

利用 HSV1 α -基因启动子构建真核表达载体 phIE^{*}

寸 韡, 刘龙丁, 张 莹, 罗 杰, 吴文娟, 张雪梅, 廖 芸, 李琦涵^{**}

(中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

Construction and Application of Eukaryotic Expression Vector

phIE Containing HSV1 α -gene Promoter

CUN Wei, LIU Long-ding, ZHANG Ying, LUO Jie, WU Wen-juan, ZHANG Xue-mei,
LIAO Yun, LI Qi-han^{**}

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: An eukaryotic expression vector phIE composed of pcDNA3 skeleton and the herpes simplex virus immediate early gene promoter was constructed to provide a new choice for ectopic expression. The plasmid phIE-Us1 was constructed by inserting the us1 cDNA downstream of the promoter to analyze the function of ICP22 protein very early in the infection process. Furthermore, the gene encoding the chloramphenicol acetyl-transferase was inserted into the multiple cloning site of the expression vector to yield the phIE-CAT. In functional analysis of viral protein ICP22 and Vp16, phIE-CAT was confirmed to be capable of evaluating the mechanism of the genome of herpes simplex virus 1 transcriptional regulation.

Key words: Herpes simplex virus; Immediate early gene; Vector; Promoter

摘要: 以 pcDNA3 质粒为骨架, 构建由 1 型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus I, HSVI)立即早期基因启动子指导外源蛋白转录的 phIE 真核表达载体, 该质粒为外源蛋白的表达提供了更为广泛的选择, 通过插入 us1 编码序列, phIE-Us1 被用于分析 ICP22 蛋白在病毒感染早期的功能; 在多克隆位点插入氯霉素乙酰转移酶编码基因构建 phIE-CAT 检测载体, 应用于检测 HSVI 病毒蛋白 Vp16 及 ICP22 的功能, 明确显示该质粒对于研究单纯疱疹病毒的基因转录调控具有重要的应用价值。

关键词: 单纯疱疹病毒, 立即早期基因, 载体, 启动子

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2006)04-0328-05

随着病毒分子生物学研究的深入, 利用各种病毒基因启动子构建真核表达载体的技术已日益广泛^[1]。目前, 已有多种含有病毒启动子的真核表达载体以商业化或研究用的形式问世。其中, 具有人巨细胞病毒 (CMV) 和空泡病毒 SV40 基因启动子的 pcDNA 系列及 pSV 系列真核表达载体最为实验室常用^[2]。它们作为一类非特异性外源基因的表达载体, 具有重要的应用意义。同时, 许多工作在与 CMV 和 SV40 同属 DNA 病毒的单纯疱疹病毒 (*Herpes*

simplex virus I, *HSV1*) 的分子生物学研究中, 亦注意到其 α 、 β 、 γ 基因上游序列具有转录启动子所表现的特性^[3], 尤其是 α 基因的启动子, 能够分别指导五个 α 基因编码蛋白 ICP0、ICP4、ICP22、ICP27 和 ICP47 的转录启动, 这些启动子均具有典型的结构特点, 包括 Sp1 结合基序、病毒蛋白 Vp16 的结合基序以及 GABP 结合基序等等^[4-6]。这些元件组成了较完整的启动子结构, 并与 CMV、SV40 基因启动子类似, 因而亦具备了作为一个真核表达载体

收稿日期: 2005-12-31, 修回日期: 2006-03-24

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370065, 30570081)。

作者简介: 寸 韡 (1980-), 男, 云南省籍, 博士, 主要从事病毒免疫学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0871-8335905, E-mail: qihanli@public.km.yn.cn

启动子的结构基础。更为重要的是, 由于 HSV α -基因启动子在其病毒感染过程中, 能够受到多种病毒蛋白, 包括其自身转录翻译的 IE 蛋白及细胞调控因子的调控而表现出不同的转录效率^[7,8], 因而可以作为研究 HSV 病毒感染复制机制最有效的工具。基于这个目的, 我们在进行 HSV 病毒分子生物学研究的工作中, 选取了 HSV1 病毒的 $\alpha 4$ 基因上游启动子序列, 以 pcDNA3 及 pCAT3 作为基础, 分别构建了 phIE 表达载体和 phIE-CAT 检测载体, 并对其表达效率及在 HSV1 相关蛋白功能分析中的应用意义作了初步的实验性研究。结果表明, 该 phIE 表达载体及 phIE-CAT 检测载体作为真核表达载体及 HSV 相关蛋白的功能研究工具, 具有较好的研究意义。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH 5 α 、pCAT3 系列质粒为 Promega 公司产品; 携带有人巨噬细胞病毒立即早期启动子的 pcDNA3 真核表达质粒为 Invitrogen 公司产品, 表达氯霉素乙酰转移酶 (Chloramphenicol acetyl transferase, CAT)、 $\alpha 22$ 蛋白、Vp16 蛋白的 pcDNA3-CAT、pcDNA3-Usl、pcDNA3-Vp16 重组质粒以及分别由 SP1、CAAT、ATF、AP1、OCTA 元件指导 CAT 蛋白表达的 pCAT-Sp1、pCAT-CAAT、pCAT-ATF、pCAT-Ap1、pCAT-OCTA 检测质粒为本科室构建并保存。

Vero 细胞生长于 25 x 50mm 小方瓶中, 培养液使用含 8% 牛血清 DMEM 液, 100 u /mL 青霉素; 20 μ g/mL 链霉素, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养; 中国仓鼠卵巢细胞 CHO-k1 使用含 5% 牛血清 F12 营养液培养, 其它条件同前。HSV1 型病毒为本室保存, 生长于 Vero 细胞, 滴度测定使用同样细胞, 按标准方法进行。

各种工具酶、PCR 试剂盒购自大连宝生物公司; LipofectamineTM2000 为 Invitrogen 公司产品, 用于 CAT 分析的 Reporter Lysis Buffer、CAT enzyme assay system 试剂盒为 Promega 公司产品; [³H]-氯霉素购自中国同位素公司; 邻硝基苯基半乳糖苷 (σ -nitrophenyl β -D-galactopyranoside, ONPG)、2,5-二苯基噁唑 (2,5-diphenyloxazole, PPO) 以及 1,4-双-[2'-(5'-苯基噁唑基)]苯 (1,4-Di-[2'-(5'-phenyloxazolyl)]-benzene, POPOP) 均为 SIGMA 公司试剂。其余试剂均为进口或国产分析纯以上级产品。

1.2 病毒基因组的提取

HSV1 病毒以 0.01m.o.i 接种经 PBS 清洗过的 Vero 细胞, 37 $^{\circ}$ C 吸附 30min, 加入含 1% 牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养至细胞病变, 收集培养物, 离心去除细胞碎片, 加入 0.02mol/L Zn(Ac)₂ 沉淀病毒颗粒, 离心后所获沉淀经饱和 EDTA 溶解后, 加入蛋白酶 K 于 56 $^{\circ}$ C 反应 1h, 按照常规方法, 经酚: 氯仿抽提去除病毒蛋白, 所得 DNA 经乙醇沉淀后, 获得 HSV1 病毒基因组。

1.3 重组质粒的构建

根据 HSV1 基因组以及 CAT 基因序列, 设计 5' 端携带有保护性碱基 (AGC) 以及限制性酶切位点的引物, 其编号及序列如下:

P1: 5' AGC AGATCT GGGCCCCGCCCCCTGC 3'

P2: 5' AGC GGATCC GTGTCGGCAGCC 3'

P3: 5' AGC GGATCC ATGGAGAAAAAATCAC3'

P4: 5' AGC TCTAGA TTACGCCCCGCCCCCTG 3'

P5: 5' AGC GGATCC ATGGCCGACATTTCCCCAGG

P6: 5' AGC TCTAGA TCACGGCCGGAGAAACT
GGT

以 HSV1 基因组为模板, P1/P2 为引物, 在 GC 缓冲液中进行降落 PCR, 获得 P hsv 片段。目的片段经 BglII 和 BamHI 双酶切后, 连入经过相同酶切处理、切除 P cmv 后的 pcDNA3 载体, 构建包含有 HSV1 α 基因启动子的真核表达质粒 phIE (如图 1)。以 pcDNA3-CAT 质粒为模板, P3/P4 为引物, PCR 扩增获得 CAT 基因, 经相应酶切后连入 phIE 载体, 构建 phIE-CAT 重组质粒 (如图 2a)。以 HSV1 基因组为模板, P5/P6 为引物, PCR 扩增获得 Usl 基因, 经相应酶切后连入 phIE 载体, 构建 phIE-Usl 重组质粒 (如图 2b)。所有质粒的扩增及转化均在大肠杆菌 DH 5 α 菌株中进行, 并通过酶切及测序鉴定。

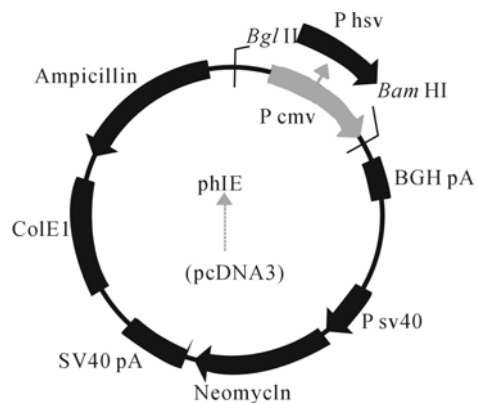


图 1 phIE 重组质粒的构建
Fig.1 Construction of phIE

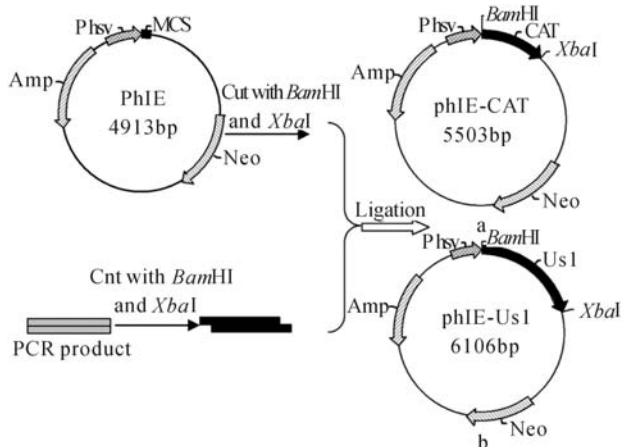


图2 phIE-CAT 和 phIE-Usl1 重组质粒的构建
Fig.2 Construction of phIE-CAT and phIE-Usl1

1.4 细胞转染

接种于六孔板中的 CHO-k1 细胞生长至 70% 培养面积时, 根据操作说明, 使用 LipofectamineTM 2000 进行瞬时转染, 在转染前撤去细胞全营养液, 换为无血清培养液, 2~4 μ g 质粒 DNA 稀释于 250 μ L 无血清培养液(每种质粒用量为 2 μ g/孔), 与 250 μ L 含有 5-10 μ L LipofectamineTM2000 的无血清培养液混合, 室温孵育 20 min 形成 DNA 脂质体复合物后, 逐滴加入细胞培养孔中, 6h 后将转染液更换为全营养液继续培养 30h, 收集细胞进行 CAT 活性分析, 每个样品重复制备三次。

1.5 CAT 活性检测

待转染细胞经 PBS 小心清洗 3 次, 每孔细胞加入 200 μ L 1 \times Reporter Lysis Buffer, 室温孵育 15min 后仔细刮下细胞裂解物, 60 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 离心收集上清。根据操作说明采用 CAT enzyme assay system 试剂盒以及基于液闪计数 (LSC) 的方法检测 CAT 活性, 同时设立空白对照以及连续倍比稀释的 CAT 标准品: 10 μ L 细胞提取液(空白裂解液或 CAT 标准品) 各加入 10 μ L 9.25 $\times 10^5$ Bq/mL [³H]-氯霉素+5 μ L 正丁酰辅酶 A+90 μ L Tris·HCl (25mmol/L, pH8.0), 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h 后, 每只离心管加入 300 μ L 二甲苯, 振荡离心, 转移上层有机液至另一只新离心管, 每管各加入 100 μ L 新鲜的 0.25mol/L Tris.HCL (pH8.0), 振荡离心。小心吸取 200 μ L 上层液相转移至液闪管, 加入相应的液闪液。进行 ³H 的液闪计数。根据检测结果, 制作标准曲线, 计算出每孔细胞的 CAT 蛋白表达量。1 个 CAT 活性单位定义为 37 $^{\circ}$ C、1min 内转移 1nmol 乙酰基团至氯霉素所需的酶量。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

酶切鉴定显示成功构建 phIE 真核表达质粒(图 3A), 测序结果与预期相符, 在 phIE 多克隆位点内插入 CAT 或 us1 基因, 酶切结果(图 3B、C)及测序显示成功构建 phIE-CAT 和 phIE-Usl1 质粒。

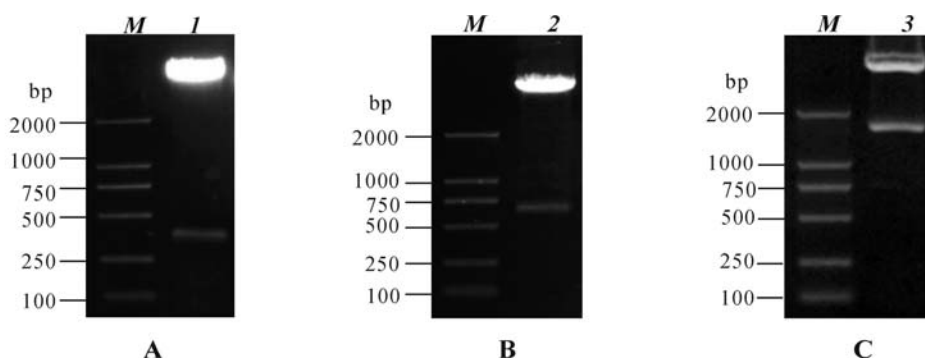


图3 重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme analysis of phIE(A), phIE-CAT(B) and phIE-Usl1(C).
M, DL2000; 1, phIE /BglIII+ BamHI; 2, phIE-CAT / BamHI+XbaI; 3, phIE-Usl1 / PstI.

2.2 phIE 启动子与 CMV 及 SV40 启动子转录效率的比较

对使用病毒基因启动子的真核表达载体的分析表明, 含有 CMV 启动子的表达载体通常具有较强的转录表达效率, 而含有 SV40 启动子的载体则相对较低, 但仍具有应用意义。为了检测包含有

HSV1 α 启动子的 phIE 表达载体的转录效率, 我们利用 CAT 检测系统对 phIE-CAT 与无启动子的 pCAT3-Basic, 以及含有 SV40 启动子的 pCAT3-Control 或 CMV 启动子的 pcDNA-CAT 的转录效率进行了比较。其结果见图 4, 由图可以看到, 当上述各质粒分别以同样方法转染入 CHO-k1 细胞后,

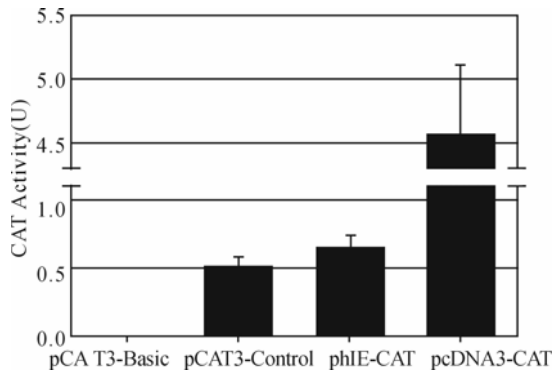


图4 在 CHO-K1 细胞中评估 pHIE 转录效率

Fig.4 Evaluation of pHIE expressive efficiency in CHO-k1 cells.

对细胞内氯霉素乙酰转移酶的表达分析表明: HSV1 α 4 启动子所表现的转录效率稍强于 SV40 启动子, 但低于 CMV。

2.3 pHIE-CAT 报告载体在 HSV1 相关蛋白功能分析中的应用意义

由于 HSV1 α 基因启动子对病毒相关蛋白的调控较为敏感^[10]。因此, 构建含有 HSV 启动子真核表达载体的另一个就是为了便于对 HSV 相关病毒蛋白进行功能分析。对此, 我们根据相关资料和本实验的前期工作结果, 利用 pHIE-CAT 报告载体检测了 Vp16 和 ICP22 两个病毒蛋白的转录调控功能。两种蛋白的编码基因 vp16 和 us1 分别克隆进入 pcDNA3 表达载体后, western blot 确定重组质粒在 CHO-k1 细胞内正常表达, 在此基础上, 按不同组合 pHIE-CAT/pcDNA3, (pcDNA3 作为对照质粒); pHIE-CAT/pcDNA-Vp16; pHIE-CAT/pcDNA-Us1; pcDNA-CAT/pcDNA3; pcDNA-CAT/pcDNA-Vp16; pcDNA-CAT/pcDNA-Us1 分别转染进入 CHO-k1 细胞, 再根据细胞内氯霉素乙酰转移酶的表达来确定结果。从图 5 中可以看到, 以 pHIE-CAT 作为报告载体, VP16 蛋白能够显著增强报告基因的表达, 而 ICP22 表现相应的抑制功能, 充分显示了两个病毒蛋白对 HSV1 α 基因的转录调控作用。但是以传统的 pcDNA3 质粒携带 CAT 报告基因作为检测对象, 并不能反映出 VP16 蛋白的转录激活以及 ICP22 蛋白的转录抑制作用。

2.4 利用 pHIE-Us1 检测 ICP22 蛋白在病毒感染早期的功能

HSV1 缺失 us1 基因后, 明显降低多种病毒蛋白的产量, 因此 ICP22 被认为具有转录激活作用^[10]; 然而 pcDNA-Us1 表达的 ICP22 对多种转录元件具有强烈的转录抑制作用, 两个看似矛盾的结果使得

需要对 ICP22 在 HSV1 感染过程中的转录调节作用进行更为详细的研究。实验结果 2.3 显示: α 蛋白 ICP22 对 α 启动子具有反馈抑制作用, 但不影响 CMV 启动子的转录。因此相对于正常 HSV1 感染, pcDNA3-Us1 过量表达了 ICP22, 为了排除这种异常表达的影响, 更真实地反映 ICP22 在病毒感染早期的功能。本实验将 us1 基因连入 pHIE 载体, 转染进入 CHO-k1 细胞后, 检测了在反馈抑制作用下, pHIE-Us1 表达的 ICP22 对 SP1 等多种细胞启动子近端序列元件(PSE)的转录调节作用, 图 6 结果显示: 即使 ICP22 由 HSV1 α 启动子启动“有限表达”, 也能够明显地抑制 SP1、CAAT、ATF、AP1 以及 OCTA 等 PSE 的转录, 确认了 ICP22 在病毒感染早期的转录抑制功能。

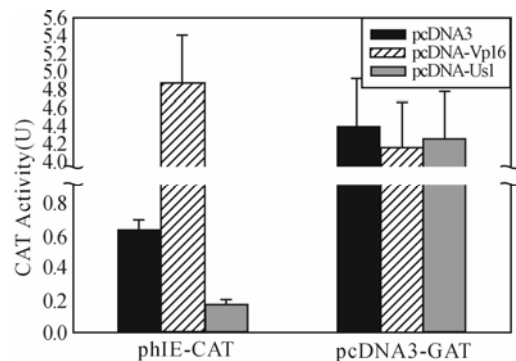


图5 在 CHO-k1 细胞中利用 pHIE-CAT 评估 Vp16 和 ICP22 对 IE 启动子的调节功能。

Fig.5 Evaluation of Vp16 and ICP22 regulative function on IE promoter using pHIE-CAT in CHO-k1 cells.

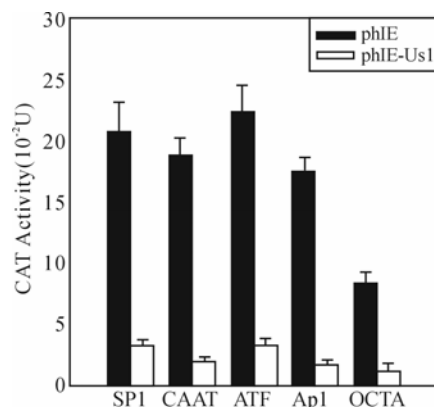


图6 在 CHO-k1 细胞中 pHIE-Us1 表达的 ICP22 能够抑制多种细胞 PSE 的转录。

Fig.6 Transcriptional repression of various cellular PSE by ICP22 expressed by pHIE-Us1 in CHO-k1 cells.

3 讨论

对病毒基因结构的分子生物学分析, 通常具有两个方面的意义, 一是对病毒在感染复制过程中基

因表达调控机理的研究^[11], 这将为认识病毒感染的过程与致病原理提供资料; 其次, 一些具有较强转录调控能力的病毒启动子序列的发现和确认, 将有可能为制备具有应用意义的真核表达载体提供基础元件^[12]。我们在对 HSV1 立即早期基因结构分析的基础上, 综合了对 α 基因启动子的认识和对一些病毒相关调控蛋白及机理分析^[13], 尝试了利用 α -4 基因启动子序列构建相关真核表达载体的技术可能, pHIE 及 pHIE-CAT 的构建为我们提供了一个新的实验性真核表达载体系统, 它具有较 pSV 系列载体高的表达能力, 因此可以用于相关外源蛋白的表达。但更为重要和具有研究意义的是, 该载体在 HSV1 的分子生物学研究中具有重要的应用价值。因为其所使用的立即早期基因启动子, 为 HSV1 相关蛋白的功能分析提供了直接的工具, 对 Vp16 和 ICP22 的功能检测 (图-6) 以及模拟 ICP22 在病毒感染早期的表达 (图 7) 就明确表明了这一点。而进一步的应用意义亦是明确的, 例如, 目前对 HSV 感染起始阶段中各转录因子的作用将影响病毒进入细胞病变还是潜伏感染的研究已提出了众多有意义的假说^[14, 15], 而这些研究将为认识 HSV 病毒如何建立潜伏性感染的机理提供有力的证据。在这个过程中, 利用 pHIE 表达载体及其突变体就有可能重现各转录调节蛋白相互作用及调控 α 基因启动子序列的过程, 而且, pHIE-CAT 的应用, 将可以利用 CAT 分析系统的定量功能对这些病毒蛋白及细胞蛋白调控 α 基因的机理做出准确的定量分析。

References

- [1] Riviere Y, Blank V, Kourilsky P, *et al.* Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection [J]. *Nature*, 1991, 350: 625-626.
- [2] Wang Q, Udayakumar T S, Vasaitis T S, *et al.* Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:17319-17328.
- [3] Mackem S, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: transcription-initiation sites and domains of alpha genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 7122-7126.
- [4] Jones K A, Tjian R. Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription in vitro [J]. *Nature*, 1985, 317: 179-182.
- [5] Klemm J D, Rould M A, Aurora R, *et al.* Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules [J]. *Cell*, 1994, 77: 21-23.
- [6] Vogel J L, Kristie T M. The novel coactivator C1 (HCF) coordinates multiprotein enhancer formation and mediates transcription activation by GABP [J]. *EMBO J*, 2000, 19: 683-690.
- [7] Kemp L M, Latchman D S. Induction and repression of cellular gene transcription during herpes simplex virus infection are mediated by different viral immediate-early gene products [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 174: 443-449.
- [8] Mossman K L, Smiley J R. Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP16 renders expression of the immediate-early genes almost entirely dependent on ICP0 [J]. *J Virol*, 1999, 73: 9726-9733
- [9] Wysocka J, Herr W. The herpes simplex virus VP16-induced complex : the makings of a regulatory switch [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 294-304.
- [10] Sears S E, Halliburton I W, Meignier B, *et al.* Herpes simplex virus 1 mutant deleted in the α 22 gene: growth and gene expression in permissive and restrictive cell and establishment of latency in mice [J]. *J Virol*, 1985, 55 : 338-346.
- [11] Roizman B, Kozak M, Honess R W, *et al.* Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: evidence for multilevel regulation of herpes simplex 1 RNA and protein synthesis [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1975, 39: 687-701.
- [12] Boshart M, Weber F, Jahn G, A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus [J]. *Cell*, 1985, 41:521-530.
- [13] Cun W, Zhang Y, Liu L-D, (寸 韡, 张 莹, 刘龙丁) *et al.* Analysis of Herpes Simplex Virus Type I Immediate Early Gene Upstream Regulative Region [J]. *Prog Biochem Biophys (生物化学与生物物理进展)*, 2006, 33: 77-82.
- [14] He X, Treacy M N, Simmons D M, *et al.* Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development [J]. *Nature*, 1989, 340: 35-41.
- [15] Kristie T M, Vogel J L, Sears A E. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1229-1233.