

鸡 Mx 基因的克隆与原核表达

尹春光^{1,2}, 杜立新^{1*}, 李善刚¹, 魏彩虹¹, 刘涛¹, 李宏滨¹, 赵桂平¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 山东省济宁学院, 济宁 273155)

摘要: 本研究旨在通过克隆鸡 Mx 全基因序列进而进行该基因的原核表达, 获得具有生物学活性的蛋白。利用 poly I:C 诱导鸡胚成纤维细胞 Mx 基因表达, 克隆了 Mx 基因全长 cDNA 序列, 将开放阅读框 (ORF) 连接构建于表达质粒 pGEX-4t-2 中获得重组表达载体 pGEX-Mx, 转化 Rosetta(DE3) 菌株, 经 IPTG 诱导后检测。表达产物检测显示该蛋白的相对分子量为 75 ku。说明获得了 Mx 基因的高效表达, 为进一步进行 Mx 基因的活性检测以及利用 Mx 蛋白进行抗病毒转基因的研究奠定了基础。

关键词: 鸡; Mx 蛋白; 克隆; 表达

中图分类号: S831.2; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-0978-04

Cloning and Expression of Chicken Mx cDNA in *Escherichia coli*

YIN Chun-guang^{1,2}, DU Li-xin^{1*}, LI Shan-gang¹, WEI Cai-hong¹, LIU Tao¹, LI Hong-bin¹, ZHAO Gui-ping¹

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. Jining University, Jining 273155, China)

Abstract: This experiment was conducted to study Mx gene expression in *E. coli* under the condition of cloning Mx gene complete sequence. Chicken embryo fibroblast (CEF) were treated with poly I:C to stimulate Mx gene expression. Full length cDNA of Mx was cloned. Recombinant expression vector pGEX-Mx including Mx ORF was constructed using pGEX-4t-2 expression system to transfer *Escherichia coli* Rosetta (DE3) strain. The result showed that the relative molecular weight of expressed protein was about 75 ku after induction with IPTG, suggesting that Mx gene has been efficiently expressed. The research laid a good foundation for further studying on bioactivity assay, exploring new way of antiviral medication and transgenic study.

Key words: chicken; Mx protein; cloning; expression

组织培养细胞或动物机体细胞在病毒或其它干扰素诱导剂的作用下, 可产生一种低分子量的可溶性糖蛋白, 即干扰素 (Interferon, IFN)。当干扰素进入其它未感染的细胞时, 可以诱导细胞产生蛋白质, 抑制其它病毒复制。Mx 蛋白就是在 IFN 诱导下产生的蛋白质, 是继 2', 5' 寡腺苷酸合成酶和 P86 蛋白激酶后发现的又一种抗病毒蛋白。1962 年, Lindenmann 首次发现小鼠 A2G16 号染色体上有一个显性基因能抵抗正黏液毒科的病毒 (流感病毒), 并将该基因命名为 myxovirusresistant, 即 Mx 基

因, 该基因表达使得 A2G 对流感病毒 NWS 株不敏感, 能抵抗致死剂量的流感病毒^[1]。人类细胞质中的 MxA 蛋白可抑制流感病毒、水泡性口炎病毒、麻疹病毒^[2-3]。随后在小鼠^[4]、大鼠^[5]中都发现了 Mx 蛋白的抗病性。

在禽类, 虽然 1995 年用免疫荧光技术检测了单细胞水平 Mx 蛋白的抗病毒活性, 发现 Mx 蛋白对流感病毒、水泡性口炎病毒、麻疹病毒、Sendai 病毒均无抗性^[6-7], 但 Ko 等证实了鸡 Mx 基因具有抗 VSV 病毒、流感病毒的活性^[8], 而且这种活性与第 631 位氨基酸 (Asn/Ser) 有密切关系, Mx 基因编码

收稿日期: 2008-05-15

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (5051004); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2007AA10Z183)

作者简介: 尹春光 (1971-), 女, 山东济宁人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种方面的研究, Tel: 0537-3196163, E-mail: jnyngc@126.com

* 通讯作者: 杜立新, E-mail: lxdu@263.net

705 个氨基酸,第 631 位为 Asn 使抗病性明显加强^[9]。鸡是禽流感的自然宿主,禽流感的爆发不仅带来了巨大的经济损失,同时还危害到了人类的健康,因此利用鸡的 Mx 基因进行抗病研究,生产基因工程药物具有重大的现实意义。

Mx 基因的原核表达未检索到国外的相关报道,国内鸡 Mx 基因的部分编码区获得了原核表达^[10],但是全编码区的原核表达国内尚未见报道。本试验拟克隆 Mx 基因的全编码区,期望获得完整的 Mx 基因序列,利用表达载体 pGEX-4t-2 实现其在大肠杆菌中的表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株 DH5 α 由本实验室保存,限制性核酸内切酶(Fermentas),T4DNA 连接酶(NEB)。鼠抗人 2C12 抗体(Abnova),羊抗鼠 IgG-HRP(华美生物工程公司),其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 鸡胚成纤维细胞的培养与诱导 用鸡胚(8~10 日龄)组织块培养法培养鸡胚成纤维细胞,取培养 2~3 代生长状态良好的细胞进行诱导,在培养液内加入诱导剂(polyI:C,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)继续培养 24 h。

1.2.2 Mx 基因全长 cDNA 克隆 用 Trizol 一步法提取总 RNA,反转录获得 cDNA。根据 NCBI 和 UCSC (University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser website (<http://genome.ucsc.edu>, California Santa Cruz) 的信息设计 PCR 引物 MxF1: 5'-GGGTAGTAGTGCATTGGAGT-3'; MxR1: 5'-CTACCTACCTCAGAGCTCAA-3'; MxF2: 5'-GTAGTGCATTGGAGTGGTTTT-3'; MxR2: 5'-TACCCGATTCAAGCTTTT-3',巢式 PCR,以反转录的 cDNA 为模板扩增全长 Mx 基因序列。

1.2.3 扩增 Mx 基因 ORF 利用获得的全长 cDNA 序列设计引物扩增 Mx 基因开放阅读框(ORF)序列,上游引物 SalF: 5'-GTCGACAACAATC-CACGGTCCA ACTTC-3'(下划线为 Sal I 酶切位点),下游引物 NotR: 5'-GCGGCCGCCAGAGACT-TAAAGTCTACCAGG-3'(下划线为 Not I 酶切位点)。PCR 反应体系 25 μL ,反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 ORF 序列连接载体与序列鉴定 PCR 目的产物回收纯化后连入 pMD18-T simple vector,酶切鉴

定、测序后,命名连接正确、序列正确的克隆为 pEG。

1.2.5 重组表达载体的构建与鉴定 将 pEG ORF 用 Sal I 和 Not I 双酶切后的目的片段连入同样酶切的 pGEX-4t-2,连接转化后将大肠杆菌涂布于 LB(50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp)平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取阳性克隆进行 PCR 及酶切鉴定、同时送北京诺赛基因 DNA 测序。

1.2.6 菌落 PCR 鉴定阳性克隆 将测序正确的重组质粒转化 Rosetta(DE3)感受态细胞,挑选阳性克隆,分别用 pGEX-4t-2 通用引物和 Mx 基因特异引物进行菌落 PCR 鉴定。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到预期条带,即为阳性转化子。

1.2.7 重组子的诱导表达 接种鉴定正确的单菌落于 LB 培养基(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp),37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡(3~5 h)培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 达到 0.6~1.0。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜,次日早晨离心收集上清。将细胞重悬于 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 到 0.4~1.0。加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 至终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h 后将摇瓶置冰上 5 min,取 8 mL 培养物 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 50 min,去上清。重悬细胞于 0.25 倍体积预冷的 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.0)中,离心。除去上清,每 1.5 mL 培养物用 100 mL 无菌水悬浮加入 100 μL 2 \times SDS 样品缓冲液在(用前加入 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 至终浓度为 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5~10 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 置冰上,取上清点样。

1.2.8 表达产物鉴定 收集诱导后的重组表达菌,经过 PBS 重悬、裂解(溶菌酶终浓度 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、磁力搅拌、超声破菌、离心、洗涤、尿素室温溶解后离心取上清,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, PBS 洗涤;以鼠抗人 2 C12 抗体为一抗(1:1 500 倍稀释)室温反应 2 h,洗涤;以辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 作为二抗(1:5 000 倍稀释)室温反应 2 h,洗涤;室温孵育,曝光,显影,定影。

2 结 果

2.1 Mx 基因全长 cDNA 克隆与 ORF 区的序列分析

利用诱导后的鸡胚成纤维细胞总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,获得了 2.7 kb 的特异条带。回收连接测序得到的鸡 Mx 基因全长 cDNA 序列,提交 GenBank,获得登录号为 EU 348752。序列全

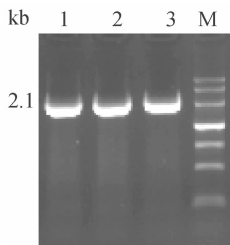
长 2 729 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 2 118 bp, 预测编码 705 个氨基酸。用 PI/Mw 软件 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测蛋白分子量为 75 ku, PI 值是 7.42。该序列与 GenBank 上禽类 Mx 基因的同源性为 82.5%, 与人、小鼠的同源性分别是 47.43% 和 35.54%。预测蛋白序列与人类及小鼠、大鼠、马、牛、羊等的序列对比发现都含有 ATP/GTP 结合域 (ATP/GTP binding motif) GDQ/RSSGKS, DLPG, TKPL, N 末端都具有动力蛋白家族结构域 (dynamin family signature motif) LPRGSGIVTR, C 末端都有 Leu 拉链结构域 (leucine zipper motif), 是动力蛋白家族的成员^[11]。说明已经获得了 Mx 基因 cDNA ORF 序列, 可以用于表达载体的构建与表达。

2.2 重组载体的鉴定

用碱裂解法提取重组质粒, 经载体 pGEX-4t-2 通用引物 (pGEXF: GGCTGGCAAGCCACGTTT-GGTG; pGEXR: CTCCGGGAGCTGCATGTGT-CAGA) 和特异性引物 (SalF, NotIR) 鉴定均获得 2.1 kb 大小的片段 (图 1, 图 2); 说明连接方向正确。单酶切和双酶切鉴定, 载体片段为 4 970 bp, 目的片段长 2 118 bp, 与预期结果一致。酶切鉴定正确命名为 pGEXMx。将构建好的 pGEXMX 质粒转化 Rossetta 菌株, 阳性菌作为表达重组子进行表达, 表达的阳性重组子命名为 pGEX RT-Mx。

2.3 诱导表达后重组子的鉴定结果

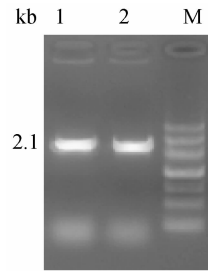
37 °C 条件下, SDS-PAGE 在 Rossetta 菌株中 pGEXRT-Mx 检测到了表达产物, 不同浓度 IPTG 的诱导表达未出现明显的差异。将诱导后表达的菌株摇菌进行超声波破碎分离包含体, SDS-PAGE 检测到 75 ku 的表达产物, 与预测的理论值相符 (图 3)。Western blotting 分析表明, 表达的产物具有特异性, 能够与抗体发生特异的反应, 表达产物的大小与预期



1-3. pGEXMx 阳性菌检测产物 (2.1 kb); M. Marker III
1-3. Positive selection of pGEXMx; M. Marker III

图 1 特异引物 (SalF, NotIR) 检测 pGEXMx

Fig. 1 Positive selection of pGEXMx (primers SalF, NotIR)

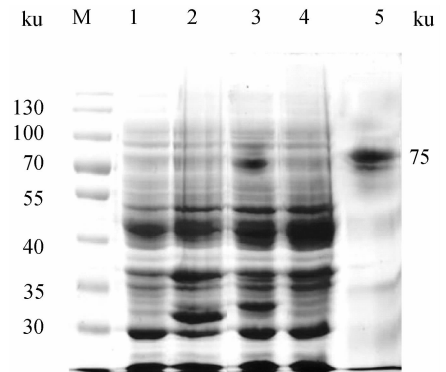


1, 2. pGEXMx 阳性检测菌产物 (2 118 bp); M. Marker III
1, 2. Positive specific selection of pGEXMx (2 118 bp); M. Marker III

图 2 载体通用引物 (pGEXF, pGEXR) 检测 pGEXMx

Fig. 2 Detection of pGEXMx with universal primers (pGEXF, pGEXR)

相符 (图 4), 说明目的蛋白获得了完好的表达。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. IPTG 诱导空菌株 Rossetta; 2. IPTG 诱导的空载体菌株 (pGEX-4t-2 菌株); 3. IPTG 诱导的含目的载体菌株 (pGEXRT-Mx); 4. 无 IPTG 诱导的载体菌株; 5. 纯化后的 Mx 蛋白 (75 ku)

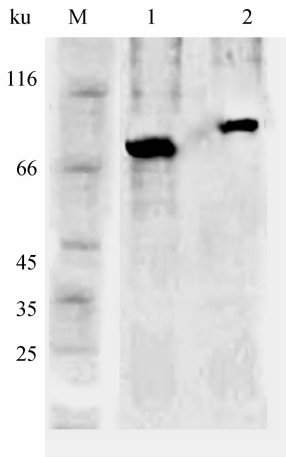
M. Protein marker; 1. Induced controls of Rossetta strain; 2. Induced controls of empty vector of pGEX-4t-2; 3. Expression of Mx protein induced by IPTG; 4. Control of expression constructed vector without IPTG induction; 5. Purified protein (75 ku)

图 3 SDS-PAGE 检测 pGEX-Mx 表达

Fig. 3 Detection of pGEX-Mx expression by SDS-PAGE

3 讨论

3.1 IFN 是多种诱导剂诱导细胞产生的具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节功能的一类可溶性糖蛋白。这种蛋白质并非直接作用于病毒, 其活性又受到另一组细胞基因的调控, 即在干扰素作用于细胞时, 又诱导另一类基因产物, 由于这类基因产物引起细胞广泛的抗病毒活性, 抑制细胞分裂和肿瘤细胞增殖以及调控免疫系统功能的活性, 因此, 这个系统称为干扰素系统。Mx 蛋白就是在 IFN 诱导下产生的蛋



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1, 2. 蛋白表达产物 (75 ku)

M. Protein marker; 1, 2. Products of Mx protein expression (75 ku)

图 4 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of expressed products

白质, Mx 基因在机体正常生理状态下表达量极低, 很难检测到。这是因为正常情况下组织或血清中不含干扰素, 只有在某些特定因素的作用下才能诱使细胞产生干扰素。I 型干扰素的主要诱生剂是病毒及人工合成的双链 RNA, 此外某些细菌和原虫感染及某些细胞因子也能诱导 I 型干扰素的产生。试验中利用人工合成的双链 RNA (polyI:C) 诱导 Mx 基因表达并成功克隆了 Mx 基因。

3.2 研究证实, 鸡 Mx 基因具有抗 VSV 病毒和流感病毒的活性, 这与第 631 位氨基酸 (Asn/Ser) 有密切关系。本研究利用白来航鸡获取了 Mx 基因 2 729 bp 全长, 包括了编码 705 个氨基酸的全编码区 2 118 bp, 测序结果显示其 631 位氨基酸对应的密码子是 AAT (Asn), 可以用来进行 Mx 蛋白的表达研究。

3.3 利用 codon usage database (<http://www.kazusa.or.jp/coden>) 对 Mx 基因 ORF 进行分析发现, 稀有密码子比例较高, 达到了 9.79%, 由于 Rosetta (DE3) 菌株在 BL21 (DE3) 基础上引用了氯霉素抗性质粒, 能够启动稀有密码 Arg 密码子 AGG 和 AGA, Ile 密码子 AUA, Leu 密码子 CUA, Pro 密码子 CCC 和 Gly 密码子 GGA 目的蛋白的表达。因此本试验选用了 Rosetta (DE3) 菌株。

3.4 本试验将 Mx 基因的全编码区克隆进表达载体并通过优化实现了 Mx 基因在大肠杆菌中的表达, 通过 Western blotting 检测发现, 表达的蛋白相

对分子量与预期相符, 可以与抗体特异性结合。为进一步进行 Mx 基因的活性检测以及利用 Mx 蛋白进行抗病毒转基因研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] LINDENMANN J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus [J]. *Virology*, 1962, 16 (2): 203-204.
- [2] AEBI M, FAH J, HURT N, et al. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1989, 9 (11): 5062-5072.
- [3] SCHNORR J J, SCHNEIDER-SCHAULIES S, SIMON-JÖDICKE A, et al. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line [J]. *J Virol*, 1993, 67 (8): 4760-4768.
- [4] JIN HK, TAKADA A, KON Y, et al. Identification of the murine Mx2 gene; interferon-induced expression of the Mx2 protein from the feral mouse gene confers resistance to vesicular stomatitis virus [J]. *J Virol*, 1999, 73 (6): 4925-4930.
- [5] MEIER E, FAH J, GROB MS, et al. A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells [J]. *J Virol*, 1988, 62 (7): 2386-2393.
- [6] BAZZIGHER L, SCHWARZ A, STAEHELI P. No enhanced influenza virus resistance of murine and avian cells expressing cloned duck Mx protein [J]. *Virology*, 1993, 195 (1): 100-112.
- [7] BERNASCONI D, SCHULTZ U, STAEHELI P. The interferon-induced Mx protein of chickens lacks antiviral activity [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1995, 15 (1): 47-53.
- [8] KO JH, JIN HK, ASANO A, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene [J]. *Genome Res*, 2002, 12 (4): 595-601.
- [9] KO JH, TAKADA A, MITSUHASHI T, et al. Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631 [J]. *Anim Genet*, 2004, 35 (2): 119-122.
- [10] 陈蕾, 江国托, 常维山. 鸡 MxA 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (2): 203-206.
- [11] LEE S H, VIDAL S M. Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection [J]. *Genome Res*, 2002, 12: 527-530.