

网络出版时间:2023-09-01 14:17 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2024.03.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20230831.1424.011

鸡 *FGL2* 基因的克隆分析及原核表达

郭亚格^{1,2}, 刘佳隆^{1,2}, 齐志颖^{1,2}, 何雷^{1,2}, 贾艳艳^{1,2},
陈建^{1,2}, 陈松彪^{1,2}, 廖成水^{1,2}, 丁轲^{1,2}, 余祖华^{1,2}

(1 洛阳市活载体生物材料与动物疫病重点实验室, 河南 洛阳 471003; 2 河南科技大学 动物科技学院
功能微生物与畜禽健康实验室, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 【目的】克隆鸡纤维蛋白原样蛋白 2(fibrinogen-like protein 2, FGL2) 基因, 并进行生物信息学分析和原核表达, 为鸡 FGL2 蛋白的功能研究奠定基础。【方法】采用逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR) 技术扩增鸡 *FGL2* 基因, 克隆至 pMD19-T 载体, 测序后对鸡 *FGL2* 基因及其编码的蛋白进行生物信息学分析。构建原核表达质粒 pET-32a-FGL2, 将其转化 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 利用 IPTG 进行诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。【结果】成功克隆了鸡 *FGL2* 基因的 CDS 区, 序列全长为 1 320 bp, 编码 439 个氨基酸。生物信息学分析显示, 鸡 FGL2 氨基酸与火鸡、雉鸡、珍珠鸡、鹌鹑等禽类的同源性高, 达 96% 以上; 与哺乳类动物的同源性较低, 其中与犬的同源性仅有 64.8%。FGL2 蛋白由 439 个氨基酸组成, 理论分子质量为 50.24 ku, 分子式为 $C_{2221}H_{3451}N_{615}O_{673}S_{22}$, 理论等电点(pI)为 8.63, 为不稳定的亲水性分泌型蛋白, 无跨膜区。成功构建了原核表达质粒 pET-32a-FGL2, 其在大肠杆菌 BL21(DE3) 可表达以包涵体形式为主的 FGL2 融合蛋白, 分子质量约为 70 ku。【结论】成功克隆出了 1 320 bp 的鸡 *FGL2* 基因, 明确了其编码蛋白的生物学信息, 经诱导表达后获得 FGL2 重组蛋白。

[关键词] 鸡; *FGL2* 基因; 生物信息学分析; 原核表达

[中图分类号] S381.7; Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2024)03-0011-08

Cloning, analysis and prokaryotic expression of *FGL2* gene in chicken

GUO Yage^{1,2}, LIU Jialong^{1,2}, QI Zhiying^{1,2}, HE Lei^{1,2}, JIA Yanyan^{1,2},
CHEN Jian^{1,2}, CHEN Songbiao^{1,2}, LIAO Chengshui^{1,2}, DING Ke^{1,2}, YU Zuhua^{1,2}

(1 Luoyang Key Laboratory of Live Carrier Biomaterial and Animal Disease Prevention and Control, Luoyang, Henan 471003, China;
2 Laboratory of Functional Microbiology and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Henan University of
Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: 【Objective】The fibrinogen-like protein (*FGL2*) gene in chicken was cloned and bioinformatics analysis and prokaryotic expression were carried out to lay a foundation for studying the function of FGL2 protein in chickens. 【Method】Reverse transcription PCR (RT-PCR) technology was used to amplify the *FGL2* gene in chickens, and it was cloned to pMD19-T vector. Bioinformatics analysis was conducted on the gene and encoded proteins. The prokaryotic expression plasmid pET-32a-FGL2 was constructed, converted into BL21(DE3) *E. coli* competent cells, and induced by IPTG. The expression products were then analyzed by SDS-PAGE and Western-blot methods. 【Result】The CDS region of the *FGL2* gene was successfully cloned, with a total sequence length of 1 320 bp encoding 439 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the homology of chicken FGL2 amino acids with turkeys, pheasants, guinea fowl, quail and

[收稿日期] 2022-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31702207)

[作者简介] 郭亚格(1998—), 男, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: 18137992136@163.com

[通信作者] 余祖华(1977—), 女, 河南商城人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防控与病原分子免疫学研究。

E-mail: yzhd05@163.com

other birds was as high as more than 96%, while that with mammals was low, of which it was only 64.8% with dogs. FGL2 protein was composed of 439 amino acids, with theoretical molecular mass of 50.24 ku, molecular formula of $C_{2221}H_{3451}N_{615}O_{673}S_{22}$ and theoretical isoelectric point (pI) of 8.63. It was an unstable hydrophilic secreted protein with no transmembrane region. The pET-32a-FGL2 plasmid was successfully constructed, and SDS-PAGE electrophoresis and Western-blot detection showed that the prokaryotic expression plasmid pET-32a-FGL2 could express FGL2 fusion protein in the form of inclusion bodies in *Escherichia coli* BL21 (DE3), with a size of about 70 ku. 【Conclusion】 The chicken *FGL2* gene with size of 1 320 bp was successfully cloned, the bioinformatics of its encoding proteins was clarified, and the FGL2 recombinant protein with good immune response was obtained after induction expression.

Key words: chicken; *FGL2* gene; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

纤维蛋白原样蛋白 2 (fibrinogen-like protein 2, FGL2), 是纤维蛋白原相关蛋白超家族 (FReD) 的成员之一^[1-2]。FGL2 蛋白的功能与其细胞定位和表达形式有关, 其有 2 种不同的表达形式, 分别为膜结合表达 (产物为 mFGL2) 和可溶性表达 (产物为 sFGL2)。mFGL2 主要表达于巨噬细胞和内皮细胞, 其 N 端结构域具有凝血酶原酶的活性^[3], 可直接将凝血酶原裂解为凝血酶, 从而在免疫凝血过程中发挥促凝活性^[4-6]。sFGL2 主要由 CD^{4+} 、 CD^{25+} 、 $Foxp^{3+}$ 等调节性 T 细胞 (Tregs) 表达^[7-10], 只含有 C 末端结构域, 其 C 末端 FReD 区域为其免疫抑制活性功能区, 具有可靠的免疫调节作用^[11]。

FGL2 作为一种新的免疫调节因子, 在免疫系统中发挥免疫调节作用, 其中以 sFGL2 为主, 其不仅可改变 T 细胞的增殖和分化, 影响抗原递呈细胞的成熟, 而且可维持 Treg 细胞的活性和功能^[12]。Liu 等^[13]研究发现, sFGL2 通过与抗原递呈细胞上 IgG 的 Fc 段受体 II B (FcγR II B) 和 Fc 段受体 III (FcγR III) 结合而实现其功能。FcγR II B 是目前发现的唯一的抑制型受体, 其胞内区含有免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM), 通过免疫复合物与激活型受体交联, 抑制相关基因的转录^[14]。与 FcγR II B 相反, FcγR III 含有一个免疫受体酪氨酸激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM), 可以激活相关基因的转录。sFGL2 能同时与 2 种受体结合, 在不同的细胞中发挥不同的作用, 这可能与 2 种受体在不同细胞中表达的比例不同有关, 也可能和 sFGL2 与 2 种受体的亲和力不同有关^[15]。mFGL2 具有凝血酶原活性, 在钙离子和磷脂存在的情况下, 可直接催化凝血酶原生成凝血酶, 从而发挥凝血活性, 参与固有免疫^[16]。最近的研究表明, FGL2 在病毒感染、肿瘤等免疫抑制性疾病发

展过程中发挥重要作用^[17]。鸡马立克病 (Marek's disease, MD) 是一种以 CD^{4+} T 细胞增生为主要特征的肿瘤性免疫抑制疾病, 该病的发生、发展过程受到多种因素的调控。目前, 对鸡 *FGL2* 基因及其编码蛋白在 MD 等家禽肿瘤性疾病发生、发展中的作用鲜有报道。

本试验以鸡胚成纤维细胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) 为材料, 克隆鸡 *FGL2* 基因, 对其编码的蛋白进行生物信息学分析, 预测其蛋白的结构和功能, 并用大肠杆菌高效表达重组蛋白 FGL2, 旨在为 FGL2 蛋白的生物学功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鸡胚成纤维细胞 (CEF)、大肠杆菌 DH5α 和 BL21 (DE3) 感受态细胞、表达载体 pET-32a, 均由洛阳市活载体生物材料与动物疫病防控重点实验室保存。pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 均购自宝日医生物工程(北京)有限公司。质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 均购自北京全式金生物技术有限公司。镍柱亲和层析蛋白纯化试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。ECL 显色液、鼠源抗 His 标签单抗、HRP 标记羊抗鼠 IgG, 均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 鸡 *FGL2* 基因的克隆

根据 GenBank 数据库中公布的鸡 *FGL2* 基因序列 (登录号: AJ851669.1), 利用 SnapGene 软件设计特异性引物, 引物序列为: FGL2-F: 5'-GCG-GATCCATGAAGCAGCTT-3', FGL2-R: 5'-CGC-TCGAGTTGGTGCAAACTT-3', 引物 FGL2-F

和 *FGL2*-R 序列中下划线部分分别为引入的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

用 TRIzol 法提取鸡胚成纤维细胞(CEF)总 RNA,利用 Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录为 cDNA。以反转录获得的 cDNA 为模板,对鸡 *FGL2* 基因进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 50 μ L:上、下游引物各 1 μ L,2 $\times$ Superstar Plus PCR Mix 25 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 21 μ L。PCR 反应程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。试验设以 ddH₂O 取代 cDNA 的处理为阴性对照。对 PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收扩增所得的目的片段,连接至 pMD19-T 载体,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行蓝白斑试验,挑取白色克隆菌落接种于含氨苄青霉素(含量为 100 mg/mL)的 LB 液体培养基中,培养后对菌液进行 PCR 鉴定。提取 PCR 鉴定阳性菌液质粒,用 *Bam*H I 进行单酶切鉴定,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定。将 PCR 和双酶切鉴定正确的阳性质粒命名为 pMD19-T-FGL2,送至通用生物(安徽)股份有限公司测序。

1.3 鸡 *FGL2* 基因编码蛋白的生物信息学分析

利用 DNASTAR 软件对鸡、火鸡、珍珠鸡、雉鸡等物种的 *FGL2* 氨基酸序列进行同源性分析。用 Mega11 软件构建系统进化树;用在线软件 ProtParam (<https://web.exp-asy.org/protparam/>) 分析蛋白理化性质。利用在线软件 ProtScale (<https://web.exp-asy.org/protscale/>) 分析蛋白亲/疏水性,用在线软件 TMHMM2.0 (<http://www.cb-s.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜结构域,用在线软件 SignalP5.0 (<http://www.cb-s.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析蛋白信号肽。利用 NCBI 在线软件 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 预测保守区域,用在线软件 IEDB (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>) 预测抗原表位,用在线软件 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 预测蛋白二级结构,用在线软件 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.exp-asy.org/interactive>) 预测蛋白三级结构。利用在线软件 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 分析蛋白的相互作用。

1.4 pET-32a-FGL2 原核表达载体的构建与鉴定

将构建成功的 pMD19-T-FGL2 重组质粒与

pET-32a 质粒分别进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,回收鸡 *FGL2* 目的基因和 pET-32a 载体线性大片段,用 DNA 连接试剂盒进行连接,构建原核表达载体 pET-32a-FGL2。将连接产物转化 BL21(DE3)大肠杆菌感受态细胞,用氨苄青霉素(含量为 100 mg/mL)抗性平板筛选单菌落。提取筛选所获得阳性菌质粒,按照 1.2 方法进行 PCR 和酶切鉴定。构建的原核重组表达菌株命名为 pET-32a-FGL2-BL21。

1.5 FGL2 重组蛋白的诱导表达

将重组表达菌株 pET-32a-FGL2-BL21 接种含氨苄青霉素(100 mg/mL)的 LB 液体培养基,于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜后按体积比 1:100 转接到新的液体培养基(含氨苄青霉素 100 mg/mL),37 $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液在 600 nm 处吸光值(OD_{600})为 0.6 时,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L,在 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 5 h。将表达产物 12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,加适量 PBS 重悬,冰水浴超声破碎 30 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,分别收集上清和沉淀,加入 5 $\times$ 上样缓冲液,煮沸 10 min 后进行 10% SDS-PAGE 电泳(电压为 120 V,时间约为 1 h),直至样品跑至胶底,检测 *FGL2* 重组蛋白的表达情况。试验设转染 pET-32a 的 BL21(pET-32a-BL21)为对照。

1.6 FGL2 重组蛋白的反应原性检测

将上述诱导表达的产物经 10% SDS-PAGE 电泳后电转到 PVDF 膜上,用 50 g/L 的脱脂奶粉封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,5 min/次;加入 1:1 000 稀释的抗 His 标签的抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,TBST 洗涤 3 次,5 min/次;加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 2~3 h,TBST 洗涤 3 次,ECL 显色后观察结果。

2 结果与分析

2.1 鸡 *FGL2* 基因克隆

以鸡胚成纤维细胞 cDNA 为模板,利用 *FGL2* 基因特异性引物进行 PCR 扩增,结果获得了大小约为 1 300 bp 的单一片段(图 1-A),与预期结果相符。菌液 PCR 扩增也获得了与预期大小相符的特异性目的片段。利用限制性内切酶 *Bam*H I 对重组质粒 pMD19-T-FGL2 进行单酶切,结果得到 1 条约 4 000 bp 的片段,利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对其进行双酶切鉴定,得到约 2 600 bp 的载体片段和约 1 300 bp 的目的片段(图 1-B),与预期

片段长度一致。将 pMD19-T-FGL2 重组质粒测序,结果显示,鸡 *FGL2* 基因 CDS 区全长 1 320 bp,与 GenBank 数据库中的鸡 *FGL2* 序列(登录号:

AJ851669.1)同源性为 100%,表明鸡 *FGL2* 基因克隆成功。

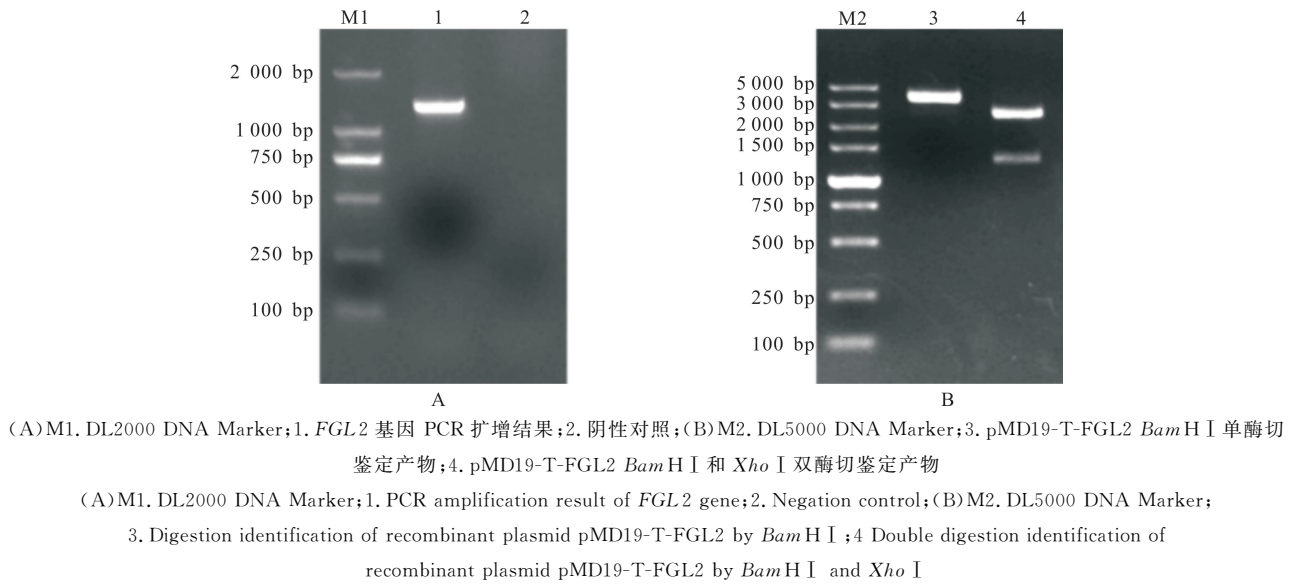


图 1 鸡 *FGL2* 基因 PCR 扩增(A)及克隆载体的酶切鉴定(B)

Fig. 1 PCR amplification (A) and cloning vector construction (B) of *FGL2* gene in chicken

2.2 鸡 *FGL2* 基因编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 鸡 *FGL2* 基因编码蛋白相似性分析和进化树构建 利用 DNASTar 软件对鸡与其他物种 *FGL2* 氨基酸序列进行同源性分析,结果(表 1)显示,鸡与火鸡、珍珠鸡、雉鸡、鹌鹑、鸽、黑天鹅、鸿雁等禽类的

氨基酸同源性较高,分别为 98.2%,97.7%,97.3%,97.0%,86.8%,91.4%和 91.6%;与人、小鼠、猪、牛、犬、猕猴、猫等哺乳类的氨基酸同源性较低,分别为 66.1%,64.2%,65.3%,66.0%,63.5%,66.1%和 66.3%。

表 1 不同物种 *FGL2* 氨基酸序列的同源性和差异性比较

Table 1 Alignment and divergence of <i>FGL2</i> amino acid sequences in different species															%
物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		98.2	97.7	97.3	97.0	86.8	91.4	91.6	66.1	65.3	65.3	66.0	63.5	66.1	66.3
2	1.8		99.1	99.1	98.4	88.0	92.3	92.5	66.6	64.9	65.5	66.2	63.7	66.6	66.5
3	2.3	0.9		98.2	98.4	88.0	92.0	92.3	66.6	64.9	65.5	66.2	63.2	66.8	66.5
4	2.8	0.9	1.8		97.5	87.7	92.3	92.5	66.4	64.6	65.5	66.2	63.2	66.4	66.3
5	3.0	1.6	1.6	2.5		88.9	92.5	92.7	67.1	64.6	66.0	66.7	63.7	67.3	67.2
6	14.5	13.2	13.2	13.4	12.1		90.7	91.0	65.0	62.6	64.1	64.6	61.9	65.0	64.7
7	9.2	8.2	8.4	8.2	7.9	9.9		99.8	65.4	63.0	65.0	65.3	62.6	65.4	65.3
8	8.9	7.9	8.2	7.9	7.7	9.6	0.2		65.7	63.3	65.3	65.5	62.8	65.7	65.6
9	44.9	44.1	44.1	44.5	43.2	47.0	46.2	45.7		77.9	89.5	90.7	82.6	99.1	92.5
10	48.4	47.2	47.2	47.6	47.6	51.5	50.6	50.2	26.2		77.9	77.0	76.1	77.7	78.9
11	46.5	46.0	46.0	46.0	45.2	48.6	46.9	46.4	11.3	26.2		91.2	81.5	89.3	90.5
12	45.2	44.8	44.8	44.8	43.9	47.7	46.4	46.0	10.0	27.6	9.4		81.9	90.5	90.2
13	49.8	49.3	50.2	50.2	49.3	52.8	51.5	51.0	19.9	28.8	21.3	20.7		82.6	85.4
14	44.9	44.1	43.7	44.5	42.8	47.0	46.2	45.7	0.9	26.6	11.6	10.2	19.9		92.3
15	44.6	44.2	44.2	44.6	43.0	47.6	46.3	45.9	7.9	24.9	10.2	10.5	16.3	8.2	

注:1.鸡;2.火鸡;3.珍珠鸡;4.雉鸡;5.鹌鹑;6.鸽;7.黑天鹅;8.鸿雁;9.人;10.小鼠;11.猪;12.牛;13.犬;14.猕猴;15.猫。对角线上为同源性数据,对角线下为差异性数据。

Note:1. *Gallus gallus*; 2. *Meleagris gallopavo*; 3. *Numida meleagris*; 4. *Phasianus colchicus*; 5. *Coturnix japonica*; 6. *Columba livia*; 7. *Cygnus atratus*; 8. *Anser cygnoides*; 9. *Homo sapiens*; 10. *Mus musculus*; 11. *Sus scrofa*; 12. *Bos taurus*; 13. *Canis lupus*; 14. *Macaca mulatta*; 15. *Felis catus*. Above the diagonal is homologous data and below is divergent data.

利用 Mega11 软件构建系统进化树,结果(图 2)显示,鸡与火鸡、珍珠鸡、雉鸡等禽类的亲缘关系较

近,与人、小鼠、猪等哺乳类的亲缘关系较远。

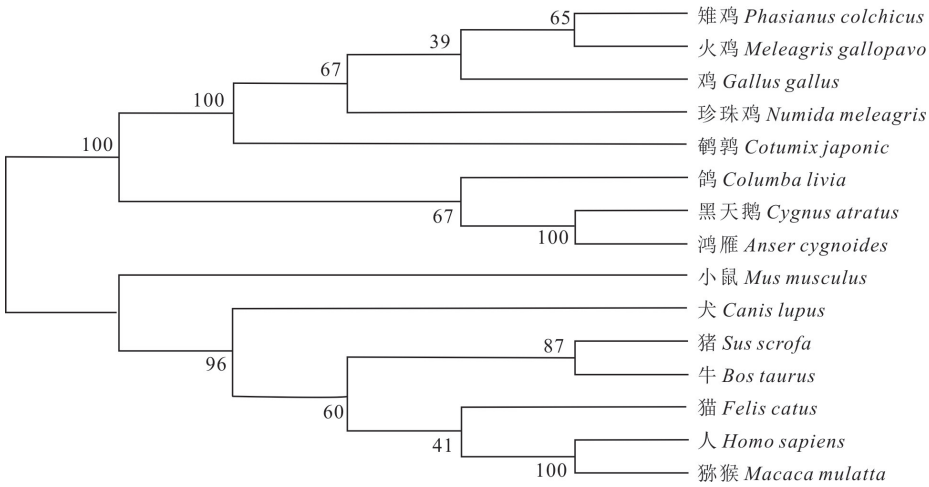


图 2 鸡 FGL2 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of FGL2 amino acid sequence in chicken

2.2.2 理化性质分析 利用在线软件 PortParam 对鸡 FGL2 蛋白理化性质进行分析,结果显示, FGL2 蛋白由 439 个氨基酸组成,蛋白分子质量 50.241 ku,分子式为 C_{2 221}H_{3 451}N₆₁₅O₆₇₃S₂₂,原子总数 6 982。FGL2 蛋白理论等电点(pI)为 8.63。由

表 2 可知,在 20 种常见氨基酸中,鸡 FGL2 蛋白中赖氨酸(Lys)含量最多(占 8.9%),色氨酸(Trp)含量最少(占 1.6%),不含硒半胱氨酸(Sec)和吡咯赖氨酸(Pyl);带正电荷的精氨酸和赖氨酸占 13.0%,带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸占 11.4%。

表 2 鸡 FGL2 蛋白氨基酸组成

Table 2 Amino acid compositions of FGL2 protein in chicken

氨基酸 Amino acid	数量 Number	占比/% Ratio	氨基酸 Amino acid	数量 Number	占比/% Ratio
丙氨酸 Ala(A)	24	5.5	赖氨酸 Lys (K)	39	8.9
精氨酸 Arg(R)	18	4.1	甲硫氨酸 Met(M)	10	2.3
天冬酰胺 Asn(N)	32	7.3	苯丙氨酸 Phe (F)	16	3.6
天冬氨酸 Asp(D)	26	5.9	脯氨酸 Pro (P)	18	4.1
半胱氨酸 Cys (C)	12	2.7	丝氨酸 Ser (S)	28	6.4
谷氨酰胺 Gln(Q)	26	5.9	苏氨酸 Thr (T)	25	5.7
谷氨酸 Glu(E)	24	5.5	色氨酸 Trp (W)	7	1.6
甘氨酸 Gly(G)	26	5.9	酪氨酸 Tyr (Y)	22	5.0
组氨酸 His(H)	9	2.1	缬氨酸 Val (V)	22	5.0
异亮氨酸 Ile (I)	17	3.9	吡咯赖氨酸 Pyl (O)	0	0.0
亮氨酸 Leu (L)	3	8.7	硒半胱氨酸 Sec (U)	0	0.0

2.2.3 亲水性、信号肽、跨膜结构区、保守结构域和 B 细胞抗原表位预测 鸡 FGL2 蛋白亲疏水性分析结果显示,总平均亲水系数(GRAVY)为-0.692,表明该蛋白为亲水蛋白(图 3-A)。信号肽预测结果显示,鸡 FGL2 蛋白具有信号肽结构,在第 22—23 位氨基酸之间有明显的剪切位点,属于分泌蛋白(图 3-B)。跨膜结构区预测结果显示,鸡 FGL2 蛋白没有明显的跨膜结构区。保守结构域分析结果显示,鸡 FGL2 蛋白属于纤维蛋白超家族,纤维蛋白原相关结构域(FReDs)处于第 211—435 位氨基酸处。B

细胞抗原表位预测结果显示,鸡 FGL2 蛋白有 15 个 B 细胞抗原表位,广泛分布于蛋白表面。

2.2.4 二、三级结构和相互作用关系预测 二级结构预测结果显示,鸡 FGL2 蛋白二级结构主要由 α-螺旋(占 38.27%)和无规则卷曲(占 41.69%)组成。三级结构预测结果显示,鸡 FGL2 蛋白的三维模型主要由 α-螺旋和无规则卷曲构成,和二级结构结果一致。蛋白互作分析结果显示,鸡 FGL2 蛋白与凝血因子Ⅱ(F2)、集落刺激因子 1 受体(CSF1R)、补体 1q 亚基 a(C1QA)等可能存在互作关系(图 4)。

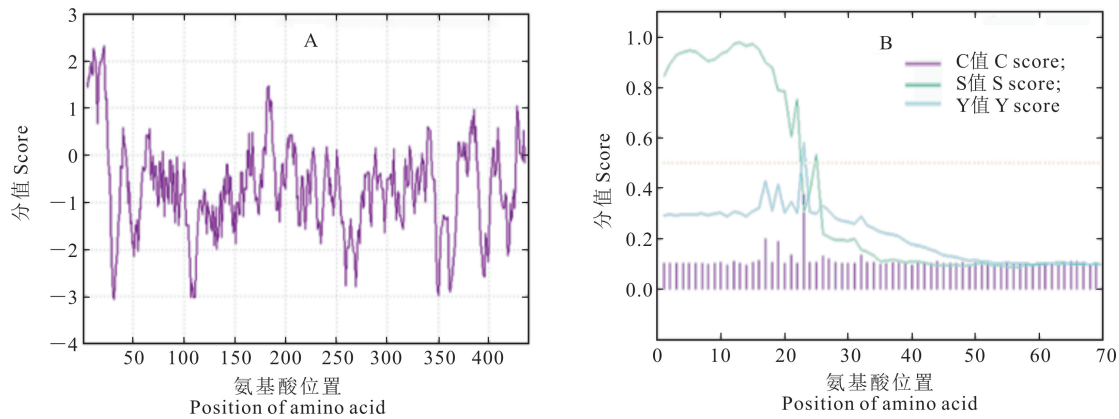
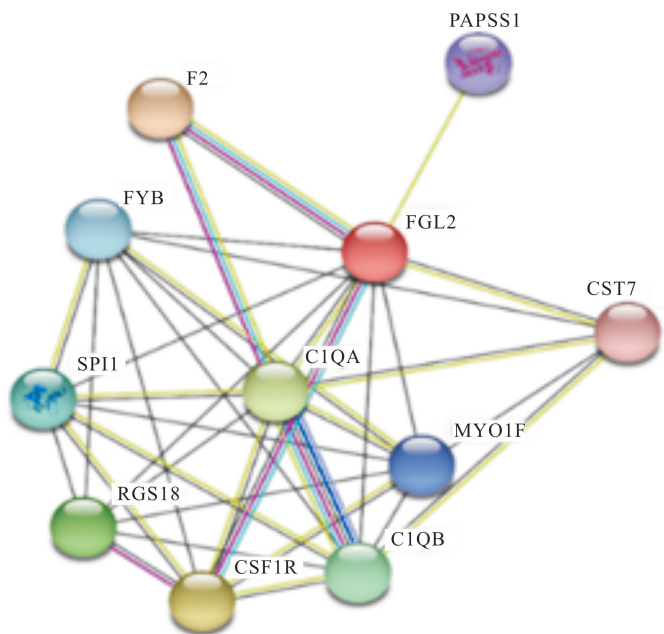


图 3 鸡 FGL2 蛋白的亲水性(A)和信号肽 (B)预测

Fig. 3 Hydrophilicity (A)and signal peptide (B) prediction of FGL2 protein in chicken



F2. 凝血因子Ⅱ;CSF1R. 集落刺激因子 1 受体;C1QA. 补体 1q 亚基 a;C1QB. 补体 1q 亚基 b;PAPSS1. 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸合成酶 1;
CST7. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 7;MYO1F. 肌球蛋白 1F;SPI1. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 1;FYB. Fyn 结合蛋白;RGS18. G 蛋白信号调节因子 18
F2. Coagulation factor Ⅱ;CSF1R. Colony-stimulating factor 1 receptor;C1QA. Complement 1q subcomponent subunit a;
C1QB. Complement 1q subcomponent subunit b;PAPSS1. 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase 1;CST7. Cystatins 7;
MYO1F. Myosin 1F;SPI1. Serpins 1;FYB. Fyn binding protein;RGS18. Regulator of G-protein signaling protein 18

图 4 鸡 FGL2 蛋白相互作用关系预测

Fig. 4 Interaction prediction of FGL2 protein in chicken

2.3 鸡 FGL2 基因原核表达载体的构建

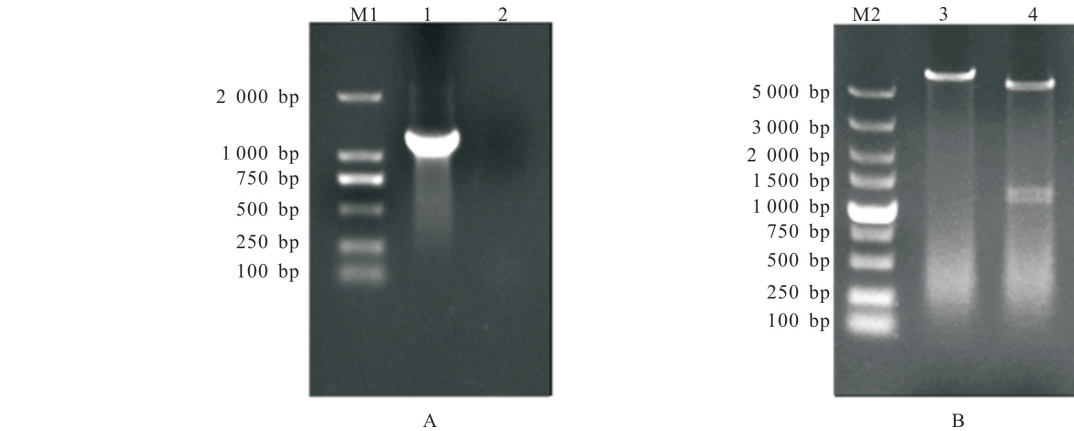
挑取疑似含有 pET-32a-FGL2 重组质粒的菌落,提取质粒进行 PCR 鉴定,结果显示获得了预期的 1 320 bp 的 FGL2 基因片段(图 5-A)。重组质粒 pET-32a-FGL2 经 Bam H I 单酶切鉴定获得了 1 条约 7 200 bp 的目的片段,经 Bam H I 和 Xho I 双酶切鉴定,获得了 1 条 5 900 bp 的载体片段和 1 条 1 320 bp 的鸡 FGL2 基因的目的片段(图 5-B),与预期结果相符,表明 pET-32a-FGL2 重组质粒构建

成功。

2.4 鸡 FGL2 重组蛋白的诱导表达及反应原性检测

SDS-PAGE 检测结果显示,在 70 ku 左右处出现与预期大小相符的重组蛋白条带,表达产物主要存在于超声破碎后的沉淀样品中(图 6-A),表明该重组蛋白主要以包涵体形式表达。Western-blot 检测结果显示,重组表达菌 pET-32a-FGL2-BL21 诱导表达的产物在 70 ku 左右出现了 His 抗体特异性

结合条带,与预期的重组蛋白的反应条带大小一致 (图 6-B)。结果表明,鸡 *FGL2* 重组蛋白具有良好 的反应原性。

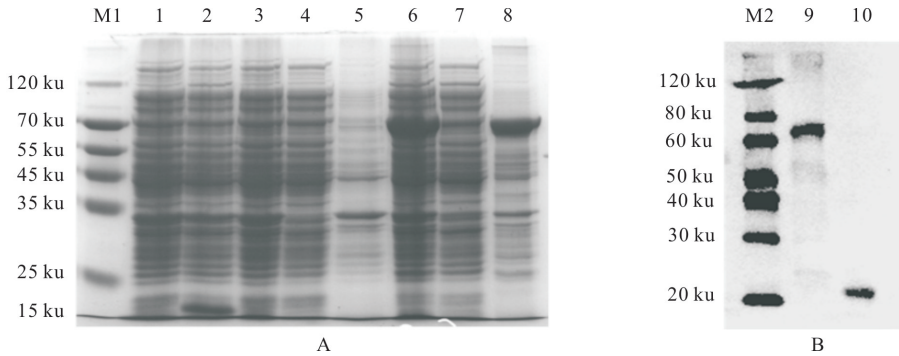


(A)M1. DL2000 DNA Marker;1. pET-32a-FGL2 PCR 鉴定;(B)2. 阴性对照;M2. DL5000 DNA Marker;3. 重组质粒 pET-32a-FGL2 的 *Bam*H I 单酶切鉴定;4. 重组质粒 pET-32a-FGL2 的 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切鉴定

(A)M1. DL2000 DNA Marker;1. PCR identification of pET-32a-FGL2;2. Negation control;(B)M2. DL5000 DNA Marker; 3. Digestion identification of recombinant plasmid pET-32a-FGL2 by *Bam*H I ; 4. Double digestion identification of recombinant plasmid pET-32a-FGL2 by *Bam*H I and *Xho*I

图 5 重组质粒 pET-32a-FGL2 的 PCR(A)和酶切鉴定(B)

Fig. 5 Recombinant plasmid pET-32a-FGL2 identification by PCR (A)and digestion(B)



(A)M1. 蛋白分子量标准;1,2. 分别为 pET-32a-BL21 未诱导和诱导样品;3,4,5. 分别为 pET-32a-FGL2-BL21 未诱导及未诱导超声破碎上清和沉淀样品;6,7,8. 分别为 pET-32a-FGL2-BL21 诱导及诱导超声破碎上清和沉淀样品;(B)M2. WB-MASTER 蛋白标准; 9. pET-32a-FGL2-BL21 诱导表达蛋白;10. pET-32a-BL21 诱导表达蛋白

(A)M1. Colorful pre-stained protein Marker;1,2. pET-32a-BL21 uninduced and induced samples;3,4,5. pET-32a-FGL2-BL21 uninduced and uninduced ultrasonic disruption supernatant and precipitation;6,7,8. pET-32a-FGL2-BL21 induced and induced of ultrasonic disruption supernatant and precipitation;(B)M2. WB-MASTER protein Marker;9. Induce expression protein pET-32a-FGL2-BL21; 10. Induce expression protein pET-32a-BL21

图 6 *FGL2* 重组蛋白原核表达产物 SDS-PAGE(A)及 Western-blot(B)分析

Fig. 6 SDS-PAGE(A) and Western-blot (B) analysis of prokaryotic expression products

3 讨 论

近几年,*FGL2* 的免疫调节作用受到人们广泛关注,其作为新的 Treg 效应分子,通过与 APC 作用,可以抑制 T 细胞的增殖活化,表现出免疫调节活性。研究表明 *FGL2* 在肿瘤、病毒性肝炎和自身免疫等多种疾病中发挥着重要作用^[17]。然而,关于 *FGL2* 效应的上游信号和下游通路,仍有许多不清楚的地方。

目前,国内外针对鸡 *FGL2* 的研究尚属空白。本试验利用 RT-PCR 技术成功克隆了鸡 *FGL2* 基因,并采用生物信息学方法分析了鸡 *FGL2* 蛋白的结构与特性。同源性分析和进化树结果显示,鸡 *FGL2* 基因与火鸡、雉鸡、珍珠鸡等禽类的亲缘关系较近,与哺乳类动物的亲缘关系较远,说明该基因在不同物种之间具有一定的保守性。本研究发现,鸡 *FGL2* 蛋白属于亲水蛋白,无跨膜区,具有信号肽结构。Yuwaraj 等^[18] 研究证明,*FGL2* 蛋白 N 端的一

段疏水氨基酸是 FGL2 的信号肽结构,与本研究结果一致。这说明鸡 FGL2 蛋白属于分泌蛋白(sFGL2),可能不是膜结合蛋白(mFGL2),不作为细胞膜受体起作用,但 sFGL2 是如何被切割和分泌的仍不清楚。本研究表明,鸡 FGL2 蛋白有 15 个 B 细胞抗原表位,广泛分布于蛋白表面,说明 FGL2 蛋白整体抗原效果较好。鸡 FGL2 蛋白二、三级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主,无规则卷曲结构易暴露球蛋白表面,易与抗体结合,因而成为抗原表位的可能性较大^[19],这印证了 B 细胞抗原表位的预测结果。

本试验成功克隆了鸡 *FGL2* 基因,构建了原核表达质粒 pET-32a-FGL2,经诱导后可在大肠杆菌表达出大小约 70 ku 的融合蛋白,与预期蛋白大小一致。本试验采用了 pET-32a 原核表达载体,其融合蛋白标签包括六聚组氨酸接头 His-tag、S-tag 和硫氧还原蛋白接头 Trx-tag,其中硫氧还原蛋白融合标签能催化二硫键的形成,增强目的蛋白的可溶性^[20]。可溶性目的蛋白更接近于天然蛋白,无需复性就具有免疫反应性,且容易纯化^[21]。但本研究鸡 FGL2 重组蛋白在菌体破碎沉淀中表达量较高,说明其主要以包涵体的形式表达。包涵体蛋白是不溶的和无活性的,需要经过变性—复性等过程以恢复生物活性,操作繁琐且周期长。与可溶性蛋白相比,含量低和天然活性丧失是包涵体蛋白的两大问题^[22]。本研究 Western-blot 试验可检测出特异性的重组融合蛋白单一条带,表明成功获得了免疫反应原性良好的鸡 FGL2 的重组蛋白,为进一步制备鸡 FGL2 抗体及开展 FGL2 蛋白的功能研究奠定了基础。

4 结 论

本研究成功克隆了鸡 *FGL2* 基因,其长度为 1 320 bp,编码 439 个氨基酸;鸡 FGL2 与禽类的亲缘关系近,与哺乳动物亲缘关系远;FGL2 蛋白属于亲水蛋白,有信号肽,无跨膜区,含有 15 个 B 细胞抗原表位,二、三级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主。成功构建的原核表达载体 pET-32a-FGL2,并获得免疫反应原性良好的鸡 FGL2 重组蛋白。

【参考文献】

[1] 李学军,宋善俊,李永敢,等. 人 fgl2 凝血酶原酶 FRED 结构域的原核表达、纯化及其凝血活性的鉴定 [J]. 华中科技大学学报(医学版),2009,38(5):660-663.

Li X J, Song S J, Li Y G, et al. Prokaryotic expression, purification and procoagulant activity analysis of recombinant fibrinogen-related domain protein of human fgl2 prothrombinase [J]. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2009, 38(5): 660-663.

[2] Xiao F, Wang H W, Hu J J, et al. Fibrinogen-like protein 2 deficiency inhibits virus-induced fulminant hepatitis through abrogating inflammatory macrophage activation [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(4): 479-496.

[3] Yanaba K, Asano Y, Noda S, et al. Increased circulating fibrinogen-like protein 2 in patients with systemic sclerosis [J]. Clinical Rheumatology, 2013, 32(1): 43-47.

[4] Levy G A, Liu M, Ding J, et al. Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis [J]. The American Journal of Pathology, 2000, 156(4): 1217-1225.

[5] Yang G, Hooper W C. Physiological functions and clinical implications of fibrinogen-like 2: a review [J]. World J Clin Infect Dis, 2013, 3(3): 37-46.

[6] Liu B Q, Bao Z Y, Zhu J Y, et al. Fibrinogen-like protein 2 promotes the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the hepatocellular carcinoma tumor microenvironment [J]. Oncology Letters, 2021, 21(1): 47.

[7] Chruscinski A, Sadozai H, Rojas-Luengas V, et al. Role of regulatory T cells (Treg) and the Treg effector molecule fibrinogen-like protein 2 in alloimmunity and autoimmunity [J]. Rambam Maimonides Med J, 2015, 6(3): e0024.

[8] Shalev I, Wong K M, Foerster K, et al. The novel CD⁴⁺ CD²⁵⁺ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis [J]. Hepatology: Official Journal of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2009, 49(2): 387-397.

[9] Shevach E M. Mechanisms of foxp³⁺ T regulatory cell-mediated suppression [J]. Immunity, 2009, 30(5): 636-645.

[10] Liu H, Yang P S, Zhu T, et al. Characterization of fibrinogen-like protein 2 (FGL2): monomeric FGL2 has enhanced immunosuppressive activity in comparison to oligomeric FGL2 [J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2013, 45(2): 408-418.

[11] Yu J, Li J, Shen J, et al. The role of Fibrinogen-like proteins in Cancer [J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(4): 1079-1087.

[12] Chan C W, Kay L S, Khadaroo R G, et al. Soluble fibrinogen-like protein2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells [J]. J Immunol, 2003, 170(8): 4036-4044.

[13] Liu H, Shalev I, Manuel J, et al. The FGL2-Fc γ RIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression [J]. European Journal of Immunology, 2008, 38(11): 3114-3126.

[14] Wang L, Yang C, Xu M, et al. The role of soluble fibrinogen-like protein 2 in transplantation: protection or damage [J]. Transplantation, 2014, 97(12): 1201-1206.

[31] Wang N,Fu F Z,Wang B T,et al. Carbon,nitrogen and phosphorus stoichiometry in *Pinus tabulaeformis* forest ecosystems in warm temperate Shanxi Province, North China [J]. Journal of Forestry Research,2018,29(6):1665-1673.

[32] Vitousek P. Nutrient cycling and nutrient use efficiency [J]. The American Naturalist,1982,119(4):553-572.

[33] Rong Q Q,Liu J T,Cai Y P,et al. Leaf carbon,nitrogen and phosphorus stoichiometry of *Tamarix chinensis* Lour. in the Laizhou Bay coastal wetland, China [J]. Ecological Engineering,2015,76:57-65.

[34] Yu Z P,Wang M H,Huang Z Q,et al. Temporal changes in soil C-N-P stoichiometry over the past 60 years across subtropical China [J]. Global Change Biology,2018,24(3):1308-1320.

[35] Stitt M,Schulze E D. Plant growth,storage,and resource allocation:from flux control in a metabolic chain to the whole plant level [J]. Flux Control in Biological Systems,1994:57-118.

[36] 孙小妹,何明珠,杨睿哲,等. 白刺器官间非结构性碳水化合与 C : N : P 计量比的关联性 [J]. 生态学报,2021,41(3):1081-1091.

Sun X M,He M Z,Yang R Z,et al. Correlation of non-structural carbohydrates with C : N : P stoichiometry among the organs of *Nitraria tangutorum* [J]. Acta Ecologica Sinica, 2021,41(3):1081-1091.

[37] Millard P,Sommerkorn M,Grelet G A. Environmental change and carbon limitation in trees;a biochemical,ecophysiological and ecosystem appraisal [J]. New Phytologist,2007,175(1): 11-28.

[38] 吴杰,潘红丽,杜忠,等. 卧龙竹类非结构性碳水化合物与叶氮含量对海拔的响应 [J]. 生态学报,2010,30(3):610-618.

Wu J,Pan H L,Du Z,et al. Responses of tissue non-structural carbohydrates and leaf nitrogen contents to altitude in two dwarf bamboos in Wolong [J]. Acta Ecologica Sinica,2010,30 (3):610-618.

[39] 郭子武,胡俊靖,杨清平,等. 林地覆盖经营对雷竹叶片非结构性碳水化合物与氮、磷关系的影响 [J]. 应用生态学报,2015, 26(4):1064-1070.

Guo Z W,Hu J J,Yang Q P,et al. Influence of mulching management on the relationships between foliar non-structural carbohydrates and N,P concentrations in *Phyllostachys violascens* stand [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2015, 26(4):1064-1070.

[40] Reich P B,Walters M B,Tjoelker M G,et al. Photosynthesis and respiration rates depend on leaf and root morphology and nitrogen concentration in nine boreal tree species differing in relative growth rate [J]. Functional Ecology, 1998, 12(3): 395-405.

[41] Reich P B,Oleksyn J. Global patterns of plant leaf N and P in relation to temperature and latitude [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(30):11001-11006.

(上接第 18 页)

[15] Blank U,Launay P,Benhamou M,et al. Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity [J]. Immunological Reviews, 2009,232(1):59-71.

[16] 彭博,戎瑞明,许明,等. 可溶性纤维介素 2 的免疫调节作用研究进展 [J]. 中国临床医学,2016,23(5):656-661.

Peng B,Rong R M,Xu M,et al. Research progress on the role of soluble fibrinogen-like protein 2 in immunoregulation [J]. Chinese Journal of Clinial Medicine,2016,23(5):656-661.

[17] Liu X G,Liu Y,Chen F. Soluble fibrinogen like protein 2 (sFGL2),the novel effector molecule for immunoregulation [J]. Oncotarget,2017,8(2):3711-3723.

[18] Yuwaraj S,Ding J,Liu M,et al. Genomic characterization, localization, and functional expression of FGL2, the human gene encoding fibroleukin: a novel human procoagulant [J]. Genomics,2001,71(3):330-338.

[19] 宋帅,李春玲,贾爱卿,等. 抗原表位研究方法进展 [J]. 动物医学进展,2010,31(12):87-91.

Song S,Li C L,Jia A Q,et al. Progress on approaches for antigen epitope study [J]. Progress in Veterinary Medicine,2010, 31(12):87-91.

[20] 朱芳,邓思,罗立新. 分选酶 A 在 pET32a(+)原核表达载体中的表达和鉴定 [J]. 生物技术通报,2011(6):218-222.

Zhu F,Deng S,Luo L X. Expression and identification of sortase A in pET32a(+) expression vector [J]. Biotechnology Bulletin,2011(6):218-222.

[21] 郭佳,郁品泽,贾敏,等. 拟南芥乙烯应答基因 HLS1 的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(7):141-147.

Guo J,Yu P Z,Jia M,et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibodies preparation of ethylene response gene HLS1 in *Arabidopsis* [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2020,48(7):141-147.

[22] 张伟,范士龙,韦丽婷,等. 马泰勒虫 RON2 基因的原核表达及生物信息学分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2021,49(12):18-27.

Zhang W,Fang S L,Wei L T,et al. Prokaryotic expression and bioinformatics analysis of RON2 gene in *Theileria equi* [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition),2021,49(12):18-27.