

神经氨酸酶基因联合抗黏液病毒基因的 抗病毒作用

傅德智¹, 张亚妮¹, 陈昊², 李伟¹, 郑蒙蒙¹, 王丹¹, 张振韬¹, 施青青¹, 李碧春^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 苏州大学第一附属医院, 苏州 215006)

摘要: 拟构建神经氨酸酶(NA)基因和抗黏液病毒(Mx)基因双基因真核共表达载体, 并检测基因表达以及转染鸡成纤维(CEF)细胞后的抗病毒效果。克隆了 NA 基因和突变型 Mx 基因的 cDNA; 分别定向插入真核细胞双顺反子载体 pVITRO₂ 中, 酶切和测序鉴定双基因共表达载体 pVITRO₂-Mx-NA 的正确性。用 pVITRO₂-Mx-NA 转染 NIH-3T3 细胞, 通过 RT-PCR 和间接免疫荧光(IFA)方法检测目的基因的表达。随后用 pVITRO₂-Mx-NA 转染 CEF 细胞, 利用 RT-PCR 及微量细胞病变抑制法测定重组蛋白抗新城疫病毒(NDV)的效果。结果: 酶切和测序分析表明成功构建了双基因真核共表达载体 pVITRO₂-Mx-NA, 在转染后的 NIH-3T3 和 CEF 细胞中同时检测到了 NA 和 Mx 基因的表达。联合基因表达的重组蛋白可保护 CEF 细胞在孵育的 72 h 内免受 NDV 的感染, 而转染了突变型 Mx 或者 NA 单基因真核表达载体的 CEF 细胞在孵育的 48 h 内亦未受到 NDV 的侵染; 与单基因转染组相比, 联合基因转染组明显延迟 NDV 感染 CEF 细胞的时间, 差异显著 ($P < 0.05$)。构建的双基因真核表达载体 pVITRO₂-Mx-NA 转染 CEF 细胞后, 其表达的重组蛋白 Mx-NA 在细胞水平上具有协同延缓 NDV 感染的能力, 且优于单个基因。

关键词: NA; Mx; 双基因表达载体; 抗病毒活性; 抗 NDV

中图分类号: Q784

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)01-0078-09

Antiviral Activities of Neuraminidase Gene Combining with Chicken Mx against Newcastle Disease Virus

FU De-zhi¹, ZHANG Ya-ni¹, CHEN Hao², LI Wei¹, ZHENG Meng-meng¹,
WANG Dan¹, ZHANG Zhen-tao¹, SHI Qing-qing¹, LI Bi-chun^{1*}

(1. *Institute of Animal Breeding and Genetics, Provincial Key Laboratory of Molecular Design, College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;* 2. *The First affiliated hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China*)

Abstract: This experiment was conducted to build the neuraminidase (NA) gene and anti-mucus virus (Mx) dual eukaryotic gene co-expression plasmid, and detect the gene expression in transfected mouse fibroblasts (NIH-3T3) cells, and to investigate the influence of the recombinant plasmid on the chicken fibroblasts (CEF) cells. The cDNA fragment of NA and mutant Mx gene were derived from pcDNA3.0-NA, pcDNA3.0-Mx plasmid by PCR, respectively. NA cDNA fragment and Mx cDNA fragment were inserted into the multiple cloning sites of pVITRO₂ to construct the eukaryotic co-expression plasmid pVITRO₂-Mx-NA. The recombinant plasmid was confirmed by restriction endonuclease treatment and sequenced, then the mouse fibroblasts (NIH-3T3) cells were transfected. The expression of genes in pVITRO₂-Mx-NA were identified

收稿日期: 2012-07-08

基金项目: 江苏省高校自然科学重大基础研究项目资助(08KJA230001); 高等学校博士学科点专项; “六大人才高峰”资助项目

作者简介: 傅德智(1987-), 男, 山西灵石人, 硕士生, 主要从事动物胚胎工程与遗传工程的研究, E-mail: wlhuanxinang@gmail.com

* 通信作者: 李碧春, E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

by RT-PCR and indirect immunofluorescence assay (IFA). Then the recombinant plasmid was transfected into CEF cells, RT-PCR and the micro-cell inhibition test were used to test the antiviral activity for NDV (Newcastle disease virus). The restriction endonuclease digestion and sequencing results suggested that co-expression vector pVITRO2-Mx-NA was constructed successfully, the expression of Mx and NA could be detected in both NIH-3T3 and CEF cells. Recombinant proteins of Mx and NA protected CEF cells from NDV infection during 0-72 hours of incubation, the mutagenesis Mx or NA protein protected CEF cells from NDV infection during 0-48 hours of incubation; Compared with single-gene transfection group, co-transfection group significantly delayed the NDV infection time of CEF cells, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The recombinant eukaryotic expression vector pVITRO2-Mx-NA was constructed and expressed in CEF cell successfully, which would contribute to delaying the infection of NDV in cell level, it revealed the co-transfection of the combined genes is more powerful than single one, they had synergistic effects.

Key words: NA; Mx; dual eukaryotic gene co-expression vector; anti-viral activity; anti-NDV

神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)是流感病毒表面的一种物质,具有酶切活性,能够使病毒本身从细胞表面脱落下来^[1]。NA既能够降解流感病毒识别的宿主细胞上的受体——唾液酸残基^[2],同时也具有免疫原性,其诱导机体产生的特异性抗体可以对同种病毒的攻击提供完全保护^[3-7],并对同亚型不同病毒株的攻击提供交叉保护,可在一定程度上减轻发病时的临床症状,并降低死亡率^[8]。由于NA基因具有抵御流感病毒的作用,因此NA一直是流感研究中的活跃领域^[9-11]。抗黏液病毒(Myxovirus resistance, Mx)基因是由干扰素诱导表达的抗病毒蛋白家族中的成员之一,经I型(α/β)和III型(λ)干扰素、双股RNA或病毒诱导可产生抗病毒Mx蛋白,而且是目前发现的唯一具有抗流感病毒作用的基因^[12-13]。将细胞因子与外源基因在重组禽痘病毒中共表达可有目的地加强机体的细胞免疫或者体液免疫应答,有效提高家禽的免疫能力。将白细胞介素6(IL-6)和干扰素(IFN)与流感病毒HA基因在重组禽痘病毒中共表达,用获得的重组病毒免疫小鼠后发现,不同的细胞因子能够诱导不同的免疫反应^[14]。与IL-6共表达的重组病毒能显著增强首免所致的全身性抗体反应和黏膜抗体反应,而表达IFN的重组病毒却大大抑制了抗体反应的发生,但对细胞免疫反应没有影响。2002年J. M. Sharma等^[15]用表达鸡新城疫病毒(NDV)血凝素、神经氨酸酶(HN)和融合蛋白(F)的重组鸡痘病毒进行鸡胚免疫,证实重组病毒能有效诱导试验鸡的体液免疫和细胞免疫,对NDV攻击的保护率达

到81%,对鸡胚的孵化率亦没有明显影响。许立华等^[16]将流感病毒血凝素基因(HA基因)及猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)核衣壳蛋白基因(N基因)联合表达,产物中的血凝素(HA)可与HA单抗特异性结合,在此基础上建立乳胶凝集试验,大大地提高了反应的特异性。M. J. Dus Santos等^[17]将口蹄疫病毒(FMDV)编码结构蛋白的P1基因和编码蛋白酶的3C基因作为免疫原基因导入紫花苜蓿,免疫小鼠产生了特异性抗体,并能抵抗强毒的攻击。M. Zheng等^[18]将FMDV O/NY00衣壳蛋白P1和蛋白酶3C基因共同插入到鸡痘病毒载体中,构建重组鸡痘病毒vUTAL3CP1,表达产物用来免疫小鼠和豚鼠,结果证明重组鸡痘病毒可以诱导小鼠产生明显的细胞免疫和体液免疫反应。此外,毒力试验结果表明,经Vutal3CP1免疫的豚鼠可获得完全保护。陈红英等^[19]探索鸡新城疫病毒(NDV)F蛋白的免疫原性及鸡白细胞介素-18(IL-18)的免疫增强作用,结果表明,质粒pcDNA-F与pIL-18联合免疫显著提高鸡体的细胞免疫水平,为NDV的防制开辟了新途径。

本研究拟将NA与Mx基因克隆入真核共表达载体pVITRO₂,尝试研究NA与Mx双基因联合的抗病毒能力,为家禽抗病育种提供具有实践意义的参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒、细胞株与病毒 *E. coli*

DH_{5α}菌株、含有鸡 *Mx* 基因序列质粒突变型 pcDNA3.0-Mx(*Mx* 蛋白第 631 位氨基酸突变为天冬酰胺)、含有鸡源 H5N1 型禽流感病毒 *NA* 基因的质粒 pcDNA3.0-NA 由本实验室保存;pVITRO₂ 质粒载体为扬州大学兽医学院孙怀昌教授惠赠;NDV 强毒株 F₄₈E₈ 为扬州大学兽医学院朱国强教授惠赠;NIH-3T3 细胞株为苏州大学兽医学院吴康副教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 LA *Taq* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、*EcoR* I、*Xho* I、*EcoR* V、*Cla* I 限制性内切酶、T4 DNA *Ligase*、胶回收试剂盒、pMDTM 19-T Vector 试剂盒、DNA Marker、PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司(大连);H5N1 全价鸡血清由扬州大学兽医学院刘文博老师惠赠(效价为 1:500);FITC 标记的羊抗鸡 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;鸡 *Mx* 蛋白多克隆抗体由本实验室制备(效价为 1:100);FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为上海吉泰生物科技有限公司产品;DMEM(Gibco);FCS(杭州四季青);胰蛋白酶(1:250, Sigma);L-谷氨酰胺(Sigma);丙酮酸钠(Sigma);非必需氨基酸(Gibco);β-巯基乙醇(BBI);电穿孔试剂盒(Eppendorf);电转染低渗液(Eppendorf);潮霉素 B(Hygromycin B)购自上海生工生物工程有限公司;其余试剂均为上海生工生物工程有限公司的分析纯级试剂。

1.2 pVITRO₂-Mx-NA 双基因真核共表达载体的构建及表达

1.2.1 pVITRO₂-NA 真核表达载体的构建 根据 *NA* 序列设计引物,上游引物:5'-CCGCCG-GAATTCATGAATCCAAATCAAAG-3',下游引物:5'-CCGCCGCTCGAGCTACTTGTC AATG-GTGAATG-3',上、下游引物分别含 *EcoR*I 和 *Xho*I 酶切位点。以 pcDNA3.0-NA 为模板扩增全长 *NA* 基因,PCR 纯化产物和 pVITRO₂ 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切纯化后,将 *NA* 定向插入 pVITRO₂ 的多克隆位点 2,转化 *E. coli* DH5_α,以 Hygromycin B 筛选阳性克隆,经酶切鉴定的克隆由上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.2 pVITRO₂-Mx 真核表达载体的构建 根据 *Mx* 序列设计引物,上游引物:5'-GCCGATATC ATGAACAATCCACGGTCCAAC-3',下游引物:5'-CCGGATCGATCTACAGAGACTTA-AAGTC-3',上游引物包含 *EcoR* V 酶切位点,下游

引物包含 *Cla* I 酶切位点。以 pcDNA3.0-Mx 为模板扩增全长 *Mx* 基因,PCR 纯化产物和 pVITRO₂ 经 *EcoR* V 和 *Cla* I 酶切纯化后,将 *Mx* 定向插入 pVITRO₂ 多克隆位点 1,转化 *E. coli* DH5_α,以 Hygromycin B 筛选阳性克隆,经酶切鉴定的克隆由上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.3 pVITRO₂-Mx-NA 双基因真核表达载体的构建 将 pVITRO₂-NA 和 pVITRO₂-Mx 分别用 *EcoR* I 与 *Xho* I、*EcoR* V 与 *Cla* I 双酶切,纯化线性 pVITRO₂-NA 载体片段与 *Mx* 基因片段,将 *Mx* 定向插入 pVITRO₂-NA 的多克隆位点 1,转化 *E. coli* DH5_α,以 Hygromycin B 筛选阳性克隆。挑取菌落用 *EcoR* V 和 *Cla* I 单双酶切鉴定,并提取质粒测序。

1.2.4 细胞转染及抗性细胞的筛选 细胞转染分为试验组和对照组,采用电穿孔转染法。实验组转染 pVITRO₂-Mx-NA;对照组转染空质粒 pVITRO₂,未转染的 NIH-3T3 细胞作为阴性对照。取生长良好的 NIH-3T3 细胞,吸取 375 μL 细胞悬液(浓度为 1×10⁶·mL⁻¹),小心注入 2 mm 电极杯中。将 25 μL 质粒(浓度为 60 μg·mL⁻¹)加入电极杯中,混合均匀。将电极杯装入电极槽内,静置 1 min,270 V 作用 80 μs。操作完毕后,将电极杯在室温或 4 °C 中静置 10 min,小心将细胞转移至 6 孔板中进行培养,48 h 后收集细胞进行筛选,将转染后的细胞换为选择性培养基继续培养每 3~4 d 换液 1 次,用 500 μg·mL⁻¹ 浓度的 Hygromycin B 对转染质粒后的 NIH-3T3 细胞进行筛选,14 d 后出现阳性克隆。所获得的阳性细胞继续培养扩增。

1.2.5 RT-PCR 检测 *Mx*-NA 在 mRNA 水平的表达 提取转染后有 HB 抗性 NIH-3T3 细胞总 RNA,进行 RT-PCR 以检测 *Mx* 和 *NA* mRNA 的表达,同时设阴性对照(ddH₂O)、阳性对照(pcDNA3.0-Mx 和 pcDNA3.0-NA)及内参(GAPDH)对照;产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 IFA 检测重组 *Mx*、*NA* 蛋白的表达 转染后 48 h,试验组与对照组进行 IFA 检测^[20]。用 4% 的多聚甲醛固定细胞 45 min,PBS 洗涤 3 次×5 min,用 10% FBS 的 PBS 在 37 °C 封闭 1 h 后,分别加入一抗(鸡 *Mx* 蛋白多克隆抗体或 H5N1 全价鸡血清多克隆抗体),37 °C 孵育 1 h,4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次×5 min,加入二抗(FITC 标记的羊抗

鼠 IgG(稀释倍数 1:100)或 FITC 标记的羊抗鸡 IgG(稀释倍数 1:100),37 ℃ 避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次×5 min,以 50%缓冲甘油封固,于荧光倒置显微镜下观察。

1.3 转染细胞抗病毒活性检测

1.3.1 细胞转染 细胞转染分为试验组和对照组,试验组 CEF 细胞分别转染 pVITRO₂-Mx-NA、pVITRO₂-Mx、pVITRO₂-NA;转染空质粒 pVITRO₂ 的 CEF 细胞作为阴性对照。转染方法见 1.2.4。

1.3.2 RT-PCR 检测 Mx、NA 基因在 mRNA 水平的表达 提取转染后各组 CEF 细胞的总 RNA,进行 RT-PCR 以检测 Mx 和 NA mRNA 的表达,同时设阴性对照(ddH₂O)、阳性对照(pcDNA3.0-Mx 和 pcDNA3.0-NA)及内参(GAPDH)对照;产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 NDV 接种细胞及其 TCID₅₀测定 NDV 接种 CEF 细胞,病毒的 TCID₅₀测定方法见参考文献[21],采用 Reed-Muench 法计算 NDV 的 TCID₅₀[21]。

1.3.4 抗 NDV 活性检测 采用微量细胞病变抑制法(Cytopathic effect inhibition, CPE)[22] CEF—NDV 系统测定鸡重组 Mx 蛋白抗病活性。本试验分为抗体组和转染组。抗体组分为 3 组,将 CEF 细胞接种于 6 孔板中,待细胞铺满单层后,在培养液中分别添加 Mx 抗体和 NA 抗体、Mx 抗体、NA 抗体,并将这 3 个试验组分别定义为 Mx-NA 抗体组、Mx 抗体组和 NA 抗体组,接种 100 TCID₅₀ NDV;转染试验组分转染 pVITRO₂-Mx-NA、pVITRO₂-Mx、pVITRO₂-NA、空质粒 pVITRO₂ 的 CEF 细胞,并将这 4 个试验组分别定义为 pVITRO₂-Mx-NA 组、pVITRO₂-Mx 组、pVITRO₂-NA 组和空载体对照组;先将细胞接种于 6 孔板,待细胞长至 80%左右汇合时进行转染,转染后 48 h,弃去培养液,用 PBS 清洗,接种 100 TCID₅₀ NDV,37 ℃ 感染 1 h 后,去除病毒液,加 2% FCS 的 DMEM 维持液培养,同时设立正常 CEF 细胞感染 NDV 为阳性对照;未接种 NDV 的正常 CEF 细胞为阴性对照。每隔 24 h 观察细胞病变程度,以抑制 50%细胞病变(CPE)为标准。24、48、72、96 和 120 h 后分别收集各组的细胞悬液(即病毒液),并且分别测定各组病毒的血凝价效价[23],具体测定方法见参考文献[24];采用 SPSS 16.0 对所得数据进行单因

素方差分析。

2 结果

2.1 pVITRO₂-Mx-NA 双基因真核共表达载体的构建及表达

2.1.1 pVITRO₂-NA 真核表达载体的构建 以 pcDNA3.0-NA 为模板,扩增 NA 基因,片段大小约为 1 400 bp,与预计大小相符。用 EcoR I 和 Xho I 对 pVITRO₂-NA 进行双酶切,获得 6 308 和 1 410 bp 2 条带,与预期结果一致,经测序确认正确构建了真核表达载体 pVITRO₂-NA。

2.1.2 pVITRO₂-Mx 真核表达载体的构建 以 pcDNA3.0-Mx 为模板,扩增 Mx 基因,片段大小为 2 118 bp,与预计大小相符。用 EcoR V 和 Cla I 对 VITRO₂-Mx 进行双酶切,获得 6 218 和 2 118 bp 2 条带,与预期结果一致,经测序确认正确构建了真核表达载体 pVITRO₂-Mx。

2.1.3 pVITRO₂-Mx-NA 双基因真核表达载体的构建 对 pVITRO₂-Mx-NA 分别进行 EcoR V 单酶切、EcoRV 和 Cla I 双酶切,分别获得 9 800、7 695 和 2 118 bp 3 条带,与预计结果一致,经测序确认正确构建了真核表达载体 pVITRO₂-Mx-NA。

2.1.4 RT-PCR 检测转染重组载体细胞 Mx、NA 基因 mRNA 的表达 提取转染后有 HB 抗性的 NIH-3T3 细胞总 RNA,经 RT-PCR 扩增后,经 0.8%琼脂糖凝胶电泳后显示:试验组出现大小约为 2.1 和 1.4 kb 的 2 条特异性条带,而对照组未出现条带(图 1 A),同时对持家基因 GAPDH 进行 PCR 检测(图 1B)。表明目的基因转染 NIH-3T3 细胞后均发生基因转录。

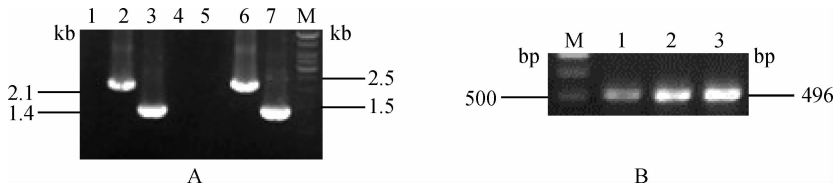
2.1.5 IFA 检测重组 Mx 和 NA 蛋白的表达 IFA 检测结果表明:试验组转染有 pVITRO₂-Mx-NA 的 NIH-3T3 细胞上可见明显荧光(图 2A、B),细胞轮廓清晰;而对照组转染有质粒 pVITRO₂ 的 NIH-3T3 细胞上没看到明显荧光(图 2C),进一步证明目的基因转染 NIH-3T3 后发生转录和翻译,重组质粒 pVITRO₂-Mx-NA 成功表达了重组 Mx 和 NA 蛋白。

2.2 转染细胞抗病毒活性检测

2.2.1 RT-PCR 检测转染重组质粒细胞 Mx、NA 基因 mRNA 的表达 RT-PCR 结果表明:pVITRO₂-Mx-NA 组中 Mx 和 NA mRNA 同时存在,pVITRO₂-Mx 组和 pVITRO₂-NA 组中分别有

Mx 和 *NA* mRNA 的表达, 而空载体对照组和阴性对照组未出现相应条带(图 3A); 同时对持家基因

GAPDH 进行 PCR 检测(图 3B)。表明目的基因转染 CEF 细胞后均发生基因转录。

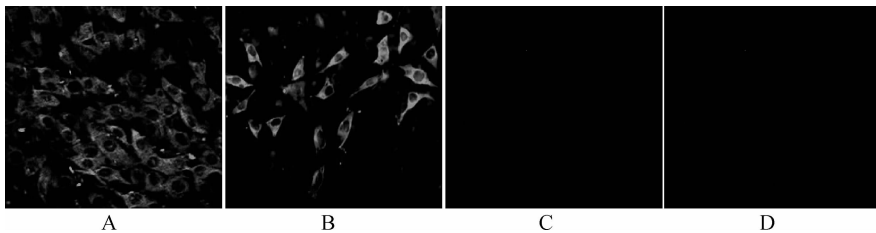


M. 1 kb DNA 相对分子质量标准。图 A 中, 1. 阴性对照; 2, 3. 阳性对照; 4. 转染 pVITRO₂ 质粒 NIH-3T3 细胞; 5. NIH3T3 细胞; 6, 7. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 载体的 NIH-3T3 细胞; B 图中, 1. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 载体的 NIH-3T3 细胞; 2. 转染 pVITRO₂ 质粒的 NIH-3T3 细胞; 3. NIH 3T3 细胞

M. 1 kb DNA marker; In Fig. A, 1. Negative control; 2 and 3. Positive control; 4. NIH3T3 cells transfected with pVITRO₂; 5. NIH 3T3 cells; 6, 7. NIH 3T3 cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA; In Fig. B, 1. NIH3T3 cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA; 2. NIH 3T3 cells transfected with pVITRO₂; 3. NIH3T3 cells

图 1 RT-PCR 检测 pVITRO₂-Mx-NA 转染 NIH3T3 细胞后 *Mx* 和 *NA* mRNA 的表达

Fig. 1 Identification the transcription of *Mx* and *NA* in pVITRO₂-Mx-NA by RT-PCR

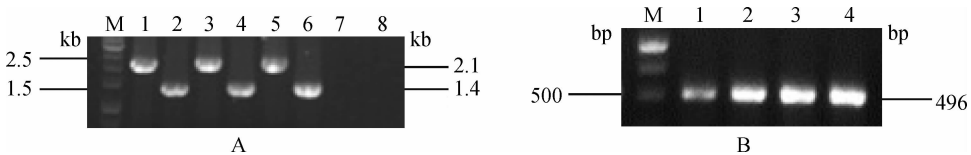


A. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 的 NIH-3T3 细胞(*Mx* 抗体); B. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 的 NIH-3T3 细胞(*NA* 抗体); C. 转染 pVITRO₂ 的 NIH-3T3 细胞; D. NIH-3T3 细胞

A. NIH 3T3 cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA(*Mx* antibody); B. NIH-3T3 cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA(*NA* antibody); C. NIH 3T3 cells transfected with pVITRO₂; D. NIH-3T3 cells

图 2 IFA 分析 *Mx* 和 *NA* 基因在转染的 NIH-3T3 细胞中的表达

Fig. 2 Expression analysis of *Mx* and *NA* gene in transfected NIH 3T3 cells by IFA



M. 1 kb DNA 相对分子质量标准。图 A 中, 1, 2. 阳性对照; 3, 4. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 的 CEF 细胞; 5. 转染 pVITRO₂-Mx 的 CEF 细胞; 6. 转染 pVITRO₂-NA 的 CEF 细胞; 7. 转染 pVITRO₂ 的 CEF 细胞; 8. 阴性对照。图 B 中, 1. 转染 pVITRO₂-Mx-NA 的 CEF 细胞; 2. 转染 pVITRO₂-Mx 的 CEF 细胞; 3. 转染 pVITRO₂-NA 的 CEF 细胞; 4. 转染 pVITRO₂ 的 CEF 细胞

M. 1 kb DNA marker; In Fig. A, 1, 2. Positive control; 3, 4. CEF cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA; 5. CEF cells transfected with pVITRO₂-Mx; 6. CEF cells transfected with pVITRO₂-NA; 7. CEF cells transfected with pVITRO₂; 8. Negative control; In Fig. B, 1. CEF cells transfected with pVITRO₂-Mx-NA; 2. CEF cells transfected with pVITRO₂-Mx; 3. CEF cells transfected with pVITRO₂-NA; 4. CEF cells transfected with pVITRO₂

图 3 RT-PCR 检测 pVITRO₂-Mx-NA 转染 CEF 后 *Mx* 和 *NA* mRNA 的表达

Fig. 3 Identification the transcription of *Mx* and *NA* in pVITRO₂-Mx-NA by RT-PCR

2.2.2 抗 NDV 试验结果 采用 CEF 细胞, 测定 NDV 的细胞半数感染量(TCID₅₀)为 $1 \times 10^{-5.53} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。接种 24、48、72、96 和 120 h 后 *Mx*-*NA* 抗体组、*Mx*

抗体组、*NA* 抗体组、pVITRO₂-*Mx*-*NA* 组、pVITRO₂-*Mx* 组、pVITRO₂-*NA* 组和空载体对照组的各组病毒的血凝效价和细胞形态变化见图 4~7。

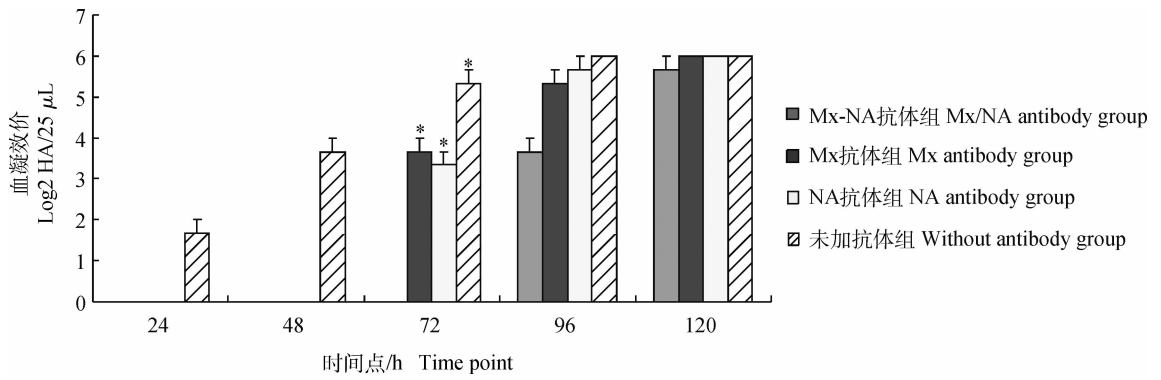


图 4 各抗体组在不同时间段的病毒血凝效价
Fig. 4 HA titer of antibody group infected NDV at different time points

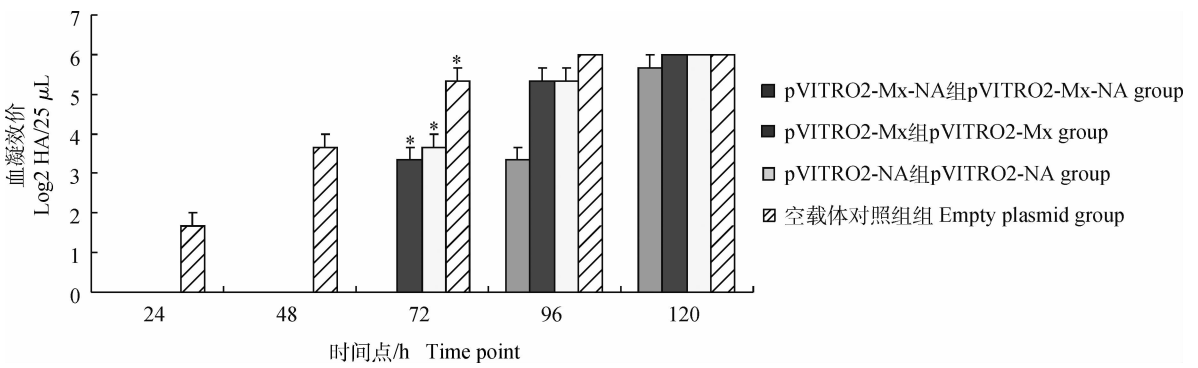


图 5 各转染组在不同时间段的病毒血凝效价
Fig. 5 HA titer of transfection group infected NDV at different time points

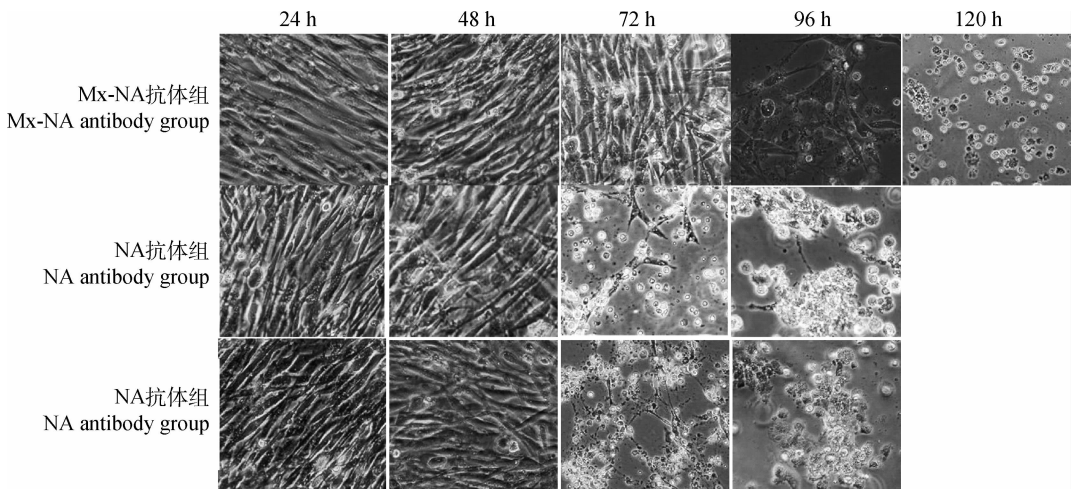


图 6 抗体组的 CEF 细胞接种 NDV 后不同时间段的细胞形态 200×
Fig. 6 The cell morphology of CEF cells inoculated NDV for each antibody group at different time points 200×

从图 4、图 6 可知,48 h 内 3 组的病毒效价均无显著性差异($P > 0.05$),直至 72 h Mx-NA 抗体组病毒的效价与 Mx 抗体组和 NA 抗体组的效价均有显著性差异($P < 0.05$);Mx-NA 抗体组的 CEF 细胞在

72 h 内无病变发生,细胞贴壁生长,形态仍然呈纤维状,但在 72 h 以后细胞有病变出现,在 120 h 后细胞全部发生病变;而 Mx 抗体组和 NA 抗体组的 CEF 细胞均在 48 h 内无病变发生,但在 72 h 以后

细胞有病变出现,在 96 h 后细胞全部发生病变。从图 5 和图 7 可知,48 h 内 pVITRO₂-Mx-NA 组、pVITRO₂-Mx 组和 pVITRO₂-NA 组病毒的效价与空载体对照均无显著性差异($P < 0.05$);72 h 时 pVITRO₂-Mx-NA 组的病毒效价与 pVITRO₂-Mx 组和 pVITRO₂-NA 组均有显著性差异($P < 0.05$);pVITRO₂-Mx-NA 组的 CEF 细胞在 72 h 内无病变发生,细胞贴壁生长,形态仍然呈纤维状,但在 72 h 以后细胞有病变出现,120 h 后细胞全部发生病变;

pVITRO₂-Mx 组和 pVITRO₂-NA 组的 CEF 细胞均在 48 h 内无病变发生,但也在 72 h 以后有病变出现,96 h 后细胞全部发生病变,而空载体对照组以及阳性对照组在攻毒 12 h 后产生病变,细胞开始出现变圆、脱落等现象,在 48 h 内全部死亡。抗体组和转染组得到了相同的结果。综上可知,在 72 h 时,双基因抗体组与单基因抗体组以及双基因共转染组与其单基因转染组 NDV 的毒力间有显著性差异($P < 0.05$)。

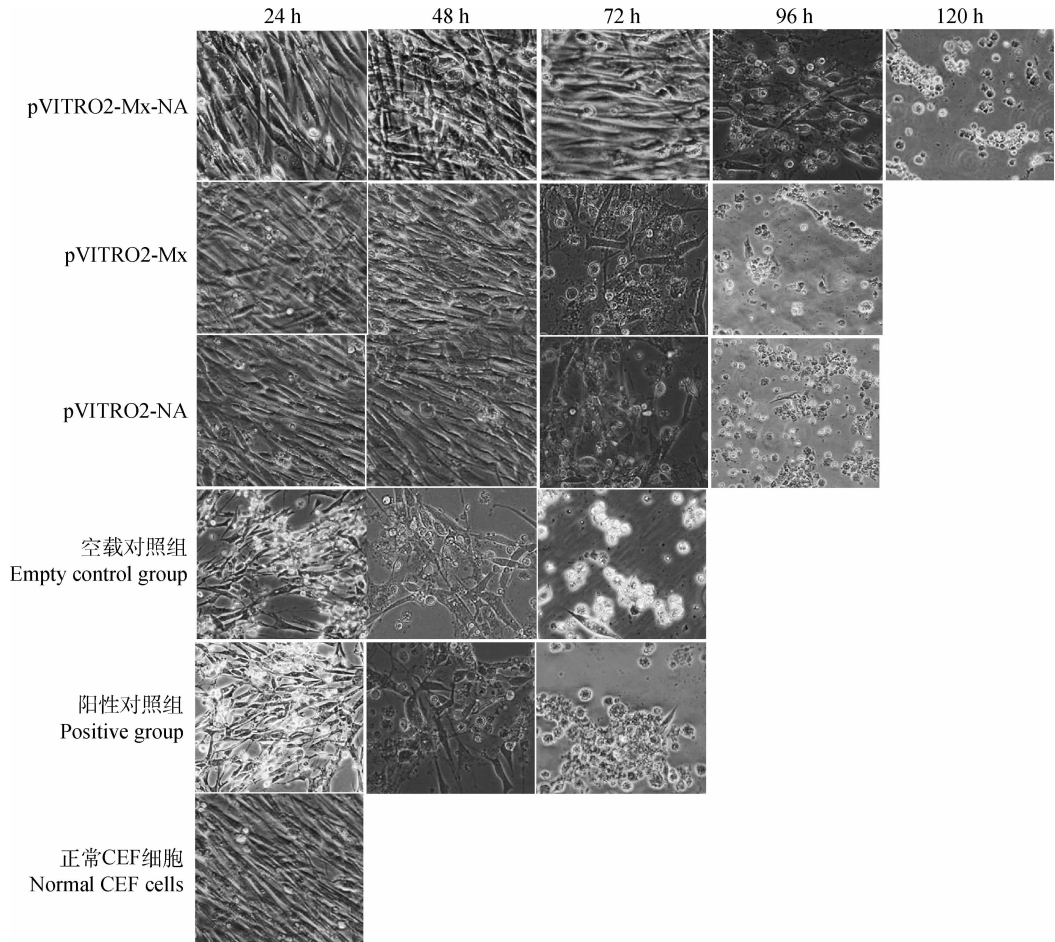


图 7 转染组的 CEF 细胞接种 NDV 后不同时间段的细胞形态 200×

Fig. 7 The cell morphology of CEF cells inoculated NDV for each transfection group at different time points 200×

3 讨论

NA 和 Mx 蛋白基因都有一定的抗病毒作用,但它们的抗病毒机理有所不同。研究表明,NA 蛋白是禽流感病毒的 2 个主要表面抗原之一,作为体液免疫的靶抗原,可诱导机体产生特异性抗体,抑制病毒从感染细胞释放,从而减少病毒增殖^[25-26]。已有报道表明,随着体内抗流感病毒 NA 抗体的水平

增加,流感病毒引起的呼吸道疾病发生率下降。B. E. Johansson 等研究表明 NA 抗体能够抑制病毒从细胞表面释放再感染其它细胞,从而减少了病毒的繁殖,使病毒感染小鼠后在体内的增殖数量低于使小鼠发病的阈值^[14]。赵小东等构建了表达流感病毒 NA 基因的重组腺病毒并初步研究其免疫效果,发现重组腺病毒可诱导机体产生良好的免疫效果^[3]。本研究中,微量细胞病变抑制法结果显示

NA 基因转染组对 CEF 细胞有一定的抗 NDV 活性作用,能使 CEF 细胞在 48 h 内不受病毒的感染,说明 CEF 细胞在转染 NA 基因后成功的表达了 NA 蛋白。当病毒侵染细胞时,NA 蛋白抑制病毒的释放进而减少病毒的繁殖,起到了抗病毒的作用。

Mx 蛋白的抗病毒机理目前还没有完全清楚,功能性的三联 GTP 结合区域是 Mx 蛋白发挥其抗病毒作用所必须的结构,其 GTP 酶活性对于其抗病毒功能的发挥是必不可少的^[27]。Mx 蛋白能够在结合区域结合水解 GTP 发挥抗病毒活性^[28]。Mx 蛋白对多种负链 RNA 病毒有抑制作用。不同的 Mx 蛋白有不同的抗病毒特异性,在抗病毒机理上也稍有不同。如对鼠而言,位于核内的 Mx1 蛋白可以抑制流感病毒的复制^[29]。对人 Mx 蛋白而言,MxA 对流感病毒的抗病毒效应及其机理是通过在胞质内阻止病毒核衣壳进入核内,从而阻止病毒在核内的复制^[30]。而 MxA 蛋白抗水泡性口炎病毒的机理主要是通过抑制病毒转录的起始阶段,抑制水泡性口炎病毒的 RNA 引物及 mRNA 合成来发挥抗水泡性口炎病毒作用。目前鸡的 Mx 蛋白的抗病毒活性受 631 位氨基酸的影响,当 631 位氨基酸为天冬酰胺时有抗病毒活性,为丝氨酸时则无抗病毒活性^[31]。同样,本研究的微量细胞病变抑制法结果表明 Mx 基因转染组也表现出了抗病毒作用,Mx 蛋白能使 CEF 细胞在 48 h 内不受病毒的感染,说明 Mx 基因载体转染 CEF 细胞后,在细胞内表达了 Mx 蛋白,当病毒感染细胞并开始进行复制增殖时,Mx 蛋白通过抑制 NDV 病毒的复制,成功地发挥了其抗性。

综上所述,Mx 和 NA 蛋白都有抵抗病毒的能力,如能将二者结合使用,优势互补,则不失为一条可取的抗病毒途径。从本试验双基因转染组的抗病性结果可以看出,Mx 基因联合 NA 基因共转染组明显延长了 CEF 细胞的抵抗病毒感染的时间,可使细胞在 72 h 内无病变发生,其联合作用明显优于单基因转染组。以上结果提示,当病毒进入细胞之后,Mx 蛋白初步抑制病毒的复制,减少病毒的增殖,同时 NA 蛋白通过抑制病毒从细胞表面释放而抑制其再感染其它细胞,从而减少了病毒的繁殖,进而增强了细胞的抗病毒能力,表明 Mx 基因和 NA 基因之间存在协同的抗病毒作用,但两者协同作用的具体抗病毒机理目前还没有相关的报道,有关多基因转染在细胞方面协同抗病毒作用的工作有待进一步研究。

4 结 论

Mx 基因和 NA 基因联合能协同加强细胞延缓 NDV 感染的的能力。双基因真核共表达载体表达的蛋白在细胞水平上延缓 NDV 感染的的能力具有良好的应用前景,为今后将该双基因载体用于禽流感病毒的多基因联合抗病和培育抗禽流感转基因鸡开辟新途径。

参考文献:

- [1] PALESE P, TOBITA K, UEDA M, et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase[J]. *Virology*, 1974, 61(2): 397-410.
- [2] MCCLLERS J A, BARTNESS K C. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187(6): 1000-1009.
- [3] 赵小东,韩 峰,王 艳,等. 表达流感病毒神经氨酸酶基因的重组腺病毒的构建[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(3):213-216.
- [4] 周 旭,李益民,侯 玲,等. 流感病毒血凝素基因、神经氨酸酶基因在小鼠中的免疫效果观察[J]. *微生物学免疫学进展*, 2001, 29(1):15-19.
- [5] 陈 则. A 型流感病毒血凝素、神经氨酸酶 DNA 疫苗研究[J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(5):1-4.
- [6] 乔传玲,姜永萍,李呈军,等. 禽流感重组禽痘病毒 rFPV. HA-NA 活载体疫苗的研究[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(1): 46-49.
- [7] 丁文正. 用神经氨酸酶的甲型流感病毒变异株对雪貂鼻内免疫的保护效果[J]. *国际生物制品学杂志*, 2006, 29(3): 140.
- [8] 李向忠,方 芳,陈 则. 流感病毒神经氨酸酶不同区域的作用[J]. *生命科学研究*, 2005, 9(2): 55-61.
- [9] 傅生芳,独军政,常惠芸,等. 禽流感病毒的分子生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(5):22-24.
- [10] LEHMANN F, TIRALONGO E, TIRALONGO J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 1331-1354.
- [11] 王全英,乔传玲,申之义. 禽流感病毒神经氨酸酶的结构及其生物学功能[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(12): 40-43.
- [12] HALLER O, FRESE M, ROST D, et al. Tick-borne thogoto virus infection in mice is inhibited by the orthomyxovirus resistance gene product Mx1 [J]. *J*

- Virol*, 1995, 69(4): 2596-2601.
- [13] STAEHELI P, HALLER O, BOLLB 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(1): 147-158.
- [14] JOHANSSON B E, MATTHEWS J T, KILBOURNE E D. Supplementation of conventional influenza A vaccine with purified viral neuraminidase results in a balanced and broadened immune response [J]. *Vaccine*, 1998, 16(9-10): 1009-1015.
- [15] SHARMA J M, ZHANG Y, JENSEN D, et al. Field trial in commercial broilers with a multivalent in ovo vaccine comprising a mixture of live viral vaccines against Marek's disease, infectious bursal disease, Newcastle disease, and fowl pox [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(3): 613-622.
- [16] 许立华, 苏小运, 王玲, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 基因和流感病毒 HA 基因的联合表达及应用 [J]. *中国病毒学*, 2003, 18(6): 548-552.
- [17] DUS SANOTOS M J, CANILLO C, ARDILA F, et al. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen [J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1838-1843.
- [18] ZHENG M, JIN N Y, ZHANG H Y, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant fowl-pox virus containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus [J]. *J Virol Methods*, 2006, 136: 230-237.
- [19] 陈红英, 崔沛, 李新生, 等. NDV F 基因真核表达质粒的构建及其与鸡 IL-18 基因联合免疫的初步研究 [J]. *云南农业大学学报*, 2010, 25(4): 511-516.
- [20] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] 齐立, 吴昆昱, 李梓, 等. 在 MDCK 细胞上高产的乙型流行性感病毒株的筛选及其全基因组克隆 [J]. *病毒学报*, 2004, 20(3): 195-199.
- [22] 陈蕾, 江国托, 常维山. 鸡 MxA 基因的克隆、表达及生物学活性检测 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22: 1018-1021.
- [23] 杨吉成, 盛伟华, 李丽娥, 等. 抗病毒蛋白 MxA 的诱导和检测方法的实验研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(1): 77-79.
- [24] 刘彦威, 刘娜, 刘利强, 等. 米糠凝集素的提取及其对新城疫病毒血凝效价的影响 [J]. *中国家禽*, 2004, 18(1): 25-28.
- [25] 王利, 禽流感病毒的免疫原性及其疫苗的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2006, 34(2): 54-57.
- [26] SMEE D F, HUFFMAN J H, MORRISON A C, et al. Cyclopentane neuraminidase inhibitors with potent in vitro anti-influenza virus activities [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 743-748.
- [27] PITOSI F, BLANK A, SCHRODER A, et al. A Functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx protein [J]. *J Virol*, 1993, 67(11): 6726-6732.
- [28] CHESTERS P M, STEELE M, PUREWAL A, et al. Nucleotide sequence of equine MxA cDNA [J]. *DNA Seq*, 1997, 7(3-4): 239-242.
- [29] LINDENMANN J, LANE C A, HOBSON D. The resistance of A2G mice to orthomyxoviruses [J]. *J Immunol*, 1963, 90: 942-951.
- [30] WEBER F, HALLER O, KOCHS G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes [J]. *J Virol*, 2000, 74(1): 560-563.
- [31] KO J H, JIN H K, ASANO A, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene [J]. *J Genome Res*, 2002, 12(4): 595-601.

(编辑 白永平)