

非洲爪蟾 IL-6 基因的克隆及 生物信息学分析

齐志涛^{1,2,3} 张启焕³ 王资生¹ 许伟³ 黄贝² 王爱民¹

(¹盐城工学院海洋技术系 江苏省沿海池塘养殖生态重点实验室, 盐城 224051)

(²中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

(³盐城工学院化学与生物工程学院 生物实验中心, 盐城 224051)

摘要: 生物信息学作为一门新兴学科,已经应用到生命科学、临床医学、工农业等方面。白细胞介素-6(IL-6)是机体重要的免疫因子,但在两栖类中未见报道。采用生物信息学方法对两栖类模式动物非洲爪蟾 IL-6 进行分析。以人 IL-6 基因对非洲爪蟾数据库进行搜索、分析,并采用 RT-PCR 方法对所得序列进行验证。结果表明,非洲爪蟾 IL-6 基因位于 scaffold_52 基因架上,具有保守的 IL-6 家族基序。采用生物信息新方法进行不同物种的免疫基因挖掘、克隆,是一种有效的方法。

关键词: 生物信息学 非洲爪蟾 白细胞介素-6 基因克隆

Cloning and Bioinformatics Analysis of the Interleukin-6 Gene from *Xenopus tropicalis*

Q i Zhitao^{1,2,3} Zhang Q ihuan³ Wang Z isheng¹ Xu Wei³ Huang Bei² Wang A im in¹

(¹Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Key Laboratory of Aquaculture and Ecology of Coastal Pool of Jiangsu Province, Yancheng 224051; ²State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences Wuhan 430072; ³Central Laboratory of Biology, Chemical and Biological Engineering College

Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051)

Abstract Bioinformatics, as a new developing science, has been applied in life science, clinical medicine, industry and agriculture. Interleukin-6 is an important immune cytokine; however, there have been no report on the IL-6 gene from amphibian. The IL-6 gene from the amphibian model animal *Xenopus tropicalis* was analyzed firstly using bioinformatics methods. Using BLAST analysis with the human IL-6 sequence, the *Xenopus tropicalis* genome database was searched and analyzed, then the obtained xIL-6 sequence was verified using RT-PCR. Results showed that the *Xenopus* IL-6 was located on scaffold_52 and contained conserved IL-6 family motif. The research proved that bioinformatics methods is a convenient technique for cloning new immune genes.

Key words Bioinformatics *Xenopus tropicalis* Interleukin-6 Gene clone

白细胞介素 (Interleukin, IL)-6 是机体先天性免疫反应中重要的多功能因子,对淋巴细胞、造血干细胞、中枢神经系统具有促进生长、诱导分化的功能^[1,2]。此外,IL-6 还可以促进 B 淋巴细胞分化和抗体的分泌,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞活化,具有增强免疫的作用^[3,4]。目前,IL-6 已在人、鼠和硬骨

鱼等物种中报道^[5,6]。然而,在动物进化过程中具有重要地位的两栖类中未见 IL-6 基因的相关报道。本研究以两栖类模式动物——非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 为研究对象,首次对其 IL-6 进行了克隆,同时采用生物信息学的方法分析了 xIL-6 基因序列特征。

收稿日期: 2010-06-30

基金项目: 2010 年江苏省省属高校自然科学研究项目 (10KJB240001), 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室重点开放课题 (BZ2007-06)

作者简介: 齐志涛,男,博士,副教授,研究方向: 水产动物疾病与免疫学; E-mail: qizhitao@ycit.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Trizol试剂和反转录酶 Super-Script™ II Reverse Transcriptase购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit购自 Fermentas 公司; SMART cDNA synthesis Kit 购自 Clontech 公司; 质粒提取试剂盒 (E.Z.N.A™ Plasmid mini kit)和胶回收试剂盒 (E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit) 购自 Omega 公司; pMD18-T 载体和 DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 试验动物 试验用非洲爪蟾购自中国科学院遗传与发育生物学研究所。运回实验室后定期投放猪肝饲养。水温保持在 37℃ 左右。通过捣碎脊髓方法处死, 选取组织放入 1 mL Trizol 中, 置于 -80℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 非洲爪蟾基因组搜索 以人 IL-6 基因蛋白质序列 (GenBank 登录号: NP_000591) 对非洲爪蟾基因组数据库 (http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html) 进行 tBlastp 搜索, 得到一系列基因组序列, 对得到的序列中相似度最高 (Identity > 40%) 的 Scaffold_52 进行 Genscan 结构预测, 之后对预测结构进行 tBLASTn 和 BLASTp 分析。

1.2.2 总 RNA 提取及反转录合成单链 cDNA 采用 Trizol 提取 RNA。将 -80℃ 保存的组织取出, 冰上解冻、匀浆。室温静置 10 min 离心 (11 400 r/min, 10 min, 4℃); 取上清, 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈摇动 15 s 室温静置 3 min 离心 (11 400 r/min, 15 min, 4℃); 取上清, 转移到干净的离心管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 室温静置 10 min 离心 (10 400 r/min, 10 min, 4℃)。沉淀用 75% 乙醇洗涤后, -80℃ 保存在 100% 乙醇中。用前通过凝胶电泳检测 RNA 样品质量。按 SMART cDNA Synthesis Kit 操作手册进行 cDNA 合成。

1.2.3 xeIL-6 基因部分序列的扩增 根据 scaffold_52 的预测结果, 采用 Primer Premier 5.0 设计了 xeIL-6 特异性引物。上游引物 xeIL-6F: 5'-TTGGTGTGGCATCCCTG-3', 下游引物 xeIL-6R: 5'-TTTGTGACTCGCTGTCTCCA-3'。所用的引物由上海

生工生物工程公司合成。以 PolyI C 诱导的非洲爪蟾脾脏组织的 SMART cDNA 为模板, 扩增 xeIL-6 cDNA 片段。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的回收、测序 将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下含目的 DNA 片段的胶条, 使用 Omega 公司的凝胶回收试剂盒回收 DNA, 回收步骤按试剂盒推荐进行。将回收得到的目的基因片段与 pMD18-T 载体连接, 16℃ 反应过夜。取连接产物 5 μL 转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞。通过特异性引物筛选阳性克隆。阳性菌液送北京奥科生物科技有限公司测序。

1.2.5 生物信息学分析 利用 ExPASy 网站 (<http://www.expasy.org>) 中的 Translate 程序进行氨基酸序列推导。使用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 的 tBLASTp 软件进行同源基因的搜索; 用 PROSITE 预测氨基酸可能含有的结构域及 N-糖基化位点。氨基酸的多序列比对使用 ClustalW 1.83 分析^[7]。不同物种同源基因的相似性用 DNASTAR 软件包中的 MEGALIGN 程序分析^[8]。采用 Mega3.0 软件中的 N-J 法构建系统发育树, 并设置 1 000 次的 Bootstraps 进行评估^[9]。

2 结果与分析

2.1 IL-6 基因座同线性分析

通过对人、鸡、非洲爪蟾 IL-6 基因座分析 (图 1) 显示, IL-6 基因座在进化上较为保守。该基因座中的细胞因子在基因排列顺序及转录方向上均保持一致。在 IL-6 基因附近的基因在进化的过程中也保持一致, 如 RAPGEF5, CDCA7L, SP4 等。

2.2 xeIL-6 生物信息学分析

Genscan 预测结果显示, 在 Scaffold_52 序列中包含有一个长度为 260 个氨基酸的蛋白质序列。对该序列进行 BLASTp 分析, 发现该序列与鸡的 IL-6 基因具有很高的相似性。为了进一步证明所得序列, 分别进行序列比对和系统进化树分析。图 2 为使用 ClustalW 软件进行序列比对的结果。结果显示, 该序列与其它物种 IL-6 序列相似性较高, 其中

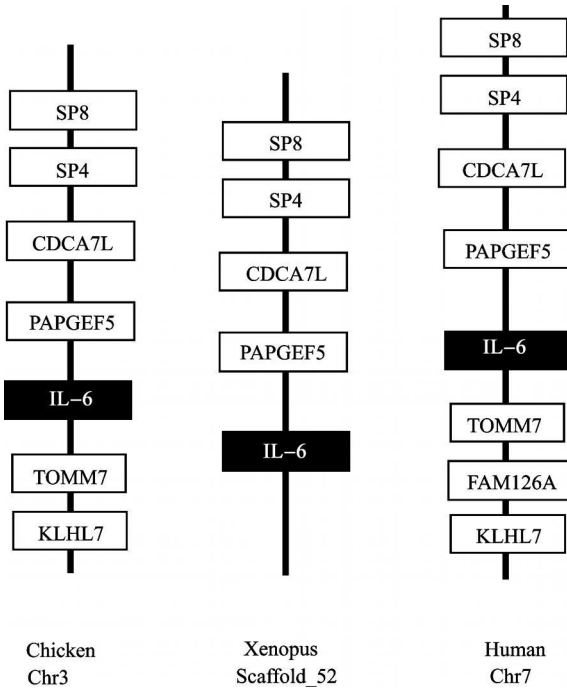
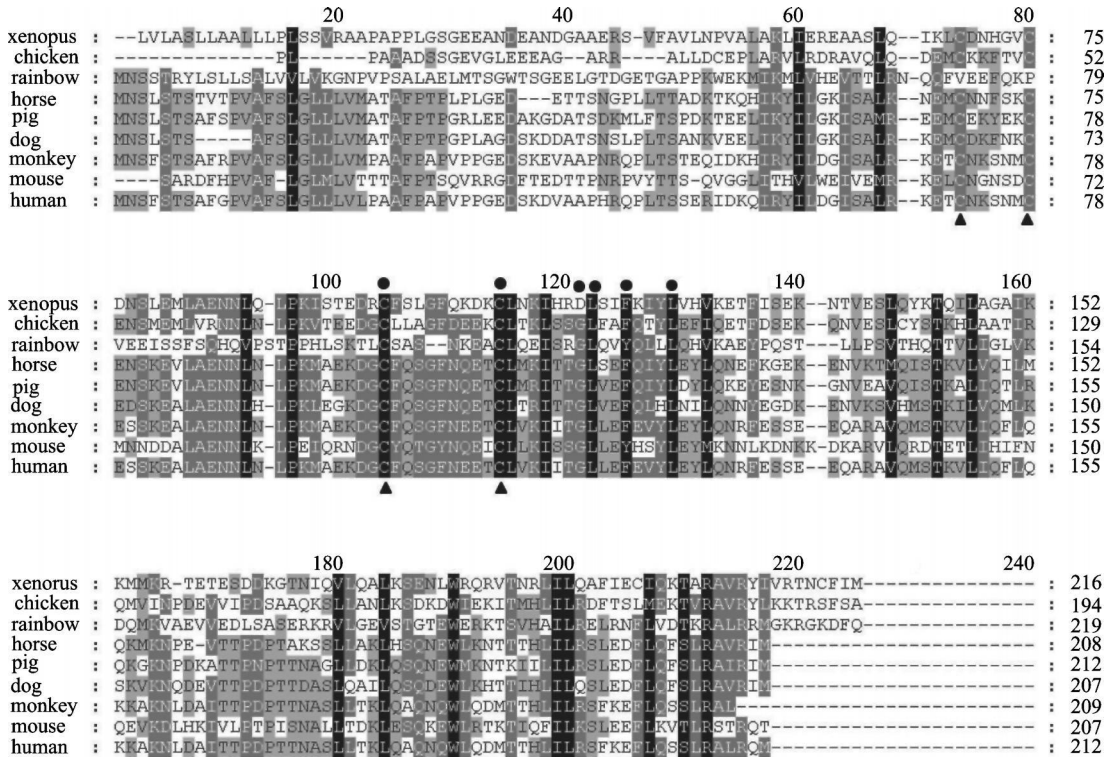


图 1 不同物种的 IL-6 基因座同线性分析

与鸡 IL-6 相似性最高, 为 39.6%。其它物种 IL-6 中保守的 4 个半胱氨酸残基在 xeIL-6 同样存在。同时, 在其它物种中保守的 4 个半胱氨酸在 xeIL-6 中同样存在, 而且 xeIL-6 含有保守的 IL-6 蛋白基序 C-X (9)-C-X (6)-GL-X (2)-FY-X (3)-L。采用 Mega3.0 软件中的 N-J 法构建系统发育树, 结果 (图 3) 显示该序列与鸡 IL-6 聚为一簇, 具有较高的枝值 (83%), 这与在进化的过程中两栖类与鸟类地位较为接近相一致。以上分析提示我们, 所预测到的序列是非洲爪蟾的 IL-6 基因。

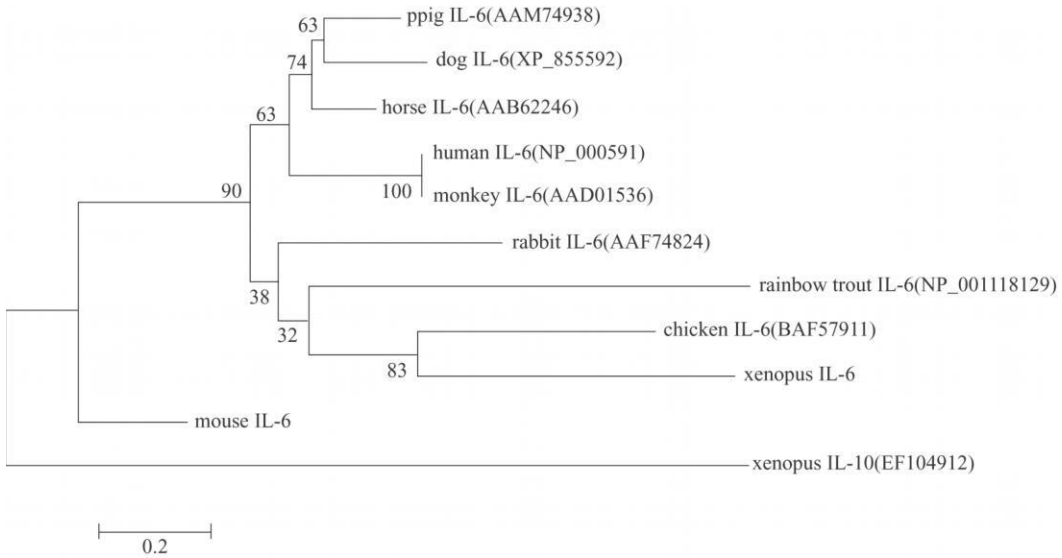
2.3 RT-PCR

为了验证以上方法所预测到的序列的正确性, 我们采用 RT-PCR 方法对 xeIL-6 基因部分序列进行了扩增。PCR 结果经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果 (图 4) 显示单一条带, 约 560 bp 目的片段, 与预计大小相符。用 pMD18-T 载体克隆后测序, 结果与预测序列一致。



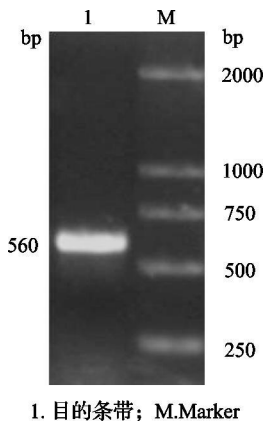
黑色、深灰色、浅灰色分别代表 100%、80%、60% 的氨基酸相似性; “▲”表示保守的半胱氨酸; “●”表示 IL-6 蛋白基序 (C-X (9)-C-X (6)-GL-X (2)-FY-X (3)-L)

图 2 非洲爪蟾 IL-6 部分序列与其它物种 IL-6 氨基酸序列的比较



括号中为各物种 GenBank 登录号

图 3 系统发育树分析非洲爪蟾 IL-6 与其它物种中 IL-6 基因进化关系



1. 目的条带; M. Marker

图 4 非洲爪蟾 IL-6 DNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

3 讨论

本研究通过比较生物信息学方法,首次对两栖类模式生物非洲爪蟾的 IL-6 基因进行了克隆及序列分析。IL-6 基因座在进化的过程中较为保守,表明 IL-6 可能是由同一个祖先基因进化而来。同时,xeIL-6 具有 IL-6 基因家族保守的蛋白基序 C-X(9)-C-X(6)-GL-X(2)-FY-X(3)-L,提示 xeIL-6 可能具有与哺乳类 IL-6 类似的功能。序列比对和系统进化树分析显示,非洲爪蟾 IL-6 与鸟纲的 IL-6 具有较高的相似性(39.6%),这与物种进化的结果相

一致,提示 IL-6 基因可能由同一个祖先基因进化而来。

生物信息学(bioinformatics)作为一门新兴学科,已广泛应用于生命科学、临床医药、工农业等方面。随着各种生物基因组计划的完成,采用比较生物信息学方法对不同物种的基因组数据库进行发掘、分析,越来越多的免疫基因得到了克隆鉴定^[10,11]。与传统基因克隆方法相比,该方法具有针对性强、快捷、成本低等特点。随着其它物种基因和蛋白质结构的完成,通过生物信息学方法可以为新基因的发现提供简捷的途径,为今后的试验工作奠定基础。当然,仅依靠生物信息学方法还远远不够,还要求我们在后续的工作中采用相应的分子生物学方法予以检验。相信随着今后生物信息学的发展,人类对于自身及其它生物基因组中所包含的信息将会突飞猛进。

参考文献

- [1] Inoue K I Takano H, Shimada A, et al Cytoprotection by interleukin-6 against liver injury induced by lipopolysaccharide. *Int J Mol Med* 2005; 15(2): 221-224
- [2] Taga T, Fukuda S Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28(3): 249-256
- [3] Hirano T. Interleukin-6 and its receptor 10 years later. *Int Rev Immunol* 1998; 16(3-4): 249-284.

- [4] Kaplanski G, Marin V, Montero Julian F, et al IL-6 a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003 24(1): 25-29
- [5] Kishimoto T, Hirano TA. A new interleukin with pleiotropic activities. *Bioessays* 1988, 9(1): 11-15
- [6] Iliev DB, Castellana B, MacKenzie S, et al Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol* 2007, 44(7): 1803-1807
- [7] Thompson JD, Higgins DG, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 4673-4680
- [8] Clewley JP, Arnold C. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE. *Methods Mol Biol* 1997, 70: 119-129.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004 5(2): 150-163
- [10] Qi ZT, Nie P. Comparative study and expression analysis of the interferon gamma gene locus cytokines in *Xenopus tropicalis*. *Immunogenetics* 2008 60(11): 699-710.
- [11] Wang T, Martin SA, Secombes CJ. Two interleukin-17C-like genes exist in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* that are differentially expressed and modulated. *Dev Comp Immunol* 2010, 34(5): 491-500.

(上接第 128页)

- [2] 田春美, 钟秋平. 超氧化物歧化酶的现状研究进展. *中国热带医学*, 2005, 5(8): 1730-1732.
- [3] 杨卫健, 张双全. 超氧化物歧化酶的研究及应用前景. *淮阴师范学院学报: 自然科学版*, 2002 1(4): 82-86.
- [4] Zelko N, Mariani TJ, Folz RJ, et al Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(1): 337-349.
- [5] Bao YB, Li L, Fei X, Guo FZ, et al Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: its gene structure, mRNA expression and recombinant protein. *Fish & Shellfish Immunology* 2009 27(2): 210-220
- [6] Hooper C, Day R, Scomber R, et al Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol* 2007, 22(4): 363-379
- [7] 李丹, 李储君, 张汉超. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究与展望. *中国医药导刊*, 2009, 11(4): 615-619
- [8] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. *海洋与湖沼*, 2000 31(3): 259-264
- [9] Ni D, Song Li, Gao Qi, et al The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) gene in *Saxidomus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2007, 23(5): 1032-1042
- [10] Li C, Sun H, Chen A, et al Identification and characterization of an intracellular Cu/Zn-superoxide dismutase (icCu/Zn-SOD) gene from clam *Venerupis philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol* 2009, 28(3): 499-503
- [11] 万夕和, 顾季生, 杨杰, 等. 南通沿海文蛤暴发性疾病的组织病理学研究. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 2006 25(2): 124-128
- [12] 任素莲, 张艳艳, 邱红, 等. “红肉病”文蛤的组织病理学. *水产学报*, 2003, 27(5): 462-467.
- [13] 刘连生, 闫茂仓, 林志华, 等. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定. *微生物学通报*, 2009 36(1): 71-77
- [14] Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper-zinc superoxide dismutase. *Nature* 1983, 306: 284-287
- [15] Lin Y, Vaseeharan B, Chen J, et al Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following β -glucan and peptidoglycan injections. *Mol Immunol* 2008 45(5): 1346-1355