第19卷6期
2004年11月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（6）：576-581
November 2004

JDV Tat反式激活LTR与HIV-1 Tat采用类似的细胞因子*

邓 刚，莎日娜，母俊杰，乔文涛，耿运琪，陈启民**

（南开大学生命科学学院，天津 300071）

JDV Tat Transactivate LTR Involves Similar Cytokines as HIV-1 Tat*

DENG Gang，SHA Ri-na，MU Jun-jie，Qiao Wen-tao，GENG Yun-qi，CHEN Qi-min**

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

Abstract：In order to define if similar cytokines take part in transactivation of Jembrana disease virus and Human immunodeficiency virus-1 Tat protein, two truncated Tat proteins, hTat47 and jTat70, which contained intact activation domains but lacking binding domains, were constructed. We also constructed cyclin T1 and CDK9 eukaryotic expression and antisense plasmids. Overexpression of hTat47 and jTat-70 both inhibited transactivation of JDV and HIV-1 Tat on HIV-1 or JDV LTR, suggesting that they may involve similar cytokines. Antisense transient assay of cyclin T1 and CDK9 further proved that these cytokines also participated in transactivation of JDV Tat.

Key words：JDV；HIV-1；Tat；Cyclin T1；CDK9

摘要：为分析JDV Tat在反式激活JDV及HIV-1 LTR过程中是否采用与HIV-1 Tat类似的细胞因子，本文构建了包含完整激活域的jTat70和hTat47，同时构建了cyclin T1和CDK9真核表达及反义转译质粒。过量表达hTat47和jTat70对hTat反式激活HIV-1 LTR，jTat反式激活JDV和HIV-1 LTR均有明显的抑制作用推测jTat和hTat的反式激活作用可能涉及类似的细胞因子。通过cyclin T1和CDK9的反义转译质粒对jTat反式激活的抑制作用证实这两种细胞因子参与了jTat对JDV和HIV-1 LTR的反式激活。

关键词：Jembrana病毒；人免疫缺陷病毒；反式激活因子；细胞周期蛋白T1；细胞周期蛋白依赖性的激酶9

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125（2004）06-0576-06

JDV(Jembrana disease virus)是一种牛慢病毒，与牛免疫缺陷病毒(*Bovine immunodeficiency virus*, BIV)有较高的同源性[1,2]。与人免疫缺陷病毒(*Human immunodeficiency virus-1*, HIV-1) Tat（以下简称为hTat）类似，JDV Tat（以下简称为jTat）也能结合到LTR(long terminal repeat，长末端重复序列)上并促进转录延伸[3]。jTat蛋白不仅能反式激活自身LTR，还能反式激活BIV和HIV-1 LTR[4]，用JDV *tat*基因替换HIV-1 *tat*基因形成的嵌合病毒能在T细胞中复制[4]。hTat反式激活LTR的机制已经比较清楚，它与P-TEFb(positive transcription elongation factor b)[5]中周期蛋白cyclin T1直接结合[6]，cyclin T1再与CDK9(cyclin-dependent kinase9)相互作用形成Tat-cyclinT-CDK9复合物，CDK9使RNA聚合酶II的C末端 (carboxy terminal domain，CTD)超磷酸化，形成进行性的延伸复合物，使转录顺利延伸[7]。hTat的N端激活域用于结合细胞因子，C端结合域与反式激活应答元件(transactivation response element，TAR) RNA上的5'端突出相结合[8]。尽管普遍认为慢病毒Tat对LTR的反式激活可能采用类似的作用模式，但jTat在反式激活不同LTR时是否采用与hTat相同的细胞因子，cyclin T1和CDK9是否参与了jTat的反式激活作用一直没有得到验证。hTat N端47个氨基酸能与异源RNA结合蛋白

收稿日期：2004-04-29，修回日期：2004-06-07
* 基金项目：国家自然科学基金（30270059）
作者简介：邓刚（1979-）男，四川省籍，博士研究生
** 通讯作者。陈启民(1944-)男，山东省籍，教授。Corresponding author. Tel: 022-23501783. E-mail: gmchen@public.tpt.tj.cn

（如 MS2/R17、Rev）[9~12]或 DNA 结合蛋白[13~15]形成嵌合蛋白，并借助其对应的应答元件反式激活 HIV-1 LTR，证明 N 端 47 个氨基酸组成的 hTat 激活域能结合转录延伸相关的细胞因子。根据 jTat 功能域的划分（数据另文发表）构建了 jTat 激活域与 Rev 组成的嵌合蛋白也能反式激活 RRE 替换 TAR 后的 JDV LTR（数据另文发表），证明 N 端 70 个氨基酸包含 jTat 完整的激活域，能与细胞因子相结合并促进转录延伸。本文构建了包含完整激活域的 jTat 和 hTat 重组真核载体及缺失蛋白，cyclin T1 和 CDK9 真核表达及反义转译质粒，通过瞬时表达分析，证明 jTat 和在反式激活 JDV 和 HIV-1 LTR 时涉及 hTat 反式激活 HIV-1 LTR 类似的细胞因子，可能采用相同或相似的反式激活途径。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pJDVLTR-*luc*、pBIVLTR-*luc*、pHIV-1LTR-*luc*、pcDNA3.1(-)jTat、pcDNA3.1(-)hTat、Hela 细胞系为本室保藏；pCI-T1 和 pcDNA3-CDK9 由 Dr. Price 馈赠；DMEM 培养基、胎牛血清、Tris、SDS、琼脂糖、荧光素、Lipofectamine 购自 GIBCO/BRL 公司；DNA 回收采用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)；各种工具酶购自宝生物公司；其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

用含 10%胎牛血清的 DMEM、37℃、5%CO_2 条件下培养 Hela 细胞系。

1.3 引物设计与 PCR 反应

以 pcDNA3.1(-)jTat 和 pcDNA3.1(-)hTat 为模板，设计引物扩增 jTat70 和 hTat47。PCR 反应条件为：94°C，3min 变性；94°C，30s，56°C，30s，72°C，30s，30 个循环；72°C 延伸 10min。扩增 jTat70 的引物为：

P1：5'- GGCCTCGAGATTCAGATATGCCTGG -3'
Xho I

P2：5'- TCCGAATTCCTCTGGTTCATCTTTTC -3'
*Eco*R I

扩增 hTat47 的引物为：

P3：5'- GAGAGCTCGAGATGGAGCCAGTAGA -3'
Xho I

P4：5'-CTTGAATTCTTAATAGGAGATGC-3'
*Eco*R I

1.4 质粒构建

目的 PCR 产物和表达载体 pcDNA3.1(-)分别用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切、回收、连接，然后转化大肠杆菌并筛选阳性克隆。用 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切 pcDNA3-CDK9，回收 1.1kb 的 CDK9 片断，连入 pcDNA3.1(-)，筛选正向重组子得到 pcDNA3.1(-)CDK9，筛选反向重组子得到 CDK9 (-)。用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切 pCI-T1，回收 2.2kb 的 cyclin T1 片断，连入 pcDNA3.1(-)，筛选正向重组子得到 pcDNA3.1(-)T1，筛选反向重组子得到 T1 (-)。

1.5 质粒转染与荧光素酶活力测定

采用阳离子脂质体法，具体步骤参见 GIBCO/BRL 产品说明书。每份样品设 3 孔平行对照，转染 72h 后裂解细胞测定荧光素酶活性（Luc 值）。Luc 值经 β-gal 内对照校正后，各平行组之间变异系数 <15%。按试剂盒提供的方法，用生物化学发光测量仪测定化学发光强度，Luc 酶的活力以 4s 内的光强表示。

1.6 序列同源性比对

氨基酸序列的比对采用 DNAMAN 软件。

2 结果

2.1 hTat、jTat、hTat47 和 jTat70 对 JDV 和 HIV-1 LTR 的反式激活

为排除 hTat47 和 jTat70 自身反式激活 LTR 的可能性，本文首先验证了两种缺失蛋白对 JDV 和 HIV-1 LTR 的反式激活能力。将 hTat、jTat、hTat47 和 jTat70 表达质粒分别与报告质粒 pHIVLTR-*luc* 和 pJDVLTR-*luc* 共转染 Hela 细胞系，瞬时表达分析结果见图 1。

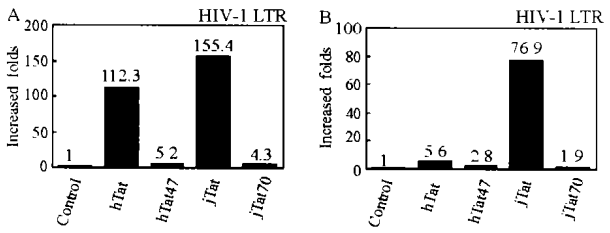

图 1 hTat、jTat、hTat47 和 jTat70 对 JDV 和 HIV-1 LTR 的反式激活

Fig.1 Activation of hTat, jTat, hTat47 and jTat70 on JDV and HIV-1 LTR

A: Hela cells were cotransfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc* and 0.5ug of widetype or truncated Tat. B: Hela cells were cotransfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc* and 0.05ug of widetype or truncated Tat. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

图 1 结果显示 hTat 和 jTat 能反式激活 HIV-1 LTR，hTat47 和 jTat70 均不能反式激活 HIV-1 LTR。

jTat 能反式激活 JDV LTR，hTat、hTat47 和 jTat70 均不能反式激活 JDV LTR。hTat47 和 jTat70 具有完整的激活域，且都不能反式激活 HIV-1 和 JDV LTR，可以作为相关细胞因子的竞争物。如果 hTat47 和 jTat70 能有效竞争性抑制 hTat 和 jTat 对 LTR 的反式激活，说明两者的反式激活可能都需要类似的细胞因子。

2.2 hTat47 和 jTat70 对 hTat 的竞争性抑制作用

将 1～20 倍质量的 hTat47 和 jTat70 表达质粒分别加入到 hTat 表达质粒和 pHIVLTR-*luc* 共转染体系中，瞬时表达分析结果见图 2。

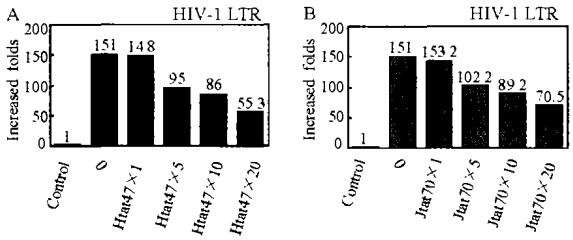

图 2 hTat47 和 jTat70 对 hTat 的竞争抑制作用

Fig.2 Competitive inhibition of hTat-induced transactivation by hTat47 and jTat70

A: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of hTat and the indicated amount of the hTat47. B: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of hTat and the indicated amount of the jTat70. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

伴随着共转染体系中逐渐加入过量的 hTat47 表达质粒，hTat 对 HIV-1 LTR 的激活倍数逐渐降低。加入 20 倍 hTat47 时，hTat 对 HIV-1 LTR 的反式激活能力降低 63%（图 2A）；逐渐加入过量的 jTat70 表达质粒，hTat 对 HIV-1 LTR 的激活倍数也逐渐降低，加入 20 倍 jTat70 时 hTat 激活能力降低 53%（图 2B）。包含完整激活域的 hTat47 能通过竞争相关细胞因子抑制 hTat 的反式激活，过量 jTat70 能竞争性抑制 hTat 的活性说明他们结合类似的细胞因子。

2.3 hTat 和 jTat70 对 jTat 的竞争抑制作用

将 1～20 倍质量的 hTat47 和 jTat70 表达质粒分别加入到 jTat 表达质粒和 pHIVLTR-*luc*、pJDVLTR-*luc* 的共转染体系中，瞬时表达分析结果见图 3。

伴随着共转染体系中加入过量的 hTat47 和 jTat70 表达质粒，jTat 对 HIV-1 和 JDV LTR 的激活倍数逐渐降低。当加入 20 倍 hTat47 时，jTat 对 HIV-1 LTR 的激活能力降低 58%（图 3A）；加入 20 倍 jTat70 时，jTat 对 HIV-1 LTR 的激活能力降低 50%（图 3B）；加入 20 倍 hTat47 时，jTat 对 JDV LTR 的激活能力

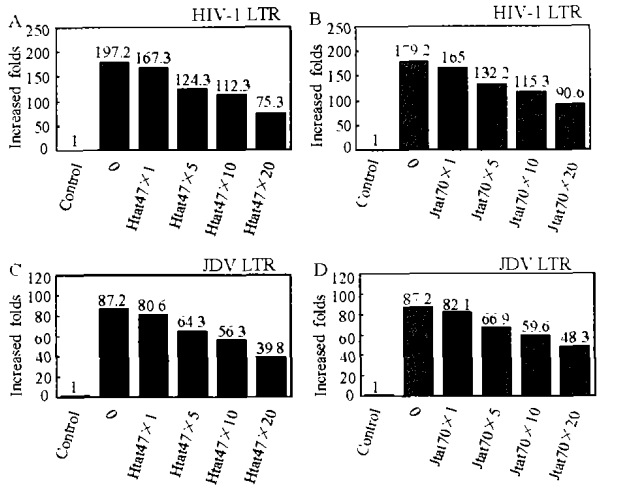

图 3 hTat47 和 jTat70 对 jTat 的竞争抑制作用

Fig.3 Competitive inhibition of jTat-induced transactivation by hTat47 and jTat70

A: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of jTat and the indicated amount of the hTat47. B: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of jTat and the indicated amount of the jTat70. C: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc*, 0.05ug of jTat and the indicated amount of the hTat47. D: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc*, 0.05ug of jTat and the indicated amount of the jTat70.

降低 54%(图 3C)；加入 20 倍 jTat70 时，jTat 对 JDV LTR 的激活能力降低 44%（图 3D）。这些结果显示 hTat47 和 jTat70 均能有效抑制 jTat 对 JDV 和 HIV-1 LTR 的激活，进一步说明 jTat 反式激活 JDV 和 HIV-1 LTR 时采用与 hTat 类似的细胞因子。

2.4 cyclin T1 和 CDK9 对 jTat 的激活作用

cyclin T1 和 CDK9[16]是 hTat 反式激活 HIV-1 LTR 中两个重要的细胞因子。为探讨这两个细胞因子是否也参与了 jTat 对 JDV 和 HIV-1 LTR 的反式激活，本文首先将不同剂量的 cyclin T1 和 CDK9 表达质粒 pcDNA3.1(-)T1 和 pcDNA3.1(-)CDK9 加入到 jTat 和报告质粒 pHIVLTR-*luc*、pJDVLTR-*luc* 的共转染体系中，瞬时表达分析结果见图 4。

在共转染体系中加入过量的 cyclin T1、CDK9 或同时加入 cyclin T1 和 CDK9 均不能增加 jTat 对 HIV-1 LTR 的反式激活。加入 20 倍的 cyclin T1、CDK9 或 cyclin T1 和 CDK9 表达质粒甚至导致 jTat 激活能力下降 17%、20%和 37%（图 4A）。过量的 cyclin T1、CDK9 或同时加入 cyclin T1 和 CDK9 也不能增加 jTat 对 JDV LTR 的反式激活，加入 20 倍质量的 cyclin T1、CDK9 或 cyclin T1 和 CDK9 表达质粒导致 jTat 激活能力下降 18%、14%和 41%（图 4B）。说明细胞内 cyclin T1 和 CDK9 的量足够支持

jTat 对 HIV-1 和 JDV LTR 的反式激活，过量表达这些细胞因子，特别是同时过量表达 cyclin T1 和 CDK9 可能影响细胞整体生理状态，整体降低细胞 RNA 的转录水平，并最终导致 jTat 对 LTR 反式激活能力的下降。

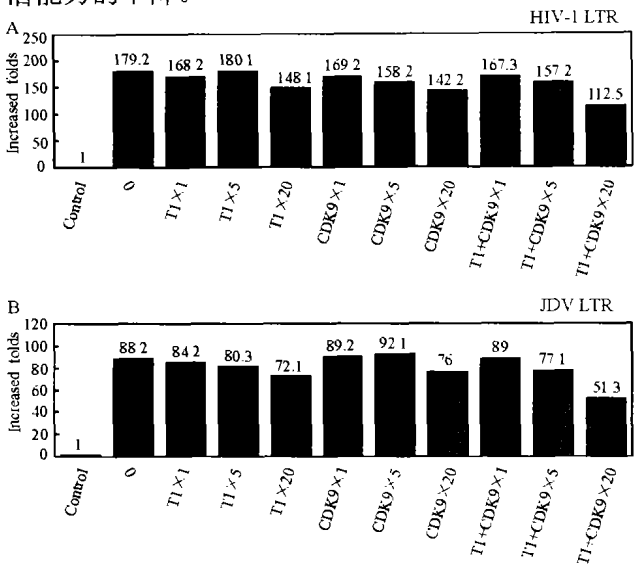

图 4 cyclin T1 和 CDK9 对 jTat 激活的影响

Fig. 4 Effect of cyclin T1and CDK9 on jTat-induced transactivation

A: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of jTat and the indicated amount of the cyclinT1and CDK9 expression plasmids. B: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc*, 0.05ug of jTat and the indicated amount of the cyclin T1and CDK9 expression plasmids.

2.5 cyclin T1 和 CDK9 反义转译质粒对 jTat 激活的抑制作用

为进一步证明 cyclin T1 和 CDK9 是否参与了 jTat 对 JDV 和 HIV-1 LTR 的反式激活，将过量的 cyclin T1 和 CDK9 反义转译质粒 T1(-)和 CDK9(-)加入到 jTat 和 pHIVLTR-*luc*、pJDVLTR-*luc* 的共转染体系中，瞬时表达分析结果见图 5。

在共转染体系中加入 T1(-)明显降低 jTat 对 HIV-1 LTR（图 5A）和 JDV LTR（图 5C）的激活能力，加入 20 倍 T1(-)时 jTat 对 HIV-1 和 JDV LTR 的激活能力分别降低 88%和 87%。加入 CDK9(-)同样明显降低jTat对HIV-1 LTR(图5B)和JDV LTR（图 5D）的激活，加入 20 倍 CDK9(-)质粒时 jTat 对 HIV-1 和 JDV LTR 的激活能力分别降低 74%和 76%。说明cyclin T1 和CDK9均参与了jTat对HIV-1 和 JDV LTR 的激活，且 cyclin T1 数量减少的对激活的抑制作用大于 CDK9。

3 讨论

在 HIV-1 的转录中，hTat 和 cyclin T1 形成的复合物能有效结合到 TAR 上，cyclin T1 能与 CDK9 结合形成 P-TEFb[5]。CDK9 磷酸化 RNAPII 的 C 末端区域（CTD）[17,18]从而促进转录延伸。jTat 是一种较强的反式激活因子，它不仅能激活自身 LTR，它对 HIV-1 和 BIV LTR 的激活能力甚至强于 HIV-1 和 BIV Tat 对自身 LTR 的激活能力[3]。序列对比发现 jTat 拥有非常保守的半胱氨酸富集区和核心区[3]，因此 jTat 激活不同 LTR 的过程中可能采用类似 hTat 的细胞因子。探讨 jTat 反式激活中涉及的细胞因子有助于研究其较强激活能力原因和作用方式，催生新的 RNA 转录延伸的激活模式，同时有利于进一步揭示 JDV 急性传染、快速发病和高致死率的原因。

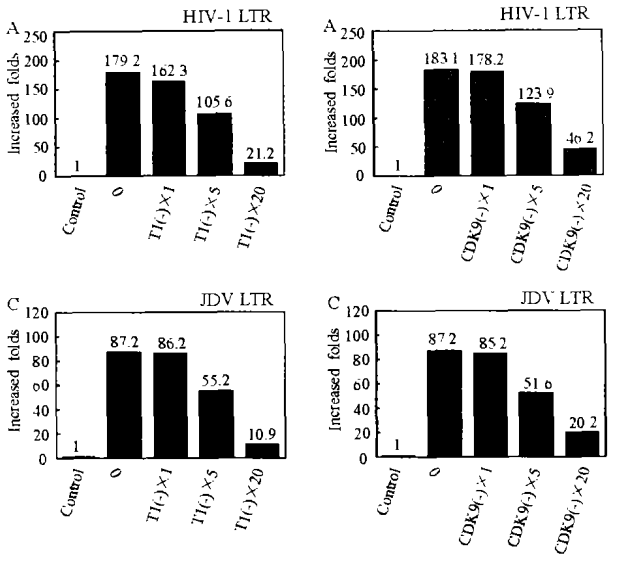

图 5 T1(-)和 CDK9(-)对 jTat 激活的抑制作用

Fig.5 Inhibition of antisense cyclin T1 and CDK9 on jTat transactivation

A: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of jTat and the indicated amount of antisense cyclin T1. B: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pHIVLTR-*luc*, 0.5ug of jTat and the indicated amount of antisense CDK9. C: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc*, 0.05ug of jTat and the indicated amount of antisense cyclin T1. D: Hela cells were cotranfected with 0.05ug of pJDVLTR-*luc*, 0.05ug of jTat and the indicated amount of antisense CDK9.

缺乏 RNA 结合域，仅包含激活域的缺失蛋白 hTat47 和 jTat70 不能反式激活 HIV-1 或 JDV LTR（图 1），却能有效抑制 hTat 对 HIV-1 LTR（图 2）、jTat 对 HIV-1 LTR（图 3A，B）或 JDV LTR（图 3C，D）的激活，上述结果证实 jTat 反式激活 JDV 或 HIV-1 LTR 时可能采用与 hTat 类似的激活机制，涉及类似的细胞因子。在 hTat 反式激活 HIV-1 LTR，jTat 激活 HIV-1 LTR 和 JDV LTR 中，加入过量 hTat47 和 jTat70 后激活倍数明显下降，推测两者可

能结合类似的细胞因子。加入20倍的hTat47后激活倍数分别下降63%、58%和54%；而加入20倍jTat70后激活分别下降53%、50%和44%，可见hTat47的竞争性抑制作用略强于jTat70，推测hTat激活域与细胞因子的结合能力强于jTat。hTat激活域和jTat结合域构成的HJ嵌合蛋白对HIV-1和JDV LTR的激活能力甚至高于jTat（数据另文发表），进一步证明了hTat激活域与细胞因子的结合能力强于jTat激活域。

Gel Shift证明jTat采用两种不同的构像，借助不同的关键氨基酸结合到HIV-1和BIV TAR (transactivating response element)上[20]。hTat与HIV-1 TAR的结合需要cyclin T1的参与，而bTat能与BIV TAR直接结合。jTat与HIV-1 TAR结合的方式类似hTat，而与自身及BIV TAR的结合方式类似bTat[20]。cyclin T1和CDK9构成的P-TEFb参与了hTat对HIV-1 LTR的转录延伸的激活[7]。HIV-1的复制对P-TEFb的表达水平非常敏感，P-TEFb的活性降低50%时hTat的反式激活能力降低为1/6到1/20[19]。但在Hela细胞系中加入过量的cyclin T1和CDK9及同时加入两种蛋白并没有提高jTat对HIV-1或JDV LTR的反式激活能力（图4），说明Hela细胞系中的P-TEFb的量足够支持jTat对HIV-1或JDV LTR的反式激活。加入20倍的两种因子后jTat的激活反而明显降低，可能是由于cyclin T1和CDK9广泛参与了RNAPII的转录调控[5]，过量P-TEFb调节多种启动子的转录，导致对转录所需其他元件和细胞因子的竞争，使得HIV-1和JDV LTR转录水平的降低。

cyclin T1和CDK9反义转译质粒T1(-)和CDK9(-)能在体内表达反义mRNA，与正链mRNA相结合，降低cyclin T1和CDK9的表达水平。加入过量T1(-)和CDK9(-)能有效抑制jTat对HIV-1和JDV LTR的反式激活（图5），证明这两种细胞因子也参与了jTat的反式激活作用。过量T1(-)对jTat激活能力的影响（降低88%和87%）略高于CDK9(-)的影响（降低74%和76%），可能是因为cyclin T1直接与Tat结合，而CDK9与cyclin T1表面两个α螺旋构成的cyclin box相结合，不与Tat直接作用[7]，导致降低cyclin T1的含量对jTat反式激活作用影响比降低CDK9含量更明显。

本文研究结果表明hTat和jTat对LTR的反式激活涉及类似的细胞因子，可能采用相似的作用机制。cyclin T1和CDK9参与了jTat对不同LTR的反式激活，证明P-TEFb也是由jTat反式激活中转录延伸复合物的组分。是否还有其他因子参与了jTat的反式激活作用，cyclin T1和CDK9参与jTat的反式激活的具体模式还有待深入研究。本工作的完成为完善慢病毒转录调控机制，进一步研究jTat反式激活模式，探讨cyclin T1和CDK9在jTat反式激活中的具体作用奠定了基础。

致谢：感谢Dr. Price馈赠pCI-T1及pcDNA3-CDK9；本工作为国家自然科学基金(批准号：30270059)资助项目。

参考文献

[1] Wilcox G E, Soeharsono S, Dharma D M N, *et al*. Jembrana disease and the bovine lentiviruses[J]. ACIAR Proc, 1997, 75:10-75.

[2] Chadwick B J, Coelen R J, Sammels L M., *et al*. Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus [J]. J Gen Virol, 1995, 76:189-192.

[3] Chen H, Wilcox G, Kertayadnya G, *et al*. Characterization of the Jembrana disease virus tat gene and the cis- and trans-regulatory elements in its long terminal repeats[J]. J Virol. 1999, 73(1):658-666.

[4] Chen H, He J, Fong S, *et al*. Jembrana disease virus Tat can regulate human immunodeficiency virus (HIV-1) long terminal repeat-directed gene expression and can substitute for HIV-1 Tat in viral replication[J]. J Virol, 2000, 74(6): 2703-2713.

[5] Price DH. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II[J]. Mol Cell Biol, 2000; 20(8):2629-2634.

[6] Peng J, Marshall N F, Price D H. Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb[J]. J Biol Chem, 1998, 273:13855-13860.

[7] Taube R, Fujinaga K, Wimmer J, *et al*. Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation[J]. Virology, 1999, 264(2):245-253.

[8] Bayer P, Kraft M, Ejchart A, *et al*. Structural studies of HIV-1 Tat protein[J]. J Mol Biol. 1995, 247(4): 529-535.

[9] Madore S J, Cullen B R. Functional similarities between HIV-1 Tat and DNA sequence-specific transcriptional activators[J]. Virology, 1995, 206(2):1150-4115.

[10] Selby M J, Peterlin B M. Trans-activation by HIV-1 Tat via a heterologous RNA binding protein[J]. Cell, 1990, 62(4):769-776.

[11] Southgate C, Zapp M L, Green M R. Activation of transcription by HIV-1 Tat protein tethered to nascent RNA through another protein[J]. Nature. 1990, 345(6276): 640-642.

[12] Tiley L S, Madore S J, Malim M H, *et al*. The VP16 transcription activation domain is functional when targeted to a promoter-proximal RNA sequence[J]. Genes Dev, 1992, (11):2077-2087.

[13] Berkhout B, Gatignol A, Rabson A B, *et al*. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter[J]. Cell, 1990, 62(4):757-767.

[14] Kamine J, Subramanian T, Chinnadurai G. Sp1-dependent activation of a synthetic promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(19):8510-8514.

[15] Southgate C D, Green M R. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function[J]. Genes Dev, 1991, 5(12B): 2496-2507.

[16] Wimmer J, Fujinaga K, Taube R, *et al*. Interactions between Tat and TAR and human immunodeficiency virus replication are facilitated by human cyclin T1 but not cyclins T2a or T2b[J]. Virology, 1999, 255:182-189.

[17] Marshall N F, Peng J, Xie Z, Price D H. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(43):27176-2783.

[18] Yankulov K, Bentley D. Transcriptional control: Tat cofactors and transcriptional elongation[J]. Curr Biol, 1998, 8(13):R447-449.

[19] Flores O, Lee G, Kessler J, *et al*. Host-cell positive transcription elongation factor b kinase activity is essential and limiting for HIV-1 type 1 replication[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 96(13): 7208-7213.

[20] Smith C A, Calabro V, Frankel A D. An RNA-binding chameleon[J]. Mol Cell. 2000, 6(5):1067-76.