

## 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$* 基因 cDNA 克隆及表达分析

杨莹莹<sup>1</sup>, 张其中<sup>1,2\*</sup>, 李春涛<sup>1</sup>, 陈霞<sup>1</sup>, 朱成科<sup>1</sup>, 李超<sup>1</sup>

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室,  
三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715;  
2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:** 白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 作为炎症反应的关键介导体, 通过开启基因的表达来调控免疫反应。为了丰富鱼类该基因的研究, 实验采用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术, 首次从鲇形目鱼类大鳍鱠中获得 *IL-1 $\beta$*  基因 cDNA 的全序列。大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因 cDNA 全长 1 194 bp, 包括 3' 非编码区 (UTR) 为 224 bp, 5' UTR 为 82 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 888 bp, 编码 296 个氨基酸。预测的蛋白质分子量为 33.843 43 ku, 等电点为 5.00。与斑点叉尾鲴等其他 8 种脊椎动物进行同源性分析发现, 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  氨基酸序列与斑点叉尾鲴相似性最高, 为 79.0%, 与原鸡的相似性最低, 为 22.0%。进化树分析表明, 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  与斑点叉尾鲴聚为一支。半定量 PCR 显示, 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因在肌肉、脑、脾脏、头肾、体肾、胃、皮肤、肝脏及肠等组织中都有不同程度的表达; 经嗜水气单胞菌刺激后大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因在头肾和脾脏的转录表达显示, 1 d 后该基因在头肾与脾脏中的表达量都达到最大, 15 d 后恢复到刺激前的水平。研究显示, 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  在抵御病原感染过程中发挥重要作用。

**关键词:** 大鳍鱠; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 基因; 克隆; 组织分布

**中图分类号:** S 917; Q 786

**文献标志码:** A

白细胞介素 1 (interleukin 1, IL-1) 是一类促炎反应的前期细胞因子。IL-1 $\beta$  作为 IL-1 家族的重要成员之一, 多种细胞均能生成 IL-1 $\beta$ , 如单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、小胶质细胞、成纤维细胞以及朗氏细胞等<sup>[1]</sup>。IL-1 $\beta$  具有诱发炎症、调节代谢、造血和促使组织应答感染的作用<sup>[2-3]</sup>。在细菌、有丝分裂原、细胞因子和微生物产物等多种刺激物的作用下会引起 *IL-1 $\beta$*  基因大量表达<sup>[4]</sup>。随着对 *IL-1 $\beta$*  功能的深入研究, *IL-1 $\beta$*  已经开始作为药物用于临床治疗各种疾病<sup>[2]</sup>。

IL-1 $\beta$  是在研究人类和老鼠的免疫系统时被发现的<sup>[5]</sup>, 自从 Zou 等<sup>[6]</sup> 在研究虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 时发现鱼类同样也具有 *IL-1 $\beta$*  基因后, 该基因在鱼类中的研究开始受到重视。近几年来, 多种鱼类的 *IL-1 $\beta$*  基因已相继得

到克隆和分析, 其中包括鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[7-8]</sup>、黄鳍鲷 (*Acanthopagrus latus*)<sup>[9]</sup>、欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[10]</sup>、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)<sup>[11]</sup>、虹鳟<sup>[12-14]</sup>、金头鲷 (*Sparus auratus*)<sup>[15]</sup>、军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)<sup>[16]</sup> 等。这些基因的成功克隆及表达调控研究, 极大地促进了鱼类分子免疫学的发展。

大鳍鱠 (*Mystus macropterus* Bleeker, 异域名 *Hemibagrus macropterus*) 属于鲇形目 (Siluriformes), 鲿科 (Bagridae), 在我国嘉陵江中下游水域有广泛的分布和一定的养殖规模。大鳍鱠肉味鲜美, 无肌间刺, 有重要的食用价值。本研究克隆了大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因 cDNA 全长, 应用半定量 PCR 技术分析了该基因在不同组织中的表达, 以及注射嗜水气单胞菌后 *IL-1 $\beta$*  基因在头肾和脾脏的表达变化规律, 旨在探索

收稿日期: 2011-09-21 修回日期: 2011-12-02

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2011AA10A216); 重庆市科技攻关计划项目 (CSTC. 1010AC1116); 三峡库区生态环境教育部重点实验室基金资助项目

通讯作者: 张其中, E-mail: zhangqzdr@126.com

鱼类的免疫预防机制,为鱼类的疾病防治寻找新途径,并为水产业的健康养殖与可持续发展提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用鱼(体质量约为 80 g)均购自重庆市北碚,水族养殖箱中暂养 7 d。感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室制备并低温保存。嗜水气单胞菌由本实验室提供,培养和浓度的测定依据文献[17]的方法。

选 3 尾健康的大鳍鲮,腹腔注射  $1 \times 10^5$  CFU/mL 嗜水气单胞菌 0.2 mL,1 d 后取头肾并用液氮冻存,用于 cDNA 基因克隆;另选 3 尾健康的大鳍鲮,分别取肌肉、脑、脾脏、头肾、体肾、胃、皮肤、肝脏及肠,液氮冻存,用于组织分布实验;另选 20 尾健康的大鳍鲮,腹腔注射 0.2 mL  $1 \times 10^5$  CFU/mL 嗜水气单胞菌。分别在刺激后第 4 小时、第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 15 天时取大鳍鲮头肾和脾脏,液氮冻存,用于研究 *IL-1 $\beta$*  基因在这两种组织中的转录表达变化规律。

### 1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

按 Trizol(Invitrogen)说明书提取总 RNA,电泳检测完整性,紫外分光光度计检测其浓度和纯度,保证其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.8 ~ 2.0。以总 RNA(约 2  $\mu$ g)为模板,按照逆转录 M-MLV(promega)说明书合成 cDNA 第一链。

### 1.3 中间片段的获得

摘录 GenBank 中鱼类 *IL-1 $\beta$*  核苷酸序列:斑点叉尾鲮(*Ictalurus punctatus*) (NM 001200219.1)、鲤(AJ401030.1)、斑马鱼(*Danio rerio*) (AM941627.1)、金鲫(*Carassius auratus*) (AJ249137.1)、鲑(*Salmo salar*) (NM001123582.1)、斜带石斑鱼(EF582837.1)进行多序列比对分析,根据保守区域的核苷酸序列设计兼并引物(表 1)。以上述合成的第一链 cDNA 作为模板,用兼并引物进行 PCR 扩增。循环参数为 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,57  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 20 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min,12  $^{\circ}$ C 保存。所扩增的 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶分析,纯化目的产物,连接于 pMD19-T 载体中,挑取阳性菌斑,用 M13 通用引物进行双向测序,送华大基因公司测序。

### 1.4 5'端和 3'端片段的获得

根据已得到 cDNA 片段序列设计特异性引物 F1、F2、R1(表 1)。在第一链 cDNA 5'和 3'分别加 SMART IV Oligonucleotide 接头和 CDS III 接头作为模板,利用末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends,RACE)对目的基因的 5'和 3'末端进行 PCR 扩增。在 3'RACE 中,F1、F2 分别与接头引物 CD III 进行半巢式(semi-nested)PCR 扩增,循环参数均为 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,65  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 55 s;28 个循环。在 5'RACE 中,利用巢式 PCR 方法首先用引物 ILR 和接头引物 UPM 进行第 1 轮 PCR 扩增,反应条件与 3'RACE 相同;再利用 R1 和接头引物 NUP 进行第 2 轮 PCR 扩增,反应条件:94  $^{\circ}$ C 30 s;68  $^{\circ}$ C 30 s;72  $^{\circ}$ C 55 s;35 个循环。3'和 5'RACE 的 PCR 产物分别进行 1.5% 琼脂糖凝胶分析,纯化目的产物,连接于载体 pMD19-T 中,挑选阳性菌斑,用 M13 通用引物进行双向测序,送华大基因公司测序。

### 1.5 全长 cDNA 的获得与序列分析

根据已获得的 cDNA 片段,在 5'和 3'非编码区(UTR)分别设计 UTR-F 和 UTR-R 引物,以第一链 cDNA 为模板,扩增出全长 cDNA。运用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对全长 cDNA 的核苷酸与氨基酸序列进行同源性分析。运用 ORFfinder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对基因的编码区进行预测。SignalP3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽。ProtParam(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)对所推测的蛋白质进行生物化学特性分析(分子量、等电点、家族签名序列)。采用 ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)程序进行多序列比对。

### 1.6 半定量 RT-PCR 分析

用半定量 RT-PCR 方法比较大鳍鲮 *IL-1 $\beta$*  基因( $n=3$ )的组织分布及经过嗜水气单胞菌刺激后头肾和脾脏中该基因的表达变化情况,以 18S rRNA 作为外参照。第一链 cDNA 为模板,*IL-1 $\beta$*  基因及 18S rRNA 特异性引物分别为 DQHF 与 DQHR,18S-F 与 18S-R(表 1),循环参数:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,61  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s;30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。所有反应均重复

3 次。取 5  $\mu$ L PCR 产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果以 *IL-1 $\beta$*  与 18S rRNA 的 RT-PCR 产物亮度之比(%)表示。

采用 Quantity one 软件对琼脂糖凝胶电泳条

带进行光密度值分析,应用 SPSS 13.0 软件包中单因素方差分析(One-Way ANOVA)对实验数据进行统计学分析。

表 1 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  基因 cDNA 全长扩增及半定量 PCR 所用的引物  
Tab.1 Primers used for cloning *IL-1 $\beta$*  gene of *M. macropterus* and its PT-PCR quantification

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
ILF	CCATGTTGCTAATGTTGTMATCGC	扩增中间片段 mid fragment amplification
ILR	GTCTTTACAATCCCCAAACAYACAGG	扩增中间片段 mid fragment amplification
F1	CAGTCCACAGAGTTCACCGACCAGG	3'RACE
F2	AATAAAGCGTGGTTCAACCTCTCAGCC	3'RACE
R1	GTCGGTGAACCTCTGTGGACTGAAC	5'RACE
CDS III	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-D(T)30N-1N	3'RACE
SMART IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG	5'RACE
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	内参基因引物 primer of internal control genes
18S-R	AGCAACTTTAATATACGCTATTGGAG	内参基因引物 primer of internal control genes
DQHF	GTTCAAGTCCACAGAGTTCACCG	半定量 PCR semiquantitative PCR
DQHR	CACAATCCCCAAACATACAGGC	半定量 PCR semiquantitative PCR
UTR-F	CGGGGAAAAAGAGTCTCACAAG	全长 full-length
UTR-R	TCAGGTATCTCAAGCTGAGATATACG	全长 full-length

## 2 结果

### 2.1 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$* 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

将克隆到的三段序列拼接后得到大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  全长 cDNA 全序列(GenBank 登录号: JN646749),包含 1194 个碱基,开放阅读框(ORF)为 888 bp,编码 296 个氨基酸,分子量约为 33.84 ku,等电点为 5.00。3'非编码区域(UTR)为 224 bp,其中含有 3 个 RNA 不稳定基序 ATTTA(RNA instability motifs),同时还含有 30 个碱基的 poly(A)尾,在 poly(A)尾上游 17 bp 处可见 poly(A)加尾信号 AATAAA。5'UTR 为 82 bp。InterPro 分析后发现,存在 *IL-1* 家族的签名序列(signature) FESVRYPGWFITTSKDDFKPV。运用 Signal P 软件分析后发现大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  序列中不存在信号肽,同时该序列中也没有 ICE(interleukin-1 converting enzyln)切割位点。大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  cDNA 及相应氨

基酸序列如图 1 所示。

### 2.2 大鳍鱠 *IL-1 $\beta$* 与其他生物的同源性分析

通过 DNASTAR 软件分析(表 2),大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  氨基酸序列与其它脊椎动物的相似性从高到低依次是斑点叉尾鲷 *IL-1 $\beta$ b* (79.0%)、斑点叉尾鲷 *IL-1 $\beta$ a* (78.9%)、鲤 (41.2%)、鲫 (37.4%)、斑马鱼 (34.7%)、非洲爪蟾 (24.7%)、智人 (22.2%) 及原鸡 (22.0%),表明大鳍鱠 *IL-1 $\beta$*  与斑点叉尾鲷 *IL-1 $\beta$ b* 亲缘关系最近,与原鸡亲缘关系最远。根据大鳍鱠及其他物种 *IL-1 $\beta$*  的氨基酸序列用 MEGA 2.1 软件构建了它们的系统树(图 2)。在系统进化树上可以看出,与鲇形目鱼类的 *IL-1 $\beta$*  基因最为接近并聚在一起,大鳍鱠与斑点叉尾鲷首先聚合在一起,然后依次分别与鲤形目的斑马鱼、鲫、鲤和虹鳟等聚在一起,之后与鲈形目的真鲷和军曹鱼聚为一大支。而包括人、鼠和大角羊等在内的哺乳动物与鸟类的 *IL-1 $\beta$*  聚为另一支。

```

GGCCATTACGGCCGGGAAAAA 22
GAGTCTCACAAAGACAACCTCCAACCTCGCACTTCTCATCCGAGCTCATTGACCACTGAA 82
ATGGCAGACAAAGATTGTTAATGCTGGAAGCTACTTTGGCAGCGACTCTGGATTGAT 142
M A D K D L L M L E S Y F G S D S G F D 20
TCAGACGACACAGATTTGATGAGCTGGACTGCTCTGATCCTTTGGCCATGAGCAGCAGA 202
S D D T D F D E L D C S D P L A M S S R 40
TGTGACCTGCACAAAGGAATCCGTATCGAGGTCACCAAGGAGCCTCTTAGCATGCCAGT 262
C D L H K G I R I E V T K E P L S M R S 60
GTTGCTAACATTGTAATCGCTGTGCATAGGCTGAAGCACACTCAACGTGTTCCAGTCCACA 322
V A N I V I A V H R L K H T Q R V Q S T 80
GAGTTCACCGACCAGGACCTCTCAATATCTTCATGGAGAATGTGATTGAAGAGAGCATG 382
E F T D Q D L F N I F M E N V I E E S M 100
GTGATCGATTTGAAGTGTAAAGCAATCCAAGAGTTACAGCATGCAGGACAAGATTGTGCAG 442
V I D L K C N E S K S Y S M Q D K I V Q 120
TGTACAATATGTGACAAGTCCAAAAGGGCCTTGGTGGGAGAGACAGCTTCTATTCTG 502
C T I C D K S K R A L V R R D K L P I L 140
CTGGCCATTACTCTGAAGGGTGCAAATGAGAATAATAAAGCGTGGTTCAACCTCTCAGCC 562
L A I T L K G A N E N N K A W F N L S A 160
TACAACCCACAAACTGCAGGAAAAACAAAAGGCCAGCCTGTATGTTGGGGATTGTG 622
Y N P P N C R E N T K G Q P V C L G I V 180
AAGAGCAACCTCTTTCTCATGTAAACTGCAGAATGAACTCCTTTTCTCAGCATAGAG 682
K S N L F L S C K L Q N E T P F L S I E 200
GAGGTAGAAGACAAAGAGAGCCTGAAGGCCATCAGGGAGAATGATGAATTGGAGCGCTC 742
E V E D K E S L K A I R E N D E L E R F 220
CTTTTCTCAGAAAGGGCTCTGGTGACACCTGAACACCTTCGAGTCAGTCAGATACCCG 802
L F L R K G S G D T L N T F E S V R Y P 240
GGCTGGTTCATCACCACCTCAAGGACGACTTAAGCCAGTGCAAATGTCTAAGCAGCAA 862
G W F I T T S K D D F K P V Q M S K Q Q 260
CCCAGCCACTCCAGCTGTTCACTCCATGATGAGACAGTAGTCCCTCAGATGAGTTCT 922
P S H L Q L F T L H D E T V V P Q M S S 280
GATTCAGAAAAACAGTTTCCAGAAAGTATGTACTATGTACAATTGTAATCTGGAGGCTC 982
D S E K Q F P E S M Y Y V Q L * 296
ATTTTATGTTTACGTATATCTCAGCTTGAGATACTGACTGGCTTATGCATATTTGTGGT 1042
TTCAAATAATCAAGTTTTTATCTAACTGATTTATCTTATTTATATAAAGTTTGTACT 1102
GAATTCATTATTCTAATTTATTGATATGTTTAAATGCCTAATAAATTTTTTTTCAAATG 1162
CGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1194

```

图1 大鳍鱠 IL-1 $\beta$  cDNA 序列和推测的氨基酸序列

起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA)和 poly(A) 加尾信号序列(AATAAA)用黑体标明,mRNA 不稳定基序(ATTTA)用下划线标明,IL-1 家族签名序列用方框标明。

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of IL-1 $\beta$  in *M. macropterus*

The start codon(ATG), the stop codon(TAA), the open reading frame and the polyadenylation signal(AATAAA) are shown in bold print. The RNA instability motif(ATTTA) in the 3'UTR are underlined. IL-1 family signature is noted in box.

表2 大鳍鱠与其他物种 IL-1 $\beta$  氨基酸序列的同源性比较

Tab. 2 Amino acid sequence identity of IL-1 $\beta$  between *M. macropterus* and other species

	<i>Hs</i>	<i>Dr</i>	<i>Cc</i>	<i>Ca</i>	<i>Xl</i>	<i>Ip a</i>	<i>Ip b</i>	<i>Mm</i>
<i>Gg</i>	25.4	13.8	16.4	19.8	33.6	19.8	20.5	22.0
<i>Hs</i>	***	14.1	22.2	19.6	32.6	21.5	21.1	22.2
<i>Dr</i>		***	56.0	50.2	17.3	36.4	38.8	34.7
<i>Cc</i>			***	72.5	22.0	40.1	40.8	41.2
<i>Ca</i>				***	25.3	35.9	37.4	37.4
<i>Xl</i>					***	19.3	19.6	24.7
<i>Ip a</i>						***	93.9	78.9
<i>Ip b</i>							***	79.0

注:表中列举的物种依次为 *Ga*, 原鸡; *Hs*, 智人; *Dr*, 斑马鱼; *Cc*, 鲤; *Ca*, 鲫; *Xl*, 非洲爪蟾; *Ip a*, 斑点叉尾鲷 IL-1 $\beta$ ; *Ip b*, 斑点叉尾鲷 IL-1 $\beta$ ; *Mm*, 大鳍鱠。

Notes: Species indicated by letter abbreviations are as follows; *Ga*, *Gallus gallus*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Dr*, *Danio rerio*; *Cc*, *Cyprin carpio*; *Ca*, *Carassius auratus*; *Xl*, *Xenopus laevis*; *Ip a*, *Ictalurus punctatus* IL-1 $\beta$  a; *Ip b*, *Ictalurus punctatus* IL-1 $\beta$  b; *Mm*, *Mystus macropterus*.

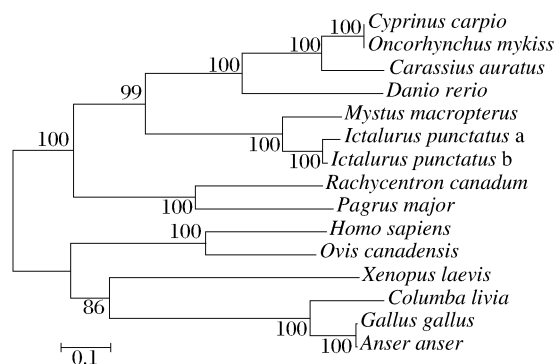


图2 大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  与其它生物的系统进化树

系统进化树中各序列在 GenBank 中的登录号分别为鲤 (*Cyprinus carpio*), CAB52366.1; 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*), CAB53541.3; 金鲫 (*Carassius auratus*), AJ249137.1; 斑马鱼 (*Danio rerio*), AM941627.1; 斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*), *IL-1 $\beta$ a*, AAZ94731.1; *IL-1 $\beta$ b*, NP 001187149.1; 军曹鱼 (*Rachycentron canadum*), AAT65502.1; 真鲷 (*Pagrus major*), AAP33156.1; 大角羊 (*Ovis canadensis*), ABU94271.1; 人 (*Homo sapiens*), NP000567.1; 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*), CAC85480.1; 天鸽 (*Columba livia*), ABD49201.1; 原鸡 (*Gallus gallus*), AEA86275.1; 灰雁 (*Anser anser*), ABD49200.1。节点上的数字表示分支可信度的百分比 (1 000 Bootstrap)。

Fig. 2 Phylogenetic tree showing relationship between *IL-1 $\beta$*  in *M. macropterus* and that in different vertebrate groups

GenBank accession numbers; *Cyprinus carpio*, CAB52366.1; *Oncorhynchus mykiss*, CAB53541.3; *Carassius auratus*, AJ249137.1; *Danio rerio*, AM941627.1; *Ictalurus punctatus*, *IL-1 $\beta$ a*, AAZ94731.1; *IL-1 $\beta$ b*, NP 001187149.1; *Rachycentron canadum*, AAT65502.1; *Pagrus major*, AAP33156.1; *Ovis canadensis*, ABU94271.1; *Homo sapiens*, NP000567.1; *Xenopus laevis*, CAC85480.1; *Columba livia*, ABD49201.1; *Gallus gallus*, AEA86275.1; *Anser anser*, ABD49200.1. The degree of confidence for each branch point was determined by Bootstrap analysis (1 000 repetitions).

### 2.3 大鳍鱧 *IL-1 $\beta$* 基因的组织表达

以 18S rRNA 作为参照,利用 RT-PCR 技术对大鳍鱧体内 *IL-1 $\beta$*  基因的表达情况进行检测。通过 18S rRNA 的 PCR 扩增调节各个组织 cDNA 的模板量,使各个组织在相同模板量的前提下进行 PCR。*IL-1 $\beta$*  在包括肌肉、脑、脾脏、头肾、体肾、胃、皮肤、肝脏及肠中都有不同程度的表达,但存在差异,其中在脑的表达量最弱(图 3)。

### 2.4 嗜水气单胞菌刺激后大鳍鱧 *IL-1 $\beta$* 基因的表达变化

嗜水气单胞菌刺激后大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  的表达变化规律(图 4)显示,刺激 4 h 后头肾和脾脏中的表达量均开始明显增加,1 d 后表达量达到最高,随后表达量开始有所降低,15 d 后恢复到未刺激的水平。

## 3 讨论

对研究获得大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  全长 cDNA 序列进行同源性分析,结果表明克隆所得的序列是 *IL-1 $\beta$*  的同源序列。大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  基因的序列 3' 端包含 3 个 mRNA 不稳定基序 (ATTTA),表明该基因在炎症反应和免疫应答中较为活跃,并起重要作用。同其它非哺乳类 *IL-1 $\beta$*  序列类似,大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  编码的前体肽中也不存在信号肽序列和 ICE 切割位点,而哺乳类中则是通过此位点被 ICE 切割后释放功能成熟肽<sup>[18-19]</sup>。推测鱼类 *IL-1 $\beta$*  编码的成熟肽可能是被一些酶消化后才成为具有生物学活性的成熟肽。

组织表达分析表明,大鳍鱧 *IL-1 $\beta$*  基因在各个组织中都有不同程度的表达,但存在差异,其中在脑的表达量最弱,这与 Shigeyuki 等<sup>[20]</sup>对鳗鲡的组织表达研究相似。*IL-1 $\beta$*  对机体具有修复与

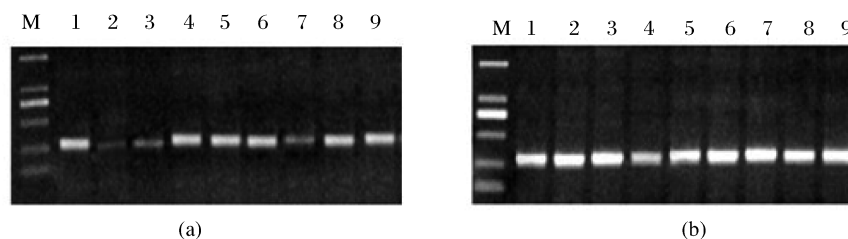


图3 大鳍鱧不同组织 *IL-1 $\beta$*  (a)、18S rRNA (b) 表达的 RT-PCR 分析

M. marker; 1. 肌肉; 2. 脑; 3. 脾脏; 4. 头肾; 5. 体肾; 6. 胃; 7. 皮肤; 8. 肝脏; 9. 肠。

Fig. 3 Analysis of *IL-1 $\beta$*  (a), 18S rRNA (b) expression in different tissues of *M. macropterus* by RT-PCR

M. marker; 1. muscle; 2. brain; 3. spleen; 4. head kidney; 5. kidney; 6. stomach; 7. skin; 8. liver; 9. intestine.

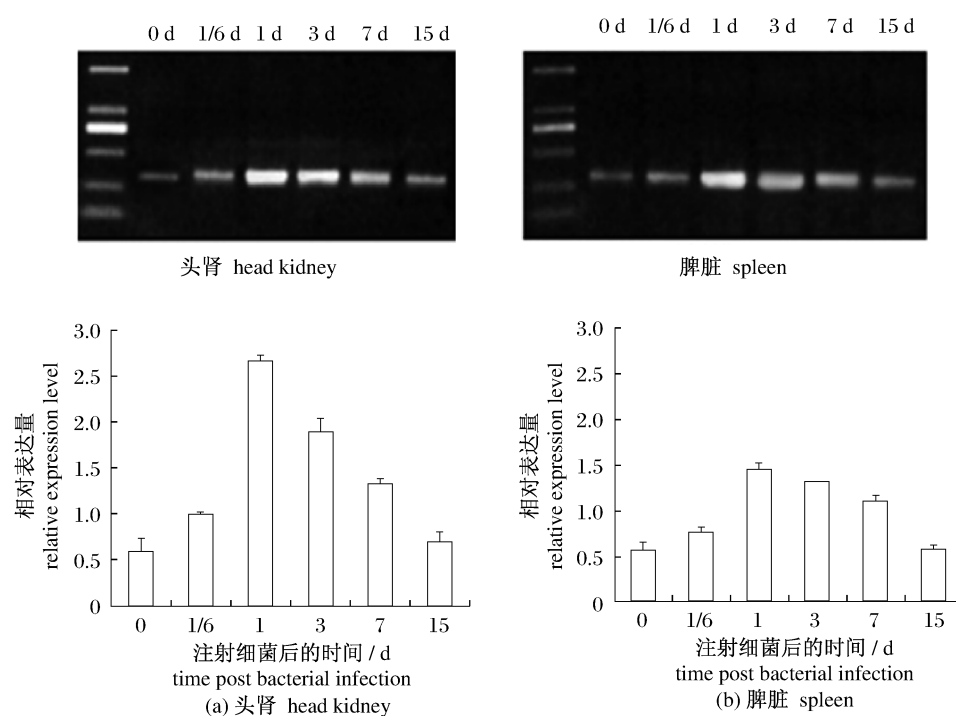


图4 注射细菌后大鳍鲮头肾和脾脏 IL-1 $\beta$  的相对表达量

平均表达量变化( $n=3$ )。

Fig. 4 Mean fold changes of IL-1 $\beta$  mRNA expression in head kidney and spleen of the *M. macropterus* at different time points after injection with *A. hydrophila*

Values are expressed as means standard error(SE) ( $n=3$ ).

损伤的双重作用。IL-1 $\beta$  作为免疫调控细胞因子在含量极微的情况下,具有增强免疫反应的潜力<sup>[21]</sup>;当 IL-1 $\beta$  表达量增加后,会损害机体各种细胞,尤其对神经细胞有极强的损害作用<sup>[22]</sup>,而脑作为神经系统的中枢含有大量神经细胞,在正常生理状态下脑组织中 IL-1 $\beta$  含量较其他组织低。

经嗜水气单胞菌刺激后,大鳍鲮头肾和脾脏 IL-1 $\beta$  基因的表达量均先上调后下降。1 d 时 IL-1 $\beta$  基因的表达量达到最大值,表明该基因参与了大鳍鲮免疫应答反应,尤其在机体抗感染防御初期发挥了重要作用;随后表达量逐渐下降,到 15 d 时恢复到正常水平,这可能是由于该基因的过量表达对机体有损伤作用而引起的<sup>[22]</sup>。另外,也表明了 IL-1 $\beta$  在大鳍鲮头肾和脾脏中不但有组成型表达,而且经刺激后表现出诱导型表达,可见该基因在大鳍鲮体内的表达为组成型和诱导型并存的模式。这点与金头鲷相似<sup>[15]</sup>,而和欧洲鲈与虹鳟的报道有一定差异<sup>[23-24]</sup>,后者不存在组成型表达,这可能是由于不同物种间该基因的表达模式存在一定差异。

Wang 等<sup>[25]</sup>研究表明,IL-1 $\beta$  存在两种形式(IL-1 $\beta$ a 与 IL-1 $\beta$ b)。同源性比较表明,大鳍鲮 IL-1 $\beta$  与斑点叉尾鲷 IL-1 $\beta$ b 较 IL-1 $\beta$ a 亲缘关系更近。另外,细菌刺激后斑点叉尾鲷 IL-1 $\beta$ a 基因在脾脏中的表达量较头肾提前增加,IL-1 $\beta$ b 基因在脾脏和头肾中的表达量同时开始增加<sup>[25]</sup>。而在本研究中大鳍鲮经过嗜水气单胞菌刺激 4 h 后,脾脏和头肾中表达量同时开始增加。因此,预测本研究所克隆得到的基因是 IL-1 $\beta$ b 类型。此外推测 IL-1 $\beta$  基因的两种不同类型可能是由于不完全剪接变种后基因表达的结果,而不完全剪接形式是否存在于成熟肽转录调控过程之中,还有待于更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Huising M O, Stet R J, Savelkoul H F, *et al.* The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish [J]. *Development & Comparative Immunology*, 2004, 28(5): 395-413.
- [2] Bird S, Zou J, Wang T, *et al.* Evolution of interleukin-1 beta [J]. *Cytokine & Growth Factor*

<http://www.scxuebao.cn>

- Reviews,2002,13(6):483-502.
- [ 3 ] Nakae S, Msano M, Horai R, *et al.* Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell dependent antibody production [ J ]. *Immunology*, 2001,104(4):402-409.
- [ 4 ] Torgoe K, Ushio S, Okura T, *et al.* Purification and characterization of the human interleukin-1 $\beta$  receptor [ J ]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 25737-25742.
- [ 5 ] Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1 [ J ]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,1998,30(10):1075-1079.
- [ 6 ] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, *et al.* Molecular cloning of interleukin1 $\beta$  from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site [ J ]. *Cytokine*,1999,11(8):552-560.
- [ 7 ] Engelsma M, Stet R, Schipper H, *et al.* Regulation of interleukin-1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* [ J ]. *Development & Comparative Immunology*,2001,25(3):195-203.
- [ 8 ] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 $\beta$ , high affinity immunoglobulin E Fc receptor  $\gamma$  subunit and serum amyloid A [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10 ( 3 ): 229-242.
- [ 9 ] Jiang S G, Zhang D C, Li J Z, *et al.* Molecular characterization, recombinant expression and bioactivity analysis of the interleukin-1 $\beta$  from the yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn) [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008,24(3):323-336.
- [ 10 ] Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, *et al.* Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 $\beta$  [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*,2001,11(8):711-726.
- [ 11 ] Lu D Q, Bei J X, Feng L N, *et al.* Interleukin-1 $\beta$  gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: Molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction [ J ]. *Molecular Immunology*,2008,45(4):857-867.
- [ 12 ] Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, *et al.* Cloning, sequencing, and analysis of expression a second IL-1beta gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [ J ]. *Immunogenetics*, 2000, 51 ( 12 ): 1002-1011.
- [ 13 ] Wang T, Zou J, Cunningham C, *et al.* Cloning and functional characterisation of the interleukin-1 $\beta$  1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [ J ]. *Biochimica et Biophysica Acta ( BBA )—Gene Structure and Expression*, 2002, 1575 ( 1 - 3 ): 108-116.
- [ 14 ] Wang T H, Johnson N, Zou J, *et al.* Sequencing and expression of the second allele of the interleukin-1 $\beta$  gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): identification of a novel SINE in the third intron [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16 ( 3 ): 335-358.
- [ 15 ] Pelegrin P, Garcia-Castillo J, Mulero V, *et al.* Interleukin-1 $\beta$  isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines [ J ]. *Cytokine*,2001,16(2):67-72.
- [ 16 ] 邱丽华,冯娟,江世贵,等. 军曹鱼白细胞介素 1 $\beta$  基因的克隆、分析及表达 [ J ]. *中国水产科学*, 2005,12(2):122.
- [ 17 ] 邓国成,江小燕,叶星,等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性 [ J ]. *微生物学通报*,2009,36(8):1170-1177.
- [ 18 ] Zou J, Bird S, Minter R, *et al.* Molecular cloning of the gene for interleukin-1 from *Xenopus laevis* and analysis of expression *in vivo* and *in vitro* [ J ]. *Immunogenetics*,2000,49(4-5):332-338.
- [ 19 ] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunk S, *et al.* Identification of prokaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites [ J ]. *Protein Engineering*,1997,10(1):1-6.
- [ 20 ] Shigeyuki T, Taiga I, Osamu N, *et al.* LPS induces gene expression of interleukin-1 $\beta$  in conger eel (*Conger myriaster*) macrophages: First cytokine sequence within Anguilliformes [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*,2007,23(4):911-916.
- [ 21 ] 邱丽华,郭奕惠,张汉华. 鱼类白细胞介素 1 $\beta$  基因的研究概况 [ J ]. *水产学报*, 2005, 29 ( 1 ): 115-119.
- [ 22 ] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1 $\beta$  and induction of inflammation, apoptosis, and vaso genic edema [ J ]. *Journal of Neurosurgery*,2000,92(1):108-120.
- [ 23 ] Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, *et al.* Phylogeny of cytokines: molecular cloning and expression analysis of seabass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 $\beta$  [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*,2001,11(8):711-726.
- [ 24 ] Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, *et al.* Factors

influencing the expression of interleukin-1 $\beta$  in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, 24(6-7):575-582.

[25] Wang Y P, Wang Q, Puttharat B, *et al.* Genomic

organization, gene duplication, and expression analysis of interleukin-1 $\beta$  in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(10):1653-1664.

## Molecular cloning and expression analysis of the *IL-1 $\beta$* gene in *Mystus macropterus*

YANG Ying-ying<sup>1</sup>, ZHANG Qi-zhong<sup>1,2\*</sup>, LI Chun-tao<sup>1</sup>, CHEN Xia<sup>1</sup>, ZHU Cheng-ke<sup>1</sup>, LI Chao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;  
2. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is a key mediator of inflammation and orchestrates a variety of immune responses by initiating gene expression. IL-1 $\beta$  was not identified from non-mammalian species until recently. However, no *IL-1 $\beta$*  genes have been reported from Siluriformes fishes class in China. In this study, we have cloned and sequenced the *IL-1 $\beta$*  in *Mystus macropterus* by RT-PCR and RACE-PCR methods. It contains 1 194 nucleotides, including 3'UTR of 224 nucleotides, 5'UTR of 82 nucleotides, and an open reading frame with 888 nucleotides encoding a 296 amino acid peptide with MW of 33.84 ku and PI of 5.00. Compared with eight vertebrates species, IL-1 $\beta$  in *M. macropterus* shared the highest identity (79.0%) with that in *Ictalurus punctatus*, and the lowest identity (22.0%) with that in *Gallus gallus*. Phylogenetic tree analysis based on some IL-1 $\beta$  amino acids indicated that IL-1 $\beta$  amino acids in *M. macropterus* were clustered closely with *Ictalurus punctatus*. Expression analysis indicated that the *IL-1 $\beta$*  gene of *M. macropterus* was detected in muscle, brain, spleen, head kidney, kidney, stomach, skin, liver and intestine in varying degrees, and increased significantly in head kidney and spleen on 1 day after injection with *Aeromonas hydrophila* and returned to the normal level 15 d later. The result indicated that *M. macropterus* IL-1 $\beta$  plays a critical role in the host-pathogen interaction.

**Key words:** *Mystus macropterus*; IL-1 $\beta$ ; genes; clone; tissue distribution

**Corresponding author:** ZHANG Qi-zhong. E-mail: zhangqzdr@126.com