

· 基础论著 ·

HBV 表面抗原大蛋白与人胰腺突触角蛋白 6 之间的相互作用

张海栋 张锦前 赵龙凤 贾因棠 王琦 刘顺爱 温少芳 孙荣华 李卓 成军

【摘要】 目的 验证 HBV 表面抗原大蛋白(LHBs)与人胰腺突触角蛋白 6 (STX6)在细胞内是否存在相互作用,为进一步研究 HBV 影响糖、脂代谢机制奠定研究基础。**方法** 构建真核表达质粒 pACT-STX6,采用哺乳动物双杂交技术验证 LHBs 与 STX6 之间的相互作用。**结果** 实验组和各阴性对照组相对荧光素酶活性值均存在差异,且均具有显著统计学意义($P < 0.01$)。**结论** LHBs 与人胰腺 STX6 在胰腺细胞内存在相互作用。

【关键词】 HBV 表面抗原大蛋白;突触角蛋白 6;哺乳动物双杂交

Confirmation of the interaction between hepatitis B virus large surface protein and homo sapiens pancreatic syntaxin 6 protein ZHANG Hai-dong, ZHANG Jin-qian, ZHAO Long-feng, JIA Yin-tang, WANG Qi, LIU Shun-ai, WEN Shao-fang, SUN Rong-hua, LI Zhuo, CHENG Jun. Institute of Infection Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: CHENG Jun, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To confirm the intra-cellular interaction between HBV large surface protein (LHBs) and homo sapiens syntaxin 6 protein (STX6), which brought some new clues for studying on the molecular biology mechanism of glucose and lipid. **Methods** Eukaryotic expression vector pACT-STX6 and confirmed the interaction between LHBs and homo sapiens syntaxin protein through mammalian two-hybrid experiment. **Results** The research constructed eukaryotic expression vector pACT-STX6. Mammalian two-hybrid experiment showed that there were significant differences in the relative luciferase activity value between experimental group and each negative control group were ($P < 0.05$). **Conclusions** LHBs might be interacted with homo sapiens syntaxin 6 protein in cells.

【Key words】 HBV large surface protein; Syntaxin 6 protein; Mammalian two-hybrid

乙型肝炎病毒 S 基因(Pre-S1 + Pre-S2 + S)编码的表面抗原大蛋白(large surface protein, LHBs),是乙型肝炎病毒的 3 种包膜蛋白之一,是 HBV 颗粒成熟包装的关键^[1],诸多实验证明其 LHBs 的表达与 HBV 感染与复制以及乙型病毒性肝炎的发病机制相关。本实验前期应用酵母双杂交技术已筛选出 LHBs 与人胰腺突触角蛋白 6(syntaxin 6, STX6)存在相互作用,但乙型肝炎患者出现糖代谢异常或代谢综合征的发生、发展是否由 LHBs 与人胰腺 STX6 的相互作用所导致,目前尚不明确。酵母双杂交系统存在一定的假阳性率,因此需要进一步验证 LHBs

与人胰腺 STX6 之间是否存在相互作用,为进一步研究 HBV 影响糖、脂类代谢的分子生物学机制提供一定的思路和实验依据^[2]。

材料与方法

一、实验材料与试剂

1. 质粒载体和细胞:pBIND 空质粒、pBIND-Id 质粒、pBIND-LHBs、pACT 空质粒、pACT-myoD 质粒、pG5luc 质粒均由本实验室保存,Capan-2 胰腺癌细胞系购于中国协和医科大学细胞库。

2. 工具酶和主要试剂:DMEM 细胞培养基购于美国 HyClone 公司,胎牛血清、青霉素、链霉素均购于美国 Gibco 公司,jetPRIME 细胞转染试剂购于法国 Polyplus 公司,总 RNA 提取试剂盒购于美国 Omega 公司,TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 试剂购于日本 TaKaRa 公司,限制性内切酶、连接酶和 Marker 均购自大连宝生物科技公司,DNA 凝胶纯化回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购于美国

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.01.007

基金项目:国家自然科学基金(30600524);太原市科技局大学生创新创业基金(201020-1720)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(张海栋、张锦前、王琦、刘顺爱、成军);山西医科大学第一医院感染病科(张海栋、赵龙凤、贾因棠)

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

Vigorous公司, Dual-Luciferase[®]双萤光素酶报告基因检测系统购于美国 Promega 公司

3. PCR 引物设计与合成: GenBank accession: NM_005819, 上游引物: 5'-GAATTCCTCCATGTCCATG GAGGACCCC-3' 和下游引物: 5'-CTCGAG TCACAG CACTAAGAAGAGG-3', 在引物两端分别加入 *Xho* I 和 *EcoR* I 限制性内切酶酶切位点。引物合成与 DNA 测序由金唯智生物科技(北京)有限公司完成。

4. 主要仪器: 凝胶成像系统 WD-9413B 购于北京六一仪器厂, PCR 扩增仪为美国 PE 公司产品, 紫外分光光度计 Bio-Photometer 购于德国 Eppendorf 公司, 高速台式离心机购于美国 IEC 公司。

二、方法

1. 目的基因的扩增: 用总 RNA 提取试剂盒提取 Capan-2 细胞总 RNA, 根据人胰腺 STX6 基因序列 (GenBank accession: NM_005819), 上游引物: 5'-GAATTCCTCCATGTCCATGGAGGACCCC-3' 和下游引物: 5'-CTCGAG TCACAGCACTAAGAAGAGG-3', 采用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒逆转录并 PCR 扩增获得 STX6 的基因全长序列。反应条件: 50℃ 逆转录 30 min; 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min (35 个循环); 72℃ 保温 8 min, 4℃ 保存。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所扩增产物, 将目的 DNA 凝胶回收、纯化。

2. 克隆载体的构建与鉴定: 将回收的目的基因片段与 pGEM-Teasy 载体连接, 16℃ 恒温水浴连接 16 h, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞 (冰浴 30 min, 42℃ 水浴热击 90 s, 冰浴 2 min, 37℃ 恒温摇箱 180 rpm, 孵育 45 min), 均匀铺于 LB/Amp 固体平皿中, 置于 37℃ 恒温孵育箱孵育 16 h。挑取培养基上生长饱满的单克隆菌落做菌落 PCR 鉴定, 对阳性菌落增菌, 质粒小量提取试剂盒提取细菌质粒 DNA, 行 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定, pGEM-Teasy-STX6 质粒由金唯智公司测序。

3. 真核表达质粒 pACT-STX6 构建、鉴定和 DNA 测序: 将测序正确的 pGEM-Teasy-STX6 质粒与 pACT 表达质粒分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳并纯化回收目的 DNA 凝胶。16℃ 恒温水浴连接 16 h, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞 (冰浴 30 min, 42℃ 水浴热击 90 s, 冰浴 2 min, 37℃ 恒温摇箱 180 rpm 孵育 45 min), 均匀铺于 LB/Amp 固体平皿中, 置于 37℃ 恒温孵育箱孵育 16 h。挑取生长饱满的单克隆菌落做菌落 PCR 鉴定, 对阳性菌落增菌, 质粒小量提取试剂盒提取细菌质粒 DNA, 行 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定, 鉴定正确的 pACT-STX6

质粒由金唯智公司测序。

4. 细胞培养: 用含 10% 胎牛血清的 HyClone DMEM 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 Capan-2 细胞, 2 d 传代 1 次。在转染质粒前 1 天按每孔 (0.5~2) $\times 10^5$ 个的细胞计数, 接种于 24 孔细胞培养板中, 每组设 3 个副孔。

5. 细胞转染: 转染共分为 6 组: (1) 阳性对照组: 将质粒 pBIND-Id、pACT-myoD 和 pG5Luc 共转染; (2) 实验组: 将质粒 pBIND-LHBs、pACT-STX6 和 pG5Luc 共转染; (3) 阴性对照组 1: 将质粒 pBIND、pACT 和 pG5Luc 共转染; (4) 阴性对照组 2: 将质粒 pBIND-LHBs、pACT 和 pG5Luc 共转染; (5) 阴性对照组 3: 将质粒 pACT-STX6、pBIND 和 pG5Luc 共转染; (6) 空细胞组。转染时质粒 DNA 的量为 0.8 μ g/孔。

转染 4 h 后换含 10% 胎牛血清的 HyClone DMEM 培养液继续培养, 转染 24 h 后裂解细胞, 检测双荧光值。用 1 \times PBS 液清洗 Capan-2 细胞 2 次, 每孔加入 100 μ l 1 \times Passive lysis buffer, 室温裂解 15 min, 持续晃动使细胞充分裂解, 将每孔中的细胞裂解液移入相应标号的 EP 管中 (置于冰上), 4℃ 12 000 rpm 离心 10 min, 每孔取 20 μ l 细胞裂解液加入微孔板, 检测 Firefly Luciferase 和 Renilla Luciferase 双荧光值。

三、统计学处理

所有实验数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数之间的比较用方差分析, 多个样本均数两两之间的比较用 SNK-*q* 检验, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、Capan-2 细胞总 RNA 的定性定量分析

紫外分光光度仪检测显示, Capan-2 细胞总 RNA 浓度为 1896.65 μ g/ml, $A_{260}/A_{280} = 1.86$, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28s、18s 和 5s 三条目的条带, 见图 1。

二、突触角蛋白 6 基因的扩增

将 Capan-2 细胞总 RNA 用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒逆转录并采用 PCR 技术扩增 STX6 的基因序列, 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果可见清晰的目的条带, 约 768 bp (图 2)。

三、构建 pACT-STX6 重组质粒

pGEM-Teasy-STX6 重组质粒用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后, 得到预期大小约 768 bp 的目的片段 (图 3), 回收并连接到用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切的 pACT 载体中, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取质粒后再次双

酶切鉴定并送测序,结果显示构建成功。

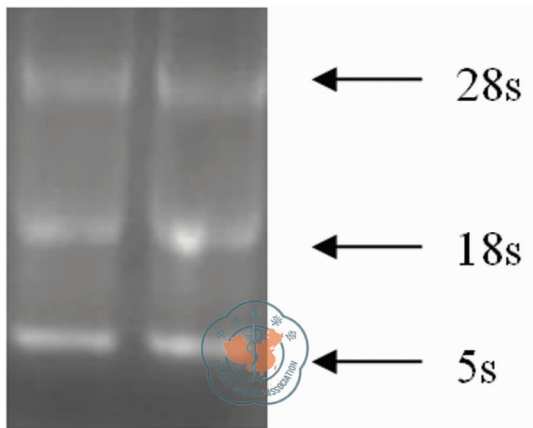


图 1 Capan-2 细胞总 RNA 检测

注:1% 琼脂糖凝胶电泳可见 28 s、18 s 和 5 s 三条目的条带

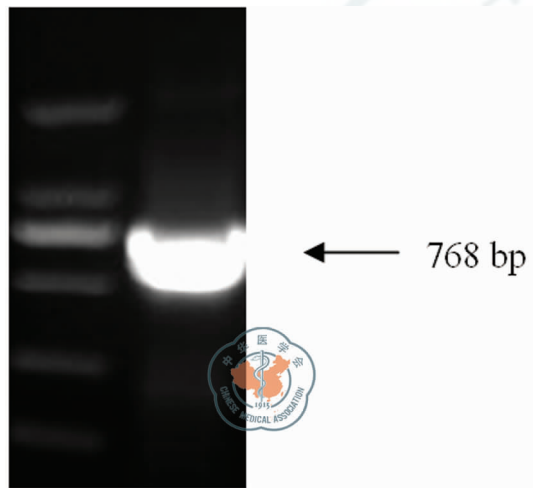


图 2 Syntaxin 6 基因 PCR 扩增图

注:左为 2000 bp DNA marker,右为 Syntaxin 6 基因片段

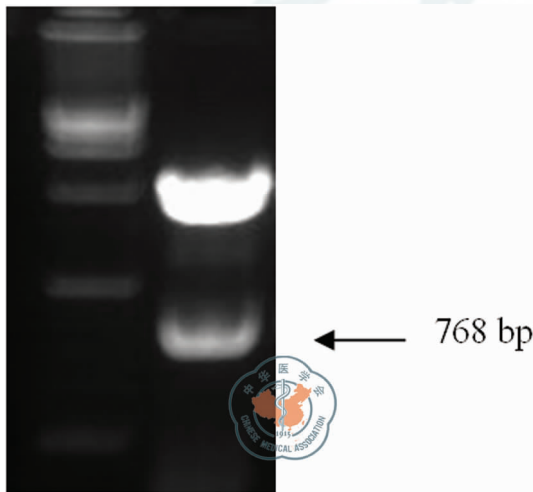


图 3 pGEM-Teasy-Syntaxin 6 重组质粒双酶切

注:左为 500 bp DNA marker,右为 Syntaxin 6 基因片段

四、哺乳动物双杂交实验结果

pBIND-LHBs 和 pACT-STX6 共转染时,相对荧光素酶活性值较 pBIND-LHBs 和 pACT 空载体共转染组、pBIND 空载体和 pACT-STX6 共转染组以及 pBIND 空载体和 pACT 转染组显著升高。分析结果表明实验组和各阴性对照组之间相比荧光素酶活性值总体均数均存在差异,且均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。提示 LHBs 与 STX6 在细胞内存在一定的相互作用,且单独转染后无自身激活作用。

表 1 哺乳动物双杂交实验结果

| 组别 | 例数 | 相对荧光素酶活性值($\bar{x} \pm s$) |
|---------|----|----------------------------------|
| 实验组 | 3 | 0.0213 \pm 0.0018 |
| 阴性对照组 1 | 3 | 0.0046 \pm 0.0003 ^a |
| 阴性对照组 2 | 3 | 0.0051 \pm 0.0008 ^a |
| 阴性对照组 3 | 3 | 0.0063 \pm 0.0007 ^a |

注:^a 与实验组相比较, $P < 0.01$

讨 论

近年来,诸多实验资料显示 HBV 慢性感染不但能引起肝脏损害,还与一些肝外组织的损害密切相关^[3],且常易伴发糖、脂代谢紊乱;另外,有研究提示慢性 HBV 感染比普通人群糖尿病发病率高,HBV 感染与 2 型糖尿病和脂肪肝等代谢性疾病的发生密切相关^[4-6]。这些均可能与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)相关。糖、脂代谢异常及 IR 三者之间关系密切,其中 IR 为中心环节^[7-8]。以上提示慢性乙型肝炎(CHB)也是一种代谢性疾病,但相关机制仍不明确。

突触角蛋白(syntaxin)家族是一种突触小泡转运受体,见于神经元的质膜,在神经系统突触小泡与突触前膜的对接中发挥着重要作用^[9-10]。突触角蛋白拥有 1 个单一的 C-端跨膜结构域,可溶性 NSF 附着蛋白受体(SNARE)结构域,和 N-端调控结构域(Habc)。人类基因编码的突触融合蛋白包括:STX1A、STX1B、STX2、STX3、STX4、STX5、STX6、STX7、STX8、STX10、STX11、STX12、STX16、STX17、STX18 和 STX19,其中 STX6 已被证实与 SNAP23、VAMP3 在突触小泡的停靠和融合方面共同发挥作用^[11-14]。

哺乳动物双杂交技术的基本原理同于酵母双杂交技术,其优势在于其比酵母细胞更接近于体内环境,可在某细胞系中研究蛋白与蛋白间的相互作用^[15]。在蛋白相互作用的研究中,可用酵母双杂交系统初步筛选相互作用的蛋白,再通过哺乳动物细胞双杂交系统进一步证实这两种蛋白质间的相互作用。

用。因此,哺乳动物双杂交技术是研究病毒蛋白与人宿主蛋白相互作用的重要手段。

本研究前期采用酵母双杂交筛选已发现 LHBs 与 STX6 存在相互作用关系,进一步应用哺乳动物双杂交技术证实了 LHBs 与 STX6 在细胞内的相互作用,为深入研究 STX6 的生物学功能及其在 HBV 相关的糖代谢异常的发生发展过程中的作用和机制奠定了实验室基础,提供了进一步的研究思路 and 方向。LHBs 与 STX6 相互作用的结合位点、结合方式及分子生物学机制尚需进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Bruss V, Vlelel K. Functions of the internal Pre2S domain of flag-tagged surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *Virology*, 1995, 69(11):6652-6657.
- 2 巩雪俐, 孙湛, 张建龙, 等. HBV 表面抗原大蛋白与人胰腺 CDK5RAP3 蛋白的亚细胞定位研究. *新疆医科大学学报*, 2011, 34(6):573-576.
- 3 王琳, 李克, 成军, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(9):1018-1021.
- 4 吴意, 李艳华. 丙型肝炎病毒感染与 2 型糖尿病之间关系的研究. *中国感染控制杂志*, 2008, 7(3):188-191.
- 5 Wyatt J, Baker H, Prasad P, et al. Steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol*, 2004, 57:402-406.
- 6 Koike K. Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH. *Hepatol Res*, 2005, 33(2):145-150.
- 7 巩雪俐, 张丽, 张建龙, 等. 哺乳动物双杂交技术验证 HBV 表面抗原大蛋白与人胰腺 CDK5RAP3 蛋白间的相互作用. *新疆医科大学学报*, 2010, 33(2):113-115.
- 8 韩学尧, 纪立农. 2 型糖尿病的遗传学研究突破将糖尿病的病因学研究引入新的时代. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(8):449-452.
- 9 Bennett MK, García-Ararrús JE, Elferink LA, et al. The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell*, 1993, 74(5):863-873.
- 10 Martín-Martín B, Nabokina SM, Blasi J, et al. Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood*, 2000, 96(7):2574-2583.
- 11 Mallard F, Tang BL, Galli T, et al. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol*, 2002, 156(4):653-664.
- 12 陈天艳, 刘敏, 陈云茹, 等. HCBP1 的细胞定位及与 HCV 核心蛋白在体内的相互作用. *南方医科大学学报*, 2007, 27(12):1809-1812.
- 13 Wang X, Ching YP, Lam WH, et al. Identification of common protein association region in neuronal Cdk5 activator. *J Biol Chem*, 2000, 275(41):31763-31769.
- 14 Ching YP, Qi Z, Wang JH, et al. Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene*, 2000, 242(1-2):285-294.
- 15 Aqata Y, Matsuda E, Shimizu A. Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through function interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem*, 1999, 274(23):16412-16422.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:孙荣华)

张海栋, 张锦前, 赵龙凤, 等. HBV 表面抗原大蛋白与人胰腺突触角蛋白 6 之间的相互作用[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(2):113-116.