

# 戊型肝炎病毒亚基因组 RNA 的研究

夏小兵\* 黄如统 李德荣

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100850)

**摘 要** 本文利用同位素代谢标记在 HEV 感染 8.5~10.5、6.5~7.5h 分别检测到 1 及 2 个亚基因组 RNA,而感染 21h 后及在成熟的病毒颗粒内未能检测到亚基因组 RNA。通过杂交实验,发现 HEV 的亚基因组 RNA 具有典型的共 3' 端的半套式结构,且基因组 RNA 与亚基因组 RNA 的 5' 端不存在共同的引导序列。通过紫外转录图谱发现 HEV 的亚基因组 RNA 是通过独立转录的方式产生的。利用引物延伸反应发现两种亚基因组 RNA 的转录起始位点分别位于 RNA 聚合酶区及非结构区、结构区的基因间序列。

**关键词:** 戊型肝炎病毒,亚基因组 RNA,紫外转录图谱

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2000)06-0622-27

许多正链 RNA 病毒的非结构基因位于基因组的 5' 部分,结构基因位于基因组的 3' 部分,基因组由多个开放阅读框架(open reading frame, ORF)组成。这些病毒在感染细胞内除合成基因组 RNA 外,还转录亚基因组 RNA(subgenomic RNA)<sup>[1]</sup>。基因组 RNA 用于翻译病毒的非结构蛋白,而亚基因组 RNA 主要用于指导病毒的结构蛋白的合成。通过亚基因翻译策略,使得正链 RNA 病毒可以在转录水平上独立地调节病毒结构蛋白与非结构蛋白在复制不同阶段的合成。戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus, HEV)是一基因组长约 7.5kb 的正链 RNA 病毒,具有典型的能合成亚基因组 RNA 的结构特征。Tam 等<sup>[2]</sup>在感染 HEV 的食蟹猴肝组织中检测到了 HEV 亚基因组 RNA,但利用动物实验研究病毒复制具有一定局限性,因此本研究利用 HEV(87A)能适应于细胞培养的特点,进一步探讨了 HEV 亚基因组 RNA 的结构及产生特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞:HEV(87A)毒株及 A549 细胞系均为本室保存。

1.1.2 寡核苷酸探针(引物):根据发表的 HEV 缅甸株序列,合成了三个寡核苷酸探针,序列分别为

OligoA: 5' AGGCAGACCACATATGTGGTCGA (1~24nt)

OligoB: 5' ATGAATTTCAGGGCCCCAATTCCTTCT (4876~4859nt)

OligoC: 5' AGAAGCTTCCGTGGCCATTATATG (5663~6886nt)

OligoD: 5' CCGGTGTTATAAACTTCTGGGCAT (1255~1297nt)

作者简介:夏小兵(1971-),男,江西省永新县人,博士,现工作单位:解放军 302 医院基因治疗研究中心,助理研究员,主要从事微生物学及生物工程的研究

收稿日期:1999-10-12,修回日期:2000-04-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

## 1.2 方法

**1.2.1 HEV RNAs 的 $[^{32}\text{P}]$ 掺入标记** :A549 细胞在培养皿上长成单层后 ,换成无磷 DMEM 培养基 ,过夜 ,接种病毒(0.05MOI) ,37℃ 吸附 1h ,用无磷培养基洗 3 次 ,加入无磷的 DMEM 维持培养基 ,感染到所需时间后 ,向维持液内加入放线菌素 D(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ,作用 1h ,倾去维持液 ,再加入含 10 $\mu\text{g}$  放线菌素 D 与 100uCi $[^{32}\text{P}]$ 正磷酸盐维持液 1mL ,继续培养 1~2h。经以上过程处理的正常细胞 ,放射自显影基本检测不到核酸信号。

**1.2.2 液相杂交** :正常及感染细胞的总 RNA 在 MOPS 缓冲液中与标记的寡核苷酸探针 94℃ 变性 5min ,于 50℃ 缓慢退火 3h ,在 MOPS 缓冲液中进行非变性胶电泳 ,电泳结束后 ,干胶直接进行放射自显影分析。

**1.2.3 紫外(UV)照射实验** :经磷饥饿(即无磷酸盐培养基)及放线菌素 D 处理的感染细胞 ,倒掉培养液并打开培养皿盖 ,在距 30W 紫外灯 10cm 下照射后 ,加入含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  放线菌素 D 及 100uCi/mL 的 $[^{32}\text{P}]$ 正磷酸盐的无磷维持液孵育 1~2h。

**1.2.4 蛋白合成抑制实验** :经过磷饥饿及放线菌素 D 处理的 HEV(87A)感染细胞 ,加入终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的放线菌酮、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的放线菌素 D 作用 1h ,继续补加 100uCi/mL 的 $[^{32}\text{P}]$ 正磷酸盐培养 1h。

**1.2.5 RNA 的电泳** :采用甲醛变性胶电泳 ,60℃ 干胶 ,同时加入变性后的核酸分子量标准 ,电泳结束后切下分子量标准 ,溴化乙啶(EB)染色 ,将各条带所代表的大致分子量按 1:1 绘到白纸上 ,用于 RNA 放射自显影后分子量的大致观察。

**1.2.6 引物延伸** :HEV 特异引物经过 $[^{32}\text{P}]$ 末端标记后 ,以总 RNA 为模板进行逆转录。用 8% 的聚丙烯酰胺尿素变性胶进行电泳分析 cDNA ,分量的判别同 RNA 电泳。

## 2 结果

### 2.1 HEV 在感染细胞内可以合成亚基因组 RNA

以 0.05MOI 接种病毒时 ,我们利用杂交以及 RT-PCR 技术证明 HEV 在感染 5h 已经开始复制。因此本文分别检测感染 6.5~7.5h 与 8.5~10.5h 时 HEV 亚基因组 RNA 的合成情况 ,结果显示 ,在感染 6.5~7.5h 之间可以检测到病毒的基因组 RNA 及两种亚基因组 RNA ,而感染 8.5~10.5h 只能检测到 HEV 的基因组 RNA 及一种亚基因组 RNA。以上结果表明 ,HEV 在感染 7.5h 以前能转录出两种亚基因组 RNA ,而感染 8.5h 以后只转录分子量较大的亚基因组 RNA(图 1)。

为了进一步研究 HEV 亚基因组 RNA 的合成 ,我们在感染后期(感染 21h 后 ,此时细胞形态明显改变) ,用 $[^{32}\text{P}]$ 正磷酸盐掺入法分析感染细胞的总 RNA 及纯化病毒颗粒中的 RNA。结果都只能检测到 HEV 的基因组 RNA ,说明在感染 21h 后 HEV 不再合成亚基因组 RNA ,且 HEV 的亚基因组 RNA 不被包装到成熟的病毒颗粒中(图 2)。

### 2.2 HEV 的亚基因组组成无共同引导序列的共 3'端的半套式结构

设计了 3 个反义寡核苷酸探针 ,oligoA ,oligoB 及 oligoC ,分别针对于 HEV 的非结构区与结构区。这样 ,假如 HEV 的亚基因组 RNA 与基因组 RNA 形成共 3'部分的半套式

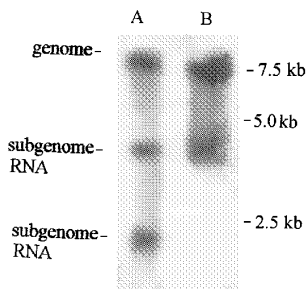


图 1 不同时间段病毒 RNA 的[<sup>32</sup>P]的掺入分析

Fig. 1 Time course of [<sup>32</sup>P] labeling of viral RNAs

A 6.5~7.5 h;

B 8.5~10.5 h.

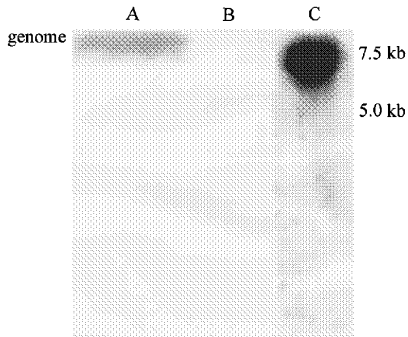


图 2 感染 21h 及纯化病毒 RNA 的分析

Fig. 2 [<sup>32</sup>P] labeling of virus RNAs at 21h postinfection and purified virus

A Infected cells B Uninfected cells C Purified virus.

结构,则 oligoB 可以检测到基因组 RNA 及一种亚基因组 RNA,而 OligoC 除可以检测到基因组 RNA 外,还可以检测到两种亚基因组 RNA(图 3 图 4)。

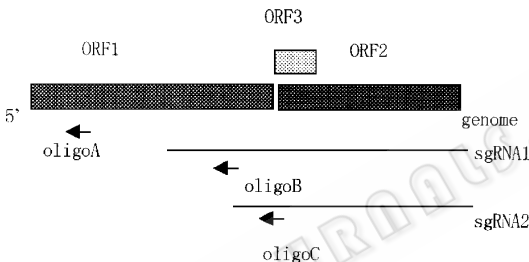


图 3 HEV 寡核苷酸探针位置

Fig. 3 Location of HEV specific probes

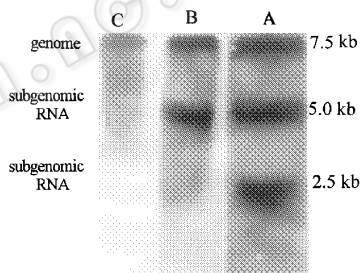


图 4 感染 HEV 细胞不同 RNA 的杂交结果

Fig. 4 Hybridization of Various RNAs from HEV infected cells

A OligoC as a Probe B OligoB as a Probe C OligoA as a Probe.

结果不但表明 HEV 在细胞内合成的亚基因组 RNA 与基因组 RNA 一起,形成共 3' 部分的半套式结构,还显示 HEV 的亚基因组 RNA 与基因组 RNA 的 5' 端不存在共同的引导序列。

### 2.3 紫外照射对 HEV 基因组 RNA 及亚基因组 RNA 合成的影响

由于感染 8.5h 后同位素掺入信号强,选择该时间段对感染细胞紫外照射 120s。经过紫外照射后观察不到 HEV 的亚基因组 RNA(图 5),表明 HEV 的亚基因组 RNA 对紫外照射敏感,可以推断 HEV 的亚基因组 RNA 是通过独立转录的方式产生的。但同时观察到 HEV 的亚基因组 RNA 对紫外照射敏感程度低于基因组 RNA,而 HEV 基因组 RNA 的大小是亚基因组 RNA 的 2 倍以上,且 RNA 对紫外线的敏感程度与其大小正相关。我们推测,由于基因组 RNA 编码病毒的 RNA 聚合酶,由于紫外照射而引起基因组 RNA 的模板功能的丧失具有较为严重的副效应:可以减少用于翻译出病毒 RNA 聚合酶的 mRNA 的合成,从而影响了依赖于 RNA 聚合酶的亚基因组 RNA 的转录,使得本来是独立转录的亚基因组 RNA 在该实验中表现气杂结果。我们在感染 8h 时,往培养基中加入终浓

度为 100 $\mu$ g/ $\mu$ L 的放线菌酮 ,作用 1h ,用于抑制 RNA 聚合酶的合成。结果发现 HEV 亚基因组 RNA 的合成被明显抑制 ,且其敏感程度较基因组 RNA 高(图 6)。这表明 ,相对于基因组 RNA ,HEV 的亚基因组 RNA 更加依赖于 RNA 聚合酶连续合成。

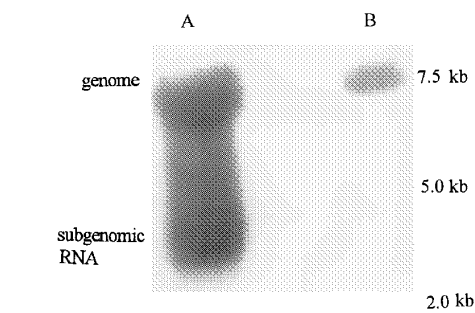


图 5 HEV RNA 的紫外转录图谱  
Fig.5 UV transcription map of HEV RNAs  
A :Infected cells unirradiated ;  
B :Infected cells irradiated for 120sec.

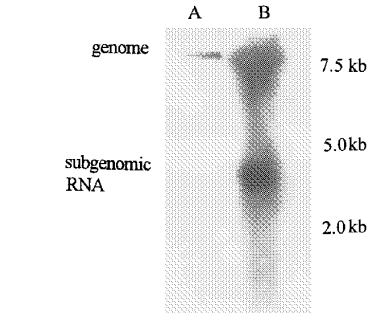


图 6 翻译抑制对 HEV RNA 转录的影响  
Fig.6 Effects of protein translation Inhibited on transcription of HEV RNAs  
A :Infected cells treated with cycloheximide ;  
B :Infected cells untreated.

2.4 引物延伸反应

设计了三条引物 ,oligoD 位于基因组的 1255~1297nt ,在引物延伸反应中应该逆转录出 HEV 基因组 RNA 的 5'端序列 ,大小为 1.2kb 左右 ,oligoB 与 oligoC 分别位于基因组的 4876~4859nt 与 5663~6886nt(图 3)。延伸产物经过聚丙烯酰胺尿素变性胶与放射自显影后发现 ,在以 oligoD、oligoB 及 oligoC 为引物时都只能观察到一条明显的延伸产物 ,大小分别为 1.2kb、1.2kb 与 600bp 左右(图 7),即以延伸产物为模板 ,以位于 RNA 聚合酶区的一对套式引物进行 PCR 扩增<sup>[3]</sup> ,结果只有 oligoB 的延伸产物 PCR 扩增阳性。表明延伸产物两个亚基因组的转录起始部位分别位于 RNA 聚合酶编码区的前端及结构基因与非结构基因的交界处。

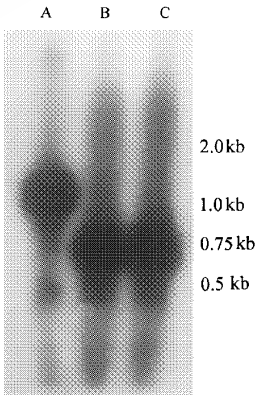


图 7 HEV RNAs 的引物延伸分析  
Fig.7 Primer extension analysis of HEV RNAs  
A :Extension products of OligoD ;  
B :Extension products of OligoB ;  
C :Extension products of OligoC.

3 讨论

大多数甲病毒样超家族及小 RNA 病毒样超家族成员的基因组具有两个以上的开放阅读框架 ,复制过程中都能合成亚基因组 RNA ,且亚基因组 RNA 数目大致与病毒本身的 ORF 数正相关 ,如杯状病毒( calicivirus )具有 3 个 ORF ,能合成 1~2 种亚基因组 RNA<sup>[4]</sup>。HEV 的基因组特征类似与杯状病毒科 ,是否也与杯状病毒一样 ,能在感染细胞内合成 1~2 种亚基因组 RNA 呢? 我们利用同位素掺入实验在 HEV 感染 6.5~7.5h 时能到

2 种亚基因组 RNA,而在感染 8.5~10.5h 时能检测到 1 种亚基因组 RNA,这表明 HEV 能在感染细胞内合成 1~2 种亚基因组 RNA,其数目与病毒的复制阶段有关。但 Keck 等<sup>[5]</sup>在小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)感染 4h 的细胞内只检测到 6 种亚基因组 RNA,而感染 8h 时可检测到 8 种亚基因组 RNA。这可能是由于 HEV 基因组结构特殊性造成的,HEV 的 ORF3 与 ORF2 几乎完全重叠,因此其亚基因组 RNA 的翻译过程可能也非常复杂,尤其较大的亚基因组 RNA,从大小看几乎包括全部 RNA 聚合酶编码区,与乳酸脱氢酶升高病毒(lacate dehydrogenase eleving virus, LDV)的 mRNA1-1 类似,后者能翻译出包括 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 C-端的前体蛋白分子<sup>[6]</sup>。

由于本实验采用同位素掺入法来检测 HEV 的亚基因组 RNA,因而检测的是 HEV 的亚基因组 RNA 在一段时间的合成情况,是一种动态变化,更能说明亚基因组 RNA 的转录状况。如我们发现感染 6.5~7.5h 时亚基因组 RNA 的同位素掺入信号稍低于感染 8.5~10.5h。亚基因组 RNA 作为一种典型的 mRNA 分子,其主要功能是用于合成病毒的结构蛋白,而基因组 RNA 主要是用于合成病毒的非结构蛋白。如 MHV 的 mRNA7 用于合成核蛋白, mRNA6 用于合成包膜糖蛋白<sup>[7]</sup>。由于在病毒大量复制阶段需要较多的包装蛋白,亚基因组 RNA 的含量可能会相对较多,同位素掺入信号要强一些。

利用杂交实验发现 HEV 的基因组 RNA 与亚基因组 RNA 的 5' 端不存在共同的引导序列,类似于甲病毒,而紫外照射实验发现 HEV 的亚基因组 RNA 对紫外照射敏感,可以排除通过由基因组 RNA 剪接后产生的可能性,因此可以初步判断,HEV 亚基因组 RNA 的转录与甲病毒一样,是由独立的启动子转录产生。我们在紫外照射实验中发现 HEV 的基因组 RNA 对紫外照射的敏感程度比其亚基因组 RNA 还要低。这一点并不能表明 HEV 亚基因组 RNA 不是独立通过转录产生的。MHV 的亚基因组 RNA 是通过独立转录产生已经得到广泛的证明,尤其是近年来克隆到其亚基因组 RNA 的引导序列,并利用报告基因证明该引导序列足以引发其亚基因组 RNA 的转录<sup>[8]</sup>。但 Jacobos 等<sup>[9]</sup>发现,尽管 MHV 最小的亚基因组 RNA(mRNA7 0.7kb)的大小是基因组 RNA(12.7kb)的 1/18,但其对紫外照射的敏感程度只是基因组 RNA 的 1/8。

Sawicki 等<sup>[10]</sup>发现,连续的蛋白合成对于 MHV 基因组 RNA 及亚基因组 RNA 的早期转录是绝对必须的,即使在感染后期,蛋白合成的抑制对基因组 RNA 及亚基因组 RNA 的影响依然非常明显。我们的研究中也发现, RNA 聚合酶合成的抑制对 HEV 亚基因组 RNA 转录的影响非常明显,在能合成亚基因组 RNA 的正链 RNA 病毒中,非结构蛋白以基因组 RNA 为模板翻译,由于紫外照射所引起的基因组 RNA 转录水平的降低,将直接导致 RNA 聚合酶合成量的减少,从而间接减少了亚基因组 RNA 的合成。这样, HEV RNA 的紫外转录图谱不但受到紫外照射的直接影响,还受到病毒 RNA 聚合酶合成抑制的间接影响,导致 HEV RNA 对紫外照射的敏感程度与其物理大小并不完全相关。此外,在病毒亚基因组 RNA 合成过程中,一些细胞因子也参与转录起始复合体的形成,如冠状病毒亚基因组 RNA 的转录还依赖于细胞因子 P35/P38<sup>[11]</sup>,如果这些蛋白因子的合成很不稳定,也将影响亚基因组 RNA 的紫外转录图谱。

Sindbis 病毒的 RNA 聚合酶是由非结构蛋白前体经过连续加工后成熟的,在前体逐渐成熟的过程中, RNA 聚合酶的功能也发生短暂的变化,既可以从转录负链 RNA 转变为

转录正链 RNA,也可以从转录亚基因组 RNA 转变为转录基因组 RNA<sup>[12]</sup>。HEV 的 RNA 聚合酶也需要经过翻译后的加工成熟过程,紫外照射后将首先影响到 RNA 聚合酶前体形式(用于转录亚基因组 RNA)的合成,而由于照射前已经合成的前体蛋白的积累,成熟蛋白(如用于转录基因组 RNA)的合成继续维持一段时间。这种由于 RNA 聚合酶构型的改变,导致其功能改变的现象可以解释两种 RNA 对紫外照射敏感度的差异。

## 参 考 文 献

- [1] Spaan W J M, Panl P S, Halbar P G, *et al.* Comparative and evolutionary aspects of coronaviral, arteriviral, toroviral genome structure. The second symposium on positive strand viruses, 1989. 1900~1912.
- [2] Tam A W, Smith M M. *Virology*, 1991, **185**: 120~131.
- [3] Huang R T, Li D R, Wei J, *et al.* *J Gen Virol*, 1992, **73**: 1143~1153.
- [4] Neill J D, Mengeling W L. *Virus Res*, 1988, **11**: 59~74.
- [5] Keck J G, Hogue B G, Brian D, *et al.* *Virus Res*, 1988, **9**: 343~356.
- [6] Cheng Z, Kuo L, Rowland R R R, *et al.* *J Gen Virol*, 1993, **74**: 643~660.
- [7] Brierley I, Digard P, Brian D, *et al.* *Cell*, 1989, **57**: 537~547.
- [8] Jeong Y S, Repass J F, Kim Y N, *et al.* *Virology*, 1996, **217**: 311~322.
- [9] Jacobs L, Spaan W J M, Horzinek M C, *et al.* *J Virol*, 1981, **39**: 401~406.
- [10] Sawicki W, Aawicki D L. *J Virol*, 1986, **57**: 328~334.
- [11] Shirako Y, Strauss J H. *J Virol*, 1994, **68**: 85724~85733.
- [12] Straus J H, Straus E G. *Microbiol Rev*, 1994, **58**: 466~566.

## STUDIES ON THE SUBGENOMIC RNAs OF HEPATITIS E VIRUS

Xia Xiaobing Huang Rutong Li Derong

(Institute of Microbiology and Epidemiology,  
Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850)

**Abstract:** Through labeling HEV RNAs with [<sup>32</sup>P]-phosphate, two subgenomic RNAs at 6.5 to 7.5h post-infection, one subgenomic RNA at 8.5 to 10.5h post-infection and none subgenomic RNAs were detected at 21 post-infection or in purified virus. Hybridization results illustrated that the HEV subgenomic RNAs form a 3' nested set which is situated at the 3' end of genome, but their 5' ends do not share a common leader sequence. UV transcription results showed that the HEV subgenomic RNAs were transcribed independently from its promote. Primer extension analysis suggested that the 5' end of large subgenomic RNA was mapped to the initiative region within RNA polymerase region, and the small subgenomic RNA was mapped to the intergenic region between ORF1 and ORF2.

**Key words:** Hepatitis E virus, Subgenomic RNAs, UV transcription map