

# 麻疹病毒绒猴细胞受体基因的克隆及功能鉴定

李凌云 刘鑫 张鹏 齐义鹏\* 程明

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072. \* 联系人, E-mail: qiyipeng@whu.edu.cn)

**摘要** 血凝素基因(*ha*)突变的麻疹病毒毒株失去了感染其敏感宿主 Vero 细胞的能力, 但可以感染绒猴-B 类淋巴母细胞系 B95a, 推测在 B95a 细胞上有这类麻疹病毒毒株的新的受体分子. 为此, 采用酵母双杂交系统, 从 B95a 细胞 cDNA 文库中筛选、克隆了一个上述麻疹病毒血凝素蛋白(Ha 蛋白)的相互作用蛋白基因——*bip*(b-lymphoblastoid interaction protein of marmoset). 该基因 cDNA 全长 1540 个碱基对, 包含 1011 个碱基对的可读框, 推测编码 337 个氨基酸组成的蛋白(Bip). 推导的氨基酸一级结构表明: Bip 蛋白含有一个疏水跨膜区和一个疏水引导区. 缺失突变体研究表明, Bip 蛋白跨膜区缺失不影响 Bip 蛋白与 Ha 蛋白的相互作用. 在麻疹病毒非允许细胞 CHO(中国仓鼠卵巢细胞)中表达 *bip* 基因, 结果证明 CHO/Bip 由非允许细胞变成了对上述麻疹病毒敏感的允许细胞, 即表达有 Bip 蛋白的 CHO 细胞可以被麻疹病毒吸附、感染. 证明 *bip* 是位于绒猴-B 类淋巴母细胞中的麻疹病毒新的细胞受体基因.

**关键词** B95a 型麻疹病毒 血凝素蛋白(Ha 蛋白) 酵母双杂交系统 *bip* *slam*

麻疹病毒(measles virus, MV)对其惟一的天然宿主——人的感染过程, 首先是通过病毒包膜蛋白——血凝素蛋白 Ha(hemagglutinin protein, Ha)与细胞表面受体的结合开始的, 现已证实 CD46 是麻疹病毒的受体<sup>[1]</sup>. 某些灵长类动物(如非洲绿猴)红细胞表面存在 CD46 受体同源类似物<sup>[2]</sup>, 所以 Ha 蛋白能与该同源类似物结合导致麻疹病毒可以凝集非洲绿猴红细胞(african green monkey red blood cells, AGM-RBC), 即 Ha 蛋白介导的血凝集性(hemadsorption, HAD)<sup>[3]</sup>. 长期以来, 血凝集性一直被认为是麻疹病毒与细胞受体 CD46 相互作用的标记.

从 1954 年第一个麻疹病毒毒株被分离纯化<sup>[4]</sup>后, 科学家一直利用猴肾细胞系如 Vero 细胞来分离纯化 MV, 但这一过程需长时间反复传代培养才能获得高滴度的病毒. Kobune 等人<sup>[5]</sup>报道绒猴 B-类淋巴母细胞系(marmoset B-lymphoblastoid cell line)如 B958 及其亚细胞系 B95a 对麻疹病毒非常敏感, 可以快速地分离纯化病毒. 但经 B95a 细胞纯化的病毒(称为 B95a 型病毒)与经 Vero 细胞分离纯化的病毒(称为 Vero 型病毒)却存在显著的表型差异<sup>[6,7]</sup>: 前者血凝集性呈阴性, 而后者血凝集性呈阳性.

以前的研究<sup>[7,8]</sup>已经证实: B95a 型病毒的 Ha 蛋白发生了重要的点突变(Ha 蛋白的 546 位由 Ser 突变为 Gly), 正是这一突变, 导致 Ha 蛋白丧失了与原有细胞受体 CD46 结合的功能, 并表现为 HAD 阴性, 但丝毫不影响该病毒对 B95a 细胞的感染能力, 这就预示

着麻疹病毒可能利用 B95a 上新的细胞受体, 通过一条与 CD46 不同的途径进入宿主, 只有这样才能确保麻疹病毒毒株的感染能力.

一般意义上, 受体分子都是蛋白质. 而酵母双杂交系统是目前研究蛋白质相互作用的一种新型系统. 由于病毒对宿主细胞的吸附感染是以包膜蛋白与细胞受体蛋白的相互作用为基础的, 是典型的蛋白质-蛋白质相互作用, 所以我们利用 B95a 型病毒的 Ha 蛋白(该 Ha 蛋白的 546 位由 Ser 突变为 Gly)为诱饵, 在 B95a 细胞 cDNA 文库中筛选并鉴定了能与 B95a 型病毒 *ha* 基因的表达产物相互作用的宿主蛋白基因, 并通过在非允许细胞中表达该宿主蛋白分子, 证实了其作为 B95a 型麻疹病毒新的细胞受体的可能性.

Tatsuo 等人<sup>[9]</sup>报道: 人 Slam 蛋白是定位于人外周血单核细胞上的新的麻疹病毒细胞受体, 这一研究成果将麻疹病毒的研究推向了一个新的高潮. 我们的研究工作利用完全不同的研究方法进行研究, 结果发现了一个新的存在于绒猴 B-类淋巴母细胞表面的 Bip 蛋白具有与人的 Slam 蛋白相同的功能, 证实它是 B95a 型麻疹病毒感染 B95a 细胞的受体分子.

## 1 材料与方法

(i) 基因、cDNA 文库、载体和细胞. 血凝集性阴性的 B95a 型麻疹病毒毒株 SMD/B 及其 *ha* 基因的扩增见文献[8]. 以酵母双杂交系统 pACT2 载体(含 Gal4<sub>(768-881)</sub>激活区——Gal4-AD 和 *leu* 基因)构建的

B95a 细胞 Matchmaker cDNA 文库购于 Clontech 公司. 酵母双杂交系统中表达载体 pGBT9(含 Gal4<sub>(1~147)</sub> DNA 结合区——Gal4-BD 和 *trp* 基因)和 pGAD424(含 Gal4-AD 和 *leu* 基因)由武汉大学分子病毒室齐兵博士惠赠.

CHO 细胞(Chinese hamster ovary cells, 中国仓鼠卵巢细胞)由武汉大学菌种保藏中心郑从义教授惠赠. CHO 细胞的培养条件为: F12+10%CS(含青霉素、链霉素), 37℃, 5% CO<sub>2</sub>.

(ii) 酵母双杂交系统. 利用酶切消化获得去除膜内区域和跨膜区域的截短的 *ha* 基因(*th*), 插入 pGBT9 载体中, 构建与表达载体 pGBT9 中 Gal4-BD 可读框相同的重组质粒 pGBT-*th*, 以此作为酵母双杂交系统中的诱饵蛋白.

采用 Clontech 公司提供的标准 LiAC 法将重组质粒 pGBT-*th* 和 B95a 细胞 Matchmaker cDNA 文库转化到酵母受体菌 HF7C 中, 涂布于 SD/-Trp-Leu-His 的平板上, 30℃倒置培养 5 d 以上.

(iii) β-半乳糖苷酶显色实验. 在被转化的酵母受体菌 HF7C 生长 7 d 后, 以接种环挑取生长在 SD/-Trp-Leu-His 的平板上所有直径 2 mm 以上的菌落, 转接于另一个新鲜的 SD/-Trp-Leu-His 平板上, 于 30℃培养. 24 h 以后, 以无菌的 Whatman 5 号滤纸印迹新鲜平板上的酵母菌, 进行 β-半乳糖苷酶显色实验. 4~8 h 后, 所观察到的蓝色菌落即为 His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup>阳性克隆.

(iv) 菌落原位杂交. 以 Digoxigenin(DIG) 偶联的 dUTP 标记(iii)中得到的 His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup>阳性克隆, 即蓝色菌落中 cDNA 片段作为分子杂交探针, 从绒猴 B958 细胞系全长 cDNA 中筛选 *bip* 基因 cDNA, 菌落原位杂交按文献[10]进行.

(v) 序列测定及计算机分析. *bip* 基因的全长 cDNA 测序由金贝公司测定. DNA 及氨基酸序列的计算机分析采用 Biosoft 软件库中的 ANTHERPRO4.3 软件进行.

(vi) PCR 扩增. 为确定 Bip 蛋白与 Th 蛋白(*th* 基因的编码产物)的结合功能区, 我们将全长的 *bip* 基因进行截短. 以 *bip* 基因全长 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 用引物 1F 和 1R 扩增 *bip* 基因的膜外区(从碱基第 66~779 位), 用引物 2F 和 2 扩增 *bip* 基因的膜

内区(从碱基第 847~1311 位). 引物中均设计有特殊的限制性内切酶位点以保证将两个 PCR 产物按正确的可读框连接起来构成仅仅缺失跨膜区(即缺失碱基第 779 ~ 848 位)的 *bip* 基因(简称为 *bip*Δ779 ~ 848). 同时用引物 1F 和 2 进行 PCR 扩增获得含有全部编码区的 *bip* 基因. PCR 循环为: 95℃, 5 min → 90℃, 1 min → 55℃, 1 min → 72℃, 2 min, 25 个循环. 引物 1F: 5' -TTTGAATTCTGGCTGATCCCAAGG-GGCTC-3'(EcoR I), 引物 1R: 5' -AGGTCGACATT-TGTCTCTGAGGGTTCTT-3'(Sal I), 引物 2F:5' -AG-GTCGACCTGAGAAGAAGAGGT-3'(Sal I), 引物 2: 5' -ATCTGCAGAGGATGCAAAGCTGTTCT-3'(Pst I).

(vii) CHO 细胞的转染. 按常规小量碱法<sup>[10]</sup>提取真核表达质粒 pGFP-*bip*, 测定 A<sub>260 nm</sub> 和 A<sub>280 nm</sub>, 计算 DNA 浓度. 该表达质粒 DNA 对 CHO 细胞的瞬时转染采用 Lipofectin 2000 法(按 GIBCO 公司常规操作进行), 被转染的细胞用 G418 进行抗性筛选.

(viii) 病毒吸附感染. 生长在 24 孔板上的 CHO 细胞用重组表达质粒 pGFP-*bip* 转染 48 h 后, 去除培养基, 用 PBS 溶液漂洗细胞表面 2 次. 将 B95a 型麻疹病毒毒株 SMD/B 的悬液(滴度为 10<sup>2.7</sup> TCID<sub>50</sub>)滴在单层细胞表面, 每孔加入 100 μL, 37℃吸附培养 30 ~ 60 min. 然后补加 F12 + 2%CS(含青霉素、链霉素)的细胞维持培养液, 同上条件培养, 48 h 以后观察 CPE.

## 2 结果

### 2.1 诱饵蛋白表达质粒 pGBT-*th* 的构建与鉴定

Ha 蛋白是一个跨膜糖蛋白, 其膜内区域与受体结合功能无关, 而且已有研究报道<sup>[11]</sup>: 去除膜内区域的截短 Ha 蛋白(truncated Ha protein, Th)仍具有正常的与细胞受体结合的能力. 所以, 用限制性内切酶 *Pst* I 和 *EcoR* I 酶切全长的血凝素基因(*ha*)获得去除膜内区域和跨膜区域的截短的 *ha* 基因(*th*), 该片段长约 1700 个碱基对. 经过亚克隆后回收 *th* 基因, 插入 pGBT9 载体中, 构建与表达载体 pGBT9 中 Gal4-BD 可读框相同的重组质粒 pGBT-*th*(图 1(a)). 该载体表达的融合蛋白 Gal4 BD-Th 可作为酵母双杂交系统的诱饵蛋白.

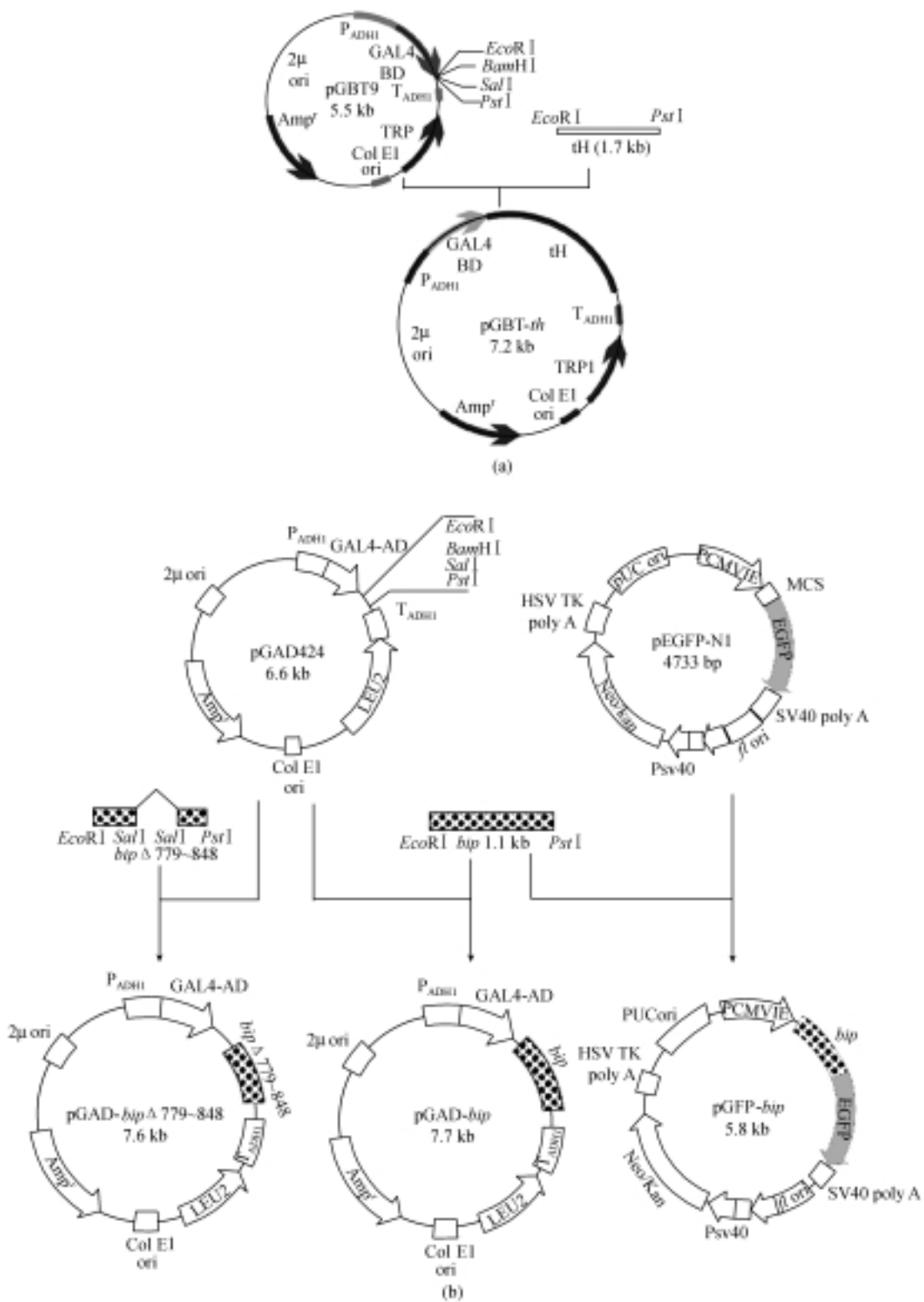


图 1 重组表达质粒的构建

(a) 酵母双杂交系统诱饵质粒 pGBT-*th* 的构建; (b) 表达质粒 pGAD-*bip* Δ779~848, pGAD-*bip* 和真核表达质粒 pGFP-*bip* 的构建

## 2.2 *bip* 基因的分离、序列及氨基酸分析

将质粒 pGBT-*th* 以 LiAC 转化法(Clontech 公司操作指南)转入酵母受体菌 HF7C 中, 然后以 cDNA 文库级 LiAC 转化法(Clontech 公司操作指南)将 B95a cDNA 文库转入酵母菌 HF7C/pGBT-*th* 中. 含有 pGBT-*th* 和 cDNA 文库质粒的转化子约有  $1.5 \times 10^6$  个. 7~10 d 后, 从 SD/-Leu-Trp-His 平板上挑取约 1000 个直径 2 mm 以上的菌落进行 $\beta$ -半乳糖苷酶显色试验, 4~8 h 后发现 6 个蓝色酵母菌落. 将蓝色菌落继续在 SD/-Leu-Trp-His 液体培养基中培养, 并提取酵母总 DNA, 电转化法转入大肠杆菌 HB101 中, 经 M9/-Leu 平板培养后, 仅从 2 个蓝色酵母菌落提取出 pACT2 来源的 cDNA 文库质粒, 并再次与 pGBT-*th* 质粒共转化酵母 HF7C 后, 发现它们均能在 SD/-Leu-Trp-His 平板上生长,  $\beta$ -半乳糖苷酶显色试验仍为蓝色. 结果证明: 这两个 pACT2 来源的 cDNA 文库质粒编码的多肽能与 Th 蛋白在酵母受体菌 HF7C 内相互结合, 使得 Gal4 DNA 结合功能区 Gal4-BD 和 Gal4 DNA 激活功能区 Gal4-AD 借助于它们的相互作用而构成有活性的转录激活因子, 从而激活了启动子控制下的报告基因——*his* 和 *lacZ* 的表达, 使共转化子具有 His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup>表型.

经序列分析发现上述两个质粒中的外源片段序列基本相同, 推测为一个新的基因, 命名为绒猴-B类淋巴母细胞系中 Ha 蛋白的相互作用蛋白(marmoset B-lymphoblastoid interaction protein, Bip)基因 *bip*.

采用菌落原位杂交, 我们从绒猴 B958 细胞系全长 cDNA 中筛选 *bip* 基因 cDNA, 序列分析结果表明, *bip* 基因 cDNA 全长 1540 个碱基对, 含有一个 1011 个碱基对组成的可读框, 推测编码一个由 337 个氨基酸组成的蛋白(图 2).

基因起始密码子侧翼序列(GGCTGATGG)符合 Kozak 规则. 推测的 Bip 蛋白氨基酸序列含有一个可能的疏水引导区(图 2 中用下画单线标明的氨基酸)和一个疏水跨膜区(图 2 中用下画双线表示的氨基酸序列), 暗示该蛋白可能是一个 I 型跨膜蛋白. 从图中还可以看到, *bip* 基因在 1386 nt 处(图 2 中用波浪号标明的 DNA 序列)存在仅有的一个明显的加 poly(A) 信号(AATAAA).

## 2.3 *bip* 基因与人 *slam* 基因编码区 DNA 序列、氨基酸序列比较

将 *bip* 基因序列与 GenBank 中的序列进行 DNA

序列分析及氨基酸序列分析, 发现其与人 *slam* 基因具有很高的同源性, DNA 序列的同源性达 91.69%, 氨基酸同源性高达 86.94%, 两者的氨基酸序列对比见图 3.

由图 3 可以得到如下结论: B95a 细胞的 Bip 蛋白和人 Slam 蛋白具有高度的同源性, 但仍存在许多差异. DNA 序列和氨基酸序列对比发现: 它们氨基酸序列的差异位点遍布整个蛋白质分子, 如在 N 末端由 27 个氨基酸组成的疏水引导区中存在 3 个氨基酸差异; 在靠近蛋白分子 C-末端的由 22 个氨基酸组成的疏水跨膜区中具有 11 个氨基酸差异, 更为特殊的是在氨基酸第 245 位, Bip 蛋白为 Ser, 而人 Slam 蛋白却缺失了这一氨基酸; 两种蛋白质膜内区域的氨基酸差异非常小, 仅有 3 个氨基酸不同. 由此我们认为这两种蛋白分子的膜外区和膜内区的功能非常保守, 且具有相同或相近的功能; 其跨膜区域存在很大的差异, 可能是由于这两种蛋白质来源于不同的细胞——Slam 来源于人外周血单核细胞(PBMC), 而 Bip 来源于绒猴-B 类淋巴母细胞 B95a, 所以具有完全不同的跨膜功能.

## 2.4 *bip* 基因表达质粒的构建与鉴定

以本文筛选到的全长 *bip* 基因为模板, 以引物 1F 和 2 扩增 *bip* 基因的编码区(从碱基第 66~1311 位, 两侧分别带有 *EcoR* I 和 *Pst* I 位点), 得到的 PCR 扩增片段长约  $1.2 \times 10^3$  个碱基对, 插入 pGAD424 中构建表达质粒 pGAD-*bip* (图 1(b)); 以全长 *bip* 基因为模板, 以引物 1F 和 1R, 引物 2F 和 2 分别扩增得到的 *bip* 基因的膜外区(从碱基第 66~779 位, 两侧分别带有 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点)和膜内区(从碱基第 847~1311 位, 两侧分别带有 *Sal* I 和 *Pst* I 位点), 两个片段连接成含有 *bip* 基因膜外区和膜内区(仅仅缺失 779~848 跨膜区)的 DNA 片段, 该片段约为  $1.1 \times 10^3$  个碱基对, 同样插入 pGAD424 载体中, 构成 *bip* 基因缺失突变体重组表达质粒——pGAD-*bip* $\Delta$ 779~848(图 1(b)).

重组表达质粒 pGAD-*bip* $\Delta$ 779~848 和 pGAD-*bip* 中 Gal4-AD 与 *bip* $\Delta$ 779~848 和 *bip* 的可读框架序列测定证实是同框的(结果未公布).

为了进一步检测 Th 蛋白与 Bip 蛋白在真核系统中的相互作用, 我们选择了一个非常有用的真核表达载体 pGFP-N1(由武汉大学分子病毒室李小峰博士惠赠). 该载体允许外源基因与 *gfp* 基因融合, 在

1 GCTTGCTTCTACCTGACGTCTATGAACAGCTGTGACACTTTGGCCTGAATATCTTCCATCCTCACTGGCTG  
72 ATGGATCCCAAGGGACTCTTCTCCTTGACCTTCGTGCTATTCTCTCCCTGGCTTTTGAGCCAAGCTAC  
1 M D P K G L F S L T F V L F L S L A F E P S Y  
141 GGAACAGGTGGGCGCATGATGAACCTGCCGAAGATTGTCCAGCAGTTGGGAAGTGATGTGCTGCTGCC  
24 G T G G R M M N C P K I V Q Q L G S D V L L P  
210 CTGACGCATGAAAGGATAAATACGAGCATGAACAAAAGCATCCACATTGTTGTCACAATGGCAAAATCA  
47 L T H E R I N T S M N K S I H I V V T M A K S  
279 CTGGAGAACAGTGTGAGAACAAAATAGTGCTCTTGATCCATCCGAAGCAGGCCCTCCACGTTACCTA  
70 L E N S V E N K I V S L D P S E A G P P R Y L  
348 AAAGACCGCTACAGGTTTTATCTGGAGAACCTGAGCCTGGCTATCCGGGAGAGCACGAAGAAGGATGAG  
93 K D R Y R F Y L E N L S L A I R E S T K K D E  
417 GGGTGGTATTTTATGACCCTGGAGAAAAATATCTCAGTTCAGCGCTTCTGCCTGCATTGAAGCTTTAT  
116 G W Y F M T L E K N I S V Q R F C L H L K L Y  
486 GAGCAGGTCTCCACTCCAGAAATTAAGTGTTAAACAAGACCCAGGAGAACGGGACCTGCACCTTGATA  
139 E Q V S T P E I K V L N K T Q E N G T C T L I  
555 CTGGGCTGCATAGTGAAGAAGGGGGACCATGTGGCTTACAGCTGGAGTGAAAAGGCGGGCACCCATCCA  
162 L G C I V K K G D H V A Y S W S E K A G T H P  
624 CTGAGCCCAGCCAACAGCTCCACCTCCTGTCCCTCACCTCGGACCCAGCATGCTAAAAATATCTAC  
185 L S P A N S S H L L S L T L G P Q H A K N I Y  
693 GTCTGCACTGTGAGCAACCCCATCAGCAACAGCTCCCAGGACTTCATTCCATGGCTCAGATGCAGGCAA  
208 V C T V S N P I S N S S Q D F I P W L R C R Q  
762 GAACCCTCAGAGACAAATATATGGCCAGTGATGCTTGGCTGTCTTAGCGGGGGTCATCATTATCTC  
231 E P S E T N I W P V Y A W L S L A G V I I I L  
831 ATCGTGATTGCAATAATGCTGCTGAGAAGAAGAGGTAAACCGACCATTACCAGACAACAACGGAAAAA  
254 I V I A I M L L R R R G K T D H Y Q T T T E K  
900 AAAAACTTACGATCTATGCCCAAGTCCAGAAACCAGGTCCTCTTCAGAAGAAACTTGACTCCTTCCCA  
277 K N L T I Y A Q V Q K P G P L Q K K L D S F P  
969 GCTCAGGACCCTTGCAACCACATTATGTTGCTGCCACAGAGCCTGTCCCAGAGCCTGTTTCAGGAAACA  
300 A Q D P C T T I Y V A A T E P V P E P V Q E T  
1038 AATTCATCACAGTCTATGCTAGTGTGACACTTCCAGAGAGCTGACATCAACGACCCAACAAAGGGACT  
323 N S I T V Y A S V T L P E S  
1107 TTCTGAAATGAAAAACCAAAACGAACACTGAACTTGGCCCCGGGCCTCTGGCAGACAGTCTGGATTGA  
1176 TTGGCCAGTCCTTCTTGATCACTTCCCTGGTGATGTTTCTTCCACATGCATCTGTGAAATGAACAAGG  
1245 AAGCGAGGCTTCCCAAGAATTTAGCTTGCTCTGCAGTGGCTGCAGGCGCAGAACAGCTTTGCATCCTTG  
1314 TGTTGTGGCAGATGAAATGGGTAGTGACGTGAGTTCAGACTTTGGACATCTTGCTCTTGGCTGGAATTG  
1383 GATAATAAAACCAAGACTGAAAGCCATCTGAGCACCATCTCAGACAGTGGACCACCGGTCACAAAG  
1452 TCTGGACAAGTTTACATTTTGGCTGTCTTTGCTTTGTCTGGGAGCTGATCATGATCACTTGCAGACCT  
1521 GATCAAGCCTCTGCGCCTCA

图 2 *bip* 基因序列及其推导的氨基酸序列

ATG和 TGA分别示起始密码和终止密码, N示 Asn——可能的 N 偶联糖基化位点, C代表 Cys,  
下画单线示疏水引导序列, 下画双线示疏水跨膜区, AATAAA示 poly(A)加尾信号

|          |                              |                                                     |                                                               |                                                                    |
|----------|------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| B95a-Bip | MDPKGL <b>F</b> SLT          | FVLFLSLA <b>F</b> E                                 | <b>P</b> SYGTGGRMM                                            | NCPK <b>V</b> QQLG                                                 |
| 人 Slam   | MDPKGL <b>L</b> SLT          | FVLFLSLA <b>G</b>                                   | <b>A</b> SYGTGGRMM                                            | NCPK <b>L</b> RQLG                                                 |
| 41       | S <b>D</b> VLLPLT <b>H</b> E | RIN <b>T</b> SMNKSI                                 | HIVVTMAKSL                                                    | ENSVENKIVS                                                         |
|          | S <b>K</b> VLLPLT <b>T</b> E | RIN <b>K</b> SMNKSI                                 | HIVVTMAKSL                                                    | ENSVENKIVS                                                         |
| 81       | LDPSEAGPPR                   | YL <b>K</b> DRY <b>R</b> FYL                        | EN <b>L</b> SL <b>A</b> IRE <b>S</b>                          | <b>T</b> K <b>K</b> DEGWY <b>T</b> M                               |
|          | LDPSEAGPPR                   | YL <b>G</b> DRY <b>K</b> FYL                        | EN <b>L</b> <b>T</b> L <b>G</b> IRE <b>S</b>                  | <b>R</b> K <b>E</b> DEGWY <b>L</b> M                               |
| 121      | TLEKNISVQR                   | FCL <b>H</b> L <b>K</b> LYEQ                        | VSTPEIKVLN                                                    | KTQENGCTCL                                                         |
|          | TLEKNVSVQR                   | FCL <b>Q</b> L <b>R</b> LYEQ                        | VSTPEIKVLN                                                    | KTQENGCTCL                                                         |
| 161      | ILGC <b>V</b> VKKGD          | HVAYSWSEKA                                          | GTHPL <b>S</b> PANS                                           | SHLLSLTLGP                                                         |
|          | ILGC <b>T</b> VEKGD          | HVAYSWSEKA                                          | GTHPL <b>N</b> PANS                                           | SHLLSLTLGP                                                         |
| 201      | QHAK <b>N</b> IY <b>V</b> CT | VSNPIS <b>N</b> SSQ                                 | <b>D</b> F <b>P</b> W <b>L</b> R <b>C</b> R <b>Q</b>          | <b>E</b> P <b>S</b> E <b>T</b> <b>N</b> I <b>W</b> P <b>V</b>      |
|          | QHAD <b>N</b> IY <b>I</b> CT | VSNPIS <b>N</b> SSQ                                 | <b>T</b> F <b>S</b> P <b>W</b> P <b>G</b> C <b>R</b> <b>T</b> | <b>D</b> P <b>S</b> E <b>T</b> <b>K</b> <b>W</b> <b>A</b> <b>V</b> |
| 241      | YAW <b>L</b> SLAGVI          | <b>I</b> IL <b>I</b> <b>V</b> I <b>A</b> <b>M</b> L | LRRRGKT <b>D</b> HY                                           | QTT <b>T</b> EKK <b>N</b> LT                                       |
|          | YAG <b>L</b> PLGGVI          | <b>M</b> IL <b>M</b> V <b>V</b> <b>I</b> L <b>Q</b> | LRRRGKT <b>N</b> HY                                           | QTT <b>V</b> EKK <b>S</b> LT                                       |
| 281      | IYAQVQKPGP                   | LQKKLDSFPA                                          | QDPCTTIYVA                                                    | ATEPVPE <b>V</b> VQ                                                |
|          | IYAQVQKPGP                   | LQKKLDSFPA                                          | QDPCTTIYVA                                                    | ATEPVPE <b>S</b> VQ                                                |
| 321      | ETNSITVYAS                   | VTL <b>P</b> ES"                                    |                                                               |                                                                    |
|          | ETNSITVYAS                   | VTL <b>P</b> ES"                                    |                                                               |                                                                    |

图 3 Bip 氨基酸序列与人 Slam 氨基酸序列的对比  
方框表示两种蛋白不相同的氨基酸

CMV 启动子作用下表达融合蛋白, 即在外源基因表达蛋白的 C 末端融合全长的 GFP(绿色荧光蛋白), 同时该载体还含有一个抗性标记基因 *neomycin*(新霉素抗性), 可以在细胞培养基中加入 G418 以抗性筛选被转染的细胞. 将 PCR 扩增得到的含有全部编码区的 *bip* 基因用 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切, 回收 DNA 片段后插入到真核表达载体 pGFP-N1 中, 构建可以在真核细胞中表达的以 *gfp* 为报告基因、以 *neomycin* 为抗性筛选标记的真核表达质粒 pGFP-*bip* (图 1(b)).

重组质粒 pGAD-*bip*, pGAD-*bip*Δ779~848 和 pGFP-*bip* 的鉴定分别采用 PCR 扩增方法.

2.5 Bip 与 Ha 两种蛋白相互作用的验证及其功能区域

为验证 Ha 和 Bip 两种蛋白在酵母中的相互作用, 我们构建成 Gal4-AD/Bip 融合蛋白表达质粒 pGAD-*bip*(图 1(b)). 然后与 Gal4-BD/Th 融合蛋白表达质粒

pGBT-*th* 共转化酵母受体菌 HF7C. 结果表明: 共表达两种融合蛋白 Gal4-AD/Bip 和 Gal4-BD/Th 的酵母受体菌 HF7C 能很好地生长在 SD/-Leu-Trp-His 营养缺陷型平板上. β-半乳糖苷酶显色试验证明质粒 pGAD-*bip* 和质粒 pGBT-*th* 共转化的酵母 HF7C 能激活 *lacZ* 基因和 *his* 基因的表达, 转化子具有 His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup> 的表型(图 4).

根据 *bip* 基因和推导的氨基酸序列分析, Bip 蛋白有一个短的跨膜区(从氨基酸第 237~259 位, 相应的碱基从第 779~848 位), 将一个长的亲水区域和另一个短的亲水区域分开. 为了分析上述区域对 Th 和 Bip 相互作用所作的贡献, 我们获得了仅仅缺失跨膜区域的、截短的 *bip* 基因(*bip*Δ779~848), 然后与 Gal4-AD 融合, 构建成酵母表达质粒 pGAD-*bip* Δ779~848. 将 pGAD-*bip*Δ779~848 与表达诱饵蛋白的表达质粒 pGBT-*th* 共转化 HF7C, 结果显示共转化子

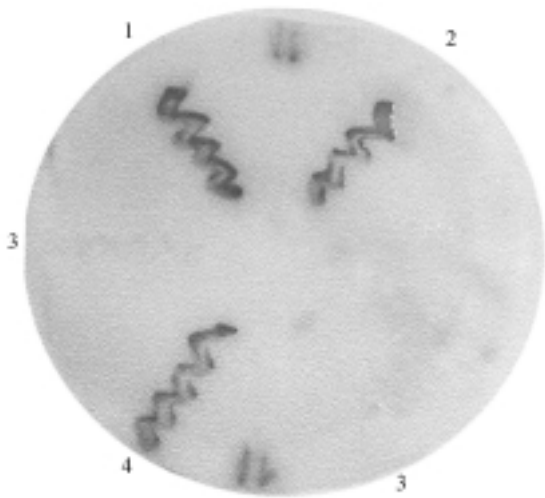


图 4  $\beta$ -半乳糖苷酶显色试验

分别转化有 pGAD-bip, pGBT-th 和 pGAD-bip $\Delta$ 779~848, 含 pGBT-th 的酵母受体菌 HF7C 经  $\beta$ -半乳糖苷酶显色试验均显蓝色, 表明在酵母中全长的 Bip 蛋白和截短的 Bip 蛋白(仅仅缺失跨膜区)均能与 Th 蛋白相互作用. 1 示转化有 pGAD-bip, pGBT-th 的 HF7C; 2 示转化有 pGAD-bip $\Delta$ 779~848, pGBT-th 的 HF7C; 3 示阴性对照; 4 示阳性对照

同样也呈 His<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup>表型(图 4). 由此证明: 缺失跨膜区域的 Bip 蛋白同样可以与 Th 蛋白相互作用.

2.6 Bip 蛋白在麻疹病毒非允许细胞中的表达

为了鉴定 Bip 蛋白与 B95a 型麻疹病毒血凝素蛋白 Ha 的相互作用是否与病毒对 B95a 细胞的吸附感染有关. 我们将真核表达质粒 pGFP-bip 转染麻疹病毒的非允许细胞系 CHO, 在 CMV 强启动子驱动下能够表达 Gfp-Bip 融合蛋白. 同时在培养基中加入 G418, 造成环境压力以确保只有被质粒转染了的细胞才能生长. 由于 Bip 蛋白与 Gfp 蛋白的融合, 在荧光倒置显微镜下可以直接观察到绿色荧光, 发绿色荧光的细胞均为同时表达 Bip 蛋白的细胞.

转染 24 h 后的 CHO 细胞就可以看到绿色荧光, 48 h 以后绿色荧光越来越清晰, 一直可以持续 7 d 左右. 在选择压力之下, 几乎所有细胞都呈现出清晰的绿色荧光, 而作为对照的未被转染的细胞则未见绿色荧光(图 5).

2.7 Bip 作为受体蛋白对麻疹病毒感染非允许细胞的影响

在转染真核表达质粒 pGFP-bip 48 h 之后, 我们用 B95a 型麻疹病毒毒株 SMD/B<sup>[8]</sup>感染被转染过的 CHO 细胞和未转染 pGFP-bip 的对照 CHO 细胞. 48 h

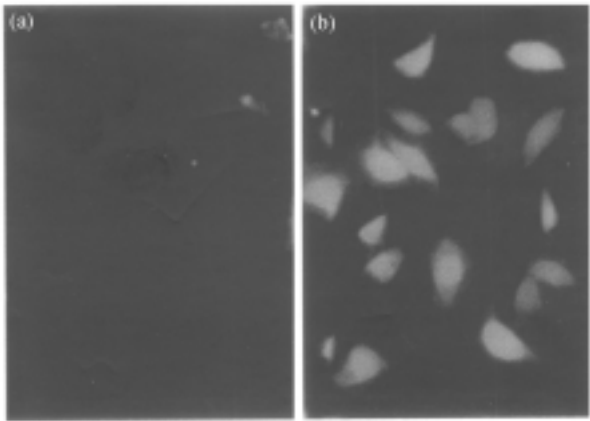


图 5 真核表达质粒 pGFP-bip 转染的 CHO 细胞  
(a) 未转染的 CHO 细胞未见绿色荧光; (b) pGFP-bip 转染的 CHO 细胞在荧光显微镜下呈绿色荧光

以后可以清楚地观察到有绿色荧光的 CHO 细胞出现了麻疹病毒感染所特有的 CPE, 即多细胞合胞体的出现(图 6), 而对照 CHO 细胞在显微镜下仍呈现 CHO 细胞原有的细胞形态, 未见麻疹病毒感染的 CPE 出现. 上述结果表明: B95a 型病毒可以吸附感染表达有 Bip 蛋白的 CHO 细胞. 本来对麻疹病毒不敏感的 CHO 细胞, 在预先表达 Bip 蛋白之后变得对麻疹病毒敏感了. 惟一正确的解释是: B95a 细胞中的 Bip 蛋白赋予了 CHO 细胞对麻疹病毒敏感的特性, 因

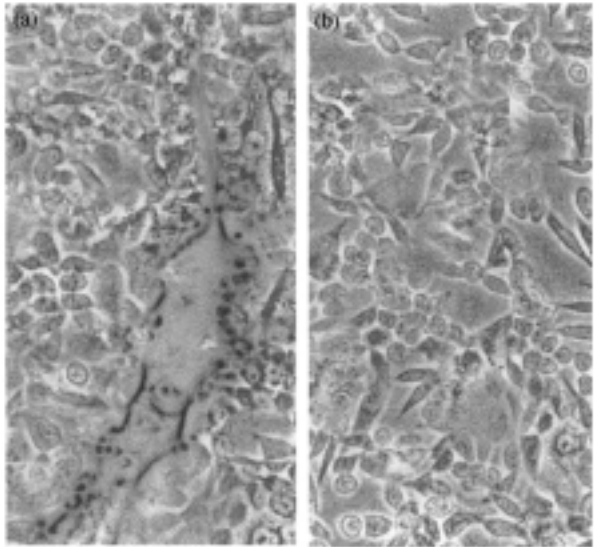


图 6 B95a 型麻疹病毒可以感染被 pGFP-bip 转染后的 CHO 细胞出现病毒特有的 CPE  
(a) 转染了 pGFP-bip 的 CHO 细胞可以被 B95a 型麻疹病毒感染, 呈现多细胞合胞体; (b) 未转染 pGFP-bip 的 CHO 细胞不能被麻疹病毒感染

此 Bip 蛋白可能作为 B95a 型麻疹病毒感染 B95a 细胞的新的受体分子。

### 3 讨论

我们以前的工作<sup>[7,8]</sup>已经证实: 新型麻疹病毒——B95a 型病毒的 Ha 蛋白具有重要的突变, 正是由于这些突变导致新型麻疹病毒毒株失去了与麻疹病毒原有细胞受体 CD46 结合的功能, 但丝毫不影响病毒对 B95a 细胞的感染能力, 这就预示着 B95a 型麻疹病毒可能利用新的细胞受体, 而且这一受体一定定位于 B95a 细胞中。

采用酵母双杂交系统, 以去除胞内功能区域的麻疹病毒 *ha* 基因, 即截短 *ha(th)* 的表达产物(Th)为诱饵蛋白, 从 B95a 细胞 cDNA 文库中分离到了能与 Th 相互作用的蛋白, 命名为在绒猴-B 类淋巴母细胞中发现的 Th 相互作用蛋白(marmoset B-lymphoblastoid interaction protein, Bip)基因 *bip*。

序列分析表明 *bip* 基因全长为 1540 个碱基对, 只有一个转录本, 在 3' 端有一个 poly(A)加尾信号 AATAAA。可读框为 1011 个碱基对, 编码一个由 337 个氨基酸组成的多肽。有趣的是, 氨基酸序列中有 14 个 Asn(分别位于氨基酸第 31, 53, 57, 76, 72, 102, 125, 150, 155, 189, 205, 213, 217 和 236 位), 分析表明可能是 N 偶联的糖基化位点; 还含有 6 个 Cys(分别位于氨基酸第 32, 158, 164, 209, 228 和 304 位), 可能与蛋白分子的二级结构有关。N 末端有一个约由 27 个氨基酸组成的疏水引导序列(从氨基酸第 1~27 位), 中间有一段亲水区域, 而在靠近 C-末端有一个由 22 个氨基酸组成的疏水跨膜区(从氨基酸第 237~259 位), 接着是一小段亲水区域。

一般来说, 跨膜蛋白的膜外区域是与蛋白质相互作用的重要区域<sup>[12]</sup>, 所以我们构建了携带跨膜区缺失突变体基因 *bip*Δ779~848 的重组表达质粒 pGAD-*bip*Δ779~848, 将该质粒与表达诱饵蛋白的重组质粒 pGBT-*th* 共转化酵母细胞, 结果表明: Bip 蛋白的跨膜区域与 Bip 蛋白和 Ha 蛋白的相互作用无关, 与许多受体分子如 CD46 十分相似, 因此, Bip 蛋白可能作为受体分子以其膜外区域与 B95a 型麻疹病毒的血凝素蛋白 Ha 相互作用。

目前所有的研究报道<sup>[13~16]</sup>均已证明: 啮齿类动物细胞系如 CHO 细胞系是麻疹病毒的非允许细胞系, 即麻疹病毒不能感染和吸附啮齿类动物细胞系。因

此可以在 CHO 细胞中表达全长的 Bip 蛋白, 观察 CHO 细胞是否可以变成麻疹病毒的允许细胞而支持麻疹病毒的感染, 从而证实 Bip 蛋白作为麻疹病毒细胞受体的可能性。

将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 作为报告基因与 *bip* 基因融合, 以此标记 Bip 蛋白在 CHO 细胞中的表达。当用 B95a 型病毒感染发绿色荧光的 CHO 细胞(也就是表达有 Bip 蛋白的 CHO 细胞)时, 看到了麻疹病毒感染所特有的 CPE, 即合胞体的形成, 本来作为非允许细胞 CHO 上没有可以与麻疹病毒结合的细胞受体, 而表达有 Bip 的 CHO 细胞却可以吸附病毒并支持病毒感染。所以我们有理由相信 B95a 细胞中的 Bip 蛋白可能充当了 CHO 细胞被麻疹病毒感染的细胞受体。

GenBank 序列对比发现, 绒猴 *bip* 基因与人 *slam* 基因具有很高的同源性, 而最近, 关于人 Slam 蛋白是位于人细胞表面的新麻疹病毒受体的研究报道引起了麻疹病毒研究领域的广泛关注<sup>[9]</sup>, 该研究被称为是麻疹病毒研究史上的一次突破性进展, 将麻疹病毒研究推向了一个新的高潮。

我们的研究工作利用了完全不同的研究方法。Tatsuo 等人<sup>[9]</sup>利用人的 PBMC 的 cDNA 文库, 构建能表达上述文库质粒的细胞系, 从中筛选能够被麻疹病毒野生型毒株 KA 感染的细胞系, 进而从人的外周血单核细胞(PBMC)中分离了能与毒株 KA(该毒株不能与 CD46 受体结合)结合的、新的麻疹病毒细胞受体。我们<sup>[7,8]</sup>则是首先筛选到了 3 株不能与 CD46 结合的从 B95a 细胞系分离的病毒毒株, 研究并证实了其血凝素蛋白的突变, 利用其变异的血凝素蛋白为诱饵, 从上述毒株高度敏感的细胞系——B95a 的 cDNA 中, 利用酵母双杂交系统寻找到了一个与人 *slam* 基因高度同源的能与 B95a 型麻疹病毒毒株 Ha 蛋白结合的蛋白——Bip, 并最终通过在麻疹病毒的非允许细胞中表达 Bip 蛋白证实: 绒猴 B-类淋巴母细胞表面存在的 Bip 蛋白具有与人的 Slam 蛋白相同的功能, 它是 B95a 型病毒感染 B95a 细胞的受体分子。

目前关于麻疹病毒新细胞受体的报道还十分有限, 且均集中在研究病毒毒株与 CD46 和 Slam 的结合作用。Tatsuo 等人<sup>[9]</sup>报道 Edmonston 毒株可以与 CD46 和 Slam 两个受体结合, Hsu 等人<sup>[17]</sup>报道了 3 株可以与 Slam 结合的麻疹病毒毒株, Ono 等人<sup>[18]</sup>报道了 7 株来自麻疹病人的毒株可以与 Slam 结合。而我



们的研究以直接的证据证明：绒猴 B-类淋巴母细胞的跨膜蛋白 Bip 也与 Slam 一样，可以充当 B95a 型麻疹病毒毒株—— SMD/B 的细胞受体，介导其对敏感宿主—— B95a 细胞的侵染作用。

麻疹病毒感染细胞的过程是一个复杂的过程：首先病毒包膜蛋白——Ha 蛋白与细胞受体结合，病毒包膜与细胞膜融合，核衣壳进入细胞，最后病毒基因组开始转录、复制。麻疹疫苗的使用是目前麻疹防治中最有效的途径，而麻疹疫苗毒株则是将来源于麻疹病人的分泌物在 Vero 细胞中长期传代后获得的适应 Vero 细胞生长的毒株，易感人群通过接种这类毒株获得的免疫保护反应使机体能够有效地抵抗这类或同类麻疹毒株的感染。但新近的研究表明：由于麻疹病毒 Ha 蛋白的突变导致新的病毒毒株利用其他的细胞受体侵入宿主，新型麻疹病毒的利用与疫苗毒株不同的侵染机制，躲避了人们建立在疫苗毒株基础上的对麻疹的免疫保护，导致基于疫苗毒株基础上的免疫接种保护能力的下降和丧失。因此，本文关于麻疹病毒第二受体基因的发现在学术上和对麻疹病毒的治疗上都有重大意义。

**致谢** 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号：39970032)。

参 考 文 献

1 Dorig R E, Marcil A, Chopra A, et al. The human CD46 is receptor for measles virus (edmonston strain). *Cell*, 1993, 75(2): 295~305

2 Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993, 67(10): 6025~6032

3 Naniche D, Wild T F, Rabourdin-Combe C, et al. Measles virus hemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol*, 1993, 74: 1073~1079

4 Enders J F, Peebles T C. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1954, 86: 277~286

5 Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol*, 1990, 64(2): 700~705

6 Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, et al. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus

(MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion and CD46 downregulation: phenotypic markers the differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol*, 1996, 70(7): 4200~4204

7 李凌云, 齐义鹏. 麻疹病毒血凝素基因 H 的点突变与血凝作用的转变. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30(5): 488~494

8 李凌云, 齐义鹏, Watanabe W, 等. 控制麻疹病毒血凝性的重要功能位点. *科学通报*, 1999, 44(1): 49~52

9 Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, et al. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 2000, 406(6798): 893~897

10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning——A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 65~75

11 Sato T A, Enami M, Kohama T. Isolation of the measles virus hemagglutinin protein in a soluble form by protease digestion. *J Virol*, 1995, 69(1): 513~516

12 Christiansen D, Deleage G, Gerlier D. Evidence for distinct complement regulatory and measles virus binding sites on CD46 SCR2. *Eur J Immunol*, 2000, 30(12): 3457~3462

13 Patterson J B, Manchester M, Oldstone M B. Disease model: dissecting the pathogenesis of the measles virus. *Trends Mol Med*, 2001, 7(2): 85~88

14 Niewiesk S. Studying experimental measles virus vaccines in the presence of maternal antibodies in the cotton rat model (sigmodon hispidus). *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2250~2253

15 Roscic-Mrkic B, Schwendener R A, Odermatt B, et al. Roles of macrophages in measles virus infection of genetically modified mice. *J Virol*, 2001, 75(7): 3343~3351

16 Tishon A, LaFace D M, Lewicki H, et al. Transgenic mice expressing human HLA and CD8 molecules generate HLA-restricted measles virus cytotoxic T lymphocytes of the same specificity as humans with natural measles virus infection. *Virology*, 2000, 275(2): 286~293

17 Hsu E C, Iorio C, Sarangi F, et al. CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology*, 2001, 279(1): 9~21

18 Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, et al. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*, 2001, 75(9): 4399~4401

(2002-03-15 收稿, 2002-06-24 收修改稿)