

应用噬菌体展示技术筛选 HBsAg 启动子 I 的 DNA 结合蛋白

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖

杨艳杰, 成军, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖, 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 100038
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
国家自然科学基金项目, 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
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: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-06-09

摘要

目的: 通过筛选HBsAg基因启动子I(SPI, surface promoter I)结合蛋白, 为HBV复制机制的研究探索新的途径。

方法: 应用噬菌体展示技术, 以HBsAg基因启动子I的聚合酶链反应(PCR)产物DNA作为固相筛选分子, 对噬菌体人肝细胞cDNA文库进行4轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程, 经噬斑的PCR扩增后, 构建克隆载体, 最后对所筛选克隆进行DNA序列分析和同源性搜索。

结果: 噬菌体经富集后, 从随机筛选的14个克隆中得到8个阳性克隆, 成功构建了克隆载体。序列测定后经过同源性搜索, 确定了和HBV表面抗原基因启动子I特异结合的肝细胞蛋白, 共编码7种蛋白。其中3个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白。

结论: 用噬菌体人肝cDNA文库筛选得到HBsAg基因启动子I的结合蛋白, 分析了该蛋白的编码基因。

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖. 应用噬菌体展示技术筛选HBsAg启动子I的DNA结合蛋白. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2737-2739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2737.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题。世界人口约6%是病毒携带者, 因此HBV是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-5], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致肝细胞癌的重要分子机制^[6-12]。HBV基因组分为结构基因序列和调节基因序列两大部分。调节基因序列和结构基因序列相互重叠, 即使结构基因序列本身也有部分重叠, 因此, HBV具有结构紧密的特点。HBsAg基因含有两个串联的启动子SPI和SPII。其中SPI(2 219-2 780 nt)调节2.4 kb mRNA的转

录, 编码表面抗原大蛋白。在HBV复制中具有十分重要的作用。SPI含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为肝细胞特异性核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)I结合位点。该结合位点是HBV转录调节的重要组成部分, 也是HBV嗜肝性的重要原因之一; 这一位点可能还有其他肝特异因子与之结合, 从而调节2.4 kb mRNA的转录^[13-14]。另外, SPI的腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)核苷酸丰富区中还有一个AFP-1(一种可与AFP基因的增强子及启动子结合的核因子)结合位点, 也可能与肝细胞特异性的转录有关。因此, 作为指导前-S基因组RNA转录的SPI启动子在HBV的生活周期中具有十分重要的作用。为了寻找与SPI结合的肝特异性转录作用因子, 进一步探讨SPI的转录调节机制, 我们应用噬菌体展示技术, 利用人肝细胞cDNA文库, 以生物素化的SPI的DNA作为固相分子进行筛选, 研究影响HBV DNA复制的肝细胞蛋白的结构和功能。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select 人肝细胞cDNA文库, 受体菌BLT5615 (Novagen公司), 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-) (Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), EcoRI、BamHI、MluI、NheI (购于宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞cDNA文库的筛选 HBV SPI启动子的扩增根据HBV *ayw*的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, 并用生物素标记, P1: 5' -ACG CGT GAA CAT CTA GTT AAT C-3', P2: 5' -GCT AGC GCT GTA GAT CTT GTT C-3' 在引物5'端分别引入MluI和NheI位点, 由赛百盛公司合成。在0.5 mL Ep管中依次加入17 μ L双蒸水, 2.5 μ L的10 \times 缓冲液(含20 mmol/L MgCl₂), 2 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L P1和P2, 1 μ L pCP10质粒, 0.5 μ L Taq酶(5 Mu/L)。放入PE 9 600 PCR仪中扩增。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C变性60 s, 57 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 循环33次后, 72 $^{\circ}$ C保温10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。玻璃奶法回收DNA片段。文库扩增: 将BLT5615新鲜克隆在3 mL LB/Amp内振摇, 37 $^{\circ}$ C过夜。在3 mL LB/Amp内加入30 μ L振摇细菌, 将细菌浓度摇至A₆₀₀值0.5, 加入30 μ L IPTG, 再振摇30 min后加入噬菌体文库5 μ L。37 $^{\circ}$ C振摇1-3 h直到观察到

细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移至另一无菌 Ep 管中, 4 °C 保存. 链亲和素 20 μ L (1 g/L) 包被微孔板, 4 °C 过夜. 1 \times TBS 洗涤, 加入 100 μ L SP I 启动子 DNA 回收片段, 4 °C 过夜. 1 \times TBST (5 g/L Tween-20) 洗涤 5 遍, 加入文库扩增裂解液 100 μ L, 4 °C 过夜. 1 \times TBST 洗板 5 次, 加入 100 μ L T7 洗脱缓冲液, 室温孵育 20 min, 将洗脱液移至另一无菌 Ep 管中. 将 15 μ L 洗脱噬菌体加入 3 mL 中对数生长期的细菌培养液, 37 °C 振荡培养, 直到看到细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移到一新 Ep 管, 4 °C 保存备下一轮筛选用. 每轮筛选后, 均做噬斑分析. 按上述步骤再筛选 5 遍.

1.2.2 噬斑的 PCR 扩增 刮取第 5 轮筛选后的阳性噬斑, 置于 100 μ L pH 8.0 的 10 mol/L EDTA 的 Ep 管中, 65 °C 加热 10 min, 14 000 *g* 离心 10 min 至澄清. 在 0.5 mL 管中依次加入 40 μ L 双蒸水, 5 μ L 的 10 \times 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl₂), 4 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L T7 select 上游引物 P3: 5' -GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3' 和下游引物 P4: 5' -AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3', 1 μ L pCP10 质粒, 0.5 μ L Taq 酶 (5 Mu/L) 放入 PE 9 600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 55 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 °C 保温 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 玻璃奶法回收 DNA 片段.

1.2.3 序列比对和同源性分析 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 以酶切鉴定阳性的重组子为模板, 进行目的基因的 DNA 序列测定, 序列测定由上海博亚生物公司完成. 同源性搜索由以下网址上的 BLASTn 软件完成 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>).

2 结果

2.1 肝细胞 cDNA 文库的筛选 以固相化的 SPI 启动子 DNA 片段作为支持分子, 对肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选. 噬菌体的富集结果见表 1. 从固相平板洗脱的噬菌体数显示了明显的增加趋势, 第 4 轮与第 1 轮相比, 富集了 356 倍 (富集倍数 = 第 4 轮产出率 / 第 1 轮产出率 产出率 = 洗脱的噬菌体数量 / 所用的噬菌体数量).

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率
	投入	捕获	
第 1 轮	3.5×10^8	2.5×10^{11}	7.1×10^2
第 2 轮	2.5×10^{11}	2.6×10^{15}	1.0×10^4
第 3 轮	2.6×10^{15}	1.5×10^{20}	5.8×10^4
第 4 轮	1.5×10^{20}	3.8×10^{25}	2.5×10^5

2.2 目的基因的 PCR 扩增 经过 4 轮筛选, 随机挑取 14 个噬斑为模板, 用 T7 select 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 结果产生片段大小不等的条带 (图 1), 用同一噬斑裂解液重复 PCR 得到相同结果.

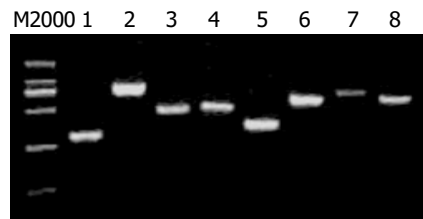


图 1 阳性噬斑裂解液 PCR 扩增.

2.3 序列比对和同源性分析 对阳性克隆基因的 DNA 序列测定, 及根据 GenBank 数据库提供的数据库进行 BLASTn 同源性搜索, 8 个阳性克隆筛选到启动子 DNA 结合蛋白, 共编码 7 种蛋白. 其中 3 个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码 4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白 (表 2).

表 2 应用噬菌体展示技术筛选到的阳性克隆

编号	编码蛋白	同源性 (%)	克隆数
1	isolate 183 mitochondrion (孤立线粒体 183)	99	1
2	RF-C/activator 1 homolog (释放因子 C/激活因子 1 同源体)	100	1
3	hypothetical protein MGC9515 (人类假想蛋白 MGC9515)	99	2
4	haptoglobin (触珠蛋白)	99	1
5	4-aminobutyrate aminotransferase (4-氨基丁酸氨基转移酶)	100	1
6	chromosome 3 clone RP11-801L18 (复制蛋白 11-801L18)	100	1
7	hypothetical protein FLJ22056 (人类假想蛋白 FLJ22056)	100	1

3 讨论

作为调节元件的一段 DNA 序列, 可与某些细胞蛋白或病毒蛋白结合, 正性或负性调节转录. HBV 的 SPI 启动子是 HBV 的一个重要调节元件. 转录因子 HNF1 和 HNF3 对 SPI 的转录调节具有重要作用, 他们作用的位置在肝脏而不在其他组织. 这两种因子协同作用可能抑制 2.4 kb mRNA 的转录. 在多聚腺苷酸 (PolyA) 加尾信号、糖皮质激素应答元件 (GRE)、增强子 I (ENH I)、增强子 II (ENH II) 和 HBxAg 及其他的细胞因子作用下顺式或反式激活 SPI, 开始发挥调节功能^[15-16]. SPI 调节 2.4 kb 的 mRNA 转录, 编码大蛋白. 对 HBV 转基因鼠的研究显示, 2.4 kb mRNA 在肝组织内呈严格分布, 具有高度的嗜肝性. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在细胞内蓄积, 引起细胞病变效应^[17-18]. HBV 各种包膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性 HBV 颗粒成熟和释放, 而且有利于宿主细胞的生存, 使二者能共生共存^[19-20]. 因此, 3 种外膜蛋白的产量有正常比例, 大蛋白过量时, 将顺式干扰 SPI, 从而降低基因的转

录水平. Li *et al*^[21]从1例慢性肝炎患者血清中分离到S基因启动子缺失变异株, 转染肝癌细胞后, 大蛋白过度表达, 而中、主蛋白表达减少, 因而病毒及亚病毒颗粒的分泌都受到抑制, 肝细胞内大蛋白堆积, 认为可能是慢性肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因. 他们进一步研究发现, 过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活grp78和grp94启动子, 改变宿主细胞的生理功能^[22-24]. 转基因小鼠模型已经证实, 若大蛋白过度表达, 在肝细胞内堆积, 将导致肝细胞内质网肿胀, 肝细胞变性. 因此, 在感染过程中, 改变大、中、小蛋白的比例将影响疾病的进程.

我们以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因, 通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称. 经过4轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程, 结果得到了8个阳性克隆, 共表达7种蛋白. 其中有3个为未知功能蛋白, 对已知功能蛋白, 如4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白(haptoglobin)、复制蛋白等蛋白的结合作用, 尚未见有文献报道, 需体外结合及真核细胞共转染等实验进一步证实. 总之, 本实验应用噬菌体展示技术, 试图寻找与HBV SPI启动子结合的肝特异蛋白及HBV、特别是表面抗原大蛋白严格嗜肝性的原因, 探索病毒表面抗原大蛋白转录、翻译的调控机制. 通过本实验, 我们筛选到了一些与SPI启动子序列特异结合的蛋白, 为今后更好地了解HBV的转录调控机制及其生活史打下了基础.

4 参考文献

- Dai LC, Yao X, Lu YL, Ping JL, Zhang BW, Ni CR. Expression of midkine and its relationship with HBV infection in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1691-1693
- Huo TI, Wu JC, Lui WY, Lee PC, Huang YH, Chau GY, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus is a recurrence-independent risk factor in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma undergoing resection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1203-1208
- Fujioka S, Shimomura H, Iwasaki Y, Fujio K, Nakagawa H, Onishi Y, Takagi S, Taniguchi H, Umeoka F, Nakajima H, Moriya A, Nanba K, Piao CY, Shinji T, Koide N, Shiratori Y. Hepatitis B virus gene in liver tissue promotes hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1920-1924
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356-360
- Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 2003;384:203-212
- 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. *中华内科杂志* 2000;39:319-322
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334
- Raimondo G, Costantino L, Caccamo G, Pollicino T, Squadrito G, Cacciola I, Brancatelli S. Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases. *J Hepatol* 2004;40:515-519
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *China J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. *中华医学杂志* 2002;82:81-85
- Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003;13:451-458
- Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- Tu Y, Qi Z, Yang P, Pan Y, Yu S, Du M, Li G. Transgenic mice model of human hepatitis B virus x gene. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2000;22:263-265
- Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001;75:2900-2911
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Co-operative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *J Biol Chem* 2000;275:18358-18365
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999;73:10399-10405
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90