



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20230167

数字出版日期: 2024-04-19; 数字出版网址: <https://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240418.1821.001>

HPV18 间隔序列介导真核基因以双顺反子形式表达

张煜豪, 孙小强, 鲍正好, 李雨彤, 刘佳艺, 何红鹏

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: HPV18 是一种 DNA 病毒, 其 E6 和 E7 基因可读框 (ORF) 相隔 8 个核苷酸, 以双顺反子形式在宫颈癌细胞 HeLa 细胞中表达 E6 和 E7 蛋白。为探究此间隔序列是否在基因双顺反子表达中发挥关键作用, 利用此序列构建 2 个双顺反子表达质粒, 转染人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞, 检测上下游 2 个 ORF 表达水平。逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 结果显示 2 个 ORF 同时转录, 免疫印迹 (Western blot) 结果显示 2 个蛋白同时表达, 荧光显微镜结果进一步显示红色荧光蛋白 (RFP) 和绿色荧光蛋白 (GFP) 共表达。以上结果证明 HPV18 E6 和 E7 基因间隔序列可在上游 ORF 翻译结束后重新启动下游 ORF 翻译。此现象在真核细胞中比较罕见, 分子机制可能与核糖体重新结合有关, 值得进一步探究。

关键词: 翻译起始; 多顺反子; HPV; 基因表达; 核糖体结合序列; 真核细胞

中图分类号: R915

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2024)04-0009-06

HPV18 Intergenic Spacer Mediating Bicistronic Expression in Eukaryotes

ZHANG Yuhao, SUN Xiaoqiang, BAO Zhenghao, LI Yutong, LIU Jiayi, HE Hongpeng

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: HPV18 is a DNA virus, with E6 and E7 gene open reading frame (ORF) separated by 8 nucleotides and expressed as a bicistron in cervical cancer HeLa cells. To investigate whether this 8 nt spacer sequence plays a crucial role in the bicistron gene expression, two bicistron expressing plasmids were constructed using this spacer sequence and transfected into HEK293T cells to detect the expression of both upstream and downstream ORFs. RT-PCR results showed simultaneous transcription of two ORFs; Western blot results showed that both proteins were expressed simultaneously. The confocal microscopy results further demonstrated the co-expression of red fluorescence protein (RFP) and green fluorescence protein (GFP). The above results demonstrate that the HPV18 E6 and E7 gene spacer sequence can re-initiate downstream ORF translation after the completion of upstream ORF translation. This phenomenon is relatively rare in eukaryotic cells, and the molecular mechanism might be related to the reentry of ribosomes which is worthy of further exploration.

Key words: translation initiation; polycistron; HPV; gene expression; ribosome binding sequence; eukaryocyte

引文格式:

张煜豪, 孙小强, 鲍正好, 等. HPV18 间隔序列介导真核基因以双顺反子形式表达 [J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(4): 9-14.

ZHANG Y H, SUN X Q, BAO Z H, et al. HPV18 intergenic spacer mediating bicistronic expression in eukaryotes [J]. Journal of Tianjin university of science & technology, 2024, 39(4): 9-14.

细胞中蛋白质的合成, 即翻译, 是核糖体以 mRNA 为模板聚合氨基酸形成多肽链的过程。翻译过程包括起始、延伸和终止三个环节, 每个环节都影

响蛋白质的合成效率。在原核细胞以及真核细胞中, 翻译过程的起始环节存在截然不同的调控方式。原核生物的 mRNA 中包含核糖体结合序列 (ribosome

收稿日期: 2023-09-07; 修回日期: 2023-11-14

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2018YFA0901702); 天津市级大学生创新创业训练计划资助项目 (202310057267)

作者简介: 张煜豪 (1998—), 男, 陕西人, 硕士研究生; 通信作者: 何红鹏, 副教授, hehongpeng@tust.edu.cn

binding sequence, RBS), 即 SD 序列。该序列与核糖体小亚基 16S rRNA 3'-端一段富含嘧啶的序列互补, 通过碱基互补配对使 mRNA 与核糖体结合, 起始下游可读框 (open reading frame, ORF) 的翻译^[1]。真核生物翻译的起始经典方式依赖于 mRNA 的 5'-帽子结构, 起始密码子附近的 Kozak 序列 (GCCRCCA UGG) 促进翻译起始, 提高翻译效率^[2]。

原核生物功能相关的基因往往形成基因簇, 以多顺反子 (polycistron) 形式表达多种蛋白质^[1], 而真核生物蛋白质编码基因主要是单顺反子 (monocistron)。病毒感染真核细胞后, 病毒基因组在宿主细胞中通常以多顺反子形式表达病毒蛋白^[1]。近年来, 随着对非编码 RNA 研究的深入, 发现一些原来认定的非编码 RNA 实际上指导一些小肽或小蛋白质 (少于 100 个氨基酸) 以多顺反子形式表达^[2]。这一发现丰富了真核生物蛋白质组信息, 也揭示了真核生物存在新的翻译起始机制。

人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 包括 HPV16 和 HPV18 等不同亚型, 其 DNA 片段插入宿主细胞基因组, 以多顺反子形式表达多个病毒蛋白, 特别是早期病毒癌蛋白 E6 和 E7。在 E6 的 ORF 中存在 RNA 剪接 (splicing) 识别序列, HPV E6-E7 转录产物经过剪接形成 HPV E6-E7 mRNA 和 HPV E6[^]E7 mRNA, 从而调控 E6 和 E7 蛋白质的表达水平^[3-6]。但是, mRNA 剪接理论仍不能清楚解释 E6 和 E7 的基因如何在细胞中以多顺反子共表达, 特别是 E7 蛋白质翻译起始的分子机制。

根据 HPV 病毒基因组结构, E6 和 E7 ORF 并非首尾相连, 不同亚型 HPV 的 E6 和 E7 ORF 之间相隔长短不等的间隔序列^[7]。这些间隔序列是否参与了多顺反子表达调控尚无文献报道。本研究旨在探究 HPV18 E6-E7 间隔序列在 HPV18 E6 和 HPV18 E7 的双顺反子表达中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞

大肠杆菌 DH5 α 、慢病毒 pLV07 质粒、pLVX-mCherry 质粒、宫颈癌细胞 HeLa 细胞和人胚胎肾细胞 HEK293T 细胞为实验室保存, 质粒载体 pCMV-Tag2B 购自美国 Stratagene 公司。编码 HPV18 E6 蛋白的单顺反子表达质粒 pCMV-Tag2B-E6 为实验室前

期构建。

1.1.2 主要试剂

鼠源单克隆抗体 HPV18 E6 抗体、E7 抗体, Santa Cruz 公司; GFP 抗体、Flag 标签抗体, AbCam 公司; 质粒构建同源重组试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Taq 和 Pfu DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术股份有限公司; 对照 siRNA、siHPV18 E6 和 siHPV18 E7, 广州市锐博生物科技有限公司; Turbo 转染试剂, Thermo Fisher 公司; DMEM 细胞培养基、LB 培养基, 天津伊诺原生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RFP 和 GFP 编码序列的扩增

在 NCBI 网上找到绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 和红色荧光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 编码序列, 依此序列及实验室前期构建的 pCMV-Tag2B-E6 质粒序列设计同源重组法基因克隆引物。如表 1 所示, 在设计引物时引入 HPV18 E6 和 E7 间隔序列 TATTAAGT, 由鼎国生物技术公司合成引物。利用 Pfu DNA 聚合酶, 以 pLVX-mCherry 质粒为模板扩增 RFP 编码区, 以 pLV07 质粒为模板扩增 GFP 编码区。聚合酶链反应 (PCR) 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行相对分子质量的分析和切胶回收。

表 1 构建重组质粒的克隆引物序列

Tab. 1 Primer sequences for plasmid construction

引物	序列 (5'→3')
GFP-F	5'-GAAACACAAGTATAA <u>TATTAAGT</u> ATGGTGAGC AAGGGC-3'
GFP-R	5'-CGATAAGCTTGATATTACTTGTACAGCTCGT CCATGCC-3'
RFP-F	5'-GATGACGACGATAAGATGGTGAGCAAGGG CGAGGA-3'
RFP-R	5'-CTTGCTACCATA <u>CTTAAT</u> TACTTGTACAGC TCGTC-3'

注: 下划线表示 HPV18 间隔序列, 加粗表示 HPV18 间隔序列的反向互补序列。

1.2.2 重组双顺反子表达质粒的构建和鉴定

RFP、GFP 以及载体质粒经 PCR 扩增后, 以 pCMV-Tag2B-E6 质粒为起始, 采用同源重组法按试剂说明书流程依次构建 pCMV-Tag2B-E6-间隔序列-GFP 和 pCMV-Tag2B-RFP-间隔序列-GFP 双顺反子表达质粒。重组双顺反子质粒经 PCR 和测序方法鉴定。

1.2.3 细胞培养与转染

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养六孔板中的 HeLa 细胞至细胞密度为 70%, 用 Turbo 转染

RFP 基因〔图 3(a)〕。利用 PCR 将 pCMV-Tag2B-E6-GFP 质粒线性化,再通过同源重组法,用 RFP ORF 取代 E6 ORF,得到 pCMV-Tag2B-RFP-间隔序列-GFP 质粒〔图 3(b)〕。

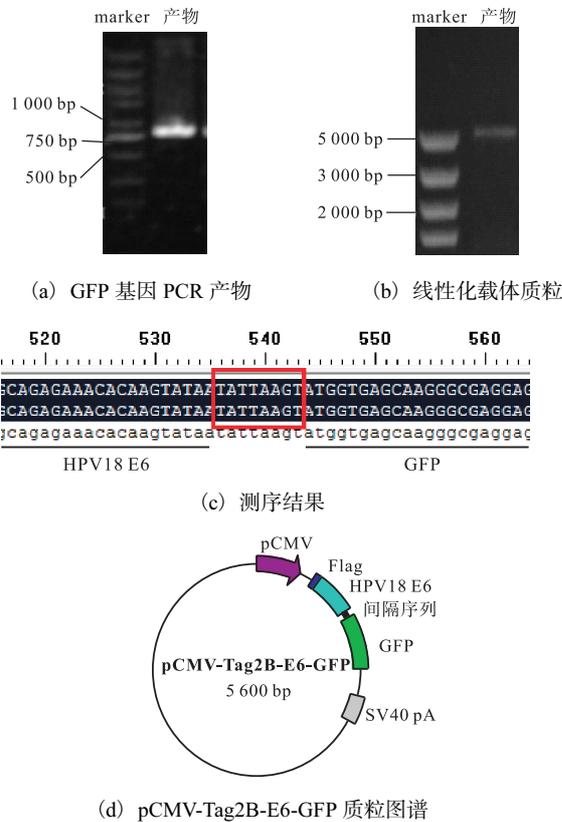


图 2 pCMV-Tag2B-E6-间隔序列-GFP 质粒构建与鉴定
Fig. 2 Construction and validation of the plasmid pCMV-Tag2B-E6-spacer-GFP

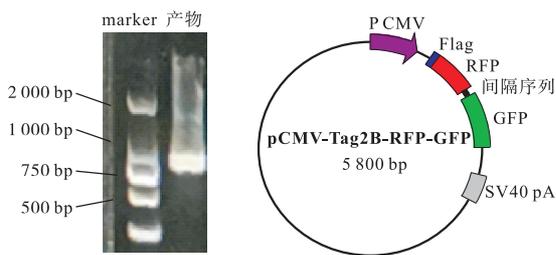


图 3 pCMV-Tag2B-RFP-间隔序列-GFP 质粒构建与鉴定
Fig. 3 Construction and validation of plasmid pCMV-Tag2B-RFP-spacer-GFP

2.3 HPV18 E6 和 GFP 蛋白在 HEK293T 细胞中共表达

为了验证双顺反子表达质粒 pCMV-Tag2B-E6-GFP 能否在细胞中同时表达 E6 和 GFP 蛋白,分别将阴性对照质粒 pCMV-Tag2B、阳性对照质粒 pLV07 和重组质粒 pCMV-Tag2B-E6-GFP 转染 HEK293T 细

胞,48 h 后提取总蛋白质进行免疫印迹,检测蛋白质表达。如图 4 所示,各组内参蛋白 β -actin 的量一致。由于 HEK293T 细胞不表达内源性荧光蛋白和病毒蛋白,所以阴性对照组无 GFP 和 E6(图 4 第 1 泳道),阳性对照组表达 GFP(图 4 第 3 泳道),pCMV-Tag2B-E6-GFP 转染的细胞同时表达 HPV18 E6 和 GFP 蛋白(图 4 第 2 泳道)。

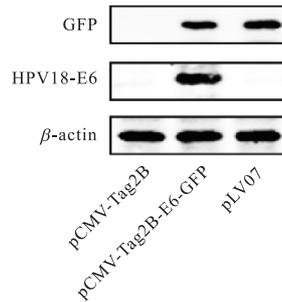


图 4 HPV18 E6 和 GFP 在 HEK293T 细胞中共表达
Fig. 4 Co-expression of HPV18 E6 and GFP in HEK293T

在 pCMV-Tag2B-E6-GFP 质粒中,第 2 个目的蛋白 GFP 编码区前面只有 HPV18 间隔序列,没有其他已知的蛋白质表达调控元件〔图 2(d)〕。为进一步确定 GFP 基因得到有效表达,利用荧光显微镜观察 HEK293T 细胞,结果如图 5 所示。各组细胞密度一致,阳性对照组 pLV07 转染细胞显示绿色荧光,阴性对照组 pCMV-Tag2B 转染细胞无荧光,pCMV-Tag2B-E6-GFP 质粒转染细胞有绿色荧光,表明已成功表达 GFP。以上结果证明 HPV18 间隔序列可介导 HPV18 E6 和 GFP 在 HEK293T 细胞中共表达。

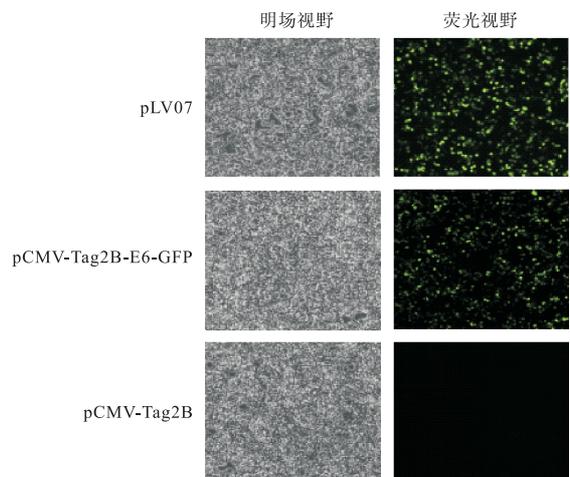
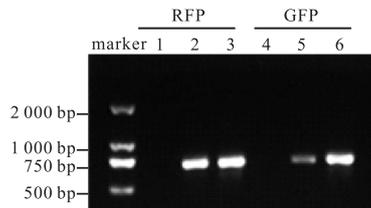


图 5 荧光显微镜检测 GFP 表达
Fig. 5 Expression of GFP detected with fluorescent microscope

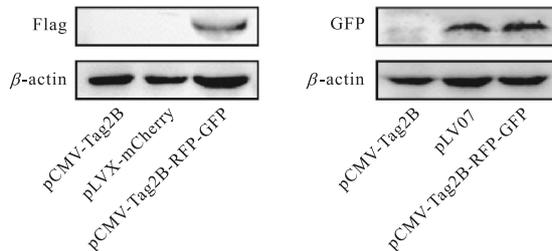
2.4 RFP和GFP蛋白在HEK293T细胞中共表达

RNA 剪接是病毒利用一条 RNA 表达多个蛋白质的常见机制。HPV18 E6 序列中有 RNA 剪接位点^[4]。为了证明 HPV18 间隔序列启动下游 ORF 表达不依赖于 RNA 剪接,用不含剪接位点的 RFP 编码序列取代 HPV18 E6,构建质粒 pCMV-Tag2B-RFP-GFP [图 3(b)]。

将质粒转染细胞,48 h 后提取 RNA 并进行 RT-PCR,检测 RFP 和 GFP 的 mRNA 水平。如图 6(a)所示,泳道 1、泳道 4 为 pCMV-Tag2B(阴性对照),泳道 3 为 pLVX-mCherry(RFP 阳性对照),泳道 6 为 pLV07(GFP 阳性对照),泳道 2、泳道 5 为重组质粒转染组。由此可以看出,泳道 2 和泳道 5 分别出现 RFP 和 GFP 目的条带,说明 RFP 与 GFP 基因同时得到转录。



(a) RT-PCR 检测 RFP 和 GFP mRNA 表达



(b) RFP 蛋白表达

(c) GFP 蛋白表达

图 6 RFP 和 GFP 在 HEK293T 细胞中共表达

Fig. 6 Co-expression of RFP and GFP in HEK293T

为了分析第一个目的蛋白 RFP 是否表达,进行免疫印迹实验。pCMV-Tag2B 载体表达的蛋白质带有 N-端 Flag 标签,所以用 Flag 标签抗体检测 RFP。如图 6(b)所示,仅在 pCMV-Tag2B-RFP-GFP 转染的细胞中检测到清晰的特异性蛋白条带,证明重组质粒编码的第 1 个目的蛋白 RFP 有效表达。

为了检测第 2 个目的蛋白 GFP 是否表达,利用 GFP 抗体进行检测。如图 6(c)所示,阴性对照组 pCMV-Tag2B 无条带,阳性对照组 pLV07 有一条特异性条带,重组质粒转染细胞中清晰可见 GFP 表达。以上结果说明 HPV18 间隔序列可以介导下游的 ORF 表达,不依赖于 RNA 剪接。

RT-PCR 和免疫印迹方法可以反映细胞群体情况,但不能区分单个细胞。为了探究 HPV18 间隔序列连接的两个 ORF 是否在同一个细胞中共表达,利用荧光显微镜观察 GFP 和 RFP。如图 7 所示,pCMV-Tag2B 组无荧光,pLV07 和 pLVX-mCherry 组分别显示绿色荧光和红色荧光,重组质粒转染的细胞同时出现绿色荧光和红色荧光,而且在大部分细胞中 RFP 和 GFP 同时表达。以上结果进一步证明 HPV18 间隔序列介导上游 ORF 翻译终止后重新开始下游 ORF 的翻译。

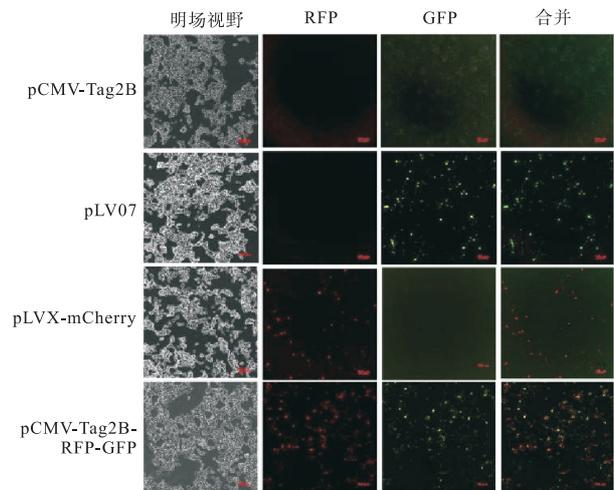


图 7 RFP 和 GFP 在 HEK293T 细胞共表达的荧光检测
Fig. 7 Detection of RFP and GFP co-expression in HEK293T with fluorescent microscope

3 讨论

不同于原核生物基因簇以多顺反子表达多种功能相关蛋白质,在哺乳动物细胞中,多数情况下一个基因编码一种蛋白质,有时一个 mRNA 经可变剪接或一条多肽链经不同酶的水解也可产生多种表达产物。真核细胞中蛋白质合成起始的经典方式依赖于 mRNA 5'-帽子结构;在应激条件下,部分 mRNA 不依赖于帽子结构而是利用长 150 ~ 250 bp 的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)募集翻译起始因子而启动蛋白质翻译^[8-9]。近年来,核糖体测序和蛋白质组学研究进一步拓展了人们对翻译起始机制的认识,相继提出了翻译重新起始和遗漏扫描等新理论^[10-15]。

本研究首先通过 RNAi 敲低实验证明 HPV18 E6 和 HPV18 E7 在 HeLa 细胞中以双顺反子形式共表达。为了验证 HPV18 E6-E7 间隔序列在共表达中的作用,构建了重组质粒 pCMV-Tag2B-E6-间隔序列-

GFP 和 pCMV-Tag2B-RFP-间隔序列-GFP, 通过 RT-PCR 和免疫印迹方法证明以 HPV18 间隔序列连接的两个蛋白质编码基因在 HEK293T 细胞中共表达, 荧光显微镜观察结果也证明间隔序列上游的 RFP 和下游的 GFP 基因同时表达。以上结果说明 HPV18 间隔序列具有开启下游 ORF 翻译的功能, 且不依赖于 mRNA 剪接。

按照遗漏扫描理论, 当 1 个 mRNA 分子上存在 2 个 ORF, 如第 1 个 ORF 缺少有效 Kozak 序列, 则通过 mRNA 5'-帽子结构募集的核糖体在扫描 RNA 序列时会略过第 1 个 ORF 而翻译第 2 个 ORF。本研究使用的表达载体 pCMV-Tag2B 带有 Kozak 序列, 所以不符合遗漏扫描机制。HPV18 间隔序列仅有 8 nt, 不能形成茎环结构而募集翻译起始因子, 故不符合依赖于 IRES 的翻译重新起始机制。本研究结果提示哺乳动物细胞中存在新的翻译重新起始方式(图 8)。

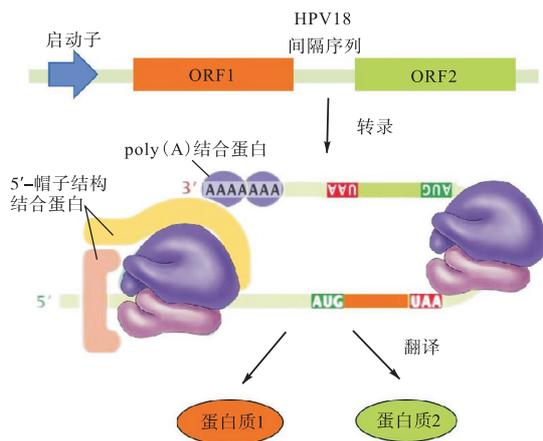


图 8 HPV18 间隔序列介导双顺反子表达

Fig. 8 HPV18 intergenic spacer mediates bicistronic expression

HPV18 间隔序列长度 8 nt, 接近原核生物 mRNA 的 SD 序列长度, 而且与人 18S rRNA 序列反向互补〔图 1(c)〕, 提示此间隔序列可能以类似 SD 序列与 16S rRNA 互补而结合核糖体的方式, 成为人核糖体结合位点, 启动下游蛋白质的翻译。因此, 还需要进一步深入研究, 从多角度加以证实。

病毒来源的 IRES 序列常被用于构建双顺反子表达载体, 被广泛用于基因工程、合成生物学和生物医药等领域^[6-8]。本研究发现 HPV18 间隔序列仅有 8 nt, 可以直接加在两个 ORF 之间, 比利用 IRES 更简单易行。利用 HPV18 间隔序列构建双顺反子表达质粒, 可用于研究细胞内两个蛋白质的相互作用, 也可用于包含两条肽链的蛋白质类药物的生产, 在生物

医药领域具有应用价值。

参考文献:

- [1] GALLAHER S D, CRAIG R J, GANESAN I, et al. Widespread polycistronic gene expression in green algae [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2021, 118(7): e2017714118.
- [2] MOHAUPT P, ROUCOU X, DELABY C, et al. The alternative proteome in neurobiology [J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2022, 16: 1019680.
- [3] AJIRO M, JIA R, ZHANG L, et al. Intron definition and a branch site adenosine at nt 385 control RNA splicing of HPV16 E6*I and E7 expression [J]. PLOS ONE, 2012, 7(10): e46412.
- [4] AJIRO M, TANG S, DOORBAR J, et al. Serine/arginine-rich splicing factor 3 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulate alternative RNA splicing and gene expression of human papillomavirus 18 through two functionally distinguishable cis elements [J]. Journal of virology, 2016, 90(20): 9138-9152.
- [5] ZHENG Y, LI X, JIAO Y, et al. High-risk human papillomavirus oncogenic E6/E7 mRNAs splicing regulation [J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2022, 12: 929666.
- [6] BRANT A C, MENEZES A N, FELIX S P, et al. Characterization of HPV integration, viral gene expression and E6E7 alternative transcripts by RNA-Seq: a descriptive study in invasive cervical cancer [J]. Genomics, 2019, 111(6): 1853-1861.
- [7] YU L, MAJERCIK V, ZHENG Z M. HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation [J]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(9): 4943.
- [8] YANG Y, WANG Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome [J]. Journal of molecular cell biology, 2019, 11(10): 911-919.
- [9] ROBERTS L, WIEDEN H J. Viruses, IRESs, and a universal translation initiation mechanism [J]. Biotechnology & genetic engineering reviews, 2018, 34(1): 60-75.
- [10] XU L, YUAN Y. Two micropeptides are translated from a KSHV polycistronic RNA in human cells by leaky scanning mechanism [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2020, 522(3): 568-573.
- [11] INCHINGOLO M A, DIMAN A, ADAMCZEWSKI M, (下转第 25 页)

- yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. International journal of food microbiology, 2006, 108: 336–345.
- [26] STANZER D, HANOUSEK C K, BLESIC M, et al. Alcoholic fermentation as a source of congeners in fruit spirits[J]. Foods, 2023, 12(10): 1951.
- [27] IGNACIO B, JAVIER R, ESTEBAN-FERNÁNDEZ A, et al. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement[J]. Molecules, 2017, 22(2): 189.
- [28] YU H Y, XIE T, XIE J R, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese rice wine using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry[J]. Food chemistry, 2019, 293: 8–14.
- [29] WEI J P, ZHANG Y X, QIU Y, et al. Chemical composition, sensorial properties, and aroma-active compounds of ciders fermented with *Hanseniaspora osmophila* and *Torulaspora quercuum* in co- and sequential fermentations[J]. Food chemistry, 2020, 306: 125623.
- [30] ZHAO G Z, KUANG G L, LI J J, et al. Characterization of aldehydes and hydroxy acids as the main contribution to the traditional Chinese rose vinegar by flavor and taste analyses[J]. Food research international, 2020, 129: 108879.
- [31] NIU Y, WANG P, XIAO Z, et al. Evaluation of the perceptual interaction among ester aroma compounds in cherry wines by GC-MS, GC-O, odor threshold and sensory analysis: an insight at the molecular level[J]. Food chemistry, 2019, 275: 143–153.
- [32] 王奇盛, 高瑞杰, 缪礼鸿, 等. 酵母菌混合发酵制备米酒及其工艺优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 155–161.
- [33] 李泽洋, 伍时华, 龙秀锋, 等. 米酒生香酵母的分离筛选鉴定及其性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(7): 43–50.
- [34] 李记明, 宋长冰, 贺普超. 葡萄与葡萄酒芳香物质研究进展[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(5): 108–112.

责任编辑: 郎婧

(上接第 14 页)

- et al. TP53BP1, a dual-coding gene, uses promoter switching and translational reinitiation to express a smORF protein[J]. iScience, 2023, 26(5): 106757.
- [12] GODFREY J D, HEJAZI D, DU X, et al. HER2 C-terminal fragments are expressed via internal translation of the HER2 mRNA[J]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(17): 9549.
- [13] WANG X, MARCHISIO M A. Synthetic polycistronic sequences in eukaryotes[J]. Synthetic and systems biotechnology, 2021, 6(4): 254–261.
- [14] SHAIMARDANOVA A A, KITAEVA K V, ABDRAKHMANOVA I I, et al. Production and application of multicistronic constructs for various human disease therapies[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(11): 580.
- [15] KARGINOV T A, PASTOR D P H, SEMLER B L, et al. Mammalian polycistronic mRNAs and disease[J]. Trends in genetics, 2017, 33(2): 129–142.

责任编辑: 郎婧