

恒河猴 *BST-2* 基因编码区单核苷酸多态性 及其对蛋白结构和功能的影响

董志会, 王 卫, 丛 喆, 熊圣文, 骆 杨, 陈 霆, 魏 强

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 筛查恒河猴 *BST-2* 基因编码区单核苷酸多态性(coding-region single nucleotide polymorphism, cSNP), 研究其对蛋白结构和功能的影响。方法 提取恒河猴外周血 RNA, RT-PCR 扩增, 单克隆测序比对, 确定猴 *BST-2* 的 cSNP 位点; 通过蛋白质结构分析软件对蛋白结构进行分析; 比较不同基因型猴体内 SHIV_{SF162p3} 复制水平的差异。结果 序列比对发现 8 个非同义突变位点; 经 Psipred 软件预测, 其中 G41A、T128C、C129 和 A333C cSNP 位点可影响 *BST-2* 蛋白二级结构。在 SHIV_{SF162p3} 感染平台期, 参考基因型猴(DLQ)病毒复制水平要高于 GLQ 型猴 ($P < 0.05$), 其他基因型猴之间无显著差异。结论 cSNP (G41A) 可能影响 *BST-2* 的抗病毒功能, 这为后续研究提供参考信息。

【关键词】 *BST-2*; cSNP; 蛋白质结构; 恒河猴

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0020-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 005

Polymorphisms of coding region in *BST-2* gene of Rhesus macaques and their effects on protein structure and function

DONG Zhi-hui, WANG Wei, CONG Zhe, XIONG Sheng-wen, LUO Yang, CHENG Ting, WEI Qiang

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional Chinese medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To explore the impacts of cSNP on the structure and function of rhesus macaque's *BST-2*. **Methods** Extracting RNA from peripheral blood of rhesus macaques, then RT-PCR, Monoclonal sequencing to find the cSNP sites; Forecasting the structure of these proteins; Comparing the Level of SIVmac239 replication between the different genotypic Rhesus macaques. **Results** We found 8 non-synonymous mutation sites, in the 8 non-synonymous mutation sites, Only G41A, T128C, C129 and A333C change the secondary protein structure of *BST-2* by forecasting of Psipred software; At the plateau of SHIVSF162p3 replication, The SHIVSF162p3 replication level of reference genotype rhesus macaque (DLQ) is higher than rhesus macaques of GLQ genotype, other genotypes rhesus macaques have no significant difference. **Conclusion** cSNP (G41A) may influence the antiviral activity of rhesus macaque's *BST-2*, this study gives us a reference to further research work.

【Key words】 *BST-2*; cSNP; Structure; Rhesus macaque

[基金项目] “十二五”传染病重大专项课题(2012ZX10004-501-001; 2013ZX10004-608-003)

[作者简介] 董志会(1988-), 男, 硕士生, 专业: 比较医学。

[通讯作者] 魏强(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

骨髓基质细胞抗原-2 (bone marrow stromal cell antigen 2, BST-2), 也称 tetherin, CD317 或 MH1. 24, 是近年来新发现的包膜病毒限制因子之一^[1-2]。BST-2 是一种具有特殊拓扑结构的脂筏相关跨膜蛋白, 其通过连接病毒和宿主细胞膜, 将新出芽病毒束缚在细胞膜表面, 从而限制病毒的释放^[1]。有研究表明, 其他天然抗病毒蛋白在与病毒协同进化的过程中, 会出现某些位点核苷酸的突变, 从而影响它们的抗病毒能力^[1,3-4]; 有文献报道, 人 BST-2 基因部分氨基酸残基位点的改变可能影响 HIV-1 vpu 对 BST-2 的敏感性^[5]。但有关恒河猴 BST-2 基因多态性, 及对蛋白结构和功能的影响尚未见报道。本研究旨在通过基因测序、序列比对、蛋白质结构预测等技术找到恒河猴 BST-2 基因中影响抗 SIV 功能的 cSNP 位点, 以及比较不同基因型猴艾滋病病毒复制的峰值与控制值, 从而为后面探究猴 BST-2 抗病毒作用提供一定理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与样品采集

中国恒河猴 55 只, 购自北京协尔鑫生物资源研究所【SCXK(京)2005-2005】; 分别采集动物外周血 1 mL, EDTA 抗凝, 样品采集后 4 h 内提取 RNA。

1.2 实验动物病毒感染与指标测定

在实验 55 只猴中选取 20 只恒河猴采取静脉注射感染, 感染病毒为 SHIV_{SF162p3}, 毒力为 300TCID₅₀, 在攻毒后 3 d, 7 d, 10 d, 后每隔 7 d 采集动物外周血 1 mL, EDTA 抗凝; 样品采集后 4 h 内, 分血浆, 实时荧光定量 PCR 测血浆病毒载量, 流式细胞术和血常规对全血进行分析。

1.3 外周血 RNA 的提取及反转录

实验猴 EDTA 抗凝全血使用 RNA BLOOD MINI KIT(购自 QIAGEN 公司)进行总 RNA 的提取, 提取过程参照试剂盒说明书; 提取 RNA 后立即对其进行反转录。

1.4 RT-PCR 扩增

BST-2 基因扩增采用两步法, 第一步使用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连) 进行 RT-PCR 合成 cDNA 第一条链, 操作过程参照试剂盒说明书; 第二步用高保真酶 KOD-Plus 试剂盒 (TOYOBO, 上海) 扩增 BST-2 基因, 操作过程参照试剂盒说明书。BST-2 基因引物来自参考文献^[6], 由 Invitrogen 公司合成。引物序列为: F 5'-ATA ACT CGA GGT GGA ATT CAT GGC ACC TAT

TTT GTA TGA C -3', R 5'-ATA TTG GTA CCT CAC AGC AGC AGA GCG CTC AAG CCC AGC AGC AG -3', 退火温度 63℃。PCR 在 System 9700 PCR 仪上进行 (Applied Biosystems 公司)

1.5 单克隆分型检测

使用 QIAquick PCR Purification Kit (购自 QIAGEN 公司) 对 PCR 产物进行纯化回收, 纯化回收过程参照试剂盒说明书; 对纯化回收回来的 DNA 片段用 DNA A-Tailing Kit (TaKaRa, 大连) 进行加 A 尾, 加 A 尾过程参照试剂盒说明书; 对加完 A 尾的 DNA 片段回收, 与 pMDTM18-T Vector 进行连接, 连接步骤参照 pMDTM18-T Vector Cloning Kit (TaKaRa, 大连) 说明书; 对连接好后的质粒进行转化, 感受态细胞为 E. coli JM109 Competent Cells (TaKaRa, 大连), 转化过程参考试剂盒说明书; 转化好后的感受态细胞放于 1 mL 无抗生素的 SOS 培养基中, 在摇床上 37℃, 180 r/min 培养 1 h, 然后从 1 mL 的菌液中抽取 300 μL 平铺在带有氨苄抗性的平板上, 37℃ 恒温培养 16 h; 待平板长出菌落, 挑取菌落, 进行菌落 PCR, 每个样品选取 6 个阳性菌, 送诺塞(北京)公司测序。

1.6 序列比对和生物软件分析

DNA 测序由北京诺赛基因公司完成。利用 BioEdit 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对, 恒河猴 [Macaca mulatta] BST-2 参考 cDNA 序列为: Transcript_id = "NM_001161666.1"; 恒河猴 [Macaca mulatta] BST-2 氨基酸参考序列为: Protein_id = "NP_001155138.1"。分别用 Psipred 软件, SWISS-MODEL 软件进行蛋白质二级和三级结构的预测。

2 结果

2.1 中国恒河猴 BST-2 基因编码区 cSNP 位点的分布

提取 20 只恒河猴全血 RNA, 逆转录 PCR 后进行测序比对 (参照序列为 NCBI 上公布的 BST-2 cDNA 序列, NM_001161666), 一共找到 9 个突变位点, 分别位于基因的胞质区、跨膜区和胞外区 (表 1); 通过使用 BioEdit 软件进行翻译和氨基酸序列比对, 发现其中 8 个突变位点为非同义突变, 在 BST-2 蛋白一级结构上的位置分别是: 9 (C/G), 12 (P/S), 14 (D/G), 29 (L/V), 43 (L/P), 111 (Q/H), 159 (P/S) (图 1)。其中 G9R, P12S, D14G 分布在 BST-2 的胞质区; I29V, L43P 分布在 BST-2 的跨膜区上; Q111H, P159S 分布在 BST-2 的胞外区上。

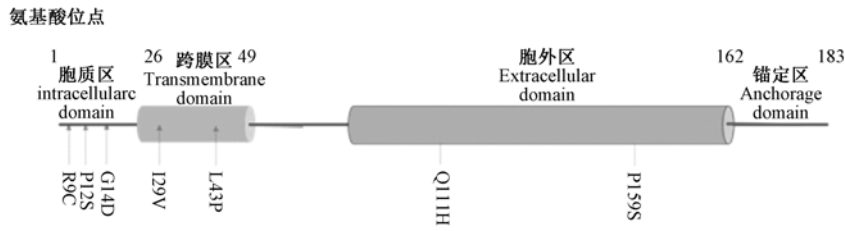


图 1 恒河猴 BST-2 的蛋白质结构及 SNP 分布情况

Fig. 1 Protein structure and SNP distribution in BST-2 of rhesus macaques

表 1 恒河猴 BST-2 基因突变位点

Tab. 1 Nucleotide mutants of rhesus macaques

结构域 Structural domain	突变位点 (bp) Mutation site	核苷酸突变 dNt point mutation	氨基酸位置 (aa) Amino acid mutation site	氨基酸突变 Amino acid mutation
胞外区 Intracellular domain	25	C-T	9	R-C
	34	C-T	12	P-S
	41	G-A	14	G-D
跨膜区 Transmembrane domain	85	A-G	29	I-V
	128	T-C	43	L-P
胞外区 Extracellular domain	129	C-G		
	333	A-C	111	Q-H
	411	G-T	137	/
	475	C-T	159	P-S

2.2 非同义 cSNP 对 BST-2 蛋白二级结构的影响

Psipred 软件分析结果显示, 3 个非同义 cSNP 位点突变影响了 BST-2 蛋白的二级结构, 具体分析, 在 13~15 氨基酸残基位置由一个无规则卷曲变成 α 螺旋, 40~42 氨基酸残基由 α 螺旋转变为无规则卷曲, 111 氨基酸残基从原来的 α 螺旋转变为无规则卷曲, 其它结构均未发生变化(图 2)。

2.3 基因分型及 cSNP 位点的频率测定

通过单克隆测序, 用 BioEdit 软件比对发现 55 只中国恒河猴中 G41A 基因频率占 2.17%; T128C 的基因频率为 22.5%; C129G 的基因频率为 50%; A333C 的基因频率为 5%。对基因分型结果进行分析, 共找到了 6 种主要基因型(自然存在的)(表 2)。

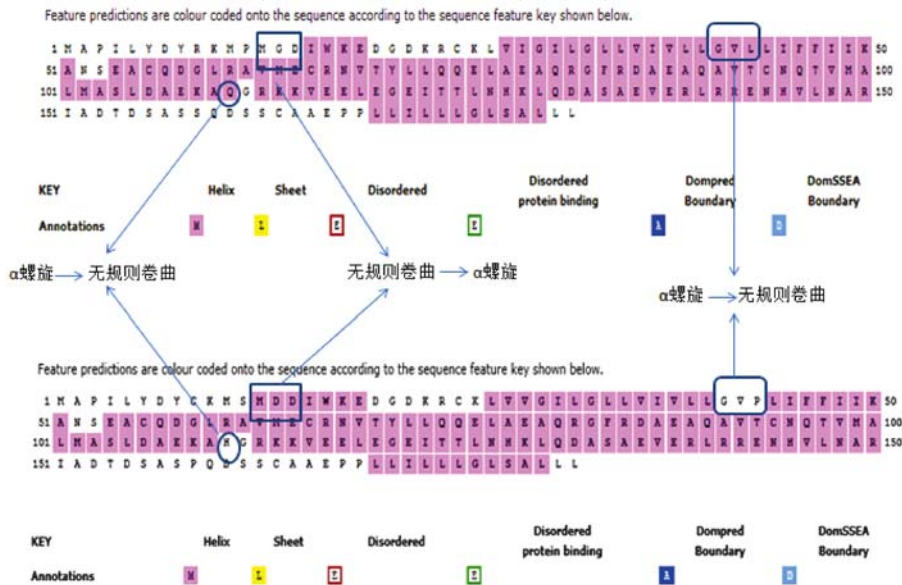


图 2 BST-2 基因 cSNP 引起的蛋白二级结构变化

Fig. 2 The change of secondary structure caused by cSNP of BST-2

表 2 恒河猴 *BST-2* 基因型及比率
Tab. 2 Genotypes of rhesus macaques' *BST-2*

名称 Name	基因型 Gene type (...41...128/129...333...)	比率 Rate(%)
RM1	...G...TC...A...	35%
RM2	...G...CG...A...	2.5%
RM3	...A...CC...A...	12.5%
RM4	...A...CG...A...	5%
RM5	...A...TG...A...	42.5%
RM6	...A...CC...C...	2.5%

2.4 不同基因型对猴艾滋病疾病进程的影响

经过对不同基因型猴 *BST-2* 蛋白的二级结构预测,我们对这 20 只猴进行了基因型的分类,共分成了 5 群,分别是 GLP(4 只),DLQ(5 只),DLQ/DPQ(4 只),DLQ/GLQ(5 只),DPH/DPQ(2 只)。G/D 是第 14 位氨基酸残基类型,L/P 是第 43 位氨基酸残基类型,Q/H 第 111 位氨基酸残基类型。在这里,我们对不同基因型猴感染 SHIV_{SF162p3} 之后病毒复制峰值和病毒复制控制值做了统计分析,统计方法采用单因素方差分析,通过 Student-Newman-Keuls 检测,进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。从图中我们可以看出,除了在病毒复制控制值上,DLQ 型基因猴组高于 GLQ 型猴组有统计学差异外($P < 0.05$),其他基因型猴组在病毒复制峰值和病毒控制值上两两之间均无统计学差异。具体来说,GLQ 型与 DLQ 相比,DLQ 型组峰值要高于 GLQ;比较 DLQ 型和 DLQ/DPQ 型,DLQ 组峰值和控制值要高于 DLQ/DPQ 组;比较 DLQ/DPQ 型和 DPH/DPQ 型,DLQ/DPQ 型组与 DPH/DPQ 型组峰值差异不明显,DLQ/DPQ 组控制值要略高于 DLQ/DPQ 组(图 3)。

3 讨论

BST-2 主要在未分化的 B 细胞,骨髓基质细胞,

树突状细胞等多种细胞中表达是一种典型的 II 型跨膜蛋白^[7]。*BST-2* 氨基端位于胞质内,随后是一个 α 螺旋结构的跨膜蛋白域,胞外区也呈 α 螺旋结构,其羧基端有一个糖基磷脂酰肌醇锚定点^[5]。*BST-2* 不仅可以抑制免疫缺陷病毒的释放,还可以抑制多重包膜病毒的释放^[7-8],由此,我们可以看出 *BST-2* 具有广泛的抗包膜病毒释放作用,因此, *BST-2* 抗病毒的作用不可能是与病毒特异性的结合,2009 年, Perez-Caballero 年发现与 *BST-2* 具有相似拓扑结构的二聚体分子同样具有束缚 HIV-1 的作用,表明是 *BST-2* 的拓扑结构而不是其一级结构氨基酸的序列起抗病毒作用^[9]。现在,人们普遍认为, *BST-2* 作为一个桥梁连接宿主细胞和病毒,从而把病毒粘连在宿主细胞表面,进而把一部分病毒内吞降解。研究发现,不同病毒对 *BST-2* 的抗病毒作用有拮抗作用,如 HIV-1vpu 可以与人 *BST-2* 的跨膜区结合,从而诱导 *BST-2* 膜定位的转移及降解^[1]; SIV nef 蛋白可以与猴 *BST-2* 的胞质区氨基酸残基结合,诱导降解 *BST-2*^[10]。比较人与恒河猴的 *BST-2* 蛋白一级结构,发现人 *BST-2* 胞质区比猴的 *BST-2* 蛋白胞质区少了 5 个氨基酸残基,而这 5 个氨基酸残基正是 SIVnef 与猴 *BST-2* 相互作用的关键部位^[11]。Marina Laplana 2013 年发现,不同的人 *BST-2* 基因型对艾滋病疾病进程具有一定的影响^[12]。

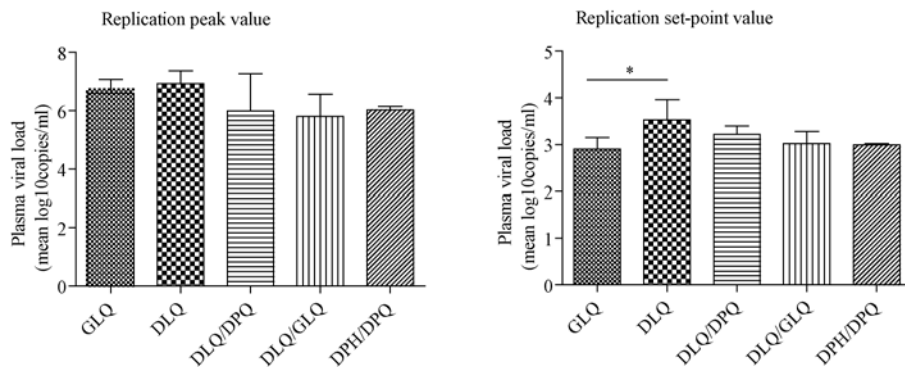


图 3 不同 *BST-2* 基因型的病毒复制峰值和控制值

Fig. 3 The replication peak value and set-point value of different *BST-2* genotype

因此,有可能不同猴 *BST-2* 基因型对猴艾滋病疾病进展有影响。

由 cSNP 碱基序列的不同而产生的非同义突变会造成蛋白质一级结构的变化,从而影响蛋白的高级结构。这种改变常常造成蛋白质一些功能的变化。本研究主要找出猴 *BST-2* 非同义 cSNP 碱基序列的改变,通过蛋白二级结构预测和结合猴艾滋病疾病进程来分析这些 cSNP 对猴 *BST-2* 功能的影响。

在这里,我们发现了八个非同义 cSNP 位点,用 Psipred 软件分析显示,只有三个 cSNP 位点的改变对猴 *BST-2* 的二级结构产生了影响,尤其是第 14 为 G/D 的变化使得猴 *BST-2* 胞质区的一小段 α 螺旋得以延伸,而第 14,15,16,17,18,19 位这几个氨基酸残基正是 SIV nef 的结合关键位点,而其他两个 cSNP 位点的改变虽对 *BST-2* 的二级结构产生了一些变化,但是用 SWISS-MODEL 软件分析发现,这两个 cSNP 对猴 *BST-2* 的三级结构几乎没有影响,而且在 *BST-2* 是以其独特的拓扑结构来发挥其抗病毒作用,因此这两个 cSNP 对 *BST-2* 的功能可能不会有太大影响。在不同基因型猴艾滋病疾病进程的比较中,DLQ 型峰值和控制值要高于 GLQ 型,DLQ 型峰值和控制值要高于 DLQ/DPQ 型,DLQ/DPQ 型与 DPH/DPQ 型峰值差异不明显,DLQ/DPQ 型控制值要略高于 DLQ/DPQ 型,这些说明了猴 *BST-2* 蛋白在第 14 位,第 43 位氨基酸残基分别是 G 和 P 时,有可能可以增强其抗病毒作用,而 111 位氨基酸残基的变化可能对猴 *BST-2* 抗病毒作用并无影响。在这里我们需要提出的是,艾滋病是一个极其复杂的病毒感染性疾病,有很多因素影响其疾病进程,因此,我们还需要进一步实验验证这些位点与猴 *BST-2* 蛋白抗病毒作用有关。

本实验为进一步研究猴 *BST-2* 蛋白功能提供一定参考依据,为病毒拮抗该蛋白的机制研究提供参考。下一步,我们将在细胞实验上去验证这 3 个 cSNP 位点对猴 *BST-2* 抗病毒作用的影响。

参考文献:

- [1] STUART J N, ZANG T, BIENIASZ P D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu [J]. *Nature*, 2008, 451(7177): 425 - 430.
- [2] VAN DAMME N, GOFF D, KATSURA C, *et al.* The interferon-induced protein *BST-2* restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(4): 245 - 252.
- [3] MCEWAN WA, SCHALLER T, YLINEN LM, *et al.* Truncation of TRIM5 in the feliformia explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat [J]. *Virol*, 2009, 83(16): 8270 - 8275.
- [4] ROLLASON R, KOROLCHUK V, HAMILTON C, *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif [J]. *Cell Sci*, 2007, 120(Pt 21): 3850 - 3858.
- [5] KUPZIG S, KOROLCHUK V, ROLLASON R, *et al.* Bst-2/HMI.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology [J]. *Traffic*, 2003, 4(10): 694 - 709.
- [6] YOSHIDA T, KAO S, STREBEL K. Identification of residues in the *BST-2* TM domain important for antagonism by HIV-1 VPU using a Gain-of-Function approach [J]. *Front Microbiol*, 2011, 2: 35.
- [7] ISHIKAWA J, KAISHO T, TOMIZAWA H, *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, *BST2*, that May be involved in pre-B-cell growth [J]. *Genomics*, 1995, 26(3): 527 - 534.
- [8] JOUVENET N, NEIL SJ, ZHADINA M, *et al.* Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin [J]. *J Virol*, 2009, 83(4): 1837 - 1844.
- [9] PEREZ-CABALLERO D, ZANG T, EBRAHIMI A, *et al.* Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells [J]. *Cell*, 2009, 139(3): 499 - 511.
- [10] ZHANG F, WILSON SJ, LANDFORD WC, *et al.* Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(1): 54 - 67.
- [11] EVANS DT, SERRA-MORENO R, SINGH RK, *et al.* *BST-2*/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses [J]. *Trends Microbiol*, 2010, 18(9): 388 - 396.
- [12] LAPLANA M, CARUZ A, PINEDA JA, *et al.* Association of *BST-2* gene variants with HIV disease progression underscores the role of *BST-2* in HIV type 1 infection [J]. *Infect Dis*, 2013, 207(3): 411 - 419.

[修回日期] 2015-06-10