



## 羚牛 *IFN- $\gamma$* 基因克隆、生物信息学分析与原核表达

柳 丽<sup>1</sup>,姚宇航<sup>1</sup>,刘晨阳<sup>1</sup>,张文涛<sup>1</sup>,马俊杰<sup>1</sup>,答林森<sup>1,2</sup>,成 功<sup>1,2</sup>

(1.西北农林科技大学 动物科技学院,陕西杨凌 712100;2.西北农林科技大学 国家肉牛改良中心,陕西杨凌 712100)

**摘 要** 旨在研究羚牛  $\gamma$  干扰素(*IFN- $\gamma$* )基因结构与功能,为进一步增强羚牛的免疫调节能力提供理论依据。通过 RT-PCR 方法克隆羚牛 *IFN- $\gamma$*  基因,并运用多种生物信息学分析工具对其结构与功能进行深入研究。将 *IFN- $\gamma$*  基因序列连入原核表达载体,并转化大肠杆菌诱导表达。结果显示,羚牛 *IFN- $\gamma$*  cDNA 序列全长 501 bp,编码 166 个氨基酸。蛋白高级结构预测结果显示,二级结构以  $\alpha$  螺旋为主,存在 13 个磷酸化修饰位点,并含有 1 个信号肽、1 个低度复杂区、1 个跨膜结构域及 1 个 *IFN- $\gamma$*  结构域,其中 *IFN- $\gamma$*  结构域位于胞外区。序列比对分析发现其与绵羊、山羊、家牛、水牛、人、黑猩猩、小鼠、鸡的核苷酸序列同源性分别为 99.0%、98.8%、97.2%、96.2%、75.8%、75.4%、64.1%、54.1%,氨基酸序列同源性分别为 99.4%、99.4%、95.8%、95.8%、62.7%、62.7%、43.9%、33.5%。系统进化树分析结果显示,羚牛与山羊、绵羊的亲缘关系最近。经 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测发现,重组 *IFN- $\gamma$*  蛋白以可溶性形式大量表达,分子质量约为 34 ku。通过密码子优化及不同浓度 IPTG 诱导表达等原核表达优化策略发现,密码子优化能促进重组蛋白的高效表达,且最佳诱导浓度为 0.9 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。

**关键词** 羚牛; *IFN- $\gamma$* ; 基因克隆; 生物信息学分析; 原核表达; IPTG 诱导

羚牛又称扭角羚,因其体形粗壮如牛,叫声似羚羊,故名羚牛。据估计,全球现存羚牛数量约为 7 000~12 000 头,是国家 I 级重点保护动物,被《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》列为易危级(UV)物种<sup>[1]</sup>。近年来随着人类活动范围的增加,羚牛适宜生境面积不断缩减<sup>[2]</sup>。在抵御病虫害方面,已在羚牛中发现 16 个寄生虫物种<sup>[3]</sup>,对羚牛的生存造成了极大的威胁。较其他反刍动物而言,羚牛对禽分枝杆菌亚种副结核也具有更高的易感性<sup>[4]</sup>。这些因素导致了羚牛免疫调节能力下降,给羚牛的保护带来了挑战。

干扰素(interferon, *IFN*)是天然免疫反应中的关键细胞因子。正常情况下, *IFN* 基因处于抑制状态。在特异性或非特异性诱生剂刺激下,激活一些与 *IFN* 基因活性相关的蛋白,从而解除 *IFN* 基因的抑制状态,启动 *IFN* 的转录和翻译。其本身不具有杀灭细菌病毒的能力,但能通过分泌信号级联反应诱导临近未感染细胞表达抗病毒蛋白,间接干扰病毒的复制<sup>[5]</sup>。按其受体类型

和功能特性可分为 I 型、II 型和 III 型干扰素。I 型干扰素在抗病毒、抗增殖反应以及调节细胞存活与凋亡等方面发挥着至关重要的作用, III 型干扰素具有抗病毒反应及黏膜免疫的功能<sup>[6]</sup>, II 型干扰素(也称为  $\gamma$  干扰素)则主要在免疫调节上发挥作用。 $\gamma$  干扰素与临近未被感染细胞的  $\gamma$  干扰素受体结合,通过 JAK-STAT 信号级联反应调控抗病毒蛋白的表达,阻止病毒基因的转录和翻译从而发挥抗病毒的作用<sup>[7]</sup>;它可以刺激树突状细胞的杀伤活性,促进 NO 等细胞毒性产物的释放,进而杀伤细胞内微生物<sup>[8]</sup>;它还能促进抗原呈递细胞表面 MHC 类分子表达,从而增强细胞免疫应答<sup>[9]</sup>;此外,  $\gamma$  干扰素还具有直接抑制肿瘤细胞增殖的效应<sup>[10]</sup>。在体外,  $\gamma$  干扰素制剂也逐渐成为动物疾病诊断与治疗的一种有效手段<sup>[11]</sup>。然而迄今为止关于羚牛的研究多集中在其活动节律、种群结构与生境利用等行为生态学方面<sup>[12-14]</sup>,关于分子遗传学的研究也多聚焦于线粒体基因组、肠道微生物等方面<sup>[15-16]</sup>,关于羚牛 *IFN- $\gamma$*  的

收稿日期:2024-01-26 修回日期:2024-03-05

基金项目:陕西省林业科技创新计划(SXLK2020-0301, SXLK2021-0102)。

第一作者:柳 丽,女,本科生,研究方向为动物遗传资源保护及分子育种。E-mail:liulixinong@163.com

通信作者:成 功,男,博士,副研究员,研究方向为动物功能基因组学及分子育种。E-mail:chenggong@nwfau.edu.cn

基因信息及其重组蛋白制备研究尚属空白。

本研究通过对羚牛 *IFN- $\gamma$*  进行基因克隆、生物信息学分析及原核表达,进一步研究羚牛  $\gamma$  干扰素的结构与功能,为后期生产羚牛  $\gamma$  干扰素免疫佐剂、增强羚牛免疫力及疾病治疗奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料及试剂

羚牛组织样来自秦岭大熊猫研究中心(陕西珍稀野生动物救助基地)。RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;PrimeScript RT Reagent Kit with DNA Eraser 反转录试剂盒、PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 酶、DNA 胶回收试剂盒、pMD19-T、DNA A-Tailing 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;pET-32a(+)载体、IPTG、细菌蛋白裂解液、考马斯亮蓝染色液、兔抗 6 $\times$ His 多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (HRP-IgG)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;超敏化学发光显色试剂盒购自 Uelandy 公司;12% Western blotting 快速制胶试剂盒购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考 GenBank 中羚牛近缘绵羊 *IFN- $\gamma$* (NM\_001009803.1)基因序列,在基因编码区两侧高度保守的区域设计一对特异性引物,引物序列为 *IFN- $\gamma$ -F*:5'-ACTCCGGCCTA-ACTCTCTCC-3';*IFN- $\gamma$ -R*:5'-GCAGGCAGGAGGACCATTA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取和 *IFN- $\gamma$*  基因克隆 采用 Trizol 试剂提取羚牛肝脏组织总 RNA,并反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系 25  $\mu$ L:上下游引物各 1  $\mu$ L,PrimeSTAR<sup>®</sup> Max 酶 12.5  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,补加灭菌水至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:98  $^{\circ}$ C 预变性 15 s;98  $^{\circ}$ C 变性 10 s;56  $^{\circ}$ C 退火 5 s;72  $^{\circ}$ C 延伸 6 s,共 33 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增结束后取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,确定目的片段的大小。采用 DNA 胶回收试剂盒回收特异性扩增的片段。

按照 TaKaRa DNA A-Tailing Kit 说明书在 PCR 产物的 3' 末端添加“A”尾,并与 pMD19-T 载体连接。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞 37  $^{\circ}$ C 培养过夜,然后挑单克隆送擎科生物技术有限公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 从 GenBank 中获取山羊、绵羊、水牛、家牛、人、黑猩猩、小鼠、鸡等物种 *IFN- $\gamma$*  基因的开放阅读框序列及氨基酸序列,利用 DNA Star-Meg Align 软件对扩增得到的羚牛及其他物种进行核苷酸及氨基酸同源性分析。利用 MEGA 7.0 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建 *IFN- $\gamma$*  基因在上述 9 个物种中的系统进化树,Bootstrap 重复值设置为 1 000。利用在线软件 NetPhos 3.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)对羚牛 *IFN- $\gamma$*  的氨基酸序列进行磷酸化位点预测分析。使用 Protean 软件以 Hopp-Woods 算法分析 *IFN- $\gamma$*  蛋白亲水性、Karplus-Schulz 算法分析蛋白柔韧性、Emini 算法分析蛋白表面可及性以及 Jameson-Wolf 算法分析蛋白抗原指数,并结合蛋白二级结构预测 *IFN- $\gamma$*  的 B 细胞抗原表位。用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/>)、SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)、SMART (<http://smart.embl.de/>)和 TMHMM Server v. 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测分析羚牛 *IFN- $\gamma$*  蛋白超二级结构、二级结构、三级结构、保守结构域以及跨膜结构。

1.2.4 羚牛 *IFN- $\gamma$*  原核表达 分析克隆得到的羚牛 *IFN- $\gamma$*  基因序列,对该序列进行密码子优化,并将优化前后的序列连接入 pET-32a(+)原核表达载体的 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点,分别命名为 pET32a-IFNG-wt 和 pET32a-IFNG-op。将上述质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞,培养过夜后挑取单个菌落至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37  $^{\circ}$ C,200 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 恒温摇床培养过夜。随后按 1:100(菌液:培养基)的体积比例扩大培养至菌液 OD<sub>600nm</sub> 值为 0.4~0.6。最后向菌液中加入终浓度为 0.3 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>、0.6 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>、0.9 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 IPTG,37  $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h。

1.2.5 重组蛋白的提取与鉴定 分别收集诱导前、诱导后 4 h 的菌液 1 mL,8 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 1 min,收集菌体沉淀。采用细菌蛋白裂解液裂解细菌,然后 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 于 4  $^{\circ}$ C 离心 5 min,吸取上清,通过 BCA 法测定蛋白浓度。将上清液按照 4:1 体积比加入蛋白上样缓冲液,于

100 °C 金属浴热变性 10 min 后进行 12% SDS-PAGE 电泳, 通过考马斯亮蓝染色, 鉴定重组蛋白的表达情况。

1.2.6 重组蛋白的 Western blot 鉴定 将提取的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印于 PVDF 膜上。转印后用 1×TBST 漂洗 2 次, 每次 10 min。加入封闭液, 室温封闭 2 h。封闭结束后用 1×TBST 漂洗 3 次。之后加入 1:4 000 倍稀释的 6×His 兔多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。用 1×TBST 漂洗 3 次后加入 1:5 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h。再用 1×TBST 漂洗 3 次, 取出 PVDF 膜, 用滤纸沥干水分, 按照 Super ECL Plus 超敏化学发光检测试剂盒说明书加入显色底物显色, ChemiDoc 化学发光成像系统进行蛋白成像。

## 2 结果与分析

### 2.1 羚牛 *IFN- $\gamma$* 基因克隆

通过 RT-PCR 方法特异性扩增得到羚牛肝组织 *IFN- $\gamma$*  mRNA 片段。经琼脂糖凝胶电泳检测发现, 在 500 bp 左右出现一条特异性条带(图 1)。对扩增产物回收并克隆至 T 载体, 测序结果显示, 羚牛 *IFN- $\gamma$*  扩增片段全长 501 bp, 编码 166 个氨基酸。核苷酸序列与 GenBank 公布的绵羊 *IFN- $\gamma$*  序列同源性为 99.0%, 说明成功克隆到羚牛 *IFN- $\gamma$*  基因。

### 2.2 生物信息学分析

2.2.1 *IFN- $\gamma$*  序列同源性分析 将羚牛 *IFN- $\gamma$*  核苷酸序列及氨基酸序列与 GenBank 中其他参

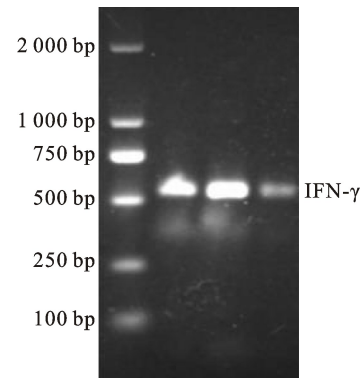


图 1 羚牛 *IFN- $\gamma$*  基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of takin *IFN- $\gamma$*  gene

考物种进行同源性比对(表 1), 结果表明羚牛与绵羊(NM\_001009803.1)、山羊(NM\_001285682.1)、家牛(NM\_174086.1)、水牛(NM\_001290905.1)等物种 *IFN- $\gamma$*  基因的序列同源性较高, 核苷酸序列同源性分别为 99.0%、98.8%、97.2%、96.2%, 氨基酸序列同源性分别为 99.4%、99.4%、95.8%、95.8%。与绵羊相比, 羚牛核苷酸序列存在 T9C、T318C、A350G、A399C、C482G 突变, 其中 A350G 为错义突变(K117R)。比对结果表明反刍动物间 *IFN- $\gamma$*  核苷酸及氨基酸序列具有高度的保守性。而羚牛与人(NM\_000619.3)、黑猩猩(NM\_001193665.1)、小鼠(NM\_008337.4)、鸡(NM\_205149.2)等物种 *IFN- $\gamma$*  的核苷酸同源性较低, 分别为 75.8%、75.4%、64.1%、54.1%, 氨基酸同源性分别为 62.7%、62.7%、43.9%、33.5%, 说明由于种属间的差异, 羚牛与亲缘关系较远的单胃动物的 *IFN- $\gamma$*  基因序列存在较大差异。

表 1 *IFN- $\gamma$*  基因核苷酸与氨基酸序列同源性比较

Table 1 Homology comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences of <i>IFN-<math>\gamma</math></i> gene										
序号 No.	物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	羚牛 <i>Budorcas taxicolor</i>		99.4	99.4	95.8	95.8	62.7	62.7	43.9	33.5
2	绵羊 <i>Ovis aries</i>	99.0		98.8	95.2	95.2	62.0	62.0	43.9	33.5
3	山羊 <i>Capra hircus</i>	98.8	99.0		95.2	95.2	62.0	62.0	43.9	33.5
4	家牛 <i>Bos taurus</i>	97.2	96.6	96.4		96.4	61.4	61.4	43.9	33.5
5	水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	96.2	96.0	95.8	97.4		60.8	60.8	43.2	32.3
6	人 <i>Homo sapiens</i>	75.8	75.2	75.0	75.2	75.0		99.4	40.6	28.6
7	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	75.4	74.9	74.7	74.9	74.7	99.2		40.6	28.6
8	小鼠 <i>Mus musculus</i>	64.1	64.5	63.5	63.7	62.4	63.5	63.2		24.8
9	鸡 <i>Gallus gallus</i>	54.1	53.7	53.7	53.5	53.3	50.4	50.0	50.0	

注: 右上角部分是 *IFN- $\gamma$*  基因氨基酸同源性, 左下角部分是 *IFN- $\gamma$*  基因核苷酸同源性。

Note: The upper right part shows the homology of the deduced amino acid sequences of *IFN- $\gamma$* , while the lower left part shows the homology of nucleotide sequences of *IFN- $\gamma$* .

2.2.2 基于 IFN- $\gamma$  氨基酸序列的物种系统进化树构建 IFN- $\gamma$  氨基酸序列在不同物种间的同源性有所差异,为了更加直观地展现不同物种间 IFN- $\gamma$  的进化关系,利用 MEGA 7.0 软件构建羚牛与其他物种 IFN- $\gamma$  氨基酸序列的系统进化树,结果如图 2。羚牛先与山羊聚为一类,然后再与绵羊、水牛、家牛、人、黑猩猩、小鼠、鸡等聚类。这

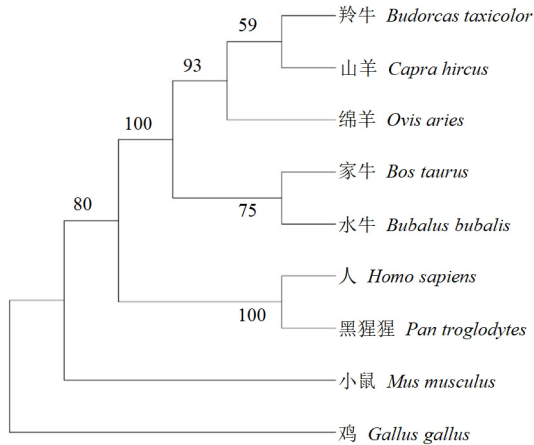


图 2 羚牛 IFN- $\gamma$  基因氨基酸序列系统进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of takin IFN- $\gamma$  gene

说明羚牛与山羊、绵羊的亲缘关系最近,其次是偶蹄目中的家牛、水牛,再是人 and 黑猩猩,然后是啮齿目的小鼠,与鸡的亲缘关系最远,这一结果符合物种进化规律,表明 IFN- $\gamma$  可作为构建物种系统进化树、反映物种间遗传进化关系的候选基因之一。

2.2.3 IFN- $\gamma$  蛋白磷酸化位点分析 磷酸化是真核生物蛋白质翻译后修饰的重要过程,具有调节蛋白质功能的作用。利用 NetPhos 3.1 Server 对 IFN- $\gamma$  蛋白磷酸化位点的预测结果显示(图 3、表 2),羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白上存在 13 个潜在的磷酸化修饰位点(评分 > 0.5),包括 12 个丝氨酸位点和 1 个酪氨酸位点。这些位点主要受到非特异性激酶(unsp, 8 个)、蛋白激酶(PKC, 5 个; PKA, 3 个; PKB, 2 个; PKG, 1 个)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK5, 1 个)、酪蛋白激酶(CK II, 1 个; CK I, 1 个)、p38MAPK(1 个)、CDC2(1 个)、ATM(1 个)、DNAPK(2 个)、RSK(2 个)等蛋白磷酸化激酶修饰。其中 DK I、CK II、CDC2、CDK5、DNAPK、p38MAPK、RSK 等激酶是细胞周期调控及 DNA 损伤修复过程中的关键激酶,提示 IFN- $\gamma$  蛋白的磷酸化修饰很有可能与细胞增殖调控有关。

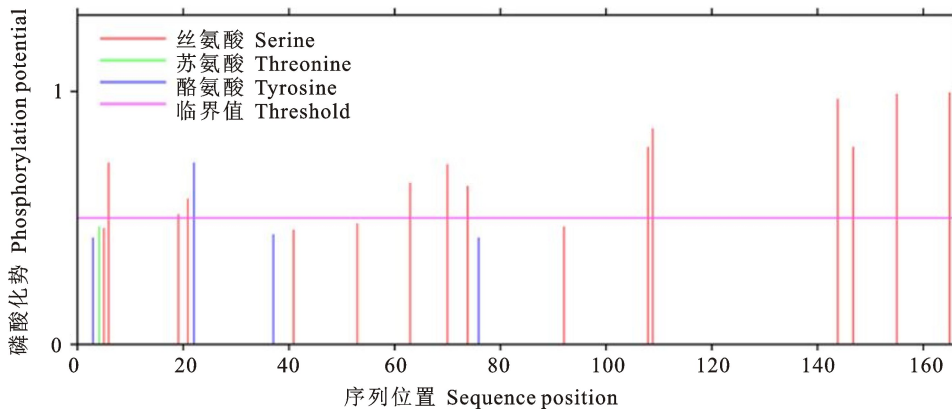


图 3 羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白磷酸化位点预测

Fig. 3 Phosphorylation site prediction of takin IFN- $\gamma$  protein

2.2.4 IFN- $\gamma$  蛋白质 B 细胞抗原表位预测 利用 Protean 软件对羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白亲水性、柔韧性、表面可及性、抗原指数进行分析,结果显示 IFN- $\gamma$  蛋白存在 6 个潜在的 B 细胞抗原表位(图 4),分别为 62~66、83~86、108~109、144~147、153~157、160~163 位氨基酸。

2.2.5 IFN- $\gamma$  蛋白质结构预测分析 应用 MEME 在线工具预测羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白超二级结构发现,羚牛与山羊、绵羊、家牛、水牛 IFN- $\gamma$  的

超二级结构高度保守(图 5),均存在 4 个相似的模体(motif)。在人与黑猩猩中均存在 3 个相似的模体。而在小鼠和鸡中模体差异较大,尤其是鸡,与羚牛没有相似的 motif。蛋白二级结构预测结果显示羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白二级结构主要由  $\alpha$  螺旋构成,中间夹杂有无规则卷曲(33.13%)、少量延伸链(3.01%)与  $\beta$  转角(3.61%)(图 6-A)。蛋白三级结构模拟结果如图 6-C 所示,该蛋白主要由  $\alpha$  螺旋构成,与二级结构预测结果基本一致。随

表 2 磷酸化位点预测结果  
Table 2 Prediction results of phosphorylation sites

序号 No.	磷酸化位点 Phosphorylation		激酶(得分) Kinase(score)
	位置 Position	氨基酸 Amino acids	
1	6	丝氨酸 Serine(S)	PKC(0.713)、PKA(0.523)
2	19	丝氨酸 Serine(S)	cdc2(0.511)
3	21	丝氨酸 Serine(S)	PKC(0.572)、CKI(0.515)、unsp(0.717)
4	22	酪氨酸 Tyrosine(Y)	unsp(0.717)
5	63	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.636)、PKC(0.517)
6	70	丝氨酸 Serine(S)	PKC(0.711)、ATM(0.611)、DNAPK(0.608)
7	74	丝氨酸 Serine(S)	PKC(0.622)
8	108	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.778)
9	109	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.849)、CKII(0.555)
10	144	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.976)、p38MAPK(0.591)、cdk5(0.516)
11	147	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.778)
12	155	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.986)、PKA(0.829)、PKG(0.707)、PKB(0.597)、RSK(0.572)、DNAPK(0.554)
13	165	丝氨酸 Serine(S)	unsp(0.993)、PKA(0.809)、PKB(0.802)、RSK(0.678)

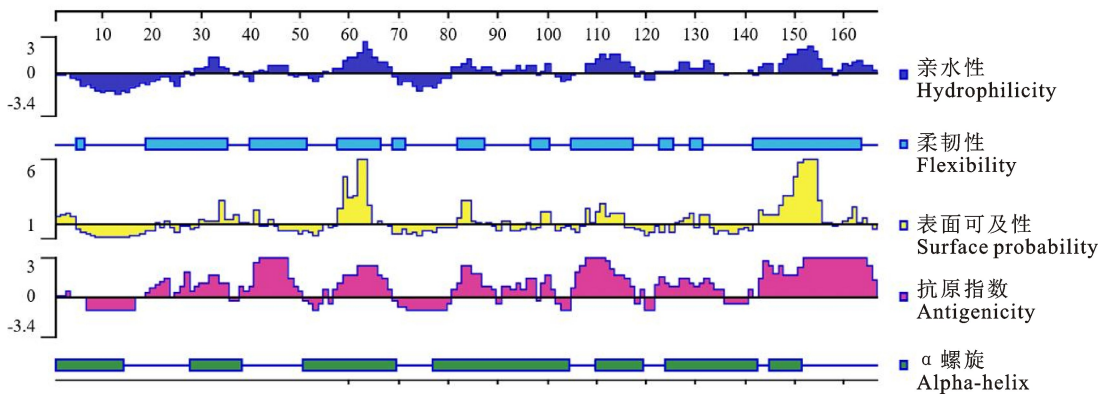


图 4 *IFN-γ* 氨基酸序列的 B 细胞多参数分析

Fig. 4 Multiple parameters analysis of *IFN-γ* amino acid sequence in B cells

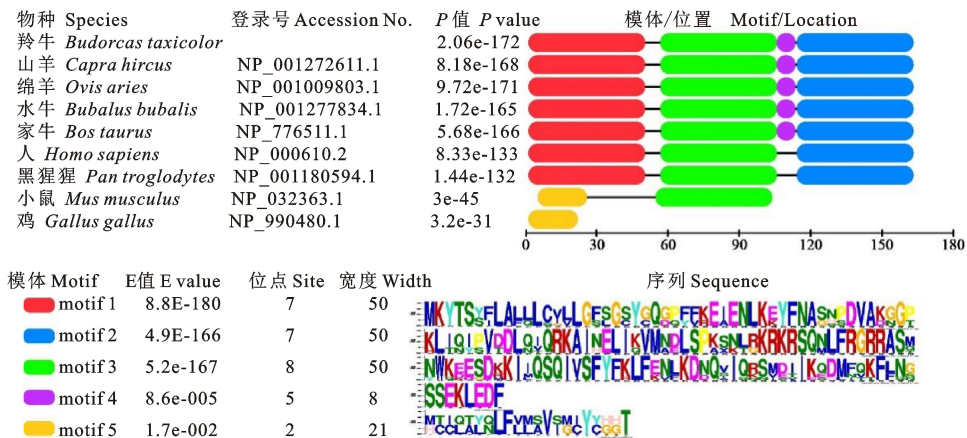
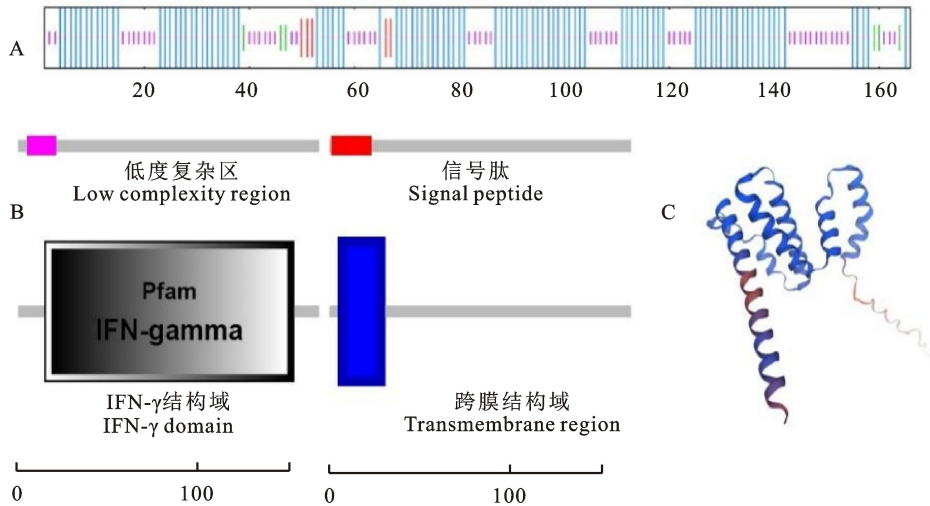


图 5 不同物种 *IFN-γ* 蛋白模体预测

Fig. 5 Motif prediction of *IFN-γ* protein in different species

后对羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白结构域进行分析发现,其含有 1 个低度复杂区(5~21 位氨基酸)、1 个跨膜结构域(7~28 位氨基酸)、1 个信号肽结构域(1~23 位氨基酸)以及 1 个 IFN- $\gamma$  结构域(15~152 位氨基酸)(图 6-B)。由此可知,IFN- $\gamma$  是分泌蛋白且存在跨膜结构,经过翻译后修饰过程分泌到

细胞外发挥其生物学功能。进一步用 TMHMM Server v. 2.0 对跨膜结构进行分析,发现蛋白存在一个跨膜结构,其 1~6 位氨基酸为胞内区域,7~28 位氨基酸为跨膜区域,28~166 位氨基酸为胞外区域,该区域即为 IFN- $\gamma$  成熟肽序列(图 7)。



A. IFN- $\gamma$  蛋白二级结构,线条从长到短依次代表  $\alpha$  螺旋、延伸链、 $\beta$  转角和无规则卷曲; B. IFN- $\gamma$  蛋白结构域; C. IFN- $\gamma$  蛋白三级结构

A. The secondary structure of IFN- $\gamma$  protein. The lines represent alpha helix, extended chain, beta turn and random coil, by the length, respectively; B. The domain structure of IFN- $\gamma$  protein; C. The tertiary structure of IFN- $\gamma$  proteins

图 6 IFN- $\gamma$  蛋白二级结构和三级结构预测

Fig. 6 Predictions of secondary structure and tertiary structure of IFN- $\gamma$  protein

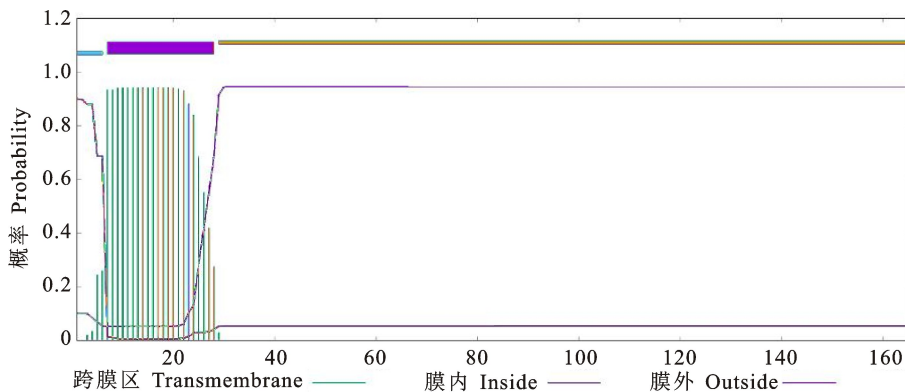


图 7 IFN- $\gamma$  蛋白跨膜结构

Fig. 7 Transmembrane structure of IFN- $\gamma$  protein

### 2.3 重组质粒构建及测定

对测序得到的羚牛 IFN- $\gamma$  基因序列进行密码子优化,将优化前后的序列分别连接入 pET-32a(+ )载体,经过生物合成得到重组质粒。并根据重组质粒的测序结果,利用 DNAMAN 软件对重组质粒进行酶切位点分析发现,IFNG-*wt* 和 IFNG-*op* 基因序列正确连入 pET-32a(+ )载体,

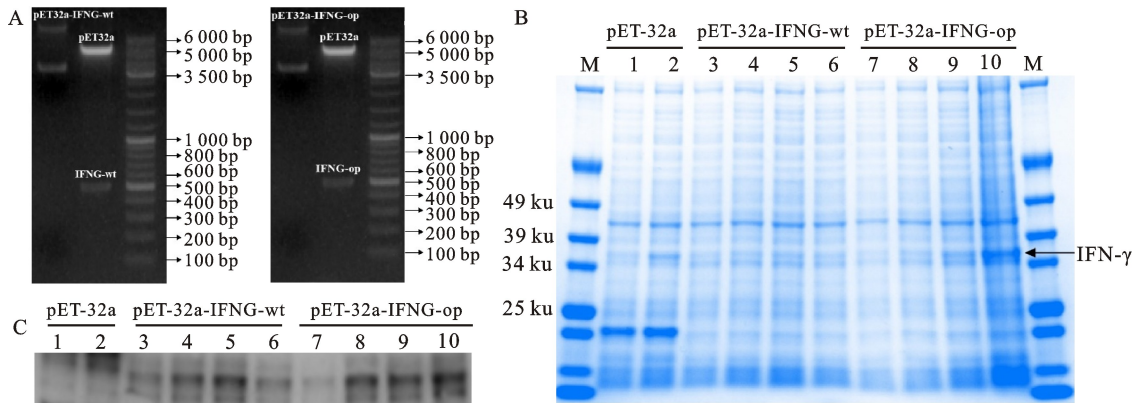
经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切可得到 507 bp 目的基因条带和 5.8k bp 的载体条带(图 8-A),说明原核表达载体构建成功。

### 2.4 重组蛋白的鉴定

利用 IPTG 诱导重组蛋白表达,经 SDS-PAGE 分析发现,重组的融合蛋白在 34 ku 处出现特异性条带(图 8-B),与预测结果一致。West-

ern blot 鉴定结果表明, 重组的融合蛋白与  $6 \times$  His 多克隆抗体结合, 在 34 ku 处有特异性条带 (图 8-C), 在原核表达系统中正确表达。此外, Western blot 结果显示密码子未优化组蛋白表达量随着 IPTG 浓度的升高呈现出先增加后降低的

趋势, 在  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处达到最高。而密码子优化组中 IPTG 浓度越高蛋白表达量越多, 最佳诱导浓度为  $0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。整体而言, IFNG-op 蛋白表达量较 IFNG-wt 有所增加, 说明密码子优化能够促进重组蛋白在大肠杆菌中的表达。



A. 重组质粒双酶切鉴定; B. 重组蛋白 SDS-PAGE 鉴定; C. 重组蛋白 Western blot 鉴定; 1. 未诱导; 2.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 3. 未诱导; 4.  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6.  $0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 7. 未诱导; 8.  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 9.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 10.  $0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

A. Dual-enzyme digestion of recombinant plasmid; B. SDS-PAGE detection of recombinant protein; C. Western-blot detection of recombinant protein; 1. Not induced; 2.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 3. Not induced; 4.  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6.  $0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 7. Not induced; 8.  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 9.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 10.  $0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 8 重组质粒双酶切鉴定及重组蛋白的鉴定

Fig. 8 Dual-enzyme digestion of recombinant plasmid and detection of recombinant protein

### 3 讨论

IFN- $\gamma$  作为天然免疫佐剂, 能够增强疫苗的免疫效果<sup>[17]</sup>, 在抗细菌感染等方面也具有广阔的应用前景<sup>[18]</sup>。然而天然 IFN- $\gamma$  含量极少, 并且存在较强的种属特异性<sup>[19]</sup>, 使用其他物种的 IFN- $\gamma$  免疫制剂治疗羚牛的疾病可能会引发不良反应。因此利用基因工程技术研究与开发羚牛 IFN- $\gamma$  对羚牛保护工作的开展是十分必要的。

本研究成功克隆到羚牛 IFN- $\gamma$  cDNA 序列, 对该序列进行分析发现, 其核苷酸和氨基酸序列比较保守, 尤其与山羊、绵羊、家牛、水牛等反刍动物同源性较高。蛋白空间结构上, 反刍动物 IFN- $\gamma$  蛋白以  $\alpha$  螺旋为主, 存在一个信号肽、跨膜区、低度复杂区以及 IFN- $\gamma$  结构域, 4 个 motif 高度保守。相反地, 在人、黑猩猩、小鼠、鸡等物种中由于与羚牛存在种属变异, 其 IFN- $\gamma$  蛋白结构存在较大差异, 并且随着亲缘关系的疏远, 蛋白结构差异越大, 这与前人的研究一致<sup>[20]</sup>。根据蛋白 B 细胞抗原表位参数筛选得到 6 个抗原表位, 与温贵兰等<sup>[20]</sup> 在猪上的报道结果大致相同, 为研究 IFN- $\gamma$  与 B 细胞相互作用提供了依据, 也为后续

开发和利用羚牛 IFN- $\gamma$  抗体提供参考。羚牛 IFN- $\gamma$  蛋白共发现 13 个磷酸化修饰位点, 主要受细胞周期调控相关激酶修饰, 推测 IFN- $\gamma$  可能受到这些位点的磷酸化并参与细胞增殖调控<sup>[21]</sup>。进一步对不同物种磷酸化位点变异进行分析, 第 19、21、108、109、147 位的丝氨酸(S)在人、黑猩猩、小鼠、鸡等物种中均发生了突变, 导致该处磷酸化位点丢失, 而该位点在牛、山羊、绵羊、水牛、家牛上均有所体现, 很有可能是反刍动物所特有的位点。综合以上结果, 推测反刍动物 IFN- $\gamma$  蛋白翻译后修饰、跨膜转运、JAK-STAT 信号转导及诱导抗原呈递等机制类似, 因此可以将其他物种 IFN- $\gamma$  的研究方法应用于羚牛中, 以期对羚牛 IFN- $\gamma$  的研究和保护提供启示与借鉴。

在分类学上, 对羚牛的归属仍然存在争议。Li 等<sup>[22]</sup> 构建的线粒体基因组水平的系统进化树显示羚牛大概在 1006 万年前从绵羊和山羊的祖先中分离出来。任轶等<sup>[23]</sup> 将羚牛 *Cyt b* 基因与山羊、绵羊、麝牛属动物进行序列分析并构建了系统发育进化树, 发现羚牛与绵羊的亲缘关系最密切, 其次是山羊、麝牛。而 Zhou 等<sup>[24]</sup> 报道了羚牛完整线粒体基因组, 根据其 10 个蛋白质编码基因

和2个rRNA基因重建了13个牛科代表物种的系统发育进化树,发现羚牛与山羊属、岩羊属的亲缘关系比盘羊属更亲近。本研究通过NJ法构建了IFN- $\gamma$ 在羚牛与其他物种中的系统发育进化树,发现羚牛先与山羊聚类,再与绵羊分支合并。这一结果为与绵羊相比羚牛与山羊亲缘关系更近的观点提供了支撑依据。

本研究在对羚牛IFN- $\gamma$ 进行原核表达时,采用了pET-32a(+)载体,并以大肠杆菌为宿主进行诱导表达。由于大肠杆菌遗传背景明了清晰,且具有成本低廉、易于培养、表达稳定等优点<sup>[25]</sup>,基因工程中广泛使用大肠杆菌等原核表达系统来表达外源蛋白<sup>[26]</sup>。李小凤等<sup>[27]</sup>采用大肠杆菌表达水牛IFN- $\gamma$ 发现重组目的蛋白以可溶性形式大量表达。Ma等<sup>[28]</sup>通过构建原核表达重组载体,正确表达出了山羊IFN- $\gamma$ 重组蛋白,并制备了针对山羊IFN- $\gamma$ 的单克隆抗体。考虑到真核细胞和原核细胞密码子偏好性不同,本研究对羚牛IFN- $\gamma$ 基因密码子进行了优化,探讨密码子优化前后重组蛋白表达量是否有差异。此外,研究显示诱导浓度对原核表达的影响也不可忽视<sup>[29]</sup>。为了进一步提高重组蛋白的表达量,本研究设置了不同IPTG诱导浓度以探索羚牛IFN- $\gamma$ 基因的最佳诱导浓度。结果表明,重组目的蛋白以可溶性形式正确表达,优化组蛋白表达量比未优化组高,并且在 $0.9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG诱导下优化的IFN- $\gamma$ 蛋白表达量可达到最高水平。猜测密码子优化可能通过影响IFN- $\gamma$ 基因mRNA稳定性、翻译延伸速率等方式,有效提高了外源蛋白原核表达的效率<sup>[30]</sup>。

## 4 结论

本研究通过RT-PCR方法成功克隆到羚牛IFN- $\gamma$ 基因mRNA序列,全长501 bp,编码166个氨基酸。生物信息学分析发现IFN- $\gamma$ 序列及结构在反刍动物中高度保守,与绵羊相比IFN- $\gamma$ 核苷酸序列同源性达99%,存在4个同义突变和1个错义突变(K117R);羚牛IFN- $\gamma$ 蛋白是分泌蛋白,主要由 $\alpha$ 螺旋构成,含有一个跨膜结构,与绵羊、山羊、家牛、水牛等反刍动物具有4个相似的motif,受到CDK5、DNAPK、p38MAPK、RSK等多种细胞周期调控相关激酶的磷酸化修饰,经多个抗原指数分析筛选到6个B细胞抗原表位区域。构建的原核表达载体经IPTG诱导,IFN- $\gamma$

重组蛋白以可溶性形式正确表达,密码子优化后重组蛋白最佳诱导浓度为 $0.9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 参考文献 Reference:

- [1] 李安宁,邱菊,郑燕,等.秦岭羚牛的保护生物学研究进展[J].西北农业学报,2021,30(8):1113-1121.
- [2] CUI X Y, TANG J F, ZHANG Q, et al. Spatio-temporal variations in takin (*Budorcas tibetanus*) habitats in the five mountains of Sichuan, China[J]. *Global Ecology and Conservation*, 2023, 42: e02390 [2023-1-26]. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02390>.
- [3] 刘世修.中国羚牛的寄生虫名录[J].野生动物,1994(6):38-39.
- [4] NAYLOR A D, RICHARDSON D, SELLAR M, et al. Clinical signs, antemortem diagnostics, and pathological findings associated with *Mycobacterium Avium* Subspecies *Paratuberculosis* infection in Mishmi takin (*Budorcas taxicolor taxicolor*) [J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2018, 49(2):412-419.
- [5] MERTOWSKA P, SMOLAK K, MERTOWSKI S, et al. Immunomodulatory role of interferons in viral and bacterial infections [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(12): 10115 [2023-6-14]. <http://doi:10.3390/ijms241210115>.
- [6] 庞立丽,段招军,罗迪贤,等.干扰素作用机制的研究进展[J].皮肤科学通报,2021,38(6):485-491,2.
- [7] DING G Y, ZHENG CH W, WANG B, et al. Transcriptome sequencing reveals the antiviral innate immunity by IFN- $\gamma$  in Chinese sturgeon macrophages [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13:854689 [2022-3-17]. <http://doi:10.3389/fimmu.2022.854689>.
- [8] LACASSE C J, JANIKASHVILI N, LARMONIER C B, et al. Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN- $\gamma$ -dependent mechanism [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 187(12):6310-6317.
- [9] JIANG Y R, YAO J W, YAO ZH X, et al. CD4 T cells in chronic myeloid leukemia present MHC class II-dependent and IFN- $\gamma$ -dependent cytotoxic capacity [J]. *Medical Oncology*, 2023, 40(9): 253 [2023-7-27]. <http://doi:10.1007/s12032-023-02123-5>.
- [10] MATSUSHITA H, HOSOI A, UEHA S, et al. Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN $\gamma$ -dependent cell-cycle arrest [J]. *Cancer Immunology Research*, 2015, 3(1):26-36.
- [11] 刘蒙达,王晓文,张皓博,等. $\gamma$ 干扰素体外释放试验在人和动物结核病诊断中的研究进展[J].中国兽医杂志,2023,59(3):91-97.
- [12] 成功,任宏涛,陈嘉玥,等.陕西秦岭地区珍稀野生动物保护研究现状及保护对策[J].陕西林业科技,2020,48(6):74-79.
- [13] 管晓,瞿桂英,唐卓,等.卧龙国家级自然保护区羚牛种群结构研究[J].四川林业科技,2021,42(2):33-39.



- [14] 陈超, 和晓阳, 薛亚东. 云南高黎贡山国家级自然保护区羚牛生境选择[J]. 林业资源管理, 2019(4): 151-158.
- [15] KUMAR A, GAUTAM K B, SINGH B, *et al.* Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genome of Mishmi takin (*Budorcas taxicolor taxicolor*) and comparison with the other Caprinae species[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 87-94.
- [16] 兰阿峰, 杨曼, 郭素芬, 等. 野生秦岭羚牛瘤胃产甲烷古菌多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 88-91.
- [17] 涂浩, 赵星灿, 杨占娜, 等. 猪重组 IL-2、IL-4 和 IFN- $\gamma$  对蹄疫合成肽疫苗的免疫增强作用研究[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(8): 1390-1399.
- [18] LIU Y, ZHANG H Y, DONG SH SH, *et al.* Secretion of IFN- $\gamma$  by transgenic mammary epithelial cells *in vitro* reduced mastitis infection risk in goats[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 89863 [2022-6-24]. <http://doi:10.3389/fvets.2022.898635>.
- [19] 丰宗洋, 陈书明. 干扰素的研究及应用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(S1): 47-51.
- [20] 温贵兰, 陈绍品, 张升波, 等. 从江香猪  $\gamma$  干扰素基因克隆与序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(6): 1437-1446.
- [21] KULKARNI A, SCULLY T J, O'DONNELL L A. The antiviral cytokine interferon-gamma restricts neural stem/progenitor cell proliferation through activation of STAT1 and modulation of retinoblastoma protein phosphorylation[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, 95(8): 1582-1601.
- [22] LI A N, YANG Q M, LI R, *et al.* Chromosome-level genome assembly for takin (*Budorcas taxicolor*) provides insights into its taxonomic status and genetic diversity. [J]. *Molecular Ecology*, 2022, 32(6): 1323-1334.
- [23] 任轶, 冯慧, 冯成利, 等. 应用线粒体 DNA 序列探讨羚牛分类地位[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(5): 481-484.
- [24] ZHOU M, YU J J, LI B, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Budorcas taxicolor tibetana* (Artiodactyla: Bovidae) and comparison with other Caprinae species: Insight into the phylogeny of the genus *Budorcas*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 121: 223-232.
- [25] YIN J CH, LI G X, REN X F, *et al.* Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 127(3): 335-347.
- [26] 徐菁昱, 刘艳芬, 陈绍红, 等. 山羊  $\alpha$ -干扰素基因克隆、原核表达及其抗病毒活性研究[J]. 西北农业学报, 2023, 32(8): 1151-1158.
- [27] 李小凤, 谢芝勋, 武晓倩, 等. 水牛  $\gamma$  干扰素的原核表达及其抗病毒活性[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(14): 124-128, 140.
- [28] MA W T, LIU Q, NING M X, *et al.* Development and applications of a monoclonal antibody against caprine interferon-gamma[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 102 [2019-12-23]. <http://doi:10.1186/s12896-019-0596-5>.
- [29] 杨领弟, 李小梅, 芦晓鸥, 等. 猴痘病毒 B20R 蛋白原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 南方农业学报, 2024, 55(1): 217-225.
- [30] 汪梦竹, 胡欣妍, 杨宣叶, 等. 同义密码子使用模式对多肽链共翻译折叠的影响研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3146-3158.

## Cloning, Bioinformatics Analysis and Prokaryotic Expression of *IFN- $\gamma$* Gene in Takin

LIU Li<sup>1</sup>, YAO Yuhang<sup>1</sup>, LIU Chenyang<sup>1</sup>, ZHANG Wentao<sup>1</sup>,  
MA Junjie<sup>1</sup>, ZAN Linsen<sup>1,2</sup> and CHENG Gong<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. National Beef Cattle Improvement Centre of Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

**Abstract** The objective of this study was to explore the structure and function of the interferon  $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) gene in takin, with the aim of providing a theoretical basis for enhancing the immune regulation capacity of this species. In this study, the *IFN- $\gamma$*  gene of takin was cloned via RT-PCR, a comprehensive analysis of its structure and function were conducted using variety of bioinformatics tools. The *IFN- $\gamma$*  gene sequence was connected to the prokaryotic expression vector and transformed into *E. coli* to induce its expression. The results showed that the *IFN- $\gamma$*  cDNA sequence of takin was 501 bp in length and encoded 166 amino acids. The prediction of the protein's higher order structure showed that the secondary structure was dominated by  $\alpha$  helix, with 13 phosphorylation modification sites, a signal peptide, a low-grade complex region, a transmembrane domain and an *IFN- $\gamma$*  domain. The *IFN- $\gamma$*  domain is located in the extracellular region. Sequence alignment analysis showed that the nucleotide sequence homology with sheep, goat, cattle, buffalo, human, chimpanzee, mouse and chicken was 99.0%, 98.8%, 97.2%, 96.2%, 75.8%, 75.4%, 64.1%, and 54.1%, respectively. The amino acid sequence homology was 99.4%, 99.4%, 95.8%, 95.8%, 62.7%, 62.7%, 43.9%, and 33.5%, respectively. The result of the phylogenetic tree analysis also showed that takin was most closely related to goats and sheep. SDS-PAGE and Western-blot showed that the recombinant *IFN- $\gamma$*  protein was abundantly expressed in soluble form with a molecular weight of about 34 ku. Through optimization strategies for prokaryotic expression, such as codon optimization and IPTG induction expression at different concentrations, it was found that codon optimization promoted the efficient expression of recombinant proteins, and the optimal induction concentration was determined to be 0.9 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. This study lays a foundational understanding for comprehensive functional exploration of *IFN- $\gamma$*  gene in takin, as well as the potential application of interferon  $\gamma$  in takin. These findings provide novel insights into takin conservation efforts.

**Key words** Takin; *IFN- $\gamma$* ; Gene cloning; Bioinformatics analysis; Prokaryotic expression; IPTG induction

**Received** 2024-01-26

**Returned** 2024-03-05

**Foundation item** Forestry Science and Technology Innovation Program of Shaanxi Province (No. SX-LK2020-0301, No. SXLK2021-0102).

**First author** LIU Li, female, undergraduate. Research area: conservation of animal genetic resources and molecular breeding. E-mail: liulixinong@163.com

**Corresponding author** CHENG Gong, male, Ph. D, associate research fellow. Research area: animal functional genomics and molecular breeding. E-mail: chenggong@nwafu.edu.cn

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)