

鸭IL-18 基因克隆与序列分析

韩先干, 黄青云*, 尹会方, 邓宪方, 柯艳坤 (华南农业大学兽医学院, 广东广州510642)

摘要 [目的] 为深入研究鸭IL-18 的基因表达及其生物学活性和分子佐剂的应用奠定基础。[方法] 依据GenBank 中香港鸭IL-18 基因的序列设计1 对特异引物, 以广东水鸭脾淋巴细胞总RNA 为模板进行RT-PCR 扩增, 克隆广东水鸭IL-18 基因并进行序列分析。[结果] 测序结果表明, 广东水鸭的IL-18 基因开放阅读框为603 bp, 编码201 个氨基酸, 分子量为23.2 kDa。序列分析表明, 所获得的广东水鸭IL-18 基因与GenBank 中香港鸭的核苷酸同源率为98.2%, 氨基酸同源率为100%。它与鸡和火鸡的核苷酸同源率分别为86.9%和87.1%, 而氨基酸同源率分别为96.5%和97.0%。[结论] 进化树分析结果表明, 鸭IL-18 基因与鸡和火鸡进化关系较近。

关键词 鸭IL-18 基因; RT-PCR; 序列分析

中图分类号 S834 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03545-03

Cloning and Sequence Analysis of Duck IL-18 Gene

HAN Xian-gan et al (College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for deeply studying the expression of duck IL-18 gene and its biological activity and molecular adjuvant application. [Method] A pair of primers was designed according to the sequences of IL-18 gene in the duck of Hongkong on GenBank website. Total RNA from spleen lymphocyte in Guangdong teal was taken as template to make RT-PCR amplification. IL-18 gene in Guangdong teal was cloned and sequenced. [Result] The sequencing results showed that the open reading frame of IL-18 gene in Guangdong teal was 603 bp, coding 201 amino acids, with the molecular weight of 23.2 kDa. The sequence analysis showed the nucleotide homology of IL-18 gene between Guangdong teal and Hongkong duck on GenBank website was 98.2% and the amino acid homology was 100%. Its nucleotide homology with chicken and turkey were 86.9% and 87.1% resp., the amino acid homology were 96.5% and 97.0% resp. [Conclusion] The results of phylogenetic analysis showed that duck IL-18 gene had closer evolutionary relationships with that of chicken and turkey.

Key words Duck IL-18 gene; RT-PCR; Sequence analysis

IL-18 作为具有多种免疫调节功能的细胞因子, 自发现以来, 研究者们一直进行着不懈的研究, 并取得了显著的成果^[1-3]。目前包括人和鼠等多种动物的IL-18 基因已成功克隆, 然而禽类IL-18 的研究相对滞后^[4]。Schneider 等首次通过RT-PCR 方法获得鸡的IL-18 基因, 并成功进行了表达和活性检测^[5]。此后Kaiser 等发现火鸡IL-18 基因^[6]。国内关于禽类IL-18 的研究近几年才有报道, 且主要集中于鸡的IL-18^[7-9]。关于鸭的IL-18 的研究, 国内外尚未见文献报道, 仅见GenBank 中有1 个香港鸭(无写明品种)的IL-18 基因序列。

该研究依据GenBank 中仅有的1 条鸭IL-18 基因, 设计1 对特异引物, 通过RT-PCR 扩增, 克隆广东水鸭IL-18 基因, 并进行序列分析, 为进一步研究鸭IL-18 的基因表达及其生物学活性和分子佐剂的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物。成年广东水鸭, 经鸭瘟疫苗强化免疫。

1.1.2 质粒与菌种。大肠杆菌DH5, 实验室保存; pMD18-T 载体质粒, 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 酶与主要试剂。Ex Taq 酶、DL2000 DNA Marker、Reverse Transcriptase XL(AMV) 反转录酶购自大连宝生物公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自Omega 公司; Trizol 购自广州Invitrogen 公司; conA 购自北京鼎国公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计。根据GenBank 上鸭序列的ORF, 利用Pi mer(Version 5.0) 基因分析软件, 设计1 对引物P1、P2, 扩增鸭白介素18 基因(以下简称DIL-18) 的ORF。跨幅为603 bp, 由上海博亚公司合成, 引物序列如下: P1, 5'-ATGAGATGT-

GAATTGAT-3'; P2, 5'-TCACAGGTTGTACCTTTC-3'。

1.2.2 鸭脾淋巴细胞的诱导培养及RNA 提取。参照温纳相等介绍的方法^[7], 将饲养的广东水鸭颈静脉放血致死, 无菌采取鸭的脾脏, 制备鸭脾淋巴细胞。用适量DMEM 培养液将鸭脾淋巴细胞密度调整至 $8 \times 10^6/\text{ml}$, 加入终浓度为 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的ConA、10% 灭活小牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素, 置于细胞培养瓶中, 于5% CO₂ 培养箱中37 培养24 h, 收集淋巴细胞培养物, 4 5 000 r/min 离心5 min, 弃上清, 取沉淀细胞。按Invitrogen 公司的Trizol 步骤提取鸭脾淋巴细胞的总RNA。

1.2.3 鸭IL-18 mRNA 的反转录。参照宝生物公司的Reverse Transcriptase XL(AMV) 反转录酶使用说明书, 以引物P2 为反转引物, 在20 μl 体系中依次加入如下组分: 5 \times buffer 4.0 μl 、dNTP 1.0 μl (10 mmol/L)、RNase Inhibitor 0.5 μl 、P2 1.0 μl (20 pmol/ μl)、AMV 1.0 μl (5 U/ μl)、总RNA 12.5 μl 。将上述反应体系混匀, 室温放置10 min 后移入42 恒温水浴锅中作用1 h, 冰浴2 min。反应产物(cDNA) 进行PCR 扩增。

1.2.4 鸭IL-18 基因的PCR 扩增、电泳。参照Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 使用说明书, 在25 μl 体系中加入如下组分: 10 \times buffer 2.5 μl 、dNTP 0.5 μl (10 mmol/L)、P1 0.5 μl (20 pmol/ μl)、P2 0.5 μl (20 pmol/ μl)、cDNA 1.0 μl 、ddH₂O 19.8 μl 、Ex Taq 0.2 (5 U/ μl)。混匀后进行PCR 扩增。扩增条件为: 94 3 min, 94 40 s, 53 45 s, 72 45 s, 35 个循环, 72 延伸10 min。PCR 产物经1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.2.5 PCR 产物的克隆、鉴定与序列分析。从琼脂糖电泳凝胶中切下约603 bp 的DNA 条带, 按照Omega 公司的DNA 纯化回收试剂盒说明书进行纯化、回收。将回收纯化的PCR 产物与pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌DH5a 感受态细胞, 在含IPTG、X-gal 和Amp 的LB 平板中培养, 挑取白色菌落, 按照Omega 的质粒提取试剂盒提取转化菌质粒, PCR 鉴定为阳性的克隆质粒DIL-18-PM18-T 送生物公司测序, 并用Dmstar 和

基金项目 广东省自然科学基金项目(3227)。

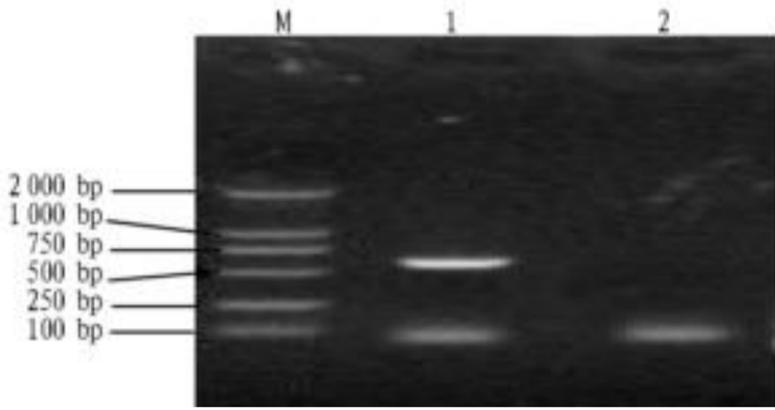
作者简介 韩先干(1977-), 男, 安徽肥西人, 硕士, 从事兽医微生物及分子免疫学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-12-01

Dnasis 分析软件对该序列进行测序。

2 结果与分析

2.1 鸭IL-18 基因的 RT-PCR 结果 电泳结果出现1 条约 603 bp 的 DNA 片段, 与预期的结果相符(图1)。



注: M. DL 2000 Marker ;1 . RT-PCR 产物;2 . 阴性对照。

Note : M. DL 2 000 Marker ;1 . products of RT-PCR;2 .negative control .

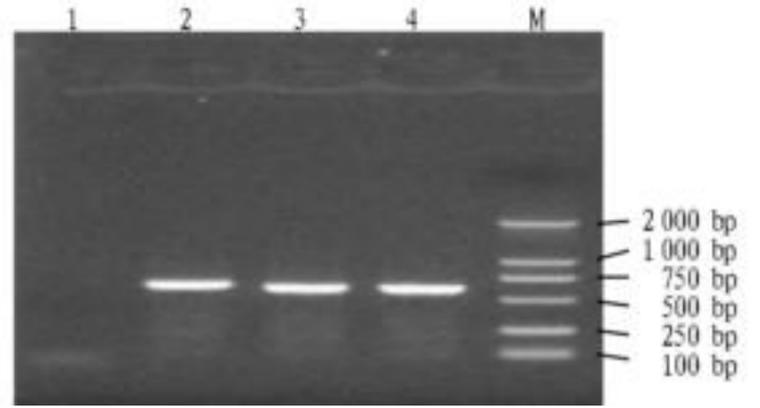
图1 RT-PCR 结果

Fig.1 RT-PCR amplification

2.2 重组质粒的 PCR 鉴定 电泳结果, 得到约603 bp 的片段(图2) , 与连接前的 RT-PCR 产物大小一致。

2.3 鸭IL-18 基因测序结果 将重组质粒送 TAKARA 公司分别进行上下游测序, 结果表明, 广东水鸭的IL-18 基因阅读框架为603 bp, 编码201 个氨基酸, 分子量为23.2 kDa(图3)。

2.4 鸭IL-18 基因的序列分析 Dnastar 和 Dnasis 软件分析结果显示: 该实验所获得的鸭IL-18 基因与 GenBank 登记的唯一一条鸭IL-18 基因, 有6 个碱基不同, 核苷酸同源性的



注: M. DL 2000 Marker ;1 . 阴性对照;2 ~4 . 重组质粒PCR 产物。

Note : M. DL 2000 Marker ;1 .negative control ;2 ~4 . PCR products of recombinant plasmid .

图2 重组克隆质粒PCR

Fig.2 The PCR products of recombinant plasmid

```

ATGAGATGTGAATTGATGGTTGTGTGTGCAGTACAGCTTGGAGAGAAGCTCTGCCTCTATTTTGC
TGATGACGATGAGCTGGAATGTGATGCTTCTCTAAGGAAAAAACCCTCCATCGCTTCTTGGGAATG
TAAATAGCCAGGTGCTTGTGGTCCAGCCAGATCTGAACATGGCAGCTTTTGAAGATGTAACAGATCAG
GAGATGAAATCTGGCAGCGAATGAACTTCTGCATGCACTGTTACAAAACCTACCACACCTTCAGCAGG
GATGCTTGTTCATTGATGTCGGGTAGAAGATAAAGCTACTACATGTTGTTGTGAGGAAGAACAAG
GGAAAATGATAGTTCGATTTAGGAAGGAGAAGTCCCAAGACATTCCTGGTGAAGCAACATCATC
TTCTTCAAAAAGACATTTACATCTTACAGCTCCAGGCATTTAAGTTTGAATACTACTAGAAGCAGG
GATGTTCTCTGGCTTTGAGGAAGAAGACTCTTAAAGAAATTAATTTTAAAGAAATGCCAAGAGAAG
ATGAGGTAGATGAACCCACAAGATAACTTTAACAGTCATAATGAAGGTACAACCTGTGA
MRCELMVVCAYQLGENLCLYFADDDDELBCDAFSPKERTLHRFLRNVNSQVLLVVPDLNMAAFEDVT
DQBMKSGSQMFMHCYKTTTSAQMPVAFSVRVEK.SYMXCEEHGMIVRFRBGEVPKDIPGESN
LIFFKTFTSYSSKAFKFEYSLERQMLAFEEEDSLRKLILKKLPRFEDVDETTKILTLTSHNERYNL-
    
```

图3 广东水鸭IL-18 基因序列与推导氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of IL-18 gene and deduced amino acid sequence of GD duck

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	█	42.8	86.9	38.4	41.1	98.2	43.5	40.5	37.6	36.7	39.8	38.2	37.2	37.6	87.1	1	GD-DIL-18
	2	100.0	█	42.1	49.5	72.2	42.4	41.7	73.2	47.7	48.1	45.7	47.6	47.0	49.1	40.8	2	cat
	3	14.5	100.0	█	38.6	40.5	87.0	45.1	40.7	36.7	36.0	39.9	38.1	36.5	37.5	96.3	3	chicken
	4	100.0	84.2	100.0	█	48.4	38.7	38.9	49.3	86.4	85.4	74.9	91.2	74.5	97.4	38.7	4	cow
	5	100.0	34.8	100.0	87.5	█	40.1	39.9	92.2	46.8	46.1	44.9	45.7	45.1	48.1	40.1	5	dog
	6	1.8	100.0	14.4	100.0	100.0	█	43.5	39.6	37.9	37.0	40.0	38.5	37.2	37.9	87.2	6	duck
	7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	█	39.4	38.7	38.1	40.6	37.8	40.6	37.9	45.0	7	Fugu
	8	100.0	33.3	100.0	84.8	8.3	100.0	100.0	█	47.2	47.4	46.1	46.6	46.4	48.6	39.9	8	horse
	9	100.0	90.2	100.0	15.1	93.2	100.0	100.0	92.1	█	97.8	75.1	85.0	74.0	86.8	36.6	9	human
	10	100.0	88.8	100.0	16.5	95.8	100.0	100.0	91.4	2.3	█	74.0	84.7	73.0	85.8	35.5	10	monkey
	11	100.0	98.0	100.0	31.3	100.0	100.0	100.0	97.0	30.9	32.6	█	73.4	91.7	74.0	39.4	11	mouse
	12	100.0	90.8	100.0	9.5	97.9	100.0	100.0	94.7	17.1	17.5	33.9	█	71.8	92.1	37.4	12	pig
	13	100.0	93.5	100.0	32.3	100.0	100.0	100.0	95.8	32.8	34.5	8.9	37.0	█	73.7	36.0	13	rat
	14	100.0	85.4	100.0	2.6	88.7	100.0	100.0	87.1	14.7	16.1	32.7	8.5	33.8	█	37.6	14	sheep
	15	14.2	100.0	3.8	100.0	100.0	14.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	█	15	turkey
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

图4 GD DIL-18 与其他动物IL-18 ORF 同源性比较

Fig.4 Comparison on homology of IL-18 gene from GD D and other animals

98.2 % , 但推导氨基酸序列完全相同。将 GD DIL-18 基因序列与人及13 种动物的IL-18 基因序列进行比较, 结果表明: GD DIL-18 基因与鼠(rat) 的同源性最低, 仅为37.2 % ; 和鸡、火鸡的同源性分别为86.9 % 和87.1 % (图4) 。进化树分析结果分为2 组: 第一组是人和哺乳动物, 包括羊、牛、猪、狗、猫、猴、小鼠、老鼠等; 第二组是禽类, 包括鸡、火鸡和鸭。进化树

表明, 人及各种动物间亲缘关系越近, IL-18 基因的进化关系也越近(图5) 。

氨基酸序列分析结果表明(图6) : 实验获得的 GD DIL-18 基因推导氨基酸序列与 GenBank 注册的鸭IL-18 的一致; 两者在人和多种动物IL-18 氨基酸的序列进化树中处于同一位置(图7) ; 与鸡和火鸡的同源性分别为96.5 % 和97.0 % 。

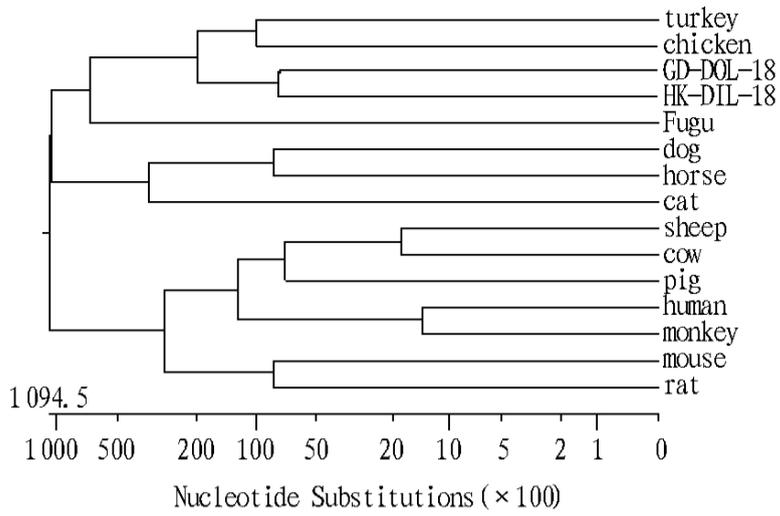


图5 GD DIL-18 与其他动物IL-18 ORF 系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic tree of IL-18 nucleotide sequence from GD D and other animals

3 讨论

(1) 为了提高 RT-PCR 扩增鸭IL-18 基因的产量,提高鸭脾淋巴细胞IL-18 基因转录 mRNA 的丰度甚为关键。该实验对实验鸭以鸭瘟弱毒疫苗每周1 次,连续3 次强化免疫。第3 次免疫后5 ~7 d 制备鸭脾淋巴细胞,再以20 μg/ml ConA 诱导培养24 h,提取脾淋巴细胞总RNA,RT-PCR 达到了满意的效果。

(2) 该研究获得的 GD DIL-18 基因和香港在 Gen Bank 唯一注册的 DIL-18 基因在核苷酸水平存在6 个碱基的差异,但在氨基酸序列上完全一致,造成这种情况的原因是因为氨基酸存在简并性,不同的密码子编码同一种氨基酸。该研究结果为 DIL-18 基因表达及重组 DIL-18 生物学活性及分子佐剂的应用研究打下了基础。

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	█	80.8	96.5	84.0	80.8	100.0	80.4	82.0	83.0	83.5	81.8	81.3	81.3	83.0	97.0	1	GD-DIL-18
	2	22.2	█	81.3	96.4	98.0	80.8	85.6	97.4	95.4	94.9	90.8	95.9	90.8	96.4	80.8	2	cat
	3	3.6	21.5	█	85.1	81.3	96.5	81.5	82.5	84.0	84.5	82.3	82.4	81.9	84.5	99.5	3	chicken
	4	18.0	3.7	16.7	█	96.4	84.0	87.8	97.5	98.0	97.5	92.8	97.4	92.3	99.0	84.5	4	cow
	5	22.2	2.1	21.5	3.7	█	80.8	85.1	97.4	95.4	94.9	90.8	96.9	90.8	96.4	80.8	5	dog
	6	0.0	22.2	3.6	18.0	22.2	█	80.4	82.0	83.0	83.5	81.8	81.3	81.3	83.0	97.0	6	duck
	7	22.7	16.0	21.3	13.3	16.7	22.7	█	85.2	86.2	86.2	86.1	85.1	85.6	86.8	81.0	7	fugu
	8	20.7	2.6	20.0	2.6	2.6	20.7	16.6	█	96.4	95.9	91.3	97.4	91.3	97.5	82.0	8	horse
	9	19.3	4.7	18.0	2.1	4.7	19.3	15.3	3.6	█	99.5	91.8	96.4	91.3	97.0	83.5	9	human
	10	18.6	5.3	17.3	2.6	5.3	18.6	15.2	4.2	0.5	█	91.3	95.9	90.8	96.4	84.0	10	monkey
	11	20.9	9.9	20.2	7.5	9.9	20.9	15.4	9.3	8.7	9.3	█	91.3	99.0	91.8	81.8	11	mouse
	12	21.5	4.2	20.1	2.6	3.1	21.5	16.6	2.6	3.7	4.2	9.3	█	90.8	97.4	81.9	12	pig
	13	21.5	9.8	20.8	8.1	9.8	21.5	16.0	9.2	9.2	9.8	1.0	9.8	█	91.3	81.3	13	rat
	14	19.3	3.7	17.3	1.0	3.7	19.3	14.6	2.6	3.1	3.6	8.7	2.6	9.2	█	84.0	14	sheep
	15	3.1	22.1	0.5	17.3	22.1	3.1	22.0	20.6	18.6	18.0	20.9	20.8	21.4	18.0	█	15	turkey
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

图6 GD DIL-18 氨基酸与其他动物IL-18 氨基酸同源性比较

Fig.6 Comparison on homology of amino acid for IL-18 gene from GD D and other animals

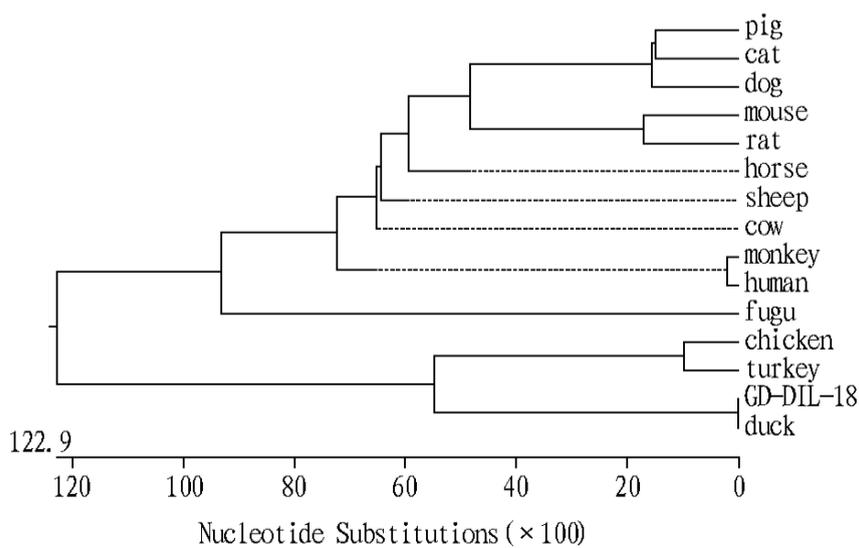


图7 GD DIL-18 氨基酸与其他动物IL-18 氨基酸进化树分析

Fig.7 Phylogenetic tree of amino acid sequence for IL-18 gene from GD D and other animals

参考文献

- LEBEL HNAY S, BERGER A, ZINZINDHOU F. Interleukin 18 biological properties and clinical implications[J]. Eur Cytokine Netw, 2000; 11: 15.
- OKAMURA H, TSUISU H, KOMAISU T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378: 88 - 91.
- JAKUB, GOLAB. Interleukin 18: interferon-inducing factor—a novel player in tumor immunotherapy[J]. Cytokine, 2000(12): 332 - 338.
- CHARLES A, DNARELLO. Interleukin 18[J]. Methods, 1999, 19: 121 - 132.
- SCHNIDER K, PUEHLER F, BAEUBLED, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin 18[J]. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20: 879 - 883.
- KAISER P. Turkey and chicken interleukin 18(IL18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3' UTR[J]. Dev Comp Imm, 1995, 26: 681 - 687.
- 温纳相, 黄青云, 陈金顶, 等. 鸡IL-18 基因的克隆与序列测定[J]. 动物医学进展, 2003, 24(2): 64 - 66.
- 温纳相, 黄青云, 陈荣光, 等. 鸡白介素18 基因原核表达质粒构建[J]. 动物医学进展, 2003, 24(5): 78 - 80.
- 潘蔚琦, 刘胜旺, 孔宪刚, 等. 编码鸡IL-18 成熟蛋白基因的分子克隆与序列测定[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(2): 114 - 117.