

# 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因1的克隆

刘敏, 成军, 王琳, 张树林, 邵清, 张健, 梁耀东

刘敏, 成军, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东, 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

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

刘敏, 女, 1969-02-19生, 陕西省西安市人, 汉族. 1993年西安医科大学本科毕业, 西安交通大学2000年内科学在读博士研究生, 主治医师. 主要从事病毒性肝炎的分子生物学发病机制研究.

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 1 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus

Min Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Yao-Dong Liang

Min Liu, Jun Cheng, Lin Wang, Shu-Lin Zhang, Qing Shao, Jian Zhang, Yao-Dong Liang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of PLA, Beijing, 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 screen and clone the target genes transactivated by hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 5A (NS5A) and to pave the way for elucidating the pathogenesis of HCV infection.

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization (SSH) technique and bioinformatics were used. mRNA from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS5A and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, was isolated, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. The coding gene transactivated by HCV NS5A was cloned by bioinformatics methods.

**RESULTS:** The obtained sequences were searched for homologous DNA sequence from GenBank, one of which was a new gene with unknown function. The new gene with no homology with known genes in this database was confirmed and electric polymerase chain reaction 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 NS5ATP1, from the mRNA of HepG2 cells transfected.

**CONCLUSION:** HCV NS5A is a potential transactivator. Suppression subtractive hybridization is an efficient and convenient method for identification and separation of expressed genes in hepatocytes. These results pave the way

for the study of the molecular mechanism of the transactivating effects of HCV NS5A protein and the development of new therapy for chronic hepatitis C.

Liu M, Cheng J, Wang L, Zhang SL, Shao Q, Zhang J, Liang YD. Cloning and identification of human gene 1 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):78-81

## 摘要

**目的:** 应用抑制性消减杂交技术(SSH)及生物信息学技术(bioinformatics)筛选并克隆丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白NS5A反式激活新型靶基因, 进一步阐明HCV感染相关疾病的发病机制.

**方法:** 以HCV NS5A蛋白表达质粒pcDNA3.1(-)-NS5A转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 提取mRNA并进行抑制性消减杂交分析. 应用分子生物学技术, 结合生物信息学技术, 分析并克隆HCV NS5A反式激活作用的新的靶基因.

**结果:** 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, 从转染pcDNA3.1(-)-NS5A的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, 并测序证实, 命名为NS5ATP1. NS5ATP1基因的编码序列全长为1011个核苷酸(nt), 编码产物由336个氨基酸残基(aa)组成.

**结论:** HCV NS5ATP1是一种典型的病毒基因组编码的具有反式激活作用的蛋白, 而SSH是一种鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的技术. 通过这种技术, 发现了HCV NS5ATP1反式激活作用的新的靶基因, 这一发现, 为进一步研究HCV NS5ATP1蛋白反式激活作用的分子生物学机制和探索新型治疗技术奠定了基础.

刘敏, 成军, 王琳, 张树林, 邵清, 张健, 梁耀东. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因1的克隆. 世界华人消化杂志 2004;12(1):78-81

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/78.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链RNA病毒, 基因组含有惟一的开放读框(ORF), 可以分成结构基因区和非结构基因区<sup>[1-4]</sup>. NS5A是非结构蛋白的一种, 哺乳动物细胞表达的NS5A蛋白以两种形式存在, 分子量分别为56 KD和58 KD. HCV NS5A是HCV基因组编码的一种重要的具有多种生物学活性的非结构蛋白质, 在HCV多蛋白的成熟和RNA的复制过程中具有十分重

要的作用<sup>[5-7]</sup>. NS5A 还是一种作用很强转录激活因子, 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 细胞发生恶性转化的过程有关<sup>[8,9]</sup>. 我们利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)及生物信息学技术(bioinformatics)筛选并克隆了 NS5A 蛋白反式激活作用的新靶基因, 命名为丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白反式激活基因 1(NS5ATP1), 为 HCV NS5A 蛋白反式激活作用及 HCV 相关疾病发病机制的研究奠定了基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 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. 丙型肝炎病毒非结构蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A 由本室构建. DNA 测序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(-)-NS5A 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 根据电子拼接的新基因序列(1 011 bp), 利用生物软件 Vector NTI 设计新基因的序列特异性的含有特异性核酸内切酶(EcoR

I/BamH I)的引物, 利用转染了 pcDNA3.1(-)-NS5A 的 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 °C 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 使用碱裂解法提质粒后进行双酶切(EcoR I/BamH I)鉴定, 证明目的基因约 1 011 bp 后测序, 进一步鉴定正确后获得阳性克隆.

## 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 纯化高质量的 mRNA 是获得 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 转染了 NS5A 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.64 μg 和 4.38 μg, A260/A280=1.97. 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, 证实获得高质量 mRNA.

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. 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 利用美国国立卫生研究院(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 NS3 蛋白的 HepG2 细胞提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR, 扩增出约 1 011 bp 片段(图 1), 经过测序克隆出全长基因片段, 获得 HCV NS5A 反式激活作用的新型靶基因, 命名为 NS5ATP1. 新基因的开放读码框架(ORF)长度为 1 011 个核苷酸(nt), 编码产物由 336 个氨基酸残基(aa)组成(图 2).

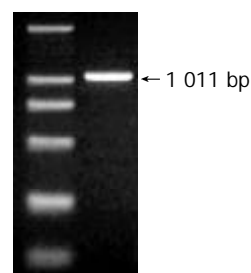


图 1 HCV NS5A 蛋白反式激活靶基因 NS5ATP1 的 PCR 扩增电泳图.

```

      M   A   A   S   L   R   L   L   G   A   A   S   G   L   R
1  ATG GCA GCC TCC TTA CGG CTC CTC GGA GCT GCC TCC GGT CTC CGG
      Y   W   S   R   R   L   R   P   A   A   G   S   F   A   A
46 TAC TGG AGC CGG CGG CTG CGG CCG GCA GCC GGC AGC TTT GCA GCG

```

```

      V  C  S  R  S  V  A  S  K  T  P  V  G  F  I
91  GTG TGT TCT AGG TCA GTG GCT TCA AAG ACT CCA GTT GGA TTC ATT
      G  L  G  N  M  G  N  P  M  A  K  N  L  M  K
136 GGA CTG GGC AAC ATG GGG AAT CCA ATG GCA AAA AAT CTC ATG AAA
      H  G  Y  P  L  I  I  Y  D  V  F  P  D  A  C
181 CAT GGC TAT CCA CTT ATT ATT TAT GAT GTG TTC CCT GAT GCC TGC
      K  E  F  Q  D  A  G  E  Q  V  V  S  S  P  A
226 AAA GAG TTT CAA GAT GCA GGT GAA CAG GTA GTA TCT TCC CCA GCA
      D  V  A  E  K  A  D  R  I  I  T  M  L  P  T
271 GAT GTT GCT GAA AAA GCT GAC AGA ATT ATT ACA ATG CTG CCC ACC
      S  I  N  A  I  E  A  Y  S  G  A  N  G  I  L
316 AGT ATC AAT GCA ATA GAA GCT TAT TCC GGA GCA AAT GGG ATT CTA
      K  K  V  K  K  G  S  L  L  I  D  S  S  T  I
361 AAA AAA GTG AAG AAG GGC TCA TTA TTA ATA GAT TCC AGC ACT ATT
      D  P  A  V  S  K  E  L  A  K  E  V  E  K  M
406 GAT CCT GCA GTT TCA AAA GAA TTG GCC AAA GAA GTT GAG AAA ATG
      G  A  V  F  M  D  A  P  V  S  G  G  V  G  A
451 GGA GCA GTT TTC ATG GAT GCC CCT GTT TCT GGT GGT GTA GGA GCT
      A  R  S  G  N  L  T  F  M  V  G  G  V  E  D
496 GCA CGA TCT GGG AAC CTC ACG TTT ATG GTG GGA GGA GTT GAA GAT
      E  F  A  A  A  Q  E  L  L  G  C  M  G  S  N
541 GAA TTT GCT GCT GCC CAA GAG TTG CTG GGG TGC ATG GGC TCC AAC
      V  V  Y  C  G  A  V  G  T  G  Q  A  A  K  I
586 GTG GTG TAC TGT GGA GCT GTT GGG ACT GGG CAG GCG GCA AAG ATC
      C  N  N  M  L  L  A  I  S  M  I  G  T  A  E
631 TGC AAC AAC ATG CTG TTA GCT ATT AGT ATG ATT GGA ACT GCT GAA
      A  M  N  L  G  I  R  L  G  L  D  P  K  L  L
676 GCT ATG AAT CTT GGA ATC AGG TTA GGG CTT GAC CCA AAA CTA CTG
      A  K  I  L  N  M  S  S  G  R  C  W  S  S  D
721 GCT AAA ATC CTA AAT ATG AGC TCA GGA CGG TGT TGG TCA AGT GAC
      T  Y  N  P  V  P  G  V  M  D  G  V  P  S  A
766 ACT TAT AAT CCT GTA CCT GGA GTG ATG GAT GGC GTT CCC TCG GCT
      N  N  Y  Q  G  G  F  G  T  T  L  M  A  K  D
811 AAT AAC TAT CAG GGT GGA TTT GGA ACA ACA CTC ATG GCT AAG GAT
      L  G  L  A  Q  D  S  A  T  S  T  K  S  P  I
856 CTG GGA TTG GCA CAA GAC TCT GCT ACC AGC ACA AAG AGC CCA ATC
      L  L  G  S  L  A  H  Q  I  Y  R  M  M  C  A
901 CTT CTT GGC AGT CTG GCC CAT CAG ATC TAC AGG ATG ATG TGT GCA
      K  G  Y  S  K  K  D  F  S  S  V  F  Q  F  L
946 AAG GGC TAC TCA AAG AAA GAC TTC TCA TCC GTG TTC CAG TTC CTA
      R  E  E  E  T  F  *
991 CGA GAG GAG GAG ACC TTC TGA

```

图2 NS5ATP1 基因序列及编码产物一级结构序列.

### 3 讨论

HCV 感染是引起慢性肝炎的主要原因, 与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒编码的NS5A 蛋白起着重要的作用. NS5A 是反式转录激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核

细胞转录因子特有的结构特征, 但是其参与细胞转录调节的机制仍不十分清楚<sup>[9-11]</sup>. 一般来说, 反式转录激活因子是在细胞核中起作用的. 尽管已有明确证据显示NS5A 蛋白全长定位于细胞内质网, 但在细胞核内仍可检测到NS5A 的N-末端定位信号<sup>[12-16]</sup>, 提示NS5A

的部分结构可进入细胞核内并成为转录激活因子的一部分. 缺失 N-末端 146 aa 和 DNA 结合区域在 GAL4(一种酵母细胞转录激活因子)的 HCV NS5A 蛋白可强烈的激活酵母和哺乳动物细胞的转录活性. 结合到 GAL4 DNA 结合区域的全长 HCV NS5A 蛋白并没有激活转录的作用, NS5A 片段转录激活作用最强的位点定位于 2 135 和 2 331 aa 之间. NS5A 的转录激活区域包括两个酸性氨基酸区 (2 143-2 184 aa, 2 220-2 273 aa) 和一个脯氨酸富集区 (2282-2327 aa). 酸性氨基酸区的酸性氨基酸残基的数量与 NS5A 的反式激活活性相关, 2 个酸性氨基酸区是 NS5A 的转录激活作用的核心区域, 因此酸性氨基酸区 2 的一些氨基酸的突变可明显影响 NS5A 的转录激活作用, 但是这些突变更多的是引起蛋白二级结构的改变. 脯氨酸富集区被认为对 NS5A 的转录激活作用只有一定的加强作用, 相对而言并不特别重要.

Gong et al<sup>[17]</sup> 研究发现, NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- $\kappa$ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用. NS5A 在细胞质内通过氧化应激作用激活 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 转录因子. NS5A 引起细胞内钙离子的紊乱.  $Ca^{2+}$  作为第二信使激发线粒体内的活性氧簇水平, 使 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 易位入细胞核内. 有证据表明 STAT-3 的激活部分有 NS5A 的作用. 在抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)或者  $Ca^{2+}$  拮抗剂(EGTA-AM, TMB-8)作用下, NS5A 诱导的 NF- $\kappa$ B 和 STAT-3 的反式激活作用消失. 这些结果说明 NS5A 可引起细胞内与病毒感染相关的病理改变的发病机制. Ghosh et al<sup>[18]</sup> 研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21<sup>WAF1</sup>, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能. 由于 NS5A 表现出对抗干扰素  $\alpha$ (IFN $\alpha$ )的治疗效应而引起人们广泛的关注, NS5A 能够与肝细胞中的 IFN 刺激蛋白-双链 RNA 依赖的激酶(PKR)相互作用, 抑制 PKR 的功能, 从而下调 IFN  $\alpha$  刺激的抗病毒效应<sup>[19]</sup>.

本项研究中发现了 HCV NS5A 蛋白反式激活的新的靶基因, 为研究 HCV NS5A 蛋白的反式激活作用及其后果提供了新的研究方向和思路. 由于目前对于新克隆的 NS5A 蛋白反式激活的靶基因的结构与功能、表达与调控, 以及新基因的生物学作用和在丙型肝炎致病机

制中的作用和地位不明, 需要进一步研究, 以阐明新基因的研究意义.

#### 4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997:83
- 2 成军. 病毒性肝炎的分子发病机制. 临床肝胆病杂志 2001;17(增刊):31-35
- 3 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 4 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16(Suppl):A185
- 5 成军. 丙型肝炎病毒干扰素敏感决定区的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 2000;27:55-58
- 6 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 7 成军, 陈菊梅, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 刘妍, 王刚, 董菁, 夏小兵, 刘友昭, 王琳, 李克, 杨继珍, 邵得志, 陈菊梅. HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体基因的筛选与鉴定. 中华实验与临床病毒学杂志 2001;15:216-218
- 8 成军, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白的生物学调节作用. 国外医学·微生物学分册 2001;24:12-14
- 9 Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- 10 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 11 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661-667
- 12 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 13 No authors listed. Post-transfusion hepatitis leading to chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:732-741
- 14 Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-6106
- 15 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12
- 16 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- 17 Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- $\kappa$ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- 18 Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- 19 Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12