

# 鸡斑联蛋白基因的慢病毒干扰载体的构建及筛选

戴国俊<sup>1,2</sup>, 孙大辉<sup>1,2</sup>, 林雨鑫<sup>1,2</sup>, 孙明明<sup>1,2</sup>, 王翔<sup>1,2</sup>, 王金玉<sup>1,2\*</sup>,  
张跟喜<sup>1,2</sup>, 谢恺舟<sup>1,2</sup>, 施会强<sup>3</sup>, 侍苗苗<sup>1</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;  
3. 江苏京海禽业集团有限公司, 南通 226103)

**摘要:** 本试验旨在构建 4 条鸡斑联蛋白(*zyxin*)基因的 RNAi 慢病毒载体, 对其进行滴度测定, 并进行有效干扰靶点的筛选, 为以后开展鸡 *zyxin* 基因抗球虫机理的研究奠定基础。提取鸡胸腺组织的 RNA, 反转录, 扩增 *zyxin* 基因的编码区, 并将其克隆到真核表达载体 Pex-6 上。设计针对 *zyxin* 的 shRNA 序列, 应用基因重组技术插入到 Lv3 慢病毒表达载体中, 将 lv3-shRNA 载体与包装质粒 pGag/Pol, pRev, Pvsv-G 共转染 293T 细胞, 进行病毒包装。将得到的病毒原液 10 倍稀释 6 个梯度, 分别转染 293T 细胞, 进行滴度的测定。将构建好的 4 条慢病毒载体与 Pex-6-*zyxin* 真核表达载体共转染 293T 细胞, 运用 RT-PCR 和 Western-blot 方法进行有效干扰靶点的筛选。构建 4 条针对目的基因 *zyxin* 的 RNAi 慢病毒穿梭质粒表达载体 CO1、CO2、CO3、CO4 和 1 个阴性对照质粒, 经测序鉴定正确; 共转染 293T 细胞包装病毒并浓缩后滴度达  $1 \times 10^8$  TU · mL<sup>-1</sup>, 适合感染目的细胞, 经过筛选, CO3 对 *zyxin* 在 293T 细胞中的表达干扰效果最佳。成功构建了 *zyxin* 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体, 并进行了有效干扰靶点的筛选, 为进一步研究 *zyxin* 基因的功能奠定了基础。

**关键词:** *zyxin* 基因; RNAi; 慢病毒干扰载体; 真核表达载体; 鸡

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1330-07

## Construction and Selection of Chicken *Zyxin* Recombinant Lenti-virus Interference Vectors

DAI Guo-jun<sup>1,2</sup>, SUN Da-hui<sup>1,2</sup>, LIN Yu-xin<sup>1,2</sup>, SUN Ming-ming<sup>1,2</sup>, WANG Xiang<sup>1,2</sup>,  
WANG Jin-yu<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Gen-xi<sup>1,2</sup>, XIE Kai-zhou<sup>1,2</sup>, SHI Hui-qiang<sup>3</sup>, SHI Miao-miao<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;  
2. Key Lab for Animal Genetic, Breeding and Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China; 3. Jiangsu Jinghai Poultry Industry Group Co., Ltd, Nantong 226103, China)

**Abstract:** The aim of this study was to construct 4 Lenti-virus Interference Vectors for chicken *zyxin* gene, determine their titers, and filter the effective interference target, and lay the foundation for studying of anti-coccidial mechanism of chicken *zyxin* gene. The experiment was performed by extracting RNA from chicken thymus, then synthesizing the cDNA with reverse transcription, amplifying coding regions of *zyxin*, and cloning it into eukaryotic expression vector Pex-6 at last. The shRNA sequences for *zyxin* were designed, and were inserted into Lv3 lenti-

收稿日期: 2013-01-25

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系(nyctx-42-G1-05); 江苏省高校自然科学研究重大项目(11KJA230001); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 戴国俊(1963-), 男, 江苏宜兴人, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物遗传育种学研究, E-mail: daigj@yzu.edu.cn

\* 通信作者: 王金玉, 教授, E-mail: jywang@yzu.edu.cn

virus vectors. Lv3-shRNA vectors and packaging plasmids which include pGag/Pol, pRev and Pvsv-G were cotransfected into 293T cells to package virus. Dilute virus liquid 10 times the 6 gradients, and transfect them into 293T cells respectively to determine the titer. Transfect 4 recombinant lenti-virus interference vectors and eukaryotic expression vectors Pex-6 into 293T cells, and filter the effective interference target by RT-PCR and Western-blot. The sequence identification results showed that the 4 constructed *zyxin* recombinant lenti-virus interference vectors including CO1, CO2, CO3, CO4 and a negative control plasmid were correctly constructed. By way of transfecting them into 293T cells and concentration, the titer reached  $1 \times 10^8$  TU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> which showed that they were suit for being transfecting into the target cells. The filter result showed that CO3 had the most significant interference effect on *zyxin* expression in 293T cells. Analysis of the data suggests that the *zyxin* recombinant lenti-virus interference vectors were constructed and filtered the effective interference target successfully, which laid the foundation for further research on *zyxin* gene function.

**Key words:** *zyxin*; RNAi; recombinant lenti-virus interference vectors; eukaryotic expression vector; chicken

鸡球虫病是由艾美耳属球虫寄生于鸡肠道内引起的一种寄生虫病<sup>[1]</sup>。据统计全世界每年因鸡球虫病的损失约 80 亿美元,仅美国年损失就高达 45 亿美元<sup>[2]</sup>,中国每年因该病损失为 6 亿~18 亿元<sup>[3]</sup>。通常初次感染球虫幸存下来的鸡由于产生了特异的保护性免疫力,可以在至少几个月内抵抗球虫的再次感染<sup>[4]</sup>。自然宿主的免疫是有物种特异性的,以至于免疫一种艾美耳种属的鸡对其他球虫也敏感。而且,不同艾美耳种属的球虫在感染宿主也具有组织与器官特异性,柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*),主要感染盲肠,破坏肠黏膜,引起肠管炎症、坏死<sup>[5]</sup>。

斑联蛋白(*zyxin*),又叫 *zyxin2* 蛋白,是一种锌指结合的磷蛋白,是肌动蛋白丝装配的调节物。该蛋白的 N 端是富含脯氨酸的区域,而 C 端包含有 3 个串联的 LIM 锌指结构区域<sup>[6]</sup>。*zyxin* 通过和其他蛋白的协同可以影响细胞的运动、肿瘤细胞的生长和迁移以及调节有丝分裂的进行,并在细胞核中起转录激活子的作用,同时还对微丝等细胞骨架的组装起作用<sup>[7]</sup>。其具有细胞内信号转导的功能,可以在富含肌动蛋白的黏着斑结构中集聚,并顺着肌动蛋白骨架移动,是一种具有细胞骨架肌动蛋白调节功能的胞内蛋白。在创伤修复、细胞迁移、细胞黏附、上皮间质转化期间,斑联蛋白起到重塑肌动蛋白细胞骨架的作用<sup>[8-10]</sup>。*zyxin* 在动物组织中广泛表达<sup>[8]</sup>。但至今其在组织细胞的生命过程中的作用还不清楚<sup>[11]</sup>。

Y. H. Hong 等<sup>[12]</sup>在 E. S. Kim 等<sup>[13]</sup>进行的鸡抗球虫病数量性状基因座的精确定位的基础上,研究发现鸡 1 号染色体上的微卫星标记 LEI0071

和 LEI0101 之间的区域与艾美耳球虫抗性相关,其试验结果证明,该区域内的 *zyxin* 基因的 5 个 SNP 位点和 *CD4* 基因的 1 个 SNP 位点同球虫病抗性指标  $\beta$ -胡萝卜素、NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub> 浓度有显著的相关。因此,该基因的 SNP 位点可作为鸡艾美耳抗球虫病抗性育种分子遗传标记进行标记辅助选择,*zyxin* 基因是一种与鸡球虫病抗性相关的候选基因。

本研究通过构建针对鸡 *zyxin* 基因的慢病毒干扰载体,并验证其干扰效率,筛选有效的干扰靶点,为以后 *zyxin* 基因与柔嫩艾美耳球虫病抗性的相关性研究的开展奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DNA 内切酶, DNA 连接酶(# EL0011)和 DNA marker(# SM0161)均购自 Fermentas 公司;琼脂糖(RT101)和 DNA 凝胶回收试剂盒(DP209-03)购自天根生化科技有限公司;中量抽提试剂盒(AP-MD-P-25)购自杭州爱思进生物技术有限公司;酵母提取物(LP0041)胰蛋白胨(LP0042)购自 OXOID 公司;琼脂(0201G16)购自捷瑞公司;*zyxin* 全基因以及 4 条干扰片段由上海吉玛公司合成, Pex-6-*zyxin* 过表达载体由上海吉玛公司合成,感受态大肠杆菌, 293T 细胞均购自上海吉玛公司; Kanamycin(DH177-6.1)购自 Japan 公司; Ampicillin(DH022-1.1)购自 Sigma 公司; SDS(S0227)购自 BBI 公司;穿梭质粒 Lv3 和包装质粒 pGag/Pol, pRev, Pvsv-G 购自上海吉玛公司; *zyxin* 一抗购自

sigma 公司,二抗购自 Millipore 公司。

## 1.2 真核表达载体 Pex-6-zyxin 构建及表达验证

提取鸡胸腺组织的 RNA,反转录。设计针对鸡 *zyxin* 基因编码区序列的引物(表 1),上下游引物分

别加上 *Nhe* I 和 *Sal* I 酶切位点及保护碱基。PCR 扩增,并将其连接到真核表达载体 Pex-6 上,转化感受态细胞,挑取阳性克隆进行双酶切鉴定并测序,利用质粒提取试剂盒提取测序鉴定正确的重组质粒。

表 1 *zyxin* 基因编码区扩增引物

Table 1 Amplified primer of *zyxin* coding region

引物 primer	序列 Sequence
上游引物 Forward primer	5'GATAGCTAGCGCCACCATGGCTTCTCCAGGTACCCCA3'
下游引物 Reverse primer	5'GATCGTCGACGCACGCTGTTTTAGCACGAACAGTGTGAC3'

利用脂质体法将 Pex-6-zyxin 真核表达载体转染到 293T 细胞中,并设立空白和阴性对照,48h 后将 293T 细胞利用 Trizol 法提 RNA、反转录并进行 RT-PCR 检测。

## 1.3 鸡 *zyxin* 基因慢病毒干扰载体的构建、包装以及有效干扰靶点的筛选

1.3.1 *zyxin* 慢病毒干扰载体的构建 根据鸡 *zyxin* 基因(GenBank accession No. NM\_001004386)核苷酸序列,按照 siRNA 设计原理并应用上海吉玛公司设计软件,设计 4 条 siRNA 序列和 1 条阴性对照序列(NC)(表 2),应用 BLAST 工具将选定序列

与鸡基因组进行比对,确保序列的唯一性。Lv3-shRNA 模板中的 loop 结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号。正义链模板的 5'端添加了 GATCC,与 *Bam*H I 酶切后形成的黏端互补;反义链模板的 5'端添加了 AATTC,与 *Eco*R I 酶切后形成的黏端互补。4 条干扰序列分别命名为 CO1、CO2、CO3 和 CO4,阴性对照命名为 shNC。制备双链 DNA oligo,连接经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切线性化 Lv3 载体,转化感受态大肠杆菌。所得质粒用 *Eco*R I 进行单酶切鉴定,并测序。

表 2 4 条干扰序列和阴性对照以及依据干扰序列合成的模板

Table 2 Four interference sequences and negative control and templates synthesized on the basis of interference sequences

干扰片段名称	干扰序列	上下游模板
Interference sequence name	Interference sequence	Forward and reverse templet
CO1	GCACGTACTAT	F 5'GATCCGCACGTACTATGTATGAAATGTTCAAGAGA CATTTCATACATAGTACGTGCTTTTTTTG 3'
	GTATGAAATG	R 5'AATTCAAAAAAGCACGTAATGTATGAAATGTCT CTTGAACATTTTCATACATAGTACGTGCG 3'
CO2	GCCTCCCAAT	F 5'GATCCGCCTCCAATTTACCTATGCTTCAAGAGAG CATAGGTGAAATTGGGAGGCTTTTTTTG 3'
	TTCACCTATGC	R 5'AATTCAAAAAAGCCTCCAATTTACCTATGCTCT CTTGAAGCATAGGTGAAATTGGGAGGCG 3'
CO3	GAAACTCTCC	F 5'GATCCGAAACTCTCTCTGACCATGATTCA ATGGTCAGAGGAGAGTTTCTTTTTTTG 3'
	TCTGACCATGA	R 5'AATTCAAAAAAGAAACTCTCTCTGACCATGA TCTCTTGAATCATGGTCAGAGGAGAGTTTCG 3'
CO4	GCTCCTTCAA	F 5'GATCCGCTCCTTCAAACCTTACAAGATTCA AGAGATCTTGTAGAGTTTGAAGGAGCTTTTTTTG 3'
	ACTTACAAGA	R 5'AATTCAAAAAAGCTCCTTCAAACCTTACAAGA TCTCTTGAATCTTGTAGAGTTTGAAGGAGCG 3'
shNC	TTCTCCGAAC	F 5'GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAG AACGTGACAGTTTCGGAGAACTTTTTTTG 3'
	GTGTCACGT	R 5'AATTCAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGT TCTCTTGAACGTGACAGTTTCGGAGAACG 3'

1.3.2 慢病毒包装收集和滴度测定 293T 细胞在 10 cm 培养皿中培养至 80%~90% 融合时,接种 15 cm 培养皿。洗涤,胰酶消化,细胞悬液接种于 15 cm 培养皿中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养过夜。无菌的 5 mL 离心管中加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养基,按比例加入含目的序列的穿梭质粒和包装质粒(pGag、pRev、pVSV-G),混匀,取另一支无菌的 5 mL 离心管,加入 1.5 mL 无血清 DMEM,再加入 300  $\mu$ L RNAi-mate,混匀,室温放置 5 min 后将两管混合,室温放置 20~25 min。在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 4~6 h,吸弃转染液,加入 20 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。在 37  $^{\circ}$ C 下,用 5% 的 CO<sub>2</sub> 继续培养 72 h。4  $^{\circ}$ C, 4 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 4 min。低速离心后,将离心管上清液倒入 50 mL 注射器内,用 0.45  $\mu$ m 过滤器过滤。滤液在离心机中进行超速离心,4  $^{\circ}$ C, 8 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 20 min, 得到浓缩液。-80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

重悬 293T 细胞,按 3  $\times$  10<sup>4</sup>  $\cdot$  孔<sup>-1</sup> 的浓度接种 96 孔板。将慢病毒原液 10  $\mu$ L, 用 10% FBS 的 DMEM 培养液十倍稀释 6 个梯度,加入到 96 孔板中,每孔加入 100  $\mu$ L 稀释的病毒液,同时设空白对照组,于 37  $^{\circ}$ C 下,用 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养 24 h。吸弃病毒液,加培养液,继续培养 72 h,通过荧光显微镜计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.3.3 慢病毒干扰载体筛选 培养 293T 细胞,细胞悬液接种于 6 孔板中。将慢病毒原液 200  $\mu$ L, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液十倍稀释。吸去 6 孔板中的培养液,每孔加入上述稀释的病毒液 1 mL,同时设空白对照组,于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。重悬细胞,按 10  $\times$  10<sup>5</sup>  $\cdot$  孔<sup>-1</sup> 的浓度接种 6 孔板,混匀后 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。在 1.5 mL EP 管中加入 250  $\mu$ L Opti-MEM I, 再加入 4  $\mu$ g Pex-6-zyxin 载体,混匀,取另一 1.5 mL EP 管,加入 250  $\mu$ L Opti-MEM I, 加入 10  $\mu$ L RNAi-mate,混匀,室温放置 5 min 后将 2 管混合,室温放置 20~25 min。吸去 6 孔板中的培养液,每孔加入 1 000  $\mu$ L 无血清的 DMEM 培养液。将转染混合物逐滴加入 6 孔板中,混匀后,在培养箱中温育 4~6 h。吸弃转染液,加入 1 500  $\mu$ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养液。37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 继续培养 24~48 h,观测结果并收样进行鸡 *zyxin* 基因 Real-time PCR 检测。鸡 *zyxin* 基因和 GAPDH 引物采用软件 Primer 5 设计,引物序列如下, *zyxin* 引物 F: 5'-GGACTGCTATGCT

GGAACCCTG-3', R: 5'-GGTATGAGTTACCG-GTGGCCTTC-3'; GAPDH 引物 F: 5'-CAT-GAGAAGTATGACAACAGCCT-3', R: 5'-AGTC-CTTCCACGATACCAAAGT-3'。应用 Trizol 裂解细胞提取细胞总 RNA。将 RNA 反转录为 cDNA。实时定量 PCR 反应体系为:上下游引物各 0.08  $\mu$ L, CDNA 2  $\mu$ L, Tag DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ L, 2  $\times$  定量 PCR Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 加至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件如下: 95  $^{\circ}$ C, 3 min; 95  $^{\circ}$ C, 30 s; 62  $^{\circ}$ C, 40 s, 共 40 个循环。

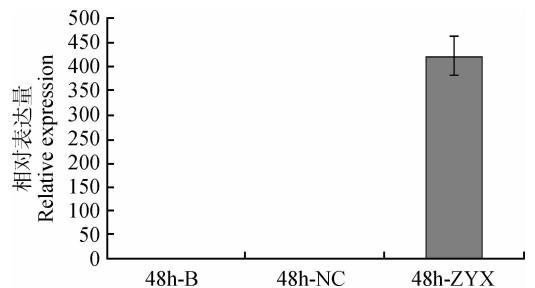
利用 Western-blot 方法进行干扰效率的检测,采用 *zyxin* 兔多克隆抗体来检测慢病毒干扰载体侵染后 72 h 不同样本的 *zyxin* 表达情况。

## 2 结果

### 2.1 Pex-6-zyxin 构建及转染 293T 细胞后 RT-PCR 检测

经双酶切鉴定并测序, Pex-6-zyxin 构建正确。

利用脂质体法将 Pex-6-zyxin 真核表达载体转染到 293T 细胞中,并设立空白和阴性对照,48 h 后将 293T 细胞利用 Trizol 法提 RNA、反转录并进行 RT-PCR 检测。Pex-6-zyxin 真核表达载体转染 293T 细胞 48 h 后观测到红色荧光,表明 Pex-6-zyxin 真核表达载体成功转染进 293T 细胞,RT-PCR 检测结果表明 *zyxin* 基因在 293T 细胞中成功表达(图 1)。



48h-B. 空白细胞对照; 48h-NC. 空载体阴性对照; 48h-ZYX. 过表达载体转染后 48 h *zyxin* 基因表达量  
48h-B. Blanket cells-control; 48h-NC. Null vector-control; 48h-ZYX. *zyxin* expression level after expression vector transfection (48 h)

图 1 *zyxin* 基因在 293T 细胞中的表达水平(以 48h-NC 的表达量为 1)

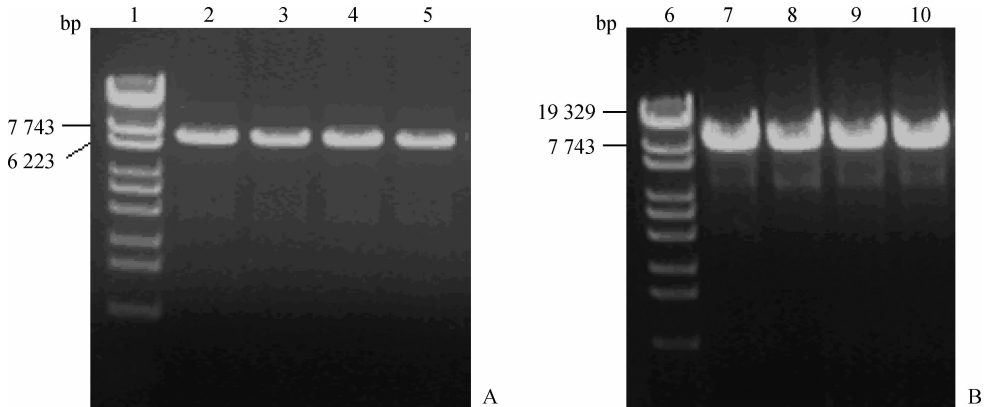
Fig. 1 The expression level of *zyxin* in 293T cells with the definition of 48h-NC to be 1

### 2.2 RNA 干扰慢病毒载体的构建与鉴定

鸡 *zyxin* 基因 shRNA 核苷酸序列 CO1、CO2、

CO3 和 CO4 经退火形成双链 DNA oligo,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 Lv3 载体后,将线性化载体与 DNA Oligo 经 T4 连接酶连接,产物转化 DH5 $\alpha$  感

受态细胞,挑选阳性克隆进行 *Eco*R I 单酶切鉴定,酶切初步鉴定正确(图 2)。经序列测定表明 shRNA 序列插入正确(图 3)。



1. Lambda DNA 相对分子质量标准;2. CO1 重组质粒电泳条带;3. CO2 重组质粒电泳条带;4. CO3 重组质粒电泳条带;5. CO4 重组质粒电泳条带;6. Eco130I DNA 相对分子质量标准;7. CO1 单酶切电泳条带;8. CO2 单酶切电泳条带;9. CO3 单酶切电泳条带;10. CO4 单酶切电泳条带  
1. Lambda DNA marker;2. CO1 recombinant plasmid electrophoresis strip; 3. CO2 recombinant plasmid electrophoresis strip; 4. CO3 recombinant plasmid electrophoresis strip; 5. CO4 recombinant plasmid electrophoresis strip; 6. Eco130I DNA marker;7. CO1 single enzyme electrophoresis strip; 8. CO2 single enzyme electrophoresis strip; 9. CO3 single enzyme electrophoresis strip; 10. CO4 single enzyme electrophoresis strip

图 2 重组质粒电泳(A)及其单酶切鉴定(B)

Fig. 2 Electrophoresis results of recombinant plasmid (A) and its single enzyme identification (B)

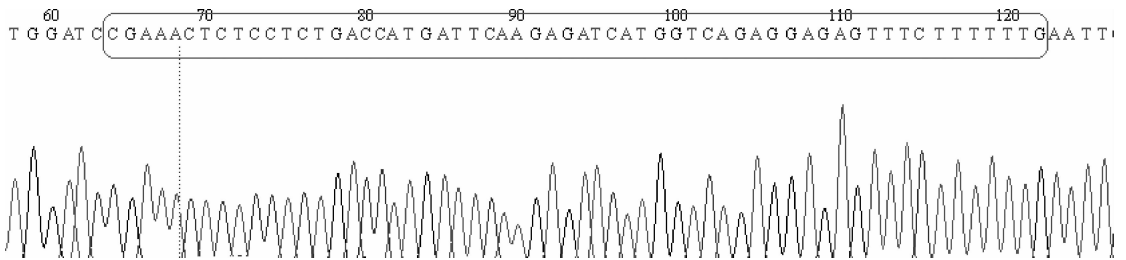


图 3 CO3 重组阳性克隆测序结果

Fig. 3 CO3 recombinant positive clones sequencing results

### 2.3 慢病毒颗粒包装及滴度测定

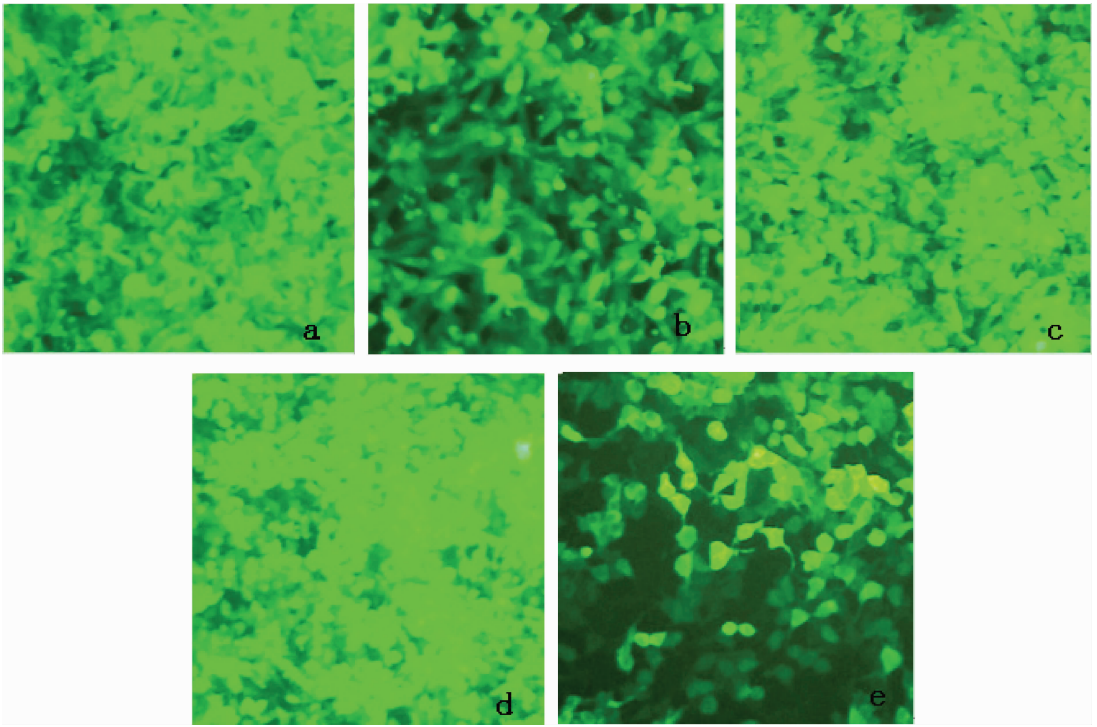
重组慢病毒质粒 Lv3-zyxin-shRNA 和包装质粒混合物共同转染 293T 细胞,在倒置荧光显微镜下,观察各孔细胞,24 h 后呈绿色荧光,细胞生长状态良好,表明病毒包装成功。收集病毒上清液,测得病毒滴度为  $1 \times 10^8$  TU  $\cdot$  mL $^{-1}$ 。

### 2.4 Real-time PCR 有效靶点筛选

将包装好的 zyxin-RNAi 慢病毒颗粒分别感染 293T 细胞,在荧光显微镜下观察,荧光细胞数量在 50% 以上者,表明感染效率大于 50%,结果表明各

内源性靶点的慢病毒均能有效感染 293T 细胞(图 4)。提取细胞总 RNA 进行 Real-time PCR 发现 zyxin-siRNA-CO3 靶点在 293T 细胞中对鸡 *zyxin* 基因的表达有较好的干扰效果,从统计结果可以发现 CO3 靶点的干扰效率约为 60%(图 5)。

采用 Western-blot 方法分析转染慢病毒干扰载体 72h 后的试验组和对照组( $\beta$ actin)细胞中 *zyxin* 基因的表达差异(图 6A)。结果表明在转染 *zyxin* 基因慢病毒干扰载体 72 h 后,CO1 和 CO3 的干扰效率最高,均在 90% 以上(图 6B)。

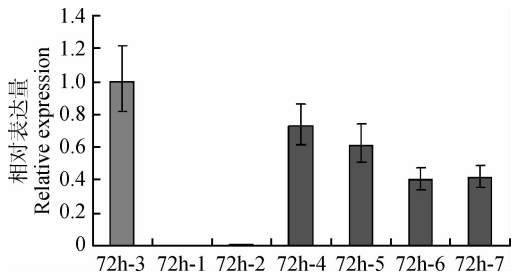


a, b, c, d, e 分别为 CO1、CO2、CO3、CO4、NC 侵染 293T 细胞后荧光显微镜观察

a, b, c, d, e are fluorescence microscope observation of 293T cells infected by CO1, CO2, CO3, CO4, NC

图 4 慢病毒侵染 293T 细胞荧光显微镜观察 (180×)

Fig. 4 Fluorescence microscope observation of 293T cells infected by virus (180×)



72h-1. 空白细胞;72h-2. lv3-nc+空质粒;72h-3. lv3-nc +*zyxin* 过表达质粒;72h-4. CO1 +*zyxin* 过表达质粒;72h-5. CO2 +*zyxin* 过表达质粒;72h-6. CO3 +*zyxin* 过表达质粒;72h-7. CO4 +*zyxin* 过表达质粒。下图同

72h-1. Blank cells; 72h-2. lv3-nc + empty plasmids; 72h-3. lv3-nc + *zyxin* expression plasmids; 72h-4. CO1 + *zyxin* expression plasmids; 72h-5. CO2 + *zyxin* expression plasmids; 72h-6. CO3 + *zyxin* expression plasmids; 72h-7. CO4 + *zyxin* expression plasmids. The same as below

图 5 *zyxin*-shRNA 慢病毒对鸡 *zyxin* 基因在 293T 细胞中表达的干扰效率

Fig. 5 The interference efficiency of *zyxin*-shRNA interfering *zyxin* expression in 293T cells

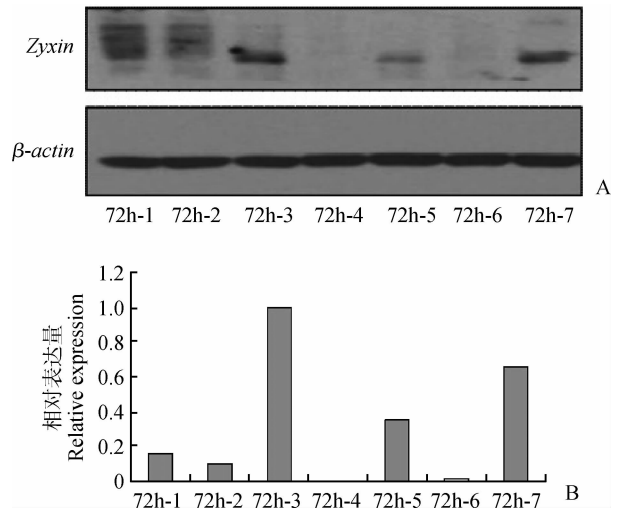


图 6 *zyxin*-shRNA 慢病毒干扰鸡 *zyxin* 基因在 293T 细胞中表达的 Western-blot 分析

Fig. 6 The Western-blot analysis of interference of *zyxin*-shRNA interfering *zyxin* expression in 293T cells

### 3 讨论

目前,国外关于人类 *zyxin* 基因方面的研究报

道较多,在人类组织中广泛表达,在有丝分裂期间 *zyxin* 和其他基因通过形成一个调节复合物控制了有丝分裂的进行<sup>[14-15]</sup>。尽管鸡 *zyxin* 和人的 *zyxin* 有约 60% 的序列相似性,但其功能的相似性却较高<sup>[13]</sup>。本研究成功利用鸡 *zyxin* 基因真核表达载体转染 293T 细胞,RT-PCR 结果表明 *zyxin* 真核表达载体在 293T 细胞中成功表达。为以后利用 293T 细胞对鸡 *zyxin* 基因干扰载体的筛选提供了可能性。但究竟能不能利用 293T 细胞在细胞水平上对鸡 *zyxin* 基因的功能进行更深入的研究,还需要进一步探索。

RNAi 与真核生物的发育、癌症的发生、基因表达的调控和抵抗病毒感染密切相关,具有重要的生物学意义,并显示了良好的应用前景。近年来,随着 RNAi 技术的发展,其在畜牧兽医领域也得到了广泛的应用,尤其是针对一些严重威胁畜禽生产、危害人类健康的疾病及特定基因功能的研究中取得了一定的研究进展<sup>[16]</sup>。控制鸡球虫病的方法主要是通过药物治疗和球虫病疫苗的免疫接种,尽管球虫病治疗药物和疫苗研制等不断创新,但要从根本上解决问题,必须从分子遗传学的角度对鸡球虫抗性相关基因进行研究,从而为培育鸡球虫病抗病群体用于家禽生产奠定基础,也为实施无公害生产提供条件。为了进一步探索 *zyxin* 基因与鸡球虫病的相关性及作用机理,作者成功构建了针对鸡 *zyxin* 基因的 4 个不同靶点的干扰载体,在 293T 细胞中初步证明这 4 个靶点均对 *zyxin* 基因在 293T 细胞中的表达有干扰效果,其中 CO3 的干扰效果最好,这为以后对于鸡 *zyxin* 基因与鸡球虫病抗性的相关性以及其功能的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 张龙乐,徐前明,李培英. 柔嫩艾美耳球虫安徽肥西(AHFX)株的分离与鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(12):1067-1070.
- [2] ALLEN P C, FETTERER R H. Recent advances in biology and immunobiology of Eimeria species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(1): 58-65.
- [3] 卢福庄,张雪娟. 中草药防治鸡兔球虫病的研究进展[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(3): 253-257.
- [4] ROSE M E. Coccidiosis; Immunity and the prospects for prophylactic immunization [J]. *Vet Rec*, 1976, 98:481-484.
- [5] 索 勋,李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998: 375-376.
- [6] BECKERLE M C. Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion[J]. *Bioessays*, 1997, 19(11): 949-957.
- [7] MOODY J D, GRANGE J, ASCIONE M P, et al. A zyxin head-tail interaction regulates zyxin-VASP complex formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(3): 625-628.
- [8] HIRATA H, TATSUMI H, SOKABE M. Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures[J]. *Commun Integr Biol*, 2008, 2(1): 192-195.
- [9] HIROTA T, MORISAKI T, NISHIYAMA Y, et al. Zyxin, a regulator of actin filament assembly targets the mitotic apparatus by interacting with LATS 1 tumor suppressor[J]. *Cell Biology*, 2006, 149(5): 1073-1086.
- [10] DEGENHARDT Y Y, SILVERSTEIN S. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the E6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation[J]. *J Virol*, 2001, 75(23): 11791-11802.
- [11] HIROTA T, MORISAKI T, NISHIYAMA Y, et al. Zyxin, a regulator of actin filament assembly targets the mitotic apparatus by interacting with LATS 1 tumor suppressor[J]. *Cell Biol*, 2006, 149(5):1073-1086.
- [12] HONG Y H, KIM E S, LILLEHOJ H S, et al. Association of resistance to avian coccidiosis with single nucleotide polymorphisms in the zyxin gene[J]. *Poult Sci*, 2009, 88(3): 511-518.
- [13] KIM E S, HONG Y H, MIN W, et al. Fine-mapping of coccidia-resistant quantitative trait loci in chickens[J]. *Poult Sci*, 2006, 85(11): 2028-2030.
- [14] FUJITA Y, YAMAGUCHI A, HATA K, et al. Zyxin is a novel interacting partner for SIRT1[J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 10: 6-20.
- [15] CALL G S, CHUNG J Y, DAVIS J A, et al. Zyxin phosphorylation at serine 142 modulates the zyxin head-tail interaction to alter cell-cell adhesion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(3): 780-784.
- [16] 杜 斌,汉丽梅,张雷雷,等. RNA 干扰在动物病毒病治疗上的应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(4):72-77.