

MDV VP22 的 N1-18 是发挥蛋白转导功能必需的序列

陈鸿军^{1,2}, 秦爱建^{1*}, 宋翠萍², 张晨飞¹, 邓绪芳¹

(¹扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室, 扬州 225009)

(²中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200232)

摘要: 血清型马立克氏病病毒(MDV-1)CVI988/Rispens 弱毒株的 VP22 蛋白缺失^{201TKSERT}²⁰⁶。为了进一步证实该缺失对 MDV-1 VP22 蛋白转导功能和效率的影响, 本研究通过将不同缺失型的 VP22 与 EGFP 相融合, 转染 COS-1 细胞, 通过间接免疫荧光方法, 检测 VP22 的蛋白转导现象。结果发现, EGFP-VP22 具有微管结合、核膜结合、核酸结合、蛋白转导等特性; CVI988 VP22 与 GA 株 VP22 的转导效率相当, 且只有完整长度的 VP22 具有明显的转导功能, 其中, N 端 1~18aa 对 VP22 的核定位及其蛋白转导功能的发挥意义很大。这一发现为利用 MDV-1 VP22 携带其他目的蛋白转导, 增强目的蛋白免疫原性及其治疗性功能具有重要的指导价值。

关键词: MDV-1; 衣被蛋白; VP22; 蛋白转导功能

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0091-07

Green 等^[1]和 Frankel 等^[2]在分别研究人型获得性免疫缺陷症(HIV-1)的 Tat 蛋白时, 发现 Tat 蛋白可迅速进入细胞并定位于核内。随后, 该蛋白被发现能够将其他蛋白携带入几乎 100%细胞中。近年来, 一些天然蛋白和人工合成的多肽相继被发现具有这样的转导功能, 从而发展成为一种新型的载体研究领域—细胞穿透肽(Cell Penetrating Peptide, CPP)。它包括: 人工合成的细胞渗透肽(Cell-Permeable Peptide)、蛋白转导域(Protein Transduction Domain, PTD)和转膜序列(Membrane-Translocation Sequence, MTS)。现已发现的三种高效的 PTDs: Tat、I 型单纯疱疹病毒 VP22(HVP22)、果蝇的同源异型转录因子触角足蛋白基因产物 Antennapedia(Antp)。利用这些 PTD, 已有大量抑癌蛋白已被成功转导, 并在诱导恶性肿瘤细胞凋亡和增强主要保护性抗原的免疫力的实践中显示出良好的应用前景^[3]。

血清型马立克氏病病毒 VP22(MVP22)与 HVP22 一样, 是一种病毒结构蛋白, 由 UL49 基因编码的^[4,5], 是该病毒复制和空斑形成必需的组分之一, 被证实具有与 HVP22 同样的蛋白转导功能, 可能是马

立克氏病毒(MDV) DNA 和相关蛋白在细胞间传递的主要工具或辅助的媒介^[6,7]。据研究, HVP22、MVP22 和 I 型牛疱疹病毒 VP22(BVP22)在体内均具有良好的免疫增强作用^[8-11]。因此, 研究 VP22 的蛋白转导域对于开发应用 VP22 的蛋白转导功能均具有极为重要的意义。

增强型绿色荧光蛋白(Enhancer Green Fluorescence Protein, EGFP)是目前较为常用的蛋白标记物^[12]。该蛋白对受体细胞无毒副作用, 不影响目的蛋白的正常定位, 在荧光显微镜下易于观察等诸多优点, 已成功标记过多种疱疹病毒蛋白组分^[13]。本研究利用 EGFP 来直观地指示 VP22 的定位, 以便确定 VP22 的蛋白转导域。另外, 我们发现 CVI988/Rispens 毒株的 VP22 缺失 201~206aa^[14], 即^{201TKSERT}²⁰⁶。为了深入研究该缺失对 VP22 蛋白转导功能的影响, 我们将不同毒株(包括: CVI988 和 GA)的 VP22 基因分别连接于 EGFP 的 C 端。在 COS-1 中检测这些蛋白的亚细胞定位区别。结果发现: CVI988 VP22 与 GA 株 VP22 的转导效率相当, 且只有完整长度的 VP22 具有明显的转导功能。其中, N1~18 对 VP22

基金项目: 国家自然科学基金(30371070); 国家“863计划”(2006AA10A205); 全国博士学位论文作者专项资金(200256)

*通讯作者。Tel: +86-514-7979217; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

作者简介: 陈鸿军(1979-), 男, 江苏南京人, 博士, 助理研究员, 主要从事病原微生物特性研究。

收稿日期: 2007-08-28; 修回日期: 2007-10-25

的核定位及其蛋白转导功能的发挥意义很大。这一发现为利用 MDV-1 VP22 携带其他目的蛋白转导, 增强目的蛋白免疫原性及其治疗性功能具有重要的指导价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒和细菌: COS-1 为 SV40 大 T 抗原转化的非洲绿猴肾细胞系, 由本实验室保存、复苏 (DMEM+10% FBS)。CVI988/Rispens 株和 GA 株分为 MDV-1 弱毒株和强毒株, 由本室保存。克隆用 DH5 α 工程菌和表达用 BL21(DE3) 菌均由本室保存。

1.1.2 载体及主要试剂: pcDNA3.1(+)/zeocin 真核表达载体购自 Invitrogen 公司; pEGFP-N1 是增强型 EGFP 突变体 2(mut2) 的克隆性载体, 购自 Clontech 公司; pIRES 载体由本室保存; pRED-express 载体由焦新安教授惠赠; T4 DNA 连接酶、pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司; pTCMV-EGFP-VP2, 将 EGFP 和鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 融合基因插入到 CMV 启动子下, 由本实验室刘红梅博士构建; Taq DNA 聚合酶、dNTP、*Bam*H、*Eco*R、*Hind* 等限制性内切酶购自 Roche 公司; 凝胶回收 DNA 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司; 细菌培养用 Tryptone、Yeast Extract 购自 OXOID 公司。

Lipofectin Reagent 购自 Invitrogen 公司; 重组质粒 pGEX-VP22C(表达 CVI988 VP22 的 C 端(94aa~243aa)在大肠杆菌 BL21(DE3)中经 0.05mM IPTG 诱导表达, 超声波裂解的上清作为免疫原, 5 免 Balb/c 小

鼠后, 制备抗 VP22C 高免血清^[15,16]; 碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司; 罗丹明标记的羊抗鼠荧光二抗和 Anti- β -actin 单抗购自 Sigma 公司, 工作浓度 1:50。

1.2 VP22 真核表达载体的构建

将 CVI988 VP22 PCR 产物插入 pcDNA3.1 载体中, 命名为 pVP22。纯化质粒, 转染 COS-1, 进行暂态表达, 72h 后固定细胞, 通过 IFA 观察染色结果。

1.3 不同片段 VP22 的选择和不同片段 VP22 N 端融合 EGFP 载体的构建

由于 CVI988 VP22 存在 6aa 缺失, 我们构建具有代表性的两种经典毒株: CVI988 和 GA 株的 VP22(以下缩写为: CVP22 和 GVP22)与 EGFP 融合表达的载体, 转染 COS-1 细胞后, 观察不同毒株的 EGFP-VP22 的定位。为了明确 VP22 中蛋白蛋白转导域的具体位置, 便于将 PTD 单独合成和应用, 我们针对 CVP22 的亲水区, 将 CVP22 分为 5 段, 设计以下引物进行扩增 CVP22 不同长度的片段。同时以 pEGFP-N1 为载体, 扩增 EGFP, 插入 pcDNA3.1 中, 构建 pEGFP 载体, 以此为母核, 插入不同片段的 VP22, 以分别构建融合表达载体; 为用肉眼观察 VP22 的转导效率, 我们设计在 EGFP-VP22 下游插入核糖体进入序列(Insert ribosoyl enhancer sequence, IRES)序列和红色荧光蛋白(Red Fluorescence Protein, RFP)序列, 构建 pGVIR 载体, 共表达 EGFP-VP22 融合蛋白和 RFP 蛋白(表 1、2)。以上各种 DNA 纯化后, 分别转染 COS-1 细胞。

表 1 目的基因的引物
Table 1 Primers of interest genes

Interest gene	Primer	Sequence(5'→3')	From the site of interest genes
VP22	P1	GCCGGATCCATGGGGGATTCTGAA	1bp→
	P3	GCCGAATTCTTATTCGCTATCACT	←750bp
	P _C	GTGGATCCATGTTTCGCTTTCAGTACG	280 bp→
	P _H	CGAGGATCCATGTCTGCATATGATGAC	55 bp→
	P _T	GTGGATCCATGAGACGCGGCGGTGAA	613 bp→
	P _S	GAGAATTCTTATACGTTCTCGTTCCC	←579bp
EGFP-mut2	PF	CCTCTAGAAAGCTTGCCACCATGGTGAGCA	1bp→
	PR	CCTCTAGATTAGGATCCCTTGACAGCTCG	←720bp

表 2 需要构建的 EGFP 与不同 VP22 片段融合表达载体
Table 2 Expression vectors of EGFP-VP22 fragments fusion protein

Group	Vectors	Size of fragment	Group	Vectors	Size of fragment
A	pEGFP	—	F	pEGFP-CVP22M	94-193aa
B	pEGFP-GVP22	249aa	H	pEGFP-CVP22N	1-193aa
C	pEGFP-CVP22	243aa	I	pEGFP-CVP22S	19-193aa
D	pEGFP-CVP22C	94-249aa	J	pT-EGFP-VP2	—
E	pEGFP-CVP22T	207-249aa	K	pGVIR	243aa

1.4 不同固定液和不同水化时间对 VP22 的影响

由于 VP22 的转导效果以前被怀疑为由于固定液所导致的假象^[17], 我们利用无水甲醇、丙酮:乙醇(3:2)、100%乙醇和 10%福尔马林固定液分别在 4 固定 5min, 观察 VP22 在 COS-1 中暂态表达时的定位情况。在固定后的 pEGFP-VP22 转染各组细胞中, 加入适量 PBS, 在不同水化时间下, 观察 EGFP-VP22 的扩散情况。

1.5 双检测系统的建立

利用罗丹明标记的抗鼠二抗和 FITC 标记的抗鼠二抗, 分别标记 EGFP、VP22 多抗和抗肌动蛋白单抗的表达产物, 在共聚焦显微镜下观察结果。

1.5.1 罗丹明染色和 EGFP 双检测: 通过荧光显微镜直接观察 EGFP, 再用丙酮:乙醇固定细胞观察, 利用 Anti-actin 单抗(1:50)和罗丹明标记的二抗显示 VP22 的定位, 在荧光显微镜下观察(紫外线的波长为 590nm, 红光的最佳吸收峰在 630nm)。或在固定的细胞上加入 1:200 稀释的抗 VP22C 多抗血清, 通过罗丹明标记的二抗显示的红光, 以此来区别 EGFP 的绿色。

1.5.2 EGFP 和 RFP 双重指示作用: 利用 IRES 区的核糖体进入位点特性, 将 EGFP-VP22 和 RFP 构建在同一载体中, 同时表达 EGFP-VP22 和 RFP, 通过转染细胞观察荧光的定位。如果在发红光的细胞周围出现发出绿色荧光的细胞内显色, 说明通过肉眼能够观察到蛋白转导现象, 如果直接观察不出区别, 则甲醇固定细胞, 加入 VP22C 多抗, 加入 FITC 标记的二抗显色。

2 结果

2.1 不同片段 VP22 的 PCR 扩增效果

通过 PCR 扩增不同片段的 VP22, 在 1.5%浓度的琼脂糖凝胶中电泳, 结果成功扩增出 VP22N(579bp)、VP22S(522bp)、VP22T(108bp)、VP22H(672bp)、VP22C(447bp)、VP22M(297bp)、CVP22(732bp)、648A VP22(750bp)和 GVP22(750bp), 经测序分析, 序列完全正确。

2.2 VP22 在 COS-1 细胞中的暂态表达和不同固定剂对 VP22 的影响

利用无水甲醇、丙酮:乙醇(3:2)、100%乙醇和 10%福尔马林固定液对 pVP22 暂态表达 COS-1 分别进行固定, 加入 VP22C 多抗, IFA 检测结果发现: 福尔马林对 VP22 有破坏性, 转染的细胞不能通过 IFA 检测, 而实验中其他各种固定剂的检测结果是一致的, 即在所有细胞核中检测到 VP22。这一结果显示: CVI988 VP22

具有蛋白转导功能, 并非固定剂的引起的假象, 而且能够高效转导入单层所有细胞核中(图 1)。

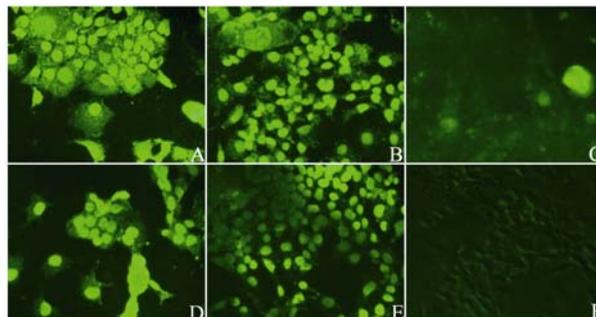


图 1 VP22 暂态表达结果

Fig. 1 Immuno-fluorescence assay on COS-1 cells transfected with pVP22 plasmid. COS-1 cells transfected by pVP22 DNA were fixed by acetone for 5min (A), by methanol(B), by formaldehyde (C), by acetone/ethanol (D), or by 100% ethanol (E); COS-1 cells transfected with pcDNA3.1 plasmid wasn't stained by VP22 antibody (F).

2.3 不同 VP22 片段与 EGFP 融合表达情况

EGFP 融合于 VP22 的上游进行表达, 可见: pEGFP-VP22 主要定位于细胞核中, 与核酸结合(图 2-A), 在胞浆中的蛋白主要与中心粒结合(图 2-B), 形成单极或对极着色(图 2-C), 也有呈多点结合于核膜周围(图 2-D, 2-E)。在正在分裂的细胞中, 与分裂相的核膜结合, 并不进入核内(图 2-F), 还有一些 VP22 赶度聚集在细胞内膜和在胞浆中呈现聚集荧光斑点, 可能与微管的结合有关(图 2-G)。而不同缺失型 VP22 的定位则大相径庭, EGFP-CVP22N 转染的细胞核定位(图 2-H); CVP22M 呈胞浆弥散; VP22S 显示与核膜和微管结合(图 2-I); CVP22C 发现具有胞浆定位和核膜定位特点(图 2-K); 而 CVP22T 具有胞浆弥散(图 2-L)。对照组 pEGFP, 则呈现整个细胞染色(图 2-M), EGFP-VP2 融合蛋白呈现胞浆染色(图 2-N)。这说明融合蛋白 EGFP-VP22 的定位特性来自于 VP22 本身。

2.3 甲醇固定转染的 COS-1 及水化结果

两种 EGFP-VP22 固定前(图 3-A1)固定后(图 3-A2), 加抗肌动蛋白抗体和罗丹明标记的抗鼠 IgG 染色, 可见细胞浆染成红色, EGFP-VP22 呈核膜、微管和微丝结合形态; 甲醇固定再水化 6h 后, 被转染细胞周围细胞核内出现扩散出去的 EGFP 荧光(图 3-B1), 加抗肌动蛋白抗体和罗丹明标记的抗鼠 IgG 染色, 可见细胞浆染成红色, EGFP-VP22 定位于核内(图 3-B2)。pEGFP-CVP22 经甲醇固定后 1h, 可见转染的细胞周围核内有 EGFP 扩散; pT-EGFP-VP2 转染后可见细胞浆内存在散在荧光聚集; EGFP-CVP22N 经甲醇固定后在转染细胞核的周围出现少量扩散, 加入 VP22C 抗体后, 荧光并不扩大; pGVIR 在固定之前主要定位于

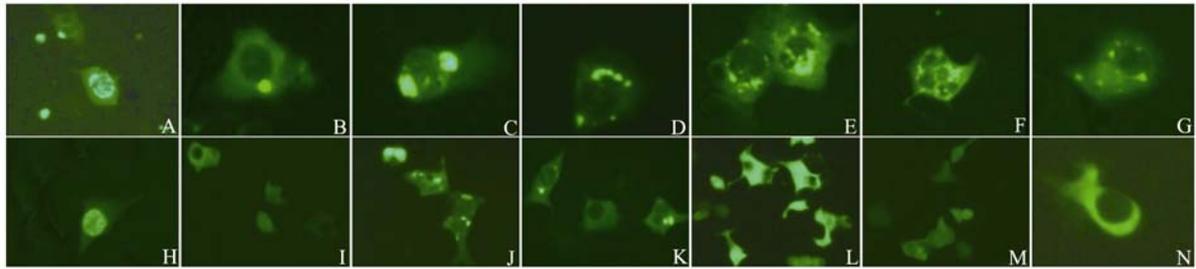


图2 不同 VP22 片段的定位(20×)

Fig. 2 EGFP-VP22 recombinants fluorescence in COS-1 (20×). In COS-1 cells PI=48h, EGFP-VP22 translocates into cell nuclei and accumulated around the nucleus rim (A), binds with centrosome (B) and appearing as two spots (C), or multiple spots binding with nucleus membrane (D, E), associates with mitotic nuclear membrane (f), VP22 associates with inter-membrane and accumulate in the cytoplasm (G), Nuclear localization of EGFP-VP22N (PI=48h)(H), EGFP-VP22M diffused in the cytoplasm as VP22T (L), EGFP-VP22S binding with nuclear membrane and microtubule (J) the same as localization of EGFP-VP22C (K), EGFP (M) diffused in whole cells while pT-EGFP-VP2 (N) diffused in the cytoplasm.

核膜和微管上; pGVIR 转染的细胞内可见 RFP 定位于细胞浆中; 这说明 CVI988 和 GA VP22 经过一定的水化时间(1h), 可以在周围细胞核内检测到 EGFP-VP22 的小范围扩散。

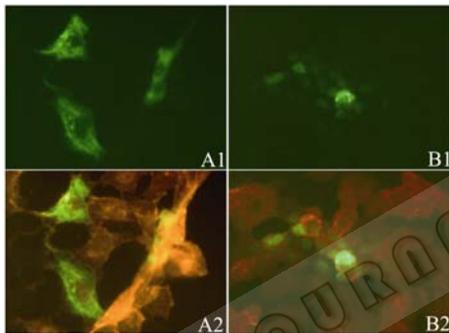


图3 VP22 的水化扩散现象

Fig. 3 Spread of VP22 in PBS solution. COS-1 cells were transfected with pEGFP-VP22 before (A1) or after fixation, which strained with anti-actin antibody or Rodamine labeling anti-mouse IgG (A2). The fixed COS-1 cells had been soaked in the PBS solution for 6h (B1) and strained with Rodamine labeling anti-mouse IgG. (B2).

2.4 抗体染色检测 VP22 的蛋白转导功能

pEGFP-VP22 经甲醇、丙酮:乙醇、100%乙醇固定后, 加入 VP22C 抗体后, 可见所有细胞核中均有 VP22 分布, 可见 EGFP-VP22 能够转导进入单层细胞的所有细胞核中, 且这几种固定剂之间没有明显差异。EGFP-CVP22C 主要聚集于核膜、微管, 甲醇固定和 VP22C 抗体染色后不改变其定位效果; EGFP-CVP22M 主要存在于细胞浆中, 甲醇固定和 VP22C 抗体染色后并不改变其定位特点; CVP22S 主要聚集于核膜、微管, 甲醇固定和 VP22C 抗体染色后不改变其定位效果; CVP22T 主要呈整个细胞着色和胞浆定位, 但甲醇固定后, 其荧光能被破坏而猝灭; pEGFP-GVP22 甲醇固定后能在周围细胞核中小量扩散; 加入 VP22C 抗体后, 周围几乎所有细

胞核内均存在 EGFP-GVP22; pEGFP 转染细胞后呈整个细胞内分布(图4)。而对比利用罗丹明标记二抗染色发现, 各种 VP22 的定位与直接观察和 FITC 标记二抗结果相似(图5)。由此可见, VP22N(1~193aa) 已显示部分转导特性, 只有全长 VP22 才能具有强大的蛋白转导作用, 而且 N1~18aa 对发挥蛋白转导功能有重要的作用。

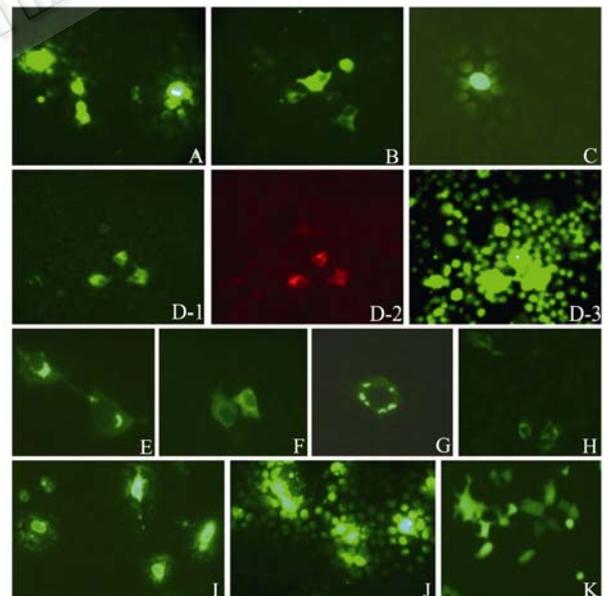


图4 不同缺失型 VP22 片段检测结果(20×)

Fig. 4 VP22 intercellular trafficking. In the methanol-fixed COS-1 cells transfected with pEGFP-CVI988 VP22 plasmid (A) or pEGFP-GA VP22 (I), we found EGFP-VP22 could spread a small scale of surrounding cells after rehydration; pEGFP-VP2 was as a control, the fluorescence remained in fixed cells as in live ones (B); pEGFP-VP22N was used, resulting that VP22N could translocate EGFP into the nuclei of the surrounding cells (C); under 592nm or 630nm laser, we found that in the cells expressed EGFP-VP22 and RFP, the nuclei of other cells in the monolayer could be detected (D-3); EGFP-VP22C (E), EGFP-VP22M (F), EGFP-VP22S (G), or EGFP-VP22T (H); pEGFP transfection for control, which showed that the fluorescence was diffusely in cytoplasm (K).

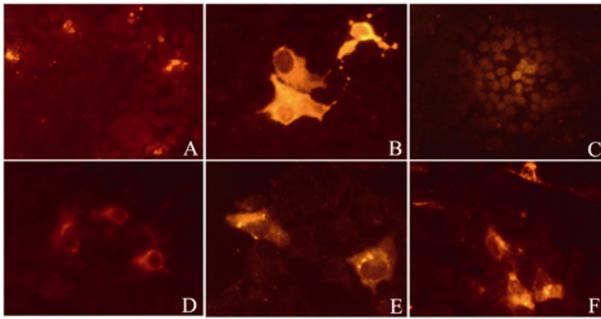


图 5 VP22C 多抗检测各种缺失型 VP22 在 COS-1 细胞中的表达(20×)

Fig. 5 Transfection of pVP22 and truncated VP22 plasmids with AVP22C staining (PI=48h). pVP22 plasmid was transfected into COS-1 cells at a dose of 1 μ g, stained with AVP22C antibody and restained with Rodamine labeling anti-mouse IgG, which resulted in VP22 could be spread into all the nuclei of the monolayer (A), pEGFP-VP22M plasmid operated as the protocol above, resulting VP22M was most localized in the cytoplasm (B), COS-1 cells transfected with pEGFP-VP22N plasmid showed that the same pattern with the wild length protein (C), EGFP-VP22T were mainly in the cytoplasm (D), EGFP-VP22S fusion protein were almost binding the microtubule network and the nuclear membrane (E), the similar pattern was in the COS-1 transfected with EGFP-VP22C (F).

3 讨论

3.1 VP22 在细胞内的定位与蛋白转导功能的关系

HSV-1 VP22 在最初合成过程中并不聚集到核内, 仅聚集在核膜周围^[18]。Elliott 等^[19]分析可能是 VP22 不具备明显的核定位信号所致。然而, 本研究在对 MVP22 进行缺失时发现, VP22 N1~18 明显具有核定位特性, 但这段序列却并不是经典的核定位序列^[6,20](Nucleus Localization Site, NLS)。这一区域还是磷酸激酶 A 的激活位点^[7,14]。缺失该段的 VP22, 不具有转导功能。而与此相对的是, C194-249 的缺失虽不影响 VP22 的核定位, 但可以大大降低转导效率。因此, VP22 的 N 端和 C 端对 VP22 发挥强大的转导功能意义很大。这可能与 N 端和 C 端形成 PTD 的左右“臂”不无关系, 同时也说明 N 端核定位区和 C 端胞浆定位区极可能是 VP22 蛋白转导功能的组成部分。

与其他同源产物相似的是, MVP22 也具有与微管和中心粒结合的功能。这一功能导致微管重组和成簇, 使之高度稳定, 导致细胞不再进行分裂^[6,7], 这很像李氏杆菌这样的胞内菌传播方式^[21]。这不但方便 VP22 携带目的蛋白在细胞内的高效运输, 而且对研究 VP22 与 MDV 致病性之间的关系很有启迪。因此, 我们认为这一特点是 MDV-1^[7]、牛淋白血病病毒^[22]等严格细胞结合型病毒的传播和扩散机理的关键点。

3.2 VP22 蛋白转导功能的特点

现已证实, HVP22 作为外源蛋白加入培养基后

可被细胞直接摄取, 且可将绿色荧光蛋白^[9,23]、P53^[24]和 HSV-1 的胸苷激酶(TK)^[25]等很多大分子量蛋白质转运至 COS-1, HeLa, BHK-21 等细胞内。然而, VP22 需要经过翻译后的磷酸化修饰来发挥正常功能。故常常需要构建 VP22 基因与目的蛋白基因融合表达载体, 通过在转染的真核细胞上的短暂表达后, 才能在周围的细胞内达到不同的水平。这与 Tat 的作用迥异。通过载体表达后的重组 Tat 融合蛋白直接加入培养物介质中, 可实现 Tat 蛋白的转运能力^[10]。而 VP22 的特点在于: 被转染的 DNA 载体表达产物就能够高效地转导目的蛋白, Tat 融合蛋白表达载体的效率则低出很多; 而且, 目前有证据表明 VP22 融合蛋白加入培养物介质时也很具有很强的转导作用^[6,7]。Dorange 等^[6]将杆状病毒表达的 VP22 加入到 PK15 细胞上, 发现 VP22 可以在 30min 内高度聚集于所有细胞核内。我们曾在 MDV 感染的 CEF 细胞上, 通过 VP22 抗体的染色, 再显出 VP22 转导入所有细胞核的特性, 说明 MVP22 具有强大的细胞内转运能力^[15]。本研究通过 MVP22 与 EGFP 在 COS-1 中融合表达, 成功地将 EGFP 转导入所有单层细胞核内。这一高效的转导现象说明, MVP22 并不比 HVP22 和 BVP22 转导效率差。

3.3 甲醇造成的转导“假象”与 VP22 本身性质有直接关系

关于蛋白转导现象, 目前国际上形成两个完全对立的观点。一种说法是倾向于认为: 蛋白转导功能只是甲醇等固定剂造成的“假象”。他们通过 FACS 检测含 EGFP 的活细胞数量, 却发现 EGFP-VP22 的细胞数并没有增加, 所以认为蛋白转导现象不过是固定剂造成的“假象”^[17,23]。因为用于固定免疫球蛋白、细菌多糖等的甲醇可以破细胞质膜, 改变正常微管的结构, 人为地导致破膜作用, 促进 EGFP-VP22 的扩散和核定位^[17]。另一种看法是认为: 蛋白转导效率是极为少量的, 而肉眼可见的荧光数是 10 万个以上/细胞, FACS 最低检测的 EGFP 量为 100 个/细胞, 但极低的蛋白量只有通过荧光实验加强染色效果, 才能体现转导特性^[23]。通过将 EGFP 与其他蛋白和各种缺失型 VP22 进行融合表达作为 EGFP-VP22 的对照, 结果显示出仅有全长的 VP22 具有这种转导现象。虽然在固定后随着水化时间的延长, 笔者的确发现经过甲醇、丙酮:乙醇和 100% 乙醇 3 种固定剂固定的细胞中, EGFP 有聚集于邻近未被转染的细胞核内的现象, 这也与 Elliott 等研究结果不谋而合。但荧光扩散的范围很小, 而且被 VP22 抗体的染色加于佐证(图 4-D3、图 5-A)。当通

过 VP22 抗体染色后, MVP22 的强大转导能力才得以充分显现。这些都说明, 这一现象与 MVP22 转导功能本身直接相关。

3.4 MVP22 的 PTD 不能单独发挥转导作用

迄今为止, 已被确定和应用的 CPP 序列一般小于 30aa, 富含碱性氨基酸残基, 能形成 α 螺旋。在生理 pH 值条件下, 带净正电荷的碱性氨基酸残基, 暴露于一侧, 形成极性分子。通过 α 螺旋的结构特征, 它们能够将其所承载的物质通过浆膜, 并在细胞内积累。这个过程不需要任何载体参与和能量参与, 目前已成为新型转移载体研究的热点^[3]。

Elliott 等^[19]曾对 HSV-1 VP22 进行缺失, 发现 C267~301 具有转导功能, 但也有研究认为 PTD 存在于 C81~195, 这段区域与 BVP22 的 C149-259 和 MVP22 的 C93-204 高度同源^[13]。研究也证实这段区域为 PTD。因此, 本研究通过构建各种缺失型 VP22, 来了解 MVP22 的 PTD 的具体位置和与其他功能区的相互关系。结果却发现, MVP22 的 PTD 和 HVP22 一样不能单独进行蛋白转导, 而必需 N 和 C 端的其他区域辅佐。这一特点与其他 CPP 不大相同。这将严重影响人工合成 VP22 的 PTD 序列, 而只能通过构建和在体内外表达 VP22 与其他蛋白融合表达的 DNA 载体, 才能实现 VP22 的转导功能。

3.5 MVP22 的功能区分布

Dorange 等^[6]指出 MDV-1 RB1B 株 VP22 的转导功能域在 N 端 38aa~188aa 处。随后, O' Donnell 等^[13]和 Normand 等^[26]将其缩小到 93aa~173aa。笔者发现, N1~18 是核定位信号, 缺失该段的 VP22 核定位现象不明显。但有研究表明: VP22 缺失 N1-16 也能入核, 这可能与 EGFP 一些未知的功能有关。Dorange 等^[6]通过 DNA 结合实验证实 N16~37 为 DNA 结合区, 而 N38~93 功能未能定性; C207~249 有染色质结合的特性, 但该段存在时, VP22 主要存在于微管、核膜、细胞内膜等处。所以, 这段序列功能可能与 VP22 的核外输有关, 却同样并非 NES 的通用序列。与此类似的是: BVP22 则存在一段亮氨酸富集区^[20], 位于 ²⁰⁴LDRMLKSAAIRIL²¹⁶, 被认为是非典型的 NES。对比 MVP22 序列, 笔者发现在 MVP22 的 C 端也存在这样的类似模体; C94~249 首先显示出中心粒结合特性, 然后沿着中心粒向膜上延伸, 仍然可以像全长 VP22 一样聚集呈斑点状, 随时间延长, 具有核内定位的特点; MVP22 C94~193 一直被认为是与 HVP22 和 BVP22 同源性最高的区域, 即极可能是蛋白转导域; O' Donnell 等^[13]认为 144~171aa 是异染色质结合区, 而 172~183aa 微管结合区。

笔者通过上述实验试图想找到最小的蛋白转导区域。结果却发现: VP22 的 N 端(1~93aa)和 C 端(207~249aa)对细胞间转运作用(C94~193)的发挥意义很大, 缺失左右“臂”之后, VP22M 呈现细胞浆定位, 所有 VP22 的其他功能一概不能表现出来。再结合我们在 MDV 感染 CEF 细胞上发现 VP22 能够快速扩散并高度聚集于所有细胞核内的特点, 笔者认为 VP22 蛋白转导功能的发挥需要一个完整的空间模式, 这其中极可能存在 VP22 被充分磷酸化而发挥功能的可能性, 即需要细胞内磷酸激酶和病毒磷酸激酶共同磷酸化作用^[27,28]。

参 考 文 献

- [1] Green M and Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*, 1988, 55(6): 1179-88.
- [2] Frankel AD and Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55(6): 1189-93.
- [3] El-Andaloussi S, Holm T, Langel U, et al. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(28): 3597-611.
- [4] Elliott GD and Meredith DM. The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J Gen Virol*, 1992, 73(3): 723-6.
- [5] Yanagida N, Yoshida S, Nazerian K, et al. Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins. *J Gen Virol*, 1993, 74(9): 1837-1845.
- [6] Dorange F, El Mehdaoui S, Pichon C, et al. Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *J Gen Virol*, 2000, 81(9): 2219-30.
- [7] Dorange F, Tischer BK, Vautherot JF, et al. Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *J Virol*, 2002, 76(4): 1959-70.
- [8] Elliott G, O'Reilly D, and O'Hare P. Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. *Virology*, 1996, 226(1): 140-5.
- [9] Elliott G, O'Reilly D, O'Hare P, et al. Identification of phosphorylation sites within the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J Virol*, 1999, 73(7): 6203-6.
- [10] Hung CF, He L, Juang J, et al. Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *J Virol*, 2002, 76(6): 2676-82.
- [11] Zheng C, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, et al. Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *J Virol*, 2005, 79(3): 1948-53.
- [12] Verhagen J, Hutchinson I, Elliott G, et al. Nucleocytoplasmic Shuttling of Bovine Herpesvirus 1 UL47 Protein in Infected Cells. *J Virol*, 2006, 80(2): 1059-63.
- [13] O'Donnell LA, Clemmer JA, Czymbek K, et al. Marek's

- disease virus VP22: subcellular localization and characterization of carboxyl terminal deletion Mutations. *Virology*, 2002, 292(2): 235–40.
- [14] 陈鸿军, 秦爱建, 丁铲, 等. MDV CVI988/Rispens 弱毒株 VP22 基因克隆和序列分析. 扬州大学学报(农业与生命科学版)[*Journal of Yangzhou University(Agricultural and Life Science Edition)*], 2003, 24(4): 7–10.
- [15] CHEN Hong-jun, SONG Cui-ping, QIN Ai-jian, *et al.* Expression and Intercellular Trafficking of the VP22 Protein of CVI988/Rispens Vaccine Strain of Marek's Disease Virus, *Science in China Series C: Life Sciences*, 2007, 50(1): 75–79.
- [16] 陈鸿军, 秦爱建, 宋翠萍, 等. MDV-1 VP22 羧基端在大肠杆菌中高效可溶性表达. 中国病毒学(*Virologica Sinica*), 2006, 21(2): 169–172.
- [17] Lundberg M and Johansson M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat Biotechnol*, 2001, 19(8): 713–4.
- [18] Lisa EP and John AB. Modified VP22 Localizes to the Cell Nucleus during Synchronized Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J Virol*, 1999, 73(8): 6769–6781.
- [19] Elliott G and O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997, 88(2): 223–33.
- [20] Zheng C, Brownlie R, Babiuk LA, *et al.* Characterization of the nuclear localization and nuclear export signals of bovine herpesvirus 1 VP22. *J Virol*, 2005, 79(18): 11864–72.
- [21] Berche P. Pathophysiology and epidemiology of listeriosis. *Bull Acad Natl Med*, 2005, 189(3): 507-16/516–21.
- [22] Wang H, Norris KM, Mansky LM, *et al.* Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging. *J Virol*, 2003, 77(17): 9431–8.
- [23] Brewis N, Phelan A, Webb J, *et al.* Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J Virol*, 2000, 74(2): 1051–6.
- [24] Zender L, Kock R, Eckhard M, *et al.* Gene therapy by intrahepatic and intratumoral trafficking of p53-VP22 induces regression of liver tumors. *Gastroenterology*, 2002, 123(2): 608–18.
- [25] Dilber MS, Phelan A, Aints A, *et al.* Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther*, 1999, 6(1): 12–21.
- [26] Normand N, van Leeuwen H, O'Hare P, *et al.* Particle formation by a conserved domain of the herpes simplex virus protein VP22 facilitating protein and nucleic acid delivery. *J Biol Chem*, 2001, 276(18): 15042–50.
- [27] Geiss BJ, Cano GL, Tavis JE, *et al.* Herpes simplex virus 2 VP22 phosphorylation induced by cellular and viral kinases does not influence intracellular localization. *Virology*, 2004, 330: 74–81.
- [28] Morrison E, Wang YF, Meredith DM, *et al.* Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J Virol*, 1998, 72(9): 7108–14.

The N1~18 Terminus of Marek's Disease Virus VP22 Is Essential for Protein Transduction

Hongjun Chen^{1,2}, Aijian Qin^{1*}, Cuiping Song², Chenfei Zhang¹, Xufang Deng¹

¹Jiangsu Animal Preventive Medicine Key Lab, Yangzhou University, China 225009)

²Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China)

Abstract: We previously showed some differences in Marek's disease virus (MDV) VP22 gene between virulent and avirulent strains, in the deletion from 201aa to 206aa, namely ²⁰¹TKSERT²⁰⁶. In this study, VP22 genes were amplified from strains: CVI988/Rispens and GA. And then the fragments were subcloned into pcDNA3.1/zeo(+), respectively, which were co-expressed with an enhancer green fluorescent protein (EGFP) after transfection into COS-1 cells. As with both human herpesvirus 1 and bovine herpesvirus 1 VP22-EGFP fusion proteins, the subcellular localization of the three MDV EGFP-VP22 products revealed few differences, which bind to microtubules and nucleus membrane, and then to heterochromatin. In addition, VP22s also bind to centrosomes and inter-membrane. During mitosis, EGFP-VP22s bind to sister chromatids, but dissociates from the centrosomes and the microtubules of the mitotic spindle. In truncated fragments' transfection experiments, stained with the specific monoclonal antibody against VP22, it concluded that the full length of VP22 was required for protein transduction, and N1-18aa was essential to VP22 translocating from cytoplasm to nucleus as a potential nucleus localization site in the absence of other viral factors in MDV-1.

Keywords: Marek's disease virus, CVI988/Rispens, VP22, protein transduction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371070) and the National Excellent Doctoral Dissertation award of China (200256)

* Corresponding Author Tel: +86-514-7979224; Fax: +86-514-7979217; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Received: 28 August 2007/Revised: 25 October 2007