

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2019)04-0333-06

## 靶向人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1) 整合酶多肽药物表达载体的构建

叶丽颖<sup>1</sup>, 彭臻菲<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>2</sup>, 谢富安<sup>3</sup>, 王军凯<sup>2</sup>, 魏碧娜<sup>1\*</sup> ( <sup>1</sup>福建卫生职业技术学院, 福建 福州 350101; <sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361102; <sup>3</sup>厦门大学附属东方医院, 福建 福州 350025)

**[摘要]** 目的 构建人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1) 整合酶(IN) 表达载体用于双分子荧光互补技术筛选多肽药物。方法 PCR 扩增 HIV-1 IN 的全长基因序列, 将目的片段插入至 pBiFc-VN173 载体中, 并对重组质粒 pBiFc-VN173-IN 进行双酶切及测序鉴定。将重组质粒 pBiFc-VN173-IN 和对照质粒 pBiFc-VN173 分别转染 HEK293T 细胞, 采用 Western blot 法和免疫荧光细胞化学染色法检测 IN 的表达。结果 通过高保真 PCR、载体构建和鉴定, 成功获得 IN 表达载体 pBiFc-VN173-IN。与对照组相比, 通过 Western blot 法和免疫荧光细胞化学染色法证实转染质粒 pBiFc-VN173-IN 载体的 HEK293T 细胞表达 IN。结论 成功构建了 IN 表达载体, 该载体可用于和 IN 相互作用的多肽药物的双分子荧光互补技术筛选。

**[关键词]** 整合酶(IN); 双分子荧光互补技术; 蛋白表达

**[中图分类号]** R392-33, Q55, Q789 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.008808

人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 是引起获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 的病原体<sup>[1]</sup>。根据联合国 AIDS 规划署 2018 年报告表明, 截止 2017 年, 全球大约有 3690 万人被确诊为 HIV 携带者, 累计 3540 万人死于 HIV/AIDS 相关疾病。目前 AIDS 仍是全球一个严峻的公共健康问题。HIV-1 在进入宿主细胞后, 在逆转录酶(reverse transcriptase, RT) 的作用下, 将病毒 RNA 进行逆转录形成双链 cDNA。病毒的 cDNA 在整合酶(integrase, IN) 的催化下插入到宿主基因组 DNA 中, 该过程称为整合过程。整合过程分为在细胞质中进行 3' 端加工(3'-processing), 紧接着在宿主细胞核中进行链转移(strand transfer)。鉴于 IN 在 HIV-1 整合过程中的重要作用并且人体细胞中缺乏 IN 同源性的蛋白质, 以 IN 为靶点可作为治疗 HIV 的方向, 并且以 IN 为靶点的治疗方案更加有效安全。IN 抑制剂通过以下几种途径抑制 IN 的活性: 干扰 IN 结合到病毒 cDNA 的末端<sup>[2-4]</sup>、抑制 IN 的 3' 端加工或链转移活性<sup>[5-6]</sup>、抑制 IN 寡聚合体的形成<sup>[7-13]</sup>、干扰 IN 和细胞因子的相互作用<sup>[14-16]</sup>。目前, 治疗 AIDS 主要采用高效抗逆转录病毒疗法(highly active antiretroviral therapy, HAART)。而 HIV-1 的 IN 抑制剂成为 HAART 方案

中的主要药物之一。目前被批准用于 HIV 阳性个体的药物包括拉替格列韦(raltegravir, RAL)、埃维替格列韦(elvitegravir, EVG) 和多路替格列韦(dolutegravir, DTG), 而卡博替格列韦(cabotegravir, CAB) 和比替格列韦(bictegravir, BIC) 仍在临床试验中<sup>[17]</sup>。伴随着抗逆转录病毒药物的治疗, 患者逐渐出现不同程度的耐药性<sup>[18-21]</sup>。由于病毒耐药性和药物间的交叉耐药性的出现, 迫切需要发现新的有效的 IN 抑制剂。在蛋白片段互补技术中, 双分子荧光互补技术能实现在活细胞中对相互作用蛋白可视化的效果, 观察直观、检测方便, 还可以对荧光的强弱进行定量来判断相互作用的强弱程度。基于 Venus 荧光蛋白的双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFc) 系统 pBiFc-VN173 载体能表达 Venus 荧光蛋白 N 端的 173 个氨基酸残基, pBiFc-VC-155 载体表达 Venus 荧光蛋白 C 端的 155 个氨基酸残基。当 Venus 荧光蛋白的 N 端片段和 C 端片段在细胞内共同表达后, 它们在细胞内相互靠近相互作用, 形成的荧光蛋白具有活性, 能在荧光显微镜下观察到荧光。本研究将 IN 的表达片段插入到载体 pBiFc-VN173, IN 和 Venus 荧光蛋白 N 端的 173 个氨基酸残基进行融合表达, 构建 IN 的表达载体 pBiFc-VN173-IN。该载体的构建为后续利用 BiFc 筛选与 IN 相互作用的多肽药物奠定实验基础。

收稿日期: 2019-01-03; 接受日期: 2019-03-05

基金项目: 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT171033)

作者简介: 叶丽颖(1987-), 女, 福建莆田人, 讲师, 硕士

Tel: 18060611556; E-mail: 411875850@qq.com

\* 通讯作者, 魏碧娜, E-mail: 779067308@qq.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

IN的模板来自厦门大学附属东方医院检验科提供的pMDL质粒;限制性内切酶 *Hind* III和 *Xba* I 购自 Fermentas 公司; 5 × faststart Fastpfu Fly buffer、dNTP、DL2000 DNA marker、faststart Fastpfu Fly DNA 酶、T4 连接酶、*Trans5α* 化学感受态细胞购自 Trans 公司; PCR 引物购自上海生物工程公司; DNA 测序由铂尚生物技术有限公司完成; 无内毒素质粒提取试剂盒(Endo-Free Plasmid Mini Kit) 购自 Omega 公司; DNA 回收/纯化试剂盒购自鼎国公司; pBiFc-VN173 质粒、HEK293T 细胞株为厦门大学附属东方医院检验科保存; 梭华-*sofast* 基因转染试剂购自厦门太阳马工程有限公司; 胎牛血清购自 Gibco 公司; EDTA-胰蛋白酶、高糖 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; 蛋白定量试剂盒购自 ThermoFisher 公司; Western blot 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司; 小鼠抗 IN 单克隆抗体购自 Abcam 公司; Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗小鼠 IgG、小鼠抗 β 肌动蛋白(β-actin) 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液、40 g/L 多聚甲醛固定液购自碧云天公司。

### 1.2 方法

1.2.1 IN 基因的 PCR 扩增 以 pMDL 质粒为模板, 采用 faststart Fastpfu Fly DNA 酶 PCR 扩增获得 IN 全长序列。引物序列(划线部分的序列分别为 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点): IN 正向引物为 5'-CCC AAGCTTTTTTTTAGATGGAATAGAT-3', 反向引物为 5'-TCCTCTAGAATCCTCATCCTGTCTACT-3'; PCR 扩增的 DNA 片段大小为 864 bp。扩增条件如下: 95℃ 5 min, (95℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 20 s) × 34 个循环, 72℃ 5 min。

1.2.2 HIV-1 IN 基因的 pBiFc-VN173-IN 载体的构建及酶切和测序鉴定 将上述 PCR 产物和 pBiFc-VN173 载体分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 进行酶切, 然后琼脂糖凝胶电泳分离并胶回收纯化。将质粒载体和 PCR 产物按照摩尔比 1:3 进行连接, 转化至 *Trans5α* 化学感受态细胞。取 150 μL 转化产物均匀涂布于含氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 抗性的 LB 平板, 37℃ 恒温箱培养过夜。挑取若干个克隆菌, 取 10 mL 含 Amp 抗性的 LB 液体培养基于 37℃ 摇床培养 12 ~ 14 h。收集菌液, 采用无内毒素质粒提取试剂盒抽提质粒, 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切对提取的质粒进行鉴定。鉴定正确后, 送铂

尚生物技术(上海)有限公司测序。将测序正确的 IN 过表达载体称为 pBiFc-VN173-IN。

1.2.3 Western blot 法检测 HEK293T 细胞 IN 蛋白水平 将  $4 \times 10^5$  个 HEK293T 细胞接种于 3.5 cm 板中, 用含 100 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 在 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养 18 ~ 24 h 后转染。按照梭华-*sofast* 基因试剂转染说明, 将质粒 pBiFc-VN173 和 pBiFc-VN-IN 分别转染至 HEK293T 细胞。24 h 后, 采用 100 μL 预冷的裂解液 RIPA(添加蛋白酶抑制剂) 提取细胞总蛋白, 采用蛋白定量试剂盒定量后, 取总蛋白 40 μg 上样, 进行 SDS-PAGE 分离蛋白。采用 0.45 μm 的 PVDF 膜恒流 150 mA、1.5 h 进行转膜。用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入小鼠抗 IN 单克隆抗体(1:1000)、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(1:1000), 4℃ 过夜; 用 TBST 洗膜 5 min × 3 次, 加 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:5000), 常温孵育 1 h; TBST 洗膜 5 min × 3 次后, 加 Western blot 超敏发光液, 暗室曝光显影。

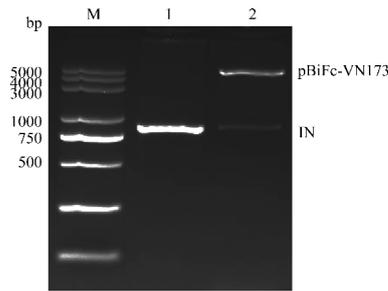
1.2.4 免疫荧光细胞化学染色法检测 HEK293T 细胞 IN 蛋白的表达 将  $6 \times 10^4$  个 HEK293T 细胞接种于 48 孔板中, 用含 100 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 在 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下, 培养 18 ~ 24 h 后转染。按照梭华-*sofast* 基因试剂转染说明, 将质粒 pBiFc-VN173 和 pBiFc-VN-IN 分别转染至 HEK293T 细胞。转染 24 h 后, 用 PBS 洗 2 次; 用 40 g/L 多聚甲醛在室温固定 20 min; PBS 洗 10 min × 2 次; 用 PBST(含 3 mL/L Triton 的 PBS) 洗 10 min; 吸去 PBS, 加封闭液(含 50 mL/L 山羊血清、3 mL/L Triton 的 PBS) 室温下 2 ~ 4 h; 加入小鼠抗 IN 单克隆抗体(1:1000), 4℃ 孵育过夜; PBS 洗 5 min × 3 次; 加 Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗小鼠二抗(1:100), 室温下孵育 2 h; 用 PBS 洗 5 min; 加 DAPI, 在室温孵育 10 min; 吸去 DAPI, 用 PBS 洗 5 min × 2 次; 荧光显微镜下观察拍照。

## 2 结果

### 2.1 pBiFc-VN173-IN 表达载体的构建及酶切和测序鉴定

将构建好的重组质粒 pBiFc-VN173-IN 载体用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行酶切鉴定。质粒 pBiFc-VN173-IN 载体酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 在约 5216 bp 和 864 bp 处呈现目的条带, 与预期的载体 pBiFc-VN173 和目的基因 IN 条带大小一致(图 1)。将酶切验证后的质粒送铂尚生物技术有限公司进行测序, 测序结

果与预期序列一致, 表明 pBiFc-VN173-IN 表达载体构建成功。



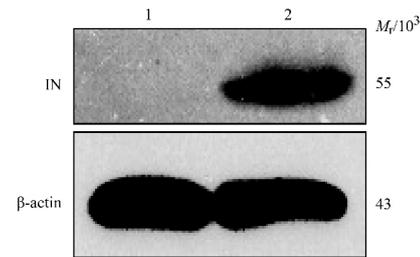
M: DL2000 DNA marker; 1: IN 全长 cDNA 的 PCR 扩增产物; 2: 重组质粒酶切结果。

图 1 IN 基因表达载体的构建及酶切鉴定

## 2.2 Western blot 法检测证实转染 pBiFc-VN173-IN 表达载体的 HEK293T 细胞可表达 IN

Western blot 法检测结果显示, 经转染 pBiFc-VN173-IN 表达载体的 HEK293T 细胞 24 h 后, 可在蛋白相对分子质量( $M_r$ ) 55 000 附近检测到目的条带。与对照组转染 pBiFc-VN173 相比, 转染 pBiFc-VN173-IN

载体的 HEK293T 细胞可表达 IN 蛋白, 表明 pBiFc-VN173-IN 表达 IN 载体构建成功(图 2)。

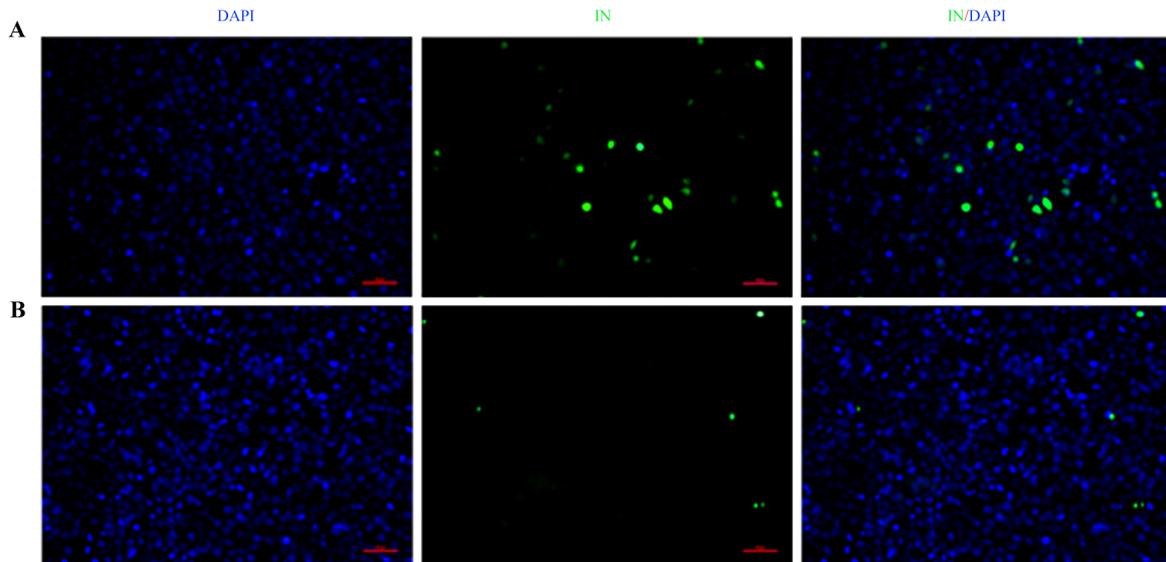


1: 转染 pBiFc-VN173 的 HEK293T 细胞; 2: 转染 pBiFc-VN173-IN 的 HEK293T 细胞。

图 2 Western blot 法检测 pBiFc-VN173-IN 载体表达 IN

## 2.3 转染 pBiFc-VN173-IN 表达载体的 HEK293T 细胞表达 IN

细胞免疫荧光检测结果显示, 经转染 pBiFc-VN173-IN 表达载体的 HEK293T 细胞 24 h 后, 与对照组转染 pBiFc-VN173 相比, 在荧光显微镜下可观察到绿色荧光。IN 主要在细胞的细胞核中表达(图 3)。



A: 转染 pBiFc-VN173-IN 的 HEK293T 细胞; B: 转染 pBiFc-VN173 的 HEK293T 细胞。

图 3 HEK293T 细胞 IN 的表达(免疫荧光细胞化学染色,  $\times 200$ )

## 3 讨论

HIV-1 的 Pol 基因编码 Pol 多聚蛋白, Pol 多聚蛋白水解加工后产生蛋白水解酶、逆转录酶和 IN 这三种酶。IN 的  $M_r$  为 32 000, 是由 288 个氨基酸残基组成, 包含三个功能明确的结构域, 分别为锌结合的 N 端结构域(N-terminal domain, NTD, 第 1~50 位氨基酸残基)、催化核心域(catalytic core domain, CCD,

第 51~212 位氨基酸残基) 和特异 DNA 结合的 C 端结构域(C-terminal domain, CTD, 第 213~288 位氨基酸残基)<sup>[22]</sup>。NTD 含有组氨酸和半胱氨酸残基组成的高度保守的组氨酸组氨酸半胱氨酸半胱氨酸(histidine histidine cysteine cysteine, HHCC) 基序, HHCC 基序螯合一个锌离子有利于 NTD 折叠构象的稳定<sup>[23-24]</sup>, 该基序很可能在介导 IN 泛素化中发挥

重要作用<sup>[25]</sup>。NTD 结构域中高度保守的 Tyr15 在促进 NTD 和 IN 中其他的结构域的疏水作用中发挥关键作用<sup>[26]</sup>。CCD 包含三个高度保守的氨基酸残基: D64、D116 和 E152, 称为 DDE 基序。该基序和二价金属离子的结合有关, 是 IN 催化活性所必需的, 任何一个氨基酸残基的突变都会使酶的催化活性丧失<sup>[27]</sup>。DDE 基序在逆转录病毒的 IN 活性中占据着重要位置。在猫泡沫病毒( feline foamy virus, FFV) 中, 将 CCD 中高度保守的 D107、D164 和 E200 突变, N 的催化活性和病毒感染性全部消失; 而 Q165、Y191 和 S195 突变后, IN 的酶活性水平发生改变。因此, DDE 基序上单个氨基酸残基的突变有可能影响病毒的复制过程<sup>[28]</sup>。在 IN 的结构中, CTD 是保守性最低的结构域, 它能非特异性地结合 DNA, 参与整合过程, 有利于 IN-DNA 复合物的稳定。虽然 CCD 是 IN 催化的核心区域, 但是 NTD 和 CTD 也是 IN 在整合过程中必不可少的结构<sup>[29-30]</sup>。核转运蛋白丝氨酸/精氨酸 2( transportin serine/arginine 2, TRN-SR2) 可特异性地结合一个 CCD-CTD 二聚体, 从而促进整合前复合物的核导入<sup>[31]</sup>。Ku70 蛋白的第 251 ~ 第 438 位氨基酸残基与 IN 第 51 ~ 第 160 位氨基酸残基相互作用, Ku70 的 N 端结构域与 IN 的第 200 ~ 第 220 位氨基酸残基形成稳定的复合物, 从而影响 HIV-1 的复制<sup>[32]</sup>。

在体外水平, HIV IN 抑制剂的筛选方法包括酶联免疫吸附法、时间分辨荧光法、荧光共振能量转移法等, 检测 IN 3'端加工活性<sup>[33]</sup>。在细胞水平, 也报道了多种检测 IN 抑制剂筛选方法, 如采用荧光素酶报告基因<sup>[34]</sup>、假病毒模型筛选<sup>[35-36]</sup>等。也有报道采用基于机构的虚拟筛选和分子动力学模拟相结合的方法来设计 HIV-1 IN 抑制剂<sup>[37-39]</sup>。亦有通过果蝇体内实验来筛选逆转录病毒 IN 抑制剂药物<sup>[40]</sup>。

近年来也发现了一些对 IN 起抑制作用的小分子肽。基于病毒蛋白 R( viral protein R, Vpr) 第 69 ~ 第 75 位氨基酸残基的 7 个氨基酸残基构成的七肽具有低微摩尔抑制 IN 活性的特性, 通过光交联试验发现该肽能直接和 IN 结合<sup>[41]</sup>。N-末端琥珀酰亚胺修饰的晶状体上皮衍生生长因子( lens epithelium-derived growth factor, LDEGF) 第 361 ~ 第 370 位氨基酸残基构成的肽对 HIV-1 的 IN 具有共价抑制作用<sup>[42]</sup>。四种结构类似于和 IN 结合的 LEDGF 结构域的小环肽在低毫摩尔浓度下和 IN 具有高亲和度<sup>[43]</sup>。

衍生于乙型肝炎病毒的六肽能通过抑制 HIV-1 的 IN 活性而起抗病毒效应<sup>[44]</sup>。目前肽类药物已经是个成熟的技术研发体系, 特异性好, 容易修饰, 分子小, 并已经占据了广阔的医药市场份额。本研究中之所以构建 BiFc 筛选的 IN 表达载体, 是由于 BiFc 能够直观、快速判断目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的情况, 在荧光显微镜下可直接观察到荧光, 并可根据荧光的强弱判断目的蛋白相互作用的强弱。本实验构建的 pBiFc-VN173-IN 载体对筛选与 IN 相互作用的多肽药物可实现操作简单、结果观察直观、实验周期较短等优势, 为下一步研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Gallo R C, Salahuddin S Z, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses ( HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS [J]. *Science*, 1984, 224( 4648): 500 - 503.
- [2] Engelman A N, Singh P K. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75( 14): 2491 - 2507.
- [3] Li Y, Xuan S, Feng Y, et al. Targeting HIV-1 integrase with strand transfer inhibitors [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20( 4): 435 - 449.
- [4] Blanco J L, Whitlock G, Milinkovic A, et al. HIV integrase inhibitors: a new era in the treatment of HIV [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16( 9): 1313 - 1324.
- [5] Naidu B N, Walker M A, Sorenson M E, et al. The discovery and preclinical evaluation of BMS-707035, a potent HIV-1 integrase strand transfer inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28( 12): 2124 - 2130.
- [6] Hassounah S A, Alikhani A, Oliveira M, et al. Antiviral activity of bictegravir and cabotegravir against integrase inhibitor-resistant SIVmac239 and HIV-1 [J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61( 12): e01695 - 17. DOI: 10.1128/AAC.01695 - 17. Print 2017 Dec.
- [7] Jentsch N G, Hart A P, Hume J D, et al. Synthesis and evaluation of aryl quinolines as HIV-1 integrase multimerization inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9( 10): 1007 - 1012.
- [8] Bonnard D, Le Rouzic E, Eiler S, et al. Structure-function analyses unravel distinct effects of allosteric inhibitors of HIV-1 integrase on viral maturation and integration [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293( 16): 6172 - 6186.
- [9] Kalathiya U, Padariya M, Baginski M. Extracting functional groups of ALLINI to design derivatives of FDA-approved drugs: Inhibition of HIV-1 integrase [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, 65( 4):

- 594 – 607.
- [10] Hoyte A C , Jamin A V , Koneru P C , et al. Resistance to pyridine-based inhibitor KF116 reveals an unexpected role of integrase in HIV-1 Gag-Pol polyprotein proteolytic processing [J]. *J Biol Chem* , 2017 , 292( 48) : 19814 – 19825.
- [11] Peese K M , Allard C W , Connolly T , et al. 5 , 6 , 7 , 8-Tetrahydro-1 , 6-naphthyridine derivatives as potent HIV-1-integrase-allosteric-site inhibitors [J]. *J Med Chem* , 2019 , 62( 3) : 1348 – 1361.
- [12] Wilson T A , Koneru P C , Rebensburg S V , et al. An isoquinoline scaffold as a novel class of allosteric HIV-1 integrase inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett* , 2019 , 10( 2) : 215 – 220.
- [13] Amadori C , van der Velden Y U , Bonnard D , et al. The HIV-1 integrase-LEDGF allosteric inhibitor MUT-A: resistance profile , impairment of virus maturation and infectivity but without influence on RNA packaging or virus immunoreactivity [J/OL]. *Retrovirology* , 2017 , 14( 1) : 50. DOI: 10.1186/s12977-017-0373-2.
- [14] George A , Gopi Krishna Reddy A , Satyanarayana G , et al. 1 , 2 , 3 , 4-Tetrahydroisoquinolines as inhibitors of HIV-1 integrase and human LEDGF/p75 interaction [J]. *Chem Biol Drug Des* , 2018 , 91( 6) : 1133 – 1140.
- [15] Zhang F H , Debnath B , Xu Z L , et al. Discovery of novel 3-hydroxypicolinamides as selective inhibitors of HIV-1 integrase-LEDGF/p75 interaction [J]. *Eur J Med Chem* , 2017 , 125: 1051 – 1063.
- [16] Thangsunan P , Wongsaiapun S , Kittiwachana S , et al. Effective prediction model and determination of binding residues influential for inhibitors targeting HIV-1 integrase-LEDGF/p75 interface by employing solvent accessible surface area energy as key determinant [J]. *J Biomol Struct Dyn* , 2019 , 27: 1 – 14.
- [17] Anstett K , Brenner B , Mesplede T , et al. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors [J/OL]. *Retrovirology* , 2017 , 14( 1) : 36. DOI: 10.1186/s12977-017-0360-7.
- [18] Derache A , Iwuji C C , Danaviah S , et al. Predicted antiviral activity of tenofovir versus abacavir in combination with a cytosine analogue and the integrase inhibitor dolutegravir in HIV-1-infected South African patients initiating or failing first-line ART [J]. *J Antimicrob Chemother* , 2019 , 74( 2) : 473 – 479.
- [19] Modica S , Rossetti B , Lombardi F , et al. Prevalence and determinants of resistance mutations in HIV-1-infected patients exposed to integrase inhibitors in a large Italian cohort [J]. *HIV Med* , 2019 , 20( 2) : 137 – 146.
- [20] Marcelin A G , Grude M , Charpentier C , et al. Resistance to integrase inhibitors: a national study in HIV-1-infected treatment-naive and-experienced patients [J]. *J Antimicrob Chemother* , 2019 , 74( 5) : 1368 – 1375.
- [21] Yoshinaga T , Seki T , Miki S , et al. Novel secondary mutations C56S and G149A confer resistance to HIV-1 integrase strand transfer inhibitors [J]. *Antiviral Res* , 2018 , 152: 1 – 9.
- [22] Pommier Y , Johnson A A , Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS [J]. *Nat Rev Drug Discov* , 2005 , 4( 3) : 236 – 248.
- [23] Craigie R. HIV integrase , a brief overview from chemistry to therapeutics [J]. *J Biol Chem* , 2001 , 276( 26) : 23213 – 23216.
- [24] Cai M , Zheng R , Caffrey M , et al. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase [J]. *Nat Struct Biol* , 1997 , 4( 7) : 567 – 577.
- [25] Wang Z , Hou X , Wang Y , et al. Ubiquitination of non-lysine residues in the retroviral integrase [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2017 , 494( 1/2) : 57 – 62.
- [26] Takahata T , Takeda E , Tobiume M , et al. Critical contribution of Tyr15 in the HIV-1 integrase ( IN) in facilitating IN assembly and nonenzymatic function through the IN precursor form with reverse transcriptase [J/OL]. *J Virol* , 2016 , 91 ( 1) : e02003 – 16. DOI: 10.1128/JVI.02003-16. Print 2017 Jan 1.
- [27] Gerton J L , Ohgi S , Olsen M , et al. Effects of mutations in residues near the active site of human immunodeficiency virus type 1 integrase on specific enzyme-substrate interactions [J]. *J Virol* , 1998 , 72( 6) : 5046 – 5055.
- [28] Lee G E , Kim J , Shin C G. Single residue mutation in integrase catalytic core domain affects feline foamy viral DNA integration [J]. *Biosci Biotechnol Biochem* , 2019 , 83( 2) : 270 – 280.
- [29] Engelman A , Bushman F D , Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex [J]. *EMBO J* , 1993 , 12 ( 8) : 3269 – 3275.
- [30] Zeinalipour-Loizidou E , Nicolaou C , Nicolaides A , et al. HIV-1 integrase: from biology to chemotherapeutics [J]. *Curr HIV Res* , 2007 , 5( 4) : 365 – 388.
- [31] Tsirkone V G , Blokken J , De Wit F , et al. N-terminal half of transportin SR2 interacts with HIV integrase [J]. *J Biol Chem* , 2017 , 292( 23) : 9699 – 9710.
- [32] Anisenko A N , Knyazhanskaya E S , Zalevsky A O , et al. Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting [J/OL]. *Sci Rep* , 2017 , 7( 1) : 5649. DOI: 10.1038/s41598-017-05659-5.
- [33] 张旋, 杨柳萌, 郑永唐. HIV-1 整合酶抑制剂体外筛选方法研究进展 [J]. *中国药理学通报* , 2013 , 29( 1) : 14 – 17. Zhang X , Yang L , Zheng Y. Advances of screening methods *in vitro* for HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Zhongguo Yao Li Xue Tong Bao* , 2013 , 29( 1) : 14 – 17.
- [34] Van Loock M , Meersseman G , Van Acker K , et al. A novel high-throughput cellular screening assay for the discovery of HIV-1 integrase inhibitors [J]. *J Virol Methods* , 2012 , 179( 2) : 396 – 401.
- [35] Rosenbluh J , Hayouka Z , Loya S , et al. Interaction between HIV-1 rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV

- peptides[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(21): 15743–15753.
- [36] Belshan M, Schweitzer C J, Donnellan M R, et al. *In vivo* biotinylation and capture of HIV-1 matrix and integrase proteins [J]. *J Virol Methods*, 2009, 159(2): 178–184.
- [37] Samorlu A S, Yeleki K, Ibrahim Uba A. The design of potent HIV-1 integrase inhibitors by a combined approach of structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2018 Dec 8: 1–16. DOI: 10.1080/07391102.2018.1557559. [Epub ahead of print].
- [38] Panwar U, Singh S K. Structure-based virtual screening toward the discovery of novel inhibitors for impeding the protein-protein interaction between HIV-1 integrase and human lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2018, 36(12): 3199–3217.
- [39] Sun L, Gao P, Dong G, et al. 5-Hydroxypyrido[2,3-b]pyrazin-6(5H)-one derivatives as novel dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H and integrase [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 714–724.
- [40] Cancian M, Loreto E L S. A Mos1 transposase *in vivo* assay to screen new HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Genetica*, 2018, 146(2): 243–247.
- [41] Zhao X Z, Metifiot M, Kiselev E, et al. HIV-1 integrase-targeted short peptides derived from a viral protein R sequence [J/OL]. *Molecules*, 2018, 23(8): E1858. DOI: 10.3390/molecules23081858.
- [42] Chandra K, Das P, Metanis N, et al. Peptide fibrils as monomer storage of the covalent HIV-1 integrase inhibitor [J]. *J Pept Sci*, 2017, 23(2): 117–121.
- [43] Northfield S E, Wielens J, Headey S J, et al. Cyclic hexapeptide mimics of the LEDGF integrase recognition loop in complex with HIV-1 integrase [J]. *Chem Med Chem*, 2018, 13(15): 1555–1565.
- [44] Kim H, Lee S Y, Choi Y M, et al. HBV polymerase-derived peptide exerts an anti-HIV-1 effect by inhibiting the acetylation of viral integrase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(2): 541–546.

## Construction of a vector targeting integrase of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) used for screening peptide drug

YE liying<sup>1</sup>, PENG Zhenfei<sup>1</sup>, ZHAO Tingting<sup>2</sup>, XIE Fuan<sup>3</sup>, WANG Junkai<sup>2</sup>, WEI Bina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fujian Health College, Fuzhou 350101; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102; <sup>3</sup>Dongfang Hospital, Xiamen University, Fuzhou 350025, China

\* Corresponding author, E-mail: 779067308@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To obtain the expression vector, which could be used for screening peptide drug against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase (IN) with bimolecular fluorescence complementation (BiFc). **Methods** Full-length IN sequence was amplified using high-fidelity PCR with the template pMDL vector, following with the insertion of target sequence into pBiFc-VN173 vector. Moreover, the recombinant vector pBiFc-VN173-IN was further confirmed by double enzyme digestion and sequencing. Compared with empty control, expression of IN from pBiFc-VN173-IN in HEK293T cells was validated by Western blotting and immunofluorescence assay (IFA). **Results** The pBiFc-VN173-IN vector, which could drive the ectopic expression of IN, was successfully obtained through high-fidelity PCR, vector construction and confirmation. In addition, Western blot analysis and IFA validated the ectopic expression of IN in HEK293T cells after transfection. **Conclusion** The pBiFc-VN173-IN vector has been successfully obtained, and it will be helpful for screening specific peptides against IN using BiFc.

**[Key words]** integrase; bimolecular fluorescence complementation (BiFc); protein expression