

曹影丽, 刘 琪, 柴震震, 等. 鸡 *cGAS* 基因的克隆、表达特性分析及 FAdV-4 感染前后亚细胞定位变化[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 453-460.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.018

鸡 *cGAS* 基因的克隆、表达特性分析及 FAdV-4 感染前后亚细胞定位变化

曹影丽, 刘 琪, 柴震震, 杨侃侃, 梁月巧, 宋祥军, 邵 颖, 涂 健, 祁克宗
(兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室/安徽省动物性食品质量与生物安全工程实验室, 安徽 合肥 230036)

摘要: *cGAS* 作为一种新型的胞质 DNA 受体, 在宿主抵抗 DNA 病毒而触发的天然免疫中起着至关重要的作用。血清 4 型禽腺病毒(Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 是无囊膜的一种双链 DNA 病毒, 可引起鸡肝炎-心包积液综合征。为明确鸡 *cGAS* (*chcGAS*) 基因功能, 探究在鸡肝癌(LMH) 细胞中过表达 *chcGAS* 以及 FAdV-4 感染前后细胞定位的变化情况。本研究针对 *chcGAS* 序列设计引物进行 PCR 扩增, 并分析该基因序列与其他物种之间的同源性以及预测该基因的结构域, 构建重组质粒 pET-32a-*chcGAS* 进行原核表达, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, 利用激光共聚焦观察 FAdV-4 感染 LMH 细胞前后 *chcGAS* 细胞定位变化。结果表明, 本试验克隆得到大小为 1 317 bp 的 *chcGAS* 基因, 与其他物种同源性为 50.5% ~ 84.4%, SDS-PAGE 分析结果显示, *chcGAS* 蛋白主要以可溶性蛋白质的形式在上清液处表达, 目的蛋白质相对分子质量为 75 000, 与预期大小相符。亚细胞定位结果显示, FAdV-4 感染可导致定位于细胞核膜上的 *chcGAS* 蛋白转移到细胞质中。本研究结果为进一步研究 FAdV-4 与 *cGAS*-*STING* 信号通路的关联调控机制提供了科学依据。

关键词: *cGAS*; 血清 4 型禽腺病毒(FAdV-4); 序列分析; 原核表达; 亚细胞定位

中图分类号: S831 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023) 02-0453-08

Cloning and expression characteristics of chicken *cGAS* gene and changes in subcellular localization before and after FAdV-4 infection

CAO Ying-li, LIU Qi, CHAI Zhen-zhen, YANG Kan-kan, LIANG Yue-qiao, SONG Xiang-jun, SHAO Ying, TU Jian, QI Ke-zong

(Anhui Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control/Anhui Province Animal Food Quality and Biosafety Engineering Laboratory, Hefei 230036, China)

Abstract: *cGAS* plays a key role in the host's innate immune response against DNA viruses as a receptor for DNA recognition within the cytoplasm. Fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) is a double-stranded DNA virus without an envelope, and can cause hepatitis-pericardial effusion syndrome in chicken. In order to clarify the function of chicken *cGAS* (*chcGAS*) gene, the overexpression of *chcGAS* in chicken liver cancer (LMH) cells and the changes of cell location before

and after FAdV-4 infection were investigated. In this study, the primers were designed according to the *chcGAS* sequence, and the *chcGAS* gene was amplified by PCR. The homology between the gene sequence and other species was analyzed, and the domain was predicted. The re-

收稿日期: 2022-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972642)

作者简介: 曹影丽(1997-), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事兽医病理学研究。(E-mail) 1107801265@ qq.com

通讯作者: 祁克宗, (E-mail) qkz@ ahau.edu.cn

combinant plasmid pET-32a-*chcGAS* was constructed for prokaryotic expression, identified by SDS-PAGE and Western blot, and the localization changes of *chcGAS* in LMH cells before and after FAdV-4 infection were observed by laser confocal microscopy. The results showed that the *chcGAS* gene with a size of 1 317 bp was successfully cloned, and the homology with other species was 50.5%–84.4%. The results of SDS-PAGE analysis indicated that *chcGAS* protein was mainly expressed in the supernatant in the form of soluble protein. The relative molecular mass of target protein was 75 000, which was consistent with the expected size. The results of subcellular localization showed that FAdV-4 infection could lead to transfer of *chcGAS* protein localized on the nuclear membrane into the cytoplasm. These results can provide a scientific basis for further studying the correlation regulatory mechanism between FAdV-4 and *cGAS-STING* signaling pathways.

Key words: *cGAS*; fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4); sequence analysis; prokaryotic expression; subcellular localization

当外界的病原微生物或其产物进入机体时,细胞内的模式识别受体 (PRRs) 活化,进而产生 I 型干扰素 (IFN) 和一些促炎细胞因子^[1-3]。在过去的几年里,模式识别受体研究领域将胞质 DNA 感受器作为重要研究方向^[4-6]。PRRs 是一类天然免疫分子,是天然免疫受体识别的重要组成部分^[7-8]。2013 年 Wu 等^[9]发现细胞中存在某种物质可以通过识别胞质内的 DNA 激活 IFN- β 信号通路,质谱检测分析后发现是一种新的物质,这种物质为环磷酸鸟苷-腺苷 (cGAMP),并且该物质可以通过与干扰素刺激基因 (*STING*) 结合从而激活 IFN 信号通路。也有研究表明,cGAS 可以作为一种广谱胞质 DNA 受体识别胞质内 DNA 并激活 IFN 信号通路^[10]。常规情况下,细胞质内存在的 DNA 较少,故以 cGAS 为主的胞质 DNA 感受器处于未活化的状态。但当细胞处于某些应激状态时,比如 DNA 病毒感染,其胞质内的 DNA 含量上升,随后可通过 *cGAS-STING* 通路发挥抗病毒作用。目前,普遍认为 cGAS 定位于细胞质中,而 Barnett 等^[11]指出,cGAS 并非传统意义上的胞质蛋白质,而是通过其 N 端磷酸肌醇结合域的作用从而出现膜定位的一种蛋白质,并提到在静息状态下,cGAS 定位在细胞膜,而识别 DNA 病毒感染后可出现由细胞膜到细胞质转位的现象。

目前,关于鸟类中 cGAS 的研究也有报道。杨洁^[12]的研究结果表明,cGAS 和 *STING* 信号轴对 DNA 病毒、RNA 病毒和反转录病毒均有抗病毒作用,证明其广泛的抗病毒功能和在鸡先天免疫中的关键作用。Oliveira 等^[13]的研究结果表明,在鸡巨噬细胞中,cGAS/*STING* 通路不但能产生 I 型干扰素以响应细胞内 DNA 刺激,而且对调节巨噬细胞效应器功能[包括组织相容性复合体 (MHC-

II) 和共刺激分子的表达]至关重要。在禽痘病毒 (一种禽 DNA 病毒) 感染的情况下,发现 *cGAS/STING* 途径与 I 型干扰素的产生及 MHC-II 转录有关。禽腺病毒 4 型属于腺病毒科禽腺病毒属,是无囊膜的双链 DNA 病毒。血清 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 是肝炎-心包积液综合征的主要病原体。作为一种 DNA 病毒,目前 Wang 等^[14]通过在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中瞬时转染鸡 *cGAS* 基因 (*chcGAS*) 来研究其亚细胞定位,结果表明,*chcGAS* 主要定位在细胞质中。通过过表达 *chcGAS* 基因和 RNA 干扰 *chcGAS* 基因,证明了 *chcGAS* 对外源性双链 DNA (dsDNA) 以及来自 DNA 损伤反应的自身 dsDNA 有反应,从而激活了 *STING/TBK1/IRF7* 介导的先天免疫。目前,对于 *chcGAS* 的研究着重在其作为胞质 DNA 感受器触发一系列通路方面的探索,但关于鸡 cGAS 在体外的蛋白质表达以及鸡 cGAS 在 DNA 病毒感染后细胞内定位、转位的研究较少。cGAS 对胞质内 DNA 的识别是非特异性的,几乎可以识别所有的双链 DNA^[15-16]。

本研究拟通过克隆 *chcGAS* 的完整开放阅读框序列,构建原核表达载体,获得 *chcGAS* 蛋白,此外,通过对比 *chcGAS* 被 FAdV-4 感染前后细胞定位的变化更进一步阐述 *chcGAS* 在触发天然免疫激活中的作用,以期为进一步研究 FAdV-4 与 *cGAS-STING* 信号通路的关联调控机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和毒株

鸡肝癌 (LMH) 细胞由中国农业科学院上海兽医研究所刘光清研究员赠送。FAdV-4 AH-F19 株^[17] (登录号: MN781666) 由本实验室分离并经过

鉴定后保存于-80 ℃冰箱。

1.2 菌株和质粒

感受态细胞 DH5 α 、Rosseta (DE3) 购于南京擎科生物科技有限公司。pET-32a、pCAGGS-HA、pmCherry-C1 质粒由本实验室保存于-20 ℃冰箱。

1.3 主要试剂

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、ECL 发光显色工作液、质粒小量提取试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 2 \times Hiff Canace[®] Gold PCR Master Mix 购自上海翌圣生物科技有限公司, 去内毒素质粒提取试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司, PAGE 蛋白凝胶快速配制试剂盒、5 \times 蛋白质上样缓冲液、雅酶三色预染 Marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司, *EcoR* I 限制性内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。同源重组连接酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 鼠抗 HA 单克隆抗体、鼠抗 His 单克隆抗体购自艾比玛特生物医药(上海)有限

公司, FITC 标记二抗羊抗鼠、山羊抗鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 序列分析与结构域预测

从 NCBI 中下载已发表的一些物种的 *cGAS* 序列, 通过 Megalign 软件进行同源性分析并利用 MEGA5.0 对各物种序列构建遗传进化树。用 SMART 在线网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 *chcGAS* 的结构域。

1.5 引物设计与基因扩增

根据 GenBank 中发表的 *chcGAS* 基因序列, 使用 Primer Premier 5 软件设计基因扩增的上下游引物, 引物合成序列见表 1。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 LMH 细胞中的总 RNA 并反转录为 cDNA, 以此为模板扩增 *chcGAS* 特异性引物。

1.6 重组质粒 *chcGAS* 载体的构建

根据 *chcGAS* 基因序列, 利用 CE DesignV1.04 软件依次设计 pET-32a-*chcGAS*、pCAGGS-HA-*chcGAS*、pmCherry-C1-*chcGAS* 同源臂引物, 引物合成序列见表 1。

表 1 本研究所用引物对序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物	序列(5'→3')
<i>chcGAS</i> -F	ATGGAGGAGACCGCGCGGGCAGAG
<i>chcGAS</i> -R	CTACACCTGGTGAAATACTGGGAAT
pET-32a- <i>chcGAS</i> -F	GCTGATATCGGATCCGAATTC ATGGAGGAGACCGCGGGC
pET-32a- <i>chcGAS</i> -R	TTGTTCGACGGAGCTCGAATTC TACACCTGGTGAAATACTGGGAA
pCAGGS-HA- <i>chcGAS</i> -F	GTTCCAGATTACGCTGAATTC ATGGAGGAGACCGCGGGC
pCAGGS-HA- <i>chcGAS</i> -R	ACCATCGATGAGCTCGAATTC TACACCTGGTGAAATACTGGGAA
pmCherry-C1- <i>chcGAS</i> -F	GGTACCGCGGGCCCGGGATCC ATGGAGGAGACCGCGGGC
pmCherry-C1- <i>chcGAS</i> -R	TTATCTAGATCCGGTGGATCC CTACACCTGGTGAAATACTGGGAA

加粗的字母为同源臂序列。

PCR 反应体系 (50 μ l): 2 \times Hiff Canace[®] Gold PCR Master Mix 25 μ l、ddH₂O 19 μ l、DNA 模板 2 μ l、上下游引物各 2 μ l。PCR 反应条件: 98 ℃ 预变性 3 min; 98 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 3 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 再延伸 5 min。利用 PCR 扩增含有酶切位点的 *chcGAS* 基因, PCR 产物分别切胶回收, 将其克隆到经 *EcoR* I 酶切的 pET-32a、pCAGGS-HA、pmCherry-C1 空载体中。重组质粒经 PCR 鉴定正确后移交到测序公司进行测序。重组质粒经鉴定后分别命名为 pET-32a-*chcGAS*、pCAGGS-HA-*chcGAS*、

pmCherry-C1-*chcGAS*。

1.7 pET-32a-*chcGAS* 诱导表达与可溶性分析

将 pET-32a-*chcGAS* 与 pET-32a 空载体质粒分别转化 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 涂布到氨苄抗性的固体培养板, 次日分别挑取单菌落至溶菌肉汤 (LB) 液体培养基中。用摇床 37 ℃、180 r/min 摇 4~5 h 后转接到大容积的 LB 液体培养基中, 再次用摇床 37 ℃、180 r/min 培养, 当 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时, 添加 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 15 ℃、120 r/min 诱导表达, 取诱导 20 h 后的菌体, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行洗菌, 随后

超声裂解至液体清亮,离心后分别吸取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,而后经考马斯亮蓝染色、脱色后进行观察和分析。通过分析确定重组蛋白质表达可溶性。

1.8 Western-blot 检测

将诱导后处理好的蛋白质样品,在 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,恒流 100 mA 转膜 1.0 h。将转膜后的 PVDF 膜放入配制好的 5%脱脂奶粉封闭液中,随后移入 4 ℃ 冰箱过夜封闭,用磷酸缓冲液(PBST)洗涤 2~3 次,按照 1:5 000(体积比)加入鼠抗 His 单克隆抗体作为一抗,常温下孵育 1.5 h,在用 PBST 洗涤 2~3 次,同样按照 1:5 000(体积比)加入山羊抗鼠 IgG-HRP 作为二抗,常温孵育 1.0 h,用 PBST 洗涤 2~3 次,随后用辣根过氧化物酶化学发光剂(HRP-ECL)底物发光显色工作液进行显色。

1.9 chcGAS 感染前后亚细胞定位

为了观察 chcGAS 在 FAdV-4 感染前后亚细胞定位变化,设置 2 组试验,分为感染组和对照组(未感染),分别将 2 组长满的 LMH 细胞接种于铺上细胞爬片的 12 孔板中,观察细胞,细胞密度达到 80% 左右将 pCAGGS-HA-chcGAS 重组质粒转染进细胞,对照组 24 h 后弃培养液,换成新鲜的维持培养液,感染组在质粒转染 24 h 后接种 FAdV-4 AH-F19 株,37 ℃ 培养 1 h,弃去培养液,用 PBS 清洗细胞 2 次,感染 8 h 后分别收取感染

组和对照组样品,通过间接免疫荧光步骤,分别使用 HA 标签鼠抗多克隆抗体作为一抗,FITC 绿色荧光抗体作为二抗,而后利用激光共聚焦观察分析 chcGAS 在 LMH 细胞中的定位情况。

为了进一步证实 chcGAS 的定位,同样将 pm-Cherry-C1-chcGAS 重组质粒转染到 LMH 细胞,以相同的方法对转染后的细胞进行收样,利用 pmCherry-C1 载体自带红色荧光在激光共聚焦显微镜下观察 chcGAS 定位情况,观察是否与 pCAGGS-HA-chcGAS 重组质粒定位情况一致。

2 结果与分析

2.1 序列分析与结构域预测

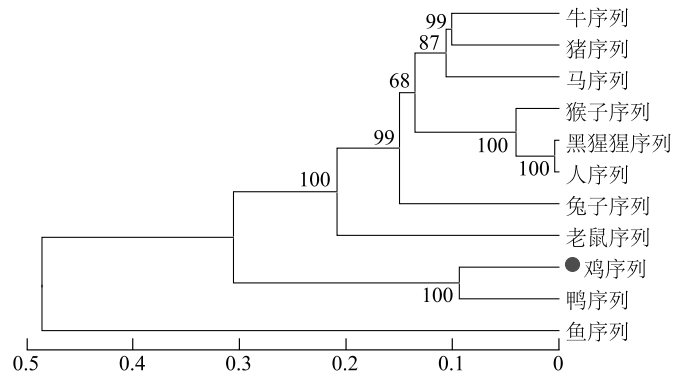
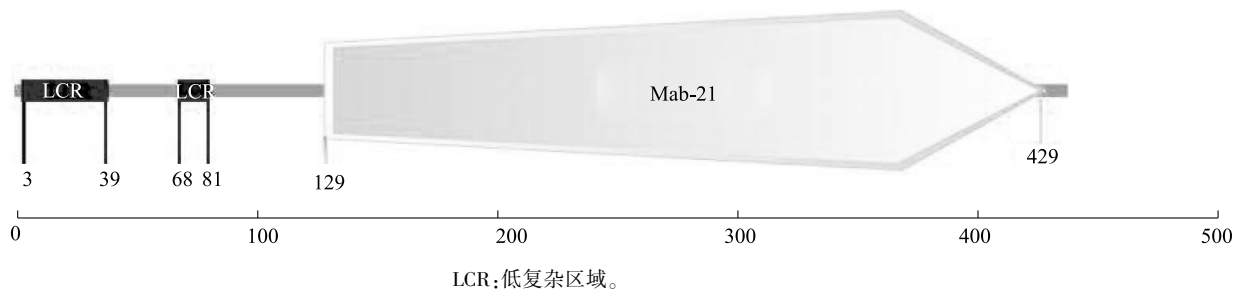
通过 Megalign 比对分析物种间 cGAS 核苷酸同源性,结果显示,chcGAS 与其他物种 cGAS 的同源性为 50.5%~84.4%(图 1)。将 chcGAS 与其他物种 cGAS 核苷酸序列比对并对系统发育树进行分析,结果显示,chcGAS 与鸭子 cGAS 位于同一分支上,亲缘关系较近;但与鱼类 cGAS 和哺乳类 cGAS 不在同一分支上,表明亲缘关系稍远(图 2)。利用 SMART 在线网站预测 chcGAS 的结构域,结果显示,编码区包括 2 个低复杂度区域(Low-Complexity region, LCR),分别为第 3 至第 39 氨基酸与第 68 至第 81 氨基酸,还包括 1 个高度保守的 Mab-21 结构域(第 129 至第 429 氨基酸)(图 3)。

同源性百分比 (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		58.9	59.7	84.4	50.5	61.7	60.7	60.9	55.6	60.5	61.6
2	60.0		76.0	59.2	47.8	79.4	75.8	75.4	64.9	82.2	73.2
3	58.2	29.1		59.9	46.3	79.3	98.8	93.0	68.7	78.9	74.5
4	17.6	59.2	57.7		50.6	62.2	60.6	61.8	57.1	61.5	60.1
5	83.4	91.4	97.4	82.7		46.6	47.3	48.1	45.1	48.8	46.7
6	54.0	24.1	24.4	53.0	96.1		80.3	79.7	70.4	83.2	77.2
7	56.1	29.4	1.2	56.4	93.7	23.0		92.9	70.1	79.4	75.6
8	55.7	30.1	7.4	53.7	90.6	23.8	7.5		69.6	78.9	74.7
9	68.5	47.7	40.7	64.4	102.3	37.8	38.4	39.3		69.7	66.4
10	56.9	20.4	24.9	54.7	87.9	19.1	24.3	25.0	39.1		74.9
11	54.3	33.4	31.4	57.5	95.5	27.4	29.9	31.2	44.9	30.9	

1:鸡序列;2:牛序列;3:黑猩猩序列;4:鸭子序列;5:鱼序列;6:马序列;7:人类序列;8:猴子序列;9:老鼠序列;10:猪序列;11:兔子序列。

图 1 不同物种间 cGAS 核苷酸序列同源性分析

Fig.1 Homology analysis of cGAS nucleotide sequence between species

图2 不同物种 *cGAS* 基因核苷酸序列进化树分析Fig.2 Evolutionary tree analysis of *cGAS* gene nucleotide sequences in different species

LCR:低复杂区域。

图3 *chcGAS* 结构域预测Fig.3 Domain prediction of *chcGAS*

2.2 *chcGAS* 基因扩增结果

经 PCR 扩增 *chcGAS* 基因得到目的条带 (图4), 目的片段大小为约1 317 bp, 显示与预期条带大小一致, 经测序比对后与目的基因序列完全一致。

2.3 重组质粒的酶切鉴定

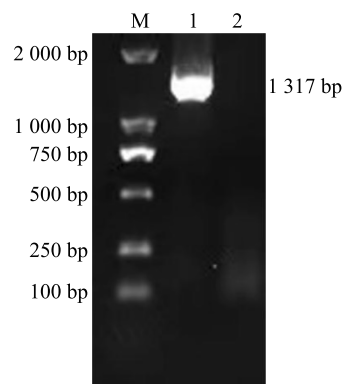
将 pET-32a-*chcGAS*、pCAGGS-HA-*chcGAS*、pmCherry-C1-*chcGAS* 重组质粒经 *EcoR* I 酶切鉴定后在核酸凝胶电泳上显示的条带大小与预期的载体大小和目的基因大小一致 (图5), 并且经测序比对分析后与目的基因序列完全一致, 碱基未见缺失或者突变, 说明重组质粒构建成功。

2.4 pET-32a-*chcGAS* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将 pET-32a-*chcGAS* 重组质粒转化到 Rosetta (DE3) 感受态细胞中后, 成功表达出相对分子质量为 75 000 的目的蛋白质 (图6), 分析结果显示, 蛋白质在包涵体和上清液都有表达且主要集中在上清液表达。

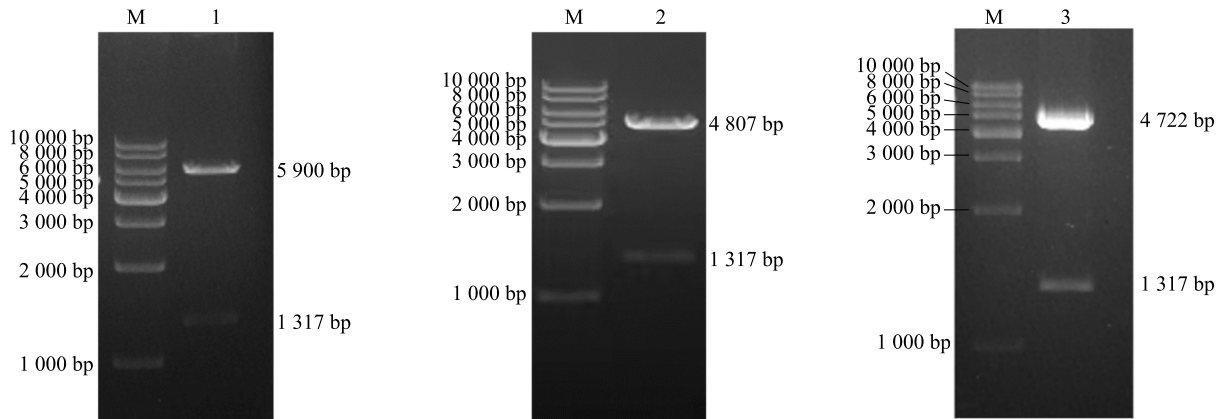
2.5 重组蛋白质的 Western-blot 鉴定

利用 Western-blot 对蛋白质进一步鉴定分析, 结果 (图7) 显示, 在 PVDF 膜上有一条明显条带且位置大小与预期目的蛋白质大小一致。说明重组蛋白质可以被抗 His 标签的一抗识别。

M: DNA marker; 1: *chcGAS* 基因; 2: 阴性对照。图4 *chcGAS* 基因扩增产物Fig.4 PCR product of *chcGAS* gene

2.6 *chcGAS* 感染前后亚细胞定位分析

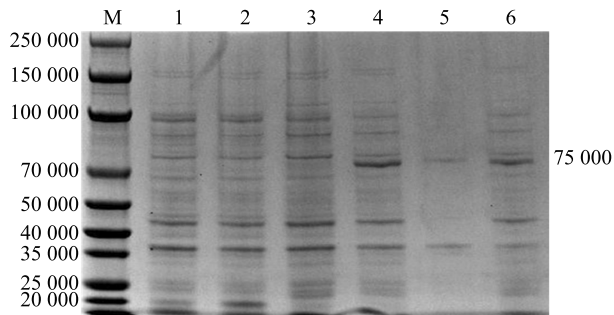
通过在 LMH 细胞中转染 pCAGGS-HA-*chcGAS* 和 pmCherry-C1-*chcGAS* 来研究 *chcGAS* 的细胞定位。结果显示, 未感染 FAdV-4 时 *chcGAS* 主要分布在细胞核的核膜上, 感染 FAdV-4 后, 可以观察到 *chcGAS* 从细胞核的核膜向细胞质里转移 (图8、图9)。



M:Marker;1:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒酶切产物;2:pCAGGS-HA-*chcGAS* 重组质粒酶切产物;3:pmCherry-C1-*chcGAS* 重组质粒酶切产物。

图 5 *chcGAS* 重组质粒酶切鉴定

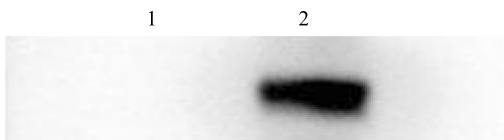
Fig.5 Identification of *chcGAS* recombinant plasmid by enzyme digestion



M:蛋白质 marker;1:pET-32a 空载体未经 IPTG 诱导;2:pET-32a 空载体经 IPTG 诱导;3:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒未经 IPTG 诱导;4:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒经 IPTG 诱导;5:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒诱导表达包涵体;6:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒诱导表达上清液。

图 6 pET-32a-*chcGAS* 表达产物 SDS-PAGE 电泳

Fig.6 SDS-PAGE electrophoresis of the protein product of pET-32a-*chcGAS*



1:pET-32a 空载体经 IPTG 诱导表达;2:pET-32a-*chcGAS* 重组质粒经 IPTG 诱导表达。

图 7 Western-blot 鉴定 *chcGAS* 蛋白的体外表达

Fig.7 Western-blot identification of *chcGAS* protein *in vitro* expression

3 讨论

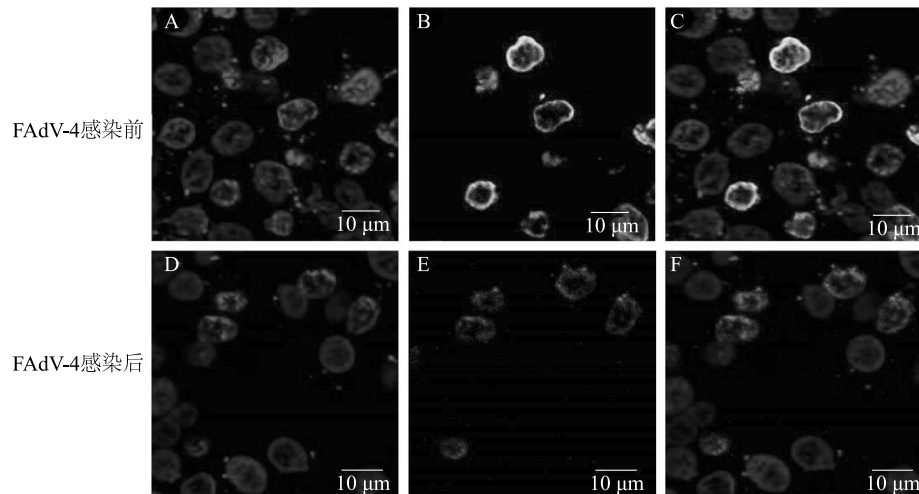
cGAS 作为近几年来发现的一种新型胞质 DNA

受体,其功能为识别胞质内的 DNA。然而鸡 *cGAS* 基因的相关研究较少,通过 Megalign 比对分析物种间 *cGAS* 核苷酸同源性,结果显示,*chcGAS* 与其他物种 *cGAS* 的同源性为 50.5%~84.4%,且具有 2 个在第 3 至第 39 氨基酸和第 68 至第 81 氨基酸的低复杂区域和 1 个高度保守的具有第 129 至第 429 氨基酸的 Mab-21 结构域,表明 *chcGAS* 与其他物种具有差异。本研究对 *chcGAS* 基因进行了克隆。首先,通过构建 pET-32a-*chcGAS* 原核表达载体,其次,经过多种对比分析后从大肠杆菌表达菌株中挑选了 Rosetta (DE3) 表达菌株,最后以 15 ℃、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 0.5 mmol/L、诱导 20 h 为最适诱导条件,成功表达了 *chcGAS* 蛋白。SDS-PAGE 分析结果显示,重组蛋白质 *chcGAS* 主要以可溶性蛋白质的形式在上清液处表达,利用 His 标签抗体经 Western-blot 鉴定,在 PVDF 膜上显示有单一的条带且与预期目的蛋白质条带大小相符。

在正常情况下 DNA 只存在于细胞核和线粒体中,但在病毒感染后会游离在细胞质中,随后被位于细胞质中的 *cGAS* 识别,继而激活 *cGAS-STING* 通路发挥抗病毒作用^[10]。目前为止报道人和小鼠 *cGAS* 调控较多^[18],以往的研究中,普遍认为人 *cGAS* 仅仅分布在细胞质中^[19],并行使 DNA 识别受体的功能^[20-21]。但近期有试验结果表明,人 *cGAS* 定位在细胞膜上,并指出有外源 DNA 感染细胞时 *cGAS* 发生移位即可从细胞膜上转移到细胞质中从而识别一些 DNA 而后激活天然免疫。鸡 *cGAS* 还没有得到足够的研究,尤其鸡 *cGAS* 的细胞定位、功

能及精确调控机制还未完全研究清楚。先前 Wang 等^[14]通过在鸡胚成纤维细胞中瞬时转染 Flag 标记的 *cGAS* 来研究鸡 *cGAS* 的亚细胞定位,定位分析结果表明, *chcGAS* 分布在细胞质中。本研究使用 pCAGGS-HA-*chcGAS* 和 pmCherry-C1-*chcGAS* 2 个重组质粒在 LMH 细胞中对 *chcGAS* 进行定位,结果显示, *chcGAS* 是定位在细胞核的核膜上,此外还通过

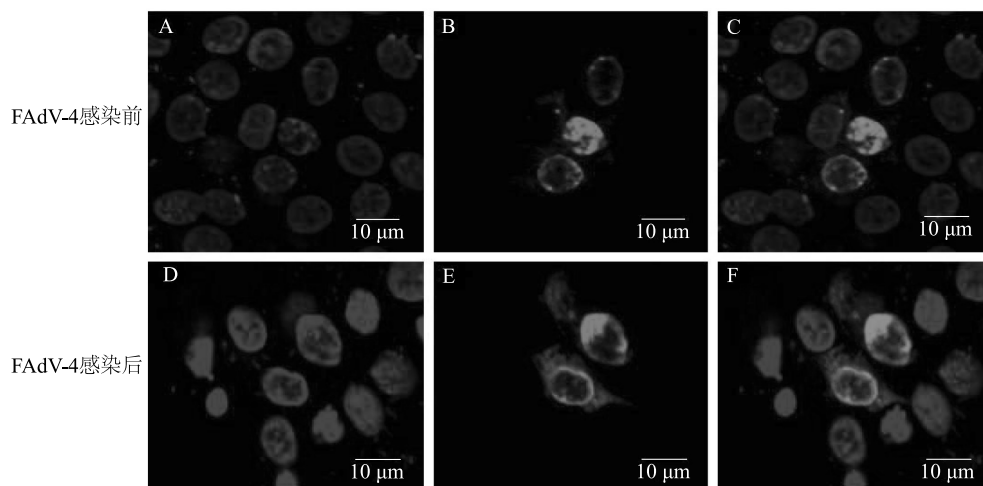
FAdV-4 感染 *chcGAS* 对细胞定位进行观察,结果表明,在 FAdV-4 感染后 *chcGAS* 定位可从细胞核的核膜上转移到细胞质中,后续将通过构建稳定表达 *chcGAS* 的 LMH 细胞系对这一结果进行更加深入地研究验证。通过 *chcGAS* 定位了解其在天然免疫中发挥的作用,同时也为后续研究 *chcGAS* 的功能提供了理论依据。



FAdV-4;血清 4 型禽腺病毒。A、B 分别为 pCAGGS-HA-*chcGAS* 转染细胞在 FAdV-4 感染前通过二氨基苯基吡啶 (DAPI) 染色荧光显微、FITC 绿色荧光抗体定位获得的定位图;C 为 A 和 B 的叠加图;D、E 分别为 pCAGGS-HA-*chcGAS* 转染细胞在 FAdV-4 感染 8 h 后通过二氨基苯基吡啶 (DAPI) 染色荧光显微、FITC 绿色荧光抗体定位获得的定位图;F 为 D 和 E 的叠加图。

图 8 pCAGGS-HA-*chcGAS* 表达产物 *chcGAS* 亚细胞定位图

Fig.8 pCAGGS-HA-*chcGAS* subcellular localization map



FAdV-4;血清 4 型禽腺病毒。A、B 分别为 pmCherry-C1-*chcGAS* 转染细胞在 FAdV-4 感染前通过二氨基苯基吡啶 (DAPI) 染色荧光显微、编码蛋白质自带红色荧光定位法获得的定位图;C 为 A 和 B 的叠加图;D、E 分别为 pmCherry-C1-*chcGAS* 转染细胞在 FAdV-4 感染 8 h 后通过二氨基苯基吡啶 (DAPI) 染色荧光显微、编码蛋白质自带红色荧光定位法获得的定位图;F 为 D 和 E 的叠加图。

图 9 pmCherry-C1-*chcGAS* 表达产物 *chcGAS* 亚细胞定位图

Fig.9 pmCherry-C1-*chcGAS* subcellular localization map

参考文献:

- [1] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [2] KATO K, ISHII R, GOTO E, et al. Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76983.
- [3] MORI A, OLESZYCKA E, SHARP F A, et al. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses[J]. *European Journal of Immunology*, 2012, 42(10): 2709-2719.
- [4] STEMPEL M, CHAN B, BRINKMANN M M. Coevolution pays off: herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway[J]. *Medical Microbiology and Immunology*, 2019, 208(3): 495-512.
- [5] DAMBUZA I M, BROWN G D. C-type lectins in immunity: recent developments[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2015, 32:21-27.
- [6] STEIN S C, LAM E, FALCK-PEDERSEN E. Cell-specific regulation of nucleic acid sensor cascades: a controlling interest in the antiviral response [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13303-13312.
- [7] ZHOU H, CHEN S, WANG M S, et al. Interferons and their receptors in birds: a comparison of gene structure, phylogenetic analysis, and cross modulation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(11): 21045-21068.
- [8] KEATING S E, BARAN M, BOWIE A G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction[J]. *Trends in Immunology*, 2011, 32(12): 574-581.
- [9] WU J X, SUN L J, CHEN X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by Cytosolic DNA[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 826-830.
- [10] SUN L J, WU J X, DU F H, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 786-791.
- [11] BARNETT K C, CORONAS-SERNA J M, ZHOU W, et al. Phosphoinositide interactions position cGAS at the plasma membrane to ensure efficient distinction between self- and viral DNA[J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1432-1446.
- [12] 杨洁. 鸡源天然免疫 DNA 感受器 cGAS-STING 信号轴功能及其抗病毒作用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [13] OLIVEIRA M, RODRIGUES D R, GUILLORY V, et al. Chicken cGAS senses fowlpox virus infection and regulates macrophage effector functions [J]. *Front in Immunology*, 2021, 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.613079.
- [14] WANG J, BA G, HAN Y Q, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is essential for cytosolic double-stranded DNA and fowl adenovirus serotype 4 triggered innate immune responses in chickens[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 497-507.
- [15] ZHANG H W, JIN W J, DING K, et al. Genetic characterization of fowl adenovirus strains isolated from poultry in China[J]. *Avian Diseases*, 2017, 61(3): 341-346.
- [16] CAVLAR T, DEIMLING T, ABLASSER A, et al. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING[J]. *The EMBO Journal*, 2013, 32(10): 1440-1450.
- [17] YIN D D, XUE M, YANG K K, et al. Molecular characterization and pathogenicity of highly pathogenic fowl adenovirus serotype 4 isolated from laying flock with hydropericardium-hepatitis syndrome[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104381.
- [18] DAI J, HUANG Y J, HE X H, et al. Acetylation blocks cGAS activity and inhibits self-DNA-induced autoimmunity [J]. *Cell*, 2019, 176(6): 1447-1460.
- [19] ZHOU Y, HE C, WANG L, et al. Post-translation regulation of antiviral innate signaling [J]. *European Journal of Immunology*, 2017, 47(9): 1414-1426.
- [20] CIVRIL F, DEIMLING T, DE OLIVEIRA MANN C C, et al. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS[J]. *Nature*, 2013, 498(7454): 332-337.
- [21] LI X D, WU J X, GAO D X, et al. Pivotal roles of core-cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects [J]. *Science*, 2013, 341(6152): 1390-1394.

(责任编辑: 陈海霞)