

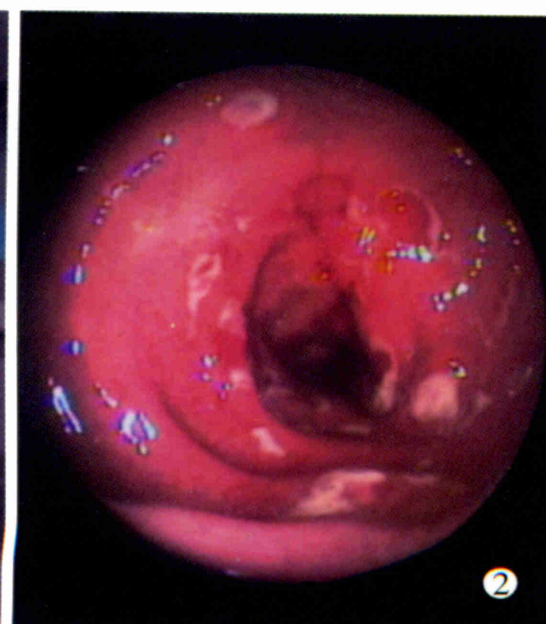
世界华人消化杂志®

**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

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

陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 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 hepatitis B virus e antigen binding protein E-19 in hepatocytes by yeast two-hybrid technique

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

Yin-Ying Lu, Qing Shao, Jun Cheng, Tian-Yan Cheng, Lin Wang, Yao-Dong Liang, Yan Liu, Jian Zhang, Ke Li, 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, 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 hepatitis B precore Ag (HBeAg) is a secreted nonparticulate version of the viral nucleocapsid hepatitis B core Ag (HBcAg), and its function is unknown. Some researchers have proposed that the HBeAg may have an immunoregulatory function in promoting viral persistence and is associated with immunologic tolerance. To investigate biological functions of hepatitis B virus e protein (HBeAg), yeast two-hybrid technique was employed to seek proteins in hepatocytes interacting with HBeAg.

METHODS: HBeAg bait plasmid was constructed by ligating HBeAg gene with yeast expression vector pGBKT7, then transformed into yeast AH109 (a type). The transformed yeast cells were amplified and mated with yeast cells Y187 (α type) containing liver cDNA library plasmid pCAT2 in 2 \times YPDA medium. Diploid yeast cells were 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 twice. Plasmid of true positive blue

colonies were extracted and analysed by DNA sequencing and blast in Genbank. After the complete sequence of new gene E-19 was amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR and cloned into pGADT7 vector, the recombinant plasmid was translated by using reticulocyte lysate and analysed by immunoprecipitation technique *in vitro* together with HBeAg.

RESULTS: Twenty genes in thirty nine positive colonies were obtained, there were five new genes. The complete sequence of new gene E-19 was successfully amplified from the mRNA of HepG2 cell by RT-PCR. The interaction between HBeAg and expression products of new gene E-19 was further confirmed by immunoprecipitation technique.

CONCLUSION: Genes of HBeAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned and HBeAg could bind with the protein expressed by new gene E-19.

Lu YY, Shao Q, Cheng J, Cheng TY, Wang L, Liang YD, Liu Y, Zhang J, Li K, Zhang LX. Screening and identification of a novel hepatitis B virus e antigen binding protein E-19 in hepatocytes by yeast two-hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(8):1118-1121

摘要

目的: 乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)对HBV的感染和复制都不是必须的, 普遍认为其与HBV引起免疫耐受、免疫系统功能障碍有关。筛选并克隆人肝细胞cDNA文库中与HBeAg相互作用蛋白的基因, 明确其具体作用机制。

方法: 应用酵母双杂交系统3, 将多聚酶链反应(PCR)法扩增的HBeAg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- α -半乳糖(X- α -gal)上进行双重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的质粒转化大肠杆菌氨苄青霉素-LB平板上选择并测序, 结果在GenBank中进行生物信息学分析。并根据GenBank中的序列信息设计引物从并克隆到另一酵母表达载体pGADT7中, 体外免疫共沉淀方法再次验证二者之间的结合作用。

结果: 成功克隆出HBeAg基因并在酵母细胞中表达, 与肝文库配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-His-Ade)培养基又能使X- α -gal变成蓝色的真阳性菌落39个, 其中有5个未知基因, 在genbank中未找到同源序列, 在HepG2细胞的mRNA中成功扩增出该基因的全序,

体外免疫共沉淀方法证明HBeAg与新基因E-19表达的蛋白质在体外也有结合作用。

结论: 成功克隆出 HBeAg 的肝细胞结合蛋白, 发现与 HBeAg 有相互作用的未知蛋白新基因, 为 HBeAg 的功能研究提出新线索。

陆荫英, 邵清, 成军, 陈天艳, 王琳, 梁耀东, 刘妍, 张健, 李克, 张玲霞. 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. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1118-1121

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1118.asp

0 引言

乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)是核壳蛋白的分泌型, 研究发现HBeAg对乙型肝炎病毒(HBV)的感染和复制无重要作用, 有学者提出他可能具有免疫调节的作用而导致HBV感染的持续^[1-3]. HBeAg可阻断细胞毒性T淋巴细胞优先清除对HBcAg特异的Th1细胞及Th1细胞介导的抗-HBc抗体反应, 使免疫应答转换为Th2细胞亚型, 使HBV逃避免疫清除, 感染慢性化^[4-7]. 但HBeAg与肝细胞之间的相互作用的机制尚不清楚, 此方面的研究较少, 从寻找HBeAg与肝细胞间的相互作用蛋白入手, 可望在研究HBeAg的确切生物学功能方面有所发现^[8-10].

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^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、pGADT7-AD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, 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、RT-PCR试剂盒购于Promega公司. TEMED购于宝林曼公司. 醋酸锂、半硫酸腺苷购于Sigma公司. HepG2细胞购于中科院上海细胞生物研究所. HBeAg扩增引物(P1 5'-GAATTCATGCAACTTTTTCACCTCTG-3', p2 5'-CTGCAGGCCCAAAGCCACCCAAGGC-3', 新基因E-19扩增引物(P3 5'-GAATTCATGTCATGGACACCCACCTC-3', P4 5'-GGATCCAGAAAGAAACA GGG TGAGGG-3')的合成及DNA测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒的构建及表达 PCR扩增HBeAg基因与

pGBKT7载体连接, 酶切鉴定后醋酸锂法转化入酵母菌株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HBeAg在酵母中的表达.

1.2.2 诱饵与肝文库的酵母配合 挑取在SD/-Trp培养基上生长的pGBKT7-HBeAg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 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的菌落再次划线于铺有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. 提取阳性酵母细胞中的质粒, 电穿孔法转化大肠杆菌, 氨苄青霉素平板筛选阳性克隆并测序.

1.2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组 根据Genbank的序列信息设计引物p3、p4, 以HepG2细胞的mRNA为模板, 逆转录RT-PCR扩增E-19基因的全序列, 送DNA测序鉴定后EcoR I、BamH I双酶切克隆入酵母表达载体pGADT7.

1.2.4 体外免疫共沉淀 TNT网织红细胞裂解物体外翻译HBeAg和E-19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 G蛋白-琼脂糖珠、10 μL c-myc单克隆抗体、4℃孵育2 h. 14000 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-HBeAg重组诱饵质粒的构建及表达 成功扩增出HBeAg基因片段, 连接到pGBKT7载体中酶切鉴定结果正确. 诱饵质粒转化酵母AH109株, 提酵母蛋白质进行SDS-PAGE和Western免疫印迹分析结果显示, 对照无表达, 而转化了pGBKT7-HBeAg的酵母蛋白提取物Western印迹分析可见明显目的条带(图1).



图1 pGBKT7-HBeAg酵母表达Western免疫印迹分析.

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在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)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39个,其中有5个未知基因,在GenBank中未找到同源序列。

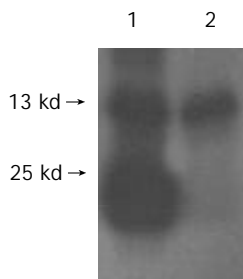
2.3 新基因全序及表达载体的克隆及重组结果 RT-PCR方法成功克隆出E-19新基因的完整序列(图2),大小为351 bp, Genbank 注册号AF529373,并接入pGADT7载体。

```

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

图2 E-19新基因序列(Genbank号AF529373)。

2.4 体外免疫共沉淀再次证实结合作用 HBeAg的M_r25 000,新基因E-19编码蛋白的M_r13 000,经体外翻译相互作用SDS电泳后,放射自显影图上可看出,1泳道两条带的大小正确,对照2泳道仅有HBeAg一条带,证实二者在体外也能相互结合(图3)。



1: HBeAg+E-19; 2: HBeAg
图3 免疫共沉淀结果。

3 讨论

近年来由于乙肝疫苗的广泛应用对HBV感染起到了一定的阻断作用,但全世界仍有超过3.5亿人处于HBV慢性感染状态,成为重要的传染源,其中有很大部分要转化为肝硬化、肝癌^[11-14]。在HBV感染的漫长过程中,大多数感染者由于HBeAg的阴转及抗HBe的出现

而伴随病毒复制明显减少;但少数HBeAg阴性的感染者体内病毒仍有持续或间断的高水平复制,并伴肝细胞坏死性炎症及进行性纤维化。既往的研究结果普遍认为HBeAg是一种免疫调节因子,可调节宿主的免疫应答,抑制宿主T细胞的细胞毒活性,形成对HBV感染的免疫耐受性^[15-17]。另一方面,由于HBeAg含有病毒高度保守的体液和细胞抗原靶位,与HBcAg有部分共同的序列,有相同的抗原靶位,当HBeAg发生突变时,失去血清中HBeAg的调节,表达HBcAg的肝细胞经受增强的T细胞的细胞毒作用,可导致病情加重^[18-22]。血中抗HBe长期阳性的患者,发生肝硬化、肝癌的几率较高,原因不清,这些发现使得HBeAg的生物学功能变得更复杂。寻找肝细胞中HBeAg的相互作用蛋白,并进一步阐明其机制,对于明确上述问题有着重要意义。

在本项研究中所使用的酵母双杂交系统3,在原有系统的基础上增加了报告基因的数量,分别与BD和AD结合的HBeAg和肝文库中的蛋白要确实有相互作用,才能同时激活下游的3个报告基因,表达3种编码产物,加上2个载体上各自带有的氨基酸报告基因,筛出的真阳性菌落才能在缺乏4种氨基酸的培养基上生长,并能分解x- α -gal显现蓝色。另外,该系统利用a型和 α 型酵母配合形成的二倍体细胞内,诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用的原理,免去了需要共转染2种质粒所带来的低效率问题,并将真阳性率提高到95%,大大增强了结果的可靠性^[23,24]。

我们应用此技术构建了pGBKT7-HBeAg诱饵表达质粒,在预转化的人肝cDNA文库中“钓”出与HBeAg有相互作用的蛋白基因20种,其中3种为未知基因,在genbank中未发现与之同源的表达基因序列^[25-31]。根据genbank的信息,我们自行设计了新基因E-19的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列,说明该基因能在HepG2细胞中表达。将其连入另一酵母表达载体pGADT7,与pGBKT7-HBeAg一起分别在TNT网织红细胞系统翻译,掺入同位素,免疫共沉淀方法分析,结果显示新基因E-19的表达产物在体外能与HBeAg结合,聚丙烯酰胺凝胶电泳可见二者配合后的两条带,对应的分子量大小正确。HBeAg的肝细胞结合蛋白新基因E-19的发现及证实,提示我们对HBeAg生物学功能、HBV致病机制的认识存在很大的局限性,目前的研究着眼点可能遗漏了很多重要的方面,或许有更关键的因素没有被发现,而使研究工作误入歧途;新基因的发现同时也为今后的科研工作指明了新的方向。

4 参考文献

- 1 Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998;160:2013-2021
- 2 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol*

- Hepatology* 1997;12:218-222
- 3 Ou JH. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:178-187
 - 4 Wan K, Tang S, Gong H. Relationship between T cell subgroups and HBV markers in the patients with chronic hepatitis B. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 1999;24:590
 - 5 Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 2002;168:4951-4959
 - 6 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Modeling the T-helper cell response in acute and chronic hepatitis B virus infection using T-cell receptor transgenic mice. *Antiviral Res* 2001;52:99-111
 - 7 Barth H, Klein R, Berg PA, Wiedenmann B, Hopf U, Berg T. Induction of T helper cell type 1 response and elimination of HBeAg during treatment with IL-12 in a patient with therapy-refractory chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2001;48:553-555
 - 8 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
 - 9 Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
 - 10 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
 - 11 Ohkubo K, Kato Y, Ichikawa T, Kajiyama Y, Takeda Y, Higashi S, Hamasaki K, Nakao K, Nakata K, Eguchi K. Viral load is a significant prognostic factor for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:2663-2668
 - 12 Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:128-135
 - 13 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486
 - 14 Marx G, Martin SR, Chicoine JF, Alvarez F. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins. *J Infect Dis* 2002;186:295-301
 - 15 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
 - 16 Lau GK, Nanji A, Hou J, Fong DY, Au WS, Yuen ST, Lin M, Kung HF, Lam SK. Thymosin- α 1 and famciclovir combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepat* 2002;9:280-287
 - 17 Merkle H, Deutschle T, Gastrock-Balitsch I, Nusser P, Knehr S, Reifenberg K. H-2(d) mice born to and reared by HBeAg-transgenic mothers do not develop T cell tolerance toward the hepatitis B virus core gene products. *Virology* 2000;273:149-159
 - 18 Chen M, Sallberg M, Thung SN, Hughes J, Jones J, Milich DR. Nondeletional T-cell receptor transgenic mice: model for the CD4(+) T-cell repertoire in chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000;74:7587-7599
 - 19 Jiang R, Lu Q, Hou J. Polarized populations of T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2000;80:741-744
 - 20 Milich DR. Do T cells "see" the hepatitis B core and e antigens differently? *Gastroenterology* 1999;116:765-768
 - 21 Diepolder HM, Ries G, Jung MC, Schlicht HJ, Gerlach JT, Gruner N, Caselmann WH, Pape GR. Differential antigen-processing pathways of the hepatitis B virus e and core proteins. *Gastroenterology* 1999;116:650-657
 - 22 Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2001;8:311-321
 - 23 Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
 - 24 Zhen Z. Progress in proteomics. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2001;17:491-493
 - 25 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
 - 26 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y. Cloning and expression of pre-s1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Jiefangjun Yixue Zazhi* 2002;27:341-342
 - 27 Lu YY, Li K, Liu Y, Wang L, Cheng J, Zhang LX. Cloning and expression of PreS2 gene of hepatitis B virus in yeast. *Weichangbingxue He Ganbingxue Zazhi* 2002;11:222-224
 - 28 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
 - 29 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
 - 30 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
 - 31 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



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

