



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102559688 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110180051. 3

(22) 申请日 2011. 06. 30

(71) 申请人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市大学路  
100 号

(72) 发明人 罗廷荣 蔡新斌 孙石开 李晓宁  
苏丽娟 尹珊 李晓泉 李延生

(74) 专利代理机构 广西南宁汇博专利代理有限公司 45114

代理人 邓晓安

(51) Int. Cl.

*C12N 15/12* (2006. 01)

*C12N 15/10* (2006. 01)

*C12N 15/79* (2006. 01)

*C07K 14/47* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

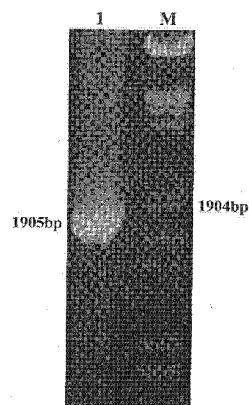
权利要求书 3 页 说明书 9 页  
序列表 2 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位

### (57) 摘要

本发明提供了与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR(tetratricopeptide repeat) 结构基序, ISG60 基因的 TPR 结构基序含有病毒感染相关的调控元件序列, 与现有报道的猪基因的 TPR 结构没有显著同源性。本发明还具体地涉及到猪 ISG60 基因的策略, 鉴定了 ISG60 基因在细胞中的定位, 通过 ISG60 基因的 TPR 结构基序, 能够用于研究猪瘟病毒感染机制, 并通过揭示该基因抗猪瘟病毒的机制, 开发一种治疗猪瘟的药物。



1. 一种与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位,其特征在于:包括以下的步骤:

(1) 基因在染色体上的定位;(2) 基因片段的获得;(3) 载体构建;(4) 基因在细胞上的定位;(5) TPR 结构基序的获得;

所述的基因在染色体上的定位,首先是采用猪全基因组芯片分析猪外周血淋巴细胞的基因表达谱,发现 ISG60 基因在猪瘟病毒感染后表达量增多,在感染后 6 天该基因的表达量最多,通过将 ISG60 基因的 EST 序列与 NCBI 数据库中公布的猪基因组序列进行比对,发现 ISG60 基因定位于猪 14 号染色体上;

所述的基因片段的获得,首先是采用重组人 I 型干扰素 IFN- $\alpha$  2b 刺激猪肾上皮细胞 PK-15 细胞系介导产生 ISG60 基因, Trizol 抽提诱导后的 PK-15 的总 RNA,用寡聚核苷酸 oligo dT16 作为反转录的引物将总 RNA 反转录为 cDNA;根据猪全基因组芯片上的 ISG60 5' 端的表达序列标签 (EST) 序列,设计针对 ISG60 基因的特异性引物,用特异性引物 PCR 扩增 ISG60 基因,并克隆至 pMD18-T 载体上,测序鉴定,确定获得了 ISG60 的基因片段;

所述载体构建是将编码 6 $\times$ His 的核苷酸标记的 ISG60 基因,亚克隆至 pCDNA3.0 真核载体上,将构建好的真核表达载体转染 PK-15 细胞;

所述基因在细胞上的定位,首先是用重组真核表达载体转染 PK-15 细胞,然后采用间接免疫荧光技术观察 ISG60 基因在 PK-15 细胞上的定位;

所述 TPR 结构基序的获得是将克隆的猪 ISG60 基因测序鉴定后,得到包括完整 ORF 的核苷酸序列,并推导出了相应的氨基酸序列,按已知 TPR 基序预测方法,对 ISG60 基因的推导氨基酸序列进行 TPR 基序预测,预测发现,ISG60 基因含 7 个 TPR 结构基序。

2. 与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位,其特征在于:ISG60 基因测序得到的核苷酸序列如下:

(1) 猪测序得到的核苷酸序列

①序列特征:

长度:1530 碱基对

类型:DNA

链型:双链

几何结构:线性

②分子类型:核苷酸

③序列描述:

atgagtgaggtcaacaagaattctctggagaagatccttccacagctgaaatgccatttcacatggaacttac  
ctaaggaagaacatgtct

ggcatgatctagaagacagagtgtgtaaccagactgaacttttaactctgagttcaaagcgacaatgtacaa  
cttggttgcttacataaaacattta

aatggtcaaaatgaggtgccttgaatacttacagcaagctgaagagtttatccagcaagaacacactgacc  
aggcagaaatcagaagcctg

gttacctggggaaactatgcctgggtctattatcacctgggaagactctcagaagctcaaatttatgtagaca  
aggtgaaacaagtatgtgagaag

ttctcaaatecttacagtattgagtggtccggagcttgactgtgaagaaggatggacactgctaaagtgtggag

gaaaacaaattgaaaaggcaaa

ggtgtatTTTTgagaaggctctggaagagaaacccgacaaccagaattctcctctggactggccatcgcatg  
tactttctgaatggcaaaccag

cgcagcagtcctccgtggatattctcaaggaggccattgagttgagccctgacaatcagtatatcaaagttct  
cttggccctgacattgcagaaga

tgaatgaagaagctgaagggaagagttggttgtagaggccctggaaaaagctcctcgccaaacagatgtcct  
ccgcagtgagccaaatttta

ccgagtaaagggtgatctagacaaagctattgaactatttctaacggcactggaatccacaccaacaatggc  
tacctctatcaccagattgcatg

ctgctatagggcaaaagtcaaacaacttctggatgcaggagaatctgaagctagcaggaatagagagataatt  
gaagaactacggaaatatgcc

aaggactatgtgaataaagctattgaaaagggactaaatcctctgtatgcatattctgatagcactgagctcc  
tggaatataggagaatgtcatcaga

cagctttcagtaaggagctccctagcactgaggcgcaacaacttcacgcgctcttgcaactctcaggagta  
tcacgagaagtctgaagacact

gcagcccaacagctctttagaaaatttgtccataaacacgaaatcaactgagaaggaaaagatgaaataccaac  
tacagaatggagctgcaaatc

agcttccacaaagtgcaccaaattcatggatatctccgaggattaattcacaagatgaatggagacctgctgca  
agcagccgcatgctatgagaag

gaactgggctacctactaaggaacagcccttcaggcataggcagcattttccagccagcatctgagctggaag  
aaggcactgaggaaatggac

cagggtgcagatggctctactctcaggagcttcctgaccctggggctgacagagacaggaaggaaaggaaag  
gaacagagagtcagggc

gcctggaatagtggctga

(2) 猪 ISG60 基因推导氨基酸序列：

①序列特征：

长度：509 个氨基酸

类型：多肽

链型：单链

几何结构：立体

②分子类型：蛋白质

(3) 序列描述：

Met Ser Glu Val Asn Lys Asn Ser Leu Glu Lys Ile Leu Pro Gln Leu Lys Cys His  
Phe Thr Trp Asn Leu Pro Lys Glu Glu His Val Trp His Asp Leu Glu Asp Arg Val Cys  
Asn Gln Thr Glu Leu Leu Asn Ser Glu Phe Lys Ala Thr Met Tyr Asn Leu Leu Ala Tyr  
Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu Glu  
Phe Ile Gln Gln Glu His Thr Asp Gln Ala Glu Ile Arg Ser Leu Val Thr Trp Gly Asn  
Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp Lys  
Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe Ser Asn Pro Tyr Ser Ile Glu Cys Pro Glu Leu Asp

Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Glu Lys Ala Lys Val  
 Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn Pro Glu Phe Ser Ser Gly Leu Ala  
 Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu Lys  
 Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn Gln Tyr Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Thr Leu  
 Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys Ala  
 Pro Arg Gln Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp Leu  
 Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn Gly Tyr Leu  
 Tyr His Gln Ile Ala Cys Cys Tyr Arg Ala Lys Val Lys Gln Leu Leu Asp Ala Gly Glu  
 Ser Glu Ala Ser Arg Asn Arg Glu Ile Ile Glu Glu Leu Arg Lys Tyr Ala Lys Asp Tyr  
 Val Asn Lys Ala Ile Glu Lys Gly Leu Asn Pro Leu Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser Thr Glu  
 Leu Leu Glu Ile Gly Glu Cys His Gln Thr Ala Phe Ser Lys Glu Leu Pro Ser Thr Glu  
 Ala Gln Gln Leu His Gln Arg Ser Cys Asn Ser Gln Glu Tyr His Glu Lys Ser Glu Asp  
 Thr Ala Ala Gln Gln Ser Leu Glu Asn Leu Ser Ile Asn Thr Lys Ser Thr Glu Lys Glu  
 Lys Met Lys Tyr Gln Leu Gln Asn Gly Ala Ala Asn Gln Leu Pro Gln Ser Ala Pro Asn  
 Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala Ala  
 Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn Ser Pro Ser Gly Ile Gly Ser Ile  
 Phe Gln Pro Ala Ser Glu Leu Glu Glu Gly Thr Glu Glu Met Asp Gln Gly Ala Asp Gly  
 Ser Thr Leu Arg Glu Leu Pro Asp Pro Gly Ala Asp Arg Asp Arg Lys Glu Arg Lys Gly  
 Thr Glu Ser Gln Gly Ala Trp Asn Ser Gly

#### ISG60 基因 TPR 结构基序序列

##### ①序列特征：

- a. 长度 :34 个氨基酸
- b. 类型 :多肽
- c. 链型 :单链
- d. 几何结构 :立体
- e. 数量 :7 个

##### ②序列描述：

氨基酸		氨基酸
起始位点		终止位点
TPR1	51 Ala Thr Met Tyr Asn Leu Leu Ala Tyr Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu Glu Phe Ile Gln Gln Glu	84
TPR2	94 Leu Val Thr Trp Gly Asn Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp Lys Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe	127
TPR3	138 Leu Asp Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Glu Lys Ala Lys Val Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn	171
TPR4	175 Ser Ser Gly Leu Ala Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu Lys Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn	208
TPR5	209 Gln Tyr Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Thr Leu Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys Ala Pro Arg Gln	242
TPR6	243 Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp Leu Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn	276
TPR7	418 Pro Asn Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala Ala Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn	451

3. 根据权利要求 1 所述的与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位,其特征在于:其序列的一致性达到 60% 以上的 TPR 结构基序的序列。

## 与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位

### 技术领域

[0001] 本发明属于家畜基因工程领域,具体涉及与猪抗病毒免疫相关基因结构基序。

### 背景技术

[0002] 猪是全球最为重要的畜禽产品之一。猪瘟是猪的一种有重大经济意义的烈性传染病,全世界每年因为猪瘟造成的经济损失巨大。因此研究猪的抗猪瘟病毒免疫具有重大意义。猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus)是猪瘟的病原,潜伏期 24-72 小时,其病毒粒子呈圆形,属于黄病毒科瘟病毒属,大小为 38 ~ 44nm,核衣壳是立体对称二十面体,氯化铯中浮密度 1.15 ~ 1.17g/ml,有包膜,在细胞质内复制。猪瘟病毒危害猪和野猪,俗称“烂肠瘟”,是一种急性、热性、高度接触性传染病,主要特征是高温、微血管变性而引起全身出血、坏死、梗塞。猪瘟对猪危害极为严重,会造成养猪业重大损失。自 1933 年在美国俄亥俄州发现猪瘟病以来,猪瘟一直是威胁世界养猪业最严重的疾病之一,每年给各国造成高达几十亿美元的损失,我国每年的养猪量约为 10 亿头,猪的死亡率超过 10%,死亡的第一大原因就是猪瘟,直接经济损失高达 40 亿元。

[0003] 目前对猪瘟的防治方法:是保持猪舍干燥、清洁,夏季注意通风,猪舍、用具经常消毒。注意气候变化,加强饲养管理。早发现,早隔离,早治疗。最近几年,人们开始研究抗猪瘟病毒基因,并采用克隆方法表达,发表了一些文献,例如:

[0004] 1、【题名】世界首例“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”诞生【作者】王浩然【刊名】中国兽医学报.2008(9).【文摘】2008 年 9 月 9 日,世界首例“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”在位于中国长春的吉林大学农学部诞生。这标志着人类首次培育的“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”获得了成功。9 月 9 日 17:40 至 19:10,在吉林大学原种猪场,3 头“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”先后顺利诞生,体质量分别为 1 050、1 100 和 550g。猪瘟是一种严重威胁养猪业的传染病。为了培育出能够抗猪瘟病毒的猪,以吉林大学农学部畜牧兽医学院赖良学教授为首席专家和军事医学科学院军事兽医研究所的专家共同组成的课题组,在国家自然科学基金资助的基础上,经过近 2 年时间的协作攻关,将能抑制猪瘟病毒的基因转染到“中国实验小型猪”胎儿成纤维细胞内,并以此体细胞进行核移植制备猪克隆胚胎,将此胚胎移植到杜洛克代孕母猪体内,怀孕 114d 后顺利产出 3 头健康的克隆仔猪。经对仔猪体细胞进行基因检测,证实该克隆猪的细胞带有所转入的抗猪瘟病毒基因。进一步的抗病毒检测实验正在进行中。世界首例“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”诞生。

[0005] 2、【题名】猪瘟病毒衣壳蛋白靶向核酸酶表达系统的建立及鉴定【作者】周斌刘珂陈溥言【机构】南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,【刊名】病毒学报.2008,24(6):451-455【文摘】根据猪瘟病毒衣壳蛋白(C)基因序列设计一对引物,RT-PCR 扩增获得编码猪瘟病毒衣壳蛋白的 C 基因,将其插入到含有葡萄球菌核酸酶(SN)基因的真核表达载体 pCDNA-SN 中,筛选获得重组质粒 pCDNA-C-SN。脂质体转染猪肾细胞(PK-15),并经 G418 稳定筛选,通过 RT-PCR、免疫印迹和间接免疫荧光鉴定表达的融合蛋

白,体外 DNA 消化试验检测核酸酶活性。结果表明融合蛋白 C-SN 在 PK-15 细胞中获得了稳定表达,能够被兔抗猪瘟病毒衣壳蛋白多抗所识别,并具有良好的核酸酶活性,能够对 DNA 进行切割。同时,稳定表达融合蛋白 C-SN 的 PK-15 细胞系能够有效抑制猪瘟野毒的增殖,使其感染性降低  $10^2 \sim 10^3$  倍。这些结果为进一步将衣壳蛋白靶向病毒灭活策略应用于抵抗猪瘟病毒感染奠定了基础。

[0006] 尽管目前使用的猪瘟疫苗对猪有很好的保护作用,但猪瘟却始终无法得到彻底的根除,而且猪瘟病毒的感染在临床上也出现了新的特点,除了一般看到的急性临床症状外,还有一些不表现明显临床症状的温和型猪瘟或亚临床型猪瘟,但抗体检测和基因检测都呈阳性,也就是所谓的持续性感染状态,长期携带病毒而不表现临床症状的猪就成为重要的传染源。

#### 发明内容:

[0007] 本发明的目的是提供一种与猪抗病毒免疫相关基因结构基序,以通过该结构基序,找出能够用于研究猪瘟病毒感染机制,并通过揭示该蛋白基因抗猪瘟病毒的机制,开发一种治疗猪瘟的药物。

[0008] 本发明人从经过干扰素刺激的猪肾细胞 PK-15 中抽提总 RNA,反转录,PCR 扩增,得到了一种与猪抗病毒免疫相关的 ISG60 基因,该 ISG60 基因的 TPR(tetratricopeptide repeat) 结构基序含有病毒感染相关的调控元件序列,与现有报道的猪基因的 TPR 结构没有显著同源性。ISG60 基因是由 1530 个碱基组成,含有完整的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF),它的起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA。

[0009] 本发明人首先克隆了猪 ISG60 基因的策略和 ISG60 基因的特异性引物,对病毒、细菌感染有免疫作用的 I 型干扰素介导刺激机体产生的猪 ISG60 基因,以及通过间接免疫荧光的方法(用倒置荧光显微镜观察)鉴定 ISG60 基因在 PK-15 细胞中定位的策略,从而为进一步构建各种表达载体,用于研究 ISG60 基因抗病毒的反应机理以及病毒与宿主间互相作用奠定基础。

[0010] 所述的抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR 结构基序和细胞定位,包括以下的步骤:

[0011] (1) 基因在染色体上的定位;(2) 基因片段的获得;(3) 载体构建;(4) 基因在细胞上的定位

[0012] 所述的基因在染色体上的定位,首先是采用猪全基因组芯片分析猪外周血淋巴细胞的基因表达谱,发现 ISG60 基因在猪瘟病毒感染后表达量增多,在感染后 6 天该基因的表达量最多。通过将 ISG60 基因的 EST 序列与 NCBI 数据库中公布的猪基因组序列进行比对,获得了 ISG60 基因在猪染色体上的定位。

[0013] 所述的基因片段的获得,首先是采用重组人 I 型干扰素 IFN- $\alpha$  2b 刺激猪肾上皮细胞 PK-15 细胞系介导产生 ISG60 基因。干扰素是一种哺乳动物细胞产生抗病毒蛋白质,主要分为 I 型、II 型干扰素,其中  $\alpha$ 、 $\beta$  干扰素属于 I 型干扰素, $\gamma$  干扰素属于 II 型干扰素,干扰素中主要成分是 I 型干扰素。干扰素刺激猪肾细胞 PK-15 后,ISG60 基因的 mRNA 被大量的转录,由于细胞含有 RNA、DNA 和蛋白质等分子,需要从其中抽提出细胞总 RNA,而 ISG60 基因的 mRNA 就包含在细胞总 RNA 中。干扰素与细胞上的干扰素受体结合后,激活 JAK-STAT

信号通路,使 STAT1 与 STAT2 异源二聚体、干扰素调节因子 IRF9 形成 ISGF3 的复合物,ISGF3 复合物进入细胞核,与细胞基因组上干扰素刺激应答元件 ISRE 结合,启动干扰素刺激基因的转录。

[0014] 用 Trizol 抽提诱导后的 PK-15 的总 RNA。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂,可以直接从细胞或组织中提取总 RNA。其含有苯酚、异硫氰酸胍等物质,能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶。取干扰素刺激后的 PK-15 细胞,弃培养液, PBS 洗涤 3 次,转移至 1.5mL EP 管, Trizol 600  $\mu$  L 裂解,上下震荡混匀,室温静置 10min。加入氯仿 200  $\mu$  L,上下震荡 20s 混匀,室温静置 3min。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10min,吸取 500  $\mu$  L 上层 RNA 溶液至新的 EP 管,加入 500  $\mu$  L 异丙醇,上下轻柔混匀,室温下或 4 $^{\circ}$ C 静置 10min。4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 10min,弃掉上清,加入 75%乙醇 500  $\mu$  L,上下混匀,4 $^{\circ}$ C 12,000rpm 离心 5min。重复上述步骤一次。最后 50 $^{\circ}$ C 10min 晾干 EP 管中的 RNA,用无 RNAase 的水溶解。

[0015] 用寡聚核苷酸 oligo dT16 作为反转录的引物将总 RNA 反转录为 cDNA。根据猪全基因组芯片上的 ISG60 5' 端的表达序列标签 (EST) 序列,利用计算机软件 Oligo6,设计了针对 ISG60 基因的特异性引物。用特异性引物 PCR 扩增 ISG60 基因,并克隆至 pMD18-T 载体上,测序鉴定,确定获得了 ISG60 的基因片段。

[0016] 所述载体的构建是将编码 6 $\times$ His 的核苷酸标记的 ISG60 基因,亚克隆至 pCDNA3.0 真核载体上,将构建好的真核表达载体转染 PK-15 细胞。

[0017] 所述 ISG60 基因在细胞上的定位,首先是用重组真核表达载体转染 PK-15 细胞,然后采用间接免疫荧光技术观察 ISG60 基因在 PK-15 细胞上的定位。间接免疫荧光方法:吸掉转染 36 小时后的 PK-15 细胞培养液, PBS 洗涤 3 次细胞,甲醛与甲醇 1 : 1 体积固定, PBS 洗涤 3 次细胞;用 6 $\times$ his 单克隆抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min, PBS 洗涤 3 次细胞;用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min, PBS 洗涤 3 次细胞,倒置荧光显微镜观察细胞。

[0018] 所述 TPR 结构基序的获得是将克隆的猪 ISG60 基因测序鉴定后,得到包括完整 ORF 的核苷酸序列,并推导出了相应的氨基酸序列,按已知方法,例如网站 (<http://tprpred.tuebingen.mpg.de/tprpred>) 上介绍的 TPR 基序预测方法,对 ISG60 基因的推导氨基酸序列进行 TPR 基序预测。预测发现, ISG60 基因含 7 个 TPR 结构基序。

[0019] 本发明首次提供了猪 ISG60 基因的策略和 ISG60 基因的特异性引物,本发明的目的是提供对病毒、细菌感染有免疫作用的 I 型干扰素介导刺激机体产生的猪 ISG60 基因,以及鉴定 ISG60 基因在 PK-15 细胞中定位的策略,从而为进一步构建各种表达载体,用于研究 ISG60 基因抗猪瘟或其它病毒的反应机理以及病毒与宿主间互相作用奠定基础,具有重大意义。

[0020] ISG60 基因为 I 型干扰素刺激机体介导产生的基因,与宿主抗病毒免疫作用有关。TPR 结构基序一般是由 34 个氨基酸残基组成的序列单元,约 3-16 串联重复排列组成。TPR 结构域介导蛋白质-蛋白质相互作用,在一些情况下为特异性识别靶蛋白的特征,在多蛋白复合体的组装中发挥作用。TPR 基序所在的蛋白家族参与许多重要的生命活动如细胞周期调控、转录控制、线粒体和过氧化物酶体的运输等。

[0021] TPR(tetratricopeptide repeat) 结构基序的蛋白发现存在于细菌、蓝藻、酵母和其它真菌、昆虫、植物、动物,包括人类中,并在细胞质、细胞核、线粒体和过氧化物酶体中亚细胞定位。

[0022] TPR 基序作为与细胞分裂周期相关的蛋白反应元件最初在酵母中发现 (Hirano T et al 1990 ;Sikorski RS, et al. 1990)。TPR 结构基序一般是由 34 个氨基酸残基组成的序列单元 (Lamb JR et al 1995), 在基序中位点 4(W/L/F), 7(L/I/M), 8(G/A/S), 11(Y/L/F), 20(A/S/E), 24(F/Y/L), 27(A/S/L), 32(P/K/E) 的这 8 个氨基酸残基显示出较高频率的保守性 (Sikorski RS et al. 1990)。

[0023] 目前研究显示, TPR 基序的三维构象表明一个 TPR 结构包含两个反向平行的  $\alpha$ -螺旋 (Das AK, et al. 1998), TPR 基序串联排列产生一个右手螺旋的两性通道结构, 这种结构可能容纳靶蛋白的互补区域。大量证据表明, TPR 基序对伴侣蛋白的功能 (Smith DF1993 ; Chang H-CJ, 1994 ;)、细胞周期 (Lamb JR, 1994 ;Sikorski RS, 1993 ;Samejima I, 1994)、转录 (Smith RL 1995)、蛋白运输复合物 (Dodt G 1995 ;Brocard C 1994 ;Fransen M, 1995 ; van der Leij I, 1993) 有重要作用。TPR 基序可能表现为一种古老的蛋白与蛋白作用的组件, 被不同的蛋白招募并赋予特异的功能。

[0024] I 型干扰素在抗病毒感染中发挥着重要作用。猪 ISG60 基因是由 I 型干扰素刺激产生的免疫因子之一, ISG60 基因可能通过自身 TPR 结构域参与细胞周期调控、转录控制、线粒体和过氧化物酶体的运输而发挥抗病毒免疫作用。

[0025] 以下是 ISG60 基因测序得到的核苷酸序列、推导的氨基酸序列和 TPR 结构基序序列, 列表如下:

[0026] 猪测序得到的核苷酸序列

[0027] (1) 序列特征:

[0028] 长度: 1530 碱基对

[0029] 类型: DNA

[0030] 链型: 双链

[0031] 几何结构: 线性

[0032] (2) 分子类型: 核苷酸

[0033] (3) 序列描述:

[0034] atgagtgaggtcaacaagaattctctggagaagatccttccacagctgaaatgccatttcacatggaac  
ttacctaaggaagaacatgtct

[0035] ggcattgatctagaagacagagtgtgtaaccagactgaacttttaactctgagttcaaagcgacaatgt  
acaacttggttgcttacataaaacattta

[0036] aatggtcaaaatgaggctgccctggaatacttacagcaagctgaagagtttatccagcaagaacacact  
gaccaggcagaaatcagaagcctg

[0037] gttacctggggaaactatgcctgggtctattatcacctgggaagactctcagaagctcaaatttatgta  
gacaaggtgaaacaagtatgtgagaag

[0038] ttctcaaactccttacagtattgagtgtccggagcttgactgtgaagaaggatggacactgctaaagtgt  
ggaggaaaacaaattgaaaaggcaaa

[0039] ggtgtatttttgagaaggctctggaagagaaacccgacaaccagaattctcctctggactggccatcg  
gatgtacttttctgaatggcaaaccag

[0040] cgcagcagtcctccgtggatattctcaaggaggccattgagttgagccctgacaatcagtatatcaaag  
ttctcttgccctgacattgcagaaga

[0041] tgaatgaagaagctgaaggggaagagttggtttagaggccctggaaaaagctcctcgccaaacagatg  
tcctccgcagtgagccaaatttta

[0042] ccgagtaaagggtgatctagacaaagctattgaactatttctaacggcactggaatccacaccaaaaca  
tggctacctctatcaccagattgcatg

[0043] ctgctatagggcaaaagtcaaacaacttctggatgcaggagaatctgaagctagcaggaatagagagat  
aattgaagaactacggaaatatgcc

[0044] aaggactatgtgaataaagctattgaaaagggactaaatcctctgtatgcatattctgatagcactgag  
ctcctggaaataggagaatgtcatcaga

[0045] cagctttcagtaaggagctccctagcactgaggcgcaacaacttcacagcgctcttgcaactctcagg  
agtatcacgagaagctctgaagacact

[0046] gcagcecaacagtccttagaaaaattgtccataaacacgaaatcaactgagaaggaaaagatgaaatac  
caactacagaatggagctgcaaatc

[0047] agcttccacaaagtgaccaaattcatgggtatctccgaggattaattcacaagatgaatggagacctgc  
tgcaagcagccgcatgctatgagaag

[0048] gaactgggtacctactaaggaacagcccttcaggcataggcagcattttccagccagcatctgagctg  
gaagaaggcactgaggaaatggac

[0049] cagggtgcagatggctctactctcaggagcttcctgaccctggggctgacagagacaggaaggaaagg  
aaaggaacagagagtcagggc

[0050] gcctggaatagtggctga

[0051] 猪 ISG60 基因推导氨基酸序列：

[0052] (1) 序列特征：

[0053] 长度：509 氨基酸

[0054] 类型：多肽

[0055] 链型：单链

[0056] 几何结构：立体

[0057] (2) 分子类型：蛋白质

[0058] (3) 序列描述：

[0059] Met Ser Glu Val Asn Lys Asn Ser Leu Glu Lys Ile Leu Pro Gln Leu Lys Cys  
His Phe Thr Trp Asn Leu Pro Lys Glu Glu His Val Trp His Asp Leu Glu Asp Arg Val  
Cys Asn Gln Thr Glu Leu Leu Asn Ser Glu Phe Lys Ala Thr Met Tyr Asn Leu Leu Ala  
Tyr Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu  
Glu Phe Ile Gln Gln Glu His Thr Asp Gln Ala Glu Ile Arg Ser Leu Val Thr Trp Gly  
Asn Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp  
Lys Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe Ser Asn Pro Tyr Ser Ile Glu Cys Pro Glu Leu  
Asp Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Glu Lys Ala Lys  
Val Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn Pro Glu Phe Ser Ser Gly Leu  
Ala Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu  
Lys Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn Gln Tyr Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Thr  
Leu Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys

Ala Pro Arg Gln Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp  
 Leu Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn Gly Tyr  
 Leu Tyr His Gln Ile Ala Cys Cys Tyr Arg Ala Lys Val Lys Gln Leu Leu Asp Ala Gly  
 Glu Ser Glu Ala Ser Arg Ash Arg Glu Ile Ile Glu Glu Leu Arg Lys Tyr Ala Lys Asp  
 Tyr Val Asn Lys Ala Ile Glu Lys Gly Leu Asn Pro Leu Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser Thr  
 Glu Leu Leu Glu Ile Gly Glu Cys His Gln Thr Ala Phe Ser Lys Glu Leu Pro Ser Thr  
 Glu Ala Gln Gln Leu His Gln Arg Ser Cys Asn Ser Gln Glu Tyr His Glu Lys Ser Glu  
 Asp Thr Ala Ala Gln Gln Ser Leu Glu Asn Leu Ser Ile Asn Thr Lys Ser Thr Glu Lys  
 Glu Lys Met Lys Tyr Gln Leu Gln Asn Gly Ala Ala Asn Gln Leu Pro Gln Ser Ala Pro  
 Asn Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala  
 Ala Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn Ser Pro Ser Gly Ile Gly Ser  
 Ile Phe Gln Pro Ala Ser Glu Leu Glu Glu Gly Thr Glu Glu Met Asp Gln Gly Ala Asp  
 Gly Ser Thr Leu Arg Glu Leu Pro Asp Pro Gly Ala Asp Arg Asp Arg Lys Glu Arg Lys  
 Gly Thr Glu Ser Gln Gly Ala Trp Asn Ser Gly

[0060] ISG60 基因 TPR 结构基序氨基酸序列

[0061] (1) 序列特征：

[0062] a. 长度：34 氨基酸

[0063] b. 类型：多肽

[0064] c. 链型：单链

[0065] d. 几何结构：立体

[0066] e. 数量：7 个

[0067] (2) 序列描述：

[0068]

氨基酸		氨基酸	
起始位点		终止位点	
TPR1	51	Ala Thr Met Tyr Asn Leu Leu Ala Tyr Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu Glu Phe Ile Gln Gln Glu	84
TPR2	94	Leu Val Thr Trp Gly Asn Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp Lys Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe	127
TPR3	138	Leu Asp Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Glu Lys Ala Lys Val Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn	171
TPR4	175	Ser Ser Gly Leu Ala Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu Lys Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn	208
TPR5	209	Gln Tyr Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Thr Leu Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys Ala Pro Arg Gln	242
TPR6	243	Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp Leu Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn	276
TPR7	418	Pro Asn Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala Ala Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn	451

[0069] 本发明所述的 ISG60 基因的核苷酸序列、氨基酸序列及 TPR 结构基序序列，其功能与突变的氨基酸序列相同，突变形式包括缺失、无义、插入、错义。

[0070] 含有本发明所述的 ISG60 基因在细胞中定位的策略。

[0071] 含有本发明所述的构建猪 ISG60 基因抗病毒研究所用的表达载体的方法。

[0072] 本发明的原理是：干扰素是一种能够抗病毒的蛋白，其通过刺激细胞产生许多的下游抗病毒蛋白发挥抗病毒作用，而 ISG60 是干扰素诱导产生的下游抗病毒蛋白之一。TPR 基序的三维构象表明一个 TPR 结构包含两个反向平行的  $\alpha$ -螺旋，TPR 基序串联排列产生

一个右手螺旋的两性通道结构,这种结构表现为一种蛋白与蛋白作用的组件,ISG60 蛋白通过自身 TPR 结构基序重复序列参与抗病毒作用。

[0073] 本发明的优点是:

[0074] 1、本发明提供了与抗病毒免疫相关的猪 ISG60 基因的 TPR(tetratricopeptide repeat) 结构基序,该 ISG60 基因的 TPR 结构基序含有病毒感染相关的调控元件序列,与现有报道的猪基因的 TPR 结构没有显著同源性。

[0075] 2、本发明还具体地涉及到克隆猪 ISG60 基因的策略,提供了鉴定 ISG60 基因在细胞中的定位,通过 ISG60 基因的 TPR 结构基序,能够用于研究猪瘟病毒感染机制,并通过揭示该蛋白基因抗猪瘟病毒的机制,开发一种治疗猪瘟的药物。

[0076] 3、有报道指出,通过酵母双杂交的方法发现鼠 SGT 蛋白与细小病毒的非结构蛋白 NS1 能相互作用,这种鼠 SGT 蛋白中含有另一种富含谷氨酰胺的 TPR 基序。目前国内外研究中,对包含 TPR 基序的 ISG60 基因的抗病毒免疫作用的研究尚未被发现。本发明通过基因芯片杂交方法,将感染猪瘟石门病毒后猪外周血淋巴细胞的转录谱与未感染病毒的对照组相比较,发现包含 TPR 基序的干扰素刺激基因 ISG60 在实验组中大量上调,ISG60 基因可能通过 TPR 结构基序改变细胞对病毒的特异性反应。

[0077] 4、通过预测,确定 ISG60 基因包含 7 个 TPR 基序,TPR 基序的克隆为进一步阐明干扰素途径的基因表达调控和抗病毒机制提供理论依据,在抗病毒感染研究中具有潜在的应用价值。

#### 附图说明:

[0078] 图 1 用基因特异性引物 PCR 扩增 ISG60 基因的琼脂糖凝胶电泳图;

[0079] 1:ISG60 基因扩增产物 M:lambda DNA(EcoRI/HindIII)。

[0080] 图 2 克隆至 pMD18-T 载体上 ISG60 基因双酶切琼脂糖凝胶电泳图;

[0081] M:lambda DNA(EcoRI/HindIII) 1:pMD-ISG60 载体 HindIII、BamHI 双酶切。

[0082] 图 3 对 ISG60 基因的 ORF 的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图;

[0083] M:lambda DNA(EcoRI/HindIII) 1:PCR 扩增 ISG60 的 ORF 的产物。

[0084] 图 4 亚克隆至哺乳动物表达载体 pCDNA3.0 上的 ISG60 基因的双酶切琼脂糖凝胶电泳图;

[0085] M:lambda DNA(EcoRI/HindIII) 1:pCDNA-ISG60 载体 HindIII、XhoI 双酶切。

[0086] 图 5 鉴定克隆的猪 ISG60 基因在 PK-15 细胞中的定位,ISG60 基因在 PK-15 细胞的细胞浆表达。

#### 具体实施方式

[0087] 下面的优选例对本发明作详细叙述,但并不意味着限制本发明的范围。在本发明的实施例中所用到的材料包括:

[0088] PK-15(猪肾细胞)细胞系、大肠杆菌(*Escherichia coli*)株 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。M-Mlv reverse transcriptase 购自 Promega 公司。限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶、dNTP 和 PCR 扩增 DNA 克隆载体 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。6 $\times$ His 鼠单克隆抗体、胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。FITC 标记羊抗鼠 IgG 购自 sigma 公司。DNA

Marke 购自 Fermentas 公司。引物合成、序列测定委托上海生工生物工程技术有限公司完成。Trizol、脂质体、pCDNA3.0 载体购自 invitrogen 公司。荧光倒置显微镜购自 Nikon 公司。

[0089] 大肠杆菌培养基为普通的 LB(蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g, 超纯水 1000ml, pH 7.0) 和 LA(琼脂粉 15g、蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g) 培养基。细胞培养用 5% CO<sub>2</sub> 37℃ 培养箱, 培养基使用含 10% FBS 的 DMEM(invitrogen Gibco)。

[0090] 实施例 1、猪 ISG60 基因的 EST 序列的染色体的定位

[0091] 采用猪全基因组芯片分析猪外周血淋巴细胞的基因表达谱, 发现 ISG60 基因在猪瘟病毒感染后表达量增多, 在感染后 6 天该基因的表达量最多。通过将 ISG60 基因的 EST 序列与 NCBI 网站 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 数据库进行核苷酸 blast 程序分析, 发现 ISG60 基因定位于猪染色体 14 号染色体上。

[0092] 实施例 2、猪 ISG60 基因的克隆

[0093] 首先是采用重组人 I 型干扰素 IFN- $\alpha$  2b 刺激猪肾上皮细胞 PK-15 细胞系介导产生 ISG60 基因。干扰素是一种哺乳动物细胞产生的抗病毒蛋白质, 主要分为 I 型、II 型干扰素, 其中  $\alpha$ 、 $\beta$  干扰素属于 I 型干扰素,  $\gamma$  干扰素属于 II 型干扰素, 干扰素中主要成分 I 型干扰素。干扰素刺激猪肾细胞 PK-15 后, ISG60 基因的 mRNA 就被大量的转录, 由于细胞含有 RNA、DNA 和蛋白质等分子, 需要从其中抽提出细胞总 RNA, 而 ISG60 基因的 mRNA 就包含在细胞总 RNA 中。干扰素与细胞上的干扰素受体结合后, 激活 JAK-STAT 信号通路, 使 STAT1 与 STAT2 异源二聚体、干扰素调节因子 IRF9 形成 ISGF3 的复合物, ISGF3 复合物进入细胞核, 与细胞基因组上干扰素刺激应答元件 ISRE 结合, 启动干扰素刺激基因的转录。

[0094] 用 Trizol 抽提诱导后的 PK-15 的总 RNA。Trizol 是一种新型总 RNA 抽提试剂, 可以直接从细胞或组织中提取总 RNA。其含有苯酚、异硫氰酸胍等物质, 能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶。取干扰素刺激后的 PK-15 细胞, 弃培养液, PBS 洗涤 3 次, 转移至 1.5mL EP 管, Trizol 600  $\mu$ L 裂解, 上下震荡混匀, 室温静置 10min。加入氯仿 200  $\mu$ L, 上下震荡 20s 混匀, 室温静置 3min。4℃ 12,000rpm 离心 10min, 吸取 500  $\mu$ L 上层 RNA 溶液至新的 EP 管, 加入 500  $\mu$ L 异丙醇, 上下轻柔混匀, 室温下或 4℃ 静置 10min。4℃ 12,000rpm 离心 10min, 弃掉上清, 加入 75% 乙醇 500  $\mu$ L, 上下混匀, 4℃ 12,000rpm 离心 5min。重复上述步骤一次。最后 50℃ 10min 晾干 EP 管中的 RNA, 用无 RNAase 的水溶解。

[0095] 用寡聚核苷酸 oligo dT16 作为反转录引物, 将总 RNA 反转录为 cDNA。根据猪全基因组芯片上的 ISG60 5' 端的表达序列标签 (EST) 序列, 利用计算机软件 Oligo6, 设计了针对 ISG60 基因的特异性引物。用特异性引物 PCR 扩增 ISG60 基因 (见图 1), 并克隆至 pMD18-T 载体上 (见图 2), 测序鉴定, 确定获得了 ISG60 的基因片段。

[0096] 用于特异性扩增 ISG60 基因的特异性引物:

[0097] ISG60-T1 :5' gagaacagaccgcatca 3'

[0098] ISG60-T2 :5' agccaaggataagacttagga 3'

[0099] 用于亚克隆构建哺乳动物真核表达载体 pCDNA-ISG60 的引物:

[0100] ISG60-P1 :5' GACCAAGCTTATGAGTGAGGTCAACAAGAATTC 3'

[0101] ISG60-P2 :

[0102]

5'CTCCCTCGAGTCAGTGATGATGGTGATGGTGGCCACTATTCCAGGCGCCCTGA 3'  
6×his

[0103] 实施例 3、鉴定 ISG60 基因在 PK-15 细胞中的定位

[0104] 将编码 6×his 的核苷酸通过 PCR 标记到 ISG60 基因上（见图 3），在 T4 连接酶的作用下将标记的 ISG60 基因亚克隆至哺乳动物真核表达载体 pCDNA3.0 上（见图 4），用脂质体介导的方法转染 PK-15 细胞，用间接免疫荧光鉴定 ISG60 基因的细胞定位（见图 5）。间接免疫荧光方法：吸掉转染 36 小时后的 PK-15 细胞培养液，PBS 洗涤 3 次细胞，甲醛与甲醇 1 : 1 体积固定，PBS 洗涤 3 次细胞；用 6×his 单克隆抗体 37℃ 孵育 60min，PBS 洗涤 3 次细胞；用 FITC 标记的羊抗鼠 Ig G 37℃ 孵育 60min，PBS 洗涤 3 次细胞，倒置荧光显微镜观察细胞。

[0105] 实施例 4、克隆的 ISG60 基因 TPR 结构基序序列的推测

[0106] 将克隆的猪 ISG60 基因测序鉴定后，得到包括完整 ORF 的核苷酸序列，并推导出了相应的氨基酸序列，按网站 (<http://tprpred.tuebingen.mpg.de/tprpred>) TPR 基序预测方法，对 ISG60 基因的推导氨基酸序列进行 TPR 基序预测。预测发现，ISG60 基因含 7 个 TPR 结构基序。

[0001]

## 氨基酸序列表

1、猪 ISG60 基因测序所得的核苷酸序列、推导出的氨基酸序列和 TPR 结构基序序列，列表如下：

## (1)核苷酸序列

atgagtgagggtcaacaagaattctctggagaagatccttcacagctgaaatgccatttcacatggaacttacctaaggaagaacatgtctggcat  
gatctagaagacagagtggtgaaccagactgaacttttaactctgagttcaaaagcacaatgtacaacttggtgcttacataaaacatttaaatgg  
tcaaatgaggctgccctggaatacttacagcaagctgaagagtttatccagcaagaacacactgaccaggcagaatcagaagcctggttacc  
tgaggaaactatgcctgggtctattatcacctgggaagactctcagaagctcaaatttatgtagacaagggtgaacaagtatgtgagaagtctca  
aatccttacagtattgagtgctcggagcttgactgtgaagaaggatggacactgctaaagtgtggaggaaaacaaattgaaaaggcaaaagtgt  
attttgagaaggctctggaagagaaacccgacaaccagaattctctctggactggccatcgcatgtactttctgaatggcaaacagcgcag  
cagtcctccgtggatattctcaaggaggccattgagttgagccctgacaatcagtatatacaagttctctggccctgacattgcagaagatgaatg  
aagaagctgaagggtgaagagtggtgttagaggccctgaaaaagctctcgccaacacagatgtcctccgagtcagccaaattttaccgag  
taaagggtgatctagacaaagctattgaactatttctaacggcactggaatccacaccaacaatggctaccttatcaccagattgcatgtctgcta  
tagggcaaaagtcaacaactctggatgcaggagaatctgaagctagcaggaatagagagataattgaagaactacggaatatgccaagga  
ctatgtgaataaagctattgaaaaggactaaatcctctgtatgcataattctgatagcactgagctcctggaaataggagaatgtcatcagacagct  
ttcagtaaggagctccctagcactgaggcgcaacaactcagcagccttgcaactctcaggagtatcacgagaagtctgaagacactgcag  
cccaacagctcttagaaaattgtccataaacacgaaatcaactgagaaggaaaagatgaaataccaactacagaatggagctgcaaatcagctt  
cccaaaagtcaccaaattcatggtatctccgaggatttaattcacaagatgaatggagacctgctgcaagcagccgcatgctatgagaaggaaac  
tggtctacactactaaggaacagccctcagggcataggcagcattttccagccagcatctgagctggaagaaggcactgaggaaatggaccagg  
gtgcagatggctctactctcaggagcttctgacctggggctgacagagacaggaaggaaaggaaaggaacagagagtcaggcgccctg  
gaatagtggctga

## (2)氨基酸序列：

Met Ser Glu Val Asn Lys Asn Ser Leu Glu Lys Ile Leu Pro Gln Leu Lys Cys His Phe Thr Trp Asn Leu Pro Lys Glu  
Glu His Val Trp His Asp Leu Glu Asp Arg Val Cys Asn Gln Thr Glu Leu Leu Asn Ser Glu Phe Lys Ala Thr Met  
Tyr Asn Leu Leu Ala Tyr Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu Glu  
Phe Ile Gln Gln Glu His Thr Asp Gln Ala Glu Ile Arg Ser Leu Val Thr Trp Gly Asn Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His  
Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp Lys Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe Ser Asn Pro Tyr Ser Ile  
Glu Cys Pro Glu Leu Asp Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Glu Lys Ala Lys Val  
Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn Pro Glu Phe Ser Ser Gly Leu Ala Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn  
Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu Lys Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn Gln Tyr Ile Lys Val  
Leu Leu Ala Leu Thr Leu Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys Ala  
Pro Arg Gln Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp Leu Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe  
Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn Gly Tyr Leu Tyr His Gln Ile Ala Cys Cys Tyr Arg Ala Lys Val Lys Gln  
Leu Leu Asp Ala Gly Glu Ser Glu Ala Ser Arg Asn Arg Glu Ile Ile Glu Glu Leu Arg Lys Tyr Ala Lys Asp Tyr Val  
Asn Lys Ala Ile Glu Lys Gly Leu Asn Pro Leu Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser Thr Glu Leu Leu Glu Ile Gly Glu Cys His

[0002]

Gln Thr Ala Phe Ser Lys Glu Leu Pro Ser Thr Glu Ala Gln Gln Leu His Gln Arg Ser Cys Asn Ser Gln Glu Tyr His  
 Glu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ala Gln Gln Ser Leu Glu Asn Leu Ser Ile Asn Thr Lys Ser Thr Glu Lys Glu Lys Met  
 Lys Tyr Gln Leu Gln Asn Gly Ala Ala Asn Gln Leu Pro Gln Ser Ala Pro Asn Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His  
 Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala Ala Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn Ser Pro Ser  
 Gly Ile Gly Ser Ile Phe Gln Pro Ala Ser Glu Leu Glu Glu Gly Thr Glu Glu Met Asp Gln Gly Ala Asp Gly Ser Thr  
 Leu Arg Glu Leu Pro Asp Pro Gly Ala Asp Arg Asp Arg Lys Glu Arg Lys Gly Thr Glu Ser Gln Gly Ala Trp Asn  
 Ser Gly

### (3) ISG60 基因 TPR 结构基序序列

氨基酸		氨基酸	
起始位点		终止位点	
TPR1	51	Ala Thr Met Tyr Asn Leu Leu Ala Tyr Ile Lys His Leu Asn Gly Gln Asn Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Leu Gln Gln Ala Glu Glu Phe Ile Gln Gln Glu	84
TPR2	94	Leu Val Thr Trp Gly Asn Tyr Ala Trp Val Tyr Tyr His Leu Gly Arg Leu Ser Glu Ala Gln Ile Tyr Val Asp Lys Val Lys Gln Val Cys Glu Lys Phe	127
TPR3	138	Leu Asp Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Leu Lys Cys Gly Gly Lys Gln Ile Gln Lys Ala Lys Val Tyr Phe Glu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Pro Asp Asn	171
TPR4	175	Ser Ser Gly Leu Ala Ile Ala Met Tyr Phe Leu Asn Gly Lys Pro Ala Gln Gln Ser Ser Val Asp Ile Leu Lys Glu Ala Ile Glu Leu Ser Pro Asp Asn	208
TPR5	209	Gln Tyr Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Thr Leu Gln Lys Met Asn Glu Glu Ala Glu Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Ala Leu Glu Lys Ala Pro Arg Gln	242
TPR6	243	Thr Asp Val Leu Arg Ser Ala Ala Lys Phe Tyr Arg Val Lys Gly Asp Leu Asp Lys Ala Ile Glu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Glu Ser Thr Pro Asn Asn	276
TPR7	418	Pro Asn Ser Trp Tyr Leu Arg Gly Leu Ile His Lys Met Asn Gly Asp Leu Leu Gln Ala Ala Ala Cys Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Tyr Leu Leu Arg Asn	451

。

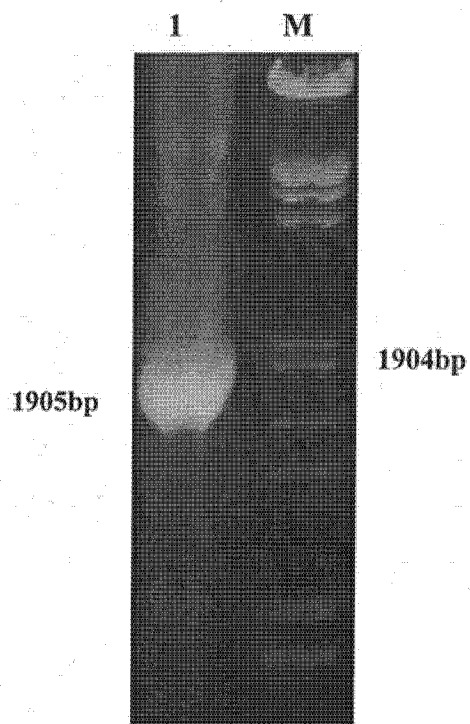


图 1

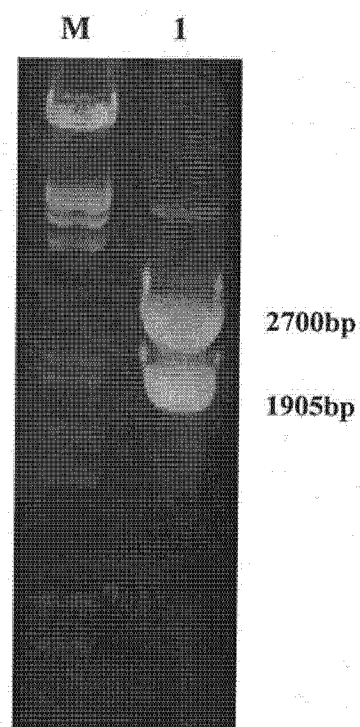


图 2

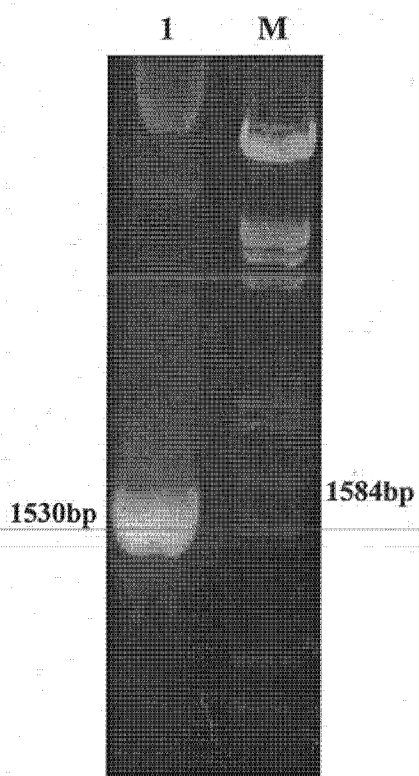


图 3

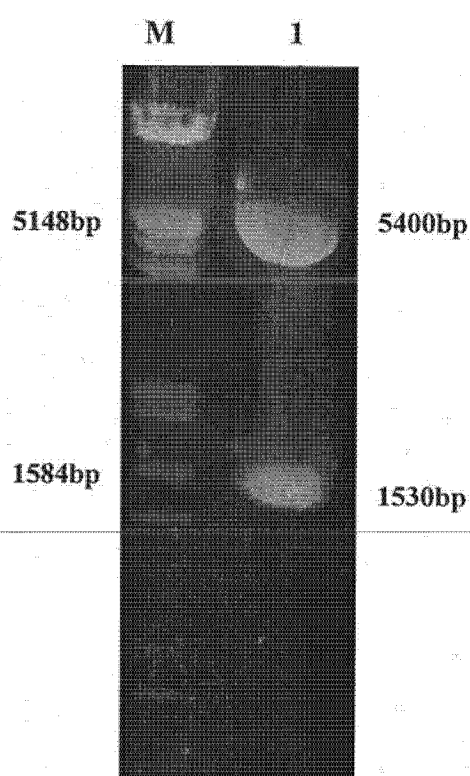
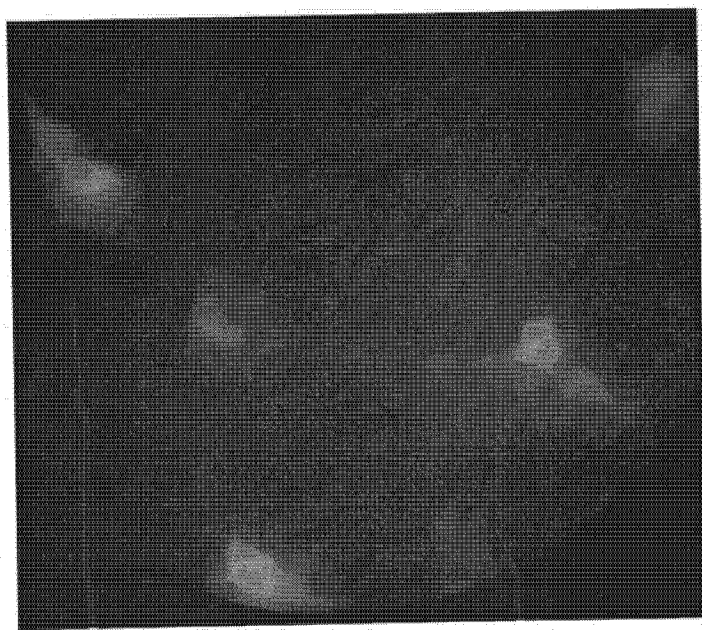


图 4



(10×40)

图 5

专利名称(译)	与抗病毒免疫相关的猪ISG60基因的TPR结构基序和细胞定位		
公开(公告)号	<a href="#">CN102559688A</a>	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201110180051.3	申请日	2011-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	罗廷荣 蔡新斌 孙石开 李晓宁 苏丽娟 尹珊 李晓泉 李延生		
发明人	罗廷荣 蔡新斌 孙石开 李晓宁 苏丽娟 尹珊 李晓泉 李延生		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/10 C12N15/79 C07K14/47 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

# 摘要(译)

本发明提供了与抗病毒免疫相关的猪ISG60基因的TPR(tetratricopeptide repeat)结构基序，ISG60基因的TPR结构基序含有病毒感染相关的调控元件序列，与现有报道的猪基因的TPR结构没有显著同源性。本发明还具体地涉及到猪ISG60基因的策略，鉴定了ISG60基因在细胞中的定位，通过ISG60基因的TPR结构基序，能够用于研究猪瘟病毒感染机制，并通过揭示该基因抗猪瘟病毒的机制，开发一种治疗猪瘟的药物。

