

## ◇ 基础医学研究 ◇

## 人巨细胞病毒 pUL76 蛋白非保守 C 端与蛋白聚集体形成的研究

张文昌<sup>1</sup>, 陈敬贤<sup>1,2</sup>, 王明丽<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过分别构建人巨细胞病毒(HCMV) UL76 基因编码蛋白的全长以及保守 N 端和非保守 C 端的真核表达质粒 探讨 pUL76 引起核内蛋白聚集体形成的决定序列。方法 根据 GenBank 中 HCMV AD169 (FJ527563.1) 株基因序列设计分别用于扩增 pUL76 全长以及保守 N 端和非保守 C 端的引物 将 3 段序列分别构建至增强型绿色荧光蛋白表达载体(pEGFP-N1)中 经双酶切和测序验证重组质粒的正确构建。空载体和 3 种重组质粒分别瞬时转染人胚肺成纤维细胞(HELF)和人肝癌细胞(HepG-2),经逆转录(RT-PCR)和 Western blot 法验证各段基因的正确表达 在荧光显微镜下观察转染不同重组质粒后细胞核内蛋白聚集体形成的状态。结果 pEGFP-N1 空载体和 pUL76 保守 N 端均不能引起核内蛋白聚集体的形成 而 pUL76 及其非保守 C 端均能够引起核内蛋白聚集体的形成。结论 pUL76 非保守 C 端是其引起核内蛋白聚集体形成所必须的。

**关键词** 人巨细胞病毒; UL76; 蛋白聚集体

中图分类号 R 349.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0411-05

疱疹病毒有着相似的结构和复制周期,有一些基因行使着相同或相近的功能,比如用于 DNA 合成的 DNA 聚合酶、转录调节因子等。现已知疱疹病毒家族的 3 个亚科中约有 40 个核心基因来自共同祖先<sup>[1]</sup>,且这些基因在 3 个亚科中都保守。通常将从共同祖先继承而来,在不同亚科中的同源基因构成 1 个基因家族。疱疹病毒 UL24 基因家族即属于这 40 个核心基因之一,其编码的氨基酸序列 N 端高度保守, C 端变异较大<sup>[2]</sup>。该基因家族在病毒整个复制周期以及潜伏感染中的作用研究较少。人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属于疱疹病毒 β 亚科,其 UL76 基因属于疱疹病毒 UL24 基因家族。研究<sup>[3]</sup>表明 UL76 转染细胞最显著的特征是引

起细胞核内蛋白聚集体的形成。该研究通过分别构建 pUL76 及其保守 N 端和非保守 C 端的真核表达质粒 确定了 pUL76 引起蛋白聚集体的决定序列。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** HCMV AD169 毒株由复旦大学医学院微生物学教研室提供;人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)和人肝癌细胞(human hepatoma, HepG-2)购自美国 ATCC 公司; HELF 细胞、HepG-2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(内含 100 U/ml 青霉素, 100 g/ml 链霉素)在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。pEGFP-N1 质粒购自美国 Clontech 公司;脂质体 2000 购自北京 Invitrogen 公司;T4 DNA 连接酶、BamH I 和 Hind III 限制性内切酶和逆转录试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司;Rabbit-anti-GFP 抗体、蛋白质提取试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;引物由北京 Invitrogen 公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** PCR 分别扩增出 HCMV UL76 全长、UL76 保守 N 端和 UL76 非保守 C 端的编码序列。用于扩增各片段的 PCR 引物如下:UL76 全长(325aa) F:5'-AAGCTTATGCCGTCGGGCGGT-3', R:5'-GGATCCGCTAAAGACCGTGTGGGACGGCG-3'; UL76N (1 ~ 190aa) F:5'-AAGCTTATGCCGTC-CGGGCGGT-3', R:5'-GGATCCGCCCGTCCCAGAT-AGTC-3'; UL76C (187 ~ 325aa) F:5'-AAGCTTATG-GACTATCTGGGACGGCG-3', R:5'-GGATCCGCTA-AAGACCGTGTGGGACGGCG-3'。各片段分别连接至 pEGFP-N1 真核表达载体,所形成的新的重组质粒分别命名为 pEGFP-UL76、pEGFP-UL76N 和 pEGFP-UL76C。阳性克隆经双酶切和测序鉴定后,保菌并提取适量质粒 DNA 用于转染。

**1.2.2 细胞转染和荧光显微镜观察** 转染前 1 d HELF 细胞  $1 \times 10^6$ /ml (或 HepG-2 细胞  $2 \times 10^5$ /ml) 密度铺于 6 孔板中。分别将 2.5 μg 质粒和 5 μl 脂质体 2000 混匀于 500 μl 无血清和抗生素的 DMEM 培养基中,室温静置 5 min 后将两者轻轻混匀,室温

2015-01-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30872253);安徽高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2012ZD08)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>哥伦比亚大学病理与细胞生物学系,纽约 10032

作者简介:张文昌,男,硕士研究生;

王明丽,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: mingli-wang@ahmu.edu.cn

放置 20 min。在此过程中用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min。最后吸尽 PBS,将 1 ml 混合液加到细胞中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后换含有血清和抗生素的 DMEM 完全培养基,并于荧光显微镜下观察。

**1.2.3 逆转录 PCR (RT-PCR)** 转染后 48 h,用 PBS 洗涤细胞 3 次。6 孔板每孔加入 500 μl TRIzol 试剂。RNA 提取采用生工总 RNA 提取试剂盒 (SK1322)。用于 cDNA 合成的 RNA 先用 DNase I 处理,然后由 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kits 合成,每 20 μl 体系加 1 μg 模版 RNA。RT-PCR 所用引物同克隆引物。

**1.2.4 Western blot 法检测** 转染后 48 h,用 PBS 洗涤细胞 3 次。6 孔板每孔加入 150 μl 蛋白裂解液 (含 PMSF 1 μmol/L),冰上裂解 30 min,期间每隔 10 min 晃动平板使裂解液均匀覆盖。收集裂解液于 -80 ℃ 保存。然后采用 BCA 法进行蛋白质定量。SDS-PAGE 分离目的蛋白,250 mA 恒流转膜 80 min。转印了蛋白的 PVDF 膜用 3% 的脱脂奶粉封闭 1 h。Rabbit-anti-GFP 一抗 1 : 600 倍稀释,孵育过夜。PBST 洗涤 3 次后用 HRP 标记羊抗兔二抗 (1 : 5 000) 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后进行化学发光法曝光。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增 UL76 全长以及 UL76 保守 N 端和 UL76 非保守 C 端的编码序列** 采用梯度退火温度摸索 PCR 扩增 UL76、UL76 保守 N 端 (1 ~ 190aa) 和非保守 C 端 (187 ~ 325aa) 3 个不同片段的最适退火温度。PCR 扩增结果经 1% 琼脂糖凝胶电泳。见图 1。

**2.2 UL76、UL76N (1 ~ 190aa)、UL76C (187 ~ 325aa) 连接至 pEGFP-N1** 双酶切 UL76、UL76N (1 ~ 190aa)、UL76C (187 ~ 325aa) 连接至 pEGFP-N1 后转化大肠杆菌 DH5α,卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,阳性克隆扩大培养并提取质粒经 BamH I 和 Hind III 双酶切。见图 2。酶切结果显示 3 种不同的片段都成功连接至真核表达载体 pEGFP-N1 上。

**2.3 3 种重组质粒测序结果与 HCMV AD169 株 UL76 基因比对** 采用 DNAMAN 软件对测序结果与 GenBank 中登录的 HCMV AD169 株 (FJ527563.1) UL76 基因序列进行比对,散点图中对角线两侧相同位置出现相应的散点,表明序列有一致性。纵坐标代表目的序列,从下至上方向为读码框方向;横坐标代表 3 个重组质粒的测序结果,从左至右为读码

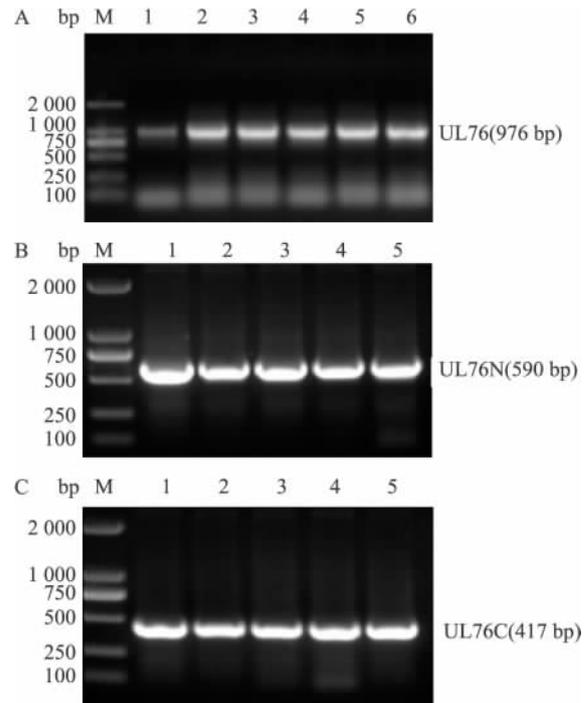


图1 UL76 全长、UL76 保守 N 端以及 UL76 非保守 C 端 PCR 扩增 M:DL2000 DNA Marker; A: UL76 全长 PCR (1~6 退火温度分别为 50.5 ℃、52.3 ℃、54.1 ℃、57.7 ℃、59.4 ℃、62.1 ℃); B: UL76 保守 N 端 PCR 结果; C: UL76 非保守 C 端 PCR 扩增结果; 不同泳道代表不同的退火温度 泳道 1~5 退火温度分别为 52.3 ℃、54.1 ℃、57.7 ℃、59.4 ℃、62.1 ℃

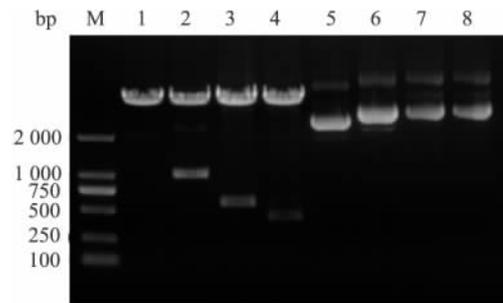


图2 pEGFP-N1 空载体和 3 种重组质粒双酶切的结果 M:DL2000 DNA Marker; 1~4: pEGFP-N1 空载体、pEGFP-UL76、pEGFP-UL76N、pEGFP-UL76C 双酶切结果; 5~8: 对应 4 种质粒酶切之前的电泳结果

框方向, A、B、C 分别与目的序列全长、N 端和 C 端序列相同。见图 3。

**2.4 pUL76、pUL76 保守 N 端和 pUL76 非保守 C 端亚细胞定位的不同以及引起蛋白聚集体形成的差异** 将 4 种质粒分别转染 HepG-2 细胞和 HELF 细胞。见图 4、5。转染不同质粒后增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 可以很好的显示目的片段在细胞内的定位,另外蛋白聚集体可以通过荧光信号聚集在细胞内形成斑块样结构

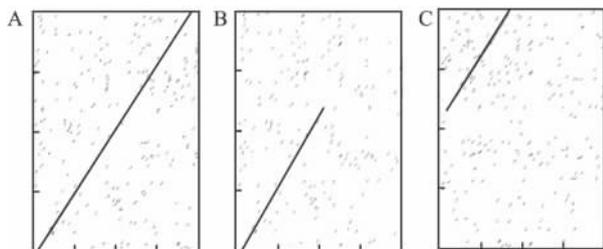


图3 3种重组质粒测序结果与HCMV AD169毒株UL76基因序列比对散点图  
A:pEGFP-UL76;B:pEGFP-UL76N;C:pEGFP-UL76C

来体现,图4 B、D中红色箭头所指为细胞核内蛋白聚集体的形成。

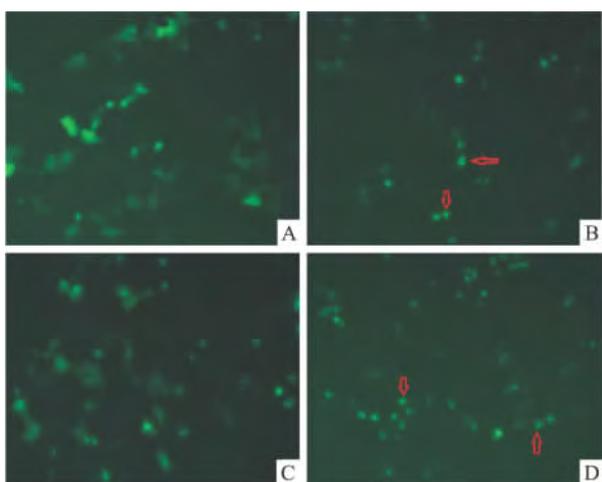


图4 不同质粒转染HepG-2细胞后,荧光显微镜下观察 ×100  
A:pEGFP-N1;B:pEGFP-UL76;C:pEGFP-UL76N;D:pEGFP-UL76C

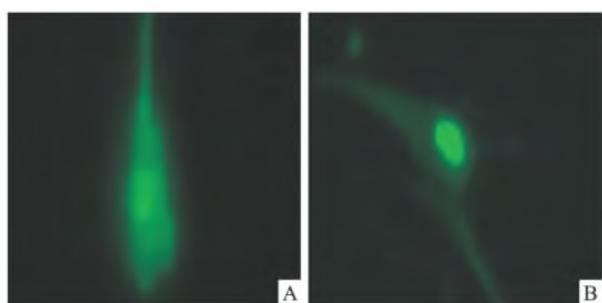


图5 荧光显微镜下观察pEGFP-UL76N和pEGFP-UL76C转染HELF细胞 ×400  
A:pEGFP-UL76N;B:pEGFP-UL76C

**2.5 RT-PCR 和 Western blot 法验证各重组质粒的正确表达** 因为目前没有商品化的UL76抗体,但是各重组质粒表达的融合蛋白均含有EGFP-tag,所以本研究采用抗EGFP抗体来检测各融合蛋白的表达。经蛋白质分子量预测,EGFP-tag按27ku计

算,各融合蛋白大小应为:pEGFP-N1为27ku,pEGFP-UL76为63ku,pEGFP-UL76N为49ku,pEGFP-UL76C为41ku。见图7。

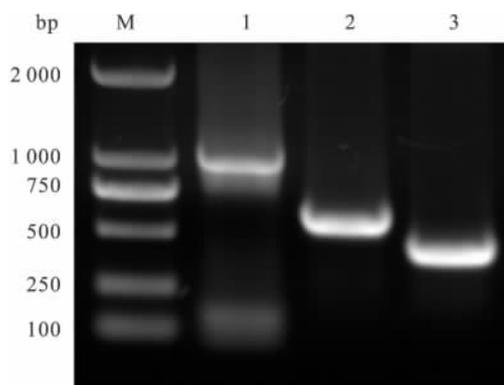


图6 RT-PCR检测各不同克隆片段的mRNA表达  
M:DL2000 DNA Marker;1:pEGFP-UL76;2:pEGFP-UL76N;3:pEGFP-UL76C

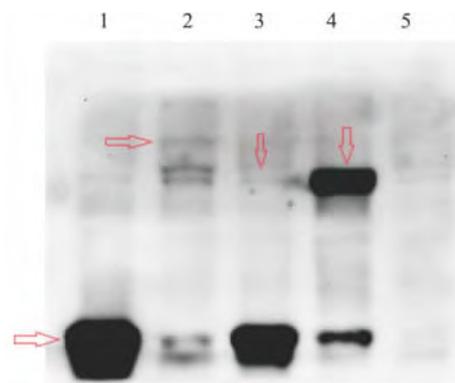


图7 Western blot法检测各不同克隆片段与EGFP融合蛋白的表达  
1:pEGFP-N1;2:pEGFP-UL76;3:pEGFP-UL76N;4:pEGFP-UL76C;5:细胞对照

### 3 讨论

研究<sup>[2]</sup>表明疱疹病毒UL24家族成员都能够引起细胞周期阻滞,生物信息学分析显示该家族成员有潜在的核酸内切酶活性<sup>[4]</sup>。其他一些功能也在部分UL24家族成员中得到验证,如HSV-1 UL24(疱疹病毒α亚科)与病毒毒力相关<sup>[5]</sup>,能引起核仁素的重新分布等<sup>[6-7]</sup>。疱疹病毒β亚科的HCMV UL76不仅能够调节病毒自身基因(立即早期、早期以及晚期基因)的表达<sup>[8]</sup>,还能够调节宿主基因的表达,如诱导IL-8的表达<sup>[9]</sup>;致染色体损伤<sup>[10]</sup>;引起核内蛋白聚集体的形成<sup>[3]</sup>等。疱疹病毒γ亚科如KSHV的ORF20目前研究较少。

细胞内一些异常的或不正确折叠的蛋白会给细

胞本身代谢带来不利的影响,这些蛋白需要被及时识别和清理。在细胞质中,错误折叠的蛋白能够通过两种途径被降解:泛素化降解途径和溶酶体参与的自噬途径。而在细胞核中错误折叠的蛋白只能通过泛素化降解途径来清理<sup>[11]</sup>,当错误折叠蛋白产生过多以致超出它们的降解能力或蛋白酶体功能自身受损(如泛素化蛋白受体 S5a 被扣留)后,错误折叠蛋白会进一步形成蛋白聚集体。一些严重的神经系统疾病如克雅病就是与细胞内错误折叠的蛋白不能够被清除,进而形成聚集体有关<sup>[12]</sup>。

研究<sup>[3]</sup>显示,UL76 可以通过与泛素化降解途径受体 S5a 相互作用引起核内蛋白聚集体形成。本研究在重复其部分研究的过程中显示,引起核内蛋白聚集体形成并非由其保守 N 端决定,而是由非保守的 C 端决定。由于所克隆的片段均相同,区别仅在本课题组采用的真核表达载体为 pEGFP-N1,而 Lin et al<sup>[3]</sup>使用的是 pEGFP-C1(本实验中目的基因位于 EGFP N 端,对方实验中目的基因位于 EGFP C 端),因此产生了截然相反的结果。而且通过核定位信号预测也表明 pUL76 所含有的核定位信号(205 ~ 245aa)位于非保守 C 端,现有的实验结果也证实只有 pUL76 和 pUL76 非保守 C 端定位于细胞核,而 pUL76 保守 N 端弥散分布于整个细胞。因此非保守的 C 端与细胞核内蛋白泛素化降解途径受体 S5a 相互作用更符合实际。

HCMV 先天性感染主要累及中枢神经系统,可引起感音神经性耳聋、智力发育迟缓和小头畸形等。目前,HCMV 致神经系统病变的确切机制尚不清楚。本研究通过截短表达 UL76 的不同片段,探讨 pUL76 引起细胞核内蛋白聚集体形成的决定序列,从而为进一步研究 UL76 的生物学功能以及其在 HCMV 致病中所扮演的角色奠定基础。

### 参考文献

[1] Davison A J. Evolution of the herpesviruses [J]. *Vet Microbiol*,

2002, 86(1-2):69-88.

- [2] Nascimento R, Dias J D, Parkhouse R M. The conserved UL24 family of human alpha, beta and gamma herpesviruses induces cell cycle arrest and inactivation of the cyclinB/cdc2 complex [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(7):1143-9.
- [3] Lin S R, Jiang M J, Wang H H, et al. Human cytomegalovirus UL76 elicits novel aggresome formation *via* interaction with S5a of ubiquitin proteasome system [J]. *J Virol*, 2013, 87(21):11562-78.
- [4] Knizewski L, Kinch L, Grishin N V, et al. Human herpesvirus 1 UL24 gene encodes a potential PD-(D/E)XK endonuclease [J]. *J Virol*, 2006, 80(5):2575-7.
- [5] Jacobson J G, Martin S L, Coen D M. A conserved open reading frame that overlaps the herpes simplex virus thymidine kinase gene is important for viral growth in cell culture [J]. *J Virol*, 1989, 63(4):1839-43.
- [6] Bertrand L, Pearson A. The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt 5):1142-51.
- [7] Bertrand L, Leiva-Torres G A, Hyjazie H, et al. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin [J]. *J Virol*, 2010, 84(1):109-18.
- [8] Wang S K, Duh C Y, Chang T T, et al. Cloning and identification of regulatory gene UL76 of human cytomegalovirus [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 10):2407-16.
- [9] Costa H, Nascimento R, Sinclair J, et al. Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(9):e1003609.
- [10] Siew V K, Duh C Y, Wang S K. Human cytomegalovirus UL76 induces chromosome aberrations [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16:107.
- [11] Matsuo Y, Kishimoto H, Tanae K, et al. Nuclear protein quality is regulated by the ubiquitin-proteasome system through the activity of Ubc4 and San1 in fission yeast [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15):13775-90.
- [12] Lee J, Hyeon J W, Kim S Y, et al. Review: Laboratory diagnosis and surveillance of Creutzfeldt-Jakob disease [J]. *J Med Virol*, 2015, 87(1):175-86.

## Unconserved C terminal of pUL76 in human cytomegalovirus elicits aggresome formation

Zhang Wenchang<sup>1</sup>, Chen Jingxian<sup>1,2</sup>, Wang Mingli<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Pathology, Columbia University, New York 10032)

**Abstract Objective** To define the nuclear aggresome formation is determined by which part of the UL76 of

# 绿色荧光蛋白标记兔 BMSCs 体外成骨的定量能谱分析

宁寅宽 李 强 蔡伟良 武成聪 陈佳滨 石正松

**摘要** 目的 观察绿色荧光蛋白(GFP)标记的兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨诱导后形态学改变和体外骨生成中矿化钙结节的形成,并结合扫描电镜和X射线能谱分析技术(SEM/EDS)对矿化钙结节元素进行定量能谱分析。方法

用携带GFP基因的腺病毒转染兔BMSCs进行示踪标记,并诱导细胞向成骨方向分化,通过倒置荧光显微镜、钙结节茜素红染色观察成骨诱导后细胞形态改变和矿化钙结节的形成,结合SEM/EDS技术观测矿化钙结节的表面微观结构及其元素构成。结果 腺病毒介导GFP基因(Ad-GFP)转染兔BMSCs后在荧光显微镜下观察到绿色荧光,经成骨诱导后细胞形态向成骨方向分化,并形成不透光的矿化钙结节,钙结节茜素红染色见红色矿化结节,SEM下见矿化钙结节散布于细胞中,细胞重叠生长,分泌基质旺盛。EDS分析显示矿化钙结节主要组成元素与正常骨组织相同,其钙磷比(Ca/P)为1.55,接近正常骨组织钙磷比1.49。结论 Ad-GFP能成功转染并标记兔BMSCs,成骨诱导后BMSCs向成骨方向分化,具备较好的骨生成能力,BMSCs体外矿质化成骨过程与体内基本相同。

**关键词** 重组腺病毒;绿色荧光蛋白;骨髓间充质干细胞;扫描电镜;能谱分析

中图分类号 R 687.34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0415-04

2014-12-31 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31160199)

作者单位:桂林医学院附属医院四肢创伤手外科 桂林 541001

作者简介:宁寅宽,男,硕士研究生;

李 强,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:li.q12251970@163.com

在观察骨髓间充质干细胞(bone-marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)体外诱导成骨时,一般通过生物化学检测方法检测所培养BMSCs内碱性磷酸酶活性,I型胶原、成骨特异性蛋白和成骨分化调控因子的表达等,但这些生物化学检测方法仅能间接地反映BMSCs体外成骨分化的生物特性,而对BMSCs体外骨生成的直接观测方法较少<sup>[1]</sup>。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因标记是一种细胞示踪技术,用GFP标记BMSCs可直接观察细胞的形态改变和空间分布<sup>[2]</sup>。该实验以腺病毒为表达载体,介导GFP基因标记兔BMSCs,在即时动态观察成骨诱导后细胞形态学改变的同时,并结合扫描电镜和X射线能谱分析(scanning electron microscope and energy dispersive spectrometer, SEM/EDS)技术直接观测BMSCs成骨分化中矿化钙结节的表面微观结构及其钙、磷元素含量,定量研究BMSCs体外骨生成中矿化钙结节元素组成。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 腺病毒载体** Ad-GFP表达载体由美国英潍捷基(上海)贸易有限公司构建、鉴定和提供。采用免疫法检测腺病毒滴度,病毒滴度为 $2 \times 10^{10}$  pfu/ml。

**1.1.2 兔BMSCs** 本课题组前期实验已完成了兔

HCMV. Full-length, conserved N terminal and unconserved C terminal of pUL76 were constructed to eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1. **Methods** Primers were designed to amplify full-length and different part of pUL76 according to standard sequence of HCMV AD169 which had been submitted to GenBank (FJ527563.1). These fragments were constructed to eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1. The recombinant plasmids were designated pEGFP-UL76, pEGFP-UL76N, pEGFP-UL76C respectively. Double digestion and sequencing were performed to verify the accuracy of recombinant plasmids construction. Empty vector and three recombinant plasmids were transiently transfected to HELF and HepG-2 cells respectively. Reverse transcription PCR and Western blot were performed to detect the RNA and protein expression level respectively. Different nuclear aggresome formations were visualized with an Olympus fluorescence microscopy. **Results** pEGFP-N1 and pEGFP-UL76N were unable to induce nuclear aggresome formation, whereas pEGFP-UL76 and pEGFP-UL76C were able to elicit nuclear aggresome formation. **Conclusion** The unconserved C terminal of pUL76 is sufficient to induce nuclear aggresome formation. **Key words** human cytomegalovirus; UL76; protein aggresome