

树鼩连接黏附分子 A 的基因 克隆及初步功能研究

李晓飞, 孙晓梅, 王文广, 匡德宣, 陆彩霞, 全品芬, 罕园园, 李娜, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

[摘要] 目的 获取树鼩连接黏附分子 A(junctional adhesion molecule A, JAM-A)的全长编码序列并进行分子特征分析, 探讨 JAM-A 作为呼肠孤病毒受体入侵树鼩原代肺细胞的作用机制。方法 提取健康树鼩组织总 RNA, 采用反转录 PCR 和 cDNA 末端快速克隆技术获取 JAM-A 基因; Unipro UGENE 分析编码氨基酸, 使用 MEGA 6.0 软件最大似然法构建系统发育树; 实时荧光定量 PCR 检测 JAM-A 在树鼩 25 个组织和血液中的表达分布情况; 于树鼩原代肺上皮细胞上进行受体的特异性抗体阻断处理, 然后采用免疫荧光法观察病毒抗原对呼肠孤病毒感染的影响。结果 获取了 JAM-A 基因 cDNA 全长序列, 2 962 bp; 系统发育树进化分析显示 JAM-A 基因与人的亲缘关系较啮齿类更近; JAM-A 分子广泛表达于树鼩的外周组织, 而在呼吸道和消化道表达水平更高。特异性抗体作用于细胞显著降低病毒抗原的免疫荧光积分吸光度值($P < 0.000 1$)。结论 首次克隆并分析了 JAM-A 的基因序列, 验证 JAM-A 分子是呼肠孤病毒入侵树鼩的主要受体, 提示树鼩可作为一种新的呼肠孤病毒动物模型。

[关键词] 连接黏附分子 A; 基因克隆; 呼肠孤病毒; 树鼩

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)03-0196-08

连接黏附分子 A(junctional adhesion molecule A, JAM-A)是具细胞黏附作用的细胞免疫球蛋白超家族成员, 也称之为 JAM-1、JAM1 和 F11R。JAM-A 在胚胎发育、正常组织结构维持、炎症反应与免疫应答、创伤修复、肿瘤转移等多种生理病理过程中发挥重要作用^[1]。此外, JAM-A 还可作为病毒感染受体, 是目前发现的哺乳动物呼肠

孤病毒(mammalian reovirus, MRV)建立外周感染的高亲和力受体, 通过依赖 $\beta 1$ 整合素介导 MRV 内化病毒进入细胞^[2]。JAM-A 的膜远端免疫球蛋白样 D1 结构域的同源二聚化是与 MRV 结合所必需^[3]。

MRV 是一种双链 RNA 病毒, 经粪口途径进入胃肠道后被黏膜表面唾液酸受体(sialic acid, SA)吸附束缚, 经消化系统蛋白酶作用转化成感染性亚病毒颗粒后, 结合肠上皮细胞表面 JAM-A 受体感染肠道^[4]。新生小鼠肠道微绒毛可介导 MRV 快速感染, 而成年小鼠微绒毛细胞不感染。MRV 行至小肠隐窝(特别是回肠), 被特化的滤泡相关上皮细胞即一种微褶皱膜样上皮细胞(membranous/microfold cell, M 细胞)摄取转吞至 Peyer Patches 淋巴结, 被肠相关淋巴组织捕获后穿过基底细胞和血管内皮细胞进入血液, 与血细胞表面 JAM-A 相互作用介导血行传播, 在次级复

[收稿日期] 2019-11-28

[基金项目] 国家自然联合基金重点项目(U1702282), 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019); 重点实验室运行补助专项(2017DG008); 云南省重大科技专项(2017ZF007)

[作者简介] 李晓飞(1988—), 女, 博士研究生, 主要从事病原生物学研究。E-mail: 597325992@qq.com

[通信作者] 代解杰(1961—), 男, 研究员, 主要从事人类疾病动物模型及机制研究。

E-mail: dj@imbcams.com.cn

制点穿过血管内皮细胞与组织细胞受体结合,导致外周组织器官感染。MRV 经呼吸道进入宿主肺部后,经蛋白酶降解为感染性亚病毒颗粒,通过 JAM-A 受体感染 I 型肺泡上皮细胞,造成闭塞型支气管炎、间质性肺炎等。覆盖于支气管相关淋巴组织的 M 细胞将 MRV 摄取并转吞进入肺相关淋巴组织,然后进入血液传播^[5]。

已知 MRV 的分离宿主物种包括人、鸟、牛、猴、羊、猪、狒狒和蝙蝠等^[6]。虽然 MRV 在多数情况下仅引起宿主轻微症状,但亦有许多研究^[7]报道 MRV 导致单一宿主或动物种群爆发呼吸道疾病、胃肠炎、胆道闭锁、脑水肿或脑脊髓炎等疾病,因此,对 MRV 感染的研究和监视仍然是必要的。树鼯与人类及非人灵长类动物有较高的遗传同源性,在病毒感染的临床前药物开发研究中具有独特价值,这种新型实验动物正在成为生命科学研究的有力工具^[8]。先前的研究多次从树鼯体内分离出呼肠孤病毒^[9-11],这些研究为树鼯可能是呼肠孤病毒易感宿主的观点提供了有力证据。但迄今为止,尚无有关树鼯 JAM-A 分子克隆和 JAM-A 作为树鼯感染呼肠孤病毒受体的研究报道。因此,本研究采用 cDNA 末端快速克隆(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)技术获得树鼯 JAM-A 全长编码序列,并对其序列和分子特征进行分析,在树鼯原代肺细胞水平验证了 JAM-A 作为呼肠孤病毒受体入侵树鼯原代肺泡细胞(primary tree shrew alveolar epithelial cells, pTAECS)的作用机制,为今后应用树鼯建立呼肠孤病毒感染模型并研究其感染机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

人工繁育的健康成年雄性树鼯 1 只,3 月龄,体质量 90~110 g,来源于医学生物学研究所树鼯种质资源中心[SCXK(滇)K2013-0001]。实验操作在医学生物学研究所树鼯种质资源中心进行[SYXK(滇)K2013-0001]。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号 DWSP201803034)。

1.2 细胞和毒株

树鼯 pTAECS 由 1~2 日龄的新生树鼯分离培

养获得。细胞感染所用病毒株为本实验室自患病树鼯粪便中分离纯化的呼肠孤病毒株 MRV3/TS/2012。

1.3 试剂与仪器

TRIzol 试剂购自日本 TaKaRa 公司,反转录合成第一链 cDNA 试剂盒和 PCR 预混液均购自立陶宛 Fermentas 公司, RACE 扩增试剂盒购自美国 Clontech 公司, 胶原酶 XI C7657、神经氨酸酶(NA)(产气荚膜梭菌)和抗 JAM-A 抗体(ab180821)均购自英国 Abcam 公司, 抗 3 型呼肠孤病毒抗体 9BG5 购自美国 LSBio 公司, FITC 标记的羊抗鼠 IgG SA00003-1 购自美国 Proteintech 公司, 梯度 PCR 仪购自日本 TaKaRa 公司, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)仪购自美国 Bio-Rad 公司, 倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.4 方法

1.4.1 组织采集和总 RNA 提取 给树鼯腹腔注射过量 1% 戊巴比妥钠以麻醉后实施安死术, 无菌打开腹腔、胸腔和颅腔, 取约 100 mg 相关组织块置于无菌无酶 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 放入 DEPC 水处理过的钢珠, 在高通量组织研磨仪中 300 Hz 研磨 3 min, 获取组织匀浆。采集心脏抗凝全血 200 μ L。完成大脑、舌、食道、心、肺、肝、胆囊、胃、脾、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、肾、膀胱、睾丸、小脑、海马、颞叶、额叶、顶叶、枕叶和视交叉 25 个组织和血液的总 RNA 提取, 洗涤后的白色 RNA 沉淀用 40 μ L DEPC 水溶解, 用 NanoDrop 1000 分光光度计测定提取的 RNA 浓度和纯度。

1.4.2 PCR 和 RACE 首先, 扩增出 JAM-A 基因的中间序列。参照试剂盒使用说明书配制反转录体系, 反转录获得 cDNA。以该 cDNA 为模板, 用 JAM-A 中间序列特异性引物(表 1), 进行 PCR 扩增, 克隆测序获取 JAM-A 的中间序列。其次, 应用 RACE 技术和 PCR 扩增 JAM-A 基因的 3' 端和 5' 端序列。按照 JAM-A 中间序列设计 5' 端序列特异性引物(GSP)和 3' 端 GSP(表 1)。参照反转录合成第一链 cDNA 试剂盒说明, 分别合成 5'RACE cDNA 和 3'RACE cDNA。以 5'RACE cDNA 为模板、5' 端 GSP 和自带接头引物, 进行 PCR 扩增。

以 3'RACE cDNA 为模板、3'端 GSP 和自带接头引物,进行 PCR 扩增。取扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭)进行电泳检测,胶

回收纯化 PCR 产物,克隆测序获取 *JAM-A* 的 3'端和 5'端序列。最后,将中间序列和两端序列进行拼接,获取树鼩 *JAM-A* 的全长 cDNA 序列。

表 1 *JAM-A* 基因扩增引物

Table 1 Amplification primers for the junctional adhesion molecule A (*JAM-A*) gene

引物名称	序列信息
J8-正向	5'-TCGGGTGGAGTGGAAAGTTTG-3'
J8-反向	5'-TGCCGAAAATCAGGACTCCC-3'
J10-正向	5'-GCCGTTCTCGTGACTCTGAT-3'
J10-反向	5'-CTCCTCTTGCCGTCTCCTTG-3'
SEQ-正向	5'-CCCAGTGCTCGGAGTGA-3'
SEQ-反向	5'-CCAAAGAGCCAAGGAAC-3'
J12-正向	5'-GGAGAGTGGAGAGCAGAT-3'
J12-反向	5'-AGAAAGTGAAGAGCAGAGAC-3'
J2-正向	5'-TGGGCTTCCCTATGTAGGCT-3'
J2-反向	5'-CCCTTTCACCCAGCCATGAT-3'
5'-GSP-J5R3	5'-CATCAGCACCCCATCCTTGAACCAGGAGTACTCAGAAGCA-3'
3'-GSP-J3F4	5'-AGCCGTCTCTCGTGACTCTGATTCTCCTG-3'

注: GSP 为序列特异性引物。

1.4.3 qRT-PCR检测*JAM-A*的组织表达分布 根据 *JAM-A* 的全长 cDNA 序列,设计合成引物和探针(表 2),制备标准质粒,参照 TaKaRa 一步法实时定量 RT-PCR 试剂盒制备标准曲线。使用 1.4.1 节提取的各组织总 RNA,以管家基因 *GAPDH* 作为内参基因,测定 *JAM-A* mRNA 在树鼩 26 个组织中的基因拷贝数。

表 2 *JAM-A* 基因定量探针及引物

Table 2 The probe and primers for quantitative detection of junctional adhesion molecule A (*JAM-A*) gene

名称	序列
正向引物	5'-TCGGGTGGAGTGGAAAGTTTG-3'
反向引物	5'-TGCCGAAAATCAGGACTCCC-3'
探针	5'-GCCGTTCTCGTGACTCTGAT-3'

1.4.4 树鼩 *JAM-A* 基因序列分析 对拼接后树鼩 *JAM-A* 基因的 cDNA 序列全长进行分析,用 Unipro UGENE 软件分析其编码氨基酸。与 GenBank 数据库中已有的 *JAM-A* 基因进行比对,使用 MEGA6.0 软件最大似然法构建系统发育树。

1.4.5 树鼩 pTAECs 培养 用清洗液[Hank's 平衡盐溶液(不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}),添加 1% 双抗,0.5 mmol/L 二硫苏糖醇]清洗肺组织数次至上清液澄清。将

肺剪碎成 1 mm² 大小的组织块,再用清洗液清洗数次至上清液澄清,静置 10 min,去除清洗液。加入 5 mL 0.125% 胰蛋白酶,置于孵箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 0.5 h,每 10 min 摇晃一次。加入含 5% 血清的 DMEM 完全培养液终止胰蛋白酶的消化,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 1 mL 吸头吸取肺组织块,均匀分布于细胞培养瓶底部,倒置培养瓶,加入 5 mL 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下倒置培养 1 h。正置培养瓶,继续培养,每 3 d 更换一次培养液。

1.4.6 病毒感染和抗体阻断 从培养箱中取出用 12 孔板培养的 80%~90% 融合的 pTAECs,弃培养液,用 PBS 洗 3 次,按如下方式进行处理: PBS 处理组,加入 PBS,与细胞相互作用 1 h;抗 *JAM-A* 处理组,加入 *JAM-A* 抗体(50 $\mu\text{g/mL}$),与细胞相互作用 1 h; NA 处理组,加入 NA(50 mU/mL),与细胞相互作用 1 h;抗 *JAM-A* 和 NA 共同处理组,加入 *JAM-A* 抗体(50 $\mu\text{g/mL}$)与 NA(50 mU/mL),共同与细胞相互作用 1 h。所有实验孔中,弃去与细胞表面分子相互作用的处理剂,加入 MRV3/TS/2012 病毒液(滴度为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL)吸附液,4 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h(每隔 15 min,轻轻振荡 1 次),洗去病毒吸附液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 24 h。

1.4.7 病毒抗原的免疫荧光染色 感染后细胞在 37 °C 下条件孵育 24 h 以完成病毒的一步生长复制, 立刻将单层细胞用 1 mL 质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 20 min, 进行病毒抗原 σ 1 的免疫荧光染色, 一抗为抗 3 型呼肠孤病毒抗体 9BG5, 二抗为 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG。镜下观察间接免疫荧光, 受感染的细胞质显现强烈的绿色荧光, 细胞核无病毒抗原荧光。pTAECs 的每个处理孔随机选择 3 个视野进行荧光图片的采集, 使用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件, 进行吸光度校正, 读取荧光面积和 A 值。

1.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 处理组与 PBS 组间比较采用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因片段扩增结果

RT-PCR 扩增出 *JAM-A* 基因的中间序列片段如电泳图 1A 所示, RACE PCR 扩增出 *JAM-A* 基因的 5' 端和 3' 端基因片段如电泳图 1B 和图 1C 所示。

2.2 *JAM-A* 基因特征

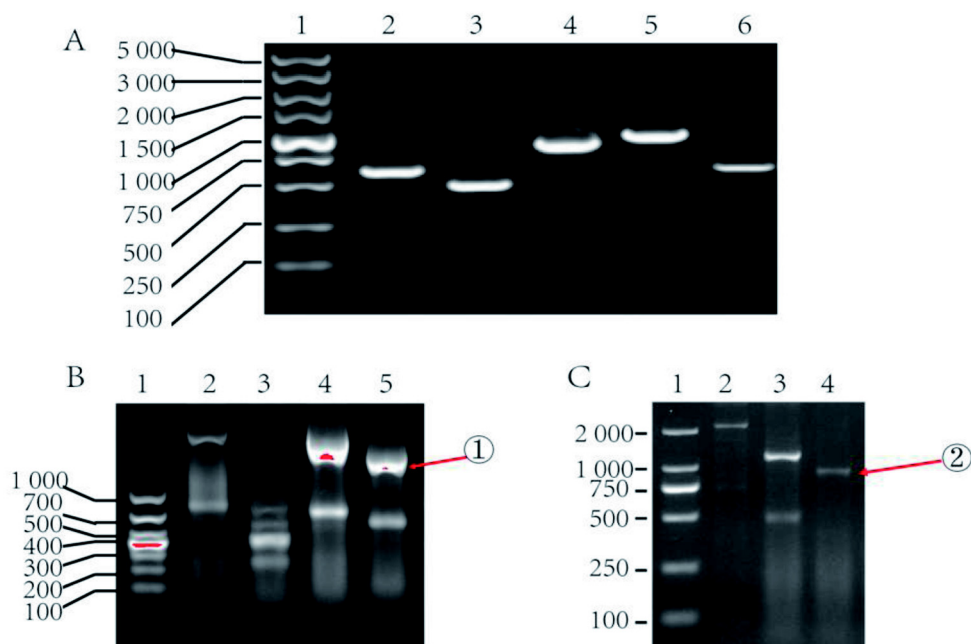
JAM-A 基因 cDNA 全长 2 962 bp, 编码 274 氨基酸, 其氨基酸序列与猫的 *JAM-A* 高度相似 (图 2A)。系统发育树 (图 2B) 显示, 树鼩 *JAM-A* 基因序列与犬 (*Canis lupus familiaris*)、猫 (*Felis catus*)、牛 (*Bos taurus*) 最为相似, 自然聚类在同一分支, 之后与人和猕猴 (*Macaca mulatta*) 聚类为一支, 最后与小鼠 (*Mus musculus*) 和褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 聚类为一支, 而斑马鱼 (*Danio rerio*) 则在哺乳动物聚类分支以外的分支。

2.3 组织表达量分布

绘制树鼩 25 个组织和血液中的 *JAM-A* 相对表达量 (以海马为 1) 柱状图 (图 3)。结果显示, *JAM-A* 广泛表达于树鼩的外周组织, 呼吸道和消化道中表达水平较高。

2.4 阻断 *JAM-A* 可抑制呼肠孤病毒对 pTAECs 的感染

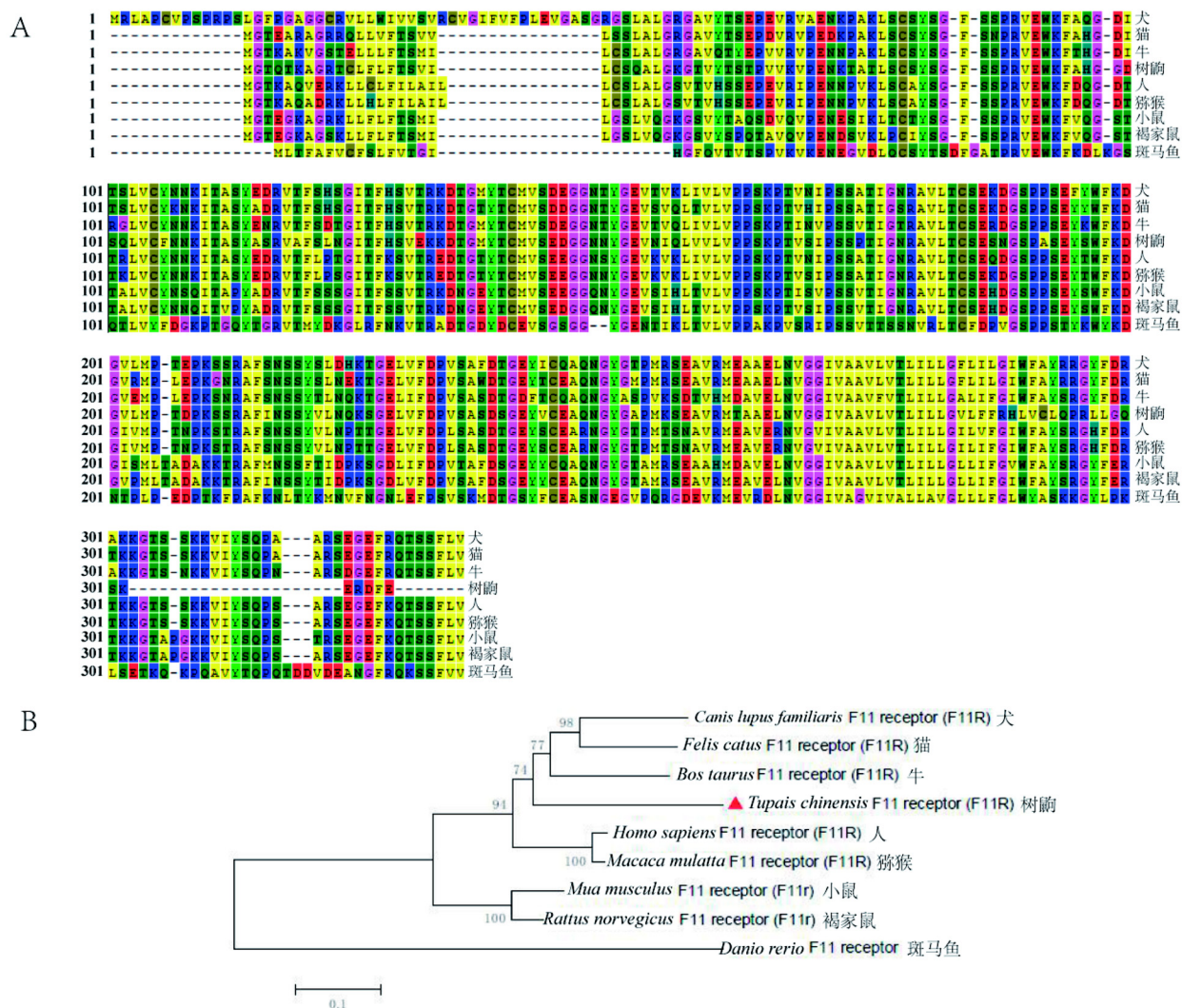
pTAECs 的病毒抗原免疫荧光染色和绿色荧光 A 值统计结果 (图 4) 显示, pTAECs 是呼肠孤病毒容纳细胞, 抗 *JAM-A* 抗体 (50 μ g/mL) 单独作用在一定程度上抑制了呼肠孤病毒株 MRV3/TS/2012 的吸附感染效率 ($P < 0.000 1$), NA (50 mU/mL)



A: *JAM-A* 基因中间序列片段, 其中 1 泳道分别为 DNA Marker 5 000, 2-6 泳道分别为 J8、J10、SEQ、J12、J2 引物扩增条带; B~C: 分别显示 *JAM-A* 基因的 RACE PCR 5' 和 3' 端序列片段, ①为 J3F4 引物扩增条带, ②为 J5R3 引物扩增条带。

图 1 *JAM-A* 基因片段电泳图

Figure 1 Electrophoresis bands of junctional adhesion molecule A (*JAM-A*) gene fragments



A: 树鼩 JAM-A 与 8 种动物 JAM-A 的氨基酸序列比对; B: JAM-A 的基因系统发育树。

图 2 JAM-A 氨基酸序列分析及基因系统发育树(最大似然法; 步长: 1 000 times)

Figure 2 Amino acid analysis and phylogenetic tree of junctional adhesion molecule A (JAM-A) gene

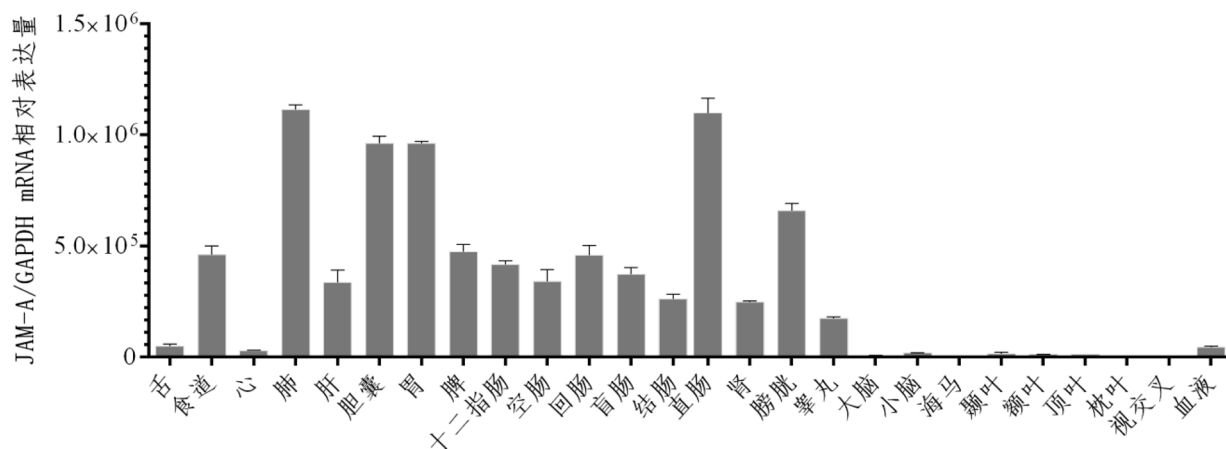
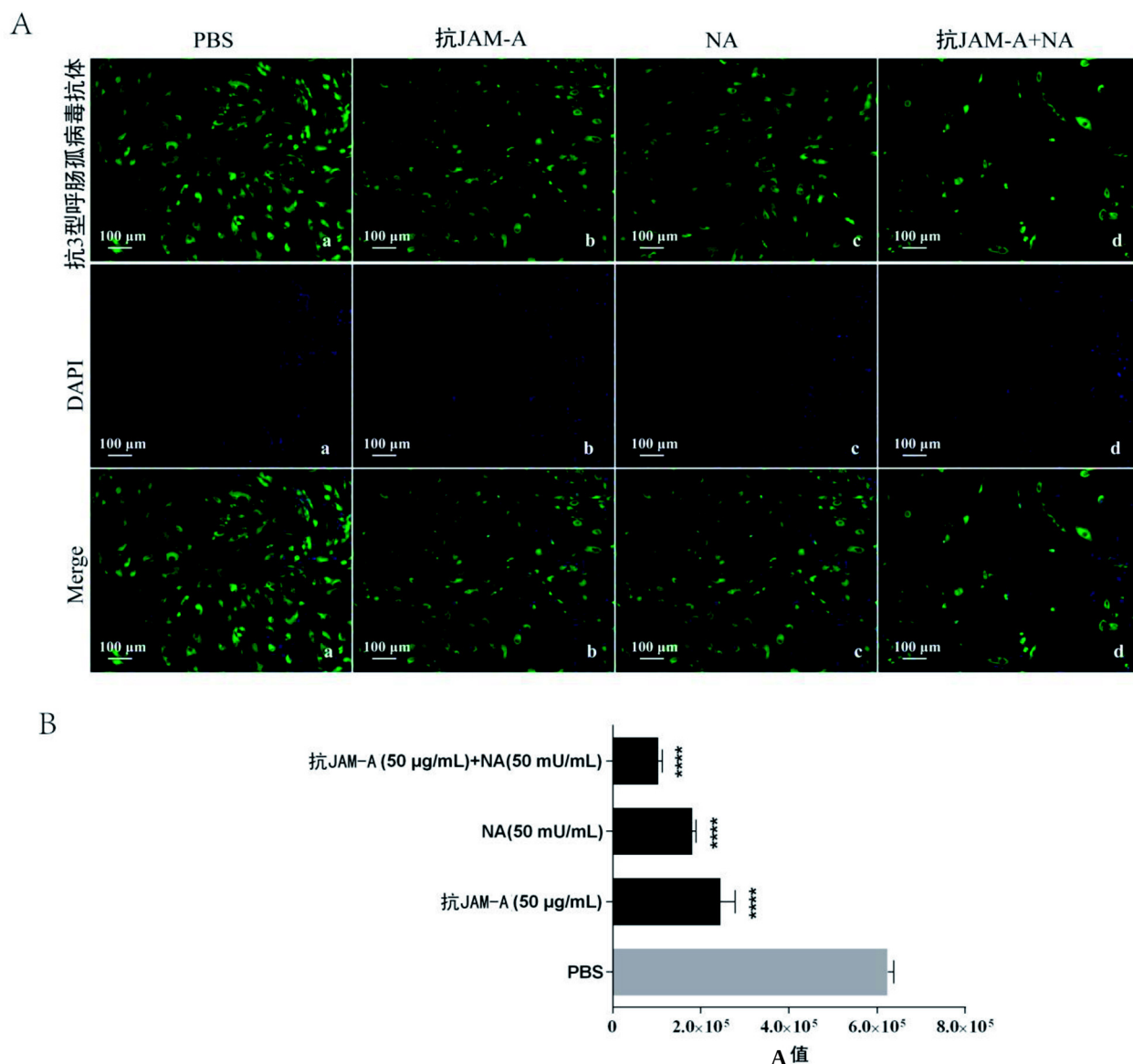


图 3 树鼩 25 个组织和血液中 JAM-A mRNA 的表达水平

Figure 3 Expression levels of junctional adhesion molecule A (JAM-A) mRNA in 25 tissues and blood of tree shrew



A: pTAECs 不同处理组病毒抗原的免疫荧光(比例尺为 100 μm), 其中 a 为 PBS 处理组, b 为抗 JAM-A 抗体(50 μg/mL)处理组, c 为 NA(50 mU/mL)处理组, d 为抗 JAM-A(50 μg/mL)和 NA(50 mU/mL)共同处理组; B: 不同处理组病毒抗原免疫荧光的 A 值统计分析结果。与 PBS 组比较, **** $P < 0.0001$ 。

图 4 阻断 JAM-A 可抑制呼肠孤病毒株 MRV3/TS/2012 对树鼩原代肺泡细胞(pTAECs)的感染

Figure 4 Blocking of junctional adhesion molecule A (JAM-A) inhibits reovirus MRV3/TS/2012 infection of tree shrew pTAECs

单独作用一定程度上抑制了 MRV3/TS/2012 病毒的吸附感染效率($P < 0.0001$); JAM-A(50 μg/mL)和 NA(50 mU/mL)共同作用于 pTAECs 表面的 JAM-A 和 SA 分子,可最大程度地抑制呼肠孤病毒的感染($P < 0.0001$)。

3 讨论

树鼩作为一种新型实验动物,已成为研究多

种人类疾病如抑郁症、近视、乙型肝炎和丙型肝炎病毒感染等的良好模型^[12]。本课题组多次从树鼩体内分离到呼肠孤病毒,认为树鼩可能是研究呼肠孤病毒感染机制的良好模型。已知呼肠孤病毒入侵宿主细胞的受体有 SA、JAM-A 和 NgR1,但该病毒的致病机制和感染嗜性仍有待深入研究。研究人员已于 2013 年完成了中缅树鼩全基因组序列的注释^[12],此研究对了解树鼩的遗传基础

具有重大意义。但以往发表的 JAM-A 序列残缺不全。本研究首次克隆 JAM-A 基因的完整序列, 对其分子特征进行全面详细的解析, 为今后研究 JAM-A 分子及功能奠定了基础; 同时采用抗细胞受体法初步验证了 JAM-A 作为呼肠孤病毒入侵树鼩细胞受体的功能。

呼肠孤病毒 $\sigma 1$ 与靶细胞表面 SA 结合, 病毒颗粒在细胞表面横向扩散, 促进与 JAM-A 高亲和力结合, 在低 pH 微环境下依赖细胞膜上微管蛋白和 Src 激酶协助内吞进入细胞^[13-15]。本研究应用 NA 消解表面的 SA, 用抗 JAM-A 抗体封闭细胞表面的 JAM-A, 在 pTAECS 水平验证了 JAM-A 对呼肠孤病毒感染的介导作用。单独使用抗 JAM-A 抗体或 NA 对细胞保护效果远低于同时阻断 JAM-A 和 SA, 说明 JAM-A 和 SA 在介导呼肠孤病毒感染的功能上具有协同作用^[16]。树鼩 JAM-A mRNA 主要在器官组织表达, 其中肺部表达量最高, 胆囊和直肠次之, 在血液细胞中也有表达。树鼩 JAM-A 基因和氨基酸序列与猫相似性最高。值得注意的是, 2015 年在猫科动物果子狸体内分离到一株 III 型呼肠孤病毒^[17], 鼻内感染雌性 BALB/c 小鼠引起致命性的呼吸系统损伤, 在肺组织中具有较其他组织更高的病毒滴度。III 型呼肠孤病毒在树鼩肺部的病毒滴度可能更高, 并造成对肺部的健康威胁, 这是值得高度警惕的。

综上所述, 本研究首次克隆并分析了 JAM-A 分子的基因序列全长, 分析了 JAM-A 的分子遗传进化关系, 进一步说明了树鼩较其他实验动物有更高的遗传分类学地位。JAM-A 在树鼩体内主要组织器官的受体分布为研究呼肠孤病毒感染树鼩的靶器官亲嗜性提供了实验依据, 细胞水平抗体阻断可抑制呼肠孤病毒感染, 进一步验证了 JAM-A 是介导呼肠孤病毒感染受体。可以看出, 呼肠孤病毒对树鼩不同组织感染可依赖于不同的受体分子, 体现了呼肠孤病毒的高度进化和环境适应性。这项研究为了解呼肠孤病毒和宿主之间的相互作用关系提供了基础资料。

参考文献:

[1] 周童, 仵敏娟. 连接黏附分子 A 的研究进展[J]. 生命科

学, 2013, 25(9): 865-870.

- [2] Barton ES, Forrest JC, Connolly JL, et al. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus[J]. Cell, 2001, 104:441-451.
- [3] Kiachner E, Guglielmi KM, Strauss HM, et al. Structure of reovirus sigma 1 in complex with its receptor junctional adhesion molecule A[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(12): e1000235.
- [4] Guglielmi KM, Kirchner E, Holm GH. Reovirus binding determinants in junctional adhesion molecule-A[J]. J Biol Chem, 2007, 282:17930-17940.
- [5] Boehme KW, Lai CM, Dermody TS. Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination[J]. Adv Virus Res, 2013, 87:1-35.
- [6] 张云, 刘明, 欧阳岁东, 等. 正呼肠孤病毒及其分类学依据研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(6):46-49.
- [7] 左庭婷, 端青. 呼肠病毒感染实验动物致病性的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(4):389-391.
- [8] Tsukiyama-Kohara K, Michinori K. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection [J]. Exp Anim, 2014, 63(4):367-374.
- [9] 徐娟, 黄晓燕, 李晓飞, 等. 树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定[J]. 动物学研究, 2013, 43(2):116-120.
- [10] 李晓飞, 殷安国, 张媛, 等. 树鼩呼肠孤病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6):63-65.
- [11] 刘建生, 陶玉芬, 李晓菲, 等. 二株不同基因型树鼩呼肠孤病毒的分离和鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4):365-370.
- [12] Fan Y, Huang Z, Cao C, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. Nat Commun, 2013, 4:1426.
- [13] Mainou B, Zamora P, Ashbrook A, et al. Reovirus cell entry requires functional microtubules[J]. mBio, 2013, 4(4): e00405-00413.
- [14] Mainou B, Dermody TS. Src kinase mediates productive endocytic sorting of reovirus during cell entry[J]. J Virol, 2011, 85(7):3203-3213.
- [15] Thete D, Danthi P. Conformational changes required for reovirus cell entry are sensitive to pH[J]. Virology, 2015, 483:291-301.
- [16] Reiss K, Stencel J, Liu Y, et al. The GM2 glycan serves as a functional coreceptor for serotype 1 reovirus[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(12):e1003078.
- [17] Li Z, Shao Y, Liu C, et al. Isolation and pathogenicity of the mammalian orthoreovirus MPC/04 from masked civet cats[J]. Infect Genet Evol, 2015, (36):55-61.

Study on Gene Cloning and Preliminary Function of Junction Adhesion Molecule A in Tree Shrew

LI Xiaofei, SUN Xiaomei, WANG Wenguang, KUANG Dexuan,

LU Caixia, TONG Pinfen, HAN Yuanyuan, LI Na, DAI Jiejie

(Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of junctional adhesion molecule A (JAM-A) as a reovirus receptor to invade the primary lung cells of tree shrew. **Methods** Total RNA was extracted from normal tree shrew tissues. *JAM-A* gene sequences were obtained by reverse transcription-PCR and rapid-amplification of cDNA ends. Translation of amino acids encoded by *JAM-A* gene were analyzed by using Unipro UGENE software. The phylogenetic tree was constructed by MEGA 6.0 software using the maximum likelihood method. Using real-time fluorescent quantitative-PCR to detect the relative expression level of *JAM-A* in 25 tissues and blood of tree shrew. The specific antibody blocking treatment of the receptor was performed on the primary tree shrew alveolar epithelial cells, and the fluorescence intensity of the virus antigen after reovirus infection was determined. **Results** The full-length cDNA sequences of *JAM-A* gene with 2 962 bp were obtained. Amino acid alignment and phylogenetic tree analysis showed that the genetic relationship of *JAM-A* gene in tree shrew was more closer to human than that of rodent. *JAM-A* molecule was widely expressed in the peripheral tissues of tree shrews, with the more higher expression levels in the respiratory and digestive tract. The integrated absorbance of the immunofluorescence of the virus antigen after the specific antibody was applied to the cells was significantly decreased ($P<0.000\ 1$). **Conclusion** The whole sequence of *JAM-A* gene was retrieved and analyzed for the first time, and the *JAM-A* molecule was verified to be the main receptor for reovirus to invade tree shrew, suggesting that tree shrew may be used as a new animal model of reovirus.

[Key words] Junctional adhesion molecule A; Gene cloning; Reovirus; Tree shrew