论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1904-03

猪 APOBEC3F 基因克隆及真核表达载体的构建与鉴定

孙 宇[1,2],罗 佳[3],马玉媛[1],章金刚[1] (100850 北京,军事医学科学院野战输血研究所[1]; 100017 北京,解放军第305医院检验科[2]; 530005 南宁,广西大学动物科学技术学院预防兽医系[3])

[摘要] **目的** 克隆猪载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽样蛋白 3F(apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3F, APOBEC3F)基因,构建真核表达载体实现其在体外表达与鉴定。**方法** 分离4头21周龄,体质量25~30 kg的雌性健康五指山猪的外周血单个核细胞,Trizol法提取细胞总RNA,RT-PCR特异性扩增目的基因,目的基因插入真核表达载体 pDsRed1-N1 及改造的 pCDNA3-Flage 载体构建表达质粒并在 PK-15 细胞中进行表达。激光共聚焦显微镜及 Western blot 鉴定目的基因的表达。**结果** 克隆的目的基因与公布的基因序列同源性达99%;激光共聚焦显微镜显示目的基因在 PK-15 细胞表达,且表达产物定位于细胞质内;Western blot 检测示表达的目的蛋白大小与预期相符。**结论** 成功构建了猪 APOBEC3F 真核表达载体。

[关键词] APOBEC3F;克隆;真核表达载体;鉴定

[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Cloning of porcine apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F gene and construction and identification of eukaryotic expression vectors

Sun Yu[1,2], Luo Jia[3], Ma Yuyuan[1], Zhang Jingang[1] ([1]Institute of Field Transfusion, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100085; [2] Department of Laboratory Medicine, No. 305 Hospital of PLA, Beijing, 100017; [3] Faculty of Veterinary Medicine, College of Animals Sciences & Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Regiong, 530005, China)

[**Abstract**] **Objective** To clone the gene of porcine apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F(APOBEC3F) and construct the eukaryotic expression vectors for its expression and identification *in vitro*. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples of 4 female healthy Wuzhishan porcine weighing 25 to 30 kg at the age of 21 weeks. RNA was extracted from porcine PBMC using the TRAZO regent. Coding region of the APOBEC3F gene was amplified by RT-PCR. Gene fragments were inserted into the recombinant eukaryotic expression vectors pDsRed1-N1 and modified pCDNA3-Flage-pA3F to construct the eukaryotic expression plasmids of pDsRed1-N1-pA3F and pCDNA3-Flage-pA3F expressed in PK-15 cells. The expression of target gene in PK-15 cells was detected by laser scanning confocal microscopy and Western blotting, respectively. **Results** The homology of target gene and published gene was 99%. Laser scanning confocal microscopy showed that the target gene was expressed in PK-15 cells and the expressed products were located in the cytoplasm. Western blot analysis revealed that the molecular weight of expressed target protein was consistent with the expected weight. **Conclusion** The eukaryotic expression vectors of porcine APOBEC3F has been constructed.

[**Key words**] apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F; clone; eukaryotic expression vector; identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China(3107185). Corresponding author: Zhang Jingang, E-mail: zhangjg@nic.bmi.ac.cn; Ma Yuyuan, E-mail: mayuyuan07@163.com

天然免疫是机体抵御病毒感染的重要机制。近年来,一些介导天然免疫的新型宿主细胞因子陆续被发现,如载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽样蛋白(apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide, APOBEC)家族、TRIM 家族等。这类分子的发现为研究新型抗病毒药物提供了潜在的新靶标。

APOBEC 家族成员包括 APOBEC1、2 及 APOBEC3A~H,均具有胞嘧啶脱氨酶活性,其中抗病毒活

[基金项目] 国家自然科学基金(3107185)

[通信作者] 章金刚,E-mail: zhangjg@nic.bmi.ac.cn;马玉媛,E-mail:mayuyuan07@163.com

性研究比较集中和透彻的是A3G(APOBEC3G)和A3F(APOBEC3F)[1-2]。研究发现这类分子不仅具有抑制HIV等反转录病毒复制的功能[3-4],还可以抑制HBV等其他非反转录病毒的复制[5-6]。研究发现动物体内也存在该类分子发挥着相同的抗病毒作用[7-8]。猪被认为是良好的异种移植供体[9],猪体内存在的内源性反转录病毒(porcine endogenous retrovirus,PERV)因其可以感染人源细胞[10-11]而受到关注。猪体内存在的一种APOBEC分子——APOBEC3F,具有抗反转录病毒的作用[12],但其是否具有抑制PERV的作用目前尚无明确定论。通过RT-PCR方法从猪外周血单个核细胞中(peripheral blood mononuclear cells,PBMC)克隆了猪A3F基因,将其插入真核表达载体,实现在PK-15细胞中的表达和鉴定,为研究其与PERV的相互作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

21周龄,体质量25~30 kg的雌性、健康五指山小型猪4头,前腔静脉无菌采血10 ml。采血后2 h内人淋巴细胞分离液(购自上海肯强贸易有限公司)分离单个核细胞备用。Trizol RNA提取试剂购自Invitrogen公司,SuperScript® Ⅲ反转录酶购自美国Invitrogen公司,Phusion高保真PCR扩增试剂盒购自美国NEB公司(批号:0011102),*Eco*R Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ内切酶购自日本TaKaRa公司,pCDNA3-Flag购自美国Invitrogen公司(经本室改造),pEGPF-N3载体购自美国Clontech公司,TOP10感受态细胞由实验室自制,T_4快速连接酶购自北京TansGene公司(批号:E21214),直径10 cm培养皿购自美国Corning公司,HRP标记的抗Flag标签抗体购自美国Sigma公司,蛋白Marker购自北京天根生物技术公司。

1.2 RNA提取与基因克隆

Trizol法提取猪单个核细胞总RNA。依据公布的猪APOBEC3F基因(FJ042939.1)Primer5.0软件设计扩增引物并同时在引物两端加上载体构建酶切位点,引物由北京中美泰合生物技术公司合成。pCDNA3-Flag载体构建引物:上游5′-GGAATTCTTATGGATCCTCAGCGCCTGAGG-3′,下游5′-GCGCGGCCGCTTATCTCGAGTCACTTCTTGG-3′;pDsRed1-N1载体构建引物:上游5′-GGGGTACCATGGATCCTCAGCGCCTGAGG-3′,下游5′-GGGGTACCTCTCGAGTCACTTCTTGG-3′。反转录反应条件与体系:50 mmol/L下游引物3 μl,5 μl模板RNA,94 ℃预变性5 min,冰上加入SuperScript® Ⅲ反转录酶0.5 μl,10 mmol/L dNTP 5 μl,5×Buffer 10 μl,ddH_2O 26.5 μl,50 ℃ 1 h,75 ℃ 10 min。PCR扩增反应条件与体系:50 mmol/L上下游引物各1 μl,cDNA模板2 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,5×HE Buffer 10 μl,Phusion高保真酶0.25 μl,ddH_2O 34.75 μl,98 ℃ 1 min,98 ℃ 20 s,64 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30循环,72 ℃ 5 min。PCR产物2%琼脂糖凝胶电泳分析并回收纯化,分别依据酶切位点对产物进行过夜双酶切,同时对相应载体进行相同酶切处理,回收酶切产物备用。

1.3 表达载体构建

T_4快速连接酶连接1.2中PCR产物酶切物与载体pCDNA3-Flag、pDsRed1-N1酶切产物,操作按试剂说明。连接产物转化TOP10感受态细胞,挑取阳性菌落并进行菌落PCR及双酶切鉴定。构建的载体送北京奥科公司测序分析。

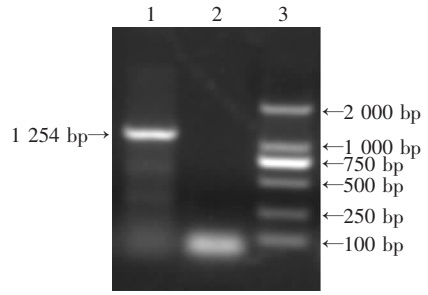
1.4 基因表达与鉴定

PK-15细胞(本室保存)培养至约90%融合率,Roche公司X-tremGENE HP DNA转染试剂按说明书操作转染构建的pCDNA3-Flag-pA3F与pDsRed1-N1-pA3F各1块10 cm培养皿同时设置转染空载体对照皿各1块。转染48 h后激光共聚焦显微镜观察(由军事医学科学院仪器中心完成),Western blot鉴定目的基因表达。

2 结果

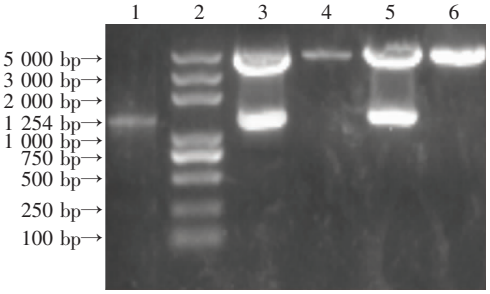
2.1 目的基因克隆与鉴定

PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,结果显示扩增到符合预期大小(1 254 bp)的基因片段(图1)。扩增产物插入pCDNA3-Flag载体、pDsRed1-N1载体,经菌落PCR与双酶切鉴定(图2)正确后测序分析,结果表明与网上登录的猪APOBEC3F基因(FJ042939.1)同源性达到99%,氨基酸序列同源性达99%。提示构建的载体序列正确,符合表达要求。



1:pA3F PCR扩增产物;2:空白对照;3:DL2000标准

图1 PCR扩增pA3F琼脂糖凝胶电泳图



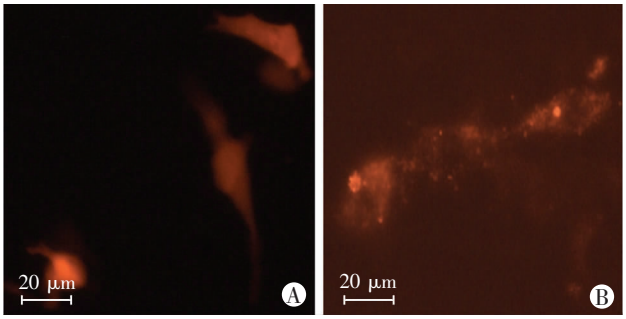
1:pA3F PCR产物对照;2:标准;3:pDsRed1-N1-pA3F双酶切产物;4:pDsRed1-N1空载体双酶切产物;5:pCDNA3-Flag-pA3F双酶切产物;6:pCDNA3-Flag空载体双酶切产物

图2 构建的pCDNA3-Flag-pA3F载体及pDsRed1-N1-pA3F鉴定

2.2 猪APOBEC3F基因在PK-15细胞中的表达与鉴定

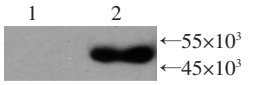
构建的pCDNA3-Flag-pA3F与pDsRed1-N1-pA3F载体分别在PK-15细胞中进行表达。激光共聚焦显微镜观察显示目的基因在PK-15细胞中实现了表达。与空荧光表达载体对照表

达结果相比,插入有目的基因的载体蛋白表达分布不同:空载体对照显示荧光蛋白弥散分布于整个表达细胞,而载有目的基因的载体蛋白表达分布于细胞质内,核内没有表达产物分布(图3)。构建的pCDNA3-Flag-pA3F转染PK-15细胞36 h收取细胞,HRP标记小鼠抗Flag标签抗体Western blot鉴定,结果显示pA3F(Porcine APOBEC3F)蛋白在PK-15细胞中实现了表达,蛋白大小为(45~55)×10^3,与蛋白实际大小49.6×10^3相符(图4)。表明构建的pDsRed1-N1-pA3F与pCDNA3-Flag-pA3F载体序列正确,且能够在PK-15细胞中实现表达,产物大小与预期相符。



A:空pDsRed1-N1载体转染PK-15细胞;B:pDsRed1-N1-pA3F载体转染PK-15细胞

图3 激光共聚焦显微镜观察pA3F基因在PK-15细胞中的表达



1:转染空pCDNA3-Flag载体细胞;2:转染pCDNA3-Flag-pA3F载体细胞

图4 Western blot鉴定pA3F蛋白在PK-15细胞中的表达

3 讨论

近年发现的天然抗病毒分子APOBEC3家族分子已成为众多研究者关注的焦点。大量研究表明其具有抑制反转录病毒复制的作用,其中研究比较透彻的为APOBEC3G、A3F。A3G、A3F分子具有两个保守的、依赖锌离子的胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase,CDA)活性位点模体,即His/Cys-X-Glu-X23-28-Pro-Cys-X2-Cys[13],针对病毒反转录产生的负链cDNA,导致C→U的突变。突变产生的过多U碱基会干扰正链DNA合成的起始,导致宿主细胞内病毒基因组DNA量下降,抑制病毒的复制与感染[13-15]。另外该类分子还可通过阻抑反转录酶与病毒模版RNA结合,抑制反转录病毒复制[15]。由于该类分子是宿主体内固有成分,它们的发现可为研究新型抗反转录病毒药物提供新的作用靶标,具有重要的意义。

猪体内含有内源性反转录病毒(PERV),相关研究表明该病毒可以感染人源细胞[10-11]。但猪是目前被寄予厚望的异种移植的良好供体[9],由于其体内存在PERV病毒,其生物安全性受到重视。如果能够证实猪体内存在的APOBEC分子能够抑制PERV,而人体内也存在相同或近似的机制,则其感染人进而造成人致病的概率就会减少,也使猪作为异种移植来源供体的使用范围变得更为广阔。

通过克隆猪体内的A3F基因,构建了真核表达载体,并在体外实现了对该基因的表达与表达产物的初步鉴定。构建的载体能够使猪的A3F基因良好表达,表达产物符合预期,为下一步进行pA3F分子与PERV相互作用机制研究及其单克隆抗体制备奠定了基础。

参考文献:

[1] Lehner T, Wang Y, Whittall T, *et al*. Innate immunity and HIV-1 infection[J]. Adv Dent Res, 2011, 23(1): 19-22.

[2] Smith J L, Pathak V K. Identification of specific determinants of human APOBEC3F, APOBEC3C, and APOBEC3DE and African green monkey APOBEC3F that interact with HIV-1 Vif[J]. J Virol, 2010, 84(24): 12599-12608.

[3] Sheehy A M, Gaddis N C, Choi J D, *et al*. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein [J]. Nature, 2002, 418(6898): 646-650.

[4] Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, *et al*. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the VIF protein[J]. Science, 2003, 300 (5622): 1112.

[5] Bonvin M, Achermann F, Greeve I, *et al*. Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication[J]. Hepatology, 2006, 43(6): 1364-1374.

[6] Nguyen D H, Gummuluru S, Hu J. Deamination-independent inhibition of hepatitis B virus reverse transcription by APOBEC3G[J]. J Virol, 2007, 81(9): 4465-4472.

[7] Takeda E, Tsuji-Kawahara S, Sakamoto M, *et al*. Mouse APOBEC3 restricts friend leukemia virus infection and pathogenesis *in vivo*[J]. J Virol, 2008, 82(22): 10998-11008.

[8] Dorrschuck E, Munk C, Tonjes R R. APOBEC3 proteins and porcine endogenous retroviruses[J]. Transplant Proc, 2008, 40(4): 959-961.

[9] Kim M K, Wee W R, Park C G, *et al*. Xenocorneal transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2011, 16(2): 231-236.

[10] Yu P, Zhang P, Zhang L, *et al*. Studies on long-term infection of human cells with Porcine endogenous retrovirus[J]. Acta Virol, 2009, 53(3): 169-174.

[11] Karlas A, Irgang M, Votteler J, *et al*. Characterisation of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C[J]. Ann Transplant, 2010, 15(2): 45-54.

[12] Jonsson S R, Hache G, Stenglein M D, *et al*. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(19): 5683-5694.

[13] Harris R S, Liddament M T. Retroviral restriction by APOBEC proteins[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(11): 868-877.

[14] Harris R S, Bishop K N, Sheehy A M, *et al*. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection[J]. Cell, 2003, 113 (6): 803-809.

[15] Mangeat B, Turelli P, Caron G, *et al*. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts[J]. Nature, 2003, 424(6944): 99-103.

(**收稿**:2011-04-05;**修回**:2011-05-15)

(编辑 栾 嘉)