

文章编号:1005-8737(2001)02-0010-04

牙鲆干扰素调节因子核心区 序列的克隆及初步表达

张 跃, 白俊杰, 李英华, 叶 星, 简 清, 李新辉, 罗建仁*

(农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘 要:采用逆转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)方法, 从牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肝脏总 RNA 中扩增出干扰素调节因子(IRF)的核心区序列。定向插入质粒 pUC18, 克隆的牙鲆 IRF cDNA 序列分析表明, 与 Yabu 报道的牙鲆 IRF cDNA 相比有 1 个碱基差异, 但与推断的氨基酸序列完全一致。将牙鲆 IRF 的核心区序列 cDNA 定向插入原核表达载体 pBV220, 构建成牙鲆 IRF 表达载体 pBVIRF22。SDS-PAGE 分析表明, 经 42℃ 诱导, 含 pBVIRF22 质粒的大肠杆菌可表达一分子量约 12 000 的特异蛋白。

关键词:牙鲆, 干扰素调节因子, 分子克隆, 原核表达
中图分类号:Q959.486 **文献标识码:**A

干扰素调节因子(IRFs)是细胞核中的一类转录因子, 可以调节 I 型干扰素(IFN- α , IFN- β)的转录^[1]。IRFs 核心功能区有间隔重复的色氨酸特征的氨基端 DNA 结合区, 由 3 个 α 螺旋侧翼和 4 个 β 折叠形成类似 HTH 结构, 以便与干扰素刺激反应因子(ISRE)结合^[2]。ISRE 相关基因参与抗病毒免疫调节^[3]。Kimura 等^[4]认为, IRFs 是 IFNs 抗病毒所必需的调节因子。IRF-1 在调节 I 型干扰素时作为活化子, 在细胞凋亡及肿瘤抑制方面有重要作用。

关于哺乳动物和鸟类 IRFs 的生物化学、生物物理学和基因特性的研究已有许多报道。而近年才有关于鱼类 IRFs 的研究, 目前仅见在鲑鱼和斑马鱼中有少量报道, 我国未见同类研究。进行鱼类 IRFs 结构和功能的研究对了解鱼类的免疫系统, 特别是鱼类干扰素的转录机制有着重要的意义, 可为研制养殖鱼类抗病毒制剂探索有效的途径。本研究参考

已报道的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)干扰素调节因子(IRF-1) cDNA 序列^[5]设计引物, 采用逆转录—聚合酶链式反应(RT-PCR)技术克隆了牙鲆干扰素调节因子核心功能区的 cDNA, 进行核苷酸序列测定, 构建了原核表达质粒, 并得到表达鱼 IRF 核心区的基因工程菌。为其他养殖鱼类 IRF 全基因的克隆以及研究鱼类干扰素类物质的抗病毒功能和作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

牙鲆购自广州黄沙水产市场。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶及有关试剂购自 Promega 公司及华美生物工程公司。RNA 提取试剂盒 High Pure RNA Isolation Kit 和逆转录试剂盒 Access RT-PCR system 分别为 ROCH 和 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pUC18 由本室保存。原核表达质粒 pBV220 取自中国预防医学科学院病毒研究所。

1.2 方法

1.2.1 牙鲆肝脏总 RNA 提取 取牙鲆肝组织 10

收稿日期:2000-07-17

基金项目:中国水产科学研究院基金资助项目(99-08-03)

作者简介:张 跃(1970-), 男, 助理研究员, 从事鱼类分子生物学研究。

* 通信联系人, 020-81510127, E-mail: prfri@guangztc.edu.cn

mg, 用 ROCH 公司 High Pure RNA Isolation Kit 介绍的方法提取总 RNA, 电泳分析 RNA 质量。

1.2.2 引物设计与 RT-PCR 根据文献报道的牙鲆 cDNA 序列, 设计并合成了 5' 和 3' 端引物:

5'-CGGAATTCATGCCTGTGTCAGGAT3'

(核苷酸序号 8~17)

5'-CGCTCTAGATTACTAGCTCTTGTCTTTCACCTC3'

(核苷酸序号 308~275)

在 5' 端引物设计中加入 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC。3' 端引物中, 加入终止码 TAG、一个大肠杆菌的强终止码 TAA 和一个 *Xba* I 酶切位点 TCTAGA。按逆转录试剂盒 Access RT-PCR system 介绍的方法进行 cDNA 合成和 PCR 扩增, 用逆转录酶 48℃ 45 min 合成 cDNA 第 1 条链, 然后进行 PCR 扩增, 30 个循环。PCR 反应条件为变性 94℃、30 s, 退火 52℃、60 s, 延伸 68℃、120 s。循环结束后 72℃ 延伸 7 min。取 5 μl PCR 产物作 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 预计产生 1 条约 320 bp 扩增带。

1.2.3 牙鲆 IRF cDNA 克隆 PCR 产物纯化后, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, 回收长度约 320 bp DNA 片段。同时用 *EcoR* I 和 *Xba* I 将 pUC18 双酶切, 在 *T*₄ 连接酶作用下, 将回收的 DNA 片段定向插入 pUC18 中, 构建 pUC-IRF 重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5α, 用蓝白斑和电泳酶切法筛选重组子。

1.2.4 DNA 序列测定 在 ABI PRISM377 全自动荧光测序仪上进行, 用 DNA 分析软件分析测定结果。

1.2.5 重组牙鲆 IRF cDNA 原核表达质粒的构建

EcoR I 和 *Pst* I 双酶切 pUCfIRF8 和 pBV220 质粒, 低熔点琼脂糖方法回收 fIRF cDNA 片段, 在 *T*₄ 连接酶作用下将 fIRF cDNA 片段定向克隆入 pBV220, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 电泳法筛选重组子, 经酶切确认插入片段的分子量。

1.2.6 重组牙鲆 IRF 的表达及 SDS-PAGE 分析

含重组牙鲆 IRF cDNA 质粒的菌株于氨苄青霉素 LB 培养基中 30℃ 培养过夜, 次日按 1:50 扩大培养至 A_{600nm} 为 0.4~0.6, 立即转到热诱导温度 42℃ 继续培养 4 h, 离心收集细菌, 并以 SDS-PAGE 检测。

2 结果

2.1 总 RNA 的分离及 RT-PCR 扩增牙鲆肝 IRF cDNA

从 10 mg 牙鲆肝组织中获得质量约 20 μg 的总 RNA。以总 RNA 为模板进行反转录省去了分离纯化 mRNA 的过程。PCR 产物电泳结果显示, 在约 320 bp 处有一扩增带(图 1)。

2.2 牙鲆肝 IRF cDNA 克隆

PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切, 定向插入同样双酶切的质粒 pUC18, 筛选得到 4 个重组子 (pUCfIRF2、pUCfIRF4、pUCfIRF7、pUCfIRF8), 经酶切鉴定, 均有约 320bp 的插入片段(图 1)。

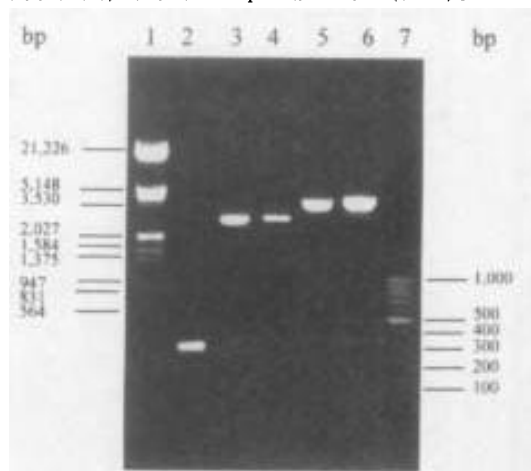


图 1 RT-PCR 产物和质粒 pUCfIRF4 和 pBVfIRF22 的酶切电泳图

Fig.1 Electrophoregram of RT-PCR product, pUCfIRF8 and pBVfIRF22

1. DNA/*EcoR* I + *Hind* III markers; 2. RT-PCR products; 3. pUCfIRF4/*EcoR* I + *Xba* I; 4. pUC18/*EcoR* I + *Xba* I; 5. pBV220/*EcoR* I + *Pst* I; 6. pBVfIRF22/*EcoR* I + *Pst* I; 7. 100bp DNA ladder markers

2.3 序列分析

取质粒 pUCfIRF4 进行序列测定。测序结果和推测的氨基酸序列见图 2, 读序结果表明, 在终止码 TAG 之后多了 1 个大肠杆菌的强终止子 TAA。编码牙鲆 IRF 核心序列与 Yabu 等人^[5]所测的结果基本一致, 仅第 78 位氨基酸的密码子有差异, 我们测的第 78 位氨基酸的密码子是 GCC, Yabu 等人的实验结果是 GCG。由于 GCG 和 GCC 都是丙氨酸的密码子, 这样虽然基因序列有些差异, 但推断的氨基酸序列却是完全一样的。它含有 6 个色氨酸, 可形成 fIRF 蛋白中的氨基端结合区。

2.4 牙鲆 IRF cDNA 原核表达质粒 pBVfIRF22 的构建和鉴定

pUCHIRF4 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切, 获得牙鲆 IRF cDNA 片段, 定向插入 pBV220 多克隆位点 *EcoR* I 和 *Pst* I 之间, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选

出重组子, 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切证实有 1 条约 320 bp 的片段插入(图 1)。将此重组质粒命名为 pBVfIRF22。

ATG	CCT	GTG	TCC	AGG	ATG	AGG	ATG	AGG	CCG	TGG	CTA	GAG	AAG	ATG	45
M	P	V	S	R	M	R	M	R	P	W	L	E	K	M	15
ATT	GAG	TCC	AAC	ACC	ATC	TCG	GGG	CTG	ACT	TGG	GTT	GAC	AAG	GAC	90
I	E	S	N	T	I	S	G	L	T	W	V	D	K	D	30
CAG	AAG	ATG	TTC	TCC	ATT	CCC	TGG	AAG	CAC	GCT	GCT	CGG	CAC	GGC	135
Q	K	M	F	S	I	P	W	K	H	A	A	R	H	G	45
TGG	GAG	CTG	GAC	AAG	GAC	GCC	TCT	CTG	TTC	AAA	AAG	TGG	GCC	ATC	180
W	E	L	D	K	D	A	S	L	F	K	K	W	A	I	60
CAC	ACC	GGG	AAG	TAC	ACA	GAG	GGG	CAG	ACC	TCC	GAC	CCA	AAG	ACA	225
H	T	G	K	Y	T	E	G	Q	T	S	D	P	K	T	75
TGG	AAA	GCC	AAC	TTC	CGC	TGT	GCA	ATG	AAC	TCG	TTG	CCT	GAC	ATT	270
W	K	A	N	F	R	C	A	M	N	S	L	P	D	I	90
GAG	GAG	GTG	AAA	GAC	AAG	AGC	TAG								294
E	E	V	K	D	K	S									97

图 2 牙鲆干扰素调节因子(fIRF)核心区 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of core region for flounder Interferon Regulatory Factor (fIRF) mature peptide cDNA and predicted amino acid sequence

2.5 重组牙鲆 IRF 的表达与 SDS-PAGE

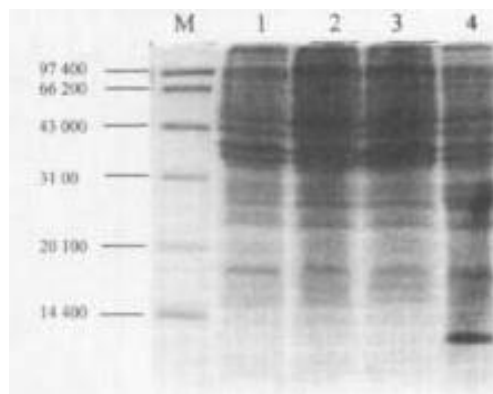
SDS-PAGE 结果表明, 牙鲆 fIRF 质粒 pBV-fIRF22 菌株经 42℃ 诱导后, 在分子量约 12 000 处有 1 条特异蛋白带, 而含有重组牙鲆 IRF cDNA 的

质粒 pBVfIRF 未经热诱导以及空质粒 pBV220 热诱导前后均无特异性蛋白带出现, 表明 pBVfIRF22 质粒在宿主菌 DH5 α 中表达重组蛋白, 见图 3。

3 讨论

干扰素(Interferon, IFN)是一种具有抗病毒活性的多功能细胞激素, 有关牙鲆 IFNs 的生理生化特性已有报道。有关体外表达重组鱼 IRFs 的工作, 目前国内外尚未见报道。IRF 家族氨基端都含有相当保守而且重复的 6 个色氨酸结构功能区, 形成 IRFs 蛋白中的氨基端 DNA 结合核心区, 以便与干扰素刺激反应因子(ISRE, 有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用)结合。我们将本实验克隆的 IRF 序列所推测的 97 个氨基酸序列与已报道的人类、鼠和鸡 IRF-1 的相应氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明同源性分别高达 70.1%、70.1% 和 73.2%。IRF 家族羧基端变异性很大。为了避免 IRF 抗病毒作用可能出现的种属特异性, 我们仅对 IRF 氨基端的 DNA 结合功能区序列进行克隆和表达, 以便了解 IRF 核心区域的抗病毒作用。

外源基因在同一表达载体中的表达水平除了与外源基因 5' 端 AUG 附近的 RNA 二级能量、AUG 与 SD 序列之间的距离以及外源基因 3' 侧翼稳定性等条件有关外, 还与外源基因的密码子偏爱性关系密切^[6]。若要将基因重组的鱼 IRF 应用到渔业生产中, 提高基因的表达水平至关重要, 有关研究将在



M-低分子量标准蛋白 Low molecular weight protein marker; 1. DH5 α (pBV220)诱导前的细胞总蛋白。Total cell protein of DH5 α containing pBV220 before induction; 2. DH5 α (pBV220)42℃ 诱导 4 h 后细胞总蛋白。Total cell protein of DH5 α containing pBV220 after 4 h induction at 42℃; 3. DH5 α (pBVfIRF22)诱导前的细胞总蛋白。Total cell protein of DH5 α containing pBVfIRF22 before induction; 4. DH5 α (pBVfIRF22)42℃ 诱导 4 h 后的细胞总蛋白。Total cell protein of DH5 α containing pBVfIRF22 after 4 h induction at 42℃.

图 3 质粒 pBVfIRF22 在大肠杆菌中的表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expressed product of pBV-fIRF22

下一步继续进行。牙鲆干扰素调节因子基因工程菌 DH5 α (pBVfIRF22)的获得,为研究鱼类干扰素抗病毒机制开辟了新的途径。有关表达产物的生物活性和实际应用的效果等实验尚待完成。

参考文献:

- [1] Henderson Y, Chou M, Deisseroth A. Interferon regulatory factor 1 induces the expression of the interferon-stimulated genes [J]. Br J Haematol, 1997, 96: 566-575.
- [2] Escalante C, Yie J, Thanos D, et al. Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation [J]. Nature, 1998, 391: 103-106.
- [3] Zhou A, Hassel B, Silverman R. Expression cloning of 2-5A-dependent RNase; a uniquely regulated mediator of interferon action [J]. Cell, 1993, 72: 753-765.
- [4] Kimura T, Nakayama K, Penninger J, et al. Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral response to interferons [J]. Science, 1994, 264: 1 921-1 924.
- [5] Yabu T, Hirose H, Hirono I, et al. Molecular cloning of a novel interferon regulatory factor in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1998, 7(2): 138-144.
- [6] 白俊杰, 马进, 简清, 等. 鱼生长激素基因在大肠杆菌中表达水平的研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 31-34.

Cloning of cDNA for flounder Interferon Regulatory Factor (fIRF) and its primary expression in prokaryocyte

ZHANG Yue, BAI Jun-jie, LI Ying-hua, YE Xing, JIAN Qing, LI Xin-hui, LUO Jian-ren

(Key Lab. of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture,
Pear River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The cDNA encoding core region of flounder Interferon Regulatory Factor (fIRF) mature peptide was amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR) method using total RNA isolated from flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver as template. The amplified cDNA fragment was inserted in plasmid pUC18 and the cloned nucleotide sequence shows there is only one codon different from that reported by Yabu in 1998, and the amino acid sequence is the same as that inferred from the nucleotide sequences. Then by subcloning the cDNA into the downstream of the PRPL promoter of expression plasmid-pBV220, the expression plasmid pBVfIRF22 was constructed. The SDS-PAGE results show that after 4 hours of induction at 42°C, *E. coli* DH5 α containing pBV220-fIRF22 can express a specific protein with 12 kD molecular weight.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; interferon regulatory factor; molecular cloning; prokaryotic expression