

地方品种固始鸭 γ -干扰素基因的克隆与分子进化分析

陈红英^{1, 2}, 崔保安^{1, 2}, 李新生¹, 胡功政^{1, 2}, 赵 丽^{1, 2}, 王东方^{1, 2}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据 GenBank 发表的鸭 γ -干扰素 cDNA 基因序列, 自行设计、合成 1 对引物, 应用 RT-PCR 技术, 无需用非特异性免疫原如 ConA、PHA 等刺激分离的脾淋巴细胞, 直接提取总 RNA, 扩增固始鸭 γ -干扰素基因(DuIFN γ), 并进行克隆和测序。测序结果表明, 获得了 DuIFN γ 全序列, 其大小为 515 bp, 包含一个完整阅读框, 编码 164 个氨基酸残基, 推导的氨基酸有 3 个潜在的 N-糖基化位点, 有 5 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。序列比较分析发现, 克隆的固始鸭 IFN γ 基因序列与 GenBank 中 4 条鸭 IFN γ 基因序列中的 3 条序列(AF087134, AF100929, AJ012254)完全一致, 而与另一条北京鸭核苷酸同源性为 99.6%, 有 2 个碱基发生非同义变异, 氨基酸同源性为 98.8%。固始鸭与人和其他种动物的 IFN γ 基因序列分析和系统进化分析表明, IFN γ 基因存在种属的差异性, 亲缘关系越近, 同源性越高。DuIFN γ 基因的成功克隆为进一步研究固始鸭 IFN γ 基因表达、生物学活性和应用奠定基础。

关键词: 固始鸭; IFN γ 基因; 克隆; 进化分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0001-04

Cloning and Phylogenetic Analysis of IFN γ Gene of Gushi Duck

CHEN Hong ying^{1, 2}, CUI Bao an^{1, 2}, LI Xin sheng¹, HU Gong zheng^{1, 2}, ZHAO Li^{1, 2}, WANG Dong fang^{1, 2}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Animal Food Safety Key Laboratory of Henan, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One pair of primers was designed according to duck interferon γ (IFN γ) gene sequences published in GenBank, which was used to amplify the IFN γ gene from total RNA extracted directly from Gushi duck splenocyte without induction of PHA by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The gene fragment was then cloned and sequenced. The result showed that the full length of the amplified duck IFN γ gene sequence was 515 bp, which includes a open reading frame (495 bp) and encodes 164 amino acid residues. There are three potential N-glycosylation sites and five cysteines in the deduced amino acid sequence. Compared with the duck IFN γ gene sequences registered in GenBank, the the nucleotide sequence of Gushi duck IFN γ gene was the same as AF087134, AF100929 and AJ012254, and shared 99.6% homology with Peking duck IFN γ gene. Based on the gene sequence comparison and phylogenetic tree analysis, the genus difference was found in IFN γ gene, and the closer the genetic relationship, the higher the homology. This study paved the way for future study of biological function and application of duck IFN γ gene.

Key words: Gushi duck; IFN γ gene; Cloning; Phylogenetic analysis

干扰素(Interferon, IFN)是细胞和机体受到病毒感染,或者受核酸、细菌内毒素、促细胞分裂素等作用后,由受体细胞分泌的一种具有高度生物学活性的糖蛋白,是由 Issacs 等于 1957 年利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒干扰现象时首次发现的。由于其具有广谱抗病毒、抗肿瘤的活性以及强大的免疫调节作

用,现已成为临床医学、免疫学、肿瘤学等相关领域的研究热点^[1-3]。干扰素分为 I 型和 II 型两类。I 型干扰素包括 IFN α 和 IFN β 等, II 型干扰素又称免疫干扰素即 IFN γ 。20 世纪 80 年代初,人的干扰素基因成功克隆和表达后,猪和犬等哺乳动物的干扰素基因也相继克隆和表达,现已有重组干扰素制品供临床应用。

收稿日期: 2006-07-02

基金项目: 国家“十五”食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11)

作者简介: 陈红英(1965-),女,四川仁寿人,副研究员,博士,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究工作

通讯作者: 崔保安(1948-),男,河南荣阳人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学及分子免疫学研究工作。

与人类和其他哺乳动物相比,鸭干扰素分子水平的研究起步较晚。Schultz 报道了鸭I型 IFN^[4]和 IFN γ 基因^[5]。夏春和吴志光等^[6,7]曾报道了北京鸭I型 IFN 和 IFN γ 基因。

养鸭业在我国具有悠久的历史,固始鸭因其抗病力强,产蛋率高,成为我国蛋鸭的优良地方品种,但是固始鸭饲养过程受多种传染性疾病危害,特别是鸭的病毒性传染病如雏鸭病毒性肝炎、鸭瘟、禽流感等威胁着固始鸭养殖业的发展。如果大量使用化学药物会威胁人们的身体健康,因此鸭干扰素制剂的研发成为鸭传染病防治中一种重要途径。为进行鸭干扰素制剂的研究,本研究选择地方品种固始鸭,采用 RT-PCR 技术,不需用非特异性免疫原如 ConA、PHA 等刺激分离的脾淋巴细胞,直接克隆 IFN γ 基因(DuIFN γ),并进行序列分析。

1 材料和方法

1.1 试验材料

成年固始鸭购自河南固始县某鸭场。pGEM T Easy Vector System 购自 Promega 公司。Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 为 MBI 公司产品,Ex Taq DNA 聚合酶, EcoRI、Pst I 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。UNIQU 10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒为上海生物工程公司产品。QI-Aquick gel extraction kit 为 Qiagen 公司产品。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 中的参考序列(AF087134)设计 1 对引物,该对引物理论跨幅 515 bp。引物本身不形成发夹结构,2 条引物间不形成二聚体。引物由上海生物工程公司合成。

上游引物 P1: 5'GGCGAACTGAACTATCACCAAG 3';
下游引物 P2: 5'GGCGTTAACATCTGCATCTCT 3'。

1.3 提取固始鸭脾细胞总 RNA

将固始鸭颈静脉放血致死后无菌取脾脏,用灭菌 Hank's 液洗涤 2 次,加入 10 mL Hank's 液,用孔径 1.2 μ m 尼龙网过滤;取容量为 10 mL 的离心管,每管加入 4 mL 淋巴细胞分离液,再加入 4 mL 脾细胞悬液,1 500 r/min 离心 20 min,用吸管吸取淋巴细胞层,置于一新离心管中,用 Hank's 液重新悬浮,1 000 r/min 离心 5 min,洗涤 2~3 次。直接用于总 RNA 的提取或-80℃保存备用。按 UNIQU 10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,将 RNA 保存于一 70℃或是直接用于第一链 cDNA 的反转录。

1.4 DuIFN γ 基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 反转录(RT) 取上述 RNA 悬浮液 1 μ L,加

入 1 μ L Oligo(dT)₁₈作为随机引物,混合后于 70℃温浴 10 min 后,置冰上 5 min,依次加入 5 \times 反转录酶缓冲液 4 μ L, RNA 酶抑制剂 (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 2 μ L,混匀,37℃水浴 5 min,最后加 MLV RTase (20 U/ μ L) 1 μ L,于 42℃温浴 60 min 后于 70℃15 min 灭活反转录酶,RT 产物于一 20℃保存或立即进行 PCR。

1.4.2 PCR 扩增 取 2 μ L 反转录产物 cDNA, 25 μ L Premix Ex Taq DNA 聚合酶,上、下游引物各 1 μ L,补超纯水至 50 μ L,反应的循环参数为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 36 个循环,最后 72℃延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后,取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳检测 PCR 的结果。

1.5 DuIFN γ 基因克隆与鉴定

将回收的 PCR 产物与 pGEM T Easy 载体进行连接反应,室温作用 1 h 后转化 JM109 感受态细胞,在含有 X gal, IPTG 和 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养 12~16 h,挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤,37℃振荡培养 12~16 h。提取重组质粒进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为 DuIFN γ 全基因重组阳性的质粒进行序列测定。

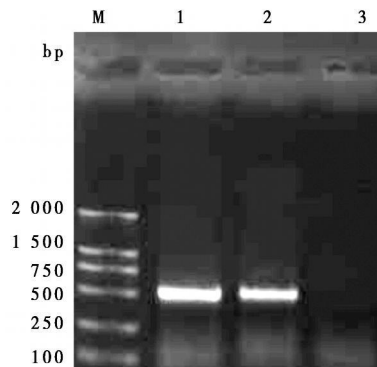
1.6 DuIFN γ 基因序列分析

用 DNASTar 软件对克隆的 DuIFN γ 基因序列及推导的氨基酸序列与 GenBank 中查得的 IFN γ 基因序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 DuIFN γ 基因的 RT-PCR 扩增

直接从成年固始鸭脾淋巴细胞提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR 扩增,扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳检测表明,获得了约 500 bp 的特异性带(图 1)。



M. DL2000 DNA marker; 1, 2 RT-PCR 产物; 3. 阴性对照

Lane M. DL2000 DNA marker; Lane 1, 2. RT-PCR product;

Lane 3 Negative control

图 1 PCR 产物电泳图

Fig 1 Electrophoresis map for PCR products

2.2 DuIFN γ 基因的克隆及鉴定

将RT-PCR产物经纯化回收后,插入到pGEM-T载体质粒的外源基因插入位点,构建重组质粒,转化JM109感受态细胞后,挑选白色菌落,直接以菌液为模板进行PCR、电泳,出现1条长约500 bp条带;抽提重组质粒再进行PCR、电泳,同样出现1条长约500 bp的特异条带;重组质粒经PstI酶切、电泳出现1条大小约3 530 bp的带;经EcoRI酶切电泳出现2条带;其中1条带为载体质粒,约3 000 bp,另一条带为所克隆的DuIFN γ全基因片段,约500 bp(图2)。

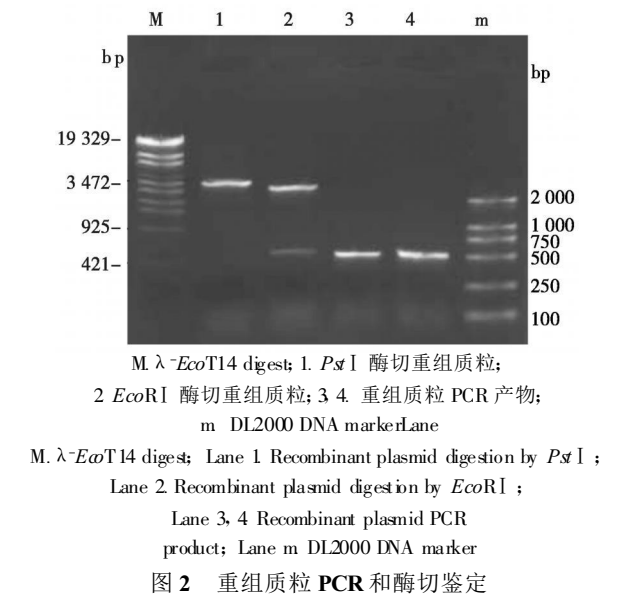


Fig 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (PstI, EcoRI) and PCR

2.3 固始鸭 IFN γ 基因序列分析

测序报告的固始鸭 IFN γ 基因序列及推导的氨

基酸序列如图3所示,固始鸭 IFN γ 基因的全长为515 bp,包含一个完整阅读框,共编码164个氨基酸的前体蛋白,N-末端的19个氨基酸残基形成信号肽,成熟蛋白为145个氨基酸,推测其分子量为17 ku。DuIFN γ 基因推导的氨基酸有3个潜在的N糖基化位点,有5个与二硫键形成有关的半胱氨酸(图3)。将获得的DuIFN γ 序列注册GenBank,登陆号为DQ855272。

2.4 IFN γ 基因序列比较分析及进化分析

将得到的固始鸭 IFN γ 基因序列与GenBank上发表的4条鸭 IFN γ 基因序列进行比较分析发现,克隆的固始鸭 IFN γ 基因序列与AF087134, AF100929, AJ012254的序列完全一致,而与北京鸭(AY166850)核苷酸同源性为99.6%,变异点为C⁵³T、G²⁸⁴A,从而引起 IFN γ 基因推导的氨基酸序列中第18位氨基酸由丝氨酸(S)突变为苯丙氨酸(F),第95位由丝氨酸(S)突变为天冬酰胺(N),氨基酸同源性为98.8%。

固始鸭 IFN γ 基因与鸡、火鸡、珠鸡、雉和鹌鹑 IFN γ 基因核苷酸序列同源性分别为77.2%, 78.0%, 77.8%, 78.4%和78.8%,与人、狒狒、猪、牛、绵羊、犬和猫 IFN γ 核苷酸同源性在39.7%~42.1%之间,与鲑核苷酸同源性为25.6%。固始鸭 IFN γ 基因推导的氨基酸序列与鸡、火鸡、雉和鹌鹑 IFN γ 基因氨基酸同源性均67.1%,与珠鸡氨基酸同源性为67.7%,与人、狒狒、猪、牛、绵羊、犬和猫 IFN γ 在28.0%~31.7%之间,而与鲑氨基酸同源性仅为16.5%。

```
1  ACTGAAGTATACCAAGAAAATGACTTGGCAGACCTACTGCTTGTGTTCTCTCTGTC
    M T C Q T Y C L F V L S V
60  ATCATGATTTATTTTGGATGTTCTGGAAGTGCTTTATTTCTAGGTCAACTTCAAAATGAC
14  I M I Y F G C S G S A L F L G Q L Q N D
120 ATAGACAAAGCTGAAAGCTGATTTTAATGCAAGTAATTCGGATGTAGCTGATGGCAATCCT
34  I D K L K A D F N A S N S D V A D G N P
180 GTTTTTATAGAGAAAGTAAAACTGGACAGAGAGAAATGAAAAAGGATCATACTAGAGC
54  V F I E K V K N W T E R N E K R I I L S
240 CAGATTGTTACCTGTACTTGGAAATGCTAAAGAAAAGTACATGTCAAAAGCCACACATC
74  Q I V T L Y L E M L K K T D M S K P H I
300 AAAAAATTATCTGACGAGCTCAATACTCTGAGAAATACCTTTTCCAATGACTACAAGAAG
94  K N L S E Q L N T L R N T L S N D Y K K
360 TTCAGAGACCTGCTGGAAGTCTCAAACTTCAGCTGACTGGCTTGAAGATCCAACGCAAG
114 F R D L V E L S N L Q L T G L K I Q R K
420 GCTGTGAGTGAAGTCTTCACTGCTTACAGAAAGTGGTGGAGACTTCGCAAAAGG
134 A V S E L F S V L Q K L V E T S T S K R
480 AAAAGGAGCCAGTCTCAAAAGAGATGCAGATGTTAA
154 K R S Q S P K R C R C *
```

斜体部分代表信号肽序列;下划线氨基酸代表糖基化位点; *代表终止密码子
The amino acid sequence italicized represents signal peptide sequence; the underlined residues represent potential N glycosylation sites; the asterisk indicates the stop codon

图3 固始鸭的 IFN γ 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列
Fig 3 The IFN γ gene nucleotide sequence and deduced amino acid sequence in Gushi duck

将DuIFN γ 基因推导氨基酸序列与人和12种动物的 IFN γ 基因推导氨基酸序列绘制进化树可分为3组(图4),第1组是人、狒狒和哺乳动物,包括

猪、牛、绵羊、犬和猫;第2组是禽类,包括鸡、火鸡、珠鸡、雉和鹌鹑;第3组是鲑。

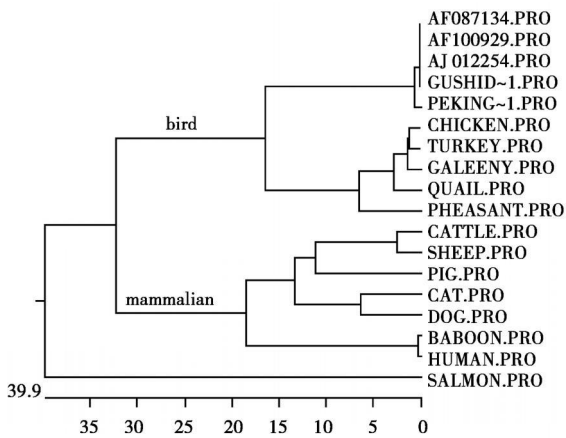


图4 鸭、人和其他动物 IFN γ 推导的氨基酸

序列绘制的进化树

Fig 4 Phylogenetic tree analysis of IFN γ genes of duck, human and other animals

3 讨论

由于干扰素具有广谱抗病毒、抗肿瘤的活性以及强大的免疫调节作用,人们很早就对干扰素进行了大量的研究工作。20 世纪 80 年代初,人的干扰素基因成功克隆后,狗、猪、猫干扰素基因相继克隆。我国是最大的养禽国,品种资源丰富,然而禽类也存在多种难以控制的病毒性和肿瘤性疾病,需要干扰素生物制剂治疗。同时,也需要利用 IFN 等细胞因子基因和 DNA 重组技术加强各种疫苗的免疫效果^[8]。为了在我国开展禽类 IFN 等细胞因子的研究,克隆不同品种鸭 γ 干扰素基因,有助于利用基因工程技术表达不同品种鸭 γ 干扰素,实现对抗病毒活性高的重组鸭 γ 干扰素的筛选。因此,根据 GenBank 发表的鸭 γ 干扰素 cDNA 基因序列,自行设计 1 对引物,应用 RT-PCR 技术直接从固始鸭脾细胞提取的总 RNA 中扩增得到固始鸭 γ 干扰素基因(DuIFN γ),克隆并鉴定了固始鸭 γ 干扰素基因。测序结果表明,获得了 DuIFN γ 全序列,其大小为 515 bp,包含一个完整阅读框(495 bp),编码 164 个氨基酸残基。DuIFN γ 基因的成功克隆为进一步研究固始鸭 IFN γ 基因表达、生物学活性和应用奠定了基础。

序列比较分析发现,克隆的固始鸭 IFN γ 基因序列与 GenBank 上发表的 4 条鸭 IFN γ 基因序列中 3 条(AF087134, AF100929, AJ012254)完全一致,而与另一条北京鸭核苷酸序列同源性为 99.6%,氨基酸同源性在 98.8%,并无插入和缺失变异,但是,在 18 和 95 位存在氨基酸点变异,这可能是由于鸭品种不同而导致的差异。将 DuIFN γ 基因推导氨基酸序列与人和 12 种动物的 IFN γ 基因推导氨基酸序列分析与其绘制进化树发现, DuIFN γ 基因推导的氨基

酸序列与第 1 组(人、狒狒和哺乳动物)的亲缘关系较远,氨基酸同源性在 28.0%~31.7%之间;与第 3 组蛙的亲缘关系最远,氨基酸同源性仅为 16.5%;与固始鸭 IFN γ 基因同组的鸡、火鸡、雉、珠鸡和鹌鹑 IFN γ 基因亲缘关系较近,氨基酸同源性均为 67.0%以上。这表明 IFN γ 基因存在种属的差异性,亲缘关系越近,同源性越高。

国内外对细胞因子基因的克隆,大多采用 ConA, PHA 和 LPS 等刺激分离、纯化淋巴细胞后,再收集淋巴细胞,进一步进行基因克隆工作。本研究利用直接从固始鸭脾脏分离的淋巴细胞中的总 RNA,以 Oligo(dT)₁₈ 作为随机引物,使用 Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 合成第一链,采用 PCR 技术成功地扩增出固始鸭 IFN γ 基因,无需进行诱导,简化了试验操作,节省了时间,避免了细胞培养过程中污染的可能性。本研究从未经诱导的鸭脾淋巴细胞中直接提取的总 RNA 中扩增出 IFN γ 基因,就其原因可能是临床上大量使用各种疫苗,致使脾淋巴细胞中 IFN γ mRNA 大量表达,另外以 Oligo(dT)₁₈ 作为随机引物进行反转录可提高转化效率。本研究在省去细胞分离、培养工作的同时,也为细胞因子的克隆开辟了一条新途径。

参考文献:

- [1] 张宜俊,夏书奇,曾水娣,等. 酶联免疫斑点法检测慢性乙型肝炎患者 HBcAg 特异性分泌 γ 干扰素细胞及其临床意义[J]. 检验医学, 2006, 21(1): 8—11
- [2] 范义湘,罗荣城,方永鑫,等. 干扰素 γ 对乳腺癌细胞 Her2/neu 表达及¹³¹I-Herceptin 抑制肿瘤细胞增殖的影响[J]. 癌症, 2006, 25(4): 443—446
- [3] 巫顺秀,陈显光,李森美,等. 脑脊液 γ 干扰素检测对结核性脑膜炎诊断价值的探讨[J]. 华中医杂志, 2006, 30(1): 41—42
- [4] Schultz U, Chisari F V. Recombinant duck interferon: a new reagent for studying the mode of interferon action against hepatitis B virus[J]. Virology, 1995, 212: 641—649.
- [5] Schultz U, Chisari F V. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes[J]. Journal of Virology, 1999, 73(4): 3162—3168
- [6] 夏春,万建青,吴志光,等. 鸭 I 型干扰素基因分子克隆与序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 567—570
- [7] 吴志光,夏春,汪明. 北京鸭 II 型干扰素基因分子克隆与序列分析[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(3): 7—10
- [8] 汪明,吴志光,夏春. 肉鸡 IFN 基因的克隆与序列分析以及在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(4): 337.