

TT 病毒 ORF₂ 在 Cos7 细胞中的表达及蛋白质定位*

何 燕, 叶林柏**, 李 礼, 廖庆姣, 特马力, 余应龙, 叶 力, 吴正辉

(武汉大学生命科学院病毒研究所, 教育部病毒学重点实验室, 湖北武汉 430072)

Expression of TT Virus ORF₂ and the Protein Localization of VP2 in Cos7 Cells

HE Yan, YE Lin-bai**, LI Li, LIAO Qing-jiao, Khalid A Timani, SHE Ying-long, YE Li, WU Zheng-hui

(Key lab of Virology, Institute of Virology, College of life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Coding sequences of Transfusion transmitted virus (TT virus or TTV) ORF₂ was amplified by PCR, using plasmid pET-His-TTV2 containing the full-length ORF₂ of TTV as template. The amplified fragment of 606bp was cloned into plasmid pEGFP-N1 and GFP-VP2 fusion protein was expressed. The recombinant plasmid pEGFP-TTV2 was identified by restriction enzyme analysis and PCR. The pEGFP-TTV2 was transfected into Cos7 cell line using LipoFectamine 2000, and the transcription products of TTV ORF₂ gene in the transfected cells were confirmed by RT-PCR. Localization of the fusion protein was detected by confocal microscope, using PI to visualize the nuclear DNA. The result showed that VP2 was localized in cytoplasm and the inner nuclear membrane. Thus, VP2, as a non-structure protein, may play a role during DNA replication or transcription of TT virus.

Key words: TTV ORF₂; GFP; VP2; PI; Protein Localization

摘要: 应用 PCR 方法从含有 TT Virus ORF₂ 的质粒 pET-His-TTV₂ 中扩增出 606bp 的蛋白质编码区, 并将其克隆到真核表达载体 pEGFP-N1 中以表达成 GFP-VP2 融合蛋白。构建出的重组质粒 pEGFP-TTV2 经过酶切分析和 PCR 鉴定。用脂质体介导法将 pEGFP-TTV2 质粒 DNA 转染 Cos7 细胞, 通过 RT-PCR 分析, 证实细胞中存在 ORF₂ 基因的转录产物。用共聚焦显微镜结合 PI 染色技术研究 TTV VP2 蛋白在细胞中的分布情况。结果表明, TTV VP2 分布在细胞质中和细胞核膜内侧。因此推测 VP2 作为一种非结构蛋白, 功能可能是参与病毒 DNA 的复制或转录。

关键词: 输血传播病毒 (TTV) ORF₂; GFP; VP2; PI; 蛋白质定位

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0431-04

1997 年底, 日本学者 Nishizawa 等^[1]利用差异代表性技术在一例不明原因的急性肝炎病人中发现了一种新的肝炎病毒, 怀疑其与不明原因的急性肝炎有关, 后将其命名为输血传播病毒 (Transfusion Transmitted virus, TT Virus 或者 TTV)。TTV 是无包膜的单链闭合环状负链 DNA 病毒, 其基因组约 3.8kb^[2], 与鸡贫血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 和 TTV 相似迷你病毒 (TTV-like mini virus, TLMV) 同属于副环状病毒科 (Paracircoviridae)^[6], 也是在人类中发现的第一个单链环状病毒。虽然在随后的研究中证实在 TTV 感染的人群中, 除了引起转氨

酶升高外, 一般不引起其他临床症状和造成明显的肝损伤, 但是由于 TTV 存在大量的变异^[3,4], 因此其中某种基因型能导致肝炎是完全有可能的^[8], 所以对 TTV 的研究仍然受到国际上的重视。

目前对于 TTV 的研究主要集中在对其变异株的分离, 测序和比较上, 而对于其蛋白质功能的研究却很少。对蛋白质功能研究有利于确定 TTV 的致病性和感染途径。计算机分析 TTV 基因组序列, 发现有两个主要的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF): ORF₁ 和 ORF₂, 推测 ORF₁ 主要编码核衣壳蛋白, 而 ORF₂ 主要编码非结构蛋白^[12]。我

收稿日期: 2004-02-18, 修回日期: 2004-03-19

* 基金项目: 湖北省自然科学基金项目(99J129)

作者简介: 何燕(1979-)女, 重庆市籍, 硕士研究生, 从事医学病毒学研究。

** 通讯作者: 叶林柏(1948-), 男, 广东省籍, 教授, 博士生导师, 从事医学病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 027-68752372, Email: linbaiye@whu.edu.cn

们利用 pEGF-N1 真核表达载体在 Cos7 细胞中表达了 TTV VP2, 并且通过融合表达的绿色荧光蛋白 GFP 探讨了 VP2 在细胞中的分布, 结果表明 VP2 可分布于细胞核中, 推测 VP2 可能参与病毒 DNA 的复制及对细胞内某些基因的表达调控起重要的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Cos7 细胞由本实验室保存, 在含有 10% 的新生牛血清, 100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM (GIBCO) 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养和传代。各种酶由晶美公司出售; DNA 回收试剂盒购自晶美公司, 用于 DNA 片段回收; 质粒提取试剂盒购自上海申能博彩公司; Trizol 购自 Introvigene 公司。含有 TTV ORF2 的质粒 pET-His-TTV₂ (约 4.2kDa) 和真核表达载体 pEGF-N1 由本实验室保存。大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10F' 由本实验室保存。

1.2 TTV ORF₂ 片段的扩增及重组质粒 pEGFP TTV2 的构建

以含有 TTV ORF₂ 的质粒 pET-His-TTV2 为模板, 用 PCR 方法扩增 TTV ORF₂ 基因。上游引物为: 5'-GCGCAAGCTTATGGCTGAGTTTCC-3'; 下游引物为: 5'-GAGGGGATCCATCCATCGTTTCTGCGGC GGC-3'。反应混合物先在 94 $^{\circ}$ C5min 后 94 $^{\circ}$ C1min, 54 $^{\circ}$ C1min, 72 $^{\circ}$ C1.5min 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C8.5min。用 BamH I 和 Hind III 双酶消化 PCR 产物和 pEGFP-N1 质粒, 电泳分离后利用回收试剂盒分别回收, 将回收的两个片段进行连接后转化大肠杆菌 TOP10F', 提取重组质粒。通过 BamH I 单酶切以及 BamH I 和 Hind III 双酶分析鉴定重组质粒 pEGFP TTV2。

1.3 TTV VP2 在 Cos7 细胞中的表达

利用脂质体介导法将重组质粒 pEGFP TTV2 转染 Cos7 细胞 24h 后收集细胞。参照 Trizol RNA Isolation Protocol 提取总 RNA, 用异丙醇沉淀后加入不含 RNase 的 DNase, 37 $^{\circ}$ C 消化 45min 后用酚: 氯仿 (1:1) 抽提, 最后用乙醇沉淀。以提取的 RNA 为模板, 利用一步法进行 RT-PCR。对照组为用载体 pEGFP-N1 转染的 Cos7 细胞。

1.4 TTV VP2 在 Cos7 细胞中的分布

利用脂质体介导法将重组质粒 pEGFP TTV2 转染 Cos7 细胞, 以载体 pEGFP-N1 为对照。转染 24h 后用丙酮和甲醇固定细胞, 并利用 PI 染色技术对细胞核进行染色。在共聚焦显微镜下观察 GFP 的激发光为 489nm, 发射光为 509nm; PI 的激发光为 538nm,

发射光为 617nm。共聚焦显微镜 LEICA TCS PS (Technik, Germany) 观察照相所用的软件是 LEICA TCS NT Version 1.6.587。

2 结果

2.1 TTV ORF 片段的扩增及重组质粒 pEGFP TTV 2 的构建

以 pET-His-TTV₂ 为模板, PCR 扩增 TTV₂ 的 ORF₂ 编码区 DNA 片段, 得到一条约为 600bp 的带, 与预期的结果相符。把这一片段克隆到用 BamH I 和 Hind III 消化后的 pEGF-N1 载体中构建成重组质粒 pEGFP TTV2。重组质粒 pEGFP TTV2 用 BamH I 单酶消化及 BamH I 和 Hind III 双酶消化, 如图 1(封 3 彩版) 所示。BamH I 单酶消化重组质粒 pEGFP TTV2 后得到一条约为 5.3kb 的带, 而用 BamH I 和 Hind III 双酶消化后得到两条带, 其中一条约为 600bp, 是插入的 TTV ORF₂ 片段, 另一条约为 4.7kb, 是载体 DNA, 说明重组质粒构建是正确的。

2.2 TTV VP2 在 Cos7 细胞中的表达

重组质粒 pEGFP TTV2 和空载体 pEGFP-N1 分别转染 Cos7 细胞, 24h 后分别收集细胞提取总 RNA, 作为模板做 RT-PCR。产物经琼脂糖电泳, 结果表明, 在以重组质粒 pEGFP TTV2 转染的细胞的总 RNA 为模板的 RT-PCR 产物中出现一条约为 600bp 的带, 大小与所克隆的 TTV ORF₂ 编码区的大小相同。以 pEGFP-N1 转染的细胞的总 RNA 为模板的 RT-PCR 对照中却没有约 600bp 的 RT-PCR 的产物出现, 如图 2(封 3 彩版) 所示。说明用重组质粒 pEGFP TTV2 转染的细胞中已经有了 TTV ORF₂ 基因的转录产物。

2.3 TTV VP2 在 Cos7 细胞中的分布

转染了重组质粒 pEGFP TTV2 的 Cos7 细胞与转染空质粒 pEGFP-N1 阴性对照组细胞 PI 染色后分别于共聚焦显微镜下观察。结果如图 3(封 3 彩版) 所示, 实验组细胞中表达出 GFP-VP2 的融合蛋白, 除在细胞质中存在外, 在细胞核内局部有明显的黄绿色荧光产生, 这是由于 GFP 的绿色光与经 PI 染色后产生的红色光叠加所致, 表明 GFP-VP2 融合蛋白进入了细胞核内。这一现象在进一步放大的图 3B 中更为清楚。GFP-VP2 融合蛋白在核中并非均匀分散地分布, 而是集中在核膜内侧, 也不分布在核仁中, 说明 VP2 可能与病毒的 DNA 复制或转录有关。而对照组细胞只表达 GFP 蛋白, GFP 基本上分布在细胞质中, 而不进入细胞核中且在细胞核中呈均匀分布状态, 如图 3C 所示。

3 讨论

TTV 的感染普遍存在于人群中, 虽然目前没有充分的证据证明 TTV 感染可以明显引起肝细胞病变, 但是 TTV 的感染能使病人的 ALT 显著升高, 其某些变异株可能引起急性肝炎的发生, 有的甚至可能是导致血友病人隐匿性肝衰竭的原因^[5], 因此对 TTV 作用机理和致病性的研究很有必要的。目前对于 TTV 的研究主要集中于对其变异株的分离, 测序及序列比较, 对于其蛋白质功能的研究却很少。对病毒蛋白质功能的研究对了解病毒致病机理是必不可少的。

在本研究中, 我们把 TTV 非结构蛋白 ORF₂ 的编码区与 GFP 融合, 成功地在 Cos7 细胞中表达出融合蛋白, 并且用共聚焦显微镜研究该蛋白在细胞内的分布, 结合 PI 染色技术使细胞核显示出红色荧光。这样就能清楚的区分出细胞质, 核膜, 核质和核仁, 以保证定位的准确。我们发现, GFP-VP2 融合蛋白除分布在细胞质外, 也分布在核中, 主要集中在核膜内侧, 而且在核膜内侧的局部荧光远超过在细胞质中的强度。而对照的只表达 GFP 的细胞中绝无此现象, GFP 基本均匀地分布在细胞质中。

根据 Garcia-Bustos 等人总结出来的核蛋白定位的基本原则^[10]: 分子量在 40kDa~60kDa 以下的蛋白质除了可以通过核孔被动扩散进入细胞核外, 还可以通过主动运输进入细胞核内, 超过一定限度的蛋白质则需要核定位序列 (Nuclear Localization Signals, NLS) 存在的情况下, 通过核孔复合体 (Nuclear Pore Complex, NPC) 才能进入核内。被动扩散进入细胞核内的蛋白在细胞核内均匀分布, 并且在细胞核内的浓度远远低于在细胞质内的浓度。而主动运输到细胞核内的蛋白根据其功能的不同, 蛋白质会运输到细胞核内不同的位置, 分布相对集中, 且局部浓度高于细胞质内的浓度。我们所表达的融合蛋白小于 60kDa, 在细胞核内非均匀分布, 局部浓度远大于细胞质内的浓度, 说明 GFP-VP2 进入细胞核内是一个主动运输的过程。只表达 GFP 的细胞内可以看见, GFP 基本上只均匀分布在细胞中。此外, 在分析 VP2 的氨基酸序列时, 我们发现与 NLS 相似的序列 RKKR, 我们怀疑 VP2 中也存在 NLS, 与 VP2 的核定位有关, 这需要通过氨基酸替换或者缺失突变研究才能验证。

TTV 是一种单链负链 DNA 病毒, 在核内进行转录和复制。核膜往往是病毒 DNA 结合部位, 并且在此进行转录和复制。ORF₂ 编码的 VP2 除在细胞质里

外, 集中分布在核膜内侧, 因此根据我们的研究结果分析, 非结构蛋白 VP2 可能参与病毒 DNA 的转录与复制。在比较 TTV 各个变异株中 VP2 的氨基酸序列时发现, 虽然 ORF₂ 的变异性很大, 但是在现有的 VP2 的氨基酸序列中都存在一段保守的氨基酸序列 WX₇HX₃CXCX₅H, 并且这段保守序列同样存在于与 TTV 同属于副环状病毒科的 CAV 和 TLMV 的 VP2 中^[9]。有研究表明^[11], CAV 和 TLMV 的 VP2 具有酪氨酸磷酸酯酶 (protein-tyrosine phosphatase, PTPase) 活性。一般而言, 蛋白质去磷酸化酶的主要功能为有丝分裂的调控, 基因转录, 信号传导, 细胞间的相互作用, 以及细胞分化等等。但是对于病毒 DNA 分子量较小的 CAV, TLMV 而言, 其复制高度依赖宿主细胞来完成。与细胞调控作用相比较, VP2 在病毒复制中所起的作用可能更为重要。根据分析比较, 我们推测 TTV 的 VP2 可能也具有 PTPase 的活性, 并且该蛋白在 TTV 的病毒复制中起着极其重要的作用。

综上所述, 我们认为 TTV 的 ORF₂ 编码的 VP2 蛋白除在细胞质中外, 也分布于细胞核内, 并集中于细胞核膜内侧, 它的功能可能是参与病毒 DNA 的复制和转录。

参考文献

- [1] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, *et al.* A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241: 92-97.
- [2] Mushahwar I K, Erker J C, Muerhoff A S, *et al.* Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3177-3182.
- [3] Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, *et al.* New genotypes of TT virus (TTV) and a genotype assay based on restriction fragment length polymorphism [J]. *FEBS Lett*, 1998, 437: 201-206
- [4] Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF₂ sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes [J]. *Virology*, 1999, 260: 17-22
- [5] Takayama S, Miura T, Mastuo S, *et al.* Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs [J]. *Br J Haematol*, 1999, 104(3): 626-629.
- [6] Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, *et al.* Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus [J]. *Arch Virol*, 2000,

- 145: 979-993.
- [7] Toshio K, Shigeo H, Hironori M. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in cos1 cells [J]. *J Virol*, 2000: 9980-9986.
- [8] Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, *et al.* Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions [J]. *Virology*, 1999, 259: 428-436.
- [9] Thom K, Morrison C, Lewis JCM, *et al.* Distribution of TT virus (TTV) TTV-like mini virus, and related viruses in humans and nonhuman primates [J]. *Virology*, 2003, 306(2):324-333
- [10] Garcia B J, Heitman J, Hall MN. Nuclear protein localization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1071: 83 - 101.
- [11] Michelle A. Peters, David C. Jackson, Brendan S. Crabb, *et al.* Chicken Anemia Virus VP2 Is a Novel Dual Specificity Protein Phosphatase [J]. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(42): 39566-39573
- [12] 刘媛媛, 王艳洁, 牛俊奇. TTV 研究现状[J]. *中国实验诊断学*, 2001, 5(3): 102-103.

欢迎订阅《微生物学报》

《微生物学报》(双月刊)创刊于 1953 年,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊。主要报道普通微生物学,工业、农业、医学和兽医微生物学,免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。

自 2004 年本刊已经全新改版,更换了彩色封面,由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297),2005 年的页面再次扩增至 160 页,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2005 年的每册定价为 30 元,全年 180 元,我们将按期免费邮寄。

另,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可直接与编辑部联系,款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: 100080 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内《微生物学报》编辑部

Tel: (010) 62630422; E-mail: actamicro@sun.im.ac.cn; Http://www.im.ac.cn/journals

国内邮发代号: 2-504; 国外发行代号: BM67

彩 版

何 燕, 等. TT Virus ORF2在Cos7细胞中的表达及蛋白质定位 (正文见431页)

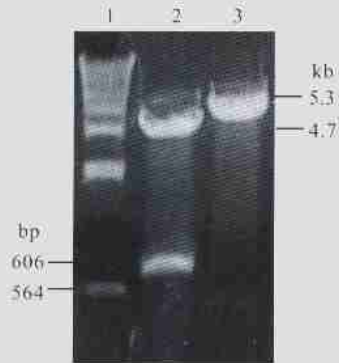


图1 重组质粒pEGFP/TTV2酶切鉴定

Fig.1 Analysis of the recombinants-pEGFP/TTV2

1, λ DNA/*Hind* III Marker; 2, pEGFP/TTV2/*Bam*H I+*Hind* III; 3, pEGFP/TTV2/*Bam*H I.

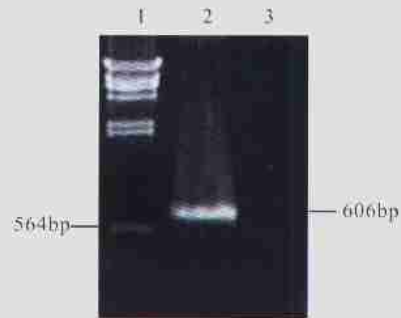


图2 转染细胞内TTVV ORF2转录产物的RT-PCR分析

Fig.2 Analysis of RT-PCR products of pEGFP/TTV2 transfected cell total RNA.

1, λ DNA/*Hind* III Marker; 2, RT-PCR products of pEGFP/TTV2 transfected cell total RNA; 3, RT-PCR of control cell total RNA.



图3 GFP-VP2在Cos7细胞中的分布

Fig.3 Distribution of GFP-VP2 in Cos7 cells

A, Distribution of GFP-VP2 in Cos7 cells; B, Distribution of GFP-VP2 in Cos7 cells; C, Control cells.