

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16343

淇河鲫 IL-8 原核表达系统的构建及多克隆抗体的制备与鉴定

王俊丽^{1,2}, 陈金顶¹, 卢荣华^{3,4}, 雒燕婷², 聂国兴^{3,4}

1. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;

3. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007;

4. 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007

摘要: 为揭示淇河鲫(*Carassius auratus* var. *Qihe*)白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)的功能, 本研究构建了原核表达系统, 并制备了兔抗鲫 IL-8 多克隆抗体。首先采用 RT-PCR 法扩增淇河鲫 IL-8 基因编码序列中不含信号肽的基因片段, 克隆到 pET-32a(+)载体后转化入 Rosetta 菌株构建原核表达系统。经 IPTG 诱导表达出相对分子质量约 27.8 kD 的目标融合蛋白。将纯化的融合蛋白免疫家兔制备多克隆抗体, 效价达 1:10⁵。经免疫亲和层析纯化的抗体能特异性识别重组和天然的淇河鲫 IL-8 蛋白。比较不同组织的免疫组化和荧光定量 PCR 结果, IL-8 蛋白量和 mRNA 的表达量在不同组织间变化趋势一致, 在肌肉、脾和头肾均检测到较高的表达量, 肠道的表达量较低。本研究为进一步探讨淇河鲫 IL-8 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 淇河鲫; 白细胞介素-8; 原核表达系统; 多克隆抗体; 组织表达; 免疫组化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-0970-07

白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8/CXCL8)属于趋化因子 CXC 亚家族, 由 Yoshimura 等^[1]于 1987 年首次从脂多糖刺激的人血单核细胞培养上清液中获得。人类 IL-8 是一种多细胞来源的小分子多肽, 在炎症反应、免疫应答及创伤愈合等过程中具有重要作用^[2], 也与肿瘤的发生、血管生成、转移和复发等过程密切相关^[3]。除人类外, 很多哺乳动物、鸟类、两爬类及鱼类的 IL-8 分子结构也已得到阐明。虽然对鱼类 IL-8 功能的研究还不深入, 但现有资料显示其与人类和其他脊椎动物 IL-8 一样, 在免疫反应中发挥重要作用, 不仅可诱导头肾和外周血白细胞的迁移, 还可刺激这些细胞的增殖^[4]。另外, IL-8 有望成为鱼类 DNA 疫苗的佐剂。Jimenez 等^[5]将虹鳟 IL-8 与出血性败血症病毒(haemorrhagic septicemia virus, VHSV)糖蛋白基

因的 DNA 疫苗一起注射, 可调节疫苗引起的早期免疫反应中细胞因子的表达。因此, 深入开展鱼类 IL-8 功能的研究, 不仅可以揭示其在鱼类先天性免疫反应中的作用机制, 还有望为鱼类传染病的防治工作提供新的研究方向。淇河鲫(*Carassius auratus* var. *Qihe*)为天然三倍体雌核发育鲫, 因原产于豫北的淇河而得名, 是河南省特有的鲫生态类型^[6]。本课题组在前期的工作中阐明了淇河鲫 IL-8 的基因和蛋白结构^[7]。成熟的淇河鲫 IL-8 蛋白为 76 个氨基酸残基组成的小分子多肽, 肽链的 N 端含有 4 个保守的半胱氨酸残基, 前两个半胱氨酸由 1 个精氨酸分隔, 形成典型的 CXC 结构。在此基础上, 本研究采用基因工程技术构建了淇河鲫 IL-8 原核表达系统, 并利用表达的融合蛋白免疫家兔, 制备了抗 IL-8 多克隆抗体, 以期为进一步

收稿日期: 2016-11-18; 修订日期: 2017-01-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372545); 河南省高校科技创新团队支持计划项目(14IRTSTHN013); 河南省科技计划基金项目(142300410159); 河南省教育厅科学技术重点研究项目(14A180007); 河南省自然科学基金项目(162300410165).

作者简介: 王俊丽(1971–), 女, 副教授, 研究方向为动物营养与免疫. E-mail: wangjunli1971@126.com

通信作者: 聂国兴(1971–), 教授, 研究方向为水产动物营养与饲料学. E-mail: niegx@htu.cn

一步揭示淇河鲫 IL-8 的生物学特性及其在鱼类免疫反应中的作用提供必要的研究工具。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器设备

1.1.1 材料 健康淇河鲫由河南师范大学水产养殖基地提供, 体重约 250 g; 健康新西兰大白兔购自新乡市场, 体重 2~3 kg。大肠杆菌 JM-109、Rosetta 和 pET-32a(+) 质粒由本实验室保存; pGEM-T 质粒购自 Promega。

1.1.2 试剂 总 RNA 提取试剂、第一链 cDNA 合成试剂盒、Premix Taq® Version 2.0、T4 DNA 连接酶、EcoR I、Hind III、DNA marker、蛋白 marker、IPTG 购自宝生物工程(大连)有限公司; PurePlasmidMini Kit 购自康为世纪生物科技有限

公司; CNBr-4B、氨苄青霉素、氯霉素、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂为 Sigma 产品; 牛血清白蛋白购自 Genview; 羊抗兔 IgG(H+L)/HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色剂为北京索莱宝科技有限公司产品。其他试剂均为国产分析纯。引物(表 1)合成委托英潍捷基(上海)贸易有限公司。

1.1.3 仪器 T100 Thermal Cycler PCR 仪(Bio-Rad 公司); Multiskan Ascent 温控酶标仪; MB100-2A 微孔板恒温振荡器; NanoDrop 2000 微量分光光度计(Thermo 公司); ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥机(Christ 公司); 2-16PK 高速冷冻离心机(Sigma 公司); Axio Scope A1 荧光显微镜(Zeiss 公司); LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司)。

表 1 实验中所用引物
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物 primer	核苷酸序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 function
IL-8-F1	CGGAATTCGGAATGAGTCTTAGAGGACTG	目的基因的克隆(下划线为 EcoR I 酶切位点) clone of target gene (underline shows restriction site of EcoR I)
IL-8-R1	CCAAGCTTTCATGGGGCTTTGTTGGCAAT	目的基因的克隆(下划线为 Hind III 酶切位点) clone of target gene (underline shows restriction site of Hind III)
IL-8-F2	CCCTGAAGATAACTGGGAAAGAG	荧光定量 real-time PCR
IL-8-R2	TCCACAGATGACCTTGACATTC	荧光定量 real-time PCR
actin-F	CAAAGCCAACAGGGAGAAGA	内参引物 internal control primer
actin-R	CACCGGAGTCCATCACAATAC	内参引物 internal control primer

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体构建 根据淇河鲫 IL-8 cDNA 序列^[7](GenBank 登录号: KC184490), 设计引物 IL-8-F1 和 IL-8-R1(表 1)扩增 IL-8 基因。PCR 产物(长度 228 bp)与载体 pGEM-T 连接并转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆菌株, 测序验证目的基因序列[英潍捷基(上海)贸易有限公司]。经 EcoR I 和 Hind III 双酶切的目的基因片段和 pET-32a(+)(酶切体系见表 2)通过 T4 酶连接(连接体系见表 3), 转化大肠杆菌 Rosetta, 经筛选和单、双酶切鉴定, 获得含有重组质粒 pET-32a(+)-IL-8 的原核表达系统(工程菌)。

1.2.2 IL-8 融合蛋白的表达及纯化 将构建的 IL-8 原核表达系统接种于 TB 培养基, IPTG 诱导

表达。扩大培养后收集菌体, 破菌后离心, 收集上清, SDS-PAGE 电泳后将目的蛋白条带切下, 从中分离纯化重组蛋白。具体纯化方法: 将目的条带剪碎, -20℃预冷 48 h, 然后放入冷冻干燥机冻干 48 h, 冻干后立即研磨成粉, 适量生理盐水溶解, 离心取上清, 微量分光光度计测定蛋白溶液浓度。

1.2.3 IL-8 多克隆抗体的制备和纯化 以纯化的重组蛋白溶液作抗原, 采用皮下多点注射法免疫新西兰大白兔, 免疫量为 300 μg/(只·次), 共免疫 3 只兔子; 以未经免疫的兔子为阴性对照。初次免疫 2 周后, 进行第一次加强免疫, 之后每 2 周加强免疫 1 次。抗体效价达 1 : 10⁵ 以上时, 颈动脉取血, 凝固后收集血清。

表 2 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切反应体系
Tab. 2 Reaction system of *EcoR* I and *Hind* III double digests

试剂 reagent	使用量 dosage μL
10×M buffer	3
<i>Hind</i> III	2
<i>EcoR</i> I	2
pGEM-T-IL-8 或 pET-32a(+)	8
dd H ₂ O	15
总体积 total volume	30

表 3 T4 酶连接反应体系
Tab. 3 Reaction system of T4 ligation

试剂 reagent	使用量 dosage μL
pET-32a(+)	13
IL-8	4
10×T4 buffer	2
T4 ligase	1
总体积 total volume	20

参照 Santana 等^[8]的方法纯化多克隆抗体：用溴化氰活化的 Sepharose 4B(CNBr-4B)免疫亲和层析法纯化抗体，在偶联缓冲液(0.1 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.4)中将纯化的重组蛋白偶联至 CNBr-4B，未反应的组分用 0.1 mol/L Tris(pH8.0)洗脱。然后将 PBS(pH 7.4)稀释过的抗淇河鲫 IL-8 兔血清过柱(4℃孵育过夜)，PBS 冲洗柱料后用 0.1 mol/L 的甘氨酸缓冲液(pH 2.5)洗脱。洗脱液用 1 mol/L 的 Tris(8.0)中和后-20℃保存。

1.2.4 抗体的活性检测 采用 ELISA 检测抗体效价，参考聂国兴等^[9]的方法检测抗血清中的抗体效价，用纯化的重组蛋白溶液(10 μg/mL，包被液稀释)包被酶标板，以纯包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)作空白对照，4℃过夜；37℃封闭 2 h(0.5% BSA)后加不同稀释度的抗血清(1：10²、1：10³、1：10⁴、1：5×10⁴、1：10⁵、1：5×10⁵、1：10⁶、1：5×10⁶)及阴性对照血清(未免疫兔血清)，37℃孵育 2 h；HRP 标记的羊抗兔二抗 37℃孵育 1 h；TMB 显色 15 min，测定 A_{450nm} 值。效价判定标准为免疫血清吸光值大于 0.2，且(免疫血清吸光值 - 空白吸光值)/(阴性对照吸光值 - 空白吸光值)大于 2，判定为“+”，否则为“-”，以结果为“+”的最大稀释倍数作为待测血清的效价。

Western Blot 检测抗体特异性 将诱导过表达 IL-8 融合蛋白的工程菌和含空载体的细菌裂解，取上清进行 SDS-PAGE 电泳后转膜；5%脱脂奶粉(W/V, TBST 配制)室温封闭 2 h；纯化的兔抗鲫 IL-8 多克隆抗体作为一抗(封闭液稀释)，4℃孵育过夜，TBST 洗涤 3 次；HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗(封闭液稀释)，室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次；DAB 显色。

1.2.5 多克隆抗体的应用 淇河鲫组织 IL-8 的免疫组化检测：对淇河鲫头肾、脾、肠、肌肉等组织的切片(片厚 5 μm)进行免疫组化染色，加入 3% 的过氧化氢 20 min；山羊血清 37℃封闭 30 min；纯化的兔抗鲫 IL-8 多克隆抗体孵育(4℃过夜)；二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG)孵育 30 min；DAB 显色；苏木精伊红复染。

淇河鲫组织 IL-8 的 Western Blot 检测：取淇河鲫头肾、脾、肠、肌肉等组织，匀浆后离心，取上清进行 Western Blot 分析。方法同上。

淇河鲫组织 IL-8 mRNA 表达丰度的检测：采用荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测 IL-8 mRNA 的组织表达，比较 IL-8 蛋白与 mRNA 的组织表达丰度是否一致。荧光定量引物及内参(金鱼 β-actin 基因)引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 原核表达系统的构建和鉴定

利用带 *EcoR* I(IL-8-F1)和 *Hind* III(IL-8-R1)酶切位点的特异性引物进行 PCR 扩增，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，在 250 bp 附近有一条明显的条带(实际长度为 228 bp)，经测序证明该条带为目的基因片段。将构建的重组质粒进行 *EcoR* I 单酶切和 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定，证明目的基因片段已插入质粒载体，含有 pET-32a(+)-IL-8 重组载体的原核表达系统(工程菌)构建成功。

2.2 IL-8 重组蛋白的诱导表达与鉴定

以含空质粒 pET-32a(+)的细菌和无 IPTG 诱导的工程菌为对照，检测淇河鲫 IL-8 重组蛋白的表达情况。结果如图 1 所示，与其他组相比，经 IPTG 诱导的工程菌可高效表达一种分子量为 27.8 kD 的融合蛋白，与预计的目的蛋白分子量相吻合。

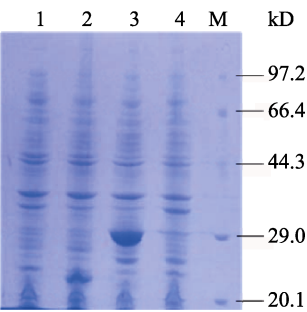


图 1 IL-8 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱
M. 蛋白 marker; 1. 含空质粒的细菌(经 IPTG 诱导); 2. 含空质粒的细菌(未经 IPTG 诱导); 3. 经 IPTG 诱导的工程菌; 4. 未经 IPTG 诱导的工程菌.

Fig. 1 Electrophoretogram of IL-8 recombinant protein
M. Protein marker; 1. *Escherichia coli* with empty plasmid (induced by IPTG); 2. *Escherichia coli* with empty plasmid (not-induced by IPTG); 3. Engineering bacteria induced by IPTG; 4. Engineering bacteria not-induced by IPTG.

2.3 多克隆抗体的活性分析

第一次加强免疫和第三次加强免疫后, 分别对兔子进行耳缘静脉取血及抗血清效价检测, 均检测到一定效价的抗体, 且第三次效价远高于第一次, 于是进行了第 4 次加强免疫, 并于免疫后 10 d 对兔子进行了颈动脉取血, 收集血清。每只兔子约制备了 15~25 mL 抗血清。经 ELISA 检测, 3 只免疫兔的抗血清效价接近, 且都达到 $1:10^5$ 。

经 Western Blot 检测, 工程菌经诱导表达的蛋白与纯化的多克隆抗体形成了一条特异性免疫条带, 而含空载体的细菌与抗体没有反应性(图 2)。说明制备的多克隆抗体与原核表达的淇河鲫 IL-8 发生特异性结合反应。

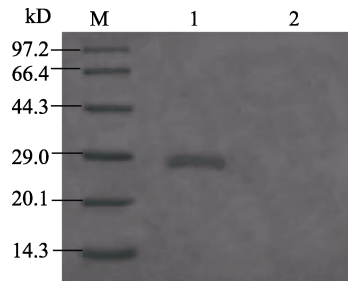


图 2 多克隆抗体与淇河鲫重组 IL-8 的特异性结合 (Western Blot 检测)

M. 蛋白 marker(kD); 1. 工程菌蛋白;
2. 含空质粒细菌蛋白.

Fig. 2 Specific combination of the polyclone antibody with the IL-8 recombinant protein(Western Blot analysis)
M. Protein marker; 1. Proteins expressed by engineering bacteria; 2. Proteins expressed by *Escherichia coli* with empty plasmid.

2.4 多克隆抗体的应用

免疫组化结果(图 3)显示抗体有较高的特异

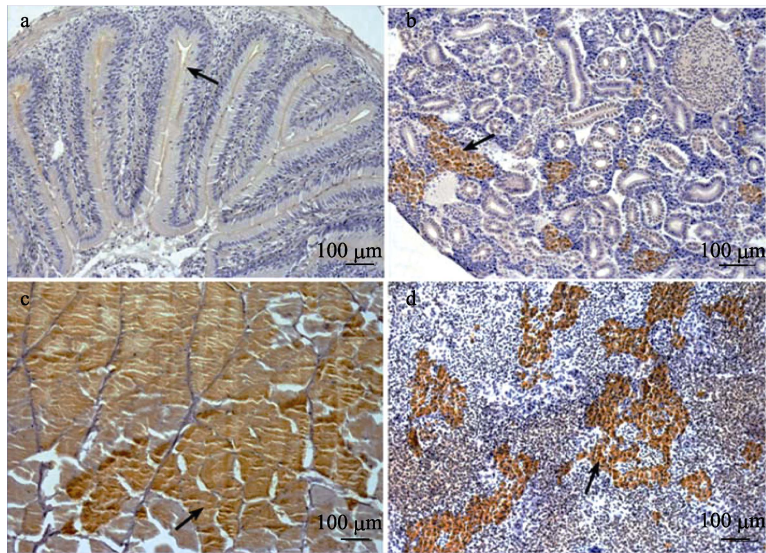


图 3 多克隆抗体对淇河鲫不同组织 IL-8 的免疫组化检测
箭头所指棕黄色即为阳性染色; a、b、c、d 分别为肠、头肾、肌肉和脾(200×).

Fig. 3 Immunohistochemistry detection of IL-8 in different tissues of *Carassius auratus* var. *Qihe*
The claybank indicated by arrows is the positive staining. a, b, c, and d represent the gut, headkidney, muscle and spleen, respectively (200×).

性和灵敏度,可检测出淇河鲫 IL-8 蛋白的组织分布和组织表达差异。在检测的 4 种组织中,肌肉中表达量最高,在肌纤维束的横切面上可见阳性染色密集分布;其次是脾,阳性染色呈片状分布;头肾的阳性染色主要分布在外周区的弥散性淋巴组织内,呈团块状;肠道的表达量最少,只在绒毛基部有少量阳性染色。qRT-PCR 法检测的 IL-8 mRNA 组织表达差异见图 4,肌肉中的表达量最高,其次为脾和头肾,说明正常情况下,淇河鲫 IL-8 的组织表达在转录和翻译水平上是一致的。

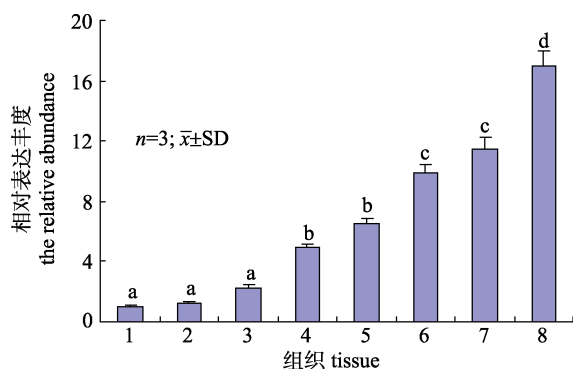


图 4 淇河鲫不同组织 IL-8 mRNA 相对表达丰度

1. 肝胰脏; 2. 肠; 3. 心脏; 4. 鳃; 5. 脑; 6. 头肾; 7. 脾; 8. 肌肉。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 The relative abundance of IL-8 mRNA expressed in different tissues of *Carassius auratus* var. *Qihe*
1. Hepatopancreas; 2. Intestine; 3. Heart; 4. Gill; 5. Brain; 6. Head kidney; 7. Spleen; 8. Muscle. Different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$).

免疫印迹法只在肌肉组织中检测到一条非常微弱的条带,其他组织均未检测到(图 5)。

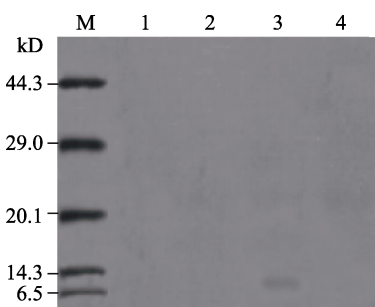


图 5 多克隆抗体对不同组织 IL-8 的 Western-Blot 检测
M. 蛋白 marker; 1. 头肾; 2. 脾; 3. 肌肉; 4. 肠。

Fig. 5 Western Blot detection of IL-8 in different tissues
M. protein marker; 1: headkidney; 2: spleen; 3: muscle; 4: gut.

3 讨论

自从 1999 年 Najakshin 等^[10]从七鳃鳗(*Lampetra fluviatilis*)克隆出第一个鱼类 IL-8 分子,迄今已有几十种鱼的 IL-8 基因及其产物相继被鉴定,但研究主要集中在结构分析及基因表达方面,对其功能及在疾病防治中的应用研究远落后于哺乳类。只在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[11]、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)^[12]、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)^[4]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[13]、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[14-15]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[16]和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[17]等鱼类中开展了重组 IL-8 蛋白的研究。这些研究表明,鱼类 IL-8 也是一种促炎因子,可促进细胞迁移和炎症发生,并能引发靶细胞的呼吸暴发和过氧化物的产生。为研究 IL-8 在淇河鲫免疫反应中的作用,本实验构建了可高效表达淇河鲫 IL-8 的原核表达系统。因 IL-8 为小分子多肽,其开放阅读框只有 297 bp^[7],所以选取其基因的编码序列全长作为目的基因。该系统表达的重组蛋白以可溶形式存在于菌体内,蛋白纯化后不需复性。本研究制备的淇河鲫 IL-8 多克隆抗体经 Western Blot 鉴定,能特异识别原核表达的淇河鲫 IL-8 融合蛋白。为进一步鉴定该抗体能否识别内源性 IL-8,笔者利用免疫组化法和 Western Blot 对淇河鲫肌肉、头肾、脾和肠进行了检测。免疫组化结果非常理想,不仅可以清晰地分辨 IL-8 在被检组织的分布情况,还可明显看出在肌肉中的表达量最高,其次是脾和头肾。运用 Western Blot 除在肌肉中检测到 1 条非常微弱的条带,其他组织均未检测到,其原因可能是组织中的 IL-8 占总蛋白的比例比较低^[18],经电泳再转膜后膜上的 IL-8 条带非常微弱,导致二抗标记的 HRP 不能催化底物产生显著的颜色。为比较 IL-8 的组织分布是否在转录和翻译水平上一致,笔者还对多种组织的 IL-8 基因表达进行了荧光定量,结果表明淇河鲫各组织 IL-8 的基因表达水平与蛋白表达量基本一致。目前关于鱼类 IL-8 组织表达的研究主要集中在 mRNA 的组织表达丰度,本研究首次利用构建的

多克隆抗体, 检测到淇河鲫 IL-8 蛋白在不同组织的分布和表达情况。

本研究构建了 IL-8 原核表达系统及特异性多克隆抗体, 为深入研究淇河鲫 IL-8 的功能和生物学特性提供了有用的工具。

参考文献:

- [1] Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim J J, et al. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin-1 (IL-1)[J]. *J Immunol*, 1987, 139(3): 788–793.
- [2] Lotti F, Maggi M. Interleukin 8 and the male genital tract[J]. *J Reprod Immunol*, 2013, 100(1): 54–65.
- [3] Chen Y, Chen L, Li J Y, et al. ER β and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote the invasion of breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(5): 497–511.
- [4] Sun J S, Zhao L, Sun L. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(6): 1362–1367.
- [5] Jimenez N, Coll J, Salguero F J, et al. Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Vaccine*, 2006, 24(27–28): 5615–5626.
- [6] Li X J, Liu Y Y. Discussion on development and research progress of *Carassius auratus* in Qihe River[J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(6): 93–96. [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]
- [7] Wang J L, Luo Y T, Hao G, et al. Cloning and tissue expression analysis of the interleukin-8 gene from crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(9): 282–289. [王俊丽, 雒燕婷, 郝光, 等. 淇河鲫 IL-8 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(9): 1281–1289.]
- [8] Santana P, Palacios C, Narváez E, et al. Anti-peptide antibodies: A tool for detecting IL-8 in salmonids[J]. *Electron J Biotechnol*, 2012, 15(5): 1–5.
- [9] Nie G X, Wang B, Yan X, et al. Expression of *sglt1* gene in *Cyprinus carpio* and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(3): 329–335. [聂国兴, 王贝, 闫潇, 等. 鲤鱼肠道 *sglt1* 基因的表达与抗体制备[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 329–335.]
- [10] 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(2): 375–382.
- [11] Harun N O, Zou J, Zhang Y A, et al. The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8[J]. *Dev Comp Immunol*, 2008, 32(6): 673–681.
- [12] Cai Z, Gao C, Zhang Y, et al. Functional characterization of the ELR motif in piscine ELR⁺CXC-like chemokine[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(4): 505–512.
- [13] Hu Y H, Chen L, Sun L. CXCL8 of *Scophthalmus maximus*: Expression, biological activity and immunoregulatory effect[J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35(10): 1032–1039.
- [14] Li C, Yao C L. Molecular and expression characterizations of interleukin-8 gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(3): 799–809.
- [15] Mu Y, Wang K, Ao J, et al. Molecular characterization and biological effects of a CXCL8 homologue in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 44(2): 462–470.
- [16] Kurato O, Wada S, Matsuyama Y, et al. N-terminal region is responsible for chemotaxis-inducing activity of flounder IL-8[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 38(2): 361–366.
- [17] Wang T T, Song X H, Bao G M, et al. Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35(5): 1421–1432.
- [18] Cao X T, Ye T X, Du P. Progress in basic research on cytokines and cytokine network[J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Immunology*, 1990, 10: 230–237. [曹雪涛, 叶天星, 杜平. 细胞因子和细胞因子网络的基础研究进展[J]. *国外医学: 免疫学分册*, 1990, 10: 230–237.]

Construction of prokaryotic expression system for IL-8 of *Carassius auratus* var. *Qihe* and preparation of polyclonal antibody

WANG Junli^{1,2}, CHEN Jinding¹, LU Ronghua^{3,4}, LUO Yanting², NIE Guoxing^{3,4}

1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

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

3. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

4. Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Xinxiang 453007, China

Abstract: Interleukin-8 (IL-8), a chemokine that participates in the early inflammatory process, plays a key role in mediating resistance to infection in animals. However, there has been no information about IL-8 at the protein level for characterizing the regulatory role of this molecule during the immune response in fish. In this work, we constructed a prokaryotic expression system and prepared a polyclonal antibody against IL-8 of Qihe crucian carp (*Carassius auratus* var. *Qihe*). The coding region without a signal peptide sequence was first amplified and cloned into pET-32a(+), a prokaryotic expression plasmid. The recombinant plasmid was then transformed into *Escherichia coli* Rosetta. A soluble fusion protein was expressed after induction by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. The purified protein was detected as a single band by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, with a predicted molecular mass of 27.8 kD, suggesting that the prokaryotic expression system for IL-8 of Qihe crucian carp was successfully constructed. The purified recombinant protein was used as an immunogen to raise polyclonal antibodies in New Zealand rabbits. The serum antibody titer reached $1 : 10^5$, as detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. The antibody was purified by affinity chromatography and had a high binding activity and specificity for the recombinant protein antigen, as measured by Western Blot. Immunohistochemistry results showed that the polyclonal antibody can also specifically bind to endogenous IL-8 in crucian carp tissues. Comparing the results of immunohistochemistry with that of fluorogenic quantitative polymerase chain reaction, the expression of IL-8 was consistent between the protein and mRNA levels, and its expression ranked among tissues as follows: muscle > spleen > head kidney > intestine. This study provides a material basis for further research on the role of IL-8 in the immune response of *Carassius auratus* var. *Qihe*.

Key words: *Carassius auratus* var. *Qihe*; interleukin-8; prokaryotic expression system; polyclonal antibody; tissue expression; immunohistochemistry

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