

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220418002

http://www.yykxjz.cn/

王琳, 王滨, 徐永江, 关长涛. 黄条鲮白介素-1 $\beta$ 基因克隆及其免疫应答分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 64–73  
WANG L, WANG B, XU Y J, GUAN C T. Two putative interleukin-1 beta molecules involved in the immune response of *Seriola aureovittata*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 64–73

# 黄条鲮白介素-1 $\beta$ 基因克隆及其免疫应答分析\*

王琳<sup>1,2</sup> 王滨<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1,2</sup>① 关长涛<sup>1,2</sup>

(1. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所) 山东 青岛 266071;  
2. 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能研究室 山东 青岛 266237)

**摘要** 白介素-1 $\beta$ 是一种典型的促炎细胞因子,参与调控免疫细胞增殖、分化和凋亡等过程。本研究从黄条鲮(*Seriola aureovittata*)中鉴定到2个白介素-1 $\beta$ 分子(分别命名为*SalL-1 $\beta$ 1*和*SalL-1 $\beta$ 2*)。*SalL-1 $\beta$ 1*全长cDNA序列为1292 bp,开放阅读框长度为828 bp,编码275个氨基酸;*SalL-1 $\beta$ 2* cDNA序列为1337 bp,开放阅读框长度为960 bp,编码319个氨基酸。*SalL-1 $\beta$ 1*和*SalL-1 $\beta$ 2*编码的蛋白均含有IL-1保守的结构域和12个 $\beta$ 折叠,具有结构上的保守性。组织表达分布显示,*SalL-1 $\beta$ 1*在头肾中表达量最高,脾脏和肝脏次之;而*SalL-1 $\beta$ 2*在鳃中表达量最高,头肾和脾脏次之。脂多糖(LPS)刺激后,*SalL-1 $\beta$ 1*和*SalL-1 $\beta$ 2*在头肾和脾脏中的表达量均显著增加。在头肾中,LPS刺激后6 h,*SalL-1 $\beta$ 1*急剧上升至对照组的10.03倍( $P<0.05$ ),随后逐渐回落,在12、24、48、72 h分别为对照组的7.15、4.09、2.71、3.03倍( $P<0.05$ );在刺激后6 h,*SalL-1 $\beta$ 2*表达量急剧上升至对照组的11.49倍( $P<0.05$ ),最后逐渐回落,48 h恢复至正常水平,72 h下降至对照组的0.29倍( $P<0.05$ )。脾脏中,LPS刺激后6 h,*SalL-1 $\beta$ 1*表达量急剧上升至对照组的6.59倍( $P<0.05$ ),随后逐渐回落;*SalL-1 $\beta$ 2*转录水平表达模式与*SalL-1 $\beta$ 1*相似。综上,本研究在黄条鲮中鉴定了2种白介素-1 $\beta$ 分子,并探讨了其在免疫应答中的表达规律,为研究白介素-1 $\beta$ 分子在黄条鲮抗菌免疫中的作用提供了基础。

**关键词** 白介素-1 $\beta$ ; 免疫应答; 细胞因子; 黄条鲮

**中图分类号** Q71 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0064-10

白介素-1(IL-1)家族是调节免疫系统炎症反应的重要细胞因子,在哺乳动物中,该家族包含IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-1Ra、IL-36Ra、IL-38和IL-17等11个成员(Wang *et al.*, 2013),按功能主要分为三类,分别为具有促炎活性的细胞因子、天然受体拮抗剂和抗炎细胞因子(Dinarelo, 2018)。IL-1 $\beta$ 作为一个典型的促炎细胞因子,广泛存在于后生动物中,在病原感

染引起的免疫防御中发挥重要作用。哺乳动物成熟的IL-1 $\beta$ 蛋白由IL前体和IL1两个结构域构成,12个 $\beta$ 折叠片折叠形成三叶草状结构,其C-末端含有IL-1家族的特征基序(Dinarelo, 2013)。正常情况下,IL-1 $\beta$ 以无活性的前体形式存在于细胞基质中,当接收到外界刺激信号后,IL-1 $\beta$ 前体经半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)特异性切割,形成具有生物学活性的成熟

\* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM300001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD51; 2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。王琳, E-mail: wanglin@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-04-18, 收修改稿日期: 2022-05-09

IL-1 $\beta$ , 通过非经典分泌途径从细胞中释放出来(Wewers *et al*, 1997)。IL-1 $\beta$ 与受体结合后,通过衔接蛋白髓样分化因子(MyD88)激活下游的白介素1受体相关激酶(IRAKs)和肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF6),调控核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)等转录因子的激活,进而在机体免疫应答、炎症响应、代谢调节、肿瘤转移等一系列生理过程中发挥作用(Dinarelo, 2018)。

IL-1 $\beta$ 的结构和功能在进化中较为保守。目前,已在多种鱼类中鉴定出IL-1 $\beta$ 基因,且发现在新真骨鱼亚群、原棘鳍总目等鱼类中存在1个以上的IL-1 $\beta$ 亚型(Engelsma *et al*, 2003; Zou *et al*, 1999)。溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)、神经坏死病病毒(VNNV)和寄生性血内鞭毛虫(*Trypanoplasma borreli*)感染能够引起鱼类IL-1 $\beta$ 表达响应(Wu *et al*, 2015; Pleguezuelos *et al*, 2000; Wu *et al*, 2019)。个体注射重组IL-1 $\beta$ 蛋白能够增强鱼类单核/巨噬细胞迁移和吞噬活性,抑制细菌增殖(Gao *et al*, 2019; Hong *et al*, 2003)。在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中使用重组IL-1 $\beta$ 作为佐剂可增强疫苗注射后的免疫应答,提高抗体效价(Guo *et al*, 2018; Taechavasonyoo *et al*, 2013)。

黄条鲮(*Seriola aureovittata*)肉质鲜嫩,具有极大的消费市场潜力(Wang *et al*, 2021)。目前,黄条鲮的人工繁育和养殖技术已日渐成熟,但其疾病防控技术尚待完善(Purcell *et al*, 2018)。本研究通过RACE克隆获得黄条鲮SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的cDNA全长,并基于序列特征进行了生物信息学分析,进而通过荧光定量PCR(qRT-PCR)技术对SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的组织分布和免疫应答模式进行了探究,以期黄条鲮疾病综合防控技术提供基础信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用黄条鲮(平均体重约430 g)于实验1周前购自辽宁省大连富谷水产有限公司,置于18~25℃、盐度20~23、pH 8.0~8.3的无菌海水中暂养,期间持续充氧,并投喂商品化基础饲料以维持良好状态。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物刺激实验、样品收集** 将40尾黄条鲮随机等分为2组,MS222麻醉后称重,实验组按照1  $\mu$ g/g体重注射脂多糖(LPS),对照组注射磷酸盐缓冲液(PBS),分别于6、12、24、48、72 h后每组随机取4尾鱼,解剖取头肾和脾脏组织,保存于液氮中,

用于总RNA提取。此外,取对照组黄条鲮的脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃组织保存于液氮中,用于基因克隆和组织表达分析。

**1.2.2 总RNA提取和cDNA合成** 采用Trizol法提取上述黄条鲮各组织样品总RNA。通过琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,使用NanoDrop2000定量并调整至相同浓度备用。以黄条鲮9个组织混合RNA为模板,使用SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa),按照说明书操作步骤分别合成5'RACE及3'RACE cDNA,用于基因片段克隆。使用Primer Script<sup>TM</sup> RT Master Mix试剂盒(TaKaRa)将黄条鲮LPS刺激实验的组织RNA分别反转录为cDNA,用于不同组织及LPS不同时期基因表达情况的检测。

### 1.2.3 SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2基因的克隆与测序

根据NCBI基因组数据库中注释的基因序列信息,使用Primer Premier 5.0软件设计SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的特异引物(表1),并利用ExTaq高保真酶进行扩增。扩增体系(25  $\mu$ L): ExTaq酶0.15  $\mu$ L, cDNA模板1  $\mu$ L, 正反向引物各1  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 2.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.85  $\mu$ L。反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸3 min 40 s, 35个循环。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收目的条带连接T载体并转化至克隆菌pMD19-T,挑取阳性单克隆菌株,送生工生物(上海)股份有限公司进行测序。

**1.2.4 基因序列分析** 利用DNAMAN对SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的氨基酸序列进行序列比对;利用SMART软件预测SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的蛋白结构域;利用在线蛋白分析软件(<https://www.expasy.org>)预测蛋白分子量和等电点;通过SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2蛋白的三级结构;通过NCBI查找相关脊椎动物IL-1氨基酸序列(表2),利用SeaView4软件(Gouy *et al*, 2010)采用最大似然法构建进化树。

**1.2.5 qRT-PCR** 根据SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2序列设计qRT-PCR引物,选用18S rRNA作为内参基因进行qRT-PCR扩增。反应条件: 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 45 s, 40个循环。每个待测样品均设置3次重复,保证准确性。实验得到的数据采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法处理数据,经计算得到SaIL-1 $\beta$ 1和SaIL-1 $\beta$ 2的相对表达量(Schmittgen *et al*, 2008)。

**1.2.6 数据分析** 本实验所涉及数据的差异性分析均利用SPSS软件,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行比较。所有数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)(n=3)表示, P<0.05为差异显著。

表1 本研究用到的引物序列

Tab.1 Nucleotide sequence of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
SaIL-1 $\beta$ 1-F1	TTCACTCTCATCAGTCTACATCAGG	SaIL-1 $\beta$ 1 核心序列扩增
SaIL-1 $\beta$ 1-R1	GTACCCTCAGCATCTGGATACATTA	SaIL-1 $\beta$ 1 core sequence
SaIL-1 $\beta$ 2-F1	CAGACCTTCTCAATTCAGAAAAAG	SaIL-1 $\beta$ 2 核心序列扩增
SaIL-1 $\beta$ 2-R1	CCAAATTAGTTACAAGGCTTATTA	SaIL-1 $\beta$ 2 core sequence
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Universal primer
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	Universal primer
SaIL-1 $\beta$ 1-R334	GGCGTCCGCAACCGTCTTCACAAC	5'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 1-R220	GTTACCCGCCATCACCAGCGTAGC	5'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 1-F197	GCTACGCTGGTGATGGCGGTGAAC	3'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 1-F385	CACCCTGAGCGACACCCAGAAGAA	3'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 2-R761	GGGTGCCAGTCTACATTCAGTAAGGGG	5'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 2-R416	GTGCTGGGTAAAGGTGGCAAGTAGGT	5'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 2-F735	CCCCTTACTGAATGTAGACTGGCACCC	3'RACE, 1st
SaIL-1 $\beta$ 2-F227	GTGCTTTTCAAATCCACCAAGTCAGTT	3'RACE, 2nd
SaIL-1 $\beta$ 1-F2	GTCACTCTGAAAGGAGGATACGCCG	qRT-PCR
SaIL-1 $\beta$ 1-R2	GACGCAGGAGAGGTAGAACTTGTGG	
SaIL-1 $\beta$ 2-F2	TGGAGACAGTGGAGGACAAAAGC	qRT-PCR
SaIL-1 $\beta$ 2-R2	AGGGAAGGAGGCAGACATGAAAG	
18S-F	TACCACATCCAAAGAAGGCA	内参基因
18S-R	TCGATCCCAGATCCAACCTA	Reference gene

## 2 结果

### 2.1 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 的编码序列分析

以黄条鲷脑、肝脏和肌肉等混合组织为模板,扩增得到候选白介素基因序列,分别命名为 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2*, *SaIL-1 $\beta$ 1* 基因全长 cDNA 为 1 292 bp, 其中, 5'UTR 为 25 bp, 3'UTR 为 439 bp, 编码区长度为 828 bp, 编码 275 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 30.75 kDa, 理论等电点为 6.14 (图 1)。SMART 保守结构域分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 第 121~268 个氨基酸区域构成 IL-1 结构域(图 3a)。*SaIL-1 $\beta$ 2* 基因全长 cDNA 序列为 1 337 bp, 其中, 5'UTR 为 122 bp, 3'UTR 为 255 bp, 编码区长度为 960 bp, 编码 319 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 36.66 kDa, 理论等电点为 6.40 (图 2)。SMART 保守结构域分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 第 91~245 个氨基酸区域构成 IL-1 结构域(图 3b)。通过 SWISS-MODEL 网站预测获得, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 蛋白均为由 12 个  $\beta$  折叠构成的三叶草结构(图 4)。

### 2.2 氨基酸多序列比对与系统进化分析

*SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 蛋白序列与其他物种的同源性分析显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 与高体鲷(*Seriola dumerili*,

XP\_022625284.1)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*, XP\_035481228.1)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*, KAE8285371.1)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP\_005457944.1)蛋白的相似性分别为 87.04%、53.01%、50.55%和 47.58%。*SaIL-1 $\beta$ 2* 与高体鲷(BAT57261.1)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*, AZL87291.1)、大菱鲆(XP\_035496710.1)和大黄鱼(KAE8291795.1)蛋白的相似性分别是 97.25%、77.43%、65.18%和 60.16%。氨基酸多序列比对揭示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 的 C 端均含有 IL-1 超家族典型的 [FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-P-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM]基序(图 5)。进化树分析结果表明, 脊椎动物 IL-1 $\beta$  蛋白分为两支, 哺乳动物、爬行动物和鸟类聚为一支, 鱼类聚为一支, *SaIL-1 $\beta$ 1* 与高体鲷 IL-1 $\beta$  亲缘关系较近, *SaIL-1 $\beta$ 2* 与卵形鲳鲹 IL-1 $\beta$  亲缘关系较近(图 6)。

### 2.3 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 在不同组织中的表达分布

通过 qRT-PCR 检测 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在黄条鲷脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃中的表达水平。结果显示, 9 种组织中均检测到 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 转录水平表达。其中, *SaIL-1 $\beta$ 1* 在头肾中表达量最高, 脾脏和肝脏次之, 随后依次是鳃、心脏、胃、垂体、肌肉和脑(图 7a)。*SaIL-1 $\beta$ 2* 在

```

aagc agt ggt atc aac gca gag tac atg gga gtc tac atc agg aca atg tgc gac ttt gat 61
          M G V Y I R T M C D F D 12
ctg gct caa gct ctg gac agt cct ctg gga ttc gac gat aca gga cct gaa tcc cgc tgc 121
L A Q A L D S P L G F D D T G P E S R C 32
ttc gac atg acg gat gtt aaa aaa gag atc atc aac ctc gac acg gga ctg aac ctg gag 181
F D M T D V K K E I I N L D T G L N L E 52
att tcc tgc aac cca aaa acc atg aag agc gtc gct acg ctg gtg atg gcg gtg aac agg 241
I S C N P K T M K S V A T L V M A V N R 72
atg aaa aag tcc ccg act cgc agc agc tgg gag ctg aga ggc gac gag ctc tgc agc gtg 301
M K K S P T R S S W E L R G D E L C S V 92
atc atg gac agc ctg gtg gac gaa acg gtt gtg aag acg gtt gcg gac gcc acc acg gga 361
I M D S L V D E T V V K T V A D A T T G 112
cag aga agc atc aag ttc gta cgc gcc cga agc gag gag tgc acc ctg agc gac acc cag 421
Q R S I K F V R A R S E E C T L S D T Q 132
aag aaa gac atc atc tgc acc ccg gga gat tta aaa ctg cag gcc gtc act ctg aaa gga 481
K K D I I C T P G D L K L Q A V T L K G 152
gga tac gcc gat cgc aaa gtg aat ttt aaa ctg gtg aag tac atc tcc att ggt gcc ggg 541
G Y A D R K V N F K L V K Y I S I G A G 172
cag acg ttt gtt ctg tca atc aaa aat gac cac agc cac aag ttc tac ctc tcc tgc gtc 601
Q T F V L S I K N D H S H K F Y L S C V 192
aag aac agc aac aat gct gag ctg cat ctg gag gaa tgc agt gag gac gat ata aga aac 661
K N S N N A E L H L E E C S E D D I R N 212
gac atg gac cgt ttc ctc ttc gaa aag aaa tta tca gga aaa tct cag acc agc ttc gag 721
D M D R F L F E K K L S G K S Q T S F E 232
tcc gtt aag cac cgc ggc tgg ttc atc agc acg tct gag agc gag aac cag cca gtg gag 781
S V K H R G W F I S T S E S E N Q P V E 252
ctg tgt caa ata gac agc gcc cag cgt gtc acc tcc ttc aac gtc agc tca aaa aag cct 841
L C Q I D S A Q R V T S F N V S S K K P 272
ctg att ggc tga agc agc tgt gta cag tta cag ttt aat gta tcc aga tgc tga ggg tac 901
L I G * 275
ttt tta ttt taa aac ttt ttt att tta cct gac ccc tag atg gag taa tcc cct gca gga 961
tga taa taa ttc agt gta acc tac taa aag aga ctt taa ctt tat att att tta ccc tga 1021
ggc aaa atg atg tga aat ttg tat ttt ttt tac tgg gga atg taa cag gat att cct aaa 1081
atc tgc ttc cat ttt taa tta tta ttt ccc ctt aac tta act tca tta ttg att gtc cgt 1141
tgt tac taa ata tgc cat tgt cat ttt taa gtg cat gta aaa aat tac gtt att att tgc 1201
tgt ttt aat aaa cat caa ata tgt gtt tgt tta aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa 1261
aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa a 1292
    
```

图 1 黄条鲮 *SalL-1 $\beta$*  基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列  
 Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SalL-1 $\beta$*  in *S. aureovittata*

小写字母为核苷酸序列, 大写字母为推导的氨基酸序列, 阴影表示起始密码子和终止密码子;  
 下划线表示保守结构域; 双下划线表示 polyA 信号。

Lowercases indicate the nucleotides, and uppercases indicate the amino acids. Shadow indicates the start and stop codons.  
 Underline indicates the conserved domain. Double underline indicates the polyA tail sequence.

鳃中表达量最高, 头肾和脾脏次之, 随后依次是心脏、胃、垂体、肌肉、肝脏和脑(图 7b)。

#### 2.4 LPS 刺激后黄条鲮免疫组织中 *SalL-1 $\beta$* 和 *SalL-1 $\beta$ 2* 的表达

在 LPS 刺激后的黄条鲮头肾中, *SalL-1 $\beta$*  各时间点转录水平表达均显著高于对照组, 在 LPS 刺激后

6 h, *SalL-1 $\beta$*  急剧上升至对照组的 10.03 倍( $P < 0.01$ ), 随后逐渐回落, 在 12、24、48、72 h 分别为对照组的 7.15、4.09、2.71、3.03 倍( $P < 0.05$ )(图 8a)。*SalL-1 $\beta$ 2* 转录水平呈现出先上升后下降的趋势, 在 LPS 刺激后 6 h, 急剧上升至对照组的 11.49 倍( $P < 0.05$ ), 最后逐渐回落, 48 h 恢复至正常水平, 72 h 下降至对照组的 0.29 倍( $P < 0.05$ )(图 8b)。

```

aa 2
gca gtg gta tca acg cag agt aca tgg gga gaa caa cac tga cag gac aag ctt aac caa 62
gaa cag taa aac aac ttc ttc tct act gac ttc aac aga cct tcc tca att cag aaa aag 122
atg gaa tcc gag atg aaa tgc aac tfg agc gag atg tgg agc tcc aag atg ccc aag gga 182
M E S E M K C N L S E M W S S K M P K G 20
ctg gac ctg gag atc tcc cat cat cca atg aca atg agg cgt gtg gcc aac ctc atc atc 242
L D L E I S H H P M T M R R V A N L I I 40
gcc atg gag agg ctg aag gcc ggc aca tca gag tca gtg ctg agc acc gag ttc aga gat 302
A M E R L K A G T S E S V L S T E F R D 60
gaa aac ctg ctc aac atc atg atg gag aac atg gtg gaa gag cgt gtt atg ttc gag tgc 362
E N L L N I M M E N M V E E R V M F E C 80
ttt tca aat cca cca agt cag ttc agg agg aca tgt cag cac cag tgc agt gtg acc gac 422
F S N P P S Q F R R T C Q H Q C S V T D 100
agc cag cag aga cac tta gtt agg gac tta aac agc atg gag ctc aac gca gtg acg ctg 482
S Q Q R H L V R D L N S M E L N A V T L 120
caa gcc ggc agt gaa aac cac aaa gtg cat ctg acc atg tgc acc tac ttg cca cct tta 542
Q A G S E N H K V H L T M S T Y L P P L 146
ccc agc acc gag gcc aag gcc aga cct gtg gct ctg tgc att aaa gac aca aat atc tac 602
P S T E A K A R P V A L C I K D T N I Y 160
ttg tca tgc cac atg gac ggt gac atg cca acc ctg aac ctg gag aca gtg gag gac aaa 662
L S C H M D G D M P T L N L E T V E D K 180
agc agt ctg ctg agg atc agc tct gac agc gat ctg gtg cga ttt ctg ttc tac acc cag 722
S S L L R I S S D S D L V R F L F Y T Q 200
gtc agc gga ctg aac gtc acc act ttc atg tct gcc tcc ttc cct gac tgg tac atc agc 782
V S G L N V T T F M S A S F P D W Y I S 220
aca gca gag gaa gac aac aag cca gtt gat atg tgc acg gag acc gac aac cgc tac aga 842
T A E E D N K P V D M C T E T D N R Y R 240
acc ttc aac atc cgg tca aag aca ccc ctt act gaa tgt aga ctg gca ccc ggg gtc atg 902
T F N I R S K T P L T E C R L A P G V M 260
aga ggc gct ctt aaa gag aac atc ttg gta ttg aac aga atg caa aag tta ttg tat ttt 962
R G A L K E N I L V L N R M Q K L L Y F 280
aga tgt ttt gat tca gat aat cag cta caa aga tgt aat ttt cta cca ctg tct gcg aga 1022
R C F D S D N Q L Q R C N F L P L S A R 300
aag act tct gca agt ttt aca gag tgc cta ttt act gta tgt acc aag tac aga aag tga 1082
K T S A S F T E C L F T V C T K Y R K * 319
aat tct aag tgt att gac ata gtc aaa tat cac cac aag gtg aca ttg ttg tgc tga ctg 1142
gtg agc acc ttg tgt att tac atg aca cac tct taa tgc ttt tat cta ttt att cat tta 1202
ttt atc tat tta tgc acc att tta aca tat gta ttt att tgg aaa tct gct ttc taa caa 1262
tta ttt aaa tga tgt tca aca aat ctt taa taa agc ctt gta act aaa aaa aaa aaa aaa 1322
aaa aaa aaa aaa aaa 1337

```

图 2 黄条鲷 *SaIL-1β2* 基因核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *SaIL-1β2* in *S. aureovittata*

小写字母为核苷酸序列，大写字母为推导的氨基酸序列，阴影表示起始密码子和终止密码子；

下划线表示保守结构域；双下划线表示 polyA 信号。

Lowercases indicate the nucleotides, and uppercases indicate the amino acids. Shadow indicates the start and stop codons.

Underline indicates the conserved domain. Double underline indicates the polyA tail sequence.

在 LPS 刺激后的黄条鲷脾脏中, *SaIL-1β1* 转录水平显著升高, 在 LPS 刺激后 6 h, *SaIL-1β1* 急剧上升至对照组的 6.59 倍 ( $P < 0.05$ ), 随后逐渐回落, 在 12、24、48 h 分别为对照组的 3.85、4.09、2.17、2.65 倍 ( $P < 0.05$ ), 72 h 恢复正常水平(图 8c)。 *SaIL-1β2* 转录水平表达模式与 *SaIL-1β1* 相似, 在 6、12、24、48 h

分别为对照组的 7.25、3.20、2.02、1.59 倍, 72 h 恢复至正常水平(图 8d)。

### 3 讨论

本研究在黄条鲷中克隆获得了 *SaIL-1β1* 和 *SaIL-1β2* 两个基因, 分别编码 275 和 319 个氨基酸。

经预测, 2 个蛋白均不含信号肽, 具有白介素-1 结构域并含有 12 个  $\beta$  折叠片。与其他脊椎动物相同, 鱼类 IL-1 $\beta$  蛋白在前体阶段被半胱天冬-1 酶分解后分泌

至细胞外, 因此, 分解过程无信号肽参与(Wewers *et al*, 1997)。SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 两个蛋白含有的 12 个  $\beta$  折叠是成熟 IL-1 $\beta$  的典型特征, 可能形成对受体结合至关重要的  $\beta$  三叶草结构。高等脊椎动物 IL-1 $\beta$  由 IL1 前体结构域和 IL1 结构域组成(Dinarelo, 2013)。已有研究提出, 部分鱼类物种中缺少的 IL1 前体结构域功能性较弱, 且其保守性远低于 IL1 结构域(Hailey *et al*, 2009)。哺乳动物 IL-1 超家族的 C 端经典基序为[FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-P-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM] (Bird *et al*, 2002), 多序列比对结果显示, IL-1 $\beta$  的 C 端典型基序在 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$  蛋白中均存在, 但在黄条鲮中存在细微变异, 为[FC]-x-S-[ASLV]-x(2)-[PRS]-x(2)-[FYLV]-[LI]-[SCA]-T-x(7)-[LIVM]形式。相较于哺乳动物 IL-1 $\beta$ , 鱼类的 IL-1 $\beta$  存在基因多态性(Eggestøl *et al*, 2020; Engelsma *et al*, 2003), 本研究在黄条鲮中发现了 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 两种亚型, 可能与鱼类基因组复制有关。进一步分析脊椎动物 IL-1 $\beta$  分子的进化关系, 结果表明, 鱼类的 IL-1 $\beta$  分子发生了独立复制, 单独聚为一支, 而在鱼类中 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 分属于 2 个分支, 其中, SaIL-1 $\beta$ 1 与高体鲮 IL-1 $\beta$  进化关系最近, SaIL-1 $\beta$ 2 与卵形鲳鲹进化关系最近。以上结果表明, SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 基本具有脊椎动物 IL-1 $\beta$  的结构特征, 可能属于白介素-1 超家族成员。

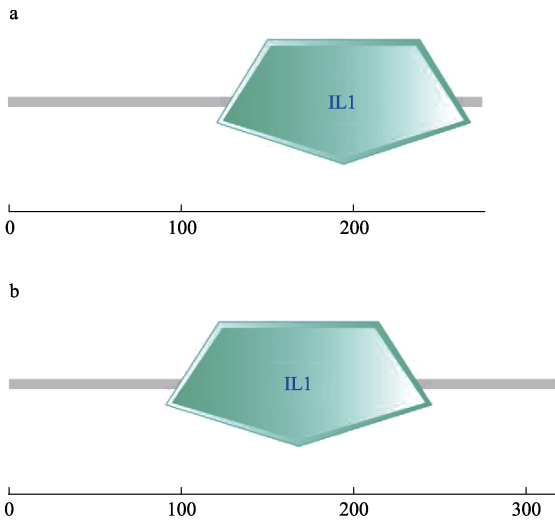


图 3 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白结构域预测  
Fig.3 The predicted domain of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2

a: SaIL-1 $\beta$ 1 结构域; b: SaIL-1 $\beta$ 2 结构域  
a: Domain of SaIL-1 $\beta$ 1; b: Domain of SaIL-1 $\beta$ 2

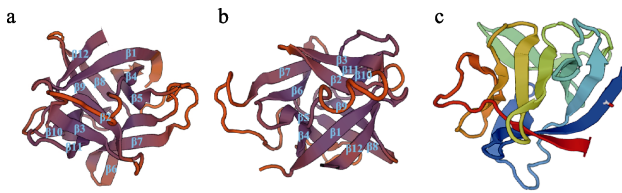


图 4 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白三级结构预测  
Fig.4 The tertiary structure of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2

a: SaIL-1 $\beta$ 1 蛋白; b: SaIL-1 $\beta$ 2 蛋白;  
c: 人类 IL-1 $\beta$  蛋白  
a: SaIL-1 $\beta$ 1 protein; b: SaIL-1 $\beta$ 2 protein;  
c: Human IL-1 $\beta$  protein

IL-1 $\beta$  是一种重要的促炎症细胞因子, 在免疫响应中起着重要的调节作用(Dinarelo, 2018)。本研究显示 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA 在脑、肝脏、肌肉、垂体、胃、心脏、脾脏、头肾和鳃组织广泛表达, 表明 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 可能广泛参与机体各种生理活动, 其中 *SaIL-1 $\beta$ 1* 在头肾、脾脏、肝脏和鳃中表达较高, 而 *SaIL-1 $\beta$ 2* 主要在鳃、头肾、脾脏和心脏中表达较高, 在肝脏中较少。头肾和脾脏是鱼类主要的免疫器官, 鳃是鱼类接触水环境微生物的主要器官, 其中的黏膜中含有大量的 T 淋巴细胞抵御病原感染(Klosterhoff *et al*, 2015)。以上结果暗示了 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在黄条鲮免疫响应中具有重要作用。

表 2 序列比对及进化树构建所用 IL-1 $\beta$  蛋白序列  
Tab.2 The amino acid sequences of IL-1 $\beta$  used in multi-sequence alignment and phylogenetic analyses

物种名 Species	NCBI Accession No.
智人 <i>Homo sapiens</i>	AAA74137.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	EDL28238.1
绿海龟 <i>Chelonia mydas</i>	XP_007066079.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_989855.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAI70521.1
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005457944.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	KAE8285371.1
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	XP_035481228.1
高体鲮 <i>Seriola dumerili</i>	XP_022625284.1
卵形鲳鲹 <i>Trachinotus ovatus</i>	AZL87291.1

头肾和脾脏是硬骨鱼类免疫细胞产生和分化的重要器官(Kumar *et al*, 2016)。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的主要成分, 能够模拟细菌感染、激活机体炎症信号通路、诱导炎症因子的释放(Lu *et al*, 2008)。为探究 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 是否参与黄条鲮免疫应答, 本研究检测了 LPS 刺激后黄条鲮头肾和脾脏中 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 转录水平时序变化。qRT-PCR 结果显示, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 均在 LPS 刺激后大量表达, 且在刺激 6 h 时表达量最高, 达到对照组的 10 倍以上。斑马鱼和大西洋鲑(*Salmo salar*)等硬骨鱼类

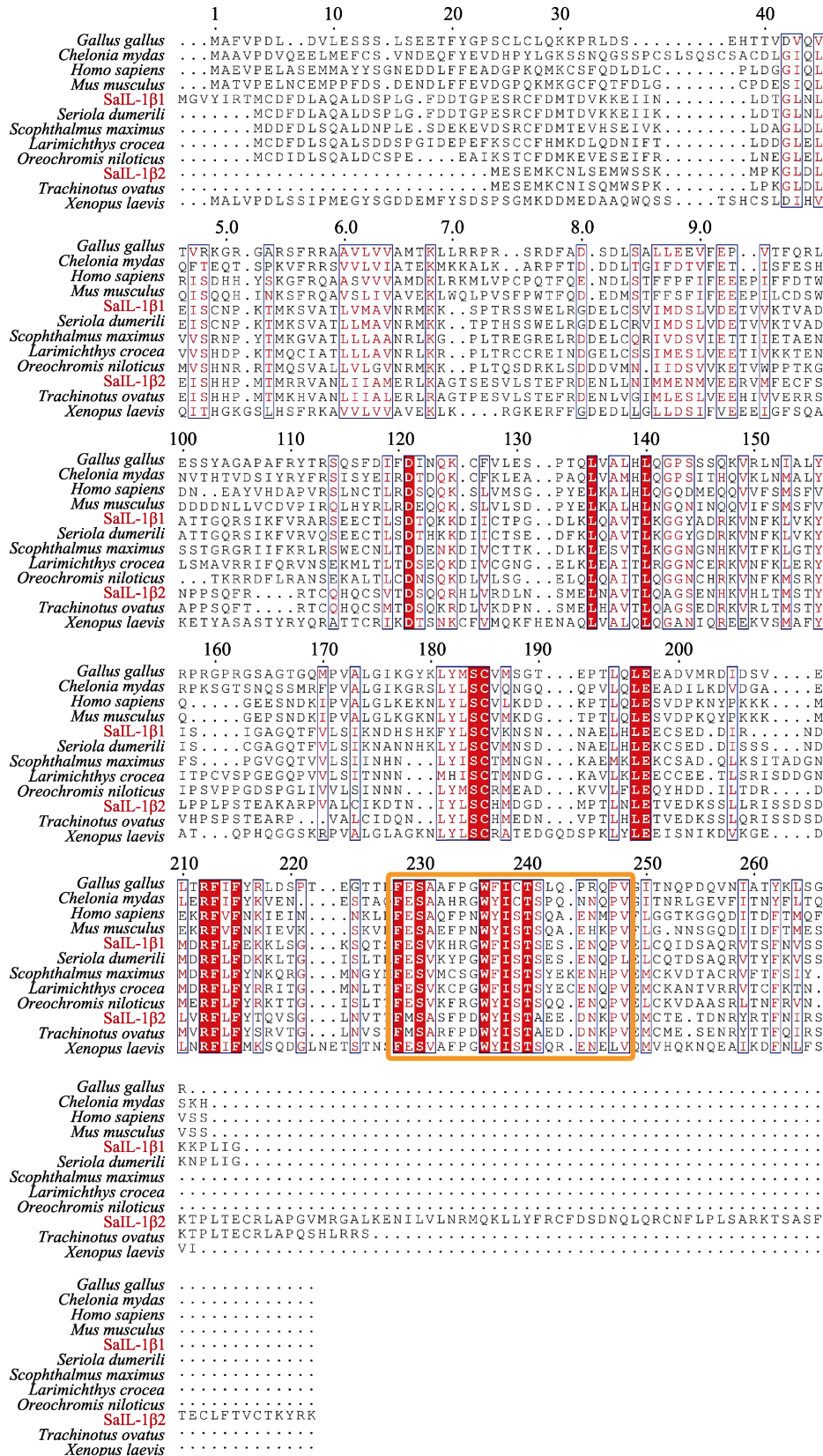


图5 黄条鲷 SaIL-1β1 和 SaIL-1β2 与其他物种 IL-1β 氨基酸序列比对  
 Fig.5 Multi-sequence alignment of SaIL-1β1 and SaIL-1β2 with IL-1β in other species

黄框为 IL-1 超家族 C 端保守基序。

Yellow box indicates the conserved motifs of IL-1 superfamily.

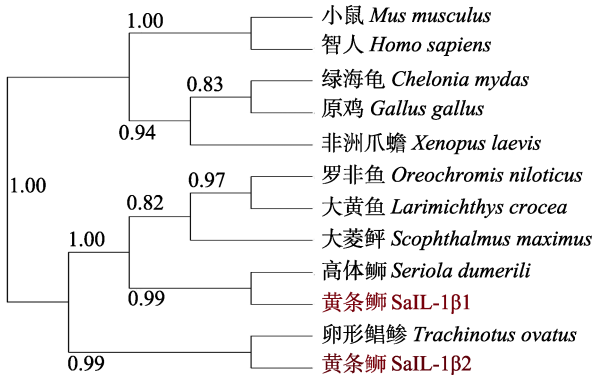


图 6 黄条鲷 SaIL-1 $\beta$ 1 和 SaIL-1 $\beta$ 2 与其他脊椎动物 IL-1 $\beta$ 2 的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic relationship of SaIL-1 $\beta$ 1 and SaIL-1 $\beta$ 2 with other IL-1 $\beta$ s in vertebrates

在 LPS 刺激后, 激活 Toll 通路上调 *il-1 $\beta$*  表达, 进而诱导其他炎症细胞因子、趋化因子的合成, 激活淋巴细胞和巨噬细胞等, 介导机体促炎反应(Pleguezuelos *et al*, 2000; Vojtech *et al*, 2012)。因此, 可以推测, 在 LPS 刺激后, *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 在黄条鲷头肾和脾脏中表达量上调以参与免疫反应, 且在免疫防御早期的促炎反应中发挥重要作用。

本研究首次在黄条鲷中克隆得到 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2*, 通过序列结构、组织表达分析等手段鉴定了其作为 IL-1 $\beta$  分子的特征。同时, 探明了 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 参与黄条鲷免疫响应的表达规律, 为今后深入研究细胞因子白介素在黄条鲷免疫防御中的作用提供了基础信息。

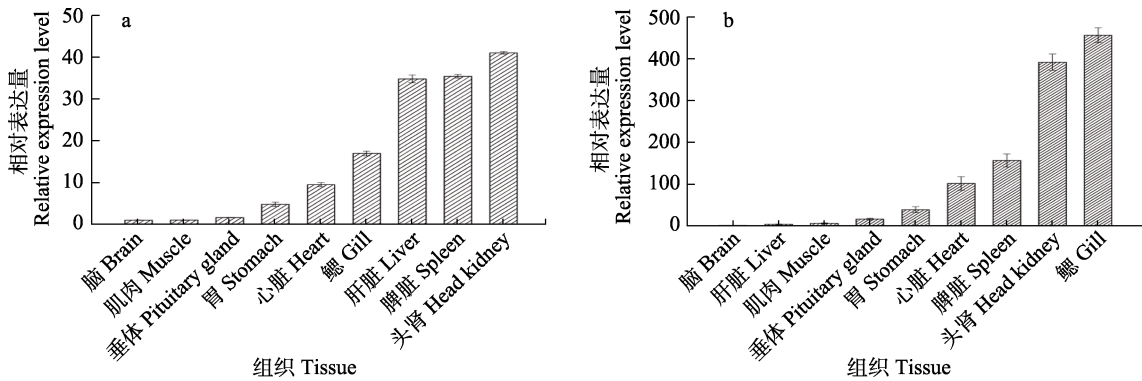


图 7 黄条鲷主要组织中 *SaIL-1 $\beta$ 1*(a)和 *SaIL-1 $\beta$ 2*(b)转录水平表达

Fig.7 The expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* (a) and *SaIL-1 $\beta$ 2* (b) transcripts in different tissues of *S. aureovittata*

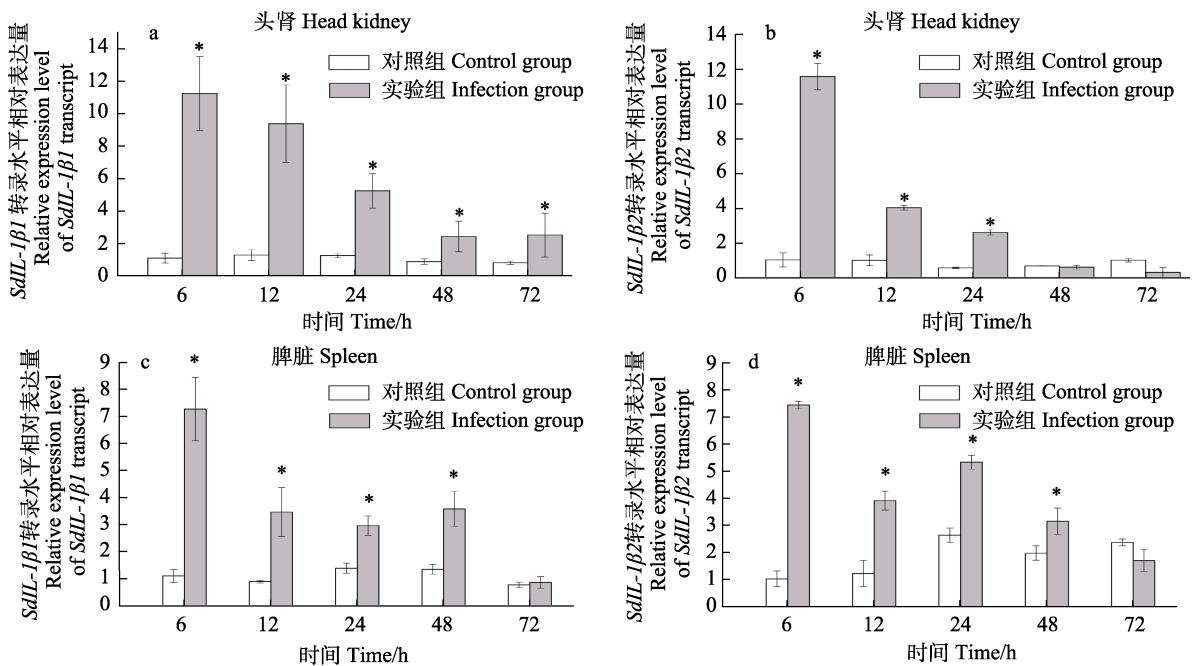


图 8 LPS 刺激后 *SaIL-1 $\beta$ 1* 和 *SaIL-1 $\beta$ 2* 的转录水平变化

Fig.8 The expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* transcripts after LPS stimulation



## 参 考 文 献

- BIRD S, ZOU J, WANG T, *et al.* Evolution of interleukin-1 $\beta$ . Cytokine and Growth Factor Reviews, 2002, 13(6): 483–502
- DINARELLO C A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews, 2018, 281(1): 8–27
- DINARELLO C A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. In "Seminars in immunology", 2013, 25(1): 389–393
- EGGESTØL H Ø, LUNDE H S, KNUTSEN T M, *et al.* Interleukin-1 ligands and receptors in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.): Molecular characterization, phylogeny, gene expression, and transcriptome analyses. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 502
- ENGELSMA M Y, STET R J, SAEIJ J P, *et al.* Differential expression and haplotypic variation of two interleukin-1 $\beta$  genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cytokine, 2003, 22(1): 21–32
- GAO J, JIANG X, WANG J, *et al.* Phylogeny and expression modulation of interleukin 1 receptors in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Developmental and Comparative Immunology, 2019, 99: 103401
- GOUY M, GUINDON S, GASCUEL O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular and Biological Evolution, 2010, 27: 221–224
- GUO M, TANG X, SHENG X, *et al.* The effects of IL-1 $\beta$ , IL-8, G-CSF and TNF- $\alpha$  as molecular adjuvant on the immune response to an *E. tarda* subunit vaccine in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 2018, 77: 374–384
- HAILEY K L, LI S, ANDERSEN M D, *et al.* Pro-interleukin (IL)-1 $\beta$  shares a core region of stability as compared with mature IL-1 $\beta$  while maintaining a distinctly different configurational landscape: A comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(38): 26137–26148
- HONG S, PEDDIE S, CAMPOS-PÉREZ J J, *et al.* The effect of intraperitoneally administered recombinant IL-1 $\beta$  on immune parameters and resistance to *Aeromonas salmonicida* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developmental and Comparative Immunology, 2003, 27(9): 801–812
- KLOSTERHOFF M C, PEREIRA Jr J, RODRIGUES R V, *et al.* Ontogenic development of kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of CD3 and CD4 receptors on the lymphocytes of cobia (*Rachycentron canadum*). Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2015, 87: 2111–2121
- KUMAR R, JOY K, SINGH S. Morpho-histology of head kidney of female catfish *Heteropneustes fossilis*: Seasonal variations in melano-macrophage centers, melanin contents and effects of lipopolysaccharide and dexamethasone on melanins. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(5): 1287–1306
- LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 2008, 42(2): 145–151
- PLEGUEZUELOS O, ZOU J, SECOMBES C J. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second IL-1  $\beta$  gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunogenetics, 2000, 51(12): 1002–1011
- PURCELL C M, SEETHARAM A S, SNODGRASS O, *et al.* Insights into teleost sex determination from the *Seriola dorsalis* genome assembly. BMC Genomics, 2018, 19(1): 1–11
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, 2008, 3: 1101–1108
- TAECHAVASONYO A, KONDO H, NOZAKI R, *et al.* Identification of novel interleukin 1 beta family genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 393–396
- VOJTECH L N, SCHARPING N, WOODSON J C. Roles of inflammatory caspases during processing of zebrafish interleukin-1 beta during *Francisella noatunensis* infection. Infection and Immunity, 2012, 80(8): 2878–2885
- WANG B, WANG K, CUI A, *et al.* LPXRFa down-regulates brain reproductive genes in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Aquaculture, 2021, 545: 737251
- WANG P, LU Y Q, WEN Y, *et al.* IL-16 induces intestinal inflammation via PepT1 upregulation in a pufferfish model: New insights into the molecular mechanism of inflammatory bowel disease. Journal of Immunology, 2013, 191(3): 1413–1427
- WEWERS M D, DARE H A, WINNARD A V, *et al.* IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: Macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. Journal of Immunology, 1997, 159: 5964–5972
- WU J, SHI Y H, ZHANG X H, *et al.* Molecular characterization of an IL-1 $\beta$  gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection. Zoological Research, 2015, 36(3): 133–141
- WU Y, ZHOU Y, CAO Z, *et al.* Comparative analysis of the expression patterns of IL-1 $\beta$ , IL-11, and IL-34 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) following different pathogens challenge. Fish and Shellfish Immunology, 2019, 93: 863–870
- ZOU J, CUNNINGHAM C, SECOMBES C J. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 $\beta$  gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. European Journal of Biochemistry, 1999, 259: 901–908

## Two Putative Interleukin-1 beta Molecules Involved in the Immune Response of *Seriola aureovittata*

WANG Lin<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2①</sup>, GUAN Changtao<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China)

**Abstract** Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) is the quintessential pro-inflammatory cytokine, playing important roles in immune cell proliferation, differentiation, and apoptosis. The IL-1 $\beta$  genes have been characterized for many fish species. Unlike mammalian genes, several species of fish possess two IL-1 $\beta$  genes, which may be a consequence of genome duplication in particular fish lineages. Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) is a pelagic marine finfish species, which is an emerging candidate for the aquaculture industry. Therefore, details encompassing the role of IL-1 $\beta$  in the immune response aids a development strategy for economic and efficient aquaculture. In the present study, two novel *il-1 $\beta$*  molecules were identified from *S. aureovittata* (designated as *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2*). The full-length cDNA of *SaIL-1 $\beta$ 1* was 1 292 bp with a 828 bp open reading frame, encoding a polypeptide of 275 amino acids, while the full-length cDNA of *SaIL-1 $\beta$ 2* was 1 337 bp with a 960 bp open reading frame, encoding a polypeptide of 319 amino acids. Both *SaIL-1 $\beta$*  molecules contain an IL1 domain, 12  $\beta$ -sheets, and a C-terminal conserved region, which are IL-1 family signature characters. A phylogenetic analysis revealed the fish IL-1 $\beta$ s clustered together. *SaIL-1 $\beta$ 1* and IL-1 $\beta$  in *Seriola dumerili* initially clustered together. However, *SaIL-1 $\beta$ 2* initially clustered with IL-1 $\beta$  in *Trachinotus ovatu*. Real-time PCR showed the transcripts of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* were present in all the tested tissues, including the head kidney, spleen, liver, gill, heart, stomach, pituitary gland, muscle, and brain. Among them, the *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were predominantly in the head kidney, spleen, and liver. The expression of *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA was predominantly in the gill, head kidney, and spleen. The high expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA in the immune related organs implies a potential role in immune regulation. LPS is a pro-inflammatory endotoxin used as a standard immune activating agent. After LPS stimulation, the two *SaIL-1 $\beta$* s transcripts were vigorously altered in the head kidney and spleen. *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were significantly increased at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-stimulation in the head kidney (10.03, 7.15, 4.09, 2.71, and 3.03-fold of the control group results, respectively) ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, *SaIL-1 $\beta$ 2* transcripts significantly increased from 6 h to 24 h post-stimulation after infection in the head kidney (11.49, 4.08, and 4.70-fold of the control group, respectively) ( $P < 0.05$ ), had returned to normal at 48 h, and had decreased at 72 h (to 0.29-fold of the control group) ( $P < 0.05$ ). In the spleen, *SaIL-1 $\beta$ 1* transcripts were sharply elevated at 6 h (to 6.59-fold of control group), gradually returned to normal at 12 h, 24 h, and 48 h (3.85, 4.09, 2.17, and 2.65-fold of control group, respectively) ( $P < 0.05$ ), and had dropped to basal level by 72 h. *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA had a similar expression pattern to *SaIL-1 $\beta$ 1*. *SaIL-1 $\beta$ 2* mRNA increased from 6 h to 48 h post-stimulation after infection (7.25, 3.20, 1.59, and 1.59-fold of the control group, respectively) ( $P < 0.05$ ) and had returned to normal by 72 h. The activated immune signaling promoted the expression of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2* in the immune response, especially in the early stage, indicating they might be a pro-inflammatory cytokine in *S. aureovittata*. Collectively, the conserved structure and tissue distribution of *SaIL-1 $\beta$ 1* and *SaIL-1 $\beta$ 2*, together with their sensitivity to LPS stimulation suggests their involvement in the immune response, providing clues to our understanding of the role of IL-1 $\beta$  in *S. aureovittata* during immune response.

**Key words** Interleukin-1 beta; Immune response; Cytokine; *Seriola aureovittata*

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn