

番鸭 IFN- α 基因的克隆与序列分析

王春霞, 王林川, 黄爱芳, 王 庆, 鄢志强, 陈庆华

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从经免疫的番鸭外周血分离淋巴细胞, 经 PHA 刺激培养后提取总 RNA, 采用 RT-PCR 的方法, 按照 GenBank 中序列号为 X84764 鸭 I 型 IFN(DIFN1) 基因设计引物, 成功扩增出番鸭 IFN 基因, 命名为 MDIFN- α , 包含编码 MDIFN- α 成熟蛋白全部核苷酸序列。DIFN1 开放阅读框架(ORF) 有 576 个核苷酸, 编码 191 个氨基酸, 其中切除信号肽的 IFN- α 为成熟 DIFN1, 共有 486 个核苷酸组成, 编码 161 个氨基酸。MDIFN- α (含有不完整的信号肽) 与 X84764 的核苷酸同源性为 97.7%, 推导氨基酸同源性为 95.7%。结果显示, MDIFN- α 可能为鸭 I 型 IFN 一个新的亚型。

关键词: 番鸭; α 干扰素基因; 克隆

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

干扰素是具有正常生理功能的细胞, 在适宜的诱生剂的作用下产生的并能抑制病毒增殖的一类重要细胞素, 其化学本质是一种糖蛋白, 具有广谱抗病毒、抗细胞分裂及免疫调节等多种生物学功能。干扰素按其基因序列和氨基酸组成的差别可分为 I 型和 II 型, I 型干扰素包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- τ 4 个亚型, 主要是由白细胞或成纤维细胞在病毒诱导下分泌的, II 型干扰素主要有 IFN- γ , 一般不是由病毒诱导产生, 而是由被抗原物质激活的 T 细胞和 NK 细胞合成的, 此类抗原物质可为植物血凝素(PHA)、半刀豆蛋白(ConA)等^[1]。两类 IFN 可诱导机体转录多种重要基因, 可使靶细胞出现一个“抗病毒时期”, 靶细胞生长速度降低或更易凋亡, 靶病毒的分裂和复制被中断或破坏; 此外, 两类 IFN 还具有复杂的免疫调节功能^[2]。自 1957 年 Isaacs 和 Lindenmann 首次发现这种抗病毒增殖的可溶性物质, 并命名为干扰素(interferon, IFN)以来, 其诱导机制、基因调控和抗病毒等功能的研究日趋深入。迄今, 人、狗、猪、猫等的干扰素基因先后被克隆, 已有多种利用基因工程方法生产的干扰素产品应用于临床, 展现出广阔的应用前景^[3]。与哺乳动物相比, 鸭 IFN 的分子水平研究起步较晚, 直至 1995 年才有 Schultz 报道了鸭 I 型 IFN 基因^[4], 随后于 1999 年又报道了 IFN- γ 基因^[5]。

番鸭品种优良, 肉质鲜美, 在我国特别是华南地区饲养规模较大。但是, 番鸭饲养过程受多种病毒性疾病危害, 如“番鸭三周病”、“花肝病”、“禽流感”, 致使番鸭养殖业几乎遭受到毁灭性的打击。目前针对这类病毒性疾病没有效果理想的治疗药物, 因此有必要开创干扰素类生物制剂来控制疾病。本研究采用 RT-PCR 的方法克隆出番鸭 IFN- α 基因, 为下一步研究表达 IFN- α 奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 隔离饲养 4 周龄健康番鸭。

1.1.2 引物 从 GenBank 读取鸭的 IFN- α 基因序列(X84764), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计上、下游引物, 上游引物序列为 5' CTGAATTCAACGC-CTTCTCCTGCA3', 下游引物序列为 5' ATGGATCCT-TAGCGCATGGTGCGGGTGA3', 在上游和下游引物的 5' 端分别增加 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点。

1.1.3 培养基 Hanks 平衡盐溶液; RPMI 1640 细胞培养基和小牛血清均为 Sigma 公司产品。

1.1.4 其他主要化学与分子生物学试剂 PHA 为广东医药工业研究所产品; 总 RNA 提取试剂盒和淋巴细胞分离液为华美生物工程公司产品; *Taq* 酶和逆转录酶为宝生物工程(大连)有限公司产品; PGEM-T Easy 载体为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 免疫鸭外周血淋巴细胞体外刺激培养 采集经 H9 亚型的禽流感病毒灭活油乳苗免疫的番鸭外周血, 用淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞, 经 Hanks 平衡盐溶液洗涤, 悬浮于含 $\varphi=10\%$ 的小牛血清细胞培养基中(约 8×10^6 个/mL)。于 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 1 mL 培养基-淋巴细胞混悬液, 37℃温育 1 h 后, 加终浓度为 5 μ g/mL 的 PHA, 37℃孵育 24 h 收集细胞, 提取总 RNA^[6]。

1.2.2 番鸭 IFN- α 基因的 RT-PCR 上述总 RNA 的逆转录参照 TaKaRa 公司产品说明书进行, 室温作用 10 min, 42℃1 h, 冰浴 5 min。PCR 扩增参数为 97℃预变性 10 min, 冰浴 5 min, 然后置 PCR 仪(UNOII Thermoblock, Biometra 公司)中 94℃45 s, 58℃45 s, 72℃1

min, 循环 28 次, 最后 72 °C 延伸 8 min.

1.2.3 RT-PCR 产物的克隆及测序 PCR 产物经 0.012 g/mL 低熔点琼脂糖电泳后, 切下 500 bp 处 DNA 带, 回收后与 PGEM-T Easy 载体连接, 转化 DH5α, 挑取白色菌落于加氨苄青霉素 LB 中 37 °C 振荡培养, 送菌液至上海基康生物技术有限公司测序.

2 结果

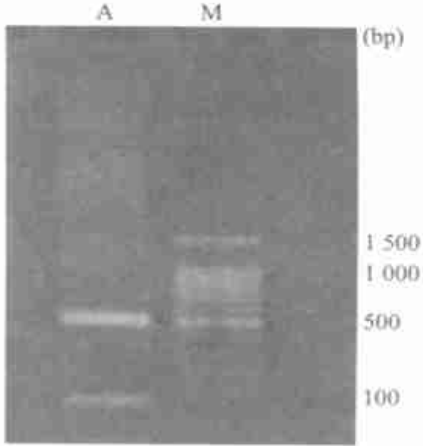
2.1 番鸭 IFN-α 基因的获取及克隆

以 RT-PCR 方法, 从番鸭淋巴细胞中成功获取到 500 bp 特异片段, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳, 其大小与目的片段大小相同(图 1).

2.2 基因序列

获取的基因全长为 498 个核苷酸, 命名为 MD-IFN-α, 包含 IFN-α 成熟蛋白的全部基因. 切除信号肽的 IFN-α 共有 486 个核苷酸, 在 GenBank 上进行同源性分析, 同 X84764 基因相比较, 共有 11 个碱基发生

突变, 同源性为 97.7%(475/486) (图 2).



A: RT-PCR 产物, M: 100 bp Marker
A: RT-PCR product, M: 100 bp DNA Marker

图 1 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

MDIFN:	1	aacgccttctctctgcagccccctgcgcctccacgacagcgcttc	ccctgg	acagcctc	60
X84746:	1471	aacgccttctctctgcagccccctgcgcctccacgacagcgcttc	ccctgg	acagcctc	1530
MDIFN:	61	cagctcctccgc	acatggctcccagccccacacagcctgcccgcagcaaacacgcgct	120	
X84746:	1531	cagctcctccgc	acatggctcccagccccacacagcctgcccgcagcaaacacgcgct	1590	
MDIFN:	121	tgctccttcccggacacccctcctggacaccaacgacacgcagcaagccgcacacaccgcc	180		
X84746:	1591	tgctccttcccggacacccctcctggacaccaacgacacgcagcaagccgcacacaccgcc	1650		
MDIFN:	181	ctccacctctctcaaacacctctctgacaccctcagcagccccagcaccgccgcgactgg	240		
X84746:	1651	ctccacctctctcaaacacctctctgacaccctcagcagccccagcaccgccgcgactgg	1710		
MDIFN:	241	ctccacac	acagccacgacctctcaaccagct	ccagcaccacatccaccacctcgag	300
X84746:	1711	ctccacac	acagccacgacctctcaaccagct	ccagcaccacatccaccacctcgag	1770
MDIFN:	301	cgtgtcttccag	acgacgcca	cgcgctccacagcgagggccccgcaaccttcacctc	360
X84746:	1771	cgtgtcttccag	acgacgcca	cgcgctccacagcgagggccccgcaaccttcacctc	1830
MDIFN:	361	agcatcaacaagtacttca	gctgcatccaacattctctccagaaccacacctacagcccc	420	
X84746:	1831	agcatcaacaagtacttca	gctgcatccaacattctctccagaaccacacctacagcccc	1890	
MDIFN:	421	tgcgcattgggaccacgtccgcctcgaggtcacgcctgcttcagcgcatt	ccaccg	gctc	480
X84746:	1891	tgcgcattgggaccacgtccgcctcgaggtcacgcctgcttcagcgcatt	ccaccg	gctc	1950
MDIFN:	481	accgcaccatgcgctaa	498		
X84746:	1951	accgcaccatgcgctaa	1968		

图 2 MDIFN-α 基因序列在 GenBank 中同源性分析结果

Fig. 2 The blast result of the MDIFN-α sequence in GenBank

2.3 氨基酸序列分析

切除信号肽的 MDIFN-α 的基因共编码 161 个氨基酸, 同 IFN-αX84746 相比, 有 11 个密码子突变(图 3). 其中 4 个同义突变, 7 个非同义突变, 有趣的是 4 个丙氨酸发生突变, 其中 2 个突变为脯氨酸. 12 和 80 位点的丙氨酸突变为一种亚氨基酸脯氨酸; 101 位点的非极性的中性丙氨酸突变为极性带负电荷的酸性氨基酸, 溶解性增加; 104 位点的丙氨酸突变为含羟基的极性氨基酸, 溶解性亦升高; 14 和 21 位点带

MDIFN:	CSPLRLHDSAF	W	SLQLLR	MAPSPTQPCPQQHAPCSFPDITLDTNDTQQA
X84746:	-----	A	D	-----N-----
MDIFN:	HTALHLLQHLFDLSSPSTPAHWLHT	PRHDLNQLQHHIHLERCF	DDA	IRLH
X84746:	-----	A	-----	A-----A-----
MDIFN:	RRGPRNLHLSINKYF	SCIQHFLQNHTYSPCAWDHVRLEAHACFQRIHRLTRTMR*		
X84746:	-----	G	-----	-----*

图 3 MDIFN-α 基因和基因文库序列号为 X84764 基因的推导氨基酸的比较

Fig. 3 The comparison of deduced amino acid sequences of the MDIFN-α gene between entry No. X84764 gene from GenBank

负电荷的酸性天冬氨酸和不带电荷的极性天冬酰胺酸突变为带正电荷的碱性组氨酸; 123 位点甘氨酸突变为丝氨酸.

3 讨论

近 40 年来, 人类医学和兽医学对哺乳动物干扰素的研究取得了许多突破性的进展. 由于不同动物的干扰素具有种属特异性, 同源性较低; 在人类和其他哺乳动物研究中应用的有效方法和成功经验未能用于禽类干扰素的研究; 因此, 从分子水平上对禽类干扰素的研究是近年来才取得成功的. 1994 年, Sekellick 等^[7]首先克隆得到鸡胚成纤维细胞 IFN 基因. 随后 Schultz 报道了鸭 I 型 IFN 基因和 IFN- γ 基因^[1,7]. 国内也报道了北京鸭 I 型 IFN 基因^[8]和 II 型 IFN 基因^[9].

本实验从番鸭外周血分离淋巴细胞, 分别应用灭活的流感病毒和 PHA 刺激进行诱导培养, 采用 RT-PCR 的方法成功地扩增出番鸭 I 型 IFN 基因, 序列分析表明作者扩增到包含番鸭白细胞干扰素成熟基因序列, 其与基因文库序列号为 X84764 的同源性为 97.7%, 有 11 个核苷酸发生变异, 引起 11 个密码子突变, 其中 4 个同义突变, 导致 7 个氨基酸发生变异, 变异率达 4.35%; 而夏春等^[8]报道的北京鸭 I 型 IFN 与序列号为 X84764 的 IFN 同源性达 99.8%, 且氨基酸水平完全一致. 根据国际干扰素命名委员会的规定, 各种干扰素应先根据动物的来源确定分类, 再根据干扰素的抗原特异性和分子结构分成不同的型别, 以 α 、 β 、 γ 表示. 在某一特定的干扰素类别内, 有氨基酸序列或组成方面的差异时可确定为亚型^[10]. 因此有理由认为 MDIFN- α 可能为鸭 I 型 IFN

的一个新的亚型.

参考文献:

[1] YOUNG D F, DIDCOCK L, GOODBOURN S, et al. Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response[J]. *Virology*, 2000, 269: 383-390.

[2] GOODBOURN S, DIDCOCK L, RANDALL R E. Interferon: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 2341-2364.

[3] 夏春, 汪明, 朱凌云, 等. 惠阳胡须鸡 IFN- α 基因克隆和序列分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(6): 563-566.

[4] SCHULTZ U, KÖCK J, SCHULTZ H J, et al. 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 inhibit duck Hepatitis B virus replication in primary hepatocytes[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(4): 3162-3168.

[6] 黄爱龙, JILBERT A, KOTLARSKI I. 鸭子 α 干扰素基因表达及多样性分析[J]. *中国免疫学杂志*, 2000, 16(12): 644-647.

[7] SEKELICK M J, FERRANDION A F, HOPKINS D A, et al. Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis[J]. *Journal of Interferon Research*, 1994, 14: 71-79.

[8] 夏春, 万建青, 吴志光, 等. 北京鸭 I 型干扰素基因分子克隆和序列分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(6): 567-570.

[9] 吴志光, 夏春, 汪明. 北京鸭 II 型干扰素基因分子克隆和序列分析[J]. *中国兽医科技*, 2000, 31(3): 567-570.

Cloning and Sequencing of the Muscovy Duck IFN1 Gene

WANG Chun-xia, WANG Lin-chuan, HUANG Ai-fang, WANG Qing, YAN Zhi-qiang, CHEN Qing-hua
(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using primers based on entry No. X84764 from GenBank, the muscovy duck IFN1 gene (named MDIFN- α) containing the nucleotide sequence of the mature protein was cloned from total RNA derived from PHA-stimulated cultured lymphocyte of immunized muscovy duck by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The open reading frame (ORF) of DIFN1 consisted of 576 nucleotides, encoding 191 amino acids. After excising the signal peptide, mature DIFN1 consisted of 486 nucleotides, encoding 191 amino acids. The homology of MDIFN- α (lacking signal peptide) nucleotide and deduced amino acid sequences to No. X84764 was 97.7% and 95.7% respectively. The result showed that MDIFN- α might be a new IFN subtype of duck type I interferon.

Key words: muscovy duck; IFN- α gene; cloning

【责任编辑 柴 焰】