

草鱼 Mx 蛋白基因的克隆与原核表达

王 伟^{1,2}, 白俊杰¹, 劳海华¹, 叶 星¹, 罗建仁¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与
养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:根据已报道的 Mx 蛋白 cDNA 序列设计合成特异引物, 应用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法, 从草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 诱导的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝脏总 RNA 中扩增获得 Mx 蛋白 cDNA, 回收纯化后克隆到 pGEM-T Easy Vector 系统的 T 载体上。重组子的序列分析表明: 所克隆的 Mx 蛋白 cDNA 长 722 bp, 编码 240 个氨基酸, 包括 1 个三联 GTP 结合区域和 1 个发动蛋白 (dynamitin) 族特征的序列。与已知鱼类 Mx 蛋白基因序列比较表明, 草鱼 Mx 蛋白基因序列与其它鱼类 Mx 基因相应序列具有较高的同源性, 其中与斑马鱼 Mx 蛋白 E 型基因碱基序列比较同源性最高, 为 87.1%。将此基因改造后定向克隆至原核表达质粒 pBV220, 构建成重组草鱼 Mx 蛋白基因表达质粒 pBVgcMx, 并在大肠杆菌中获得高效表达, 重组草鱼 Mx 蛋白的表达量占菌体总蛋白的 26.6%。Q-sephrose FF 层析柱分离纯化的重组草鱼 Mx 蛋白纯度达 95.6%。

关键词:草鱼; Mx 蛋白基因; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: Q959.468; Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)05-0365-05

Mx 蛋白是一类由干扰素诱导的抗病毒蛋白, 大小为 70~80 kD, 当机体或细胞受病毒感染或其他因子影响时产生^[1-2]。有关 Mx 蛋白的研究目前主要集中在人、鼠、鸟类等脊椎动物 Mx 基因的克隆、序列分析、Mx 蛋白的结构功能及 Mx 蛋白与干扰素之间关系等方面^[3-8], 鱼类的相关研究尚不多见, 目前仅见大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等鱼类的 Mx 基因相关研究^[9-12]。

干扰素是动物细胞或机体在一定条件诱导下产生的一类功能调节蛋白, 是一类具有广谱抗病毒作用和免疫调节功能的重要细胞因子。干扰素的产生与动物细胞或机体免疫反应密切相关, 但目前对鱼类干扰素的检测还没有很有效的方法。作为一类干扰素诱导的蛋白质, Mx 蛋白与干扰素的产生、活性密切相关, 在人为诱导的情况下, Mx 蛋白在细胞内

的表达量很大, 最高可达细胞胞质蛋白的 1%^[9], 与多数细胞因子相比, Mx 蛋白半衰期较长, 达 2.5 d, 其诱导没有反馈机制, 易于用常规方法进行检测。因此人们通常把 Mx 蛋白在细胞中的表达作为干扰素表达的标志^[10]。Trobridge 等^[9]用大肠杆菌表达的虹鳟 Mx 蛋白片段制备的抗血清, 能够用来检测虹鳟 3 种 Mx 蛋白和大西洋鲑 Mx 蛋白。

本研究克隆得到了草鱼 Mx 蛋白 cDNA 序列, 构建了原核表达质粒, 并在大肠杆菌中成功表达, 表达产物纯化后拟用来制备抗血清, 以检测鱼体内干扰素的产生机制, 并为深入研究鱼类的免疫机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用草鱼 (体重约 60 g) 和草鱼呼肠孤病毒取自珠江水产研究所; TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) Ver1.1 为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; pGEM-T Easy Vector 系统、SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品; Agarose Gel DNA Extraction Kit 为 Roche 公司产品; 有关试剂购自华美

收稿日期: 2003-04-11; 修改日期: 2003-05-15.

资助项目: 中国水产科学研究院基金项目 (99-08-03).

作者简介: 王 伟 (1977-), 男, 硕士, 从事鱼类生物技术研究.

E-mail: xsw56@sohu.com

通讯作者: 罗建仁. E-mail: prfri@guangztc.edu.cn

生物工程公司等。大肠杆菌 DH5 α 、质粒 pBV220 由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 草鱼的诱导及其肝脏总 RNA 的提取 用草鱼呼肠孤病毒注射草鱼胸腔进行诱导,使草鱼产生免疫应答,3 d 后取肝脏提取总 RNA。

1.2.2 引物设计与 RT-PCR 根据已发表的大西洋鲑、虹鳟、牙鲆等鱼类 Mx 蛋白 cDNA 序列设计引物,正向引物为 P1:5'TAT GAG GAG AAG GTG CGT CCC TGC ATC GAC CT 3';反向引物为 P2:5'CCC CTG CAC CTG ACG(T) ATC ATG TAG C 3'。cDNA 合成反应条件:45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5min;PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后进行 35 个循环反应,其温度循环条件为变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min。循环结束后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

1.2.3 草鱼 Mx 蛋白基因克隆与测序分析 扩增的目的基因片段经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收,与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,筛选鉴定重组子。ABI PRISMTM 377 全自动荧光测序仪进行序列测定。

1.2.4 草鱼 Mx 蛋白 cDNA 改造及原核表达工程菌的构建 根据测序结果设计用于改造草鱼 Mx 蛋白 cDNA 的引物。正向引物为 P3:5'CGG AAT TCA TGT ATG AGG AGA AGG TGC GTC C 3',加入了 1 个起始密码子 ATG 和 1 个 *EcoR* I 酶切位点;反向引物为 P4:5'CGC GGA TCC TTA CTA CCT GCA CCT GAC GAT CAT GT 3',加入了 2 个终止密码子 TAA 和 TAG,以及 1 个 *Bam*H I 酶切位点。草鱼 Mx 蛋白基因原核表达工程菌的构建方法,参照文献[13]。

1.2.5 诱导表达和 SDS-PAGE 分析 参照文献[14]的方法,重组菌 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达,SDS-PAGE 检测表达产物的有无及其存在形式。薄层扫描测定特异蛋白在大肠杆菌总蛋白中的含量。

1.2.6 重组菌表达产物的纯化 参照文献[14]的方法,将诱导后的重组菌超声波破碎,收集沉淀物,用 2 mol/L 尿素洗涤,8 mol/L 尿素溶解包涵体,AK-TA prime 蛋白质纯化系统阴离子交换层析柱 Q-sephrose FF 纯化重组蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度^[15]。

2 结果

2.1 草鱼的诱导及其肝脏总 RNA 的提取

草鱼呼肠孤病毒诱导草鱼 3 d 后,其内脏如肝、脾、肾表面都出现了红色斑点,表明病毒诱导有了明显效果,此时提取的草鱼肝脏总 RNA 推测含有较高目的基因转录本。

2.2 RT-PCR 扩增草鱼 Mx 蛋白 cDNA

以总 RNA 为模板进行反转录,省去了分离纯化 mRNA 的过程。RT-PCR 扩增产物在约 722 bp 处有明亮的扩增带,与预期大小一致。

2.3 草鱼 Mx 蛋白基因克隆与测序分析

RT-PCR 扩增片段与 T 载体连接后,筛选得到 17 个重组子(pGEM-T gcMx)。选取其中 2 个重组子,测定基因序列并分析表明,所克隆的基因片段长 722 bp,编码草鱼 Mx 蛋白基因成熟肽编码区的 N 端区域 240 个氨基酸(图 1),包括 1 个三联 GTP 结合区域;1 个发动蛋白(dynamin)族特征的序列。三联 GTP 结合区域和发动蛋白族特征的序列是脊椎动物 Mx 蛋白的结构特征,在抗病毒过程中起重要作用。

2.4 草鱼 Mx 蛋白基因原核表达工程菌的构建

以 pGEM-T gcMx 重组质粒为模板,P3、P4 为引物,PCR 改造扩增得到一约 746 bp 的 DNA 片段,将该片段插入原核表达质粒 pBV220 的多克隆位点中,酶切筛选鉴定得到 4 个重组子(pBVgcMx)(图 2)。对插入部分进行了序列测定,测序结果表明改造后的基因与预期设计的序列完全一致,扩增和重组表达质粒构建中没有发生基因突变。

2.5 重组菌的表达与 SDS-PAGE

诱导后的重组菌经 SDS-PAGE 检测,在分子量约 26 kD 处有 1 条特异蛋白带出现(图 3),与预期推测一致,经 7 h 诱导表达的特异蛋白约占菌体总蛋白的 26.6%。表达产物主要以包涵体的形式存在。

2.6 表达产物的纯化

包涵体经洗涤、溶解、透析、Q-sephrose FF 柱层析纯化后,重组 gcMx 蛋白的纯度达 95.6%。用 Bradford 法测定蛋白浓度,重组 gcMx 的表达产量达 16.4 mg/L 培养基。

```

1 Y E E K V R P C I D L V D S L R S L G V E K D L N
1 TAT GAG GAG AAG GTG CGT CCC TGC ATC GAC CTA GTG GAC TCA CTC AGG TCA TTA GGT GTA GAA AAG GAC CTG AAC
26 L P A I A V I G D Q S S G K S S V L E A L S G V A
76 CTG CCA GCT ATT GCT GTC ATA GGT GAC CAG AGC TCA GGA AAG AGT TCT GTG TTG GAA GCC CTG TCT GGA GTG GCG
51 L P R G T G I V T R C P L V L K L K K I S K D N N
151 CTG CCT AGG GGA ACA GGT ATT GTG ACA CGC TGT CCT CTG GTA TTG AAA CTG AAG AAA ATT TCA AAG GAC AAC AAC
76 W H Q W H G L M S Y R D Q T K K L K D P A E I E N
226 TGG CAT CAG TGG CAT GGA TTG ATG TCA TAT AGG GAC CAA ACA AAG AAA CTA AAA GAC CCA GCG GAA ATA GAG AAT
101 A V L K A Q T V L A G T G E G I S H E M I T L E I
301 GCT GTC TTA AAA GCT CAG ACA GTA TTG GCT GGA ACG GGA GAA GGG ATC AGT CAT GAG ATG ATC ACT CTG GAG ATC
126 Q S S D V P D L T L I D L P G I A R V A T G N Q P
376 CAG TCC AGT GAT GTC CCT GAC CTC ACT CTC ATT GAT TTG CCA GGC ATT GCT AGA GTT GCC ACT GGC AAC CAG CCA
151 K D I E K Q I K D L I E K Y I K R Q E T I S L V V
451 AAA GAC ATC GAG AAA CAA ATA AAA GAC CTA ATT GAA AAG TAC ATT AAA AGA CAA GAA ACC ATC AGC TTG GTT GTG
176 V P A N I D I A T T E A L Q M A S K V D S T G Q R
526 GTG CCT GCA AAC ATT GAC ATC GCC ACC ACT GAG GCA CTG CAG ATG GCA TCC AAA GTC GAT TCA ACT GGA CAA AGG
201 T L G I L T K P D L V D K G N E E T V V R T V N N
601 ACC CTG GGT ATT CTG ACT AAA CCG GAC TTG GTG GAC AAA GGC ATG GAG GAG ACG GTG GTC AGA ACA GTC AAT AAT
226 Q V I Q L K K G Y M I V R C R
676 CAA GTG ATA CAA CTG AAG AAG GGC TAC ATG ATC GTC AGG TGC AGG GG

```

图1 草鱼 Mx 蛋白 cDNA 片段的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of cDNA for grass carp Mx (*gcMx*) gene and predicted amino acid sequence

框内为三联 GTP 结合区域,下划线部分为发动蛋白族特征的序列

Boxes are the GTP binding motif; underline is the dynamin family characteristic sequence

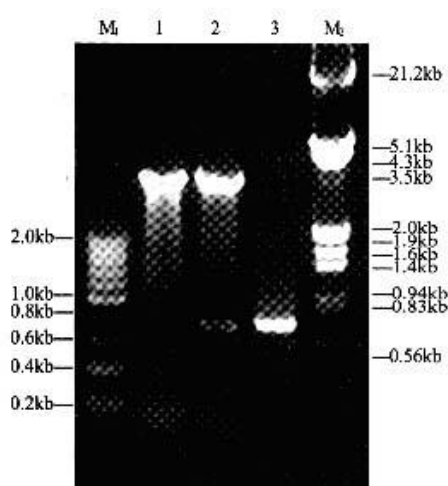
图2 重组表达质粒的 *EcoR* I、*Bam* H I 酶切鉴定

Fig.2 Restriction mapping analysis of expression recombinant plasmids

M₁, 200bp DNA ladder; 1. pBV220/*EcoR* I + *Bam* H I; 2. 重组质粒 pBVgcMx/*EcoR* I + *Bam* H I; 3. pGEM-T gcMx PCR product(P3 + P4)
M₂, λDNA/*EcoR* I + *Hind* III

3 讨论

本研究用 RT-PCR 方法首次克隆了草鱼 Mx 蛋白 cDNA 序列,并在大肠杆菌中获得高效表达。所克隆的草鱼 Mx 蛋白 cDNA 片段及其推测的氨基酸序列与牙鲈 Mx、大西洋鲑 Mx1、虹鳟 Mx1、河鲈 Mx 蛋白基因相应碱基及氨基酸序列比较同源性较高,分别为 69.8% 和 69.2%;66.9% 和 70.0%;66.6% 和 70.4%;70.7% 和 72.5%;其中与斑马鱼 Mx 蛋白 E 型基因碱基序列及氨基酸序列比较同源性最高,均为 87.1%。根据已发表的鱼类、人类、啮齿类、鸟类、马、牛、羊、猪 Mx 基因及其氨基酸序列进行分析,表明 Mx 蛋白高度保守,尤其是 N 端氨基酸序列同源性更高,为 Mx 蛋白氨基酸序列的核心区。

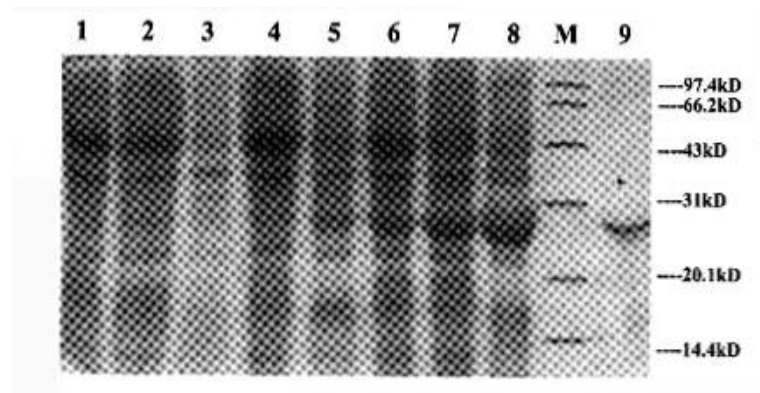


图3 SDS-PAGE 检测表达产物

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression products

1. 诱导前的 DH5 α (pBV220); 2. 诱导 7 h 的 DH5 α (pBV220); 3. 诱导前的重组菌(pBVgcMx); 4-7. 诱导 1、3、5、7 h 重组菌; 8. 包涵体沉淀; 9. Q-sephrose FF 柱层析纯化重组蛋白; M. 低分子量标准蛋白

1. DH5 α (pBV220) before induction; 2. DH5 α (pBV220) after 7 h induction; 3. DH5 α (pBVgcMx) before induction; 4-7. DH5 α (pBVgcMx) after 1, 3, 5, 7 h induction; 8. Precipitate of DH5 α (pBVgcMx) after 7 h induction; 9. Q-sephrose FF column purified gcMx protein; M. LMW protein marker.

Trobridge 等^[2]用大肠杆菌表达了虹鳟 Mx 蛋白片段,该片段具有 115 个氨基酸,位于相对不保守的蛋白区段,只包含 1 个 GTP 结合区域,用此重组蛋白片段成功制备了 Mx 蛋白抗血清,能够用来检测虹鳟 3 种 Mx 蛋白和大西洋鲑 Mx 蛋白。本研究表达的草鱼 Mx 蛋白片段为 Mx 蛋白 N 端核心区,长度为 240 个氨基酸,包括完整的三联 GTP 结合区域和发动蛋白族特征的序列,估计更适合用于制备 Mx 蛋白抗血清。为了避免 Mx 蛋白免疫反应可能出现的种属特异性,本研究仅对 Mx 蛋白 N 端核心区进行了克隆和表达,用此表达产物制备的鱼类 Mx 蛋白抗血清,希望能够用来检测不同种类鱼的 Mx 蛋白。有关草鱼 Mx 蛋白的抗血清制备工作正在进行。

参考文献:

- [1] 徐耀先. 分子病毒学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2000.
- [2] Trobridge G D, Leong J A. Characterization of a rainbow trout Mx gene[J]. J Interferon Cytokine Res, 1995, 15(8): 691-702.
- [3] Staeheli P, Yu Y X, Grob R, et al. A double-stranded RNA-inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx [J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(7): 3117-3121.
- [4] Bryan Charleston, Steward H J. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high-level expression in the endometrium of pregnant sheep [J]. Gene, 1993, 137: 327-331.
- [5] Krister Melen, Tapani Ronni, Barbara Broni, et al. Interferon-induced Mx protein form oligomers and contain a putative leucine zipper [J]. Biolog Chem, 1993, 267(36): 25898-25907.
- [6] Horisberger M A, McMaster G K, Helmut Zeller. Cloning and sequence analysis of cDNAs for interferon and virus-induced human Mx proteins reveal that they contain putative guanine nucleotide-binding sites: Functional study of the corresponding gene promoter [J]. Virol, 1990, 64(3): 1171-1181.
- [7] Jovan Pavlovic, Otto Haller, Peter Staeheli. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle [J]. Virol, 1992, 66(4): 2564-2569.
- [8] Staeheli P, Haller O, Boll W, et al. Mx Protein: Constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus [J]. Cell, 1986, 44: 147-158.
- [9] Trobridge G D, Chiou P P, Leong J A. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs characterization of trout Mx Protein expression in salmon cells [J]. Virol, 1997, 71(1): 5304-5311.
- [10] Kim C H, Johnson M C, Drennan J D, et al. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish [J]. Virol, 2000, 74(15): 7048-7054.
- [11] Lee J Y, Hirono I, Aoki T. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(4): 407-415.
- [12] Robertsen B, Trobridge G, Leong J A. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Dev Comp Immunol, 1997, 21(5): 392-412.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. (第2版). 北京:科学出版社, 1993. 34-70.
- [14] 白俊杰, 马进, 简清, 等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 生长激素基因克隆及原核表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,

1999, 15(3):409-412.

2002. 42-47.

[15] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社.

Cloning of cDNA for grass carp Mx protein and its expression in prokaryocyte

WANG Wei^{1,2}, BAI Jun-jie¹, LAO Hai-hua¹, YE Xing¹, LUO Jian-ren¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The specific primers were designed referring to the reported Mx protein gene sequences of fishes. After the experimental fish were induced by grass carp Reovirus (GCRV) for 3 days, the cDNAs encoding grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Mx protein gene (*gcMx*) was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method using total RNA isolated from grass carp liver as template. The amplified cDNA fragments were purified and inserted into pGEM-T Vector and sequenced. The sequencing results showed that the cloned cDNA was 722 bp in length, encoding 240 amino acid residues of the mature peptide, containing GTP binding region and dynamin family character sequence. The homology of the nucleotide sequences of Mx protein gene between grass carp and other fishes was more than 66.6%. The highest homology reached 87.1%, which was between grass carp Mx and Zebrafish MxE. The grass carp Mx cDNA was modified by PCR technique. The modified cDNA was cloned to the plasmid pBV220. The expression recombinant plasmid pBVgcMx was constructed. After temperature inducement and SDS-PAGE analysis, the recombinant expression bacteria produced a special protein of about 26 kD in molecular weight. The proportion of the recombinant protein in total bacterial protein was 26.1%. After the anion chromatography column was purified, the purity of the recombinant protein reached 95.6%.

Key words: grass carp; Mx protein gene; gene clone; prokaryotic expression

Corresponding author: LUO Jian-ren. E-mail: prfri@guangztc.edu.cn

欢迎订阅 2004 年度《内陆水产》

《内陆水产》是由湖南省水产学会和湖南省水产科学研究所共同主办的水产综合性月刊,主要栏目有:信息大观、渔家风采、科技推广、名特优新、养鱼技术服务台、健康养殖、病害防治、休闲渔业、各地渔市等。本刊长期坚持“面向生产,面向渔农”的办刊方针,以“仁慈水产信息、致富养殖渔农”为办刊宗旨,为广大水产工作者、养鱼专业户提供技术信息咨询服务。

本刊曾获全国水产优秀报刊一等奖,是《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,是中国学术期刊引文数据库、中国科学引文数据库来源期刊。全国统一刊号:CN43-1103/S,国际标准刊号:ISSN1005-636X。

2004 年《内陆水产》本着更加求新、务实、高效的办刊原则,新年版面更新、内容更加丰富、辐射面更广,欢迎广大新老读者到当地邮局办理订阅手续,本刊邮发代号 42-127,每期 4 元,全年 48 元。如当地邮局订阅不便,亦可从《内陆水产》杂志社订阅,汇款请寄:湖南省沅江市书院路 257 号,《内陆水产》杂志社。邮政编码:413100,热线电话:0737-2850666,联系人:罗梦良。