

鲁海富, 沈文, 崔茹鹏, 等. 新疆巴什拜羊 *ISG15* 基因的克隆表达及活性检测[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 26–29.

新疆巴什拜羊 *ISG15* 基因的克隆表达及活性检测

鲁海富, 沈文, 崔茹鹏, 杨文, 姜方配, 孙廷鸣

(石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 克隆表达新疆巴什拜羊 *ISG15* 基因, 并对其表达产物的活性进行检测。利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了巴什拜羊 *ISG15* 基因的 cDNA 全长序列, 将 *ISG15* 基因克隆至真核表达载体 pPIC9K, 经电击转化至 GS115 中并用甲醇进行诱导表达, 用 Ni^{2+} 螯合亲和层析法对表达的蛋白进行纯化, 通过淋巴细胞转化试验来检测表达蛋白的活性。结果表明: 克隆得到的巴什拜羊 *ISG15* 基因 cDNA 全长为 646 bp, 开放阅读框为 474 bp, 编码 157 个氨基酸。经酵母重组菌株 GS115/pPIC9K-*ISG15* 表达, SDS-PAGE 结果显示表达的蛋白约为 33 ku, 表达的蛋白可用 Ni^{2+} 螯合亲和层析方法纯化, 淋巴细胞增殖试验结果显示, 表达的 *ISG15* 蛋白能够显著地刺激淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$), 表明表达的蛋白具有生物学活性。

关键词: 巴什拜羊; *ISG15*; 克隆表达; 活性检测

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0026-04

ISG15 是干扰素刺激基因 15 (interferon-stimulated gene 15, *ISG15*), 其编码蛋白为 *ISG15* 蛋白。*ISG15* 蛋白是在病原微生物或 I 型干扰素的刺激下高效表达的一种蛋白质^[1-2], 后续的研究证实 *ISG15* 所编码的氨基酸序列实际包含 165 个氨基酸残基, 分子质量为 17.89 ku^[3]。*ISG15* 具有细胞因子活性、调节干扰素信号通路、抗病毒及抗细菌感染等功能, 在先天性免疫中发挥着重要作用^[4]。巴什拜羊是新疆地区优秀的地方品种资源, 原产中国新疆维吾尔自治区裕民县。该羊毛色以红棕色为主, 体形呈方圆形, 角呈棱形, 颈中等长, 背平直, 具有生长发育速度快、产肉性能高、抗病力强等特征^[5]。在对巴什拜羊长期的饲喂过程中发现, 该羊对绵羊肺炎支原体

的感染具有较强的抗性, 即使被感染也不表现出明显的临床症状。*ISG15* 基因为羊的疾病抗性相关基因^[6], 当地巴什拜羊所表现的较强的抗病能力可能与 *ISG15* 基因有关。因此, 本研究从羊疾病抗性相关基因 *ISG15* 入手, 利用 RACE 技术克隆出新疆巴什拜羊的 *ISG15* 基因 cDNA 序列, 再对其基因进行真核表达, 最后通过淋巴细胞转化试验对表达产物的活性进行检测, 为进一步研究 *ISG15* 在疾病抗性中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

新疆巴什拜羊 5 只, 购自新疆维吾尔自治区塔城市裕民县, 绵羊由石河子大学动物科技学院实验站提供。

1.2 菌株与载体

巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株及真核表达载体 pPIC9K 为新疆农垦科学院畜牧兽医研究所馈赠, DH5 α 菌株由本实验室保存。

收稿日期: 2012-12-25

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31060351)。

作者简介: 鲁海富 (1987—), 男, 安徽合肥人, 硕士, 研究方向为临床兽医学。E-mail: 445330418@qq.com。

通信作者: 孙廷鸣, 博士, 教授, 主要从事临床兽医学研究。E-mail: sym@shzu.edu.cn。

为 0.075 9), 表明品种中用于配种的种公羊数量较少, 存在一定程度的近交, 也可能是长期对某一性状的选择而造成整体血统狭隘, 或是品种曾经历过始祖效应, 这些都会造成较多基因纯合。

参考文献:

- [1] Miesfeld R, Krystal M, Arnheim N. Nucl[J]. Acids Res, 1981, 9: 5931–5947.
- [2] Luikart G, Biju-Duval M P, Ertugrul O, et al. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*) [J]. Animal Genetics, 1999, 30(6): 431–438.
- [3] Kim K S, Yeo J S, Lee J W, et al. Genetic diversity of goats from Korea and China using microsatellite analysis [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2002, 15(4): 461–465.
- [4] Chenyambuga S W, Hanotte O, Hirbo J, et al. Genetic characterization

of indigenous goats of sub-Saharan Africa using microsatellite DNA markers [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2004, 17(4): 445–452.

- [5] 兰蓉, 朱兰, 王鹏, 等. 云南肉山羊黑色品系内不同家系遗传多样性分析 [J]. 中国草食动物, 2012(2): 8–12.
- [6] 秦崇凯, 杨菊清, 王琼, 等. 中国美利奴羊 (新疆型) 及其杂交后代群体遗传多态性研究 [J]. 新疆农业科学, 2012, 49(1): 113–121.
- [7] 张兴国, 石国庆, 柳楠, 等. 4 对微卫星 DNA 标记在 3 个绵羊品种中多态性的研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2571–2572, 2574.
- [8] 刘全德, 杨博辉, 郭健, 等. 柴达木绒山羊八个微卫星位点遗传多样性分析 [J]. 中国草食动物, 2008, 28(3): 3–6.
- [9] 张娜娜, 王清义, 毛薇, 等. 伏牛白山羊 6 个微卫星标记的遗传多样性分析 [J]. 河南农业科学, 2010(2): 92–96, 107.

1.3 试剂

质粒小量提取制备试剂盒、GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Mark DL2501 和 DNA marker DL2503 都购自上海捷瑞生物工程有限公司; SMARTTM RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; 限制性内切酶 *SnaB* I、*Not* I、*Sac* I 均购自 TaKaRa 公司; T_4 DNA 连接酶购自天根生化科技有限公司; DNA marker I 购自北京艾德莱生物科技有限公司; 蛋白 marker 购自 Fermentas 公司; *D* - 山梨醇、酵母氮碱 (YNB)、G418 均购自北京索莱宝科技有限公司; MTT 购自 Amresco 公司; 澳洲胎牛血清、二甲基亚砷购自西安沃尔森生物技术有限公司; RPMI1640 培养基购自上海浩然生物技术有限公司; 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; 刀豆蛋白 A (ConA) 购自上海索莱宝生物科技有限公司; Ni - NTA 树脂购自 QIAGEN 公司。

1.4 *ISG15* 基因片段的克隆

1.4.1 设计引物 从 GenBank 中查出已登录的绵羊、山羊、牛 *ISG15* 基因的 cDNA 序列进行同源性比对, 根据 *ISG15* 基因的保守序列分别设计 5' RACE 引物和 3' RACE 引物。5' RACE 引物: GSP1 为 5' - TTTGCTACAACCTTTATTACTG - 3', GSP2 为 5' - CTTTTCAAAAGACAGCCAGA - 3', Nested GSP 为 5' - CCACTCAAACCTCTGCACCAGCCTACC - 3'; 3' RACE 引物: 3GSP1 为 5' - GGGACCTGAAGGTGAAGATGCT - 3', 3GSP2 为 5' - TGCCTCTGAGGGACTCCATGAT - 3', 3' RACE Outer Primer 为 5' - TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT - 3', 3' RACE Inner Primer 为 5' - CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG - 3'。根据该基因的 ORF 设计出表达引物, 上游引物: 5' - TACGTAATGGGCGGGGACCTG - 3'; 下游引物: 5' - GCGGCCGCTTTGCTACAACCTTTATTCCTGC - 3'。以上引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.4.2 总 RNA 的提取 通过颈静脉采集巴什拜羊血液, 按照淋巴细胞分离液说明书方法分离外周血淋巴细胞。用 TRIzol 法提取巴什拜羊血液淋巴细胞总 RNA, 参照 RNA 提取试剂盒说明书进行具体操作。提取的总 RNA 最后用无菌 DEPC 水溶解, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4.3 利用 RACE 快速扩增获得基因 cDNA 全长序列 以巴什拜羊淋巴细胞提取的 RNA 反转得到的 cDNA 为模板, 参照 5' RACE 试剂盒的方法进行扩增, 通过巢式 PCR 对 5' RACE 扩增产物进行鉴定。巢式 PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 连接至克隆载体 pMD18 - T, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选及 PCR 鉴定正确后, 将菌株送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。利用 DNAMAN 等软件对测序得到的序列进行拼接, 并将测序得到的巴什拜羊 *ISG15* 基因的 cDNA 序列与 GenBank 数据库中公布的 *ISG15* 基因进行序列同源性分析, 最终获得基因的全长序列。

1.5 *ISG15* 基因重组表达载体的构建与鉴定

以巴什拜羊淋巴细胞提取的 RNA 反转得到的 cDNA 为模板, 在表达引物作用下进行 PCR 扩增。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 35 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 35 s, 共 34 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min, 得到 *ISG15* 基因。用 *Not* I

和 *SnaB* I 对巴什拜羊的 *ISG15* 基因进行双酶切后, 在 T_4 DNA 连接酶的作用下, 16 °C 过夜后连接于同样酶切的 pPIC9K 表达载体上, 将连接产物转化至感受态细胞 DH5 α 中, 涂于含氨苄青霉素的 LB 琼脂板上, 挑取单个菌落进行 PCR 和双酶切鉴定, 将鉴定为阳性的菌株送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 测序结果正确的重组质粒命名为 pPIC9K - *ISG15*。

1.6 *ISG15* 基因重组表达载体的转化与鉴定

将重组表达质粒 pPIC9K - *ISG15* 和表达载体 pPIC9K 用 *Sac* I 单酶切线性化后, 电击转化至 GS115 感受态细胞, 涂布于 MD 和 MM 抗性培养基上, 将平板上长出的单菌落用影印法依次接种到含 G418 浓度为 1.0、2.0、4.0 g/L 的 YPD 培养基中, 筛选多拷贝重组菌株, 用 PCR 方法^[7]进行鉴定。

1.7 重组菌株 GS115/pPIC9K - *ISG15* 的诱导表达与 SDS - PAGE 分析

从 YPD - G418 平板上挑取多拷贝重组菌株 GS115/pPIC9K - *ISG15*, 经 PCR 鉴定正确的阳性转化子先接种于 BMGY 培养基中培养 24 h, 再转接于诱导表达培养基 BMMY 中, 用 0.5% 甲醇进行诱导表达; 同时分别在 0、24、48、72 h 取 1 mL 菌液样品, 离心, 分别收集上清和菌体, 进行 SDS - PAGE 分析, 并设置空载体转化的重组菌株为空白对照。

1.8 *ISG15* 基因表达产物的纯化与活性检测

1.8.1 表达产物的纯化 取诱导表达 72 h 后的菌液离心, 12 000 r/min 离心 10 min, 先用超滤管浓缩上清液, 将浓缩液上样至 Ni - NTA 树脂; 用缓冲液和洗脱液进行洗脱, 洗脱下的目的蛋白放入透析袋中, 在 500 mmol/L Tris (pH 值为 7.6) 中透析过夜, 4 °C 下用聚乙二醇 20000 浓缩; 最后取 20 μ L 样品进行 SDS - PAGE 检测, 并测定蛋白含量。

1.8.2 表达产物的活性检测 通过颈静脉采集绵羊血液, 按照淋巴细胞分离液说明书方法分离外周血淋巴细胞, 将外周血淋巴细胞培养 24 h 后, 用 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L; 分别加入不同浓度的纯化产物 (5、10、20、40、80 μ g/mL), 每组设置 3 个复孔, 同时设置细胞对照组和 ConA 阳性对照组; 将 96 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 中孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h; 低速离心 10 min, 小心吸掉上清, 每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷, 室温振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪 (630 nm 校准) 测量各孔的吸光度 D_{570nm} 。

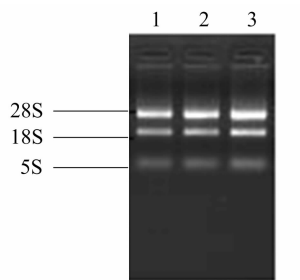
2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

对试验提取的新疆巴什拜羊外周血淋巴细胞的 RNA 进行电泳检测, 可见清晰的 5S、18S、28S 条带 (图 1), 表明 RNA 完整性好, 且无蛋白质和其他杂质污染。

2.2 *ISG15* 基因的克隆及 cDNA 全序列的获得

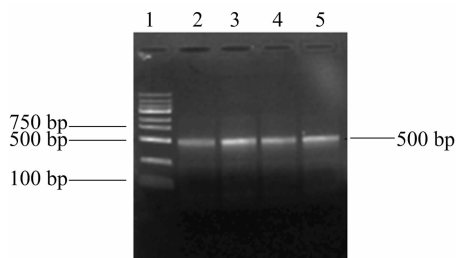
利用设计的特异性引物 5' GSP1、5' GSP2 和 3' GSP1、3' GSP2 分别扩增出 500 bp 的 5' RACE 产物和 560 bp 的 3' RACE 产物 (图 2、图 3)。扩增产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 并通过 DNAMAN 等软件对测序所得序列进行拼接分析, 最终得到了新疆巴什拜羊 *ISG15* 基因的 cDNA 全长序列。该基因的 cDNA 全长 646 bp, 其 5' 非编码区



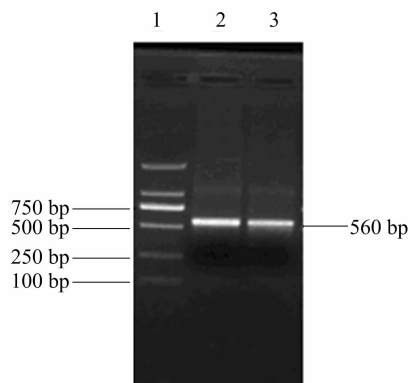
1~3—所提取RNA产物

图1 新疆巴什拜羊外周血淋巴细胞RNA电泳结果

为 91 bp, 3'非编码区为 81 bp, 开放阅读框为 474 bp, 编码 157 个氨基酸。将该基因在 NCBI 进行 BLAST 比对分析, 结果显示: 该基因与 GenBank 上公布的绵羊 (NM_001009735.1)、山羊 (HQ329184.1)、小尾寒羊 (FJ844480.1)、水牛 (HM543269.1)、牛 (BC102318.1)、野猪 (EU647216.1) 的基因序列同源性分别为 99%、98%、95%、94%、93%、82%。利用 DNASTar 软件分析推导可知新疆巴什拜羊 *ISG15* 基因的氨基酸序列与目前报道的山羊 (AEA36726.1)、绵羊 (ADB66167.1)、水牛 (AAZ38149.1)、牛 (NP776791.1)、野猪 (NP001121941.1)、人 (AAH09507.1)、小鼠 (NP056598.2) 的同源性分别为 99%、92%、89%、88%、73%、66%、62%。



1—DNA marker DL2503; 2~5—PCR产物

图2 巴什拜羊*ISG15*基因cDNA 5'末端的扩增

1—DNA marker DL2501; 2~3—PCR产物

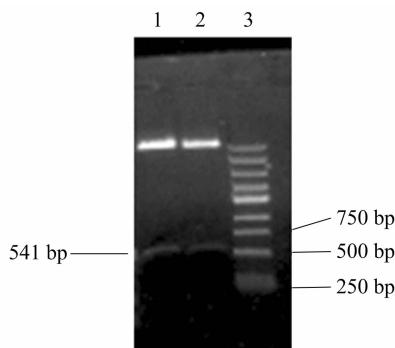
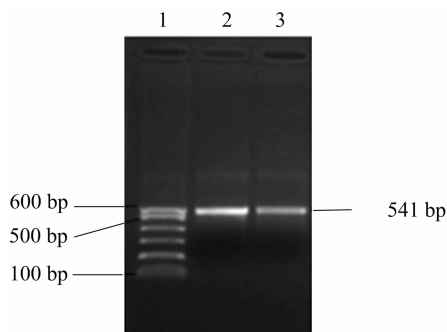
图3 巴什拜羊*ISG15*基因cDNA 3'末端的扩增

2.3 重组表达载体 pPIC9K-*ISG15* 的双酶切与 PCR 鉴定

重组表达型质粒 pPIC9K-*ISG15* 经 *Not* I、*Sna*B I 双酶切和 PCR 鉴定, 均得到了大小为 541 bp 的条带, 与预期片段大小相符合 (图 4, 图 5)。测序结果正确, 表明该基因已经正确插入到 pPIC9K 载体中。

2.4 重组菌株 GS115/pPIC9K-*ISG15* 的鉴定

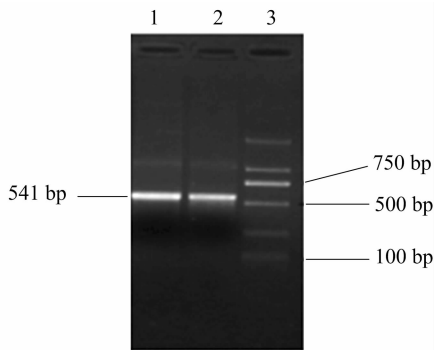
挑取 YPD-G418 平板上的单个菌落, 以重组菌株的

1~2—*Not* I和*Sna*B I酶切巴什拜羊pPIC9K-*ISG15*质粒产物;
3—DNA marker DL2503图4 重组质粒pPIC9K-*ISG15*的双酶切鉴定

1—DNA Mark I; 2~3—PCR产物

图5 重组质粒pPIC9K-*ISG15*的PCR鉴定

DNA 为模板, 进行 PCR 扩增鉴定, 可见阳性转化子条带大小为 541 bp, 与预期条带大小相符合 (图 6)。



1~2—PCR扩增产物; 3—DNA marker DL2501

图6 重组菌株GS115/pPIC9K-*ISG15*的鉴定

2.5 重组菌株 GS115/pPIC9K-*ISG15* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将重组菌株 GS115/pPIC9K-*ISG15* 经甲醇诱导表达后, 收集上清, 经过 SDS-PAGE 分析, 在约 33 ku 处出现条带, 与目的蛋白大小相符, 表明 *ISG15* 蛋白在毕赤酵母中成功表达 (图 7)。

2.6 重组菌株 GS115/pPIC9K-*ISG15* 表达产物的纯化

用 Ni^{2+} 螯合亲和层析法对表达产物进行纯化, 纯化产物经 SDS-PAGE 分析, 在约 33 ku 出现单一条带, 基本上无其他杂带, 表明目的蛋白纯化成功 (图 8)。

2.7 表达产物对淋巴细胞增殖的影响

通过 MTT 法检测巴什拜羊 *ISG15* 蛋白对淋巴细胞增殖

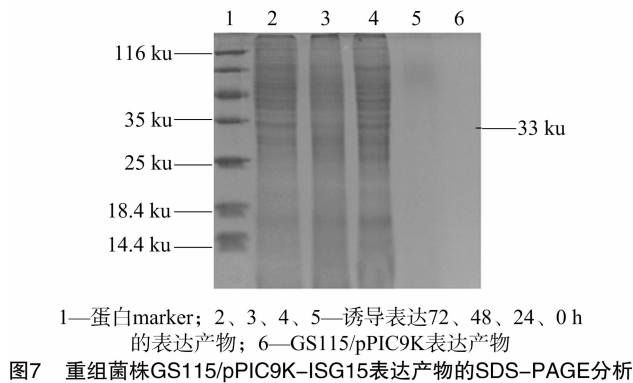


图7 重组菌株GS115/pPIC9K-ISG15表达产物的SDS-PAGE分析

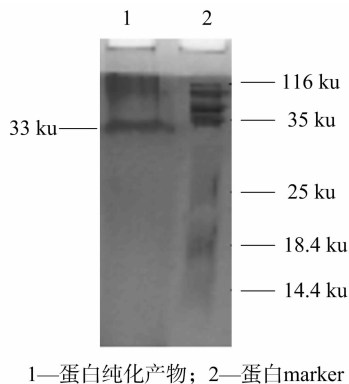


图8 重组菌株GS115/pPIC9K-ISG15表达产物的纯化

的效果,当加入的蛋白浓度为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,试验组淋巴细胞增殖效果与细胞对照组差异不显著($P>0.05$);当加入蛋白浓度为 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,试验组淋巴细胞增殖效果显著好于细胞对照组($P<0.05$)(表 1)。说明本试验表达、纯化的新疆巴什拜羊 ISG15 蛋白具有活性,可以刺激淋巴细胞增殖,并且随着 ISG15 蛋白浓度升高,淋巴细胞增殖作用增强。

表 1 巴什拜羊 ISG15 对淋巴细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别及浓度	$D_{570\text{ nm}}$
细胞对照(1640 培养基)	0.106 7 \pm 0.041 6a
ConA(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.177 0 \pm 0.125 3d
重组蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.105 7 \pm 0.100 7a
重组蛋白(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.107 0 \pm 0.060 0a
重组蛋白(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.112 0 \pm 0.036 1ab
重组蛋白(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.121 0 \pm 0.070 0b
重组蛋白(80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.143 7 \pm 0.260 5c

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

1986 年,人类 ISG15 的 cDNA 由 Blomstrom 等在 Daudi 细胞中克隆获得^[8]。ISG15 作为一种疾病抗性基因,在机体先天性免疫方面发挥着重要的作用。Takeuchi 等发现泛素样蛋白 ISG15 在抗病毒天然免疫中发挥着重要作用^[9]。已有报道表明,由 *E. coli* 表达人的重组类泛素 ISG15 在体外具有细胞因子样的功能,能够诱导 T 细胞表达 IFN- γ 并刺激自然杀伤细胞的增殖^[10-11]。Kim 等通过研究证实,ISG15 及其蛋白质共价修饰能够刺激细胞增殖^[12-13],本试验通过淋巴细胞转化试验对表达产物进行活性检测,结果与 Kim 等的报道

一致。

本研究利用 RACE 技术对新疆巴什拜羊 ISG15 基因全长 cDNA 序列进行扩增,并且成功获得了该基因的 cDNA 全长序列。此外,本研究成功构建了重组真核表达载体 pPIC9K-ISG15,并且成功实现了巴什拜羊 ISG15 在毕赤酵母中的分泌表达,但分泌表达量不高,诱导表达条件有待进一步优化。由于目的蛋白带有 his 标签,能够与 Ni^{2+} -NTA 树脂特异性结合,分离的目的蛋白纯度较高,而且 Ni^{2+} -NTA 树脂可再生反复利用。因此,本试验采用 Ni^{2+} 螯合亲和层析法对目的蛋白进行分离纯化。纯化产物经 SDS-PAGE 分析条带较为单一,表明本试验成功获得了 33 ku 大小的目的蛋白。本研究用淋巴细胞转化试验来检测纯化产物的活性,纯化产物能够刺激淋巴细胞增殖,表明表达产物具有活性,有望为后续深入研究巴什拜羊 ISG15 蛋白的功能奠定基础。

参考文献:

[1] Whitmarsh A J, Filamin B; a scaffold for interferon signalling[J]. EMBO Rep, 2009, 10(4): 349-351.

[2] Ritchie K J, Hahn C S, Kim K I, et al. Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection[J]. Nat Med, 2004, 10(12): 1374-1378.

[3] Reich N, Evans B, Levy D, et al. Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on upstream enhancer element[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(18): 6394-6398.

[4] 刘畅, 乔文涛, 王琛, 等. 类泛素蛋白 ISG15 及其在先天免疫中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(11): 1023-1029.

[5] 决青·阿尼瓦尔, 韩业东, 李齐发, 等. 巴什拜羊微卫星标记多态性及其与生长指标关联性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3425-3432.

[6] 宋雪梅. 小尾寒羊 5 个与繁殖和疾病抗性相关基因的克隆及比较基因组学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.

[7] 陈国华, 贾怀杰, 曾爽, 等. 猪 IL-2 基因在毕赤酵母中的高效表达及生物活性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(4): 551-556.

[8] Blomstrom D C, Fahey D, Kutny R, et al. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein: molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence[J]. J Biol Chem, 1986, 261(19): 8811-8816.

[9] Takeuchi T, Kobayashi T, Tamura S, et al. Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation[J]. FEBS Lett, 2006, 580(18): 4521-4526.

[10] D'Cunha J, Knight Jr E, Haas A L, et al. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(1): 211-215.

[11] Recht M, Borden E C, Knight E Jr. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma[J]. J Immunol, 1991, 147(8): 2617-2623.

[12] Kim K I, Zhang D E. ISG15, not just another ubiquitin-like protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 307(3): 431-434.

[13] Ritchie K J, Hahn C S, Kim K I, et al. Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection[J]. Nat Med, 2004, 10(12): 1374-1378.