棉铃虫 5 型质型多角体病毒 RNA 聚合酶的确证与功能机制研究

杨洁, 张松柳, 熊威, 钱齐, 王赵玮, 胡远扬, 周溪*

武汉大学生命科学学院, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: zhouxi@whu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-12; 接受日期: 2014-10-17; 网络版发表日期: 2015-02-03

国家自然科学基金(批准号: 31270190, 31400141)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20120141120020)资助项目
doi: 10.1360/N052014-00297

摘要 棉铃虫 5 型质型多角体病毒属于呼肠孤病毒科质型多角体病毒属, 以重要农业害虫棉铃虫为其天然宿主, 对棉铃虫的生物控制具有重要意义. 本文对棉铃虫 5 型质型多角体病毒第 3 片段编码的蛋白的功能进行了初步研究. 首先通过同源性对比, 推测其所编码的蛋白可能行使 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRP)的功能. 通过体外活性研究确定了该蛋白的 RdRP 活性, 并确定了其保守活性位点 GDD. 随后以病毒基因组 RNA 和 3'-OH 封闭的病毒基因组 RNA 为模板, 利用 Northern blot 方法研究该蛋白起始病毒基因组 RNA 合成的分子机制. 结果表明, 该病毒的 RdRP 主要通过引物非依赖的方式起始病毒基因组 RNA 的合成, 并且该 RdRP 蛋白并不具有末端转移酶活性. 最后, 对 RdRP 行使功能的生化条件进行探索, 发现 RdRP 功能的发挥需要二价金属离子 Mg^{2+} 的存在.

关键词

棉铃虫
质型多角体病毒
RNA 聚合酶
末端转移酶

双链 RNA(dsRNA)病毒是一类基因组由 dsRNA 组成的病毒, 包括许多重要的人类及动物病毒. dsRNA 病毒最大的特点是在病毒感染的细胞中, 以其内衣壳作为复制机器来进行基因组的复制^[1]. 呼肠孤病毒科(Reoviridae)病毒是 dsRNA 病毒中宿主范围最广且研究最多的一类. 呼肠孤病毒科的病毒含有一层蛋白质内衣壳结构, 以及 1~2 层蛋白质外衣壳, 基因组由 9~12 个节段的双链 RNA 分子组成^[2]. 呼肠孤病毒科中的轮状病毒属(Rotavirus)主要感染脊椎动物, 是导致 2 周岁以下的婴幼儿腹泻甚至死亡的主要病原; 而质型多角体病毒属(cytoplasmic polyhedrosis virus 或 Cypovirus, CPV)一般以昆虫为天然宿主. 不

同于呼肠孤病毒科中的其他病毒, CPV 的病毒粒子只含有单层衣壳结构, 这种特殊的结构使得 CPV 成为研究呼肠孤病毒复制的一种理想而简化的模型.

与单链 RNA 病毒不同, 呼肠孤病毒及其他 dsRNA 病毒的复制发生在病毒衣壳的内部. 在呼肠孤病毒感染的核心衣壳中, 包含有多个拷贝数的 RdRP(RNA-dependent RNA polymerase)复制酶. 每个 RdRP 拷贝都锚定在核心衣壳的五重轴突起结构的内部, 并与 10~12 个 dsRNA 基因组片段中的 1 个节段相互作用. 在病毒的 RNA 转录过程中, 呼肠孤病毒的 RdRP 蛋白用负链 RNA((-)RNA)为模板, 进行多次高效反应, 合成正链 RNA(+)RNA, 这些合成的

引用格式: 杨洁, 张松柳, 王赵玮, 等. 棉铃虫 5 型质型多角体病毒 RNA 聚合酶的确证与功能机制研究. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 183–189

Yang J, Zhang S L, Wang Z W, et al. Identification and characterization of *Helicoverpa armigera* cypovirus RNA dependent RNA polymerase. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 183–189, doi: 10.1360/N052014-00297

(+)RNA 作为 mRNA, 穿过病毒粒子五重轴顶端的孔状结构, 释放到细胞质中成为病毒蛋白翻译的模板. 在病毒感染的后期, 细胞质中新合成的病毒蛋白将组装成为子代病毒. 而在子代病毒组装过程中, RdRP 蛋白及 mRNA 也会随之一起包装. 在子代病毒内部利用 (+)RNA 为模板进行一轮转录复制, 形成 (-)RNA, 从而形成双链基因组 RNA. 新形成的子代病毒释放到细胞外进行下一轮的感染^[3]. 在这个过程中, 亲代基因组双链 RNA 始终留在核心衣壳内部, CPV 的病毒核酸采用全保留复制的方式增殖. 尽管对于 CPV 的研究已经取得了较多成果, 但是对于 CPV 以及呼肠孤病毒核酸复制的分子机制还有待进一步的探索.

根据病毒 RdRP 蛋白的一级结构和进化树分析, 病毒的 RdRP 一般含有 8 个保守基序(保守基序 I~VIII), 可以分为 3 个超家族(超家族 I, II 和 III). 除了一级结构上的相似性, 病毒 RdRP 在高级结构上也具有一定相似性^[4,5]. 但是, 由于呼肠孤病毒病毒复制的特点, 该类病毒的 RdRP 蛋白在高级结构具有与其他病毒 RdRP 蛋白不同的特点, 这种结构上的特点方便其在核心衣壳的限制内完成核酸的复制过程. 这些笼状聚合酶内部有 4 个通道, 不仅使 RNA 模板、核苷酸以及二价阳离子进入催化中心, 更能形成 2 个释放通道, 1 个让 RNA 模板进入, 1 个让 RNA 生成和输出. 尽管呼肠孤病毒的 RdRP 能结合 RNA 模板, 但其聚合活性受到核心衣壳蛋白的严格调控^[6].

目前, 对于病毒核酸复制的研究主要集中在呼肠孤病毒科中的轮状病毒中, 而对 CPV 中的研究较少. CPV RNA 复制机制的研究, 主要是关于病毒的几个核心衣壳蛋白在病毒复制过程中的作用及功能机制. 同时, 对病毒核酸复制中至关重要的 RdRP 蛋白的研究也是必需的. 对于 CPV 病毒复制酶 RdRP 的研究, 有助于更加清晰地研究病毒 RNA 复制的具体方式, 也有助于了解呼肠孤病毒科甚至整个 dsRNA 病毒基因组核酸的复制过程.

棉铃虫 5 型质型多角体病毒是本实验室于 2006 年在中国境内发现的第一株 5 型 CPV 病毒, 其天然宿主是重要的农业害虫棉铃虫(*Helicoverpa armigera*). 每年, 棉铃虫会给棉花(*Gossypium* spp.)生产造成巨大经济损失, 并且农药的大量使用也造成严重的环境污染问题. 棉铃虫 5 型质型多角体病毒则能够感染棉铃虫并致其死亡, 但是该病毒并不能感染脊椎动

物, 因此可以作为很好的对棉铃虫进行生物控制的工具. 因此, 本文以棉铃虫 5 型质型多角体病毒为对象, 研究其重要的聚合酶 RdRP 蛋白的生活功能, 探索 CPV 的复制机制, 为后期对 CPV 病毒进一步深入研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 病毒扩增与核酸提取

将本实验室保存的 HaCPV-5 型病毒多角体(cypovirus polyhedral inclusion body, CPB)稀释到 1×10^7 CPB/mL. 将稀释好的病毒多角体溶液撒到二龄棉铃虫的食物上. 在 28℃ 条件下培养 5~7 天, 直到棉铃虫出现病毒感染的症状. 将病毒感染的棉铃虫收集后用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)溶液匀浆. 55℃ 条件下用水饱和酚和氯仿进行核酸抽提. 用无 RNAase 的无菌去离子水溶解. -20℃ 保存待用.

1.2 质粒构建

为了构建在体外表达 HaCPV5 S3 片段编码的 RdRP 蛋白及其突变体, 以提取出的病毒基因组为模板, 进行 RT-PCR 反应扩增得到蛋白编码片段, 并将其通过 *Pst* I 与 *Sal* I 酶切位点克隆到 pMAL-c2x 载体(New England Biolabs, 美国)中, 使之能够在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达带 N 端麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)标签的重组蛋白. 为了构建将 RdRP 保守基序 GDD 突变为 GAA 的表达克隆, 用重叠延伸法进行定点突变, 并同样通过 *Pst* I 与 *Sal* I 酶切位点克隆到 pMAL-c2x 载体中.

1.3 重组蛋白的表达与纯化

将 MBP 标签融合蛋白 MBP-RdRP 在大肠杆菌 TB1 细胞中进行表达. (i) 将转化了目的基因表达质粒的 TB1 细胞在 LB(Luria-Bertani)培养基中进行培养至 A 值约为 0.6 后, 加入 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)在 25℃ 诱导表达; (ii) 采用 Amylose 树脂(New England BioLabs)进行纯化, 用超滤管(Amicon Ultra-15 filters, Millipore, 德国)将溶液最终浓缩到约 300 μL 溶液中, 再继续通过超滤将缓冲液体系替换为 25 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)-

1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES, pH7.5), 并储存在 -20°C 待用. 超滤完成的样品用 10%十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)和 Western blot 的方法进行检测.

1.4 RdRP 反应 RNA 模板的制备与纯化

采用体外转录的方法转录体外 RdRP 反应所需的 RNA 模板. 首先, 从病毒基因组 RNA 中用 RT-PCR 的方法扩增出目的 DNA 片段, 同时在目的片段 5'端的引物上引入 T7 启动子序列(TAATACGACTCACTATAGG). 以含 T7 启动子序列的 PCR 产物为模板用 T7 RNA 聚合酶(Promega, 美国)进行体外转录, 消化 DNA 模板后, 用 TRIzol(Invitrogen, 美国)法提取 RNA. 转录的 RNA 用含 7 mol/L 尿素的 6% 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离, 用 Poly-Gel RNA Extraction Kit(Omega Bio-Tek, 美国)进行纯化, 最终得到高纯度的模板 RNA.

对于需要 3'末端封闭的 RNA 模板, 用氧化法进行末端封闭. 将 RNA 溶解于 100 mmol/L 乙酸钠(pH5.0)中, 然后与 100 mmol/L NaIO_4 等体积混合从而使 RNA 的 3'羟基氧化, 在 25°C 反应 90 min 后, 用上述 RNA 高纯度纯化的方法提纯 3'末端封闭的 RNA.

1.5 体外 RdRP 反应

在本研究中, 标准的 RdRP 反应体系为: 25 mmol/L HEPES(pH7.5), 1.5 mmol/L MnCl_2 , 2 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L NaCl, 4 mmol/L DTT, 4 种 NTP 各 250 $\mu\text{mol/L}$, 10 U RNA 酶抑制剂(RNasin, Promega), 0.3 μg RNA 模板(约 200 nmol/L)和 800 nmol/L 纯化的蛋白, 总体积 25 μL . 于 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 中反应 1~1.5 h, 1:1 加入 2 $\times$ loading mix(10%甘油、0.01%溴酚蓝、50%去离子甲酰胺和 20%甲醛)终止反应.

1.6 Northern blot

在反应结束后加入 2 $\times$ loading mix 后在 65°C 水浴 5 min 随后迅速冰浴. 在 1.5%甲醛变性琼脂糖凝胶中进行电泳, 并采用下行毛细法将 RNA 转移至 N^+ 尼龙膜(Millipore)上并在 120°C 烘箱中烘烤 20~30 min 以固定 RNA. 然后将该尼龙膜置于杂交瓶中, 并加入杂交液和地高辛(digoxigenin, DIG)标记的特异性探针进行杂交, 杂交 12 h 后依次用 2 $\times$, 0.5 $\times$ 和 0.1 $\times$ 柠檬

酸钠(saline sodium citrate, SSC)缓冲溶液洗涤, 每次 15 min, 然后加入马来酸孵育 15 min, 再加入封闭液(Roche, 瑞士), 封闭 1 h 后加入带碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)的 DIG 抗体(Roche), 30 min 后将碱性磷酸酶化学发光底物 CDP(Roche)均匀地铺于膜上, CDP 作为底物在 AP 的催化下在 37°C 反应 10~15 min 后进行曝光和显影.

1.7 体外末端转移酶 TNTase 反应

在末端转移酶(terminal nucleotidyl transferase, TNTase)反应中, 在其他组分与标准 RdRP 反应体系相同的条件下, 用 250 mmol/L DIG-标记的 UTP 混合物(65% DIG 标记的 UTP 和 35%普通 UTP)取代 RdRP 反应体系的 4 种 NTP. TNTase 反应结束后, 在反应体系中 1:1 加入 2 $\times$ loading mix, 65°C 水浴 5 min 后冰浴. TNTase 反应产物在 15%甲醛变性胶中进行电泳, 然后通过下行毛细法转移至 N^+ 尼龙膜上并在 120°C 烘箱中烘烤 20~30 min 以固定 RNA. 随后依次用 2 $\times$, 0.5 $\times$ 和 0.1 $\times$ SSC 溶液洗涤, 每次 15 min, 然后加入马来酸孵育 15 min, 再加入封闭液(Roche), 封闭 1 h 后再用 AP 标记的抗 DIG 抗体(Roche)孵育该尼龙膜, 30 min 后以 CDP-StarTM(Roche)为底物与附在膜上的抗体在 37°C 烘箱中反应 10~15 min. 反应信号可以通过放射显影方法在 X 光片中观察到.

2 结果与分析

2.1 蛋白纯化

为了研究 HaCPV5 的复制机制, 在大肠杆菌 TB1 细胞成功表达了带 MBP 标签的 MBP-RdRP 蛋白及其突变体 MBP-GAA(将 RdRP 保守基序 GDD 突变为 GAA)蛋白(图 1). 加上 MBP 标签的 RdRP 融合蛋白的分子量为 181 kD. 体外纯化的野生型以及突变型蛋白进行凝胶电泳, 用 MBP 蛋白多克隆抗体进行 Western blot 检测. 图 1 中箭头所示的位置为野生型以及突变型蛋白的条带. 一般来说, 将病毒 RdRP 的 GDD 基序突变为 GAA 将导致该蛋白 RdRP 活性的丧失^[4,5,7].

2.2 RdRP 活性研究

为了研究 HaCPV5 的 RdRP 蛋白的活性, 在体外转录得到病毒基因组片段的不同部分的 RNA 模板.

图 1 MBP-RdRP 蛋白和 RdRP 突变蛋白 MBP-GAA Western blot 结果

A: MBP-RdRP 蛋白. 泳道 1: RdRP 野生型蛋白; 泳道 M: 预染 Marker; B: RdRP 突变蛋白. 泳道 1: RdRP 突变蛋白 MBP-GAA; 泳道 M: 预染 Marker

分别为 5'端的正链(5+), 5'端的负链(5-), 3'端的正链(3+)以及 3'端的负链(3-), 长度均为 108 nt. 以这 4 种 RNA 链为模板进行体外的 RdRP 反应. 反应的产物用 Northern blot 检测, 发现野生型蛋白可以很有效利用这 4 种 RNA 模板进行互补 RNA 链的合成(图 2, 泳道 2). 同样, 也用突变体以及 MBP 标签进行了体外的活性实验, 发现 GDD 保守位点的突变导致该蛋白丧失了 RdRP 的活性(图 2, 泳道 1), 而且 MBP 标签也没有反应(图 2, 泳道 3). 结果表明, RdRP 能够在不依

赖引物、宿主蛋白及病毒其他蛋白的情况下起始病毒 RNA 的合成.

2.3 TNTase 活性研究

很多关于病毒编码的 RdRP 的研究均发现, 这些 RdRP 还具有末端转移酶活性^[8~11], 这个活性对于一些以模板引物方式起始 RNA 合成的病毒 RdRP 来说是必需的, 并且这个活性被认为可能可以修复病毒受损的 RNA^[10].

为了验证 RdRP 蛋白是否同时具有 TNTase 的活性, 将 MBP-RdRP 与(3-)RNA 模板一同孵育, 在反应体系中只包含了 DIG 标记的 UTP, 使 RdRP 反应无法进行, 若该蛋白仍然能够将 DIG 标记的 UTP 加入到模板中从而被检测到, 则说明其具有末端转移酶活性. 但是在本研究中, 无论是在 3'末端是否封闭的情况下, 还是在其他的 NTP 不存在的情况下, 它不能在(3-)RNA 模板的 3'端添加 DIG 标记的 UTP, 因此排除了合成的 RNA 产物是由末端转移酶形成的这种情况(图 3, 泳道 1, 3). 而在所有的 NTP 都存在的条件下, MBP-RdRP 能显示出 RdRP 的活性, 能生成用 DIG 标记的产物(图 3, 泳道 2, 4). 因此可以证明, S3 片段所编码的蛋白具有 RdRP 的活性, 但是并不具有 TNTase 活性.

图 2 RdRP 反应结果

A: (3-)RNA; B: (3+)RNA; C: (5-)RNA; D: (5+)RNA. 泳道 1, 5: MBP-GAA; 泳道 2, 6: MBP-RdRP; 泳道 3, 7: MBP. 泳道 1~4: 存在 RNA 模板的反应体系, 只有野生型 MBP-RdRP 蛋白可以合成 RNA; 泳道 5~7: 缺少 RNA 模板的反应体系, 均未扩增出目标带, 说明反应体系没有污染

2.4 不同 Mg^{2+} 浓度对 RNA 合成的影响

二价金属离子对病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性具有重大影响, 甚至缺失这些离子将使得聚合酶活性完全丧失. 因此本研究也以 Mg^{2+} 为代表, 研究其不同浓度对 RNA 合成的影响. 本研究以 (3-)RNA 为模板, 在无任何二价阳离子的反应体系中研究不同 Mg^{2+} 浓度对 RdRP 合成 RNA 能力的影响. 产物在 Northern blot 显影后, 使用 Bio-Rad Quantity One software 对 RNA 的生成量进行定量. 以标准曲线展示出其线性关系, 结果显示, 当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时, RNA 的生成量最高. 低浓度时, 随着 Mg^{2+} 浓度的升高, RdRP 活性增高, 但当 Mg^{2+} 浓度达到一定值时, 高浓度的 Mg^{2+} 会影响 RdRP 的活性 (图 4).

图 3 TNTase 反应结果

以 (3-) 模板的非封闭链 (泳道 1, 2) 和封闭链 (泳道 3, 4) 为模板, 只添加 UTP 时, 均不能形成生成链 (泳道 1, 3); 所有 NTP 都存在的情况下 (泳道 2, 4), MBP-RdRP 能显示出 RdRP 的活性, 能生成用 DIG 标记的产物

图 4 不同浓度 Mg^{2+} 对 RdRP 合成 RNA 的能力影响

以 (3-)RNA 为模板, 研究 Mg^{2+} 浓度梯度分别为 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 mmol/L (当其浓度为 0 时, 加入 2 mmol/L 的 EDTA 螯合可能存在的 Mg^{2+})、其他反应条件均相同时对 RdRP 合成 RNA 能力的影响. 产物在 Northern blot 显影后, 使用 Bio-Rad Quantity One 软件对 RNA 的生成量进行定量. 以标准曲线展示出其线性关系

3 讨论

病毒的 RdRP 能够以多种方式起始互补链 RNA 的合成, RdRP 以何种方式起始互补链 RNA 的合成也是 RdRP 的重要基础性质. 一般来说, RdRP 起始 RNA 合成可以分为引物依赖 (primer-dependent) 和非引物依赖 (primer-independent) 2 种机制, 非引物依赖机制又称为从头合成 (*de novo*) 机制^[12,13]. 引物依赖机制即在引物的 3' 末端羟基后继续合成互补链 RNA, 引物依赖机制又包括许多类型. 而本研究发现, CPV 的 RdRP 蛋白可以在不依赖宿主细胞蛋白和病毒其他蛋白的条件下, 以不依赖引物的方式起始病毒 RNA 的合成.

与许多聚合酶相似, 一些 RdRP 还具有末端核苷酸转移酶活性^[8-11]. 末端核苷酸转移酶活性是一种能够在 RNA 的 3' 末端以不依赖模板的方式添加核苷酸的聚合酶活性. RdRP 的末端核苷酸转移酶活性对于一些以模板引物方式起始 RNA 合成的病毒 RdRP 来说是必需的, 同时该活性被认为可能可以修复病毒受损的 RNA^[10]. 是否具有末端转移酶活性也是 RdRP 的重要性质. 本研究发现, CPV 的 RdRP 蛋白并不具有末端转移酶活性.

双链 RNA 病毒相关研究表明, 呼肠孤病毒科病毒基因组的 5' 和 3' 末端的非编码区 (untranslated regions, UTR) 对于病毒的复制至关重要. 5' 以及 3' UTR 部分的碱基突变会导致 RNA 链合成的失败. 并且病毒 mRNA 可以通过 5' 和 3' 末端的相互作用而环化, 环化的结果是病毒的 RdRP 蛋白等复制机器能更高效地进行基因组的复制^[14-16]. 呼肠孤病毒科的 RdRP 蛋白结构相似, 整个蛋白主要由 4 个主要的区域组成, 而 4 个区域中最重要的是 GDD 保守区域. 通常用其来断定某蛋白是否可以行使 RdRP 的功能. 而本研究中也确定了 CPV 的 RdRP 的 GDD 保守区域. 该区域的突变确实导致了蛋白聚合酶活性的丧失. 这也进一步确定了 S3 片段编码的确实是 RdRP 蛋白.

此前大量的研究发现, 适宜的 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 对于 RdRP 功能的行使是必需的^[17]. 不同的 RdRP 对金属离子有一定的选择性, 如脊髓灰质炎病毒偏爱采用 Mn^{2+} 离子^[9], 而丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 以从头合成方式起始 RNA 合成的过程对 Mn^{2+} 具有专一性^[18], 但在以引物依赖方式起始 RNA 合成的过程

中则偏好 Mg^{2+} [8,19]。因此, 本研究探讨了不同浓度 Mg^{2+} 对 RNA 合成能力的影响。结果发现, CPV 在 Mg^{2+} 存在情况下可以起始 RNA 合成, 而且 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时, RNA 的生成量最高。

本研究确定了 HaCPV-5 的第 3 片段编码的蛋白是病毒的 RdRP 蛋白, 并且对该蛋白的活性进行了初

步的研究探索, 发现其可以在没有引物、病毒蛋白等因子的参与下起始病毒 RNA 的复制。确定了其保守基序 GDD, 并且发现其没有 TNTase 的活性。这些初步研究为更好地了解 CPV 病毒的复制提供了途径, 同时也为后续深入研究 CPV 病毒的复制机制奠定了基础。

参考文献

- 1 Reinisch K M. The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 714–716
- 2 Mertens P. The dsRNA viruses. *Virus Res*, 2004, 101: 3–13
- 3 Ahlquist P. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 371–382
- 4 Koonin E V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2197–2206
- 5 Johnson K N, Johnson K L, Dasgupta R, et al. Comparisons among the larger genome segments of six nodaviruses and their encoded RNA replicases. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1855–1866
- 6 McDonald S M, Tao Y J, Patton J T. The ins and outs of four-tunneled Reoviridae RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19: 775–782
- 7 Argos P. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 9909–9916
- 8 Behrens S E, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J*, 1996, 15: 12–22
- 9 Arnold J J, Ghosh S K, Cameron C E. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase ($3D^{pol}$). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J Biol Chem*, 1999, 274: 37060–37069
- 10 Ranjith-Kumar C T, Gajewski J, Gutshall L, et al. Terminal nucleotidyl transferase activity of recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerases: implication for viral RNA synthesis. *J Virol*, 2001, 75: 8615–8623
- 11 Fullerton S W, Blaschke M, Coutard B, et al. Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, 2007, 81: 1858–1871
- 12 Kao C C, Singh P, Ecker D J. *De novo* initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology*, 2001, 287: 251–260
- 13 van Dijk A A, Makeyev E V, Bamford D H. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1077–1093
- 14 Tortorici M A. Template recognition and formation of initiation complexes by the replicase of a segmented double-stranded RNA virus. *J Biol Chem*, 2003, 278: 32673–32682
- 15 Tortorici M A, Shapiro B A, Patton J T. A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA*, 2006, 12: 133–146
- 16 Patton J T, Spencer E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*, 2000, 277: 217–225
- 17 Ferrari E, Wright-Minogue J, Fang J W, et al. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1999, 73: 1649–1654
- 18 Zhong W, Uss A S, Ferrari E, et al. *De novo* initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol*, 2000, 74: 2017–2022
- 19 Lohmann V, Roos A, Korner F, et al. Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Virology*, 1998, 249: 108–118

Identification and Characterization of *Helicoverpa armigera* Cypovirus RNA Dependent RNA Polymerase

YANG Jie, ZHANG SongLiu, XIONG Wei, QIAN Qi, WANG ZhaoWei, HU YuanYang & ZHOU Xi

State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

The type 5 *H. armigera* cypovirus (HaCPV-5) was initially isolated by our laboratory in 2006 from a mixture of HaCPVs, and can quickly cause lethal disease in *H. armigera* that is one of the most serious agricultural pests in China. In this study, we expressed and purified recombinant HaCPV-5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) in *E. coli* and characterized its RdRP activity in detail. Our study revealed that this protein can initiate RNA synthesis without a primer or other viral or cellular factors. The conserved motif GDD was also identified by mutagenesis assay. Further results showed that the RdRP does not possess the terminal nucleotidyl transferase (TNTase) activity. Furthermore, we examined its RdRP activity under varying concentrations of Mg^{2+} to characterize the biochemical properties of RdRP.

***Helicoverpa armigera*, cypovirus, RNA dependent RNA polymerase, TNTase**

doi: 10.1360/N052014-00297