

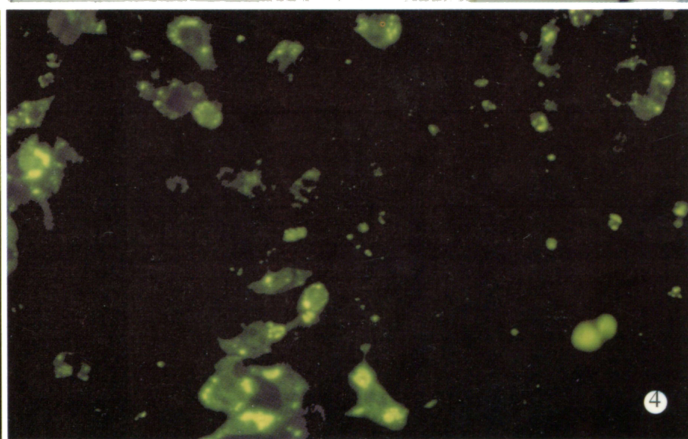
世界华人消化杂志®

**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,侯庆福,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: wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd@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** 14-1260/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: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

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

成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍, 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项目, No. C39970674, C03011402, 归国留学人员科研启动基金资助项目, No. 98H038
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 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: 010-6693 3391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2002-10-29 接受日期: 2002-11-28

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

Jun Cheng, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu

Jun Cheng, Ke Li, Yin-Ying Lu, Lin Wang, Yan Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
Supported by grants from National Natural Science Foundation of China, No. C39970674, No. C03011402, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038
Correspondence to: Jun Cheng, MD, PhD, Chief, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-28

Abstract

AIM: To investigate the structure and function of gene encoding human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 (HCBP6) with yeast two-hybrid technique and bioinformatics methods.

METHODS: Yeast two-hybrid technique and bioinformatics method were used to screen and identify the human HCBP6 gene and its amino acid sequences.

RESULTS: Human HCBP6 cDNA and genomic DNA sequences were identified. Human HCBP6 coded for 456 nt and corresponding protein was composed of 152 amino acids. The promoter sequence of HCBP6 gene was identified and promoter motif was predicted by 3 different bioinformatics methods. No intron in HCBP6 gene was identified by homologous search of cDNA and genomic DNA sequence database. The hydrophilic domain was predicted by bioinformatics methods, and the functional domains were determined with online search tools. Mouse HCBP6 gene was identified on the basis of the mouse homologous DNA sequence database. However, all data obtained from bioinformatics analysis were

preliminary and further study is required for confirmation.

CONCLUSION: The bioinformatics is a powerful method for the analysis and prediction of a new gene and corresponding protein. Although the predicted result is not accurate, it provides valuable information for further study.

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y. Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):378-384

摘要

目的: 克隆丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合的肝细胞的蛋白基因, 对新发现的基因及编码产物的结构与功能, 及其基因表达的调节机制的结构基础进行生物信息学分析.

方法: 应用酵母双杂交技术, 以HCV的核心蛋白作为“诱饵(bait)”, 筛选鉴定与其结合的肝细胞中蛋白的编码基因. 应用生物信息学(bioinformatics)技术, 对其中筛选得到的人HCV核心蛋白结合蛋白6(HCBP6)全长基因及其编码产物的一级结构序列, 进行生物信息学分析. 获得该基因的基因组序列, 并利用同源基因序列的比对, 确定该基因在染色体上的定位, 并确定人HCBP6基因的内含子序列. 对其编码上游的基因组DNA序列进行分析, 获得该基因启动子序列的一些信息. 同时, 根据同源基因序列的比较, 确定了小鼠HCBP6的基因序列和氨基酸残基序列. 通过对氨基酸残基序列的疏水性特点的分析, 确定了HCBP6蛋白的潜在的抗原结构位点. 通过蛋白质一级结构的在线计算机软件的分析, 对人HCBP6蛋白质一级结构潜在的功能性结构位点进行了计算机辅助分析预测.

结果: 通过酵母双杂交技术的筛选和鉴定, 结合生物信息学分析, 证实人HCBP6基因由456 nt组成, 编码产物由152 aa组成. 人HCBP6的基因组DNA是没有内含子序列的DNA结构. 通过生物信息学技术分析, 确定人HCBP6基因组DNA定位于人22号染色体上. 在对人HCBP6基因启动子序列的生物信息学分析中发现了几段可能的启动子序列结构, 以及可能的转录因子蛋白潜在的结合位点. 利用同样的技术, 确定了小鼠的HCBP6的基因序列和蛋白质一级结构序列. 对人HCBP6的蛋白质一级结构序列进行分析, 发现在其序列中第80-110氨基酸残基序列之间存在疏水性结构位点, 提示抗原位点所在, 对其进行免疫学分析提供了可能. 利用在线软件, 对人的

HCBP6 蛋白质结构中潜在的功能位点进行了初步的预测, 为进一步研究 HCBP6 蛋白的生物学功能的实验研究, 提供了丰富的信息. 这些生物信息学分析的结果, 虽然目前还只是初步的, 有些还不能被实验所证实, 但是, 对新基因的结构与功能的研究来说, 毕竟这种生物信息学分析, 能够提供一些线索, 对下一步结构与功能分析实验的设计, 具有很大的帮助.

结论: 酵母双杂交技术结合生物信息学技术, 是克隆、分析蛋白结合蛋白的基因, 对于其功能结构域的预测的有效工具, 在病毒性肝炎的致病机制研究中具有重要应用前景.

成军, 李克, 陆荫英, 王琳, 刘妍. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(4):378-384
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/378.htm>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)作为输血传播的非甲非乙型病毒性肝炎(NANBH)的主要病原体, 是一种单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒属, 因此 HCV 感染的发病机制与乙型肝炎病毒(HBV)这种 DNA 病毒可能有很大的区别^[1-4]. HCV 与肝细胞之间的相互作用, 可能是 HCV 感染发病机制的重要部分^[5-8]. HCV 基因组编码的核心(core)蛋白除了与 HCV RNA 结合, 保护 HCV RNA 免受 RNA 酶的消化作用, 维持 HCV RNA 的稳定性之外, 还具有一系列不同的生物学调节作用^[9-12]. HCV 核心蛋白作为一种反式激活蛋白, 对感染的肝细胞中基因表达谱产生影响, 同时, HCV 核心蛋白自身结合形成同二聚体结构, 也可以与肝细胞中其他类型的蛋白之间进行结合, 形成异二聚体或多聚体结构, 对肝细胞中的信号转导产生严重干扰. 通过这些生物学作用, 对肝细胞的细胞凋亡、细胞周期进行调节, 从而参与 HCV 感染的发病机制^[13-15]. HCV 感染除了引起急性和慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌(HCC), 还包括肝脏脂肪变、B 细胞淋巴瘤、冷球蛋白血症等, 这些病理改变的分子生物学机制, 目前我们还知之甚少, 需要进行细致深入的探索, 以阐明 HCV 感染与这些病理改变之间的相互关系^[16-18]. 本研究我们采用酵母双杂交技术, 以 HCV 核心蛋白作为“诱饵”, 对肝细胞 cDNA 文库进行酵母双杂交筛选, 获得了一些与 HCV 核心蛋白结合的肝细胞中的蛋白的编码基因, 其中包括功能未知基因 6 号, 我们命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6)^[12,19], 为了阐明 HCBP6 基因的生物功能, 我们对 HCBP6 基因进行了生物信息学分析.

1 材料和方法

1.1 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤等参考基因治疗研究中心相关的研究论文^[12,17].

1.2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因及蛋白一级结构的确定 利用核苷酸序列数据库和基因序列同源性在线分析途径(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), 获得与酵母双杂交技术筛选结果同源性的核苷酸序列. 因为构建肝细胞表达型 cDNA 文库时, 插入位点的确定性, 因此, 筛选得到的序列的终止密码子可以根据与插入位点规定的 ORF 结构特点进行确定, 即序列中发现的第一个出现的框架内终止密码子就是该基因的终止密码子^[20]. 上游翻译起始密码子的确定, 就是根据该编码基因序列的三联体密码子结构上溯, 直至没有发现进一步的框架内翻译起始密码子(ATG)为止, 来确定该基因的翻译起始密码子. 另外, 还需要查对新基因的起始密码子是否符合 Kozack 结构原则^[21].

1.3 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 同源基因序列的搜索和比较 利用美国国立图书馆国立生物工程信息中心(NCBI)建立的核苷酸数据库(GenBank)以及同源基因序列的在线搜索分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)软件进行分析.

1.4 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因组结构的确定 以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 应用在线分析工具(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)分析, 确定人 HCBP6 的基因组 DNA 的核苷酸序列.

1.5 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因启动子的序列分析 首先以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 对 GenBank 数据库中与其同源的人基因组 DNA 序列进行搜寻, 确定人 HCBP6 基因组 DNA 序列中编码基因上游约 3 000 nt 的核苷酸序列, 并且认为人 HCBP6 基因启动子序列即位于此段序列之中. 然后采用 NCBI 的 GenBank 核苷酸数据库以及相关的 3 种基因启动子序列在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>)、(http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)和(<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/proscan/>)版本 1.7, 对潜在的启动子序列和可能的结合的转录因子蛋白的结构位点进行分析.

1.6 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 疏水位点的分析 利用核苷酸序列数据库以及在线软件(http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/plot_hydroph.pl)对人 HCBP6 蛋白质一级结构序列进行分析, 发现疏水位点, 对 HCBP6 蛋白质一级结构中潜在的抗原位点进行分析预测.

2 结果

2.1 以 HCV 核心蛋白为“诱饵”对肝细胞文库酵母双杂交筛选结果 经过以 HCV 核心蛋白为“诱饵”的肝细胞 cDNA 文库的酵母双杂交筛选, 根据其能够突破 4 重缺陷型培养基的限制而生长, 且能够在 X- - 半乳糖苷酶(X- -gal)培养基上变成蓝色酵母集落, 确定了能够与 HCV 核心蛋白结合的一系列阳性克隆. 根据克隆的随机编号, 将这一基因编码产物命名为 HCV 核心蛋白结合蛋白 6(HCBP6), 这一 cDNA 克隆的部分序列如图 1 所示. 根据建立肝细胞 cDNA 文库时外源基

因插入载体的位点及其上游翻译起始点 ATG 的序列, 以及此开放读码框架(ORF)的翻译终止密码子(TAA), 确定 HCBP6 基因编码产物羧基末端的这一段多肽片段 (GRVDGYIKVDWQRVEKDMKKAKEQLKIRKSNQIPTEVRS KAEEVVSFVKKNVLVTGGFFGGFLLGMAS)是与 HCV 核心蛋白结合的结构域.

TCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAA
AGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTA
CGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCGGG
GATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGGGTACATCAAAGT
TGACTGGCAACGAGTGGAGAAGGACATGAAGAAAGCCAA
AGAGCAGCTGAAGATCCGTAAGAGCAATCAGATACCTAC
TGAGGTCAGGAGCAAAGCTGAGGAGGTGGTGTCAATTTGT
GAAGAAGAATGTTCTAGTAAGTGGGGGATTTTCGGAGG
CTTTCTGCTTGGCATGGCATCCTAAGGAAGATGACCTCA
TGTTCAATTGTTCTGGTTTTTCCAGCCAGCAGCCTCTA
CACTCCATCATAGGACATCGAGTCCCTCCTCCTCTTCTC
CCATGCCTTCTTCCCTGCCATGGCAAATCTGAGTGGCTT
CTCTAAGCATCTGCTGGTACAAGTCAATGTGGCACCATG
AGCTTCATGGTGGCAGAAGAGACAATAGTCCTTAGCTCT
CCTCCAGTACACCCCTACTTGGCCAGTCTGTAGGCCAA
CAAGAAGGTTCTTTACCCCATGCAAGAACACTTTATG
AAGAACACATTACCAAGGATGGGTTTGACCCGTGGGAAG
GAATTAAGTGGGATNCCTTGAAAANGGTTGGTCCCCAAA
ACCTGNTTTGATTTTTGGGAAAAAGNAAAATAAGCCCCC
ATTAGAATAAACCTTAAATTGGTGGTNGCCTTGCCATT
GGGAA

图 1 HCBP6 阳性克隆的部分基因序列.
根据构建肝细胞cDNA文库时外源基因插入位点在EcoRI(GAATTC), 且其中的AA分成2个相邻的三联体密码子, 确定下游的编码产物氨基酸残基序列和终止密码子TAA.

2.2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因序列的确定
利用NCBI建立的核苷酸数据库同源基因序列的在线分析(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), 在核苷酸序列数据库中检索, 与我们发现的 HCBP6 同源的核苷酸序列共有 6 个(表 1). 但这些基因序列的功能目前不清楚. 说明我们克隆的人肝细胞基因序列是新型基因序列, 而且在国际上首次证实 HCBP6 与 HCV 核心蛋白有结合功能. 通过核苷酸序列同源性分析发现两个显著的特点: (1)人和小鼠组织中, 都存在 HCBP6 不同的基因类型, 这种基因类型的生物学意义非常重要, 目前还不清楚; (2)人 HCBP6 和利用同样技术筛选鉴定的人 HCV 核心蛋白结合蛋白 1(HCBP1)两种基因序列的同源性在 44 % 以上, 提示这两种基因可能组成一个基因超家族, 也很可能还有其他超家族的成员有待于进一步的研究发现. 从目前的研究结果来看, HCBP6 的基因表达类型以 152 aa 为主, 但其他类型蛋白的生物学意义有待于进一步的研究.

表 1 HCBP6 基因的不同组织细胞来源和基因的剪切型

基因的种属与组织来源	核苷酸长度(nt)	氨基酸残基长度(aa)
人 眼睛 / 视网膜母细胞瘤	456	152
树突状细胞基因序列	417	139
22 号染色体基因组 DNA 序列		
小鼠 新生小鼠头	456	152
脑海马回	456	152
睾丸	555	185

从核苷酸序列的同源性比较分析结果确定人 HCBP6 的 cDNA 序列长度为 456 bp, 编码产物 HCBP6 由 152 个氨基酸残基组成. 以此序列上溯, 上游序列中的 ATG 三联体密码子不再是框架内的 ATG; 下游首先出现的终止密码子是 TAA, 所以确定无疑. 本序列的 ATG 翻译起始密码子也符合 Kozack 原则(图 2).

```

ATG GAA ACA TCT GCC CCA CGT GCC GGA AGC
M E T S A P R A G S
CAA GTG GTG GCG ACA ACT GCG CGC CAC TCC
Q V V A T T A R H S
GCG GCC TAC CGC GCA GAT CCT CTA CGT GTG
A A Y R A D P L R V
TCC TCG CGA GAC AAG CTC ACC GAA ATG GCC
S S R D K L T E M A
GCG TCC AGT CAA GGA AAC TTT GAG GGA AAT
A S S Q G N F E G N
TTT GAG TCA CTG GAC CTT GCG GAA TTT GCT
F E S L D L A E F A
AAG AAG CAG CCA TGG TGG CGT AAG CTG TTC
K K Q P W W R K L F
GGG CAG GAA TCT GGA CCT TCA GCA GAA AAG
G Q E S G P S A E K
TAT AGC GTG GCA ACC CAG CTG TTC ATT GGA
Y S V A T Q L F I G
GGT GTC ACT GGA TGG TGC ACA GGT TTC ATA
G V T G W C T G F I
TTC CAG AAG GTT GGA AAG TTG GCT GCA ACA
F Q K V G K L A A T
GCT GTG GGA GGT GGA TTT TTT CTC CTT CAG
A V G G G F F L L Q
CTT GCA AAC CAT ACT GGG TAC ATC AAA GTT
L A N H T G Y I K V
GAC TGG CAA CGA GTG GAG AAG GAC ATG AAG
D W Q R V E K D M K
AAA GCC AAA GAG CAG CTG AAG ATC CGT AAG
K A K E Q L K I R K
AGC AAT CAG ATA CCT ACT GAG GTC AGG AGC
S N Q I P T E V R S
AAA GCT GAG GAG GTG GTG TCA TTT GTG AAG
K A E E V V S F V K
AAG AAT GTT CTA GTA ACT GGG GGA TTT TTC
K N V L V T G G F F
GGA GGC TTT CTG CTT GGC ATG GCA TCC TAA
G G F L L G M A S *

```

图 2 人丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 的基因序列和编码的蛋白质一级结构序列.

2.3 人 HCBP6 的基因组 DNA 结构 以人 HCBP6 的 cDNA 序列为参照, 应用 GenBank 数据库分析和在线分析工具(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)分析, 确定人 HCBP6 的 cDNA 与人 22 号染色体的基因组核苷酸序列 100 % 同源, 所以将人的 HCBP6 基因定位于第 22 号染色体。人 HCBP6 基因组序列与其 cDNA 序列完全同源, 未发现内含子(intron)序列。

2.4 人 HCBP6 疏水性位点的分析 利用在线软件(http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hyd-bin/plot_hydroph.pl)对人 HCBP6 蛋白质一级结构序列进行分析, 发现疏水位点在蛋白质一级结构的第 80-110 氨基酸残基序列之间。可以根据此序列人工合成抗原多肽, 进行动物免疫获得抗体或经过噬菌体表面展示技术筛选人源化单链可变区抗体(scFv), 进行免疫组织化学染色, 探讨正常肝组织中或在急性、慢性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞癌的肝组织中 HCBP6 蛋白表达的特点及变化规律。

2.5 人 HCBP6 的编码区上游的基因序列分析 对人 HCBP6 基因组 DNA 序列翻译起始密码子 ATG 上游的序列进行分析, 试图确定调节人 HCBP6 基因启动子序列的结构与调节基础。对人 HCBP6 基因组序列翻译起始密码子上游的 3 000 nt 的序列(图 3)进行 3 种不同的在线软件的分析, 提示潜在的调节结构基础。但是, 这些调节的结构基础只是生物信息学的初步分析, 还必须以实际的实验研究结果来进一步证实。

```

1 CCTAGTGCCTCCATGATTTATATGGTGGGTGTAATATGAGAATAGAGT
51 ATTCCTTAGTGATAAACAGACATTTCTCCCTGATATTCTCTATTGTAAG
101 CATATGTTAAGTGCCCTTTATGAATTACCTCGGTGTTATCTCCTTTATTC
151 CTCAATTTGTGAAGAACTAATAGCTCCATTTTGTAGATGTAACCTGAGGT
201 TTAGAAGTCTAAAAAGTAAAGTAATCTCCAGATCCCTTCTTTGTAGGA
251 TATTTTATAAGGTGACTTGGAAGAGGTAGTGTTAGAATAGGAGTGGCTC
301 CTGGGTCAATTGCTTTTCTTAAGTGTCAACACTAATAAATGAATAGGGT
351 TATGTTTTTATTTAATAAAAAATATACAGTAAATAGCATATACAGTT
401 AAAAGAATTTATAATGTCTGCCACTATAATCAGGTTACCAGACAGTTTCA
451 TGGTCCAGAAAATCCCTAAACATAGGGTACTTTTAAACATTTTACAA
501 ATTACAATGAAAACAAATTGTGAATCTGAACCAAGGCCATTTGAGGAGAA
551 AATAGTTTCTACTTGTAATGGTAATTTATTTTAAATTTTCATAGCAATTT
601 GCAAGTACCTTTTGAAAGTATTATACAGTTGTATCTAAAAGTCACTATTA
651 ACTGTAGGGAAACAAAGTTTGTAGTAAACAGTATTTGCAAATTTTACA
701 TTGTATTTTCTCAGGATGTTTATCAGTTTTGTTGAAGTACACTGCTACA
751 GTGACAAGACTCCTGAAGTCTCAACTGTAAACAAATTTAAAACTAAGT
801 GCACATTTACAGACTCTTGGTCAGGTTGGGCTGTGCTTATATAGTCACGC
851 TAGATCCACCTGATGGCAGCACCTATCTGGGACACTCGGCTTCTTGCC
901 AGAGAAGATGGTGGGTCATGCGCTGGCTCTTAAAGCTGTTACAAACAAA
951 CCAAAGCAAGTGAATGGCTAAGTGCAGGGCAGTGGCATGGGACTGAG
1001 GATTTGTGTTTCTGACAAGTCCAGGTGATGCTAATGCTACTGGCCTAC
1051 TGGCCCTACTTTGAGTAGCATGATTGGAACATTCTCAGCCCAAGAAGTA
1101 TTGGGGGTGACTGACTGACTGACAAGCTTGTGGAGAATGCCACTGTCTGA
1151 ATATCTGTCCAGTTTGATCTAGGCCTAGCGGAAAGGGACTAAACAGAAGT
1201 GCAGTCGATTTCAGGTGAGGCTATCCAGCATATCTTGCTTATTGGAC
1251 AGATGTTGTCTAAGGTTAAGCCTGTTGTGCTGCACTCAGCAACTTCTTT

```

```

1301 CCAACAATCTAAAATTATTTCTTCAGCTTATTGTGTAATAAGGGTTTGT
1351 GTTCGTGGCTATGGATTAATATGGCAAGTTTTCTTGAGTCTCTTCAAT
1401 ATCAAAATAGGAAGGGTTATGTTACAGTTAGAAAGGACCAAAAGTCTAGT
1451 TGCTACAAAGGTTTGTACATTTGAAGTTTGTGGTTTGGCCATGGCTGGG
1501 CTCCGCTGTACTCCAGAAACATCTAACTGGAACATTGCCAGTCTCATGAT
1551 AGGGAATAATGGAGAACAATCAGCTGGCTCTTTCAAAGTGATGCTGGGA
1601 AGTGATGCATATCATTAACTTCTCAGCCAAAGCAAGTCACATACA
1651 GAGTAGTGGCTGTGGGACTGGGGAAGTATAATCTCCAGGTAGCAGATA
1701 TTTTGGACAATAATACAATCTACCATATCTTTCTAATTTTTCTTTGTCT
1751 ACAGTCCGTTTGTGCTGTTACATATTTAAAGCACTCTACCACTTGTCTT
1801 TGTGCTTCTTTGCTTATAACCCCAAGAAAGAGCCTTATTGTACAGATAA
1851 GAAAATTATCTTTAAGAGGTGAAATTTATTTATCTCAGGTCACACACCCCC
1901 CAGGTGTTAGGATGAGATTCAAAATCCAAGTCTGCTCTTTCAAGTTCATA
1951 CCTGCTGGAAGAAATTTTAGGCCCTGGCAGACTAGAGGGGCAGACCGGAA
2001 CAACTAGTTTTAGCTGGAAGTGAATAGACATCTGTTTCGATCTGAC
2051 AGCTTTTGGGATTAATACCCTTTATTTGTTAAAATAATTGAGCTAAAATA
2101 CGTTTGTTCATTCCCATAAACCTATGGTGACAGAACAGAGAGCTACAT
2151 TCTAAAATTTGAAACAGATTGAGAAATGAGCTGAAAGTAAGATTTTGGT
2201 CTGATTCTACTAATCTTTTTTCTCCATTAATGCTGGATTCATGTTCTT
2251 CAGTAGCTCTTCCCTCCCTCTGCCATCCAGTAAGATATATATGTTTGTA
2301 TATGTGTGTGTGTATATATACATATACACATATATATACATATACACA
2351 TATATATACATATAATACATATATACACATATATATACATATATACAC
2401 ATATATACATATATATACACATATATAGATATATACATGCACACATACTT
2451 TTTTGTAGAGAAGTATTAAGGCAACTAATAACAGTTTTCAGCTTTTCCAA
2501 AACAAATGATTAGAAAAGTCTTCTATTACATAAGTTTTCATCGCTCCAAT
2551 CAGCACAGTCTTGAATGCCATTTTGCAGCGAGTTCTGGGAATGCAGGCA
2601 CAGTCAGCAAAGAAAACAGTATCACATCTCCAGCCTGAACACTTTGGGCA
2651 CTGTAAACTAGACAATTTTATTTTATTTTAAAAACCATAACTGTTAAAAT
2701 GTCAAGGTGGACTGAAAAAGATATTATTGAAAAAGAAATAGCCCCCTGGA
2751 TCTTAAAAATATTAGTGAAAACTGCCAGCAGGAAAAATTCAGATGTTT
2801 ATTAAGATTCTACATATTTGGGTGAAAGAAATTTGTACTTTGAAAAGCCA
2851 AGACAAGTACTACCCCTACCATCAGCCTAAAAATAAACTTACTGACATA
2901 TTACATAAAATAAGAAAGGGTGTCTACACCGCCCGCTGAGCTCTGTGATGT
2951 AGCCGCTTGCAGGAGTGCAGCAGCCACGCGCGCCCTCTCCGTGGGA
3001 ATG

```

图 3 人 HCBP6 基因上游非编码区基因序列。

第一种分析方法:采用在线分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>), 以预测值为 2.0 作为其判断的 cut-off 值, 分析结果如下:

Promoter 2.0	Prediction	Results
Sequence, 3003 nucleotides		
Position	Score	Likelihood
600	0.596	Marginal prediction
1 000	1.055	Highly likely prediction
1 500	0.585	Marginal prediction

第二种分析方法:采用在线分析软件(http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl)进行分析, 以预测值为 0.80 作为其判断的 cut-off 值, 分析结果如下: Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for seq 0:

Start End Score Promoter Sequence

625 675 0.88 ACAGTTGTATCTAAAAGTCACTATTAACGTAGGGAAACAAAGTTTGA
 830 880 0.96 GCTGTGCTTATATAGTCACGCTAGATCCCACCGTATGGCAGCACATATC
 1 326 1 376 0.92 GCTTATTGTGTAAATAAGGGTTTGTGTTCTGCGGCTATGGATTAATATGGC
 2 896 2 946 0.97 ACATATTACATAAATAAGAAAGGGTGCTCACACCGCCCGTGAGCTCTGT

第三种分析方法:采用在线分析软件(<http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/proscan/>)版本 1.7 进行分析,以预测值为 53.00 作为其判断的 cut-off 值,分析结果如下:

Proscan: Version 1.7

Processed Sequence: 3003 Base Pairs

Promoter region predicted on reverse strand in 2664 to 2414

Promoter Score: 54.84 (Promoter Cutoff = 53.000 000)

TATA found at 2437, Est.TSS = 2405

Significant Signals:

Name	Strand	Location	Weight
Y	-	2 553	9.680 000
CTF	-	2 551	1.704 000
MBF-I	+	2 438	1.036 000
TFIID	-	2 435	1.971 000

Promoter region predicted on reverse strand in 259 to 9

Promoter Score: 53.04 (Promoter Cutoff = 53.000 000)

TATA found at 27, Est.TSS = -5

Significant Signals:

Name	Strand	Location	Weight
TFIID	-	259	1.971 000
TFIID	-	259	2.920 000
TFIID	-	259	2.618 000
retroviral_TATA	-	150	1.067 000
TFIID	-	23	1.971 000
TFIID	-	23	2.618 000

2.6 小鼠 HCBP6 的 cDNA 及其编码产物的序列 根据核苷酸序列同源序列的搜索分析,确定了小鼠的 HCBP6 基因以及蛋白质一级结构的序列,如图 4 所示.小鼠的 HCBP6 核苷酸序列由 555 nt 组成,其氨基酸残基序列由 184 aa 组成.

ATG ACA ACG AAC ACA TCC ACC ACC ACA ACC
 M T T N T S T T T T
 GCA ACT GTG GCA CGC TCT ATC TCC TCC TTT
 A T V A R S I S S F
 ACG GAC CCT CAT CAT TTC CCC TCT CAC AAC
 T D P H H F P S H N
 CAC ATT ATA AGG ATG GCC TCG GCC AGT CAA
 H I I R M A S A S Q
 GGG CAT TTT GAT GCT TAC GAG GCA CTG GAT
 G H F D A Y E A L D
 CTT ACA GAA TTT GCC AAA AAA CAG CCT TGG
 L T E F A K K Q P W

TGG CGC AAG CTT TTC GGG CAG GAG AGT CGG
 W R K L F G Q E S R
 TCT GCA GGT GAG AAG TAC AGT GTG GCA ACC
 S A G E K Y S V A T
 CAG CTC CTT ATT GGA GGT GTC ACT GGC TGG
 Q L L I G G V T G W
 TGC ACT GGC TTC ATA TTC CAG AAA GTT GGA
 C T G F I F Q K V G
 AAG CTG GCT GCC ACA GCA GTG GGA GGG GGC
 K L A A T A V G G G
 TTT TTT CTC CTC CAG CTT GCA AAC CAC ACT
 F F L L Q L A N H T
 GGC TAC ATC AAA GTT GAC TGG AGT CGA GTA
 G Y I K V D W S R V
 GAG AAG GAC ATG AAA AAG GCC AAG GAG CAG
 E K D M K K A K E Q
 CTG ACA ATT CGG AAG AGC GCC CAA ATA CCA
 L T I R K S A Q I P
 ACT GAA GTC AAG AGC AAA GCT GAG GAG GTG
 T E V K S K A E E V
 GTG TGC TTT GTG AAG AAG AAT GTT TTA GTA
 V C F V K K N V L V
 ACT GGA GGA TTT TTT GGA GGC TTT CTG CTC
 T G G F F G G F L L
 GGT ATG GCA TCC TAA
 G M A S *

图 4 小鼠 HCBP6 基因序列和蛋白质一级结构序列.

2.7 人 HCBP6 蛋白质一级结构序列潜在功能位点的预测结果 利用在线软件对人 HCBP6 蛋白质一级结构中潜在的功能性结构位点进行预测,如图 5 所示.关于这些结构位点预测的意义以及可靠性,还需要实验研究结果的进一步证实.

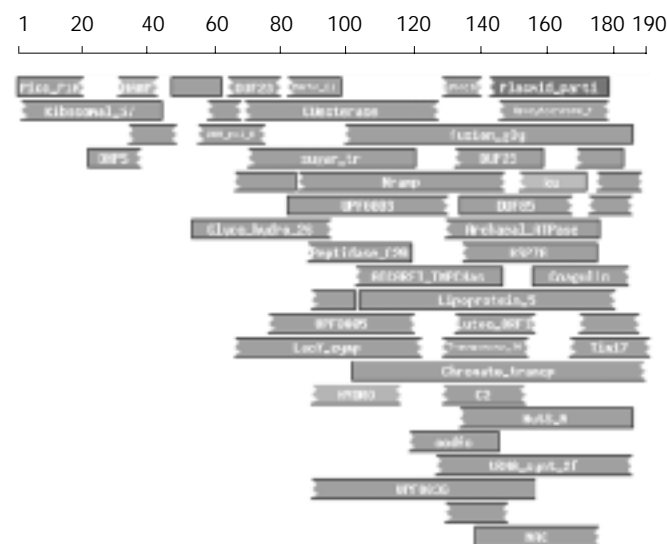


图 5 人 HCBP6 蛋白质一级结构及功能域的生物信息学预测.

3 讨论

研究新基因的结构与功能是目前分子生物学研究领域中最具有挑战性的工作之一^[22,23]. 特别是人类基因组计划(HGP)完成以后, 进入到后基因组计划(Post-HGP), 新基因的功能研究任务更为紧迫. 随着各种生物种类基因序列的测定, 已经积累了大量的核苷酸序列, 建立了基因序列强大的数据库, 同时, 关于基因序列, 特别是编码的蛋白质一级结构序列和功能结构位点保守序列的数据库的建立, 结合计算机和计算机网络技术的不断进步, 使我们可以通过对基因序列和蛋白质序列的比较分析, 进行结构与功能相互关系的预测, 为进一步的分子生物学研究提供方向和理论根据^[24-26]. 但是, 应该清醒地认识到, 目前对基因序列和蛋白质一级结构序列的功能位点的认识还是初步的, 已经积累的核苷酸和蛋白质一级结构的数据库还是非常初步的, 关于这些数据的计算机分析工具也还是初步的, 因此, 关于这些数据的生物信息学分析结果, 还只能是具有一定的参考意义. 这些基于核苷酸和蛋白质结构特点、数据库的建立以及计算机分析为基础的所谓的生物信息学分析技术才刚刚开始. 这些生物信息学预测的结果有些具有一定的指导意义, 有些还不能完全照搬, 必须有实验结果的证实^[27].

研究未知功能基因或新基因, 可以从不同的角度入手. 我们在肝炎病毒致病的分子生物学机制研究中, 经常会遇到研究蛋白和蛋白间相互结合、作用, 病毒基因表达产物对肝细胞表达基因谱的影响^[28-30], 以及肝炎病毒蛋白的抗体^[31-44]、抗原(配体)、结合蛋白、模拟表位^[45-47]、DNA/RNA-结合蛋白的筛选等方面的问题, 其中现代分子生物学技术如酵母双杂交技术(yeast two-hybrid)^[48]、抑制性消减杂交技术(SSH)^[49]、噬菌体表面展示(phage display)技术^[50]等的应用, 都是研究蛋白质的功能与基因的克隆化相耦联的技术途径. 因为这些研究技术, 不是以研究对象的背景资料作为先决条件, 所以, 筛选的结果, 既能得到已知功能基因, 又能得到未知功能的基因. 对所得到的未知功能的基因序列的研究, 往往觉得无从下手. 生物信息学技术的分析可能会提供很好、很多有价值的信息. 我们利用酵母双杂交技术, 首先筛选到了HCV核心蛋白结合的蛋白, 在众多可以与HCV核心蛋白结合的蛋白质类型中, 包括已知蛋白基因, 例如, 载脂蛋白A1(APO-A1)、载脂蛋白A2(APO-A2)、染色体转位蛋白(translin)等^[5], 从这些研究结果, 我们开始重视了HCV感染与肝脏脂肪变的问题, 并进行了系统的研究, 为HCV感染引起肝脏脂肪变提供了许多证据, 发现了一些慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的有规律的现象^[51,52]. 同时, 在酵母双杂交筛选过程中也得到了一些其他的信息, 例如获得了一些编码基因序列, 但这些蛋白的生物功能目前还没有研究报道, 还不特别清楚. 因此, 对于这些未知功能基因的研究迫切需要新的思路. 当初, 获得部分基因序列以

后, 如果要对全长基因进行研究, 需要应用互补末端快速扩增(RACE)技术, 扩增其余部分的基因序列. 而现在只需要以此序列为参照, 利用GenBank的在线同源基因搜索, 就可以获得这部分序列, 快速有效, 十分简便. 如果我们得到的是人或小鼠等种属的基因类型, 利用同样的技术, 就可以得到其他种属的同源性的基因. 如在本研究中, 我们应用人HCBP6的cDNA序列作为参照, 进行GenBank数据库搜寻时, 就可以获得小鼠、大鼠、牛等种属生物的HCBP6的基因序列. 但是, 由于目前还没有得到全部的人类染色体的编码基因序列, 对于大部分功能位点结构更是所知甚少, 因此由此建立的蛋白质功能位点的预测软件还有许多不完善的地方. 因此, 目前应用计算机分析技术对新型蛋白质分子中功能结构进行预测, 都还是初步的, 其结果也仅供参考. 但是, 对蛋白质结构的疏水性位点的分析结果, 还是相对可靠的. 我们已经利用这些分析结果获得了人HCBP6蛋白的抗原位点, 而且通过噬菌体表面展示技术对半合成的抗体基因文库的筛选获得了相应的人源化单链可变区抗体^[33-43]. 生物信息学技术不仅可以用于结构基因的功能预测, 而且还可以用于调节基因的预测. 例如, 我们应用不同的生物信息学技术对人HCBP6基因编码区上游的核苷酸序列进行分析, 初步获得了HCBP6基因启动子的序列结构特点. 关于HCBP6基因启动子的功能分析, 目前我们的报告基因表达载体的构建以及细胞转染实验结果也证实了这一点.

总之, 目前以克隆新基因为目的的分子生物学技术, 其实实验结果的分析, 必须利用、结合生物信息学技术的研究成果, 根据生物信息学技术预测的初步结果, 进行实验设计, 以获得事半功倍的效果; 当然, 目前的生物信息学技术, 由于核酸和蛋白一级结构与功能之间的相互关系的研究资料还不是特别完整, 因此, 这种预测的结果也还是初步的. 某些方面的研究结果比较可靠, 例如对同源核苷酸序列的比对以及全基因的克隆化, 蛋白质一级结构的分析中关于疏水位点的确定等, 都还是具有一定的可信度的, 但是关于蛋白质功能结构位点的预测, 关于启动子序列中转录因子蛋白结合的种类以及结合位点的预测, 则与实际情况还有相当大的差距, 还需要进行不断的更新与改进. 现代分子生物学技术与生物信息学技术的结合, 相互补充和改进, 将是当前基因分子生物学研究、重大疾病发病的分子生物学机制研究的主流方向, 相信随着分子生物学技术本身的发展以及数据库和计算机分析技术的发展, 这些技术的综合运用, 将迎来分子医学发展的崭新阶段.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯主编. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 83
- 2 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001; 17: 31-35
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病的分子生物学机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 125-128

- 4 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 5 李克,王琳,成军,陆荫英,洪源,刘妍,张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 6 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:123-127
- 7 成军,张玲霞. CD81分子的生物学功能. 国外医学免疫学分册 2000;23:322-324
- 8 成军,朱传琳. 肝炎病毒对双链RNA激酶PKR的调节作用. 国外医学微生物学分册 2000;23:1-3
- 9 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
- 10 成军,朱传琳. 丙型肝炎病毒感染慢性化的分子生物学机制. 国外医学病毒学分册 2000;7:29-32
- 11 成军. 丙型肝炎病毒基因组的翻译及其产物的加工. 国外医学微生物学分册 1995;18:14-16
- 12 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
- 13 刘妍,成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 14 刘妍,成军,邵得志,王琳,钟彦伟,夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 15 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒5' - 非翻译区及其结合蛋白的研究进展. 国外医学微生物学分册 2001;24:7-9
- 16 成军,李克,陆荫英,董菁,李莉,王琳,钟彦伟. 丙型肝炎病毒调节基因区结合蛋白的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:223-225
- 17 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
- 18 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein- a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 19 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,夏小兵,李莉,杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. 军医进修学院学报 2002;23:1-3
- 20 李克,王琳,成军,张玲霞,陆荫英,李莉,刘妍,段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:129-132
- 21 王琳,李克,成军,陆荫英,王刚,刘妍,钟彦伟,段惠娟,洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 22 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;3:281-96
- 23 Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, Benson G, Branch AD. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA* 2002;8:557-571
- 24 Husmeier D, Wright F. A Bayesian approach to discriminate between alternative DNA sequence segmentations. *Bioinformatics* 2002;18:226-234
- 25 Kernebeck T, Lohse AW, Grotzinger J. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. *Hepatology* 2001;34:230-233
- 26 Husmeier D, Wright F. Probabilistic divergence measures for detecting interspecies recombination. *Bioinformatics* 2001;17(Suppl 1):S123-S131
- 27 Klinck R, Westhof E, Walker S, Afshar M, Collier A, Aboul-Ela F. A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *RNA* 2000;6:1423-1431
- 28 Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-A262
- 29 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白的生物学调节作用. 国外医学微生物学分册 2001;24:12-14
- 30 成军,陈菊梅. 丙型肝炎病毒3' - 非翻译区RNA结合蛋白的研究进展. 国外医学病毒学分册 2000;7:17-21
- 31 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
- 32 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
- 33 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
- 34 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
- 35 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
- 36 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
- 37 钟彦伟,成军,施双双,王刚,夏小兵,田小军,李莉,张玲霞. 抗丙肝病毒包膜蛋白E2人源单链抗体的制备及免疫组织化学研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:109-112
- 38 钟彦伟,王松山,赵景民,成军,张玲霞. 抗丙肝病毒非结构蛋白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
- 39 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
- 40 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
- 41 成军,钟彦伟,施双双,夏小兵,王刚,陈菊梅. 丙型肝炎病毒E2蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 42 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
- 43 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
- 44 成军,钟彦伟,刘妍,董菁,杨继珍,杨守纯. 丙型肝炎病毒非结构区NS3基因在大肠杆菌中的可诱导性高表达. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:85-87
- 45 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
- 46 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
- 47 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
- 48 陆荫英,李克,成军,王琳,刘妍,张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. 解放军医学杂志 2002;27:341-342
- 49 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
- 50 董菁,施双双,王业东,皇甫乾坤,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
- 51 成军,李莉,张玲霞,陈菊梅. 丙型肝炎病毒感染与脂类代谢的相关性. 肝脏 2002;7:56-58
- 52 李克,张玲霞,成军. 丙型肝炎病毒与脂质系统代谢关系的研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:1-3



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

