



小反刍兽疫病毒 H 和 F 蛋白在细胞融合中的作用

邓瑞雪, 蒙学莲*, 朱学亮, 才学鹏, 窦永喜, 张志东

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, 甘肃 兰州 730046

摘要:【目的】研究小反刍兽疫病毒囊膜糖蛋白(血凝素蛋白和融合蛋白)在病毒囊膜和宿主细胞膜融合过程中所发挥的作用。【方法】制备构建成功的小反刍兽疫病毒囊膜糖蛋白和病毒受体 SLAM、Nectin4 的真核表达质粒 pCMV-HA-H、pCAGGS-Flag-F、pCMV-Myc-SLAM 和 pCMV-Myc-Nectin 4, 将其组合转染至 CHO-K1 细胞, 通过显微观察和间接免疫荧光技术分析小反刍兽疫病毒 H 和 F 蛋白在病毒融合过程中的功能。【结果】除空白对照组和重组质粒单独转染组细胞中没有发现合胞体外, 其余组细胞中均出现了合胞体, 而且 F 和 H 蛋白共转染组合胞体的数目明显较多; 并在共表达 H、F 蛋白的细胞中观察到了蛋白分布极化的帽子现象。【结论】PPRV F 蛋白是病毒囊膜和细胞膜融合的必需蛋白, 但需要与 PPRV H 共同作用才能使病毒成功入侵靶细胞。

关键词: 血凝素蛋白, 融合蛋白, 受体, 膜融合, 小反刍兽疫病毒

小反刍兽疫病毒(*Peste des petits ruminants virus*, PPRV)是引起家养和野生小反刍动物发生急性、高度接触性传染病——小反刍兽疫的病原体, 属于副粘病毒科(*Paramyxoviridae*)麻疹病毒属(*Morbillivirus*)。PPRV 基因组是单股负链 RNA, 全长 15948 bp, 是已知麻疹病毒属成员中基因组最长的病毒, 从 3'端至 5'端依次分布着 6 个基因 N-P-M-F-H-L, 它们分别编码六种结构蛋白和两种非结构蛋白, 这 6 种结构蛋白为核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白

(H)、多聚酶大蛋白(L), 两种非结构蛋白为 C 蛋白、V 蛋白^[1-2], 其中 F 和 H 蛋白都是 PPRV 囊膜糖蛋白, 参与完成病毒对宿主靶细胞的入侵过程, 也是诱导产生中和抗体的主要免疫原^[3-5]。

囊膜病毒的入侵主要是病毒囊膜与宿主细胞膜的融合过程, 病毒蛋白与宿主靶细胞的正常膜成分——受体蛋白在一系列分子作用机制下, 使 2 个膜融合, 从而使病毒粒子侵入。一般认为, 副粘病毒在侵入细胞的过程中需要 H/HN 和 F 蛋白的共同作用, 其中 H/HN 蛋白负责与宿主病毒受

基金项目: 国家自然科学基金(31300142); 国家重点研发计划(2016YFD0500108)

*通信作者。Tel: +86-931-8374122; E-mail: mengxuelian@caas.cn

收稿日期: 2017-10-25; 修回日期: 2018-01-22; 网络出版日期: 2018-03-07

体蛋白发生结合, 而 F 蛋白直接参与病毒囊膜与靶细胞膜的融合^[6-7]。Hammouchi 等发现单独表达 PPRV H 或者 F 蛋白时, 并不能引起细胞融合, 而共表达 H 和 F 蛋白的重组痘病毒可以使易感细胞发生融合^[3]。但有研究证明, F 蛋白单独存在时仍表现出融合功能, 可以介导宿主邻近细胞间的融合, 并且将麻疹病毒(measles virus, MV) F 基因亚克隆到其他病毒的基因上也就可以使重组病毒产生融合细胞的能力, H 蛋白能提高合胞体的形成^[3,8]。此外, Merz 等发现 MV F 蛋白诱导产生的特异性抗体比抗 H 蛋白特异性抗体中和病毒的能力更有效, 能够阻止感染和防止病毒在体内的扩散^[9]。

目前已确定的 PPRV 受体有 2 个: 信号淋巴细胞活化分子(signaling lymphocyte activation molecule, CD150/SLAM)和脊髓灰质炎病毒受体相关分子 4 (poliovirus receptor-related 4, Nectin4/PVRL4), 这两种蛋白也是 MV 和犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)的受体^[10-17]。SLAM 和 Nectin4 均为免疫球蛋白超家族成员, 为典型的跨膜蛋白, 包括胞内区、跨膜区和含有免疫球蛋白结构域的胞外区^[16,18]。SLAM 是促进淋巴细胞增殖、免疫球蛋白合成和分泌 γ -IFN 的淋巴细胞表面共刺激分子, 通常选择性表达在活化的 T 细胞和 B 细胞、未成熟的胸腺细胞、树突状细胞及巨噬细胞等免疫细胞中^[19]。Nectin4 主要表达于卵巢、乳腺、肺、口腔黏膜和呼吸道上皮细胞中, 主要介导通过肺和气管上皮细胞发生的病毒感染^[20-21]。

尽管很多研究表明麻疹病毒属病毒 H 和 F 蛋白之间存在着相互作用, 但关于这两种蛋白在融合过程中的关系仍然存在着较大的争议, 且其与病毒受体的相互作用, 尤其是 F 蛋白与受体的相互作用机制仍不清楚。因此, 笔者构建了在 CHO

细胞中能够成功表达 PPRV H、F 蛋白和两种受体蛋白 SLAM、Nectin4 的真核表达载体, 不同组合进行共表达, 通过显微观察和激光共聚焦研究 PPRV H 和 F 蛋白的促融合作用, 这对今后 PPRV 入侵分子机制的研究、新型疫苗和诊断试剂的研发有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株: pCMV-HA 和 pCMV-Myc 真核表达质粒购自 Clontech 公司; pCMV-HA-H (JF939201.1)、pCMV-Myc-Nectin 4、pET30a-SLAM 和 pCAGGS-Flag-F (JF939201.1) 重组质粒由本实验室保存; *E. coli* DH5 α 购自北京全式金生物技术公司; 中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 细胞株购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、高保真 PrimeSTAR[®](Premix) DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; QIAprep[®] spin Miniprep 试剂盒购自 QIAGEN 公司; 脂质体 Lipofectamine[™] 3000 购自 Invitrogen 公司; DMEM 培养液、胎牛血清和胰酶购自 Gibco 公司; 鼠抗标签 HA 单抗、兔抗标签 Myc 单抗、山羊抗 Flag 单抗、驴抗山羊 CF350 标记 IgG、兔抗山羊 FITC 标记的 IgG、驴抗鼠 CF488 标记 IgG 和驴抗兔 CF594 标记 IgG 均购自 Sigma 公司。

1.2 真核表达载体的构建

根据 NCBI 数据库中山羊 SLAM mRNA 序列(登录号 DQ228869)设计引物: 上游引物为 5'-GAATTCATATGGATCCCA AAGGGCTCCT-3',

下划线部分为加入的 *EcoR* I 酶切位点; 下游引物为 5'-GGTACCTCAGCTCTCTGGAACCGTCACA-3', 下划线部分为加入的 *Kpn* I 酶切位点。

以 pET30a-SLAM 重组质粒为模板进行扩增, 回收扩增片段; 将载体 pCMV-Myc 质粒以及目的片段进行双酶切, 回收酶切产物, 将双酶切处理的载体和目的片段进行连接转化, 然后挑选单克隆培养, 提取质粒进行 PCR 和双酶切验证, 所得到的阳性重组质粒送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。

1.3 细胞转染

将 CHO-K1 细胞接种于六孔板中, 等细胞长至 90% 融合度时, 按照表 1 分组, 参照 Lipofectamine™ 3000 的使用说明书进行转染操作。转染完成后, 将细胞置于 CO₂ 培养箱中(37 °C, 5% CO₂) 孵育 6 h, 然后弃去培养基, 换用 DMEM F12 完全培养基继续培养; 36 h 后, 在显微镜下观察、分析转染细胞。

1.4 重组蛋白的表达与鉴定

将 pCMV-Myc-SLAM 转染 CHO-K1 细胞, 36 h 后, 弃去培养基, 预冷的 PBS (pH 7.4) 漂洗 2 次, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 漂洗

3 次, 0.2% Triton X-100 于 4 °C 通透化处理 15 min, 5% BSA 封闭 1 h, 漂洗; 而后用兔抗 Myc MAb 和驴抗兔 CF594 标记 IgG 进行间接免疫荧光试验, 检测重组蛋白的表达情况。

1.5 合胞体形成实验

重组质粒组合共转染 36 h 后, 弃掉培养液; 预冷的 PBS 漂洗 3 遍, 用丙酮甲醇(1: 1)于 -20 °C 固定 1 h; 弃掉固定液, 同上漂洗, 加入 PBS 配制的 10% 驴血清, 37 °C 封闭 1 h; 分别加入羊抗 PPRV 高免血清或兔抗 Myc MAb, 37 °C 孵育 1 h; 漂洗, 加入对应的兔抗山羊 FITC 标记的 IgG 和驴抗兔 CF594 标记的 IgG, 37 °C 避光孵育 1 h; 洗去二抗; 漂洗后于荧光显微镜下进行观察。

1.6 Confocal 试验

重组质粒共转染 36 h 后, 按照间接免疫荧光操作步骤检测重组蛋白的共定位。用 4% 多聚甲醛固定 30 min; 根据表 1 分组, 向每组细胞中分别加入针对蛋白的鼠抗 HA MAb、兔抗 Myc MAb 和/或羊抗 Flag MAb, 4 °C 孵育过夜; 漂洗后加入相对应的驴抗山羊 CF350 标记的 IgG、驴抗鼠 CF488 标记的 IgG 和/或驴抗兔 CF594 标记的 IgG, 37 °C 暗盒孵育 1 h, 利用 TCS SP8 激光共聚焦系统进行观察与分析。

表 1. 转染分组

Table 1. Groups of transfection

Groups	Plasmid and dose
1	Control
2	pCMV-Myc-SLAM (3.0 μg)
3	pCMV-Myc-Nectin4 (3.0 μg)
4	pCMV-HA-H (3.0 μg)
5	pCAGGS-Flag-F (3.0 μg)
6	pCMV-HA-H (1.5 μg)+ pCAGGS-Flag-F (1.5 μg)
7	pCMV-Myc-SLAM (1.5 μg)+ pCAGGS-Flag-F (1.5 μg)
8	pCMV-Myc-Nectin4 (1.5 μg)+ pCAGGS-Flag-F (1.5 μg)
9	pCMV-Myc-SLAM (1.0 μg)+ pCAGGS-Flag-F (1.0 μg)+pCMV-HA-H (1.0 μg)
10	pCMV-Myc-Nectin4 (1.0 μg)+ pCAGGS-Flag-F (1.0 μg)+pCMV-HA-H (1.0 μg)

2 结果和分析

2.1 真核表达载体的构建和鉴定

将目的片段插入 pCMV-Myc 载体, 所构建的重组表达载体经 PCR、双酶切鉴定均为阳性; 测序结果显示, 目的基因已正确插入到表达载体中, 且阅读框没有改变, 将该重组质粒命名为 pCMV-Myc-SLAM。

2.2 重组蛋白的表达

将重组质粒 pCMV-Myc-SLAM 转染 36 h 后观察融合蛋白在 CHO-K1 细胞中的表达情况。结果显示, 转染 36 h 后观察到了大量特异性红色荧光, 空白对照没有出现荧光(图 1)。这说明目的基因在 CHO-K1 细胞中能够高效表达。

2.3 显微观察合胞体的形成

将重组质粒按照表 1 转染 CHO 细胞, 36 h 后通过荧光显微镜观察共转染之后的细胞变化。结果发现, 共表达重组蛋白的第 F、G、H、I 和 J 组细胞中均存在合胞体; 并且在 F 和 H 蛋白共表达的第 F 组细胞中, 形成的合胞体数明显多于缺少 H 蛋白组的; 而第 A-E 组细胞中均没有出现合胞体(图 2)。

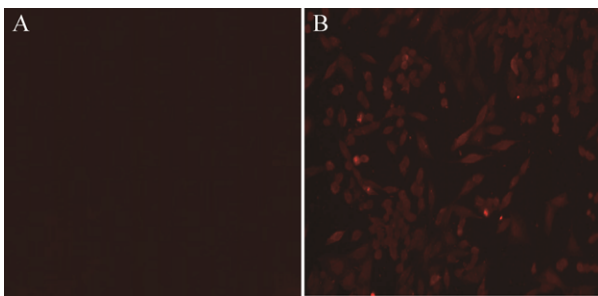


图 1. 转染 36 h 后融合蛋白表达情况

Figure 1. Expression of fluorescent protein 36 hours after transfection. A: Untransfected CHO-K1 cells; B: pCMV-Myc-SLAM transfected CHO-K1 cells.

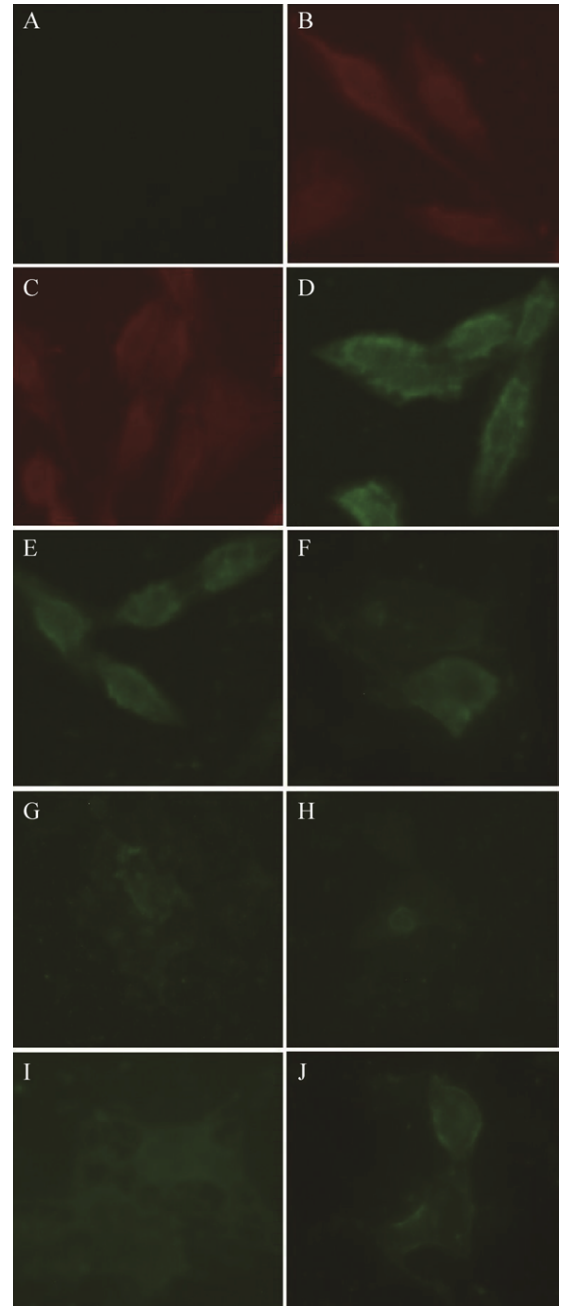


图 2. PPRV 囊膜蛋白的促融合作用

Figure 2. Fusion function of PPRV envelope glycoprotein. A: Untransfected CHO-K1 cells; B-J: pCMV-Myc-SLAM, pCMV-Myc-Nectin4, pCMV-HA-H, pCAGGS-Flag-F, pCMV-HA-H+ pCAGGS-Flag-F, pCAGGS-Flag-F+pCMV-Myc-SLAM, pCAGGS-Flag-F+pCMV-Myc-Nectin4, pCMV-HA-H+pCAGGS-Flag-F+pCMV-Myc-SLAM, pCMV-HA-H+pCAGGS-Flag-F+pCMV-Myc-Nectin4 transfected CHO-K1 cells, respectively.

2.4 重组蛋白在细胞中的共定位分析

将重组质粒共转染 36 h 后, 固定, 间接免疫荧光标记, 利用共聚焦显微镜进行观察。结果发现, 共表达的 F 与 H 或/和受体蛋白共定位分布, 且在共

表达 H、F 和受体 SLAM 或 Nectin4 的细胞中, 蛋白的分布发生极化, 出现了 Co-Capping 现象(图 3)。但单种重组质粒转染组和空白对照组细胞中的蛋白均匀分布, 没有发生极化; 空白对照组未出现荧光。

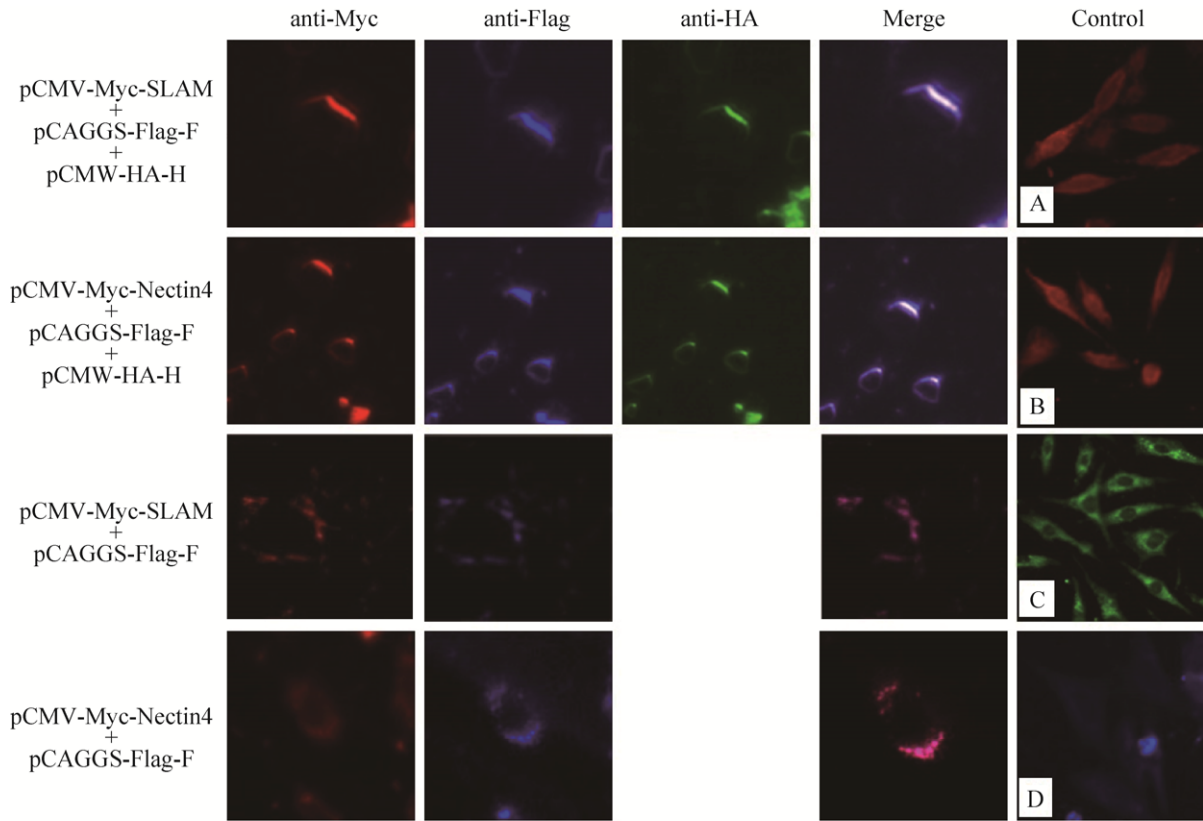


图 3. 利用激光共聚焦试验检测 PPRV H、F 蛋白与受体的亚细胞定位

Figure 3. Subcellular co-localization of PPRV H, F and receptors in transfected CHO-K1 cells under confocal microscopy. A: pCMV-Myc-SLAM; B: pCMV-HA-H; C: pCMV-Myc-Nectin4; D: pCAGGS-Flag-F.

3 讨论

病毒入侵宿主细胞是病毒生命周期中一个重要的过程, 是病毒感染宿主的第一步, 在这个过程中发生了多种蛋白的相互作用, 其中病毒囊膜蛋白与宿主细胞表面受体蛋白构象变化以及它们之间的相互作用是完成膜融合不可缺少的步骤。有相关研究人员认为副粘病毒的融合依赖其表面的

两种囊膜糖蛋白——H/HN 和 F 的相互作用来实现。融合的一般过程包括融合蛋白构象改变、融合肽暴露、融合肽插入到细胞膜、中间体形成、病毒囊膜和宿主细胞聚集以及病毒囊膜与宿主细胞膜融合^[7,22]。H/HN 和 F 蛋白在形成寡聚物过程中发生构象改变, 为膜融合提供了所必需的环境。在 H 与受体相互作用之前, H 蛋白如同夹子一样牢牢握住 F 蛋白, 使其以稳定的融合前体存在,

当 H 蛋白与受体蛋白结合发生作用时, H 蛋白构象发生变化, 从而使 F 蛋白脱离 H 蛋白, F 蛋白发生重排, 以中间体和融合后形式存在^[23-24]。2015 年, Gui 等运用冷冻电子断层扫描术对人副流感病毒 3 的 3D 结构进行了研究, 发现 HN 至少以两种形式存在: 一是 HN 四聚体呈“低头”式阵列分布, 另一种是 HN 以“抬头”形式与融合前 F 三聚体共定位存在, 即 HN 与 F 两种蛋白的相互作用不足以激活 F 蛋白构象变化, 只有当受体与 HN 球状头部结合后, HN 才能将激活信号传递给 F 蛋白, 发生融合^[25]。因此, 认为 H 蛋白与受体的结合可能是解离 H-F 复合物、诱导融合的触发器。此外, Porotto 等研究发现, 在膜融合的全过程中都需要 H 蛋白对 F 蛋白不断地激活^[25], 这提示可能存在更复杂的相互作用。

虽然目前已确定, 副粘病毒科病毒的 H/HN/G 和 F 蛋白之间存在相互作用, 且这两种蛋白共同作用能够促进细胞的融合^[26-31]; 但关于 PPRV H、F 和受体蛋白在融合中的作用还没有明确。因此, 在本研究中, 我们将能在 CHO-K1 细胞中表达的 PPRV H、F 和受体重组质粒组合转染, 通过显微观察和共聚焦技术对 PPRV 囊膜蛋白在细胞融合过程中的作用进行了探究。结果发现, 在 CHO-K1 细胞中共表达 PPRV H 蛋白、F 蛋白和受体蛋白时有合胞体出现并且经过共聚焦显微镜可以观察到极化现象; 除此之外, 在没有 H 蛋白存在时, 仅依靠 F 蛋白与受体蛋白之间的相互作用也能诱导细胞发生融合, 但是融合现象较 F 和 H 蛋白共表达细胞中的弱, 且未表现出极化现象; 而在 H 蛋白和受体、单独的 F 蛋白及空白对照组的 CHO 细胞都未观察到融合现象。因此, 推测 PPRV H、F 和受体 3 种蛋白共表达时的极化现象就是触发

融合的表现。由此产生两种猜测: 一是 PPRV F 蛋白与 H 蛋白或者受体蛋白的相互作用会引起 F 蛋白的构象发生改变, 但不能诱发有效的细胞融合; 只有 F、H 蛋白和受体共同作用时, 受体使 H-F 复合体解离, 并能激活 F 蛋白形成更有利于诱导细胞融合的稳定构象; 二是在某些特定的情况下, PPRV F 蛋白与高浓度的 H 蛋白或受体蛋白相互作用时, 也能使 F 蛋白的构象发生改变, 进而诱导细胞融合。

4 结论

综上所述, 本试验将克隆有 PPRV H、F 和受体 SLAM、Nectin4 基因的真核表达质粒转染 CHO 细胞后, 目的基因正确表达; 通过显微观察和共聚焦技术研究确定了 PPRV H、F 蛋白在融合中的作用, 虽然 F 蛋白是细胞融合所必需的, 但需要与 PPRV H 蛋白和/或受体蛋白相互作用。这为后续 PPRV 入侵机制的研究、新型疫苗和诊断试剂的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] Bodjo SC, Lelenta M, Couacy-Hymann E, Kwiatek O, Albina E, Gargani D, Libeau G, Diallo A. Mapping the Peste des Petits Ruminants virus nucleoprotein: identification of two domains involved in protein self-association. *Virus Research*, 2008, 131(1): 23-32.
- [2] Bao JY, Wang QH, Parida S, Liu CJ, Zhang L, Zhao WJ, Wang ZL. Complete genome sequence of a Peste des petits ruminants virus recovered from wild bharal in Tibet, China. *Journal of Virology*, 2012, 86(19): 10885-10886.
- [3] Seth S, Shaila MS. The fusion protein of Peste des petits ruminants virus mediates biological fusion in the absence of hemagglutinin-neuraminidase protein. *Virology*, 2001, 289(1): 86-94.
- [4] Meyer G, Diallo A. The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the Peste des petits ruminants virus: the long

- untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Research*, 1995, 37(1): 23–35.
- [5] Diallo A, Minet C, Le Goff C, Berhe G, Albina E, Libeau G, Barrett T. The threat of Peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, 2007, 25(30): 5591–5597.
- [6] Wild TF, Buckland R. Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *The Journal of General Virology*, 1997, 78(Pt 1): 107–111.
- [7] Das SC, Baron MD, Barrett T. Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of Peste-des-petits-ruminants virus: homologous F and H proteins are required for virus viability. *Journal of Virology*, 2000, 74(19): 9039–9047.
- [8] Alkhatib G, Roder J, Richardson C, Briedis D, Weinberg R, Smith D, Taylor J, Paoletti E, Shen SH. Characterization of a cleavage mutant of the measles virus fusion protein defective in syncytium formation. *Journal of Virology*, 1994, 68(10): 6770–6774.
- [9] Merz DC, Scheid A, Choppin PW. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *Journal of Experimental Medicine*, 1980, 151(2): 275–288.
- [10] Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(3): 135–142.
- [11] Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of Virology*, 2003, 77(18): 9943–9950.
- [12] Pawar RM, Dhinakar Raj G, Balachandran C. Relationship between the level of signaling lymphocyte activation molecule mRNA and replication of Peste-des-petits-ruminants virus in peripheral blood mononuclear cells of host animals. *Acta Virologica*, 2008, 52(4): 231–236.
- [13] Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VHJ, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PBJr, Cichutek K, Von Messling V, Lopez M, Cattaneo R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 2011, 480(7378): 530–533.
- [14] Pratakpiriya W, Seki F, Otsuki N, Sakai K, Fukuhara H, Katamoto H, Hirai T, Maenaka K, Techangamsuwan S, Lan NT, Takeda M, Yamaguchi R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *Journal of Virology*, 2012, 86(18): 10207–10210.
- [15] Birch J, Juleff N, Heaton MP, Kalbfleisch T, Kijas J, Bailey D. Characterization of ovine Nectin-4, a novel peste des petits ruminants virus receptor. *Journal of Virology*, 2013, 87(8): 4756–4761.
- [16] Zhang XA, Lu GW, Qi JX, Li Y, He Y, Xu X, Shi J, Zhang CWH, Yan JH, Gao GF. Structure of measles virus hemagglutinin bound to its epithelial receptor nectin-4. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(1): 67–72.
- [17] Delpout S, Noyce RS, Richardson CD. The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. *Viruses*, 2014, 6(6): 2268–2286.
- [18] Ohishi K, Ando A, Suzuki R, Takishita K, Kawato M, Katsumata E, Ohtsu D, Okutsu K, Tokutake K, Miyahara H, Nakamura H, Murayama T, Maruyama T. Host-virus specificity of morbilliviruses predicted by structural modeling of the marine mammal SLAM, a receptor. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 33(3): 227–241.
- [19] Ostrakhovitch EA, Li SSC. The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 84(6): 832–843.
- [20] Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(8): 603–615.
- [21] Kurita S, Ogita H, Takai Y. Cooperative role of nectin-nectin and nectin-afadin interactions in formation of nectin-based cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(42): 36297–36303.
- [22] Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *Journal of General Virology*, 1991, 72(2): 439–442.
- [23] Navaratnarajah CK, Oezguen N, Rupp L, Kay L, Leonard VHJ, Braun W, Cattaneo R. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(2): 128–134.
- [24] Plemper RK, Brindley MA, Iorio RM. Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(6): e1002058.
- [25] Porotto M, DeVito I, Palmer SG, Jurgens EM, Yee JL, Yokoyama CC, Pessi A, Moscona A. Spring-loaded model revisited: paramyxovirus fusion requires engagement of a receptor binding protein beyond initial triggering of the fusion protein. *Journal of Virology*, 2011, 85(24): 12867–12880.

- [26] Lee JK, Prussia A, Paal T, White LK, Snyder JP, Plemper RK. Functional interaction between paramyxovirus fusion and attachment proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(24): 16561–16572.
- [27] Plemper RK, Compans RW. Mutations in the putative HR-C region of the measles virus F₂ glycoprotein modulate syncytium formation. *Journal of Virology*, 2003, 77(7): 4181–4190.
- [28] Lee JK, Prussia A, Snyder JP, Plemper RK. Reversible inhibition of the fusion activity of measles virus F protein by an engineered intersubunit disulfide bridge. *Journal of Virology*, 2007, 81(16): 8821–8826.
- [29] Corey EA, Iorio RM. Mutations in the stalk of the measles virus hemagglutinin protein decrease fusion but do not interfere with virus-specific interaction with the homologous fusion protein. *Journal of Virology*, 2007, 81(18): 9900–9910.
- [30] Ennis MK, Hu CL, Naik SK, Hallak LK, Peng KW, Russell SJ, Dingli D. Mutations in the stalk region of the measles virus hemagglutinin inhibit syncytium formation but not virus entry. *Journal of Virology*, 2010, 84(20): 10913–10917.
- [31] Gravel KA, McGinnes LW, Reitter J, Morrison TG. The transmembrane domain sequence affects the structure and function of the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal of Virology*, 2011, 85(7): 3486–3497.

Fusion function of *Peste des petits ruminants* virus envelope proteins

Ruixue Deng, Xuelian Meng^{*}, Xueliang Zhu, Xuepeng Cai, Yongxi Dou, Zhidong Zhang

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To study the role of *Peste des petits ruminants* virus envelope glycoproteins hemagglutinin and fusion during the fusion process. [Methods] The eukaryotic expression recombinant plasmids pCMV-HA-H, pCAGGS-Flag-F, pCMV-Myc-SLAM and pCMV-Myc-Nectin 4 sequenced correctly were transfected or co-transfected into CHO-K1 cells, and then the fusion role of PPRV H and F proteins was analyzed by microscopy and indirect immunofluorescence technique. [Results] The formation of syncytium was observed in the co-transfected cells while it was not found in the single plasmid transfected cells and the negative control. The number of syncytia in cells co-expressing H and F proteins was significantly more than that of the other groups. The H and F proteins were co-redistributed to form the polar caps (co-capping) in the same position. [Conclusion] PPRV F protein is an essential protein for fusion of the viral membrane with host cell membrane, but it must interact with PPRV H to make virus invasion successfully.

Keywords: hemagglutinin, fusion protein, receptor, membrane fusion, *Peste des petits ruminants* virus

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300142) and by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0500108)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-931-8374122; E-mail: mengxuelian@caas.cn

Received: 25 October 2017; Revised: 22 January 2018; Published online: 7 March 2018