

狸猫 α -干扰素全基因的克隆及生物信息学分析

朱前磊¹, 王亚丹¹, 崔保安¹, 陈红英^{1*}, 魏战勇¹, 王子馨¹, 段廷云²

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 漯河出入境检验检疫局, 漯河 462000)

摘要: 根据猫 α -干扰素基因核苷酸序列, 设计并合成了 1 对引物, PCR 扩增狸猫 α -干扰素全基因, 并克隆、测序。用 DNASTar 软件及在线分析方法对克隆的 IFN- α 基因核苷酸及其推导氨基酸序列进行分析, 并与人和其他种动物的 IFN- α 基因进行同源性和进化分析。结果表明, 获得了狸猫 α -干扰素全基因序列, 其大小为 631 bp, 编码 194 个氨基酸的多肽, 推导氨基酸序列有 1 个潜在的 N-糖基化位点和 7 个潜在的 O-糖基化位点。IFN- α 基因存在种属的差异性, 亲缘关系越近, 同源性越高。狸猫 IFN- α 基因的成功克隆为进一步研究猫 IFN- α 基因表达、生物学活性和应用奠定基础。

关键词: 狸猫; α -干扰素基因; 基因克隆; 生物信息学

中图分类号: Q959.838

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)01-0055-06

Cloning and bioinformatics analysis of IFN- α gene of wild cat

ZHU Qian-lei¹, WANG Ya-dan¹, CUI Bao-an¹, CHEN Hong-ying¹,

WEI Zhan-yong¹, WANG Zi-xin¹, DUAN Ting-yun²

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

2. Luohe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Luohe 462000)

Abstract: One pair of primer was designed and synthesized according to the feline interferon alpha gene (IFN- α) nucleic acid sequence. Wild cat IFN- α was amplified by PCR, then cloned and sequenced. The nucleotide sequence of the amplified IFN- α gene and the amino acid sequence deduced from the gene were then analyzed by the DNASTar software and on-line tools, and the similarity and evolution of IFN- α gene were analyzed among wild cat, human and other animals. The results showed the full length sequence of wild cat IFN- α gene was 631 bp, which includes one open-reading frame, encoding 194 amino acid residues, one potential N-glycosylation site and seven O-glcnaC sites in deduced amino acid sequence. The results of comparative sequence analysis and phylogenetic tree analysis indicated there was difference of genus in IFN- α gene, the nearer their relationship, the higher the homology. This study paved the way for future study of biological function and application of feline IFN- α .

Key words: wild cat; interferon- α ; gene cloning; bioinformatics

干扰素(interferon, IFN)是由动物淋巴细胞、巨噬细胞等在诱导因子的作用下分泌的一类具有高度生物学活性的糖蛋白^[1], 具有调节机体免疫功能、抗病毒、抗肿瘤等多种生物学活性, 是当今具有广阔应用前景的重要生物制剂之一^[2-4]。干扰素一般分为 I 型和 II 型。迄今为止, I 型干扰素已发现 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- κ 、IFN- τ 、IFN- δ 、IFN- ε 、IFN- ζ 等 8 种类型, 而 II 型只包括 IFN- γ 。 α -干扰素是由能

在脊椎动物的各种类型细胞上增殖的病毒诱导白细胞产生的^[5], 其主要活性是抗病毒。20 世纪 80 年代中期, 人的 α -干扰素基因克隆成功, 抗病毒与抑制肿瘤的效果十分显著^[6]。随后, 犬、猪和鸡的 α -干扰素基因相继克隆成功, 并正在向临床应用过渡^[7-8]。而猫 IFN- α 的分子生物学研究至今很少。

目前, 猫作为一种传统宠物在国内的养殖量非常大。虽然猫具有很强的抗病力, 而猫类各种病毒

收稿日期: 2011-05-30

基金项目: 国家“十五”食品安全重大攻关专项(2001BA804A30-11)资助。

作者简介: 朱前磊, 男, 硕士研究生。E-mail: zhuqianlei@126.com

* 通讯作者: 陈红英, 女, 副教授。E-mail: chhy927@163.com

性疾病是造成死亡的最重要病因。 α -干扰素对病毒具有广谱、特效的抗病毒感染作用。为进行猫 α -干扰素制剂的研究,本研究采用PCR方法,从狸猫血液中成功克隆出IFN- α 基因,并对其核苷酸和氨基酸序列进行了初步的生物信息学分析,为进一步研究猫干扰素的分子生物学特性、抗病毒作用机理以及开发高效防治猫病毒性疾病新型制剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌种和实验动物

狸猫(*Felis chaus*)血液由河南农业大学动物医院提供。pGEM-T Easy Vector System 购自Promega公司。大肠杆菌DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 酶和试剂

Premix Taq DNA 聚合酶, DNA Maker DL2000, X-gal 和 IPTG, 琼脂糖, 限制性内切酶 *EcoR* I 等购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 提取试剂盒购自 V-gene 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进(杭州)生物技术有限公司; 质粒快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.3 引物的设计与合成

参照 GenBank 中发表的猫扰素基因(AB094996), 利用引物设计软件 Premier5.0 设计 1 对引物, 并用 DNASTar、Pcrdesn、DNAclub 等软件评价所设计引物。上下引物之间所扩增片段长 631 bp。引物由博尚生物技术有限公司合成。

上游引物序列为:

5'-ATGCGCTGCCCTCTTCCTT-3'

下游引物序列为:

5'-GTTGTGGTGTGATGAGTCAG-3'

1.4 狸猫干扰素基因的扩增

将血液用灭菌生理盐水稀释, 参照 V-gene DNA 提取试剂盒说明书方法提取 DNA。以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 在 50 μ L PCR 扩增体系中, 反应体系为 Premix Taq 酶 25 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, DNA 模板 6 μ L, 补去离子水 17 μ L, 共 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min 之后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 8 min。扩增后用 0.8 g \cdot L $^{-1}$ 琼脂糖电泳检测 PCR 结果。

1.5 狸猫干扰素基因的克隆与测序

将纯化回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 构建重组质粒 pGEM-FeIFN, 转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 涂抹在含有 X-gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。

挑取白斑菌落接种含有氨苄青霉素的 LB 肉汤培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒, 对重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定。选择酶切和 PCR 鉴定均为阳性的重组质粒进行测序。

1.6 狸猫 α -干扰素基因的生物信息学分析

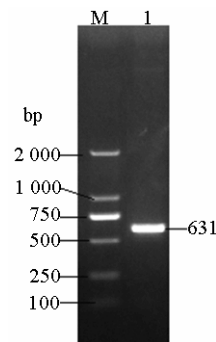
应用 DNASTar 软件对狸猫 IFN- α 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列进行分析。应用在线分析软件 TMHMM Server V.2.0, SignalP 3.0 Server, NetNGlyc1.0 (<http://www.ebs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), NetPhos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), BepiPred 1.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 和 PSORT WWW Server (<http://psort.nib.b.ae.jp/>) 分别对狸猫 IFN- α 进行信号肽、跨膜区、N-糖基化、O-糖基化、磷酸化、亲水性、抗原决定簇及亚细胞定位预测。

应用 DNASTar 软件 Clustal W 程序狸猫 IFN- α 核苷酸及氨基酸序列与 GenBank 中已发表的 IFN- α 核苷酸及氨基酸进行同源性和进化分析。

2 结果与分析

2.1 狸猫 α -干扰素基因的扩增

利用特异性引物, 采用 PCR 技术从血液基因组中扩增出 1 条约 631 bp 的片段(图 1), 与预期扩增片段大小相吻合。



M. DNA Marker DL2000; 1. PCR 产物
M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product

图 1 狸猫 IFN- α 的 PCR 扩增

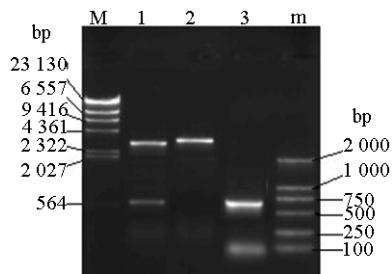
Figure 1 PCR amplification of IFN- α gene from wild cat

2.2 重组质粒 pGEM-FeIFN 的克隆与鉴定

以提取的重组质粒为模板进行 PCR、电泳, 出现 1 条约 600 bp 的特异条带(图 2), 与预期大小相符。初步证明重组质粒构建成功。

pGEM-T Easy 质粒的大小为 3 015 bp, 有 2 个 *EcoR* I 和 1 个 *Pst* I 酶切位点。重组质粒经 *EcoR* I 酶切、电泳出现 2 条带: 其中一条带为载体质粒,

约 3 000 bp, 另一条带为所克隆的狸猫 IFN- α 全基因片段, 约 600 bp; 经 *Pst* I 酶切、电泳出现 1 条大小约 3 600 bp 的特异性条带 (图 2), 与预期结果相符。进一步说明重组质粒构建成功。



M. DNA marker λ -*Hind* III digest; 1. *Eco*R I 酶切; 2. *Pst* I 酶切; 3. PCR 产物; m. DNA marker DL2000

M. DNA marker λ -*Hind* III digest; 1. Recombinant plasmid digestion by *Eco*R I; 2. Recombinant plasmid digestion by *Pst* I; 3. PCR products; m. DNA marker DL2000

图 2 重组质粒 pGEM-FeIFN 的酶切鉴定图

Figure 2 Identification of recombinant plasmid pGEM-FeIFN by digestion

2.3 狸猫 IFN- α 基因序列分析、糖基化及磷酸化位点的预测

测序报告的狸猫 IFN- α 基因序列及推导的氨基

酸序列如图 3 所示, 狸猫 IFN- α 基因的全长为 631 bp (GenBank 登录号 HQ680865), 包含一个完整阅读框 (585 bp), 其中 A+T 占 42.91%, G+C 占 57.09%, 编码 194 个氨基酸, 分子质量为 21.90 ku, 等电点为 6.48。

将狸猫 IFN- α 的氨基酸序列分别通过 NetNGlyc1.0 在线分析进行 N-糖基化位点预测及 YinO Yang1.2 在线分析进行 O-糖基化位点预测。其氨基酸序列含有 1 个潜在的 N-糖基化位点, 7 个潜在的 O-糖基化位点。应用在线软件对其磷酸化位点分析, 其氨基酸含有 12 个潜在的磷酸化位点 (包括 8 个丝氨酸、2 个苏氨酸和 2 个酪氨酸)。

2.4 信号肽与跨膜区分析

将狸猫干扰素氨基酸序列在丹麦技术大学生物序列分析中心 (CBS) 的网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/Singnal> 上, 通过 signal Networks (NN) 和 Hidden Markov Models (HMM) 这 2 种模型进行预测。结果均表明其信号肽切割部位最可能位于第 18 位的 S (丝氨酸) 和第 19 位的 V (缬氨酸) 氨基酸之间 (图 4)。TMHMM 分析结果显示, 狸猫 IFN- α 的氨基酸序列没有跨膜区。

```

1  ATG GCG CTG CCC TCT TCC TTC TTG GTG GCC CTG GTG GCT CCG GGC TGC AAC TCC GTC TGC
   M A L S S S F L V A L V A P G C N S V C
61  TCT CTG GGC TGT GAC CTG CCT CAG ACC CAC GGC CTG CTG AAC AGG AGG GCC TTG ACG CTC
   S L G C D L P Q T H G L L N R R A L T L
121 CTG GGA CAA ATG AGG AGA CTC CCT GCC AGC TCC TGT CAG AAG GAC AGA AAT GAC TTC GCC
   L G Q M R R L P A S S C Q K D R N D F A
181 TTC CCC CAG GAC GTG TTC GGT GGA GAC CAG TCC CAC AAG GCC CAA GCC CTC TCG GTG GTG
   F P Q D V F G G D Q S H K A Q A L S V V
241 CAC GTG ACG AAC CAG AAG ATC TTC CAC TTC TTC TGC ACA GAG GCG TCC TCG TCT GCT GCT
   H V T N Q K I F H F F C T E A S S S A A
301 TGG AAC ACC ACC CTC CTG GAG GAA TTC TGC ACG GGA CTT GAT CGG CAG CTG ACC CGC CTG
   W N T T L L E E F C T G L D R Q L T R L
361 GAA GCC TGC GTC CTG CAG GAG GTG GAG GAG GGA GAG GCT CCC CTG ACG AAC GAG GAC ATT
   E A C V L Q E V E E G E A P L T N E D I
421 CAT CCC GAG GAC TCC ATC CTG AGG AAC TAC TTC CAA AGA CTC TCC CTC TAC CTG CAA GAG
   H P E D S I L R N Y F Q R L S L Y L Q E
481 AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG ATC GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCC TTG TAT
   K K Y S P C A W E I V R A E I M R S L Y
541 TAT TCA TCA ATA GCC ATG CAG AAA AGG TTA AGG AGC GAG AAA TGAGACCTGTCAACATG
   Y S S I A M Q K R L R S E K *
601 GAA ATG ATTCTCACTGACTCATCACACCACA

```

下划线部分代表引物序列, 方框内氨基酸代表糖基化位点, *代表终止密码子

The underlined nucleotide sequences represent primer sequence, the framed residues represent potential N-glycosylation sites, the asterisk indicates the stop codon.

图 3 狸猫 IFN- α 基因序列及推导的氨基酸序列

Figure 3 The IFN- α gene nucleotide sequence and deduced amino acid sequence in wild cat

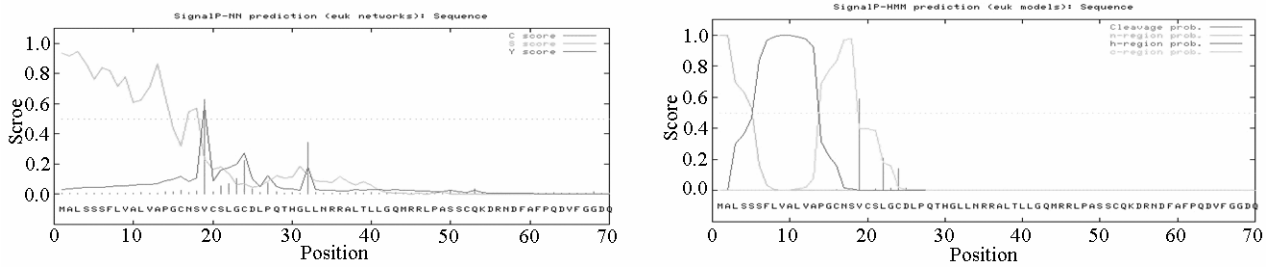


图 4 狸猫 IFN-α 的信号肽预测

Figure 4 The prediction of signal peptide of feline IFN-α

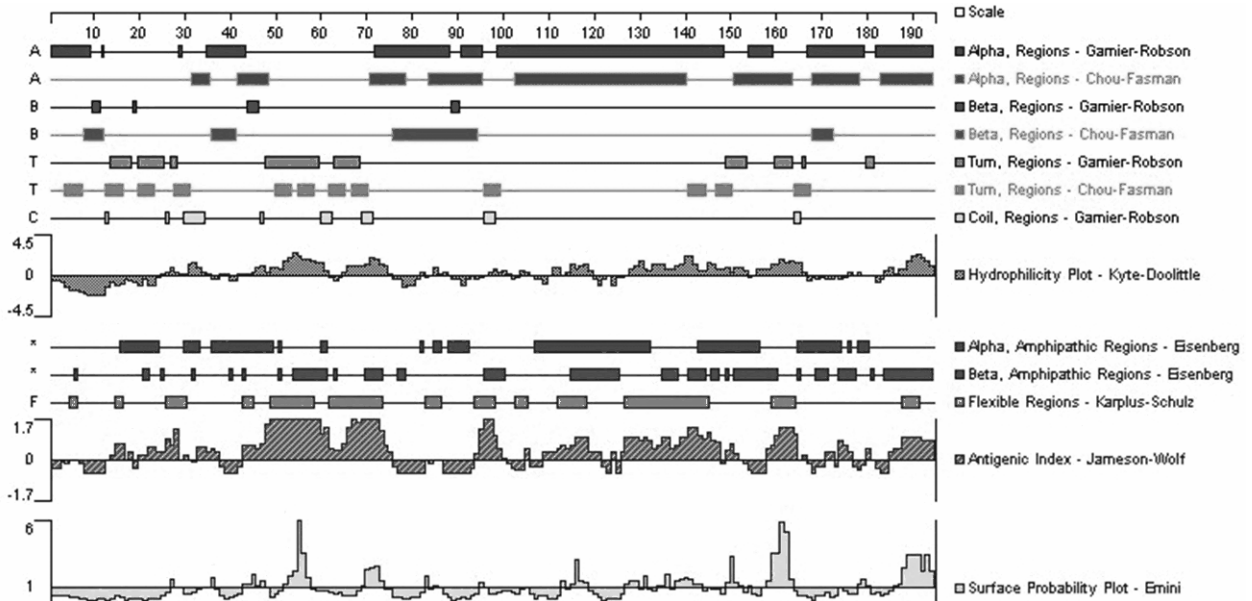


图 5 狸猫 IFN-α 结构及抗原性分析

Figure 5 Analysis of structure and antigenic index of feline IFN-α

2.5 狸猫 IFN-α 蛋白结构、抗原性分析及亚细胞定位分析

应用 DNASTar 软件对狸猫 IFN-α 蛋白分子的二级结构、蛋白的柔性区域 IFN-α 蛋白氨基酸残基位于表面的可能性、亲水性区域及抗原指数进行了预测, 预测结果见图 5。为进一步在体外对 IFN-α 的生物学活性的研究提供参考。

亲水性测相图表明, 狸猫 IFN-α 基因编码蛋白疏水性的最大值为 2.39, 最小值为 -2.22。

用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> 在线软件及 DNASTar(Protean)对狸猫 IFN-α 基因编码的蛋白进行抗原表位分析, 得出其抗原表位主要集中在第 16~17, 25~29, 46~75, 95~101, 110~120, 127~146, 161~166, 190~194 位氨基酸。用 <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html> 在线分析网站, 对提交肽链序列进行分析, 结果表明 IFN-α 基因表达的蛋白有 44.4%在细胞外, 33.3%在细胞质, 22.2%在线粒体中。

2.6 IFN-α 基因序列比较分析及进化分析

用 DNASTar 软件将狸猫 IFN-α 基因与 GenBank 中查得的 7 条猫 IFN-α 基因序列进行比较分析发现, 狸猫 IFN-α 基因与 GenBank 报道的猫 IFN-α 基因序列(AB094996) 核苷酸和氨基酸同源性最高, 均为 98.5%, 有 3 个位点氨基酸发生变化, 其中第 14 位氨基酸由亮氨酸 (Leu) 突变为脯氨酸 (Pro), 第 184 位氨基酸由苏氨酸(Thr)突变为异亮氨酸 (Ile) 和第 186 位氨基酸由亮氨酸 (Leu) 突变为蛋氨酸 (Met)。而狸猫 IFN-α 基因与另外 6 条猫 IFN-α 基因序列核苷酸、氨基酸同源性分别在 94.9~98.1 和 93.3~97.3 之间 (表 1), 远远高于其他动物的相似性 (42.3~77.1 和 18.7~61.5)。

将狸猫 IFN-α 基因推导氨基酸序列与人和 9 种动物的 IFN-α 基因推导氨基酸序列绘制进化树可分为两组 (图 6), 第一组是人和哺乳动物, 包括牛、猪、旱獭、鼠、犬和猫; 第二组是禽类, 包括鸡、鸭和鹅, 从进化关系可以看出相似的物种总是聚在一起的。

表 1 狸猫与哺乳动物及禽类 IFN- α 基因核苷酸、氨基酸序列的同源性比较

Table 1 Homology comparison of the nucleotide sequence of IFN- α gene and the amino acid sequence deduced from the gene among human, wild cat and other animals

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		94.8	53.1	19.6	60.8	95.9	21.1	20.1	56.7	49.5	58.2	98.5	51.5	95.9	94.8	95.4	94.8
2	95.6		55.0	20.6	52.4	96.8	22.2	21.2	58.2	50.8	59.3	95.8	52.9	98.9	97.9	97.9	97.4
3	71.6	73.0		27.5	53.4	55.0	23.8	23.8	62.4	53.4	67.2	52.9	51.9	55.0	55.0	55.0	54.5
4	42.2	42.5	37.6		21.8	19.7	50.8	50.3	20.7	21.2	24.9	18.7	21.8	20.2	20.2	19.7	19.7
5	75.0	77.2	61.3	42.3		63.6	24.6	24.6	55.1	48.1	54.5	61.5	49.7	63.6	63.1	63.6	63.1
6	95.6	98.2	63.1	42.1	78.4		21.8	20.7	58.5	51.6	60.6	97.3	53.7	98.4	98.4	97.9	97.3
7	42.4	43.3	38.1	71.5	43.3	43.6		91.6	23.0	20.9	25.7	20.4	22.5	22.0	22.0	22.0	22.0
8	42.7	43.7	39.1	72.2	44.0	44.1	96.0		22.5	20.4	24.6	19.4	22.5	20.9	20.9	20.9	20.9
9	73.5	74.9	67.4	42.3	70.7	75.8	40.8	41.3		58.2	68.3	57.1	59.3	58.7	58.7	59.3	59.3
10	65.6	66.7	60.4	39.7	64.9	67.4	39.4	40.3	74.6		53.8	49.5	55.8	51.1	51.1	51.6	51.6
11	71.8	73.5	76.3	44.7	71.3	74.6	43.6	44.6	79.1	68.5		58.7	58.2	60.3	60.3	60.8	60.8
12	98.5	97.5	62.8	42.3	77.1	98.1	43.1	43.4	75.4	66.3	65.3		50.5	94.3	93.3	93.8	93.3
13	68.5	70.7	61.6	41.9	68.8	71.6	41.8	42.7	74.7	71.8	62.8	68.0		53.7	53.7	53.7	53.7
14	95.9	98.9	63.1	43.0	78.2	98.8	43.1	43.4	75.4	66.8	65.8	95.4	70.7		98.9	98.9	98.4
15	95.4	98.8	63.0	42.6	78.4	99.3	42.9	43.4	75.8	66.6	65.9	94.9	71.0	98.8		97.9	97.4
16	95.9	98.8	63.1	42.3	78.7	98.8	42.7	43.1	75.8	66.6	65.9	95.4	70.7	99.1	98.6		99.5
17	95.7	98.6	63.0	42.3	78.5	98.6	42.7	43.1	75.6	66.4	66.1	95.2	70.5	98.9	98.4	99.8	

注: 1: 猫 (AB094996); 2: 猫 (AB094997); 3: 牛; 4: 鸡; 5: 狗; 6: 猫 (DQ220469); 7: 鸭; 8: 鹅; 9: 人; 10: 鼠; 11: 猪; 12: 狸猫; 13: 旱獭; 14: 猫 (AY117391); 15: 猫 (AY117393); 16: 猫 (AY117394); 17: 猫 (AY117395)。右上部分是氨基酸序列的同源性, 左下部分为的核苷酸序列同源性。

Note: 1: Cat(AB094996) ; 2: Cat(AB094997); 3: Cattle ; 4: Chicken ; 5: Dog ; 6: Cat (DQ220469); 7: Duck ; 8: Goose ; 9: Human ; 10: Mouse ; 11: Pig ; 12: Wild cat ; 13: Woodchuck ; 14: Cat ; 15: Cat ; 16: Cat ; 17: Cat . . The numbers in the upper-right of the table is the identities of the the amino acid sequences and the numbers in the lower-left of the table is the identities of nucleotide sequence.

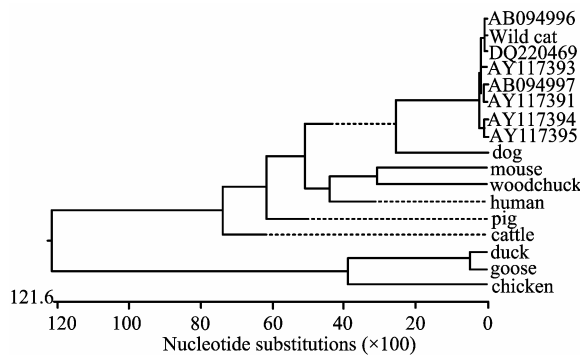


图 6 IFN- α 基因核苷酸序列的遗传进化树

Figure 6 Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of IFN- α gene of human, wild cat and other animals

3 讨论

近年来, 养猫业在我国发展十分迅速, 尤其是越来越多的人将猫作为宠物饲养, 而病毒病却严重危害着猫的健康与生存。猫 IFN- α 蛋白具有治疗猫科动物体内急性或慢性病毒感染的潜能^[9]。为了在我国开展猫 IFN- α 等细胞因子的研究, 克隆猫 IFN- α 基因, 有助于利用基因工程技术表达 IFN- α , 实现

对抗病毒活性高的重组 IFN- α 的筛选。本研究应用 PCR 技术直接从狸猫血液中提取的 DNA 中扩增得到狸猫 IFN- α 基因, 并鉴定了狸猫 IFN- α 基因。结果表明, 获得了狸猫 IFN- α 全序列, 其大小为 631 bp, 包含一个完整阅读框, 编码 194 个氨基酸。狸猫 IFN- α 基因的成功克隆为进一步研究狸猫 IFN- α 基因表达、生物学活性和应用奠定了基础。

序列分析发现, 克隆的狸猫 IFN- α 基因序列与 GenBank 上公布的 7 条猫 IFN- α 基因核苷酸同源性在 94.9%~98.5% 之间, 氨基酸同源性在 93.3%~98.5% 之间, 狸猫 IFN- α 基因序列与 AY117391、AY117393、AY117394、AY117395、AB094997 和 DQ220469 在第 418 位插入 15 个核苷酸(ATTTCATCCCGAGGAC), 从而引起 IFN- α 基因推导的氨基酸序列中第 139 位插入 5 个(Asp Ile His Pro Glu); 与 AB094996 并无插入和缺失变异, 但是存在氨基酸发生点变异, 这可能是由于猫品种不同而导致的差异。将狸猫 IFN- α 基因推导氨基酸序列与人和 8 种动物的 IFN- α 基因推导氨基酸序列分析

并绘制进化树发现, 狸猫 IFN- α 基因推导的氨基酸序列与第 1 组 (人和哺乳动物) 的亲缘关系较近, 氨基酸同源性在 49.5%~61.5% 之间; 与第 2 组中的鸡、鸭和鹅 IFN- α 基因亲缘关系较远, 氨基酸同源性在 18.7%~20.4% 之间。这表明 IFN- α 基因存在种属的差异性, 亲缘关系越近, 同源性越高。

信号肽是引导翻译出的前体蛋白通过细胞膜分泌到胞外的一段序列, 切除信号肽序列后的前体蛋白才能成为具有正常功能的成熟蛋白^[10], 因此对狸猫 IFN- α 信号肽切割位点进行预测, 为基因表达的引物设计和表达载体的构建提供有价值的信息。应用 Neural Networks (NN) 和 Hidden Markov Models (HMM) 两种模型进行预测, 从图 4 可以看出, 信号肽切割部位可能位于 S 和 V 氨基酸之间, 信号肽位置位于 1~18 位氨基酸, 即 18 和 19 位氨基酸处为可能切割点。糖基化是真核生物蛋白质翻译前或翻译后的一个重要修饰过程, 并可提高蛋白基因组的多样性^[11], 它可以影响蛋白的抗原决定簇、蛋白质的电荷性质以及酶学性质, 特别是蛋白的热稳定性。克隆的狸猫 IFN- α 含有 1 个潜在的 *N*-糖基化位点, 7 个潜在的 *O*-糖基化位点。当阈值为 0.5 时, 第 102 位 (NTT) 可能为其 *N*-糖基化位点。对狸猫 IFN- α 的潜在糖基化位点进行预测, 为进一步研究 IFN- α 蛋白的真核表达载体提供理论依据。

参考文献:

- [1] Furio L, Billard H, Valladeau J, et al. Poly (I:C)-treated human langerhans cells promote the differentiation of CD4⁺ T cells producing IFN- γ and IL-10[J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(8): 1963-1971.
- [2] Samuel C E. Antiviral actions of interferons[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809.
- [3] Rizza P, Capone I, Moretti F, et al. IFN- α s a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use [J]. Expert Rev vaccines, 2011, 10(4): 487-498.
- [4] Li Q, Kawamura K, Ma G, et al. Interferon-lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(1): 180-190.
- [5] Holko M, Williams B R. Functional annotation of IFN-alpha-stimulated gene expression profiles from sensitive and resistant renal cell carcinoma cell lines [J]. J Interferon Cytokine Res, 2006, 26(8): 534-547.
- [6] Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens [J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(3): 373-379.
- [7] Schijns V E, Weining K C, Nuijten P, et al. Immunoadjuvant activities of *E. coli*- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN-alpha/beta, IFN-gamma and IL-1beta in 1-day- and 3-week-old chickens [J]. Vaccine, 2000, 18(20): 2147-2154.
- [8] Nishikawa Y, Iwata A, Nagasawa H, et al. Comparison of the growth inhibitory effects of canine IFN-alpha, -beta and -gamma on canine cells infected with Neospora caninum tachyzoites [J]. J Vet Med Sci, 2001, 63(4): 445-448.
- [9] Sandmeyer L S, Keller C B, Bienzle D. Effects of interferon-alpha on cytopathic changes and titers for feline herpesvirus-1 in primary cultures of feline corneal epithelial cells[J]. Am J Vet Res, 2005, 66(2): 210-216.
- [10] Hiss J A, Schneider G. Architecture, function and prediction of long signal peptides [J]. Brief Bioinform, 2009, 10(5): 569-578.
- [11] Bond A E, Row P E, Dudley E. Post-translation modification of proteins; methodologies and applications in plant sciences [J]. Phytochemistry, 2011, 2: 1-21.