

·论 著·

## 抑制性消减杂交构建乙型肝炎病毒 X 蛋白羧基端缺失 40 个氨基酸 cDNA 文库

王 力,朱明华\*,李咏梅,李芳梅(第二军医大学长海医院病理科,上海 200433)

[摘要] 目的:应用抑制性消减杂交(SSH)技术筛选乙型肝炎病毒(HBV)X蛋白羧基端缺失40个氨基酸(HB<sub>X3-40</sub>)反式激活基因,克隆其反式激活的相关靶基因。方法:以HB<sub>X3-40</sub>蛋白表达质粒pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub>转染Huh-7细胞,以转染pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub>为对照;制备转染后的细胞裂解液,提取总RNA并逆转录为cDNA,经RsaI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PCR,将产物与pUCmT载体连接,构建cDNA消减文库,并转染大肠杆菌JM109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:成功构建了HB<sub>X3-40</sub>反式激活基因差异表达的cDNA文库,文库扩增后得到154个白色克隆,经菌落PCR分析,克隆包含有200~800bp的插入片段,部分片段编码蛋白涉及原癌基因、信号转导相关基因、细胞生长因子相关基因、细胞凋亡、代谢和蛋白合成等相关基因。结论:应用抑制性消减杂交技术成功构建了HB<sub>X</sub>和HB<sub>X3-40</sub>差异表达的cDNA消减文库,为进一步阐明HB<sub>X3-40</sub>在HBV感染相关的肝细胞癌发生中的分子生物学机制提供理论依据。

[关键词] 乙型肝炎病毒 X 蛋白;基因文库;抑制性消减杂交

[中图分类号] R 735.7 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1081-04

### Construction of cDNA library of hepatitis B virus with X protein C-terminally truncated 40 amino acids by suppression subtractive hybridization method

WANG Li, ZHU Ming-hua\*, LI Yong-mei, LI Fang-mei (Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct subtractive cDNA library from human hepatocellular carcinoma cells transactivated by C-terminally truncated 40 amino acids using suppression subtractive hybridization (SSH) technique and to clone the associated genes. **Methods:** Huh-7 cells were separately transfected with pcDNA3(-) harboring the sequence of HBx protein C-terminally truncated 40 amino acids and pcDNA3(-) harboring the full length sequence of HBx protein vectors. The total RNAs were isolated from the transfected Huh-7 cells and were reversely transcribed into double strand cDNAs. After the cDNAs were digested with restriction enzyme RsaI, they were divided into 2 groups and were ligated to the special adaptor 1 and adaptor 2R, respectively. The tester cDNAs were then hybridized with driver cDNAs twice and the products were amplified twice by nested PCR technique. The PCR products were connected with pUCmT plasmid vectors to establish the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain JM109. The inserts of cDNAs were sequenced and analyzed in GenBank with Blast search. **Results:** The subtractive cDNA library was successfully constructed. The amplified library contained 154 positive clones, and colony PCR showed that these clones contained 200-800 bp inserts; some fragments coded proteins involved proto-oncogenes, cell signaling genes, cell growth factor genes, cell apoptosis genes, metabolism and protein synthesis genes. **Conclusion:** Subtractive cDNA library has been successfully constructed by SSH technique, which may help to clone novel genes transactivated by HBx C-terminally truncated 40 amino acids and to explore the molecular mechanism of hepatoma pathogenesis.

[KEY WORDS] hepatitis B virus X protein; gene library; suppression subtractive hybridization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10):1081-1084]

乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染是引发肝细胞癌的主要危险因素之一,HBV X蛋白(HB<sub>X</sub>)对多种细胞与病毒的增强子及启动子有反式激活作用,HB<sub>X</sub>蛋白的致癌作用可能与HB<sub>X</sub>蛋白反式激活作用密切相关。研究<sup>[1]</sup>表明,HB<sub>X</sub>基因存在不同程度的突变和缺失,并且发现HB<sub>X</sub>基因变异在肿瘤组织比非肿瘤组织更为常见。其中一些关键性的突

变或缺失可能导致其反式激活作用消失,减弱HBV的复制和表达水平<sup>[2]</sup>。刘晓红等<sup>[3]</sup>研究表明,HB<sub>X</sub>

[基金项目] 国家自然科学基金(30070344,30070839)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30070344,30070839)。

[作者简介] 王 力,博士生。现在成都军区昆明总医院病理科,昆明650031。E-mail: digangport@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: mhzhu2000@hotmail.com

蛋白羧基端缺失 40aa (HB<sub>X3-40</sub>)的突变体与全长的 HB<sub>X</sub> 蛋白相比,前者对肝癌细胞的增殖具有非常明显的促进作用。

本实验应用 SSH 技术,成功构建了带有截短 HB<sub>X3-40</sub> 蛋白与全长 HB<sub>X</sub> 蛋白的肝癌细胞株 Huh-7 间 cDNA 消减文库,筛选差异表达的基因,为进一步阐明 HB<sub>X3-40</sub> 在 HBV 感染相关的肝细胞癌发生中的分子生物学机制提供理论依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株 Huh-7 及大肠杆菌 JM109 (本室保存), HB<sub>X</sub> 蛋白及 HB<sub>X3-40</sub> 蛋白的真核表达质粒 pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub> 和 pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub> 由本室构建。RNeasy Mini Kit (Qiagen), PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences), Lipofectamine PLUS 转染试剂盒 (Gibco), Advantage cDNA PCR Kit (BD Biosciences), DNA Cloning Vector Kit (Bio Basic), X-gal 和 IPTG (Gibco), DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer)。

1.2 细胞转染及总 RNA 提取 按照 Lipofectamine PLUS 转染试剂盒的方法,将 10 μg pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub> 及 10 μg pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub> 分别转染 90 mm 平皿 Huh-7 细胞,48 h 后收获细胞,经筛选鉴定后,用 RNeasy Mini Kit 试剂盒,提取转染了重组表达质粒 Huh-7 细胞的总 RNA,用分光光度计及琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 进行定性、定量分析。

1.3 消减杂交文库的构建 按照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 说明书上的方法进行:以转染了重组表达质粒 pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub> 及 pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub> 的 Huh-7 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA,并分别标记为 Tester 和 Driver,双链 cDNA(ds cDNA)经 *Rsa* 消化后,产生平末端 cDNA 片段,将 Tester 的 cDNA 分为 2 份,分别连接寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2R,然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交,将两种杂交产物混合后再与过量的 Driver cDNA 作第 2 次杂交;然后将杂交产物行抑制性 PCR 扩增,使 Tester cDNA 中高表达或特异表达的片段得到特异性扩增。

1.4 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与 pUCmr-T 载体连接,转化 JM109 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB/ X-gal/ IPTG 培养基上 37 培养

18 h。挑取白色菌落,增菌,以 pUCmr-T 载体 A/T 克隆位点两端引物进行菌落 PCR 扩增,结果显示大多数菌落含有插入片段(200~800 bp)。

1.5 cDNA 片段序列的测定和同源性分析 将 1.4 中得到的 DNA 片段送上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,测序引物为:P1: 5'-TCG A GC GGC CGC CCG GGC A GG T-3; P2: 5'-AGC GTG GTC GCG GCC GA G GT-3。测序结果通过 Advanced BLAST 2.0 软件与 GenBank 中收录的序列进行同源性比较。

### 2 结果

2.1 mRNA 的定性、定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了真核表达质粒 pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub> 及 pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub> 的 Huh-7 细胞总 RNA 含量分别为 5.21 μg/μl 和 5.56 μg/μl, D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub> 均大于 1.93。1.0%琼脂糖凝胶电泳可见 28 S 和 18 S 的清晰条带,见图 1。

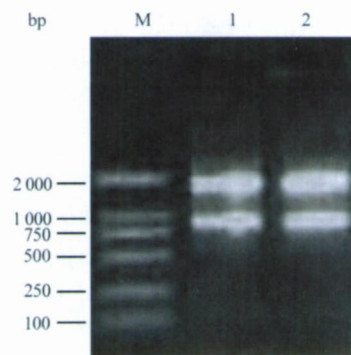


图 1 总 RNA 的电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of total RNAs

M: DL2000 DNA marker; 1: Total RNAs of Huh-7 transfected with pcDNA3(-)-HB<sub>X</sub>; 2: Total RNAs of Huh-7 transfected with pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub>

2.2 dscDNA 与接头连接效率的检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败关键的步骤。将连接有 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物进行 25 个循环扩增,产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定,见图 2。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

2.3 正向及反向消减文库的 cDNA PCR 扩增 以正向及反向的第 2 次 PCR 产物为模板,以 Nested

PCR primer1 和 Nested PCR primer2R为引物,进行 PCR 扩增,结果见图 3。片段大小在 300 ~ 1 500 bp 之间。

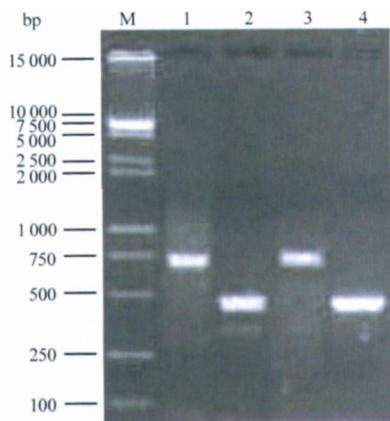


图 2 连接效率的检测结果

Fig 2 Results of ligation efficiency

M: DNA marker; 1,3: PCR products using GAPDH 3 primer and PCR primer 1, respectively; 2,4: PCR products using GAPDH 3 and 5 primers, respectively

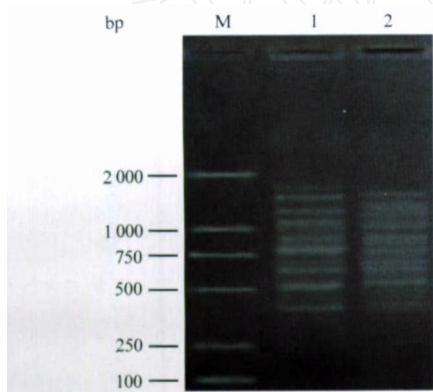


图 3 正向及反向消减文库的 cDNA PCR 扩增结果

Fig 3 PCR results of cDNA in forward and reverse subtraction library

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR products in forward subtraction library (HBx<sub>3-40</sub>); 2: PCR products in reverse subtraction library (HBx)

2.4 cDNA 文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减 PCR 产物为模板,用 GAPDH 引物进行 PCR 扩增,分别在第 18、23、28 和 33 个循环结束时从体系中吸取 5  $\mu$ l 进行电泳分析,见图 4。结果显示:与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中 GAPDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库有很高的消减效率。

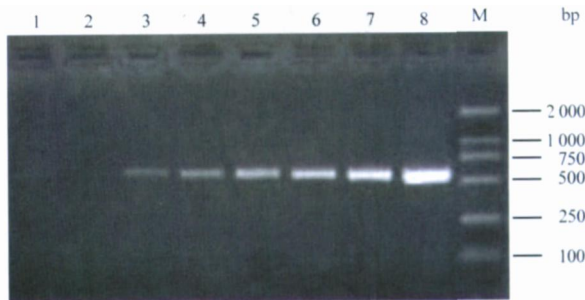


图 4 消减效率的分析结果

Fig 4 Results of subtraction efficiency analysis

M: DL2000 DNA marker; 1-4: PCR results of the subtracted with the GAPDH 5 and 3 primers after 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively; 5-8: PCR results of the un-subtracted with the GAPDH 5 and 3 primers after 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively

2.5 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 两轮 PCR 扩增后的消减杂交产物再行抑制性 PCR 扩增,扩增产物克隆于 pUCm-T 载体,转染大肠杆菌 JM109,菌落 PCR 扩增结果显示为 200 ~ 800 bp 大小不等的插入片段,所获得的 154 个克隆中多数含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段,见图 5。

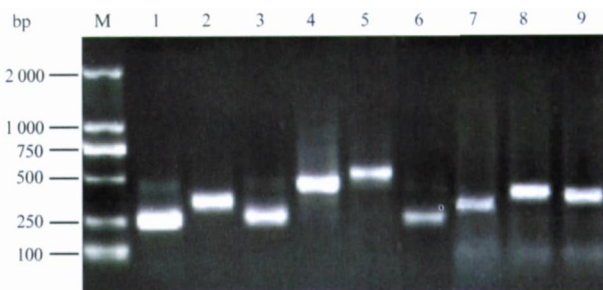


图 5 部分克隆的 PCR 鉴定结果

Fig 5 Results of PCR detection in some clones

M: DL2000 DNA marker; 1-9: Results of PCR detection in some clones

2.6 部分 cDNA 片段的序列测定和同源性分析结果 对含有插入片段的 20 个阳性克隆进行测序,获得 13 个有效序列,经同源性分析后发现 11 条为已知基因,其中 2 条基因的功能未知。生物信息学分析表明已知基因涉及原癌基因 (Wnt5a)、信号转导相关基因、细胞生长因子相关基因、细胞凋亡 (HSP70)、代谢 (UBA) 和蛋白合成 (HNRPD) 等相关基因。见表 1。

表1 cDNA文库中部分克隆基因与  
GenBank同源序列比较结果

Tab 1 Comparison of some clones in cDNA  
library by sequence homologization in GenBank

Genes of homologous protein	Up-regulation	Down-regulation	Strains of homologization	Gene homology (%)
Proto-oncogene	1	-	1	99
Cell signaling	2	-	2	98
Cell growth factor	1	1	2	98
Apoptosis	1	-	1	100
Metabolism	2	1	3	98-100
Protein synthesis	1	1	2	98
Unknown function	2	-	2	100

### 3 讨论

HB<sub>x</sub>蛋白是一种具有广泛活性的转录激活因子,它由两部分组成,1~50aa为其自身的调控区域,该区域(1~20aa)能够抑制HB<sub>x</sub>蛋白的反式激活活性<sup>[4]</sup>,另一部分51~154aa为其反式激活区域<sup>[5]</sup>。该区域羧基端105~148aa富含负电荷,为一亮氨酸锌指结构,具有反式激活因子激活功能域所具有的典型特征,该结构是HB<sub>x</sub>蛋白反式激活作用的结构基础,能够反式激活同源/异源的病毒/细胞转录调节序列,对乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的转化有密切关系<sup>[6,7]</sup>。

HB<sub>x</sub>基因是高度保守的序列,但在肝细胞癌(HCC)患者中常常检测到HB<sub>x</sub>蛋白读码框的自然突变和缺失,突变的HB<sub>x</sub>基因产生变异的HB<sub>x</sub>蛋白。HB<sub>x</sub>蛋白不同区域的缺失和突变对其反式激活能力有不同的影响,研究表明,HB<sub>x</sub>羧基端缺失不仅能够抑制HB<sub>x</sub>相关的促凋亡过程,而且还能加速细胞转化的进程<sup>[3]</sup>。Tu等<sup>[7]</sup>在肝癌患者的肿瘤组织中发现HB<sub>x</sub>蛋白羧基端的缺失突变,并将其转染入小鼠胚胎成纤维细胞,发现与转染全长HB<sub>x</sub>相比其反式激活能力和对细胞增生和转化的抑制效果降低;刘晓红等<sup>[3]</sup>研究表明,HB<sub>x</sub>蛋白羧基端缺失20aa和40aa的突变体与全长的HB<sub>x</sub>蛋白相比,对肝癌细胞的增殖具有非常明显的促进作用。由此看来,HB<sub>x</sub>蛋白全长的反式激活能力对细胞转化可能

起着负调控作用,羧基端的缺失可能打破了全长HB<sub>x</sub>蛋白各区域功能的平衡,使其在调节细胞增殖、生长和转化方面出现了紊乱。因此,HB<sub>x</sub>蛋白羧基端缺失突变体和全长的HB<sub>x</sub>蛋白在HBV相关的肝病发生中可能起着不同的作用。所以研究HB<sub>x</sub>蛋白的反式激活功能,对阐明HBV感染的慢性化和肝癌形成的机制很有意义,本实验成功构建了HB<sub>x</sub>蛋白的真核表达载体,用SSH技术筛选并克隆了HB<sub>x</sub>和HB<sub>X3-40</sub>差异表达的相关基因。

本研究将真核表达质粒pcDNA3(-)-HB<sub>X3-40</sub>转染Huh-7细胞,以转染pcDNA3(-)-HB<sub>x</sub> Huh-7为对照,提取总RNA并逆转录为cDNA,用SSH方法成功构建了HB<sub>x</sub>和HB<sub>X3-40</sub>差异表达的cDNA消减文库,并得到了部分差异表达的cDNA基因片段,对这些差异表达基因的进一步研究,有利于阐明HB<sub>x</sub>蛋白突变对HB<sub>x</sub>蛋白反式激活功能的影响,从而为揭示HBV感染相关的肝炎慢性化和肝细胞癌的形成机制提供新思路。

### [参考文献]

- [1] 董菁,施双双,皇甫竞坤,等.乙型肝炎病毒X基因准种特点的研究[J].中国病毒学,2002,17:22-26.
- [2] 刘妍,董菁,皇甫竞坤,等.乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及其对转录活性的影响[J].解放军医学杂志,2002,27:128-130.
- [3] 刘晓红,朱明华,曹晓哲,等.HB<sub>x</sub>蛋白羧基端缺失对肝癌细胞生物学行为的影响[J].癌症,2005,24:1213-1219.
- [4] Seishi M, Jaehun C, Shuichi K. Human hepatitis virus X gene encodes a regulatory domain that represses transactivation of X protein[J]. Biol Chem,1994,269:15118-15123.
- [5] Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology[J]. Intervirology,1999,42(2-3):81-99.
- [6] Murakami S. Hepatitis B virus X protein: multifunctional viral regulator[J]. Gastroenterology,2001,36:651-660.
- [7] Tu H, Bonura C, Giannini C, et al. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues[J]. Cancer Res,2001,61:7803-7810.

[收稿日期] 2006-04-27

[修回日期] 2006-06-13

[本文编辑] 曹静