

RU5 区对 BFV3026 基因表达的调控*

孔晓红, 余 荭, 宣成昊, 辛 丹, 王金忠, 陈启民, 耿运琪**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

Regulation of RU5 Region to Gene Expression of BFV 3026

KONG Xiao-hong, YU Hong, XUAN Cheng-hao, WANG Jin-zhong, CHEN Qi-min, GENG Yun-qi**

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In order to elucidate the regulation mechanism of RU5 region to *BFV* gene expression, *BFV*3026 provirus DNA was used to construct the plasmids containing different deletion of R region, which were cotransfected with *luc* report gene located behind the IP promoter to BL12 cells, and luciferase activities was assayed, confirming that U5 region could repress the initiation function of LTR as well as IP. The *BFV* structure genes with different deletion of R region were cloned closely behind to heterogenous CMV promoter, then transfected to 293T cells, RT activity was performed, testifying the R region was required for *BFV pol* gene expression, and also the function domain was identified within the 100n.t. sequence at the 5' end.

Key words: *Bovine foamy virus*; RU5 region; Gene expression; Regulation

摘要: 以牛泡沫病毒(*Bovine foamy virus*, *BFV*)中国株 *BFV*3026 原病毒 DNA 为材料, 构建 R 区系列缺失质粒, 通过对其转染细胞中 RT 水平及对缺失质粒与 *luc* 报告质粒共转染细胞中萤火虫荧光素酶活性的测定, 确立 U5 区对于 *BFV*3026 两类启动子 LTR 和 IP 均具有负调控作用; 同时将带有不同 R 区的 *BFV*3026 结构基因片段克隆于异源启动子 CMV 之下, 通过对其转染细胞 293T 中 RT 酶活性的测定, 确立 R 区对于病毒结构基因 *pol* 的表达具有一定的调节作用, 并将其功能区域初步界定在 R 区 5'端 100bp 内。

关键词: 牛泡沫病毒 3026; RU5 区; 基因表达调控

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0129-04

泡沫病毒(*Foamy virus*, *FVs*)是一种特殊的反转录病毒, 虽然在体外可感染多种细胞, 产生强烈的细胞病变, 在体内却不表现任何致病性。由于这种极高的安全性, 使泡沫病毒具有巨大潜力开发为反转录病毒载体, 用于基因治疗。与其它反转录病毒不同, 泡沫病毒基因组存在两类启动子: 一类为典型反转录病毒所共有的长末端重复序列(long terminal repeats, LTR), 由 U3、R、U5 区组成, 用以启动结构基因的表达; 另一类是位于 *env* 基因 3'端的内部启动子(internal promoter, IP), 用于启动位于其下游的反式激活因子 Tas(在牛泡沫病毒为 Borf-1)的表达^[1-3]。另外泡沫病毒的 Pol 是由独

立的 mRNA 翻译而成, 其剪切供体(SD)位于 R 区, 通过位于 *gag* 基因末端的剪接受体实现剪切^[4,5]。有关泡沫病毒的研究主要集中在灵长类, 对于非灵长类泡沫病毒尤其是牛泡沫病毒(*BFV*)的研究甚少, GenBank 中仅收录了两条 *BFV* 的序列, 其中之一即为本室分离的 *BFV*3026(GenBank 收录号 AY134750), 有关其基因表达、调控的研究主要集中在本实验室。本文以牛泡沫病毒中国株 *BFV*3026 原病毒 DNA 为基础, 通过对其 LTR 中 RU5 区的系列缺失, 确立该区域对病毒基因组中两类启动子的调节作用并对其调控机制予以初步探讨。

收稿日期: 2003-09-05, 修回日期: 2003-10-21

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100003)

作者简介: 孔晓红(1968-), 女, 山西省籍, 医学博士, 主要从事生物化学和分子病毒学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 022-23501783. E-mail: yqgeng@public.tpt.tjcn

1 材料与方法

1.1 细胞

表达 SV40 大 T 抗原的腺病毒转化的人胚胎肾细胞 (293T 细胞)、牛肺细胞系 (BL12 细胞) 由本室保存。

1.2 质粒

本文所用的质粒由本室前期构建。其中 pGP 是将 BFV3026 *gag-pol* 基因克隆于异源启动子 CMV 之下, pGPSSD 则是在 pGP 基础上于 CMV 及 *gag* 起始密码子之间引入 SV40 的 SD/SA 元件; pGPSSD 不仅含有 *gag-pol* 基因并含有 *gag* 起始密码子上游至 654nt 区域, 其中包括完整的 R 区(见图 1)。

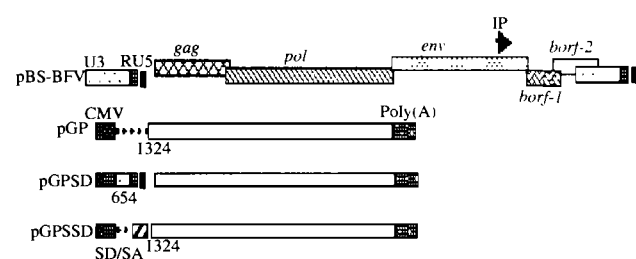


图 1 *gag-pol* 不同缺失的真核表达质粒的构建

Fig. 1 Schematic presentation of the *gag-pol* expressing constructions

pBS-BFV 为 BFV3026 原病毒 DNA 克隆, 而 pBFV*1-4 则是在 pBS-BFV 基础上就 R 区至 *gag* 基因 5' 端所构建的不同缺失。pIP-Luc 是将 *luc* 基因置于 BFV3026 内部启动子之下所构成的 Luc 报告质粒 (见图 2)。

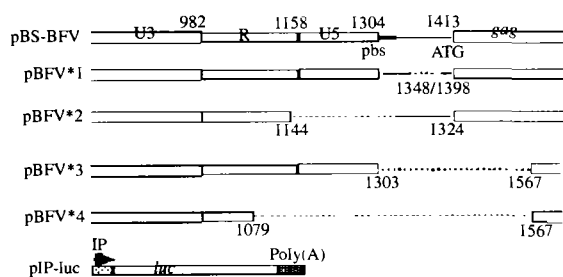


图 2 BFV 原病毒 DNA 克隆及其不同缺失

Fig. 2 Schematic presentation of the different BFV provirus DNA clones

1.3 细胞培养和转染

用含 10% FBS 的 DMEM, 37°C, 5% CO₂ 培养 293T 细胞和 BL12 细胞。转染采用阳离子脂质体法 (lipofectAMINE reagent), 具体步骤参见 GIBCO/

BRL 产品说明书。细胞转染在六孔板上进行, 每孔用目的质粒 2μg, 与 3μL lipofectAMINE 混合。

1.4 萤火虫荧光素酶 (Luc) 活性测定

转染 72h 后裂解细胞, 离心收集上清, 按试剂盒提供的方法, 加入底物于测量管内, 测定 Luc 值。Luc 酶的活力以 6s 内的发光强度表示。每份样品设 3 孔平行对照, 并以 β-gal 作为内对照, 各平行组之间变异系数 < 15%, 重复 3 次。

1.5 RT 酶活性的测定

采用 Cavid Tech UPPSALA (SWEDEN) 公司的 Lenti-RTTMActivity Assay 试剂盒进行测定。于转染后第 4 天收集细胞, 裂解后加入 RT 反应液, 于 37°C 孵育 1h 转入酶标板。按说明书依次加入抗体、显色底物, 并于 405nm 波长处测定 OD 值。每份样品设 3 孔平行对照, 并重复 3 次, 阴性对照为 pUC19 转染的 293T 细胞。

2 结果

2.1 BFV R 区与病毒 *pol* 的表达相关

将含有 *gag-pol* 的质粒 pGP、pGPSSD 及 pGPSSD 转染 293T 细胞, 通过对转染细胞中 RT 活性的测定, 确立 R 区对病毒结构基因表达的影响。结果见图 3。

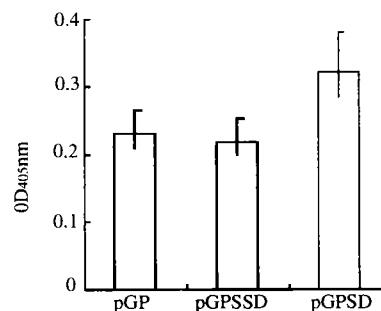


图 3 BFV *gag-pol* 表达质粒转染细胞的 RT 活性测定

Fig. 3 RT assay in 293T cells transfected with various constructions
293T cells were transfected with different constructions, cells were collected at 4 days post transfection and used for RT assay

从上图可以看到: R 区完全缺失的 pGP 转染细胞中 RT 酶活性较含有完整 R 区的 pGPSSD 转染细胞下降 34%, 而加入 SD/SA 元件的 pGPSSD 转染细胞中的 RT 水平没有任何改变, 表明 BFV3026 的 R 区对于其结构基因 *pol* 的表达是必需的。即使将 *pol* 克隆于强启动子 CMV 之下, 并添加 SD/SA 元件, *pol* 的表达仍然受到 R 区的影响, 由此可以推测: R 区对于 *pol* 的调节不是在转录水平, 也不仅仅是因为用作剪接供体的 SD 位于 R 区, 还存在其它机制调节 *pol* 的表达。

2.2 U5 区对于 LTR 的负调控及 R 功能区的初步界定

上述结果显示, BFV3026 的 R 区对 *pol* 基因的表达具有一定调节作用。据此以 BFV3026 原病毒 DNA 克隆 pBS-BFV 为基础, 在 RU5 直至 *gag* 基因 5' 端区域引入缺失, 获得质粒 pBFV*1、pBFV*2、pBFV*3 及 pBFV*4, 将它们分别转染 293T 细胞, 对其中 RT 酶活性予以测定, 结果如图 4 所示。从图中可以看出: 较 pBS-BFV 转染细胞中 RT 水平而言, 各缺失均造成其相应 RT 表达水平的改变, 其中缺失 U5 区的 pBFV*2、pBFV*4 与含有完整的 U5 区的 pBS-BFV、pBFV*1 及 pBFV*3 相比, 前者具有较高的 RT 水平, 表明 U5 区对于由 LTR 起始的基因表达具有负调节作用。比较各缺失区域, 可以看到 pBFV*4 不仅缺失整个 U5 区, 还缺失部分 R 区以及 U5 至 *gag* 前端 154bp 区域, 然而 pBFV*4 却具有与 pBFV*2 相同的 RT 水平, 后者仅缺失 U5 区。根据 pBFV*3 转染细胞中 RT 测定结果可知, 缺失 U5 至 *gag* 前端 154bp 区域不引起 RT 水平的大幅度提高, 可见 U5 区的负调节作用大于位于其下游的非编码区, 并且 pBFV*4 中所缺失的 R 区部分不影响 *pol* 的表达, 即 R 区功能区位于其 5' 端 100bp 内。

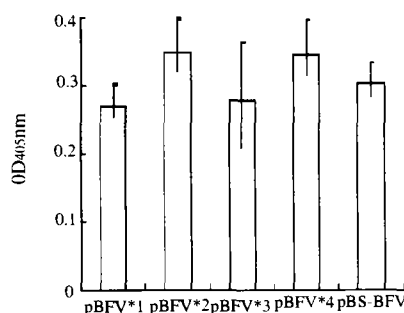


图 4 BFV 系列缺失质粒转染细胞的 RT 活性测定

Fig.4 RT assay in 293T cells transfected with various constructions

2.3 BFV U5 区对于其 IP 的启动功能具有负调控作用

本室前期工作表明, BFV3026 基因组中同样存在两类启动子 LTR 与 IP, 它们共同调节病毒基因的表达, 这两类启动子的活性均依赖于反式激活因子 Borf-1, 其中 IP 具有较高的基础活性。在病毒感染早期, 首先由 IP 启动其下游的 *borf-1* 表达, 产生的 Borf-1 反之激活 IP, 使自身获得大量表达并激活 LTR 以起始结构基因的表达。已经证实, Borf-1 对于 IP 或 LTR 的反式激活效应与其剂量成正比^[6]。因此可将报告基因 *luc* 克隆于 IP 之下, 通过测定 Luc 激活倍数确立 Borf-1 对于 IP 的激活效应或反映 Borf-1 的量。本文所用 pBFV*1、pBFV*2、pBFV*4

缺失质粒与 pBS-BFV 相同, IP 及其下游的 *borf-1* 基因保持完整。当将它们分别与 pIP-*luc* 共转染 BL12 细胞后, 缺失质粒中的 IP 同样可以启动其下游 *borf-1* 的表达。Borf-1 可顺式激活其上游的 IP, 使自己获得大量表达, 也可反式激活 pIP-*luc* 中的 IP 启动子, 使 *luc* 获得表达。所以通过测定 Luc 激活倍数以确立共转染细胞中 Borf-1 的水平, 即缺失区域对于 IP 启动功能的影响程度。将上述缺失质粒及 pUC19 分别与报告质粒 pIP-*luc* 共转染 BL12 细胞, 其中 pUC19 共转染细胞中的 Luc 值为 pIP-*luc* 的基础表达值, 以此为基础计算各缺失转染中的 Luc 激活倍数, 从图 5 可以看到, 较 pBS-BFV 转染细胞而言, U5 区及其下游非编码区的分别缺失或全部缺失均导致其 *luc* 激活倍数增加 5-18 倍, 其中以全缺失 (pBFV*4) 最高, 表明上述区域对于 IP 功能的实施具有抑制作用, 它们的缺失使 IP 功能获得增强。

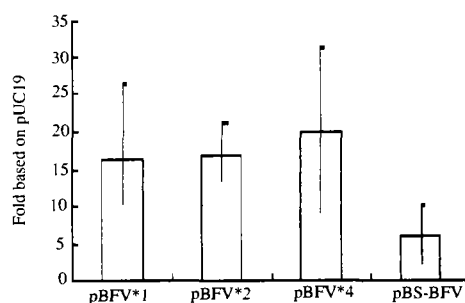


图 5 BFV 5'LTR 缺失质粒的瞬时表达分析

Fig. 5 Transient expression assay of the BFV 5'LTR deletions in BL12 cells

3 讨论

细胞中皆存在一种机制, 防止剪切不完全或不成熟的 mRNA 输出细胞核, 这一机制同样也限制了不完全剪接的反转录病毒 mRNA 的核输出^[7], 然而, 对于所有反转录病毒而言, 在其繁殖过程中不仅需要在宿主细胞质中完成对其完全剪接的 mRNA 的翻译, 同时也需要完成对不完全剪接或未剪接的 mRNA 的翻译, 为此, 各反转录病毒演变出自身特有的解决机制。其中主要为编码一些转录后调节蛋白如 Rev、Rex 等, 以完成对上述 mRNA 的核输出^[8]。然而泡沫病毒中却未发现类似蛋白, 有人推测 R 区可能用于行使类似功能, 因为对于灵长类泡沫病毒的有关研究表明, 其 LTR 中 R 区对于病毒 *gag* 及 *pol* 基因的表达皆必需, 但 R 区并不影响病毒蛋白的 mRNA 水平, 表明 R 区可能在转录后水平调节

gag、*pol* 基因的表达^[9]。另外,对 HFV R 区系列缺失的研究显示,R 区前 130nt 对于 HFV *gag*、*pol* 的表达十分必需。当缺失达到 120nt 时,*gag*、*pol* 基因的表达均受到抑制^[7]。在 BFV3026 中,R 区的完全缺失同样会影响 CMV 启动的 *pol* 基因的表达,加入异源 SD/SA 序列,也不能消除这种影响,即 *pol* 基因表达水平未发生任何变化。但若保留 R 区前 100nt,则对 *pol* 基因的表达不产生任何影响,表明 R 区对于 *pol* 基因表达的影响也可能存在于转录后水平。由于泡沫病毒不编码转录后调节蛋白,它通过 RNA 的剪接获得各种蛋白的 mRNA,其中 Gag 蛋白的 mRNA 为病毒全长 RNA,病毒可能通过 R 区调节 Gag 蛋白的表达水平,但 *pol* 基因的转录本为剪接后的 RNA,其剪接供体位于转录起始点下游 51bp 处,其 mRNA 中仅有部分 R 区,为何 R 区却会对 *pol* 基因的表达产生影响,有学者报道,这种影响可能为 LTR 启动子所致,若将其换为 CMV 启动子,R 区对 *pol* 蛋白表达的调节作用即会消失^[7]。然而在 BFV3026 中似乎并非如此,即使有 CMV 启动子存在,R 区同样会影响 RT 酶的表达。因为加入异源 SD/SA 并没有使 *pol* 基因表达水平发生任何改变,其表达水平仍然同不含 R 区的 *pol* 基因表达水平一样,其中的机制尚需进一步探讨。

对 BFV3026 U5 区的研究显示,它可以抑制由 LTR 起始的 *pol* 基因的表达,类似现象亦存在于灵长类泡沫病毒中,对于 HFV、SFV 的体外瞬时表达分析表明,U5 区具有抑制其 LTR 起始基因表达的作用,U5 区缺失的重组子基因表达水平可提高 10-30 倍,若将 U5 区序列以正向或反向引入异源启动子(如 SV40)的下游,同样可抑制 SV40 起始的基因表达,究其原因,推测可能是由于 U5 区能形成稳定的 RNA 二级结构所致。BFV3026 对其启动子功能的调节是否有类似作用呢?对 BFV3026 的 U5

区的分析,发现其 RNA 同样能形成稳定的二级结构,推测,BFV3026 的 U5 区对于 *pol* 基因表达的抑制作用也存在类似机制。同时,BFV3026 U5 区的缺失同时还可使由 IP 启动的 Borf-1 的表达水平获得提高,表明 BFV3026 U5 区对 IP 的启动功能亦具有抑制作用,这在灵长类泡沫病毒中未见报道。因此,BFV3026 U5 区对其两类启动子均具有调节作用,U5 区不仅抑制 LTR 起始的转录而且还抑制内部启动子 IP 的启动功能。

参考文献

- [1] Linial M L. Foamy viruses are unconventional retroviruses[J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 1747-1755.
- [2] Mergia A. Simian foamy virus type 1 contains a second promoter located at the 3' end of the *env* gene[J]. *Virology*, 1994, 199(1): 219-222.
- [3] 张莉,王世珍,刘佳健,等.牛泡沫病毒内部启动子(IP)的克隆及功能分析[J]. *病毒学报*, 2000, 16(3): 227-231.
- [4] Enssle J, Jordan I, Mauer B, *et al.* Foamy virus reverse transcriptase is expressed independently from the Gag protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4137-4141.
- [5] Jordan I, Enssel E, Cottler B. *et al.* Expressed of human foamy virus reverse transcriptase involves a spliced *pol* mRNA[J]. *Virology*, 1996, 224: 314-319.
- [6] 刘佳建,刘淑红,陈启民,等. *Borf1* 是牛泡沫病毒的反式激活因子[J]. *科学通报*, 1999, 44(8): 844-847.
- [7] Russel R A, Zeng Y, Elwein O, *et al.* The R region found in the human foamy virus long terminal repeat is critical for both Gag and Pol protein expression[J]. *J Virol*, 2001, 75: 6817-6824.
- [8] Cullen B R. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways[J]. *Virology*, 1998, 249: 203-210.
- [9] Heinkelein. M. Thurow J, Dressler M. *et al.* Complex effects of deletions in the 5' untranslated region of primate foamy virus on viral gene expression and RNA packaging[J]. *J Virol*, 2000, 74: 3141-3148.