

文章编号: 1674-5566(2012)04-0502-07

草鱼抗病毒基因 *Mx* 全长 cDNA 的克隆、序列分析与真核表达载体构建

刘 莉, 刘 鹏, 金佳丽, 吴海丽, 王改改, 江 晨, 采克俊

(湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000)

摘 要: *Mx* 蛋白是一类由 I 型干扰素 (IFN) 诱导表达的抗病毒蛋白。以 PolyI:C 诱导的草鱼 (*Ctenopharyngodon indellus*) 肾细胞 (CIK cells) 为材料, 抽提细胞总 RNA, 通过 RT-PCR 的方法扩增出 *Mx* 基因 cDNA 全序列, 连接至 pMD20-T 载体上, 构建重组质粒 pMD20-T-*Mx*, 并测序进行序列分析。用限制性内切酶从克隆的重组质粒 pMD20-T-*Mx* 上切下 *Mx* 基因, 插入到质粒 pEGFP-C1 中, 构建真核表达载体 pEGFP-C1-*Mx*。结果显示, 该基因 cDNA 全序列为 1 921 bp, 阅读框共编码 627 个氨基酸, 分子量约为 71.1 ku, 理论等电点 pI 为 8.33, 其编码的 *Mx* 蛋白具有脊椎动物 *Mx* 蛋白共有的结构特征: 一个三联体 GTP 结合区域和一个发动蛋白家族的典型结构特征序列。生物信息学分析表明, 草鱼 *Mx* 基因所编码的蛋白质以亲水区域为主, 具有丰富的 B 细胞抗原位点, 但无明显的核定位序列, 空间结构包括 N 端的 GTP 酶结构域 (GTPase domain)、中间的中央相互作用结构域 (central interactive domain, CID) 和 C 端的 GTP 酶效应结构域 (GTPase effector domain, GED)。同源性分析显示, 草鱼 *Mx* 蛋白氨基酸序列和其他物种的相似性为 45.1%~99.7%。此外还成功构建了含草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列的真核表达载体 pEGFP-C1-*Mx*。

研究亮点: 首次通过干扰素诱生剂 PolyI:C 诱导草鱼肾细胞的方法克隆得到了草鱼抗病毒基因 *Mx* cDNA 全序列, 并且借助生物信息学软件对其编码的氨基酸进行了序列分析, 还成功构建了真核表达载体 pEGFP-C1-*Mx*, 为进一步研究草鱼 *Mx* 蛋白的生物学活性及其在抗鱼类病毒性疾病中的应用奠定基础。

关键词: 草鱼; *Mx* 基因; 克隆; 序列分析; 载体构建

中图分类号: S 917

文献标志码: A

随着渔业的迅速发展和其集约化程度的提高, 与此带来的鱼类病害问题也日益突出和严重, 尤其是病毒引起的大规模暴发性传染病更是给水产养殖业带来了沉重的打击。目前, 在防治鱼类病毒病方面, 抗病毒药物种类少, 效果不明显, 主要为化学类药物, 且极易造成因药物使用不当造成药物残留、环境恶化乃至最终会影响食品安全等问题^[1-2]。*Mx* (Myxovirus resistance) 蛋白是由 LINDENMANN^[3] 发现的一类由 I 型干扰素 (Interferon, IFN) 诱导的抗病毒蛋白, 属于大 GTP 酶的发动蛋白超家族, 其分子量一般为 70~80 ku, 具有特异性强、表达稳定、抗病毒作用直接等特点^[4-5]。目前已相继在多种鱼类中发现了具有部分抗病毒活性的 *Mx* 蛋白, 如大西洋鲑

(*Salmo salar*)、石斑鱼 (*Epinephelus* sp.)、澳洲肺鱼 (*Neoceratodus forsteri*) 等^[6-8]。白俊杰等人采用鳃传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 感染草鱼后克隆得到其 *Mx* 基因 cDNA 全序列 (GenBank 登录号为 AY395698), 但未见后续的研究报道。本研究首次采用干扰素诱生剂 PolyI:C 诱导草鱼肾细胞的方法^[9], 克隆获得草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列并借助生物软件分析了序列信息; 同时考虑到 *Mx* 蛋白在胞内发挥抗病毒效应的特点, 构建携带绿色荧光蛋白和草鱼 *Mx* 融合基因的真核表达质粒 pEGFP-C1-*Mx*, 为进一步开展草鱼 *Mx* 蛋白的功能性研究及其在抗鱼类病毒性疾病中的应用奠定基础。

收稿日期: 2011-10-21 修回日期: 2011-12-20

基金项目: 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 项目 (2010R425022); 浙江省自然科学基金 (Y3090561, Y3110432); 湖州市自然基金项目 (2008YZ01)

作者简介: 刘 莉 (1972—), 女, 副教授, 研究方向为鱼类病害防治。E-mail: Liuli6655@hutc.zj.zn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株

质粒 pEGFP-C1, 传代培养的草鱼肾细胞 (*Ctenopharyngodon indellus* kidney cells, CIK 细胞) 以及大肠杆菌 DH5 α 均由湖州师范学院细胞工程研究所提供。

1.1.2 试剂

PolyI: C 购自 Sigma 公司, 高糖 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 限制性内切酶、T₄ DNA ligase、Alkaline Phosphatase (Shrimp)、pMD20-T Vector、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 均购自 Takara 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒均为杭州 Axygen 公司产品, Trizol 试剂购自上海 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Mx* 蛋白的诱导表达

将传代培养的 CIK 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于培养板中, 置于 27 °C、饱和湿度条件下培养。当细胞汇片至 70% ~ 80 % 时, 向每孔加入含 PolyI: C (终浓度为 100 μ g/mL) 的培养液 (无双抗、血清), 取 3 个孔分别处理 12 h、36 h、48 h, 留一孔做阴性对照组。在倒置显微镜下观察实验组和对照组细胞生长情况并照相记录。

1.2.2 *Mx* 基因全序列的克隆、测序

根据 GenBank 中草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列 (AY395698) 为模板设计引物, 并由上海 Invitrogen 公司合成。其中正向引物 *Mx*-F: 5'-AGAAATGCACAACTTGGACAGGA-3', 反向引物 *Mx*-R: 5'-ACATAGGCGTCCGCTGGTGAA-3'。

经 PolyI: C 诱导的 CIK 细胞参照 Trizol 试剂说明书抽提总 RNA。采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 反转录合成草鱼 *Mx* cDNA 第一条链; 反转录产物在 99 °C 预变性 3 min, 然后在 94 °C 30 s、60.6 °C 30 s、72 °C 3 min 50 s 的条件下进行 35 个循环, 最后延伸 10 min。使用试剂盒回收 PCR 产物并将其连接到 pMD20-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。筛选抗性菌落培养并抽提质粒, 经酶切和 PCR 鉴定, 筛选阳性重组子。最后将重组质粒送至上海 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 序列分析

利用 Vector NTI 7.0 寻找草鱼 *Mx* cDNA 全序列的开放性阅读框, 并推测其编码的蛋白序列; 使用 DNASTar 5.0 的 Protean 程序预测其蛋白结构; 选用 DNASTar 5.0、MEGA 4 等软件把其氨基酸序列与其他物种的进行比对; 选用 InterProScan (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)、PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 在线分析工具分别预测其结构域和核定位信号序列 (nuclear localization signal sequence, NLS)。

1.2.4 重组质粒的构建

提取质粒 pMD20-T-*Mx* 和 pEGFP-C1, 采用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xba* I 分别对两种质粒双酶切, 回收 *Mx* 目的基因片段和 pEGFP-C1 载体片段, 然后利用 T₄ DNA ligase 连接, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞。转化子经 PCR 筛选后, 提取质粒, 采用酶切和 PCR 鉴定重组质粒。

2 结果

2.1 PolyI: C 诱导对 CIK 细胞生长的影响

分别于 12 h、36 h、48 h 后在倒置显微镜下观察经 PolyI: C 诱导处理的 CIK 细胞形态特征并拍照记录 (图 1)。与正常的 CIK 细胞相比, 经 PolyI: C 处理的细胞在 12 h 后相对正常; 在 36 h 后部分细胞呈现梭形或不规则三角形, 且有少量细胞脱落死亡; 在 48 h 后细胞变得稀疏、细长, 且有大片细胞脱落死亡。其中诱导 36 h 的 CIK 细胞开始发生了较大的形态变化, 后续实验将其作为抽提总 RNA 的材料。

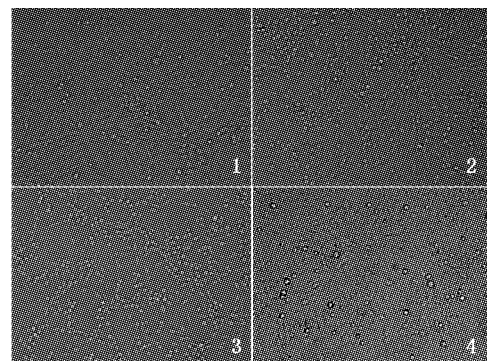


图 1 Poly I : C 作用不同时间的 CIK 细胞形态 (200 \times)

Fig. 1 The morphology of CIK cells which were treated with Poly I : C in different periods (200 \times)

1. 12 h; 2. 36 h; 3. 48 h; 4. 对照组。

2.2 *Mx* 基因的克隆和序列分析

2.2.1 *Mx* 基因的克隆

用 Trizol 试剂抽提经 PolyI: C 诱导 36 h 后的 CIK 细胞的总 RNA, 以总 RNA 为模板经 RT-PCR 扩增后获得草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列, 电泳鉴定为 2 000 bp 左右的目的条带(图 2)。之后, 将该片段连接至 pMD20-T 载体上, 得到草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列的重组克隆载体 pMD20-T-*Mx*。

2.2.2 *Mx* 基因的序列分析

测序结果显示草鱼 *Mx* cDNA 全长为 1 921 bp, 其中开放阅读框位于 38 ~ 1 921 bp 处, 共编码 627 个氨基酸, 分子量为 71.1 ku, 理论等电点 $pI = 8.33$, 包含有一个三联体 GTP 结合区域 GDQSSGKS、DLPG、TKPD (GXXXSGKS/T、DXGX、T/NKXD, X 代表任意氨基酸) 和一个发动蛋白家族签名序列 LPRGTGIVTR (LPRGS/KGIVTR) (图

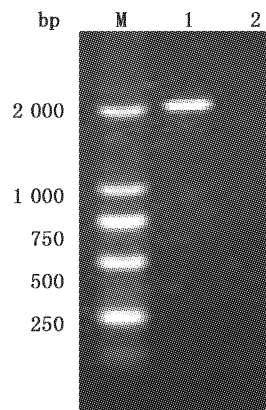


图 2 草鱼 *Mx* 基因 RT-PCR 扩增产物

Fig. 2 RT-PCR product of grass carp *Mx* gene

M. DL 2000 DNA marker; 1. 诱导组; 2. 未诱导组。

3), 这些是已知的脊椎动物 *Mx* 蛋白共有结构特征。用 PSORT II 程序预测表明草鱼 *Mx* 蛋白不存在明显的核定位信号序列 NLS。

```

1 ACATAGGCGTCGCTGGTGAACACTGAACAGAGTTCAGAC
38 ATG TCT CCA AGC ACT TCT TCA AAG GGA AAG AGT AGT GGT CTG AAC CAG CAC TAT GAA GAG AAG GTG CGC CCA TGC
1 M S P S T S S K G K S S G L N Q H Y E E K V R P C
113 ATT GAC CTA GTG GAC TCA CTC AGG TCA TTA GGT GTA GAA AAG GAC CTG AAC CTG CCA GCT ATT GCT GTC ATA GGT
26 I D L V D S L R S L G V E K D L N L P A I A V I G
188 GAC CAG AGC TCA GGA AAG AGT TCT GTG TTG GAA GCC CTG TCT GGA GTG GCG CTG CCT AGG GGA ACA GGT ATT GTG
51 D Q S S G K S S V L E A L S G V A L P R G T G I V
263 ACA CGC TGT CCT CTG GTA TTG AAA CTG AAG AAA ATT TCA AAG GAC AAC AAC TGG CAT CAG TGG CAT GGA TTG ATG
76 L E C P L V L K L K K I S K D N N W H Q W H G L M
338 TCA TAT AGG GAC CAA ACA AAG AAA CTA AAA GAC CCA GCG GAA ATA GAG AAT GCT GTC TTA AAA GCT CAG ACA GTA
101 S Y R D Q T K K L K D P A E I E N A V L K A Q T V
413 TTG GCT GGA ACG GGA GAA GGG ATC AGT CAT GAG ATG ATC ACT CTG GAG ATC CAG TCC AGT GAT GTC CCT GAC CTC
126 L A G T G E G I S H E M I T L E I Q S S D V P D L
488 ACT CTC ATT GAT TTG CCA GGC ATT GCT AGA GTT GCC ACT GGC AAC CAG CCA AAA GAC ATC GAA CAA ATA AAA
151 T L I D L P G I A R V A T G N Q P K D I E K Q I K
563 GAT CTA ATT GAA AAG TAC ATT AAA AGA CAA GAA ACC ATC AGC TTG GTT GTG GTG CCT GCA AAC ATT GAC ATC GCC
176 D L I E K Y I K R Q E T I S L V V V P A N I D I A
638 ACC ACT GAG GCA CTG CAG ATG GCA TCC AAA GTC GAT TCA ACT GGA CAA AGG ACC CTG GGT ATT CTG ACT AAA CCG
201 T T E A L Q M A S K V D S T G Q R T L G I L T K P
713 GAC TTG GTG GAC AAA GGC ATG GAG GAG ACG GTG GTC AGA ACA GTC AAT AAT CAA GTG ATA CAA CTG AAG AGG GGC
225 L L V D K G M E E T V V R T V N N Q V I Q L K R G
788 TAC ATG ATC GTA AAG TGC AGA GGC CAG CAA GAC ATC AAT GAG AAG CTT GAT CTG GTC AAA GCG CTG GAA AAA GAA
  
```

图 3 草鱼 *Mx* 基因 cDNA 全序列的部分核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the partial grass carp

Mx gene full-length cDNA sequence

下划线部分为三联体 GTP 结合区域, 黑色框内为发动蛋白家族签名序列。

利用 InterProScan 在线分析测序结果得到草鱼 *Mx* 蛋白结构域模式图(图 4)^[10], 即其 N 端是包含三联体 GTP 结合区域(tripartite GTP-binding motif)和自我组装区(self assembly sequence, SAS)的 GTP 酶结构域(GTPase domain, 46 ~ 225 aa)、中间是中央相互作用结构域 CID (central interactive domain, 236 ~ 531 aa), C 端是 GTP 酶效应结构域 GED (GTPase effector domain, 533 ~ 623 aa)。

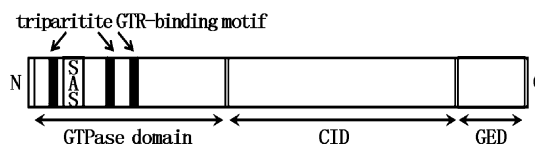


图 4 草鱼 *Mx* 蛋白结构域示意图

Fig. 4 The schematic diagram of grass carp *Mx* protein domains

用 DNASTar 5.0 的子程序 Protean 预测草鱼 *Mx* 蛋

白的亲水性、柔韧性、表面可能性及抗原性(图 5),结果表明,Kyte-Doolittle 方法预测的亲水性区域大致为 1~25 aa,52~59 aa,86~117 aa,163~189 aa,209~219 aa,226~296 aa,302~334 aa,341~351 aa,356~446 aa,476~530 aa,598~617 aa 这 11 个区域,可见亲水性残基区域远大于疏水性残基区域,所以推测该蛋白质为亲水性。Jameson-Wolf 方法预测抗原性显示,该蛋白含有大量的 B

细胞抗原位点,特别是在 3~25 aa,52~62 aa,101~121 aa,163~189 aa,254~270 aa,392~458 aa,507~530 aa 这 7 个区域,为优势抗原表位。同时从图 5 中还可以明显发现,抗原表位部分与 Karplus-Schulz 方法预测的柔韧性区域和 Emini 方法预测的表面可能性区域出现了较多的重叠部分,这些区域相对易于形变,便于抗原、抗体的自由结合,可能是抗原结合位点的富集区域。

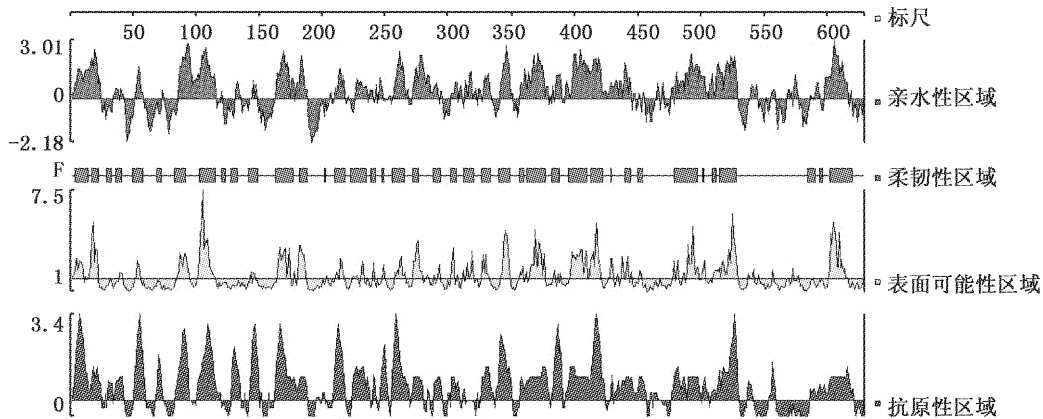


图 5 草鱼 Mx 蛋白亲水性、柔韧性、表面可能性和抗原性的预测结果

Fig. 5 Predicted results of hydrophilicity, flexibility, surface probability and antigenicity of grass carp Mx protein

用 DNASTar 5.0 的 Clustal W 程序对该 Mx 蛋白与鲫鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、澳洲肺鱼 (*Lates calcarifer*)、河道鲶鱼 (*Ictalurus punctatus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、日本比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)、塞内加尔鲷目鱼 (*Solea senegalensis*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、人 (*Homo sapiens*)、鹌鹑 (*Coturnix coturnix*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*) 14 个物种的 19 种 Mx 蛋白进行氨基酸同源性比对(未显示)。结果表明,他们的同源性在 45.1%~99.7%,总体为 56.2%,说明总体上 Mx 蛋白较保守。用 MEGA 4^[11] 的 Neighbor-Joining 法,将上述比对结果重复 1 000 次,构建 Bootstrap 验证的系统发育树(图 6),发现草鱼 Mx 与鲫鱼 Mx3 的亲缘关系最近,与其他鱼类形成一个小分支,与人、小家鼠、褐家鼠形成脊椎动物的一个大分支,再与鹌鹑、红原鸡、绿头鸭这些禽类形成整体的发育树。

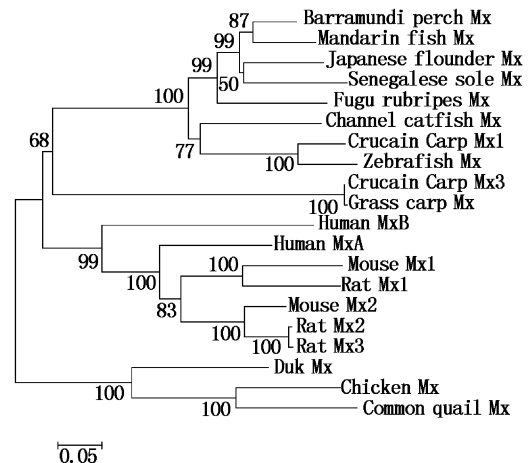


图 6 草鱼与其他物种 Mx 蛋白氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 6 NJ phylogenetic tree of Mx protein amino acid sequences of grass carp and other species

用 MEGA 4 软件中的 N-J bootstrap 方法构建进化树,分支上的数字表示 1 000 次 bootstrap 验证中该分支的可信度。

2.3 重组质粒 pEGFP-C1-Mx 的构建与鉴定

用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切重组质粒 pMD20-T-Mx 获得 *Mx* 基因片段, 插入到质粒 pEGFP-C1 中, 构建真核表达载体 pEGFP-C1-Mx, 并用 PCR 和酶切方法鉴定。结果表明, pEGFP-C1-Mx 分别经过 *Sma* I 和 *Xba* I 单酶切后, 可获得单一的 6.7 kb 左右条带; 经 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切后, 电泳结果显示有两条分别约为 4.7 kb 和 2.0 kb 的条带, 与 pEGFP-C1 载体和 *Mx* 基因全长片段的长度相符(图 7)。上述结果证实 *Mx* 基因全长序列已正确插入了 pEGFP-C1 载体, 成功构建了重组质粒 pEGFP-C1-Mx。

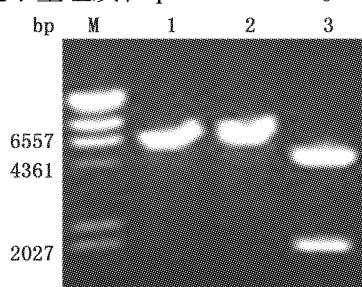


图 7 草鱼重组质粒 pEGFP-C1-Mx 酶切鉴定

Fig. 7 Identification of pEGFP-C1-Mx by restriction analysis

M. λ -Hind III digest DNA marker; 1. *Sma* I 单酶切 pEGFP-C1-Mx; 2. *Xba* I 单酶切 pEGFP-C1-Mx; 3. *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切 pEGFP-C1-Mx。

3 讨论

I 型 IFN 系统是先天免疫反应系统的重要组成部分, 它通过 JAK-STAT 信号途径可诱导多种干扰素刺激基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 的表达, 使机体构筑抵抗病毒感染的第一道防线^[12]。其中 *Mx* 蛋白是 ISGs 编码的具有直接抗病毒活性的分子之一, 它通过阻碍病毒基因组复制周期的早期阶段来抑制病毒的增殖^[13]。目前已知病毒或双链 RNA 可对多种细胞诱导出 *Mx* 蛋白^[9,14]。其中的 PolyI: C 是具有强大 IFN 诱导能力的人工双链 RNA, 它诱导 IFN 的途径之一是 TLR3 (toll like receptor 3, TLR3) 介导的信号转导通路, 而 TLR3 能专一性地识别 dsRNA, 诱导 IFN- α 、IFN- β 的表达^[15]。

本研究用 PolyI: C 诱导后的 CIK 细胞, 发现与吕英军等^[16]用同样方法处理的鸡胚成纤维细胞 (chick embryo fibroblast, CEF) 的生长情况类

似, 处理后的细胞逐渐变得稀疏、瘦长, 有明显抑制现象。本研究还比较了 PolyI: C 诱导的 CIK 细胞和疱疹性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 感染的 CIK 细胞(图 1 和图 8), 发现用 VSV 病毒感染的细胞在 36 h 之后出现剧烈圆缩、高度融合和大量脱落死亡现象, 而经 Poly I: C 处理相同时间的细胞则呈梭形或不规则三角形及脱落现象, 说明与病毒感染有一定相似之处, 对细胞生长有抑制作用, 两种方法均可诱导 *Mx* 的表达。

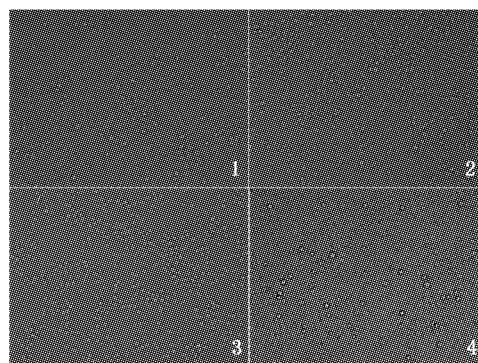


图 8 VSV 感染不同时间的 CIK 细胞形态 (200 ×)

Fig. 8 The morphology of CIK cells which were treated with VSV in different periods (200 ×)

1. 12 h; 2. 36 h; 3. 48 h; 4. 对照组。

经分析, 我们克隆的草鱼 *Mx* 蛋白包含 3 个结构, 即 N 端的 GTPase 结构域, 中间的中央相互作用结构域 CID, C 端的 GTP 酶效应结构域 GED。GTP 结合基序中引入突变将不仅导致其 GTP 结合能力下降和 GTP 酶活性降低, 也使其抗病毒活性降低; C 端的 GED 能与特定种类的病毒病原体识别并直接作用, 达到杀灭的目的; GED 不仅通过与 GTPase 结构域的相互作用调节 GTPase 的活性, 还能特定的和 CID 作用, 且这种作用对于构成具有功能性的 GTP 酶结构域和寡聚化是至关重要的^[5,17-18]。对草鱼 *Mx* 蛋白结构预测表明, 我们可以利用该蛋白具有丰富的 B 细胞抗原位点, 且这些位点与柔韧性区域、表面可能区域出现了较多的重叠的特点来设计针对草鱼 *Mx* 蛋白的特异抗体, 便于后续的检测。

不同 *Mx* 蛋白序列比对的结果显示在 *Mx* 蛋白的 N 端保守性较高, 而 C 端变异较大 (未显示)。有趣的是这种在 C 端高度的种属变异性也反映在人、小家鼠、红原鸡和绿头鸭的个体之间,

即 C 端显示出的差异性最终表现为某些物种各亚型 *Mx* 蛋白功能上的多样性,如不同的细胞内定位、抗病毒特性和细胞内其他蛋白的作用,这同样可以适用于鱼类的研究^[19]。因此我们与 GenBank 中白俊杰等人克隆的草鱼 *Mx* 基因 (AY395698) 比对,发现序列同源率为 89.5%, C 端的 GED 区域则只有 76.8% (未显示),可能通过 Northern blotting 来确定它们是否为草鱼 *Mx* 基因的两个亚型。

对草鱼 *Mx* 蛋白的核定位预测表明其没有明显的核定位信号序列,推测其定位在胞浆中。因此我们将草鱼 *Mx* cDNA 序列整合到 pEGFP-C1 载体中,从而利用荧光显微镜可方便检测 *Mx* 蛋白的表达,并可实现对其在细胞内的定位^[20-21]。同时已有研究显示,*Mx* 蛋白的抗病毒特性间接地反映了其亚细胞定位^[17]。为此在后续的实验我们结合将抗病毒实验,即对转染草鱼 *Mx*-EGFP 融合基因的细胞进行病毒感染,研究其定位特征及其抗病毒效应。

参考文献:

- [1] 战文斌,刘洪明,王越. 水产养殖病害及其药物控制与水产品安全[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 758-760.
- [2] 杨先乐,郑宗林. 我国渔药使用现状、存在的问题及对策[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 374-380.
- [3] LINDENMANN J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus[J]. Virology, 1962, 16: 203-204.
- [4] SADLER A J, WILLIAMS B R. Interferon-inducible antiviral effectors[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(7): 559-568.
- [5] 孙业平,高福. 天然免疫抗病毒效应分子 *Mx* 蛋白的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(7): 699-706.
- [6] ROBERTSEN B. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2008, 25(4): 351-357.
- [7] CHEN Y M, SU Y L, SHIE P S, et al. Grouper *Mx* confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32(7): 825-836.
- [8] WU Y C, LU Y F, CHI S C. Anti-viral mechanism of barramundi *Mx* against betanodavirus involves the inhibition of viral RNA synthesis through the interference of RdRp[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(3): 467-475.
- [9] 李文超,王文娟,孟庆文,等. 鸡抗病毒 *Mx* 基因的克隆与序列分析[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(3): 233-238.
- [10] ZDOBNOV E M, APWEILER R. InterProScan-an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro[J]. Bioinformatics, 2001, 17(9): 847-848.
- [11] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [12] SCAPIGLIATI G, BUONOCORE F, RANDELLI E, et al. Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 28(2): 303-311.
- [13] LI G, ZHANG J, SUN Y, et al. The evolutionarily dynamic IFN-inducible GTPase proteins play conserved immune functions in vertebrates and cephalochordates[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(7): 1619-1630.
- [14] LIU S Y, DAVID J S, CHENG G H. New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon[J]. Current Opinion in Immunology, 2011, 23(1): 57-64.
- [15] MATSUMOTO M, SEYA T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(7): 805-812.
- [16] 吕英军,倪嘉宁,鲍恩东. 聚肌胞诱导鸡胚成纤维细胞和鸡胚及肉鸡抵抗新城疫病毒感染的研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 97-101.
- [17] LEE S H, VIDAL S M. Functional diversity of *Mx* proteins: variations on a theme of host resistance to infection[J]. Genome Research, 2002, 12(4): 527-530.
- [18] HALLER O, KOCHS G, WEBER F. Interferon, *Mx*, and viral countermeasures [J]. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2007, 18(5/6): 425-433.
- [19] FERNANDEZ-TRUJILLO M A, PORTA J, BORREGO J J, et al. Cloning and expression analysis of *Mx* cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 21(5): 577-582.
- [20] 田智泉,倪黎纲,吴晓伟,等. 鸡 *Mx*-EGFP 融合表达蛋白的细胞亚定位及其抗病毒活性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(12): 1642-1648.
- [21] 孙晓红,姚泉洪,陈明杰,等. 含绿色荧光蛋白及 *trp3iar* 基因的草菇表达载体的构建[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 12-16.

Cloning and sequence analysis of antiviral *Mx* gene full-length cDNA from grass carp (*Ctenopharyngodon indellus*) and its eukaryotic expression vector construction

LIU Li, LIU Peng, JIN Jia-li, WU Hai-li, WANG Gai-gai, JIANG Chen, CAI Ke-jun

(School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, Zhejiang, China)

Abstract: *Mx* protein is one of the classes of antiviral proteins induced by type I interferon (IFN). A full-length cDNA sequence of *Mx* gene from grass carp (*Ctenopharyngodon indellus*) was amplified using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with total RNA extracted from *Ctenopharyngodon indellus* kidney (CIK) cells treated with PolyI:C and cloned into pMD20-T vector named pMD20-T-M_x, and sequenced. The recombinant plasmid pMD20-T-M_x and eukaryotic expression vector pEGFP-C1 were cleaved by restriction endonuclease, *Mx* gene full-length cDNA sequence linked with pEGFP-C1. The data indicate that grass carp *Mx* gene full-length cDNA sequence has 1 921 nucleotides, encoding 627 amino acid residues of the mature peptide with a molecular weight of about 71.1 ku and a theoretical isoelectric point of 8.33. The grass carp *Mx* protein contains a tripartite guanosine-5'-Triphosphate (GTP)-binding motif and a dynamin family signature sequence, which are conserved in all IFN-induced *Mx* proteins of the vertebrates. Bioinformatics analysis reveals that the protein encoded by *Mx* gene in grass carp is hydrophilic in most regions and has rich B cell antigenicity positions without obvious nuclear localization signal sequence. The dimensional structure of the grass carp *Mx* protein includes GTPase domain in the amino terminus region, central interactive domain (CID) in the middle and GTPase effector domain (GED) in the carboxyl terminus region. Comparative analysis shows that the *Mx* protein amino acid sequence of grass carp shares similarity of 45.1% - 99.7% to those of other species. pEGFP-C1-M_x, which contains *Mx* gene full-length cDNA sequence and *EGFP* gene, has been constructed.

Key words: grass carp; *Mx* gene; cloning; sequence analysis; vector construction