

小反刍兽疫病毒血凝素蛋白与受体蛋白 SLAM 的相互作用

蒙学莲, 窦永喜, 朱学亮, 骆学农, 才学鹏*

(中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 旨在利用免疫共沉淀技术验证小反刍兽疫病毒血凝素蛋白和受体蛋白 SLAM 间的相互作用。鉴于截短的 H 蛋白仍具有正常的与细胞受体结合的能力, 分别构建 pcDNA3.1-tH 真核表达载体和 SLAM 及其缺失突变体 (m1-胞外区、m2-无信号肽胞外区、m3-胞外区 N 端 29-136 位氨基酸和 m4-胞外区 C 端 137-240 位氨基酸) 编码基因的 pEGFP-N1 系列真核表达载体, 将测序正确的重组质粒共转染中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 细胞株, 利用免疫共沉淀技术验证 tH 蛋白与 SLAM 蛋白相互作用的关键氨基酸区段。结果表明, 成功构建了预期的重组表达载体, 转染 CHO 细胞后目的蛋白正确表达; 免疫共沉淀时, tH 能与 SLAM、m1、m2 和 m3 蛋白发生反应, 但没有与 m4 蛋白发生反应。由此可知, SLAM N 端 29-136 位氨基酸是决定 SLAM 与 PPRV H 蛋白结合的关键氨基酸区段, 这与麻疹病毒属其他宿主 SLAM 受体的研究结果一致。

关键词: 血凝素蛋白; SLAM; 转染; 免疫共沉淀; 相互作用

中图分类号: S852.659.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)03-0426-08

Interaction between Hemagglutinin Protein of Peste des Petits Ruminants Virus and Signalling Lymphocyte Activation Molecule

MENG Xue-lian, DOU Yong-xi, ZHU Xue-liang, LUO Xue-nong, CAI Xue-peng*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: This experiment was conducted to explore the interaction between PPRV Hemagglutinin (H) protein and signalling lymphocyte activation molecule (SLAM) by co-immunoprecipitation. In view of the truncated H protein still has normal binding capacity to cell receptor, the genes of tH, SLAM and its several deletion mutants which lacked transmembrane and intracellular fragments (m1), a signal peptide fragment (m2) or C-terminal fragment (amino acids 29-136, m3) or N-terminal fragment (amino acids 137-240, m4), were directionally cloned into eukaryotic expression vectors pcDNA3.1 and pEGFP-N1, respectively. The recombinant plasmids were co-transfected into CHO-K1 cells, and then the key amino acid regions of viral protein and SLAM protein interactions was identified initially by co-immunoprecipitation. The results showed that 1) The recombinant vectors were constructed successfully, and the proteins were expressed correctly in CHO cell; 2) tH was identified can interact with SLAM, m1, m2 and m3, and can not with m4 by co-immunoprecipitation. These results indicated that the N-terminal segment (amino acids 29-

收稿日期: 2013-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(31300142); 农业公益性行业科研专项(201103008); 兰州市科技计划项目(2013-4-40)

作者简介: 蒙学莲(1975-), 女, 甘肃靖远县人, 博士, 主要从事分子生物学与免疫学的研究, E-mail: xuelianm@126.com, Tel: 0931-8342716

* 通信作者: 才学鹏, 研究员, E-mail: caixp@vip.163.com

136) of SLAM was essential to bind to PPRV H protein. This finding is agreed with that of Morbillivirus receptor SLAM.

Key words: hemagglutinin (H) protein; signaling lymphocyte activation factor (SLAM); transfection; co-immunoprecipitation; interaction

病毒的感染与致病是非常复杂的,而病毒入侵是病毒生命周期中一个关键的过程,该过程存在多种蛋白质-蛋白质之间的相互作用,尤其是囊膜病毒,与宿主细胞膜发生融合是囊膜病毒入侵的第一步,其中涉及了病毒囊膜蛋白和宿主细胞表面受体蛋白之间的相互作用和构象变化。囊膜病毒的侵入一般是以其糖蛋白与受体的特异性识别与结合介导的膜融合为起始步骤,在系列分子作用机制下,2个膜融合成为1个膜,从而使病毒粒子侵入,完成其生命周期的第一个关键步骤。副黏病毒通过黏附蛋白(HN、H/G,因不同病毒而异)识别、结合相应的特异性受体来启动侵染细胞的过程。从分子水平上研究黏附蛋白与受体的相互作用,既有助于认识病毒侵入过程的本质,又有利于找出其弱点,从而达到防控的目的。

小反刍兽疫(peste des petits ruminants, PPR)是由副黏病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(Morbillivirus)小反刍兽疫病毒(PPR virus, PPRV)感染小反刍动物引起的急性、热性、高度接触性的传染病。PPR自1940年首次记述发生于非洲以来呈扩大蔓延的趋势,中国2007年首次发生于西藏自治区。与其他病毒一样,PPRV侵染宿主细胞的“核心”机制是病毒血凝素蛋白(H蛋白)与特定受体结合进而感染宿主细胞。现已证实,宿主信号淋巴细胞激活因子(SLAM/CD150)是PPRV、麻疹病毒(measles virus, MV)、犬瘟热病毒(CDV)和牛瘟病毒(rinderpest virus, RPV)的细胞受体^[1-4]。最近,研究者证实脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白4(poliovirus receptor related 4, nectin-4)也是PPRV和MV的受体^[5-6]。

麻疹病毒属H蛋白包含有1个N末端胞质尾区、跨膜区(TM)、茎区和与受体结合的C末端头结构域。去除膜内区域的截短H蛋白(truncated H protein)仍具有正常的与受体结合的能力,而且第58-61、429-438位氨基酸可能是H蛋白与SLAM相互作用的功能区^[7-8]。而SLAM的V结构域是与病毒蛋白结合的功能区,包含与病毒蛋白在空间结构上特异结合的关键位点。V结构域第

64、67、69、73、85、119、121和130位8个氨基酸是其与病毒H蛋白结合的关键位点,分布于这2种蛋白相互结合形成的 β 折叠面上,其中PPRV、RPV和CDV的H蛋白通过 β 螺旋的顶端与SLAM胞外域的 β 折叠相结合,而MV的H蛋白通过 β 螺旋的侧面与SLAM结合^[5,7,9-10]。C. Hu等利用酵母双杂交技术证实了SLAM分子上的27-135位氨基酸区域是与MV H蛋白相互作用主要区域,并且利用这段多肽筛选得到了2个能抑制麻疹病毒侵染的十肽^[8]。

因此,笔者构建了SLAM及其胞外区、缺失信号肽的胞外区、胞外区N端29-136位氨基酸和胞外区C端137-240位氨基酸的缺失突变体和PPRV tH的真核表达载体,利用免疫共沉淀技术验证蛋白间的相互作用,并确定SLAM与病毒蛋白相互作用的关键性氨基酸区段。这为后续SLAM与病毒蛋白相互作用关键位点的确定以及新疫苗等研究奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 pcDNA3.1(+)和pEGFP-N1真核表达质粒购自Promega公司; *E. coli* DH5 α 菌种、含SLAM ORF基因序列的重组质粒pGEM-SLAM和含PPRV H基因序列的重组质粒pET30a(+)-H均由本实验室保存;中国仓鼠卵巢细胞CHO-K1细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Hind* III、*Kpn* I、*Xba* I、*Taq* DNA聚合酶、dNTP均购自日本TaKaRa公司; T4 DNA连接酶购自Promega公司; QIAprep[®] spin Miniprep试剂盒购自QIAGEN公司; 细胞培养基F12 K、G418、脂质体Lipofectamine2000均购自Invitrogen公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 硝酸纤维素膜购自GE Healthcare公司; 免疫共沉淀试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; HRP标记的山羊抗兔IgG抗体购自Sigma公司; 兔抗山羊SLAM抗体、兔抗PPRV H

抗体由本实验室制备并保存。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体的构建 以 PPRV *H* 基因和山羊 *SLAM* 基因为模板,设计引物(见表 1)。在 pEGFP-N1 系列表达载体上、下游引物中分别引入了 *Hind* III 和 *Kpn* I (下划线部分);在 pcDNA3.1/

tH 上游引物中引入了 *Kpn* I 位点(下划线部分),下游引物中引入了 *Xba* I 位点(下划线部分)。胶回收目的片段,对目的片段及载体进行双酶切,胶回收酶切产物,连接、转化,挑取单克隆,PCR 及双酶切鉴定,对所得到的阳性重组质粒进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

| 基因名称 Name of gene | 引物(5'—3') Primer | 片段大小/ bp Fragment |
|---------------------------------|---|-------------------|
| <i>SLAM</i> (ORF) | C AAGCTT <u>ACC</u> ATGGATCCCAAAGGGCTCCT GG GGTACCCC <u>ATG</u> CTCTCTGGAACCGTCACACT | 1 014 |
| <i>m1</i> (缺失跨膜区和胞内区的胞外区) | C AAGCTT <u>GAT</u> GGATCCCAAAGGGCTCCT GG GGTACCCC <u>ATT</u> AGTCCCCATTGTCTTGATTCTG | 720 |
| <i>m2</i> (缺失信号肽的胞外区) | C AAGCTT <u>GAT</u> GTTGACCAGTCCACAAAGACG GG GGTACCCC <u>ATT</u> AGTCCCCATTGTCTTGATTCTG | 636 |
| <i>m3</i> (缺失胞外区 C 端的胞外区) | C AAGCTT <u>GAT</u> GTTGACCAGTCCACAAAGACG GG GGTACCCC <u>ATG</u> GAGACCTGCTCATAGAGCTTC | 342 |
| <i>m4</i> (缺失胞外区 N 端的胞外区) | C AAGCTT <u>GAT</u> GACTCCGCAAATTAAGGTGTTG GG GGTACCCC <u>ATT</u> AGTCCCCATTGTCTTGATTCTG | 294 |
| <i>tH</i> (PPRV <i>H</i> 基因胞外区) | GG GGTACC <u>ATG</u> AGGCTTCACCGAGCCACC GC TCTAGAG <u>ACT</u> GGATTACATGTTACCTC | 1 653 |

1.2.2 细胞转染 按 $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 接种 CHO-K1 细胞至六孔板中,待细胞长至 90% 融合时共转染,以 pEGFP-N1 转染为对照组。具体方法:①将 2 μg pEGFP-N1-*SLAM*、pEGFP-N1-*m1*、pEGFP-N1-*m2*、pEGFP-N1-*m3* 和 pEGFP-N1-*m4* 分别稀释到 100 μL 的 Opti-MEM[®] I 细胞培养基中,10 μg pcDNA3.1-*tH* 稀释到 500 μL 的 Opti-MEM[®] I 细胞培养基中,4 μg pEGFP-N1 稀释到 200 μL 的 Opti-MEM[®] I 细胞培养基中;②将 60 μL 脂质体 lipofectamine[™]2000 稀释到 1 200 μL 的 Opti-MEM[®] I 细胞培养基中,室温放置 5 min;③按试验设计合并稀释的质粒和脂质体混合物(表 2),轻柔混匀,室温放置 20 min;④将六孔板中培养基换用 2 mL Opti-MEM[®] I 细胞培养基,加入转染混合液,并轻柔混匀,置于 CO₂ 培养箱中(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂) 孵育;⑤5 h 后,弃去培养基,换用 F12 K 完全培养基继续培养。

表 2 转染分组

Table 2 Groups of transfection

| 组别 Group | 质粒及剂量 Plasmid and dose |
|----------|---|
| 1 | pEGFP-N1(4 μg) |
| 2 | pEGFP-N1- <i>SLAM</i> (2 μg) + pcDNA3.1- <i>tH</i> (2 μg) |
| 3 | pEGFP-N1- <i>m1</i> (2 μg) + pcDNA3.1- <i>tH</i> (2 μg) |
| 4 | pEGFP-N1- <i>m2</i> (2 μg) + pcDNA3.1- <i>tH</i> (2 μg) |
| 5 | pEGFP-N1- <i>m3</i> (2 μg) + pcDNA3.1- <i>tH</i> (2 μg) |
| 6 | pEGFP-N1- <i>m4</i> (2 μg) + pcDNA3.1- <i>tH</i> (2 μg) |

1.2.3 免疫共沉淀 转染 48 h 后,弃去培养基,用预冷的 PBS(pH 7.4)漂洗 2 次,向各孔内加入 500 μL RIPA 裂解液,冰浴裂解 30 min。收集细胞裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min;将上清转移到新的 1.5 mL 离心管内。根据 BBI 公司的 Immuno-

precipitation Kit 使用说明书,用抗 PPRV tH 抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀,用 45 μ L 1 \times loading buffer 溶解,煮沸 5 min,稍离心后进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测。

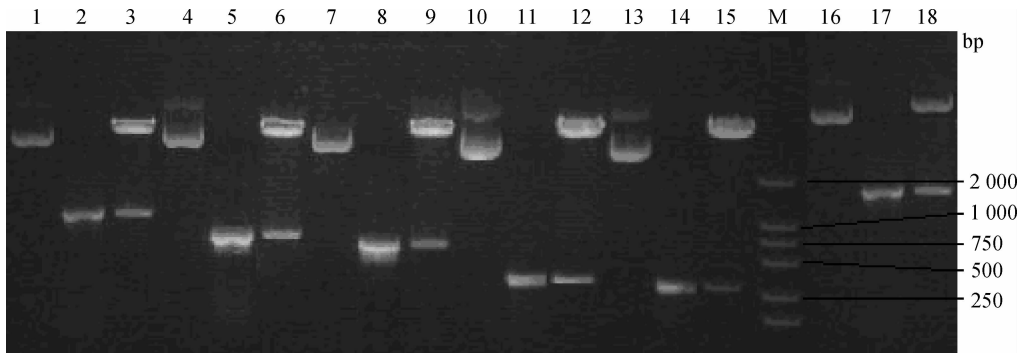
1.2.4 Western blotting 检测 用 10% Tricine SDS-PAGE 胶进行电泳,用半干电转仪转膜后,5% BSA 封闭 1 h,然后分别加入 1:200 稀释的兔抗山羊 SLAM 和 PPRV H 的多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育后, TBST 洗膜 3 次,加入 1:2 000 稀释的羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,将 NC 膜洗涤后浸于 10 mL 底物溶液中,避光反应,出现条带后立即终止反应,室

温保存。

2 结果

2.1 真核表达载体的构建及鉴定

将目的片段分别插入 pEGFP-N1 和 pcDNA3.1 载体,所构建的重组表达载体经 PCR、双酶切鉴定均为阳性(图 1);测序结果表明,各目的基因已正确插入到表达载体中且保持正确的阅读框,分别命名为 pEGFP-N1-SLAM、pEGFP-N1-m1、pEGFP-N1-m2、pEGFP-N1-m3、pEGFP-N1-m4 和 pcDNA3.1-tH。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1,4,7,10,13. pEGFP-N1 系列表达载体质粒(pEGFP-N1-SLAM、pEGFP-N1-m1、pEGFP-N1-m2、pEGFP-N1-m3 及 pEGFP-N1-m4);16. pcDNA3.1-tH 质粒;2,5,8,11,14,17. 重组质粒的 PCR 产物;3,6,9,12,15,18. 重组质粒的酶切产物

M. DL2000 DNA marker; 1,4,7,10,13. Plasmids of pEGFP-N1-SLAM, pEGFP-N1-m1, pEGFP-N1-m2, pEGFP-N1-m3 and pEGFP-N1-m4; 16. Plasmid of pcDNA3.1-tH; 2,5,8,11,14,17. PCR products of recombinant plasmids; 3,6,9,12,15,18. Recombinant plasmids digested by enzymes

图 1 重组表达质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmids

2.2 重组质粒在 CHO-K1 细胞中的表达

转染后 48 h 观察融合蛋白在 CHO-K1 细胞中的表达情况。结果显示,转染 48 h 后观察到了亮而密的荧光(图 2)。

2.3 Western blotting 分析表达蛋白

分别利用抗 PPRV、SLAM 多克隆抗体进行分析,结果表明,转染目的基因表达质粒的 CHO-K1 细胞中均可检测到 tH 蛋白和 SLAM 及其系列缺失突变体蛋白的表达(图 3),这说明所有目的蛋白均获得正确表达。

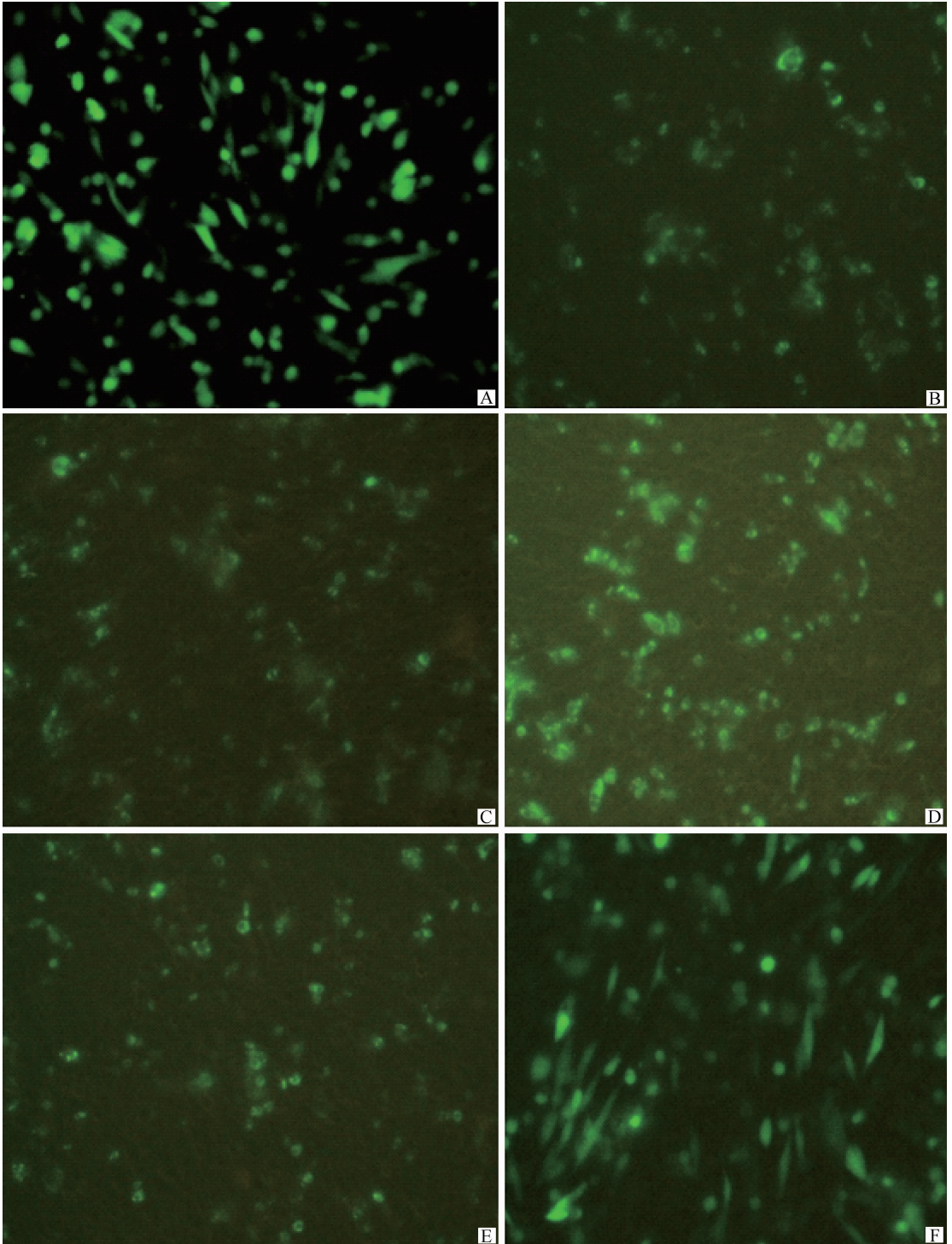
2.4 山羊 SLAM 与 PPRV H 蛋白相互作用的功能片段

山羊 SLAM 及其突变体 pEGFP-N1-SLAM、pEGFP-N1-m1、pEGFP-N1-m2、pEGFP-N1-m3 和 pEGFP-N1-m4 分别与 pcDNA3.1-tH 共转染至培养在 6 孔板上的 CHO 细胞。转染后 48 h,进行免

疫共沉淀及 Western blotting 检测。结果显示,用抗 tH 免疫兔血清进行免疫共沉淀时,能沉淀出 SLAM、m1、m2 和 m3 蛋白,但不能将 m4 蛋白沉淀下来;用抗山羊 SLAM 免疫兔血清进行免疫共沉淀时,转染 CHO-K1 细胞中表达的 SLAM、m1、m2 和 m3 可将 tH 蛋白免疫沉淀下来,而 m4 也不能将 tH 蛋白免疫沉淀下来(图 4)。这表明 SLAM 胞外区的 N 端是与 H 蛋白相互作用的重要位点。

3 讨论

H 蛋白是 PPRV 上的一种重要的跨膜糖蛋白,其主要作用是与宿主细胞膜受体结合,调节病毒吸附并侵入宿主细胞^[11-12]。现已证明,H 蛋白的膜内区域与受体结合功能无关,去除膜内区域的截短 H 蛋白仍具有正常的与细胞受体结合的能力^[13]。MV H 蛋白上 58-61、429-438 位氨基酸是决定与



A~F. 分别是 pEGFP-N1、pEGFP-N1-SLAM + pcDNA3.1-tH、pEGFP-N1-m1 + pcDNA3.1-tH、pEGFP-N1-m2 + pcDNA3.1-tH、pEGFP-N1-m3 + pcDNA3.1-tH 和 pEGFP-N1-m4 + pcDNA3.1-tH

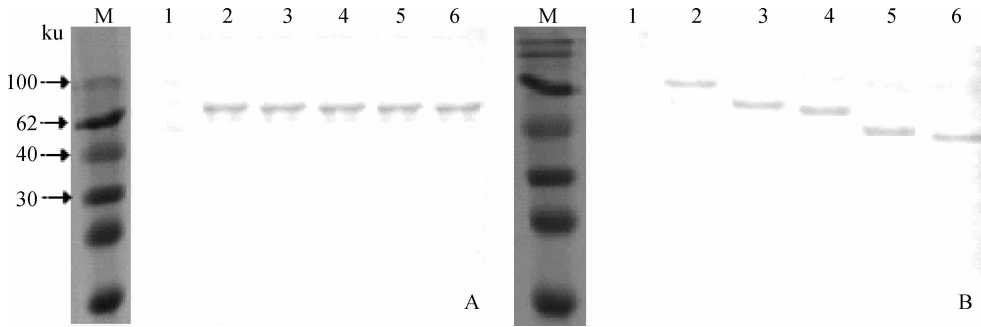
A-F. Stand for pEGFP-N1, pEGFP-N1-SLAM + pcDNA3.1-tH, pEGFP-N1-m1 + pcDNA3.1-tH, pEGFP-N1-m2 + pcDNA3.1-tH, pEGFP-N1-m3 + pcDNA3.1-tH and pEGFP-N1-m4 + pcDNA3.1-tH, respectively

图 2 转染 48 h 后融合蛋白表达情况 (400×)

Fig. 2 Expression of fluorescent protein 48 hours after transfection (400×)

SLAM 相互作用的重要部位,它可能是 H 蛋白与 SLAM 相互作用的功能区^[7-8]。

随着 SLAM 被证明为 MV、CDV 和 RPV 感染的细胞受体之后,R. M. Pawar 等通过 siRNA 干扰

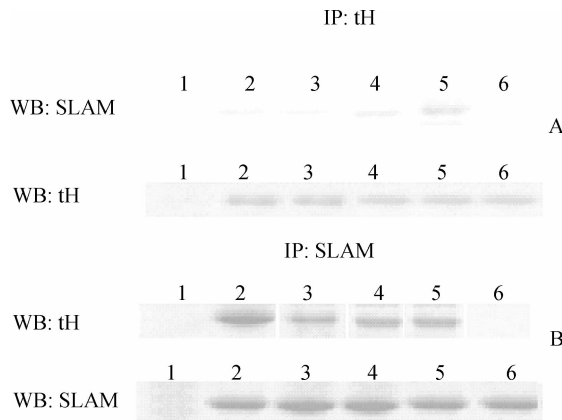


A. 抗 PPRV 阳性兔血清; B. 抗 SLAM 阳性兔血清; M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. pEGFP-N1 对照; 2~6. 分别是 pEGFP-N1-SLAM+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m1+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m2+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m3+ pcDNA3. 1-tH 和 pEGFP-N1-m4+ pcDNA3. 1-tH

A. Positive PPRV antibody; B. Positive SLAM antibody; M. Protein molecular weight marker; 1. Negative control of pEGFP-N1; 2-6. Stand for pEGFP-N1-SLAM+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m1+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m2+ pcDNA3. 1-tH, pEGFP-N1-m3+ pcDNA3. 1-tH and pEGFP-N1-m4+ pcDNA3. 1-tH, respectively

图 3 转染细胞中表达融合蛋白的分析

Fig. 3 Analysis of the expressed products from transfected CHO-K1



1. pEGFP-N1; 2. pEGFP-N1-SLAM+ pcDNA3. 1-tH; 3. pEGFP-N1-m1+ pcDNA3. 1-tH; 4. pEGFP-N1-m2+ pcDNA3. 1-tH; 5. pEGFP-N1-m3+ pcDNA3. 1-tH; 6. pEGFP-N1-m4+ pcDNA3. 1-tH. A. 用抗 tH 抗体沉淀表达的 tH 蛋白, 然后分别用 H 抗体和 SLAM 进行 Western blotting 检测; B. 用抗 SLAM 的抗体沉淀表达的 SLAM 蛋白及其系列突变体蛋白, 然后分别用 SLAM 抗体和 H 抗体进行 Western blotting 检测

1. pEGFP-N1; 2. pEGFP-N1-SLAM+ pcDNA3. 1-tH; 3. pEGFP-N1-m1+ pcDNA3. 1-tH; 4. pEGFP-N1-m2+ pcDNA3. 1-tH; 5. pEGFP-N1-m3+ pcDNA3. 1-tH; 6. pEGFP-N1-m4+ pcDNA3. 1-tH. A. tH antibody as the precipitating antibody; B. SLAM antibody as the precipitating antibody, and the SLAM and tH antibodies were used as reagenic antibody by Western blotting

图 4 共表达的 tH 与 SLAM 及其系列缺失突变体在 CHO 细胞中的相互作用

Fig. 4 Detection the interaction of tH with SLAM and deletion mutations in CHO cells

技术证实 SLAM 也是 PPRV 感染的细胞受体^[3]。SLAM 包含的 V 结构域是与病毒蛋白相互作用的主要区域, 该结构域中有 21 个氨基酸残基与病毒蛋白结合, 其中 8 个氨基酸残基(63、66、68、72、84、119、121 和 130 位)是麻疹病毒属病毒易感动物所共有的, 这 8 个氨基酸残基决定宿主-病毒相互作用的特异性, 其分布于 SLAM 与病毒 H 蛋白形成相互结合的 β 折叠面上, 其中 PPRV、RPV 和 CDV 的 H 蛋白通过 β 螺旋的顶端与 SLAM 胞外域的 β 折

叠相结合, 而 MV 的 H 蛋白通过 β 螺旋的侧面与 SLAM 结合^[5,7,9-10]。近来, 人 SLAM 家族成员 NTB-A 和 CD84 胞外区的晶体结构研究显示, 这些蛋白的 IgV 和 IgC2 结构域构成了杆状单体, IgV 结构域之前的 β 折叠是同类分子间结合的一个界面^[14-15]。此外, 值得注意的是, 山羊 SLAM 蛋白中第 60(isoleucine, 异亮氨酸)和 61 位(histidine, 组氨酸)氨基酸残基在其作为 PPRV 受体功能方面发挥着关键性作用^[16], 而人 SLAM 第 60、61 和 63 或第

58、59 和 61 位氨基酸残基是病毒结合和感染的关键氨基酸^[8-9,16]。晶体结构和突变研究显示, MV-H 蛋白是 1 个由 6 个类螺旋桨叶($\beta 1-\beta 6$)组成的方形结构,其受体结合位点位于 β 螺旋面且存在广泛重叠, $\beta 4$ 和 $\beta 5$ 与 CD46 的 SCR1 和 SCR2 相互作用, $\beta 4-6$ 和环状区域与 SLAM V 结构域的 GFCC' C'' 相互作用,nectin-4 通过 N 末端 IgV 结构域特异地结合于 $\beta 4-\beta 5$ 之间的沟槽内,而且 H Asp530 和 Arg533 与 SLAM Glu123 构成的盐桥对 MV-H-SLAM 络合物稳定过程发挥了关键作用^[17-20]。

在本研究中,笔者将成功构建的 PPRV H 蛋白胞外区(tH)真核表达载体和 SLAM 及其系列缺失突变体(胞外区、无信号肽胞外区、胞外区 N 端 29—136 位氨基酸和胞外区 C 端 137—240 位氨基酸)真核表达载体共转染 CHO-K1,通过免疫共沉淀技术验证了 SLAM 与 PPRV H 蛋白的相互作用。结果显示,胞外区 N 端 29—136 位氨基酸是 SLAM 分子上与 H 蛋白相互作用的关键氨基酸区段。N 端 29—136 位氨基酸位于 SLAM V 结构域(1—138 位氨基酸),而已报道的决定宿主—病毒相互作用特异性的 8 个氨基酸残基也位于 N 端 29—136 位内,这表明该研究结果与麻疹病毒属其他宿主 SLAM 受体的结果一致,SLAM N 端 29—136 位氨基酸是决定 SLAM 与 PPRV H 蛋白相互作用的关键氨基酸区段。此外,根据对共转染细胞的荧光观察发现,在 tH 和 SLAM 及其突变体发生相互作用的细胞中,荧光多积聚存在于细胞质的某部位,而且这些部位紧贴于细胞膜,这与 SLAM 蛋白的分泌位置及其和病毒蛋白相互作用的特性相一致。本研究为后续 SLAM 与 H 蛋白相互作用关键氨基酸位点的确定以及新疫苗等研究奠定了基础。

4 结 论

将 pcDNA3.1-tH 和 SLAM 及其缺失突变体 pEGFP-N1 系列真核表达质粒转染 CHO 细胞后目的蛋白正确表达,利用免疫共沉淀技术验证了 SLAM 与 PPRV H 蛋白的相互作用,并证明 SLAM N 端第 29—136 位氨基酸是决定其与 PPRV H 蛋白结合的关键氨基酸区段。

参考文献:

[1] TATSUO H, YANAGI Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150) [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46

(3):135-142.

- [2] SEKI F, ONO N, YAMAGUCHI R, et al. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells[J]. *J Virol*, 2003, 77(18): 9943-9950.
- [3] PAWAR R M, RAJ G D, KUMAR T M, et al. Effect of siRNA mediated suppression of signaling lymphocyte activation molecule on replication of peste des petits ruminants virus *in vitro* [J]. *Virus Res*, 2008, 136(1-2): 118-123.
- [4] ONO N, TATSUO H, TANAKA K, et al. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor[J]. *J Virol*, 2001, 75(4): 1594-1600.
- [5] BIRCH J, JULEFF N, HEATON M P, et al. Characterization of ovine Nectin-4, a novel peste des petits ruminants virus (PPRV) receptor [J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4756-4761.
- [6] NOYCE R S, RICHARDSON C D. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus [J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(9): 429-439.
- [7] XU Q, ZHANG P, HU C, et al. Identification of amino acid residues involved in the interaction between measles virus Haemagglutinin (MVH) and its human cell receptor (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(4): 406-411.
- [8] HU C, ZHANG P, LIU X, et al. Characterization of a region involved in binding of measles virus H protein and its receptor SLAM (CD150) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 698-704.
- [9] OHNO S, SEKI F, ONO N, et al. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(Pt 9): 2381-2388.
- [10] OHISHI K, ANDO A, SUZUKI R, et al. Host virus specificity of morbilliviruses predicted by structural modeling of the marine mammal SLAM, a receptor [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2010, 33(3): 227-241.
- [11] DIMITROV D S. Cell biology of virus entry [J]. *Cell*, 2000, 101(7): 697-702.
- [12] SINNATHAMBY G, RENUKARADHYA G J, RAJASEKHAR M, et al. Immune responses in goats to recombinant hemagglutinin-neuraminidase glycopro-

- tein of peste des petits ruminants virus: Identification of a T cell determinant [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (32): 4816-4823.
- [13] SATO T A, ENAMI M, KOHAMA T. Isolation of the measles virus hemagglutinin protein in a soluble form by protease digestion [J]. *J Virol*, 1995, 69(1): 513-516.
- [14] CAO E, RAMAGOPAL U A, FEDOROV A, et al. NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family [J]. *Immunity*, 2006, 25(4): 559-570.
- [15] YAN Q, MALASHKEVICH V N, FEDOROV A, et al. Structure of CD84 provides insight into SLAM family function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(25): 10583-10588.
- [16] SARKAR J, BALAMURUGAN V, SEN A, et al. Sequence analysis of morbillivirus CD150 receptor-Signaling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM) of different animal species [J]. *Virus Genes*, 2009, 39 (3): 335-341.
- [17] TAHARA M, TAKEDA M, SHIROGANE Y, et al. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin [J]. *J Virol*, 2008, 82(9): 4630-4637.
- [18] SANTIAGO C, CELMA M L, STEHLE T, et al. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to the CD46 receptor [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17 (1): 124-129.
- [19] HASHIGUCHI T, OSE T, KUBOTA M, et al. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(2): 135-141.
- [20] ZHANG X, LU G, QI J, et al. Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(1): 67-72.

(编辑 白永平)