

RNA 结合域决定 JDV Tat 具有较强的激活能力*

邓 刚, 苏 旻, 母俊杰, 李 悦, 乔文涛, 耿运琪, 陈启民**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

JDV Tat has Strong Transactivate Ability Because of its RNA Binding Domain

DENG Gang, SU Yang, MU Jun-jie, LI Yue, QIAO Wen-tao, GENG Yun-qi, CHEN Qi-min*

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

Abstract: In order to find the cause of different transactivate abilities among JDV, BIV and HIV-1 Tat, four chimeric Tat cDNA expression constructs, JH, HJ, JB and BJ, were generated with the crossover points at the boundary of activation and binding domains based on functional domain division of HIV-1 Tat and amino acid sequence comparison among HIV-1, JDV and BIV Tat. These chimeric Tat proteins were co-transfected with JDV, BIV and HIV-1 LTR report plasmids in HeLa. Transient assay showed that different transactivate abilities among JDV, BIV and HIV-1 Tat were mainly caused by different binding abilities of their binding domains. We further excluded some possibilities that may cause the poor transactivate ability of JH on HIV-1 LTR, such as incomplete functional domains and the lack of related cytokines.

Key words: JDV; HIV-1; BIV; LTR; Fusion protein

摘要: 为分析 JDV 与 BIV、HIV-1 LTR 和 Tat 相互激活能力差异的原因, 在氨基酸序列对比及 HIV-1 Tat 功能域划分的基础上构建了 JH、HJ、JB、BJ 几种嵌合 Tat 蛋白, 并克隆到真核表达载体。将上述表达质粒与以 JDV、BIV 和 HIV-1 LTR 为启动子, 以 *luc* 为报告基因的质粒共转染 HeLa 细胞, 证实了三种不同 Tat 激活能力的差异主要来自其结合域 RNA 结合能力的差异, 排除了结构域不完整和细胞因子缺乏造成 JH 不激活 HIV-1 LTR 的可能性。

关键词: JDV; HIV-1; BIV; LTR; 嵌合蛋白

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0142-06

JDV (*Jembrana disease virus*) 是一种牛的慢病毒, 与牛免疫缺陷病毒 (*Bovine immunodeficiency virus*, BIV) 有较高的同源性^[1,2]。慢病毒反式激活因子 Tat 蛋白结合 LTR 上 R 区的 TAR 序列并促进转录延伸是当前的研究热点。其中 HIV-1 Tat (以下简称 hTat) 蛋白结构和功能域已经得到精确划分, 分为五个区, N 端区, 富含半胱氨酸区, 核心区, 碱性区和 C 端区。其中前三个区构成激活域, 用于结合细胞因子 cyclin T1; 后两个区构成结合域, 与 TAR 上的 5' 端突出相结合^[3]。hTat 激活域能与异源 RNA 结合蛋白 (如 MS2/R17、Rev)^[4-7] 或 DNA 结合蛋白^[8-10] 形成嵌合蛋白, 并借助其对应的应答元件

激活 HIV-1 LTR。JDV 和 BIV Tat (以下简称为 jTat 和 bTat) 的结构和功能域尚未精确划分。hTat 激活域与 P-TEFb (positive transcription elongation factor b)^[11,12] 中周期蛋白 cyclin T1 直接结合, 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 CTD 超磷酸化, 形成进行性的延伸复合物, 使转录顺利延伸^[13]。jTat 蛋白不仅能激活自身 LTR, 它对 HIV-1 和 BIV LTR 的激活能力甚至强于 hTat 和 bTat 对自身 LTR 的激活^[14]。为研究不同 Tat 蛋白激活能力差异与其激活域和结合域的关系, 本文构建了一系列嵌合 Tat 蛋白, 通过对他们的活性进行分析,

收稿日期: 2005-08-22, 修回日期: 2005-09-24

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30270059, 30570071)

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

揭示这种 Tat 蛋白对 LTR 激活能力的差异主要来自于其 RNA 结合能力的强弱。探索不同 Tat 蛋白激活能力差异及其原因, 精确界定 jTat 结合域边界, 有助于解释 JDV 的强致病性及对慢病毒 Tat 蛋白结构和功能的全面了解, 并为艾滋病的研究及治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pJDVLTR-*luc*, pBIVLTR-*luc*, pHIV-1LTR-*luc*, pRSV-jTat, BIV127, HIV-1hxb2 和 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 引物设计

分别以 pRSV-jTat, BIV127, HIV-1hxb2 为模板, 94°C, 3min 变性; 94°C, 30s, 54~59°C, 30s, 72°C, 30s, 30 个循环; 72°C 延伸 10min 的 PCR 条件^[7]分别扩增 tat 全长及嵌合序列, 引物序列见表 1。

表 1 引物列表
Table.1 List of primers

Names	Primer Sequence
P1	5'- GGCCTCGAATTCAGATATGCCTGG-3'
P2	5'- GCTCGAATTC AACGATCTAGTG-3'
P3	5'- GAGAGCTCGAGATGGAGCCAGTAGA-3'
P4	5'- GCGTTACATGAATTCCTTACTGC-3'
P5	5'- TAGCTCGAGGCAATATGCCCGGAC-3'
P6	5'- CCAAGGGTGGAAATTCACCGTTATTG-3'
P7	5'- TTCTTCTTCTTCTCCATAGTTGA-3'
P8	5'- AGGAATCAACTATGGAGGAAGAAGG-3'
P9	5'- CCGCGCCGTCTAGGTCCTGAATCATGTCTGATGCC-3'
P10	5'- ATCAGACATGATTCAGGACCTAGAC-3'
P11	5'- GTCTCCGCTTCTTCTATCATGTCTGATGC-3'
P12	5'- AGGCATCAGACATGATAGGAAGAAG-3'
P13	5'- CTTTCTTCTTCTTCCGCATAGGAGA-3'
P14	5'- AGGCATCTCCTATGGCGGAAGAAG-3'
P15	5'- AAGGCTTTTGTATGAAGCATAACTGGCAATG-3'
P16	5'- GGCATTGCCAGTTATGCTTCATAACAAAAGCCTTA-3'
P17	5'- CTCCGCTTCTTCTGCTTTCTTCTTCTTCC-3'
P18	5'- GGAAGAAGGAAGAAAGGCAGGAAGAAG-3'

Underline indicated cutting sites for enzymes, boldfaced letters indicated overlapping bases

扩增不同基因所用模板及引物见表 2。

1.3 重组表达质粒的构建

目的 PCR 产物和表达载体 pcDNA3.1(-) 分别用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切、回收、连接, 然后转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆。所有重组表达质粒均测序记

实。

表 2 扩增不同嵌合蛋白所用模板及引物
Table 2 Primers used for different fusion proteins

Proteins	Templates	Primers			
jTat	pRSV-jTat	P1	P2		
hTat	HIV-1hxb2	P3	P4		
bTat	BIV127	P5	P6		
BJ	BIV127 pRSV-jTat	P5	P7	P8	P2
JB	pRSV-jTat BIV127	P1	P9	P10	P6
JH	pRSV-jTat HIV-1hxb2	P1	P11	P12	P4
HJ	HIV-1hxb2 pRSV-jTat	P3	P13	P14	P2
JH38	pRSV-jTat HIV-1hxb2	P1	P15	P16	P4
J69H	pRSV-jTat HIV-1hxb2	P1	P17	P18	P4

1.4 细胞培养和转染

用含 10% 胎牛血清的 DMEM, 37°C, 5%CO₂ 条件下培养 HeLa 细胞系用于转染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 -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。

1.5 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 嵌合蛋白的构建

以 pRSV-jTat、BIV127、HIV-1hxb2 为模板, 参照 hTat 激活域和结合域划分推测 jTat 和 bTat 激活域和结合域边界, 设计融合引物扩增不同长度的激活域或结合域片段, 融合引物之间存在序列重叠。然后再以不同的激活域和结合域片段为模板, 通过重叠延伸 PCR^[15,16] 获得不同的嵌合片段, 构建的嵌合蛋白结构示意图见图 1。

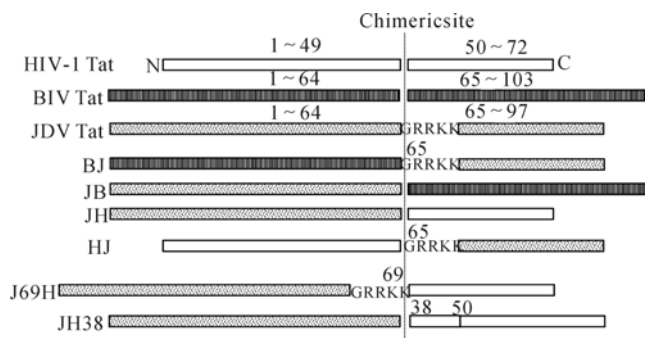


图 1 嵌合蛋白构建示意图

Fig.1 Schematic representation of fusion proteins
Activation domains lie at the left side of chimeric site, binding domains lie at the right side of chimeric site.

2.2 不同嵌合蛋白激活 HIV-1 LTR 能力对比

为研究 JDV、HIV-1 和 BIV Tat 蛋白对 HIV-1 LTR 激活能力差异, 将 JH、HJ、BJ、JB 四个嵌合蛋白及 jTat、hTat、bTat 真核表达质粒与报告质粒 pHIV-1LTR-*luc* 共转染 HeLa 细胞系, 瞬时表达分析结果如图 2。

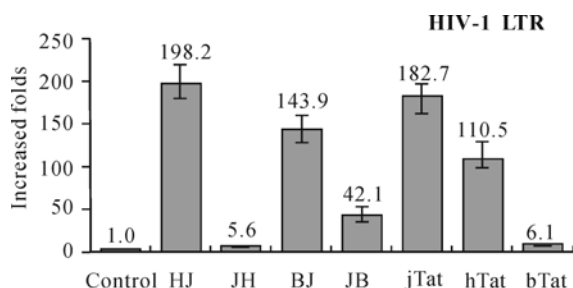


图 2 不同 Tat 及嵌合蛋白对 HIV-1 LTR 的激活

Fig.2 Activation of different fusion proteins on HIV-1 LTR
HeLa cells were cotransfected with 0.05 μ g of pHIV-1 LTR-*luc* and 0.25 μ g of different Tat fusion protein prokaryotic expression plasmids, pcDNA3.1(-) was taken as negative control. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

如图 2 所示, jTat 和 hTat 能激活 HIV-1 LTR, 且 jTat 的激活能力强于 hTat。HJ、BJ 均能激活 HIV-1 LTR, 且 HJ 的激活能力最强。BJ 激活能力低于 jTat, 但强于 hTat。JB 能部分激活 HIV-1 LTR, 而 bTat 没有激活能力。可以看出所有包含 jTat 结合域的蛋白均能激活 HIV-1 LTR, 且激活能力强于 hTat。意料之外的是虽然包含 hTat 的 RNA 结合域和 jTat 激活域, JH 却不能激活 HIV-1 LTR, 可能与功能域的完整性、细胞因子及嵌合蛋白构象有关。

2.3 不同嵌合蛋白激活 JDV LTR 能力对比

将 JH、HJ、BJ、JB 四个嵌合蛋白及 jTat、hTat、bTat 真核表达质粒与报告质粒 pJDV-LTR-*luc* 共转染 HeLa 细胞系, 瞬时表达分析结果如图 3。

如图 3 所示, HJ、BJ、JB、jTat 和 bTat 均能激活 JDV LTR, 且 HJ、BJ 和 jTat 的激活能力较强, JB 和 bTat 激活能力较弱, JH 和 hTat 不能激活 JDV LTR。可见所有包含 jTat 或 bTat 结合域的蛋白均能激活 JDV LTR, 且包含 jTat 结合域蛋白的激活能力明显强于包含 bTat 结合域的蛋白。

2.4 不同嵌合蛋白激活 BIV LTR 能力对比

将 JH、HJ、BJ、JB 四个嵌合蛋白及 jTat、hTat、bTat 真核表达质粒与报告质粒 pBIV-LTR-*luc* 共转染 HeLa 细胞系, 瞬时表达分析结果如图 4。

HJ、BJ、JB、jTat 和 bTat 均能激活 BIV LTR, 而 HJ、BJ 和 jTat 的激活能力明显高于 JB 和 bTat,

JH 和 hTat 不能激活 JDV LTR (图 4)。可见所有包含 jTat 或 bTat 结合域的蛋白均能激活 BIV LTR, 且包含 jTat 结合域蛋白的激活能力强于包含 bTat 结合域的蛋白。

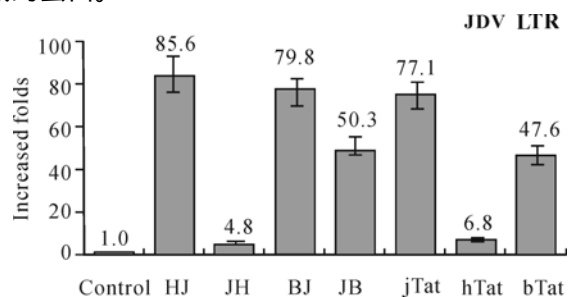


图 3 不同 Tat 及嵌合蛋白对 JDV LTR 的激活

Fig.3 Activation of different fusion proteins on JDV LTR
HeLa cells were cotransfected with 0.05Mg of pJDV LTR-*luc* and 0.25Mg of different Tat fusion protein prokaryotic expression plasmids, pcDNA3.1(-) was taken as negative control. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

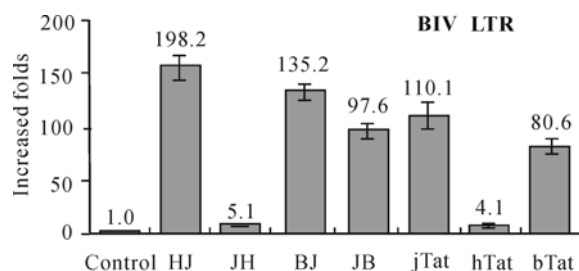


图 4 不同 Tat 及嵌合蛋白对 BIV LTR 的激活

Fig.4 Activation of different fusion proteins on BIV LTR
HeLa cells were cotransfected with 0.05Mg of pBIV LTR-*luc* and 0.25Mg of different Tat fusion protein prokaryotic expression plasmids, pcDNA3.1(-) was taken as negative control. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

2.5 扩大激活域和结合域的 JH 蛋白不激活 HIV-1 LTR

JH 蛋白具有 jTat 的激活域和 hTat 的结合域, 但却不能激活 HIV-1 LTR。为了排除结构域不完整造成 JH 不能激活 HIV-1 LTR 的可能性, 本文构建了 J69H, 将 JH 中 JDV Tat 激活域的 C 端延伸了 5 个氨基酸。为排除嵌合后可能对 hTat 结合域空间构象造成的影响, 构建了 JH38, 将 HIV-1 核心区加入到嵌合蛋白。将 JH、J69H、JH38 三个嵌合蛋白及 jTat, hTat 真核表达质粒与报告质粒 pHIV-1LTR-*luc* 共转染 HeLa 细胞系, 瞬时表达分析结果如图 5。

在 JH 基础上扩大 JDV 激活域的 J69H 和扩大 HIV-1 结合域的 JH38 均不能激活 HIV-1 LTR (图 5)。

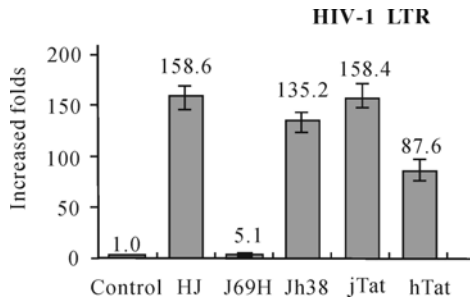


图 5 扩大结构域的嵌合蛋白对 HIV-1 LTR 的激活

Fig.5 Activation of JH fusion protein with enlarged binding domain on HIV-1 LTR

Hela cells were cotransfected with 0.05Mg of pHIV-1 LTR-*luc* and 0.25Mg of Jtat, Htat, JH, J69H and JH38 fusion protein prokaryotic expression plasmids, pcDNA3.1(-) was taken as negative control. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

2.6 JH、J69H、JH38 不激活 HIV-1 LTR 与细胞因子无关

为了排除参与 hTat 激活的细胞因子 cyclin T1 和 CDK9 不足造成 JH、J69H、JH38 不能激活 HIV-1 LTR 的可能性, 将嵌合蛋白, pHIV-1 LTR-*luc* 及 pCI-T1(cyclin T1 真核表达质粒)和 pcDNA3-CDK9 (CDK9 真核表达质粒)共转染 Hela 细胞系, 瞬时表达分析结果如图 6。

如图 6 所示, 加入 cyclin T1 和 CDK9 表达质粒后 JH、J69H、JH38 对 HIV-1 LTR 的激活没有明显变化, 可见 JH、J69H、JH38 不激活与细胞因子无关。

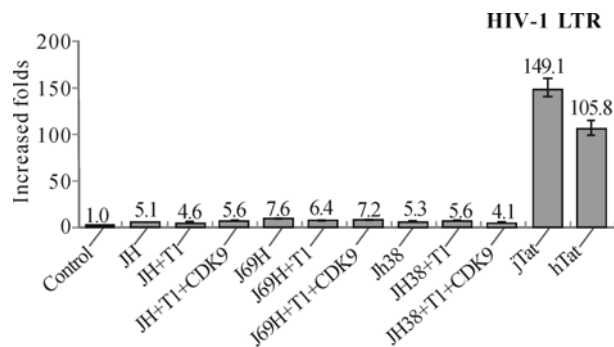


图 6 加入 T1 和 CDK9 对 JH、J69H 和 JH38 激活的影响

Fig.6 Effects of T1 and CDK9 on JH, J69H, JH38 activation Hela cells were cotransfected with 0.05Mg of pHIV-1 LTR-*luc*, 0.25Mg JH, J69H or JH38 and 0.5ug T1 or CDK9 prokaryotic expression plasmids, pcDNA3.1(-) was taken as negative control. The total amount of DNA used for each experiment was kept constant by adjusting with pcDNA3.1(-) plasmid DNA.

3 讨论

作为慢病毒的一种重要的反式激活因子, Tat 具有激活和结合两个独立的功能域。jTat 能激活 HIV-1 和 BIV LTR, 且激活能力强于其自身 Tat。

bTat 能激活 JDV LTR, 但激活能力弱于 jTat^[14]。凝胶阻滞试验在体外证明 jTat 与各 LTR 的直接结合力最强^[18]。本文通过构建 HJ、JH、JB 和 BJ 四个嵌合蛋白并验证了其对不同 LTR 的激活能力。HJ 与 hTat 具有相同的激活域和不同的结合域, HJ 对 HIV-1 LTR 的激活能力强于 hTat; BJ 和 bTat 具有相同的激活域和不同的结合域, BJ 对 JDV LTR 和 BIV LTR 的激活能力强于 bTat; JB 和 jTat 具有相同的激活域和不同的结合域, jTat 对 JDV LTR 和 BIV LTR 的激活能力强于 JB。总体而言, HJ 和 BJ 在针对不同 LTR 时均具有类似 jTat 的较强激活能力; JB 激活 BIV 和 JDV LTR 的激活能力与 bTat 相当。上述结果证明不同 jTat 比 hTat 和 bTat 更强的激活能力主要因为其 RNA 结合域能力的较强。探讨 jTat 具有较强激活能力的原因将有助于进一步揭示 JDV 急性感染、快速发病和高致死率的机理。

试验证明 N-SIV/C-HIV-1 嵌合 Tat 蛋白不能激活 HIV-1 和 SIV LTR^[19]。本文构建的 JH 虽然具备完整的 hTat 结合域, 却不能激活 HIV-1、BIV 或 JDV LTR。进一步扩大 JH 中 JDV Tat 激活域或 HIV-1 Tat 结合域也没能得到有活性的嵌合蛋白, 证明 JH 无活性不是由于激活域或结合域不完整造成。jTat 和 hTat 均能激活 HIV-1 LTR, 且两者在体内与 TAR 的结合时都需要 cyclin T1 的参与^[18]。hTat 激活域结合 cyclin T1 后的二元复合物能形成正确构象, 在结合域与 TAR 5' 端突出相互作用的同时 cyclin T1 能与 TAR 中央环相互作用, 最终二元复合物有效结合到 TAR 上^[13]。CyclinT1 与 CDK9 相互作用, CDK9 使 RNA 聚合酶 II 的 CTD 超磷酸化, 形成进行性的延伸复合物, 使转录顺利延伸^[13]。hTat 能在体外试验中与 HIV-1 TAR 5' 突出直接结合, 但作用力较弱^[18], 与 TAR 在体内体外的紧密结合并最终激活 HIV-1 LTR 还需 cyclin T1 和 TAR 中央环结构的参与。但过量表达 cyclin T1 和 CDK9 并不能提高 JH、J69H 和 JH38 对 HIV-1 LTR 的激活, 证明不激活不是由细胞因子引起的。推测 JH 中 hTat 结合域也能与 HIV-1 TAR 5' 突出发生相互作用, 但作用力较弱, 无法与 TAR 有效结合促进转录。序列分析显示嵌合位点附近 jTat 和 bTat 的氨基酸序列同源性较高, 而 hTat 与 jTat 碱性区氨基酸同源性相对较低 (图 6)。JH 不激活 HIV-1 TAR 的原因可能是由于嵌合位点氨基酸序列差异较大, 导致所形成嵌合蛋白激活域和结合域相对空间结

构发生变化,与 cyclin T1 形成二元复合物的构象阻碍了 cyclin T1 和中央环的相互作用,最终导致该二元复合物无法有效结合到 TAR 上促使转录

延伸(图 7)。JH 不具激活能力的进一步解释还需通过结构生物学对比其空间构象上相对 hTat 发生的具体变化。

	Core domain	Basic domain	C terminal domain
HIV-1 TatFITKALGISYG	RKKRRQRRR	AHQNSQTHQASLSKQ
JDV TatFLQKGLGIRHD	GRRKKRGTR	GKGRKIHYSRSTESGGQRAPNCA
BIV TatFLQKNLGINYG	SGPRRRGTR	GKGRRI RRTASGGDQRREADSQRSFTNMDQ

图 6 hTat jTat 和 bTat 嵌合位点的序列对比

Fig.6 Comparison of amino acids sequence near chimeric site of hTat, jTat and bTat

Black indicating the same amino acid of three proteins, grey indicating the same amino acid of two proteins. Chimeric site is between core domain and basic domain.

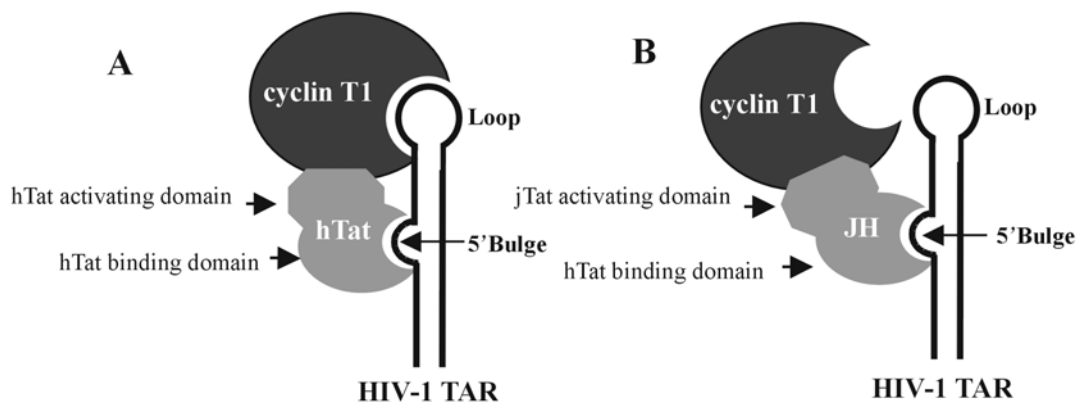


图 7 JH 失活的可能作用模式

Fig.7 Possible model for defective activate ability of JH fusion protein

(A) Model of hTat-cyclin T1 complex binding HIV-1 TAR^[18]. (B) Possible model for defective activate ability of JH. Conformation of JH-cyclin T1 complex doesn't support the binding of cyclin T1 and central loop of TAR RNA, this structure finally results in defective binding of JH-cyclin T1 complex with TAR and the pause of transcription elongation.

致谢:感谢 Dr. Price 馈赠 pCI-T1 和 pcDNA3-CDK9。

References

- [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] Bayer P, Kraft M, Ejchart A, *et al.* Structural studies of HIV-1 Tat protein [J]. *J Mol Biol*, 1995, 7; 247 (4): 529-535.
- [4] Madore S J, Cullen B R. Functional similarities between HIV-1 Tat and DNA sequence-specific transcriptional activators [J]. *Virology*, 1995, 1; 206 (2): 1150-1154.
- [5] Selby M J, Peterlin B M. Trans-activation by HIV-1 Tat via a heterologous RNA binding protein [J]. *Cell*, 1990, 24; 62 (4): 769-776.
- [6] 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, 14; 345 (6276): 640-642.
- [7] 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, 6 (11): 2077-2087.
- [8] 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, 24; 62 (4): 757-767.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Price D H. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II [J]. *Mol Cell Biol*, 2000; 20 (8): 2629-2634.

- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Mullis K B, Ferre F, Gibbs R A. *The Polymerase Chain Reaction* [M]. Boston: Birkhuser 1994.
- [16] Horton R M, Cai Z, Ho S N, *et al*. Gene splicing by overlap extension: Tailor-made genes using the polymerase chain reaction [J]. *Biotechniques*, 1990, 8: 528-532.
- [17] Carroll R, Martarano L, Derse D. Identification of lentivirus tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras [J]. *J Virol*, 199, 65 (7): 3460-3467.
- [18] Smith C A, Calabro V, Frankel A D. An RNA-binding chameleon [J]. *Mol Cell*, 2000, 6 (5): 1067-1076.
- [19] Baier-Bitterlich G, Tretiakova A, Richardson M W, *et al*. Structure and function of HIV-1 and SIV Tat proteins based on carboxy-terminal truncations, chimeric Tat constructs, and NMR modeling [J]. *Biomed Pharmacother*, 1998, 52 (10): 421-430.

征 稿 启 事

《中华现代中西医杂志》、《中华现代临床医学杂志》、《中华现代耳鼻喉杂志》、《中华现代妇产科学杂志》是综合性、国际性医学学术期刊。具有 ISSN/CN 标准刊号，被收入国内多种学术期刊光盘刊。面向医、药、护、卫等专业的科研、教学、临床工作者。栏目设有：专家论坛、论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、临床护理、预防医学、医院管理等。本系列刊物发表周期短、版面费低、来稿免收审稿费。

地址：北京 100081 信箱—54 分箱 杂志编辑部收

电话：010-62226159（传真） 010-62221057 邮编：100081

电子信箱：YXZZ@sohu.com