

## 黄鳍棘鲷重组 IL-1 $\beta$ 的表达及生物学活性检测

刘振兴<sup>1,2</sup> 张殿昌<sup>1</sup> 李建柱<sup>1</sup> 江世贵<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

(<sup>2</sup> 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

**摘要** 将扩增得到的黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus* 白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )基因克隆到表达载体 pQE30,并转化到大肠杆菌 M15 中进行表达。采用 Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose FF 层析对重组蛋白进行纯化,并用梯度透析对纯化蛋白进行复性。经 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析,获得了分子量为 21kD 的重组白细胞介素 1 $\beta$  (Recombinant Interleukin 1 $\beta$ , rIL-1 $\beta$ )。采用 Percoll 不连续密度梯度离心分离黄鳍棘鲷头肾白细胞,在分离液密度 1.080 g/ml 的界面上可以有效富集白细胞。用不同终浓度的 rIL-1 $\beta$  和 5 $\mu$ g/ml 脂多糖(LPS)刺激培养的黄鳍棘鲷头肾白细胞,23 $^{\circ}$ C 培养 4h 后提取细胞的总 RNA,经 RT-PCR 半定量检测,当培养基中 rIL-1 $\beta$  的浓度达到 20 ng/ml 时可以提高 IL-1 $\beta$  基因的转录水平,与 5  $\mu$ g/ml LPS 的刺激效果相当,表达的重组蛋白表现出很好的生物学活性。

**关键词** 黄鳍棘鲷 rIL-1 $\beta$  Percoll 不连续密度梯度离心 细胞培养 RT-PCR

**中图分类号** Q344 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0097-06

## Expression and bioactivity analysis of *Acanthopagrus latus* recombinant IL-1 $\beta$

LIU Zhen-xing<sup>1,2</sup> ZHANG Dian-chang<sup>1</sup> LI Jian-zhu<sup>1</sup> JIANG Shi-gui<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

(<sup>2</sup> Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**ABSTRACT** Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gene was amplified from the total RNA of *Acanthopagrus latus*. The PCR product was subcloned into expression vector pQE30 and was subsequently transformed into *E. coli* M15 with IPTG inducement to be expressed. The recombinant protein was purified with Ni<sup>2+</sup>-chelating sepharose FF chromatography and the renaturation of the recombinant protein was subjected to gradient dialysis. The results of SDS-PAGE and Western Blot analysis proved that the recombinant IL-1 $\beta$  with a molecular weight of 21kD was successfully expressed. The head kidney leucocytes of *A. latus* were isolated by using a discontinuous Percoll density gradient centrifugation and the density of 1.080g/ml was suitable for the isolation of head kidney leucocytes. The cultured head kidney leucocytes of the *A. latus* were stimulated by different final concentrations of rIL-1 $\beta$  and 5 $\mu$ g/ml LPS. The total RNA of the leucocytes was extracted after 4 h at 23 $^{\circ}$ C. The RT-PCR revealed that rIL-1 $\beta$  could up-regulate the transcription of IL-1 $\beta$  at 20ng/ml and was equivalent to the effect of 5 $\mu$ g/ml LPS. The rIL-

国家科技基础条件平台项目(2005DKA30470)和广东省科技计划项目(2006B60101038)共同资助

收稿日期:2007-12-25;接受日期:2008-02-20

\* 通讯作者。E-mail:jiangsg@21cn.com Tel:(020)89108338

作者简介:刘振兴(1981-),男,硕士研究生,主要从事鱼类免疫学研究。E-mail:liuzhenxing81@yahoo.com.cn Tel:(020)89109193

IL-1 $\beta$  of *A. latus* showed efficacious bioactivity.

**KEY WORDS** *Acanthopagrus latus* rIL-1 $\beta$  Discontinuous Percoll density gradient centrifugation Cell culture RT-PCR

IL-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , 白细胞介素 1 $\beta$ )是一种重要的炎症介质和免疫因子,在机体的免疫应答中发挥着广泛的调节作用,在哺乳动物中 IL-1 $\beta$  的前体肽没有生物学活性,经过 IL-1 $\beta$  转换酶(IL-1 $\beta$  converting enzyme, ICE)酶切后成为有活性的成熟肽。IL-1 $\beta$  是 IL-1 家族的成员之一,除 IL-1 $\beta$  外该家族还包括 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 受体拮抗物(IL-1Ra)和 IL-18,以及新发现的一些成员(Dinarello 1996; Smith *et al.* 2000; Scapigliati *et al.* 2004)。1999 年 Zou 等在鱼类中首先克隆了虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 的 IL-1 $\beta$  基因(Zou *et al.* 1999),迄今已有 10 余种鱼类的 IL-1 $\beta$  基因得到克隆(李建柱等 2006; Lee *et al.* 2006; Corripio-Miyar *et al.* 2007),但是对其生理功能方面的研究仅见少量报道,研究对象也仅限于虹鳟 *Salmo gairdner*、鲤 *Cyprinus carpio* L. 和舌齿鲈 *Dicentrarchus labrax* 等,研究发现 IL-1 $\beta$  具有明显的免疫学活性,可以活化淋巴细胞,提高头肾白细胞的吞噬、趋化活性,促进免疫相关基因的转录,提高抗体滴度,并且具有免疫佐剂的功能(Buonocore *et al.* 2004; Hong *et al.* 2001; Kono *et al.* 2002; Peddie *et al.* 2001; Yin *et al.* 2000); Metz 等(2006)还研究了鲤中 IL-1 $\beta$  对 HPI 轴的影响。

黄鳍棘鲷 *Acanthopagrus latus* 隶属鲈形目、鲷科、棘鲷属,是我国南方重要的水产养殖对象。本实验室于 2006 年克隆了黄鳍棘鲷 IL-1 $\beta$  基因(GenBank 登录号:AY669059)(李建柱等 2006),将其氨基酸序列与已知鱼类的 IL-1 $\beta$  氨基酸序列进行多重比对,参考虹鳟、舌齿鲈等 IL-1 $\beta$  成熟肽的预测结果,推测黄鳍棘鲷 IL-1 $\beta$  在 Ala<sup>85</sup> 处开始形成一个可能的成熟肽。本研究将扩增得到的成熟肽基因序列插入表达载体 pQE30,转入大肠杆菌 M15,构建了原核表达系统:M15 (pQE30-mIL1 $\beta$ ),诱导表达并纯化重组蛋白;用 Percoll 不连续密度梯度离心分离黄鳍棘鲷头肾白细胞,并用纯化的 rIL-1 $\beta$  刺激培养的头肾白细胞,检测 rIL-1 $\beta$  对自身基因转录水平的影响,初步探索 rIL-1 $\beta$  的生物学活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康的黄鳍棘鲷,每尾质量 400~450 g,购自广州市黄沙水产市场,试验前于室内暂养 7 d。

大肠杆菌:Top 由本实验室保存;表达载体 pQE30 和宿主菌 M15 购自 Qiagen 公司。

### 1.2 rIL-1 $\beta$ 原核表达系统的构建与表达

用 10  $\mu$ g/ml 的 LPS 按 1 $\mu$ l/g 鱼体重胸腔注射暂养的黄鳍棘鲷,4h 后取其头肾组织用 Trizol 法提取总 RNA。以 Oligo(dT)<sub>17</sub>-adapter (5'GGCCACGCGTTCGACTAGTACT<sub>17</sub>)为引物,用 M-Mlv Reverse Transcriptase(TaKaRa)合成第 1 链 cDNA。用 Primer Premier 5.0 软件设计带酶切位点(*Bam*HI)的引物 F1: 5'CGGGATCCGCTCAGTACACATACTTCC 和带酶切位点(*Sal*I)的引物 R1: 5'GCGTCGACTTAA-CACTCGCCATCCCC,扩增 IL-1 $\beta$  的成熟肽基因片段,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1min,25 个循环。扩增产物进行 *Bam*HI 和 *Sal*(TaKaRa)双酶切后回收 IL-1 $\beta$  基因片段,将 IL-1 $\beta$  定向插入到同样处理的原核表达载体 pQE30 中,构建原核表达载体 pQE30-mIL1 $\beta$ 。

将 pQE30-mIL1 $\beta$  转化 *E. coli* M15,蓝白斑筛选后阳性克隆送英韦创津公司测序。挑取单菌落接种到 500ml LB 液体培养基中(100 $\mu$ g/ml Amp, 25 $\mu$ g/ml Km),37 $^{\circ}$ C 200r/min 震荡培养至 OD600 为 0.5~0.6。加入 IPTG 至终浓度 0.6 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h,收集诱导菌,SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.3 rIL-1 $\beta$ 的纯化

离心收集诱导后的菌体,加预冷的 TE1 Buffer(20 mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA, pH8.0)悬浮菌体

后超声波粉碎(6 $\times$ 100 s, 4 s 间隔),离心收获包涵体,将包涵体溶解于 Start Buffer(20mmol/L Tris-Cl, 0.5 mol/L NaCl, 10mmol/L Imidazole, 8mol/L Urea, 1 mmol/L 2-ME, pH 8.0),用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤。然后用 Chelating Sepharose FF 亲和层析柱洗脱纯化目的蛋白。

10 ml 纯化蛋白用 250 ml 稀释用变性液(20 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L Urea, pH8.0)稀释后装入透析袋(截留分子量 3.5kD, Pierce Chemical Company),再将透析袋依次放入 5 L 4、3、2、1 和 0.5mol/L Urea 的梯度复性液中复性,最后将透析袋放入 1.1% NaCl 溶液中透析两次,复性的纯化蛋白使用 Amicon Ultra-15 型(5K)超滤管浓缩。

纯化的 rIL-1 $\beta$  进行 SDS-PAGE 电泳,并用 Bradford 法测定蛋白质浓度,参照汪家政等(2002)的方法进行。内毒素检测试剂盒购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司,使用方法参照产品使用说明书。

#### 1.4 纯化蛋白的 Western Blot 检测

参照 Deane 等(2006)的方法进行,将 IPTG 诱导和未诱导的 M15 (pQE30-mIL1 $\beta$ )菌液各 1 ml 离心,菌体溶解于 SDS-PAGE 上样缓冲液,与纯化蛋白共同上样,进行 SDS-PAGE 电泳;再用 Mini-Protean II cell 系统(BioRad)将样品转移到 0.45  $\mu$ m 的硝酸纤维素滤膜上,200 V,转移 2 h;5%的脱脂奶粉封闭 1 h,用 TBST Buffer 洗膜 3 次,加入一抗(TIANGEN Anti-His 小鼠单克隆抗体),37  $^{\circ}$ C,孵育 2 h,同上洗涤,加入羊抗鼠 HRP 酶标二抗(TIANGEN),37  $^{\circ}$ C,孵育 1 h,同上洗涤,DAB 显色。

#### 1.5 rIL-1 $\beta$ 生物学活性检测

##### 1.5.1 头肾白细胞的分离与培养

参照 Scapigliati 等(2000)的方法进行,先将暂养的黄鳍棘鲷尾静脉取血降低其活力,再将头肾剪碎用 100 $\mu$ m 不锈钢筛网过滤。用 Percoll 分离液原液(Pharmacia)制备 1.020 和 1.080 g/ml 的分离液,上下层叠加,再将上面制备的头肾细胞悬液叠加到分层液上,500 g,23  $^{\circ}$ C 离心 30 min,小心收集两层分离液之间的细胞层,分离细胞用瑞氏染色液染色后镜检,计算白细胞百分比。用 RPMI-1640 培养基将细胞悬液调整到 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml,用 2% 台盼蓝染色,计算活细胞百分率。

将制备的头肾白细胞悬液(每份 5 ml)分别加入终浓度 1、20 和 50 ng/ml rIL-1 $\beta$ ,以终浓度 5  $\mu$ g/ml LPS 作为正对照,同时设定不添加任何试剂的空白对照和仅添加生理盐水的阴性对照,做两组平行,23  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养细胞。

##### 1.5.2 引物设计与合成

选择  $\beta$ -actin 作为半定量检测的内参照,参考 Gen Bank 上已发表的黑鲷等鲷科鱼类的  $\beta$ -actin 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 F2: 5' AACCAAACGCCCAACA ACT, R2: 5' CATACAAGCGATACTA-CAACCAT;利用已知的黄鳍棘鲷 IL-1 $\beta$  基因序列设计引物 F3: 5' GCTGGACTTGGAGATTGC, R3: 5' GCTTGGCTCGTTACCT;上述引物送上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

##### 1.5.3 总 RNA 的提取及反转录

细胞培养 4 h 后,4  $^{\circ}$ C,8 000 g 离心,Trizol(Invitrogen)法提取总 RNA,以 9 Random Primer 引物合成第 1 链 cDNA,作为半定量 PCR 的模板,具体步骤参照 M-Mlv Reverse Transcriptase 使用说明书(TaKaRa)。

##### 1.5.4 rIL-1 $\beta$ 生物学活性的半定量检测

以合成的单链 cDNA 为模板,以引物 F2/R2 扩增  $\beta$ -actin,反应程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,分别进行 20、25、30、35 和 40 个循环的扩增;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4  $^{\circ}$ C 保温。扩增结果进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,采用 Gene Tool 软件进行分析,确定线性扩增的循环数范围。

循环数确定后,以合成的单链 cDNA 为模板,以引物 F2/R2 和 F3/R3 分别扩增  $\beta$ -actin 和 IL-1 $\beta$ ,反应程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4  $^{\circ}$ C 保温。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离。将目的片段割胶回收,回收片段与 TaKaRa 的 pMD18-T 连接,转化到大肠杆菌 Top10 中。转化产物进行 PCR,阳性克隆送英韦创津公司测序。

同时将  $\beta$ -actin 及 IL-1 $\beta$  扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, Gene Tool 软件分析, 确定各组每个样品中 IL-1 $\beta$  与  $\beta$ -actin 相对浓度, 用 SPSS 软件对 3 组结果进行显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 rIL-1 $\beta$ 的表达与纯化

经 IPTG 诱导后, rIL-1 $\beta$  在含有质粒 pQE30-mIL1 $\beta$  的 *E. coli* M15 中得到表达。离心收集诱导后的菌体, 破碎菌体回收包涵体后杂蛋白条带明显减少, 采用 Ni<sup>2+</sup>-Chelating Sepharose FF 层析对重组蛋白进行纯化, 并用梯度透析对纯化蛋白进行复性后进行 SDS-PAGE 电泳, 详细结果见图 1。

SDS-PAGE 电泳结果显示, 获得了分子量 21kD 极高纯度的 rIL-1 $\beta$ 。用 Band Scan 5.0 软件扫描分析, rIL-1 $\beta$  的纯度有 95%。用 Bradford 法测定, 复性后的 rIL-1 $\beta$  浓度为 0.18 mg/ml。经检测, 复性的 rIL-1 $\beta$  内毒素含量为 0.964 EU/ml, 参照产品说明 1 ng = 2.5 EU, 本研究纯化的 rIL-1 $\beta$  内毒素含量不超过 0.386 ng/ml。

### 2.2 Western Blot 检测

从 Western Blot 的结果(图 2)可以看出, *E. coli* M15 经过 IPTG 诱导后在 21kD 处出现 1 个明显的条带, 该条带即为带有 6  $\times$  his-tag 的表达蛋白。大小与 SDS-PAGE 中诱导后出现的条带吻合, 结合测序结果可以推断, 已经成功表达黄鳍棘鲷 IL-1 $\beta$ 。

### 2.3 rIL-1 $\beta$ 生物学活性检测

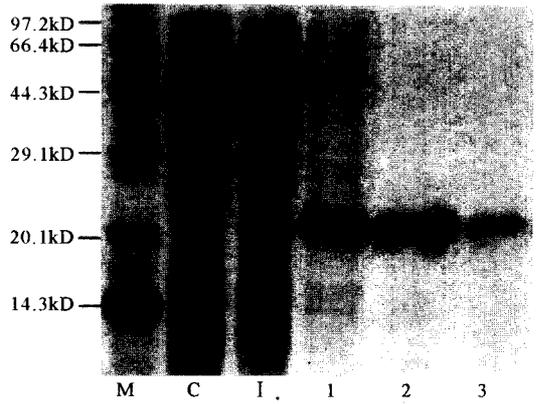
#### 2.3.1 头肾白细胞分离

采用 Percoll 不连续密度梯度离心分离黄鳍棘鲷头肾白细胞, 分离到的头肾白细胞进行瑞氏染色后, 油镜(10 $\times$ 100)下观察计数, 该层细胞中白细胞约占 95%, 台盼蓝染色显示, 活细胞百分率为 97%。

#### 2.3.2 RT-PCR 半定量检测

PCR 反应的循环数在半定量检测中也很重要, 在循环数为 25~35 的范围内, PCR 产物的量与循环数成线性关系(图 3 和图 4), 因此在半定量分析中 PCR 反应都采用 30 个循环。

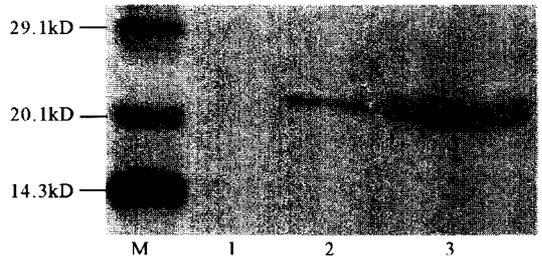
RT-PCR 扩增得到的  $\beta$ -actin 和 IL-1 $\beta$  片段送英韦创津公司测序, 将  $\beta$ -actin 测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 扩增所得到的 396bp 片段, 与黑鲷 *Acanthopagrus schlegelii* 和金头鲷 *Sparus aurata* 的  $\beta$ -actin 序列比对的 E 值均为 0.0, Identities 分别为 99% 和 97%; 扩增所得到的 IL-1 $\beta$  片段为 445bp, BLAST 分析显示, 该片段与为黄鳍棘鲷的 IL-1 $\beta$  的序列比对 E 值为 0.0, Identities 为 100%。



M: Marker; C: M15 未诱导; I: M15 诱导; 1: 包涵体回收; 2: rIL-1 $\beta$  纯化; 3: rIL-1 $\beta$  复性  
M: Marker; C: M15 not induced; I: Induction of M15; 1: Recovery of inclusion body; 2: Purification of rIL-1 $\beta$ ; 3: renaturation of rIL-1 $\beta$

图 1 rIL-1 $\beta$  的 SDS-PAGE 电泳

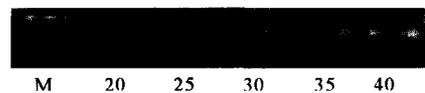
Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretogram of rIL-1 $\beta$



M: Marker; 1: M15 未诱导; 2: M15 诱导; 3: rIL-1 $\beta$  纯化  
M: Marker; 1: M15 not induced; 2: Induction of M15; 3: Purification of rIL-1 $\beta$

图 2 rIL-1 $\beta$  的 western blot 鉴定

Fig. 2 Western blot detection of rIL-1 $\beta$



M: 100 bp DNA marker; 20~40: 不同循环数的 PCR 产物  
M: 100 bp DNA marker; 20~40: PCR products of different cycle numbers

图 3 PCR 循环参数确定的电泳

Fig. 3 Electrophoretogram of PCR cycle number determination

选择  $\beta$ -actin 作为半定量检测的内参照,用 Gene Tool 软件分析,确定各组每个样品中 IL-1 $\beta$  与  $\beta$ -actin 相对浓度,并用 SPSS 软件对 3 组结果进行显著性分析后可知,在适当剂量的 rIL-1 $\beta$  刺激下,IL-1 $\beta$  基因的转录水平明显提高(图 5 和图 6)( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

Western Blot 检测结合 DNA 测序结果可以确认,本研究诱导表达并纯化了黄鳍棘鲷 rIL-1 $\beta$ 。由于表达蛋白以包涵体形式存在,所以在检测其生物学活性前需要进行复性。包涵体蛋白的复性方法一般有稀释法、透析法、超滤法以及层析法。本研究采用透析法,逐步降低外透液浓度,即逐步降低尿素浓度,从 4mol/L 到 0mol/L,由于复性前蛋白浓度较高,直接透析容易发生聚沉,所以透析前将纯化蛋白稀释。

本研究通过 Percoll 不连续密度梯度离心分离了黄鳍棘鲷头肾白细胞。研究中发现,采用 1.080 g/ml 的分离液,在 500 g 离心 30 min 的情况下,能够很好的将头肾白细胞和红细胞分开。过高密度,例如 1.085 g/ml 的分离液在 500 g 离心 30 min 的情况下红细胞未能到达分离液底部,而与白细胞处在 1.020 g/ml 与 1.085 g/ml 分离液的界面上。低于 1.080 g/ml 的分离液不能最大比例的富集头肾白细胞。

RPMI-1640 培养基较为适合培养鱼类白细胞(丰培金等 2004, Meloni *et al.* 2000), 因组分含量不同渗透压有一定变化,平均值约为 300mOsm/kg。实验证明,添加 15% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基适合培养黄鳍棘鲷头肾白细胞。1.1% NaCl 的渗透压约为 300mOsm/kg,因此将纯化的 rIL-1 $\beta$  通过透析溶解于 1.1%NaCl。

Hong 等(2001)在虹鳟的研究中发现, rIL-1 $\beta$  诱导后 3~6 h, IL-1 $\beta$  的转录水平达到最大, Buonocore 等(2004)在舌齿鲈的研究中采用了刺激后 4h 抽提 RNA, 本研究将刺激时间定为 4 h。RT-PCR 的结果显示, 1 ng/ml rIL-1 $\beta$  即可显著提高 IL-1 $\beta$  基因的转录水平, 20 ng/ml rIL-1 $\beta$  对自身转录水平的促进相当于 5  $\mu$ g/ml LPS 的影响, 而 50 ng/ml rIL-1 $\beta$  与 20 ng/ml

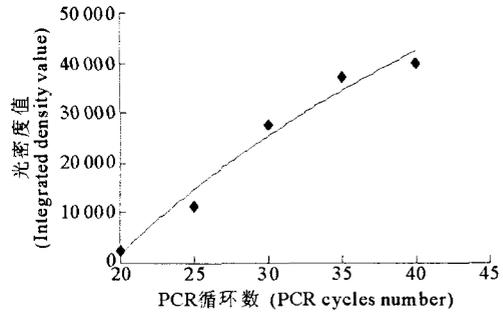
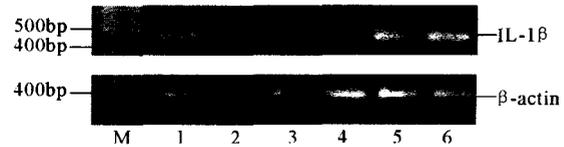


图 4 PCR 循环参数的确定

Fig. 4 Determination of the PCR cycle numbers

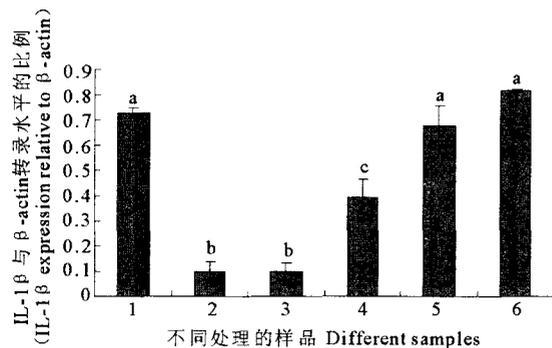


M: 100 bp DNA marker; 1: 正对照(5 $\mu$ g/ml LPS 刺激); 2: 空白对照(无刺激物); 3: 阴性对照(1.1% NaCl 刺激); 4: 1ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激; 5: 20ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激; 6: 50ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激

M: 100 bp DNA marker; 1: Positive control (stimulated with 5 $\mu$ g/ml LPS); 2: Blank control (stimulated with nothing); 3: Negative control (stimulated with 1.1% NaCl); 4: Stimulated with 1ng/ml rIL-1 $\beta$ ; 5: Stimulated with 20ng/ml rIL-1 $\beta$ ; 6: Stimulated with 50ng/ml rIL-1 $\beta$

图 5 IL-1 $\beta$  和  $\beta$ -actin 电泳

Fig. 5 Electrophoretogram of IL-1 $\beta$  and  $\beta$ -actin



1: 正对照(5 $\mu$ g/ml LPS 刺激); 2: 空白对照(无刺激物); 3: 阴性对照(1.1% NaCl 刺激); 4: 1ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激; 5: 20ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激; 6: 50ng/ml rIL-1 $\beta$  刺激

具有不同字母的组之间具有显著性差异, 相同字母的组之间不具有显著性差异( $P < 0.05$ )

1: Positive control (stimulated with 5 $\mu$ g/ml LPS); 2: Blank control (stimulated with nothing); 3: Negative control (stimulated with 1.1% NaCl); 4: Stimulated with 1ng/ml rIL-1 $\beta$ ; 5: Stimulated with 20ng/ml rIL-1 $\beta$ ; 6: Stimulated with 50ng/ml rIL-1 $\beta$

Different letters on the parameters mean significant difference ( $P < 0.05$ )

图 6 同一个样品中 IL-1 $\beta$  与  $\beta$ -actin 转录水平的比例

Fig. 6 The ratio of IL-1 $\beta$  mRNA level and  $\beta$ -actin level expressed in the same samples

rIL-1 $\beta$ 对自身转录的促进则没有明显差别,因此20 ng/ml rIL-1 $\beta$ 的可以作为最适刺激浓度。这跟 Hong 等采用 Northern blot 对虹鳟 rIL-1 $\beta$ 生物学活性的研究结果相吻合,此外他认为,10 ng/ml 与 1 ng/ml rIL-1 $\beta$ 相比,前者能够有效刺激 IL-1 $\beta$ 的转录,并且采用更高浓度的 rIL-1 $\beta$ (100 ng/ml)比 5 $\mu$ g/ml LPS 刺激效果更明显。然而 Buonocore 等(2004)在舌齿鲈的研究中发现 1 ng/ml 与 10 ng/ml rIL-1 $\beta$ 在诱导 IL-1 $\beta$ 转录上并没有明显差别,在较高的浓度下(50 ng/ml rIL-1 $\beta$ )才能表现出明显生物学活性。关于刺激剂量的研究结果不尽相同,可能与纯化蛋白的复性情况,转录本的检测方法、体外细胞培养条件以及鱼类种属的差异有关。

本研究纯化了大肠杆菌表达的黄鳍棘鲷 rIL-1 $\beta$ ,并初步检测了重组蛋白的生物学活性;确定了黄鳍棘鲷头肾白细胞的分离培养条件,为进一步开展黄鳍棘鲷体外分子、细胞水平的免疫学研究打下了基础。

## 参 考 文 献

- 丰培金,卢强,李莲瑞,张俊辉. 2004. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养. 中国兽医学报,24(4):369~371
- 付峰,刘荭,范万红,江育林,黄捷. 2007. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白基因的克隆及其在毕赤酵母中的初步表达. 海洋水产研究,28(4):72~76
- 李建柱,江世贵. 2006. 黄鳍鲷白细胞介素 1 $\beta$  基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 热带海洋学报,25(2): 37~43
- 汪家政,范明. 2000. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社,42~91
- 杨绒,陈松林,李伟,王志坚. 2006. 牙鲆抗菌肽 hepcidin 基因在成鱼组织和不同发育时期胚胎中的表达分析. 海洋水产研究,27(6):84~87
- 金利华,骆晶晶,林圣彩,叶志云. 2006. 凡纳滨对虾 G 蛋白 G $\beta$ 1 亚基的克隆、表达与鉴定. 海洋水产研究,27(3):7~13
- Buonocore, F., Mazzini, M., Forlenza, M., Randelli, E., Secombes, C. J., Zou, J., and Scapigliati, G. 2004. Expression in *Escherchia coli* and purification of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Interleukin 1 $\beta$ , a Possible Immunoadjuvant in Aquaculture. Mar. Biotechnol. 6:53~59
- Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Tsamopoulos, K., and Secombes, C. J. 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 beta and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Mol. Immunol. 44(6): 1 361~1 373
- Deane, E. E., and Woo, N. Y. 2006. Molecular cloning of growth hormone from silver seabream; Eects of abiotic and biotic stress on transcriptional and translational expression. Biochem Biophys Res Commun. 342(4):1 077~1 082
- Dinarelo, C. A. 1996. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. Blood, 87(6): 2 095~2 147
- Hong, S., Zou, J., Crampe, M., Peddie, S., Scapigliati, G., Bols, N., Cunningham, C., and Secombes, C. J. 2001. The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 $\beta$ . Vet. Immunol. Immuno. 81:1~14
- Kono, T., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T., Endo, M., and Sakai, M. 2002. The immune responses of common carp, *Cyprinus carpio* L., injected with carp interleukin-1 beta gene. J. Interferon Cytokine Res. 2(4): 413~419
- Lee, D. S., Hong, S. H., Lee, H. J., Jun, L. J., Chung, J. K., Kim, K. H., and Jeong, H. D. 2006. Molecular cDNA cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1beta gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 143(3): 307~314
- Meloni, S., and Scapigliati, G. 2000. Evaluation of immunoglobulins produced in vitro by head-kidney leucocytes of sea bass *Dicentrarchus labrax* by immunoenzymatic assay. Fish Shellfish Immunol. 10(1):95~99
- Metz, J. R., Huising, M. O., Leon, K., Verburg-van Kemenade, B. M., and Flik, G. 2006. Central and peripheral interleukin-1beta and interleukin-1 receptor I expression and their role in the acute stress response of common carp, *Cyprinus carpio* L. J. Endocrinol. 191(1):25~35
- Peddie, S., Zou, J., Cunningham, C., and Secombes, C. J. 2001. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 $\beta$  and derived peptides induce migration of head kidney leucocytes in vitro. Fish & Shellfish Immunol. 11:697~709
- Scapigliati, G., Costantini, S., Colonna, G., Facchiano, A., Buonocore, F., Bossù, P., Cunningham, C., Holland, J. W., and Secombes, C. J. 2004. Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. Dev. Comp. Immunol. 28: 429~441
- Scapigliati, G., Romano, N., Abelli L., Meloni, S., Ficca, A. G., Buonocore, F., Bird, S., and Secombes, C. J. 2007. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish & Shellfish Immunol. 10: 329~341
- Smith, D. E., Renshaw, B. R., Ketchum, R. R., Kubin, M., Garka, K. E., and Sims, J. E. 2000. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. J. Biol. Chem. 275(2): 1 169~1 175
- Yin, Z., and Kwang, J. 2000. Carp interleukin-1beta in the role of an immuno-adjuvant. Fish & Shellfish Immunol. 10: 375~378
- Zou, J., Grabowski, P. S., Cunningham, C., and Secombes, C. J. 1999. Molecular cloning of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 $\beta$  reveals no evidence of an ICE cut site. Cytokine, 11(8): 552~560
- Zou, J., Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C., and Secombes, C. J. 2000. Factors influencing the expression of interleukin-1 $\beta$  in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. Dev. Comp. Immunol. 24:575~582