

服IgY预防肠道感染更有其独特的功能.因此,IgY可作为食品公司的免疫型强化剂.有人提出给小于5月龄的婴儿及先天性免疫缺陷患儿口服含有高滴度抗病毒活性的IgY用于疾病的防治,对那些不能以母乳喂养的儿童尤为有意义^[14].

4 参考文献

- 1 Carroll S B, Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983;258:24-29
- 2 Song CS, Yu JH, Bai DH, Hester PY, Kim KH. Antibodies to the α -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J Immunol* 1985;135:3354-3361
- 3 Rose ME, Or lane E. Buttres. Immunoglobulin classes in the haes egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J Immunol* 1974;4:521
- 4 Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981;46:63-67
- 5 Toivanen PA. Immunology: basis and practice. Boca Raton FL USA. CRC press 1987:113-121
- 6 Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C' 1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol* 1961;87:616-621
- 7 Kronvall G, Seal US, Svensson S, Willams PC. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of IgG globulin using Staphylococcal protein A. *J Immunol* 1990;104:140-146
- 8 Kronvall G, Seal US, Finstad J. Phylogenetic protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect* 1974;82:12-18
- 9 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺旋杆菌感染的基础与临床. 中国科学技术出版社, 2002:58-122
- 10 Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. Coli strain. *J Immunol Meth* 1993;160:207-214
- 11 Ebina T, Tskada K, Umezu K, Xose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in sucking mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein bond polysaccharide Preparation(PSK). *Microbiol Immunol* 1990;34:617-629
- 12 Hiraga C, Kodama Y, Sugiyam T. Prevention of HTB in fection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *Kansenshogaka Zasshi* 1990;64:118
- 13 Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sento S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Eschichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 1992;60:998-1007
- 14 Schimizu M, Fitisimmons RC, Nakai S. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 1988;53:1360

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 TAHCCP1 转染细胞差异表达基因

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军, 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
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. 30371288
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
北京市自然科学基金面上项目, No. 5042024
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: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的表达对肝母细胞瘤细胞系HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TAHCCP1在肝细胞中上调或下调的基因, 探索其可能的调节功能.

方法: 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的TAHCCP1编码基因片段克隆到

TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 应用基因表达谱芯片技术对两组间差异表达mRNA进行检测和分析.

结果: 在筛选的1152点cDNA芯片中, 有110种基因的表达水平上调(占9.55%), 98种基因的表达水平下调(8.51%), 包括一些与体内免疫调节、脂类代谢、蛋白质的翻译合成、氧化反应、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的基因.

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了TAHCCP1转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TAHCCP1蛋白可能的生物学功能提供依据.

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军. 基因表达谱芯片技术筛选TAHCCP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2876-2880
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2876.asp>

0 引言

TAHCCP1是本室利用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选到的丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式调节的新靶基因,该新基因的编码序列全长为2 001个核苷酸(nt),编码产物由667个氨基酸残基(aa)组成,在GenBank中注册号为AY038359^[1-4]。该蛋白在细胞内的生物学功能未知,为了探索TAHCCP1的功能,我们构建了TAHCCP1基因真核表达载体,应用基因表达谱芯片技术筛选、克隆TAHCCP1上调或下调的基因,推测其在体内的功能,为研究HCV核心蛋白的致病机制及探索未知基因的功能提供了新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存,细胞培养相关试剂、总 RNA 提取试剂 Trizol 及真核表达载体 pcDNA3.1(-)均购自 Invitrogen 公司。人类基因组分类 I 芯片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、细胞信号转导相关基因等 1 152 个 cDNA,由上海联合基因有限公司提供。mRNA 纯化试剂 Oligotex mRNA Midi Kit 购自 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性引物,上下游引物序列分别为:5' - GAT ATC CGC AGA AAT GGA GCA AGA GC-3', 5' - GGA TCC GTG ATT CCC AGC ACT TCA TC-3', 下划线部分为引物两端的酶切位点, *EcoRV* 和 *BamHI*。以转染了 HCV 核心表达质粒的 HepG2 细胞 cDNA 作为模板,应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1的全长编码基因。依次克隆到 TA 载体中进行序列测定及真核表达载体 pcDNA3.1(-)中,构建真核表达载体 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1。在 35 mm 培养皿中常规培养 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 μ g pcDNA3.1(-)-TAHCCP1 和空载体 pcDNA3.1(-) 转染 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞,每 5 \times 10⁶ 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂,立即于液氮中保存。

1.2.2 总 RNA 提取及 mRNA 纯化 Trizol 试剂一步法提取转染 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1 和空载体 pcDNA3.1(-) 的细胞 HepG2 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 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后,经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。纯化 mRNA 并行电泳检测。

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μ g),乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 \times SSC+2 g/L SDS 杂交液中。芯片包含的 1 152 个 cDNA 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 g/L 溶解于 3 \times 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),紫外线(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在 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15-17 h,依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

1.2.5 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 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 ImageGene 3.0 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 > 2.000, 红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.500, 为绿色荧光,显示表达减弱。

2 结果

2.1 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1 的表达载体构建 TAHCCP1 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1 经限制性内切酶分析和核苷酸序列测定,证实含有 TAHCCP1 完整的开放读码框架,序列准确无误。

2.2 总 RNA 及 mRNA 的定性、定量分析 实验组和对照组总 RNA 的吸光度比值 A_{260}/A_{280} 分别为 1.898 和 1.912,热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ 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常表达基因共 208 条,其中 110 条基因表达增强,98 条基因表达降低。

2.4 差异表达基因分析 TAHCCP1 上调基因类型:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 2.000 以上,就判断为 TAHCCP1 的上调基因。在我们的研究中发现有 110 种基因的表达水平上调,表 1 列出部分上调基因。TAHCCP1 基因下调基因:在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下,就判断为 TAHCCP1 的下调基因。在我们的研究中发现有 98 种基因的表达水平下调,表 2 列出部分下调基因。

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是 HCV 基因组编码的一种最为重要的具有多种生物学活性的结构蛋白质,与 HCV 感染的靶细胞的细胞周期与细胞凋亡的分子生物学调节机制密切相关^[5-10]。核心蛋白是一种作用很强的转

表1 TAHCCP1上调的部分基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_001226	凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 6(CASP6)	2.173
2	NM_006101	肿瘤中高表达的富含亮氨酸的蛋白(HEC)	2.314
3	NM_025190	丙型肝炎病毒 NS3 蛋白反式激活蛋白 6(NS3TP6)	2.403
4	NM_004661	CDC23 细胞周期分裂蛋白(CDC23)	2.503
5	NM_000857	鸟苷酸环化酶 1(GUCY1B3)	2.829
6	NM_014225	蛋白磷酸酶(PPP2R1A)	2.981
7	NM_005637	分泌滑液的肉瘤转位蛋白(SS18)	3.159
8	NM_003202	转录因子 7(TCF7)	3.368
9	NM_003330	硫氧还蛋白还原酶(TR)	3.459
10	NM_053274	FKBP 相关蛋白 48(FAP48)	3.614
11	NM_002736	cAMP 依赖的蛋白激酶(PRKAR2B)	4.534
12	NM_001961	真核翻译延伸因子 2(EEF2)	5.105

表2 TAHCCP1下调的部分基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_003142	La 自身抗原	0.267
2	NM_001551	免疫球蛋白结合蛋白 1(IGBP1)	0.269
3	NM_002624	预折叠蛋白 5(PFDN5)	0.289
4	NM_002292	层粘连蛋白(LAMB2)	0.323
5	NM_005950	金属硫蛋白(MT1G)	0.347
6	NM_005627	血清 / 糖皮质激素调节激酶(SGK)	0.350
7	NM_000581	谷胱甘肽过氧化物酶(GPX1)	0.350
8	NM_003790	肿瘤坏死因子受体超家族成员 12(TNFRSF12)	0.373
9	NM_006609	丝裂素活化的蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)	0.381
10	NM_003254	组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP1)	0.412
11	NM_002166	DNA 结合的显性负相螺旋环螺旋蛋白(ID2)	0.412
12	NM_001350	死亡相关蛋白 6(DAXX)	0.417
13	NM_033306	凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 4(CASP4)	0.420
14	NM_021138	TNF 受体相关因子 2(TRAF2)	0.432
15	NM_012317	肿瘤中下调的亮氨酸拉链蛋白(LDOC1)	0.451
16	NM_006098	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(GNB2L1)	0.452
17	NM_012341	G 蛋白结合蛋白(CRFG)	0.473

录激活因子,能够影响细胞信号转导途径,激活多种病毒及细胞基因启动子,调控着细胞基因的转录^[11-15].我们利用抑制性消减杂交技术,对于表达 HCV 核心蛋白表达载体转染的 HepG2 细胞进行研究,结合生物信息学技术克隆了核心蛋白反式激活作用的新靶基因,命名为 TAHCCP1,该基因的细胞内生物学功能未知.

基因表达谱芯片技术可快速有效地检测到两组组织或细胞基因表达谱的差异,在研究新基因的功能上显示出其优越性^[16-18].我们用常规分子生物学技术构建了 TAHCCP1 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-TAHCCP1,并用空载体作为阴性对照,利用脂质体转染 HepG2 细胞,提取总 RNA,逆转录为 cDNA,进行基因芯片技术分析.结果表明,在筛选的 1152 个 cDNA 中,有

110 个基因表达水平上调,98 种基因的表达水平下调,其中包括一些未知功能的基因.

在上调的基因中,NS3TP6 是丙型肝炎病毒 NS3 蛋白反式激活蛋白 6,TAHCCP1 对其表达水平上调,表明 HCV 感染靶细胞后病毒不是孤立存在的,病毒编码蛋白与肝细胞蛋白、肝细胞蛋白与肝细胞蛋白之间存在复杂的相互调节作用^[9].细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源,是促进细胞分裂后期复合物(anaphase-promoting complex, APC)的成员,对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的. APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素(cyclin B-ubiquitin)形成共轭复合物,在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用,推测 TAHCCP1 通过上调 CDC23

的表达对细胞周期有调控作用^[20]。蛋白磷酸酶, 为钙依赖的磷酸酶, 对T细胞的激活非常重要, 其表达升高可能与机体的免疫功能相关^[21]。硫氧还蛋白还原酶(TR)是硒蛋白质, 为嘧啶核苷氧化还原酶家族成员之一, 能够还原催化硫氧还蛋白及其他底物, 调节细胞内多种氧化还原作用敏感蛋白, 在硒元素新陈代谢和保护电离辐射诱导的氧化应激及随之增强的转录因子AP-1 DNA结合活性过程中起重要作用。在 β -干扰素/全反式维甲酸诱导细胞凋亡过程中, TR是关键性的调节因子, TR可迅速诱导细胞凋亡, 研究发现羧基末端表面功能域缺失突变的TR可以组成型激活TR依赖的细胞凋亡应答, 促进p53依赖的基因表达, 抑制细胞生长调节^[22]。此外, TAHCCP1对真核翻译延伸因子2的表达水平显著上调, 高达5倍, 提示TAHCCP1促进蛋白质的翻译合成^[23]。

下调的基因中, 人La自身抗原, 能够与HCV 5'-非翻译区的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)相互作用, 刺激IRES介导的HCV翻译。TAHCCP1通过下调La自身抗原表达水平, 反馈调节HCV基因组的翻译^[24]。免疫球蛋白结合蛋白1(IGBP1)为B细胞信号转导分子 $\alpha 4$, 参与B细胞增生分化以及B细胞受体复合物介导的多种信号转导途径, 在机体的体液免疫应答过程中发挥至关重要的作用, 在表达TAHCCP1的细胞, IGBP1分子水平显著下调, 提示免疫功能低下, 这与HCV感染患者免疫功能低下的临床表现是一致的^[25]。预折叠蛋白是辅助其他蛋白正确折叠和有效组装的伴侣蛋白, 该蛋白的第五亚单位蛋白前折叠素5(prefoldin)可与原癌基因*c-myc*相互结合, 抑制*c-myc*的转录活性, 被公认为是候选的肿瘤抑制基因。可见, TAHCCP1下调肿瘤抑制基因前折叠素5的表达, 间接激活原癌基因*c-myc*的转录, 参与HCV核心蛋白的肝细胞恶性转化机制^[26]。谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)是体内抗氧化损伤的重要酶, 参与过氧化氢解毒作用。在培养的胸部肿瘤细胞中, 该酶能够保护CD95诱导的细胞凋亡^[27]。MAP3K2是丝氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族成员之一, 优先活化参与MAP激酶信号途径的一些激酶, 包括MAPK7和MAP2K4。MAP3K2能够直接磷酸化并激活IK κ B激酶(IKKs), 在核转录因子NF- κ B信号转导途径中起重要作用。该激酶也能够结合并活化蛋白激酶C相关的激酶2(PRKCL2/PRK2), 参与PRKCL2调节的信号过程^[28]。凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶胱冬肽酶4是半胱氨酸-精氨酸蛋白酶家族成员, 胱冬肽酶家族酶的依次活化, 在细胞凋亡的各时相起着至关重要的作用^[29]。可见, TAHCCP1下调上述基因的表达, 参与细胞信号转导途径。

总之, TAHCCP1在体内免疫调节、氧化还原代谢、信号转导、蛋白质的翻译合成方面可能具有一定的作用, 可能参与细胞凋亡及细胞内的信号传导功能的调控。作为人体中正常存在的基因, 其具体的功能尚需要进一步研究来证实。

4 参考文献

- 1 刘妍, 成军. 丙肝病毒致肝细胞癌的分子生物学机制. 国外医学流行病学传染病学分册 2000;27:10-13
- 2 刘妍, 成军, 邵得志, 王琳, 钟彦伟, 夏小兵. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活SV40病毒早期启动子/增强子的研究. 军医进修学院学报 2001;22:186-188
- 3 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. 解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 4 刘妍, 王建军, 成军, 杨倩, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 张玲霞. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的克隆化研究. 解放军医学杂志 2004;29:237-239
- 5 刘妍, 成军, 王刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白的协同反式激活功能. 中华肝脏病杂志 2002;10:354-357
- 6 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
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. 世界华人消化杂志 2002;10:215-217
- 8 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
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白AI结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 10 成军, 任进余, 李莉, 陆志橡, 李克, 洪源, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒结构基因转基因小鼠引起肝脏脂肪变. 世界华人消化杂志 2002;10:1022-1026
- 11 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健. 丙型肝炎病毒蛋白与脂蛋白之间的相互作用. 世界华人消化杂志 2002;10:1030-1032
- 12 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-virus core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 13 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:A185
- 14 Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. Hepatitis C virus core from different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 1998;72:3060-3065
- 15 Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1997;272:10983-10986
- 16 Schena M, Shalon D, Dais RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- 17 Zhang MQ. Large-scale gene expression data analysis: a new challenge to computational biologists. *Genome Res* 1999;9:681-688
- 18 Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001;75:7059-7066
- 19 洪源, 杨倩, 成军, 刘妍, 王建军. 丙型肝炎病毒NS5A蛋白上调NS3TP6基因启动子表达活性的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:813-816
- 20 Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998;53:184-190
- 21 Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1225-1235
- 22 Anestalt K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 23 Hanes J, Freudenstein J, Rapp G, Scheit KH. Construction of a plasmid containing the complete coding region of human elongation factor 2. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:201-204
- 24 Pudi R, Abhiman S, Srinivasan N, Das S. Hepatitis C virus

- internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* 2003;278:12231-12240
- 25 Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E, Sakaguchi N. Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* 1997;46:373-378
- 26 Watanabe K, Ozaki T, Nakagawa T, Miyazaki K, Takahashi M, Hosoda M, Hayashi S, Todo S, Nakagawara A. Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem* 2002;277:15113-15123
- 27 Chen X, Scholl TO, Leskiw MJ, Donaldson MR, Stein TP. Association of glutathione peroxidase activity with insulin resistance and dietary fat intake during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5963-5968
- 28 Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 1999;274:8355-8358
- 29 Nasir J, Theilmann JL, Vaillancourt JP, Munday NA, Ali A, Scherer S, Beatty B, Nicholson DW, Hayden MR. Interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) and related cell death genes ICERel-II and ICERel-III map to the same PAC clone at band 11q22.2-22.3. *Mamm Genome* 1997;8:611-613

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 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

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: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV核心蛋白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-7中构建诱饵质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后与转化了人白细胞文库质粒的酵母细胞Y187进行配合, 在营养缺陷型培养基上进行双重筛选阳性菌落, 增菌后提出质粒, 转化入大肠杆菌(DH5 α), 提出质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HBV核心蛋白编码基因并在酵母细胞中表达, 配合后选出既能在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基又能在辅有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17个, 其中肿瘤高甲基化1基因3个, 编码线粒体蛋白的DNA聚合酶 γ 基因1个, 乙酰辅酶A合成酶3基因1个, 假定翻译起始因子

基因1个, 趋化因子受体5基因1个, 线粒体核糖体蛋白L41基因1个, Kyot结合蛋白基因1个, Ran结合蛋白基因1个, 真核细胞翻译延伸因子2基因2个, 未知基因5个。

结论: 成功克隆出乙型肝炎病毒核心蛋白的结合蛋白, 为进一步研究HBV核心蛋白在病毒装配、损害肝细胞、感染致病等方面的具体作用提供了新线索。

蔺淑梅, 陈天艳, 成军, 王琳, 梁耀东, 李克, 张树林. 酵母双杂交技术筛选白细胞中乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12): 2880-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2880.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害人类健康的致病病毒因子, 除引起急、慢性病毒性肝炎, 慢性肝炎迁延不愈, 导致肝纤维化(LC), 还与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关^[1]. HBV属嗜肝DNA病毒, 基因组为3 200千碱基对(kb)部分双链环状DNA. HBV有2个核心相关的开放读框, 其中核心蛋白基因编码21 ku的HBcAg. HBcAg有高度免疫原性, 几乎所有HBV感染者都产生抗-HBc, 同时有T细胞免疫应答^[1-2]. HBV的蛋白与肝细胞和白细胞中的蛋白之间的相互作用在HBV感染、慢性肝炎和致肝细胞癌过程中起着重要的作用. 我们曾用酵母双杂交技术筛选了肝细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白结合蛋白的基因, 证明HCV核心蛋白与肝脏脂肪变的关系, 为探讨HCV致病