

卓严玲, 颜秋, 邓启霞, 等. 猪热休克蛋白 40(Hsp40)基因的克隆及过表达和 RNA 干扰载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 63–67. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.015

# 猪热休克蛋白 40(Hsp40)基因的克隆及过表达和 RNA 干扰载体的构建

卓严玲<sup>1</sup>, 颜秋<sup>1</sup>, 邓启霞<sup>1</sup>, 邓家华<sup>1</sup>, 吕其壮<sup>1,2</sup>

(1. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西玉林 537000; 2. 广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 广西玉林 537000)

**摘要:**热休克蛋白(Hsp)是在各种生物体内广泛分布的一类具有高度保守性、短时性、多样性等特点的热应激蛋白质,参与细胞的多种生理生化活动。已有研究表明,Hsp40在多种病毒感染细胞的过程中发挥重要作用,但其对猪圆环病毒2型(PCV2)复制的影响及机制尚不清楚。为了探究Hsp40在PCV2感染中的生物学功能,在克隆猪Hsp40基因CDS区全基因序列的基础上,采用双酶切位点法分别构建猪Hsp40基因的过表达载体和RNA干扰载体。该研究为猪Hsp40转基因细胞株的构建搭建好平台,同时也为挖掘猪Hsp40对PCV2感染的响应机制提供极大的便利。

**关键词:**猪热休克蛋白40;过表达载体;RNA干扰载体;猪圆环病毒2型

**中图分类号:** S852.65\*9.2; Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0063-04

猪圆环病毒2型是引起猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)的主要病原体<sup>[1-2]</sup>,我国于2001年首次报道该病,目前已成为危害我国规模化猪场养猪生产的重要传染病之一<sup>[3-4]</sup>。然而,直到现在人们对PCV2的复制机理和致病机制仍然不是很清楚,尤其对PCV2感染过程中病毒DNA和蛋白与宿主胞内蛋白之间的相互作用网络及其所蕴含的生物学意义更是知之甚少。PCV2作为能够感染哺乳动物的最小病毒之一,其基因组的编码能力有限,必须依赖于宿主细胞内的酶类才能完成复制增殖,因此PCV2不得不借助其病毒DNA和蛋白与宿主细胞内的各种基因相互作用来调控宿主免疫应答,如导致细胞因子分泌失调、免疫抑制和疾病等,从而实现其对病毒复制和致病机制的调控<sup>[5]</sup>。其中,有关PCV2衣壳蛋白Cap与猪热休克蛋白40(Hsp40)互作的文献报道最早见于2009年,但至今仍无关于此研究的新进展,特别是它们二者之间是否真的互作以及这种互作所蕴含的生物学意义目前尚不清楚<sup>[5-6]</sup>。

Hsp40是一类跨物种存在的蛋白家族,存在于各种生物体的线粒体、核糖体、内质网等细胞器中,并对蛋白翻译、折叠、去折叠和转运等起重要作用<sup>[7]</sup>,同时还可以通过与病毒蛋白或病毒复制复合体结合对多数病毒的复制产生影响<sup>[8]</sup>。其中,不仅有很多动物病毒和植物病毒,而且还涵盖了许多DNA和RNA病毒。因此,既然已有研究表明PCV2 Cap与宿主Hsp40蛋白之间存在相互作用,那么就有必要进一步探究Hsp40对PCV2复制的影响及机制。

目前,研究某一基因的生物学功能往往须要使其正常的

表达量上调或者下调,其中最常用的方法就是构建其过表达和RNA干扰载体,其中双酶切位点法又是构建转基因载体的最普遍方法。为此,本研究利用双酶切位点法分别构建猪Hsp40基因的过表达和RNA干扰载体,从而为其进一步的遗传转化和稳定表达细胞系的建立奠定基础,同时为进一步明确猪Hsp40基因在PCV2病毒感染过程中的生物学功能提供了高效便捷的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织、菌株及载体 脾脏组织采自3日龄美系大白猪,该猪呈CSFV、PRRSV和PCV2阴性;大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,购自天根生化科技(北京)有限公司;真核表达载体pEGFP-C1和RNA干扰载体pCDH-U6-MCS-EF1-GreenPuro(简称为pCDH-U6),均由西北农林科技大学张彦明教授馈赠。本试验于2018年上半年在玉林师范学院生物与制药学院基因工程实验室完成。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶(EcoR I和BamH I)、T<sub>4</sub> ligase、PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser和Trizol,均购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒、高纯质粒小量提取试剂盒和UltraPower®核酸染料,均购自北京百泰克生公司;DL2000和Trans 2K plus DNA marker,均购自北京全式金公司;Pfu高保真扩增酶和溴化乙锭(EB),均购自Thermo Fisher Scientific公司;琼脂糖,购自美国BD公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据GenBank中登录的猪Hsp40基因序列(XM\_003131409),利用Primer Premier 6.0软件设计出用于扩增猪Hsp40基因的引物,上游引物Hsp40-F:5'-CGGAATTCATATGCGGCTGCCGCGGACTGCGATC-3'(下划线为EcoR I酶切位点),下游引物Hsp40-R:5'-CGGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGAATCGCCAACTGGA AAAAGAAATC-3'(下划线为BamH I酶切位点,斜体为Flag标签序

收稿日期:2018-05-17

基金项目:广西自然科学基金(编号:2017GXNSFBA198025);广西高校中青年教师基础能力提升项目(编号:2017KY0548)。

作者简介:卓严玲(1997—),女,广西平南人,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:18378967279@163.com。

通信作者:吕其壮,博士,副教授,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:lvqizhuang062@163.com。

列)。待测出克隆获得的猪 *Hsp40* 基因序列后,利用 Thermo Fisher Scientific 公司的 shRNA 在线设计软件 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/>) 设计出猪 *Hsp40* 基因的 5 对干扰序列和 1 对阴性对照序列<sup>[9]</sup>,引物信息详见

表 1。为载体构建鉴定需要,本研究参考文献[9]合成了上游引物 5'-TTCTTGGGTAGTTTGCAGTT-3'和下游引物 5'-CGGAGCCAGTACACGACA-3',分别命名为 U6-F 和 U6-R。以上引物全由北京华大基因公司合成。

表 1 短发夹 RNA 干扰序列

shRNA 名称	序列 (5'→3')
<i>Hsp40</i> - sh1S	GATCC GCAGGAGTTCAAGAATGCTAA <b>CAAGAG</b> TTAGCATTCTTGAACCTCTGCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - sh1A	AATTCAAAAA GCAGGAGTTCAAGAATGCTAA <b>CTCTTG</b> TTAGCATTCTTGAACCTCTGCG
<i>Hsp40</i> - sh2S	GATCC GGAGTTCAAGAATGCTAATGCC <b>CAAGAG</b> GCATTAGCATTCTTGAACCTCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - sh2A	AATTCAAAAA GGAGTTCAAGAATGCTAATGCC <b>CTCTTG</b> GCATTAGCATTCTTGAACCTCCG
<i>Hsp40</i> - sh3S	GATCC GGATGAAGAGGGCATGAATAT <b>CAAGAG</b> ATATTTCATGCCCTCTTCATCCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - sh3A	AATTCAAAAA GGATGAAGAGGGCATGAATAT <b>CTCTTG</b> ATATTTCATGCCCTCTTCATCCG
<i>Hsp40</i> - sh4S	GATCC GGCATGAATATGGGTGATTT <b>CAAGAG</b> GAAATCACCCATATTTCATGCCCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - sh4A	AATTCAAAAA GGCATGAATATGGGTGATTT <b>CTCTTG</b> GAAATCACCCATATTTCATGCCG
<i>Hsp40</i> - sh5S	GATCC GGCTTCAGCTTTGAAGCATCC <b>CAAGAG</b> GGATGCTTCAAAGCTGAAGCCCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - sh5A	AATTCAAAAA GGCTTCAGCTTTGAAGCATCC <b>CTCTTG</b> GGATGCTTCAAAGCTGAAGCCG
<i>Hsp40</i> - shNS	GATCC GCTTAAACGCATAGTAGGACT <b>CAAGAG</b> AGTCCTACTATCGCTTTAAGCTTTTTC
<i>Hsp40</i> - shNA	AATTCAAAAA GCTTAAACGCATAGTAGGACT <b>CTCTTG</b> AGTCCTACTATCGCTTTAAGCG

注:下划线部分为插入序列,粗体字为 loop 环。

1.2.2 组织总 RNA 提取与 cDNA 的制备 取 100 mg 猪脾脏组织置于研钵中,加入适量液氮并研磨完全后,将样品移入离心管中,利用 Trizol 法抽提总 RNA,具体方法参见文献[10]。待测定出所提取总 RNA 浓度后,按照 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 说明书制备 cDNA。

1.2.3 猪 *Hsp40* 基因的扩增 以上述制备的 cDNA 为模板,*Hsp40*-F 和 *Hsp40*-R 为上、下游引物,利用 *Pfu* 高保真酶进行 PCR 扩增,同时设立阴性对照。反应体系为:*Hsp40*-F 1.0 μL、*Hsp40*-R 1.0 μL、2 × *Pfu* 高保真酶 10.0 μL、cDNA 1.0 μL、ddH<sub>2</sub>O 加至 20 μL。反应程序包括:95 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s,68 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s,35 个循环;72 ℃ 10 min; 4 ℃ 结束反应。PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,然后置于凝胶成像系统中观察并拍照。

1.2.4 猪 *Hsp40* 基因真核表达载体和 RNA 干扰载体的构建与鉴定 将上述含有目的基因片段的凝胶用手术刀快速切下并放置于 2.0 mL 的离心管中,按照胶回收试剂盒的说明书纯化出 PCR 产物,置于 -20 ℃ 保存。将纯化后的 PCR 产物和真核表达载体 pEGFP-C1 分别用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 进行双酶切,反应体系为:10 × K buffer 2.0 μL、*Bam* H I 1.0 μL、*EcoR* I 1.0 μL、PCR 产物或 pEGFP-C1 载体加至 20 μL。反应条件为:37 ℃ 2 h,加入 2 μL 10 × Loading buffer 终止酶切反应。酶切产物再次经电泳和胶回收后,利用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶于 4 ℃ 过夜条件下将 PCR 产物连入 pEGFP-C1 载体,反应体系为:T<sub>4</sub> ligase 1.0 μL、T<sub>4</sub> ligase buffer 1.0 μL、pEGFP-C1 载体 1.5 μL、PCR 产物加至 20 μL,最终得到重组 pEGFP-*Hsp40* 载体。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,挑取单克隆菌置于 LB 液体培养基(Kan<sup>+</sup>)中扩大培养 12~16 h,按高纯质粒小量提取试剂盒说明书提取细菌质粒,经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切验证后,送由北京华大基因公司测序。应用 DNA Star 软件(MegAlign)对克隆获得的猪 *Hsp40* 基因序列进行比对分析。将测得的猪 *Hsp40* 基因序列拷贝进 Thermo Fisher Scientific 公司的 shRNA 在线设计软件

并按其说明设计出相应的 RNA 干扰序列,将合成的各 shRNA 干扰序列按照事先设定好的 PCR 程序(95 ℃ 30 s;90 ℃ 30 s;85 ℃ 30 s;80 ℃ 30 s;75 ℃ 30 s;70 ℃ 30 s;65 ℃ 30 s;60 ℃ 30 s;55 ℃ 30 s;50 ℃ 30 s)进行退火,然后使用 T<sub>4</sub> DNA Ligase 将其与经 *Eco* RI 和 *Bam* HI 双酶切过的 pCDH-U6 干扰载体进行 4 ℃ 过夜连接,分别得到 5 条干扰载体(pCDH-U6-*Hsp40*-sh1、pCDH-U6-*Hsp40*-sh2、pCDH-U6-*Hsp40*-sh3、pCDH-U6-*Hsp40*-sh4、pCDH-U6-*Hsp40*-sh5)和 1 条阴性对照载体(pCDH-U6-*Hsp40*-shN),分别简称为 *Hsp40*-sh1、*Hsp40*-sh2、*Hsp40*-sh3、*Hsp40*-sh4、*Hsp40*-sh5 和 *Hsp40*-shN,统称为重组干扰载体。以构建的各重组干扰载体及 pCDH-U6 空载体为模板,利用引物 U6-F/U6-R 进行 PCR 扩增,反应条件为:95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min; 4 ℃ 保存。PCR 产物加入 12 g/L 琼脂糖凝胶中进行核酸电泳检测,检测正确后送由北京华大基因公司测序。

2 结果与分析

2.1 猪脾脏总 RNA 的提取

利用 Trizol 法提取猪脾脏组织总 RNA 后,取 5 μL 加入 12 g/L 琼脂糖凝胶中进行检测分析,结果可见 3 条清晰的电泳条带,从下往上分别是 5S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA,且条带亮度 28S:18S≥1(图 1)。经核酸浓度测定仪检测,其 D<sub>260 nm</sub>/D<sub>280 nm</sub>=1.96,浓度为 780 mg/L,表明所提取的总 RNA 纯度较高、完整性良好,适用于后续的 cDNA 制备。

2.2 猪 *Hsp40* 基因的克隆

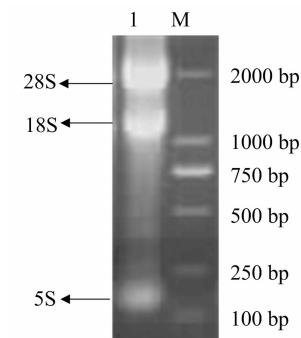
以猪脾脏组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,*Hsp40*-F/*Hsp40*-R 为引物,进行 RT-PCR 反应。反应结束后,将 PCR 产物加入 12 g/L 琼脂糖凝胶中检测分析,结果见图 2。可见 1 条大小约为 1 485 bp 的 DNA 条带,与预期结果一致。

2.3 猪 *Hsp40* 基因真核表达载体的构建和鉴定

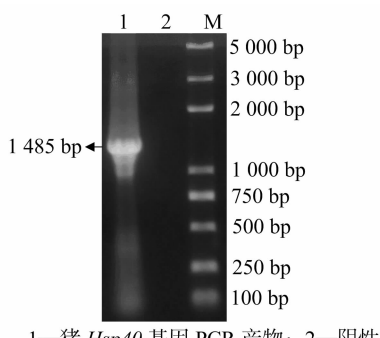
将构建好的重组质粒 pEGFP-*Hsp40* 经 *EcoR* I 和

*Bam*H I 双酶切,反应体系经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,见图 3。可见 1 条大小约为 4 700 bp 载体片段和 1 条大小约 1 485 bp 的目的基因片段,与预测的片段大小基本一致,说明 pEGFP-*Hsp40* 重组过表达载体构建成功。为了进一步验证其正确性,将酶切鉴定正确的质粒送北京华大基因公司测

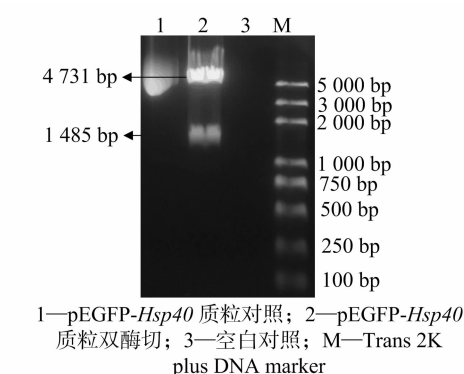
序并将测序结果与已报道的猪 *Hsp40* 基因序列进行比对分析,结果发现二者之间的核苷酸序列同源性为 99.8%,氨基酸序列同源性为 99.4%,说明猪 *Hsp40* 基因克隆成功且构建的 pEGFP-*Hsp40* 重组过表达载体成功,测序结果如图 4 所示。



1—总 RNA; M—DL2000 DNA 标准  
图1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果



1—猪 *Hsp40* 基因 PCR 产物; 2—阴性对照; M—Trans 2K plus DNA 标准  
图2 猪 *Hsp40* 基因的 PCR 扩增结果



1—pEGFP-*Hsp40* 质粒对照; 2—pEGFP-*Hsp40* 质粒双酶切; 3—空白对照; M—Trans 2K plus DNA marker  
图3 重组表达质粒 pEGFP-*Hsp40* 的双酶切鉴定

ATAAGATCCATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAGT  
CCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTATGGCGGCTGCCCGGAGTGCGATGTGGT AATGGCGGC  
GACCGGGCCAGAGCTGCTCGACGACGAGGAAGCGAAGAGGGAAGCAGAGTCTTTTAAGGAACAA GGAATGCA  
TACTATGCCAAGAAAGATTACAATGAAGCTTATAATTATTATACGAAAGCCATAGATATGTGTC CTAAAAATG  
CTAGCTATTACGGGAATCGACGAGCCACCTTGATGATGCTTGGGAAGGTTCCGGGAAGCTCTTGG AGATGCACA  
GCAGTCAGTGAGATTGGATGACAGCTTCGTCGGGGTCATCTACGAGAGGGCAAATGCCACCTG TCCCTAGGG  
AATGCCATGGCAGCATGTCGTAGTTTCCAGAGAGCCCTAGAGCTGGATCACAAAAATGCTCAGG CACAGCAGG  
AGTTCAAGAATGCTAATGCAGTCATAGAATATGAAAAATAGCAGAAACGGATTTTGAGAAGCG GGAATTTTCG  
GAAGGTGTTTTTTTGCATGGACCGTGCCCTAGAATTTGCCCTGCTGCCATCGCTTCAAAATC CTAAAGCA  
GAATGTTTAGCAATGCTAGGTCTGTTATCCAGAAGCACAGTCTGTGGCCAGCGACATTTTACGAA TGGATTCCA  
CCAACGCAGATGCTCTGTACGTCCGAGGTCTTTGCCCTTATTATGAAGATTGTATTGAGAAGGC GGTTCAGTT  
TTTTGTACAGGCACTCAGGATGGCTCCTGACCATGAGAAGGCTGCATTGCTTGCAAAATGCC AAAGCACTT  
AAAGCAAAGAAAGAAGATGGAACAAGGCATTTAAAGAAGGAAATTACAAGCTAGCATATGAAC TGTACACAG  
AAGCCCTGGGATAGACCCCAACAATATAAAACAAATGCTAAACTCTACTGTAATCGGGGTAC GGTTAATTC  
CAAGCTTAGGAACTAGATGATGCAATAGAAGACTGCACACATGCAGTGAAGCTCGATGACACT TACATAAAA  
GCCTACTTGAGAAGAGCGCAGTGTTACATGGACACAGAACAGTATGAAGAAGCAGTCCGGG GCTATGAAAAAG  
TGTATCAGACGGAGAAAACGAAAGAACACAAACAGCTCCTGAAGAATGCACAGCTGGAAC TGAAGAGTAA  
GAGGAAAGATTACTACAAGATCCTTGGAGTAGACAAGAATGCATCTGAGGATGAGATCAAGAAA GCTTACCGG  
AAACGGGCTTGATGCACCATCCAGATCGGCACAGCGGAGCC tGTGCGGAAGTTCAGAAGGAGGAGGAGAAAA  
AGTTCAAGGAAGTTGAGAAGCTTTTACCATTCTCTCTGATCCCAAGAAAAAGACTCGCTATGA CAGTGGGCA  
AGACCTGGATGAAGAGGGCATGAATATGGGTGATTTCGAtGCA tACAATATCTTCAAGGCATTCTTTGGCGGT  
CCTGGGGCTTTCAGCTTTGAAGCATCCGGTCCAGGGAATTTCTTTTCCAGTTTGGC GATTACAAGGATGACG  
**ACGATAAGTAAGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC T**  
TGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTT GTTAACTGT  
TTATGCAGCTATAAGACC

下划线显示的是猪 *Hsp40* 基因序列; 粗体显示的是 Flag 标签; 小写显示的是突变位点

图4 pEGFP-*Hsp40* 质粒的测序结果

## 2.4 猪 *Hsp40* 基因 RNA 干扰载体的构建和鉴定

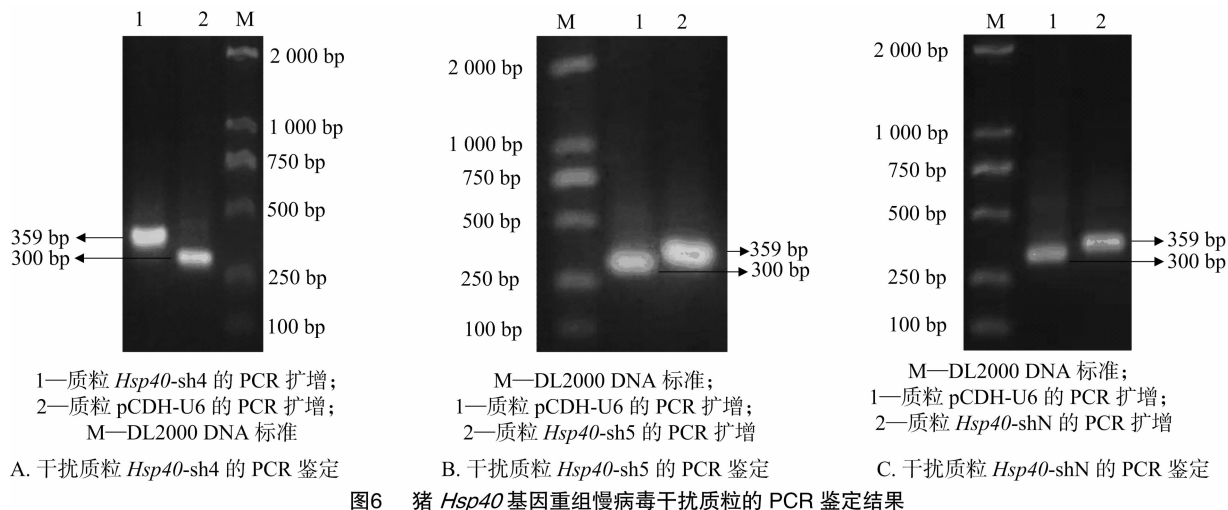
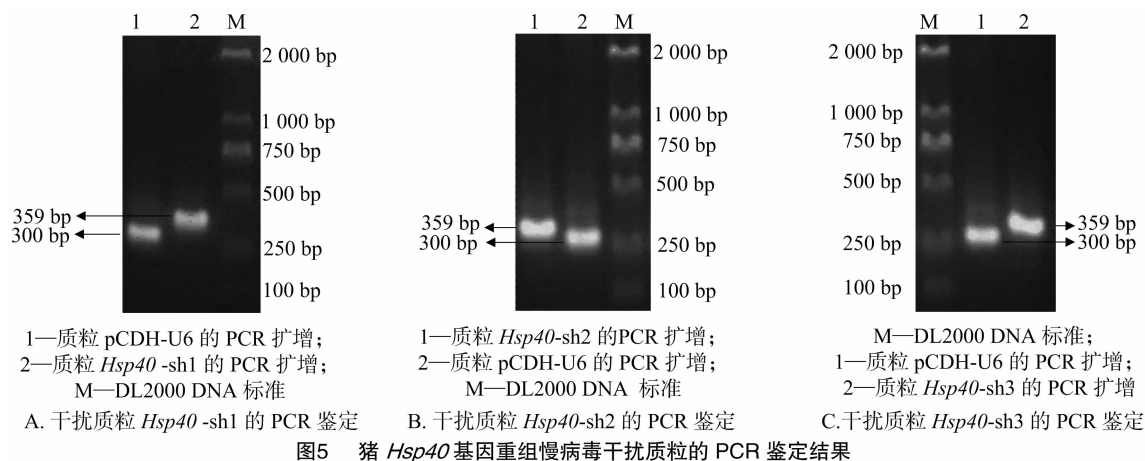
以构建好的猪 *Hsp40* 基因 RNA 干扰载体和 pCDH-U6 空载体为模板, U6-F/U6-R 为引物, 进行 PCR 扩增, 扩增产物置于 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳中检测, 结果见图 5、图 6。可见 *Hsp40*-sh1、*Hsp40*-sh2、*Hsp40*-sh3、*Hsp40*-sh4、*Hsp40*-sh5、*Hsp40*-shN 和 pCDH-U6 干扰质粒经引物 U6-F/U6-R PCR 扩增后分别得到大小约为 359、359、359、359、359、359、300 bp 的 DNA 条带, 表明各干扰序列均已被成功插入到 pCDH-U6 载体, 即猪 *Hsp40* 基因各重组干扰载体构建成功。

## 3 讨论与结论

自 dsRNA 被发现以来, RNA 干扰技术逐渐称为研究基

因功能的一种有效方法, 其形成的发夹 RNA 通过碱基互补配对识别并降解与之高度保守的同源 mRNA, 从而使基因沉默<sup>[11-14]</sup>。近年来, 由于 RNA 干扰技术具有高效、简便和特异性强的特点, 其已被广泛应用于各种生物基因表达调控和功能基因的挖掘与鉴定等领域, 尤其在动物、植物和微生物等的品质改良中得到成功应用<sup>[15-17]</sup>。目前, 尽管载体构建的方法多种多样, 构建策略也逐步完善, 但传统的“酶切-连接”方法因其操作简便、成本低廉仍是应用最普遍的方法。本研究利用“酶切-连接”方法成功构建了猪 *Hsp40* 基因的真核过表达载体和 RNA 干扰载体。

由于有关猪 *Hsp40* 蛋白生物学功能的研究相对较少, 所以目前市场上或各大实验室都还没有该蛋白抗体的文献报道, 笔者在构建其真核表达载体时, 在猪 *Hsp40* 基因的 C 端添



加了 1 个 Flag 标签,使将来便于猪 *Hsp40* 蛋白的检测。经测序发现,插入的 Flag 标签序列与当初设计一致,没有突变和移码现象;与此同时,测得的猪 *Hsp40* 基因序列与 GenBank 已发表的猪 *Hsp40* 基因的序列同源性达 99.8%,氨基酸同源性达 99.4%,证明克隆获得的猪 *Hsp40* 基因正确,可用于后续 RNA 干扰序列设计的靶基因。

将克隆获得的猪 *Hsp40* 基因序列放入 Thermo Fisher Scientific 公司的 shRNA 在线设计软件,笔者设计了其 RNA 干扰序列,且此干扰序列的设计是一次性合成的,既避免了原始的“酶切-连接”方法无一例外地需要多轮酶切连接反应,又尽可能地降低成本。由于设计出的每一条 shRNA 干扰序列引物只有 59 bp,因此将合成后的各上、下游引物经连续退火后直接与已经双酶切过的 pCDH-U6 干扰载体相连接。鉴于 59 bp 这个长度太短,市场上也很少有如此低标准的 DNA marker 可用,采用 PCR 方法和基因测序法对插入的各个 shRNA 干扰序列进行检测验证是可行的。由于笔者是根据 pCDH-U6 干扰载体的全基因序列在其多克隆位点的上游和下游分别设计引物 (U6-F/U6-R) 且扩增出来的基因片段大概为 300 bp,因此一旦设计出的 RNA 干扰序列成功插入 pCDH-U6 干扰载体,那么再用引物 (U6-F/U6-R) 扩增构建好的各重组干扰载体时就会得到 1 条约 360 bp DNA 电泳条带,由于在 DNA 凝胶电泳中 360 bp 显著大于 300 bp,因

此可以根据 PCR 扩增条带的高低大致判断出所构建的载体是否正确。图 5、图 6 显示,本研究构建的猪 *Hsp40* 基因 RAN 干扰载体经 PCR 鉴定是正确的,目前有关其遗传转化和转基因细胞株系建立的研究尚在进行中。本研究的载体构建策略以其步骤简便、效率可观等特点可被广泛运用于各生物表达载体及干扰载体的构建当中。本研究载体构建成功的目的是通过转基因的方式将 pEGFP-Hsp40 和 *Hsp40*-shRNA 转入 PCV2 宿主细胞中并筛选出其相对应的转基因细胞株系,从而为研究 *Hsp40* 对 PCV2 复制的影响和机制奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Dvorak C M, Puvanendiran S, Murtaugh M P. Cellular pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection[J]. *Virus Research*, 2013, 174(1/2): 60-68.
- [2] Lv Q Z, Guo K K, Zhang Y M. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2[J]. *Virus Genes*, 2014, 49(1): 1-10.
- [3] 郎洪武, 王力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(3): 3-5.
- [4] 赵明军, 闫若潜, 盛敏, 等. 猪圆环病毒 2 型致病机理研究进展[C]//中国畜牧兽医学学会家畜传染病分会第八次全国会员代表大会暨第 15 次学术研讨会论文集. 徐州: 中国畜牧兽医学出版社, 2013: 81-83.

王佳琦,王璐,潘玉光,等. 甘草 MYB 转录因子 *GLMYB10* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):67-70.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.016

# 甘草 MYB 转录因子 *GLMYB10* 的克隆与表达分析

王佳琦,王璐,潘玉光,鹿通,李雅丽

(内蒙古科技大学生命科学与技术学院,内蒙古包头 014010)

**摘要:**根据甘草悬浮细胞经茉莉酸甲酯(MeJA)诱导前后的转录组测序结果,筛选到 1 个响应 MeJA 诱导的 MYB 转录因子基因,通过克隆该基因片段并进行序列分析确定该基因编码 1 个甘草 MYB 转录因子,将其命名为 *GLMYB10*。该基因开放阅读框全长为 1 172 bp,编码产物包含 340 个氨基酸,对其编码产物的基本理化性质、亲水性和疏水性、保守结构域等方面进行了生物信息学分析和预测,对 *GLMYB10* 基因编码产物的氨基酸序列进行聚类分析。结果表明,其与木豆中 MYB 类转录因子的同源性最高。应用 qRT-PCR 分析该基因的表达水平发现,*GLMYB10* 基因在甘草悬浮细胞受 MJ 诱导后的表达量明显高于未诱导组,并且诱导 9 h 后表达量最高。通过对 *GLMYB10* 基因进行克隆与表达分析,为探索该基因在甘草悬浮细胞黄酮类化合物生物合成中的调控作用奠定基础。

**关键词:**甘草;悬浮细胞;茉莉酸甲酯;MYB 转录因子;基因克隆;基因表达

**中图分类号:**S567.7+10.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0067-04

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch),豆科多年生草本植物,主要分布在内蒙古、宁夏、新疆、甘肃等西部地区,具有抗炎、抗病毒、抗癌防癌、保肝解毒、调节免疫功能以及降血脂、抗动脉粥样硬化等心脑血管药理活性,是应用最广的补益类药食兼用的大宗药材<sup>[1]</sup>。近年来,由于无节制采挖、过度放牧及不合理工农业占地等,野生甘草资源逐年锐减,栽培品种收获期过长使得靠大面积人工栽培来满足市场需求存在诸多困

难。植物细胞大规模培养技术是目前公认的最有前景的珍贵植物药物资源的替代生产技术之一,可以很好地解决天然植物资源匮乏问题。但由于植物细胞遗传与生理的不稳定性及细胞间的非一致性等各种原因,使得甘草悬浮细胞中主要目标产物——黄酮类化合物的含量很低,阻碍了通过细胞培养工业化生产药用成分的进程。

转录因子作为转录起始过程中 RNA 聚合酶所需的辅助因子,可激活特定次生代谢产物系列合成酶的协同表达,有效地促进目标次生代谢产物的合成。因而利用转录因子构建高产的转基因细胞系成为提高产量的有效途径之一。MYB 类转录因子是植物中数量最多、功能最多样化的一类转录因子<sup>[2]</sup>,许多研究表明 MYB 转录因子家族在植物黄酮类化合物合成代谢调控中发挥更主要的作用<sup>[3]</sup>。Moyano 等发现 MYB340 和 MYB305 在金鱼草花中特异表达,MYB305 激活了苯丙烷代谢途径的第 1 个酶苯丙氨酸酶(PAL),MYB340 激活了 *Pal* 基因启动子的转录,这 2 种转录因子还能激活黄酮

收稿日期:2019-02-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960688,31460064);内蒙古自然科学基金[编号:2017MS(LH)0304];内蒙古高等学校“青年科技英才计划”(编号:NJYT-15-A08);内蒙古科技大学科研仪器专项(编号:2015KYYQ03)。

作者简介:王佳琦(1994—),女,山西太原人,硕士研究生,主要从事植物生物技术研究。

通信作者:李雅丽,博士,教授,主要从事药用植物次生代谢调控研究。E-mail:blilyali@126.com。

[5] Meng X J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Animal Biosciences*, 2013, 1(1): 43-64.

[6] Finsterbusch T, Steinfeldt T, Doberstein K A, et al. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins[J]. *Virology*, 2009, 386(1): 122-131.

[7] 李雨轩,包勇. 热休克蛋白 40 在肺癌中的研究进展[J]. *生命的化学*, 2016, 36(4): 487-490.

[8] Knox C, Luke G A, Blatch G L, et al. Heat shock protein 40 (Hsp40) plays a key role in the virus life cycle[J]. *Virus Research*, 2011, 160(1/2): 15-24.

[9] 吕其壮. 猪圆环病毒 2 型 ORF5 蛋白功能分析和 ORF4 蛋白拮抗细胞凋亡机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.

[10] 刘伟. 猪 Jiv 蛋白表达与猪瘟病毒感染相关性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.

[11] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic

interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[12] Gunsalus K C, Piano F. RNAi as a tool to study cell biology: building genome-phenome bridge[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(1): 3-8.

[13] Kusaba M. RNA interference in crop plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(2): 139-143.

[14] Perrimon N, Ni J Q, Perkins L. *In vivo* RNAi: today and tomorrow[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(8): 36-40.

[15] 张瑞杰,苗向阳. 绵羊抑制素 shRNA 慢病毒干扰载体的构建与鉴定[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 21-27.

[16] 郭志鸿,张金文,王蒂,等. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 494-501.

[17] 刘晓艳. HPV 相关 miRNA 参与 HPV 免疫逃逸的分子机制及基于 miRNA 骨架的 RNA 干扰载体的效应研究[D]. 杭州:浙江大学, 2013.