

白细胞中与NS5A TP5蛋白结合的蛋白基因的筛选与克隆

张 健, 成 军, 王 琳, 邵 清, 陆荫英, 梁耀东, 李 强, 刘 敏

张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 李强, 刘敏, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

张健, 男, 1973-05-18生, 北京市人, 汉族. 1997年解放军第四军医大学本科毕业, 2001年解放军军医进修学院内科传染病学专业硕士研究生, 医师. 主要从事传染病的临床与基础研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

Screening and cloning of human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus

Jian Zhang, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yin-Ying Lu, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu

Jian Zhang, Jun Cheng, Lin Wang, Qing Shao, Yin-Ying Lu, Yao-Dong Liang, Qiang Li, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

Abstract

AIM: Human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus (NS5ATP5) is a kind of protein with unknown function from the study with suppression subtractive hybridization (SSH). To investigate the biological function of NS5ATP5, we performed yeast-two hybrid to seek for proteins in leucocytes interacting with NS5ATP5.

METHODS: NS5ATP5 bait plasmid was constructed by ligating the gene of NS5ATP5 into pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type), the transformed yeast mated with yeast Y187 (α type) containing leucocyte cDNA library plasmid in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- α -gal for selection and screening. After extracting and sequencing of plasmids from blue colonies, we underwent sequence analysis by bioinformatics.

RESULTS: Ten colonies were sequenced. Among them, 8 colonies were genes with known functions and two colonies were new genes.

CONCLUSION: The preliminary successful cloning of gene of protein interacting with NS5ATP5 paves the way for studying the physiological function of NS5ATP5 and asso-

ciated protein.

Zhang J, Cheng J, Wang L, Shao Q, Lu YY, Liang YD, Li Q, Liu M. Screening and cloning of human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1): 51-53

摘要

目的: 采用酵母双杂交体系寻找与NS5ATP5相互作用的白细胞蛋白, 以探讨NS5ATP5的生物功能.

方法: 应用酵母双杂交系统3, 构建NS5ATP5诱饵质粒, 转化酵母AH109, 与含人白细胞cDNA文库质粒的酵母Y187进行配合, 于涂有x- α -gal营养缺陷型培养基上筛选生长. 挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒转化大肠杆菌提取质粒DNA后进行测序, 然后进行生物信息学分析.

结果: 筛选出10个与NS5ATP5特异性相互作用的克隆, 其中1个为金属硫蛋白, 1个为热休克蛋白HSP60, 1个为主要组织相容性复合体II淋巴细胞抗原DQB, 5个为人类重排免疫球蛋白 λ -轻链, 2个是未知功能基因.

结论: 初步克隆了NS5ATP5与白细胞结合蛋白基因, 对NS5ATP5的功能研究有一定的提示作用; 为以后研究这些能与NS5ATP5相互作用的基因在白细胞中的生理功能奠定了基础.

张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 李强, 刘敏. 白细胞中与NS5ATP5蛋白结合的蛋白基因的筛选与克隆. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):51-53
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/51.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染, 与肝纤维化和肝细胞癌发生发展过程密切相关. HCV感染机体后可形成病毒的持续感染, 导致肝脏的慢性化损伤. 另外, 目前许多研究发现, 丙型肝炎患者易发生肝外疾病如糖尿病、肾脏疾病、淋巴瘤等. 多数HCV慢性感染时的肝外症状为自身免疫性的, HCV病程的慢性化与此类疾病密切相关. 这提示我们HCV可能与人类免疫系统有相互作用^[1-13].

本实验室已经应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)构建HCV NS5A作用于肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞后反式调节的cDNA消减文库, 筛选差异表达的基因片段, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术对所得片段进行序列同源性分析, 获得其全长基因序列, 筛选到了一系列未知功能基因, 并把其中一个

命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5 (human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, NS5ATP5). 为进一步研究 NS5ATP5 是否与免疫系统存在着某种关系, 本实验采用酵母双杂交系统 3 寻找与 NS5ATP5 相互作用的白细胞蛋白, 通过相互作用蛋白的研究探讨 NS5ATP5 可能的功能与作用.

1 材料和方法

1.1 材料 酵母双杂交系统及筛选培养基 pGBKT7-BD 克隆载体、pGADT7-AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒 pGBKT7-53(AH109)、编码 DNA-BD/ 鼠 p53 融合蛋白、pTD1-1 (Y187)、质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白、酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基、SD/-Leu 培养基、SD/-Trp/-Leu 培养基、SD/-Trp/-Leu/-His 培养基、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基、X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自 Clontech 公司; 半硫酸腺苷、醋酸锂购自 Sigma 公司. cDNA 白细胞文库(Y187)为本室自行转化.

1.2 方法 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 NS5ATP5 的酵母表达载体 pGBKT7-NS5ATP5 由本室构建, 用醋酸锂^[14]法转入酵母细胞 AH109 后, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上培养, 无集落生长, 排除其自身激活作用. 挑取在 SD/-Trp 培养基上的转化子 - 即 GBKT7-NS5ATP5(AH109)(计数大于 1×10^9 细胞/mL), 与白细胞文库混合, 30 $^{\circ}$ C 轻摇配合过夜, 24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 6-18 d 后把长出的大于 2 mm 的酵母集落, 在铺有 X- α -半乳糖苷酶的 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落. 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的 Lyticase 法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获新的基因存入 GenBank 数据库.

2 结果

2.1 部分筛选克隆 Bgl II 酶切鉴定结果 因质粒 pACT2 内含有两个 Bgl II 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的肝细胞文库的基因片段(图 1). 图 1 中出现的各个大小不同的 DNA 片段证实我们筛选的克隆为阳性克隆, 而非配合后在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基生长的假阳性克隆.

2.2 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选 10 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 2 个克隆为新基因, 其余 8 个均与已知基因的部分序列高度同

源(94-99%), 这 8 个已知基因包括金属硫蛋白 2A、热休克蛋白 HSP60、主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB、人类重排免疫球蛋白 λ - 轻链共 4 种(表 1).

表 1 NS5ATP5 结合蛋白筛选结果

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	金属硫蛋白 2A	1	99
2	热休克蛋白 HSP60	1	98
3	主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB	1	98
4	人类重排免疫球蛋白 λ - 轻链	5	94-96
5	未知功能基因	2	97-98

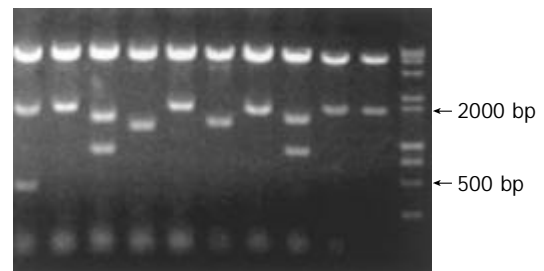


图 1 部分不同的克隆 Bgl II 酶切鉴定.

3 讨论

HCV 基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基的多蛋白前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区. 多蛋白前体至少被加工为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 具有多种生物学功能, HCV NS5A 是病毒编码的一种功能广泛的蛋白质, 参与许多重要的调节过程^[15-20]. 基于对 HCV 复制子亚基因组的研究, Blight et al^[21]发现 NS5A 与 RNA 的复制有关, 当对该序列进行多种突变实验时, 他们均可不同程度的增强病毒的复制能力. 除了参与 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程外, 还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长、凋亡以及免疫调节等功能. 近年研究发现, NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征^[22-24]. 尽管 NS5A 蛋白存在于细胞质中, 但其具有功能性核定位信号(nucleic localization signal, NLS)序列, 即 PPRKKRVV(354-362 aa), 因此有核信号转导功能. Ghosh et al^[25-26]研究发现, NS5A 蛋白可以抑制细胞周期调节基因 p21/WAF1 的转录, 而后者是介导细胞凋亡的 p53 的下游效应基因, 说明 NS5A 对细胞凋亡有抑制作用, 对细胞生长有促进作用. 通过酵母双杂交筛选试验发现 NS5A 蛋白可以和一种新近被确认的细胞转录因子 SRCAP 的 C 末端相互作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. 另外, NS5A 表现出对抗干扰素 α

(IFN α)的治疗效应也引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白 - 双链 RNA 依赖的激酶 (PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN 刺激的抗病毒效应. NS5A 蛋白中央包括一段干扰素敏感决定区 (ISDR), 该区被认为是介导 NS5A 与 IFN α 诱导的双链 RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR) 结合的部位, 后者是 IFN α 诱导的早期细胞内抗病毒合成反应. 同时 NS5A 显示出诱导 CXC 趋化因子、白介素 - 18 (IL-18), 可抵消 IFN α 抗病毒效应^[27-28].

本实验室利用 SSH 技术筛选出 HCV NS5A 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 对挑选的克隆进行分析, 发现其中一个新基因与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性. 电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因, 将该未知功能基因命名为 NS5ATP5. 为进一步验证 NS5ATP5 与白细胞蛋白的相互作用, 本实验采用了酵母双杂交技术筛选 NS5ATP5 与白细胞文库中有相互作用的蛋白. 酵母双杂交系统是近年来新发展起来的分析真核细胞中蛋白 - 蛋白、蛋白 - DNA、蛋白 - RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 本次实验共筛选出金属硫蛋白 2A、热休克蛋白 HSP60、主要组织相容性复合体 II 淋巴细胞抗原 DQB、人类重排免疫球蛋白 λ - 轻链 4 种已知基因及 2 个未知功能基因, 对 NS5ATP5 功能的研究有一定的提示作用, 并为以后研究这些能与 NS5ATP5 相互作用的基因在白细胞中的生理功能奠定了基础.

4 参考文献

- 1 成军, 朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学·病毒学分册 2000;7:29-32
- 2 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995;69:3893-3896
- 3 Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996;70:4438-4443
- 4 刘妍, 成军. HCV 致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 5 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362
- 6 Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura TJ, Dienstag L, Alter MJ, Stevens CE, Tagtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shister JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-364
- 7 Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *World J Gastroenterol* 1999;5:107-110
- 8 Huang F, Zhao GZ, Li Y. HCV genotypes in hepatitis C patients and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 1999;5:547-549
- 9 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75-79
- 10 Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 11 Zhang LF, Peng WW, Yao JL, Tang TH. Immunohistochemical detection of HCV infection in patients with hepatocellular carcinoma and other liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:64-65
- 12 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
- 13 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261
- 14 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. 世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 15 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. 中华微生物和免疫学杂志 2000;20:567
- 16 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. 中华中西医结合杂志 2001;2:97-99
- 17 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 18 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 19 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 刘妍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS_{5A} 抗原模拟表位的筛选与鉴定. 中华肝脏病杂志 2002;10:266-268
- 20 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 21 Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974
- 22 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 25 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 26 Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chivria J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 27 Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999;73:6506-6516
- 28 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106