

鸡白细胞介素-2 基因的克隆与 酵母表达质粒的构建

张辉华^{1,2}, 毕英佐¹, 曹永长¹, 马静云¹, 周庆丰¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 佛山科学技术学院 生命科学学院, 广东 佛山 528131)

摘要: 从经 Con A 活化的 4 周龄岭南黄鸡脾脏淋巴细胞中分离提取总 RNA, 经过反转录 PCR (RT-PCR) 扩增出鸡白细胞介素-2 (IL-2) cDNA 片段。PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy 载体, 重组质粒命名为 IL-2-T, 经菌落 PCR 与限制酶切鉴定, 然后测序, 结果表明克隆片段长度为 432 bp, 与预期大小一致, 为鸡 IL-2 基因的编码区全长。将 IL-2-T 克隆重组质粒进行双酶切 (*Cla* I 与 *Xba* I), 回收 IL-2 片段插入同样酶切的毕赤酵母表达质粒 pPICZα-C, 构建重组 IL-2-C 表达质粒, 为鸡 IL-2 在毕赤酵母中的表达奠定基础。

关键词: 白细胞介素-2; 克隆; 鸡

中图分类号: S852.42

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 01-0102-04

Cloning of interleukin-2 cDNA fragment and construction of yeast expression plasmid

ZHANG Hui-hua^{1,2}, BI Ying-zuo¹, CAO Yong-chang¹, MA Jing-yun¹, ZHOU Qing-feng¹

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

2 College of Biology, Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China)

Abstract: The Lingnanhuang chicken interleukin-2 (IL-2) cDNA fragment was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from Con A stimulated, cultured spleen lymphocytes of four-week-old chicken. The RT-PCR product was inserted into the pGEM-T cloning vector. Restriction analysis and PCR were performed to identify the clone containing the DNA fragment of interest, and then the cDNA fragment was sequenced. The result showed that the length of obtained fragment was 432 bp and was the same as that of the chicken IL-2 gene open reading frame. The plasmid IL-2-T was digested with the enzymes *Xba* I and *Cla* I, the IL-2 fragment was recovered, and the IL-2 fragment was inserted into the plasmid pPICZα-C digested with the same enzymes. Also, restriction analysis and PCR were performed to identify the clone containing the plasmid IL-2-C, and then the cDNA fragment was sequenced. The result showed that the ORF was correct. These results provided foundation for the expression of IL-2 in yeast expression system.

Key words: interleukin-2 (IL-2); clone; chicken

鸡白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 是由激活的 T 辅助细胞分泌产生的一种细胞因子, 在细胞免疫调节网络中具有重要的调节作用。研究证明它可

以促进 T、B 淋巴细胞, NK 细胞, 单核细胞等的增殖, 也可以促进其他细胞因子的分泌、释放, 增强淋巴细胞和内皮细胞表面粘附分子的表达, 促进淋巴

收稿日期: 2004-03-12

作者简介: 张辉华 (1971-), 男, 讲师, 博士。通讯作者: 毕英佐 (1944-), 男, 研究员;

E-mail: yzbi@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技攻关计划项目 (2002B21404); 广东省科技攻关计划重大项目 (2004A20106001)

Copyright © 2005 China Academic Journal Electronic Publishing House. All Rights Reserved. http://www.cnki.net

细胞及其他分子活化细胞的粘附及移动能力, 增加抗原递呈细胞表面 MHC I 和 MHC II 类分子的量, 增强抗原递呈作用^[1]. 以重组 IL-2 为佐剂能有效地提高亚单位疫苗的免疫效果^[2,3]. 一些禽病, 特别是一些免疫抑制性疾病, 如 MD、RE、传染性贫血因子病及球虫病感染后 IL-2 分泌水平明显降低, 说明 IL-2 与禽病的发生及免疫抑制密切相关, IL-2 可能在抗感染免疫中发挥一定作用^[4,5]. 因此深入开展鸡 IL-2 的研究, 对阐明家禽的免疫调节机理及禽病防治具有十分重要的意义, 具有诱人的应用前景.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用鸡 1 日龄岭南黄鸡购自广东畜牧研究所, 华南农业大学动物科学院基因工程实验室饲养至 4 周龄.

1.1.2 菌株及质粒 基因工程菌 DH-5 α 与质粒 pPICZ α -C (Invitrogen 公司产品) 由华南农业大学动物科学学院基因工程实验室保存; pGEM-T Easy 载体质粒系统为 Promega 公司产品.

1.1.3 细胞总 RNA 提取试剂盒 为 GibcoBRL 公司的 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒.

1.1.4 酶类及其他试剂 AMV 反转录酶、Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 (大小为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp) 为 TakaRa 产品. E.Z. N. A. Plasmid Minipreps Kit 和 E.Z. N. A. Gel Extraction Kit 均为 Omega 公司产品. Zeocin 抗生素为 Invitrogen 公司产品.

1.1.5 细胞培养用试剂 RPMI1640 培养液, 淋巴细胞分离液, ConA, 小牛血清 (Gibco 公司产品), Hank's 液、PBS (无 Ca²⁺, Mg²⁺ 离子) 液.

1.2 试验方法

1.2.1 鸡脾脏淋巴细胞悬液的制备 按照李建荣等^[6] 人的方法并略加改动进行. 具体如下: 鸡放血干净致死, 无菌摘取脾脏, 用机械法捣碎, 过 200 目钢丝筛, 以 PBS (无 Ca²⁺, Mg²⁺ 离子) 液冲洗, 300 r/min, 离心 5 min, 去除大的组织块, 取上清液置于淋巴细胞分离液上密度梯度离心分离淋巴细胞, 用 PBS (无 Ca²⁺, Mg²⁺ 离子) 液洗涤 3 次, 台盼兰染色活细胞 > 95% 以上, 用 RPMI1640 培养液 (无血清) 稀释成 1 $\times$ 10⁷/mL 的淋巴细胞悬液.

1.2.2 IL-2 的体外诱导和总 RNA 的提取 在 1 $\times$ 10⁷/mL 的淋巴细胞悬液中加入 Con A 至终质量浓度为 10 mg/L, 培养 8、12、24 h 后, 收集淋巴细胞, 按

照 GibcoBRL 公司的 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒使用说明书进行淋巴细胞总 RNA 的提取.

1.2.3 RT-PCR 反应和 cDNA 的扩增 根据 Sundick 等^[7] 发表的鸡 IL-2 基因 cDNA 序列和 PCR 引物设计原则, 借助计算机软件 DNASTar 进行辅助分析, 设计了 1 对 PCR 引物, 序列如下:

上游引物 (Primer1): 5'-GCATCGATGATGT-GCAAAGTACTGATCTT,

下游引物 (Primer2): 5'-GCTCTAGAT-CATTTT-TGCAGATAT-3'.

Primer1 的 5' 端含有 Cla I 酶切位点并根据表达质粒 pPICZ α -C 的要求加多 1 个碱基以便克隆后读码框正确; Primer2 的 5' 端含有 Xba I 酶切位点及终止密码子 TCA.

cDNA 第 1 链的合成参照 TaKaRa 的 AMV 反转录酶使用说明进行. RT 产物直接用于 PCR 扩增. PCR 反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1 个循环. PCR 产物用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

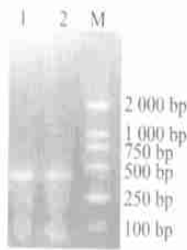
1.2.4 IL-2 基因 cDNA 的克隆和测序 PCR 目的片断经过胶纯化回收后, 与 pGEM-T Easy 质粒相连, 连接产物直接转化 DH-5 α 感受态细胞, 然后培养于含 X-gal、IPTG 和 Amp 的 LB 平板中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 挑取单个白色菌落于 LA 液体中培养, 进行菌落 PCR 和抽质粒酶切鉴定. 鉴定正确的质粒称为 IL-2-T, 送上海博亚公司测序.

1.2.5 表达质粒 IL-2-C 的构建 将测序正确的 IL-2-T 重组质粒进行 Cla I、Xba I 双酶切, 回收目的片断 IL-2 基因, 同时将质粒 pPICZ α -C 也进行 Cla I、Xba I 双酶切. 将酶切的 IL-2 基因片断与酶切质粒 pPICZ α -C 在 T4 连接酶作用下进行连接, 转化 DH-5 α 感受态细胞, 培养于含有 Zeocin 抗生素的低盐 LB 平板上. 挑取单个菌落进行菌落 PCR 和抽质粒酶切鉴定. 鉴定正确的质粒送上海博亚公司测序.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

以经 Con A 活化的岭南黄鸡脾脏淋巴细胞总 RNA 为模板, 利用自己设计的特异性引物, 采用 RT-PCR 技术进行扩增, 扩增产物经 0.01 g/mL 的琼脂糖凝胶电泳, 出现了预期大小的单一条带, 大小约 450 bp 左右, 结果见图 1.



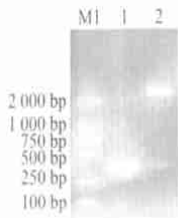
M 为 DNA marker; 1, 2 为 RT-PCR 结果
M: DNA marker; 1, 2: RT-PCR product

图 1 粤黄鸡 IL-2 RT-PCR 产物

Fig. 1 Results of RT-PCR amplification

2.2 IL-2 基因的克隆与 PCR、酶切鉴定结果

将 RT-PCR 产物用低熔点胶进行纯化, 然后克隆到 pGEM-T Easy 载体, 挑取阳性菌落分别用 PCR 和质粒酶切进行鉴定, 结果都出现预期大小的条带 (见图 2), 表明基因已克隆到 pGEM-T Easy 载体中。



M1 为 DNA marker; 1, 2 分别为菌落 PCR 与酶切结果
M1: DNA marker; 1: PCR product; 2: restriction digestion product

图 2 IL-2-T 菌落 PCR 与酶切图

Fig. 2 Identification of IL-2-T by PCR and restriction digestion

2.3 DNA 序列测定与分析

PCR 产物测序结果如图 3 所示. 结果表明克隆获得的长 432 bp PCR 产物为预期的鸡 IL-2 编码区全长序列. 与 Sundick 等^[7]发表的鸡 IL-2 基因 cDNA 序列编码区完全一致, 序列覆盖编码区全长。

1 ATG ATG TGC AAA GTA CTG ATC TTT GGC TGT ATT TCG GTA GCA ATG CTA ATG ACT ACA GCT
M M C K V L I F G C I S V A M L M T T A
61 TAT GGA GCA TCT CTA TCA CCA GAA2 AAA TGG AAA ACT CTT CAA ACA TTA ATA AAG GAT TTA
Y G A S L S P E K W K T L Q T L I K D L
121 GAA ATA TTG GAA AAT ATC AAG AAT AAG ATT CAT CTC GAG CTC TAC ACA CCA ACT GAG ACC
E I L E N I K N K I H L E L Y T P T E T
181 CAG GAG TGC ACC CAG CAA ACT CTG CAG TGT TAC CTG GGA GAA GTG GTT ACT CTG AAG AAA
Q E C T Q Q T L Q C Y L G E V V T L K K
241 GAA ACT GAA GAT GAC ACT GAA ATT AAA GAA GAA TTT GTA ACT GCT ATT CAA AAT ATC GAA
E T E D D T E I K E E F V T A I Q N I E
301 AAG AAC CTC AGG AGT CTT ACG GGT CTA AAT CAC ACC GGA AGT GAA TGC AAG ATC TGT GAA
K N L R S L T G L N H T G S E C K I C E
361 GCT AAC AAC AAG AAG AAA TTT CTT GAT TTT CTC CAT GAA CTG ACC AAC TTT GTG AGA TAT
A N N K K K F P D F L H E L T N F V R Y
421 CTG CAA AAA TGA
L Q K

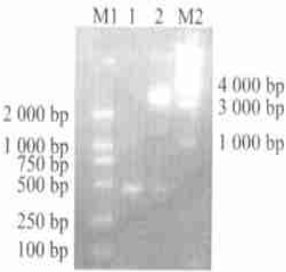
图 3 岭南黄鸡 IL-2 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列图

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of IL-2 gene

将该序列与 GenBank 上发表了的其他鸡 IL-2 编码区序列进行比较, 在核苷酸水平上同源性为 86.1%~99.3%; 与火鸡 IL-2 同源性最低, 为 86.1%, 与仙居鸡 IL-2 同源性为 99.3%, 与来航鸡 IL-2 同源性为 98.1%, 与成仁鸡、萧山鸡、肉仔鸡 IL-2 同源性为 98.4%, 与 Gallus Gallus IL-2 同源性为 98.1%, 与丝毛鸡 IL-2 同源性为 99.1%, 与印度肉仔鸡 IL-2 同源性为 97.9%。在氨基酸水平上同源性为 70.1%~97.9%; 与成仁鸡、萧山鸡、Gallus Gallus、肉仔鸡 IL-2 氨基酸同源性为 95.8%, 与丝毛鸡 IL-2 同源性为 97.2%, 与印度肉仔鸡、来航鸡 IL-2 同源性为 95.1%, 与火鸡 IL-2 相似性最低为 70.1%, 与仙居鸡 IL-2 同源性为 97.9%。氨基酸变异主要是在 27 位的 P, 其他序列为 S; 30 位的 W, 其他为 R 或 L; 32 位的 T, 其他为 P 或 I; 104 位的 R, 其他为 K。

2.4 表达质粒 IL-2-C 的构建

采用 Cla I、Xba I 进行双酶切将 IL-2 基因克隆至酵母表达质粒 pPICZα-C 中, 经阳性菌落分别用 PCR 和质粒酶切鉴定, 结果都出现大小约 450 bp 的条带, 表明基因已克隆到 pPICZα-C 载体中 (图 4)。经最后测序表明质粒 IL-2-C 读码框正确, 可用于转化毕赤酵母进行鸡 IL-2 的酵母真核系统的表达。



M1, M2 为 DNA marker; 1, 2 为菌落 PCR 与酶切结果
M1, M2: DNA marker; 1: PCR product; 2: restriction digestion product

图 4 IL-2-C 菌落 PCR 与酶切图

Fig. 4 Identification of IL-2-C by PCR and restriction digestion

3 讨论

以经 Con A 活化的岭南黄鸡脾脏淋巴细胞总 RNA 为模板, 利用自己设计的特异性引物, 采用 RT-PCR 技术成功地扩增出岭南黄鸡 IL-2 基因. 对 Con A 刺激时间及培养基有无血清对扩增结果的影响也进行了研究. 添加体积分数为 10% 小牛血清培养的淋巴细胞中没有扩增出 IL-2 基因; Con A 刺激 8、12、24 h 都能扩增出 IL-2 基因. 关于 Con A 诱导时

间对鸡 IL-2 基因扩增的影响, 不同试验结果并不完全一致. 有的报道仅在 ConA 诱导后 6 h 扩增出 IL-2^[6]; 有的仅在 Con A 活化 8 h 后^[8] 可以扩增, 其他时间未能扩增出来; 也有报道经 Con A 诱导 20 h 扩增出 IL-2 基因^[9, 10]. 原因可能与不同研究者的试验条件有关, 同时也与 IL-2 mRNA 在细胞内的半衰期有关, 因为鸡 IL-2 的 mRNA 的末端序列中有许多影响 mRNA 半衰期的基元. 陈吉刚等^[11] 认为与 IL-2 基因中的“ATTTA”对 mRNA 的稳定性影响有关.

本试验所得基因序列与 GenBank 上发表了的其他鸡 IL-2 编码区序列核苷酸水平同源性最高达 99.3%; 氨基酸水平上同源性最高达 97.9%, 而且通过 DNAStar 软件分析(本文未列出)其二级结构完全相同, 证实了鸡 IL-2 在核苷酸与氨基酸组成和结构上具有保守性. 黄鸡是华南地区饲养量最大的一类鸡品种, 远销港澳市场, 岭南黄鸡 IL-2 基因的克隆为新型免疫增强剂的研制和新型基因工程苗的研究提供了十分有用的价值, 为当地品种鸡资源开发奠定了基础. 甲醇型毕赤酵母表达系统具有高表达、易操作、纯化简便等特点, 属于真核表达系统, 具有可以进行蛋白质翻译后的修饰等功能^[12]. 将岭南黄鸡 IL-2 基因克隆至毕赤酵母表达质粒 pPICZ α -C 中的目的就是希望利用毕赤酵母大量生产重组 IL-2 蛋白用于家禽生产, 该质粒的构建为下一步的表达奠定基础.

参考文献:

[1] JANSSEN R A, MULDER N H, THE T H, et al. The immunobiological effects of interleukin-2 *in vitro* [J]. Cancer Immunol Immunother, 1994, 39: 207—216.

[2] HAZAMA M, MAYUMI A, ASAKAWA N, et al.

Adjuvant-independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type I glycoprotein D by fusion with biological active interleukin-2 [J]. Vaccine, 1993, 11(6): 629—636.

[3] 姜永厚, 陈奖励, 宋秀龙, 等. 鸡新城疫病毒 F 基因和鸡 IL-2 重组疫苗的构建 [J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(2): 81—83.

[4] 李广兴, 刘忠贵, 郎跃深. SPF 雏鸡感染网状内皮组织增殖病病毒后白细胞介素 2 和干扰素诱生活性的变化 [J]. 中国兽医科技, 2000, 30(4): 3—4.

[5] RIVAS A L, FABRICANT J. Indications of immunodepression in chickens infected with various strains of Marek's disease virus [J]. Avian Diseases, 1988, 32: 1—8.

[6] 李建荣, 黄耀伟, 孟松树, 等. 我国地方品种萧山鸡白细胞素 2 基因的克隆和分子进化分析 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(6): 713—718.

[7] SUNDICK R S, GILL-DIXON C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15 [J]. J Immunol, 1997, 159(2): 720—725.

[8] 陈奖励, 王欢, 宋英晖, 等. 鸡 IL-2 基因的克隆及序列测定 [J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(4): 11—13.

[9] 李祥瑞, 金红, 卢景良. 鸡白细胞介素—2 cDNA 克隆 [J]. 南京农业大学学报, 1999, 22: 80—84.

[10] 陈洪岩, 刘胜旺, 陈奖励, 等. 鸡 IL-2 基因的克隆及序列测定 [J]. 中国兽医科技, 1999, 29(7): 5—7.

[11] 陈吉刚, 周继勇, 王金勇. 艾维茵商品肉用鸡白细胞介素—2 基因的克隆及其二级结构分析 [J]. 中国兽医科技, 2003, 33(1): 19—24.

[12] CEREGHINO J L, CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24: 45—66.

【责任编辑 柴 焰】