

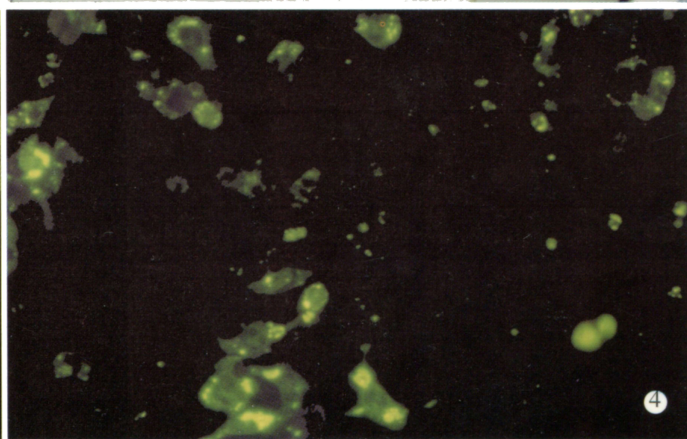
世界华人消化杂志®

**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

的反式激活作用,目前还没有定论. HBsAg 大蛋白与截短型 HBsAg 中蛋白一样,可以激活一系列的启动子元件. 有足够的资料表明,PKC 依赖性的 AP-1 和 NF- κ B 的激活是 HBsAg 大蛋白作用的主要机制. 在 PKC 作用的下游, c-Raf-1 激酶是 HBsAg 大蛋白激活 AP-1 和 NF- κ B 的先决条件,因为抑制 c-Raf-1 激酶的活性,就可以阻断 HBsAg 大蛋白对 AP-1 和 NF- κ B 的反式激活作用.

4 参考文献

- 1 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学,第1版,北京:人民军医出版社, 1997:83-103
- 2 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
- 3 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
- 4 刘妍,成军,董菁,夏小兵,李克,杨继珍. 截短型乙肝病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的初步研究. 肝脏 2001;6:8-10
- 5 刘妍,成军,陆荫英,李克. 乙型肝炎病毒蛋白反式激活基因的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:217-219
- 6 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 7 陆荫英,刘妍,成军,张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 蛋白的功能研究进展. 国外医学病毒学分册 2002;9:33-36
- 8 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
- 9 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 10 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:34671-34680
- 11 Lee YI, Kim SO, Kwon HJ, Park JG, Sohn MJ, Jeong SS. Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro. *J Virol Methods* 2001;95:1-10
- 12 Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka K, Arai M, Yamamoto M. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2001;18:1271-1278
- 13 Kang-Park S, Lee JH, Shin JH, Lee YI. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:303-307
- 14 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
- 15 Heim MH. Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis* 2000;32:257-263
- 16 Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273:25510-25515
- 17 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- 18 刘妍,董菁,皇甫竞坤,成军,王刚,王琳,李莉. 乙型肝炎病毒 X 基因异质性及其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 19 刘妍,董菁,成军,夏小兵,李克,王琳,施双双,段惠娟,杨继珍. 乙肝病毒 X 基因在真核细胞中的表达及反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2001;26:404-406
- 20 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996;225:235-239

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

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳,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
国家自然科学基金资助项目, No.C39970674, C03011402

项目负责人:成军,10039,北京市西四环中路100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:010-6693 3391 传真:010-6380 1283

收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-18

成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(4):474-477

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/474.htm>

0 引言

新基因的克隆化无异是生物医学领域创新知识源泉的重要组成部分. 这一任务,不仅是人类基因组计划(HGP)的核心内容,同时也是后基因组计划(post-HGP)的重要内容. 多年来,随着以人的基因克隆化为主的不同生物类型基因克隆化研究的进展,已然积累了大量的不同生物基因序列、蛋白质的氨基酸残基序列,同时对于不同生物种属之间基因序列、蛋白质以及结构序列的保守结构位点也积累了丰富的资料,并据此建立了庞大的数据库系统. 对于这些数据的分析,必须依靠计算机分析技术. 计算机分析技术的不断发展,为这些资料和数据的分析建立了一些有效的分析技术. 因此,自然而然就将基因和蛋白质结构的资料与计算机分析技术结合起来,形成了目前极具潜力的新兴交叉学科 - 生物信息学(bioinformatics)技术^[1]. 生物信息学技术的形成和发展,大大促进了以基因的分子生物学为核心内容的现代生物医学的发展,以基因的分子生物学为核心内容的理论和技术,已经成为生物学领域、医学领域重要的创新知识源泉.

1 基因序列和氨基酸残基序列同源性比对及其应用

基因序列和蛋白质一级结构序列的同源性比对,是目前生物信息学技术中最基本、应用最广泛的技术之一. 随着基因和蛋白一级结构序列数据库的不断扩充,人们甚至单单从数据库的计算机分析就可以克隆新的基因. 目前以美国国家生物工程信息学中心(NCBI, national center of bioengineering information)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其相应的检索分析系统的应用最为广泛^[2].

基因序列同源性的比对,对于分析基因组DNA序列以及完成新基因的染色体定位也是极为便捷的. 将确定的新基因的编码基因序列作为参照,对于GenBank数据库中高通量基因序列(htgs)数据库中基因组DNA序列进行同源性对比,当发现与新基因的cDNA序列完全同源

的基因组 DNA 序列时, 根据 Chambon 原则, 内含子(intron)的序列总是以 GT 开始, 以 AG 结束, 就可以确定该基因的基因组 DNA 序列的结构, 及外显子(exon)-内含子序列结构. 因为在 htgs 数据库收录的基因组 DNA 序列, 其染色体的来源是十分清楚的, 因此就非常容易、很方便地将该基因组进行染色体的定位, 而不再需要进行荧光原位杂交(FISH)的常规的基因染色体定位技术. 可见基因的生物信息学技术的发展对于基因组 DNA 序列的确定和在染色体上的定位是多么重要. 我们根据基因序列同源性的比较, 曾经以人肝再生增强因子(ALR, augmenter of liver regeneration)的基因序列为参照, 确定了人 ALR 基因组 DNA 序列、小鼠 ALR 的 cDNA 序列, 甚至克隆了大鼠的 ALR 的假基因(pseudogene)序列^[3-10].

核苷酸、蛋白质一级结构的序列对比, 不限于两两比较的方式, 多个序列彼此之间序列的比较技术, 逐渐发展成为遗传树分析法. 例如, 对于一个慢性乙型肝炎患者血清中乙型肝炎病毒(HBV)的基因序列进行克隆测定, 同时对于可能是传染源的血清标本中 HBV 基因序列进行测定比较, 就可以确定 HBV 的传染源. 即根据多个 HBV DNA 序列的比对分析, 判断序列的相似性, 确定彼此之间的序列的同源性, 从而确定传染源. 同样的道理, 对于一系列不同生物特定基因序列进行克隆分析、比较, 即可以确定彼此之间的亲缘关系, 并绘制成图谱, 进行分类, 这就是遗传分类学(cladistics).

2 基因启动子序列的预测分析

真核细胞的基因表达调节虽然是多个水平的调节, 但主要是转录水平的调节. 转录水平的调节基础就是转录因子蛋白与启动子 DNA 序列之间的结合和激活. 转录因子蛋白的结构可以分成结合域(BD, binding domain)以及激活域(AD, activation domain). 作为基因启动子 DNA 的序列也具有特征性的结构. 但是相比较而言, 目前基因启动子以及转录因子蛋白结合的种类, 积累的资料还十分有限, 数据库容量偏小, 计算技术相对滞后, 其预测结果仅供参考, 还必须结合其他的分子生物学技术进行证实.

一般情况下, 确定了一种新基因的编码区序列之后, 通过与 htgs 数据库的同源性比对, 可以很方便地确定其相应的基因组 DNA 序列. 在确定编码基因的起始密码子之后, 指导基因表达的启动子序列一般位于其上游基因序列 300-3 000 nt 之间, 鲜有例外. 可以从翻译起始密码子上有的基因组 DNA 序列, 选取 3 000 nt 左右的核苷酸序列进行生物信息学分析. 例如可以应用在线软件分析技术, 或自行研发的启动子序列分析技术等软件分析, 如: <http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>、http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl, <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/> 等. 根据这些软件分析的结果, 首先确定进行缺失突变体构建时应该采用的引物序列, 如果一段序列的缺失导

致报告基因表达水平的升高, 那么说明这一段基因序列存在着启动子的静息子(silencer)的序列, 对于基因的表达水平具有负调节作用. 通过逐步缺失的策略, 最终确定启动子 DNA 的核心序列. 报告基因表达载体的构建以及细胞转染技术, 仍然是目前研究基因启动子序列活性最为基本的方法.

研究转录因子蛋白的结合及其对基因表达水平的调节作用和性质有许多技术, 但是利用生物信息学技术预测的启动子 DNA 序列的结合的转录因子蛋白结果只有部分参考的意义. 凝胶迟滞(gel shift)试验、超级迁移实验(super shift)、竞争性结合实验、酵母单杂交技术(yeast one hybrid)、噬菌体展示技术(phage display)等在转录因子蛋白与启动子 DNA 序列结合的研究中具有重要应用前景.

3 不同种属基因序列的克隆化及其分析

细胞凋亡(apoptosis)是生命活动的重要形式. 2002年的诺贝尔医学奖就颁给了3位在细胞凋亡研究领域做出突出贡献的科学家. 早期的细胞凋亡研究, 相当一部分的工作是在一种称为美丽线虫(*C. elegans*)的简单生物模型上进行的. 例如在美丽线虫凋亡相关基因研究中, 发现 Ced-3 基因与线虫细胞凋亡有关, 被称为线虫细胞的自杀基因. 根据不同生物同源基因序列的比对, 发现 Ced-3 蛋白与人白介素-1 β 转换酶(ICE)的蛋白质一级结构序列同源性达到 26 %, 这种同源性在两种遗传背景相去甚远的物种的基因之间是鲜见的. 因此初步认为人的 ICE 基因是细胞凋亡促进基因, 即人细胞的自杀基因. 通过对人 ICE 基因对于细胞凋亡的研究, 发现 ICE 的确可以促进细胞凋亡, 从而直接导致了人类第一个自杀基因的发现与鉴定. 这是生物信息学技术, 基因序列同源性比对在发现新基因或基因的新功能方面一个十分成功的例子. 随着核苷酸数据库的容量不断加大, 计算机分析技术的不断进步, 关于不同生物种属之间序列的比对在发现新基因或发现基因的新功能方面越来越重要.

在生物进化过程中, 不同生物种属的基因都是高度保守的. 因此, 通过核苷酸序列同源性的比对, 就可以对来源于不同生物种类的同源基因序列进行分析. 这种分析过程也是新基因克隆化的重要途径. 例如, 我们在利什曼原虫新基因的克隆研究中, 为了探索与免疫应答的相关分子, 筛选基因疫苗的更好的靶抗原蛋白编码基因, 就是利用了生物信息学技术. 首先确定利什曼原虫这种细胞内寄生的原虫类型, 虫体表面的蛋白质抗原具有更多的与机体的免疫系统接触的机会, 在机体抗寄生虫免疫应答中具有重要作用^[11,12]. 因此, 计划对于利什曼原虫表面蛋白分子进行研究, 以期有所发现. 为了完成这一研究, 我们首先对于 GenBank 核苷酸数据库中收录的锥虫(*T. cruzi*)的基因序列进行检索分析, 在 GenBank 我们首先发现了无鞭毛体蛋白(amastin)的编码基因序列. 然后以此序列作为参照, 利用 BLAST 作为检索工具, 对于 GenBank 中所收录的利什曼原虫的同源性基因序列进

行搜索,结果找到了一段309 nt的基因片段来源于硕大利什曼原虫(*L. major*)。随后,我们利用这一片段作为探针,对于硕大利什曼原虫的cDNA文库进行杂交筛选,最终获得了硕大利什曼原虫的无鞭毛体蛋白的编码基因。随后我们对于其他株的利什曼原虫的无鞭毛体蛋白的编码基因序列也进行了克隆与分析,获得了显著的进展^[13-20]。这一基因序列是利什曼原虫基因组中的第一个无鞭毛体的基因序列,对于研究利什曼原虫与宿主细胞之间的相互作用研究具有重要意义。

数据库的相似性搜索使我们能够从数据库中存在的数十万个基因序列中可以挑选出可能同感兴趣的序列有关联的序列,这个方法有时会导致意想不到的收获,用这种策略获得成功的第一个例子就是发腺病毒肿瘤基因v-sis是细胞中编码血小板衍生因子(PDGF)的正常细胞基因的一个变体形式。那个时候,序列的数据库还不是很大,因此这一发现令人称奇。随着数据库的不断扩大,基本上可以检索到大部分基因的同源序列。

4 调节作用靶基因的分析

对于一种新基因生物学和医学意义的认识,可以从多方面入手。其中对于这种蛋白的表达及其在细胞中对于基因表达谱的影响研究,也是重要的突破口。获得基因差异表达谱的手段很多,可以从蛋白方面入手,也可以从基因的克隆化方面入手。从目前的研究技术来看,以基因芯片技术和抑制性消减杂交(SSH)技术最为有效。首先构建这种新基因的真核表达载体,然后与该空白载体分别转染相同的细胞获细胞系,同时提取mRNA、逆转录为cDNA,进行差异表达分析,获得差异表达的基因片段。因为目前的差异表达分析技术不能完全排除假阳性,因此还必须首先借助杂交技术排除假阳性的可能^[21-31]。

获得差异表达基因片段之后,因为这些基因片段有些是编码基因区片段,有些是非编码区基因片段,而且位于上游还是下游也不能一下得到确定,这就要借助生物信息学分析技术的力量。随着核苷酸序列数据库的不断扩大,大部分的基因序列片段经过核苷酸序列同源性的比对就可以迅速得到确定。如果在已经登录的基因序列数据库中没有发现同源基因序列时,需要进行相对复杂的生物信息学技术的分析,同时也蕴藏着发现新的基因序列的可能。首先可根据基因序列同源性对比的原则,以新发现的cDNA片段序列作为参照,对于GenBank数据库中来源于人的表达序列标签(human EST)数据库以BLAST为检索工具进行同源序列的比对。一般可以发现多个与之同源的EST序列,然后根据这些同源的EST序列进行电子拼接,得到更长的cDNA片段,然后对于这一cDNA片段6种可能的开放读码框架(ORF, open reading frame)进行计算机预测。一般来讲,除了个别的基因之外,其编码基因序列都在100个氨基酸残基以上,即>300 bp的ORF要得到特别的重视。之后以此ORF为参照,利

用上述核苷酸序列同源性比对的原则,确定相应的基因组DNA序列,基因组DNA序列的确定对于新基因编码取得确定同样具有决定性的意义。从确定的基因组DNA序列中,首先要检查该新基因序列的起始密码子(ATG)是否符合Kozak^[32]原则,即ATG周围的序列是否是哺乳动物细胞起始密码子序列特定性的结构。大部分人的基因序列都符合这一特点。如果能够证实这一新基因的起始密码子序列符合Kozak原则,那么关于这一新基因序列的起始密码子的确定就可以认为是基本正确的。关于终止密码子序列的确定在生物信息学理论中同样有章可循。在人类大部分基因的基因组DNA序列中,终止密码子序列是TAA、或者TAG、TGA,但无论是哪一种终止密码子,在其后大约200-600 nt的位置上,都有mRNA的加尾信号(tailing signal),即AATAA序列,有时这一加尾信号序列还多次重复出现,保证基因转录得到及时终止,在转录终止的mRNA尾部,加上数量不等的多聚腺苷酸,对于维持所转录的mRNA的稳定性至关重要,同时也是调节mRNA稳定性,调节基因翻译水平和表达时空的重要机制之一。如果在编码基因序列下游可以确定明确的多聚腺苷酸信号序列,那么这一新基因的生物信息学预测结果基本是可信的。

5 参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-410
- Zhang J, Madden TL. Power BLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 1997;7:649-656
- 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, 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 augmentor of liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2000;6:275-277
- 成军. 肝再生增强因子超家族研究进展. *生物学杂志* 2000;17:4-6
- 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. *中华肝病杂志* 2001;9:105-107
- 成军主编. 程序性细胞死亡与疾病. 第1版. 北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1997:125-129
- 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. 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
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 墨西哥利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *中国人兽共患病杂志* 2000;16:39-41
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 董菁, 杨继珍, 陈菊梅. 巴西利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *寄生虫与医学昆虫学报* 2000;7:193-197
- 成军, 钟彦伟, 刘妍, 杨继珍, 董菁. 亚马逊利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆化与序列分析. *中国地方病杂志* 2001;20:175-177
- 成军, 夏小兵, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 王琳, 杨继珍. 杜氏利什曼原虫蛋白磷酸酶2C的基因克隆化与序列分析. *中国人兽共患病杂志* 2001;17:37-39
- Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral *Leishmaniasis*. *Infect Immun* 2001;69:4719-4725

- 18 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,王琳,杨继珍. 硕大利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2001;19:373-374
- 19 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,杨继珍. 巴西利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. 寄生虫与医学昆虫学报 2001;8:193-198
- 20 成军,夏小兵,王刚,刘妍,钟彦伟,王琳,杨继珍. 杜氏利什曼原虫激活蛋白激酶C受体的基因克隆化与序列分析. 中国人兽共患病杂志 2002;18:24-27
- 21 董菁,成军,王勤环,王刚,施双双,夏小兵,斯崇文. 外周血中乙型肝炎病毒截短型囊膜中蛋白基因的克隆化与分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:163-165
- 22 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
- 23 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
- 24 倪勤,成军,李莉,夏光明,王红旗,王刚. 肝移植术后败血症患者粪肠球菌 PBP4 基因的克隆化与分析. 中华医药杂志 2001;1:1-3
- 25 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of human augmentor of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobil Pancreatic Dis Int* 2002;1:87-91
- 26 李克,王琳,成军,陆荫英,张玲霞,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
- 27 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的蛋白基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 28 成军,杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京人民军医出版社, 1997:204-210
- 29 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmentor of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 30 李克,王琳,成军,张玲霞,段惠娟,陆荫英,杨继珍,刘妍,邵得志,夏小兵,王刚,董菁,李莉,钟彦伟,洪源,陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因. 中华实验与临床病毒学杂志 2002;16:51-54
- 31 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟,段惠娟,芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 32 Kozak M. Interpreting cDNA sequence, some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 1996;7:563-574

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

• 消息 •

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标,1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系,该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标,如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定,今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号.

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)



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

