

在 HSV I 感染细胞中类 PEBP 蛋白基因的克隆及分析*

王 炯, 刘龙丁, 孙明, 董承红, 王丽春, 王晶晶, 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, 云南昆明 650118)

Cloning and Analyzing a New PEBP Like Protein Gene in Human Fibroblast Cell Infected by HSV I

WANG Jiong, LIU Long-Ding, SUN Ming, DONG Cheng-Hong, WANG Li-Chun,

WANG Jing-Jing, LI Qi-han**

(Department of Viral and Immunology, Institute of medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming 650118, China)

Abstract: In our study on the gene response to virus infection, a colony of 705bp - HSP-714 was selected from the cell specific cDNA library induced by HSVI infection. The gene sequence analysis revealed that it was a new complete gene sequence (Gene Bank Accession number; AF372624) with a complete ORF encoding 126 amino acids. The biological informatics analysis demonstrated that this protein contained a phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) like domain, which had a high homology to the CEN-like family of plant and mammalian etc. genome. Furthermore, the evolution tree demonstrates that this gene shows more homologous to CEN-like family of plant. Therefore, it can be predicted that this gene might be a new member of human PEBP-like family with special significance.

Key words: PEBP-like protein; HSVI infection; Gene cloning

摘要: 在细胞对病毒感染后的基因反应研究中, 从克隆的 HSVI 感染后细胞特异 cDNA 文库中筛选出一个 705bp 克隆基因—HSP-714, 基因测序分析表明为一新的全基因序列 (Gene Bank Accession Number: AF372624), 含有完整的 ORF 框架, 编码 126 个氨基酸; 信息生物学分析结果表明该蛋白含有磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (PEBP) 结构域, 与植物、哺乳动物等多物种类 CEN 家族产物有高度的同源性, 此外该基因的进化分析结果表明此基因更接近于植物的类 CEN 家族。据此推测, 该基因可能是人 PEBP 基因家族中具有特殊意义的一个新成员。

关键词: 类磷脂酰乙醇胺结合蛋白; HSVI 病毒感染; 克隆

中图分类号: Q71 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)02-0097-05

在病毒与细胞相互作用的研究中, 日益增多的资料已表明这种相互作用所表现的多样性, 尤其是病毒感染的不同阶段刺激细胞产生的多种基因产物^[1], 它们在感染细胞中的出现, 为病毒与细胞相互作用的复杂现象提供了直接的实验基础和分析线索。在我们的前期工作中, 我们已注意到 HSVI 结合人成纤维细胞 KMB-17 株表面的受体之后, 诱导细胞出现了多种特异的基因反应^[2]。在这些基因反应的分析, 我们克隆到了一些新基因^[3], 这些基

因结构上所表现的特点, 丰富了我们对于病毒与细胞相互作用的认识。而本文所描述的一个新的类磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (Phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP) 基因的发现, 更为这样的认识提供了线索。目前, PEBP 的生物学活性并不明确, 但最新的研究结果表明^[4,5] PEBP 家族是一类与信号传导密切相关的调控分子, 并且具有重要的生物学活性。在用 HSVI 结合 1h 的 KMB-17 细胞提取的 mRNA 建立的 cDNA 库中, 我们以 mRNA 差异显示

收稿日期: 2001-07-10, 修回日期: 2001-10-10

* 作者简介: 王炯 (1969-), 女, 辽宁省抚顺籍, 助理研究员, 硕士, 主要从事病毒免疫学研究。

** 通讯作者: 李琦涵 (1957-), 男, 江苏省徐州籍, 研究员, 博士, 主要从事分子病毒学的研究。

Correspondence author. e-mail: qihanl@public.km.yu.cn

所发现的差异片段作为探针进行筛选、克隆得到一个新基因,该基因包含一个磷脂酰乙醇胺结合蛋白的结构域,提示该基因编码的蛋白可能是一个类PEBP蛋白家族的新成员,至于此蛋白与HSV1病毒感染之间的关系,以及它的生物学活性还有待进一步探索,此新基因的发现亦为相应领域的进一步研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒

KMB-17细胞为人成纤维细胞株(本室冻存),生长于DMEM-5%牛血清培养基(Gibco公司产品)中,37℃ 48h呈单层时备用(用于本实验为p25代);HSV-I型标准病毒株(本室保存),繁殖并收获于Hela细胞,蔗糖密度梯度离心纯化,病毒滴度为 10^7 CCID₅₀/mL。

1.2 HSVI型病毒刺激KMB-17细胞后的特异性cDNA文库的建立

1.2.1 病毒吸附细胞 将HSVI型病毒接种于弃上清并经PBS洗3次的单层细胞,4℃吸附1h后转至37℃ 1h,刮下细胞,冷PBS洗3次备用。

1.2.2 带有EcoR I酶切位点的双链cDNA的制备

采用Pharmacia公司Quick mRNA提取上述细胞的mRNA,方法按试剂盒说明书;并以此mRNA为模板,使用Time Save cDNA合成试剂盒(Pharmacia公司)先逆转录合成cDNA第一条链,再制备成双链cDNA,并在两侧各加上一个EcoR I位点的接头,纯化备用,方法按试剂盒使用说明书。

1.2.3 病毒刺激后特异性cDNA文库的建立 将上述带有EcoR I位点的双链cDNA重组入pUC-19克隆载体中,转化到DH-5 α 感受态细胞中,挑取白色菌落扩增培养,编号,于-20℃ 25% LB-甘油液保存备用。

1.3 斑点杂交

病毒刺激前后的mRNA差异显示分析所获得原癌基因相关的特异性基因片段为模板^[2],按常规使用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 标记PCR扩增的特异性DNA片段为探针;上述文库中的菌种扩增培养,将少量提取的质粒DNA 80℃变性后点样于硝酸纤维素膜上,与探针42℃杂交过夜,2 \times SSC及0.2 \times SSC 0.1 \times SSC梯度洗3-5遍后,自显影于X光片。

1.4 新基因的酶切及测序分析

将斑点杂交结果为阳性及弱阳性的质粒DNA,

经EcoR I酶切初步确定基因大小后,分别用正、反向通用引物从片段的两端进行测序分析(377 Genetic Analyzer自动测序仪)。

1.5 生物信息分析

1.5.1 BLAST相似性分析 所得基因序列,用BLASTN软件经Internet与GenBank的所有已知基因序列进行比较。

1.5.2 读码框架分析 用OMIGA2.0基因分析软件对所得片段进行ORF分析。

1.5.3 功能结构分析 用ProDom软件进行所得基因编码蛋白的功能结构域分析。

1.5.4 编码蛋白的特性分析 采用Vector NTI 6.0生物学软件包对基因所编码的蛋白的氨基酸组成,及各种理化特性进行分析;用PSORT III软件分析该蛋白在细胞中的可能分布部位。

1.5.5 编码蛋白的进化分析 采用Vector NTI 6.0生物学软件包对目前已知的哺乳动物(人、牛、鼠)PEBP蛋白、大米和金鱼草属植物类CEN蛋白、以及果蝇和线虫的类PEBP蛋白进行进化树分析。

2 结果与分析

2.1 差异显示片段阳性克隆的鉴定

将病毒刺激细胞后的cDNA文库与差异片段杂交所得到的阳性及弱阳性的质粒DNA,并经EcoR I酶切确定基因的大小,其中杂交结果为弱阳性的HSP-714克隆经酶切出700bp \pm 的片段(见图1),测序结果见图2。

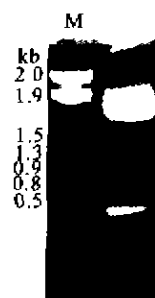


图1 筛选出的HSP-714克隆

Fig.1 Finding a colony—HSP-714

HSP-714 was picked up from the cDNA library infected by the HSV 1, the insert was 700 \pm bp gene; M DNA marker λ EcoR I+ Hind III.

2.2 生物信息学分析

2.2.1 BLAST相似性分析结果 经BLASTN软件分析表明没有与该序列完全一样的同源基因,所得序列为新基因,并以全序列基因注册于GeneBank

(Accession Number: AF372624)。编码蛋白序列分析结果显示该蛋白与植物的 CEN 家族中的 CEN、TF 等基因产物有较高的同源性,达 50% 左右,而与哺乳动物的 PEBP 家族产物的同源性较低,只有

30% 左右(见图 3)。

HSP-714 克隆是从 HSVI 型病毒刺激的特异性 cDNA 文库中筛选出的,带有 700bp 左右的外源基因片段。

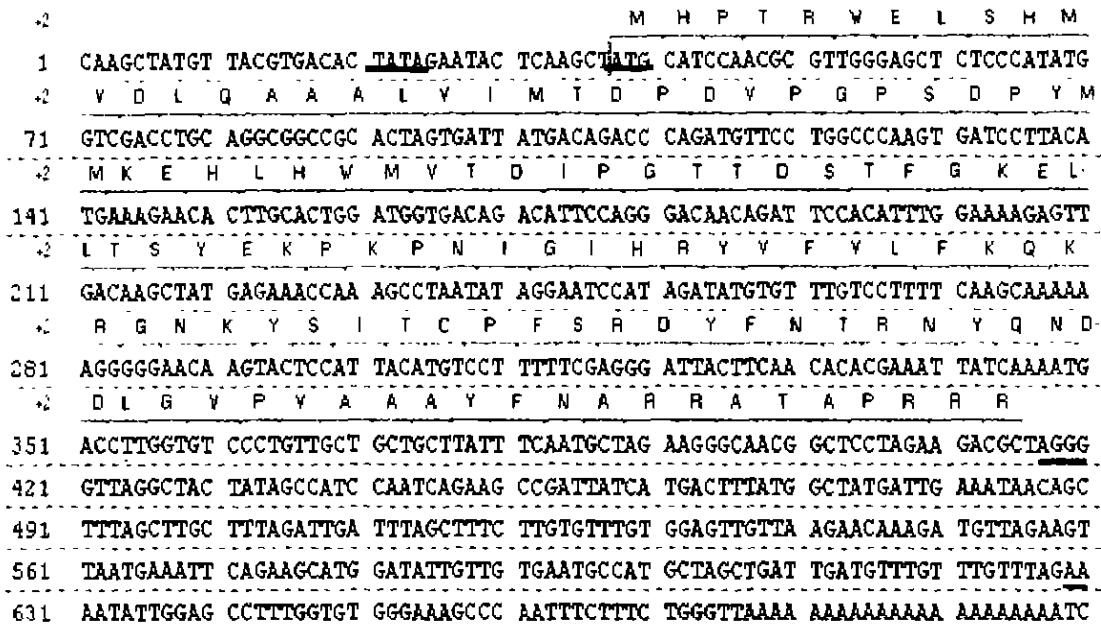


图 2 HSP-714 的基因序列及其读码框架分析

注:划线部分为翻译的起始密码、终止密码、Poly-A 尾和 AAATATT 结构。

Fig. 2 The sequence of HSP-714 and analysis of its ORF structure

The translational start (5'ATG), stop codons (5'TAG), the poly A tail and AAATATT structure are underlined.

2.2.2 读码框架分析 所得序列为 705bp, OMI-GA2.0 软件分析结果表明该基因内存在一完整的读码框架:38bp 的 ATG 起始至 418bp 的终止密码共编码 126 氨基酸的蛋白质,5'非编码区的 21-24bp 有明显 TATA box 结构,3'非编码区除典型的 Poly A 尾处,还有 AAAATATT 结构(见图 2),由此推测该基因是一个完整的基因序列。

2.2.3 功能结构域分析结果 用 ProDom 软件分析表明该基因编码的蛋白包含有一个与磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)相似的结构域,分别与 PEBP 的同源结构域有 54.2% 的同源性。

2.2.4 编码蛋白特性分析 Vector NTI 6.0 软件包分析结果显示该蛋白为一碱性蛋白,等电点 PI 为 9.4,预测分子量为 14.56kD,靠近 C 末端有一小的疏水基团;PSORT II 软件分析结果认为该蛋白位于胞浆内的可能性是 79.6%。

2.2.5 编码蛋白的进化分析 Vector NTI 6.0 软件包分析结果表明 HSP-714 编码的蛋白在进化上

更接近与植物类 CEN 家族的成员(见图 4)。

3 讨论

目前克隆到的植物 CEN 家族成员主要有 Centroradialis (CEN)、Self-pruning (SP)、Terminal Flower(TFL-1),他们的主要功能是促进植物的发芽,表达产物是促进植物开花的 FLO、LFY 基因的拮抗物。该家族基因是与哺乳动物的 PEBP(也称为 RKIP)蛋白家族具有较高的同源性^[6]。该蛋白的命名是由于最初发现它在体外具有磷脂酰乙醇胺的高亲和性,而对其生物学活性尚不清楚^[7];虽然 23kD 的人 PEBP 是从脑组织分离得到的^[8],目前认为它可能是海马回神经刺激肽(hippocampal neurostimulatory peptide, HCNP)的前体,该活性肽包含有 PEBP 的 N 末端 12 个氨基酸残基,但多种组织器官均可表达 PEBP,并且作为高度的保守序列,与植物、酵母、果蝇到高等的哺乳动物相应产物均有高度的同源性^[9-11],提示该蛋白可能具有非常重要的

```

HSP-714
Oryzasativa -----MSRSVEP[V]G[ ]IGD[ ]DTFNPCMKMIVTYNS
ANTIRRHINU -----MAAKVSSDP[V]G[ ]IGD[ ]DHFTSTVKMSVIYNS
Nematode  MVVLVTRSLLPALFFASRAPFAAATTSARFORGLAT[A]ARAFTKHE[ ]P[V]VLASNP[ ]SKV[ ]SV
DROSOPHILA -----MKLPALHLLFLGYICLARSQDNDENV[ ]RRI[ ]KEME[ ]PE[ ]LDRPPRELLR[ ]
MURINE_PEBP -----MAAD[ ]SQWAGP[ ]S[ ]QEVD[ ]R--POHALRV
BOVINE_PEBP -----MP[ ]D[ ]S[ ]SGP[ ]S[ ]QEVD[ ]ER-POHPLQV
HUMAN_PEBP -----MP[ ]D[ ]S[ ]WSGP[ ]S[ ]QEVD[ ]EQ-POHPLHV

HSP-714 -----[ ]H[ ]TRWELS-----HM[ ]DLO[ ]AAL[ ]MTD[ ]V[ ]G[ ]PSD[ ]YM[ ]EH[ ]W[ ]T
Oryzasativa N---KLVFNGHELY[ ]AVVS[ ]P-R[ ]EVQGGDLR[ ]F[ ]TLVMTD[ ]V[ ]G[ ]PSD[ ]YLREH[ ]W[ ]T
ANTIRRHINU NNSIKHVYNGHELF[ ]AVTSTP-R[ ]EVHGGDMR[ ]F[ ]TL[ ]MTD[ ]V[ ]G[ ]PSD[ ]YLRRH[ ]W[ ]T
Nematode  K[ ]NSGVEANGNVLT[ ]TQVKDTP-E[ ]KWD-AFPG[ ]LYTL[ ]KTD[ ]A[ ]-K[ ]TYRSWH[ ]W[ ]LV
ROSOPHILA KYDNTIDIEG[ ]TYT[ ]TF[ ]KFQP-R[ ]DMN-ADPR[ ]FYT[ ]MIC[ ]A[ ]NRFN[ ]MYRSR[ ]W[ ]LV
MURINE_PEBP DYAGVTVDRG[ ]VLT[ ]TQVNN[ ]PSS[ ]SWDG[ ]DPGKLYTLV[ ]TD[ ]A[ ]RKD[ ]K[ ]RSWH[ ]W[ ]LV
BOVINE_PEBP KYGGAEVDEG[ ]VLT[ ]TQVKN[ ]PTS[ ]TWDG[ ]DPGKLYTLV[ ]TD[ ]A[ ]RKD[ ]KYRKWH[ ]W[ ]LV
HUMAN_PEBP TYAGAAVDRG[ ]VLT[ ]TQVKM[ ]PTS[ ]SWDG[ ]DSGKLYTLV[ ]TD[ ]A[ ]RKD[ ]KYRSWH[ ]W[ ]LV

HSP-714  DIP[ ]TTDS[ ]FGKELTSYEK-[ ]KPNIG[ ]H[ ]YV[ ]L[ ]K[ ]KRG-NKYSITCP-----FSRDYFNT
Oryzasativa DIP[ ]TTD[ ]SFGREVISYES-[ ]KPNIG[ ]H[ ]YV[ ]L[ ]K[ ]KRR-QTVIVP-----SFRDHFNT
ANTIRRHINU DIP[ ]TTDS[ ]SFGKEVVSPEM-[ ]RPNIG[ ]H[ ]YV[ ]L[ ]K[ ]KRRGQAMLSP[ ]-----VCRDGFNT
Nematode  NIP[ ]NDI[ ]KGD[ ]TL[ ]SHY[ ]G[ ]G[ ]PPKTG[ ]H[ ]YV[ ]L[ ]YK[ ]SGRIEDARHGRL[ ]NTSGDKRGG[ ]KA
DROSOPHILA N[ ]P[ ]LDIMKGP[ ]SEYFGP[ ]PKD[ ]G[ ]Q[ ]Y[ ]ILVYQ[ ]S-DKLD[ ]FDRK[ ]RLSN[ ]DGH[ ]SN[ ]FDV
MURINE_PEBP N[ ]K[ ]NDISSGTVLS[ ]DY[ ]GSG[ ]PSGTS[ ]H[ ]YV[ ]LVYE[ ]E-QPLSCDRPIL[ ]NKS[ ]G[ ]DHR[ ]G[ ]K[ ]FKV
BOVINE_PEBP N[ ]K[ ]NNISSGTVLS[ ]Y[ ]GSG[ ]PKGTG[ ]H[ ]YV[ ]LVYE[ ]E-GPLKCDEPIL[ ]NRS[ ]G[ ]DHR[ ]G[ ]K[ ]FKV
HUMAN_PEBP N[ ]K[ ]NDISSGTVLS[ ]DY[ ]GSG[ ]PKGTG[ ]H[ ]YV[ ]LVYE[ ]D-RPLKCDEPIL[ ]NRS[ ]G[ ]DHR[ ]G[ ]K[ ]FKV

HSP-714  RN[ ]QN---LGV[ ]A[ ]AYF[ ]ARRATAPR[ ]R-----
Oryzasativa RRFAEEN[ ]LGL[ ]A[ ]VYF[ ]AQR[ ]TAAR[ ]R-----
ANTIRRHINU RKFTQKKEGL[ ]A[ ]VFF[ ]CQR[ ]TAAR[ ]R-----
Nematode  ADFVAK[ ]KLG[ ]A[ ]FGNLFQAR[ ]DDYVPI[ ]LNKQLG[ ]---
DROSOPHILA MKFTQQYE[ ]G[ ]AGNIFQ[ ]RMD[ ]YVPKLMK[ ]TLYGVSE
MURINE_PEBP ETFRKKYNLGA[ ]AGTC[ ]QAE[ ]DDYVPKLYE[ ]QLSGK--
BOVINE_PEBP ASFRKKYELGA[ ]AGTC[ ]QAE[ ]DD[ ]VPKLYE[ ]QLSGK--
HUMAN_PEBP ASFRKKYELRA[ ]AGTC[ ]QAR[ ]DDYVPKLYE[ ]QLSGK--
    
```

图3 HSP-714 与其他动物 PEBP 家族及植物 CEN 家族的同源性分析

Fig. 3 Alignment and comparison of HSP-714 and other animal PEBP family and plant CEN family

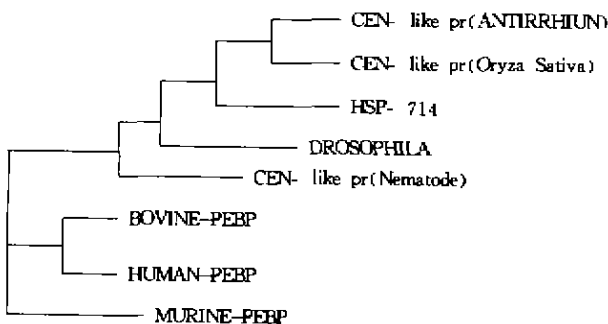


图4 HSP-714 与其分动物 PEBP 家族及植物 CEN 家族蛋白氨基酸序列的系统进化分析

由 Graw Tree(Vector NTI Suit6.0)构建系统发生树

Fig.4 Phylogenetic analysis of amine acid sequence of HSP-714 and other animal PEBP family and plant CEN family

The tree was constructed using Graw Tree(Vector NTI Suit 6.0)

生物学活性。有研究表明^[4]哺乳动物的 PEBP 在 Raf-1/MEK/ERK 信号传导通路中起着—个调控因子的作用,抑制 Raf-1 的磷酸化,并与之形成复合物,阻断 Raf-1 与 MEK 的相互作用;从而抑制 Raf-1 激酶的活性,故也被称为 Raf-1 激酶抑制蛋白(Raf-1 Kinase Inhibitor Protein, RKIP);此外,最新的研究证实^[5]该蛋白还是丝氨酸蛋白酶抑制物,可抑制多种丝氨酸蛋白酶活性,而丝氨酸蛋白酶在神经系统发育等多个过程中均起着非常重要的作用,如 Neuropepsin。由此可见,PEBP 家族是一类与信号传导密切相关的调控分子,并且具有重要的生物学活性。迄今为止,PEBP/PKIP 的直接生物学活性并不明确。PEBP 家族与植物 CEN 家族的空间构象也类

似,均是以核心区的 β 大片段为特点,高度保守的磷酸结合位点就存在于此结构中,并且该区域已被证实是 PEBP 阻断 Raf-1 的关键区域。

我们所克隆得到的 HS-714 基因,虽然编码的蛋白质有 126 个氨基酸,分子量为 14.5kD,略短于已克隆到的人 PEBP,但含有典型的 PEBP 结构域,与 PEBP 蛋白也有一定的同源性,可能是 PEBP 家族的新成员。更有趣的是该蛋白与植物的 CEN 家族的同源性高于与哺乳动物的 PEBP 的同源性,此外,C 末端以三个精氨酸结尾,这也与多数植物 CEN 家族成员具有相同的特点。由此可见,这个新基因可能是一个更为保守、具有不同于人 PEBP 生物学活性的新的功能基因。此外,我们是利用 RNA 差异显示技术所发现的 HSVI 病毒刺激后细胞特异性表达的基因片段为探针,在 HSVI 型病毒作用后细胞的特异性 cDNA 文库中筛选出来的克隆进行测序分析发现该新基因的,这表明该基因与 HSVI 病毒刺激有着一定的相互关系,可能是细胞受到 HSVI 刺激后产生的一种反应,而两者之间的相互关系还有待于进一步研究,同时本研究也为 PEBP 家族及其功能的研究提供了新的依据及线索,为今后更深一步的研究提供基础。

参考文献

- [1] Bibb J A, Bermerdt G, Wimmer E. The human poliovirus receptor alpha is a serine phosphoprotein[J]. J Virol, 1994, 68: 6111 - 6115
- [2] 李琦涵,董承红,王炯,等.两种病毒和细胞结合诱导的原癌基因早期表达[J].生物化学与生物物理学报,2000,32:149 - 152.
- [3] 董承红,王丽春,赵红玲,等.HSVI 型病毒结合所诱导 SR-样蛋白的基因克隆[J].中国生物化学与分子生物学报,2001,17:729 - 732
- [4] Yeung K, Seitz T, Li SF, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signaling by RKIP[J]. Nature, 1999, 401: 173 - 177.
- [5] Hengst U, Allbrecht H, Hess D, et al. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 535 - 540
- [6] Grandy D K, Hanneman E, Bunzow J, et al. Purification, cloning and tissue distribution of a 23kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography [J]. Mol Endocrinol, 1990, 4: 1370 - 1376.
- [7] Seddiq N, Bollengier F, Alliel P M, et al. Amino acid sequence of the Homo sapiens brain 21 - 23kDa protein (neuropeptide h3), comparison with its counterparts from Rattus norvegicus and Bos Taurus, and expression of its messenger RNA in different tissue [J] J Mol Evol, 1994, 39: 655 - 660
- [8] Schoentgen F, Seddiq N, Bucquoy S, et al. Main structural and functional features of the basic cytosolic bovine 21kDa protein delineated from hydrophobic cluster analysis and molecular modeling [J]. Protein Eng, 1992, 5: 295 - 303
- [9] Amaya I, Batchliffe O J, Bradley D J. Expression of CENTRORADIALIS(CEN) and CEN-like genes in tobacco reveal a conserved mechanism controlling phase change in diverse species[J]. Plant Cell, 1999, 11: 1405 - 1418
- [10] Banfield J J, Barker J J, Perry ACF, et al. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction [J]. Structure 1998, 6: 1245 - 1254.
- [11] Schoentgen F, Seddiq N, Bucquoy S, et al. Main structural and function features of the basic cytosolic bovine 21 kDa protein delineated from hydrophobic cluster analysis and molecular modeling [J] Protein Eng, 1992, 5: 295 - 303