

抗 HSV-I ICP22 蛋白抗原多肽抗体对 ICP22 定位的检测分析*

寸 韡, 马绍辉, 赵红玲, 刘龙丁, 李卫中, 王丽春, 董承红,
张 莹, 王 祥, 李琦涵**

(中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所, 云南昆明, 650118)

Localization of HSV-I ICP22 Protein in Cells by Antibody Against a predicted Antigenic Peptide

CUN Wei, MA Shao-hui, ZHAO Hong-ling, LIU Long-ding, WANG Li-chun,
DONG Cheng-Hong, ZHANG Ying, WANG Xiang, LI Qi-han**

(Institute of Medical Biology, Chinese Academemy of Medical Sciences and PekingUnion Medical college, Kunming
650118, China)

Abstract: As one of the viral proteins expressed in the immediate-early phase of HSVI infection, ICP22 functions in the regulation of viral replication. However, it is difficult to produce specific antibody against ICP22 protein with homology of antigenicity in this protein. Based upon prediction of antigenicity of ICP22, a peptide of 1-36 amino acids was thought to possess a specific antigenic epitope, which was expressed as a fusion protein with GST. The antibody, raised in mice immunized with a purified fusion protein, was able to recognize ICP22 expressed in eukaryotic cells. Analysis with this antibody suggested a nuclear locatization of ICP22 and specific punctuative structure in cells.

Key words: Herpes simplex virus; ICP22 antibody; Localization in cells

摘要: ICP22 作为单纯疱疹病毒进入细胞后最早表达的蛋白之一, 对于病毒的复制具有重要的调节功能, 由于抗原表位的同源性, 使用完整的 ICP22 蛋白作为抗原难以获得特异性的抗体。通过氨基酸序列预测, ICP22 蛋白 1~36 位氨基酸具有较强的抗原性, 将 ICP22 蛋白 1-36 位氨基酸偶联于 GST 蛋白作为抗原免疫小鼠, 所制备抗体能够特异性识别具有正常生理构象的 ICP22 蛋白。抗体检测结果显示, ICP22 不但定位于细胞核内, 而且还能够形成特殊的点状结构。

关键词: 单纯疱疹病毒; ICP 22 抗体; 细胞定位

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-221-05

单纯疱疹病毒 (*Herpes simplex virus*, HSV) 是最早被发现的人类疱疹病毒, 亦是研究蛋白转运、膜结构、基因调控以及基因治疗等方面的工具^[1-4]。研究表明, 在增殖性感染过程中, 病毒进入宿主细

胞后, 能迅速表达 5 种感染性多肽 (Infected cell polypeptide, ICP)—ICP0、ICP 4、ICP 22、ICP 27 和 ICP 47, 这些感染性多肽由于不依赖于其它病毒蛋白的表达、在时序上最先产生, 因此被命名为病

收稿日期: 2005-11-28, 修回日期: 2006-01-16

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370065, 30570081)

作者简介: 寸 韡 (1980-), 男, 云南籍, 博士, 主要从事病毒免疫学研究

** 通讯作者. Corresponding author. Tel:0871-8335905, E-mail: qihanli@public.km.yn.cn

毒立即早期蛋白^[5]。在 HSV 感染过程中,立即早期蛋白不但能够通过宿主蛋白进行修饰或完全抑制宿主蛋白的功能改变宿主细胞的微环境,从而更有利于病毒的复制、组装或释放^[6];而且还能通过自身的修饰,在不同时段发挥多种功能^[7]。ICP22 作为病毒立即早期蛋白之一,其功能还不为人们所

完全了解,但是其特殊的核苷酸化形式^[8,9]、对周期素的影响^[10]、以及维持特殊磷酸化形式的 RNA 聚合酶 II^[11~13]的能力,已经引起了研究者的注意。但相对于其它一些立即早期蛋白,完整的 ICP22 不易在原核细胞中表达,迄今仅有零星报道以完整的 ICP22 重组表达蛋白作为抗原免疫小鼠获得的抗体,其能与细胞内的某种未知蛋白发生交叉反应^[14],因此尚未得到广泛的应用。在此情况下,ICP22 蛋白特异性抗体的制备,仍然是对其深入研究的前提,在本文的工作中,我们基于对 ICP22 蛋白抗原特性的分析,尝试使用该蛋白结构中的一个主要抗原多肽,制备了相应的抗体,并确定了其对 ICP22 的特异识别,同时,利用该抗体对 ICP22 进行了初步的细胞内定位研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 DH 5 α 、BL21(DE3)为 Promega 公司产品;表达谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白的原核表达质粒 pGEX-5x-1 为 Pharmacia 公司产品、携带有人巨噬细胞病毒立即早期启动子的 pcDNA3 真核表达质粒为 Invitrogen 公司产品、表达绿色荧光融合蛋白的真核表达质粒 pEGFPN2 为 Clontech 公司产品。

Vero 细胞生长于 25 \times 50mm 小方瓶中,培养液使用含 8%牛血清 DMEM 液,100 U/mL 青霉素;20 μ g/mL 链霉素,5%CO₂,37 $^{\circ}$ C 培养;中国仓鼠卵巢细胞 CHO-k1 使用含 5%牛血清 F12 营养液培养,其它条件同前。HSV1 型病毒为本科室保存,生长于 Vero 细胞,滴度测定使用同样细胞,按标准方法进行。

各种工具酶、PCR 试剂盒、IPTG 购自大连宝生物公司;LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品,Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司,弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品。其余试剂均为进口或国产分析纯以上级产品。

1.2 病毒基因组的提取

病毒以 0.01 MOI 接种 Vero 细胞,37 $^{\circ}$ C 吸附 30min,加入含 1%牛血清的 DMEM 培养液,继续培养至细胞病变,收集培养物,离心去除细胞碎片,加入 0.02mol/L Zn(Ac)₂ 沉淀病毒颗粒,离心后所获沉淀经饱和 EDTA 溶解后,加入蛋白酶 K 于 56 $^{\circ}$ C 反应 1h,按照常规方法,蛋白质经酚:氯仿抽提,

核酸经乙醇沉淀后,获得 HSV1 病毒基因组。

1.3 重组质粒的构建

以 HSV1 基因组为模板,根据 ICP22 基因核苷酸序列和所要连入目的载体的物理图谱,设计并合成携带有 *EcoRI* 限制性酶切位点的 P1 (AGCGAATTCATGGCCGACATTTCCCAGG) 和 P2 (AGCGAATTCACGGCCGGAGAAACGTGT) 引物,PCR 扩增获得 ICP22 基因,经相应酶切后正向连入 pCDNA3 载体,构建 pCDNA3-ICP22 重组质粒;设计并合成携带有 *BglIII* 限制性酶切位点的 P3 引物 (AGCAGATCTGGATGGCCGACATTCCCAG) 和携带有 *EcoRI* 限制性酶切位点的 P4 引物 (AGCGAATTCGGCCGGAGAAACGTGTGCGC),PCR 扩增获得无终止子的 ICP22 基因,经相应酶切后连入表达荧光融合蛋白的 pEGFPN2 真核表达载体;设计并合成携带有 *BamHI* 限制性酶切位点的 P5 引物 (AGCGGATCCAGATGGCCGACATTTCCCAGG) 和携带有 *EcoRI* 限制性酶切位点的 P6 引物 (AGCGAATTCGGGGCGGGCAGGGCGCTTG),PCR 扩增获得编码 ICP22 蛋白氨基端 36 个氨基酸的核苷酸序列,经相应酶切后连入表达 GST 融合蛋白的 pGEX-5x-1 原核表达载体,构建 pGEX-5x-E36 重组质粒。所有质粒的扩增及转化均在大肠杆菌 DH 5 α 菌株中进行。

1.4 pGEX-5x-E36 在 BL21 中的表达

pGEX-5x-E36 转化大肠杆菌 BL21 菌株,转化子在含有 100 μ g/mL 氨苄西林的 2 \times YT 培养基中 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养。菌液 1:100 接种新鲜的含有氨苄西林的 2 \times YT 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养,至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时,加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h。12500r/min 离心 10 min,收集菌体,菌体立即用 SDS-PAGE 胶鉴定或于 -20 $^{\circ}$ C 冻存,操作同时设置 pGEX-5X-1 载体转化的大肠杆菌 BL21 菌株为对照。

1.5 SDS - PAGE 分析

SDS-PAGE 参照文献^[15]进行。电泳完毕后,经考马斯亮蓝染色,10%冰乙酸脱色液脱色。

1.6 融合蛋白的纯化与定量

将适量诱导后的大肠杆菌菌体悬浮于裂解缓冲液(含有 1g/L Triton X-100,1mmol/L PMSF 的 PBS, pH 7.4),放置于冰浴中,超声波细胞粉碎机破碎菌体,直至细胞悬浮液变得澄清。将裂解液 4 $^{\circ}$ C

12000g 离心 15min, 收集上清液, 与适量 PBS (pH7.4) 平衡后的 Glutathione Sepharose 4B 匀浆搅拌混匀。混合液体缓缓流经亲和层析柱, 5 倍体积的 PBS (pH 7.4) 洗涤柱子两次后, 用洗脱液(10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 50mmol/L 的 Tris. HCl, pH 8.0)洗脱, 室温静置 10min 后, 收集洗脱液。采用同样方法得到 GST 或 GST-E36 融合蛋白。经 SDS-PAGE 鉴定后, Lowry 法测定蛋白质含量。

1.7 小鼠免疫

纯化后的GST蛋白或GST-E36融合抗原以1:1的比例与弗氏不完全佐剂超声乳化混匀, 皮下注射免疫6周龄的昆明小鼠, 0、2、4周时各免疫一次。免疫剂量为50 μ g/只·次; 于第三次免疫后7 d 眼底采血, 制备血清。

1.8 细胞转染

当单层 CHO-k1 细胞生长至 70%培养面积时, 根据操作说明, 使用 Lipofectamine™ 2000 进行瞬时转染, 简而言之, 在转染前撤去细胞全营养液, 换为无血清培养液, 质粒 DNA 稀释于无血清培养液, 与含有 Lipofectamine™ 2000 的无血清培养液混合, 室温孵育 20min 形成 DNA 脂质体复合物后, 逐滴加入细胞培养液中, 6h 后将转染液更换为全营养液继续培养 30h。

1.9 Western Blotting

细胞核的分离, 参照^[16]方法, SDS-PAGE 电泳后, 蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转至硝酸纤维素膜上, 以2%BSA封闭非特异性结合位点, 37 $^{\circ}$ C与所得小鼠血清(1:500稀释)结合, 经TTBS清洗三道后, 37 $^{\circ}$ C与HRP-兔抗鼠IgG(1:100稀释)结合, 充分洗膜, DAB显色。

1.10 细胞免疫组化

CHO-k1 细胞经预冷的 2% 甲醛 / 0.2% Triton X-100/PBS(pH7.4)处理10min后, 以2%BSA封闭非特异性结合位点, 37 $^{\circ}$ C与所得小鼠血清(1:500稀释)结合, 经PBS清洗三道后, 37 $^{\circ}$ C与罗丹明标记羊抗鼠IgG(1:100稀释)结合, 经PBS清洗三道后, 于 Nikon E600 荧光显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 抗原多肽序列的选择

由于没有已知的明确表位, 我们曾将 ICP22 全基因连入多个不同的载体, 分别在大肠杆菌和酵母

中表达, 试图获得完整的 ICP22 蛋白作为抗原来制备抗体, 但均未检测到目的蛋白的表达, 这可能与 ICP22 蛋白抑制转录的功能有关, 因此, 我们根据 ICP22 氨基酸序列, 通过 Vector NT 生物分析软件对其抗原特性进行了分析, 结果显示(如图 1), 在由 420 个氨基酸组成的 ICP22 蛋白结构中有两段氨基酸序列具有较高的抗原性(1-36aa, 289-327 aa)。由于从 HSV1 的基因结构上看, ICP22 蛋白的羧基端(171-420aa)与另一个 HSV1 病毒蛋白 US1.5 重合, 因而为了增加抗体的特异性, 本实验选用了 ICP22 氨基端的 36 个氨基酸作为免疫原, 并以 GST 蛋白融合方式对该抗原进行表达制备。

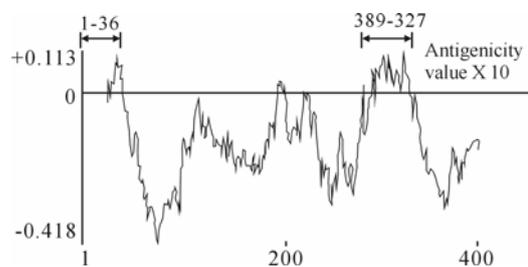


图 1 根据氨基酸序列预测对 α 22 蛋白的抗原性分析结果
Fig.1 Antigenicity analysis of the predicted amino acid sequence of the ICP22 gene

2.2 重组质粒的构建

酶切及测序证明成功构建重组质粒 pGEX-5x-E36、pcDNA3-ICP22 和 pEGFPN2-ICP22(结果略)。将多次的 ICP22 基因测序结果与 HSV1 标准序列(Genebank 登录号: NC_001806)比较^[17], 1263bp 的 ICP22 基因编码序列在该病毒株与标准株之间有 10 个碱基的差异, 变异率为 0.79%, 由于突变大都发生在密码子第三位碱基, 绝大部分为无意突变。

2.3 目的蛋白的表达与纯化

IPTG 诱导 3h 后, SDS-PAGE 分析证实, 对照空载体或 pGEX-5x-E36 转染的 BL21 工程菌, 分别表达了约 26kDa 和 30kDa 的蛋白, 大小与 GST 和 GST-E36 蛋白相符, 分离其上清和沉淀显示, 细菌裂解上清液中有较高浓度的 GST 和 GST-E36 蛋白。用 Glutathione Sepharose 4 B 亲和层析柱纯化后, 得到纯度较高的 GST-E36 融合蛋白(图 2), Lowry 法确定 GST-E36 蛋白浓度为 347 μ g/mL 可用于免疫小鼠制备抗血清。同时, GST 蛋白作为对照同时免疫小鼠。

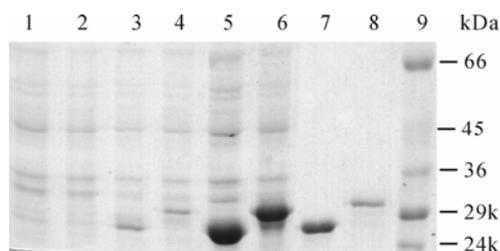


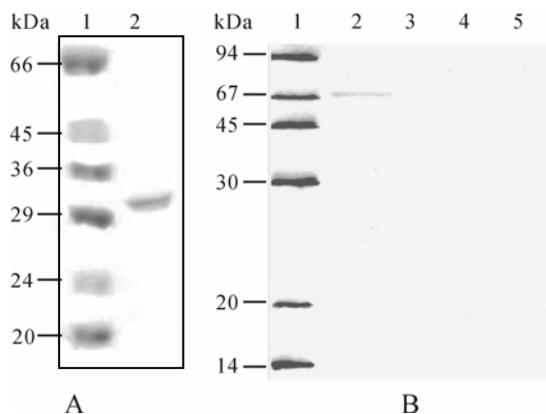
图2 抗原蛋白的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of antigen protein.

1, BL21 (pGEX-5x-1) pre-induced; 2, BL21 (pGEX-5x-E36) pre-induced; 3, BL21 (pGEX-5x-1) 3h post induced by 0.1mol/L IPTG; 4, BL21 pGEX-5x-E36) 3h post induced by 0.1mol/L IPTG; 5, Supernate of induced BL21 (pGEX-5x-1); 6, Supernate of induced BL21 (pGEX-5x-E36); 7, Purified GST protein by Glutathione Sepharose 4B; 8, Purified GST-E36 fusion protein by Glutathione Sepharose 4B; 9, M.W. mark.

2.4 A36 抗体的特异性鉴定

GST 或 GST-E36 免疫小鼠后所获血清分别命名为 A0 和 A36, A36 能够对 GST-E36 表达的 E36 蛋白特异性识别, 见图 3A。同时对于 pcDNA3-us1 或 pcDNA3 转染后 CHO-k1 细胞质和细胞核组份, GST-E36 免疫的小鼠血清 A36 能够特异性地识别细胞核内一条约 68kDa 的条带 (图 3B), 而 GST 蛋白免疫的小鼠血清 A0 均表现为阴性反应, 初步证实 A36 抗体可以特异性地识别变性后的 ICP22 蛋白。



A

B

图3 A36 血清的 Western blotting 检测结果

Fig.3 Western blotting with A36 anti-serum.

A: 1, M.W. mark; 2, the supernate of induced BL21 (pGEX-5x-E36). B: 1, M.W. mark; 2, Nuclear partition of the pcDNA3-us1 transfected CHO-k1 cell; 3, cytoplasm of the pcDNA3 transfected CHO-k1 cell; 4, nuclear partition of the pcDNA3 transfected CHO-k1 cell; 5, cytoplasm of the pcDNA3 transfected CHO-k1 cell.

2.5 ICP22 细胞核内定位分析

为了进一步证实 A36 抗体能够识别细胞内表达的 ICP22 蛋白, 我们尝试用 A36 抗体检测瞬时转染了表达 GFP-ICP22 融合蛋白质粒 pEGFPN2-ICP22 的 CHO-k1 细胞, 可以观察到 A36 抗体检测的红色荧光信号与 GFP-ICP22 发出的绿色荧光在细胞内的位置完全吻合 (图 4A-C)。表明 A36 抗体能够识别具有正常生物学构象的 ICP22 蛋白。

3 讨论

报道表明, HSVI ICP22 蛋白在高等真核细胞中与 RNA 聚合酶 II 大亚基的异常磷酸化密切相关^[11-13], 并可能参与病毒复制过程的调控, 因此对其研究具有重要意义。本实验通过表达 ICP22 蛋白上的部分片段来制备其抗体, 通过蛋白结构序列分析, 选取了蛋白结构中具有抗原效应的第 1 至 36 位氨基酸, 其与 GST 蛋白形成融合表达体作为抗原免疫小鼠制备抗体。由于只选择了 ICP22 蛋白的部分肽段作为抗原诱导抗体, 对于所获抗体不但要检测其是否能够特异性识别变性后的 ICP22 蛋白, 而且还需要检测其是否能够识别具有正确折叠构象的 ICP22 蛋白。综合本实验不同检测结果可以证实, 所获抗血清 A36 不但能够特异性地识别 ICP22 第 1 至 36 位氨基酸抗原多肽与 GST 蛋白形成的融合表达体, 而且还能够识别真核细胞内表达的, 处于正常构象的 ICP22 蛋白。

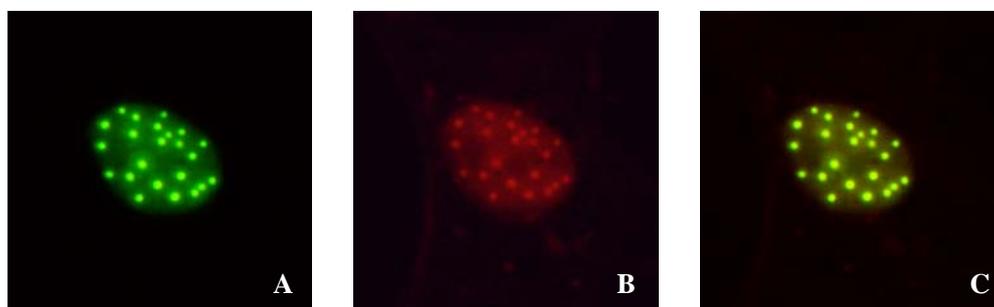
图4 A36 对 α 22 蛋白的免疫荧光检测

Fig.4 Immunofluorescence analysis with A36 anti-serum

GFP-ICP22 formed many green spots (A) and A36 stains many red spots (B) throughout the nucleoplasm of the same transfected CHO-k1 cell by pEGFPN2-ICP22, the two colors were then overlaid (C).

在检测过程中, 实验结果还显示了 HSV-1 立即早期蛋白 ICP22 的部分特性。首先, 通过计算, ICP22 蛋白的分子量为 46520 道尔顿, 但在病毒感染中, ICP22 蛋白的表观分子量却为 68kDa, 因此 ICP22 又被称为 IE68。由于 ICP22 蛋白含有大量的丝氨酸和苏氨酸, 因此普遍认为 ICP22 蛋白被进行了相应的修饰, 迄今为止, 已知对 ICP22 蛋白进行磷酸化的蛋白病毒激酶只有 US3 和 UL13^[18,19], 但本实验 Western 印记结果显示, 即使在没有这些病毒激酶存在的情况下, 变性后的 ICP22 也具有 68kDa 的表观分子量, 因此 ICP22 所表现出的表观分子量的增加, 并不是由于病毒蛋白对其的修饰作用产生的。其次, 我们的实验结果显示, ICP22 大部分定位于核内, 并形成许多点状结构。ICP22 在细胞内的定位将为进一步研究 ICP22 对转录的普遍抑制作用提供有益的提示。同时特异性识别 ICP22 蛋白的 A36 抗体的制备也将为进一步研究 ICP22 蛋白功能提供有利的工具。

References

- [1] Foster T P, Melancon J M, Olivier T L, *et al.* Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization [J]. *J Virol*, 2004, 78:13262-13277.
- [2] Crump C M, Bruun B, Bell S, *et al.* Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (Pt 12):3517-3527.
- [3] Wysocka J, Herr W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28:294-304.
- [4] Frampton A R Jr, Goins W F, Nakano K, *et al.* HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system [J]. *Gene Ther*, 2005, 12:891-901.
- [5] Cun W, Li Q H (寸 韡, 李琦涵). Advanced in analysis of HSV1 immediate early gene [J]. *F Med Sci Sec Virol(国外医学病毒学分册)*, 2003, 10:129~132
- [6] Song B, Yeh K C, Liu J, *et al.* Herpes simplex virus gene products required for viral inhibition of expression of G1-phase functions [J]. *Virology*, 2001, 290:320-328.
- [7] Advani, S J, Hagglund R, Weichselbaum R R, *et al.* Posttranslational Processing of Infected Cell Proteins 0 and 4 of Herpes Simplex Virus 1 Is Sequential and Reflects the Subcellular Compartment in Which the Proteins Localize [J]. *J Virol*, 2001, 75:7904-7912.
- [8] Mitchell C, Blaho J A, Roizman B. Casein kinase II specifically nucleotidylates in vitro the amino acid sequence of the protein encoded by the 22 gene of herpes simplex virus 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:11864-11868.
- [9] Mitchell C, Blaho J A, McCormick A L, *et al.* The nucleotidylation of herpes simplex virus 1 regulatory protein 22 by human casein kinase II [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:25394-25400.
- [10] Advani S J, Brandimarti R, Weichselbaum R R, *et al.* The disappearance of cyclins A and B and the increase in activity of the G(2)/M-phase cellular kinase cdc2 in herpes simplex virus 1-infected cells require expression of the alpha22/U(S)1.5 and U(L)13 viral genes [J]. *J Virol*, 2000, 74:8-15.
- [11] Long M C, Leong V, Schaffer P A, *et al.* ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II [J]. *J Virol*, 1999, 73:5593-5604.
- [12] Jenkins H L, Spencer C A. RNA polymerase II holoenzyme modifications accompany transcription reprogramming in herpes simplex virus type 1-infected cells [J]. *J Virol*, 2001, 75:9872-9884
- [13] Durand L O, Advani S J, Poon A P, *et al.* The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1 [J]. *J Virol*, 2005, 79: 6757-6762
- [14] Blaho J A, Zong C S, Mortimer K A. Tyrosine phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP22 and a cellular protein which shares antigenic determinants with ICP22 [J]. *J Virol*, 1997, 71:9828-9832.
- [15] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [16] Andrews N C, Faller D V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19:2499.
- [17] McGeoch D J, Dolan A, Donald S, *et al.* Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1 [J]. *J Mol Biol*, 1985, 181:1-13.
- [18] Purves F C, Roizman B. The UL13 gene of the herpes simplex 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein 22 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:7310-7314.
- [19] Hagglund R, J Munger, A P Poon, *et al.* US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks caspase 3 activation induced by the products of US1.5 and UL13 genes and modulates expression of transduced US1.5 open reading frame in a cell type-specific manner [J]. *J Virol*, 2002, 76:743-754.