

分类号: S855.3

授予学位单位代码: 10434

学

号: 2018110433

山東農業大學

硕士学位论文

猪环鸟腺苷酸合成酶 cGAS 相互作用蛋白的筛选与鉴定

Screening and Identification of Proteins Interacting with
Porcine Cyclic GMP-AMP Synthase

研 究 生 : 赵雨娜

学 科 专 业 : 预防兽医学

研 究 方 向 : 动物免疫学

学 院 : 动物科技学院

指 导 教 师 : 商营利教授

2021 年 5 月 28 日

论 文 提 交 日 期：2021年5月28日

论 文 答 辩 日 期：2021年5月21日

学 位 授 予 日 期：2021年6月

学 科 门 类：农 学

答 辩 委 员 会 主 席：张 兴 晓

符号说明

英文缩写	英文全称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BIS	N,N'-Methylene-bis(acrylamide)	N,N'-亚甲基双丙烯酰胺
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cGAMP	Cyclic GMP-AMP	环磷酸鸟苷腺苷
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
ddH ₂ O	Distilled and deionized water	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	DMEM 培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
dsDNA	Double-stranded DNA	双链 DNA
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HT-DNA	Herring testis DNA	鲱鱼睾丸 DNA
IFA	Immunofluorescence assay	间接免疫荧光测定
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀法
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
IRF3	Interferon regulatory Factor 3	干扰素调节因子 3
ISGs	Interferon-stimulated genes	干扰素刺激基因
Kana	kanamycin sulfate	硫酸卡那霉素
KD	Kilodalton	千道尔顿

LB	Luria-Bertani	LB 液体培养基
NLR	Nucleotide oligomerization domain-like receptor	NOD 样受体
OD	Optical density	光密度
PAMP	Pathogen associated molecule pattern	病原体相关分子模式
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲溶液
PBST	Phosphate buffered solution/Tween-20	磷酸盐吐温缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PRR	Pattern-recognition receptor	模式识别受体
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏（二）氟乙烯
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RLR	RIG-I-like receptor	RIG-I 样受体
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录 PCR
rpm	round per minute	每分钟转数
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
STING	Stimulator of interferon genes	干扰素基因刺激蛋白
TAE	Tris acetic acid EDTA	核酸电泳缓冲液
TBS	Tris buffer saline	Tris-HCl 缓冲盐溶液
TEMED	NNNN`-tetramethyl aminomethane	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
WB	Western Blot	免疫印迹试验

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
1 前言	1
1.1 天然免疫识别与模式识别受体	1
1.1.1 TLRs 样识别受体	2
1.1.2 RLRs 样识别受体	2
1.1.3 NLRs 样识别受体	3
1.1.4 DNA 识别受体	3
1.2 cGAS 的发现及意义	4
1.2.1 cGAS 的结构与功能	5
1.2.2 cGAS 的调控机制	6
1.3 猪 cGAS 研究进展	8
1.4 本研究的目的和意义	10
2 材料与方法	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 质粒和细胞	11
2.1.2 主要试剂及抗体	11
2.1.3 设备仪器	12
2.2 实验方法	13
2.2.1 猪 cGAS 基因扩增	13
2.2.2 重组表达载体构建与鉴定	13
2.2.3 感受态细胞制备	15
2.2.4 质粒的小量提取	16
2.2.5 重组蛋白的诱导表达及表达条件优化	17

2.2.6 重组蛋白的纯化.....	18
2.2.7 蛋白浓度测定.....	19
2.2.9 免疫印迹.....	20
2.2.10 重组蛋白活性验证.....	20
2.2.11 生物大分子相互作用仪与质谱鉴定.....	21
2.2.12 细胞的培养、冻存与复苏.....	22
2.2.13 真核细胞转染.....	22
2.2.14 间接免疫荧光.....	22
2.2.15 细胞总 RNA 的提取与反转录.....	23
2.2.16 实时荧光定量 PCR.....	24
2.2.17 免疫共沉淀.....	24
2.2.18 数据统计分析.....	24
3 结果与分析.....	25
3.1 猪 cGAS 基因的克隆及真核表达载体的构建.....	25
3.2 猪 cGAS 蛋白表达验证及细胞定位.....	26
3.3 猪 cGAS 原核表达载体的构建.....	26
3.4 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达与鉴定.....	27
3.5 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达条件优化.....	28
3.6 重组猪 cGAS 蛋白的纯化及条件优化.....	29
3.7 重组猪 cGAS 蛋白的活性检测.....	30
3.8 生物大分子相互作用仪质谱分析猪 cGAS 相互作用蛋白.....	31
3.9 猪 cGAS 相互作用蛋白鉴定.....	34
4 讨论.....	37
5 结论.....	40
参考文献.....	41

附录.....	47
致谢.....	51
攻读学位期间发表论文情况.....	52

中文摘要

环鸟苷-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)是新发现的一种胞浆 DNA 感受器, 其识别 DNA 活化后可催化生成 cGAMP, 进而激活下游接头蛋白 STING, 诱导 I 型干扰素产生和启动宿主防御。另外 cGAS 也能识别自身 DNA 而异常激活, 并可能导致免疫损伤以及自身免疫病。因此 cGAS 活化受到机体的严格调控。目前已发现人和小鼠的 cGAS 存在着多种形式的翻译后调控机制, 但对于猪 cGAS 活化的调控机制尚不完全清楚。

为了筛选和鉴定调控猪 cGAS 的分子, 我们构建了猪 cGAS 的原核表达载体并将其转化至 BL21(DE3)大肠杆菌中进行重组蛋白的表达。通过优化表达的温度、IPTG 浓度、诱导时间三方面找到了最佳诱导表达条件, 实现了猪 cGAS 的可溶性表达。将获得的重组蛋白利用镍柱进行亲和层析纯化, 得到了纯度较高的重组猪 cGAS 蛋白。为了验证重组蛋白的生物学活性, 利用体外酶促反应检测了重组猪 cGAS 生物合成 2'3'-cGAMP 和诱导 IFN- β 的产生的能力, 发现所纯化的重组猪 cGAS 蛋白具有较高的生物学活性。进一步, 将纯化的重组猪 cGAS 蛋白通过氨基偶联包被到 CM5 芯片上, 利用生物大分子相互作用仪 BiaCORE 筛选猪 cGAS 与猪肺泡巨噬细胞裂解液中可能相互作用的蛋白分子。质谱分析找到了 61 个与猪 cGAS 可能相互作用的细胞蛋白, GO 富集分析发现这些蛋白主要分布于外泌体、细胞核、胞外区、细胞质中, 参与基因表达、转录后基因调控、翻译、细胞自噬、凋亡、RNA 代谢等途径。利用免疫荧光和免疫共沉淀对筛选出的与猪 cGAS 相互作用可能性较高的细胞蛋白 YWHAB、FABP5 进行相互作用验证, 结果表明猪 cGAS 均能与 YWHAB、FABP5 在细胞中发生共定位和相互作用, 证实本研究中筛选到的相互作用蛋白分子均有很高的可靠性。

综上所述, 本研究利用大肠杆菌表达系统实现了猪 cGAS 蛋白的可溶性表达, 并获得纯度较高的具有生物学活性的重组猪 cGAS 蛋白。利用生物大分子相互作用仪和质谱的方法筛选和鉴定多个与猪 cGAS 相互作用的新蛋白分子。这些结果为下一步深入研究猪 cGAS 活化的调控机制及研发新型抗病毒药物提供理论依据。

关键词: 猪 cGAS, 原核表达, 蛋白纯化, 蛋白相互作用, BiaCORE

Screening and Identification of Proteins Interacting with Porcine Cyclic GMP-AMP Synthase

Abstract

Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) is a newly identified cytosolic DNA sensor that recognizes DNA activation and catalyses the generation of cGAMP, which in turn activates the downstream adapter protein STING, induces production of type I interferons (IFNs) and initiates host defense. In addition, cGAS can also recognize DNA from the host cells and is activated abnormally, which may lead to immune damage and autoimmune diseases. Therefore, activation of cGAS is strictly regulated by the organism. Although various post-translational regulatory mechanisms of cGAS in human and mouse have been studied, how the porcine cGAS (pcGAS) activation is regulated remains largely unclear.

In order to understand the regulatory mechanisms of pcGAS activation, we first constructed a prokaryotic expression vector of pcGAS and expressed recombinant pcGAS in *Escherichia coli* (BL21/DE3). Soluble recombinant pcGAS proteins were obtained by optimizing the expression temperature, IPTG concentration, and induction time. The recombinant protein pcGAS were then purified by affinity chromatography using a nickel column to reach high purity. The biological activity of the purified pcGAS were further verified by using an in vitro enzymatic reaction to detect the ability of recombinant pcGAS to synthesis of 2'3'-cGAMP and induction of type I IFNs. To screen and identify molecules that may interact with pcGAS, the purified recombinant pcGAS were coated on a CM5 Chip through amino coupling as bait protein to screen potential interaction proteins in porcine alveolar macrophage lysates by using BiaCORE system for interactions of biological macromolecules. As a result, 61 potential proteins that may interact with pcGAS were identified by liquid chromatograph mass spectrometer (LC/MS). GO enrichment analysis showed that the identified proteins distributed in exosomes, nuclei, extracellular regions, and cytoplasm, and were functionally involved in regulation of gene transcription, protein translation, RNA metabolism, autophagy and apoptosis. The interaction of pcGAS and two high possible proteins 14-3-3 protein beta/alpha (YWHAB) and fatty acid-binding protein 5 (FABP5) were confirmed by immunofluorescence and co-immunoprecipitation (Co-IP). The results showed that pcGAS co-localized interacted with YWHAB and FABP5 in cytoplasm and interacted with YWHAB and FABP5 in cells, suggesting that the interacting molecules identified in this study are reliable.

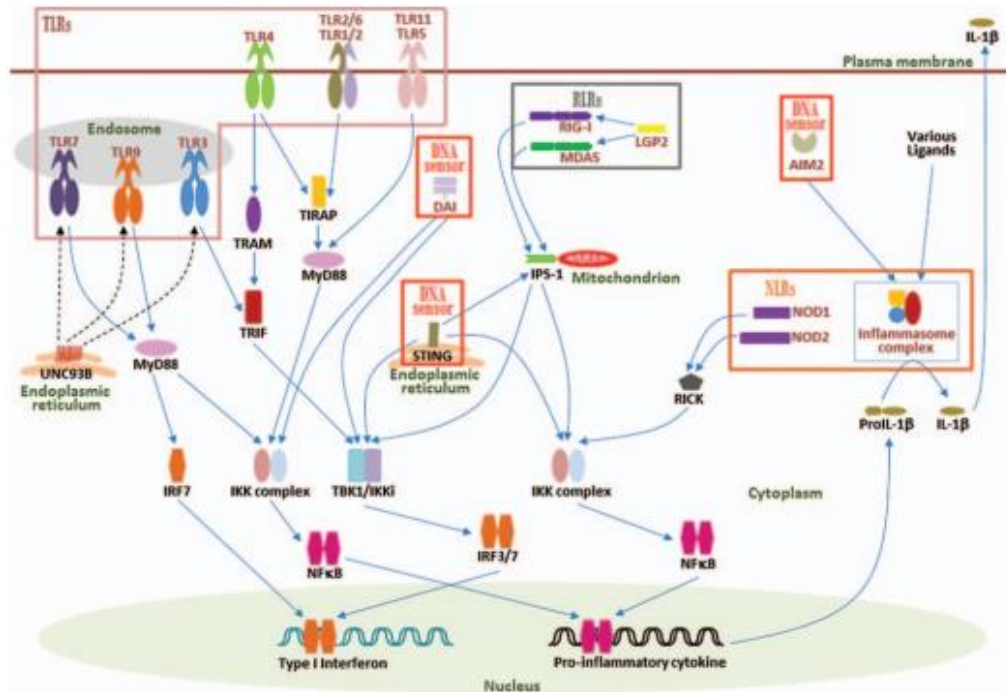
In summary, we have successfully obtained soluble recombinant pcGAS with high purity and biological activity. Moreover, 61 pcGAS interacting proteins that were previously unappreciated were identified by BiaCORE and LC/MS method and two of them were further confirmed immunofluorescence and Co-IP. Hence, the results in this study provided a theoretical basis for deep understanding of regulatory mechanisms of pcGAS activation and potential targets for antiviral drugs.

Keywords: Porcine cGAS; Prokaryotic Expression; Protein Purification; Protein Interaction; BiaCORE

1 前言

1.1 天然免疫识别与模式识别受体

固有免疫是机体在种系发生和进化过程中形成的一种与生俱来的免疫防御功能，是构成机体抵御病原入侵的第一道防线(Takeuchi and Akira 2010)。例如，皮肤和粘膜对于病原体的机械阻挡，机体针对病毒感染产生的 I 型干扰素，以及针对不同细菌和病毒产生的抗菌肽和炎症反应等，都是机体固有免疫的重要组成成分(Ganz 2003)。固有免疫包括组织的机械屏障作用、固有免疫细胞的抗感染作用和固有免疫分子的抗感染效应(Klotman and Chang 2006)。固有免疫是抵御入侵病原体的第一道防线，在机体抗病原微生物的入侵发挥非常重要的作用。当病原微生物侵入机体时，免疫细胞能够快速识别并激活免疫反应，这一过程通过模式识别受体(Takeuchi and Akira 2010)识别病原体相关的分子模式(PAMP)来感知病原体的多种危险信号，还检测损伤相关的分子模式(DAMP)以维持体内平衡。该受体在先天性免疫细胞(如树突状细胞，巨噬细胞和嗜中性粒细胞)上表达，可以特异性识别病原微生物高度保守的分子区域，通过病原体携带的多种毒力因子与宿主的免疫监视机制之间的相互作用(Janeway 1989)。病原体相关分子模式主要包括蛋白质，脂质，碳水化合物和核酸等(Ronald and Beutler 2010)。PAMP 和 DAMP 都被先天性免疫模式识别受体(PRR)识别。迄今为止已经发现了几类 PRR，其中包括 TLRs 受体，RLRs 受体，NLRs 受体，C 型凝集素样受体(CLR)和胞质 DNA 受体(CDR)(Cui *et al.*, 2014)。模式识别受体识别 PAMPs 后进一步激活下游信号，PRR 触发细胞内信号传导，以启动基因转录如转录因子 NF- κ B (Nuclear factor- κ B)、IRFs 活化或蛋白酶依赖性细胞因子的分泌，从而产生抗病毒干扰素 (IFN)、促炎细胞因子和趋化因子以直接对抗病原体并形成随后的适应性免疫力(Blander 2012)。

图 1 PRRs 介导的信号传导 (H. Kumar *et al.* 2011)Fig 1. PRRs-mediated signaling.(H. Kumar *et al.* 2011)

1.1.1 TLRs 样识别受体

TLRs 是研究最广泛的 PRRs, 被认为是病原体主要的传感器, 这一发现使 TLR 在免疫生物学领域迅速扩大。目前为止已经鉴定出 11 个 TLR 家族成员(小鼠中有 13 个)。TLR 在体内多种组织与细胞中均有表达, 特别在巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞中高表达 (An *et al.*, 2010)。TLR1、2、4、5 和 6 主要在细胞表面表达, 识别来自细菌、真菌和原生动物的 PAMPs, 而 TLR3、7、8 和 9 只在内吞腔内表达, 主要识别来自各种病毒和细菌的核酸 PAMPs(Barton and Medzhitov 2002)。TLR 属于 I 型跨膜受体, 其特征在于细胞外富含亮氨酸重复序列 (LRR) 和细胞内 Toll / IL-1R 受体 (TIR) 区域, TIR 结构域通过与接头蛋白的相互作用转导信号, 最终活化转录因子 NF-κB 和 IRF3 等, 产生 I 型 IFN、炎性细胞因子等参与机体防御反应(Takeda and Akira 2005)。

1.1.2 RLRs 样识别受体

进入细胞内的病毒核酸主要由 RLR 识别。已知的 RLR 由三个成员组成, 即 RIG-1, MDA5 和 LGP2。这些传感器从感染细胞的细胞质中的 RNA 病毒中识别出 RNA, 并诱导炎性细胞因子和 I 型干扰素。RIG-1, MDA5 和 LGP2 识别结构不同的 RNA, RIG-I 识别长度通常为 300-1000bp 的 dsRNA, MDA5 主要识别 1kb 以上的 dsRNA(Loo and Gale 2011)。当病毒感染宿主细胞产生 dsRNA 时, RIG-I 和 MDA5 通过线粒体定位的衔接蛋

白 IPS-1 激活信号传导, 从而分别通过 IKK 复合物和 TBK1 / IKK 激活 NF- κ B 和 IRF3 / IRF7, 这导致了炎性细胞因子和 I 型干扰素的产生。主要是炎性细胞因子通过募集免疫细胞(例如巨噬细胞和树突状细胞)来启动和协调各种先天免疫反应(Kell and Gale 2015, Kim and Ewbank 2018)。

1.1.3 NLRs 样识别受体

NOD 样受体(NLR)是一类分子, 可感知细胞胞质内的各种配体。该家族在人类中包含 23 个成员, 在小鼠中包含约 34 个成员(Shaw *et al.*, 2008)。这些传感器包括三个域: C 端结构域由几个(LRR)组成, 被认为与微生物 PAMP 或内源性宿主分子的识别有关; N 末端结构域由死亡效应结构域, 热蛋白结构域(PYD), CARD, 杆状病毒抑制剂重复序列(BIR)和酸性结构域(与下游信号蛋白的同型相互作用所必需)组成(Caruso *et al.*, 2014)。在识别 PAMP 时, 这些传感器要么激活 NF- κ B 或 MAP 激酶以诱导炎性细胞因子的产生, 要么激活多蛋白复合物“炎症小体”, 后者启动各种蛋白酶的蛋白水解切割(或成熟), 从而导致炎性细胞因子(例如 IL-1 β 和 IL-18)的成熟和产生, 引发细胞死亡(Franchi *et al.*, 2009)。

1.1.4 DNA 识别受体

微生物 DNA 很容易在微生物感染过程中暴露在细胞质中, 是一种典型的被宿主细胞感知的 PAMP。DNA 传感器由多种受体组成, 包括膜结合 TLR9 和各种 CDR。TLR9 是第一个在 ER 中定位的 DNA 传感器。识别溶酶体甲基化不足的 CpG DNA, 激活转录因子 IRF7 和 NF- κ B 并刺激 I 型 IFN 的产生(Hemmi *et al.*, 2000)。TLR9 表达是免疫细胞特异性的, 主要在 B 细胞和浆细胞样树突状细胞(pDC)中表达。pDC 中需要两个 CDR, 即 DExD / H-box 解旋酶 DHX36 和 DHX9, 用于依赖 TLR9 的 IFN α 和 TNF- α 产生(Dempsey and Bowie 2015)。除 DHX36 和 DHX9 外, CDR 还包括 DNA 依赖的干扰素调节因子激活物(DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor, DAI), AIM2, RNA 聚合酶 III(RNA polymerase III), LRRFIP1, 干扰素诱导蛋白 16(interferon-inducible protein 16, IFI16), DDX41, DNA-PK, MRE11, 环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) 和 STING(Takaoka *et al.*, 2007, Chiu *et al.*, 2009, Hornung *et al.*, 2009)。

DAI(或 ZBP-1)是第一个发现的 CDR, 能够诱导干扰素通过 IRF3 和 NF- κ B 激活(Takaoka *et al.* 2007)。但是, DAI 基因敲除小鼠表明能产生正常的 DNA 介导的细胞因子。因此, DAI 作为 DNA 传感器的作用有争议, 它也表明存在其他 CDR(Ishii *et al.*, 2008, Fernandes-Alnemri *et al.*, 2010)。AIM2 属于 PYHIN 家族蛋白包含 Pyrin 和 HIN 域。其 C

端 HIN 结构域结合病毒双链 dsDNA 随后通过其 N 端招募下游适配器 ASC pyrin 域相互作用。此外, ASC 能够通过同型募集和激活 caspase-1 与 CARD 域相互作用以形成炎症小体。反过来, caspase-1 引起蛋白水解切割和促炎细胞因子 IL1 β 和 IL18 的表达(Hornung *et al.* 2009)。RNA 聚合酶 III (Pol III) 被鉴定为 DNA 传感器因为富含 AT 的 dsDNA 的转录, 例如 poly(dA:dT) 转化为 5-三磷酸 RNA, 然后可以激活 RIG-1 导致 IFN β 诱导(Ablasser *et al.*, 2009, Chiu *et al.*, 2009)。LRRFIP1 被报道可以结合 dsDNA 和 dsRNA, 然后相互作用与 β -catenin 结合并激活 β -catenin, 从而增加 IFN β 的表达通过与 IRF3 结合并招募乙酰转移酶 p300 与 IFN β 增强体(Yang *et al.*, 2010)。DDX41, DExD / H-box 解旋酶显示与 DNA 并激活 STING / TBK1 依赖性 IRF3 和 NF- κ B, 以及随后的细胞因子产生(Zhang *et al.*, 2011)。DDX41 被进一步报道为与细菌环二核苷酸 (CDN), 环二 GMP 结合, 和循环 di-AMP 激活类似的下游信号(Parvatiyar *et al.*, 2012)。DNA-PK 和 MRE11 都是核 DNA 损伤传感器蛋白, 前者包含异源复合物 Ku70, Ku80 和催化亚基 DNA-PKcs 的组成。两个都报道胞浆中的蛋白质复合物参与 DNA 感应并触发 STING 依赖性细胞因子的产生(Ferguson *et al.*, 2012, Kondo *et al.*, 2013)。尽管据报道这些候选传感器参与了某些细胞类型的不同细胞中的 DNA 传感, 但体外和体内证据均表明 cGAS 是多种细胞质中使用最广泛的细胞质 DNA 传感器。

1.2 cGAS 的发现及意义

2013年, 陈志坚课题组发现了一种新的DNA感受器环磷酸鸟苷-腺苷合酶(cGAS)。cGAS 不仅能识别致病性 DNA 而且还能识别自身的异常的 DNA(Sun *et al.*, 2013)。正常情况下在真核细胞中, 只有细胞核和线粒体中存有 DNA, 但是如果有 DNA 病毒或者逆转录病毒侵入细胞时, 细胞质中就会出现 DNA(Goubau *et al.*, 2013), 除此之外, 在细胞质中出现的异常定位的 DNA 与肿瘤的发生及病毒感染有关(Gao *et al.*, 2015)。近些年的研究中已经表明 DNA 感受器在胞质 DNA 的识别并启动免疫反应过程中至关重要。cGAS 识别 DNA 后催化由 ATP 和 GTP 合成环状 GMP-AMP (cGAMP) (Sun *et al.*, 2013), 后者又结合并激活位于内质网 (ER) 的蛋白质, 称为 IRF3 激活 (MITA) 的介质或刺激干扰素基因 (STING), STING 被激活后进一步激活 TBK1, TBK1 磷酸化激活下游 IRFs 和 NF- κ B, 诱导 I 型干扰素产生和炎症反应的效应子基因转录(Zhong *et al.*, 2008, Ishikawa *et al.*, 2009)。cGAS-MITA 轴以时空方式受到严格和精细的调节确保适当的免疫

反应以清除入侵的病原体或异常细胞，并避免免疫反应不足或过度的免疫损伤(Hu and Shu 2018)。已经证明，cGAS-MITA 轴的失调与炎性/自身免疫性疾病和肿瘤发生有关(Ablasser and Chen 2019)。

1.2.1 cGAS 的结构与功能

cGAS 是一种含有 522 个氨基酸的蛋白质，其 C 端含有核苷酸转移酶(NTase)结构域 N 端含有非结构且带正电荷结构域。cGAS 的 N 和 C 末端结构域均参与 DNA 的结合过程。虽然 cGAS 的 N 末端结构域具有较低的同源性在不同物种之间，但仍保留了一些关键的和决定功能的残基(Barnett *et al.*, 2019, Gentili *et al.*, 2019)。近年来研究表明 cGAS 的 N 端结构域可使 cGAS-DNA 复合物的液-液相分离,这对于 cGAS 的激活至关重要(Du and Chen 2018)。cGAS 的 C 端结构域与 DNA 双链体的糖磷酸骨架相互作用(Gao *et al.*, 2013)。cGAS 与 dsDNA 结合组装成一个 2:2 cGAS-dsDNA 寡聚复合物，两个 dsDNA 分子结合两个 cGAS 分子(Li *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2014)，形成二聚体。cGAS 二聚体在两个单独的 dsDNA 片段之间形成阶梯状网络，这显著增强了每个单独的 cGAS-dsDNA 复合物 dsDNA 的稳定性(Andreeva *et al.*, 2017)。

一旦 cGAS 与 dsDNA 结合，cGAS 会发生结构重排，从而导致由 ATP 和 GTP 合成 2, 3-cGAMP，在 GMP 的 2-羟基和 AMP 的 5-磷酸之间具有一个磷酸二酯键，而在 AMP 的 5-羟基之间具有另一个磷酸二酯键。AMP 的 3-羟基和 GMP 的 5-磷酸盐(Ablasser *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013)。有研究表明双链 RNA 或单链 DNA 也能与 cGAS 发生结合，但是它们并不会不引起 cGAS 的重排(Civril *et al.*, 2013)。

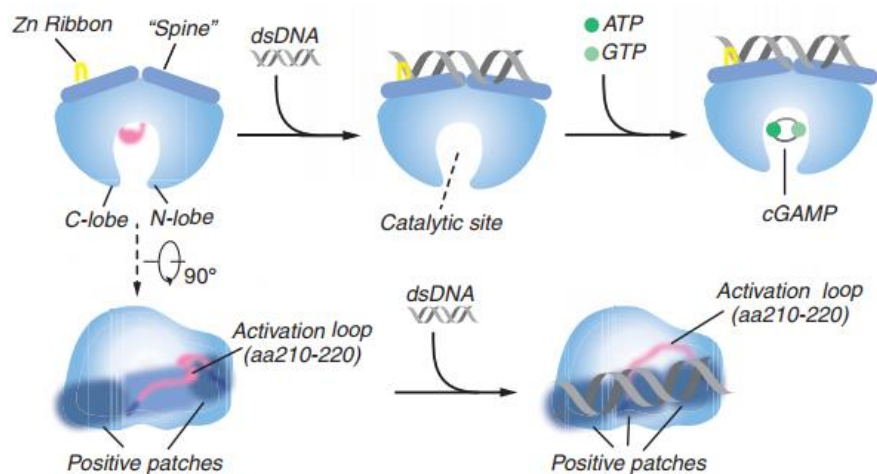


图 2 cGAS 识别 DNA 的分子机制 (Ablasser A *et al.* 2019)

Fig 2. Molecular mechanism of DNA sensing by cGAS. (Ablasser A *et al.* 2019)

cGAS 在各种各样的组织中表达,但在免疫组织中显著表达。cGAS 基因的启动子中有两个相邻的 IFN 敏感反应元件(ISRE),使其成为可以被 I 型 IFN 刺激诱导的 ISG(Ma *et al.*, 2015)。cGAS 不仅可以检测由大分子产生的细胞质 DNA,例如 DNA 病毒和细菌,也可以检测逆转录病毒逆转录过程中产生的 DNA(Hansen *et al.*, 2014, Herzner *et al.*, 2015)。更有趣的是,cGAS 在针对某些无 DNA 的 RNA 病毒的免疫防御中也显示出重要的功能,但其机制还并不清楚(Aguirre and Fernandez-Sesma 2017, Aguirre *et al.*, 2017)。此外,cGAS 还可以通过分别从吞噬细胞(例如树突细胞)吞噬的 DNA 损伤或肿瘤 DNA 吸收的 DNA 损伤积累的胞质 DNA 来检测细胞衰老和抗肿瘤免疫力(Lau *et al.*, 2015, Mackenzie *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2017)。

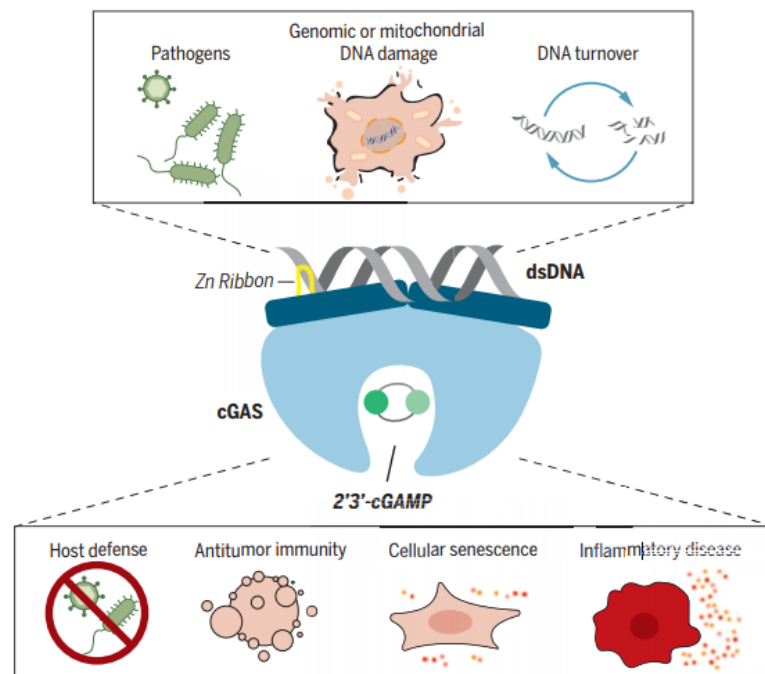


图 3 cGAS 的功能 (Ablasser A *et al.* 2019)

Fig 3. Infectious and noninfectious functions of cGAS. (Ablasser A *et al.* 2019)

1.2.2 cGAS 的调控机制

cGAS-STING 信号通路开始被发现时就被视为天然免疫系统的一个关键部分,此信号通路的作用是检验胞质 DNA 的存在性,并在一系列反应中诱导一些炎症因子的表达 (Ablasser and Chen 2019)。cGAS 对 DNA 的成功识别是向下传达信号的开始,其活性过强时会带来不必要的损伤,一般通过谷氨酰化、SUMO 化修饰等方法来控制其活化程度。

cGAS 的谷氨酰化和去谷氨酰化调节 cGAS 的活化(Xia *et al.*, 2016)。研究表明,缺乏羧肽酶 CCP5 或 CCP6 的小鼠更容易受到 DNA 病毒的感染。如果细胞中的细胞浆内

没有羧肽酶 CCP5 和 CCP6, cGAS 与 dsDNA 的连接就会被阻止, 缺失上述两种酶后, 位于 cGAS 蛋白上的第 272 位氨基酸-谷氨酸 (Glu) 发生多聚谷氨酰化, 此过程依赖于酪氨酸连接酶样酶 6 (TTL6) 的介导, cGAS 在 Glu272 处的多谷氨酰化 TTL6 酶损害其 DNA 结合能力; 此外, 定位于 cGAS 蛋白上的第 302 位氨基酸 Glu 会因 TTL4 的存在而单戊聚糖化, 这两种情况都使 cGAS 的活性被阻止(Xia *et al.*, 2016)。当病毒侵入后, 机体会迅速做出相应的免疫应答, 同时 cGAS 被谷氨酰化的程度和酪氨酸连接酶样酶 6、酪氨酸连接酶样酶 4 的介导作用呈现明显下降。上述可知, 在调节 cGAS 酶活性的过程中存在着反馈调节机制。

cGAS 不仅会发生谷氨酰化, 也能发生依赖于蛋白激酶 B (Akt) 的磷酸化。磷酸化是一种应用最广泛的方法来改变蛋白质的性质和功能底物, 如活性、亚细胞定位、蛋白质稳定性和蛋白质相互作用。通过一系列的蛋白质组学分析表明, cGAS 的 N 端和 C 端结构域的数十个丝氨酸和苏氨酸残基被磷酸化修饰, 这表明 cGAS 可能受到不同残基上多重磷酸化的调控。然而, cGAS 上大多数这些磷酸化位点的功能和分子机制目前尚不清楚, 但有报道称 AKT 磷酸化 cGAS 的 Ser305 位点可抑制 cGAS 催化活性(Seo *et al.*, 2015)。Akt 属于氨基酸残基, 当机体受到病毒感染后, 蛋白激酶 B 被激活, 人 cGAS 蛋白的第 305 位氨基酸-丝氨酸 (Ser) 或鼠 cGAS 蛋白的第 291 位氨基酸 Ser 被磷酸化(Seo *et al.*, 2015)。cGAS 发生磷酸化后, ATP 和 GTP 的反应以及 cGAMP 的生成被阻止, 说明 cGAS 的活性也受到了一定程度的抑制。

泛素化是细胞中常见且重要的一种翻译后修饰并被泛素连接酶催化并被去泛素化酶去共轭(Gao and Karin 2005)。已经证明, k27 连接的 cGAS 多聚泛素化在 RNF185 在 DNA 病毒感染后促进其酶活性(Wang *et al.*, 2017), 而 E3 连接酶 TRIM14 使 k48 连接的 cGAS 在 Lys414 位点多泛素化导致其 p62-病毒感染后期依赖的自噬降解(Chen *et al.*, 2016)。也有报道称在未感染细胞中, cGAS 被 k48 连接的 Lys271 和 Lys464 多泛素修饰在感染的晚期, 未知的 E3 连接酶促进其蛋白酶体降解并有助于 cGAS 的稳态, 以适当启动和减弱先天免疫反应(Hu and Shu 2017)。

有报道称, SUMO 化在病毒感染调节宿主反应中起着关键作用(Hu *et al.*, 2016, Hu *et al.*, 2017)。SUMO 化修饰也介入了 cGAS 的活性调节, 此过程发生于病毒感染的早期阶段, SUMO 化的 cGAS 会阻止其连接 DNA, 同时 cGAS 的降解会受到阻止。有研究表明, 在未感染的细胞中, cGAS 在 Lys217 位点被 SUMO 化, 并进一步在 DNA 病毒感染早期的 Lys464 位点被 TRIM38 SUMO 化。cGAS 在 Lys217 处的 SUMO 化通过物理障碍

抑制其在 Lys271 处的 k48 链接多泛素化,以维持 cGAS 的稳定性,而在 Lys464 处的 cGAS 的 SUMO 化则阻止其在 k48 链接在相同的残基上多泛素化以防止其被泛素-蛋白酶体降解病毒感染早期的途径(Hu *et al.*, 2016)。在感染后期 cGAS 的 Lys217 和 Lys464 的 SUMO 部分被 SENP2 移除,导致 k48 链接的多泛素化和 cGAS 的蛋白酶体降解,从而减弱先天抗病毒作用反应(Ma *et al.*, 2015)。此外 SENP2 还会通过依赖于分子伴侣的自噬途径推动 STING 的降解。

最近,有研究表明 cGAS 被未知的乙酰转移酶在多个残基处乙酰化,包括 Lys384, Lys394 和 Lys414,从而抑制了未感染细胞中 cGAS 的活化(Dai *et al.*, 2019)。病毒感染后, cGAS 发生去乙酰化。有趣的是,阿司匹林可以在这些残基处乙酰化 cGAS,并在体内和体外有效地抑制 cGAS 介导的先天免疫反应。阿司匹林还能有效抑制 AicardiGoutieres 综合征(AGS)患者细胞和 AGS 小鼠模型中的自身 DNA 诱导的自身免疫,这为治疗 DNA 介导的自身免疫性疾病提供了一种潜在的疗法(Dai *et al.*, 2019)。

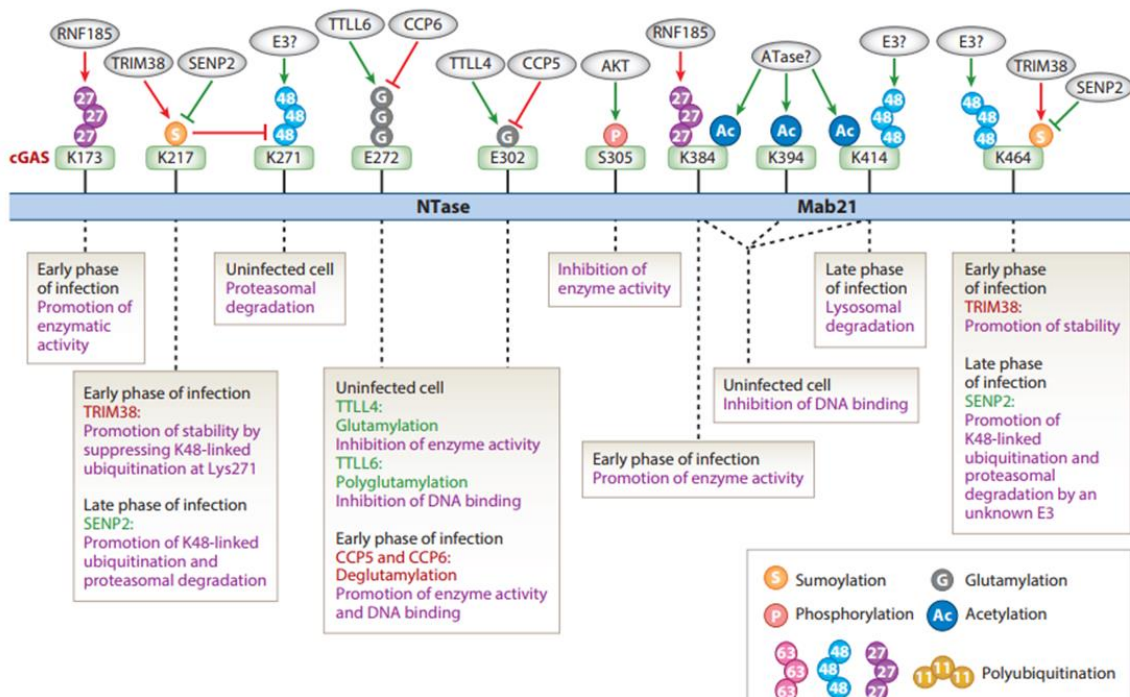


图 4 不同翻译后修饰对 cGAS 活性的调节 (Hong-Bing Shu *et al.* 2019)

Fig 4. Regulation of cGAS activities by different posttranslational modifications. (Hong-Bing Shu *et al.* 2019)

1.3 猪 cGAS 研究进展

目前关于猪 cGAS 的研究知之甚少,主要是初步鉴定了猪 cGAS 的功能。根据 NCBI 数据库中查阅的猪 cGAS 基因的相关信息,可知猪 cGAS 基因开放阅读框长 1488 个碱基,编码 496 个氨基酸,蛋白的分子量约为 56 kDa,其 C 端含有具有酶活性的 Mab-21 结

构域(188 aa-490aa)。有研究发现人、小鼠、牛和猪的 cGAS 蛋白保守区域相似，并且有四个酶活性关键氨基酸，分别为 G187, S188, E200 和 D202 是保守的。(Wang *et al.*, 2015)。选取不同物种的 cGAS 氨基酸序列进行比对分析 cGAS 物种间的相似性和系统进化关系，发现猪和牛的 cGAS 相似性为 74%，亲缘关系最近，人和猪 cGAS 基因的同源性为 64%，与鼠的同源性为 56%。提示猪 cGAS 虽然与人的 cGAS 具有同源性，但可能调控机制并不完全一致，因此有待我们进一步研究。

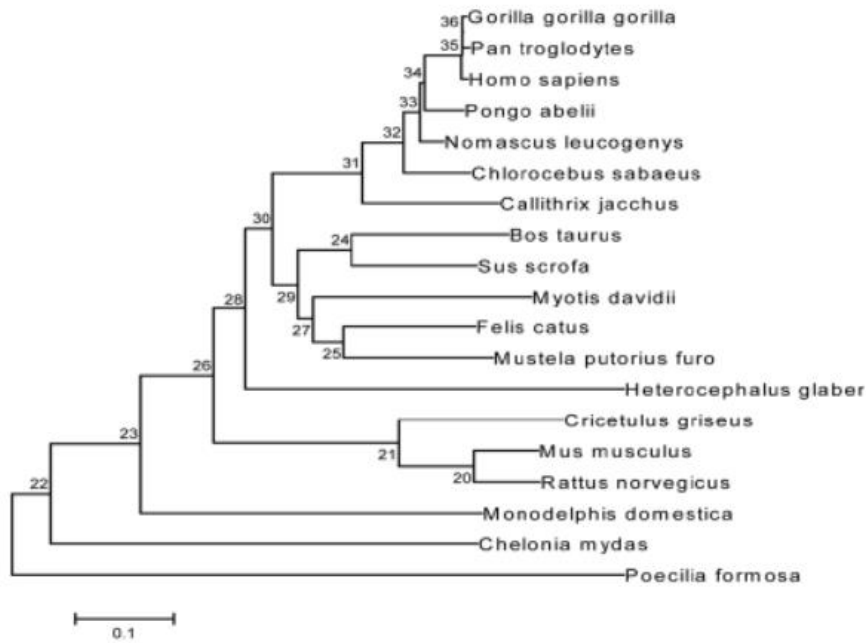
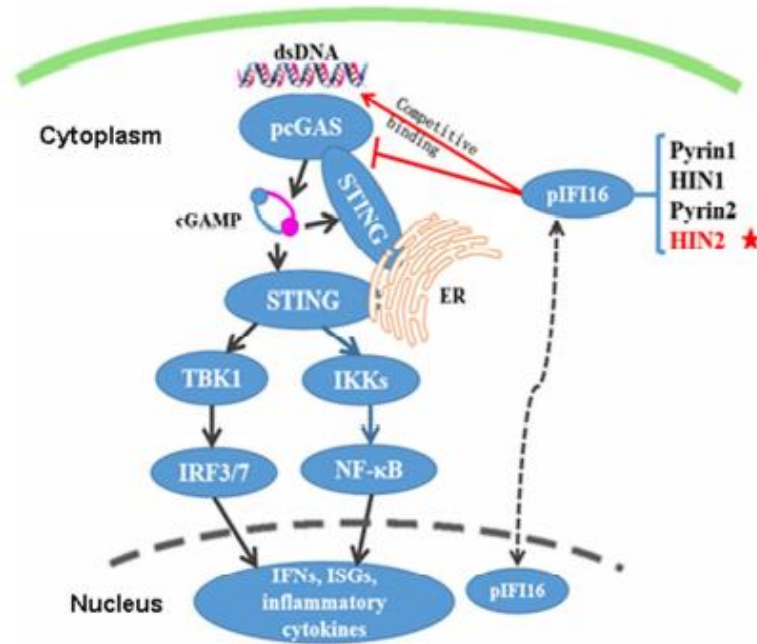


图 5 cGAS 蛋白的系统进化分析 (Jiang Wang *et al.* 2015)

Fig 5. Phylogenetic tree of the cGAS proteins from different species. (Jiang Wang *et al.* 2015)

DNA 传感器因其对 DNA 病毒和细胞内细菌感染的重要作用而备受关注。在众多的 DNA 传感器中，IFI16 和 cGAS 是最主要的两种，因此受到了广泛的研究。最近有学者研究了猪 IFI16 和 cGAS 及其相互关系。研究表明两者都可以在 DNA 转染和 HSV-1 感染后向下游 IFN 传递 STING 依赖性信号，而 cGAS 在 DNA 信号中起主要作用。在就它们之间的关系而言，IFI16 似乎干扰了 cGAS 信号传导。稳态猪 IFI16 主要位于细胞核中，其穿梭进入细胞质，主要通过其 HIN2 结构域与 cGAS 竞争结合激动剂 DNA 和 STING，从而调节 cGAMP 的产生和下游信号传导。(Zheng *et al.*, 2020)。

图 6 IFI16 调节猪 cGAS 的示意图 (Zheng *et al.*2020)Fig 6. The schematic illustration of porcine cGAS regulation by IFI16. (Zheng *et al.*2020)

1.4 本研究的目的是和意义

cGAS 在宿主抵抗 DNA 病毒感染及自身免疫中发挥着至关重要的作用,然而目前对于猪 cGAS 的调控机制还没有报道。本研究通过利用生物大分子相互作用仪 BiaCORE 结合质谱分析鉴定和寻找猪 cGAS 的新的相互作用蛋白和可能调控分子,明确其调控 I 型干扰素产生的机制,有助于我们深入认识机体抗 DNA 病毒与天然免疫反应的调控机理,同时为也为开发抗病毒药物以及疫苗的研发提供方向。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 质粒和细胞

人胚肾上皮 (HEK-293T) 细胞、猪肺泡巨噬 (3D4/21) 细胞、人宫颈癌 (Hela) 细胞均由实验室保存。pcDNA4To-Myc/His-pcGAS、pcDNA3.0-Flag-YWHAB、pcDNA3.0-Flag-FABP5、pET-30a-pcGAS 真核及原核质粒均由实验室构建保存。DH5 α 感受态细胞与 BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物有限公司。

2.1.2 主要试剂及抗体

rTaq、dNTPs、DNA Marker、T4 DNA 连接酶、高保真酶 Prime STAR、6 $\times$ 核酸上样缓冲液、限制性核酸内切酶、MMLV Reverse Transcriptase、Recombinant RNase Inhibitor 均购自宝生物工程(大连)有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒与无内毒素质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技有限公司；Eastep[®] Super 总 RNA 提取试剂盒购自普洛麦格公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司 (PC0020)；化学发光液 (170-5060) 购自 BIO-RAD 公司。

DMEM 培养基, Opti-MEM (31985070), 双抗 (15140-122) 均购自 gibco 生物工程有限公司；BI 胎牛血清 (Bioind 胎牛血清) (04-001-1ACS) 购自以色列 Bioind 公司；胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO)、青链霉素混合液、Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

抗体: β -actin 抗体 (B1029) 购自博奥龙公司；His 抗体 (66005-1-Ig) 购自 Proteintech 公司；单克隆抗体 FLAG M2 (F1804) 购自 Sigma 公司；Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 和 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 PTG 公司；HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

HisTrap HP 层析柱、CM5 芯片、10 x HBS-EP 缓冲液购于 GE 公司。

2.1.3 设备仪器

表 1 主要仪器清单
Table. 1 List of main instruments

仪器名称	购自公司
PH 计	Sartorius 公司
电子天平	美国奥豪斯仪器有限公司
超纯水仪	Millipore 公司
4°C 冷冻离心机	Thermo 公司
PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司
超声波细胞粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
AKTA Pure 蛋白纯化仪	美国 GE 公司
荧光定量 PCR 仪 (StepONE Plus)	美国 ABI 公司
核酸电泳仪	北京六一生物科技有限公司
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
半干转膜仪	Bio-Rad 公司
Western blot 荧光成像仪	美国 ProteinSimple 公司
紫外光凝胶成像分析仪	上海天能科技有限公司
全波长酶标仪	Thermo 公司
生物大分子相互作用仪	美国 GE 公司
恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司
细胞计数板	德国 Marienfel 公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯
37°C 恒温培养箱	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
摇床	天津市欧诺仪器仪表有限公司
移液器	美国 RAININ® (瑞宁) 公司
制冰机	宁波新芝生物科技股份有限公司
无菌超净工作台	北京王堂蓝翼科技有限公司
生物安全柜	新加坡艺思高科技有限公司
-80°C 低温冰箱	Thermo 公司
-20°C 冰箱、4°C 冰柜	海尔集团

2.2 实验方法

2.2.1 猪 cGAS 基因扩增

根据 NCBI 预测的猪 cGAS 的基因序列,按照序列原则设计相应的上游和下游引物,引物由上海生工公司合成,引物序列见附录 2。以提取的猪小肠组织 RNA 反转 cDNA 为模板扩增目的基因序列,利用 Prime STAR 高保真酶来扩增目的基因片段。PCR 反应体系如下 (50 μL):

5* PrimeSTAR Buffer	10 μL
dNTP Mixture	4 μL
pcGAS-F	1 μL
pcGAS-R	1 μL
cDNA 模板 (100ng)	1 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	32.5 μL

先将上述各组分依次加入到小 PCR 管中,然后放入小型离心机中瞬离使上述组分充分混匀,将小 PCR 管放置于 PCR 仪中,按照以下程序进行 PCR 反应:

Step1	98 °C	30 s
Step2	98 °C	10 s
Step3	58 °C	5 s
Step4	72 °C	1 min 45 s

Step2 至 Step4 共做 35 个循环

根据引物 T_m 值计算退火温度,大于 55 °C 退火 5 s,小于 55 °C 时退火 15 s; 72 °C 延伸 1 min/kb。

2.2.2 重组表达载体构建与鉴定

琼脂糖凝胶电泳: PCR 反应完成后,将小 PCR 管里的扩增产物做普通琼脂糖核酸电泳,其电泳步骤如下:

(1) 用称量天平准确称取 0.5 g 琼脂糖粉,用 62.5 mL 1×TAE 溶液进行溶解,使用微波炉加热 3 min,待溶液清亮说明琼脂糖粉彻底溶解则终止加热。

(2) 微波炉关好后将锥形瓶拿出,冷却后,加入 6.25 μL EB 染料,充分摇匀后,倒入提前插好梳子的制胶板中,静置冷却。

(3) 1 h 后将先前插好的梳子拔掉,将凝胶放入电泳槽中,加入 TAE 溶液没过凝胶。

(4) 先加 10 μL DL5000 DNA Marker 至右侧样品孔中, 用移液枪吸取 10 μL 6 $\times$ Loading Buffer 加入到含 pcGAS 扩增产物的小 PCR 管里, 吹打混匀后移入样品孔中。

(5) 盖好电泳槽, 准确连接电泳仪, 打开电源, 18 min 后关闭电源, 将胶块从电泳槽拿出放入紫外核酸凝胶成像仪里, 观察结果并做相应记录

PCR 产物回收: 把核酸凝胶用紫外照着切下大小正确的条带, 切碎后放入提前称量好管重的离心管中, 称量此时离心管和凝胶的总重量, 然后用琼脂糖凝胶回收盒(天根生化公司)进行凝胶 DNA 回收, 其具体做法如下:

(1) 将收集管放在管架上, 然后从回收盒中取出吸附柱放于摆放好的收集管中, 用移液器移取 500 μL BL 平衡液至吸附柱里以平衡柱子, 然后连同收集管一起放入离心机中, 13400 $\times g$ 离心 1 min, 倒掉废液, 备用。

(2) 在称重后的凝胶块里以 0.1 g 凝胶添加 100 mL PN 溶液的比例加入相应的 PN 溶液, 放入提前设置好温度(50 $^{\circ}\text{C}$)的水浴锅中进行溶解, 期间慢慢地反复上下颠倒并轻弹离心管, 使凝胶块彻底地溶解。

(3) 待凝胶块彻底溶解后, 用移液枪将其转移到第(1)步平衡好的吸附柱里, 放于试管架上室温放置 2 min, 13400 $\times g$ 离心 1 min, 倒掉废液。假使样品量很多导致一次离心不完则进行分批次离心, 直到将溶解后的凝胶溶液完全离心。

(4) 加入 600 μL 漂洗液到吸附柱中, 常温放置 3 min, 13400 $\times g$ 离心 30 s 或 1 min, 倒掉废液。重复此步骤一次。

(5) 将第(4)步准备好的收集管放回离心机, 13400 $\times g$ 离心 2 min, 弃去从吸附柱离心至收集管中的废液, 将吸附柱打开盖, 在吸水纸上放置 5 min。

(6) 将静置后的吸附柱放入新的无菌离心管里, 用移液器悬空向吸附柱中央滴加 30 μL ddH₂O 来进行洗脱, 放于试管架上静置 2 min, 13400 $\times g$ 离心 2 min, 离心管中的溶液即为回收产物。用移液器移取 3 μL 回收产物, 酶标仪测量吸光度 OD_{280nm} 并记录测量值。

酶切: 将胶回收目的片段或载体用限制性内切酶进行双酶切反应, 酶切体系如下(50 μL):

目的片段或载体	2 μg
10 $\times$ QuickCut Buffer*	5.0 μL
限制性内切酶 I	2.0 μL
限制性内切酶 II	2.0 μL
ddH ₂ O	up to 50 μL

将以上组分加入到离心管后，将离心管放入普通离心机离心使上述溶液充分混匀，将离心管用封口膜封好，放在浮漂上，然后放于 37 °C 水浴锅中，放置 1 h 后，将酶切后的溶液按照电泳步骤做核酸凝胶电泳，电泳停止后，用核酸凝胶成像分析仪成像并保存图片，然后进行核酸凝胶回收。

连接：将酶切后的目的基因与载体用 T4 连接酶进行连接，根据片段大小计算按摩尔比，目的基因与载体比例为 10: 1，连接体系如下（25 μ L）：

目的片段	0.2 pmol
载体	0.02 pmol
10 $\times$ T4 Buffer	2.5 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
ddH ₂ O	up to 25 μ L

将以上组分加入到离心管中后充分混匀，放入 16 °C 恒温连接仪中过夜连接。

连接产物的转化：

提前将感受态细胞从 -80 °C 冰箱取出放置于冰上，向一管 DH5 α 感受态细胞加入连接了 12 h 的连接产物，慢慢吹匀，然后放在冰上静置 30 min，42 °C 水浴锅中热激 90 s 后，冰上静置 2 min。继续在管中加入 1 mL LB 培养基，置 37 °C 恒温摇床中 180 rpm/min 培养 1 h。对照试验为另取一管 DH5 α 感受态细胞，除不加连接产物外做上述所有操作。放于摇床上 2-3 h，将离心管从摇床上取出，常温条件下 1180 $\times$ g 离心 5 min，留大约 200 μ L 上层液体将沉淀悬起，在 LB 平板（Kana⁺）上均匀的涂上菌液，放入 37 °C 培养箱中，倒置过夜。

双酶切鉴定与测序：

挑取单克隆菌落于 37 °C 220 rpm/min 摇床过夜摇菌，第二天将菌液用无内毒素小提试剂盒提取质粒，用构建载体时用的两种限制性内切酶进行双酶切，将酶切产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳，观察条带大小，将酶切并切下符合目的条带大小的质粒送到生工公司进行测序。测序结果与目的基因比对一致，可进行后续实验。

2.2.3 感受态细胞制备

按照 CaCl₂ 法制备感受态细胞：

（1）取出保藏于本实验室的 DH5 α 菌株，用提前灼烧过的接种针蘸取菌液，在无抗性 LB 平板中画“之”字，此后将培养皿放入 37 °C 恒温培养箱中，先将培养皿正放 1 h 后再倒放培养 16 h。

(2) 将第(1)步放于培养箱中的培养皿拿出, 观察细菌菌落的状态, 在超净台中向已经灭菌的试管中加入 4 mL 液体 LB 培养基, 用移液枪枪头从菌落生长状态较好的培养基上挑取单克隆细菌菌落至液体 LB 中, 将试管放入实验室中的恒温摇床上, 设置摇床温度为 37 °C, 摇床速度为 220 rpm/min, 12 h 后从摇床上取出试管。

(3) 在超净台中加 100 mL 液体 LB 培养基至锥形瓶中, 按照(摇混的菌液: 液体 LB 培养基=1: 100)的比例加入相应的菌液, 再将锥形瓶放回 37 °C 恒温摇床, 以 220 rpm/min 培养 2 h。

(4) 提前准备好 2 个 50 mL 分离管插在冰里然后用冷的分离管分装培养好的菌液, 继续将离心管放回到冰中冷激 10 min, 再将离心管离心 10 min, 离心过程中条件为 4 °C 的温度和 800×g。倒掉上面的溶液, 为了使上清液尽可能地丢弃干净而将离心管倒置扣于平铺于超净台里的吸水纸上。

(5) 提前配置好 0.1 mol/L 氯化钙溶液, 然后将其暂放于 4 °C 冰箱中, 用冷的 15 mL 0.1 mol/L 氯化钙溶解菌体沉淀, 继续把离心管放回到冰中冷激 30 min。再将离心管离心 10 min, 离心过程中条件为 4 °C、800×g。倒掉上层废液。

(6) 按照 50 mL 初始培养液用 1200 μL 氯化钙和 800 μL 50% 甘油重悬菌体, 冰浴 15 min。

(7) 将菌体悬液按 100 μL /管分装至预冷的无菌离心管中, -80 °C 冰箱保存备用。

2.2.4 质粒的小量提取

将 LB 平板从 37 °C 培养箱中拿出, 在超净台里向灭菌后的试管中加入 10 mL 液体 LB, 用移液枪枪头选择性地将 LB 平板上的单克隆菌落挑取至液体 LB 中。此后将试管放入 37 °C 恒温摇床上, 以 220 rpm/min 培养 12 h。

向 1.5 mL 离心管中加入 500 μL 培养了 12 h 的菌液和 500 μL 80% 的甘油, 用封口膜将离心管包好后保存于本实验室的 -20 °C 冰箱。按照质粒提取试剂盒(天根生化公司)里质粒提取的具体步骤将试管里剩下的菌液进行质粒提取, 操作如下:

(1) 将收集管放在管架上, 然后从回收盒中取出吸附柱放于摆放好的收集管中, 用移液器移取 500 μL BL 平衡液至吸附柱里以平衡柱子, 然后连同收集管一起放入普通离心机中, 13400×g 离心 1 min, 倒掉废液, 备用。

(2) 把剩余的菌液分批次转移到无菌离心管里进行离心, 13400×g 离心 1 min, 离心后倒掉上清液, 尽可能地只剩菌液沉淀。

(3) 加 500 μL P1 溶液悬起菌液沉淀, 为使菌体彻底混匀而使用涡旋振荡仪振荡。

(4) 继续向离心管中加入 500 μL P2 溶液, 反复缓慢地上下颠倒 8 次, 让细菌充分地破裂。

(5) 向离心管中加入 500 μL P4 溶液后, 立即缓慢地上下颠倒离心管 8 次(防止局部沉淀), 白色絮状沉淀已经在离心管中形成, 在管架上常温放置 10 min, $13400\times g$ 离心 10 min。

(6) 10 min 后打开离心机, 向 CS 过滤柱中移入适量上层液体, $13400\times g$ 离心 2 min, 把离心于收集管中的液体转移到提前准备好的无菌的 2 mL 离心管里。倘若上清液过多, 则需要分批次进行如上操作(一次过滤 700 μL)。

(7) 向含有过滤液的 2 mL 离心管里加入相应的异丙醇(异丙醇的体积为收集的滤液的 0.3 倍), 用移液枪吹打着充分混匀, 分批次向 CP4 吸附柱中加入混匀液, $13400\times g$ 离心 1 min, 倒掉废液。

(8) 500 μL PD 溶液被移入吸附柱中, $13400\times g$ 离心 1 min, 倒掉废液。

(9) 600 μL PW 漂洗液被移入吸附柱中, 加入后在常温条件下把离心管放置在管架上静置 5 min 后放回离心机, $13400\times g$ 离心 1 min, 倒掉废液。

(10) 操作步骤同第(9)步。

(11) $13400\times g$ 离心 2 min, 将吸附柱和收集管分开, 打开吸附柱的盖子, 将吸附柱放于吸水纸上, 静置 10 min, 此步骤的目的为将漂洗液尽可能地排除干净。

(12) 10 min 后将吸附柱放于提前准备好的无菌离心管里, 用移液器悬空向吸附柱中央滴加 100 μL ddH₂O 来进行洗脱, 在管架上室温条件下静置 2 min, 2 min 后将装有吸附柱的离心管放入离心机里, $13400\times g$ 离心 1 min。用移液枪移取 3 μL 提取物, 用全波长酶标仪测量浓度和 A_{260}/A_{280} 值, 将测量值写于离心管上。

2.2.5 重组蛋白的诱导表达及表达条件优化

向一管 BL21 感受态细胞中加入 1 μL 重组质粒, 移于冰上冰浴 30 min(此时打开水浴锅, 调温度至 42 $^{\circ}\text{C}$), 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中放置 90 s, 再于冰上冰浴 2 min, 继续加入 1 mL 液体 LB 培养基, 把离心管放于恒温摇床上 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm/min 培养 1 h。对照试验为另取两管 BL21 感受态细胞, 一管除不加重组质粒外做上述所有操作, 另外一管将重组质粒换成空质粒, 其余操作相同。放于摇床上 2-3 h 后, 将离心管从摇床上取出, 常温条件下 $1180\times g$ 离心 5 min, 留大约 200 μL 上层液体将沉淀悬起, 在固体 LB 培养基(Kana⁺)上均匀的涂布浑浊液, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 倒置 16 h。

从 37 °C 恒温培养箱中取出 LB 平板，观察菌落生长状态，在超净台中用移液枪移取 5 mL 液体 LB 培养基 (Kana⁺) 至已灭菌试管中，用移液枪枪头选择性地从菌落生长状态较好的 LB 平板 (Kana⁺) 上把单克隆细菌菌落挑取至液体 LB 中，将试管放入 37 °C 恒温摇床，摇床的转速为 220 rpm/min，12 h 后从摇床上取出试管。

在超净台中移取 500 μ L 菌液和 500 μ L 80% 甘油至已灭菌离心管中，保存备用。向无菌试管中移入 5 mL 液体 LB 培养基 (Kana⁺)，按照 (菌液: 液体 LB 培养基 (Kana⁺)) = 1: 100 的比例向其加入相应的菌液，将试管放入 37 °C 恒温摇床上培养，速度为 220 rpm/min，时间为 3 h，3 h 后加入 50 μ L IPTG，然后将试管放入摇床中培养，将摇床的温度设置为 16 °C，转速为 220 rpm/min，诱导 16 h。诱导结束后，将菌液从试管转移至称好空管重 m_1 的离心管中，将离心管放入制冷离心机中，4 °C 1180 $\times$ g 离心 10 min，后弃去离心的上清培养基，将细菌沉淀用冷的无菌 PBS 洗涤，继续放回制冷离心机，条件为 4 °C 1180 $\times$ g 离心 10 min，倒掉上清缓冲液，称量此时的管重为 m_2 ，菌重即为 $m_2 - m_1$ ，按菌重 1g/ mL 无菌 PBS 溶解细菌沉淀，以此为基准加入相应的 PBS 量溶解沉淀。

用超声波细胞粉碎机裂解置于冰上的菌液，超声条件为开 2 s，关 3 s，25% 的超声功率超声 30 min，此时的细菌细胞裂解液应该清亮透明。将细菌细胞裂解液放入到制冷离心机 4 °C 13400 $\times$ g 离心 15 min。向新的 1.5 mL 离心管中加入上层液体，沉淀加入与上一步相同的 PBS 来溶解。将所有样品放在 -80 °C 保存备用。

鉴定时可知蛋白质有可溶性蛋白和包涵体两种形式，本次实验想得到较多的可溶性蛋白，因此我们采取控制变量法分别从诱导剂的浓度、诱导的时间以及诱导的温度这三个方面来探索最佳的诱导条件。

2.2.6 重组蛋白的纯化

样品准备：培养细菌的条件需是结果能得到最多的可溶性蛋白的诱导条件，液体 LB 量为 450 mL。制备细菌细胞裂解液的步骤和之前一样，只是在分离上清液和沉淀时要取出 1 mL 上清液不去纯化蛋白作为对照，用 0.22 μ m 滤器将其余上清液过滤后，分成四等份来探究纯化效果最好时所对应的结合缓冲液的咪唑浓度。

蛋白纯化：设置 AKTA 系统程序，运行系统，首先以 1 mL/min 的速度用超纯水冲洗系统 10 min，安装镍柱后，继续冲洗 10 min，之后更换为结合缓冲液继续运行至 Cond 线稳定。上样时选择 Manual Load 每次上样 0.5 mL，上样完成后选择“Inject”。待 UV 值下降时再次上样，重复上一步，直到上样完毕。Cond 线与 UV 值稳定后，更换为清洗缓冲液继续运行冲洗 15-20 min，再更换为洗脱缓冲液继续运行，收集 UV 峰值时洗脱液。

UV 值稳定后暂停机器更换为超纯水, 冲洗 15 min, 卸下柱子, 关闭仪器和电脑。

2.2.7 蛋白浓度测定(BCA 法)

(1) 先将 BSA 标准样品进行稀释, 稀释液选用的是 PBS 溶液, 最终使稀释后的浓度为 0.5 mg/mL。稀释方法为: 从试剂盒中取出 BSA 标准品, 用移液枪取 10 μ L 至离心管中, 在移取 90 μ L PBS 至离心管中稀释, 二者混匀后即可。

(2) 将 96 孔板平铺于试验台上, 按照先后顺序向蛋白标准空孔中的每孔加入 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 μ L 第 (1) 步稀释好的 BSA 标准品, PBS 补足至 20 μ L。

(3) 将样品进行 8 倍稀释, 然后移取 20 μ L 稀释后的样品液到 96 孔板的样品孔中。

(4) 当 BCA 试剂加 1 mL 时, Cu 试剂需加入 20 μ L 来配置 BCA 工作液, 以此比例按照下一步所需 BCA 溶液的实际体积进行适当配置。

(5) 向第(2)和(3)步中加了标准样品和样品的每孔中加入 200 μ L 上一步配制好的 BCA 工作液, 封闭 96 孔板, 放入恒温培养箱中, 37 $^{\circ}$ C 放置 15-30 min。把 96 孔板放入酶标仪中相应位置进行测定, 酶标仪上呈现的是标准曲线, 继而读取样品稀释后的浓度, 计算得样品的浓度。

2.2.8 聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮蓝染色

聚丙烯酰胺凝胶电泳: 将玻璃板洗干净晾干或用吸水纸擦干, 用夹子将两块玻璃板固定在制胶架上, 加入 12 mL 超纯水检查是否漏水, 水倒掉, 用滤纸吸去残留。将配好的分离胶注入两块玻璃板中, 至制胶架的绿线处。在胶面上轻轻铺一层 1 cm 高的水, 勿扰乱胶面。垂直放置于室温 1 h 使之凝聚, 可在凝胶和水之间看到很清楚的界面, 用滤纸吸出上面的水。注入积层胶后立即插入梳子, 小心避免气泡, 在室温放置 30 min。加入 1 $\times$ Running Buffer, 垂直倒入电泳槽内。正确固定好凝胶后放于电泳槽中, 加入相应的电泳液, 先一侧加入蛋白质 marker, 然后按顺序加入样品, 记录加样顺序。加完样品后, 将样品放入-20 $^{\circ}$ C 保存。盖好盖子, 此时电泳仪上的电压设置为 80 V, 打开电源开关, 大约 30 min 后, 将电泳仪上的电压调至 120 V, 期间观察电泳仪中的电泳液是否需要添加, 当样品到达凝胶底部时, 关闭电源。

考马斯亮蓝染色: 向新的离心管中移入 100 μ L 上述上清裂解液和 20 μ L 6 $\times$ Loading 上样缓冲液, 二者用移液枪吹打着充分混匀, 沉淀裂解液做相同操作, 然后在 100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10 min, 放于离心机中瞬离后备用。按照 SDS-PAGE 步骤进行电泳, 将凝胶转移至装有考染液玻璃皿中, 将玻璃皿放于摇床上, 转速调到最慢, 室温条件下, 染色 3-4 h, 染色完成后染色液回收。提前将脱色液倒入玻璃皿中, 将凝胶转移至玻璃

皿中脱色，此时摇床转速可比染色时大，当脱色液颜色变深时换液，直至脱色液澄清时停止脱色，扫描并做好记录。

2.2.9 免疫印迹

转膜：取出滤纸泡于转膜液中，切下凝胶放于转膜液中，对比凝胶大小把 PVDF 膜剪掉，PVDF 膜先浸泡于甲醇溶液中 15 s，转于 ddH₂O 中 1-2 min，最后充分浸泡于转膜液中，然后把滤纸用手稍微捏一下去掉部分转膜液后放到转膜仪里，滤纸上放好提前准备好的 PVDF 膜，将凝胶放到 PVDF 膜上，最后再放上滤纸，盖好转膜仪，正确安装正负极，将电流调至 80mA 后打开电源，转膜 1 h。取 10 mL 离心管，用天平称量 0.5 g 的 BSA 至离心管中，然后用移液枪移取 10 mL PBST 溶液至离心管中溶解 BSA，将离心管放于涡旋振荡仪上使 BSA 完全溶解，此时的配制的溶液为 5%BSA 溶液，备用。

抗体孵育：转膜完成后，用镊子将 PVDF 膜转移至干净小盒中，将提前配置好的 5%BSA 溶液倒入小盒中在摇床上（转速调至最小）室温封闭 1 h。之后弃掉封闭液，按稀释比例加入一抗 4 °C 孵育过夜（anti-His, 1: 1000）。一抗孵育完成后，用 PBST 洗膜 3 遍，每次 8 min。将 HPR 标记的二抗用 2.5%BSA 溶液进行稀释（抗小鼠 IgG-HPR: 1: 25000），在室温避光孵育 1 h 以上。PBST 洗膜 3 次后，将膜放入 PBS 溶液中。

显影：将显影液中的 A、B 液按 1: 1 比例混合，均匀滴加在 PVDF 膜上，进行发光成像，保存图片。

2.2.10 重组蛋白活性验证

在体外加入以下试剂合成 2'3'-cGAMP。酶促反应体系如下：

pcGAS	10 μmol/L
HEPES	20 mmol/L
MgCl ₂	5 mmol/L
ATP	2 mmol/L,
GTP	2 mmol/L
HT-DNA	0.1 mg/mL。

反应程序：37 °C 恒温水浴锅孵育 2 h，然后加入 50 μL Benzonase 核酸酶 37 °C 水浴锅孵育 30 min，95 °C 金属浴孵育 5 min，16000×g 离心 10 min，取上清保存于 -20 °C 冰箱。对照不加 pcGAS。将反应产物与细胞透膜剂 1: 1 混匀后加入到 3D4/21 细胞中，放置 37 °C 培养箱孵育 30 min，吸去孵育液，用 PBS 洗两遍，弃去 PBS 加入正常细胞培养基，6 h 后收细胞提取 RNA，qPCR 检测 *IFNB* 的表达。

2.2.11 生物大分子相互作用仪与质谱鉴定

利用 Biacore T200 系统, 以猪 cGAS 蛋白为诱饵蛋白, 在 3D4/21 细胞裂解液中垂钓与之结合的分子, 并利用质谱对回收到的样品进行鉴定, 从而发现与猪 cGAS 蛋白相互作用的分子。用醋酸钠将猪 cGAS 蛋白溶液稀释至 20 $\mu\text{g/ml}$, 200 μL (至少保证 1: 10 的稀释比)。醋酸钠最适 pH 需根据预富集实验确定。本次实验所用醋酸钠 PH 为 5。

仪器准备: 打开 Biacore T200 系统和电脑的电源开关。Biacore T200 的电源开关位于系统背面的左下角。开机后, 需等待检测单元的温度达到预设温度 (通常为 25 $^{\circ}\text{C}$)。量取 50 mL 10 x HBS-EP+ buffer、450 mL 去离子水 (已经 0.22 μm 膜过滤), 混匀后放入 500 mL 缓冲液瓶。将缓冲液进液管 A 插入至缓冲液瓶底部。其余三根进液管 (B、C 和 D) 放在左侧的舱门后。点击工具条中的按钮或选择工具菜单中的插入芯片选项, 打开芯片舱门。如果使用的是新芯片, 选择 New Chip。在芯片类型的下拉菜单中选择对应的芯片种类 (此实验为 CM5 芯片), 在 Chip ID 中填入和芯片相关的实验信息。手持芯片, 有字的一面朝上。按照芯片上的箭头方向, 将芯片轻轻推入卡槽, 最后合上芯片舱的舱门。点击 Dock Chip 按钮, 芯片置入后系统将自动转入待机状态。选择工具→Prime 命令, 点击开始。缓冲液会冲洗整个内部流路系统, 整个过程耗时 6-7 min。结束后系统自动转入待机状态。

配体偶联: 打开 Biacore T200 Control Software, 选择文件下面的 Open/New wizard template, 选择 immobilization。对话框中, 在芯片类型中选 CM5, 在每个循环流过细胞选 4, 仪器一次偶联 4 个通道。勾选 Flow cell 1, 2, 3, 4, 方法选用氨基偶联, 输入配体名称, 该实验连接时间输入 420s (垂钓实验需要高偶联, 可延长进样时间提高偶联量), 流速一般设为 10 $\mu\text{L/min}$ 。选择实验温度, 一般默认 25 $^{\circ}\text{C}$ 。选择样品架系统会自动排好样品放置位置。根据样品架位置表准备样品 (EP 管的盖子要剪去)。将样品架送回样品舱。整个过程系统自动运行偶联程序耗时约 40 min。建议最终偶联量大于 10000 RU。

样品检测: 在 Method Builder 界面中, 点实验步骤里的 Inject and recover, 修改 number of replicates, 推荐 10-20 次以便收集到足够量的样品进行质谱检测。在 Cycle Types 界面里, Inject and Recover, 首次实验推荐使用默认参数, 洗脱和收集缓冲液默认为 0.5% TFA, 也可以根据样品情况使用 0.2%-1%TFA, 甲酸, 乙酸或再生溶液等。沉积溶液为 50mM NH_4HCO_3 。点击 Setup Run, 流速通道选择 1, 2, 3, 4, 点 Next。勾选 prime, 默认实验温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。点 Next 进入 Rack Position 界面。根据样品所在位置进行样品准备和放置。D1 放置 290 μL 的 NH_4HCO_3 , 浅绿色 D2-D11 均放置空的 1.5 mL EP 管, F1-F3 放

置 4.0 mL 的玻璃瓶，分别装入 1350 μ L 样品，3321 μ L 0.5% TFA, 1610 μ L 0.5% TFA。点下一步后，对方法进行保存，再对数据路径进行保存，仪器便会开始自动运行，样品被回收至空的 EP 管中。

对照组实验：用一张新的 CM5 芯片，不做配体偶联，直接在空白 CM5 芯片上进行 Inject and recover，垂钓的实验操作与参数同实验组，回收到的样品作为阴性对照打质谱。

2.2.12 细胞的培养、冻存与复苏

细胞复苏：从液氮罐中取出细胞冻存管，然后立即放入 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中轻微摇动（拧紧盖子防止液体进入冻存管中）。待液体融化后放入生物安全柜中，将液体加入无菌 15 mL 离心管中，再加入 2 mL 10% FBS+1%青链霉素的 DMEM 培养基，700 $\times$ g 离心 5 min。弃上清，加入 1mL 培养基将细胞重悬后转入含 4 mL 细胞培养瓶中，前后左右轻轻摇动，使细胞分布均匀。在培养瓶上标注细胞种类、日期、培养人名字，放到 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

细胞培养：待细胞瓶中的细胞覆盖率达到 90% 以上时要进行传代，把原有的培养基弃掉，加入 1 mL PBS 洗一遍，吸去 PBS。加入 1 mL 胰酶消化（不同细胞消化时间不同），待细胞都变圆后加入 2 mL 培养基终止消化，用移液枪轻轻吹打细胞并转移至 15 mL 离心管中，700 $\times$ g 离心 5 min。弃上清，加 2-3 mL 培养基将细胞重悬起来，取适当的量传到几个培养瓶中置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

细胞冻存：待细胞状态最好时冻存，把细胞消化下来并离心（同上）。提前配好冻存液（FBS 和 DMSO 按照 9:1 混匀），用配好的冻存液把细胞悬浮起来，分装到冻存管中。写明细胞种类，冻存日期。将冻存管先放置于 -80 $^{\circ}$ C 过夜然后转入液氮罐中保存。

2.2.13 真核细胞转染

转染提前一天将细胞铺于 12 孔板上，细胞密度为 2.5×10^5 /mL，37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养过夜；第二天换无青链霉素低血清培养基 2 h 后进行转染。所用转染试剂 Lipofectamine 2000（Lipo 2000），根据其说明书进行转染。在 12 孔板中，每孔需要转染 1 μ g 质粒，对应要用到 2 μ L Lipo2000，准备两支无菌的 EP 管，将质粒和 Lipo 2000 分别加入 1 mL Opti-MEM 中，Lipo 2000 加入 1 mL Opti-MEM 后室温孵育 5 min，再将两管组分混匀，室温静置 15 min，加入细胞中，轻轻摇晃均匀，将细胞放回培养箱中培养。

2.2.14 间接免疫荧光

先在 24 孔板底部滴一滴培养基后用镊子将细胞爬片放到 24 孔板。将细胞按 1×10^5 个/mL 的密度铺到 24 孔板中。待细胞密度长到 80% 时，转染质粒，24 h 后弃去培养基，

用预冷的 PBS 洗三遍。

- 1) 每孔加入 500 μ L 4% 细胞固定液室温放置于桌面孵育 20 min, PBS 洗三遍。
- 2) 加入 500 μ L 0.1% 的 Triton-100 (PBS 稀释) 冰上放置 5 min 打孔, PBS 洗三遍。
- 3) 加入 500 μ L 5% 的山羊血清室温封闭 30 min (用 PBS 稀释原液)。
- 4) 加入 200 μ L 一抗, 放置摇床慢速室温孵育 1.5 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗三遍。
- 5) 加入 200 μ L 荧光二抗 (1: 200 稀释), 避光室温孵育 45min-1 h, PBS 洗三遍。
- 6) 加入 50 μ L DAPI, 室温孵育 5 min, PBS 洗三遍。

将爬片倒扣于在载玻片上, 周围用指甲油封闭。激光共聚焦显微镜观察结果。

2.2.15 细胞总 RNA 的提取与反转录

提取猪小肠组织 RNA, 根据 RNA 提取试剂盒说明书, 取 20-40 mg 组织放入匀浆管中, 加入 500 μ L 裂解液和 500 μ L 稀释液, 用组织匀浆器破碎细胞。

RNA 提取步骤如下: 按不同样品最适量加入 RNA 稀释液, 用移液枪混匀, 室温放置 3-5 min (70 $^{\circ}$ C 加热 3 min 可提高 RNA 得率), 以最大转速离心 5 min, 小心吸取上清。加入 0.5 倍上清体积的无水乙醇, 用移液枪吹打 3-4 次, 混匀。将混合物转移至离心柱中, 12000-14000 $\times$ g 离心 1 min, 弃滤液。加 600 μ L RNA 洗液, 12000-14000 $\times$ g 离心 45 s, 弃滤液。加入 50 μ L DNA 酶 I 孵育液到吸附膜中央, 室温放置 15 min。加入 600 μ L RNA 洗液, 12000-14000 $\times$ g 离心 45 s, 弃滤液。重复一次。空离 2 min。将离心柱移至洗脱管上, 向膜中央加入 50-200 μ L 无核酸酶水, 室温静置 2 min, 12000-14000 $\times$ g 离心 1 min, 用酶标仪测定 RNA 浓度, 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存 RNA 样品。

提取的 RNA 用 M-MLV 反转录酶进行反转录, 分两步反应, 第一步反应体系如下:

RNA	1 μ g
Oligo (dT)	2 μ L
RNase -free water	补至 14 μ L

混匀后放入 PCR 仪, 设置程序 70 $^{\circ}$ C 10 min。置于冰上至少 2 min 进行第二步反应:

5 $\times$ M-MLV Buffer	4 μ L
dNTP(10mM)	1 μ L
RNase Inhibitor	0.5 μ L
M-MLV	0.5 μ L
第一步反应产物	14 μ L

混匀后, 放入 PCR 仪中条件为: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min。

反应结束后, 将 cDNA 稀释 10 倍, 浓度为 5 ng/ μ L, 放置 -20 °C 冰箱保存。

2.2.16 实时荧光定量 PCR

根据参考文献设计猪 *IFNB* 的引物, 合成引物序列见附录。按照 GeneStar 的 2×RealStar Green Fast Mixture with ROX 说明书进行基因水平检测, GAPDH 作为内参。用两步法 PCR 扩增。PCR 反应体系如下 (10 μ L) :

2×RealStar Green Fast Mixture with ROX	5 μ L
正向引物 (10 μ M)	0.2 μ L
反向引物 (10 μ M)	0.2 μ L
cDNA (10ng)	2 μ L
RNase-free H ₂ O	2.6 μ L

2.2.17 免疫共沉淀

将重组质粒 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 与 His-pcGAS 分别共转染至 HEK 293T 细胞中, 空载体为对照。转染 24 h 后收获细胞, 每个样品用 1 mL NP-40 裂解液加 10 μ L PMSF 重悬, 4 °C 垂直混合仪裂解 1 h, 4 °C 13400×g 离心 10 min。吸取上清, 取 100 μ L 加 20 μ L 6×Loading 上样缓冲液, 100 °C 煮 10 min 作为 Input。剩余样品加入 2.5 μ g Flag 抗体 4 °C 垂直混合仪过夜孵育。第二天用 NP-40 裂解液洗 3 遍 protein A/G, 每管样品用 20 μ L protein A/G, 4 °C 500×g 离心 3min。将抗体孵育的样品加到 protein A/G 中, 4 °C 垂直混合仪孵育 2-4 h, 用 NP-40 裂解液 4 °C 500×g 离心 3 min, 洗 4 遍。吸去上清, 最后加入 60 μ L NP-40 裂解液重悬, 加入 6×Loading 上样缓冲液, 100 °C 煮 10 min, -20 °C 保存样品。

2.2.18 数据统计分析

使用 Prism 6 (GraphPad) 进行统计分析, 并通过双尾 Student's *t* test 或单向或双向分析来分析统计。P < 0.05 时以 * 表示, P < 0.01 时以 ** 表示。

3 结果与分析

3.1 猪 cGAS 基因的克隆及真核表达载体的构建

为了研究能够调控猪 cGAS 的分子以及其在抗感染免疫中的作用, 我们首先从猪的小肠组织中克隆出猪 cGAS 基因。根据 NCBI 数据库中预测的猪 cGAS 基因的 CDS 序列, 确定猪 cGAS 编码基因片段长 1488 bp。将其构建到真核表达载体 pcDNA4/TO/myc-His 质粒上(图 7 A、B), 以提取猪小肠组织 RNA 将其反转成 cDNA 为 DNA 模板进行 PCR, 扩增 p-cGAS 基因, 结果在 1488 bp 处有一条特异性条带(图 7 C), 大小与预期一致, 表明成功扩增 p-cGAS 基因。对 p-cGAS 基因和 pcDNA4/TO/myc-His 载体进行双酶切, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果在 1488 bp 和 5100 bp 左右出现单一条带(图 7 D), 符合预期的 p-cGAS 基因和 pcDNA4/TO/myc-His 质粒大小, 表明酶切成功。将上述酶切产物进行连接转化到 DH5 α 感受态细胞中挑取单克隆菌落, 利用双酶切进行鉴定, 结果显示在 5100 bp 和 1488 bp 处分别出现单一条带(图 7 E), 表明猪 cGAS 真核表达载体构建成功。

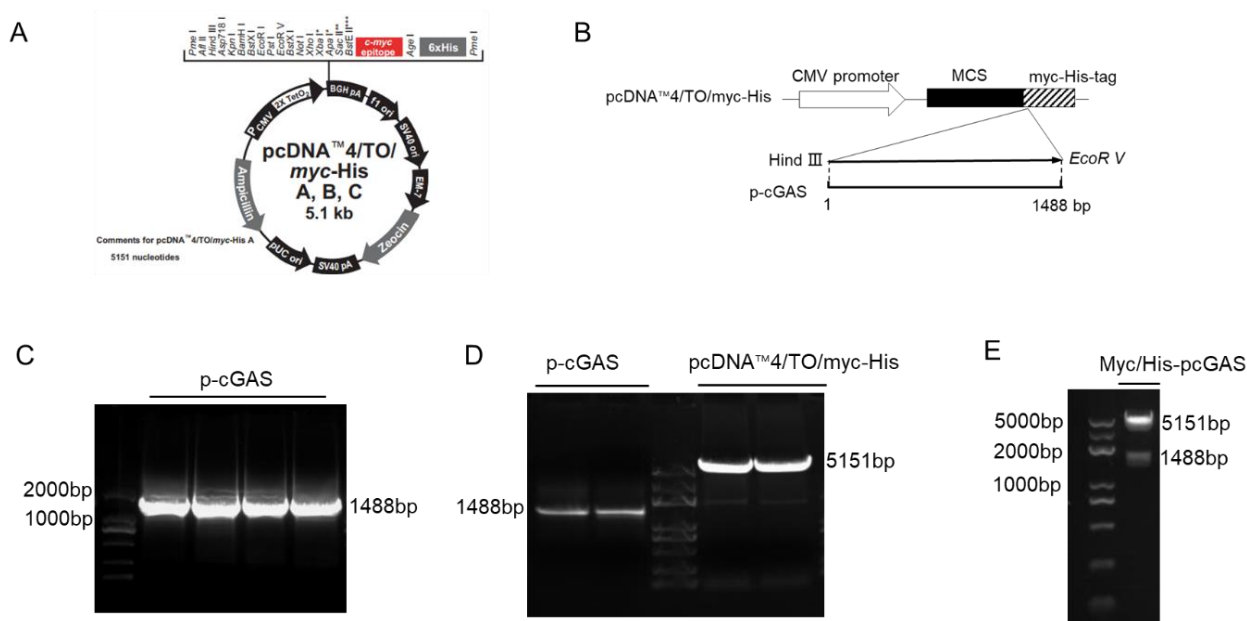


图 7. 猪 cGAS 基因的克隆及真核表达载体的构建 (A、B) pcDNA4/TO/myc-His 质粒与重组质粒 pcDNA4/TO/myc-His-pcGAS 的构建示意图; (C) PCR 扩增 p-cGAS; (D) p-cGAS 与 pcDNA4/TO/myc-His 质粒的双酶切; (E) 重组质粒 pcDNA4/TO/myc-His-pcGAS 的双酶切鉴定。

Fig7. Cloning of p-cGAS gene and construction of eukaryotic expression vector. (A、B) Schematic structure of the recombinant plasmid pcDNA4/TO/myc-His-pcGAS; (C) Amplification of p-cGAS gene by PCR; (D) Digestion of p-cGAS gene and pcDNA4/TO/myc-His vector by *Hind*III and *Eco*RV restriction enzyme; (E) Identification of recombinant pcDNA4/TO/myc-His-pcGAS by restriction digestion with *Hind*III and *Eco*RV.

3.2 猪 cGAS 蛋白表达验证及细胞定位

为了验证猪 cGAS 在细胞中的表达情况。进一步将构建的 Myc/His-pcGAS 真核表达载体转染至 HEK 293T 细胞，24 h 后利用 Western blot 验证全细胞裂解液中 猪 cGAS 蛋白表达，结果表明 Myc/His-pcGAS 成功表达（图 8A），表明我们成功构建了表达带 Myc/His 标签的猪 cGAS 真核表达载体。为进一步研究 猪 cGAS 的细胞定位，我们将 3D4/21 细胞接种于放有细胞爬片的 24 孔板中，第二天转染 Myc/His-pcGAS 质粒，然后用 His 抗体红色荧光标记的二抗进行染色，之后进行荧光共聚焦显微分析，结果表明猪 cGAS 主要定位于细胞质中（图 8B）。

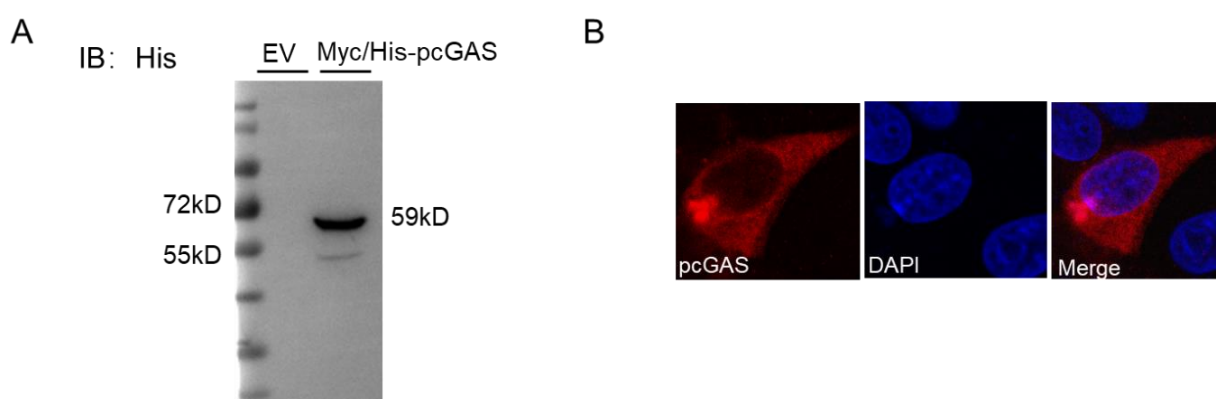


图 8. 猪 cGAS 蛋白表达验证及细胞定位 (A) Western blot 检测 HEK293T 细胞中转染空质粒与表达 Myc/His-pcGAS 质粒的蛋白表达情况；(B) 免疫荧光检测 3D4/21 细胞中 pcGAS 亚细胞定位情况（红色代表猪 cGAS 蛋白，蓝色代表细胞核的位置）。

Fig8. pcGAS protein expression verification and subcellular localization. (A) Western blot analysis of protein expression of extracellular Myc/His-pcGAS in HEK 293T cells. (B) Immunofluorescence detection of pcGAS subcellular localization in 3D4/21 cells. Red: pcGAS; Blue: Nucleus.

3.3 猪 cGAS 原核表达载体的构建

为了实现猪 cGAS 蛋白在大肠杆菌中的高效表达，选取了带有 His 标签的 pET-30a 载体，（图 9A），以实验室扩增的 p-cGAS 为 DNA 模板进行 PCR，其结果表明在大小为 1488bp 的位置显现出了一条单一的条带，与预期效果一致（图 9B）。对 p-cGAS 和 pET-30a 质粒进行双酶切，电泳结果表明酶切出了大小为 1488 bp 和 5400 bp 左右的单一条带（图 9C），符合预期的 p-cGAS 基因和 pET-30a 质粒大小，表明酶切成功。将上述的酶切产物进行连接转化到 DH5 α 感受态细胞中挑取单克隆菌落，通过酶切鉴定，结果显示在 5400 bp 和 1488 bp 处可见单一条带（图 9D），表明猪 cGAS 原核表达载体构建成功。

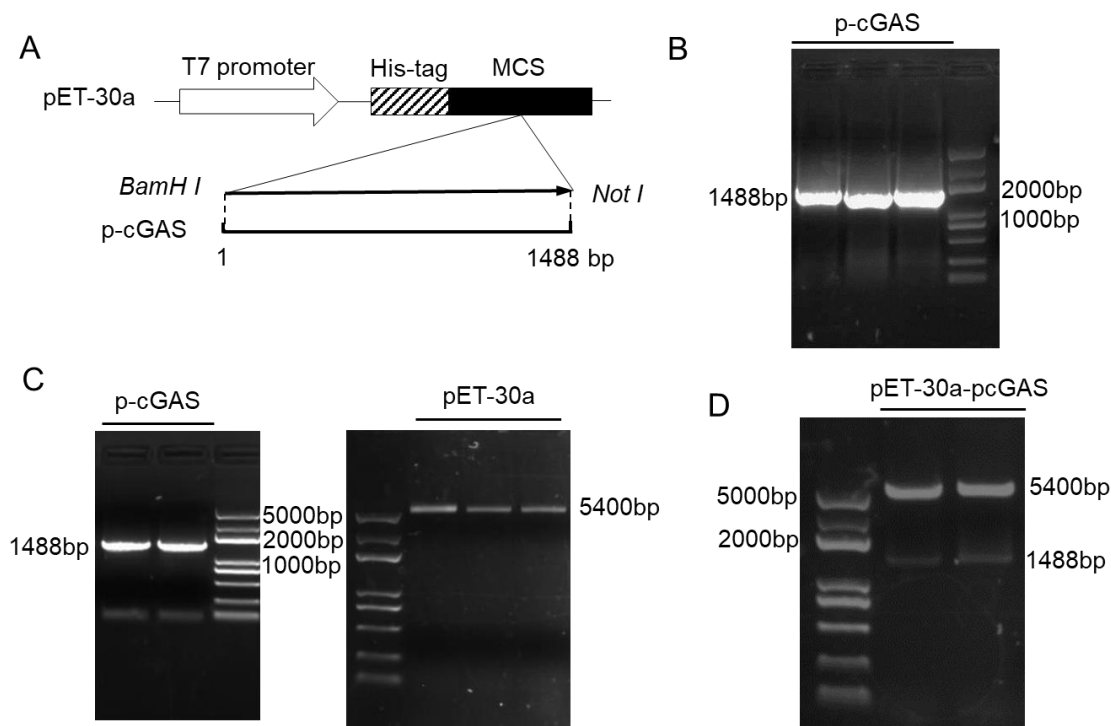


图 9. 猪 cGAS 蛋白原核表达载体的构建。(A) pET-30a-pcGAS 的构建示意图；(B) PCR 扩增 p-cGAS 全长基因片段；(C) p-cGAS 与 pET-30a 双酶切；(D) pET-30a-pcGAS 酶切鉴定。

Fig9. Construction of pET-30a-pcGAS. (A) Schematic structure of the recombinant plasmid pET-30a-pcGAS; (B) PCR amplification of p-cGAS; (C) Double digestion of p-cGAS and pET-30a by *Bam*HI and *Not*I restriction enzyme; (D) Identification of pET-30a-pcGAS digestion with *Bam*HI and *Not*I.

3.4 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达与鉴定

为了验证猪 cGAS 蛋白在大肠杆菌的表达情况。将 pET-30a-pcGAS 重组质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 37 °C 培养 3 h 后加入 IPTG 诱导猪 cGAS 蛋白表达, 超声裂解细菌, 以空质粒为阴性对照。通过考马斯亮蓝染色和免疫印迹实验验证重组猪 cGAS 蛋白的表达情况, 发现与对照相比在 60 kDa 处有一条明显的带 (图 10A、B), 猪的 cGAS 蛋白的分子量为 56 kDa, 本实验将其加上了 His 标签并克隆到 pET-30a 载体上后分子量大小大约为 60 kDa, 与预期大小相符, 而对照组在 60 kDa 处没有条带, 表明目的蛋白 pcGAS 成功在原核细胞中表达, 并且在上清和包涵体中均能够检测到猪 cGAS 蛋白的表达, 说明重组猪 cGAS 蛋白不仅以可溶性蛋白的形式在上清液中存在, 还以包涵体的形式在沉淀中存在。

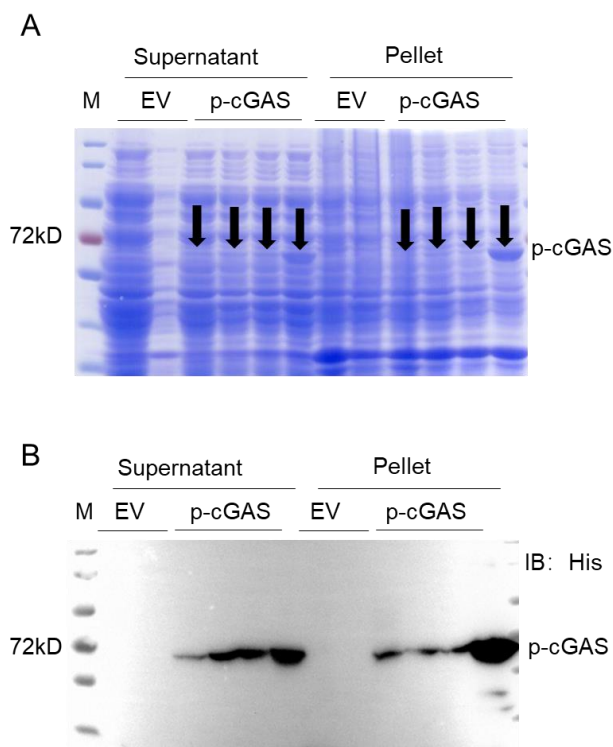


图 10 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达 (A、B) 考马斯亮蓝染色和免疫印迹验证猪 cGAS 蛋白在大肠杆菌中的表达情况，空载体对照及重组猪 cGAS 蛋白超声裂解菌体后分别取上清和沉淀进行检测。

Fig10. Soluble Inducible Expression of p-cGAS Protein. (A、B) Coomassie bright blue staining and western blot were used to verify the expression of p-cGAS protein in *Escherichia coli*. The empty vector control and recombinant p-cGAS protein were ultrasonically lysed and the supernatant and pellet were taken for detection.

3.5 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达条件优化

为了探究猪 cGAS 蛋白在上清中的最佳诱导表达条件，挑取单克隆菌落按照菌液：LB=1：100 的比例进行转接，37 °C 培养 3 h 后分别进行不同条件的诱导表达，将诱导温度分别定为 16 °C、26 °C、37 °C，IPTG 浓度和诱导时间分别统一为 0.5 mM 和 16 h，以此探索 pET-30a-pcGAS 表达的最适温度，结果表明在 16 °C 时产生融合蛋白的量较多（图 11A）。将 IPTG 浓度分别定为 0.1 mM、0.5 mM、0.8 mM、1.0 mM，诱导温度和诱导时间分别统一为 16 °C 和 16 h，以此探索 pET-30a-pcGAS 表达的最适 IPTG 浓度，结果表明在 0.5 mM 时产生融合蛋白的量较多（图 11B）。以不同诱导时间固定诱导温度 16 °C 和 0.5 mM IPTG 浓度，摸索猪 cGAS 表达的最适诱导时间，结果表明诱导 16 h 时产生融合蛋白的量最多（图 11C）。综上所述，当诱导条件为 16 °C、0.5 mM 的 IPTG 诱导 16 h 能得到最多的可溶性蛋白。

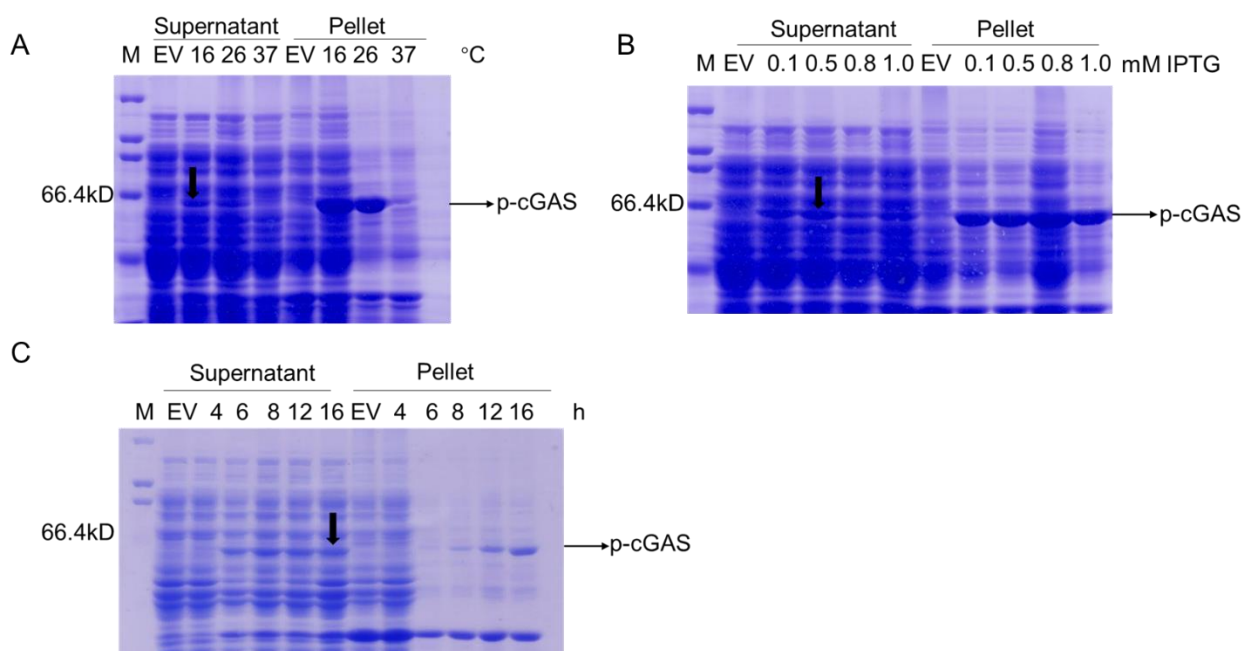


图 11 猪 cGAS 蛋白的可溶性诱导表达条件优化。（A）考马斯亮蓝染色验证猪 cGAS 蛋白在不同温度、不同 IPTG 浓度（B）及不同诱导时间（C）表达情况。

Fig11. Optimizing conditions for recombinant soluble protein p-cGAS production in BL21(DE3). (A)Coomassie brilliant blue staining verified the expression of p-cGAS protein at different temperatures、different IPTG concentration (B) and induction time at indicated periods (C).

3.6 重组猪 cGAS 蛋白的纯化及条件优化

为了纯化猪 cGAS 蛋白，以上述所探索的最适诱导条件来诱导大量表达猪 cGAS 蛋白，超声裂解后取上清液，裂解得到的上清液过滤后用 AKTA pure 蛋白纯化系统纯化蛋白，冲洗杂蛋白时分别用 20 mM、40 mM、60 mM、80 mM 咪唑浓度的结合缓冲液，通过 250 mM 咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白，利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测纯化后重组猪 cGAS 蛋白的浓度分别为 0.1094 mg/mL、0.5094 mg/mL、0.2990 mg/mL、0.2470 mg/mL（图 12A）。分别收集不同咪唑浓度的结合缓冲液纯化所收集的样品中选取浓度最高的进行考马斯亮蓝染色。结果显示在蛋白分子量大小大约为 58 kDa 处出现单一条带（图 12B），表明纯化后得到的蛋白即为所要蛋白。通过不同浓度的结合缓冲液去除杂蛋白发现 80 mM 咪唑浓度的结合缓冲液洗脱杂蛋白更充分（图 12B），表明用 80 mM 咪唑浓度的结合缓冲液时最佳的纯化条件。为了大量获得猪 cGAS 蛋白以作为配体包被芯片，大量收集 80 mM 咪唑浓度洗脱获得的重组猪 cGAS 蛋白，通过考马斯亮蓝染色和免疫印迹验证，结果显示 80 mM 咪唑的结合缓冲液洗脱杂蛋白能够获得纯度较高的猪 cGAS 蛋白（图 12C、D），以上结果表明成功获得了纯度较高的重组猪 cGAS 蛋白。

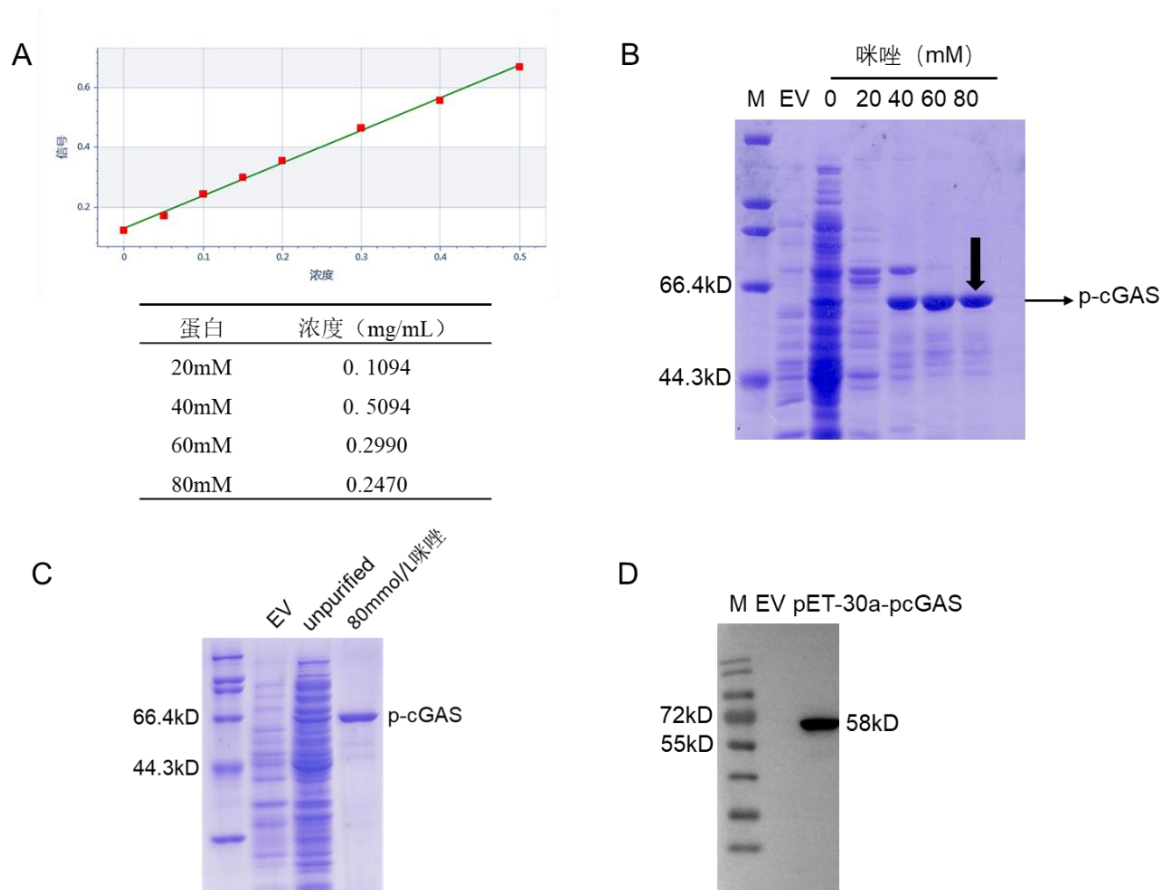


图 12 重组蛋白的纯化及检测 (A) 不同条件下纯化猪 cGAS 重组蛋白的浓度测定; (B) 考马斯亮蓝染色检测不同咪唑浓度结合缓冲液纯化蛋白效果; (C、D) 考马斯亮蓝染色和免疫印迹检测 80 mM 咪唑结合缓冲液纯化重组猪 cGAS 蛋白的效果。

Fig12. Purification and detection of recombinant soluble protein p-cGAS. (A) Concentration determination of purified recombinant p-cGAS protein under different conditions; (B) Coomassie bright blue staining was used to detect the purification effect of binding buffer with different imidazole concentrations; (C, D) Purification of recombinant p-cGAS protein by 80 mM imidazole-binding buffer was detected by Coomassie bright blue staining and Western blot.

3.7 重组猪 cGAS 蛋白的活性检测

为了检测重组蛋白的活性, 我们通过体外合成 2'3'-cGAMP 实验。由于 cGAS 在胞质 dsDNA 刺激下, 通过 ATP 和 GTP 催化合成第二信使分子 2'3'-cGAMP, 随后 2'3'-cGAMP 结合并激活下游接头蛋白 STING, 并通过激活 TBK1 促使转录因子 IRF3/7 和 NF- κ B 入核, 从而诱导 I 型 IFNs 的产生(Xia *et al.*, 2016)。因此本研究将纯化后的重组蛋白 pcGAS 通过体外实验合成了 2'3'-cGAMP, 与透膜剂 1:1 加入 3D4/21 细胞中 37 °C 孵育 30 min, 提取细胞 RNA 利用 qPCR 检测 *IFNB* 的表达。结果显示, 与不加酶的对照体系相比, 猪 GAS 酶促反应产物能够激活 IFN- β 的表达, 约为对照组的 4 倍, 2'3'-cGAMP 标准品刺激诱导产生的 *IFNB* 约为对照组 70 倍 (图 13), 表明重组表达的猪 GAS 蛋白具有生物学活性。

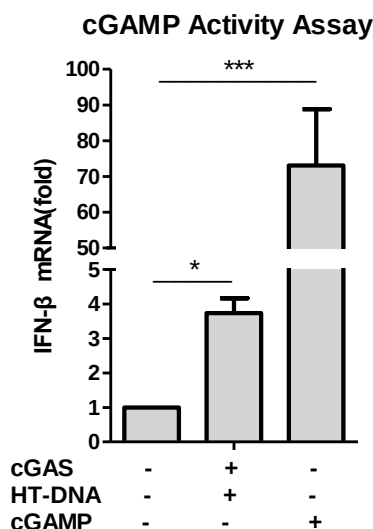


图 13 qPCR 检测纯化的重组猪 cGAS 蛋白生物学活性 将纯化后的猪 cGAS 蛋白通过体外酶促反应合成 cGAMP，与细胞透膜剂 1: 1 加到 3D4/21 细胞中，37 °C 孵育 30 min 后换正常培养基，6 h 后收细胞，提取 RNA 通过 qPCR 检测 *IFNB* 的表达量。本结果为三次独立重复实验结果，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ (Student's unpaired *t* test)。

Fig13. Detection of the activity of purified recombinant pcGAS protein by qPCR. The purified porcine cGAS protein was synthesized by *in vitro* enzymatic reaction to cGAMP, and the cell permeabilizing agent 1:1 was added to 3D4/21 cells, incubated at 37°C for 30 minutes, and then replaced with normal medium. After 6 hours, the cells were harvested, and RNA was extracted to detect the expression of IFN-β by qPCR. These results from the 3 independent repeated experiments, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Student's unpaired *t* test).

3.8 生物大分子相互作用仪质谱分析猪 cGAS 相互作用蛋白

为了寻找调控猪 cGAS 的因子，我们利用 Biacore 生物大分子相互作用仪的分子垂钓功能来钓取与猪 cGAS 可能发生相互作用的蛋白。生物大分子相互作用仪的原理是基于表面等离子共振技术，将诱饵蛋白通过氨基偶联包被在芯片表面，然后从混合物中钓取互作蛋白。因此我们首先将纯化后并具有生物学活性的重组猪 cGAS 蛋白通过氨基偶联包被到 CM5 芯片表面，自动偶联结果显示最终偶联量约为 5000RU (图 14)，可进行后续垂钓实验。

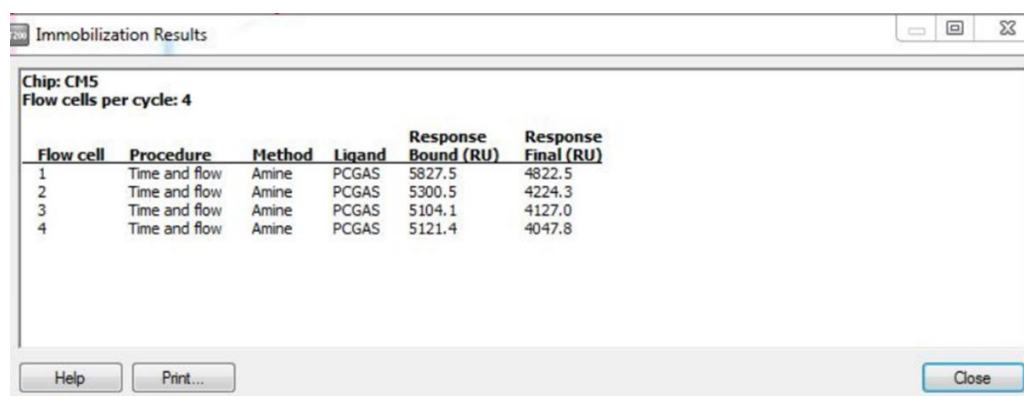


图 14 pcGAS 蛋白偶联芯片结果

Fig14. Results of pcGAS protein coupling chip



图 16 猪 cGAS 蛋白相互作用蛋白 GO 富集分析

Fig16. Analysis of GO Enrichment of Porcine cGAS Protein Interacting Protein

表 2 猪 cGAS 相互作用蛋白功能分析

Table 2. Functional analysis of porcine cGAS interacting protein

Function	Protein
Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements	ANP32A, PSMA4, PSMA5, SET, YWHAB
Metabolism of RNA	ALYREF, ANP32A,, PSMA4, PSMA5, RBMX, SET, YWHAB
Metabolism	AKR7A2, BLVRB, CAD, CHPF, COX5A, CTPS1, CYC1, DBT, FABP5, HPSE, NUDT12, PFKM, PIK3R6, PLCD1, PSMA4, PSMA5, UPP1
Signaling by moderate kinase activity BRAF mutants	CNKSR1, KRAS, YWHAB
RHO GTPases activate PKNs	H2AFZ, MYL9, YWHAB
Regulation of RAS by GAPs	KRAS, PSMA4, PSMA5
Diseases of signal transduction	CNKSR1, KRAS, PSMA4, PSMA5, RAC2, YWHAB
MAPK1/MAPK3 signaling (RAF/MAP kinase cascade)	CNKSR1, KRAS, PSMA4, PSMA5, YWHAB
Assembly of the pre-replicative complex (DNA Replication Pre-Initiation)	MCM3, PSMA4, PSMA5
G2/M Checkpoints	MCM3, PSMA4, PSMA5, YWHAB
Apoptosis	PLEC, PSMA4, PSMA5, YWHAB
Downstream signaling events of B Cell Receptor (BCR)	KRAS, PSMA4, PSMA5
Signaling by Rho GTPases	ARHGAP23, H2AFZ, MYL9, PRC1, RAC2, YWHAB
PCP/CE pathway	PSMA4, PSMA5, RAC2
RAF activation	KRAS, YWHAB
Transcriptional regulation by RUNX3	KRAS, PSMA4, PSMA5
NF-kB signaling	AKR7A2, HBZ, SLPI, FABP5, UBE2L3
autophagy	EIF2AK3, RAB8B,
RIG-I-MAVS signaling	PGAM5

3.9 猪 cGAS 相互作用蛋白鉴定

为了验证质谱鉴定结果，我们从质谱分析结果当中筛选出与猪 cGAS 相互作用可能性较高的细胞蛋白 YWHAB、FABP5，利用激光共聚焦、IP 等方法验证是否与猪 cGAS 相互作用。首先我们根据 NCBI 数据库中 YWHAB 及 FABP5 的基因序列合成引物（见附录），利用猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 细胞的 cDNA 为模板扩增出了 YWHAB、FABP5 基因，琼脂糖凝胶电泳结果显示成功扩增出单一目的条带（YWHAB 基因编码区长 741bp，FABP5 基因编码区长 408bp）（图 17A、B），通过酶切连接将其构建到真核表达载体 pcDNA3.0-Flag 载体上，酶切鉴定及测序结果表明 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 真核表达载体构建成功（图 17C、D）。

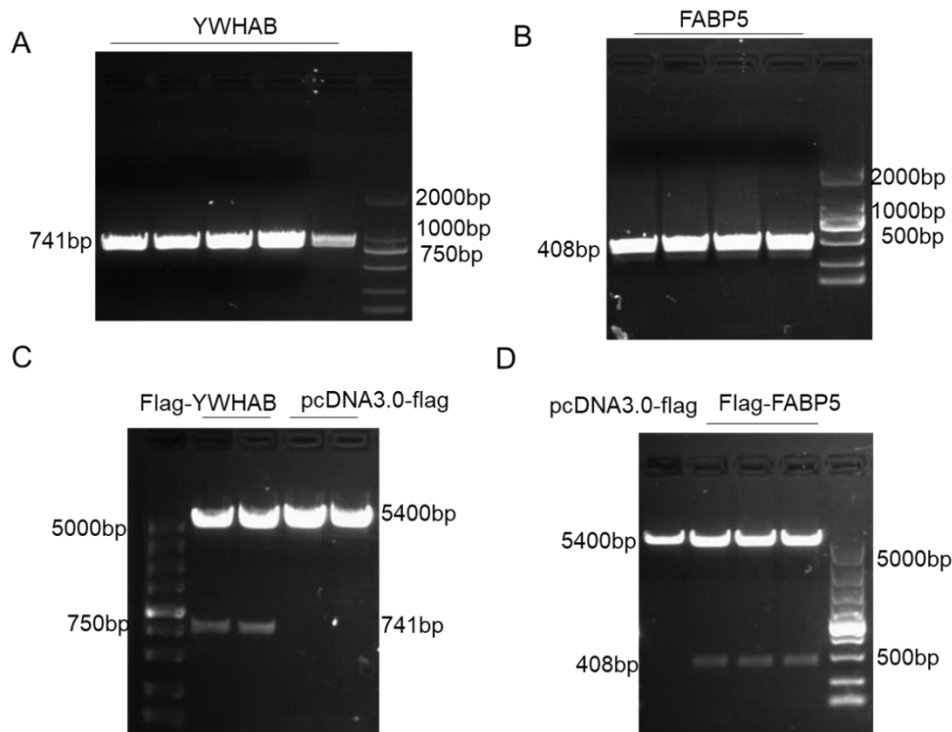


图 17. 猪 YWHAB、FABP5 真核表达载体的构建 (A) PCR 扩增 YWHAB; (B) PCR 扩增 FABP5; (C、D) Flag-YWHAB、Flag-FABP5 酶切鉴定。

Fig17. Construction of Flag-YWHAB、Flag-FABP5. (A、B) PCR amplification of YWHAB、FABP5; (C、D) Identification of Flag-YWHAB、Flag-FABP5 by restriction digestion with *Hind*III and *Xho*I.

为了验证 YWHAB、FABP5 在细胞中的表达情况。我们将构建成功的重组质粒 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 转染至 HEK 293T 细胞，转染 24 h 后利用 Western blot 验证全细胞裂解液中 YWHAB、FABP5 蛋白表达情况，结果发现与对照相比在预期位置出现了大小一致的条带（YWHAB 蛋白大小约为 28kDa，FABP5 蛋白大小约为 15kDa），表明 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 在细胞中成功表达（图 18A、B）。为了验证 YWHAB、FABP5 在细胞中的定位情况，将构建成功的重组质粒 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 分别

转染 Hela 细胞进行免疫荧光，通过激光共聚焦显微镜观察我们发现 YWHAB、FABP5 主要定位于细胞质（图 18C），与已有的研究结果一致。

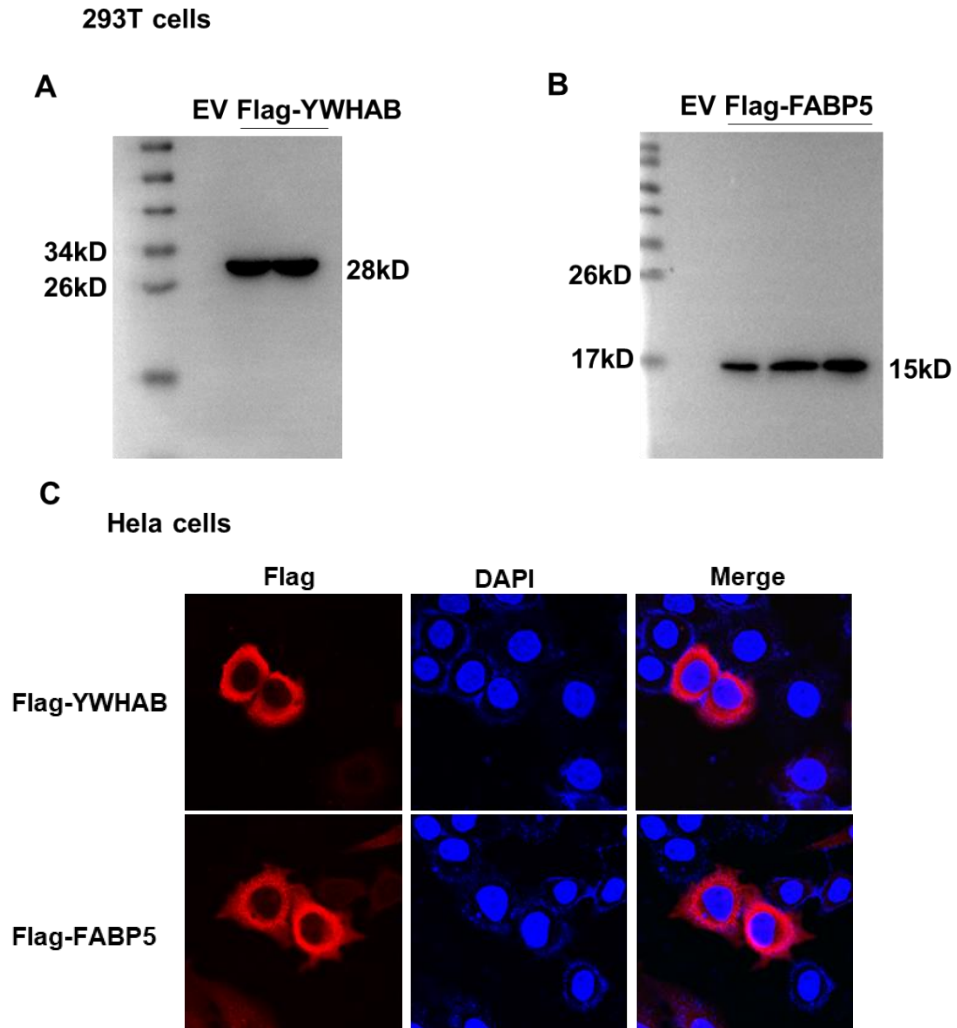


图 18 YWHAB、FABP5 蛋白细胞定位 (A、B) Western blot 检测 HEK293T 细胞中分别转染空质粒与表达 Flag-YWHAB、Flag-FABP5 质粒的蛋白表达情况；(C) Flag-YWHAB、Flag-FABP5 分别转染至 HeLa 细胞，24 小时后进行免疫荧光，激光共聚焦显微镜观察 YWHAB、FABP5 细胞定位结果。（红色代表 YWHAB 及 FABP5 的定位，蓝色代表细胞核的位置）

Fig18. Cellular localization of YWHAB, FABP5 protein. (A、 B) Western blot analysis of the protein expression of HEK293T cells transfected with empty vector and Flag-YWHAB, Flag-FABP5 plasmids; (C) Flag-YWHAB and Flag-FABP5 were transfected into HeLa cells respectively, and immunofluorescence was performed 24 hours later. The localization results of YWHAB and FABP5 cells were observed by laser confocal microscope. Red: YWHAB、FABP5; Blue: Nucleus.

为了验证 YWHAB、FABP5 与猪 cGAS 蛋白的相互作用，我们将构建的猪 cGAS 蛋白真核表达载体和 YWHAB、FABP5 载体分别共转染至 HeLa 细胞，利用免疫荧光检测了猪 cGAS 蛋白与 YWHAB、FABP5 蛋白在细胞中的共定位情况。发现猪 cGAS 蛋白可以和 YWHAB、FABP5 蛋白共定位在细胞浆中，而空载体则不与 YWHAB、FABP5 蛋白发生共定位（图 19A）。为了进一步验证 YWHAB、FABP5 与猪 cGAS 的相互作用，

我们将猪 cGAS 蛋白真核表达载体和 YWHAB、FABP5 载体分别共转染至 HEK 293T 细胞，利用免疫共沉淀实验检测了猪 cGAS 蛋白与 YWHAB、FABP5 蛋白在细胞中的互作情况。结果发现 YWHAB、FABP5 与猪 cGAS 蛋白均存在相互作用（图 19 B，C）。以上数据表明 YWHAB、FABP5 蛋白可以和猪 cGAS 蛋白发生相互作用。

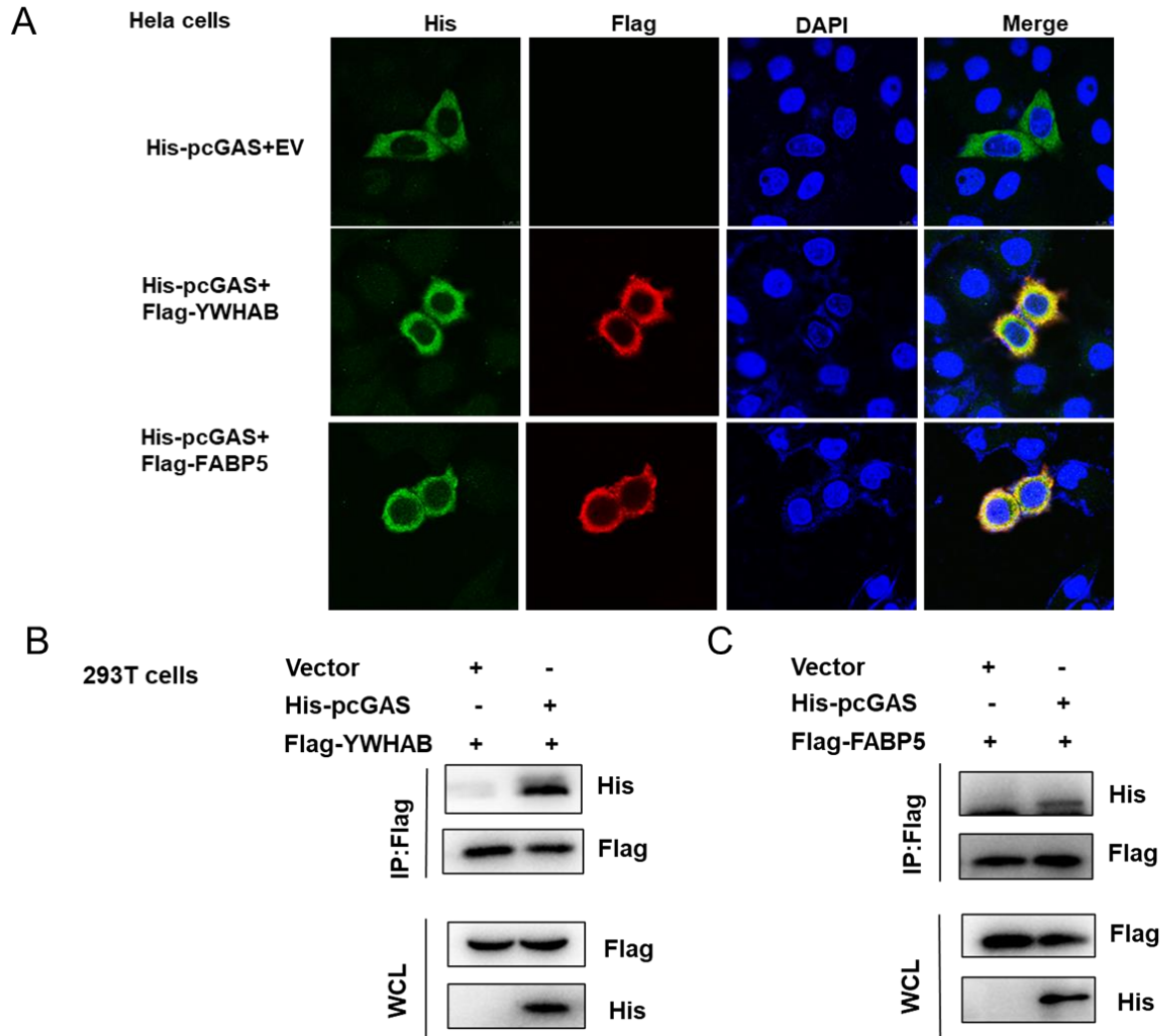


图 19 猪 cGAS 相互作用蛋白鉴定 (A) His-pcGAS 分别与 pcDNA3.0-flag 空载体、Flag-YWHAB、Flag-FABP5 共转染至 Hela 细胞，24 小时后进行免疫荧光，激光共聚焦显微镜观察猪 cGAS 蛋白与 YWHAB、FABP5 蛋白共定位结果；

(B)免疫共沉淀验证 293T 细胞中猪 cGAS 蛋白与 YWHAB 蛋白相互作用；(C)免疫共沉淀验证 293T 细胞中猪 cGAS 蛋白与 FABP5 蛋白相互作用；（绿色代表猪 cGAS 蛋白的定位，红色代表 YWHAB 及 FABP5 的定位，蓝色代表细胞核）

Fig19. Identification of Porcine cGAS Interacting Proteins. (A) His-pcGAS was co-transfected with pcDNA3.0-flag empty vector, Flag-YWHAB, and Flag-FABP5 into Hela cells. After 24 hours, immunofluorescence was performed and the results of co-localization of porcine cGAS protein and YWHAB and FABP5 protein were observed by laser confocal microscope. (B)Co-immunoprecipitation verifies the interaction of porcine cGAS protein and YWHAB protein in 293T cells. (C) co-immunoprecipitation verifies the interaction of porcine cGAS protein and FABP5 protein in 293T cells; (Green: pcGAS. Red:YWHAB、FABP5; Blue: Nucleus.

4 讨论

固有免疫是机体防御病原微生物入侵的第一道防线,病原体相关分子模式的识别对于启动先天免疫应答至关重要,机体主要通过模式识别受体来实现这一功能(Beutler 2004)。环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cGAS)是2013年新被鉴定的胞质DNA感受器(Sun *et al.* 2013)。正常情况下DNA只存在于细胞核和线粒体中,在病毒感染或细胞损伤时会出现在细胞质中出现游离DNA,是一种重要的病原体相关分子模式(Takeuchi and Akira 2010),这些DNA被cGAS识别并激活下游抗病毒反应。另外cGAS的异常激活可能对机体造成免疫损伤以及自身免疫病,因此cGAS的精确调控对机体十分重要。目前研究报道人和小鼠cGAS的调控较多(Dai *et al.*, 2019),猪cGAS相关的调控机制还未报道。鉴于cGAS的重要功能,研究猪cGAS的调控机制有助于我们深入认识机体抗DNA病毒的调控机理,同时也为治疗自身免疫病提供新的策略。本研究通过外源表达猪cGAS蛋白,利用生物大分子相互作用仪BiaCORE质谱分析首次鉴定了与猪cGAS相互作用的蛋白,为寻找能够调控猪cGAS的分子及其在抗感染免疫中的作用,探究其对于干扰素产生机制的研究,更好的发挥cGAS的功能提供理论依据。

大肠杆菌一直是表达外源蛋白的首选表达系统,具有遗传背景清楚、培养周期短、培养经济、外源蛋白表达水平高、待选质粒和宿主类别多等特点(Kaur *et al.*,2018),但外源蛋白在表达过程中容易形成包涵体,其应用受到了限制。本研究为实现猪cGAS的可溶性表达及纯化展开了一系列优化试验,实验设计前期,根据文献报道参考了多种载体的优缺点,并结合已有文献选择了带有His标签的pET-30a载体,His标签蛋白促进了目的蛋白的可溶性表达,因而避免了蛋白纯化时的包涵体变性复性过程,能够保证其生物活性。同时,诱导条件也是影响重组蛋白异源表达的重要因素,本研究从不同温度、IPTG浓度和诱导时间等方面优化了猪cGAS的诱导表达条件,最终确定猪cGAS最佳可溶性诱导表达条件,极大的提高了重组蛋白的表达量。本研究还探索了亲和层析纯化条件,选择不同咪唑浓度的结合缓冲液,最终确定最佳咪唑浓度的缓冲液洗脱杂蛋白,得到纯度较高的重组猪cGAS蛋白,可为后续蛋白活性检测、体内研究、体外合成以及相关机制研究做准备。然而,通过降低温度和延长表达时间来实现可溶性表达也存在着不可避免的缺点,例如目的蛋白更易被蛋白酶降解,约50%的目的蛋白仍以包涵体形式存在,造成可溶性目的蛋白收率较低。

蛋白质之间的相互作用是细胞进行一切代谢活动的基础。蛋白相互作用的方法有很多,例如酵母双杂交、pull-down、免疫共沉淀(Co-IP)、噬菌体展示技术、蛋白质芯片技术等。BiaCORE 是基于表面等离子体共振(SPR)技术的原理,鉴定在天然状态下生物分子之间的互作,无需任何标记物。相比于其他蛋白互作研究方法具有全自动、24 小时出结果、无污染风险,高灵敏度、能发现瞬时结合物等优点,而 Co-IP、酵母双杂交等技术的缺点是,假阳性率高,无法垂钓瞬时结合,且手工操作易受污染,不适用于检测与膜蛋白之间的相互作用,且不能体现生理状态下蛋白-蛋白之间的相互作用。本研究以 BiaCORE 生物大分子相互作用仪来筛选互作蛋白,使实验结果更具有可信度。目前 BiaCORE 广泛应用于研究各种生物分子(如多肽、蛋白质、寡核苷酸,以及病毒、细菌、小分子化合物)之间的相互作用过程,以及特异性抗体检测或质控、疾病机制、药物筛选及相关药物动力学实时监测、配体垂钓、免疫调节、结构-功能关系等。相比 EMSA (凝胶迁移实验,需标记)、ITC(等温量热滴定实验)蛋白(配体)用量极少,一般 10-20 μg 足矣,但蛋白纯度要求达到 90-95%。还有待解决的就是分析物与芯片非特异性吸附问题,但是由于芯片可选种类很多,对于非特异性吸附除了样品缓冲液的优化还可以通过选择不同类型芯片解决此问题。

本研究通过生物大分子相互作用仪 BiaCORE 质谱鉴定了 61 个与猪 cGAS 相互作用的蛋白,通过分析发现这些蛋白分布于外泌体、细胞核、胞外区、细胞质中,参与基因表达、转录后翻译调控、细胞自噬、凋亡、RNA 代谢等途径,具有结合 RNA 的功能。从中我们并没有发现与人和小鼠 cGAS 相同的调控分子,可能由于猪 cGAS 与人和小鼠的同源性差异较大,并且 BiaCORE 的灵敏度较高,这提示我们猪 cGAS 可能存在着新的调控机制。我们从质谱结果中选取互作可能性较高(Score 值大于 50)的蛋白 YWHAB、FABP5 进行验证。YWHAB 蛋白是 14-3-3 蛋白家族中的 14-3-3 β 亚型,是 14-3-3 蛋白家族中表达量最高的蛋白,分子量约为 28kDa(Fu *et al.*, 2000)。14-3-3 蛋白具有特异性磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸结合活性,这种高度保守的蛋白质家族存在于植物和哺乳动物中。14-3-3 二聚体可以与多种细胞蛋白相互作用,已有许多研究表明 YWHAB 在调控细胞周期、细胞凋亡、细胞自噬、癌症以及抗病毒感染中发挥着重要的作用。其中 14-3-3 ϵ 在对抗 RNA 病毒感染中起重要作用,是 RIG-I 易位子的关键组分,此外 14-3-3 ϵ 对于 RIG-I 与 TRIM25 的稳定是必需的(Liu *et al.*, 2012)。然而 YWHAB 是否参与 cGAS 介导的抗 DNA 病毒感染尚未见报道。脂肪酸结合蛋白 5-FABP5 为脂肪酸结合蛋白家族重要成员,分子量大小为 15kDa,位于胞浆。FABP5 可与跨膜转运载体、脂粒、过氧化物酶

体、线粒体、内质网、CD36 等相互结合，参与脂肪酸的摄取、转运和代谢，为细胞生长提供提供能量和原材料，调节细胞分化、促进细胞增殖和抑制细胞的凋亡(Senga *et al.*, 2018)。已有许多研究表达脂代谢与天然免疫密切相关，然而 FABP5 是否参与了 cGAS 介导的抗病毒天然免疫还不清楚，需要我们进一步深入研究。我们的结果表明筛选出的 YWHAB、FABP5 能够与猪 cGAS 蛋白发生相互作用，为进一步探究其调控机制奠定了理论基础。

综上所述，本研究成功构建了 pET-30a-pcGAS 原核表达载体，并利用大肠杆菌表达系统实现了猪 cGAS 蛋白的可溶性表达。通过高灵敏度的 BiaCORE 生物大分子相互作用仪质谱分析首次鉴定了猪 cGAS 相互作用蛋白。为猪 cGAS 的体外表达、分离纯化、提供了技术方法，同时也为后续开展猪 cGAS 调控干扰素产生的机制研究奠定了前期的基础。

5 结论

- 1.成功构建猪 cGAS 真核和原核表达载体，利用大肠杆菌表达系统实现猪 cGAS 蛋白的可溶性表达。
- 2.获得了纯度较高并具有生物活性的重组猪 cGAS 蛋白，通过生物大分子相互作用仪-质谱筛选鉴定了 61 个与猪 cGAS 可能相互作用的蛋白，并验证了猪 cGAS 与 YWHAB、FABP5 的相互作用。

参考文献

- Ablasser, A., F. Bauernfeind, G. Hartmann, E. Latz, K. A. Fitzgerald and V. Hornung. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol*,2009, **10**(10): 1065-1072.
- Ablasser, A. and Z. J. Chen. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science*,2019, **363**(6431).
- Ablasser, A., M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Röhl, K. P. Hopfner, J. Ludwig and V. Hornung. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*,2013, **498**(7454): 380-384.
- Aguirre, S. and A. Fernandez-Sesma. Collateral Damage during Dengue Virus Infection: Making Sense of DNA by cGAS. *J Virol*,2017, **91**(14).
- Aguirre, S., P. Luthra, M. T. Sanchez-Aparicio, A. M. Maestre, J. Patel, F. Lamothe, A. C. Fredericks, S. Tripathi, T. Zhu, J. Pintado-Silva, L. G. Webb, D. Bernal-Rubio, A. Solovyov, B. Greenbaum, V. Simon, C. F. Basler, L. C. Mulder, A. García-Sastre and A. Fernandez-Sesma. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol*,2017, **2**: 17037.
- An, H., C. Qian and X. Cao. Regulation of Toll-like receptor signaling in the innate immunity. *Sci China Life Sci*,2010, **53**(1): 34-43.
- Andreeva, L., B. Hiller, D. Kostrewa, C. Lässig, C. C. de Oliveira Mann, D. Jan Drexler, A. Maiser, M. Gaidt, H. Leonhardt, V. Hornung and K. P. Hopfner. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature*,2017, **549**(7672): 394-398.
- Barnett, K. C., J. M. Coronas-Serna, W. Zhou, M. J. Ernandes, A. Cao, P. J. Kranzusch and J. C. Kagan. Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. *Cell*,2019, **176**(6): 1432-1446.e1411.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*,2002, **270**: 81-92.
- Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*,2004, **40**(12): 845-859.
- Blander, J. M. Designing a type I interferon signaling phagosome. *Immunity*,2012, **37**(6): 947-949.
- Caruso, R., N. Warner, N. Inohara and G. Núñez. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*,2014, **41**(6): 898-908.
- Chen, M., Q. Meng, Y. Qin, P. Liang, P. Tan, L. He, Y. Zhou, Y. Chen, J. Huang, R. F. Wang and

- J. Cui. TRIM14 Inhibits cGAS Degradation Mediated by Selective Autophagy Receptor p62 to Promote Innate Immune Responses. *Mol Cell*,2016, **64**(1): 105-119.
- Chiu, Y. H., J. B. Macmillan and Z. J. Chen. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*,2009, **138**(3): 576-591.
- Civril, F., T. Deimling, C. C. de Oliveira Mann, A. Ablasser, M. Moldt, G. Witte, V. Hornung and K. P. Hopfner. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature*,2013, **498**(7454): 332-337.
- Cui, J., Y. Chen, H. Y. Wang and R. F. Wang. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Hum Vaccin Immunother*,2014, **10**(11): 3270-3285.
- Dai, J., Y. J. Huang, X. He, M. Zhao, X. Wang, Z. S. Liu, W. Xue, H. Cai, X. Y. Zhan, S. Y. Huang, K. He, H. Wang, N. Wang, Z. Sang, T. Li, Q. Y. Han, J. Mao, X. Diao, N. Song, Y. Chen, W. H. Li, J. H. Man, A. L. Li, T. Zhou, Z. G. Liu, X. M. Zhang and T. Li. Acetylation Blocks cGAS Activity and Inhibits Self-DNA-Induced Autoimmunity. *Cell*,2019, **176**(6): 1447-1460.e1414.
- Dai, J., Y. J. Huang, X. He, M. Zhao, X. Wang, Z. S. Liu, W. Xue, H. Cai, X. Y. Zhan, S. Y. Huang, K. He, H. Wang, N. Wang, Z. Sang, T. Li, Q. Y. Han, J. Mao, X. Diao, N. Song, Y. Chen, W. H. Li, J. H. Man, A. L. Li, T. Zhou, Z. G. Liu, X. M. Zhang and T. Li. Acetylation Blocks cGAS Activity and Inhibits Self-DNA-Induced Autoimmunity. *Cell*,2019, **176**(6): 1447-1460 e1414.
- Dempsey, A. and A. G. Bowie. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*,2015, **479-480**: 146-152.
- Du, M. and Z. J. Chen. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science*,2018, **361**(6403): 704-709.
- Ferguson, B. J., D. S. Mansur, N. E. Peters, H. Ren and G. L. Smith. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*,2012, **1**: e00047.
- Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, C. Juliana, L. Solorzano, S. Kang, J. Wu, P. Datta, M. McCormick, L. Huang, E. McDermott, L. Eisenlohr, C. P. Landel and E. S. Alnemri. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. *Nat Immunol*,2010, **11**(5): 385-393.
- Franchi, L., N. Warner, K. Viani and G. Nuñez. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*,2009, **227**(1): 106-128.
- Fu, H., R. R. Subramanian and S. C. Masters. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,2000, **40**: 617-647.

- Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*,2003, **3**(9): 710-720.
- Gao, D., T. Li, X. D. Li, X. Chen, Q. Z. Li, M. Wight-Carter and Z. J. Chen. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2015, **112**(42): E5699-5705.
- Gao, M. and M. Karin. Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell*,2005, **19**(5): 581-593.
- Gao, P., M. Ascano, T. Zillinger, W. Wang, P. Dai, A. A. Serganov, B. L. Gaffney, S. Shuman, R. A. Jones, L. Deng, G. Hartmann, W. Barchet, T. Tuschl and D. J. Patel. Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell*,2013, **154**(4): 748-762.
- Gentili, M., X. Lahaye, F. Nadalin, G. P. F. Nader, E. Puig Lombardi, S. Herve, N. S. De Silva, D. C. Rookhuizen, E. Zueva, C. Goudot, M. Maurin, A. Bochnakian, S. Amigorena, M. Piel, D. Fachinetti, A. Londoño-Vallejo and N. Manel. The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus. *Cell Rep*,2019, **26**(9): 2377-2393.e2313.
- Goubau, D., S. Deddouche and C. Reis e Sousa. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*,2013, **38**(5): 855-869.
- Hansen, K., T. Prabakaran, A. Laustsen, S. E. Jørgensen, S. H. Rahbæk, S. B. Jensen, R. Nielsen, J. H. Leber, T. Decker, K. A. Horan, M. R. Jakobsen and S. R. Paludan. *Listeria monocytogenes* induces IFN β expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. *Embo j*,2014, **33**(15): 1654-1666.
- Hazlett, L. and M. Wu. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*,2011, **343**(1): 175-188.
- Herzner, A. M., C. A. Hagmann, M. Goldeck, S. Wolter, K. Kübler, S. Wittmann, T. Gramberg, L. Andreeva, K. P. Hopfner, C. Mertens, T. Zillinger, T. Jin, T. S. Xiao, E. Bartok, C. Coch, D. Ackermann, V. Hornung, J. Ludwig, W. Barchet, G. Hartmann and M. Schlee. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA. *Nat Immunol*,2015, **16**(10): 1025-1033.
- Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz and K. A. Fitzgerald. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*,2009, **458**(7237): 514-518.
- Hu, M. M., C. Y. Liao, Q. Yang, X. Q. Xie and H. B. Shu. Innate immunity to RNA virus is regulated by temporal and reversible sumoylation of RIG-I and MDA5. *J Exp Med*,2017, **214**(4): 973-989.

- Hu, M. M. and H. B. Shu. Multifaceted roles of TRIM38 in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol*,2017, **14**(4): 331-338.
- Hu, M. M. and H. B. Shu. Cytoplasmic Mechanisms of Recognition and Defense of Microbial Nucleic Acids. *Annu Rev Cell Dev Biol*,2018, **34**: 357-379.
- Hu, M. M., Q. Yang, X. Q. Xie, C. Y. Liao, H. Lin, T. T. Liu, L. Yin and H. B. Shu. Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus. *Immunity*,2016, **45**(3): 555-569.
- Ishii, K. J., T. Kawagoe, S. Koyama, K. Matsui, H. Kumar, T. Kawai, S. Uematsu, O. Takeuchi, F. Takeshita, C. Coban and S. Akira. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*,2008, **451**(7179): 725-729.
- Ishikawa, H., Z. Ma and G. N. Barber. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*,2009, **461**(7265): 788-792.
- Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*,1989, **54 Pt 1**: 1-13.
- Kell, A. M. and M. Gale, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*,2015, **479-480**: 110-121.
- Kim, D. H. and J. J. Ewbank. Signaling in the innate immune response. *WormBook*,2018, **2018**: 1-35.
- Klotman, M. E. and T. L. Chang. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*,2006, **6**(6): 447-456.
- Kondo, T., J. Kobayashi, T. Saitoh, K. Maruyama, K. J. Ishii, G. N. Barber, K. Komatsu, S. Akira and T. Kawai. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2013, **110**(8): 2969-2974.
- Lau, L., E. E. Gray, R. L. Brunette and D. B. Stetson. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science*,2015, **350**(6260): 568-571.
- Li, X., C. Shu, G. Yi, C. T. Chaton, C. L. Shelton, J. Diao, X. Zuo, C. C. Kao, A. B. Herr and P. Li. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity*,2013, **39**(6): 1019-1031.
- Liu, H. M., Y. M. Loo, S. M. Horner, G. A. Zornetzer, M. G. Katze and M. Gale, Jr. The mitochondrial targeting chaperone 14-3-3 ϵ regulates a RIG-I translocon that mediates membrane association and innate antiviral immunity. *Cell Host Microbe*,2012, **11**(5): 528-537.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*,2011, **34**(5): 680-692.

- Ma, F., B. Li, S. Y. Liu, S. S. Iyer, Y. Yu, A. Wu and G. Cheng. Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS. *J Immunol*,2015, **194**(4): 1545-1554.
- Mackenzie, K. J., P. Carroll, C. A. Martin, O. Murina, A. Fluteau, D. J. Simpson, N. Olova, H. Sutcliffe, J. K. Rainger, A. Leitch, R. T. Osborn, A. P. Wheeler, M. Nowotny, N. Gilbert, T. Chandra, M. A. M. Reijns and A. P. Jackson. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*,2017, **548**(7668): 461-465.
- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*,2006, **6**(3): 173-182.
- Parvatiyar, K., Z. Zhang, R. M. Teles, S. Ouyang, Y. Jiang, S. S. Iyer, S. A. Zaver, M. Schenk, S. Zeng, W. Zhong, Z. J. Liu, R. L. Modlin, Y. J. Liu and G. Cheng. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol*,2012, **13**(12): 1155-1161.
- Ronald, P. C. and B. Beutler. Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science*,2010, **330**(6007): 1061-1064.
- Senga, S., N. Kobayashi, K. Kawaguchi, A. Ando and H. Fujii. Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*,2018, **1863**(9): 1057-1067.
- Seo, G. J., A. Yang, B. Tan, S. Kim, Q. Liang, Y. Choi, W. Yuan, P. Feng, H. S. Park and J. U. Jung. Akt Kinase-Mediated Checkpoint of cGAS DNA Sensing Pathway. *Cell Rep*,2015, **13**(2): 440-449.
- Shaw, M. H., T. Reimer, Y. G. Kim and G. Nuñez. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol*,2008, **20**(4): 377-382.
- Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen and Z. J. Chen. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*,2013, **339**(6121): 786-791.
- Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba and T. Taniguchi. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*,2007, **448**(7152): 501-505.
- Takeda, K. and S. Akira. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*,2005, **17**(1): 1-14.
- Takeuchi, O. and S. Akira. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*,2010, **140**(6): 805-820.
- Wang, J., B. Chu, L. Du, Y. Han, X. Zhang, S. Fan, Y. Wang and G. Yang. Molecular cloning and functional characterization of porcine cyclic GMP-AMP synthase. *Molecular*

- Immunology*,2015, **65**(2): 436-445.
- Wang, Q., L. Huang, Z. Hong, Z. Lv, Z. Mao, Y. Tang, X. Kong, S. Li, Y. Cui, H. Liu, L. Zhang, X. Zhang, L. Jiang, C. Wang and Q. Zhou. The E3 ubiquitin ligase RNF185 facilitates the cGAS-mediated innate immune response. *PLoS Pathog*,2017, **13**(3): e1006264.
- Wang, Y., X. Ning, P. Gao, S. Wu, M. Sha, M. Lv, X. Zhou, J. Gao, R. Fang, G. Meng, X. Su and Z. Jiang. Inflammasome Activation Triggers Caspase-1-Mediated Cleavage of cGAS to Regulate Responses to DNA Virus Infection. *Immunity*,2017, **46**(3): 393-404.
- Xia, P., B. Ye, S. Wang, X. Zhu, Y. Du, Z. Xiong, Y. Tian and Z. Fan. Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nat Immunol*,2016, **17**(4): 369-378.
- Yang, P., H. An, X. Liu, M. Wen, Y. Zheng, Y. Rui and X. Cao. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol*,2010, **11**(6): 487-494.
- Zhang, X., H. Shi, J. Wu, X. Zhang, L. Sun, C. Chen and Z. J. Chen. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell*,2013, **51**(2): 226-235.
- Zhang, X., J. Wu, F. Du, H. Xu, L. Sun, Z. Chen, C. A. Brautigam, X. Zhang and Z. J. Chen. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep*,2014, **6**(3): 421-430.
- Zhang, Z., B. Yuan, M. Bao, N. Lu, T. Kim and Y. J. Liu. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*,2011, **12**(10): 959-965.
- Zheng, W., R. Zhou, S. Li, S. He, J. Luo, M. Zhu, N. Chen, H. Chen, F. Meurens and J. Zhu. Porcine IFI16 Negatively Regulates cGAS Signaling Through the Restriction of DNA Binding and Stimulation. *Front Immunol*,2020, **11**: 1669.
- Zhong, B., Y. Yang, S. Li, Y. Y. Wang, Y. Li, F. Diao, C. Lei, X. He, L. Zhang, P. Tien and H. B. Shu. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*,2008, **29**(4): 538-550.

附录

(1) 100mg/mL Kanamycin 的配制

用电子天平称量 1g 卡那霉素加到干净的 15mL 离心管中，用 10mL 灭菌水来溶解，充分混匀后继续加灭菌水将溶液定容至 10mL，用 0.22 μ m 滤器过滤去菌，用灭菌的 1.5mL 离心管进行分装，放于-20℃保存。

(2) 液体 LB 培养基的配制

用天平准确称取 2g NaCl、2g 胰蛋白胍、1g YEAST EXTRACT 于锥形瓶中，用量筒量取 200mL 去离子水来进行溶解，121℃高压灭菌后，保存于 4℃冰箱中。

(3) 固体 LB 培养基 (Kana⁺) 的制备

用天平依次称取 2g NaCl、2g 胰蛋白胍、1g YEAST EXTRACT、3g Agar Powder 于锥形瓶中，量取 200mL 去离子水加入锥形瓶中来溶解，121℃高压灭菌后，待溶液温度降至不再烫手时，在超净台中加入 100 μ L Kanamycin，倒入培养皿中，200ml 大约可倒入 10 个培养皿，静止放置，待凝固后保存于 4℃。

(4) 50×TAE Buffer 的配制

用电子天平称取 18.6g Na₂EDTA·2H₂O、121g Tris 于烧杯中，用量筒量取 400mL 去离子水来进行溶解，充分溶解后加入 28.55mL 的醋酸，搅拌溶解后加超纯水将溶液定容至 1000mL，倒入瓶中放于室温下保存。

(5) 0.1mol/L CaCl₂ 的制备

用电子天平称取 1.1gCaCl₂ 于烧杯中，用量筒量取 90mL 去离子水溶解，搅拌混匀后，加超纯水定容至 100mL，在超净台中，用注射器通过 0.22 μ m 滤器过滤除菌，分装于 50mL 离心管中，保存于 4℃。

(6) 0.1mol/L IPTG 的配制

用电子天平称取 2.383g IPTG 于小烧杯中，加入 100mL 灭菌水进行溶解，充分混匀后，在超净台中用 0.22 μ m 滤器过滤除菌，分装于 1.5mL 离心管中，每管分装 1mL，放于-20℃保存。

(7) 10%SDS 的配制

用电子天平称取 10g SDS 于烧杯中，用量筒量取 100mL 去离子水溶解，搅拌混匀后倒入瓶中，室温保存。

(8) 30%丙烯酰胺的配制

用天平称 290g 丙烯酰胺、10g BIS 于烧杯中,用量筒量取 600mL 去离子水溶解,使用转子辅助溶解后,继续加去离子水将溶液定容至 1L,用 0.45 μ m 滤器过滤除去杂质,倒于瓶中在 4℃冰箱中避光保存。

(9) 10%APS 的制备

用电子天平称取 10gAPS 于烧杯中,用量筒量取 10mL 去离子水充分溶解,用 1.5mL 离心管进行分装 (1mL/份),保存于-20℃。

(10) 1mol Tris-HCl (pH=6.8) 的配制

用电子天平称取 121.1g Tris 于烧杯中,用量筒量取 800mL 去离子水进行溶解,使用转子加速溶解,用浓盐酸调节 pH 值至 6.8,加去离子水定容至 1L,通过高压灭菌锅灭菌后,保存于-4℃。

(11) 1.5M Tris-HCl (pH=8.8) 的配制

用电子天平称取 181.7g Tris 于烧杯中,用量筒量取 800mL 去离子水来溶解,使用转子辅助溶解,用浓盐酸调节 pH 值至 8.8,向溶液中继续加去离子水使溶液定容至 1L,通过高温高压灭菌锅后,保存于-4℃。

(12) PBST

用电子天平称取 0.2g KCl、8.18g NaCl、0.245g KH₂PO₄、3.58g Na₂HPO₄于烧杯中,用量筒量取 1L 去离子水进行溶解,在磁力搅拌器上充分搅拌混匀后,加入 1mL Tween 20,充分混匀后,保存于室温。

(13) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 15%分离胶的配制

表 S1 分离胶的配制 (5 mL)
Table. S1 Formula of separation gel (5 mL)

组成成分	8%	10%	12%	15%
灭菌水	2.3 mL	1.9 mL	1.6 mL	1.1 mL
30%丙烯酰胺	1.3 mL	1.7 mL	2 mL	2.5 mL
1.0 M Tris-HCL (pH8.8)	1.3 mL	1.3 mL	1.3 mL	1.3 mL
10% SDS	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
10%过硫酸铵	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
TEMED	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L

将上述组分加入到 50mL 离心管中,用涡旋振荡器振荡混匀后,加到清洗干净并固定好的两块玻璃板中间。

(14) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 5%积层胶的配制

表 S2 浓缩胶的配制 (3 mL)
Table. S2 Formula of spacer gel (3 mL)

组成成分	5%
灭菌水	2.1 mL
30%丙烯酰胺	0.5 mL
1.5 M Tris-HCL	380 μ L
10% SDS	30 μ L
10%过硫酸铵	30 μ L
TEMED	3 μ L

将上述组分加入至 50mL 离心管中，用涡旋振荡器振荡混匀后，加到已经凝固的分离胶上方。

(15) 考马斯亮蓝 R-250 染色液的配制

用电子天平称取 1g 考马斯亮蓝 R-250 于烧杯中，用量筒量取 250 mL 的异丙醇、100mL 的冰醋酸、650mL 的去离子水，然后依次加入到烧杯中，用搅拌棒搅拌均匀，通过定性滤纸除去杂质后，倒于容器中放于室温保存。

(16) 脱色液的配制

用量筒量取 100mL 冰醋酸、50mL 乙醇、850mL 超纯水，依次加到 1L 烧杯中用搅拌棒搅拌均匀后待用。

PCR 引物序列

表 S3 载体构建引物清单
Table. S3 Primers list for PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
pcGAS-F	ACTAAGCTTGCGGCCCGCGGGGAAAGTCCACG
pcGAS-R	ACTGATATCTCACCAAAAACTGGAAATCCATTG TTTCTTTCATATTC
YWHAB-F	CCCAAGCTTATGACCATGGATAAAAGTGAGCTG
YWHAB-R	CCGCTCGAGTTAGTTCTCTCCCTCCCCAGTATC
FABP5-F	CCCAAGCTTATGGCCTCCATCCAGCAGCAGCTG
FABP5-R	CCGCTCGAGTCACTCTACTTTTTCATAGACCCG

荧光定量引物序列

表 S4 荧光定量引物清单
Table. S4 Primers list for qPCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
p-GAPDH-F	TACACTGAGGACCAGGTTGTG
p-GAPDH-R	TTGACGAAGTGGTCGTTGAG
p-IFN- β -F	CTCTAGCACTGGCTGGAATGAA
p-IFN- β -R	CCGGAGGTAATCTGTAAGTCTGTT

致谢

时光荏苒，岁月如梭，转眼间硕士阶段的学习就要结束了。回想这三年研究生学习生活让自己成长了许多，从什么都不会的实验小白到现在已经可以独立设计实验完成自己的课题，从大学生到研究生的转变像是质的飞跃，才让我真正明白什么是科学研究，同时让我对自己的未来有了更清晰的规划，希望自己也能有所成就为兽医领域贡献自己的一份力量。

首先感谢我的导师商营利教授，回想起从决定保研来到商老师实验室的那天起，我就深深的被商老师渊博的知识和对待科学研究严谨的态度吸引了。三年来，感谢他对我的培养与帮助。商老师对待所有事情都尽心尽力，亲历亲为。感谢商老师教我做实验，耐心的指导我，给我提供非常好的实验条件，让我的实验能够顺利完成。所谓严师出高徒，他的严厉才让我们对自己有了更高的要求，才能让我们做更好的自己。无论是送我到清华大学实习还是推荐我攻读博士学位，他都给予了我很大的帮助。商老师对我的指导与帮助我都铭记于心，一定不会辜负他的期望。

感谢清华大学胡小玉老师一直以来对我的帮助，让我在研究生一开始就得到非常高水平的训练。胡老师对待科研的热情深深的影响了我，是我今后学习的楷模。

感谢实验室的张文、陈萌（女）、王凡师姐，感谢她们教我做实验，给予我的帮助；感谢赵宁宁、孔正杰、王晓丽、陈萌（男）、韩庆兵、赵鹤娇、殷红艳、崔灿、孙喆、王敬文、林灵芝、李艳洁、孙博览等师兄师姐师弟师妹对我工作学习的帮助；还要感谢同级的刘振、傅振东和刘照贞，感谢他们这三年来对我的帮助和关心。

感谢我的室友商红旗、姚忠慧和宋彦莹。感谢她们的陪伴，在我开心的时候分享喜悦，在我遇到困难时开导我，七年的时光转瞬即逝，这份友情我永远都不会忘记。

最后特别感谢我的父母和家人，感谢他们养育了我，给我最无私的爱，让我在成长和学习的道路上无忧无虑，一直默默支持我鼓励我，让我可以追求自己的梦想。

攻读学位期间发表论文情况

1. **Yuna Zhao**, Chanyang Ju, Karmen Au, Jimmy Zhu, Baohong Zhao, Yingli Shang, Xiaoyu Hu. Engagement of TLR and dectin-1/Syk signaling is required for activation of Notch targets in dendritic cells. *Infectious Microbes & Diseases*.2021,1.
2. Fei Ning, Xiaoyu Li, Li Yu, Bin Zhang, **Yuna Zhao**, Yu Liu, Baohong Zhao, Yingli Shang, and Xiaoyu Hu. Hes1 attenuates type I IFN responses via VEGF-C and WDFY1. *Journal of Experimental Medicine*.2019,6.
3. Meng Chen, **Yuna Zhao**, Jun Peng, Gang Wang & Yingli Shang. Cytoplasmic translocation of TRIM28 is critical for autophagy induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. (Manuscript in preparation).