

乙型肝炎病毒包膜蛋白不同区段反式激活功能的初步研究

周飞 任建林 卢雅丕 施华秀 陈美娅 陈建民 刘明 董菁

【摘要】 **目的** 构建系列含乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原前-前-S区的酵母细胞表达质粒,初步探讨表达蛋白是否具有反式激活作用。**方法** 用多聚酶链反应(PCR)扩增含前-前-S区的全S、S₂和S基因,定向克隆于pDEST32载体,进行序列测定,重组质粒命名为pDEST32-wS、pDEST32-pS₂和pDEST32-SHBs。用乙酸锂转化法将重组质粒转化酵母菌MaV203,经Western blot和胶体金法验证重组质粒在酵母细胞中的表达。以酵母双杂交法将重组质粒和载体pDEST22共同转入酵母菌MaV203,并在SC/-leu/-trp/-his三缺培养基及不同浓度梯度3AT培养基中验证自激活。**结果** 重组质粒pDEST32-wS经序列测定含有HBV自前-前-S至主蛋白基因序列。经Western blot和胶体金法证实转染的酵母细胞可表达表面抗原蛋白。pDEST32-wS与pDEST22共转染实验证实被转染酵母细胞不能在浓度30 mmol/L以上的3AT培养基生存。**结论** 构建了pDEST32-wS、pDEST32-pS₂和pDEST32-SHBs表达载体,pDEST32-wS和pDEST32-SHBs在酵母细胞中可表达HBsAg,含前-前-S区的HBV表面抗原可能不具有反式激活作用。

【关键词】 乙型肝炎病毒;全S基因;酵母细胞双杂交;反式激活

Primary study on trans - activation ability of hepatitis B virus envelope proteins
ZHOU Fei, REN Jian-lin, LU Ya-pi, SHI Hua-xiu, CHEN Mei-ya, CHEN Jian-min, LIU Ming, DONG Jing. Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China

Corresponding author: DONG Jing, Email: dj@xmzsh.com

【Abstract】 Objective To construct yeast expression vector of HBV whole-S gene including pre-pre-S region and explore the trans-activation function of whole-S protein. **Methods** Whole-S gene, pre-pre-S to pre-S₂ region and major HBsAg coding region containing *Not* I and *Sal* I endoenzyme sites were obtained by PCR method. After enzyme digestion, PCR products were cloned into yeast expression vector pDEST32. Recombinant plasmids were sequenced and named as pDEST32-wS, pDEST32-pS₂ and pDEST32-SHBs, respectively. Recombinant plasmids were transfected into

基金项目:厦门市首批重大疾病科研攻关项目(WKZ0501);厦门市卫生局医学科研立项项目(WSK0506);厦门大学引进人才科研启动基金(Z03109);福建省青年科技人才创新项目(2006F3127);福建省青年科技人才创新项目(2006F3127)

作者单位:361004 厦门市,厦门大学医学院附属中山医院消化内科

通讯作者:董菁 Email: dj@xmzsh.com

yeast cell MaV203 by Liac-mediated transformation. Whole surface protein expressed in yeast cell was tested by Western blot and colloidal gold analysis. Recombinant plasmids pDEST32-wS, pDEST32-pS2 and pDEST32-SHBs were transfected into MaV203 by yeast two-hybrid and cultured in a series of 3AT plates with SC/-leu/-trp/-his to testify autonomous activation. **Results** After sequencing, recombinant plasmid pDEST32-wS was proved to include the anticipated fragment of whole S gene. Both Western blot and colloidal gold analysis showed that yeast cell transfected with plasmid pDEST32-wS can express whole-S protein. Yeast two-hybrid method showed that MaV203 transfected by pDEST32-wS and pDEST22 cannot grow in SC/-leu/-trp/-his plates with 3AT concentration higher than 30 mmol/L. **Conclusions** Recombinant plasmids pDEST32-wS, pDEST32-pS2 and pDEST32-SHBs were successfully constructed. MaV203 transfected by pDEST32-wS or pDEST32-SHBs can express HBsAg. HBV whole S protein might have no trans-activation ability.

【Key words】 Hepatitis B virus; Whole-S gene; Yeast two-hybrid; Trans-activation

乙型肝炎病毒是一种部分双链的嗜肝 DNA 病毒,可引起急性或慢性病毒性肝炎,而且与肝硬化和肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关。最初的研究将 HBV DNA 基因组的 4 个主要开放读码框架(ORF),分别命名为 S、C、P 和 X 区,其中 S 区通过 3 个同框(in-frame)起始密码子(ATG)被人为分为 3 个结构区:前-S1,前-S2 和 S 结构域,从这 3 个 ATG 开始编码 3 种大小不等的包膜蛋白:主蛋白(SHBs),中蛋白(MHBs:前-S2 + SHBs)和大蛋白(LHBs:前-S1 + 前-S2 + SHBs)。近年来董菁等^[1,2]研究提示在前-S1 区之前存在一个同框编码的 ORF,即前-前-S 区(pre-pre-S region),其长度为 135 bp,编码 45 个氨基酸,初步的流行病学研究^[2]提示该区编码不是一种偶然现象,成军等对前-前-S 区进行了初步研究,探讨了前-前-S 多肽的结合蛋白^[3,4]以及前-前-S 区启动子结合蛋白^[5],但对于该多肽以及全 S 蛋白(前-前-S 区 + LHBs)的生物学意义尚需深入探讨。HBV 导致 HCC 的一个重要假说是 HBV 编码的病毒蛋白具有反式激活作用,可使细胞癌基因异常激活,也是病毒高复制的一个重要原因,具有反式激活作用的病毒蛋白有 X 蛋白(HBx)、LHBs 及截短型表面抗原中蛋白(MHBst)。全 S 蛋白包含 LHBs 的所有结构域,本研究试图探讨全 S 蛋白是否具有大蛋白反式激活的生物学活性。

材料与方法

一、材料

dNTP、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶(*Not* I, *Sal* I)及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; pDEST32、pDEST22 表达载体及酵母 MaV203 购自 Invitrogen 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自厦门鹭隆生物技术有限公司;酵母提取物和胰化蛋白胨购自 Oxoid 公司;胶体金购自厦门英科新创科技有限公司;质粒小量提取

试剂盒和各种氨基酸购自北京博大泰克公司;大肠埃希菌 DH5 α 为实验室保存;PCR 引物由上海英骏公司合成;其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

二、方法

1. 酵母重组质粒的构建:据本室自患者体内克隆的 HBV 全 S 序列,通过 PCR-TA 法将其克隆于 pMD19 T(TaKaRa 公司)质粒,GenBank 号 EU075334(另文报告)。根据该段全 S 基因序列设计扩增引物为:

全 S 上游引物:5'-GTGCGGCCGCTATGGATGCA GTTAATCATTACTTC-3'

全 S 下游引物:5'-ATGGTCGACGGTTCTAATGTATAACC CAAAGAC-3'

SHBs 上游引物:5'-ATGGTCGACAACATG GAGAACACAACATCAG-3'

前-S2 下游引物:5'-GTGCGGCCGCTATGATGTTGTGTTCTCCATGTTC-3'

不同的引物组合扩增出不同长度的 HBV S 基因。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 共 35 个循环。PCR 产物与 pDEST32 载体经 *Not* I 和 *Sal* I 双酶切并电泳回收,在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接,重组质粒转化至 DH5 α 大肠埃希菌中,经酶切与 PCR 鉴定后,重组载体由上海英骏生物技术有限公司测序验证。

2. 酵母转化及蛋白验证:将重组质粒经乙酸锂转化法转入酵母菌 MaV203,培养于亮氨酸(Leu)营养缺乏的培养基。挑取培养阳性克隆,用亮氨酸营养缺乏培养液培养,酵母菌裂解液裂解 MaV203 后,保留上清备用。胶体金法(colloidal gold)验证重组质粒转化的 MaV203 能否表达相关蛋白。Western blot 法验证重组蛋白的表达:将样品及阴性对照的酵母裂解液加入上样缓冲液后煮沸 5 min,经 12% SDS-PAGE 胶电泳,积层胶 60 V, 30 min,分离胶 80 V, 90 min; 60 V 电转 100 min 将胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜;5% 脱脂牛奶封闭 1 h,分别与 1:1000 抗-前-S1 或抗-HBs 鼠单克隆抗体室温孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次,每次 10 min; 再与 1:1000 羊抗鼠二抗室温孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次,增强化学发光法(ECL)放射自显影。

3. 3-氨基-1, 2, 4-三唑(3AT)浓度梯度验证反式激活:按照 Invitrogen 公司酵母双杂交实验指南,将重组质粒和 pDEST22 经乙酸锂转化法共同转入酵母菌株 MaV203,于缺 Leu 和色氨酸(Trp)的培养基中培养,并将其中的阳性克隆分别划在 SC-Leu/-Trp/-His 且分别含 10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、40 mmol/L 及 50 mmol/L 的 3AT 浓度梯度培养皿中观察其生长结果,若在两个浓度之间则以 2 mmol/L 梯度继续细分 3AT 浓度观察其生长结果。

结 果

一、重组酵母表达载体的构建

不同长度的靶基因片段为:全 S 上游引物与全 S 下游引物扩增的靶片段为全 S 基因(含前-前-S 区,下同),长度为 1338 bp;SHBs 上游引物与全 S 下游引物扩增的靶片段为 S 主蛋白基因,长度为 681 bp;全 S 上游引物与前-S2 下游引物扩增的靶片段为前-前-S 区至前-S2 基因,长度 657 bp(图 1)。靶片段经过 *Not* I 和

Sal I 双酶切,定向克隆到pDEST32质粒中,经测序鉴定正确,分别将重组质粒命名为:pDEST32-wS、pDEST32-SHBs和pDEST32-pS。

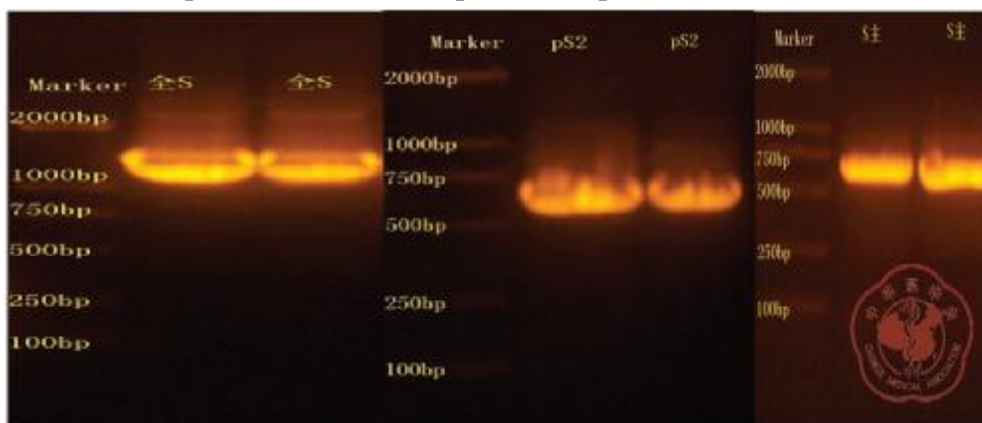


图1 HBV不同长度S基因扩增产物电泳结果

二、靶基因表达的鉴定

将pDEST32-wS、pDEST32-SHBs和pDEST32-pS以及pDEST32空质粒(无插入片段)转化酵母细胞并进行裂解,按英科新创公司胶体金操作指南检测上清中HBsAg的表达,结果发现pDEST32-wS和pDEST32-SHBs转化的酵母裂解液中可检出HBsAg,阴性对照、pDEST32-pS及pDEST32空质粒转化酵母裂解上清中均未检出HBsAg(图2)。Western blot结果提示pDEST32-wS转化酵母的表达蛋白可与抗-前-S1或抗-HBs结合(图3)。



图2 胶体金法检测重组质粒转化酵母后HBsAg的表达



图3 pDEST32-wS转化MaV203 Western bolt检测

A. 抗-前-S1单克隆抗体 B. 抗-HBs单克隆抗体
注: + pDEST32-wS转化MaV203; - pDEST32转化MaV203

三、抑制反式激活的 3AT 浓度

按照 Invitrogen 公司酵母双杂交实验指南,将 pDEST32-wS、pDEST32-pS 和 pDEST32-SHBs 与 pDEST22 共同转化 MaV203,经过 3AT 梯度实验证明,pDEST32-wS 与 pDEST22 共同转化 MaV203 后,在 28 mmol/L 3AT 培养基中有微弱生长,在 30 mmol/L 3AT 培养基中无生长;pDEST 32-SHBs 和 pDEST32-pS2 与 pDEST22 共同转化 MaV203 后,在 28 mmol/L 3AT 培养基中无生长(图 4)。



图 4 pDEST32-wS、pDEST32-pS、pDEST32-SHBs 与 pDEST22 共同转化 MaV203 后在不同浓度 3AT 培养基生长

讨 论

1983 年, Fujiyama 等^[6]克隆的 adr 亚型的 HBV 基因组(GenBank 号: X01587)中存在一不明的开放阅读框前-前-S 区 ORF。Mimms 等^[7]认为该 ORF 是前-S1 多肽的一部分,前-S1 长度为 164 个氨基酸,之后没有学者进一步研究该段多肽的意义。我们的早期研究^[1,2]提示前-前-S 区是一个广泛存在的现象,不是基因变异的个体现象,因此本研究试图探讨表达前-前-S 区的 HBV 全 S 蛋白的生物学功能。

应用定向克隆技术将全 S 基因、SHBs 基因和前-前-S 至前-S2 部分基因定向克隆到酵母表达质粒 pDEST32 中,分别命名为 pDEST32-wS、pDEST32-SHBs 和 pDEST32-pS,经过胶体金快速检测和 Western blot 方法证实转化 pDEST32-wS 或 pDEST32-SHBs 后的酵母 MaV203 可表达 HBsAg;转化 pDEST32-wS 和 pDEST32-pS 的 MaV203 可表达前-S1 蛋白。初步证实这些质粒可作为酵母双杂交的诱饵质粒。

HBV 导致 HCC 的发生机制目前尚无定论。有研究^[8,9]认为病毒蛋白的反式激活作用是其中一个环节,除了 HBx 和截短型 MHBs 外,LHBs 也是重要的反式激活因子^[10,11]。全 S 蛋白包含 LHBs 所有结构域,不排除其具有反式激活作用的可能。我们应用 Invitrogen 公司酵母双杂交系统,初步探讨了全 S 蛋白是否具有反式激活作用。本研究将重组诱饵质粒与 pDEST22 共同转化酵母菌株 MaV203,

由于 pDEST22 不携带外源基因,如果诱饵质粒表达的蛋白具有较强的转录活性,则可通过启动酵母细胞 HIS3 报告基因的转录,使其在 His 缺失培养基中生存。HIS3 基因编码一种与组胺生物合成相关的酶,该酶的活性可以被 3-氨基-1, 2, 4-三唑(3AT)特异性抑制,表现出剂量依赖性关系。本研究应用这个原理,以 3AT 抑制浓度表明 HIS3 报告基因的表达情况,进而表明诱饵质粒表达蛋白的反式激活作用。实验结果提示诱饵质粒和 pDEST22 的共转染酵母菌后,在浓度大于 30 mmol/L 的 3AT 培养基上无法生长。Invitrogen 公司的酵母双杂交系统设置的反式激活上限为 3AT 浓度 100 mmol/L,在超过 100 mmol/L 的培养基上生长表明诱饵载体携带的靶蛋白具有很强的反式激活作用,可以引起 MaV203 酵母菌内 HIS3 报告基因的表达。本研究提示 pDEST32-wS、pDEST32-pS 和 pDEST32-SHBs 这三个诱饵载体与 pDEST22 共同转化 MaV203 后均未表现出强的反式激活作用。纪冬等^[12]利用酵母双杂交实验证实 LHBs 的反式激活作用,选用的系统为 Clontech 公司的 MATCHMAKER 酵母双杂交系统-3,结果证实 LHBs 具有强的反式激活作用。本研究认为全 S 蛋白虽然含有 LHBs 的所有结构,但可能由于前-前-S 的表达导致蛋白构象改变,全 S 蛋白未表现出强的反式激活作用。

本研究构建了 HBV 全 S 基因的重组表达质粒,转化酵母后可检测到 HBsAg 和前-S1 抗原的表达。共转化实验初步表明 pDEST32-wS 不具有强的反式激活作用,提示全 S 蛋白可能不具有反式激活作用,但该重组质粒可作为诱饵质粒通过 Invitrogen 公司的酵母双杂交系统筛选相互作用的蛋白。

参 考 文 献

- 1 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前前-S 区编码基因的界定. 世界华人消化杂志, 2003, 11:1091-1096.
- 2 杨倩, 董菁, 成军, 等. 乙型肝炎病毒基因组中前前-S 编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志, 2003, 28:761-762.
- 3 蔺淑梅, 成军, 张树林, 等. 乙型肝炎病毒前前-S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化. 世界华人消化杂志, 2004, 12:2733-2736.
- 4 蔺淑梅, 张树林, 成军, 等. 肝细胞 cDNA 文库中乙型肝炎病毒前前-S 蛋白结合蛋白基因筛选. 世界华人消化杂志, 2004, 12:2907-2910.
- 5 黄燕萍, 成军, 张树林, 等. 噬菌体展示技术筛选 HBV 前前-S 抗原基因启动子结合蛋白基因. 世界华人消化杂志, 2004, 12:2801-2804.
- 6 Fujiyama A, Miyanohara A, Nozaki C, et al. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. Nucleic Acids Res, 1983, 11:4601-4610.
- 7 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, et al. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 195:186-191.
- 8 Caselmann WH. Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis. J Hepatol, 1995, 22:34-37.
- 9 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. Methods Mol Biol, 2006, 317:141-155.
- 10 Hildt E, Saher G, Bruss V, et al. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. Virology, 1996, 225:235-239.
- 11 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. Recent Results Cancer Res, 1998, 154:315-329.

12 纪冬, 成军, 陆荫英, 等. 乙型肝炎病毒包膜大蛋白的自激活. 世界华人消化杂志, 2004, 12: 2321-2324.

(收稿日期: 2008-01-11)

(本文编辑: 温少芳)

周飞, 任建林, 卢雅丕, 等. 乙型肝炎病毒包膜蛋白不同区段反式激活功能的初步研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(3): 146-152.