论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0876-03

# 用T7噬菌体展示技术筛选HCV核心蛋白的相互作用蛋白

黄 英[1],蔡雪飞[2],张 君[2],黄爱龙[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院感染科;[2]感染性疾病分子生物学教育部省部共建重点实验室,重庆 400016)

**提 要:目的** 用T7噬菌体筛选系统筛选HCV核心蛋白的相互作用蛋白。**方法** 应用T7噬菌体展示技术,以通过原核表达的方式得到HCV的核心蛋白作为靶分子,对噬菌体人肝细胞cDNA文库进行筛选,对筛选到的克隆进行DNA序列分析及同源性搜索。**结果** 经鉴定得到1个阳性克隆,确定了能与HCV核心蛋白相互作用的蛋白为:Smad interacting-protein 1(SIP1)。**结论** T7噬菌体展示筛选系统是筛选相互作用蛋白的一种简单、快速和有效的手段,筛选到的相互作用蛋白为进一步探讨核心蛋白的致病、致癌机制提供重要依据。

**关键词:** T7噬菌体展示技术;HCV核心蛋白;相互作用蛋白

**中图法分类号:** R341;R373.21;R394-33 **文献标识码:** A

# Screening of proteins interacting with hepatitis C virus core protein from T7-phage display library

HUANG Ying[1], CAI Xue-fei[2], ZHANG Jun[2], HUANG Ai-long[2] ([1]Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital, [2]Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To screen and identify proteins that interact with the hepatitis C virus core protein by means of T7-phage display system. **Methods** The hepatitis C virus core protein was expressed by prokaryotic expression and used as selected molecule to biopan the T7 human liver cDNA library. The selected positive clones were identified by DNA sequence and analyzed with BLAST program in GenBank. **Results** After BLAST in all positive clones, one protein--Smad interacting protein 1 (SIP1) was found to interact with the hepatitis C virus core protein. **Conclusion** T7-phage display system is a convenient, rapid and effective method for screening interacting proteins.

**Key words:** T7-phage display; hepatitis C virus core protein; interacting proteins

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的慢性感染是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生的主要危险因素之一。核心蛋白作为HCV的一种结构蛋白,除具有组装病毒颗粒的功能外,其与细胞蛋白结合形成的不同的复合物,参与HCV感染的致病过程、HCV感染的慢性化、HCV感染的宿主细胞的信号转导,并且可以略过某些致癌的中间步骤而直接导致肝细胞癌的发生[1]。目前鉴定的与HCV核心蛋白相互作用的蛋白有多种,部分解释了HCV为什么对人体的作用如此多样,所引起的病生改变如此广泛。因此,进一步研究HCV结合蛋白将会为深入探讨HCV的生物学作用和发病机制提供新的线索为抗HCV感染的预防和治疗提供新的靶位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株和质粒:受体菌BLT5615(Novagen公司),质粒HFL(含HCV全长DNA片段)由本实验室保存。

试剂:T7select人肝细胞cDNA文库(Novagen公司),内切酶*Bam*H Ⅰ, *Hind* Ⅲ, λ-EcoT14 digest ,100 bp DNA Marker, DL 2 000 Marker(宝生物公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 融合蛋白的表达 以GenBank数据库提供的HCV核心蛋白(C22-3)基因的核苷酸序列设计一对包含限制性内切酶*Bam*H Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶切位点的引物:上游引物:5′-GCGGATC-

基金项目:国家自然科学基金(30500427)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500427)

作者简介:黄 英(1973-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事HBV分子生物学方面的研究,电话:13072376208,E-mail:cqhangying@163.com

通讯作者:黄爱龙,电话:13508312469,E-mail:ahuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2006-09-20;修回日期:2006-11-21

CAGCACGAATCCT-3′,下游引物:5′-GCAAGCTTACCCAAATT-GCG-3′。以质粒 HFL 为模板,通过 PCR 扩增得到 C22-3 基因片段,用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 进行双酶切后再与同样经过双酶切的原核表达载体 pET32a 连接。将连接产物转化感受态克隆菌 JM109 得到 pET32a-C22-3 重组质粒,经酶切及测序鉴定后用此重组质粒转化感受态表达菌 BL21($DE_3$),转化产物涂布于含 Ampr(100 μg/ml)的 LB 固体培养基,37 ℃过夜培养。挑选单个菌落于 2 ml 含 Ampr(100 μg/ml)的 LB 液体培养基中,37 ℃的条件下摇床上培养(300 r/min)直至 $D$(600)值≈0.6。在培养的菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 22 ℃ 条件下,摇床上培养(300 r/min)12 ~ 16 h,收集菌体。

1.2.2　融合蛋白的纯化　　取重组表达菌 BL21($DE_3$)超声破碎后上清液与 Ni-NTA 树脂充分混匀,冰浴 1 h,将悬液转入层析柱内,让液体自然流下,收集穿透液。收集的蛋白质在 -20 ℃保存。

1.2.3　C22-3 相互作用蛋白的筛选

1.2.3.1　文库扩增　　挑取 BLT5615 新鲜单克隆在 3 ml LB/Amp 内振摇,37 ℃过夜。将 30 μl 振摇细菌加入 3 ml LB/Amp 内振摇至 $D$(600)值 0.5 ~ 1.0,加入30 μl IPTG,再振摇 30 min 后加入噬菌体文库 4 μl,振摇 1 ~ 3 h 直到细菌裂解。收集裂解液。以 100 μl 含 3% BSA 的 TBS 包被微孔板,置湿盒中37 ℃封闭 2 h;弃封闭液,1 × TBST 洗涤 3 遍,将裂解液 100 μl 加入酶标板微孔内,于湿盒中 37 ℃ 封闭 2 h,吸出孔内液,并用 100 μl TBS 清洗微孔 1 次,合并吸出的孔内液和清洗液为预筛选液。

1.2.3.2　生物筛选　　将 C22-3 以 TBS 稀释为 10 μg/ml,取 100 μl 包被微孔板,4 ℃过夜;1 × TBST(含 0.5% Tween20)洗涤 3 遍,加入 100 μl 含 3% BSA 的 TBS,置湿盒中 37 ℃ 封闭 2 h;弃封闭液,1 × TBST 洗涤 3 遍,加入 100 μl 预筛选液,4 ℃过夜;弃孔内液,1 × TBS 洗涤 3 遍,加入 100 μl BLT5615 大肠杆菌菌液[$D$(600)值 0.5 ~ 1.0],于 37 ℃孵育 2 h,吸出感染有噬菌体的菌液,加入到 2 ml BLT5615 大肠杆菌菌液[$D$(600)值 0.5 ~ 1.0],37 ℃振摇直到细菌裂解,收集裂解液 4 ℃保存备下一轮筛选用。将第 1 轮筛选后的噬菌体裂解液 100 μl 加入预先包被 C22-3 的微孔板,于 37 ℃孵育 2 h,弃孔内液,1 × TBST(0.5% Tween20)洗板 5 次,在加入 100 μl BLT5615 大肠杆菌菌液,37 ℃孵育 2 h,吸出感染有噬菌体的菌液,按上述方法得到第 2 轮噬菌体裂解液。按第 2 轮筛选方法再筛选 1 轮。每轮筛选后,均做噬斑分析。

1.2.4　竞争性洗脱特异性结合的噬菌体　　将每轮筛选后的噬菌体液都以 TBS 稀释为 $1 \times 10^9$ pfu/ml,取 100 μl 分别加入预先包被 C22-3 和 BSA 酶标板微孔内,于 37 ℃孵育 2 h,弃孔内液,1 × TBST(0.5% Tween20)洗板 5 次,加入 100 μl 20 μg/ml 的 C22-3,于室温平缓摇动 5 h,吸出孔内液,用 1 × TBST(0.5% Tween20)洗板 1 次,合并吸出的孔内液和清洗液,对合并后的液体进行噬菌体滴度分析。

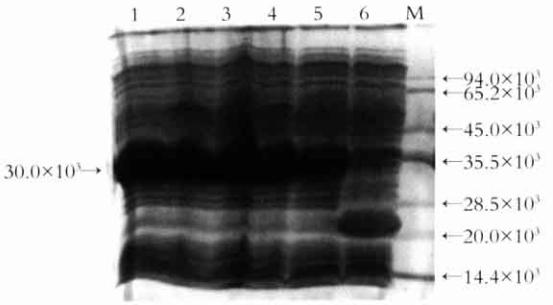
1.2.5　噬斑的 PCR 扩增　　挑取第 3 轮筛选后的阳性噬斑,进行噬菌体裂解,提取噬菌体基因组后进行 PCR 扩增,上游引物:5′-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3′;下游引物:5′-AACCCCT-CAAGACCCGTTTA-3′。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.2.6　DNA 序列测定及同源性搜索　　将 PCR 产物进行 DNA 序列测定(本实验室完成),利用 DNAMAN 生物软件和 NCBI 生物信息学资源对序列进行分析。

## 2　结果

### 2.1　融合蛋白的表达

经 IPTG 诱导后的重组表达菌 BL21($DE_3$)菌液超声破碎,8 000 r/min,5 mim,4 ℃离心,取上清用蛋白电泳检测呈现出特异性扩增条带,大小约为 $30 \times 10^3$,与预期值相符。见图 1。

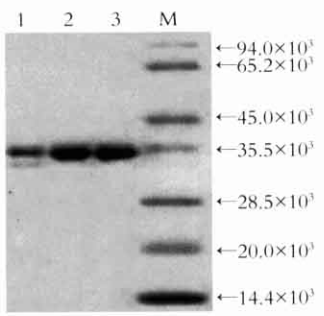



1 -5:阳性菌株;6:pET32a 空载体;M:标准

**图 1　融合蛋白的表达**

### 2.2　融合蛋白的纯化

通过 Ni-NTA 树脂蛋白纯化系统对 C22-3 进行亲和层析纯化后,纯化产物在电泳图上呈一条带,见图 2,经扫描分析 C22-3 纯度高达 90%,可以满足亲和筛选的要求,避免了杂蛋白对亲和筛选的干扰。




1 -3:纯化的 C22-3;M:标准

**图 2　C22-3 的纯化结果**

### 2.3　结合噬菌体滴度测定

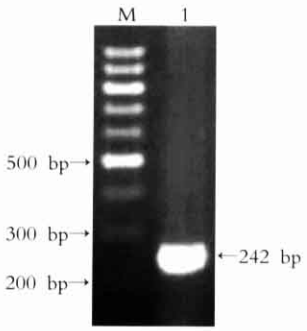
在筛选前和每轮筛选后,分别测定从阳性对照孔(包被 C22-3 微孔)中竞争性洗脱下的噬菌体滴度(P)和阴性对照孔(包被 BSA 微孔)洗脱下的噬菌体滴度(N),以 P/ N 评价筛选后与 C22-3 结合的噬菌体的富集程度。见表 1。表中结果显示,随着筛选次数增多,P/N 值较筛选前明显增加,表明每一轮筛选后与 C22-3 特异性结合的噬菌体得到明显富集。

表1 C22-3特异性结合的噬菌体滴度测定

| | 筛选前 | 第1轮筛选 | 第2轮筛选 | 第3轮筛选 |
|---|---|---|---|---|
| 投入量 | $1\times10^9$ | $1\times10^9$ | $1\times10^9$ | $1\times10^9$ |
| P | $1\times10^2$ | $6\times10^2$ | $4\times10^2$ | $15\times10^2$ |
| N | $1\times10^2$ | $3\times10^2$ | $1\times10^2$ | $2\times10^2$ |
| 富集指数 P/N | 1 | 2 | 4 | 7.5 |

### 2.4 目的基因的PCR扩增,序列比对和同源性分析

经过3轮生物筛选,通过PCR对cDNA插入片段进行扩增之后作T克隆经测序后来鉴定噬菌体重组子的基因型,结果显示得到两个不同大小的片段,其大小分别为158 bp和242 bp,我们将得到的两个片段在NCBI的EST数据库中进行同源性比较,确定158 bp片段为一载体序列,而242 bp的片段获得一个同源性很高的EST结果:人的Smad interacting protein 1(SIP1),同源性为90%,见图3。




M:标准;1:PCR结果

**图3 PCR扩增电泳图**

## 3 讨论

噬菌体展示技术作为一种筛选相互作用蛋白的有力工具,已成功筛选出多种蛋白质,如抗原[2]、RNA结合蛋白[3]、受体[4]、传导途径中的相互作用蛋白[5]等。本研究利用T7噬菌体展示技术从人肝细胞cDNA文库中筛选HCV核心蛋白(C22-3)相互作用蛋白。在筛选过程中,我们尝试用含3% BSA的TBS封闭预先包被有C22-3的微孔板,可以避免噬菌体与微孔板的塑料表面发生非特异性结合。而为了避免筛选出的克隆是和BSA结合的蛋白或多肽,我们采用了预筛选的策略,即先将文库裂解液加入包被BSA的微孔,使与BSA结合的噬菌体被吸附在微孔板上,收集未结合的噬菌体来进行筛选,从而提高了筛选的专一性。

筛选到的蛋白质SIP1是一个可以和Smad相互作用的具有多个锌指结构的蛋白质,全长的SIP1能够抑制E-钙黏素的表达[6,7]。钙黏素(cadherin)家族是一类依赖钙的跨膜单链糖蛋白,通过不同的连接蛋白与不同的细胞骨架成分相连,如E-钙黏素通过α-、β-、γ-连锁以及黏着斑蛋白、锚蛋白、α辅肌动蛋白等与肌动蛋白纤维相连,从而介导细胞间的黏附反应,参与构建细胞间黏合连接,抑制细胞迁移。很多癌组织细胞表面的E-钙黏素减少或消失,以致癌细胞易从瘤块脱落,成为侵袭和转移的前提。因而有人将E-钙黏素视为转移抑制因子。已有研究提示E-钙黏素与肝癌的肝内播散有关[8]。E-钙黏素在肝癌组织中同样较少表达,即使有表达亦多为残缺不全的膜表达;其表达量在高危组中显著低于低危组,提示与肝癌的侵袭转移倾向密切相关;同时还提示,E-钙黏素的表达与HCC的包膜是否完整,癌细胞分化程度高低密切相关。因此认为E-钙粘素的表达缺失与HCC的侵袭转移密切相关。并参与肝癌细胞的分化调节,影响患者的预后[9]。许多研究表明HCV核心蛋白与HBV的X蛋白有诸多类似之处,与肝细胞癌的发生密不可分。HCV核心蛋白有可能与SIP1结合之后,通过SIP1抑制E-钙粘素的表达,从而促进细胞的恶性转化。如果上述假设能获得证实,对进一步了解HCV核心蛋白在肝细胞癌发生中的作用具有重要的意义。

## 参考文献:

[1] Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, *et al*. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis [J]. Oncology, 2002, 62(Suppl 1): 29-37.

[2] Hansen M H, Ostenstad B, Sioud M. Identification of immunogenic antigens using a phage-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumour[J]. Int J Oncol, 2001, 19(6): 1303-1309.

[3] Danner S, Belasco J G. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries[J]. Proc Natl Acad U S A, 2001, 98(23): 12954-12959.

[4] Wojnar P, Lechner M, Merschak P, *et al*. Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display[J]. J Biol Chem, 2001, 276(23): 20206-20212.

[5] Zozulya S, Lioubin M, Hill R J, *et al*. Mapping signal transduction pathways by phage display[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(12): 1193-1198.

[6] Comijn J, Berx G, Vermassen P, *et al*. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion [J]. Mol Cell, 2001, 7(6): 1267-1278.

[7] Van-Grunsven L A, Michiels C, Van-De-Putte T, *et al*. Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin[J]. J Biol Chem, 2003, 278(28): 26135-26145.

[8] Osada T, Sakamoto M, Ino Y, *et al*. E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1996, 24(6): 1460-1467.

[9] 朱争艳,杜 智,王毅军,等. 原发性肝癌钙粘素E和基质金属蛋白酶检测及临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(7): 839-840.

(编辑 薛国文)