

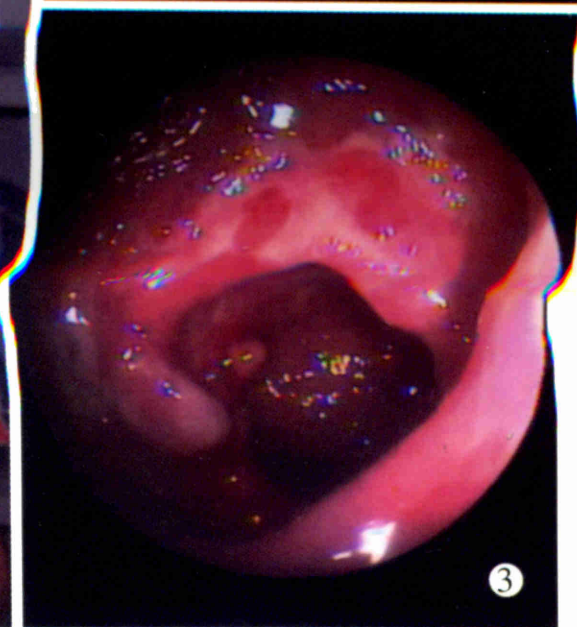
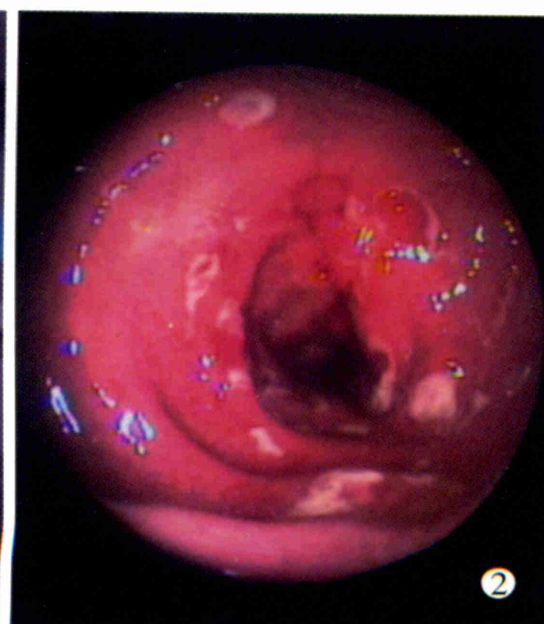
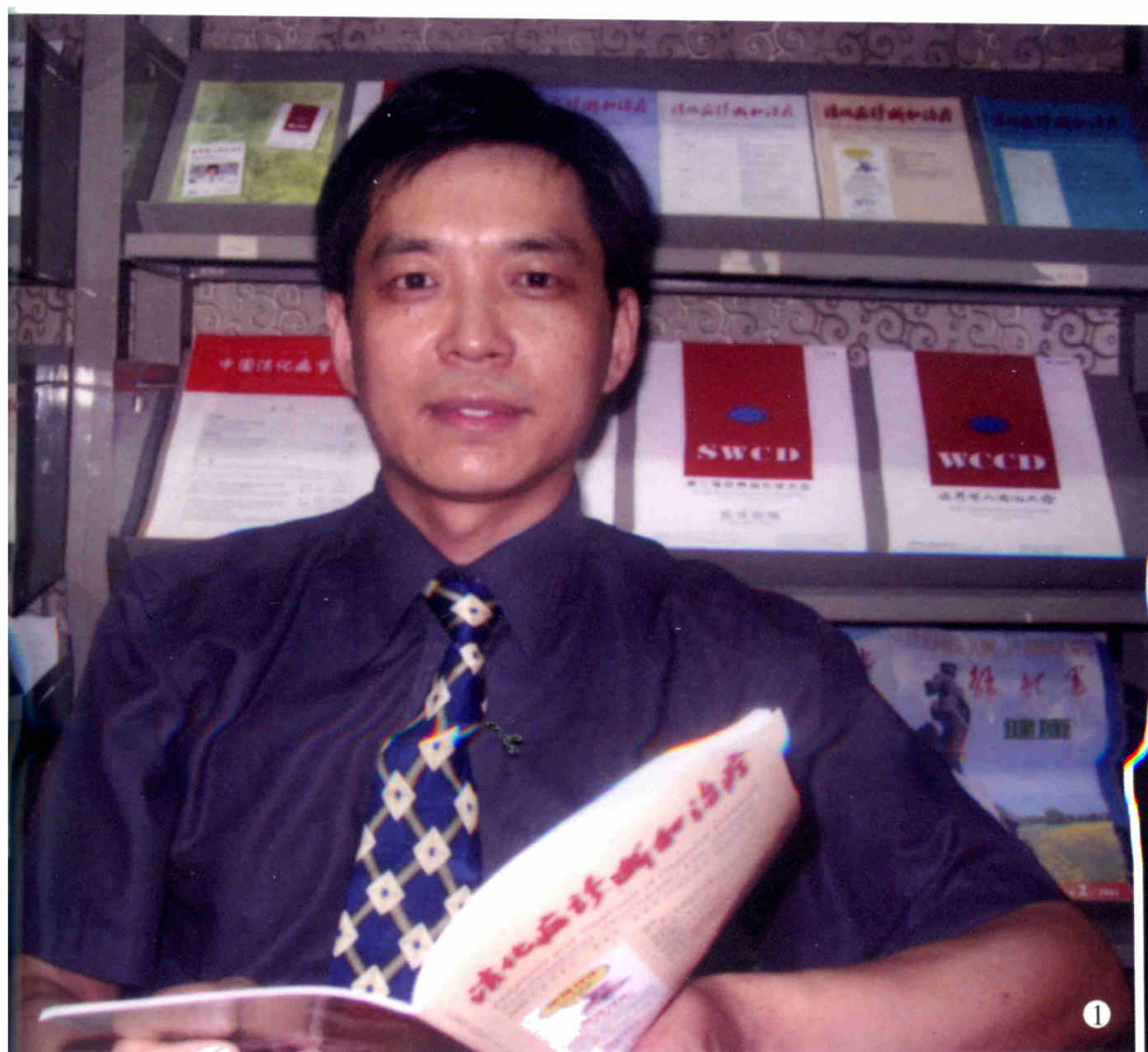
世界华人消化杂志®

**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

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

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元

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

陆荫英, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 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 gene coding for Hepatitis B virus core antigen interacting protein C-12 in hepatocytes

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

Yin-Ying Lu, Tian-Yan Chen, Jun Cheng, Qing Shao, Yao-Dong Liang, Lin Wang, 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: Hepatitis B virus (HBV) core protein (HBcAg) is present in the nucleus and cytoplasm of infected hepatocytes. Phosphorylation of HBcAg was a prerequisite for pregenomic RNA encapsidation into viral capsids. HBcAg capsids are extremely immunogenic and can activate naive B cells by cross-linking their surface receptors and HBcAg-specific CD4(+) T-cell responses are believed to play an important role in the control of human HBV infection. To investigate the complex biological functions of HBcAg, we employed yeast-two hybrid technique to screen proteins in hepatocytes interacting with HBcAg.

METHODS: HBcAg gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The pGBKT7-HBcAg bait plasmid was constructed by using yeast-two hybrid system 3 and transformed into yeast cells AH109, then mated with yeast cells Y187 containing liver cDNA library plasmid in 2xYPDA 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 two times. After extracting and sequencing of plasmid from blue colonies, we conducted bioinformatics analysis. Primers of new gene were designed according to the information in Genbank and used to amplify the complete sequence of new gene C-12#. Gene of C-12# was ligated into another yeast expression vector pGADT7 and transformed into yeast cell Y187 and mated with yeast cell AH109 containing pGBKT7-HBcAg bait plasmid to further verify the interaction between HBcAg and the novel protein coded by the new gene C-12.

RESULTS: Sixteen colonies were sequenced. Among them, there were four new genes with unknown function. The complete sequence of new gene C-12 was successfully amplified from the mRNA of HepG2 cell by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The interaction between HBcAg and the novel protein coded by the new gene C-12 was further confirmed by re-mating.

CONCLUSION: Genes of HBcAg interacting proteins in hepatocytes were successfully cloned. The findings of new genes coding for HBcAg associated proteins pave the way for studying the biological functions of HBcAg.

Lu YY, Chen TY, Cheng J, Shao Q, Liang YD, Wang L, Liu Y, Zhang J, Li K, Zhang LX. Screening and identification of a novel gene coding for Hepatitis B virus core antigen interacting protein C-12 in hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(8):1122-1125

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细胞核和胞质中,对于病毒前基因组 RNA 装配入核壳体是必须的,HBcAg 还是 HBV 介导体液免疫反应和 CD4⁺T 细胞免疫反应的重要抗原,寻找人肝细胞cDNA文库中与HBcAg相互作用蛋白的基因,是研究HBcAg生物学功能的重要途径。

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- α -半乳糖(X- α -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。根据 Genbank 的信息设计新基因的引物,从 HepG2 细胞的 mRNA 中逆转录 PCR 扩增出 C-12# 新基因的完整序列,连入另一酵母表达载体 pGADT7,并转化进酵母细胞 Y187,再次与转化了诱饵质粒的酵母细胞 AH109 配合(回交),以进一步证实 HBcAg 与 C-12# 新基因编码蛋白的结合作用。

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-His-Ade)培养基又能在铺有X- α -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, 其中未知基因4个. 用自行设计的引物成功地从HepG2细胞的mRNA中扩增出C-12#新基因的完整序列, 回交实验再次证实二者之间的结合作用。

结论: 成功克隆出HBcAg的肝细胞结合蛋白, 发现未知功能基因, 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, 陈天艳, 成军, 邵清, 梁耀东, 王琳, 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核心蛋白结合蛋白新基因C-12的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1122-1125

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1122.asp>

0 引言

在HBV感染的肝细胞中, HBcAg同时存在于胞核和胞质内, 具有保护病毒mRNA, 防止其被RNA酶降解的作用; HBcAg与病毒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], 其磷酸化作用对于乙肝病毒前基因组RNA的装配入核壳体、基因组DNA的合成必不可少^[3-5]. 在介导免疫应答方面, HBcAg特异性CD4⁺T细胞免疫应答是清除HBV的重要反应^[6-8]; 另外, 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^[9]. 利用酵母双杂交技术寻找HBcAg与肝细胞中相互作用的蛋白, 对于明确HBV致病机制, 有效防治乙型肝炎有着重要意义^[10-16].

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DH5 α 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、EcoRI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、Trizal RNA提取及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. HBcAg扩增引物(P1 5'-GAATTCATGGACATCGACCCTTATAA-3', P2 5'-CTGCAGAACATTGAGATTCCC GAGAT-3', 肝文库插入序列扩增引物(P3 5'-CTATT CGATGATGAAGATACCCC ACCAAACCC-3', P4 5'-GTGAACTTGCGGGGTTT TTCAGTATCTACGA-3'),

新基因扩增引物(P5 5'-GAATTCATGGACATCGACCCTTATAA-3', P6 5'-CT CAGAACATTGAGATTCC CGAGAT-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pGBKT7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 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. PCR扩增出文库靶基因片段后测序并进行生物信息学分析. (3) C-12新基因的克隆: Trizal RNA提取试剂盒提取HepG2细胞的RNA, 逆转录成cDNA, 以cDNA为模板, 以P5、P6为引物行PCR扩增出C-12新基因的完整序列, 酶切后并连接入另一酵母表达载体pGADT7中. (4) 回交实验: 将构建好的pGADT7-C12#新基因质粒转化入 α 型酵母细胞Y187, 接种在1缺亮氨酸的SD平板上, 筛选出的阳性菌落再次与转化了诱饵质粒的a型酵母细胞AH109配合, 4缺/SD培养基上筛选鉴定, 进一步验证HBcAg与C-12#新基因表达产物的结合作用。

2 结果

2.1 pGBKT7-HBcAg重组诱饵质粒的构建及表达 利用引物P1、P2成功扩增出HBcAg基因片段, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示片段为549 bp, 测序结果完全符合报告序列. 连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中, 经酶切鉴定结果正确. 醋酸锂法将诱饵质粒转化入酵母AH109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(图1), 说明HBcAg基因已成功地在酵母中表达.

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-Ade-His)培养基又能在铺有X- α -半乳糖(X- α -gal)的四缺培养基上均能生长并变成蓝色的真阳性菌落16个, 用文库扩增引物行PCR, 扩增出目的片段并测序, 结果在GenBank中进行分析,

找到未知基因4个。

2.3 新基因 C-12 全序列的克隆 用引物 P5, P6 成功地从 HepG2 细胞 cDNA 中扩增出 C-12# 新基因的全序列长 591 bp (图 2), 并连入载体 pGADT7 中 (图 3)。

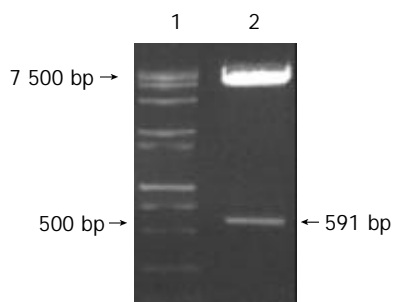


图 1 pGBKT7-HBcAg 酵母细胞表达 Western 免疫印迹分析。

```

      M I S E G G W G W Q G W G R S Q G
1  ATG ATA AGT GAA GGC GGA TGG GGA TGG CAG GGG TGG GGG CGA AGC CAA GGT
      L R P A P C S W V S R M V S P P A
52  CTG AGA CCT GCA CCC TGC AGC TGG GTC AGC AGG ATG GTA TCT CCA CCC GCG
      A I Q E T Q L H F L A D T L P S P
103  GCC ATC CAG GAA ACA CAG CTC CAT TTC CTT GCT GAC ACC CTC CCC TCC CCG
      L S I L L P P H K Q E E L S Q S Q
154  TTG TCC ATC CTG CTC CCT CCC CAC AAG CAA GAG GAG TTG TCC CAG AGT CAG
      L L I A D L L P A S D L G N F Q T
205  CTC CTC ATA GCT GAC CTC TTA CCA GCT TCG GAT CTA GGA AAC TTC CAG ACT
      S R E T Q S Y Q K A Q P T P I S F
256  TCT AGG GAG ACA CAG AGC TAC CAG AAA GCC CAA CCC ACC CCC ATC TCT TTC
      S P D H R K V S R D V I P G A A L
307  TCT CCA GAT CAT AGG AAA GTA TCA AGG GAT GTC ATT CCG GGA GCA GCC CTT
      G T A S S R C W Q M L C P S P S V
358  GGG ACA GCC AGC AGC AGG TGC TGG CAG ATG CTC TGT CCT TCA CCC TCT GTC
      P G T R W G R P Q W K L L N S V T
409  CCC GGC ACC AGA TGG GGA AGG CCA CAG TGG AAA CTT CTC AAT TCC GTC ACA
      G Q S S D T V I S Q F S L A M S F
460  GGG CAG AGC TCT GAC ACT GTT ATA AGT CAG TTC TCC CTG GCC ATG TCT TTT
      P N F P V P Q L R F L N T C S T D
511  CCT AAT TTT CCT GTC CCA CAA CTT AGG TTC CTT AAC ACT TGT TCT ACA GAT
      E T K K S S V N K *
562  GAA ACA AAA AAG TCC TCT GTT AAC AAG TAG
  
```

图 2 c-12# 新基因序列图 (HBcbp, Genbank number: AF 529371)。



1: DNA Marker; 2: pGADT7-C12 质粒
图 3 pGADT7-C12 质粒酶切图。

2.4 回交实验 pGADT7-C12# 重组质粒转化入酵母 Y187, 在缺亮氨酸的 SD 平板上长出阳性菌落, 再次与转化了诱饵质粒的酵母 AH109 配合, 配合后的二倍体酵母能在 4 缺/SD 平板上长出阳性菌落, 说明 HBcAg 和 C12# 编码的蛋白有结合作用。

3 讨论

近年来新发展起来的酵母双杂交系统是一种分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种分子生物学技术, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了有效的遗传学方法。分别融合到一酵母转录激活因子 GAL4 的 BD 和 AD 上的两种蛋白 X 和 Y 之间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, 间接证明 X 和 Y 两蛋白间有相互作用^[17,18]。

HBcAg 在感染肝细胞中可同时存在于胞核和胞质, 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, 他在肝内的分布与病毒的复制状态、炎症活动程度密切相关^[19]。HBcAg 有高免疫原性, 几乎所有 HBV 感染者均产生抗 HBc, HBcAg 通过 B 细胞表面受体轻重链的 FR1-CDR1 连接区域结合而激活 B 细胞产生抗体^[20], 同时还是 CTL 免疫应答的靶抗原, 针对 HBcAg 的细胞免疫应答在病毒清除中起重要作用^[21]。HBcAg 受细胞激酶或病毒编码的激酶作用部分磷酸化, 磷酸化是前基因组 RNA 包被入病毒核壳体过程中必不可少的环节; HBcAg 有鱼精蛋白样亲胞核性的羧基末端, 磷酸化后该末端的核定位序列暴露, HBcAg 与核孔复合体结合通过直接转运介导病毒基因组向核内转运, 而其他嗜肝 DNA 病毒的核壳体蛋白都不转运核内, 但到目前为止还没有发现宿主肝细胞中有与之有关的任何激酶^[22,23]。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^[24-28]。

本研究中所用的 Clontech 公司的酵母双杂交系统 3, 下游采用了 3 种报告基因, 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 %^[29-32]。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, 与转化了人肝 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 4 种为未知基因, 在 GenBank 中未发现同源序列。根据 GenBank 的信息, 我们设计了新基因 C-12 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, 说明该基因也能在 HepG2 细胞中表达。由于 C-12 新基因序列的大小与 HBcAg 相差仅几十个碱基, 体外免疫共沉淀后电泳很难将二者分开, 因此我们只有将其连入另一酵母表达载体 pGADT7, 转化入酵母菌株 Y187,

并再次与表达了 HBcAg 的 AH109 配合, 通过回交实验进一步证实 HBcAg 与 C-12# 新基因表达产物结合. 新基因的发现为我们研究 HBcAg 的功能提出了新线索, 对新基因功能的深入研究将对感染机制的了解及阻断提出新的思路, 对 HBV 感染的防治工作有着重要意义.

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 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 secretion. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, Ullrich A, Cotten M. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002;76:8124-8137
- Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA. Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *J Gen Virol* 1998;79:1665-1670
- Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998;72:3796-3803
- 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
- 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
- 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
- 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, 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Tsai SL. Immunopathogenesis of viral hepatitis B and C. *Changcheng Yixue Zazhi* 1999;22:159-170
- 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
- Usuda S, Okamoto H, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. An enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies for the determination of phosphorylated hepatitis B core protein (p21c) in serum. *J Virol Methods* 1998;72:95-103
- Fehr T, Skrstina 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
- 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
- Pumpens P, Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 2001;44:98-114
- 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
- Murray K, Shiao AL. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol Chem* 1999;380:277-283
- 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



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

