



# 乙型肝炎病毒核心蛋白赖氨酸位点 K96 对病毒衣壳组装的影响

刘淼雅, 刘宽程, 梁宗锁

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘要:** 通过构建突变型蛋白表达质粒, 将乙型肝炎病毒核心蛋白 (Hepatitis B virus core protein, HBc) 的赖氨酸位点 K96 突变为谷氨酰胺 (Q) 或精氨酸 (R), 以分别模拟 HBc 的持续性乙酰化状态以及去乙酰化状态, 分析赖氨酸位点 K96 在病毒衣壳组装过程中的关键性作用; 通过建立瞬时转染模型, 将野生型及突变型核心蛋白表达质粒转染至细胞中, 分别检测突变后的核心蛋白的表达水平和衣壳组装水平, 比较分析不同突变对衣壳组装的影响。结果表明: 阻断赖氨酸位点 K96 的乙酰化修饰能够抑制 HBc 的表达, 并且显著降低病毒衣壳的组装水平; 而赖氨酸位点 K96 的持续性乙酰化状态对 HBc 的表达和病毒衣壳组装水平没有显著影响。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 核心蛋白; 赖氨酸位点; 衣壳组装; 乙酰化修饰

中图分类号: R373.21

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2022) 01-0103-06

## The effect of lysine residue K96 in the hepatitis B virus core protein on viral capsid assembly

LIU Miaoya, LIU Kuancheng, LIANG Zongsuo

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** By constructing mutant protein expression plasmid, this study aims to explore the role of lysine residue K96 in viral capsid assembly by mutating this lysine residue into glutamine (Q) or arginine (R), mimic the continuous acetylation or non-acetylation states of HBc, respectively and analyze the key role of lysine residue K96 in the process of viral capsid assembly. The wild-type (WT) and mutant core protein expression plasmids were transfected into cells by establishing a transient transfection model, to detect the expression level of the mutant core proteins and the level of capsid assembly respectively, and compare and analyze the effects of different mutations at this site on the capsid assembly. The results showed that blocking the acetylation of lysine residue K96 can inhibit the expression of HBc and also significantly reduce the level of viral capsid assembly, while the continuous acetylation state of lysine residue K96 had no significant effect on HBc expression or the level of viral capsid assembly.

**Key words:** hepatitis B virus; core protein; lysine residue; capsid assembly; acetylation modification

收稿日期: 2021-05-13 网络出版日期: 2021-07-02

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ19H190003)

作者简介: 刘淼雅 (1997-), 女, 浙江丽水人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学方面的研究。

通信作者: 梁宗锁, E-mail: liangzs@zstu.edu.cn

## 0 引言

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是一种严重危害全球人类健康的病原体。据世界卫生组织(World health organization, WHO)统计,全球有超过20亿人感染过HBV,其中有2.57亿为慢性感染者。HBV慢性感染往往造成严重的肝脏疾病,如慢性肝炎、肝硬化以及肝癌;全球每年有超过100万人的死亡是由HBV感染造成的<sup>[1]</sup>。乙肝疫苗和抗病毒药物的使用可有效预防或治疗HBV感染,但现有治疗HBV慢性感染的手段和疗效均有限,患者通常需长期乃至终身治疗,而且存在副作用和耐药风险<sup>[2]</sup>。因此进一步通过对HBV复制机制进行研究,寻找新的药物靶点对开发新的抗病毒药物具有重要的意义。

在新型抗HBV药物及策略研究工作中,病毒衣壳(Capsid)的组装是研究的热门靶点。HBV衣壳是由120个或90个核心蛋白(HBV core protein, HBc)二聚体组装而成<sup>[3]</sup>,HBV复制过程中的pgRNA包装、逆转录以及基因组DNA的合成均在病毒衣壳内进行<sup>[4]</sup>,破坏病毒衣壳的正常组装能有效阻断HBV的复制,因而对HBV病毒衣壳组装机制的深入研究将为靶向衣壳组装的抗HBV药物的研发提供基础<sup>[5]</sup>。

HBc是组成病毒衣壳的基本单位,含有183个氨基酸,由两个结构域组成,即N端结构域(N-terminal domain, NTD)和C端结构域(C-terminal domain, CTD)<sup>[3]</sup>,其中:CTD包含多个磷酸化位点,磷酸化修饰在病毒衣壳组装中起着重要的调控作用<sup>[6]</sup>;NTD是病毒衣壳组装的最小单位,位于NTD的赖氨酸位点K96在所有HBV基因型中是高度保守的<sup>[7]</sup>。赖氨酸位点K96的突变能够阻断病毒颗粒的释放<sup>[8]</sup>,HBc能以泛素依赖的方式与具有泛素结合能力的宿主蛋白 $\gamma$ 2-adaptin相结合并影响病毒颗粒的释放,而赖氨酸位点K96在HBc与 $\gamma$ 2-adaptin的结合中发挥了关键作用,赖氨酸位点K96与宿主泛素化修饰系统的互作能调控病毒颗粒的产生与释放<sup>[9-10]</sup>。具有泛素连接酶活性的NIRF能够与HBc结合,介导HBc通过泛素化-蛋白酶体途径降解<sup>[11]</sup>。HBc的赖氨酸位点K96在HBV病毒颗粒释放和HBc的降解中发挥着关键作用,且与宿主泛素化修饰系统密切相关。赖氨酸位点既可以泛素化修饰也可以乙酰化修饰,同一赖氨酸位点上不同修饰作用之间的相互转化可以调控蛋白质的功能和

稳定性等<sup>[12]</sup>。作为潜在的泛素化位点和乙酰化位点,HBc上的赖氨酸位点K96也可能通过其乙酰化修饰作用调控病毒衣壳的组装,但其具体作用及其机制仍不明确。

本文通过位点突变技术,将赖氨酸位点K96突变为谷氨酰胺(Q)或精氨酸(R),以分别模拟HBc的持续乙酰化状态和去乙酰化状态,构建突变型蛋白表达质粒,利用免疫印迹及非变性琼脂糖凝胶电泳技术检测和分析赖氨酸位点K96对病毒核心蛋白表达水平以及组装水平的影响,明确赖氨酸位点K96在病毒衣壳组装过程中发挥的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人肝癌细胞系HepG2由复旦大学袁正宏课题组赠送,pCI-HBc-WT(表达HBV野生型衣壳蛋白)由宾州州立大学Jianming Hu教授惠赠,pCI-HBc-K96Q(将K96位点由赖氨酸突变为谷氨酰胺)、pCI-HBc-K96R(将K96位点由赖氨酸突变为精氨酸)均由本实验室构建。

大肠杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 购于上海唯地生物技术有限公司,单点突变试剂盒、DMEM/F12细胞培养液、PBS、胎牛血清、胰蛋白酶、Penicillin-Streptomycin、化学发光显色液和预染蛋白marker选购于ThermoFisher Scientific,质粒小量提取试剂盒和质粒大量提取试剂盒(除内毒素)选购于康为世纪公司,琼脂糖选购于擎科生物公司,琼脂粉、蛋白胨和酵母提取物为英国Oxoid公司产品,核酸染料、DNA maker和10 $\times$  loading buffer为TaKaRa公司产品,X-tremeGENE HP DNA转染试剂盒为罗氏产品,蛋白酶抑制剂Cocktail为上海陶素产品,其他化学试剂均为上海生工生物公司产品;兔多克隆抗体Anti-HBcAg购自上海长岛抗体诊断技术有限公司和带HRP标签的羊抗兔IgG购自BBI生命科学有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变质粒的构建

以野生型pCI-HBc-WT为模板,利用PCR技术扩增含有目的突变位点的基因序列。取上/下游引物各0.6  $\mu$ L、DNA模板1  $\mu$ L、10 $\times$  reaction buffer 2.5  $\mu$ L、dNTP mix 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 19.8  $\mu$ L,在25  $\mu$ L体系中加入0.5  $\mu$ L的Pfu DNA聚合酶后,进行PCR循环扩增。PCR程序为95  $^{\circ}$ C 30 s、95  $^{\circ}$ C 30 s、55  $^{\circ}$ C 1 min、68  $^{\circ}$ C 5 min共15个循环。反应结束

后,将体系放置在冰上冷却 2 min,使体系温度低于 37 °C。在每个体系中加入 0.5 μL 的 DpnI 消化酶,上下颠倒混匀,离心 1 min,在 37 °C 下孵育 1 h 消化亲本 DNA,取 5 μL 体系进行转化扩增。

突变引物为 HBc-K96Q (上游引物: 5'-CACTAATATGGGCCTACAGTTCAGGCAACTC TTG-3', 下游引物: 5'-CAAGAGTTGCCTGAA CTGTAGGCCCATATTAGTG-3') 和 HBc-K96R (上游引物: 5'-CACTAATATGGGCCTAAGGTTT AGGCAACTCTTG-3', 5'-CAAGAGTTGCCTGA ACCTTAGGCCCATATTAGTG-3')。

### 1.2.2 细胞转染

HepG2 细胞按 1:3 接种在 60 mm 细胞培养皿中,过夜培养使细胞到达约为 70% 的融合度,按转染试剂盒操作说明配制转染体系,将含有野生型及突变型蛋白表达质粒的转染混合物在室温下孵育 20 min 后均匀地滴加在培养皿的四周,轻摇混匀。将培养皿放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 72 h。

### 1.2.3 Western blot 实验

收集转染后的细胞,用 NP-40 裂解液在冰上裂解后进行 SDS-PAGE 电泳。100 V 电泳 1.5 h, 300 mA 进行转膜 1.5 h, 5% 脱脂奶粉在室温下封闭孵育 1 h。1% 脱脂奶粉将一抗 1:1000 稀释,在 4 °C 下孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min; 用 1% 脱脂奶粉将二抗 1:10000 稀释,在室温下孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后滴加显影液,通过化学发光仪发光显影。

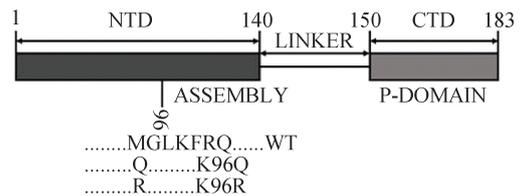
### 1.2.4 HBV 衣壳组装水平检测

HBV 衣壳的组装水平可通过非变性琼脂糖凝胶电泳及 Western blot 实验来检测,在非变性琼脂糖凝胶中分子量较小的未组装成病毒衣壳的核心蛋白单体或者寡聚体从胶中分离,而分子量较大的 HBV 病毒衣壳将集中在非变性胶中的特定位置,将其转印至硝酸纤维素膜后可通过 HBc 特异性抗体进行检测。具体如下:取 30 μL NP-40 细胞裂解液,依次加入 Micrococcal nuclease (15 U/μL) 0.25 μL 和 0.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 0.3 μL, 37 °C 下旋转孵育 1 h; 14000 r/min 离心 5 min, 取上清进行琼脂糖凝胶 22 V 电泳过夜; 利用虹吸原理,搭建盐桥和转膜过夜,通过紫外交联仪固定 NC 膜,并将交联后的 NC 膜在 80 °C 下烤膜 2 h,用 ddH<sub>2</sub>O 再次将膜湿润,后续步骤同 Western blot 实验。

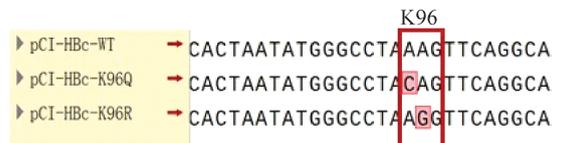
## 2 结果及分析

### 2.1 突变型蛋白表达质粒的构建与鉴定

蛋白质赖氨酸位点(K)的翻译后修饰如泛素化修饰和乙酰化修饰,能调节蛋白质的结构和生理功能<sup>[13-14]</sup>。HBV 核心蛋白中的赖氨酸位点 K96 在所有的 HBV 基因型中是高度保守的,是泛素化及乙酰化修饰的潜在位点<sup>[15]</sup>。分别将 K96 位点的赖氨酸残基(K)突变为谷氨酰胺(Q)或者精氨酸(R),以分别模拟赖氨酸位点的持续性乙酰化状态或去乙酰化状态,构建 HBc 的突变型蛋白表达质粒(见图 1(a))。在野生型 HBc 蛋白表达质粒 pCI-HBc-WT 的基础上,利用点突变技术原理,设计单点突变引物,将该位点赖氨酸密码子 AAG 突变为谷氨酰胺密码子 CAG,或突变为精氨酸密码子 AGG(见图 1(b))。利用 PCR 技术扩增含有目的突变位点的基因序列,通过酶切酶连技术构建突变型蛋白表达质粒,经测序验证,构建的突变质粒该位点序列均正确。



(a) 突变型 HBc 蛋白表达质粒的构建示意图



(b) 突变型 HBc 蛋白表达质粒序列对比

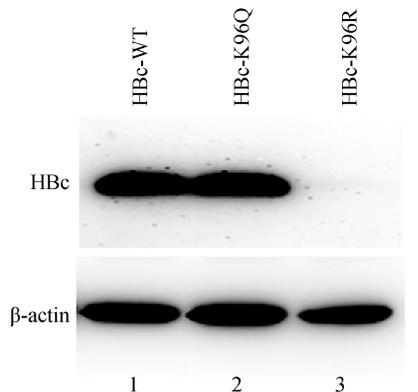
图 1 突变型蛋白表达质粒的构建与定点突变

### 2.2 赖氨酸位点 K96 的突变对核心蛋白表达水平的影响

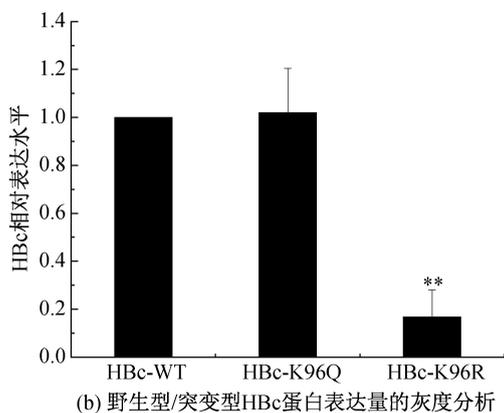
为研究赖氨酸位点 K96 不同的乙酰化状态对 HBc 的表达水平的影响,将构建好的野生型及突变型蛋白表达质粒转染至 HepG2 细胞中,通过 SDS-PAGE 及 Western blot 检测核心蛋白的表达水平。与野生型 HBc 相比,模拟去乙酰化状态的 K96R 突变体 (HBc-K96R) 的表达水平明显下降(见图 2(a)),进一步的量化分析显示,突变体的表达量与野生型相比具有显著性差异(见图 2(b)),说明阻断赖氨酸位点 K96 的乙酰化修饰能显著降低 HBV 核心蛋白的表达。图 2 结果显示,模拟持续性乙酰化状态的 K96Q 突变体 (HBc-K96Q) 的表达水平与野生

型核心蛋白的表达水平没有显著差别,K96位点的持续性乙酰化修饰对核心蛋白的表达没有影响。

构或者状态。以上结果表明,HBV核心蛋白赖氨酸位点K96不同的乙酰化状态能调控病毒衣壳的组装。



(a) 野生型/突变型HBc蛋白表达水平的检测



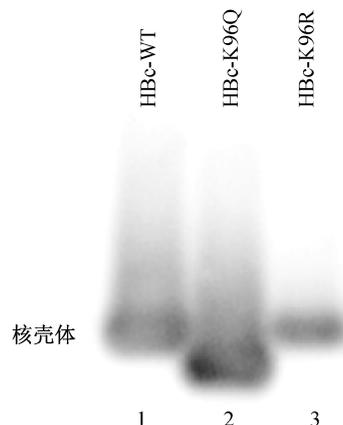
(b) 野生型/突变型HBc蛋白表达量的灰度分析

图2 K96位点的突变对核心蛋白表达水平的影响

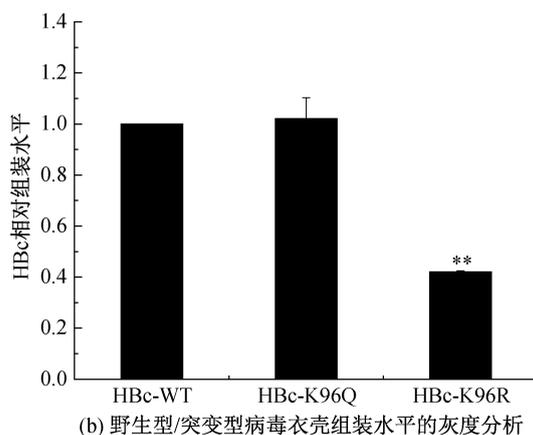
注:\*\* $p < 0.01$ 。

### 2.3 赖氨酸位点K96的突变对病毒衣壳组装的影响

HBV核心蛋白在不同的蛋白表达体系里单独表达时,在达到一定的表达水平后HBc能自发组装为HBV病毒衣壳<sup>[3]</sup>。本文为探明赖氨酸位点K96的乙酰化状态对病毒衣壳组装的影响,将野生型及突变型蛋白表达质粒转染细胞后,通过非变性琼脂糖凝胶电泳及Western blot实验来检测病毒核心蛋白的组装水平,结果如图3所示。图3表明:与野生型相比,模拟去乙酰化状态的K96R突变体组装成的衣壳的水平明显下降,而量化分析显示差异具有显著性,表明阻断赖氨酸位点K96的乙酰化修饰能显著降低HBV核心蛋白组装成衣壳的水平;K96Q突变体的组装水平与野生型相比没有显著差异,表明赖氨酸位点K96的持续性乙酰化状态对核心蛋白组装成衣壳的水平没有影响;形成的病毒衣壳在非变性胶中的迁移位置发生变化,其比野生型核心蛋白形成的病毒衣壳迁移速度更快,表明赖氨酸位点K96的持续乙酰化修饰可能影响病毒衣壳的结



(a) 野生型/突变型病毒衣壳组装水平的检测



(b) 野生型/突变型病毒衣壳组装水平的灰度分析

图3 K96位点的突变对病毒衣壳组装的影响

注:\*\* $p < 0.01$ 。

## 3 讨论

HBV核心蛋白是组成病毒衣壳的基本单位,在HBV复制过程中的多个环节发挥调控作用,且核心蛋白上关键氨基酸位点的翻译后修饰介导了其对病毒复制的调控作用,如磷酸化和泛素化修饰等<sup>[16-17]</sup>。HBV核心蛋白的NTD上的赖氨酸位点K96是高度保守的<sup>[7]</sup>,K96位点能通过宿主泛素化修饰系统的相互作用介导病毒核心蛋白的降解<sup>[11]</sup>,并在病毒颗粒的释放中发挥关键作用<sup>[9-10]</sup>。由于蛋白质上的赖氨酸位点既能被泛素化修饰又能被乙酰化修饰,以共同调节蛋白的结构和功能<sup>[12-13]</sup>,HBV核心蛋白的赖氨酸位点K96很可能通过其乙酰化修饰调控病毒衣壳的组装和病毒颗粒的释放。本文的结果证实,赖氨酸位点K96确实在病毒衣壳的组装中发挥着重要作用,其中阻断赖氨酸位点K96的乙酰化修饰能够显著抑制核心蛋白的表达以及病毒衣壳的组

装,且该位点的持续乙酰化状态对核心蛋白的表达以及病毒衣壳的组装水平没有影响,但是其可能影响了形成的病毒衣壳的结构或者状态。

本文发现,阻断赖氨酸位点 K96 的乙酰化修饰(K96R 突变体)能显著降低核心蛋白的表达水平,究其原因,一种可能是其转录翻译受到抑制,另一种可能是表达后的核心蛋白的降解被加快。由于该突变体表达质粒使用的是和野生型核心蛋白表达相同的载体,使用相同的外源启动子(CMV)和相同的细胞翻译系统(人肝癌细胞系 HepG2),因此,因转录翻译水平降低造成赖氨酸 K96R 表达水平下降的可能性很小。本课题组前期研究发现,HBV 核心蛋白的一种截短体 C149 在哺乳动物细胞中表达量极低,截短体的低表达量是由于其不能有效组装成病毒衣壳造成的<sup>[6]</sup>。本文中赖氨酸 K96R 突变体的表达量的降低可能是其组装成衣壳的效率过低造成的,突变体被转录和翻译出和野生型相似的蛋白水平,但由于其组装成衣壳的效率低于野生型,只有少部分 HBc 单体能组装成较为稳定的病毒衣壳,而未组装成衣壳的单体或者寡聚体则不稳定被快速降解,赖氨酸 K96R 突变体组装成病毒衣壳的水平显著下降,进一步验证了该推测。

赖氨酸位点 K96 模拟持续性乙酰化状态的突变(K96Q)虽然对核心蛋白的表达水平及衣壳组装水平没有影响,但其形成的病毒衣壳在非变性胶中的迁移速度比野生型快,这提示赖氨酸位点 K96 的乙酰化状态可能影响了形成的病毒衣壳的结构或者状态。一种可能是病毒衣壳的总电荷发生改变,由于赖氨酸位点 K96 暴露于衣壳的表面<sup>[8]</sup>,K96 位点的赖氨酸突变为谷氨酰胺后所带正电荷丢失,从而造成形成的病毒衣壳失去大量正电荷,在非变性胶中能更快的向正极移动。但也不能排除赖氨酸位点 K96 模拟持续乙酰化修饰的突变造成了病毒衣壳结构的改变,需要进一步的研究进行验证。

## 4 结 论

本文对 HBV 核心蛋白赖氨酸位点 K96 在病毒衣壳组装过程中的关键作用进行探究,并初步评估了赖氨酸位点 K96 在模拟不同乙酰化状态下对病毒衣壳组装的影响,主要结论如下:

a) 阻断赖氨酸位点 K96 的乙酰化能够降低核心蛋白的表达水平,而模拟该位点持续性乙酰化状态不影响核心蛋白的表达。

b) 阻断赖氨酸位点 K96 的乙酰化能降低病毒

衣壳组装水平,而模拟该位点持续性乙酰化状态对其组装水平没有影响。

## 参考文献:

- [1] World Health Organization. Global Hepatitis Report; 2017[R]. France: WHO, 2017.
- [2] 袁怡. 靶向 HBV 核心蛋白二聚体形成的药物筛选及鉴定[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020: 45-52.
- [3] Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, et al. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle[J]. Antiviral Research, 2015, 121(1): 82-93.
- [4] Seeger C, Mason W S. Molecular biology of hepatitis B virus infection[J]. Virology, 2015, 479/480: 672-86.
- [5] Xia Y, Liang T J. Development of direct-acting antiviral and host-targeting agents for treatment of hepatitis b virus infection[J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 311-324.
- [6] Ludgate L, Liu K, Luckenbaugh L, et al. Cell-free hepatitis b virus capsid assembly dependent on the core protein c-terminal domain and regulated by phosphorylation [J]. Journal of Virology, 2016, 90(12): 5830-5844.
- [7] Chain B M, Myers R. Variability and conservation in hepatitis B virus core protein[J]. BMC Microbiology, 2005, 5(1): 33-40.
- [8] Ponsel D, Bruss V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation [J]. Journal of Virology, 2003, 77(1): 416-22.
- [9] Rost M, Mann S, Lambert C, et al. Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(39): 29297-29308.
- [10] Langerová H, Lubyová B, Zábanský A, et al. Hepatitis b core protein is post-translationally modified through K29-linked ubiquitination[J]. Cells, 2020, 9(12): 2547-2550.
- [11] Qian G, Jin F, Chang L, et al. NIRF, a novel ubiquitin ligase, interacts with hepatitis B virus core protein and promotes its degradation[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(1): 29-36.
- [12] Spange S, Wagner T, Heinzl T, et al. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, 41(1): 185-198.
- [13] Narita T, Weinert B T, Choudhary C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(3): 156-174.
- [14] You Z, Jiang W X, Qin L Y, et al. Requirement for p62

acetylation in the aggregation of ubiquitylated proteins under nutrient stress[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5792.

[15] Yang F. Post-translational modification control of HBV biological processes [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2661-2673.

[16] Hu Z, Ban H, Zheng H, et al. Protein phosphatase 1 catalyzes HBV core protein dephosphorylation and is

co-packaged with viral pregenomic RNA into nucleocapsids [J]. *PLoS pathogens*, 2020, 16 (7): e1008669.

[17] Diab A, Foca A, Zoulim F, et al. The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBc) in the viral life cycle: Implications for the development of HBc-targeting antivirals [J]. *Antiviral Research*, 2018, 149: 211-220.

(责任编辑:张会巍)