

戊型肝炎病毒 ORF1 多聚蛋白的不同功能域在细胞内的定位

黄慧, 郑子峥, 赵敏, 李婧娴, 赖旺生, 苗季, 张军, 夏宁邵*

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 为了探讨戊型肝炎病毒多聚蛋白 ORF1 的多个功能域在宿主细胞中的表达和定位情况, 我们首先将 psk-HEV 重组载体上的 ORF1 各功能域的编码序列克隆到绿色荧光蛋白载体 pcDNA3.1-GFP 上, 构建融合表达的重组质粒, 并测序和酶切鉴定其构建成功。再通过 Western Blot 验证各融合蛋白在细胞中正确表达, 并用激光扫描共聚焦显微镜观察融合蛋白在细胞内的分布和定位。在 Huh7 细胞中, RdRp 蛋白主要分布于细胞核内, HEL 蛋白以囊泡状分布于细胞核周, MET 蛋白以颗粒状存在于细胞核和细胞质中, PLP 蛋白呈极性分布于细胞核周, X 蛋白在细胞核和细胞质中均存在。各融合蛋白在细胞中的不同定位印证了对这些蛋白质的功能预测和体外研究结果, 这为进一步研究 HEV 不同蛋白功能提供了支持。

关键词: HEV; ORF1 蛋白; ORF3 蛋白; 定位

中图分类号: R373.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2011)03-0195-07

戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)是单股正链无包膜的 RNA 病毒, 主要经消化道传播, 其中最重要的传播方式为粪口途径。据报道, HEV 曾在一些不发达国家和地区大规模暴发流行并在全世界范围内散发流行, 对社会公共卫生产生了深远影响。其临床症状与甲型肝炎类似, 但死亡率更高, 尤其在孕妇中死亡率高达 20%^[1]。目前 HEV 的复制及包装机制仍不十分清楚, 对 HEV 各蛋白功能的研究并不完全。

HEV 基因组全长约 7.5 knt, 由 5 端非编码区、3 个读码框(Open reading frame, ORF), 即 ORF1、ORF2 和 ORF3)和 3 端非编码区组成。ORF1 位于 HEV 基因组 5 端, 编码一个约 1693aa 的非结构性多聚蛋白, 其功能可能涉及病毒复制和病毒蛋白的成熟。ORF1 含有多个酶活性功能区, 分别为多聚蛋白 C 端的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRp)区、RNA 螺旋酶(Helicase, HEL)区、木瓜蛋白酶样的半胱氨酸蛋白酶(Papain-like protease, PLP)区、位于多聚蛋白 N 端的甲基转移酶(Methyltransferase, MET)区及功能未知的 X 区和 Y 区^[2-3]。RdRp 存在于 ORF1 多

聚蛋白 C 端第 1200~1700 氨基酸位置, 研究表明原核表达纯化的 RdRp 蛋白仍具有 RNA 聚合酶活性^[4]。HEL 存在于 ORF1 多聚蛋白第 960~1204 氨基酸位置, 纯化的 HEL 蛋白在体外实验中具有 NTP 酶活性和解旋酶活性^[5]。PLP 存在于 ORF1 多聚蛋白第 440~610 氨基酸位置, 根据 Gorbalenya 等推测^[6-7], PLP 可能是在 ORF1 多聚蛋白翻译时或翻译后加工过程中将其特异性剪切从而产生不同的非结构功能蛋白。MET 存在于 ORF1 多聚蛋白第 60~240 氨基酸位置, 体外结果表明 HEL 将甲基转移到 HEV 基因组 RNA 5' 端形成 m7G 帽^[3]。据报道, X 区与聚 ADP 核糖结合^[8]。Y 是功能未知的区域。截止目前, 对 ORF1 功能基因的研究尚停留在预测及体外验证阶段, 仍不清楚 ORF1 多聚蛋白的翻译和翻译后加工过程。

ORF2 位于 HEV 基因组 3 端, 编码 HEV 病毒的主要结构蛋白。ORF3 编码一种能与细胞骨架相结合的磷酸化蛋白^[9], 报道显示 ORF3 表达的蛋白可能广泛参与 HEV 的免疫逃逸、病毒复制及组装等多个过程^[10-17]。

本研究克隆了 ORF1 中 5 个功能蛋白基因和 ORF3 蛋白基因, 并分别构建了与绿色荧光蛋白融合表达的重组质粒, 通过共聚焦显微镜观察这些 HEV 蛋白在 Huh7 中的定位情况, 观察各功能基因表达蛋白在真核细胞中的定位是否与预测相符合, 为进一步研究 HEV 蛋白在细胞中的作用提供证据支持。

收稿日期: 2011-02-09; 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30870514); 国家自然科学基金杰出青年基金(30925030); 传染病重大专项(2008ZX10404)

作者简介: 黄慧(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究

Tel: 13656009576; E-mail: huanghui@xmu.edu.cn

通讯作者: 夏宁邵, 研究员, 361005 厦门, 厦门大学国家传染病诊断试剂与工程疫苗技术研究中心 E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

材料与方 法

1 菌株、质粒、载体和抗体 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室用 CaCl₂ 法自行制备; pcDNA3.1-GFP 是通过 BamHI 和 EcoRI 酶切将 GFP 基因全长编码区(美国 NIH 的 Emerson SU 赠与)连入真核表达载体 pcDNA3.1(+)(Invitrogen)构建而成; psk-HEV(美国 NIH 的 Emerson SU 赠与)包含 Sar55-HEV 全长基因组; pMD18-T 购自 TaKaRa; 抗 GFP 鼠单抗购自 Santa Cruz Biotechnology.

2 重组质粒的构建 在 NCBI 的 GenBank 数据库

中查找 Sar55-HEV 全长基因组序列,并用 Oligo 软件设计引物(表 1),以 psk-HEV 为模板,通过 PCR 扩增出 RdRp (1461bp)、HEL (735bp)、MET (546bp)、PLP(480bp)、X(474bp)及 ORF3(372bp)片段,琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,连接入 T 载体后,用 EcoRI 和 XbaI 酶切鉴定阳性克隆。将测序正确的克隆载体用 EcoRI 和 XbaI 酶切,回收目的片段,与经相同酶切处理的 pcDNA3.1-GFP 连接,构建成真核表达重组质粒 pGFP-RdRp、pGFP-MET、pGFP-HEL、pGFP-PLP、pGFP-X 和 pGFP-ORF3。

表 1 HEV ORF1 不同功能域和 ORF3 基因的引物

Table 1 The primers of HEV ORF1 different functional domains and ORF3 gene

Functional domains	Primers
RNA-directed RNA polymerase (RDRP)	Fn: 5'-GAATTCATGGGTGGCGAAATTGGG-3' Rn: 5'-TCTAGATCATTCACCCGACACAGGATTG-3'
Methyltransferase (MET)	Fn: 5'-GAATTCATGGTTTCCGCCCGAGGTTTCTG-3' Rn: 5'-TCTAGATCAGCGCAGGTTGGAACATCG-3'
Helicase (HEL)	Fn: 5'-GAATTCATGGGCTGTCCAGTCACG-3' Rn: 5'-TCTAGATCAGAAAAAGTTATTAACGATTGCATCG-3'
papain-like protease (PLP)	Fn: 5'-GAATTCATGCACTGTAGGCGCTGGCTCTG-3' Rn: 5'-TCTAGATCAGAGATTGTGGCGCTCTGGGG-3'
X domain (X)	Fn: 5'-GAATTCATGCCGGATGGCTCTAAGGTATTCTG-3' Rn: 5'-TCTAGATCATGCTGTCCGTGCAACATCCTCA-3'
ORF3	Fn: 5'-GAATTCATGAATAACATGTCTTTGG-3' Rn: 5'-TCTAGATTAGCGGCGCGCCCCAGG-3'

3 细胞培养和转染 人肝源细胞系 Huh7 细胞(ATCC)用 DMEM (10% 胎牛血清(FBS, Hyclone), 100 μ g/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素)培养基培养。293FT 细胞(Invitrogen)用 DMEM (10% 胎牛血清, 100 μ g/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 1% 非必需氨基酸)培养基,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。上述细胞接种 12h 后按梭华(Sofast)脂体转染试剂(厦门太阳马)操作手册进行转染。

4 Western Blot 鉴定目的蛋白表达 转染 24h 后收集细胞,每孔加入 100 μ l DDM 裂解液(2m 的 1M HEPES, 1ml 的 100mM EGTA, 2ml 的 250mM MgCl₂, 2ml 的 5M NaCl 和 400ng 的 DDM 粉末,加去离子水配至成 100ml)并在冰浴中放置 30 min,离心收集上清液,然后加入上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min,取 20 μ l 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,硝酸纤维素膜电转印 50min,用 TN 缓冲液配置的 5% 脱脂奶粉封闭 30min,再依次加入一抗 GFP 鼠单抗孵育 60min,二抗 Alexa Fluor 680-GAM(Invitrogen)孵育 30min,最后用 Odyssey 红外激光成像系统(LICOR)扫膜。

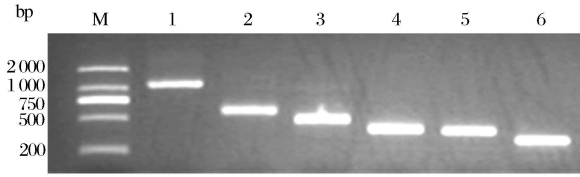
5 激光共聚焦显微镜扫描 将 Huh7 细胞接种于预先放置盖玻片的 6 孔板中,12h 后分别转染重组质粒 pGFP-RdRp、pGFP-HEL、pGFP-MET、pGFP-PLP、pGFP-X、pGFP-ORF3 和对照质粒 pcDNA3.1-GFP,24h 后 PBS 洗 1 次,4% 多聚甲醛常温固定 20min, PBS 洗 2 次,然后用 PBS-0.3% Triton 通透 10min, PBS 洗 2 次,最后 DAPI 核染 5min, PBS 洗 3 次,封片后用激光共聚焦显微镜(Leica)扫描。

结 果

1 目的基因真核表达载体的构建

以质粒 psk-HEV 为模板,用表 1 中所示引物分别扩增出 ORF1 中编码 5 个功能域 RdRp (1461bp)、HEL (735bp)、MET (546bp)、PLP

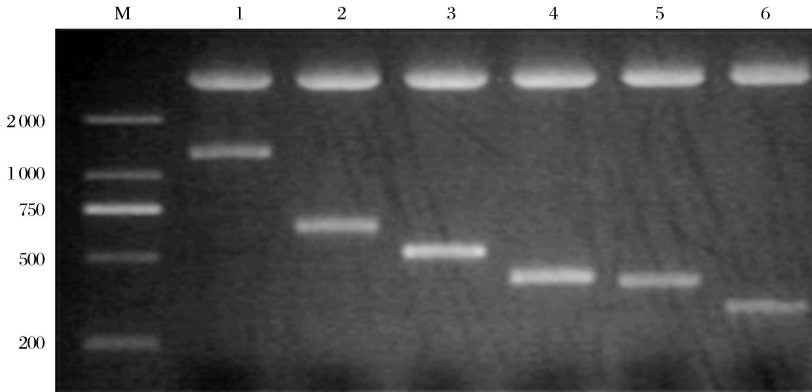
(480bp)、X(474bp) 的序列片段和 ORF3(372bp) 基因片段, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定各目的片段大小正确(图 1)。



M. DNA marker DL2000; 1 HEV ORF1 RdRp segment, 1461bp; 2 HEV ORF1 HEL segment, 735bp; 3 HEV ORF1 MET segment, 546bp; 4 HEV ORF1 PLP segment, 480bp; 5 HEV ORF1 X segment, 474bp; 6 HEV ORF3 segment, 372bp.

图 1 HEV ORF1 不同功能基因和 ORF3 基因的扩增

Figure 1 PCR amplification of various functional domains of HEV ORF1 and ORF3 gene



M. DNA marker DL2000; 1 HEV ORF1 RdRp segment, 1461bp; 2 HEV ORF1 HEL segment, 735bp; 3 HEV ORF1 MET segment, 546bp; 4 HEV ORF1 PLP segment, 480bp; 5 HEV ORF1 X segment, 474bp; 6 HEV ORF3 segment, 372bp.

图 2 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切鉴定 pcDNA3.1 载体中 HEV ORF1 不同功能基因和 ORF3 基因

Figure 2 Identification of various functional domains of HEV ORF1 and ORF3 genes in pcDNA3.1 vector using restriction enzymes *EcoRI* and *XbaI*

3 各目的蛋白在细胞内的定位情况

通过将相应质粒转染 Huh7 细胞, 我们观察了 GFP 融合的 HEV ORF1 各个功能域蛋白及 ORF3 蛋白在细胞内放大 1 000 倍的定位情况。在 Huh7 细胞中表达的 GFP-RdRp(绿色)蛋白分布于整个细胞内, 通过 DAPI 染色标记细胞核(蓝色)位置, 可以观察到 RdRp 的表达存在明显的细胞核定位现象(图 4, A); GFP-HEL 蛋白(绿色)聚集成泡状蛋白团, 分布上主要集中在细胞核周区域(图 4, B); GFP-MET 融合蛋白(绿色)也呈颗粒状聚集, 广泛分布于整个细胞, 细胞核内也能观察到明显的蛋白点状聚集(图 4, C); GFP-PLP 蛋白(绿色)全部集中

将各目的扩增产物连入 pMD18-T 载体, 测序结果表明所扩增各片段的序列没有突变。从 T 载体切下的目的片段并连接到 pcDNA3.1-GFP 真核融合表达载体上, 构建 pGFP-RdRp、pGFP-MET、pGFP-HEL、pGFP-PLP、pGFP-X 和 pGFP-ORF3(图 2)。

2 Western-Blot 鉴定目的蛋白的表达

将构建好的重组质粒 pGFP-RdRp、pGFP-HEL、pGFP-MET、pGFP-PLP、pGFP-X 和 pGFP-ORF3 分别转染 293FT 细胞, 转染 48h 后制备细胞总蛋白样品, Western-Blot 检测细胞内 GFP 融合蛋白(anti-GFP 抗体)。结果表明 GFP 融合蛋白在真核细胞内均能有效表达, 且表达蛋白的大小与预期情况(从左到右依次是 80kD、53kD、47kD、44kD、44kD 和 40kD)符合(图 3)。

在细胞核周区域, 并且在分布上存在明显的极性, 主要聚集在细胞核的一侧, 在其他位置只要少量分布在细胞核边缘(图 4, D); GFP-X 蛋白(绿色)在细胞核和细胞质中均有明显表达, 但其分布不同于同样在细胞核与细胞质内都有分布的 GFP-RdRp 及 GFP-MET, GFP-X 的分布主要集中在细胞核内及细胞一侧的部分区域内(图 4, E); 表达的 ORF3 融合蛋白(绿色)主要存在细胞质中, 部分存在细胞膜定位, 其中分布于细胞质中的蛋白呈颗粒状聚集(图 4, F); 作为对照表达的 GFP 蛋白集中分布在细胞核内(图 4, G)。

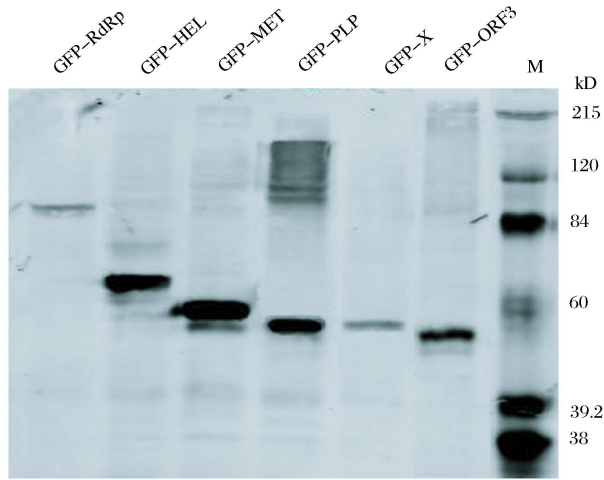


图 3 HEV ORF1 不同功能蛋白和 ORF3 蛋白的表达鉴定
 Figure 3 Identification of expression of various functional domains from HEV ORF1 and ORF3 by Western Blot

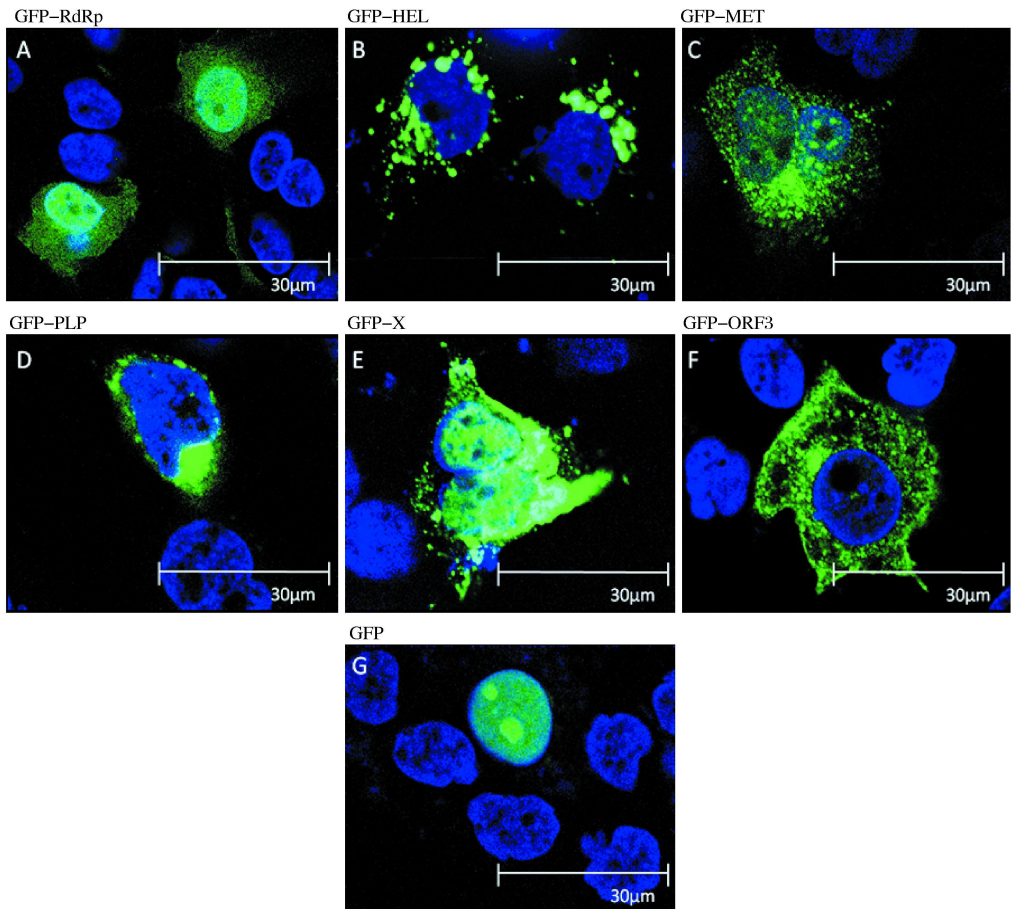


图 4 HEV ORF1 不同功能域蛋白和 ORF3 蛋白在宿主细胞内的定位
 Figure 4 Location for various functional domains of HEV ORF1 and ORF3 protein in huh7 cells

讨 论

目前 HEV 可分为 4 种基因型, 中国主要流行 1 型和 4 型 HEV。本研究中涉及到的 SAR55 属于 1 型 HEV。比对不同型 HEV ORF1 的序列, 发现其同源性很高, 大部分有 90% 以上, 可见 ORF1 具有较高的保守性^[18]。ORF1 包含多个功能域, 然而 ORF1 多聚蛋白的翻译和翻译后加工机制目前不清楚。体外合成感染性 HEV RNA 转染实验中 ORF1 多聚蛋白翻译后加工产生特异性的分子量在 35~40kD 之间的多肽, 而不是 186kD 的大蛋白^[19], 然而在大肠杆菌和 HepG2 细胞中 ORF1 重组质粒只能表达出分子量为 186kD 的大蛋白, 不能自动加工成各种功能蛋白^[4], 所以关于 ORF1 各功能基因的研究尚比较少, 其各基因所表达蛋白的潜在功能主要是通过序列比对并预测所得的^[18, 20]。关于 ORF1 各分功能基因有少量的体外重组表达的研究报道, 但对各功能蛋白在真核细胞内的情况却知之甚少。本文正是从真核细胞表达蛋白入手研究 ORF1 各功能蛋白的细胞定位情况, 从细胞定位的角度与已报道的 ORF1 蛋白的功能(序列预测及体外实验结果)进行相互印证。

有报道表明, 在体外实验中大肠杆菌表达的 RdRp 蛋白仍具有聚合酶活性, 该蛋白能与 HEV RNA 的 3 端颈环结合^[4], 这可能是 HEV 复制过程的起始机制^[21]。通过观察 GFP-RdRp 蛋白在细胞内的定位(图 4A), 我们发现 RdRp 蛋白主要在细胞核内有明显分布, 而细胞质中较少。这表明 RdRp 蛋白可能存在一个特异性的核定位信号, 该蛋白在细胞质中翻译完成后会被运输到细胞核内, 这与序列预测结果及体外实验结果相吻合, 表明 RdRp 基因所表达蛋白很可能参与 HEV 基因组的复制过程。

纯化的 HEL 蛋白在体外仍具有 NTP 酶活性和解旋酶活性^[5], 当突变或缺失 HEL 序列时, HEV 的复制被抑制^[22], 可见其在病毒基因组复制和转录过程中发挥了非常重要的作用。我们观察发现 GFP-HEL 蛋白在 Huh7 细胞中聚集呈泡状蛋白聚集(图 4B), 大部分在细胞核周区域, 这表明表达的 HEL 蛋白可能主要集中在某些核周囊泡状细胞器中, 典型的如内质网, 这表明其解旋酶活性可能主要发生在 RNA 合成过程的后期, 即离开细胞核到达内质网附近的这段时期。

MET 序列上有类甲病毒超家族的特征^[20], 报道称 MET 具有类似细胞内 S-腺苷甲硫氨酸依赖甲基转移酶的序列和尿苷转移酶活性, 在 HEV 基因组复制过程中催化甲基转移, 从而产生 HEV 基因组 RNA 5 端 m7G 帽^[3]。我们观察发现 GFP-MET 在细胞中的是以小颗粒形态存在的(图 4C), 在细胞核和细胞质中都有分布, 其细胞核定位印证 MET 蛋白确实可能参与了 HEV 基因组复制过程。

据 Gorbalenya A 等报道^[6, 7], PLP 可能是在 HEV 多蛋白翻译时或翻译后加工过程中发挥蛋白酶作用, 从而产生不同的非结构蛋白。共聚焦显微镜观察发现 PLP 蛋白主要集中在靠近细胞核的位置(图 4D), 其明显的极性分布表明该蛋白主要分布在某些极性细胞器上, 如高尔基体, 这与对该蛋白功能的预测(翻译后加工)相吻合, 预示着该蛋白很可能是在糙面内质网或高尔基体上执行对 HEV 蛋白的翻译后加工。

目前还不是很清楚 X 蛋白的功能, 根据 Egloff 等研究^[23], X 区与聚 ADP 核糖结合, 可能参与了细胞内 ADP 核糖代谢和翻译后蛋白质修饰的运输途径, 但在病毒复制和与宿主细胞作用的过程中功能未知。通过共聚焦显微镜观察, 我们发现 X 蛋白在细胞核和细胞质中都存在(图 4E), 该结果显示出该基因表达的蛋白带有核定位信号, 预示该蛋白可能与 HEV 基因组复制过程相关联。

ORF3 是一种能与细胞骨架结合的磷酸化蛋白^[9], 其 N 端可连接 HEV RNA 并与衣壳蛋白形成复合体^[2], 其 C 端具有多个功能, 在宿主细胞内能与多种信号分子相互作用, 感染后发病机制和宿主细胞免疫逃逸等信号通路中发挥一定作用^[11], 同时还有报道表明 ORF3 很可能参与了 HEV 的复制、组装及出胞过程^[12-16], 在体内实验中, ORF3 蛋白对病毒感染是必需的^[21, 24]。在本研究中, 我们以 ORF3 作为 GFP-蛋白融合细胞定位可信性的验证。通过观察 ORF3 蛋白在 Huh7 细胞中的定位, 我们发现 ORF3 蛋白存在于整个细胞质中, 并且在细胞膜上也有定位, 主要以颗粒状分布(图 4F), 这与已经报道的关于 ORF3 的定位及功能的研究成果完全一致。

通过本研究工作, 我们首次构建出 ORF1 中独立的 5 个功能蛋白基因的 GFP 融合表达质粒, 并通过共聚焦显微镜观察这些蛋白在 Huh7 中的定位情况。各蛋白的细胞定位, 不仅印证了现有的关于这些蛋白在体外实验及序列比对预测上所获得的研究

结果,同时还发现一个未知功能基因 X 可能参与了 HEV 的复制调控过程。这些结果有助于解释 ORF1 基因如何执行其生理功能,为进一步研究 HEV 不同蛋白功能提供了真核细胞上的证据支持。

(致谢:感谢美国 NIAID 的 Emerson SU 教授提供 psk SAR55-HEV 全长基因组重组质粒。)

参考文献:

- [1] Meng X J Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk [J]. *Vet Microbiol*, 140(3-4): 256-265
- [2] Tam A W, Smith M M, Guerra M E, et al Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome [J]. *Virology*, 1991, 185(1): 120-131
- [3] Koonin E V, Gorbalenya A E, Purdy M A, et al Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(17): 8259-8263.
- [4] Agrawal S, Gupta D, Panda S K The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [J]. *Virology*, 2001, 282(1): 87-101.
- [5] Karpe Y, A Lole K S RNA 5'-triphosphatase activity of the hepatitis E virus helicase domain [J]. *J Virol*, 84(18): 9637-9641.
- [6] Gorbalenya A E, Donchenko A P, Blinov V M, et al Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases A distinct protein superfamily with a common structural fold [J]. *FEBS Lett*, 1989, 243(2): 103-114
- [7] Gorbalenya A E, Koonin E V, Lai M M Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses Identification of rubin and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubin, alpha and coronaviruses [J]. *FEBS Lett*, 1991, 288(1-2): 201-205.
- [8] Karpe Y A, Lole K S NTase and 5' to 3' RNA duplex-unwinding activities of the hepatitis E virus helicase domain [J]. *J Virol*, 84(7): 3595-3602
- [9] Zafrullah M, Ozdener M H, Panda S K, et al The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton [J]. *J Virol*, 1997, 71(12): 9045-9053.
- [10] Meng X J Recent advances in hepatitis E virus [J]. *J Viral Hepat*, 17(3): 153-161.
- [11] Panda S K, Thakral D, Rehman S Hepatitis E virus [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(3): 151-180
- [12] Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, et al The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(25): 22759-22767.
- [13] Tyagi S, Surjit M, Lal S K. The 41-amino acid G-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor [J]. *J Virol*, 2005, 79(18): 12084-12087
- [14] Tyagi S, Surjit M, Roy A K, et al The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMBp) and expedites their export from the hepatocyte [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29308-29319
- [15] Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, et al Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces [J]. *Arch Virol*, 2008, 153(9): 1703-1713
- [16] Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, et al ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 8): 1880-1891
- [17] Chandra V, Kalia M, Hajela K, et al The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex [J]. *J Virol*, 84(8): 3857-3867
- [18] Ansari I H, Nanda S K, Durgapal H, et al Cloning, sequencing, and expression of the hepatitis E virus (HEV) nonstructural open reading frame 1 (ORF1) [J]. *J Med Virol*, 2000, 60(3): 275-283
- [19] Panda S K, Ansari I H, Durgapal H, et al The *in vitro*-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious [J]. *J Virol*, 2000, 74(5): 2430-2437.
- [20] Rozanov M N, Koonin E V, Gorbalenya A E. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the Sindbis-like supergroup of positive-strand RNA viruses [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 8): 2129-2134.
- [21] Graff J, Nguyen H, Yu C, et al The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques [J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 6680-6689
- [22] Thakral D, Nayak B, Rehman S, et al Replication of a recombinant hepatitis E virus genome tagged with reporter genes and generation of a short-term cell line producing viral RNA and proteins [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 4): 1189-1200

- [23] Egloff M P, Malet H, Putics A, et al Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains[J]. *J Virol*, 2006, 80 (16): 8493-8502
- [24] Huang Y W, Opriessnig T, Halbur P G, et al Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo[J]. *J Virol*, 2007, 81(6): 3018-3126

Localization of Functional Domains of HEV ORF1 in Cells

HUANG Hui, ZHENG Zi-zheng, ZHAO Min, LI Jing-xian, LAI Wang-sheng,
MIAO Ji, ZHANG Jun, XIA Ning-shao*

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: To investigate the expression and localization of various functional domains of ORF1 polyprotein and ORF3 protein of hepatitis E virus in host cells, the coding sequences of the various functional domains (RdRp, HEL, MET, PLP, X) of ORF1 were separately cloned into pcDNA3.1-GFP vectors for constructing the recombinant plasmids which were verified by enzyme digestion and sequencing. The exact expression of the fusion proteins were detected by Western Blot, and the distribution and localization were observed by the laser scanning confocal microscope (LSCM). In huh7 cells, GFP-RdRp proteins were found mainly in the nuclei, GFP-HEL proteins were distributed vesicularly around the nucleus, GFP-MET proteins were distributed granularly both in the nuclei and the cytoplasm, GFP-PLP proteins had polar distribution around the nucleus, and unknown GFP-X proteins were distributed uniformly both in the nuclei and the cytoplasm. Different localization of these proteins verified the previous data obtained from *in vitro* studies, providing a support for further research on the biological functions of various proteins coded by HEV genome.

Key words: hepatitis E virus; ORF1 polyprotein; ORF3 protein; localization

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn