

* 研究简讯 *

鳊 IL-1 β 基因的克隆及原核表达 *王改玲¹ 孙宝剑² 王高学¹ 聂品^{2**}

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

摘要 用 RACE PCR 获得了鳊白介素-1 β (IL-1 β)的全长 cDNA。鳊 IL-1 β 的 cDNA 全长为 1298 nt (核苷酸), 其 5' 非编码区包含 UTR 93 nt; 3' 非编码区包含 452 nt; 其开放阅读框内包含 753 nt, 翻译成 251 个氨基酸。将鳊 IL-1 β 克隆到原核表达载体 pET-32a 上, 在大肠杆菌 Rosetta-gami(DE3)内以包涵体形式得以高效表达。

关键词 鳊 白介素-1 β 基因克隆 原核表达

白介素-1 β (IL-1 β)是一个具有广泛生物学活性的细胞因子, 它可促进胸腺细胞、T 细胞、B 细胞的活化、增殖和分化; 促进免疫球蛋白的合成和分泌; 并且刺激骨髓干细胞的增殖; 在炎症反应中刺激单核细胞和巨噬细胞分泌促炎介质^[1]。由于 IL-1 β 在免疫应答和炎症反应中发挥着重要的功能, 已经有多种哺乳动物(如绵羊、马、猪、奶牛)的重组 IL-1 β 被用作疫苗的免疫佐剂^[2]。目前, 在多种鱼类中发现了 IL-1 β 分子, 但只有少数研究对体外表达的 IL-1 β 的生物学活性进行了鉴定^[3-5]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国一种重要的淡水养殖对象, 但是各种疾病的发生严重影响其产量^[6, 7]。免疫防治是控制疾病发生的重要途径。目前对鳊免疫学研究已经在免疫球蛋白和一些非特异性免疫因子方面展开^[8-10]。本研究对鳊 IL-1 β 的全长 cDNA 进行了克隆和序列分析, 并在大肠杆菌

(*E. coli*)中进行了高效表达, 为鉴定其生物学活性和免疫佐剂的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 SMART RACE PCR 扩增鳊 IL-1 β cDNA 全长

鳊 IL-1 β cDNA 片段由抑制性差减杂交的方法获得, 使用构建的 SMART cDNA 文库扩增 cDNA 全长^[10]。参考 SMART RACE PCR Kit (Clontech)操作手册扩增 IL-1 β cDNA 的 5' 和 3' 末端。PCR 所用的引物见表 1。在 25 μ L 反应体系中, 取 1.0 μ L cDNA 用作模板。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 66 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 20 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物纯化后与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 检测阳性克隆后测序。

2004-11-08 收稿, 2005-02-01 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30130150, 30025035)

** 通讯作者, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

表1 鳊 IL-1 β cDNA 全长扩增所用的引物

引物名称	引物序列	作用
MIRF1F1	GTGGCTGGAGCAGATGATCGAGTCA	扩增 3' 末端第一轮
MIRF1F2	GAGTCAAACCTCCATTTCCGGGTCTG	扩增 3' 末端第二轮
MIRF1R1	GAACATCGTCTTATCCTTGTCACC	扩增 5' 末端第一轮
MIRF1R2	CAAGTCAGACCCGAAATGGAGTTTGA	扩增 5' 末端第二轮
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	扩增 5' 和 3' 末端的通用引物

1.2 序列分析

用 ABI PRISM 377 自动测序仪进行测序, 测序结果通过 BLASTX 在 GenBank 数据库中进行相似性检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); 氨基酸序列的多重对准采用 CLUSTAL W1.8 程序完成。

1.3 重组鳊 IL-1 β 原核表达载体的构建

用引物 P1 和 P2 扩增已获得的 IL-1 β cDNA 序列上的开放阅读框。IL-1 β 基因的上游引物序列 P1 为 GGA GGT ACC AAG ATG GAA TCC GAG ATG, 下游引物序列 P2 为 GGA AAG CTT TTA GGA TGC CCT TGG CAG G, 分别含有 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点(用下划线表示)以及起始密码子和终止密码子(用黑体表示)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 *Kpn* I 和 *Hind* III 分别双酶切扩增的 IL-1 β 和 pET-32a 表达载体, 连接后转化大肠杆菌 DH5 α 。PCR 鉴定阳性菌落后测序。

1.4 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

将重组质粒 pET-32a-IL-1 β 转化到 Rosetta-gami(DE3)感受态细胞内, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h。PCR 鉴定阳性菌落, 将阳性的菌液重新接种于含氨苄青霉素 (ampicillin) 100 μ g/mL、卡那霉素 (kanamycin) 15 μ g/mL、四环素 (tetracycline) 12.5 μ g/mL、氯霉素 (chloramphenicol) 34 μ g/mL 的 LB 培养液(以含空载体的细胞设立空白对照), 在 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min 条件下培养 4 h 至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.7 时, 取出 1 mL 作为阴性对照。诱导组加异丙基硫代 β -半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L, 然后继续以相同培养条件培养, 分别在培养 3, 6, 9 h 后吸取诱导组菌液各 1 mL 测定 OD₆₀₀ 值。收集的菌液经离心后进行

超声破碎, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 对表达产物进行分析。

1.5 兔多克隆抗体的制备

表达的 IL-1 β 蛋白切胶回收后, 电洗脱并浓缩蛋白, 按 800 μ g/mL 浓度溶解于 0.7% 的生理盐水中, 并按以下免疫程序来免疫家兔。600 μ L 蛋白溶液(约 500 μ g)与等量弗氏完全佐剂混匀, 多点注射兔腭淋巴结和脚掌。2 周后用 300 μ L 蛋白溶液加等量弗氏非完全佐剂混匀, 背部皮下、脚掌多点注射。4 周后, 用 150 μ L 蛋白溶液加等量弗氏非完全佐剂再免疫一次。在第三次免疫 2 周后, 分离抗血清。

1.6 免疫印迹

将诱导前后的含空载体和 IL-1 β 的表达菌总蛋白电泳后, 用 Mini Protein II Cell (Bio-Rad 公司) 转移至硝酸纤维素膜上, 分别用制备的兔抗鳊 IL-1 β 抗体和鼠抗 6 组氨酸的单抗与之反应, 二抗分别为碱性磷酸酶耦联的山羊抗兔或抗鼠 IgG 血清。各步骤之间用含 0.05% Tween 的 PBS 清洗膜 3 次, 每次 5 min, 最后用 NBT/BCIP 显色。

2 结果

鳊 IL-1 β 的 cDNA 全长为 1298 nt (图 1), 其 5' 非编码区包含 UTR 93 nt; 3' 非编码区包含 452 nt; 其开放阅读框内包含 753 nt, 翻译成 251 个氨基酸。在 3' UTR 发现 6 个 mRNA 不稳定信号 ATTTA 和 1 个 mRNA 的加尾信号 (AATAAA)。鳊 IL-1 β 与其他鱼类的 IL-1 β 序列氨基酸相似性分别为: 舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 72%, 真鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 69%, 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 68%, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 67%, 真鲷 (*Pagrosomus major*) 67%, 金头鲷 (*Sparus aurata*) 65%, 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 55%, 虹鳟

(*Oncorhynchus mykiss*) IL-1 β 55%, 虹鱒 IL-1 β 1 β 2-1 31%, 斑马鱼(*Danio rerio*) 31% (图 2).
53%, 鲤(*Cyprinus carpio*) IL-1 β 34%, 鲤 IL-

```

TCTATTTAAGGGAAATAAATAAATGTGTTGTGATTGAGTACATTGGAAATCGCTTTCTA    60
TCTTCCTGCAGATCTTTCTTAATTCAGAAAAAGATGGAATCCGAGATGAAATGCAACATG    120
                                     M E S E M K C N M          9
AGCGAGATGTGGAGCCTCAAGATGCCCAAGGGACTGGACTTGGAGATTACACATCACCCA    180
S E M W S L K M P K G L D L E I T H H P          29
CTGACAATGAGGAGTGTGGTCAACCTCGTCATCGCCATGGAGAGGTTGAAGGGCAGCGGG    240
L T M R S V V N L V I A M E R L K G S G          49
TCAGTGGGAGCACCAAGTGCACAGATGAAAACCTGCTCAACTTCATGATGGAGAGCATA    300
S V R S T K C T D E N L L N F M M E S I          69
GTGGAAGAGCAAACCTGTGTTTGAGCGCGGTTTCAGCTCCACCGCTTCAGTTCAGGAGGACG    360
V E E Q T V F E R G S A P P L Q F R R T          89
GATGAGTACCAGTGCAGTGTGACTGACAGCAAGAAGAGGAGCTTAGTTCTGGTCCAAAAC    420
D E Y Q C S V T D S K K R S L V L V Q N          109
AGCATGGAGCTCCACGCAATGATGCTGCAGGGAGGCGCTGAAAACCTCAAAGTTTACCTG    480
S M E L H A M M L Q G G A E N S K V Y L          129
AACATGTCGACCTACATCCATCCTGCACCCAGCGCTGAGGCCAGAACTGTGGCTCTGGGC    540
N M S T Y I H P A P S A E A R T V A L G          149
ATCAGGGGCACAAATCTCTACCTGTCTTGCCACAAGGATGGTCCCGAAGCAACCTTGCAT    600
I R G T N L Y L S C H K D G P E A T L H          169
CTGGAGGCCGTGGAGGACAAAAACAGTCTGTTGAGTATCCGCTCGGACAGCGACATGGTG    660
L E A V E D K N S L L S I R S D S D M V          189
CGATTTCTCTTCTACAAACAGGACACCGGGGTGAACATCAGCACCCCTCGTGTCTGTGCGC    720
R F L F Y K Q D T G V N I S T L V S V A          209
TTCCGTGACTGGTACATAAGCACAGCAGTCGATAACAACAAGCCGGTGGAAATGTGCCTG    780
F R D W Y I S T A V D N N K P V E M C L          229
GAGACCGCCAACGCCACCGAACCTTCAACATCCAGCATCAGAGTTCAAACCTGCCAAGG    840
E T A Q R H R T F N I Q H Q S S N L P R          249
GCATCCATAAGTGAATGTGGATCTGCATCTGGGGGAGTTTGACCCACTTACGATGAAAT    900
A S Stop                                         251
TTTGCTATTGAACAGAACGTAAAATATACTTCACTTCACTTCACTATTTTGGATTCAAATAATCA    960
GCAAAAAATACTTTTTTTTAAAGTACTATCACTGTCTGCTAGAAGGACTTCTGCAAGTT    1020
TTTTCAGAGTGCTATTTACTGTATGTACCAAGTACAGAAAGTGAATACTTAGTGTATT    1080
GACATAATCAATTTTACCACAAGGTGGCATTATTGTGCTGTCTGGTGAGTATCCTATGT    1140
ATTTATTATGCTGTATGACATGACNCNCTGTTAATGCTTTTATCTATTAATTTATTTATC    1200
TATTTATACCCATTTTAAACGTATATATTTATTTGGAAATTTGCTTACTAACAATTTATTTA    1260
AATGATGTGCTGTGGATTTTTAATAAAGCCTTATAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA    1298
    
```

图 1 鲑白介素-1 β 的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列
(GenBank 登录号: AY647430)

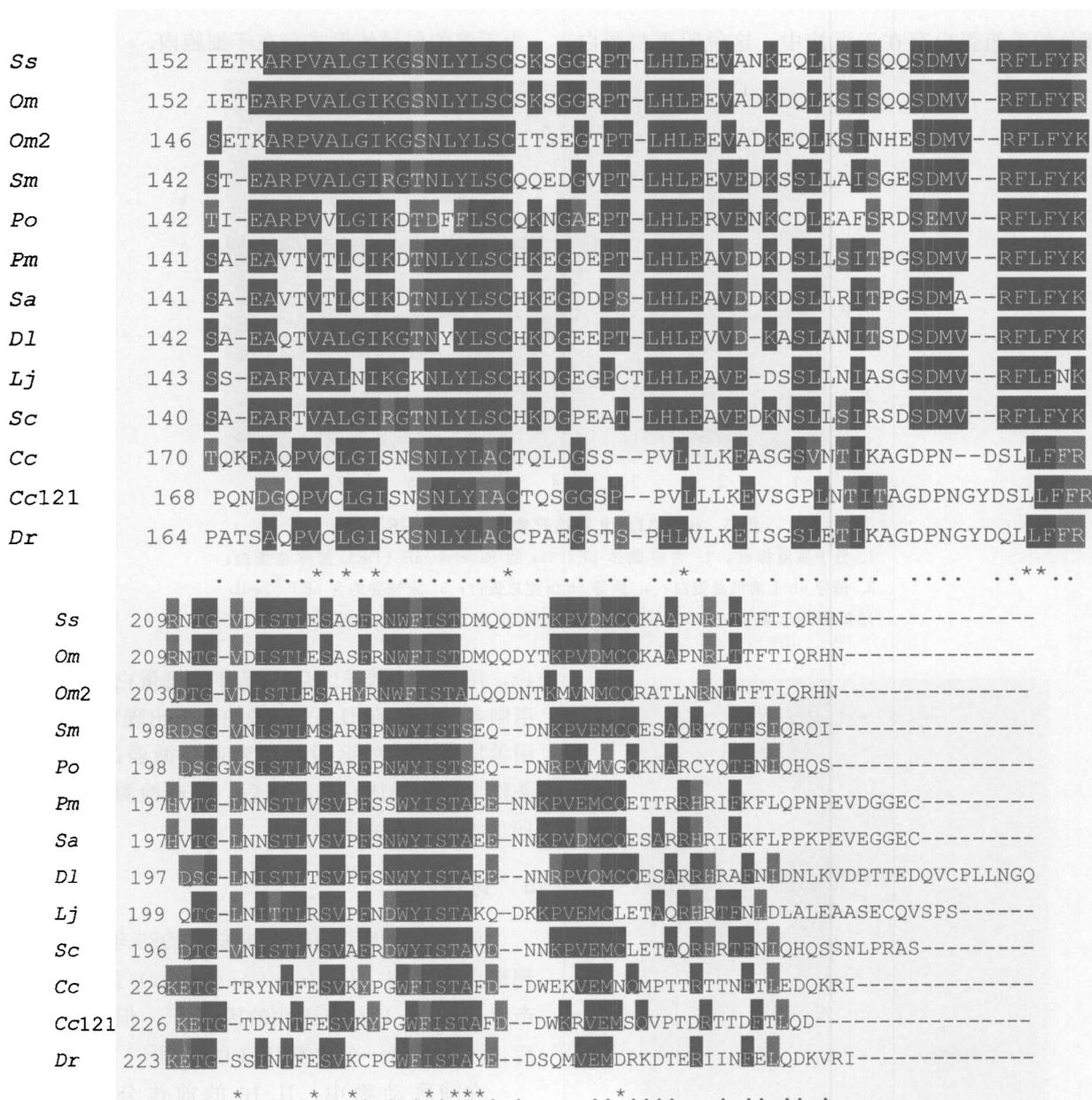


图 2 鲷白介素-1 β 与其他鱼中白介素-1 β 的氨基酸序列比较

ClustalW 进行序列比较时相同氨基酸用(*)表示,相似性的氨基酸用(.)表示.用于比较的白介素-1 β 序列号分别为:鲷(*Sc*) AY647430;舌齿鲈(*Dl*) CAC41006;真鲈(*Lj*) AAQ89601;真鲷(*Pm*) AAP33156;金头鲷(*Sa*) CAD11603;大菱鲆(*Sm*) CAC33867;牙鲆(*Po*) BAB86882;虹鳟(*Om*) IL-1 β CAA06157;虹鳟 IL-1 β 2 CAB53541;大西洋鲑(*Ss*) AAT36642;鲤(*Cc*) IL-1 β BAA24538;鲤 IL-1 β 2-1 CAC19887;斑马鱼(*Dr*) NP-9980099

将基因重组质粒 pET-32a-IL-1 β 转化于 Rosetta-gami(DE3)感受态细胞内.经 IPTG 诱导后,含 pET-32a-IL-1 β 的大肠杆菌在大约 45 ku 处出现一条明显的蛋白特征带,这与理论估计的分子质量 44.2 ku 相符(图 3).经 IPTG 诱导的相应空载

体克隆总蛋白、未诱导的重组表达克隆总蛋白分别作为空白对照和阴性对照.阴性对照中重组蛋白仅有微弱表达;而诱导后,重组蛋白大量表达,并且表达量在诱导后 3—9 h 内逐渐上升.细菌经超声波破碎后,在上清中可以看出少量重组蛋白的存在,

大部分的重组蛋白存在于沉淀中,这说明重组蛋白 为不溶的包涵体形式存在于细胞内.

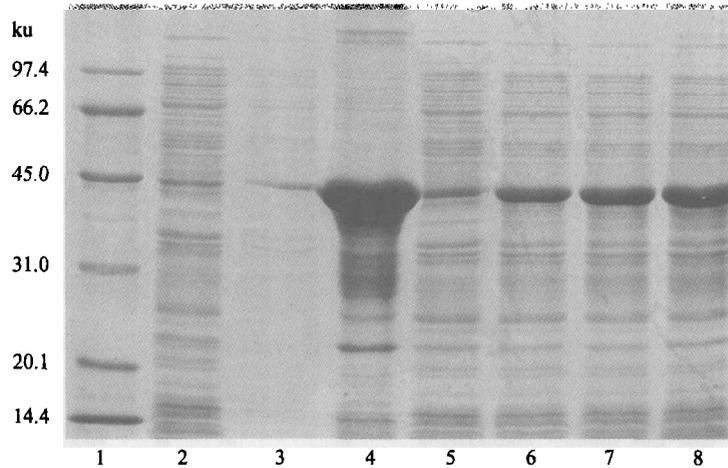


图3 pET-32a-1 β 表达产物的SDS-PAGE分析

1. 分子质量标准; 2. 含空载体 pET-32a 的 Rosetta-gami(DE3) 菌体总蛋白;
3. 诱导 6h 上清液总蛋白; 4. 诱导 6h 沉淀总蛋白; 5. 未诱导的含 pET-32a-IL-1 β 的菌体总蛋白; 6—8 分别为诱导 3, 6 和 9h 含 pET-32a-IL-1 β 的菌体总蛋白

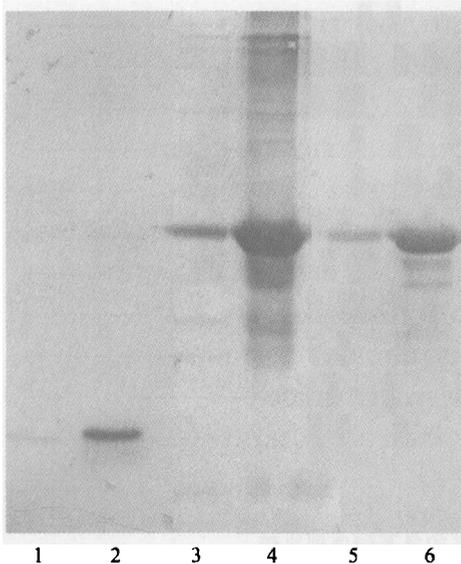


图4 pET-32a-IL-1 β 表达产物的免疫印迹

1. 用抗 6 组氨酸单抗检测诱导之前的空白对照总蛋白; 2. 用抗 6 组氨酸单抗检测诱导 6h 的空白对照总蛋白; 3. 用兔抗鳊重组 IL-1 β 多抗检测诱导之前的重组菌; 4. 用兔抗鳊重组 IL-1 β 多抗检测诱导 6h 的重组菌; 5. 用抗 6 组氨酸单抗检测诱导之前的重组菌; 6. 用抗 6 组氨酸单抗检测诱导 6h 的重组菌

在用 IPTG 诱导之前, 无论是用制备的兔抗鳊重组 IL-1 β 多克隆抗体还是用抗 6 组氨酸的单抗进行检测, 都能够检测到一条清晰的重组 IL-1 β 条带(图

4), 用 IPTG 诱导之后, 随着重组蛋白的大量表达, 用制备的多抗在 IL-1 β 条带的下方出现模糊的带, 而用单抗在相应的区段检测到两条微弱的带. 在同样条件下, 空载体在诱导前后, 没有检测到与重组 IL-1 β 大小相应的条带.

3 讨论

鱼类细胞因子的研究起步于 1985 年, Clem 检测到斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的单核细胞能产生具有 IL-1 生物活性的因子^[11]. 但是直到 10 年后, 才获得第一个鱼类 IL-1 的基因^[3].

在哺乳动物中, IL-1 β 的前体分子的质量为 31 ku, 被 ICE(IL-1 converting enzyme)切割为 17 ku 的成熟蛋白后, 才具有广泛生物学活性^[1]. 鳊 IL-1 β 同其他鱼的 IL-1 β 一样, 缺乏 ICE 的酶切位点^[3, 12]. 目前在鱼类中发现酶切后的 IL-1 β 缺少经典的信号肽.

目前在虹鳟和鲤中发现了两个 IL-1 β . 虹鳟的 IL-1 β 2 的 mRNA 在第三个外显子编码区域缺少了 9 nt, 在第四个外显子由于选择性拼接造成 IL-1 β 2 又缺少了 9 nt. 鲤 IL-1 β 2 与鲤 IL-1 β 氨基酸序列仅有 74% 的相似性; 并且鲤 IL-1 β 2 在基因组中存在多个拷贝, 鲤 IL-1 β 2 之间相似性为 95%—99%^[3, 13]. 其

他鱼 IL-1 β 基因是否存在多基因现象目前没有报道, 鳊 IL-1 β 是否存在两个以上的基因尚待进一步证实.

pET 表达系统是近年来广泛使用的原核表达系统, 其 T7 启动子可以高效地表达外源蛋白, 所表达外源蛋白量一般占总蛋白的 25% 以上, 甚至可达到细菌总蛋白量的 50%. 在本实验中, 重组蛋白在诱导后大量地表达, 并且多数以不溶的包涵体形式存在于细胞内, 可以方便地被纯化出来.

从 pET-32a-IL-1 β 表达产物的 SDS-PAGE 分析来看, 含空载体的空白对照在约 45 ku 处也出现一条较弱的带, 但是在免疫印迹中, 没有出现该条带, 这条带应该是大肠杆菌的一种组成性表达蛋白.

在诱导之前, 无论用单抗或多抗来检测, 均能够检测到清晰的一条带, 而在诱导之后的 IL-1 β 条带的下方发现微弱的杂带. 由于抗 6 组氨酸的单抗具有很高的特异性, 是不与缺少表达质粒的大肠杆菌的蛋白进行反应; 这说明杂带是表达的 IL-1 β 的降解产物. IL-1 β 的降解可能是由于表达蛋白在菌体内的大量积累, 促进菌体产生蛋白酶来降解这种对细菌本身无益的蛋白.

虽然在哺乳动物中, 只有切割后的成熟蛋白才具有广泛生物学活性, 但是在鱼类中存在着特殊的现象, 目前有实验证明, 将鲤的 IL-1 β 前体分子 C 末端的 162 个氨基酸构成的多肽与病原菌抗原一起免疫鱼, 鱼体能够产生更高的特异性抗体^[14]; 由虹鳟 IL-1 β 衍生出来的两个小肽(10—12 个氨基酸构成)具有诱导白细胞迁移的功能^[5]. 重组的鳊 IL-1 β 是否具有生物学功能尚待于进一步的实验证明.

参 考 文 献

- 1 Dinarello C A. The biology of Interleukin-1. *Chem Immunol*, 1992, 51: 1
- 2 Elhay M, Barcham G J, Cameron A, et al. Recombinant interleukin-1 β as an adjuvant for multivalent bacterial vaccines. In: *Cytokines in Veterinary medicine*. Wallingford: CAB International,

- 1997, 139
- 3 Zou J, Cunningham C, Secombes C J. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 β gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *Eur J Biochem*, 1999, 259: 901
- 4 Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin 1beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site. *Cytokine*, 1999, 11: 552
- 5 Peddie S, Zou J, Cunningham C, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β and derived peptides induce migration of head kidney leucocytes *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2001, 11: 697
- 6 He J G, Zeng K, Weng S F, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). *Aquaculture*, 2002, 204: 11
- 7 Nie P. Co-occurrence and microhabitat of *Ancyrocephalus murgurdae* (Monogenea) and *Henneguya weishanensis* (Myxosporea) on the gills of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi*. *Folia Parasitol*, 1996, 43: 272
- 8 Zhang Y A, Nie P, Wang Y P, et al. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2003, 14: 477
- 9 Zhang Y A, Nie P, Luo H Y, et al. Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 95: 81
- 10 Sun B J, Nie P. Molecular cloning of the viperin gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 101: 161
- 11 Clem L W, Sizemore R C, Ellsaesser C F, et al. Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev Com Immunol*, 1985, 9: 803
- 12 Hong S, Zou J, Collet B, et al. Analysis and characterisation of IL-1 processing in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunol*, 2004, 16: 453
- 13 Engelsma M Y, Stet R J, Saeij J P, et al. Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1beta genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cytokine*, 2003, 22: 21
- 14 Yin Z, Kwang J. Carp interleukin-1 beta in the role of an immunoadjuvant. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10: 375