

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001483

葡萄糖调节蛋白 GRP78 与 HBV 的 PreS1 相互作用位点的初步研究

靳鑫¹, 王石磊¹, 吴爽¹, 张祥¹, 魏杰¹, 阳媛¹, 师悦媛¹, 牛司强², 汪德强³

(1. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:初步研究 78 kD 的葡萄糖调节蛋白(the 78 kD glucose-regulated protein, GRP78)与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的前 S1 蛋白(PreS1)的相互作用位点。**方法:**利用 PCR 技术扩增 GRP78 的基因, 将扩增的目的基因克隆至 pW28 载体质粒, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) B834 中表达, 经过镍离子亲和层析柱纯化 GRP78 蛋白; 将 PreS1 3 个截短片段的重组质粒(pGST-PreS1-X1/X2/X3)在 B834 中表达后, 经过 GST 亲和层析柱纯化相应蛋白; 利用蛋白质体外结合实验(pull down)、微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)检测 GRP78 与 PreS1 3 个截短片段的相互作用。**结果:**成功构建重组质粒 pW28-GRP78; 获得 GRP78 蛋白及 PreS1 3 个截短片段的融合蛋白; pull down 及 MST 实验验证了 GRP78 可以与 PreS1 的 3 个片段结合, 且 GRP78 与 GST-PreS1-X1 结合效果最好。**结论:**利用分子克隆技术及蛋白质表达纯化技术, 获得 GRP78 蛋白及 PreS1 截短片段的融合蛋白, 并初步筛选了 PreS1 与 GRP78 的相互作用位点, 为后续研究打基础。

【关键词】葡萄糖调节蛋白; 前 S1 蛋白; 蛋白质体外结合实验; 微量热泳动

【中图分类号】Q786

【文献标志号】A

【收稿日期】2017-08-02

Preliminary study of interaction sites on glucose-regulated protein GRP78 with PreS1 of hepatitis B virus

Jin Xin¹, Wang Shilei¹, Wu Shuang¹, Zhang Xiang¹, Wei Jie¹, Yang Yuan¹,
Shi Yueyuan¹, Niu Siqiang², Wang Deqiang³

(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases Established by Ministry of Education)

【Abstract】Objective: To study interaction sites of the glucose-regulated protein 78 kD (GRP78) with pre-S1 protein (PreS1) of hepatitis B virus (HBV). **Methods:** Being amplified by PCR, the open reading frame of GRP78 was subcloned into pW28 and expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) B834. The GRP78 protein was purified by nickel affinity chromatography column. Three truncated plasmids of HBV PreS1, including pGST-PreS1-X1, pGST-PreS1-X2, pGST-PreS1-X3, were expressed in B834 and then the bacterial protein was purified by GST affinity chromatography column. Interactions between GRP78 and PreS1 truncations were detected by pull down and microscale thermophoresis (MST). **Results:** The recombinant plasmid of pW28-GRP78 was successfully constructed. The GRP78 protein and the fusion protein (GST-PreS1-X1, GST-PreS1-X2, GST-PreS1-X3) were obtained. The directly interaction between GRP78 and fusion protein were detected by pull down and MST, suggesting that the 1-65 amino acid residues of PreS1 play a key role for GRP78 binding to PreS1. **Conclusion:** Thanks to the molecular cloning and purified technology of protein purification, the fu-

sion protein of GRP78 protein and the PreS1 truncated segments is formed. And interaction sites of GRP78 protein and the PreS1 is primarily compared, providing preliminary data for future study.

【Key words】 the 78 kD glucose-regulated protein (GRP78); PreS1; pull down; microscale thermophoresis (MST)

作者简介: 靳鑫, Email: 1074923975@qq.com,

研究方向: 乙型病毒肝炎的发病机理。

通信作者: 汪德强, Email: wangdq@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市卫计委 2016 年医学科研面上资助项目 (编号: 2016MSXM001); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1702022)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.1029.032.html>
(2018-01-09)

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球严重公共问题之一,感染人群已达约 2.4 亿,且持续感染的病人患肝硬化(cirrhosis)、肝癌(hepatocellular carcinoma)的风险增高,每年由乙肝病毒导致的肝癌会让 50 万~60 万人失去生命,成为全球癌症死亡的第二大原因^[1-3]。虽然目前已有相应的干扰素(interferon, INF)及核苷酸类似物(nucleotide analog, NAs)进行治疗,但存在长期治疗的耐药风险,而且只能将病毒的复制水平及滴度控制在较低的水平,难以完全消除^[4]。因此,对乙肝病毒感染机制的进一步研究就显得尤为重要。

78 kD 的葡萄糖调节蛋白(the 78 kD glucose-regulated protein, GRP78),顾名思义它的合成是由于葡萄糖饥饿引起,也称之为 BiP,因在前 B 细胞中发现其与免疫球蛋白重链结合。同时,因为它是由人 heat shock 70 kD protein 5(HSPA5)基因编码而名为 HSPA5,属于热休克蛋白(heat shock protein, HSP)家族,与 HSP70 有 60%的同源性,主要分布在内质网及线粒体,作为内质网分子伴侣,它可以促进蛋白质的折叠组装,也可以输出未折叠蛋白质,使之降解^[5-6]。GRP78 含有 2 个功能结构域:核苷酸结合结构域,可以结合水解 ATP,底物结合结构域,属于延伸的多肽^[7]。GRP78 被广泛报道在肿瘤细胞系表达量有所增高,并且与肿瘤增殖、迁移习性相关。它还可以维持内质网蛋白质的折叠能力、维持内质网压力传感器以及在肿瘤细胞不活跃阶段调节内质网相关的凋亡前机制,以此来调节肿瘤细胞生存与凋亡的平衡^[8-10]。

鉴于 GRP78 在体内的相关功能,广泛引起了研究者对它的关注。近来有些文献报道了 GRP78 在 HBV 的感染过程中会呈现高表达,并且发现 GRP78 可能与 HBV 的复制、分泌等生命周期相关^[11-13]。因此,GRP78 有望成为新一代控制 HBV 感染的治疗靶点,但仍需要深入的了解与探究来支持这一愿景。HBV PreS1 尤其是 21-47 位氨基酸残基,被认为在介导 HBV 与肝细胞表面候选受体作用中起到关键作用^[14]。本课题组前期初步证明了 GRP78 可以与 HBV PreS1 相互作用^[15-17],本文则进一步证明 GRP78 与 HBV PreS1 相互作用的区域,夯实 GRP78 与 HBV 的关系,为之后深入研究 GRP78 在 HBV 感染中的作用打下坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)DH5 α 及 *E.coli* B834 为实验室保存;载体 pW28 由 pET-28a(中国科学院高能物理研究所王大成院士馈赠)改造而来,载体 pGEX-6P-1 为实验室保存;DL 2000 DNA Marker、PrimeSTAR Max Premix(2 \times)购自 Takara 公司;质粒抽提试剂盒、T4 DNA Ligase 及 10 \times Buffer 购自 Promega 公司;2 \times Taq 酶及 Buffer 购自 Novoprotein 公司;限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho* I)及 10 \times Buffer 购自 Thermo Scientific 公司;蛋白质 Marker D530A 购自北京全式金公司。电泳仪购自北京六一公司;PCR 仪、低温高速离心机、金属恒温浴购自 Eppendorf 公司;核酸蛋白微量检测仪购自 Thermo Scientific 公司;ChampChemi 凝胶蛋白成像仪购自北京赛智;镍离子层析柱、GST 层析柱购自 GE healthcare 公司;层析实验冷柜购自 GREEN 谷宁科技公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

1.2.1.1 pW28-GRP78 重组质粒的构建 通过 NCBI 查找 GRP78 的基因全长,并通过 Blast 等对其进行生物信息学分析并应用软件 Primer Premier5 设计引物(表 1),由北京华大基因公司合成。以基因组 DNA 为模板,进行 PCR 反应扩增目的片段,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增的目的片段。利用糖原沉淀法纯化 PCR 产物。以 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别双酶切纯化的 PCR 产物与载体 pW28。利用糖原沉淀法将酶切产物纯化。将纯化后的目的片段与载体片段用 T4 DNA Ligase 在 16 $^{\circ}$ C 金属浴中连接 16 h。将连接产物转入 *E.coli* DH5 α 后接种于含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 温箱培养 10 h。随机挑取 20 个单克隆菌于 1 mL 含有卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇菌 4 h 后进行菌液 PCR,取条带位置正确的阳性克隆菌在 5 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中放大培养,提取质粒,通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切进行初步鉴定。取酶切验证成功的质粒送成都擎科公司测序。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers

引物	序列(5'-3')
GRP78-F	CGGGATCCATGAAGCTCTCCCTGCTGGC
GRP78-R	CCGCTCGAG CTACAACCTCATCTTTTCTGCG

1.2.1.2 PreS1 的 3 个截短片段 PreS1 3 个截短片段的重组质粒(pGST-PreS1-X1, pGST-PreS1-X2, pGST-PreS1-X3)构建由课题组前期完成,片段相互关系如图 1 所示。

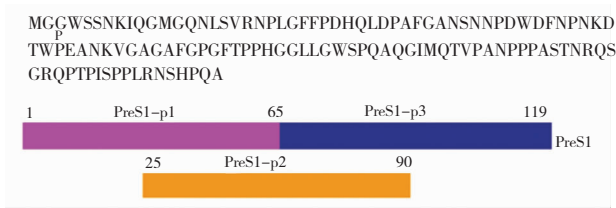


图 1 PreS1 片段的相互关系

Fig.1 Interaction of PreS1-X1, PreS1-X2 and PreS1-X3

1.2.2 蛋白的表达与纯化

1.2.2.1 GRP78 蛋白的表达与纯化

1.2.2.1.1 预实验 将构建成功的 GRP78 的质粒转化于 B834 感受态中,之后接种在含有卡那霉素的 LB 固体培养基中,37 °C 过夜培养。随机挑取 5 个单克隆菌落于 5 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中放大,37 °C、200 r/min 摇床培养至 A_{600 nm} 约为 0.2 时,将每个单克隆菌液分成 3 组,1 组为空白对照,不做处理;1 组为加入 1 μL IPTG(诱导蛋白的表达)的表达组;最后 1 组为保菌组。再次将所有的菌液放入摇床至其 A_{600 nm} 约为 0.6 时,保菌组加入甘油-20 °C 保存;其余菌液离心(17 000 r/min,2 min),弃上清,加入无菌水及 2.5 × SDS Loading Buffer 悬起沉淀,沸水煮 15 min,再离心(17 000 r/min,10 min),取上清进行蛋白电泳,鉴定蛋白的表达情况,优化表达蛋白的条件(包括培养时间、温度、是否加诱导剂及诱导剂 IPTG 的浓度等)。

1.2.2.1.2 大量表达 取 GRP78 表达较好的菌种加入 5 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 摇床培养至 A_{600 nm} 约为 0.8 时,将活化的菌液转接至 300 mL 含有卡那霉素的液体 LB 培养基中,摇至 A_{600 nm} 约为 0.6 时,加入 60 μL IPTG 19 °C 诱导 16 h。离心(4 000 r/min,4 °C,30 min)收菌,加入适量 Binding Buffer 重新悬起细菌,超声破碎菌体(4 °C,破菌时间 13 min,能量 29%)。破菌液离心(12 000 r/min,4 °C,30 min)。上清液缓慢加入镍离子亲和层析柱,滴速 6 s/滴。分别用 300 mL 40 mmol/L 的 Washing Buffer 及 100 mL 50 mmol/L 的 Washing Buffer 清洗杂蛋白。最后用 30 mL Elution Buffer 洗脱镍柱上的目的蛋白。

1.2.2.1.3 蛋白浓缩 将目的蛋白置于超滤杯中,给予 0.2 MPa 的压力浓缩。之后用 5 mmol/L Tris-HCl 稀释蛋白 3 次。当浓缩至 800 μL 时收集蛋白,并测量蛋白浓度。分装,-80 °C 贮存备用。

1.2.2.2 PreS1 片段融合蛋白的纯化与表达 将 PreS1 3 个截短片段的重组质粒转化至 B834 的感受态中。根据摸索的诱导表达的条件(37 °C 摇菌至 A_{600 nm} 约为 0.7,再加入 0.2 mmol/L IPTG,18 °C 诱导 18 h)诱导蛋白的表达。之后将破菌离心后的上清进行 GST 柱纯化(分别利用 Regeneration I、Regeneration II、PBS 依次过柱平衡,再加入蛋白上清,控制滴速 7 s/滴之后用 200 mL PBS 洗脱杂蛋白,最后 25 mL Elution Buffer 洗脱目的蛋白)。最后将收集的目的蛋白超滤浓缩至

1~2 mL,测量蛋白浓度。分装,-80 °C 贮存备用。

1.2.3 Pull down 实验

1.2.3.1 GST pull down 实验时,将 PreS1 的截短片段(GST-PreS1-X1、GST-PreS1-X2、GST-PreS1-X3)作为诱饵蛋白通过 GST 亲和柱,使其紧密结合于柱。再用 GRP78 作为捕获蛋白分别加入含有 PreS1 片段的 GST 柱中,在 4 °C 摇床孵育 12 h。之后 PBS(磷酸盐缓冲液)冲洗 GST 柱,去除未被捕获的 GRP78 蛋白。最后用相应洗脱液洗脱结合蛋白,并通过 SDS-PAGE 电泳观察 3 种蛋白与 GRP78 是否有结合。

1.2.3.2 Ni²⁺ pull down 将 His 标签的 GRP78 蛋白作为诱饵蛋白通过镍离子亲和柱,PreS1 的截短片段作为捕获蛋白分别加入柱中,在 4 °C 摇床孵育 12 h。用 Binding Buffer 清洗未被捕获的 PreS1 截短片段蛋白,再用含有高浓度咪唑(500 mmol/L)的洗脱液洗脱结合蛋白,并通过 SDS-PAGE 电泳观察 GRP78 与 3 种蛋白的结合情况。

1.2.4 MST 实验 在 MST 实验中,当检测 GRP78 与 PreS1 截短片段相互作用时,荧光标记(NT-647)的蛋白 GRP78 浓度保持 50 nmol/L 不变,非标记的 PreS1 截短片段分别做 16 个浓度梯度的稀释。短时间的结合反应后,将样品装载到 MST 标准型毛细管中,通过 Monolith NT.115 标记型来测量。之后通过 NanoTemper 系统自动分析出反应曲线,计算出分子结合程度。

2 结果

2.1 成功构建 pW28-GRP78 重组质粒

目的片段 GRP78 通过 PCR 技术扩增后,经过 1.0% 的琼脂凝胶电泳的分离鉴定,在 1 900 bp 处得到特异性条带与预测的分子量相符(图 2A)。同时对构建好的重组质粒进行双酶切验证(图 2B),条带位置与图 2A 一致。之后,将酶切验证成功的重组质粒送往擎科公司进行基因测序,测序结果与 GenBank 收录的基因序列比对吻合,表明重组质粒构建成功。

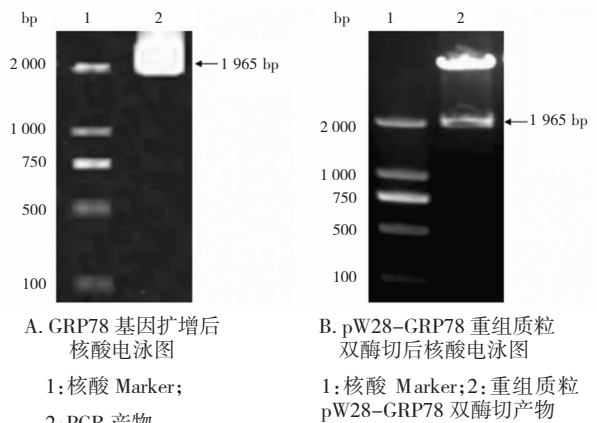


图 2 GRP78 基因扩增及双酶切鉴定

Fig.2 Agarose electrophoresis of GRP78 amplification and digestion identification

2.2 重组蛋白质的表达与纯化

通过优化蛋白纯化条件,得到 9 mg/mL 的可溶性上清表达蛋白。由 SDS-PAGE 电泳可知,经过镍离子亲和层析柱,处理获得了纯度在 80% 以上的 GRP78 蛋白(图 3A)。同时,利用 GST 亲和柱纯化了 GST-PreS1 的 3 个片段,并获得了相应蛋白(图 4A~C),分子量均为 30 kD 左右。为了明确目的蛋白,以纯化目的蛋白的条件分别纯化了相应的空载体(pW28 和 pGEX-6p-1)作为阴性对照(图 3B,图 4D)。以上实验说明目的基因经过诱导表达可以纯化出相应的蛋白,即 GRP78 蛋白和 PreS1 三个截短片段的融合蛋白。

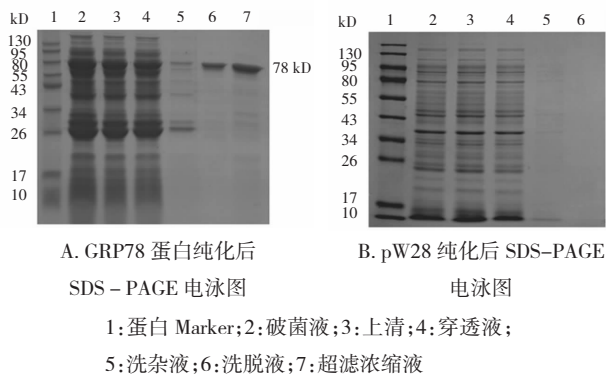


图 3 GRP78 蛋白纯化后 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE of purification on GRP78 by Ni-NAT

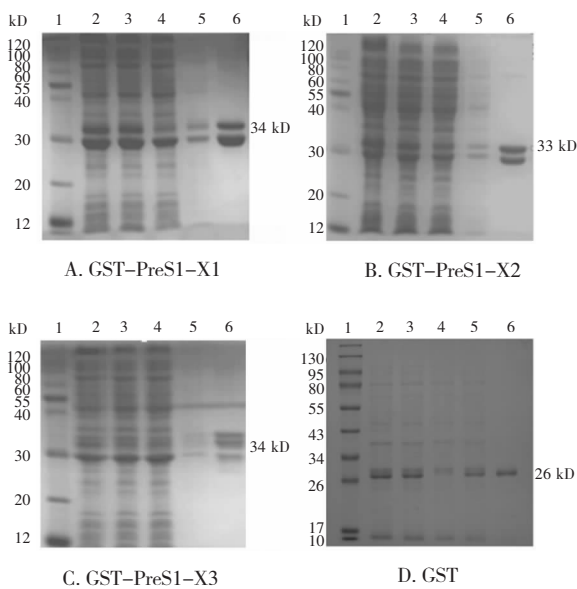


图 4 GST-PreS1 片段纯化结果

Fig.4 SDS-PAGE results of GST-PreS1 after purification by GST-NAT

2.3 Pull down 实验初步验证 GRP78 与 PreS1 截短片段结合

在 GST pull down 实验中,保证 GRP78 是过量的,从而

使得 PreS1 三个截短片段(GST-PreS1-X1、GST-PreS1-X2、GST-PreS1-X3)能够与之充分结合,由 SDS-PAGE 电泳可知,在分子量 30 kD 左右的位置是 PreS1 的 3 个截短蛋白,相对应的分子量 78 kD 左右的位置是与之结合的 GRP78 蛋白(图 5A);当镍离子柱的 pull down 实验中,同样,控制 PreS1 的 3 个片段的量是相同且过量的,从而保证与 GRP78 的充分结合,如图 5B,GRP78 与 PreS1 的 3 个片段均有少量结合。此外,设立了 His-GRP78 与 GST 结合的对照实验,在 GST pull down 实验中,在孵育过夜的混合液(图 5C-2)与 PBS 洗杂液(图 5C-3)中可见 GST 蛋白与 His-GRP78 蛋白,而在结合后的洗脱液中则只有 GST 蛋白,未见 His-GRP78 蛋白;在镍离子柱的 pull down 实验中,在孵育过夜的混合液(图 5D-2)与 Binding 洗杂液(图 5D-3)中可见 His-GRP78 蛋白与少量的 GST 蛋白,在结合后的洗脱液中则只有 His-GRP78 蛋白,未见 GST 蛋白。以上实验说明 GRP78 与 PreS1 的 3 个截短片段均有结合,且不受 GST 及 His 标签的影响。

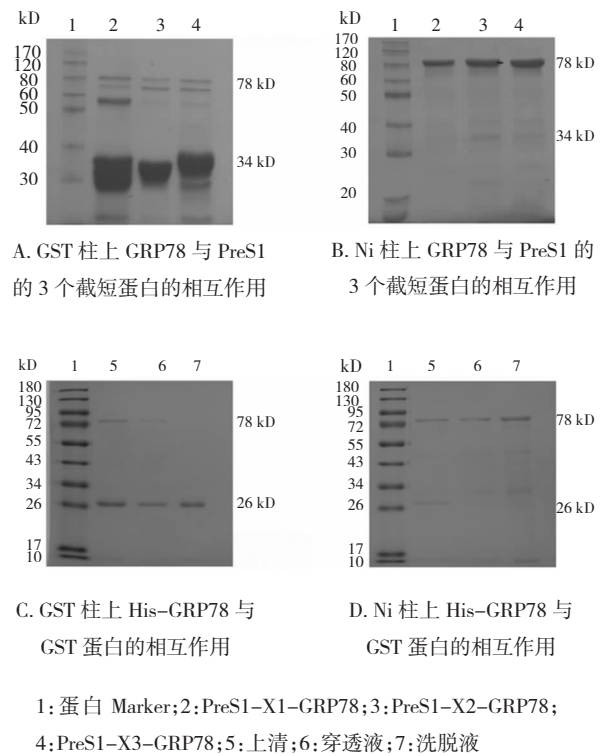


图 5 Pull down 验证 PreS1 片段与 GRP78 结合

Fig.5 Analysis of interaction (pull down) between GRP78 and PreS1

2.4 MST 实验进一步验证 GRP78 与 PreS1 截短片段的结合

前面已经利用 pull down 实验初步验证 GRP78 可以与 PreS1 的 3 个片段结合,尔后又通过 MST 实验进一步证明 GRP78 与 PreS1 片段的结合(图 6),并且根据结合曲线计算出 GRP78 与 PreS1 的截短片段的解离常数(K_d)。结果可知,GRP78 与 GST-PreS1-X1 的结合效果最好。

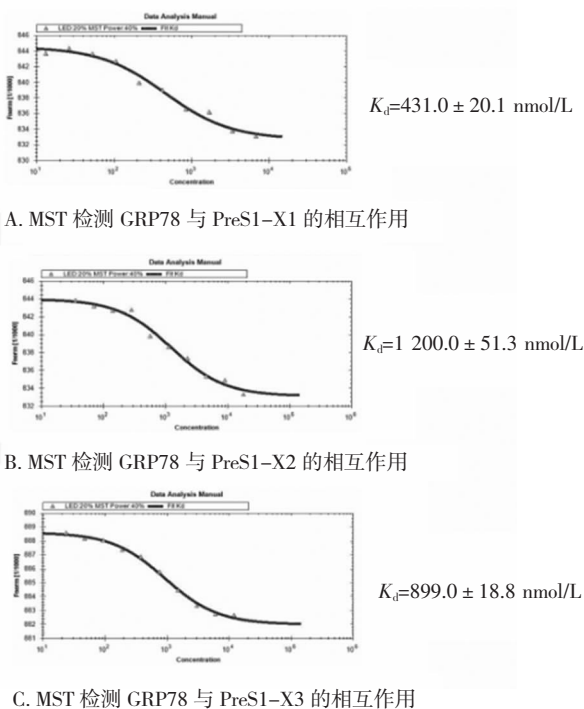


图 6 MST 验证 GRP78 与 PreS1 的结合

Fig.6 GRP78 interaction with PreS1 via MST

3 讨论

HBV 能够进入宿主细胞, 得益于其编码的 3 种包膜蛋白(大、中、小表面蛋白), 尤其是大表面蛋白的 pre-S1 区域, 它的 21~47 位氨基酸长期以来都被认为与肝细胞特异性结合相关^[18]。虽然这段区域在 HBV 结合中的重要性早已认识, 但肝细胞膜上与之相互作用的受体分子目前还不明了, 但存在一些候选受体包括转铁蛋白受体、IL-6 受体、铁蛋白轻链以及新近报道最有希望的 NTCP 受体, 它们中可能一种或者多种共同参与 HBV 进入宿主细胞^[19-21]。

有研究证明 GRP78 可以作为细胞表面受体, 介导病毒进入细胞, 并且能够通过 G 蛋白偶联系统将第二信使信号传入细胞。例如它是 2 型登革热病毒(dengue virus serotype 2)受体复合物之一, 也可作为柯萨奇病毒 A9(coxsackievirus A9, CAV-9)共受体分子存在^[22-24], 那么 GRP78 会不会也是 HBV 进入细胞的候选受体介导病毒入侵呢? 课题组前期通过 pull down 实验以及细胞共定位等实验, 观察到 GRP78 在细胞膜上均匀分布, 并指出 GRP78 可能通过 PreS1 结合参与 HBV 早期感染过程^[15-17]。虽然 GRP78 不是肝细胞所特有, 不能作为 HBV 感染的特异性受体, 但考虑它可能参与了病毒的早期感染与粘附, 并通过使信号传入胞内, 间接介导病毒入侵。

本文通过表达纯化稳定的 GRP78 蛋白及 PreS1 3 个截短片段的融合蛋白, 利用 pull down 实验, 微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)进一步研究 GRP78 与 PreS1 的结合区域。实验结果表明, GRP78 与 PreS1 的 3 个截短片段都有不同程度的结合, 结合位点的分布广泛, 说明存在一定的非特异性结合, 这可能与其相对广泛的生物学功能有关: GRP78 作为一种分子伴侣在蛋白质折叠和转运过程发挥作用, 可维持蛋白质自稳^[6]; GRP78 的 N 端包含内质网相关定位信号肽, 能与钙离子及多种蛋白发生可逆性结合^[7]; GRP78 在免疫应答中可以作为免疫佐剂参与免疫应答反应, 与错误折叠的蛋白质结合, 形成免疫复合物^[25]。但是从 MST 结果可以看出 GRP78 与 PreS1-X1 结合效果最好。而这一结合的区域又恰与 PreS1 介导病毒进入细胞的区域(21~47 位氨基酸)相符, 那么, GRP78 就更有可能作为 HBV 与宿主细胞相互作用候选受体。

MST 作为本实验的主要检测手段, 是通过测量分子在微观温度梯度场中的运动变化来检测水化层、电荷或者分子大小的变化。可以快速分析多种生物样品的相互作用, 可以在接近天然的环境中完成测量。但是作为科学研究, 实验手段相对单一, 因此, 未来课题组还会采用多种检测蛋白质相互作用的实验方法, 包括等温滴定量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)、基于表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)等技术, 也会合成一些 PreS1 的截短小肽及 PreS1-X1 突变体蛋白质寻找验证 PreS1 与 GRP78 相互作用的位点, 为之后进一步研究 GRP78 对 HBV 进入宿主细胞后生命周期的影响打下坚实基础。

参 考 文 献

- [1] Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(5): 275-284.
- [2] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2012, 132(7): 2557-2576.
- [3] Venook AP, Papandreou C, Furuse J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective[J]. Oncologist, 2010, 15(S4): 5-13.
- [4] Gish R, Jia JD, Locarnini S, et al. Selection of chronic hepatitis B therapy with high barrier to resistance[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(4): 341-353.
- [5] Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. FEBS Lett, 2007, 581(19): 3641-3651.
- [6] Munro S, Pelham HR. An Hsp70^o like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy