

鲈鱼白细胞介素-8 cDNA序列的克隆与原核表达

陈吉刚¹, 杜海韬¹, 熊娟², 毛芝娟¹, 杨季芳¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 417100)

摘要: 采用 RT-PCR 方法扩增和克隆了鲈鱼白细胞介素-8(LjIL-8)的编码阅读框。该编码阅读框由 300 个核苷酸组成, 编码由 99 个氨基酸组成前体蛋白。LjIL-8 氨基酸序列与哺乳动物和鱼类 IL-8 类似物的氨基酸同源性分别为 23%~48% 和 25%~92%。氨基酸序列分析表明, N 端存在一长 23 个氨基酸的信号肽, 含有形成 2 个链内二硫键的 4 个半胱氨酸。分子进化分析表明, LjIL-8 与欧洲鲈鱼的亲缘关系最近。将 LjIL-8 编码序列克隆到原核表达载体 pET-28a(+), 转化 *E. coli* BL21(DE3) 后用 IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 检测结果表明, 预期分子量大小的小分子蛋白在大肠杆菌中成功表达, Western blotting 检测结果显示, 目的蛋白能与抗 6×His 单克隆抗体发生特异性反应。

关键词: 鲈鱼; 白细胞介素-8; 克隆; 原核表达

中图分类号: Q 785; Q 786; S 917 **文献标识码:** A

Cloning and prokaryotic expression of *Lateolabrax japonica* interleukin-8 cDNA

CHEN Ji-gang¹, DU Hai-tao¹, XIONG Juan², MAO Zhi-juan¹, YANG Ji-fang¹

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 417100, China)

Abstract: cDNA encoding *Lateolabrax japonica* interleukin-8 (LjIL-8) open reading frame (ORF) was cloned by RT-PCR. Sequencing results showed that the LjIL-8 ORF nucleotide sequence was 300 bp in length, encoding a prepropeptide of 99 amino acids. The deduced mature amino acid sequence of LjIL-8 was compared with those of several fish and mammalian species. The results showed that the LjIL-8 had 23%~48% and 25%~92% identities with mammalian and fish IL-8s in deduced amino acid sequence. Phylogenetic analysis showed that the LjIL-8 had close relationship with *Dicentrarchus labrax* IL-8. Recombinant expression plasmid of pET-28a(+) was constructed by inserting the LjIL-8 ORF sequence into the prokaryotic expression vector pET-28a(+). An expected protein band was observed on SDS-PAGE gel, recognized by monoclonal antibody against 6×His in Western blotting assay.

收稿日期: 2009-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(30800856); 浙江省科技厅支撑与引导项目(2008C22059); 宁波市海洋与渔业局项目(甬海办[2008]39号); 浙江万里学院人才引进启动资金(1741000171)

作者简介: 陈吉刚(1977-), 男, 博士, 副教授, 主要从事水产病害防控技术方面的研究。Tel: 0574-88222679, E-mail: genanji@

Key words *Lateolabrax japonica*; interleukin-8; cloning; prokaryotic expression

白细胞介素-8又名嗜中性粒细胞激活因子-1 (neutrophil activating factor 1, NAF-1), 是最早被发现的趋化因子^[1]。趋化因子是一类小分子量分泌型细胞因子, 通过与G蛋白偶联受体作用控制免疫细胞的传递^[2-5]。目前, 近40种趋化因子基因已被成功鉴定, 根据其分子结构中前两个半胱氨酸的排列方式将其分为CXC(α), CC(β), C(γ)和CX3(δ)4个亚族^[6]。IL-8属于CXC亚族, 体外能够趋化中性粒细胞、T淋巴细胞和嗜碱白细胞^[7]。细菌脂多糖、细胞因子和病毒等多种刺激物均可诱导巨噬细胞等多种类型的细胞产生IL-8^[8-10]。目前, 大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)^[11]、鲤(*Cyprinus carpio* L)^[12]、欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)^[13]、河鲀(*Takifugu rubripes*)^[14]、黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*)^[15]、七鳃鳗(*Lampetra fluviatilis*)^[16]、皱唇鲨(*Triakis scyllia*)^[17]、虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[18]、银鲛(*Chimaera phantasma*)^[19]和牙鲆(*Paralichthys olivaceous*)^[20]等十几种鱼类的IL-8基因序列相继被成功克隆。本实验运用RT-PCR技术克隆获得了海水养殖鲈鱼(*Lateolabrax japonica*)IL-8 cDNA序列, 并实现了IL-8的原核表达, 为进一步研究鲈鱼IL-8的生物学功能及临床应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和主要试剂

受体菌 *E. coli* Top10、表达菌 *E. coli* BL21 (DE3)、表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存; 克隆载体 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司; M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 为 TaKaRa 产品; 抗 6×His 单克隆抗体为 Invitrogen 公司产品; Trizol 试剂 购自 Gibco 公司; Lipopolysaccharides (LPS) 购自 Signa 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自晶美生物技术有限公司; AEC 显色试剂盒购自华美生物工程有限公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯。LPS 以 0.85% 生理盐水培养液配成 1 mg/mL 的溶液, 过滤除菌, -20℃ 保存备用。

1.2 RNA提取和 RT-PCR

取健康的花鲈在实验室内暂养 2 d 后, 从胸腔注射 400 μ L LPS (10 μ g/mL), 6 h 后取肾脏组织置于研钵中, 加入液氮研磨成粉末状后, 按照 Trizol 操作说明书进行总 RNA 的提取。以抽提的 RNA 为模板, 以引物 oligo(dT)₁₆ 为反转录引物, 采用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 反转录合成第一链 cDNA。根据 GenBank 中 Qiu 等注册的鲈鱼 IL-8 序列 (GenBank accession No. DQ855621), 设计 1 对 PCR 扩增用引物: 上游引物 (IL-8F) 5'-TGCAAAATTTGTAAAGGCAAAA TG-3' 和下游引物 (IL-8R) 5'-GAAACACATCGC TCCC GATCTGTTCA-3', 上下游引物跨度 300 bp, 含整个开放阅读框。以 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增, 程序为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环进行 PCR, 最后延伸 10 min, PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 鲈鱼 IL-8 cDNA 的克隆与序列分析

用 Gel DNA Midi Purification Kit 纯化回收目的 PCR 产物片段, 利用 T-A 克隆策略连接于 pMD18-T vector 载体, 连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 在含 Amp, X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上初步筛选阳性克隆。PCR 和酶切鉴定后, 选择 3 个阳性克隆进行测序。OMIGA 2.0 预测编码蛋白分子量和等电点。SignalP V1.1 用于编码蛋白的信号肽序列预测。DNASTAR 5.0 用于鲈鱼 IL-8 成熟蛋白的序列比较。MEGA 4.1 软件用于 IL-8 氨基酸序列的进化分析。参与序列比较和进化分析的 IL-8 序列均来自 GenBank。

1.4 鲈鱼 IL-8 原核表达载体的构建

根据已获得的鲈鱼 IL-8 核苷酸序列及 pET-28a(+) 多克隆位点, 设计引物 E28 (5'-CCGAATTCATGAAGAGCAGCAGAGTG-3') 和引物 P28 (5'-CACTCGAGTCAGGGTGTCTGTGGATGATGATGTCAGAATCTGCAGCACAA)。引物 E28 引入 EcoR I 酶切位点, 引物 P28 引入 Xho I 酶切位点和 6×His 纯化标签。以含 IL-8 序列的

重组 T 载体 (T-LjIL-8) 为模板, 用 E28 和 P28 引物进行 PCR 扩增。PCR 产物电泳回收纯化后, 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后, 克隆于表达载体 pET-28a(+) 载体, 转化感受态细胞 E. coli Top10 细胞, 并利用卡那霉素抗性平板初步筛选阳性克隆, 挑选阳性克隆并小量抽提质粒, 利用 PCR 和双酶切进行鉴定。

1.5 重组表达蛋白的诱导表达与鉴定

利用携带目的基因的重组质粒 pET-LjIL-8 转化表达受体菌 E. coli BL21(DE3), 挑选单个阳性克隆接种于 LB 培养基 (含 Kan 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 振荡培养过夜, 次日按 1:100 比例接种于含 10 mL 新鲜 LB 培养基 (含 Kan 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 100 mL 锥形瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 振荡培养, 当菌液 OD₆₀₀ 值达 1.0 左右时加入 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h, 同时取诱导 0 h 的菌液做对照, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 按 Zhou 等^[21] 的方法进行 SDS-PAGE 和

Western blot 分析。

2 结果与分析

2.1 鲈鱼 IL-8 cDNA 序列的测定与分析

鲈鱼肝脏中提取的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 可获得大小约为 300 bp 左右的条带, 符合预期大小 (图略)。测序结果显示, 此序列全长 300 bp (去除引物序列) (GenBank accession No. FJ518815), 为鲈鱼 IL-8 的完整阅读框 (图 1)。序列分析显示, 克隆的鲈鱼 IL-8 cDNA 序列编码 99 个氨基酸组成的前体多肽, 前体多肽序列的第 23 和 24 位氨基酸之间 (G²³-M²⁴) 存在一个潜在信号肽酶识别位点。该前体蛋白的分子量为 10.9 ku, 等电点为 8.1, 成熟蛋白的分子量则为 8.6 ku, 等电点为 7.7。鲈鱼 IL-8 成熟蛋白含有 4 个保守的半胱氨酸 (C¹² C¹⁴ C³⁸ C⁵⁵), 参与形成 2 个分子内二硫键。

```

ATGAAGAGCAGCAGAGTGATTGTACCTCTATTGTGGTGCTCTGGCTTTCTTGGCCATCACTGAAGGGATG 72
M K S S R V I V T S I V V L L A F L A I T E G M
AGTCTGAGAAGCCTTGGAGTGGAGCTGCACTGCCGCTGCATCCAGACGGAGAGCAAACCATCGGCCGCCAC 144
S L R S L G V E L H C R C I Q T E S K P I G R H
ATTGAGAAGGTGGAGCTGATTCCTGCCAACTCCCACTGCGAGGAGACTGAGATCATTGCCACTCTGAAGAAG 216
I E K V E L I P A N S H C E E T E I I A T L K K
ACAGCCAAGAAGTTTGCTGGACCCGGAGGCTCCCTGGGTGAAGAAAGTGATCAATAAGATCCTGTCCAAC 288
T G Q E V C L D P E A P W V K K V I N K I L S N
AGAACACCTGA 300
R T P
  
```

图 1 鲈鱼 IL-8 cDNA 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig 1 The nucleotide and predicted aa sequences of *Lateolabrax japonica* interleukin-8

2.2 与其它动物 IL-8 蛋白的一致性及其亲缘关系

与 GenBank 中登录的 23 种动物的 IL-8 氨基酸序列同源性分析发现, 鲈鱼 IL-8 基因推断的氨基酸与已知其他动物的同源性位于 23% ~ 48% 之间。与已获得鱼类 IL-8 的同源性位于 25% 到 92% 之间, 其中与虹鳟鱼同源性最低为 25%, 与欧洲鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*) 的同源性最高为 92%。与河鲈 (*Takifugu nubiipes*)、黑鲷 (*Spanus macrocephalus*)、大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)、比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) 的同源性也比较高, 分别达到了 85%、87%、76% 和 72%。

同七鳃鳗 (*Lampetra fluviatilis*)、斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 的同源性就比较低, 只有 41% 和 35%。

为了追踪鲈鱼 IL-8 的分子进化, 将获得的鲈鱼和 GenBank 中收录的哺乳动物、鸡和鱼类 IL-8 的成熟蛋白的氨基酸序列进行聚类分析, 用 Mega 4.1 软件构建进化树 (图 2)。从图中可以看出整个进化树分为 2 大支, 在第一大支中包括哺乳动物 IL-8 和鱼类 IL-8, 说明 IL-8 存在于物种的早期进化过程中。鲈鱼和欧洲鲈鱼位于同一大支中的邻近小支, 说明它们的亲缘关系相对于其他的动物更近一些。

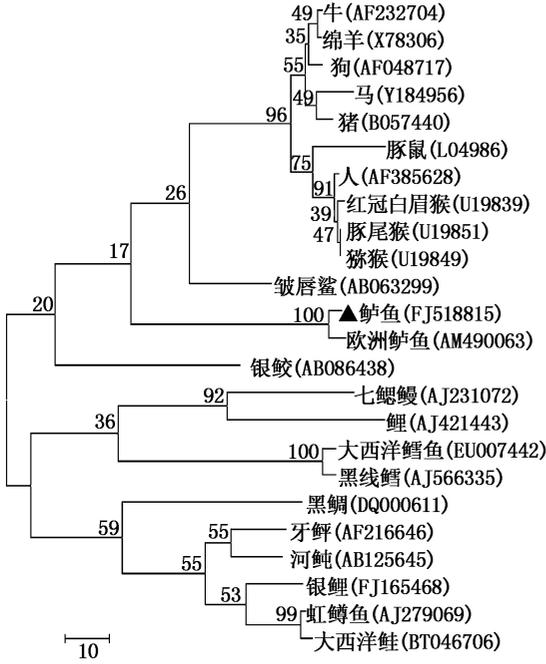


图 2 根据 IL-8 氨基酸序列构建的基因系统进化树
Fig 2 Phylogenetic relationship based on deduced amino acid sequences of several vertebrate IL-8s

2.3 鲈鱼 IL-8 在大肠杆菌中的表达及 Western blot 鉴定

重组载体 pET-LjIL-8 经 PCR 检测获得 300 bp 左右的目的片段, 经 EcoR 和 Xho I 双酶切鉴定, 得到 4 kb 和 300 bp 左右大小 2 个片段, 与预期相符 (图略), 说明目的片段基因已成功克隆入表达载体中。如图 3 所示, 重组载体 pET-LjIL-8 转化 E. coli BL21(DE3) 后, 在 IPTG 诱导下诱导表达一种小分子量的蛋白, 抗 6×His 单克隆抗体可与发生特异性反应, 初步证实 IL-8 已在大肠杆菌中获得表达。

3 讨论

本研究获得的鲈鱼 IL-8 编码阅读框含有 300 和核苷酸序列, 编码 99 个氨基酸的前体蛋白, 与人 IL-8 前体蛋白分子长度相同, 比哺乳动物 IL-8 (101 个氨基酸) 和鸡 IL-8 类似物-EMF-1 (103 个氨基酸) 和 K60 前体蛋白 (104 个氨基酸) 短。鲈鱼 IL-8 序列具有 CXC 趋化因子的特征: 一是存在与三维结构形成和生物学活性发挥密切相关, 在所有的趋化因子中均高度保守的 4 个半胱氨酸残基, 且前两个半胱氨酸残基被另一个氨基酸残基所分隔 (Arg³⁵), 产生一个典型

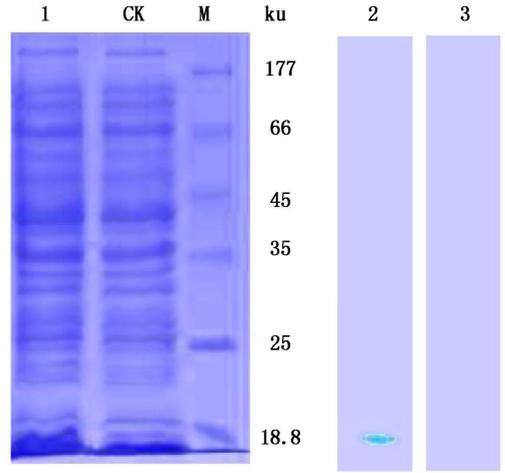


图 3 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定鲈鱼 IL-8 在 pET28a (+) 表达系统中的表达
Fig 3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of LjIL-8 expressed in pET28a (+) system
1. 诱导 4 h 后的重组菌; CK: 诱导 0 h 后的重组菌; M: 蛋白 Marker 2. 重组表达蛋白被抗 6×His 单抗识别; 3. 阴性对照菌体蛋白不被抗 6×His 单抗识别。

的 CXC 基序; 二是 23 个氨基酸组成的信号肽序列富含疏水性氨基酸, 符合分泌型蛋白的特征^[8]。由于本实验克隆的鲈鱼 IL-8 序列较短, 因此对于 IL-8 的所具备的趋化因子家族的第三个特征, 即 3' 端非编码区 (3' UTR) 是否富含 “AU” 序列 (如 “ATTTA”) 无法进行确认。目前研究已经证实, 哺乳动物和禽类 IL-8 分子中均含有 “ELR” 基序 (位于 “CXC” 基序上游, 紧邻 “CXC” 基序), 而鲈鱼 IL-8 相应位置为 “ELH”, 基序中一个氨基酸的改变是否会导致 IL-8 生物学活性的改变 (如中性粒细胞趋化活性) 需要证实。序列比较表明, 鲈鱼 IL-8 与趋化因子家族中的 IL-8 分子的同源性最高。与其他鱼类趋化因子比较结果表明, 鲈鱼 IL-8 分子与欧洲鲈鱼 IL-8 具有很高的同源性, 说明两者可能是同一类分子。鲈鱼 IL-8 分子与斑马鱼 SCYBA (哺乳动物 CXCL14 同源物, 属于趋化因子 CXC 家族) 的同源性很低, 这似乎表明在某些鱼类中可能存在两种不同的 CXC 趋化因子。

尽管 IL-8 体内外功能显著, 应用前景广阔, 但天然 IL-8 产量很低, 无法从动物体内大量提取; 而化学合成肽价格昂贵。因此, 利用基因工程技术生产 IL-8 就成为必然选择。近年来, 基因工程重组表达鱼类 IL-8 的方法有了一些尝试^[22], 但是目前看来, 要高水平地表达 IL-8 还有很大的难度。目前, 原核表达系统表达目的基

因的研究多采用融合蛋白的形式进行的,然而目的蛋白携带了大分子量的外源基因,影响了目的蛋白的生物学活性,必须切除外源基因,才能恢复蛋白的生物学功能。本研究选择 pET-28a (+)表达载体进行表达,并在设计引物时分别添加 EcoR I和 Xho I酶切位点,不带有载体上大的标签序列(上游 His标签、凝血酶蛋白和 T7 标签),只在蛋白 C端添加 $6 \times \text{His}$ 标签,不但降低大的外源蛋白序列对目的蛋白的影响,同时为利用亲和层析技术纯化目的蛋白奠定了基础。

参考文献:

- [1] Secombes C J, Wang T, Hong S, et al. Cytokines and innate immunity of fish[J]. *Dev Comp Immunol* 2001, 25(8-9): 713-723.
- [2] Walz A, Peveri P, Aschauer H, et al. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149(2): 755-761.
- [3] Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84(24): 9233-9237.
- [4] Van D J, Van B J, Opendakker G, et al. A novel NH₂-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive and granulocytosis-promoting activity[J]. *J Exp Med* 1988, 167(4): 1364-1376.
- [5] Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, et al. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity[J]. *J Immunol* 1987, 139(10): 3474-3483.
- [6] Murphy P M, Baggiolini M, Charo I F, et al. International union of pharmacology XXII. Nomenclature for chemokine receptors[J]. *Pharmacol Rev* 2000, 52(1): 145-176.
- [7] Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions[J]. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998, 9(1): 9-23.
- [8] Lang K J, Zou J J, Wang T, et al. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Dev Comp Immunol* 2002, 26(5): 433-444.
- [9] Hébert C A, Vitangcol R V, Baker J B. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding[J]. *J Biol Chem* 1991, 266(28): 18989-18994.
- [10] Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, et al. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities[J]. *J Biol Chem* 1991, 266(34): 23128-23134.
- [11] Seppola M, Larsen A N, Steiro K, et al. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Mol Immunol* 2008, 45(4): 887-897.
- [12] Huisin M O, Stolte E, Flik G, et al. CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Dev Comp Immunol* 2003, 27(10): 875-888.
- [13] Sepulcre M P, Sarropoulou E, Kotoulas G, et al. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases[J]. *Mol Immunol* 2007, 44(15): 3751-3757.
- [14] Saha N R, Bei J X, Suetake H, et al. Description of a fish CXC chemokine and two CXC receptor genes and characterization of the effects of different stimulators on their expression[J]. *Fish Shellfish Immunol* 2007, 23(6): 1324-1332.
- [15] Corripio M iyar Y, Bird S, Tsanopoulos K, et al. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8 in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. *Mol Immunol* 2007, 44(6): 1361-1373.
- [16] Najakshin A M, Mechetina L V, Alabyev B Y, et al. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines[J]. *Eur J Immunol* 1999, 29(2): 375-382.
- [17] Inoue Y, Hanta C, Usui K, et al. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA[J]. *Fish Shellfish Immunol* 2003, 14(3): 275-281.
- [18] Fujiki K, Gauley J, Bols N C, et al. Genomic cloning of novel isotypes of the rainbow trout interleukin-8[J]. *Immunogenetics* 2003, 55(2): 126-131.
- [19] Inoue Y, Endo M, Hanta C, et al. Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA[J]. *Fish Shellfish Immunol* 2003, 15(3): 269-274.
- [20] Lee E Y, Park H H, Kim Y T, et al. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Gene* 2001, 274(1-2): 237-243.
- [21] Zhou J Y, Chen J G, Wang J Y, et al. cDNA cloning and functional analysis of goose interleukin-2[J]. *Cytokine* 2005, 30(6): 328-338.
- [22] Chen L, He C, Baoprasertkul P, et al. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Dev Comp Immunol* 2005, 29(2): 135-142.