SSH 技术筛选β干扰素真核表达载体转染细胞的下调基因

钟彦伟[1**]，成 军[2]，曲建慧[1]，张黎颖[2]，郭 江[2]，李晓东[1]

（1. 解放军第 302 医院传染病研究所病毒性肝炎研究室，北京 100039; 2. 北京地坛医院传染病研究所，北京 100011）

Screening and Cloning of the Target Genes Down-regulated by β-interferon plasmid Using Suppression Subtractive Hybridization Technique

ZHONG Yan-Wei[1**], CHENG Jun[2], QU Jian-Hui[1], ZHANG Li-Ying[2], GUO Jiang[2], LI Xiao-Dong[1]

(1. Center for Viral Hepatitis Research, Institute of Infectious Diseases, Chinese PLA 302 Hospital, Beijing 100039, China; 2. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China)

Abstract: The suppression subtractive hybridization (SSH) and bioinformatics techniques were used for screening and cloning of the target genes down-regulated by β-interferon in HepG2. The mRNA was isolated from HepG2 cells transfected pcDNA3.1(-)IFN β and pcDNA3.1(-) empty vector, respectively, and SSH method was employed to analyze the differentially expressed DNA sequence between the two groups. After restriction enzyme *Rsa* I digestion, small sizes cDNAs were obtained. Then tester cDNA from pcDNA3.1(-) empty vector transfected cell was divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2, respectively. After tester cDNA was hybridized with driver cDNA twice and underwent two times of nested PCR, the products were subcloned into T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain DH5α. The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with Blast search. The subtractive library of genes down-regulated by β-interferon was constructed successfully. The amplified library contained 50 clones, of which 37 clones had 200-1000 bp inserts. Sequence analysis indicated that 22 clones containing the coding sequences , of which 19 had homology in the GenBank and 3 were unknown. The obtained sequences may be target genes regulated by β-interferon, and some genes encode proteins involved in cell cycle regulation, metabolism, and cell apoptosis.

Key words: β-interferon; Down-regualated; Suppression subtractive hybridization (SSH)

摘要：筛选β-干扰素质粒转染下调相关基因。以β-干扰素表达质粒 pcDNA3.1(-)-IFN β转染 HepG2 细胞，同时以空载体 pcDNA3.1(-)为对照；制备转染后的细胞裂解液，从中提取 mRNA 并合成 cDNA，经 *Rsa*I 酶切后将来自 pcDNA3.1(-)转染的 cDNA 分成两组，分别与两种不同的接头 adaptor 1 和 adaptor 2 衔接，再与来自 pcDNA3.1(-)-IFN β转染的 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性 PCR，将产物与 T/A 载体连接，构建 cDNA 消减文库，并转染大肠杆菌进行文库扩增，随机挑选克隆 PCR 后进行测序及同源性分析。成功构建人β-干扰素质粒转染下调相关基因差异表达的 cDNA。所获得的 50 个克隆中，随机挑选 37 个克隆均含有插入片段，将这些克隆进行序列测定，并通过生物信息学分析获得其全长基因序列，结果共获得 22 种编码基因，其中 3 种为未知功能的基因。筛选到的 cDNA 序列，包括与细胞生长调节、物质代谢和细胞凋亡密切相关的一些蛋白编码基因。

关键词：β-干扰素；下调；抑制性消减杂交技术(SSH)

中图分类号：R373.2 文献标识码：A 文章编号：1003-5153(2006)01-0021-03

慢性乙型病毒性肝炎严重危害我国人民健康。到目前为止还没有有效而可靠的治疗办法。虽然α干扰素（IFNα）有一定的抗病毒作用，但研究表明仅对 30%～40%的病人有效。拉米夫定虽然有一

收稿日期：2005-07-14， 修回日期：2005-10-20

** 通讯作者：钟彦伟（1965-），女，吉林省籍，副研究员，医学硕士，主要从事肝脏疾病治疗及发病机理的研究。
Corresponding author. Tel：010-66933392, E-mail: zhongyanwei@126.com

定效果，但病毒的高抵抗率限制了其治疗作用。因此，对α干扰素治疗无效的患者仍需探索新的治疗途径。近年来有研究证明，β干扰素（IFNβ）可有效治疗 IFNα治疗无效的慢性乙肝患者[1-2]。也有研究者推荐对 HBeAg 阴性/HBV DNA 阳性的慢性乙型肝炎患者用 IFNβ治疗[3-4]。为探索β干扰素与肝细胞蛋白相互作用的分子生物学机制，我们利用抑制性消减杂交技术构建β-干扰素质粒作用于肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞的 cDNA 消减文库，筛选差异表达的基因片段，并应用生物信息学进行分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5α为本室保存，pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司；FuGENE6 转染试剂购自 Roche 公司，mRNA Purification 试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司，PCR- Select cDNA Subtraction 试剂盒、50×PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自 Clontech 公司，High Pure PCR Product Purification 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司，T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司。真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-β由本室构建。用 FuGENE6 转染试剂将 2μg pcDNA3.1(-)-IFNβ及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞，48h 后收获细胞。使用 mRNA Purification 试剂盒，直接提取转染了重组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。

1.2 消减杂交文库的建立

采用 Clontech 公司的 PCR-Select cDNA Subtraction Kit，常规 SSH 方法按说明书进行。以转染了重组表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA)，把来自 pcDNA3.1(-)空载体转染细胞获得的 dscDNA 标记为测试 Tester，把来自 pcDNA3.1(-)-IFNβ转染细胞获得的 dscDNA 标记为驱动 Driver，dscDNA 经 *Rsa* Ⅰ（一种识别 4 碱基序列的内切酶）消化，产生相对较短的平端片段，纯化酶切产物。将 Tester 的 dscDNA 分为两份，分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2，然后与过量的 Driver dscDNA 进行杂交；合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交。扩增产物与 pGEM- Teasy 载体连接，转化 DH5α 感受态细菌，在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上，37℃培养 18 h。共得到 50 个白色菌落，以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物对随机挑选的 37 个克隆进行菌落 PCR 扩增，证明含有插入片段（200～1 000bp）后，将这些克隆送测序（上海申友公司），并且应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 mRNA 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及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 4.18μg 和 4.19 μg，*A*260／*A*280=2.06。应用 20g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 500 bp 清晰慧尾片状条带，证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求。

2.2 dscDNA 两端连接效率检测

dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤。将连接有 adaptor1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物（看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物）进行 28 个循环扩增，产物用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当，说明 dscDNA 已经与接头高效率连接。

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定

以 1μL 消减及未消减 PCR 产物为模板，用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增，分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5μL 进行电泳鉴定。结果显示：与未消减组 PCR 产物相比，消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少，说明所构建的消减文库具有很高的消减效率（图１）。

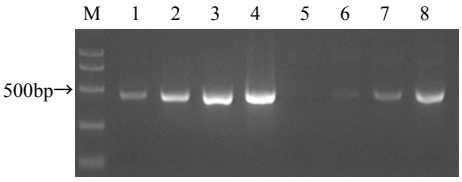

图 1 消减效率分析

Fig.1 Analyse of subtractive efficiency

1~4: unsubtractive, 5-8: subtractive, primer G3PDH, PCR cycle 18,23,28,33

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆

杂交产物经两轮 PCR 扩增后，菌落 PCR 扩增结果显示为 200～1 000 bp 大小不等的插入片段，所获得的 50 个克隆中随机挑选 37 个克隆均含有插入片段，这些条带可能代表差异表达的基因片段（图 2）。

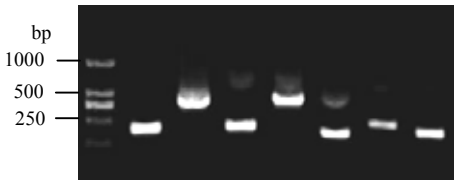

图 2 部分克隆 PCR 鉴定电泳图
Fig.2 Some clones PCR electrophoretogram

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果

将 22 个克隆基因，与 GenBank 数据库进行初步比较。其中 19 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源（99%～100%），3 个克隆未检索到任何相应的相似序列，可能为未知功能的基因。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果
Table1 List of genes down-regulated by IFN-β

Homologous protein	Homologous clones	Homology (%)
Aldo-keto reductase family 1 member C1 (Catalyt/ic activity)	1	99
dihydrodiol dehydrogenase	1	99
ribosomal protein	9	99-100
scar protein	1	100
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	1	100
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	2	100
H2A histone family, member Z (H2AFZ)	1	99
myosin, light polypeptide 6(MYL6)	1	100
Human meningioma-expressed antigen 6 (MEA6)	1	100
alpha-2-macroglobulin	1	100
Unknown function protein（KIAA0101）	3	100
Total clones	22	

3 讨论

本研究利用抑制性消减杂交技术（Suppression subtractive hybridization，SSH）[5~7]筛选并克隆β-干扰素质粒转染下调靶基因，推测其在体内可能存在功能的线索。SSH 方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术，与传统的方法比较，具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点，能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因，可以在较短的时间内获得较理想的实验结果[8~9]。我们将真核表达载体 pcDNA3.1(-)-IFNβ，转染肝母细胞瘤细胞系 HepG2，同时以空白载体转染相同细胞系，以 2 种转染的细胞系中提取的 mRNA 为起始材料，应用 SSH 方法成功地构建了β干扰素质粒下调相关基因差异表达的 cDNA 消减文库，挑选 37 个克隆测序分析，结果主要包括两种类型的序列，即已知功能的基因序列和未知功能的基因序列。在本次实验中获得 3 种差异表达的未知功能序列，对其基因结构和功能正在研究之中。

在已知功能基因序列中，主要包括：①细胞内结构与细胞生长相关蛋白，如核糖体蛋白、异种核糖核蛋白等。②参与细胞内代谢的蛋白基因，如 Aldo-keto reductase family 1 member C1、脱氢酶 dihydrodiol dehydrogenase、组织蛋白酶(H2AFZ)。③参与细胞信号转导的蛋白基因，如真核转录起始因子 3 亚基 3。未知功能基因序列，如 KIAA0101，功能有待进一步研究。

References

[1] Raquel M, Gregorio C, Inmaculada F, *et al*. A pilot study of β-interferon for treatment of patients with chronic hepatitis B who failed to respond to α-interferon[J]. J Hepatol 2002, 37(5): 655-659.

[2] Cooksley W G. Treatment with interferons (including pegylated interferons) in patients with hepatitis B[J]. Semin Liver Dis, 2004, 24 (Suppl 1):45-53.

[3] Yasuji A, Kazuaki C, Akihito T, *et al*. A randomized,double-blind, controlled trial of natural interferon-β therapy for e-antigen-negtive chronic hepatitis B patients with abnomal transaminase levels[J]. J Gastroenterol 1996, 31(4)：559-564.

[4] Goodbourn S, Didcock L, Randall R E. Interferons:cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures [J]. J Gen Virol 2000, 81(pt10): 2341-2364.

[5] Chen J(成 军).Recent development in the study on the transactivation effects of hepatitis virus protein [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army(解放军医学杂志), 2004, 29(5):373-376.

[6] Galbraith E A, Antonopoulos D A, White B A. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model[J]. Environ Microbiol 2004; 6(9):928-937 [PMID: 15305918].

[7] Hou L, Tang J W, Cui X N, *et al*. Construction and selection of subtracted cDNA library of mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis potential[J]. World J Gastroenterol 2004; 10(16): 2318-2322 [PMID: 15285011].

[8] Sun W, Zhang K, Zhang X, *et al*. Identification of differentially expressed genes in human lung squamous cell carcinoma using suppression subtractive hybridization[J]. Cancer Lett 2004; 212(1): 83- 93 [PMID: 15246564].

[9] Ji W, Wright M B, Cai L, *et al*. Efficacy of SSH PCR in isolating different-tially expressed genes[J]. BMC Genomics 2002;3(1):12 [PMID: 12033988].