

# 应用抑制性消减杂交技术克隆和筛选丙型肝炎病毒NS3蛋白反式激活基因1的反式调节基因

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花

纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花, 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

纪冬, 男, 内蒙古自治区人, 医师, 毕业于第一军医大学, 现为军医进修学院内科传染病专业2002级硕士学位研究生, 主要从事传染病临床及病毒性肝炎的基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30371288

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: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

## Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization

Dong Ji, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang

Dong Ji, Jun Cheng, Jian-Jun Wang, Yan Liu, Qian Yang, Xiao-Yan Dang, Chun-Hua Wang, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by Grants from the National Natural Scientific Foundation, No. C03011402, No. C30070689, No. C39970674, No. C30070689, No. C30371288; and the 9.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 98D063; and the Launching Foundation for Student Studying Abroad of PLA, No. 98H038; and the 10.5 Youth Research and Technique Foundation of PLA, No. 01Q138; and the 10.5 Research and Technique Foundation of PLA, No. 01MB135.

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein (NS3TP1) by constructing a cDNA subtractive library with suppression subtractive hybridization (SSH).

**METHODS:** Suppression subtractive hybridization and bioinformatics were used for screening and cloning of the target genes transactivated by NS3TP1 protein. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)-NS3TP1 and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed cDNA sequence between the two groups. After restriction enzyme Rsa I digestion, small sizes cDNAs were

obtained. Then tester cDNA was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. Tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent polymerase chain reaction (PCR) twice, and then was subcloned into pGEM-Teasy plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search after PCR.

**RESULTS:** The subtractive library of genes transactivated by NS3TP1 was constructed successfully. The amplified library contained 68 positive clones. Colony PCR showed that these clones contained 200-1000 bp inserts. Sequence analysis was performed in 36 clones, randomly, and the full length sequences were obtained with bioinformatics method. Altogether 23 coding sequences were obtained, which consisted of 20 known and 3 unknown ones.

**CONCLUSION:** The obtained sequences may be target genes transactivated by NS3TP1. among which some genes coding proteins involve in cell cycle regulation, metabolism, immunity and cell apoptosis. This finding brings some new clues for studying the biological functions of NS3TP1.

Ji D, Cheng J, Wang JJ, Liu Y, Yang Q, Dang XY, Wang CH. Screening and cloning of the target genes transactivated by human gene 1 transactivated by hepatitis C virus NS3 protein using suppression subtractive hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):843-846

## 摘要

**目的:** 筛选与克隆丙型肝炎病毒(HCV)NS3反式激活基因1的反式激活基因, 了解其可能存在的调节功能线索。

**方法:** 应用抑制性消减杂交(SSH)技术及生物信息学(bioinformatics)技术筛选并克隆NS3TP1反式激活的新型靶基因。以NS3TP1表达质粒pcDNA3.1(-)-NS3TP1转染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并逆转录为cDNA, 经Rsa I酶切后, 将实验组cDNA分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组cDNA进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与pGEM-Teasy载体连接, 构建cDNA消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆PCR扩增后进行测序及同源性分析。

**结果:** 成功构建人NS3TP1反式激活基因差异表达的cDNA消减文库。文库扩增后得到68个阳性克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-1 000 bp插入片段。随机挑选其中36个插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序

图1 消减效率分析结果。1-4: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33。

2.5 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 菌落 PCR 扩增结果显示为 200-1000 bp 大小不等的插入片段, 所获得的 68 个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段 (图 2)。

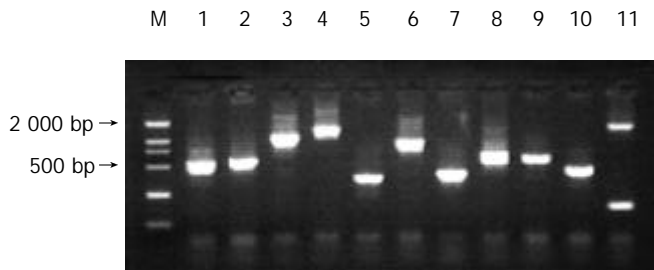


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图。

2.6 cDNA 测序与同源性分析初步结果 挑选其中 36 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。有 33 个与已知基因的部分序列高度同源(97-100%), 3 个克隆未检索到任何对应的相似序列, 可能代表了某些新基因, 详细结果见表 1。

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
核糖体蛋白	9	98-100
CDC28 蛋白激酶	3	99-100
皮肤 T 细胞淋巴瘤肿瘤抗原 HD-CL-08	2	99-100
真核翻译延长因子	2	99-100
胰岛素样生长因子结合蛋白	2	97-100
β5- 微管蛋白	1	100
RAS 癌基因家族 RAB10	1	100
纤维结合素	1	100
白蛋白	1	100
线粒体单倍体	1	100
细胞色素 C 氧化酶亚单位 IV 亚型 1(COX4I1)	1	100
真核翻译起始因子 3	1	100
肝丙酮酸脱氢酶	1	100
ATP 合酶、H <sup>+</sup> 转运、线粒体 F1 复合体	1	99
α-2 巨球蛋白	1	99
膜整合溶酶体 / 后期核内体蛋白	1	99
凋亡抑制子 (IEX-1L)	1	99
蛋白二硫化物异构酶相关蛋白	1	99
甲状腺激素受体相互作用蛋白 3(TRIP3)	1	98
蛋白激酶 WEE1	1	97
新基因序列	3	
克隆总计	36	

### 3 讨论

HCV NS3 蛋白为一多功能蛋白, 近年研究表明他对多

种基因具有反式激活作用<sup>[3-4]</sup>, 为了解 NS3 在丙肝发病机制中的作用, 我室构建出 HCV NS3 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 并发现了一些新基因, 其中一个命名为 NS3TP1, GenBank 收录 AY116969。对其进行克隆化研究, 反应产物经测序完全符合计算机分析结果, 表明我们顺利得到了 NS3TP1 编码序列。NS3TP1 的 ORF 长度为 1 932 个核苷酸(nt), 编码 642 个氨基酸残基(aa)<sup>[5]</sup>。为进一步研究 NS3TP1 这一新基因的功能, 明确 HCV NS3 在丙型肝炎发病机制中的作用, 我们构建 NS3TP1 基因真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP1, 利用抑制性消减杂交技术<sup>[6]</sup> (suppression subtractive hybridization, SSH)筛选并克隆 NS3TP1 反式激活的靶基因, 推测其在体内可能存在功能的线索。

SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果<sup>[7]</sup>。我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS3TP1, 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 2 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 NS3TP1 反式激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 挑选 36 个克隆测序分析, 主要包括两种类型的序列, 即已知功能的基因序列和未知功能的基因序列。在本次实验中共获得 3 个差异表达的未知序列, 对其基因结构和功能正在研究之中。

在已知功能基因序列中, 主要包括以下几种类型: (1)细胞内结构与细胞生长相关蛋白, 如线粒体蛋白、核糖体蛋白、纤维结合素、β5- 微管蛋白、真核翻译起始因子、真核翻译延长因子等, 在细胞生长、分化、黏附中起重要作用。(2)参与细胞内代谢的蛋白基因, 如白蛋白在各种物质代谢中起运输作用, 并且是维持血浆胶体渗透压的重要物质。肝丙酮酸脱氢酶参与了三羧酸循环等的代谢。细胞色素 C 氧化酶是线粒体呼吸链的末端酶, 他是一个多亚单位的酶复合体, 功能是将电子从细胞色素 c 传递到分子氧, 并且为线粒体内膜提供一部分的电化学梯度。复合体由线粒体及核编码的共 13 个亚单位组成, 线粒体编码的亚单位是电子转运体并且有质子泵活性, 而核编码的亚单位功能尚不清楚, 但他们可能发挥了对于复合体的调控作用。本实验筛选到的细胞色素 c 氧化酶 IV 亚型 1(COX4I1)属于核编码的亚单位, 位于 NOC4 基因的 3' - 端, 并且与之共用一个启动子。这很可能说明了 HCV NS3 蛋白涉及到了线粒体的呼吸链, 改变了细胞的正常的能量代谢。(3)参与信号转导途径, 影响 HCV 与宿主细胞的相互反应, 导致肝硬化、肝癌等病理改变。如 CDC28 蛋白激酶属于细胞周期素依赖性激酶(CDK)家族, 是细胞由 G1 期到 S 期、G2 期到 M 期所必需, 影响着细胞分裂的过程<sup>[8]</sup>, 近年研究认为 CDK 在慢性肝炎向肝细胞癌(HCC)的转换过程

中具有十分重要的意义<sup>[9]</sup>. 蛋白激酶 WEE1 为一种细胞周期调节蛋白, 主要通过阻断 M 期启动因子(MPF), 包括 cdc2 激酶和细胞周期蛋白 B, 特异性的调控细胞 G2/M 的转换, 抑制细胞的有丝分裂. 既往研究发现, WEE1 激酶的活性和水平在 S 期均升高, 在细胞进入 M 期时则很快下降<sup>[10]</sup>, 研究者认为这种现象可能是由于当 DNA 的复制被阻断时, WEE1 激酶的降解就被抑制, 在进入 DNA 复制期间有一种因子可以使 WEE1 激酶保持持续的高水平直至进入 M 期, 推测这种因子即 c-Fos/AP-1<sup>[11]</sup>. 王建军 et al<sup>[12]</sup> 研究发现了 HCV 核心蛋白可以上调 WEE1 基因的表达, 而本研究则说明了 HCV NS3 也可以上调 WEE1 基因. RAS 癌基因家族 RAB10 为 RAS 样小分子量的 GTP 结合蛋白, 主要负责真核细胞内的膜运输. 癌基因 RAS 可以与 RAF 超家族结合, 从而启动 MAPK 信号转导途径<sup>[13]</sup>, HCV NS3 与 RAS 家庭成员相互作用的关系还需进一步的研究. 凋亡抑制子 IEX-1L, Wu et al<sup>[14]</sup> 于 1998 年克隆出来, 他们运用 mRNA 差异性展示技术发现了与早期即刻反应基因 IEX-1 同源的基因<sup>[15]</sup>, 但他在 IEX-1 编码区 211 位点上有 111 个核苷酸的插入, 故将之命名为 IEX-1L, 认为他是 IEX-1 未经过剪切的形式, 包含了 IEX-1 全部的内含子. IEX-1L 可以保护细胞免于由 Fas 或肿瘤坏死因子 (TNF) $\alpha$  介导的凋亡, 并且还发现用  $\alpha$  干扰素 (IFN) 处理 JurKat 细胞时, NF- $\kappa$ B 的细胞存活功能是通过 IEX-1L 来完成的, 因为他是惟一的核因子 (NF- $\kappa$ B) 蛋白调节基因. 本实验得到 NS3TP1 可以反式激活 IEX-1L, 提示了 NS3 蛋白与 IFN $\alpha$  治疗 HCV 时的耐药有关. (4) 肝外组织相关性基因. 如甲状腺激素受体相互作用蛋白 3 (TRIP3)、胰岛素样生长因子结合蛋白、皮肤 T 细胞淋巴瘤肿瘤抗原, 可能与 HCV 所致自身免疫性损伤有关, 但具体意义尚待进一步研究.

通过对 NS3TP1 的上述反式激活基因的分析, 我们发现他与体内物质代谢、信号转导、凋亡关系密切, 在病毒感染后肝细胞恶性变方面有一定的作用, 而且还与肝外组织有关, 这可能与 HCV 所致肝外疾患有一定的关系. NS3TP1 是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白 NS3 的存在下其功能被进一步激活. 关于其在体内与各种活性因子的具体调节机制, 仍需进行详细的实验来

研究. 对新基因的研究及其功能的确定是分子生物学领域一项很具有挑战性的工作, NS3TP1 抑制性消减文库的建立为研究其功能提供了理论依据, 并为 HCV 感染慢性化机制提供了新的研究方向.

#### 4 参考文献

- 1 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活 SV40 病毒早期启动子的研究. 解放军医学杂志 2003;28:44-46
- 2 Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Lan KH, Ono-Nita SK, Feng Z, Shiina S, Omata M. Poor association of TT virus viremia with hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000;20:247-252
- 3 牟劲松, 刘妍, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 及其对信号转导途径的影响. 国外医学·流行病学传染病学分册 2002;29:342-345
- 4 牟劲松, 刘妍, 王刚, 成军, 段惠娟, 李克, 陆荫英, 王琳, 王惠芬. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因. 世界华人消化杂志 2003;11:399-403
- 5 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活基因 1 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:237-240
- 6 Libikova H, Pogady J, Wiedermann V, Breier S. Search for herpetic antibodies in the cerebrospinal fluid in senile dementia and mental retardation. *Acta Virol* 1975;19:493-495
- 7 Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277:15035-15043
- 8 Russo GL, van den Bos C, Sutton A, Coccetti P, Baroni MD, Alberghina L, Marshak DR. Phosphorylation of Cdc28 and regulation of cell size by the protein kinase CKII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2000;351:143-150
- 9 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 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. 世界华人消化杂志 2003;11:1255-1258
- 10 Michael WM, Newport J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee1. *Science* 1998;282:1886-1889
- 11 Kawasaki H, Komai K, Ouyang Z, Murata M, Hikasa M, Ohgiri M, Shiozawa S. c-Fos/activator protein-1 transactivates wee1 kinase at G(1)/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cells. *EMBO J* 2001;20:4618-4627
- 12 王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 杨艳杰. 丙型肝炎病毒核心蛋白上调细胞周期调节蛋白 Wee1 基因表达研究. 世界华人消化杂志 2003;11:947-950
- 13 纪冬, 成军. 乙型肝炎和丙型肝炎病毒对 MKP 蛋白信号转导影响的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:200-202
- 14 Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- $\kappa$ B-mediated cell survival. *Science* 1998;281:998-1001
- 15 Kondratyev AD, Chung KN, Jung MO. Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Research* 1996;56:1498-1502