

单纯疱疹 I 型病毒即刻早期基因 上游调控序列分析*

寸 犇 张 莹 刘龙丁 王丽春 董承红 李琦涵**

(中国医学科学院 医学生物学研究所病毒免疫室, 昆明 650118)
中国协和医科大学

摘要 感染人体的单纯疱疹病毒 (HSV) 在宿主细胞中, 以级联反应的方式表达病毒蛋白. 作为最早表达的立即早期基因, 其上游都具有相似的调控序列. 通过 $\alpha 4$ 基因上游转录相关元件的依次递减, 以 CAT 作为报告基因, 评估了在病毒感染细胞早期阶段中, 各 DNA 序列对立即早期基因转录所发挥的可能作用. 实验数据表明, HSV 立即早期基因在细胞中的表达受到多种元件的共同调控, 这些成簇分布的调控元件的排列分布将为深入了解 HSV 的复制周期提供有益的线索.

关键词 单纯疱疹病毒(HSV), 立即早期基因, 转录, 调控
学科分类号 Q7

以人体为感染宿主的单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)是一种具有包膜的线状双链 DNA 病毒^[1], 其在人群中较高的感染率及在不同组织细胞中的不同感染形式, 均与其复杂的基因结构和表达功能有直接的关系^[2]. HSV 的基因组 DNA 通过共价连接的长节段(L)和短节段(S)组成, 在每个节段的两端, 含有反向重复序列, 包括末端重复序列 (TR) 和内部重复序列 (IR) ^[3]. 通常, HSV DNA 一旦进入细胞核内, 线状 DNA 就可通过两端的 TR 连接形成环状^[4], 而在宿主细胞核内的病毒基因组则以级联反应的方式表达病毒蛋白^[5], 根据基因表达时序的不同, HSV 基因被分为立即早期 (α)、早期(β)和晚期(γ)基因^[6]. 病毒感染细胞后, α 基因能够迅速表达, 该表达产物对于病毒的增殖和复制发挥着重要的调节功能, 如 α 蛋白的产生对其后的 β 基因表达具有直接的意义, 而 γ 基因的转录又需要 β 蛋白的存在^[7]. HSV 基因结构的分析表明, 作为 HSV 进入细胞后最先表达的 5 种 α 蛋白—— $\alpha 0$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 22$ 、 $\alpha 27$ 和 $\alpha 47$ 均具有相似的上游调控序列, 在位置上, 它们几乎都位于病毒基因组的反向重复序列中^[8], 如果利用重组技术, 将这些调控序列插入在 β 基因的读码框之前, 则该 β 基因在表达时序上也将具有 α 基因的特性^[9], 这些结果提示, 病毒蛋白在表达时序上的不同似乎是由

HSV 基因特殊的上游转录调控序列所决定. 因此, 对这些反向重复序列中的转录调控元件进行相应的功能分析, 对于了解 HSV 基因的复制和转录调控将具有重要意义.

氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 作为报告基因用于检测转录调控元件已经是一个较为成熟的技术^[10], 相对于氯霉素上的 2 个乙酰化位点, CAT 只能催化 1 个丁酰基团结合于氯霉素, 以丁酰辅酶 A 作为底物检测 CAT 活性, 更能直观、线性地反映 CAT 酶活性的高低^[11]. 本实验在此检测系统基础上, 以 HSVI $\alpha 4$ 基因上游 300 bp 附近的转录调控序列为检测对象, 通过依次递减的方法, 初步检测了 HSV I α 基因上游各片段对转录效率的影响. 同时, 实验中采用了 pSV- β -gal 质粒作为内对照控制转染效率不同所产生的误差. 实验结果初步证实, α 基因上游转录调控序列所包含的多种调控元件可以通过一定的叠加作用而达到最大的激活效果, 也即各种调控元件的激活作用可以叠加, 当然, 这种叠加并非各调控元件的激活作用简单相加, 它可能具有特定的几何倍

*国家自然科学基金资助项目(30370065).

** 通讯联系人. Tel: 0871-8335905, Fax: 0871-8334483

E-mail: qihanli@public.km.yn.cn

收稿日期: 2005-06-02, 接受日期: 2005-08-30

数效应. 而在 HSV I 病毒感染的细胞中, 正是这些元件的共同协调作用决定了 α 基因的基本转录水平.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒. 大肠杆菌 DH5 α , 质粒 pCAT3-Basic、pCAT3-Promoter、pSV- β -gal 为 Promega 公司产品.

1.1.2 细胞和病毒. 宫颈癌 HeLa 细胞, 绿猴肾 Vero 细胞生长于 25 mm $\times$ 50 mm 小方瓶中, 培养液使用含 8% 小牛血清的 DMEM 全营养液 (100 U/ml 青霉素, 20 mg/L 链霉素), 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C. HSV I 型病毒, 生长于 Vero 细胞, 滴度测定使用相同细胞按标准方法进行^[2].

1.1.3 酶和其他试剂. 各种工具酶、带有 GC 缓冲液的 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司; LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品; 正丁酰辅酶 A 为 Promega 公司产品; [H³]-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 方法

1.2.1 病毒基因组的提取. HSV I 病毒以 m.o.i.0.01 接种经 PBS 清洗过的 Vero 细胞, 37 $^{\circ}$ C 吸附 30 min, 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 0.02 mol/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 1 h, 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 HSV I 病毒基因组.

1.2.2 重组质粒的构建.

a. 引物设计. 根据 HSV I 基因组序列, 设计 5' 端携带有保护性碱基(AGC)以及 *Sac* I (GAGCTC) 或 *Bgl* II (AGATCT) 酶切位点的引物, 其位置及序列见图 1.

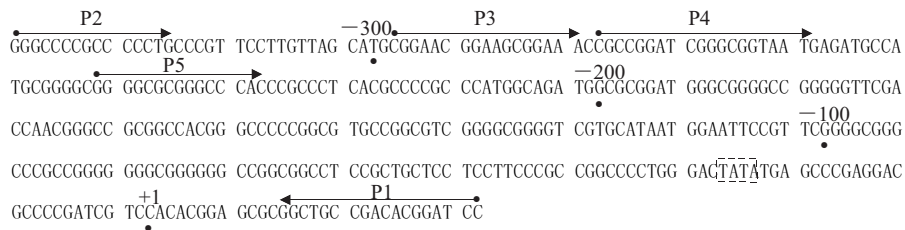


Fig. 1 The location of primers for PCR within the HSV I α 4 gene upstream region

b. 构建重组质粒. 以 HSV I 基因组为模板, P1/P2 为引物, 在 GC 缓冲液中进行降落 PCR, 获得 PSE332 片段. 经 *Sac* I 和 *Bgl* II 双酶切后, 将目的片段连入 pCAT3-Basic 载体, 构建质粒 pCAT-PSE332. 随后, pCAT-PSE332 质粒作为模板, 分别以 P1/P3、P1/P4、P1/P5 为引物, 在 GC 缓冲液中进行降落 PCR, 获得 PSE298、PSE279、PSE244 目的片段. 使用同样方法, 构建质粒 pCAT-PSE298、pCAT-PSE279 和 pCAT-PSE244 (图 2). 所得阳性克隆经测序确证.

1.2.3 细胞转染. 接种于六孔板中的 HeLa 细胞生长至适当密度后, 利用 LipofectamineTM 2000 分别转染 pCAT-PSE332、pCAT-PSE298、pCAT-PSE279 或 pCAT-PSE244 与 pSV- β -gal 的质粒混合物

(1.5 μ g / 孔 pCAT-PSE+1.5 μ g / 孔 pSV- β -gal), 以携带有 SV40 启动子的 pCAT3-Promoter 作为阳性对照, 一式三份. 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后, 撤去转染液, 换为含有 10% 小牛血清的 DMEM 全营养液继续培养 36 h, 经 PBS 清洗 3 次, 收集细胞, 每孔细胞重悬于 200 μ l Tris-HCl (25 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液中, 冻融 3 次, 16 000 g 离心 3 min, 除去细胞碎片, 所得上清用于相应检测.

1.2.4 CAT 活性检测. 40 μ l 细胞提取液放入 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后, 各加入 10 μ l 9.25 $\times$ 10⁵ Bq/ml [H³]-氯霉素 + 5 μ l 正丁酰辅酶 A + 70 μ l Tris-HCl (25 mmol/L, pH 8.0), 同时设立空白对照. 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 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 0.25 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 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 3 H 的液闪计数, 当数值位于 10 000~150 000 时, CAT 活性处在线性范围内^[13].

1.2.5 β -gal 活性检测. 50 μ l 细胞提取液 (或空白对照)+1 μ l β - 巯基乙醇+80 μ l 4 g/L ONPG+350 μ l

缓冲液 (21.5 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.22 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.75 g/L KCl, 0.246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0), 混匀, 30 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min 后, 溶液变为亮黄色, 加入 200 μ l 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应. 16 000 g 离心 10 min. 小心将上清移至一干净比色杯中, 以对照管调零, 测 A_{420} 值, 当数值位于 0.2~2.0 时, β -gal 活性处在线性范围内^[14].

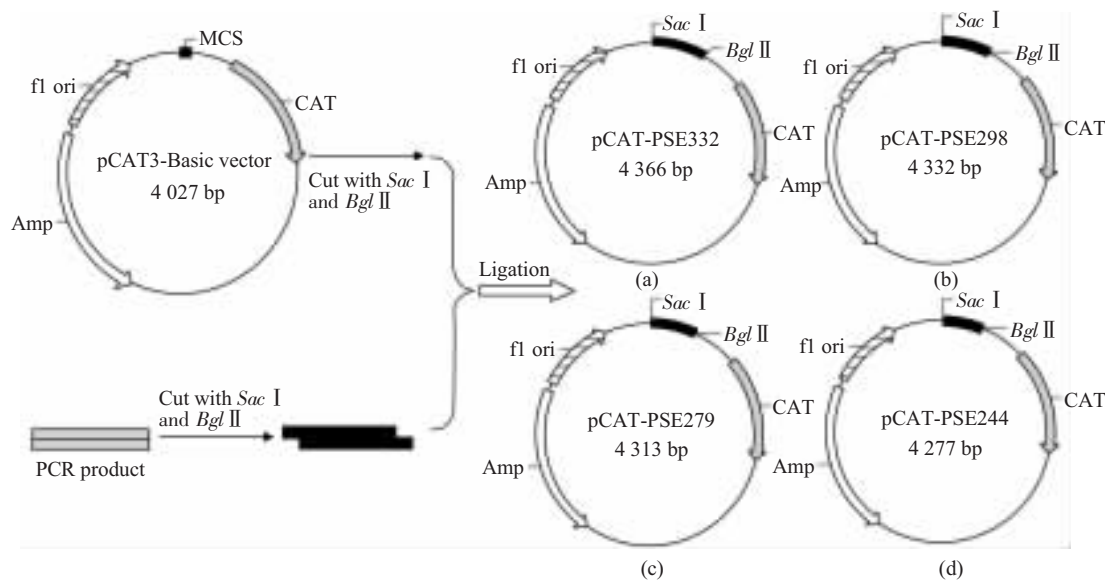


Fig. 2 Construction of pCAT-PSE332 (a) , pCAT-PSE298 (b) , pCAT-PSE279 (c) and pCAT-PSE244 (d)

2 结果与分析

2.1 目的片段的扩增及构建相应的质粒

以 HSV I 基因组为模板, 使用能扩增具有复杂二级结构模板的 LA Taq 配合 GC 缓冲液. 我们首先获得了片段大小及酶切结果与预期相符的 PSE332 片段. 以此为模板, 根据巢式 PCR 原理, 在获得余下 3 个较短片段的同时, 也进一步保证了本实验所获 HSV α 4 立即早期基因上游调控序列的正确性. PCR 获得大小与预期相符的约 380 bp 的片段(图 3b-1 号泳道), 连入相应载体, 酶切鉴定成功构建质粒 pCAT-PSE332 (图 3a).

pCAT-PSE332 为模板, 分别以 P1/P3、P1/P4、P1/P5 为引物, 扩增获得特异性的, 大小为 346 bp、327 bp 或 292 bp 的片段 (图 3b-2、3、4 号泳道), 巢式 PCR^[15]进一步证明 pCAT-PSE332 插入片段正确, 将所获 PCR 产物分别连入 CAT 表达载体, 酶切鉴定成功构建质粒 pCAT-PSE298、pCAT-PSE279、pCAT-PSE244(图 3c). 上述质粒均

由测序确证.

2.2 HSV I α 基因几种不同上游调控序列的相对活性

通过检测 CAT、 β -gal 酶活性, 其检测结果见表 1.

根据表 1 所列数据, 初步评估不同 HSV I 立即早期基因上游调控区的相对活性, 按如下公式计算:

相对活性 = $\frac{S_{\text{cpm}} - B_{\text{cpm}}}{S_{A420}} \div \frac{C_{\text{cpm}} - B_{\text{cpm}}}{C_{A420}}$

S_{cpm} 为样品之 cpm 平均值; B_{cpm} 为空白细胞之 cpm 值(3610.3); C_{cpm} 为阳性对照 pCAT-Promoter Vector 之 cpm 平均值; S_{A420} 为样品平均的 β - 半乳糖苷酶活性; C_{A420} 为阳性对照 pCAT-Promoter Vector 的平均 β - 半乳糖苷酶活性.

从转录的相对活性可以看出 PSE332>PSE298>PSE279>PSE244 (图 4). 这与上游调控序列的长度具有正相关性, 通过序列的依次递减, 从 PSE332 缩短到 PSE244, 转录效率下降了约 50%.

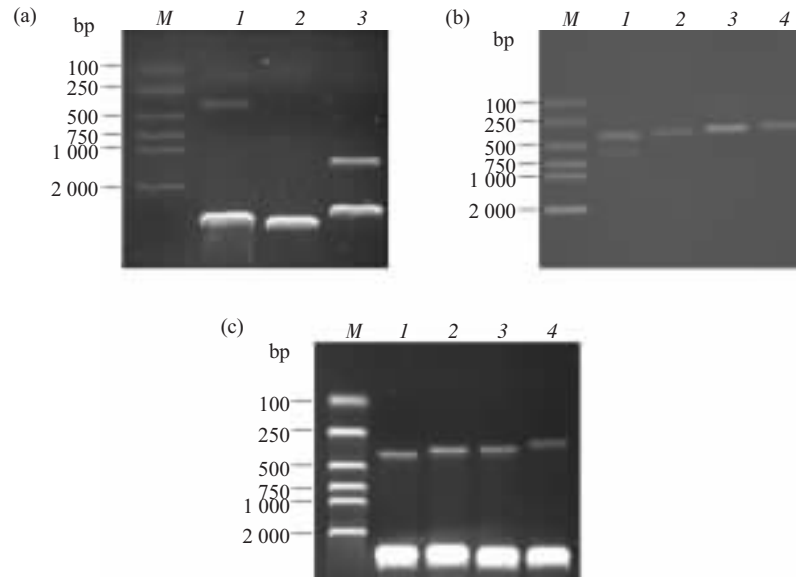


Fig. 3 Identification of pCAT-PSE series plasmid constructed with pCAT3-basic and different length segment amplified by PCR

(a) Restriction enzyme analysis of pCAT-PSE332. *M*: DL2000; *1*: Digested with *Sac* I + *Bgl* II; *2*: Digested with *Eco*R I; *3*: Digested with *Bam*H I. (b) The product by PCR amplification. *M*: DL2000; *1*: PSE332(380 bp); *2*: PSE298(346 bp); *3*: PSE279(327 bp); *4*: PSE244(292 bp). (c) Restriction enzyme analysis of recombinant. *M*: DL2000; *1*: pCAT-PSE332 digested with *Sac* I / *Bgl* II; *2*: pCAT-PSE298 digested with *Sac* I / *Bgl* II; *3*: pCAT-PSE279 digested with *Sac* I / *Bgl* II; *4*: pCAT-PSE244 digested with *Sac* I / *Bgl* II.

Table 1 Relative activity assay of HSVI α 4 gene upstream regulative region

Plasmid	CAT activity (cpm value) ¹⁾	β -gal activity (A_{420}) ¹⁾
pCAT3-Promoter	12 643.75 $\pm$ 543.68	0.472 57 $\pm$ 0.019 85
pCAT-PSE332	12 0514.5 $\pm$ 4 700.07	0.505 18 $\pm$ 0.021 22
pCAT-PSE298	67 664.52 $\pm$ 3 112.57	0.402 50 $\pm$ 0.020 53
pCAT-PSE279	71 325.56 $\pm$ 2 924.35	0.492 32 $\pm$ 0.021 17
pCAT-PSE244	58 831.58 $\pm$ 2 000.27	0.463 66 $\pm$ 0.016 69

¹⁾ The value represents a mean of three samples detection.

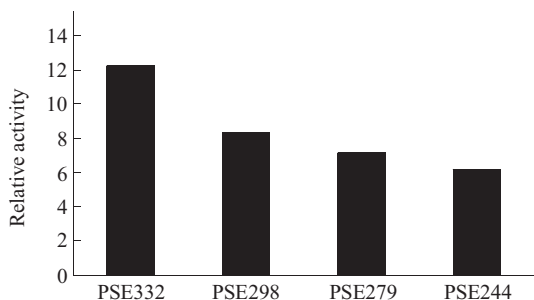


Fig. 4 Comparison of transcriptional efficiency of different segments in α 4 upstream regulative region

3 讨 论

HSV由于其复杂的基因结构和严格有序的蛋白质表达方式, 因而成为阐明基因表达调控机理的有效模型^[16]. 以往的实验通过在不同时段使用相应抑制转录或蛋白质翻译的试剂, 已经证明, α 蛋白的表达决定了 β 基因的转录, 而 γ 基因的转录需要 β 蛋白的表达^[7]. 长期以来, 病毒间质蛋白 VP16 的反式激活作用也被认为是诱导 α 基因表达的主要原因. 但是, 实验结果显示: 虽然 VP16 能够提高 α 基因的转录水平, 但对于 α 基因的转录却并非绝对必需的^[17], 从本实验结果也可以看出, 即使在没有 VP16 存在的情况下, α 基因上游序列也具有很强的转录效率.

通过序列递减所导致的转录分析, 本实验结果明确提示了 α 基因上游转录调控序列包含有多种反式调控元件, 经过序列比对以及参考其他文献^[18~21] 可知, 这些调控元件至少包括 VP16 结合元件、与 SV40 增强子核心区域相似的富含 GA 区和 GC 盒等, 在此基础上可以认为, 如果要达到该基因的最大激活程度, 需要增加相关的 DNA 元

件, 同时这些结果也表明, HSV 的 α 基因上各种调控元件的激活作用可以叠加 (图 5), 当然, 这种叠加并非各调控元件的激活作用简单相加, 而可能是一种几何倍数的增加效应. 而正是这些元件的共同作用决定了 α 基因的基本转录水平, 明确这一点, 将能够更容易地理解 HSV 感染过程中的一些特殊生理和病理现象.

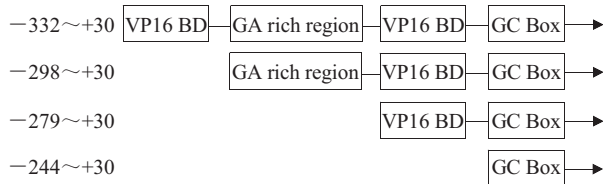


Fig. 5 Designed regulative elements contained in different segments

由于各顺式作用元件功能所表现的叠加效应, 我们可以认为, HSV 线状双链 DNA 基因进入细胞核后迅速环化的过程, 实际上是病毒增加 α 基因转录效率的一种策略, 而环化过程中位于基因组末端 TR 的连接将使得转录元件更为集中, 从而大大提高位于 TR 附近 α 基因的转录效率, 而当 α 基因转录结束后, 病毒基因组复制所产生的子代病毒 DNA 仍以线状形式存在, 由于采用了多元件叠加增强转录效率的策略, 就使得对基因组利用如此“节约”的病毒, 存在大片段的重复序列. 另外, 相对于 VP16 对 α 基因的诱导作用, 多元件增强 α 基因表达的模型, 提示病毒的复制过程可能在很大程度上决定于细胞的代谢状况, 而并不完全取决于 VP16 在不同细胞中的不同功能. 这一认识从一定程度上解释了为什么 HSV 在代谢旺盛的上皮细胞中表现为扩增性感染, 而在代谢极其缓慢的神经细胞中则出现潜伏性感染. 当然, 这一推论的证实仍需要更多的实验资料.

参 考 文 献

- Kaplan A S. The Herpesviruses. New York: Academic Press, 1973. 1~25
- Rock D L, Fraser N W. Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature*, 1983, **302** (5908): 523~525
- Wadsworth S, Jacob R J, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol*, 1975, **15** (6): 1487~1497
- Poffenberger K L, Roizman B. Studies on non-inverting genome of a viable herpes simplex virus 1: Presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol*, 1985, **53** (2): 589~59
- Weir J P. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene*, 2001, **271** (2): 117~130
- 寸 韡, 李琦涵. HSV I 立刻早期基因研究进展. 国外医学病毒学分册, 2003, **10** (5): 129~132
- Cun W, Li Q H. *F Med Sci Sec Virol*, 2003, **10** (5): 129~132
- Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, *et al.* *Fields Virology*. 4th. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2001. 2399~2460
- 徐耀先, 周晓峰, 刘立德. 分子病毒学. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2000. 368~369
- Xu Y X, Zhou X F, Liu L D. *Molecular Virology*. Hubei: Hubei Science Technology Press, 2000. 368~369
- Gelman I H, Silverstein S. Dissection of immediate-early gene promoters from herpes simplex virus: sequences that respond to the virus transcriptional activators. *J Virol*, 1987, **61** (10): 3167~3172
- Schenborn E, Groskreutz D. Reporter gene vectors and assays. *Mol Biotechnol*, 1999, **13** (1): 29~44
- Seed B, Sheen J Y. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene*, 1988, **67** (2): 271~277
- 严银芳, 夏洪铃, 徐 华, 等. 喷昔洛韦对单纯疱疹病毒 I 型和 II 型的抑制作用. *中国皮肤性病学杂志*, 2004, **18** (2): 80~82
- Yan Y F, Xia H L, Xu H, *et al.* *Chin J Derm Venereol*, 2004, **18** (2): 80~82
- Schenborn E, Titus D. Detection of eukaryotic transcriptional regulatory sequences with the CAT reporter gene assay. *Promega Notes*, 1989, **21**: 1~4
- Mockli N, Auerbach D. Quantitative beta-galactosidase assay suitable for high-throughput applications in the yeast two-hybrid system. *Biotechniques*, 2004, **36** (5): 872~876
- Hu S, Chung W H, Hung S I, *et al.* Detection of sporothrix schenckii in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol*, 2003, **41** (4): 1414~1418
- Honess R W, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975, **72** (4): 1276~1280
- Spector D, Purves F, Roizman B. Role of alpha-transinducing factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes. *J Virol*, 1991, **65** (7): 3504~3513
- Gaffney D F, McLauchlan J, Whitton J L, *et al.* A modular system for the assay of transcription regulatory signals: the sequence TAATGARAT is required for herpes simplex virus immediate early gene activation. *Nucleic Acids Res*, 1985, **13** (21): 7847~7863
- Lang J C, Spandidos D A, Wilkie N M. Transcriptional regulation of a herpes simplex virus immediate early gene is mediated through an enhancer-type sequence. *EMBO J*, 1984, **3** (2): 389~395
- Jones K A, Tjian R. Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription *in vitro*. *Nature*, 1985, **317** (6033): 179~182
- Preston C M, Cordingley M G, Stow N D. Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a herpes simplex virus immediate early gene. *J Virol*, 1984, **50** (3): 708~716

Analysis of Herpes Simplex Virus Type I Immediate Early Gene Upstream Regulative Region*

CUN Wei, ZHANG Ying, LIU Long-Ding, WANG Li-Chun, DONG Cheng-Hong, LI Qi-Han**

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

Abstract In the cells infected by HSV, various viral proteins are expressed in a cascade style. The expression of immediate-early (IE) gene occurred in early phase of infection is under the control of regulatory elements in upstream sequence of promoter. A series of pCAT expression vectors containing different upstream sequence fragment of $\alpha 4$ - gene, in which relative element is deleted orderly, is constructed and detected in CAT assay. The transcriptional ability of these DNA fragments on $\alpha 4$ - gene are evaluated to investigate their efficacy in early phase infection. The data collected indicated that the expression of IE gene in cells is controlled by various elements in its upstream. Topological distribution of these elements provides probably useful information for further understanding about the mechanism of virus replication.

Key words herpes simplex virus(HSV), immediate early gene, transcript, regulation

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30370065).

**Corresponding author . Tel: 86-871-8335905, Fax: 86-871-8334483, E-mail: qihanli@public.km.yn.cn

Received: June 2, 2005 Accepted: August 30, 2005