

酵母双杂交技术筛选 HCV F 蛋白结合蛋白基因

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 张树林

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 丙型肝炎病毒(HCV)F蛋白是一个新的HCV基因产物, 其生物学特性目前尚不明确, 我们应用酵母双杂交系统技术进行筛选F蛋白结合蛋白基因。

方法: 构建F蛋白诱饵质粒, 转化酵母AH109后与含肝细胞cDNA文库质粒的酵母Y187进行配合, 在涂有X- α -gal营养缺陷型培养基(SD/-Trp-Leu-His-Ade)上筛选生长。挑选蓝色克隆, 提取此酵母克隆的质粒, 转化大肠杆菌提取质粒DNA后测序, 进行生物信息学分析。

结果: 筛选出36个与F蛋白特异性相互作用的克隆, 其中11个为人类酶原颗粒蛋白, 5个锌指蛋白, 6个SL15蛋白, 2个过氧化物酶体离子蛋白酶, 1个补体调节蛋白因子, 2未知功能基因。

结论: 克隆到的基因对以后研究F蛋白的功能有一定提示作用。

黄燕萍, 成军, 王琳, 杨倩, 杨瑗, 白桂芹, 刘敏, 张树林. 酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1701-1704
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1701.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属黄病毒科, 基因组为单股正链RNA, 长度约为9.6千碱基对(kb), 编码一个约3010个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的共同裂解作用下, 至少切割产生10个病毒基因编码产物: C、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B。F蛋白是HCV基因组RNA核心蛋白编码序列表达的一个17 ku蛋白, 与核心蛋白有一个重叠的编码序列(5-485 nt)^[1-3], 其生物学功能尚不明确。我们通过酵母双杂交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 寻找可与F蛋白相互作用的蛋白, 为揭示F蛋白潜在的生物学功能提供依据^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 材料 Saccharomyces cerevisiae AH109酵母株、Y187酵母株(K1612-1)、预转化入酵母的对照质粒pGBKT7-53(AH109)、编码DNA-BD/鼠p53融合蛋白、pTD1-1(Y187)、质粒pACT2中编码AD/SV40大T抗原融合蛋白、预转化的cDNA肝文库(Y187)、质粒pACT2表达AD/cDNA文库融合蛋白(PT3183-1), pGBKT7-BD克隆载体、pGADT7-AD克隆载体、pGBKT7-53对照质粒、pGBKT7-Lam对照质粒, 酵母YPDA培养基、SD/-Trp培养基、SD/-Leu培养基、SD/-Trp/-Leu培养基、SD/-Trp/-Leu/-His培养基、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基、X- α -半乳糖苷酶(Gal)等均购自Clontech公司; 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 F蛋白的酵母表达载体pGBKT7-F由本室构建, 用醋酸锂法^[6]转入酵母细胞AH109后, 在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上培养, 无集落生长, 排除其自身激活作用。挑取在SD/-Trp培养基上的转化子, 即pGBKT7-F(AH109), 基数大于 1×10^{12} 细胞/L, 与肝细胞cDNA文库混合, 30 轻摇配合过夜, 24 h后铺板SD/-Trp/-Leu/-His25块、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade25块。同时进行阳性对照实验及文库滴定。生长12-16 d后把长出的大于2 mm的酵母集落, 在铺有X- α -半乳糖苷酶的SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基上生长且出现蓝色菌落的配合为阳性集落。

1.2.2 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的Lyticase法提取酵母质粒。提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 与含有氨苄青霉素(SOB)平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序。阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对, 进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 筛选克隆 Bgl I 酶切鉴定 因质粒pACT2内含有2个Bgl I酶切位点, 分别位于多克隆位点两侧, 故使用该内切酶消化将释放出所筛选到的肝细胞文库的基因片断(图1)。中出现的各个大小不同的DNA片断证实我们筛选的克隆为阳性克隆, 而非配合后在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基生长的假阳性克隆。

2.2 cDNA测序与同源性分析 挑选36个克隆测序, 与GenBank数据库进行比较。36个克隆中有35个均与已知基因的部分序列高度同源(97-100%), 这些已知基因

包括人类酶原颗粒蛋白、人类 SL15 蛋白、人类锌指蛋白 83、人类锌, α 2- 糖蛋白 1、人类过氧化物酶体离子蛋白酶、人类补体调节蛋白因子 1、人类血管

紧张素原、人类唾液酸转移酶、人类丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂、人类组织蛋白酶和人类玻璃体结合蛋白等共 11 种, 2 个为未知功能基因(表 1).

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
1	人类酶原颗粒蛋白 16	11	99
2	人类 SL15 蛋白	6	99-100
3	人类锌指蛋白 83	5	100
4	人类锌 α 2- 糖蛋白 1	4	99
5	人类过氧化物酶体离子蛋白酶	2	100
6	人类补体调节蛋白因子 1	1	98
7	人类血管紧张素原(丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂, clade A- α 1 抗蛋白酶, α 1- 抗胰蛋白酶)	1	97
8	人类唾液酸转移酶(β 半乳糖苷酶 α -2, 6 唾液酸转移酶)	1	97
9	人类 C1 抑制剂, 丝氨酸或半胱氨酸蛋白酶抑制剂	1	99
10	人类组织蛋白酶 B	1	99
11	人类玻璃体结合蛋白(血清传播因子, 促生长因子)	1	100
12	人类未知基因	2	98-99

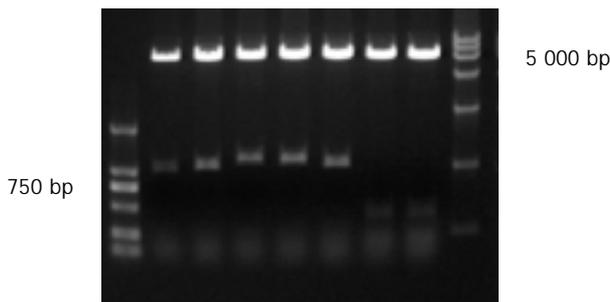


图 1 部分不同的克隆 BglI 酶切鉴定.

3 讨论

丙型肝炎病毒是输血后肝炎主要的病原体, 常导致严重肝病, 包括肝硬化和肝细胞癌. 由于缺乏有效的体外复制系统和适当的 HCV 感染的动物模型, 阻碍了其有关发病机制、病毒复制以及防治策略的研究. HCV 核心蛋白构成了病毒的核衣壳成分, 同时也是重要的调节因子, 大量证据表明核心蛋白可以直接调节细胞内信号传导、参与宿主的免疫应答、影响细胞凋亡信号, 反式调节病毒及细胞内的一些基因的转录和干扰脂类代谢, 其分子机制之一就是病毒与宿主蛋白质之间的相互作用^[7-18]. F 蛋白是一个新的 HCV 基因产物^[1-3]. 编码 F 蛋白的开放阅读框与核心蛋白的编码序列重叠, 是翻译过程中核糖体阅读框发生 -2/+1 位漂移产生的, 与核心蛋白具有相同的 N- 端序列. F 蛋白与核心蛋白、NS5A 相似, 亚细胞定位于内质网^[19-22], 但显示比核心蛋白有更多的序列差异性, 核心蛋白的突变导致患者逃避宿主免疫反应, 可能触发了细胞的恶性转化. 核心蛋白的某些功能是否是 F 蛋白的作用, F 蛋白对病毒的侵入、是否调控 HCV RNA 的复制, 是否参与病毒的形态形成及在病毒生命周期中调节细胞

功能是否发挥重要作用, 值得进一步研究.

病毒蛋白与肝细胞蛋白之间相互作用是病毒致病的关键之一, 他们的相互作用介导病毒进入肝细胞, 他们的网络作用可改变蛋白的正常生物学功能, 影响病毒自身的复制、持续感染和致病. 酵母双杂交系统是分析真核细胞中蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA 相互作用的一种有效的基因分析方法, 为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法. 酵母双杂交系统³^[23-25]的原理是利用 α 型和 α 型酵母配合形成二倍体细胞内诱饵质粒与文库质粒所表达的蛋白质可以相互作用, 他有三个报告基因用来筛选及严格的对照, 阳性率达到 95%, 假阳性率为 5% 以下. 我们在实验中根据此技术构建了 pGBKT7-F 诱饵质粒并在酵母菌株 AH109 中表达了 HCV F 基因, 与预转化的酵母肝细胞 cDNA 文库进行双杂交筛选, 得到真正阳性克隆 36 个, 进行测序分析. 其中 34 个为已知基因序列, 2 个未知功能基因序列.

我们筛选到了大量相同蛋白(11 个相同克隆), 人类酶原颗粒蛋白 16(ZG16). ZG16 在胰腺细胞中大量表达, 是酶原颗粒内部表面部分膜蛋白基质的连接蛋白, 已经证明由硫酸蛋白分解素、糖蛋白和植物凝集素 ZG16P 组成的部分膜蛋白基质在酶原颗粒形成中对酶原限制及选择是非常重要的, ZG16 影响着蛋白合成率、分泌性蛋白细胞内的转运率及酶原的成熟^[26-29]. 有研究表明 HCV 感染和其所致的慢性肝病与糖尿病有明显的相关性^[30-31], 糖耐量降低与丙型肝炎严重程度有关. 我们实验结果表明 HCV F 蛋白与 ZG16 相互作用, 为揭示 HCV F 蛋白的功能、HCV 致病机制及与糖尿病的关系的研究提供了新的线索.

我们筛选到的另一种重要蛋白是锌 α_2 糖蛋白(ZAG). ZAG 存在于精液及其他体液中, 肝细胞被认为是血浆 ZAG 的主要来源. 肿瘤可以诱导正常前列腺或其他分泌性上皮分泌内源性的 ZAG, 前列腺癌、乳腺癌及汗腺瘤均含有 ZAG. 有研究证实 ZAG 产物与肿瘤分化状态相关, 肿瘤 ZAG 产物可引起全身性的 ZAG 浓度增加, ZAG 可诱导脂肪分解, 导致恶病质. 人和动物实验表明 ZAG 是前列腺癌潜在的血清标志物, ZAG 表达是否可预示风险和疾病恶化^[32]. 玻璃体结合蛋白. 属非胶原蛋白, 又被称为血清传播因子、S 蛋白和上皮细胞移动因子, 是人类血浆和血清中的糖蛋白、粘连蛋白, 他也存在于不同的疏松结缔组织中, 特别是弹性纤维中. 玻璃体结合蛋白通过在细胞玻璃体结合蛋白特异性细胞表面受体的细胞结合域 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列相互作用而结合到细胞上. 他可调节血凝固和补体诱导的细胞溶解, 结合了基质的玻璃体结合蛋白在调节细胞周围蛋白溶解起着重要作用. 玻璃体结合蛋白可促进许多正常和新生物细胞的细胞附着、传播、增生及分化^[33-34]. C1 抑制物(C1INH)是血清中高度糖基化的一种蛋白质, 含糖量高达 35-49%. 与其他几种丝氨酸蛋白酶抑制物 (serpin) 超家族成员 (α_1 抗胰蛋白酶、 α_1 抗糜蛋白酶及抗凝血酶 等) 约有 30% 的氨基酸同源性. C1INH 可与活化的 C1r 或 C1s 结合形成稳定的复合物而导致 C1 丝氨酸蛋白酶失活. C1INH 能防止在缺乏抗体时, C1 以很低但仍有一定速率出现的自发激活. C1INH 还可抑制凝血因子 a、a、激肽释放酶及纤溶酶, 因而其在凝血、激肽和纤溶系统中也有重要的调节作用^[35-36].

唾液酸转移酶是糖基转移酶家族中的成员, 存在于高尔基体中, 具有催化细胞黏附分子-神经节苷酯聚唾液酸化的功能, 神经节苷酯是一类膜结合的含唾液酸的糖鞘脂, 是细胞黏附和体外培养恶性细胞生长的重要因子^[37]. 近年糖鞘脂作为信号分子直接参与信号传导或通过影响其他膜蛋白的机制研究是热点, 他将促使我们对细胞识别、信号传递、神经发育进一步认识.

除此之外, HCV F 还与补体调节蛋白因子 1、人类过氧化物酶体离子蛋白酶、人类组织蛋白酶 B 及 2 个推定蛋白基因有相互作用. 我们筛选到的一些结合蛋白分别与糖代谢, 免疫调节, 肿瘤发生、发展等有密切关系. 这些结合蛋白的发现, 为揭示 HCV F 生物学功能、HCV 致病机制及其恶性转化的原因提供了新的研究线索.

4 参考文献

- 1 Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 2002;277:17713-17721
- 2 Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001;7:710-721
- 3 Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frame shift. *EMBO J* 2001;20:3840-3848

- 4 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 夏小兵, 李莉, 杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. *军医进修学院学报* 2002;23:1-3
- 5 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 6 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
- 7 Kunkel M, Watowich SJ. Biophysical characterization of hepatitis C virus core protein: implications for interactions within the virus and host. *FEBS Lett* 2004;557:174-180
- 8 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang L, Duan H, Lu Y, Yang J, Liu Y, Xia X, Wang G, Dong J, Li L, Zhong Y, Hong Y, Chen J. Screening and cloning gene of hepatocyte protein interacting with hepatitis C virus core protein. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:351-353
- 9 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein—a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 10 Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 2001;290:224-236
- 11 成军. 丙型肝炎病毒致病的分子生物学机制. *解放军医学杂志* 2003;28:23-27
- 12 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
- 13 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
- 14 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
- 15 刘重阳, 刘为纹, 陈东风, 杨建民, 房殿春. 丙型肝炎病毒核心蛋白对细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1125-1128
- 16 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 A1 结合的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1018-1021
- 17 Monto A. Hepatitis C and steatosis. *J Semin Gastrointest Dis* 2002;13:40-46
- 18 Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001;33:1358-1364
- 19 Brass VE, Bieck R, Montserret B. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2002;277:8130-8139
- 20 Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, Matsuura Y. Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2004;78:6370-6380
- 21 Mclauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J EMBO* 2002; 21:3980-3988
- 22 Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292:198-210
- 23 Osman A. Yeast two-hybrid assay for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 2004;270:403-422
- 24 Miller J, Stajlgjar I. Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol* 2004;261:247-262
- 25 Xia XB, Cheng J, Wang G, Yang JZ, Liu Y, Dong J, Wang L, Li K. Expression of human augmentor of liver regeneration in *Pichia pastoris*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:743-746
- 26 Kalus I, Hodel A, Koch A, Kleene R, Edwardson JM, Schrader M. Interaction of syncollin with GP-2, the major membrane

- protein of pancreatic zymogen granules, and association with lipid microdomains. *Biochem J* 2002;362:433-442
- 27 Hodel A, An SJ, Hansen NJ, Lawrence J, Wasle B, Schrader M, Edwardson JM. Cholesterol-dependent interaction of syncollin with the membrane of the pancreatic zymogen granule. *Biochem J* 2001;356:843-850
- 28 Schmidt K, Schrader M, Kern HF, Kleene R. Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas: Involvement of the GPI-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p and cholesterol-glycosphingolipid enriched microdomains. *J Biol Chem* 2001;276:14315-14323
- 29 Braun M, Thevenod F. Photoaffinity labeling and purification of ZG-16p, a high-affinity dihydropyridine binding protein of rat pancreatic zymogen granule membranes that regulates a K(+)-selective conductance. *Mol Pharmacol* 2000;57:308-316
- 30 Arao M, Murase K, Kusakabe A, Yoshioka K, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Tagaya T, Yamanouchi K, Ichimiya H, Sameshima Y, Kakumu S. Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 2003;38:355-360
- 31 邵清, 成军, 白雪帆. 丙型肝炎病毒与2型糖尿病关系的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:143-145
- 32 Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF. Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:846-853
- 33 Stawowy P, Kallisch H, Veinot JP, Kilimnik A, Prichett W, Goetze S, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, Graf K. Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation* 2004;109:770-776
- 34 Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. *Biomaterials* 2004;25:2721-2730
- 35 Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2004;32:21-27
- 36 Toomayan GA, Chen LE, Jiang HX, Qi WN, Seaber AV, Frank MM, Urbaniak JR. C1-esterase inhibitor and a novel peptide inhibitor improve contractile function in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2003;23:561-567
- 37 陆荫英, 刘妍, 成军, 梁耀东, 陈天艳, 邵清, 王琳, 张玲霞. 乙型肝炎病毒e抗原肝细胞结合蛋白新基因E-36基因表达谱芯片分析. 世界华人消化杂志 2004;12:66-69

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 •

HBV 核心蛋白结合蛋白 1 编码基因 C1 的克隆化

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 张树林

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 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: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

摘要

目的: 对乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白结合蛋白1的基因C1进行克隆化研究。

方法: 对应用酵母双杂交技术筛选的白细胞中与HBV核心蛋白结合的新蛋白基因, 利用分子生物学与生物信息技术相结合的方法获得新基因的编码序列, 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 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编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为C1, 在GenBank中注册, 注册号为AY555145。

结果: C1基因编码区为366个核苷酸(nt), 编码产物由121

个氨基酸残基(aa)组成。经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性, 表明我们克隆的C1基因属于未知功能新基因。

结论: 成功克隆了HBV核心蛋白结合蛋白新基因C1。

蔺淑梅, 成军, 陈天艳, 王琳, 刘敏, 张树林. HBV核心蛋白结合蛋白1编码基因C1的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1704-1707

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1704.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是严重危害我国人民身体健康的致病因子^[1-10]。HBV基因组全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒。HBV基因组划分出4个开放读码框架, 分别命名为S、C、P、X区。HBV核心抗原(HBcAg)由乙型肝炎病毒C基因的C区编码, 由183个氨基酸残基(aa)组成, 分子量为21-22 kD。HBcAg是组成核壳的主要成分, 在HBV的生活周期中, 病毒核心抗原、病毒mRNA和DNA聚合酶共同构成核心颗粒, 在核心颗粒中完成病毒DNA的合成。HBcAg具有保护病毒mRNA, 防止其被RNA酶降解的作用, 对于乙肝病毒前基因组RNA的装配、基因组DNA的合成具有重要作用, 还与病毒成熟、识别包膜蛋白以及病毒向细胞