

- internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 25 Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E, Sakaguchi N. Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* 1997;46:373-378
- 26 Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A. Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem* 2002;277:15113-15123
- 27 Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5963-5968
- 28 Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 1999;274:8355-8358
- 29 Nasir J, Theilmann JL, Vaillancourt JP, Munday NA, Ali A, Scherer S, Beatty B, Nicholson DW, Hayden MR. Interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) and related cell death genes ICERel-II and ICERel-III map to the same PAC clone at band 11q22.2-22.3. *Mamm Genome* 1997;8:611-613

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

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: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

### 摘要

**目的:** 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白的基因。

**方法:** 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV核心蛋白编码基因, 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, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 $\alpha$ ), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

**结果:** 成功克隆出HBV核心蛋白编码基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在辅有X- $\alpha$ -半乳糖(X- $\alpha$ -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落17个, 其中肿瘤高甲基化1基因3个, 编码线粒体蛋白的DNA聚合酶 $\gamma$ 基因1个, 乙酰辅酶A合成酶3基因1个, 假定翻译起始因子

基因1个, 趋化因子受体5基因1个, 线粒体核糖体蛋白L41基因1个, Kyot结合蛋白基因1个, Ran结合蛋白基因1个, 真核细胞翻译延伸因子2基因2个, 未知基因5个。

**结论:** 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究HBV核心蛋白在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林. 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12): 2880-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2880.asp>

### 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的致病病毒因子, 除引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 还与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[1]</sup>. HBV属嗜肝DNA病毒, 基因组为3 200千碱基对(kb)部分双链环状DNA. HBV有2个核心相关的开放读框, 其中核心蛋白基因编码21 ku的HBcAg. HBcAg有高度免疫原性, 几乎所有HBV感染者都产生抗-HBc, 同时有T细胞免疫应答<sup>[1-2]</sup>. HBV的蛋白与肝细胞和白细胞中的蛋白之间的相互作用在HBV感染、慢性肝炎和致肝细胞癌过程中起着重要的作用. 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, 证明HCV核心蛋白与肝脏脂肪变的关系, 为探讨HCV致病

的分子生物学机制提供了重要线索<sup>[3-6]</sup>。为进一步研究 HBV 与免疫系统的关系,我们用酵母双杂交技术筛选白细胞中与 HBcAg 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 白细胞文库、以上产品均购自 Clontech 公司。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- $\alpha$ -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(DH5 $\alpha$ ),本室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒的构建及表达** HBV 核心蛋白基因的酵母表达载体 pGBKT7-HBV core 用醋酸锂法转入酵母细胞 AH109 由本室构建。

**1.2.2 酵母白细胞文库的构建** cDNA 白细胞文库进行增菌后,提出质粒,转化入酵母细胞(Y187),经文库滴定,确定文库细胞计数大于  $1 \times 10^{12}$  细胞/mL。

**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  $1 \times 10^{12}$  细胞/mL)与白细胞文库混合,30℃轻摇配合过夜,24 h 后铺板 SD/-Trp/-Leu/-His 25 块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(QDO)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- $\alpha$ -半乳糖苷酶的 QDO 上检查  $\alpha$ -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,并把所获新的基因存入 GenBank 数据库。

## 2 结果

**cDNA 测序与同源性分析初步结果** 配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade)培养基又能在铺有 X- $\alpha$ -gal 的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 17 个克隆并测序,与 GenBank 数据库进行初步比较,发现其中含肿瘤高甲基化 1 基因 3 个,编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶  $\gamma$  基因 1 个,乙酰辅酶 A 合成酶 3 基因 1 个,假定翻译起始因子基因 1 个,趋化因子受体 5 基因 1 个,线粒体核糖体蛋白 L41 基因 1 个,Kyot 结合蛋白基因 1 个,Ran 结合蛋白基因 1 个,真核细胞翻译延伸因子 2 基因 2 个,未知蛋白基因 5 个(表 1)。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

同源蛋白质	同源性(%)	相同克隆数
肿瘤高甲基化 1 (HIC1)	98-100	3
编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶 $\gamma$ (POLG)	99	1
乙酰辅酶 A 合成酶 3	99	1
假定翻译起始因子	99	1
趋化因子受体 5	100	1
线粒体核糖体蛋白 L41	100	1
Kyot 结合蛋白	99	1
Ran 结合蛋白 (RanBPM)	99	1
真核细胞翻译延伸因子 2	100	2
未知蛋白	97-100	5

## 3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)基因组中的核心基因以第一和第二个开始密码子 ATG 分为前 -C 和 C 区,前 -C 区的 ATG 在 1 841 nt, C 区 ATG 在 1 901 nt,前 -C 与 C 区有共同的终止密码子,在 2 458 nt. HBcAg 有保守的三维结构,分子质量 21 ku. 其 1-144 aa 是核壳装配区,而羧基端的 150-185 aa 段是精氨酸富集区. HBcAg 的羧基末端是与 RNA/DNA 的结合区段,而且受细胞激酶作用而部分磷酸化,磷酸化对核心内 DNA 合成、复制和传染的建立很重要. HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性羧基末端,可介导细胞核内转运信号,大量 HBcAg 进入细胞核内<sup>[7-9]</sup>。

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结合结构域(BD)和激活结构域(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. 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<sup>[10-14]</sup>。

实验中我们在真核表达载体 pGBK-T7 中构建 pGBKT7-HBV core 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBV 核心蛋白基因,与人白细胞 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合,筛选出与之相互作用的蛋白基因 17 种,其中肿瘤高甲基化基因(HIC1)是肿瘤抑制基因的代表,在正常组织活跃表达,而在各种肿瘤细胞表达低下,与 17p13.3 的 CpG 岛联合使其异常高甲基化及在多种常见人类肿瘤 HIC1 转录失活<sup>[15]</sup>, HBcAg 可与之结合,表明 HBcAg 可能与 HCC 的发生有关. 人线粒体 DNA 是 16 569 bp 的双链 DNA,编码的 13 个蛋白产物为氧化磷酸化用来合成真核细胞所需的 ATP,而编码线粒体蛋白的 DNA 聚合酶  $\gamma$ (POLG)是惟一的参与合成 mtDNA 的聚合酶, POLG 由于校正效率的降低而

有错误倾向,由于变异、外因和某些抗病毒药物抑制, POLG 的活性缺陷可增强 mtDNA 的变异<sup>[16-18]</sup>; 另外 HbcAg 可与线粒体核蛋白 L41 结合, 这些都支持 HBV 核心蛋白通过肝细胞线粒体介导 HBV 的复制和装配。乙酰辅酶 A 合成酶是用来合成脂肪酸, 在肝线粒体外膜、微粒体、细胞质膜和过氧化物酶发现有活性表现, 乙酰辅酶 A 合成酶活性依赖某些外因, 如用去垢剂处理微粒体和过氧化物酶可诱导抑制乙酰辅酶 A 合成酶<sup>[19-20]</sup>。趋化因子受体 5 (CCR5) 主要表达于单核细胞, 也选择性表达于 Th1 细胞。有人报告, CCR5 尽管都表达在活化的效应性 Th1、Th2 细胞上, 强度亦相仿, 但仍认为 CCR5 是 Th1 细胞的标志, 人免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 通过 CD4 分子作为第一受体, 以趋化因子受体 CXCR4、CCR5 等作为第二受体实现其对靶细胞的感染, 并导致 HIV 感染细胞之间发生融合, 形成合胞体, 这是 HIV 在体内进行扩散的主要形式, 也是 HIV 感染导致机体 CD<sup>+</sup>4 细胞绝对数下降的一个重要原因<sup>[21]</sup>。Kyot 结合蛋白 (KBP) 基因至少编码三个转录本 (KBP1、KBP2、KBP3), 三个转录本与 Kyot 结合的区域和能力是一样的, 说明三者的功能一样, 通过酵母双杂交证明 Kyot2 和 KBP 相互作用, 而且 Kyot 通过其 LIM 区域介导二者结合, LIM 区域是半胱氨酸富集的锌结合基序, 参与蛋白之间的结合, LIM 蛋白能和受体酪氨酸激酶和蛋白激酶 C (PKC) 结合, 可能参与信号转导, LIM 区域作为接头分子促进蛋白复合体的形成, KBP 与 Kyot 的 LIM 区域结合, 说明 KBP 可能参与调节 Kyot 的功能<sup>[22]</sup>。Ran 是 Ras 样核 GTPase, 参与核质转运、微管装配及核膜形成<sup>[23-24]</sup>, RanBPM 是位于细胞中心的蛋白, 作为 Ran 结合蛋白参与核质的转运过程<sup>[25]</sup>。未知功能新基因的发现也为我们研究 HBV 的致病作用提供了新线索, 但需要进一步研究证实。

通过本次实验我们得知 HBcAg 能与多种蛋白相结合, 其中包括几种免疫因子, 使我们进一步了解了 HBV 病毒与免疫系统的相互关系。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, 进一步弄清各种与 HBcAg 结合的蛋白及作用机制, 为阻断 HBV 感染及肝细胞癌 (HCC) 发生探索新道路。

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:55-70
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:47-50
- 3 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性. 中西医结合肝病杂志 2002;12:257-259
- 4 李莉, 成军, 李梵, 王建军, 张健, 吴勤, 韩萍, 陈国凤, 纪冬, 李克. 慢性丙型肝炎病毒脂肪变的相关性. 世界华人消化杂志 2002;10:1009-1013
- 5 张健, 成军, 李莉, 刘爱兵, 吴勤, 董蕾, 王琳, 陆荫英. 慢性丙型肝炎患者血清载脂蛋白 AI 和 AII 水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1014-1017
- 6 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
- 7 Wingfield PT, Stahl SJ, Williams RW, Steven AC. Hepatitis core antigen produced in Escherichia coli: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* 1995;34:4919-4932
- 8 Hatton T, Zhou S, Standring DN. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* 1992;66:5232-5241
- 9 Nassal M. The arginine-rich domain of the hepatitis B virus core protein is required for pregenome encapsidation and productive viral positive-strand DNA synthesis but not for virus assembly. *J Virol* 1992;66:4107-4116
- 10 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
- 11 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 12 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- 13 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- 14 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 15 Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570-577
- 16 Faraj A, Fowler DA, Bridges EG, Sommadossi JP. Effects of 2', 3'-dideoxynucleosides on proliferation and differentiation of human pluripotent progenitors in liquid culture and their effects on mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:924-930
- 17 Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med* 1995;1:417-422
- 18 Ropp PA, Copeland WC. Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* 1996;36:449-458
- 19 Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA. Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys* 2002;404:263-270
- 20 Wilson KS, Noller HF. Molecular movement inside the translational engine. *Cell* 1998;92:337-349
- 21 Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia growth and development study, Multicenter AIDS cohort study, Multicenter hemophilia cohort study, San Francisco city cohort, ALIVE study. *Science* 1996;273:1856-1862
- 22 Rong L, Jian W, Hua H. KBP, a novel protein interacting with LIM protein KyoT. *Gene* 2003;304:133-141
- 23 Azuma Y, Dasso M. The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:302-307
- 24 Heald R, Weis K. Spindles get the ran around. *Trends Cell Biol* 2000;10:1-4
- 25 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