

137-207

HIV-1 长末端重复序列对重组痘苗病毒 表达 Gag 蛋白的影响

Q753
Q338.4

毛春生* 金宁一[↓] 佟明华 郭军庆
王秀清 郭志儒 殷 震

(解放军农牧大学研究所, 解放军基因工程实验室, 长春 130062)

摘要 将系列缺失的 HIV-1 长末端重复序列(LTR)和全长的 *gag* ORF 置于痘苗病毒载体中, 经同源重组和血球吸附试验, 成功地构建了 6 株重组痘苗病毒。免疫印迹和免疫酶试验检测均表明, 6 株重组病毒的 Gag 蛋白表达量因 LTR 不同而有明显差异, 表明 HIV-1 的 LTR 及其下游基因置于痘病毒启动子控制下, 在痘苗病毒中表达时有下述特点: (1) 不同的痘苗病毒启动子与全长 LTR 相互作用, 对 *gag* 基因表达有显著不同的调控效果; (2) NR 序列对 Gag 蛋白表达没有明显影响; (3) EN 序列不能被重组痘苗病毒表达系统识别; (4) TAR 序列可提高 Gag 蛋白的表达量; (5) U5 区及下游非翻译序列不影响 Gag 蛋白的表达。

关键词 人 I 型免疫缺陷病毒(HIV-1), 长末端重复序列(LTR), Gag 蛋白, 表达调控, 痘苗病毒

反转录病毒感染敏感细胞后, 单链 RNA 基因组需反转录为双链 DNA, 并与宿主细胞的基因组整合, 才能完成其生命周期。前病毒 DNA 基因组与单链 RNA 基因组的区别, 在于 DNA 基因组两端形成了长末端重复序列(long terminal repeats, LTR), 由 U3、R、U5 区三部分组成。人 I 型免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) LTR 的 U3 区长 453 bp、R 区长 98 bp、U5 区长 83 bp。LTR 实际上是一个启动子, 对病毒的表达和其它生命活动起调控作用, 其功能区主要位于 U3 区和 R 区, 从 5' 端到 3' 端依次为负调节序列(negative regulation sequence, NR)、增强子(enhancer, EN)、TAR 元件(反式激活应答元件, trans-activating responsive element), U5 区与病毒的 DNA 整合有关^[1]。已经证明, HIV-1 LTR 在多种病毒^[2]和大肠杆菌^[3]中具有启动子作用, 可促进外源基因的表达。

一般认为, 痘苗病毒具有独立的酶系统, 在感染细胞的胞浆内增殖, 因此该病毒基因表达的调控方式与其它病毒(包括反转录病毒)或真核细胞不同, 与大肠杆菌也有很大差别^[4]。为了在痘苗病毒中高效表达 HIV 的基因, 有必要弄清 LTR 各功能区在痘苗病毒中对外源基因表达的影响。观察这种效应, 也有助于我们全面、深入地了解 HIV LTR 的各种生物学功能。本研究将系列缺失的 HIV-1 LTR 和全长的 *gag* ORF 插入痘苗病毒的基因中, 观察发现 HIV-1 LTR 对 *gag* 基因在痘苗病毒中的表达具有重要的影响。

收稿日期: 1996-12-13, 修回日期: 1998-01-04

* 现通讯地址: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

材料与方法

1 菌株

大肠杆菌(*E. coli*) HB101、DH5a、JM109,均由本室保存。

2 质粒

质粒 pNL432 由日本京都大学病毒研究所 Adachi 博士赠送,它是一个含有 HIV-1 前病毒全基因的杂交质粒^[5],痘苗病毒表达载体质粒 pSFJ2-16 为金宁一等所构建^[6],质粒 pBluescript SK(+)由本实验室保存。

3 病毒和细胞

WR 株痘苗病毒由 R. Conclit 博士惠赠,地鼠肾细胞(BHK21)由本室保存。细胞和病毒用含有 10% 或 2% 小牛血清的 DMEM 或 MEM 培养增殖。

4 痘苗病毒表达质粒的构建

质粒构建及限制性内切酶消化、连接、转化、重组质粒的酶切鉴定等,均参照文献[7]介绍的方法进行。所用的限制性内切酶和其它工具酶为 Promega 公司、华美生物工程公司、Boehringer Mannheim 等公司的产品。

痘苗病毒表达质粒构建的策略如下:将含有 HIV-1 前病毒全基因的质粒 pNL432,用限制性内切酶 EcoRV 消化,切出 HIV-1 前病毒基因组的 5'-LTR 和 *gag* 基因以及部分 *pol* 基因片段(nt 112~nt 2977,核苷酸编号与 pNL432 上一致,下同),插入质粒 pBluescript SK(+)的 EcoR V 位点,构建了质粒 pSKLGp。以 Hinc II 酶切 pSKLGp,切除大部分残余的 *pol* ORF(nt 2496~nt 2977),并自身连接,成为质粒 pSKLG。从 pSKLG 中以 BamH I -Hinc II 切出 nt 112~nt 2496 DNA 片段,插入 pSFJ2-16^[6]的 BamH I -Sma I 位点之间,构建 pATILG。pATILG 质粒以 EcoRI 切出 nt 112~nt 2496 的 DNA 片段,插入 pSFJ2-16 的 EcoR I 位点,构建表达质粒 p16LG。pATILG 质粒以 Sca I 和 EcoR I 联合消化,回收 nt 313~nt 2496 的 DNA 片段,插入 pSFJ2-16 的 Sma I 和 EcoR I 位点之间,构建表达质粒 p16LGΔ1。以 Pvu II 和 BssH II 消化 pATILG 质粒,切出 nt 433~nt 711 片段,插入 p16LG 的 Sma I -BssH II 位点,构建表达质粒 p16LGΔ2。pATILG 质粒以 SacI 切出 nt 487~nt 2496 的 DNA 片段,插入 pSFJ2-16 的相应位点,构建表达质粒 p16LGΔ3。BssH II -Hinc II 双酶切 pATILG 质粒,得到 nt 711~nt 2496 的基因片段,补平后插入 pSFJ2-16 的 Sma I 位点,构建表达质粒 p16G。构建的质粒用 4~6 种限制性内切酶消化鉴定,并将亚克隆的 HIV-1 基因片段再转入 pBluescript SK(+)中,按一般方法进行确证性序列分析。

5 重组病毒的构建

5.1 质粒 DNA 转染和同源重组 按照以前报道的方法^[6]进行,主要步骤是,培养 BHK21 细胞至 20%~40% 成层,以 0.1 PFU/细胞的量感染 WR 株痘苗病毒,37℃ 作用 1 h。在第一组微量离心管中将 10 μL 转染试剂(DOTAP,Boehringer Mannheim 产品)与 500 μL DMEM 培养液轻轻混合,在第二组微量离心管将 10 μg 的各种表达质粒 DNA 与 500 μL DMEM 轻轻混合,然后把第二组溶液小心地滴入第一组。室温静止 15~30 min。将混合物直接加至上述已感染有病毒的 BHK21 细胞平皿中,6~8 h 后换新鲜配制的 10% 小牛血清 DMEM,培养 48 h 后收毒,作为筛选重组病毒的样品。

5.2 重组痘苗病毒的初步筛选 将样品用 PBS 稀释,接种于 BHK21 单层细胞,感染 48 h 后,加入 0.5% 鸡红细胞。吸附 20 min,挑选不吸附鸡红细胞的重组病毒空斑。进行空斑纯化直至无吸附鸡红细胞的空斑出现。

6 间接免疫荧光试验(IFA)

将重组病毒子和 WR 株痘苗病毒分别以 0.01~0.03 PFU/细胞的量接种于盖玻片培养的 BHK21 细胞单层,36~48 h 后取出盖玻片,50% 乙醇-50% 丙酮固定,洗涤后与抗 HIV-1 p24 单克隆抗体(Boehringer Mannheim 产品)反应,再与异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的绵羊抗鼠 IgG(军事医学科学院产品)反应,最后置荧光显微镜下观察。

7 免疫印迹试验

按常规方法进行^[7]。重组病毒和对照病毒(WR)分别以 10 PFU/细胞的量接种于 BHK21 细胞,感染后 24 h,收获感染细胞,裂解,制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶样品,在 10% 的胶中电泳,每泳道加 40 万细胞裂解物上

清样品。电泳毕,转移至硝酸纤维素膜,再先后与 p24 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG(Promega 产品)反应,最后用 NBT 和 BCIP(Sigma 产品)显色。

8 Gag 蛋白表达量的免疫酶检测(EIA)

培养在 6 孔板中感染重组痘苗病毒的 BHK21 细胞经 PBS(pH 7.2)洗涤后,每孔加入 500 μ L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6),洗下细胞。用超声波破碎,碳酸盐缓冲液(pH 9.6)倍比稀释。3000 r/min 离心 10 min,取 100 μ L 裂解液或其稀释液直接包被 ELISA 反应板,再依次与 p24 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG(本所刘子研究员惠赠),于室温下作用 1 h,最后用 OPD-H₂O₂ 显色,酶联阅读仪测定光吸收值(A₄₉₀),以 A₄₉₀>0.2 的细胞裂解物的最高稀释度为终点效价。

9 对照

免疫学检测(IFA、Western blot、EIA)中所用细胞对照为未接种病毒的正常 BHK21 细胞,其裂解物再接种 BHK21 应无空斑出现;病毒对照为 WR 株痘苗病毒感染的 BHK21 细胞,其裂解物再接种细胞后所形成的空斑应全部为 HA 阳性。

结 果

1 痘苗病毒表达质粒的构建

含有 HIV-1 前病毒基因的质粒 pNL432,酶切后分离 5'端 LTR 和 gag 基因的 DNA 片段,按“材料和方法”中所述策略,经多次亚克隆,构建出 6 种痘苗病毒表达质粒,其结构见图 1A。这些重组质粒都经 4~6 种 DNA 限制性内切酶鉴定,证明构建正确,如图 1B 所示。该图为 BamHI 和 PstI 双酶切 6 种质粒的电泳照片,在这些质粒中,BamHI 位点位于外源片段的上游,PstI 位于 HIV-1 gag 基因中(nt 1415),因此 BamHI-PstI 片段的大小可以反映 LTR 的缺失情况。由图 1B 可见,从 pATLG 起到 p16G,BamHI-PstI 片段依次减小,说明 LTR 依次缺失。确证性序列分析也证明质粒构建正确,如图 1C。

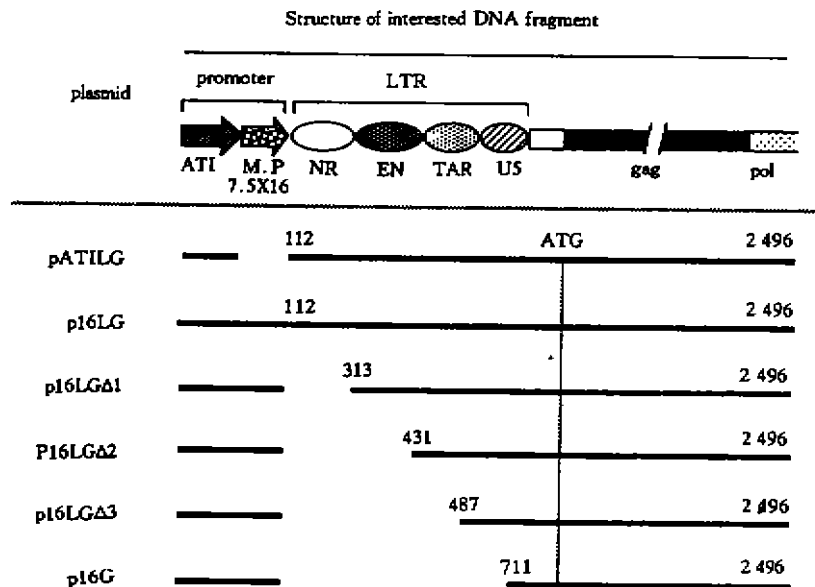


图 1A 6 种痘苗病毒表达质粒的结构

Fig. 1A Schematic structure of the six vaccinia virus expression plasmids

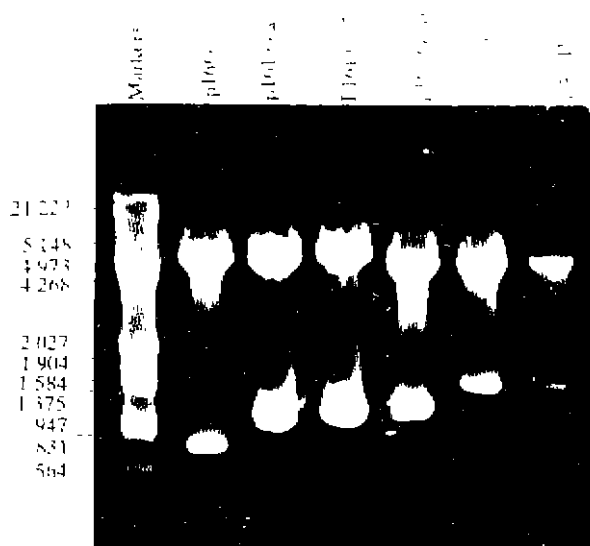


图1B 双酶切鉴定6种痘苗病毒表达质粒. BamH I -Pst I 片段在各表达质粒中的大小依次为: p16G, 0.7kb; p16LG Δ 3, 0.93kb; p16LG Δ 2, 0.98kb; p16LG Δ 1, 1.2kb; p16LG, 1.3kb; pATILG, 1.3kb.

Fig. 1B Identification of the six vaccinia virus expression plasmids by double digestion with BamH I and Pst I. The length of BamH I -Pst I fragment in each one was as follows: p16G, 0.7kb; p16LG Δ 3, 0.93kb; p16LG Δ 2, 0.98kb; p16LG Δ 1, 1.2kb; p16LG, 1.3kb; pATILG, 1.3kb

2 gag 基因重组痘苗病毒的构建

痘苗病毒 WR 株感染 BHK21 单层细胞 1 h 后, 以 DOTAP 分别转染表达质粒 pATILG、p16LG、p16LG Δ 1、p16LG Δ 2、p16LG Δ 3 和 p16G, 通过鸡红细胞吸附试验, 筛选出不吸附鸡红细胞(HA⁻)的重组病毒空斑。经间接荧光染色进一步鉴定, 得到与表达质粒相对应的 6 株重组痘苗病毒, 依次命名为 vATILG、v16LG、v16LG Δ 1、v16LG Δ 2、v16LG Δ 3 和 v16G。

3 Gag 蛋白的 IFA 检测

将各重组病毒及对照病毒(WR)接种 BHK21 细胞, 间接免疫荧光染色后置荧光显微镜下观察, 结果如图 2。没有接毒或接种 WR 株的 BHK21 细胞中没有荧光, 感染重组痘苗病毒的细胞浆内, 均可见特异的黄绿色荧光。

4 Gag 蛋白的免疫印迹检测

将各株重组痘苗病毒和 WR 株野生型痘苗病毒以 10 PFU/细胞 的量接种 BHK21 细胞, 24 h 收集感染细胞, 裂解后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 再转移至硝酸纤维素膜(NCM), 用抗 p24 单克隆抗体和酶标抗体染色。结果显示, 重组病毒感染细胞裂解物均有特异的蛋白带, 表明各重组病毒均能表达 Gag 蛋白, 其中 v16LG Δ 2 的表达量最高, 结果见图 3。

5 免疫酶分析重组病毒 Gag 蛋白的相对表达量

将收集的各重组病毒和对照病毒感染的细胞培养物, 加 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液, 超声波破碎和倍比稀释后直接进行酶免疫分析, 比较各重组病毒表达 Gag 蛋白的相对产量, 取 3 次免疫酶试验结果的平均值, 结果见图 4。6 株重组病毒中, 以 v16LG Δ 2 的 Gag 蛋白表达量最高, 3 次测定的平均效价为 754.3 ± 257 ; vATILG、v16LG Δ 3、v16G 的表达量相近, 其效价分别为 85.30 ± 36.95 、 128.00 ± 0.00 、 85.30 ± 36.95 ; v16LG 和 v16LG Δ 1 的表达量较低, 其效价分别是 2.70 ± 1.15 和 4.00 ± 0.00 。若以表达量最低的 v16LG 的免疫酶试验效价为 1, 则 v16LG Δ 2 为 297, vATILG、v16LG Δ 3、v16G 分别为 32、47 和 32, v16LG Δ 1 为 1.5。

讨 论



图 1C 表达质粒确证性序列分析照片之一——p16LG 的序列分析

Fig. 1C One of the photograph of the confirming sequencing (for p16LG)

本研究在成功地构建痘苗病毒表达质粒的基础上,通过同源重组和血球吸附试验筛选,构建了 6 株重组病毒,用于分析 HIV-1 LTR 对 *gag* 基因在重组痘苗病毒中表达的影响。实验表明,痘苗病毒启动子与 LTR 的不同功能区相互作用,对 Gag 蛋白在痘苗病毒中表达具有显著的影响。

1 不同的痘苗病毒启动子严重影响全长 LTR 下游 *gag* 基因的表达

已有报道,将 HIV-1 LTR 与报告基因组成的表达系统转染不同细胞系时,有的细胞系表达量很低,甚至不表达,造成这种差别的原因是转染的细胞中含有不同的反式作用蛋白。但前病毒 DNA 在宿主细胞中整合处的 DNA 序列是否影响病毒蛋白的表达则尚不明确。本研究用两株含有全长 LTR 的 Gag 重组病毒——vATILG 和 v16LG,二者区别仅在于所用启动子不同,vATILG 为牛痘病毒 A 型包涵体蛋白(ATI)启动子,v16LG 为 ATI-p7.5 复合启动子,但两株病毒的 Gag 蛋白的表达量相差达 32 倍(图 4)。说明不同的痘苗病毒启动子对 LTR 的功能影响较大。

2 LTR 中的 NR 序列不影响 Gag 蛋白在重组痘苗病毒中的表达

NR 序列含有多种真核表达的调控元件,因细胞类型不同,即细胞中反式蛋白不同,则不同的顺式功能区被激活,有时表现为正调节,有时表现为负调节甚至没有作用。

重组病毒 v16LG 和 v16LGΔ1 所用的启动子结构完全相同,两者的唯一不同是后者 LTR 中缺失了 NR 序列(图 1),但其 Gag 蛋白表达量相近,间接免疫荧光试验、免疫印迹试验和免疫酶试验等三种免疫学方法检测均无明显差异,说明 LTR 中的 NR 序列在病毒中对 Gag 蛋白表达没有明显影响。

3 LTR 的 EN 序列不能被重组痘苗病毒表达系统识别

LTR 中的 EN 序列,长约 120 bp,其中有两个 NF- κ B 蛋白的结合基元(motif)、三个 SP1 蛋白结合基元和一个 TATA 盒,细胞的反式作用因子和该区域结合后,可增强多种类型启动子的活性^[8-10]。按一般原则推测,将 LTR EN 序列置于痘苗病毒 ATI-p7.5 复合启动子的下游,应当能提高所控制基因的表达效率,缺失该序列则表达效率应当降低。但本实验的结果与这种推论相反,含有 EN 序列的重组病毒 v16LG 和 v16LGΔ1 表达 Gag 蛋白的产量相近,且是 6 株重组病毒中表达量最低的;而缺失 EN 序列的重组病毒 v16LGΔ2、v16LGΔ3 和 v16G 则以最高和次高的产量表达了 Gag 蛋白(图 3、图 4)。这些结果说明重组痘苗病毒表达系统不能识别 HIV-1 LTR 的 EN 序列。

4 TAR 序列可显著提高 Gag 蛋白的表达量

HIV-1 的 TAR 序列,可在前病毒基因组 DNA 转录生成的 mRNA 5' 端形成稳定的茎环

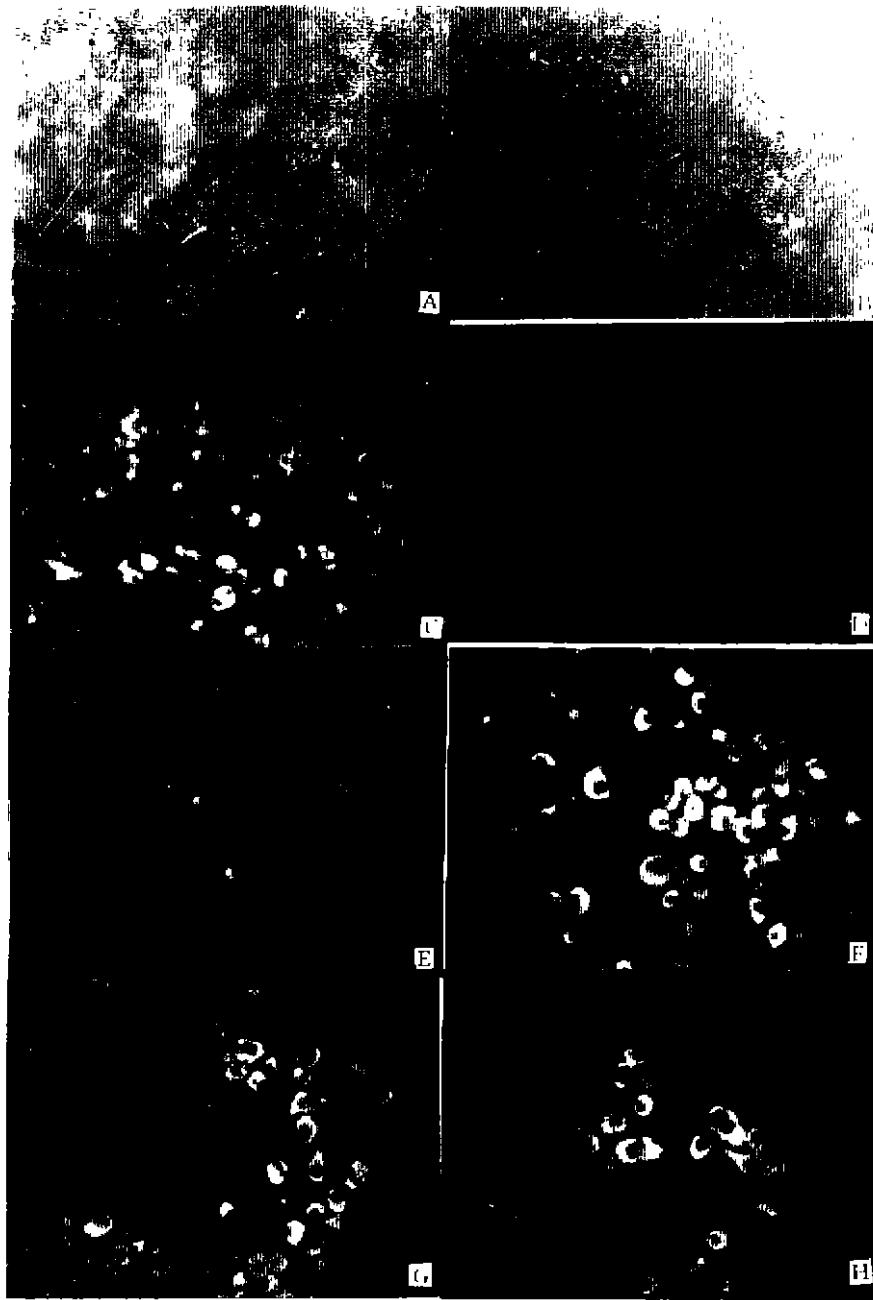


图2 间接免疫荧光分析6株重组病毒表达的 HIV-1 Gag 蛋白

Fig.2 Indirect immunofluorescence assay. BHK21 cells were infected with recombinant vaccinia virus at 0.01-0.03 PFU/cell, and incubated for 36-48 h. Infected cells were fixed with acetone-ethanol prior to labelling. Gag protein expressed by recombinant vaccinia viruses were revealed by incubation with anti-p24 monoclonal antibody followed by sheeting anti-mouse FITC-labelled antibody. The intense cytoplasmic staining was observed in recombinant vaccinia virus-infected cells.

A. uninfected; B. WR; C. v16ATILG; D. v16LG; E. v16LGA1; F. v16LGA2; G. v16LGA3; H. v16G

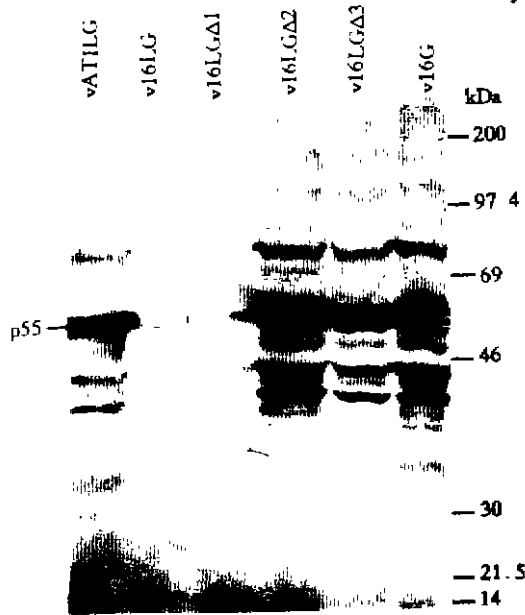


图 3 重组病毒表达 Gag 蛋白的免疫印迹分析
 Fig.3 Immunoblot analysis of HIV-1 Gag protein expressed in recombinant vaccinia viruses-infected cells. BHK21 cells were infected with recombinant vaccinia viruses and WR. At 24 h postinfection, cells were harvested and then carried out electrophoresis in gel. The separated proteins were transferred to nitrocellulose filter for immunoblot analysis. The p55 protein and its processed products were revealed with anti-p24 monoclonal antibody.

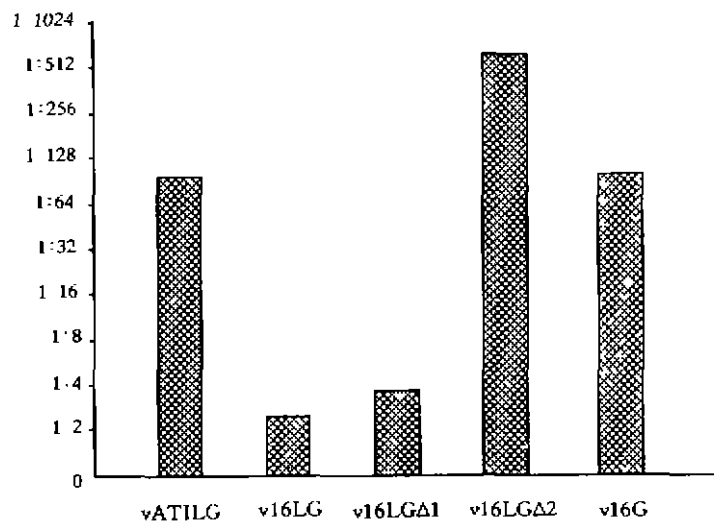


图 4 5 种重组病毒的 Gag 蛋白相对表达量

Fig. 4 Gag protein expressed by recombinant vaccinia viruses were semiquantitatively estimated by immunoenzyme assay. After 24 h infection with recombinant vaccinia viruses, BHK21 cells were harvested, sonicated. The cell lysates were directly coated on the surface of ELISA plate. The Gag protein was revealed by anti-p24 monoclonal antibody, followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP) conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody. The amounts of Gag protein expressed by various recombinant vaccinia viruses were given as values relative to the end-point dilution (titer) at which the A_{490} was less than 0.2.

结构,进而与病毒编码的 Tat 蛋白结合,促进转录^[11,12],而且, TAR DNA 还能与多种细胞因子如 LBP-1 等结合,调节基因表达。将 TAR DNA 置于外源启动子中,可提高外源启动子的本底(basal)和 Tat 蛋白诱导活性^[1,12]。所构建的 6 株重组病毒中,以含 TAR 序列的 v16LGΔ2 表达 Gag 蛋白的产量最高,其 Gag 蛋白的表达量为缺失 TAR 序列的 v16LGΔ3 和 v16G 的 5.9 倍和 8.8 倍(图 3、图 4),说明 HIV-1 的 TAR 序列在痘苗病毒中具有生物学效应,提高 Gag 蛋白的表达量。这一结果可与 Robinson 等的实验互相印证,他们将常用的反转录病毒载体——鼠白血病病毒(MoLV)载体的 LTR 的一部分 U3 区,换成巨细胞病毒立即早期增强子/启动子(CMV-IE)和 HIV-1 的 TAR 元件(HIV-1-TAR)。在细胞中表达发现,杂交 LTR 的本底转录效率比野生型高 10~15 倍,该质粒的结构与本实验的表达质粒 p16LGΔ2 颇为相似,都是在 DNA 病毒启动子的下游,接上 HIV-1 的 TAR 元件。可能是由于痘苗病毒的启动子与 LTR 中不同的功能区相互作用,使 Gag 蛋白在重组痘苗病毒中得到高效表达。

5 U5 区及其下游非翻译序列不影响 Gag 蛋白的表达

一般认为,痘苗病毒表达的外源基因,需尽可能地去掉上游的非编码序列,否则会严重影响表达效率^[13]。HIV LTR 的 U5 区主要与病毒的复制和整合有关,而对调节病毒基因在细胞中的表达效率并不很重要。含有 U5 区的重组病毒 v16LGΔ3 和缺失大部分 U5 区的 v16G,其 Gag 蛋白的表达量相近(图 3、图 4),说明 U5 区及其下游序列不影响 gag 基因在重组痘苗病毒中的表达,同时也说明牛痘、痘苗病毒启动子对外源基因上游非编码区的长短要求不十分严格,对有较长非编码区的外源基因仍能很好表达。

值得注意的是,免疫印迹的实验结果中,能够与抗 p24 单克隆抗体反应的蛋白,除 p55 蛋白对应的 55 kDa 的主要蛋白带外,还有其它多条蛋白带(图 3)。这种情况与 Hu 等以痘苗病毒表达 Gag 蛋白的结果一致^[14]。他们通过试验确认,其它蛋白带的出现,并不是由于非特异免疫反应造成的,而是 Gag 蛋白被细胞的蛋白酶作用后形成的酶解产物^[14]。

参 考 文 献

- 1 Coffin JM. Retroviridae and their replication. In: Fields BN *et al* ed. Virology, 2nd ed. New York: Raven Press, 1990. 1437 - 1500
- 2 Claver B, Berkhout B. Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in immunodeficiency virus. J Virol, 1994, 68:711 - 713
- 3 Kashanchi F, Wood C. Human immunodeficiency viral long terminal repeat is functional and can be transactivated in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:2157 - 2161
- 4 Moss B. Poxviridae and their replication. In: Fields BN *et al* ed. Virology, 2nd ed. New York: Raven Press, 1990, 2079 - 2111
- 5 Adachi A, Gendelman HE, Koenig S *et al*. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. J Virol, 1986, 59:284 - 291
- 6 Jin NY, Funahashi S, Shida H. Construction of vaccinia virus A-type inclusion body protein tandemly repeated mutant 7.5 kDa protein and hemagglutinin gene promoters support high levels of expression. Arch Virol, 1994, 138:315 - 330
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989
- 8 Garcia JA, Wu EK, Mitsuyasu R *et al*. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human

- immunodeficiency virus. *EMBO J*, 1987, 6:3761 - 3770
- 9 Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature (London)*. 1987, 326:711 - 713
- 10 Perkins ND, Edwards NL, Duchett CS *et al*. A cooperative interaction between NFkB and SP1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J*. 1993, 12:3551 - 3558
- 11 Sharp PA, Marciniak RA. HIV TAR; an RNA enhancer? *Cell*, 1989, 59:229 - 230
- 12 Bohan CA, Kashanchi F, Ensoli B *et al*. Analysis of Tat transactivation of human immunodeficiency virus transcription *in vitro*. *Gene Express*, 1992, 2:391 - 407
- 13 Shida H, Tanabe K, Matsumoto S. Mechanism of virus inclusion into A-type inclusion during poxvirus infection. *Virology*, 1987, 76:217 - 233
- 14 Hu S-L, Travis BM, Garrigues J *et al*. Processing assembly and immunogenicity of human immunodeficiency virus core antigen expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology*, 1990, 179:321 - 329

Effects of Long Terminal Repeat (LTR) of Human Immunodeficiency Virus Type 1 on the Expression of gag Gene in Recombinant Vaccinia Viruses

Mao Chunsheng Jin Ningyi Tong Minghua Guo Junqing Wang Xiuqing Yin Zhen

(Laboratory of Genetic Engineering of PLA, Changchun 130062)

Abstract To investigate the function of LTR in vaccinia virus, 6 recombinant viruses were constructed by inserting intact or serially truncated LTR together with their downstream of *gag* ORF of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) into the vaccinia virus genome. Indirect fluorescence assay, Western blot and immunoenzyme assay showed that all the 6 recombinant vaccinia viruses expressed Gag protein, but the efficiency were significantly different. These results suggested that the function of each function domain in HIV-1 LTR exhibited distinct characteristics on *gag* gene expression in vaccinia virus: (1) The function of intact LTR on *gag* gene expression varied with the upstream poxvirus promoter; (2) NR sequence neither decreased nor increased the Gag protein expression level; (3) Enhancer sequence might not be recognized by recombinant vaccinia virus expression system; (4) TAR sequence enhanced Gag protein expression effectively; (5) U5 region and its downstream non-translated sequence had little effect on Gag protein expression efficiency.

Key words HIV-1, Long terminal repeats (LTR), Gag protein, Regulation, Vaccinia virus