

鸡贫血病毒 VP3 蛋白序列与其核定位功能的相关性*

陶 冶 张靖溥**

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 编码一种小蛋白 VP3. 通过构建 vp3 基因与绿色荧光蛋白基因的真核融合表达载体, 转染 5 种肿瘤/转化细胞株, 观察绿色荧光在亚细胞区域的定位, 证实 VP3 具有核定位的功能; 分析 VP3 的氨基酸序列, 将其具核定位序列 (nuclear localization sequence, NLS) 特征的区域删除, 再构建此缺失的 VP3 的基因与绿色荧光蛋白基因的真核融合表达载体、转染实验显示核定位现象消失; 进一步将具核定位序列特征的区域亚克隆到绿色荧光蛋白真核表达载体上, 核定位功能再现. 从而推断这一区域是 VP3 蛋白核定位的功能区. 此区域位于 VP3 的 C 端, 且富含碱性氨基酸, 二级结构预测发现这一区域形成特定的 β 折叠结构. 用碘丙锭 (propidium iodide, PI) 染色的方法还得到了 VP3 促进肿瘤细胞凋亡的初步证据.

关键词 VP3 蛋白, 肝癌细胞系, 绿色荧光蛋白, 脂质体转染, 核定位序列, 细胞凋亡

学科分类号 Q28

真核细胞中物质转运入细胞核的现象称为核定位^[1]. 核定位是一个受到严格调控的过程, 是真核细胞基因调控中一个重要的控制点^[2]. 核定位蛋白都具有一段核定位序列, 是其进入细胞核必需的^[3]. 鸡贫血病毒是一种禽类小病毒^[4], 它编码一种小蛋白 VP3, 具有诱导哺乳动物肿瘤和转化细胞凋亡的功能^[5]. 有研究认为这种功能与 VP3 的核定位有关^[6], 但对其核定位现象在哺乳动物肿瘤和转化细胞中是否具有普遍性还不清楚, 对其核定位序列和核定位机理还只有推测^[7].

本文通过构建 vp3 基因、vp3 基因片段与绿色荧光蛋白基因融合的真核表达载体, 用其转染肿瘤/转化细胞系对上述问题进行了研究.

本文还用 vp3 基因的真核表达载体转染 Smmu7721 后, 用碘丙锭 (PI) 染色, 通过观察到核碎裂现象, 得到了 VP3 诱导细胞凋亡的初步证据.

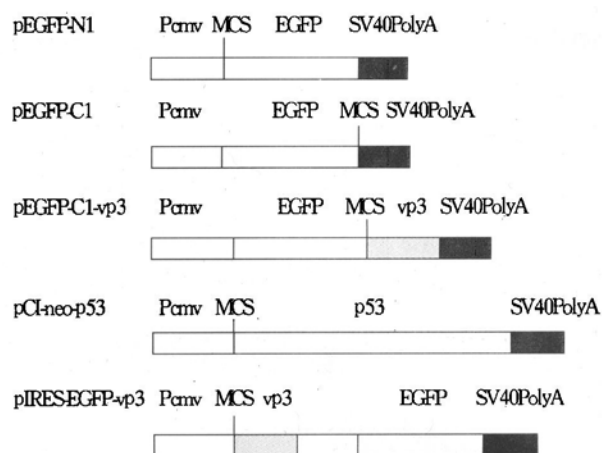
1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 Smmu7721 (中国药品及生物制品检定所李湛君老师惠赠), 人肝癌细胞株 HepG2 (军事医学科学院刘军博士赠送) 大鼠肝癌细胞株 HTC (澳大利亚堪培拉大学 David 教授赠送), 人胚肾细胞株 293 (购自中国基础医学科学院细胞中心), 小鼠成纤维细胞株 Ψ 2 (购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心), PEGFP-N1 载体与 pEGFP-C1、pIRES-EGFP 载体 (澳大利亚国立大学 Claus Matthaei 博士赠送, CLONTECH 公司产

品), pCI-neo-p53 (北京医科大学谭焕然教授赠送), vp3 基因 (北京市农业科学院周文平教授惠赠). 其他试剂均购自 GIBCO/BRL 公司.

1.2 表达载体



1.3 基因片段删除和亚克隆

从 VP3 氨基酸序列发现含有具核定位序列特征的序列; 即: 含有两个碱性氨基酸区域 (图 1). 用分子生物学方法^[8]删除这两个碱性氨基酸区域, 可得到去掉一个碱性氨基酸区域和去掉两个碱性氨基酸区域的真核细胞表达载体 pEGFP-C1-VP3-d1 和 pEGFP-C1-vp3-d2, 可将这两个碱性氨基酸区域亚克隆到 pEGFP-C1, 得到 pEGFP-C1-NLS.

* 中国科学院留学回国启动基金资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62551218, E-mail: cqjp@public.east.cn.net

收稿日期: 2001-05-17, 接受日期: 2001-07-23

```

(+) 1 atg aac gct ctc caa gaa gat act cca ccc gga cea tca acg gtg ttc agg cca cca aca
N端:1 M N A L Q E D T P G P S T V F R P P T

61 agt tea cgg cgg tgg gaa acc cct cac tgc aga gag atc cgg att ggt atc gct gga att
21 S S R P L E T P H C R E I R I G I A G I

121 aca atc act cta tgg ctg tgt ggc tgc gcg aat gct cgc gct ccc acg cta aga tct gca
41 T I T L S L C G C A N A R A P T L R S A

181 act gcg gac aat taa gaa agc act ggt ttc aag aat gtg cgg gac tgg agg acc gaa caa
61 T A D N S E S T G F K N V P D L R T D Q

241 ccc aag cct ccc tgg aag aag cga tcc tgc gac ccc tcc gag tac agg gta agc gag cta
81 P K P P S K K R S C D P S E Y R V S E L

301 aaa gaa agc tgg att acc act act ccc acg cga ccc cga acc gca aga agg cgt ata aga
101 K E S L I T T T P S R P R T A R R I R

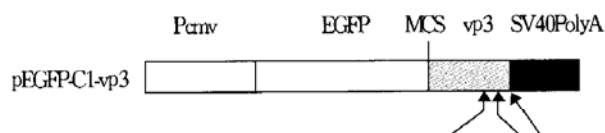
361 ctg taa
121 L STOP C端

```

Fig 1 Amino acid sequence and nucleotide sequence of vp3 gene

121 amino acids in total including 21 basic amino acids (black characters) which points to the sites where the fragments of the gene was deleted from two basic amino acid regions (characters within frames 4).

pEGFP-C1-vp3 经 *Bgl* II + *Bam* HI 双切得到 4.9 kb 大片段和 200 bp 小片段, 4.9 kb 大片段两端自连, 得到删除两个碱性氨基酸区域的质粒 pEGFP-C1-vp3-d2 (缺失两个碱性氨基酸区域); 将 200 bp 小片段插入 pEGFP-C1 载体, 得到 VP3 核定位序列的表达载体 pEGFP-C1-NLS. pEGFP-C1-vp3 经 *Hind* III + *Bam* HI 双切, 取其 5.0 kb 大片段, 用 klenow 补平、自连, 得到在 C 端删除一个碱性氨基酸区域的质粒 pEGFP-vp3-d1 (缺失 1 个碱性氨基酸区域). 经限制性内切酶图谱鉴定, 上述构件正确.



1.4 细胞培养与转染

以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基或 MEM 培养基, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养人肝癌细胞系 Smmu7721、HepG2, 大鼠肝癌细胞株 HTC, 转化细胞株 293 (人胚肾细胞株)、ψ2 (小

鼠成纤维细胞株), 按 1×10^5 个/ml 传代于 35 mm 平皿中, 24 h 后用脂质体介导法以质粒 pEGFP-N1 或 pEGFP-C1、pEGFP-C1-vp3、pEGFP-C1-vp3-d1、pEGFP-C1-vp3-d2、pEGFP-C1-NLS、pCI-neo-p53 和 pIRES-EGFP-vp3 分别转染上述细胞: 取 12 μl 脂质体转染试剂 LIPOFECTAMINE, 用 DMEM 无血清培养基稀释为 100 μl, 两者轻轻混合, 室温 30 min. 细胞先用无血清 DMEM 培养基清洗两次, 脂质体与质粒混合液中加入 DMEM 无血清培养基至 1 ml, 加到细胞表面. 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 5 h 后, 换成完全培养基. 继续培养 24 h 后, 495 nm 波长下, 用荧光显微镜观察并照相.

1.5 PI 染色

转染 pCI-neo-p53 和 pIRES-EGFP-vp3 的 Smmu7721 细胞及未转染的 Smmu7721 细胞用 50 mg/L PI 染液染色 2~3 min, 495 nm 波长下, 荧光显微镜观察并照相.

1.6 二级结构预测

以 GOR IV 算法^[9]对 VP3 二级结构进行了预测.

2 结果与讨论

2.1 核定位现象的观察

人肝癌细胞株 Smmu7721、HepG2, 大鼠肝癌细胞株 HTC, 转化细胞株 293 (人胚肾细胞株)、ψ2 (小鼠成纤维细胞株) 转染后 24 h, 用荧光显微镜在 495 nm 激发波长下观察绿色荧光在细胞中的分布. 结果显示: pEGFP-N1 或 pEGFP-C1 转染后, 绿色荧光分布于整个细胞质中, 而 pEGFP-C1-vp3 转染后, 绿色荧光聚集于细胞核区域 (图 2a~j). 说明 VP3 蛋白在上述细胞中具有核定位的功能. 对 VP3 的核定位功能作出研究的荷兰 Leiden 大学 Noteborn 等应用免疫荧光的方法证明了 VP3 在骨肉瘤等几种人类肿瘤/转化细胞中的核定位^[10]. 但是还不清楚 VP3 在其他哺乳动物细胞中是否也具有核定位的功能. 本文中以 5 种其他细胞株为实验材料, 都证实了 VP3 的核定位功能; 这 5 种细胞有两种人肝癌细胞、大鼠肝癌细胞, 转化了的人胚肾细胞, 小鼠成纤维细胞, 结合已知的研究结果, 我们认为 VP3 定位在哺乳动物肿瘤/转化细胞核上很可能是具有普遍性的.

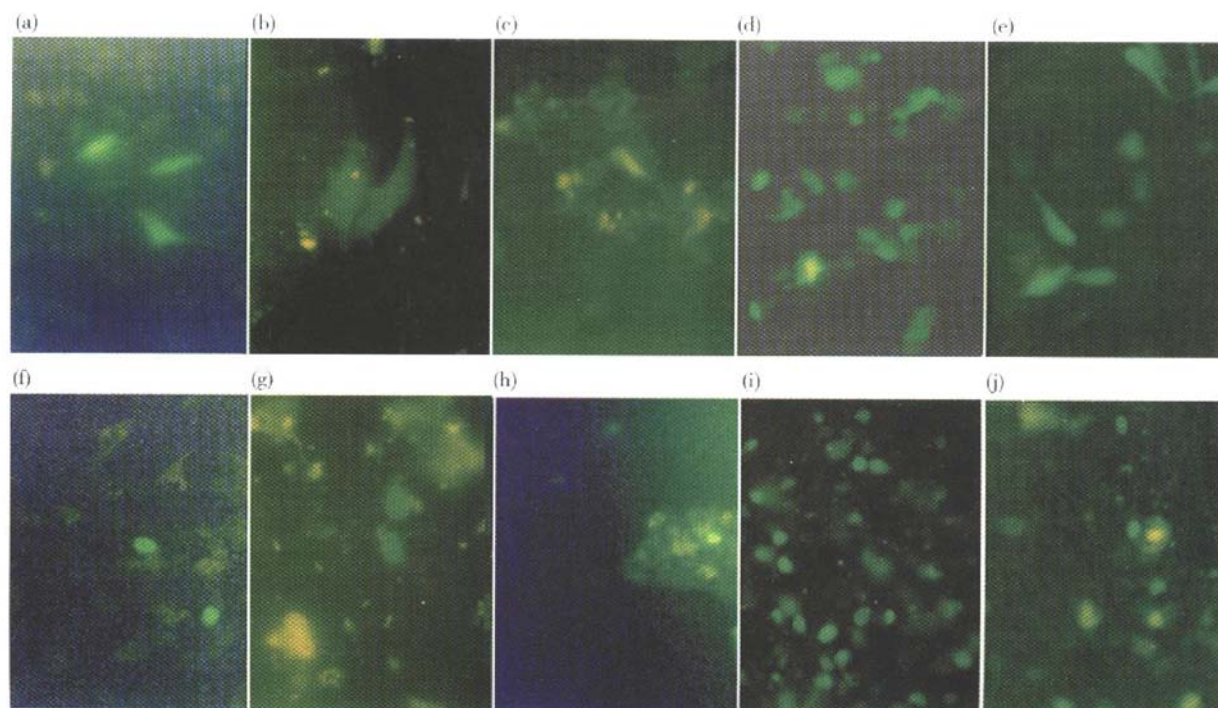


Fig. 2 VP3's nuclear localization function

The following cell strains transfected by pEGFP-N1 or pEGFP-C1 show green fluorescence all over the cytosol (a) ~ (e). When transfected by pEGFP-C1-VP3, the following cell strains show green fluorescence aggregates in the nuclear (f) ~ (j). These mean VP3 has the nuclear localization function. Smmu7721 transfected by pEGFP-N1 (a) and pEGFP-C1-VP3 (f); HepG2 transfected by pEGFP-C1 (b) and pEGFP-C1-VP3 (g); HTC transfected by pEGFP-N1 (c) and pEGFP-C1-VP3 (h); 293 transfected by pEGFP-C1 (d) and pEGFP-C1-VP3 (i); Ψ 2 transfected by pEGFP-C1 (e) and pEGFP-C1-VP3 (j). $E_s = 495 \text{ nm}$ ($200\times$).

2.2 VP3 核定位序列与 VP3 的核定位功能

pEGFP-C1-VP3-d2 转染 Smmu7721 后, 用荧光显微镜 495 nm 波长下观察绿色荧光在细胞中的分布. 可看到绿色荧光分布于整个细胞质中而不再聚集在细胞核中 (图 3a). 由于 pEGFP-C1-VP3-d2 表达的融合蛋白是删除了 C 端两个碱性氨基酸区域

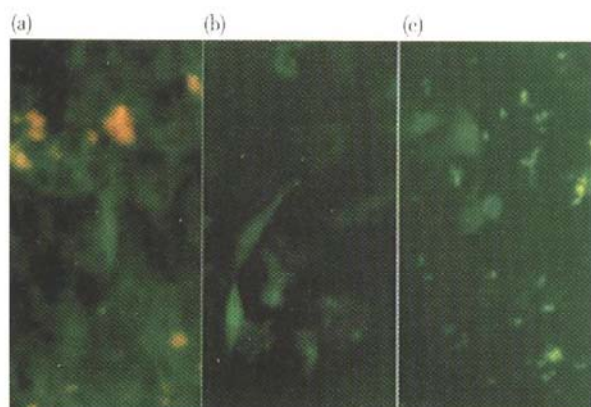


Fig. 3 VP3 nuclear localization sequence and VP3's function of nuclear localization

Smmu7721 transfected by pEGFP-C1-VP3-d2, shows green fluorescence all over the cytosol (a), Smmu7721 (b) and HepG2 (c) transfected by pEGFP-C1-VP3-NLS show green fluorescence aggregate in the nuclear mainly. These results mean that the region of two basic amino acids is

VP3's nuclear localization sequence. $E_s = 495 \text{ nm}$ ($200\times$).

的蛋白 EGFP-VP3-d2, 结果表明失去了核定位的能力, 所以我们认为这两个碱性氨基酸区域可能是 VP3 的核定位序列; pEGFP-C1-VP3-NLS 转染 Smmu7721 (图 3b)、HepG2 (图 3c) 后绿色荧光大部分定位于细胞核, 表明 VP3 的碱性氨基酸区域可引导与其融合的蛋白质入核. 这些结果说明这 2 个碱性氨基酸区域就是 VP3 的核定位序列.

pEGFP-C1-VP3-d1 转染 Smmu7721 (图 4a)、

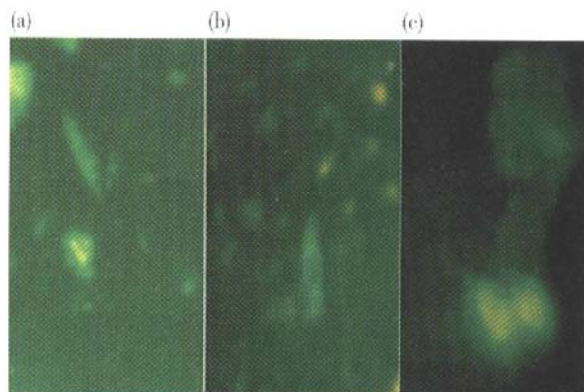


Fig. 4 Deletion of a part of VP3 nuclear localization sequence
Smmu7721 (a), HepG2 (b), HTC (c) transfected by pEGFP-C1-VP3-d1 show green fluorescence all over the cytosol. This result means the region of basic amino acids of VP3's C end is very important to VP3's nuclear localization.

- chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virology*, 1994, **68** (1): 346~ 351
- 6 Zhuang S M, Shvarts A, van Ormondt H, *et al.* Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces P53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res*, 1995, **55** (3): 486~ 489
 - 7 陶冶, 张靖溥. Apoptin——一种特异地促进肿瘤细胞凋亡的蛋白. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (5): 19~ 22
Tao Y, Zhang J P. *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (5): 19~ 22
 - 8 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 53~ 101
 - 9 Garnier J, Gibrat J F, Robson B. Gor secondary prediction method version IV. In: Doolittle R F, eds. *Methods in Enzymology*, **266**. New York: Academic Press, 1996. 540~ 553
 - 10 Daner Van Oorschot A A M, Fisher D F, Grimbergen J M, *et al.* Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5843~ 5847
 - 11 杨景山主编. *医用细胞化学与细胞生物学技术*. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 120~ 121
Yang J S. *Cytochemical and Cytobiological Techniques*. Beijing: Beijing Medical University Press, 1990. 120~ 121

The Relationship Between Chicken Anemia Virus's VP3 Protein Sequence and Its Nuclear Localization Function^{*}

TAO Ye, ZHANG Jing-Pu^{**}

(*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract Chicken anemia virus (CAV) encodes a small protein, VP3. A fusion gene construct which can express the fusion protein of enhanced green fluorescence protein (EGFP) and VP3 in eukaryotic cells, was transfected into five cell lines, human hepatoma cell strain Smmu7721, HepG2, rat hepatoma cell strain HTC, human embryo kidney cell strain 293 and mouse fibroblast cell strain Ψ 2. The green fluorescence was observed within the nuclei of the strains. While the control plasmid, which can express only enhanced green fluorescence protein in eukaryotic cells, was transfected into these cell strains, the green fluorescence was observed around the whole cytosol. This means that VP3 has the function of nuclear localization in these cell strains. After the analysis of the amino acid sequence of VP3, a domain of the amino acid sequence of the protein that has the character of nuclear localization sequences (NLS) was found. Deletion of this domain from VP3 led to the deprivation of nuclear location in human hepatoma cell strain Smmu7721. This domain was subcloned and fused to EGFP. The fusion gene construct was transfected to human hepatoma cell strains. The green fluorescence could be seen again to locate mainly in the nuclei. Deletion of the basic amino acids region near the C end of VP3 also led to the deprivation of nuclear location. The prediction of the secondary structure of VP3 shows that the basic amino acid region near the C end can form a β -sheet. This means that the basic amino acids region near the C end is very important for VP3 nuclear localization. The domain maybe the NLS of VP3. After a vector that could only express VP3 was transfected into Smmu7721 and stained the cells with propidium iodide (PI), the primary evidence of VP3 inducing apoptosis was obtained.

Key words VP3, hepatoma cell strain, green fluorescence protein, cationic lipid transfection, nuclear localization sequence, apoptosis

^{*} This work was supported by Initiative Fund for Returned Scholars, The Chinese Academy of Sciences.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62551218, E-mail: cqjp@public.east.cn.net

Received: May 17, 2001 Accepted: July 23, 2001