维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0340-04

用 T7 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用蛋白

黄 英[1],张 君[2],何茂锐[2],陈维贤[2],黄爱龙[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院感染科, 重庆 400010;
2.重庆医科大学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)

【摘 要】目的:用 T7 噬菌体筛选系统筛选乙型肝炎病毒 PreS1 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的乙型肝炎病毒 PreS1 作为靶分子,对噬菌体人肝细胞 cDNA 文库进行生物筛选,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,确定了能与乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用的蛋白可能为:细胞色素 C 氧化酶 1(Cytochrome c Oxidase Subunit I,COX1)。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 PreS1 的致病机制提供重要依据。

【关键词】T7 噬菌体展示技术;乙型肝炎病毒 PreS1;相互作用蛋白
【中国图书分类法分类号】R512.6+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-18

Screening of proteins interacting with the Hepatitis B Virus PreS1 protein from T7-Phage display library

HUANG Ying, et al

(*Department of Infection Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To screen and identify proteins that interact with the hepatitis B virus PreS1 protein by means of T7-phage display system. *Method*: Hepatitis B virus PreS1 protein was expressed by prokaryotic expression and used as selected molecule to biopan the T7 select human liver cDNA library, the selected positive clones were identified by DNA sequence and analyzed with BLAST program in GenBank. *Result*: After BLAST in all positive clones, one protein: Cytochrome c Oxidase Subunit I (COX1) was found to interact with the hepatitis B virus PreS1 protein. *Conclusion*: T7-phage display system is a convenient, rapid and effective method for screening interacting proteins. This results will provide important evidences for studying the pathogenesis and mechanism of HBV.

【Key words】T7-phage display; Hepatitis B virus PreS1 protein; Interacting proteins

乙型肝炎病毒(HBV)的感染是一个非常严重的全球性健康问题。HBV 感染引起的慢性肝病导致全世界每年有 50~120 万患者死亡[1]。而慢性乙肝至今仍缺乏有效的治疗手段和解决方案,临床常用的抗病毒药物疗效有限,不能有效阻断 HBV 在肝组织内的复制和再感染。而 HBV 与肝细胞之间相互作用分子机制的研究进展相对滞后是严重影响新型治疗方法和药物研发的重要原因之一。乙型肝炎病毒的前 S1 蛋白(PreS1)是其外膜蛋白(HBsAg)的重要组成部分,已有研究表明 PreS1 不仅仅在介导 HBV 进入肝脏细胞过程中起重要作用,而且对肝细胞具有广泛的生物学意义[2-4]。但目前对于这种重要的蛋白的作用机制知之甚少,如果能找到与 PreS1 发生相互作用的蛋白以及 PreS1 的受体,进而揭示 PreS1 所激活的信号传导通路,这将有助于我们进一步弄清 PreS1 在 HBV 感染和致病过程中的生物学作用,从而促进 PreS1 在乙型肝炎诊断和治疗中的应用。

我们成功构建了能与 GST 融合表达的含 PreS1 基因片段的原核表达质粒,并将其转化大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了高效表达,同时利用 Novagen 公司构建的 T7 噬菌体为载体的 cDNA 文库展示系统使我们可以通过固相化的 PreS1 对文库进行多轮亲和筛选,从而快速、高效地从文库中选择性地富集到与 PreS1 相互作用的重组克隆,并获得特异性

作者介绍:黄 英(1973-),女,主治医师,博士,主要研究方向:蛋白质的相互作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500427)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

重组克隆所携带的 PreS1 相互作用蛋白的编码序列信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 pGEM-Teasy (Promega 公司), 受体菌 BLT5615(Novagen 公司),含双拷贝乙肝病毒 adw2 亚型基因全序列的质粒 pEcob6 由本研究所保存。原核表达载体质粒 pGST-MOLUC 由芝加哥大学何通川助理教授馈赠。

1.1.2 试剂 T7select 人肝细胞 cDNA 文库 (Novagen 公司), Pyrobest DNA 聚合酶,T4DNA 连接酶(Promega 公司),内切酶 XbaⅠ,*Hind* Ⅲ,λ-EcoT14 digest,100bp DNA Marker(宝生物公司)。

1.2 方 法

1.2.1 融合蛋白的表达 以 Genebank 数据库提供的 HBV adw2 亚型 PreS1 基因的核苷酸序列设计一对包含限制性内切酶 XbaⅠ和 *Hind* Ⅲ酶切位点的引物: 上游引物:5'-ATGAAGCTTAATGGGAGGTTGGTCATC-3', 下游引物:5'-ATCTCTAGAGGCCTGAGGATGACT-3'。以质粒 pEcob6 为模板,通过 PCR 扩增得到 HBV PreS1 基因片段,用限制性内切酶 XbaⅠ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 pGST-MOLUC 连接。将连接产物转化感受态克隆菌 JM109 得到 pGST-PreS1 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(DE3),转化产物涂布于含 Ampr(100μg/ml)的 LB 固体培养基,37℃过夜培养。挑选单个菌落于 2ml 含 Ampr(100μg/ml)的 LB 液体培养基中,37℃的条件下摇床上培养 (300r/min) 直至 OD 值≈0.6。在培养的菌液中加入终浓度为 1mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG), 在 37℃条件下, 摇床上培养 (300r/min)6h,收集菌体。

1.2.2 融合蛋白的纯化 用 20mlPBS 重悬收集的菌体沉淀,加苯甲基磺酰氟 (PMSF,17.4mg/ml)20μl, 终浓度为 (0.1mmol/L),先用溶菌酶处理,冰上放置 30min。超声破碎 10min(相关参数为:功率 235W,其中超声破碎 5s,间隔 5s)。轻轻颠倒盛有谷胱甘肽—琼脂糖树脂的容器,将树脂混成匀浆, 每 20ml 细胞破碎液加入 400μl 匀浆;4℃,500g×5min 离心, 去上清; 加入 1ml 预冷的 PBS 颠倒混匀,4℃,500g×5min 离心,去上清;重复洗涤 2~3 次;加入 200μl 洗脱液,室温孵育 10min,重复 2~3 次,收集洗脱液;取收集的洗脱液 5μl 加蛋白上样缓冲液,SDS-PAGE 鉴定蛋白纯化情况。

1.2.3HBV PreS1 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 3mlLB/Amp 内振摇,37℃过夜。将 30μl 振摇细菌加入 3mlLB/Amp 内振摇至 OD600 值 0.5~1.0,加入 30μl IPTG,再振摇 30min 后加入噬菌体文库 4μl,振摇 1~3h 直到细菌裂解。收集裂解液。以 100μl 含 3%BSA 的 TBS 包被微孔板, 置湿盒中 37℃封闭 2h;弃封闭液,1×TBST 洗涤 3 遍,将裂解液 100μl 加入酶标板微孔内, 于湿盒中 37℃封闭 2h, 吸出孔内液, 并用 100μlTBS 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 PreS1 以 TBS 稀释为 10μg/ml,取 100μl 包被微孔板,4℃过夜;1×TBST (含 0.5%Tween20)洗涤 3 遍,加入 100μl 含 3%BSA 的 TBS,置湿盒中 37℃封闭 2h;弃封闭液,1×TBST 洗涤 3 遍,加入 100μl 预筛选液,4℃过夜;弃孔内液,1×TBS 洗涤 3 遍,加入 100μl BLT5615 大肠杆菌菌液(OD600 值 0.5~1.0),于 37℃孵育 2h,吸出感染有噬菌体的菌液, 加入到 2ml BLT5615 大肠杆菌菌液 (OD600 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。将第一轮筛选后的噬菌体裂解液 100μl 加入预先包被 PreS1 的微孔板,于 37℃孵育 2h,弃孔内液,1×TBST (0.5%Tween20) 洗板 5 次, 在加入 100μl BLT5615 大肠杆菌菌液,37℃孵育 2h, 吸出感染有噬菌体的菌液,按上述方法得到第二轮噬菌体裂解液。按第二轮筛选方法再筛选 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 1×10^9pfu/ml,取 100μl 分别加入预先包被 GST-PreS1 和 GST 酶标板微孔内,于 37℃孵育 2h,弃孔内液,1×TBST (0.5%Tween20) 洗板 5 次, 加入 100μl 20μg/ml 的 PreS1,于室温平缓摇动 5h,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'-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.2.6 克隆载体的构建和鉴定 将纯化的噬菌体基因组 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落提取质粒并鉴定。

1.2.7DNA 序列测定及同源性搜索 将鉴定正确的质粒进行 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

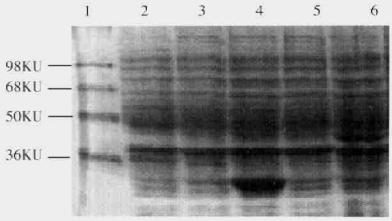
2.1 融合蛋白的表达

经 IPTG 诱导后的重组表达菌 BL21(DE3)菌液超声破碎,8000r/min,5mim,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 37ku 左右,与预期值相符。见图 1。

2.2 融合蛋白的纯化

融合蛋白分子中含有谷胱甘肽转移酶(GST),

维普资讯 http://www.cqvip.com



1.Protein Marker;
3.5.分别为 pGST-MOLUC、pGST -PreS1 未诱导的转化菌;
2.4.6. 分别为 BL21、pGST-MOLUC、pGST -PreS1 诱导后的转化菌

图 1 融合蛋白的表达

用谷胱甘肽-Sepharose-4B 亲和凝胶对表达产物进行了快速方便的纯化。结果表明,通过一步亲和纯化,从 400ml 培养液中可获得 20mg 左右的融合蛋白,纯度在 90%以上,这为以后的实验及开发应用打下了很好的基础。

2.3 结合噬菌体滴度测定

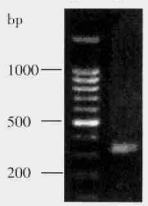
在筛选前和每轮筛选后,分别测定从阳性对照孔(包被 GST-PreS1 微孔)中竞争性洗脱下的噬菌体滴度(P)和阴性对照孔[包被 pGST-MOLUC(空质粒)表达产物微孔]洗脱下的噬菌体滴度(N),以 P/N 评价筛选后与 PreS1 结合的噬菌体的富集程度。见表 1。表中结果显示,随着筛选次数增多,P/N 值较筛选前明显增加,表明每一轮筛选后与 PreS1 特异性结合的噬菌体得到明显富集,同时也表明与 GST-PreS1 发生特异性结合的噬菌体结合部位应该在 PreS1 而不是在 GST。

表 1 PreS1 特异性结合的噬菌体滴度测定

	筛选前	第一轮筛选	第二轮筛选	第三轮筛选
投入量	1×10^9	1×10^9	1×10^9	1×10^9
GST-PreS1	1×10^2	8×10^2	4×10^3	16×10^3
空质粒表达产物	1×10^2	2×10^2	1×10^2	2×10^2
富集指数 P/N	1	2.5	4	8

2.4 目的基因的 PCR 扩增,序列比对和同源性分析

经过 3 轮筛选,以随机挑取噬斑提取的噬菌体 DNA 为模板,用 T7select 引物进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳。结果得到 1 条带,用同一噬斑裂解液重复 PCR 得到同样结果,见图 2。PCR 产物作 T 克隆后测序结果用 BLAST 进行同源性搜索后,证实其为编码蛋白序列,编码蛋白的序列长为 350bp。



M:100bp DNA Marker;1:PCR 产物:350bp

图 2 第三轮筛选后随机挑取的噬菌体 cDNA 插入片段的 PCR 鉴定

3 讨 论

以噬菌体展示技术构建的 cDNA 表达文库,具有容量大、易于进行生物淘洗的特点,能够特异性地富集和分离到含有目标基因的噬菌体[5]。在生物淘洗过程中,包括靶蛋白的包被、封闭、加入文库液、洗去非特异结合的噬菌体、收集特异性结合的噬菌体和扩增,其中有很多因素都影响到筛选的结果。其中保证靶蛋白的纯度和正确的空间构象是成功筛选相互作用蛋白的第一步,只有具有高纯度和正确空间构象的靶蛋白才能防止噬菌体的非特异性结合和筛选出与靶蛋白功能部位特异性结合的噬菌体。我们通过高效的亲和层析来纯化重组 PreS1,其纯度可达 90%以上,并且具有较高的生物学活性,这就避免了生物淘洗出针对杂蛋白的非特异性克隆,为高效地筛选出特异性的 PreS1 相互作用蛋白奠定了基础。

经过三轮生物筛选,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,结果显示得到一个片段,其大小为 350bp。我们将得到的这个片段在 NCBI 的 EST 数据库中进行同源性比较,获得一个同源性很高的 EST(Homo sapiens isolate AF51 mitochondrion, Homo sapiens isolate AF51 mitochondrion) 该区段含有 13 个蛋白质编码区,其中第 3 个蛋白质编码区和我们的序列完全相同,即第 5468 至 7009 碱基对编码的蛋白质为 COX1(Cytochrome c Oxidase Subunit 1),即细胞色素 C 氧化酶 1,这提示我们与 PreS1 相互作用的蛋白很可能就是蛋白 COX1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome c oxidase, COX)即呼吸链复合物Ⅳ,是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,它由线粒体基因组与核基因组各自编码的亚基共同组成复合物,其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ3 个大亚基由线粒体基因编码并定位合成,其余 10 个小亚基由核基因编码合成,然后进入线粒体,起调节线粒体催化亚基活性的作用。在哺乳动物组织中 COX 亚基的表达及其调节机制尚不完全清楚。Claire M.Payne 等研究发现 COX1 表达减少与细胞凋亡抵抗有明显的关系,这是促成肿瘤形成的重要原因。因此他们把 COX1 作为评估结肠癌恶性程度的指标[6]。我们由此可推测 HBV PreS1 和 COX1 相互作用可能具有以下两方面的潜在意义:一方面,通过 COX1 的介导增强肝细胞抗凋亡能力,帮助建立 HBV 感染状态。当 HBV 感染肝细胞时,宿主本身会诱导细胞凋亡来作为一种防御反应。为了能持续感染宿主细胞,HBV 很有可能通过 PreS1 和 COX1 的相互作用以提高肝细胞抗凋亡能力;另一方面,通过 COX1 介导提高肝细胞增殖能力。因此,PreS1 与 COX1 相互作用有可能参与了 HBV 相关性肝癌的发生。这些都待于进一步研究证实。在下一步研究工作中,我们将建立 COX1 的原核和真核表达系统,表达和纯化出 COX1 蛋白,并对其进行理化性质分析和亲和鉴定,体外证实其与 PreS1 的相互作用,并进行亚细胞定位。只有通过上述的后续研究才能最终确证本实验中所筛选到的 cDNA 片段是否真实地反映了 PreS1 相互作用蛋白的相关 DNA 序列信息。因此本实验所得到的结果无疑为寻找 PreS1 相互作用蛋白和揭示 PreS1 的作用机制提供了重要线索,具有很大的指导价值。

综上所述,本研究从噬菌体表面展示的 cDNA 表达文库中筛选出与 PreS1 特异性结合的噬菌体克隆,并且得到其基因型和表型特征,为进一步研究 PreS1 相互作用蛋白提供了重要的线索,具有潜在的医学运用价值。

参 考 文 献

[1] Lavanchy D.Hepatitis B virus epidemiology,disease burden, treatment,and current and emerging prevention and control measures [J].J Viral Hepat,2004;11:97-107.

[2] Hui J,Mancini M,Li G,et al.Immunization with a plasmid encoding a modified hepatitis B surface antigen carrying the receptor binding site for hepatocytes[J].Vaccine,1999;17: 1711-1718.

[3] Budkowska A,Dubreuil P,Capel F,et al.Hepatitis B virus pre-S gene-encoded antigenic specificity and anti-pre-S antibody: relationship between anti-pre-S response and recovery [J]. Hepatology,1986;6:360-368.

[4] Lenhoff RJ,Summers J.Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus[J].J Virol,1994;68:4565-4571.

[5] Santi E,Capone S,Mennuni C,et al.Bacteriophage lamda display of complex cDNA libraries:a new approach to functional genomics[J].J Mol Biol,2000;296:497-506.

[6] Claire M.Payne1,4,Hana Holubec1,Carol Bernstein1,et al. Crypt-Restricted Loss and Decreased Protein Expression of Cytochrome c Oxidase Subunit 1 as Potential Hypothesis-Driven Biomarkers of Colon Cancer[J].Risk Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention,2005;9:2066-2075.

《重庆医科大学学报》征订启事

《重庆医科大学学报》综合性医学专业性学术刊物,CN:50-1046/R,月刊,国内外公开发行。本刊已被《中文科技期刊数据库》、《中国期刊全文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科技论文统计源期刊》、《中国生物学文摘》、《中国生物学文献数据库》全文收录。

《重庆医科大学学报》月刊,全年 12 期,大 16 开本,每期定价 8 元,全年订费 96 元。

邮发代号:78-132,全国各地邮局均可订阅。