

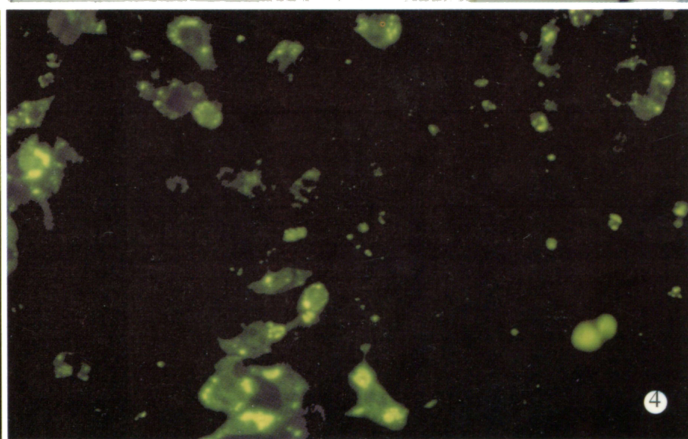
# 世界华人消化杂志®

**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- $\alpha$ 、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 $\alpha$ 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 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm</a> 2002 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm</a> 2001 世界华人消化杂志电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm</a> 2003 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm</a> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm</a> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm</a>
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- $\alpha$ , 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 $\alpha$  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

# 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

王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟,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

王琳,女,实验技师,主要从事肝炎病毒蛋白结合蛋白和分子生物学调节机制的研究。

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:010-66933392 传真:010-63801283

收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

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

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jian Zhang, Tian-Yan Chen  
Yuan Hong, Yan Liu, Gang Wang, Yan-Wei Zhong

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jian Zhang, Tian-Yan Chen, Yuan Hong, Yan Liu, Gang Wang, Yan-Wei Zhong, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, 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 seek for hepatic proteins that interacted with protein encoded by Hcbp6 for exploring the biological function of Hcbp6.

**METHODS:** Hcbp6 gene was introduced into pGBKT7, and then transformed into yeast AH109, which was mated with yeast Y187 ( $\alpha$  type) containing liver cDNA library plasmid in 2 $\times$ YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing x- $\alpha$ -gal. Plasmids were extracted from positive colonies, and sequence analysis was performed by bioinformatics.

**RESULTS:** Four kind of proteins including paralemmin, Ran binding protein 2, transmembrane transporting protein and albumin were identified to interact with Hcbp6 specifically.

**CONCLUSION:** Hcbp6 proteins may belong to or be associated with formation of secretory proteins, more study needs to be done for clarifying its biological function.

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW. Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):385-388

## 摘要

**目的:** Hcbp6 是与核心蛋白相结合的未知功能蛋白基因, 为了初步提示他的生物学功能和在细胞中的存在形式,

采用酵母双杂交体系寻找与他相互作用的肝细胞蛋白, 探讨 Hcbp6 的生物功能。

**方法:** 应用酵母双杂交系统 3, 构建 Hcbp6 诱饵质粒并转化酵母 AH109, 与含人肝细胞 cDNA 文库质粒的酵母 Y187 进行配合, 在涂有 x- $\alpha$ -gal 营养缺陷型培养基(SD/-Trp-Leu-His-Ade)上筛选生长。挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒, 转化大肠杆菌提取质粒 DNA 后进行测序, 然后进行生物信息学分析。

**结果:** 筛选出 4 种与 Hcbp6 特异性相互作用的蛋白, 包括 Paralemmin(PALM)、Ran 结合蛋白 2(Ranbp2)、跨膜运输蛋白 21(Tmp21)和血清白蛋白。

**结论:** 推测该蛋白可能为一分泌性蛋白, 或与分泌蛋白的形成有关。进一步的生物学功能的研究需要更多的实验加以探讨。

王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2002;11(4):385-388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/385.htm>

## 0 引言

HCV 核心蛋白是病毒编码的一种重要的致病因子, 参与介导多种生物调节和病理反应过程, 其分子机制之一就是病毒与宿主细胞蛋白质间的相互作用。HCBP6 是以酵母双杂交技术筛选出能与 HCV 核心蛋白发生结合的蛋白<sup>[1]</sup>, 这种结合在体外实验得到了明确的证实。该蛋白在哺乳动物中比较保守, 从小鼠、大鼠、奶牛到人具有较高的同源性, 但是目前既没有功能上的研究, 也不知其对核心蛋白的作用。基于此, 我们再次采用酵母双杂交系统对 HCBP6 的结合蛋白基因进行筛选, 以期寻找 HCBP6 可能的生物学功能, 并为研究核心蛋白的致病机制提供一定的线索。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 预转化入酵母的对照质粒 AH109(MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2 GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2 URA3 MEL1TATA-lacZ MEL1) 酵母中含有 pGBKT7-53, 编码 DNA-BD/鼠 p53 融合蛋白, Y187 (MAT ura3-52, his3-200, Ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4, gal80, met-, URA3 GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ MEL1) 酵



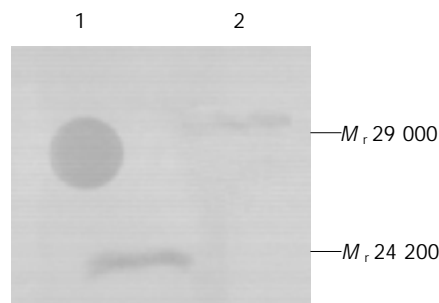
母中含有 pTD1-1, 由质粒 pACT2 中编码 AD/SV40 大 T 抗原融合蛋白. 预转化的 cDNA 肝文库(Y187), 由质粒 pACT2 表达 AD/cDNA 文库融合蛋白均购自 Clontech 公司(PT3183-1). 酵母双杂交系统3 含有 pGBKT7 DNA-BD 克隆载体、pGADT7 AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGADT7-T 对照质粒、pGBKT7-Lam 对照质粒、pCL1 对照质粒、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), AH109 酵母株、Y187 酵母株, 购自 Clontech 公司(K1612-1). Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司. T4 DNA 连接酶、EcoRI 和 BamHI 购自宝生物公司. c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生. 辣根过氧化物酶酶标羊抗鼠 IgG 为中山生物公司产品. 醋酸锂购自 Sigma 公司. 丙烯酰胺、N, N' - 亚甲双丙烯酰胺为 Promega 公司产品, TEMED 为宝林曼公司产品. X- $\gamma$ -Gal 购自 Clontech 公司. 培养基: 胰蛋白胨、酵母提取物为 OXOID 公司产品. 酵母 YPDA 培养基、SD/-Trp 培养基 SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 购自 Clontech 公司, 半硫酸腺苷购自 Sigma 公司.

1.2 方法 (1)载体的构建: “诱饵”质粒的建立. 将 HCV 核心蛋白基因用 T4 连接酶连于含有 GAL4 结合域的 pGBKT7 载体上构成诱饵质粒 pGBKT7- Hcbp6, 用醋酸锂法<sup>[2]</sup>转入酵母细胞 AH109 后, Western blotting 杂交鉴定是否有融合蛋白表达, 并且在四缺培养基上培养排除其自身激活作用. (2)酵母配合实验: 挑取在 SD/-Trp 培养基上含有 pGBKT7- Hcbp6 质粒的 AH109 酵母菌落(> 2 mm)数个接种于 SD/-Trp 液体培养基中, 30 250 rpm 振摇过夜. 第 2 天离心后重悬细胞约 5 mL, 计数 $>1 \times 10^{12} \cdot L^{-1}$  细胞, 室温水浴中融化 1 份 1 mL 文库酵母培养物, 全部 5 mL 的 AH109 酵母细胞与 1 mL 的文库混合, 加入 45 mL 的 2 $\times$ YPDA 后 30-50 r $\cdot$ min $^{-1}$  30 $^{\circ}$  培养配合过夜, 24 h 后进行离心用 YPDA 10mL 重悬细胞后铺 15 cm 的 SD/-Trp/-Leu/-His 平板 25 块和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 25 块. 同时进行阳性对照实验及文库滴定. 生长 6-18 d 后把长出的 > 2 mm 的酵母集落, 在铺有 X- $\gamma$ -Gal 的 QDO 上检查 X- $\gamma$ -Gal 酶活性, 认为在 QDO 培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落. 酵母质粒提取转化大肠杆菌, 按试剂盒提供的操作指南 Lyticase 法进行. 挑取真正的阳性集落于 QDO 液体培养基中培养过夜后, 提取酵母质粒, 提取的质粒用电穿孔法<sup>[3]</sup>转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的 LB 平板培养, 所获得菌落提取质粒后测序. 阳性克隆 DNA 测序后, 提交 GenBank 分析, 所获新的基因存入 GenBank 数据库.

## 2 结果

2.1 Hcbp6 蛋白表达的鉴定 “诱饵”载体 pGBKT7- Hcbp6 构建后转化到酵母 AH109 后能够稳定表达 HCBP6 融合蛋白(图 1). 阳性对照组含有 DNA 结合片段

Gal4<sub>1-147</sub> 氨基酸及 c-myc 标签的总分子量 18 200, 实验组因表达 HCBP6 融合蛋白其分子量为 38 985. Western 免疫印迹分析结果显示转化 pGBKT7 质粒组在 14 200 后有一特异表达带, 转化 pGBKT7- Hcbp6 质粒的酵母提取物于 40 000 左右有明显条带, 而未转化质粒组缺乏特异性反应带, 其分子量大小与理论值相符合.



1: pGBKT7 阳性对照组 2: pGBKT7- Hcbp6 实验组  
图 1 pGBKT7- Hcbp6 蛋白 Western 免疫印迹分析.

2.2 部分筛选克隆 Bgl 酶切鉴定结果 pACT2 内含有两个 Bgl 酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 使用该酶消化将释放出肝细胞文库片段(图 2).

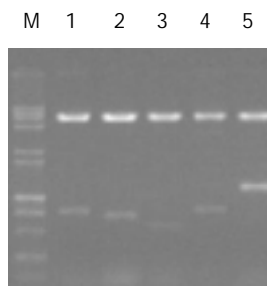


图 2 1-5 种不同的克隆 Bgl 酶切鉴定.

2.3 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选 8 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较, 已知基因的部分序列高度同源(99 %)(表 1).

表 1 1-5 种阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

编号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性
1	血清白蛋白(alb)	2	99
2	Paralemmmin(PALM)	1	99
3	Ran 结合蛋白 2 (Ranbp2)	2	99
4	跨膜运输蛋白 21(TMP21)	1	99
5	DNA 序列	2	99

## 3 讨论

HCV 核心蛋白为一个多功能蛋白, 除组成蛋白衣壳外, 还能作用于多种病毒和细胞的启动子, 调控基因转录, 干扰其他病毒的复制, 促进宿主细胞的分化和恶化, HCV 的基因组为正链 RNA 病毒, 但是其复制和表达均在胞质内完成, 不涉及到逆转录过程, 核心蛋白的存在为 HCV 感染后致肝癌的发生机制提供基础<sup>[4-10]</sup>.

但是有关核心潜在的生物学功能还远不为人们了解, 在以酵母双杂交技术寻找与核心蛋白相互作用的蛋白质时, 我们分离并确定了未知功能蛋白基因 Hcbp6. Hcbp6 是日本等学者在小鼠肾等器官中进行 cDNA 文库测序时发现的, 蛋白全长 190 aa, Genbank 中的资料显示该基因在哺乳动物中较为保守, 组织分布广泛, 在人和小鼠的不同组织中存在不同的基因剪切型, 可以认为这是一个不断进化中的古老基因. 绿色荧光(EGFP)融合蛋白分析发现 HCBP6 以小泡状结构散布于核周的胞质或细胞器内, 而 EGFP 空白对照则均匀弥散于整个细胞质及核质中, 因此推测 HCBP6 可能以分泌蛋白的形式由内浆网和高尔基体合成并运输. 为了进一步探讨该未知蛋白的功能, 本实验再次以酵母双杂交系统从人肝细胞 cDNA 文库中筛选 HCBP6 的结合蛋白, 以期发现其部分下游信息和对 HCV 核心致病机制的影响.

我们此次共获得了 8 个阳性克隆, 经测序及回交分析证实了 Paralemmen(PALM)、Ran 结合蛋白 2 (Ranbp2)、跨膜运输蛋白 21(Tmp21)和血清白蛋白(alb)白四种特异性结合蛋白. Tmp21 是 p24 货物受体家族成员之一, 他与 p24a 被认为是 COP 小囊泡外衣蛋白的受体成分, 广泛分布于各类组织细胞内的微粒体膜、酶原颗粒膜和质膜表面, 与酵母蛋白 Emp24p 有部分同源性, 推测其功能与分泌蛋白从内浆网到高尔基体的运输以及小囊泡的寻靶作用有关. 免疫荧光实验显示此蛋白连续循环于中间区室元件(IC)和高尔基体网络间, 侧面证实了他在高尔基体分泌通路中的运输行为<sup>[11-15]</sup>. PALM 是一类推定的有关质膜融合的调节蛋白, 在人类不同组织细胞内均有表达, 神经元细胞中高丰度表达. PALM 与一类涉及到如吞噬、胞吐、突起形成、信号转导等快速质膜动力学事件的蛋白分子具有分子结构或免疫形态学上的共同特征, 以其羧基末端的 CaaX 基序通过脂类锚定在质膜内表面, 而氨基末端的卷曲螺旋可能具有象 t-SNATE 蛋白一样介导细胞内的小囊泡插入的活性. 有实验观察到过度表达的 PALM 确实可以扩张细胞边缘、放射出长的突起而形成奇怪的多叶型. PALM 也结合在微粒体和小囊泡等细胞内组分上, 推测同时存在小囊泡运输的活性<sup>[16-20]</sup>. 另外一个感兴趣的蛋白质 RanBP2 定位于核孔复合物的浆膜侧并构成 Ran-GTP 酶在核浆膜面的结合域, 辅助 Ran 信号传导通路中的各种核过程包括核蛋白的双向运输、mRNA 的加工和输出及细胞周期的调节<sup>[21-33]</sup>. HCBP6 与他的结合可能导致某些核功能的建立或改变, 也可以想象, 这种作用可能对 HCV 核心蛋白的核内转运有影响.

从本实验结果来看, HCBP6 与多种负责细胞内运输的蛋白发生结合, 提示其可能为一种分泌性蛋白质, 但是通过生物软件初步分析没有发现典型的信号肽序列, 因此需要更多的实验如免疫荧光实验观察他的亚细胞定位和体内运输行为, 进而揭示此蛋白的生

物学功能. 本实验采用的酵母双杂交技术是研究蛋白质间相互作用的经典方法, 具有假阳性率低、部分模拟体内环境等优点, 同时是建立全部蛋白质-蛋白质组相互作用及其功能关系的图谱的重要手段, 为提示蛋白质在作用网络中所起的作用提供一条快速、便捷的途径<sup>[31-33]</sup>.

#### 4 参考文献

- 1 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 用酵母双杂交技术筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因 6. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:351-353
- 2 Gietz D, Jean A, Woods R, A Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1425
- 3 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1998:23-24
- 4 郝飞, 余宙耀. 丙型肝炎基础与临床. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998:46-47
- 5 李克, 王琳, 成军. 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
- 6 李克, 王琳, 成军. 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
- 7 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
- 8 刘妍, 成军, 邵得志. 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
- 9 Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997; 71:657-662
- 10 Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055
- 11 Blum R, Feick P, Puype M, Vandekerckhove J, Klengel R, Nastainczyk W, Schulz I. Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J Biol Chem* 1996; 271:17183-17189
- 12 Blum R, Pfeiffer F, Feick P, Nastainczyk W, Kohler B, Schafer KH, Schulz I. Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J Cell Sci* 1999; 112:537-548
- 13 Horer J, Blum R, Feick P, Nastainczyk W, Schulz I. A comparative study of rat and human Tmp21 (p23) reveals the pseudogene-like features of human Tmp21-II. *DNA Seq* 1999; 10:121-126
- 14 Wang H, Kazanietz MG. Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain. *J Biol Chem* 2002; 277:4541-4550
- 15 Barr FA, Preisinger C, Kopajtich R, Korner R. Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 2001;155:885-891
- 16 Burwinkel B, Miglierini G, Jenne DE, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Ring HZ, Francke U, Kilimann MW. Structure of the human paralemmen gene (PALM), mapping to human chromosome 19p13.3 and mouse chromosome 10, and exclusion of coding mutations in grizzled, mocha, jittery, and hesitant mice. *Genomics* 1998; 49:462-466
- 17 Kutzleb C, Sanders G, Yamamoto R, Wang X, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW. Paralemmen, a prenyl-palmitoyl-anchored phosphoprotein abundant in neurons and implicated in plasma membrane dynamics and cell process formation. *J Cell Biol* 1998; 143:795-813
- 18 Hu B, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kilimann MW. The paralemmen protein family: identification of paralemmen-2, an isoform differentially spliced to AKAP2/AKAP-KL, and of palmdelphin, a more distant cytosolic relative. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:1369-1376

- 19 El-Husseini AD, Craven SE, Brock SC, Bredt DS. Polarized targeting of peripheral membrane proteins in neurons. *J Biol Chem* 2001; 276:44984-44992
- 20 Andreu N, Escarceller M, Feather S, Devriendt K, Wolf AS, Estivill X, Sumoy L. PALML, a novel paralemmin-related gene mapping on human chromosome 1p21. *Gene* 2001; 278:33-40
- 21 Wu J, Matunis MJ, Kraemer D, Blobel G, Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* 1995; 270:14209-14213
- 22 Moroianu J, Hijikata M, Blobel G, Radu A. Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6532-6536
- 23 Seki T, Hayashi N, Nishimoto T. RCC1 in the Ran pathway. *J Biochem* 1996; 120:207-214
- 24 Chook YM, Cingolani G, Conti E, Stewart M, Vetter I, Wittinghofer A. Pictures in cell biology. Structures of nuclear-transport components. *Trends Cell Biol* 1999; 9:310-311
- 25 Nothwang HG, Rensing C, Kubler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998; 47:383-392
- 26 Wang LF, Zhu HD, Miao SY, Cao DF, Wu YW, Zong SD, Koide SS. Molecular cloning and characterization of a novel testis-specific nucleoporin-related gene. *Arch Androl* 1999; 42:71-84
- 27 Yaseen NR, Blobel G. GTP hydrolysis links initiation and termination of nuclear import on the nucleoporin nup358. *J Biol Chem* 1999; 274:26493-26502
- 28 Villa Braslavsky CI, Nowak C, Gorlich D, Wittinghofer A, Kuhlmann J. Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin-beta. *Biochemistry* 2000; 39:11629-11639
- 29 Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 2002; 108:109-120
- 30 Walther TC, Pickersgill HS, Cordes VC, Goldberg MW, Allen TD, Mattaj JW, Fornerod M. The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import. *J Cell Biol* 2002; 158:63-77
- 31 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340:245-246
- 32 Swinbanks D. Government backs proteome proposal. *Nature* 1995; 378:653
- 33 Frederickson RM. Macromolecular matchmaking: advances in two-hybrid and related technologies. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:90-96

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

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,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,解放军医学图书馆CMCC系统,世界消化学网数据库,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),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总引比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96.世界华人消化杂志®大16开,128页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262.E-mail:wcjd@wjgnet.com  
<http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)





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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

