

# 乙型肝炎病毒前-X融合蛋白结合蛋白的筛选

肖鸿敏<sup>1</sup>, 任建林<sup>1</sup>, 潘金水<sup>1</sup>, 施华秀<sup>1</sup>, 许鸿志<sup>1</sup>, 周飞<sup>2</sup>, 董菁<sup>2</sup> [1. 福建医科大学教学医院(厦门大学附属中山医院), 厦门 361004; 2. 福建医科大学附属第一医院肝病中心, 福州 351005]

**摘要:** 目的 利用酵母双杂交技术自肝细胞cDNA文库中筛选HBV前-X(pre-X)融合蛋白结合蛋白, 探讨pre-X融合蛋白的生物学功能。方法 PCR扩增HBV pre-X基因序列, 根据酵母双杂合体系构建诱饵质粒pDEST32-pre-X, 并测定DNA序列验证。将质粒pDEST32-pre-X转化为酵母细胞MaV203, 应用Western blot验证pre-X融合蛋白在酵母细胞中正确表达, 再与转化为人肝细胞cDNA文库质粒的酵母细胞pDEST22配合, 在营养缺陷型培养基和X-gal上三重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的猎物物质进行DNA测序。利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对筛选结果进行分析。结果 成功构建pDEST32-pre-X诱饵质粒, Western blot证实转化诱饵质粒的酵母细胞能正确表达pre-X融合蛋白, pDEST32-pre-X及正常成人肝细胞cDNA文库共转化酵母细胞后, 选择性培养出45个菌落, 经缺陷培养基分离及X-gal检测后筛选出3个阳性克隆, 测序结果为一种蛋白, 即TCP1蛋白。结论 用酵母双杂交技术筛选出1个与pre-X融合蛋白相互作用的肝细胞结合蛋白, 为进一步研究HBV pre-X融合蛋白的作用提供了新线索。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 酵母双杂交技术; 前-X融合蛋白; 结合蛋白

## Screening of hepatocellular proteins interacting with pre-X fusion protein of hepatitis B virus

XIAO Hong-min<sup>1</sup>, REN Jian-lin<sup>1</sup>, PAN Jin-shui<sup>1</sup>, SHI Hua-xiu<sup>1</sup>, XU Hong-zhi<sup>1</sup>, ZHOU Fei<sup>2</sup>, DONG Jing<sup>2</sup> [1. Fujian Medical University Teaching Hospital (The Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University), Xiamen 361004, China; 2. Liver Center, The First Hospital Affiliated Fujian Medical University, Fuzhou 351005, China]

**Abstract: Objective** To screen hepatocellular candidate binding proteins interacting with pre-X fusion protein (pre-X) of hepatitis B virus by yeast-two hybrid technique. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) method was applied to amplify pre-X gene. The targeted gene of pre-X was cloned into yeast expression plasmid pDEST32 to construct bait plasmid pDEST32-pre-X. Western blot method was employed to test pre-X expression after pDEST32-pre-X being transformed into the yeast cell MaV203 by LiAc-mediated method. Both pDEST32-pre-X and pDEST22-cDNA were contemporarily transformed into MaV203 to screen the binding protein of pre-X. MaV203 was plated on synthetic dropout nutrient medium (SC/-Trp-Leu-His-Ura) and containing X-gal for selection and screening. After that, the prey plasmids from true positive colonies were extracted and sequenced. The partial cDNA sequence in prey plasmids were analyzed by bioinformatics software. **Results** The yeast expressed vector pDEST32-pre-X was successfully constructed. After screening, 3 pieces of cDNA in prey plasmids from true positive blue colonies were sequenced. The cDNA sequence was a TCP1 protein. **Conclusions** Yeast-two hybrid method was successfully applied for screening TCP1 protein as candidate binding protein of HBV pre-X.

**Key words:** Hepatitis B virus; Yeast-two hybrid technique; Pre-X fusion protein; Binding protein

乙型肝炎病毒(HBV)是引起病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌(HCC)的重要病原体。X基因位于基因组1374~1838核苷酸(nt),长465 bp,编码145~154个氨基酸(aa),分子量约为17 kD<sup>[1]</sup>。1990年, Loncarevic等<sup>[2]</sup>克隆了一株adr血清型HBV基因组,发现了前-X区,长度168 nt,编码56 aa。Takahashi等<sup>[3]</sup>于1995年初步研究认为前-X区与肝细胞癌(HCC)的形成有关。笔者早期研究<sup>[4-6]</sup>证实前-X区的存在不是孤立现象。本研究以前-X蛋白为靶蛋白,利用酵母双杂交技术寻找与肝细胞相互作用的蛋白,这对于明确HBV致病机制及其进入细胞机制具有重要意义。

## 1 材料和方法

1.1 材料 Proquest2 酵母双杂交系统、人肝细胞cDNA文库(货号10422-020)、感受态酵母细胞、醋酸锂、X- $\alpha$ -半乳糖苷酶(Gal)、酵母细胞质粒提取试剂盒等均购自Invitrogen公司。酵母YPAD培养基、不含氨基酸的酵母氮碱基等购自Oxoid公司,各种氨基酸及质粒提取试剂盒均购自北京博大泰克公司;大肠埃希菌(DH5 $\alpha$ )为室温保存。

### 1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建以及靶基因表达的验证 利用PCR法扩增靶基因,根据HBV中国流行病毒株基因序列,设计上游引物5'-ATGGTCTGAC tggATGGCTGCTAGGCTGTGCTG-3',下游引物5'-GTGCGGCCGCTAatgatgatgatgatgTTTGGC AGAGGTGAAGCGTTC-3',上游引物画线部分为Sal I内切酶位点,下游引物画线部分为Not I内切酶位点,下游引物小写字母为His标签;PCR扩增HBV前-X蛋白编码基因;PCR条件:94℃ 3分钟,94℃ 30秒,55℃ 30秒,72℃ 30秒,35个循环,72℃ 7分钟;PCR产物经Not I/Sal I双酶切后连入酵母表达载体pDEST32中构建诱饵质粒,经酶切及PCR鉴定后进行DNA测序验证,命名为pDEST32-pre-X。将重组质粒在大肠埃希菌中扩增,提取诱饵质粒。按说明书步骤,将诱饵质粒pDEST32-pre-X转化入MaV203。在亮氨酸缺乏的培养基培养5天后,挑取阳性克隆进行培养,用

亮氨酸缺乏培养液培养,酵母裂解液裂解MaV203后,保留上清备用。

Western blot法验证靶基因的表达:将样品及阴性对照的酵母裂解液加入上样缓冲液后煮沸10分钟,分别经10% Tricine-SDS-PAGE胶电泳。积层胶60 V 30分钟;分离胶90 V 100分钟。100 V电转60分钟后,将胶上的蛋白质电转移至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭2小时,然后加入1:500抗-His鼠单克隆抗体,4℃孵育过夜,用TBST在室温下脱色摇床上洗脱3次,每次10分钟;再与1:2000羊抗鼠二抗室温孵育1小时,同上步骤洗脱3次,每次10分钟;用增强化学发光法进行放射自显影。

1.2.2 酵母双杂交筛选 首先大量扩增猎物载体,按照文库扩增手册操作滴定肝细胞文库原液,使其浓度达到 $9 \times 10^{12}$  cfu/L,以大量质粒提取试剂盒提取猎物质粒。按照Invitrogen公司Proquest2酵母双杂交操作指南,醋酸锂法将诱饵质粒pDEST32-pre-X与肝细胞文库(克隆在pDEST22中)共同转化酵母MaV203,之后将酵母细胞涂布在SC-leu/-trp以及SC-leu/-trp/-his + 25 mmol/L 3AT培养基上(3AT终浓度恰好能抑制诱饵质粒自身激活)。3AT终浓度预实验测定流程:首先在SC-Leu-Trp-His板分别设定3AT浓度分别为0 mmol/L、10 mmol/L、15 mmol/L、20 mmol/L、25 mmol/L、30 mmol/L、35 mmol/L、40 mmol/L、45 mmol/L和50 mmol/L,然后将构建好的重组诱饵及猎物质粒用醋酸锂法共转入高效MaV203酵母感受态细胞,测定刚好能完全抑制其自身激活作用的最低3AT浓度,即为终浓度25 mmol/L 3AT。将生长在SC-leu/-trp/-his+3AT的阳性克隆划线到SC-leu/-trp/-ura的培养基上,最后将阳性菌落接种于YPAD培养皿影印于硝酸纤维素膜用液氮裂解后置于含X-gal的Z-buffer反应体系上检查 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性,变为蓝色的为真阳性菌落。

1.2.3 候选结合蛋白基因的克隆化与分析 挑取真正的阳性集落按照Invitrogen公司酵母细胞提取试剂盒提供的操作指南提取酵母质

粒。提取的质粒经验证后，利用Invitrogen公司提供的pDEST22质粒，插入文库序列两端的引物进行PCR扩增验证。上游引物5'-TCGATGATGAAGATACCCACC-3'，下游引物5'-CTCGACGTCTTACTTACTTAGC-3'。PCR条件：94℃ 3分钟，94℃ 30秒，58℃ 50秒，72℃ 70秒，35个循环，72℃ 7分钟。靶片段长度约为540 bp。PCR产物经纯化后送生物公司进行DNA测序，阳性克隆的DNA测序结果提交GenBank比对，进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 诱饵质粒构建的验证 诱饵质粒经PCR扩增出前-X基因相应片段长度的条带，测序结果在基因库中经查询比对正确。Western bolt法验证诱饵质粒pDEST32-pre-X转化酵母细胞后融合蛋白的表达，见图1。



图 1 pDEST32-pre-X转化MaV203后Western Blot结果  
注：图中单抗为抗-His，+ 为pDEST32-pre-X转化MaV203泳道，- 为pDEST32转化MaV203泳道

2.2 肝细胞cDNA文库的筛选 按照Invitrogen公司Proquest2酵母双杂交操作指南，将构建并验证过的诱饵质粒pDEST32-pre-X与肝细胞文库（克隆在pDEST22中）在SC-leu/-trp/-his + 25 mmol/L 3AT培养基上共转化酵母MaV203，培养基中共长出45个阳性菌落，之后利用不同缺陷培养基来筛选阳性菌落，最后获得3个可以表达His<sup>+</sup>、Ura<sup>+</sup>和LacZ报告基因的阳性菌落，见图2。

2.3 阳性克隆的鉴定 利用Invitrogen公司提供的肝细胞文库载体pDEST22引物，PCR扩增阳性克

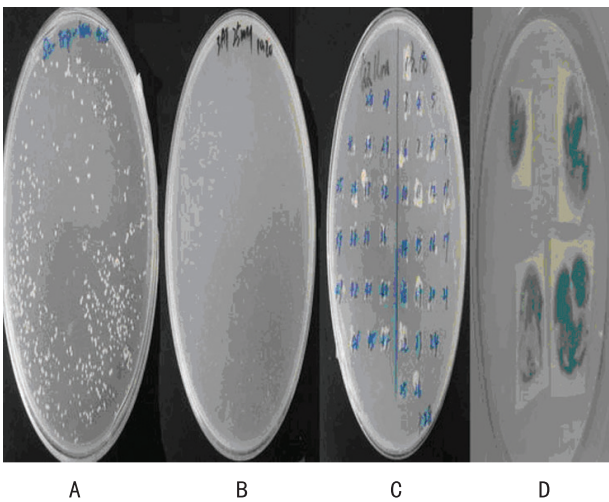


图 2 酵母双杂交结果

注：A为检测转化效率；B为表达His<sup>+</sup>报告基因；C为表达Ura<sup>+</sup>报告基因；D为表达LacZ报告基因

隆获得的基因片段约850 bp，见图3。扩增片段的测序结果及GenBank数据库查询结果提示3个克隆均为TCPI蛋白，见图3。

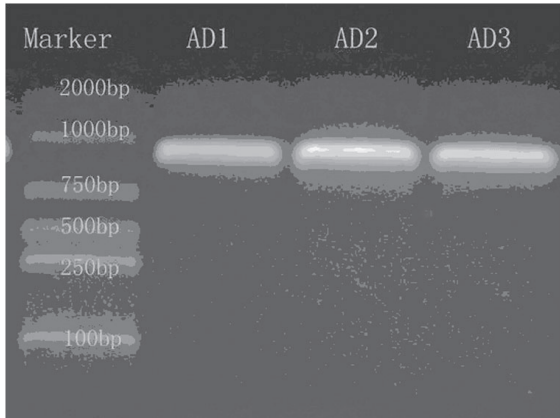


图 3 酵母双杂交阳性克隆猎物质粒引物PCR产物的凝胶电泳

3 讨论

HBV慢性感染以及感染后导致肝硬化和原发性肝癌的机制一直不明确，目前研究认为HBV通过其病毒蛋白调节癌基因/抑癌基因的表达、诱导/对抗细胞凋亡及阻断细胞DNA损伤修复等方式导致病情的演进<sup>[7-13]</sup>。在上述过程中，除X基因、截短型中蛋白具有反式激活作用外，HBV干预肝细胞功能的方式也可能是通过蛋白-蛋白相互作用而完成<sup>[14-16]</sup>。近年来，酵母双杂交技术被成功地引入



蛋白-蛋白相互作用领域,对HBV X蛋白结合蛋白的研究较多见,本研究着重探讨HBV pre-X融合蛋白的候选结合蛋白。研究表明,约半数HBV前-X区来自肝细胞癌患者,另外还有慢性肝炎、急性重型肝炎和暴发性肝炎患者等。尽管前-X区对肝细胞癌发生发展的影响尚需进一步研究,但其可作为评估亚洲C/adr型HBV携带者日后发生肝细胞癌风险的一个标志<sup>[5]</sup>。Faure等<sup>[17]</sup>研究表明,含有前-X ORF的HBV几乎都来自亚洲或亚裔患者,其中绝大多数(> 80%)在中国内地和日本,因此在我国对其进行深入研究尤为重要。

笔者应用Proquest酵母双杂交系统对pre-X融合蛋白进行了结合蛋白的筛选,该系统特点是利用低复制载体控制猎物基因表达,同时联合3个报告基因系统以最大程度的减少酵母细胞双杂交实验系统的假阳性,其优点是假阳性率低。按照该系统,将构建的诱饵质粒pDEST32-pre-X与携带人肝cDNA文库的猎物质粒共同转化酵母细胞,只有表达His<sup>+</sup>、Ura<sup>+</sup>和LacZ报告基因的阳性克隆才被纳入进一步研究。通过该系统,笔者筛选出肝细胞文库中与pre-X融合蛋白相互作用的蛋白,共获得3个阳性克隆,经过测序分析及与GenBank数据库进行比较,这3个阳性克隆测序结果均为一种已知蛋白(TCP1蛋白)的基因。该实验结果只筛选出单一克隆,原因可能是肝cDNA文库多样性经多次克隆后部分被破坏了,也可能是所筛出的单一克隆TCP1蛋白就是诱饵质粒强相互作用的结合蛋白,下一步需通过反向酵母双杂交实验进一步验证,这样更有利于证明两者之间的相互作用。

TCP1蛋白是一种伴侣蛋白,是真核细胞胞质中惟一的伴侣蛋白,大量研究表明TCP1主要参与细胞骨架的构成,为细胞生长所必需。TCP1和其他伴侣蛋白的一个显著差别在于其他伴侣蛋白均仅由一种或两种亚基构成,而哺乳动物TCP1则由7~9种不同亚基组成。虽然这些不同亚基在进化上高度保守,其氨基酸序列的同源性约在25%~36%,但每个TCP1亚基的作用却互不相同<sup>[18,19]</sup>。分子伴侣不仅与胞内蛋白的折叠和组装密切相关,影响到蛋白

质转运、定位或分泌,而且与信号转导中的信号分子的活性状态与活性行为相关,具有重要的生理意义。研究表明<sup>[20]</sup>,TCP-1是原肌动蛋白和微管蛋白及其他许多蛋白质合成所必需,可影响参与细胞周期和细胞骨架组织的合成。

总之,自肝cDNA文库中应用酵母双杂交方法筛选出1种可能与pre-X融合蛋白结合的蛋白基因,研究结果提示pre-X融合蛋白可能通过与TCP1蛋白相互作用来影响肝细胞功能,其具体作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2000,64:51-68.
- [2] Loncarevic IF, Zentgraf H, Schroder CH. Sequence of a replication competent hepatitis B virus genome with a preX open reading frame[J]. Nucleic Acids Res,1990,18:4940.
- [3] Takahashi K, Kishimoto S, Ohori K, et al. A unique set of mutations in the "preX" region of hepatitis B virus DNA frequently found in patients but not in asymptomatic carriers: implication for a novel variant[J]. Int Hepatol Commun,1995,3:131-138.
- [4] 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定[J]. 世界华人消化杂志,2003,11:1097-1101.
- [5] 杨倩, 董菁, 成军, 等. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定[J]. 解放军医学杂志,2003,28:763-765.
- [6] 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究[J]. 世界华人消化杂志,2004,12:42-46.
- [7] Wei W, Huang W, Pan Y, et al. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras[J]. Cancer Lett,2006,28;244:119-128.
- [8] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med,2006,147:58-66.
- [9] Peng Z, Zhang Y, Gu W, et al. Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: a key to the cell cycle and apoptosis[J]. Int J Oncol,2005,26:467-473.
- [10] Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, et al. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells[J]. Cancer Sci,2007,98:1540-1548.
- [11] Wei W, Huang W, Pan Y, et al. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras[J]. Cancer Lett,2006,244:119-128.
- [12] Ou DP, Tao YM, Tang FQ, et al. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases[J]. Int J Cancer,2007,120:1208-1214.

- [13] 成军, 刘妍, 陆荫英, 等. 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11: 472-474.
- [14] Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 74-81.
- [15] Hildt E, Munz B, Saher G, et al. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice[J]. EMBO J, 2002, 21: 525-535.
- [16] Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma[J]. Methods Mol Biol, 2006, 317: 141-155.
- [17] Faure E. Alternative peptide-fusion proteins generated by out-of-frame mutations, just upstream ORFs or elongations in mutants of human hepatitis B virus[J]. Virus Res, 2006, 117: 185-201.
- [18] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell[J]. Nature, 1992, 355: 33-45.
- [19] Kubota H, Hynes G, Carne A, et al. Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin[J]. Curr Biol, 1994, 4: 89-99.
- [20] Brackley KI, Grantham J. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation[J]. Cell Stress Chaperones, 2009, 14: 23-31.

收稿日期: 2009-03-10

## • 健康园地 •

## 肝脏病防治问答

## 1. 肝病患者饮食要注意哪些方面?

肝病患者饮食除遵守所有肝病患者饮食治疗中的“高蛋白质、高热量”原则以外, 还要低盐、高维生素。这是因为慢性肝炎及肝硬化患者体内易发生水、钠潴留, 且常缺乏多种维生素如维生素A、维生素C、维生素E等, 患者可通过摄入黄绿叶蔬菜以及豆类制品来达到补充的目的。酒精性肝硬化患者体内往往缺乏维生素B<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、叶酸等B族维生素, 要补充这类维生素, 可将主食改为富含维生素B<sub>1</sub>及叶酸的胚芽类。

## 2. 肝病可以治愈吗?

俗话说“上医治未病”, 肝病最好的治疗方法是“防患于未然”。如果能了解科学防治肝病的常识, 即可以避免一些肝病的发生。如果肝病能够及时发现, 在疾病早期, 是比较容易治疗, 甚至是可以治愈的, 因此一定不要寄希望于重病后再治疗。目前医学还未能完全征服病毒性肝炎这一类疾病, 但已有许多对付肝炎病毒的手段, 干扰素就是其中之一。酒精性肝炎和药物性肝炎, 只要戒酒和停止使用有关药物, 就能终止肝损害。自身免疫性肝炎的发病率相对较低, 激素和免疫抑制药即可控制病情。

## 3. 肝病如何用药?

肝病至今尚无特效药物, 病毒性肝炎是一种自限性自愈性疾病, 故急性病毒性肝炎只需适当的对症治疗, 除重型外, 大多数会自愈康复。对慢性病毒性肝炎则自愈过程漫长, 至少有1/3左右会发展至肝硬化, 而能够帮助其自愈过程的有效药物, 目前国内外公认的还是干扰素。在临床上“保肝药物”很多, 但真正有效的药物很少。不少患者追求新药, 喜欢多用药, 不重视食补而强调药补都是错误的认识。另外, 用药一定要在专业医生指导下使用。

## 4. 中医防治肝病疗效好吗?

中医认为肝病发生, 外因多由于时邪湿热侵袭和饮食不洁, 内因多由于情志不和、劳倦内伤而削弱了机体抵抗力。在预防保健上, 提出饮食营养、食品卫生、减少传染、调节情志联合治疗。临床证明中医保健对肝病的防治起到关键性作用。结合使用保健食品海补乐宝和RU21效果更好。