

HBsAg 结合蛋白 C-12 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析

陆荫英, 刘 妍, 成 军, 梁耀东, 陈天艳, 邵 清, 王 琳, 张玲霞

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 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, 贵州贵阳人, 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研究及临床工作。

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: 2003-06-25 接受日期: 2003-07-16

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with a novel gene C-12 coding for HBcAg binding protein

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

Yin-Ying Lu, Yan Liu, Jun Cheng, Yao-Dong Ling, Tian-Yan Chen, Qing Shao, Lin Wang, Ling-Xia Zhang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from National Natural Science Foundation of China, No. C030114020, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

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: 2003-06-25 Accepted: 2003-07-16

Abstract

AIM: To study the biological function of a novel hepatitis B virus core antigen binding protein C-12, and to analyze the gene expression profiles of HepG2 cell transfected with C-12 gene.

METHODS: C-12 gene was screened and identified by using yeast two-hybrid system 3 technique. Full-length encoding frame C-12 and its amino acid sequences was identified using bioinformatics method and the recombined eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(-)-C-12 was constructed. cDNA microarray technology was employed to detect the mRNA from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-C-12 and pcDNA3.1(-), respectively.

RESULTS: According to yeast two-hybrid screening and the bioinformatics analysis results, C-12 cDNA sequence was identified. Among 1152 genes, there were 17 differences, of which 16 genes were upregulated and 1 gene were downregulated in HepG2 cells transfected with C-12 protein expression plasmid. These genes differentially regulated by C-12 protein included human genes encoding proteins

involved in cell signal transduction, cell proliferation and differentiation, and cell growth regulation.

CONCLUSION: Overexpression of C-12 affects the expression profile of HepG2 cells. The results prove some clues for further clarifying the molecular biology processes of hepatocytes during the interaction between HBV core protein and C-12.

Lu YY, Liu Y, Cheng J, Ling YD, Chen TY, Shao Q, Wang L, Zhang LX. Gene expression profile of HepG2 cell transfected with a novel gene C-12 coding for HBcAg binding protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):62-65

摘要

目的: 为研究未知功能的乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原(HBcAg)结合蛋白 C-12 的生物学功能, 我们应用基因芯片技术对于 C-12 转染的 HepG2 细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对细胞基因表达的影响。

方法: 应用酵母双杂交技术筛选并验证 HBcAg 的肝细胞结合蛋白基因。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从 HepG2 细胞中扩增 C-12 蛋白编码基因片段, 经测序鉴定后构建表达载体 pcDNA3.1(-)-C-12。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 与转染空白表达载体 pcDNA3.1(-) 的 HepG2 细胞进行 DNA 芯片分析并比较。

结果: 筛选出肝文库中 HBcAg 结合蛋白新基因 C-12, 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和 DNA 序列测定鉴定正确。提取转染细胞的总 mRNA 并逆转录成为 cDNA, 进行 DNA 芯片技术分析。在 1 159 个基因表达谱的筛选中, 发现有 16 个基因表达水平显著下调, 包括胰岛素受体、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂、SUMO-1 活化酶亚基 1、肿瘤易感基因 101、磷酸酰合成酶 2 (SPS2)、caspase 4 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 4、急性淋巴细胞性白血病易位子 T、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、DEAD box 蛋白多肽 21、前折叠素 5 (Prefoldin 5)、丝氨酸棕榈酰转移酶、G 蛋白通路抑制剂、肿瘤坏死因子受体相关蛋白、转化生长因子 β 1、ADP-核糖基转移酶及 1 个未知蛋白基因; 1 个未知功能蛋白编码基因的表达水平显著上调。

结论: C-12 基因的表达对于肝癌细胞基因表达谱有显著影响, 基因表达谱芯片技术是探索基因功能的有效技术途径, 实验结果为进一步阐明 C-12 与 HBcAg 结合后的肝

细胞生物学变化提供了有力的依据.

陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. HBsAg 结合蛋白 C-12 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004; 12(1):62-65
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/62.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白(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, 还参与介导机体的免疫反应, 在病毒致病过程中起着重要的作用^[1-6]. 肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用, 是病毒感染导致肝细胞损伤、肝纤维化和肝细胞癌发生、发展的重要原因, 研究 HBcAg 与肝细胞蛋白之间的相互作用, 有助于更好地理解 HBV 的致病作用. 我们采用酵母双杂交系统 3, 以 HBcAg 作为“诱饵”, 从肝细胞 cDNA 文库“钓”出一未知蛋白 C-12. 为进一步探索该基因的功能, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)筛选 C-12 表达质粒转染 HepG2 细胞后的差异表达基因, 并进行分析, 为全面了解 C-12 基因在肝细胞中的生物过程提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、EcoR I、BamH I 和 Pst I 等限制性内切酶购于 Takara 生物公司, pcDNA3.1(-) 真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega), 新基因 E-36 扩增引物(P3 5' - GAATTCATGCTCTATCCA GCCCTTCACCAG-3', P4 5' - GGATCCTCAGCAGC AGGCGGAAA CGCTCGTC-3')由合成及 DNA 测序由上海博亚公司承担.

1.2 方法

1.2.1 HBcAg 结合蛋白的酵母双杂交筛选 应用酵母双杂交技术筛选 HCV 核心蛋白结合的肝细胞蛋白的研究原理、方法、操作步骤以及 C-12 基因真核表达载体的构建等参考基因治疗研究中心相关的研究论文^[7-13].

1.2.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 在 35 mm 培养皿中常规培养肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 Lipofectamine PLUS 将 2 μg pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10⁶ 个细胞加入 1 mL Trizol RNA 提取试剂. 立即于液氮中保存. 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对

照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 °C 和 70 °C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化. 以 Qiagen 公司 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化得 Mrna(操作按说明书进行), 并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中. 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 μg/μL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), UV 交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC+2 g/L SDS、0.1 × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.8, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.7, 为绿色荧光, 显示表达减低.

2 结果

2.1 以 HBcAg 为“诱饵”对肝细胞文库酵母双杂交筛选及鉴定结果 以 HBcAg 为“诱饵”与肝细胞 cDNA 文库的杂交, 筛选出 HBcAg 结合蛋白新基因 C-12^[14-15], 并经回交实验再次证实.

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 提取 pcDNA 3.1(-)-C-12 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA, 测得吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀>1.90, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置了阴性对照(8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素(呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 152 个基因中筛选

出差异表达基因共 20 条, 其中 13 条基因表达增强, 7 条基因表达降低。

2.4 差异表达基因分析 在 1152 个基因中筛选出 17 个差异表达的基因, 除一个未知基因表达上调外, 其余 16 种基因的表达下调, 提示 C-12 的过表达对 HepG2 细胞中的这些蛋白表达有抑制作用。这些差异表达基因大多与细胞信号转导、细胞增生分化、肿瘤发生等生物过程密切相关, 如相关肿瘤发生相关基因如肿瘤易感基因 101、急性淋巴细胞性白血病易位子 T 等; 细胞生长调节及细胞信号转导相关基因, 如 G 蛋白通路抑制剂、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂、caspase 4、肿瘤坏死因子受体相关蛋白、转化生长因子、丝氨酸棕榈酰转移酶等及 DNA 复制及翻译相关基因如 DEAD box 蛋白多肽 21 等; 过氧化酶相关基因如 ADP-核糖基转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶 4、磷酸硒合成酶 2 等(表 1)。

表 1 C-12 影响表达减低的基因

GenBank 号(NM)	编码蛋白
000208	胰岛素受体
005500	SUMO-1 活化酶亚基 1
006292	肿瘤易感基因 101
012248	磷酸硒合成酶 2 (SPS2)
006217	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂
033306	caspase 4 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 4
L04731	急性淋巴细胞性白血病易位子 T
002085	谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)
004728	DEAD box 蛋白多肽 21
002624	Prefoldin 5
006415	丝氨酸棕榈酰转移酶
004127	G 蛋白通路抑制剂
016614	肿瘤坏死因子受体相关蛋白(TTRAP)
000660	转化生长因子(TGFβ1)
006437	ADP-核糖基转移酶
AK027136	未知蛋白

3 讨论

基因表达谱芯片技术是近年来新发展起来的一项研究差异基因表达的分子生物学前沿技术, 通过将大量的基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块固相载体上, 与待测样品杂交后用激光共聚焦荧光检测系统进行结果扫描、检测, 对来源不同的个体、组织、发育阶段、分化阶段、病变及刺激条件下的细胞内的 mRNA 或 cDNA 进行分析, 获得大量有价值的生命信息^[16-20]。该技术解决了传统核酸杂交技术操作复杂、检测目的基因少、低通量的缺点, 能一次进行大量的信息分析, 在各种的疾病诊断、基因突变分析、病原体检测、治疗药物筛选、疾病发生发展的分子生物学机制研究等方面具有广泛的应用价值。本研究应用基因表达谱芯片技术, 对肝细胞 cDNA 文库中未知功能的 HBcAg 结合蛋白新基

因 C-12 表达质粒 pcDNA3.1(-)-C-12 和空载体对照分别转染的 HepG2 细胞差异表达的 mRNA 进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找 C-12 反式调节的基因。在 1152 个基因中筛选出 17 个差异表达的基因, 其中 16 个是表达减低的基因, 与细胞信号转导、细胞增生分化、肿瘤发生及氧化还原有关。

在受 C-12 表达影响下调的基因中, SUMO-1 活化酶能催化 SUMO-1 (一种泛素的类似物) 结合并修饰 RanGAP1, PML, Sp200 及 I kappa B alpha 等转录因子^[21-23]。DEAD box 蛋白因含有保守的 Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) 序列, 是一种推定的 RNA 解旋酶, 与许多细胞过程有关如改变 RNA 二级结构包括转录起始、细胞核及线粒体的分裂、核糖体和剪接体的聚合等, 影响着诸如胚胎发育、精子发生、细胞生长、分化等活动。该蛋白可以使双链 RNA 解旋、使单链 RNA 折叠, 并在核糖体 RNA 的产生、RNA 编辑、RNA 转运以及普通转录过程中发挥重要作用^[24]。前折叠素(Prefoldin)是分子伴侣家族中的一员, 是伴侣蛋白(chaperonin)介导的蛋白质折叠过程中一个重要的中间物质, 他能捕获并转运胞质中未折叠的目的蛋白, 使其特异性地与伴侣蛋白结合, 介导蛋白质的正确折叠和成熟^[25-29]。

肿瘤易感基因(TSG101 tumor susceptibility gene)在纤维母细胞中的表达产物的失活可以引起细胞发生转化, 导致裸鼠发生转移性肿瘤。而人的 TSG101 基因位于 11 号染色体的 15.1-15.2 长臂上, 该区域被推断含有肿瘤抑制基因, 有研究证实发现乳腺癌组织中发现 TSG101 的等位基因有缺失突变, 而正常的乳腺组织中则没有^[30]。急性淋巴细胞性白血病基因(ALL-1)位于第 11 号染色体的 23 号长臂上, 在急性白血病时该基因出现中间缺失突变或与第 1、4、6、9、10、19 号染色体的相应区域发生交互转位, 且该基因的异常变化可以引起一些特殊的肿瘤融合蛋白的产生^[31]。抑制过氧化酶相关基因如 ADP-核糖基转移酶、谷胱甘肽过氧化物酶 4、磷酸硒合成酶 2 等, 可以干扰细胞的能量代谢, 引起细胞炎症坏死。C-12 新基因的表达可抑制以上基因的表达, 提示 C-12 蛋白可能参与细胞转录和蛋白合成、肿瘤发生及细胞的能量代谢等多方面的作用。

总之, 利用基因表达谱芯片对 C-12 蛋白差异调节基因的表达研究表明, 细胞内 C-12 蛋白的过表达引起的生物过程涉及许多不同基因表达的变化, 这些基因与细胞增生与分化、肿瘤发生、能量代谢及生物转化等生物过程密切相关, 结果为深入了解 C-12 基因的生物学功能及其与 HBV 相互作用过程中致病(癌)的分子生物学机制提供重要的线索。

4 参考文献

- 1 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
- 2 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. *J Virol* 2002;76:6510-6517
- 3 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
- 4 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
- 5 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
- 6 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
- 7 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
- 8 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒 X 基因酵母表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:15-18
- 9 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
- 10 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蛋白的基因. 世界华人消化杂志 2002;10:161-164
- 11 陆荫英, 李克, 刘妍, 王琳, 成军, 张玲霞. 乙型及丙型肝炎病毒受体的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:211-213
- 12 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 13 马守东, 洪源, 成军. 酵母单杂交技术的原理及应用. 世界华人消化杂志 2003;11:450-451
- 14 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;11:426-429
- 15 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 16 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11:461-463
- 17 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 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. 世界华人消化杂志 2003;11:394-398
- 18 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 19 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarray for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1517-1523
- 20 Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537
- 21 Okuma T, Honda R, Ichikawa G, Tsumagari N, Yasuda H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:693-698
- 22 Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 1999;274:10618-10624
- 23 Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 1999;448:185-189
- 24 Valdez BC, Henning D, Busch RK, Woods K, Flores-Rozas H, Hurwitz J, Perlaky L, Busch H. A nucleolar RNA helicase recognized by autoimmune antibodies from a patient with watermelon stomach disease. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1220-1224
- 25 Vainberg IE, Lewis SA, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein HL, Cowan NJ. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* 1998;93:863-873
- 26 Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11:15-25
- 27 Evstigneeva ZG, Solov'eva NA, Sidel'nikova LI. Structure and functions of chaperones and chaperonins. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2001;37:5-18
- 28 Braig K. Chaperonins. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:159-165
- 29 陆荫英, 成军, 张玲霞. 分子伴侣及其与乙型肝炎病毒的关系. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:177-179
- 30 Li L, Li X, Francke U, Cohen SN. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* 1997;88:143-154
- 31 Schiffer CA, Hehlmann R, Larson R. Perspectives on the treatment of chronic phase and advanced phase CML and Philadelphia chromosome positive ALL(1). *Leukemia* 2003;17:691-699