

应用抑制性消减杂交技术筛选流感病毒感染 宿主应答基因

陈忠斌, 杨 静, 王 华, 孙偶军, 王升启*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 从宿主系统寻找病毒感染特异性相关的生物大分子是研究病毒药物靶标和诊断标志物的新方向. 为了筛选宿主细胞中流感病毒感染特异性基因, 采用抑制性消减杂交技术 (SSH), 以流感病毒 A/鲁防/93-9 (H3N2) 感染 MDCK 细胞及正常 MDCK 细胞为材料, 构建病毒感染特异性差减 cDNA 文库, PCR 法扩增鉴定其中插入片段大小. 从差减文库中随机挑取 100 个克隆进行测序, 用生物信息学方法对其同源性和基因功能进行分析和预测. 结果显示, 成功构建了流感病毒感染特异性差减 cDNA 文库, 文库中 cDNA 片段长度在 250~1 000 bp 之间. 从文库中随机选取 100 个克隆测序, 获得了 95 个有效序列, 经 blast 同源性分析发现, 大部分基因为参与宿主细胞能量代谢和蛋白质生物合成过程中的基因; 其中 19 个为无任何功能线索的新基因片段. 流感病毒感染特异性差减 cDNA 文库的建立和筛选出病毒感染应答候选新基因 cDNA 片段, 为发现新型流感病毒药靶和诊断标志物以及病毒感染机制研究打下基础.

关键词 流感病毒, 抑制性消减杂交, 病毒感染应答基因, 药物靶标

中图分类号 R511.7

Screening and Identification of Differentially Expressed Genes from Influenza Virus Infected Host Cells by Suppression Subtractive Hybridization

CHEN Zhong-bin, YANG Jing, WANG Hua, SUN Ou-jun, WANG Sheng-qi*

(Department of Biotechnology, Biochip Technical Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract An alternative strategy for antiviral drug finding is to inhibit the function of host protein that are essential for the virus to complete its replication. To find the potential cellular anti-viral targets which were differentially expressed genes during influenza virus infection, subtractive cDNA library was constructed by suppression subtractive hybridization (SSH) with influenza virus A/Lufang/93-9 (H3N2) infected MDCK cells as tester and mock-infected MDCK cells as driver. 100 clones were randomly selected for further DNA sequencing, blast homology analysis and function prediction. It was showed that the inserts in subtractive cDNA library were between 250—1 000 bp. Most of the subtractive genes differentially expressed during Influenza virus infection were related to energy process and protein synthesis pathway. Meanwhile, 19 clones were found to be novel EST as no functional clues were associated with them by bioinformatic analysis. The novel ESTs differentially expressed in the course of influenza virus infection would make a good foundation for further finding host-derived antiviral target and diagnostic biomarker, and also probing the molecular

收稿日期: 2002-05-31, 接受日期: 2002-07-10

国家自然科学基金项目 (项目号: 30000146)

* 联系人 Tel: 010-66932211; Fax: 010-66932211; E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

陈忠斌, 男, 1969 年 10 月生, 博士, 副研究员

Received: May 31, 2002; Accepted: July 10, 2002

Supported by National Natural Science Foundation of China (No: 30000146)

* Corresponding author Tel: 010-66932211; Fax: 010-66932211; E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

pathogenesis of influenza virus infection.

Key words influenza virus, suppression subtractive hybridization, virus-host interaction, antiviral target

由于病毒基因组编码能力有限,从病毒寻找药靶受到限制,而且以病毒蛋白为靶的抗病毒药物易出现耐药性^[1].病毒是一种严格的细胞寄生物.病毒与宿主相互作用是病毒感染致病以及免疫的生物学基础,病毒感染宿主后通过多种信号传导途径引起病毒与宿主细胞基因表达的变化^[2,3].寻找宿主细胞中与病毒感染复制密切相关的基因、蛋白或其他生物大分子,不仅有助于阐明病毒感染致病的分子机制,而且可以发现来源于宿主系统的病毒药物新靶标和诊断标志物,为病毒病诊断和防治开辟新的研究方向^[4,5].

本文以流行性感冒病毒(简称流感病毒)为切入点,从病毒与宿主相互作用的角度,应用抑制性消减杂交技术筛选宿主细胞中与病毒感染密切相关基因,以期发现来源于宿主的病毒药靶和诊断标志物,为流感病毒新的防治与诊断措施研究奠定基础.

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞系和试剂盒

流感病毒 A/鲁防/93-9(H3N2)、MDCK 细胞系购自中国预防医学科学院病毒学研究所国家流感中心.抑制性消减杂交试剂盒 CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 购自 Clontech 公司.pGEM-T 载体、JM109 感受态细菌、mRNA 提取试剂盒等购自 Promega 公司. Trizol RNA 提取试剂盒为 Gbco 公司产品.

1.2 细胞培养和病毒感染

MDCK 细胞系培养液为含 10% 小牛血清、100 mg/L 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 DMEM.细胞置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养.待细胞长至 50%~70% 时倾去培养液,用 PBS 冲洗细胞单层 2 次,将经 DMEM 稀释的流感病毒 A/鲁防/93-9(H3N2)以 MOI = 1 的量感染细胞,同时设立加入相同体积 DMEM 培养液的对照,置 37 ℃ 培养箱中吸附 1 h,用无血清的 DMEM 培养液冲洗 2 次后,加入维持液(含有 2% 血清、5 mg/L 胰蛋白酶、100 mg/L 的链霉素和 100 U/ml 青霉素)于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养 24 h.

1.3 细胞总 RNA 提取与 mRNA 分离纯化

参照 Trizol RNA 提取试剂盒及 mRNA 分离试剂盒说明书进行.甲醛变性凝胶电泳观察 18 S 和 28 S rRNA 确定提取 RNA 质量.

1.4 病毒感染特异差减 cDNA 文库构建

参照 CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 说明书进行.以流感病毒感染细胞作为检测子(Tester),以正常 MDCK 细胞作为驱赶子(Driver).

1.4.1 第一、二链 cDNA 的合成与 *Rsa* 酶消化
取病毒感染细胞和正常细胞 mRNA 各 3 μg(4 μl),分别与 1 μl cDNA 合成引物(10 μmol/L)混合,70 ℃ 温育 2 min,加入 5 × 第一链缓冲液 2 μl,dNTP 混合物(各 10 mmol/L)1 μl,DEPC 处理的无菌水 1 μl 及 AMV 反转录酶(20 U/μl)1 μl,42 ℃ 温育 1.5 h,置冰上终止反应.立即在第一链合成反应液中加入预冷的无菌水 48.4 μl,5 × 第二链反应缓冲液 16.0 μl,dNTP(10 mmol/L)1.6 μl,20 × 第二链合成酶混合物 4.0 μl,混匀,16 ℃ 温育 2 h,加入 T4 连接酶 2 μl,16 ℃ 温育 30 min 后终止反应,用酚氯仿抽提纯化,最终溶于 60 μl 水中.分别取 43.5 μl 双链 cDNA,*Rsa* 酶消化为相对较短的平端片段.

1.4.2 Tester 双链 cDNA 与特异性接头连接 将酶切后的 Tester 双链 cDNA 按 1:6 稀释后,分为 2 组,一组与 Adaptor1 连接,另一组与 Adaptor 2R 连接,Adaptor 序列分别为:

Adaptor1:5'-CTAATACGACTCACTATA GG
GCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGF3

Adaptor2R:5'-CTAATACGACTCACTATA G
GGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGF3

1.4.3 消减杂交 将连有不同接头的 Tester 双链 cDNA 分别与过量 Driver 双链 cDNA 杂交.杂交条件为 98 ℃ 变性 1.5 min,68 ℃ 杂交 8 h.然后混合 2 份杂交样本,并补加过量的经 98 ℃ 变性 1.5 min 的 Driver cDNA 和杂交缓冲液,于 68 ℃ 杂交过夜.杂交完成后加入 200 μl 稀释缓冲液,于 -20 ℃ 冻存.

1.4.4 PCR 扩增 根据杂交反应动力学,只有在 Tester 中特异性表达的基因才能通过 PCR 得以大量扩增,从而获得差异表达的基因片段.取 1 μl 消减杂交产物用试剂盒提供的引物(PCR 引物 1)进行第 1 次 PCR 扩增,循环参数为:94 ℃ 25 s [94 ℃ 10 s,66 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min] 27 个循环 72 ℃ 10 min.将 PCR 产物按 1:10 稀释后,取 1 μl 进行第 2 轮 PCR 扩增,扩增条件为:94 ℃ 10 s [94 ℃ 10 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min] 15 个循环 72 ℃ 10 min.各取第 1、第 2 次 PCR 产物 5 μl,2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩

增情况.

1.4.5 cDNA 文库的构建 将第 2 次 PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,与 pGEM-T 载体连接,转化感受态大肠杆菌 JM109,构建差减 cDNA 文库.用 SP6/T7 通用引物作 PCR 筛选阳性克隆.

1.5 DNA 序列测定和基因功能分析

从文库中随机挑选 100 个 cDNA 克隆交由大连宝生物公司进行 DNA 测序,进一步对 DNA 序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST 网站进行序列同源性和基因功能预测.

2 结果

2.1 RNA 完整性及纯度鉴定

RNA 完整性和纯度是构建 cDNA 文库成败的关键.将提取的 RNA 进行甲醛变性电泳(见 Fig. 1).从图可看出,28 S RNA 与 18 S RNA 的比值介于 1.5 ~ 2.0 之间,说明 RNA 完整且未降解.紫外分光光度计测的 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8 ~ 2.0 之间,证明所提 RNA 纯度较好.

1 2

28 S

18 S

Fig. 1 Formaldehyde agarose gel electrophoresis of total RNA

1. From influenza virus infected cells; 2. From mock infected cells

2.2 抑制性消减杂交后 PCR 扩增

分别提取病毒感染细胞和正常细胞的总 RNA,合成其 dsDNA,用 *Rsa* 消化成平端.把 Tester 平分成 2 份,分别与 Adaptor1 和 Adaptor 2R 连接,按 Fig. 2 进行 2 轮杂交和 2 轮 PCR.用接头序列的外侧引物对消减杂交产物进行第 1 次 PCR 扩增,27 个循环后,由于产物较少,几乎看不出条带,但用接头序列的内侧引物对第 1 轮 PCR 稀释产物进行巢式 PCR 扩增后,由于特异性进一步增强,15 个循环后即出现许多条带,大小分布在 250 ~ 2 000 bp;同时,试剂盒提供的阳性对照经第 2 轮 PCR 扩增后出现了特征性条带(Fig. 3),提示应用抑制性消减杂交技术成功获得了流感病毒感染宿主应答基因 cDNA 片段.

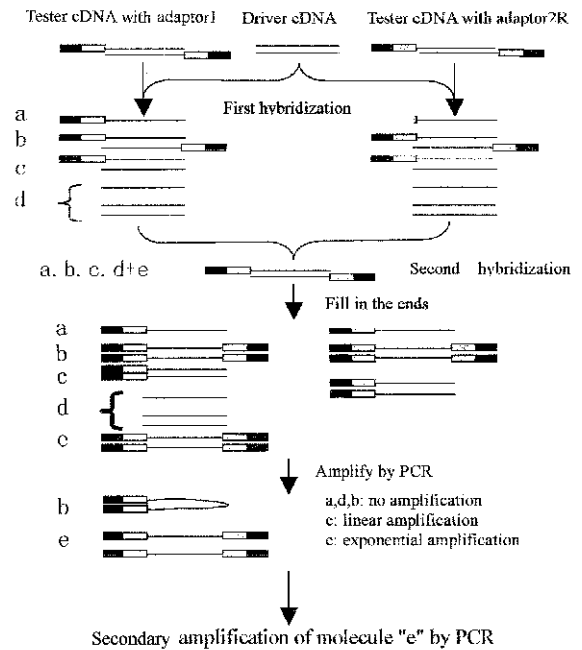


Fig. 2 Overview of suppression subtractive hybridization

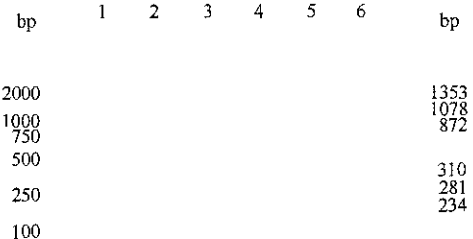


Fig. 3 PCR amplification of the subtractive hybridization samples

1: DNA marker/DL2000; 2: First PCR of subtractive hybridization samples; 3: First PCR of control samples; 4: Second PCR of subtractive hybridization samples; 5: Second PCR of control samples; 6: ϕ X174/*Hae* markers

2.3 差减 cDNA 文库克隆及鉴定

第 2 次 PCR 产物纯化后进行 pGEM-T 载体克隆,经一轮转化 JM109 共获得 768 个重组克隆.随机选取 40 个克隆 PCR 扩增后,1% 凝胶电泳鉴定其中插入片段的大小.结果发现,cDNA 文库中插入片段大小在 250 ~ 1 000 bp 之间,大部分集中在 400 bp 左右(Fig. 4).

2.4 cDNA 序列分析和基因功能预测

从差减文库中随机选取 100 个克隆进行 DNA 测序,获得了 95 个有效序列,将 95 个有效序列经 Blast 同源性分析和基因功能预测.同源性分析时,参照 nr 库中 score 100,Identity 90%,且 dbEST 库

No.16
 CTCAGTTC AAGTTAATAGAAAACAACAAAAGATCAAAAAGTATGCTTGGCTACTACTGTAC
 CTCGGCCGCGACACGCTA

No.18
 GTTTTACTCAAAATATTTAFTAAAGGCTTCAATAGAGIAAAAATCCAGCCTCCAGATCCAAC
 GCCAAGGAGACCCTATTTATGCTGTGGGTACCTGCCCCGGG CCGCCGA

No.30
 ATGGGTCACTGAGGCCFTTTTATTCTGCACATAAAACCCTGCGGGATCTTGCCGTAGACA
 CCTTGAGAITATTACATAGACAGACCTGGCTCCAGATGCTTGGTGGAAAGTGAGGTGAGAAA
 GCAACGATTTGGACCAATTACATGTTTACAGAGCTTGGGTCCAGCAGGGTTCAGATGT
 CAACCTGGCTTCTGTAGCAAATCTAAGGAAGCTTTGAGAAAATCACGGGGAAGGGAGAG
 GGCAGCTAACTAGCACAGGGCCCTGCUACTTTGGGTGGGGCCCTTGAGCTGCCCCGGGG
 AGCAGAGGTCTAACGAGCTGACTCAGGACCTCGGCCGCGACCACGA

No.32
 AGCGTGGTTCGCGCCGAGGTACAATTTACAGCTGATGAGCTGTTTITAGAAAIAAACTGTGG
 TATGTGTGTGTCAGTGCACAAAACATTTAALAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAGCTGCCCGGGCC
 GGCCGCTCGAA

No.38
 AGCGTGGTTCGCGCCGAGGTACATAGTCCCTTTACTTCCCTTGTAGCCTGTGAACTAGTTIA
 TAATAACTCTTAAGAAATATTCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAGCTTGAC
 CTGCCCGGGCGGCCGCTCGAA

No.41
 GACTCAATCAATAAGTGTATTTGATTACCTACATATGTGCCAGCCTCTTATAGCTAGTCTGG
 GAGATACAAAAGAGCCCTCGGGATGGTCCCTACCCCTCAAGAGTTTACAATGTCTTTGTGA
 AATCAGATACITACAAAAAGATAACTACCCATCAAAAAATTTGTGAACAATAAGCATCAGAGA
 AGCAAGAGTTATACACGGAGGGATAGAGGAAGGAGCGTAGGAGAGAAAATGGAGTGGT
 GAGAGGTGACTCGGTGTAGGAGGTGGTGCITGAGCAAGTTCCTCAGACAGCAGGAGGACT
 TGACTAAGAGGACAGGCCCTTCCAGCTTTGGGAGAAGAGCTCAGTCATAAAGTAAAGAGCTG
 GAGAGGTGGAALACTCGGCCGCGACCACGA

No.43
 TCGAGCGGCCGCCGGGCGAGGTAGCAGACTTTGTAGAAAGCAGTCAACAAGGTCCACTGA
 TGTGTGTCTCCAGCCCTGTGCCAGCCCTCAATGCTTTGATAAAACACTGAATTTTCAGAT
 ATGCCGGGTTCAGGTGGCCACACATGGTGGCAAGCTGCTCTCTGTGAATCAAGTGTCTCCCA
 GCCATCTCTCTTACCTGGGATGTTCCATTTCTCCTTGCAGGCCAGCATCAAGGTGGCCCT
 TGTGAAAATCTCCCTTGTTCACCCAAGGAGTACCTCGGCCGCGACCAC

3 讨论

流感是一种古老的病毒性传染病,对人类健康和生命构成极大威胁.流感的致病机理和以此为基础的防治措施研究是生物医学界关注的一个重要基础问题^[7,8]. A 型流感病毒亚型如此之多 ($H_{15}N_{1-9}$), 为何只有 H_1N_1 , H_2N_2 和 H_3N_2 三个亚型毒株对人类有致病性? 各亚型病毒在基因组结构、编码蛋白种类和功能上极其相似,如何决定其不同的感染特性和致病特征? 有报道^[7], 宿主细胞蛋白酶对流感病毒 HA 的裂解作用与病毒致病性有关,那么其中的分子机制是什么? 宿主其它因素是否也参与流感病毒的感染和致病作用? 等等. 解决以上问题的关键之一是,发现宿主系统中与病毒感染和致病性密切相关的生物大分子. 研究表明^[9], 流感病毒感染 3h 后能关闭宿主细胞蛋白表达,但宿主细胞质中功能性 mRNA 丰度不受影响,而病毒蛋白在这一时期却出现高水平表达,流感病毒 NS1 在上述过程中发挥重要调节作用. 此外,流感病毒感染也可引起宿主某些基因表达的变化,如白介素 (IL1, IL6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、干扰素 (IFN)、细胞趋化因子 (MIP-1; MCP-1; IP-10)、凋亡早期基因 (Bcl-2, Fas receptor/Fas-Ag; TGF β) 和细胞粘附因子等^[8]. 但是,由于所采用的实验体系、观察的指标和实验目的不同,目前对流感病毒感染宿主应答基因研究还只是片面和零碎

的,特别是对其中的低丰度表达基因尚缺乏系统研究.

抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是近几年出现的一种分离克隆差异表达新基因的策略. 与传统的差异表达基因克隆技术如差异显示 PCR (DD-PCR)、代表性差异分析 (RDA) 等相比, SSH 具有简便易操作 (3~4d 完成,无需物理分离单链和双链 DNA 分子)、所需材料少 (0.5~2.0 μ g mRNA)、特异性高、背景低、重复性好,特别是能分离出低丰度差异表达基因等优点^[10], 因此广泛应用于生理病理过程中差异表达基因的筛选和功能研究中^[11,12]. 本研究应用抑制性消减杂交技术结合 DNA 测序和生物信息学分析技术,从病毒与宿主相互互动的角度发现流感病毒感染宿主应答基因,为流感病毒感染机理和防治研究打下基础.

病毒作为一种严格的细胞内寄生物,其复制过程必须依赖于宿主细胞的能量代谢机制和生物合成途径. 对流感病毒感染细胞中差异表达基因的功能分析提示,这些基因主要参与细胞的能量代谢以及细胞蛋白生物合成等基本生命过程. 例如,编码 tRNA、细胞色素 b、12 S 和 16 S rRNA、NADH 脱氢酶 1 的线粒体基因群以及编码核糖体蛋白 L6、L7 (RPL7)、L11 (RPL11)、L18a 和 S13 (RPS13) 基因等. 以上参与细胞最基本的能量代谢和生物大分子生物合成过程中的基因,可能是所有病毒感染宿主细胞

后产生的一组共性应答基因.可以肯定,病毒感染过程中共性生物效应的背后必定存在其特异性的一面,而且病毒特异性宿主应答基因的发现对病毒药物研究和致病机制的阐明具有更大意义.本研究同时发现了 19 个流感病毒感染应答候选新基因,其中有的可能与流感病毒感染特异性密切相关.为了进一步证实获得的差异表达基因是否与流感病毒感染具有特定关系,是否与病毒致病性密切相关,目前正在应用反义技术和 RNAi 对其功能进行深入研究.

参考文献 (References)

- 1 陈忠斌. 病毒与宿主相互作用-病毒病防治的重要基础问题. 国外科技动态 (Chen Zhong-bin. Virus-host interaction-an important basic issue for prevention and treatment of viral diseases. *Recent Developments in Science & Technology Abroad*), 2000, **8**:33 ~ 34
- 2 Diao J, Garces R, Richardson C D. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infection and hepatocarcinogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2001, **12**:189 ~ 205
- 3 陈忠斌,王升启. 从肝炎病毒看病毒与宿主相互作用研究现状与策略. 病毒学报 (Chen Zhong-bin, Wang Sheng-qi. The research advances and a proposed research strategy of the virus-host interaction. *Chin J Virol*), 2002, **18**, (4):378 ~ 381
- 4 Fruh K, Simmen K, Luukkonen B G M, Beii Y C, Ghazal P. Virogenomics: a novel approach to antiviral drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2001, **6**(12):621 ~ 627
- 5 陈忠斌,高玮,王升启. 抗病毒药物研究新领域:病毒感染基因组学. 国外医学-药学分册 (Chen Zhong-bin, Wang Sheng-qi. A new area for antiviral drug research: Virogenomics. *Foreign Med Sci, Section on Pharmacy*), 2001, **28**(6):351 ~ 355
- 6 Ma S H, Wang S Q, Fan B X, Ma Z C, Gao Y. The isolation of differentially expression cDNAs from Siwutang-induced moused with SSH. *Lett Biotechnol*, 2002, **13**(2):128 ~ 131
- 7 Stenhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, **258**:1 ~ 20
- 8 Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. A fatal relationship-influenza virus interaction with the host cell. *Viral Immunol*, 1999, **12**(3):175 ~ 196
- 9 Nemeroff M E, Barabino S M, Li Y, Keller W, Krug R M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30KD subunits of CPSF and inhibits 3 end formation of cellular pre-mRNA. *Mol Cell*, 1998, **1**(7):991 ~ 1000
- 10 Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:6025 ~ 6030
- 11 王晓丽,刘丽,刘建斌,王焜,曹颖. 大鼠正加速度高耐力相关基因的分离. 中国生物化学与分子生物学报 (Wang Xiao-li, Liu Li, Liu Jian-bin, Wang Ye, Cao Ying. The separation of genes from rats related to high tolerance to positive acceleration. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(6):733 ~ 738
- 12 郭俊明,陶莎,庄菁,梁雪清,罗超权. 应用抑制性消减杂交分析全反式维甲酸和 1,25-二羟维生素 D₃ 诱导结肠癌细胞的相关基因. 中国生物化学与分子生物学报 (Guo Jun-ming, Tao Sha, Zhuang Jing, Liang Xue-qing, Luo Chao-quan. Analysis of the differentiation associated genes in colon cancer cells induced by all-trans-retinoic acid and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ using SSH technology. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2001, **17**(2):255 ~ 261