

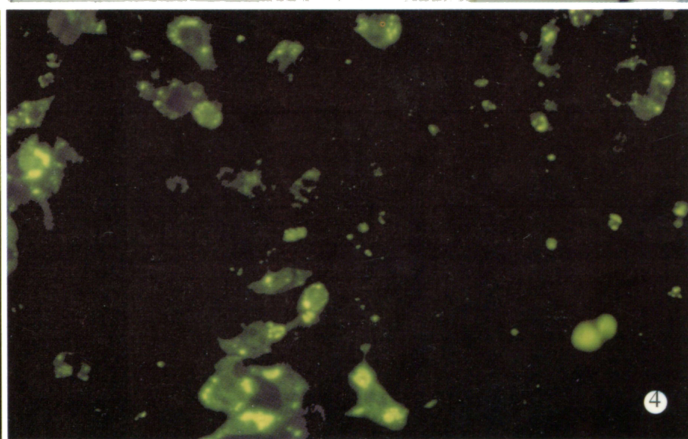
世界华人消化杂志®

**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

酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因

陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞

陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞,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 100039
陆荫英,女,1973-08-27生,贵州省贵阳市人,汉族,博士生,主治医师,主要从事肝病的基础及临床研究。

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:010-66933392 传真:010-63801283

收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-28

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

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

Yin-Ying Lu, Lin Wang, Jun Cheng, Ke Li, Yan Liu, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received:2002-10-29 Accepted:2002-11-28

Abstract

AIM: To screen proteins in hepatocytes interacting with hepatitis B virus core protein (HBcAg) with yeast-two hybrid technique for investigating the biological functions of HBcAg.

METHODS: The HBcAg gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and HBcAg bait plasmid was constructed with yeast-two hybrid system 3, then transformed into yeast AH109. The transformed yeast mated with yeast Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2 × YPDA medium. Diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) and synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) containing X-α-gal for selecting two times and screening. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, the results were analyzed by bioinformatics.

RESULTS: Sixteen colonies were sequenced, of which, two colonies were metallothionein 2A, one NAD(P)H dehydrogenase, one complement component 8 α polypeptide, one retinoic acid receptor responder (tazarotene induced), one cytochrome b, one cytochrome c oxidase subunit II, one albumin, two DAZ associated protein 2, two mitochondrial ribosomal protein L41 and four new genes with unknown function.

CONCLUSION: Genes of HBcAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and the results provided some new clues for studying the biological functions of HBcAg and its associated proteins.

Lu YY, Wang L, Cheng J, Li K, Liu Y, Zhang LX. Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):426-429

摘要

目的: 乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白(HBcAg)在 HBV 感染的肝细胞中可同时存在于筛选并克隆人肝细胞cDNA文库中与 HBcAg 相互作用蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增 HBcAg 基因, 连接入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞 AH109 并在其内表达, 然后与转化了人肝 cDNA 文库质粒 pACT2 的酵母细胞 Y187 进行配合, 在营养缺陷型培养基和 X- -半乳糖(X- -gal)上进行双重筛选阳性菌落, PCR 从中扩增出目的片段并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出 HBcAg 基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- -gal 的四缺培养基上均能生长, 并变成蓝色的真阳性菌落 16 个, 其中含金属硫蛋白 A2 基因的菌落有 2 个、未知基因 4 个、补体 8 基因 1 个、NAD(P)H 脱氢酶亚基 1 个、维甲酸受体应答元件 2 基因 1 个、细胞色素 c 氧化酶基因 1 个、细胞色素 b 基因 1 个、DAZ 相关蛋白 2 基因 2 个、线粒体核蛋白 L41 基因 2 个、人血白蛋白基因 1 个。

结论: 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究 HBcAg 在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):426-429

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/426.htm>

0 引言

在乙型肝炎病毒(HBV)的生活周期中, 病毒核心抗原(HBcAg)、病毒 mRNA 和 DNA 聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒 DNA 的合成^[1,2]. HBcAg 具有保护病毒 mRNA, 防止其被 RNA 酶降解的作用, 对于乙肝病毒前基因组 RNA 的装配、基因组 DNA 的合成具有重要的作用. HBV 在肝细胞内复制后, 膜上有 HBcAg 的表达, HBcAg 与 HBeAg 一同成为细胞毒性 T 细胞(Tc)细胞识别的主要靶抗原, HBcAg 既可作为 T 细胞依赖性抗原, 也可作为非 T 细胞依赖性抗原, 诱导强烈 CTL 应答^[3]; B 细胞刺突尖部有 HBcAg 的抗原决定簇, 可产生相应的体液免疫反应^[4]. HBcAg 在 HBV 的装配和致病机制中是必不可少的, 利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞中相互作用的蛋白, 并进一步探明

具体作用机制, 对于明确 HBV 致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义^[5-10].

1 材料和方法

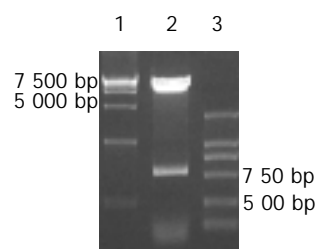
1.1 材料 AH109 酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4, gal80, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lac Z MEL1)、预转化的 cDNA 肝文库(Y187)、pGBKT7-BD 克隆载体及酵母 YPD 培养基、SD/-Trp、SD/-Leu, SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 等培养基、X- β -gal 购于 Clontech 公司.大肠杆菌 DH5 及 HBV ayw 亚型基因全序列质粒载体 pCP10 为本室保存, c-myc 单克隆抗体本室自制, 由购自 ATCC 的 1-9E10.2 杂交瘤产生.辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购于北京中山生物公司.Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I 和 Pst I 购于 Takara 生物公司. 丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、IPTG 及 X- β -Gal 及 pGEM-T 载体购于 Promega 公司. TEMED 购于宝林曼公司.醋酸锂、半硫酸腺苷购于 Sigma 公司. HBcAg 扩增引物(P1 5' GAATTCATGGA CATCGACCCCTTATAA3', P2 5' CTGCAGAACATTG AGATTCCCGAGAT3'), 肝文库插入序列扩增引物(P3 5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGA-3') 合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法 (1)诱饵质粒的构建及表达:PCR 扩增 HBcAg 基因与 pGBK-T7 载体连接, 酶切鉴定后转化入酵母菌株 AH109, 提取酵母蛋白质用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western 免疫印迹法验证 HBcAg 在酵母中的表达. (2)诱饵与肝文库的酵母配合:挑取在 SD/-Trp 培养基上生长的 pGBKT7-HBcAg 质粒的酵母 AH109 菌落一到数个接种于 SD/-Trp 培养基中, 30 250 r·min⁻¹ 振摇过夜, 次日离心后用 2 × YPDA 培养液 5 ml 重悬细胞, 计数细胞数 $>1 \times 10^{12}$ ·L⁻¹ 时与 1 ml 的肝文库酵母细胞在 50 ml 2 × YPDA 中 30 30-50 r·min⁻¹ 配合 18-24 h, 离心用 1 × YPDA 10 ml 重悬细胞, 分别取 250 μ l 铺于 15 cm 的 SD/-Trp/-Leu/-His(3 缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (4 缺)培养基各 25 块上, 同时将配合产物按 1 10、1 100、1 1 000 铺于 SD/-Trp/-Leu 培养基上检验配合效率. 生长 6-18 d 后挑取大于直径 3 mm 的菌落再次画线于铺有 X- β -gal 的 4 缺培养基上检查 X- β -gal 酶活性, 在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落. PCR 扩增出文库靶基因片段后测序并进行生物信息学分析.

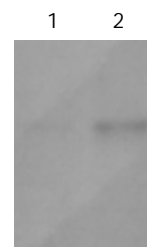
2 结果

2.1 pGBKT7-HBcAg 重组诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBcAg 基因片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约

549 bp, 与预期片段符合, 且无非特异扩增现象, 测序结果显示完全符合报告序列. 用 EcoRI 及 PstI 双酶切所得片段, 连接到用相同酶所切的 pGBKT7 载体中, 经酶切鉴定结果正确(图1). 由此表明 HBcAg 基因已按正确方向克隆入酵母表达载体 pGBKT7 中, pGBKT7-HBcAg 质粒构建成功. 用醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母 AH109 株后在 SD/-Trp 培养基上筛选生长 6-8 d, 挑取阳性菌落培养后提酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析结果(图2). 结果显示对照无表达而转化了 pGBKT7-HBcAg 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带且无杂带, 说明 HBcAg 基因已成功地在酵母中表达.



1、3 DNA Marker, 2、pGBKT7-HBcAg.
图1 pGBKT7-HBcAg 质粒 EcoRI 和 PstI 酶切.



1、5 μ l 上样, 2、10 μ l 上样.
图2 pGBKT7-HBcAg 酵母细胞表达 Western 免疫印迹分析.

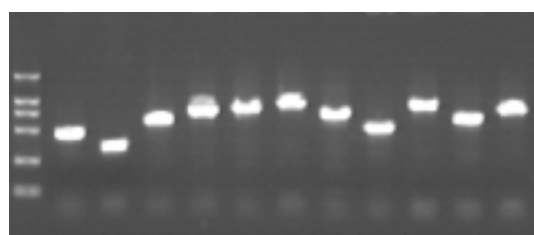


图3 部分文库筛选菌落 PCR 扩增结果.

2.2 诱饵与肝文库酵母菌株配合结果 配合后筛选出既能在 4 缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在铺有 X- β -半乳糖(X- β -gal)的 4 缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落 16 个, 用文库扩增引物 PCR 扩增出目的片段(图3)并测序, 结果在 GeneBank 中进行分析, 发现其中含金属硫蛋白 2A 基因的菌落有 2 个, 补体 8 基因 1 个, NAD(P)H 脱氢酶亚基 1 个、维甲酸受体应答元件 2 基因 1 个、细胞色素 c 氧化酶基因 1 个、细胞色素 b 基因 1 个、DAZ 相关蛋白 2 基因 2 个、线粒体核蛋白 L41 基因 2 个、人血白蛋白基因 1 个, 未知基因 4 个, 见表 1.

表1 HBcAg 肝文库筛选结果

同源蛋白质	同源性	相同克隆数
维甲酸受体应答元件 2	100 %	1
补体 8A	98 %	1
金属硫蛋白 2A	100 %	2
细胞色素 B	100 %	1
未知蛋白	98 %	4
线粒体核蛋白 L41	100 %	2
DAZ 相关蛋白 2	100 %	2
细胞色素 C 氧化酶	99 %	1
人血白蛋白	100 %	1
NADH 脱氢酶亚基 4	100 %	1

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了遗传学方法. 酵母双杂交系统通过将两个推定相互作用的蛋白 X 和 Y 被分别融合到一酵母转录激活因子 GAL4 的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子导致下游报告基因的转录, 产生容易探测到的表型. 我们选用的 Clontech 公司的酵母双杂交系统 -3, 在下游有 3 种报告基因分别为组氨酸、腺苷和半乳糖苷酶(LacZ), 加上两种载体中分别带有的亮氨酸、色氨酸, 使得真阳性菌落能在铺有 X- β -gal 并缺乏上述 4 种营养的培养板上生长并呈现出蓝色. 由于增加了报告基因的种类, 使单个报告基因自激活出现假阳性的几率大大降低, 筛选结果的真阳性率可达 95 %^[11-15].

HBcAg 有保守的三维结构, 受细胞激酶或病毒编码的激酶作用部分磷酸化^[16], HBcAg 有鱼精蛋白样亲细胞核性的羧基末端, 可介导核内转运信号, 使大量 HBcAg 进入细胞核内, 而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳蛋白都不核内转运, 人肝细胞核内 HBcAg 的功能不明. 在病毒成熟过程中, 核壳和外膜相互作用, 形成病毒颗粒分泌的信号^[17,18]. HBcAg 有高免疫原性, 几乎所有 HBV 感染者均产生抗 HBc, 同时是 CTL 免疫应答的靶抗原, 对于 HBcAg 的免疫应答在病毒清除中可能有重要作用. HBcAg 与肝细胞蛋白的相互作用是病毒装配、释放、清除过程中关键的环节, 找出其间的联系对于探明 HBV 致病机制, 寻找有效的防治方法有着深远意义^[19-26].

我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBcAg 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBcAg 基因, 与人肝 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 筛选出与之相互作用的蛋白基因 16 种. 其中, 金属硫蛋白系存在于人体及哺乳动物肝内的一种富含金属和半胱氨酸的小分子蛋白质, 在体内具有拮抗重金属(隔、汞和铝)和抗辐射(包括紫外线), 消除自由基、修复受损组织等

功效, 他还能生物体提供多种微量元素(如锌、铜、钴等), 与 HBcAg 结合可能是机体自身保护反应的一种, 是否可以用他作为 HBV 的辅助用药^[27-29]. 临床上 HBV 的感染者中, 男性发生慢性化、重症化及肝硬化的几率远大于女性, 曾有人提出可能跟雌激素作用有关, 但未找到确切的证据, HBV 感染发展的性别差异的原因至今仍是未知数. 位于 Y 染色体上的 DAZ 基因和位于常染色体上的 DAZ 类似基因 DAZL1, 编码一种只在精子细胞中表达的 RNA 结合蛋白, 他们与果蝇属 不育基因同源, 在 DAZL1 敲除的鼠发生不育, 说明 DAZ 基因在精子发生过程中起作用. 所有的哺乳动物常染色体都有 DAZL1 的同源基因, 而 DAZ 基因只存在于猿和部分种类的猴中, 二者的 C-末端重复序列有所不同. 有人用 DAZ 做诱饵, 酵母双杂交技术筛选获得与之有相互作用但功能未知的 DAZ 相关蛋白 2 (DAZAP2), 我们用 HBcAg 在肝文库中也筛选到该蛋白, 并有两个克隆, 提示 HBV 感染发生、发展的性别差异可能与之有关系^[30-32]. HBcAg 与线粒体核蛋白 L41、NADH 脱氢酶亚基 4、细胞色素 C 氧化酶、细胞色素 B 等有作用, 支持 HBcAg 通过肝细胞线粒体介导 HBV 的复制和装配. 新基因的发现也为我们研究 HBcAg 的功能提出了新线索, 但需要进一步研究证实.

4 参考文献

- Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett* 1999;442:1-6
- Le S, Pogam S, Shih C. Influence of a putative intermolecular interaction between core and the Pre-S1 domain of the large envelope protein on hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- Livingston BD, Crimi C, Fikes J, Chesnut RW, Sidney J, Sette A. Immunization with the HBV core 18-27 epitope elicits CTL responses in humans expressing different HLA-A2 supertype molecules. *Hum Immunol* 1999;60:1013-1017
- Lazdina U, Cao T, Steinbergs J, Alheim M, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Leroux-Roels G, Sallberg M. Molecular basis for the interaction of the hepatitis B virus core antigen with the surface immunoglobulin receptor on naive B cells. *J Virol* 2001;75:6367-6374
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Wang G, Liu Y, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augmenter of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:161-164
- Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Duan HJ, Lu YY, Yang JZ, Liu Y, Hong Y, Xia XB, Wang G, Dong J, Li L, Zhong YW, Chen JM. Screening and cloning of gene of hepatocyte protein 1 interaction with HCV core proyein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yaest two hybrid 'Bait' vector in yeast. *Sijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:129-132
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L. Mutunal interaction between hepatitis C virus core protein and translin, a recombination hotspot binding protein. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1-5
- Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM.

- Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 12 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
 - 13 Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Related Articles Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
 - 14 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 15 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
 - 16 Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A. Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1999;145:45-55
 - 17 Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, Wingfield PT. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002;21:876-884
 - 18 Karpenko LI, Ivanisenko VA, Pika IA, Chikaev NA, Eroshkin AM, Veremeiko TA, Ilyichev AA. Insertion of foreign epitopes in HBcAg: how to make the chimeric particle assemble. *Amino Acids* 2000;18:329-337
 - 19 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
 - 20 Fehr T, Skrastina D, Pumpens P, Zinkernagel RM. T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9477-9481
 - 21 Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 2000;191:503-514
 - 22 Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 2001;44:98-114
 - 23 Tsai SL. Immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *Changcheng Yixue Zazhi* 1999;22:159-170
 - 24 Ulrich R, Koletzki D, Lachmann S, Lundkvist A, Zankl A, Kazaks A, Kurth A, Gelderblom HR, Borisova G, Meisel H, Kruger DH. New chimeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotype Puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge. *J Biotechnol* 1999;73:141-153
 - 25 Murray K, Shiau AL. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol Chem* 1999;380:277-283
 - 26 Cao T, Meuleman P, Desombere I, Sallberg M, Leroux-Roels G. In vivo inhibition of anti-hepatitis B virus core antigen (HBcAg) immunoglobulin G production by HBcAg-specific CD4(+) Th1-type T-cell clones in a hu-PBL-NOD/SCID mouse model. *J Virol* 2001;75:11449-11456
 - 27 Quaife CJ, Cherne RL, Newcomb TG. Metallothionein overexpression suppresses hepatic hyperplasia induced by hepatitis B surface antigen. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;155:107-116
 - 28 Okazaki Y, Namikawa K, Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue. *Yakugaku Zasshi* 2000;120:282-289
 - 29 Smolarek C, Stremmel W. Therapy of wilson disease. *Z Gastroenterol* 1999;37:293-300
 - 30 Brekhman V, Itskovitz-Eldor J, Yodko E, Deutsch M, Seligman J. The DAZL1 gene is expressed in human male and female embryonic gonads before meiosis. *Mol Hum Reprod* 2000;6:465-468
 - 31 Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH. Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics* 2000;65:266-273
 - 32 Dorfman DM, Genest DR, Reijo Pera RA. Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells. *Hum Reprod* 1999;14:2531-2536

第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事

为了加强国际及沪港学术交流, 进一步提高肝癌和肝炎防治研究水平, 由上海国际肝癌肝炎会议组织委员会(复旦大学、上海第二医科大学、第二军医大学、中国科学院上海分院、上海市卫生局)和程思远国际肝炎研究基金会(香港)联合主办, 定于 2004-02-14~17 日在香港召开“2004 年港沪国际肝癌肝炎会议 - 第五届上海国际肝癌肝炎会议、第三届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”, 会议规模定为 1 200 人, 大会主席为中国工程院院士、复旦大学汤钊猷教授和香港大学医学院林兆鑫教授、大会邀请程思远、吴阶平两位副委员长为名誉主席, 并由国内吴孟超等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者 80 人作专题报告。欢迎国内外从事肝炎和肝癌基础与临床研究的专家、学者参加大会。投稿(请撰写中英文摘要)及联系事项寄: 200023, 上海市医学院路 136 号, 复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。电话: (021)64041990-2436, 传真: (021)64037181; 电子信箱: qiusj68@zshospital.net。有关会议的详情及注册, 请查询 www.hepa2004.org 网址。



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

