

韩凯凯,李文良,李 银,等. 鸭 *viperin* 基因的克隆、表达及 Viperin 蛋白的抗病毒活性[J].江苏农业学报,2017,33(5):1099-1104.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.021

鸭 *viperin* 基因的克隆、表达及 Viperin 蛋白的抗病毒活性

韩凯凯, 李文良, 李 银, 毕可然, 刘宇卓, 刘青涛, 赵冬敏, 杨 婧, 黄欣梅
(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: Viperin 蛋白是一种由 I 型和 II 型干扰素诱导的宿主蛋白,广泛存在于各类动物体内,在进化上高度保守。本研究以鸭外周血淋巴细胞为原材料,通过 RT-PCR 扩增得到 *viperin* 基因,同时构建真核表达质粒 pEGFP-N1-*viperin*,转染至 DF-1 细胞,用坦布苏病毒攻击后,检测该病毒在转染质粒组和转染空载体组细胞中的增殖情况。结果表明,鸭 *viperin* 基因开放阅读框为 1 092 bp,编码蛋白由 363 个氨基酸构成。转染结果显示,*viperin* 基因在 DF-1 细胞中成功表达。坦布苏病毒攻击后,与转染空载体组相比,转染 pEGFP-N1-*viperin* 组显著抑制了坦布苏病毒在 DF-1 细胞中的增殖。说明鸭 Viperin 蛋白作为抗病毒蛋白,具有良好的抑制坦布苏病毒增殖的作用。本试验结果为鸭 Viperin 蛋白抗病毒生物学功能的进一步研究奠定了良好基础。

关键词: *viperin* 基因; 坦布苏病毒; 抗病毒活性

中图分类号: S858.32

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)05-1099-06

Cloning and expression of duck *viperin* gene and preliminary study on the antiviral activity of Viperin protein

HAN Kai-kai, LI Wen-liang, LI Yin, BI Ke-ran, LIU Yu-zhuo, LIU Qing-tao, ZHAO Dong-min, YANG Jing, HUANG Xin-mei

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

Abstract: Viperin is a kind of host cellular protein induced by type I and type II interferon, which is found in a wide range of organisms, and is highly conserved in evolution. In this research, we had cloned a full-length open reading frame (ORF) of duck *viperin* gene from peripheral blood mononuclear cells using RT-PCR. The *viperin* gene was successfully subcloned into eukaryotic expression vector pEGFP-N1-*viperin* and transfected into DF-1 cells. After challenged with duck Tembusu virus, the virus replication was analyzed between pEGFP-N1-*viperin* transfection group and empty vector transfection group. The results showed that duck *viperin* gene was amplified and containing 1 092 bp. Transfection results showed that eukaryotic expression vector pEGFP-N1-*viperin* was successfully expressed in DF-1 cells. Viperin was able to limit the

infection of duck Tembusu virus and the virus infection was significant lower than that of the control group. These results indicated that the duck Viperin had well antiviral activity, and it would lay foundations for further research for antiviral biological functions of Viperin.

Key words: *viperin*; Tembusu virus; antiviral activity

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502101);江苏省自然科学基金项目(BK20130710)

作者简介: 韩凯凯(1983-),男,河南新乡人,博士,副研究员,主要从事家禽病毒分子生物学研究。(Tel) 025-84390047; (E-mail) hankk0917@126.com

通讯作者: 李 银, (Tel) 025-84391687

干扰素应答是抵御病毒感染的第一道防线,其中 I 型干扰素可与细胞表面特定受体结合,激活 JAK-STAT 级联信号放大系统,诱导相关效应器的表达,产生抗病毒蛋白。Viperin 是其中一种重要的抗病毒蛋白,最早在感染人细胞巨化病毒的成纤维细胞中被发现^[1]。Viperin 一级结构具有 3 个不同的区域:N 末端(长度和序列随物种变化而变化的区域)、中央保守区域(又称 SAM 区域)以及高度保守的 C 末端^[2]。除了人细胞巨化病毒外,还有十几种病毒可诱导 Viperin 表达,包括仙台病毒、水泡性口炎病毒、丙肝病毒、伪狂犬病毒、日本脑炎病毒、辛德毕斯病毒和西尼罗病毒等^[3-6]。Viperin 对不同病毒的抗病毒机制不同,其中关于 Viperin 对丙肝病毒影响的报道比较多,Viperin 蛋白亚细胞定位可通过 N 端将 Viperin 蛋白定位在细胞的内质网(ER)、脂滴以及线粒体上。病毒核蛋白 C 最初定位于 ER 胞浆面,成熟后移位至脂滴。脂滴不仅是储存、运输脂质的结构,而且参与多种代谢性疾病的发生。C 蛋白使病毒非结构蛋白和复制复合物向脂滴聚集。Viperin 可能影响 ER 膜上脂质的种类和数量,进而影响病毒感染后脂滴的形成、形状以及病毒蛋白的定位,从而发挥抗病毒作用^[7]。Viperin 对流感病毒的抑制是通过破坏脂筏结构和抑制病毒的出芽释放来发挥作用的。Viperin 与法尼基焦磷酸合酶(FPPS)结合并抑制其活性,影响胆固醇和类异戊二烯的生物合成,从而破坏脂筏结构^[3]。

viperin 基因作为先天性免疫中的干扰素刺激基因,在抵御多种病原的入侵中起着重要作用,然而大多数干扰素刺激基因(ISGs)的抗病毒机制未知,Viperin 是近年来新发现的一种信号蛋白^[8]。本研究拟利用鸭 viperin 基因产物,构建鸭 viperin 基因真核表达质粒,转染至 DF-1 细胞,观察 Viperin 蛋白在真核细胞中的表达情况,然后接种坦布苏病毒,测定病毒滴度,以期为 Viperin 蛋白抗病毒活性的初步评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒、质粒和菌株

坦布苏病毒分离株(JS804)、新城疫病毒株、*E. coli* DH5 α 菌株和真核表达载体 pEGFP-N1 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶和蛋白质相对分子质量标准等均购自宝生物工程(大连)有限公司,DMEM 细胞培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司,质粒小量提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒均购自 Axygen 生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。基因序列合成、引物合成和测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中鸭 viperin 的基因序列(GenBank No. KP198582)设计 1 对 PCR 扩增引物,上游引物(VF)序列为:5'-GAATTCTGATGCATCTGGGTGCACTG-3',划线部分为引入的 *Eco* R I 酶切位点,下游引物(VR)序列为:5'-GTCGACTTAGCCAGTC-CAGTTTCAT-3',划线部分为引入的 *Sal* I 酶切位点。这对引物由南京金斯瑞生物有限公司合成,预期扩增片段大小约为 1 000 bp。

1.4 鸭 viperin 基因的克隆

参照文献[9]进行鸭外周血淋巴细胞培养。当细胞长成良好的单层后,加入新城疫病毒,于 37 ℃ 下培养 3 h,收集诱导液,然后再与 poly(I:C)一起于 37 ℃ 下联合培养 7 h。利用 Axygen 公司细胞 DNA/RNA 提取试剂盒提取总 RNA,参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将其反转录成 cDNA,备用。以鸭 viperin cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25.00 μ l,其中双蒸水 15.00 μ l,10 \times *Ex* PCR buffer 2.50 μ l,2.5 mmol/L dNTP 2.00 μ l,25.0 mmol/L $MgCl_2$ 1.50 μ l,上、下游引物(25.0 pmol/ μ l)各 1.00 μ l,cDNA 产物 1.50 μ l,*Ex Taq* (5 U/ μ l) 0.50 μ l。PCR 反应程序设置如下:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后,对 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,切取目的条带进行胶回收。纯化的 PCR 产物片段首先与 pMD18-T 克隆载体进行连接,转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。经酶切鉴定后,挑选阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物有限公司测定基因序列。

1.5 生物信息学分析

用 DNASTar 7.0 软件对不同物种的 viperin 基因序列和推导的氨基酸序列进行同源性比对,分析不同物种之间的序列差异。用 MEGA 5.0 软件构建 vi-

perin 基因的系统发育树,用 Prot-Param Tool 软件分析氨基酸组成和等电点等理化性质,用 SignallP 4.0 Server 软件分析蛋白质序列的信号肽,用 ProtScale 软件分析蛋白质的疏水性,用 Conserved domains 软件分析鸭 *viperin* 基因的保守区结构域,用 TMpred 软件分析蛋白质的跨膜区。

1.6 鸭 *viperin* 基因表达质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的构建

用 *Eco* R I+*Sal* I 双酶切阳性质粒 pMD18-T-*viperin* 和空载体 pEGFP-N1,胶回收,T4 DNA 连接酶进行连接,构建重组表达质粒 pEGFP-N1-*viperin*。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上培养 14 h,随机挑选阳性单一菌落接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中,180 r/min,14 h 后用质粒小提试剂盒提取质粒,送至金斯瑞生物科技有限公司进行测序。将鉴定正确的质粒命名为 pEGFP-N1-*viperin*,然后大量提取 pEGFP-N1-*viperin* 重组质粒,用于真核转染。

1.7 鸭 *viperin* 基因在 DF-1 细胞中的表达

采用常规复苏方法复苏 DF-1 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞。在转染前的第 24 h,将 $0.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个细胞种植到 500 μ l 无抗生素的培养基中,转染时保证 80%~90% 细胞铺满板底。参照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000TM 转染试剂盒操作说明,用 2 μ g pEGFP-N1-*viperin* 重组质粒进行转染,并设置转染空载体和不转染任何质粒的细胞为对照组。转染 4~6 h 后更换培养液,24 h 后用荧光显微镜观察并拍照记录。

1.8 Viperin 蛋白抵抗鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 感染试验

取 DF-1 细胞铺设 24 孔板,待细胞长至 80%~90%,按照 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000TM 试剂说明书将已被鉴定的阳性质粒转染到 DF-1 细胞内,转染 24 h 后,加入感染复数 (MOI) 值为 1 的坦布苏病毒 JS804 株,对 DF-1 细胞进行感染,坦布苏病毒液孵育细胞 1 h 后,移除病毒液,PBS 洗涤 1 次,同时加入 2% 胎牛血清的 DMEM 营养液继续培养 24 h。在感染 24 h 后收集细胞,采用实时定量 PCR 方法检测所收取细胞中的病毒含量。

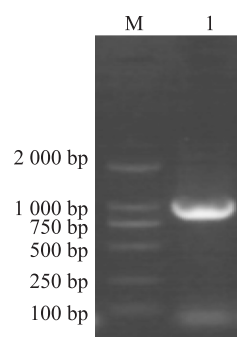
定量 PCR 中所需的 2 套引物序列信息如下:内参基因 *actin* 引物上游:5'-TTGGAGGCTCTATCCT-

GG-3',内参基因 *actin* 引物下游:5'-TAGAAG-CATTTCGGGTGG-3'。鸭 *viperin* 基因引物上游:5'-GCCGAGAGTATGCTGTTGCTT-3',鸭 *viperin* 基因引物下游:5'-AATGAGCAGGCACTGGAACAC-3'。按照 SYBR Green 一步法定量 PCR 试剂盒说明书,将处理好的 cDNA 作为样品模板,按照如下体系加样:2.00 μ l cDNA 模板,10.00 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master Mix,0.10 μ l QN ROX Reference Dye,上、下游引物各 0.56 μ l,6.78 μ l RNase-Free water。PCR 反应体系:95 $^{\circ}$ C 作用 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环。每个样品设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 鸭 *viperin* 基因的克隆与序列分析

利用特异性引物 VF 和 VR,以鸭外周血淋巴细胞为材料,以反转录得到的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,得到约 1 000 bp 的基因片段。经序列测定,*viperin* 开放阅读框长 1 092 bp,表明成功获得了鸭 *viperin* 基因的序列(图 1)。将鸭 *viperin* 基因与人 (AF442151.1)、小鼠 (AF442152)、文昌鱼 (KP979737)、鸡 (EU427332.1)、石斑鱼 (EU926745) 的 *viperin* 基因进行序列比对,发现鸭 *viperin* 基因序列与鸡 *viperin* 基因序列的同源性最高,与文昌鱼 *viperin* 基因序列的同源性最低。MEGA 5.0 软件构建的 *viperin* 基因系统发育树(图 2)显示,*viperin* 基因随哺乳类、鸟类、鱼类等物种发育进化地位的不同而表现出种属内的保守性和种属间的差异性。

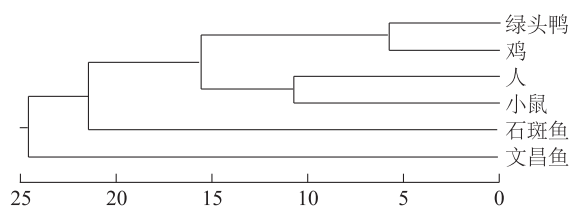


M:DNA 分子质量标准;1:鸭 *viperin* 基因的 PCR 产物。

图 1 鸭 *viperin* 基因的扩增

Fig.1 Amplification of duck *viperin* gene

采用 ProtParam 软件对 Viperin 蛋白理化性质进

图 2 鸭 *viperin* 基因的系统发育树Fig.2 Phylogenetic tree based on *viperin* gene

行分析,结果表明,*viperin* 基因编码 363 个氨基酸,蛋白分子质量为 41 500,等电点为 8.26。采用 ProtScale 软件对 Viperin 蛋白的疏水性进行分析,发现 Viperin 蛋白最大的疏水指数位于第 9 位,数值为 1.978,最小疏水指数位于第 65 位,数值为-3.800 (图 3)。利用 SignalP 4.1 Server 软件对 Viperin 蛋白信号肽的分析结果表明,鸭 Viperin 蛋白 1~19 位氨基酸为潜在的信号肽区域。用 Conserved domains 软件分析鸭 Viperin 保守区结构域,发现该蛋白存在 S-腺苷甲硫氨酸超家族,是 Viperin 蛋白上结构保守的区域。利用 Tmpred 软件分析鸭 Viperin 蛋白的二级结构,发现该蛋白存在 1 个潜在跨膜区,位于第 1~41 位氨基酸(图 4)。

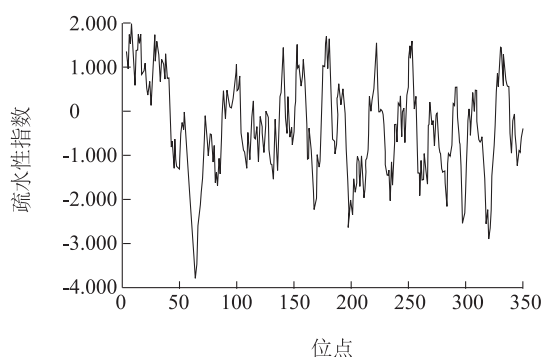
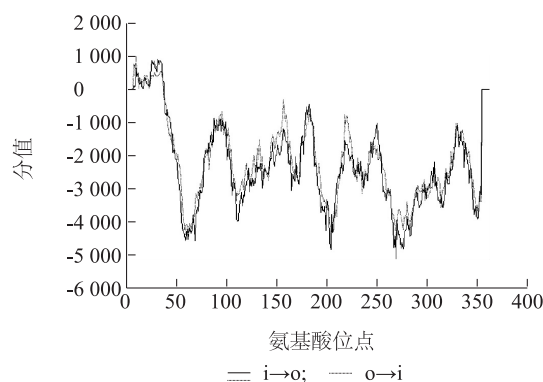


图 3 鸭 Viperin 蛋白的疏水性分析

Fig.3 Hydrophobicity analysis of duck Viperin protein

2.2 重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的构建

利用 *Eco* R I 酶和 *Sal* I 酶双酶切 pMD18-T-*viperin* 质粒,同时用这 2 种酶双酶切 pEGFP-N1 载体,将回收的基因片段与载体片段连接转化后提取质粒,利用限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Sal* I 对 pEGFP-N1-*viperin* 进行双酶切鉴定,可以获得预期

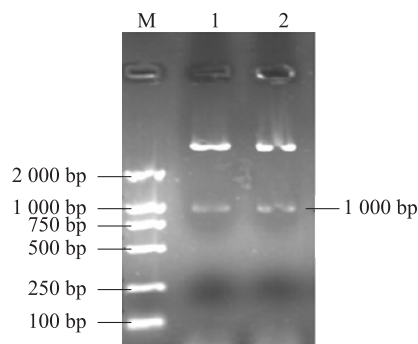


i→o 表示预测的蛋白在细胞膜由内到外;o→i 表示预测的蛋白在细胞膜由外到内。

图 4 鸭 Viperin 蛋白的二级结构分析

Fig.4 Secondary structure analysis of duck Viperin protein

1 000 bp 大小的目的片段(图 5),与理论值相符。质粒测序结果表明,pEGFP-N1-*viperin* 重组质粒构建成功。

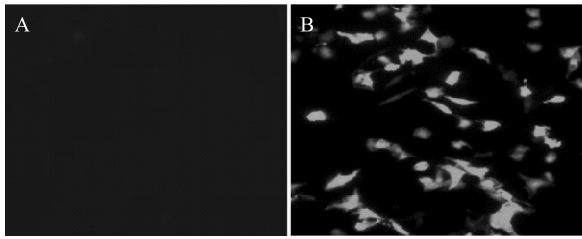
M: DNA 分子质量标准;1,2: 阳性重组质粒 pEGFP-N1-*viperin*。图 5 重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的酶切鉴定Fig.5 Identification of recombinant plasmid pEGFP-N1-*viperin* by enzyme digestion

2.3 重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的表达

将构建好的真核表达质粒 pEGFP-N1-*viperin* 转染至 DF-1 细胞,转染后第 24 h 换液观察,未转染质粒的对照组细胞无任何荧光信号,转染重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的细胞有明显的绿色荧光(图 6),这表明 *viperin* 基因和 *EGFP* 基因可以在 DF-1 细胞内表达。

2.4 鸭 Viperin 蛋白对 DTMUV 增殖的抑制

将 pEGFP-N1-*viperin* 和空载体 pEGFP-N1 分别

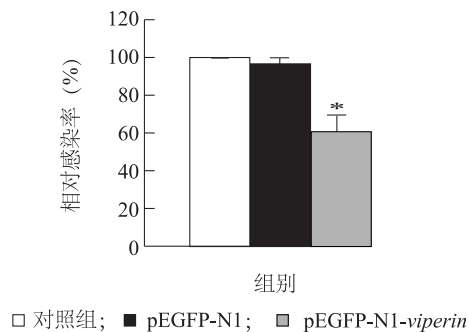


A: 未转染任何质粒的细胞; B: 转染重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 的细胞。

图 6 重组质粒 pEGFP-N1-*viperin* 在 DF-1 细胞中的表达

Fig.6 The expression of pEGFP-N1-*viperin* plasmid in DF-1 cells

转染至 DF-1 细胞, 24 h 后接种 DTMUV JS804 株 ($MOI=1$), 接种 24 h 后收样, 提取总 RNA, 用相对定量法检测细胞中病毒的含量。结果(图 7)表明, pEGFP-N1-*viperin* 转染孔的 DTMUV 相对病毒含量低于空载体转染孔和未转染任何质粒的转染孔的 DTMUV 相对病毒含量, 说明鸭 Viperin 蛋白对 DTMUV 的增殖有抑制作用。



对照组: 未转染任何质粒的细胞。*: 转染 pEGFP-N1-*viperin* 的细胞对 DTMUV 的相对感染率与转染空载体 pEGFP-N1 和未转染任何质粒的细胞对 DTMUV 的相对感染率差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 Real-time PCR 检测鸭坦布苏病毒在不同组别 DF-1 细胞中的复制

Fig.7 The impact of duck Viperin on duck Tembusu virus proliferation by Real-time PCR

3 讨论

坦布苏病毒病最早爆发于 2010 年, 传播迅速, 对鸭、鹅危害大, 给中国水禽业造成了巨大的

经济损失。坦布苏病毒属于黄病毒科黄病毒属, 是不分节段的单股正链 RNA 病毒, 该病毒属还包括日本脑炎病毒、黄热病毒、西尼罗河病毒和登革病毒等。随着生物学技术的发展, 人们开始重视对家禽机体抗病毒基因的发掘, 以期为家禽病毒性疾病的防控开辟一条新途径。Viperin 作为一种能被干扰素诱导的抗病毒蛋白, 对多种病毒有抑制作用, 而且抑制机制各不相同。Viperin 可以通过将 C 端结构域与登革病毒非结构蛋白 NS3 结合来抑制病毒复制, 但是如果在 C 末端保守性色氨酸后添加分子标记(如融合 1 个 Flag 标签), 可能会导致该蛋白抗登革病毒(DENV)功能丧失。缺失 N 端 50 个氨基酸对 Viperin 抑制 DENV 和西尼罗河病毒(WNV)无显著影响, 表明 N 端结构域不是 Viperin 抗 DENV 和 WNV 的关键结构域^[10]。在森林脑炎病毒的研究中发现, Viperin 通过 N 端定位到 ER 和 C 端与细胞质 Fe/S 蛋白组装因子结合, 再通过 SAM 结构域的酶抑制森林脑炎病毒 RNA 的合成, 起到抗病毒作用^[11]。但是对于同属于黄病毒属的坦布苏病毒来说, 关于 Viperin 是否同样具有抗病毒活性, 其抗病毒活性是怎样发挥出来的等问题的相关报道较少。

本研究通过采集鸭外周血淋巴细胞, 克隆鸭的 *viperin* 基因, 对鸭 *viperin* 基因序列及其编码的蛋白理化性质、疏水性、二级结构、保守区结构域和信号肽的比对分析。结果显示, 该基因随物种发育进化地位的不同而表现出种属内保守性和种属间差异性。鸭 Viperin 蛋白是由 363 个氨基酸构成的保守蛋白, 存在 1 个潜在跨膜区, 1~19 位氨基酸为潜在的信号肽区域。构建的 pEGFP-N1-*viperin* 质粒在 DF-1 细胞中成功表达, 为 Viperin 专性表达细胞系的构建和鸭 Viperin 蛋白抗坦布苏病毒分子机制的研究奠定了基础。鸭 Viperin 蛋白对 DTMUV 的增殖有一定抑制作用, 至于鸭 Viperin 蛋白是如何发挥这种抑制作用的还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] MATTIJSSEN S, PRUIJN G J M. Viperin, a key player in the an-

- tiviral response[J]. *Microbes and Infection*, 2012, 14(5): 419-426.
- [2] DUSCHENE K S, BRODERICK J B. The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(6): 1263-1267.
- [3] TAN K S, OLFAT F, PHOON M C, et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the antiviral activities of viperin against influenza H1N1 virus infection[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(6): 1269-1277.
- [4] ZHANG Y, BURKE C W, RYMAN K D, et al. Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(20): 11246-11255.
- [5] SZRETTTER K J, BRIEN J D, THACKRAY L B, et al. The interferon-inducible gene *viperin* restricts West Nile virus pathogenesis[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(22): 11557-11566.
- [6] CARLTON-SMITH C, ELLIOTT R M. Viperin, MTAP44, and protein kinase R contribute to the interferon-induced inhibition of Bunyamwera Orthobunyavirus replication[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(21): 11548-11557.
- [7] WANG S, WU X, PAN T, et al. Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33[J]. *Journal of General Virology*, 2012, 93(1): 83-92.
- [8] 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.
- [9] 谢昆,蒋成砚,全舒舟,等. 鸡外周血淋巴细胞的分离和体外培养[J]. *中国家禽*, 2011, 33(11): 57-58.
- [10] JIANG D, WEIDNER J M, QING M, et al. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(16): 8332-8341.
- [11] UPADHYAY A S, VONDERSTEIN K, PICHLMAIR A, et al. Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity[J]. *Cellular Microbiology*, 2014, 16(6): 834-848.

(责任编辑:王妮)