

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180625001

http://www.yyqxjz.cn/

刘莹莹, 于珊珊, 柴迎梅, 林啸鹏, 祝茜. 松江鲈白介素15(TfIL-15)的结构特征与重组表达. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 95-103

Liu YY, Yu SS, Chai YM, Lin XP, Zhu Q. Characterization and recombinant protein expression of Interleukin-15 from roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 95-103

松江鲈白介素 15(TfIL-15)的结构特征 与重组表达*

刘莹莹 于珊珊 柴迎梅 林啸鹏 祝茜^①

(山东大学(威海)海洋学院 威海 264209)

摘要 为研究白介素 15(Interleukin-15, IL-15)在松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)先天免疫中的功能,本研究利用 RACE 技术克隆得到松江鲈 IL-15 基因(命名为 TfIL-15)的全长 cDNA 序列,其长度为 1140 bp,包括 5'-非编码区(5'-UTR) 165 bp、开放阅读框(ORF) 522 bp 和 3'UTR 453 bp。在 5'UTR 区域,存在 4 个读码框外的 AUG 翻译起始位点。基因 ORF 编码 173 个氨基酸(aa),其中,前 59 aa 为信号肽序列。成熟肽全长为 114 aa,预测分子量为 12.975 kDa,理论等电点为 5.15。同源比对发现,鱼类 IL-15 变异程度较高,TfIL-15 与其他鱼类 IL-15 同源性在 23%~61%之间。多序列比对和三维结构构建结果显示,TfIL-15 具有典型 4 个 α 螺旋二级结构,形成二硫键的 4 个半胱氨酸高度保守。qRT-PCR 分析表明,TfIL-15 广泛表达于松江鲈各组织中。腹腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)后,TfIL-15 mRNA 在血液、皮肤、肝脏和脾脏中均上调表达。在皮肤和血液中,刺激后 2 h 表达量迅速上调至最高峰,分别为对照组的 74 倍和 41 倍。脾脏和肝脏在刺激后 12 h 分别达到对照组的 3 倍和 18 倍。肝脏中,刺激后 96 h,表达量再次上调至对照组的 86 倍。上述结果表明,TfIL-15 可能参与了松江鲈抵抗外界刺激的先天免疫过程。另外,通过构建 TfIL-15 成熟肽的原核表达载体,成功获得重组蛋白,为进一步研究 TfIL-15 蛋白的功能奠定了基础。

关键词 松江鲈; 白介素 15(IL-15); 克隆; 基因表达; 重组蛋白表达

中图分类号 Q78; S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0095-09

IL-15 是白介素(Interleukin, IL)家族的重要成员之一,它与 IL-2、GM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、G-CSF(粒细胞集落刺激因子)等,同属于 4 α 螺旋细胞因子家族(Lodolce *et al*, 2002)。转录水平的 IL-15 存在于多种类型细胞和组织器官中,包括表皮细胞、上皮细胞、神经细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞及心脏、肺、脾和骨骼肌等(Carson *et al*,

1995; Lee *et al*, 1996)。但蛋白水平的 IL-15 在血清或培养细胞的上清液中却很难被检测到。这种现象与 IL-15 基因的蛋白表达受严谨调控相关,这些调控方式包括 5'-UTR 多个翻译起始位点的存在、特殊的信号肽及羧基末端的某些结构等(Bamford *et al*, 1996、1998; Kurys *et al*, 2000)。IL-15 是一种多效细胞因子,具有增强淋巴细胞活性、促进粒细胞吞噬(Rathé *et al*,

* 山东省自然科学基金(ZR2016CP10)和威海市科技局项目(1070413421706)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CP10), and Weihai Science and Technology Bureau (1070413421706)].
刘莹莹, E-mail: liuying0631@163.com

^① 通讯作者: 祝茜, 教授, E-mail: qianzhu@sdu.edu.com

收稿日期: 2018-06-25, 收修改稿日期: 2018-07-31

2004)和NK细胞发育并增强其细胞毒性的作用(Fehniger *et al*, 2001; Lodolce *et al*, 2002)。此外,IL-15还具有刺激T细胞/B细胞增殖、诱导免疫球蛋白分泌、刺激特异性抗原产生、诱导信号转导和转录激活蛋白表达等多种功能(王东勇等, 1996)。

尽管功能多样,但由于白介素等细胞因子在趋异进化过程中的变异程度相当高,导致鱼类相关基因的开发难度加大,免疫功能研究相对滞后(贝锦新, 2006)。2004年之前,硬骨鱼IL-15的相关研究工作几乎未见报道。随着红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)和斑马鱼(*Danio rerio*)等物种基因组计划的完成,一系列细胞因子包括IL-15才开始被陆续发现和鉴定(Bei *et al*, 2006; Fang *et al*, 2006; Gunimaladevi *et al*, 2007)。除了以上3种鱼,目前,IL-15也仅在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、露斯塔野鲮(*Labeo rohita*, Hamilton)等少数鱼类中克隆得到(方玮, 2009; Das *et al*, 2015; Pérez-Cordón *et al*, 2014; Wang *et al*, 2007)。研究发现,鱼类IL-15可以由多种组织和细胞产生,组织分布广泛;受到不同诱导物免疫刺激后,IL-15表达上调,但上调时间和不同组织的表现有所不同(贝锦新, 2006; 方玮, 2009)。此外,IL-15还参与了鱼体对抗寄生虫的免疫反应(Pérez-Cordón *et al*, 2014; Das *et al*, 2015)。虹鳟体外重组表达IL-15蛋白能诱导虹鳟脾脏细胞产生IFN- γ (Wang *et al*, 2007)。红鳍东方鲀重组表达的IL-15,能活化鱼的外周血白细胞、小鼠T淋巴细胞(CTLL-2)、鱼的头肾细胞和胸腺细胞,说明重组蛋白具有活化增殖免疫细胞的生物学功能(贝锦新, 2006; 孙赛红等, 2015)。这些研究为今后进一步深入开展重组IL-15在鱼类健康养殖上的应用研究提供了基础。

松江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel),隶属于鲈形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼科(Cottidae)、松江鲈属(*Trachidermus*),是一种近海溯河洄游的肉食性鱼类(于诗群等, 2008; 陈学昭等, 2016)。近年来,由于种群数量剧减,被列为国家Ⅱ级保护动物(陈学昭等, 2016)。目前,关于IL-15基因在松江鲈体内的研究尚未开展,本研究克隆了松江鲈IL-15(命名为TfIL-15)的基因,分析了序列结构特征,应用实时荧光定量PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术研究了其在鱼体内的分布和免疫刺激后基因应答情况,并利用原核表达系统体外表达了IL-15成熟肽的重组蛋白。研究结果可进一步丰富鱼类细胞因子的研究内容,有利于阐明鱼类细胞因子与鱼类免疫系统

的关系。重组蛋白的表达为进一步开展对TfIL-15的功能研究和抗体制备奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与组织样品制备

9~10月龄的松江鲈(体重约15~23 g)取自山东文登埠口松江鲈自然保护区,实验前置于充气海水中(12℃~14℃)饲养1周。选取正常健康个体,麻醉后心脏取血,然后解剖取其心脏、肝脏、鳃、肠、皮肤、肾脏、脾脏、脑、卵等组织,立即放入Trizol中研磨,用于提取正常组织RNA。

LPS(Lipopolysaccharides,脂多糖)刺激实验,将松江鲈平均分成2组(每组50条),一组腹腔注50 μ l(0.04 mg/kg)的LPS,对照组注射等体积无菌生理盐水。刺激后0、2、6、12、24、48、72、96 h麻醉取样(每次6条),分别取其血、皮肤、肝脏和脾脏用于组织总RNA提取。

1.2 总RNA的提取和cDNA合成

依据Trizol(Invitrogen公司)操作说明提取各样品的组织总mRNA。cDNA第一链的合成参照Clontech公司SMART(Switching mechanism at 5' end of RNA template)的指导说明进行(表1)(史晓丽等, 2018)。

1.3 TfIL-15 cDNA的全长克隆

根据LPS刺激后cDNA文库的构建获得TfIL-15基因的EST序列,利用Primer 5.0设计特异性后引物15R与5' primer配对进行5' RACE克隆;设计特异性前引物15F与3' anchor R配对进行3' RACE克隆。所用模板为松江鲈刺激后肝脏cDNA,反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸40 s,30个循环;72℃延伸7 min。然后将PCR纯化产物与pMD-18T载体连接,克隆测序,得到5'端和3'端序列片段。

1.4 TfIL-15基因的序列分析

利用软件BioEdit对RACE获得的两端cDNA序列进行拼接,以获得TfIL-15的cDNA全长序列;通过在线软件ExPASy(<http://www.au.expasy.org/>)对TfIL-15的cDNA序列进行蛋白翻译、等电点及分子量预测;TfIL-15编码蛋白的信号肽、糖基化位点分别应用SignalIP 4.1和NetNGlyc1.0 Server进行分析;蛋白的三级结构预测在SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行,然后用PyMol软件进行三维结构的

建构与标注;在 NCBI 下载同源序列,利用 ClustalW、BioEdit 和 DNAMAN 进行同源序列比对分析,利用 MEGA5.0 软件以邻位法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

1.5 组织表达分析

TfIL-15 的组成型表达及刺激后表达模式的变化通过 qRT-PCR 分析来进行。根据 TfIL-15 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物(表 1),以正常各组织及刺激组 and 对照组的的不同时间点 cDNA 为模板,进行反应。反应条件:94℃ 3 min;94℃ 15 s,60℃ 60 s,40 个循环(陈学昭等,2016),结束后进行熔解曲线分析。以 β -actin 作为内参基因,每个样品 cDNA 设 3 个平行实验。反应和分析使用 7300 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行。基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示(马慧鑫等,2018)。差异显著性使用 T 检验的

方法分析,当差异显著性水平 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

1.6 TfIL-15 重组蛋白表达

TfIL-15 基因成熟肽的两端引物分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,插入到 pET-30a(+)表达载体的多克隆位点中,构建 pET-30a(+)/TfIL-15 表达载体转化入大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 中。经阳性克隆筛选后,提取构建好的质粒载体转化表达菌株 BL21(DE3)并进行阳性筛选。

将筛选出的菌落分别置于 LB 液体培养基中过夜培养。次日,将过夜菌转培养(1:100 的比例)至新的液体 LB 培养基中约 3 h。待其 OD_{600nm} 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。诱导结束后,收集菌体,通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。进一步的超声破碎检测发现,蛋白以包涵体形式表达。

表 1 PCR 引物名称及序列
Tab.1 PCR primers and the sequences

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
15F	ACTACCCTGTTGACTGTCCACC	5' RACE and 3' RACE
15R	CACAGAAGTACTCAGGAGGC	
3' anchor R	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	反转录 PCR Reverse transcription PCR
5' Primer	TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAA	
Oligo-anchor R	GACCACGCGTATCGATGTCGACT16(A/C/G)	
Smart F	TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAAAGGG	qRT-PCR
15RTF	CTGACGCTATGCTGTATGCTCCG	
15RTR	CGTTGTCCGACTATTCATTTCTTGC	
ActinF	TGAGACCACCTACAACAGCATC	qRT-PCR
ActinR	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	
15EMF	TACTCAGAATTCGCTGAGCGTCCCTTCGGTTTAT	蛋白表达 Protein expression
15EMR	TACTCACTCGAGTTACGTTGTCCGACTATTCAT	

在确定重组蛋白表达的情况下,进行蛋白的大规模培养表达,表达结束用 PBS 重悬菌体超声破碎 1 h。将超声破碎后沉淀进行包涵体洗涤,然后用 GenScript 的 His-tag 亲和层析柱进行纯化,具体操作步骤参见 Yu 等(2013)的方法。重组蛋白的复性采用尿素梯度透析法,每个梯度 4℃ 透析 16 h(王彤等,2013)。透析结束后,通过 SDS-PAGE 检测重组蛋白的纯化结果。

2 结果

2.1 TfIL-15 基因克隆及序列分析

松江鲈 IL-15 全长 cDNA 序列(图 1, GenBank 登录号为 MH299805)为 1140 bp,其中,5'-非编码区

(5'-UTR) 165 bp,开放阅读框(ORF)522 bp,3'-UTR 453 bp。在 5'-UTR 区域,存在 4 个读码框外的 AUG 翻译起始位点。基因 ORF 编码 173 个氨基酸(aa),其中,前 59 aa 为信号肽序列。成熟肽全长为 114 aa,预测分子量为 12.975 kDa,理论等电点为 5.15。成熟肽含有 2 个可能的 N 糖基化位点:NASM,132~134;NITV,153~155。

将 TfIL-15 与其他物种同源序列进行比对,发现 TfIL-15 与条石鲷(BAN84544.1)的同源性最高为 61%,其次为三刺鱼(NP_001254613.1) 59%,与斑马鱼同源性为 23%,与鱼类序列同源性在 23%~61%之间。与鸡(*Gallus gallus*, AAF61446.1)同源性为 24%,与人类 IL-15(*Homo sapiens*, AAA21551.1)同源性为

```

1  GTGTCTGGAGCCTCATCTGGACCGCAATAACGCTCTCAAGCGTACACAACACAGGACATGGACTACTGAGACAAA
76  AAAAAAGCTTTATGGGAATAAGCGAAATGCAAAAATGTGAGCTTGGCTTATTGCTCCGCTGGGAAGGAGAACGACC
151  ACGGCCGCTACGAGATGACAGCCTTACGACGGCGTCCCGGTGATCCACGTCAGCCCGCATGGCCCGGAGAG
1  M T A F T T A S P V I H V Q P A W P G E
226  CAGCGCGCGAAAGGGTCCAGTTCAGTTGACCTGTCTTTCAGAGAGAGTACAAAACTAAGGTCTGGCTT
21  Q R A K G V Q F Q L T C H L C R E S H K T K V W L
301  TGTTTCTAGTCTGAGCCTCCTGAGTACTTCTGTGTGCTGCTGAGCGTCTCGGTTTATCTACTGAATTGC
46  C F L V L S L L S T S V C A A E R P S V Y L L N C
376  TTGGGGTCGAAAGACTGAAAAATGCCATTAAGAGATCTGACGCTATGCTGTATGCTCCGTCAACTAGTGACGTT
71  L G S E R L K N A I K R S D A M L Y A P S T S D V
451  AAAGAAAACTGTAAGAGTCAATCGCTCAAATGTTACATATTGGAGCTGATGGTGGTCATCGTTGAAGAAGAAAT
96  K E N C K E S S L K C Y I L E L M V V I V E E E I
526  CAGGATAAAAAAGCACATTGCATCTTTGACTTCAATGCCTCCATGCCAACAACTACCCTGTTGACTGTCCACCA
121  Q D K K A H C I F D F N A S M P T N Y P V D C P P
601  TGTGAAGCATTCTCACTTAAAAATATTACAGTATTCTGGATAGACTCTTTAGCCTTTGCAAGAAATGAATAGT
146  C E A F S L K N I T V F L D R L F S L L Q E M N S
676  CGGACAACGTAATGATGTGATACAATGTGCATTGTAAATATTTGTAATAATTTGGTGGTGGTTTTATTTGTAT
171  R T T *
751  ATATCACACTATAACTATGCCAACCTGTGAAAAAGCATACCGTCCTGTATTTAAAAATATAGCTTTAAATCGATG
826  AAAGAACTGAATTGGAAGCCATTGATTGATTGTTGAAACAAATTGTAATATGTACATGAAGCCTCTGCCACTG
901  CGTTGAAGAATTTGCCTTTTGGTTTTACAGTTTTGAGACAAGTAGCCAACAGTAGCAGCATGTATGAAATCCAGA
976  ATGTATATAAATGTGTGTATATATATATATATATAGCTCAGCTAAACACTACTGAATGTGACACCTATTATAC
1051  AGTATACACATAATGAACCTAGTATCTCAGAATAGCTTCTCACTCCATTAAATAATACCATAACTATGGAAAA
1126  AAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 TfIL-15 的 cDNA 序列及其编码序列

Fig.1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of TfIL-15

下划线标出的分别为起始密码子和终止密码子。阴影部分为 N-糖基化位点。箭头表示信号肽切割位点。

方框内为 5'-UTR 区读码框外的 ATG 翻译起始位点

The start codon and stop codon are underlined, the N-glycosylation sites are shadowed by gray, the arrow indicates the signal peptide cleavage site, and the four out-of-frame ATG initiation codons in the 5' UTR are indicated in the boxes

25%，与哺乳类同源性在 20%~25%之间(表 2)。氨基酸序列多序列比对发现，鱼类 IL-15 与鸟类和哺乳类 IL-15 的成熟肽区域的同源性较信号肽高，鱼类 IL-15 同源序列含有与鸟类和哺乳类相同的 4 个保守的半胱氨酸残基(图 2)。

用 SWISS-MODEL 软件进行三维结构预测，发现 TfIL-15 具有典型 4 个 α 螺旋二级结构(图 3A)。将 TfIL-15 与人类的 IL-15 叠合时(图 3B)，发现蛋白结构较吻合，并且二硫键形成位点相互重合。此外，松江鲈另外 2 个半胱氨酸形成了第 3 个二硫键(图 3A)，TfIL-15 成熟肽起始氨基酸丙氨酸(A)与人类成熟肽起始氨基酸天冬酰胺(N)重合。

系统进化分析表明，所有鱼类的 IL-15 聚为一大支，鸟类和哺乳动物的 IL-15 聚为另外一大支(图 4)。

2.2 TfIL-15 组织表达分析

qRT-PCR 结果表明，TfIL-15 mRNA 广泛表达于松江鲈各组织中。其中，在心脏中的表达量最高，其次为鳃(图 5)。

2.3 LPS 刺激后各组织中 TfIL-15 基因的表达变化

腹腔注射 LPS 后，TfIL-15 mRNA 在血液、皮肤、肝脏和脾脏中均呈上调表达(图 6)。在皮肤中，刺激后 2 h 表达量迅速上调至最高峰，为对照组的 74 倍，

表 2 脊椎动物 IL-15 同源性比对分析

Tab.2 Amino acid identity of TfIL-15 with other vertebrate IL-15s

物种 Species	同源性 Identity (%)	物种 Species	同源性 Identity (%)
条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	61	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	28
三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	59	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	23
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	51	人 <i>Homo sapiens</i>	25
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	49	鸡 <i>Gallus gallus</i>	24
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	47	牛 <i>Bos taurus</i>	23
黑青斑河豚 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	42	野猪 <i>Sus scrofa</i>	23
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	31	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	20

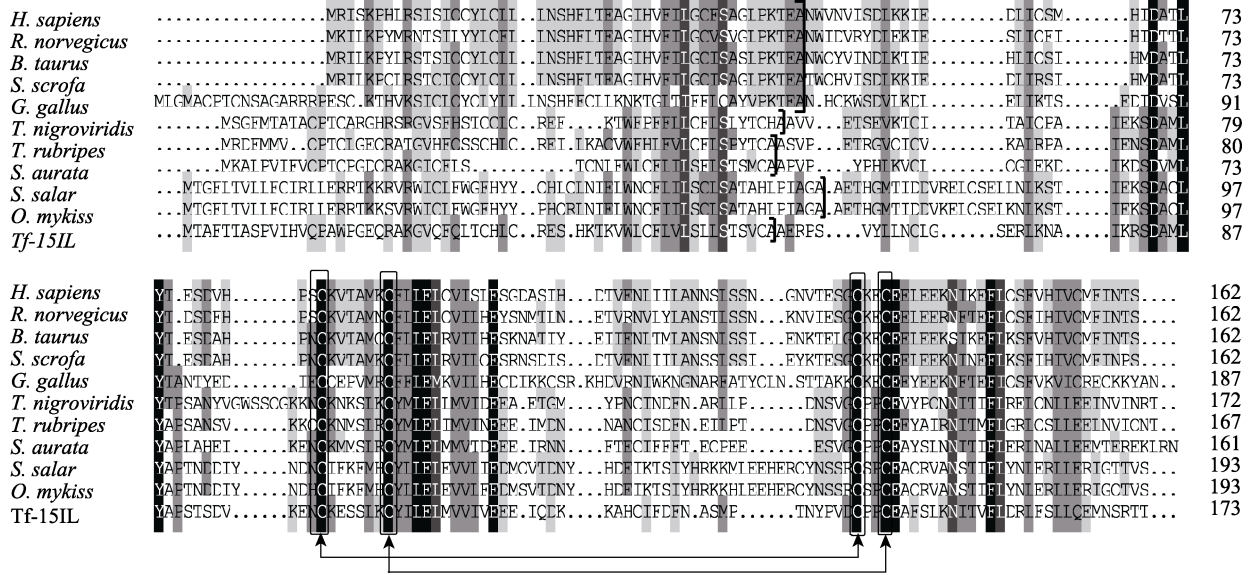


图 2 不同物种 IL-15 氨基酸序列的多序列比对

Fig.2 Alignment of the amino acids of IL-15 protein sequences

保守的半胱氨酸以方框表示, 箭头表示形成的二硫键结构, 信号肽切割位点以]表示。序列的 GenBank 登录号分别为: 人 *H. sapiens* (AAA21551.1), 褐家鼠 *R. norvegicus* (AAB94536.1), 牛 *B. taurus* (AAA85130.1), 野猪 *S. scrofa* (ABI81495.1), 鸡 *G. gallus* (AAF61446.1), 黑青斑河豚 *T. nigroviridis* (AAR25702.1), 红鳍东方鲀 *T. rubripes* (CAF28987.2), 金头鲷 *S. aurata* (AGS55349.1), 大西洋鲑 *S. salar* (AFB81536.1), 虹鳟鱼 *O. mykiss* (CAD88594.1)

The letters in box are the four conserved cysteine residues, the arrows indicate the formed two potential disulphide bonds, and semi square bracket indicates the potential signal peptide cleavage site

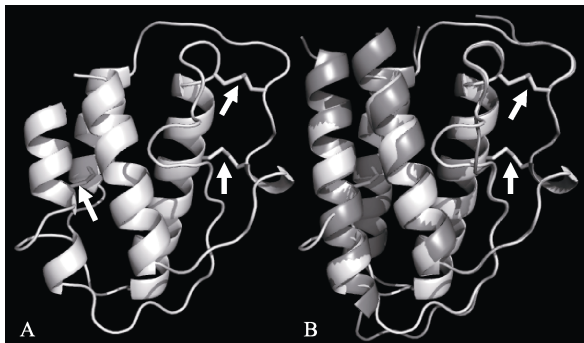


图 3 理论预测的 TfIL-15 蛋白(A)及与人类 IL-15(灰色)结构叠合图(白色) (B)

Fig.3 Three-dimensional structure of modeled TfIL-15 protein (A) and the structural superposition of TfIL-15 protein (white) with human IL-15 (Grey) (B)

二硫键位置以白色箭头表示
The disulfides are indicated with arrows

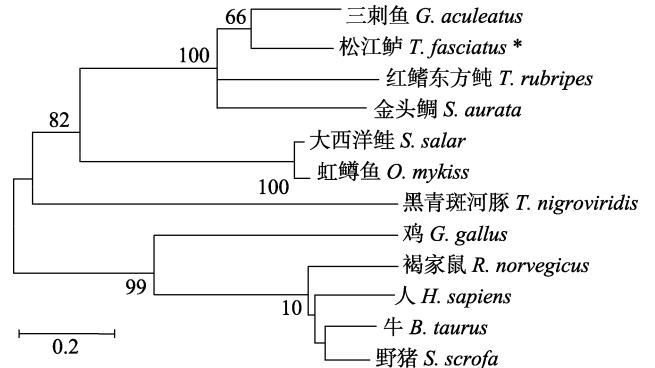


图 4 基于不同物种 IL-15 的氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed with amino acid sequences of IL-15 from various species

三刺鱼 *G. aculeatus* 的 GenBank 登录号为 NP_001254613.1, 其余物种的 GenBank 登录号同图 2, 星号表示本研究物种 GenBank accession number of *G. aculeatus* is NP_001254613.1, and the others accession numbers are the same as in Fig.2. The position of TfIL-15 is marked by an asterisk

之后一直呈现较高的表达水平直至刺激后 96 h; 在血液中, 刺激后 2 h 表达量上调至对照组的 41 倍, 6 h 表达量下降至对照组的 0.23 倍, 之后表达量一直显著低于对照组直至实验结束; 在脾脏中, 刺激后 2 h

表达量开始上调至对照组的 1.3 倍, 6 h 略有下调, 12 h 达到对照组的 3 倍左右, 之后恢复至对照组水平。在肝脏中, 刺激后表达量逐渐上调, 2 h、6 h 表达量分别上调至对照组的 2.2 倍和 2.4 倍, 12 h 达到对照

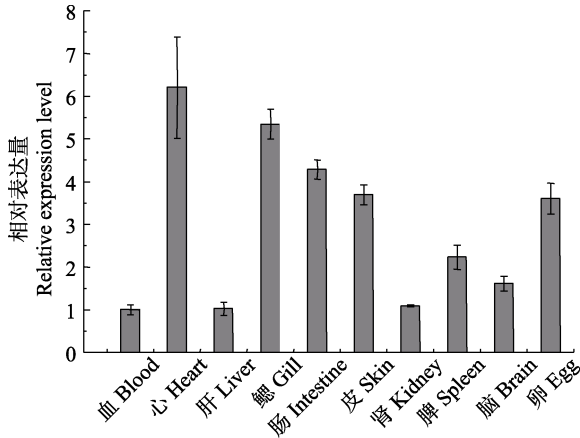


图5 TfIL-15 基因在正常组织中的表达模式

Fig.5 The constitutive expression of TfIL-15 mRNA in different tissues of normal roughskin sculpin

组的 18 倍, 后恢复对照组水平; 但在刺激后 96 h, 表达量再次上调至在对照组的 86 倍。

2.4 TfIL-15 的原核表达及纯化

将构建的 TfIL-15 原核表达菌株经 IPTG 诱导后

进行 SDS-PAGE, 在 19 kDa 处出现一条高表达蛋白的特异性条带, 与预期大小相符(图 7)。将以包涵体形式表达的重组蛋白经亲和层析柱纯化、尿素梯度透析复性, 可用于后续的活性检测。

3 讨论

本研究成功克隆到松江鲈 IL-15 基因 cDNA 全长序列, 跟其他鱼类、哺乳类和鸟类的 IL-15 基因一样, TfIL-15 的 5'-UTR 含有多个(4个)读码框外的 AUG 翻译起始位点(红鳍东方鲀 2 个, 斑马鱼 4 个, 黑青斑河豚 2 个, 虹鳟 7 个)。TfIL-15 含有一段很长的信号肽序列, 这也与其他鱼类(松江鲈 59 aa, 红鳍东方鲀 53 aa, 斑马鱼 68 aa, 虹鳟 65 aa, 黑青斑河豚 53 aa)以及哺乳类和鸟类相似(人类含有 48 aa 信号肽, 鸟类 66 aa)。脊椎动物 IL-15 这种现象的存在可能与 IL-15 的转录后表达受到严谨的调控有关(Bamford *et al*, 1996、1998; Kurys *et al*, 2000)。TfIL-15 与条石鲷 IL-15 的同源性最高, 尽管如此, 也只有 61%。与鱼类同源

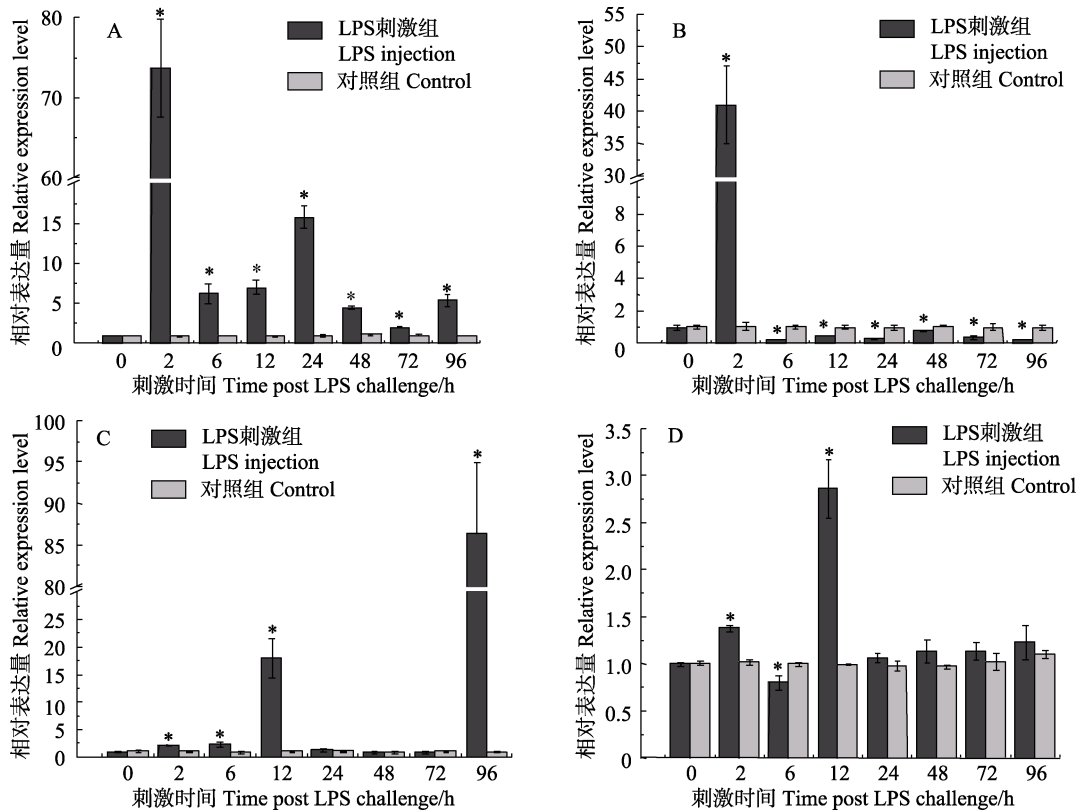


图6 LPS 刺激后 TfIL-15 在不同组织的表达模式变化

Fig.6 The temporary expression of TfIL-15 mRNA in different tissues post LPS challenge

A: 皮肤; B: 血; C: 肝脏 D: 脾. “*”表示实验组与对照组差异显著($P<0.05$)

A: Skin; B: Blood; C: Liver; D: Spleen. The asterisks indicate significant differences ($P<0.05$)

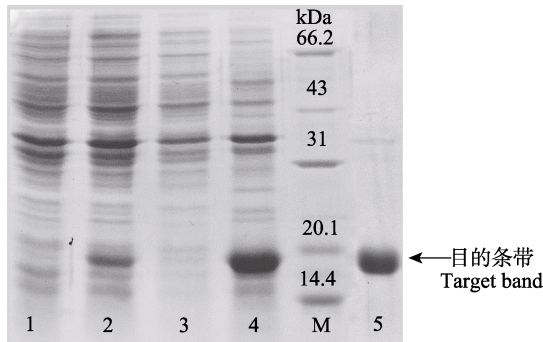


图 7 TfIL-15 的原核表达
Fig.7 Prokaryotic expression of TfIL-15

1: 诱导前细菌总蛋白; 2: 诱导后细菌总蛋白; 3: 超声破碎上清液; 4: 破碎后的包涵体; M: 蛋白 Marker; 5: 纯化蛋白
Lane 1: Lysate of *E. coli* without induction; Lane 2: Lysate of *E. coli* with induced with IPTG; Lane 3: Supernatant of recombinant pET-30a(+)/TfIL-15 after ultrasonication; Lane 4: Sedimentation of recombinant pET-30a(+)/TfIL-15 after ultrasonication; M: Protein marker; 5: Purified protein

性在 23%~61%之间, 可以看出不同物种鱼类 IL-15 变异程度比较大, 这可能是为了适应不同的生长环境而进化所致(TfIL-15 与同为海水或者咸淡水鱼类同源性高于淡水鱼类), 同时这可能也是目前鱼类 IL-15 研究较少的原因之一。

氨基酸序列多序列比对结果显示, 不同物种动物 IL-15 的成熟肽区域的同源性较信号肽区域高, 这可能由于成熟肽参与执行细胞因子的功能, 而信号肽仅参与引导 IL-15 的胞内转运与分泌。在人类 IL-15 成熟肽序列中存在 4 个半胱氨酸残基, 能形成两对二硫键(Bernard *et al*, 2004)。这 4 个半胱氨酸在鱼类 IL-15 同源蛋白序列中高度保守。蛋白质三级结构预测结果显示, TfIL-15 与人类 IL-15 三级结构基本吻合, 同属于 4 α 螺旋家族, TfIL-15 的 2 个二硫键位置与人类二硫键位置重合。这说明这些保守残基对于维持脊椎动物 IL-15 空间构象的形成和功能发挥可能起重要作用。三刺鱼、红鳍东方鲀、金头鲷和本研究松江鲈中, 还含有另外的 2 个半胱氨酸, 在三维结构预测中, 这 2 个半胱氨酸形成了第 3 个二硫键(图 3A)。这 2 个半胱氨酸是否确实形成新的二硫键, 对于维持构象起到怎样的作用, 尚需要进一步验证。

qRT-PCR 结果显示, TfIL-15 广泛表达于松江鲈各个组织器官中, 这与以往研究鱼类 IL-15 的表达模式相同, 并且类似于人类 IL-15 的广泛分布特征, 这表明 IL-15 可能在多个生理过程中发挥重要的作用。值得注意的是, 在卵中, IL-15 也表现出了较高的转录水平表达。在对红鳍东方鲀的研究中也发现, IL-15 在性腺中表达量较高。Das 等(2015)在对露斯塔野鲮

IL-15 的研究中发现, IL-15 在卵巢组织和未受精卵中也呈现出较高的表达量, 而且在受精后发育初期表达量持续上调, 都表明了 IL-15 转录本以母系遗传的形式给予待发育的后代被动免疫保护。IL-15 在卵中遗传性的组成型高表达在卵排出体外、受精卵或幼体尚未获得自身免疫的时候, 对于鱼类的体外受精及幼体发育过程中对抗水体复杂的病原微生物侵袭起着至关重要的作用。

为了进一步探讨 TfIL-15 在机体免疫中的作用, 对 LPS 刺激后 TfIL-15 在松江鲈主要免疫组织内的表达情况进行了检测。结果发现, 在血液和皮肤中, LPS 刺激后 2 h, TfIL-15 迅速上调至最高峰, 在肝脏和脾中 12 h 达到表达高峰, 比皮肤和血液稍有延迟。这可能是因为血液作为承载各种免疫细胞和细胞因子的全身免疫器官, 皮肤作为机体接触外界复杂水体环境的首个免疫组织, 是最直接和快速的 LPS 应答和反应器官; 而脾脏是鱼类红细胞、中性粒细胞和粒性白细胞等各种免疫细胞生产、贮存和成熟的主要场所, 肝脏是鱼类多种重要免疫相关蛋白的合成场所, 因而上调时间与皮肤和血液相比有所滞后。肝脏 TfIL-15 mRNA 在刺激后 96 h 又出现一个新的高峰, 这在对转铁蛋白、C-型凝集素、白介素 1 β 等的研究中也发现(Liu *et al*, 2012a、b; Yu *et al*, 2013), 原因可能是首次免疫激活的免疫细胞产生的新的信号分子, 又激活了新的免疫细胞类型, 从而再次上调表达 TfIL-15 基因。在对红鳍东方鲀的研究中发现, 在 LPS 刺激对 IL-15 的表达没有明显的影响。而在黑青斑河豚的研究中, LPS 可引起几乎所有组织 IL-15 表达量的上调。本结果与黑青斑河豚的研究类似, 推测可能 IL-15 在不同鱼体内的功能存在一定的差异。鱼类作为低等脊椎动物, 其适应性免疫机制相对不完善, 因此在抵御外界病原体入侵时主要依靠先天免疫发挥作用。细胞因子 IL-15 的上调表达正是适应了机体所需, 通过其激活淋巴细胞、促进免疫相关蛋白表达等作用, 在机体对抗外来病原入侵过程中发挥重要的抵御作用。鉴于 TfIL-15 可能在鱼类抵抗外界刺激的免疫反应中的作用, 本研究成功地对松江鲈 IL-15 的成熟肽进行了体外表达, 这为进一步研究 TfIL-15 蛋白的功能奠定了基础。

参 考 文 献

Bamford RN, DeFilippis AP, Azimi N, *et al*. The 5'-untranslated region, signal peptide, and the coding sequence of the carboxyl terminus of IL-15 participate in its multifaceted translational control. *Journal of Immunology*, 1998, 160(9):

- 4418–4426
- Bamford RN, Battiata AP, Waldmann TA. IL-15: The role of translational regulation in their expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 59(4): 476–480
- Bei JX. The homologues of interleukin (IL)-15 and IL-15 receptor subunits in Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*): Cloning, identification and functional characterization. Doctoral Dissertation of Sun Yat-Sen University, 2006 [贝锦新. 红鳍东方鲀白细胞介素(IL)-15 及其受体亚基同源基因的克隆鉴定和功能研究. 中山大学博士研究生学位论文, 2006]
- Bei JX, Suetake H, Araki K, *et al.* Two interleukin (IL)-15 homologues in fish from two distinct origins. *Molecular Immunology*, 2006, 43(7): 860–869
- Bernard J, Harb C, Mortier E, *et al.* Identification of an interleukin-15 alpha receptor-binding site on human interleukin-15. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(23): 24313–24322
- Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, *et al.* Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96(6): 2578–2582
- Chen XZ, Zhang L, Yu SS, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2-D2 in roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 37(10): 133–140 [陈学昭, 张雷, 于珊珊, 等. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)泛素结合酶 E2-D2 基因的分子克隆及组织表达分析. *海洋学报*, 2016, 37(10): 133–140]
- Das S, Mohapatra A, Kar B, *et al.* Molecular characterization of interleukin 15 mRNA from rohu, *Labeo rohita* (Hamilton): Its prominent role during parasitic infection as indicated from infection studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 25–35
- Fang W, Xiang LX, Shao JZ, *et al.* Identification and characterization of an interleukin-15 homologue from *Tetraodon nigroviridis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 143: 335–343
- Fang W. Molecular cloning, evolution and functional analyses of IL-15 subfamily and IL-15 receptor alpha chain family in teleost fish. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009 [方玮. 鱼类 IL-15 及其受体 α 链基因家族的分子克隆、进化 and 功能研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2009]
- Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: Biology and relevance to human disease. *Blood*, 2001, 97(1): 14–32
- Gunimaladevi I, Savan R, Sato K, *et al.* Characterization of an interleukin-15 like (IL-15L) gene from zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(4): 351–362
- Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, *et al.* The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(39): 30653–30659
- Lee YB, Satoh J, Walker DG, *et al.* Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport*, 1996, 7(5): 1062–1066
- Liu YY, Yu SS, Chai YM, *et al.* Transferrin gene expression in response to LPS challenge and heavy metal exposure in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012a, 32(1): 223–229
- Liu YY, Yu SS, Chai YM, *et al.* Lipopolysaccharide-induced gene expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 and interleukin-1 β in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2012b, 33(4): 690–698
- Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, *et al.* Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002, 13(6): 429–439
- Ma HX, Wang L, Wang LQ, *et al.* The different expression patterns of the gene Arginase II in *Paralichthys olivaceus* and the correlation between its expression and *Edwardsiella tarda* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 44–52 [马慧鑫, 王磊, 汪林庆, 等. 牙鲆精氨酸酶 II 基因的克隆以及免疫应答表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 44–52]
- Pérez-Cordón G, Estensoro I, Benedito-Palos L, *et al.* Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish-parasite model. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 37(2): 201–208
- Rathé C, Girard D. Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: Importance of the IL-15 alpha chain. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 76(1): 162–168
- Shi XL, Meng XH, Kong J, *et al.* cDNA cloning of the FBA gene in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression and functional analysis after WSSV infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 112–119 [史晓丽, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国明对虾 FBA 基因克隆及其在白斑综合征病毒感染中的表达及功能分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 112–119]
- Sun SH, Ma P, Li H, *et al.* Prokaryotic expression and biological activity evaluation of recombinant IL15 from tiger pufferfish *Takifugu rubripes*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(6): 598–603 [孙赛红, 马普, 李慧, 等. 红鳍东方鲀白介素 15 的原核表达及其活性测定. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(6): 598–603]
- Wang DY, Huang JS, Guo MQ. Interleukin 15. *Chemistry of Life*, 1996, 16(3): 26–28 [王东勇, 黄建生, 郭明秋. 白介素 15. *生命的化学*, 1996, 16(3): 26–28]
- Wang T, Holland JW, Carrington A, *et al.* Molecular and functional characterization of IL-15 in rainbow trout

- Oncorhynchus mykiss*: A potent inducer of IFN- γ expression in spleen leukocytes. *Journal of Immunology*, 2007, 179(3): 1475–1488
- Wang T, Zhang J, Li DJ, *et al.* Optimization on expression of recombinant human interleukin 21 and its biological activity analysis in vitro. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 20(4): 283–287 [王彤, 张娟, 厉道娟, 等. 重组人白介素 21 的原核表达与体外活性研究的优化. *药物生物技术*, 2013, 20(4): 283–287]
- Yu SQ, Wang SD. Characterization and breeding technology of roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. *Journal of Beijing Fisheries*, 2008, 25(8): 50–52 [于诗群, 王世党. 松江鲈鱼的生物学特征及养殖技术. *北京水产*, 2008, 25(8): 50–52]
- Yu SS, Yang H, Chai YM, *et al.* Molecular cloning and characterization of a C-type lectin in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 582–592

(编辑 冯小花)

Characterization and Recombinant Protein Expression of Interleukin-15 from Roughskin Sculpin, *Trachidermus fasciatus*

LIU Yingying, YU Shanshan, CHAI Yingmei, LIN Xiaopeng, ZHU Qian^①

(School of Marine Science, Shandong University (Weihai), Weihai 264209)

Abstract Interleukin 15 (IL-15) is an important cytokine of fish immune system. In the present study, the IL-15 cDNA named as TfIL-15 was cloned from roughskin sculpin, *Trachidermus fasciatus*. The full-length of TfIL-15 cDNA is 1140 bp, which contains a 5'-UTR (untranslated region) of 165 bp, a 3'-UTR of 453 bp and an open reading frame (ORF) of 522 bp, encoding a polypeptide of 173 amino acids (aa) with a putative 59 aa-long signal peptide. Four out-of-frame AUG initiation codons, the negative translational regulators of mammalian IL-15 genes were also detected in the 5'-UTR of TfIL-15. The protein sequence shared 23%~61% identity with reported fish IL-15s, displaying relatively high degree of variation. TfIL-15 homologues also contained four highly conserved cysteine residues allowing the formation of two disulfide bridges along with four predicted α -helices. Phylogenetic analysis grouped roughskin sculpin with other fish on a separated branch, excluded from mammalian and avian IL-15s. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that TfIL-15 was widely expressed in all detected tissues, with the highest expression in the heart. Post LPS challenge, TfIL-15 increased rapidly to the maximum of 74 folds and 41 folds compared with that of the control group at 2 h post challenge (hpc) in the skin and blood. The induction of TfIL-15 mRNA in the spleen and liver was 3 folds and 18 folds at 12 hpc. Interestingly, at 96 hpc, the expression of TfIL-15 in the liver was up-regulated again to the 86 folds higher than that of the control group. These results indicate that TfIL-15 may play an important role in fish innate immune response against microbial infections. Furthermore, the mature peptide of TfIL-15 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells successfully, laying a foundation for further research on the function of TfIL-15 protein.

Key words Roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*); Interleukin-15 (IL-15); Gene clone; Relative expression; Recombinant protein expression

① Corresponding author: ZHU Qian, E-mail: qianzhu@sdu.edu.com