

· 论 著 ·

HSV-2 多功能蛋白 ICP27 真核表达载体构建及其在 Vero 细胞中的表达

龙朝钦, 杨慧兰, 张发洲, 薛礼长

(广州军区广州总医院, 广东 广州 510010)

[摘 要] **目的** 构建单纯疱疹病毒 2 型(HSV-2)多功能蛋白感染细胞多肽 27(ICP27)真核表达载体 pCDNA3.0-ICP27,并检测其在非洲绿猴肾细胞(Vero)中的表达。**方法** 提取病毒株 HSV-2333 DNA,用高保真 DNA 聚合酶对多功能蛋白 ICP27 基因进行高保真扩增,用双酶切连接至真核表达载体 pCDNA3.0 中。pCDNA3.0-ICP27 经双酶切、测序验证,并通过脂质体介导质粒瞬时转染 Vero 细胞,经 RT-PCR 和 Western blot 检测 ICP27 蛋白的表达。**结果** pCDNA3.0-ICP27 经双酶切可切出目的片段,测序结果经比对,与基因库中的序列完全一致。转染后经 RT-PCR 和 Western blot 检测,证实转染重组质粒组有 ICP27 蛋白表达,而转染空质粒组及未转染组没有检测到 ICP27 的表达。**结论** 成功构建了 HSV-2 多功能蛋白 ICP27 真核表达载体 pCDNA3.0-ICP27,并能在 Vero 细胞中表达。

[关 键 词] 单纯疱疹病毒 2 型;疱疹,单纯;感染细胞多肽 27;真核表达载体;质粒;疱疹,生殖器

[中图分类号] R752.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)02-0081-05

Construction of HSV-2 eukaryotic expression plasmid pCDNA3.0-ICP27 and expression in Vero cells

LONG Chao-qin, YANG Hui-lan, ZHANG Fa-zhou, XUE Li-zhang (Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective** To construct herpes simplex virus type 2(HSV-2) eukaryotic expression plasmid pCDNA3.0-ICP27 and to evaluate its expression in Vero cells. **Methods** The target sequence of ICP27 gene was obtained and high-fidelity amplified from HSV-2 DNA. The ICP27 gene was cloned into a eukaryote plasmid pCDNA3.0 after restrictive endonucleases digestion. The pCDNA3.0-ICP27 was checked and verified by double digestion and DNA sequence analysis. Vero cells were transiently transfected with pCDNA3.0-ICP27 by lipofectamine 2000 in vitro. RT-PCR and Western blot analysis were employed to detect the expression of ICP27. **Results** The 1741bp DNA fragment was obtained by DNA and cloned into pCDNA3.0. The recombinant plasmid pCDNA3.0-ICP27 was subjected to sequence analysis which indicated all nucleotides were identical to the HSV-2 ICP27 sequence provided by Genbank. Being transfected by lipofectamine 2000, the expression of ICP27 in Vero cells was detected. **Conclusion** Recombinant plasmid pCDNA3.0-ICP27 was constructed and expressed successfully in Vero cells.

[Key words] herpes simplex virus type 2; herpes, simplex; ICP27; eukaryotic expression vector; plasmid; herpes, genitals

[Chin Infect Control, 2011, 10(2): 81-85]

单纯疱疹病毒 2 型(herpes simplex virus, HSV-2)是引起生殖器疱疹的主要病原体。HSV-2 沿感觉神经传播并潜伏于感觉神经节内,可因各种应激反应而复发。目前尚无特效药物控制 HSV 的

感染和复发,而且其潜伏复发的分子机制不明确。HSV-2 潜伏复发的基因表达过程受到级联作用的调节,这些病毒基因可被分成 3 大类,包括立即早期(IE)基因、早期(E)基因和晚期(L)基因^[1]。IE 基

[收稿日期] 2010-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30972666)

全军医学科学技术研究“十一五”计划资助项目(06J008)

[作者简介] 龙朝钦(1976-),男(汉族),湖南省衡东市人,医师,主要从事医学病毒分子生物学研究。

[通讯作者] 杨慧兰 E-mail: huilany@medmail.com

因在新生病毒蛋白尚未合成时即可被转录。IE 基因的产物 ICP0、ICP4、ICP22、ICP27 和 ICP47 共同调节所有病毒蛋白的表达,并发挥不同的功能^[2]。感染细胞多肽 27(infected-cell polypeptide 27, ICP 27)是一个多功能蛋白,由 512 个氨基酸组成,分子量约为 63 kD。国外对 HSV-1 ICP27 的研究发现,其不但对宿主细胞基因的表达具有调节作用^[3-4],而且还可能参与细胞的凋亡^[5-7]。有关 HSV-2 ICP27 的功能及其对宿主细胞生物学影响的研究尚无报道。为此,本研究首次构建了 HSV-2 ICP27 真核表达质粒 pCDNA 3.0-ICP27,建立 ICP27 在 Vero 细胞中瞬时高表达的模型,为进一步研究 HSV-2 ICP27 对宿主细胞的生物学作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验株来源 病毒株、菌株、细胞及质粒 HSV-2 333 株、*E. coli* Top 10、非洲绿猴肾细胞(Vero)及质粒 pCDNA3.0 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Pfx DNA 聚合酶、PureLink Hipure Plasmid Midiprep kit 及 TRIzol 购自上海 Invitrogen 公司;病毒基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒及逆转录试剂盒购自 TaKaRa(大连);胎牛血清、新生牛血清及 RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司;EcoR I、BamH I 及 T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品;转染试剂盒 Xfect 购自 Clontech;RIPA 细胞裂解液购自上海申能博彩公司;鼠抗 ICP27 单抗购自 Abcam,HRP 标记抗鼠多克隆抗体购自 CST 公司;ECL 发光液为 Millipore 公司产品。

1.1.3 引物的设计与合成 ICP27 上游引物 P1: 5'-CCG GAATTCGGCGACCTACAACATGGC-TACC-3'(下划线部分为 EcoR I 酶切位点);下游引物 P2: 5'-CGC GGATCCGCGTCTGCCGT-GAGTTCCTG-3'(下划线部分为 BamH I 酶切位点)。内参 β -actin 上游引物 P3: 5'-CGTAC CACTGGCATCGTGAT-3';下游引物 P4: 5'-GTGTTGGCTGACAGGTCTTTG-3'。上述引物由上海 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Vero 细胞的培养 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下对 Vero 细胞进行常规培养,2~3 d 以 1:3 进

行一次传代。

1.2.2 病毒的接种及基因组的提取 HSV-2 感染 Vero 细胞参考高建等^[8]报道的方法,并于显微镜下观察细胞病变。待 70%~80%的细胞发生病变时收集细胞,反复冻融使细胞充分裂解,低速离心后取上清液,用病毒基因组提取试剂盒提取 HSV-2 基因组。

1.2.3 聚合酶链反应(PCR)扩增 ICP27 基因 以提取的病毒基因组为模板,PCR 扩增 ICP27 基因。反应体系:10×Pfx 扩增缓冲液 2.5 μ L, dNTP(各 2.5 mmol/L)0.5 μ L,50 mmol/L MgSO₄ 0.5 μ L,引物 P1、P2 各 0.5 μ L,病毒基因组 1 μ L,10×PCR 加强液缓冲液 5 μ L,Pfx DNA 聚合酶 0.3 μ L,加双蒸水至 25 μ L。扩增条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 15 s,68℃退火,延伸 2 min 15 s,共 35 个循环;72℃再延伸 5 min 后冷却至 4℃。1%琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

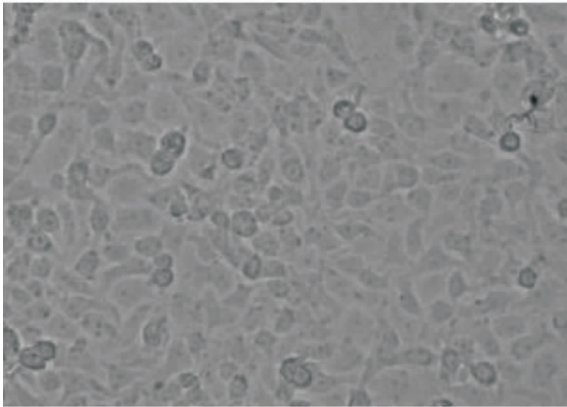
1.2.4 真核表达质粒 pCDNA3.0-ICP27 的构建及鉴定 EcoR I、BamH I 双酶切质粒 pCDNA3.0 及 PCR 产物。酶切后的产物经胶回收,T4 DNA 连接酶于 16℃过夜连接目的基因及载体。连接产物转化感受态的 *E. coli* Top 10,经氨苄西林抗性培养基筛选,菌落 PCR 鉴定阳性克隆,提取质粒,EcoR I、BamH I 双酶切及测序鉴定,将完全正确的质粒命名为 pCDNA3.0-ICP27。

1.2.5 pCDNA3.0-ICP27 转染 Vero 细胞 待 6 孔板中的细胞生长密度达到 70%~80%时,用 Xfect 转染试剂盒分别将 pCDNA3.0-ICP27、pCDNA3.0 转染至 Vero 细胞。具体方法参照 Clontech 公司的 Xfect™ Transfection Reagents 说明书。

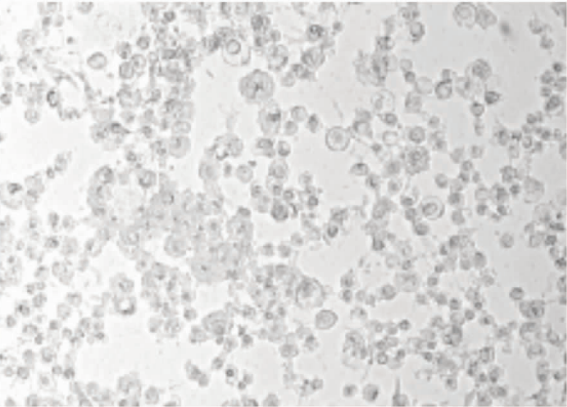
1.2.6 RT-PCR 鉴定 ICP27 在 Vero 细胞中表达 转染 48 h 后,收获细胞提取总 RNA。逆转录试剂盒合成 cDNA,以此为模板,PCR 扩增 ICP27 及 β -actin。反应体系:10×Pfx 扩增缓冲液 2.5 μ L, dNTP(各 2.5 mmol/L)0.5 μ L,50 mmol/L MgSO₄ 0.5 μ L,引物 P1、P2 或 P3、P4 各 0.5 μ L,逆转录产物 cDNA 3 μ L,10×PCR 加强液缓冲液 5 μ L,Pfx DNA 聚合酶 0.3 μ L,加双蒸水至 25 μ L。扩增 ICP27 基因条件同 1.2.3,共 25 个循环;扩增 β -actin 基因的条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 25 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 25 个循环;72℃再延伸 5 min 后冷却至 4℃。PCR 产物经 1%琼脂糖电泳鉴定。

1.2.7 Western blot 检测 ICP27 蛋白 转染 48 h 后,贴壁细胞经消化后离心,弃上清,用预冷 PBS 洗

3 次。加 20 μ L RIPA 细胞裂解液,充分裂解细胞后于 4℃、12 000 g 离心 30 min。上清 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,一抗为小鼠抗 ICP27 单克隆抗体,二抗为 HRP 标记的抗小鼠多克隆抗体,ECL 化学发光显色,X 光片显影。



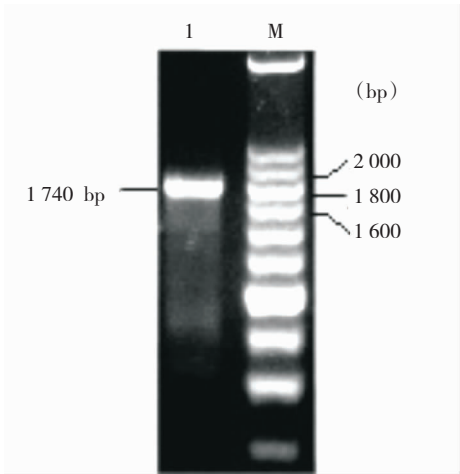
A 正常 Vero 细胞 (nomal Vero cell)



B HSV-2 感染 Vero 细胞 48 h 后 (the Vero cells infected by HSV-2 for 48 hours)

图 1 正常 Vero 细胞与 HSV-2 感染 Vero 细胞对比(×200)
Figure 1 Normal Vero cells and Vero cells infected by HSV-2(×200)

2.2 ICP27 基因的扩增 以提取的病毒基因组为模板,P1、P2 为引物扩增 ICP27 基因,PCR 凝胶电泳。以 2 000 bp DNA ladder marker 为参照,所扩增条带与预期片段大小(1 740 bp)一致,见图 2。



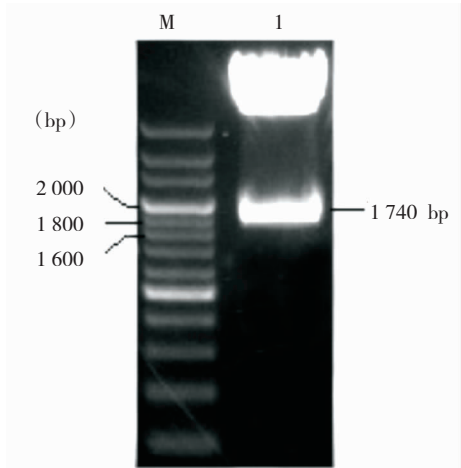
M: DNA marker;1:ICP27 基因 PCR 扩增产物(ICP27 gene PCR product)
图 2 ICP27 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Figure 2 Agarose gel electrophoresis of ICP27 gene PCR product

2.3 重组质粒 pCDNA3. 0-ICP27 双酶切及测序鉴

2 结果

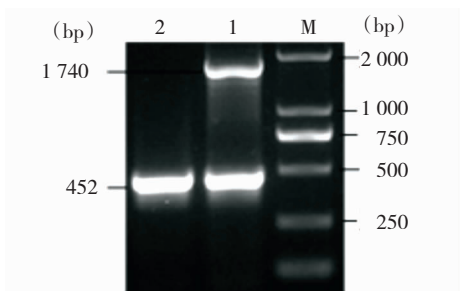
2.1 HSV-2 感染 Vero 细胞致细胞病变 HSV-2 感染 48 h 后,Vero 细胞肿胀,变圆,呈空泡化,核膜破裂,染色质浓缩;部分细胞碎裂、细胞器溶解等,发生典型的细胞病变。见图 1。

定 EcoR I、BamH I 双酶切重组质粒,酶切后经凝胶电泳鉴定,结果显示,在约 2 000 bp 及 5 000 bp 处出现条带,与预期相符,见图 3。测序结果经 Blast 比对分析,与美国国立生物技术信息中心(NCBI)中的序列完全一致。



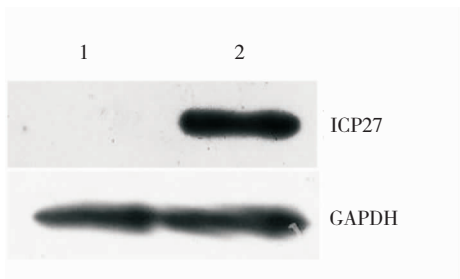
M:DNA marker;1:EcoR I、BamH I 双酶切重组质粒 pCDNA3. 0-ICP27(Double digestion of pCDNA3. 0-ICP27 by EcoR I and BamH I)
图 3 重组质粒 pCDNA3. 0-ICP27 的双酶切鉴定
Figure 3 Indentification of pCDNA3. 0-ICP27 by double digestion

2.4 重组质粒 pCDNA3.0-ICP27 转染 Vero 细胞及表达鉴定 重组质粒 pCDNA3.0-ICP27 及质粒 pCDNA3.0 转染 Vero 细胞 48 h 后, RT-PCR 结果表明只有转染重组质粒 pCDNA3.0-ICP27 的 Vero 细胞所提取的 RNA 才能扩增出 ICP27 基因, 而 β -actin(452 bp)在转染了 2 种质粒的 Vero 细胞所提取的 RNA 中均可扩增出来, 见图 4。Western blot 结果显示, 在转染 pCDNA3.0-ICP27 的 Vero 细胞中能检测到 ICP27 蛋白, 而在转染空质粒的 Vero 细胞中未检测到, 见图 5。



M:DNA marker;1:Vero 细胞/ pCDNA3.0-ICP27(Ve-ro cells/ pCDNA3.0-ICP27);2:Vero 细胞/pCDNA3.0(Ve-ro cells/pCDNA3.0)

图 4 RT-PCR 鉴定 ICP27 基因在 Vero 细胞中的表达
Figure 4 The expression of ICP27 gene inVero cells identi-fied via RT-PCR



1:Vero 细胞/pCDNA3.0(Vero cells/ pCDNA3.0);2:Vero 细胞/ pCDNA3.0-ICP27 (Vero cells/ pCDNA3.0-ICP27)

图 5 Western blot 检测 ICP27 蛋白
Figure 5 Detection of ICP27 protein via Western blot

3 讨论

ICP27 是一个能在细胞核与细胞质中穿梭的 RNA 结合蛋白,该蛋白有一个精氨酸和甘氨酸丰富的结构域 RGG-box,使它能够与 RNA 结合。mR-NA 穿梭于细胞核与胞浆之间,这有利于 HSV mR-

NA 的排出^[9-10]。ICP27 也有 2 个核定位序列(NLS)和一个亮氨酸富集序列,与人免疫缺陷病毒(HIV)蛋白 Rev 的出核转运序列(NES)非常相似。因此,HSV-2 与 HIV 具有协同感染的作用^[11]。

病毒潜伏基因在疱疹病毒家族中是一个非常独特的生物学现象。HSV 在感染的黏膜细胞通过感觉神经元上行至神经节中潜伏,在潜伏期间,HSV-基因组维持一个环状的 DNA,潜伏的 HSV 可能在各种刺激下,比如神经纤维支配的组织损伤或者应激时被活化,这就可能导致细胞凋亡,为了维持病毒的潜伏,受病毒感染细胞的凋亡作用必须被保护。一些与凋亡相关的病毒蛋白或基因已陆续得到确定^[12]。HSV 含有多个能调节宿主细胞凋亡的基因,如 US3、US5、US6、ICP22、LAT 等^[13-14]。HSV-1 ICP27 参与潜伏病毒的再活化过程,在活化过程中,ICP27 的高表达可导致细胞凋亡。在研究 HSV-1 诱导细胞凋亡时发现,ICP27 参与了激活 p38 和 Jun N-末端蛋白激酶(JNK)-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,这 2 个通路的激活能使 Bcl-2 失稳定化而导致细胞凋亡^[5]。ICP27 与病毒复制、转录激活、RNA 稳定性、凋亡以及潜伏病毒的再活化有关,而病毒的潜伏再活化与凋亡和氧化应激密切相关^[6]。但 Aubert 等^[7]认为 HSV-1 的调节蛋白 ICP27 对阻止感染的人细胞凋亡是必需的。此外,在 HSV 潜伏与再活化的过程中,TGF- β 和 SMAD 通路的激活所导致的细胞凋亡也是不可忽视的^[15],HSV ICP27 在参与细胞凋亡时是否与这些通路有关,目前还不清楚。

本研究以真核表达质粒 pCDNA3.0 作为表达载体,将 ICP27 基因插入其中,通过酶切、测序等验证,成功构建了真核表达载体 pCDNA3.0-ICP27。Vero 细胞在研究 HSV-1 所致凋亡中是一个经典的细胞宿主^[16],本研究通过脂质体介导的 pCDNA3.0-ICP27 瞬时转染 Vero 细胞。分别在 mRNA 及蛋白水平检测 ICP27 的表达和分泌,表明所构建的载体可以在 Vero 细胞中成功表达,建立了 ICP27 在 Vero 细胞高表达模型。为进一步探讨 HSV-2 ICP27 在细胞内与凋亡相关的生物学功能,阐明 ICP27 在病毒潜伏与再激活过程中的作用奠定了基础,为临床防治生殖器疱疹提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Johnson K E, Song B, Knipe D M. Role for herpes simplex vi-rus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling[J].

- Virology, 2008,374 (2):487-494.
- [2] Efsthathiou S, Preston C M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency[J]. Virus Res, 2005,111 (2):108-119.
 - [3] Sandri-Goldin R M. The many roles of the regulatory protein ICP27 during herpes simplex virus infection[J]. Front Biosci, 2008,13(18):5241-5256.
 - [4] Lei Zhao, Wen bo Zhu, Qiong Ding, *et al.* The herpes simplex virus type 1 multiple function protein ICP27[J]. Virologica Sinica, 2008, 23(6):399-405.
 - [5] Gillis P A, Okagaki L H, Rice S A. Herpes simplex virus type 1 ICP27 induces p38 mitogen-activated protein kinase signaling and apoptosis in HeLa cells[J]. J Virol, 2009,83(4):1767-1777.
 - [6] Kim J C, Lee S Y, Kim S Y, *et al.* HSV-1 ICP27 suppresses NF-kappaB activity by stabilizing IkappaBalpha [J]. FEBS Lett, 2008,582(16):2371-2376.
 - [7] Aubert M, Blahó J A. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells[J]. J Virol, 1999,73(4):2803-2813.
 - [8] 高建, 黄宇峰, 曹晶, 等. II 型单纯疱疹病毒培养及 gG-2 基因特异片段的克隆[J]. 中华男科杂志, 2009, 15(3):223-227.
 - [9] Smith R W, Malik P, Clements J B. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression[J]. Biochem Soc Trans, 2005,33 (Pt 3):499-501.
 - [10] Lengyel J, Strain A K, Perkins K D, *et al.* ICP27-dependent resistance of herpes simplex virus type 1 to leptomycin B is associated with enhanced nuclear localization of ICP4 and ICP0 [J]. Virology, 2006,352(2):368-379.
 - [11] Wald A, Link K. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis[J]. J Infect Dis, 2002,185(1):45-52.
 - [12] Young L S, Dawson C W, Eliopoulos A G. Viruses and apoptosis[J]. Br Med Bull, 1997,53(3):509-521.
 - [13] Zhou G, Galvan V, Campadelli-Fiume G, *et al.* Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins[J]. J Virol, 2000, 74 (24):11782-11791.
 - [14] Perng G C, Jones C, Ciacci-Zanella J, *et al.* Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript[J]. Science, 2000, 287(5457):1500-1503.
 - [15] Gupta A, Gartner J J, Sethupathy P, *et al.* Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript[J]. Nature, 2006,442(7098):82-85.
 - [16] Cotter C R, Blahó J A. Detection of herpes simplex virus dependent apoptosis[J]. Methods Mol Biol, 2009,559(6):371-387.

《中国中医药咨讯》征订征稿启事

《中国中医药咨讯》杂志(半月刊)是经国家新闻出版总署正式批准,中国科学技术协会主管,中华中医药学会主办的国家级医药卫生综合类专业学术期刊。国内刊号:CN 11-5560/R,国际刊号:ISSN 1817-2016。为中国核心期刊来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国科技部《中文科技资料目录—医药卫生》核心期刊、《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文数据库全文收录期刊、中国生物医学文献数据库(CBM)来源期刊,创刊于 2009 年。定价:每期 18 元。

1 主要栏目 论著、综述、基础研究、临床研究、中西医结合、经验交流、医学教育、病例报告、误诊分析、医院管理、护理研究等。

2 稿件要求 文稿应具有科学性、实用性和创新性,资料应真实可靠,数据准确,论点明确,文字精炼,层次清楚。论著、综述、基础研究等论著类文章一般不超过 8000 字,其他栏目文章不超过 3000 字。

2.1 文题 文题应简明扼要,重点突出。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜,尽量不用缩略语。

2.2 作者 作者姓名在文题下按序排列,排序应在投稿时确定,稿件修改及编排过程中一般不宜再做更改。确需变更时必须由第一著者出具书面证明并加盖有关单位公章。应注明著者单位全称、所在科室及详细地址、邮政编码、联系电话和电子信箱。

2.3 摘要及关键词 论著类文章须附中文摘要,其中临床研究、实验研究类文章应按照目的、方法、结果、结论的结构编写摘要,字数以 200 字左右为宜。论著类文章需标出 2~5 个关键词。

2.4 参考文献 著录格式参考《文后参考文献著录规则》(GB/T 7714-2005)。文中参考文献角码依照其出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号在正文右上角标出。同一文献作者不超过 3 人全部著录,超过 3 人只著录前 3 人,后加“等”。中文期刊用全称,外文期刊名称缩写以 Index Medicus 格式为准。每条参考文献要写明起止页码。

3 稿件处理 来稿必须用 E-mail 投稿,根据《中华人民共和国著作权法》,切勿一稿两投。作者必须对稿件内容的真实性负责。严禁抄袭。依照有关规定,编辑部可对来稿做文字修改、删节,来稿一经接受,该论文的专有使用权即归《中国中医药咨讯》杂志社所有;《中国中医药咨讯》杂志社有权以电子期刊、光盘版、网络出版等其他方式出版该论文。稿件刊登后赠当期杂志 1 册。

联系人:杜编辑 电话:0311-80668831

投稿信箱:zgzyyzx8@163.com QQ:1025055851