

地方品种固始鸭与樱桃谷鸭 α -干扰素基因的克隆与遗传进化分析

管 倩^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 杨明凡^{1,2}, 郭小参^{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:根据 GenBank 发表的鸭 α -干扰素(interferon- α , IFN- α)基因序列(AY879230),设计并合成了 1 对引物,提取固始鸭和樱桃谷鸭基因组 DNA,应用 PCR 技术扩增地方品种固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因,并克隆、测序。测序结果表明获得了固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因,大小均为 584 bp,包含 1 个 IFN- α 基因完整的开放阅读框,编码 191 个氨基酸的多肽。推导的氨基酸有 2 个潜在的 N-糖基化位点,有 7 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。克隆的固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因与北京鸭 IFN- α 基因的氨基酸序列比较,仅固始鸭 IFN- α 基因发生突变 D³⁸N。固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因与其他 IFN- α 基因的氨基酸序列遗传进化树分析表明樱桃谷鸭与北京鸭有很近的亲缘关系,固始鸭次之。地方品种固始鸭在非常保守的 38 位发生了氨基酸突变,推测这可能与该品种鸭具有很强的抗病能力有关。

关键词:鸭; α -干扰素; 克隆; 遗传进化分析

中图分类号:S858.32

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)02-0104-04

Cloning and Genetic Analysis of Interferon- α Gene in Gushi Duck and Yingtaogu Duck of Local Breed

GUAN Qian^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, CHEN Hong-ying^{1,2},
YANG Ming-fan^{1,2}, GUO Xiao-can^{1,2}, LÜ Xiao-li^{1,2}, WANG Dong-fang^{1,2}

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, He'nan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 Animal Food Safety Key Laboratory, He'nan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One pair of primers was designed and synthesized according to the duck interferon- α (IFN- α) gene nucleotide sequence(AY879230) in GenBank. Genome DNA was extracted from Gushi duck (GS duck) and Yingtaogu duck (YT duck), and then the IFN- α gene fragment was amplified from both GS duck and YT duck by PCR and the amplicons were cloned and sequenced. The results indicated that the nucleotide sequences of IFN- α genes from both duck breeds were 584 bp, including one open-reading frame, encoding 191 amino acid polypeptide. Both of the deduced amino acid sequences contained two potential N-glycosylation sites and seven cysteines which are related to shape disulfide bond. Compared to the amino acid sequence of Beijing duck (BJ duck) IFN- α gene, GS duck IFN- α gene show D³⁸N mutation at 38 site amino acid. Phylogenetic analysis showed that there were close relationships between YT duck and BJ duck. mutation was found at the amino acid sequence position 38 of local breed of GS duck, which was highly conserved usually, and it is speculated that this may be related to its high resistance against diseases.

Key words: duck; interferon- α ; cloning; phylogenetic analysis

干扰素(interferon, IFN)是在特定的诱生剂作用下,由细胞产生的一种具有高度生物学活性的糖蛋白,因其具有干扰病毒在动物机体内的复制作用而得名。由于其具有广谱抗病毒、抗肿瘤的活性以及强

收稿日期:2007-10-28

作者简介:管 倩(1982—),女,硕士研究生; 通讯作者:崔保安(1948—),男,教授,E-mail: baoancui@henau.edu.cn.

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

大的免疫调节作用,现已成为病毒学、临床医学、免疫学和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 2 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 . 其中 IFN- α 以其突出的抗病毒作用而备受人们重视,已广泛用于人医临床^[4-6]. 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^[7-8]. 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. 1995 年, Schulz^[9] 报道了鸭干扰素序列,并开展了其抗病毒的研究;夏春等^[10] 和吴志光等^[11] 曾对北京鸭 I 型和 II 型干扰素基因进行了克隆和序列分析. 近年来随着我国养鸭业的快速发展,多种病毒性疾病如“鸭瘟”、“花肝病”、“禽流感”,致使蛋鸭、肉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. 本研究以固始鸭和樱桃谷鸭为研究对象,以其肝组织中提取的基因组 DNA 为模板,克隆了固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因,为下一步表达 IFN- α 基因奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

成年固始鸭、樱桃谷鸭购自河南信阳某鸭场. pGEM-T Easy Vector System 为 Promega 公司产品. Premix Ex Taq DNA 聚合酶, X-gal 和 IPTG, 限制性内切酶 *Eco*R I、*Pst* I 等为宝生物工程(大连)有限公司产品. Animal Tissue Genomic DNA Mini-prep Kit 为杭州维特洁生物技术有限公司产品. QIA Quick Gel Extraction Kit 为 Qiagen 公司产品.

1.2 鸭 IFN- α 全基因 PCR 扩增

参照 GenBank 中的参考序列(A Y879230)设计 1 对引物(上游引物 P1:5'-AATGCCATGCCTGGGCCAT-CA-3',下游引物 P2:5'-AAGCCTCCTCTTAGCGCATG-GT-3'),该对引物理论跨幅约 584 bp(包含 IFN- α 全基因). 按 Animal Tissue Genomic DNA Mini-prep Kit 提取固始鸭和樱桃谷鸭肝组织 DNA,进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,36 个循环,最后 72 °C 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 8 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)进行电泳检测 PCR 的结果. 然后进行目的片段的回收.

1.3 鸭 IFN- α 基因克隆与鉴定

将电泳后回收的产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接反应,16 °C 连接 15 h,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,挑取白斑菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤培养基,37 °C 振荡培养 12 ~ 16 h. 提取重组质粒后,进行 PCR 及酶切鉴定. 选择酶切和 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定.

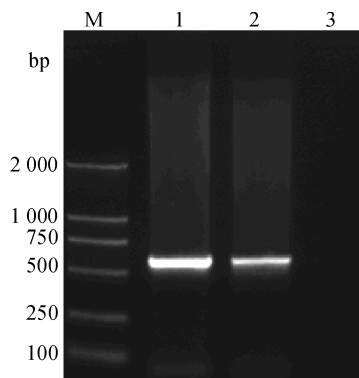
1.4 鸭 IFN- α 基因序列分析

用 DNASTar 软件对克隆的 IFN- α 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列与 GenBank 中收录的 IFN- α 基因序列进行比较,分析它们之间的同源性及变异程度.

2 结果与分析

2.1 鸭 IFN- α 基因的 PCR 扩增、克隆与测序

电泳结果显示,利用 IFN- α 基因的特异引物,采用 PCR 技术,从固始鸭和樱桃谷鸭肝组织基因组中均扩增出 1 条约为 584 bp 的特异带,与预期扩增的 DNA 片段大小相符(图 1). 纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接、转化,并测序. 测序结果表明固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因核苷酸序列均为 584 bp,包含 1 个 IFN- α 基因的完整开放阅读框(576 bp),G + C 含量为 67.36%,共编码含 191 个氨基酸的多肽,相对分子质量均为 21 650. 固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因推导的氨基酸均有 2 个潜在的 N-糖基化位点(NDT 和 NHT),均有 7 个与二硫键形成有关的半胱氨酸. 将获得的固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因序列注册 GenBank,登陆号分别为: DQ861429, DQ864757.



M:DNA marker DL2000;1:固始鸭 IFN- α 基因 PCR 产物;2:樱桃谷鸭 IFN- α 基因 PCR 产物;3:阴性对照

M:DNA marker DL2000;1:PCR product of IFN- α gene from Gushi duck;2:PCR product of IFN- α gene from Yingtaogu duck;3:negative control

图1 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoretic analysis of PCR products

2.2 IFN- α 基因推导的氨基酸序列比较

将克隆的固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因推导的氨基酸与 GenBank 中发表的 2 个品种鸭和其他动物的 IFN- α 基因氨基酸序列进行比较(图 2),结果显示固始鸭与北京鸭 IFN- α 基因(AB128861)相比较,在第 38 位氨基酸发生突变 D³⁸N.

Gushi duck	.P.....A.S.L...L...P..N.FSCS...L.N..F.WDSL.L..NM.....QP..Q...PC.....D..D.....	84
Yingtaogu duck	.P.....A.S.L...L...P..N.FSCS...L.D..F.WDSL.L..NM.....QP..Q...PC.....D..D.....	84
Beijing duck	.P.....A.S.L...L...P..N.FSCS...L.D..F.WDSL.L..NM.....QP..Q...PC.....D..D.....	84
Ma duck	.P.....A.S.L...L...P..N.FSCS...L.D..F.WDSL.L..NM.....QP..Q...PC.....D..D.....	84
cat	..LS.SFLVA.VA.G.NSV.S.G.DL.Q..G.LN..A.TL.G...LPAS..QKDRN..AF..DV..GDQSHKA.AL.VVHVTN	84
cattle	..PAWSEFLA.LL.S.NAI.S.G.HL.H...AN..V.ML.G.L..V.PS..LQDRN..AF..E.L.GSQLQKA.AI.VLHEVT	84
chicken	..V.AS.QH.RG.GILL.TL..KAL.TTASACNHL.PQD.TFSHDSIQ.LRDMAPTLPQLC...NASCSFNDTILDT.NTRQ.D	84
dog	..L.CSESVA.VL.S.HS..C.A.DL.D...RNW.V.TL.G...L.AS..DHYT...AF.KEL.DGQRLQEA.AL.VVHVMT	84
pig	..PT.TLLTV.VL.S.NAI.C.G.NL.Q...AHT.A.RL.....I.PF..LDHRR..GS.HE...GNQVQKA.AMALVHEML	84
human	..LTF.LLVA.LV.S.KSS.SVG.DL.Q...GS..T.ML.....KI..F..LKDRH..GF..EE..NQFQKAETIPVLHEMIQ	84
MAGPSAPPPPLIYLACALLCLLTCPAPATHSLFLRRHLSALAQMRQSLRSCAPSPTFDCPPQHAEGSFEDTLLQTNSTQQAHAH		
Gushi duck	T....Q.L..T.....P.....	168
Yingtaogu duck	T....Q.L..T.....P.....	168
Beijing duck	T....Q.L..T.....P.....	168
Ma duck	T....Q.L..T.....P.....	168
cat	.KIFHF..C.EA.S.AAWNNTTLEEFCTGLDRQLTRLEACV.QEVGEGE.PLTNEDS.LRNYFQRLSLYLQEKKYSPCAWIEIVR.	168
cattle	.HTFQ..S.EG.ATMWDESLLDKLRDAL.QQLTDLQFCLRQ.EELQGAPLLKEDSS.AVRKYFHRLTLYLQEKRHSPCAWEVVR	168
chicken	KTT.DILQHLEKIL.SPSTPAHWNDSSQRQS.LNRI.RYTQHLEQCLDSSDTRS.TRWPRNLHLTI.KHFSCL.TFLQDNDSYAC	168
dog	.KVFH..C.NM.SAPWNMTLLEELCSGLSEQLDDDACPLQ.AGLAETPLMHEDST..TYFQR.SL.LQDRN.SPCAWEMVRAE	168
pig	.QTFQ..S.EG.AAANDESLLHQFCTGL.QQLRDLEACVMQ.AGLEGTPLLEEDSI.AVRKYFHRLTLYLQEKKNYSLCAMBIIR	168
human	.IFN.FSTKDS.AAWDE.LLDKPY.ELYQQ..D.EACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLQEKKYSPCAWIEIVR.	168
QALHLLFHTFDSLSSPSTPAHWLHTARHDLNLQLQHHIHLERCFPADAARLHRRGLRNLHLISINKYFGCTQHFLQNHTYSPCA		
Gushi duck	H.....--	191
Yingtaogu duck	H.....--	191
Beijing duck	H.....--	191
Ma duck	H.....C.....--	191
cat	EIMRS.YS.TAL.KRL.SEK-----	188
cattle	AQVM.AFS.STNLQESFRRKD-----	189
chicken	AWEHVRLQARAWVLDIHNLGT..	193
dog	IGRSFFSLTILQE.VR.RK-----	187
pig	AEVR.VFS.STNLQDRLRKKE----	189
human	EIMRSFSL.TNL.ESL.SKE-----	188
WDHVRLEASACFORIHRLTRTMRRT		

图2 固始鸭、樱桃谷鸭 IFN- α 基因推导的氨基酸与其他品种鸭和其他动物的 IFN- α 基因氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of deduced amino acid sequences of Gushi duck and Yingtaogu duck IFN- α gene with that of other breeds of duck and other animals

2.3 IFN- α 基因的核苷酸与推导的氨基酸序列同源性比较

固始鸭、樱桃谷鸭、人和其他动物的 IFN- α 基因核苷酸与推导的氨基酸序列同源性比较(表1).

表1 不同种类的鸭和其他动物 IFN- α 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列比较¹⁾

Tab.1 Comparison of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of IFN- α gene between different duck breeds and other animals

种类	同源性 homology/%									
breed	GS duck	YT duck	BJ duck	Ma duck	chicken	cat	cattle	dog	pig	human
GS duck	*	99.5	99.5	98.4	49.2	18.9	20.5	21.8	21.1	19.6
YT duck	99.7	*	100	99.0	49.7	18.9	20.5	21.8	21.1	19.6
BJ duck	99.5	99.8	*	98.4	49.5	18.9	20.5	21.8	21.1	19.6
Ma duck	99.0	99.3	99.2	*	49.0	18.3	20.0	21.3	20.5	19.0
chicken	66.0	66.3	66.2	65.8	*	17.2	21.1	17.6	19.5	16.9
cat	30.2	30.2	30.2	30.2	29.3	*	53.3	62.2	53.9	55.0
cattle	31.9	31.9	31.4	31.2	31.4	67.4	*	52.1	64.2	58.2
dog	30.9	30.9	30.9	30.1	31.2	73.3	63.5	*	50.5	49.5
pig	32.5	32.5	32.5	31.8	31.9	67.8	78.6	64.5	*	61.9
human	28.0	28.0	28.0	27.9	28.7	70.2	74.1	64.0	73.9	*

1) * 左边是不同动物的核苷酸序列比较;右边是不同动物推导的氨基酸序列比较

GS duck; 固始鸭 Gushi duck; YT duck; 樱桃谷鸭 Yingtaogu duck; BJ duck; 北京鸭 Beijing duck; Ma duck; 麻鸭 Ma duck; chick-
en; 鸡; cat; 猫; cattle; 牛; dog; 狗; pig; 猪; human; 人

2.4 IFN- α 基因分子进化分析

通过 DNASar 软件对 IFN- α 基因进行了遗传进化分析,结果发现出现 2 个较大的分支,分别是禽类和哺乳类. 所克隆的樱桃谷鸭与北京鸭的亲缘关系较近,地方品种固始鸭次之,与鸡 IFN- α 基因形成的分支并行,表明鸭与鸡的亲缘关系较近,而与哺乳类的牛、猪、人、猫、狗处在一个较大的分支中,表明它们的亲缘关系较远(图3).

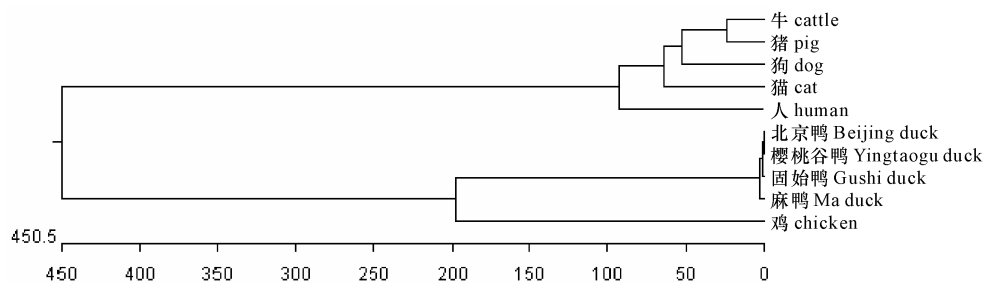


图3 固始鸭及樱桃谷鸭 IFN- α 基因与人及其他动物 IFN- α 基因氨基酸序列遗传进化关系

Fig.3 Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence of IFN- α genes from Gushi duck, Yingtaogu duck, human and other animals

3 讨论

本研究参照已发表 IFN- α 基因序列,设计并合成了1对引物,应用PCR技术从固始鸭和樱桃谷鸭肝组织基因组DNA中扩增得到固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因,并克隆、测序。通过DNASar软件Clustal程序将克隆的固始鸭和北京鸭 IFN- α 基因进行比较分析,其核苷酸序列有3个突变点 G¹¹²A、T³⁷⁵C、A⁵⁰⁴G,无插入或缺失变异,从而导致编码的氨基酸发生突变 D³⁸N。与基因库中收录的麻鸭相比,固始鸭和樱桃谷鸭氨基酸在159、182位点发生突变,并且均为 L¹⁵⁹F、R¹⁸²C,说明这2个品种的鸭在150~185这一氨基酸区域都比较保守。固始鸭和樱桃谷鸭与麻鸭、北京鸭 IFN- α 核苷酸同源性99.0%~99.8%,氨基酸同源性为98.4%~100.0%。而与鸡、猫、牛、狗、人、猪的核苷酸同源性为28.0%~78.6%,氨基酸同源性为18.9%~61.9%。这表明鸭种类不同,IFN- α 基因存在差异。由于鸡、犬、猪 IFN- α 基因存在亚型^[9-10],我们推测固始鸭和樱桃谷鸭 IFN- α 基因可能也存在亚型或多基因座^[12]。鸭 IFN- α 基因与人和其他种动物的 IFN- α 基因序列分析表明,IFN- α 基因在禽类间也存在种属特异性,如鸭和鸡干扰素之间的基因序列差异较大,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,樱桃谷鸭与北京鸭具有相同的基因祖先,而固始鸭与北京鸭具有相近的基因祖先。特别值得一提的是,地方品种固始鸭在38位极端稳定的氨基酸发生突变,我们推测这可能与固始鸭具有很强的抗病性有关^[13]。

近年来,随着养鸭业的快速发展,各种传染性疾病尤其是病毒性传染病的发生频繁且严重。大量使用化学药物会造成鸭肉品质下降,威胁人们的身体健康,许多国家和地区已禁止使用化学抗病毒药物。鸭 IFN- α 基因的克隆对于其在体外表达、为制备鸭的免疫佐剂或进行临床应用奠定基础。

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]. 华中医学杂志,2006,30(1):41-42.

[4] 宋清兰. 干扰素治疗小儿病毒性脑炎疗效观察[J]. 中原医刊,2006,33(3):47.

[5] 潘玉泉,朱小宁. 不同剂量干扰素治疗毛细支气管炎临床分析[J]. 临床医药实践杂志,2006,15(1):29-30.

[6] 唐建明,吴乃川,孙兴怀,等. α -干扰素联合青光眼治疗新生血管性青光眼[J]. 眼外伤职业眼病杂志,2006,28(1):12-14.

[7] DEVOS K, DUERINCK F, VAN AUDENHOVE K, et al. Cloning and expression of the canine interferon-gamma gene [J]. Journal of Interferon Research, 1992, 12(2):95-102.

[8] DIJKMANS R, VANDENBROECK K, BEUKEN E, et al. Sequence of the porcine interferon-gamma (IFN-gamma) gene [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(14):4259.

[9] SCHULTZ U, KOCK J, SCHLICHT 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(2):641-649.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 阮小飞,林常有,杨天耀,等. 北京鸭干扰素- α 基因的分子克隆与表达[J]. 中国兽医杂志,2004,40(12):11-13.

[13] 陈吉刚,周继勇,郑肖娟. 中国地方品种丝羽乌骨鸡白细胞介素2基因的克隆及遗传进化分析[J]. 中国预防兽医学报,2003,25(1):21-23.

【责任编辑 柴 焰】