

禽流感病毒 PA-N182 与鸡 COPD 蛋白互作的鉴定

王巧, 李庆贺, 刘冉冉, 郑麦青, 文杰, 赵桂苹*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 宿主蛋白质广泛参与流感病毒基因组在宿主体内的转录、复制和翻译。病毒蛋白质和宿主蛋白质的互作对于病毒的感染有重要影响。PA-N182 是新发现的 PA 基因的转录形式, 关于其宿主互作蛋白质的研究目前尚少。COPD(coatomer protein complex, subunit delta) 是负责细胞内新合成蛋白质从内质网向高尔基体转运的基因, COPD 基因敲除后细胞内流感病毒滴度降低, 表明 COPD 基因可能参与流感病毒的复制。COPD 基因影响流感病毒感染的机制仍未见报道。本研究通过构建 PA-N182 和 COPD 过表达载体并共转染细胞, 利用免疫共沉淀、Western blot 的方法, 证实在鸡细胞内 H5N1 禽流感病毒 PA-N182 蛋白和 COPD 蛋白有相互作用, 表明 COPD 对流感病毒感染的影响可能与其和 PA-N182 蛋白的互作并影响 PA-N182 蛋白从宿主细胞内质网向高尔基体的转运有着密切的联系。

关键词: 鸡; 禽流感病毒; PA-N182; COPD; 蛋白互作; 免疫共沉淀

中图分类号: S813.1; S858.315.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)10-1899-06

Identification of the Interaction of Avian Influenza Virus PA-N182 and COPD Protein of Chicken

WANG Qiao, LI Qing-he, LIU Ran-ran, ZHENG Mai-qing, WEN Jie, ZHAO Gui-ping*

(Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Host factors are widely involved in transcription, duplication and translation of influenza virus genome, and host factors are required for the infection of influenza virus. PA-N182 is a recently identified truncated form of influenza PA gene, and little is known about its host interaction factors. COPD(coatomer protein complex, subunit delta), with the function of translocation of newly translated peptides from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus, has an essential role in duplication of influenza virus and its knock down results in decrease of virus titer. We co-transfected PA-N182 and COPD expression vectors into chicken DF1 cells and found that PA-N182 interacted with COPD by the method of immunoprecipitation and Western blot. Our results reveal that COPD might affect the infection of influenza virus through interacting with PA-N182 and translating it from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus.

Key words: chicken; avian influenza virus; PA-N182; COPD; protein interaction; immunoprecipitation

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)属甲型流感病毒,其遗传物质为单股负链 RNA。禽流感病毒核酸包括 HA(hemagglutinin)、NA(neuramin-

idase)、PB1(polymerase basic protein 1)、PB2(polymerase basic protein 2)、PA(polymerase acidic protein)、NP(nucleoprotein)、M1(matrix protein

收稿日期: 2015-01-21

资助项目: 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS04); 国家科技支撑项目(2011BAD28B03); 国家肉鸡产业技术体系(CARS-42)

作者简介: 王巧(1991-), 女, 山东日照人, 硕士生, 主要从事家禽抗病育种研究, E-mail: 17746516692@163.com

* 通信作者: 赵桂苹, 研究员, E-mail: zhaoguiping@caas.cn

1)和 NS1(non-structure protein 1)等 8 个基因片段^[1]。上述基因直接编码或者其编码的蛋白质经剪切或修饰后最多成为 17 种蛋白质^[2-3]。PA 和 PB1、PB2 蛋白组成依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶复合体,参与流感病毒的复制。PA 蛋白具有调控蛋白质稳定性、内切酶活性、RNA 帽子结构结合及启动子结合等功能^[4]。聚合酶复合体捕获宿主细胞的 mRNA 后,PA 蛋白发挥其核酸内切酶活性切割宿主基因 mRNA,用于病毒自身 RNA 的合成^[5]。从不同的位置起始翻译或移码突变,PA 基因除编码 PA 蛋白外还编码 PA-X、PA-N155 和 PA-N182 三种蛋白质。PA-N182 是从 PA 基因的第 182 位核苷酸(第 13 个 AUG)起始翻译的蛋白质产物。通过对 11 000 余株流感病毒毒株的序列分析发现 99.3%的流感病毒毒株都有 PA-N182 蛋白翻译起始所需要的 AUG 密码子,不具有 PA-N182 翻译起始所需 AUG 位点的流感病毒毒株多为禽类和猪的 H9N2 毒株^[6]。

禽流感病毒自身并不具有复制能力,感染宿主后须借助宿主的细胞系统进行复制。流感病毒的组成蛋白和宿主蛋白质有着广泛的相互作用,这些相互作用对于流感病毒的感染、复制和传播有着极为重要的作用。流感病毒 PB1 和 PB2 蛋白和人细胞中的 PP6 蛋白(protein phosphatase 6)有直接作用,PP6 蛋白的敲除导致由细胞核向细胞质输出的病毒核糖核蛋白量减少,病毒复制减缓,病毒滴度降低^[7]。TRIM22 基因是流感病毒的抗性基因,TRIM22 对流感病毒的抗性是通过和流感病毒 NP 蛋白的互作实现的,TRIM22 促使 NP 蛋白发生泛素化并通过蛋白酶体途径降解病毒的 NP 蛋白,使流感病毒丧失生物学活性^[8]。PA-N182 是 2013 年新发现的 PA 基因的新翻译形式,其缺失了 PA 蛋白的 N 端。PA-N182 在鸡细胞内有哪些互作蛋白质及其生物学功能仍知之甚少。

COPD(coatomer protein complex, subunit del-

ta),又名 ARCN1,是 Coatomer 复合物的组成亚基之一。Coatomer 复合物参与细胞内合成的蛋白质从内质网到高尔基体的运输。COPD 基因突变的小鼠由于细胞内蛋白质运输的障碍导致毛色变浅,同时伴有运动失调等症状^[9]。在多个全基因组 RNAi 扫描研究中都发现了 COPD 等 Coatomer 复合物亚基的表达被抑制后会阻碍流感病毒在细胞内复制,表明 COPD 是影响流感病毒感染的重要宿主因子^[10]。

在本研究中,作者利用蛋白质免疫沉淀等技术分析了 H5N1 AIV PA-N182 基因和 COPD 基因的互作情况。我们在鸡胚胎成纤维细胞系(DF1)中过表达了 H5N1 AIV 的 PA-N182 基因和鸡 COPD 基因,并成功的利用免疫共沉淀技术富集了 PA-N182 蛋白,Western blot 显示 PA-N182 基因的免疫共沉淀产物可以检测到 COPD 蛋白的存在,表明 H5N1 禽流感病毒 PA-N182 基因在鸡细胞内和 COPD 基因有相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株及病毒 cDNA 的合成

DF1 细胞购自中国科学院细胞库。本研究所用 H5N1 禽流感病毒毒株为 A/Chicken/ShanXi/2/2006(H5N1),毒株 RNA 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠。cDNA 反转录参照 Primer-Script™ RT Master Mix 试剂盒(TaKaRa,大连)操作说明进行,-20 °C 保存备用。

1.2 引物设计

根据 Influenza research database 公布的 A/Chicken/ShanXi/2/2006(H5N1)的 PA-N182 基因序列、NCBI 上公布的鸡 COPD 基因(GenBank 登录号:NM_001079499.1)序列,利用 Oligo6 软件设计引物(表 1),引物均包含 *Nhe*I 和 *Bam*HI 酶切位点。引物由金维智生物科技(苏州)有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	上游序列 Upstream(5'-3')	下游序列 Downstream(5'-3')
PA-N182	CCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGGC-CAGTAGGGGTCTATGGGATT	TTTGTAGTCGGATCCTTTTCAGTGCAT-GTGTGAGGAAGGA
COPD	ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGC-CACCATGGTGTCTTGGCGGCAGCTGT	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGGATCCCAG-GATTTCATACTGTCCACCAGG

1.3 蛋白质表达载体的构建

1.3.1 PCR 扩增 根据 *Trans PCR SuperMix* (全式金)操作说明进行 PCR 扩增。*PA-N182* 和 *COPD* 基因的引物退火温度都为 55 °C, 35 个循环。

1.3.2 目的基因与载体连接 双酶切 pcDNA3.1-3Flag-C 载体和 pcDNA3.1-6His-C 载体,根据无缝连接试剂盒(Clonesmarter)说明书分别与 PCR 产物 *PA-N182* 和 *COPD* 连接,转化大肠杆菌感受态细胞后均匀涂在氨苄琼脂糖平板上培养过夜,挑取单个菌落划线并进行 PCR 鉴定,选取阳性菌落提取质粒进行双酶切鉴定并测序。

1.3.3 质粒提取 液体 LB 培养基培养转化后的阳性单菌落 12 h 后,12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min 收集菌液,根据 EndoFree® Plasmid Maxi Kit(Qiagen)说明书操作步骤提取质粒并测定浓度。

1.4 细胞培养及转染

DF1 细胞用含 10% 胎牛血清(Life Technologies)的 DMEM 高糖培养基(Hyclone)在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养,细胞培养至 80% 汇合度时转染。细胞转染按 Lipofectamine® 3000 试剂(Life Technologies)说明书进行,用 Opti-MEM® 培养基稀释 Lipofectamine® 3000 试剂并充分混匀,用 Opti-MEM® 培养基稀释 DNA 制成 DNA 预混液,在 DNA 预混液中添加 P3000™ 试剂,在每管已稀释的 Lipofectamine® 3000 试剂中加入稀释的 DNA(1:1 比例),室温孵育 5 min,加入 DNA-脂质体复合物至细胞中。转染 48 h 后倒掉旧培养基,PBS 冲洗后加 0.25% 的胰蛋白酶(Hyclone)于 37 °C 培养箱消化 5 min,轻晃培养皿显微镜下见细胞游离时立即加入 2 倍体积完全培养基终止消化。将细胞悬浮液加入到 15 mL 离心管中,1 000 r · min⁻¹、离心 5 min,去上清,用 PBS 重悬细胞并转入 1.5 mL 离心管中,1 000 r · min⁻¹、离心 5 min,去上清,细胞沉淀用于下游试验。

1.5 蛋白质提取

向细胞中加 RIPA 裂解液并吹匀,置冰上 30 min,每 5 min 轻弹一次离心管。13 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,将上清转入新的离心管后根据 BCA 蛋白质定量试剂盒(Thermo scientific,美国)测蛋白质浓度。

1.6 蛋白质免疫沉淀

裂解液中加入预处理过的 Protein G beads (Millipore)20 μL,于 4 °C 摇床缓慢振荡 2 h,以去除

非特异性杂蛋白质,降低背景,离心后收集上清于新离心管中。取 1/50 裂解液(全蛋白质)保存至 -80 °C 冰箱用作阳性对照(Input),剩余裂解液用作免疫沉淀(IP)即试验组。向用作 IP 的裂解液中加入 anti-FLAG M2 beads(Sigma),于 4 °C 摇床缓慢振荡过夜。离心收集琼脂糖珠,弃上清,RIPA buffer 清洗 4 次,54K buffer 清洗 2 次后加入上样缓冲液,96 °C 煮沸 10 min,立即置于冰上,简短离心后吸取上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。试验以鼠 IgG 作为阴性对照。

1.7 Western blot

蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜(Millipore)上,转膜条件为 350 mA 恒流 40 min。PVDF 膜分别用相应抗体孵育 1 h 后显影。本试验所用抗体如下:抗 Flag 标签抗体-HRP(Cell Signaling Technology)和抗 His 标签抗体-HRP(Abcam)。

1.8 PA-N182 与 COPD 蛋白互作鉴定的试验分组方法

将 *PA-N182* 和 *COPD* 表达载体共转染 DF1 细胞,同时设置 Flag 空载体、His 空载体、Flag 空载体和 His 空载体、Flag 空载体和 *COPD*、*PA-N182* 和 His 空载体 5 个对照组。

2 结果

2.1 PA-N182 及 COPD 基因表达载体的构建

以 H5N1 禽流感 cDNA 和鸡肌肉组织 cDNA 分别扩增 *PA-N182* 和 *COPD* 基因,所得的 PCR 产物大小均符合预期(图 1)。PCR 扩增所得目的片段用无缝连接试剂盒连入 pcDNA3.1-C-Flag 载体。转化后所得阳性质粒双酶切结果如图 2 所示。*COPD* 基因经 PCR 扩增后连入 pcDNA3.1-C-His 载体,其阳性质粒双酶切结果如图 3 所示。*PA-N182* 和 *COPD* 载体插入片段均经测序验证无误。上述载体将分别表达带有 Flag 标签的 *PA-N182* 蛋白和带有 His 标签的 *COPD* 蛋白。

2.2 PA-N182 基因在 DF1 细胞的过表达及免疫共沉淀捕获

将 *PA-N182* 表达载体转染进 DF1 细胞中,对照组并没有检测到目的蛋白质,而试验组有 *PA-N182* 条带,表明 *PA-N182* 正常表达(图 4)。以带有 Flag 抗体的微珠和细胞裂解液孵育进行免疫共沉淀反应,所得产物用 Flag 抗体进行检测,结果显

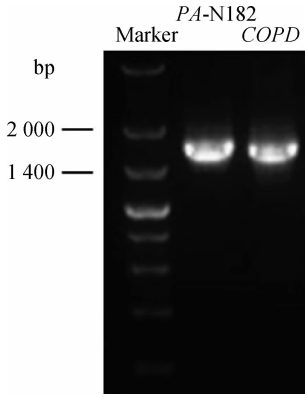
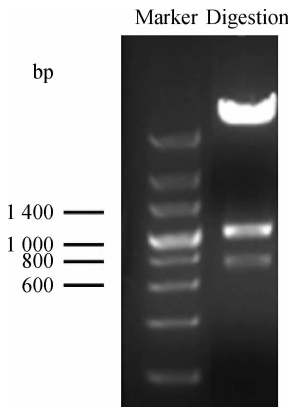


图 1 PA-N182 和 COPD PCR 产物凝胶电泳
Fig. 1 Gel electrophoresis results of PCR products of PA-N182 and COPD



所用内切酶为 *Nhe* I 和 *Bam*H I。除载体外切出 2 条目的条带是因为 PA-N182 序列内部有 *Nhe* I 酶切位点
Nhe I and *Bam*H I enzyme were used. Two target bands were observed because of *Nhe* I site in PA-N182 sequence

图 2 PA-N182 表达载体双酶切鉴定
Fig. 2 Enzyme digestion results of PA-N182 expression vector

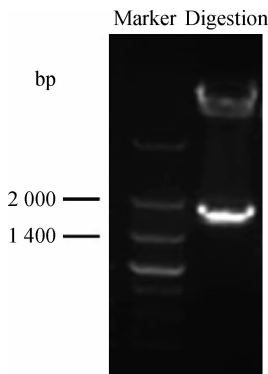
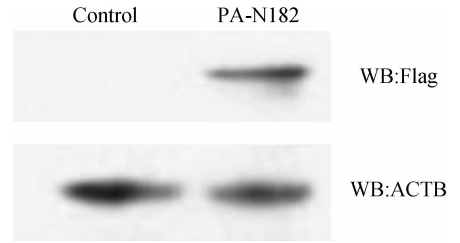


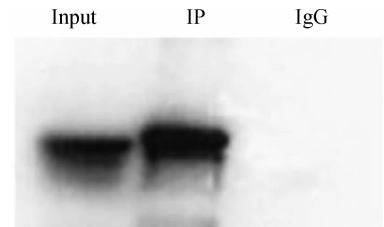
图 3 COPD 表达载体的 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定
Fig. 3 *Nhe* I and *Bam*H I enzyme digestion results of COPD expression vector

示, Input 阳性对照组和 IP 组都检测到 PA-N182 蛋白, 而 IgG 对照组则没有检测到 PA-N182 的表达 (图 5), 表明成功且特异地捕获了 PA-N182 蛋白。



PA-N182 表达质粒转染后的 DF1 细胞提取蛋白质后, 取 10 μ g 蛋白质进行 Western blot。ACTB 作为内参 10 μ g total protein was used for Western blot, and ACTB was used as loading control

图 4 转染细胞后 PA-N182 表达的 Western blot 检测
Fig. 4 Western blot detection of PA-N182 in transfected DF1 cells



PA-N182 表达质粒转染后的 DF1 细胞提取蛋白质后, 以 500 ng 总蛋白质进行免疫共沉淀, 所得蛋白质进行 Western blot。10 μ g 总蛋白质用作 Input。鼠 IgG 用于免疫共沉淀的阴性对照

500 ng total protein was used for immunoprecipitation and protein pulled down by flag beads was used for Western blot analysis. 10 μ g total protein was used as Input. Mouse normal IgG was used as negative control for immunoprecipitation

图 5 PA-N182 的免疫共沉淀检测
Fig. 5 Immunoprecipitation of PA-N182 in transfected DF1 cells

2.3 PA-N182 与 COPD 蛋白互作的鉴定

试验组 PA-N182 和 COPD 表达载体共转染 DF1 细胞, 对照组 Flag 空载体、His 空载体、Flag 空载体和 His 空载体、Flag 空载体和 COPD、PA-N182 和 His 空载体, 于转染 48 h 收集细胞并提取蛋白质。以带有 Flag 抗体的微珠和上述 6 组样品的细胞裂解液孵育后分别进行免疫共沉淀反应, 所得的蛋白复合物分别用 Flag 和 His 标签的抗体进行 Western blot 检测。所得结果如图 6 所示。用 Flag 抗体进行的 Western blot 检测结果中, 在 Input 阳性对照结果中 PA-N182 和 His 空载体、PA-N182 和 COPD 共转染组中检测到了 PA-N182 的

表达,表明共转染后 PA-N182 质粒在 DF1 细胞中有明确的表达,而在 IP 组样品中 PA-N182 和 His 空载体、PA-N182 和 COPD 两个共转染组的 West-

ern blot 显示有清晰的 PA-N182 条带,表明带 Flag 标签的 PA-N182 蛋白被成功捕获。

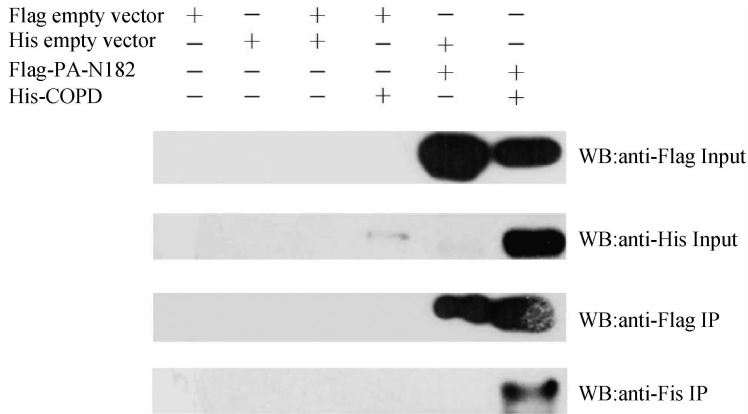


图 6 禽流感病毒 PA-N182 与鸡 COPD 基因的蛋白质互作

Fig. 6 Protein interaction between PA-N182 and chicken COPD

用 His 抗体进行的 Western blot 检测结果中,在 Input 阳性对照结果中检测到 PA-N182 和 COPD、Flag 空载体和 COPD 两个共转染组有 COPD 的表达,表明带有 His 标签的 COPD 表达载体表达正常。仅在 PA-N182 和 COPD 共转染组的 IP 产物中检测到 COPD 蛋白的存在,此结果表明在鸡 DF1 细胞内,COPD 和 H5N1 禽流感病毒的 PA-N182 蛋白有相互作用。

3 讨论

流感病毒自身并不具有复制能力,病毒的复制须借助宿主的细胞系统。流感病毒侵入细胞后,病毒基因组进入宿主细胞核,利用宿主细胞系统完成病毒基因组的转录和复制后进入细胞质利用宿主蛋白质翻译机制完成蛋白质翻译,随后形成病毒核糖核蛋白体(vRNP),再在宿主细胞内完成病毒的包装和组装后形成新的病毒粒子并释放出细胞^[11]。和病毒蛋白质有相互作用的宿主蛋白质对于病毒的感染和复制具有至关重要的影响。禽流感病毒在感染过程中与宿主细胞的多个信号通路及蛋白质有相互联系,如 NF- κ B 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 TLR/RIG-I 信号通路等^[12]。

本研究在体外共表达了禽流感病毒 PA-N182 和鸡 COPD 蛋白,利用亲和纯化、Western blot 技术检测了禽流感病毒 PA-N182 蛋白和鸡 COPD 蛋白的互作情况,在鸡胚胎成纤维细胞中证实了 PA-N182 和 COPD 的相互作用。真核细胞的大部分肽

段在内质网的核糖体上由 mRNA 翻译而成,肽段在内质网上经过进一步加工形成较成熟的蛋白质,随后蛋白质被转运至高尔基体进行相应的修饰后成为成熟的蛋白质。COPD 是 Coatomer 复合物的组成亚基,Coatomer 复合物参与细胞内合成的蛋白从内质网到高尔基体的运输^[13]。研究证实对 COPD 基因进行 RNA 干扰后的细胞被流感病毒侵染后,细胞内的病毒滴度降低,表明了 COPD 基因在流感病毒复制过程中的积极作用^[10]。COPD 基因可能参与流感病毒蛋白在宿主细胞内翻译后从内质网到高尔基体的转运,这一过程被阻断后可能会影响病毒蛋白质翻译后向高尔基体的转运、病毒蛋白质的翻译后修饰及病毒蛋白质的形成,进而抑制病毒的复制。

本研究证实了 H5N1 禽流感病毒 PA-N182 和鸡 COPD 蛋白在细胞内有相互作用,表明病毒 PA-N182 可能是 COPD 所转运的蛋白之一。N 端缺失的 PA-N182 并不具备 PA 基因所具有的 RNA 聚合酶活性,PA-N182 可能并不参与病毒基因的转录而仅和病毒蛋白的复制有关。PA-N182 在宿主体内的正常翻译和转运与 COPD 基因密切相关。COPD 对流感病毒侵染的影响可能通过其和 PA-N182 蛋白的互作及影响 PA-N182 蛋白的转运实现。PA-N182 是新发现的 PA 基因的 N 端缺失形式,对于其功能的研究报道较少,本研究揭示了 PA-N182 和 COPD 的互作,为揭示 PA-N182 蛋白的功能提供了新的线索。

参考文献(References):

- [1] SCHRAUWEN E J, DE GRAAF M, HERFST S, et al. Determinants of virulence of influenza A virus[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(4): 479-490.
- [2] JAGGER B W, WISE H M, KASH J C, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response[J]. *Science*, 2012, 337(6091): 199-204.
- [3] SHI M, JAGGER B W, WISE H M, et al. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus[J]. *J Virol*, 2012, 86(22): 12411-12413.
- [4] SONG J, FENG H, XU J, et al. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks[J]. *J Virol*, 2011, 85(5): 2180-2188.
- [5] YUAN P, BARTLAM M, LOU Z, et al. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site[J]. *Nature*, 2009, 458(7240): 909-913.
- [6] MURAMOTO Y, NODA T, KAWAKAMI E, et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA[J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2455-2462.
- [7] YORK A, HUTCHINSON E C, FODOR E. Interactome analysis of the influenza A virus transcription/replication machinery identifies protein phosphatase 6 as a cellular factor required for efficient virus replication[J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13284-13299.
- [8] DI PIETRO A, KAJASTE-RUDNITSKI A, OTEIZA A, et al. TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation[J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4523-4533.
- [9] XU X, KEDLAYA R, HIGUCHI H, et al. Mutation in archain 1, a subunit of COPI coatomer complex, causes diluted coat color and Purkinje cell degeneration[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(5): e1000956.
- [10] KÖNIG R, STERTZ S, ZHOU Y, et al. Human host factors required for influenza virus replication[J]. *Nature*, 2010, 463(7282): 813-817.
- [11] SHI Y, WU Y, ZHANG W, et al. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(12): 822-831.
- [12] PFEFFERLE S, SCHÖPF J, KÖGL M, et al. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10): e1002331.
- [13] GALAN J A, PARIS L L, ZHANG H J, et al. Proteomic studies of Syk-interacting proteins using a novel amine-specific isotope tag and GFP nanotrapp[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011, 22(2): 319-328.

(编辑 白永平)