

# HCBP6模拟磷酸化重组质粒的构建与亚细胞定位

杨雪亮<sup>1</sup>, 王雯<sup>2</sup>, 吴文娟<sup>3</sup>, 刘小静<sup>2</sup>, 李卫敏<sup>1</sup>, 叶峰<sup>2</sup>, 成军<sup>4</sup>, 蔺淑梅<sup>2</sup> (1.西安交通大学第一附属医院 营养科, 西安 710061; 2.西安交通大学第一附属医院 感染科, 西安 710061; 3.天津市第五中心医院 呼吸科, 天津 300450; 4.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015)

**摘要:** **目的** 构建HCBP6及HCBP6不同位点模拟磷酸化的绿色荧光蛋白重组质粒, 明确其亚细胞定位。**方法** 以构建含有570 bp的HCBP6外显子基因的绿色荧光蛋白重组质粒为基础, 应用快速定点突变技术构建HCBP6不同位点模拟磷酸化的重组质粒。将重组质粒测序并进行序列比对。利用jetPRIME转染体系将HCBP6及HCBP6不同位点模拟磷酸化的重组质粒转染至细胞中, 应用Real-Time PCR技术检测目的基因mRNA的表达, 应用Western blot技术检测目的基因蛋白表达, 应用荧光显微镜观察HCBP6不同位点磷酸化质粒的亚细胞定位。**结果** 将测序的重组序列与目的基因进行比对, 发现重组序列与目的基因完全一致, 说明HCBP6不同位点模拟磷酸化的重组质粒构建成功。Real-Time PCR和Western blot表明, 与对照组相比, 实验组高表达HCBP6及HCBP6不同位点模拟磷酸化的基因。免疫荧光显微镜可见10Ala主要在细胞质表达, WT、10Asp、151Ala、151Asp主要在细胞核表达。**结论** 构建的HCBP6及HCBP6不同位点模拟磷酸化的重组质粒可成功转染细胞并在细胞中高表达, HCBP6不同位点磷酸化质粒亚细胞定位不同。

**关键词:** HCBP6; 重组质粒; 模拟磷酸化; 亚细胞定位

## Construction and subcellular location of HCBP6 mimic phosphorylated recombinant plasmid

Yang Xueliang<sup>1</sup>, Wang Wen<sup>2</sup>, Wu Wenjuan<sup>3</sup>, Liu Xiaojing<sup>2</sup>, Li Weimin<sup>1</sup>, Ye Feng<sup>2</sup>, Cheng Jun<sup>4</sup>, Lin Shumei<sup>2</sup> (1.Department of Nutrition, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2.Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3.Department of Respiratory, The Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China; 4.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

**Abstract:** **Objective** To construct green fluorescent protein recombinant plasmids of HCBP6 and clarify its subcellular localization. **Methods** Based on the green fluorescent protein HCBP6 recombinant plasmid which contained 570 bp HCBP6 exon gene, rapid site-directed mutagenesis was used to construct HCBP6 mimics phosphorylation at different sites of recombinant plasmids. The recombinant plasmids were sequenced and aligned. JetPRIME transfection system was used to transfect HCBP6 and HCBP6 mimic phosphorylated recombinant plasmids into cells. Real-Time PCR technology was used to detect the expression of target gene mRNA. Western blot was used to detect the expression of target gene protein, and fluorescence microscopy was used to observe the subcellular

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2022.01.005

基金项目: 国家“十三五”重大传染病防治科技重大专项(2017ZX10201201、2017ZX10202202); 西安交通大学第一附属医院基金资助项目(2018QN-13)

通讯作者: 蔺淑梅 Email: linshumei123@126.com

localization of HCBP6 mimic phosphorylated plasmids at different sites. **Results** It was found that the recombination sequence was completely consistent with the target gene, indicating that the HCBP6 mimic phosphorylated recombinant plasmid was successfully constructed. Real-time PCR and Western blot showed that compared with the control group, the experimental group highly expressed *HCBP6* and *HCBP6* mimic phosphorylation genes at different sites. Immunofluorescence microscopy showed that 10Ala was mainly expressed in the cytoplasm, and WT, 10Asp, 151Ala, and 151Asp were mainly expressed in the nucleus. **Conclusions** HCBP6 mimic phosphorylation recombinant plasmids at different sites and HCBP6 can be successfully transfected into cells and highly expressed. The subcellular localization of HCBP6 mimic phosphorylation recombinant plasmids at different sites were different.

**Key words:** HCBP6; Recombinant plasmid; Mimic phosphorylated; Subcellular location

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种代谢应激性肝损伤<sup>[1]</sup>, NAFLD可引发代谢综合征、2型糖尿病、动脉硬化性心血管疾病,增加肠道肿瘤发病率,同时其也可进展为肝硬化、肝癌,严重危害患者生命健康<sup>[2-5]</sup>。近年来,随着经济水平的提高,NAFLD已逐渐成为我国主要的慢性肝病<sup>[6]</sup>。目前NAFLD的发病机制尚未完全明确,仍无特异性治疗NAFLD的药物<sup>[7,8]</sup>。因此,深入探讨NAFLD发生的分子机制,寻求有效的分子靶点药物,对治疗NAFLD具有重要意义。

HCV核心蛋白结合蛋白6(hepatitis C virus core-binding protein 6, HCBP6)是通过酵母双杂交技术从肝cDNA文库中筛选的与HCV核心蛋白结合的一种蛋白质<sup>[9]</sup>。在NCBI数据库中,HCBP6又被命名为FUND C2、HCC3和DC44。*HCBP6*基因位于22号染色体,外显子全长570 bp,基因编码189个氨基酸,其中包含15个丝氨酸(serine, Ser),是一种富含Ser的蛋白质。蛋白磷酸化位点通常在Ser和苏氨酸,将这些氨基酸利用定点诱变的方式突变为丙氨酸(alanine, Ala)后持续去磷酸化,但Ala为非极性氨基酸,不会发生磷酸化,而将Ser或者苏氨酸突变为谷氨酸或天门冬氨酸(aspartic acid, Asp)后将持续磷酸化,由于谷氨酸与Asp是带有羧基侧链、本身具有负电荷的极性氨基酸,这与蛋白磷酸化非常类似,在一定程度上模拟了磷酸化所产生的物理化学效应,是一种模拟磷酸化状态的技术手段<sup>[10,11]</sup>。早期通过比较HCBP6过表达细胞与正常细胞基因表达的差异变化发现HCBP6可能主要参与细胞的分化、信号转导和能量代谢<sup>[12]</sup>。近年来,从细胞和动物水平证实HCBP6可调节细胞内甘油三酯及胆固醇的代谢,在NAFLD的发生发展中发挥重要作用<sup>[13-16]</sup>。前期研究表明HCBP6可调控SREBP1c-

FASN、SREBP2-HMGCR信号转导通路,调控脂质代谢,影响NAFLD的发生发展<sup>[17-20]</sup>。既往研究表明参与甘油三酯合成与代谢的蛋白通过不同位点磷酸化而发挥调控作用<sup>[21,22]</sup>。利用UniProt网站预测发现HCBP6的Ser-10和Ser-151可能存在磷酸化,本研究拟应用定点突变技术模拟Ser-10和Ser-151磷酸化与去磷酸化,构建HCBP6模拟磷酸化重组质粒,初步探讨HCBP6模拟磷酸化蛋白的亚细胞定位。

## 1 资料与方法

1.1 实验材料 pEGFP-C1绿色荧光蛋白质粒、人肝癌细胞系HepG2及DH5 $\alpha$ 大肠杆菌菌种由本实验室留存。高保真Taq酶购于美国Promega公司, DNA Marker购于日本TaKaRa公司, PCR Primers由上海生工生物公司合成,总RNA提取试剂盒购自美国Omega公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司, SYBR Green qPCR Master Mix试剂购自美国ABI公司, *Hind* III酶、*Eco*R I酶购自美国Promega公司,凝胶回收试剂盒与质粒小量提取纯化试剂盒购自台湾GeneMark公司,胰蛋白胨及酵母提取物购于美国Sigma公司,DMEM培养基与胰蛋白酶购自美国Life公司,胎牛血清购自美国Gibco公司, jetPRIME转染试剂购自法国polyplus公司。12孔板与6孔板购于美国Thermo公司, ABI7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司, Varioskan Flash酶标仪购自美国Thermo公司。

1.2 HCBP6 Ser-10与Ser-151模拟磷酸化引物的设计与合成 HCBP6第10位Ser突变为Ala用10Ala表示,突变为Asp用10Asp表示;第151位Ser突变为Ala用151Ala表示,突变为Asp用151Asp表示。设计引物时,先在NCBI的Protein中查找编码HCBP6蛋白的基因序列,然后利用Vector NTI软件进行HCBP6引物设计(即为野生型HCBP6引物,采用WT表

示),将设计好的引物在NCBI库中,利用BLAST进行查询,确定该序列与其他基因无同源性,即为特异性序列。设计引物时,在引物的上下游分别引入与载体相应的内切酶位点,上游用核酸内切酶Hind III酶,其识别序列为AAGCTT,下游用核酸内切酶EcoR I酶,其识别序列为GAATTC。PCR引物序列由上海生工生物公司合成(表1)。

**1.3 野生型HCBP6绿色荧光蛋白重组质粒的构建** 将L02细胞进行分离纯化,获取人全基因组DNA。加入WT引物,PCR扩增HCBP6基因片段,将PCR产物回收,连接pGEM-Teasy载体构建重组质粒,然后将上述重组质粒进行转化、培养及提取。将重组质粒小提取产物中加入Hind III酶、EcoR I酶进行双酶切及测序鉴定,采用相同的内切酶对pEGFP-C1空质粒进行双酶切,将酶切后的空质粒与将上述测序正确的酶切目的片段连接,将连接后的重组质粒进行转化并测序,将测序正确的重组质粒pEGFP-C1-HCBP6(WT)小提取后进行中提,最终获得真核细胞转染级WT质粒。

**1.4 定点突变质粒的PCR反应及PCR产物的消化** 以成功构建的WT为模板,加入不同位点模拟磷酸化及去磷酸化的引物序列,按照表2构建定点突变质粒的PCR反应体系。待PCR反应结束后,在PCR产物中加入1 μl DMT酶消化HCBP6野生型真核表达质粒。

**1.5 定点突变重组质粒的转化** 取3 μl上述DMT酶消化产物,加入50 μl DMT感受态细胞中,轻弹混匀,冰浴30 min。然后42℃,90 s,冰上2 min。加500 μl室温液体LB培养基,水浴振荡器225 r/min,37℃,1 h。4000 r/min(离心半径为9 cm),1 min,保留100 μl菌液,铺板,培养14~18 h。选取单克隆菌落,以5 ml液体LB培养基培养14~20 h。取500 μl菌液进行测序。比对测序结果与HCBP6不同位点磷酸化的突变基因序列,留用完全正确的菌液,弃掉错误的菌液。取测序正确的质粒菌液进行大量培养,采用质粒中提试剂盒获得真核细胞转染级质粒。

**1.6 重组质粒转染表达及效率检测** 将复苏的肝癌细胞系HepG2细胞在含有10%胎牛血清的DMEM培养基、5% CO<sub>2</sub>的37℃孵箱培养,待细胞传至3~4代,细

胞轮廓清楚,细胞饱满时,将HepG2细胞铺在6孔板上,进行质粒转染。将培养的细胞分为6组,分别转染pEGFP-C1(NC)、WT、10Ala、10Asp、151Ala、151Asp质粒,转染24 h后,提取总RNA,逆转录为cDNA,采用Real-time PCR检测GAPDH与HCBP6的mRNA表达。转染48 h后,采用免疫荧光镜观察,其中绿色荧光为转染的质粒在细胞中进行蛋白表达。观察结束后,提取各组细胞内总蛋白,测定总蛋白浓度,进行蛋白变性、电泳、转膜,采用GAPDH及HCBP6抗体,测定GAPDH及HCBP6模拟磷酸化质粒表达。

**1.7 重组质粒的亚细胞定位** 取12孔培养板,每孔放入一块细胞爬片,将培养的HepG2细胞分别铺在上述12孔板上,培养24 h(待细胞贴壁后),将培养的细胞分为5组,分别转染WT、10Ala、10Asp、151Ala、151Asp质粒,转染24 h后,细胞融合度为40%~50%时,取出每孔的细胞爬片,采用Mito Tracker Deep Red FM进行线粒体染色,DAPI进行核染色,利用免疫荧光显微镜观察。

**1.8 统计学处理** 采用GraphPad Prism 6软件作图,采用SPSS 22进行统计学处理,蛋白质和mRNA相对表达量均来自3次独立重复实验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HCBP6模拟磷酸化绿色荧光蛋白重组质粒构建与鉴定** 凝胶电泳发现产物位于570 bp,与HCBP6目的基因片段长度一致(图1A)。回收上述目的片段,将目的片段连接pGEM-Teasy载体转化、酶

表2 HCBP6点突变质粒构建的PCR反应体系

名称	体积(μl)
p-HCBP6质粒	0.2
点突变质粒正向引物(10 μmol/L)	1
点突变质粒反向引物(10 μmol/L)	1
5 × TransStart FastPfu buffer	10
10 mmol/L dNTPs	1
TransStart FastPfu DNA Polymerase	1
Dnase Free dH <sub>2</sub> O	加至50 μl

表1 PCR引物序列

质粒名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	退火温度(℃)
WT	AAGCTTATGGAACATCTGCCCCACG	GAATTCGGATGCCATGCCAAGCAGAA	58
10Ala	ATCTGCCCCACGTGCCGGACGGCAAGTGGTGG	CCTTTGTAGACGGGGTGCACGGCCTGCCG	67
10Asp	TGCCCCACGTGCCGGACTGCAAGTGGTGGC	CCTTTGTAGACGGGGTGCACGGCCTGAC	65
151Ala	AGCTGAAGATCCGTAAGCGGAATCAGATACCT	GGTTTCTCGTCACTTCTAGGCAITCGCC	65
151Asp	CAGCTGAAGATCCGTAAGCTGAATCAGATACC	CGGTTTCTCGTCACTTCTAGGCATTTCGAC	63

切后,发现2条特异性条带,其中目的基因570 bp (图1B),与HCBP6基因片段长度一致。将目的条带连接pEGFP-C1载体、转化、菌液PCR,发现目的条带与HCBP6基因长度一致(图1C),将上述大小准确的菌液进行质粒测序,将测序结果进行比对,将序列比对一致的菌液进行大量扩增并提取GFP-HCBP6质粒(WT)保存留用。以WT为模板,进行定点突变质粒的PCR扩增、转化、测序,将测序结果(图2)与HCBP6基因序列进行比对,发现10Ala为HCBP6的第10位Ser变为Ala、10Asp为HCBP6第10位Ser变为Asp、151Ala为HCBP6的第151位Ser变

为Ala、151Asp为HCBP6的第151位Ser变为Asp。说明HCBP6模拟磷酸化的真核表达质粒构建成功。  
2.2 HCBP6模拟磷酸化质粒的表达 转染HCBP6模拟磷酸化绿色荧光蛋白重组质粒,绿色荧光蛋白表达良好,转染率达到40%以上(图3)。Real-time PCR与Western blot检测表明HCBP6表达良好(图4)。说明HCBP6蛋白在HepG2细胞可成功表达。  
2.3 HCBP6模拟磷酸化质粒亚细胞定位 转染HCBP6模拟磷酸化质粒及WT质粒后,WT主要在细胞核表达,10Ala主要在细胞质表达,10Asp、151Ala、151Asp在细胞核和细胞质均表达(图5)。

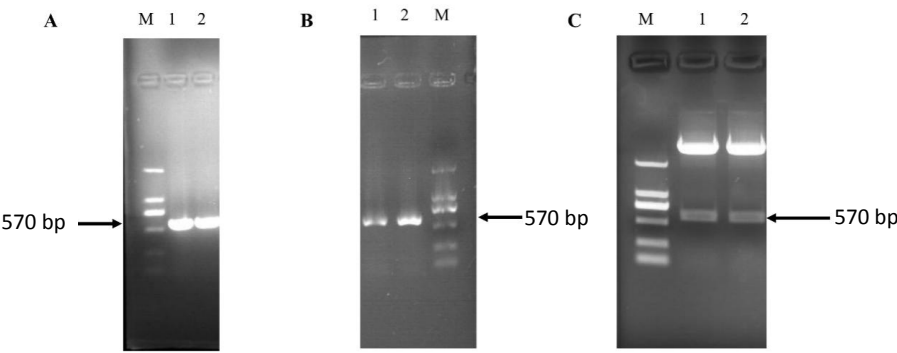


图1 HCBP6 绿色荧光蛋白重组质粒构建与鉴定

注: M 为 Marker DL2000, 箭头所指为目的片段; A 为 PCR 扩增 HCBP6, 1、2 为野生型 HCBP6 PCR 扩增产物; B 为 HCBP6 连接 pGEM-T Easy 载体上获得重组质粒的菌液 PCR, 1、2 为野生型 HCBP6 菌液 PCR 扩增产物; C 为 HCBP6 连接 pEGFP-C1 载体上获得重组质粒的双酶切产物, 1、2 为野生型 HCBP6 双酶切产物。

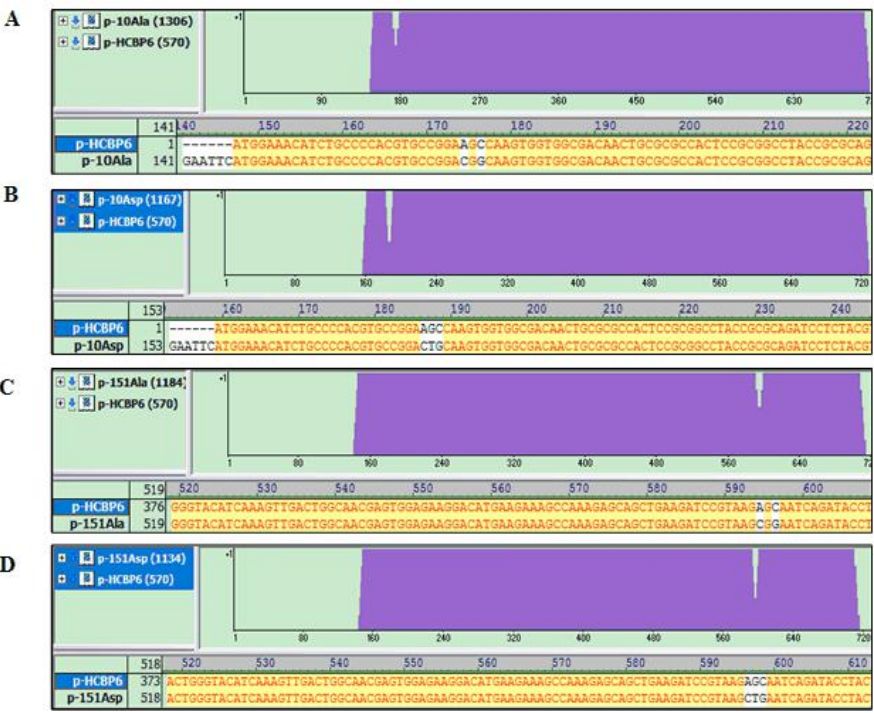


图2 HCBP6 模拟磷酸化绿色荧光蛋白重组质粒测序比对

注: A 为 HCBP6 第 10 位 Ser 变为 Ala, B 为 HCBP6 第 10 位 Ser 变为 Asp, C 为 HCBP6 第 151 位 Ser 变为 Ala, D 为 HCBP6 第 151 位 Ser 变为 Asp。

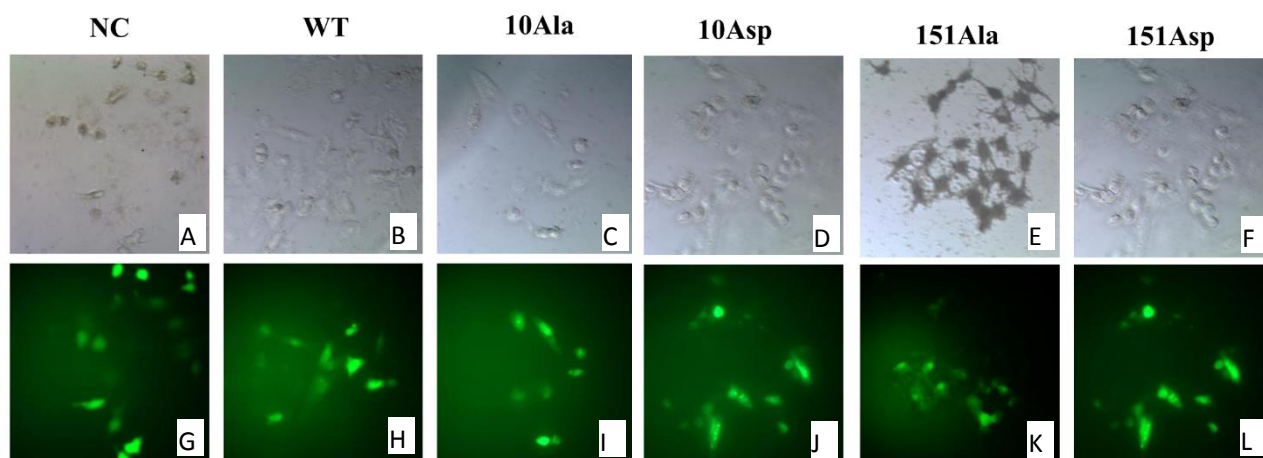


图3 HCBP6 模拟磷酸化质粒转染后绿色荧光蛋白在 HepG2 细胞的表达 ( $\times 20$ )

注: A ~ F 为光学显微镜下观察各质粒在 HepG2 细胞的表达, G ~ L 为荧光显微镜下观察各质粒在 HepG2 细胞的表达; NC 为 pEGFP-C1 空质粒, WT 为野生型 HCBP6 质粒, 10Ala 为 HCBP6 第 10 位去磷酸化质粒 (Ser 突变为 Ala), 10Asp 为 HCBP6 第 10 位磷酸化质粒 (Ser 突变为 Asp), 151Ala 为 HCBP6 第 151 位去磷酸化质粒 (Ser 突变为 Ala), 151Asp 为 HCBP6 第 151 位去磷酸化质粒 (Ser 突变为 Asp)。

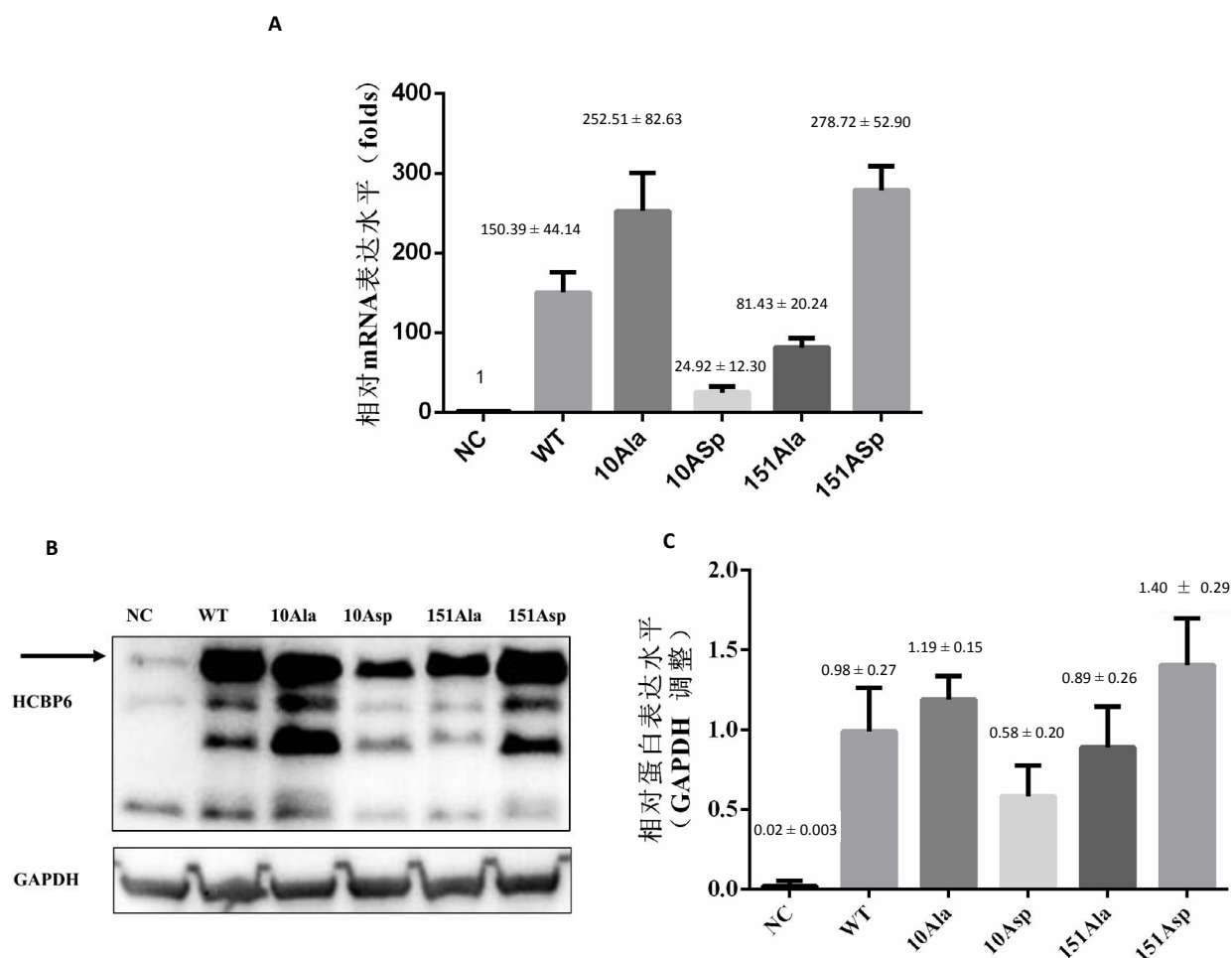


图4 HCBP6 模拟磷酸化质粒转染后 HCBP6 表达水平

注: A 为 HCBP6 mRNA 相对表达水平, 组间比较  $F=20.044$ ,  $P<0.001$ , 与 NC 相比, WT  $t=149.39$ ,  $P=0.002$ , 10Ala  $t=251.51$ ,  $P<0.001$ , 10Asp  $t=23.93$ ,  $P=0.527$ , 151Ala  $t=80.43$ ,  $P=0.049$ , 151Asp  $t=277.72$ ,  $P<0.001$ ; B 为 HCBP6 蛋白表达的 Western blot 图, 箭头为 HCBP6 蛋白条带; C 为 HCBP6 蛋白的相对灰度分析, 组间比较  $F=14.991$ ,  $P<0.001$ , 与 NC 相比, WT  $t=0.97$ ,  $P<0.001$ , 10Ala  $t=1.17$ ,  $P<0.001$ , 10Asp  $t=0.56$ ,  $P=0.009$ , 151Ala  $t=0.87$ ,  $P<0.001$ , 151Asp  $t=1.38$ ,  $P<0.001$ 。



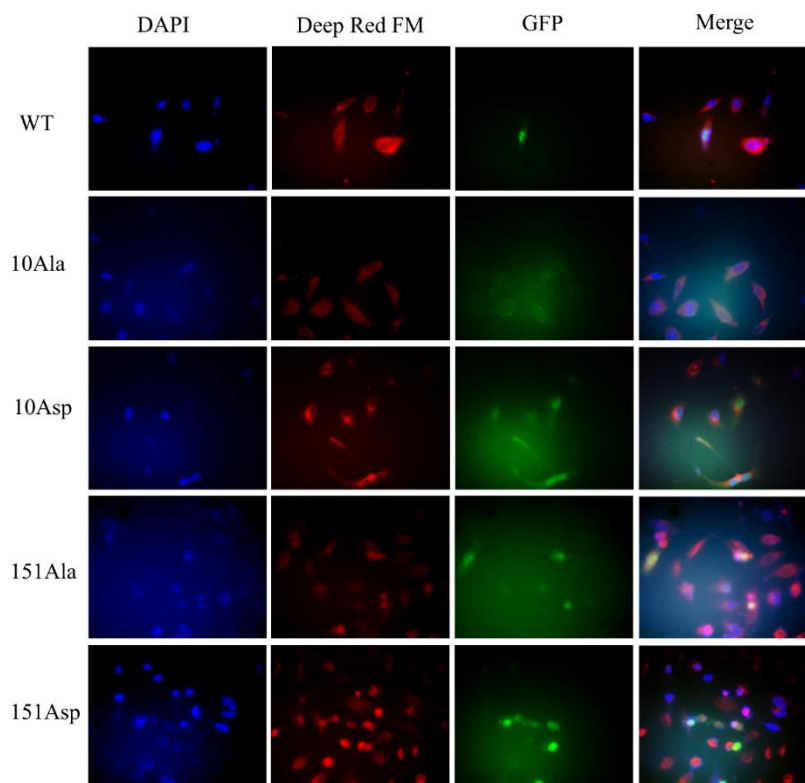


图5 倒置三色荧光显微镜观察 HCBP6 模拟磷酸化质粒亚细胞定位 ( $\times 20$ )

注: DAPI 为细胞核染色, Deep Red FM 为线粒体染色, GFP 为 HCBP6 模拟磷酸化质粒, Merge 为融合图。WT 为野生型 HCBP6 质粒亚细胞定位; 10Ala 为 HCBP6 第 10 位去磷酸化质粒亚细胞定位 (Ser 突变为 Ala); 10Asp 为 HCBP6 第 10 位磷酸化质粒亚细胞定位 (Ser 突变为 Asp); 151Ala 为 HCBP6 第 151 位去磷酸化质粒亚细胞定位 (Ser 突变为 Ala); 151Asp 为 HCBP6 第 151 位磷酸化质粒亚细胞定位 (Ser 突变为 Asp)。

### 3 讨论

蛋白磷酸化是最常见、最重要的翻译后修饰,参与并调节机体的多种生命活动<sup>[23,24]</sup>。通常借助质谱分析鉴定蛋白质磷酸化位点。质谱分析虽能准确定位蛋白的修饰位点,但因其主要通过识别肽段和片段的质量电荷定位磷酸化位点,因此在分析前需对蛋白质进行复杂的分离,此外若肽段中存在多个 Ser 和 Asp 残基,质谱分析定位磷酸化位点相对困难<sup>[25]</sup>。应用生物信息学和计算生物学技术不仅能快速获取磷酸化位点的预测结果,并且可实时更新数据,快速建立新的蛋白磷酸化位点的预测模型。本研究即通过 UniProt 网站成功预测 HCBP6 第 10 位和第 151 位 Ser 发生磷酸化。

绿色荧光蛋白因其易表达、分子质量小、蛋白稳定及对细胞无毒性等优点成为分子生物学中应用最广泛的标记性蛋白质之一<sup>[26]</sup>。pEGFP-C1 是常用的绿色荧光蛋白真核表达质粒<sup>[27]</sup>, 目前已经广泛用于研究基因表达、蛋白质定位和蛋白质-蛋白质相互作用载体<sup>[28]</sup>。本研究基于该真核表达载体成功构建了 HCBP6 不同位点磷酸化真核细胞表达质

粒,采用 jetPRIME 转染试剂进行转染, Mito Tracker Deep Red FM 进行线粒体染色、DAPI 进行核染色。jetPRIME 能够与 DNA 形成阳离子复合物,通过内吞作用进入细胞。入胞后通过质子海绵机制在细胞质基质中释放出 DNA。该转染试剂在血清存在条件下转入贴壁细胞中,适合 DNA 转染、多个质粒的共转以及 DNA/siRNA 的共转,因为转染时只需少量的试剂和核酸,对细胞非常温和<sup>[28]</sup>。Mito Tracker Deep Red FM 能够聚集在活线粒体上,经过透化后仍能在细胞中维持良好<sup>[29]</sup>。

本实验成功构建 pEGFP-C1-HCBP6 野生型及模拟磷酸化型真核表达载体,并初步证实 HCBP6 不同位点磷酸化在细胞中的定位,为探讨 HCBP6 及 HCBP6 不同位点磷酸化后在细胞系或动物体内的生物学效应奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 杨松, 成军. 非酒精性脂肪性肝病与骨密度降低研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(3): 1-5.
- [2] 曾义岚, 韩源平, 王丽, 等. 维生素 D 缺乏与非酒精性脂肪性肝病的关系及机制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(1): 12-16.

- [3] KUCUKOGLU O, SOWA J P, MAZZOLINI G D, et al. Hepatokines and adipokines in NASH-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(2): 442-457.
- [4] DE VRIES M, WESTERINK J, KAASJAGER K, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and Meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(12): 3842-3853.
- [5] 姚诚子, 冯巩, 宇文思, 等. 非酒精性脂肪性肝病发生及进展的危险因素[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2): 433-436.
- [6] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2018, 21(2): 177-186.
- [7] 朱达, 孙凤霞, 李晓玲, 等. 健脾疏肝丸对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝X受体 $\alpha$ -固醇调节元件结合蛋白-1-脂肪酸合成酶信号转导通路的影响[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2020, 12(2): 60-67.
- [8] RAZA S, RAJAK S, UPADHYAY A, et al. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(2): 206-237.
- [9] 李小权, 成军, 张树林, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白core与其结合蛋白HCBP6在哺乳动物细胞中的相互作用[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(7): 790-792.
- [10] ZHONG X, WANG Z Q, XIAO R, et al. Mimic phosphorylation of a betaC1 protein encoded by TYLCCNB impairs its functions as a viral suppressor of RNA silencing and a symptom determinant[J]. *J Virol*, 2017, 91(16): e00300-e00317.
- [11] TSAI H Y, FU S L, TSENG L M, et al. hnRNPK S379 phosphorylation participates in migration regulation of triple negative MDA-MB-231 cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7611.
- [12] 成军, 李克, 陆荫英, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析[J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(4): 378-384.
- [13] 李炜. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)基因转录调节机制初步研究[D]. 太原:山西医科大学, 2010.
- [14] 何晓瑜. HCBP6基因过表达载体和RNAi载体的构建及其功能学研究[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
- [15] 成军. 新基因丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)的发现和发现——献礼非酒精性脂肪性肝病[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019, 13(5): 353-356.
- [16] LU H, YUAN X, ZHANG Y, et al. HCBP6 deficiency exacerbates glucose and lipid metabolism disorders in non-alcoholic fatty liver mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110347.
- [17] YANG X, HAN M, LIU S, et al. HCBP6 upregulates human SREBP1c expression by binding to C/EBP $\beta$ -binding site in the SREBP1c promoter[J]. *BMB Rep*, 2018, 51(1): 33-38.
- [18] 陆志冲, 毛海琴, 张雨, 等. “利沃素”治疗非酒精性脂肪性肝炎患者1例及文献复习[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2020, 12(2): 81-85.
- [19] ZHENG Y P, ZHONG X Y, HUANG Y S, et al. HCBP6 is involved in the development of hepatic steatosis induced by high-fat diet and CCl<sub>4</sub> in rats[J]. *Ann Hepatol*, 2018, 17(3): 511-518.
- [20] GAO L L, LI M, WANG Q, et al. HCBP6 modulates triglyceride homeostasis in hepatocytes via the SREBP1c/FASN pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(10): 2375-2384.
- [21] BECARES N, GAGE M C, VOISIN M, et al. Impaired LXR $\alpha$  phosphorylation attenuates progression of fatty liver disease[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(4): 984-995.
- [22] KIEGERL B, TAVASSOLI M, SMART H, et al. Phosphorylation of the lipid droplet localized glycerol-3-phosphate acyltransferase Gpt2 prevents a futile triacylglycerol cycle in yeast[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(12): 158509.
- [23] NESVEROVA V, TÖRNROTH-HORSEFIELD S. Phosphorylation-dependent regulation of mammalian aquaporins[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 82.
- [24] HUANG B, LIU Y, YAO H, et al. NMR-based investigation into protein phosphorylation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145: 53-63.
- [25] YATES J R, RUSE C I, NAKORCHEVSKY A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009, 11: 49-79.
- [26] JACKSON S E, CRAGGS T D, HUANG J R. Understanding the folding of GFP using biophysical techniques[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2006, 3(5): 545-559.
- [27] ZHAO C, PU Y, ZHANG H, et al. IL10-modified human mesenchymal stem cells inhibit pancreatic cancer growth through angiogenesis inhibition[J]. *J Cancer*, 2020, 11(18): 5345-5352.
- [28] KODAMA Y, NAKASHIMA M, NAGAHARA T, et al. Development of a DNA vaccine for melanoma metastasis by inhalation based on an analysis of transgene expression characteristics of naked pDNA and a ternary complex in mouse lung tissues[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 540.

收稿日期: 2020-11-21

杨雪亮, 王雯, 吴文娟, 等. HCBP6模拟磷酸化重组质粒的构建与亚细胞定位[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2022, 14(1): 27-33.