

- 16 Nakane M, Hsieh G, Miller LN, Chang R, Terranova MA, Moreland RB, Kolasa T, Brioni JD. Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: synergism of nitric oxide and YC-1. *Int J Impot Res* 2002;14:121-127
- 17 Pyatakova NV, Khropov YV, Churakov AM, Tarasova NI, Serezhenkov VA, Vanin AF, Tartakovsky VA, Severina IS. Derivatives of benzotetrazine-1, 3-dioxide are new NO-donors, activators of soluble guanylate cyclase, and inhibitors of platelet aggregation. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:329-334
- 18 Mizusawa H, Hedlund P, Brioni JD, Sullivan JP, Andersson KE. Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. *J Urol* 2002;167:2276-2281
- 19 Semple-Rowland SL, Tepedino M, Coleman JE. Pinopsin mRNA levels are significantly elevated in the pineal glands of chickens carrying a null mutation in guanylate cyclase-1. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;97:51-58
- 20 Gregan J, Lindner K, Brimage L, Franklin R, Namdar M, Hart EA, Aves SJ, Kearsey SE. Fission yeast Cdc23/Mcm10 functions after pre-replicative complex formation to promote Cdc45 chromatin binding. *Mol Biol Cell* 2003;14:3876-3887
- 21 Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- 22 Hart EA, Bryant JA, Moore K, Aves SJ. Fission yeast Cdc23 interactions with DNA replication initiation proteins. *Curr Genet* 2002;41:342-348
- 23 Mohri K, Ono S. Actin filament disassembling activity of *Caenorhabditis elegans* actin-interacting protein 1 (UNC-78) is dependent on filament binding by a specific ADF/cofilin isoform. *J Cell Sci* 2003;116:4107-4118
- 24 Miao J, Kusafuka T, Udatsu Y, Okada A. Mutation analysis of the BCL10 gene in childhood solid malignancies. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:543-546
- 25 Kawano T, Iwase S, Nakayama R, Horiguchi-Yamada J, Kobayashi M, Yamada H. Lack of BCL10 mRNA mutation in lymphoid malignancies. *Anticancer Res* 2002;22:305-309
- 26 Park YK, Park HR, Kim YW, Chi SG, Unni KK. Lack of Bcl10 mutations in malignant cartilaginous tumors. *Int J Mol Med* 2002;9:217-219
- 27 Vermeer H, Hendriks-Stegeman BI, van der Burg B, van Buul-Offers SC, Jansen M. Glucocorticoid-induced increase in lymphocytic FKBP51 messenger ribonucleic acid expression: a potential marker for glucocorticoid sensitivity, potency, and bioavailability. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:277-284
- 28 Neye H. Mutation of FKBP associated protein 48 (FAP48) at proline 219 disrupts the interaction with FKBP12 and FKBP52. *Regul Pept* 2001;97:147-152
- 29 Krummrei U, Baulieu EE, Chambraud B. The FKBP-associated protein FAP48 is an antiproliferative molecule and a player in T cell activation that increases IL2 synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2444-2449
- 30 Geng L, Pfister S, Kraeft SK, Rudd CE. Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11527-11532
- 31 Ikeda Y, Suehiro T, Ohsaki F, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K. Relationships between polymorphisms of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;60:79-85
- 32 Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468-474
- 33 Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-44449
- 34 Porcellini A, Messina S, De Gregorio G, Feliciello A, Carlucci A, Barone M, Picascia A, De Blasi A, Avvedimento EV. The expression of the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor and the cAMP-dependent protein kinase RII beta regulatory subunit confers TSH-cAMP-dependent growth to mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 2003;278:40621-40630
- 35 Glenn HL, Jacobson BS. Cyclooxygenase and cAMP-dependent protein kinase reorganize the actin cytoskeleton for motility in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55:265-277
- 36 Bariagaber AK, Whalen MM. Decreased adenylyl cyclase and cAMP-dependent protein kinase activities inhibit the cytotoxic function of human natural killer cells. *Hum Immunol* 2003;64:866-873
- 37 Wong LF, Harding T, Uney J, Murphy D. cAMP-dependent protein kinase A mediation of vasopressin gene expression in the hypothalamus of the osmotically challenged rat. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:82-90

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 •

大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因是一种新型琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因

成军, 王刚, 刘妍, 邵得志, 张玲霞, 陈菊梅

成军, 王刚, 刘妍, 邵得志, 张玲霞, 陈菊梅, 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
国家自然科学基金资助课题, No. C39970674, No. C03011402
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 应用分子生物学和生物信息学方法, 寻找、克隆大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因, 阐明LRRP1基因的结构和功能, 为研究肝脏再生调节的分子生物学机制奠定基础。

方法: 利用美国国立卫生研究院建立的核苷酸数据库

(GenBank)以及相应的核苷酸序列同源性搜索分析软件(BLASTN),以大鼠的LRRP1的cDNA序列作为参照,对于人的同源性cDNA序列进行搜索分析,寻找人的LRRP1的同源基因序列.利用蛋白质一级结构序列的数据库以及相应的同源蛋白序列的搜索分析,阐明人LRRP1蛋白质一级结构与已知蛋白序列的同源性,从而根据蛋白质一级结构的相似性,对于新克隆基因进行功能方面的预测分析.应用在线软件的分析,对于人LRRP1蛋白质一级结构序列进行分析预测,分析其氨基末端序列是否具有信号肽序列,以判断人LRRP1蛋白是否是一种可以分泌表达的蛋白;同样对人LRRP1蛋白质一级结构序列进行在线软件的分析,对于人LRRP1蛋白质分子结构中的潜在的糖基化位点以及其他类型的修饰位点进行预测.

结果:人的LRRP1的编码基因由480 nt组成,编码产物由159 aa组成.人LRRP1的蛋白质一级结构序列与人琥珀酸脱氢酶亚单位D、牛琥珀酸脱氢酶亚单位D高度同源,同源性分别为79% (126/159),78% (123/156).人LRRP1是一种分泌蛋白,在其分子结构中具有N-糖基化位点、蛋白激酶C磷酸化位点和豆蔻脂化修饰位点.

结论:人LRRP1蛋白是一种新型的琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因.

成军, 王刚, 刘妍, 邵得志, 张玲霞, 陈菊梅. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因是一种新型琥珀酸脱氢酶的亚单位编码基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1714-1717

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1714.asp>

0 引言

肝脏是一种具有极强的再生能力的器官之一.正常肝脏一般都处于静止状态,但是如果出现肝脏损伤的情况,如肝脏部分切除(手术)、化学性肝损伤(药物中毒)、病毒感染后的肝损伤(各种急、慢性病毒性肝炎)、肝脏肿瘤(肝细胞癌)等原因造成肝脏细胞损伤和坏死,都可以立即诱发和启动肝脏的再生过程^[1-3].肝脏损伤和再生的过程涉及到非常复杂的分子生物学机制,研究肝脏再生的分子生物学机制,探索参与肝脏再生过程的因素及其调节作用,对于肝脏疾病的防治、探索新型的治疗方法和药物具有十分重要的意义.为了研究在肝再生过程中参与的新的基因,我们首先建立了肝脏部分切除的大鼠模型,对于静止期肝脏和再生过程中的肝脏的基因表达谱,利用抑制性消减杂交(SSH)技术进行筛选^[4-6],获得了一系列与肝脏再生相关的基因类型,其中包括大鼠肝脏再生相关蛋白1(LRRP1)^[7].为了研究不同种属生物LRRP1的同源基因,探索其生物学功能,我们利用生物信息学(bioinformatics)技术^[8-10]对于大鼠LRRP1的人的同源基因进行了研究和分析,发现人LRRP1是一种琥珀酸脱氢酶的新的亚单位.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠LRRP1的基因克隆化的基本过程见文献.人LRRP1的基因克隆化利用不同种属生物基因同源的原理,利用美国国立卫生研究院(NIH)的生物工程研究所(NCBI)建立的核苷酸数据库 GenBank 进行同源基因序列的比对和搜索,发现 cDNA 序列 AY358788 与我们克隆的大鼠的 LRRP1 的 cDNA 序列有高度的同源性. AY358788 基因序列是基因组研究计划中的一部分,并不是功能性的克隆化策略,也不清楚 AY358788 这一基因存在的真实性和生物学功能.从核苷酸序列同源性的比对结果来看,AY358788 基因与我们的 LRRP1 基因序列有着高度的同源性,认为 AY358788 就是大鼠 LRRP1 的人的同源基因序列.

1.2 方法 以人的LRRP1蛋白质一级结构序列作为参照,应用蛋白质一级结构序列的数据库进行分析(<http://www.ncbi.nlm.gov.nih/blast/swissprot>),在蛋白质一级结构序列的常用数据库 Swissprot 数据库发现了人的 LRRP1 与人的琥珀酸脱氢酶亚单位 D 和牛的琥珀酸脱氢酶亚单位 D 高度同源.因为人 LRRP1 的蛋白质一级结构与人的琥珀酸脱氢酶 D 亚单位的序列高度同源,但又不完全一致,因而对于人 LRRP1 的结构和功能的预测具有非常重要的价值.目前根据已知蛋白信号肽序列的性质和比较结果,建立了蛋白信号肽序列的预测方法和计算机软件系统,我们应用在线软件系统 <http://www.stepc.gr/cgi-synaptic/sigfind>,对于人 LRRP1 蛋白质信号肽序列进行预测分析.对于人 LRRP1 蛋白质潜在修饰位点序列的计算机预测,应用的软件系统是 <http://us.expasy.org/prosite>.

2 结果

2.1 人LRRP1的基因克隆化 利用生物信息学技术,发现在核苷酸序列数据库 GenBank 中存在与大鼠 LRRP1 的同源的来源于人的基因序列.其中一段 cDNA 序列与大鼠 LRRP1 的基因序列高度同源,从而确定为人的 LRRP1,即大鼠 LRRP1 的人的同源基因.对于人 LRRP1 的基因序列及其编码产物的一级结构进行分析,结果表明人 LRRP1 的编码基因序列为 480 nt,编码产物由 159 aa 组成 (图 1).

```
ATG GCG GTT CTC TTA AAG CTG GGC GTT CTC
M A V L L K L G V L
TGC AGT GGC CAA GGA GCT CGA GCT CTC CTA
C S G Q G A R A L L
CTC CGA AGC CGG GTG GTC AGA CCC GCT TAT
L R S R V V R P A Y
GTG TCA GCA TTT CTC CAG GAC CAG CCT ACC
V S A F L Q D Q P T
CAA GGA CGG TGT GGT ACC CAG CAC ATT CAC
Q G R C G T Q H I H
CTG TCA CCA AGC CAC CAC TCT GGT TCC AAG
L S P S H H S G S K
```

GCT GCA TCT CTC CAC TGG ACC AGT GAG AGG
 A A S L H W T S E R
 GTT GTC AGT GTT CTG CTC TTG GGG CTG ATC
 V V S V L L L G L I
 CCT GCT GGG TAC TTG AAT CCC TGC TCT GTG
 P A G Y L N P C S V
 GTG GAC TAC TCT CTG GCT GCA GCC CTC ACC
 V D Y S L A A A L T
 CTG CAC AGT CAC TGG GGC CTT GGA CAA GTG
 L H S H W G L G Q V
 GTT ACC GAC TAC GTT CAT GGG GAC ACC CTG
 V T D Y V H G D T L
 CCG AAG GCT GCC AGG GCA GGC CTC TTG GCA
 P K A A R A G L L A
 CTC TCA GCT TTG ACC TTT GCT GGG CTT TGC
 L S A L T F A G L C
 TAC TTC AAT TAC CAC GAT GTC GGC ATC TGC
 Y F N Y H D V G I C
 AGA GCG GTT GCC ATG CTG TGG AAG CTC TGA
 R A V A M L W K L *

图1 大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因及其编码产物一级结构序列。

2.2 人LRRP1蛋白同源序列的分析 以人的LRRP1蛋白质一级结构序列作为参照,对于蛋白质一级结构序列的数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/swissprot>)进行搜寻,发现人LRRP1的蛋白质一级结构序列与人琥珀酸脱氢酶亚单位D、牛琥珀酸脱氢酶亚单位D高度同源,同源性分别为79% (126/159), 78% (123/156),表明人LRRP1属于琥珀酸脱氢酶亚单位D的一个新的同源蛋白(图2),其基本功能就是构成琥珀酸脱氢酶。

2.3 人LRRP1蛋白的信号肽序列分析 利用生物信息学技术的在线分析(<http://www.stepc.gr/cgi-synaptic/sigfind>),对于人LRRP1的潜在的信号肽序列进行分析,发现人LRRP1蛋白质序列中的氨基末端45个氨基酸残基(MAVLLKLGVLCSGQGARALLLSRVVRPAYV

SAFLQDQPTQGRCG)组成了人LRRP1的信号肽序列,表明人LRRP1是一种可以分泌的蛋白类型。

2.4 人LRRP1蛋白质结构中潜在修饰位点的分析 利用在线软件(<http://us.expasy.org/prosite/>)对于人LRRP1蛋白质一级结构中存在的潜在的修饰位点进行分析,结果表明:在人LRRP1蛋白分子结构中,第68-70位的氨基酸残基序列(SER)存在潜在的蛋白激酶C(PKC)的磷酸化位点;在89-92 aa(SVVD)存在酪蛋白激酶II磷酸化位点;在8-13 aa(GVLC SG)、58-63 aa(GSKAAS)、78-83 aa(GLIPAG)、108-113 aa(GQVVTD)和148-153 aa(GICRAV)分别存在潜在的N-豆蔻脂化位点。

3 讨论

许多与细胞周期、细胞凋亡和细胞信号转导相关的基因几乎都参与了肝脏再生的分子生物学调节机制和过程^[11-15]。我们采用肝脏70%手术切除后12h时间点,此时的基因表达对于早期阶段肝脏再生过程的调控具有十分重要的意义。由于本项研究旨在发现肝脏再生过程中相关的新的基因序列,因此我们采用的技术途径和方法主要是抑制性消减杂交(SSH, suppression subtractive hybridization)技术。这种SSH技术,对于2个具有可比性的系统的基因表达谱进行比较研究,但是对于研究的对象基因又没有先决条件,所以是一种十分有效的研究技术途径,这一点优于基因表达谱新技术,因在基因表达谱芯片技术研究中,芯片制备时点样的基因类型就决定了表达谱芯片的检测范围,因而不利于发现更多的新的基因类型。我们对于大鼠70%肝脏部分切除模型的基因表达谱进行分析,发现了一种新的基因,命名为LRRP1,本文应用生物信息学技术,确定了人LRRP1的核苷酸和蛋白质一级结构序列。利用在线软件分析结果表明,人LRRP1是一种分泌性的蛋白类型,在其蛋白质一级结构的氨基末端有一段由45 aa组成的信号肽序列。对于已知蛋白序列数据库的搜索结果表明,人LRRP1是一种新型的琥珀酸脱氢酶复合体亚单位分子。在人LRRP1分子结构中,还存在着潜在的N-糖基化位点、PKC磷酸化位点和豆蔻脂化位点等。

人 LRRP1:	1	MAVLLKLGVLCSGQGARVXLLRSWVVRHAYVSAFLQDQPTQGRCGTQHIHLSPSHHSGSK	60
人 SH-D:	1	MAVLWRLSAVCGALGGRALLRTPVVRPAHISAFQDRPIEWCGVQHIHLSPSHHSGSK	60
牛 SH-D:	1	MAVLWRLSVLCGAKEGRALFLRTPVVRPALVSAFLQDRPAQGWCGTQHIHLSPSHHSGSK	60
人 LRRP1:	61	AASLHWTSEVVSVLLGLIPAGYLNPCSVVDYSLAAALTLHSHWGLGQVVTDYVHGDTL	120
人 SH-D:	61	AASLHWTSEVVSVLLGLLPAAYLNPCSAMDYSLAAALTLHGHWGLGQVVTDYVHGDA	120
牛 SH-D:	61	AASLHWTGERVVSVLLGLIPAAAYLNPCSAMDYSLAATLTLHSHWGLGQVVTDYVHGDAV	120
人 LRRP1:	121	PKAPRAGLLALSAPTFAGLCYFNYHDVGICRAVAMLWKL	159
人 SH-D:	121	QKAAKAGLLALSALTFAAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL	159
牛 SH-D:	121	QKAAKTGLLVLSAFTFAAGLCYFNYHDVGICKAVAMLWKL	159

图2 人LRRP1与人、牛琥珀酸脱氢酶蛋白质一级结构的序列比较。人LRRP1:大鼠肝再生相关基因LRRP1的人同源基因编码产物;人SH-D:人琥珀酸脱氢酶亚单位D;牛SH-D:牛琥珀酸脱氢酶亚单位D。

在肝脏再生的调节机制中,一系列的生长因子参与这一复杂的调节过程,如肝细胞生长因子(HGF)、肝再生增强因子(ALR)、表皮生长因子(EGF)等.特别是ALR在肝脏再生中的作用近年来受到了广泛的重视.寻找与肝脏再生相关的新型蛋白药物,利用基因重组技术表达纯化促进肝脏再生的新型药物,具有十分重要的意义.我们利用基因工程技术,经过发酵和蛋白质纯化等过程,制备了重组的人ALR蛋白,在体内实验中发现这种生长因子蛋白可以显著减轻四氯化碳引起的小鼠的急性肝损伤,为进一步推进重组ALR的产业化,奠定了坚实的基础^[16-19].

4 参考文献

- 1 成军. 新基因结构与功能研究的策略. 世界华人消化杂志 2003; 11:373-377
- 2 成军. 病毒性肝炎发病机制相关基因克隆化的研究策略. 解放军医学杂志 2003;28:757-761
- 3 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004; 12:1-5
- 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, 党晓燕, 王春花. 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. 世界华人消化杂志 2004;12:843-846
- 6 党晓燕, 成军, 邓红, 王建军, 杨倩, 刘妍, 纪冬, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆HCV NS3蛋白反式激活基因2的上调基因. 世界华人消化杂志 2004;12:847-850
- 7 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因LRRP1的克隆化. 世界华人消化杂志 2002;10:165-168
- 8 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 牛丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 中国人兽共患病杂志 2003;19:73-76
- 9 成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 王刚, 张玲霞. 猪丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6同源基因的克隆化研究. 生物学杂志 2003; 20:10-13
- 10 成军, 李克, 王琳, 刘妍, 钟彦伟, 李莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6猴同源基因的克隆化与序列分析. 中西医结合肝病杂志 2003;14:354-357
- 11 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 钟彦伟. 大鼠肝再生增强因子基因组DNA的克隆化与序列分析. 临床肝胆病杂志 2001;17:36-37
- 12 董菁, 成军, 刘友昭, 王勤环, 王刚, 施双双. 大鼠肝再生增强因子假基因的克隆化与序列分析. 中华肝脏病杂志 2001;9:105-107
- 13 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 14 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
- 15 成军, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 肝再生增强因子的作用机制. 临床肝胆病杂志 2002;18:146-148
- 16 王永华, 成军, 洪源, 王琳, 刘妍, 张健, 李克. 重组人肝再生增强因子对小鼠CCl₄中毒性肝损伤的治疗作用. 世界华人消化杂志 2004;12:859-861
- 17 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of human augmenter of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:87-91
- 18 Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmenter of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 19 Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screening of augmenter of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:81-84

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 •

酵母双杂交筛选白细胞中新基因NS3TP6结合蛋白基因

邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 卢成哲, 梁耀东, 刘敏, 李强

邵清, 成军, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强, 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

白雪帆, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科 陕西省西安市 710039
卢成哲, 中国人民解放军解放军第206医院CT室 吉林省通化市 134001
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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 用酵母双杂交技术筛选白细胞中与丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白3(NS3)反式调节靶基因编码产物NS3TP6

蛋白结合蛋白的基因。

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HCV NS3TP6蛋白基因, 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, 增菌后提取质粒, 转化入大肠杆菌, 提取质粒并测序, 进行生物信息学分析。

结果: 成功克隆出HCV NS3TP6蛋白基因并在酵母细胞中表达 配合后选出在四缺(SD/-Trp-Leu-Ade-His)培养基和铺有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共7个, 其中3个人类白细胞CD14抗原, 1个人类免疫球蛋白轻链, 3个人类推定蛋白基因