

形成丙型肝炎病毒负链复制体的相关蛋白的分析

黄开红, 邓庆丽, 王 巍, 邵 静, 黄志明

(中山医科大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】确定丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白 NS5B 以及肝母细胞瘤株 HepG2 胞浆提取物中的宿主蛋白与 HCV 负链 RNA 3'末端的特异性结合作用。【方法】用蛋白-核酸紫外交联试验分别检测 NS5B 以及 HepG2 胞浆提取物中的宿主蛋白与 HCV 负链 RNA 3'末端的结合作用, 用非同源 RNA 和非同源蛋白作为竞争物分析这种结合的特异性。【结果】NS5B 以及宿主细胞内一约 45 ku 的蛋白质(简称 P45)均可与 HCV 负链 RNA 3'末端特异性结合。【结论】NS5B 和 P45 是 HCV 负链 RNA 3'末端复制体的两个成分。

关键词: 丙型肝炎病毒; 复制; 蛋白; 紫外交联试验

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0348-03

Studies on the Proteins Related to the Replica of Hepatitis C Virus Negative-Strand RNA HUANG Kai-hong, DENG Qing-li, WANG Wei, SHAO Jing, HUANG Zhi-ming. (Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】To identify whether HCV NS5B and proteins in HepG2 cytoplasmic extracts bind specifically to the 3'-terminal sequences of HCV negative-strand or not, for further study of the replica of HCV negative-strand 【Methods】UV-cross-linking was used to detect the interaction of NS5B and proteins of HepG2 with the 3'-terminal sequences of HCV negative-strand, the specificity of interaction was identified by using heterogeneous RNA and heterogeneous proteins as competitors in UV-cross-linking. 【Results】NS5B and a host protein with approximate molecular mass of 45 ku(P45) could specifically bind to the 3'-terminal sequences of HCV negative-strand 【Conclusion】NS5B and P45 are two components of the replica of HCV negative-strand

Key words: hepatitis C virus; replication; protein; UV-cross-linking

丙型肝炎病毒(HCV)是单链正链 RNA 病毒, 基因组合一个开放读框和两端各一非编码区。目前, HCV 的复制过程尚未清楚。大多数的研究集中在复制的初期, 即正链复制体的形成和负链 RNA 合成的启动, 而负链复制体的形成以及子代正链 RNA 合成的启动方面, 研究刚刚开始。NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RDRP), 这一酶活性是 RNA 合成过程中所必需的。另一方面, HCV 作为单链 RNA 病毒, 主要在宿主细胞浆内复制。基于上述考虑, 我们用蛋白-核酸紫外交联试验检测 NS5B 以及肝母细胞瘤株 HepG2 胞浆提取物与 HCV 负链 RNA 3'末端的特异性结合, 明确 NS5B 和胞浆提取物中的宿主蛋白参与形成 HCV 负链 RNA 3'末端复制体, 为进一步研究 HCV 子代正链 RNA 合成的启动机理打下基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

NS5B 重组蛋白由山下龟也博士友好赠送,

RNA 合成试剂盒(riboprobe kit)为 Promega 公司产品, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ 为北京亚辉生物医学工程公司产品, 酵母 tRNA、RNase A 和 RNase T₁ 为 Sigma 公司产品, 质粒提取试剂盒为 QIA-GEN 公司产品, 蛋白定量试剂盒为 Bio-Rad 公司产品, 大肠杆菌 JM109、肝母细胞瘤株 HepG₂、肝癌细胞株 H7402、胰腺癌细胞株 Sw-1990、胃癌细胞株 7901、宫颈癌细胞株 Hela、猴肾细胞株 COS-7 均来自本研究中心, HCV 负链 3'末端 RNA 体外转录质粒 pHCVN-3 由课题负责人黄志明教授构建。

1.2 HCV 负链 3'末端 RNA 探针的合成及纯化

用限制性内切酶 Hind III 将转录质粒(pT73' UTR)线性化, 按 RNA 合成试剂盒说明书合成探针, 探针经葡聚糖(Sephadex)G50 柱纯化, 乙醇沉淀后溶于 MMK (20 mmol/L MOPS pH7.6, 25 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂)缓冲液中。使用前经 45 °C 水浴 30 min 恢复 RNA 二级结构。

1.3 胞浆蛋白的提取

HCV 主要在宿主细胞浆内复制, 为此我们用

收稿日期: 2001-08-23

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990098, 990101); 中山医科大学“211”工程基金资助项目

作者简介: 黄开红(1961-), 男, 广东阳江人, 主治医师; 邓庆丽(1969-), 女, 广东肇庆人, 助理研究员。

胞浆提取物来检测是否有宿主蛋白参与 HCV 的复制过程。胞浆蛋白的提取方法如下: 细胞株用 DMEM 等液体培养基于 37 °C CO₂ 培养箱内培养, 收集细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 加入细胞裂解液 (50 mmol/L Tris pH8.0, 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 5 ml/L NP-40, 0.1 mmol/L PMSF 用前加入) 裂解后, 硫酸铵沉淀上清蛋白, 溶解后于透析缓冲液 (25 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES pH7.8, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 38 ml/L 甘油, 2 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF 两者用前加入) 透析过夜, 分量保存于 -80 °C 冰箱, 取少量测定蛋白浓度。

1.4 RNA 结合蛋白及结合特异性分析

紫外交联试验 (UV cross-linking) 参照 Furuya 的实验步骤进行^[1]。将适量胞浆蛋白提取物在结合缓冲液 (25 mmol/L HEPES pH7.6, 125 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 100 ml/L 甘油, 0.1 mmol/L DTT, 7.5 mmol/L ATP, 10 mmol/L GTP) 中与 10 μg 酵母 tRNA 混合, 30 °C 水浴 10 min, 然后加入适量³²P 标记的 RNA 探针, 冰浴条件下用 254 nm 的紫外光照射使 RNA-蛋白复合物共价结合; 经 RNA 酶 A 与 RNA 酶 T₁ 消化裸露在蛋白-RNA 复合物外的 RNA 以及未与蛋白结合的游离 RNA 后, 与蛋白分子量标记物一起进行 SDS-PAGE 电泳; 最后通过放射自显影识别结合在 RNA 探针上的蛋白及其相对分子量。

结合特异性分析用以下 3 种方法: ① 由于标记的 HCV 负链 3' 末端 RNA 含有载体 pGEM 中的少量核苷酸, 为了排除这些非同源 RNA 对结合的影响, 以空载体为模板合成非标记的 RNA, 以高于探针量的适当倍数作竞争结合试验; ② 以未标记的 HCV 负链 3' 末端自身 RNA 的适当倍数作竞争结合试验; ③ 用适当倍数的非同源蛋白小牛血清白蛋白 (BSA) 作竞争结合试验。

2 结果

2.1 NS5B 与 HCV 负链 3' 末端 RNA 的结合

如图 1 所示, 在紫外线作用下, NS5B 与 HCV 负链 3' 末端 RNA 相互结合, 且随着 NS5B 量的增加这种结合作用增强, 提示 NS5B 与负链 3' 末端 RNA 的结合在结构上具有互补的关系。

2.2 NS5B 与 HCV 负链 3' 末端 RNA 结合的特异性

图 2 所示, 未标记的 HCV 负链 3' 末端自身

RNA 在 100 倍时基本竞争抑制 NS5B 的结合, 而 pGEM 的 RNA 在相当于探针 500 倍量时也不影响 NS5B 的结合。图 3 所示, 过量 BSA 不影响这种结合作用。

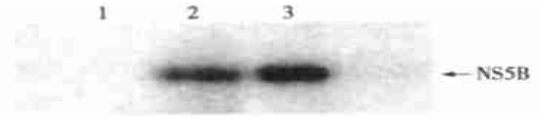


图 1 NS5B 与 HCV 负链 3' 末端 RNA 的结合作用
Fig 1 Interaction of NS5B with 3'-terminal sequences of HCV negative-strand (UV-Cross linking)

no NS5B (lane 1); 25 ng, 50 ng NS5B respectively (lane 2, 3)

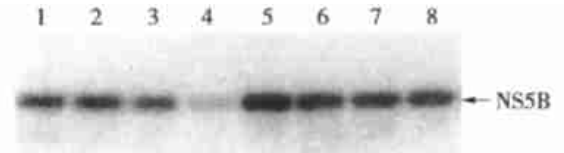


图 2 非同源性 RNA 与 NS5B 结合的竞争试验

Fig 2 Competitive interaction of NS5B with heterogeneous RNA (UV-Cross linking)

50 ng NS5B respectively (lane 1 ~ 8); no competitor RNA (lane 1, 5); 10×, 50×, 100× non-labelled 3'-terminal RNA (lane 2 ~ 4); 100×, 250×, 500× non-labelled pGEM RNA (lane 6 ~ 8)

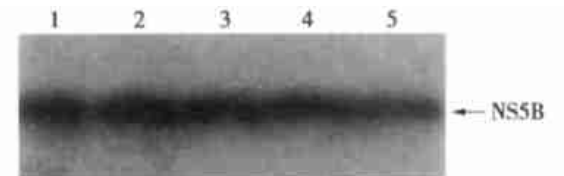


图 3 小牛血清白蛋白与 HCV 负链 3' 末端 RNA 结合的竞争试验

Fig 3 Competitive interaction of BSA with 3'-terminal sequences of HCV negative-strand (UV-Cross linking)

50 ng NS5B (lane 1 ~ 5); 100×, 200×, 300×, 400× competitor BSA (lane 2 ~ 5)

2.3 HepG2 胞浆提取物与 HCV 负链 RNA 3' 末端的结合

图 4 所示, 箭头指向的显影带表明 HepG2 的胞浆提取物能与 HCV 负链 RNA 3' 末端相互结合; 且随着胞浆提取物的量的增加, 这种 RNA 复合物结合作用也逐渐增强, 说明胞浆提取物中可能有蛋白参与形成此 RNA 复合物。

图 5 所示, 在 3 组对照试验中 (① 不加细胞提取物; ② 不用紫外线照射; ③ 在 UV cross-linking 后用蛋白酶 K 消化 30 min), 均显示这种 RNA 复合物消失, 说明确实有细胞来源的蛋白质与探针发生结合。与蛋白相对质量标记物对比, 此核酸-蛋白复合物位于约 45 ku 大小的位置。为了方便

叙述,我们将此宿主蛋白命名为 P45(下同)。

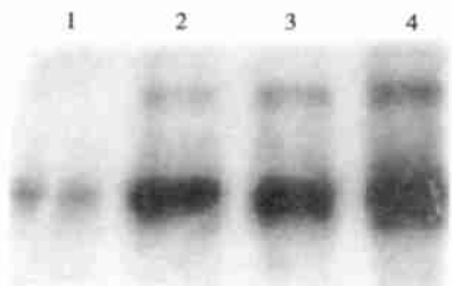


图4 HepG2 胞浆提取物与 HCV 负链 RNA^{3'}末端的结合
Fig 4 Interaction of proteins from HepG2 cytoplasm with 3'-terminal sequences of HCV negative strand (UV-Cross linking)

5 μg, 10 μg, 15 μg, 20 μg total proteins from HepG2 cytoplasm respectively (lane 1~4)

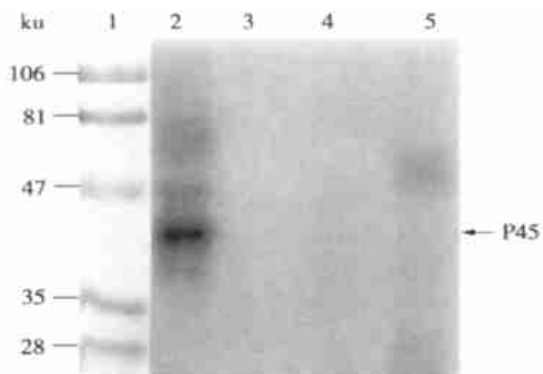


图5 HepG2 胞浆提取物与 HCV 负链 RNA^{3'}末端结合的蛋白鉴定

Fig 5 Identification of proteins from HepG2 cytoplasm interacting with 3'-terminal sequences of HCV negative-strand (UV-Cross linking)

protein marker(lane 1); positive control(lane 2); without total proteins(lane 3); without UV treatment(lane 4); with proteinase K treatment(lane 5)

2.4 P45 与 HCV 负链 RNA^{3'}末端结合的特异性

图6所示,未标记的 HCV 负链^{3'}末端自身 RNA 在 20 倍时能完全竞争抑制 P45 的结合,而 pGEM 的 RNA 不影响 P45 的结合。另一方面,图7所示,过量非同源的 BSA 不影响这种结合作用。

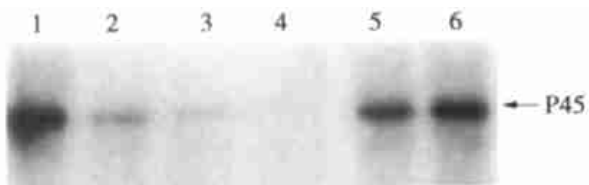


图6 非同源性 RNA 与 P45 结合的竞争试验

Fig 6 Competitive interaction of P45 with heterogeneous RNA (UV-Cross linking)

no competitor(lane 1); 10×, 20×, 40× non-labeled 3'-terminal sequences of HCV negative-strand(lane 2~4); 10×, 40× non-labeled pGEM polylinker transcripts(lane 5, 6)

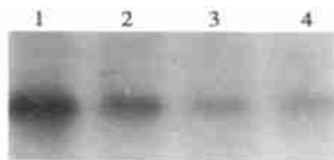


图7 非同源蛋白 BSA 与 HCV 负链 RNA^{3'}末端结合的竞争试验

Fig 7 Competitive interaction of heterogeneous BSA with 3'-terminal sequences of HCV negative-strand (UV-Cross linking)

10 μg total proteins(lane 1~4); no BSA (lane1); 15 μg, 30 μg, 60 μg BSA respectively(lane 2~4)

3 讨论

HCV 正链复制时,正链 RNA^{3'}-UTR 可形成特殊的茎环二级结构,宿主蛋白 P58、P87、P130 等作为 PTB 类蛋白,可特异性结合茎环结构中的保守序列,推测它们和病毒非结构蛋白 NS5B、NS3、NS4A、NS5A 一起与 HCV 正链 RNA^{3'}-UTR 结合形成复制体^[2~5],其中,NS5B 为 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RDRP),NS3 为丝氨酸蛋白水解酶、RNA 螺旋酶和三磷酸核苷酶,NS4A 与 NS5A 协助 NS3 起作用,然后复制体通过正链^{3'}端回折形成的发夹状引物来促进负链 RNA 合成^[6]。作为 HCV 复制中间体的负链 RNA,其^{3'}-UTR 的结构尚未有准确报道。本文报道了 NS5B 和宿主细胞蛋白 P45 与 HCV 复制中间体^{3'}末端特异性结合,认为它们是 HCV 负链复制体的成分。由此推测 HCV 在负链合成结束后,原来的复制体分裂,病毒非结构蛋白如 NS5B、NS3、NS4A 等与宿主蛋白如 P45 结合形成新的复制体,在引物作用下启动子代正链 RNA 合成。

RNA 与蛋白质的相互作用是研究基因调控的重要途径之一。UV-cross linking 是较为常用的研究 RNA 与蛋白质结合的试验之一。与其他同类方法相比,UV-cross linking 操作上简单,较适用于竞争结合试验鉴定结合的特异性^[7]。我们应用这种方法证实了 NS5B 和宿主蛋白 P45 与 HCV 负链 RNA^{3'}末端的特异性结合,为深入研究 HCV 负链 RNA 复制机理打下基础。

参考文献:

- [1] Furuya T, Lai M M. Three different cellular proteins bind to (下转 353 页 to page 353)

种方法测定的上述指标具有差异性, X线心室造影测出的指标均高于 EBCT 测出的相应值。本组中有3例心肌梗死合并室壁瘤的患者, 心功能为 III 级, X线心室造影 LVEF 值为 45%, 40%, 60% 而 EBCT 测出相应的值为 40%, 35%, 45%。心室的收缩性在各层面均有差别, 因而整体 EF 值的测量不能仅测量某一层面否则可能会高估整体心功能。X线心室造影仅根据 1 个或 2 个平面上的测量, 使用传统的面积—长轴法假设左心室为椭球体而做出几何推测。但当心肌梗死或室壁瘤形成时左室构型发生了显著的改变, 若仍沿用上述方法测量则必然有较大误差。EBCT 积采用修正的 Simpson 法对每层的血池数值进行测量, 测量容积无需依赖几何构型, 因此测量方法更合理、更可靠。笔者认为本组研究中 EBCT 测量的 LVEDV、LVESV、LVSV 和 LVEF 值可能更接近实际值。国内外学者实验证明^{6-8]}, 常规 X 线左室造影和超声心动图测量较心脏实际容积相差 30% 左右, 而 EBCT 测量值与实际容积相差 < 10%。

室壁运动情况可以评估患者血流动力学及临床过程并预测近期预后。X 线心室造影是用右前斜位 30° 动态观察前基底段、前侧壁、心尖部、膈面段和后基底段的室壁运动。EBCT 能逐层动态显示室壁运动状态, EBCT 内的软件可将每个断层图像以室中左室壁中后方参照点, 每 30° 细分为 12 等分, 对每等份进行精确的定量分析, 观察有无心肌变薄、隐匿心肌梗死、动脉瘤或室壁瘤等。本组研究结果, EBCT 评价室壁运动与 X 线心室造影检查高度相关, 两者之间无显著性差别。

心肌质量的增加是心脏病死亡事件的重要提

示。本研究中 EBCT 通过勾划出心内膜面和心外膜面, 由舒张末或收缩末期层面总容积与心室容积之差再乘以 1.05 (心肌相对质量) 即得出每层心肌质量, 相加即为心肌总质量。本研究 EBCT 还测定了 15 例冠心病病人的心肌质量为 (111±33) g。X 线心室造影由于无法勾划出心内、外膜面所以无法测量心肌质量。

本研究提示 EBCT 在心功能的定性和定量方面准确、可靠和用途广泛, 是临床值得推荐的无创心功能检查方法。

参考文献:

- [1] Cortina A, Ambrose J A, Priteo-Granada J, *et al*. Left ventricular function after myocardial infarction: clinical and angiographic correlations[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 5(3): 619.
- [2] Ahnve S, Gilpin E, Henning H, *et al*. Limitations and advantages of the ejection fraction for defining high risk after acute myocardial infarction[J]. *J Am Cardiol*, 1986, 58(10): 872.
- [3] 李向民, 陈剑魂, 杜志民, 等. 室壁瘤与左室功能及冠状动脉狭窄的关系[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3): 234.
- [4] Mann D I, Gilam L D, Weyman A E. Cross sectional echocardiographic assessment of regional left ventricular performance and myocardial perfusion[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1986, 29(1): 1.
- [5] Hajduczuk Z D, Weiss R M, Stanford W, *et al*. Determination of right ventricular mass in humans and dogs with ultrafast cardiac computed tomography[J]. *Circulation*, 1990, 82(1): 202.
- [6] Reiter S J, Rumberger J A, Feiring A J, *et al*. Precision of measurements of right and left ventricular volume by cine computed tomography[J]. *Circulation*, 1986, 74: 890.
- [7] 崔炜, 戴汝平, 郭玉印, 等. 超高速 CT 评价心室容积准确性的研究[J]. *中华放射学杂志*, 1997, 31(2): 93.
- [8] 戴汝平. 心血管影像学新发展对“金标准”的挑战[J]. *中华放射学杂志*, 1997, 31(2): 79.

(编辑 刘清海)

(上接第 350 页 from page 350)

complementary sites on the 5'-end-positive and 3'-end-negative strands of mouse hepatitis virus RNA[J]. *J Virol*, 1993, 67(10): 7215.

- [2] Takayoshi I T O, Lai M M. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome[J]. *J Virol*, 1997, 71(11): 8698.
- [3] Tsuchihara K, Tanaka T, Hijikata M, *et al*. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with extreme 3' terminal structure of the hepatitis C virus genome: the 3'X[J]. *J Virol*, 1997, 71(9): 6720.
- [4] Inoue Y, Miyazaki M, Ohashi R, *et al*. Ubiquitous presence of cellular proteins that specifically bind to the 3' terminal region of

hepatitis C virus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(1): 198.

- [5] Luo G. Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA genome[J]. *Virology*, 1999, 256(1): 105.
- [6] Behrens S E, Tomei L, Francesco R D. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus[J]. *EMBO J*, 1996, 15(1): 12.
- [7] 邓庆丽, 黄志明, 王巍, 等. PIP 融合蛋白在大肠杆菌中的表达纯化及其与 PRE 特异性结合的试验[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(4): 355.

(编辑 黄小延)