

# 猪维甲酸诱导基因 I 的克隆及其在诱导 I 型干扰素中的作用

王 荡<sup>1,2</sup>, 方六荣<sup>1,2</sup>, 梅小伟<sup>1,2</sup>, 谢立兰<sup>1,2</sup>, 陈焕春<sup>1,2</sup>, 肖少波<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学动物医学院 动物病毒室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 本研究旨在探讨猪维甲酸诱导基因 I (RIG-I) 的结构特征及其在 I 型干扰素信号通路中的作用。从猪外周血单核细胞中克隆猪 RIG-I 全长 cDNA, 进一步构建猪 RIG-I 全长及不同区域缺失突变体的真核表达载体, 通过 IFN- $\beta$ 、IRF3 和 NF- $\kappa$ B 的荧光素酶报告系统分析猪 RIG-I 在诱导 I 型干扰素中的作用。结果表明, 猪 RIG-I 开放读码框全长为 2 832 bp, 编码 943 个氨基酸, 与鸭嘴兽、大鼠、小鼠、猴、黑猩猩、人、马和牛 RIG-I 相应序列的同源性为 53.2%~83.2%。猪 RIG-I 超表达能显著激活转录因子 IRF3 和 NF- $\kappa$ B, 并诱导 IFN- $\beta$  的产生。缺失猪 RIG-I 的 CARD 区不仅不能激活下游信号, 而且还负调控 poly(I:C) 诱导 IFN- $\beta$  的能力。结果提示 RIG-I 是猪天然免疫系统中的一个模式识别受体, 在 I 型干扰素诱导的信号通路中具有重要作用。

**关键词:** 猪; RIG-I; 克隆; 序列分析; 干扰素; 信号通路

**中图分类号:** S828; S813.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2010)02-0135-06

## Molecular Cloning and Function Study on Induction of Type I Interferon of Porcine Retinoblastoma-inhibiting Gene I

WANG Dang<sup>1,2</sup>, FANG Liu-rong<sup>1,2</sup>, MEI Xiao-wei<sup>1,2</sup>, XIE Li-lan<sup>1,2</sup>,  
CHEN Huan-chun<sup>1,2</sup>, XIAO Shao-bo<sup>1,2\*</sup>

(1. Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. National Key Laboratory of Agriculture Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to study the structural characterization of porcine RIG-I (poRIG-I) and its role in type I interferon signal pathway. The full length cDNA of poRIG-I was amplified from porcine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by RT-PCR. The eukaryotic expression vector of poRIG-I full-length and the mutated poRIG-I were constructed, respectively. The role of poRIG-I in the induction of type I interferon was investigated by using IFN- $\beta$ , IRF3 and NF- $\kappa$ B luciferase reporter system. The results showed that the open reading frame of poRIG-I is 2 832 bp encoding 943 amino acids. The putative poRIG-I protein exhibited identity with the corresponding sequences of platypus, rat, mouse, monkey, chimpanzee, human, horse and cattle ranging from 53.2% to 83.2%. Overexpression of the full-length poRIG-I significantly induced the expression of IFN- $\beta$  by activating transcription factors NF- $\kappa$ B and IRF3. The mutant CARD lacking poRIG-I was not capable of activating downstream signals and inhibited poly(I:C)-mediated IFN- $\beta$  production. These results indicate that poRIG-I is a pattern recognition receptor in innate immune system of pig and plays an important role in the induction of type I interferon.

**Key words:** porcine; RIG-I; cloning; sequence analysis; interferon; signal pathway

收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-07-0347); 国家自然科学基金(30871871)

作者简介: 王 荡(1984-), 男, 湖北武汉人, 博士生, 主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究, Tel: 027-87286884, E-mail: wangdang511@126.com

\* 通讯作者: 肖少波, E-mail: vet@mail.hzau.edu.cn

天然免疫是机体抵抗病毒入侵的第一道防线。模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 能够通过识别病原相关分子模式 (如病毒的双链 RNA 等), 诱导干扰素等抗病毒细胞因子的产生, 从而激发机体产生抗病毒反应, 最终清除病毒<sup>[1-2]</sup>。人维甲酸诱导基因 I (retinoic acid inducible gene I, RIG-I) 是近年来确定的一种十分重要的胞内模式识别受体, 可以直接或间接地识别进入细胞内的病原体及其产物, 在天然免疫中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。进一步的研究发现, 人 RIG-I 的 N 端存在两个串联的类胱天蛋白酶募集域 (CARD), C 端存在一个 RNA 解旋酶区, 可结合人工合成的双链 RNA [poly(I:C)] 以及病毒的双链 RNA, 活化干扰素调节因子 3 (IRF3) 以及核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 从而调控 I 型干扰素的表达<sup>[4-5]</sup>。

迄今为止, 仅人和鼠的 RIG-I 被鉴定, 猪源 RIG-I 的研究尚未见报道。本研究克隆了猪 RIG-I 的全长 cDNA 并对其在调控 I 型干扰素中的作用进行了分析, 为今后深入研究猪的天然免疫系统奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和细胞系

大肠埃希氏菌 DH5 $\alpha$ 、真核表达载体 pCMV-Tag 2B、猪肾传代细胞系 PK-15 均由华中农业大学动物病毒室保存; 猪 IFN- $\beta$  启动子及其 IRF3、NF- $\kappa$ B 结合位点的荧光素酶报告质粒 pIFN- $\beta$ -Luc、4 $\times$  pIRF3-Luc、4 $\times$  pNF- $\kappa$ B-Luc<sup>[6]</sup> 由本实验室构建; pMD18-T 载体购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司。

### 1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 Trizol、脂质体转染试剂盒 LipofectAMINE<sup>TM</sup>2000、无血清培养基 OPTI-MEM、DMEM 培养基、氨苄青霉素 (Amp) 及卡那霉素 (Kan) 为 Invitrogen 公司产品。TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒、各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物公司。T4 DNA 连接酶、DNA Marker 均购自晶美生物公司。新生牛血清 (NCS) 购自杭州四季青材料有限公司, 使用前经 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min。人工合成双链 RNA —— 聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)) 购自 Sigma 公司。

### 1.3 PCR 引物的设计及合成

用人 RIG-I (NM\_014314) 以及牛 RIG-I (XM\_580928) 序列通过 blastn 软件对猪基因表达序列标签 (Expressed Sequence Tag, EST) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9823>) 进行搜索, 发现 2 个猪 ESTs (BW961246; DB798771) 与它们的 5' 端具有高度同源性, 同时 3 个猪 ESTs (EW056712; EW446858; BE014029) 与它们的 3' 端具有高度同源性。序列比对 BW961246 以及 DB798771 得到猪 RIG-I 5' 端一段保守区域, 据此设计特异性上游引物 P1 (5'-AGACGAGGCGCGCCAGAAGCTGAG-3') 和下游引物 P2 (5'-CAGGCGATCCATGATTTAGC-CCCAGT-3')。引物由大连宝生物公司合成。

### 1.4 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

利用淋巴细胞分离液 (密度 1.077) 无菌分离猪外周血单核细胞 (PBMC), 调整细胞浓度至 5 $\times$ 10<sup>6</sup> 个 $\cdot$ mL<sup>-1</sup>。将分离的猪 PBMC 接种至 6 孔细胞培养板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。72 h 后收集培养细胞按照 Trizol Reagent 试剂说明书进行总 RNA 提取。以提取的 RNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物, RT-PCR 扩增得到含有 RIG-I 全长编码区的片段并克隆至 pMD18-T 载体, 命名为 pMD18-poRIG-I。双脱氧末端终止法进行测序。根据测序结果设计扩增 RIG-I 全长编码区的引物 RIG-I-F 和 RIG-I-R。

### 1.5 猪 RIG-I 基因及其突变体真核表达载体的构建及鉴定

以 pMD18-RIG-I 为模板, 分别以 RIG-I-F (5'-TTTGGATCCATGACAGCAGAGCAGCGGCGGAAT-3') 和 RIG-I-R (5'-TTTAAGCTTCACTCAAG-GTTGCCATTCCCTG-3'), RIG-I-F 和 RIG-I-N-R (5'-TTAAAGCTTTCATTTCTTAAGATGAT-GTTCACA-3') 以及 RIG-I-C-F (5'-TTTGGATC-CGAACCAGAAAACCAGGATCTTAGT-3') 和 RIG-I-R 为引物, PCR 分别扩增 RIG-I 全长编码区、RIG-I N 端以及 RIG-I C 端编码区。将纯化后的 PCR 产物经 BamH I 和 Hind III 双酶切后分别与经同样双酶切的真核表达载体 pCMV-Tag 2B 连接。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取单菌落于含卡那霉素的 LB 培养基中振荡培养, 小量碱裂解法提取 DNA, 进行酶切鉴定。获得的表达载体分别命名为 Tag-RIG-I、Tag-RIG-I-N 和 Tag-RIG-I-C。

## 1.6 荧光素酶报告基因检测

将 PK-15 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种 24 孔板,待细胞长至 80%~90% 融合,采用脂质体转染试剂分别转染 0.8  $\mu\text{g}$  Tag-RIG-I、Tag-RIG-I-N、Tag-RIG-I-C 和空载体 pCMV-Tag 2B,同时共转染 0.1  $\mu\text{g}$  荧光素酶报告质粒以及 0.05  $\mu\text{g}$  内参质粒 pRL-TK。转染后 24 h,收集细胞,按照 Promega 公司双荧光素酶检测试剂盒说明书进行双荧光检测。在分析 poly(I:C) 刺激作用的试验中,在首次共转染后 24 h 再进一步转染 1  $\mu\text{g}$  poly(I:C),12 h 后收集细胞进行双荧光素酶检测。

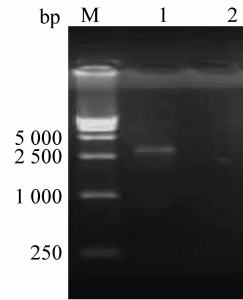
## 1.7 统计学分析

所有数据以均值士标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 Excel 统计软件进行统计学分析,组间差异显著性用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 猪 RIG-I 基因 RT-PCR 的扩增及序列分析

提取猪的外周血单核细胞的总 RNA,通过 RT-PCR(一步法)扩增猪 RIG-I 基因的全长 cDNA。琼脂糖凝胶电泳显示扩增出 1 条约 2 900 bp 的片段(图 1),与预期设计大小相符。将纯化的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌,菌落经 PCR 扩增验证后,挑取阳性克隆菌液送北京奥科生物公司进行测序。通过序列比对得到猪 RIG-I 基因的全长编码区,提交 GenBank,序列登录号为 EU126659。



M. DNA 标准 DL15000;1. 猪 RIG-I RT-PCR 产物;2. 阴性对照  
M. DL15000 DNA marker ; 1. Product of porcine RIG-I RT-PCR; 2. Negative control

图 1 猪 RIG-I RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis analysis of RIG-I RT-PCR product

根据猪 RIG-I 的 cDNA 序列推导其编码的氨基酸序列,并与其他哺乳动物 RIG-I 的氨基酸序列进行比较,发现各种哺乳动物 RIG-I 的氨基酸序列具有较高的保守性。通过 DNASTAR 软件比较发现猪 RIG-I 与牛 RIG-I 的同源性最高,达 82.3%;与马、人、黑猩猩、猴的同源性分别为 80.2%、80.2%、79.7%、和 78.8%;与小鼠、大鼠和鸭嘴兽的同源性较低,分别为 73.7%、70.7% 和 53.2%(图 2)。根据不同哺乳动物 RIG-I 的氨基酸序列绘制遗传进化树,结果也显示猪 RIG-I 与牛 RIG-I 的亲缘关系最近(图 3)。BLAST 序列比对发现,猪 RIG-I N 端也存在 2 个串联的类胱天蛋白酶募集域(CARD),且不同物种间该区域高度保守(图 4)。

		Percent identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1	■	83.2	80.2	80.2	78.8	73.7	79.7	70.6	53.2	1	Pig
	2	19.0	■	81.3	80.3	79.0	72.9	79.5	71.1	53.0	2	Cattle
	3	20.4	19.0	■	82.1	81.0	74.4	80.9	71.3	54.5	3	Horse
	4	22.8	22.2	20.2	■	95.8	77.0	98.6	73.6	52.3	4	Human
	5	24.7	24.0	21.7	4.3	■	76.2	94.8	72.8	52.6	5	Monkey
	6	32.2	33.1	31.0	27.4	28.5	■	75.9	86.3	52.2	6	Mouse
	7	23.1	22.8	21.3	1.1	5.1	28.6	■	72.1	50.9	7	Chimpanzee
	8	37.0	36.0	35.9	32.4	33.7	15.2	34.4	■	49.2	8	Rat
	9	66.4	67.5	67.1	67.8	68.9	69.5	70.2	76.8	■	9	Platypus
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

图 2 猪 RIG-I 与其他哺乳动物 RIG-I 的氨基酸序列比较

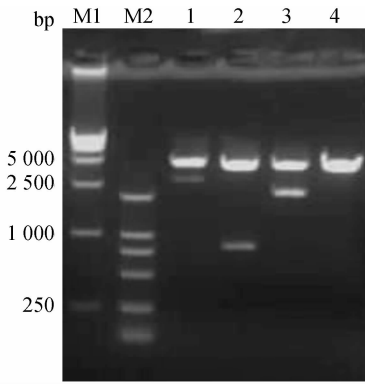
Fig. 2 Alignment among pig and other mammalian RIG-I in amino acid sequences

### 2.2 猪 RIG-I 基因及其突变体真核表达载体的构建及鉴定

根据 1.5 方法分别构建编码全长、缺失 C 端或缺失 N 端的 poRIG-I 真核表达载体 Tag-RIG-I、Tag-RIG-I-N、Tag-RIG-I-C(结构示意图见图 5)。3

种载体经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后,分别释放出 2 832、849 和 2 184 bp 大小的片段(图 6),与预期大小相符。测序结果也无碱基误配,证明真核表达载体构建正确。





M1. DNA 标准 DL15000; M2. DNA 标准 DL2000; 1. Tag-RIG-I/*Bam*H I + *Hind* III 双酶切鉴定; 2. Tag-RIG-I-N/*Bam*H I + *Hind* III 双酶切鉴定; 3. Tag-RIG-I-C/*Bam*H I + *Hind* III 双酶切鉴定; 4. pCMV-Tag 2B/*Bam*H I + *Hind* III 双酶切鉴定

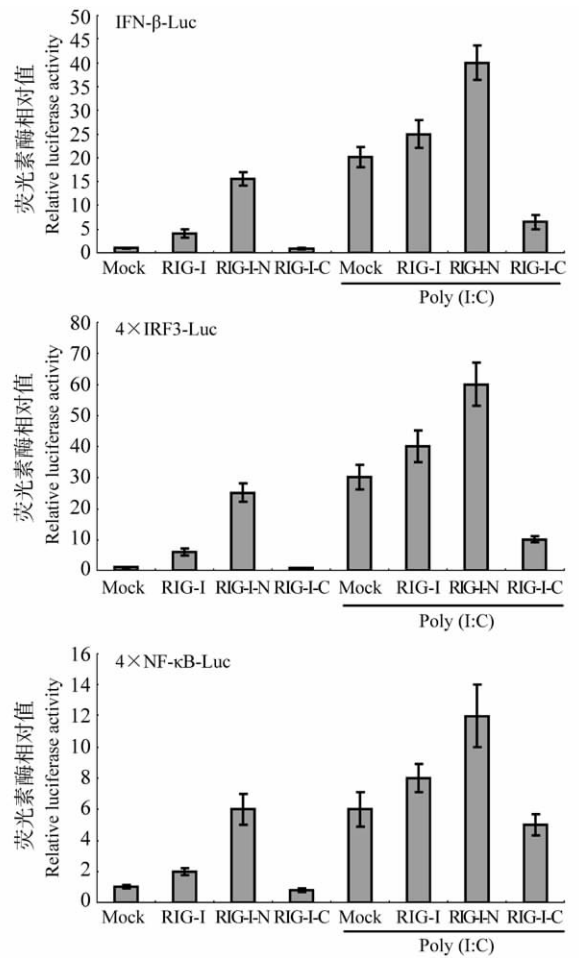
M1. DNA marker DL15000; M2. DNA marker DL2000; 1. Tag-RIG-I/*Bam*H I + *Hind* III; 2. Tag-RIG-I-N/*Bam*H I + *Hind* III; 3. Tag-RIG-I-C/*Bam*H I + *Hind* III; 4. pCMV-Tag 2B/*Bam*H I + *Hind* III

图 6 poRIG-I 真核表达载体的酶切鉴定

Fig. 6 Identification of the recombinant eukaryotic expression plasmids

天蛋白酶募集域(CARD), C 端存在 1 个 RNA 解旋酶区, 提示猪 RIG-I 可能与人 RIG-I 具有相似的作用和功能。

IFN- $\beta$  作为重要的 I 型干扰素, 其启动子由正调控区和负调控区组成, 正调控区为病毒诱导增强复合体区, 包括 4 个调节元件 (PRD)。转录因子 IRF-3 可与 PRD I 和 PRD III 结合; NF- $\kappa$ B 可与 PRD II 结合, 并通过协同作用起始或活化基因的转录<sup>[8]</sup>。本研究应用猪 IFN- $\beta$  启动子及其 IRF3、NF- $\kappa$ B 结合位点的荧光素酶报告质粒, 检测猪 RIG-I 对 IFN- $\beta$  的影响。结果表明超表达猪 RIG-I 能通过激活 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 并显著诱导 IFN- $\beta$  的产生。缺失突变分析显示, RIG-I-C 不能激活 IRF3 和 NF- $\kappa$ B, 表明 N 端 CARD 区是 RIG-I 激活下游通路所必需的。有意义的是缺失 C 末端的 RIG-I-N 诱导 IFN- $\beta$  的能力较全长 RIG-I 更强, 提示 RIG-I 的 C 端可能存在一个负调控 IFN- $\beta$  产生的区域。为了验证这一假设, 我们进一步通过转染仅含 C 末端的 RIG-I-C 以及相应报告质粒后, 再通过转染 poly(I:C) 进行刺激, 发现 RIG-I-C 具有抑制 poly(I:C) 诱导 IFN- $\beta$  的能力。相似的结果在人 RIG-I 研究中也已被证实<sup>[4-5]</sup>。因此, RIG-I-C 可以作为猪 RIG-I 的一个负



横坐标 X 轴为用于转染的不同真核表达载体或试剂, 纵坐标 Y 轴为荧光素酶相对值

X-axis: The indicated eukaryotic expression plasmids or reagent used for transfection; Y-axis: The relative luciferase activities

图 7 RIG-I 对猪 IFN- $\beta$  启动子及其 IRF3、NF- $\kappa$ B 结合位点荧光素酶活性的影响

Fig. 7 Effects of RIG-I on luciferase activity driven the porcine IFN- $\beta$  promoter, IRF3 binding sites or NF- $\kappa$ B binding sites

调控突变体用于今后的研究。

在以前的研究中, 具有抗病毒作用的干扰素和细胞因子以及可诱导干扰素产生的 Toll 受体的接头分子, 如 MyD88 和 TRIF 等<sup>[9]</sup>, 被用作免疫增强剂以提高疫苗的免疫效力。本研究证实, 猪 RIG-I 的超表达能显著诱导 I 型干扰素的产生, 而且缺失 C 末端的 RIG-I-N 诱导 IFN- $\beta$  的能力更强。那么, 能否将 RIG-I-N 作为一种免疫增强剂以提高疫苗的免疫效力值得进一步探讨。

## 4 结 论

**4.1** 猪 RIG-I 开放读码框全长为 2 832 bp, 编码 943 个氨基酸, 与鸭嘴兽、大鼠、小鼠、猴、黑猩猩、人、马和牛 RIG-I 相应序列的同源性介于 53.2%~83.2%。

**4.2** 猪 RIG-I 是一种十分重要的模式识别受体。全长 RIG-I 以及单独的 CARD 区均能激活转录因子 IRF3 和 NF- $\kappa$ B, 并诱导  $\beta$  干扰素的产生。缺失 CARD 区的 RIG-I 不仅不能激活下游信号, 而且还负调控 poly(I:C) 诱导 IFN- $\beta$  的能力。

### 参考文献:

- [1] JANEWAY JR C A, MEDZHITOV R. Innate immune recognition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20(1):197-216.
- [2] KAWAI T, AKIRA S. Innate immune recognition of viral infection[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(2):131-137.
- [3] YONEYAMA M, KIKUCHI M, MATSUMOTO K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity[J]. *J Immunol*, 2005, 175(5):2851-2858.
- [4] YONEYAMA M, KIKUCHI M, NATSUKAWA T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(7):730-737.
- [5] CUI S, EISENACHER K, KIRCHHOFER A, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I[J]. *Mol Cell*, 2008, 29(2):169-179.
- [6] WANG D, FANG L, LI T, et al. Molecular cloning and functional characterization of porcine IFN-beta promoter stimulator 1 (IPS-1)[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 125(3-4):344-353.
- [7] KOYAMA S, ISHII K J, COBAN C, et al. Innate immune response to viral infection[J]. *Cytokine*, 2008, 43(3):336-341.
- [8] KIM T K, MANIATIS T. The mechanism of transcriptional synergy of an *in vitro* assembled interferon-beta enhanceosome[J]. *Mol Cell*, 1997, 1:119-129.
- [9] TAKESHITA F, TANAKA T, MATSUDA T, et al. Toll-like receptor adaptor molecules enhance DNA-raised adaptive immune responses against influenza and tumors through activation of innate immunity[J]. *J Virol*, 2006, 80(13):6218-6224.