

• 动物及兽医生物技术 •

鸡 Foxp3 结构预测及组织表达谱分析

常贺, 高辉, 王永强, 高丽, 曹红, 李晓齐, 郑世军

中国农业大学动物医学院 农业动物流行病学重点实验室, 北京 100193

常贺, 高辉, 王永强, 高丽, 曹红, 李晓齐, 郑世军. 鸡 Foxp3 结构预测及组织表达谱分析. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2928-2938.

CHANG H, GAO H, WANG YQ, GAO L, CAO H, LI XQ, ZHENG SJ. Analysis of the structure of chicken Foxp3 and its expression profile in tissues. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2928-2938.

摘要: 本研究旨在克隆鸡 *foxp3* (*chfoxp3*) 基因全长编码区序列 (coding sequence, CDS), 并对其生物信息学及组织表达谱分析。以 50 日龄无特定病原鸡为样本, 从脾脏组织中克隆 *chfoxp3* 基因全长 CDS 序列, 利用在线工具和软件对 *chFoxp3* 进行生物信息学分析, 以实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测 *chfoxp3* 基因在鸡各组织中的表达分布情况。研究表明, *chfoxp3* 基因包含 882 bp 的开放阅读框, 编码 293 个氨基酸, *chFoxp3* 分子质量为 33.44 kDa, 属于亲水蛋白; *chFoxp3* 具有 Fox 转录因子家族典型的 forkhead 结构域, 含有核定位信号; 其二级结构由 α -螺旋 (29.35%)、延伸链 (10.92%)、 β -转角 (5.12%) 和无规则卷曲 (54.61%) 组成; *chfoxp3* 在不同组织中表达有差异, 在鸡心脏及胰腺中表达水平较高, 显著高于脾脏、法氏囊以及胸腺等免疫器官 ($P < 0.01$), 这一特点明显区别于哺乳动物; 通过系统进化树分析发现, 鸡 Foxp3 与其他野禽属于相同分支, 但与哺乳动物相差较远。这些研究结果为进一步深入研究 *chFoxp3* 的免疫调节功能奠定了基础。

关键词: 鸡; Foxp3; 克隆; 表达分析

Received: April 8, 2022; Accepted: May 31, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32130105); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-40)

Corresponding author: ZHENG Shijun. E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32130105); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-40)

Analysis of the structure of chicken *Foxp3* and its expression profile in tissues

CHANG He, GAO Hui, WANG Yongqiang, GAO Li, CAO Hong, LI Xiaoqi, ZHENG Shijun

Key Laboratory of Animal Epidemiology of the Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: In this study, we cloned the complete coding sequence (CDS) of chicken *foxp3* (*chfoxp3*) gene, analyzed its structure, and investigated its expression profile in different chicken tissues. To be specific, *chfoxp3* was cloned from the splenic tissue of 50-day-old specific-pathogen-free chickens, and analyzed by using online bioinformatics tools or software. The expression profiles of the *chfoxp3* gene in different chicken tissues were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results indicated that the *chfoxp3* gene contains an 882-bp open reading frame, encoding 293 amino acids hydrophilic protein with a molecular weight of 33.44 kDa. The chFoxp3 protein has a forkhead domain and carries a nuclear localization signal, which is typical in the Fox transcription factor family. The secondary structure of chFoxp3 consists of α -helix (29.35%), extended chain (10.92%), β -turn (5.12%) and random coil (54.61%). The expression of *chfoxp3* varied in different tissues. The expression levels of *chfoxp3* in chicken heart and pancreas were higher than in spleen, bursa of Fabricius, thymus, and other immune organs ($P < 0.01$), which was quite different from that of mammals. Phylogenetic tree analysis showed that chFoxp3 belonged to the same clade as other wild birds did, but was far different from that of mammals. These results may facilitate further research on the role of chFoxp3 in immune regulation.

Keywords: chicken; Foxp3; cloning; expression analysis

调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 是调控免疫应答最重要的细胞, 在维持机体自身稳定中发挥重要作用。而 Foxp3 是 Treg 标志性转录调控因子, 在 Treg 发育、成熟以及发挥功能中起关键作用^[1-3]。Foxp3 是 Fox (forkhead box) 蛋白家族成员之一, 其典型的 forkhead 结构域呈“翼状螺旋”结构^[4]。Treg 通过直接接触靶细胞或通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等抑制性细胞因子发挥抑制免疫应答的作用^[5]。研究发现, 小鼠 Foxp3 缺陷会引发 CD4⁺ T 细胞介导的淋巴细胞增殖性疾病, 表现为恶病质和多器官淋巴细胞浸润^[6]。人类 *foxp3* 基因突变会引起免疫失调、多发性内分泌疾病以及肠道疾病 X-连锁综

合征 (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, IPEX)^[7], 说明 Foxp3 在生命正常活动中发挥重要作用。

哺乳动物的 Foxp3 蛋白由 forkhead 结构域、锌指结构域和亮氨酸拉链 3 个主要的功能结构域组成, 另外其 N 末端还有一段富含脯氨酸的区域。Foxp3 的 forkhead 结构域是结合 DNA 启动子的区域, 其氨基酸序列在 Fox 转录因子家族相当保守, 其中含有核定位信号, 与 Foxp3 入核发挥转录调控作用直接相关^[8]。由于 Foxp3 是起免疫调控作用的转录调控因子, 在人和小鼠中, 主要表达于脾脏、胸腺和淋巴结等免疫器官和组织, 在其他器官组织中的表达量较

低^[9-10]。由于禽免疫应答调控机制一直不清楚，而鸡是否存在与人相同的 Treg 以及功能性 Foxp3 (chFoxp3) 转录调控因子引起人们极大的关注，因此阐明 chFoxp3 的生物学功能具有重要意义。

最近研究发现，鸡的确存在 *foxp3* 基因^[11]，但关于 chFoxp3 是否具有哺乳动物 Foxp3 类似的功能尚不清楚，因此深入研究 chFoxp3 十分重要。只有解析 chFoxp3 的生物学特性，才能揭示鸡 Treg 在免疫调控中的作用与机理，为全面了解免疫应答调控提供参考。本研究成功克隆了 *chfoxp3* 基因全长编码区序列 (coding sequence, CDS)，并对其进行了生物信息学分析和组织表达谱研究，为研究鸡 Treg 的功能奠定基础，也为丰富家禽免疫调控理论提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以 5 只 50 日龄无特定病原 (specific pathogen free, SPF) 鸡为实验材料，放血处死后分别采集脾脏、法氏囊、胸腺、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、腺胃、脑组织、十二指肠、胰腺、空肠、回肠、盲肠、直肠等组织样，置入液氮速冻后，保存于 -70 °C 备用。动物实验获中国农业大学动物福利与伦理委员会批准 (批准号：XXMB-2012-03-01-1；XXMBB-2012-03-15-1；SKLAB-2016-01-06)。

RNA 提取试剂盒购自飞捷公司，RNA 反

转录试剂盒、2×M5 HiPer SYBR Premix *EsTaq* plus (with Tli RNase H)、DL2000 plus DNA Marker 以及 M5 Hiper ECL Western HRP Substrate 均购自北京聚合美生物科技有限公司，SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System 购自 Thermo Fisher Scientific 公司，DNA 凝胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司，PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司，pEASY®-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 及大肠杆菌 DH5α 感受态细胞均购自北京全式金生物技术股份有限公司，无内毒素高纯度质粒小提中量试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司，转染试剂 JetPRIME 购自法国 Polyplus-transfection 公司，QuickBlock™ Western 一抗稀释液、DAPI 染色液均购自上海碧云天生物技术有限公司，GFP-tag Mouse mAb 购自 Proteintech 公司，β-actin Rabbit mAb 购自武汉爱博泰克 (ABclonal) 生物技术有限公司，辣根酶标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 引物设计与合成

根据 NCBI 数据库中 *chfoxp3* 基因序列 (GenBank 登录号：MT133687.1)，设计引物用于构建真核表达载体，并用 Primer Premier 5 软件设计实时荧光定量 PCR 引物，引物序列信息见表 1，引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)	Purpose
EGFP- <i>chfoxp3</i>	S: CGGACTCAGATCTCGAATGGCGGGTGCCCGGGAC A: TAGATCCGGTGGATCCTCAGCTCCGTGGGGCAG	914	PCR
<i>β-actin</i>	S: GTTACCCACACTGTGCCCATCTATG A: GTCACGCACAATTTCTCTCTCGG	159	qRT-PCR
<i>chfoxp3</i>	S: GCCACAACACCGCCACG A: CAGCCTCATCCACAGTCCATACA	111	qRT-PCR

S: sense primer; A: antisense primer.

1.3 RNA 提取及 cDNA 制备

以硅膜柱吸附法提取鸡各组织总 RNA, 取 2 μg 各组织总 RNA, 以聚合美公司反转录试剂盒反转录制备 cDNA, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取 1 μL 鸡脾脏组织总 RNA, 以 SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System 制备 cDNA, 用于 *chfoxp3* 基因全长 CDS 序列的克隆。

1.4 *chfoxp3* 基因的克隆及测序

以脾脏组织 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增目的基因, 反应体系体积为 50 μL , 包括: 2 μL cDNA 模板, 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL , 10 μL 5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} Plus), 4 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 0.5 μL PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/ μL), 29.5 μL ddH₂O。PCR 扩增程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 30 个循环; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 将特异性条带切胶回收后, 参照 pEASY®-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 说明书, 将 *chfoxp3* 基因片段克隆至 pEGFP-C1 真核表达载体构建 pEGFP-*chfoxp3* 质粒, 将构建的 pEGFP-*chfoxp3* 质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落, 摇菌后送往北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

1.5 真核表达系统表达 chFoxp3

以 jetPRIME 转染试剂将 pEGFP-*chfoxp3* 真核表达质粒 (pEGFP-C1 空质粒作为对照) 转染 DF-1 细胞, 24 h 后收取蛋白样品, 利用 GFP 标签抗体对 chFoxp3-GFP 融合蛋白进行 Western blotting 鉴定。另一方面, 将转染后的细胞经固定、透化后, 使用 DAPI 染料对细胞核进行染色, 随后通过激光共聚焦显微镜观察 chFoxp3 蛋白的亚细胞定位。

1.6 检测组织中 *chfoxp3* 的表达

以 qRT-PCR 检测鸡各组织中 *chfoxp3* 和内

参基因 *β -actin* 的表达, 引物序列见表 1。PCR 扩增体系体积为 20 μL , 包含: 10 μL 2 \times M5 HiPer SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNase H), 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 2 μL 鸡各组织 cDNA 模板, 7 μL RNase-free ddH₂O。PCR 扩增程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s (Ramp rate: 4.4 $^{\circ}\text{C/s}$); 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s (Ramp rate: 4.4 $^{\circ}\text{C/s}$), 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s (Ramp rate: 2.2 $^{\circ}\text{C/s}$, Acquisition Mode: Single), 共 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s (Ramp rate: 4.4 $^{\circ}\text{C/s}$), 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (Ramp rate: 2.2 $^{\circ}\text{C/s}$), 95 $^{\circ}\text{C}$ (Ramp rate: 0.11 $^{\circ}\text{C/s}$, Acquisition Mode: Continuous, Acquisitions: 5 per $^{\circ}\text{C}$) 融解曲线分析; 降温 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (Ramp rate: 2.2 $^{\circ}\text{C/s}$)。

以脾脏组织 *chfoxp3* mRNA 表达量为 1, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各组织 *chfoxp3* 的相对表达情况, 每个样品重复 3 次。

1.7 chFoxp3 生物信息学分析

从 NCBI 网站下载数据库中常见动物的 Foxp3 氨基酸序列, 包括: 人 (*Homo sapiens*, GenBank 登录号: NP_054728.2)、家鼠 (*Mus musculus*, GenBank 登录号: NP_473380.1)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, GenBank 登录号: XP_038955722.1)、野猪 (*Sus scrofa*, GenBank 登录号: XP_020935196.1)、牛 (*Bos taurus*, GenBank 登录号: XP_005228160.1)、马 (*Equus caballus*, GenBank 登录号: XP_023488959.1)、绵羊 (*Ovis aries*, GenBank 登录号: NP_001138419.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, GenBank 登录号: XP_021334102.1)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, GenBank 登录号: NP_001269822.1)、西藏山雀 (*Pseudopodoces humilis*, GenBank 登录号: NP_001310890.1)、鸮鹦鹉 (*Strigops habroptila*, GenBank 登录号: XP_030331320.1)、孟加拉雀 (*Lonchura striata domestica*, GenBank 登录号: XP_021407742.1) 以及家鸡 (*Gallus gallus*,

GenBank 登录号: QQZ00853.1) 的 Foxp3 氨基酸序列, 利用 DNASTar 的 MegAlign 分析软件进行同源性比较分析; 使用 EMBL 的多序列比对工具 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) Clustal Omega 进行多序列比对分析; 利用 MEGA 7.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 自展分析 bootstrap 1 000 次; 利用在线软件 ExPASy 服务器上的 PROSITE (<https://www.expasy.org/resources/prosite>)、ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 以及 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 等程序预测 chFoxp3 蛋白的结构域以及理化性质; 利用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 对 chFoxp3 蛋白二级结构进行预测。

1.8 数据统计分析

用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析并作图, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 *chfoxp3* 基因克隆及测序

提取脾脏组织总 RNA, 以 RT-PCR 反转录成 cDNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增 *chfoxp3* 基因全长 CDS 序列。结果表明, PCR 特异性产物条带大小约 900 bp (图 1), 与预期大小一致。测序结果表明, *chfoxp3* 基因全长 CDS 为 882 bp, 编码 293 个氨基酸, 与 NCBI 数据库 (GenBank 登录号: MT133687.1) 发表的序列一致。

2.2 *chfoxp3* 真核表达鉴定

将 *chfoxp3* 基因插入 pEGFP-C1 载体, 构建 pEGFP-*chfoxp3* 真核表达质粒。将 pEGFP-*chfoxp3* 以及 pEGFP-C1 对照质粒转染 DF-1 细胞, 24 h 后收取蛋白样品, 利用 GFP 标签抗体对

chFoxp3-GFP 融合蛋白进行 Western blotting 鉴定, chFoxp3-GFP 融合蛋白分子量约为 61 kDa, 与预期大小相符 (图 2)。另一方面, 将转染后的细胞经固定、透化后, 使用 DAPI 染料对细胞核进行染色, 随后通过激光共聚焦显微镜观

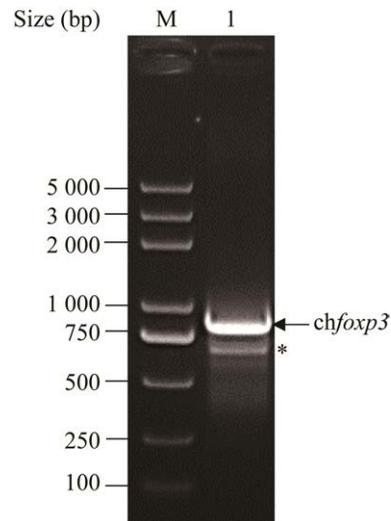


图 1 *chfoxp3* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of PCR amplification of *chfoxp3* gene. M: DL2000 plus DNA Marker; lane 1: PCR amplification product of *chfoxp3*. *: non-specific band.

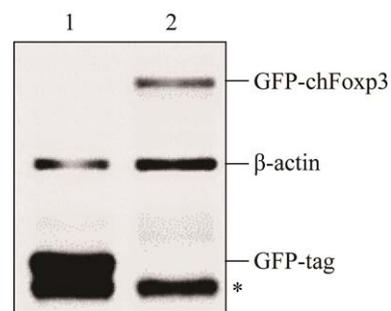


图 2 Western blotting 检测 chFoxp3-GFP 融合蛋白的表达情况

Figure 2 Western blotting of the chFoxp3-GFP fusion protein. Lane 1: DF-1 cells transfected with pEGFP-C1 control plasmid; lane 2: DF-1 cells transfected with pEGFP-*chfoxp3*. β -actin was used for loading control. *: non-specific band.

察 chFoxp3 蛋白的亚细胞定位。转染 pEGFP-C1 对照质粒的 DF-1 细胞表达绿色荧光, 绿色荧光蛋白在胞浆中均匀散在分布, 而转染 pEGFP-chfoxp3 的 DF-1 细胞表达的绿色荧光集中于细胞核 (图 3), 说明鸡 chFoxp3-GFP 融合蛋白进入了细胞核, 即 chFoxp3 含有 Fox 转录因子家族共有的入核信号肽。

2.3 chfoxp3 在鸡不同组织中的表达情况

采用 qRT-PCR 方法检测 chfoxp3 mRNA 在鸡脾脏、法氏囊、胸腺、心脏、肝脏、肺脏、肾脏、腺胃、脑组织、十二指肠、胰腺、空肠、回肠、盲肠、直肠等 15 种不同组织中的表达情况。检测结果发现, chfoxp3 在鸡心脏、胰腺中表达水平显著高于其他组织, 也高于脾脏、法氏囊以及胸腺等免疫器官 (图 4), 这与哺乳动物 (人和家鼠) foxp3 在组织中的分布有显著区别, 人和家鼠 foxp3 主要在免疫器官或组织中

表达^[9-10]。

2.4 chFoxp3 序列比对及系统进化树分析

利用 DNASTar 的 MegAlign 分析软件, 对鸡与其他物种的 foxp3 基因的核苷酸序列及相应蛋白的氨基酸序列进行同源性比较分析 (表 2), 结果表明 chFoxp3 氨基酸序列与野禽西藏山雀、孟加拉雀、鸚鸚的相似性为 80% 左右, 而与哺乳动物相似性则低于 50%。将 chFoxp3 与常见动物的 Foxp3 氨基酸序列进行多序列比对分析 (图 5), 亦可见 chFoxp3 氨基酸序列与野禽的相似性较高, 而与其他物种的相似性较低。

利用 ExPASy 的 PROSITE 软件对 chFoxp3 蛋白保守结构域进行预测发现, 195-281 位氨基酸区间存在有 Fox 转录因子家族典型的 forkhead 结构域, 而且该结构域的氨基酸序列与野禽及哺乳动物的 Foxp3 高度相似, 具有保守性。除了 forkhead 结构域外, chFoxp3 蛋白 N 端

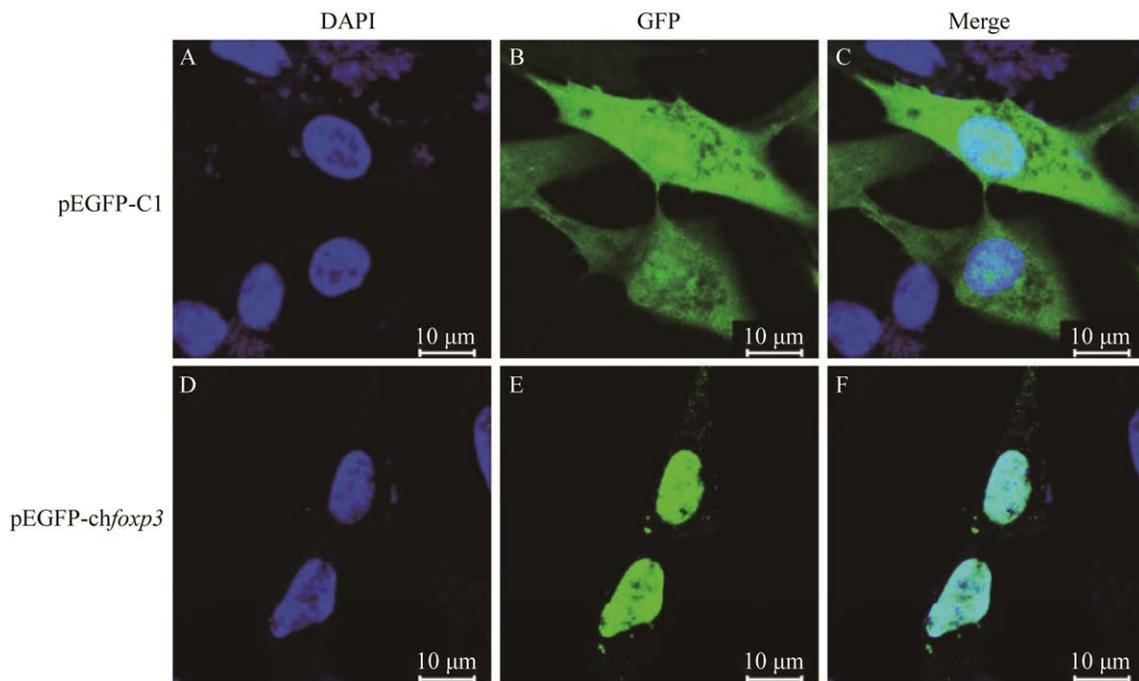


图 3 激光共聚焦显微镜观察 chFoxp3-GFP 融合蛋白在 DF-1 细胞中的表达

Figure 3 Observation of the expression of chFoxp3-GFP fusion protein in DF-1 cells using laser confocal microscopy.

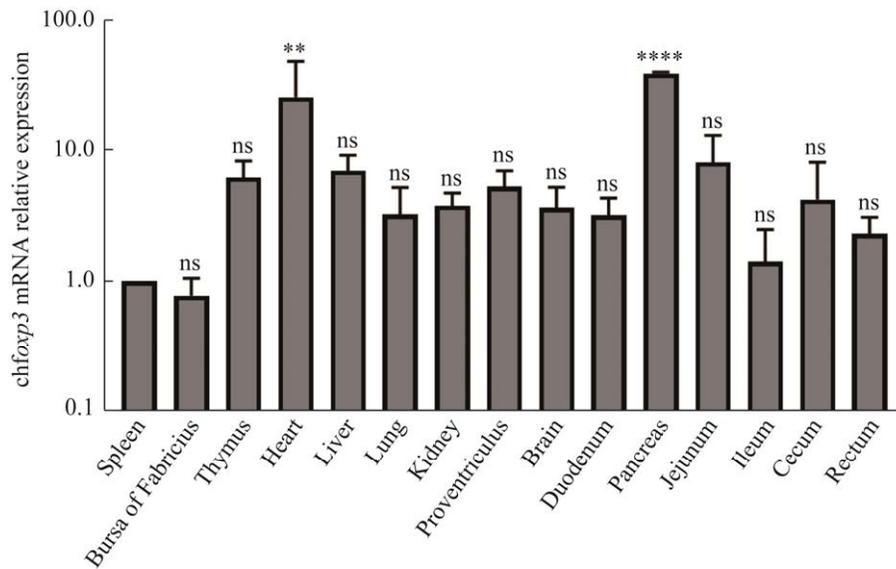


图 4 *chfoxp3* 基因在鸡不同组织中的表达情况

Figure 4 Relative expression level of *chfoxp3* in different tissues of chicken. qRT-PCR was used to detect the expression of *chfoxp3* in chicken spleen and other tissues at mRNA level. The expression level of *chfoxp3* in the spleen was set to 1, and the relative expression levels of *chfoxp3* in each tissue were analyzed. Quantitative statistics were carried out in the three repeated tests. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

表 2 不同物种 *foxp3* 基因核苷酸及氨基酸序列同源性比较结果

Table 2 Homology of nucleotide and amino acid sequences of *foxp3* gene from different species.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	–	86.9	86.5	80.8	90.3	91.2	89.8	42.3	32.8	41.8	42.1	43.2	44.3
2	85.1	–	95.8	77.7	87.4	87.1	87.6	42.1	33.2	42.8	43.5	43.5	46.7
3	84.3	93.9	–	76.3	81.6	83.3	86.7	42.7	32.7	42.8	43.1	43.2	46.0
4	83.5	78.9	78.9	–	86.2	84.7	85.9	33.2	27.1	34.8	34.5	36.9	36.5
5	89.4	84.8	80.4	86.7	–	88.7	99.5	42.8	32.5	42.5	42.5	43.5	44.6
6	90.5	85.5	82.6	85.8	89.4	–	93.3	43.7	32.8	42.9	42.8	44.2	45.0
7	89.4	85.4	84.3	86.7	98.5	91.7	–	42.8	32.5	42.2	42.1	43.2	44.3
8	56.6	55.4	55.9	50.1	56.6	55.9	56.6	–	59.4	43.7	43.0	43.7	44.8
9	49.9	47.7	47.6	46.6	49.2	50.4	49.3	63.5	–	32.8	34.1	32.4	33.3
10	54.8	53.8	53.5	49.4	54.6	55.5	54.0	49.1	46.0	–	80.3	93.3	80.8
11	54.3	54.7	54.6	48.5	54.1	54.1	53.6	49.4	45.0	84.4	–	79.9	83.7
12	53.9	52.7	52.2	49.0	54.0	54.6	53.3	48.6	44.3	93.9	83.0	–	79.7
13	52.9	52.4	52.7	47.6	52.9	52.9	52.4	48.8	43.7	81.3	83.4	79.4	–

The lower left was nucleotide sequence homology and the upper right was amino acid sequence homology. 1: *Homo sapiens*; 2: *Mus musculus*; 3: *Rattus norvegicus*; 4: *Sus scrofa*; 5: *Bos taurus*; 6: *Equus caballus*; 7: *Ovis aries*; 8: *Danio rerio*; 9: *Oreochromis niloticus*; 10: *Pseudopodoces humilis*; 11: *Strigops habroptila*; 12: *Lonchura striata domestica*; 13: *Gallus gallus*. Homology data of chicken (*Gallus gallus*) with other species were shown in boldface.

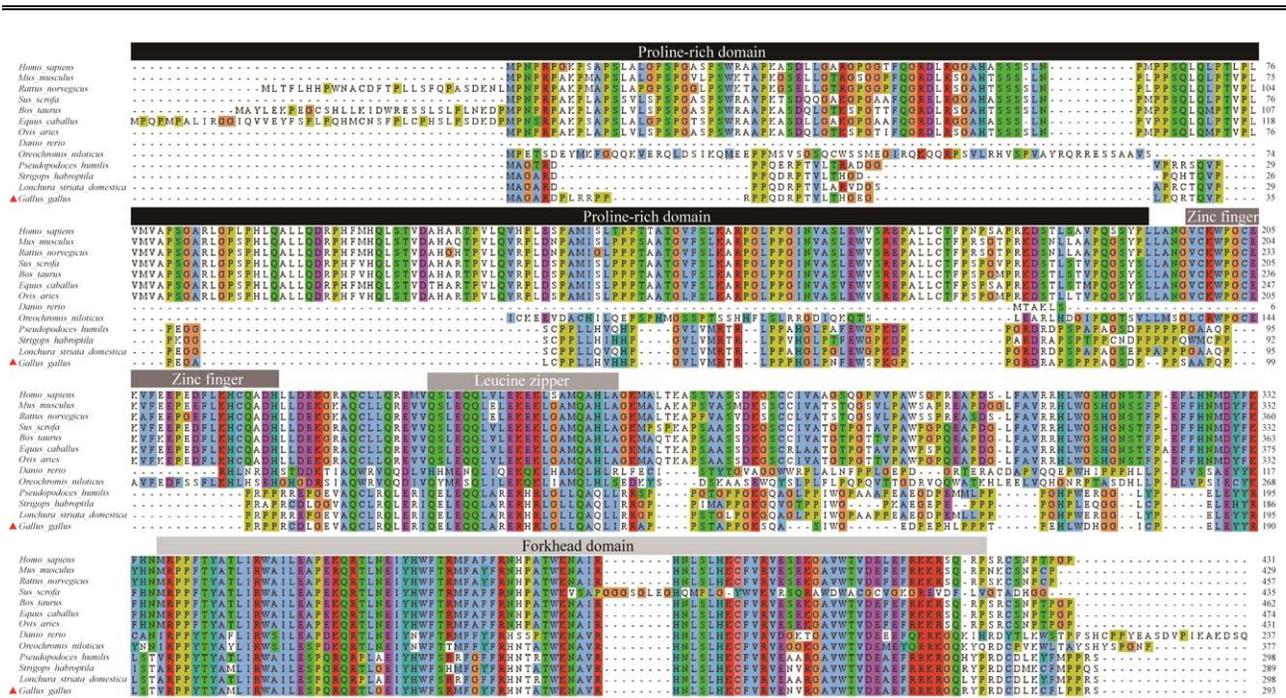


图5 不同物种 Foxp3 氨基酸序列比对

Figure 5 Alignment of amino acid sequences of Foxp3 from different species.

还含有一个脯氨酸富集区 (proline-rich domain), 该段区域比哺乳动物 Foxp3 相应的区域短 (图 5), 以及亮氨酸拉链结构 (leucine zipper domain), 但不含哺乳动物 Foxp3 所具有的锌指结构域 (zinc finger domain)。采用 MEGA7.0 软件邻接法构建系统进化树 (图 6), chFoxp3 与野禽 Foxp3 属于同一分支, 与哺乳动物 Foxp3 相差较远。而作为参考物种的斑马鱼和其他鱼类属于同一分支, 单独列为一支。

2.5 chFoxp3 理化性质及亲/疏水性分析

利用 ExPASy 的 ProtParam 软件对 chFoxp3 蛋白进行理化性质分析, 得出分子式为 $C_{1493}H_{2323}N_{457}O_{401}S_{11}$, 分子质量为 33.44 kDa, 理论等电点为 9.87, 含有 20 种基本氨基酸, 其中含量最多的是脯氨酸 (16.4%), 精氨酸 (11.9%) 次之。利用 ExPASy 中的 ProtScale 程序对 chFoxp3 蛋白进行亲/疏水性分析, 第 205 位的精氨酸疏水性最强 (最高分值为 1.856), 第 277 位的谷氨酰胺

胺亲水性最强 (最低分值为 -3.189), 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.796 , 即 chFoxp3 为亲水性蛋白。

2.6 chFoxp3 二级结构预测

利用 SOPMA 在线软件对 chFoxp3 蛋白二级结构进行预测, 结果显示 chFoxp3 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋 (29.35%)、延伸链 (10.92%)、 β -转角 (5.12%) 和无规则卷曲 (54.61%) 组成 (图 7)。

α -螺旋在 DNA 结合基序 (DNA-binding motifs) 中有非常重要的作用, 这是由于 α -螺旋的直径为 1.2 nm, 与 B 型 DNA 大沟的直径相等, 因此能够和 B 型 DNA 紧密结合, 在 chFoxp3 蛋白的亮氨酸拉链结构域以及 forkhead 结构域中均含有 α -螺旋, 说明 chFoxp3 具有典型的转录调控因子的特征。由于 Fox 蛋白家族典型的 forkhead 结构域呈“翼状螺旋”结构, 又称“螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix)”结构^[4], 因此推

他成员 *Foxp1*、*Foxp2* 和 *Foxp4* 相同, 但 *Foxp1*、*Foxp2* 和 *Foxp4* 的 forkhead 结构域均定位于序列中央, 而 *Foxp3* 的 forkhead 结构域则位于其 C 末端, 具有一定的独特性。ch*Foxp3* 的 forkhead 结构域的氨基酸序列与野禽及哺乳动物高度相似, 具有保守性, 其中包含核定位信号位点^[8], 该信号位点与哺乳动物 *Foxp3* 相应位置的氨基酸序列 100%一致^[11]。ch*Foxp3* 同样含有介导二聚化的亮氨酸拉链结构^[12-14], 与哺乳动物相似。然而, ch*Foxp3* 蛋白不含哺乳动物 *Foxp3* 中的锌指结构域。研究发现, *Foxp3* 作为转录因子, 其 N 端的脯氨酸富集区参与发挥转录抑制活性相关的功能, 这一特点将 *Foxp3* 与家族其他成员 *Foxp1*、*Foxp2* 和 *Foxp4* 区分开来 (后者 N 端富含谷氨酰胺)^[14], 而 ch*Foxp3* 的 N 端脯氨酸富集区的长度比哺乳动物 *Foxp3* 相应区域短 (图 5), 脯氨酸的含量以及脯氨酸富集区的长度与 *Foxp3* 抑制功能是否相关目前尚不明确。这些信息表明, ch*Foxp3* 蛋白的 C 端结构总体上与哺乳动物相似, 而 N 端结构与哺乳动物存在差异, 其功能是否与哺乳动物相同有待于进一步研究。

本研究成功克隆了 ch*foxp3* 基因全长 CDS 序列, 并对其进行了生物信息学及组织表达谱分析。通过构建系统进化树发现, ch*Foxp3* 与野禽 *Foxp3* 属于同一分支, 与哺乳动物 *Foxp3* 相差较远。2022 年, Burkhardt 等初步分析了 ch*foxp3* 在淋巴细胞群中的表达模式, 发现 ch*foxp3* 除了表达于外周淋巴器官 (脾脏、盲肠扁桃体) 的 $CD4^+CD25^+$ T 细胞中, 还表达于胸腺中未发育成熟的 $CD4^-CD8^-$ T 细胞^[11], 这一特点与哺乳动物具有显著差别。本研究利用实时荧光定量 PCR 检测了 ch*foxp3* 基因在鸡各组织中的表达情况, 发现 ch*foxp3* 基因在鸡心脏、胰腺中的表达显著高于其他组织, 也高于脾

脏、法氏囊以及胸腺等免疫器官 ($P < 0.01$)。相比较而言, 人和家鼠的 *foxp3* 在脾脏、淋巴结中表达水平较高, 而在心脏、胰腺以及肠道等部位表达量较低^[9-10]。因此, ch*foxp3* 的组织表达分布与人、鼠等哺乳动物具有显著区别。由于鸡和其他禽类的免疫系统与哺乳动物存在差异, 而 *Foxp3* 是发挥免疫调控作用的重要转录调控因子, ch*Foxp3* 的结构、功能及组织表达谱很可能与哺乳动物有所不同。本文的相关研究结果证实了这一推测。

在很长一段时间内, 人们认为禽类在进化过程中天然缺失 *foxp3* 基因, 因此已有的研究均暂且将 $CD4^+CD25^+$ T 细胞确定为鸡的 Treg, 并发现其与多种疾病的发病机制有关^[15-17]。鸡在感染传染性法氏囊病毒后, $CD4^+CD25^+$ T 细胞迅速从胸腺和脾脏中迁出, 经血液循环到病毒靶器官法氏囊发挥作用, 这可能反映了传染性法氏囊病毒引起免疫抑制的机理, 即利用宿主免疫抑制细胞抑制抗病毒免疫应答^[16]。

然而 2013 年, 在西藏山雀 (*Pseudopodoces humilis*) 基因组研究结果公布时, *foxp3* 在其基因组中被自动注释^[18]。随后, Denyer 等在猎鹰中进一步识别出单个 *foxp3* 外显子^[19]。上述研究为禽类中确实存在 *foxp3* 提供了证据。而禽类基因组的高 GC 含量以及 GC 串联重复序列导致其容易形成二级结构, 降低了测序质量^[20-22], 从而给禽类 *foxp3* 的鉴定造成困难。2022 年 3 月 Burkhardt 等研究发现, 鸡的确存在 *foxp3* 基因^[11]。由于 *Foxp3* 是 Treg 的特异性标志, 因此 ch*foxp3* 基因的成功鉴定为禽类 Treg 的研究明确了方向。

4 结论

本研究成功克隆了 ch*foxp3* 基因, 其包含 882 bp 的开放阅读框, 编码 293 个氨基酸。序

列分析发现, *chFoxp3* 含有 Fox 转录因子家族典型的 forkhead 结构域, 并含有核定位信号。在 DF-1 细胞中过表达 *chFoxp3* 时, *chFoxp3* 聚集于细胞核, 符合转录调控因子的基本特征。根据系统进化树分析发现, 鸡 *Foxp3* 与其他野禽属于同一分支, 与哺乳动物相差较远。另外发现, *chfoxp3* 在鸡心脏及胰腺中的表达水平高于其他组织, 显著高于脾脏、法氏囊以及胸腺等免疫器官 ($P < 0.01$)。这些研究结果为进一步深入研究 *chFoxp3* 的功能奠定了基础, 也为研究鸡 Treg 在免疫应答中的作用提供了参考。

REFERENCES

- [1] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, 299(5609): 1057-1061.
- [2] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 330-336.
- [3] Khattri R, Cox T, Yasayko SA, et al. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol*, 2003, 4(4): 337-342.
- [4] Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, et al. Fox's in development and disease. *Trends Genet*, 2003, 19(6): 339-344.
- [5] 郑世军. 动物分子免疫学. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Zheng SJ. *Veterinary molecular immunology*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [6] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 68-73.
- [7] Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*, 2000, 106(12): R75-R81.
- [8] Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA, et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol*, 2006, 177(5): 3133-3142.
- [9] Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(2): 397-406.
- [10] Yue F, Cheng Y, Breschi A, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 2014, 515(7527): 355-364.
- [11] Burkhardt NB, Elleder D, Schusser B, et al. The discovery of chicken Foxp3 demands redefinition of avian regulatory T cells. *J Immunol*, 2012, 188(5): 1128-1138.
- [12] Rudra D, DeRoos P, Chaudhry A, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol*, 2012, 13(10): 1010-1019.
- [13] Chae WJ, Henegariu O, Lee SK, et al. The mutant leucine-zipper domain impairs both dimerization and suppressive function of Foxp3 in T cells. *PNAS*, 2006, 103(25): 9631-9636.
- [14] Deng GP, Xiao Y, Zhou ZC, et al. Molecular and biological role of the FOXP3 N-terminal domain in immune regulation by T regulatory/suppressor cells. *Exp Mol Pathol*, 2012, 93(3): 334-338.
- [15] Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. Regulatory T cell properties of chicken CD4⁺CD25⁺ cells. *J Immunol*, 2011, 186(4): 1997-2002.
- [16] Yu XX, Rui L, Shao Q, et al. Changes of CD4⁺CD25⁺ cells ratio in immune organs from chickens challenged with infectious bursal disease virus strains with varying virulences. *Viruses*, 2015, 7(3): 1357-1372.
- [17] Selvaraj RK. Avian CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: properties and therapeutic applications. *Dev Comp Immunol*, 2013, 41(3): 397-402.
- [18] Qu YH, Zhao HW, Han NJ, et al. Ground tit genome reveals avian adaptation to living at high altitudes in the Tibetan Plateau. *Nat Commun*, 2013, 4: 2071.
- [19] Denyer MP, Pinheiro DY, Garden OA, et al. Missed, not missing: phylogenomic evidence for the existence of avian FoxP3. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150988.
- [20] International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 2004, 432(7018): 695-716.
- [21] Hron T, Pajer P, Pačes J, et al. Hidden genes in birds. *Genome Biol*, 2015, 16: 164.
- [22] Beauclair L, Ramé C, Arensburger P, et al. Sequence properties of certain GC rich avian genes, their origins and absence from genome assemblies: case studies. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 734.

(本文责编 郝丽芳)