

一个由 HSV 诱导的类 SR 蛋白新基因的克隆

董承红, 王丽春, 赵红玲, 孙明, 刘龙丁, 李琦涵*

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 昆明 650118)

摘要 根据 mRNA 差异显示分析,由单纯疱疹病毒(HSV) 型结合人成纤维细胞膜受体后 2 h 诱导产生的早期基因 cDNA 库中,分离到一个编码具有 SR 蛋白结构特征的新基因,该基因长 904 bp. 编码产生的蛋白含 121 个氨基酸残基,分子量 14.9 kD,具有 RS 重复区和 PLP 结构域,但不具备 SR 蛋白家族所特有的 RNA 识别区域(RRM). 主要分布于细胞质内,仅在细胞膜相应受体与 HSV 结合后特异产生.

关键词 HSV, 早期基因反应, SR-15 蛋白, 克隆

中图分类号 Q753

Cloning of a New Gene Encoding an SR-like Protein Induced by HSV Binding

DONG Cheng-hong, WANG Li-chun, ZHAO Hong-ling, SUN Ming, LIU Long-ding, LI Qi-han*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract With analysis of mRNA differential display, a new gene encoding an SR-like protein was isolated from cDNA library of the human fibroblast infected by HSV. The length of this new gene was 1 387 bp. The protein encoded with this gene consisted of 121 amino acid residues with M_r 14.9 kD. It was distributed in cytoplasm of the cells as it was induced specifically by HSV binding.

Key words HSV, early gene response, SR-15 protein, cloning

单纯疱疹病毒(HSV)对上皮类细胞的感染是通过与其膜表面的复合受体成分相结合而开始的^[1]. 由于病毒与受体的结合实质上模拟了一种生理配体与受体结合的过程,因而亦可以使受病毒结合的细胞产生特定的信号导入和相应的基因反应^[2]. 对不同的病毒而言,因其相应的受体各异,故产生的基因反应亦有差异. 我们先前有关 HSV 和脊髓灰质炎病毒的实验已证实了这一点. 其结果表明,HSV 和脊髓灰质炎病毒分别结合人成纤维细胞 KMB-17 相应受体后,在 2 h 内的早期基因反应均表现了一定的差异^[3]. 循此线索,我们进一步探索了 HSV 结合受体后细胞产生的其它差异基因. 从 HSV 吸附之后 2 h 的 KMB-17 细胞 mRNA 经逆转录建立起来的 cDNA 库中,发现了一个具有类 SR 蛋白结构的新基因. 利用该基因在原核系统中的表达蛋白而制备的特异抗体,我们进一步地分析发现了该基因编码蛋白分子作为 HSV 结合受体所特异诱导人成纤维细胞 KMB-17 株产生的特定产物,主要

分布于细胞质内. 该蛋白的发现,以 HSV 导致的细胞基因反应为线索,为深入分析病毒与细胞的关系,尤其是细胞对病毒结合受体的反应及其对病毒感染的影响,提供了有意义的线索.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 HSV 由本实验室保存,生长于 Hep-2 细胞,稀释病变法确定使用浓度为 $10^{7.0}$ CCID₅₀/ml.

收稿日期:2001-01-30,接受日期:2001-03-20

国家人事部 99 年度回国人员基金,云南省自然科学基金(No. 2000C0087M)资助

*联系人:Tel: 0871-8335905, Fax: 0871-8334483

董承红,女,1964 年 7 月生,主管技师

Received: January 30, 2001; Accepted: March 20, 2001

Supported by the Fund of Ministry of Human Resource of China, and the Fund of Yunnan Provincial Scientific Committee (No. 2000C0087M)

* Corresponding author Tel: 0871-8335905, Fax: 0871-8334483

1.1.2 细胞 Hep-2 细胞、KMB-17 细胞,均生长于 DMEM+5%小牛血清,1%青-链霉素,生长为单层备用。

1.1.3 工具酶及试剂 各种限制性内切酶,连接酶,Factor,逆转录试剂盒,PCR 试剂盒,荧光抗体等均购于 Pharmacia,上海生工及宝生物公司。

1.1.4 克隆及表达载体 实验使用的 gt 11,pUC-18,pcDNA-3,pGEX-5x1 载体为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 病毒对细胞的结合及 mRNA 提取、cDNA 库制备 使用 10 ×15 cm 培养瓶,DMEM+5%小牛血清培养 KMB-17 至单层,去除培养液,无血清 DMEM 洗 2 次,加入滴度为 $10^{7.0}$ CCID₅₀/ml 的 HSV 0.5 ml,室温吸附 0.5 h,弃残余的病毒液,加 DMEM 无血清培养液 2 ml,37 °C 2 h,刮取细胞,PBS 洗 2 次,使用 cDNA 制备试剂盒(Pharmacia 公司)。提取 mRNA 并逆转录为 cDNA,方法按说明书,并以 gt 11 制备 cDNA 文库备用。

1.2.2 mRNA 差异显示分析 使用 polyT 引物将经病毒结合及未结合的对照细胞 mRNA 逆转录。再使用 polyT 引物及随机引物 N₁₂,PCR 扩增,方法详见参考文献[4]。循环参数:95 °C,5 min;94 °C,1 min;42 °C,1 min;72 °C,1 min;40 个循环。上样 7%PAGE 7 mol/L 尿素胶,1 700 V 电泳,干胶后 X 片放射自显影。对差异片段进行测序。

1.2.3 杂交及克隆分析 使用³²P 标记方法。制备特异差异片段探针,对所得 cDNA 库中的约 10⁵ 个基因进行原位杂交筛选,方法见参考文献[5]。所得阳性克隆进行测序分析。

1.2.4 HSP-975 重组蛋白的表达及抗体制备 HSP-975 基因中的编码区序列克隆入 pGEX-5x1 载体中,大肠杆菌 BL21 中表达,SDS-PAGE 确定有特异性蛋白表达。该表达产物经过亲和柱纯化,用 Factor X 进行酶切,将酶切下来的重组蛋白浓缩至 5 μg/ml,该重组蛋白命名为 SR-15。小鼠肌肉及静脉免疫后 5 周放血制备抗血清,56 °C 灭活 30 min 后 -20 °C 冻存备用。

1.2.5 SR-15 蛋白序列比较分析 从 GneBank 调取 SR 蛋白家族成员 SR-20,SR-30,SR-40,SF,SF9G8 和 SF2 等蛋白质序列,使用 OMIGA 2.0 序列分析软件进行同源性比较分析。

1.2.6 免疫荧光 HSP-975 基因编码区序列重组入 pcDNA-3 载体,使用 Lipofectin 转染方法导入 KMB-17 细胞,方法见参考文献[6]。固定后,以抗 SR-15 抗体

于 37 °C 结合,PBS 洗 2 次,再以抗鼠 IgG 荧光抗体 37 °C 作用;荧光显微镜镜检,同法对经 HSV 结合的 KMB-17 细胞以荧光显微镜镜检。

1.2.7 Northern 杂交 为明确该 mRNA 是否为 HSV 结合 KMB-17 细胞膜受体所特异诱导产生,按常规取正常人胚胎肺组织,正常培养条件下的 KMB-17 细胞及经 HSV 刺激的 KMB-17 细胞。提取的 mRNA 在甲酰胺条件下上样于 1.5%琼脂糖凝胶,40 V 电泳后按常规吸印法转移至硝酸纤维素膜上,80 °C 变性 2 h,以 -³²P-dATP 标记的 SR-15 基因片段探针在 58 °C 杂交过夜,1 ×SSC 及 0.2 ×SSC 梯度洗 3~5 遍后,于 X 片自显影。

2 结果

2.1 HSV 结合病毒后的差异显示

经 HSV 结合细胞 2 h 与对照细胞的 mRNA 差异显示结果表明,除了其表现为一些已知基因的差异外^[3],还有数个差异(Fig. 1)。测序后经 GenBank 查询,均为新 EST 片段,其登录号为:AW585312;AW585313 和最终确定为 HSP-975 基因部分片段。



Fig. 1 The mRNA differential display of KMB-17 cell bound by HSV

1. Cell control at 1 hour; 2. Cell control at 2 hours; 3. HSV binding cell at 1 hour; 4. HSV binding cell at 2 hours

2.2 HSP-975 基因克隆及蛋白编码系列

经原位杂交,利用差异片段与已制备的探针在 cDNA 库中发现了一个长为 904 bp 的完整基因,并命名为 HSP-975。经测序分析其序列结果见 Fig. 2,其具有 5 非编码区、编码区和 3 端非编码区。经 GenBank 查询(包括所有人类已知基因序列及各种病毒基因系列),为一新的基因,登录号为 AF281279,推测的蛋白编码序列亦见 Fig. 2,并命名为 SR-15。其结构具有 SR 蛋白家族特点,表现在 N 末端有一 RS 重复序列,在中部有一 PHLIP 结构域,该区被认为可与 Src 蛋白结合^[7];但缺失 SR 蛋白通常具有的 RNA 识

```

1  GGC GCG CCG G GAC GGA ACC TGG GCG TCA GAAC GAA AGG CAG CGG CGC GCG CTTC CCA
61  GCC GGC CAG C TCCC GCG CA GCG CCC CGG CCG GAA GCCT C CTC GCC CGC CTT CCT CTC G
M A 2
121  AGA AGG CGC G GGG CGG GCT G TCC GGC CGC AGG CGG GTC AG CCC CGC GGC GCC ATG GCT C
H V G S R K R S R S R S R S R G R G S E 22
181  ACG TCG GCT C CCG CAA GCG C TCG AGG AGT C GCAG CCC GTC CCG GGG AC G GGT CCG GAAA
K R K K K S R K D T S R N C S A S T S Q 42
241  AGA GAA AGA A GAA GAG CAG G AAA GAC ACC T CGAG GAA CTG CTC GGC CTCC ACAT CCC AAG
G R K A S T V P G A E V L L A P L L P P 62
301  GTC GCA AGG C CAG CAC GGT C CCT GGG CGG AGG TTC TCT AGT CCT CTT CTT CCT CCT C
R P P P L P P V M A G R S G G S T R T R 82
361  GTC CTC TCC TCT CTC CCA GTG ATG GCG GAA GA AGCG GGA AGT ACA AGG ACA AGAG
G G R R R R R G R T E E E G Q G E G G S 102
421  GAG GAAG AAG AAG AAG AAG GAA GAA CTG AAG AAG AAG GCA AGG AGA GCG GAG ACA
T A E H H P Q G G G P L D G A H Q A Y * 121
481  CAG CAGA ACA TCAT CCG CAA GGT GGT GAC CCT TAG AC G GCG CAC CAG GCT TAT TAAG
541  GGAG ATG GCG AGG TC TAGA GGA ATCG TA ACC AAA GAAC GAC CCAG AGA GAT CAACA AG
601  CAAC CCAC CC GAG GGG ACT G CCT GGC CTC CAG ATG CGA CTG GGT TCT TCC CTG GGG
661  CCCC CGT GG CCA AGG CCT G TGG AC GAC GC TTG CGG CCA GCT TGG GCG GTT TCA GGG T
721  GCC AGT GGG A GCCT GAT GG GTG CTGG TGG CCT TCCCC G GTGG ATT GCT CTC TGG CCA
781  GCC CAG TCT T TCT CAG GGG CAG GGG TGG AGG TTGG GGT CAC CGC CTG CTT GGC ACC C
841  CCAT CTG AAA GAG CAC CACT TCT CAG CTAT TAA AGG CCG CTG GAT AGA AAAAAAAAA
901  AAGA

```

Fig. 2 The gene sequence of HSP-975 and protein sequence of SR-15

别区域 (RNA recognized motif, RRM), 其分子量为 14.9 kD.

2.3 SR-15 蛋白序列与部分 SR 蛋白家族成员序列的同源性比较

SR-15 蛋白的序列与部分 SR 蛋白家族成员序列比较可以发现, SR-15 蛋白的序列与 SR 蛋白家族序列并没有十分明显的同源性, 主要表现在 SR-15 序列中的 RS 重复区域位于 N 端, 而 SR 类蛋白序列中 RS 重复区多位于近 C 端. 但 SR-15 与 SR 蛋白家族在结构上都具有精氨酸富集区域 (arginine-rich region). 其与 RS 重复区域一道提示, 该蛋白可能具有与 DNA 或 RNA 分子结合的功能.

2.4 SR-15 蛋白在原核系统中的表达

HSP-975 基因编码区序列共 363 bp 重组进入原核表达载体 pGEX-5X1. 阳性克隆经 IPTG 诱导表达, 其 SDS-PAGE 结果如 Fig. 3. 经亲和层析并经 Factor X 酶切后得到纯化蛋白.

2.5 SR-15 在细胞内的分布

将 SR-15 蛋白的编码序列重组进入真核表达载体 pcDNA3 并转染入 KMB-17 细胞. 使用免疫荧光检测结果发现, 该蛋白明显分布于细胞质中 (Fig. 4A). 同法对经 HSV 病毒结合 2 h 的 KMB-17 细胞检测,

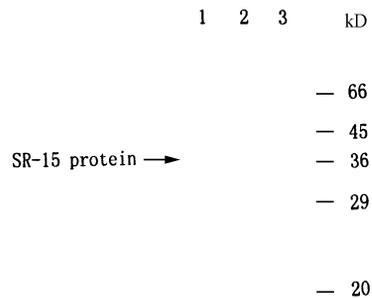


Fig. 3 SR-15 protein expression by the pGEX-5X1 system. 1. The expression of SR-15 in pGEX system; 2. Cell control; 3. Protein marker

亦发现类似的结果, 即在细胞质中发现该蛋白 (Fig. 4B).

2.6 Northern 杂交

Northern 杂交实验结果 (见 Fig. 5) 明确提示, 人胚肺组织及正常培养条件下 KMB-17 细胞均无 SR-15 mRNA 产生, 仅有经 HSV 刺激后的人 KMB-17 细胞 (来源于人胚肺组织) 出现该基因的表达. 其分子大小在 3.0 kb 左右. 此结果证实, SR-15 mRNA 是由 HSV 结合细胞受体所特异诱导产生的.

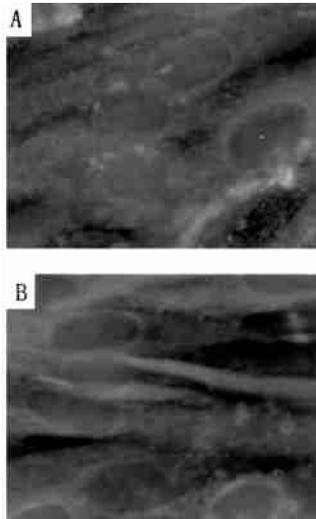


Fig. 4 The distribution of SR-15 in KMB-17 cell in immunofluorescence detection

(A) The immunofluorescence result of the cell transfected with the HSP-975 gene.

(B) The immunofluorescence result of the cell bound by HSV

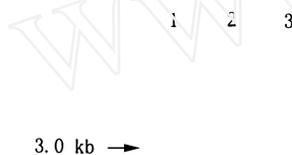


Fig. 5 The Northern hybridization of SR-15 gene

1. KMB-17 cells bound by HSV ; 2. Fetal lung; 3. KMB-17 cell

3 讨论

病毒结合受体可以诱导产生相应的细胞内信号传递这一事实已为实验所证实^[8]。而因此信号导入所产生的细胞早期基因反应亦是其逻辑结果,它已为我们早期的实验结果所支持^[3]。但各种病毒所结合的受体不同,因而理论上可以推测其导致的基因反应是各异的,实验已经明确了这一点。这些各异的基因反应对不同的病毒感染以及受感染细胞的预后有什么影响,则是病毒与细胞相互作用研究中令人感兴趣的问题。HSV 结合的受体很可能是一复合受体,它与病毒结合的机理及后果,以及此过程对机体其它细胞的影响都是很复杂的。SR-15 蛋白作为 HSV 结合受体后使细胞在 2 h 内所产生的一个特异分子,其结构特点与所知的 SR 蛋白分子家族有

一定程度的类似。而大量实验结果已证实,SR 分子是一类参与细胞前 mRNA 剪接的重要蛋白^[9]。根据 SR-15 与 SR 家族的结构对比,可以认为,该蛋白可能具有与 DNA 或 RNA 结合的功能。如果该蛋白也能参与 RNA 剪接过程,那它如何进入细胞核内则是一令人感兴趣的问题。因而这个蛋白分子的克隆为进一步研究 HSV 与细胞的相互作用提供了线索。并由此可以推测,虽然我们尚不清楚 HSV 在 KMB-17 细胞上受体的生理功能,但此结果已提示,HSV 借助与该受体的结合,可能影响了细胞的某些功能。另外,SR-15 蛋白在正常生理条件下并不表达,仅在细胞受到 HSV 刺激时产生,这意味着受病毒感染的细胞很可能通过此蛋白分子对病毒有一定的作用。但这样一个以早期基因的产物形式出现,并表现有一定结构特性的蛋白分子,是对细胞有益还是对病毒感染有益尚需进一步的探讨。

参考文献 (References)

- 1 Herold B C, Visalli R J, Sumarki N, Brandt C R, Spear P G. Glycoprotein C-independent binding of HSV to cell requires cell surface heparan sulfate and glycoprotein B. *J Gen Virol*, 1994, **75**:1211 ~ 1222
- 2 White J. In: Wimmer E ed. *Cellular Receptors for Animal Virus*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994, 281 ~ 301
- 3 李琦涵, 董承红, 王炯, 王丽春, 孙明, 杨芳. 两种病毒与细胞结合诱导的原癌基因早期表达. *生物化学与生物物理学报* (Li Qi-han, Dong Cheng-hong, Wang Jiong, Wang Li-chun, Sun Ming, Yang Fang. Early expression of protooncogene induced by the binding to cell of two viruses. *Acta Biochim Biophys Sin*), 2000, **32**(2): 149 ~ 152
- 4 Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display; refinements and optimization. *Nucleic Acids Res*. 1993, **21**(14): 3269 ~ 3275
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 538 ~ 572
- 6 Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection (cationic lipid vesicles /N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethyl-ammonium chloride (DOTMA)/transfection). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**:6077 ~ 6084
- 7 Chen H I, Sudol M. The W W of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**:7819 ~ 7823
- 8 Bibb J A, Berndardt G, Wimmer E. The human poliovirus receptor alpha is serine phosphoprotein. *J Virol*, 1994, **68**:6111 ~ 6116
- 9 Zahler A M, Lane, W S, Stalk, J A, Roth, M B. SR proteins: a conserved family of pro-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, 1992, **6**:837 ~ 847