

孟春花,王春玲,李静心,等. 猪 *APOBEC3F* 基因真核表达载体的构建及其在 MARC145 细胞中的表达定位[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1344-1349.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.023

猪 *APOBEC3F* 基因真核表达载体的构建及其在 MARC145 细胞中的表达定位

孟春花^{1,2}, 王春玲^{1,3}, 李静心^{1,2}, 李隐侠^{1,2}, 朱前明^{1,3}, 曹少先^{1,2}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院动物品种改良与繁育重点实验室,江苏 南京 210014; 3.南京农业大学动物科技学院,江苏 南京 210095)

摘要: 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽 3F (APOBEC3F) 属固有免疫系统中的重要成员,对人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)等多种病毒的复制具有广泛的抑制作用。为构建 *APOBEC3F* 基因的真核表达载体,并检测其在体外培养的 MARC145 细胞中的表达情况,通过 RT-PCR 从猪脾脏组织扩增 *APOBEC3F* 基因,定向克隆到表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的真核表达载体 pEGFP-CMV 中,构建 pEGFP-*APOBEC3F*。PCR 扩增及测序显示,*APOBEC3F* 插入载体位置、方向及序列均正确。pEGFP-*APOBEC3F* 经脂质体介导法转染 MARC145 细胞,转染后 24 h *APOBEC3F* mRNA 的水平升至最高。细胞免疫化学法检测发现 APOBEC3F 蛋白主要在 MARC145 细胞质中表达。研究结果为体外研究猪 *APOBEC3F* 基因在抗猪蓝耳病中的作用奠定了基础。

关键词: *APOBEC3F*; 真核表达载体; MARC145 细胞; 转染; 荧光定量 PCR; 脂质体; 猪

中图分类号: S858.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1344-06

Construction of eukaryotic vector for porcine *APOBEC3F* gene and its expression and localization in MARC145 cells

MENG Chun-hua^{1,2}, WANG Chun-ling^{1,3}, LI Jing-xin^{1,2}, LI Yin-xia^{1,2}, ZHU Qian-ming^{1,3}, CAO Shao-xian^{1,2}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3F (APOBEC3F, A3F) is an important member of innate immune system in mammals, playing vital roles in inhibiting the replication of multiple viruses, such as human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), etc. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), is one of the most economically important diseases of swine. No reliable or sustainable cure is available due to some special features of PRRSV. It is one of the effective directions to control PRRS disease by improving genetic resistance of the host. Our previous study has shown that the polymorphism of *A3F* gene was associated with PRRSV resistance. In this study, *A3F* gene was amplified by RT-PCR and cloned into pEGFP-CMV eukaryotic expression vector with enhanced green fluorescence protein (EGFP) by using porcine splenic

收稿日期: 2015-04-16

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20140741); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)2034]; 国家自然科学基金项目(30972075)

作者简介: 孟春花(1979-), 女, 山东单县人, 博士, 副研究员。主要从事抗猪 PRRSV 育种的研究。(Tel) 025-84390095; (E-mail) mengchunhua@jaas.ac.cn

通讯作者: 曹少先, (Tel) 025-84390352; (E-mail) caoshaoxian@163.com

important diseases of swine. No reliable or sustainable cure is available due to some special features of PRRSV. It is one of the effective directions to control PRRS disease by improving genetic resistance of the host. Our previous study has shown that the polymorphism of *A3F* gene was associated with PRRSV resistance. In this study, *A3F* gene was amplified by RT-PCR and cloned into pEGFP-CMV eukaryotic expression vector with enhanced green fluorescence protein (EGFP) by using porcine splenic

RNA as template and primers based on A3F gene sequences on GenBank. Verified by double enzymes (*Bgl* II and *Sal* I) digestion and sequencing, A3F eukaryotic expression vector was constructed and named pEGFP-A3F. The vector was then transfected into MARC145 cells mediated by liposome. Realtime PCR showed that the expression of A3F mRNA was increased over time and reached its maximum 24 h after transfection and subcellular localization of A3F protein was in the cytoplasm revealed by immunocytochemistry (ICC). This research laid a foundation for the studies on A3F's role in anti-PRRS *in vitro*.

Key words: apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3F (APOBEC 3F); eukaryotic expression vector; MARC145 cell; transfection; real time-PCR; liposome; swine

载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽 3F (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3F, APOBEC3F) 属于细胞胞嘧啶脱氨酶家族的重要成员,为固有免疫系统中的一个重要蛋白,包括 APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A ~ APOBEC3G 以及 AID (活化诱导脱氨酶) 等 11 个成员^[1-2]。近年来的研究发现 APOBEC 家族蛋白对包括人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV)^[2-4]、泡沫病毒 (Foamy virus, PFV)、乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV)^[5] 等多种病毒具有抑制或超突变作用,是具有广谱抗病毒活性的天然免疫分子^[1-6]。*APOBEC3F* 对病毒复制的抑制作用可以利用其胞嘧啶脱氨酶活性,通过 DNA、RNA 编辑途径和非编辑途径将 HIV、HBV 复制过程中 cDNA 或 RNA 上的胞嘧啶 (C) 突变为尿嘧啶 (U),也可使 5' 甲基胞嘧啶 (5' mC) 转化为 5' 甲基尿嘧啶 (5' mU),引起从 G 到 A 的超突变,从而产生大量致死突变,如色氨酸密码子 TGG 突变为终止子 TAA,降低病毒的复制效率^[7-9]。但 *APOBEC3F* 是否在猪体内具有抗病毒作用未见报道。

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 俗称“猪蓝耳病”,由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染引发,已在全世界范围内引起养猪业的巨大经济损失^[10]。PRRSV 的增殖对细胞有严格的选择性, MARC145 细胞是猴胚胎肾上皮细胞,近年来常用于体外增殖 PRRSV。本研究拟构建含增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescence protein, GFP) 的真核表达载体 pEGFP-*APOBEC3F*,并转染 MARC145 细胞,检测 APOBEC3F 蛋白在 MARC145 细胞中的表达、定位,为体外研究 *APOBEC3F* 对 PRRSV 的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体和细胞

MARC145 细胞、大肠杆菌菌株 Top10 为本实验室保存, pEGFP-CMV 载体 (图 1) 由本实验室构建; MARC145 细胞培养条件为: DMEM 培养液添加 10% 胎牛血清和 100 mmol/L 的谷氨酰胺, 胰蛋白酶消化传代。

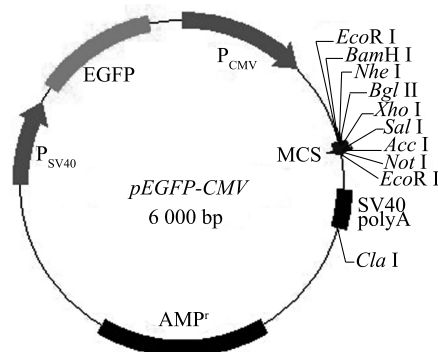


图 1 pEGFP-CMV 质粒图谱

Fig.1 The profile of plasmic pEGFP-CMV

1.2 主要试剂

DMEM 液体培养基、Trypsin/EDTA、胎牛血清、Opti-MEM、Lipofectamin™ LTX Reagent、PLUS™ Reagent、Trizol 等试剂购自 Invitrogen 公司, DMSO 为 Sigma 公司产品, M-MLV Reverse Transcription 反转录酶购自 Promega 公司, 各种限制性内切酶和 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司, 快速胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒购自南京卡罗登生物科技有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 *APOBEC3F* 基因的克隆

取 -80 °C 保存的二花脸猪脾脏, Trizol 法提取猪脾脏组织总 RNA, M-MLV 反转录获得 cDNA。根据

GenBank 中猪 *APOBEC3F* cDNA 序列(DQ974647.1), 利用 Primer Premier 5.0 软件辅助设计引物, 扩增猪 *APOBEC3F* cDNA。引物序列如下: 上游引物 5'-GGAGATCTGGGCTCTTCCTACATGG-3' (下划线部分为 *Bgl* II 酶切位点); 下游引物 5'-GTCGACGGAAGTGTCTGTCATCTCGA-3' (下划线部分为 *Sal* I 酶切位点), 由上海英潍捷基生物公司合成。

PCR 反应体系为 20.0 μ l, 包括 5 \times Primer star 缓冲液 4.0 μ l, dNTP mix 1.6 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, Primer star 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.2 μ l, 以及 ddH₂O 11.2 μ l。反应程序: 98 $^{\circ}$ C 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。目的片段大小约 1 350 bp。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 参照卡罗登 DNA 纯化回收试剂盒说明书回收 PCR 产物, 所得 PCR 产物用 T4 DNA 连接酶与 pMD19-T 载体连接为 pMD-*APOBEC3F*, 然后, 将连接产物转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞后, 在含有氨苄青霉素抗性的平板培养基上培养, 挑取阳性克隆菌落摇菌。提取质粒, 经 PCR 鉴定后, 阳性克隆菌液送上海美吉生物科技有限公司测序。

1.4 *APOBEC3F* 表达载体构建

将 pEGFP-CMV 载体和测序验证后的 pMD-*APOBEC3F* 分别用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段 DNA。将回收的片段用 T4 DNA Ligase 连接后转化至大肠杆菌中, 取转化好的菌液铺板在含氨苄青霉素的 LB 平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 静置培养 12 h 左右, 挑取单克隆, 培养菌液提取质粒, 用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切鉴定。鉴定正确的克隆送上海美吉生物医药科技有限公司测序, 命名为 pEGFP-*APOBEC3F*。

1.5 重组质粒转染及转染细胞的观察

MARC145 细胞接种至 24 孔培养板, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 18~24 h, 细胞汇合至 80% 左右时, 用脂质体 LTX 介导 pEGFP-*APOBEC3F*, pEGFP-CMV 转染 MARC145 细胞, 对照组细胞不转染质粒, 荧光显微镜下观察转染结果^[11]。

1.6 *APOBEC3F* 基因表达水平的 Q-PCR 检测

分别于转染后 12 h、24 h、48 h 和 72 h 收集 pEGFP-*APOBEC3F*、pEGFP-CMV 转染组及对照组的 MARC145 细胞, Trizol 法提取总 RNA。DNase I 处理后, 参照 TaKaRa 公司试剂盒说明书反转录获得 cD-

NA, 设计合成 *APOBEC3F* 基因的 Q-PCR 检测引物: 上游引物 5'-CGGAACCGCTCCTACATC-3'; 下游引物 5'-GGAAGTGAAGCCACCTTCG-3'。实时荧光定量 PCR 参照 TaKaRa 大连宝生物公司的 SYBR Green 试剂盒说明书进行, 反应体系为 20.0 μ l, 包括 SYBR Green Mix 10.0 μ l, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, ROX 0.4 μ l, 以及 ddH₂O 6.0 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环。数据通过 7500 Software v 2.0.5 软件分析。

1.7 *APOBEC3F* 蛋白的细胞免疫化学检测

吸去 MARC145 细胞培养液, 用预冷的 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 用 0.2% TritonX-100 处理 10~15 min, 然后用 1% BSA 封闭 1 h, 加入兔来源单克隆抗 *APOBEC3F* 抗体 (1:100 倍稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:100 倍稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 室温下 DAB 显色 0.5~3.0 min, 在光学显微镜下观察, 棕色为 *APOBEC3F* 阳性区域。

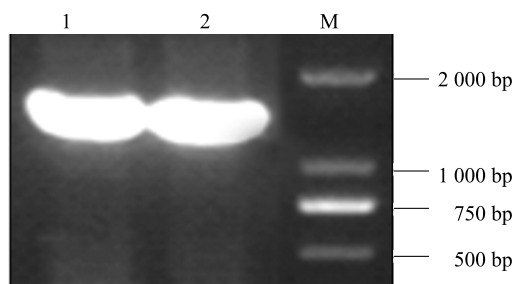
1.8 统计分析

使用 SPSS17.0 统计软件 one-way ANOVA 进行显著性分析。

2 结果

2.1 *APOBEC3F* 基因的克隆

APOBEC3F 基因 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示约 1 300 bp (图 1), 大小与预期相符合。



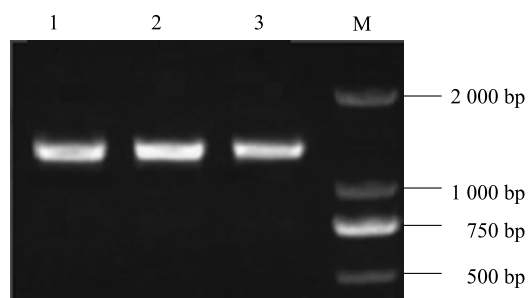
M:DL2000; 1,2:*APOBEC3F*。

图 1 *APOBEC3F* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of *APOBEC3F* gene by PCR

2.2 pMD-*APOBEC3F* 质粒的鉴定和测序

扩增后的 *APOBEC3F* 片段与 pMD19-T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 从抗性平皿上挑取阳性菌落, 经 PCR 鉴定为阳性的菌液 (图 2) 送上海美吉生物公司测序。经测序分析, 获得的 *APOBEC3F* 序列与参考序列一致。



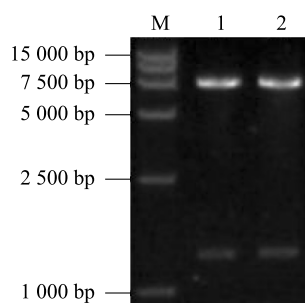
M:DL2000; 1~3:pMD-*APOBEC3F* 质粒。

图2 pMD-*APOBEC3F* 质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of plasmid pMD-*APOBEC3F* by PCR

2.3 pEGFP-*APOBEC3F* 的酶切鉴定及测序

对阳性质粒用 *Bgl* II 和 *Sal* I 进行酶切鉴定,可得到 2 个片段(图 3),片段大小与预计相符。经测序,获得的 *APOBEC3F* 序列与参考序列一致。



M:DL15000; 1、2 均为 pEGFP-*APOBEC3F* 质粒。

图3 pEGFP-*APOBEC3F* 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of plasmid pEGFP-*APOBEC3F* by restriction endonuclease digestion

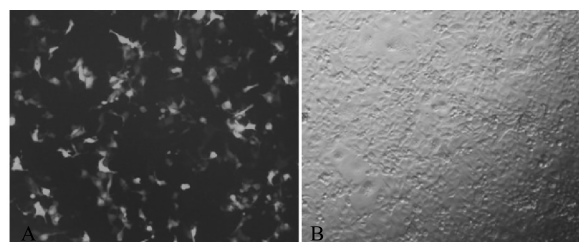
2.4 pEGFP-*APOBEC3F* 在 MARC145 中的转染效率

荧光显微镜下观察到 MARC145 细胞转染 pEGFP-*APOBEC3F* 和 pEGFP-CMV 24 h 后有绿色荧光(图 4A),对照组细胞未见绿色荧光(图 4B)。转染后 48 h pEGFP-*APOBEC3F* 组转染效率为 82.9%,略低于 pEGFP-CMV 转染组(84.4%),两组差异不明显。

2.5 *APOBEC3F* 在 MARC145 细胞中的表达水平变化

Q-PCR 结果显示,MARC145 细胞中 *APOBEC3F* mRNA 水平在 pEGFP-*APOBEC3F* 转染后 24 h 达到最高,随后呈下降趋势;转染空载体 pEGFP-CMV 组和

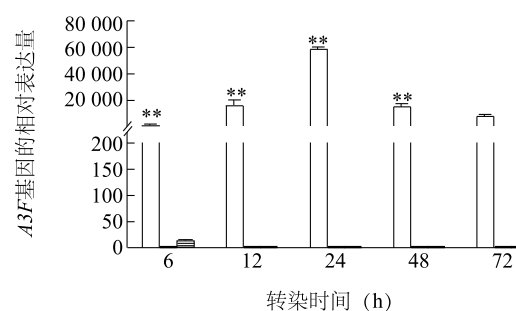
未转染阴性对照组中 *APOBEC3F* cDNA 的表达水平极显著低于转染 pEGFP-*APOBEC3F* 组($P < 0.01$)。



绿色荧光为转染阳性细胞:A:荧光;B:可见白光。

图4 pEGFP-*APOBEC3F* 质粒转染 MARC145 细胞

Fig. 4 Transfection of plasmid pEGFP-*APOBEC3F* in MARC145 cells



□ pEGFP-*APOBEC3F*; ■ pEGFP-CMV; ▨ 未转染阴性对照

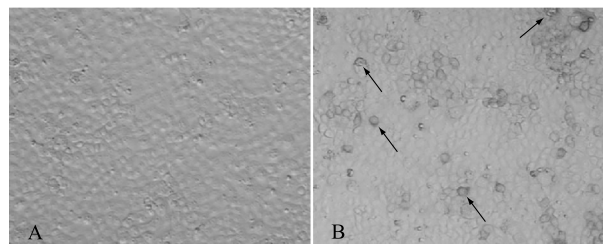
**表示同一转染时间与其他两组相比差异达极显著水平($P < 0.01$)。

图5 *APOBEC3F* 基因在 MARC145 细胞中的表达

Fig.5 Expression of *APOBEC3F* gene in MARC145 cells

2.6 *APOBEC3F* 蛋白在 MARC145 中的表达、定位

细胞免疫化学检测表明,pEGFP-*APOBEC3F* 转染组 MARC145 细胞中 *APOBEC3F* 蛋白主要在细胞质中表达,pEGFP-CMV 转染组 MARC145 细胞中未发现 *APOBEC3F* 蛋白的表达(图 6)。



箭头处指示 *APOBEC3F* 蛋白表达部位:A:pEGFP-CMV 转染组; B:pEGFP-*APOBEC3F* 转染组。

图6 *APOBEC3F* 蛋白在 MARC145 中的表达定位

Fig.6 Cellular localization of *APOBEC3F* in MARC145 cells

3 讨论

APOBEC3F 具有广谱的抗病毒活性,可有效抑制 HIV、HBV、PREV 等病毒的复制,在宿主抗病毒天然免疫应答中发挥着重要作用,因此受到广泛关注^[1-6, 12-17]。APOBEC3F 含 N 端模体脱氨基作用较弱,主要与 APOBEC 分子衣壳化、RNA 结合及二聚体的形成有关,C 端脱氨基模体是其发挥脱氨基作用的主要活性区域,但两者都是发挥脱氨基功能必不可少的部分^[18-20]。APOBEC3F 的作用机制是通过 gag 蛋白^[19]、病毒 RNA^[20]、细胞 RNA^[21] 的媒介进入成熟病毒粒子的核心,并在随后感染的靶细胞中使新合成的负链 cDNA 发生 C→T 突变,从而导致新合成的 DNA 降解或产生大量致死性的 G→A 突变来抑制病毒的复制与感染^[22-25]。

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 是传染性极强的反义正链 RNA 病毒,可以造成仔猪死亡和妊娠母猪流产及死胎、木乃伊胎。目前,PRRS 的防控尚无理想方法,因为 PRRSV 灭活疫苗免疫后不能产生足够的保护抗体,弱毒活疫苗也只能保护同种毒株的感染,而 PRRSV 变异很快。宿主自身免疫能力对该病毒的复制具有重要抑制作用,因此筛选抗 PRRSV 能力强的个体进行抗性选育是 PRRS 防控的重要途径,可以从根源上解决 PRRS 防控难的问题。我们的前期研究表明:*APOBEC3F* 的外显子 8 及内含子 6 的 SNP 与猪抗 PRRS 的能力显著相关,提示 *APOBEC3F* 可能与猪对 PRRSV 的易感性/抗性相关^[26]。MARC145 细胞是 PRRSV 在猪体外增殖的常用细胞系,本研究成功构建了 APOBEC3F 的真核表达载体并研究了其在 MARC145 细胞中的表达,对研究 *APOBEC3F* 对 PRRSV 的作用,以及探索猪 PRRSV 抗性差异的机制和抗 PRRSV 猪的选育具有重要意义。

Jonsson^[16] 的研究发现偶蹄动物牛、羊和猪 APOBEC3F 主要定位在细胞质,并能抑制 HIV-1 和 MLV 的复制。本研究中, APOBEC3F 转染 MARC145 细胞后也主要在细胞质中表达,这与 Jonsson 等的研究结果一致。本研究中使用脂质体介导法将外源 DNA 导入真核细胞,是一种常用的表达外源基因的方法,这种方法具有结果可靠、重复性好、便于操作等特点,而且所携带的 DNA 片段大小不受限制^[27]。本研究中采用的脂质体介导转染贴壁细

胞系 MARC145 细胞的条件为本实验室建立的成熟体系^[11],在该体系中 pEGFP-*APOBEC3F* 的转染效率达到 82.9%,且基本没有细胞因为转染死亡,而电穿孔法转染后细胞死亡率较高,病毒介导转染法存在安全风险^[11]。

参考文献:

- [1] LEE J, CHOI J Y, LEE H J, et al. Repression of porcine endogenous retrovirus infection by human APOBEC3 proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1): 266-270.
- [2] HARRIS R S, DUDLEY J P. APOBECs and virus restriction [J]. Virology, 2015, 479-480C: 131-145.
- [3] ZHENG Y H, DAN I, TAKESHI K, et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication [J]. J Virol, 2004, 78(11): 6073-6076.
- [4] LAND A M, SHABAN N M, EVANS L, et al. APOBEC3F determinants of HIV-1 Vif sensitivity [J]. J Virol, 2014, 88(21): 12923-12927.
- [5] SUSPENE R, GUETARD D, HENRY M, et al. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(23): 8321-8326.
- [6] FRANCA R, SPADARI S, MAGA G. APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism [J]. Med Sci Monit, 2006, 12(5): RA92-98.
- [7] MANGEAT B, TURELLI P, CARON G, et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts [J]. Nature, 2003, 424(6944): 99-103.
- [8] BISHOP K N, HOLMES R K, SHEEHY A M, et al. APOBEC-mediated editing of viral RNA [J]. Science, 2004, 305(5684): 645.
- [9] WIJESINGHE P, BHAGWAT A S. Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(18): 9206-9217.
- [10] NIEUWENHUIS N, DUINHOF T F, VANNES A. Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds [J]. Vet Rec, 2012, 170(9): 225.
- [11] 丰秀静,曹少先,孟春花,等. 脂质体 LTX 介导高效转染山羊胎几成纤维细胞(gFFCs)条件的优化[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 561-565.
- [12] HULTQUIST J F, LENGUEL J A, REFSLAND E W, et al. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1 [J]. J Virol, 2011, 85(21): 11220-11234.
- [13] XIANG S L, MA Y, YAN Q, et al. Construction and characteriza-

- tion of an infectious replication competent clone of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs [J]. *Virol J*, 2013, 10: 228.
- [14] HARRIS R S, BISHOP K N, SHEEHY A M, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection [J]. *Cell*, 2003, 113(6): 803-809.
- [15] ZHENG Y H, IRWIN D, KUROSU T, et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication [J]. *J Virol*, 2004, 78(11): 6073-6076.
- [16] JONSSON S R, HACHE G, STENGLEIN M D, et al. Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(19): 5683-5694.
- [17] REBECCA K H, FRANSJE A K, KATE N B, et al. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(4): 2587-2595.
- [18] HACHE G, LIDDAMENT M T, HARRIS R S. The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 10920-10924.
- [19] CEN S, GUO F, NIU M, et al. The interaction between HIV-1 gag and APOBEC3G [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(32): 33177-33184.
- [20] LUO K, LIU B, XIAO Z, et al. Amino-terminal region of the human immuno-deficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging [J]. *J Virol*, 2004, 78(21): 11841-11852.
- [21] IWATANI Y, TAKEUCHI H, STREBEL K, et al. Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect [J]. *J Virol*, 2006, 80(12): 5992-6002.
- [22] WANG T, ZHANG W, TIAN C, et al. Distinct viral determinants for the packaging of human cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3C [J]. *Virology*, 2008, 377(1): 71-79.
- [23] HARRIS R S, LIDDAMENT M T. Retroviral restriction by APOBEC proteins [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(11): 868-877.
- [24] LACKEY L, LAW E K, BROWN W L, et al. Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination [J]. *Cell Cycle*, 2013, 2(5): 762-772.
- [25] SONG C, SUTTON L, JOHNSON M E, et al. Signals in APOBEC3F N-terminal and C-terminal deaminase domains each contribute to encapsidation in HIV-1 virions and are both required for HIV-1 restriction [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(20): 16965-16974.
- [26] 朱前明, 孟春花, 茆达干, 等. 猪 *APOBEC3F* 基因外显子 8 核苷酸的多态性及其与猪繁殖和呼吸综合征病毒易感性的关联性[J]. *江苏农业学报*, 2014, 10(5): 1051-1057.
- [27] 李 扬, 吴凯峰, 郭旭东, 等. 脂质体介导外源基因体外转染牛胎儿成纤维细胞条件的优化[J]. *遗传*, 2002, 24(6): 653-655.

(责任编辑: 孙 宁)