

# TP53BP2 基因真核表达载体的构建及在人胚肾 Expi293F 细胞中蛋白表达、纯化及活性鉴定

李全维, 高明慧, 寇卜心, 柴梦音, 石英, 刘晓霓

(北京肝病研究所 / 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069)

**摘要:** 目的 构建人肿瘤抑制因子 p53 结合蛋白 2 (tumor suppressor p53-binding protein 2, TP53BP2) 的重组真核表达载体, 转染人胚肾 Expi293F 细胞, 获得高纯度的重组人全长 TP53BP2 蛋白并对其进行生物学活性鉴定。方法 利用 UniProt 网站查询 TP53BP2 基因序列, 并进行 Expi293F 表达系统序列优化, 通过同源重组连接至 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP 载体并进行双酶切和测序鉴定, 通过转染试剂聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 将 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 质粒瞬时转染至 Expi293F 细胞, 荧光显微镜观察转染效率, 收集实验组及对照组细胞, 利用免疫印记试验 (Western blot, WB) 检测 TP53BP2 重组蛋白表达水平。通过 His 标签纯化试剂盒及 Superdex 200 10/300GL 层析柱进行蛋白纯化, 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 对纯化后重组蛋白进行鉴定。利用免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 检测重组人全长 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白结合情况。利用免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测重组人全长 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白共定位。利用表面等离子体共振 (surface-plasmon resonance, SPR) 技术, 检测纯化后的重组人全长 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体的相互作用。结果 经测序和双酶切鉴定, 重组质粒 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 构建成功。经荧光显微镜观察结果显示转染效率约为 60%, WB 结果表明 TP53BP2 蛋白在 Expi293F 细胞中过表达, 证明转染成功。SDS-PAGE 结果表明纯化后重组蛋白纯度在 90% 以上, 证明纯化成功。Co-IP 结果表明, TP53BP2 重组蛋白可与 p65 蛋白相互作用。IF 结果表明, His 标签蛋白、TP53BP2 蛋白及 p65 蛋白存在共定位, 表明三者之间存在相互作用。SPR 结果表明, 纯化的重组人 TP53BP 蛋白与 TP53BP2 抗体具有较好的结合活性。以上结果均证明重组人全长 TP53BP2 蛋白具有生物学活性。结论 成功构建了 TP53BP2 基因真核表达载体并在人胚肾 Expi293F 细胞中成功表达出具有生物学活性的重组人全长 TP53BP2 蛋白, 为进一步研究 TP53BP2 的结构和功能奠定了基础。

**关键词:** 肿瘤抑制因子 p53 结合蛋白 2; 人全长肿瘤抑制因子 P53 结合蛋白 2 真核表达; 人胚肾细胞 Expi293; 瞬时转染; 蛋白纯化; 活性鉴定

中图分类号: Q786; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 06-011-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.002

## Construction of Eukaryotic Expression Vector of TP53BP2 Gene and Its Expression, Purification and Activity Identification in Human Embryonic Kidney Expi293F Cells

LI Quanwei, GAO Minghui, KOU Puxin, CHAI Mengyin, SHI Ying, LIU Xiaoni (*Beijing Institute of Hepatology/Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China*)

**Abstract: Objective** To construct a recombinant eukaryotic expression vector of human tumor suppressor p53-binding protein 2 (TP53BP2) and transfect human embryonic kidney Expi293F cells. High-purity recombinant human full-length TP53BP2 protein was obtained and its biological activity was identified. **Methods** The TP53BP2 gene sequence was queried on the UniProt website, and the Expi293F expression system was optimized. The TP53BP2 gene was connected to pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP vector by homologous recombination, and identified by double enzyme digestion and sequencing. Transfect pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 plasmid into Expi293F cells of Polyethylenimine (PEI), observe the transfection efficiency with a fluorescence microscope, collected cells from the experiment group and control group. The expression level of TP53BP2 recombinant protein was detected by Western blot (WB). Protein was purified by His label purification kit and Superdex 200

**基金项目:** 北京市自然科学基金资助项目 (编号: 7192084); 首都卫生发展科研专项 (编号: 2020-2-1152); 北京市属医学研究所公益发展改革试点项目 (就医研 2021-10)。

**作者简介:** 李全维 (1994-), 男, 硕士, 在读研究生, 主要研究方向: 肝癌发生发展分子机制, E-mail: quanweili@mail.ccmu.edu.cn。

**通讯作者:** 刘晓霓 (1972-), 女, 博士, 研究员, 副教授, 主要研究方向: 肝癌发生发展分子机制, E-mail: liuxiaoni888@ccmu.edu.cn。

石英 (1976-), 女, 博士, 研究员, 副教授, 主要研究方向: 肝癌发生发展分子机制, E-mail: yingshi@ccmu.edu.cn。

10/300 GL chromatographic column. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified recombinant protein was identified by SDS-PAGE. Combining recombinant human full-length TP53BP2 protein with p65 protein was investigated for Co-immunoprecipitation (Co-IP) precipitation. Recombinant human full-length TP53BP2 protein was co-localized with p65 protein by Immunofluorescence (IF). The surface plasmon resonance (SPR) technique was used to detect the interaction between purified recombinant human full-length TP53BP2 protein and TP53BP2 antibody. **Results** The recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 was successfully constructed by sequencing and double digestion. The fluorescence microscopy results showed that the transfection efficiency was about 60%. WB showed that the TP53BP2 protein was overexpressed in Expi293F cells, which proved that transfection was successful. SDS-PAGE results showed that the purity of the purified recombinant protein was above 90%, which proved that the purification was successful. Co-IP results showed that the TP53BP2 could interact with p65 protein. The results of IF showed that His tag protein, TP53BP2 protein, and p65 protein were co-located, indicating the interaction between the three proteins. SPR results showed that the purified TP53BP2 recombinant protein had good binding activity with the TP53BP2 antibody. These results all prove that the recombinant human full-length TP53BP2 protein has biological activity. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of TP53BP2 gene was successfully constructed and the recombinant full-length human TP53BP2 protein with biological activity was successfully expressed in human embryonic kidney Expi293F cells. It lays a foundation for further study on the structure and function of TP53BP2.

**Keyword:** tumor suppressor p53-binding protein 2; human full-length TP53BP2 eukaryotic expression; human embryonic kidney cell Expi293F; transient transfection; protein purification; activity identification

肿瘤抑制因子 p53 结合蛋白 2 (tumor suppressor p53-binding protein 2, TP53BP2) 也称为 p53 凋亡刺激蛋白 2 (apoptosis stimulating protein 2 of p53, ASPP2), 是 ASPP 家族的第一个成员<sup>[1]</sup>。该家族包括 ASPP1, ASPP2 及 iASPP 三个成员。ASPP1 和 ASPP2 特异性刺激肿瘤抑制因子 p53 介导的凋亡反应, 而 iASPP 抑制 p53 介导的细胞凋亡<sup>[2]</sup>。许多研究表明 TP53BP2 以 p53 依赖和非依赖性的方式在肿瘤发生发展中发挥重要作用<sup>[3-9]</sup>。临床报道 TP53BP2 在多种肿瘤中表达显著下调, 与肿瘤的不良预后、低生存率有关<sup>[10-14]</sup>。前期研究曾利用原核细胞表达了 TP53BP2 N 端两个截短小片段<sup>[15]</sup>, 为 TP53BP2 蛋白与其他生物学活性分子相互作用提供了有效工具。为进一步研究 TP53BP2 体内外生物学功能, 本研究拟通过构建带 His 标签的 TP53BP2 真核表达载体, 并在人胚肾 Expi293F 细胞中表达, 以期获得可用于研究的全长重组人 TP53BP2 蛋白。

## 1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及细胞来源 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP 质粒及大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  (上海陶术生物科技有限公司); 人胚肾 Expi293F 细胞 (北京肝病研究所保存, 其亲代均来自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心)。

1.2 仪器与试剂 TS-100C 恒温摇床 (玛瑞特科技有限公司); BIOBASE 超净工作台 (山东博科集团); TD5 离心机 (卢湘仪离心机仪器有限公司); FormaSteri-Cycle<sup>TM</sup> CO<sub>2</sub> 培养箱 (赛默飞世尔科技公司, 美国); ÄKTA-Micro<sup>TM</sup> 色谱仪 (GE Healthcare, 美国); AKTA AVANT 25 蛋白纯化仪

(Cytiva, 美国); Biacore T200 (GE Healthcare, 美国); Leica TCS SP8 CARS 共聚焦显微镜 (Leica, 德国); PAGE 预制胶 (金斯瑞生物科技有限公司); Superdex-200 Increase 10/300 尺寸排阻层析柱 (GE Healthcare, 美国); Expi293<sup>TM</sup> Met (-) 表达培养液 (赛默飞世尔科技公司, 美国); His 标签纯化试剂盒 (百奥莱博科技有限公司); 无内毒素质粒小提中量试剂盒 (天根生化科技有限公司); Quickcut<sup>TM</sup> Hind III 和 Bpi I (赛默飞世尔科技公司, 美国); ClonExpress II One Step Cloning Kit (诺唯赞生物科技股份有限公司); CM5 Sensor Chip (Cytiva, 美国); His-Tag 抗体 [Cell Signaling Technology(CST), 美国]; 53BP2 Polyclonal antibody (武汉三鹰生物技术有限公司); NF- $\kappa$ B p65 抗体 [Cell Signaling Technology(CST), 美国]; Protein A+G Agarose(Fast Flow, for IP) (碧云天生物技术有限公司); CoraLite® Plus 488-conjugated His-Tag Monoclonal antibody (武汉三鹰生物技术有限公司); Anti-53BP2/ASPP2/BBP 抗体 (Abcam, 英国); 驴抗兔 IgG (Abcam, 英国); CY3 Conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG (博士德生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 人 TP53BP2 基因的获取: 从 UniProt 网站上查询 TP53BP2 基因序列, 进行 Expi293F 细胞表达系统序列优化, 在 TP53BP2 片段的 N 端加入 His 标签和 KOZAK 序列, 重组基因序列交由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3.2 重组人 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 真核表达载体的构建与鉴定: 利用上游的同源臂:

5'-CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT-3' 和下游同源臂: 5'-GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC-3', 将人 TP53BP2 基因与 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP 质粒通过同源重组连接构成重组克隆载体, 构建策略见图1。转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态, 经过氨苄抗生

素筛选, 获得阳性克隆后, 用无菌牙签挑取单菌落接种于 LB 培养液 (含 50  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 200r/min 培养过夜。提取质粒, 对重组表达质粒进行双酶切 (Quickcut<sup>TM</sup> Hind III / Bpi I) 鉴定及序列测定, 鉴定正确的重组表达质粒命名为 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2。

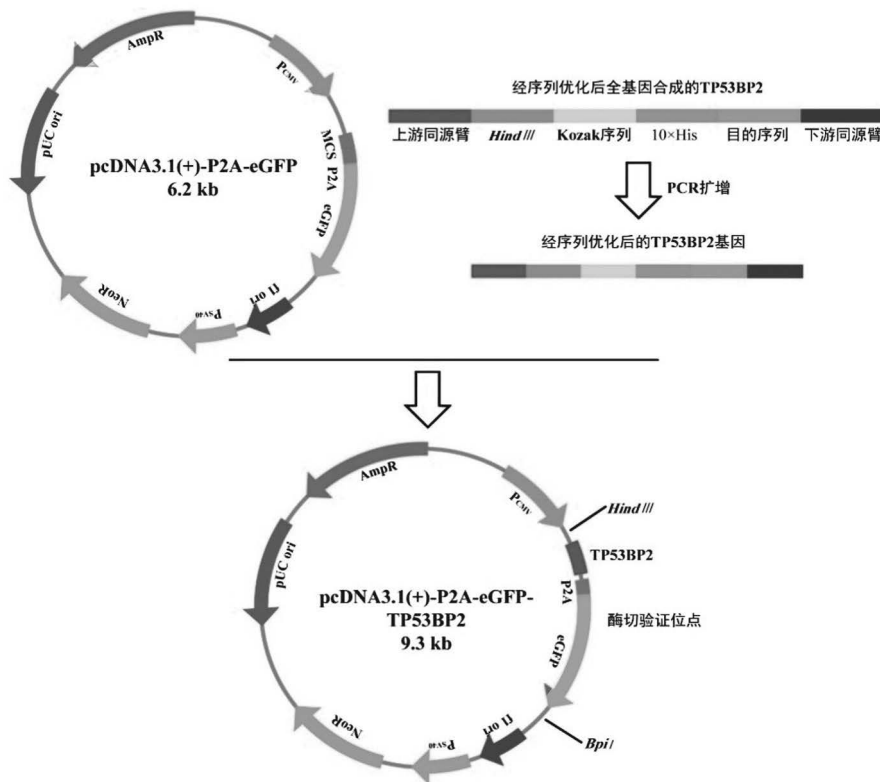


图1 重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 的构建策略

1.3.3 细胞培养与转染: Expi293F 细胞接种于含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%(v/v)CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。转染前一天, 将生长良好的 Expi293F 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞达到 80% ~ 90% 融合度时, 采用聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 常规转染方法将 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 重组真核表达质粒瞬时转染至 Expi293F 细胞 (作为实验组), 同时以转染 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP 空载质粒作为空白对照组。转染 48h 后, 在倒置荧光显微镜下观察 TP53BP2 的转染效率并拍照。收集转染后的细胞提取蛋白, 免疫印记试验 (Westernblot, WB) 检测 TP53BP2 蛋白表达情况。

1.3.4 重组人 TP53BP2 蛋白的表达与纯化: 采用 PEI 转染试剂转染, 将重组真核表达质粒转染至 Expi293F 细胞。每日取样镜检并用台盼蓝法计算细胞存活率, 待活细胞量下降至 60% 时, 收集细胞。使用超声破碎仪破碎细胞后, 使用 His 标签纯化试

剂盒进行蛋白纯化, 得到初步纯化的目标蛋白样品后, 将蛋白样品装载到 Superdex 200 10/300 GL 色谱柱进行进一步分离并收集蛋白。纯化后的蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测该重组蛋白的位置大小与纯度。

1.3.5 免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 检测重组人 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白的相互作用: 将人 TP53BP2 真核重组质粒转染 Expi293F 细胞后 (作为实验组), 转染 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP 空载质粒作为空白对照组, 收集转染后的细胞, 加入细胞裂解液冰上裂解 30min, 提取蛋白并进行蛋白定量后, 加入 His 标签免疫沉淀抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜孵育。之后加入免疫沉淀试剂 (Protein A+G Agarose), 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 3h, 离心收集沉淀, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗三次, 收集沉淀, 加入蛋白上样缓冲液, WB 检测 TP53BP2 与 p65 的表达。

1.3.6 免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测重

组人 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白的共定位：细胞爬片生长 24h 后，将人 TP53BP2 真核重组质粒转染至 Expi293F 细胞，转染 48h 后，吸掉培养液，PBS 洗三次。加入 4g/dl 多聚甲醛溶液固定 20min，PBS 洗三次。加入 1g/dl Triton X-100 溶液透化处理 15min，PBS 洗三次。加入 10 g/dl 山羊血清，室温封闭 1h。分别加入一抗（His 标签蛋白抗体；兔抗 p65 抗体；鼠抗 TP53BP2 抗体），4℃ 孵育过夜，次日用 PBS 洗三次。加入 Cy3 标记的山羊抗鼠 IgG 和驴抗兔 IgG，室温避光孵育 1h 后，PBS 洗三次。使用带 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染料的防淬灭剂进行封固，封片后使用徕卡激光共聚焦荧光显微镜进行图像采集分析。

1.3.7 表面等离子体共振（SPR）检测纯化的重组人全长 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体的相互作用：在 BIAcore T200 上使用 CM5 传感器芯片进行检测，用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺（EDC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）激活芯片。将 TP53BP2 蛋白用 pH5.0 的醋酸钠稀释，使用胺偶联试剂盒将蛋白固定在芯片的通道上，并生成偶联报告。用乙醇胺封闭通道，重复两次。作为参考的邻近通道同样被激活和封闭，区别是使用不含蛋白的醋酸钠缓冲液。TP53BP2 抗体在 96 孔板内稀释成若干浓度，通过芯片从低浓度到高浓度与 TP53BP2 蛋白偶联。每个浓度点流过后，用 10 mmol/L 甘氨酸盐酸盐（pH2.0）溶液使芯片再生，重复这一过程直到跑完所有的 TP53BP2 抗体对应浓度，最后使用 BIAcore T200 Control 软件（v.2.0, GE Healthcare）收集样本蛋白的数据，并将其减去

未固定 TP53BP2 蛋白参考通道的数据。通过使用 BIAcore T200 评估软件将数据全局拟合到 1:1 Langmuir 结合模型，计算解离常数。

## 2 结果

2.1 重组人 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 真核表达载体鉴定 重组表达质粒 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 的双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析，结果显示产物电泳位置与预期一致，见图 2。测序序列结果显示与设计序列一致，表明重组质粒构建成功，此质粒分子量理论值约为 125 KD。

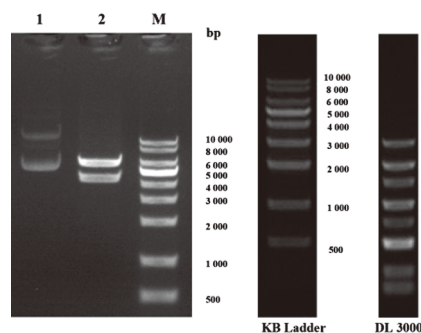
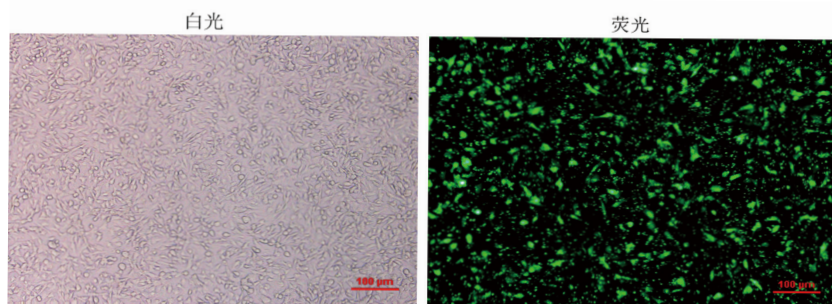


图 2 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 质粒双酶切验证 2.2 重组人 TP53BP2 蛋白过表达鉴定 Expi293F 细胞转染 TP53BP2 重组质粒 48h 后，经荧光显微镜观察转染效果，结果显示转染效率在 60% 左右，表明转染成功。WB 结果显示，与空白对照组相比，pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 在 Expi293F 细胞中过表达，表明此重组蛋白过表达成功，见图 3。



倒置荧光显微镜观察 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP-TP53BP2 质粒的转染效率（100 ×）

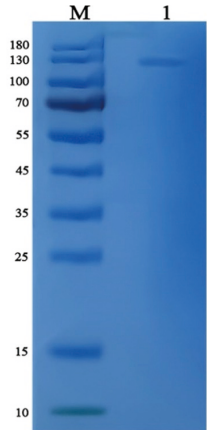
### 图 3 质粒转染 Expi293F 细胞验证

2.3 重组人 TP53BP2 蛋白的纯化鉴定 见图 4。纯化后的 TP53BP2 蛋白经 SDS-PAGE 检测，结果显示，TP53BP2 蛋白在 125kDa 左右呈均一的条带，表明纯化后的 TP53BP2 蛋白纯度在 90% 以上，证明纯化获得了目的蛋白。

2.4 重组人 TP53BP2 蛋白活性鉴定 见图 5。Expi293F 细胞转染 TP53BP2 真核重组质粒后，使

用 His 标签蛋白免疫沉淀（immunoprecipitation, IP）抗体进行免疫共沉淀。Input 组结果显示，均检测到了 TP53BP2 蛋白、p65 蛋白及 His 标签蛋白的条带，IP-IgG 组未显示条带，IP-His 组显示有 TP53BP2 蛋白、His 标签蛋白及 p65 蛋白的条带，表明 His 标签蛋白将 TP53BP2 蛋白沉淀下来，且 TP53BP2 蛋白和 p65 蛋白之间存在相互作用。已知

野生型 TP53BP2 蛋白可以与 p65 蛋白结合<sup>[1]</sup>, 证明 TP53BP2 蛋白具有生物学活性。



M: 蛋白 Marker; 1: TP53BP2 蛋白  
图 4 蛋白纯化鉴定

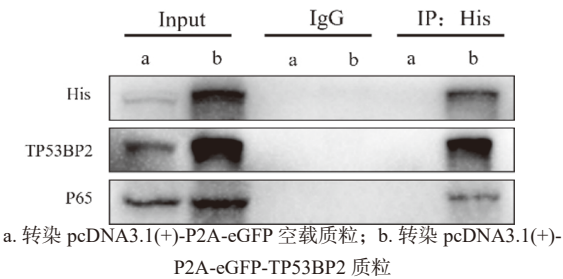
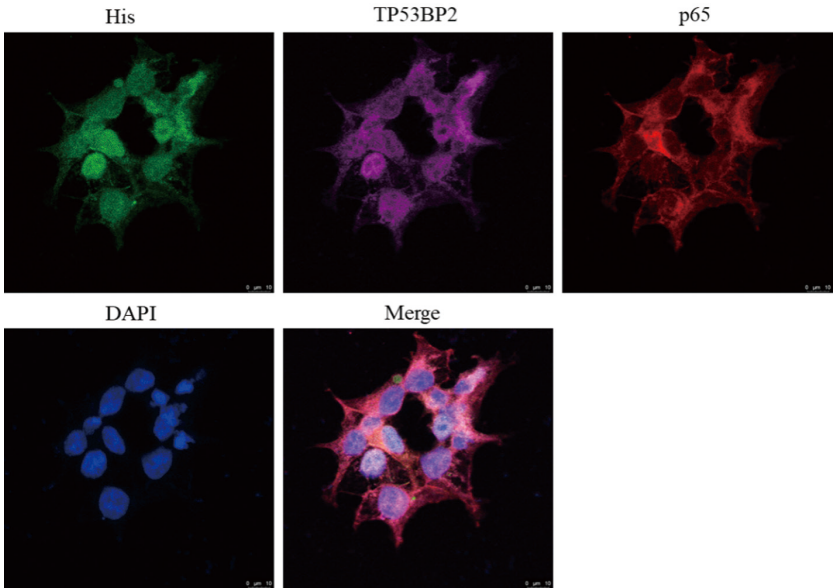


图 5 Co-IP 检测重组人 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白的结合活性

2.5 IF 检测重组人 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白共定位 见图 6。Expi293F 细胞转染 TP53BP2 重组质粒后, IF 结果显示, His 标签蛋白、p65 蛋白及 TP53BP2 蛋白存在共定位, 三者之间存在相互作用关系, 证明带有 His 标签蛋白的重组人 TP53BP2 蛋白具有较好生物学活性。



绿色: His 标签蛋白; 紫红色: TP53BP2 蛋白; 红色: p65 蛋白; 蓝色: DAPI, 标尺=10 μm。

图 6 IF 检测重组人 TP53BP2 蛋白与 p65 蛋白的共定位 (400×)

2.6 重组人 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体的亲和力检测 见图 7。经表面等离子体共振 (surface-plasmon resonance, SPR) 检测纯化后的重组人 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体的结合活性,

TP53BP2 抗体的动力学拟合的测定结果显示, 解离常数 KD 为 0.237 nmol/L。结果表明重组人 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体具有较好的亲和力, 证明其生物学活性较高。

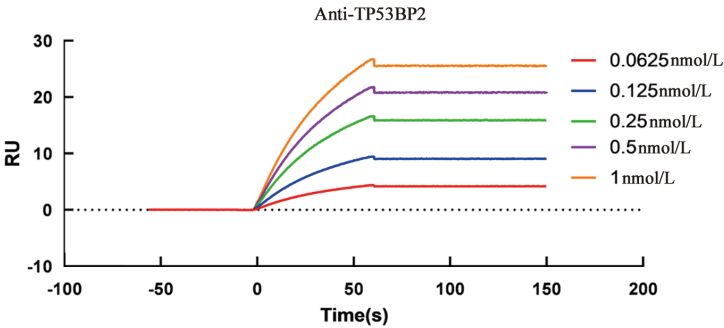


图 7 TP53BP2 蛋白与 TP53BP2 抗体相互作用传感图



### 3 讨论

TP53BP2是一个由1128个氨基酸编码的蛋白,其N端具有泛素样折叠结构(1~83 aa)、 $\alpha$ 螺旋结构(123~323 aa)及一个富含脯氨酸的(ASPP2 Pro)结构域(674~902aa),C端部分包含4个锚蛋白重复序列和一个SH3结构域(ASPP2 Ank-SH3)(919~1119 aa)<sup>[1]</sup>,TP53BP2的Ank-SH3结构域介导了与许多结合蛋白的相互作用,这些结合蛋白参与了许多细胞功能的调控。其中包括p53及其家族成员p63和p73<sup>[1]</sup>,PP1<sup>[16-17]</sup>,丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白<sup>[18]</sup>等。TP53BP2的N端也有一些结合蛋白,如与ROYER等<sup>[16]</sup>结合调节细胞衰老、自噬、凋亡及细胞极性等功能。此前已有研究利用原核表达系统进行TP53BP2截短小片段的表达或通过化学合成TP53BP2多肽<sup>[15,19]</sup>,以此进行TP53BP2蛋白与其他蛋白相互作用的研究,但未见有利用真核表达系统表达全长的TP53BP2蛋白,为探索更多TP53BP2蛋白的生物学功能及其相互作用蛋白,本研究拟构建全长重组人TP53BP2蛋白真核表达载体,并利用真核表达系统进行全长TP53BP2蛋白的纯化及其生物活性的鉴定。

获得有活性的全长TP53BP2蛋白是进一步研究其功能和蛋白相互作用机制的前提。本研究在TP53BP2片段的N端引入的His短肽是蛋白纯化常用的标签,His标签蛋白较小,不会影响目的蛋白质本身的结构和蛋白活性,且便于采用固化金属离子亲和层析,具有操作方便、纯化蛋白成本低等优点<sup>[20]</sup>。利用pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP为真核表达载体,通过同源重组方法构建His-TP53BP2真核表达重组质粒,使用真核动物细胞进行重组蛋白的表达,能够提供蛋白表达所需的内源性翻译后加工修饰,表达的蛋白质通常是正确折叠且具有功能的,相较于原核和酵母真核表达系统具有更高的翻译精度及活性<sup>[21-22]</sup>。

综上所述,本研究成功构建了重组人全长TP53BP2蛋白真核表达体系,经纯化鉴定,最终得到了有较好生物活性的重组人全长TP53BP2蛋白,其可以应用在以TP53BP2为靶点的药物筛选中,为后续以TP53BP2为靶点开发治疗恶性肿瘤的药物,探索蛋白与蛋白、蛋白与小分子药物相互作用等作用机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] HUO Yunfei, CAO Ke, KOU Buxin, et al. TP53BP2: roles in suppressing tumorigenesis and therapeutic opportunities[J]. *Genes Diseases*, 2023, 10(5): 1982-1993.
- [2] MILLER P, AKAMA-GARREN E H, OWEN R P, et al. p53 inhibitor iASPP is an unexpected suppressor of

- KRAS and inflammation-driven pancreatic cancer[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2023, 30(7): 1619-1635.
- [3] YANG Tongwang, ZHU Cunle, SHI Ying, et al. RDIVpSGP motif of ASPP2 binds to 14-3-3 and enhances ASPP2/k18/14-3-3 ternary complex formulation to promote BRAF/MEK/ERK signal inhibited cell proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2022, 29(11): 1616-1627.
- [4] LIANG Beibei, JIANG Yuan, SONG Shaohua, et al. ASPP2 suppresses tumour growth and stemness characteristics in HCC by inhibiting Warburg effect via WNT/ $\beta$ -catenin/HK2 axis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(5): 659-671.
- [5] XU Ping, SHI Honglin, JIAO Yan, et al. TP53BP2/ASPP2 inhibits autophagy of HepG2 cells by activating mTOR pathway in a p53-independent manner[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2019, 35(11): 986-991.
- [6] TSINTARI V, WALTER B, FEND F, et al. Alternative splicing of Apoptosis Stimulating Protein of TP53-2 (ASPP2) results in an oncogenic isoform promoting migration and therapy resistance in soft tissue sarcoma (STS)[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 725.
- [7] LIU Dian, ERTAY A, HILL C, et al. ASPP1 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in colorectal cancer[J]. *Cell death Disease*, 2020, 11(4): 224.
- [8] PANG Yi, PAN Lianhong, ZHANG Yonghui, et al. TP53BP2 decreases cell proliferation and induces autophagy in neuroblastoma cell lines[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(6): 4976-4984.
- [9] 张明珠,朱景怡,张智宇,等. 多功能蛋白ASPP2在肿瘤发生发展中的作用[J]. *生命科学*, 2024, 36(3): 353-359.
- ZHANG Mingzhu, ZHU Jingyi, ZHANG Zhiyu, et al. The role of multifunctional protein ASPP2 in tumorigenesis and development [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2024, 36(3): 353-359.
- [10] WU Tianqi, SONG Hongming, XIE Dan, et al. Silencing of ASPP2 promotes the proliferation, migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via the PI3K/AKT pathway[J]. *International Journal of Oncology*, 2018, 52(6): 2001-2010.
- [11] PATEL K D, BARASIYA Y V, PATEL J B, et al. Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP) 1 and ASPP2 m-RNA expression in oral cancer [J]. *Archives of Oral Biology*, 2020, 119: 104920.
- [12] JIANG Feiyun, BIAN Ganxia, LI Jiehua. ASPP2 promotes cell apoptosis in cervical cancer through inhibiting autophagy [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2022, 24(6): 726.
- [13] KONNO T, KOHNO T, OKADA T, et al. ASPP2 suppression promotes malignancy via LSR and YAP in human endometrial cancer[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2020, 154(2): 197-213.
- [14] YANG Tongwang, GAO Yuxue, LIU Daojie, et al. ASPP2 enhances chemotherapeutic sensitivity

- through the down-regulation of XIAP expression in a p53 Independent manner in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(3): 769-774.
- [15] 南萍, 李秉超, 柳雅立, 等. 谷胱甘肽-S-转移酶-ASPP2融合蛋白的原核表达及纯化[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(11): 65-68.  
NAN Ping, LI Bingchao, LIU Yali, et al. Prokaryotic expression and purification of GST-ASPP2 fusion proteins [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, 40(11): 65-68.
- [16] ROYER C, SANDHAM E, SLEE E, et al. ASPP2 maintains the integrity of mechanically stressed pseudostratified epithelia during morphogenesis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 941.
- [17] BERTRAN M T, MOUILLERON S, ZHOU Yanxiang, et al. ASPP proteins discriminate between PP1 catalytic subunits through their SH3 domain and the PP1 C-tail[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 771.
- [18] SMIRNOV A, MAGRI A, LOTZ R, et al. ASPP2 binds to hepatitis C virus NS5A protein via an SH3 domain/PxxP motif-mediated interaction and potentiates infection [J]. *Journal of General Virology*, 2023, 104: 001895.
- [19] KATZ C, BENYAMINI H, ROTEM S, et al. Molecular basis of the interaction between the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and the proapoptotic protein ASPP2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2008, 105(34): 12277-12282.
- [20] MISHRA V. Affinity Tags for protein purification[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2020, 21(8): 821-830.
- [21] 徐杨, 杜惠芬, 李克生, 等. 再生基因4(REG4)真核表达载体的构建及其蛋白在HEK 293T细胞中的表达、纯化[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(4): 35-38.  
XU Yang, DU Huifen, LI Kesheng, et al. Construction of eukaryotic expression vector of regenerating gene 4(REG4) and expression and purification of its protein in HEK 293T cells [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(4): 35-38.
- [22] KESIDIS A, DEPPING P, LODÉ A, et al. Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts [J]. *Methods*, 2020, 180: 3-18.
- 收稿日期: 2024-01-09  
修回日期: 2024-05-24
- (上接第10页)
- [57] 林果为, 王吉耀, 葛均波. 实用内科学[M]. 15版. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 320-324.  
LIN Guowei, WANG Jiyao, GE Junbo. *Practice of Internal Medicine*[M]. 15th ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2017: 320-324.
- [58] 冯文雅, 刘钢. 儿童巨细胞病毒感染诊治进展[J]. *传染病信息*, 2019, 32(3): 265-269.  
FENG Wenya, LIU Gang. Diagnosis and treatment progress of cytomegalovirus infection in childhood[J]. *Infectious Disease Information*, 2019, 32(3): 265-269.
- [59] WEN Le, QIU Yong, CHENG Shuang, et al. Serologic and viral genome prevalence of HSV, EBV and HCMV among healthy adults in Wuhan, China[J]. *Journal of Medical Virology*, 2018, 90(3): 571-581.
- [60] GESSAIN A, CASSAR O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 388.
- [61] IWANAGA M. Epidemiology of HTLV-1 Infection and ATL in Japan: an update [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1124.
- [62] 廖峭, 单振刚, 王敏, 等. 2016-2018年广州献血者HTLV流行概况及基因分型[J]. *中国输血杂志*, 2019, 32(2): 179-182.  
LIAO Qiao, SHAN Zhengang, WANG Min, et al. Epidemiology and genotyping of HTLV among voluntary blood donors in Guangzhou from 2016 to 2018[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2019, 32(2): 179-182.
- [63] 欧山海, 林洪铿, 徐冬峰, 等. 福建省无偿献血者HTLV-1/2感染情况研究[J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(6): 610-613.  
OU Shanhai, LIN Hongkeng, XU Dongfeng, et al. Seroprevalence of HTLV1/2 among voluntary blood donors in Fujian province, China[J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2020, 33(6): 610-613.
- [64] 黄如欣, 赵春红, 陈长荣. 厦门市无偿献血者HTLV感染率及1株病毒株膜基因分析[J]. *中国输血杂志*, 2002, 15(6): 381-384.  
HUANG Ruxin, ZHAO Chunhong, CHEN Changrong. The infection rate and envelop gene analysis of HTLV-I in the blood donors of Xiamen [J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2002, 15(6): 381-384.
- [65] ROSADAS C, TAYLOR G P. HTLV-1 and Co-infections[J]. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 2022, 9: 812016.
- [66] SCHACKMAN B R, LEFF JA, BARTER D M, et al. Cost-effectiveness of rapid hepatitis C virus (HCV) testing and simultaneous rapid HCV and HIV testing in substance abuse treatment programs[J]. *Addiction (Abingdon England)*. 2015, 110(1): 129-143.
- [67] LINAS B P, WONG A Y, SCHACKMAN B R, et al. Cost-effective screening for acute hepatitis C virus infection in HIV-infected men who have sex with men[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 55(2): 279-290.
- [68] MARTIN N K, HICKMAN M, MINERS A, et al. Cost-effectiveness of HCV case-finding for People who inject drugs via dried blood spot testing in specialist addiction services and prisons[J]. *BMJ Open*, 2013, 3(8): e003153.
- [69] CANDOTTI D, GRABARCZYK P, GHIAZZA P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains[J]. *Journal of Hepatology*, 2008, 49(4): 537-547.  
收稿日期: 2024-10-18  
修回日期: 2024-10-30