



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102321627 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110191074. 4

C12N 15/79 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 07. 08

C12N 5/10 (2006. 01)

(71) 申请人 华中农业大学

G01N 33/53 (2006. 01)

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

G01N 21/64 (2006. 01)

A61K 35/23 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

(72) 发明人 钱平 李祥敏 许晋芳 刘莎莎
周锐 金梅林 陈焕春

A01K 67/027 (2006. 01)

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 2 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞
株的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法和应用,其步骤:A、hTRIM25 基因的获取:参照人源 TRIM25 基因序列,设计一对引物;B、真核表达载体 pCA-hTRIM25eGFP 的构建:通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 将 hTRIM25 连入 pCA 载体,获得 pCA-hTRIM25。然后用 *SaI* 和 *XhoI* 分别酶切 pEGFP-C1 和 pCA-hTRIM25,回收载体 pEGFP-C1 和含有启动子和 hTRIM25 片段并用 T4ligase 连接,提取重组质粒,分别通过 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切鉴定;C、稳定表达 hTRIM25 基因的 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株的构建:通过脂质体法 Lipofectamine2000 将 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 转染 BHK-21 细胞,转染后筛选,通过间接免疫荧光和 Westernblotting 鉴定 hTRIM25 蛋白的表达,为 BHK21-hTRIM25eGFP。该株在制备治疗或预防 FMDV 药物中的应用。构建的 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株能稳定表达 hTRIM25 蛋白;稳定表达 hTRIM25 基因的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP 能够抑制口蹄疫病毒复制;hTRIM25 基因用来构建转基因小鼠和转基因猪等转基因动物。

1. 一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法,其步骤是:

A、hTRIM25 基因的获取:

参照人源 TRIM25 基因序列,设计一对引物:

phTRIM25F :5' -TTTGAATTCCACCATGGCAGAGCTGTGC-3' ;

phTRIM25R :5' -TTTCTCGAGTCACGTAGTAGAATCGAGACCGAG-3' ;

提取 HeLa 细胞 RNA 为模板,以通用引物扩增获得 cDNA 后,用特异引物 phTRIM25F 和 phTRIM25R 扩增 hTRIM25 基因,在其 5' 端和 3' 端分别引入 *Eco*RI 和 *Xho*I,进行亚克隆,其反应体系为:模板 cDNA 5.0 μ L,10 $\times$ LA buffer 5.0 μ L, phTRIM25F、phTRIM25R 引物各 1.0 μ L;终浓度为 10pmol/L,LA 酶 0.25 μ L,dNTPS 1.0 μ L,加 ddH₂O 至 50.0 μ L,按 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分钟;然后 94 $^{\circ}$ C 作用 30 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟的反应条件在 PCR 仪上进行扩增,扩增的 PCR 产物经 0.8%g/v 的琼脂糖凝胶电泳,一条大小 1893bp 带为 hTRIM25 基因;

B、真核表达载体 pCA-hTRIM25eGFP 的构建:

通过 *Eco*RI 和 *Xho*I 将 hTRIM25 连入 pCA 载体,获得 pCA-hTRIM25,然后用 *Sal*I 和 *Xho*I 分别酶切 pEGFP-C1 和 pCA-hTRIM25,回收载体 pEGFP-C1 和含有启动子和 hTRIM25 片段并用 T4 ligase 连接,提取重组质粒,分别通过 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切鉴定,结果表明成功获得 pCA-hTRIM25eGFP;

C、稳定表达 hTRIM25 基因的 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株的构建:

通过脂质体法 Lipofectamine 2000 将 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 转染 BHK-21 细胞,转染 36 小时后用 800 μ g/ μ L G418 筛选,进行 5 轮后,通过间接免疫荧光和 Western blotting 鉴定 hTRIM25 蛋白的表达,为 BHK21-hTRIM25eGFP;

① 间接免疫荧光鉴定 hTRIM25 蛋白的表达:

将 BHK-eGFP 和转染人源 TRIM25 的 BHK-TRIM25eGFP 细胞接种于 24 孔细胞培养板,待细胞长满单层,进行间接免疫荧光,多聚甲醛固定,一抗为抗 V5 单克隆抗体,二抗为抗鼠的 Ig-G-RFP FITC,绿荧光蛋白与 hTRIM25 融合,细胞直接在荧光显微镜下观察到绿色荧光信号,用抗 V5 抗体进行间接免疫荧光,红色荧光信号表明 hTRIM25 的表达,构建细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP;

② Western blotting 鉴定外源基因 hTRIM25 的表达:

收集长满单层 BHK-eGFP 和 BHK-hTRIM25eGFP 细胞,提取蛋白,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测,一抗为抗 V5 单克隆抗体,二抗是 HRP 标记的鼠抗兔单克隆抗体,结果在 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞中有 75KD 的特异性阳性带,与 hTRIM25 蛋白大小相符,正常 BHK-eGFP 细胞阴性,表明 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株中 hTRIM25 有效表达。

2. 权利要求 1 所述的一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株在制备治疗或预防 FMDV 药物中的应用。

3. 权利要求 1 所述的一种人源 TRIM25 基因在构建转基因猪中的应用。

一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法 和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒学和抗病育种领域。更具体涉及一种抑制口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) 增殖的 TRIM25 基因,同时还涉及一种抑制口蹄疫病毒增殖的 TRIM25 基因的制备方法,还涉及一种 TRIM25 基因在制备治疗或预防 FMDV 药物中的应用。

背景技术

[0002] 我国是世界养猪第一大国。养猪业是我国畜牧业的主导产业,猪肉占肉类的 67.7%,是我国人民动物蛋白质的最主要来源。猪病严重制约着我国养猪业发展。近年来,口蹄疫、猪繁殖与呼吸道综合征等重大疾病频频爆发,对我国养猪业造成巨大损失。口蹄疫的暴发不但影响到经济发展、国际贸易,而且对社会的稳定构成威胁,因此又称之为“政治经济病”。联合国粮农组织 (FAO) 和世界动物卫生组织 (OIE) 都将该病列为重要动物传染病,并列入重大跨国动物疫病的全球消灭计划。在国际上,口蹄疫 (Foot-and-Mouth disease, FMD) 造成的经济损失巨大。如 2001 年 2 月由英国引发的 FMD 使得法国、爱尔兰、荷兰等欧盟国家相继暴发该病,南美的阿根廷也暴发 FMD。英国在此期间共宰杀动物达 450 万头,由此造成的全部经济损失高达 90 亿英镑,而且 2007 年英国又发生两起 FMD 疫情。有经济报告分析,如果畜牧业十分发达的美国暴发 FMD,当年的直接和间接损失将分别是 40 亿美元和 400 亿美元。

[0003] 我国的 FMD 疫情非常严重。据统计资料表明,1999-2003 年期间,我国发病动物总数达 890616 头 (只),遍及 31 个省、市、自治区,疫情暴发次数 1129 个,疫点数 2375 个。2003 年 4 月份以后,0 型 FMD 出现了我国罕见的基因型毒株,泛亚毒株又卷土重来。青海和新疆分别发现了 A 型和 Asia I 型 FMD。新疆 0 型和 Asia I 型 FMD 同时流行,在病畜中还发现 0 型和 Asia I 型混合感染。2009-2010 年猪 0 型 FMD 耿马毒在我国养猪场大面积的流行。而且各亚型之间无明显的交叉保护,增加了疫情的复杂性和控制难度,使防疫工作面临很大困难。因此如果能培育出抗 FMD 的猪新品种,将能从根本上解决 FMD 防控问题,而其关键是发掘抗 FMDV 复制的抗性基因。目前研究表明,FMDV 对干扰素非常敏感,干扰素处理的细胞能够很好的抑制 FMDV 的增殖,因而激活干扰素信号通路的宿主信号分子具有抗 FMDV 复制的潜力。

[0004] 三基序 (Tripartite motif, TRIM) 蛋白家族包括 60 多个成员,在生物学过程中发挥多种功能,如细胞分化、发育、发展、凋亡和免疫等 (Quaderi et al., 1997; Avela et al., 2000)。TRIM 蛋白具有共同的特征性的三基序,三个锌指结合区,一个 RING 指以及 1~2 个 B-Box 和一个环状的环区,因而称为 RBCC (Boxden, 1998)。C 末端在不同的分子间存在差异,大多有一个或更多的特异区域来决定该 TRIM 蛋白特异功能。TRIM RING 区域具有 E3 泛素化连接酶活性,介导不同底物的翻译后修饰。通过 CC 区自我关联,TRIM 蛋白寡聚体化并充当支架组装成多蛋白复合物占特异的细胞层。最新研究表明,TRIM 超家族中的多个成

员由于干扰素诱导表达,并且在参与了多种与天然免疫相关的生物过程。TRIM25RING E3 泛素连接酶能使病毒 RNA 受体维甲酸诱导基因 (retinoic acid-inducible gene-1, RIG-1) 的 N 段泛素化,进而与下游 MAVS 结合激活宿主干扰素信号通路,启动 IFN- β 的产生,发挥抗病毒作用 (McNab et al., 2011; Gack et al., 2007; Gack et al., 2008; Yoneyama and Fujita, 2001)。

[0005] 动物病毒性疫病的预防传统上主要通过疫苗的免疫预防接种,在动物疫病预防与控制中发挥着极其重要的作用。由于 FMDV 各亚型之间无明显的交叉保护,增加了疫情的复杂性和控制难度,使防疫工作面临很大困难。近年来随着转基因等生物技术的快速发展,动物的分子抗病育种得到长足的进步,可以从源头上控制疫病尤其是病毒性疾病的发生。分子抗病育种是控制疾病有效的策略之一,如将疫苗免疫和分子抗病育种结合在一起必将有助于动物疫病的控制。以人源 FMDV (hFMDV) 蛋白为研究对象,利用过表达 hTRIM25 蛋白的细胞株来评价 hTRIM25 对 FMDV 增值的影响,为 FMDV 的抗病毒育种提供优良的候选基因奠定基础。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是在于提供了一种稳定表达人源 TRIM25 基因 (hTRIM25) 的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP。该细胞可以稳定表达 hTRIM25 和绿荧光蛋白 eGFP,用于体外研究 TRIM25 蛋白抗病毒活性的优良材料。

[0007] 本发明的另一个目的是在于提供了一种稳定表达 hTRIM25 基因 (hTRIM25) 的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP 的制备方法,利用自身携带的绿荧光 eGFP 和抗性基因 neo 的 G418,便于细胞株的筛选和建立。

[0008] 本发明另一个目的是在于提供了一种抑制口蹄疫病毒 (FMDV) 增殖的 hTRIM25 基因的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP 在制备治疗或预防口蹄疫病毒 (FMDV) 药物 (增殖上) 中的应用。在 BHK-21 细胞上过表达 hTRIM25,通过细胞病变程度可以直接评价该蛋白抗病毒活性。

[0009] 本发明的还有一个目的是在于提供了一种 hTRIM25 基因在构建转基因小鼠和转基因猪等转基因动物中的应用。通过显微注射在体内稳定表达 hTRIM25 基因,为研究该蛋白的抗病毒活性提供材料。

[0010] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术措施:

[0011] 一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法,其步骤是:

[0012] A、hTRIM25 基因的获取:

[0013] 参照人源 TRIM25 基因序列 (NM_00508),设计一对引物:

[0014] phTRIM25F (5' -TTTGAATTCCACCATGGCAGAGCTGTGC-3')

[0015] phTRIM25R (5' -TTTCTCGAGTCACGTAGTAGAATCGAGACCGAG-3')

[0016] 提取 HeLa 细胞 RNA 为模板,以通用引物扩增获得 cDNA 后,用特异引物 phTRIM25F 和 phTRIM25R 扩增 hTRIM25 基因,在其 5' 端和 3' 端分别引入 EcoRI 和 XhoI,便于进行亚克隆。其反应体系为:模板 cDNA 5.0 μ L, 10 $\times$ LA buffer 5.0 μ L, phTRIM25F、phTRIM25R 引物各 1.0 μ L (终浓度为 10pmol/L), LA 酶 0.25 μ L, dNTPS 1.0 μ L,加 ddH₂O 至 50.0 μ L。按 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分钟;然后 94 $^{\circ}$ C 作用 30 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟,共 35 个循

环,最后 72℃延伸 10 分钟的反应条件在 PCR 仪上进行扩增,扩增的 PCR 产物经 0.8% (g/v) 的琼脂糖凝胶电泳分析,一条大小 1893bp 带为 hTRIM25 基因。

[0017] B、真核表达载体 pCA-hTRIM25eGFP 的构建:

[0018] 通过 EcoRI 和 XhoI 将 hTRIM25 连入 pCA 载体,获得 pCA-hTRIM25。然后用 SalI 和 XhoI 分别酶切 pEGFP-C1 和 pCA-hTRIM25,回收载体 pEGFP-C1 和含有启动子和 hTRIM25 片段并用 T4ligase 连接,提取重组质粒,分别通过 EcoRI 和 HindIII 酶切鉴定,结果表明成功获得 pCA-hTRIM25eGFP (见图 1B)。

[0019] C、稳定表达 hTRIM25 基因的 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株的构建:

[0020] 通过脂质体法 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 转染 BHK-21 (baby hamster kidney, ATCC CCL10) 细胞,转染 36 小时后用 800 μ g/ μ L G418 筛选,进行 5 轮后,通过间接免疫荧光和 Western blotting 鉴定 hTRIM25 蛋白的表达情况,并命名为 BHK21-hTRIM25eGFP。

[0021] ①间接免疫荧光鉴定 hTRIM25 蛋白的表达:

[0022] 将 BHK-eGFP 和转染人源 TRIM25 的 BHK-TRIM25eGFP 细胞接种于 24 孔细胞培养板,待细胞长满单层,进行间接免疫荧光。多聚甲醛固定,一抗为抗 V5 单克隆抗体 (Invitrogen),二抗为抗鼠的 Ig-G-RFP FITC。由于绿荧光蛋白与 hTRIM25 融合,所以细胞直接在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光信号,初步表明外源基因表达情况。进而用抗 V5 抗体进行间接免疫荧光,红色荧光信号表明 hTRIM25 的表达。一种分离的细胞株,其序列为 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列,表明成功构建细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP。

[0023] ② Western blotting 鉴定外源基因 hTRIM25 的表达:

[0024] 收集长满单层 BHK-eGFP 和 BHK-hTRIM25eGFP 细胞,提取蛋白,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。所用一抗为抗 V5 单克隆抗体 (Invitrogen),二抗是 HRP 标记的鼠抗兔单克隆抗体。结果在 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞中有 75KD 的特异性阳性带,与 hTRIM25 蛋白大小相符,而正常 BHK-eGFP 细胞阴性,表明 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株中 hTRIM25 有效表达 (如图 2B)。

[0025] 通过间接免疫荧光和 Western blotting 表明所建立 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株能稳定表达 hTRIM25 蛋白。由于 hTRIM25 蛋白理论上通过 RING E3 泛素连接酶使病毒 RNA 受体维甲酸诱导基因 (retinoic acid-inducible gene-1, RIG-1) 的 N 段泛素化,进而与下游 MAVS 结合激活宿主干扰素信号通路,启动 IFN- β 的产生,发挥抗病毒作用,进而通过抗病毒活性研究其生物功能。

[0026] 一种稳定表达人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株在制备治疗或预防口蹄疫病毒药物中的应用,其应用过程是:

[0027] 为了研究 hTRIM25 基因对 FMDV 增殖的影响,在 96 孔细胞培养板中分别接种 BHK-eGFP 和 BHK-TRIM25-eGFP, 0.8×10^4 cells/well。次日分别用 O 型 FMDV 进行病毒感染,感染剂量为 100TCID₅₀ (0.0125MOI),每孔接种 100 μ L, 37℃, 5% (v/v) CO2 吸附 1h。1h 后吸弃上清,补加 200 μ L 维持液。分别在感染后不同的时间点观察病毒感染细胞情况并收集上清,进而测定 TCID₅₀ (如图 3)。

[0028] 一种抑制 FMDV 增殖的 hTRIM25 基因在转基因猪等转基因动物中的应用,其应用过程是:

[0029] 为了在机体水平研究 hTRIM25 基因的抗病毒活性,利用 pCA-hTRIM25eGFP,通过显微注射进行转基因猪的研究,图 4 为转基因猪第一代产仔猪的 DNA 检测结果。

[0030] 本发明的有益效果是:

[0031] 1. 本发明所构建的 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株能稳定表达 hTRIM25 蛋白。

[0032] 2. 本发明是稳定表达 hTRIM25 基因的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP 能够抑制口蹄疫病毒复制。

[0033] 3. 本发明的 hTRIM25 基因可以用来构建转基因猪等转基因动物。

附图说明

[0034] 图 1 为构建真核质粒 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 的示意图以及酶切鉴定图

[0035] 图 1A 为构建真核质粒 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 的示意图。

[0036] 图 1B 为利用 EcoRI 和 HindIII 分别进行酶切鉴定图。

[0037] 图 2 为一种人源 TRIM25 基因在 BHK21 细胞中表达图谱示意图。

[0038] 利用自身表达的绿荧光和抗 V5 标签的间接免疫荧光的鉴定 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞株 (2A);

[0039] 抗 V5 抗体进行 Western-blotting 进一步鉴定 hTRIM25 的表达,大小为 75KDa (2B)。

[0040] 图 3 为一种稳定表达人源 TRIM25 基因细胞株抑制口蹄疫病毒增殖的图谱示意图。

[0041] 将 BHK-eGFP 和 BHK21-hTRIM25eGFP 细胞分别接种 96 孔细胞培养板, 0.8×10^4 cells/well。次日用 0.0125MOI O 型和 A 型 FMDV 进行病毒感染,分别于感染后不同时间点观察细胞病变并取样测定病毒含量。结果表明在 24h 时, BHK21-hTRIM25eGFP 细胞细胞病变很少,而 BHK-eGFP 细胞病变程度很严重,表现为细胞变圆,脱落 (A)。测定结果不同时间点病毒含量 (半数组织培养感染计量 $TCID_{50}$,如 B 所示),统计表明 hTRIM25 能显著抑制 FMDV 的增殖 (C)。

[0042] 图 4 为转基因母猪所产第一代仔猪样品 DNA 检测图。

[0043] 通过显微注射胚胎于母猪受孕,所产仔猪耳部样品提取 DNA 进行 PCR 扩增外源基因 hTRIM25 结果图。

具体实施方式

[0044] 实施例 1:

[0045] 一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的构建:

[0046] 1、人源 TRIM25 基因的合成:

[0047] 参照人源 TRIM25 基因序列 (NM_00508),设计一对引物

[0048] pTRIM25F (5' -TTTGAATTCCACCATGGCAGAGCTGTGC-3')

[0049] pTRIM25R (5' -TTTCTCGAGTCACGTAGTAGAATCGAGACCGAG-3')

[0050] 提取 HeLa 细胞 RNA 为模板,以通用引物扩增获得 cDNA 后,用特异引物 phTRIM25F 和 phTRIM25R 扩增 hTRIM25 基因,在其 5' 端和 3' 端分别引入 EcoRI 和 XhoI,便于进行亚克隆。其反应体系为:模板质粒 cDNA 5.0 μ L, 10 $\times$ LA buffer 5 μ L, phTRIM25F、phTRIM25R 引物各 1.0 μ L (终浓度为 10pmol/L), LA 酶 0.25 μ L, dNTPS 1.0 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。按

94℃作用 3 分钟;然后 94℃作用 30 秒分钟,58℃退火 30 秒,72℃延伸 3 分钟,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 分钟的反应条件在 PCR 仪上进行扩增,扩增的 PCR 产物经 0.8% (g/v) 的琼脂糖凝胶电泳分析,一条大小 1893bp 为 hTRIM25 基因。

[0051] 2、真核表达载体 pCA-hTRIM25eGFP 的构建:

[0052] 通过 EcoRI 和 XhoI 将 hTRIM25 连入 pCA 载体,获得 pCA-hTRIM25。然后用 SalI 和 XhoI 分别酶切 pEGFP-C1 和 pCA-hTRIM25,回收载体 pEGFP-C1 和含有启动子和 hTRIM25 片段并用 T4ligase 连接,提取重组质粒,分别通过 EcoRI 和 HindIII 酶切鉴定,结果表明成功获得 pCA-hTRIM25eGFP (见图 1B)。

[0053] 3、稳定表达人源 TRIM25 基因的 BHK21hTRIM25eGFP 细胞株的构建:

[0054] 用 pCA-eGFP 和 pCA-hTRIM25eGFP 共转染 BHK-21 细胞,转染 36 小时后用 800 μ g/ μ LG418 进行筛选,进行多轮筛选后,通过间接免疫荧光和 Western-blotting 鉴定外源基因 hTRIM25 的表达情况。

[0055] (a)、间接免疫荧光鉴定 hTRIM25 的表达:

[0056] 将 BHK-eGFP 和转染人源 TRIM25 的 BHK-TRIM25eGFP 细胞接种于 24 孔细胞培养板,待细胞长满单层,进行间接免疫荧光,具体步骤如下:

[0057] 1. 吸弃培养液,用 PBS 洗细胞 3 次,每次 5min;

[0058] 2. 吸弃 PBS,每孔加 1ml 4% (v/v) 多聚甲醛,室温摇床作用 30 分钟;

[0059] 3. 吸弃 4% (v/v) 多聚甲醛,用 PBS 洗细胞 3 次,每次 10min;

[0060] 4. 吸干 PBS,每孔加 1ML0.2% (v/v)TrotonX-100 的 PBSA,冰上作用 5min;

[0061] 5. 用 PBS 洗细胞 3 次,每次 3min;

[0062] 6. 每孔加 1ml 1% (g/v)BSA 的 PBS,室温作用封闭 1h;

[0063] 7. 用 PBS 洗细胞 1 次,每次 3min;

[0064] 8. 加入一抗 (anti-V antibody 1:200,):300ul PBSA+1.5ul anti-V antibody,100ul/孔;

[0065] 9. 37℃作用 1h(CO₂ 培养箱);

[0066] 10. 用 PBS 洗细胞 3 次,每次 3min;

[0067] 11. 加入二抗 (抗鼠的 Ig-G-RFP FITC antibody 1:100):300ul PBSA+3.0ul FITC antibody+6.0ul DAPI(500ug/ml),100ul/孔;避光操作。

[0068] 12. 37℃作用 1h(CO₂ 培养箱);

[0069] 13. 用 PBS 洗细胞 3 次,每次 3min;

[0070] 14. 荧光显微镜下观察红荧光情况,结果见附图 2A。

[0071] 由于 BHK-TRIM25eGFP 细胞自身有绿荧光,所以在荧光显微镜下可以直接观察到绿色荧光信号。利用 V5 标签单克隆抗体,红荧光检测 hTRIM25 的表达,红色信号表明 hTRIM25 有效表达。另外蓝色为细胞核的染色情况。

[0072] (b)、Western blotting 鉴定 hTRIM25 的表达:

[0073] 将长满单层 BHK-eGFP 和 BHK-TRIM25eGFP 细胞收集,提取蛋白,12% SDS-PAGE 电泳后利用抗体为抗 V5(Invitrogen) 的单克隆抗体进行 Western blot 检测。同时以 β -actin 为内参,结果表明 BHK-TRIM25eGFP 细胞有一条特异性条带,大小为 75KD,与预期结果一直,而 BHK-eGFP 细胞阴性 (附图 2B)。

[0074] 实施例 2：

[0075] 一种抑制 FMDV 增殖的 TRIM25 基因的细胞株 BHK21-hTRIM25eGFP 在制备治疗或预防 FMDV 药物中的应用，其应用过程是：

[0076] 为了研究 hTRIM25 基因对 FMDV 增殖的影响，分别在感染后不同的时间点观察病毒感染细胞产生细胞病变 (CPE) 情况并收集上清，测定其病毒含量 (TCID₅₀)。

[0077] 1、FMDV 感染细胞后形态学观察：

[0078] 为了观察 hTRIM25 蛋白对 FMDV 增殖的影响，用相同剂量的 FMDV (0.0125MOI) 感染 BHK21-hTRIM25eGFP 和 BHK-eGFP 细胞，分别在感染后不同时间点观察病毒感染细胞所致细胞病变效应 (CPE) (附图 3A)。结果表明感染后 6h 可以发现 BHK-eGFP 细胞中有明显的细胞变圆，细胞间隙扩大。而 BHK-hTRIM25eGFP 细胞长势良好，直到感染后 36h BHK-hTRIM25eGFP 细胞才有的典型 CPE。

[0079] 2、病毒滴度的测定：

[0080] 为了量化 hTRIM25 蛋白对 FMDV 的抑制效果，测定病毒感染后不同时间点样品中 FMDV 的滴度。具体操作如下：

[0081] 将 BHK-eGFP 和 BHK-hTRIM25eGFP 细胞以 0.8×10^4 cells/well 量分别接种 96 孔细胞培养板，次日用 0.0125MOI 0 型 FMDV 进行病毒感染，每孔接种 100 μ l，各 3 个重复。37℃，5% CO₂ 吸附 1h。1h 后吸弃上清，补加 200 μ l 2% 胎牛血清的 DMEM。分别在感染后不同时间点观察病毒感染细胞所致细胞病变效应并收集上清，进而测定各个时间点样品中病毒的滴度。按 Reed-Muench 法测定病毒半数组织细胞感染剂量 (TCID₅₀) (结果见附图 3B)。统计结果表明感染 BHK-hTRIM25eGFP 细胞组病毒含量一直低于 BHK-eGFP 细胞感染组，滴度低 10^3 倍，表明 hTRIM25 能显著抑制 FMDV 的增殖 (附图 3C)。

[0082] 实施例 3：

[0083] 一种抑制 FMDV 增殖的 hTRIM25 基因在构建转基因猪等转基因动物中的应用，其应用过程是：

[0084] 为了在机体水平研究 hTRIM25 基因的抗病毒活性，利用 pCA-hTRIM25eGFP，通过显微注射进行转基因猪的研究，图 4 为转基因猪第一代产仔猪的 DNA 检测结果。

[0085] 尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明，但是不能认为是对本发明范围的限制，本发明的范围由所附权利要求书限定。另外，本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰，这些改动或修饰形式同样落在本发明范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 华中农业大学

<120> 一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法和应用

<130> 一种人源 TRIM25 基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法和应用

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1893

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

atggcagagc	tgtgccccct	ggccgaggag	ctgtcgtgct	ccatctgcct	ggagcccttc	60
aaggagccgg	tcaccactcc	gtgcggccac	aacttctgcg	ggtcgtgcct	gaatgagacg	120
tgggcagtcc	agggtctgcc	atacctgtgc	ccgcagtgcc	gcgccgtcta	ccaggcgcga	180
ccgcagctgc	acaagaacac	ggtgctgtgc	aacgtggtgg	agcagttcct	gcaggccgac	240
ctggccccgg	agccacccgc	cgacgtctgg	acgccgcccc	cccgcgcctc	tgcaccacgc	300
ccgaatgccc	aggtggcctg	cgaccactgc	ctgaaggagg	ccgccgtgaa	gacgtgcttg	360
gtgtgcatgg	cctccttctg	tcaggagcac	ctgcagccgc	acttcgacag	ccccgccttc	420
caggaccacc	cgctgcagcc	gcccgttcgc	gacctgttgc	gccgcaaattg	ttcccagcac	480
aatcggtctg	gggaattttt	ctgccccgag	cacagcgagt	gcattctgcca	catctgcctg	540
gtggagcata	agacctgctc	tcccgcgtcc	ctgagccagg	ccagcgccga	cctggaggcc	600
accctgaggg	acaaactaac	tgtcatgtac	agtcagatca	acggggcgctc	gagagcactg	660
gatgatgtga	gaaacaggca	gcaggatgtg	cggatgactg	caaacagaaa	ggtggagcag	720
ctacaacaag	aatacacgga	aatgaaggct	ctcttgagcg	cctcagagac	cacctcgaca	780
aggaagataa	aggaagagga	gaagagggtc	aacagcaagt	ttgacaccat	ttatcagatt	840
ctcctcaaga	agaagagtga	gateccagacc	ttgaaggagg	agattgaaca	gagcctgacc	900
aagagggatg	agttcgagtt	tctggagaaa	gcatcaaaac	tgcgaggaat	ctcaacaaag	960
ccagtctaca	tccccgaggt	ggaactgaac	cacaagctga	taaaaggcat	ccaccagagc	1020
accatagacc	tcaaaaacga	gctgaagcag	tgcattcgggc	ggctccagga	gcccaccccc	1080
agttcaggtg	accctggaga	gcatgaccca	gcgtccacac	acaaatccac	acgccctgtg	1140
aagaaggtct	ccaaagagga	aaagaaatcc	aagaaacctc	cccctgtccc	tgccttaccc	1200
agcaagcttc	ccacgttttg	agccccggaa	cagttagtgg	atttaaaaca	agctggcttg	1260
gaggtgcag	ccaaagccac	cagctcacat	ccgaactcaa	catctctcaa	ggccaaggtg	1320
ctggagacct	tcctggccaa	gtccagacct	gagctcctgg	agtattacat	taaagtcac	1380
ctggactaca	acaccgcccc	caacaaagtg	gctctgtcag	agtgtatatac	agtagcttct	1440
gtggctgaga	tgcctcagaa	ctaccggccg	catccccaga	ggttcacata	ctgctctcag	1500

gtgctgggcc	tgcactgcta	caagaagggg	atccactact	gggaggtgga	gctgcagaag	1560
aacaacttct	gtggggtagg	catctgctac	ggaagcatga	accggcaggg	cccagaaagc	1620
aggctcggcc	gcaacagcgc	ctcctggtgc	gtggagtggg	tcaacaccaa	gatctctgcc	1680
tggcacaata	acgtggagaa	aacctgccc	tccaccaagg	ccacgcgggt	gggcgtgctt	1740
ctcaactgtg	accacggctt	tgtcatcttc	ttegtgttg	ccgacaaggt	ccacctgatg	1800
tataagtcca	gggtggactt	tactgagget	ttgtaccceg	ctttctgggt	attttctgct	1860

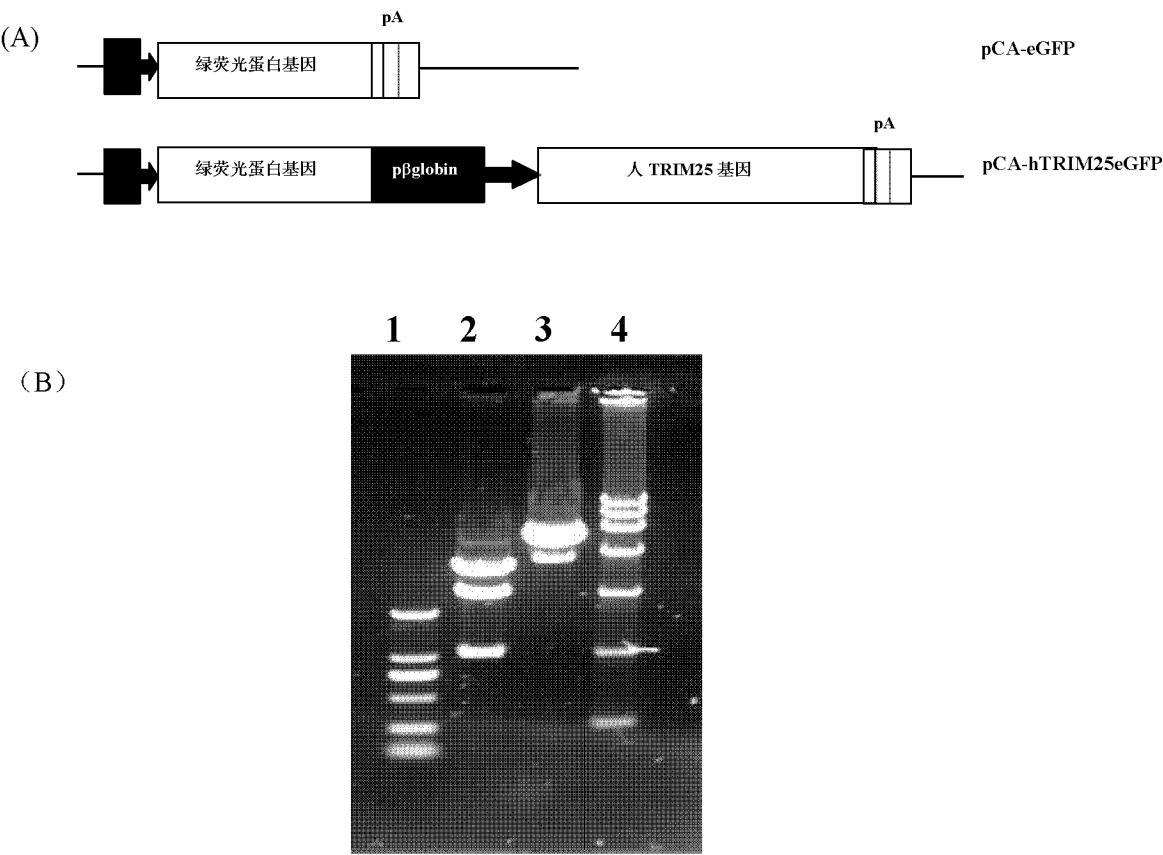


图 1

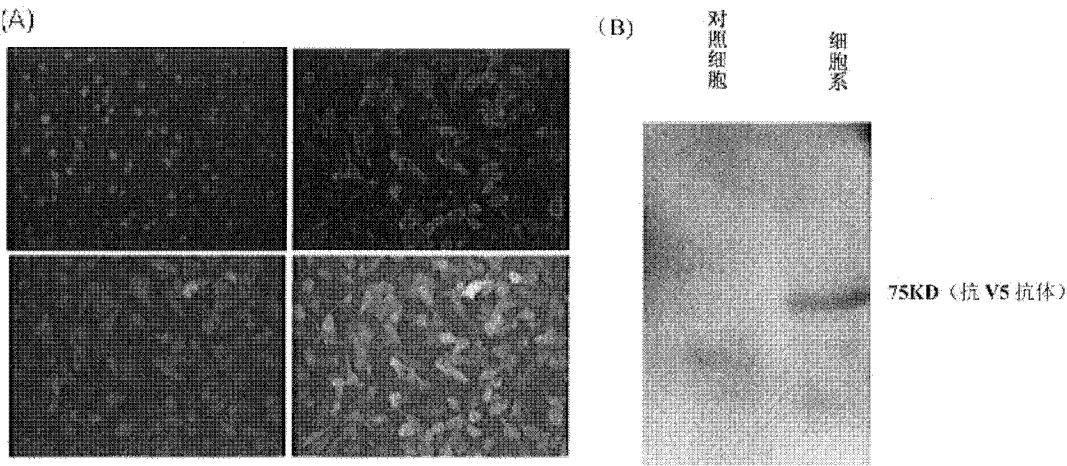
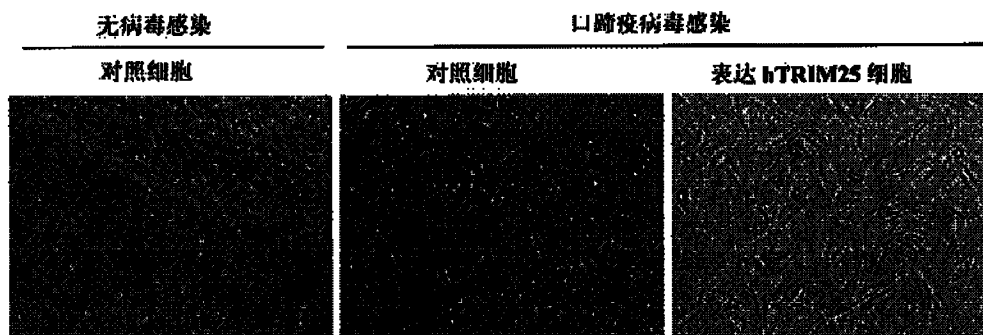
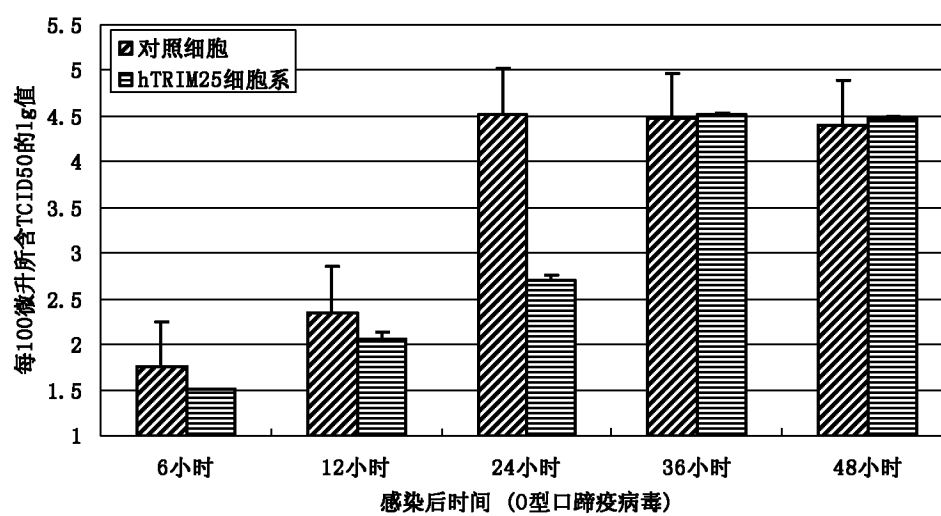


图 2

(A)



(B)



(C)

100 个 TCID50 的 O 型口蹄疫病毒	6 小时	12 小时	24 小时	36 小时	48 小时
表达 hTRIM25 细胞	1.51	2	2.67	4.5	4.47
	1.5	2.13	2.75	4.53	4.49
对照细胞	1.5	2.34	4.5	4.47	4.3
	2	2.35	4.55	4.49	4.5

图 3

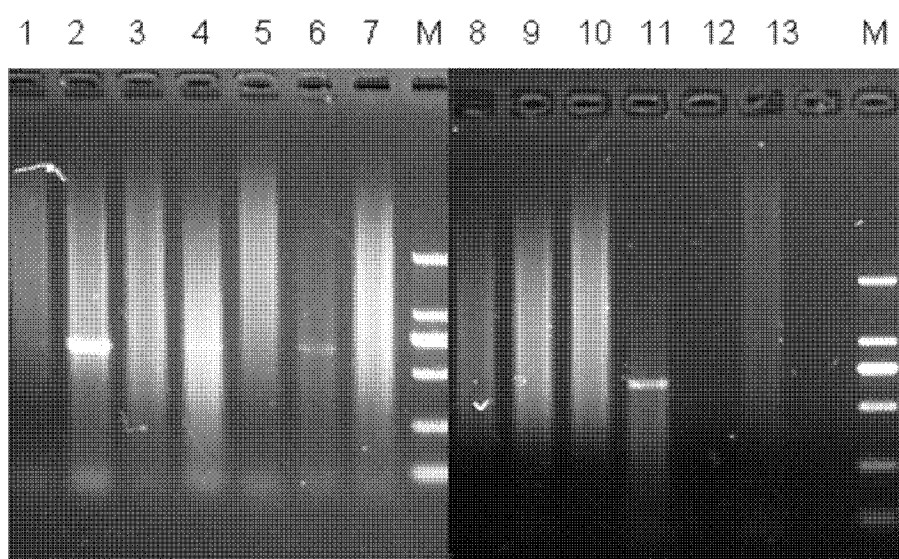


图 4

专利名称(译)	一种人源TRIM25基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102321627A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201110191074.4	申请日	2011-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	钱平 李祥敏 许晋芳 刘莎莎 周锐 金梅林 陈焕春		
发明人	钱平 李祥敏 许晋芳 刘莎莎 周锐 金梅林 陈焕春		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/79 C12N5/10 G01N33/53 G01N21/64 A61K35/23 A61P31/14 A01K67/027 A61K35/22		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN102321627B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人源TRIM25基因抑制口蹄疫病毒细胞株的制备方法和应用，其步骤：A、hTRIM25基因的获取：参照人源TRIM25基因序列，设计一对引物；B、真核表达载体pCA-hTRIM25eGFP的构建：通过EcoRI和XhoI将hTRIM25连入pCA载体，获得pCA-hTRIM25。然后用Sall和XhoI分别酶切pEGFP-C1和pCA-hTRIM25，回收载体pEGFP-C1和含有启动子和hTRIM25片段并用T4ligase连接，提取重组质粒，分别通过EcoRI和HindIII酶切鉴定；C、稳定表达hTRIM25基因的BHK21-hTRIM25eGFP细胞株的构建：通过脂质体法Lipofectamine2000将pCA-eGFP和pCA-hTRIM25eGFP转染BHK-21细胞，转染后筛选，通过间接免疫荧光和Westernblotting鉴定hTRIM25蛋白的表达，为BHK21-hTRIM25eGFP。该株在制备治疗或预防FMDV药物中的应用。构建的BHK21-hTRIM25eGFP细胞株能稳定表达hTRIM25蛋白；稳定表达hTRIM25基因的细胞株BHK21-hTRIM25eGFP能够抑制口蹄疫病毒复制；hTRIM25基因用来构建转基因小鼠和转基因猪等转基因动物。

