

淮南猪 *IL-2* 全基因的克隆与遗传进化分析

郭小参^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 杨明凡^{1,2}, 管倩^{1,2}, 吕晓丽^{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: 参照 GenBank 发表的猪 *IL-2* cDNA 基因序列, 设计 1 对引物, 将河南地方品种淮南猪脾淋巴细胞在伴刀豆球蛋白 A (Con A) 的刺激下体外培养 27 h 后, 提取激活淋巴细胞总 RNA, 进行反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增, 克隆到 pGEM-T Easy 载体上并测序。测序结果显示, 克隆的 Huainan *IL-2* cDNA 全长为 516 bp, 开放阅读框 (ORF) 包含 465 bp, 编码 154 个氨基酸, 分子量为 17.4 kDa, 等电点为 5.27, 疏水氨基酸 38.3%, 亲水氨基酸 42.0%, 碱性氨基酸 11%, 酸性氨基酸 23%。此 cDNA 与已报道的猪 *IL-2* 同源率为 100%, 与猫、牛、鸡、狗、鸭、山羊、马、人、家鼠等的 *IL-2* 基因进行比较分析, 核苷酸同源性分别为 83.7%, 82.6%, 28.2%, 80.6%, 29.6%, 83.4%, 81.3%, 82.0%, 61.5%。

关键词: 猪; 白细胞介素-2; 基因; 克隆; 遗传进化分析

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0014-05

Cloning and Genetic Analysis on Interleukin-2 Gene of Huainan Pig

GUO Xiao-can^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, CHEN Hong-ying^{1,2}, YANG Ming-fan^{1,2},

GUAN Qian^{1,2}, LU Xiao-li^{1,2}, WANG Dong-fang^{1,2}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Key Laboratory on Food Safety from Animal Products, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One pair of primers was designed based on the pig *IL-2* gene sequences published in GenBank and used to amplify the interleukin-2 cDNA of Huainan Pig by RT-PCR from total RNA extracted from spleen lymphocytes, which were cultivated and stimulated with 10 μ g/mL ConA *in vitro* for 27 h. Then the amplified cDNA was cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. The result showed that the full length of Huainan pig *IL-2* was 516 bp with an ORF of 465 bp, encoding a peptide of 154 amino acids which molecular weight is 17.4 kDa, pI 5.27, hydrophobic amino acid 38.3%, hydrophilic amino acid 42.0%, basic amino acid 11% and acidic amino acid 23%. The sequence was the same as the corresponding genes published in Genbank. The base similarity of pig *IL-2* with those of cat, cattle, chicken, dog, duck, goat, horse, human and house mouse was 83.7%, 82.6%, 28.2%, 80.6%, 29.6%, 83.4%, 81.3%, 82.0% and 61.5%, respectively.

Key words: Procine; Interleukin-2; Gene; Cloning; Phylogenetic analysis

白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 主要由激活 T 淋巴细胞产生的一类 Th1 型细胞因子, 在抗肿瘤、抗毒素、免疫调节及感染性疾病的治疗中具有重要作用。它能够有效的提高免疫功能, 促进 T、B 淋巴细胞的增殖; 增强 NK 细胞单核巨噬细胞等的杀伤活性; 能激活、提高免疫细胞的多种功能, 如提高它们杀伤癌细胞、病毒或细菌感染细胞、促进抗体生成和分泌的能力, 在免疫应答系统中具有十分重要的免

疫生理调节效应^[1-3], 是一种最早发现的具有广泛生物活性的细胞因子^[4]。由于其可引起 T 细胞增殖和维持 T 细胞在体外的持续生长, 故曾称为 T 细胞生长因子 (TCGF), 1979 年更名为 IL-2。该因子于 1979 年由 Morgan 报告, Taniguchi 等^[5] 于 1983 年首次克隆成功。自 Taniguchi 等^[6] 从人细胞中首次克隆出 *IL-2* 全长 cDNA 并报道其全序列以来, 已从 30 多种动物中克隆出此基因。在人类医学方面, 重组

收稿日期: 2007-09-30

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

作者简介: 郭小参 (1982-), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

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

IL-2 在提高免疫抗病机能、抗感染和治疗癌症等方面也获得了广泛的应用^[7]。

淮南猪为河南省优良地方猪种。因主要产区集中在淮河上游以南, 故得此名。中心产区在固始县。按其头形大致可分为“齐嘴大耳型”和“尖嘴小耳型”两种。淮南猪具有产仔数多, 繁殖力强; 耐粗饲, 适应性强, 耐热少病, 宜粗放饲养; 肉质好, 胴体品质良好, 遗传性能稳定, 性情温驯易管理等优点。淮南猪瘦肉率较高, 为 44.66%, 与长白和约克夏杂交后代的瘦肉率分别为 52.28% 和 54.47%; 是河南省发展瘦肉型猪, 提高瘦肉率最快的一个地方良种。目前, 有关淮南猪的免疫基因及其免疫学特性的研究, 国内外均未见报道。本试验选择淮南猪, 首次对其 *IL-2* 基因进行扩增和序列测定, 旨在为进一步研究淮南猪 *IL-2* 功能性蛋白的有效表达、生物学活性及其作为分子佐剂在疫苗免疫中的促进作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验动物 3 月龄健康淮南猪购自河南新县某淮南猪育种场。

1.1.2 菌种和质粒 基因工程菌 JM109 购自宝生物工程(大连)有限公司。基因型 *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyr A96 relA1 thiΔ(Lac-p_{lac}AB)F' [traD36 p_{lac}AB⁺ Lac I^q LacZΔM15]*。pGEM-T Easy Vector System 购自 Promega 公司。

1.1.3 酶类和主要试剂 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 PuerExtreme 公司。高纯度总 RNA 快速提取试剂盒(Trizol-离心柱型)购自上海捷瑞生物工程有限公司, Ex Taq DNA 聚合酶、EcoR I、Pst I 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)。质粒回收试剂盒为北京博大泰克基因技术有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 RT-PCR 引物设计与合成 应用 DNASTAR (Version 4.0) 及 Primer (Version 5.0) 基因分析软件, 参照 GenBank 发表的 pIL-2 cDNA 基因序列(序列号为 X58428)设计 1 对引物, 该对引物理论跨幅包括 *IL-2* 功能蛋白基因及前导序列共约 516 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技术有限公司合成。

上游引物 P1: 5'-CAGTAACCTCAACTCCTACCAC A-3'; 下游引物 P2: 5'-CCCATTAAACATGAGAGCCAC

AT-3'。

1.2.2 淮南猪脾淋巴细胞总 RNA 的提取 淮南猪脾淋巴细胞的提取及诱导培养参考王彦彬^[8] 的试验方法进行。把诱导培养过的脾淋巴细胞收集、分装, -70℃ 保存或直接用于总 RNA 的提取。细胞总 RNA 的提取按高纯度总 RNA 快速提取试剂盒(Trizol-离心柱型)提供的方法进行。提取的 RNA 保存于 -70℃ 或直接用于第一条链 cDNA 的反转录。取 5 μL RNA 测定其浓度, 另取 5 μL RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 以检测其完整性。

1.2.3 淮南猪 *IL-2* 全基因的 RT-PCR 扩增

1.2.3.1 反转录(RT) 取上述提取的 RNA 11 μL 于一灭菌 EP 管中, 加入 1 μL 通用引物, 70℃ 温浴 10 min, 快速置冰上 5 min, 然后依次加入 5× 反转录酶缓冲液 4 μL, RNA 酶抑制剂(20 U/μL) 1 μL, dNTP 混合物 2 μL, 37℃ 水浴 5 min, 最后快速加入 M-MuLV Reverse Transcriptase(200 U/μL) 1 μL, 继续 42℃ 温浴 60 min 后于 70℃ 15 min 灭活反转录酶, RT 产物于 -20℃ 保存或立即进行 PCR 扩增。

1.2.3.2 PCR 扩增 取 5 μL 反转录产物 cDNA, 25 μL Premix tap, 上、下游引物各 1 μL, 去离子水 18 μL 于 EP 管中, 离心混匀, 然后进行 PCR 扩增。反应的循环参数为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB) 进行电泳检测 PCR 结果。

1.2.4 淮南猪 *IL-2* 的基因克隆与鉴定 将电泳回收产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接反应, 16℃ 作用 12 h, 再将连接产物转化 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 16 h, 挑取白色菌落接种含有 Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养 14 h。按质粒回收试剂盒说明提取重组质粒, 再进行 PCR 及酶切电泳检测鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定为淮南猪 *IL-2* 全基因重组阳性的质粒送上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.5 淮南猪 *IL-2* 的基因序列分析 用 DNASTar 和 BioXM2.6 生物软件对所测定的淮南猪 *IL-2* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行分析, 并与 GenBank 中收录的其他猪品种及不同物种的序列进行比较, 分析它们之间的同源性及其变异程度。

2 结果与分析

2.1 淮南猪 *IL-2* 全基因的 RT-PCR 扩增

从 ConA 诱导培养的淮南猪脾淋巴细胞提取细

胞总 RNA, 然后利用 RT-PCR 技术扩增反转录产物, 琼脂糖凝胶电泳初步检测表明, 在 510 bp 左右出现了一条特异性条带, 而用灭菌去离子水为模板扩增的 PCR 产物则没有出现这一特异性条带, 与预期结果相符(图 1)。

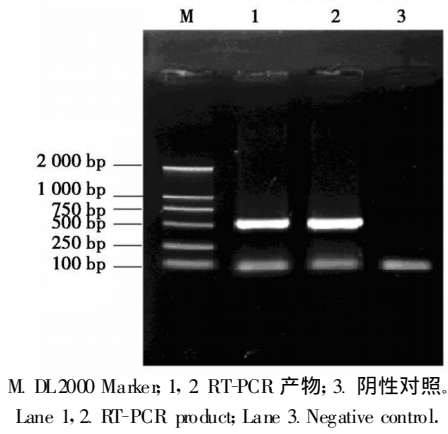


图 1 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis map for PCR product

2.2 淮南猪 IL-2 基因的克隆及鉴定

将淮南猪 IL-2 基因的 RT-PCR 产物经纯化回收后, 插入到 pGEM-T Easy 载体质粒的外源基因插入位点, 构建重组质粒, 转化 JM109 工程菌后挑选白色菌落, 直接以菌液为模板进行 PCR 扩增、电泳, 出现一条长约 516 bp 的条带; 抽提重组质粒再进行 PCR 扩增、电泳, 同样也出现一条长约 510 bp 的特异条带; 重组质粒经 *Pst*I 酶切、电泳出现一条大小约 3 500 bp 的条带; 经 *Eco*R I 酶切电泳出现 2 条带, 其中一条带为载体质粒, 约 3 000 bp, 另一条带为所克隆的 IL-2 全基因片段, 约 510 bp(图 2)。

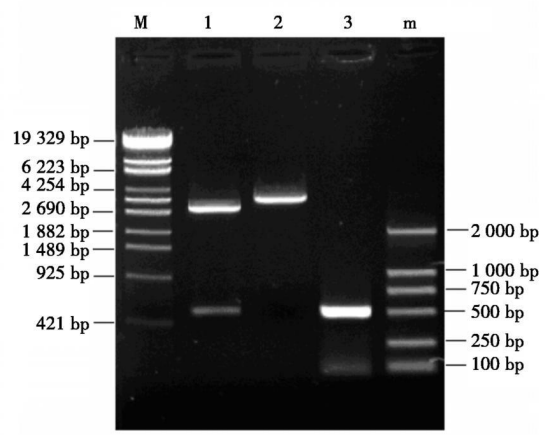


图 2 重组质粒 PCR 和酶切鉴定图谱

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Eco*R I+*Pst* I) and PCR

2.3 淮南猪 IL-2 基因序列测定及分析

选择酶切和 PCR 鉴定为淮南猪 IL-2 全基因重组阳性的菌液送上海生物工程有限公司, 进行正反两个方向的序列测定, 报告的核苷酸序列为 516 bp, 包含一个猪 IL-2 基因的完整开放阅读框(465 bp), G+C含量为 62.36%, 用 BioXM2.6 软件分析表明, 淮南猪 IL-2 基因序列共编码含 154 个氨基酸的多肽, 其中前 20 个氨基酸为信号肽, 其他为成熟肽; 具有 1 个潜在的 N-糖基化位点(NVT), 有 5 个与二硫键形成有关的半胱氨酸(C); 分子量为 17.4 kDa, 等电点为 5.27; 疏水氨基酸 38.3%, 亲水氨基酸 42.0%, 碱性氨基酸 11%, 酸性氨基酸 23%。结果见图 3。

```
ATG TAT AAG ATG CAG CTC TTG TGT TGC ATT GCA CTA ACC CTT GCA
M Y K M Q L L C C I A L T L A
CTC ATG GCA AAC GGT GCA CCT ACT TCA AGC TCT ACA AAG AAC ACA
L M A N G A P T S S S T K N T
AAG AAA CAA CTG GAG CCA TTG CTG CTG GAT TTA CAG TTG CTT TTG
K K Q L E P L L L D L Q L L L
AAG GAA GTT AAG AAT TAC GAG AAT GCT GAT CTC TCC AGG ATG CTC
K E V K N Y E N A D L S R M L
ACA TTT AAA TTT TAC ATG CCC AAG CAG GCT ACA GAA TTG AAA CAC
T F K F Y M P K Q A T E L K H
CTT CAG TGT TTA GTA GAA GAA CTC AAA GCT CTG GAG GGA GTG CTA
L Q C L V E E L K A L E G V L
AAT TTA GGT CAA AGC AAA AAC TCT GAC TCA GCA AAT ATC AAG GAA
N L G Q S K N S D S A N I K E
TCA ATG AAC AAT ATC AAC GTA ACA GTT TTG GAA CTA AAG GGA TCT
S M N N I N V T V L E L K G S
GAA ACA AGT TTC AAA TGT GAA TAT GAT GAT GAG ACA GTA ACT GCT
E T S F K C E Y D D E T V T A
GTT GAA TTT CTG AAC AAA TGG ATT ACC TTT TGT CAA AGC ATC TAC
V E F L N K W I T F C Q S I Y
TCA ACA CTG ACT TGA
S T L T .*
```

下划线部分代表信号肽序列; 阴暗部分代表半胱氨酸; 方框部分代表 N-糖基化位点

图 3 淮南猪核苷酸序列及其编码的氨基酸

Fig. 3 The nucleotide sequence and deduced amino acids

2.4 淮南猪 IL-2 基因与其他猪品种及不同动物的 IL-2 基因核苷酸序列同源性比较及系统进化分析

运用 DNASTar 软件将淮南猪 IL-2 基因序列与 GenBank 上公布的其他猪品种进行同源性分析, 结果发现他们具有 100% 的同源性; 与从 GenBank 下载读取的猫、牛、鸡、狗、鸭、山羊、马、人、家鼠等的 IL-2 基因进行同源性比较(表 1), 得出的核苷酸同源性分别为 83.7%, 82.6%, 28.2%, 80.6%, 29.6%, 83.4%, 81.3%, 82.0%, 61.5%。表明 IL-2 存在明

显的种属差异性, 与哺乳动物的核苷酸同源较高, 而与禽类的核苷酸同源性却很低。通过对 IL-2 基因进行系统进化分析, 结果出现两个较大的分支, 分别是禽类和哺乳类。所克隆的淮南猪与牛、羊的亲缘关系较近, 猫、狗、人、马次之, 而与哺乳动物鼠类处在一个较大的分支中, 表明它们的亲缘关系相对较远。从系统进化树(图 4)可以看出, 猪与禽类处在完全不同的大分支中, 表明它们的亲缘关系很远。

表 1 不同种属动物 IL-2 之间核苷酸同源性比较

Tab. 1 Homology of the nucleotides sequence among different animals												
种类	Cat	Cattle	Chicken	Dog	Duck	Goat	Horse	Human	Mouse	Pig	Rat	Sheep
猫 Cat		79.6	28.9	89.0	24.1	79.6	86.4	87.0	65.2	83.7	69.9	79.1
牛 Cattle			31.7	72.9	29.1	97.6	78.0	76.8	56.6	82.6	59.6	97.2
鸡 Chicken				27.5	72.3	30.8	28.7	28.9	25.2	28.2	26.2	30.3
狗 Dog					24.8	73.3	81.8	83.5	62.8	80.6	66.2	72.9
鸭 Duck						29.6	24.8	25.5	23.9	29.6	22.0	29.6
山羊 Goat							78.4	77.3	57.7	83.4	59.6	99.6
马 Horse								82.9	64.0	81.3	68.7	77.8
人 Human									65.6	82.0	71.6	76.6
小鼠 Mouse										61.5	88.5	56.6
猪 Pig											65.8	82.8
大鼠 Rat												58.8
绵羊 Sheep												

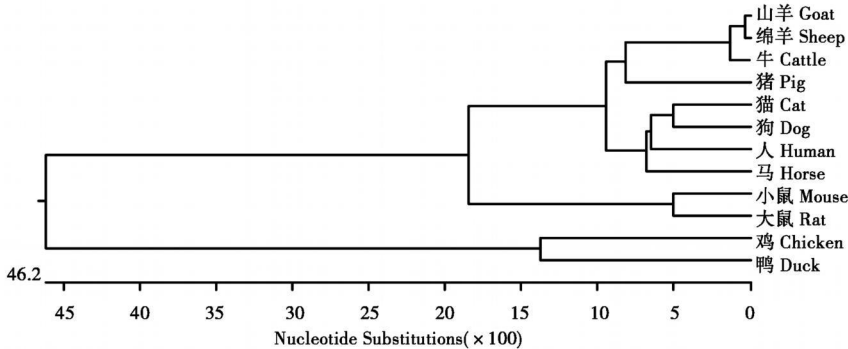


图 4 不同种属动物 IL-2 基因系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Interleukin-2 of different animals

3 讨论

白介素是由淋巴细胞、单核细胞或其他非单核细胞产生的细胞因子, 它在细胞间的相互作用、免疫调节、造血以及炎症过程中起重要调节作用。IL-2 是兽药中研究最多的细胞因子, 是 T 细胞在抗原或促有丝分裂原刺激下所分泌的一种淋巴因子^[9]。T 细胞受多种刺激后可分泌 IL-2, 又作用于 T 细胞本身, 诱导自身增殖、分化和发挥功能。IL-2 对 T 细胞作用还包括增强 CTL 的细胞毒活性, 诱导 c-myc、c-myb 和 IL-2 受体表达, 促进细胞移动, 增强细胞间的接触和诱导细胞分泌细胞因子(IFN- γ 、IL-4、TNF 和 CSF 等)。此外, IL-2 还参与调节 T 细胞受体基因的重排和表达; 可能还参与自身耐受和自身免疫

机制。在体内, IL-2 有抗肿瘤、抗微生物感染、引起移植排斥和自身免疫及免疫调节等作用^[10]。

本研究应用 RT-PCR 技术, 设计合成了 1 对引物, 在体外成功地从 ConA 激活的淮南猪淋巴细胞总 RNA 中扩增出了一条特异 cDNA 条带, 并将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 经测定, 该 cDNA 全长为 516 个碱基, 开放阅读框为 465 个碱基, 编码 154 个氨基酸, 前 20 个氨基酸为信号肽, 其他 134 个氨基酸为成熟肽。与 GenBank 公布的猪 IL-2 基因具 100% 的同源性, 证明成功克隆出了淮南猪 IL-2 基因, 此外它与国内已报道的藏猪^[11]、广西巴马小型猪^[12]的同源性也为 100%, 从而可以推断猪 IL-2 基因具有高度的保守性, 不易因品种、地区的不同而发生变异。通过 DNASTar 软件分析比较, 淮南猪 IL-2

基因与哺乳动物 *IL-2* 同源性在 61.5% ~ 83.7%, 具有较高的同源性, 而与禽类(鸡、鸭)只有 28.2% ~ 29.6% 的同源性, 同源性很低, 这表明淮南猪 *IL-2* 基因存在较大的种属特异性, 但同一种属不同种类间差异甚微。基因系统进化树分析表明, 淮南猪 *IL-2* 与牛、羊具有相似的基因祖先, 而与禽类的基因祖先相差甚远。

养猪业在我国国民经济中占据着相当重要的地位, 但是猪的一些烈性传染病, 严重威胁着养猪业的进一步发展。应用传统免疫预防手段存在一些问题, 如弱毒疫苗潜在安全问题; 灭活疫苗虽然安全有效, 但免疫效力尤其细胞免疫作用受限制; 基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗虽具有应用潜力, 但也需提高其免疫效力、尤其是细胞免疫效果。 *IL-2* 是一种具有广泛生物学活性的细胞因子, 它能够有效地提高机体的免疫功能, 医学上已用于预防和治疗一些常规方法难以治疗的疾病, 如肿瘤等。在兽医方面, 因其能提高疫苗的免疫效果, 尤其是提高基因工程亚单位疫苗的免疫效果而倍受重视, 展现出了广阔的应用前景^[13]。因此, 本研究成功克隆的淮南猪 *IL-2* 全基因及遗传进化分析, 为河南优良地方品种淮南猪 *IL-2* 功能蛋白的有效表达及对疫苗免疫促进作用的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Allen E M, Weir J P, Martin S, *et al.* Role of coexpression of *IL-2* and Herpes simplex virus proteins in recombinant vaccinia virus vectors on levels of induced immunity [J]. *Viral Immunol*, 1990, 3: 207—215.

[2] Flexner C, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccinia virus in

immunodeficient mice by vector directed *IL-2* expression [J]. *Nature*, 1987, 330: 259—261.

[3] Kogut M, Rothwell L, Kacser P. Differential effects of age on chicken heterophil futional activation by recombinant chicken interleukin-2 [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26(9): 817—830.

[4] 刘诗柱, 赵 峰, 肖传斌. 白细胞介素 2 对固始鸡空肠中 SIgA 分泌的影响 [J]. *河南农业科学*, 2007(12): 112—115.

[5] 王世若, 王兴龙. 现代动物免疫学 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001: 78—79.

[6] Taniguchi T. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 [J]. *Nature*, 1983, 46: 302—305.

[7] Zelus D, Robinson Rechavi M, Delacre M, *et al.* Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive in ruminants [J]. *J Mol Evol*, 2000, 51(3): 234—244.

[8] 王彦彬, 卢中华, 康相涛, 等. 固始鸡白细胞介素-2 的克隆、表达及其表达蛋白活性的检测 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 5(34): 66—71.

[9] 童 岩, 边传周, 郑纯宁. 新型免疫佐剂研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2005, 7: 103—104.

[10] 张 曦, 翟丽云, 赫安娜, 等. 胸腺素对毛细支气管炎患儿白细胞介素-2 水平的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18(2): 132—133.

[11] 高 荣, 李 惠, 武 梅, 等. 藏猪白细胞介素-2 基因的克隆及序列分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2004, 6(40): 3—5.

[12] 黄伟坚, 韦祖樟, 朱南光, 等. 广西巴马小型猪白细胞介素-2 基因 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *检验免疫科学*, 2005, 1(15): 5—7.

[13] 李宏梅, 李祥瑞, 郭慧君, 等. 白细胞介素-2 的研究进展及应用 [J]. *山东畜牧兽医*, 2002, 5(30): 38—39.