P.O.Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2004 January;12(1):86-88
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2004年版权归世界胃肠病学杂志社

酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV核心蛋白结合蛋白基因

邵 清, 成 军, 白雪帆, 王 琳, 张 健, 梁耀东, 刘 敏, 李 强

邵清, 成军, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强, 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
白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039
邵清, 男, 1966-10-22出生, 汉族, 北京市人, 1991年第四军医大学本科毕业, 第四军医大学唐都医院感染科2001年级硕士研究生. 主要从事病毒性肝炎的基因治疗研究.
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、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. 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 of the genes of HCV core interacting proteins from human leucocyte cDNA library by yeast two-hybrid system

Qing Shao, Jun Cheng, Xie-Fan Bai, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li

Qing Shao, Jun Cheng, Lin Wang, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Min Liu, Qiang Li, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Xie-Fan Bai, Department of Infectious Diseases,Tangdu hospital, The Fourth Military Medical University, Xian, 710039, Shanxi Province, 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: To investigate the binding protein of hepatitis C virus core protein (HCVcore).

METHODS: The HCVcore gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and HCVcore bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3, then transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing leucocyte cDNA library plasmid in 2×YPDA medium. Diploid yeast was 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 and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we underwent analysis by bioinformatics.

RESULTS: Six colonies were sequenced, among which,two colonies were golgi complex associated protein 1 (GOCAP1), one colony was Ran binding protein M (RanBPM), one colony was pellino homolog 2 (PELI2), and two colonies were KIAA1949 protein (KIAA1949).

CONCLUSION: Genes of HCV core interacting proteins in leucocyte are successfully cloned and the results bring some new clues for studying the biological functions of HCVcore and associated proteins.

Shao Q, Cheng J, Bai XF, Wang L, Zhang J, Liang YD, Liu M, Li Q. Screening of the genes of HCV core interacting proteins from human leucocyte cDNA library by yeast two-hybrid system. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(1):86-88

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV核心蛋白基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提取质粒, 转化入大肠杆菌, 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析.

结果: 成功克隆出核心蛋白基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有X-α-半乳糖(X-α-gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共6个, 其中2个高尔基复合体关联蛋白1, 1个Ran结合蛋白M, 1个pellino同族体2, 2个未知功能蛋白基因(KIAA1949).

结论: 成功克隆出丙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究HCV的作用提供了新线索.

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV核心蛋白结合蛋白基因.世界华人消化杂志 2004;12(1):86-88
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/86.asp

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)于1989年被发现, 是输血后病毒性肝炎的重要病原体, 可引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 甚至肝细胞癌(HCC)[1-5]. 丙型肝炎病毒是单股正链RNA病毒, 全长约9 500个核苷酸(nt), 含有一个大的开放读码框架(ORF), 编码3 010-3 033个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 多肽前体至少被加工为10种结构蛋白

和非结构蛋白，其中结构蛋白核心蛋白基因(1-573 nt)编码的21kD HCV核衣壳蛋白(191 aa)是一种多功能蛋白质，在HCV致病过程中可能起着重要的作用[6-10]，我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因[11]，为探讨HCV致病的分子生物学机制提供了重要线索，为进一步研究HCV核心蛋白与免疫系统的关系，我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中HCV核心蛋白结合蛋白基因.

1 材料和方法

1.1 材料 Saccharomyces cerevisiae AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、cDNA淋巴文库、酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade， 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. 复杂高效感受态(FSB)，本室自制. 大肠杆菌(DH5α)，本室保存[12].

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 HCV核心蛋白的酵母表达载体pGBKT7- HCV core用醋酸锂法转入酵母细胞AH109，由本室构建[11].

1.2.2 酵母白细胞文库的构建 cDNA白细胞文库进行增菌后，提取质粒，转化入酵母细胞(Y187)，经文库滴定，确定文库细胞计数大于1×10^9细胞/mL，由本室构建[13-16].

1.2.3 诱饵与白细胞文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp选择培养基上生长转化子(计数大于1×10^9细胞/mL)与淋巴文库混合，30 ℃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16 d后把长出的大于3 mm的酵母集落，在铺有X-α-半乳糖苷酶的QDO上检查α-半乳糖苷酶活性，认为在QDO培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落.

1.2.4 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落，按照试剂盒提供的操作指南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比对，进行生物信息学分析.

表1 丙型肝炎病毒核心蛋白结合的白细胞蛋白的筛选结果

序号	筛选出的目的基因	同源性	相同克隆数
1	高尔基复合体关联蛋白1	99-100%	2
2	Ran结合蛋白M	99%	1
3	1个pellino同族体2	99%	1
4	未知功能蛋白基因(KIAA1949)	99-100%	2

2 结果

cDNA测序与同源性分析初步结果配合后筛选出在4缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基和铺有X-α-gal的4缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落6个克隆测序，与GenBank数据库进行初步比较. 2个为未知功能蛋白基因，其余4个均与已知基因的部分序列高度同源(99-100%)表1.

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种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. 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白X和Y分别融合到一酵母转录激活因子的BD和AD上，X与Y的相互作用重构了激活因子，从而导致下游“报告基因”的转录，产生容易探测到的表型[17-21]. 我们使用的是酵母双杂交系统3(Clontech公司商品化的双杂交系统)，由于有3个表达基因用来筛选及严格的对照，其阳性率达95%以上，假阳性率5%以下. 实验中我们在真核表达载体pGBK-T7中构建pGBKT7-HCVNS3诱饵质粒并在酵母菌株AH109中表达了HCVcore基因[7]，与人白细胞cDNA文库的酵母菌株Y187进行配合，配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有X-α-半乳糖(X-α-gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落共6个，其中2个高尔基复合体关联蛋白1，1个Ran结合蛋白M，1个pellino同族体2，2个未知功能蛋白基因(KIAA1949).

Ohda *et al*[22]研究表明高尔基复合体关联蛋白1是高尔基体的外围结构，通过与高尔基体的巨大端的相互作用来保持高尔基体的结构，影响从内质网到高尔基体的蛋白质运输.

Rao *et al*[23]研究表明RanBPM与类固醇受体相互作用并选择性地改变其活性，类固醇受体包括雄激素受体、糖皮质激素受体、盐皮质激素受体和黄体酮受体. Nakamura *et al*[24]研究表明RanBPM与微管成核作用有关，Ran通过RanBPM调节细胞中心体. Wang *et al*[25]报道MET是肝生长因子(HGF)的蛋白酪氨酸激酶受体，是1个控制细胞生长、形态发生和运动性的多功能细胞因子. 在人类多种肿瘤发生时均可查到MET的过表达. RanBPM的功能是MET酪氨酸激酶区域的衔接蛋白，可增大HGF-MET信号传导途径，RanBPM的过表达可导致Ras信号传导途径的组成部分激活. Shimotohno *et al*[26]研究表明HCV核心蛋白影响细胞增生主要通过两个机制，即激活Ras/Raf的活性和抗凋亡作用.

通过以上结果提供的这些线索，我们可以进行更深入的研究，进一步弄清各种蛋白与HCV核心蛋白的相互作用及HCV核心蛋白确切的作用，为寻找阻断HCV感染及HCC发生的有效方法探索新道路[27-32]. 当然，这些结合蛋白的发现只是研究病毒蛋白功能的一个起点，在极其复杂的体内环境中，需要更多的实验证据来揭示这种结合的生物学意义[33-44].

4 参考文献

1 成军, 李莉. 清除乙型肝炎病毒的非细胞裂解机制. 世界华人消化杂志 2002;10:73-76

2 成军, 李克, 陆荫英, 董菁, 李莉, 王琳, 钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225

3 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128

4 成军. 慢性丙型病毒性肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003

5 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003;11:373-377

6 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18

7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交"饵"载体构建与表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132

8 韩萍, 刘妍, 成军, 王刚, 陆荫英, 李克, 李莉. 截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白上调*c-myc*基因表达的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:141-144

9 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217

10 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:213-215

11 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

12 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164

13 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769

14 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388

15 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选HBcAg肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429

16 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425

17 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746

18 皇甫竞坤, 董菁, 邓红, 成军, 施双双, 洪源, 任喜民, 李莉. 乙型肝炎病毒核心基因启动子序列突变及准种. 世界华人消化杂志 2001;9:1323-1325

19 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

20 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HBsAg重组疫苗与表面抗原DNA疫苗诱导H-2^b小鼠免疫应答实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:137-140

21 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168

22 Ohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Yano A, Nakamura N, Ikehara Y. Identification and characterization of a novel Golgi protein, GCP60, that interacts with the integral membrane protein giantin. *J Biol Chem* 2001;276:45298-45306

23 Rao MA, Cheng H, Quayle AN, Nishitani H, Nelson CC, Rennie PS. RanBPM, a nuclear protein that interacts with and regulates transcriptional activity of androgen receptor and glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2002;277:48020-48027

24 Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 1998;143:1041-1052

25 Wang D, Li Z, Messing EM, Wu G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J Biol Chem* 2002;277:36216-36222

26 Shimotohno K, Watashi K, Tsuchihara K, Fukuda K, Marusawa H, Hijikata M.Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation. *J Gastroenterol* 2002;37:50-54

27 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98

28 Nagpal S, Ghosn CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376

29 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454

30 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486

31 Zhong YW, Cheng J, Wang G, Shi SS, Li L, Zhang LX, Chen JM. Preparation of human single chain Fv antibody against hepatitis C virus E2 protein and its application in immunohistochemistry. *World J Gastroenterol* 2002;8:863-867

32 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM.Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303

33 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021

34 成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2003;11:378-384

35 钟彦伟, 成军, 张忠东, 孙敏, 李强, 李克, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 噬菌体表面展示技术筛选HCBP6人源单链可变区抗体. 世界华人消化杂志 2003;11:389-393

36 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403

37 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398

38 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:935-938

39 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2003;11:920-924

40 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白3反式调节靶基因. 世界华人消化杂志 2003;11:930-934

41 成军, 刘妍, 洪源, 王琳, 钟彦伟, 董菁, 王刚. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因10的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11:925-929

42 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896

43 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:943-946

44 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白5A反式调节基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:939-942