

抗病毒基因 MxA 真核表达载体的构建及在鸡细胞中的表达

刘 莉 采克俊 张易祥 何 湃¹ 丁志丽 张念慈*

(湖州师范学院生命科学学院, 湖州 313000; ¹ 苏州大学生命科学学院, 苏州 215006)

摘要 将人抗病毒蛋白基因 MxA 与携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的真核表达质粒重组后构建 MxA 基因真核表达载体 pEGFP-C1-MxA。经 PCR 和酶切方法鉴定后, 重组质粒在脂质体介导下转染鸡成纤维细胞和睾丸组织原代细胞, 通过荧光观察, RT-PCR 及细胞免疫组化检测目的基因的表达。结果表明, MxA 基因片段已经被克隆到 pEGFP-C1 表达载体, 成功构建了 MxA 基因真核表达载体 pEGFP-C1-MxA。经该重组质粒转染后的鸡细胞的胞质中呈现颗粒状分布的绿色荧光, RT-PCR 扩增出 EGFP 和 MxA 基因的特异性片断, 免疫组化结果显示 EGFP 报告基因在细胞内的阳性表达, 并表现出 MxA 的表达特征, 间接证明了 MxA 可在鸡细胞中表达。MxA 基因真核表达载体的成功构建以及在鸡细胞中的表达为进一步研究 MxA 基因在抗禽病毒性疾病中的应用打下了基础。

关键词 MxA 基因; 转染; 表达; 鸡细胞

随着家禽高密度集约化生产的发展, 家禽爆发的疾病越来越多, 特别是人畜共患病 - 禽流感有不断爆发蔓延的趋势, 给人类的健康和禽业的发展构成了巨大的威胁^[1]。迄今为止, 病毒性疾病的治疗仍是难题。干扰素(IFN)具有很强的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节的生物学活性, 作为 IFN 抗病毒重要的机制之一是通过诱导抗病毒蛋白的表达而发挥作用。人 MxA 是由 I 型干扰素诱导宿主细胞所产生的抗病毒蛋白家族的成员之一, 具有 GTP 酶活性, MxA 的广谱抗病毒的作用已被证实^[2-4]。家禽中鸭的 Mx 无抗病毒活性^[5], 鸡的 Mx 的抗病毒活性受 631 位氨基酸的影响: 当 631 位氨基酸为天冬酰胺时有抗病毒活性, 为丝氨酸时则无抗病毒活性^[6-7]。本研究采用基因工程重组技术, 构建携带绿荧光蛋白和 MxA 融合基因的真核表达质粒 pEGFP-C1-MxA, 再经脂质体介导转染鸡细胞, 使 MxA 基因在鸡细胞中表达, 旨在为进一步开展 MxA 在抗鸡病毒性疾病中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pCDNA3.1(+)-MxA 和 pEGFP-C1, 以及大肠杆菌 DH5 α 均由湖州师范学院细胞工程研究所实验室提供。

1.1.2 试剂 DNA marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Taq 酶、质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒均为 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司产品。单克隆抗体 GFP (B-2)及免疫组化染色试剂购自 Santa Cruz 生物技术有限公司。

1.1.3 鸡胚及其孵化 受精蛋来源于广州温氏青山种鸡场, 品种为广西土鸡(Guangxi native broilers), 孵化温度为 37.5 °C, 相对湿度为 60%, 采用德国 Grumbach BSS-420 自动孵化器孵蛋。

1.1.4 引物设计与合成 根据 MxA 基因序列和 pEGFP-C1 载体序列设计 3 对引物用于检测, 分别为: 检测 MxA 基因的上游引物 5'-ACGAAAATGAAAA-ATGTTT-3', 下游引物 5'-GAGAGAGAAGGTGAG-AAGCT-3', 预计扩增靶序列大小为 462 bp; 检测 EGFP 基因的上游引物 5'-GCGAATTCATGGTGAGCAA-GGGCGAGGAG-3', 下游引物 5'-GCCTCGAGGATT-ATGATCAGTTATCTAG-3', 预计扩增靶序列大小为 812 bp; 检测 EGFP-MxA 融合基因的上游引物 5'-GCGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3', 下游引物 5'-GCCTCGAGTATTAT TCTGAGTCC-

收稿日期: 2007-10-25 接受日期: 2007-12-07

国家自然科学基金项目(No.30500270), 浙江省科技计划重点项目(No.2005C22052), 浙江省自然科学基金项目(No.Y304194)资助

* 通讯作者。Tel: 0572-2322053, E-mail: nczhang@hutc.zj.cn

GGACTTGTAC-3', 预计扩增靶序列大小为 2 765 bp。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建、转化及鉴定 提取质粒 pCDNA3.1(+)-MxA 和 pEGFP-C1, 采用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *ApaI* 分别对两种质粒双酶切, 并用胶回收试剂盒回收 MxA 目的基因片段和 pEGFP-C1 载体片段, 然后利用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞。转化子经 PCR 筛选后, 提取质粒, 采用酶切和双重 PCR 鉴定重组质粒。

1.2.2 转染细胞的制备^[8] 鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblast, CEF)取自 9~10 日龄的鸡胚。将其除去头部、翅膀及内脏; 用 EDTA-胰蛋白酶消化后, 细胞悬液经 300 目网筛过滤, 离心去上清液, 重悬细胞沉淀并计数。以 5×10^5 个/ml 的密度接种到培养瓶中, 于 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养, 待细胞铺满培养瓶底部时, 进行常规消化传代, 以 5×10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板中, 于 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度、饱和湿度条件下培养。待汇片至 70%~80% 时用于细胞转染。

鸡睾丸组织原代细胞取自 18 日龄鸡胚。将其剪开腹部, 取出睾丸(有两个白色的性腺者为雄性), 剥离睾丸白膜和血管, 剪碎, 用胶原酶消化(于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15~30 min), 离心收集细胞混合液, 再用胰蛋白酶消化 5 min, 然后加含血清的培养基终止消化。过滤后细胞计数, 以 5×10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板中, 于 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。待汇片至 70%~80% 时用于细胞转染。

1.2.3 重组质粒的制备及体外转染鸡细胞 将少量提取并纯化的重组质粒 pEGFP-C1-MxA 和对照质粒 pEGFP-C1 的 DNA 调整浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 备用。采用脂质体转染试剂 Lipofectin 进行转染, 方法参照说明书进行。

1.2.4 荧光显微镜观察 EGFP 在细胞内的表达和分布 将上述培养的鸡胚成纤维细胞和鸡睾丸组织细胞转染 48 h 后, 在荧光倒置显微镜下观察自发绿色荧光的被转染细胞, 照相记录。

1.2.5 RT-PCR 检测基因的转录 采用 TRIZOL 法提取转染后细胞的总 RNA。利用 RT-PCR 试剂盒检测 EGFP 和 MxA 基因的转录。参照说明书进行。

1.2.6 免疫组化检测基因的表达 将转染 48 h 后的细胞, 经 4% 多聚甲醛固定后, 用单克隆抗体 GFP (B-2) 进行常规的细胞免疫组化检测。

2 结果

2.1 重组质粒 pEGFP-C1-MxA 的构建与鉴定

体外连接转化获得的重组质粒 pEGFP-C1-MxA 经 PCR 和酶切进行鉴定。酶切鉴定的结果表明, pEGFP-C1-MxA 质粒经过 *EcoRI* 单酶切后, 可获得单一的 6.7 kb 条带; 经 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切后, 电泳结果显示有两条分别约为 4.7 kb 和 2 kb 的条带, 与 pEGFP-C1 载体和 MxA 全基因片段的长度相符(图 1)。以 pEGFP-C1-MxA 质粒为模板, 采用 EGFP 和 MxA 两对特异性引物进行双重 PCR 扩增, 结果显示扩增出 460 bp 左右和 810 bp 左右的特异性条带(图 2)。上述结果证实 MxA 基因已正确插入了 pEGFP-C1 载体, 成功获得了重组质粒 pEGFP-C1-MxA。

2.2 重组质粒转染细胞后的荧光检测

重组质粒转染到 CEF 48 h 后, 用荧光倒置显微

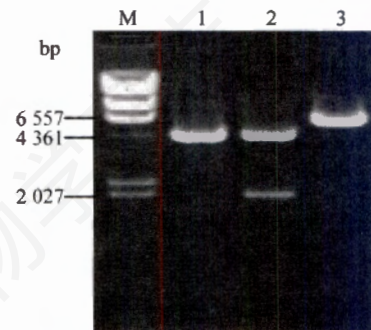


图1 重组质粒 pEGFP-C1-MxA 酶切鉴定

M: λ -HindIII digest DNA marker; 1: *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切质粒 pEGFP-C1; 2: *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切重组质粒 pEGFP-C1-MxA; 3: *BamHI* 单酶切重组质粒 pEGFP-C1-MxA。

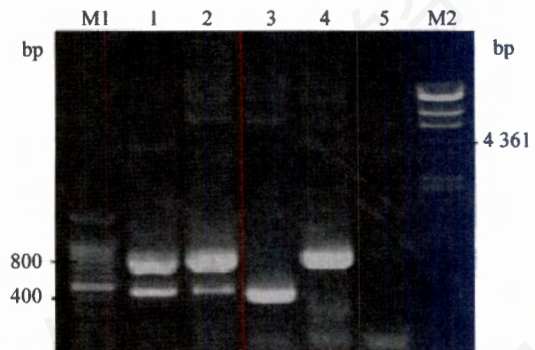


图2 重组质粒 pEGFP-C1-MxA 的 PCR 鉴定

M1: 100 bp DNA ladder; 1、2: 以重组质粒为模板扩增 EGFP 和 MxA 目的片段; 3: 以质粒 pCDNA3.1(+)-MxA 为模板扩增 MxA 目的片段; 4: 以质粒 pEGFP-C1 为模板扩增 EGFP 目的片段; 5: 阴性对照; M2: λ -HindIII digest DNA marker。

镜观察到CEF中绿色荧光蛋白的表达,且呈现出胞浆中颗粒状表达,胞核中无表达的特征现象(图 3A),而空载体质粒 pEGFP-C1 转染 CEF,镜下可见绿色荧光分布在细胞质和细胞核内,细胞质内的荧光强度较均匀,细胞核的绿色荧光强度强于细胞质(图 3B),阴性对照组的细胞未见绿色荧光。

重组质粒转染睾丸组织原代细胞 48 h 后,可观察到胞浆中呈颗粒分布的绿色荧光(图 4A),其中被转染的大多数为支持细胞,少数为圆形细胞,而这些圆形细胞多为精子前体细胞(相关文章另发表)。空

载体质粒 pEGFP-C1 转染到鸡睾丸组织细胞后,镜下可见绿色荧光分布在细胞质和细胞核内,无颗粒分布特征(图 4B)。阴性对照组细胞中没有绿色荧光出现。由于在鸡睾丸组织细胞中表达的是融合蛋白,说明人的 MxA 基因也可以在鸡睾丸组织细胞中表达,并且可以在精子的前体细胞中表达,为转基因鸡的研究提供了新的途径和实验基础。

将重组质粒及对照质粒转染后的 CEF 及鸡睾丸组织细胞和未转染的阴性对照细胞提取总 RNA 进行

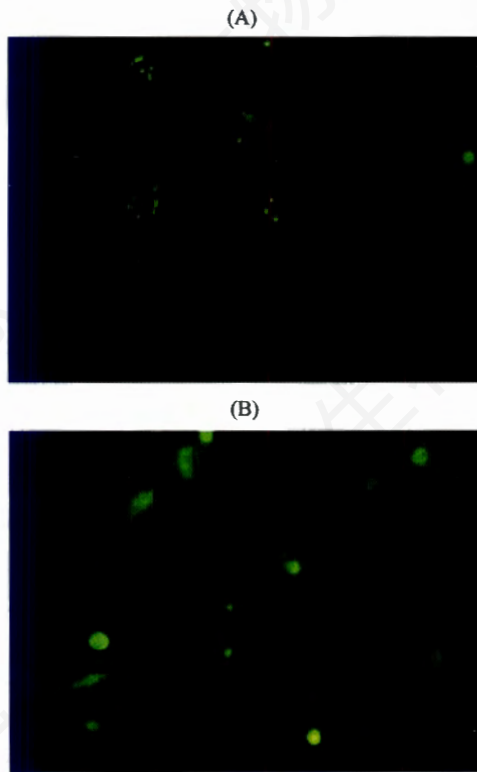


图 3 重组表达载体在 CEF 中表达

A: pEGFP-C1-MxA 转染 CEF; B: pEGFP-C1 转染 CEF。

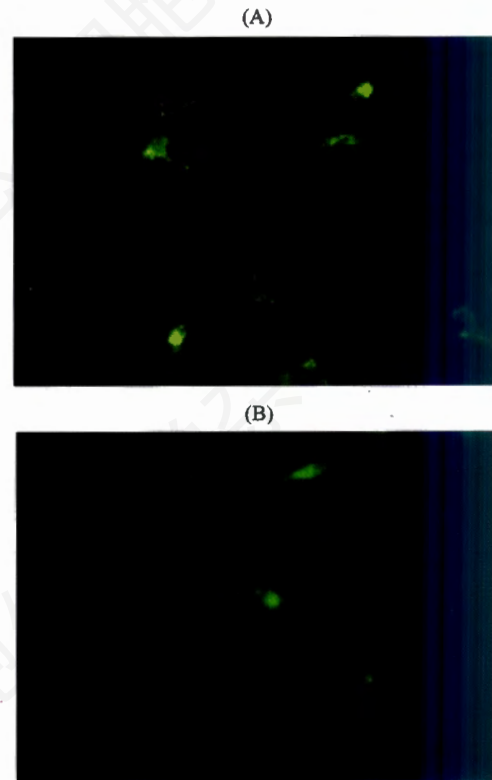


图 4 重组表达载体在鸡睾丸组织细胞中表达

A: pEGFP-C1-MxA 转染鸡睾丸细胞; B: pEGFP-C1 转染鸡睾丸细胞。

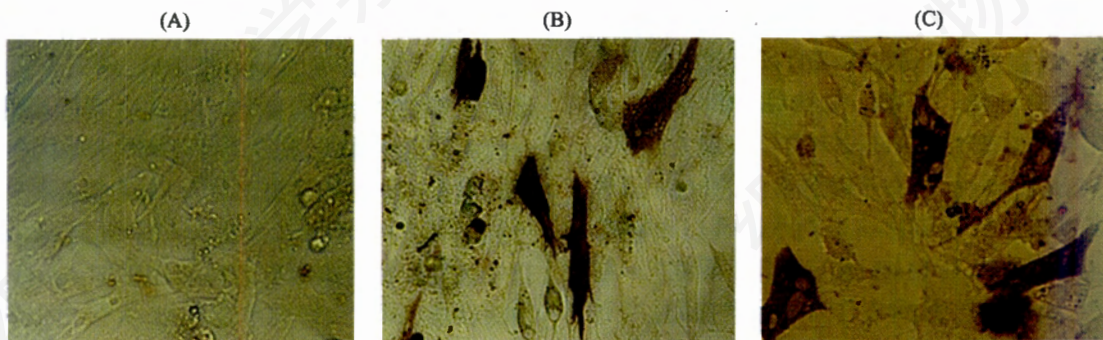


图 6 重组质粒转染 CEF 的免疫组化鉴定

A: 未经转染的 CEF; B: 经空载体质粒 pEGFP-C1 转染的 CEF; C: 经重组质粒 pEGFP-C1-MxA 转染的 CEF。

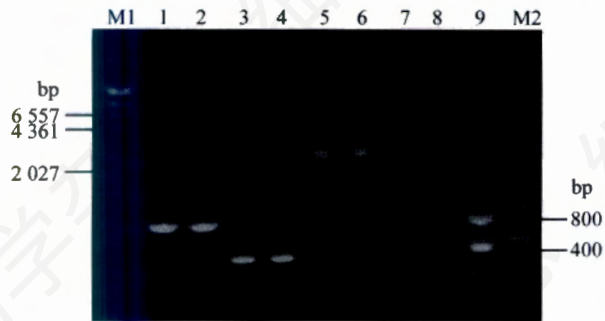


图5 转染鸡细胞的RT-PCR鉴定

M1: λ -HindIII digest DNA marker; 1、2: pEGFP-C1 转染 CEF 和鸡睾丸细胞后扩增 EGFP 目的片段; 3、4: pEGFP-C1-MxA 转染 CEF 和鸡睾丸细胞后扩增 MxA 目的片段; 5、6: pEGFP-C1-MxA 转染 CEF 和鸡睾丸细胞后扩增 EGFP-MxA 融合基因片段; 7、8: 阴性对照组(从未转染的 CEF 和鸡睾丸组织细胞中扩增 EGFP-MxA 融合基因片段); 9: 质控组(以 pEGFP-C1 质粒 DNA 为模板扩增 EGFP 和 MxA 目的片段); M2: 100 bp DNA ladder marker。

RT-PCR 检测, 结果显示重组质粒转染后的细胞可扩增出约为 460 bp 和 2 800 bp 的条带, 而空载体对照组扩增出一条约 810 bp 的条带, 阴性对照组则没有出现相应的条带(图 5)。上述结果表明 MxA 基因已成功转入 CEF 和鸡睾丸组织细胞内, 并能在 CEF 和鸡睾丸组织细胞中有效转录为 mRNA。

2.3 免疫组化检测转染细胞中目的基因的表达

为了进一步证实外源基因在转染后的 CEF 中表达, 采用免疫组化的方法检测 EGFP 的表达。由于 MxA 与 EGFP 为融合蛋白, 因此, EGFP 的表达也可有效地指示 MxA 的表达。免疫组化的结果显示(图 6), 空载体质粒 pEGFP-C1 与重组质粒 pEGFP-C1-MxA 转染后的 CEF 中均有 EGFP 的表达。但是, 在重组质粒转化后的阳性细胞胞浆中, EGFP 呈明显的颗粒分布, 胞核为阴性, 与荧光观察结果一致, 为 MxA 的表达特征, 这也进一步间接证实了 MxA 与 EGFP 以融合蛋白的形式可在鸡细胞中表达。

3 讨论

Mx 是干扰素发挥抗病毒作用的重要效应蛋白之一, 在人、哺乳动物、鱼类、家禽体内均存在, 其抗病毒作用具有广谱性。Aebi 等^[9]首次发现人的 Mx, 将其分为 MxA 和 MxB, 分布于细胞浆内的 MxA 抗病毒谱广, 可直接发挥对流感病毒和水泡性口炎病毒(VSV)的抗病毒效应, 而 MxB 则无抗病毒活性^[2]。与 IFN 相比^[10], Mx 稳定, 抗病毒作用更为直接, 且半衰期长, 特异性好, 此外 MxA 的 GTP 酶抗病毒活性呈现 GTP→GDP→GTP 重复转换效率, 具放大效应。尽管也发现了鸡的 Mx, 但其抗病毒活性受特定位点

氨基酸的影响, 并非在所有鸡种群中都能表现出抗病毒效果, 给生产实践带来一定的影响。鉴于此, 本研究构建了具有广谱抗病毒活性的人的 MxA 真核表达质粒, 使其在鸡细胞中表达, 以便于进一步研究其在禽类病毒性疾病预防与治疗中的作用。同时, 为便于检测, 我们将 MxA 基因插入真核表达载体 pEGFP-C1 中使 MxA 与 EGFP 形成融合蛋白基因, EGFP 的表达可以很好地指示 MxA 的表达。本研究不仅通过 RT-PCR 显示 EGFP 和 MxA 均可以在转染细胞中转录, 而且荧光显微镜观察到绿色荧光呈颗粒状分布于胞浆中; 以 GFP 的单克隆抗体进行免疫组化的结果也显示阳性细胞中分布棕褐色颗粒, 间接证明了 EGFP 报告基因和 MxA 目的基因均可以在鸡细胞中表达, 并且是以融合蛋白的形式在胞浆中呈颗粒状分布, 呈现出 MxA 典型的表达特征。

无论从荧光观察结果还是免疫组化结果看, 均发现重组质粒与空载体质粒的 EGFP 的表达特征有明显的区别。空载体转染细胞后, EGFP 在胞浆中和胞核中均有分布, 且胞核中的荧光较强(我们已通过相关实验证实), 推测可能是由于 EGFP 序列中有弱化的核定位序列。重组质粒转染细胞后, 呈现出明显的颗粒状、胞浆分布的特征, 这是 MxA 典型的表达特征。这一表达特征是由于 MxA 具有自组装的能力, 在胞浆内以多聚体形式存在, 并结合脂质, 形成环形微管, 通过受体 AMF-R 与光滑内质网(ER)相连^[11], 具有明显的胞浆定位特征, 最终表现为胞浆颗粒分布。EGFP 与 MxA 形成融合蛋白后, EGFP 的核定位序列不起作用, 而仅表现出 MxA 的表达特征。这一现象也为进一步对重组质粒在体内表达的示踪和检测提供了依据。

本研究分别选择了鸡胚成纤维细胞和鸡睾丸组织细胞进行重组质粒的转染, 均可有效表达, 为进一步研究 MxA 基因在抗禽病毒性疾病的作用打下了基础。Mundt^[12]以鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)感染 MxA 基因稳定转染的 vero 细胞株, 结果表明 MxA 能显著地抑制 IBDV 的复制。MxA 在鸡胚成纤维细胞中的成功表达, 提示重组质粒可能作为基因免疫制剂, 使其发挥抗病毒的效果。尽管 MxA 抗各种病毒的具体机制有差异, 但相关的研究均表明 MxA 在胞内能有效地发挥抗病毒效应。例如在对 Thogoto 病毒(一种副黏液病毒)的研究中发现 MxA 蛋白能识别病毒新合成的核糖核蛋白复合物 vRNPs, 并能与之紧密结合, 通过 MxA 的 GTP 酶活性对病毒核衣壳发挥水解作用, 进而可阻止病毒核衣壳转运至细胞核内, 阻止

病毒基因组的核内复制^[13]。由此推测, MxA 以基因免疫的方式, 使 MxA 在鸡体细胞内表达, 对发挥其抗病毒作用更有利。本研究结果还显示 MxA 重组质粒在鸡睾丸组织的多种细胞中均得到成功表达, 旨在为利用精子前体细胞制作抗病毒转基因鸡打下基础。Trefil 等^[14] 将性成熟和性未成熟供体公鸡的睾丸组织细胞移植到无生精能力的受体母鸡中, 可发育成熟为精子, 并经交配后可产生具有供体鸡性状的子代。我们将 MxA 基因导入鸡睾丸组织细胞, 在支持细胞和精子前体细胞中均观察到 MxA 的表达, 尤其是在精子前体细胞中的表达, 使体外获得携带 MxA 基因的鸡生殖细胞成为可能, 再通过体内移植手术, 可望作为制备抗病毒转基因鸡的新途径。

参考文献(References)

- [1] Katz J M. *Avian Dis*, 2003, **47** (3 Suppl): 914
- [2] Lee SH *et al. Genome Res*, 2002, **12**: 527
- [3] Chieux V *et al. Virol*, 2001, **283**: 84
- [4] Gordien E *et al. J Virol*, 2001, **75**: 2684
- [5] Bazzigher L *et al. Virol*, 1993, **195**: 100
- [6] Ko JH *et al. Genome Res*, 2002, **12**: 595
- [7] Ko JH *et al. Anim Genet*, 2004, **35**: 119
- [8] 斯佩克特等著, 黄培堂等译. *细胞实验指南*, 北京: 科学出版社, 2001, 27
- [9] Aebi M *et al. Mol Cell Biol*, 1989, **9**: 5062
- [10] Ronni T *et al. J Immunol*, 1993, **150**: 1715
- [11] Accola M A *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 21829
- [12] Mundt E. *J Gen Virol*, 2007, **88**: 1319
- [13] Haller O *et al. Traffic*, 2002, **3**: 710
- [14] Trefil P *et al. Biol Reprod*, 2006, **75**: 575

Construction of Eukaryotic Expression Vector Containing Antiviral MxA Gene and Its Expression in Chicken Cells

Li Liu, Ke-Jun Cai, Yi-Xiang Zhang, Pai He¹, Zhi-Li Ding, Nian-Ci Zhang*

(School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China;

¹College of Life Sciences, Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract Human MxA has broad antiviral spectrum. The aim of the study was to construct eukaryotic expression vector containing antiviral MxA gene which was expressed in chicken cells in order to study the role of MxA against avian virus disease. MxA gene was obtained from pCDNA3.1(+)-MxA by restriction enzyme *EcoRI* and *ApaI*, and linked with eukaryotic expression vector pEGFP-C1. The recombinant plasmid pEGFP-C1-MxA was identified by PCR and restriction analysis. pEGFP-C1-MxA was transfected into chicken embryo fibroblast (CEF) and chicken testicle tissue cells. Granular green fluorescence was detected by fluorescence microscope in cytoplasm of transfected cells after 48 h, and specific fragments of MxA and EGFP gene were amplified respectively by RT-PCR with total RNA of transfected cells. Moreover, the expression of EGFP-MxA fusion protein was detected by immunohistochemistry with monoclonal antibody of GFP. The data indicated that the antiviral gene MxA of the recombinant plasmid could be expressed in CEF and chicken testicle tissue cells. The results would contribute to further studies of application of MxA in dealing with chicken virus diseases.

Key words MxA gene; transfect; expression; chicken cells

Received: October 25, 2007 Accepted: December 7, 2007

This work supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500270), Science and Technology Project of Zhejiang Province (No.2005C22052) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y304194)

*Corresponding author. Tel: 86-572-2322053, E-mail: nc Zhang@hutc.zj.cn