

应用基因表达谱芯片技术筛选HCV p7蛋白反式调节基因

郭江¹, 成军², 洪源², 王琦², 邢卉春¹, 毛羽² (1.首都医科大学北京地坛医院内五科, 北京 100015; 2.首都医科大学北京地坛医院传染病研究所, 北京 100015)

摘要: 目的 应用基因芯片技术对pcDNA3.1(-)和pcDNA3.1(-)-p7分别转染的HepG2细胞的基因表达谱进行分析, 筛选能被HCV p7蛋白反式调节的靶基因, 研究p7蛋白的生物学功能。方法 以含有HCV全基因组的pBRTM质粒作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)扩增p7蛋白编码基因片段, 以常规分子生物学技术构建表达载体pcDNA3.1(-)-p7。以脂质体技术转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析并比较。结果 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定, 证实准确无误, 提取高质量的总mRNA并逆转录成cDNA, 进行DNA芯片技术分析。在1152个基因表达谱的筛选中, 有1个基因表达水平显著上调, 22个基因表达水平显著下调。结论 HCV p7蛋白是一种反式调节因子, p7蛋白的表达对于肝细胞基因表达谱有显著影响。

关键词: 丙型肝炎病毒; p7蛋白; 反式调节

Screening and identification of genes trans-regulated by HCV p7 protein with microarray assay

GUO Jiang¹, CHENG Jun², HONG Yuan², WANG Qi², XING Hui-chun², MAO Yu² (1. The Fifth Department of Internal Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the biological functions of hepatitis C virus p7 protein and screen genes regulated by p7 protein by cDNA microarray technique. **Methods** The HCV p7 coding DNA fragment was amplified with polymerase chain reaction (PCR) with pBRTM plasmid containing the full length of HCV genome as the template. The expression vector of pcDNA3.1-p7 was constructed by routine molecular biological methods. The HepG2 cells were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-p7, respectively, using FuGENE6 transfection reagent. Total RNA was isolated and reverse transcribed. The cDNA were subjected for microarray screening with 1152 cDNA probes. **Results** The expression vector were constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. High quality mRNA and cDNA were prepared and successful microarray screening was conducted. From the scanning results, one gene was up-regulated and 22 genes were down-regulated by HCV p7 protein. **Conclusions** HCV p7 protein is a trans-regulator. The expression of p7 protein affect the expression spectrum of HCV infected hepatocytes.

Key words: Hepatitis C virus; p7 protein; Trans-regulation

丙型肝炎病毒(HCV)是世界范围内慢性肝炎的主要病原之一, 约有1.7亿人被感染, 常导致严重肝病, 包括肝硬化和肝细胞癌(HCC)^[1]。HCV

基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF), 编码一个约由3010个氨基酸残基(aa)组成的多肽, 该多肽被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少10个病毒蛋白产物: 核心蛋白(core)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B蛋白等^[2]。p7是由HCV基因组第2580~2768核苷酸

基金项目: 国家自然科学基金(N0: 30371288)

通讯作者: 成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

(nt)编码的由63个氨基酸残基(aa)组成的一个小蛋白,其功能研究尚较少。为了研究p7蛋白对于宿主细胞基因表达的上调和下调作用,本研究应用基因表达谱芯片技术,对p7蛋白基因和空表达载体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2进行筛选,试图从p7蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响这一角度,探索HCV感染的发病机制,包括HCV相关的HCC发生发展的分子生物学机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂 HepG2细胞及感受态大肠埃希菌DH5 α (本室保存), pcDNA 3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); FuGENE6转染试剂(Roche); mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech); PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech); High Pure PCR Product Purification试剂盒(Boehringer Mannheim); T7、SP6通用引物及pGEM-Teasy载体(Promega)。

1.2 表达载体的构建及细胞转染 根据HCV-1型基因序列,在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡聚核苷酸引物(上游:5'-GAA TTCA TGGCTTTGGAGAACCTCG-3';下游:5'-GGATCCTTACGCGTACGCCCGCTGG-3'),在引物两端分别引入了Eco RI和Bam HI酶切位点,引物由上海博亚公司合成。使用25 μ l反应体系,以pBRTM质粒DNA为模板,放入PE9600 PCR仪中扩增。扩增条件:94 $^{\circ}$ C变性50秒,60 $^{\circ}$ C退火50秒,72 $^{\circ}$ C延伸50秒,循环35次,72 $^{\circ}$ C保温10分钟。0.9 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。扩增的p7蛋白编码基因首先克隆到TA载体进行序列测定,然后亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中,构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-p7。用FuGENE6转染试剂将2 μ g pcDNA3.1(-)-p7及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞,48小时后收获细胞。

1.3 杂交及洗涤 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了p7表达质粒及空载体的HepG2细

胞mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。逆转录标记cDNA探针并纯化,用Cy3-dUTP标记对照细胞mRNA(5 μ g),Cy5-dUTP标记实验细胞mRNA(5 μ g),乙醇沉淀后溶解在20 μ l含5 \times SSC和2 g/L SDS杂交液中。芯片包含的1152个cDNA由上海联合基因有限公司提供,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、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1000~3000 bp。靶基因以0.5 g/L溶解于3 \times SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2小时)、室温干燥(0.5小时),紫外线(UV)交联,再分别用2 g/L SDS、水及2 g/L硼氢化钠溶液处理10分钟,晾干备用。将基因芯片和杂交探针在95 $^{\circ}$ C水浴变性5分钟,将混合探针加在基因芯片上,置于60 $^{\circ}$ C杂交15~17小时。依次以2 \times SSC+2 g/L SDS、0.1 \times SSC+2 g/L SDS、0.1 \times SSC洗涤10分钟,室温晾干。

1.4 检测与分析 使用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片。以预先选定的内参基因(24个管家基因,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ImaGene 3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值。阴性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0,为红色荧光,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 HCV p7蛋白表达载体的构建 利用自行设计的引物成功扩增出HCV p7基因片段,PCR产物经0.9%琼脂糖凝胶电泳分析显示扩增片段约207 bp,与预期片段符合,且无非特异扩增现象。将PCR扩增的HCV p7基因与pGEM T载体连接后测序,结果显示序列与报告的完全符合。用Eco RI及Bam HI双酶切所得片段,连接到以相同酶切过的pcDNA3.1(-)载体中,经酶切鉴定结果正确,见图1。由此表明HCV p7基因已按正确方向克隆入真核表达载体中,pcDNA3.1(-)-p7质粒构建成

表 1 HCV p7蛋白下调基因列表

编号	Cy3/Cy5	基因名称
1	0.337	沃纳综合征（WRN）
2	0.368	肾母细胞瘤过度表达基因（NOV）
3	0.394	阴离子交换蛋白SLC4A3
4	0.403	脂肪分化相关蛋白（ADFP）
5	0.406	SOX11
6	0.410	蛋白酶体26S亚单位ATP酶3（PSMC3）
7	0.411	淋巴细胞激活相关蛋白
8	0.411	raft相关蛋白（RAFTLIN）
9	0.405	肾肿瘤抗原中度类似物
10	0.419	人狨猴属重复因子X连锁2（ALEX2）
11	0.436	KIAA0899蛋白
12	0.436	腺苷酸环化酶6（ADCY6）突变体1
13	0.448	前B细胞集落增强因子1（PBEF1）突变体1
14	0.459	锌指蛋白547（ZNF547）
15	0.473	TATA盒结合蛋白相关因子（TAF15）
16	0.476	卵巢上皮肿瘤相关蛋白
17	0.483	蛋白磷酸酶1抑制亚单位16B（PPP1R16B）
18	0.485	锌指蛋白（ZNF345）
19	0.492	转运素分裂增强子2（TLE2）
20	0.481	RELA（p65）
21	0.492	FLJ46523
22	0.469	膜蛋白C21orf4

相关的一种蛋白^[12,13]。ZNF547定位于核中，可调节转录，具有DNA依赖性。ZNF547作为一种转录因子，可负调控Pol III启动子的转录。RELA为NF-κB的p65亚单位，其细胞核功能受转录后修饰的影响，可抑制机体对内毒素的反应^[14,15]。RELA可通过ARF肿瘤抑制因子抑制抗凋亡因子表达而促进凋亡，进而抑制体内肿瘤的发展^[16]。p7下调RELA的表达，从而在HCV致癌中起一定作用。PPP1R16B即TGF-β₁抑制的膜相关蛋白（TIMAP）在血管内皮中表达，可被TGF-β₁抑制，通过与蛋白磷酸酶1的相互作用起信号转导功能^[17]。TLE2可起转录抑制的作用^[18]。RNF19即p38，可与转录因子Sp1相互作用，具有内在蛋白连接酶活性，与锌离子结合参与微管细胞骨架的组织和发展。

本研究中还有2个未知功能的新基因，均为下调基因。将每一个基因片段序列提交GenBank进行同源基因序列搜索，确认所得基因片段的独特

性，然后依据GenBank数据库EST中的同源基因片段进行电子拼接，根据Kozak规则和终止密码子下游的多聚腺苷酸信号序列，确定完整的编码基因序列，分别命名为HCV p7TP2（p7蛋白反式调节蛋白2）和p7TP3，已提交GenBank。这些新基因的功能正在进一步研究中。

参考文献

[1] 成军, 李亮, 陆荫英, 等. 丙型肝炎病毒调节基因区结合的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10: 223-225.

[2] Lo SY, Selby M, Tong M, et al. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by single amino acid substitution[J]. Virology, 1994, 199: 124-131.

[3] Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine[J]. FEBS Lett, 2003, 535: 34-38.

[4] Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polypeptide: processing and functional studies[J]. J Virol, 2000, 74: 9498-9506.

[5] Hirasaki S, Koide N, Ujike K, et al. Expression of Nov, CYR61 and CTGF genes in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2001, 19: 294-305.

- [6] Liu C, Liu XJ, Crowe PD, et al. Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation[J]. Gene,1999,238:471-478.
- [7] Corsini E, Viviani B, Zancanella O, et al. Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants[J]. J Invest Dermatol,2003,121:337-344.
- [8] Sock E, Rettig SD, Enderich J, et al. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling[J]. Mol Cell Biol,2004,24:6635-6644.
- [9] Tanahashi N, Suzuki M, Fujiwara T, et al. Chromosomal localization and immunological analysis of a family of human 26S proteasomal ATPases[J]. Biochem Biophys Res Commun,1998,243:229-232.
- [10] Saeki K, Miura Y, Aki D, et al. The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction[J]. EMBO J,2003,22:3015-3026.
- [11] Kurochkin IV, Yonemitsu N, Funahashi SI, et al. ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,280:340-347.
- [12] Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis[J]. J Clin Invest,2004,113:1318-1327.
- [13] Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor[J]. FEBS Lett,2003,544:74-78.
- [14] Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, et al. A role for NF-kappaB subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock[J]. J Immunol,2004,173:5786-5793.
- [15] Campbell KJ, Perkins ND. Post-translational modification of RelA (p65) NF-kappa B[J]. Biochem Soc Trans,2004,32:1087-1089.
- [16] Perkins ND. Regulation of NF-kappaB by atypical activators and tumour suppressors[J]. Biochem Soc Trans,2004,32:936-939.
- [17] Cao W, Mattagajasingh SN, Xu H, et al. TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2002,283:C327-337.
- [18] Grbavec D, Lo R, Liu Y, et al. Transducin-like Enhancer of split 2, a mammalian homologue of Drosophila Groucho, acts as a transcriptional repressor, interacts with Hair/Enhancer of split proteins, and is expressed during neuronal development[J]. Eur J Biochem,1998,258:339-349.

收稿日期: 2008-09-08

•会议报道•

第四届地坛国际感染病会议

首都医科大学北京地坛医院主办,并得到中华医学会感染病学分会、中华医学会肝病学分会、中华医学会热带病与寄生虫学分会、中华医学会检验学分会、中华医学会皮肤性病学分会、中华医学会呼吸病学分会和欧洲临床微生物及感染病学学会(ESCMID)支持的第四届地坛国际感染病会议,定于2010年7月15日~7月18日在北京国际会议中心举行。会议将提供一个国际平台供专家们分享和讨论感染疾病领域中的最新进展。通过这种建设性的“全球对话”,相信我国在感染病领域上的研究和实践将很快能够与外接轨。在众多中外知名专家的参与下,您将有机会参加一系列能够反映最先进的科学研究,高标准的临床实践,以及全球的技术进步的课程。会议还将辅以卫星会议和展览,使第四届国际感染病会议成为所有中外感染病领域研究员和专家眼中的一件瞩目盛事。