

基因组学与应用生物学
Genomics and Applied Biology
ISSN 1674-568X, CN 45-1369/Q

《基因组学与应用生物学》网络首发论文

题目：青海湖裸鲤 IL-8 的原核表达及诱导条件优化
作者：马德昭，田菲，吴其中，刘思嘉，赵凯
网络首发日期：2019-05-09
引用格式：马德昭，田菲，吴其中，刘思嘉，赵凯. 青海湖裸鲤 IL-8 的原核表达及诱导条件优化[J/OL]. 基因组学与应用生物学.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20190508.1427.005.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



研究报告

Research Report

青海湖裸鲤 *IL-8* 的原核表达及诱导条件优化马德昭^{1,2,3} 田菲^{1,3} 吴其中⁴ 刘思嘉^{1,2,3} 赵凯^{1,2,3*}

1 中国科学院西北高原生物研究所, 高原生物适应与进化重点实验室, 高原鱼类进化与功能基因组学实验室, 西宁, 810001; 2 中国科学院大学, 北京, 100049; 3 青海省动物生态基因组学重点实验室, 西宁, 810001; 4 青海大学, 西宁, 810016

*通信作者, zhaokai@nwipb.cas.cn

摘要 白细胞介素-8 (interleukin-8, *IL-8*)是一种 CXC 家族趋化因子,主要通过趋化炎症细胞参与机体免疫反应。本研究通过 RT-PCR 技术,扩增得到含一对酶切位点的青海湖裸鲤 *IL-8* 成熟蛋白 DNA 序列(gp*IL-8*),经酶切连接至 pET30a (+)质粒得到原核表达重组质粒 pET30a-gp*IL-8*,将重组质粒转化入大肠杆菌 B L21 后成功诱导得到分子量约 13.7 kD 的重组蛋白,重组蛋白以包涵体和可溶性蛋白两种形式存在。对影响蛋白表达量的诱导物浓度和诱导时间进行优化,发现包涵体重组蛋白表达量随诱导时间增加而增加,随诱导物浓度增加呈先增加后减少的趋势,在 0.4 mmol/L IPTG 诱导 8 h 时表达量最高。可溶性重组蛋白表达量总体上随诱导时间的增加呈先增加后减少趋势,随诱导物浓度的增加表达量无明显改变,在 0.4 mmol/L IPTG 诱导 6 h 时即可表达高浓度的可溶性重组蛋白。因可溶性蛋白有利于后续实验,利用最佳诱导条件诱导后对可溶性蛋白进行纯化,得到高纯度的 *IL-8* 重组蛋白,测得浓度达 101.5 μg/mL,满足后续实验要求。本研究为青海湖裸鲤 *IL-8* 多克隆抗体制备,及其功能、作用机制研究提供了理论依据。

关键词 青海湖裸鲤, *IL-8*, 原核表达, 诱导条件优化

Construction of Prokaryotic Expression System and Optimization of Expression Conditions of *IL-8* in *Gymnocypris przewalskii przewalskii*

Ma Dezhaoh^{1,2,3} Tian Fei^{1,3} Wu Qizhong⁴ Liu Sijia^{1,2,3} Zhao Kai^{1,2,3*}

1 Laboratory of Plateau Fish Evolutionary and Functional Genomics, Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3 Qinghai Key Laboratory of animal ecological genomics, Xining, 810001; 4 University of Qinghai, Xining, 810016

* Corresponding authors, zhaokai@nwipb.cas.cn

Abstract Interleukin-8 (*IL-8*) is one of CXC chemokines playing the important role in mediating inflammatory response and being involved in immune response. In this study, the primers with two restriction enzyme cutting sites were used to clone the complete DNA sequence of *IL-8* mature protein of *Gymnocypris przewalskii przewalskii*. Then the gp*IL-8* gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET30a (+) to construct the recombinant vector pET30a-gp*IL-8*. After that, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 strain to the expression of target protein. A molecular weight of 13.7 kD recombinant protein which existed in forms of inclusion body and soluble protein was successfully expressed by induction. The concentration of inducer and the induction time affecting the expression level of recombinant protein were optimized, the expression level of inclusion body increased with the augment of induction time, while the expression level firstly increased and then decreased with the augment of the concentration of inducer, and the expression level was the highest at 0.4 mmol/L IPTG for 8 hours. On the whole, the expression level of soluble recombinant protein firstly increased and then decreased with the augment of the induction time, while the expression level of soluble protein didn't change obviously with the augment of the concentration of inducer, and the expression level was the highest at 0.4 mmol/L IPTG for 6 hours. Owing to soluble protein being beneficial to subsequent experiments, it can use the

best induction conditions to purify soluble recombinant protein of gp*IL-8*, a concentration of 101.5 $\mu\text{g/mL}$, which can meet the requirements of the subsequent experiments. The result laid a foundation for the preparation of *IL-8* polyclonal antibody, and the research of function and mechanism of *IL-8* in *Gymnocypris przewalskii przewalskii*.

Keywords *Gymnocypris przewalskii przewalskii*, Interleukin-8 (*IL-8*), Prokaryotic expression, Conditions optimization

白细胞介素-8 (interleukin-8, *IL-8/CXCL8*)是一种小分子质量蛋白,属于趋化因子 CXC 亚家族成员(Laing and Secombes, 2004)。在哺乳动物中, *IL-8* 主要由巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、纤维母细胞等多种细胞分泌(Nakamura et al., 1991), 与 CXCR1 和 CXCR2 结合趋化中性粒细胞等白细胞到达损伤、感染部位, 参与炎症反应, 在先天性免疫反应中发挥重要作用(Harada et al., 1994)。 *IL-8* 的基因结构和氨基酸序列特征已经在不同物种中被揭示, 基因结构分析显示, 在哺乳动物、鸟类、爬行类、鱼类中 *IL-8* 基因均由 3 个内含子和 4 个外显子组成, 不同物种的 *IL-8* 氨基酸序列中均含有四个高度保守的半胱氨酸残基(Li and Yao, 2013; Nguyen et al, 2017)。目前对哺乳动物 *IL-8* 的功能已经有较深入的研究, 但鱼类 *IL-8* 功能的研究依旧较少(Wang et al, 2016)。现有研究显示鱼类 *IL-8* 的功能与哺乳动物类似, 具有趋化白细胞、促进炎症反应的功能(Wang et al., 2013; Wang et al., 2017)。

青海湖裸鲤是青藏高原天然鱼类中发挥经济效益最大的一种鱼类(武云飞和吴翠珍, 1991), 在维护青海湖及周边地区生态系统稳定中发挥重要作用。在野外调查和人工养殖过程中发现, 青海湖裸鲤极易感染多种寄生虫, 可导致鱼体大量死亡(杨延宝和廖翔华, 1999; 杨延宝等, 2000; Tong et al., 2015), 已成为青海湖裸鲤保护和人工驯化养殖的重要限制因素。目前对青海湖裸鲤免疫系统及免疫基因的研究很少, 尚没有有关 *IL-8* 基因的研究。本研究利用实验室前期鉴定的青海湖裸鲤 *IL-8* (gp*IL-8*)基因设计引物, 结合 RT-PCR 技术克隆得到带有酶切位点的青海湖裸鲤 *IL-8* 成熟蛋白基因序列, 通过基因工程技术构建青海湖裸鲤 *IL-8* 原核表达系统, 并对重组蛋白诱导表达条件进行优化, 经诱导、纯化得到高纯度的重组蛋白。该研究为青海湖裸鲤 *IL-8* 多克隆抗体制备及进一步研究青海湖裸鲤 *IL-8* 的生物学活性、作用机制提供了有效的研究工具。

1 结果与分析

1.1 *IL-8* 原核表达载体构建及转化

以青海湖裸鲤 cDNA 为模板, 利用带有 *Bam*H1 和 *Ho*X1 酶切位点的特异引物扩增得到 247 bp 的目的条带, 并成功连接到 *PMD*^{19T} 载体。通过 *Bam*H1 和 *Ho*X1 双酶切 *PMD*^{19T}-gp*IL-8* 重组质粒获得与预期大小一致的带有粘性末端的目的条带(图 1)。对 *pET30a* 空质粒进行双酶切得到带有粘性末端的线性质粒。用 T4 DNA 连接酶连接酶切的目的条带和质粒, 并转入 *DH5a* 大肠杆菌感受态中进行克隆, 用 *Bam*H1 和 *Ho*X1 对阳性克隆提取的质粒进行双酶切得到与预期大小一致的两个条带(图 2)。经测序确认成功构建 *pET30a*-gp*IL-8* 表达载体, 将重组质粒转化入 *BL21* 感受态后得到表达重组 *IL-8* 蛋白的工程菌。

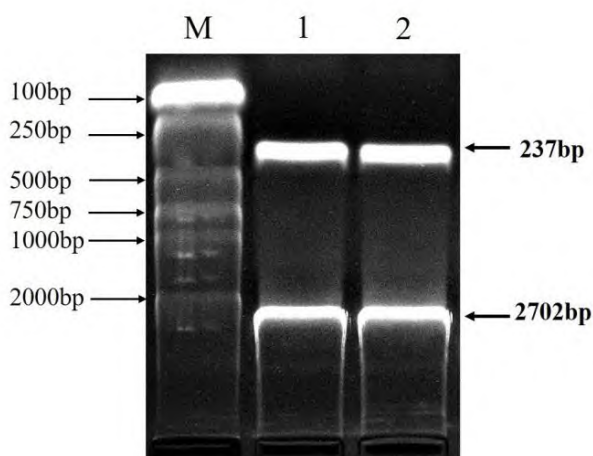


图 1 *PMD*^{19T}-gp*IL-8* 重组质粒双酶切

注: M: DL 2 000 Marker; 1, 2: PMD^{19T}-gpIL-8 质粒双酶切

Figure 1 Double enzyme digestion of PMD^{19T}-gpIL-8 recombinant vector

Note: M: DL 2 000 Marker; 1, 2: Double enzyme digestion of PMD^{19T}-gpIL-8 vector

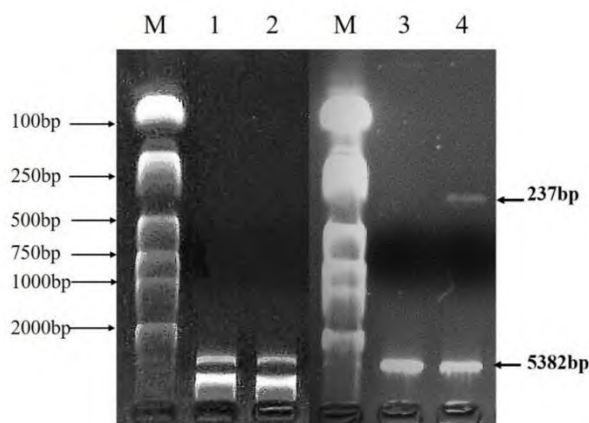


图 2 pET30-gpIL-8 表达载体的提取和双酶切

注: M: DL 2 000 Marker; 1, 2: pET30-gpIL-8 表达载体; 3: pET30 空质粒双酶切; 4: pET30-gpIL-8 表达载体双酶切

Figure 2 Extraction and double enzyme digestion of pET30-gpIL-8 expression vector

Note: M: DL 2 000 Marker; 1, 2: pET30-gpIL-8 expression vector; 3: double enzyme digestion of pET30 vector; 4: double enzyme digestion of pET30-gpIL-8 expression vector

1.2 重组 IL-8 蛋白的诱导表达

含重组质粒 pET30a-IL-8 的表达菌株经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 菌体破碎液的上清液和沉淀中均含有约 14 kD 的融合蛋白, 与预测的重组蛋白分子量 13.7 kD 一致。在未经 IPTG 诱导的含重组质粒的表达菌株破碎液上清和沉淀中同样含有与预测分子量大小一致的重组蛋白, 但表达量比诱导组低; 含 pET30a (+)空质粒的 *E.coli* BL21 诱导后上清液与沉淀中未出现融合蛋白条带, 表明目的基因在大肠杆菌中被成功诱导表达(图 3)。

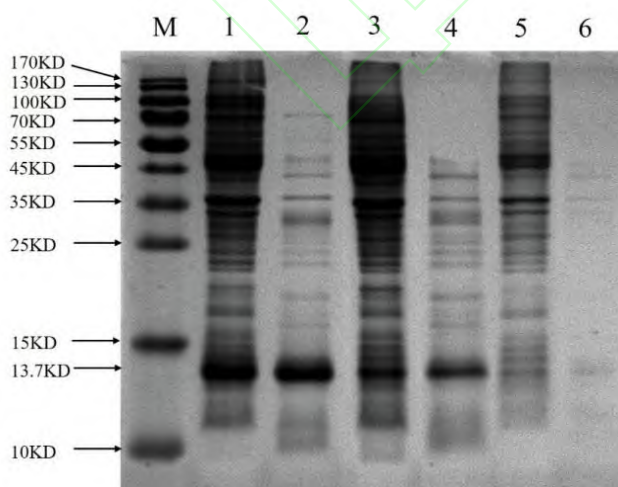


图 3 gpIL-8 重组蛋白诱导表达

注: M: 蛋白分子 Marker; 1: 含重组质粒的菌液诱导后沉淀; 2: 含重组质粒的菌液诱导后上清液; 3: 未诱导含重组质粒的菌体沉淀; 4: 未诱导含重组质粒的菌体上清液; 5: 含空质粒菌液诱导后沉淀; 6: 含空质粒菌液诱导后上清液

Figure 3 Inducible expression of gpIL-8 recombinant protein

Note: M: Protein molecular marker; 1: Protein precipitate of induced bacteria with pET30-gpIL-8 vector; 2: Protein supernatant of induced bacteria with pET30-gpIL-8 vector; 3: Protein precipitate of uninduced bacteria with pET30-gpIL-8 vector; 4: Protein supernatant of uninduced bacteria with pET30-gpIL-8 vector; 5: Protein precipitate of induced bacteria with pET-30a vector; 6: Protein supernatant of induced bacteria with pET-30a vector

1.3 gpIL-8 融合蛋白表达条件优化

为提高融合蛋白在大肠杆菌中的表达量，对诱导剂的浓度和诱导时间进行了优化。结果发现，当诱导物浓度一定时，包涵体重组蛋白表达量随诱导时间增加而增加，在诱导 8 h 时产生大量的包涵体蛋白。当诱导时间一定时，重组蛋白表达量随诱导物浓度的增加呈先增加后减少的趋势，IPTG 诱导浓度在 0.4 mmol/L 时包涵体重组蛋白表达量最高(图 4)。因此，包涵体重组蛋白在 0.4 mmol/L IPTG 诱导 8 h 时表达量最高。

当诱导物浓度一定时，可溶性重组蛋白表达量随诱导时间呈先增加后减少的趋势，诱导 6 h 时可溶性蛋白表达量最高。当诱导时间一定时，随诱导物 IPTG 浓度的增加可溶性蛋白表达量无明显改变，在 0.4 mmol/L IPTG 诱导 6 h 时可溶性蛋白表达量达到最高(图 5)。

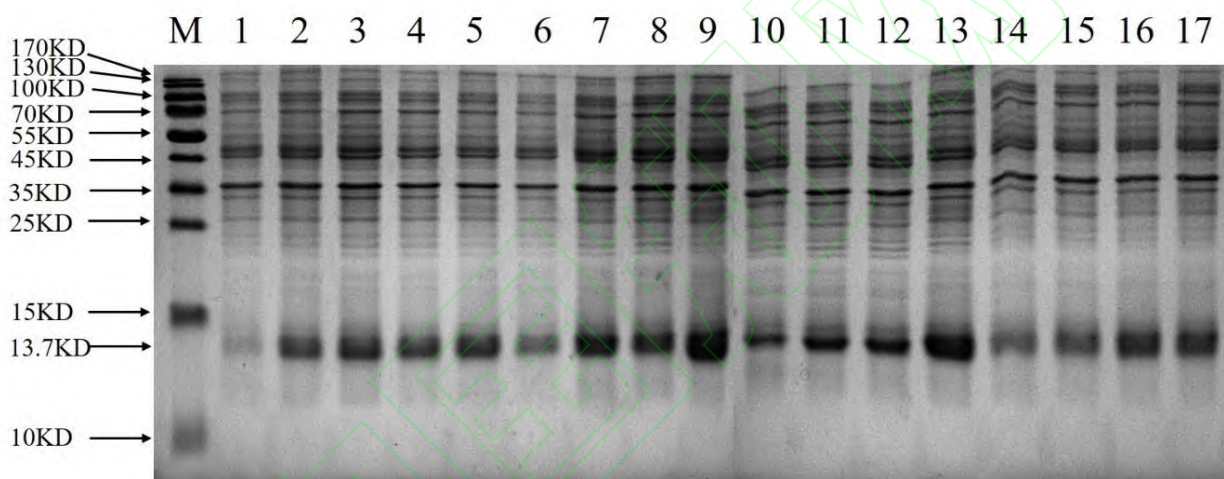


图 4 gpIL-8 包涵体蛋白诱导条件优化

注: M: 蛋白分子 Marker; 1: 未诱导; 2~5: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 6~9: 0.4 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 10~13: 0.8 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 14~17: 1.0 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h

Figure 4 Optimization of induction conditions of Inclusion body protein

Note: M: Protein molecular marker; 1: Inclusion body protein in the uninduced group; 2~5: Inclusion body protein induced by 0.1 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hour; 6~9: Inclusion body protein induced by 0.4 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hour; 10~13: Inclusion body protein induced by 0.8 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hour; 14~17: Inclusion body protein induced by 1.0 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hour

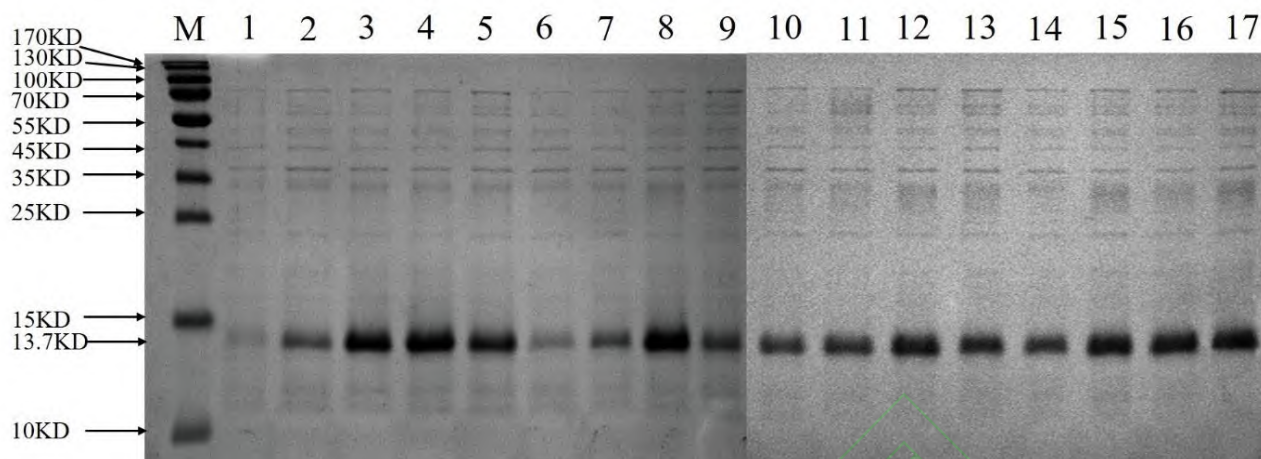


图 5 gpIL-8 可溶性蛋白诱导条件优化

注: M: 蛋白分子 Marker; 1: 未诱导; 2~5: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 6~9: 0.4 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 10~13: 0.8 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h; 14~17: 1.0 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 4 h, 6 h, 8 h

Figure 5 Optimization of induction conditions of soluble protein

Note: M: Protein molecular marker; 1: Soluble protein in the uninduced group; 2~5: Soluble protein induced by 0.1 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hours; 6~9: Soluble protein induced by 0.4 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hours; 10~13: Soluble protein induced by 0.8 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hours; 14~17: Soluble protein induced by 1.0 mmol/L IPTG for 2, 4, 6, 8 hours

1.4 重组蛋白的纯化和浓度测定

由于可溶性蛋白易纯化且有利于后续实验, 因此从上清液中纯化可溶性重组蛋白。基于诱导条件优化结果, 用 0.4 mmol/L IPTG 诱导菌液 6 h, 取破碎液上清进行重组蛋白纯化, 获得高纯度的 IL-8 重组蛋白(图 6)。通过制作标准曲线(图 7), 测得纯化的重组蛋白浓度可达 101.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

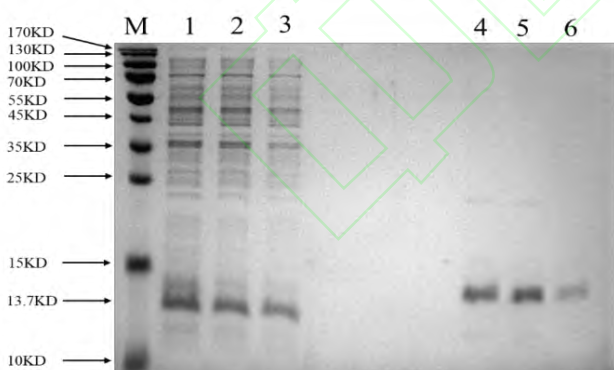


图 6 gpIL-8 重组蛋白纯化

注: M: 蛋白分子 Marker; 1, 2, 3: 菌体破碎液上清液; 4: 第一次重组蛋白洗脱液; 5: 第二次重组蛋白洗脱液; 6: 第三次重组蛋白洗脱液

Figure 6 Purification of gpIL-8 recombinant protein

Note: M: protein molecular marker; 1, 2, 3: Protein supernatant of bacteria; 4: The first eluate of gpIL-8 recombinant protein; 5: The second eluate of gpIL-8 recombinant protein; 6: The third eluate of gpIL-8 recombinant protein

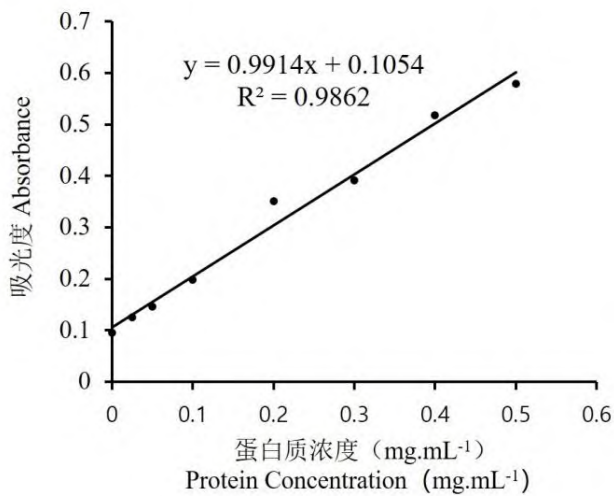


图 7 BSA 蛋白质浓度标准曲线

Figure 7 The BSA standard curve of protein concentration

2 讨论

功能基因在体外的表达主要用原核和真核两种表达系统实现，目前，原核表达系统的研究更加深入，技术也更加成熟(范翠英等, 2012)。大肠杆菌是第一个被用于外源基因表达的宿主菌，因其具有遗传背景清楚、生长繁殖快、易操作、成本低、易表达等优点，成为外源基因表达的首选系统(Baneyx, 1999; Sørensen, 2005)。pET 系统是基于 T7 RNA 聚合酶与其强启动子之间的特异性、转录高效性建立的表达载体，能对外源基因进行高效表达(吴一凡等, 2002; 范翠英等, 2012)，并能使表达的蛋白携带 6-His 标签，便于目的蛋白的鉴定和纯化。本研究以大肠杆菌 BL21 作为宿主菌，利用 pET30a (+)表达载体对青海湖裸鲤 *IL-8* 基因进行原核表达。

对构建的青海湖裸鲤 *IL-8* 重组蛋白表达系统进行诱导表达，发现该系统可诱导产生包涵体和可溶性蛋白两种形式的重组蛋白，且可溶性蛋白表达量高，说明该系统能很好的表达可溶性蛋白，这得益于 *IL-8* 相对较小的分子量，将有利于后期对青海湖裸鲤 *IL-8* 融合蛋白进行纯化及后续研究。为提高融合蛋白的表达量，对影响表达量的诱导时间和诱导物浓度进行了优化。结果显示，在诱导物浓度一定时，随着诱导时间的增加，可溶性蛋白的表达量总体上先增加后减少，在诱导 6 小时时达到最高，而包涵体蛋白的表达量随诱导时间的增加而增加，表明长时间的诱导会使可溶性蛋白变性为包涵体蛋白，反而不利于可溶性蛋白的获得。当诱导时间一定时，可溶性蛋白的表达量并没有随诱导物浓度的升高呈现出明显的变化，诱导物浓度在 0.4 mmol/L 时即可表达较高水平的可溶性蛋白，而包涵体形式的蛋白随诱导物浓度的增加表达量先增加后减少，在 0.4 mmol/L 时表达量最高，表明诱导剂浓度的增加并不一定使蛋白表达量增加，反而会抑制蛋白的表达，这可能是由于高浓度的 IPTG 对细胞具有毒性作用(常云胜等, 2018)。

本研究成功构建青海湖裸鲤 *IL-8* 原核表达系统，并对重组蛋白诱导表达条件进行了优化，发现在 0.4 mmol/mL IPTG 诱导 6 h 的条件下可得到高浓度的可溶性蛋白，对可溶性蛋白进行纯化得到高纯度青海湖裸鲤 *IL-8* 重组蛋白。该研究为青海湖裸鲤 *IL-8* 多克隆抗体制备，及功能、作用机制研究提供了理论依据。

3 材料与方法

3.1 实验材料

一龄青海湖裸鲤由青海湖裸鲤救护中心提供。基因克隆载体 PMD19-T 购自 TaKaRa 公司，大肠杆菌 DH5a 感受态购自天恩泽生物技术有限公司，表达菌株 BL21 感受态购自上海生工生物工程有限公司，pET30 (+)质粒在 -20℃ 条件下保存于本实验室。

3.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 反转录试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H1 和 *Hox*1 购自 NEB 公司; 质粒小量提取试剂盒、PCR 产物凝胶回收试剂盒、IPTG (异丙基硫代半乳糖) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、考马斯亮蓝快速染液、His 标签蛋白纯化试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、彩虹蛋白 Marker 购自碧云天公司; 引物合成和测序由武汉天一辉远生物科技有限公司完成。

3.3 IL-8 原核表达载体构建及转化

按总 RNA 提取试剂盒中的说明书对青海湖裸鲤头肾组织总 RNA 进行提取, 经琼脂糖凝胶检测后, 按照反转录试剂盒中的说明书将 RNA 反转录为 cDNA。

根据青海湖裸鲤成熟肽 DNA 序列设计一对带有酶切位点的引物(F: CGGGATCCATGAGTCTTAGAGGTCTGGGTGTA (*Bam*H1); R: CCCTCGAGTCATGGGGCTTTGTTGGCAAT (*Hox*1)), 并由武汉天一辉远公司合成。以青海湖裸鲤 cDNA 为模板扩增目的序列, 扩增产物纯化后连接至 PMD-19T 载体, 并转化 DH5a 感受态细胞后在 LB 固体培养基(含 50 μ g/mL Amp⁺)上进行培养, 经菌液 PCR 鉴定为阳性的菌液送至武汉天一辉远生物公司进行测序确认。

利用质粒小量抽提试剂盒提取测序正确的重组克隆质粒, 分别使用 *Bam*H1 和 *Hox*1 内切酶在 37°C 下对重组克隆质粒和原核表达载体 pET30 空质粒进行双酶切, 酶切后回收目的片段和酶切的空载体。在 16°C 条件下, 利用 T4 DNA 连接酶过夜连接回收的目的片段和表达载体, 之后转化 DH5a 感受态, 并在含有卡那霉素的 LB 固体培养基(含 30 μ g/mL Kan⁺)上进行培养。对通过菌液 PCR 和双酶切验证为阳性的克隆菌株进行质粒提取, 提取的重组质粒转化入 BL21 感受态细胞中, 在含有卡那霉素的 LB 固体培养基(含 30 μ g/mL Kan⁺)上进行培养。通过菌液 PCR 和酶切验证为阳性的克隆送至天一辉远公司测序, 以确定成功构建青海湖裸鲤 IL-8 表达菌株。

3.4 IL-8 重组蛋白诱导表达

将带有重组质粒的表达菌株和带 pET30 空质粒的菌株以 1:100 的比例接种到 LB(含 30 μ g/mL Kan⁺)液体培养基中, 带重组质粒的菌株接种两份, 37°C、200 r/min 震荡培养约 3 h 至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6, 在一份重组质粒菌液和空质粒菌液中加入 IPTG 至终浓度达到 1 mmol/L, 另一份带重组质粒菌液不加 IPTG, 继续在上述条件下诱导 4 h, 各收集 3 mL 菌液进行超声破碎, 收集破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

3.5 重组蛋白诱导表达条件优化

为得到更高浓度的重组蛋白, 对诱导表达过程中 IPTG 的浓度和诱导时间进行优化。将成功表达重组蛋白的菌株按 1:100 比例分别接种到 4 个含有 20 mL LB (含 30 μ g/mL Kan⁺)液体培养基的试管中, 37°C、200 r/min 培养约 3 h, 使 4 个试管中菌液 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6, 在各试管中加入不同量的 IPTG, 使 4 个试管中的 IPTG 终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L、1 mmol/L。37°C、200 r/min 条件下对 4 个试管中的菌液进行诱导, 在诱导 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 时分别从每个试管中取 3 mL 菌液, 对收集的菌液分别进行超声破碎和离心, 收集上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝染色后观察表达情况, 确定最佳诱导条件。

3.6 重组蛋白纯化和浓度测定

按 1:100 的比例将构建的青海湖裸鲤 IL-8 表达菌株接种至 100 mL LB (含 30 μ g/mL Kan⁺)液体培养基中, 在 37°C、200 r/min 条件下培养约 3 h, 使 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6, 根据以上优化的最佳诱导条件对菌液进行诱导, 离心后对收集的菌体进行超声破碎, 离心取上清液, 根据蛋白纯化试剂盒说明书中的步骤过镍柱纯化重组蛋白, 纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 检测其纯度。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白的浓度, 先根据说明书中的方法制作标准曲线, 再利用标准曲线和样品吸光度计算蛋白浓度。

作者贡献

马德昭负责实验实施、论文撰写；田菲负责实验与论文的指导，吴其中参与实验实施和论文撰写；刘思嘉参与实验设计和结果分析；赵凯是项目负责人，指导实验设计及论文写作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31700325)和青海省自然科学基金(2016-ZJ-941Q)共同资助。

参考文献

- Laing K.J., and Secombes C.J., 2004, Chemokines, *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5): 443-460
- Nakamura H., Yoshimura K., Jaffe H.A., and Crystal R.G., 1991, Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 266(29): 19611-19617
- Harada A., Sekido N., Akahoshi T., Wada T., Mukaida N., and Matsushima K., 1994, Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, 56(5): 559-564
- Li C., and Yao C.L., 2013, Molecular and expression characterizations of interleukin-8 gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), *Fish and Shellfish Immunology*, 34(3): 799-809
- Nguyen T.T.T., Nguyen H.T., Wang P.C., and Chen S.C., 2017, Identification and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, TNF- α and IL-8, in cobia (*Rachycentron canadum* L.) in response to *Streptococcus dysgalactiae* infection, *Fish and Shellfish Immunology*, 67: 159-171
- Wang E.L., Wang J., Long B., Wang K.Y., He Y., Yang Q., Chen D.F., Geng Y., Huang X.L., Ouyang P., and Lai W.M., 2016, Molecular cloning, expression and the adjuvant effects of interleukin-8 of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against *Streptococcus iniae*, *Scientific Reports*, 6: 29310
- Wang T.T., Song X.H., Bao G.M., Zhao L.X., Yu X., and Zhao J., 2013, Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*, *Fish and Shellfish Immunology*, 35(5): 1421-1432
- Wang G.L., Wang M.C., Zhang X.W., Chang M.X., Xie H.X., and Nie P., 2017, Molecular cloning, biological effect, and tissue distribution of interleukin-8 protein in mandarin fish (*Siniperca chuasti*) upon *Flavobacterium columnare* infection, *Fish and Shellfish Immunology*, 66: 112-119
- Wu Y.F., and Wu C.Z., eds., 1991, The fishes of the Qinghai-Xizang Plateau, Sichuan Publishing House of Science and Technology, Chengdu, China, pp.444 (武云飞, 吴翠珍, 主编, 1991, 青藏高原鱼类, 四川科学技术出版社, 中国, 成都, pp.444)
- Yang T.B., and Liao X.H., 1999, Studies on the cavity helminth community of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* in Qinghai Lake, *Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinicaz)*, 23(2): 134-140 (杨廷宝, 廖翔华, 1999, 青海湖裸鲤体腔寄生蠕虫群落研究, *水生生物学报*, 23(2): 134-140)
- Yang T.B., Liao X.H., and Zeng B.P., 2000, Population ecology of *Contracaecum rudolphii* in the host *Gymnocypris przewalskii przewalskii* in Qinghai Lake, *Shuisheng Shengwu Xuebao (Acta Hydrobiologica Sinicaz)*, 24(3): 213-218 (杨廷宝, 廖翔华, 曾伯平, 2000, 青海湖裸鲤寄生对盲囊线虫的种群生态研究, *水生生物学报*, 24(3): 213-218)
- Tong C., Zhang C.F., Zhang R.Y., and Zhao K., 2015, Transcriptome profiling analysis of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) provides insights into the immune-related genes in highland fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2): 366-377
- Fan C.Y., Feng L.Y., Fan J.L., Guo D.A., and Liu X., 2012, Recent advances on the expression systems for recombinant protein production, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 22(2): 76-80 (范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 果德安, 刘璇, 2012, 重组蛋白表达系统的研究进展, *生物技术*, 22(2): 76-80)

- Baneyx F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5): 411-421
- Sørensen H.P., 2005, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 115(2): 113-128
- Wu Y.F., Zhang S.Q., Gao X.Y., and Liu X.Y., 2002, Expression of B lymphocyte stimulator (BLyS) from pET plasmid using lactose as inducer, *Nanjing Shida Xuebao (Ziran Kexueban) (Journal of Nanjing Normal University (Natural Science))*, 5(1): 89-93 (吴一凡, 张双全, 高秀玉, 刘晓宇, 2002, 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究, *南京师大学报(自然科学版)*, 25(1): 89-93)
- Chang Y.S., Zhou W., Gao Z.H., and Ding Y., 2018, Cloning and Prokaryotic Expression of *recA* Gene of *Vibrio harveyi*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 37(5): 1947-1954 (常云胜, 周维, 高增鸿, 丁燊, 2018, 哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*) *recA* 基因的克隆与原核表达, *基因组学与应用生物学*, 37(5): 1947-1954)