

噬菌体展示技术在 HBV 前-S1 蛋白反式激活基因 1 启动子 DNA 的结合蛋白筛选中的应用

纪冬 成军 韩萍 邵清 陈国凤

【摘要】 目的 应用噬菌体展示技术筛选 HBV 前-S1 蛋白反式激活基因 1 (PS1TP1) 的启动子 DNA 结合蛋白,进一步阐述 PS1TP1 在慢性乙型肝炎发病机制中的作用。方法 根据 GenBank 中的 PS1TP1 启动子 DNA 序列设计引物,运用 PCR 技术以人基因组 DNA 为模板,扩增获得 PS1TP1 启动子的 DNA 片段,并通过亚克隆方法构建真核报告载体 pCAT3-PS1TP1p 后转染 HepG2 细胞系,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测转染细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性,以验证所获得的 DNA 片段具有启动子活性;将 PS1TP1 启动子 DNA 片段进行固相化,对噬菌体人肝细胞 cDNA 文库进行筛选,将所获得的噬斑裂解液进行 PCR 扩增,测序后进行 DNA 序列分析和同源性生物信息学搜索。结果 pCAT3-PS1TP1p 瞬时转染的 HepG2 细胞中 CAT 表达活性是对照组(pCAT3-Basic 空载体)的 32.9 倍,是 pCAT3-promoter 的 4.2 倍,提示所获得的 DNA 片段具有启动子活性;经 4 轮筛选共得到阳性克隆 18 个,经 PCR 扩增、测序,并经生物信息学分析后筛选出 PS1TP1 的启动子 DNA 结合蛋白编码基因共 15 个。结论 PCR 扩增后所获得的 PS1TP1 启动子 DNA 片段具有顺式激活下游基因表达的作用,为研究 PS1TP1 启动子功能奠定了基础;噬菌体展示筛选结果提示 PS1TP1 可能参与了细胞周期调节、MAPK 信号转导通路,并且有可能在辅助性 T 细胞亚群的发育和 B 细胞分化过程中发挥作用。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;前-S1 蛋白;转录启动子;DNA 结合蛋白质类

Selection of protein binding to pre-S1 transacted protein 1 promoter DNA by phage display Ji Dong, CHENG Jun, HAN Ping, SHAO Qing, CHEN Guo-feng. Liver Fibrosis Noninvasive and Treatment Center, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Corresponding author: CHEN Guo-feng, Email: bjchen302@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To select proteins binding to pre-S1 transacted protein 1 (PS1TP1) promoter and to clarify the regulation mechanism of PS1TP1 gene in pathogenesis of chronic hepatitis B. **Methods** The PCR primer set was designed based on the PS1TP1 promoter sequence registered in GenBank, the template was HepG2 genomic DNA. PCR technology was applied to amplify the promoter of PS1TP1. The eukaryotic reporter plasmid pCAT3-PS1TP1p was constructed by routine subcloning method and transfected into HepG2 cell lines mediated by liposome. The chlorophenical acetyltransferase (CAT) activity of transfected cell was determined by ELISA to verify the promoter activity of pCAT3-PS1TP1p. Phage display technique was employed to screen the promoter DNA-binding protein of PS1TP1 gene, after four rounds of screening, clones exhibiting high DNA-binding activity were selected and amplified. **Results** The level of CAT in HepG2 cells transfected with pCAT3-PS1TP1p was detected by ELISA, which was 4.2 times higher than that of pCAT3-promoter. Sequence analysis was performed in 18 positive plaque and the full length sequences were obtained with bioinformatics method, a total of 15 coding sequences were obtained, which consisted of 13 known and 2 unknown ones. **Conclusions** The PCR fragment of PS1TP1 gene promoter has transcriptional activity on its down-stream genes, which could be used for further study of PS1TP1 promoter. Phage display screening suggests that PS1TP1 might be involved in cell cycle regulation,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.001

基金项目:国家自然科学基金(No.30700713);北京自然科学基金(No.7122177)

作者单位:100039 北京,解放军第302医院肝纤维化诊疗中心(纪冬、韩萍、邵清、陈国凤);首都医科大学附属北京地坛医院(成军)

通讯作者:陈国凤,Email:bjchen302@yahoo.com.cn

MAPK signal pathway and immune regulation of helper T cells and B cells lymphocyte genes.

【Key words】 Hepatitis B virus; Pre-S1 protein; Transcription initiation site; DNA-binding proteins

乙型肝炎病毒 (HBV) 前-S1 蛋白编码区长 324 ~ 357 bp (nt 2854 ~ 3211), 具有多种功能^[1-2], 本研究小组应用抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术, 对于前-S1 蛋白反式激活作用的靶基因进行筛选, 发现前-S1 蛋白可反式激活某些基因的表达, 其中包括未知功能基因, 命名为前-S1 反式激活基因 1 (pre-S1 transacted protein 1, PS1TP1), 其编码区共有 642 个核苷酸 (nt), 其产物由 213 个氨基酸 (aa) 残基组成 (GenBank 号: AY426672)^[3-4]。为深入了解 PS1TP1 的功能, 本研究应用生物信息学及分子生物学技术构建 PS1TP1 基因启动子的真核报告载体, 验证所获得的 DNA 片段确实具有启动子活性, 将启动子序列注册入 GenBank (AY646229), 并应用噬菌体展示技术筛选人肝 cDNA 文库中的 PS1TP1 启动子 DNA 结合蛋白, 以明确在体内参与调节 PS1TP1 基因表达调控的蛋白, 为研究乙型肝炎的致病机制及探索未知功能基因提供新的理论依据。

材料和方法

一、实验材料

T7select 人肝细胞 cDNA 文库, 受体菌 BLT5615 (购自 Novagen 公司), *Taq* 酶、琼脂糖、dNTP、T4 连接酶、RNA 酶、DNA 回收试剂盒 (博大科技公司产品), *Kpn* I、*Xho* I、*Eco* R I、*Bam* H I 等限制性内切酶 (宝生物公司产品), 人肝癌细胞系 HepG2 细胞及大肠埃希菌 DH5 α 为本实验室保存, PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。质粒 DNA 提取试剂盒, 中间载体 pGEM-Teasy 及报告质粒 pCAT3-Basic 均购自 Promega 公司; CAT-ELISA 检测试剂盒及质粒 DNA 转染试剂盒购自 Roche 公司, 其他生化试剂购自 Sigma 公司。

二、PS1TP1 启动子 DNA 的扩增

根据 PS1TP1 基因及启动子序列, 选取翻译起始点 (ATG) 上游 1423 bp 至下游 49 bp, 设计引物 (上游引物: 5' -GGTACCTTGATGTA CTTTTCATGTCAGC ACC-3', 下游引物: 5' -CTCGAGTTTGCTTCCTTC TATGTTGTT TTCC-3', 5'-端划线部分为 *Kpn* I、*Xho* I 酶切位点), 模板为 HepG2 细胞基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化后回收; 所获得 DNA 片段亚克隆至 pCAT3-

Basic 中, 构建重组质粒 pCAT3-PS1TP1p。通过脂质体介导将 pCAT3-PS1TP1p 转染至 HepG2 细胞中, 设置阴性对照 (pCAT3-Basic) 和阳性对照 (pCAT3-promoter), 转染 48 h 后采用 ELISA 检测氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 的表达情况 (检测波长和参考波长分别为 415 nm 和 490 nm)。

三、噬菌体展示筛选

使用链亲和素 10 μ l (1.0 g/L) 包被微孔板, 加入 80 μ l PS1TP1 启动子 DNA 回收片段进行固相化, 之后加入扩增裂解液 110 μ l 进行筛选; 使用 TBST 漂洗, T7 洗脱缓冲液洗脱, 10 μ l 洗脱噬菌体中加入 3 ml BLT5615 细菌培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至细菌裂解。裂解液 4 $^{\circ}$ C 保存, 下一轮筛选备用。每轮筛选后均进行噬斑分析, 重复以上步骤, 共进行 4 轮筛选。

四、阳性克隆的 PCR 扩增及生物信息学分析

将第 4 轮的阳性噬斑裂解后行 PCR 扩增 (上游引物: 5' -GGAGCTGTCGTATTCAGTC-3', 下游引物: 5' -AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3')。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 选取长度为 200 ~ 800 bp 的 PCR 片段测序 (北京利嘉泰成生物公司), 将测序结果进行生物信息学分析并确定开放读码框。

结 果

一、pCAT3-PS1TP1p 重组质粒的构建

运用 PCR 成功扩增出 PS1TP1 的基因启动子序列, 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见扩增片段长约 1500 bp, 与预期符合 (图 1)。将扩增 DNA 片段纯化回收后进行定向克隆, 得到重组质粒 pCAT3-PS1TP1p, 经双酶切鉴定正确 (图 2)。

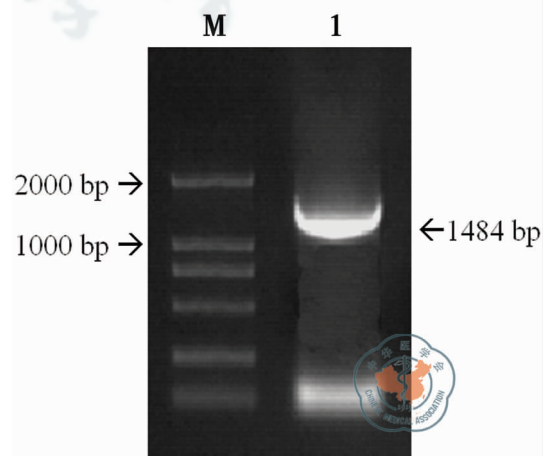


图 1 PS1TP1 启动子 PCR 产物电泳图 (1% 琼脂糖凝胶)

注: M: DNA Marker (2000 bp); 1: PS1TP1 基因启动子

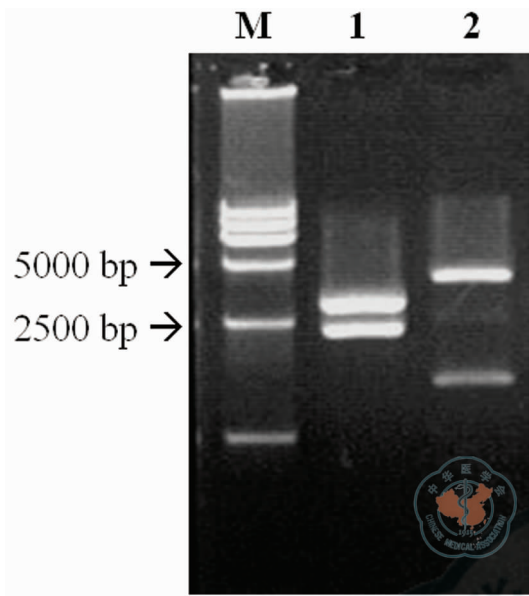


图2 pCAT3-PS1TP1p 酶切电泳图(1%琼脂糖凝胶)

注:M:DNA Marker(15 000 bp);1:*Eco* R I/*Bam* H I 双酶切(2387 bp/3087 bp);2:*Kpn* I/*Xho* I 双酶切(1474 bp/4000 bp)

二、pCAT3-PS1TP1p 启动子活性检测

将 0.8 μg pCAT3-PS1TP1p 重组质粒转染 HepG2 细胞,同时转染 1.0 μg pCAT3-Basic(阴性对照)及 pCAT3-promoter(阳性对照)。转染 48 h 后收获细胞并制备细胞裂解液(严格按照试剂盒操作手册),采用 ELISA 检测细胞 CAT 吸光度(A),见图 3。

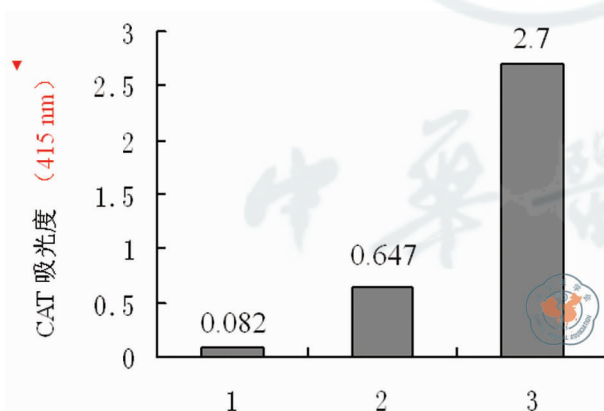


图3 pCAT3-PS1TP1p 转染 HepG2 细胞后 CAT 的表达(A)

注:1. pCAT3-Basic;2. pCAT3-promoter;3. pCAT3-PS1TP1p

三、肝细胞 cDNA 文库的筛选

固相化的 PS1TP1 基因启动子的 DNA 片段作为支持分子,进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的人肝细胞 cDNA 文库筛选,固相平板洗脱的噬菌体数明显增

加,与第 1 轮相比,第 4 轮筛选富集了 232 倍(富集倍数 = 第 4 轮产出率/第 1 轮产出率)(表 1)。

表1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数(个)		产出率(%)
	投入	捕获	
第1轮	8.8×10^9	2.5×10^{15}	2.8×10^5
第2轮	2.5×10^{13}	6.0×10^{22}	2.4×10^9
第3轮	6.0×10^{20}	1.0×10^{31}	1.7×10^{10}
第4轮	1.0×10^{29}	6.5×10^{36}	6.5×10^7

注:产出率 = 捕获洗脱的噬菌体数量/投入;其中投入为每轮“吸附”时所用的噬菌体数量,捕获为每轮“洗脱”时所得到的噬菌体数量

四、噬斑的 PCR 扩增及生物信息学分析

4 轮噬菌体展示技术筛选后,随机挑取 25 个噬斑为模板,用 T7 select 引物进行 PCR 扩增,可见 250 ~ 1000 bp 的条带(图 4),选择其中 18 个阳性片段测序后采用 BLASTn 程序进行同源性搜索,共获得 15 个蛋白,其中 2 个为未知功能蛋白(表 2)。

表2 筛选的阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果 (PS1TP1 启动子结合蛋白)

同源蛋白	同源菌株数	GenBank 号	同源性(%)
线粒体	3		100
MAP3K11	2	NM_002419	98
胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (IGFBP7)	1	NM_001553	98
Rab 受体 1 (RABAC1)	1	BC008950	98
FK506 结合蛋白 4 (FKBP4)	1	NM_002014	99
酪氨酸 3-单[加]氧酶/色氨酸 5-单[加]氧酶激活蛋白 β-亚单位 (YWHAB)	1	NM_139323	99
上游结合转录因子, RNA 聚合酶 1	1	BC042297	99
真核翻译起始因子 4B (EIF4B)	1	NM_001417	100
视黄醛 X 受体 α (RXRA)	1	NM_002957	100
触珠蛋白 (HP)	1	NM_005143	98
人血清白蛋白	1	BC035969	98
补体 4A (C4A)	1	NM_007293	100
α-2-巨球蛋白	1	BC040071	99
未知功能基因	1	BC062567	100
未知功能基因	1	NM_015635	98

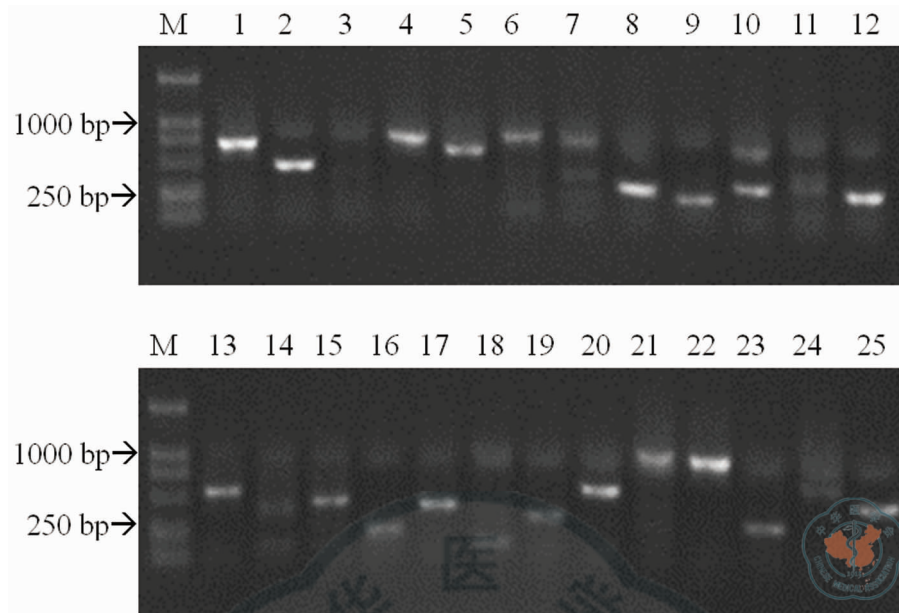


图4 部分阳性噬斑裂解液 PCR 产物电泳图(1% 琼脂糖凝胶)

注:M:DNA marker;1~25:噬斑 PCR 片段

讨 论

随着人类基因组计划的完成、新基因的不断发现以及其相互作用的研究,使得分子生物学具有永不衰竭的生命力。启动子 DNA 结合蛋白的研究是在转录水平上研究基因表达的调节,以寻找新的蛋白质为手段,以了解其对转录调节作用为目的,为阐明疾病的发病机制奠定一定的理论基础^[5]。噬菌体展示是一种经济、高效的研究生物大分子相互作用的技术,为研究启动子 DNA 结合蛋白开辟了新的研究策略和技术途径^[6],其基本原理是“生物淘选”(biopanning),是将编码多肽的外源性 DNA 片段与噬菌体表面蛋白的编码基因融合后,以融合蛋白的形式呈现在噬菌体表面;被展示的多肽或蛋白可保持相对的空间结构和生物活性,导入了多种外源基因的一群噬菌体,构成展示各种外源肽的噬菌体展示库;之后通过亲和富集法获得表达有特异肽或蛋白质的噬菌体。HBV 前-S1 蛋白具有反式激活作用,可参与细胞的信号转导,影响多种病毒及细胞基因启动子的作用。PS1TP1 是本室以往研究所发现的前-S1 反式激活的肝细胞基因,为进一步探讨 PS1TP1 及前-S1 蛋白在 HBV 感染机制中的作用,本研究应用噬菌体展示技术,通过链亲和素-生物素作用,以 DNA 为固相支持分子筛选人肝细胞 cDNA 文库,经序列测定和分析筛选出与 PS1TP1 启动子 DNA 结合的蛋白。

在所筛选到的蛋白中,具有重要功能的有以下

3 种:①丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶 11 (MAP3K11),其为丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员之一,信号转导过程中可激活其下游的 MAPK8/JNK 激酶,从而激活 c-Jun 而增强其转录活性^[7-8]。②酪氨酸 3-单[加]氧酶/色氨酸 5-单[加]氧酶激活蛋白 β-亚单位(YWHAB),属 14-3-3 蛋白家族成员^[9],14-3-3 蛋白家族在真核细胞中广泛表达且功能复杂,主要通过磷酸化依赖的方式与靶蛋白结合而发挥其调控作用。14-3-3 蛋白可与多种调节蛋白相互作用,进而调节 G2/M 期和 G1/S 期的转换。另外,其可以与具有丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点的蛋白相结合,类似含有 SH2 位点和磷酸酪氨酸结合(phosphotyrosine binding, PTB)位点的蛋白的功能,从而参与 MAPK 通路的信号转导^[10-12]。另有研究发现 HBxAg 与细胞质中含有 MEKK1、SEK1、SAPK,与 14-3-3 蛋白的复合体分布范围相似;基因突变分析发现 HBxAg 分子结构中存在与 14-3-3 蛋白结合的特殊位点,与诱导 SAPK/JNK 活性及抑制 Fas 介导的细胞凋亡均显著相关^[13]。③FK506 结合蛋白 4(FKBP4),又名 FKBP52,其在钙离子通道调控、免疫反应调节、蛋白质折叠运输、激素信号调控及神经生长等方面均起着重要作用,所有 FKBP 家族成员氨基端基序均具有肽基脯氨酰基异构酶(PPlase)活性,能够使靶蛋白脯氨酰肽键从顺式异构体变成反式异构体,但此作用可被 FK506 或雷帕霉素所抑制。FKBP52 是一种表达广泛的 FK506 结合免疫亲合蛋白,具有参与蛋白-蛋白反应的 34 肽

重复序列,可通过其 PPIase 活性来调节糖皮质激素受体(GR)的受体结合能力和加强 GR 依赖的转录活性,此过程依赖于其和热休克蛋白 HSP90 的反应及与动力蛋白的结合。另外,FKBP52 还可与干扰素调节因子 4(interferon regulatory factor 4, IRF 4)结合,IRF4 在免疫细胞中表达,在辅助性 T 细胞亚群的发育和 B 细胞分化过程中发挥重要的作用,有望成为临床对于感染、自身免疫性疾病以及血液肿瘤诊断的指标或疾病治疗新的靶点^[14-15]。通过分析以上 3 种具有多种功能的蛋白,结果提示 PS1TP1 可能处于 14-3-3 蛋白调节信号转导通路的下游,并且参与细胞周期的调节、MAPK 信号转导以及表达的免疫调节过程。

PS1TP1 为 HBV 前-S1 蛋白反式激活基因,本研究成功克隆了 PS1TP1 的启动子 DNA 序列,其启动子活性经报告基因技术得以确定,应用噬菌体展示技术筛选出其结合蛋白,提示了 PS1TP1 可能参与体内多种信号转导途径,有助于明确新基因的功能及 HBV 的致病(瘤)机制。

参 考 文 献

- Huang X, Qin Y, Zhang P. Pre-S deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *J Med Virol*, 2010, 82(1):23-31.
- Bertoletti A, Maini MK, Ferrari C. The host-pathogen interaction during HBV infection: immunological controversies. *Antivir Ther*, 2010, 15(Suppl 3):15-24.
- 纪冬, 成军, 王建军, 等. 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-S1 蛋白反式激活的相关基因. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13(1):3-8.
- 纪冬, 成军, 郭江, 等. 乙型肝炎病毒前-S1 蛋白反式激活蛋白 1 基因的克隆化研究. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13(1):9-12.
- 成军, 刘研, 陆荫英, 等. 生物信息学技术与新基因的研究. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(3):474-477.
- Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6):849-858.
- Bandyopadhyay S, Chiang CY, Srivastava J, et al. A human MAP kinase interactome. *Nat Methods*, 2010, 7(10):801-805.
- Chen J, Miller EM, Gallo KA. MLK3 is critical for breast cancer cell migration and promotes a malignant phenotype in mammary epithelial cells. *Oncogene*, 2010, 29(31):4399-4411.
- Mohammad DH, Yaffe MB. 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(9):1009-1017.
- Robinson DN. 14-3-3, an integrator of cell mechanics and cytokinesis. *Small Gtpases*, 2010, 1(3):165-169.
- Johnson C, Crowther S, Stafford MJ, et al. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem J*, 2010, 427(1):69-78.
- Cockrell LM, Puckett MC, Goldman EH, et al. Dual engagement of 14-3-3 proteins controls signal relay from ASK2 to the ASK1 signalosome. *Oncogene*, 2010, 29(6):822-830.
- Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 2010, 29(16):2309-2324.
- Li J, Richter K, Buchner J. Mixed Hsp 90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(1):61-66.
- Cioffi DL, Hubler TR, Scammell JG. Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(4):308-301.

(收稿日期:2011-08-08)

(本文编辑:孙荣华)

纪冬,成军,韩萍,等. 噬菌体展示技术在 HBV 前-S1 蛋白反式激活基因 1 启动子 DNA 的结合蛋白筛选中的应用[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(4):263-267.