



研究报告

与猪流行性腹泻病毒 M 蛋白互作的宿主蛋白的鉴定

王瑞阳^{1,2,3,4} 于瑞嵩^{2,3,4} 陈冰清^{2,3,4} 李凤平^{1,2,3,4} 谢春芳^{2,3,4} 司伏生^{2,3,4}
董世娟^{*2,3,4} 李震^{*2,3,4}

1 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

2 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海 201106

3 上海农业遗传育种重点实验室 上海 201106

4 上海种猪工程技术研究中心 上海 201106

摘要:【背景】猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)膜蛋白(M)在病毒粒子的组装、膜融合和病毒复制等方面具有重要的作用,但 M 蛋白与宿主细胞的互作机制尚不清楚。【目的】利用免疫沉淀技术和液质联用技术筛选细胞内与 PEDV M 蛋白相互作用的蛋白,为揭示 M 蛋白在病毒增殖过程中发挥的功能提供研究基础。【方法】将 MOI=0.1 的 PEDV DR13 疫苗株接种于长成单层的 Vero 细胞,感染 36 h 后,收集细胞并进行裂解。利用抗 M 的单克隆抗体沉淀与 M 相互作用蛋白复合物,通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)进行鉴定并利用细胞功能富集分析(Gene ontology, GO)对感染组鉴定到的细胞蛋白进行分析,确定两个细胞内源性蛋白为候选蛋白,进行免疫共沉淀(Co-IP)验证和共定位分析。【结果】基于鉴定蛋白的肽段数的方法分析显示,感染组与对照组相比,鉴定了 218 个与 M 蛋白相互作用的细胞内源性蛋白,分别与蛋白质合成、代谢、细胞信号通路转导等密切相关,选择细胞分裂周期蛋白 42 (Cell division cycle 42, CDC42)、真核翻译起始因子 3 亚基 L 蛋白(eIF3L)为候选蛋白进行 Co-IP (Co-immunoprecipitation)验证和共定位分析,结果证实 CDC42、eIF3L 蛋白分别与 M 蛋白在细胞内存在相互作用。【结论】鉴定出 PEDV M 蛋白能够与宿主细胞 CDC42 和 eIF3L 蛋白相互作用,并鉴定出其他可能与 M 蛋白发生相互作用的宿主蛋白 60 个,为开展 PEDV 与宿主细胞蛋白相互作用研究提供了重要理论依据。

关键词: 免疫共沉淀, 猪流行性腹泻病毒, CDC42, eIF3L, 膜蛋白, 蛋白互作

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31602060); Special Project of Subject Building of Shanghai Academy of Agricultural Sciences (31602060-2016 matching); National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500101); Shanghai Key Project on Agricultural Development (2015-6-1-9)

***Corresponding authors:** DONG Shi-Juan: Tel: 86-21-62200389; E-mail: dsjnm@163.com

LI Zhen: Tel: 86-21-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

Received: 04-01-2019; **Accepted:** 01-05-2019; **Published online:** 15-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31602060); 上海市农业科学院学科领域建设专项(31602060-2016 匹配); 国家重点研发计划(2016YFD0500101); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2015)第 6-1-9 号)

***通信作者:** 董世娟: Tel: 021-62200389; E-mail: dsjnm@163.com

李震: Tel: 021-62206391; E-mail: zhenli60@163.com

收稿日期: 2019-01-04; **接受日期:** 2019-05-01; **网络首发日期:** 2019-05-15

Identification of host cellular proteins interacting with porcine epidemic diarrhea virus M protein

WANG Rui-Yang^{1,2,3,4} YU Rui-Song^{2,3,4} CHEN Bing-Qing^{2,3,4} LI Feng-Ping^{1,2,3,4}
XIE Chun-Fang^{2,3,4} SI Fu-Sheng^{2,3,4} DONG Shi-Juan^{*2,3,4} LI Zhen^{*2,3,4}

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

4 Shanghai Engineering Research Center of Breeding Pig, Shanghai 201106, China

Abstract: [Background] The membrane protein (M) of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) plays an important role in the viral assembly process, membrane fusion and viral replication, but the mechanism of interaction between M protein and host cells is still unclear. **[Objective]** Co-immunoprecipitation technique coupled with LC-MS/MS were used to screen cellular proteins interacting with PEDV M protein, which can provide a foundation for revealing the function of M in viral multiplication. **[Methods]** PEDV DR13 vaccine strain was inoculated into monolayer of Vero cells at a MOI of 0.1. After 36 hours of infection, the cells were collected and lysed. Host cellular proteins that interact with the M protein of PEDV were immunoprecipitated using the M monoclonal antibody, then identified by LC-MS/MS, and analyzed by gene ontology (GO) annotation. Among them, two interested cellular proteins were further confirmed with Co-IP and cellular colocalization. **[Results]** Based on the analysis of the number of peptide segments, 218 cellular proteins interacting with M protein were identified. These host cellular proteins are closely related to protein synthesis, metabolism and cell signaling pathway transduction. Cell division cycle 42 (CDC42) and eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L (eIF3L) were chosen for reverse Co-IP reconfirmation and colocalization analysis. The results showed that both CDC42 and eIF3L protein interact with M protein. **[Conclusion]** This study identified that PEDV M protein could interact with CDC42 and eIF3L proteins in host cells, and identified 60 other host proteins that might interact with M protein. The study is to provide an important theoretical basis for the study of the interaction between PEDV and host cell proteins.

Keywords: Co-IP, PEDV, CDC42, eIF3L, Membrane protein, Protein-protein interaction

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是引起仔猪病毒性腹泻的重要病原之一, 属于冠状病毒科(Coronaviridae)、冠状病毒属(Coronavirus), 基因组为单股正链 RNA, 长度约为 28 kb^[1]。基因组分别编码 S 蛋白(纤突蛋白)、M 蛋白(膜糖蛋白)、E 蛋白(小包膜糖蛋白)、N 蛋白(核衣壳蛋白)、16 个非结构蛋白(nsp1–nsp16)和 ORF3 蛋白^[1]。其中 M 蛋白位于病毒颗粒表面, 属于膜糖蛋白, 由 226 个氨基酸组成, 分子量大小为 27–30 kD。冠状病毒属的 M 蛋白是病毒囊膜结构中含量最高的蛋白, 其氨基酸组成也最保守, 具有三重跨膜结构, 在病毒表面具有短氨基末端结构域, 囊膜内部具有长的羧基末端结构域^[2]。冠状病毒的 M 蛋白

合成后聚集在高尔基体内, 通过与 S 蛋白、N 蛋白的相互作用参与病毒的组装, 在出芽过程中也具有重要的作用^[2–4]。除了形成病毒粒子的关键作用外, 由于 M 蛋白具有高度保守的糖基化序列, 在病毒和宿主细胞之间的互作过程中发挥重要作用^[5]。研究证实 PEDV M 蛋白能改变猪肠上皮细胞的生长状态, 通过降低细胞周期蛋白 A 的转录水平, 诱导细胞停滞在 S 期, 更易于病毒复制^[6]; PEDV M 蛋白在补体存在的情况下诱导病毒的中和抗体^[7]; PEDV M 蛋白能够抑制 I 型干扰素通路的活化, 降低 I 型干扰素的表达^[8]; 由此可见, PEDV M 蛋白在 PEDV 的增殖和逃避宿主的先天性免疫应答中发挥着重要的作用。

为了阐明 PEDV M 蛋白的具体作用机制,迫切需要了解与 M 蛋白有相互作用的细胞内源性蛋白。免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP)技术是研究蛋白之间相互作用的经典方法,本研究利用免疫共沉淀方法,结合液质联用技术(LC-MS/MS)鉴定 Vero 细胞内与 PEDV M 蛋白相互作用的蛋白,为研究 M 蛋白在 PEDV 侵染细胞过程中的功能和作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

PEDV DR13 弱毒株为本实验室保存;非洲绿猴肾(Vero)细胞、海拉(Hela)细胞为实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

同源重组试剂盒,南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收纯化试剂盒,Axygen 生物技术(杭州)有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂、DMEM 培养液、胎牛血清,Thermo Fisher Scientific 公司;鼠源抗 PEDV M 单克隆抗体,华中农业大学肖少波研究员惠赠;鼠源抗 Flag 单克隆抗体,Abcam 公司;兔源抗 HA 单克隆抗体,Cell Signaling Technology 公司;RIPA 裂解液,上海翊圣生物科技有限公司;Protein A/G PLUS,圣克鲁斯生物技术公司。PCR 仪,Bio-Rad 公司;凝胶图像分析系统,UVItec 公司;全自动细胞计数分析仪,Nexcelom 公司。

1.3 PEDV M 蛋白表达量检测

将浓度为 2×10^5 个/mL Vero 细胞接种于 6 孔板中,待细胞长至 80% 汇合,感染 PEDV DR13 病毒(MOI=0.1)^[9],同时设置不接毒细胞作为对照,于 37 °C 5% 二氧化碳培养箱中培养,分别在感染后 24、36、48、60 h 收集细胞,加入 RIPA 裂解液冰浴 30 min,4 °C、14 000×g 离心 10 min,取上清加入上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳,以鼠源抗 PEDV M 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot,检测病毒 M 蛋白的表达情况,确定 PEDV 病毒的感染时间。

1.4 IP 试验筛选细胞内与 M 蛋白相互作用的蛋白

将 Vero 细胞接种于 10 cm 培养皿中,待细胞长至 80% 汇合,感染 PEDV DR13 病毒(MOI=0.1),36 h 后收集细胞,加入 RIPA 裂解液冰浴 30 min,14 000×g 离心 10 min,收集上清,加入抗 M 蛋白的单克隆抗体(1:50 倍稀释),4 °C 旋转孵育 12 h,加入经细胞裂解液平衡的 20 μL 的 Protein A/G,4 °C 旋转孵育 12 h。用 1 mL 冷的裂解液清洗,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,反复 4 次,向其中加入 20 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液,100 °C 煮沸 10 min。将上述样品进行 10% SDS-PAGE,银染法对凝胶进行染色。

1.5 质谱分析差异蛋白

将 40 μL 实验组和对照组免疫沉淀后的样品进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后,分别切割实验组和对照组胶内所有蛋白条带,经脱色、还原、烷基化、酶解等过程后,进行 LC-MS/MS 分析,得到的质谱原始数据用软件 MasQuant (1.3.0.5)进行分析并检索 UniProt chlorocebus 数据库,确定与 PEDV M 相互作用的细胞内源性蛋白。

1.6 重组质粒的构建

以实验室保存毒株 PEDV DR13 RNA 为模板,利用引物 1 和 2 (表 1)进行 RT-PCR 扩增 M 基因,EcoR I 和 Xho I 双酶切载体 PCAGGS-HA,采用同源重组试剂,将 M 基因克隆于载体 PCAGGS-HA,

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
PEDV-HA-M	1	CCAGATTACGCTGAATTCATGTCTA ACGGTTCTATTCCCGT
	2	TCTGCTAGCTCGAGTTAGACTAAAT GAAGCACTTTCTCAC
CDC42-flag	3	CTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAT GCAGACAATTAAGTGTGT
	4	TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTA TCTCATAGCAGCACACACCTGCG
eIF3L-flag	5	CTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAT GTCBTCTCCCGCTGATGA
	6	TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTA TCTCAAGGTCTCTGTCCCATCTT

构建重组质粒 PCAGGS-HA-M。以 Vero 细胞全基因组 RNA 为模板,利用引物 3 和引物 4 (表 1)进行 PCR 扩增 CDC42-flag (tag),PCR 反应体系:RNA (约 25 ng/ μ L) 4 μ L, 2 \times One step mix 25 μ L, One step mix 2.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, 以 ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。利用引物 5 和引物 6 (表 1)进行 PCR 扩增 eIF3L-flag (tag)基因,反应体系同上,PCR 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。快切酶 *Eco*R I (5 U/ μ L)和 *Xho* I (5 U/ μ L)双酶切载体 PCAGGS, 利用同源重组试剂盒, 将 CDC42-flag (tag)、eIF3L-flag (tag)基因克隆于载体 PCAGGS, 构建重组质粒 PCAGGS-CDC42-flag、PCAGGS-eIF3L-flag。将上述质粒转化至 TOP10 感受态细胞, 进行酶切及测序验证。

1.7 Co-IP

经质谱分析初选后,去除阴性对照组鉴定到的蛋白,然后基于检测蛋白的肽段数的方法,在 PEDV 感染组中选择肽段数 ≥ 2 的蛋白 CDC42、eIF3L 进行 Co-IP 验证,将 PCAGGS-HA-M 和 PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag 真核表达质粒共转染 Hela 细胞且分别单转染 PCAGGS-CDC42-Flag、PCAGGS-eIF3L-Flag 作为对照,并设立细胞对照,检测 PEDV M 蛋白与 CDC42/eIF3L 的相互作用。转染 36 h 后,收集细胞样品,加入裂解液冰浴 30 min, 14 000 \times g 离心 10 min, 收集上清,以部分上清做 Input, 其余加入鼠源抗 Flag 标签蛋白的单克隆抗体(1:50 倍稀释), 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 12 h, 加入经细胞裂解液平衡的 20 μ L 的 Protein A/G, 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 12 h。用 1 mL 冷的裂解液清洗, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清,反复 4 次,向其中加入 20 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。

将 PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag 分别转染 Vero 细胞 24 h 后,感染 PEDV DR13,

并分别单转染 PCAGGS-CDC42-Flag、PCAGGS-eIF3L-Flag 作为对照,设立细胞对照和单独感染 PEDV DR13 对照。转染 36 h 后,收集细胞样品、裂解、离心,以部分上清做 Input, 其余上清分别经鼠源抗 M 蛋白的单克隆抗体(1:50 倍稀释)、Protein A/G 进行孵育后,加入上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。

1.8 Western blot 鉴定

Input 样品及 Co-IP 样品通过 SDS-PAGE 电泳后,转印至 PVDF 膜,经含 10%脱脂乳的 TBST 缓冲液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,以免源抗 HA 标签、鼠源抗 Flag 标签的单抗、鼠源抗 M 蛋白单抗为一抗,羊抗兔 HRP-IgG、羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗进行 Western blot 鉴定。

1.9 免疫荧光(IFA)鉴定

将 Hela 细胞接种于铺有飞片的 24 孔板中,待细胞生长至 80%汇合,将 PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag 分别与 PCAGGS-HA-M 表达质粒共转染至 Hela 细胞。24 h 后, PBS 清洗细胞,重复 3 次后, 5%多聚甲醛固定细胞 15 min、0.1% Triton x-100 的 PBS 室温透化细胞 15 min、5%羊血清的 PBS 封闭液室温封闭 1 h; 以免源抗 HA 标签和鼠抗 Flag 标签单克隆抗体为一抗(1:50 倍稀释), 488 山羊抗兔、647 山羊抗鼠为二抗(1:200 倍稀释)进行孵育; PBS 稀释 DAPI 细胞核染料(1 μ L/1 mL), 200 μ L/孔室温作用 15 min; PBS 清洗细胞 3 次,双蒸水漂洗 1 次,晾干并封片,荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 PEDV 感染后 M 蛋白在细胞中的表达

接种 PEDV DR13 至 Vero 细胞后,分别在 24、36、48 和 60 h 收集细胞样品,以鼠源抗 M 单克隆抗体作为一抗进行 Western blot 分析,检测 M 蛋白的表达水平。细胞中 GAPDH 蛋白的表达作为内参。Western blot 分析表明, PEDV 感染后, M 蛋白表达量逐渐增加,在 36–48 h 达到高峰期,在 36 h, M 蛋白的表达量处于最高水平(图 1)。因此,

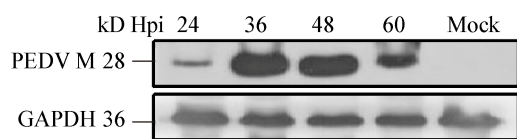


图1 Western blot 分析不同时间点 PEDV M 蛋白的表达量

Figure 1 The expression of PEDV M protein at different time points by Western blot analysis

PEDV 感染 36 h 后, 收集细胞样品进行免疫沉淀分析。

2.2 免疫沉淀样品的质谱分析

PEDV DR13 感染细胞 36 h 后, 收集细胞样品, 留取部分样品, 通过 Western blot 检测 M 蛋白的表达水平(图 2A)。其余样品进行免疫沉淀实

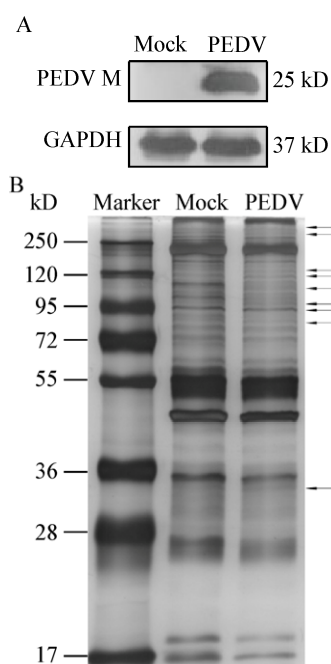


图2 Co-IP 分析细胞内与 PEDV M 蛋白相互作用的蛋白

Figure 2 Identification of the cellular proteins that interact with PEDV M protein by Co-IP

注: A: Western blot 检测 PEDV M 蛋白表达水平; B: 银染分析免疫沉淀后的 PEDV 感染组与阴性对照组细胞裂解液; 箭头: 与细胞对照相比 PEDV 感染组鉴定到的差异蛋白条带。

Note: A: The expression of PEDV M detected by Western blot; B: Silver staining of the different proteins immunoprecipitated by M antibody in mock- or PEDV-infected cells; Arrows: Differential protein bands identified in the PEDV-infected group compared to mock-infected controls.

验, 取免疫沉淀后的部分样品进行 SDS-PAGE 电泳, 对凝胶进行银染显色。从凝胶上可以清晰的看到: 与阴性对照相比, 免疫沉淀后, PEDV 感染组鉴定到了更多的蛋白条带(图 2B)。将 40 μ L 样品经 LC-MS/MS 质谱分析后, PEDV 感染组与细胞对照相比, 去除细胞对照鉴定到的蛋白, PEDV 感染组共鉴定出 218 个细胞内源性蛋白, 其中唯一肽段数 ≥ 2 的蛋白有 62 个(表 2)。GO 功能富集分析(图 3)显示鉴定到的蛋白分别参与了细胞生物学过程, 其中 27% 的蛋白参与了多肽代谢过程, 26% 的蛋白参与了翻译过程, 27% 的蛋白参与了多肽生物合成过程。分子功能分析显示, 鉴定出的蛋白具有结合能力和酶活性。细胞位置分析结果显示与 M 蛋白互作的宿主蛋白主要分布于细胞质、大分子复合体以及核糖体等部位。

2.3 Co-IP 验证与 PEDV M 相互作用的蛋白

为了研究鉴定到的细胞蛋白是否与 PEDV M 特异性相互作用, 选择两种细胞蛋白 CDC42 和 eIF3L 进行 Co-IP 验证。Western blot 分析显示, 无论是在质粒共转染(图 4A、4B)还是 PEDV 病毒感染的情况下(图 4C、4D), PEDV M 蛋白都能与 CDC42 和 eIF3L 结合, 发生相互作用。

2.4 PEDV M 蛋白与 CDC42/eIF3L 定位分析

将重组质粒 PCAGGS-CDC42-Flag、PCAGGS-eIF3L-Flag 与 PCAGGS-M-HA 共转染至 HeLa 细胞, 24 h 后固定细胞, 并用抗 HA 和抗 Flag 的单克隆抗体作为一抗, 有荧光标记的二抗处理细胞, 最后在荧光显微镜下观察。如图 5 所示, CDC42、eIF3L 与 M 蛋白主要分布在细胞质中, M 蛋白分别与 CDC42、eIF3L 共定位, 共定位区域呈现黄色。

3 讨论与结论

PEDV 主要感染猪肠道上皮细胞, 引起仔猪严重腹泻, 1 周日龄以内的仔猪死亡率高达 100%, 给养猪业造成了巨大的经济损失。目前 PEDV 的

表 2 与 M 蛋白互作的宿主细胞蛋白

Table 2 The host cellular proteins interacting with M

Protein IDs	Name	Unique peptides	Sequence coverage (%)	iBAQ intensity (%)	Protein IDs	Name	Unique peptides	Sequence coverage (%)	iBAQ intensity (%)
A0A0D9QUJ7	KARS	2	3.8	1 912 600	A0A0D9RNF7	CSRP1	2	16.6	11 263 000
A0A0D9QXJ1	PRDX3	2	8.2	0	A0A0D9RNG4	IGF2BP2	2	4.7	3 265 400
A0A0D9QZQ5	HSD17B12	2	9.6	5 759 600	A0A0D9RPF0	RAB2A	2	12.7	0
A0A0D9R011	CYB5R3	2	10.3	5 541 000	A0A0D9SC62	N/A	2	15.4	39 325 000
A0A0D9R0H6	ACO2	2	4.1	1 729 200	A0A0D9RR51	PSMC6	2	7.2	4 413 000
A0A0D9R354	SLC3A2	2	4.3	1 264 300	A0A0D9RRD3	RTRAF	2	13.8	3 382 200
A0A0D9R3K0	EIF3L	3	13.6	2 801 700	A0A0D9RS97	PSMA2	3	17.5	7 083 600
A0A0D9R3Q2	DNM2	3	4.5	1 763 100	A0A0D9RSE1	BLVRA	2	10.5	5 070 000
A0A0D9RYP7	RAC1	2	10.4	10 820 000	A0A0D9RSM7	PSMA6	2	12.3	8 606 500
A0A0D9R6M6	AIFM1	2	3.9	3 306 300	A0A0D9RSX3	ERLIN2	2	7.9	3 056 000
A0A0D9R6P7	RAB11A	4	17.0	5 409 500	A0A0D9RTZ7	IPO4	3	4.0	2 005 100
A0A0D9R7C5	SAR1A	2	15.7	18 015 000	A0A0D9S247	RAB5C	2	9.8	22 669 000
A0A0D9R7D9	PPA1	2	10.8	6 033 500	A0A0D9S338	RUVBL2	3	7.6	6 205 700
A0A0D9R8E8	RAB7A	2	13.5	7 068 500	A0A0D9S3R1	HYOU1	3	5.9	2 352 500
A0A0D9RAB6	RPS24	2	20.8	43 934 000	A0A0D9S3W2	TAGLN2	3	21.1	8 782 600
K7X429	TNPO3	2	3.3	1 591 600	A0A0D9S4H7	RPLP0	3	20.1	48 573 000
A0A0D9RDI7	RPL26	3	12.4	59 140 000	A0A0D9S4H8	PXN	2	5.9	1 837 000
A0A0D9RDT3	NCAPD2	2	1.9	577 950	A0A0D9S4I8	NPLOC4	3	7.7	4 529 700
A0A0D9RDV7	ARPC4	3	18.5	19 474 000	A0A0D9S4L8	N/A	2	13.9	3 280 800
A0A0D9RF48	MIF	2	17.4	24 952 000	A0A0D9S5Z6	SEC22B	2	10.2	7 615 300
A0A0D9RG57	MPDU1	2	8.1	19 791 000	A0A0D9S6E6	TRIM28	2	5.6	2 154 900
A0A0D9RGJ5	RPS14	2	16.6	129 360 000	A0A0D9S885	HMGCL	2	7.4	3 384 000
A0A0D9RGR4	KIF5B	4	7.9	2 494 400	A0A0D9SDS3	N/A	2	13.2	61 616 000
A0A0D9RHD6	PSMB1	2	7.9	1 749 900	A0A0D9S8E4	UBR4	2	0.4	99 260
A0A0D9RIA0	ECPAS	3	2.1	1 475 500	A0A0D9S8A9	CDC42	2	8.9	1 849 200
A0A0D9RIN4	LARS	3	2.9	1 388 700	A0A0D9SD70	Trx-1	2	21.6	73 275 000
Q5D0W6	ABCB1	2	2.7	975 110	A0A0D9SB94	N/A	2	14.4	28 687 000
A0A0D9RKC1	DECR1	2	7.8	4 006 100	A0A0D9SCB9	RPL27	3	18.4	65 946 000
A0A0D9RLR8	PCNA	2	7.3	7 638 200	A0A0D9SCH7	N/A	2	24.1	44 490 000
A0A0D9RLW4	ATP5F1C	3	11.1	25 949 000	A0A0D9SCR9	N/A	2	20.0	142 290 000
A0A0D9SB72	N/A	2	19.4	18 120 000	Q6SSD8	Rli1	2	5.3	0

注: N/A 为功能未知的蛋白。

Note: N/A is a protein with unknown function.

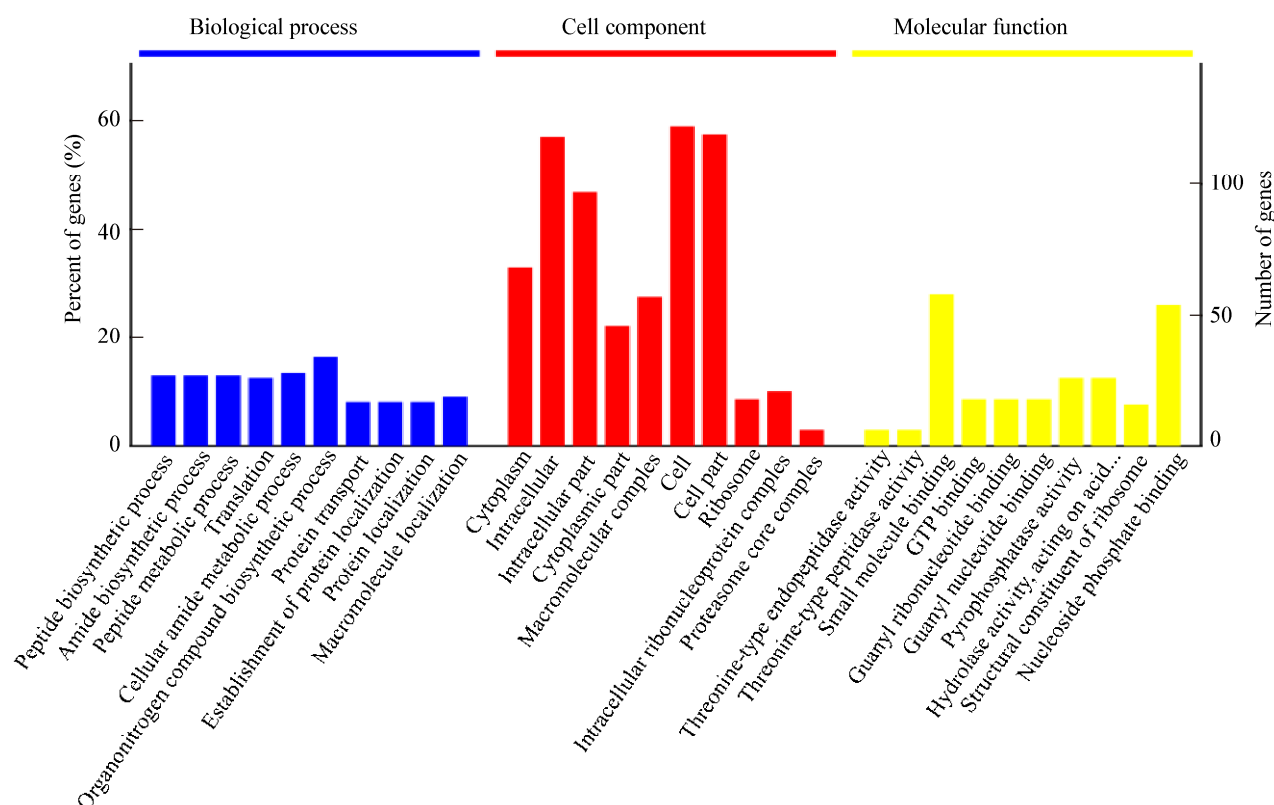


图3 与 PEDV M 蛋白相互作用的蛋白 GO 富集分析图

Figure 3 The annotation of proteins interacting with PEDV M protein using Gene Ontology

致病机制还不是很清楚,病毒在细胞内复制过程中,病毒蛋白的功能通过自身或与细胞内源性蛋白之间的相互作用而实现,了解病毒蛋白与细胞内源性蛋白的相互作用有助于阐明病毒的致病机制。

PEDV 在猪体内主要侵染猪小肠上皮细胞,研究 M 蛋白与细胞内源性蛋白的相互作用理想的细胞模型是猪小肠上皮细胞,我们尝试用猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)增殖 PEDV DR13,但 DR13 不能在 IPEC-J2 上增殖。Vero 细胞常用于 PEDV 的分离和增殖,所以本项目采用 Vero 细胞为模型进行 M 蛋白与细胞内源性蛋白的相互作用研究。

本研究采用 PEDV 的疫苗株 DR13 感染 Vero 细胞,通过免疫共沉淀方法筛选与 PEDV M 蛋白有相互作用的细胞内源性蛋白,进一步了解 PEDV-M 蛋白与宿主细胞的相互作用机制。PEDV DR13 感染细胞后,以 M 蛋白单抗免疫沉淀细胞内源性蛋白进行 Co-IP 试验、LC-MS/MS 分析。结果

基于质谱鉴定蛋白的唯一肽段数的方法分析显示, PEDV 感染的细胞中比细胞对照多鉴定了 218 个细胞内源性蛋白,其中唯一肽段数 ≥ 2 的有 62 个蛋白。经 GO 分析显示鉴定到的蛋白参与了生物信息学过程,具有调节细胞免疫应答、细胞凋亡、细胞生长周期及病毒复制等方面的功能。其中细胞分裂周期蛋白 42 (CDC42)可通过调节信号通路,控制细胞迁移、内吞作用和细胞周期的进程^[10-11];真核翻译起始因子 3 亚基 L 蛋白(eIF3L)可通过与病毒特定区域结合,影响病毒 RNA 翻译^[12]。基于筛选出的宿主细胞蛋白 CDC42、eIF3L 的生物学功能,我们选择 CDC42、eIF3L 作为候选蛋白验证筛选蛋白实验过程和生物信息学分析的可信性。利用 Co-IP 及免疫荧光方法对 CDC42、eIF3L 与 PEDV M 蛋白的相互作用进行检测,证实 PEDV M 蛋白与 CDC42、eIF3L 存在着相互作用,且两个蛋白分别与 M 蛋白共定位于细胞质中。

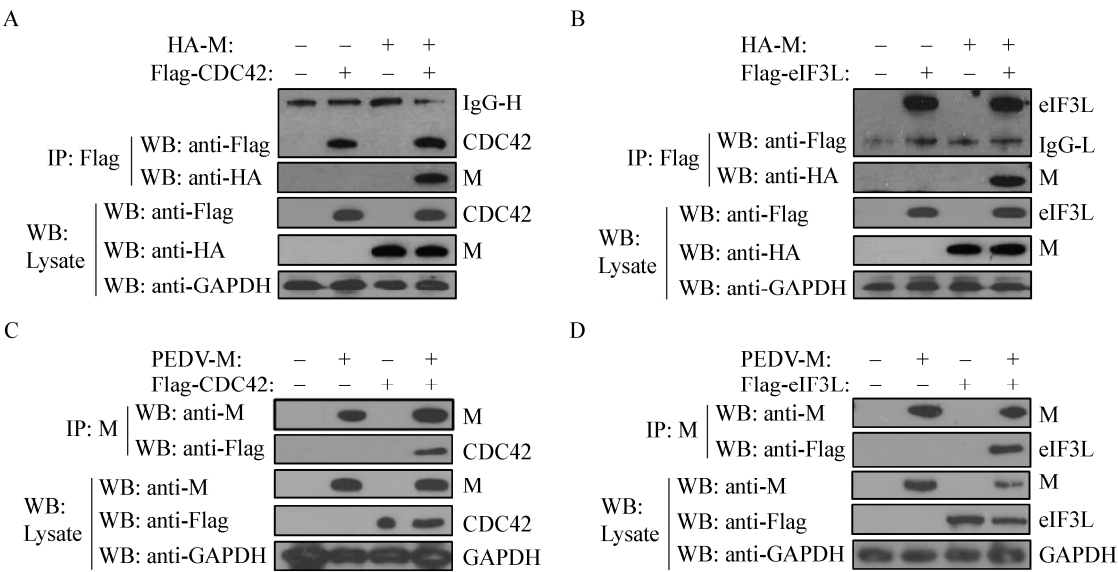


图 4 Co-IP 验证 PEDV M 与 CDC42 (A)、eIF3L (B) 的相互作用

Figure 4 Re-Confirmation of interaction of PEDV M protein with CDC42 (A) and eIF3L (B) by Co-IP

注: A、B: 在 HeLa 细胞中共转染 PCAGGS-HA-M 和 PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag 质粒, 验证 M 蛋白和 CDC42/eIF3L 之间的相互作用; C、D: 分别将 PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag 质粒转染 Vero 细胞后, 感染 PEDV DR13, 验证 M 蛋白和 CDC42/eIF3L 之间的相互作用。

Note: A, B: HeLa cells were co-transfected with PCAGGS-HA-M and PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag, the interaction between M and CDC42/eIF3L were validated; C, D: Vero cells were transfected the plasmids of PCAGGS-CDC42-Flag/PCAGGS-eIF3L-Flag, then infected with PEDV DR13, the interaction between M and CDC42/eIF3L were validated.

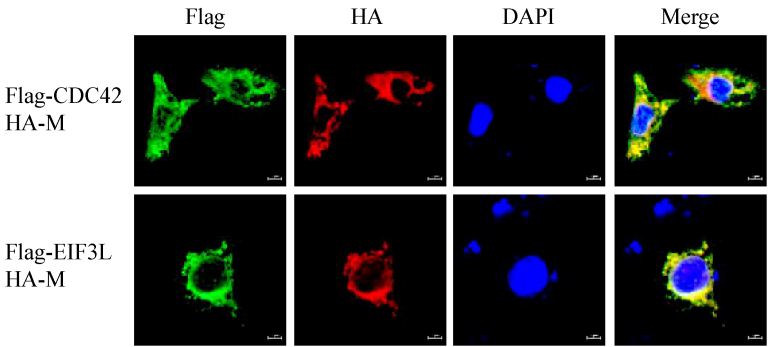


图 5 CDC42、eIF3L 分别与 M 蛋白在细胞内共定位分析

Figure 5 Colocalization analysis of M protein with CDC42 and eIF3L in cells

CDC42 是 Rho 蛋白鸟苷三磷酸酶家族成员之一, 除了调节细胞生理过程外, 目前也有研究表明多种 RNA 病毒如呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV)^[13]、轮状病毒 (Rotavirus, RV)^[14]、冠状病毒 (Coronaviruses, CoV)^[15]、埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV)^[16] 依赖 CDC42 信号途径侵染靶细胞。学者^[15]研究鼠肝炎病毒 (Mouse

hepatitis virus, MHV) 的入侵时, 通过 siRNA 筛选证实沉默 CDC42 的下游效应分子 Arp2/3 导致 MHV 产量降低, 表明 CDC42 参与了病毒的入侵过程。PEDV 与 MHV 同属于冠状病毒属, 本研究鉴定 M 蛋白与 CDC42 有相互作用, 暗示 M 蛋白参与了病毒的入侵, 还需进一步探讨 M 蛋白与 CDC42 的相互作用机制。真核翻译起始因子 eIF3

在翻译起始过程中起着核心作用^[17], eIF3L 是 eIF3 的一个亚基^[18]。研究表明 eIF3L 可通过与病毒特定区域结合, 进而影响病毒 RNA 翻译^[12]。也有学者推测, 病毒借用细胞 eIFs 启动 RNA 翻译过程^[19], 事实上, 已有研究已经证明包括 eIF3 在内的 eIFs 因子在病毒复制中的作用^[15,20-21]。Schoggins 等^[22]在细胞内过表达 eIF3L, 对 YFV 的复制有 10% 的抑制潜力。Morais 等^[23]研究表明 eIF3L 与黄热病毒(YFV)的 NS5 蛋白结合, 能轻微地抑制 YFV 复制, 暗示 eIF3L 在病毒复制过程中有潜在的作用。有关 M 蛋白与 eIF3L 的结合是否也抑制病毒的复制, 还需要进一步通过试验证实。

总之, 本研究在细胞内筛选了与 PEDV M 蛋白相互作用的细胞内源性蛋白, 并证实 CDC42、eIF3L 与 M 蛋白的相互作用, 将为揭示 M 蛋白在 PEDV 侵染细胞过程中的生物学功能提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193
- [2] de Haan CAM, Vennema H, Rottier PJM. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(11): 4967-4978
- [3] Ariel LA, Blake JL, Brenda GH. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(21): 11418-11428
- [4] Klumperman J, Locker JK, Meijer A, et al. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the Site of virion budding[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(10): 6523-6534
- [5] de Haan CAM, Kuo LL, Masters PS, et al. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(8): 6838-6850
- [6] Xu XG, Zhang HL, Zhang Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells[J]. *Acta Virology*, 2015, 59(3): 265-275
- [7] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2): 167-175
- [8] Zhang QZ, Shi KC, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1[J]. *Virology*, 2016, 489: 252-268
- [9] Wang Q, Li YW, Dong H, et al. Identification of host cellular proteins that interact with the M protein of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain[J]. *Virology Journal*, 2017, 14(1): 39
- [10] Qadir MI, Parveen A, Ali M. CDC42: role in cancer management[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015, 86(4): 432-439
- [11] Johnson DI, Pringle JR. Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity[J]. *Journal of Cell Biology*, 1990, 111(1): 143-152
- [12] Cai Q, Todorovic A, Andaya A, et al. Distinct regions of human eIF3 are sufficient for binding to the HCV IRES and the 40S ribosomal subunit[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 403(2): 185-196
- [13] San-Juan-Vergara H, Sampayo-Escobar V, Reyes N, et al. Cholesterol-rich microdomains as docking platforms for respiratory syncytial virus in normal human bronchial epithelial cells[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(3): 1832-1843
- [14] Díaz-Salinas MA, Silva-Ayala D, López S, et al. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(8): 4389-4402
- [15] Swaine T, Dittmar MT. CDC42 use in viral cell entry processes by RNA viruses[J]. *Viruses*, 2015, 7(12): 6526-6536
- [16] Quinn K, Brindley MA, Weller ML, et al. Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(19): 10176-10186
- [17] Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, et al. The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40S ribosomal subunits *in vitro*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(10): 8946-8956
- [18] Morris-Desbois C, Réty S, Ferro M, et al. The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(49): 45988-45995
- [19] Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat[J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2010, 30(1): 237-260
- [20] Easton LE, Locker N, Lukavsky PJ. Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(16): 5537-5549
- [21] Valente ST, Gilmartin GM, Mott C, et al. Inhibition of HIV-1 replication by eIF3F[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4071-4078
- [22] Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 481-485
- [23] Morais ATS, Terzian ACB, Duarte DVB, et al. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with *Flavivirus* NS5 and may modulate yellow fever virus replication[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 205