

黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物结合多肽的氨基酸序列分析

王岳平, 阮强, 吉耀华, 孙峥嵘, 何蓉, 齐莹, 马艳萍

王岳平, 阮强, 吉耀华, 孙峥嵘, 何蓉, 齐莹, 马艳萍, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室 辽宁省沈阳市 110004
国家课题基金资助项目, No. 30770109; No. 30672248
作者贡献分布: 本课题设计和论文书写由王岳平与阮强设计完成; 实验操作由王岳平、吉耀华及孙峥嵘完成; 何蓉与齐莹参与实验设计; 软件分析由吉耀华与马艳萍完成。
通讯作者: 阮强, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室. ruanq@sj-hospital.org
电话: 024-83955345
收稿日期: 2009-01-13 修回日期: 2009-03-06
接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-04-28

Amino acid sequence analysis of UL149 encoded product binding peptides of human cytomegalovirus in infants with jaundice

Yue-Ping Wang, Qiang Ruan, Yao-Hua Ji, Zheng-Rong Sun, Rong He, Ying Qi, Yan-Ping Ma

Yue-Ping Wang, Qiang Ruan, Yao-Hua Ji, Zheng-Rong Sun, Rong He, Ying Qi, Yan-Ping Ma, Virology Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770109; No. 30672248
Correspondence to: Qiang Ruan, Virus Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. ruanq@sj-hospital.org
Received: 2009-01-13 Revised: 2009-03-06
Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-04-28

Abstract

AIM: To identify peptides that have high affinity to UL149 gene encoded product of human cytomegalovirus in jaundice infants and to analyze the characteristics of peptides binding amino acid sequence.

METHODS: With random peptide display library screening, peptide with high affinity to UL149 encoded product in jaundice infants infected HCMV was sequenced. Comparisons were conducted for amino acid peptide homology.

RESULTS: The peptide binding amino acid, which had high affinity to UL149 encoded prod-

uct in jaundice infants infected with HCMV, shared similar homology. A central part was found, that is, D/E-D/E-G-W/F/I/L. Comparison with present protein database, peptides binding amino acid had a close relation with human immunoglobulin heavy chain variable region (IgHV). Besides, it also held strong binding with serine/threonine protein kinases, human cytomegalovirus IE UL37 protein, glycoprotein B.

CONCLUSION: The UL149 gene encoded product from jaundice infants infected with HCMV might combine with human cytomegalovirus IE UL37 protein or glycoprotein B, and might be involved in immune escape mechanism.

Key Words: Jaundice; Human cytomegalovirus; UL149 gene; Random peptides display library; Screening

Wang YP, Ruan Q, Ji YH, Sun ZR, He R, Qi Y, Ma YP. Amino acid sequence analysis of UL149 encoded product binding peptides of human cytomegalovirus in infants with jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(12): 1269-1271

摘要

目的: 初步确定能够与黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物具有较强结合能力的多肽, 并分析这些多肽氨基酸序列的特点。

方法: 应用多肽文库展示技术筛选与来源黄疸患儿的人巨细胞病毒临床低传代分离株UL/b'区基因中的UL149基因编码产物结合的多肽克隆, 对相应的多肽氨基酸序列进行同源性比较, 并与蛋白数据库中已知的蛋白序列进行比较。

结果: 与黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物具有结合能力的多肽序列之间具有较高的同源性, 氨基酸序列中存在较为集中的区域, 即D/E-D/E-G-W/F/I/L; 与已知蛋白数据库进行比较, 发现与人免疫球蛋白重链可变区关系密切, 亦与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、人巨细胞病毒的立刻早期基因UL37、

■背景资料

人巨细胞病毒感染可引起患儿多种系统疾病和各种先天畸形。黄疸是消化系统受累最常见的临床表现, 研究其致病机制可以为其防治提供基础资料。

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

■研发前沿

人巨细胞病毒在感染患儿中的致病机制一直是该研究领域的热点。病毒与人体免疫系统之间以及病毒分子之间的相互作用是揭示其致病机制的直接线索。

gpB等存在结合关系。

结论: 在黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物可能与人巨细胞病毒的gpB、立刻早期基因UL37等具有联合作用, 并且可能参与HCMV的免疫逃避机制。

关键词: 黄疸; 人巨细胞病毒; UL149基因; 随机多肽展示文库; 筛选

王岳平, 阮强, 吉耀华, 孙峥嵘, 何蓉, 齐莹, 马艳萍. 黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物结合多肽的氨基酸序列分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(12): 1269-1271

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1269.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)先天感染可以导致新生儿多种疾病或畸形, 其中以消化系疾病较为常见, 如黄疸、巨结肠、胆道闭锁等^[1-3], 其致病机制尚不清楚。近年来, HCMV基因结构研究发现UL/b'区基因是临床低传代分离株所特有的^[4], 并且可以被表达^[5]。本文应用多肽文库展示技术筛选与来源黄疸患儿的HCMV临床低传代分离株UL/b'区基因中的UL149基因编码产物结合的多肽克隆, 并对结合多肽的氨基酸序列进行分析, 初步探讨来源于黄疸患儿的HCMV UL149基因编码产物的配体蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料 根据荧光定量PCR结果选取HCMV感染阳性的黄疸患儿的尿标本, 在培养的人胚肺细胞内进行病毒分离, 待3 wk后出现巨细胞病变后, 备用。

1.2 方法

1.2.1 制备GST-HCMV UL149基因编码产物融合蛋白: 采用裂解法提取DNA; 应用Primer Premier 5.0软件设计UL149基因PCR扩增引物, 5'端引入限制性内切酶EcoR I和BamH I的识别序列, 上游引物序列: 5'-GCGGATCCATGGTGGTGGATCAG-3'; 下游引物序列: 5'-GCGAATTCTCACC CGCCCTCTGGGTG-3'。以分离株的DNA为模板扩UL149基因编码序列, 并应用内切酶切割PCR产物后与pGEX-2T质粒连接, 转化到感受态细菌DH5α中, LB-琼脂-Amp过夜培养, 挑选阳性克隆进行DNA测序鉴定UL149基因克隆是否成功; 应用IPTG诱导融合蛋白表达, 应用SDS-PAGE电泳及考马斯亮蓝染色及Western杂交鉴定表达的

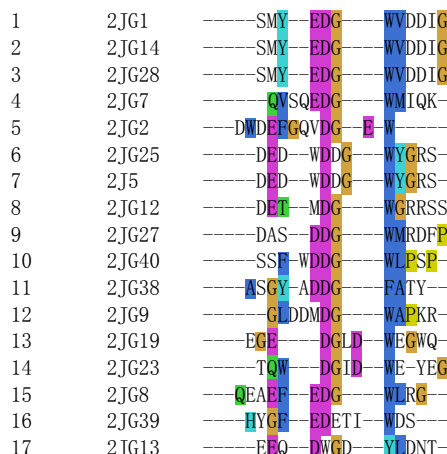


图1 黄疸患儿感染的人巨细胞病毒UL149基因编码产物结合多肽的氨基酸序列同源性比较结果。

融合蛋白; 应用超声破碎表达蛋白的菌体, 应用GST-亲和层析柱纯化目的蛋白, 制备高纯度的融合蛋白。

1.2.2 随机多肽展示文库筛选: 应用Invitrogen公司的FliTrx™ Random Peptide Display Library试剂盒, 按照操作说明筛选与融合蛋白GST-UL149-2J结合的随机多肽克隆, 进行14轮筛选, 然后应用GST蛋白反筛, 反筛后留取未与包被的GST蛋白结合的上清菌液, 并过夜培养, 继续循环筛选10次, 排除与GST结合的多肽克隆。

1.2.3 氨基酸序列分析: 将最后筛选获得的细菌稀释后在琼脂-Amp的平皿中过夜培养, 挑选阳性克隆测序, 应用BioEdit软件将随机多肽区域核酸序列翻译为多肽氨基酸序列, 应用Clustal X软件对多肽的氨基酸序列同源性进行比较, 并与已知蛋白数据库的氨基酸序列比较, 初步分析与UL149基因编码产物结合的蛋白。

2 结果

HCMV UL149基因在表达质粒中序列插入正确, GST-HCMV UL149融合蛋白可以大量表达, 并且纯度达到80%以上, 符合进一步筛选的要求。

随机多肽展示文库筛选共得到17个多肽序列, 氨基酸序列具有较高的同源性, 存在结构相似的区域, 即D/E-D/E-G-W/F/I/L。

结合多肽的氨基酸序列与已知蛋白数据库比较, 其中13个序列与人免疫球蛋白重链可变区具有同源序列, 并且占据抗原结合位点或异源二聚体结合位点, 有5个序列与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶具有同源序列, 有8个序列与人巨细胞病毒的立刻早期基因UL37蛋白具有同源序列, 有5个序列与HCMV gpB蛋白具有同源序列(图1)。

■创新盘点

本文应用多肽文库展示技术筛选与来源黄疸患儿的人巨细胞病毒临床低传代分离株UL149基因编码产物结合的多肽克隆, 并对结合多肽的氨基酸序列进行分析, 初步探讨来源于黄疸患儿的人巨细胞病毒UL149基因编码产物的配体蛋白, 为进一步研究UL149基因的生物功能提供基础资料。

3 讨论

HCMV先天感染及在免疫系统功能缺陷人群中的致病作用提示这种病毒与人体的免疫应答机制关系密切。现有的研究表明, HCMV的UL/b'区基因与人的免疫分子之间存在相互作用^[6-8], 同时研究也表明HCMV致病作用的复杂性可能与HCMV的多个基因编码产物形成复合物后干扰机体免疫应答过程有关^[9-10]。

我们通过随机多肽展示文库筛选结果表明, HCMV UL149基因编码产物的结合多肽与UL37的编码产物具有同源性。UL37基因是一个立刻早期基因, 其氨基末端含有一个抗凋亡区域^[11], 其编码产物与病毒的生长及适应宿主细胞功能有关^[12]。UL/b'区基因是临床低传代分离株中所特有的结构, 但是对于病毒的生长和复制是不必需的。我们的实验结果提示UL149基因的编码产物可能会利用HCMV基因组的其他基因编码产物达到参与病毒适应宿主细胞的机制, 进而发挥其致病作用。

另外, 我们的实验结果还表明HCMV UL149基因编码产物的结合多肽与人免疫球蛋白重链可变区具有高度的同源性, 并且同源区域占据抗原结合位点或异质二聚体干扰的位点。人免疫球蛋白重链可变区是识别并特异性结合抗原的部位, 这两个位点均处于T细胞受体范围内。这个结果提示HCMV UL149基因的编码产物可能影响免疫球蛋白与病毒抗原的结合, 使病毒逃避免疫细胞的攻击; UL149基因的编码产物与人免疫球蛋白重链可变区结合可以形成空间位障, 影响免疫球蛋白C区的Fc段, 使其不能通过T细胞表位与T淋巴细胞结合, 这些都有利于HCMV的编码产物逃避了细胞免疫的监视作用。

4 参考文献

1 王宝香, 朱润庆. 婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总

管囊肿与巨细胞病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1745-1747

2 马艳萍, 吉耀华, 刘庆, 王继东, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 阮强. 黄疸婴儿人巨细胞病毒的检测. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1704-1707

3 Munro SC, Trincado D, Hall B, Rawlinson WD. Symptomatic infant characteristics of congenital cytomegalovirus disease in Australia. *J Paediatr Child Health* 2005; 41: 449-452

4 Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70: 78-83

5 Yang S, Ghanny S, Wang W, Galante A, Dunn W, Liu F, Soteropoulos P, Zhu H. Using DNA microarray to study human cytomegalovirus gene expression. *J Virol Methods* 2006; 131: 202-208

6 Poole E, King CA, Sinclair JH, Alcamí A. The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NFκB via a TRAF6-dependent mechanism. *EMBO J* 2006; 25: 4390-4399

7 Tomasec P, Wang EC, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, McSharry BP, Morris RJ, Llewellyn-Lacey S, Rickards C, Nomoto A, Sinzger C, Wilkinson GW. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol* 2005; 6: 181-188

8 Wills MR, Ashiru O, Reeves MB, Okecha G, Trowsdale J, Tomasec P, Wilkinson GW, Sinclair J, Sissons JG. Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *J Immunol* 2005; 175: 7457-7465

9 Mach M, Kropff B, Dal Monte P, Britt W. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* 2000; 74: 11881-11892

10 Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18153-18158

11 Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, Cahir McFarland ED, Kieff ED, Mocarski ES, Chittenden T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12536-12541

12 Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14223-14228

■同行评价

本文选题新颖, 方法合理, 具有一定得学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才