

· 基础论著 ·

酵母双杂交技术筛选 p7TP2 蛋白结合肝细胞蛋白的编码基因

袁菊 成军 洪源 靳亚平 韩莉 陶明亮 李越 王琦

【摘要】 目的 筛选 HCV p7 蛋白反式调节蛋白 p7TP2 的结合蛋白,探讨 HCV 的致病机制及新蛋白 p7TP2 的生物学功能。**方法** 应用酵母双杂交系统 3,将多聚酶链反应(PCR)法扩增的 p7TP2 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒,转化单倍体酵母细胞 AH109 并在其内表达,然后与转化了人肝细胞文库质粒 pACT2 的单倍体酵母细胞 Y187 进行配合,在营养缺陷型培养基和 X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选,提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠埃希菌氨苄青霉素-LB 平板上选择并测序,结果在 GenBank 中进行生物信息学分析。然后将阳性文库质粒与诱饵质粒回交,以证实其相互作用。**结果** 筛选出与 p7TP2 结合的蛋白基因 10 个,其中包括金属硫蛋白 2A、载脂蛋白 H、蛋白 C、果糖二磷酸醛缩酶 B、配对免疫球蛋白样 2 型受体 α 、CTL1 基因类胆碱运输蛋白等已知功能蛋白基因相互作用,回交试验已经证实其相互作用。**结论** 由本研究结果发现 p7TP2 蛋白可以结合一系列不同功能的肝细胞蛋白,作为一种新基因,对它的进一步作用机制的研究将为阐明 HCV 感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出新的思路。

【关键词】 HCV p7;酵母双杂交;回交试验;抗凝血

Screening of proteins binding to p7TP2 protein from liver cDNA library by yeast two-hybrid technique YUAN Ju*, CHENG Jun, HONG Yuan, JIN Ya-ping, HAN Li, TAO Ming-liang, Li Yue, WANG Qi. *Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: cj@genetherapy.com.cn

【Abstract】 Objective To study the pathogenesis of HCV and the biological functions of a novel HCV p7 trans-regulated protein(p7TP2). **Methods** p7TP2 bait plasmid was constructed by ligating the p7TP2 cDNA with yeast expression plasmid pGBKT7, then pGBKT7-P7TP2 was transformed into yeast cells AH109 (a type). Thereafter, the transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium, diploid

基金项目:国家重点基础研究项目(2004CB518908)

作者单位:100011 北京地坛医院传染病研究所(袁菊、成军、洪源、韩莉、陶明亮、李越、王琦);西北农林科技大学动物科技学院(袁菊、靳亚平)

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing X- α -gal for selecting two times. Plasmids of true positive blue colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and blast search in GenBank database. **Results** Eleven genes, including MT2A, APOH, protein C, eukaryotic translation elongation factor 1 α 1, paired immunoglobulin-like type 2 receptor α , CTL1 gene for choline transporter-like protein, etc, have been found binding with p7TP2 protein. **Conclusions** These results show that p7TP2 protein could bind to proteins of inhibiting blood clotting directly or indirectly. All these brought some new clues for studying the biological functions of novel gene p7TP2 and the pathogenesis of HCV.

【Key words】 p7TP2; Yeast two-hybrid; Crossing back experiment; Inhibiting blood blotting

丙型肝炎病毒(HCV)是输血后肝炎主要的病原体,常导致严重肝病,包括肝硬化和肝细胞癌^[1-5]。由于缺乏有效的体外复制系统和适当的 HCV 感染的动物模型,阻碍了其有关发病机制、病毒复制以及防治策略的研究。HCV p7 是由 HCV 基因组编码的由 63 个氨基酸残基(aa)组成的一个小的疏水性多蛋白,编码基因位于结构蛋白和非结构蛋白之间,可在黑脂膜中形成六聚体阳离子通道,推测其功能与病毒离子孔道蛋白(viroporin)类似,可使细胞内膜结构不稳定化,以利于成熟的病毒颗粒释放,这一离子通道可被金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物抑制^[6-9]。亚细胞结构分离显示 p7 可以定位在线粒体或内质网衍生的微粒体的膜结构,其在细胞内分布的复杂性推测 p7 在 HCV 生命周期中在细胞内或者作为病毒粒子组件起着多重作用。p7TP2 基因是郭江等应用基因表达谱芯片技术研究 p7 蛋白对于宿主细胞基因的反式调节作用,对人 cDNA 片段进行了系统的筛选研究,发现并鉴定了 p7 蛋白反式调节的未知功能靶基因,该序列被美国核苷酸序列数据库 GenBank 收录,收录号码为 AY819648,开放读码框长 495 bp,编码 164 个氨基酸残基,且已经成功从 HepG2 细胞中克隆出该基因^[10],为进一步研究该基因的生物学功能,我们用肝细胞 cDNA 文库与 p7TP2 蛋白诱饵进行酵母双杂交筛选^[11],以期发现与 p7TP2 蛋白相互作用的新的蛋白质基因。

材料和方法

一、材料

预转化入酵母的对照质粒 AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3: MEL1TATA-lacZ MEL1), 预转化的 cDNA 肝文库 Y187 (MAT ura3-52, his3-200, Ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , met-, URA3: GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ MEL1), pGBKT7-BD, pGADT7-AD 克隆载体、酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-

Trp/-Leu/-His/-Ade, X- α -Gal 购自 Clontech 公司。醋酸锂购自 Sigma 公司。大肠埃希菌 DH5 α 为本室保种。pGEM-T 载体试剂盒购自 Promega 公司, DNA 回收试剂盒购自博大公司。Eco RI/Bam HI 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, PCR 的 Taq 酶购自 MBI 公司 DL 2000 及 DL 15000 购自 TaKaRa 公司, 琼脂糖购自上海 Yito 有限公司, 酵母提取物, 胰蛋白胨为 OXIOD 公司产品。氨苄西林、卡那霉素华北制药有限公司。其他试剂均为国产分析纯。Pepstatin A、Leupeptin、Benzamidine、Aprotinin、PMSF(苯甲基磺酰氟)均为 Sigma 公司产品。玻璃珠为 Sigma 公司产品。 β -巯基乙醇瑞典 BioChemika 公司。

二、方法

1. “诱饵”质粒的建立: 根据新基因 p7TP2 的完整开放读码框和空载体 pGBKT7 序列设计引物, 由上海生工合成。引物序列, 上游引物: 5'-GAA TTC ATG GTG GAG GTG CCC AGG-3' (Eco RI 位点); 下游引物: 5'-GGA TCC CAT GAC GAC CAG GCC CAG-3' (Bam HI 位点)。

PCR 扩增玻璃奶回收 p7TP2 基因的 PCR 产物; 然后将其和 pGEM-T 克隆载体连接转化感受态细胞 DH5 α 中, 挑取单菌落碱裂解法提取质粒 DNA, 用设计的酶切位点和菌落 PCR 方法进行初步鉴定分析, 并送测序。并玻璃奶回收酶切片段, 用 Bam HI 和 Eco RI 酶切克隆载体 pGBKT7, 再次连接转化大肠埃希菌, 酶切鉴定正确的重组表达质粒 pGBKT7-p7TP2, 碱裂解法提取质粒 DNA。

2. 醋酸锂转化及 Western blotting 验证酵母蛋白的表达: 将酶切鉴定正确的重组质粒水溶后用醋酸锂法^[12,13]转入酵母细胞 AH109, 铺 SD/-Trp-His-Ade/kana(4 缺+亮氨酸)培养基, 观察 2 周, 排除自激活现象, 同时铺 SD/-Trp/kana(缺色氨酸)培养基, 30℃ 孵育 5~7 d, 利用 Urea/SDS 方法提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 免疫印迹法验证 p7TP2 在酵母中的表达。

3. 肝细胞 cDNA 文库的筛选: 挑取在 SD/-Trp 培养基上含有 pGBKT7-p7TP2 质粒的 AH109 酵母菌落(>2 mm)数个接种于 SD/-Trp 液体培养基中, 30℃ 250 rpm 振摇 16~24 h, 当 A₆₀₀ 在 0.8~1.0 时与 400 μ l 肝细胞文库的酵母细胞在 50 ml 2 \times YPDA 中 30℃ 30~45 rpm/min 振摇条件下配合 18~24 h, 可观察到三叶草状的二倍体细胞, 将其重悬于 10 ml 的 0.5 \times YPD 培养基中, 铺 150 mm 的 SD/-Trp/-Leu/-His 平板 25 块和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块, 30℃ 培养, 直至菌落出现。将在四缺上生长的单克隆在铺有 X- α -Gal 的 QDO 上划线, 30℃ 培养 4~8 d, 蓝色菌落的即为阳性菌落。

4. 酶切鉴定及测序: 提取阳性酵母质粒并用电穿孔法转化大肠埃希菌, 于含有氨苄青霉素的 LB 平板培养, 所获得菌落提取质粒后用 Bgl II 酶切, 证明有插入片段后测序, 在 GenBank 数据库进行同源分析。

5. 回交试验验证阳性结果: 将提取的部分阳性文库质粒分别与 pGBKT7-p7TP2 质粒及 pGBKT7 空质粒醋酸锂法共转染酵母细胞 AH109, 同时将 pACT2 空

质粒与 pGBKT7 空质粒醋酸锂法共转染酵母细胞 AH 109 作为阴性对照,铺 SD/-Trp/-Leu 平板,30℃ 培养,直至菌落出现,然后再挑取克隆在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上划线,30℃ 培养 3 ~ 6 d。

结 果

一、pGBKT7-p7TP2 饵载体的鉴定

用特异引物扩增 p7TP2 基因(图 1),将其与 pGEM-T 克隆载体连接,转化大肠埃希菌,酶切鉴定及测序正确(图 2),然后用设计的酶切位点进行酶切,然后与 pGBKT7 载体连接,得到诱饵载体 pGBKT7-p7TP2,酶切鉴定正确(图 3)。

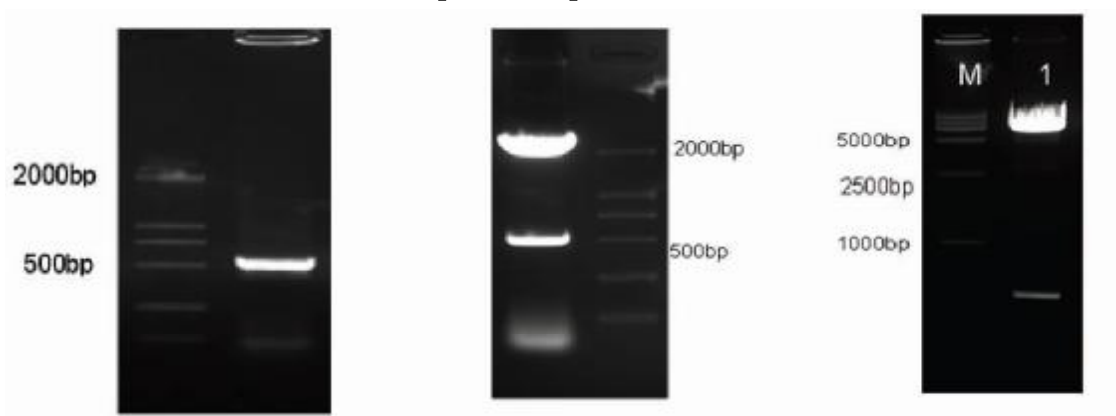


图 1 p7TP2 基因 PCR 扩增 图 2 pGEM-T-p7TP2 酶切图 图 3 pGBKT7-p7TP2 酶切图

二、p7TP2 融合蛋白的表达

“诱饵”载体 pGBKT7-p7TP2 构建后转化到酵母 AH 109 后能够稳定表达 p7TP2 融合蛋白(图 4,彩图见光盘)。阳性对照组含有 DNA 结合片段 Gal 41 ~ 147 氨基酸残基(aa)及 c-myc 标签的总分子量为 20.757 kD,实验组因表达 p7TP2 融合蛋白计算分子量为 37.518 kD。Western 免疫印迹分析结果显示 pGBKT7-p7TP2 质粒的酵母提取物于 38 kD 左右有明显条带。

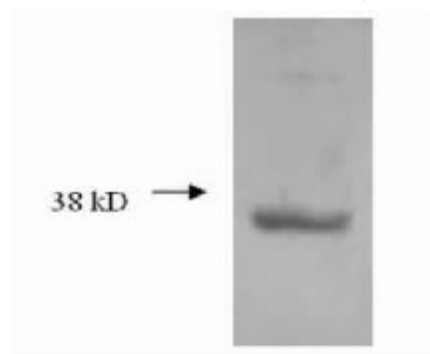


图 4 p7TP2 蛋白 Western 免疫印迹分析

三、单倍体酵母的配合及显色反应

配合培养 24 h 时,在倒置显微镜下观察到了三叶草状二倍体细胞(图 5),说明酵母配合培养成功。以 1:1000 稀释的配合产物在 SD/-Leu、SD/-Trp-Leu 培养基生长的克隆数分别为:118、22,以 1:10 000 稀释比的克隆数分别为 23、3,计算可得配合效率为 10%。4 缺/X- α -gal 培养基筛选阳性菌落:在三缺四缺平板上共挑取 70 个单克隆,在铺有 X- α -Gal 的四缺平板上划线,生长并变为蓝色的为阳性克隆(图 6)。

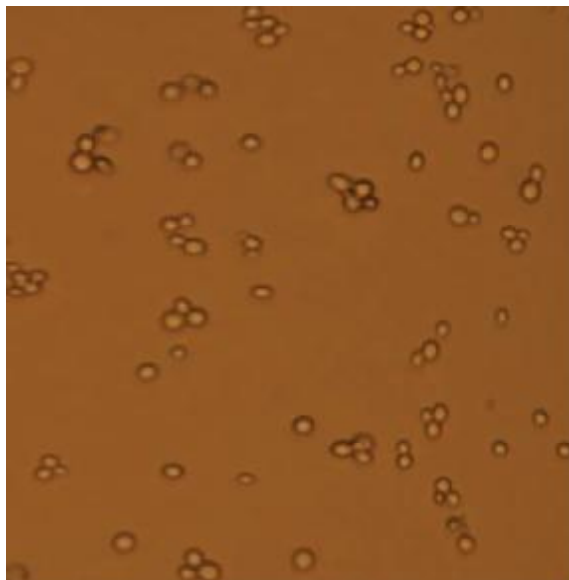


图 5 倒置显微镜下观察到的三叶草状二倍体细胞

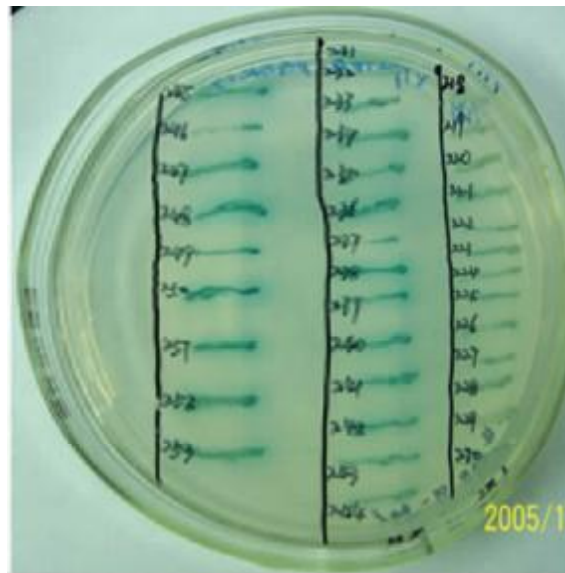


图 6 X- α -Gal 筛选阳性克隆

四、部分筛选克隆 *Bgl* II 酶切鉴定结果

筛选后的阳性克隆转化大肠杆菌,提取质粒后进行 *Bgl* II 酶切,琼脂糖凝胶电泳后可看到不同大小肝细胞 cDNA 克隆片段(图 7)。

五、cDNA 测序与同源性分析初步结果

挑选 28 个克隆进行测序,测序结果与 GenBank 数据库进行初步比较,已知基因的部分序列高度同源(99%),如表 1 所示。

将上述金属硫蛋白 2A、载脂蛋白 H、SL15 蛋白、C 蛋白和果糖二磷酸醛缩酶 B (ALDOB) 种文库质粒分别与 pGBKT7-p7TP2 质粒及 pGBKT7 空质粒醋酸锂法共转染酵母细胞 AH 109,在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上划线,30℃ 培养,所有与 pGBKT7-p7TP2 质粒共转的均在四缺平板上生长,而与 pGBKT7 空质粒共转的只有人 SL15 蛋白在四缺平板上长出克隆,其他没有生长,说明 SL15 蛋白为假阳性,其他初步认定为阳性结果,且阴性对照成立,共转的克隆在四缺平板上均未生长。

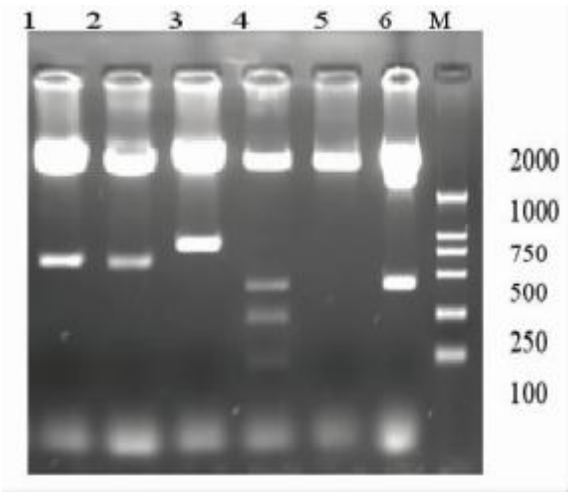


图 7 阳性克隆质粒 Bgl II 酶切分析

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

序号	蛋白名称	同源性	相同克隆数
1	金属硫蛋白 2A	100%	7
2	载脂蛋白 H	98% ~99%	3
3	SL15 蛋白	99%	3
4	果糖二磷酸醛缩酶 B(ALDOB)	100%	2
5	配对免疫球蛋白样 2 型受体 α	99%	1
6	C 蛋白(PC)	97%	1
7	受体相关蛋白复合体 2, α 2 亚基	99%	1
8	CTL1 基因类胆碱运输蛋白	99%	1
9	真核转录延伸因子 1 α	99% ~100%	2
10	HBV DNAPTP1 结合蛋白 1	100%	3
11	假想蛋白 FLJ14981	99%	1

讨 论

生物体内的多种蛋白相互作用,在很大程度上决定了细胞内信息流、信号转导和细胞周期调节,进而影响细胞功能。酵母双杂交系统是研究蛋白间相互作用的有力手段,酵母双杂交系统 3,利用 a 型和 α 型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理,免去了需要共转染文库质粒与诱饵质粒所带来的低效率问题。且由于有 3 个报告基因用来筛选及严格的对照阳性率达到 95% 以上。我们以新基因 p7TP2 为“诱饵”蛋白,应用酵母双杂交系统 3 对正常人肝细胞 cDNA 文库进行了筛选。实验中先筛出了 44 个克隆,经 X- α -Gal 显色反应后挑取 25 个阳性克隆测序,然后与 GenBank 数据库进行同源性比较及回交试验验证,发现 p7TP2 蛋白与金属硫蛋白 2A、载脂蛋白 H、蛋白 C、果糖二磷酸醛缩酶 B、配对免疫球蛋白样 2 型受体 α 、CTL1 基因类胆碱运输蛋白等已知功能蛋白基因相互作用。

金属硫蛋白系存在于人体及哺乳动物肝内的一种富含金属和半胱氨酸的小分子蛋白质,在体内具有拮抗重金属(汞、汞和铝)和抗辐射(包括紫外线),消除自由基、修复受损组织等功效,还能为生物体提供多种微量元素(如锌、铜、钴等),大量研究结果表明,肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝癌等肝脏疾病与自由基损伤有关,动物实验证实,毒性物质可引起体内自由基明显升高,肝内自由基过氧化物明显增多,肝细胞大量坏死,血清谷 ALT 水平升高。一般认为 MTs 参与基本的细胞生长和凋亡的过程^[12],本研究中应用实时定量逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)估测 MT 的表达类型在原代培养的正常细胞和瘢痕角化细胞,发现 MT2A 表达量最大^[13]。有研究通过检测鱼藤酮处理的 HeLa 细胞里胱冬肽酶(caspase)3 和胱冬肽酶 7 活性和胞质核小体的富集,发现 MT2A 过表达且明显的减少或延迟细胞凋亡^[14]。

蛋白 C 是一种糖蛋白,合成于肝脏,分子量为 62 000。它是一种维生素 K 依赖性的酶原,在凝血酶-血栓调节蛋白复合物的作用下被激活。激活的蛋白 C (APC)主要作用是使因子 V、VIII 灭活,减少纤溶酶原激活物的抑制物,同时抑制因子 X 结合于血小板膜磷脂。因而蛋白 C 具有抗凝和促纤溶作用。蛋白 C 缺乏症患者有血栓形成增加的倾向。蛋白 C 系统的抗凝特性严格制约了血栓形成^[15-17]。

人载脂蛋白 H(Apo H)又称为 $\beta 2$ 糖蛋白 I ($\beta 2$ -GI),由 Schultze 等于 1961 年首先发现,它是人血浆中作为过氯酸可溶性部分存在的一种 50 kD 糖蛋白^[18]。有报道,Apo H 在 Apo CII 存在时,能提高 LPL 活性(45 ± 17)%,而 Apo CIII 则降低 Apo H 是 Apo CII 赋予的 LPL 活性的 77%。Apo H 还参与凝血机制,因为 Apo H 与血小板结合,使磷脂带阴电荷,从而减少凝血因子 Xa、Va、 Ca^{2+} 与凝血酶原的结合位点或凝血酶原结合到血小板膜上后,通过调节腺苷酸环化酶活性来抑制 ADP 介导的血小板凝集,它作为一种血浆抑制因子,抑制内源性凝血旁路的接触激活。

综上所述推测 p7TP2 蛋白可能间接或直接参与体内抗凝血机制,而该基因是 p7 蛋白下调基因,郭江等利用抑制性消减杂交筛选 HCV p7 蛋白反式调节基因时发现 p7 蛋白可以下调一些直接和间接与抗凝血因子有关的基因,推测 p7TP2 蛋白可能与 HCV 感染病人肝脏合成的凝血因子减少,凝血机制发生障碍而引起的肝硬化、肝纤维化、肝癌等有关,而作为一种新基因,对它的进一步作用机制的研究将为阐明 HCV 感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出新的思路。

参 考 文 献

- 1 Zhang WH, Zhu SN, Lu SL, et al. HBV concomitant infection in HCV associated HCC. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2000, 8: 175-177.
- 2 Zhao YY, Yang HY, Liu GX, et al. Hepatitis C virus infection in patients with primary liver cancer. Xin Xiaohuabingxue Zazhi, 1996, 4: 43-44.
- 3 Xia SS. The risk factors of liver cirrhosis transforming to HCC. Xin Xiaohua Bingxue Zazhi, 1996, 4: 467-468.

- 4 Zhang H, Piao XX, Zhao JY, et al. The differentiation among liver cirrhosis and primary hepatocellular carcinoma caused by alcohol, HCV and HBV. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*,1999,7:572-576.
- 5 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma: cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol*,2001,7:445-454.
- 6 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms anion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*,2003,535:34-38.
- 7 Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, et al. The hepatitis C virus p7 protein forms anion channel that is inhibited by long-alkyl-chain minosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100:6104-6108.
- 8 Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*,2002,76:5326-5338.
- 9 Griffin S, Clarke D, McCormick C, et al. Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *J Virol*,2005,79:5525-15536.
- 10 袁菊,郭江,成军,等. HCV p7 蛋白反式调节基因 p7TP2 的克隆化及生物信息学分析. *世界华人消化杂志*,2006,14:581-587.
- 11 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*,1989,340:245-246.
- 12 Tan OJ, Bay BH, Chow VT. Differential expression of metallothionein isoforms in nasopharyngeal cancer and inhibition of cell growth by antisense down-regulation of metallothionein-2A. *Oncol Rep*,2005,13:127-131.
- 13 Lim D, Phan TT, Yip GW, et al. Up-regulation of metallothionein isoforms in keloid keratinocytes. *Int J Mol Med*,2006,17:385-389.
- 14 Reinecke F, Levanets O, Olivier Y, et al. Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells. *Biochem J*,2006,395:405-415.
- 15 Suzuki K, Matsuda K, Kusumoto H, et al. Monoclonal antibodies to human protein C: effects on the biological activity of activated protein C and the thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biochem*,1985,97:127-138.
- 16 Koelman BP, Reitsma PH, Allaart CF, et al. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood*,1994,84:1031-1035.
- 17 Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, et al. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*,1995,15:214-218.
- 18 Schultze HE. Glycoproteins of human plasma. *Bull Schweiz Akad Med Wiss*,1961,17:77-91.

(收稿日期:2007-01-12)

(本文编辑:李国力)