

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.015

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

吕芳彪, 杨慧兰. 单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体真核表达载体的构建及表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7866-7870.

单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体真核表达载体的构建及表达*[★]

吕芳彪¹, 杨慧兰²

¹ 华南理工大学
生物科学与工程学院,
广东省广州市
510006; ² 解放军
广州军区广州总
医院皮肤科, 广东
省广州市
510010

吕芳彪[★], 男,
1988年生, 湖南
省永州市人, 华南
理工大学在读硕
士, 主要从事病毒
分子生物学的研
究。
lvfangbiao@
163.com

通讯作者: 杨慧
兰, 博士, 教授,
解放军广州军区
广州总医院皮肤
科, 广东省广州市
510010
huilany@
medmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)42-07866-05

收稿日期: 2012-02-17
修回日期: 2012-03-16
(20111117013/W·T)

文章亮点: 实验通过 PCR 成功扩增了单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体开放读码框 1 基因, 然后将其连接到带有绿色荧光蛋白基因标记的 pEGFP-C2 载体上, 构建了 pEGFP-开放读码框 1 真核表达载体, 并实现了其在 Vero 细胞中表达, 这在国内外尚属首次。

关键词: 单纯疱疹病毒II型; 潜伏相关转录体; 开放读码框 1; 真核表达载体; 转染; 体外表达

缩略语: 单纯疱疹病毒: herpessimplexvirus, HSV; 潜伏相关转录体: latency associated transcript, LAT

摘要

背景: 单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体开放读码框 1 真核表达载体的构建可以为研究单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体开放读码框 1 在病毒潜伏复发中的功能奠定基础。

目的: 构建含存单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体开放读码框 1 的真核表达载体, 并通过转染非洲绿猴肾细胞(Vero), 验证载体的体外表达情况。

方法: 根据单纯疱疹病毒II型潜伏相关转录体开放读码框 1 基因序列设计一对引物, 以单纯疱疹病毒II型 333 标准株基因组为模板 PCR 法扩增出开放读码框 1 基因, 克隆至真核表达载体上, 并进行酶切鉴定以及测序; 利用 X-fect 转染试剂盒将重组质粒 pEGFP-C2/潜伏相关转录体开放读码框 1 转染 vero 细胞, RT-PCR 检测其 mRNA 水平的表达, 并用荧光倒置显微镜观察融合蛋白的表达。

结果与结论: 开放读码框 1 基因的体外扩增目的片段为 741 bp, 所构建的真核表达载体 pEGFP-C2/潜伏相关转录体开放读码框 1 经双酶切鉴定, 与预期大小一致, 测序结果与 NCBI 收录的开放读码框 1 基因序列一致; 重组质粒 pEGFP-C2/潜伏相关转录体开放读码框 1 转染 vero 细胞后, RT-PCR 验证有目的基因的转录, 荧光显微镜观察到融合蛋白在转染的 Vero 细胞中表达。表明成功构建 pEGFP-C2/潜伏相关转录体开放读码框 1 真核表达载体, 并且实现其在非洲绿猴肾细胞(Vero)中的表达。

Construction and expression of a herpes simplex virus type II latency-associated transcript eukaryotic expression vector

Lü Fang-biao¹, Yang Hui-lan²

Abstract

BACKGROUND: The construction of herpes simplex virus (HSV-II) latency-associated transcript (LAT) open reading frame 1 (ORF1) (pEGFP-C2/LAT ORF1) eukaryotic expression vector can lay a foundation for the study of the function of HSV-2 LAT ORF1 in the virus latency and recurrence.

OBJECTIVE: To construct pEGFP-C2/LAT ORF1 eukaryotic expression vector and to verify its expression *in vitro* through the transfection of African green monkey kidney cells.

METHODS: A PCR primer was designed according to DNA sequencing of pEGFP-C2/LAT ORF1. HSV-II 333 standard plant genome was used as the template and ORF1 gene was amplified by PCR method and subcloned into the pEGFP-C2 eucaryotic experssion vector. And then enzyme digestion and DNA sequencing were used for identifying the recombinant plasmid pEGFP-ORF1. Finally, the recombinant plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 was transfected into Vero cells *in vitro* by X-fect transfection kits. Fusion green fluorescent protein expression was observed by inverted fluorescence microscope and its mRNA expression levels were detected by reverse transcription PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: *In vitro* amplified targeted DNA fragment was 741 bp in length and the size of pEGFP-C2/LAT ORF1 eucaryotic experssion vector constructed was conformed to the expectation, moreover, its sequencing results were conformed to those of ORF1 gene sequencing included by NCBI. Recombinant plasmid pEGFP-C2/LAT-ORF1 was verified by reverse transcription PCR after transfected into Vero cells, and green fluorescent protein expression in the transfected Vero cells was determined by fluorescence microscope. These results suggest that the pEGFP-C2/LAT ORF1 eucaryotic experssion Vector have successfully constructed and realized its expression in African green monkey kidney cells (Vero cells).

Lü FB, Yang HL. Construction and expression of a herpes simplex virus type II latency-associated transcript eukaryotic expression vector. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(42): 7866-7870.

¹School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; ²Department of Dermatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Lü Fang-biao★, Studying for master's degree, School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China lvfangbiao@163.com

Corresponding author: Yang Hui-lan, Doctor, Professor, Department of Dermatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30972666*

Received: 2012-02-17
Accepted: 2012-03-16

0 引言

单纯疱疹病毒分属于疱疹病毒科 α 亚科,包括单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) I型(HSV-I)和II型(HSV-II)两个血清型,两型病毒的碱基序列有70%的同源性。HSV-I感染主要引起眼角膜炎、致死性脑炎^[1]; HSV-II主要感染躯干下部皮肤及黏膜,通过破损皮肤及黏膜感染人体后,主要引起生殖器疱疹^[2]。HSV-II的感染非常普遍,全球HSV-II的携带者约10亿,且每年约有2 000万的新人感染HSV-II^[3]。初次感染后,HSV-II病毒潜伏在人的骶尾神经节中,并可伴随各种非特异性刺激而激活,导致复发感染。由于HSV-II的这种嗜神经潜伏及复发机制还未阐明,到目前为止尚无有效的药物或疫苗能彻底治愈生殖器疱疹。

潜伏相关转录体(latency associated transcript, LAT)是HSV在潜伏感染时惟一大量表达和可被检测到的基因,被认为在HSV潜伏的建立、维持和激活过程中起重要作用^[4-7]。已有研究表明,HSV-I LAT是通过其编码的蛋白发挥该作用^[7-9],但与其同源性很高的HSV-II LAT是否也是通过编码蛋白发挥此作用却鲜有报道。HSV-II LAT含有3个开放阅读框,分别为ORF1、ORF2和ORF3^[10],本实验旨在构建含有HSV-II LAT ORF1的pEGFP-C2/LAT-ORF1真核表达载体,并在Vero细胞中瞬时表达成功,以开展对HSV-II LAT ORF1作用机制的研究,为探讨HSV-II LAT ORF1在HSV-II 潜伏复发中的作用奠定基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2011年4至10月在解放军广州军区广州总医院医学实验科完成。

材料: 病毒株、菌株、细胞及质粒 HSV-II 333 标准株、*E.coli* Top10、非洲绿猴肾细胞(Vero)及质粒pEGFP-C2均为本实验室保存。

主要试剂:

试剂	来源
PfxDNA 聚合酶、PureLink Hipure Plasmid Maxiprep kit 及 TRIzol	上海 Invitrogen 公司
病毒基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒及 T ₄ DNA 连接酶	TaKaRa(大连)
胎牛血清, 及 RPMI-1640 培养基	Hyclone 公司
<i>Eco</i> RI、 <i>Kpn</i> I	NEB 公司
胰酶 Gibco, 转染试剂盒 Xfect	Clontech

方法:

引物的设计与合成: 根据 GenBank 上的 HSV-II 333 株 LAT ORF1 序列,用 Primer Premier5.0设计PCR引物并添加酶切位点和保护碱基。

上游引物P1: 5'-TAG CGAATT CAT GCC TCG GGT CTC CTC TTC CTG-3'下划线为 *Eco*RI酶切位点; 下游引物P2: 5'-TCA TGG TAC CTT TGT TAT TGA CTT TCT TAC CTT G-3'下划线为 *Kpn*I酶切位点。内参 β -actin上游引物P3: 5'-CGT ACC ACT GGC ATC GTG AT-3', 内参 β -actin下游引物P4: 5'-GTG TTG GCT GAC AGG TCT TTG-3'。引物由上海 Invitrogen公司合成。

Vero细胞的培养: 用含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在37 °C、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下对Vero细胞进行常规培养,两三天以1:3进行1次传代。

病毒的接种及基因组的提取: HSV-II 感染 Vero细胞后,于显微镜下观察细胞病变。待70%~80%细胞发生病变时收集细胞,反复冻融使细胞充分裂解,低速离心后取上清液,用病毒基因组提取试剂盒提取HSV-II基因组。

LAT ORF1片段的PCR扩增: 以提取的 HSV-II 333株基因组为模板,PCR扩增ORF1。反应体系如下: 10 \times pfx扩增缓冲液2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP混合液, 2 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 0.5 μ L, 上游引物(10 μ mol/L)1 μ L, 下游引物(10 μ mol/L)1 μ L, 模板1 μ L, pfxDNA聚合酶0.3 μ L, 10 \times PCR加强缓冲液5 μ L, 补灭菌蒸馏水至25 μ L, 瞬时离心混匀。PCR反应条件

为94 °C 7 min; 94 °C 30s, 55 °C 20 s, 72 °C 45 s, 共35个循环; 72 °C再延伸5 min后冷却至4 °C。并设立空白对照: 除不加病毒基因组外, 其余相同。反应完毕后1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

pEGFP-C2质粒和ORF1片段双酶切及酶切产物回收: 将回收纯化的目的片段和提取的pEGFP-C2质粒用限制性内切酶EcoRI和KpnI分别双酶切, 并回收酶切产物。双酶切反应体系如下: 10xNEB缓冲液5 μL, pEGFP-C2质粒15 μL (ORF1片段15 μL), 100xBSA 0.5 μL, EcoRI 1 μL和KpnI 1 μL, 补灭菌蒸馏水至50 μL, 37 °C水浴过夜。反应完毕后1.0%琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 分别回收线性载体和ORF1片段, 具体回收步骤参照TaKaRa胶回收试剂盒说明书。

ORF1片段与pEGFP-C2质粒的连接及转化: ORF1片段与pEGFP-C2质粒连接反应体系如下: ORF1片段酶切回收产物7 μL, pEGFP-C2质粒酶切回收产物1 μL, T₄ DNA连接酶0.5 μL, T₄ DNA连接酶Buffer 1 μL, 补灭菌蒸馏水至10 μL, 瞬时离心后放入PCR仪中16 °C连接过夜。连接产物转化至预先用CaCl₂法制备的大肠杆菌TOP10感受态细胞中, 均匀涂布于含60 mg/L卡那霉素的LB固体培养基上, 静置30 min, 再倒置培养18-24 h。

重组质粒提取和鉴定:

菌落PCR鉴定: 将含卡那霉素的LB固体培养基上长出的阳性克隆菌落编号, 再挑取这些阳性菌落, 进行菌落PCR。除模板外, PCR反应体系和反应条件及循环参数与扩增ORF1片段相同。以HSV- II 基因组为模板做阳性对照。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测目标条带。

重组质粒的双酶切及测序鉴定: 选取只能扩增出与阳性对照有一致条带的重组质粒, 进行EcoRI和KpnI双酶切。酶切体系和pEGFP-C2质粒双酶切相同, 酶切条件为37 °C水浴酶切过夜。酶切产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。将同一阳性克隆的菌液送至上海英俊公司用pEGFP-C2质粒的通用引物测通。

重组质粒转染Vero细胞: 待6孔板中的细胞生长密度达到80%-90%时, 用Xfect转染试剂盒分别将pEGFP-C2/LAT-ORF1、pEGFP-C2转染至Vero细胞。具体方法参照Clontech公司的Xfect™ Transfection Reagents说明书。48h后荧光倒置显微镜下观察融合蛋白的表达情况。

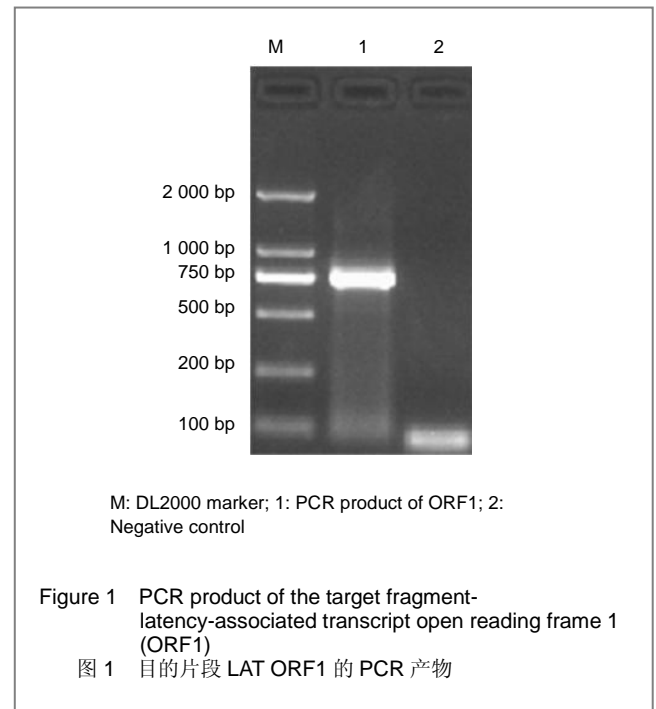
RT-PCR鉴定LAT ORF1在Vero细胞中的表达: 转染48 h后, 于荧光显微镜下观察Vero细胞中绿色荧光蛋白的表达情况, 并收获细胞提取总RNA。反转录合成cDNA, 以此为模板, PCR扩增ORF1及β-actin。反应

体系为: 10xPfx扩增缓冲液2.5 μL, 10 mmol/L dNTP混合液0.5 μL, 50 mmol/L MgSO₄ 0.5 μL, 引物P1、P2或P3、P4各1 μL, 反转录产物cDNA 1 μL, 10xPCR加强液缓冲液5 μL, Pfx DNA聚合酶0.3 μL, 加双蒸水至25 μL。扩增ORF1/β-actin基因的条件为: 94 °C预变性7 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火20 s, 72 °C延伸45 s, 共35个循环; 72 °C再延伸5 min后冷却至4 °C。PCR产物经1%琼脂糖电泳鉴定。

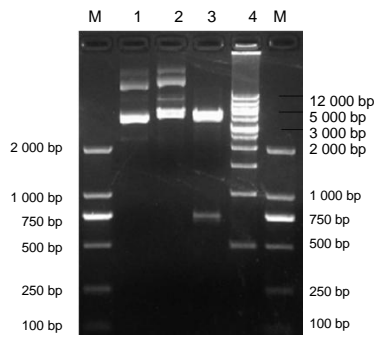
主要观察指标: ①目的片段的扩增结果。②重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1的酶切和测序鉴定结果。③重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1在Vero细胞中的表达及鉴定结果。

2 结果

2.1 目的片段的扩增结果 以提取的HSV- II 333标准株基因组为模板, 扩增出的条带和目标条带大小(加酶切位点和保护碱基共741 bp)一致, 见图1。



2.2 重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1的酶切和测序鉴定 重组质粒经限制性内切酶EcoRI和KpnI双酶切, 可以获得大小约750 bp和4.7 kb的条带, 见图2。说明目的片段已经成功插入真核表达载体pEGFP-C2。将上海英俊测序结果与GenBank中的HSV- II 333标准株(M69065.1)LAT ORF1序列比较, 完全一致, 表明重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1构建成功。



M: DL2000 marker; 1: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1; 2: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 digested with Kpn I; 3: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 digested with Kpn I and EcoRI; 4: 500-12 000 wide range marker

Figure 2 The recombinant plasmid of herpes simplex virus latency-associated transcript open reading frame 1 (pEGFP-C2/LAT ORF1) by enzyme digestion
图2 重组质粒 pEGFP-C2/LAT ORF1 的酶切

2.3 重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1在Vero细胞中的表达及鉴定 见图3, 见图4。

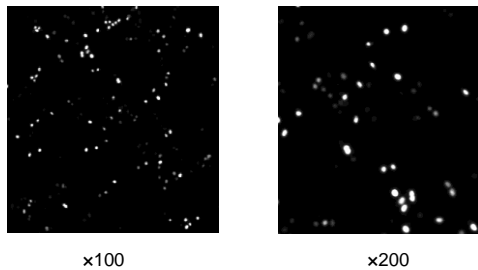
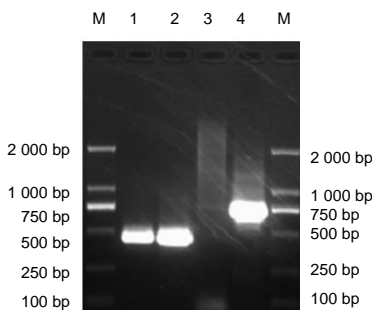


Figure 3 Expression of plasmid pEGFP-C2/latency-associated transcript open reading frame 1 in Vero cells at 48 h after transfection
图3 转染 48 h 后 pEGFP-C2/LAT-ORF1 在 vero 细胞中的表达



M: DL2000 marker; 1: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1; 2: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 digested with Kpn I; 3: Plasmid pEGFP-C2/LAT ORF1 digested with Kpn I and EcoRI; 4: 500-12 000 wide range marker

Figure 4 Identification of latency-associated transcript open reading frame 1 expression in Vero cells by using reverse transcription PCR
图4 RT-PCR 鉴定 LAT ORF1 基因在 Vero 细胞中的表达

转染48 h后,用荧光倒置显微镜观察重组质粒在Vero细胞中的表达情况,发现pEGFP-C2/LAT ORF1融合绿色荧光蛋白在Vero细胞中有表达,表现为强绿色荧光,表明重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1可在Vero细胞中表达。RT-PCR结果表明只有转染重组质粒pEGFP-C2/LAT ORF1的Vero细胞所提取的RNA才能扩增出LAT ORF1基因,而 β -actin(452bp)在转染了两种质粒的Vero细胞所提取的RNA中均可扩增出来。

3 讨论

HSV是人类常见的病毒性疾病病原体之一,人体是其唯一的自然宿主。近年来研究表明HSV- II 感染可显著增加人类免疫缺陷病毒感染概率,并和宫颈癌的发生有关^[11]。HSV- II 嗜神经潜伏使它可以逃避免疫系统监视而难以根除。目前这种潜伏复发机制尚未明确,是彻底解决HSV- II 感染这一医学难题的瓶颈所在。LAT的发现给研究者们揭开HSV- II 潜伏感染的神秘面纱带来了新的希望。国外的许多研究结果证明LAT对HSV的潜伏激活至关重要,但学者对LAT具体的作用机制仍有分歧,主要集中在以下几个方面:①反义RNA分子机制: LAT通过下调立即早期蛋白ICP0的表达,从而使病毒处于潜伏感染状态^[12]。②microRNA水平上的抗凋亡作用^[13-16]: 在病毒潜伏阶段, LAT编码microRNA作用其靶基因,发挥RNA干扰效应进而抑制神经元细胞的凋亡,使病毒持续潜伏感染。③蛋白水平上的抗凋亡作用^[7,17]: LAT ORF1编码了与ICP0有类似功能的蛋白,该蛋白以级联调控的方式调节早期基因和晚期基因的有序表达,从而激活潜伏的病毒,且该蛋白瞬时表达后即发挥作用,存在时间很短,难以检测。HSV- II 起主要作用的LAT含有3个开放阅读框,分别为ORF1, ORF2, ORF3, 本实验以ORF1为研究对象,选用pEGFP-C2为载体,构建真核表达载体pEGFP-ORF1。EGFP是一种新型的报告基因,检测方便,定位准确,荧光稳定,且对宿主细胞无任何毒害,具有共用性和通用性,不受受体范围的限制,可以在胚胎或转基因动物模型中表达等优势。

本实验成功构建了真核表达载体pEGFP-ORF1,将其转染进Vero细胞, RT-PCR鉴定了LAT ORF1在Vero细胞中的表达,并且在荧光显微镜下观察到了融合蛋白的表达。目前国内外还没有将HSV- II LAT ORF1克隆进pEGFP-C2真核表达载体的报道,该重组载体的成功构建尚属首次,它可以为进一步研究 HSV- II LAT ORF1在HSV- II 潜伏复发中的作用机制和生物学功能提供重

要的分子工具和试验基础。

4 参考文献

- [1] Bedadala GR, Pinnoji RC, Palem JR, et al. Thyroid hormone controls the gene expression of HSV-1 LAT and ICP0 in neuronal cells. *Cell Research*.2010;20(5):587-598.
- [2] Johnston C, Saracino M, Kuntz S, et al. Standard-dose and high-dose daily antiviral therapy for short episodes of genital HSV-2 reactivation: three randomised, open-label, cross-over trials.2012;379(9816):641-647.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years United States, 2005-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*.2010;59(15):456-459.
- [4] Jin L, Carpenter D, Moerdyk SM, et al. Cellular FLIP can substitute for the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene to support a wild-type virus reactivation phenotype in mice. *J Neurovirol*.2008;14(5):389-400.
- [5] Jiang XZ, Chentoufi AA, Hsiang CH, et al. The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Can Protect Neuron-Derived C1300 and Neuro2A Cells from Granzyme B-Induced Apoptosis and CD8 T-Cell Killing. *J Virol*.2011;85(5):2325-2332.
- [6] Bertke AS, Patel A, Imai Y, et al. Latency-Associated Transcript (LAT) Exon 1 Controls Herpes Simplex Virus Species-Specific Phenotypes: Reactivation in the Guinea Pig Genital Model and Neuron Subtype-Specific Latent Expression of LAT. *J Virol*.2009;83(19):10007-10015.
- [7] Carpenter D, Henderson G, Hsiang C, et al. Introducing point mutations into the ATGs of the putative open reading frames of the HSV 1 gene encoding the latency associated transcript (LAT) reduces its anti apoptosis activity. *Microb Pathog*.2008;44(2):98-102.
- [8] Henderson G, Jaber T, Carpenter D, et al. Identification of herpes simplex virus type 1 proteins encoded within the first 1.5 kb of the latency-associated transcript. *Journal of Neurovirology*.2009;15(5):439-448.
- [9] Branco FJ, Fraser NW. Herpes simplex virus type 1 latency associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J Virol*.2005;79(14):9019-9025.
- [10] Krause PR, Ostrove JM, Straus SE. The nucleotide sequence, 5' end, promoter domain, and kinetics of expression of the gene encoding the herpes simplex virus type 2 latency-associated transcript. *J Virol*.1991;65(10):5619-5623.
- [11] Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, et al. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochimica Polonica*.2009;56(2):337-342.
- [12] Chen SH, Lee LY, Garber DA, et al. Neither LAT nor open reading frame Putations increase expression of spliced or intron containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol*.2002;76:4764-4772.
- [13] Jurak I, Kramer MF, Mellor JC, et al. Numerous Conserved and Divergent MicroRNAs Expressed by Herpes Simplex Viruses 1 and 2. *J Virol*.2010;84(9):4659-4672.
- [14] Tang S, Bertke AS, Patel A, et al. An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105(31):10931-10936.
- [15] Tang S, Patel A, Krause PR, et al. Novel less-abundant viral microRNAs encoded by herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating ICP34.5 and ICP0 mRNAs. *J Virol*.2009;83(3):1433-1442.
- [16] Umbach JL, Wang K, Tang S, et al. Identification of Viral MicroRNAs Expressed in Human Sacral Ganglia Latently Infected with Herpes Simplex Virus 2. *J Virol*.2010;84(2):1189-1192.
- [17] Thomas SK, Lilley CE, Latchman DS, et al. A protein encoded by the herpes simplex virus (HSV) type 1 2-kilobase latency-associated transcript is phosphorylated, localized to the nucleus, and overcomes the repression of expression from exogenous promoters when inserted into the quiescent HSV genome. *J Virol*.2002;76(8):4056-4067.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金资助项目 (30972666)。

作者贡献: 本课题由第一作者设计及实施, 由通讯作者评估, 盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。

文章概要:

文章要点: 构建 HSV-II LAT ORF1 真核表达载体 pEGFP-ORF1, 实现其在 Vero 细胞中的表达。

关键信息: 成功构建 pEGFP-C2/HSV-II LAT ORF1 真核表达载体, 通过 RT-PCR 验证了其 mRNA 水平的表达, 并用荧光倒置显微镜观察到了融合蛋白的表达。为研究 HSV-II LAT ORF1 的功能奠定了基础。

研究的创新之处与不足: 实验只构建了 pEGFP-C2/HSV-II LAT ORF1 真核表达载体, HSV-II LAT ORF1 在潜伏复发中的功能还有待进一步研究。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。