

鸡新城疫Ⅰ系疫苗诱导鸡IL-2基因 转录及cDNA克隆的研究*

李银聚, 程相朝, 吴庭才, 张春杰

(河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

[摘 要] 应用RT-PCR方法从鸡新城疫Ⅰ系疫苗接种鸡胚的脾淋巴细胞中扩增出IL-2基因cDNA。结果表明, 以鸡新城疫Ⅰ系疫苗稀释50倍或100倍接种10日龄鸡胚, 培养48 h的脾脏提取mRNA的扩增效果最好。测序结果显示, 所扩增片段的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列, 与已发表的IL-2基因的同源性分别为97.7%~99.8%和95.1%~99.3%。其中第8位、68位和130位氨基酸(分别是L、V和S)的变异是其他品种鸡所没有的。

[关键词] 鸡IL-2基因; 转录; 克隆; 序列分析

[中图分类号] Q785; S831.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0069-04

白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)是T淋巴细胞分泌的一种淋巴因子, 在免疫反应过程中具有重要的调节作用, 可促进T、B细胞的增殖、分化, 增强单核细胞及NK细胞的杀伤活性, 且在转录、翻译及受体信号传导过程中具有重要作用^[1]。自1983年Taniguchi等^[2]首次克隆人IL-2基因cDNA后, 已有多种动物的IL-2基因得到成功克隆^[3]。由于对鸡细胞因子和调节基因结构了解较少, 并且鸡淋巴因子的种属特异性较强, 使人们在哺乳动物研究中成功使用的技术无法在鸡IL-2研究中应用, 因此对鸡IL-2的研究相对滞后于哺乳动物。直到1997年Sundick等^[4]用激活的鸡脾淋巴细胞构建了一个cDNA文库, 获得了鸡IL-2的基因克隆, 才使IL-2的研究进入到分子水平。

鉴于已报道的鸡IL-2在不同品种间存在一定差异, 本研究以鸡新城疫(ND)Ⅰ系疫苗毒诱导鸡胚的方法使IL-2基因表达, 然后用提取的总RNA克隆出洛阳土种鸡IL-2基因cDNA, 并与国内外有关报道进行了比较, 现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

10日龄鸡胚为洛阳健康土种鸡种蛋自孵至所需日龄。ND-Ⅰ系疫苗为辽宁益康生物制品厂产品(批号20030415)。

克隆载体pMD18-T购自大连宝生物工程公司, JM109感受态细菌购自华美生物工程公司。

限制性内切酶EcoRⅠ, EcoRⅤ, SalⅠ, HindⅢ及RNA提取试剂盒均为华美生物工程公司产品。一步法RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司。

1.2 引物设计

根据Genbank中IL-2基因cDNA序列(收录号: AY029588)设计出1对引物, 并由大连宝生物工程公司合成。

P1: 5'CGGAATTCA TGA TGA TGCAAA GTACT GATC-3';

P2: 5'CGGTCGACTTTTGTGCA GATATCTCAC-3'。

1.3 鸡胚诱导IL-2基因表达及总RNA的提取

将ND-Ⅰ系疫苗分别稀释10倍、50倍和100倍, 通过尿囊腔接种于10日龄鸡胚, 0.2 mL/枚, 每个稀释度接种20枚。37℃继续孵化, 并于接种后36、48和72 h每组各取1枚活鸡胚(10倍稀释组在30 h内全部死亡)。取鸡胚脾脏加变性液无菌研碎, 按RNA提取试剂盒的要求提取总RNA进行RT-PCR扩增。

1.4 RT-PCR扩增鸡IL-2基因cDNA

按RT-PCR试剂盒的要求, 在50 μL反应体系中分别加入10倍Buffer 5 μL, MgCl₂ 10 μL, dNTP混合物 5 μL, RNA酶抑制剂 1 μL, 反转录酶 1 μL,

* [收稿日期] 2004-02-13

[基金项目] 河南省科技攻关项目(0424050010)

[作者简介] 李银聚(1965-), 男, 河南中牟人, 副教授, 在读博士, 主要从事分子生物学研究。

Taq 酶 1 μL , 上、下游引物各 2 μL , 模板 RNA 5 μL , 无 RNA 酶水 18 μL 。50 30 min 反转录, 94 2 min 灭活反转录酶。采用降落 PCR 进行扩增, 参数为 94 50 s, 58 45 s, 72 100 s 循环 6 次; 94 50 s, 56 50 s, 72 100 s 循环 27 次; 72 10 min 延伸。扩增产物通过 12 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 目的基因的克隆、鉴定与序列测定

扩增产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 回收 0.45 kb 的 DNA 片段。将纯化后的 DNA 片段与 pMD18-T 载体于 16 条件下连接 1~4 h, 连接产物按常规方法转化 JM 109 感受态细菌, 并进行蓝白斑筛选。挑取生长良好的白色菌落接种于含 Amp 的 LB 中扩增培养, 按碱裂解法^[5]提取质粒。分别用 *EcoR* I + *Sal* I 进行双酶切, 切出 2.69 和 0.45 kb 的片段; 应用 *Xho* I + *Bam* H I 双酶切, 切出 2.84 和

0.3 kb 片段。酶切正确的质粒进一步进行 PCR 扩增。将酶切和 PCR 鉴定均为阳性的质粒送大连宝生物工程公司测序。

2 结果与分析

2.1 鸡胚不同诱导条件下目的基因 RT-PCR 扩增

将 ND-I 系疫苗稀释 10 倍、50 倍和 100 倍后接种鸡胚。结果表明, 10 倍稀释组在 30 h 时已全部死亡, 取其脾脏提取 RNA, 未扩增出目的片段。50 倍和 100 倍稀释组在 36 h 时提取 RNA, 经 RT-PCR 扩增有细弱的条带出现; 诱导 48 h 时的扩增结果最为清晰; 诱导 72 h 时鸡胚基本死亡。因此, 从时间和经济上考虑, 以在 50 倍或 100 倍稀释 ND-I 系疫苗诱导 48 h 时, 采用活胚脾脏提取 RNA 进行 RT-PCR 扩增为最佳条件, 且采用二梯度降落 PCR 扩增出 0.45 kb 片段, 与理论设计相符(图 1)。

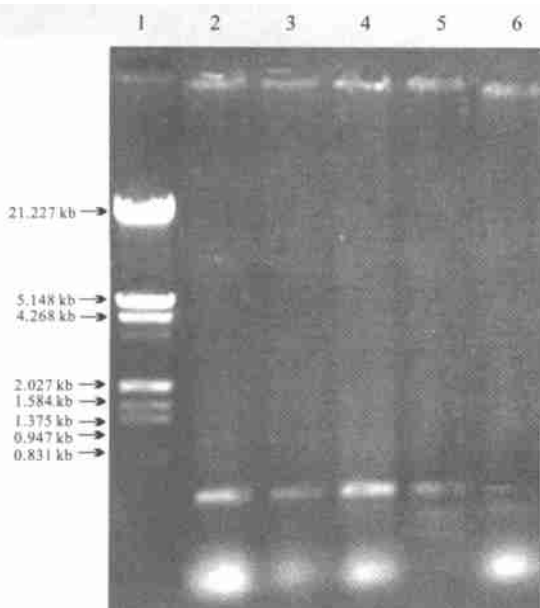


图 1 不同条件诱导的 IL-2 基因 PCR 扩增结果

1. Marker; 2. 50×48 h; 3. 50×36 h;
4. 100×48 h; 5. 100×36 h; 6. 10×

Fig. 1 PCR products of IL-2 gene induced by different condition

1. Marker λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 2. 50×48 h;
3. 50×36 h; 4. 100×48 h; 5. 100×36 h; 6. 10×

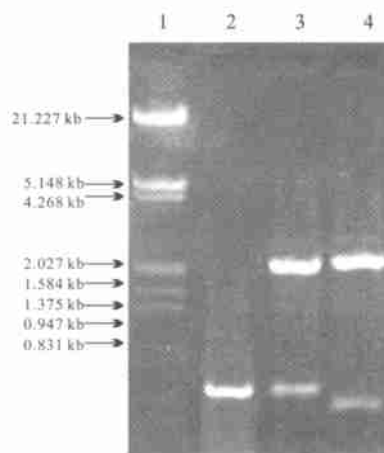


图 2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

1. Marker; 2. PCR 鉴定; 3. *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切;
4. *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

1. Marker λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III; 2. Identified by PCR;
3. Identified by digesting with *EcoR* I + *Sal* I;
4. Identified by digesting with *Xho* I + *Bam* H I

2.2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

筛选白色菌落提取质粒, 应用 *EcoR* I 和 *Sal* I, *Xho* I 和 *Bam* H I 分别切出 0.43 和 0.3 kb 片段者, 再以 PCR 方法进行扩增鉴定, 扩增出 0.45 kb 片段者定为阳性重组质粒(图 2)。

2.3 IL-2 基因 cDNA 测序及推导的氨基酸序列

将 2 株阳性质粒送大连宝生物工程公司测序, 2 株序列完全相同, 其核苷酸序列和氨基酸序列结果见图 3。

选测的 2 个 IL-2 阳性克隆序列完全一致, 该结

构基因全长432个核苷酸,为编码143个氨基酸的前体蛋白。其核苷酸序列和氨基酸序列与Genbank中的IL-2有所不同(收录号分别为AF033563, AY370778, AF000631, AY029588, AF502412,

AF017645),其中核苷酸的同源性为97.7%~99.8%,氨基酸的同源性为95.1%~99.3%。尤其是第8位、68位和130位氨基酸(分别为L、V和S)的变异是其他品种鸡所没有的。

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

图3 鸡IL-2基因cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig 3 Sequence of nucleotide and predicted amino acid of chicken IL-2 gene

3 讨论

鸡白细胞介素-2(chIL-2)是继鸡干扰素基因被定位后,在禽类中正式被确认的第2种细胞因子。由于chIL-2在免疫反应过程中具有特异的调节作用,因而引起了很多研究者的关注。

目前报道的有关鸡IL-2的资料较少,这是由于很多在哺乳动物中使用的成功方法都无法在鸡IL-2的研究中使用。因此,对鸡IL-2基因诱导转录和克隆方法的研究是很有必要的。

1997年Sundick等^[4]克隆鸡IL-2基因采用了构建cDNA文库方法,Kaiser等^[6]采用RACE技术获得IL-2的全序列,李建荣等^[7]则采用ConA刺激体外培养的鸡淋巴细胞,应用RT-PCR直接扩增鸡IL-2基因cDNA。本研究采用鸡新城疫I系疫苗接种鸡胚,诱导鸡IL-2基因表达,直接从鸡胚脾淋巴细胞中提取RNA进行RT-PCR扩增。鸡细胞基因组中含有IL-2基因,但正常情况下IL-2的表达量极低,只有当鸡受到病毒攻击时鸡细胞才有足够的能力表达IL-2。鸡新城疫I系疫苗通常被认为是诱导鸡产生

细胞因子较为理想的诱导剂。本研究结果表明,ND-I系疫苗50倍稀释液按0.2mL/枚接种鸡胚,48h取活胚提取RNA进行RT-PCR扩增效果最好。这种方法不需要体外培养淋巴细胞和ConA刺激,能更为简便、直接地进行IL-2基因转录和RT-PCR扩增。

序列分析结果表明,洛阳土种鸡与已发表的其他鸡IL-2基因序列有3~7个氨基酸的差异。尤其是第8位、68位和130位氨基酸分别为L、V和S,这些变异是其他品系鸡所没有的,这可能是鸡的品系差异所致。但这些置换并没有导致鸡IL-2的空间结构和与IL-2受体结合位点的突变,说明这些置换并没有影响其生物学功能。Kaiser等^[6]比较了8个品系鸡IL-2基因启动子结构,发现IL-2并不存在多态性现象。说明同一家族中不同品系鸡IL-2的功能位点是十分保守的。Lawson等^[8]也证实,重组表达的鸡和火鸡IL-2蛋白氨基酸序列同源性仅为69.3%,但在体外仍存在一定的交叉反应性。因此,本研究对洛阳土种鸡IL-2基因的成功克隆,为进一步研究鸡IL-2基因结构、功能及表达和应用奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Chio K D, Lillehoj H S. Role of chicken IL-2 on gamma delta T-cell and *Eimeria acervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gamma delta T-cells[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000, 73(3): 309- 321.
- [2] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2[J]. *Nature*, 1983, 302(5906): 305- 310.
- [3] Zelus D, Robinson R M, Delacre M, et al. Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in remnants[J]. *J Mol Evol*, 2000, 51(3): 234- 244.
- [4] Sundick R S, Gil-Dixon A. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15C[J]. *The Journal of Immunology*, 1997, 159: 720- 725.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 北京: 科学出版社, 1993.
- [6] Kaiser P, Mariani P. Promoter sequence, exon: intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken with T-cell proliferative activity is IL-2 and not IL-15[J]. *Immunogenetics*, 1999, 49: 26- 35.
- [7] 李建荣, 黄耀伟, 孟松树, 等. 我国地方品种萧山鸡白介素-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.
- [8] Lawson S, Rothwell L, Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-2 cross-reaction *in vitro* proliferation assays despite limited amino acid sequence identity[J]. *Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(2): 161- 170.

Transcription and cDNA cloning of chicken interleukin-2 induced chicken embryo splenocytes by New castle Disease viruse

L I Y in -ju, CHENG Xiang-chao, W U Ting-cai, ZHANG Chun-jie

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: A cDNA encoding chicken interleukin-2 (ch IL-2) was cloned from Luoyang local chicken embryo splenocytes by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the best factor for mRNA isolated from spleen cells of chicken embryo was 48 h after being inoculated with 50 × or 100 × diluted New castle Disease viruses. Sequence analysis showed that the ch IL-2 cDNA was 432 bp and encoded a protein 143 amino acids compared with reported ch IL-2. The homology of nucleotide acid and amino acid were 97.7% - 99.8% and 95.1% - 99.3%, respectively. Especially the amino acids in sites 8, 68 and 130 (L, V and S) were different from other strains. These provide a basis for the study of the structure and function of ch IL-2 gene.

Key words: chicken IL-2 gene; transcription; cloning; sequence analysis