

## • 论 著 •

# 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白相互作用蛋白

刘 刚

(中南大学生殖与干细胞工程研究所, 长沙 410078)

**摘要:** 目的 利用  $T_7$  噬菌体展示技术筛选与乙型肝炎病毒 X 蛋白相互作用的蛋白。方法 构建 X 蛋白的原核表达载体, 表达并纯化 X 蛋白, 以 X 蛋白作为靶蛋白, 应用  $T_7$  噬菌体展示技术对人肝细胞 cDNA 文库进行筛选, 对筛选到的阳性克隆进行 DNA 序列分析及同源性研究。结果 表达并纯化了 X 蛋白, 经过 4 轮筛选后, 选择 52 个阳性克隆, 采用  $T_7$  特异性引物扩增插入片段, 回收 PCR 产物进行测序。经过同源性分析, 确定了 7 个与乙型肝炎 X 蛋白相互作用的蛋白。结论  $T_7$  噬菌体展示筛选是 1 种快速、简单的筛选蛋白质相互作用的工具, 筛选的与 X 蛋白相互作用蛋白为进一步研究乙型肝炎病毒的致病机制奠定了基础。

**关键词:** 细菌噬菌体  $T_7$ ; 肝炎病毒, 乙型; X 蛋白; 相互作用蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.012

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2011)01-026-03

## Identification of protein that interact with Hepatitis B virus(HBV) X protein by means of $T_7$ -phage display system

Liu Gang

(Central South University, Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering, Changsha 410078, China)

**Abstract: Objective** To screen and identify proteins that interact with Hepatitis B virus(HBV) X protein by means of  $T_7$ -phage display system. **Methods** X gene was cloned and expressed by prokaryotic expression, the purified protein was used as a selected protein to biopan the  $T_7$  select human liver cDNA library, the selected positive clones were identified using DNA sequencing and searched for homologous. **Results** X protein was expressed and purified, after 4 rounds of biopanning, 52 positive clones were selected. The inserted fragments were amplified by PCR using  $T_7$  primer. The products were purified for sequencing, 7 proteins were identified to interact with X protein by homologous analysis. **Conclusion**  $T_7$  select phage display system is a convenient and rapid method for screening binding proteins. The result will be useful for further studying the pathogenic mechanism of HBV.

**Key words:** bacteriophage  $T_7$ ; hepatitis B virus; X protein; interacting protein

噬菌体展示技术是 1 种用于筛选和改造功能性蛋白的生物技术, 是寻找结合靶蛋白的多肽或蛋白的有效方法。亲和作用是噬菌体展示技术的主要原理, 它首先将外源基因与噬菌体外壳蛋白融合, 外源蛋白表达于噬菌体表面后, 经结合、洗脱、扩增 3 个步骤, 获得与靶蛋白有结合关系的多肽或蛋白。本研究构建了 HBV X 蛋白的原核表达载体, 通过 Ni-NTA 纯化获得较高纯度的 X 蛋白。以纯化的 X 蛋白作为靶蛋白, 利用  $T_7$  展示筛选技术对人肝细胞 cDNA 文库进行筛选, 并对获得的结果及筛选方法进行初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1** 材料 大肠杆菌 TG<sub>1</sub> 及 BL21 (DE3) 由本室保存; pGEM-Teasy 质粒、pET-28a(+)、Ni-NTA、 $T_7$  展示筛选人肝细胞 cDNA 文库和受体菌 BLT5615 均购自德国 Novagen 公司; ExTaq 聚合酶、限制性内切酶、 $T_4$  DNA 连接酶为 Promega 公司产品; DNA 纯化回收试剂盒、蛋白相对分子质量标志为 Fermentas 公司产品; PCR 引物由上海基康公司合成。

**1.2** X 蛋白的克隆及表达 根据基因库中 ayw3 型 x 基因的核苷酸序列, 用 Primer 5.0 设计软件, 在其编码区 C 端的两侧设计 1 对引物, 并在 5' 端引入 BamH I 酶切位点, 3' 端引入 Hind III 酶切位点, 以 HBV 为模板, PCR 扩增 X 基因片段。PCR 产物和 pET-28a(+) 分别用 BamH I 和 Hind III 双酶切后纯化回收, 16 ℃ 水浴连接过夜。连接产物电穿孔转化到大肠杆菌 TG1 中, 重组质粒 pET-28a(+) / X 经酶切及测序后, 将测序正确的重组质粒电穿孔转化到大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单个克隆接种到含卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 37 ℃ 摆床以离心半径 8 cm 200 r/min 培养过夜, 按 1 : 100 比例接种于新鲜含卡那霉素抗性的 LB 培养基中, 37 ℃ 培养至

$A_{600}$  为 0.4~0.6, 在培养菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 ( $\triangle$ IPTG), 37 ℃ 条件下, 摆床培养 4 h 后收集菌体。

**1.3** X 蛋白的纯化 诱导后的菌液以离心半径 8 cm 12 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 细菌裂解液裂解菌体, 冰浴 30 min, 离心后沉淀重悬于细菌裂解液中, 超声波充分破碎菌体。以离心半径 8 cm 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 用含 2% 脱氧胆酸钠的细菌裂解液洗沉淀 2 次, 包涵体溶于 8 mol/L 尿素中, 用镍离子金属螯合柱纯化包涵体蛋白。依照说明书程序, 最后收集洗脱液, 用含 0.1 mol/L 精氨酸梯度浓度的尿素溶液透析蛋白, 最后将蛋白冻干保存, 并用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 ( $\triangle$ SDS-PAGE) 电泳分析纯化后蛋白纯度。

**1.4** Western 印迹检测 纯化的蛋白质加上样缓冲液后煮沸 5 min, 12% SDS-PAGE 分离, 电泳结束后将蛋白转到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶溶于含吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 中, 封闭膜 2 h, 1 : 500 加入抗-his 标志的兔抗孵育 2 h, PBST 洗膜 5 min × 3 次, 1 : 5 000 加入辣根过氧化酶。

**1.5** X 蛋白相互作用蛋白的筛选 (1) 文库扩增: 挑取 BLT5615 单个克隆到 5 mL LB 培养基中培养, 37 ℃ 摆床培养至  $A_{600}$  为 0.6, 加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG, 振摇 30 min, 加 10  $\mu$ L 噬菌体文库, 振荡约 3 h 至细菌裂解, 以离心半径 8 cm 11 000 r/min 离心 10 min, 收集裂解液, 4 ℃ 保存。(2) 结合: 用 Tris 缓冲液 ( $\triangle$ TBS) 溶解 HBV X 蛋白, 终浓度为 1~10 mg/mL, TBS 洗酶标板 3 次, 每孔加入 100  $\mu$ L X 蛋白。室温 3~4 h 或者 4 ℃ 过夜, 含吐温 20 的 Tris 缓冲液 ( $\triangle$ TBS-T) 200  $\mu$ L /孔, 洗 3 次。加 5% 牛血清白蛋白封闭过夜, 用 TBS-T 洗孔

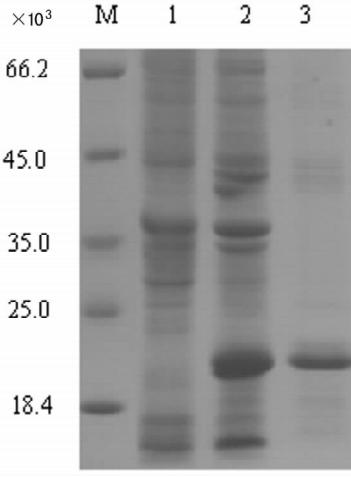
3 次。噬菌体裂解液 200  $\mu$ L 加入包被好的酶标板微孔中, 4  $^{\circ}$ C 过夜。(3)洗脱: 加 200  $\mu$ L T<sub>7</sub> 洗脱缓冲液, 室温放置 30 min。取 10  $\mu$ L 洗脱噬菌体加入 5 mL BLT5615 细菌的培养液中扩增, 37  $^{\circ}$ C 摆床培养至细菌裂解, 收集裂解液 4  $^{\circ}$ C 保存, 以备下一轮筛选。每轮筛选后均作噬斑分析。重复 4 轮“结合-洗脱-扩增”的过程。

**1.6 噬斑的 PCR 扩增** 挑取第 4 轮筛选后的阳性噬斑进行噬菌体裂解, 取 2  $\mu$ L 噬斑裂解液作为模板, T<sub>7</sub> 筛选引物进行 PCR 扩增。上游引物: 5'-GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3'; 下游引物: 5'-AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3'。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 50  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 循环 35 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果, DNA 纯化回收试剂盒, 纯化回收 PCR 产物。

**1.7 序列比对及同源性分析** 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16  $^{\circ}$ C 条件下用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶过夜, 电穿孔转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有 IPTG/X-gal 的氨苄青霉素平板上进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落并鉴定。将鉴定正确克隆以 T<sub>7</sub> 为引物进行 DNA 测序分析。获得结果在美国国立卫生研究院的基因数据库中进行同源序列比对。

## 2 结 果

**2.1 X 蛋白的表达及纯化** 将测序鉴定正确的阳性克隆转入 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导 3 h 后收集菌体, 12% SDS-PAGE 分析显示, X 蛋白主要存在于细菌的包涵体中, 约占细菌总体蛋白的 45% 以上。收集诱导表达后菌液 2 L, 超声波破碎菌体后, 收集包涵体沉淀, 经含 2% 脱氧胆酸钠细菌裂解液洗涤, Ni-NTA 进一步纯化, 收集洗脱液尿素梯度浓度透析冰冻成干粉, 得到约 25 mg 的蛋白且纯度较高, 见图 1。



注: M 为低相对分子质量蛋白质标志; 1 为 pET-28a(+) 空质粒表达产物对照; 2 为 pET-28a(+) / S 重组质粒表达产物; 3 为纯化后的 X 蛋白。

图 1 诱导表达产物 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色结果

**2.2 Western 印迹检测 X 蛋白表达** 由于 pET-28a(+) 带有组氨酸标志, 为进一步确认纯化的蛋白是否为含 his 标志的融合蛋白, 用抗-his 标志的兔抗 Western 印迹检测纯化蛋白及诱导的全菌蛋白, 结果见图 2, 在 20  $\times 10^3$  左右处有目的条带, 表明所表达的蛋白为含 his 标志的目的蛋白。

**2.3 T<sub>7</sub> 噬菌体展示筛选人肝 cDNA 文库** 以 HBV X 蛋白为靶蛋白, 通过 T<sub>7</sub> 噬菌体展示技术对人肝 cDNA 文库进行 4 轮“结合-洗脱-扩增”的筛选, 计数不同稀释度下的噬菌斑。随着筛选次数的增加, 投入量和产出量比例趋于稳定, 表明筛选

已达到饱和状态, 与 X 蛋白特异性结合的噬菌体得到了富集。见表 1。



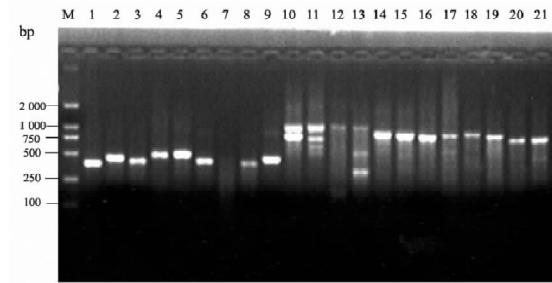
注: 1 为纯化前的表达产物; 2 为纯化后的 X 蛋白。

图 2 X 蛋白表达及纯化的 Western 印迹鉴定

表 1 4 轮 T<sub>7</sub> 噬菌体筛选投入量和产出量的结果 (pfu/mL)

筛选轮数	投入量	产出量	投入量/产出量
1	$9.43 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^6$	$2.87 \times 10^6$
2	$1.26 \times 10^{11}$	$8.7 \times 10^7$	$1.45 \times 10^5$
3	$5.50 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^8$	$4.58 \times 10^4$
4	$7.60 \times 10^{12}$	$1.8 \times 10^8$	$4.22 \times 10^4$

**2.4 噬斑的 PCR 扩增** 经过 4 轮筛选, 随机选择了 52 个噬斑, 加入裂解液裂解噬菌体, T<sub>7</sub> 筛选引物进行 PCR 扩增, PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, 见图 3。



注: M 为 DNA 相对分子质量; 1~21 为噬斑裂解液 PCR 扩增产物。

图 3 噬斑裂解液 PCR 扩增结果

**2.5 序列比对及同源性分析** 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接后, 阳性克隆以 T<sub>7</sub> 为引物进行 DNA 测序分析, 结果在 NIH 的基因数据库中进行同源序列比对, 发现了 7 种编码蛋白序列。

## 3 讨 论

噬菌体展示技术可以将各种自然界存在或不存在的 DNA 整合到噬菌体基因中, 以重组蛋白的形式表达在噬菌体表面, 从中筛选出人们所需的目的片段<sup>[1]</sup>。HBV 基因组有 4 个开放读框 S、C、P、X, 能编码 7 种不同的病毒蛋白。X 基因编码 1 种由 154 个氨基酸残基组成的多功能蛋白, 即乙型肝炎病毒 X 蛋白, HBx 不仅是病毒复制所必需的, 而且与乙型肝炎和原发性肝癌的发生有密切的关系<sup>[2]</sup>。

本研究成功地表达了 X 蛋白, 并通过 Ni-NTA 纯化获得较高纯度的目的蛋白。由于目的蛋白以包涵体的形式存在, 为使纯化后的蛋白能尽量正确折叠, 纯化后的洗脱液采用尿素平缓浓度梯度透析, 并在透析液中加入低浓度的 L-精氨酸。L-精氨酸能促进蛋白复性, 使纯化的蛋白最终能溶于水相中。结果表明, 本组成功表达并纯化了 X 蛋白, 在此基础上, 以 HBV X 蛋白为靶蛋白, 利用 T<sub>7</sub> 噬菌体展示技术对人肝 cDNA 文库进行筛选, 通过测序分析 52 个筛选到的克隆, 经基因数据库进行同源序列比对, 得到了 7 个编码蛋白序列。本组采用哺乳动物双杂交系统和免疫共沉淀技术对这些蛋白与 X 蛋白能否相互作用进行了验证, 结果显示筛选的 7 个蛋白均能和 X 蛋白相互结合。

其中 Complement component 8, alpha polypeptide, Com-

plement component 8(C8B)、Complement component 5(C5)为补体因子,表明 X 蛋白可能参与补体的激活途径,参与宿主早期抗感染免疫;Hepsin 属于跨膜丝氨酸蛋白酶家族成员之一,在肝细胞生长并维持肝细胞正常形态、细胞的发育,起始血液凝集过程等方面是必不可少的<sup>[3]</sup>,说明 X 蛋白可能参与细胞的分裂,在 HBV 致癌机制中起着重要作用<sup>[4]</sup>。X 蛋白与 Metallothionein 2A 相互作用,表明 X 蛋白可能参与肿瘤转移和机体炎性反应<sup>[5]</sup>。Proteasome subunit 参与蛋白或多肽的消化,X 蛋白可能对维持机体蛋白稳定性起到一定作用<sup>[6]</sup>。与 Liver alcohol dehydrogenase 相互作用,表明 X 蛋白可能参与肝脏代谢过程<sup>[7]</sup>。但 X 蛋白与这些蛋白相互作用后的生物学功能如何,需要进一步探讨。

目前乙型肝炎缺乏有效防治手段的主要原因是对 HBV 的本质认识不足,对其变异、致病机制和人体的防御机制缺乏了解。本研究表达并纯化了 X 蛋白,采用 T<sub>7</sub> 噬菌体展示筛选系统,以 HBV X 蛋白为靶蛋白,筛选了人肝细胞 cDNA 文库,得到多个可能与 X 蛋白相互作用的蛋白,为进一步研究乙型肝炎的致病机制及防治奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Paschke M. Phage display systems and their applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70(5): 2-11.
- [2] Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepat-

carcinogenesis[J]. Int J Oncol, 1999, 15(2): 373-379.

- [3] Kazuma Y, Hamamoto T, Foster DC, et al. Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation[J]. J Biol Chem, 1995, 270(8): 66-72.
- [4] Meier UT. How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(4): 311-315.
- [5] Jin R, Chow VT, Tan PH, et al. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 81-86.
- [6] Klimaschewski L, Hausott B, Ingrokva S, et al. Constitutively expressed catalytic proteasomal subunits are up-regulated during neuronal differentiation and required for axon initiation, elongation and maintenance[J]. J Neurochem, 2006, 96(6): 1708-1717.
- [7] Venkataramaiah TH, Plapp BV. Formamides mimic aldehydes and inhibit liver alcohol dehydrogenases and ethanol metabolism[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (38): 36699-36706.

(收稿日期:2010-07-08)