

应用基因表达谱芯片技术筛选 NS4ATP2 蛋白反式调节基因

杨 媛, 成 军, 赵英仁, 黄燕萍, 刘 妍

杨媛, 成军, 黄燕萍, 刘妍, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
赵英仁, 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、五科技攻关项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 对丙型肝炎病毒非结构蛋白 4A(HCV NS4A)反式激活新基因 NS4ATP2 转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制及其生物学功能。

方法: 应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和 pcDNA3.1(-)空载体分别转染的 HepG2 细胞的 mRNA 的差异性表达进行检测。

结果: 基因表达谱芯片所检测的 1152 条目的基因均为 GenBank 中登录的基因, NS4ATP2 表达质粒转染的细胞有 29 条差异表达基因, 其中 12 条基因表达增强, 17 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞信号转导、凋亡、肿瘤的发生密切相关。

结论: 基因表达谱芯片技术对于初步探索新基因的功能提供重要的资料。本实验结果为进一步阐明 NS4ATP2 生物学功能及 HCV-NS4A 的致病机制提供了理论依据。

杨媛, 成军, 赵英仁, 黄燕萍, 刘妍. 应用基因表达谱芯片技术筛选 NS4ATP2 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1901-1904
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1901.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链RNA病毒, 基因组的长度约 10 kb, 编码一种多蛋白形式, 然后在 HCV 丝氨酸蛋白酶和宿主细胞信号肽酶的联合作用下, 裂解成为 10 余种结构和非结构蛋白, 其中非结构蛋白区包括 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B。近年来, HCV NS4A 的结构与功能倍受关注, NS4A 蛋白分子由 54 个氨基酸残基组成。在丝氨酸蛋白酶裂解活性、NS5A 蛋白磷酸化修饰和免疫应答的调节中具有十分重要的功能, 近来研究显示其还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长、凋亡以及免疫调节等功能^[1-5]。我们利用抑制性消减杂交(SSH)技术, 对于 NS4A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 发现了 NS4A 蛋白上调一些基因的表达。其中包括一未知功能基因, 命名

为 NS4ATP2。我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 NS4ATP2 反式调节的靶基因进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究新基因 NS4ATP2 功能及 NS4A 的反式调节作用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司, pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 由本室构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及取材 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 FuGENE6 将 2 μg pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5 × 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 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 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℃ 和 70℃ 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 s、18 s 条带变化。

1.2.3 探针标记 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 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μg), 乙醇沉淀后溶解在 20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中。

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、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、信号转导相关基因等。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 × 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。

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95℃ 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95℃ 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干。将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42℃ 预杂交 5-6 h。

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95℃ 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95℃ 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上, 用盖玻片

覆盖,置于杂交舱中,用Parafilm密封,放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h).依次以2×SSC+2 g/L SDS、1 g/L×SSC+2 g/L SDS、1 g/L×SSC洗涤10 min,室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 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ImaGene3.0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 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总RNA的定性、定量分析 实验组和对照组总RNA的吸光度 A_{260}/A_{280} 值分别为2.02和2.01,热稳定实验70℃保温1 h与-20℃ 1 h的电泳条带比较,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.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1152个cDNA.为了监控芯片杂交体系,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.在基因芯片的扫描分析中,发现有12种基因的表达水平上调(表1),有17种基因的表达水平下调(表2).

表1 表达显著增强的基因

编号	Cy5/Cy3	编码蛋白
1	2.728	癌基因下调/相关的细胞黏附分子(CDON)
2	2.412	胶原质, VI型 $\alpha 3$ (COL6A3)转录变体1
3	2.338	骨形态生成蛋白受体, II型(丝氨酸/苏氨酸激酶)(BMP2)转录变体1
4	2.204	2RAD54同源蛋白(BRAD54B), 转录变体1
5	2.179	SYNJ1, 转录变体2
6	2.140	锌指蛋白和BTB8(ZBTB8)
7	2.124	TTK蛋白激酶
8	2.093	细胞周期蛋白激酶(CDC2-类似)11(CDK11)
9	2.073	周期同族体1(PER1)
10	2.036	Cullin3(CUL3)
11	2.010	假想丝氨酸富集蛋白
12	2.008	TBP类似物1

3 讨论

HCV NS4A蛋白核心部位的多肽结构是NS3丝氨酸蛋白酶生物学活性重要的辅助因子^[6]. NS3的丝氨酸蛋白酶活性参与NS3-NS4A、NS4A-NS4B、NS4B-NS5A、NS5A-NS5B之间的裂解过程. HCV的这种丝氨酸蛋白酶的生物学

活性是HCV复制过程中重要的调节机制之一,因此NS4A在HCV的复制过程中发挥着重要的作用.另外, HCV NS4A蛋白对于NS5A蛋白的磷酸化修饰具有重要的调节作用^[7], NS4A蛋白与NS4B、NS5A之间的结合,是NS4B-NS5A之间连接部位发生裂解的重要条件.近来研究发现, NS4A能够抑制双链RNA激活蛋白酶(PKR)的功能,从而下调IFN刺激的抗病毒效应^[1]; NS4A抑制细胞周期调节基因p21/Waf1的表达,从而产生翻译抑制效应,增加某种细胞内蛋白的降解^[8-9],与HCV的感染及增加病毒在体内的存活有关.可见, HCV非结构蛋白NS4A的反式激活功能在HCV致病中发挥了重要作用.

我们课题组利用SSH技术筛选出HCV NS4A反式激活基因差异表达的cDNA消减文库,对挑选的克隆进行分析发现其中一个新基因与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性,将该未知功能基因命名为NS4ATP2.我们用基因芯片技术筛选NS4ATP2的反式调节基因,结果表明, 12种基因的表达水平上调, 17种基因的表达水平下调, 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号传导、肿瘤发生等基因, 如癌基因下调/相关的细胞黏附分子、CUL3、TTK蛋白激酶、周期同族体1、生长抑制家族成员1转录变体1、BSG转录变体1、热休克蛋白8转录变体1、基质金属蛋白酶28、TAF7聚合酶II, TATA盒结合蛋白相关因子等.

在表达显著增加的基因中, 癌基因下调/相关的细胞黏附分子(CDON)是细胞表面球蛋白超家族成员, 研究

表2 表达显著下降的基因

编号	Cy5/Cy3	编码蛋白
1	0.315	BSG 转录变体1
2	0.331	蛋白酶体26S亚单位, ATP酶, 3(PSMC3)
3	0.335	锌指蛋白547(ZNF547)
4	0.415	钙通道, 电压依赖, L型, $\alpha 1C$ 亚单位(CACNA1C)
5	0.416	纤维蛋白溶酶原激活剂, 尿激酶受体(PLAUR)
6	0.420	基质金属蛋白酶28(MMP28), 转录变体2
7	0.425	膀胱癌相关蛋白
8	0.443	生长抑制家族成员1(ING1)转录变体1
9	0.446	阴离子交换剂SLC4A3
10	0.478	蛋白激酶, DNA-激活, 接触反应多肽(PRKDC)
11	0.480	TAF(TBP相关因子)7RNA聚合酶II, TATA盒结合蛋白(TBP)-相关因子(TAF7)
12	0.483	ATP结合盒, 亚家族B(MDR/TAP)6
13	0.486	眼癌结合蛋白4
14	0.489	热休克蛋白8(HSPA8)转录变体1
15	0.491	异质核糖核糖体蛋白K(HNRPK)转录变体1
16	0.495	TRAF和TNF受体相关蛋白
17	0.498	混合激酶相关激酶MRK- β

发现在肺癌、乳癌及卵巢癌中存在该基因的杂合丢失^[10], 故其功能的丢失可能在癌症的发生中起到一定的作用. CUL3是一种细胞的负性调节因子, 应用免疫共沉淀法及对CUL3基因敲除鼠的研究发现CUL3可与细胞周期素E特异性结合, 并刺激细胞周期素E的聚集, 对于细胞周期素E普遍泛素化起重要作用, 对细胞循环的S期进行异常调节, 导致了处于S期的细胞频率的增加^[11]. CUL3在组织中广泛表达, 近来发现在COL0205结肠癌细胞中表达增加, 因此CUL3可能参与细胞异常增生的调节^[12]. TTK蛋白激酶(TTK)的激酶区可明显增加磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸及磷酸酪氨酸的水平, 在许多良性组织中, 不能检测到TTK的mRNA, 而在恶性肿瘤分离的细胞中均检测到了TTK的mRNA, 故提出TTK可能通过使丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化参与细胞的增殖^[13]. 周期同族体1(PER1)是生理循环的转录因子, 作为一种负性调节元件, 其启动子可作为多个信号分子的传感器, 但不能与DNA直接结合, 提示其可能通过间接方式发挥转录抑制效应^[14]. RAD54B参与同源重组(HR)、有丝分裂和减数分裂重组及双链缺损的修复. 在人的淋巴和结肠癌中, RAD54B的高度保守区发生同源突变, 这些结果显示一些癌症的发生可能是通过RAD54B功能的改变来实现的^[15].

在表达显著降低的基因中, 生长抑制家族成员1(ING1)转录变异体1是肿瘤抑制基因ING多种变异体之一, 已证实ING1在细胞凋亡和衰老等过程中发挥重要作用. 同时ING蛋白的生化功能参与转录调节、细胞循环、DNA修复和凋亡^[16], 在信号转导过程中与p53/TP53协同作用, 通过调节p53依赖的p21/Waf1转录活性来负性调节细胞生长的通路^[17]. Garkavtsev *et al*^[18]研究发现ING1具有肿瘤抑制的特征, 该基因在一些乳癌细胞系发生杂合丢失, 在成纤维细胞瘤细胞中发生基因突变, 从而表达降低, 故其失活可促进癌症的发生. 目前研究发现ING1具有不同转录变异体, 但是是否不同的转录变异体编码不同蛋白, 并发挥不同作用的报道十分有限. BSG转录变异体1所编码的蛋白是免疫球蛋白家族成员之一, 与整合素之间相互作用在BSG信号通路中发挥重要的作用, BSG主要存在于肿瘤细胞的表面, 可触发间充质细胞和肿瘤细胞中基质金属蛋白酶的产生和释放, 由此引起肿瘤的侵袭^[19]. 热休克蛋白8(HSPA8)转录变异体1可调节压力激活蛋白酶对JNK的抑制, 通过抑制细胞的凋亡程序来促进细胞的存活. 基质金属蛋白酶28(MMP28)在组织动态平衡和修复过程中发挥着重要的作用, 在上皮细胞修复过程中与细胞的增殖相关, 在肿瘤中广泛表达, 可调整基膜或降低角质细胞间的黏附蛋白, 从而促进细胞的迁移^[20]. TAF7聚合酶II, TATA盒结合蛋白相关因子(TAF7), 对于激活因子依赖的转录是必要的^[21], 通过蛋白与蛋白之间的相互作用而发挥其功能. 目前研究发现TAF7在HEK293和COS细胞中可提高c-Jun激活功能,

可作为c-Jun协同调节因子, 与c-Jun的N-端和C-端部分相互作用, 调节AP-1靶基因的活性, 作用于细胞外信号^[22], 从而参与细胞的生长、增殖、凋亡及炎症与肿瘤的发生.

通过对NS4ATP2基因芯片结果的分析, 我们发现其与体内细胞的生长、信号转导和凋亡关系密切, 因此在病毒感染后肝细胞恶性变方面可能发挥一定的作用. NS4ATP2是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白NS4A的存在下其功能被进一步激活. NS4ATP2蛋白能够上调或下调HepG2细胞中许多不同基因的表达, 这些基因变化是复杂的, 而本研究对于初步了解新基因在肝细胞中的生物学效应提供了一些线索, 值得注意的是NS4A可通过抑制p21/Waf1从翻译水平降低某些蛋白的表达, 目前在对HCV的抗病毒治疗中又提出了联合应用NS3-NS4A蛋白水解酶抑制剂来抑制病毒复制并促进病毒的清除^[23]; 本研究发现NS4ATP2可下调ING1转录变异体1, 而ING1也可调节p53依赖的p21/Waf1通路, 那么二者之间又存在着如何的关系, 他们在复杂的细胞分子网络中是如何发挥作用的, 都值得我们继续深入的研究, 以期能对HCV慢性化感染及不良结局的发病机制与临床治疗有所帮助.

4 参考文献

- 1 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001; 59:1271
- 2 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 3 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661
- 4 Gong G, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599
- 5 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS4A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 6 Howe AY, Chase R, Taremi SS. A novel recombinant single-chain hepatitis C virus NS3-NS4A protein with improved helicase activity. *Protein Sci* 1999;8:1332-1341
- 7 Asabe SI, Tanji Y, Satoh S. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol* 1997;71:790-796
- 8 Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 2002; 90:119-131
- 9 Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66:187-199
- 10 Kang JS, Gao M, Feinleib JL, Cotter PD, Guadagno SN, Krauss RS. CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *J Cell Biol* 1997;138:203-213
- 11 Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 1999;13:2375-2387
- 12 Du M, Sansores-Garcia L, Zu Z, Wu KK. Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-

- 3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem* 1998;273:24289-24292
- 13 Mills GB, Schmandt R, McGill M, Amendola A, Hill M, Jacobs K, May C, Rodricks AM, Campbell S, Hogg D. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem* 1992;267:16000-16006
- 14 Motzkus D, Maronde E, Grunenber U, Lee CC, Forssmann W, Albrecht U. The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett* 2000;486:315-319
- 15 Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Sumii K, Kajiyama G, Kamada N, Miyagawa K, Kamiya K. Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene* 1999;18:3422-3426
- 16 Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2597-2613
- 17 Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature (Lond)* 1998;391:295-298
- 18 Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14:415-420
- 19 Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003;18:981-987
- 20 Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001;265:87-93
- 21 Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995;267:531-536
- 22 Munz C, Psichari E, Mandilis D, Lavigne AC, Spiliotaki M, Oehler T, Davidson I, Tora L, Angel P, Pintzas A. TAF7 (TAFII55) plays a role in the transcription activation by c-Jun. *J Biol Chem* 2003;278:21510-21516
- 23 Lin K, Kwong AD, Lin C. Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4784-4792

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助, 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
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)X 蛋白(HBxAg)对前 -X 基因启动子的调节作用, 研究 HBxAg 在 HBV 致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 应用聚合酶链反应(PCR)扩增 HBV 前 X 基因启动子, 以 T-A 克隆法, 将前 -X 基因启动子(promoter)的基因片段连入载体 pGEM-T。将获得的质粒 pGEMT-前 -X-promoter 与报告质粒 pCAT3-basic 分别用 *KpnI* 和 *BglII* 双酶切后构建前 -X 启动子报告基因表达载体 pCAT3-前 -

X-promoter, 以重组表达质粒 pCAT3-前 -X-promoter 分别与 pCDNA3.1 空载体和 HBxAg 表达载体 pCDNA-HBxAg 瞬时转染 HepG2 细胞, 以转染 pCAT3 basic 的 HepG2 细胞为阴性对照, 48 h 后收获细胞。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解 HBxAg 对前 X 基因启动子的调节作用。

结果: 构建的报告载体 pCAT3-前 -X-promoter 经过序列分析和酶切鉴定正确。真核表达载体 pCDNA3.1(-)-X 和 pCAT3-前 -X-promoter 共转染的 HepG2 细胞的 CAT 表达活性是 CAT3 启动子的 3.12 倍, 是 pCAT3-前 -X-promoter 的 2.65 倍, 是 pCAT3-3.1 空载体和 pCAT3-前 -X-promoter 共转染的 2.28 倍。

结论: HBxAg 可以上调乙型肝炎病毒基因组中前 -X 基因启动子的活性。

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 张树林. 乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1904-1906
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1904.asp>