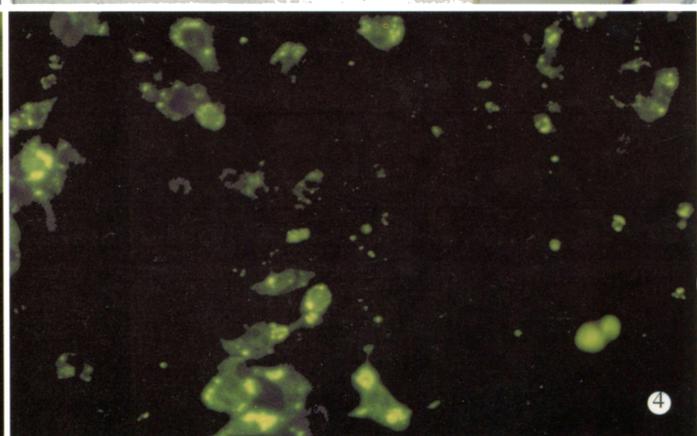
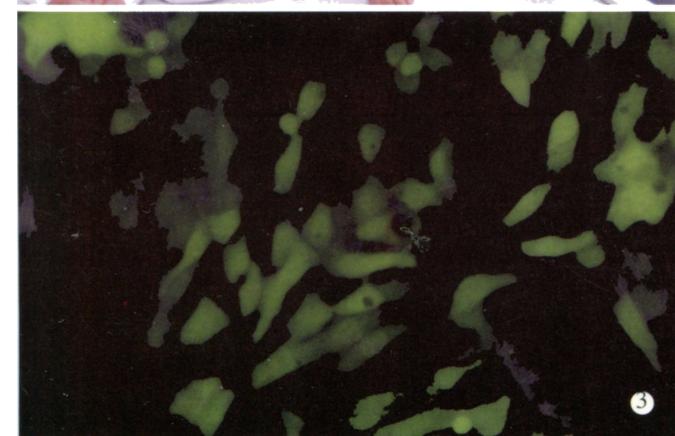


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年4月15日 第11卷 第4期 (Volume 11 Number 4)



4/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003年4月15日 第11卷 第4期(总第108期)

述评	373 新基因结构与功能研究的策略 成军
病毒性肝炎	378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍
	385 酵母双杂交技术筛选Hcbp6结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟
	389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅
	394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军
	399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬
肝癌	404 单克隆抗体3A5-复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺
	408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德
	411 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔
	415 热休克蛋白70与IL-2对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣
	419 肝癌DC疫苗活化的CTL对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英
基础研究	422 HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞
	426 酵母双杂交技术筛选HBeAg肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞
	430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松
	434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝TGF- α 、HGF、PCNA和IGFBP-1s mRNA的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立
	438 细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁
	442 大鼠肠巨噬细胞TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦
	446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩
焦点论坛	450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军
	451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林
	456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林
	459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林
	461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英
	464 丙型肝炎病毒与JAK-STAT信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	466 丙型肝炎病毒与MAPK信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	469 肿瘤抑制因子p21/waf1与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
	474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
研究快报	478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层B细胞及IL-12的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明
	481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,候庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 433 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 任师颜
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wjgd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wjgd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话: (010)85381892
传真: (010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期 24.00 元 全年 288.00 元	1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene
Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary - Editor - in - Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor - in - Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 4-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.**M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

新基因结构与功能研究的策略

成 军

成军,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039
成军,男,1963-08-17生,山东省淄博市人,汉族.1986年毕业于第一军医大学军医学系,获医学学士学位,1989年毕业于军医进修学院,获传染病学硕士学位,1994年毕业于北京医科大学,获传染病学博士学位,1994-11-17至1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究.回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床医疗工作和基础研究工作,主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制,已出版专著5部,发表论文及综述300篇.
国家自然科学基金资助课题, No. C39970674, No. C03011402, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
项目负责人:成军,100039,北京市丰台路26号,中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室.
cj@genetherapy.com.cn
电话:010-66933391 传真:010-63801283
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

摘要

发现一种新的基因,同时把其编码的新蛋白的结构与生物学功能、与生物学和临床医学之间的相互关系、以及新基因表达调节的机制阐明,是目前基因的分子生物学研究领域中最具挑战性的工作.首先利用酵母双杂交(yeast two-hybrid)技术、酵母单杂交技术(yeast one-hybrid)、抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)技术、基因芯片(DNA chip)技术、噬菌体表面展示(phage display)技术等获得蛋白结合蛋白的编码基因、差异表达的基因、DNA/RNA结合的蛋白基因等,或利用生物信息学技术获得推测的编码基因.然后,利用分子生物学技术和生物信息学技术相结合的手段,阐明新基因的功能、基因表达启动子的结构和调节机制基础,最终阐明新基因的结构和新蛋白的生物学功能,以及这种基因研究的可能临床医学意义.生物信息学技术与分子生物学技术的结合,是目前基因的分子生物学研究领域中的重要、有效的研究技术和方法.

成军.新基因结构与功能研究的策略.世界华人消化杂志 2003;11(4):373-377
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/373.htm>

0 引言

人类基因组计划(HGP, human genome project)完成以后,获得了大量的关于染色体DNA的基因序列的信息.这些基因序列,大部分(99%以上)是没有编码功能的重复基因序列,编码基因序列还不到整个基因组长度的百分之一.怎样确定编码基因序列,怎样确定新基因编码的蛋白质的结构与功能,怎样研究编码基因的表达与调节,怎样确定编码产物的生物学与医学的意义,等等,都是摆在我们面前的迫切任务^[1].所有这些内容,都是后基因组计划(post-HGP)的基本内容,也是在今后相当长的一段时

间内,基因的分子生物学研究领域的主要任务和内容^[2].目前,以基因的克隆化为主要目的综合的分子生物学技术结合生物信息学(bioinformatics)技术,是完成这一阶段性任务的重要策略.分子生物学技术研究的结果与数据库技术和计算机分析技术的结合,直接导致了生物信息学技术的产生,并随着分子生物学技术的开展,生物信息学技术不断完善;另外,生物信息学技术的出现,又极大地推动了分子生物学研究的快速发展^[3].

1 编码基因序列的研究

在基因克隆化的创新性科研工作中,首先必须得到感兴趣的编码基因片段.目前有几种技术手段可以应用.特种组织细胞cDNA文库的构建及大规模测序,基因芯片技术高通量筛选技术的应用,既是人类基因组计划的主要工具,也是后基因组计划必不可少的技术途径^[4].但是,由大规模随机测序获得的基因序列,一般来说得到的不是基因的全长序列,更谈不上基因的编码产物及功能.因此,在人类基因组计划基本完成以后,这些技术途径已经不再是主要的技术手段.相反,一些虽然不具备高通量筛选规模,但是功能筛选与基因的克隆化相耦联的研究技术显示出广阔的应用前景^[5].例如,以研究蛋白-蛋白相互结合作用的酵母双杂交技术及酵母三杂交(yeast three-hybrid)技术,由此发展而来的哺乳动物细胞的双杂交技术,就是研究蛋白-蛋白结合功能,同时又是克隆相关基因的技术途径^[6-8].应用这种技术,不仅可以获得蛋白质之间相互结合的功能研究信息,而且还能获得相应的基因序列,因而简洁高效.通过这种技术途径获得的新基因序列,虽然其功能的研究还需要进行许多工作,但是至少可以知道这种新蛋白与已知蛋白之间的结合关系;而蛋白-蛋白之间结合的关系,是研究新基因和新蛋白结构与功能的重要的突破线索.

在分子生物学研究领域,经常会遇到研究两个极为相似领域差异表达基因的筛选.例如,肿瘤组织和正常组织之间基因表达谱的差别,同一种细胞类型受到细胞因子或其他刺激因素作用之后基因表达谱发生的变化,一种基因转染细胞和仅转染空白表达载体之间基因表达谱的差别,发育不同阶段相同组织之间基因表达的不同,病变组织和正常组织之间基因表达的差别等.对于研究的基因类型没有事先的限制和先决条件,因此可以筛选得到已知和未知功能的基因.能够应用的技术类型包括抑制性消减杂交技术(SSH)、任意引物差

异显示逆转录多聚酶链反应(AP-DD-RT-PCR, arbitrary primer differential display reverse transcription polymerase chain reaction)、代表性差异分析技术(RDA, representative differential assay)等^[9-12]。随着噬菌体表面展示技术的不断发展,以及噬菌体展示文库构建及应用的拓展,这种技术不仅可以应用到抗体基因的筛选、模拟表位的筛选、抗独特型单链可变区抗体的筛选等,而且可以应用于蛋白结合蛋白的筛选和DNA/RNA结合蛋白的筛选^[13-22]。应用上述一些分子生物学技术筛选得到的基因片段,虽然只是编码基因区的基因片段,但是为阐明其功能奠定了基础。筛选DNA结合蛋白的技术还包括酵母单杂交技术以及其他一些蛋白质化学技术等。

无论采用的是酵母双杂交技术、酵母单杂交技术、抑制性消减杂交技术、基因芯片技术、还是噬菌体表面展示技术,筛选得到的基因一般都是编码基因的部分片段,要想进一步研究这些新基因的生物学功能和医学意义,必须首先获得编码基因的全长序列。获得全长编码基因的途径,一是分子生物学途径,一是生物信息学结合分子生物学途径,后者在研究中更为有效^[23-31]。既往对于已知基因序列两端未知基因序列的克隆化,根据多聚酶链反应(PCR)技术的原理,设计了特殊的技术方法,如5'-cDNA末端快速扩增法(5'-RACE)和3'-cDNA末端快速扩增法(3'-RACE)。这些技术在扩增cDNA片段两端的未知基因序列克隆中发挥过十分重要的作用。但目前则是生物信息学分析结合分子生物学的时代。利用美国国立生物工程信息学中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库,进行同源基因序列的比对,可以发现与已知功能或推断基因序列的同源基因。如果在这些数据库中没有发现同源的基因序列,还可以与表达序列标签(EST)数据库中的序列进行比对,可以人工拼接成为更长的cDNA片段^[32]。酵母双杂交技术和噬菌体表面展示技术中,由于文库构建过程中基因编码的框架结构是固定的,因此,结合基因序列的比对,以及根据Kozack原则,很容易确定该基因的全长编码序列。

利用5'-RACE或3'-RACE技术,或者结合生物信息学技术,首先确定新基因片段以及新型基因全长编码序列。此时,对于新基因的功能,我们还是知之甚少。此时,除了应用生物信息学技术对于该基因编码的产物进行一级结构和高级结构的预测,或者对于蛋白质分子结构中保守的功能位点进行预测之外,还可以应用前述的酵母双杂交技术,对于新型蛋白结合的蛋白进行筛选,获得重要功能的提示,或构建真核表达载体,利用细胞转染技术,结合DNA芯片和SSH技术,对于这种新型蛋白上调或下调的靶基因进行研究,获得新的线索,为进一步的实验研究设计,提供理论依据,最终阐明该新基因的生物学功能和医学意义^[33]。

如果筛选的是人的基因文库,那么首先得到的是人的cDNA序列。利用人类基因组DNA序列的数据库(htgs)同源序列进行比对,以及依据Chambon原则,可以确定其基因组DNA的序列结构,确定外显子(exon)和内含子(intron)的结构。同时,利用生物信息学技术,结合分子生物学技术,设计特异性核苷酸引物,利用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术获得人、小鼠、大鼠、牛等生物品系的相应的全长编码的cDNA,并进行序列分析。同样,利用生物信息学技术,结合分子生物学技术,设计特异性核苷酸引物,利用PCR技术获得人、小鼠、大鼠等生物品系的相应的全长的基因组DNA,并进行序列分析^[34]。这样,通过分子生物学技术及生物信息学技术,就可以发现或确定新型基因的全长编码基因序列,并可以初步确定这些新基因编码产物的生物学意义或医学意义。

简单生物分子生物学的研究,也是新基因克隆化技术和思想的重要来源。例如:美丽线虫(*C. Elegans*)、果蝇(*Dros. phila*)、拟介南等在西方发达国家的分子遗传学研究中具有重要地位。2002年诺贝尔医学奖的三位获得者,因其在细胞程序化死亡(programmed cell death),即细胞凋亡(apoptosis)的研究领域中成绩卓著而获奖。正是这一重要领域,以美丽线虫作为研究模型,从而为哺乳动物细胞的细胞凋亡研究开辟了新的领域。首先,从美丽线虫的细胞凋亡分子调节机制中发现,Ced-3基因是促进美丽线虫细胞凋亡的重要基因,即细胞自杀基因(suicide gene)。利用生物信息学技术,对于当时核苷酸序列数据库中收录的基因序列和结构特点进行同源性分析,最终发现人白介素-1 β 转换酶(ICE, interleukin-1 β converting enzyme)的结构与之类似,其序列的同源性达到26%。这在线虫与人的这二种遗传背景相距甚远的生物中是绝无仅有的。经过随后的一系列结构与功能的研究,证实ICE基因也是主导哺乳动物细胞凋亡的基因,从而发现了人细胞中的第一个自杀基因。类似的例子还很多。关于线虫、果蝇、拟介南等生物的研究目的也是如此。因此,低等、简单生物系统的分子生物学研究,也是人类新基因克隆化的重要思路和指示源泉。

2 调节基因序列的研究

人类基因组计划获得大量的有关人类染色体基因序列的信息,为编码基因序列的确定提供了很大的帮助,同时为调节基因序列的确定也奠定了坚实的基础。利用分子生物学技术结合生物信息学技术,可以很容易地确定编码基因序列上游具有调节功能的基因序列。调节基因序列的确定是第一步,还必须采取综合的研究策略,对于其调节的特点及其调节的结构基础和机制进行研究。因为生物信息学技术的预测结果还是初步的,因此,其预测结果仅具有一定的参考价值^[35]。

首先,以发现的新基因的编码基因序列作为参照,对人的基因组DNA序列进行同源基因序列的比

对, 寻找与之同源的基因组 DNA 序列, 然后根据确定的翻译起始位点 ATG 三联体密码子, 上游约 3 000 nt 的基因序列, 该基因的调节序列, 特别是核心启动子的结构序列, 基本上就位于其中. 因为大部分的基因调节序列都位于翻译起始位点上游这一部分序列之中, 但是也有例外, 例如有些基因的增强子(enhancer)调节基因序列, 其位置离翻译起始位点可以很远, 甚至在编码基因序列之中. 根据生物信息学分析结果, 确定启动子等主要调节基因序列以后, 就可以着手设计序列特异性引物, 应用 PCR 技术扩增获得这一基因片段. 然后按照正确的方向, 将调节基因序列插入没有启动子序列的报告基因表达载体的上游, 构建新的报告基因表达载体, 利用真核细胞的转染技术, 证实这一段基因序列中存在的启动子序列对于下游报告基因表达的指导作用. 但是, 这种证实的结果只是初步的, 还要进行更为细致的研究. 例如, 利用分子生物学技术, 进行系列缺失突变体的构建, 结合细胞转染和报告基因表达水平的检测, 阐明核心启动子 DNA 序列的结构基础, 为下一步更为细致的研究奠定基础^[36].

真核细胞基因表达的调节机制是多水平的、复杂的, 但主要是转录水平的调节. 转录水平调节的结构基础就是启动子 DNA 序列和与之结合的蛋白质因子, 即细胞核内存在的转录因子蛋白. 通过 DNA 序列的缺失突变体的构建, 可以确定启动子 DNA 序列的基本核心结构, 对于其结合的蛋白质转录因子的类型及其作用机制, 有许多研究途径. 例如经典的研究技术就是同位素标记的 DNA 探针与细胞核蛋白结合的实验研究. 这种技术涉及蛋白质的分离纯化技术, 对于阐明启动子的结合蛋白研究虽然有用, 但效率不高. 酵母单杂交技术, 在筛选启动子 DNA 结合蛋白方面更为有效, 已经有许多成功的研究报道. 另外, 随着噬菌体表面展示技术的不断进步, 结合高质量噬菌体表面展示 cDNA 文库的构建及应用, 利用噬菌体表面展示技术研究启动子 DNA 结合蛋白业已成为可能. 利用引物合成的生物素化, 配合链亲和素的固相包被, 利用生物素-亲和素之间特异性的结合, 很容易实现启动子 DNA 的固相化, 结合表达型 cDNA 噬菌体文库的筛选, 可以筛选得到特定启动子 DNA 的结合蛋白, 阐明特定基因启动子序列的调节基础^[37]. 目前关于启动子 DNA 序列与转录因子蛋白结合的多样性资料已积累了不少, 并且根据这些资料建立的数据库和生物信息学技术也已经出现, 但是, 由于目前关于启动子 DNA 和转录因子蛋白之间结合的研究资料有限, 而且还因为转录因子蛋白及其结合的 DNA 序列的多样性, 目前根据生物信息学技术对于启动子序列与结构的预测、潜在的结合的转录因子蛋白类型的预测结果, 都是十分初步的, 仅供参考, 需要有更为合适的实际的分子生物学技术研究结果进行证实. 研究启动子 DNA 和转录因子蛋白的结合, 有用的研究技术还包括凝胶迟滞(gel retardation)试验, 即电

泳迁移率漂移分析(EMSA, electrophoresis mobility shift assay), 以及超级迁移率分析(super shift assay) 等^[38,39]. 这些都是证实启动子 DNA 与转录因子蛋白特异性结合的有效技术方法.

3 蛋白质分子结构与功能的分析

利用常规的分子生物学技术扩增、克隆一些编码基因, 甚至是采用综合的分子生物学技术获得未知功能的新基因, 目前也不是一件很难的事情. 但是, 获得新的编码基因序列之后, 新蛋白的生物学功能, 甚至其医学意义的研究, 目前仍然是分子生物学研究领域中最有挑战性的任务. 从目前可能实现的分子生物学技术途径来说, 只能是一步一步进行研究, 逐渐积累对于新蛋白功能的认识, 争取在达到一定程度时获得对于这种新蛋白生物学功能认识的突破. 利用 Northern blot 杂交技术, 可以阐明组织细胞的分布特点, 以及生理和病理状态下这种基因表达的方式和表达的水平, 从而据此可以推测这种新基因和新蛋白的生物学和医学意义. 也可以利用酵母双杂交技术, 首先阐明在自然状态下, 这种新型蛋白在细胞内的结合蛋白对象是什么, 因为细胞内蛋白的生物学功能, 蛋白与蛋白之间结合是十分重要的基础, 因此, 如果可以阐明在细胞内结合蛋白的类型, 对于其生物学功能的认识将提供十分重要的线索. 构建这种新型基因的真核表达载体, 转染合适的细胞系, 利用研究差异表达基因的 SSH 技术、表达谱基因芯片技术等, 研究这种新蛋白的表达对于靶细胞中基因表达谱的影响, 如果可以阐明这种蛋白上调或下调的靶基因类型, 将为研究新蛋白的生物学功能提供重要的线索和研究方向.

建立转基因动物(transgenic animal)模型、基因敲除(gene knock-out)模型、基因敲除细胞系等都是研究新基因生物学功能的重要研究技术手段. 对于某些重要功能基因的敲除模型研究, 一定要清楚某些重要基因的缺乏, 可能会导致胚胎发育的重要障碍, 以至于不能顺利建立该基因的基因敲除动物模型, 因此, 必须对于适龄转基因动物胚胎研究, 为阐明新蛋白的生物学功能提供突破口. 利用生物信息学技术对于新蛋白一级结构进行预测, 可以获得蛋白质一级结构中疏水位点的结构信息, 据此可以设计出抗原多肽, 人工合成抗原多肽以后, 可以进行动物免疫制备相应的多克隆抗体, 或者利用人源化单链可变区抗体(ScFv)的噬菌体文库的筛选, 获得特异性的人源化 ScFv. 具备抗体之后, 就可以开展许多研究工作, 例如 Western blot 杂交, 免疫组织化学研究, 阐明这种蛋白表达水平、表达方式与临床疾病演变之间的相互关系, 从而赋予新基因和新蛋白的生物学和医学意义^[40-45]. 虽然利用上述研究技术和研究途径, 不一定完全阐明该基因和蛋白的生物学功能, 但是, 这些结果的获得, 必然为新基因和新蛋白的生物学功能和医学意义研究奠定

坚实的基础,或者提供进一步研究的重要线索,为最终阐明其生物学作用探索出研究技术途径。

基因的分子生物学研究,不仅要发现新的编码基因,而且要阐明新基因的表达与调控机制及其编码产物的生物学功能和医学意义,这是目前基因分子生物学研究领域中最具挑战性的工作。基因分子生物学研究已经积累了大量、丰富的数据资料,在此基础上,结合数据库的建立和计算机分析技术的应用,产生了生物信息学技术这一崭新的交叉学科^[46-50]。分子生物学技术和生物信息学技术相互联系,相互促进。生物信息学技术本身就是从分子生物学技术发展起来的边缘交叉学科,同时生物信息学技术又为分子生物学技术的发展提供理论预测,提高了分子生物学技术的工作效率^[51-54]。但是还应看到,生物信息学技术的出现历史尚短,还很不完全,但相信随着分子生物学技术的不断发展,基因的分子生物学资料的不断积累和数据库的不断扩大,计算机分析技术的不断改进,将产生更为强有力的生物信息学技术,到时反过来促进基因的分子生物学技术的发展,为最终揭秘人体基因组的结构和功能,阐明发病机制,探索新型的疾病治疗和预防技术,为人类的健康事业做出应有的贡献^[55-57]。

4 参考文献

- Jain E. Current trends in bioinformatics. *Trends Biotechnol* 2002; 20:317-319
- Lahm A, Yagnik A, Tramontano A, Koch U. Hepatitis C virus proteins as targets for drug development: the role of bioinformatics and modelling. *Curr Drug Targets* 2002;3:281-296
- Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C, Andersen CA, Knudsen S, Krogh A, Valencia A, Brunak S. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features. *J Mol Biol* 2002;319:1257-1265
- 成军. 临床精粹: 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. *中华肝脏病杂志* 2002;10:302
- Fuchs R. From sequence to biology: the impact on bioinformatics. *Bioinformatics* 2002;18:505-506
- 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 应用酵母双杂交技术筛选与克隆肝再生增强因子结合的蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 陈菊梅. 酵母双杂交技术筛选克隆 HCV 核心蛋白结合蛋白基因 1. *世界华人消化杂志* 2001;9:1379-1383
- 刘妍, 成军. HBV 截短的表面抗原蛋白 MHBs' 的反式激活作用. *国外医学病毒学分册* 2000;7:190-193
- 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张跃新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. *世界华人消化杂志* 2002;10:165-168
- 刘妍, 成军, 张跃新, 段惠娟, 牟劲松, 韩萍, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 截短型 HBsAg 中蛋白反式激活基因的克隆. *中华传染病杂志* 2002;20:31-34
- 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 可溶性 HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体在大肠杆菌中的表达. *肝脏* 1999;4:73-76
- 钟彦伟, 王松山, 赵景民, 成军, 张玲霞. 抗丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 单链抗体的制备及免疫组织化学研究. *中华实验与临床病毒学杂志* 2001;15:186-188
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达. *中华肝脏病杂志* 2000;8:171-173
- 钟彦伟, 成军, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 张玲霞. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定. *中华传染病杂志* 2000;18:84-87
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Zhang LX. Screening and identification of a humanized single chain variable region antibody for hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Chin J Immunol* 2000;16:246-249
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 人源单链抗体的筛选与鉴定. *免疫学杂志* 2000;16:422-424
- 成军, 施双双, 钟彦伟, 夏小兵, 王刚, 王琳, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达. *解放军医学杂志* 2000;25:394-397
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 王刚, 董菁, 夏小兵, 杨继珍, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体可变区基因的筛选与鉴定. *中华微生物和免疫学杂志* 2000;20:567
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 杨继珍, 董菁, 夏小兵, 李克, 刘妍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 人源单链抗体的筛选与表达. *中华中西医结合杂志* 2001;2:97-99
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Yang JZ. Cloning and sequence analysis of an amastin coding gene from *Leishmania major* Abdou. *Chinese Med J* 1999;112:698-700
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. *传染病信息* 1999;12:62
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 小鼠肝再生增强因子 cDNA 的克隆化与序列分析. *肝脏* 1999;4:138-140
- 成军, 斯崇文, 王勤环. 硕大利什曼原表面蛋白 "无鞭毛体蛋白 (amastin)" 的基因克隆化与序列分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2000;18:30-32
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 人肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. *中华肝脏病杂志* 2000;8:12-14
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Dong J, Yang JZ, Chen JM. Cloning and sequence analysis of human genomic DNA of augmenter of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆化与序列分析. *中华传染病杂志* 2001;19:27-31
- 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 钟彦伟. 大鼠肝再生增强因子基因组 DNA 的克隆化与序列分析. *临床肝胆病杂志* 2001;17:36-37
- 董菁, 成军, 刘友昭, 王勤环, 王刚, 施双双. 大鼠肝再生增强因子假基因的克隆化与序列分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:105-107
- Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD. Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma-H) Regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2002;184:4881-4890
- Smith VA, Jarvis ED, Hartemink AJ. Evaluating functional network inference using simulations of complex biological systems. *Bioinformatics* 2002;18 (Suppl 1):S216-24
- Heber S, Alekseyev M, Sze SH, Tang H, Pevzner PA. Splicing graphs and EST assembly problem. *Bioinformatics* 2002;18 (Suppl 1):S181-188
- Torshin I. Structural criteria of biologically active RGD-sites for analysis of protein cellular function Da bioinformatics study. *Med Sci Monit* 2002;8:BR301-BR312
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002;48:1296-1304
- 董菁, 施双双, 王业东, 皇甫克坤, 洪源, 李莉, 张玲霞, 成军. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. *解放军医学杂志* 2002;27:321-322
- Cheng J, Zhong YW, Liu Y, Yang JZ. Dual peak expression of transcriptional factor Oct-1 in apoptotic Jurkat cell line induced by diethylstilbestrol. *Chinese J Immunol* 2000;16:81-83
- 成军, 斯崇文, 王勤环. 己烯雌酚诱导人 T 细胞肿瘤 Jurkat 细胞系凋亡中转录因子 Oct-1 的表达. *北京医科大学学报* 1999;31 (Suppl 2):17-19
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. *中华实验与临床病毒学杂志* 2001;15:216-218
- 钟彦伟, 成军, 施双双, 夏小兵, 王刚, 杨继珍, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中华肝脏病杂志* 2001;9:217-219
- 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;

18:153-154

43 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. *世界华人消化杂志* 2002;10:133-136

44 钟彦伟,成军,陈新华,王刚,洪源,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 抗原模拟表位的筛选和鉴定. *免疫学杂志* 2002;18:42-45

45 钟彦伟,成军,田小军,陈新华,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 抗原模拟表位的筛选与鉴定. *中华肝脏病杂志* 2002;10:266-268

46 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmenter of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67

47 Blaschke C, Hirschman L, Valencia A. Information extraction in molecular biology. *Brief Bioinf* 2002;3:154-165

48 Stupka E. Large-scale open bioinformatics data resources. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:265-274

49 Walker M, Pavlovic V, Kasif S. A comparative genomic method for computational identification of prokaryotic translation initiation sites. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3181-3191

50 Schonbach C, Kun Y, Brusica V. Large-scale computational identification of HIV T-cell epitopes. *Immunol Cell Biol* 2002;80:300-306

51 von Heijne G. Bioinformatics of membrane proteins. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2002;17-27

52 Zhu Z, Pilpel Y, Church GM. Computational identification of transcription factor binding sites via a transcription-factor-centric clustering (TFCC) algorithm. *J Mol Biol* 2002;318:71-81

53 Brown CT, Rust AG, Clarke PJ, Pan Z, Schilstra MJ, De Buysscher T, Griffin G, Wold BJ, Cameron RA, Davidson EH, Bolouri H. New computational approaches for analysis of cis-regulatory networks. *Dev Biol* 2002;246:86-102

54 Brzeski H. An introduction to bioinformatics. *Methods Mol Biol* 2002;187:193-208

55 Stein L. Creating a bioinformatics nation. *Nature* 2002;417:119-120

56 Li B, Perabekam S, Liu G, Yin M, Song S, Larson A. Experimental and bioinformatics comparison of gene expression between T cells from TIL of liver cancer and T cells from UniGene. *J Gastroenterol* 2002;37:275-282

57 Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ* 2002;324:1018-1022

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

图 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中国人民解放军第 302 医院传染病研究所副所长、基因治疗研究中心主任、病毒性肝炎治疗研究首席专家成军博士、教授、主任医师正在进行医疗教学查房。

图 2 基因治疗研究中心实验室一角。

图 3 绿色荧光蛋白(GFP)在小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 中的表达。因为 GFP 没有特殊的亚细胞定位,因此 GFP 在 NIH 3T3 细胞中均匀分布。

图 4 基因治疗研究中心在人第 22 号染色体上发现的丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6)与 GFP 融合蛋白在 NIH 3T3 细胞中的表达。研究表明,HCBP6 蛋白在细胞中的分布是在细胞核核膜的胞浆侧。

(2003-03-20)



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

