

酵母双杂交技术筛选白细胞 cDNA 文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因

张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠

张黎颖, 成军, 郭江, 郭风劲, 王巧侠, 北京地坛医院传染病研究所
北京市 100011

邓红, 西安交通大学第二医院感染科 陕西省西安市 710004

张黎颖, 女, 1978-10-26 生, 陕西省西安市人, 汉族, 2002 年毕业于西安交通大学临床医学系, 获医学学士学位, 2005 年毕业于西安交通大学医学系, 获医学硕士学位, 主要研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制。

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”科技攻关项目, No. 01MB135

通讯作者: 成军, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京市地坛医院传染病研究所, cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-64481639 传真: 010-64281540

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Hong Deng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang

Li-Ying Zhang, Jun Cheng, Jiang Guo, Feng-Jin Guo, Qiao-Xia Wang, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Hong Deng, Department of Infectious Diseases, the Second Hospital, Xi'an Jiaotong University Xi'an 710004, China

Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402, No.C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique Foundation of Chinese PLA during the 9th and 10th Five-Year Period, No. 98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of Chinese PLA for Young Scholars during the 10th Five-Year Plan Period, No. 01Q138

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, 13 Ditan Park, Anwai Street, Dongcheng District, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2005-01-10 Accepted: 2005-05-25

Abstract

AIM: To screen the proteins binding to a transregulated protein of hepatitis C virus (HCV) NS2 protein (NS2TP) by yeast two-hybrid technique, and to investigate the pathogenesis of HCV and the biological functions of NS2TP.

METHODS: NS2TP bait plasmid pGBKT7-NS2TP was constructed by ligating the NS2TP gene into yeast expression plasmid pGBKT7. Then pGBKT7-NS2TP was used to transform yeast cells AH109 (α type). Thereafter, the transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing leukocyte cDNA li-

brary plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium. The obtained diploid yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and SD/-Trp-Leu-His-Ade containing x- α -gal for selection twice. The plasmids of positive colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and BLAST search in GenBank.

RESULTS: Twenty-five proteins binding to NS2TP were screened, including cytochrome P450 2E1, decorin, p68, β -2-microglobulin, and carboxypeptidase N precursor (CPN2), etc whose functions had been known. Three proteins with unknown function were screened at the same time.

CONCLUSION: These results bring some new clues for studying the biological functions of the novel gene NS2TP and the pathogenesis of HCV.

Key Words: Hepatitis C virus; yeast two-hybrid; NS2TP

Zhang LY, Cheng J, Deng H, Guo J, Guo FJ, Wang QX. Screening of proteins binding to NS2TP from leukocyte cDNA library by yeast two-hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(14):1688-1691

摘要

目的: 筛选 HCV 非结构蛋白 2(NS2)反式调节蛋白(NS2TP)的结合蛋白, 探讨 HCV 的致病机制及新蛋白 NS2TP 的生物学功能。

方法: 应用酵母双杂交系统 3, 将 PCR 法扩增的 NS2TP 基因连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化单倍体酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒 pACT2 的单倍体酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和 X- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌氨苄青霉素-LB 平板上选择并测序, 结果在 GenBank 中进行生物信息学分析。

结果: 筛选出与 NS2TP 结合的蛋白基因 25 个, 其中包括细胞色素 p450 2E1、核心蛋白聚糖、p68、 β 2 微球蛋白、羧肽酶 N2 等已知功能基因及 3 个未知功能序列。

结论: 为阐明新蛋白 NS2TP 的分子生物学功能及 HCV 的致病机制提供了新的思路。

关键词: 病型肝炎病毒; 酵母双杂交; NS2TP 蛋白

张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭双劲, 王巧侠. 酵母双杂交技术筛选白细胞 cDNA 文库中新基因 NS2TP 蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2005;13(14): 1688-1691
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1688.asp>

0 引言

NS2TP 是我室利用抑制性消减杂交技术从肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞中筛选出来的新型蛋白基因, 其开放读码框架 (ORF) 长度为 456 个核苷酸 (nt), 编码产物由 151 个氨基酸残基 (aa) 组成, 我们已经成功的进行了克隆化, 并且应用蛋白免疫印记法 (Western blotting) 验证在酵母细胞 AH109 中成功表达融合蛋白. HCV 感染可引起肝炎、肝硬化、肝癌、及脂肪肝等, 严重危害着我国的人群健康, 但其致病机制目前还不十分清楚, 我们发现了 HCV NS2 可下调 NS2TP 在 HepG2 细胞中的表达^[1-2], 为进一步研究 NS2TP 是否是 HCV 引起肝病的一条途径, 本研究应用酵母双杂交技术筛选白细胞文库中 NS2TP 蛋白的结合蛋白基因.

1 材料和方法

1.1 材料 AH109 酵母菌株 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^A, gal80^A, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2URA3::MEL1TATA-lac Z MEL1)、预转化的 cDNA 白细胞文库 (Y187)、pGBKT7-BD、pGADT7-AD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp-Leu-His, SD/-Trp-Leu-His-Ade 等培养基、X- α -gal 购于 Clontech 公司. 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存. Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I 和 Pst I 购于 Takara 生物公司. c-Myc mAB 本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶酶标羊抗鼠 IgG 为中山生物公司产品. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HepG2 细胞购于中科院上海细胞生物研究所. NS2TP PCR 引物: 有意链: 5'-GAA TTC ATG CCG CGT GGA AGC CGA-3', 反义链: 5'-GGA TCCTTA GGC CAA TCC GTT TGC-3' 由上海生工公司合成. DNA 测序由上海华诺公司承担.

1.2 方法 PCR 扩增 NS2TP 基因与 pGEM-T 克隆载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 测序正确后, 提取质粒与 pGBKT7 空载体同时进行 EcoR I/BamH I 双酶切后将 NS2TP 连入 pGBKT7 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 应用 Vector NTI Suite 8.0 分析质粒 pGBKT7-NS2TP, 选择内切酶进行酶切鉴定正确后, 醋酸锂法转入酵母菌株 AH109, 铺 SD/-Trp-His-Ade /kana (4 缺 + 亮

氨酸) 培养基, 观察 2 wk, 排除自激活现象, 同时铺 SD/-Trp/kana (缺色氨酸) 培养基, 30 $^{\circ}$ C 孵育 5-7 d, 提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和 Western 免疫印迹法验证 NS2TP 在酵母中的表达. 挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBeAg 质粒的酵母 AH109 单个菌落 (2-3 mm) 接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 振摇 16-24 h, 紫外分光光度计测 OD₆₀₀ = 0.8-1.0 时与 1 mL 的白细胞文库酵母细胞在 50 mL 2 \times YPDA 中 30 $^{\circ}$ C 30-50 r/min 配合 18-24 h, 离心用 1 \times YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别取 220 μ L 铺于 15 cm 的 SD/-Trp-Leu-His (3 缺), SD/-Trp-Leu-His-Ade (4 缺) 培养基各 25 块上, 同时将配合产物按 1:100、1:1 000、1:10 000 铺于 SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Trp-Leu 培养基上检验配合效率. 30 $^{\circ}$ C 孵育 6-18 d. 挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- α -gal 的 4 缺培养基上检查 X- α -gal 酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. 按照试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法提取酵母质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α , 于含有氨苄青霉素的 SOB 平板筛选阳性克隆, BgIII 酶切鉴定插入 200-1 000 bp 的序列后进行测序. 结果提交 GenBank 比对, 进行生物信息学分析.

2 结果

NS2TP 的 PCR 扩增结果 (图 1), DNA 测序鉴定后 EcoR I、BamH I 双酶切克隆入酵母表达载体 pGBKT7, 应用 Vector NTI Suite 8.0 分析质粒 pGBKT7-NS2TP,

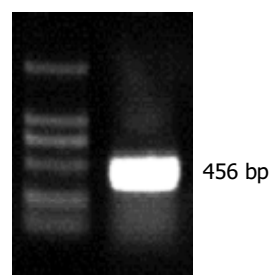


图1 NS2TP RT-PCR.

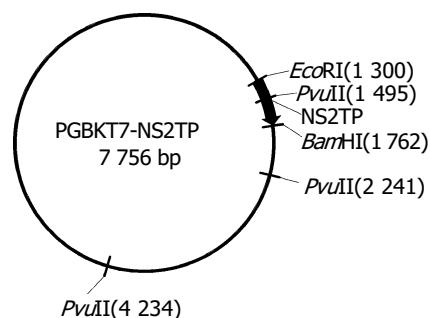


图2 应用 Vector NTI Suite 8.0 分析质粒 pGBKT7-NS2TP, PvuII 酶切应得到三个片段: 746 bp, 1 993 bp, 5 017 bp.

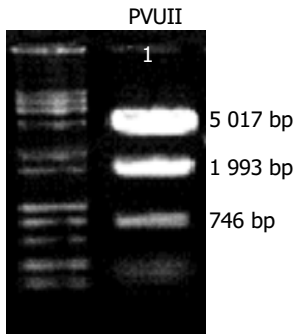


图3 pGBKT7-NS2TP质粒 PvuII 酶切.

选择 *Pvu*II 进行酶切鉴定, 应得到三个片段, 分别为: 746 bp, 1 993 bp, 5 017 bp (图2). 酶切鉴定结果见图3. 将“诱饵”载体 pGBKT7-NS2TP 构建后转化到酵母AH109后能够稳定表达NS2TP融合蛋白(图4). 阳性对照组含有 DNA 结合片段 Gal41-147 氨基酸及 c-Myc 标签的总分子量为 M_r 20 757, 实验组因表达 NS2TP 融合蛋白为 37 518. Western 免疫印迹分析结果显示转化 pGBKT7 质粒组在 M_r 201 000 后有一特异表达带, 转化 pGBKT7-NS2TP 质粒的酵母提取物于 M_r 38 000 左右有明显条带. 以 1:1 000 稀释的配合产物在 SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-Trp-Leu 培养基生长的克隆数分别为: 57, 81, 7. 计算可得 Y187 的成活性为 5.7×10^8 cfu/L, 为限制部分, 二倍体的成活性为 7×10^7 cfu/L, 配合效率为 12.3%. 4 缺/X- α -gal 培养基筛选真阳性菌落(图5). 部分筛选克隆 BglIII 酶切鉴定结果见图6. 挑选 42 个阳性克隆进行测序, 得到 25 种已知蛋白基因及 3 种未知功能基因(表1).

3 讨论

酵母双杂交系统 3, 利用 a 型和 α 型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理, 免去了需要共转染文库质粒与诱饵质粒所带来的低效率问题. 而且由于有 3 个报告基因用来筛选及严格的对照阳性率达到 95% 以上. 本课题组应用抑制性消减杂交技术发现、注册并体外克隆了 HCV NS2 反式调节新基因 NS2TP, 为研究 NS2TP 的



图5 蓝色为阳性, 白色为阴性 4 缺/X- α -gal 培养基筛选真阳性菌落.

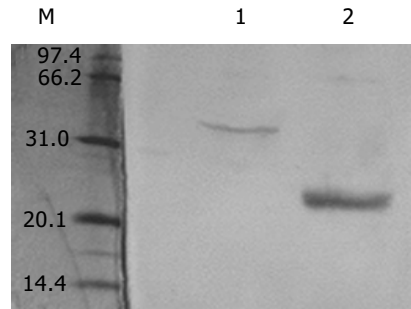


图4 pGBKT7-NS2TP 蛋白 Western 免疫印迹分析. 1: pGBKT7-NS2TP 实验组; 2: pGBKT7 阳性对照组.

生物学功能, 我们采用酵母双杂交技术筛选了白细胞文库中 NS2TP 蛋白结合蛋白的基因, 得到细胞色素 p450 2E1 (CYP2E1)、核心蛋白聚糖 (Decorin, DCN)、P68、 β 2 微球蛋白、羧肽酶 N2, 金属硫蛋白 2A, 胰岛素样生长因子、纤维蛋白原等, 均在细胞因子相互作用网络中具有重要的作用, 与生物信息学分析结果一致, 下面对部分结合蛋白的功能进行阐述.

CYP2E1 属 P450 (CYP) 超家族, 是一类重要的氧化代谢酶, 他不仅参与催化多种外源性物质, 如小分子溶剂、癌前物质和药物, 而且参与内源性物质的代谢, 如脂肪酸和酮体^[1]. CYP2E1 可被乙醇诱导, 同其他细胞色素 P450 相比, 可以产生更多的活性氧, 如超氧自由基和 H₂O₂, 在酒精性肝病的机制中起到重要作用. 除此外, 游离脂肪酸 (FFA) 也是 CYP2E1 的重要底物之一, 可诱导 CYP2E1 升高, 脂质过氧化加剧, 导致抗氧化能力减弱, 氧化与抗氧化机制失衡的结果是自由基的生成增多, 自由基不但氧化细胞膜的脂质, 更重要的是氧化细胞膜的蛋白, 最终导致肝细胞结构与功能的损害, 因此 CYP2E1 也被认为与非酒精性脂肪肝的预后密切相关^[2]. 戴军 *et al*^[3] 研究发现正常肝组织内, CYP2E1 表达仅见于中央静脉周围区, 主要表达于肝腺泡 III 区, 肝细胞质和细胞膜可见 CYP2E1 表达, 但在 CCL₄ 模型肝组织中, 其表达强度增加, 分布的方式亦发生改变, 可见于肝腺泡 I 和 II 区, 与肝细胞脂肪变分布相一致, 在假小叶的肝细胞中不见表达, 认为 CYP2E1 表达与肝纤维化发生有关. 而 NS2TP

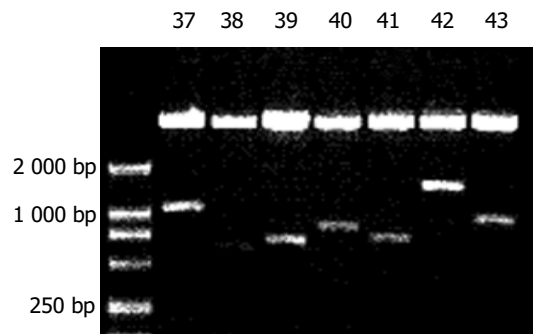


图6 部分筛选克隆 BglIII 酶切鉴定.

表1 筛选阳性克隆测序后在 GeneBank 上的比对结果

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	线粒体基因	4	98
2	β 2 微球蛋白	2	100
3	补体 1 因子	1	100
4	金属硫蛋白 2A	2	100
5	contactin 4	1	100
6	胰岛素样生长因子	1	99
7	羧肽酶 N2	1	99
8	细胞色素 p450 2E1	1	99
9	载脂蛋白 H	5	99
10	硒结合蛋白	1	100
11	CD200 细胞表面糖蛋白	1	100
12	硒蛋白	3	98
13	P68	1	97
14	Zn- α -2 糖蛋白	3	99
15	Decorin	1	99
16	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂	1	100
17	甘露糖结合蛋白	1	100
18	激肽原	1	99
19	乙酰乙酰 C o A 硫解酶	1	100
20	Ga 黏素	1	100
21	纤维蛋白原	1	100
22	真核翻译起始因子 3	1	97
23	甘氨酸氨基转移酶	1	98
24	白蛋白	2	100
25	血管紧张素原	1	97
26	未知功能基因 1-3	3	97-100

可能作为 HCV NS2 与 CYP2E1 作用的中间桥梁, 其具体的作用有待于进一步研究.

除 CYP2E1 外, 我们还对 DCN 很感兴趣, 他属于小分子、间质性、富含亮氨酸蛋白聚糖家族成员, 是一种多效性分子, 有抑制细胞生长的作用, 参与构成调控细胞增殖的负反馈环路. 研究表明, DCN 和细胞膜上细胞外液 (ECF) 受体结合, 启动了 MAP 激酶/P21 等的信号转导途径^[4]. Kotaka *et al*^[5] 证明肝癌细胞和正常肝细胞相比 DCN 表达明显下降. 而 HCV NS2 下调 NS2TP 的表达, 是否使其对 DCN 抑制细胞生长的协同作用减弱, 导致肝炎后肿瘤的发生. P68 是另一个与

NS2TP 结合的重要蛋白, 他的首次发现是因为他与 SV40 大 T 抗原原有免疫交叉反应^[6], 属于 DEAD 盒 RNA 解旋酶超家族, 具有高度保守性, 定位于细胞分裂末期的新鲜核仁, 参与 RNA 的剪切、加工、转录和翻译, 具有重要的功能. 研究发现^[7], HCV NS5B 可与内源性 P68 相互作用, NS5B 的过表达可引起 P68 的重新分布, 即从核仁到胞质. 在转染 HCV RNA 全长基因的细胞中, 采用 siRNA 技术敲除内源性 P68 基因, 结果发现以正链 RNA 为模板形成的负链 RNA 显著减少, 而在 NS5B 过表达的细胞中, 虽保留 P68 基因仍然可引起负链 RNA 显著减少, 推测 NS5B 可与 P68 结合从而阻断 P68 与病毒复制酶的作用, 引起病毒复制减少. 而在我们的研究中, 作为 NS2 下调的蛋白 NS2TP 也可与 P68 结合, 究竟有发挥着什么作用, 是否是 HCV NS2 下调 NS2TP 蛋白, 使 P68 释放, 从而催化病毒复制酶的活性, 使病毒复制得以顺利进行.

总之, NS2TP 可能介导 HCV 病毒和宿主相互作用, 是各种导致病毒清除和慢性感染以及肝病发生发展过程中很重要的一个环节, 而作为一种新基因, 对他的进一步研究将为阐明 HCV 感染及慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的病理机制提出新的思路.

4 参考文献

- Lieber CS. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997;77:517-544
- Chalasan N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. Hepatic cytochrome P450E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-550
- 戴军, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 华静, 茅益民, 范竹萍, 彭延申, 邱德凯. 肝细胞色素 P450 2E1 在实验性肝纤维化组织中的表达. *肝脏* 2000;5:16-17
- Hino N, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996;16:123-129
- Kotaka M, Chen GG, Lai PB, Lau WY, Chan PK, Leung TW, Li AK. Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer* 2001;85:228-234
- Ford MJ, Anton IA, Lane DP. Nuclear protein with sequence homology to translation initiation factor eIF-4A. *Nature* 1988; 332:736-738
- Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Tan YH, Lim SG, Fuller-Pace F, Hong W. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78:5288-5298

编辑 潘伯荣 审读 张海宁