

I 型人类免疫缺陷病毒 tat 基因重组慢病毒表达载体的构建^①

陈玉礼, 韦红玉, 唐华英, 赵丽娟, 曾怡^②

(右江民族医学院病原生物学与免疫学教研室, 广西 百色 533000)

E-mail: 1032212879@qq.com)

摘要: **目的** 构建人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1) tat 基因重组慢病毒表达载体。**方法** 将 pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 载体分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切制备线性化载体;通过设计引物及 PCR 扩增,获得 5'端与 3'端分别与 15nt 线性化载体 3'端与 5'端互补的 tat 基因片段;tat 基因片段和线性化载体经纯化后,进行重组反应;将重组产物转化感受态细胞 DH5 α ,通过菌落 PCR、质粒双酶切、序列测定等方法鉴定重组克隆。**结果** 菌落 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,在约 354bp 位置出现预期的条带;*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒经琼脂糖凝胶电泳,在约 7544bp 和 354bp 位置上出现预期条带;通过测序,重组质粒中插入的 tat 基因序列与 GenBank 基因库中的 HIV-1 tat 基因序列同源。**结论** 采用本研究方法能成功构建 HIV-1 tat 基因重组慢病毒表达载体。

关键词: 人免疫缺陷病毒 1 型; tat 基因; 重组慢病毒表达载体

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)06-0444-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.06.005

Construction of recombinant lentivirus expression vector for human immunodeficiency virus 1 tat gene

Chen Yuli, Wei Hongyu, Tang Huaying, ZhaoLijuan, ZengYi

(Department of Pathogenic Biology and Immunology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi E-mail: 1032212879@qq.com)

Abstract: **Objective** To construct recombinant lentivirus expression vector for human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) tat gene. **Methods** The pCDH-GFP and pCDH-RFP vectors were used to prepare the linear vectors respectively by *EcoR* I and *Hind* III. By designing primers and PCR amplification, 15nt complementary sequences of 3' terminal and 5' terminal of linearized vectors was added to the 5' terminal and 3' terminal of tat gene, and the gene fragments that the 5' terminal and 3' terminal respectively complemented 3' terminal and 5' terminal of 15nt linearized vectors were obtained. Subsequently, the recombinant reaction was performed after the tat gene fragments and the linearized vectors were purified. The recombinant products were transformed into competent cells DH5 α by conventional methods. Finally, the recombinant clones were identified with colony PCR, plasmid double enzyme digestion and sequencing. **Results** Expected DNA bands occurred at about 354bp after the colony PCR amplification products were separated by agarose gel electrophoresis, two DNA bands with the expected size at about 7500bp and 350bp were visible when *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion recombinant plasmids were separated by agarose gel electrophoresis. The data of the gene sequencing showed that the tat gene inserted in recombinant plasmid was homologous to the HIV1 tat gene sequence of GenBank. **Conclusion** The HIV1 tat gene lentivirus recombinant expression vector can be successfully constructed by the protocol designed in this study.

Key words: human immunodeficiency virus 1; tat gene; lentivirus expression vector

① 基金项目:广西自然科学基金 2014GXNSFAA118136

② 通信作者, E-mail: 47675297@qq.com

人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus, HIV-1)是获得性免疫缺陷综合征的病原体。其中 Tat 蛋白是 HIV 基因复制和表达调控所必需的一种蛋白^[1]。Tat 蛋白由 2 个外显子编码,一个外显子编码 1-72 位氨基酸残基,另一个编码 73-101 位氨基酸残基,其中一个外显子编码的 72 个残基的肽段具有完全的体外反式激活活性^[2]。Tat 蛋白能从 HIV-1 感染的细胞中释放到胞外,当细胞外的 Tat 蛋白被 HIV 感染的细胞吸收时,Tat 蛋白可反式激活 HIV-1 长末端重复序列而致下游的 HIV-1 基因表达,促进 HIV-1 病毒颗粒的产生。最近有研究者研究了 Tat 蛋白进入细胞后与宿主细胞基因组的结合图谱,结果发现约 53% 的 Tat 结合靶区位于 DNA 重复元件中,约 30% 位于 Alu 序列中,仅有约 7% 位于转录起始位点附近,剩下的 Tat 蛋白结合靶区位于内含子和基因间区^[3]。此结果提示,Tat 蛋白不仅可增强 HIV-1 病毒基因的转录,还可结合到宿主基因组的特异位置,是维持病毒生活周期的潜在重要因素。Tat 蛋白是一种具有多功能的蛋白,既能通过反式激活效应调控病毒基因的复制和表达,又可以激活静态 T 淋巴细胞抑制免疫细胞的分化和增殖,诱导细胞凋亡,加快病毒在体内的感染和传播以及引发各种并发症^[4]。因此构建 tat 基因重组慢病毒表达载体,是进一步研究 Tat 蛋白功能的重要工作基础。

1 资料与方法

1.1 实验耗材 pSec-Tat 质粒为本课题组构建保存,pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 质粒载体由南京医科大学卢春教授惠赠。PCR 引物由 Takara 生物公司合成,PCR 试剂盒、限制性内切酶、DNA 标准分子量 Marker、EasyGeno 重组试剂盒、感受态 DH5 α 、质粒小量提取试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司。研究中主要使用下列仪器:5424 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Chemidoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),Mycycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),Nanophotometer P360 超微量分光光度计(美国 IMPLLEN 公司)。

1.2 方法

1.2.1 tat 基因片段及线性化 pCDH-GFP、pCDH-RFP 载体的制备 根据 Genbank 基因库中登记的 HIV-1 tat 基因序列以及 pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 载体序列设计 PCR 引物,在 tat 基因片段 5'端和 3'端分别加入 15nt 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切制备的线性化载体 3'端或 5'端序列,使扩增的 tat 基因片段上下游分别带有 15nt 与线性化载体两端互补的序列。引物序列如下(下划线部分分别为与线性化载体 3'端或 5'端序列互补的序列):

Forward attctagagctagcgaattcATGGAGCCAGTAGA TCCTAGAC

Reverse tccttcgcgccgcgatccCTTGTCATCGTCGT CCTTG

以 100ng pSec-Tat 质粒为模板,用合成的 PCR 引物扩增 tat 基因,50 μ l PCR 反应体系包括 Forward 2.0 μ l、Reverse 2.0 μ l、5 \times Fast HiFidelity PCR Buffer 10 μ l、Fast HiFidelity Polymerase 1.0 μ l,以 ddH₂O 补足 50 μ l;扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 10 s,68 $^{\circ}$ C 15 s 循环 30 次,68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 载体进行双酶切。双酶切的 20 μ l 体系如下:载体 1 μ g,*EcoR* I FastDigest enzyme 1 μ l,*Hind* III FastDigest enzyme 1 μ l,10 \times FastDigest Green Buffer 2 μ l,以 ddH₂O 补足 20 μ l;双酶切体系在 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。

PCR 反应产物和双酶切产物分别加上样缓冲液后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察扩增条带。最后用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒按说明书回收并纯化凝胶产物,并用紫外分光光度计进行浓度的测定。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 tat 基因重组慢病毒表达载体的构建 建立 10 μ l 重组反应体系:线性化载体 0.02 pmol,tat 基因 0.2 pmol,2 \times EasyGeno Assembly Mix 45 μ l,以 ddH₂O 补足 10 μ l;把重组反应混合液置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 15 min,反应结束后将离心管置于冰上冷却 5 min。取 5 μ l 重组产物转化感受态细胞,以含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选克隆。挑取生长的克隆接种含氨苄青霉素的 LB 培养液,180 rpm 振荡培养 1 h 后,取 1 μ l 菌液进行 PCR 鉴定,50 μ l 反应体系如下:PCR SuperMix 45 μ l、Forward 2.0 μ l、Reverse 2.0 μ l、菌液 1 μ l,反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 30 个循环,68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物检测、双酶切验证反应条件及反应体系同 1.2.1。提取菌落 PCR 和双酶切验证阳性克隆质粒送广州天一辉远公司测序。

2 结果

2.1 tat 基因片段及线性化 pCDH-GFP、pCDH-RFP 载体的制备 以 pSec-Tat 为模板,经 PCR 扩增并用 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在约 354 bp 处出现条带,与预期的 354 bp 大小基本一致,结果见图 1a。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 载体进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳后,在约 7544 bp 处出现条带,电泳结果见图 1b。

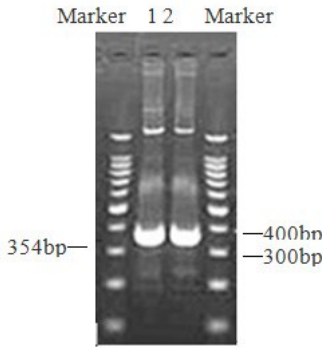


图 1a PCR 使 *tat* 基因两端分别带有 15nt 与线性化载体两段 3'端与 5'端重叠互补的序列 1%琼脂糖凝胶电泳图
注:Marker:100bp ladder;1,2:*tat* 基因

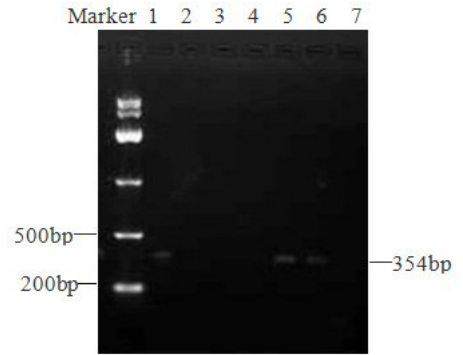


图 2b LB 固体培养基上挑选菌落进行菌落 PCR 验证 pCDH-GFP-Tat 阳性克隆
注:1,5,6:阳性克隆;2,3,4,7:阴性克隆

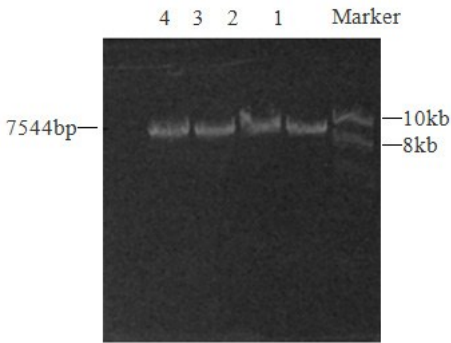


图 1b pCDH-GFP 和 pCDH-RFP 两个载体分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切制备线性化载体
注:Marker:10000bp ladder;1,2:pCDH-GFP;3,4:pCDH-RFP

2.2.2 双酶切鉴定菌落 PCR 阳性克隆 提取菌落 PCR 阳性克隆质粒进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切验证,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,其中 3 个 pCDH-GFP-Tat 阳性克隆和 5 个 pCDH-RFP-Tat 阳性克隆在 7544kp 和 354bp 位置上出现条带,与预期的载体和 *tat* 基因片段的大小一致。电泳结果见图 3a 和图 3b。

2.2 重组克隆的鉴定

2.2.1 菌落 PCR 重组克隆 在 LB 固体培养基上挑选生长的菌落进行菌落 PCR 验证,琼脂糖凝胶电泳后在约 354bp 处出现条带,与预期的条带大小一致。电泳结果见图 2a 和图 2b。

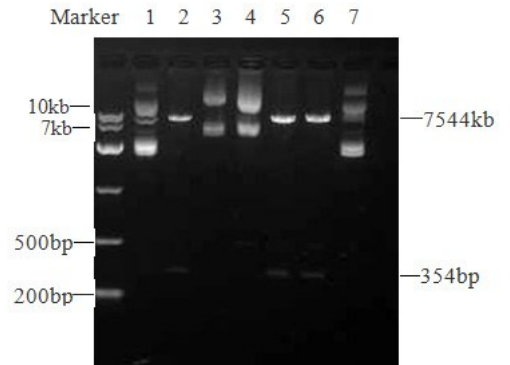


图 3a 对疑似阳性克隆双酶切验证 pCDH-GFP-Tat
注:2,5,6:阳性克隆;1,3,4,7:阴性克隆

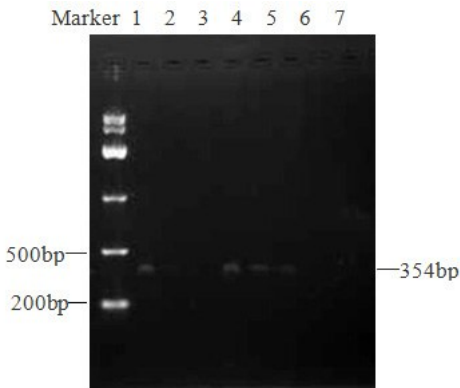


图 2a LB 固体培养基上挑选菌落进行菌落 PCR 验证 pCDH-RFP-Tat 阳性克隆
注:1,4,5,6:阳性克隆;2,3,7:阴性克隆

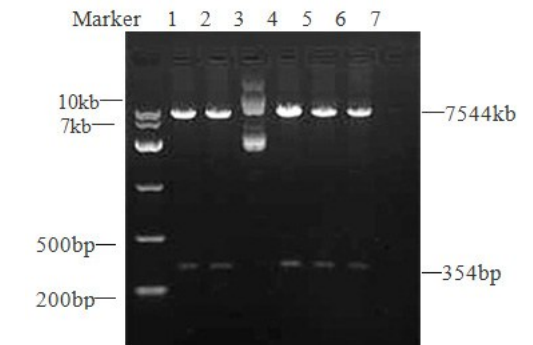


图 3b 对疑似阳性克隆双酶切验证 pCDH-RFP-Tat
注:1,2,4,5,6:阳性克隆;3,7:阴性克隆

2.2.3 阳性克隆 *tat* 基因序列的测定 送菌落 PCR

和双酶切鉴定均为阳性的克隆质粒到测序公司进行测序,结果显示,重组的 pCDH-GFP-Tat 和 pCDH-RFP-Tat 中 tat 基因序列与 GenBank 中登记的 HIV-1 tat 基因 100%同源。

3 讨论

HIV-1 反式转录激活因子 Tat (Trans-activator of transcription, Tat) 是一种非常重要的调节蛋白,产生于病毒感染的早期,它可与位于 HIV-1 基因组 5' 端长末端重复序列的反式激活效应元件 (Transactivating responsive region, TAR) 结合,促进 HIV-1 复制及转录,在 HIV-1 感染及致病中起着非常重要的作用^[5]。Tat 蛋白是 HIV-1 编码的可溶性蛋白之一,具有上调许多病毒和细胞基因表达的转录因子特性。我们之前的研究已经证实 HIV-1 Tat 可激活 KSHV 裂解复制周期, JAK-STAT 信号通路参与调节 Tat 激活 KSHV 裂解复制周期^[6], 在激活和促进病毒复制中起重要作用。

本实验是根据 DNA 序列同源性进行片段重组,用 2×EasyGeno AssemblyMix 试剂盒中的重组酶活性,可将载体和 PCR 扩增的 tat 基因片段同源区域重组连接,转化感受态细胞筛选克隆,并经 PCR、双酶切和测序鉴定重组成功。本课题组计划将重组 tat 基因的慢病毒表达载体转染 293T 细胞,经免疫印迹技术、RT-PCR 技术检测构建的重组 tat 基因在 293T 细胞中的表达后,鉴定 Tat 蛋白的反式激活活性。构建的

重组 tat 基因的慢病毒表达载体与包装质粒共载体转染 293T 细胞,包装重组慢病毒后,可用于感染多种人体细胞并稳定表达 Tat 蛋白,从而研究 Tat 蛋白对人体细胞的表观遗传学或转录组的影响,探索 Tat 蛋白在 HIV-1 感染的相关疾病中的作用。

参考文献:

- [1] 袁雅红,赵珊珊,王小莉,等. HIV-1 Tat 蛋白抑制骨髓间充质干细胞的造血支持功能[J]. 中国生物工程杂志, 2017,37(6):1-8.
- [2] 邱会平,程晓东,卢春. HIV-1 tat 基因重组原核表达载体的构建及融合蛋白的表达纯化与功能鉴定[J]. 江苏大学学报(医学版),2013,23(4):308-312.
- [3] Celine Marban, Trent Su, Roberto Ferrari, et al. Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome[J]. PLoS one, 2011, 6(11): e26894.
- [4] 陈蔚宇. 细胞自噬及代谢相关因素在 HIV-1 Tat 激活中的作用机制研究[D]. 北京:北京工业大学, 2015.
- [5] 赵丽娟,陈源红,唐华英,等. 1 型人类免疫缺陷病毒 tat 基因重组分泌型真核表达载体的构建[J]. 微创医学, 2012,7(4):347-350.
- [6] Zeng Y, Zhang X, Huang Z, et al. Intracellular Tat of human immunodeficiency virus type 1 activates lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: role of JAK/STAT signaling[J]. J Virol, 2007, 81(5): 2401-2417.

收稿日期:2017-11-13;修回日期:2017-12-19

《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要,缩短审稿流程,加快稿件处理速度,方便作者投稿和专家审稿,本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统,2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjmzyxy.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度,审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 yyxb1979@126.com,自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后,学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统,并向编辑部反馈意见,以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题,请与编辑部联系:0776-2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫