

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年8月15日 第11卷 第8期

(Volume 11 Number 8)



8/2003

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. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 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 8 月 15 日 第 11 卷 第 8 期 (总第 112 期)

述 评

- 1073 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识 成军, 董菁
1081 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗 江学良

病毒性肝炎

- 1083 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳
1091 乙型肝炎病毒基因组中前-S 区编码基因的界定 董菁, 成军
1097 乙型肝炎病毒基因组中前-X 编码基因的界定 董菁, 成军
1102 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因 1 的克隆化研究 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1107 乙型肝炎病毒 X 蛋白激活基因 1 的克隆化与序列分析 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克
1114 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白基因 S2-29 的克隆化研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞
1118 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒 e 抗原结合蛋白 E-19 的研究 陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1122 酵母双杂交技术筛选鉴定乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白新基因 C-12 的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞
1126 乙型肝炎病毒 X 蛋白与去唾液酸糖蛋白受体 2 突变体相互作用的研究 陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 张健, 邵清, 李克, 张玲霞
1131 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林
1135 丙型肝炎病毒 NS5A 基因变异与干扰素疗效的关系 张琳, 赵桂珍, 石理兰, 曹丽
1139 汉族人 IL-12b 和 IL-10 启动子区基因多态性与 HBV 感染的相关性 李永纲, 刘明旭, 王福生, 金磊, 洪卫国

基础 研 究

- 1144 肝外胆管癌组织 BAG-1 与 BAD 表达与凋亡调控的原位定量研究 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮
1148 牛磺酸脱氧胆酸损伤线粒体诱导 HepG2 细胞凋亡 李光明, 谢青, 周霞秋, 俞红, 郭清, 廖丹, 李定国
1152 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立
1156 苦参碱对大鼠原位肝移植冷缺血再灌注中肝窦内皮细胞损伤的影响 仇毓东, 朱新华, 史敏科, 丁义涛
1160 犬肝动脉输注阿霉素联合血液灌流的研究 张志友, 张文怡, 钱绍诚
1164 中国人金属基质蛋白酶组织抑制因子-1 基因的克隆与表达 刘双虎, 谭德明, 侯珏, 胡国龄
1168 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华
1172 垂体后叶素和特利加压素降低门胆汁性肝硬化大鼠门静脉高压对肝组织氧分压的影响 祝建波, 邓利群, 王思元
1175 电泳法检测肝和血清中醇脱氢酶同工酶 宓庆梅, 曹鲁宁, 高春芳
1178 肝细胞生成素核受体的确定及特性 王阁, 陈东风, 胡铭, 王军, 樊丽琳, 张晓荣
1182 PD98059 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增生的影响 马洪德, 蒋明德, 钟显飞, 解方为, 曾维政
1185 雌二醇对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原及 TGF β_1 表达的影响 许君望, 龚均, 冯新利, 茆新明, 罗金燕, 董蕾, 贾皓, 徐贵平
1189 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞
1193 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞 HCT-8 增生的影响 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红
1197 大肠癌组织胸苷磷酸化酶 / 血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲
1200 多粘菌素 B 及其模拟肽体外抗内毒素的实验研究 万志红, 王宇明, 刘国栋
1203 肥大细胞在胃嗜酸性肉芽肿发病中的作用 高振军, 罗和生, 操寄望, 余保平, 宋刘来

临床研究	1207 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1211 奥沙拉秦钠治疗慢性反复发作型溃疡性结肠炎随机对照研究 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1214 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤 1219 胃癌前病变演变过程中凋亡相关蛋白和PCNA的表达意义 伍银桥, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 祝庆孚 1223 汉防己甲素抑制肝癌细胞增生的作用 荆绪斌, 李涛, 杨绮华, 郭光华, 胡辉, 陈素钻 1227 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕 1230 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力 1234 肠易激综合征 402 例发病时间分布及症状特征 许小幸, 李定国, 宋光辉, 周惠清, 刘清华
焦点论坛	1237 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的研究进展 成军 1238 准种是乙型肝炎病毒存在的基本方式 成军, 董菁, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1240 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究 邵清, 成军, 白雪帆 1242 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮 1245 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1248 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活作用的研究 杨倩, 刘妍, 成军, 王建军, 洪源, 张树林 1250 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对于细胞周期素 A 的调节研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚 1255 乙型和丙型肝炎病毒对细胞周期素及细胞周期素依赖性蛋白激酶的调节 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩 1258 乙型和丙型肝炎病毒对 MAPKK 信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1261 乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响 张忠东, 成军, 钟彦伟, 张树林 1264 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗前景的研究 成军, 刘妍, 王琳, 钟彦伟, 王刚
临床经验	1222 一氧化碳中毒伴筋膜间隙综合征的综合治疗 邹淑杭, 马丽萍, 金镇勋, 贺红, 王一玲, 李冰 1267 胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤 21 例 樊丽琳, 陈东风
病例报告	1143 成人不典型郎格罕组织细胞增生症 1 例 王巍峰, 黄启阳, 王志强, 杨云生 1147 慢性酒精性肝损伤致 Gilbert 综合征样改变 1 例 张文瑾, 王晓峰, 赵景民 1192 小肠血管结构不良 2 例 冯瑞娥, 赵大春, 陈杰
消 息	1080 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 1090 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 1130 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1155 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 1226 WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台
封面故事	1138 溃疡性结肠炎的基础和临床研究

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 2003-08-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元
社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 朱丽虹
排版 李少华
校对 李天华

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(PJ)》
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
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营 14010040

50

www.wjgnet.com

乙型肝炎病毒前-S2蛋白结合蛋白基因S2-29的克隆化研究

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 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 北京市 100039

陆荫英, 女, 1973-08-27生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 博士, 2003年军医进修学院毕业, 主治医师。主要从事肝病的基础及临床工作。

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689, 军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063, 军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038, 军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138, 军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 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: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-04-16

Screening and identification of a novel gene coding for hepatitis B virus pre-S2 antigen interacting protein S2-29

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Cheng, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Ke Li, Jian Zhang, Qing Shao, Ling-Xia Zhang

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Cheng, Jun Cheng, Yao-Dong Liang, Lin Wang, Yan Liu, Ke Li, Jian Zhang, Qing Shao, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Professor, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-04-16

Abstract

AIM: The Pre-S2 region of hepatitis B virus (HBV) has been reported to have complex biological functions. It has human polymerized albumin receptor (PAR) activity, which correlates with viral replication, and it can induce neutralization antibody. As an important part of truncated middle surface proteins (MHBS), the Pre-S2 domain binds PKC α/β and triggers a PKC-dependent activation of the c-Raf-1/MAP2-kinase signal transduction cascade, resulting in activation of transcription factors such as AP-1 and NF- κ B. To investigate the biological function of hepatitis B virus (HBV) Pre-S2 protein, we used yeast two-hybrid technique to screen proteins interacting with HBV Pre-S2 antigen in hepatocytes.

METHODS: The HBV Pre-S2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into yeast expression vector Pgbkt7 to construct HBV Pre-S2 bait plasmid. The bait plasmid was transformed into yeast AH109 and mated with yeast Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2 \times 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 selection and screening. After being extracted and sequenced, genes were analyzed by bioinformatics. The complete sequence of new gene S2-29 was amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pGADT7, then translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro*.

RESULTS: Twenty-six colonies were obtained, among them two colonies were new genes with unknown function and no homeobox genes were found in Genbank by blast. The complete sequence of new gene S2-29 could be amplified from the mRNA of HepG2 cell and the interaction between HBV Pre-S2 antigen and S2-29 was further confirmed by coimmunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Genes of HBV Pre-S2 interacting proteins were successfully screened. A novel gene S2-29 was cloned and could express in HepG2 cell. The HBV Pre-S2 antigen could interact with S2-29, which brings new clues for studying the biological functions of HBV Pre-S2 and the pathogenesis of HBV infection.

Lu YY, Cheng TY, Cheng J, Liang YD, Wang L, Liu Y, Li K, Zhang J, Shao Q, Zhang LX. Screening and identification of a novel gene coding for hepatitis B virus pre-S2 antigen interacting protein S2-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1114-1117

摘要

目的: 筛选人肝细胞中与乙型肝炎病毒 (HBV) 前-S2蛋白 (Pre-S2) 相互作用的蛋白, 探寻 HBV 致病机制。

方法: 用多聚酶链反应 (PCR) 技术扩增 HBV 前-S2 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 文库质粒的酵母细胞 Y187 进行配合, 用营养缺陷型培养基及蓝白斑双重筛选阳性菌落, 提取酵母质粒转化大肠杆菌并测序, 进行生物信息学分析。逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 方法从 HepG2 细胞的 mRNA 中扩增出完整的新基因 S2-29, 连入另一酵母表达载体 pGADT7, 并用免疫共沉淀方法再次证实二者间的相互作用。

结果: 成功克隆出 HBV 前-S2 基因并在酵母细胞中表达, 配合后筛选出既能在四缺 (SD/-Trp-Leu-His-Ade) 培养基又能在铺有 X- α -半乳糖 (X- α -gal) 的四缺培养基上生长并变成蓝色的真阳性菌落 26 个, 其中有 1 个未知基因 S2-29, 该基因能在 HepG2 细胞中表达, 免疫共沉淀方法证实二者在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出与乙型肝炎病毒前-S2蛋白相结合的新基因, 为进一步研究HBV前-S2的作用提供了新线索.

陆荫英, 陈天艳, 成军, 梁耀东, 王琳, 刘妍, 李克, 张健, 邵清, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2蛋白结合蛋白基因S2-29的克隆化研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1114-1117

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1114.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)的前-S2(Pre-S2)蛋白是HBV外膜蛋白的组成部分之一, 因有多聚人血清白蛋白(PHSA)结合位点而与HBV的嗜肝性及入侵肝细胞有关^[1-3]; 前-S2蛋白上存在B淋巴细胞识别位点, 有较强的免疫原性, 可诱导中和抗体的产生, 在HBV疫苗的研究和应用方面深受重视^[4-10]; 近年来还发现HBV前-S2区域是HBV截短型中蛋白的反式激活功能的重要功能域, 与肝脏肿瘤发生密切相关^[11,12], 使前-S2蛋白的功能变得更加复杂, 明确其具体的作用机制并进行相应的阻断对于HBV感染的防治有着重要的意义; 我们用酵母双杂交技术筛选其结合蛋白基因, 找到肝细胞能与前-S2蛋白结合的新基因S2-29, 为研究前-S2蛋白的生物学功提供新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂 AH109酵母菌株(MA Ta, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4^Δ, gal80^Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2URA3::MEL1_{TATA}-lacZ 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-α-gal 购于Clontech公司. 大肠杆菌DH5α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、BamHI和PstI 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. HBV多聚酶(PCR)链技术扩增Pre-S2基因片段所用引物(P1 5'-GGATCCATGCAGTGAATTCCACAACCTTCC-3', P2 5'-CTGCAGGTTTCAGCGC AGGGTCCCCAATCCTC-3'), 根据表达载体外源基因插入位点设计肝cDNA文库插入序列扩增引物(P3 5'-CTATTC GATGATGAAGATACC CCACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACCTGCGGGG TTTT TCAGTATCTACG A-3'), 未知基因S2-29扩增引物(p5 5'-GAATTCATGGGGGCCACTGAGGTTGGGG ATG-3', p6 5'-GGATCCTCACCCCCCTCTTCTTC TGATGTGG -3')合成及DNA测序在上海博亚公司进行.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR从HBV ayw亚型基因全序列质粒载体pCP10中扩增HBV前-S2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HBV前-S2基因在酵母中的表达.

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 pGBKT7载体中有色氨酸(Trp)基因, 转化成功的酵母菌株能在缺乏Trp的SD平板上生长, 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBV前-S2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振荡过夜, 次日离心后用2×YPDA培养液5 mL重悬细胞, 计数细胞数大于1×10¹²·L⁻¹时与1 mL的肝文库酵母细胞(含有亮氨酸Leu基因)在50 MI 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 μl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-α-gal的4缺培养基上检查X-α-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扩增出目的片段后测序并进行生物信息学分析.

1.2.3 未知基因完整序列的克隆及测序 根据Genbank的序列信息设计引物p5、p6, 以HepG2细胞的mRNA为模板, 逆转录RT-PCR扩增S2-29基因的全序列, EcoRI、BamHI双酶切克隆入酵母表达载体pGADT7, 鉴定后送DNA测序.

1.2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 TNT网织红细胞裂解物体外翻译HBV Pre-S2 Ag和S2-29蛋白(在此过程中掺入³⁵S), 二者各取5 μL在1.5 mL的微离心管中冰上混合, 30℃孵育1 h, 加入470 μL免疫共沉淀缓冲液、10 μL蛋白-G琼脂糖珠、10 μL c-myc单克隆抗体、4℃孵育2 h. 14 000 r·min⁻¹离心1-2 min, 弃上清. 加入TBST 0.5 mL洗3次, 加15 μL SDS上样缓冲液, 80℃加热变性5 min, 瞬时离心后将上清10 μL上样到SDS-PAGE胶上电泳, 清洗固定凝胶后, 恒定60℃真空干燥40 min, -20℃条件下放射自显影.

2 结果

2.1 pGBKT7-HBV Pre-S2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HBV前-S2蛋白基因片段, PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约165 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BamHI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. 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, 挑取阳性菌落培养并提酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析. 结果显示转化了 pGBKT7- HBV 前-S2 的酵母蛋白提取物 Western 印迹分析可见明显目的条带(约 24 Kd, 其中 c-myc 1.3 kd, DNA 结合域 17 kD, Pre-S2 蛋白约 6 kD), 且无杂带, 说明 HBV 前-S2 蛋白基因已成功地在酵母中表达(图 1).



1: (pGBKT7-HBV PreS2)酵母蛋白提取物; 2: 蛋白 Marker
图 1 Western 免疫印迹图.

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四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基生长又能分解 X- α -gal 变成蓝色的真阳性菌落 26 个, PCR 扩增出目的片段后, 测序结果在 GenBank 中进行分析, 发现其中有未知基因 2 个.

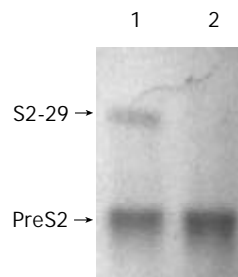
2.3 未知基因完整序列的克隆及测序 RT-PCR 方法成功克隆出 S2-29# 新基因的完整序列(图 2), 大小为 342 bp, Genebank 注册号 AF 497566, 并连接入 pGADT7 载体中.

```

      M G A T E V G D E N A G T V S
1  ATG GGG GCC ACT GAG GTT GGG GAT GAA AAT GCC GGT ACC GTC AGT
      A Q P C S R Q C C L E D F W A
46  GCA CAG CCC TGT TCC AGA CAG TGC TGC CTG GAA GAT TTC TGG GCT
      L L R R H P A P E P P P W T P
91  CTC CTG AGG CGC CAC CCC GCA CCT GAG CCA CCT CCT TGG ACT CCT
      V L Y P L R T S L P S T L A V
136  GTC CTC TAC CCC TTG AGG ACC TCC CTC CCT TCT ACC CTA GCT GTC
      F L N L G L S F P K A S I T S
181  TTC TTG AAC TTG GGA CTC TCC TTT CCC AAG GCT TCC ATC ACT AGC
      S W R D W T L H L P F A W S L
226  TCC TGG AGG GAC TGG ACT TTG CAT CTT CCC TTC GCG TGG AGC CTC
      S V R G P S Q C V H V R G G G
271  AGT GTG AGA GGC CCT AGC CAA TGC GTG CAT GTC AGA GGT GGT GGG
      D H I R R R G G *
316  GAC CAC ATC AGA AGA AGA GGG GGG TGA
  
```

图 2 Pre-S2-29 新基因序列(GenBank 号: AF 497566).

2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 HBV Pre-S2 蛋白(M_r 6 000), 新基因编码蛋白的相对分子质量为(M_r 12 500), 经体外翻译相互作用 SDS 电泳后, 放射自显影图上可看出(图 3), 1 泳道两条带的大小正确, 对照 2 泳道仅有 HBV Pre-S2 蛋白的一条带, 进一步证实二者在体外也能相互结合.



1: HBV PreS2+S2-29; 2: HBV PreS2
图 3 免疫共沉淀图.

3 讨论

HBV 前-S2 蛋白作为 HBV 包膜蛋白的组成之一, 功能复杂, 不仅能与 PHSA 结合介导肝细胞的黏附及入侵, 在其肽段内还包含有 I、II 类 MHC 限制性和 T 细胞受体(TCR)的不同功能位点和特异性 T、B 淋巴细胞结合位点, 能引起中和抗体和保护性免疫的发生, 可用于构建新型的乙型肝炎疫苗^[13-18]. 近年来还有报道前-S2 蛋白 N 末端 I 区的存在对于截短型中蛋白(MHBs¹)的反式激活作用是必不可少的, MHBs¹通过启动不同的细胞内信号系统分别来激活转录因子 Ap-2、NF κ B、血清应答元件(SRE)以及转录因子 Sp1, 从而完成其反式激活功能, 提示前-S2 蛋白可能参与 HBV 慢性化及 HCC 的发生过程. 弄清 HBV 前-S2 蛋白在肝细胞中到底与那些蛋白质因子相互作用、如何作用, 对于研究 HBV 在自然感染中的具体过程和机制是非常关键的.

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, 他通过将两个推定有相互作用的蛋白 X 和 Y 分别融合到一酵母转录激活因子的 DNA 结合域(BD)和转录激活域(AD)上, X 与 Y 的相互作用使 BD 和 AD 重新结合在一起, 重构了激活因子的完整结构功能, 导致下游报告基因的转录、表达^[19-23]. 基于该原理, 我们在真核表达载体 pGBKT7 中构建 pGBKT7-HBV 前-S2 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HBV 前-S2 基因, 与人肝 cDNA 文库的酵母菌株 Y187 进行配合, 寻找与前-S2 蛋白相互作用的蛋白, 经过营养缺陷和蓝白斑双重选择^[24-30], 筛选出与 HBV Pre-S2 蛋白有相互作用的未知功能的新基因 S2-29#, 将其在 Genebank 中进行比较未找到与之同源的基因序列, 用自行设计的引物能从肝癌细胞系 HepG2 细胞的 mRNA 中逆转录出该基因的完整序列, 说明该基因在之前从未被报道过, 是一个全新的基因序列, 并能在肝癌细胞系 HepG2 中表达. 为进一步确证, 我们又用体外免疫共沉淀的方法再次证实二者在体外也有相互作用^[31,32], 由此得出结论 HBV 前-S2 蛋白能与肝细胞中的未知基因 S2-29 表达产物结合, 并可能在 HBV 感染肝细胞的过程中起着一定作用.

以上结果为前-S2 蛋白的功能研究提供了新的有价值的线索, 对 HBV 致病机制的探讨也提出了全新的主

题, 但我们还需要进一步探明其间相互作用的具体机制、作用结果及其对HBV前-S2蛋白生物学功能的影响, 为寻找阻断HBV感染及原发性肝癌(HCC)发生的有效方法开辟新道路。

4 参考文献

- Kondo J, Shimomura H, Fujioka S, Iwasaki Y, Takagi S, Ohnishi Y, Tsuji H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Mutations in the hepatitis B virus Pre-S2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med Okayama* 2002;56:193-198
- Deng H, Cheng J, Shi S, Hong Y, Ren X, Li L. A preliminary study on the heterogeneity of Pre-S2 region in hepatitis B virus. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:233-236
- Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *J Gen Virol* 2000;81:369-378
- Park JH, Cho EW, Lee YJ, Shin SY, Kim KL. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins. *Microbiol Immunol* 2000;44:703-710
- Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann KH, Kaluza G, Pumpens P, Gerlich WH. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. *J Gen Virol* 2000;81:369-378
- Soussan P, Pol S, Garreau F, Brechot C, Kremsdorf D. Vaccination of chronic hepatitis B virus carriers with Pre-S2/S envelope protein is not associated with the emergence of envelope escape mutants. *J Gen Virol* 2001;82:367-371
- Eyigun CP, Yilmaz S, Gul C, Sengul A, Hacibektasoglu A, Van Thiel DH. A comparative trial of two surface subunit recombinant hepatitis B vaccines vs a surface and PreS subunit vaccine for immunization of healthy adults. *J Viral Hepat* 1998;5:265-269
- Jilg W. Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1998;16:65-68
- Madalinski K, Sylvan SP, Hellstrom U, Mikolajewicz J, Zembrzuska-Sadkowska E, Piontek E. Antibody responses to preS components after immunization of children with low doses of BioHepB. *Vaccine* 2001;20:92-97
- Shi X, Liu Q, Wang Z, Zhang D. Cloning and sequence analysis of light chain gene of human antibody against HBV pre-S2. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:30-33
- Hildt E, Hofschneider PH. The Pre-S2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998;154:315-329
- Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The Pre-S2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J, Brecho C. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;34:917-921
- Pol S, Couillin I, Michel ML, Driss F, Nalpas B, Carnot F, Berthelot P, Brechot C. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti HBV vaccine. *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61:228-233
- Hui J, Li G, Kong Y, Wang Y. Expression and characterization of chimeric hepatitis B surface antigen particles carrying preS epitopes. *J Biotechnol* 1999;72:49-59
- Cho EW, Park JH, Yoo OJ, Kim KL. Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus. *J Cell Sci* 2001;114:1115-1123
- Yamada T, Iwabuki H, Kanno T. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. *Vaccine* 2001;19:3154-3163
- Kuttner G, Kramer A, Schmidtke G. Nucleotide, protein characterization of neutralizing anti-pre-S1 and anti-pre-S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments. *Mol Immunol* 1999;36:669-683
- 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
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- 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
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
- 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, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y. Screening and cloning of the genes of protein interacting with human augments 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 protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1379-1383
- Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY. Cloning and expression of recombinant augments of liver regeneration in yeast. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:384
- Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Li L, Liu Y, Duan HJ. Expression of NS2 gene of hepatitis C virus from yeast two hybrid 'bait' vector in yeast. *Shijie 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. Mutual 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
- Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351
- Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 1999;73:7231-7240



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

