维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0152-03

人 MxA 基因重组真核载体的构建及鉴定

黄 琴,赵瑞秋,刘爱平,许红梅

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014)

【摘 要】目的:应用真核载体 PcDNA3.1 构建含我国健康人目的基因 MxA 的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA。方法:在大肠杆菌 JM109 中扩增前期已构建的含有目的基因 MxA 的 PAdtrack-MxA 和真核载体 PcDNA3.1,使用两者共同的限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*Not* Ⅰ进行双酶切,并连接以构建重组真核载体 PcDNA3.1-MxA,然后通过氨苄青霉素抗性筛选,双酶切及 PCR 鉴定,选取鉴定正确的克隆测序,并应用 DNAssist 2.0 软件对序列与前期获得的基因序列以及已知 GenBank 中 MxA 基因序列进行同源性分析。结果:经限制性内切酶、PCR 鉴定重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 构建成功。测序结果表明本实验所克隆片段长 2012bp,包含人 MxA 基因序列,核苷酸序列分析表明与前期获得的目的基因序列完全相同,而与 GenBank 中人 MxA 基因序列同源性也达 99.75%,仅有 5 个碱基不同,且所编码的氨基酸仅 1 个发生改变,此氨基酸位于 MxA 蛋白的非功能区。结论:重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 构建成功,为下一步研究 MxA 抗乙型肝炎病毒作用奠定了基础。

【关键字】MxA;PcDNA3.1;PcDNA3.1-MxA

【中国图书分类法分类号】R512.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-05

Construction and identification of the recombinant eucaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA

HUANG Qin, et al

(*Department of Infectious Diseases and Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify the recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA encoding MxA with the eukaryotic plasmid PcDNA3.1. *Methods*: Recombinant plasmid PAdTrack-MxA constructed before and PcDNA3.1 were amplified in Escherchia coli JM109. Plasmids were double-digested with restrictive endonucleases *Not* Ⅰ and *Xba* Ⅰ after extracted, and then ligated to construct recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA. The recombinant plasmid was selected for Ampicillin resistance and then confirmed by digestion with *Not* Ⅰ and *Xba* Ⅰ, PCR and sequencing. The sequence was homology-analysed compared with the sequence of MxA gene in PAdTrack-MxA and the sequence of MxA gene published in Genebank(NM_002462) with sofeware DNAssist 2.0. *Results*: The restrictive endonuclease and PCR analysis confirmed that the recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA was constructed successfully. Sequencing analysis revealed that the cloned segment was 2012bp including MxA gene sequence, and the nucleotide sequence of MxA gene was same to that in PAdTrack-MxA exactly. There were five variations in nucleotide sequence compared with published sequence in Genebank, which caused only one amino acid residue replaced from isoleucine to valine. This replaced amino acid residue was located in the non functional area of MxA protein. *Conclusions*: The recombinant eukaryotic plasmid PcDNA3.1-MxA is constructed successfully, which lays foundation for the further study on anti-HBV effects of MxA.

【Key words】MxA;PcDNA3.1;PcDNA3.1-MxA

乙型肝炎病毒感染严重威胁到人类健康,至今尚无十分有效的治疗方法,基因治疗目前已经成为临床和基础研究的热点。MxA 蛋白是一种广谱的抗病毒蛋白,MxA 基因有可能作为乙肝基因治疗的一种目的基因来选择。本实验在前期以后获得含有目的基因 MxA 的重组腺病毒穿梭质粒 PAdtrack-MxA 基础上,应用真核载体 PcDNA3.1 构建重组真核载

作者介绍:黄 琴(1981-),女,硕士,研究方向:肝病研究。

通讯作者:许红梅,女,教授,E-mail:xuhongmwpx@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

体 PcDNA3.1-MxA，为下一步研究 MxA 抗乙型肝炎病毒作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

真核表达质粒 PcDNA3.1 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存，大肠杆菌 JM109 由重庆医科大学儿童医院中心实验室保存，限制性内切酶 *Not* Ⅰ，*Xba* Ⅰ，DNA 连接试剂盒，PCR Amplification Kit，DNA Marker (DL 15 000) 购于 TaKaRa 公司，PCR 产物纯化试剂盒，小量质粒 DNA 抽提试剂盒购于 Omega 公司，DNA 胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司，PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 目的基因 MxA 和载体 PcDNA3.1 的双酶切与胶回收

将 PAdtrack-MxA 和 PcDNA3.1 的 JM109 菌种分别接种于 1.5ml LK 和 LA 液体培养基中，37℃ 230r/min 摇床内振荡过夜扩增，使用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒，并使用限制性内切酶 *Not* Ⅰ，*Xba* Ⅰ 进行双酶切，然后将双酶切后的载体和目的基因 MxA 进行纯化和胶回收。分别取 3μl 胶回收产物行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收的 MxA 基因和载体 PcDNA3.1 于 -20℃保存。

1.3 目的基因 MxA 和载体 PcDNA3.1 的连接

将具有相同双酶切粘性末端上述 2 个胶回收产物(MxA 基因和 PcDNA3.1)使用 TaKaRa 连接试剂盒按比例配制连接反应体系，16℃连接过夜。体系比例严格按照说明书进行。

1.4 重组真核载体的转化

将上述连接产物采用化学法转化入新鲜感受态大肠杆菌 JM109，接种于含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上培养，将平板于 37℃倒置培养过夜。

1.5 重组真核载体的酶切鉴定

挑取平板上生长的数个菌落，使用 Omega 公司小量质粒 DNA 抽提试剂盒抽提质粒，用 *Not* Ⅰ，*Xba* Ⅰ 进行双酶切鉴定，酶切产物行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并于 -20℃保存。

1.6 重组真核载体的 PCR 鉴定

以酶切鉴定正确的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 为模板 PCR 扩增目的基因 MxA。参照 GenBank 中 MxA 基因序列(NM_002462)，根据 PCR 引物设计原则应用 Primer5.0 软件设计引物，并根据双酶切所需，在每条引物的 5'端引入相应的限制性内切酶酶切位点及保护性碱基，引物序列如下(下划线为内切酶位点)：

F:5'-CCGGCGGCCGCATGGTTGTTTCCGAAGTGGAC-3'(*Not* Ⅰ 酶切位点)

R:5'- GCGTCTAGATTAGTTAACCGGGGAACTGGGCAAG-3'(*Xba* Ⅰ 酶切位点)

PCR 体系按照说明书比例加入，反应条件：94℃变性 5min；94℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 2min，共 35 个循环；72℃再延伸 7min，并以等量灭菌水为模板扩增作为阴性对照。1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定。

1.7 测序鉴定

选取酶切及 PCR 鉴定成功的菌落，过夜培养的菌液 0.8ml 加无菌甘油 0.2ml 混匀后送上海生工生物技术有限公司进行测序。

2 结 果

2.1 目的基因 MxA 和载体 PcDNA3.1 胶回收纯化结果

1%琼脂糖凝胶电泳结果显示在 DNA Maker 2 000bp 和 5 000bp 附近有 2 条明显的条带，符合目的片段 MxA 2 012bp 和 PcDNA3.1 5 400bp 大小，说明两者可以用作下一步连接之用(如图 1)。

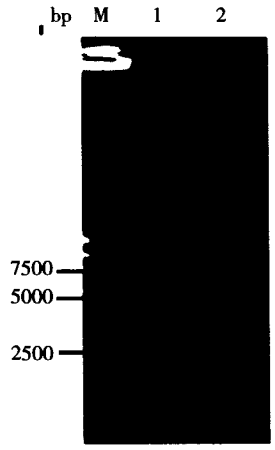


图 1 胶回收产物 1%琼脂糖凝胶电泳

2.2 重组真核载体的酶切鉴定

以 *Xba* Ⅰ、*Not* Ⅰ 对重组真核载体进行双酶切鉴定，电泳显示双酶切后分别在 2 000bp 及 5 000bp 出现 2 条 DNA 片段，与 MxA 基因及 PcDNA3.1 大小一致，证明重组真核载体构建成功，命名为 PcDNA3.1-MxA(图 2)。

2.3 重组真核载体的 PCR 鉴定

以酶切鉴定正确的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 为模板进行 PCR 扩增目的基因 MxA。电泳结果显示 PcDNA3.1-MxA 为模板的一道扩增出 2 000bp 左右的条带，符合目的基因大小，而阴性对照则无条带出现。因此 PCR 鉴定结果证明重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 构建成功(图 3)。

2.4 测序鉴定

测序分析结果显示，本实验所得的片段全长 2 012bp，包含 MxA 基因序列(1 989bp)，与前期获

维普资讯 http://www.cqvip.com

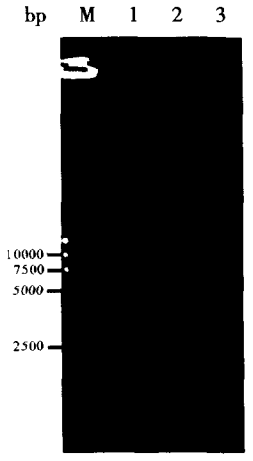


图 2 PcDNA3.1-MxA 双酶切 1%琼脂糖凝胶电泳

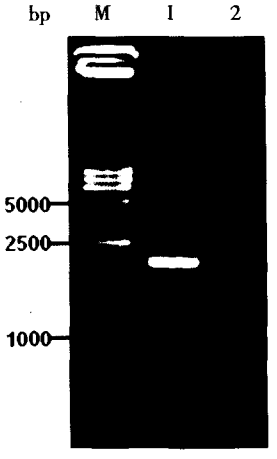


图 3 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳

得的 MxA 基因序列完全相同，与 GenBank 中所报道的 MxA 基因序列同源性为 99.75%，有 5 个核苷酸不同但所编码的氨基酸仅有 1 个发生了改变，且此氨基酸位于 MxA 蛋白的非功能区。

3 讨 论

1964 年 Lindenmann 在实验中发现 A2G 小鼠比其他小鼠更能耐受高剂量流感病毒感染，提示其对这种病毒有天然抵抗力，深入了解得知：A2G 小鼠这种特性是由其 16 号染色体单一显性等位基因遗传获得的，因其可抗流感病毒（属于正粘液病毒科）故称为 myxovirus-resistant（Mx）基因，即抗粘液病毒基因，其编码的蛋白为 Mx 蛋白。在人类 Mx 基因定位于 21 号染色体长臂上，由 IFN-α/β 诱导产生并存在于细胞浆内的 Mx 蛋白。人类 Mx 基因编码两种蛋白即 A 型和 B 型，其中仅 A 型即 MxA 具有抗病毒活性。

MxA 蛋白具有广谱的抗病毒作用，主要对 RNA 病毒敏感，其中包括正粘液病毒科（流感病毒、Thogoto 病毒等）、布尼亚病毒科（汉坦病毒、内罗病毒等）、副粘液病毒科（麻疹病毒、呼吸道合胞病毒等）、HCV 等；对于双链 DNA 病毒如 HBV 也有明显抑制作用[1]。MxA 蛋白具有非活性 GDP 结合形式以及活性 GTP 结合形式 2 种构型，两者可相互转化。当 GDP 形式的 MxA 蛋白与病毒核蛋白结合后其构象发生改变，成为 GTP 结合形式而活化；活化的 MxA 能水解病毒核衣壳，释放出的病毒核酸被细胞质中内切酶降解，水解作用后的 MxA 又转化为GDP 结合形式[2,3]。体外试验证实，MxA 蛋白对乙型肝炎病毒（HBV）有抗明显病毒活性。在表达 MxA 蛋白的 HuH_7 细胞株被转染入 HBV 后，细胞质内 HBsAg 及 HBeAg 明显减少，且 HBV DNA 复制的中间产物（负链 DNA）几乎全部消失，细胞质中 HBV 前基因组 RNA 减少了 2~4 倍，从而第一次认定 MxA 对于双链 DNA 的 HBV 也有抗病毒作用[1]；Peltekian 对转基因鼠的体内试验也证实了这一点[4]。

MxA 蛋白属于大分子 GTP 酶动态蛋白超家族、分子量较大约 75ku、有研究[5]显示：人类 MxA 蛋白与动态蛋白有 30%序列同源性，并具有许多共性如：自组装倾向、对脂质的亲和力、GTP 酶的水解能力等。其结构至少由 3 个区域组成：（1）N- 末端结构域：由约 300 个氨基酸组成，是 GTP 酶的活性区；（2）中间结构域：约含有 150 个氨基酸；（3）C- 末端结构域：是 GTP 酶效应区（GTPase effector domain，GED），约含有 100 个氨基酸。本实验对健康中国人的 MxA 基因首次进行扩增并构建重组真核载体，所构建的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA 经经限制性内切酶、PCR 鉴定等显示构建成功。对重组载体的 MxA 基因序列测序显示其 MxA 基因序列（1989bp），与 GenBank 中所报道的 MxA 基因序列同源性为 99.75%，有 5 个核苷酸差异但所编码的氨基酸仅有 1 个发生了改变，且此氨基酸位于 MxA 蛋白的中间结构域即非功能区，对 MxA 蛋白的作用没有影响。

本研究使用目前应用最为广泛的真核表达载体 PcDNA3.1 成功构建含有人 MxA 基因的重组真核载体 PcDNA3.1-MxA。为下一步研究 MxA 蛋白抗乙型肝炎病毒作用奠定了基础。

（下转第 249 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

迟发性脑血管痉挛是 SAH 严重的并发症，发生率高达 16%~66%，推测与 SAH 后各种致痉因子的释放密切相关。大量研究提示蛛网膜下腔积血释放出的氧合血红蛋白可能是导致脑血管痉挛持续发展的一个关键因素，它能引发自由基和脂质过氧化反应，影响花生酸类代谢，刺激血管内皮合成内皮素，进一步使脑血管自身调节血流功能受损和血管壁神经末梢退化[3]。脑脊液置换直接清除了血小板、氧合血红蛋白以及一些血细胞破坏产生的血管活性物质，致痉因子的清除可减轻或避免 SAH 后脑血管痉挛，并且脑脊液置换清除红细胞可减轻或避免对蛛网膜颗粒的阻塞；鞘内注射地塞米松可稳定细胞膜，减少纤维素渗出，减轻血液刺激引起的化学性炎症反应，防止脑室孔和蛛网膜颗粒粘连，降低颅压，减轻 SAH 后早发和迟发性脑积水[3]。本文治疗结果表明脑脊液置换组疗效明显优于常规治疗组，两组脑血管痉挛及脑积水的发生率以及头痛的缓解时间均有明显差异($P<0.05$)。有报道认为脑脊液置换增加再出血[4]，本文治疗组再出血率与对照组比较无显著差异($P>0.05$)。再度出血主要是疾病变本身所致，如剧烈头痛、烦躁及血压突然增高均可诱发[5]，同时穿刺放液速度过快也可使颅内压骤减致动脉瘤破裂出血，通过术前降颅压、控制放液速度可以预防。

参 考 文 献

[1] 杨 波，主编.经颅多谱勒超声应用合实践[M]. 第 1 版.西安：陕西科学技术出版社，1995.132-134.

[2] 胡维铭，王维治，主编.神经内科主治医生 700 问[M]. 第 2 版.北京：中国协合医科大学出版社，2000.518-521.

[3] Jan Claassen, Ricardo Carhuapoma, Kurt T, et al. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage frequency, predictors, and impact on outcome[J]. Stroke, 2002; 33(2): 1225.

[4] P rofe ta G, De Falco R, P rofe ta L. Reasons against lumban puncture diagnosis with cerebrospinal fluid drainage in subarachnoid hemorrage[J]. M inerva A nestesiology, 1998; 64(4): 137-139.

[5] 史玉泉，主编.实用神经病学[M]. 上海：上海科技出版社，1994.653.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 154 页)

参 考 文 献

[1] Gordien E, Rosmorduc O, Peltekian C, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein[J]. J Virol, 2001; 75(6): 2684-2691.

[2] Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity[J]. Traffic, 2002; 3(10): 710-717.

[3] Roth J, Dobbelstein M. Export of hepatitis B virus RNA on a Rev-like pathway: inhibition by the regenerating liver inhibitory factor IKappaB alpha[J]. J Virol, 1997; 71(11): 8933-8939.

[4] Peltekian C, Gordien E, Garreau F, et al. Human MxA protein participates to the interferon-related inhibition of hepatitis B virus replication in female transgenic mice[J]. J Hepatol, 2005; 43(6): 965-972.

[5] Accola MA, Huang B, Almasri A, et al. The antiviral dynamin family member, MxA, tabulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2002; 277(24): 21829-21835.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 206 页)

26(2): 122-124.

[16] Pasic J, Levy WC, Sullivan MD. Cytokines in Depression and Heart Failure[J]. Psychosom Med, 2003; 65(2): 181-193.

[17] 李 慧，金章安，霍艳明.生脉注射液对充血性心力衰竭患者即刻血流动力学的影响[J]. 中国危重病急救医学，2003; 15(9): 572-573.

[18] 郭昌星，杨兴易，林兆奋，等.生脉注射液对全身炎症反应综合征患者血浆血管活性介质影响的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志，2004; 11(4): 239-241.

[19] 杜光辉，张 悦，周大桥，等.生脉注射液对蛋白激酶 C 调控 LPS 诱导 iNOS 基因表达的影响[J]. 中华急诊医学杂志，2003; 12(1): 21-22.

[20] 楚 延，潘定彬，唐学农，等.生脉注射液对内源性糖皮质激素水平的影响[J]. 中成药研究，1983; 10: 25.

(责任编辑：冉明会)