

酵母双杂交系统筛选与 HCMV pUL23 蛋白相互作用的蛋白质

赵振岭, 李实骞, 姚火旺, 周天鸿, 李弘剑

(暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632)

[摘要] 将 UL23 基因的 ORF 序列克隆到酵母表达载体 pGBKT7 构建诱饵质粒 pGBKT7-UL23, 用酵母双杂交技术筛选人胚肾 cDNA 文库中与人巨细胞病毒 pUL23 相互作用的宿主蛋白分子, 再通过回复酵母双杂交再次确认两者之间的相互作用. 结果表明: 酵母双杂交, 回复酵母双杂交试验证明宿主蛋白分子 eIF3e (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E interacting protein) 能够与人巨细胞病毒 UL23 蛋白相互作用. 宿主蛋白分子 eIF3e 能够与人巨细胞病毒 UL23 蛋白相互作用, 这为进一步研究 pUL23 蛋白在 HCMV 生活周期中的作用机制提供依据.

[关键词] pUL23; 人巨细胞病毒; 酵母双杂交; 蛋白质相互作用; eIF3e

[中图分类号] Q51; Q71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)05-0566-05

Identification of HCMV UL23 protein by yeast two-hybrid system

ZHAO Zhen-ling, LI Shi-qian, YAO Huo-wang, ZHOU Tian-hong, LI Hong-jian

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] The ORF sequence of HCMV UL23 was cloned into yeast-expressing vector pGBKT7 to construct the vector pGBKT7-UL23. The fusion protein pGBKT7-UL23 expressed in the AH109 yeast strain served as the bait protein. We used a yeast two-hybridization assay to screen the proteins that can interact with HCMV pUL23 from HEK cDNA library. Yeast two-hybridization retransformation experiment was applied to verify the interactions. 79 proteins that interacted with pUL23 were screened out after the construction of pGBKT7-UL23. Among which, eIF3e were verified by the yeast two-hybridization retransformation experiment to interact with pUL23. HCMV pUL23 interacting proteins could be screened by using yeast two-hybrid system. These results provide the basis for the function of pUL23 in the HCMV life cycle.

[Key words] pUL23; Human cytomegalavirus; yeast two-hybrid; protein interaction; eIF3e

[收稿日期] 2009-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30770106); 广东省自然科学基金项目(06025162)

[作者简介] 赵振岭(1977-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质工程方向. E-mail: zhaoxun96@sina.com
通讯作者: 李弘剑, 女, 教授, 博士生导师, Tel: 020-85226360, E-mail: tlihj@jnu.edu.cn

人类巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)属疱疹病毒科亚属(β 疱疹病毒),在世界人群中广泛分布,据血清学调查表明,普通人群中HCMV的感染率为80%以上,而在某些特殊地区和人群中,其感染率高达100%。人群感染HCMV后,通常呈隐性感染,在健康、免疫功能正常的人群中,HCMV感染很少引起临床症状。但是,对于孕妇、发育的胎儿、免疫抑制和免疫功能低下者,如器官移植病人、艾滋病患者和其它肿瘤病人,HCMV的感染可引起严重的临床症状,甚至导致死亡^[1-2]。目前,随着多个HCMV病毒株的完整基因组核酸序列分析的完成^[3],HCMV基因组结构已被阐明,HCMV分子病毒学研究的重点已经进入了功能基因组学,研究的焦点主要集中在病毒基因编码产物的功能、病毒蛋白自身及与宿主相互作用的机制、病毒基因变异的机制以及与病毒进化的关系等领域。

UL23属于HCMV US22基因家族成员,该家族的编码产物含有至少一个由4个氨基酸序列组成的保守基序,对于UL23基因,目前知道它能编码一个33 ku的病毒皮层蛋白pUL23,在细胞内定位在核周边^[4],LIU实验室的研究表明缺失了UL23的人巨细胞病毒株Towne在人包皮成纤维细胞(HFF)中的繁殖速度加快^[5],这暗示UL23可能在感染细胞中对人巨细胞病毒的生长起到某种调控作用,但分子机制尚不清楚。这种病毒自身表达的蛋白抑制病毒生长的现象,是巨细胞病毒研究领域的新发现,可能是HCMV与人共生的又一新机制、新方式,这促使我们进行UL23基因功能的研究。

为研究pUL23在HCMV生活周期中的作用机制,本研究利用酵母双杂交系统来筛选与pUL23相互作用的宿主蛋白,并通过酵母回转试验进一步确认这种蛋白之间的相互作用。

1 材料

BAC-HCMV TOWNE质粒由美国加州大学柏克利分校LIU FENYONG实验室惠赠,其它质粒为本实验室保存,Matchmaker GAL4 yeast two-hybrid system 3和人胚肾cDNA文库均购自Clontch公司,glutathione-Sepharose beads购自Novagen公司,HA-tag鼠单克隆抗体购自Cell Signaling公司,转染试剂Polyfect Transfection Reagent购自QIAGEN公司,*E.*

coli DH5 α 为本实验室保存。

2 方法

2.1 诱饵质粒pGBKT7-UL23的构建及其序列测定

以BAC-HCMV TOWNE为模板,上游引物:5' CCGGAATTCCGGATGTCGGTAATCAAGGACPCR3',下游引物:5'CGCGGATCCCGCGTCGTCAAAAAGTTCGGT3',扩增UL23基因的ORF序列,下划线区域分别为EcoRI、BamHI酶切位点。PCR产物经胶回收处理,进行EcoRI和BamHI双酶切,并克隆至pGBKT7中,转化*E. coli* DH5 α 。pGBKT7-UL23转化子经PCR鉴定、双酶切鉴定后送交公司进行序列测定。

2.2 酵母双杂交筛选

(1)转化 实验操作按Clontech产品说明书进行。采用Polyethylene glycol(PEG)-LiAc将诱饵质粒pGBKT7-UL23和人胚肾cDNA文库质粒共转化AH109。新鲜制备的AH109感受态细胞(8 mL)、0.2 mg pGBKT7-UL23诱饵质粒、文库质粒0.1 mg、鲑鱼精DNA 20 mg混合完全后加入1 \times PEG/LiAc溶液60 mL,经漩涡振荡混匀后30 $^{\circ}$ C孵育30 min,加入7.0 mL Dimethyl sulfoxide(DMSO),充分混匀后水浴42 $^{\circ}$ C热激15 min,放置冰上2 min,1 000 g离心5 min,菌体重悬浮于10 mL 1 \times Tris/EDTA buffer(pH7.0, TE),并涂布在SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade平板上30 $^{\circ}$ C倒置培养5 d。

(2)pGBKT7-UL23自激活检测 将pGBKT7-UL23、pGADT7共转化入酵母AH109中,并涂布在SD/-Trp/-Leu平板上。挑选克隆分别划线在SD/-Trp/-Leu和SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade平板上(随机挑选4组)。如果该诱饵蛋白没有自激活活性,则只能在SD/-Trp/-Leu培养基上生长,而不能在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长,并且 β -半乳糖苷酶活性检测呈阴性;而有自激活活性的诱饵蛋白既能在SD/-Trp/-Leu培养基上生长,也能在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长,并且 β -半乳糖苷酶活性检测呈阳性。

(3) β -半乳糖苷酶活性检测 将酵母克隆点于Whatman #5滤纸上,液氮中反复冻融3次,每次30 s,恢复至室温后将滤纸放于浸有3 mL Z buffer($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 16.1 mg/mL, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

5.5 mg/mL, KCl 0.75 mg/mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 mg/mL), 8.1 μ L β -巯基乙醇和 12.6 μ L X-a-Gal (20 mg/mL) 的滤纸上, 置于 30 $^{\circ}C$ 培养箱内, 直至蓝色出现. 反应时间在 8 h 之内.

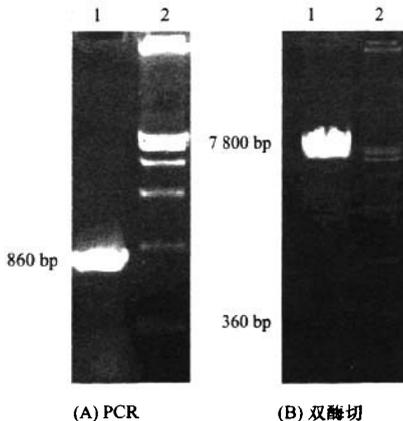
(4) eIF3e 与 UL23 的回复性杂交确证相互作用 分别将 AD-eIF3e + BD, AD-eIF3e + BD-UL23 共转化 AH 109, 并分别涂布在 SD/-Trp/-Leu 平板上, 挑选克隆划线在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上(随机挑选 3 组), 并进行 β -半乳糖苷酶活性检测.

(5) 阳性克隆鉴定与分析 应用酵母质粒抽提试剂盒抽提阳性酵母克隆质粒, 并电转化 *E. coli* DH5 α 中, 进行氨苄青霉素 (Ampr) 抗性筛选, 阳性克隆进行质粒小量抽提试剂盒抽提. PCR 扩增 AD 上的插入片段, 上游引物: 5' TTGCGGGCTTTTTCAG-TATCTACGA3', 下游引物: 5' GATGATGAAGATAC-CCCACCAAACC3'. PCR 扩增产物进行 Hae III 酶切去重复. 然后将含有非重复片段的克隆送进行测序, 对测序结果在 GenBank 上进行同源性搜索和序列比对分析.

3 结果

3.1 酵母双杂交诱饵表达载体 (pGBKT7-UL23) 的构建及鉴定

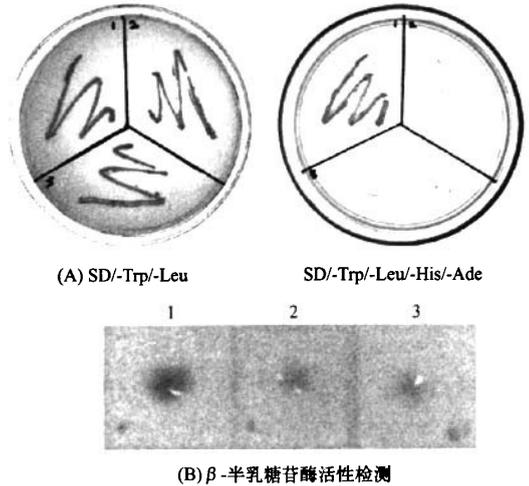
通过以 BAC-HCMV TOWNE 为模板, PCR 扩增全长的 UL23 的 ORF, 并克隆至 pGBKT7 载体中. 经 PCR、双酶切鉴定, 试验结果如图 1, 显示克隆成功, 提交测序结果表明插入序列和通读框均正确(图未显示).



1: UL23 基因; 2: DNA Ladder
图 1 载体构建鉴定结果图

3.2 酵母双杂交诱饵表达载体 (pGBKT7-UL23) 自激活作用检测

自激活试验结果如图 2-A; β -半乳糖苷酶活性检测表明 pGBKT7-UL23 + pGADT7 为阴性, 结果如图 2-B 所示. 以上结果表明 UL23 在 AH109 中无自激活作用.



1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: pGBKT7-UL23 + pGADT7.

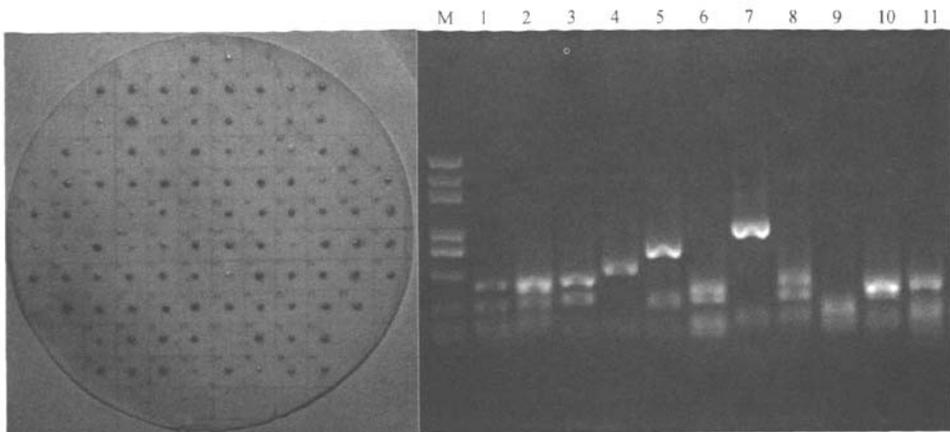
图 2 pUL23 自激活作用检测结果图

3.3 酵母双杂交方法筛选与 pUL23 相互作用蛋白

将 pGBKT7-UL23 诱饵质粒和构建在 pACT2 载体上的人胚肾 cDNA 文库质粒 pGADT7 共转化酵母 AH 109 中, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上培养. 7 d 后, 从中挑选 100 个长势良好的克隆进行 β -半乳糖苷酶活性检测, 得到 79 个 β -半乳糖苷酶活性阳性的克隆, 结果如图 3A. 选取 11 个阳性克隆抽提质粒并电转入大肠杆菌 DH5 α 中, ampr 筛选, 抽提质粒, PCR 扩增 pACT2 中的文库插入片段, PCR 产物进行 Hae III 单酶切, 酶切后的样品进行琼脂糖凝胶电泳(如图 3B), 进行对比除重复, 最后将非重复克隆递交测序, 测序结果在 GenBank 上进行同源性和序列比对分析, 其中与 UL23 蛋白有相互作用的蛋白之一就是 eIF3e (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E interacting protein).

3.4 eIF3e 与 UL23 的回复性杂交确证检测

为确认 eIF3e 与 UL23 在酵母中的相互作用, 我们进行了回复性杂交确证检测, 结果如图 4-A; 之后再行 β -半乳糖苷酶活性检测, 结果如图 4-B 所示, 结果表明 UL23 在酵母中能与 eIF3e 相互作用.

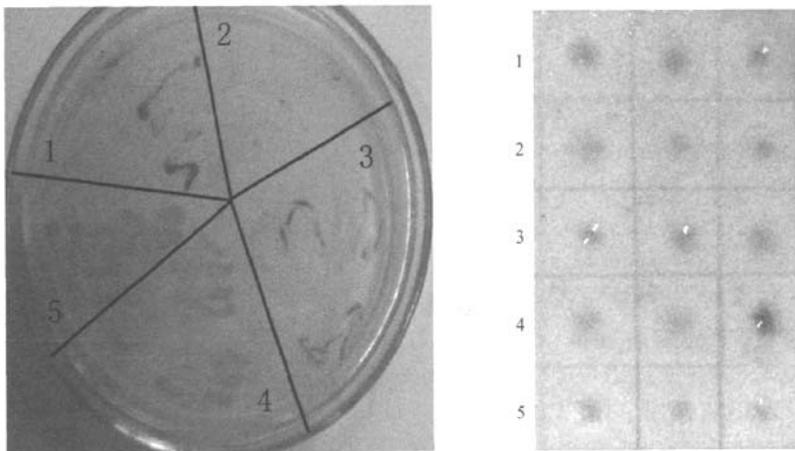


(A) β -半乳糖苷酶活性检测

(B) 琼脂糖凝胶电泳

M: DNA Ladder; 1 - 11: 阳性克隆

图 3 酵母双杂交实验筛选与 pUL23 相互作用的蛋白质



(A) SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade

(B) β -半乳糖苷酶活性检测

A: 1: AD + BD-UL23; 2: 阴性对照; 3: AD-eIF3e + BD; 4: AD-eIF3e + BD-UL23; 5: 阳性对照.

B: 1: AD-eIF3e + BD-UL23; 2: AD-eIF3e + BD; 3: AD + BD-UL23; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照.

图 4 回转变实验验证 pUL23 和 eIF3e 的相互作用

4 讨论

已经有研究表明人巨细胞病毒感染能激活和诱导多种细胞蛋白, 如热休克蛋白、酶、DNA 代谢酶、转录因子等. 此外人巨细胞也能通过病毒的结构蛋白在病毒基因表达前影响细胞的生理活动^[6]. 人巨细胞病毒 US22 家族成员包括 UL23、UL24、UL28、UL29、UL36、UL43、TRS1、IRS1、US22、US23、US24 和 US26 等一共 12 个成员, 他们广泛参与病毒的生长过程, 而对于 UL23 基因, 目前仅知道它能编码一个 33 ku 的病毒皮层蛋白, 在细胞内定位在核周边, 它

的缺失能导致病毒在人包皮成纤维细胞中的繁殖速度加快.

而本次筛选出来与 UL23 有相互作用的 eIF3e 属于真核翻译起始因子(eIF3)的一个亚基. eIF3 是最大的真核起始因子, eIF3 在真核翻译起始进程中起着核心作用, 它可以与不同的真核起始因子以及 RNA 结合来调控整个翻译起始进程^[7-8]. 除了在翻译起始过程中发挥核心作用, eIF3 还被发现参与翻译过程以及细胞周期的调控^[9-10]. 通过调节不同类型的 mRNA 的翻译起始, eIF3 就可能选择性地调控蛋白的合成, 从而对细胞的生长进行调控. eIF3 是

一个多亚基复合物,也是最复杂的起始因子,哺乳动物中存在13种不同的亚基(a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l和m),其中a、b、c、g、i为核心亚基,e亚基并不是核心亚基,它在eIF3这个复合体中的功能还不是很清楚。在哺乳动物中,eIF3的e亚基(eIF3e)由Int6基因编码,而Int6基因是鼠乳腺癌病毒(mouse mammary tumor virus)基因组的整合位点。而病毒基因组的插入能够导致生成被剪切的eIF3e,表达被剪切的eIF3e就能够导致细胞发生癌变^[11]。因此,eIF3e虽然不直接引发癌症,但却与癌症的发生密切相关。eIF-3e在细胞核内和胞浆中均有分布,而且胞浆中的eIF-3e能与COP9信号肽(CSN)H和蛋白酶体相互作用,参与蛋白质降解而在蛋白质平衡中发挥作用。更重要的一个发现是,在对模式生物酵母菌的研究中有迹象表明eIF-3的一个蛋白质亚基eIF-3e在真核细胞的耐药中发挥了作用^[12]。还有研究表明,过量的eIF3e会抑制翻译的进行^[13],而利用RNA干扰技术敲除Int6基因后,NMD(nonsense-mediated mRNA decay)被强烈的抑制^[14]。以上结果使我们联想到UL23是否是通过与eIF3e相互作用进而影响细胞的生理活动过程,从而达到与细胞“共生”,这还需要进一步的试验来证实。在后续的实验,我们可以通过GST-pull down技术在体外进一步确认eIF3e与UL23之间的相互作用。在确认他们之间的相互作用后,我们可以构建一系列的eIF3e的缺失突变体克隆,然后利用GST-pull down技术验证这些eIF3e的缺失突变体是否与UL23有相互作用,从而确定eIF3e与UL23相互作用的关键区域,为下一步研究UL23在人巨细胞病毒与细胞之间所起到的作用提供更充分的依据。

[参考文献]

- [1] YOW M D, WHITE N H, TABER L H, et al. Acquisition of cytomegalovirus infection from birth to 10 years: a longitudinal serologic study[J]. *The Journal of Pediatrics*, 1987, 110(1): 37 - 42.
- [2] WANG P S, EVANS A S. Prevalance of antibodies to Epstein-Barr Virus and cytomegalovirus in sera from a group of children in the People's Republic of China[J]. *Infect Dis*, 1986, 153(1): 150 - 152.
- [3] YU D, SILVA C M, SHENK T, et al. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis[J]. *PNAS*, 2003, 100(21): 12396 - 12401.
- [4] ADAIR R, DOUGLAS R E, MACLEAN B J, et al. The products of human cytomegalovirus genes UL23, UL24, UL43 and US22 are tegument components[J]. *Gen Virol*, 2002, 83(pt): 1315 - 1324.
- [5] DUNN W, CHOU C, Li H, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome [J]. *PNAS*, 2003, 100(24): 14223 - 14228.
- [6] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] VIRGINIA M PAIN. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells[J]. *EJB*, 1996, 236: 747 - 771.
- [8] HINNEBUSCH A G. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes [J]. *Trends in Biochemical Sci*, 2006, 31: 553 - 562.
- [9] DONG Zi - zheng, ZHANG Jian - ting. Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 59: 169 - 180.
- [10] STEPHANE PYRONNET, NAHUM SONENBERG. Cell-cycle-dependent translational control [J]. *Current Opinion Genet Dev*, 2001, 11: 13 - 18.
- [11] MAYEUR G L, HERSHEY J W. Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3e) [J]. *FEBS Lett*, 2002, 514: 49 - 54.
- [12] 魏群, 曹江. 真核翻译起始因子与肿瘤[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29: 197 - 201.
- [13] AVITAL YAHALOM, TAE-HOUN KIM, BIJOYTTA ROY, et al. Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation [J]. *The Plant Journal*, 2008, 53: 300 - 311.
- [14] CHRISTELLE MORRIS, JURGEN WITTMANN, HANS-MARTIN JACK, et al. Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay [J]. *EMBO Reports*, 2007, 8: 596 - 602.

[责任编辑:黄建军]