

人肝细胞内戊型肝炎病毒结合蛋白的酵母双杂交筛选

何水珍,林亦伟,郑子峥,吴小成,张军,夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建省医学分子病毒学研究中心,福建 厦门 361005)

摘要:为进一步深入研究戊型肝炎病毒(HEV)感染机制以及致病机理,用酵母双杂交系统从人肝细胞 cDNA 文库中筛选与戊型肝炎病毒衣壳蛋白 E2 相互作用的蛋白,核酸序列分析及同源性检索表明,4 个克隆与 E2 相互作用,其中一个克隆与 P38IP 高度同源,细胞免疫共沉淀实验结果显示:在哺乳动物细胞水平仍能够检测到 E2 与 P38IP 片段的特异的相互作用。

关键词:戊型肝炎病毒(HEV);结合蛋白;酵母双杂交

中图分类号:Q78;R373.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2006)04-0262-05

戊型肝炎(戊肝)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)引起的、经消化道传播的急性肝炎,主要流行于发展中国家。我国是戊肝的主要流行区,时有暴发或流行的报道^[1, 2]。HEV 为大小约 27~34nm 的单股正链无包膜的 RNA 病毒,其基因组包含 3 个开放读码框架(ORFs),其中 ORF2 编码的 660 个氨基酸组成病毒衣壳^[2]。迄今 HEV 的稳定细胞培养仍未成功,使得对 HEV 感染机制以及致病机理的研究进展缓慢。随着酵母双杂交体系的广泛应用,直接分离细胞内的病毒结合蛋白,已成为研究病毒感染及致病机制的一个重要途径。酵母双杂交系统由与 DNA 特异结合域(BD)融合表达的蛋白(诱饵蛋白)、与转录激活域(AD)融合的蛋白(靶蛋白)以及带有报告基因的宿主菌株组成。如果诱饵蛋白和靶蛋白能相互结合,就可使 AD 与 BD 形成一个完整的转录激活因子并激活报告基因表达。HEV 的主要中和表位区域集中于 ORF2 的 394~606aa 之间^[3-5],且重组表达的相应片段(E2)能够很好地再现病毒衣壳外表面的主要结构特征^[6-9],该研究以这一区域片段作为诱饵蛋白,从人胚胎肝细胞文库中筛选与之结合的靶蛋白,为进一步深入研究奠定基础。

材料与amp;方法

1 材料 酵母双杂交系统(MATCHMAKER Two-Hybrid

收稿日期:2005-12-21;修回日期:2006-04-19

基金项目:863 计划(2005AA2Z3H20),福建省科技重大专项(2004YZ01),厦门市重大产业科技项目(3502Z20041008)

通讯作者:夏宁邵,361005 厦门,厦门大学福建省医学分子病毒学研究中心(E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

System 3)、人肝细胞 pACT2 质粒预转化文库、酵母培养基(SD、Tripto Supplement、Leu Do Supplement、YPD)等均购自 Clontech 公司。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。胰蛋白酶及酵母提取物为 Oxoid 公司产品。X-gal、Lyticase、蛋白酶抑制剂 Cocktail 均为 Sigma 公司产品。Anti-HA Epitope 购自 Upstate,羊抗鼠荧光二抗购自 Molecular Probes。含 HEV ORF2 394~606aa 基因片段的质粒 pTO-T7-E2 为本实验室构建^[10],大肠杆菌表达的重组蛋白 E2 为本实验室提供。

2 BD-E2 表达载体和 AD-E2 表达载体的构建 以 pTO-T7-E2 质粒为模板,用 PCR 扩增出 639bp 的 E2 基因片段。PCR 扩增片段与 pMD18-T 载体连接,得到插入 E2 基因的阳性亚克隆;再经 *Nde* / *EcoR* 酶切处理,分别接入已处理好的 pGBT7 载体和 pGADT7 载体,获得表达载体 BD-E2 和 AD-E2,并测序证实序列无误。

3 酵母的电转 酵母的过夜培养物转接至 150ml YPDA/Kn₃₀ 培养至 OD_{0.4}~0.6,4 离心收集细胞;等体积冷无菌超纯水重悬;4 离心收集细胞;弃上清,用一半体积无菌冷超纯水重悬;4 离心收集细胞;弃上清,用 80ml 1mol/L Sorbital 重悬;4 离心收集细胞;弃上清,1ml 1mol/L Sorbital 重悬;将感受态细胞每 80μl 分装至 4 预冷的 1.5ml 管中;每管加入 5μg 纯化后的质粒 DNA,混合物转移至 4 预冷的电转杯,冰浴 2min;1.5kV,25μF,200 电击转化,加 1ml 1mol/L Sorbital 重悬,混匀,玻璃珠涂板,每块 10mm 板涂 200μl。

4 酵母外源蛋白的表达及提取 菌液 300μl 接种至 10ml 相应培养基中,30 中振荡培养至菌液 OD 约 1.3,离心收集细胞,超纯水洗 1 遍,溶解酶 25 作用 80min,离心,水洗;用含蛋白酶抑制剂 Cocktail 的 PBS 重悬,FRENCH PRESS 微量细胞高压匀浆仪在 800~1000psi 的压力下循环 5 次破碎细胞至悬液澄清,4 暂存。

5 诱饵蛋白对酵母生长及接合的影响 将等量的转有 BD-E2 载体和空载体 pGBT7 的酵母分别接种到相同体积的液体培养基中,比较二者生长速度,评价诱饵蛋白对酵母生长

的影响。将酵母菌株 AH109[BD-E2]与 Y187[pGAD7-T]融合,涂布 SD/-Trp/X⁻-Gal, SD/-Leu/X⁻-Gal, SD/-Trp/Leu/X⁻-Gal 等平板,计算融合效率并与 AH109[pGBT7-53]与 Y187[pGAD7-T]的融合效率比较,评价诱饵蛋白对酵母结合的影响。

6 诱饵蛋白的自激活检测 挑取 5~10 个 AH109[BD-E2]单克隆划线至 SD/-Trp/X⁻-Gal, SD/-His/-Trp/X⁻-Gal, SD/-Ade/-Trp/X⁻-Gal 等固体培养板,同时将阳性对照菌株 AH109[pCL1]及阴性对照菌株 AH109[BD]分别在同一培养板划线,30℃ 培养 2~3d,观察酵母菌落的生长状况。

7 酵母双杂交及阳性克隆的初筛 挑取一个直径 2~3mm 的 AH109[pGBT7-E2]新鲜菌落(两个月以内)至 50ml SD/-Trp 液培养。30℃ 250~270r/min 摇床培养 16~24h。OD 超过 0.8 后,离心收集细胞,重悬于约 5ml 的残留液中,细胞浓度 > 10⁹cell/mL。与 1ml 文库菌株 Y187[pACT2-X]混合于 2L 锥形瓶中,加入 45ml 2 * YPDA/ Kan,轻轻摇匀。30℃ 低速摇床培养 20~24h,离心收集细胞,用 10ml 0.5 * YPDA/ Kan 重悬。将融合物以 1:10 000,1:1 000,1:100 及 1:10 稀释后,各取 100μl 涂布 SD/-Leu, SD/-Trp 及 SD/-Leu/-Trp 板用以计算筛选的克隆数和共转化效率。将剩余融合物各取 200μl 涂布 50 个 150 mm 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 选择培养板上,30℃ 培养 8~21d。挑取直径大于 2mm 的菌落再在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X⁻-gal 选择培养基上进行第二次筛选。X⁻-gal 检测 -半乳糖苷酶活性,即 MEL 基因表达,显示蓝斑者为阳性克隆。

8 阳性克隆质粒的提取 菌液 300μl 接种至 3ml 相应培养基中,30℃ 振荡培养至 OD 约 1.3,8 000g 离心 5min,弃上清,溶解酶消化酵母细胞壁后,按从大肠杆菌中提质粒的方法提取酵母细胞中的质粒,10μl 水溶,立即转化大肠杆菌,Amp+LB 固体培养基培养,挑取阳性克隆,培养后提取文库质粒,用于测序及后续的阳性克隆基因的表达。阳性克隆测序后,将其插入的肝细胞 cDNA 基因于 GenBank 数据库进行同源搜索。

9 阳性克隆的验证 通过文库载体上的引物 PCR 扩增阳性克隆中插入的 cDNA 片段(X),将产物连入 pMD18-T 载体,筛选正插克隆。Nde I 单酶切下片段,连入经 Nde I 处理过的 pGBT7 载体中,筛选正插克隆,获得 BD-X 融合载体。将 BD-X 电转入 AH109。AH109[BD-X]与 Y187[AD-E2]杂交,进一步验证阳性克隆。

10 免疫共沉淀 构建 pcDNA3.1(+)-HA-P38IP 重组质粒并用磷酸钙转染法将质粒转染至 293 细胞。转染 24h 后换液,48h 后收集细胞,加 1ml 细胞裂解液(20mmol/L TB pH7.4,150mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,1% Triton X-100,2.5mmol/L 焦磷酸钠,1mmol/L β-巯基乙醇,2mmol/L PMSF),4℃ 放置 5 min,离心留上清。用 E2 单抗 15B2 与 protein A/G 琼脂糖珠(Santa Cruz Biotech 公司)偶连,再将大肠杆菌表达的重组蛋白 E2 结合至琼脂糖珠上,裂解液洗 3 次,将处理好的 E2-15B2-琼脂糖珠与表达 P38IP 的 293 细胞

裂解液 4℃ 缓慢颠倒 3h,使细胞裂解液中的 HA-P38IP 能充分与 E2 结合。反应完成后,在 4℃ 以 3 000r/min 离心 3min,将琼脂糖珠离心至管底。小心吸去上清,琼脂糖珠用 500μl 裂解液洗 3 次,每次将 Eppendorf 管轻轻颠倒约 20 次,然后 4℃ 3 000r/min 离心 3min,吸去上清。最后加 30μl 裂解缓冲液重悬琼脂糖珠,加入等量 2 * 上样缓冲液悬浮,沸水浴 10min,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转移到硝酸纤维素膜上,4℃ 封闭 2h,一抗为 HA 单克隆抗体,二抗为荧光标记的羊抗鼠抗体,在 Odyssey 双色荧光扫描仪(购自 LI-COR)中检测。

结 果

1 表达载体 BD-E2 和 AD-E2 的构建及酵母表达重组蛋白 BD-E2 和 AD-E2 的活性鉴定

将 E2 基因正确克隆到载体 pGBT7 和 pGAD7 中,分别获得酵母表达载体 BD-E2 及 AD-E2。质粒 BD-E2 和 AD-E2 转化 AH109 酵母菌株后,表达并提取酵母菌体总蛋白。在蛋白质免疫印迹实验,抗 HEV 单抗 15B2 均能在相应的位置检测到目的蛋白(图 1),证实 BD-E2 和 AD-E2 都可在酵母 AH109 株中得到表达。以中和单抗 8C11 为包被抗体,分别以中和单抗 8C11、8H3 以及线性单抗 16D7 为酶标抗体进行 ELISA 检测,BD-E2 和 AD-E2 都有良好活性,并可形成二聚体,提示酵母中融合表达的 E2 空间构象未发生明显改变(图 2)^[4]。

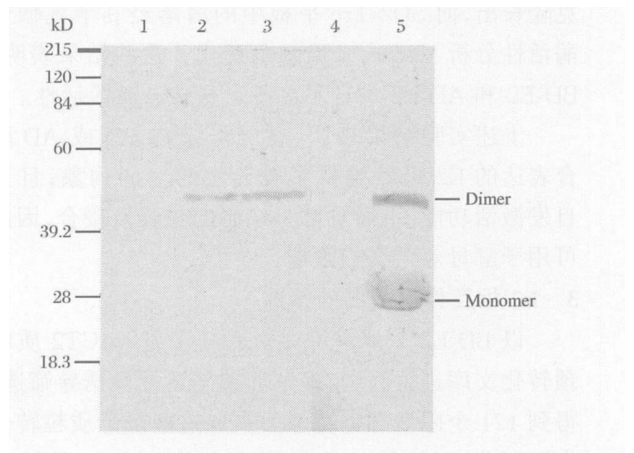


图 1 蛋白免疫印迹检测酵母 AH109 株中表达的 BD-E2 和 AD-E2

Figure 1 Analysis of BD-E2 and AD-E2 proteins in yeast (AH109) cell with Western blot

1. Yeast (AH109) cell transformed with AD; 2. Yeast (AH109) cell transformed with AD-E2; 3. Yeast (AH109) cell transformed with BD-E2; 4. Yeast (AH109) cell transformed with BD; 5. E2 protein.

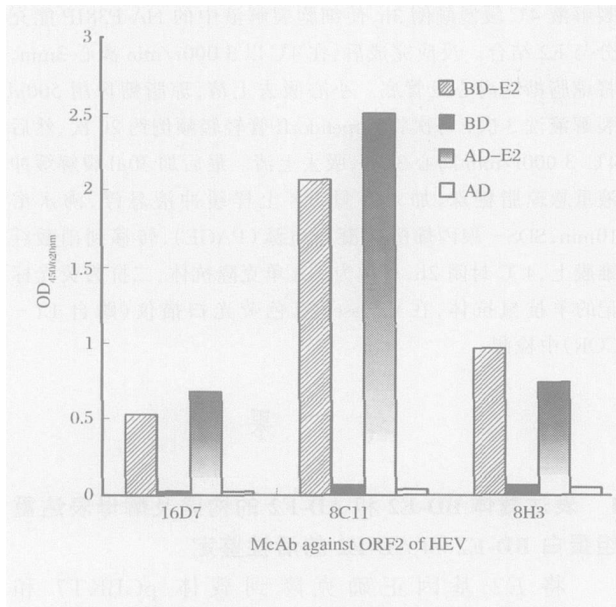


图 2 BD-E2 和 AD-E2 对 3 种 HEV 单克隆抗体的反应 (ELISA)

Figure 2 The immunoreactivity of BD-E2, AD-E2 with HEV McAbs (ELISA)

2 E2 的表达对酵母细胞影响的检测

表达 BD-E2 和 AD-E2 的酵母菌落大小、颜色均正常,在液体培养基中生长速率与空载体对照菌株一致,提示 E2 的表达对酵母细胞没有明显的毒性。将克隆菌落涂布 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-Ade 培养平板,30 培养 5d。结果 SD/-Trp/-Ade 平板上未见克隆长出,而 SD/-Trp 平板中的菌落经 -半乳糖苷酶活性分析,24h 内未见颜色变化。这些结果表明, BD-E2 和 AD-E2 本身不具备自身转录激活活性。

上述实验结果表明,在酵母中与 BD 或 AD 融合表达的 E2 仍然维持了较天然的空间构象,且无自发激活功能,不影响酵母细胞的生长及接合,因此可用于酵母双杂交的筛选。

3 E2 相互作用蛋白的筛选

以 BD-E2 为诱饵蛋白对人肝细胞 pACT2 质粒预转化文库进行筛选,经营养缺陷选择及诱导筛选,得到 121 个阳性酵母克隆。提取这些酵母质粒转化大肠杆菌,通过抗性选择筛出含 pACT2-X 的转化子,测序,经序列比对分析合并相同的序列得到 15 株阳性克隆。将这 15 个 pACT2-X 质粒电转入 Y187 酵母菌,将 Y187[AD-X] 与 AH109[BD] 杂交,剔除了 5 株有反应的假阳性克隆(有反应提示 AD-

X 可能直接和报告基因启动子结合,或是直接与 BD 结合)。

为进一步排除假阳性,我们互换诱饵蛋白及靶蛋白的融合表达标签,再次进行双杂交筛选,即进行 AH109[BD-X] 与 Y187[AD-E2] 的双杂交。经营养缺陷选择及诱导筛选最终得到 8 株阳性克隆。对这 8 个克隆的插入片段测序后在 GenBank 数据库中进行序列比对,发现有 4 个片段没有同源蛋白匹配,另外 4 个片段分别与 P450、p38IP、DDAH2 以及 TRP13 的一个片段同源(表 1)。

表 1 筛选出的 4 株阳性克隆的序列比对结果

Table 1 BLAST results of four positive clones

Clone no.	Homologous protein	GenBank accession no.	Position	Function of homologous protein
87	P450	AAH96253	aa387 - 440	Drug metabolism-related enzyme
162	TRP13	AAQ18035	aa271 - 391	Transformation-related protein
175	p38IP	HS171185	aa510 - 733	P38 interaction protein
191	DDAH2	NP039268	aa176 - 285	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2, relative with synthesis of NO

4 阳性克隆的体外验证

无论是诱饵蛋白与 DNA 结合结构域在酵母中的融合表达,还是文库蛋白与激活结构域在酵母中的融合表达,都有可能因为打破原有酵母细胞内基因表达的平衡而造成假阳。因此我们通过体外免疫共沉淀进一步验证二者的相互作用。

由于克隆 162 对应的蛋白目前无功能性报道,克隆 87 在翻译框两侧含有部分可读通的内含子序列,因此暂时不作深入验证。将克隆 175 和克隆 191 内的 p38IP 片段和 DDAH2 片段分别转移至 pcDNA3.1 载体(带有 HA 标签),转染 293 细胞。结果转染 DDAH2 片段的细胞无法正常生长,而转染 p38IP 片段的细胞生长正常。将转染 p38IP 的 293 细胞培养后裂解,裂液上清与事先用 E2 蛋白和抗 HEV 单抗 15B2 耦联好的琼脂糖珠混匀,免疫共沉淀结果如图 3。pcDNA3.1-p38IP 转染细胞内可见约 36kD 的 p38IP 蛋白表达(第 2 道),并可与 E2 蛋白发生免疫共沉淀(第 3 道),证实哺乳动物细胞内表达的 p38IP 蛋白 aa510 ~ 573 片段能与 E2 蛋白相互结合。

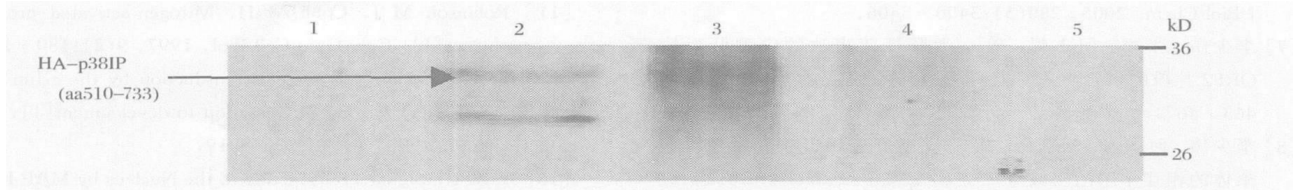


图3 E2蛋白与293细胞内p38IP的免疫共沉淀

Figure 3 Co-IP of E2 and P38IP

1. 293 cell transformed with pcDNA3.1; 2. 293 cell transformed with pcDNA3.1-p38IP; 3. Co-IP of E2 and 293 cell transformed with pcDNA3.1-p38IP; 4. Co-IP of E2 and 293 cell transformed with pcDNA3.1; 5. Co-IP of PBS and 293 cell transformed with pcDNA3.1-p38IP. HA-p38IP has a molecular weight of 31.5kD and the lower band probably is its degraded polypeptide.

讨 论

HEV为RNA病毒,本身极易降解,天然HEV纯病毒很难通过分离得到,而且迄今为止还没有成功的HEV细胞培养模型及细胞感染模型,HEV在感染过程中发生的事件至今为止还一无所知。希望通过相互作用蛋白的分析可以对HEV感染的生物分子机理有所理解。

此实验研究结果表明,E2能较好地再现HEV病毒衣壳的表面结构,则HEV与宿主细胞表面的相互作用及进入细胞后的一些行为很可能就表现为E₂蛋白与宿主蛋白的相互作用上。我们验证了在酵母中与DNA结合区融合表达的E2仍然维持了类似的构象,这样提高了利用它来做诱饵蛋白筛到有意义蛋白的概率。且该诱饵蛋白无自发激活,不影响酵母细胞的生长及接合,因此以E2为杂交筛选的诱饵蛋白是可行的。

为了尽可能减少假阳性,我们设置了多组实验排除了那些直接和报告基因启动子结合,以及那些直接与DNA结合结构域结合,而使报告基因得以转录等的假阳性克隆。并且,为了排除由于与结合结构域融合表达形成特异的空间构象造成的假阳,我们通过互换诱饵蛋白及文库蛋白分别带的融合表达标签(结合结构域及激活结构域)再次进行双杂交筛选。另外,无论是诱饵蛋白与DNA结合结构域在酵母中的融合表达,还是文库蛋白与激活结构域在酵母中的融合表达,都可能打破原有酵母细胞内基因表达的平衡而造成假阳性。我们利用免疫共沉淀在体外进一步验证了在哺乳动物细胞表达水平P38IPaa510~733仍然与E2存在相互作用。

有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)途径是生物体内最重要的信号转导途径之一,参与介导生长、发育、分裂、分化、死亡以及细胞间的功能同步等

多种细胞过程^[11-13]。p38蛋白分子是该信号传导途径的核心成分之一,能被多种炎性刺激所激活,并对炎症的发生、发展起重要调控作用。p38蛋白的底物多是转录因子,最终导致多种炎症因子(如IL-2,IL-8,TNF等)的大量表达。Balasubramanian等^[14]曾报道丙型肝炎病毒(HCV)、艾滋病毒(HIV)的膜蛋白E2、gp120共刺激HepG2细胞,可激活p38而使IL-8表达量大大提高;临床中,HCV和HIV重叠感染者体内IL-8的表达量也是大大高于常人。因此他们提出可能正是这种机制造成了细胞功能紊乱及炎症的产生。已有研究表明HEV的ORF3激活MAPK的ERK途径,提供细胞从静止期向S期转变的信号,有益于病毒在感染细胞中的复制^[10]。本研究发现HEV ORF2能与一个p38结合蛋白(p38IP)相互作用,可能意味着在细胞内HEV ORF2激活MAPK P38途径的可能,为进一步深入研究HEV与宿主细胞的相互作用提供了重要线索。

参考文献:

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, et al. Epidemiology of hepatitis E in China[J]. Gastroenterol Jpn, 1991, 26 Suppl 3:135-138.
- [2] Purcell R, Emerson S. Hepatitis E virus[A]. Knipe D, Howley P, et al. (eds) Fields Virology[M]. 4th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001: 3051-3061.
- [3] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein[J]. J Med Virol, 2001, 64(2):125-132.
- [4] Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. Vaccine, 2005, 23(22):2881-2892.
- [5] Li S W, Zhang J, Li Y M, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates[J]. Vaccine, 2005, 23(22):2893-2901.
- [6] Li S W, Zhang J, He Z Q, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid[J].

- J Biol Chem, 2005, 280(5):3400 - 3406.
- [7] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 463 - 467.
- [8] 李少伟, 何志强, 王颖彬, 等. 戊型肝炎病毒衣壳蛋白同源二聚体的相互作用结构域[J]. 生物工程学报, 2004, 20(1):90 - 98.
- [9] 葛胜祥, 张军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1):35 - 42.
- [10] Kar-Roy A, Korkaya H, Oberoi R, et al. The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase[J]. J Biol Chem, 2004, 279(27):28345 - 28357.
- [11] Robinson M J, Cobb M H. Mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(2):180 - 186.
- [12] Ip Y T, Davis R J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(2):205 - 219.
- [13] Davis R. Signal Transduction to the Nucleus by MAP Kinase[A]. Silvio G (eds). Signaling Networks and Cell Cycle Control: The Molecular Basis of Cancer and Other Diseases[M]. Humana Press, Totowa, 2000: 3219 - 3256.
- [14] Balasubramanian A, Ganju R K, Groopman J E. Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin - 8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(37):35755 - 35766.

Screening of Protein Interacting with HEV by Yeast Two-hybrid from Human Leucocyte cDNA Library

HE Shui-zhen, LIN Yi-wei, ZHENG Zi-zheng, WU Xia-cheng, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using yeast two-hybrid system to screen the protein interacting with HEV from human leucocyte cDNA library, four clones interacting with apoptin were identified. One of them was P38IP(aa510-733). Cell co-immunoprecipitation showed that E2 could bind to P38IP in mammalian cells.

Key words: hepatitis E virus (HEV); interactive protein; yeast-two hybrid

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn