

# 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 5 的克隆

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏, 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  
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

## Cloning and identification of human gene 5 transactivated by hepatitis B virus X protein

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Min Liu

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China  
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 explore the new target genes transactivated by HBx, suppression subtractive hybridization (SSH) method and to pave the way for elucidating the pathogenesis mechanism of HBV infection.

**METHODS:** The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-X and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, using SSH and bioinformatics technique, and the differentially expressed DNA sequence between the two groups was analyzed. The obtained sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank, one of which was a novel gene with unknown function. The new gene with no homology with known genes in this database was confirmed and electric polymerase chain reaction (PCR) was conducted for the cloning of the full-length DNA for the new gene and in conjunction with Kozak role and the exist of polyadenyl signal sequence. The reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to amplify the new gene, named as XTP5, from the mRNA of HepG2 cells transfected.

**RESULTS:** The new gene was cloned in combination of molecular biological and bioinformatics methods.

**CONCLUSION:** HBx is a potential transactivator. A new gene has been recognized as the new target transactivated by HBx protein. These results pave the way for study on the transactivation of HBx protein.

Wang L, Li K, Cheng J, Zhang J, Liu M. Cloning and identification of human gene 5 transactivated by hepatitis B virus X protein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):74-77

### 摘要

**目的:** 为了阐明乙型肝炎病毒(HBV)感染相关疾病的发病机

制, 筛选并克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白HBx反式激活新型靶基因。

**方法:** 以HBV X蛋白(HBx)表达质粒pcDNA3.1(-)-X转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取mRNA并进行SSH分析。对于所获基因片段序列分析表明, 其中之一为新型基因片段, 与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性, 利用表达序列标签(EST)序列的搜索和比对, 确定新型基因序列并命名为XTP5。从HepG2细胞提取总RNA, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长序列。

**结果:** XTP5基因的编码基因序列全长为1 527个核苷酸(nt), 编码产物由508个氨基酸残基(aa)组成。

**结论:** HBx是一种由病毒基因组编码的具有反式激活作用的蛋白。应用SSH技术发现了HBx反式激活作用的新的靶基因, 这一发现, 为阐明HBx蛋白的反式激活作用及其机制, 开辟了新的研究方向。

王琳, 李克, 成军, 张健, 刘敏. 乙型肝炎病毒 X 蛋白反式激活基因 5 的克隆. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):74-77  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/74.asp>

### 0 引言

哺乳类嗜肝 DNA 病毒的 X 基因编码一个小的(17 kD)多功能蛋白 HBx, 他的表达除了为 HBV 自然感染的建立所必需, 还影响宿主的多种细胞内过程, 包括真核细胞转录因子的反式激活、DNA 损伤后的修复、细胞周期检查点的调控、信号转导通路组分的干扰等, 是 HBV 感染后引起急、慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的重要分子生物学基础。本研究利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 对于表达 HBx 载体转染的 HepG2 细胞进行研究, 阐明了 HBx 蛋白反式激活作用的部分靶基因, 同时我们结合生物信息学技术(bioinformatics)克隆了 HBx 蛋白反式激活作用的新靶基因, 即 HBx 蛋白反式激活基因 5(XTP5), 从而为 HBx 反式激活作用的研究提供新的方向。

### 1 材料和方法

1.1 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司; Lipofectamine PLUS 转染试剂购自 Gibco 公司, mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech,

PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech, High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司. 乙型肝炎病毒 X 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-X 由本室构建<sup>[1]</sup>. DNA 序列测定由上海博亚公司完成.

## 1.2 方法

**1.2.1 消减杂交文库的建立及克隆分析** 分别将 pcDNA3.1(-)-X 及 pcDNA3.1(-)空载体转染 HepG2 细胞, 48 h 后提取 mRNA, 以此 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA (dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, 经 Rsa I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化后将 Tester cDNA 分为两份, 分别连接特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 与过量的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交和 2 次抑制性 PCR, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增. 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-1 000 bp), 测序. 对于每一条基因片段的序列提交 GenBank 进行同源基因序列的搜索, 确认所得基因片段的独特性, 然后依据 GenBank 数据库中的同源基因片段进行电子拼接, 根据 Kozak 规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列, 确定完整的编码基因序列.

**1.2.2 新基因的 PCR 扩增与序列分析** 根据电子拼接序列的新基因序列, 设计新基因的序列特异性的引物, 利用转染了 pcDNA3.1(-)-X 的 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增与克隆技术, 获得阳性克隆并进行序列分析.

## 2 结果

**2.1 mRNA 的定性、定量分析** 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.54 μg 和 4.23 μg, A260/A280=1.7. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实

mRNA 质优量足.

**2.2 消减杂交文库的构建与分析** dscDNA 两端连接效率检测结果显示两组 dscDNA 已与接头高效率连接. 消减效率的鉴定结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 PCR 产物中看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率. 对差异表达基因片段进行菌落 PCR 扩增, 结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段<sup>[6]</sup>. 挑选克隆测序并与 GenBank 数据库进行初步比较.

**2.3 新基因的序列分析及全长基因的获得** 利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现其中的 1 个克隆序列与 GenBank 中注册的已知功能基因序列没有同源性. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从表达 HCV NS5A 蛋白的 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 1 500 bp 左右片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HCV NS5A 蛋白反式激活作用的新型靶基因, 命名为 XTP5. 新基因的开放读码框架(ORF)长度为 1 527 个核苷酸(nt), 编码产物由 508 个氨基酸残基(aa)组成(图 2).

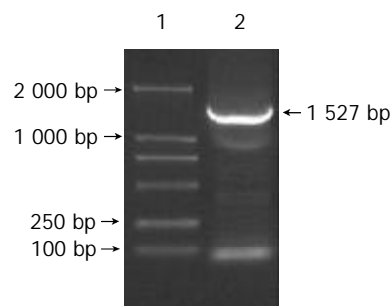


图1 XTP5 反转录 PCR 扩增结果.

## 3 讨论

像多数病毒一样, HBV 基因表达的调节主要是在转录水平上的多水平调控, 病毒借助宿主细胞的一些复制表达元件完成其生活周期及致病过程. HBx 是病毒编码的主要调节成分, 参与 HBV 基因在肝细胞中的表达、增生和再感染<sup>[2-5]</sup>. 由于 HBx 不与双链 DNA 发生结合,

```

      M   W   E   I   L   R   R   K   D   C   D   K   E   K   R   V   K
1  ATG TGG GAG ATT TTA AGA AGA AAA GAC TGT GAC AAA GAA AAA AGA GTA AAG
    L   M   S   D   L   Q   K   L   I   Q   G   K   I   K   T   I   A
52  TTA ATG AGT GAT TTG CAG AAG TTG ATT CAA GGG AAA ATT AAA ACT ATT GCA
    F   A   H   D   S   T   R   V   I   Q   C   Y   I   Q   Y   G   N
103 TTT GCA CAC GAT TCA ACT CGT GTG ATC CAG TGT TAC ATT CAG TAT GGT AAT
    E   E   Q   R   K   Q   A   F   E   E   L   R   D   D   L   V   E
154 GAA GAA CAG AGA AAA CAG GCT TTT GAA GAA TTG CGA GAT GAT TTG GTT GAG
    L   S   K   A   K   Y   S   R   N   I   V   K   K   F   L   M   Y
205 TTA AGT AAA GCC AAA TAT TCG AGA AAT ATT GTT AAG AAA TTT CTC ATG TAT
  
```

```

      G   S   K   P   Q   I   A   E   I   I   R   S   F   K   G   H   V
256 GGA AGT AAA CCA CAG ATT GCA GAG ATA ATC AGA AGT TTT AAA GGC CAC GTG
      R   K   M   L   R   H   A   E   A   S   A   I   V   E   Y   A   Y
307 AGG AAG ATG CTG CGG CAT GCG GAA GCA TCA GCC ATC GTG GAG TAC GCA TAC
      N   D   K   A   I   L   E   Q   R   N   M   L   T   E   E   L   Y
358 AAT GAC AAA GCC ATT TTG GAG CAG AGG AAC ATG CTG ACG GAA GAG CTC TAT
      G   N   T   F   Q   L   Y   K   S   A   D   H   R   T   L   D   K
409 GGG AAC ACA TTT CAG CTT TAC AAG TCA GCA GAT CAC CGA ACT CTG GAC AAA
      V   L   E   V   Q   P   E   K   L   E   L   I   M   D   E   M   K
460 GTG TTA GAG GTA CAG CCA GAA AAA TTA GAA CTT ATT ATG GAT GAA ATG AAA
      Q   I   L   T   P   M   A   Q   K   E   A   V   I   K   H   S   L
511 CAG ATT CTA ACT CCA ATG GCC CAA AAG GAA GCT GTG ATT AAG CAC TCA TTG
      V   H   K   V   F   L   D   F   F   T   Y   A   P   P   K   L   R
562 GTG CAT AAA GTA TTC TTG GAC TTT TTT ACC TAT GCA CCC CCC AAA CTC AGA
      S   E   M   I   E   A   I   R   E   A   V   V   Y   L   A   H   T
613 TCA GAA ATG ATT GAA GCC ATC CGC GAA GCG GTG GTC TAC CTG GCA CAC ACA
      H   D   G   A   R   V   A   M   H   C   L   W   H   G   T   P   K
664 CAC GAT GGC GCC AGA GTG GCC ATG CAC TGC CTG TGG CAT GGC ACG CCC AAG
      D   R   K   V   I   V   K   T   M   K   T   Y   V   E   K   V   A
715 GAC AGG AAA GTG ATT GTG AAA ACA ATG AAG ACT TAT GTT GAA AAG GTG GCT
      N   G   Q   Y   S   H   L   V   L   L   A   A   F   D   C   I   D
766 AAT GGC CAA TAC TCC CAT TTG GTT TTA CTG GCG GCA TTT GAT TGT ATT GAT
      D   T   K   L   V   K   Q   I   I   I   S   E   I   I   S   S   L
817 GAT ACT AAG CTT GTG AAG CAG ATA ATC ATA TCA GAA ATT ATC AGT TCA TTG
      P   S   I   V   N   D   K   Y   G   R   K   V   L   L   Y   L   L
868 CCT AGC ATA GTA AAT GAC AAA TAT GGA AGG AAG GTC CTA TTG TAC TTA CTA
      S   P   R   D   P   A   H   T   V   R   E   I   I   E   V   L   Q
919 AGC CCC AGA GAT CCT GCA CAT ACA GTA CGA GAA ATC ATT GAA GTT CTG CAA
      K   G   D   G   N   A   H   S   K   K   D   T   E   V   R   R   R
970 AAA GGA GAT GGA AAT GCA CAC AGT AAG AAA GAT ACA GAG GTC CGC AGA CGG
      E   L   L   E   S   I   S   P   A   L   L   S   Y   L   Q   E   H
1021 GAG CTC CTA GAA TCC ATT TCT CCA GCT TTG TTA AGC TAC CTG CAA GAA CAC
      A   Q   E   V   V   L   D   K   S   A   C   V   L   V   S   D   I
1072 GCC CAA GAA GTG GTG CTA GAT AAG TCT GCG TGT GTG TTG GTG TCT GAC ATT
      L   G   S   A   T   G   D   V   Q   P   T   M   N   A   I   A   S
1123 CTG GGA TCT GCC ACT GGA GAC GTT CAG CCT ACC ATG AAT GCC ATC GCC AGC
      L   A   A   T   G   L   H   P   G   G   K   D   G   E   L   H   I
1174 TTG GCA GCA ACA GGA CTG CAT CCT GGT GGC AAG GAC GGA GAG CTT CAC ATT
      A   E   H   P   A   G   H   L   V   L   K   W   L   I   E   Q   D
1225 GCA GAA CAT CCT GCA GGA CAT CTA GTT CTG AAG TGG TTA ATA GAG CAA GAT
      K   K   M   K   E   N   G   R   E   G   C   F   A   K   T   L   V
1276 AAA AAG ATG AAA GAA AAT GGG AGA GAA GGT TGT TTT GCA AAA ACA CTT GTA
      E   H   V   G   M   K   N   L   K   S   W   A   S   V   N   R   G
1327 GAG CAT GTT GGT ATG AAG AAC CTG AAG TCC TGG GCT AGT GTA AAT CGA GGT
      A   I   I   L   S   S   L   L   Q   S   C   D   L   E   V   A   N
1378 GCC ATT ATT CTT TCT AGC CTC CTC CAG AGT TGT GAC CTG GAA GTT GCA AAC
      K   V   K   A   A   L   K   S   L   I   P   T   L   E   K   T   K
1429 AAA GTC AAA GCT GCA CTG AAA AGC TTG ATT CCT ACA CTG GAA AAA ACC AAA
      S   T   S   K   G   I   E   I   L   L   E   K   L   S   T   *
1480 AGC ACC AGC AAA GGA ATA GAA ATT CTA CTT GAA AAA CTG AGC ACA TAG

```

图2 HBx 反式激活靶基因 XTP5 核苷酸及其编码产物序列.

其发挥作用的普遍规律是对宿主细胞和病毒启动子转录的反式激活。作为一个有力的转录激活子, HBx可使HBV其他基因产物转录活性增加数倍。大量体内研究证明, HBx可激活多种基本转录因子以及RNA聚合酶包括RNA聚合酶1、2、3, NF $\kappa$ B、NF-AT、AP-1、ATF/CREB、抑癌基因p53<sup>[6-22]</sup>。在体外研究中HBx还可以结合一些转录元件, 包括TATA结合蛋白(TBP), TFIIB, TFIIF, RNA聚合酶亚单位RPB5<sup>[23-26]</sup>。HBx细胞内定位通常在胞质, 他还具有激活胞质内信号转导通路的活性, 特别是Ras-Raf-MAPK途径<sup>[27, 28]</sup>, 细胞应激介导的MEKK1-p38-JNK通路和Src酪氨酸激酶。HBx可影响早期细胞周期的调控点, 通过激活内源性细胞周期素A和周期素A依赖的胞质Src转导通路, 使细胞越过G1期而停滞在S期, 这一时期对病毒的复制是至关重要的。而对于肝细胞的分化、增生、凋亡和肝肿瘤的转化具有重要意义。

本实验将真核表达载体pcDNA3.1(-)-X, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 并以转染空白载体的相同细胞系作为对照, 以两种转染的细胞系中提取的mRNA为起始材料, 应用SSH方法成功地构建了HBxAg反式激活相关基因差异表达的cDNA消减文库, 随机挑选克隆测序并与GenBank数据库进行同源性比较分析, 结果主要包括两种类型, 第一种是已知基因的序列, 与GenBank中数据高度同源, 其中包括一些已知的看家基因序列和一些与细胞生长调节密切相关的基因序列, 第二种是未知基因序列, 共获得9个差异表达的未知序列<sup>[1]</sup>。对其中的一个未知功能基因序列, 我们采用生物信息学方法进行电子拼接分析, 获得了其全长基因序列, 命名为XTP5, 是存在于肝细胞内HBx反式激活的新的靶基因, 我们已构建其哺乳动物细胞和酵母细胞表达载体, 为进一步研究该基因的生物学功能和对X蛋白的致病作用提供线索。

#### 4 参考文献

- 刘妍, 成军, 陆荫英. 乙型肝炎病毒X蛋白反式激活基因克隆化的研究. 中华肝脏病杂志 2003;11:5-7
- Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379
- Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-1226
- Yen TS. Hepadnaviral X Protein: review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
- Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994;68:2026-2030
- Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
- Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ. Alternate translation initiation on hepatitis B virus X mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J Virol* 1992;66:4382-4389
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1997;17:6838-6846
- Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;18:7086-7094
- Barnabas S, Hai T, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 1997;272:20684-20690
- Weil R, Sirma H, Giannini C, Kremsdorf D, Bessia C, Dargemont C, Brechot C, Israel A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* 1999;19:6345-6354
- Levrero M, Balsano C, Natoli G, Avantiaggiati ML, Elfassi E. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 1990;64:3082-3086
- Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992;66:983-991
- Maguire HF, Hoeffler JP, Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science* 1991;252:842-844
- Natoli G, Avantiaggiati ML, Chirillo P, Puri PL, Ianni A, Balsano C, Levrero M. Ras-and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX. *Oncogene* 1994;9:2837-2843
- Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74
- Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70:4558-4566
- Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993;192:346-350
- Twu JS, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-2050
- Williams JS, Andrisani OM. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3819-3823
- Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
- Takada S, Kaneniwa N, Tsuchida N, Koike K. Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells. *Oncogene* 1997;15:1895-1901
- Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1003-1007
- Haviv I, Shamay M, Doitsh G, Shaul Y. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1562-1569
- Qadri I, Conaway JW, Conaway RC, Schaack J, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIF and stimulates the DNA helicase activity of TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10578-10583
- Cheong JH, Yi M, Lin Y, Murakami S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J* 1995;14:143-150
- Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;1:10350-10354
- Cross JC, Wen P, Rutter WJ. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen-activated cellular serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8078-8082