

人 APOBEC-3F 和-3G 的克隆表达、亚细胞定位及其抑制 HBV 的研究*

王革非^{1,2)} 彭程³⁾ 李卫中^{1,2)} 辛岗^{1,2)} 苏芸^{1,2)}
陈幼莹^{1,2)} 林桂梅^{1,2)} 李康生^{1,2)**}

(¹⁾ 汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室, 汕头 515041; (²⁾ 汕头大学医学院广东省免疫病理重点实验室, 汕头 515041;

(³⁾ 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科, 武汉 430030)

摘要 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic-polypeptide, APOBEC)家族成员, 是近年来发现的具有抗病毒作用的天然免疫分子, 对 HIV 和 HBV 等多种病毒具有抑制作用, 为研究 APOBEC 的抗病毒作用, 对 APOBEC-3F 和 -3G 进行克隆、表达及亚细胞定位分析. HBV 主要的生物合成发生于细胞核中, 利用核定位信号(NLS)及二联核定位信号(B-NLS)与 APOBEC-3F 和 -3G 融合表达, 以进一步了解 APOBEC-3F 和 -3G 的亚细胞定位及功能. 利用 RT-PCR 从植物凝集素(PHA)刺激的人外周血淋巴细胞 RNA 中, 对 APOBEC-3F 和 -3G 进行克隆, 利用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切插入到 pcFlag 载体中, 脂质体转染 MDCK 细胞后利用免疫荧光检测 APOBEC 重组蛋白的亚细胞定位. 电泳结果表明, RT-PCR 扩增得到 APOBEC-3F 和 -3G 基因, 双酶切鉴定结果表明, APOBEC 真核表达载体构建成功, 基因序列经 DNA 测序证实. 免疫荧光结果表明, 转染表达后的 APOBEC-3F 和 -3G 均定位于细胞胞浆中. APOBEC-3F 和 -3G 可以在 HepG2.2.15 细胞中显著抑制 HBV 的复制. 可以有效转运绿色荧光蛋白(GFP)入核的 NLS 及 B-NLS, 不能将 APOBEC-3F 和 -3G 有效地转运至核中. 成功地对 APOBEC 家族中的两个重要成员 APOBEC-3F 和 -3G 进行了克隆、表达及亚细胞定位研究, 为进一步利用 APOBEC 家族蛋白开发抗 HIV 及 HBV 药物提供基础.

关键词 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽, 表达, 亚细胞定位, HBV, 核定位信号

学科分类号 R392, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00448

载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic-polypeptide, APOBEC)家族, 是近年来发现的具有抗多种病毒作用的天然免疫分子^[1]. APOBEC 属于细胞胞嘧啶脱氨酶家族, 能够诱导 DNA 或 RNA 中的胞嘧啶(C)通过脱氨基作用转换为尿嘧啶(U)^[2]. 人来源的 APOBEC 家族成员包括 APOBEC-1、APOBEC-2、APOBEC-3A、APOBEC-3B、APOBEC-3C、APOBEC-3D/E、APOBEC-3F、APOBEC-3G、APOBEC-3H 和 APOBEC-4^[3]. APOBEC 家族蛋白对多种病毒具有抑制或超突变作用, 包括人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)^[4~6]、猿猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)^[7]、泡沫病毒(foamy virus, PFV)^[8]、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)^[9,10]、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)^[11]等多种病毒. 因此, APOBEC 家族蛋白在抗感染天然免疫中具有重要

作用.

为研究 APOBEC 的抗病毒作用, 本文对 APOBEC 家族中的两个重要成员 APOBEC-3F 和 -3G, 进行了克隆、表达及亚细胞定位研究, 为进一步利用 APOBEC 家族蛋白开发抗 HIV 及 HBV 药物提供基础.

1 材料与方法

1.1 质粒

pcFlag 真核表达载体为汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室构建保存, 该质粒以 pcDNA3

* 国家自然科学基金(30571674, 30771988)和广东省自然科学基金(05008347, 04020239)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

收稿日期: 2008-06-23, 接受日期: 2008-09-22

为骨架, 在 CMV 启动子下游、多克隆位点前加入了 Flag 标签(DYKDDDDK).

1.2 细胞及培养基

犬肾上皮细胞系 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 细胞, 培养基为含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 的 minimum essential medium (MEM, GIBCO PRL) 培养基, 细胞为汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室保存. HepG2.2.15 细胞为稳定表达 HBV 的 HepG2 细胞系.

1.3 引物

在 GenBank 及 GeneCard 中检索到相应基因的标准序列, 使用 DNAStar 中的 EditSeq 和 MapDraw 对序列进行编辑和酶切位点分析, 使用 Primer 5.0、Blast 和 ePCR 软件设计评价引物序列. 引物在上海生工生物技术公司合成. 其中, hA3F 和 hA3G 使用共同的上游引物: 5' GTCAAGCTTATGAAG-CCTCACTTCAGAAAC 3', 含有 *Hind* III 酶切位点和起始密码子 ATG; hA3F 的下游引物为 5' CAG-GGTACCTCACTCGAGAATCTCCTG 3', hA3G 的下游引物为 5' CAGGGTACCTCAGTTTTCTGAT-TCTGGAG 3', 均含有 *Kpn* I 酶切位点和终止密码子 TGA.

1.4 人外周血淋巴细胞 RNA 的提取

收集健康志愿者抗凝血, 用无菌 PBS 缓冲液将抗凝血进行 1:1 稀释, 取 5 ml 稀释后的血液铺在装有 5 ml 淋巴细胞分离液的 15 ml 无菌离心管中, 室温下 1 200 r/min 离心 20 min. 将淋巴细胞层吸出, 转至装有 10 ml RPMI 1640 培养基的离心管中, 混匀后室温下 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基悬浮细胞, 以 10^6 个/孔的浓度接种于六孔板中, 加入 5 mg/L 的植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA, Sigma 公司)刺激, 细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养. 刺激 12 h 后, 淋巴细胞用于 RNA 的提取.

1.5 APOBEC-3F 和-3G 的 RT-PCR 及真核表达载体的构建

所提取的 RNA, 用 SuperScript III RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen 公司) 和 Oligo dT 引物(Invitrogen 公司)进行反转录, 反应体系为 20 μ l, 按产品说明书配制. RNA、dNTP 和引物混合后, 于 65℃ 处理 5 min 后快速冰浴, 加入 DTT、缓冲液和逆转录酶, 50℃ 继续反应 60 min 完成反转录, 70℃ 15 min 灭活反转录酶. 用 1.3 中的引物进行 PCR 扩增. PCR 条件为: 94℃ 3 min 后进入

循环; 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 32 个循环; 72℃ 5 min. APOBEC-3F 和 -3G 的片段克隆至 Flag 标签 N 端融合表达载体 pcFlag, 并进行基因测序.

1.6 MDCK 细胞的转染及稳定表达细胞系的构建

使用脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)将质粒分别转染至约 95% 融合率的 MDCK 细胞中, 转染剂量和操作见试剂说明书. 转染后约 48 h 用含有 800 mg/L G418 的培养基进行筛选, 每 3~5 天换液, 约 3 周左右肉眼可见到抗性细胞集落. 各细胞集落扩大培养后, 将部分细胞接种至另一块 24 孔板中, 使用免疫荧光检测 hA3F 和 hA3G 的表达情况, 选取阳性细胞最多的集落进行扩大培养.

1.7 APOBEC-3F 和-3G 表达细胞系的检测

Western blotting 检测细胞重组表达的 hA3F 和 hA3G. hA3F 和 hA3G 用含有蛋白酶抑制剂 Complete Protease Inhibitor Cocktail(Roche Diagnostics) 的细胞裂解液 Cytobuster 缓冲液(Novagen 公司)裂解、处理后, 于 12% 凝胶中行 SDS-PAGE 转印. NC 膜经含有 5% 脱脂奶粉的 TBST(含有 0.1% Triton X-100 的 TBS 缓冲液, pH7.6)封闭, TBST 洗 3 遍, 用含有 1:1000 稀释的小鼠抗 FLAG 单抗的 TBST 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 遍, 加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 5 遍后, 化学发光底物 ECL(GE 公司)作用 NC 膜, 使用凝胶成像系统成像.

流式细胞术检测 hA3F 和 hA3G 表达阳性细胞比例. 将 hA3F 和 hA3G 的表达细胞用胰酶消化成单细胞悬液, PBS 洗 3 遍, 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, PBS 洗 5 遍去除残留乙醇, 用细胞穿透缓冲液室温作用 3 min 后, PBS 洗 3 遍. 加入 1:500 的小鼠抗 FLAG 单抗(mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Sigma 公司)室温孵育 60 min. 弃去抗体液, PBS 洗 2 遍后, 加入 1:200 稀释的 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 二抗, 继续孵育 60 min, PBS 洗 2 遍后上流式细胞仪分析. 检测 FITC 通道的荧光强度, 采集超过 5 000 个细胞的样本数据, 用 WinMed2.9 软件进行分析, 绘制直方图, 设立未加一抗的对照组和 MDCK 细胞对照组.

用爬片法将细胞贴壁生长于盖玻片上, 经固定与穿透后, 用免疫荧光法进行重组蛋白的定位检测^[2], 加入含有 1:2000 稀释的小鼠抗 FLAG 单抗的 PBS-B(含有 1% BSA 的 PBS, pH7.2), 室温孵育 60 min, PBS 洗 3 遍. 加入含有 1:200 稀释的

Cy3 标记抗小鼠 IgG 荧光二抗的 PBS-B, 室温孵育 60 min 后, 加入终浓度 5 mg/L 的 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid(DAPI, 碧云天公司), 室温染色 5 min, PBS 洗 2 遍. 用 50%甘油的 PBS 封片, 荧光显微镜下拍照.

1.8 APOBEC-3F 和-3G 对 HBV 的抑制作用

将 hA3F 和 hA3G 的表达质粒及空载体使用脂质体 FuGENE 6 转染 HepG2.2.15 细胞. 4 μ g 的质粒 DNA 和 12 μ l FuGENE 6 转染一孔融合率约 70%接种于六孔板中的 HepG2.2.15 细胞. 转染 24 h 后, 弃去培养基及转染复合物, 用 PBS 将细胞单层洗 3 次, 加入新鲜培养基继续培养 48 h. 转染 72 h 后, 收集培养上清, 用于 HBV 基因组拷贝数的检测. 取 500 μ l HepG2.2.15 细胞转染后 72 h 的上清, 分别加入终浓度为 10 mmol/L 的 $MgCl_2$ 和 $CaCl_2$, 终浓度分别为 1% SDS、10 mg/L 蛋白酶 K 和 10 mg/L RNase A. 于 37 $^{\circ}C$ 处理 2 h、55 $^{\circ}C$ 处理 2 h, 加入 EDTA(pH8.0)溶液至终浓度为 0.1 mol/L 终止反应. 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 涡旋处理 2 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清转至新离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAC(pH5.2)沉淀 DNA, DNA 沉淀经 70%乙醇漂洗脱盐后风干, 溶解于 25 μ l 超纯水中, 用于实时 PCR 检测. 提取的 HBV 基因组 DNA, 用 HBV 实时定量 PCR 检测试剂盒(上海复星公司), 在 ABI 7700 荧光定量 PCR 仪上进行检测. 以 HBV 标准品 DNA 作标准曲线, 根据各检测样品的 CV 值, 计算检测上清中的 HBV 基因组拷贝数. 实验中设立强阳性、阳性和阴性血清 DNA 样品对照, 并检查 PCR 产物的熔解曲线, 确认 PCR 产物为单一扩增条带.

1.9 核定位信号对 APOBEC-3F 和-3G 亚细胞定位的影响

将 hA3F 和 hA3G 的 cDNA 与 NRDR-A2 的二联核定位信号(B-NLS)及 cirhin 的单核定位信号(NLS)进行融合表达载体的构建. 同时将绿色荧光蛋白(EGFP)与上述核定位信号进行融合表达载体的构建, 作为对照检测核定位信号转导重组蛋白的入核效率. 将表达载体瞬时转染 MDCK 细胞, 按方法 1.7, 对细胞进行免疫荧光检测, 观察核定位细胞对 APOBEC-3F 和 -3G 亚细胞定位的影响. 其中所使用的核定位信号为来源于 cirhin 的 NLS(氨基酸序列为 PPIKKKKF)^[13]和来源于 NRDR-A2 的 B-NLS(序列为 KRGKHERNPADKKVRRRA)^[14], 上

述定位信号分别融合表达于 hA3F 和 hA3G 的 C 端.

2 结 果

2.1 人 APOBEC-3F 和-3G 的克隆及表达载体构建

经 PHA 刺激 12 h 后的 PMBC 细胞, 经 RNA 提取和特异性引物 RT-PCR 后, 对扩增产物进行 TAE-琼脂糖电泳检测, 如图 1 所示, 在 1.2 kb 左右, 出现了 APOBEC-3F 和 -3G 的特异性扩增 DNA 带, 大小与预计相符. 对基因片段进行回收、酶切后, 插入到真核表达载体 pcFlag 中, 重组质粒经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, 如图 2 所示, 出现了预计的外源片段, 表明 APOBEC-3F 和 -3G 的真核表达载体构建成功, 分别标注为 pcFlag-3F 和 pcFlag-3G.

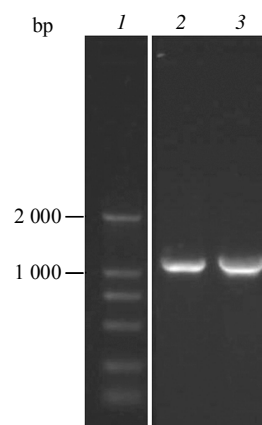


Fig. 1 RT-PCR products of APOBEC-3F and -3G

1: DNA marker DL-2000; 2: APOBEC-3F; 3: APOBEC-3G.

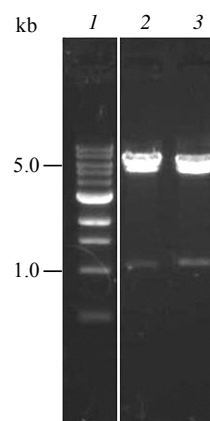


Fig. 2 Construction of APOBEC-3F and -3G expression plasmids

1: DNA marker 0.5 kb ladder; 2: pcFlag-3F digested by *Hind* III and *Kpn* I; 3: pcFlag-3G digested by *Hind* III and *Kpn* I.

2.2 人 APOBEC-3F 和-3G 的测序及序列分析

将 2.1 中构建的表达载体 pcFlag-3F 和 pcFlag-3G 进行双向测序, 对序列进行拼接后, 在 Blast 中与 GenBank 中的序列进行对比. APOBEC-3F 编码区的 DNA 序列见图 3, APOBEC-3G 编码区的 DNA 序列见图 4.

```
ATGAAGCCTC ACTTCAGAAA CACAGTGGAG CGAATGTATC GAGACACATT CTCCTACAAC TTTTATAATA
GACCCATCCT TTCTCGTCGG AATACCGTCT GGCTGTGCTA CGAAGTGAAA ACAAGGGGTC CCTCAAGGCC
CCGTTTGAGC GCAAAGATCT TTCGAGGCCA GGTGTATTCC CAGCCTGAGC ACCACGCAGA AATGTGCTTC
CTCTCTTGGT TCTGTGGCAA CCAGCTGCCT GCTTACAAGT GTTTCAGAT CACCTGGTTT GTATCCTGGA
CCCCCTGCCG GGAAGTGTG GCGAAGCTGG CCGAATTCCT GGCTGAGCAC CCCAATGTCA CCCTGACCAT
CTCCGCCGCC CGCCTCTACT ACTACTGGGA AAGAGATTAC CGAAGGGCGC TCTGCAGGCT GAGTCAGGCA
GGGGCCCCGG TGAAGATTAT GGACGATGAA GAATTGTCAT ACTGCTGGGA AAACCTTTGTG TACAGTGAAG
GTCAGCCATT CATGCCTTGG TACAAATTCG ATGACAATTA TGCATTCTGT CACCGCACGC TAAAGGAGAT
TCTCAGAAAC CCGATGGAGG CAATGTATCC ACACATATTC TACTTCCACT TTAACCACTT ACGCAAAGCC
TATGTCGGA ACGAAAGCTG GCTGTGCTTC ACCATGGAAG TTGTAAAGCA CCACTCACCT GTCTCTGGA
AGAGGGGCGT CTCCGAAAC CAGGTGGATC CTGAGACCCA TTGTCATGCA GAAAGGTGCT TCCTCTCTTG
GTTCTGTGAC GACATACTGT CTCCTAACAC AAACACTCAG GTCACCTGGT ACACATCTTG GAGCCCTTGC
CCAGAGTGTG CAGGGGAGGT GGCCGAGTTC CTGGCCAGGC ACAGCAACGT GAATCTCACC ATCTTCACCG
CCCGCCTCTA CTACTTCTGG GATACAGATT ACCAGGAGGG GCTCCGCAGC CTGAGTCAGG AAGGGGCTC
CGTGGAGATC ATGGGCTACA AAGATTTTAA ATATTGTTGG GAAAACCTTG TGTACAATGA TGATGAGCCA
TTCAAGCCTT GGAAGGACT AAAATACAAC TTTCTATTCC TGGACAGCAA GCTGCAGGAG ATTCTCGAGT
GA
```

Fig. 3 Sequence of human APOBEC-3F ORF

```
ATGAAGCCTC ACTTCAGAAA CACAGTGGAG CGAATGTATC GAGACACATT CTCCTACAAC TTTTATAATA
GACCCATCCT TTCTCGTCGG AATACCGTCT GGCTGTGCTA CGAAGTGAAA ACAAGGGGTC CCTCAAGGCC
CCCTTTTGAGC GCAAAGATCT TTCGAGGCCA GGTGTATTCC CAACTTAAGT ACCACCCAGA GATGAGATTC
TTCCACTGGT TCAGCAAGTG GAGGAAGCTG CATCGTGACC AGGAGTATGA GGTACCTGG TACATATCCT
GGAGCCCCGT CACAAAGTGT ACAAGGGATA TGGCCACGTT CCTGGCCGAG GACCCGAAGG TTACCTGTAC
CATCTTTGTT GCCCGCTCT ACTACTCTGT GGACCCAGAT TACCAGGAGG CGCTTCGAG CTGTGTGAG
AAAAGAGACG GTCCGCTGTC CACCATGAAG ATCATGAATT ATGACGAATT TCAGCACTGT TGGAGCAAGT
TCGTGTACAG CCAAAGAGAG CTATTTGAGC CTTGGAATAA TCTGCCTAAA TATTATATAT TACTGCACAT
CATGCTGGGG GAGATTCTCA GACACTCGAT GGATCCACCC ACATTCATT TCAACTTTAA CAATGAACCT
TGGGTGAGAG GACGGCATGA GACTTACCTG TGTATGAGG TGGAGCGCAT GCACAATGAC ACCTGGGTCC
TGCTGAACCA GCGCAGGGGC TTTCTATGCA ACCAGGCTCC CTGGACCTGG ACCAGGACTA CAGGGTTACC
TGCAGAGCTG TGCTTCTGG ACGTGATTCC CTTTGGGAG CTGGACCTGG ACCAGGACTA CAGGGTTACC
TGCTTCACTT CTGGAGGCC CTGCTTCAGC TGTGCCAGG AAATGGCTAA ATTCATTTC AAAAAACAAAC
ACGTGAGCCT GTGCATCTTC ACTGCCGCA TCTATGATGA TCAAGGAAGA TGTAGGAGG GGCTGCGCAC
CCTGGCCGAG GCTGGGGCCA AAATTTCAT AATGACATAC AGTGAATTTA AGCACTGCTG GGACACCTTT
GTGGACCACC AGGGATGTCC CTTCCAGCCC TGGGATGGAC TAGATGAGCA CAGCCAAGAC CTGAGTGGGA
GGCTGCGGGC CATTCTCCAG AATCAGGAAA ACTGA
```

Fig. 4 Sequence of human APOBEC-3G ORF

2.3 人 APOBEC-3F 和-3G 表达细胞的检测

为检测表达细胞系中 hA3F 和 hA3G 的表达情况, 用 Western blotting 对 hA3F 和 hA3G 转染的 MDCK 细胞进行了检测, 如图 5a 所示, 在约 45 ku 处出现了特异性免疫条带, 而未经转染的阴性细胞对照没有免疫反应条带, 表明转染的 MDCK 细胞表达 hA3F 和 hA3G 的重组蛋白. 免疫荧光实验结果表明, 转染的 MDCK 细胞系, 大部分细胞都出现阳性的荧光信号(图 5b). 流式细胞术对表达细胞检测的结果表明, 如图 5c 所示, 稳定表达 hA3F 和 hA3G 重组蛋白的阳性细胞比例

APOBEC-3F 编码区含有 1 122 bp, 编码 374 个氨基酸, 与 GenBank 中的序列 NM_145298 进行对比完全一致. APOBEC-3G 编码区含有 1 155 bp, 编码 385 个氨基酸, 与 GenBank 中的序列 NM_021822 进行对比分析存在 1 处差异, 第 357 位核苷酸出现 C 到 T 的转变.

超过 90%.

2.4 人 APOBEC-3F 和-3G 的亚细胞定位研究

将真核表达载体 pcFlag-3F 和 pcFlag-3G 转染 MDCK 细胞, 根据免疫荧光观察其在胞内的定位. 使用 Cy3 标记的抗 Flag 抗体检测 Flag 标签融合表达的 APOBEC-3F 和 -3G 重组蛋白, 为红色荧光信号. 使用 DAPI 对细胞核进行染色, 为蓝色荧光信号. 如图 6 所示, APOBEC-3F 和 -3G 重组蛋白呈密集点状主要分布在细胞胞浆, 而胞核位置无明显荧光信号. 表明 hA3F 和 hA3G 蛋白主要定位于细胞胞浆.

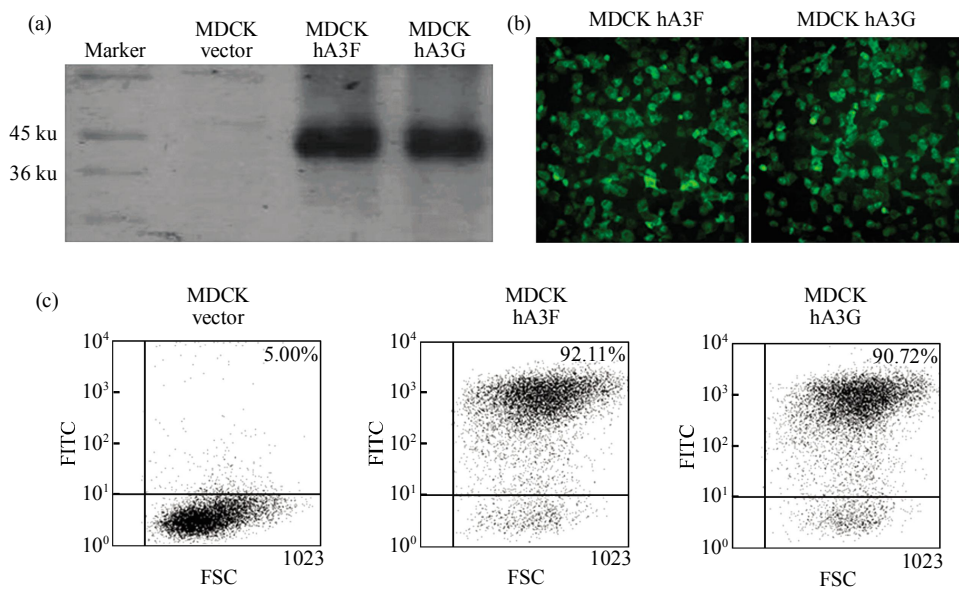


Fig. 5 Identification of stable expressing cell lines
(a) Western blotting. (b) Immunofluorescence. (c) FCM.

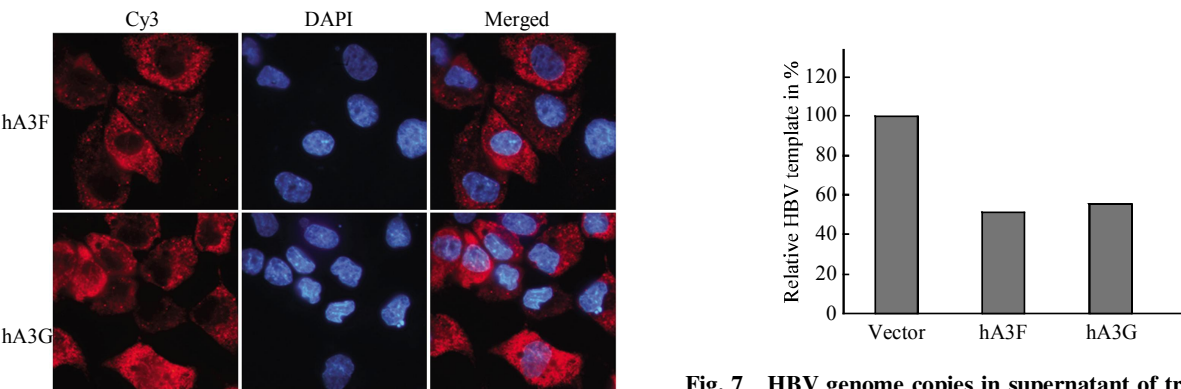


Fig. 6 Cellular localization of APOBEC-3F and -3G (1000×)

Fig. 7 HBV genome copies in supernatant of transfected HepG2.2.15 were detected by real-time PCR
Relative titers are given by setting the empty vector control to 100%.

2.5 人 APOBEC-3F 和-3G 对 HBV 具有抑制作用
为检测实验中所使用的 hA3F 和 hA3G 表达载体，是否可以在转染细胞中表达具有生物活性的重组蛋白，将 hA3F 和 hA3G 表达载体转染可稳定分泌 HBV 病毒的 HepG2.2.15 细胞，通过实时 PCR 检测上清中 HBV 病毒基因组拷贝数，来检测 hA3F 和 hA3G 表达载体在细胞中的抗病毒活性。如图 7 所示，以转染空载体的 HepG2.2.15 细胞分泌 HBV 的拷贝数为 100%，hA3F 和 hA3G 表达载体转染后的细胞分泌 HBV 的量分别为 51.65% 和 55.69%。表明本实验中进行细胞转染用的 hA3F 和 hA3G 表达载体，可在转染细胞中表达具有病毒抑制活性的重组蛋白。

2.6 核定位信号对 APOBEC-3F 和-3G 亚细胞定位的影响
利用 NLS 及 B-NLS 与 APOBEC-3F 和 -3G 融合表达，以进一步了解 APOBEC-3F 和 -3G 的亚细胞定位及功能。如图 8 所示，与 NLS 及 B-NLS 融合表达的 GFP 重组蛋白，主要表达于细胞核中，根据 10 个随机视野的计算，入核效率大于 95%。而 NLS 及 B-NLS 融合表达的 APOBEC-3F 和 -3G，仍然主要分布在细胞胞浆中(图 9)，根据 10 个随机视野的计算，入核效率均小于 10%。上述结果表明，可以有效引导 GFP 进入细胞核的 NLS 及 B-NLS，不能将 APOBEC-3F 和 -3G 有效地转运至细胞核。

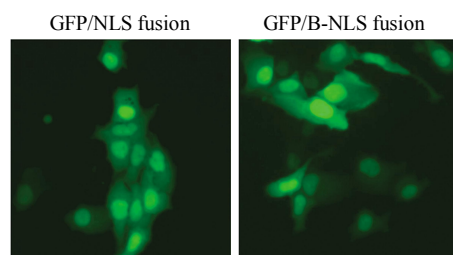


Fig. 8 Cellular localization of GFP/NLS and GFP/B-NLS (200×)

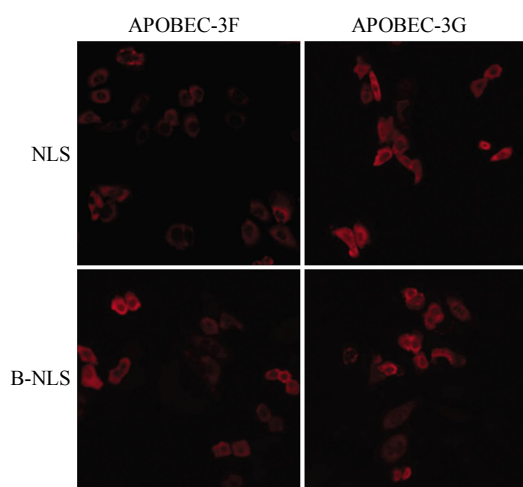


Fig. 9 Cellular localization of APOBECs and NLSs (200×)

3 讨 论

APOBEC 家族是近年来报道对多种病毒具有抑制活性的天然免疫分子. 本文对 APOBEC 两个最重要的成员 APOBEC-3F 和 -3G 进行了克隆和表达细胞系的构建. 基因序列分析发现, APOBEC-3G 基因序列与 GenBank 中的序列发生了一处 C 到 T 的突变, 利用不同供体重复多次克隆确认了该突变, 是潜在的 SNP 位点.

APOBEC 家族抗病毒功能可以通过至少 3 种途径发挥作用: DNA 编辑、RNA 编辑以及非编辑途径^[15, 16]. APOBEC 家族成员通过 DNA/RNA 编辑途径, 可以利用其胞嘧啶脱氨基活性, 将 HIV cDNA 上的胞嘧啶(C)突变为尿嘧啶(U), 同时也可直接对 HIV RNA 上的胞嘧啶进行突变, 使 HIV 基因组突变频率增加, 从而降低 HIV 的复制效率、抑制 HIV 的复制^[4, 15]. APOBEC 家族成员可以通过非编辑途径, 阻止 HBV 前体 RNA 的复制与组装, 从而抑制 HBV 复制. 与此同时, APOBEC 家族成员亦可以通过 DNA/RNA 编辑途径, 诱导 HBV 的基因组发生超突变效应^[9, 17~19].

另一方面, APOBEC 家族成员诱导的病毒基因组超突变, 为病毒的进化提供了促进因素, 病毒基因组序列的变化会改变其表型, 如逃避免疫识别、获得抗药性、提高宿主适应能力、扩展宿主感染范围等等, 与病毒的致病性、流行性及其进化都有着重要而紧密的联系^[15, 20]. 如具有 Oseltamivir 抗药性的流感病毒, 即源于其基因组上发生了单个 C 到 U 的突变^[21, 22]. 而 C 到 U 的超突变效应, 可以由 APOBEC 或其他胞嘧啶脱氨酶家族成员而实现. 因此, APOBEC 蛋白在抑制病毒的同时, 又促进了病毒的进化.

本文分析了 APOBEC-3F 和 -3G 的亚细胞定位, 结果表明其主要分布在细胞胞浆中. 由于 APOBEC-3F 和 -3G 亦可以通过 DNA/RNA 编辑途径, 诱导 HBV 的基因组发生超突变效应, 而 HBV 的基因组复制主要发生在细胞核中, 为深入研究 APOBEC-3F 和 -3G 的亚细胞定位及其功能, 将可以有效转导 GFP 入核的核定位信号与 APOBEC-3F 和 -3G 进行融合表达, 以期研究 APOBEC-3F 和 -3G 亚细胞定位是否发生变化以及可能存在的对 HBV 效应的改变, 结果发现, 核定位信号不能有效地使 APOBEC-3F 和 -3G 入核, 推测 APOBEC-3F 和 -3G 中可能存在更强的胞浆定位信号或与其他胞浆蛋白具有较强的结合活性, 其胞浆特异定位的原因及其与功能间的关系, 对深入认识和理解 APOBEC 蛋白有一定帮助, 值得进一步的探讨.

APOBEC-3F 和 -3G 对 HBV 的复制有抑制作用已被报道, 文献报道中使用的是 HBV 表达载体与 APOBEC 表达载体共转染的方法, 检测 HBcAg 相关的 RNA/DNA 分子水平. 为了进一步研究 APOBEC 与 HBV 的作用关系, 本文中使用了稳定表达 HBV 的细胞系 HepG2.2.15 细胞为模型, 转染细胞后直接检测细胞培养上清中 HBV 病毒的载量, 结果表明, APOBEC-3F 和 -3G 在 HepG2.2.15 细胞模型中亦可以有效抑制 HBV 病毒的产生.

由于 APOBEC-3F 和 -3G 对 HIV 和 HBV 具有很强的抑制作用, 具有发展成为治疗 HIV 和 HBV 患者药物的潜力. 因此, 在避免病毒快速进化的同时, 利用 APOBEC 抑制病毒, 成为开发 APOBEC 的方向之一. 本论文对 APOBEC-3F 和 -3G, 两个 APOBEC 家族中抗病毒作用最为重要的成员, 进行了克隆、表达、序列分析及亚细胞定位研究, 为利用和开发 APOBEC 进行抗病毒治疗提供了基础.

参 考 文 献

- 1 李卫中, 洪敏, 李琦涵. APOBEC 家族: 介导天然抗病毒免疫的新型宿主细胞因子. 病毒学报, 2006, **22**(1): 74~80
Li W Z, Hong M, Li Q H. Chin J Virol, 2006, **22**(1): 74~80
- 2 Cullen B R. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. J Virol, 2006, **80**(3): 1067~1076
- 3 Rogozin I B, Basu M K, Jordan I K, *et al.* APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. Cell Cycle, 2005, **4**(9): 1281~1285
- 4 Mangeat B, Turelli P, Caron G, *et al.* Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. Nature, 2003, **424**(6944): 99~103
- 5 Zheng Y H, Irwin D, Kurosu T, *et al.* Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. J Virol, 2004, **78**(11): 6073~6076
- 6 Shindo K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, *et al.* The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. J Biol Chem, 2003, **278**(45): 44412~44416
- 7 Yu Q, Chen D, Konig R, *et al.* APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. J Biol Chem, 2004, **279**(51): 53379~53386
- 8 Delebecque F, Suspene R, Calattini S, *et al.* Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. J Virol, 2006, **80**(2): 605~614
- 9 Turelli P, Mangeat B, Jost S, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. Science, 2004, **303**(5665): 1829
- 10 Rosler C, Kock J, Malim M H, *et al.* Comment on "Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G". Science, 2004, **305**(5689): 1403; author reply 1403
- 11 Chen H, Lilley C E, Yu Q, *et al.* APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. Curr Biol, 2006, **16**(5): 480~485
- 12 Wang G F, Zhang J, Li W Z, *et al.* Apoptosis and proinflammatory cytokine responses of primary mouse microglia and astrocytes induced by human H1N1 and avian H5N1 influenza viruses. Cell Mol Immunol, 2008, **5**(2): 113~120
- 13 Yu B, Mitchell G A, Richter A. Nucleolar localization of cirhin, the protein mutated in North American Indian childhood cirrhosis. Exp Cell Res, 2005, **311**(2): 218~228
- 14 李蕊, 宋旭红, 刘戈飞, 等. 人神经母细胞瘤 NRDR 新剪接亚型 A2 的亚细胞定位. 癌变·畸变·突变, 2007, **19**(3): 215~218
Li R, Song X H, Liu G F, *et al.* Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2007, **19**(3): 215~218
- 15 Bishop K N, Holmes R K, Sheehy A M, *et al.* APOBEC-mediated editing of viral RNA. Science, 2004, **305**(5684): 645
- 16 Holmes R K, Malim M H, Bishop K N. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?. Trends Biochem Sci, 2007, **32**(3): 118~128
- 17 Suspene R, Guetard D, Henry M, *et al.* Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(23): 8321~8326
- 18 Muller V, Bonhoeffer S. Guanine-adenine bias: a general property of retroviral genomes that is unrelated to host-induced hypermutation. Trends Genet, 2005, **21**(5): 264~268
- 19 Noguchi C, Ishino H, Tsuge M, *et al.* G to A hypermutation of hepatitis B virus. Hepatology, 2005, **41**(3): 626~633
- 20 Wang G F, Lin S Y, Zhang H, *et al.* APOBEC 3F and APOBEC 3G have no inhibition and hypermutation effect on the human influenza A virus. ACTA Virologica, 2008, **52**(3): 193~194
- 21 Chutinimitkul S, Suwannakam K, Chieochansin T, *et al.* H5N1 oseltamivir-resistance detection by real-time PCR using two high sensitivity labeled TaqMan probes. J Virol Methods, 2007, **139**(1): 44~49
- 22 Yen H L, Herlocher L M, Hoffmann E, *et al.* Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob Agents Chemother, 2005, **49**(10): 4075~4084

Cloning, Expression and Sub-cellular Localization of APOBEC-3F and -3G and Their Effect on HBV*

WANG Ge-Fei^{1,2)}, PENG Cheng³⁾, LI Wei-Zhong^{1,2)}, XIN Gang^{1,2)}, SU Yun^{1,2)},
CHEN You-Ying^{1,2)}, LIN Gui-Mei^{1,2)}, LI Kang-Sheng^{1,2)**}

¹⁾Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China;

²⁾The Key Immunopathology Laboratory of Guangdong Province, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China;

³⁾Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic-polypeptide) family members were reported as innate immune molecules with anti-viral activity for many viruses, such as HIV and HBV. In order to understand the function of APOBEC, the APOBEC-3F and -3G were cloned, expressed, and the sub-cellular localization of them was detected. The genes of APOBEC-3F and -3G were cloned from PHA-stimulated PMBC and expressed in the MDCK cell by transfection. The sub-cellular localization of APOBEC-3F and -3G were detected by immunofluorescence. APOBEC-3F and -3G were cloned by RT-PCR and confirmed by DNA sequencing. The immunofluorescence indicated APOBEC-3F and -3G were located in the cytosol. APOBEC-3F and -3G could inhibit HBV replication effectively in HepG2.2.15 cell. APOBEC-3F and -3G could not be trans-located into nuclear by nuclear location signal (NLS) or bi-NLS (B-NLS). These results will help the future research on the function of APOBEC.

Key words APOBEC, expression, sub-cellular localization, HBV, nuclear location signal

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00448

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571674, 30771988) and Guangdong Natural Science Foundation (05008347, 04020239).

**Corresponding author.

Tel: 86-754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: June 23, 2008 Accepted: September 22, 2008