

文章编号: 1001-411X(2002)04-0061-03

石岐杂鸡 γ -干扰素基因的克隆与序列分析

吕英姿, 毕英佐, 曹永长

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据现有鸡 γ -干扰素基因序列设计引物, 应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 从 Con A 诱导培养的鸡脾淋巴细胞中扩增得到石岐杂鸡 γ -干扰素(sqChIFN- γ)基因, 将其克隆到 pGEM-T 载体中, 进行序列测定. 结果表明, 克隆得到的 ChIFN- γ 基因的开放阅读框由 492 个核苷酸组成, 和其他 ChIFN- γ 基因的同源性达 99%, 与火鸡 γ -干扰素基因的同源性为 96%, 与鸭 γ -干扰素基因的同源性为 81%. 推导的石岐杂鸡 IFN- γ 氨基酸序列与其他已发表的 ChIFN- γ 氨基酸序列完全一致, 与火鸡和鸭 IFN- γ 氨基酸同源性分别为 97% 和 67%.

关键词: 鸡; γ -干扰素; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q785

文献标识码: A

干扰素(interferon, IFN)是由干扰素诱生剂诱导细胞后所产生的一类高活性多功能的糖蛋白, 是由 Issaacs 等于 1957 年利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒干扰现象时发现的, 具有广谱抗病毒、抗肿瘤活性及强大的免疫调节作用. 根据干扰素蛋白质的氨基酸结构、抗原性和细胞来源, 可将其分为两类, 即 I 型和 II 型. 哺乳动物 I 型干扰素包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- τ , 前三个由病毒诱导合成; IFN- τ 也称滋养层干扰素, 是反刍动物和人怀孕时滋养层细胞的分泌产物. IFN- α 相当于过去的白细胞干扰素, IFN- β 相当于过去的成纤维细胞干扰素. II 型干扰素只包含 IFN- γ , 主要由抗原或分裂素刺激的 T 细胞和 NK 细胞合成. 禽干扰素的研究是近几年的热点, 从基因克隆、序列分析到体外重组表达都进行了大量的研究. 在禽类中目前只发现 2 种干扰素 IFN- α 和 IFN- γ , IFN- α 含 1 个由 579 bp 组成的开放阅读框, 编码含 193 个氨基酸的多肽, 其中 31 个氨基酸为信号肽^[1]; IFN- γ 含 1 个由 492 bp 组成的开放阅读框, 编码含 164 个氨基酸的多肽, 成熟的蛋白质由 145 个氨基酸组成^[2]. 较早前, 笔者从石岐杂鸡成纤维细胞中克隆了石岐杂鸡的 α -干扰素^[3], 这里笔者采用反转录-聚合酶链反应从石岐杂鸡的脾脏细胞中扩增得到了 γ -干扰素基因.

1 材料与方法

1.1 干扰素基因的诱导

从 30 日龄的石岐杂鸡中取出脾脏, 分离淋巴细胞, 用含 20 μ g/mL Con A 的 DMEM 作为培养基, 在

41 $^{\circ}$ C、 $\varphi=5\%$ CO₂ 下培养 16 h.

1.2 细胞总 RNA 的分离

按 TRIzol Reagent(Gibco BRL 产品)说明书, 提取脾脏细胞总 RNA.

1.3 引物的设计

根据发表的 ChIFN- γ 基因序列^[4], 设计 1 对引物 P1、P2 用于 RT-PCR, 为外侧引物, P3、P4 为内侧引物, 其中 P3、P4 内包含 ChIFN- γ 基因全序列, 引物序列如下:

P1: TATAAATACCACTCAGGCGAGA;

P2: CAGGTCAACAAACATACAACAGA;

P3: ATGACTTGCCAGACTTACAA;

P4: ATTAGCAATTGCATCTCCTC.

1.4 反转录

在一 0.5 mL 灭菌离心管中加入细胞总 RNA 6 μ L, 5 $\times$ 反转录酶缓冲液 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 6 μ L, 引物 P2 1 μ L, RNA 酶抑制剂(Takara 公司产品) 20 U, AMV (Takara 公司产品) 10 U, 加 DEPC 水至 20 μ L, 混匀后在室温放置 10 min, 然后 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h.

1.5 巢式 PCR

PCR 反应在 Master gradient(Eppendorf 公司)PCR 仪上进行. 取反转录产物 10 μ L, 分别加入适量 P1、P2、dNTP、10 $\times$ PCR 反应缓冲液、Ex TaqDNA 聚合酶(Takara 公司产品)进行 PCR 扩增. 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min.

取上述 PCR 产物 5 μ L, 分别加入适量 P3、P4、dNTP、10 $\times$ PCR 反应缓冲液、Ex TaqDNA 聚合酶

(Takara 公司产品)进行 PCR 扩增. 反应条件为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 40 s, 52 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min.

扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下观察.

1.6 基因克隆

纯化 PCR 产物, 与 pGEM-T (Promega 公司) 载体连接, 转化 JM109 受体菌. 阳性菌落用 PCR 进行鉴定.

1.7 序列分析

小规模培养阳性菌落, 提取质粒进行酶切鉴定后, 送大连宝生物公司测序, 测得的 DNA 序列用 Blast 程序进行同源性检索. 根据核苷酸序列推导出

氨基酸序列, 并与相关干扰素的氨基酸序列进行比较.

2 结果与讨论

利用特异性引物, 采用反转录和巢式 PCR 技术, 从 Con A 诱导的鸡脾脏细胞中扩增出 1 条约 500 bp 的片段(图 1), 将其克隆到 pGEM-T 载体后, 分别用 PCR 和酶切(图 2)进行鉴定, 对阳性克隆进行序列测定, 结果如图 3 所示.

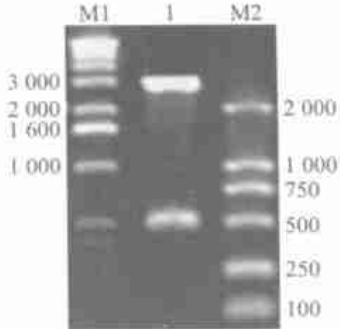
序列测定结果表明, 克隆的 ChIFN- γ 基因全长 492 bp, 编码 164 个氨基酸, 成熟蛋白由 145 个氨基酸组成, 有 2 个潜在的 N-糖基化位点. 根据核苷酸序列推导的氨基酸序列见图 4.



M 为 DNA Marker, 1 和 2 均为 RT-PCR 产物
M is DNA Marker, 1 and 2 are the product of RT-PCR

图 1 sqzChIFN- γ RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of sqzChIFN- γ



M1 和 M2 为 DNA Marker, 1 为 IFN- γ -T 的双酶切产物
M1 and M2 are DNA Markers, 1 is the product of restriction digestion

图 2 IFN- γ -T 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of IFN- γ -T by restriction digestion

1	ATGACTTGCC	AGACTTACAA	CTTGTTTGTT	CTGTCTGTCA	TCATGATTTA
51	TTATGGACAT	ACTGCAAGTA	GTCTAAATCT	TGTTCAACTT	CAAGATGATA
101	TAGACAAACT	GAAAGCTGAC	TTTAACTCAA	GTCATTCAGA	TGTAGCTGAC
151	GGTGGACCTA	TTATTGTAGA	GAAACTGAAG	AACTGGACAG	AGAGAAATGA
201	GAAAAGGATC	ATACTGAGCC	AGATTGTTTC	GATGTACTTG	GAAATGCTTG
251	AAAACACTGA	CAAGTCAAAG	CCGCACATCA	AACACATATC	TGAGGAGCTC
301	TATACTCTGA	AAAACAACCT	TCCTGATGGC	GTGAAGAAGG	TGAAAGATAT
351	CATGGACCTG	GCCAAGCTCC	CGATGAACGA	CTTGAGAATC	CAGCGCAAAG
401	CCGCGAATGA	ACTGTTACGC	ATCTTACAGA	AGCTGGTGGA	TCCTCCGAGT
451	TTCAAAAGGA	AAAGGAGCCA	GTCTCAGAGG	AGATGCAATT	GCTAA

图 3 石岐杂鸡 γ -干扰素的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the sqzChIFN- γ

S1	S19 M1	M32
<i>MTCQTYNLFVLSVIMIIYYG</i>	HTASSLNVLVLQDDIDKLKADF	<i>NSS</i> HSDVADG
M33		M83
GPIIVEKLLK	<i>NWT</i> ERNEKRIILSQIVSMYLEMLENTDKSKPHIKHISEELYT	
M84		M132
LKNNLPDGVKVKVDIMDLAKLPMNDLRIQRKAANELFSILQKLVDPPSF		
M133	M145	
KKRKSQSQRRCNC		

信号肽用斜体标出(S1~S19), M1~M145 为成熟的 ChIFN- γ , 2 个潜在的 N-糖基化位点用方框标出

The signal peptide(S1-S19) is labeled in italics. The peptide M1-M145 is the mature sqzChIFN- γ . The two potential N-glycosylation sites are boxed

图 4 石岐杂鸡 γ -干扰素氨基酸序列

Fig. 4 Deduced amino acid sequence of sqzChIFN- γ

用 Blast 程序在 GenBank 中对核苷酸序列进行同源性检索, 发现它与其他 ChIFN- γ 基因的同源性达 99%^[2,4], 与火鸡 IFN- γ 基因的同源性为 96%^[5], 与鸭 IFN- γ 基因的同源性为 81%^[6].

将推导的石岐杂鸡 γ -干扰素的氨基酸序列进行同源性检索, 发现其氨基酸序列与其他已发表的 ChIFN- γ 的氨基酸序列完全一致, 表明 ChIFN- γ 的氨基酸序列高度保守; 与火鸡 IFN- γ 氨基酸序列的同源性为 97%, 与鸭 IFN- γ 氨基酸的同源性为 67%. 几种不同家禽 γ -干扰素氨基酸序列的差异见图 5.

1	MTCQTYNLFVLSVIMIIYYGHTASSLNLVQLQDDIDKLKAD	ChIFN- γ 1.pro
1		ChIFN- γ 2.pro
1		TuIFN- γ -aa.pro
1	C.....F.CSG.A.F.G...N.....	DuIFN- γ -aa.pro
41	FNSSHSDVADGGPIIVEKLNWTERNEKRIILSQIVSMYL	ChIFN- γ 1.pro
41		ChIFN- γ 2.pro
41		TuIFN- γ -aa.pro
41	..A.N.....N.VFI..V.....TL..	DuIFN- γ -aa.pro
81	EMLENTDKSKPHIKHISEELYTLKNNLPDGVKVKVDIMDL	ChIFN- γ 1.pro
81		ChIFN- γ 2.pro
81		TuIFN- γ -aa.pro
81	...KK..M.....NL..Q.N..R.T.SNDY..FR.LVE.	DuIFN- γ -aa.pro
121	AKLPMDLRIQRKAANELFSILQKLVDPSPFKRKRSQSQR	ChIFN- γ 1.pro
121		ChIFN- γ 2.pro
121	...Q.....S.....HP..	TuIFN- γ -aa.pro
121	SN.QLTG.K.....VS.....V.....ETSTS.....PK	DuIFN- γ -aa.pro
161	RCNC	ChIFN- γ 1.pro
161		ChIFN- γ 2.pro
161		TuIFN- γ -aa.pro
161	..R.	DuIFN- γ -aa.pro

ChIFN- γ 1——GenBank 中检索得到的序列; ChIFN- γ 2——本实验测得的序列; TuIFN- γ ——火鸡 γ -干扰素; DuIFN- γ ——鸭 γ -干扰素
ChIFN- γ 1——sequence from GenBank; ChIFN- γ 2——sequence of this experiment; TuIFN- γ ——turkey IFN- γ ; DuIFN- γ ——duck IFN- γ

图 5 不同家禽 γ -干扰素氨基酸序列比较

Fig. 5 Comparison of amino acid sequence among various avian IFN- γ

参考文献:

[1] SEKELICK M J, FERRANDINO A F, HOPKINS D A, et al. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis[J]. J Interferon Res, 1994, 14: 71—79.

[2] DIGBY M R, LOWENTHAL J W. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene[J]. J Interferon Cytokine Res, 1995, 15: 939—945.

[3] 曹永长, 吕英姿, 毕英佐. 鸡 α -干扰素基因的克隆和鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23: 259—262.

[4] KAISER P, WAIN H M, ROTHWELL L. Structure of the chicken interferon-gamma gene, and comparison to mammalian homologues[J]. Gene, 1998, 207: 25—32.

[5] SURESH M, SARACA K, FOSTER D, et al. Molecular and functional characterization of turkey interferon[J]. J Virol, 1995, 69: 8 159—8 163.

[6] SCHULTZ U, CHISARI F V. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes[J]. J Virol, 1999, 73: 3 162—3 168.

Cloning and Sequencing Analysis of Interferon- γ from Shiqiza Chicken

LÜ Ying-zi, BI Ying-zuo, CAO Yong-chang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The Shiqiza chicken interferon- γ (sqzChIFN- γ) was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from splenocytes stimulated with Con A. The gene was cloned into pGEM-T vector and then sequenced. The result showed that the open reading frame of cloned ChIFN- γ consisted of 492 nucleotides, sharing 99% homology with other ChIFN- γ gene, 96% homology with turkey IFN- γ and 81% with duck IFN- γ . The deduced amino acid sequence of sqzChIFN- γ was completely identical to other published sequence of ChIFN- γ , and shared 97% and 67% homology with turkey and duck IFN- γ , respectively.

Key words: chicken; interferon- γ ; clone; sequence analysis