

# 噬菌体展示 HIV-1 Tat38-61 碱性区 51 和 55 位随机突变体文库的构建

葛宜兵<sup>1</sup>, 杨旭芳<sup>2</sup>, 杜哲明<sup>3</sup>, 庞强<sup>2</sup>, 曹洁<sup>2</sup>, 陈秋莉<sup>2</sup>, 王锦红<sup>2</sup>, 张华群<sup>2</sup>, 廖文婷<sup>2</sup>, 祁培培<sup>2</sup>, 刘超<sup>2</sup>, 章萍萍<sup>1</sup>, 邓松华<sup>1</sup>, 潘卫<sup>2</sup>

1 安徽医科大学 病理生理学教研室, 合肥 230032

2 中国人民解放军第二军医大学 微生物学教研室, 上海 200433

3 武警江西总队医院外一科, 南昌 330000

**摘要:** 为了构建噬菌体展示 Tat38-61(51N/55N) 碱性区突变体文库, 进一步研究 HIV-1 Tat38-61 表位的分子进化筛选, 采用含随机核苷酸序列的引物, 通过 Overlap PCR 的方法获得 51 和 55 位氨基酸随机突变的全长 Tat 编码序列, 再以此为模板 PCR 扩增出两端含有 *Xba* I 识别序列的 Tat38-61 突变体片段 HIV-1 Tat38-61(51N/55N), 克隆至噬菌体展示载体 pCANTAB5S 上, 转化大肠杆菌 TG1, 经 M13K07 辅助噬菌体拯救, 构建噬菌体展示 Tat38-61(51N/55N) 碱性区突变体文库。结果显示文库的库容量为  $5.0 \times 10^6$ , 滴度为  $2.65 \times 10^{12}$  TU/mL, 阳性克隆率为 56.50%; 序列分析显示文库中 51、55 位核苷酸与氨基酸均呈随机性分布, 达到了对文库进行分子进化筛选的要求, 为获得可用作疫苗候选物的新型 Tat 突变体奠定基础。

**关键词:** HIV-1 Tat, 碱性区, 随机突变, 噬菌体展示

## Constructing a phage-displayed random mutation library of HIV-1 Tat38-61 at the sites of 51 and 55 amino acids in basic region

Yibing Ge<sup>1</sup>, Xufang Yang<sup>2</sup>, Zheming Du<sup>3</sup>, Qiang Pang<sup>2</sup>, Jie Cao<sup>2</sup>, Qiuli Chen<sup>2</sup>, Jinhong Wang<sup>2</sup>, Huaqun Zhang<sup>2</sup>, Wenting Liao<sup>2</sup>, Peipei Qi<sup>2</sup>, Chao Liu<sup>2</sup>, Pingping Zhang<sup>1</sup>, Songhua Deng<sup>1</sup>, and Wei Pan<sup>2</sup>

1 Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

**Received:** December 22, 2010; **Accepted:** April 14, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 30872246, 30872405, 30972632, 30972799), Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 090413136), Basic Research and Development Program of Shanghai (No. 08Jc1405200).

**Corresponding author:** Songhua Deng. Tel: +86-551-5160061; E-mail: desoh@126.com

Wei Pan. Tel: +86-21-81870989; E-mail: pwpanwei@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30872246, 30872405, 30972632, 30972799), 安徽省自然科学基金 (No. 090413136) 资助, 上海市基础研究重点项目 (No. 08Jc1405200) 资助。

2 Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3 Department of Number 1 General Surgery, Jiangxi Hospital of Armed Police Forces, Nanchang 330000, China

**Abstract:** We constructed a phage-displayed random mutation library of Tat38-61(51N/55N), for studying the molecular evolution screening of HIV-1 Tat38-61 epitope. We used primers containing the random nucleotide sequences, and introduced the random mutations at the sites of 51 and 55 amino acids coding sequences into full-length Tat sequences by overlapping PCR. With the randomly mutated full-length Tat as template, the Tat38-61(51N/55N) mutants which contained recognition sequences for the *Xba* I in both ends were amplified by PCR using the designed primers. The mutants were cloned into *Xba* I site in the phagemid vector pCANTAB5S, then the recombinants were transformed into *E. coli* TG1, a phage-displayed the random mutation library of Tat38-61(51N/55N) was constructed by the rescue of help virus M13KO7. The results showed that the library consisted of about  $5.0 \times 10^6$  colonies and the phage library titer was  $2.65 \times 10^{12}$  TU/mL. More than 56.50% colonies in the library were positive for insertion. Sequence analysis showed that the nucleotides encoding amino acids at the sites of 51 and 55 distributed randomly. The constructed mutation library could meet the requirements for the following molecular evolution screening, and might prepare the Tat mutants for the further study of new Tat vaccine candidates.

**Keywords:** HIV-1 Tat, basic region, random mutation, phage display

目前, 艾滋病 (Human immunodeficiency virus, HIV) 已经成为我国乃至全球所面临的重大公共卫生问题, 研制有效的 HIV 疫苗是 HIV 防治的重要手段之一。人免疫缺陷病毒 I 型 (Human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 的反式激活蛋白 Tat (Trans-activator of transcription) 是 HIV 复制早期产生的一种重要调控蛋白, 在 HIV-1 的复制、扩散和致病中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。Tat 还可被感染细胞通过多种方式分泌到胞外发挥“病毒毒素”的作用: 通过诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞和 B 细胞的凋亡, 发挥其免疫抑制的作用<sup>[4-6]</sup>。HIV-1 Tat 分子含有 N 端区 (1~21aa)、半胱氨酸富集区 (22~37aa)、核心区 (38~48aa)、碱性氨基酸富集区 (49~59aa)、谷氨酰胺富集区 (60~72aa) 以及 C 端区 (73~101aa) 6 个功能区<sup>[7]</sup>。

碱性氨基酸富集区 (49~59aa) 与 HIV RNA 的转录激活反应单元 (Transactivation response element, TAR) 结合, 促进病毒基因组的转录, 激活病毒复制<sup>[8]</sup>。该区域含有核定位序列 (Nuclear localization signal, NLS), 具有核转位功能, 此外, 该区具有穿膜功能, 是 Tat 进入旁观者细胞和穿越血脑屏障的结构基础<sup>[9-10]</sup>, 在卡波氏肉瘤<sup>[11]</sup>和艾滋病脑病<sup>[12]</sup>的发生中起重要作用。该序列在各亚型间

高度保守, 是序列中最保守的区域, 同时碱性区还是 Tat 的主要中和表位之一, 其抗体可完全消除 Tat 分子所特有的穿入其他细胞内发挥毒性作用的核心功能<sup>[13]</sup>。目前, 重组表达的具有生物学活性的全长 Tat 蛋白作为治疗性疫苗已进入临床 II 期<sup>[14-15]</sup>。鉴于 Tat 分子的毒性作用, 消除 Tat 生物学活性并保留其免疫原性是新型 Tat 疫苗研发的重要方向。通过对碱性区进行突变消除其生物学活性是很好的选择, 有研究表明将 Tat 全长 27、51、55、79 位分别定点突变为丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、亮氨酸 (L) 和丙氨酸 (A) 后, 其生物学活性被大大减弱且免疫原性未受影响, 但 51、55 位的单独突变体生物学活性减弱不明显<sup>[16]</sup>。Tat 51、55 位位于碱性区表位内, 并且其序列高度保守, 几乎不发生变异, 如此保守的位点发生变异到底能否影响及如何影响其生物学活性及免疫原性尚未有系统的研究, 为了回答这一问题, 本研究对 Tat(38-61) 51、55 位分别进行随机突变, 构建噬菌体展示 HIV-1 Tat38-61(51N/55N) 碱性区突变体库, 为应用分子进化的方法系统研究 51、55 位突变对抗原性的影响, 并以此作为获得可用作疫苗候选物的新型 Tat 突变体奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

经大肠杆菌偏爱密码子优化的编码天然 HIV-1 HXB2 株 Tat 蛋白的重组质粒 pET32a-Tat(1-101)、大肠杆菌 *E. coli* TG1、质粒 pCANTAB5S、辅助噬菌体 M13K07 均由第二军医大学微生物教研室构建保存<sup>[17]</sup>。

#### 1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Xba* I 购自华美生物公司; 高效连接液购自 TOYOBO 公司; 碱性磷酸酶 (CIP)、DNA marker 购自宝生物工程 (上海) 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN BIOTECH (北京) 公司; 质粒抽提试剂盒及 DNA *Taq* 酶购自上海申能博彩生物公司。

#### 1.1.3 引物序列

用于扩增制备 K51 位、R55 位随机突变片段的引物共 6 条, 见表 1。用于噬菌粒展示载体 pCANTAB5S 中克隆片段的 PCR 扩增及测序引物为: pCANTAB5S-1; 5'-CAACGTGAAAAATTATTATTCGC-3' (上游引物); pCANTAB5S-6; 5'-GTAAATGAATTTTCTGTATGAGC-3' (下游引物)。以上引物均委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 K51 位、R55 位随机突变片段的扩增制备、酶切及纯化

以 pET32a-Tat 质粒为模板, 以 Up-1、51D 为引

物, 扩增 51 位和 55 位随机突变的 Tat1-61(51N/55N), PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以 pET32a-Tat 质粒为模板, 以 56U、Down-1 为引物, 扩增 Tat56-101, PCR 反应条件同上。再以 Tat1-61(51N/55N)、Tat56-101 片段的 PCR 混合产物为模板, 以 Up-1、Down-1 为引物, Overlap PCR 扩增 51 位和 55 位随机突变的 Tat1-101(51N/55N), PCR 反应条件同上。最后以 Tat1-101(51N/55N) 片段的 PCR 产物为模板, 以 38U、61D 为引物, 扩增 51 位和 55 位随机突变的 Tat38-61(51N/55N), PCR 反应条件同上。取 Tat38-61(51N/55N) PCR 产物, 用 *Xba* I 酶切, 酶切产物经 2% 琼脂糖电泳, 胶回收纯化。

#### 1.2.2 噬菌粒 pCANTAB5S 的制备、酶切及去磷酸化处理

取 pCANTAB5S TG1 菌种接种于 3 mL 2×YT (Amp) 培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡培养过夜。提取质粒后用 *Xba* I 酶切, 回收酶切后的 pCANTAB5S 载体, 用 2% 琼脂糖电泳定量。将回收后的酶切载体 pCANTAB5S 用 CIP 去磷酸化, 回收经过去磷酸化处理的 pCANTAB5S 载体, 用 2% 琼脂糖电泳定量。

#### 1.2.3 Tat38-61(51N/55N) 突变体重组噬菌体展示原代文库的构建

取 20 μL (4 μg) Tat38-61(51N/55N) 酶切片段与 10 μL (2 μg) 经去磷酸化处理的 pCANTAB5S 混匀, 加入 15 μL 高效连接液按说明书进行连接反应。连

表 1 Tat38-61(51N/55N) 随机突变引物

Table 1 Tat38-61(51N/55N) primers for random mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Up-1	AGAGGATCC*ATGGAACCGCTGACCCG	26
Down-1	CCCTCGAGTAAGCTT*CTAGTCAACCGGGTCGGTTT	35
51D	GTTCTGGTGAGCACGACG <u>SNN</u> **CTGACGACG <u>SNN</u> **TTTACGACCGTAA	46
56U	CGTCGTCGTCACCAGAAC	18
38U	TGCTGCTTCCACTGCCAGTCTAGATTCATCACCAAAGCTCT	41
61D	AGAAGCCGGCTGTTTAGATCTAGAGTTCTGGTGAGCACGA	40

Note: \* clone sites; \*\* the mutation sites were underlined (N=A/T/C/G, S=G/C); *Xba* I restriction sites were in italic.

接产物转化 *E. coli* TG1 感受态细胞, 加入 500  $\mu\text{L}$   $1.3 \times 10^{12}$  TU/mL 的 M13K07 辅助噬菌体拯救, 制备原代 Tat38-61(51N/55N) 突变体随机组合噬菌体展示文库。另取 10  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$ 、0.1  $\mu\text{L}$  菌液涂 LB (含 Amp 100 ng/mL) 平皿计转化数测定库容。整个噬菌体展示文库的构建流程见图 1。

#### 1.2.4 噬菌体文库滴度测定及无菌试验

取 1  $\mu\text{L}$  噬菌体文库作 10 倍系列稀释, 各取 10  $\mu\text{L}$  噬菌体文库感染对数生长期的 *E. coli* TG1 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养 1 h 后, 涂布 LB (含 100 ng/mL Amp) 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。计数不同稀释度的平皿上生长的菌落数, 菌落数乘以稀释度再乘以 100 即为每毫升噬菌体的转化单位数 (Transformation unit, TU), 即滴度。

无菌试验: 取 10  $\mu\text{L}$  噬菌体滤液涂布 LB 平板, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 观察有无菌落生长。

#### 1.2.5 Tat38-61(51N/55N) 突变体库的 PCR 鉴定及序列分析

分别从转化平皿上挑 23 个单克隆加入 SOB (Amp) 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养 5 h 后, 以菌液为模板, pCANTAB5S-1、pCANTAB5S-6 为上下游引物进行 PCR 扩增, PCR 反应条件同上。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 通过电泳图与阳性对照及 DL2000 DNA marker 比较判断文库中单克隆插入片段的大小和分布情况。

挑取 PCR 鉴定插入阳性单克隆 33 个, 委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测定, 测序引物为 pCANTAB5S 克隆位点 PCR 鉴定引物 pCANTAB5S-1 和 pCANTAB5S-6, 测序结果用 DNASTAR 软件分析, 根据测序结果分析 Tat38-61 中 51、55 位氨基酸突变的随机性。

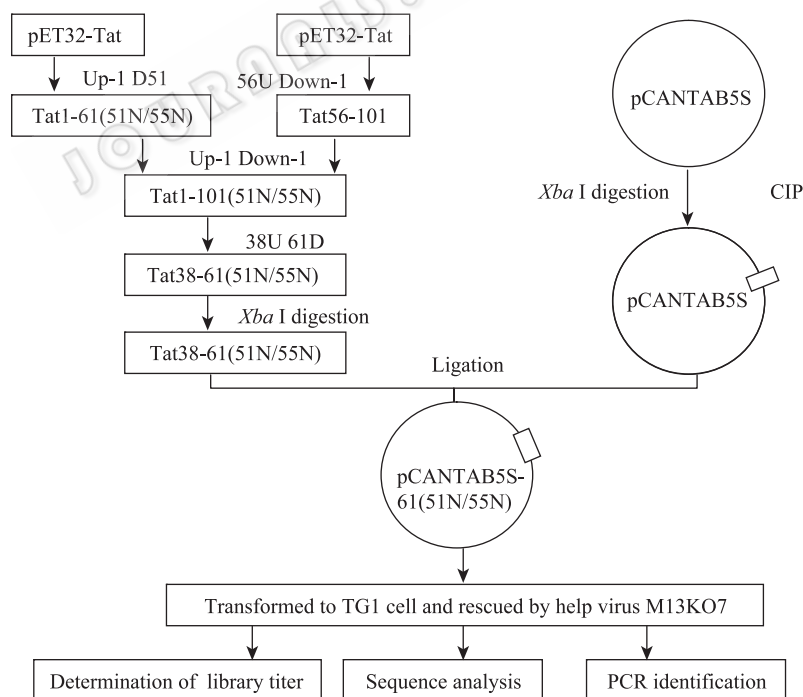


图 1 Tat38-61(51N/55N) 随机突变文库的构建

Fig. 1 Construction of Tat38-61(51N/55N) random mutation library.

## 2 结果

### 2.1 随机突变体片段的扩增、制备与酶切

以 pET32a-Tat 质粒为模板, 分别以 Up-1、51D 及 56U、Down-1 为引物, 扩增 Tat1-61(51N/55N) 及 Tat56-101, 大小分别为 183 bp 和 138 bp, 与理论值相符; 再以 Tat1-61(51N/55N)、Tat56-101 片段的 PCR 混合产物为模板, 以 Up-1、Down-1 为引物, Overlap PCR 扩增 Tat1-101(51N/55N), 大小为 303 bp, 与理论值相符; 最后以 Tat1-101(51N/55N) 片段的 PCR 产物为模板, 以 38U、61D 为引物, 扩增 Tat38-61(51N/55N), 大小为 138 bp, 与理论值相符。Tat38-61(51N/55N) 片段回收后经 *Xba* I 酶切, 得到酶切后大小为 96 bp 的 Tat38-61(51N/55N) 片段 (图 2)。

### 2.2 噬菌粒 pCANTAB5S 的酶切及去磷酸化处理

噬菌粒 pCANTAB5S 经 *Xba* I 酶切, 试剂盒回收纯化, 大小为 4 555 bp, 与理论值相符, 与未酶切前的构象区别明显。经 CIP 处理后的噬菌粒 pCANTAB5S 与酶切构象保持一致 (图 3)。

### 2.3 噬菌体展示 Tat38-61(51N/55N) 随机突变文库的构建

*Xba* I 酶切后的 Tat38-61(51N/55N) 片段与经 CIP 处理的噬菌粒 pCANTAB5S 连接, 连接产物转化 *E. coli* TG1, 辅助噬菌体 M13K07 拯救, 得到 Tat38-61(51N/55N) 随机组合噬菌体展示文库。该库的库容量即转化数为  $5.0 \times 10^6$  CFU, 滴度为  $2.65 \times 10^{12}$  TU/mL, 无菌试验为 0。

### 2.4 噬菌体展示 Tat38-61(51N/55N) 随机组合文库插入片段的检测情况

PCR 检测组合文库的插入片段情况见图 4, 可见不同插入片段在文库中的分布比例如下: 在 23 个单克隆中, 插入 0 个 Domain 的即 5S 载体自连为 10 个, 百分比为 46.5%; 1 个 Domain 的为 11 个, 占 47.8%; 2 个 Domain 及以上的为 2 个, 占 8.7%; 阳性克隆比例总计达 56.5%。

### 2.5 随机点突变组合文库重组子测序结果

对 33 个 Tat38-61(51N/55N) 随机点突变组合文库重组子质粒进行序列测定, 证实插入的序列为 Tat38-61(51N/55N) 突变体基因, 被突变的氨基酸位

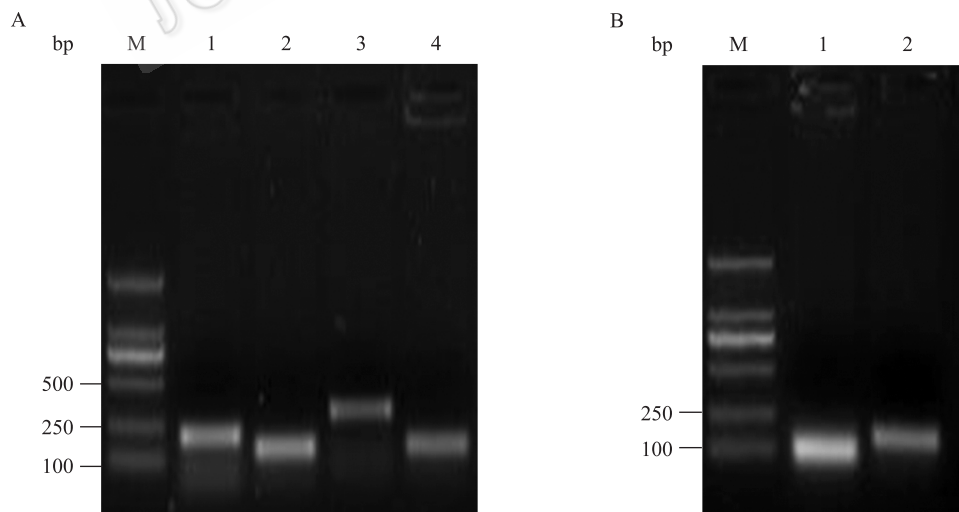


图 2 Tat38-61(51N/55N) 突变体片段的 PCR 扩增 (A) 及酶切鉴定 (B)

Fig. 2 PCR amplification of fragment Tat38-61(51N/55N) (A) and restriction digestion analysis (B). (A) M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of Tat1-61(51N/55N); 2: PCR product of Tat56-101; 3: PCR product of Tat1-101(51N/55N) (303 bp); 4: PCR product of Tat 38-61(51N/55N). (B) M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of Tat38-61(51N/55N) digested with *Xba* I; 2: PCR product of Tat38-61(51N/55N) without digestion.

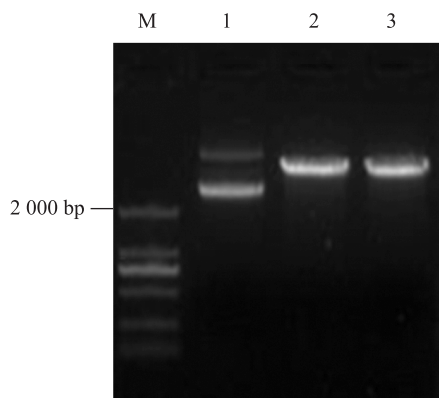


图3 噬菌粒 pCANTAB5S 酶切和去磷酸化鉴定

Fig. 3 Digestion and dephosphorylation identification of pCANTAB5S. M: DL2000 DNA marker; 1: phagemid pCANTAB5S; 2: pCANTAB5S digested with *Xba* I; 3: pCANTAB5S treated by CIP.

点分别是 K51 和 R55, 且核苷酸序列均不相同, 突变频率的比较结果见表 2。单点核苷酸的突变频率范围为理论值的 12%~157% (实际出现次数与理论出现次数之比); 各点平均后的核苷酸的突变频率范围为理论值的 64%~172%。所对应的各氨基酸平均三点随机突变频率范围为理论值的 24%~283%, 见表 3。51N-55N 核苷酸序列与氨基酸序列均呈随机排列组合, 无偏向性, 插入片段正反向均有 (24 个正向, 9 个反向), 各种氨基酸及终止密码子编码在序列中分布均匀, 表明本试验所构建的噬菌体 Tat38-61(51N/55N) 组合文库以随机方式组合。

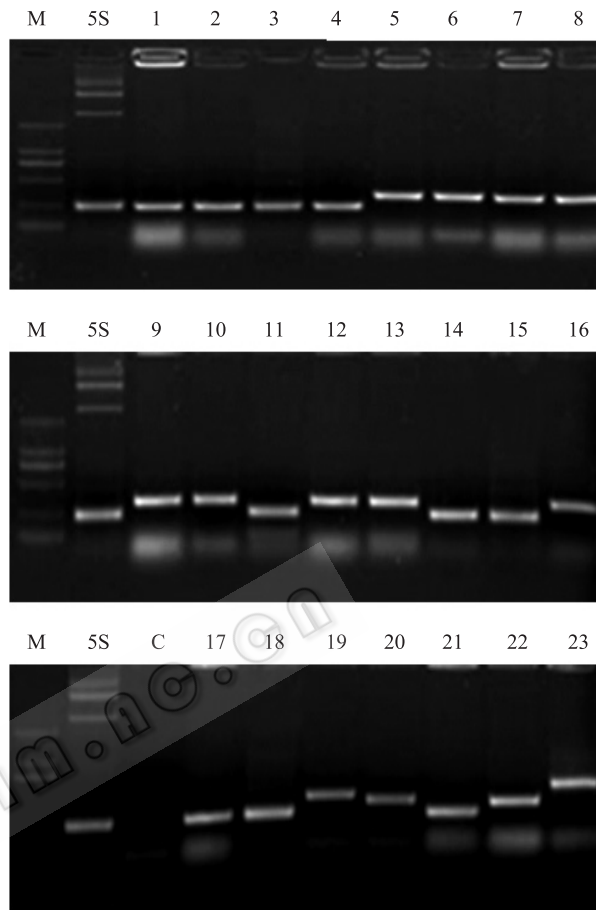


图4 PCR 检测文库中不同大小插入片段克隆的分布

Fig. 4 Distribution of colonies of inserted fragments with different size in combinatorial library detected by PCR. M: DL2000 DNA marker; 1-23: the number of 23 single colonies; 5S: the phagemid pCANTAB5S for positive control; C: the negative control.

表2 HIV-1 Tat38-61(51N/55N) 随机突变组合文库核苷酸突变频率

Table 2 Nucleotide mutation frequencies of the HIV-1 Tat38-61(51N/55N) combined site-directed random mutation library

Nucleotide	51			55			Average
	N	N	S	N	N	S	
A	12.00*/8.25**	8.00/8.25	0.00/0.00	13.00/8.25	11.00/8.25	0.00/0.00	7.50/8.25
T	7.00/8.25	11.00/8.25	0.00/0.00	6.00/8.25	8.00/8.25	0.00/0.00	5.30/8.25
C	11.00/8.25	9.00/8.25	25.00/16.50	5.00/8.25	13.00/8.25	23.00/16.50	14.20/8.25
G	3.00/8.25	5.00/8.25	8.00/16.50	9.00/8.25	1.00/8.25	10.00/16.50	6.00/8.25

Note: \* measured value; \*\* theoretical value.

表 3 HIV-1 Tat38-61(51N/55N) 随机突变组合文库氨基酸突变频率

Table 3 Amino acid mutation frequencies of the HIV-1 Tat38-61(51N/55N) combined site-directed

Amino acid	51	55	Average	Theory
Ala	1.00	2.00	1.50	2.05
Asp	2.00	2.00	2.00	1.06
Phe	1.00	1.00	1.00	1.06
His	3.00	0.00	1.50	1.06
Ile	4.00	2.00	3.00	1.06
Lys	0.00	4.00	2.00	1.06
Leu	5.00	4.00	4.50	3.10
Met	1.00	0.00	0.50	1.06
Asn	2.00	3.00	2.50	1.06
Pro	2.00	6.00	4.00	2.05
Gln	0.00	0.00	0.00	1.06
Arg	2.00	0.00	1.00	3.10
Ser	7.00	3.00	5.00	3.10
Thr	2.00	3.00	2.50	2.05
Val	0.00	1.00	0.50	2.05
Trp	0.00	0.00	0.00	1.06
Tyr	1.00	0.00	0.50	1.06
Ter	0.00	2.00	1.00	1.06
Total	33.00	33.00	33.00	33.00

### 3 讨论

HIV 感染所引起的艾滋病是全球重大公共卫生问题之一, 目前缺乏有效的疫苗用于预防。虽然 HAART 疗法能有效治疗艾滋病, 但终身服药及抗药性的产生限制了 HAART 疗法的疗效, 因此, 治疗性疫苗作为艾滋病防治的新方法正愈来愈受到重视。HIV Tat 作为一种病毒毒素, 在艾滋病致病中发挥重要作用, 临床研究发现, HIV 感染者中 Tat 抗体的水平与 AIDS 的发病呈明显负相关, Tat 抗体滴度高的感染者发病缓慢或长期不发病<sup>[18]</sup>。Tat 蛋白可以诱导中和抗体, 阻断病毒复制和 T 细胞凋亡<sup>[19]</sup>, 动物试验表明, Tat 疫苗引发了较强的抗体反应和 T 细胞反应, 虽不能完全保护原发感染, 但能明显地降低病毒血症, 并具有长期的病毒感染抑制作用, 显示出 Tat 疫苗的应用价值<sup>[20]</sup>。因此, 以 Tat 为靶分

子的治疗性疫苗研发显得尤为重要。

本研究拟用分子进化技术这一新途径寻找新型 Tat 免疫原。通过对天然 Tat 碱性区进行重组改造, 使之成为制备新免疫原的候选物, 应用噬菌体展示技术, 构建由该区段 51 和 55 位氨基酸随机突变体相互随机连接的重复串联体的噬菌体展示文库, 用含有高中和活性的抗-Tat 兔血清进行进化筛选, 以期获得免疫原性更强、穿膜活性更低的突变体。研究表明, 用重组表达的具有活性的 Tat 分子能产生很好的免疫效果。

HIV Tat 分子内包含很多抗原表位, 其中主要为构象表位, 如果用抗-Tat 抗体对噬菌体展示全长 HIV Tat 突变体库进行进化筛选会因为抗原抗体的相互作用过于复杂而得不到明确的结论, 因此, 我们选择了 HIV Tat 分子内重要的功能区段碱性区进行展示。Tat 分子具有天然非折叠蛋白的特征, 属于无规卷曲类型的分子, 并且其构象处于快速动态的变化之中<sup>[21]</sup>, 分子缺乏明确的高级结构, 其抗原性受高级结构的影响很大, 在 Tat 碱性区内含有明确的线性抗原表位, 但侧翼序列对其有很大的影响, 因此, 明确 Tat38-61 的抗原性是分子进化筛选必要的前提。为此, 我们构建了 pET32a-Tat(38-61) 融合蛋白, 采用本实验室独立制备的兔抗 PEPTIDE-Tat(1-101) 血清以及上海市公共卫生中心提供的 HIV 阳性血清进行 ELISA 检测, 结果表明 Tat38-61 与兔抗 Tat 血清及抗 HIV Tat 阳性感染者血清特异反应, 证明 Tat38-61 较好地保留了其抗原性 (数据未显示)。

由于 Tat38-61 编码序列较短, 通过 PCR 对其 51 和 55 位氨基酸进行随机化难度较大, 我们首先对全长 Tat1-101 的 51 和 55 位氨基酸进行随机化, 再以此为模板 PCR 扩增 Tat38-61 编码序列, 结果顺利地获得了 51 和 55 位氨基酸随机化的 Tat38-61 编码序列并成功构建了其噬菌体展示文库, 该库容量为  $5.0 \times 10^6$ , 滴度为  $2.65 \times 10^{12}$  TU/mL, 片段插入率为 56.5%。序列分析显示该文库中 51、55 位核苷酸的



分布状况与 NNS 随机化的理论预测值相近 (表 2), 所编码氨基酸的情况与随机化的理论预测值也相近 (表 3)。另外, 正向插入与反向插入序列也均出现, 符合随机分布的规律。这些结果均表明所构建的文库显示出良好的随机性, 达到了对该文库进行分子进化筛选的要求, 为后续分子进化筛选、新型 Tat 突变体的获得及疫苗候选物的构建奠定了基础。

综上所述, 我们成功构建了 HIV-1 株 Tat38-61(51N/55N) 碱性区突变文库, 并且其库容、多样性、随机性均达到文库构建要求, 本实验室已将该文库展示于丝状噬菌体表面, 且通过用不同抗体及血清对文库进行亲和筛选, 进一步研究 HIV-1 Tat38-61 表位的分子进化筛选, 以期获得理想的免疫原。

## REFERENCES

- [1] Apolloni A, Hooker CW, Mak J, et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of Tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication. *J Virol*, 2003, 77(18): 9912-9921.
- [2] Aoki Y, Tosato G. HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood*, 2004, 104(3): 810-814.
- [3] Ai Q, Wang LM, Xia W, et al. Research on HIV-1 Tat protein structure and functions. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2005, 21(S1): 133-135.  
艾菁, 王丽梅, 夏威, 等. Tat 蛋白结构与功能研究的进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(S1): 133-135.
- [4] Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, et al. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, 279(46): 48197-48204.
- [5] Zocchi MR, Rubartelli A, Morgavi P, et al. HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J Immunol*, 1998, 161(6): 2938-2943.
- [6] Lin JP, Yu YL, Wang LY. Research on HIV-1 Tat protein pathogenic effect of extracellular HIV-1 Tat protein and research on vaccine. *Foreign Med Sci: Sect Immunol*, 2005, 28(2): 76-79.  
林剑平, 于永利, 王丽颖. 细胞外 HIV-1 Tat 蛋白的致病作用及其疫苗研究进展. *国外医学: 免疫学分册*, 2005, 28(2): 76-79.
- [7] Teng JF, Pan W. Biological characteristics and pathogenic effect of HIV-1 Tat protein. *Chin J Biol*, 2009, 22(4): 406-410.  
滕竞飞, 潘卫. HIV-1 Tat 的生物学特性及其致病效应. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(4): 406-410.
- [8] Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem*, 1999, 274(41): 28837-28840.
- [9] Ensoli B, Fiorelli V, nsoli F, et al. Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials. *AIDS*, 2006, 20(18): 2245-2261.
- [10] Delom F, Fessart D, Caruso ME, et al. Tat-mediated protein delivery in living *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(3): 587-591.
- [11] Fiorelli V, Barillari G, Toschi E, et al. IFN gamma induces endothelial cells to proliferate and to invade the extracellular matrix in response to the HIV-1 Tat protein: implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J Immunol*, 1999, 162(2): 1165-1170.
- [12] Epstein LG, Gelbard HA. HIV-1-induced neuronal injury in the developing brain. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(4): 453-457.
- [13] Moreau E, Belliard G, Partidos CD, et al. Important B-cell epitopes for neutralization of human immunodeficiency virus type 1 Tat in serum samples of humans and different animal species immunized with Tat protein or peptides. *J Gen Virol*, 2004, 85(S10): 2893-2901.
- [14] Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP. A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine*, 2006, 24(19): 4062-4081.
- [15] Longo O, Tripiciano A, Fiorelli V, et al. Phase I therapeutic trial of the HIV-1 Tat protein and long term follow-up. *Vaccine*, 2009, 27(25/26): 3306-3312.
- [16] Mayol K, Munier S, Beck A, et al. Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity. *Vaccine*, 2007, 25(32): 6047-6060.
- [17] Chen L, Deng SH, Cao J, et al. Effective expression and immunogenicity analysis of HIV-1 HXB2 subtype Tat protein deleted the cysteine-rich region in *E. coli*. *Chin J Microbiol Immunol*, 2008, 28(5): 404-410.  
陈璐, 邓松华, 曹洁, 等. 缺失半胱氨酸富集区的 HIV-1 HXB2 株 Tat 蛋白在大肠杆菌中的高效表达及免



- 疫原性分析. 中华微生物和免疫学杂志, 2008, 28(5): 404-410.
- [18] Zagury JF, Sill A, Blattner W, et al. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat Toxoid as an HIV-1 vaccine. *J Hum Virol*, 1998, 1(4): 282-292.
- [19] Belliard G, Hurtrel B, Moreau E, et al. Tat-neutralizing versus Tat-protecting antibodies in rhesus macaques vaccinated with Tat peptides. *Vaccine*, 2005, 23(11): 1399-1407.
- [20] Maggiorrella MT, Baroncelli S, Michelini Z, et al. Long-term protection against SHIV89.6P replication in HIV-1 Tat vaccinated cynomolgus monkeys. *Vaccine*, 2004, 22(25/26): 3258-3269.
- [21] Shojania S, O'Neil JD. HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 2006, 281(13): 8347-8356.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 现场细菌学

徐建国 等著译

开本: 大 16 开 营销分类: 生物 装帧: 圆脊精装

ISBN 978-7-03-030126-0 ¥ 260.00 2011 年 1 月出版

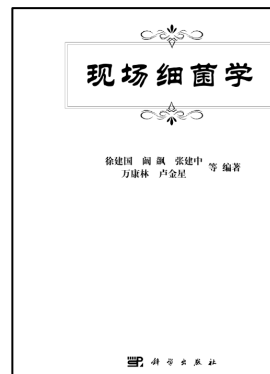
### 内容简介

本书是为了帮助解决细菌性传染病预防控制现场遇到的问题,根据专业人员的经验和体会编写的。目的是为从事细菌性传染病疫情实验室调查和研究的人员提供一本参考书和技术手册。和传统的细菌学不同,现场细菌学的章节编排不是以分类学为基础,而是以病原菌所致的传染病或感染性疾病为基础;除了病原菌的分离、鉴定和血清学诊断外,更多的是分离菌株的分析,是传染源和传播途径的调查,分子分型等。本书主要介绍方法,强调可操作性,包括样品的采集和保存、运输,试剂的选择和评价,以及每个病原菌的生物安全须知,实验活动的风险性分析和防护措施等。

**读者对象** 本书重在实用和数据共享,是我国近年来细菌性传染病实验室调查的经验和体会的总结。是从事细菌性传染病或感染性疾病调查研究的实验室工作人员,也是从事细菌性传染病预防控制工作的流行病学专家、管理专家、传染病医生、医学院校教师等必备的参考书。

**编辑推荐** 《现场细菌学》是为了帮助解决细菌性传染病预防控制现场遇到的问题,根据专业人员的经验和体会编写的。目的是为从事细菌性传染病疫情实验室调查和研究的人员提供一本参考书和技术手册。

全书重在实用和数据共享,是我国近年来细菌性传染病实验室调查的经验和体会的总结。是从事细菌性传染病或感染性疾病调查研究的实验室工作人员,也是从事细菌性传染病预防控制工作的流行病学专家、管理专家、传染病医生、医学院校教师等必备的参考书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目