

登革 2 型病毒中国株 3' 非编码区 RNA 元件对翻译的影响

尉雁, 姜涛, 李晓峰, 赵慧, 刘忠钰, 邓永强, 刘然, 秦成峰, 秦鄂德*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要: 【目的】探讨登革病毒 (dengue virus, DEN) 3' 非编码区 (untranslated region, UTR) RNA 元件 (VR、RCS2、CS2、CS1 和 SL) 对基因组翻译的影响。【方法】首先构建登革 2 型病毒中国株 (DEN2-43) UTR 与萤火虫荧光素酶基因 (LUC) 组成的病毒诱导报告基因 (virus induced reporter gene, VIRG), 在此基础上分别构建包含 DEN2-43 3' UTR 不同 RNA 元件的 VIRG, 并通过 LUC 检测、实时 RT-PCR 和 Western blot 方法分析含有不同元件 VIRG 对翻译效率的影响。【结果】发现完整的 3' UTR 缺失可显著抑制翻译, 含有病毒 VR 元件 VIRG 的翻译水平与完整 3' UTR 的 VIRG 相似, RCS2 或 CS2 元件可提高 VIRG 的翻译效率, CS1 或 SL 元件可降低 VIRG 的翻译效率。【结论】DEN 2-43 病毒基因组 3' UTR 参与了报告基因的翻译, 其不同元件具有可上调和下调报告基因翻译效率的作用。

关键词: 登革病毒; 3' UTR; 翻译调控

中图分类号: Q933.985 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0583-06

登革病毒 (dengue virus, DEN) 基因组是一个长约 11 kb 的单股正链 RNA, 包括 5' 非编码区 (untranslated region, UTR) 单一开放读码框 (open reading frame, ORF) 和 3' UTR。其 ORF 编码 3 种结构蛋白 (C, prM 和 E) 和 7 种非结构蛋白 (NS)。5' 和 3' UTR 包括调控病毒翻译与复制的几个保守序列元件和茎环结构 (stem-loop, SL)。3' UTR 有 5 个 RNA 元件: 可变区 (variable region, VR)、串联的重复保守序列 2 (repeated conserved sequence, RCS2)、保守序列 (CS) 2、CS1 和茎环结构 (stem loop, SL)^[1], 其中 RCS2 和 CS2 元件位于 3' UTR 的 A2 和 A3 结构域中^[2]。近来对 DEN^[3] 及与 DEN 同属于黄病毒的西尼罗病毒 (WNV) 3' UTR 的研究认为^[4, 5], SL 可调控病毒翻译, 而对 VR、RCS2、CS2 和 CS1 的研究主要集中在病毒基因组 RNA 复制方面^[6-11]。

由于登革病毒非编码区既调控病毒翻译又调节其 RNA 复制, 因此不含 DEN 复制酶 (NS1-7) 的报

告基因可用于观察 UTR 对翻译的影响。荧光素酶敏感而易于分析, 可作为病毒翻译研究的报告基因。本研究以荧光素酶取代 DEN 的大多数结构蛋白和全部非结构蛋白, 构建登革 2 型病毒中国株 (DEN2-43) 非编码区诱导的报告基因 (virus induced reporter gene, VIRG), 分别探讨 3' UTR RNA 元件对翻译效率的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株与细胞株: DEN2-43 株为 1987 年自我广西登革热患者血清中分离, 其基因组全序列的 GenBank 登录号为 AF204178。扩增 DEN2-43 UTR 的模板来自本研究室构建的含有 DEN2-43 株 cDNA 全长克隆的低拷贝载体 pWSK29/DEN2-43。BHK-21 细胞 (本室保存) 采用包含 10% FCS、10 U/mL 青霉素和 10 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液, 3~4 d 传代

基金项目: 国家自然科学基金 (30600530; 30770107)

*通讯作者: Tel: +86-10-66948604; Fax: +86-10-63898239; E-mail: qinede@sohu.com

作者简介: 尉雁 (1971-), 女, 山西太原人, 主治医师, 博士研究生, 从事黄病毒致病机理研究。E-mail: swallow019@163.com

收稿日期: 2007-09-19; 修回日期: 2008-01-10

一次。大肠杆菌 DH5 α 购于 Tiangen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器：T7 RNA 转录试剂盒、m⁷G 帽子结构类似物(Ribo m⁷G Cap Analog)、pGEM®-T 载体(pGEM®-T Easy Vector System)、小量质粒 DNA 提取试剂盒 (Wizard®Plus SV Minipreps DNA purification system)、T4 DNA 连接酶、萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, LUC) pGL3.0 质粒、海肾荧光素酶(*Renilla luciferase, Rluc*) pGL4.79 质粒及其检测系统均为 Promega 公司产品；DNA 快速提取试剂盒 (QIAquick™ Gel Extraction Kit) 和质粒快速提取试剂盒 (Qiagen Plasmid Midi Kit) 为 Qiagen 公司产品；M-MuLV 反转录酶购自 BioLabs 公司；LA DNA 聚合酶、限制性内切酶及 DNA 分子量标准均为 TaKaRa 公司产品；Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司；7900HT 实时荧光定量 RT-PCR 检测仪购自 ABI 公司；TaqMan 一步法 RT-PCR 试剂购自 Roche 公司。

1.2 质粒构建

DEN2-43 病毒 3'UTR 不同元件 VIRG 的质粒构建见图 1。采用相应引物，经 PCR 扩增 DEN 5'UTR (包括 DEN 编码 C 蛋白的前 108 个碱基) 3'UTR、LUC5 半分子及 3'UTR 4 个片段，分别将 DEN 5'UTR 与 LUC 5 半分子及 DEN 3'UTR 与 LUC 3 半分子进行融合 PCR 反应，产物经凝胶回收后再将二者进行融合 PCR 反应，最终产物与载体 pGEM-T easy 连接。按同样方法将 Rluc 基因与 DEN 5'、3'UTR 连接构建的 VIRG 作为内对照。

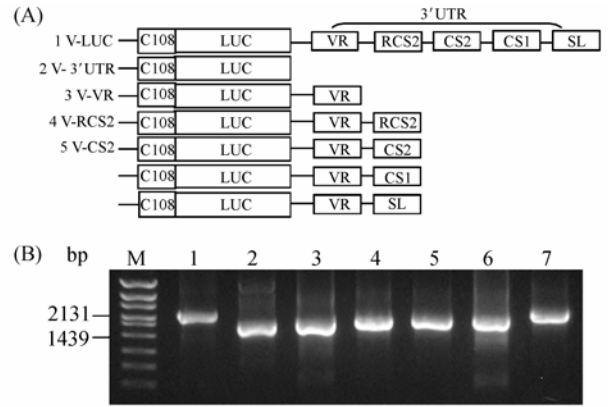


图 1 DEN2-43 3'UTR 各 RNA 元件与 LUC 构建的 VIRG
 Fig. 1 Construction of VIRGs including LUC and different elements of DEN2-43 3'UTR. A: Schematic diagram of VIRGs including different elements of 3'UTR. B: The electrophoretic patterns of VIRGs including different elements of 3'UTR. M. DNA Marker; 1. V-LUC 2213bp; 2. V-Δ3'UTR 1762bp; 3. V-VR 1940bp; 4. V-RCS2 2008bp; 5. V-CS2 2008bp; 6. V-CS1 1979bp; 7. V-SL 2017bp.

由 3'UTR 各元件构建的质粒其 VIRG 的序列差异见表 1。各元件的 5'端接 3'UTR 的 VR 端，经融合 PCR 与 LUC 3'半分子相连，其余步骤同上。经 PCR 和测序鉴定，获得了 7 个 VIRG 重组质粒：V-LUC (5'UTR-LUC-3'UTR)、V-Δ3'UTR (5'UTR-LUC, Δ 为完全缺失 3'UTR)、V-VR (5'UTR-LUC-VR)、V-RCS2 (5'UTR-LUC-RCS2)、V-CS2 (5'UTR-LUC-CS2)、V-CS1 (5'UTR-LUC-CS1)、V-SL (5'UTR-LUC-SL) 及内对照 V-Rluc (5'UTR-Rluc-3'UTR)。

表 1 DEN2-43 3'UTR 各元件序列
 Table 1 Sequence of elements within DEN2-43 3'UTR

Element	5' 3'
VR	AAGGCCAAAACATAACATGAAACAAGGCTAGAAGTCAGGTCGGATTAAGCCATAGTACGGAAAAAATATGCTACCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTTAAAAAGAAGTCAGGCCATTACAAATGCCATAGCTTGAGTAAACTGTGCAGCCTGTAGCACCTGAGAAGGTGTAATAATCT
RCS2	GGGAGGCCACAAACCATGGAAGCTGTACGCATGGCGTAGTGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCC
CS2	TGGGGGCCAAAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAGGACTAGAGTTAGAGGAGACCCCCCA
CS1	AAACAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACCAGAG
SL	ATCCTGCCGTCTCTCAGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAATGGTGCTGTTGAATCAACAGTTCT

1.3 RNA 制备和细胞转染

将上述构建的质粒分别用限制性内切酶 Spe 线性化，回收定量后按 T7 RNA 转录酶及 m⁷G 帽子结构类似物试剂说明书进行报告基因 VIRG 和内对照 V-Rluc 的体外转录。随后加入 Dnase 37 孵育 15 min 以去除模板 DNA，对纯化的转录产物通过电泳和分光光度计进行定量。

接种 BHK-21 细胞于 24 孔板，于 37 孵育过夜，分别将纯化的体外转录产物 (VIRG 和内对照 V-Rluc) 与脂质体 2000 按试剂盒说明书转染 BHK-21 细胞，置 37、5%CO₂ 培养箱中孵育。转染按照 VIRG 15 μg/孔及内对照 4 μg/孔的浓度进行。24 h 内于不同时间加入 100 μLEDTA 液收集细胞，-70 冻存，分别用于荧光素酶检测和 RT-PCR 分析。

1.4 荧光素酶检测及 Western blot 分析

根据 LUC 与 Rluc 在不同条件下氧化不同底物发光的原理,按照荧光素酶活性检测试剂盒说明书,将 50 μ L 收集的转染 VIRG 的 BHK 细胞加入 50 μ L 细胞裂解液,分别取 10 μ L 上清在 GloMax 发光仪上检测 LUC 和 Rluc 活性,二者比值为 VIRG 荧光素酶的相对活性。

为进一步鉴定荧光素酶的表达,按分子克隆实验指南对裂解的 BHK 细胞进行蛋白电泳,转膜后,分别与针对 LUC (按 1:1000 稀释) β -肌动蛋白 (按 1:1000 稀释) 的一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的二抗 (分别按 1:1000 稀释) 室温孵育 1 h,加底物显色。

1.5 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 分析

采用 RNA 抽提试剂盒对转染 VIRG 的 BHK 细胞提取总 RNA。由于 RNA 的降解常始于 3' 端,检测 LUC RNA 的靶序列位于 3' 末端, β -actin 为内对照。根据试剂说明书,采用 TaqMan 一步法 RT-PCR 试剂和 ABI 公司 PRISM 7900HT 进行实时荧光定量分析。计算 LUC 与 β -actin RNA 含量所需的标准曲线,分别以 LUC 体外转录产物和 BHK 细胞总 RNA 依次 10 倍稀释后作为标准品进行绘制。

以上述提取的总 RNA 为模板,采用 M-MuLV 反转录酶扩增 LUC 和 β -actin。反应体系 20 μ L,42 $^{\circ}$ C 温育 1 h,继续进行 PCR 反应。1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 统计学分析与半衰期计算

荧光素酶基因的相对含量,为不同时间实时 RT-PCR 测得 RNA 含量与 β -actin 的比值。翻译效率的比较是以转染 4 h 后 VR 元件的翻译水平为 100,其余元件与其比值进行计算的。每个 VIRG 的半衰期是经 RT-PCR 所测得 RNA 相对含量随时间变化作图而得。在 Excel 中利用公式 $y = me^{-bx}$ 获得指数曲线,再经公式 $t_{1/2} = (\ln 2)/b$ 计算半衰期^[3]。所有试验的均数、标准误差及 t 检验均在 Excel 完成。

2 结果

2.1 含 DEN2-43 株 3'UTR 元件的报告基因重组表达载体的构建与鉴定

为了构建包含 DEN2-43 3'UTR 各元件的 VIRG,本研究以萤火虫荧光素酶 (LUC) 为报告基因,其两侧分别与 DEN 5'UTR 及 3'UTR 的不同元件相连,构建了 7 个报告基因重组表达载体 (图 1)。由于 DEN 基因组编码区衣壳蛋白 C 的部分序列与 3'CS1 互补,参与 5'和 3'末端长范围 RNA-RNA 相互作用的环化结构,因此构建的所有报告基因均含有 DEN 5'UTR 和起始密码子 AUG 之后衣壳蛋白 C 基因的 108 个碱基。为对所构建的重组质粒进行体外转录,将各片段分别插入 pGEM-T 载体的 T7 启动子之后,并且将 DEN 基因组序列中 5'UTR 起始的 A 替换为 G 以利于 T7 转录^[12]。体外转录时,5'末端加入 m⁷G 帽子结构类似物,以便于 BHK 细胞内翻译起始因子的结合并增加了报告基因 mRNA 的稳定性。另外,为了使 LUC 的翻译完全处于 DEN UTR 调控中,LUC 基因从第二个密码子开始翻译,终止子被替换为 DEN 终止子。

将融合 PCR 所得 VIRG 各片段进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果 (图 1-B) 显示 7 个报告基因的片段大小均与预期一致,回收后插入 pGEM-T 载体,经 DNA 测序鉴定正确,说明已获得包含 DEN 3'UTR 不同元件的 VIRG 重组表达载体。

2.2 报告基因在 BHK-21 细胞的高效表达

为了评价所构建的 VIRG 是否能在 BHK-21 细胞进行高效表达,将含完整 3'UTR 的 V-LUC 与内对照 V-Rluc 的体外转录产物同时转染 BHK 细胞,分别于不同时间收集 BHK 细胞检测 LUC 的表达与活性。荧光素酶活性的检测结果 (图 2-A、B) 显示,LUC 可高效表达,转染后 5~8h 为表达高峰。Rluc 表达的峰值曲线与 LUC 基本一致,可作为内参照以减少每孔接种细胞状态和细胞数不同所引起的差异。

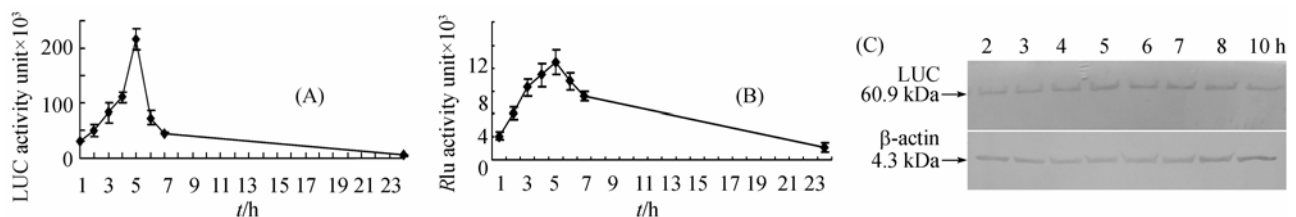


图 2 荧光素酶 VIRG 的表达与鉴定

Fig. 2 Expression and identification of LUC in VIRG. A and B: Schematic diagram of LUC or Rluc within VIRG. Luciferase activity was monitored at indicated time post-transfection. C: Result of Western blot of LUC and β -actin at indicated time post-transfection.

为进一步评价报告基因表达的可靠性,对转染的 BHK 细胞裂解后进行 Western blot 检测(图 2-C)。以 β -actin 为内对照, LUC 的表达峰值集中在 5~7 h, 与 LUC 活性的检测结果一致,表明可在此基础上对构建的 DEN2-43 株 3'UTR 不同元件的 VIRG 进行翻译效率的比较。

2.3 3'UTR 各元件报告基因的稳定性分析

为排除可能由于体外转录产物的降解影响其翻译效率的评估,将转染后不同时间收集的 BHK 细胞提取总 RNA,进行 RT-PCR 分析报告基因 RNA 的完整性及其含量。

由于 mRNA 的降解常始于其 3'端,因此选择 LUC 靠近 3'端的片段进行 RT-PCR 分析。电泳结果表明,4 个报告基因在转染 BHK 细胞后随时间变化 3 片段的衰减趋势无明显差异(图 3-A),说明各报告基因片段的完整性较为一致。实时荧光定量 RT-PCR 分析结果显示,报告基因的相对含量随时间延长下降(图 3-B),各元件 RNA 的 $t_{1/2}$ 差异无统计学意义(表 2)。这一结果与 RNA 完整性的分析结果一致,表明在转染 BHK 细胞后各报告基因 RNA 随时间的降解无明显差异,不会影响对其翻译效率的比较。

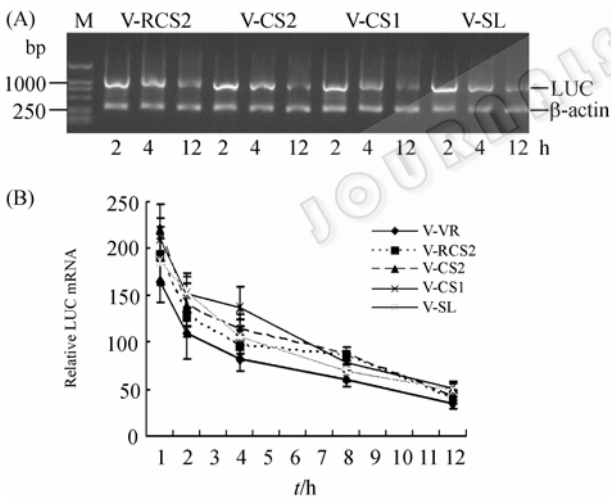


图 3 VIRG mRNA 的 RT-PCR 和实时 RT-PCR 分析

Fig. 3 Analysis of VIRGs mRNA RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR. A: RT-PCR analysis of LUC and β -actin within total RNA isolated from BHK cells at 2, 4 and 12 h post-transfection. B: Schematic diagram of LUC within total RNA isolated from BHK cells at indicated time point post-transfection by quantitative realtime RT-PCR analysis. The amount of β -actin mRNA was set to an internal control.

表 2 VIRG mRNA 稳定性分析

Table 2 Assay of the physical stabilities of VIRG mRNA

VIRG RNA	V-VR	V-RCS2	V-CS2	V-CS1	V-SL
$t_{1/2}$ (h)	6.0±0.8	6.4±0.8*	5.8±0.8*	6.0±0.4*	6.3±0.7*

*Not significantly different from mRNAs containing VR element.

2.4 DEN 3'UTR 各元件对翻译的调控作用

为了选择比较各元件对翻译影响的适宜表达时间,将不同时间收集的相应报告基因的 BHK 细胞进行裂解后检测 LUC 活性,观察 24 h 内 LUC 活性的变化曲线(图 4-A)。结果显示转染后 4 h LUC 活性呈高效表达,同时 RNA 尚未大幅降解($t_{1/2}$ 均大于 5 h,见表 2)因此选择转染后报告基因的表达活性比较各元件对翻译的影响。由于 VR 元件与完整 3'UTR 的翻译水平一致,因此以 VR 元件的 LUC 表达为基础 100,将各元件翻译效率与其比值做图(图 4-B)结果显示:转染 4h 后, RCS2 元件的翻译效率为 145±9, CS2 为 156±10,而 CS1 为 77±5, SL 为 65±7,完全缺失 3'UTR 几乎为 0,即 RCS2 与 CS2 的 LUC 翻译水平高于 VR 元件;CS1 与 SL 的翻译水平低于 VR 元件。上述结果说明,3'UTR 中 RCS2 与 CS2 元件对 LUC 报告基因的翻译起上调作用,而 CS1 与 SL 元件对 LUC 报告基因的翻译起下调作用,3'UTR 参与了报告基因翻译。

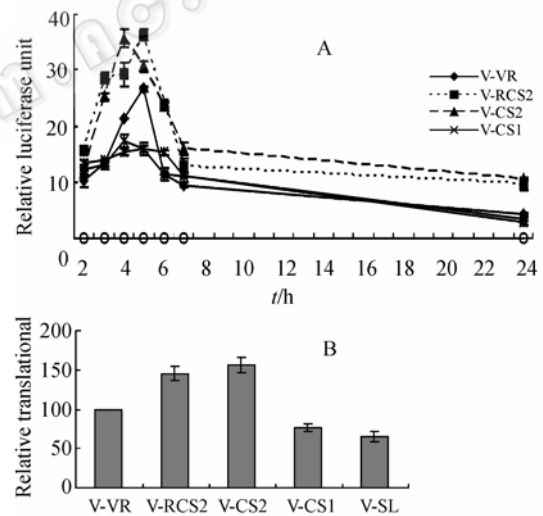


图 4 DEN2-43 VIRG mRNA 在 BHK 细胞的相对翻译效率

Fig. 4 Relative translational efficiency of DEN2-43 VIRGs mRNA in BHK cells. A: Schematic diagram of relative luciferase units at 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 24 h after VIRGs transfection into BHK cells. The value for V-Rluc was appointed as an internal control. Error bars indicate the standard deviation of the mean for duplicate samples. B: Diagram of the translational efficiency of VIRGs at 4 h post-transfection. The value for V-VR was set to 100 as the baseline. The relative translational efficiency of other VIRGs was calculated by dividing their relative luciferase units by the value of V-VR.

3 讨论

早期的研究认为,登革病毒基因组 5'UTR 与病

毒的翻译起始有关,而其 3' UTR 则参与病毒 RNA 的复制。近年来,随着反义的磷酸二酰胺吗啉代寡聚体 (PMO)、复制子及 VIRG^[3, 12, 13, 15]等新方法在黄病毒基因组翻译调控研究中的应用,则发现 3' UTR 参与了病毒的翻译调控,但其不同的 RNA 元件在此调控中的确切作用并不清楚。本研究采用 VIRG 技术探讨了登革 2 型病毒中国株 3' UTR 对翻译的影响。在首先明确所构建的 DEN2 中国株 VIRG 表达水平稳定的基础上,观察了病毒 3' UTR 不同 RNA 元件在翻译中的作用。

登革病毒基因组 5' 和 3' 非编码区之间存在较大范围的互补序列,所形成的基因组 RNA 锅柄状环化结构对于病毒复制必不可少,但其在病毒翻译中的作用并不重要。本研究发现, DEN2-43 病毒不含与 5' UTR 互补序列的 RCS2 和 CS2 元件的 VIRG 比含互补序列的 CS1 和 SL 元件的翻译水平显著增高,该结果表明登革 2 型病毒 5' 和 3' 非编码区间的环化结构并非为病毒翻译早期阶段所必需。Holden 等^[15]采用反义方式合成与 DEN2 3' UTR 环化序列互补的 PMO 对其进行封闭,从而阻断病毒基因组非编码区环化结构的形成,结果显示不能阻止病毒基因组 RNA 的翻译。Lo 等^[16]则通过构建西尼罗病毒的复制子,对其中 3' UTR 环化序列进行点突变和缺失突变,发现报告基因的翻译也不受影响。这种通过不同研究方法得出的类似结论,可能更接近病毒 RNA 3' UTR 调控其翻译的真实情况。同时也表明,采用简单易行的 VIRG 方法研究登革病毒 UTR 对翻译调控是可靠的。关于登革 2 型病毒 3' UTR 中 RCS2 和 CS2 元件上调病毒翻译水平的研究,目前尚未见报道。

登革病毒基因组 RNA 的环化结构,可能会由于其空间结构的位阻而影响病毒基因组接近核糖体翻译系统。本研究结果发现,含有 DEN2-43 病毒环化序列的 CS1 和 SL,可显著下调 VIRG 的翻译水平,也印证了这一推断。Li 等^[5]通过构建以氯霉素转乙酰基酶 (CAT) 为报告基因的西尼罗病毒 3' UTR SL VIRG 的结果表明,在 CAT 之后仅连接单一的 SL 元件,其翻译水平比不连任何其他元件要明显的低。据此推测,SL 在没有其它元件存在时,更易于接近 5' UTR 而导致基因组环化,从而降低了翻译效率。Holden 等^[17]采用缺失 DEN2 3' UTR 的 SL 元件而保留其余元件的 VIRG,发现其翻译水平下降,从而推测 SL 可以提高病毒翻译效率,这也可能与其余元件之

间的相互影响有关。另外, Alvarez 等^[14]在构建的分别缺失 DEN3' UTR 各元件而保留其余元件的复制子中,没有观察到这些元件缺失对翻译的影响。这一结果也可能表明,这些元件对病毒翻译的影响被保留的其余元件的作用掩盖了。

本研究通过 VIRG 技术分别对 DEN2-43 病毒 3' UTR 的 4 个元件进行的分析发现,它们在病毒的翻译调控中可能起着上调和下调的作用,这对进一步深入探讨登革病毒 RNA 翻译的分子机制提供了新的思路。但登革病毒翻译的调控是一个多阶段多因素参与的复杂过程,因而还应对病毒 3' UTR 上调和下调元件的功能进行验证。目前我们正进一步利用反向遗传学方法构建复制子,经点突变、缺失突变等深入细化各元件的功能,为阐明登革病毒 3' UTR 的不同元件对翻译调控的机理奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Hahn CS, Hahn YS, Rice CM *et al.* Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol*, 1987, 198(1): 33–41.
- [2] Markoff L. 5' and 3' noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 177–228.
- [3] Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology*, 2004, 329(1): 119–133.
- [4] Tilgner M, Deas TS, Shi PY *et al.* The flavivirus-conserved pentanucleotide in the 3' stem-loop of West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology*, 2005, 331(2): 375–386.
- [5] Li W, Brinton MA. The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation of chimeric mRNAs. *Virology*, 2001, 287(1): 49–61.
- [6] Khromykh A, Meka H, Guyatt K *et al.* Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2001, 75(14): 6719–6728.
- [7] Tilgner M, Deas TS, Shi PY *et al.* The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology*, 2005, 331(2): 375–386.
- [8] Elghonemy S, Davis WG, Brinton MA *et al.* The majority of the nucleotides in the top loop of the genomic 3' terminal stem loop structure are *cis*-acting in a West Nile virus infectious clone. *Virology*, 2005, 331(2): 238–246.
- [9] Corver J, Lenches E, Smith K *et al.* Fine mapping of a *cis*-acting

- sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J Virol*, 2003, 77(3): 2265–2270.
- [10] Deas TS, Binduga GI, Tilgner M *et al.* Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol*, 2005, 79(8): 4599–4609.
- [11] Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol*, 2006, 80(6): 2976–2986.
- [12] Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol*, 2005, 79(13): 8303–8315.
- [13] Edgil D, Diamond MS, Holden KL *et al.* Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. *Virology*, 2003, 317(2): 275–290.
- [14] Alvarez DE, Lella E, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3' UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, 2005, 339(2): 200–212.
- [15] Holden KL, Stein DA, Pierson TC *et al.* Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology*, 2006, 344(2): 439–452.
- [16] Lo MK, Tilgner M, Bernard KA *et al.* Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J Virol*, 2003, 77(18): 10004–10014.
- [17] Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology*, 2004, 329(1): 119–133.

Effects of RNA elements within 3' untranslated region on dengue virus translation

Yan Wei, Tao Jiang, Xiaofeng Li, Hui Zhao, Zhongyu Liu, Yongqiang Deng, Ran Liu, Chengfeng Qin, Ede Qin*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: **[Objective]** To investigate the effect of the well-defined RNA elements (VR, RCS2, CS2, CS1 and SL) within the 3' untranslated region (UTR) on dengue virus (DEN) translation. **[Methods]** We constructed a virus induced reporter gene (VIRG) by inserting the firefly luciferase (LUC) gene between 5' - and 3' -UTRs of DEN2-43 genome. Subsequently, a series of modified VIRGs consisting of different RNA elements in the 3'UTR were constructed. A 3' UTR-deficient VIRG was also constructed. The translational efficiency of all VIRGs was then analyzed by LUC detection, real time RT-PCR and Western blot assays. **[Results]** The translation of 3' UTR-deficient VIRG was abolished. The translational efficiency of VIRG with RNA element VR was comparable with that of VIRG with unmodified 3' UTR. The translational efficiency of VIRG with RNA elements RCS2 or CS2 was significantly higher while the translational efficiency of VIRG with RNA elements CS1 or SL was substantially lower than that of VIRG with RNA element VR. **[Conclusion]** These results suggested that 3' UTR was indispensable for DEN translation, and some RNA elements within 3' UTR might either up-regulate or down-regulate translation.

Keywords: dengue virus; 3' untranslated region; modulation of translation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600530; 30770107)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66948604; Fax: +86-10-63898239; E-mail: qinede@sohu.com

Received: 19 September 2007/ Revised: 10 January 2008