

噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白

陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖

陈京龙, 魏红山, 张黎颖, 北京地坛医院 北京市 100011
刘霞, 山东大学2004级硕士研究生 山东省济南市 250013
通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院病毒研究室. ddriver@163.com
电话: 010-64211031-2358
收稿日期: 2006-08-27 接受日期: 2006-09-25

Screening of serum protein of cryptogenic hepatitis binding protein by phage display system

Jing-Long Chen, Hong-Shan Wei, Xia Liu, Li-Ying Zhang

Jing-Long Chen, Hong-Shan Wei, Li-Ying Zhang, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Xia Liu, Postgraduate in Medical College of Shandong University, Jinan 250013, Shandong Province, China
Correspondence to: Hong-Shan Wei, Department of Virology, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Andingmenwai Street, East District, Beijing 100011, China. ddriver@163.com
Received: 2006-08-27 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To investigate the pathogenesis of cryptogenic hepatitis (CH) by screening its binding protein of serum protein.

METHODS: Using serum protein of cryptogenic hepatitis as the selective molecule, T7 select phage from human liver cDNA library was bio-panned and the positive clones were selected 5 times. After polymerase chain reaction of bacteriophage plaque, the DNA fragments of the screened clones were sequenced, and the amino acid sequence of target protein was compared with protein sequence database from BLAST in GenBank.

RESULTS: After bioamplification for 5 times, 24 positive clones were obtained from 60 clones screened randomly. The sequence of the positive clones were researched for homology, and Homo sapiens hepatitis V virus NS5A trans-regulated protein 13 was ascertained as the serum protein of CH-binding protein, which was located at liver.

CONCLUSION: Serum CH protein is interacted with Homo sapiens hepatitis V virus NS5A trans-regulated protein 13 in liver, which plays an important role in the pathogenesis and treatment of CH.

Key Words: Cryptogenic hepatitis; Binding protein; Serum protein; Hepatitis C virus; Phage display system

Chen JL, Wei HS, Liu X, Zhang LY. Screening of serum protein of cryptogenic hepatitis binding protein by phage display system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3509-3512

摘要

目的: 通过筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白, 为隐源性肝炎的发病机制研究探索新途径。

方法: 应用噬菌体表面展示技术, 将隐源性肝炎患者血清作为固相筛选蛋白, 用噬菌体正常人肝细胞T7 cDNA文库进行5轮生物筛选, 经噬斑PCR, 对筛选克隆进行DNA序列分析, 将推断的氨基酸序列在蛋白质库中进行搜索, 自GenBank中获得结合蛋白的cDNA和基因组的全长序列, 然后再探讨该蛋白在隐源性肝炎发病机制中的作用。

结果: 噬菌体经过5轮生物富集后, 从随机筛选的60个克隆中得到24个阳性克隆, 经序列测定后进行同源搜索, 初步确定人类HCV NS5A转化调节蛋白13(NS5ATP13)为人体肝脏中固有的与隐源性肝炎血清蛋白结合的蛋白。

结论: 应用T7 cDNA噬菌体表面展示技术, 我们发现隐源性肝炎血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 在隐源性肝炎发生及抗病毒治疗有重要意义。

关键词: 隐源性肝炎; 血清蛋白; 结合蛋白; 丙型肝炎病毒; 噬菌体表面展示技术

陈京龙, 魏红山, 刘霞, 张黎颖. 噬菌体表面展示技术筛选隐源性肝炎血清蛋白结合蛋白. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3509-3512
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3509.asp>

■背景资料

隐源性肝炎是肝炎病毒学指标阴性并排除常见肝病的一类肝损害, 之前有学者提出新型病毒感染、自身免疫性肝炎等病因学说, 至今仍无法判断感染或非感染因素在其肝损害发病过程中作用。由于隐源性肝炎发病率较高, 且病因尚不明确, 目前隐源性肝炎的病原学研究成为该方面研究热点, 开展对隐源性肝炎发病机制的研究对隐源性肝炎的临床有很好的指导意义。

■创新盘点

本研究应用的T7 cDNA噬菌体展示文库是目前先进的结合蛋白高通量筛选方法,避免了一些体内环境的干扰,在体外真实而单一的模拟出肝细胞编码蛋白的情况,经与固相靶蛋白(隐源性肝炎血清蛋白)结合,筛选出其结合蛋白,为下一步机制研究提供新思路。

0 引言

隐源性肝炎(cryptogenic hepatitis)又称特发性肝炎(idiopathic hepatitis)、未分类肝炎(unclassified hepatitis),临床上专指不能用感染(常见为病毒感染)、脂肪代谢、药物以及肝脏肿瘤、淤血等常见肝病病因解释的一类肝损害。之前有学者曾提出新型病毒感染、自身免疫性肝炎等病因学假说,至今仍无法判断感染或非感染因素在其肝损害发病过程中作用。有研究指出,病毒等病原体基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间相互作用,可能是病原体致病的重要分子机制^[1]。因此,本研究拟采用隐源性肝炎患者血清蛋白为固相靶分子,用噬菌体表面展示的人肝细胞cDNA文库来筛选特异的血清蛋白结合蛋白,以探讨隐源性肝炎发病的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select人类肝脏cDNA噬菌体展示文库购自Novagen公司,应用菌株为BLT5615。PCR相关试剂、异丙基2β2D硫代半乳糖苷(IPTG)购自华美生物公司。胰蛋白胨和酵母提取物为Oxoid公司产品。其他试剂均为国产分析纯。所用10例隐源性肝炎血清标本选自北京地坛医院2005-03/2006-03住院患者。每例样本均为HBV、HCV病毒标志物检测阴性,血清免疫指标检测阴性,且无长期大量饮酒史的肝炎患者。对照组20例为健康查体者。

1.2 方法

1.2.1 T7 select人类肝脏cDNA噬菌体文库生物筛选扩增 T7 select人肝脏cDNA噬菌体展示文库用于筛选。取混合后的肝炎血清80 μL,加入320 μL包被液震荡混匀,包被于24孔板,4℃ 48 h后,1×TBST(含1 mL/L体积Tween-20)洗涤5遍,加入T7 select人肝脏cDNA噬菌体展示文库,4℃过夜;洗涤后,加入T7洗脱缓冲液洗脱;将噬菌体洗脱液10 μL加入BLT5615菌中扩增,收获细菌裂解液作为扩增噬菌体文库以用于下一步筛选,再取混合后的正常血清80 μL,加入320 μL包被液震荡混匀,包被于24孔板4℃ 48 h后,1×TBST洗涤5遍,加入前一步细菌裂解液用于筛选。上述两步生物筛选为1轮。重复上述生物筛选步骤,共筛选5轮。

1.2.2 噬斑PCR扩增 5轮筛选后的噬菌体洗脱液加入BLT5615扩增,选择适当滴度铺于LB平板,挑取单个噬斑置于100 mmol/L IPTG诱导后的BLT5615,37℃裂解细菌,最后以此裂解液作为

表 1 噬菌体生物富集结果

筛选轮数	投入量 (pfu/L)	产出量 (pfu/L)	产出率(%)
1	1×10^{12}	3×10^{13}	30.00
2	3×10^{13}	4×10^{13}	1.30
3	4×10^{13}	5×10^{12}	0.13
4	5×10^{12}	4×10^{12}	0.80
5	4×10^{12}	3×10^{12}	0.75

产出率 = 洗脱的噬菌体数量/投入的噬菌体数量。

PCR模板扩增插入的外源性cDNA片段。T7重组噬菌体中插入片断引物: sense: 5'-TTATCGGATA ACCCTTTATA-3', antisense: 5'-CCCTCAAGACC CGTTTAGAG-3'。由上海生物工程公司合成。PCR反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s; 50℃退火50 s; 72℃延伸1 min; 共35个循环; 之后72℃总延长10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增结果。

1.2.3 测序及同源性分析 PCR产物经琼脂糖电泳筛选合适的条带,送生物公司进行DNA序列测定(北京英俊生物公司)。根据测序结果判断其开放性读码框架(ORF),将获得的推断的核苷酸序列在美国国立卫生院GenBank数据库BLASTn进行同源性序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>),最终判定相关蛋白的性质、基因组序列及该基因在染色体中的定位等。

2 结果

2.1 T7 select肝细胞cDNA文库的筛选 以隐源性肝炎患者血清蛋白作为固相支持分子,对人类正常肝细胞cDNA文库进行5轮“包被-结合-洗脱-扩增”筛选。固相平板洗脱下的噬菌体量呈现明显增加趋势,均可达到 10^9 数量级以上。噬菌体的投入及产出情况见表1。

2.2 测序结果的初步分析 经过60个噬斑PCR筛选序列测定,获得7个测序结果,将推断的核苷酸序列经GenBank数据库BLAST软件分析得到3个克隆编码18-1基因结构与人类HCV NS5A转化调节蛋白13基因区高度同源(同源性为100%)。经对比研究,我们确定人类HCV NS5A转化调节蛋白13为人体肝脏所固有的,与隐源性肝炎血清蛋白相结合的候选蛋白。该蛋白包含700个氨基酸,其基因位于10号染色体长臂24.32区(10q24.32),cDNA全长2103 bp。

3 讨论

隐源性肝炎是一类甲、乙、丙、丁、戊5型肝炎病毒学指标阴性的(急或慢性)肝炎,总发患者

数约有9万人, 占肝炎总数的11.5%。隐源性肝炎的病原学指标一直未能明确, 因此, 国内外学者以病因学为其命名-“不明原因肝炎”^[2-4]。根据2000年召开的第十次全国病毒性肝炎和肝病会议对隐源性肝炎的定义, 本实验选取肝炎病毒学指标阴性的患者血清, 同时排除常见的肝病病因: 自身免疫性肝炎(自身抗体阴性)、脂肪性肝病(酒精性、糖尿病)、药物性肝病、先天性肝病等。应用T7 select肝细胞噬菌体文库能将正常肝细胞的蛋白表达于其表面的特性与亲和选择相结合的技术^[5-6], 研究隐源性肝炎血清蛋白与肝细胞蛋白之间的相互作用, 继而探明其发病机制。经5轮生物筛选富集, 发现人类HCV NS5A 转化调节蛋白13(NS5A13)可能为人体肝脏中固有的与隐源性肝炎血清蛋白结合的候选蛋白。HCV NS5A基因(位于6258-7601 bp之间)编码的58 kDa的NS5A蛋白属丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白, 在HCV RNA病毒的复制过程中起关键作用^[7]。HCV NS5A本身作为转录反式激活因子, 能够激活转录因子STAT3, NF- κ B, 在细胞的炎症反应、肿瘤发生及转移过程中均起重要作用^[8-9]。本实验通过对病毒学指标阴性的肝炎患者血清进行T7 select肝细胞噬菌体cDNA文库筛选发现HCV NS5A基因的转化调节蛋白13上调, 认为可能是间接通过HCV调节基因-NS5A调节肝细胞转录、信号转导以及HCV病毒复制等途径导致肝损伤^[10-13]。洪源 *et al*^[14]通过基因表达谱芯片技术对HCV NS5A基因反式调节基因的研究也证实上调的基因中包括细胞生长、炎症发生、肿瘤发生的相关调节基因。研究表明, 在NS5A上还存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 能够与肝细胞中干扰素(IFN)刺激蛋白-双链RNA依赖的激酶(PKR)相互作用, 通过抑制PKR的功能, 下调IFN引起的抗病毒反应, 这也从理论上证实临床上隐源性肝炎容易对IFN无应答的原因^[15-16]。对于血清学检测中HCV病毒学阴性者, 我们仍不能完全排除丙型肝炎。针对本实验筛选的3个阳性克隆均为NS5A转化调节蛋白13, 而临床检测中病毒标志物阴性, 我们考虑丙型肝炎可能性大: 丙型肝炎抗体的阳性率尚受机体免疫功能状态影响, 少数患者抗体滴度比较低, 影响检测结果, 对丙型肝炎病毒抗体阴性、有输血史和反复ALT异常的患者应当采用丙型肝炎病毒结构和非结构蛋白做免疫印迹, 提高检出率, 该检测为目前丙型肝炎病毒抗体的最敏感的方法之一^[3]。

本研究发现, 隐源性肝炎患者血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 对隐源性肝炎肝细胞损伤发生机制的研究, 以及指导临床干扰素抗病毒治疗都有重要的意义。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Quiros-Roldan E, Torti C, Carosi G. The novel non-A, non-E hepatitis viruses and their pathogenic effect. *Med Clin (Barc)* 2004; 122: 552-554
- 3 缪晓辉. 隐源性肝炎诊治方面的若干问题. *肝脏* 2001; 6: 74-78
- 4 Menon KV, Zein NN. What do we need to know about non-A-to-E viral hepatitis? *Curr Gastroenterol Rep* 2000; 2: 33-39
- 5 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫竞坤, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前S1蛋白结合蛋白筛选. *世界华人消化杂志* 2002; 27: 321-322
- 6 钟彦伟, 成军, 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核心蛋白抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2003; 28: 34-36
- 7 Amemiya F, Maekawa S, Enomoto N. Interferon resistance and ISDR (interferon sensitivity determining region). *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1249-1253
- 8 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9599-9604
- 9 Waris G, Tardif KD, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1425-1430
- 10 Nunez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C, Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004; 53: 1665-1672
- 11 Choi SH, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem* 2006; 281: 7468-7478
- 12 Girard S, Vossman E, Misek DE, Podevin P, Hanash S, Brechot C, Beretta L. Hepatitis C virus NS5A-regulated gene expression and signaling revealed via microarray and comparative promoter analyses. *Hepatology* 2004; 40: 708-718
- 13 Nunez O, Fernandez-Martinez A, Majano PL, Apolinario A, Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Lopez-Cabrera M, Bosca L, Clemente G, Garcia-Monzon C, Martin-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins.

■应用要点

本研究发现, 隐源性肝炎患者血清蛋白与人类肝细胞HCV NS5A转化调节蛋白13相互作用, 对隐源性肝炎肝细胞损伤发生机制的研究, 以及指导临床干扰素抗病毒治疗都有重要的意义。

■同行评价

该研究方法先进, 有创新性, 结果有重要的理论和实用价值.

- 14 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
- 15 Kmiecik D, Kruszyna L, Migdalski P, Lacinski M, Juszczak J, Trzeciak WH. Mutations within protein kinase R-binding domain of NS5A protein of hepatitis C virus (HCV) and specificity of HCV

antibodies in pretreatment sera of HCV-chronically infected patients and their effect on the result of treatment. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 92-99

16 Gervain J, Czibula A, Simon J, Kalmar T. Structural analysis of the PKR-binding region of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C and the correlation with IFN-sensitivity. *Orv Hetil* 2003; 144: 1179-1184

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10