

HCV p7下调基因p7TP2编码蛋白的亚细胞定位研究

袁菊^{1,2}, 成军¹, 洪源¹, 李越¹, 石磊¹, 兰孟东¹, 韩莉¹, 杨延平² (1. 北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 目的 进一步研究HCV p7下调基因p7TP2编码蛋白的亚细胞定位。方法 构建p7TP2与绿色荧光蛋白(GFP)融合基因的表达载体, 转染肝癌细胞系HepG2及绿猴肾细胞系COS-7, 通过荧光显微镜观察其亚细胞定位。利用多克隆抗体的免疫组织化学技术, 检测p7TP2蛋白在正常肝组织、HBV感染的肝组织、HCV感染的肝组织、肝硬化肝组织、肝癌组织、正常肾脏组织及肾癌组织中的表达。结果 蛋白荧光主要集中在细胞浆部分, p7TP2蛋白在阳性组织中同样分布在细胞浆, 且在正常组织的表达量显著高于病理组织。结论 为进一步研究p7TP2蛋白的结构和功能的研究奠定了基础。
关键词: p7TP2/绿色荧光蛋白; 亚细胞定位; 免疫组织化学; 细胞浆

Study of subcellular location of p7TP2 down-regulated by HCV p7 protein

YUAN Ju^{1,2}, CHENG Jun¹, HONG Yuan¹, LI Yue¹, SHI Lei¹, LAN Meng-dong¹, HAN Li¹, YANG Yan-ping² (1. Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangling 712100)

Abstract: **Objective** To investigate the subcellular location of p7TP2 protein. **Methods** A fusion gene of p7TP2 with green fluorescent protein (GFP) was constructed and transfected into HepG2 and COS-7 cell lines, respectively. The subcellular location of GFP-fusion protein was analyzed by fluorescence microscope. p7TP2 expression were detected by immunohistochemistry in normal liver tissue, liver tissue with HBV infection, liver tissue with HCV infection, cirrhotic liver tissue, liver hepatoma tissue, normal kidney tissue and renal carcinoma tissue, respectively. **Results** The fluorescence of p7TP2-GFP fusion protein was detected mainly in the cytoplasm. p7TP2 protein was also found in cytoplasm of many tissues including normal liver tissue, liver tissue with HBV infection, liver tissue with HCV infection, cirrhotic liver tissue, liver hepatoma tissue, normal kidney tissue and renal carcinoma tissue. It also showed p7TP2 protein expressed higher in normal tissues than that of pathological tissues. **Conclusions** The study of subcellular location of p7TP2 in cytoplasm established a foundation for its further structural and functional study.

Key words: p7TP2/GFP; Subcellular location; Immunohistochemistry; Cytoplasm

丙型肝炎病毒(HCV)是慢性肝炎的主要病原之一, 全世界约有1.7亿人被感染, 常导致肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[1-3]。HCV基因组编码的p7蛋白是一个小的疏水性蛋白, 由63个氨基酸残基组成, 编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间, 是一种膜相关性蛋白, 定位在内质网内。p7蛋白包括2个跨膜 α 螺旋, 与一小的带电细胞质环相连, 其氨基和羧基端尾朝向细胞内质网腔^[4,5]。

本课题组利用基因表达谱芯片技术筛选到HCV p7蛋白下调表达的新基因p7TP2, 这是一个未知功能的新基因, 对于这一新基因结构与功能的研究目前还知之甚少, p7TP2基因开放读码框长495 bp, 编码164个氨基酸残基, 该序列被美国核苷酸序列数据库GenBank收录, 收录号码为AY819648, 生物信息学预测p7TP2蛋白属于不稳定蛋白, 疏水指数较高, 含有3个螺旋区域, 4个 β 折叠, 4个潜在的蛋白激酶C磷酸化位点, 1个酪氨酸蛋白激酶 II 磷酸化位点, 5个N-肉豆蔻酰位点^[6], 其

通讯作者: 成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

中蛋白激酶C磷酸化位点与介导胞外分泌有关^[7],酪蛋白激酶II磷酸化位点与调节细胞凋亡和细胞周期有关^[8],N-豆蔻酰化位点可能定位于内质网或线粒体外膜^[9]。

本研究主要运用融合蛋白表达技术,通过构建绿色荧光蛋白(GFP)融合基因转染不同的细胞系,通过GFP在细胞中的发光部位来确定p7TP2基因产物的细胞内的定位情况,并利用由本课题组自制的兔抗-p7TP2多克隆抗体,以免疫组织化学方法检测p7TP2蛋白在多种组织的石蜡切片中的定性、定量及定位研究,期待为进一步研究p7TP2基因的结构和功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒及主要试剂 肝母瘤细胞系HepG2及绿猴肾细胞COS-7由本室保存;质粒pEGFP-C1由本室保存;脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;DMEM培养基、OPTI-MEM I Reduced Serum Medium购自Gibco公司;核酸内切酶Eco RI/Bam HI购自TaKaRa公司;Taq DNA聚合酶购自鼎国生物公司;玻璃奶DNA回收试剂盒购自博大公司。p7TP2多克隆抗体由本课题组自制,由大肠埃希菌表达、纯化的重组p7TP2蛋白3次免疫新西兰白兔获得;引物合成及核苷酸序列测序由上海生物工程技术服务公司完成。免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 细胞培养 肝母瘤细胞系HepG2及绿猴肾细胞COS-7均在5% CO₂和37℃的条件下,在含10%胎牛血清(FBS购自Hyclone公司)的DMEM培养基(Invitrogen公司)中贴壁生长(含100 U/ml青霉素,100 mg/L链霉素),细胞用含0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA的消化液消化进行传代。

1.2 方法

1.2.1 p7TP2基因的RT-PCR扩增 根据新基因p7TP2的完整开放阅读框和pEGFP-C1表达载体序列设计引物,由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列如下:上游引物:5'-GAATTCTATGGTGGAGGTGCCAG-3'

(含Eco RI位点);下游引物:5'-GGATCCCATGACGACCAGGCCAG-3'(含Bam HI位点)。提取HepG2细胞总RNA,并按照Promega公司反转录试剂盒说明书合成cDNA模板,并以此为模板进行聚合酶链反应(PCR)扩增^[6]。

1.2.2 pEGFP-C1-p7TP2重组表达载体的构建 根据玻璃奶回收试剂盒说明书回收p7TP2基因的PCR产物;在T4 DNA连接酶的作用下,与pGEM-T载体连接,转化大肠埃希菌DH5α感受态细胞,挑取在平皿(Amp, X-gal/IPTG)上生长的白色菌落提取质粒,经酶切(Eco RI/Bam HI)鉴定,并测序。Eco RI/Bam HI双酶切重组质粒pGEM-T-p7TP2,玻璃奶纯化回收酶切产物,定向克隆至pEGFP-C1,构建成重组质粒pEGFP-C1-p7TP2,经双酶切鉴定正确。磁珠法提取质粒以备转染。

1.2.3 瞬时转染不同的细胞系GFP荧光显微镜观察 常规培养HepG2细胞及COS-7细胞,1×10⁵细胞/孔接种于24孔细胞培养板中,培养24小时后细胞密度生长至85%~90%,将待转染的0.8 μg pEGFP-C1-p7TP2质粒用Lipofectamine 2000按脂质体转染策略转入。阴性对照转染pEGFP-C1空质粒,同时做3个复孔。

1.2.4 利用免疫组织化学染色检测p7TP2蛋白在不同组织中的分布和定位 利用正常肝组织、HBV感染的肝组织、HCV感染的肝组织、肝硬化组织、肝癌组织、肾脏组织及肾癌组织等石蜡切片进行免疫组织化学染色,本室自制抗-p7TP2兔血清以1:4000 PBS稀释作为一抗,将切片常规脱蜡至水,并用3% H₂O₂室温孵育10分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性,PBS冲洗3次后pH值6.0枸橼酸盐缓冲液高压2分钟抗原修复,PBS冲洗后滴加适量血清(1:4000)作为一抗,37℃孵育2小时,PBS冲洗滴加HRP二抗,37℃孵育30分钟,室温下二氨基联苯氨(DAB)显色,用苏木素复染,中性树胶封片,光镜下观察。用磷酸盐缓冲液(PBS)和免疫前血清代替一抗做阴性对照。以胞质和胞膜呈棕黄色或黄色为阳性表达。染色结果判定标准:光镜下观察按着色范围并结合着色强度进行分级。着色范围以阳性细胞百分

率判定: 未着色为0分; 着色25 %以下为1分; 着色25 %~50 %为2分; 着色50 %以上为3分。着色强度判定: 无着色为0分; 浅着色为1分; 棕色为2分; 深棕色为3分。上述两项相加为分级标准。阴性(-): < 3分; 阳性(+): ≥ 3分。

1.3 统计学分析

以上实验均重复3次, 采用SPSS 10.0统计学分析软件, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 p7TP2基因的RT-PCR扩增与pEGFP-C1-p7TP2载体的构建

重组载体pEGFP-C1-p7TP2图谱(图1), 以HepG2细胞cDNA为模板扩增, 495 bp左右的RT-PCR产物与理论片段大小符合(图2); 重组表达载体pEGFP-C1-p7TP2经EcoRI/BamHI双酶切后, 显示正确的酶切图谱(图3)。

2.2 GFP荧光显微镜观察p7TP2基因产物在不同



图1 pEGFP-C1-p7TP2重组载体图谱

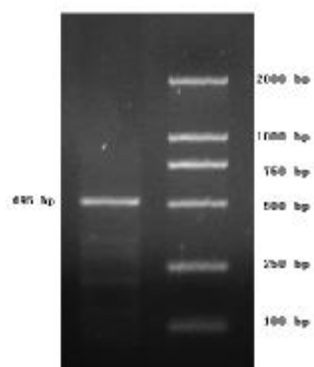


图2 p7TP2基因的RT-PCR扩增产物

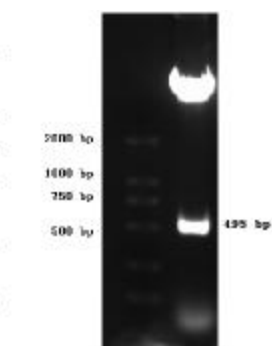


图3 pEGFP-C1-p7TP2重组载体的双酶切鉴定

细胞系的定位

常规培养HepG2细胞及COS-7细胞, 接种于24孔细胞培养板中, 将待转染的pEGFP-C1-p7TP2质粒用Lipofectamine 2000按脂质体转染策略转入, 阴性对照转染pEGFP-C1空质粒, 结果显示转染pEGFP-C1空质粒的细胞整体可见绿色荧光, 在细胞核与胞质中无任何差别, 没有明显的定位趋势, 而转染了pEGFP-C1-p7TP2质粒的两种不同细胞系在细胞浆中荧光强度很高, 没有核定位的趋势(图4)。

2.3 免疫组织化学技术研究p7TP2基因在不同组织中的细胞定位及分布特点

p7TP2蛋白在组织中主要定位于细胞的胞浆中, 且在正常肝组织中表达量较高, 主要呈区域性分布在肝静脉周围表达增强(图5-A), 在慢性丙型肝炎患者肝脏组织中主要呈现弥漫表达且表达量较少(图5-B), 在慢性乙型肝炎患者肝脏组织(图5-C)、肝硬化患者肝脏组织(图5-E)及肝癌患者肝组织(图5-D)中均几乎没有表达, 在正常肾组织中有较多的分布, 也主要定位于细胞浆, 主要分布在肾小管周围(图5-G), 在肾癌患者的肾组织中(图5-F)没有分布。免疫组织化学所有空白对照及替代对照均为阴性。

3 讨论

确定一个新基因的编码序列, 研究该基因的表达与调控, 编码蛋白的结构与功能, 确定新基因的生物学和医学意义, 是医学分子生物学研究领域一项具有挑战性的工作。真核细胞具有内膜系统, 有复杂的亚细胞结构, 除叶绿体和线粒体能合成少量蛋白质外, 绝大部分蛋白质是在胞质或粗糙内质网合成, 运送到不同地点, 形成成熟蛋白, 行使功能。翻译产物中很大一部分是以前体蛋白形式存在, 往往有蛋白质分子定位信号, 可引导蛋白质在胞内定位。

蛋白质在细胞内的定位过程, 涉及到大量的细胞生物学过程, 是近年来分子生物学研究的一个热门领域, 取得了很大进展。GFP是一种新型的生物标签^[10,11], 含有一种修饰过的氨基酸所组成的载色中心, 当GFP基因表达时, 载色中心即自发

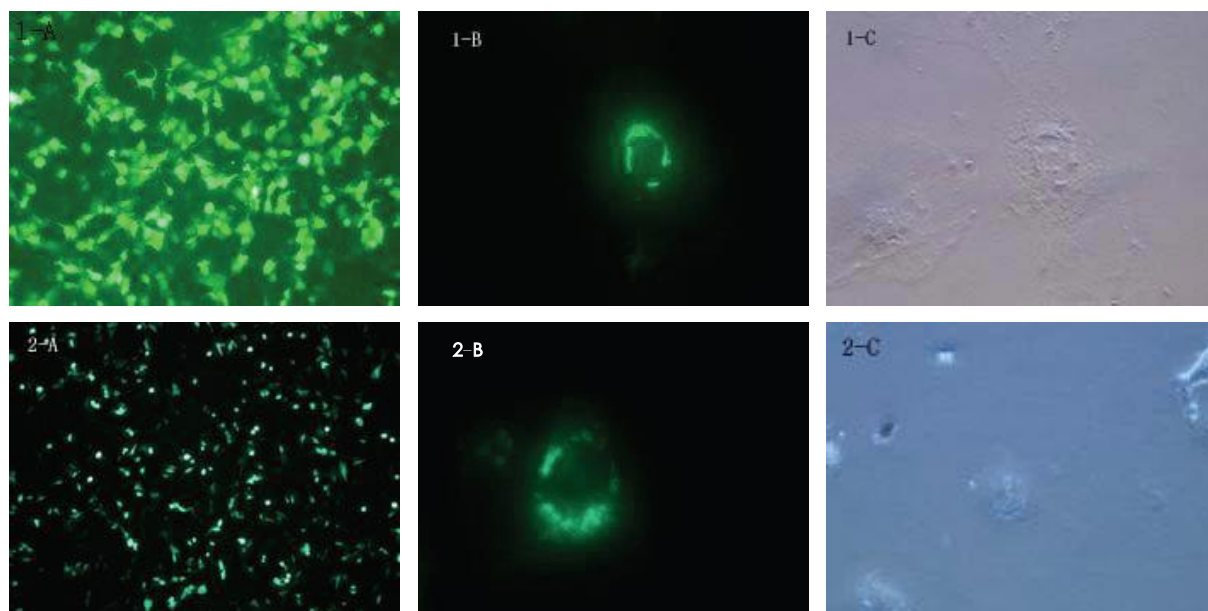


图4 p7TP2基因产物在不同细胞系的定位

1-A: 转染pEGFP-C1空质粒的HepG2细胞; 1-B: 转染pEGFP-C1-p7TP2质粒的HepG2细胞; 1-C: 明场观察的1-B的视野;
2-A: 转染pEGFP-C1空质粒的COS-7细胞; 2-B: 转染pEGFP-C1-p7TP2质粒的COS-7细胞; 2-C: 明场观察的2-B的视野

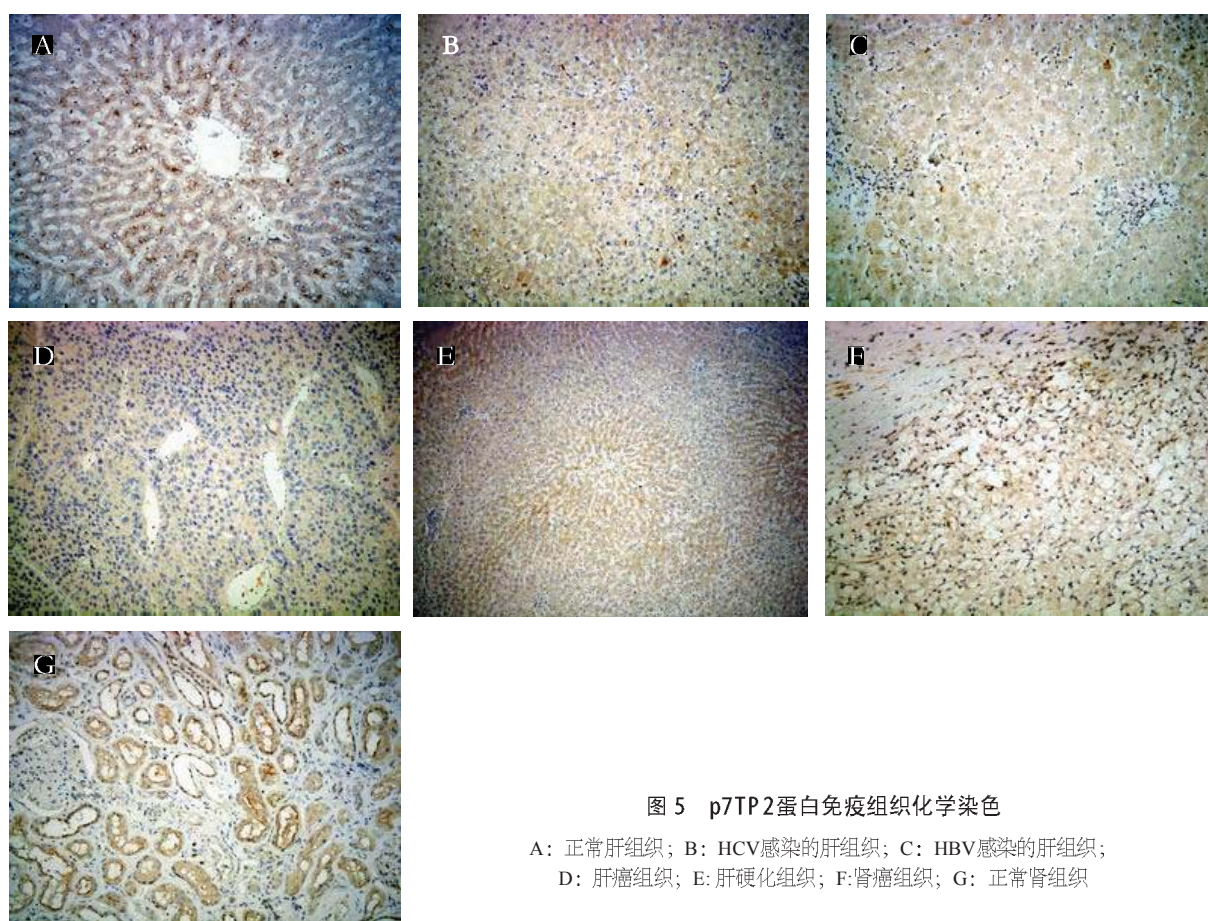


图5 p7TP2蛋白免疫组织化学染色

A: 正常肝组织; B: HCV感染的肝组织; C: HBV感染的肝组织;
D: 肝癌组织; E: 肝硬化组织; F: 肾癌组织; G: 正常肾组织

形成,用普通荧光显微镜以标准的紫外线波长就很容易观察到该基因的产物,将GFP基因与另一种基因连接在一起构成融合基因,另一种基因表达的蛋白质可由GFP产生的荧光来反映^[11],EGFP的荧光强度比其天然产物高几十倍。与外源基因偶联时不影响外源蛋白的构象和功能。在pEGFP-C1表达载体的C-端具有多克隆位点,可以将p7TP2基因与之在阅读框架中融合,重组表达载体中含有一个SV40早期启动子,可促使载体中与p7TP2基因融合的绿色荧光蛋白基因GFP表达,EGFP本身没有定位信号,其浓聚不可能由其本身引起,只能是由与之融合的定位细胞浆内的p7TP2蛋白所引起。已报道的资料表明蛋白质定位方式有多种形式,有的依赖于一级结构序列,有的信号可能存在于高级结构^[12],有的蛋白质可与胞器内特定蛋白形成聚合体,协同滞留在胞器内^[13],有的定位信号与氨基酸的疏水性、酸碱性的有关^[14]。而p7TP2与GFP融合基因在不同的细胞系HepG2细胞系和COS-7细胞系均定位在细胞浆中,根据蛋白质一级结构序列生物信息学分析含有3个螺旋区域,4个 β 折叠,4个潜在的蛋白激酶C磷酸化位点,1个酪蛋白激酶II磷酸化位点,5个N-肉豆蔻酰位点,而具有5个N-豆蔻酰位点推测与其定位于内质网或线粒体外膜^[6]的预测是相互一致的。

免疫组织化学是利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究。本文通过免疫组织化学方法检测p7TP2基因在各种组织切片中的定位,同样也定位在细胞浆,与以上结果相符。其在正常组织的表达量较大,而在各种病理组织中表达量较少,甚至没有表达。p7TP2基因在丙型肝炎肝组织的表达比在

正常肝组织的表达量少,与利用基因表达谱芯片技术筛选结果HCV p7蛋白下调p7TP2表达相一致。

本实验对p7TP2基因在哺乳细胞内的亚细胞定位研究,为进一步研究p7TP2基因的结构、功能及信号转导机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 成军,李克,陆荫英,等. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002,10:223-225.
- [2] 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究[J]. 世界华人消化杂志, 2002,10:125-128.
- [3] 成军. 慢性丙型肝炎肝脂肪变的机制及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2002,10:999-1003.
- [4] Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, et al. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus[J]. J Virol, 2002,76:3720-3730.
- [5] Griffin S, Clarke D, McCormick C, et al. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes[J]. J Virol, 2005,79:15525-15536.
- [6] 袁菊, 郭江, 成军, 等. HCV p7蛋白反式调节基因p7TP2的克隆化及生物信息学分析[J]. 世界华人消化杂志, 2006,14:581-587.
- [7] Morgan A, Burgoyne RD, Barclay JW, et al. Regulation of exocytosis by protein kinase C[J]. Biochem Soc Trans, 2005,33:1341-1344.
- [8] Yamane K, Kinsella TJ. Casein kinase 2 regulates both apoptosis and the cell cycle following DNA damage induced by 6-thioguanine[J]. Clin Cancer Res, 2005,11:2355-2363.
- [9] Colombo S, Longhi R, Alcaro S, et al. N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning[J]. J Cell Biol, 2005,168:735-745.
- [10] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994,263:802-805.
- [11] 刘默芳, 王恩多. 绿色荧光蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000,27:238-243.
- [12] Saalbach G, Jung R, Kunze G, et al. Different legumin protein domains act as vacuolar targeting signals[J]. The Plant Cell, 1991,3:695-708.
- [13] Chrispeels MJ, Short RN. Peptide domains target protein to plant vacuoles[J]. Cell, 1992,68:613-616.
- [14] Von Heijne G. Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequence[J]. J Mol Biol, 1986,189:239-242.

收稿日期: 2007-05-14