

熊猴存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型

BACK

曹光^{1,4}, 佘文惠², 刘丰亮^{1,4}, 况轶群^{1,4}, 王金焕², 苏伟婷², 郑永唐^{1,3,*}

- (1. 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
2. 遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 3. 中国科学院昆明灵长类研究中心,
中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 缺乏合适的动物模型是制约艾滋病研究取得重大突破的关键瓶颈之一。细胞内的抗病毒蛋白被称为限制因子。研究不同灵长类动物抗 HIV-1 宿主限制因子的存在形式及作用机制对建立合适 AIDS 灵长类动物模型有十分重要的意义。*TRIM5 α* 是哺乳动物细胞中一种重要和关键的限制因子, 它以物种依赖的方式限制包括 HIV-1 在内的逆转录病毒的感染。*TRIM5-CypA* 融合基因是存在于新大陆猴与旧大陆猴中的一种独特的 *TRIM5* 基因形式。为了研究不同灵长类动物 *TRIM5* 基因的存在方式, 该文对熊猴、藏酋猴、红面猴及中国恒河猴 4 个物种共 110 只灵长类动物进行了 *TRIM5-CypA* 融合模式的研究。首次发现熊猴也存在 *TRIM5-CypA* 基因融合现象。熊猴 *TRIMCyp* 融合基因形成模式类似于北平顶猴 *TRIMCyp* 融合基因模式, 即 *CypA* 假基因的 cDNA 序列通过逆转座方式插入到 *TRIM5* 基因的 3'-UTR 区域。基因序列分析表明, 该基因与北平顶猴相应基因序列高度相似; 并且其 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点也相应存在 G-to-T 突变现象(G/T)。这提示熊猴也极有可能像北平顶猴一样表达 *TRIM5-CypA* 融合蛋白, 从而导致熊猴可能跟北平顶猴一样可能被 HIV-1 感染。因此, 熊猴极有希望成为一种新的 HIV/AIDS 灵长类动物模型。

关键词: 熊猴; 限制因子; *TRIM5 α* ; *TRIM5-CypA* 融合基因; 杂合子基因型; HIV; 动物模型

中图分类号: R-332; Q959.848; R512.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2011)01-0040-10

Identification of the *TRIM5/TRIMCyp* heterozygous genotype in *Macaca assamensis*

CAO Guang^{1,4}, NIE Wen-Hui², LIU Feng-Liang^{1,4}, KUANG Yi-Qun^{1,4},
WANG Jin-Huan², SU Wei-Ting², ZHENG Yong-Tang^{1,3,*}

- (1. Key laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of the Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. Kunming Primate Research Center of Chinese Academy of Sciences, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China; 4. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The lack of appropriate animal models that utilizes HIV-1 as the challenge virus is a major impediment to HIV/AIDS research. A major reason underlying the inability of HIV-1 to replicate in nonhuman primate cells is the existence of host antiviral restriction factors. The intrinsic antiviral proteins in host cells are described as restriction factors. The understanding of restriction factors and their mechanism in different primates would undoubtedly facilitate the development of HIV/AIDS animal models. *TRIM5 α* is an important restriction factor and can restrict the infection of several retroviruses including HIV-1 in a species-specific fashion. *TRIM5-cyclophilin A (TRIMCyp)* gene is an unusual *TRIM5* locus found in New World and Old World monkeys. The different *TRIMCyp* genotypes of four primates (110 samples) including assam macaque (*Macaca assamensis*), tibetan macaque (*M. thibetana*), stump-tailed macaque (*M. arctoides*) and Chinese rhesus macaques (*M. mulatta*) were studied in this paper. We firstly found that *TRIM5-CypA* fusion gene exist in *M. assamensis*. The *TRIMCyp* of *M. assamensis* also results from the retrotransposition of *CypA* pseudogene cDNA into 3'-UTR of *TRIM5* gene like *TRIMCyp* of *M. leonina*. Moreover, there is an extremely high

收稿日期: 2010-12-01; 接受日期: 2010-12-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”) (2006CB504302); 国家自然科学基金(U0832601,30671960); 国家科技重大专项“十一五”计划(2009ZX09501-029); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-EW-R-13)资助

*通讯作者(Corresponding author), 郑永唐, Tex/Fax: 0871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 曹光, 男, 硕士研究生, 主要从事 *TRIM5 α* 限制 HIV-1 复制机制的研究

sequence homology between *TRIMCyp* genes from *M. assamensis* and *M. leonina*. Besides, we also found the G-to-T mutation (G/T) in the 3'splicing site of *TRIM5* intron 6, which was identical to *M. leonina*. These results indicate *M. assamensis* may also encode *TRIMCyp* protein like *M. leonine*, which imply *M. assamensis* might be infected by HIV-1. Therefore, it is very possible that *M. assamensis* will be used as a new HIV/AIDS animal model.

Key words: *Macaca assamensis*; Restriction factor; *TRIM5 α* ; *TRIMCyp*; Heterozygous genotype; HIV; Animal model

艾滋病, 又称为获得性免疫缺陷综合症 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 是一种由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染引起的致死性传染病。HIV 病毒属于逆转录病毒科慢病毒属, 是一种 RNA 病毒。AIDS 严重威胁人类健康和影响经济发展, 加强 HIV/AIDS 预防、诊断及治疗的基础和应用研究刻不容缓。缺乏理想或合适的动物模型是制约艾滋病研究取得重大突破的关键瓶颈之一, 宿主病毒限制因子 (restriction factor) 的存在则是无法建立理想或合适 HIV/AIDS 动物模型的重要原因之一。

病毒与其宿主在进化过程中已共存数百万年。病毒通过基因突变等方式逃避宿主的防御体系, 以利于病毒自身的复制和生存。宿主在进化过程中也发展了多种形式的天然免疫和特异性免疫系统, 以抑制病毒在体内的复制, 清除体内病毒及病毒感染的细胞, 以利于宿主自身的生存。细胞内的抗病毒蛋白被称为限制因子。通过一些天然免疫分子或限制因子来限制病毒的复制是灵长类宿主抗病毒机制的重要组成部分。在灵长类的基因组中, 有一些基因编码具有抗病毒作用的天然免疫分子, 在宿主抗病毒感染中具有重要作用。近年来, 已有多个宿主抗病毒限制因子被陆续发现, 如 APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptides) (Sheehy et al, 2002)、ZAP (zinc-finger antiviral protein) (Gao et al, 2002)、*TRIM5 α* (tripartite motif protein 5 α) (Stremlau et al, 2004)、*TRIM28* (Wolf & Goff, 2007) 和 *Tetherin* (Neil et al, 2008) 等, 它们共同形成固有免疫 (intrinsic immune) 体系的崭新内容 (Bieniasz, 2004)。宿主抗病毒限制因子为人们研究逆转录病毒的发病机制和抗病毒策略提供了全新的思路, 其研究是 AIDS 防治研究的热点和前沿领域之一。不同灵长类动物尤其是中国产灵长类动物抗 HIV-1 宿主限制因子的存在形式、多态性和对 HIV-1 的限制作用研究将对建立合适的新型 AIDS 灵长类动物模型有十分重要的意义。

TRIM5 α 是哺乳动物细胞中一种十分重要和关

键的限制因子, 它以一种物种依赖的方式限制包括 HIV-1 在内的逆转录病毒的感染 (Tang et al, 2009)。*TRIM5 α* 分子是三重模体蛋白大家族的成员。*TRIM* 家族蛋白又称 RBCC 蛋白, 因所有 *TRIM* 蛋白均具有 3 个结构域 RING、B-box(es) 和 Coiled-coil 而得名 (Towers, 2007)。*TRIM5 α* 是 *TRIM5* 转录产物中最长的选择性剪接体, 它相比其他 *TRIM5* 分子 (*TRIM5 β* 、 γ 、 δ 、 ϵ) (Xu et al, 2003) 及其他 *TRIM* 蛋白家族成员在 C 末端多了 1 个 B30.2/SPRY (SP1a and RYanodine) 结构域 (Stremlau et al, 2004) (图 1)。*TRIM5* 同源物不仅广泛存在于包括人、猿、旧大陆猴 (Old World monkey) 及新大陆猴 (New World monkey) 等多种灵长类谱系中 (Sawyer et al, 2005; Song et al, 2005), 而且在其他哺乳动物, 如牛 (Si et al, 2006; Ylinen et al, 2006) 和兔子 (Schaller et al, 2007) 等中也存在。由于 *TRIM5 α* 分子的存在和作用, 绝大部分旧大陆猴都不能感染 HIV-1。

在新大陆猴中, 鹰猴 (owl monkeys, *Aotus*) 是惟一不被 HIV-1 感染的灵长类动物。研究发现, 鹰猴细胞中存在一个独特的 *TRIM5* 基因形式, 即 1 个 LINE-1 (long interspersed nuclear element 1) 逆转座子 (retrotransposon) 催化一个 *CypA* (Cyclophilin A) 假基因的 cDNA 序列通过逆转座的方式插入到 *TRIM5 α* 基因的第 7 和第 8 外显子之间的内含子中, 从而形成 *TRIM5-CypA* 融合基因 (Sayah et al, 2004; Nisole et al, 2004) (图 1)。由于细胞内的 *CypA* 能够结合 HIV-1 衣壳蛋白 (capsid) (Luban et al, 1993; Franke et al, 1994; Thali et al, 1994), 鹰猴表达的 *TRIMCyp* 融合蛋白 (owl monkey *TRIM5-CypA*, *omTRIMCyp*) 可以通过其 *CypA* 结构域与进入细胞的病毒衣壳相互作用, 从而抑制 HIV-1 的复制 (Diaz-Griffero et al, 2006; Zhang et al, 2006; Li et al, 2007)。*omTRIMCyp* 融合基因的同源物存在于鹰猴属 (genus *Aotus*) 的许多物种中 (Ribeiro et al, 2005), 但是在其他灵长类谱系及新大陆猴的其他属中均未被发现 (Sayah et al, 2004; Ribeiro et al, 2005)。

在旧大陆猴中, 平顶猴是惟一报道可以感染

HIV-1 的动物。我们在对平顶猴群体(*M.nemestrina* group)的北平顶猴(northern pig-tailed macaque, *M. leonina*)进行研究时,首次发现其存在着与鹰猴相似的 *TRIM5-CypA* 融合基因现象,我们将该融合基因命名为 *npmTRIMCyp*,但其基因融合模式和表达剪接方式与鹰猴不同(Liao et al, 2007)(图 1)。随后国际上多个实验室证实了我们的实验结果并随后也分别在平顶猴、食蟹猴(*M. fascicularis*)和印度恒河猴中发现了这种 *TRIM5-CypA* 融合基因,这些融合基因均由 *CypA* 基因通过 LINE-1 介导的逆转座方式插入到 *TRIM5* 基因的 3'端或下游形成,它们均能经转录翻译产生由 *TRIM5* 的第 2~6 外显子和完整 *CypA* 结构域组成的 *TRIMCyp* 蛋白(图 1),这些蛋白均不能限制 HIV-1 的感染(Liao et al, 2007; Brennan et al, 2008; Newman et al, 2008; Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008),但是具有限制 HIV-2、FIV

或 EIAV 的活性(Virgen et al, 2008; Wilson et al, 2008; Kuang et al, 2009)。有研究表明,平顶猴 *TRIMCyp* 融合蛋白不能限制 HIV-1 是由于 *CypA* 结构域的一个 R69H 单氨基酸突变造成的(Virgen et al, 2008; Kuang et al, 2009)。在北平顶猴 *npmTRIMCyp* 融合蛋白中也发现了该 R69H 氨基酸突变,可能这也是造成 *npmTRIMCyp* 融合蛋白不能限制 HIV-1 的原因。HIV-1 也能感染猕猴属 *TRIMCyp* 纯合基因型的北平顶猴外周血单核细胞(PBMC)(Kuang et al, 2009),并且含 *SIV vif* 基因(用以克服猴另一 HIV-1 限制因子 APOBEC3G 的阻碍)的重组猴嗜性 HIV-1(stHIV-1)能短期内感染平顶猴(Hatziioannou et al, 2009)。这些结果表明,纯合 *TRIMCyp* 基因型的北平顶猴可能支持 HIV-1 的有效复制,有望成为 HIV-1 感染的新型模型动物。

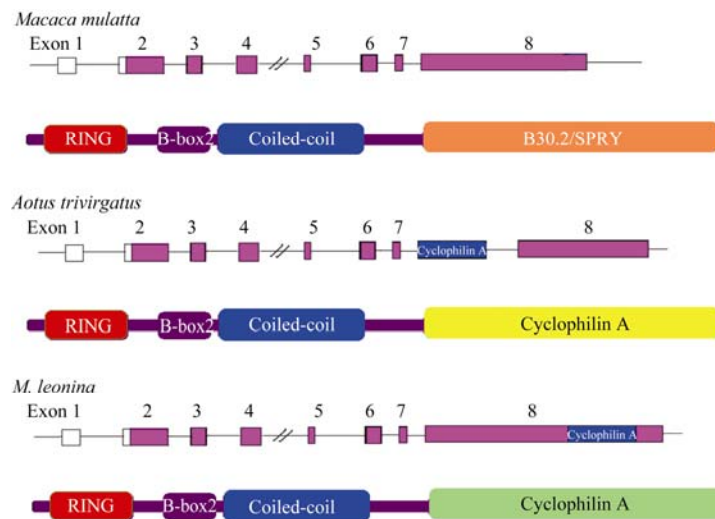


图 1 灵长类动物的 *TRIM5/TRIMCyp* 基因和蛋白结构示意图

Fig. 1 The schematic genomic and protein structures of primate *TRIM5/TRIMCyp*

Macaca mulatta: 恒河猴 (rhesus macaque); *Aotus trivirgatus*: 鹰猴 (owl monkey); *M. leonina*: 北平顶猴(northern pig-tailed macaque)。

鹰猴 *omTRIMCyp* 融合基因和北平顶猴 *npmTRIMCyp* 融合基因是目前在灵长类动物中发现存在的两种不同 *TRIM5-CypA* 基因融合模式,两者分别在天然宿主因子限制 HIV-1 复制机制研究及建立新型艾滋病灵长类动物模型方面发挥着不同的重要作用。灵长类动物种属繁多,资源丰富,但对其中许多动物的 *TRIMCyp* 基因型并不清楚,有必要进行进一步的检测。本研究检测了熊猴、藏酋猴、红面猴及中国恒河猴是否存在鹰猴 *omTRIMCyp* 及北平顶猴 *npmTRIMCyp* 两种不同的 *TRIM5-CypA* 基

因融合模式,以期发现类似于两者或者全新的 *TRIM5-CypA* 融合基因存在形式,为人们研究艾滋病发病机制及寻找适合建立 HIV 感染艾滋病模型的灵长类动物提供重要依据。

1 材料与方法:

1.1 研究材料

本研究共包括熊猴(Assam macaque, *Macaca assamensis*)、藏酋猴(Tibetan macaque, *M. Thibetana*)、红面猴(stump-tailed macaque, *M.*

arctoides)及中国恒河猴(Chinese rhesus macaques, *M. mulatta*) 4 种灵长类动物共 110 个个体, 其中 14 个熊猴个体, 2 个藏酋猴个体, 8 个红面猴个体, 86 个中国恒河猴个体。实验用样本为采自这 110 只动物的

组织或血液样本, 样本名称、类型、产地等信息见表 1。北平顶猴基因组 DNA 为本实验室 -80°C 保存样品。

表 1 研究所用灵长类动物样本
Tab. 1 The samples of primates in the present study

物种名 Species	样本编号 Symbols of individuals	个体数 Sample size	样本类型 Sample type	产地 Locality
熊猴 <i>Macaca assamensis</i>	M.assVm	1	组织 Tissue	越南西贡 Sai Gon Vietnam
	M.assYL1-M.assYL2	2	组织 Tissue	云南云龙 Yunlong, Yunnan
	M.assUk	1	组织 Tissue	未知 Unknown
	M.assY1	1	组织 Tissue	云南 Yunnan
	M.assY2-M.assY10	9	血液 Blood	云南 Yunnan
藏酋猴 <i>M. thibetana</i>	M.thiS	1	组织 Tissue	四川 Sichuan
	M.thiUk	1	组织 Tissue	未知 Unknown
红面猴 <i>M. arctoides</i>	M.arcYK	1	组织 Tissue	云南河口 Hekou, Yunnan
	M.arcYH1-M.arcYH2	2	组织 Tissue	云南黄连山 Huanglianshan, Yunnan
	M.arcH	1	组织 Tissue	湖北恩施 Enshi, Hubei
	M.arcY1-M.arcY4	4	血液 Blood	云南 Yunnan
中国恒河猴 <i>M. mulatta</i>	M.mulY1-M.mulY86	86	血液 Blood	云南 Yunnan

1.2 基因组 DNA 的提取

动物样本基因组 DNA 提取按 Qiagen 公司 Puregene blood core kit B 及上海华舜生物技术有限公司的柱式小量组织/细胞基因组 DNA 抽提试剂盒推荐方法进行。提取的基因组 DNA -20°C 保存备用。

1.3 PCR 检测类似北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)存在形式片段

参照已发表恒河猴基因组 14 号染色体序列 (Genbank no. NC_007871.1), 经序列分析找到北平顶猴 *CypA* 插入 *TRIM5* 的大致位置, 在此插入位置两端, 即 *TRIM5* intron 7 内部设计上游引物 P8F: 5'-TCTGAACAAGTTTCCTCCCA-3', *TRIM5* exon8 3'-UTR 后端设计下游引物 P8R: 5'-TAGTTTCCCTG AAGGCACAA-3', 利用此对引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μL , 以 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 为模板。PCR 反应条件为: 94°C

预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 50.3°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2.5 min, 共 30 个循环; 最后在 72°C 延伸 10 min。Taq-PCR 及 Ex Taq-PCR 试剂盒购自 Takara 公司。

1.4 PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*)存在形式片段

参照已发表恒河猴基因组 14 号染色体序列 (Genbank no. NC_007871.1), 经序列分析找到鹰猴 *CypA* 插入 *TRIM5* 的大致位置, 在此插入位置两端即 *TRIM5* intron 6 内部及 exon8 的 5'端, 利用引物 T5in6F1 和 T5ex8R3(Kuang et al, 2009)进行 PCR 扩增。PCR 反应的总体积为 25 μL , 用 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 为模板。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 58.5°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后在 72°C 延伸 7 min。Taq-PCR 及 Ex Taq-PCR 试剂盒购自

Takara 公司。

1.5 PCR 产物克隆及测序分析

根据 1.3 节及 1.4 节 PCR 检测结果, 各选取部分 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化, Gel Extraction Mini Kit (上海华舜生物技术有限公司)回收后克隆至 pMD 19-T simple Vector (Takara), 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 利用氨苄青霉素抗性筛选并挑取单克隆后, 送公司测序。测序结果应用 DNASTar Megalign、Bioedit 及 DNAssist 等程序进行序列比对与分析。

1.6 *Nsi*I 酶切反应检测 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点 G-to-T 突变

根据 1.4 PCR 检测结果, 选取部分 PCR 产物, 利用限制性内切酶 *Nsi*I (Fermentas 公司) 进行酶切反应, 酶切产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 熊猴 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型的发现及其 *TRIMCyp* 形成方式分析

我们对 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 进行了类似北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)存在形式片段的 PCR 检测。根据设计, 使用引物 P8F 和 P8R 进行 PCR 扩增时, 含有类似北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)存在形式片段的猴个体样本将被扩增产生 1 条 2.8 kb 左右的 DNA 片段; 而不含有上述存在形式片段, 但只存在 *TRIM5* 的猴个体样本将被扩增出 1 条 2.0 kb 左右的 DNA 片段。检测结果显示: 4 种灵长类动物 110 个猴个体样本中, 藏酋猴、红面猴及恒河猴样本均只产生 1 条 2.0 kb 左右

的 DNA 片段(图 2), 表明这 3 种猴个体均只存在 *TRIM5 α* 。在对 14 个熊猴样本的检测中, 发现分别来自越南西贡和中国云南的 2 只熊猴(A1 和 A2)样本出现了 2.8 kb 左右及 2.0 kb 左右的双重条带, 并且其 2.8 kb 左右条带与北平顶猴样本扩增出的 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)条带大小相一致(图 2)。提示这 2 只熊猴个体可能呈现 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型。

在藏酋猴、红面猴及恒河猴样本, 各选取了部分样本的 PCR 产物, 进行了胶回收, 纯化后 TA 克隆, 对新发现的产生双重条带的 2 只熊猴样本及只产生 1 条 2.0 kb 左右条带的熊猴样本中的部分样本, 也进行了 PCR 产物的回收, 纯化及 TA 克隆, 然后将克隆样本送公司测序后发现, 上述 2 只熊猴产生的双重条带中, 2.8 kb 左右的条带即为 *TRIMCyp*, 而 2.0 kb 左右的条带即为 *TRIM5 α* , 其它只产生 1 条 2.0 kb 左右条带的猴样本均只存在 *TRIM5 α* 。

对 2 只熊猴(A1 和 A2)样本的 *TRIMCyp* 片段进行序列分析后发现, 其 *CypA* 假基因均插入至 *TRIM5* 基因座的 3'-UTR 区域, 并且 *CypA* 假基因两端均存在靶位点重复序列(target site duplication, TSD), 这与 LINE1 元件介导的逆转录转座特征序列相同, 可见其 *TRIM5-CypA* 融合基因的形成方式与北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)的形成方式相似(图 3)。基因序列分析表明, 该融合基因与北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)高度同源。2 只熊猴(A1 和 A2)样本的 *TRIMCyp* 序列结果已提交 NCBI GenBank, 获得的序列号(accession numbers)分别为 HQ602649 及 HQ602650。

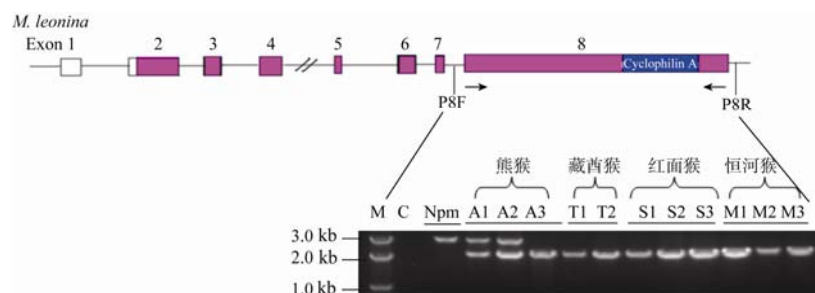


图 2 PCR 检测类似北平顶猴 *TRIMCyp*(*npmTRIMCyp*)存在形式片段

Fig. 2 PCR amplification of fragments like *npmTRIMCyp*

引物 P8F 与 P8R 扩增类似 *npmTRIMCyp* 基因片段产物为 2.8 kb 左右, 扩增 *TRIM5* 基因片段产物为 2.0 kb 左右; M: DNA 标记; C: H₂O; Npm: 北平顶猴; A1(M.assVm), A2(M.assY9), A3: 熊猴; T1,T2: 藏酋猴; S1, S2, S3: 红面猴; M1, M2, M3: 中国恒河猴。

Reactions with P8F/P8R primer pair generated about a 2.8kb fragment of *TRIM5-CypA* locus like *npmTRIMCyp* and a 2.0kb fragment of *TRIM5* locus. M: DNA marker. C: H₂O. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). A1(M.assVm), A2(M.assY9), A3: *M. assensis*. T1,T2: *M. thibetana*. S1, S2, S3: *M. arctoides*. M1, M2, M3: Chinese *M. mulatta*.

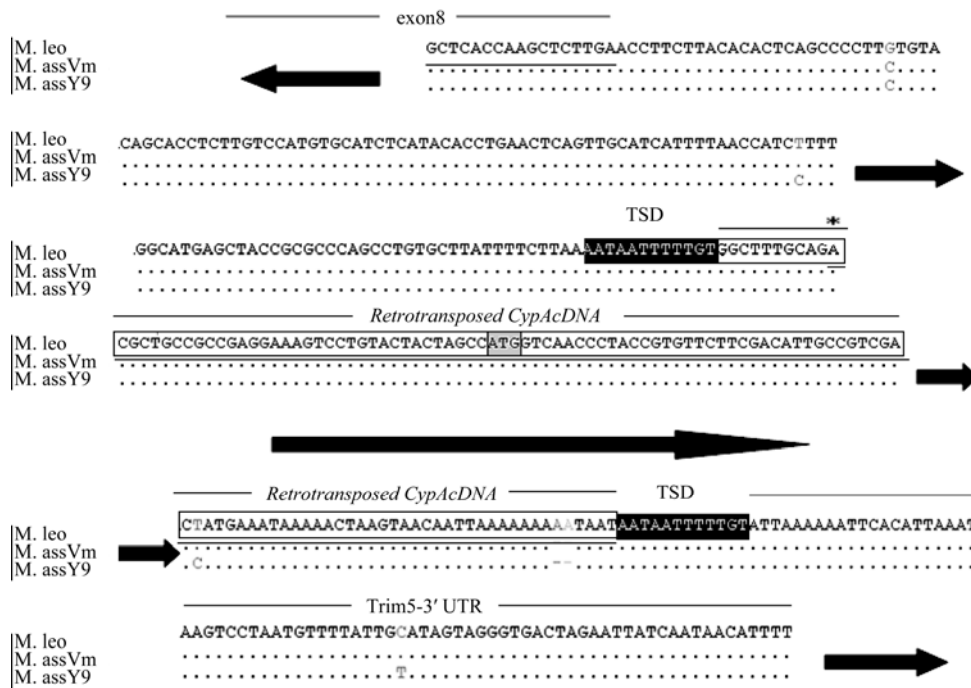


图 3 北平顶猴与熊猴 *TRIMCyp* 融合基因序列比对及基因结构比较

Fig. 3 Sequence alignment and genomic structure comparison of *TRIMCyp* gene of *Macaca leonina* and *M. assamensis*

M.leo: 北平顶猴 *TRIMCyp* 融合基因; M.assVm 及 M.assY9: 熊猴 *TRIMCyp* 融合基因; 深色阴影区域表示 TSD 序列; 星号标注的核苷酸: CypA 转录拼接 5'起始点; 黑色框: 逆转座插入的 CypA cDNA; 浅色阴影区域: CypA 假基因翻译起始位点; 下划线基因序列: 外显子; 无下划线基因序列: 内含子。

M.leo: *npmTRIMCyp*. M.assVm 及 M.assY9: *TRIMCyp* of *Macaca assamensis*. The 12-bp target site duplication (TSD) is shaded and highlighted in black. The asterisk (*) meant splice acceptor. The black frame showed the inserted CypA cDNA sequence. The 'natural' CypA start codon is shaded and highlighted in gray. The exons of *TRIMCyp* and the *TRIM5* exon8 are underlined. The introns are not underlined.

2.2 PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp(omTRIMCyp)* 存在形式片段及测序验证

我们又对 110 个灵长类动物样本的基因组 DNA 进行了类似鹰猴 *TRIMCyp(omTRIMCyp)* 存在形式片段的 PCR 检测。根据设计, 使用引物 T5in6F1 和 T5ex8R3 进行 PCR 扩增时, 含有类似鹰

猴 *TRIMCyp(omTRIMCyp)* 存在形式片段的猴个体样本将被扩增产生 1 条 1.5 kb 左右的 DNA 片段, 而不含有上述存在形式片段的猴个体样本将被扩增出 1 条 705 bp 左右的 DNA 片段。检测结果显示: 4 种灵长类动物 110 个猴个体样本均只产生 1 条 705 bp 左右的条带(图 4), 表明这些猴个体均不存在类

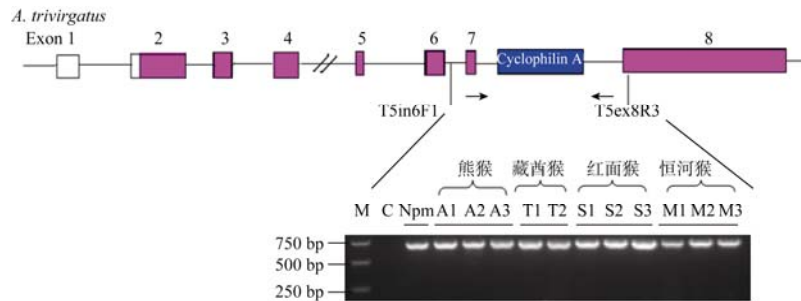


图 4 PCR 检测类似鹰猴 *TRIMCyp(omTRIMCyp)* 存在形式片段

Fig. 4 PCR amplification of fragments like *omTRIMCyp*

引物 T5in6F1 与 T5ex8R3 扩增类似 *omTRIMCyp* 基因片段产物为 1.5 kb 左右, 扩增 *TRIM5* 基因片段产物为 705 p 左右。M: DNA 标记; C: H₂O; Npm: 北平顶猴; A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2。

Reactions with T5in6F1/ T5ex8R3 primer pair generated about a 1.5 kb fragment of *TRIM5-CypA* locus like *omTRIMCyp* and a 705 bp fragment of *TRIM5* locus. M: DNA marker. C: H₂O. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2.

似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*)融合形式。然后,我们在4种灵长类动物样本中,各选取了部分样本的PCR产物,进行了胶回收,纯化后TA克隆,最后将克隆样本送公司测序,测序结果证实了上述结论。

2.3 *TRIM5*内含子6的3'-剪接位点G-to-T突变检测

在内含子6上游的1个限制性内切酶 *NisI* 的酶切位点的突变和3'-剪接位点的突变在染色体遗传上是紧密连锁的。由于该3'-剪接位点的突变可以阻止或降低 *TRIM5* 表达形成 α 异构体即 *TRIM5 α* ,从而致使其可能与 *CypA* 插入 *TRIM5* 3'-UTR 直接相关 (Newman et al, 2008; Liao et al, 2007)。我们前期研究发现,在北平顶猴融合基因 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)的2个主要转录剪接体中, *TRIM5* 的外显子7和8均被选择性地剪接删除 (Liao et al, 2007)。对造成该结果的原因进行分析后发现其也可能与3'-剪接位点的突变有关。我们通过对11只北平顶猴样本和2个中国恒河猴样本进行PCR扩增包含内含子6的1个片段,然后,通过限制性内切酶 *NisI* 酶切分析该片段的大小及对扩增的PCR产物进行测序后发现,在所有北平顶猴 *TRIM5* 内含子6的3'-剪接位点均存在G-to-T突变,而作为对照的中国恒河猴样本的PCR产物均没有发现该突变位点的存在。这很好地解释了 *TRIM5* 的外显子7被选择性地剪接删除的原因,但在内含子7中却没有检测到类似的3'-剪接位点突变存在。因此,外显子8被转录剪接删除的具体机制不明 (Kuang et al, 2009)。

由于“结果2.2节”中进行PCR检测的引物 T5in6F1 和 T5ex8R3 与我们前期研究中进行PCR扩增所用的引物相同。因此,“结果2.2节”中所得到的PCR产物即为包含内含子6的1个片段,大小为705 bp。本实验中选取了“结果2.2节”中那部分进行了TA克隆及测序的PCR产物,并对其进行了限制性内切酶 *NisI* 的酶切反应。结果发现,2只熊猴样本(A1和A2)经 *NisI* 酶切后,产生3条带,其中2条带大小分别为460 bp和245 bp,与上述我们的前期研究工作中北平顶猴样本的酶切产物一致,而另1条带大小仍为705 bp,只是条带亮度较酶切前变暗。而其他灵长类动物样本的PCR产物经 *NisI* 酶切后,均未发生变化,仍保持其705 bp的片段大小及亮度(图5A)。以上结果提示我们,这2只熊猴样本(A1和A2)可能在其 *TRIM5* 内含子6的3'-剪接位点的G-to-T突变上存在杂合现象,而其他灵长类动物样本则可能不存在该位点突变。

为了进一步证实该结果,我们对酶切前PCR产物的TA克隆样本的测序结果进行了序列分析。证明在这2只熊猴样本(A1和A2)的 *TRIM5* 内含子6的3'-剪接位点的G-to-T突变上确实存在杂合现象,而其他灵长类动物样本没有发现该位点存在突变(图5B)。

3 讨论

3.1 熊猴地理分布及亚种分析

熊猴(Assam Macaque, *Macaca assamensis*)是一种产于印度、尼泊尔、越南以及中国云南、广西、西藏等地区的灵长类猕猴属动物。熊猴主要分为东熊猴(eastern Assamese macaque, *M. assamensis assamensis*)和西熊猴(western Assamese macaque, *M. assamensis pelops*) 2个亚种 (Groves, 2001)。东熊猴主要分布在不丹、中国西南部(广西、贵州、西藏、云南)、印度东北部、老挝北部、缅甸、泰国西北部及越南北部等地区。西熊猴主要分布在孟加拉国、不丹、印度北部和尼泊尔等地区 (Groves, 2001)。本研究中所用熊猴样本来自越南西贡和中国云南,从熊猴亚种的地理分布上观察,我们取样的这些熊猴可能同属于东熊猴这个亚种,因而其基因组水平差异可能较小。对这些熊猴样本进行类似北平顶猴 *TRIMCyp* (*npmTRIMCyp*)及类似鹰猴 *TRIMCyp* (*omTRIMCyp*) 2种不同的 *TRIM5-CypA* 基因融合模式检测,我们首次发现分别来自越南西贡和中国云南的2只熊猴样本 (*M. assVm* 及 *M. assY9*) (表1)均存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型,并且二者序列同源性很高。这也从基因水平上支持了我们用于本研究的这些熊猴可能同属于一个亚种的结论。

3.2 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型在灵长类动物中的存在情况及其所占比例分析

在新大陆猴的鹰猴中, *TRIM5-CypA* 融合基因均以 *TRIMCyp* 纯合子基因型存在,不存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型。在旧大陆猴中, *TRIM5-CypA* 融合基因的存在形式及比例具有一定的种间差异。Newman et al (2008) 对101只印度恒河猴及16只平顶猴样本进行 *TRIM5-CypA* 融合基因检测后发现,101只印度恒河猴样本中,有17个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因,其中16个样本为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型,1个样本为 *TRIMCyp* 纯合子基因型, *TRIM5-CypA* 融合基因存在比例约为17%,其中 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基

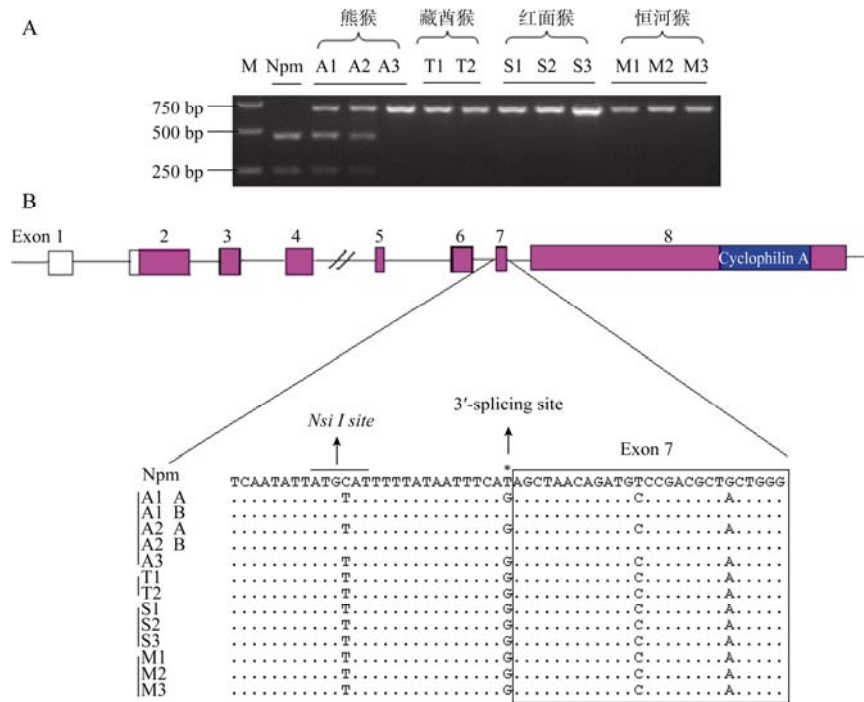


图 5 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点突变分析

Fig. 5 Analysis the G-to-T mutation in the 3'-splicing site of *TRIM5* intron 6

A) 限制性内切酶 *NsiI* 酶切 PCR 产物电泳检测内含子 6 中 3'-剪接位点的突变。M: DNA 标记; Npm: 北平顶猴; A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2; B) 测序分析内含子 6 中 3'-剪接位点的突变。A1 (A, B), A2 (A, B) 分别表示样本 A1 和 A2 的不同克隆。A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 同图 2。黑框表示 *TRIM5* 的外显子 7; 星号表示 3'-剪接位点; 划线区域表示 *NsiI* 识别序列。

A) The PCR products were digested with restriction endonuclease *NsiI*, followed by electrophoresis in agarose gel. M: DNA marker. Npm: Northern pig-tailed macaque (*Macaca leonina*). A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2; B) Sketch map and sequence of 3'-splicing site in *TRIM5* intron 6. A1 (A, B), A2 (A, B) represents the different TA clones of A1 and A2. A1,A2,A3,T1,T2,S1,S2,S3,M1,M2,M3 as described in Fig. 2. The boxes represent the exon7 of the *TRIM5* genome, and the lines represent the introns. The 3'-splicing site is indicated by the asterisk (*), and the *NsiI* recognition sequence is lined.

因型占总的 *TRIM5-CypA* 融合基因比例约为 94%。而 16 只平顶猴样本均存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 且皆为 *TRIMCyp* 纯合子基因型(Newman et al, 2008)。本实验室及国际上多个实验室在对北平顶猴、平顶猴及食蟹猴的 *TRIM5-CypA* 融合基因进行检测后, 也都发现所有研究样本均存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 且皆为 *TRIMCyp* 纯合子基因型(Liao et al, 2007; Brennan et al, 2008; Kuang et al, 2009)。Wilson et al (2008)在对 31 只印度恒河猴及 38 只中国恒河猴样本进行 *TRIM5-CypA* 融合基因检测后发现, 31 只印度恒河猴样本中, 16 个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 其中 15 个样本为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型, 1 个样本为 *TRIMCyp* 纯合子基因型, *TRIM5-CypA* 融合基因存在比例约为 51.6%, 其中 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型占总的 *TRIM5-CypA* 融合基因比例约为 94%, 而 38 只中国恒河猴样本均不存在 *TRIM5-CypA* 融合基因。由此可见, *TRIMCyp* 纯合子基因型可能主要

存在于鹰猴和平顶猴群体中, 并在这 2 个物种中得以固定并稳定遗传。由于受到地理环境因素及古代逆转录病毒选择压力的影响, *TRIM5-CypA* 融合基因在印度恒河猴中以一定比例存在, 并且保持 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型占绝大多数, 而中国恒河猴则不存在 *TRIMCyp* 基因, 并且这种现象也可能在猕猴属的其他物种中存在。

本研究首次在 14 只熊猴样本中发现了 2 个样本存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 且均为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型, *TRIM5-CypA* 融合基因存在比率为 14%, 而在包括中国恒河猴在内的其他 3 种灵长类动物中均未发现以任何形式存在的 *TRIM5-CypA* 融合基因, 这与上述其他实验室对印度恒河猴和中国恒河猴的研究结果较为相似。当然, 由于本研究所涉及的 4 种灵长类动物数量有限, 且产地不一。因此, 还不能确定是否熊猴存在 *TRIMCyp* 纯合子基因型及其所占比例, 也还不能确定其他 3 种灵长类动物是否真正不存在 *TRIM5-CypA*

融合基因。

3.3 *TRIM5* 内含子 6 3'-剪接位点的突变可能与 *CypA* 插入 *TRIM5* 3'-UTR 直接相关

国际上多个实验室先后发现在平顶猴和印度恒河猴的 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点, 存在 G-to-T 的单核苷酸突变现象, 并且认为该突变可能与其下游 exon7 的缺失有关(Brennan et al, 2007; Wilson et al, 2008)。Newman et al (2008)在对印度恒河猴 *TRIM5* 基因座进行测序时也发现其内含子 6 的 3'-剪接位点存在 G-to-T 突变, 并认为该突变可能会干扰 mRNA 的剪接过程。同时, 还发现在该突变位点上游 16 个核苷酸处偶联了另一个能够产生 *NsiI* 限制性核酸内切酶识别位点的单核苷酸突变。于是, 他们利用 PCR 及 *NsiI* 酶切反应对 101 只印度恒河猴及 16 只平顶猴样本进行 3'-剪接位点的 G-to-T 突变检测, 发现在 101 只印度恒河猴样本中, 84 个样本无 G-to-T 突变(G/G), 16 个样本存在 G-to-T 突变杂合现象(G/T), 1 个样本存在 G-to-T 突变纯合现象(T/T)。16 只平顶猴样本则均为纯合的 G-to-T 突变(T/T)。通过对上述所有样本进行 *TRIM5-CypA* 融合基因检测后发现, 3'-剪接位点的 G-to-T 突变存在与否及其存在形式与其 *TRIM5* 3'-UTR 是否存在 *CypA* 插入现象及其形成的 *TRIM5-CypA* 融合基因的基因型密切相关, 即(G/G) 对应 *TRIM5 α* 纯合子, (G/T) 对应形成 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子, (T/T) 对应形成 *TRIMCyp* 纯合子。我们在 11 只北平顶猴样本中, 也发现存在 G-to-T 突变及 *CypA* 插入 *TRIM5* 3'-UTR 现象, 并且所有 11 个样本均为纯合的 G-to-T 突变(T/T) 及对应形成 *TRIMCyp* 纯合子(Kuang et al, 2009)。由此可见, *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的纯合 G-to-T 突变(T/T) 及对应形成的 *TRIMCyp* 纯合子均在平顶猴群体中得以固定并稳定遗传。本论文研究中, 通过 PCR/*NsiI* 酶切反应及测序对 4 种灵长类动物共 110 个样本 *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的突变进行检测后发现, 在 14 只熊猴样本中, 有 2 个样本(M.assVm 及 M.assY9) 存在 G-to-T 突变杂合现象(G/T), 而且其 *TRIM5* 3'-UTR 也对应有 *CypA* 插入现象且形成 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子。这与上述 Newman et al (2008) 在 16 个印度恒河猴样本中发现的结果相一致。而其他 108 个样本均既无 G-to-T 突变(G/G), 也不形成 *TRIM5-CypA* 融合基因, 而只存在 *TRIM5 α* 。

综上所述, 我们发现 *TRIM5* 内含子 6 3'-剪接位点的突变与 *CypA* 插入 *TRIM5* 3'-UTR 密切相关, 并且两者的存在形式相互对应。因此可通过检测 *TRIM5* 内含子 6 中 3'-剪接位点的突变及其存在形式来预测其是否存在类似北平顶猴模式的 *TRIM5-CypA* 融合现象及其形成的融合基因的基因型。当然, 还有许多问题有待进一步研究, 诸如: *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点突变与 *CypA* 插入 *TRIM5* 3'-UTR 是否存在必然联系, 若存在, 两者的因果关系如何, 为什么两者可以在同一个物种中同时被固定下来并表现为相对应的基因型。

3.4 熊猴 *TRIMCyp* 主要转录剪接体及 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子功能预测

之前有很多研究表明, 在平顶猴及印度恒河猴的 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的 G-to-T 突变可能会干扰 mRNA 的剪接过程, 从而导致 *TRIM5* 外显子 7 的缺失(Brennan et al, 2007; Wilson et al, 2008; Kuang et al, 2009)。本研究中存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型的 2 只熊猴样本(A1 和 A2), 其 *TRIM5* 内含子 6 的 3'-剪接位点的 G-to-T 突变上也存在(G/T) 杂合现象, 这暗示熊猴(A1 和 A2) 融合基因 *TRIMCyp* 在其形成主要转录剪接异构体的转录剪接过程中, 可能其 *TRIM5* 的外显子 7 也会像北平顶猴一样被选择性地剪切删除。同样, 我们对外显子 8 被转录剪接删除的原因也进行了分析, 但在内含子 7 中没有检测到类似的 3'-剪接位点突变存在, 这与我们前期研究工作中对北平顶猴内含子 7 的检测结果相一致(Kuang et al, 2009)。因此, 其外显子 8 是否会像北平顶猴一样被选择性地剪切掉, 如果能被剪切掉, 那么产生该现象的具体机制又是如何? 另外, 由于北平顶猴 *npmTRIMCyp* 不能够限制 HIV-1 的复制, 可能主要是由于其外显子 7 的缺失造成的。因此推测, 熊猴(A1 和 A2) 融合基因 *TRIMCyp* 可能也不能够限制 HIV-1 的复制。而大多数旧大陆猴由于其 *TRIM5 α* 分子的作用使其都不能感染 HIV-1, 熊猴属于旧大陆猴的成员, 因此其 *TRIM5 α* 分子也可能限制 HIV-1 的复制, 但是否确实如此还未见报道。本研究首次在熊猴中发现存在 *TRIM5-CypA* 融合基因, 并进一步确定其为 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型, 但是具有该基因型的熊猴能否限制 HIV-1 或其他逆转录病毒的复制? 若能限制, 其具体机制如何? 其 *TRIM5 α* 蛋白和 *TRIMCyp* 蛋白在限制病毒复制过程中各自发挥的

作用是什么? 这些问题还有待进一步的研究。

TRIMCyp 纯合子基因型的北平顶猴对 HIV-1 易感, 并且其作为 HIV-1 感染动物模型已经取得了较好的研究结果, 但数量有限。据调查, 熊猴的野外种群数量较北平顶猴多, 并且在中国云南及东南亚一带分布较广, 易于进行繁殖和驯化。如果本研究中发现存在 *TRIM5/TRIMCyp* 杂合子基因型的熊猴能够对 HIV-1 稳定易感, 那么它将有成为新型的

HIV-1 感染艾滋病灵长类动物模型, 对艾滋病的预防和治疗及体内 HIV-1 感染和复制机制研究发挥重要作用。

致谢: 感谢本所灵长类实验动物中心吕龙宝老师在收集样本上给予的帮助。本实验室戴正喜博士生和姚志红博士生在实验上也提供了大力支持, 一并表示衷心的感谢。

参考文献:

- Bieniasz PD. 2004. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack[J]. *Nat Immunol*, **5**(11): 1109-1115.
- Brennan G, Kozyrev Y, Kodama T, Hu SL. 2007. Novel TRIM5 isoforms expressed by *Macaca nemestrina*[J]. *J Virol*, **81**(22): 12210-12217.
- Brennan G, Kozyrev Y, Hu SL. 2008. TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3569-3574.
- Diaz-Griffero F, Vandegraaff N, Li Y, McGee-Estrada K, Stremlau M, Welikala S, Si Z, Engelman A, Sodroski J. 2006. Requirements for capsid-binding and an effector function in TRIMCyp-mediated restriction of HIV-1 [J]. *Virology*, **351**(2): 404-419.
- Franke EK, HE Y, Luban J. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions[J]. *Nature*, **372**(6504): 359-362.
- Gao G, Guo X, Goff SP. 2002. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein [J]. *Science*, **297**(5587): 1703-1706.
- Groves CP. 2001. Primate Taxonomy [M]. Washington, DC, USA: Smithsonian Institution Press.
- Hatzioannou T, Ambrose Z, Chung NP, Piatk M Jr, Yuan F, Trubey CM, Coalter V, Kiser R, Schneider D, Smedley J, Pung R, Gathuka M, Estes JD, Veazey RS, KewalRamani VN, Lifson JD, Bieniasz PD. 2009. A macaque model of HIV-1 infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(11): 4425-4429.
- Kuang YQ, Tang X, Liu FL, Jiang XL, Zhang YP, Cao G, Zheng YT. 2009. Genotyping of TRIM5 locus in northern pig-tailed macaques (*Macaca leonina*), a primate species susceptible to Human Immunodeficiency Virus type 1 infection [J]. *Retrovirology*, **6**: 58.
- Li X, Song B, Xiang SH, Sodroski J. 2007. Functional interplay between the B-box 2 and the B30.2(SPRY) domains of TRIM5alpha [J]. *Virology*, **366**(2): 234-244.
- Liao CH, Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT, Su B. 2007. A novel fusion gene, TRIM5-Cyclophilin A in the pig-tailed macaque determines its susceptibility to HIV-1 infection [J]. *AIDS*, **21** (Suppl 8): S19-26.
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B [J]. *Cell*, **73**(6): 1067-1078.
- Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu [J]. *Nature*, **451**(7177): 425-430.
- Newman RM, Hall L, Kirmaier A, Pozzi LA, Pery E, Farzan M, O'Neil SP, Johnson W. 2008. Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys [J]. *PLoS Pathog*, **4**(2): e1000003.
- Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW. 2004. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(36): 13324-13328.
- Ribeiro IP, Menezes AN, Moreira MA, Bonvicino CR, Seuanez HN, Soares MA. 2005. Evolution of cyclophilin A and TRIMCyp retrotransposition in New World primates [J]. *J Virol*, **79**(23): 14998-15003.
- Sawyer SL, Wu LI, Emerman M, Malik HS. 2005. Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**(8): 2832-2837.
- Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1 [J]. *Nature*, **430**(6999): 569-573.
- Schaller T, Hue S, Towers GJ. 2007. An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins [J]. *J Virol*, **81**(21): 11713-11721.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein [J]. *Nature*, **418**(6898): 646-650.
- Si Z, Vandegraaff N, O'Huigin C, Song B, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco WA, Engelman A, Dean M, Sodroski J. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**(19): 7454-7459.
- Song B, Gold B, O'Huigin C, Javanbakht H, Li X, Stremlau M, Winkler C, Dean M, Sodroski J. 2005. The B30.2(SPRY) domain of the retroviral restriction factor TRIM5 α exhibits lineage-specific length and sequence variation in primates [J]. *J Virol*, **79**(10): 6111-6121.
- Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys [J]. *Nature*, **427**(6977): 848-853.
- Tang X, Kuang YQ, Zheng YT. 2009. Research advance of TRIM5 α on structure and restriction mechanism to HIV-1 replication [J]. *Chin J Virol*, **25**(2): 148-153. [汤霞, 况轶群, 郑永唐. 2009. TRIM5 α 分子结构和限制 HIV-1 复制机制的研究进展. 病毒学报, **25**(2): 148-153.]
- Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions [J]. *Nature*, **372**(6504): 363-365.
- Towers GJ. 2007. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A [J]. *Retrovirology*, **4**: 40.
- Virgen CA, Kratovac Z, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2008. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3563-3568.
- Wilson SJ, Webb BL, Ylinen LM, Verschoor E, Heeney JL, Towers GJ. 2008. Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(9): 3557-3562.
- Wolf D, Goff SP. 2007. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells [J]. *Cell*, **131**(1): 46-57.
- Xu L, Yang L, Moitra PK, Hashimoto K, Rallabhandi P, Kaul S, Meroni G, Jensen JP, Weissman AM, D'Arpa P. 2003. BTBD1 and BTBD2 colocalize to cytoplasmic bodies with the RBCC/tripartite motif protein, TRIM5 δ [J]. *Exp Cell Res*, **288**(1): 84-93.
- Ylinen LM, Keckesova Z, Webb BL, Gifford RJ, Smith TP, Towers GJ. 2006. Isolation of an active Lv1 gene from cattle indicates that tripartite motif protein-mediated innate immunity to retroviral infection is widespread among mammals [J]. *J Virol*, **80**(15): 7332-7338.
- Zhang F, Hatzioannou T, Perez-Caballero D, Darse D, Bieniasz PD. 2006. Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins [J]. *Virology*, **353**(2): 396-409.