

人多瘤病毒 BK 株 VP1 的 C 端阳电荷残基对 病毒样颗粒形成的影响

柯昌文^{1**}, 李天成², 武田直和²

(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东广州, 510300; 2. 日本国立感染症研究所, 日本东京, 208-0011)

Positively Charged Amino Acid Residues of VP1 Capsid Protein of Human Polyomavirus BK Influence on the Formation of Virus-like Particles Generated by Recombinant Baculoviruses

KE Chang-wen^{1**}, LI Tian-cheng², Naokazu takeda²

(1. Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China; 2. National Institute for Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan)

Abstract : VP1 is the major structural protein of the human polyomavirus BK and can be used for the generation of virus-like particles (VLP) *in vitro* by using recombinant baculoviruses. To determine the role of positively charged residues R-281, R-285, K-288, R-290, R-292, K-293, R-294, and K297 at the C terminal of VP1 in VLP formation and DNA binding, we separately changed the residue to alanine, and expressed VP1 protein. The results showed that substitution of K-288, R-290, R-292, K-293, R-294, and K297 with alanine can still form VLP, but compared with wild type there were some differences in releasing VLP into culture medium and binding between major capsid proteins and cellular DNA. Interestingly, after substituting R-281 and R-285 with alanine, a few VLP in cell but no VLP were detected respectively. This study provides evidence that positively charged residues R-281 and R-285 are necessary to form VLP and the others can influence the binding between major capsid proteins and cellular DNA.

Key words : Polyomavirus BK strain; Virus-like particle; Arginine residue; Baculovirus expression

摘要 : VP1 是人多瘤病毒 BK 株的主要结构蛋白, 使用重组杆状病毒表达系统在体外表达 VP1 可以形成病毒样颗粒 (VLP)。为了探讨 VP1 的 C 末端阳电荷残基 R-281, R-285, K-288, R-290, R-292, K-293, R-294, 和 K297 对 VLP 形成和其结合 DNA 的影响, 我们分别改变将阳电荷残基变成丙氨酸, 然后表达 VP1 蛋白。结果发现用丙氨酸替代 K-288, R-290, R-292, K-293, R-294 后仍能形成 VLP, 但与野病毒株相比, 在 VLP 分泌以及衣壳蛋白与细胞 DNA 的结合方面有差异。有趣的是, R-281 被丙氨酸取代后仅在细胞中形成少量的 VLP, 而 R-285 被丙氨酸取代后不能形成 VLP。该研究证实阳电荷氨基酸残基 R-281 和 R-285 是形成 VLP 所必须的, K-288, R-290, R-292, K-293, R-294 和 K-297 则影响 VLP 和 DNA 的结合。

关键词 : 人多瘤病毒 BK 株; 病毒样颗粒; 杆状病毒表达; 精氨酸

中图分类号: R 373 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0020-04

人多瘤病毒 BK 株 (以下称 BK) 是一种无包膜^[1-4]。多瘤病毒衣壳蛋白包括 VP1, VP2 and 的双股 DNA 病毒, 基因组呈环状, 大小约有 5 000bp VP3。VP1 分子量为 42kDa, 是病毒衣壳的外部组成

收稿日期: 2004-08-19, 修回日期: 2004-09-27

** 通讯作者: 柯昌文 (1965-), 男, 河南泌阳籍, 副主任技师, 主要从事肠道病毒的分子生物学和病毒基因的表达。
Corresponding author. Tel: 020-84457751, E-mail: kecw1965@yahoo.com.cn

成分,在病毒与敏感细胞的吸附过程中起重要作用。猴多瘤病毒(SV40)和鼠多瘤病毒的 X-线结晶学研究发现多瘤病毒衣壳由 72 个五聚体组成,形成 T=7 的二十面体晶格。每个 5 聚体由五个 VP1 和少量衣壳蛋白 VP2 和/或 VP3 组成,VP1 和 VP2 从核心扩展到 VP1 五聚体的空穴内^[5,6]。

研究发现,SV40、人多瘤病毒 JC 株(以下称 JC)、鼠多瘤病毒、猴嗜 B 淋巴细胞乳多空病毒和人多瘤病毒 BK 能在杆状病毒表达系统表达形成病毒样颗粒(VLP)^[7~11]。而且,自行装配的 BK VLP 可分泌到细胞培养液中。用 CsCl 密度梯度离心 VLP 可形成 4 条带。在下方的两条带中主要是直径为 50nm 的颗粒,并有 DNA 结合活性。在上方的两条带中含有直径分别为 26nm 和 50nm 的中空颗粒,也有 DNA 结合活性^[11]。使用乳头瘤和多瘤病毒 VLP 作为基因转移的载体的研究最近也有报道^[12~15]。序列分析发现 BK VP1 的 C 末端有一个阳电荷氨基酸区,主要是赖氨酸和精氨酸。精氨酸的胍基通常是磷酸盐或羧基的结合点,主要通过氢键结合。赖氨酸有一条可变的侧臂,在中性溶液中有一个具潜在反应性的氨基集团及和质子化的侧链。

本研究的目的是制备 BK 病毒的 VP1 阳电荷残基突变体,研究突变体在昆虫细胞中的表达和 VLP 的形成情况。阳电荷残基替代对 VLP 形成及其 DNA 结合活性的影响。

1 材料和方法

1.1 质粒 plasmid pVLVP1 突变体的构建

以含有 BK 结构蛋白基因 VP1 的重组质粒 pVLVP1 为模板使用表 1 中的引物进行重叠扩展 PCR(overlap extension PCR)以制备 pVLVP1 的突变体^[16],产生突变的正向引物和反向引物互补。例如,为了构建 281R/A 突变,分别使用引物 D1 和 U281,以及引物 D281 和 U1 扩增 850bp 和 250bp 的 PCR 产物。PCR 产物使用 PCR 纯化试剂盒(QIA GEN QIAquick)进行纯化,然后混合作为模板,使用引物 D1 和 U1 进行第二轮 PCR。大小为 1089bp 的 PCR 产物用酚-氯仿法进行纯化,然后克隆到质粒载体 pCR2.1。正向引物 D1 中,在启动子前含有 BamHI 酶切位点;反向引物 U1 中,在终止密码子后有一 NotI 的酶切位点。质粒 pCR2.1 先用内切酶 NotI 充分消化,然后用内切酶 BamHI 进行部分消化。将纯化的酶切片段连接到传递载体 pVL1393 以制备 281R/A 突变体的质粒 pVLVP1。

所有的突变都经过 DNA 序列分析证实。

表 1 构建突变体使用的 PCR 引物

Tab. 1 PCR primes used for construction of mutants		
Mutant	Primer	Sequence
281R/A	D281	5'-ACA CAA CAG TGG GCA GGC CTT GC-3'
	U281	5'-TGC AAG GCC TGC CCA CTG TTG TG-3'
285R/A	D285	5'-AGA GGC CTT GCA GCA TAT TTT AA-3'
	U285	5'-CTT AAA ATA TGC TGC AAG GCC TC-3'
288K/A	D288	5'-GCA AGA TAT TTT GCG ATC CGC CT-3';
	U288	5'-CAG GCG GAT CGC AAA ATA TCT TG-3'
290R/A0	D290	5'-TAT TTT AAG ATC GCC CTG AGA AA-3'
	U290	5'-TTT TCT CAG GGC GAT CTT AAA AT-3'
292R/A	D292	5'-AAG ATC CGC CTG GCA AAA AGA TC-3'
	U292	5'-AGA TCT TTT TGC CAG GCG GAT CT-3'
293K/A	D293	5'-ATC CGC CTG AGA GCA AGA TCT GT-3'
	U293	5'-ACA GAT CTT GCT CTC AGG CGG AG-3'
294R/A	D294	5'-CGC CTG AGA AAA GCA TCT GTA AA-3'
	U294	5'-CTT TAC AGA TGC TTT TCT CAG GC-3'
297K/A	D297	5'-AGA AAA AGA TCT GTA GCG AAT GG-3'
	U297	5'-AGG ATT CGC TAC AGA TCT TTT TC-3'
	D1	5'_TGGATCCA TGGCCCAACCAAAA GAAAA GG-3'
	U1	5'_TAGCGCCCTTAAAGCAATTTGGTTTGAATTGC-3'

1.2 含有点突变衣壳蛋白 VP1 的重组杆状病毒的构建及 VP1 的表达

Autographa californica 多角体病毒线性 DNA (Pharming Baculo Gold 21100D) 和突变体质粒按制造商(GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)提供的说明书用脂介导法共感染 Sf9 细胞(Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan)^[17]。培养细胞使用含 8% 胎牛血清和 0.26% bactotryptose phosphate broth (Difco Laboratories, Detroit, MI)的 TC-100 培养液(GIBCO-BRL),在 26.5℃ 孵育。作大量表达时,使用源于昆虫 *Trichoplusia ni* 的细胞系 B TL-Tn 5B1-4 (Tn5) (Invitrogen, San Diego, CA)。Tn5 细胞先用重组杆状病毒感染,然后在 26.5℃ 培养 7d。培养基用 EX-CELL 405 (JRH Biosciences, Lenexa, KS)。

1.3 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

细胞裂解液和培养液中的蛋白质用 SDS-PAGE 分离,用 Coomassie 亮蓝染色。为了作 Western blot 分析,胶中的蛋白质首先被电转移到硝酸纤维素膜上,纤维膜用含 5% skim milk 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 封闭,150 mmol/L NaCl 与人血清反应,人 IgG 抗体使用碱性磷酸酶标记的羊抗人免疫球蛋白检测(1◇3000,稀释)(Dako A/S, Copenhagen, Denmark)。显色剂(Bio-Rad Laboratories)显色。

1.4 VLP 的纯化

培养 7d 后收获培养液,经 10 000 r/m 离心 90 min 将完整细胞、细胞碎片和杆状病毒颗粒除去,上

清液用 Beckman SW28 转子 25 000 r/m 离心 2h。沉淀片用 4.5 mL EX-CELL 405 悬浮,4℃ 过夜。加入 1.95g CsCl,溶解后混匀,混合液用 Beckman SW55Ti 转子在 35 000 r/m 4℃ 离心 24h。收集每条带,最后将收集的各条带用 EX-CELL 405 稀释,然后 45 000 r/m 离心 2h 除去 CsCl。

2 结果

2.1 重叠扩展 PCR法构建主要衣壳蛋白基因突变体

共构建了八个氨基酸的突变体,并分别将八个突变体克隆到表达载体 pVL1393,其氨基酸序列如下:

- 野毒株 BK: RGLARYFKIRLRKRSVKNPY
- 281R/A 突变: AGLARYFKIRLRKRSVKNPY
- 285R/A 突变: RGLAA YFKIRLRKRSVKNPY
- 288K/A 突变: RGLARYFAIRLRKRSVKNPY
- 290R/A 突变: RGLARYFKIALRKRSVKNPY
- 292R/A 突变: RGLARYFKIRLA KRSVKNPY
- 293K/A 突变: RGLARYFKIRLRARSVKNPY
- 294R/A 突变: RGLARYFKIRLRKASVKNPY
- 297K/A 突变: RGLARYFKIRLRKRSVANPY

2.2 突变体主要衣壳蛋白在昆虫细胞的表达

突变质粒 pVLVP1 与杆状病毒 DNA 进行同源重组,重组杆状病毒感染 Tn5 细胞,3d 后开始出现 CPE,重组杆状病毒高效表达 BK 突变体主要衣壳蛋白 VP1,感染 Tn5 细胞 3d 后可检测到分子量为 42 kDa 的主要蛋白(图 1)。感染后 3d 细胞裂解液中细胞中 VP1 蛋白表达达到高峰,但在培养液中检测不到 VP1 蛋白。所有突变体具有相似的表达模式。

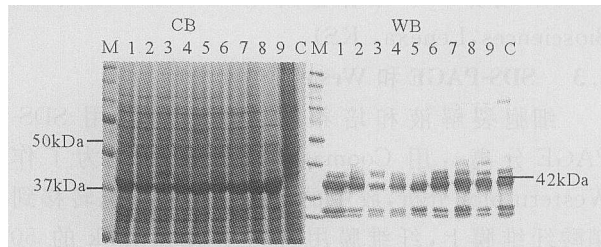


图 1 BK VP1 突变体在感染细胞 3d 后的表达情况

Fig.1 Protein expression of BK VP1 at day 3 post infection Protein bands were visualized by Coomassie brilliant blue (CB) staining or by Western Blot (WB) assay with anti-BK human serum. The results of CB (left) and WB (right) were shown separately. M, molecular weight marker; lanes 1-9, 281R/A, 285R/A, 288K/A, 290R/A, 292R/A, 293K/A, 294R/A, 297K/A and wild type BK, respectively; C, cell control.

2.3 用丙氨酸代替赖氨酸和精氨酸对 VLP 形成的影响

用重组了突变体基因的杆状病毒感染 Tn5 细胞,感染后第 7d 收获细胞培养液。先 10 000r/m 离心 90min;取上清液,然后 28 000 r/m 离心浓缩 VLP。在 285R/A 突变体的细胞培养上清液和细胞裂解液中经 SDS-PAGE 电泳没有检测到 VLP。在 281R/A 突变体的细胞培养上清液没有检测到 VLP,细胞裂解液中有极少量的 VLP。288K/A 突变体的细胞培养上清液有大量的 VLP,但细胞裂解液中只有极少量的 VLP。其它突变体 VLP 的表达和在上清液和细胞裂解液中的分布与野毒株类似(图 2)。突变体 288K/A, 290R/A, 292R/A, 293K/A, 294R/A, 297K/A 和野毒株病毒 VP1 的浓缩 VLP 经 CsCl 密度梯度离心,得到了不同浮密度的 VLP(表 2)。突变体 281R/K and 285R/K 的 VP1 在 Tn5 细胞中有表达,但氨基酸替代影响 VLP 的形成。蛋白表达的时间进程表明到第 7 天表达的蛋白几乎检测不到(图 3)。

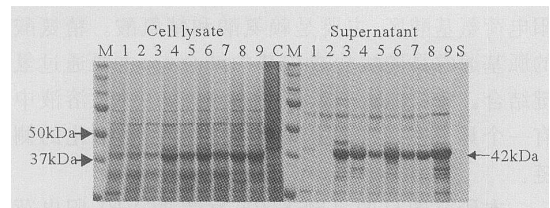


图 2 感染后第 7 天 BK VP1 突变体 VLP 的形成情况
Fig.2 Formation of VLP of BK VP1 mutants at day 7 post infection

The cell lysates (left) and culture medium (right) were analyzed separately. M; molecular weight marker; lane 1 to 9; 281R/A, 285R/A, 288K/A, 290R/A, 292R/A, 293K/A, 294R/A, 297K/A and wild type BK, respectively; C, Cell control; S, Supernatant control.

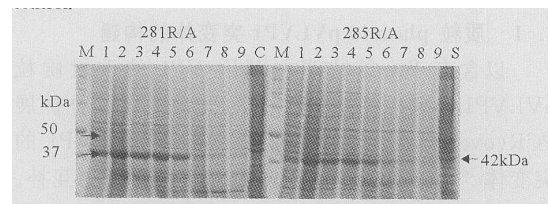


图 3 突变体 281R/A 和 285R/A 的 VP1 蛋白表达的时间进程
Fig.3 Time course of protein expression of BK VP1 mutants 281R/A and 285R/A

The cell lysates of 281R/A (left) and 285R/A (right) were analyzed separately. M, molecular weight marker; lane 1 to 8 day 2-9; C, cell control.

表 2 CsCl 密度梯度离心显示 VLP 的浮密度的差异
Tab.2 Difference of buoyant density between VLP analyzed by CsCl gradient density centrifugation

Buoyant density	Wild type	281R/A	285R/A	288K/A	290R/A	292R/A	293K/A	294R/A	297K/A
1.29g/cm ³	+	-	-	+	+	+	+	+	+
1.30g/cm ³	+	-	-	+	+	+	+	+	+
1.33g/cm ³	+	-	-	-	-	-	-	+	-
1.35g/cm ³	+	-	-	-	-	-	-	+	-

3 讨论

本研究构建了BK主要衣壳蛋白VP1的C末端阳电荷残基R-281, R-285, K-288, R-290, R-292, K-293, R-294, and K297的突变体,所有突变体VP1蛋白在Tn5细胞中都有表达,而且与野病毒的表达基本相同(图1)。有趣的是阳电荷残基R-281和R-285丙氨酸替代后显著影响VLP的形成。281R/A突变不能有效地形成VLP,细胞内可形成少量的VLP,而没有VLP分泌到培养液。285R/A突变几乎不能形成VLP。蛋白表达的时间进程分析表明,281R/A和285R/A突变后VP1在Tn5细胞表达的蛋白不稳定,不能形成VLP。用丙氨酸替代VP1的K-288, R-290, R-292, K-293, R-294,和K-297后,经Tn5细胞表达后仍能形成VLP(图2),但是,与野病毒相比仍有一些差异。288K/A突变体形成的VLP主要释放到培养液中,细胞内几乎检测不到(图2)。不同突变体和野病毒的VLP经CsCl密度梯度离心后浮密度之间有差异(表2)。野病毒VP1在昆虫细胞表达后形成的VLP经CsCl密度梯度离心分成4个密度带,密度约为 $1.29\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.30\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.33\text{g}/\text{cm}^3$ 和 $1.35\text{g}/\text{cm}^3$ 。处于下层的2条VLP带分别带有单一长度和3种不同长度的细胞DNA片段^[11]。本研究中,我们发现突变体288K/A、290R/A、292R/A、293K/A、297K/A主要形成2条带,只有突变体294R/A形成4条带。用丙氨酸替代阳电荷残基可能影响VP1蛋白和细胞DNA的结合。结果表明阳电荷残基R-281和R-285是BKVP1在杆状病毒表达体系表达时装配成VLP所必须的,而阳电荷残基K-288, R-290, R-292, K-293和K-297与表达蛋白VP1和细胞的DNA结合有关。

参考文献

[1] Dhar R, Lai C J, Khoury G. Nucleotide sequence of the DNA replication origin for human papovavirus BK: sequence and structural homology with SV40[J]. Cell, 1978, 13:345-358.

[2] Dhar R, Seif I, Khoury G. Nucleotide sequence of the BK virus DNA segment encoding small t antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76:565-569.

[3] Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BK[J]. Cell, 1979, 18: 963-977.

[4] Yang R C, Wu R. BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus[J]. Science, 1979, 206:456-462.

[5] Liddington R C, Yan Y, Moulai J, et al. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution[J]. Nature, 1991, 354:278-284.

[6] Griffith J P, Griffith D L, Rayment I, et al. Inside polyomavirus at 25 Å resolution[J]. Nature, 1992, 355: 652-654.

[7] Schiller J T, Roden R B. Papillomavirus-like particles[J]. Papillomavirus Report, 1995, 6:121-128.

[8] Stokrova J, Palkova Z, Fischer L, et al. Interactions of heterologous DNA with polyomavirus major structural protein, VP1[J]. FEBS Letters, 1999, 445:119-125.

[9] Gillock E T, Rottinghaus S, Chang D, et al. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system[J]. J Virol, 1997, 71: 2857-2865.

[10] Pawlita M, Muller M, Oppenlander M, et al. DNA encapsidation by virus-like particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus[J]. J Virol, 1996, 70:7517-7526.

[11] Li T C, Takeda N, Kato K, et al. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses[J]. Virology, 2003, 311:115-124.

[12] Forstova J, Krauzewicz N, Sandig V, et al. Polyomavirus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammal/Lol/Lalian cells[J]. Human Gene Therapy, 1995, 6:297-306.

[13] Roden R B S, Greenstone H L, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type specific neutralization of a human type 16 virion pseudotype[J]. J Virol, 1996, 70: 5875-5883.

[14] Unckell F, Streeck R E, Sapp M. Generation of pseudovirions of human papillomavirus type 33[J]. J Virol, 1997, 71: 2934-2939.

[15] Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret P Y, et al. The L1 major capsid protein of HPV-16 variants affects the yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36:2046-2051.

[16] Fritsch E, Temin H M. Formation and structure of infectious DNA of spleen necrosis virus[J]. J Virol, 1977, 21:119-130.

[17] Stewart L M D, Possee R D. Baculovirus expression vectors, in: Davison, A. J., Elliotts, R. M. (Eds.), Molecular Virology: A Practical Approach[M]. Oxford, IRL Press, 1993. 227-256.