

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620141152548

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗病毒蛋白的筛选以及前列腺受体蛋白抗
病毒作用的探究

Screen to identify the antiviral proteins and explore the effect of
prostaglandin receptor

刘瑞欣

指导教师姓名: 韩 家 淮 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩时间: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

天然免疫反应为机体提供了对于病原微生物感染而进行反击的第一道防线，与人类的许多感染性及非感染性疾病密切相关。其中，I 型干扰素（IFN- α/β ）是病毒感染后产生的介导抗病毒反应的关键分子，介导了后续的先天免疫抗病毒反应。I 型干扰素通过 IFNR（interferon receptor）-JAK/STAT 的信号通路诱导激活下游数百个 ISGs（interferon-stimulated genes）的表达。这些蛋白可以起到直接影响病毒吸附、脱壳、复制、包装和释放以及影响宿主细胞的生长和存活，从而达到广谱抗病毒的作用。虽然 ISGs 已经发现了超过 25 年，只有一些蛋白被报道具有抗病毒的作用，但是大部分干扰素诱导基因的抗病毒功能，靶点以及抗病毒机制并不完全清楚。I 型单纯疱疹病毒（HSV-1）是双链 DNA 病毒。HSV-1 在人群中的感染非常广泛，亚洲成年人约有 80% 以上都是 HSV 病毒的携带者。此外，HSV-1 感染会引起散发性脑膜炎的，这一疾病主要出现在婴幼儿中，具有较高的致死率。为了找 I 型干扰素激活的基因中具有真正起到抗病作用的蛋白，我们通过 RNA 测序的方法检测 HEK293 细胞中能够被干扰素刺激上调的基因。并构建了一个约 600 个基因的过表达质粒库，通过 HEK293 细胞中过表达确定了这 600 个基因对于 HSV 以及 VSV 病毒的抑制作用。我们筛选出 10 个具有抑制病毒合成的候选基因。并通过 CRISPR-Cas9 基因敲除的技术确定了其中的环前列腺素受体以及其家族的前列腺素 D2 受体具有抗病毒作用。前列腺素受体家族属于 G 蛋白偶联受体，可以激活下游 G 蛋白。通过基因敲除的方式确定了 G α q 蛋白可能在其抗病毒作用中起到了主要的作用。而 Gas 过表达以及下游 PKAG 蛋白，可以增强 G α q 的抗病毒效果。这些研究发现为我们寻找治疗 HSV-1 诱发的脑膜炎提供了一个潜在的治疗靶点。

关键词：ISGs；前列腺素受体；单纯疱疹病毒

Abstract

The innate immunity is the first line of defense against microbial infection, which is related to infectious and noninfectious disease. Among them, the type-1 interferon (IFN- α/β) is an important cellular factors which can mediate the antiviral activity. The type-1 interferon stimulate the IFNR (interferon receptor) -JAK/STAT signal pathway and transcriptionally regulate hundreds of interferon-stimulated genes(ISGs). Collectively, they can target almost any step in a virus life cycle (e.g. entry, uncoating, genome replication, particle assembly, egress) and influence the growth and survival of the host cell. Consequently, the type-1 IFN help the cell defense against multiple microbial infection. Although hundreds of ISGs have been identified more than 25 years ago, only a few of them have been characterized with respect to antiviral effect. For most ISG products, little is known of their antiviral activity, target specificity and mechanisms of action. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a double stranded DNA virus. It is a widespread virus and it is infects approximately 80% of adults worldwide. HSV-1 infection can cause the fatal childhood HSV-1 encephalitis (HSE). To conduct the screen we use the RNA deep sequencing to identify the gene which can be induced by interferon in the HEK293 cell, and construct an almost 600 plasmid pool. These ISGs were tested for their ability to inhibit the replication of two important human and animal viruses HSV and VSV. Using this screen we find more than 10 candidate. Through the gene editing method based on CRISPR-CAS9 nuclease we identify the prostaglandin I2 receptor (IP) and the same family member prostaglandin D2 receptor (DP) have the antiviral activity. Using the overexpress and CRISPR-CAS9 nuclease we can confirm that the downstream factor G α q has the important role in the antiviral activity. In addition overexpressing Gas protein and the downstream factor PKAG can enhance the effect of G α q respectively. These results may provide a new perspective for the exploration of pharmaceutical approaches against HSV-1 related disease.

Keywords: ISGs; Prostaglandin receptor; HSV

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
目录.....	III
Table of Contents	VI
第一章 前言	1
1.1 免疫系统.....	1
1.1.1 免疫系统概述.....	1
1.1.2 天然免疫中抗病毒机制.....	2
1.1.3 干扰素.....	4
1.1.4 ISGs.....	5
1.2 单纯疱疹病毒 (HSV)	6
1.2.1 单纯疱疹病毒简介.....	6
1.2.2 水疱性口炎病毒 (Vesicular Stomatitis Virus, VSV)	9
1.3 前列腺素受体.....	10
1.3.1 前列腺素概述.....	10
1.3.2 前列腺素受体概述.....	11
1.4 G 蛋白.....	12
1.5 立题背景.....	13
第二章 材料与方法	15
2.1 相关药品和试剂.....	15
2.1.1 哺乳动物细胞株.....	15
2.1.2 病毒株.....	15
2.1.3 试剂.....	15
2.2 常用实验仪器.....	16

2.3 实验室常用仪器.....	16
2.3.1 pBOBI 质粒载体	16
2.3.2 聚合酶链式扩增反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)	17
2.3.3 DNA 片段的分离与纯化	17
2.3.4 酶切质粒反应.....	19
2.3.5 DNA 连接反应	19
2.3.6 连接酶非依赖性克隆 Ligase Independent Clone (LIC)	19
2.3.7 制备大肠杆菌感受态细胞.....	21
2.3.8 DNA 转化	21
2.3.9 质粒 DNA 提取	22
2.4 细胞相关实验.....	24
2.4.1 细胞培养.....	24
2.4.2 细胞转染.....	25
2.4.3 慢病毒的包装与感染.....	27
2.4.4 胞内钙离子浓度检测.....	28
2.5 蛋白相关实验.....	29
2.5.1 蛋白电泳.....	29
2.5.2 免疫印迹.....	30
2.6 Knock out 细胞系构建.....	30
2.7 荧光素 (Luciferase) 测定.....	32
2.8 RNA 相关实验和方法	32
2.8.1 细胞总 RNA 提取	32
2.8.2 mRNA 逆转录	33
2.9 病毒相关实验.....	35
2.9.1 病毒的扩增.....	35
2.9.2 病毒斑形成实验.....	35
第三章 结果与讨论	37
3.1 利用 RNA 深度测序寻找 HEK293 细胞中 ISGs	37
3.2 构建质粒库并利用过表达的方法确定 ISGs 的抗病毒效应.....	39

3.3 过表达实验验证蛋白的抗病毒作用.....	39
3.3.1 过表达 PTGIR 基因可以明显抑制 HSV 的 DNA 的量	39
3.3.2 检测 HSV 病毒的即刻早期, 早期以及晚期蛋白 mRNA 水平	40
3.3.3 同家族的蛋白 PTGDR 同样具有抗病毒的作用	41
3.3.4 PTGIR 和 PTGDR 蛋白对 VSV 病毒也有很好的抑制作用	41
3.4 上游配体 PGI2 和 PGD2 没有抗病毒的作用	42
3.5 PTGIR 和 PTGDR 在细胞系中的表达量	42
3.6 PTGIR 和 PTGDR 在 HEL 和 THP-1 细胞中同样也有抗病毒作用	43
3.7 利用 CRISPR/CAS9 的基因敲除技术确定蛋白功能	43
3.8 探究 PTGIR 和 PTGDR 抗病毒的分子机制	44
3.8.1 利用过表达的方式寻找下游的抗病毒蛋白	44
3.8.2 利用 luciferase 实验证明 G α S 下游信号通路的激活和抗病毒作用的 关系	45
3.8.3 利用 shRNA 敲低 G α s 不影响 PTGIR 和 PTGDR 的抗病毒作用	45
3.8.4 利用 CRISPR/CAS9 基因敲除技术敲除 G α q 和 G α 11	46
3.8.5 过量表达实验证明 PLCB1 和 PLCD4 以及 PKAG 可能在其中有作 用	47
3.8.6 利用抑制剂证明 PLC 和 PLD 在 PTGDR 抗病毒活性中没有作用	47
3.8.7 检测细胞内钙离子浓度	48
3.9 讨论	49
附录 1 图表索引	51
附录 2 缩略语及中英文对照	52
参考文献	53
致谢	61

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	II
Table of Contents	III
Table of Contents	VI
Chapter One Introduction	1
1.1 Innate immunity	1
1.1.1 Introduction of Innate immunity	1
1.1.2 Antiviral innate immune signaling.....	2
1.1.3 Introduction of type I interferons	4
1.1.4 ISGs.....	5
1.2 Virus	6
1.2.1 Introduction of HSV	6
1.2.2 Introduction of VSV	9
1.3 Prostaglandin receptor	10
1.3.1 Introduction of prostaglandin.....	10
1.3.2 Introduction of prostaglandin receptor.....	11
1.4 G protein	12
1.5 Background.....	13
Chapter2 Materials and Methods.....	13
2.1 Materials.	15
2.1.1 Cell lines	15
2.1.2 Virus strains.	15
2.1.3 Durgs and reagents.....	15
2.2 Instrument	16

2.3 Experiment and methods for DNA	16
2.3.1 pBOBI vector	16
2.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
2.3.3 Purification of DNA	17
2.3.4 Digestion of plasmid DNA	19
2.3.5 Ligation of DNA	19
2.3.6 Ligase Independent Clone (LIC)	19
2.3.7 Preparation of E.Coli competent cells	21
2.3.8 Transformation of DNA	21
2.3.9 Extraction of plasmid DNA	22
2.4 Experiment and methods for cell	24
2.4.1 Cell culture	24
2.4.2 Cell transfection	25
2.4.3 Package and infection of lentivirus	27
2.4.4 Detection of intracellular calcium concentration	28
2.5 Experiment and methods for protein	29
2.5.1 SDS-PAGE	29
2.5.2 Immune blot	30
2.6 Generation of Knock out cell	30
2.7 Luciferase assay	32
2.8 Experiments and methods for RNA	32
2.8.1 Isolation of total RNA from cells	32
2.8.2 mRNA reverse transcription	33
2.9 Experiments and methods for virus	35
2.9.1 Viral amplification	35
2.9.2 Virus plaque forming assay	35
Chapter3 Results and Discussion	37
3.1 Using RNA sequencing find the ISGs in HEK293 cell line	37
3.2 Construct the plasmid library and determine the ISGs antiviral effect	39

3.3 Overexpressing ISGs find the antiviral protein	39
3.3.1 Overexpression of PTGIR gene can significantly inhibit the DNA of HSV.....	39
3.3.2 Detect the immediate early, early and late protein mRNA level.....	40
3.3.3 The family member PTGDR also has antiviral effect.....	41
3.3.4 PTGIR and PTGDR protein can also inhibit the VSV	41
3.4 PGI2 and PGD2 have no effect	42
3.5 mRNA level of PTGIR and PTGDR in some cell lines.....	42
3.6 PTGIR and PTGDR can inhibit the HSV in HEL and THP-1 cell	43
3.7 CRISPR/CAS9 knockout technology is used to determine the protein function.....	43
3.8 Looking for possible antiviral mechanism of PTGIR and PTGDR.....	44
3.8.1 Overexpress downstream factor	44
3.8.2 Using the luciferase experiments confirm downstream signaling pathway of G α s have no direct relation with the antiviral activity	45
3.8.3 Knock down of G α s.....	45
3.8.4 Using the CRISPR/alpha CAS9 knockout technic double knockout G α 11 and G α 11	46
3.8.5 Overexpression experiments show PLCB1 PLCD4 and PKAG may have a role in antiviral effect	47
3.8.6 Using inhibitors of PLC and PLD cannot block the antiviral activity of PTGDR	47
3.8.7 Detection of intracellular calcium ion concentration did not change ..	48
3.9 Conclusions and discussion	49
Appendix 1 Index of figures and tables.....	51
Appendix 2 Abbreviations	52
Reference	53
Acknowledgement.....	61

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 免疫系统

1.1.1 免疫系统概述

在我们的生活环境中有着各种各样的病原微生物，如：细菌、病毒、支原体、真菌、寄生虫等。人类作为宿主为这些病原微生物提供了能量代谢和繁殖提供的资源。幸运的是，人体进化出一系列防止病原微生物入侵的途径。

免疫系统是防卫病原微生物入侵最有效的武器，它能监控并清除外来病原微生物等引起的反应。人体的免疫系统不仅防御病原微生物的入侵而且监视清除体内的肿瘤细胞、死亡细胞、衰老细胞或其他有害的成分以及通过自身免疫调节使免疫系统保持稳态。免疫系统主要由免疫器官、免疫细胞、免疫活性物质等组。它们通过协同作用共同保护机体免受外来病原微生物入侵的危害。

根据对病原微生物入侵的识别的不同，免疫系统可分为先天免疫系统(innate immune system)和适应性免疫系统(adaptive immune system)。先天免疫系统，又叫做天然免疫系统、固有免疫系统，包括生理屏障(皮肤和粘膜组织、血脑屏障和胎盘屏障等)、化学屏障(pH 值、酶、脂肪酸以及补体系统)以及参与天然免疫的细胞(如上皮细胞、粒细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和树突状细胞等)。“适应性免疫”又叫做获得性免疫(acquired immunity)，又包括体液免疫和细胞免疫，获得性免疫抵抗的是被感染过的较为特意的某些病原体，它为机体提供了一个较长时间的保护^[1]。获得性免疫主要通过体内 T/B 淋巴细胞表面受体识别病原微生物的表面抗原 (epitope)，并进行自身活化、增殖、分化成效应细胞，并能对该抗原起到特异性反应。

虽然先天免疫与适应性免疫的作用机制不同，但它们并非是两个完全独立的系统，而是协同执行免疫功能。首先，生理屏障为机体提供了第一道防线。致密的上皮细胞组成的皮肤和黏膜可阻挡病原入侵，并且分泌多种杀菌、抑菌物质，如胃酸、唾液等。但是病原微生物进化出各种手段入侵人体。当病原微生物突破生理屏障后，可被局部的巨噬细胞迅速吞噬。另外，补体系统也会激活免疫和炎

症反应。在病原微生物突破机体的物理和化学屏障后，会激活被感染细胞产生大量的细胞因子（inflammatory factors）和趋化因子(chemokines)如白细胞介素（interleukin, IL）、干扰素（interferon, IFN）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）等，这些细胞因子一方面通过自分泌(autocrine)和旁分泌(paracrine)的方式激活下游信号通路，合成抑制病原微生物的蛋白；另一方面炎症细胞因子和趋化因子吸引免疫细胞中的中性粒细胞(neutrophil)、自然杀伤细胞(natural killer cell)、巨噬细胞(macrophage)和树突状细胞(dendritic cell)，来吞噬、杀伤被感染的细胞，同时清除病原微生物产生炎症反应。如果天然免疫系统没能成功清除外来病原微生物，巨噬细胞和树突状细胞会对病原微生物表面抗原进行加工，通过细胞表面的主要组织相容性复合物 I/II（major histocompatibility complex class I/II, MHC-I/II）呈递给 T 细胞和 B 细胞，通过增殖、分化、转化成效应 T 细胞、浆细胞和记忆细胞从而起到更为特异的和较长时间对病原体监控与清除作用。

1.1.2 天然免疫中抗病毒机制

天然免疫是抵抗病毒扩散的第一道防线。先天免疫系统能够识别病毒的感染并引发一系列的抗病毒反应。其中，I 型干扰素比如 IFN- α 和 IFN- β 是病毒感染后产生的抗病毒反应的关键分子,从而起到了抗病毒，抑制恶性肿瘤细胞扩增以及免疫调节的作用^[2,3,4,5]。天然免疫系统抗病毒需要两个事件，首先免疫系统的受体对入侵病毒进行识别，然后通过激活蛋白通路信号来调节干扰素合成。细胞的天然免疫系统表达模式识别受体（pattern recognition receptors ,PRR）检测病原体特定的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)，如基因组 DNA、dsRNA 等^[6,7]。宿主细胞中识别病毒病的模式识别受体大概可以分为三类：一是细胞外膜和核内体中的 Toll 样受体（Toll like receptor）；二是细胞质中识别病原体 RNA 的受体；三是识别胞内病毒 DNA 的受体。在病毒感染过程中产生主要作用的 Toll 样受体主要是 Toll like receptors 3,7,8,9^[8,9]。它们识别病毒 DNA 和 RNA 等。具体为：TLR3 主要识别核内体中 dsRNA；人源的 TLR7/8 识别单链 RNA 片段（ssRNA）；TLR9 主要识别含有未甲基化的 CpG 的 DNA 片段^[8]。TLR7/TLR8/TLR9 是通过 MyD88 介导的信号通路诱导 I 型干扰素产生的，特别是 IFN- α ^[11,12]。有报道在树突状细胞（pDCs）中，MyD88 与 IRF7 形成分子

复合体介导下游的信号传递产生 I 型干扰素^[13,14]。TLR3 作为非经典的 Toll 样受体是通过接头分子-TRIF 介导 IRF3 以及 I 型干扰素产生的^[15,16]。近年来 RIG-I (retinoic acid inducible gene - I)样受体被发现可以识别细胞质中的双链 RNA(dsRNA)^[10]。RIG-I 和 MDA5 是通过募集下游线粒体抗病毒蛋白 (Mitochondrial antiviral protein, MAVs)^[17-20]，其 N 端含有 CARD 结构域，通过和 RLRs 上 CARD 结构域相互作用，MAVs 能够通过 EYA4、TRAF3、NAP1/SINTBAD、TBK1/IKKi 和 IRF3/7 介导激活下游 NF- κ B 的激活和 I 型干扰素的产生。(如图 1.1 所示)。

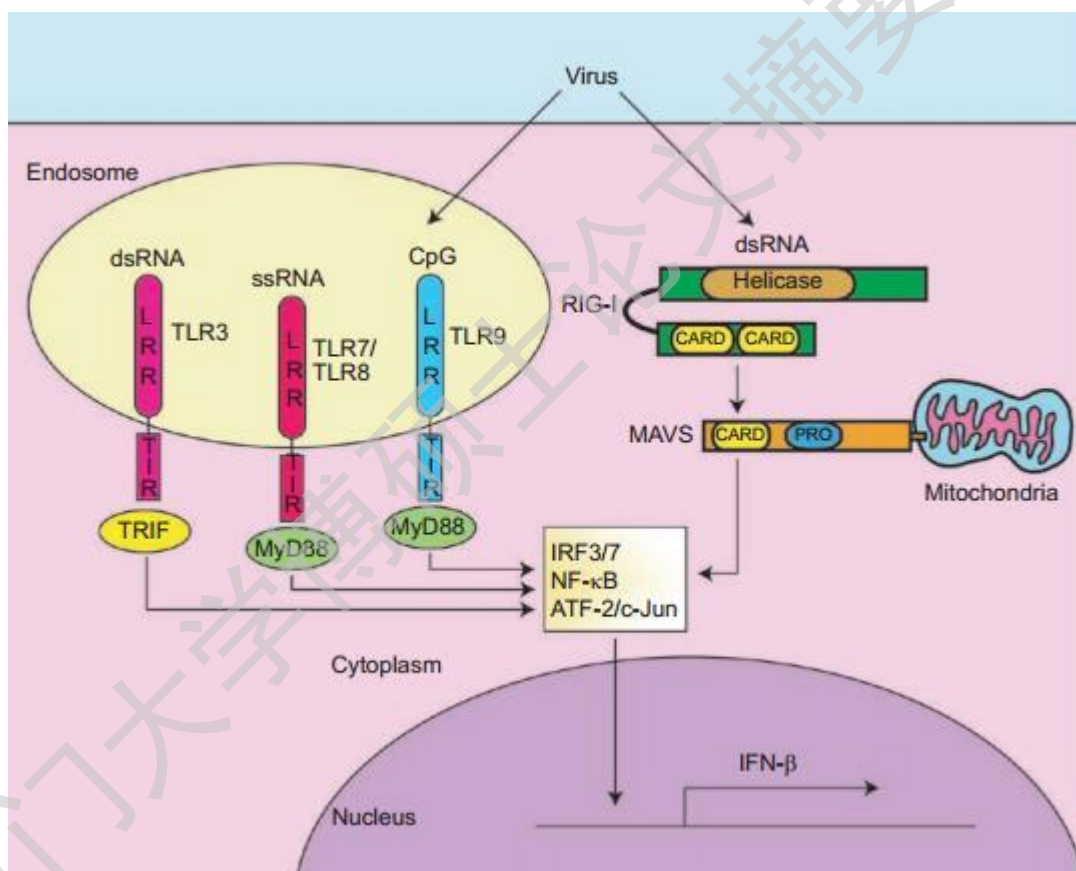


图 1.1 天然免疫抗病毒 TLR 和 RIG-I 两条信号通路

Figure 1.1 TLR and RIG-I – two antiviral innate immunity pathways^[21]

现在已经报道过的胞质 DNA 受体主要有：DAI (DNA dependent activator of IFN-regulatory factors)、IFI16 (IFN-gamma-inducible protein 16)、DDX41 (DEAD box polypeptide 41) 和 cGAS (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase)。这些胞质受体均通过下游一个叫做干扰素基因激活子 (stimulator of interferon genes, STING) 的蛋白，也称为 MITA、ERIS 或者

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库