

李文良, 毛立, 杨蕾蕾, 等. 稳定表达猪 Viperin 的 PK-15 细胞系的构建与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 128-132.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.020

稳定表达猪 Viperin 的 PK-15 细胞系的构建与鉴定

李文良, 毛立, 杨蕾蕾, 郝飞, 张纹纹, 江杰元

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为了探讨先天免疫效应因子 Viperin 的抗病毒作用, 从猪外周血单核细胞中成功扩增了猪 Viperin 基因完整阅读框, 克隆到真核表达载体 pEGFP-C1 中构建重组表达质粒 pEGFP-Vi。阳性质粒经 PCR、酶切和测序鉴定后通过脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染 PK-15 细胞, 荧光显微镜观察发现融合蛋白质 EGFP-Viperin 定位于细胞质中, 不同于对照质粒 EGFP 在细胞中的均匀分布。共聚焦检测结果表明, 重组蛋白质主要定位于细胞的内质网上。Western blot 检测结果表明, 猪 Viperin 蛋白质在 PK-15 细胞中以融合蛋白质的形式稳定表达, 分子量约为 7.0×10^4 。

关键词: 猪; Viperin; PK-15 细胞系; 表达

中图分类号: S858.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0128-05

Construction and identification of PK-15 cell line stably expressing porcine Viperin

LI Wen-liang, MAO Li, YANG Lei-lei, HAO Fei, ZHANG Wen-wen, JIANG Jie-yuan

(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China*)

Abstract: In order to explore the antiviral function of innate immunity effector Viperin, the Viperin coding region amplified from porcine peripheral blood mono nuclear cells was cloned in to expression vector pEGFP-C1. The positive plasmid, pEGFP-Vi, was detected by PCR, enzyme digestion and sequencing. PK-15 cells were transfected with pEGFP-Vi via Lipofectamine 2000. As observed by fluorescence microscope, the fusion protein EGFP-Viperin was localized in the cytoplasm, different from the uniform distribution of EGFP in the cell. Confocal laser scanning microscope revealed that EGFP-Viperin was localized in endoplasmic reticulum. Western blot analysis showed that EGFP-Viperin fusion protein was successfully expressed with molecular weight of 7.0×10^4 .

Key words: swine; Viperin; PK-15 cell line; expression

收稿日期: 2015-07-03

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20130729); 国家自然科学基金基金项目 (31402180)

作者简介: 李文良 (1984-), 男, 河南开封人, 博士, 副研究员, 主要从事分子病毒学、动物疫病防治和诊断技术研究。(E-mail) kfliwenliang@163.com

通讯作者: 江杰元, (Tel) 025-84391135; (E-mail) 1776556843@qq.com

先天免疫是机体抵抗感染的第一道防线^[1]。干扰素是感染细胞分泌的最重要的细胞因子, 其中 I 型干扰素与特异受体结合后可以诱导 300 多种干扰素刺激基因 (ISG) 的表达^[2]。Viperin 是近年来新发现的一种 ISG 编码的抗病毒蛋白质, 首次发现于人类巨细胞病毒 (HCMV) 感染的成纤维细胞中^[3]。2001 年, Chin 等鉴定出其基因序列并且命名编码蛋

白质为 Viperin (Virus inhibitory protein, Endoplasmic reticulum-associated, Interferon-inducible)^[4]。

已有研究结果证明 Viperin 对多种病毒具有抗性,如对 HCMV、日本脑炎病毒 (JEV)^[5]、西尼罗河病毒 (WNV)^[6]、丙型肝炎病毒 (HCV)^[7]、登革热病毒 (DENV)^[8] 和呼吸道合胞病毒^[9] 等具有抗性。在某些情况下,它还在细胞内信号转导通路中扮演重要角色^[10]。但这些研究均使用小鼠或人 Viperin 为研究对象,尚未有猪 Viperin 功能及其抗病毒活性的研究报道。本研究扩增猪 Viperin 基因,构建真核表达质粒,转染 PK-15 细胞构建稳定表达 Viperin 的细胞系,研究蛋白质的表达与亚细胞定位,为进一步研究 Viperin 的功能及其抗病毒活性奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

pEGFP-C1 载体购自 Clontech 公司,限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Sal* I、T4 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,TransZol UP 试剂、预染蛋白质 Marker、HRP 标记羊抗小鼠 IgG (H+L)、DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司,质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,G418 购自 Sigma 公司,兔抗 Viperin 多克隆抗体购自 Abcam 公司,GFP 标签单抗、内质网特异性探针 ER-Tracker、红细胞裂解液和细胞裂解液购自碧云天生物技术研究 所。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 Viperin 序列信息,用 Primer 5.0 软件设计合成特异性引物扩增 Viperin 编码区,引物 VF 序列为 5'-GCTGCCATGTGGACACTGGTAC-3',VR 为 5'-ATCCAGTCCCGTCTGGTCC-3'。然后设计引物 VF1 (5'-GATAGATCTATGTGGACACTGGTAC-3') 与 VR1 (5'-ATTGTGCGACTCACCAGTCAGCTTCAGGTCC),下划线部分分别为 *Bgl* II 和 *Sal* I 位点。以上引物由南京思普金生物科技有限公司合成。

1.3 Viperin 基因片段的扩增

使用红细胞裂解液按照说明书分离猪外周血单核细胞 (PBMCs),加入新城疫病毒 (NDV, Lasota

株)刺激 24 h 后,使用 TransZol UP 试剂按照说明书提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应,反应体系如下:2 \times R-Mix buffer 10.0 μ l,上游、下游引物 (10 pmol/L) 各 0.5 μ l,酶 *E*-Mix 0.4 μ l, RNA 4.0 μ l,灭菌双蒸水 4.6 μ l。RT-PCR 反应条件为:45 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。以 RT-PCR 产物为模板,用引物 VF1/VR1 进行 PCR 扩增,反应体系如下:10 \times Buffer 2.5 μ l,上游、下游引物 (10 pmol/L) 各 1.0 μ l,dNTPs 2.0 μ l,*Taq* 酶 0.5 μ l,模板 0.5 μ l,灭菌双蒸水 17.5 μ l。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。切下含 Viperin 基因 DNA 片段的凝胶放入灭菌的 1.5 ml 离心管。按照胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。

1.4 重组表达质粒的构建及鉴定

将回收的目的基因用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切,回收纯化之后与同样酶切处理的 pEGFP-C1 质粒 4 $^{\circ}$ C 过夜连接,转化 DH5 α 感受态细胞,涂布于含卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养。挑取平板上的菌落培养,提取质粒经 PCR 以及 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切鉴定,阳性质粒命名为 pEGFP-*Vi*,送南京思普金生物科技有限公司进行测序。

1.5 PK-15 细胞的转染与 Viperin 亚细胞定位检测

将 PK-15 细胞接种于 24 孔细胞培养板,当细胞的汇合度达到 80% 时进行转染。按照说明书制备 pEGFP-*Vi* 和 pEGFP-C1 与脂质体的混合物,静置 5 min 后加入细胞培养液中,转染后 24 h,将细胞置于荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况。进一步将 PK-15 细胞接种于盖玻片培养 24 h,待细胞长满单层后进行转染,48 h 后弃去细胞培养基,以 PBS 洗涤细胞 3 次后,加入 10 ng/ml 的特异内质网红色探针 ER-Tracker 染色,20 min 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次后,置于激光共聚焦显微镜下观察,检测 Viperin 与内质网的定位关系。

1.6 细胞株的构建

在转染 48 h 后,转染细胞经胰酶消化转入新的 24 孔培养板内培养,添加含有 600 μ g/ml G418 的 DMEM 培养液进行筛选,每 3 d 更换 1 次培养液,每

天观察细胞的生长状况和克隆形成情况。通过荧光显微镜检测表达绿色荧光的细胞克隆,将阳性克隆消化后计数,再亚克隆至 96 孔板,添加含有 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 DMEM 培养液继续筛选,直至出现 100% 表达绿色荧光克隆的出现,将该克隆在含有 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 DMEM 培养液中逐步扩大培养,获得稳定表达 Viperin 蛋白的细胞株,命名为 PK-Vi,连续传代 10、15、20 代分别检测目的蛋白质的表达情况。同法转染 pEGFP-C1 构建表达 GFP 的细胞系 PK-C1。

1.7 重组蛋白质的 Western blot 鉴定

收获 PK-Vi 与 PK-C1 细胞,离心去除培养液,加入细胞裂解液裂解后与 Loading buffer 混合煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE。结束后,采用半干转印的方法将蛋白质转印至 NC 膜(Pall)上,用含 1% BSA 的 PBST 封闭 2 h,加入 1/1 000 稀释的 GFP-Tag mAb 或 1/500 稀释的兔抗 Viperin 多抗室温孵育 2 h, PBST 洗涤 5 次,加入 1/1 000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP 或羊抗兔 IgG-HRP,室温轻摇 1.5 h, PBST 洗涤 5 次,用 DAB 显色试剂盒显色。

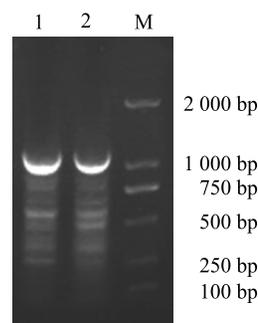
2 结果

2.1 Viperin 基因扩增

以 NDV 刺激 24 h 后的猪 PBMCs 总 mRNA 为模板进行 RT-PCR,成功扩增出 Viperin 基因片段。经电泳检测,扩增出的特异性片段大小约 1 150 bp,与预期结果一致(图 1)。将其克隆入 pMD18-T 载体,测序鉴定结果表明,该序列与 GenBank 中已有序列的同源性为 99%,编码区全长为 1 089 bp,共编码 361 个氨基酸。以该片段为模板用引物 VF1/VR1 进行 PCR 扩增,获得约 1.1 kb 片段(图 2),用于重组表达质粒的构建。

2.2 重组质粒的构建

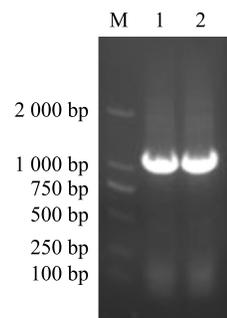
将回收的 PCR 产物和 pEGFP-C1 均用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切,连接后转化 DH5 α 感受态细胞,挑取克隆提取质粒,经 PCR 和双酶切鉴定,Viperin 基因成功克隆至 pEGFP-C1 中(图 3),将重组质粒命名为 pEGFP-Vi。测序结果表明,Viperin 基因被正确克隆,没有碱基的突变和缺失,且符合质粒 EGFP 蛋白质阅读框。



1,2:以 PBMCs 为模板的 RT-PCR 扩增产物;M:DNA 分子量标准 DL2000。

图 1 Viperin 基因的 RT-PCR 扩增

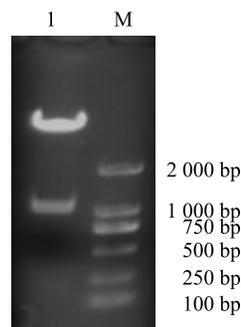
Fig.1 RT-PCR amplification of Viperin gene



1,2:以 RT-PCR 产物为模板的 PCR 扩增产物;M:DNA 分子量标准 DL2000。

图 2 Viperin 编码区的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of Viperin coding region



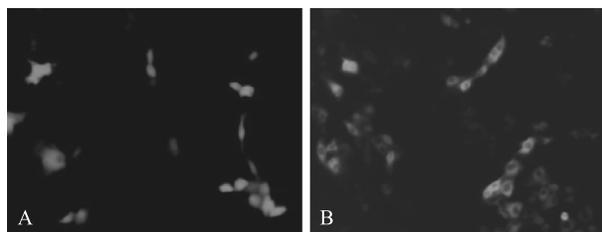
1:pEGFP-Vi 质粒 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切产物;M:DNA 分子量标准 DL2000。

图 3 pEGFP-Vi 的双酶切鉴定

Fig.3 Enzyme digestion of pEGFP-Vi

2.3 质粒转染与重组蛋白质的亚细胞定位

将重组质粒与 pEGFP-C1 对照质粒转染 PK-15 细胞,通过荧光倒置显微镜观察绿色荧光蛋白质的表达情况。结果显示,表达融合蛋白质 EGFP-Viperin 的荧光信号主要分布在细胞质中,而空质粒转染单纯表达 EGFP 的细胞荧光均匀分布于细胞内部(图 4)。



A:pEGFP-C1 转染 PK-15;B:pEGFP-Vi 转染 PK-15。

图 4 重组质粒转染 PK-15 细胞

Fig.4 Transfection of PK-15 cells with recombinant plasmid

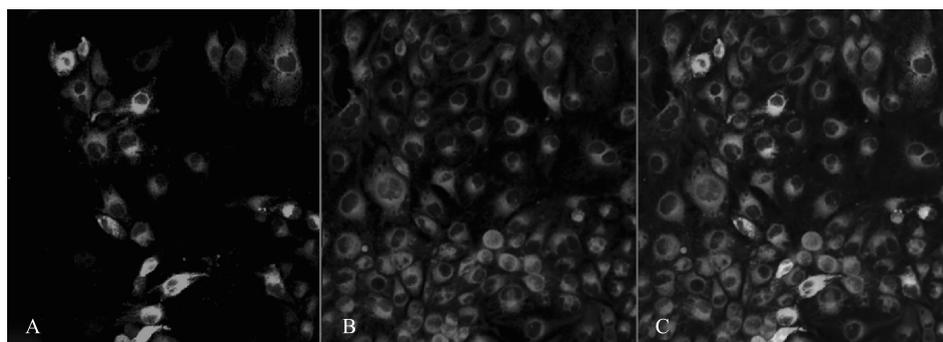
共聚焦检测结果显示,融合蛋白质 EGFP-Viperin 的绿色荧光和内质网标记物的红色荧光能够重合显示橙黄色(图 5),说明重组 Viperin 蛋白质定位于内质网上。

2.4 细胞系的建立

经过 G418 筛选与克隆传代,获得表达绿色荧光蛋白质的单克隆,将其逐步扩大培养获得稳定表达的细胞系 PK-C1 和 PK-Vi(图 6)。连续传代 10、15、20 代后,荧光表达部位、强度没有显著变化。

2.5 重组蛋白质的 Western blot 鉴定

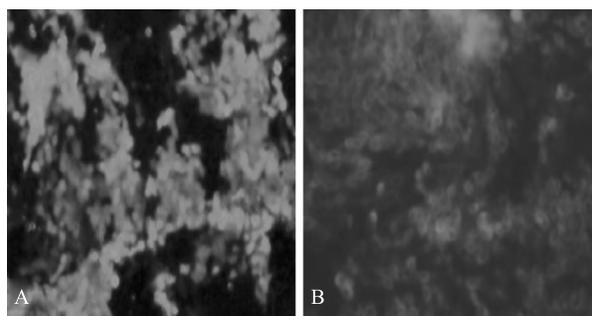
Western blot 检测结果表明,EGFP 蛋白质的分子质量约为 2.8×10^4 ,融合蛋白质 EGFP-Viperin 的分子质量为 7.0×10^4 ;采用兔抗 Viperin 多抗检测,仅 EGFP-Viperin 获得 7.0×10^4 的条带,而 EGFP 对照蛋白质无条带(图 7)。说明 Viperin 基因在所构建的 PK-Vi 细胞株中均得到了很好的表达。



A:PK-C1 细胞;B:PK-Vi 细胞;C:A、B 叠加结果。

图 5 重组 Viperin 蛋白质亚细胞定位检测

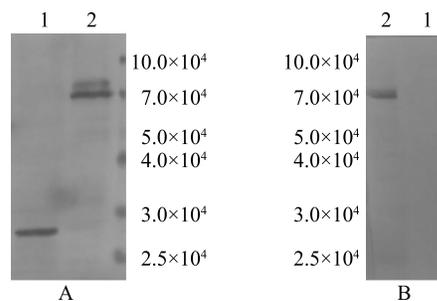
Fig.5 Detection of the subcellular localization of recombinant Viperin protein



A:PK-C1;B:PK-Vi。

图 6 PK-C1 和 PK-Vi 细胞系的构建

Fig.6 Construction of PK-C1 and PK-Vi cell lines



A:GFP 单抗检测;B:Viperin 多抗检测。1:PK-C1 细胞;2:PK-Vi 细胞。

图 7 重组蛋白质表达的 Western blot 分析

Fig.7 Western blot analysis of the expression of recombinant protein

3 讨论

Viperin 由 360 或 361 个氨基酸构成,主要可分为 3 个功能区:N 端 42 个氨基酸的双亲 α 螺旋结构,定位于粗面内质网膜上引起膜曲率的变化,影响可溶性蛋白质的分泌,与抗病毒活性相关,该区域变异较大;中间的 CX3CX2C 基序,是 SAM-依赖激酶超家族的常见结构,因此 Viperin 又被称为 RSAD2 (Radical SAM domain-containing 2);C 端区域较为保守,也与抗病毒活性相关^[11]。已有的研究结果表明 Viperin 可以通过多种机制抑制病毒复制,3 个功能区均可能独立或共同参与抗病毒作用^[1]。

本试验通过比对分析 GenBank 中小鼠、人、猪 Viperin 基因序列,设计包含完整阅读框的第 1 轮 RT-PCR 引物,该引物不包含酶切位点以提高扩增效率;同时分离猪 PBMCs,使用干扰素诱导型病毒 NDV 为刺激物对 PBMCs 进行刺激,促使 Viperin 的转录翻译,提高 RT-PCR 扩增效率。结果表明,该方法切实有效,虽然有许多非特异扩增条带,但所获得的目的条带比未刺激时明显增强。在此基础上,设计包含酶切位点的第 2 轮扩增引物,以其为模板进行套式 PCR 扩增,获得单一目的基因条带。将该产物回收后成功克隆到真核质粒 pEGFP-C1 中。

本研究使用 pEGFP-C1 作为表达质粒,目的基因与 EGFP 融合表达,通过观察绿色荧光评价重组蛋白质的表达情况,便于后续的鉴定筛选。重组质粒转染 PK-15 细胞后,绿色荧光主要分布于细胞质中,而对照质粒表达的绿色荧光则均匀分布在整个细胞中。共聚焦检测结果表明重组蛋白质与内质网存在共定位。这表明标签蛋白质 EGFP 在 Viperin 蛋白质的 N 端融合表达不影响 Viperin 在细胞中正常的定位,不会影响其功能的发挥。质粒转染 PK-15 细胞后经过 G418 筛选、克隆、检测、传代获得稳定表达 Viperin 的细胞系 PK-Vi,Western blot 鉴定结果显示融合蛋白质 EGFP-Viperin 的分子量约为

7.0×10^4 ,表明重组蛋白质以正确的形式表达。细胞系连续传代 10、15、20 代后,荧光表达的位置和强度没有显著变化,说明目的基因能够稳定存在并表达。本研究构建的猪 Viperin 真核表达质粒和 PK-Vi 细胞系,将为以后 Viperin 蛋白质的免疫学功能研究奠定基础。

参考文献:

- [1] FITZGERALD K A. The interferon inducible gene: Viperin [J]. J Interf Cytok Res, 2011, 31(1): 131-135.
- [2] DER S D, ZHOU A, WILLIAMS B R, et al. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays [J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 15623-15628.
- [3] MATTIJSEN S, PRUIJN G J. Viperin, a key player in the antiviral response [J]. Microbes Infect, 2012, 12:419-426.
- [4] CHIN K C, CRESSWELL P. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus [J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98: 15125-15130.
- [5] CHAN Y L, CHANG T H, LIAO C L, et al. The cellular antiviral protei Viperin is attenuated by proteasome-mediated protein degradation in Japanese encephalitis virus-infected cells [J]. J Virol, 2008, 82: 10455-10464.
- [6] SZRETTER K J, BRIEN J D, THACKRAY L B, et al. The interferon-inducible gene Viperin restricts west nile virus pathogenesis [J]. J Virol, 2011, 85: 11557-11566.
- [7] HELBIG K J, LAU D T, SEMENDRIC L, et al. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies Viperin as a potential antiviral effector [J]. Hepatology, 2005, 42: 702-710.
- [8] FINK J, GU F, LING L, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2007, 1: 86.
- [9] JUMAT M R, HUONG T N, RAVI L I. Viperin protein expression inhibits the late stage of respiratory syncytial virus morphogenesis [J]. Antiviral Res, 2015, 114:11-20.
- [10] SEO J Y, YANEVA R, CRESSWELL P, et al. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication [J]. Cell Host Microbe, 2011, 10: 534-539.
- [11] HELBIG K J, BEARD M R. The role of viperin in the innate antiviral response [J]. J Mol Biol, 2014, 426(6): 1210-1219.

(责任编辑:张震林)