

花鲈白细胞介素8基因的克隆与序列分析

邱丽华, 江世贵, 张汉华, 杨铿, 周发林

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要: 采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)的方法, 从经LPS刺激的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)总RNA反转录产物中获得了803 bp的IL-8 cDNA序列。该序列包含159 bp的5'非编码区(UTR)和359 bp的3'非编码区(UTR)以及297 bp的开放阅读框(ORF), 可编码99个氨基酸。序列的3'UTR含2个mRNA不稳定基序, 在Poly A尾上游17 bp处有1个明确的Poly A加尾信号(AATAA)。预测的氨基酸结构含27个氨基酸组成的信号肽, 将信号肽切除可产生72个氨基酸组成的成熟肽, 预测成熟肽的分子量约为8.3 kD, 等电点为7.85。花鲈IL-8序列中用于形成二硫键的4个半胱氨酸保守, 前2个半胱氨酸被1个精氨酸分开, 形成CXC结构。与其他鱼类的IL-8相似, 花鲈IL-8序列中也缺乏哺乳类中存在的ELR基序, 而含有ELH结构。进化分析显示, 花鲈IL-8与从鱼类和哺乳类分离的IL-8有不同程度的同源性, 与硬骨鱼黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的进化关系最近, 其次为软骨鱼类, 与无颌类和哺乳类的分化较大; 而哺乳类的ELR结构可能为IL-8在进化过程中特化而成的结构, 以加强IL-8特异性的趋化能力。[中国水产科学, 2007, 14(2): 201-207]

关键词: 花鲈; 白细胞介素8; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)02-0201-07

白介素8(Interleukin 8, IL-8)又称嗜中性粒细胞激活因子(Neutrophil activating factor, NAF)或粒细胞趋化因子(Neutrophil chemotactic factor, NCF)属CXC型趋化性因子, 是最早发现的趋化性因子^[1]。在哺乳类动物中, 它由单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、上皮细胞和肥大细胞等多种细胞经炎症刺激后产生, 具有趋化和激活嗜中性粒细胞的能力, 包括吸引嗜中性粒细胞向炎症部位迁移, 并诱导其脱颗粒、释放溶菌酶, 启动呼吸代谢暴发, 增加细胞表面黏附分子的表达等多种功能, 在炎症发生和发展过程中起着重要作用^[2]。

近年来, 细胞因子已成为鱼类免疫学研究的重点。鱼类趋化性因子的研究近年来发展迅速, 目前已从无颌类七鳃鳗(*Lampetra fluviatilis*)^[3]、软骨鱼狗鱼(*Triakis scyllia*)^[4]和银鲛(*Chimaera phantasma*)^[5]、硬骨鱼牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[6]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[7]和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[8]等几种鱼类中分离到IL-8型趋化性因子的同源序列。对这些基因的成功克隆及其表达调

控和功能的研究丰富了鱼类免疫学的内容, 也促进了鱼类分子免疫学的快速发展。

花鲈(*Lateolabrax japonicus*)属于鲈形目(Cypriniformes)鱼类, 在中国南北方海域均有分布, 因其广温、广盐、适应性强、生长快、肉质细嫩, 适合于各种形式的养殖等特点, 成为中国重要的海水增养殖对象之一^[9]。本研究以花鲈作为研究对象, 对IL-8基因进行克隆, 研究花鲈IL-8基因序列的结构特征, 为研究该基因在炎症反应中的作用, 进一步探讨鱼类炎症反应的发生机理作前期研究。

1 材料与方法

1.1 总RNA的提取

取鲜活健康的花鲈(体质量约400 g)在实验室内暂养2 d后(水温约24℃, 气泵充气), 从胸腔注射脂多糖(Lipopolysaccharide, 10 μg/mL LPS/400 μL)。刺激6 h后, 解剖鱼体取出头肾约50 mg, 放入1 mL Trizol(Gibco, Japan)中进行匀浆, 按照试剂盒使用说明提取总RNA。

收稿日期: 2006-05-10; 修订日期: 2006-08-21.

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B20301023)。

作者简介: 邱丽华(1971-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事海洋生物分子生物学研究。E-mail: qiu902@tom.com

通讯作者: 江世贵。E-mail: jiangsg@21cn.com

1.2 cDNA 第一链的合成

取花鲈总 RNA 5 μg 与反转录引物 (oligo-dT 接头引物, 见表 1) 1 μL (10 pmol/L) 混合, 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后, 立即放置冰上, 然后加入 5 $\times$ Buffer 5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 混合液, RNase 抑制剂, M-MLV 反转录酶, 反应体系为 25 μL 。反应过程为 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 最后放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 IL-8 基因 cDNA 片段的克隆

以近源物种 IL-8 基因 CDS 序列的保守区设计的兼并引物 (dIL8F, dIL8R) 序列见表 1, 扩增片段大小约为 180 bp。

以上述合成的第一链 cDNA 作为模板, 用兼并引物进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 3 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , 10 nmol/L 引物 dIL8F 和 dIL8R 各 2 μL , Taq 酶 1.25 U, 用三蒸水将反应体系补充至 50 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$

变性 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 从凝胶中回收纯化目的产物。然后将纯化的 PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体中, 转化大肠杆菌 JM-109 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 提取质粒。经兼并引物 PCR 检测后, 将具有插入片段的质粒 DNA 用 M13 通用引物进行双向测序。

1.4 IL-8 cDNA 片段的同源性分析

测序结果用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性分析, 根据 Blast 分析结果判定扩增片段是否属于 IL-8 基因家族。

1.5 IL-8 cDNA 全序列的克隆

根据已得到的 cDNA 片段序列设计特异性引物 F1、F2、R1、R2 (表 1)。利用 cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid Amplification of cDNA ends, RACE) 对目的基因的 3' 和 5' 末端进行 PCR 扩增。

表 1 实验中所用引物序列

Tab.1 Oligonucleotide primers used in experiments

引物名称 Primer names	核酸序列 (5'→3') Nucleotide sequences
dIL8F	TGCCRCTGCATHGARAC
dIL8R	ACTTGTTVATGACYHTCTTVACCCA
F1	CTGATTCTGCGAAGTCCCA
F2	CCCACTGCGAGGAGACTGAG
R1	CTTTCTTGACCCAGGGAGCC
R2	TCTTCTTCAGAGTGGCAATG
oligo-dT 接头引物 Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC (T) ₁₆
接头引物 Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC
oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGGG

在 3'RACE 中, 利用半巢式 (Semi-nested) PCR 方法, 首先由 F1 和接头引物进行 PCR 反应, 所得产物稀释 50 倍后, 取 1 μL 作为模板, 利用 F2 和接头引物再进行 PCR 扩增。

在 5'RACE 中, 利用末端转移酶和 dCTP 在 cDNA 末端加上 poly (C) 尾后, 以加尾后的 cDNA 作为模板, 利用特异性引物 R1 和 Oligo-dG 进行第一次 PCR 扩增, 所得 PCR 产物取 1 μL 作为模板, 再利用 R2 和 Oligo-dG 进行第 2 次 PCR 扩增。

所得到的 PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳上进行分离检测, 将目的片段分离纯化后, 克隆到 pMD-18T 载体中, 转化大肠杆菌 JM-109 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 用 M13 通用引物对质粒 DNA 进

行测序。利用 Clustal W 软件将测序所得序列与兼并引物扩增所得的序列进行拼接。

使用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 对全长 IL-8 cDNA 的核苷酸和预测的氨基酸序列进行同源性分析。多序列比较采用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 程序进行。

1.6 序列分析

扩增序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST 软件进行; 多序列联配采用 CLUSTAL W 程序; 以 BLAST 2 软件进行序列拼接; 模体用 InterPro 软件查找; 信号肽查找用 SignalP 程序分析; 跨膜区用 TMpred 程序搜寻; 空间结构预测采用 Swiss-model

软件,模型查看用 Swiss-PdbViewer 软件;采用 CLUSTAL W 程序和 MEGA 2.1 软件,以邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建进化树。

2 结果与分析

2.1 IL-8 基因的克隆及序列分析

以相近物种 cDNA 序列的保守区设计的兼并引物在经刺激的花鲈 cDNA 上进行克隆,获得 180 bp 的扩增序列,序列测定结果经 BLAST X 分析表明,它与鱼类和哺乳类的 CXC 基因有很高的相似性,该序列包含 4 个半胱氨酸,其中前 2 个半胱氨酸被 1 个精氨酸分开,形成 CRC 结构,符合趋化性因子 CXC 家族的特征结构域。

根据扩增出的部分序列设计基因的特异性引物,采用 RACE 技术,扩增基因的 5'上游和 3'下游的序列。获得了 340 bp 的 5'端上游序列和 490 bp 的 3'端下游序列,这 3 段序列经拼接后获得 803 bp 的花鲈 IL-8 cDNA 序列 (图 1)。该序列含 159 bp 5'端 UTR,359 bp 的 3'端 UTR 以及 297 bp 的开放式阅读框,可编码 99 个氨基酸。预测其分子量为 8.3 kD,等电点为 7.85。序列分析显示,花鲈 IL-8 序列的

3'端 UTR 含 2 个在大多数细胞因子中都普遍存在的 RNA 不稳定基序 ATTTA 的结构,它在多余的 mRNA 降解中发挥作用;有 1 个典型的 polyA 加尾信号 AATAA,位于 polyA 上游 17 bp 处。预测的氨基酸序列含 27 个氨基酸组成的信号肽,在分泌后经剪切成为成熟肽;信号肽后方的 4 个氨基酸,在构成空间结构时成环,有利于它与受体结合^[10]。该序列包含 CXC 家族成员典型的 CXC 结构,但是缺乏受体结合位点 ELR 结构,其中的精氨酸被组氨酸取代,成为 ELH 结构。以 CLUSTALW 软件将花鲈 IL-8 氨基酸序列与已获得的脊椎动物 CXC 型趋化性因子进行对序列比对分析 (图 2),结果表明,与其他动物 CXCL-8 基因相比,花鲈 IL-8 cDNA 中的 4 个半胱氨酸都非常保守,序列 CrClqteskpI-gRhIeKVVeLiPanShCeetEIItlktgtgeVCLD 基本符合 CXC 亚家族的标签序列,C-x-C-[LIVM]-x(5,6)-[LIVMFY]-x(1,2)-[RKSEQ]-x-[LIVM]-x(2)-[LIVM]-x(5)-[STAG]-x(2)-C-x(3)-[EQ]-[LIVM](2)-x(9,10)-C-L-[DN]。

```

CCAAGAAAAGGAAAAGTAGAGAGAGTGAAGTCAAGTGAAGAATAAGGAATACAGAAGAAT 60
AAAAAAGTCTTTTACTTTTATACAGGCTTCATCAGACGGCTTTCTGAAGGGCATTTCATAT 120
CCTTAGTGATAATTTGTTGCAAAATTTGTAAGGCAAAATGAAGAGCAGCAGAGTGATT 180
                                     M K S S R V I 240
GTCACCTCTACTGTGGTGCTCCTGGCTTTCTTGGCCATCACTGAAGGGATGAGTCTGAGA 240
V T S T V V L L A F L A I T E G M S L R 27
AGCCTTGGAGTGGAGCTGCACTGCCGCTGCATTGAGACGGAGAGCAAACCCATCGGCCGC 300
S L G V E L H [C R C] I E T E S K P I G R 47
CACATTGAGAAGGTGGAGCTGATTCTGCCAACTCCCACTGCGAGGAGACTGAGATCATT 360
[H I E K V E L I P A N S H C E E T E I I] 67
GCCACTCTGAAGAAGACAGGCCAAGAAGTTTGCCTGGACCCGGAGGCTCCCTGGGTCAAG 420
[A T L K K T G Q E V C L D] P E A P W V K 87
AAAGTCATGAACAAGTTCCTGTCCAACAGAACACCCTGA 459
K V M N K F L S N R T P * 99
ACAGATCGGGAGAGATGTGTTTCATGAGTCTGAACAATTTCAAAGTACTAAAAAGTATTT 519
ATTTGATAGTCATCACACTCAATTTAATACAATCAACTGTCAATTTGATCAACTGTTGAA 579
AATGACAACAGAATTTACCAAGTAAGGTTATGTTTGTATCAAACATGTGTGTTAACAAGC 639
CTGTGCTTGTGTTGTATGTCACTTGTGTGTGTTACTGTGTATTCTTATCTATAACTTATTT 699
GCTTAAATATTTATTGATATATTTATGATGTAAATGTCAATTGTTTAGCTCTGCTGACA 759
ACCAATTGATTTAATAAAGTTTACCTAAAAAAGTAAAAA 803

```

图 1 花鲈 IL-8 的核酸和氨基酸序列

箭头指示信号肽切点;CXC 家族成员的标签序列以方框表示;方框加阴影代表特征的 CXC 基序;下划线代表 RNA 不稳定基序;下划线加阴影代表 Poly A 加尾信号;终止密码子以星号表示。

Fig.1 Nucleotide and amino acid sequences of IL-8 in *L. japonicus*

The arrow indicates signal peptide cutting site; CXC subfamily signature is in the box and CXC motif is in the highlighted box; RNA instability motif is underlined and polyadenylation signal sequence is highlighted and underlined; asterisk shows stop code.

黑 鲷	Black seabream	--MSS-RVFVATIVGLLAFLAISE----ASLGV	ELHRCRC	IQTESKPIG-RHIEKVELIPA	52
花 鲈	Sea perch	--MKSS-RVIVTSTVLLAFLAITEGMSLRSLGV	ELHRCRC	IETESKPIG-RHIEKVELIPA	57
河 豚	Rubripes	--MCS-RVFLTSLVLLAFLAISNGMSLRSLGV	EQHRCRC	IQTESRPIG-RHIGKVELIPP	56
牙 鲆	Flounder	--MSS-RVIVVAVMVLLASLAISEAVLSRLSGV	SLHRCRC	IETESRPIG-RYIKSVEIISP	58
鳕	Cod	MKMTSGKIPIGSLLVLLVLLTITEGRSLRGLGM	ELRCRC	IQTESRQIG-RHIGMVEIIPA	59
鲤	Carp	--MHC-KIFLVSVIVFLGFLTTEGMSLRGLGV	DPDRCRC	IETESRRIG-KHIESVELFPP	56
羊	Sheep	--MTS-KLAVALLAAFLSAAALCEAAVL	SRMSTELRCQC	IKTHSTPFHPKFIKELRVIES	57
猪	Pig	--MTS-KLAVAFVALLSAAALCEAAVLARV	ASLELRCCQ	IKTHSTPFHPKFIKELRVIES	57
猫	Cat	--MTS-KLVVALLAAFMLSAAALCEAAVL	SRISSELRCQC	IKTHSTPFNPKLIKELTVIDS	57
人	Human	--MTS-KLAVALLAAFLISAALCEAAVL	PSRAKSELRCQC	IKTYSKPFHPKFIKELRVIES	57
				.*:**.*.*	
黑 鲷	Black seabream	NSHC	EETEIIATLKRTGQEV	CLDPEAPWVKK-VIQKILSNARR-----	94
花 鲈	Sea perch	NSHC	EETEIIATLKKTGQEV	CLDPEAPWVKK-VMNKFLSNRTP-----	99
河 豚	Rubripes	NSHC	EETEIIATLKMMSGQEV	CLDPKAPWVKK-VINKIMSSRRP-----	98
牙 鲆	Flounder	NSHC	DKTEIIATLTKDTGVEL	CLDPEAPWVKK-VINKISKRRLSRWREMSEAV	109
鳕	Cod	NSHC	EETEIIATLKRTGQEV	CLDADAPWVKK-VIERMISRRH-----	101
鲤	Carp	SSHCK	DETEIIATLKSIGKEI	CLDPTAPWVKK-VIEKILANKAP-----	98
羊	Sheep	GPHC	ENSEIIVKLTN-GKEV	CLDPKEKVVQK-VVQAFLKRAEKQDP-----	101
猪	Pig	GPHC	ENSEIIVKLVN-GKEV	CLDPKEKVVQKVVQKIFLKRTEKQQQQQ-----	104
猫	Cat	GPHC	ENSEIIVKLVN-GKEV	CLDPKQKVVQK-VVEIFLKKAQKQNA-----	101
人	Human	GPHC	ANTEIIVKLVN-GREL	CLDPKENVVQR-VVEKFLKRAE-----	97
		** *	* * * * *	** *	

IL-8与花鲈的同源性虽然低于与哺乳类IL-8的同源性,但是其与花鲈间的遗传距离却比与哺乳类的遗传距离近,成为近系旁支。花鲈与哺乳类IL-8的遗传距离最远。进化分析显示,虽然花鲈IL-8基因

与鱼类和哺乳类其他类型的CXC趋化性因子的遗传距离较大,但是仍为进化上的近邻,显示它们都源于共同的祖先。

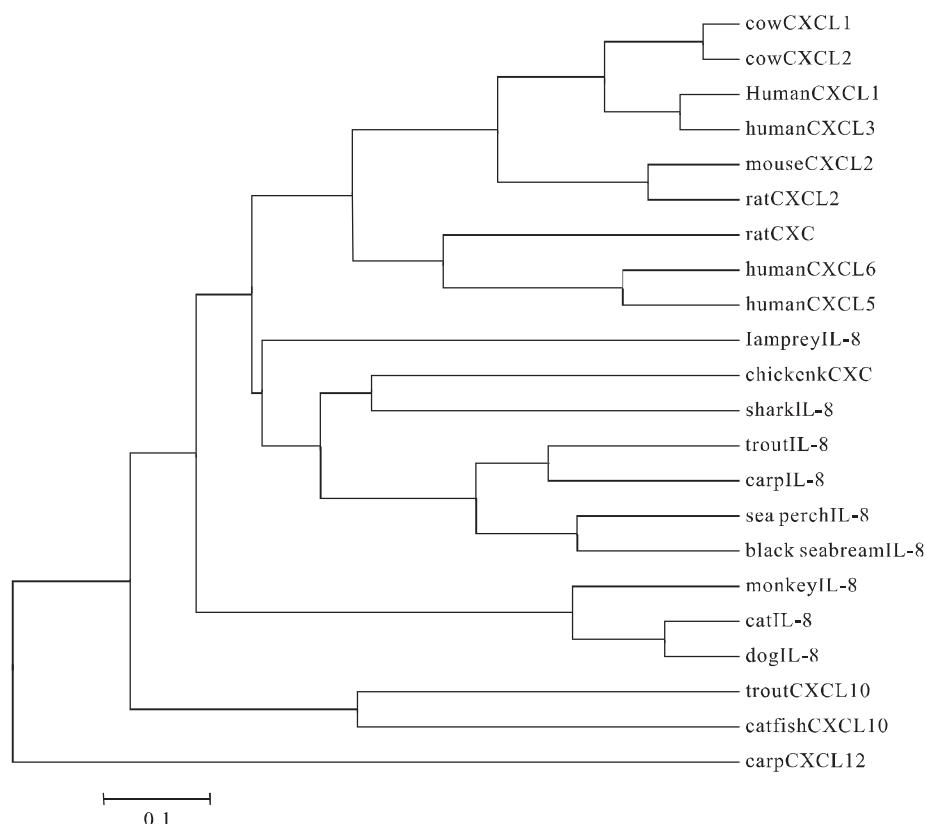


图4 以邻位相联法构建IL-8的系统进化树

使用CLUSTAL W程序和MEGA 2.1软件,以邻位相连法构建进化树。

Fig.4 Phylogenetic tree show relationship among full-length *Lateolabrax japonicus* IL-8 amino acid sequence with other representative CXC sequences

Sequences were aligned by CLUSTAL W program and phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining methods using MEGA version 2.1

3 讨论

本研究采用同源克隆技术,在经感染的花鲈cDNA上获得了803 bp IL-8的同源序列。一级结构分析显示,花鲈IL-8预测氨基酸结构中的前2个半胱氨酸被精氨酸分离形成CRC结构,符合CXC型趋化性因子的典型结构;该序列含有CXC型趋化性因子的标签序列。其空间结构预测显示其与哺乳类IL-8有相似的三维结构,具有N端的3个 β 折叠片和C端 α 螺旋结构,表明它是一种CXC型趋化性

因子。

相似性分析显示,该序列与硬骨鱼IL-8的相似性最高,其次为软骨鱼和鸟类的IL-8,与哺乳类和无颌类IL-8的相似性较低。它与其他类型的CXC型趋化性因子也有一定的相似性。虽然花鲈和其他硬骨鱼IL-8基因与无颌类的相似性低于与哺乳类的相似性,但是进化分析结果表明,硬骨鱼与无颌类的IL-8在进化上比哺乳类更近。其原因可能是因为现代鱼类与鸟类的IL-8基因从古无颌类分化出来的时候就已经发生替代突变,而哺乳类IL-8是在

此后才发生分化的^[6]。

与其他鱼类 IL-8 相似,花鲈 IL-8 在结构上也缺乏哺乳动物的 ELR 基序。该基序为哺乳类 IL-8 与其特异性受体结合的位点,与 IL-8 的特异性趋化粒细胞的功能相关。各种鱼类 IL-8 都缺乏该特异性基序可能与鱼类在进化上为低等的脊椎动物有关。IL-8 从无颌类开始已对炎性细胞具有趋化作用,但是早期的趋化因子可能在功能上尚未特化,表现为对所有炎性细胞都有相似的趋化作用^[11],而并不象在哺乳类中作用那么精确。在进化过程中,趋化性因子基因与其他类型的功能基因一样,产生功能的特异性分化,从而精确地定位被趋化的细胞^[1,3-6]。对各种鱼类 IL-8 基因的 CXC 前的基序研究佐证了这一观点,ELR 结构在花鲈中为 ELH,在虹鳟中为 DLR^[7,12],在牙鲆中为 SLH^[6],在银鲛中为 SLQ^[5],在软骨鱼狗鱼为 SLR,在无颌类七鳃鳗中为 GGR。可以假设该基序由 GGR→SLR (SLQ)→SLH→DLR (ELH)→ELR 等多次突变最终进化形成在哺乳类中有特殊意义的受体结合位点 ELR^[1,10]。同时,花鲈 IL-8 与多种其他类型的 CXC 因子都具有较高的相似性,表明它们有相同的起源。但是随着进化的历程,它们各自的结构与功能都发生了特化,进而产生较大的分化,成为具有特殊趋化作用的。

在分子水平上对从花鲈中获得的 IL-8 的分析可以证明它与哺乳类和其他鱼类 IL-8 同源。但是由于各种不同的趋化性因子的分子结构非常相似,具有相同的起源。因此,它是否具有与哺乳类 IL-8 相似的趋化功能,还有待于对其功能进行鉴定。

参考文献:

[1] Secombes C J, Wang T, Hong S, et al. Cytokines and innate im-

munity of fish [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 713-723.

[2] 龚非力. 基础免疫学 [M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1998: 116-157.

[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]. Eur J Immunol, 1999, 29: 375-382.

[4] Inoue Y, Haruta C, Usui K, et al. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 14: 275-281.

[5] Inoue Y, Endo M, Haruta C, et al. Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 269-274.

[6] 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: 237-243.

[7] Laing K J, Zou 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: 433-444.

[8] Huising M O, Stet R J Ma, Savellkoul H F J, et al. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish [J]. Dev Comp Immunol, 2004, 28 (5): 395-413.

[9] 庄虔增, 孙松山, 冯宝柱, 等. 海水鱼养殖技术 [M]. 山东: 山东科学技术出版社, 1997: 2-3.

[10] Herbert 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: 18 989-18 994.

[11] Laing K J, Bols N, Secombes C J. A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembled the closely related interferon-γ inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 [J]. Eur Cytokine Network, 2002, 13: 462-473.

[12] Sangrador A, Lenington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL-8 like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout by use of suppression subtractive hybridization [J]. Cytokine, 2002, 17 (2): 66-70.

Molecular cloning and characterization of interleukin 8 from Japanese sea perch *Lateolabrax Japonicus*

QIU Li-hua, JIANG Shi-gui, ZHANG Han-hua, YANG Keng, ZHOU Fa-lin

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Cytokines are low molecular weight proteins that serve as chemical messengers within the innate and adaptive immune systems. Closely related pro-inflammatory chemotactic cytokines, called chemokines, attract and activate specific types of leukocytes, such as lymphocytes and neutrophils. The chemokines are a superfamily of approximately 40 different small secreted cytokines that direct the migration of immune cells to sites of infection. To date, four different subfamilies of chemokines have been identified. The two major subfamilies, CC and CXC, are distinguished by the separation of the first two cysteines in their amino acid sequences by a single amino acid. Interleukin-8 (IL-8) is a CXC chemokine, which is also the first known chemokine, produced by monocytes/macrophages, fibroblasts, vascular endothelial cells, mast cells, epithelial cells and a wide variety of tissue cells, upon exposure to inflammatory stimulants. In this paper, an interleukin 8 (IL-8) homologue sequence was identified from Japanese sea perch *Lateolabrax Japonicus* based on homology cloning strategy. The cDNA sequence contained 159 bp 5'UTR, 359 bp 3'UTR and 297 bp open reading frame (ORF) which could translate a putative peptide of 99 amino acids including a signal peptide of 27 amino acids and the mature peptide of 72 amino acids with MW of 8.3 kD and PI of 7.85. There were 2 mRNA instability motifs and a polyadenylation signal in 3' UTR region. The putative peptide contained an IL-8 receptor binding site and four conserved cysteines which would involve in forming disulphide bonds and the first pair cysteines was separated by Arg and formed the IL-8 typical structure of CXC. Like other piscine IL-8 sequences, the sea perch IL-8 lack ELR motif upstream the CRC, and the third amino acid of Arg was substituted by His. The amino acids and nucleotides of this sequence shared the highest identity and similarity with the piscine IL-8 sequences, but it is very interesting that the similarity of sea perch IL-8 with lamprey was lower than that with mammals. Phylogenetic analysis showed that the ELR motif in mammalian may be typical evolved for chemotactic special cell from the ancient IL8. It is absent in lamprey and only has substitution in piscine IL-8. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 201 - 207]

Key words: *Lateolabrax japonicus*; interleukin-8; cloning and anylysis