

军曹鱼白细胞介素 1 β 基因的克隆、分析及表达

邱丽华^{1,2}, 冯 娟², 江世贵², 张汉华², 宋林生¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:采用同源克隆和锚定 PCR 技术, 从军曹鱼 (*Rachycentron canadum* Linnaeus) 中克隆到白细胞介素 1 β (interleukin-1 β) 基因 cDNA 的全序列。军曹鱼 IL-1 β 的 cDNA 全长 1 104 bp, 3' 非编码区 (UTR) 为 255 bp, 5' UTR 为 108 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 741 bp, 编码 246 个氨基酸, 分子量大约为 27.68 kD, 理论等电点为 5.71。同源性分析表明, 该序列与其他鱼类甚至哺乳动物的 IL-1 β 基因具有很高的相似性, 并含有白细胞介素家族的签名序列 (signature)。同时, 利用 RT-PCR 技术, 对特异性病原刺激下该基因在鱼体内的表达情况进行初步研究, 发现 IL-1 β 基因在鱼体的多种组织中都有表达, 而经过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后, 目的基因在组织中的表达明显增加, 但是在不同组织内的表达存在差异。研究显示, 军曹鱼 IL-1 β 基因存在组成型和诱导型 2 种表达调控机制, 在抵御病原感染过程中发挥重要作用。

关键词:军曹鱼; 白细胞介素 1 β ; 克隆; mRNA 表达

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0119-07

在研究老鼠和人类的免疫系统反应时人们发现了白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 基因^[1], 并开始对其进行深入研究。IL-1 β 是由单核细胞、巨噬细胞、朗氏细胞、树状细胞、内胚层和外胚层细胞、成纤维细胞及精液等多种细胞产生的一种重要的细胞因子。包括有丝分裂原、细胞因子和微生物产物在内的很多刺激都会引起 IL-1 β 基因的大量表达^[2-4]。IL-1 β 是一种多效的促炎细胞因子, 在炎症过程中起着重要的作用, 可以通过诱导淋巴细胞、相关组织细胞、血管内皮细胞和炎症反应效应细胞的生长和发育, 促进细胞调控免疫, 具有调节代谢作用、造血和免疫学活性, IL-1 β 作为免疫调控细胞因子具有增强免疫反应的潜力。随着对 IL-1 β 功能研究的不断深入, IL-1 β 已经开始作为治疗药物用于临床治疗各种不同的疾病^[5]。

近年来, 细胞因子的研究已成为鱼类免疫学研究的重点。目前, 大量证据已证明鱼类中存在类似 IL-1 β 基因功能的成分^[2-3, 6-7]。自从 1999 年 Zou 等^[8]利用同源克隆法从虹鲫 (*Oncorhynchus mykiss*) 中克隆到 IL-1 β 基因全序列后, 在短短的几年内, 许多鱼类的 IL-1 β 基因相继得到了克隆, 其中包括欧

洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[9]、金头鲷 (*Sparus aurata* L.)^[10]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[11-13] 及鲛鱼 (*Scydiorhinus canicula*)^[14] 等。这些基因的克隆成功及其表达调控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。

军曹鱼 (*Rachycentron canadum* Linnaeus) 俗称海鲷、鲸龙鱼, 分类属于鲈形目、军曹鱼科, 在全世界的热带、亚热带水域都有分布。近年来随着养殖规模的不断扩大, 病害问题日趋严重。本研究以军曹鱼作为研究对象, 对其重要免疫功能基因进行克隆, 并检测该基因在病原感染情况下的表达规律, 旨在深入探索鱼类的免疫防御机制, 并为寻找海水鱼类病害防治的新途径, 实现海水鱼类的健康养殖和可持续发展提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

取鲜活健康的军曹鱼 (体重约 200 g) 在实验室内暂养 2 d 后 (水温约 24 $^{\circ}$ C, 气泵充气), 从胸腔注射 200 μ L 脂多糖 (LPS 10 μ g/mL)。刺激 4 h 后, 解剖鱼体取出脾脏约 100 mg, 放入 1 mL Trizol (Gibco, Japan)

收稿日期: 2004-05-08; 修订日期: 2004-08-25。

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2003C20313); 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室开放基金项目; 广东省农业攻关项目 (2003B21502)。

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。

通讯作者: 宋林生, E-mail: lshong@ms.qdio.ac.cn

中进行匀浆,按照试剂盒使用说明提取总 RNA。

1.2 cDNA 第一链的合成

取军曹鱼总 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, 2.5 mmol/L dNTP 混合液, Ribonuclease Inhibitor, 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°C 保存备用。

1.3 IL-1 β 基因 cDNA 片段的克隆

从 GenBank 选取虹鳟 (Accession No. AJ223954)、金头鲷 (Accession No. AJ177166)、牙鲆 (Accession No. AB070835) 等物种 IL-1 β 基因的 CDS 序列,并

进行多序列比对分析,找出保守区域后,根据保守区域的核苷酸序列设计兼并引物 (ILFe、ILRe),序列见表 1,扩增片段大小约为 200 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,反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s;53 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。所扩增的 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,从凝胶中纯化回收目的产物。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 DNA。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。

表 1 实验中所用到的引物序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in this experiment

引物名称 Primer	核苷酸序列(5'→3') Nucleotide sequence
ILFe	GGGAAAGAATCTRTACCTGTCYTG
ILRe	GTGCTGATGAACCAGT
F1	CAGAGAATCGGCACAGACAG
F2	GGCACAGACAGCAGATAAGG
R1	CTGTCTGTGCCGATTCTCTG
R2	CACATCACCTGTCTTTTGCC
oligo-dT 接头引物 Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC(T) ₁₈
接头引物 Adaptor	GGCCACGCGACTAGTAC
oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGG(A/T/C)
β -actin F	ATCGTGCGGGGCGCCAGGCACC
β -actinR	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC
J1F	CTGCCAAAAGACAGGTGATG
J1R	TGTTGTATCCTTTGCTGTG

1.4 IL-1 β 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-1 β 基因家族。

1.5 cDNA 全序列的克隆及分析

根据已得到的 cDNA 片段序列设计特异性引物 F1、F2、R1、R2,序列见表 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。

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 OligodG 进行第 1 次

PCR 扩增,所得 PCR 产物取 1 μ L 作为模板,再利用 R2 和 OligodG 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后,将 PCR 产物纯化后,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 引物对质粒 DNA 进行测序,测序所得序列再与兼并引物扩增所得的序列利用 Clustal W 软件进行拼接。所用引物位置及所克隆到的序列的长度如图 1 所示。

使用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 对全长 cDNA 的核苷酸和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。

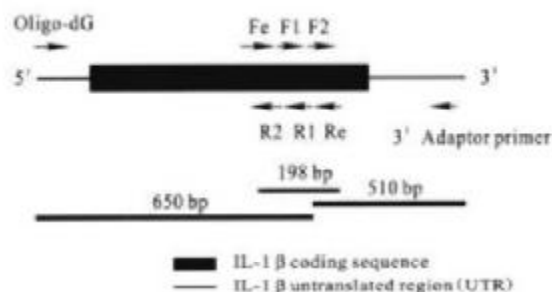


图1 扩增军曹鱼 IL-1 β cDNA 全序列中所用引物位点及扩增片段长度示意图

Fig.1 Position of primers (arrows) used to amplify IL-1 β cDNA of cobin and the products obtained

1.6 IL-1 β 基因在鱼体内的表达

用 LPS 刺激健康鲜活的军曹鱼 (3 条), 然后利用 RT-PCR 技术分别检测 IL-1 β 基因在鱼体内的表达情况。另取 3 条健康鲜活的军曹鱼作为对照。取头肾、脾脏、肝脏、脑、心脏和鳃等器官各约 100 mg, 按照前述方法提取总 RNA 后, 各反转录为 cDNA 第一链, 作为 RT-PCR 检测的模板。根据已克隆到的军曹鱼 IL-1 β 基因的表达序列设计一对特异性引物 (JIF, JIR) 对目的基因的 cDNA 进行特异性扩增, 通过 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。用 β -actin 基因作为内参照, β -actin PCR 扩增的引物分别为 β F, β R, 扩增 500 bp 左右的片段, 引物序列见表 1。PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 25 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

2 结果

2.1 IL-1 β 基因的克隆与特征分析

将 RACE-PCR 和同源克隆方法所克隆到的三段序列进行拼接后, 得到军曹鱼 IL-1 β 基因 cDNA 的全序列, 详见图 1。军曹鱼 IL-1 β cDNA 包含 104 个碱基, 开放阅读框 (ORF) 为 741 bp, 3' 非编码区 (UTR) 为 255 bp, 其中含有 3 个 RNA 不稳定模体 ATTTA (RNA instability motifs), 同时还含有 16 个碱基的 poly(A) 尾, 在 poly(A) 尾上游 12 bp 处可见 poly(A) 加尾信号 AATAA。5' UTR 为 108 bp。ORF 741 bp 可编码 246 个氨基酸, 分子量大约为 27.682 kD, 等电点为 5.71。军曹鱼 IL-1 β cDNA 核酸及相应氨基酸序列如图 2 所示。

InterPro 分析后发现, 在军曹鱼 IL-1 β 氨基酸序列 aa207 至 aa227 之间存在 IL-1 家族的签名序列 (signature) IMSAQFPDWFISTAKDDNKPV。在氨基酸序列中具有 3 个潜在的糖基化位点, 分别为 NVSE (aa8-11), SVTD (aa97-100) 及 NMST (aa132-135)。经 Signal P 软件分析后发现, 在军曹鱼 IL-1 β 序列中不存在信号肽, 这一点和其他已克隆到的 IL-1 β 基因类似。同时在序列中也未发现 ICE (interleukin-1 converting enzyme) 切割位点, 在迄今所克隆到的非哺乳类 IL-1 β 基因中均未发现此位点, 而在哺乳类是存在此氨基酸位点的。

2.2 同源性分析

军曹鱼 IL-1 β 基因的全长序列经 BLAST 分析发现与其他生物的 IL-1 β 基因具有较高的同源性。从蛋白对比结果可以看出, 军曹鱼的 IL-1 β 与其他鱼类的 IL-1 β 基因具有较高的同源性, 如大菱鲆 (相似性为 84%, E 值为 3e-94), 欧洲鲈 (相似性 80%, E 值为 2e-82), 牙鲆 (相似性 78%, E 值 8e-73), 花鲈 (相似性 77%, E 值 2e-79), 真鲷 (相似性 71%, E 值 2e-71) 等 (表 2)。同时发现与哺乳类 IL-1 β 同源性也较高, 如人 (相似性 51%, E 值 8e-18), 牛 (相似性 52%, E 值 2e-18), 绵羊 (相似性 51%, E 值 3e-17)。

根据军曹鱼及其他物种 IL-1 β 的氨基酸序列用 MEGA 2.1 软件构建了它们的系统树 (图 3)。在系统树上可以看出鲈形目鱼类的 IL-1 β 基因最为接近, 聚在一起, 军曹鱼、鲈和鲷科鱼类都属于鲈形目, 所以它们聚合在一起, 然后分别依次与鲷形目的牙鲆、大菱鲆及虹鳟、鲤鱼等鱼类聚在一起。而包括人、猴、猪等在内的哺乳动物及两栖动物等的 IL-1 β 聚为一枝。

```

C GGCATTAGNCAGGCAGAACCAACC ACTGACGATACAAGCTTAACCCAG 48
CACAGCAATACAACCTTTTCTCCATTGATCCACCAGGTCTCTCAATTCAGAAAAAG 108
ATGGATTCTGAGATGAAATGCAATGTTCAGCGAGATGCAGAGCCCCAAGATGCCAAAGGA 168
M D S E M K C N V S E M Q S P K M P K G 20
CTGGACTTGGAACCTCTCAATCATCCAAGTACAATGAGGCGCGTGGCCAACTCATCATC 228
L D L E L S N H P S T M R R V A N L I I 40
GGCATGGATAAGCTGAAGGCGCGGCATCAGAGTCAGTGTCTAAGCACCGAGTTCAGAGAT 288
G M D K L K A G A S E S V L S T E F R D 60
GAAAACCTGATAAAGTCATGCTGGAGAACATAATGGAAGAGCATGTTGTGCTTGAACCT 348
E N L I N V M L E N I M E E H V V L E L 80
GGCTCAGCTCCACCAGTTCAATTCAGCAGGACAGGGGAGTACCAGTGCAGCGTGACCGAC 408
G S A P P V Q F S R T G E Y Q C S V T D 100
AGTGAGCAGAGGAGCTTAGTCTGAACCAAAACAACGTTGAGCTCCATGCAGTGATGTG 468
S E Q R S L V L N Q N N V E L H A V M L 120
CAGGGAGGCAGTGACAACCACAAAGTGATCTGAACATGTCAACTTATGTGCACCTTCA 528
Q G G S D N H K V Y L N M S T Y V H P S 140
CCAGCACCAGGGTCAGAACCTGTGGCTCTGTGCATTAAGGGAACAAACCTGTACCTGTCC 588
P S T R V R P V A L C I K G T N L Y L S 160
TGCCAAAAGACAGGTGATGTGCTGTGCTGCACTGTAAGGCAGTGGAGGACAAAAGCAGT 648
C Q K T G D V P V L H L K A V E D K S S 180
CTGCAGAGAATCGGCACAGACGCGATAAGGTGCAATTTCTGTCTACAAGCGGACAGT 708
L Q R I G T D S D K V Q F L F Y K R D S 200
GGGCTGAACCTCAGCACCTCATGTCTGCCAGTTCCCTGACTGGTTCATCAGCACAGCA 768
G L N L S T L M S A Q F P D W F I S T A 220
AAGGATGACAACAAGCCAGTGGAAATGTGCAACGAGACTGACAACCGCTACCGAACCTTC 828
K D D N K P V E M C T E T D N R Y R T F 240
AACATCCAGCTCAGAGTTAA 849
N I Q R Q S * 247
AACCTGTTAACATACAAAAGTGGAGTGTGTGATGGGGCCAGTTTGTCTTCTTATTGAC 909
ATAGTCAAGTTCCACCACAAGGTGACATTGTTGTGCTGACTGGTAGGCACCATGTTGATG 969
CTTTTGTCTATTATTATCTATTAATGCAACATTTTAAATATCTATTATTATTGAAAT 1029
GAGCTTACAACAATTATTAAATATGTTCAGTGAATCTTTAAATAAGCTTTATGTCCA 1089
AAAAAAAAAAAAAAAA 1104

```

图2 军曹鱼 IL-1 β cDNA 序列及相应的氨基酸序列

注:起始密码子(ATG),终止密码子(TAA)及 IL-1 家族签名序列用阴影标出, poly(A)加尾信号 AATAA, mRNA 不稳定模体(ATTTA)用下划线标出,糖基化位点用黑体标出。

Fig.2 Compiled full-length IL-1 β cDNA sequence

Note: The start and stop codons or the IL-1 family signature are in highlighted; the potential glycosylation sites are shown in bold print. The putative polyadenylation signal (AATAAA) and RNA instability motif (ATTTA) in the 3' UTR are underlined.

表2 军曹鱼 IL-1 β 基因与其他已知 IL-1 β 基因的蛋白同源性比对结果Tab.2 Homology of IL-1 β protein of cobia with other known IL-1 β molecules

物种 Species	相似性/% Similarity	密度/% Density	E	注册号 Accession number
<i>Homo sapiens</i>	51	31	8e-18	P01584
<i>Bos taurus</i>	51	32	3e-17	P21621
<i>Ovis aries</i>	52	32	2e-18	X54796
<i>Danio rerio</i>	56	32	2e-26	AY340959
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	72	55	3e-66	AJ223954
<i>Sparus aurata</i>	71	55	4e-68	AJ177166
真鲷 <i>Pagrus major</i>	71	58	2e-71	AY257219
花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	77	62	2e-79	AY383480
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	78	60	8e-73	AB070835
欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	80	62	2e-82	AJ311925
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	84	68	3e-94	AJ295836

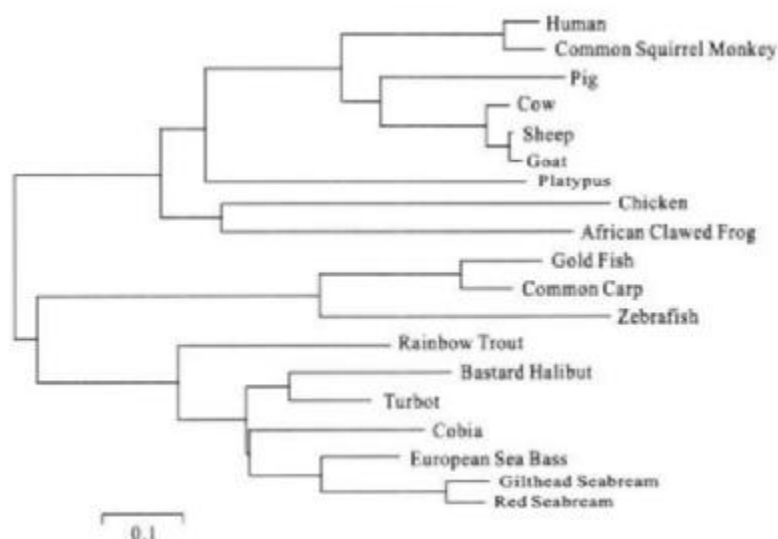


图3 利用Clustal X1.83 和MEGA2.1 软件构建的IL- 1β 基因氨基酸序列的系统树
(所用氨基酸序列来自于GenBank)

Fig.3 Phylogenetic tree of full length IL- 1β gene amino acids sequences in different groups with program Clustal X1.83 and MEGA2.1 using neighbor-join method
(The used amino acid sequences were from GenBank)

2.3 IL- 1β 基因在体内的表达情况

选择 β -actin作为参照,利用RT-PCR技术对军曹鱼IL- 1β 基因在鱼体内的表达情况进行检测。通过 β -actin的PCR扩增来调节各个组织的cDNA模板量,使各个组织在相同模板量(即cDNA)的前提下进行PCR扩增。用特异性引物(JIF, JIR)进行PCR反应,扩增220 bp片段,检测IL- 1β 基因在不同组织中的表达情况(图4)。

军曹鱼IL- 1β 在包括头肾、肝脏、脾脏、脑、鳃及心脏等不同组织中都有不同程度的表达,但存在差异。头肾、脾脏、肝脏、鳃和心脏中可见明显表达,而在脑中的表达较弱。比较LPS刺激前后IL- 1β 的表达情况可以发现,在LPS刺激后,IL- 1β 在所检测的组织中除心脏表达未见明显变化外,其余组织的表达量都有明显的增加,尤其是脑中的表达量明显提高。

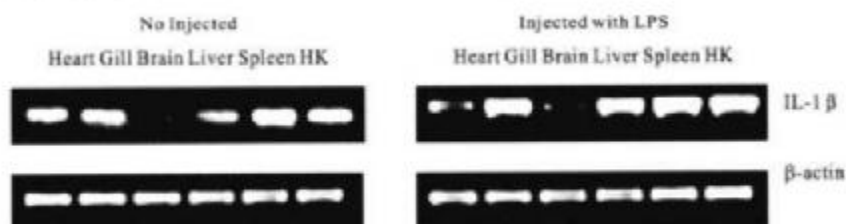


图4 军曹鱼IL- 1β 基因在不同组织内的表达情况

Fig.4 *Cobia* IL- 1β expressions in different tissues of fish HK head-kidney

3 讨论

IL- 1β 在高等动物的免疫防御及抗感染调控方面具有广泛的生物学活性,这一点在临床上已经开始得到证实^[6]。近年来,随着基因克隆及重组技术

的发展,人们已经从低等脊椎动物鱼类中克隆得到了IL- 1β 基因,并对其功能开始进行系统研究。自从留英学者Zou^[8]用同源克隆法从虹鳟中克隆到IL- 1β 基因后,国际上已经开始对其他鱼类的IL- 1β 基因进行深入的研究,而在我国目前对鱼类细胞因

子的研究还处于刚起步阶段。

本研究选取具有重要经济价值的海水养殖鱼军曹鱼为研究对象,采用同源克隆法及锚定 PCR 法,对军曹鱼 IL-1 β 基因进行分离与克隆,获得了军曹鱼 IL-1 β 基因的 cDNA 全序列。经 BLAST 同源性分析后发现与其他已知鱼类的 IL-1 β 基因具有较高的同源性,达到 70% 以上。与哺乳类动物的 IL-1 β 也具有一定的同源性(与人 IL-1 β 的相似性为 51%, E 值为 8e-18),表明所克隆到的序列是 IL-1 β 的同源序列^[15]。同时在氨基酸序列中的 aa207~aa227 存在 IL-1 家族的签名序列^[1] IMSAQFPDW-FISTAKDDNKPV,相似性达到 84%。经 CLUSTW 软件进行多序列比对后发现,此序列正位于所有已知 IL-1 β 基因序列的保守区域内。由此可以表明从军曹鱼中克隆到的这段 cDNA 序列是 IL-1 β 家族的成员。

在氨基酸同源性比对中还发现,在相对保守的区域内含有 β -trefoil 细胞因子的 12 β 折叠特性的二级结构,同时在成熟肽序列中所存在的 IL-1 家族的签名序列,刚好跨越 β 折叠区域,这些则意味着军曹鱼 IL-1 β 蛋白或许也是 β -trefoil。同其他物种 IL-1 β 序列类似,在军曹鱼的 IL-1 β 基因序列中未发现明显的信号肽。至今所克隆到的非哺乳类 IL-1 β 中,都不存在 ICE 切点,而在哺乳类中则通过此位点被 ICE 切割后释放功能成熟肽^[16-17]。另外,通过软件分析军曹鱼 IL-1 β 从 Ala⁸³ 形成一个 163aa 的预测成熟肽,但是否分子前体从此处断裂,而预测形成的成熟肽是否具有生物学活性,以及其释放动力学作用目前还不十分清楚,还需进一步研究。

作为参与天然免疫的重要细胞因子,IL-1 β 基因在鱼类中的表达和调控也是相当复杂的。从表达试验中可以看出军曹鱼 IL-1 β 基因在对照组及刺激组中的组织中都可以表达,这点同金头鲷及青蛙相似^[10,16],而与虹鳟及欧洲鲈的报道则不同^[9,18],后者不存在组成型表达。军曹鱼 IL-1 β 基因存在组成型和诱导型 2 种表达模式。LPS 刺激后 4 h,在其头肾、脾脏及肝脏的表达明显增强,尤其是在脑中的表达已清晰可见。这说明 IL-1 β 参与了机体对病原刺激的应答过程,在机体抗感染防御中发挥重要作用。军曹鱼 IL-1 β 具有一定的组织特异性,在部分器官中呈组成型表达,但同时还可以通过诱导加强,可见该基因在体内的表达表现为组成型和诱导型并存的表达方式。在军曹鱼 IL-1 β 基因的 3' UTR 中存在

3 个 ATTTA 不稳定模体,意味着该基因在免疫反应中是相当活跃的。

参考文献:

- [1] Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30: 1 075-1 079.
- [2] Scapigliati G, Bird S, Secombes C. Invertebrate and fish cytokines[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2000, 11: 354-361.
- [3] Dinarello C. The biological properties of interleukin-1[J]. *Eur Cytokine Netw*, 1994, 5: 517-531.
- [4] Secombes C J, Wang T, Hong S, et al. Cytokines and innate immunity of fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25: 713-723.
- [5] Bird S, Zou J, Wang T, et al. Evolution of interleukin-1 β [J]. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 2002, 13: 483-502.
- [6] McDevitt M, Wang H, Knobelmann C, et al. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice[J]. *J Periodontol*, 2000, 71: 156-163.
- [7] Marc Y, Engelsma M O, Willem B. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 87: 467-479.
- [8] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin 1 β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ICE cut site[J]. *Cytokine*, 1999, 11: 552-560.
- [9] 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 Immunol*, 2001, 11: 711-726.
- [10] Pelegri P, Garcia-Castillo J, Mulero V, et al. Interleukin-1 β isolated from a marine fish reveals up regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines[J]. *Cytokine*, 2001, 16: 67-72.
- [11] Fujiki K, Shin D, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor subunit and serum amyloid A[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 229-242.
- [12] Engelsma M, Stet R, Schipper H, et al. Regulation of interleukin-1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25: 195-203.
- [13] Yin Z, Wang J. Carp interleukin-1 in the role of an immune-adjuvant[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10: 375-378.
- [14] Bird S, Wang T, Zou J, et al. The first cytokine sequence within cartilaginous fish: interleukin-1 β in the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) [J]. *J Immunol*, 2000, 168 (7): 3329-3340.
- [15] Juel A, Ardy B. Searching DNA databases for similarities to DNA sequences: when is a match significant? [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(4): 349.
- [16] 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: 332-338.
- [17] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunik S, et al. Identification of prokaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites [J]. Protein Eng, 1997, 10: 1-6.
- [18] Zou J, Holland J, Pleguezuelos O, et al. Factors influencing the expression of interleukin-1 β in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24: 575-582.

Molecular cloning and expression analysis of Interleukin-1 β from cobia *Rachycentron canadum* Linnaeus

QIU Li-hua^{1,2}, FENG Juan², JIANG Shi-gui², ZHANG Han-hua², SONG Lin-sheng¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: IL-1 β is a pleiotropic proinflammatory cytokine with a wide spectrum of inflammatory, metabolic, hematopoietic and immunological activities and is responsible for the symptoms of sickness during the host response to infection. IL-1 β is produced by many cell types, including monocytes, macrophages, langerhans cells, dendritic cells, endothelial, epithelial cells and fibroblasts, even in sperm. Tremendous progress has been made in gene cloning of cytokines from fish in recent years, especially TNF α and IL-1 β et al. Several evidences provided by biological cross reaction have strongly suggested that interleukins exist in fish. IL-1 β bioactivity has been known in fish for over a decade, but only since 1999, IL-1 β gene has been cloned in a number of teleost species and at the same time confirmed those initial findings. To date most analysis has been made on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*) genes. More recently, seabass (*Dicentrarchus labrax*), seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*), dogfish (*Scyliorhinus caniculus*) and catshark (*Scyliorhinus canicula*) IL-1 β genes have been cloned and sequenced.

The techniques of homology cloning and anchored PCR were used to clone the IL-1 β gene from cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus). The full length cDNA of IL-1 β is 1 104 bp, containing a 5' untranslated region (UTR) of 108 bp, an ORF of 741 bp, a encoding polypeptide of 246 amino acids with an estimated molecular mass of 27.68 kD, and a 3' UTR of 255 bp. The searches for nucleotides and protein sequence similarities with BLAST analysis indicated that the deduced amino acid sequence of cobia IL-1 β was homologous to the IL-1 β in other fish species and even the mammalian. Conserved signature sequences of IL-1 β gene family and several potential glycosylation sites were found in the cobia IL-1 β deduced amino acid sequence. Analysis with the Signal P software revealed that there was no signal peptide in the sequence, which was common with the other known IL-1 β molecules. Just as other nonmammalian IL-1 β genes sequenced to date, the sea perch IL-1 β lacked an aspartic acid in cut region of mammalian IL-1 β which was required for cleavage by ICE (interleukin-1 converting enzyme).

The temporal expressions of IL-1 β gene in cobia were measured by semi-quantitative RT-PCR. The mRNA transcripts of IL-1 β could be detected in most of the examined tissues including head-kidney, spleen, liver, brain, gill and heart. The IL-1 β expression in most of examined tissues of cobia was up-regulated by the stimulation of LPS, but the expression varied in different tissues. The expression was the highest in kidney. The result indicated that sea perch IL-1 β was a constitutive and inducible acute-phase protein that play a critical role in the host-pathogen interaction.

Key words: *Rachycentron canadum*; interleukin-1 β ; cloning; mRNA expression

Corresponding author: SONG Lin-sheng. E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn