

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.020

## 短尾蝮蛇 IRF-2 基因的克隆和特征分析

甘小妮<sup>1,2</sup>, 陈新文<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

**摘要:**报道了短尾蝮蛇 *Gloydius brevicaudus* 干扰素调节因子 2 基因(IRF-2)的克隆和 cDNA 全序列测定分析。目前除在爬行类外,IRF-2 基因在大部分的脊椎动物如鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类都有报道。为了获得爬行类 IRF-2 基因的全序列,从短尾蝮蛇的肾、脾、肝和肠 4 种组织中使用 Trizol 试剂盒提取了总 RNA。从已知的 IRF-2 基因序列比对设计了简并引物来扩增保守片段。最后使用 RACE 方法得到 IRF-2 的 cDNA 全序列。结果显示短尾蝮蛇的 IRF-2 基因开放阅读框包含有 978 个核苷酸,编码 326 个氨基酸,其 3'UTR 包含 137 个核苷酸。与脊椎动物其他四足动物序列比对分析还发现,短尾蝮蛇的 IRF-2 基因和推导的氨基酸序列都非常保守,与大部分四足动物的 IRF-2 相似。从其氨基酸序列中可以辨别出 DBD、IDA2 和 transactivating domain 等大部分元件和阻遏模体。

**关键词:** 蝮蛇; 爬行类; IRF-2; 克隆和特征分析

**中图分类号:** Q959.6; Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0599-03

### Cloning and Character Analyses of IRF-2 Gene for *Gloydius brevicaudus*

GAN Xiao-ni<sup>1,2</sup>, CHEN Xin-wen<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Wuhan Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** IRF-2 gene have been reported in most of vertebrates such as fishes, amphibians, birds and mammals but not in reptiles. For the purpose of obtaining the cDNA sequence of reptile IRF-2, total RNA was isolated from the tissues of kidney, spleen, liver, and intestine of a viper (*Gloydius brevicaudus*) using Trizol kit. The degenerate primers to obtain IRF-2 were designed by comparing known IRF-2 sequences. RACE method also was applied to obtain the complete cDNA sequence of IRF-2 gene. The complete cDNA sequence of *G. brevicaudus* IRF-2 gene contains an ORF of 978 nt which encoding 326 amino acid with a 3' UTR of 137 nt. Aligned with other IRF-2 gene sequence, we found that reptiles have very similar sequence of IRF-2 with other vertebrates, especially the first 345 nt of ORF are very conserved due to they are DNA binding domain. And some elements, such as DBD, IAD2, transactivating domain and repression motif were identified in the amino acid sequence of *G. brevicaudus* IRF-2.

**Key words:** *Gloydius brevicaudus*; reptile; IRF-2; cloning and character analyses

IRFs 是一个与免疫相关的多功能转录因子家族,目前已有 10 个家族成员在脊椎动物中被陆续报道(Schaper *et al.*, 1998; Mamane *et al.*, 1999; Meraro *et al.*, 1999)。干扰素调节因子 1 (IRF-1) 最初因能结合在 I 型干扰素的病毒诱导类增强子元件(virus induced enhancer element)上,诱导干扰素的表达而被命名。而作为干扰素转录抑制子的 IRF-2 与 IRF-1 起拮抗作用(Barnes *et al.*, 2002)。此外,IRF-2 还具有一些重要的代谢功能,如在组蛋白 H4、VCAM-1、gp91phox, interleukin-7 转录过程中具转录活性,是 class II 的转录催化剂(Cha & Deisseroth,

1994; Vaughan *et al.*, 1995; Luo & Skalnik, 1996; Jesse *et al.*, 1998; Xi & Blanck, 2003; Oshima *et al.*, 2004)。资料显示,IRF-2 基因在脊椎动物的鱼类(Sun *et al.*, 2006; Jia & Guo, 2008)、两栖类、鸟类和哺乳类中均有报道,但在爬行类中尚无报道。爬行类是脊椎动物进化过程中的重要环节,为了解爬行类中 IRF-2 基因的结构特征,我们对短尾蝮蛇 *Gloydius brevicaudus* IRF-2 基因进行了克隆和分析。短尾蝮蛇是我国南北广为分布的一种剧毒蛇,国外分布于朝鲜半岛,从平原到海拔 1900 m 山地都有分布。本研究中,通过简并引物扩增 IRF-2 基因的保

收稿日期:2010-06-21 接受日期:2010-12-29 基金项目:国家 973 计划(HCV2009CB522500)

作者简介:甘小妮,女,主要从事鱼类分子生物学研究,E-mail: ganxn@ihb.ac.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: chenxw@whiof.ac.cn

守片段,然后通过 RACE 克隆测序获得了短尾蝮蛇 IRF-2 基因序列,并将该序列与下载的四足动物序列进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集和鉴定

短尾蝮蛇采自四川成都,标本的鉴定在中国科学院成都生物研究所进行。

### 1.2 总 RNA 提取和 RACE 克隆测序

短尾蝮蛇总 RNA 从肾、脾、肝、肠组织中提取。使用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, USA)。第一链 cDNA 合成使用逆转录 M-MLV 试剂盒 (Invitrogen, USA)。首先使用简并引物扩增 IRF-2 基因保守片段。简并引物的设计是比对已知 IRF-2 基因序列后完成的。引物序列分别是 IRF-2 F (5'-CAR ATH CCN TGG ATG CAY GC-3') 和 IRF-2 R (5'-GCY TTC CAK GTY TTN GGR TC-3')。PCR 反应的总体积为 50  $\mu$ L, 包含 100 ng cDNA, 10  $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L (TaKaRa, 大连), 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, dNTP (每种浓度为 2.5  $\mu$ mol/L) (TaKaRa, 大连) 2  $\mu$ L, Taq 聚合酶 (TaKaRa, 大连) 2.0 U, 最后补足灭菌双蒸水至终体积。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。每次反应设不含 cDNA 模板的空白对照组。最后, 根据已扩增的保守片段所设计的引物扩增出从起始密码子开始的长约 240 bp 片段, 引物序列分别为蛇 IRF-2 F (5'-ATG CCN GTV GAR MGR ATG MG-3') 和蛇 IRF-2 R (5'-CCAG TGT GAA TGG CCC AAT TC-3')。PCR 反应条件为: 退火温度 56 $^{\circ}$ C, 其他条件同上。3' RACE 使用 Ambion 公司 FirstChoice RLM-RACE Kit (Cat # AM1700) 试剂盒。3' RACE 引物序列为: 外引物: (5'-CAG ATT CCT TGG ATG CAT GCC GCA-3'); 内引物: (5'-TTC ACA CTG GAA AGT ACC AGC CAG-3')。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 40 s, 35 个循环, 最后终延伸 72 $^{\circ}$ C 7 min。所有扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Omega 公司) 进行割胶回收, 回收目的片段用 pMD18-T vector 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 为载体进行连接, 以 DH5 $\alpha$  作为宿主菌进行转化和克隆, 对所得到的克隆进行测序, 采用 M13 通用引物测序。

### 1.2 序列比对和系统发育分析

下载用于比对的物种包括人 *Homo sapien* (X15945)、猩猩 *Pongo pygnaeus* (gi55730349)、大鼠 *Rattus rattus* (gi110340294)、小鼠 *Mus musculus* (NM008391)、绵鼠 *Sigmodon hispidus* (AF480857)、羊 *Ovis aries* (AF228445)、鸡 *Gallus gallus* (NM205196) 和非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis* (gi50414494)。序列分析和编辑分别使用 clustal X 程序、BioEdit 和 SEAVIEW, 参数设置使用缺省值; 系统发育分析分别使用邻近聚类法、Maximum Likelihood 和贝叶斯法, 主要使用的软件包括 PAUP10.1、Bayes 和 MEGA 4.0; 分歧节点的置信度使用 Bootstrap 1000 次检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 短尾蝮蛇 IRF-2 序列及特征

根据已知 IRF-2 基因序列所设计的简并引物, 首先从短尾蝮蛇的 cDNA 中扩增出约 130 bp 的 IRF-2 保守片段。在此基础上再设计引物通过 RACE 方法, 最后获得了 IRF-2 基因 cDNA 其余片段。序列已提交 GenBank, 登录号为 HM126489。测序结果经拼接后显示短尾蝮蛇 IRF-2 基因 cDNA 的完整开放阅读框 (ORF) 长度为 978 bp, 编码 326 个氨基酸, 3' 非编码区长度为 137 bp, 终止密码子是 TAG。比对结果显示它的前 345 个核苷酸序列具有较高的同源性。而在它的羧基末端呈现较高的变异度。与核苷酸序列相比, 不同物种 IRF-2 因子的氨基酸序列间则显示了更高的同源性 (图 1)。特别是前 115 个氨基酸所构成的 DNA 结合域 (DBD) 中, 色氨酸重复特征非常明显, 与其余种类高度一致。通过氨基酸序列比对分析, 在短尾蝮蛇 IRF-2 的羧基末端找到与哺乳动物、鸟类、两栖类相同的阻遏模体 (repression motif)。

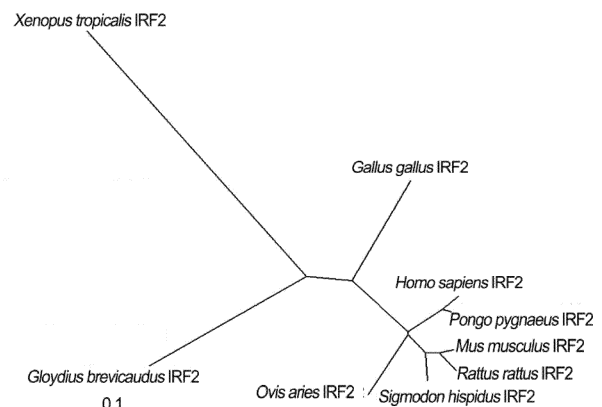


图 1 短尾蝮蛇和其余四足动物的系统发育无根树  
Fig. 1 The unrooted tree of tetrapods includes snake based on the putative amino acid sequence of IRF-2 using the NJ method

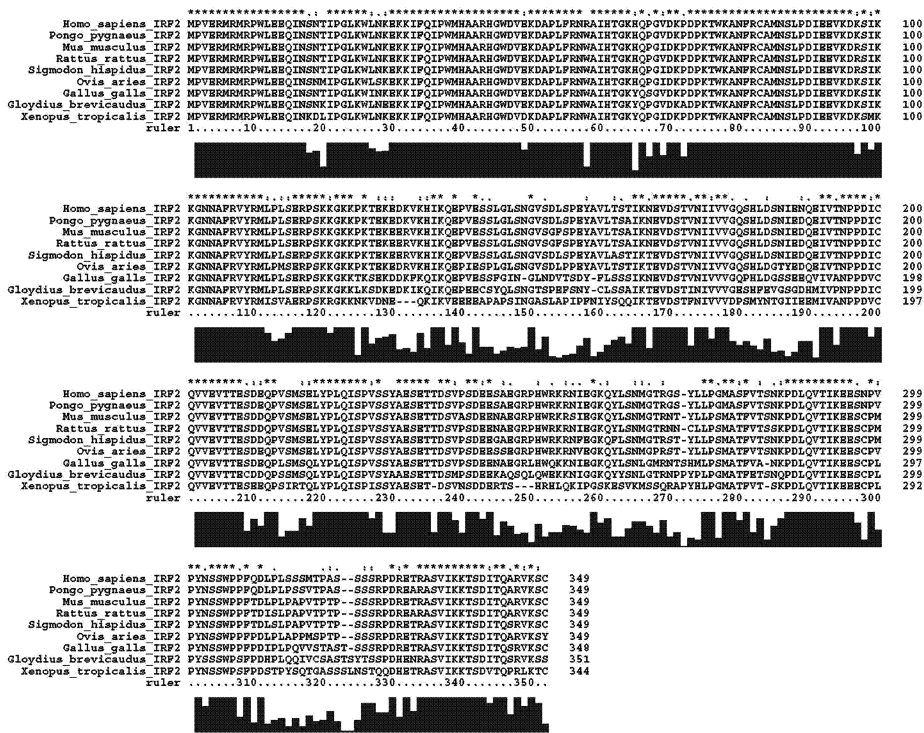


图 2 短尾蝮蛇 IRF-2 推导的氨基酸序列与其余四足动物比对分析  
 Fig. 2 The alignment of putative amino acid sequence of IRF-2 between snake and other tetrapods

从蛋白质结构上看,短尾蝮蛇的 IRF-2 结构非常保守,与其他四足动物高度相似。在短尾蝮蛇的氨基酸序列中我们辨别出了 DNA 绑定域、transactivating domain、IRF 结合域 2 (IAD2) 等区域(图 2)。

### 2.2 系统发育分析

多种分析方法都得到相似的系统发育拓扑结构和节点支持率。基于 p-distance 的邻近聚类(NJ)系统发育的分析结果见图 1。基因的系统发育树与物种之间的系统发育关系是高度一致的。例如从无根树中可以看到短尾蝮蛇所代表的爬行类与鸟类有较近的亲缘关系;而两栖类与其余三个类群之间的关系最远;几种哺乳类之间的相互亲缘关系非常近。从分析的结果来看,四足动物中 IRF-2 基因结构无论是保守的 DBD 还是多变的 IAD2 都是比较保守的。从参考文献看,它们与鱼类的 IRF-2 基因在 3'端有较大的差异。进化分析显示不管是 DNA 还是氨基酸序列都具有显著的系统发育信号。

### 3 参考文献

Bames B, Lubyova B, Pitha PM. 2002. On the role of IRF in host defense[J]. J Interferon Cytokine Res, 22: 59 ~ 71.  
 Cha Y, Deisseroth AB. 1994. Human Interferon Regulatory Factor 2 Gene[J]. J Biol Chem, 268: 5279 ~ 5287.  
 Jesse TL, LaChance R, Iademarco MF, et al. 1998. Interferon regulatory

factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecular -1[J]. J Cell Biol, 140: 1265 ~ 1276.  
 Jia W, Guo Q. 2008. Gene structures and promoter characteristics of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2 and IRF-7 from snakehead *Channa argus*[J]. Mol Immunol, 45: 2419 ~ 2428.  
 Luo W, Skalik DG. 1996. Interferon regulatory factor-2 directs transcription from the gp91phox promoter[J]. J Biol Chem, 271: 23445 ~ 23451.  
 Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, et al. 1999. Interferon regulatory factors; the next generation[J]. Gene, 237: 1 ~ 14.  
 Meraro D, Hashmueli S, Koren B, et al. 1999. Protein-protein and DNA-protein interactions affect the activity of lymphoid-specific IFN regulatory factors[J]. J Immunol, 162: 6468 ~ 6478.  
 Oshima S, Nakamura T, Mamiki S, et al. 2004. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells[J]. Mol Cell Biol, 24: 6298 ~ 6310.  
 Schaper F, Kirchhoff S, Posern G, et al. 1998. Functional domains of interferon regulatory factor 1(IRF-1)[J]. Biochem J, 335: 147 ~ 157.  
 Sun B, M Chang, D Chen, et al. 2006. Gene structure and transcription of IRF-2 in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with the finding of alternative transcripts and microsatellite in the coding region[J]. Immunogenetics, 58: 774 ~ 784.  
 Vaughan PS, Azia F, Van Wijnen AJ, et al. 1995. Activation of a cell cycle regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2[J]. Nature, 377: 362 ~ 365.  
 Xi H, Blanck G. 2003. The IRF-2 DNA binding domain facilitates the activation of the class II transactivator (CII TA) type IV promoter by IRF-1[J]. Mol Immunol, 39: 677 ~ 684.