

战俊澎,邹德颖,常江,等.小鼠 IL-1Ra 蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备[J].江苏农业科学,2022,50(9):37-42.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.007

# 小鼠 IL-1Ra 蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备

战俊澎<sup>1</sup>,邹德颖<sup>1,2</sup>,常江<sup>1</sup>,杨馨<sup>1</sup>,郭珣<sup>1</sup>,张凯<sup>1</sup>,刘益辛<sup>1</sup>,

胡盼<sup>1</sup>,卢士英<sup>1</sup>,李岩松<sup>1</sup>,柳增善<sup>1</sup>,任洪林<sup>1</sup>

(1.人兽共患病研究教育部重点实验室/吉林大学人兽共患病研究所/吉林大学动物医学学院,吉林长春 130062;

2.辽宁省盘锦检验检测中心,辽宁盘锦 124000)

**摘要:**以小鼠脾脏 cDNA 为模板,用降落 PCR 扩增 IL-1Ra 基因片段,IL-1Ra 基因片段长约为 537 bp。将 IL-1Ra 扩增片段和原核表达载体 pET-30a(+) 连接构建重组表达质粒,在 37 ℃ 诱导表达,重组表达的小鼠 IL-1Ra 蛋白的分子质量为 19 ku。用纯度较好的小鼠 IL-1Ra 重组蛋白免疫兔子,制备特异性多克隆抗体;测定多克隆抗体的效价达到 1:4 096 000。经 Western-Blot 鉴定该抗体可与 Raw264.7 细胞中表达的小鼠 IL-1Ra 天然蛋白发生特异性结合。利用实时荧光定量 PCR 和 Western-Blot 检测表明布鲁氏菌 S2 弱毒株感染 Raw264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞)后小鼠 IL-1Ra 上调表达。本研究成功制备了小鼠 IL-1Ra 重组蛋白和兔抗多克隆抗体,为深入探讨小鼠 IL-1Ra 与布鲁氏菌感染之间的关系提供工具。

**关键词:**小鼠;IL-1Ra;原核表达;多克隆抗体;IL-1Ra 重组蛋白

**中图分类号:**S858.91 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0037-06

白介素-1(IL-1)家族是最早报道的细胞因子家族之一,由 8 个细胞因子(IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-18、IL-33、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$ 、IL-37)和 3 个受体拮抗剂(IL-1Ra、IL-36Ra、IL-38)组成<sup>[1]</sup>。IL-1Ra 是 IL-1 的 1 个结构变体,与 IL-1R 结合的亲和力几乎与 IL-1 相同,但不能激活细胞<sup>[2-3]</sup>。尽管 IL-1 及 IL-1Ra 与 IL-1R I 具有相似的亲和力,但是由于少数 IL-1 与 IL-1R I 结合便足以完全激活细胞免疫应答,而且多数细胞中 IL-1R I 表达水平较高,在表达 IL-1Ra 的细胞中至少需要 100~1 000 倍过量的 IL-1Ra 才能抑制 50% 的 IL-1 反应<sup>[4-5]</sup>。IL-1Ra 包括 4 个亚型,1 个分泌型(sIL-1Ra)和 3 个胞内型(icIL-1Ra1、icIL-1Ra2、icIL-1Ra3),其中 sIL-1Ra 和 icIL-1Ra1 与 IL-1R 结合良好,而 icIL-1Ra3 与受体结合能力较弱<sup>[6]</sup>。IL-1Ra 可以减轻被注射脂多糖(LPS)的兔子产生严重的低血

压,并在免疫复合物诱导的炎症性肠病动物模型中减轻 IL-1 介导的肠道炎症和坏死,证明 IL-1Ra 在一些病理情况下有助于逆转 IL-1 所引起的炎症反应<sup>[7-8]</sup>。

IL-1 $\beta$  与 IL-1Ra 已经证明在维持肠道稳态,炎症性肠病(IBD)和炎症性结直肠癌(CRC)的发病机制中存在 2 种不同的甚至相反的功能<sup>[9-10]</sup>。过量的 IL-1 释放会引起严重的炎症反应及自身免疫类疾病<sup>[11]</sup>。而 IL-1Ra 重组蛋白与不同药物联用可以有效治疗一些疾病,目前 IL-1Ra 也可应用于基因治疗<sup>[12]</sup>。目前已有研究证明,IL-1Ra 重组蛋白对治疗类风湿关节炎是有效果的<sup>[13]</sup>。笔者所在课题组前期通过构建布鲁氏菌强毒株、弱毒株感染绵羊白细胞层抑制性消减杂交(SSH) cDNA 文库,筛选到 2 种差异表达的基因——IL-1 $\beta$  和 IL-1Ra,并证明了布鲁氏菌 S2 疫苗株与野毒株感染可引起这 2 个基因差异表达<sup>[14]</sup>。且目前国内外未见同时针对 IL-1 $\beta$  及 IL-1Ra 与布鲁氏菌之间关系的研究报道,因此对 IL-1Ra 分子特征与生理病理功能的研究将有助于探究其与布鲁氏菌感染之间的关系。

本研究拟通过构建重组质粒 pET-30a-Ra 并进行原核表达,对重组蛋白进行纯化,免疫动物制备抗小鼠 IL-1Ra 重组蛋白的多克隆抗体,以期探

收稿日期:2021-11-18

基金项目:吉林省科技发展规划(编号:YDZJ202101ZYTS124);中央高校基本科研业务费专项资金(编号:45121031B007)。

作者简介:战俊澎(1997—),女,辽宁大连人,硕士研究生,主要从事兽医公共卫生学研究。E-mail:zhanjp2021@163.com。

通信作者:任洪林,博士,教授,主要从事兽医公共卫生、人兽共患病、食品安全快速检测技术等研究。E-mail:renhl@jlu.edu.cn。

究小鼠 IL-1Ra 与布鲁氏菌感染之间的关系。

## 1 材料与方法

试验在吉林大学人兽共患病研究所细菌实验室内进行,试验时间为 2020 年 7 月至 2021 年 9 月。

### 1.1 材料

布鲁氏菌 S2 弱毒株、原核表达载体 pET-30a(+),大肠杆菌 BL21(DE3)和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、Raw264.7 细胞由笔者所在实验室保存;SPF 级雌性兔子购自辽宁长生生物技术股份有限公司;TRIzol、反转录试剂盒,ES-Taq 酶,DL2000 DNA maker,限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶和 pMD™18-T Vector Cloning Kit 均购自 TakaRa 公司;质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生物科技(北京)有限公司;彩虹预染蛋白 marker 和 M5 HiPer ECL Western HRP Substrate(超敏 ECL 发光液)购自北京聚合美生物科技有限公司;弗氏不完全和弗氏完全佐剂购自美国 Sigma 公司;TMB 显色液 A 液和 B 液购自北京梅科万德生物科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自安诺伦生物科技有限公司。

### 1.2 引物设计与合成

鼠源 IL-1Ra 基因的 CDS 序列(登录号:NM001039701.3)来源于 NCBI 数据库。引物序列如下:上游引物,5'-GGAATTCCATATGCGCCCTTCTGGAAAAGACCCCTGCAAGATGCAAGCCTTCA-3';下游引物,5'-CCGCTCGAGCTAATGGTGATGGTGTGATGTTGGTCTTCCTGGAAGTAGAACTT-3'(下划线部分分别为 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点)。引物合成自吉林省库美生物科技有限公司。

### 1.3 目的片段的扩增

用 TRIzol 法提取小鼠脾脏总 RNA,用反转录试剂盒反转录合成 cDNA,-80℃分装,保存。以小鼠脾脏 cDNA 为模板,降落 PCR 扩增得到小鼠 IL-1Ra 基因的 CDS 区序列。PCR 反应总体积为 20  $\mu$ L:模板 2  $\mu$ L,2  $\times$  Es Taq MasterMix(Dye) 10  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。降落 PCR 扩增程序为:95℃7 min;95℃1 min、72℃40 s、72℃1 min,每 1 个循环降低 1℃,共 23 个循环;94℃1 min、60℃40 s、72℃1 min,共 25 个循环;72℃10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳验证产物正确后,用胶回收试剂盒回收目的片段。将纯化好的目的片段与 pMD-18T 载体连接后转化入 DH5 $\alpha$  感受

态细胞,用西林瓶涂布于含有氨苄的 LB 固体平板上,37℃培养 12 h 后挑取单个菌落进行菌液 PCR 鉴定,将鉴定正确的菌株送去测序,鉴定正确的质粒命名为 pMD-18T-Ra。

### 1.4 pET-30a-Ra 重组质粒的构建

从测序正确的重组菌株和保种的 pET-30a(+)菌株中提取质粒。将 pMD-18T-Ra 质粒和 pET-30a(+)空质粒分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 这 2 种限制性核酸内切酶在 37℃进行双酶切 5 h,利用 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶将 IL-1Ra 与 pET-30a(+)载体 16℃过夜连接,连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞,用西林瓶涂布于含有卡那霉素的 LB 固体平板上,37℃培养 12 h 后挑取单个菌落进行菌液 PCR 鉴定,取正确的重组质粒进一步用 *Nde* I 和 *xho* I 进行双酶切验证,将鉴定正确的菌液送去测序,将正确的质粒命名为 pET-30a-Ra。

### 1.5 IL-1Ra 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

将重组克隆质粒 pET-30a-Ra 转入 BL21(DE3)感受态细胞中,用西林瓶涂布于含有卡那霉素的 LB 固体平板上,挑取单克隆菌株,接种于 LB 液体培养基中培养并测序。小鼠 IL-1Ra 表达菌分别在 37℃和 16℃,加入终浓度为 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)对菌液进行诱导表达。一段时间后收集菌体重悬(缓冲液:50 mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.6)、10%甘油、0.5 mol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑)后并超声破碎,分别对上清和包涵体进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,分析目的蛋白表达形式,确定目的蛋白上清表达的最佳表达条件。

### 1.6 IL-1Ra 重组蛋白的纯化

将 pET-30a-Ra 阳性菌液以 1:100 接种至 1 L 含卡那霉素的液体 LB 培养基中,按照“1.5”节诱导表达步骤进行诱导表达。超声破碎后的细菌裂解液 12 000 r/min 离心 40 min,取上清与 Ni-NTA Beads 于 4℃孵育结合 1 h,分别用含有不同咪唑浓度(40、60、80、150、250 mmol/L)的洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 值 7.6)、10%甘油、0.5 mmol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑)进行梯度洗脱,分别收集洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,以确定将目的蛋白洗脱下来的缓冲液咪唑浓度。纯化好的蛋白装进透析袋中,在磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液)中 24 h 内透析 4 次,PEG2000 浓缩后用 BCA 标准蛋白试剂盒检测蛋白浓度为 1.2 mg/mL。

### 1.7 多克隆抗体制备

免疫前耳缘静脉采集阳性血清,将重组 IL-

1Ra 蛋白采用背部皮下多点注射的方式免疫新西兰大白兔,每次间隔 7 d,共免疫 5 次。初次免疫时 800 μg 重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合均匀,之后的加强免疫用 400 μg 重组蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混匀,5 次免疫后 3 d 耳缘静脉采集血液分离血清。

1.8 多克隆抗体效价的测定

采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)测定采集分离血清中的抗体效价。用重组 IL-1Ra 蛋白 5 μg/mL 100 μL/孔包被 ELISA 酶标板,37 ℃ 培养箱包被 2 h;PBST 洗涤 3 次,5% 脱脂乳(5 g 脱脂奶粉溶解于 100 mL PBST 中) 200 μL/孔,37 ℃ 封闭 1 h;PBST 洗涤 3 次,将兔抗 IL-1Ra 多克隆抗体进行倍比稀释,免疫前血清作为对照的阴性血清,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 1 h;PBST 洗涤 3 次,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 1:4 000 倍稀释,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 1 h;PBST 洗涤 3 次,将 TMB 显色 A 液和 B 液等体积混合,100 μL/孔,37 ℃ 避光 8 min,加入终止液,50 μL/孔,立即使用酶标仪 450 nm 波长处测量 D 值。

1.9 多克隆抗体反应原性鉴定

收集 Raw264.7 细胞沉淀,用混合好的 RIPA 裂解液(1% PMSF)裂解细胞,4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清后加入蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,经 SDS-PAGE 电泳后转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,将 PVDF 浸没在 5% 脱脂乳(5 g 脱脂奶粉溶解于 100 mL TBST 中)中在水平摇床上室温封闭 2 h,将多克隆抗体 1:500 倍稀释作为一抗,4 ℃ 过夜孵育,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 1:5 000 倍稀释作为二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 4 次,每次 10 min;超敏 ECL 发光液显色。

1.10 布鲁氏菌 S2 弱毒株感染宿主细胞后对小鼠 IL-1Ra 表达的影响

以细胞数:细菌数=1:100 的剂量感染 Raw264.7 细胞,并以 PBS 组为对照组,收集 0、4、8、12、24 h 样品,用 qPCR 检测小鼠 *IL-1Ra* 基因的 mRNA 水平变化,用蛋白质印迹法(Western-Blot)检测小鼠 IL-1Ra 蛋白表达水平变化。引物序列见表 1。PCR 扩增程序:95 ℃ 2 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 32 s,共 40 个循环,每个样本设置 3 个重复孔。采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对试验结果进行统计分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

引物	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	片段长度 (bp)	GenBank 登录号
<i>IL-1Ra</i>	F:GCTCATTGCTGGGTACTTACAA;R:CCAGACTTGGCACAAAGACAGG	60	132	NM_001039701.3
GAPDH	F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTC;R:GGGGTCGTTGATGGCAACA	60	95	NM_001289726.1

1.11 统计分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析, $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$  分别表示在 0.05、0.01、0.001、0.0001 水平差异显著,分别用\*、\*\*、\*\*\*、\*\*\*\*表示。

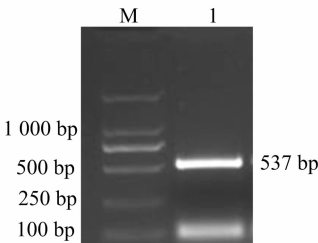
2 结果与分析

2.1 小鼠 *IL-1Ra* 基因扩增

琼脂糖凝胶电泳显示,在 537 bp 处有明亮的条带(图 1),与预期大小相符。

2.2 pET-30a-Ra 重组质粒的构建

对重组质粒 pET-30a-Ra 经 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,可以看到 1 条 5 400 bp 的条带和 1 条 537 bp 的条带(图 2),片段大小符合预期,经测序表明重组质粒与目的基因序列比对完全一致,证明 pET-30a-Ra 原核表达载体构建成功。

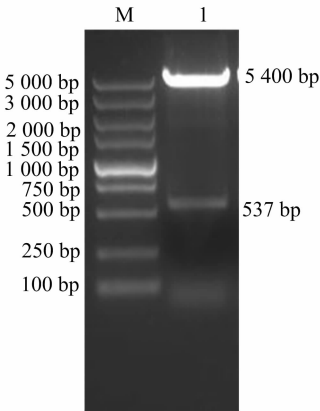


M—DNA 分子质量标准;1—小鼠 *IL-1Ra* 基因

图 1 小鼠 *IL-1Ra* 目的基因的扩增

2.3 IL-1Ra 重组蛋白的诱导表达

从图 3 可以看出,重组蛋白在 37、16 ℃ 均能诱导表达且重组蛋白在上清中的表达量都高于包涵体,但是 37 ℃ 时重组蛋白的表达量高,因此诱导条

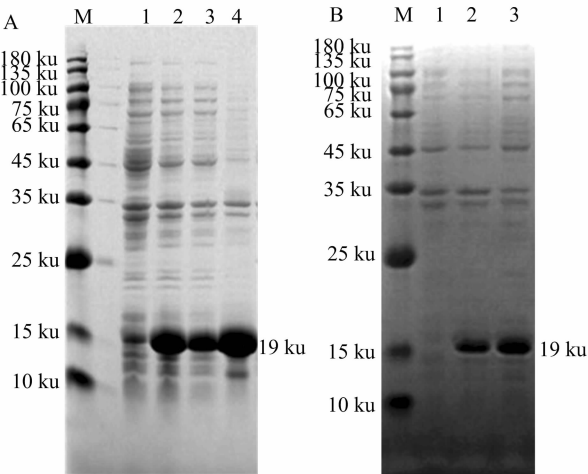


M— DNA 分子质量标准; 1—pET-30a-Ra 重组质粒  
图2 pET-30a-Ra 重组质粒的双酶切鉴定

件确定为终浓度 1 mmol/L IPTG,37 ℃ 诱导 8 h,此时重组蛋白主要以上清形式表达,分子量约为 19 ku。

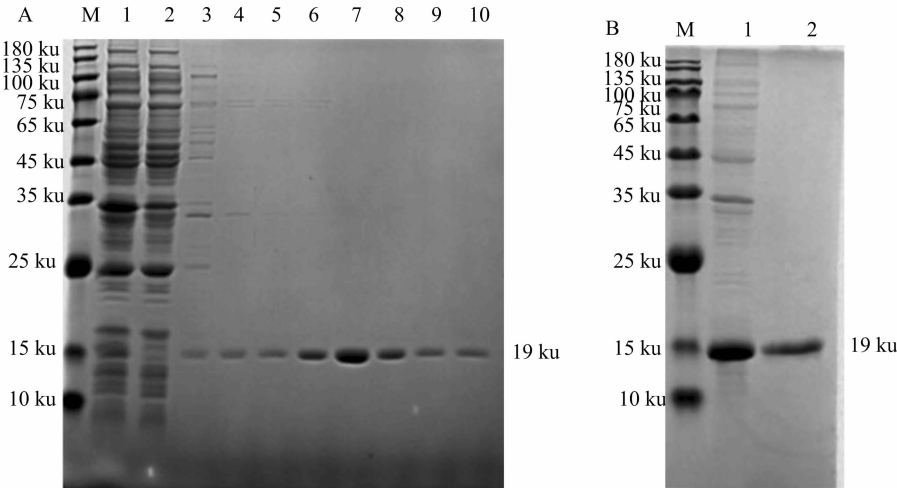
2.4 IL-1Ra 重组蛋白的纯化

SDS - PAGE 结果显示,用 40 mmol/L 咪唑洗 3 遍后再用 60 mmol/L 咪唑洗 2 遍,对杂蛋白的洗涤



A: 37 ℃ 诱导 8 h 后重组蛋白的表达; M—彩虹预染蛋白 marker; 1—未诱导的对照组; 2—诱导重组菌; 3—诱导重组菌的裂解包涵体; 4—诱导重组菌的裂解上清; B: 16 ℃ 诱导 20 h 后重组蛋白的表达; M—标准蛋白分子量; 1—未诱导的对照组; 2—诱导重组菌的裂解包涵体; 3—诱导重组菌的裂解上清  
图3 IL-1Ra 重组蛋白的 SDS-PAGE 结果

效果最好,最后用 250 mmol/L 咪唑可以将重组蛋白完全洗脱下来,此时重组蛋白的纯度较好(图 4)。



A. 重组蛋白 Ni-NTA 亲和层析纯化: M—彩虹预染蛋白 marker; 1—诱导重组菌的裂解上清; 2—镍柱孵育后的过柱蛋白; 3—40 mmol/L 咪唑洗脱第 1 遍获得的蛋白; 4—40 mmol/L 咪唑洗脱第 2 遍获得的蛋白; 5—40 mmol/L 咪唑洗脱第 3 遍获得的蛋白; 6—60 mmol/L 咪唑洗脱第 1 遍获得的蛋白; 7—60 mmol/L 咪唑洗脱第 2 遍获得的蛋白; 8—80 mmol/L 咪唑洗脱获得的蛋白; 9—150 mmol/L 咪唑洗脱获得的蛋白; 10—250 mmol/L 咪唑洗脱获得的蛋白; B. IL-1Ra 重组蛋白纯度验证: M—彩虹预染蛋白 marker; 1—诱导重组菌的裂解上清; 2—纯化后的重组蛋白

图4 IL-1Ra 重组蛋白镍柱纯化的 SDS-PAGE 结果

2.5 多克隆抗体的制备及抗体效价的测定

利用纯化的 IL-1Ra 重组蛋白免疫兔子制备多克隆抗体,采用间接 ELISA 法测定 5 次免疫后多克隆抗体的效价已经达到 1 : 4 096 000(图 5),表明纯化的 IL-1Ra 重组蛋白能够诱导新西兰大白兔产生高效价的抗体。

2.6 多克隆抗体反应原性鉴定

Western - Blot 结果显示,制备的多克隆抗体能够很好地识别 Raw264.7 中表达的天然 IL-1Ra 蛋白(图 6),该抗体可以用于检测布鲁氏菌感染 Raw264.7 细胞后 IL-1Ra 蛋白的变化。

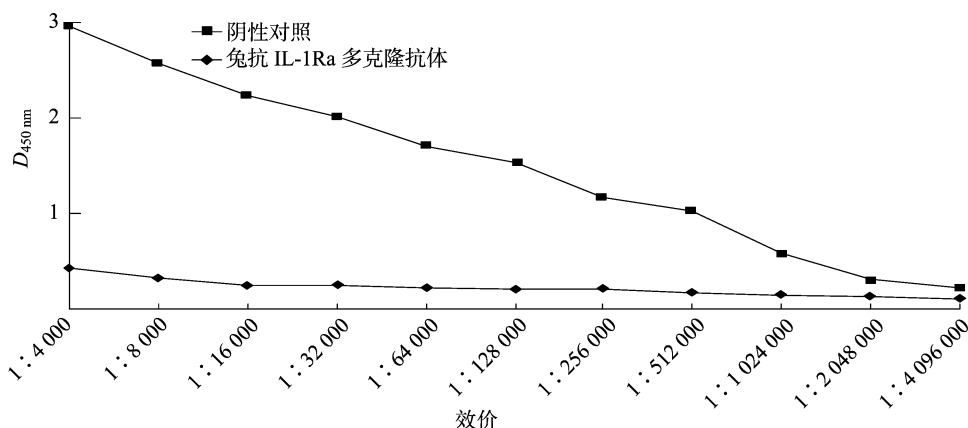
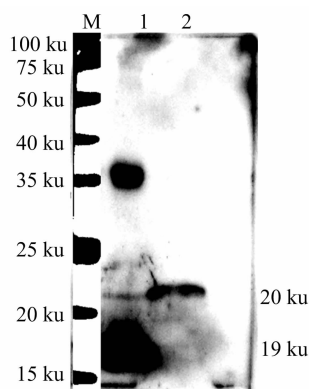


图5 多克隆抗体的效价测定

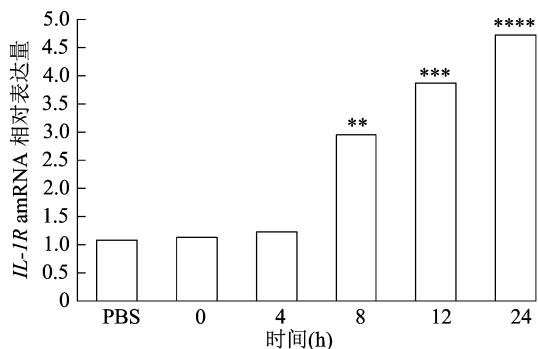


M—彩虹预染蛋白 marker; 1—重组 IL-1Ra 蛋白;  
2—Raw264.7 细胞总蛋白

图6 多克隆抗体识别天然抗原的 Western-Blot 结果

## 2.7 布鲁氏菌 S2 弱毒株感染宿主细胞后对小鼠 IL-1Ra 表达的影响

运用 qPCR 技术检测不同时间点小鼠 *IL-1Ra* 基因 mRNA 表达水平变化,与 PBS 组相比,8、12、24 h 小鼠 *IL-1Ra* 基因表达量显著升高,在 24 h 时达到峰值(图 7)。Western-Blot 检测结果发现,与 PBS 组相比,4、8、12、24 h 小鼠 IL-1Ra 蛋白的表达量均显著升高,其上升趋势与 mRNA 转录结果一致,与预期结果相符(图 8、图 9)。



\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* 表示与 PBS 组相比分别在 0.05、0.01、0.001、0.000 1 水平差异显著。图 9 同

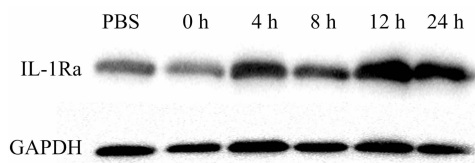
图7 小鼠 *IL-1Ra* 基因在布鲁氏菌 S2 弱毒株感染后不同时间点的 mRNA 相对表达量

图8 Western-Blot 检测小鼠 IL-1Ra 蛋白表达情况

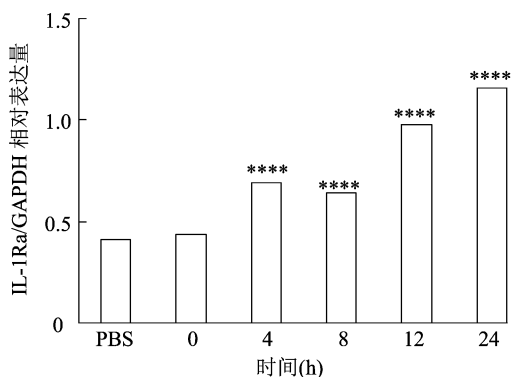


图9 小鼠 IL-1Ra 在布鲁氏菌 S2 弱毒株感染后不同时间点的蛋白表达量

## 3 讨论与结论

IL-1 与 IL-1Ra 的平衡在炎症性肠病 (IBD) 中起重要作用,在疾病早期 IL-1 就在结肠中产生,且 IL-1 水平与组织炎症程度相关,在炎症消退之前,结肠中 IL-1Ra 的水平是 IL-1 的 10 倍<sup>[15]</sup>。在该动物模型中,加入 IL-1Ra 的中和抗体会导致炎症延长和死亡率增加,表明了内源性 IL-1Ra 抗炎的重要性,且外源加入 IL-1Ra 重组蛋白可以抑制炎症<sup>[16-17]</sup>。大量 IBD 动物模型的研究表明,IL-1 和 IL-1Ra 的差异表达与 IBD 之间一定的相关性,且随着病情的好转,IL-1、IL-1Ra 表达异常也得到缓解。笔者所在课题组前期通过构建布鲁氏菌强毒株、弱毒株感染绵羊白细胞层抑制性消减杂交 (SSH) cDNA 文库,筛选到差异表达基因

*IL-1 $\beta$*  与 *IL-1Ra*<sup>[12]</sup>, 并且建立了 *IL-1 $\beta$*  及其拮抗因子的荧光定量 PCR 检测方法<sup>[18]</sup>, 双荧光 ELISA 检测方法<sup>[19]</sup> 和双 T 线胶体金免疫层析试纸条检测方法<sup>[20]</sup>, 初步探讨了 *IL-1 $\beta$*  与 *IL-1Ra* 之间关系对布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫的鉴别诊断作用, 提示 *IL-1Ra* 与布鲁氏菌感染之间可能存在某种联系。因此, 为了建立区别鉴定布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫的检测方法, 掌握 *IL-1Ra* 分子特征与生理病理功能至关重要。

本研究针对小鼠的 *IL-1Ra* 基因构建了原核表达重组质粒 pET-30a-Ra, 成功获得了可溶性表达的小鼠 *IL-1Ra* 重组蛋白, 通过镍柱纯化后, 经 SDS-PAGE 验证获得纯度较好的重组蛋白。将纯化后的重组蛋白作为免疫原免疫兔子获得多克隆抗体, 经间接 ELISA 测定, 兔抗多克隆抗体效价能够达到 1:4 096 000, 经过 Western-Blot 检测结果表明, 多克隆抗体能够特异性识别 Raw264.7 细胞中表达的天然 *IL-1Ra* 蛋白, 可用于检测布鲁氏菌弱毒株感染 Raw264.7 细胞后小鼠 *IL-1Ra* 的表达水平, 为进一步研究小鼠 *IL-1Ra* 与布鲁氏菌感染的关系提供了良好的试验材料。

#### 参考文献:

- [1] Garlanda C, Dinarello C A, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future[J]. Immunity, 2013, 39(6): 1003-1018.
- [2] Arend W P. Interleukin-1 receptor antagonist[M]//Advances in immunology Volume 54. Amsterdam; Elsevier, 1993: 167-227.
- [3] Arend W P, Malyak M, Guthridge C J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist; role in biology[J]. Annual Review of Immunology, 1998, 16: 27-55.
- [4] Benedetti F, Dallaspesza S, Melloni E M T, et al. Effective antidepressant chronotherapeutics (sleep deprivation and light therapy) normalize the *IL-1 $\beta$* :*IL-1ra* ratio in bipolar depression[J]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 740686.
- [5] 郭兴. 绵羊白介素 1 $\beta$  及其受体拮抗因子全长 cDNA 克隆、分子特性及差异表达分析[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 6.
- [6] Haskill S, Martin G, van Le L, et al. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(9): 3681-3685.
- [7] Muro M, Mrowiec A. Interleukin (IL)-1 gene cluster in

- inflammatory bowel disease: is IL-1RA implicated in the disease onset and outcome? [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2015, 60(5): 1126-1128.
- [8] 水一鸣, 刘楠楠, 郭兴, 等. 羊 *IL-1Ra* 基因全长 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 598-603.
  - [9] Arend W P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002, 13(4/5): 323-340.
  - [10] Aksentijevich I, Masters S L, Ferguson P J, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist[J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 360(23): 2426-2437.
  - [11] Horai R, Saijo S, Tanioka H, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2000, 191(2): 313-320.
  - [12] Saad K, Abdallah A E M, Abdel-Rahman A A, et al. Polymorphism of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist genes in children with autism spectrum disorders[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2020, 103: 109999.
  - [13] Altomare A, Corrado A, Maruotti N, et al. The role of Interleukin-1 receptor antagonist as a treatment option in calcium pyrophosphate crystal deposition disease[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(5): 4789-4796.
  - [14] 唐峰. 布鲁氏菌强弱毒株感染羊白细胞层 SSH cDNA 文库建立及 CD96 分子初步研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
  - [15] Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, et al. Quantitative PCR analysis of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies[J]. Digestive Diseases and Sciences, 1997, 42(7): 1557-1566.
  - [16] Isaacs K L, Sartor R B, Haskill S. Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification[J]. ZooKeys, 1992, 103(5): 1587-1595.
  - [17] Harrell C R, Markovic B S, Fellabaum C, et al. The role of Interleukin 1 receptor antagonist in mesenchymal stem cell-based tissue repair and regeneration[J]. BioFactors, 2020, 46(2): 263-275.
  - [18] 水一鸣. *IL-1 $\beta$*  和 *IL-1Ra* 双荧光 ELISA 检测方法的建立及其初步应用[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
  - [19] 迟丹. 绵羊白介素 1 $\beta$  及其受体拮抗因子荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
  - [20] 鞠丹迪. *IL-1Ra/IL-1 $\beta$*  试纸条检测方法建立及其在布鲁氏菌病感染与免疫鉴别诊断中的应用探讨[D]. 长春: 吉林大学, 2019.