

伪狂犬病毒 VP22 蛋白 C-端系列缺失突变体的构建 及亚细胞定位分析*

姚琳, 方六荣**, 肖少波, 潘永飞, 谢京国, 陈焕春

(华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070)

Construction of a Series of C-terminal Truncation Mutants of Pseudorabies Virus VP22 and Their Subcellular Localization

YAO Lin, FANG Liu-rong**, XIAO Shao-bo, PAN Yong-fei, XIE Jing-guo, CHEN Huan-chun
(Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To study the specific subcellular localization of different regions of *Pseudorabies virus* (PrV) VP22, a series of mutants with the C-terminal truncations were amplified from a plasmid containing the full-length VP22 gene of the Ea strain. The resulting truncation constructs were fused to ORF encoding the green fluorescent protein (GFP) to generate eukaryotic expression plasmids expressing VP22 mutants and GFP fusion proteins. HeLa cells were transiently transfected with these fusion expression plasmids. By detecting the GFP fluorescence localization, several potential regions of PrV VP22 for specific subcellular localization were determined as follows: 60-90 amino acids (aa) of VP22 are required for nuclear targeting; 111-159 aa may be involved with the formation of particles in the nucleus; 187-241 aa are needed for binding to microtubules. These results lay foundation for further study on the structure and function of PrV VP22.

Key words: Pseudorabies virus; VP22; Deletion mutants; Subcellular localization

摘要: 以绿荧光蛋白(GFP)为标记, 构建了一系列伪狂犬病毒 VP22 蛋白的 C-端缺失突变体与 GFP 融合表达的真核表达质粒, 脂质体介导转染 HeLa 细胞, 通过荧光显微镜观察分析各个缺失突变体的亚细胞定位, 发现伪狂犬病毒 VP22 蛋白与核定位有关的结构域在第 60 个到第 90 个氨基酸残基之间, 第 111 个到第 159 个氨基酸残基有可能与形成细胞核内的颗粒有关, 与微管蛋白结合有关的结构域可能在第 187 到第 241 个氨基酸残基之间。上述研究结果为进一步深入研究伪狂犬病毒 VP22 蛋白的结构与功能奠定了基础。

关键词: 伪狂犬病毒; VP22; 缺失突变体; 亚细胞定位

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0358-06

伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PrV)的 VP22 蛋白是由 UL49 基因编码的一种间质蛋白, 是病毒囊膜与核衣壳之间的主要成分^[1, 2], 在体内以磷酸化与非磷酸化两种形式存在^[3]。由于 PrV VP22 (PVP22)被发现的时间较短, 对其研究尚不够深入, 在病毒的感染、复制过程中的作用目前尚不明

确, 但根据其它 α -疱疹病毒亚科成员, 如人单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1)、牛疱疹病毒 1 型 (BHV-1) 和马立克氏病毒 (MDV) 的 VP22 的功能, 推测 PrV VP22 可能与病毒的感染、增殖以及成熟有关^[4]。本实验室早期克隆了伪狂犬病毒国内地方分离株 Ea 株的 UL49 基因, 通过绿荧光蛋白标记的方法发现

收稿日期: 2005-12-16, 修回日期: 2006-02-27

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (30400322); 霍英东青年教师基金 (91029)

作者简介: 姚琳 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为病毒分子生物学。

** 通讯作者. Corresponding author. E-mail: fanglr@mail.hzau.edu.cn

伪狂犬病毒 VP22 (PVP22) 在转染的真核细胞呈多种定位模式, 并可能与细胞核、核仁、微管蛋白相结合^[5, 6]。为了确定 PVP22 不同区域在亚细胞定位中的作用, 本研究进一步构建了 PVP22 一系列 C-端缺失突变体, 并以绿荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 为标记, 通过体外转染和直接的荧光显微镜观察, 分析了 PVP22 不同区域对亚细胞定位的影响, 为进一步深入研究伪狂犬病毒 VP22 蛋白的结构与功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞与试剂

质粒 pcPEGFP, 含有修饰的增强型绿荧光蛋白基因 (*mut4EGFP*) 与完整的伪狂犬病毒 VP22 编码序列的融合基因 (PVP22-*mut4EGFP*), 由本室肖少波博士构建并提供^[6]; HeLa 细胞, 来源于中国(武汉)典型物培养中心; 各种工具酶均购自宝生物(大连)公司; 脂质体转染试剂盒 Lipfectamin 2000 购自 Invitrogen 公司, DNA 快速回收试剂盒购自上海生物工程公司。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据 *mut4EGFP* 基因的序列, 设计可扩增完整 *mut4EGFP* 基因片段的引物 Pegfp1 和 Pegfp2, 上下游引物两端分别设计 *Bam*H I 和 *Bgl* II 位点。根据伪狂犬病毒 Ea 株 VP22 基因的序列 (GenBank AY190527) 设计可扩增 PVP22 C-末端不同区域缺失的突变体的引物, 所有 C-末端不同区域缺失的突变体的扩增均以 pVP22s 为上游引物。为便于克隆, 分别在上下引物两端设计 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点。引物 pmutBs 和 pmutBr 可扩增 PVP22C-末端 149-247 位氨基酸 (AA)。各引物序列如下:

Pegfp1: 5'-GGATCCTCCACCATGGTGAGCAAGG GC-3'

Pegfp2: 5'-AGATCTGCTTTACTTGACAGCTCG-3'

pVP22s: 5'-CTCAAGCTTGCCATGTCCAGCTCG AGAAAG

pmut1(1-30AA): 5'-TTTGGATCCGCCCCGGGCGC GAGAGGCGCT -3'

pmut2(1-60AA): 5'-TTTGGATCCGTCGTAGGACG GGGCAGACCG -3'

pmut3(1-90AA): 5'-TTTGGATCCCGAGGCCCGCG AGGCGGCCGC -3'

pmut4(1-111AA): 5'-TTTGGATCCCGAGGCCGAG CGGGCGGTCTTG-3'

pmut5(1-159AA): 5'-TTTGGATCCCTCGCACGGC

CTGTCGCTGAAGG -3'

pmut6(1-187AA): 5'-TTTGGATCCGTGGGCCTCG GCCACGCG -3'

pmut7(1-241AA): 5'-TTTGGATCCCCGCCCCGGG GTGCTCTCGTC -3'

pmutBs: 5'-TTTAGATCTATGCGCCGGCTCGCCTT CAGC-3'

pmutBr: 5'-CTCGGATCCTTTATACTTTTCCCTT C-3'

mut4EGFP 的扩增以质粒 pcPEGFP 为模板, 反应条件为: 95°C 5min 变性后进入循环, 循环参数为: 95°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 35 个循环后 72°C 延伸 10min。

VP22 及其 C-端缺失突变体的扩增也以质粒 pcPEGFP 为模板, 反应条件为: 95°C 5min 变性后进入循环, 循环参数为: 95°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min, 35 个循环后 72°C 延伸 10min。

1.3 表达 *mut4EGFP* 的真核表达质粒 pcEGFP 的构建

以 Pegfp1 和 Pegfp2 为引物, pcPEGFP 为模板, PCR 扩增 *mut4EGFP* 基因, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收后, 用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切, 插入 pcDNA3.1 (+) 的 *Bam*H I 位点。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落少量提取质粒进行酶切鉴定, 重组质粒命名为 pcEGFP。

1.4 PVP22 C-端缺失突变体的构建

以 pcPEGFP 为模板, pVP22s 为上游引物, pmut1-pmut7 为下游引物, 分别扩增 PVP22 C-末端不同区域缺失的突变体的 7 个突变体, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收后, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 定向插入 pcDNA3.1 (+) 的 *Bam*H I 与 *Hind* III 位点。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落少量提取质粒进行酶切鉴定。各突变体按照由小到大的顺序依次命名为 Pmut1、Pmut2、Pmut3、Pmut4、Pmut5、Pmut6、Pmut7。

1.5 质粒的大量制备与纯化

采用碱裂解法进行质粒的大量制备, 并用 13% PEG8000 纯化, 以获得超螺旋构象的质粒, 具体实验步骤参见文献^[7]。

1.6 转染与荧光观察

HeLa 细胞以 3×10^4 /孔接种 24 孔板, 待细胞长至 60%~80% 时, 取 0.5 μ g 纯化的质粒, 按照脂质体转染试剂盒 Lipfectamine 2000 的说明书所提供的方法转染 HeLa 细胞, 转染 48h 后在倒置荧光显微镜 (Olympus IX70) 下观察表达蛋白的亚细胞定位。

2 结果

2.1 表达 *mut4EGFP* 的真核表达质粒 *pcEGFP* 的构建及鉴定

PCR 扩增 *mut4EGFP* 基因, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后可观察到 0.75kb 左右大小清晰的特异性条带, 与预计的 DNA 片段大小相符 (图略)。进一步将纯化的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切, 克隆到 *pcDNA3.1 (+)* 的 *Bam*H I 位点, 获得重组质粒 *pcEGFP*, 酶切鉴定证实构建正确 (图 1)。序列测定也证实 PCR 过程中没有碱基误配。

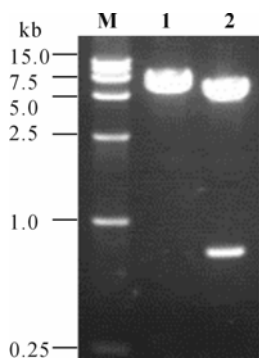


图 1 重组质粒 *pcEGFP* 的酶切鉴定

Fig.1 Identification of the recombinant expression plasmid *pcEGFP* by restriction analysis
M,DNA marker (DL15000); 1,*pcEGFP/Bam*H I; 2,*pcEGFP/Bam*H I+*Hind* III.

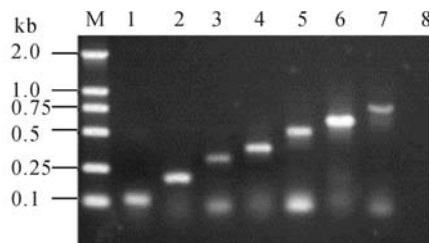


图 2 PVP22 突变体的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of PVP22 mutants
M, DNA marker; 1,PVP22 mut1; 2,PVP22 mut2; 3,PVP22 mut3; 4,PVP22 mut4; 5,PVP22 mut5; 6,PVP22 mut6; 7,PVP22 mut7; 8,Negative control.

2.2 PVP22 C-端缺失突变体的构建及鉴定

PCR 扩增 PVP22 C-末端不同区域缺失的 7 个突变体 (PVP22 mut1-mut7)。7 个突变体分别编码 PVP22 的 1-30 AA (mut1)、1-60AA(mut2)、1-90AA(mut3)、1-111AA(mut4)、1-159AA(mut5)、1-187AA(mut6)、1-241AA(mut7)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可观察到 7 条 0.09kb 至 0.72kb 左右大小清晰的特异性条带 (图 2), 与预计的 DNA 片段大小相符。纯化的 PCR 产物经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切, 分别插入 *pcEGFP* 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 位点, 重组质粒经酶切鉴定证实构建正确 (图略)。同时, 通过 DNA 测序分析证实所扩增的突变体片

段无碱基错配, 而且与 *mut4EGFP* 融合的读框完全正确。7 种突变体和全长 PVP22 与 *mut4EGFP* 融合表达质粒以及 *mut4EGFP* 非融合表达质粒的结构见图 3。

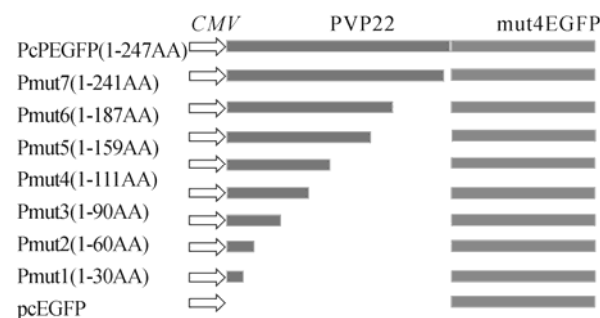


图 3 PVP22 系列突变体与 *mut4EGFP* 融合表达质粒的结构示意图

Fig.3 Schematic diagram of the plasmids expressing *mut4EGFP* fused with mutants of PVP22

2.3 各突变体的亚细胞定位

大量制备 *pcPEGFP*、*pcEGFP*、*Pmut1*、*Pmut2*、*Pmut3*、*Pmut4*、*Pmut5*、*Pmut6*、*Pmut7*, 经 PEG8000 纯化后, 按照 0.5 μ g/孔的量, 分别转染 Hela 细胞, 转染后 48h, 用 PBS (pH 7.2) 洗 3 次除去未贴壁的细胞或死亡细胞, 直接置于倒置荧光显微镜下观察各突变体的亚细胞定位。通过观察可以发现:

pcEGFP 表达的绿荧光蛋白在细胞内呈弥散样均匀分布。

伪狂犬病毒全长的 VP22 蛋白 (1-247AA) 的定位形式比较多, 有的定位在细胞的微管蛋白, 在胞浆内呈网状分布, 并且网状物上有荧光颗粒的分布, 有的定位在核膜, 这两种细胞的胞核所发出的荧光似乎要弱一些; 有的只定位于细胞核, 胞浆内几乎观察不到荧光。

Pmut1 (1-30AA) 和 *Pmut2* (1-60AA) 的定位形式与单纯的绿荧光蛋白十分类似, 其荧光都是均匀分布于整个细胞内。

Pmut3 (1-90AA)、*Pmut4* (1-111AA)、*Pmut5* (1-159AA) 的定位形式有所变化, 荧光不仅均匀分布于胞浆中, 而且有定位于细胞核的现象。

Pmut6 (1-187AA) 的核定位现象更加明显, 并且在细胞核内还有荧光颗粒, 初步推测是与核仁或染色质结合。

Pmut7 (1-241AA) 的亚细胞定位形式与全长的 VP22 蛋白十分类似, 可以与微管蛋白和核膜结合, 并且微管蛋白的网状结构上也有荧光颗粒的存在, 也可以定位于细胞核。

各突变体的亚细胞定位见图 4。

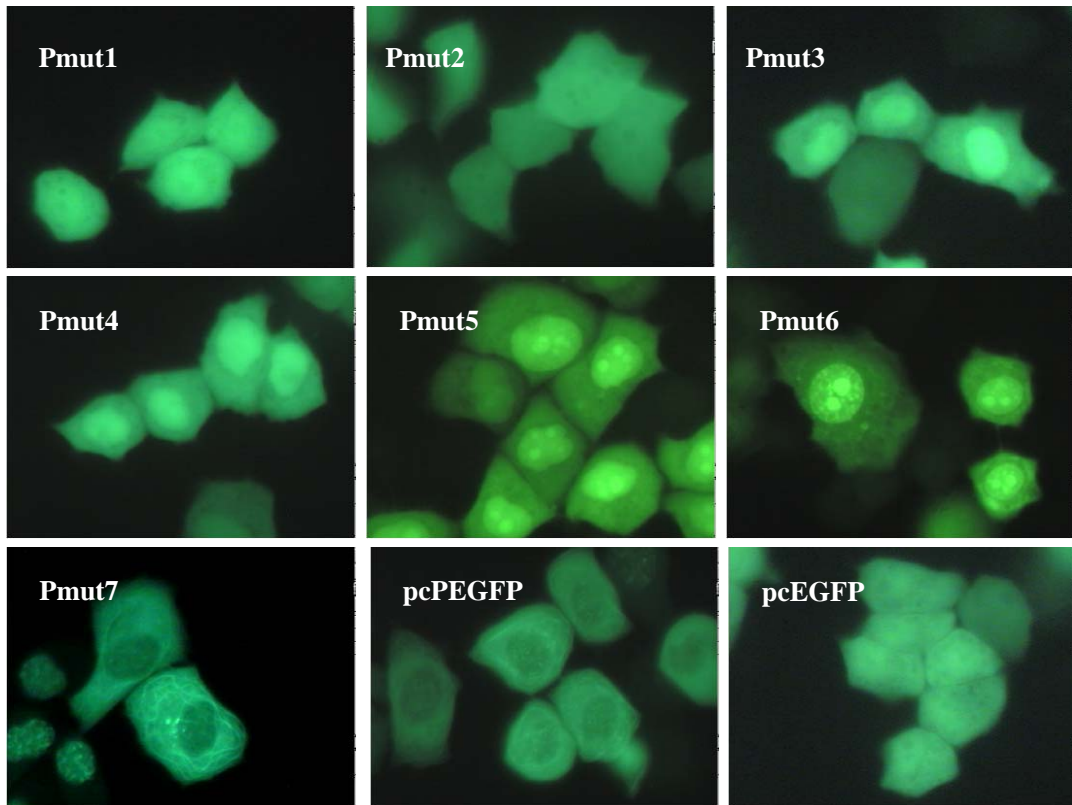


图4 PVP22 各突变体在 HeLa 细胞中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of the mutants of PVP22 in transfected HeLa cells

2.4 包含 PVP22 保守区域突变体的构建、鉴定及亚细胞定位

UL49 基因在 α -疱疹病毒亚科中十分保守, 然而, HSV-1、BHV-1、MDV-1、PRV 的全长 UL49 基因的同源性并不高, 仅介于 19.7%~30%间。本实验室以前曾采用 ClustalX(1.64b)多序列比较软件对以上 4 种 VP22 的氨基酸序列进行同源性比较, 发现 4 种 VP22 在 N 端的同源性很低, 但是在 C 末端的 80 多个氨基酸有较高的同源性(介于 39.8%~56%)^[6]。为了探讨这段同源性较高的区域与亚细胞定位的关系, 我们又构建了一个包含这个保守区域(Prv VP22 149-247AA)的缺失突变体。以 pmutBs 和 pmutBr 为引物, PCR 扩增约 0.3kb 的片段(图 5)。Bgl II 和 BamH I 酶切后插入 pcEGFP 的 BamH I 位点, 获得突变体 PmutB。随后, 又以同样的方法、同样的用量转染 HeLa 细胞, 转染 48h 后, 在倒置荧光显微镜下观察其亚细胞定位。结果发现 PmutB (149-247AA) 的亚细胞定位形式与单纯的绿色荧光蛋白及 Pmut1 和 Pmut2 的定位模式类似, 均匀分布于整个细胞(图 6)。

2.5 PVP22 不同区域与亚细胞定位的关系

综合上述 7 个 C-末端突变体和 1 个保守区域的

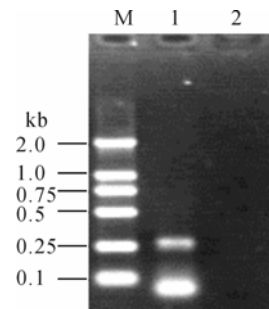


图5 PmutB 的 PCR 扩增

Fig.5 PCR amplification of PmutB

M, DNA marker (DL2000); 1, PCR of mutB; 2, Negative control (H₂O as template).

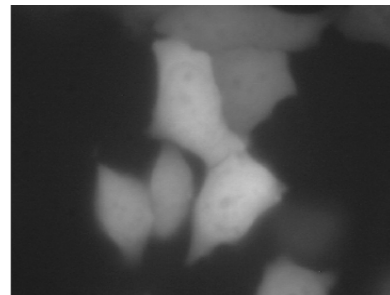


图6 PmutB 在 HeLa 细胞中的亚细胞定位

Fig.6 Subcellular localization of PmutB in transfected HeLa cells

亚细胞定位 (表 1), 可以得出以下初步结论: 伪狂犬病毒 VP22 蛋白与核定位有关的结构域在第 60 个到第 90 个氨基酸残基之间, 第 111 个到第 147 个氨基酸残基有可能与形成细胞核内的颗粒有关, 与微管蛋白结合有关的结构域可能在第 187 到第 241 个氨基酸残基之间。

表 1 各个突变体的亚细胞定位情况

Table.1 The subcellular localization of the mutants of PVP 22

Mutants	Nuclear	Nucleolar	Cytoskeleton binding
mut1 (1-30 AA)	-	-	-
mut2 (1-60 AA)	-	-	-
mut3 (1-90 AA)	+	-	-
mut4 (1-111AA)	+	-	-
mut5 (1-159AA)	+	-	-
mut6 (1-187AA)	+	+	-
mut7 (1-241AA)	+	+	+
mutB (149-247AA)	-	-	-
WT (1-247AA)	+	+	+

3 讨论

尽管伪狂犬病毒的 VP22 是一种间质蛋白, 但最初的研究结果却显示其在病毒感染过程中主要定位在细胞核, 并以颗粒的形式存在^[8]。本实验室早先通过 EGFP 作为标记发现在体外转染细胞中 PrV VP22 的亚细胞定位形式相当复杂, 有的定位于细胞核, 有的定位于核仁, 还有的与细胞微管相结合^[6]。本研究通过对 Pmut2 和 Pmut3 的亚细胞定位分析, 初步确定了与核定位有关的区域位于第 60-90 个氨基酸残基之间。然而, 通过序列分析, 并没有发现经典的和定位序列 (NLS), 国外学者在研究与伪狂犬病毒同属 α -疱疹病毒亚科的牛单纯疱疹病毒 VP22 (BVP22) 时也有相同的发现, 并且证明 BVP22 不仅可以进入细胞核, 而且与经典的核定位序列猿猴病毒 40 (SV40) 大 T 抗原不同的是, 还可以与细胞核内的组蛋白 H4 相结合^[9], 其入核机制尚不清楚, 据推测, 这种非经典的核定位序列并不是连续的, 而是一种依赖于构象的序列。目前, 有多种来源于细胞或者病毒的蛋白发现有这种特性^[10,11], PVP22 的核定位现象是否也归因于这种非连续的、依赖于构象的核定位序列, 还需进一步研究。

在分析不同突变体的亚细胞定位时还发现: 虽然 Pmut7 包括了我们初步确定的核定位结构域, 但是其核定位形式与 Pmut3、Pmut4、Pmut5、Pmut6 有很大的不同, 转染 Pmut7 的细胞有两种形式, 一

种是仅细胞核有荧光, 细胞浆内没有荧光; 一种是细胞核内没有荧光, 呈空洞样, 而荧光聚集在细胞微管上。由此我们推测, 由于 Pmut7 含有核定位、微管定位两种结构域, 所以在细胞内表达之后, 蛋白的去向也有两种, 或进入细胞核, 或定位于微管。在这个问题上, 国外学者在研究人单纯疱疹病毒 VP22 (HVP22) 时, 也有相似的推测^[12]。两种定位似乎有相互竞争相互排斥的迹象。这种只能排斥不能共存的机理还需进一步探讨。

PmutB 的定位形式出乎我们的意料, 因为 PmutB 包括了初步确定的微管定位结构域, 然而, 转染结果并没有出现微管定位的现象。我们推测这个定位于微管的结构域并不是单一的, 而是在 N-端也有一个与之协同的结构域, 两者相互作用才能定位于微管, 但这个与微管定位相关的结构域具体的位置还需要进一步确定。

除了其独特的亚细胞定位外, HSV-1、BHV-1、和 MDV 的 VP22 还被证实具有蛋白转导 (Protein transduction) 特性, 能将与之融合的外源蛋白在无任何辅助条件介导下 (如脂质体、磷酸钙、电转化、病毒载体等) 直接将融合蛋白导入细胞, 并能突破血脑屏障^[13,14]。VP22 这种独特的蛋白转导特性不仅彻底打破了传统的基因转移模式, 而且为人类基因治疗与新型疫苗设计提供了更方便、更有效的“载体”^[15]。目前, 我们实验室已证实 PrV VP22 也具有蛋白转导能力, 并能显著增强与之融合的目的抗原的 DNA 疫苗的免疫反应, 是一种具有巨大开发潜力的免疫增强分子^[6]。本研究所构建的一系列突变体, 今后也可用于 PrV VP22 的蛋白转导结构域的研究。目前, 我们正在开展 PrV VP22 N-末端缺失突变体的构建与亚细胞定位以及这一系列突变体的蛋白转导特性研究, 以期阐明 PrV VP22 的结构与功能。

References

- [1] Fuchs W, Klupp B G, Granzow H, *et al.* Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49 [J]. *J Virol*, 2002, 76 (16): 8208-8217.
- [2] Elliott G D, Meredith D M. The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49 [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73 (3): 723-726.
- [3] Elliott G, O'Reilly D, O'Hare P. Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 [J]. *Virology*, 1996, 226 (1): 140-145.

- [4] Brignati M J, Loomis J S, Wills J W, *et al.* Membrane association of VP22, a herpes simplex virus type 1 tegument protein [J]. *J Virol*, 2003, 77 (8): 4888-4898.
- [5] Fang L R, Niu C S, Xiao S B (方六荣, 牛传双, 肖少波) *et al.* Cloning and sequences determination of the fragment containing UL49 gene and partial UL48 gene of pseudorabies virus [J]. *J Huazhong Agricul Univ (华中农业大学学报)* 2002, 21 (6) : 306-310.
- [6] Xiao S B (肖少波). Study on suicidal DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus and immunoenhancement effect of VP22 protein transduction on the vaccine [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), 2004.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [8] Del Rio T, Werner H C, Enquist L W. The pseudorabies virus VP22 homologue (UL49) is dispensable for virus growth in vitro and has no effect on virulence and neuronal spread in rodents [J]. *J Virol*, 2002, 76 (2): 774-782.
- [9] Zhu J, Zhao H Q, Wiese C, *et al.* Nuclear and mitochondrial localization signals overlap with bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 [J]. *J Bio Chem*, 2005, 280 (16): 16038-16044.
- [10] Wang P, Palese P, O'Neill R E. The NPI-1/NPI-3 (Karyopherin α) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal [J]. *J Virol*, 1997: 71 (3): 1850-1856.
- [11] Lischka P, Sorg G, Kann M, *et al.* A nonconventional nuclear localization signal within the UL84 protein of human cytomegalovirus mediates nuclear import via the importin α/β pathway [J]. *J Virol*, 2003, 77 (6): 3734-3748.
- [12] Martin A, O'Hare P, McLauchlan J, *et al.* Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding [J]. *J Virol*, 2002, 76 (10): 4961-4970.
- [13] Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein [J]. *Cell*, 1997, 88 (2): 223-233.
- [14] Dorange F, El Mehdaoui S, Pichon C, *et al.* Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16 [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (9): 2219-2230.
- [15] Hung C F, He L, Juang J, *et al.* Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen [J]. *J Virol*, 2002, 76 (6): 2676-2682.