

淇河鲫 IL-8 cDNA 克隆及组织表达分析

王俊丽¹, 雒燕婷¹, 郝光¹, 孙君君¹, 段艳艳²,
卢荣华², 李学军², 孔祥会², 聂国兴^{2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: IL-8 是最早发现的趋化因子, 属于 CXC 亚家族, 与鱼类非特异性免疫水平关系密切。实验采用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法, 从淇河鲫总 RNA 反转录产物中获得了 641 bp IL-8 cDNA 序列, 其中包含 102 bp 的 5'非编码区, 242 bp 的 3'非编码区和 297 bp 的开放阅读框。该基因编码由 98 个氨基酸残基组成的前体蛋白, 前 22 个氨基酸残基为信号肽。肽链中含有 4 个保守半胱氨酸, 前 2 个半胱氨酸被 1 个精氨酸分隔, 形成 CXC 结构。第一个半胱氨酸前缺乏 ELR 基序, 其组成是 DPR。由氨基酸同源性分析和进化分析可知, 淇河鲫 IL-8 与鲤、鳙、草鱼、鲢等鲤科鱼类的进化关系较近, 与鲤 IL-8 的同源性最高(94%)。通过实时荧光定量 PCR 检测, 淇河鲫 IL-8 在被检测的 8 个组织中都有表达, 其中在肌肉中的表达量最高, 其次为脾脏、头肾和脑等。研究结果对调控淇河鲫非特异性免疫能力, 提高淇河鲫健康养殖水平具有一定参考价值。

关键词: 淇河鲫; IL-8; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

趋化因子是一类分泌型小分子细胞因子, 根据其分子中 4 个保守半胱氨酸残基的排列形式不同, 分为 CXC、CC、XC、CX3C 和 CX 5 个亚家族^[1]。IL-8 属于 CXC 亚家族, 是最早发现的趋化因子, 通过结合 CXCR1 或 CXCR2 对中性粒细胞、外周血 T 淋巴细胞和嗜碱性粒细胞发生趋化作用^[2]。近年来, 鱼类趋化因子的研究发展迅速。无颌类七鳃鳗 (*Lampetra fluviatilis*)^[3], 软骨鱼中的黑线银鲛 (*Chimaera phantasma*)^[4] 和皱唇鲨 (*Triakis scyllia*)^[5], 硬骨鱼中的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、褐牙鲂 (*Paralichthys olivaceous*)^[7]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[8]、黑线鳕 (*Melanogrammus aeglefinus*)^[9]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*)^[10]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[11]、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[12]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[13]、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[14]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[15] 等十几种鱼类的 IL-8 基因序列

相继被成功克隆, 为深入研究鱼类 IL-8 基因的功能奠定了基础。

淇河鲫 (*Carassius auratus* in Qihe River) 是自然三倍体雌核发育鲫, 因产于豫北的淇河而得名^[16], 它以味道鲜美、营养丰富而久负盛名, 而其背部肌肉较厚, 故也有“双背鲫”之称。近年来, 随着市场对淇河鲫的需求越来越大, 其人工集约化养殖规模也逐渐扩大, 因此, 提高淇河鲫的抗病能力, 提高淇河鲫的健康养殖水平备受养殖业者关注。本实验通过同源克隆和 RACE 技术获得淇河鲫 IL-8 基因的 cDNA 全长, 研究其在 8 个不同组织中的表达规律, 为深入研究淇河鲫的非特异性免疫机制及病害防控提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

pGEM-T Vector 购自 Promega 公司; JM-109 感

收稿日期: 2013-03-20 修回日期: 2013-04-30

资助项目: 国家自然科学基金项目(30972252); 河南省重点科技攻关项目(122102110049)

通信作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

受态细胞由本实验室保存;DNA Fragment Quick Purification/Recover Kit 购自鼎国昌盛生物技术有限公司;RNAiso Plus、DL1000 DNA marker、Premix Taq[®] Version 2.0、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)、dATP、PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus)均购自 TaKaRa。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取

健康淇河鲫(约 250 g)由河南师范大学水产养殖基地提供。取头肾和脾脏组织于研钵中,加液氮研磨成粉末状,按照 Trizol 使用说明书提取并纯化总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。超微量分光光度计测定 RNA 的浓度,

并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀判断 RNA 的纯度。

1.3 淇河鲫 IL-8 cDNA 部分序列的克隆

根据已报道的鱼类 IL-8 cDNA 的保守序列,设计正、反向简并引物 IL-8 F 和 IL-8 R(表 1),用于克隆淇河鲫 IL-8 基因保守区。分别以头肾和脾脏总 RNA 为模板,采用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成第一链 cDNA。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,52 °C 50 s,72 °C 30 s,共 33 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA Fragment Quick Purification/Recover Kit 进行纯化,并连接到 pGEM-T 载体。连接产物转染 JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选。对 PCR 筛选获得的阳性克隆进行测序[英潍捷基(上海)贸易有限公司]。

表 1 实验所用的主要引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
IL-8 F	5'-ATGAGTCTTAGMGGWCTGGGTGT-3'	中间片段扩增
IL-8 R	5'-ATSACYTTCTTMACCCAGGGWGC-3'	中间片段扩增
GSPP1	5'-CTGGGTGTAGATCCACGCTGTGCT-3'	3'端扩增
GSPP2	5'-CCAGGGTGCAGTAGGGTCCAGACAG-3'	5'端扩增
NGSPP1	5'-CTGTCTGGACCCTACTGCACCCTGG-3'	3'端扩增
NGSPP2	5'-AGTTTCAATGCAGCGACAGCGTGGA-3'	5'端扩增
3'-RACE Olig(T)-Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTT-3'	3'端扩增
3'-RACE Adaptor	5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'	3'端扩增
5'-RACE Olig(T)-Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'	5'端扩增
5'-RACE Adaptor	5'-GACTCGAGTCGACATCGA-3'	5'端扩增
IL-8 F1	5'-CCCTGAAGATAACTGGGAAAGAG-3'	荧光定量
IL-8 R1	5'-TCCACAGATGACCTTGACATTC-3'	荧光定量
β-actin F	5'-GACTTCGAGCAGGAGATGG-3'	内参引物
β-actin R	5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGA-3'	内参引物

1.4 淇河鲫 IL-8 基因 cDNA 的 3'-RACE 和 5'-RACE

根据上述已获得的淇河鲫 IL-8 部分序列设计 3'-RACE 和 5'-RACE 基因特异性引物(表 1),进行 3'和 5'末端扩增。

在 3'-RACE 中,用 3'-RACE Olig(T)-Adaptor 代替反转录试剂盒中的 Olig(T)合成第一链 cDNA。以 GSPP1 和 3'-RACE Adaptor 为引物,进行第一轮 PCR,扩增条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,58 °C 50 s,72 °C 45 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。以第一轮 PCR 产物稀释 50 倍后为模板,以 NGSPP1 和 3'-RACE Adaptor 为引物进行巢式 PCR,反应条件与第一轮 PCR 相同。

在 5'-RACE 中,首先用特异性引物 GSPP2 合

成第一链 cDNA,然后用 DNA Fragment Quick Purification/Recover Kit 将 cDNA 纯化,利用末端转移酶和 dATP 在纯化的 cDNA 末端加一个 Poly(A)尾巴。以加尾后的 cDNA 为模板,利用 GSPP2 和 5'-RACE Olig(T)-Adaptor 引物进行第一轮 PCR,反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,59 °C 50 s,72 °C 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。所得产物稀释 50 倍后,再以 NGSPP2 和 5'-RACE Adaptor 为引物进行巢式 PCR,反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,54 °C 50 s,72 °C 20 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

对获得的 3'-RACE 和 5'-RACE 产物分别进行纯化、连接、转染、筛选、测序,最后与淇河鲫 IL-8 cDNA 部分序列的克隆中获得的中间片段进行

拼接。

1.5 序列分析

对测序结果分析整理得到淇河鲫 IL-8 cDNA 全序列,采用 Blastn 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行序列同源性比对。氨基酸序列预测采用 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>) 的 Translate Tool 软件;氨基酸同源性比较用 ClustalX 1.83 软件完成;信号肽预测使用 SignalP 4.0 软件;蛋白二级结构预测用 SOPMA。空间结构预测采用 SWISS-MODEL 软件。采用 MEGA 5.0 软件进行分子进化分析,以邻接法(Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树,1 000 次自举(Bootstrap)分析计算各节点支持率。参与序列比较和进化分析的 IL-8 序列均来自 GenBank。

1.6 淇河鲫 IL-8 基因的组织表达

采用实时荧光定量 PCR 法检测淇河鲫头肾、肌肉、脾脏、肝胰脏、肠、鳃、心脏、脑等组织中 IL-8 基因的表达。根据上述所得淇河鲫 IL-8 cDNA 全序列,设计正、反向引物 IL-8 F1 和 IL-8 R1,以 β -actin F 和 β -actin R 为内参引物(表 1)。用 SYBR Green I 荧光染料进行荧光定量检测,比较阈值法测定不同组织的相对表达量。每种组织取 3 尾鱼,每尾鱼设 2 个平行。

提取各组织总 RNA,利用 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real-time) 反转录为 cDNA。

Real-time Quantitative PCR 程序:95 °C 30 s;95 °C 5 s、60 °C 34 s,共 40 个循环;反应结束后进行熔解曲线分析。

根据 C_t 值计算基因引物的扩增效率和分析熔解曲线,以确定引物和扩增参数达到进行荧光定量检测组织相对表达量的要求。各样品引物 PCR 扩增的 C_t 值由各自的扩增曲线分别得出,并根据公式: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{管家基因}})}$,计算出不同组织中淇河鲫 IL-8 mRNA 与内参基因 β -actin 的相对表达丰度,然后采用 SPSS 13.0 for windows 进行 One-way ANOVA 分析,并进行 LSD 与 Duncan 氏比较,结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 淇河鲫 IL-8 cDNA 的克隆与序列分析

利用同源克隆的方法,通过简并引物扩增获得了一个 200 bp 的 IL-8 cDNA 片段。Blastn 分析表明,该基因片段与鲤 IL-8 (GenBank 登录号: DQ453125) 的同源性最高(99%)。通过 RACE 技术,扩增得到 348 bp 的 3'端片段和 297 bp 的 5'端片段。将中间序列与末端序列拼接,得到淇河鲫 IL-8 cDNA 全长(GenBank 登录号:KC184490),共 641 bp (图 1)。其中,编码区 297 bp,5'端非编码区

```

1   GAGTATCCACCAGAAGTGAATGCCACAAGTGTGAGCAACCAGACTCTAGAGTTACTTTT
61  ACGTTTGTCTTTTCCATTTGTAAGTTTCACTTGGCCAGAAATGAACTGCAAAATCTTT
1   M N C K I F
121 TTAGTCAGTCTTATCATTTCCTTGGATTCTGACCATTTGGTGAAGGAATGAGTCTTAGC
7   L V S L I I F L G F L T I G E G M S L S
181 GGTCTGGGTGATAGTCCACGCTGTCGCTGCATTGAAACTGAGAGTCGACGATTGGAAAA
27  G L G V D P R C R C I E T E S R R I G K
241 CACATAGAGAGTGGAGCTTCCCTCCAACTCACACTGTAAGACACAGAGATCATT
47  H I E S V E L F P P N S H C K D T E I I
301 GCAACCCGTAAGATAACTGGGAAAGAGATCTGTCTGGACCTACTGCACCCCTGGGTTAAG
67  A T L K I T G K E I C L D P T A P W V K
361 AAGGTCATTGAGAAGATCATTGCCAACAAGCCCAATGATGTCAAGGCATCTGTGGAT
87  K V I E K I I A N K A P -
421 TTGAGAATGAAAATATGTATGATATGTCGACATTTACATTTAACCTGTATATTTTGA
481 TTGCTCTGCTTTTATTAATGTTTAAACAGTTTCTCAATATTGAGTGTTTTTCACA
541 TAAGTGTGAGTGTGATTTATTTATTTAATGATTTATTTATTTATATATTTTAAATAAATG
601 ACTTTGATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 淇河鲫 IL-8 cDNA 及预测的氨基酸序列

起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 用灰底表示。四个保守的半胱氨酸用粗体表示。mRNA 不稳定信号用下划线表示。多聚腺苷酸加尾信号用双下划线表示。CXC 亚家族标签序列用实线框表示。信号肽用斜体表示。

Fig. 1 Full length cDNA and predicted amino acid sequence of the crucian carp interleukin 8

The initiation codon ATG and the termination codon TGA are highlighted with grey. The four conservative cysteines are shown in bold. Underlined regions show mRNA instability motifs. Polyadenylation signal is indicated with the double underline. CXC subfamily signature is boxed by the solid line. The signal peptide is italicized.

102 bp, 3'端非编码区 242 bp。在 3'非编码区存在 3 个 mRNA 不稳定信号(ATTTA), 在 31 bp 的 poly(A)尾上游 13 bp 处有一脊椎动物中常见的多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)。

2.2 氨基酸组成及蛋白结构分析

运用 Translate Tool 等软件对淇河鲫 IL-8 基因编码的氨基酸序列及蛋白质结构进行分析, 结果显示其编码 98 个氨基酸组成的前体蛋白, 其中前 22 个为富含疏水性氨基酸的信号肽, 在 Gly²² 和 Met²³之间存在一个信号肽酶识别位点。肽链

中含有 4 个保守半胱氨酸, 分别位于第 34、36、60 和 77 氨基酸残基处, 前两个半胱氨酸间隔一个精氨酸(Arg, R)形成 CXC 类趋化因子的特征结构(图 1)。通过 SOPMA 软件进行结构分析显示, 在 IL-8 成熟蛋白的二级结构中, α -螺旋占 26.32%, β -转角占 10.53%, 无规卷曲占 44.74%, 延伸链占 18.42% (图 2)。存在典型的 CXC 趋化因子的空间结构, 即 N 末端 3 个 β 折叠和 C 末端 1 个 α 螺旋(图 3)。成熟蛋白的分子量为 8.5 ku, 等电点为 8.80。

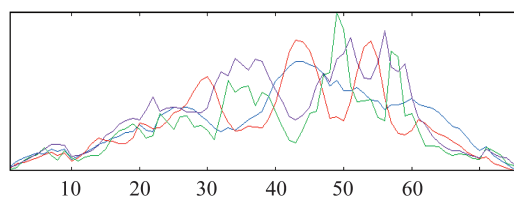


图 2 SOPMA 软件对 IL-8 蛋白二级结构的分析结果

蓝色. α -螺旋; 绿色. β -转角; 紫色. 无规卷曲; 红色. 延伸链。

Fig. 2 Secondary structure of IL-8 protein analyzed by SOPMA

blue. α -helix; green. β -turn; purple. random coil; red. extended strand.

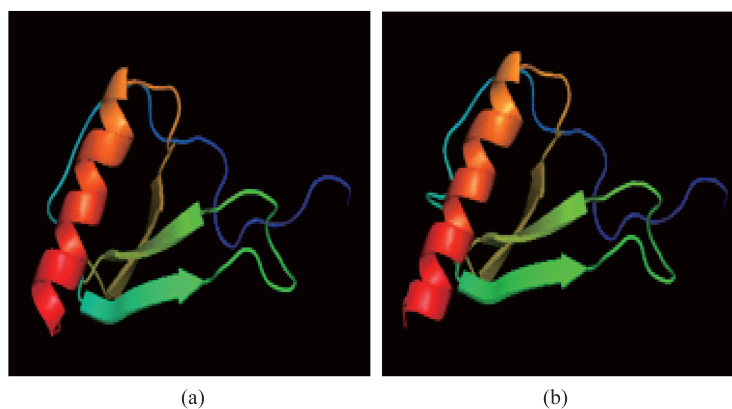


图 3 预测的淇河鲫 IL-8 (a) 与人的 IL-8 (b) 空间结构的比较

Fig. 3 Tertiary structure comparison between crucian carp IL-8 (a) and human IL-8 (b) predicted by Swiss-model

2.3 氨基酸同源性比较及系统进化分析

Blastn 分析发现(图 4), 淇河鲫 IL-8 肽链分子中 4 个半胱氨酸残基位于保守位点, 信号肽剪切位点与已知的其他鱼类 IL-8 分子相一致。与已报道的多数鱼类 IL-8 结构一样, 淇河鲫 IL-8 分子的 CXC 结构前缺乏完整的 ELR 基序, 它的谷氨酸(E)被天冬氨酸(D)代替, 亮氨酸(L)被脯氨酸(P)代替, 成为 DPR 基序(图 1 和图 4)。淇

河鲫 IL-8 的氨基酸序列与其他鲤科鱼的同源性较高, 其中与鲤的同源性最高, 为 94%; 与鲮、草鱼、鲢的同源性分别为 81%、81%、80%。与其他科鱼类的同源性相对较低, 与黑线鲢、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 和黑线银鲛的同源性分别为 62%、57%、54% 和 44%。

酸残基处。同源分析表明,淇河鲫与鲤的 IL-8 同源性最高,其次为鳙、草鱼、鲢。因此,无论是 IL-8 的肽链结构特征,还是氨基酸的同源性,都从分子水平上证明了它们同属于鲤科鱼类的分类地位。淇河鲫 IL-8 分子与虹鳟、大西洋鲑等鲑形目鱼类

也有较高的同源性,而与鲈形目的红鳍东方鲈,鲈形目的罗非鱼、舌齿鲈,鳕形目的黑线鳕、大西洋鳕,鲽形目的半滑舌鳎、褐牙鲆的同源性较低。不同鱼类 IL-8 分子的变异主要发生在肽链的 C 末端,说明该区域与 IL-8 功能的相关性较低^[18]。

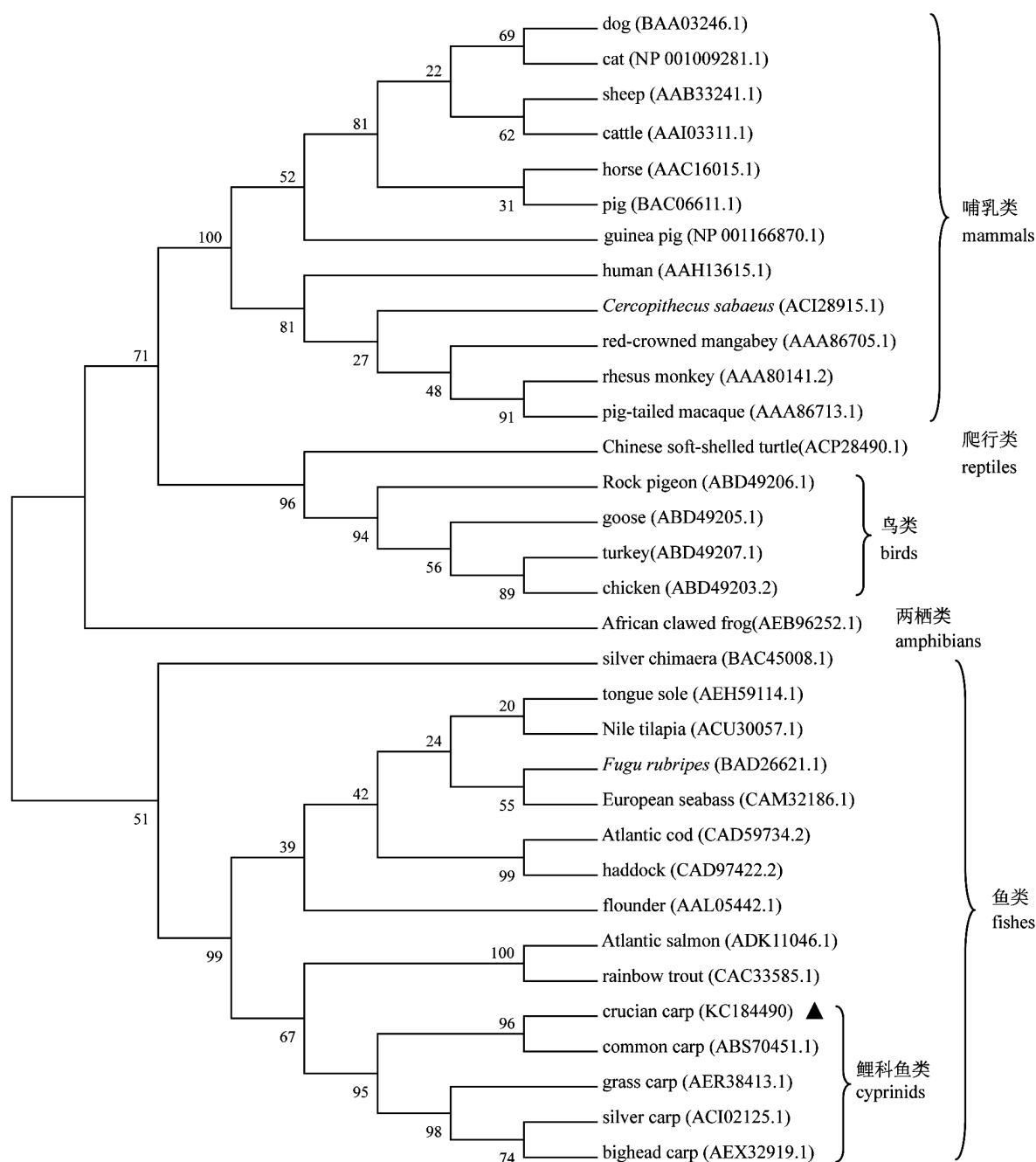


图5 鱼类 IL-8 氨基酸序列与其他脊椎动物 IL-8 的系统进化树

线长表示遗传距离。淇河鲫 IL-8 用▲标出。

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of IL-8, showing the relationship between the fishes and other known vertebrates

The length on the phylogenetic tree indicates the genetic distance. The solid triangle marks the crucian carp IL-8.

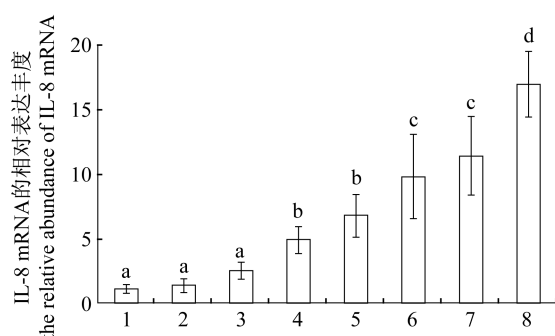


图6 IL-8 mRNA 的各组织相对表达丰度

图中数据表示为平均值 ± 标准差 ($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

1. 肝胰脏; 2. 肠; 3. 心脏; 4. 鳃; 5. 脑; 6. 头肾; 7. 脾脏; 8. 肌肉。

Fig. 6 The relative abundance of IL-8 mRNA expression in different tissues of crucian carp

Error bars indicate the mean and standard deviation ($n=3$).

Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$).

1. hepatopancreas; 2. intestine; 3. heart; 4. gill; 5. brain; 6. head kidney; 7. spleen; 8. muscle.

与其他大多数鱼类相似,淇河鲫 IL-8 在结构上也缺乏哺乳动物的 ELR 基序。该基序是 IL-8 与其受体特异性结合的位点,与 IL-8 特异性趋化粒细胞的功能相关^[19-20]。目前已报道的鱼类 IL-8 分子,除大西洋鳕与黑线鳕含有完整的 ELR 基序^[8,21]、半滑舌鳎 IL-8 完全不含此基序外,其他鱼中只发现了不完整的 ELR 基序。淇河鲫与鲤为 DPR,虹鳟为 DLR^[22],牙鲆为 SLH^[7],银鲛为 SLQ^[4],皱唇鲨为 SLR^[5],七鳃鳗为 GGR^[3]。鱼类 IL-8 ELR 基序的这种结构特点可能与其在进化上为低等脊椎动物有关。脊椎动物 ELR 基序的进化趋势可能是 GGR(无颌类)→SLR/SLQ(软骨鱼类)→SLH/DLR/ELH(硬骨鱼类),最终形成 ELR(鸟类与哺乳类)。整个过程中,氨基酸经多次突变最终形成了在哺乳类中有特殊意义的受体结合位点 ELR^[23]。

空间结构预测显示,N端有3个 β 折叠,C端有1个 α 螺旋,与人 IL-8 的三维结构相似。淇河鲫 IL-8 和人的 IL-8 氨基酸全序列相似度并不高,3D 结构却相似,原因可能是 3D 模型的构建是由氨基酸序列的核心区完成,而并非是全序列。由 3D 结构的预测结果可以推测,淇河鲫 IL-8 的功能可能与人 IL-8 类似^[24]。

淇河鲫 IL-8 在被检测的 8 个组织均有不同程度的表达,其中肌肉的表达量最高,其次为脾

脏、头肾、鳃。淇河鲫 IL-8 在肌肉中表达量高,可能与其背部肌肉组织发达有一定关系。IL-8 在其他鱼不同组织中的表达亦存在较大差异,鲤的 CXCa 显著地表达于头肾、胸腺、脾脏、肝脏、鳃等器官,以鳃的表达量最高^[25];虹鳟 IL-8 在脾脏和鳃表达量最高,在头肾和肝脏表达较弱,脑中几乎没有表达^[26];鲢 IL-8 在胰、肝脏、头肾中有较高表达,肠和鳃的表达较低,肌肉和脑中几乎没有表达^[14];斜带石斑鱼 IL-8 主要在心、头肾、脾和肝脏表达,在鳃和肠有少量表达^[13]。鱼类 IL-8 这种组成型表达模式差异的生物学意义有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2011, 35(7):705-715.
- [2] Sun J S, Zhao L, Sun L. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(6):1362-1367.
- [3] 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]. *European Journal of Immunology*, 1999, 29(2):375-382.
- [4] Inoue Y, Endo M, Haruta C, et al. Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(3):269-274.
- [5] Inoue Y, Haruta C, Usui K, et al. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14(3):275-281.
- [6] 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.
- [7] Lee E Y, Park H H, Kim Y T, et al. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*) [J]. *Gene*, 2001, 274(1-2):237-243.
- [8] 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]. *Molecular*

- Immunology, 2008, 45(4): 887 - 897.
- [9] Corripio-Miyar Y, Bird S, Tsamopoulos K, *et al.* Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(6): 1361 - 1373.
- [10] Cai Z H, Gao C P, Zhang Y, *et al.* Functional characterization of the ELR motif in piscine ELR⁺ CXC-Like chemokine [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(4): 505 - 512.
- [11] Chen L Q, He C B, Baoprasertkul P, *et al.* Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(2): 135 - 142.
- [12] 邱丽华, 江世贵, 张汉华, 等. 花鲈白细胞介素 8 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 201 - 207.
- [13] 胡云凤, 孙军, 林小涛, 等. 斜带石斑鱼白细胞介素 8 基因的克隆与表达分析 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2010, 31(3): 324 - 330.
- [14] 孙军, 梁卉, 林小涛, 等. 鲢 IL-8 基因的克隆与表达分析 [J]. 淡水渔业, 2009, 39(2): 26 - 31.
- [15] 李莲瑞, 卢强, 刘明远, 等. 鲤鱼 IL8 的克隆及序列分析 [J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(1): 68 - 72.
- [16] 李学军, 刘洋洋. 淇河鲫研究进展与开发策略 [J]. 淡水渔业, 2012, 42(6): 93 - 96.
- [17] Gay E, Babajko S. AUUUA sequences compromise human insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA stability [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 267(2): 509 - 515.
- [18] Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, *et al.* Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogues: critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(34): 23128 - 23134.
- [19] Sanchez E, Coll J, Tafalla C. Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8 [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(9): 916 - 926.
- [20] Secombes C J, Wang T, Hong S, *et al.* Cytokines and innate immunity of fish [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25(8-9): 713 - 723.
- [21] Covello J M, Bird S, Morrison R N, *et al.* Cloning and expression analysis of three striped trumpeter (*Latris lineata*) pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-8, in response to infection by the ectoparasitic, *Chondracanthus goldsmidi* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(5): 773 - 786.
- [22] Sangrador-Vegas A, Lenington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokines and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization [J]. Cytokine, 2002, 17(2): 66 - 70.
- [23] Cai Z H, Gao C P, Zhang Y, *et al.* Cloning and bioactivity analysis of a CXC ligand in black seabream *Acanthopagrus schlegeli*: the evolutionary clues of ELR⁺ CXC chemokines [J]. BMC Immunology, 2008, 9(1): 66.
- [24] 翦敏. 赤虹 (*Dasyatis akajei*) 白细胞介素 8 (Interleukin-8) 的功能研究与进化分析 [D]. 广州: 中山大学, 2007.
- [25] Huising M O, Stolte E, Flik G, *et al.* CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2003, 27(10): 875 - 888.
- [26] Liang K J, Zou J J, Wang T H, *et al.* Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2002, 26(5): 433 - 444.

Cloning and tissue expression analysis of the interleukin 8 gene from crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River

WANG Junli¹, LUO Yanting¹, HAO Guang¹, SUN Junjun¹, DUAN Yanyan²,
LU Ronghua², LI Xuejun², KONG Xianghui², NIE Guoxing^{2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Interleukin 8 (IL-8), belonging to CXC family, is the first discovered chemokine, and is closely associated with non-specific immunity of fish. In this study, a full-length cDNA sequence of the IL-8 gene was cloned from crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River using RT-PCR and RACE techniques. The IL-8 cDNA sequence consisted of 641 bp nucleotides, including 102 bp at 5'UTR, 242 bp at 3'UTR and an open reading frame with 297 bp nucleotides. This cDNA sequence encoded a precursor protein of 98 amino acids and the former 22 amino acid residues formed a signal peptide. The putative peptide contained four cysteine residues, and the former two cysteine residues were separated by an arginine residue and consequently formed a CXC structure. Furthermore, similar to the most fishes, IL-8 of crucian carp lacked the completed ELR (Glu-Leu-Arg) motif in front of the CXC structure, which was commonly present in mammalian and chicken IL-8 molecules. Therefore, DPR motif was substituted for ELR motif in IL-8 of crucian carp. Comparison of the amino acid sequences showed that the crucian carp IL-8 shared the highest similarity with *Cyprinus carpio* (94%). Phylogenetic analysis also demonstrated that the crucian carp IL-8 had the close relationship with *Cyprinidae* species such as *Cyprinus carpio* (94%), *Hypophthalmichthys nobilis* (81%), *Ctenopharyngodon idella* (81%) and *Hypophthalmichthys molitrix* (80%). IL-8 mRNA expression in eight different tissues of crucian carp was determined by Real-time Quantitative PCR technique. The results displayed that the level of IL-8 mRNA was highest in muscle, followed by spleen, head kidney and brain. The research would be beneficial to the regulation of non-specific immunity in crucian carp, and also provides a certain reference value for improving the health breeding level of crucian carp.

Key words: *Carassius auratus* in Qihe River; interleukin 8; molecular cloning; differential expression in tissues

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn