

NS5B 与 HCV 负链 RNA 3' 末端特异性结合的分析*

黄志明 黄开红¹⁾** 邓庆丽 王巍 邵静

(中山医科大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广州 510120)

摘要 NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 在病毒 RNA 合成过程中起到中心催化酶的作用. 在大肠杆菌中表达和提纯了 GST-NS5B 融合蛋白, 应用紫外交联试验 (UV cross-linking) 检测 NS5B 与丙型肝炎病毒 (HCV) 负链 RNA 3' 末端的结合, 确定 NS5B 是否参与 HCV 负链 RNA 3' 末端复制体的形成. NS5B 可与 HCV 负链 RNA 3' 末端发生结合, 这种结合存在量效关系, 比与正链 RNA 3' UTR X 区的结合强约 10 倍, 超大量的非同源性 RNA 和蛋白质不能竞争抑制 NS5B 与负链 RNA 3' 末端的结合, 证明这种结合存在特异性. 结果提示 NS5B 是 HCV 负链 RNA 3' 末端复制体的成分之一.

关键词 丙型肝炎病毒 (HCV), NS5B, 复制体

学科分类号 Q78

HCV 属披盖病毒黄病毒科 (flaviviruses) 单一正链 RNA 病毒, 全长约 9.3~9.4 kb, 包括一个单一的长开放读框和两端非译码区. 该开放读框编码约 3 000 个氨基酸的聚合蛋白, 通过宿主单一的肽酶和两个病毒本身的蛋白酶产生 10 个以上的结构和非结构蛋白. 国外多家实验室^[1~3] 已经明确 HCV 编码的非结构蛋白 NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 在 RNA 合成过程中起到中心催化酶的作用. 从某些已经研究得比较清楚的单一正链 RNA 病毒如脊髓灰质炎病毒的复制来看, RNA 依赖性 RNA 聚合酶与病毒本身编码的其他非结构蛋白和宿主蛋白一起结合到病毒 RNA 3' 端非译码区 (UTR), 共同形成复制体参与病毒的复制. 单一正链 RNA 病毒的复制是从亲代正链 3' UTR 开始的, 首先合成复制中间体 (即负链 RNA), 然后从中间体的 3' 末端开始再合成子代正链 RNA. 已经清楚, 正链 RNA 复制体由 NS5B、NS3、NS5A、NS4B 以及宿主蛋白 PTB 组成. 然而由于 HCV 正链和负链 RNA 3' 末端核苷酸序列的差异必定造成 RNA 二级结构的不同, 理论上复制体的组成也肯定有差异. 基于负链 RNA 复制体尚未清楚, 我们用紫外光交联试验检测了 NS5B 蛋白与 HCV 复制中间体负链 RNA 3' UTR 的互相作用, 发现 NS5B 可特异性地与负链 RNA 3' UTR 结合, 提示 NS5B 蛋白是 HCV 负链 RNA 复制体的组成成分.

1 材料和方法

1.1 材料

NS5B 重组蛋白表达质粒由日本友人山下龟也

博士赠送, 蛋白质表达和提纯方法按其介绍的方法进行^[3]. GST-蛋白质印迹 Kit 购自宝灵曼公司, 操作按说明书进行.

1.2 HCV 负链 3' 末端 RNA 探针的合成及纯化

将 HCV cDNA 5' UTR (核苷酸位点 1~585) 反向插入 pGEM^{3Z(+)} Sma I 位点, 在 T7 启动子控制下合成负链 3' 末端 RNA. 合成 RNA 探针前, 位于 UTR 插入位点下游的限制性内切酶 *Hind* III 将转录质粒 (pT73' UTR) 线性化.

RNA 合成试剂盒 (Riboprobe Kit) 购自 Promega 公司, 按说明书合成探针, 每次反应总体积为 50 μ L. [α -³²P]-UTP (111×10^3 Bq/mmol) 和 [α -³²P] CTP (111×10^3 Bq/mmol) 购自 Amersham 公司. 合成的探针用 6% 聚丙烯酰胺变性胶电泳分离^[4], 探针在乙醇中保存于 -20℃. 使用前离心沉淀, 沉淀物溶解于 MMK 缓冲液^[5] (20 mmol/L MOPS pH 7.4, 60 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂), 反应前在 45℃ 水浴中孵育 30 min.

1.3 紫外线交联试验 (UV cross-linking)

参照 Furuya^[6] 的实验步骤进行并加以适当改进. 简单地说, 约 50 ng 的 NS5B 蛋白与约 0.6 ng 标记的 RNA 在含 10 μ g 酵母 tRNA 的反应液中冰浴 10 min, 用 254 nm 的紫外光源照射 20 min, 距

* 广东省自然科学基金 (990098, 990101) 和中山医科大学 "211" 工程重点学科资助项目.

** 通讯联系人.

¹⁾ 中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科, 广州 510120.

Tel: 020-81332415, E-mail: gldeng3@163.net

收稿日期: 2000-06-23, 接受日期: 2000-09-28

离约 1.5 cm, 然后加 RNase A 和 RNase T₁ 各 1 μ g, 37 $^{\circ}$ C 消化 30 min, 加等体积的 2 $\times$ 加样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经醋酸和甲醇处理后干胶, -70 $^{\circ}$ C 冰箱中置 X 光片曝光过夜。

2 结 果

2.1 NS5B 融合蛋白质的表达纯化

根据 Yamashita 等^[3]的方法, 我们从 1 L 的培养物中纯化 GST-NS5B 融合蛋白, 获取的纯化蛋白质量约 1 mg. 图 1 所示为 NS5B 融合蛋白的蛋白质印迹的结果, 图 1 中显示了两个蛋白质与抗-GST 抗体反应, 大小约为 95 ku 和 26 ku. 95 ku 蛋白为 GST-NS5B 融合蛋白, 26 ku 蛋白为 GST, 与山下等纯化的蛋白质一致。

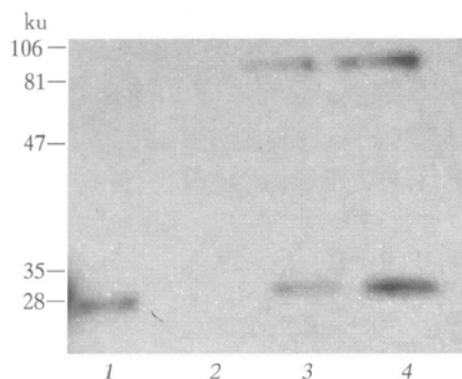


Fig. 1 Western blotting analysis of GST-NS5B fusion protein

1: GST; 2: total protein of *E. coli*. C BL21; 3: purified GST-NS5B fusion protein; 4: GST-NS5B fusion protein control.

2.2 NS5B 能与 HCV 负链 RNA 3' 末端结合

为了了解 NS5B 是否参与 HCV 复制体形成,

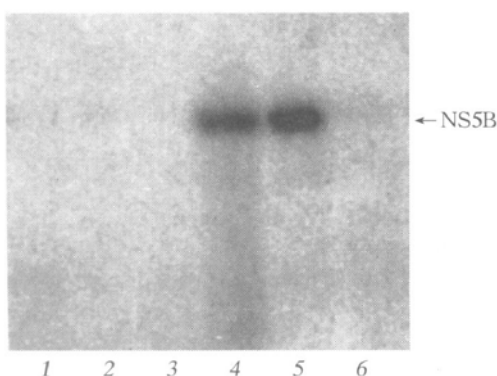


Fig. 2 Interaction of NS5B with 3'-terminal sequences of HCV negative strand by UV-cross linking

1~3: ³²P labelled 5' UTR probe of HCV positive strand; 4~6: ³²P labelled 3'-terminal probe of HCV negative strand; 3, 6: no NS5B; 1, 4: 25 ng NS5B respectively; 3, 5: 50 ng NS5B respectively.

我们用 GST-NS5B 融合蛋白与 HCV 负链 3' 末端

RNA 相互作用 (图 2). 经紫外线交联作用后, 25 ng 的 NS5B 即与负链 3' 末端 RNA 产生了很强的结合, 蛋白质量增至 50 ng 时结合反应更强. 以相对应的 HCV 正链 5' UTR 作对照, 50 ng 的 NS5B 也没有显示结合, 提示 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合在结构上具有互补的关系。

2.3 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合能力

已知 HCV 正链 RNA 3' UTR 的 X 区是复制 RNA 负链的起始区域, NS5B 参与其复制体的构成^[7,8]. 为比较 NS5B 与负链 RNA 3' 末端结合能力是否大于与正链 3' UTR 的结合能力, 我们同时用 NS5B 与 HCV 正链 3' UTR X 区的 RNA 作用和与负链 3' 末端 RNA 相互作用. 从图 3 可以看到, 在 NS5B 的蛋白质量和探针 RNA 的量相同的情况下, NS5B 与负链 3' 末端的结合能力要比与正链 3' UTR X 区的结合能力强约 10 倍, 提示 NS5B 与负链 3' UTR 结合的特异性比正链 3' UTR X 区高。

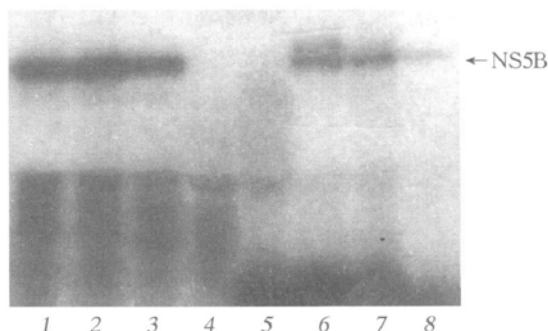


Fig. 3 Interaction of NS5B with 3'-terminal sequences of HCV negative strand and 3' UTR X region of HCV positive strand

1~4: ³²P labelled 3'-terminal probe of HCV negative strand; 5~8: ³²P labelled 3' UTR X probe of HCV positive strand; 4, 5: no NS5B; 1, 6: 100 ng NS5B respectively; 2, 7: 50 ng NS5B respectively; 3, 8: 25 ng NS5B respectively.

2.4 非同源性 RNA 的竞争抑制试验

由于标记的 HCV 负链 3' 末端 RNA 中含有载体 pGEM 中的少量核苷酸, 为排除非同源性 RNA 对 NS5B 与 3' 末端 RNA 结合的影响, 在 T7 RNA 聚合酶启动子的控制下, 以 pGEM³²⁽⁺⁾ 的多聚连接位点的序列为模板合成非标记的 RNA, 分别以相当于探针 100 倍、250 倍、500 倍 RNA 量预先与 NS5B 竞争结合, 并以未标记的 HCV 负链 3' 末端自身 RNA 的 10 倍、50 倍、100 倍作为对照, 如图 4 所示, 未标记的 HCV 负链 3' 末端 RNA 在 100 倍时即能大部分竞争掉 NS5B 的结合, 而 pGEM 的 RNA 在超过探针 500 倍的量时也不减少

NS5B 的结合, 证明 NS5B 与 HCV 负链的结合是特异性的.

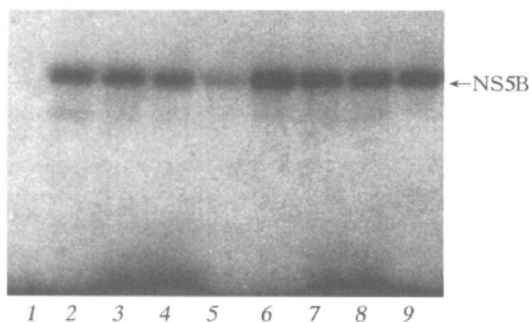


Fig. 4 Competitive interaction of NS5B with heterogeneous RNA
1 ~ 9: ^{32}P labelled 3'-terminal probe of HCV negative strand; 1: no NS5B; 2 ~ 9: 50 ng NS5B respectively; 2, 6: no competitor RNA; 3 ~ 5: 10 $\times$, 50 $\times$, 100 $\times$ non-labelled 3'-terminal RNA; 7 ~ 9: 100 $\times$, 250 $\times$, 500 $\times$ non-labelled pGEM RNA.

2.5 非同源性蛋白未显示与 HCV 负链 3' 末端 RNA 相互作用

为进一步证实 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合是特异性的, 我们用提纯的另一个 HCV 的非结构蛋白 NS5A 以及一个非同源性的蛋白 BSA 与负

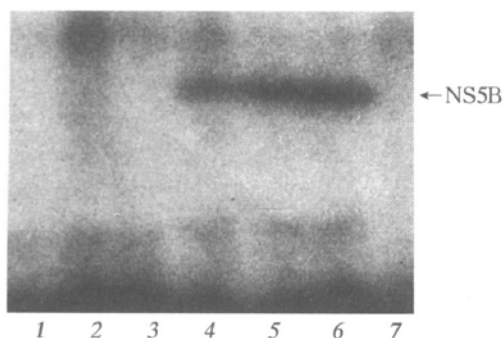


Fig. 5 Interaction of NS5B and NS5A with 3'-terminal sequences of HCV negative strand RNA

1 ~ 3: 25 ng, 50 ng, 100 ng NS5A respectively; 4 ~ 6: 25 ng, 50 ng, 100 ng NS5B respectively; 7: blank control.

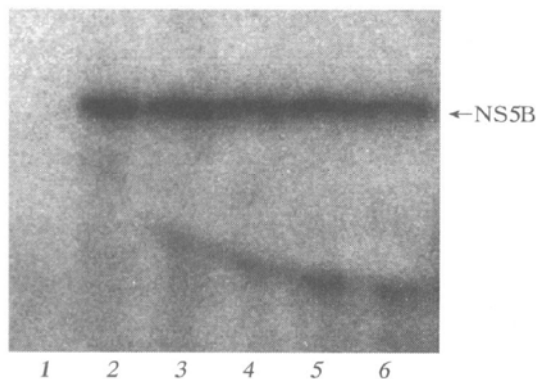


Fig. 6 Competitive interaction of heterogeneous protein with 3'-terminal of HCV negative strand RNA

1: no NS5B; 2 ~ 6: 50 ng NS5B; 3 ~ 6: 100 $\times$, 200 $\times$, 300 $\times$, 400 $\times$ competitor BSA.

链 3' 末端 RNA 相互作用. 从图 5 可以看到 NS5A 在 100 ng 时也没有显示与负链 3' 末端 RNA 结合, 而作为对照的 NS5B 随剂量的增加结合增强. 又如图 6 所示, 超过 NS5B 400 倍过量的小牛血清白蛋白也不影响 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合, 证明 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合具有很强的特异性.

3 讨 论

本文报告应用 UV-crosslinking 试验证明 HCV NS5B 特异性地与 HCV 中间复制体负链 3' 末端 RNA 结合, 这种结合在一定蛋白质量的范围内呈剂量反应关系, 非同源性的 RNA 和蛋白质无法竞争阻断这种结合, 该病毒的其他非结构蛋白如 NS5A 也未显示与负链 3' 末端 RNA 结合, 证明 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合存在着结构上的互补关系.

根据单一正链 RNA 病毒的复制原理, 认为 HCV 的复制发生于膜相关的复制复合物内^[2]. 与其他黄病毒科的病毒复制途径相似, HCV 进入宿主细胞浆并脱衣壳后, 以病毒正链 RNA 为模板, 经翻译及蛋白质裂解后, 利用病毒编码的复制酶经复制体合成负链 RNA, 后者随即作为子代 RNA 合成的模板, 经新的复制体合成多个子代正链 RNA. 在单一正链 RNA 病毒复制的整个过程中, 复制体的形成和复制的启动是关键. 从研究比较清楚的脊髓灰质炎病毒的复制机制中知道, 其复制体的形成需要下列成分参与. a. 作为复制体中心催化酶的病毒本身编码的非结构蛋白, 这种蛋白质具有 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRP) 的活性; b. 病毒本身编码的其他非结构蛋白和/或宿主细胞因子; c. 病毒 RNA 3' 末端的特殊茎环结构, 如脊髓灰质炎病毒 3' UTR 上的三叶状二级结构^[9, 10], 该三叶状结构起到结合病毒非结构蛋白和宿主蛋白的作用; d. 作为复制启动用的引物. 由于 HCV 与脊髓灰质炎病毒同属于黄病毒科, 因此推测这两者之间在复制机理方面具有类似性. 正如在前言中所提及的那样, NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 在病毒 RNA 合成过程中起中心催化酶的作用, 在 HCV 亲代 RNA (正链) 向中间体 RNA (负链) 合成以及从负链 RNA 向子代正链 RNA 合成的过程中, NS5B 如何与 RNA 3' 末端互相作用, 是研究 HCV 复制的分子机理中最关键的部分. Lohmann 等^[2]报告 NS5B 能够结合到正链 RNA 3' UTR, 但这种结合是非特异性的. 从我们的实验结果中也可以看

到, NS5B 与正链 3' UTR X 区的结合能力 (或亲和力) 比与负链 3' 末端的结合能力相差约 10 倍, 提示负链 RNA 3' 末端与 NS5B 结合的位点在二级结构上特异性比正链 3' UTR 强, 而且这种特异性无论是从量反应关系或是与其他非同源性蛋白质和 RNA 的竞争能力上均得到了体现, 从而提示 NS5B 在参与负链 RNA 复制体的形成时与末端 RNA 的茎环结构存在结构上的互补关系, 而与正链 3' UTR X 区可能不存在这种关系或这种关系很弱. 因此, 不难理解 NS5B 与这两者结合的差别, 这种差别也许造成正链 RNA 和负链 RNA 复制体的不同.

目前, 我们正在继续明确 NS5B 与负链 RNA 3' 末端结合的具体区域以及 RNA 的二级结构, 同时我们也正在检测与负链 RNA 3' 末端互相作用的宿主蛋白, 并发现了有一细胞蛋白 p45 能够与之结合, 我们将继续试验该蛋白质结合的特异性.

参 考 文 献

- Behrens S E, Tomei L, Francesco R D. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, 1996, **15** (1): 12~ 22
- Lohmann V, Korner F, Herian U, *et al.* Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol*, 1997, **71** (11): 8416~ 8428
- Yamashita T, Kaneko S, Shiota Y, *et al.* RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the G-terminal region. *J Biol Chem*, 1998, **273** (25): 15479~ 15486
- Gatignol A, Jeang K T. Expression cloning of genes encoding RNA-binding proteins. *Methods in Molecular Genetics*, 1994, **4**: 18~ 28
- Banerjee R, Echererri A, Dasgupta A. Poliovirus-encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative strand RNA. *J Virol*, 1997, **71** (12): 9570~ 9578
- Furuya T, Lai M M. Three different cellular proteins bind to complementary sites on the 5'-end-positive and 7'-end-negative strands of mouse hepatitis virus RNA. *J Virol*, 1993, **67** (12): 7215~ 7222
- Luo G, Hamatake R K, Mathis D M, *et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol*, 2000, **74** (2): 851~ 863
- Cheng J C, Chang M F, Chang S C. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J Virol*, 1999, **73** (8): 7044~ 7049
- Andino R, Rieckhof G E, Achacoso P L, *et al.* Poliovirus RNA synthesis utilities and RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J*, 1993, **12** (9): 3587~ 3598
- Andino R, Rieckhof G E, Baltimore D. A functional ribonucleo-protein complex formed around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell*, 1990, **63** (2): 369~ 380

Hepatitis C Virus (HCV) Encoded Non-structure Protein 5B Specifically Binds to the 3'-Terminal Sequences of Viral Negative Strand RNA*

HUANG Zhi-Ming, HUANG Kai-Hong^{1)**}, DENG Qing-Li, WANG Wei, SHAO Jing

(Medical Research Center, ¹⁾Division of Gastroenterology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) encoded non-structure protein 5B (NS5B) is believed to be a RNA dependent RNA polymerase. GST-NS5B fusion protein was expressed and purified and its ability to bind to the 1~ 585 nucleotides of 3'-terminal negative-strand RNA sequences was examined by UV cross-linking. Results presented here demonstrated that the NS5B binding to this region increased with the dosage of protein. The binding ability of NS5B to 3'-terminal negative-strand RNA sequences was approximately 10 folds higher than to 3' UTR X region of positive-strand RNA. The specificity of NS5B binding to 3'-terminal negative-strand RNA sequences was tested by competition with unlabelled RNA probe or an unrelated RNA/proteins. Results showed that the excess amount of cold probe RNA was able to almost completely compete out the complex resulted from protein-RNA interaction. However unrelated RNA and protein were demonstrated no competition with NS5B. These results suggest that NS5B is a participating component of 3'-terminal replica of HCV negative-strand RNA.

Key words hepatitis C virus, non-structure protein 5B, replica

* This work was supported by a grant from Scientific Research Grant of Guangdong Province (990098, 990101) and "211" project of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences.

** Corresponding author. Tel: 86-20-81332415, E-mail: gldeng3@163.net

Received: June 23, 2000 Accepted: September 28, 2000