

免疫共沉淀筛选细胞内与 A 型流感病毒 M2 蛋白相互作用的蛋白质

李耀东^{1,2}, 关振宏³, 严景华^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(²中国科学院研究生院, 北京 100049)

(³吉林大学畜牧兽医学院, 北京 130062)

摘要 【目的】筛选细胞内与 A 型流感病毒 M2 蛋白(A/M2)相互作用的蛋白质。【方法】将 A/M2 编码序列插入真核表达载体 pCAGGS-CFlag, 重组质粒 pCAGGS-CFlag-A/M2 转染 HEK-293T 细胞, 裂解细胞, 以 Flag 单抗偶联的琼脂糖珠免疫沉淀 A/M2-Flag 蛋白, 清洗去除非特异性结合的杂蛋白后, SDS-PAGE 银染法显示与 A/M2 共沉淀的蛋白, 从胶上切下此蛋白条带进行质谱分析。【结果】成功构建了 A/M2 的表达质粒, 免疫印迹证实了 A/M2 蛋白在 293T 细胞中能够表达, 免疫共沉淀筛选到与 A/M2 结合的多种蛋白, 分析质谱结果, 确定 ataxin 10 和 3 个真核翻译起始因子(eIF)为候选蛋白。【结论】ataxin 10 与 A/M2 相互作用为流感病毒感染或接种流感疫苗引发小脑性共济失调提供了解释, eIF 与 A/M2 相互作用表明 A/M2 可能在调控病毒蛋白合成方面起重要作用。

关键词: 免疫共沉淀; A 型流感病毒 M2 蛋白; 质谱; 蛋白相互作用

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1081-05

流感病毒(Influenza virus)是流行性感冒的病原体, 属正粘病毒科。根据病毒基质蛋白(M)和核蛋白(NP)抗原性及其基因特性的不同, 可将流感病毒分为 A、B 和 C3 个亚型。A 型流感病毒感染范围最广, 造成的危害最大。A 型流感病毒基因组由 8 个负链 RNA 片段组成, 编码 11 种蛋白质。A/M2 蛋白由基因组第 7 个片段编码, 全长 97 个氨基酸, 高度保守^[1]。

A/M2 在病毒囊膜上以四聚体形式存在, 分子间二硫键将四个 M2 分子围成一个质子通道, 该通道介导的酸化是病毒增殖的必要条件^[2-3]。离子通道活性是 A/M2 蛋白的首要功能, 2008 年 1 月《Nature》

杂志刊登了 A/M2 蛋白的晶体结构和 NMR 结构, 详细阐述了通道的质子传导机制^[4-5]。比较已测序的 A/M2 基因序列, 其同源性高达 90%, 尤其是 N 端的 10 个氨基酸在人流感病毒和禽流感病毒中几乎完全相同, 所以 A/M2 做为可能提供交叉保护的“通用流感疫苗”而被广泛研究^[6-7]。与 A/M2 的胞外段和跨膜区相比, 其胞内部分的研究较少。A/M2 胞内段有 54 个氨基酸, 占其全长的一半略多, 与另外两种膜蛋白 HA 和 NA 相比, 其胞内段是最长的; 虽然 A/M2 蛋白在病毒粒子囊膜上只有 60 个左右, 但其在被感染细胞的质膜上却大量存在^[8], 以上信息暗示我们流感病毒 M2 蛋白的胞内段可能具有重要

基金项目: 国家自然科学基金(30670091, 30870118)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807598; E-mail: yanjh@im.ac.cn

作者简介: 李耀东(1980-), 男, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为细胞与分子生物学。E-mail: liyaodong@im.ac.cn

收稿日期: 2009-04-21; 修回日期: 2009-05-10

作用。

病毒利用宿主蛋白质合成系统进行蛋白的合成,并通过与宿主蛋白的相互作用,对宿主生物学过程进行巧妙的调控,以进行自身复制。免疫共沉淀(Coimmunoprecipitation)是一种研究蛋白-蛋白相互作用的技术,可以用来筛选或验证蛋白质之间的相互作用。本研究以免疫共沉淀为基本手段,借助 SDS-PAGE 分离及质谱分析技术,筛选到细胞内与 A/M2 存在相互作用的两类蛋白 ataxin 10 和 eIF。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株:质粒 pCAGGS/MCS 由日本东京大学 Kawaoka 教授馈赠,pCAGGS-CFlag 由本实验室刘俊娥博士改造;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 为本实验室保存;人胚胎肾细胞 293T 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自博大泰克公司;DNA 凝胶回收纯化试剂盒购自 Macherey-Nagel 公司;PEI 转染试剂购自 ROCHE 公司;硝酸纤维素膜购自 GE Healthcare 公司;X 光片为 Kodak 公司 Kodak X-Omat BT Film(XBT-1);小鼠抗 Flag 单克隆抗体,辣根过氧化物酶偶联羊抗小鼠(Sc-2004)均购自美国 Santa Cruz 公司;新生牛血清购自三利生物制品;胰酶 Trypsin 为 Sigma 公司产品;与琼脂糖偶联的抗 Flag 抗体颗粒(Anti-Flag Monoclonal Antibody M2-Conjugated Agarose beads)购于 Sigma 公司。PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国);生物安全柜(BHC-1360 II,北京东哈联);二维液相色谱-线性离子阱质谱联用仪(Thermo 公司,美国)。

1.2 真核表达质粒 pCAGGS-CFlag-A/M2 的构建

以 A 型流感病毒株 A/WSN/33 M2 基因为模板,扩增目的片段。引物序列如下:上游引物 5'-CGGAA-TTCGCCACCATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3'(EcoR I);下游引物 5'-CCGCTCGAGGCTCCAATTCTATGTTG-ACAAAATG-3'(Xho I)。胶回收目的片段,以 EcoR I 和 Xho I 对目的片段 A/M2 及载体 pCAGGS-CFlag 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。

1.3 A/M2 蛋白的真核细胞表达

将 HEK-293T 细胞接种于直径 60 mm 的细胞培养皿中,待细胞密度达到 80% ~ 90% 时,用 PEI 转

染试剂转染 5 μ g pCAGGS-CFlag-A/M2 质粒到细胞中。20 h 后收集细胞,Western blot 检测 A/M2-Flag 融合蛋白的表达情况。

1.4 免疫共沉淀筛选细胞内与 A/M2 相互作用的蛋白

pCAGGS-CFlag-A/M2 及 pCAGGS-CFlag(用作阴性对照)分别转染 HEK-293T 细胞,20 h 后清洗、收集细胞 400 \times g,离心 3 min。用 500 μ L 细胞裂解液重悬细胞,液氮 ~ 37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融 3 次以裂解细胞,13800 \times g,离心 15 min,去除细胞碎片。将上清与经细胞裂解液平衡的 30 μ L 的与琼脂糖偶联的抗 Flag 抗体混合,4 $^{\circ}$ C 旋转结合 4 h,400 \times g 离心 5 min,弃上清。用 500 μ L 细胞裂解液洗与琼脂糖偶联的抗 Flag 抗体颗粒(15 min/次,4 次),400 \times g 离心 5 min,弃上清,保留琼脂糖颗粒。最后向其中加入 20 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。将上述两份样品进行 12% SDS-PAGE,银染法对凝胶进行染色。

1.5 质谱分析差异条带

根据凝胶染色结果,比较实验组和对照组的蛋白条带,小心切下实验组较对照组多出的条带,送生物物理所进行质谱分析,确定条带内蛋白的名称。

2 结果

2.1 质粒 pCAGGS-CFlag-A/M2 的 PCR 及双酶切鉴定

随机挑取转化平板上长出的单克隆,37 $^{\circ}$ C 振荡培养,用 A/M2 的上下游引物进行菌液 PCR。从能扩增出目的条带(约 300 bp)的菌液中提取质粒,再用 EcoR I 和 Xho I 双酶切所提质粒,可以切出一条 300 bp 左右的目的条带和一条约 5000 bp 的空载体条带(图 1)。将此质粒送测序,测序结果表明 A/M2 编码序列正确插入质粒 pCAGGS-CFlag 中。

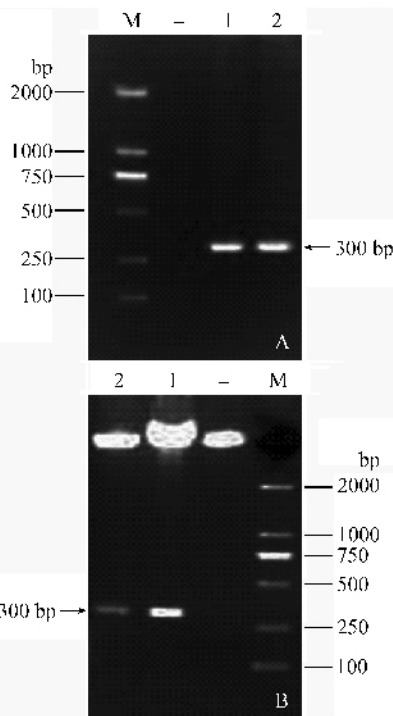
2.2 A/M2-CFlag 融合蛋白在真核细胞中表达

收集 pCAGGS-CFlag-A/M2 转染的 293T 细胞,用抗 Flag 抗体 western blot 检测 A/M2-Flag 融合蛋白的表达情况。如图 2 所示,在 20 kDa 处有一目的条带,与预期分子量相同,说明融合蛋白已经表达。

2.3 A/M2 免疫共沉淀的 SDS-PAGE 银染分析

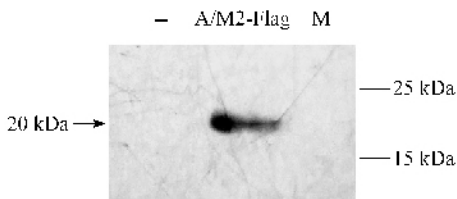
将免疫共沉淀的样品进行 SDS-PAGE,对凝胶进行银染显色。从凝胶上可以清晰的看到:与阴性对照相比,A/M2 免疫共沉淀多出了一些条带,该实验进行了 3 次重复,结果一致。切割差异明显的 3 条蛋白条带(图 3)进行质谱分析。1 号条带分子量约

为 30 kDa, 2 号条带分子量约为 50 kDa, 3 号条带分子量约为 80 kDa 左右。



1 重组质粒 pCAGGS-CFlag-A/M2 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pCAGGS-CFlag-A/M2 by PCR and double digestion. A: PCR confirmation of pCAGGS-CFlag-A/M2. M: Marker DL2000; -: Negative control; 1, 2: PCR results. B: Double digestion of pCAGGS-CFlag-A/M2. M: Marker DL2000; -: Negative control; 1, 2: results of double digestion with *EcoR* I and *Xho* I.



2 Western blot 检测 A/M2 在 293T 细胞中的表达

Fig. 2 Detection of the expression of A/M2 in 293T cells by Western blot.

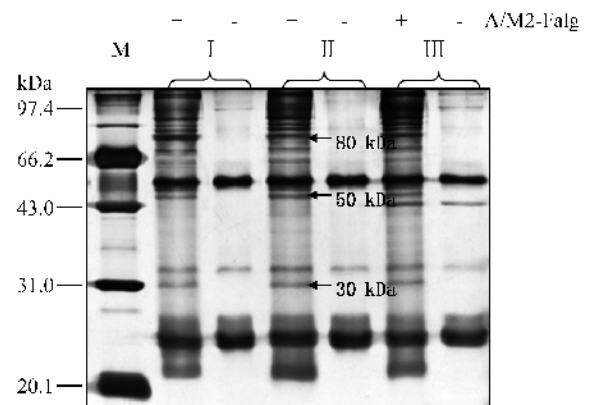
2.4 差异条带的质谱鉴定

将质谱检出的肽段氨基酸序列在人蛋白质序列数据库中进行检索,从而确定出每个条带内所含有的蛋白质种类。剔除操作过程中引入的角蛋白类污染,选择分子量大小对应且在对照组中未被检出的蛋白做为后续研究对象(表 1)。

3 讨论

Ataxin 10 广泛分布于小脑细胞的胞浆和核周围,可以诱导神经元轴突的延伸^[9]。10 型脊髓小脑共济失调(Spinocerebellar ataxia type 10, SCA10)是由

于 Ataxin 10 编码基因的第九个内含子中 ATTCT 大量重复从而降低了 Ataxin 10 蛋白的表达而引发的一种常染色体显性遗传性疾病^[10]。急性小脑性共济失调是不遗传的,致病原因为急性病毒性感染或细菌性感染(包括流感病毒感染^[11])或者流感、水痘等疫苗接种^[12],对其发病机理有两种解释:①病毒直接侵入脑部;②病毒感染引发的自身免疫反应,但尚未有定论。本实验用免疫共沉淀技术筛选到细胞内蛋白 Ataxin 10 能与流感病毒 M2 蛋白相互结合。可以对流感病毒感染或流感疫苗接种后引起小脑性共济失调的机制做出如下推断(1)病毒感染后进入脑组织(2)病毒蛋白 M2 在细胞内大量表达(3)大量的 M2 结合细胞内 Ataxin 10 蛋白,导致 Ataxin 10 功能障碍,从而引起小脑共济失调的病症。本实验结果为研究急性小脑性共济失调的致病机制提供了线索。



3 A/M2 免疫共沉淀结果的 SDS-PAGE 银染分析

Fig. 3 Coimmunoprecipitation of cellular proteins with A/M2. Cell lysates from pCAGGS-CFlag-A/M2 transfected 293T cells were immunoprecipitated with anti-Flag monoclonal antibody M2-conjugated agarose beads, followed by SDS-PAGE and silver staining. M: Protein marker; I, II, III: 3 independent repeats; +: Cell lysates expressed A/M2-Flag fusion protein; -: Negative control. 1, 2 (arrow): Bands excised for Mass Spectrometry.

表 1 质谱法鉴定差异条带内的蛋白质

Table 1 Identification of cellular protein in the bands by mass spectroscopic analysis

bands	MS results	
1		No
2	Ataxin 10	53.5 kDa
	eIF3 subunit6	52.2 kDa
	eIF4A isoform1	46.2 kDa
	basic leucine zipper and W2 domains 2	48.5 kDa
3	eIF2B subunit5	80.4 kDa

These proteins were not detected in the negative control samples.

真核翻译起始因子(eukaryotic initiation factor,

eIF) ,是指参与真核蛋白翻译起始的一系列蛋白质。与原核翻译起始因子只有三种(IF1、IF2、IF3)相比 ,真核翻译起始因子种类多且复杂 ,目前已鉴定的 eIF 共有 12 种。eIF2B 是鸟苷酸交换因子 ,将 eIF2 上结合的 GDP 转换为 GTP ,从而使 eIF2 重新参与翻译起始。eIF2B 由 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 5 个亚基组成。 ϵ 亚基是 eIF2B 中最大的亚基 ,包含了进行鸟苷酸交换的催化部位以及与 eIF2 结合的部位。eIF3 是最大的起始因子 ,哺乳动物细胞中存在 13 种亚基(a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l 和 m)。eIF3 在翻译起始过程中起核心作用。eIF3 可以与游离的 40S 核糖体亚基结合 ,阻止 40S 亚基与 60S 核糖体亚基的直接结合 ,从而防止形成无翻译活性的 80S 核糖体 ;通过与 eIF2 的相互作用 ,eIF3 可以使 eIF2·GTP·Met-tRNA_i 三联体复合物稳定地结合到 40S 核糖体亚基上 ,并促使 43S 前起始复合物的形成。除了在翻译起始时发挥核心作用 ,eIF3 还被发现参与翻译过程以及细胞周期的调控。通过调节不同类型的 mRNA 的翻译起始 ,eIF3 就可能选择性地调控蛋白的合成 ,从而对细胞的生长进行调控。而 eIF3 的 a、b、e 和 k 亚基都可能参与细胞周期调控。eIF4A 可以解开 mRNA 的 5' 端非翻译区的二级和三级结构 ,使核糖体的附着更容易 ,同时允许核糖体进行起始密码子扫描。eIF4A 在人体中有 3 个亚型 :eIF4A-1、eIF4A-2 和 eIF4A-3^[13]。目前尚未有研究表明流感病毒 M2 蛋白参与调控细胞内蛋白的合成 ,但其 NS1 蛋白则可以通过下调细胞 PKR 活性来提高病毒蛋白的表达水平 ,本实验对 M2 蛋白进行免疫共沉淀得到了可能与其存在相互作用的 3 种真核翻译起始因子 ,暗示 M2 蛋白也可能参与调控病毒蛋白的合成。

参考文献

- [1] Lamb RA ,Lai CJ ,Choppin PW. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus : colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *PNAS* ,1981 ,78 :4170 - 4174.
- [2] Sugrue RJ ,Hay AJ. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses :evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* ,1991 ,180 :617 - 624.
- [3] Holsinger LJ ,Lamb RA. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer Stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* ,1991 ,183 :32 - 43.
- [4] Amanda LS ,Acharya R ,Salom D ,et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* ,2008 ,451 :596 - 599.
- [5] Schnell JR ,Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* ,2008 ,451 :591 - 595.
- [6] Liu W ,Zou P ,Ding J ,et al. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes and Infection* ,2005 ,7 (1) :171 - 177.
- [7] Marina DF ,Walter F ,Wouter M ,et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* ,2006 ,24(46) :6597 - 6601.
- [8] Lamb RA ,Zebedee SL ,Richardson CD. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* ,1985 ,40 :627 - 633.
- [9] Waragai M ,Nagamitsu S ,Xu WD ,et al. Ataxin 10 Induces Neurogenesis Via Interaction With G-Protein β 2 Subunit. *Journal of Neuroscience Research* ,2006 ,83 :1170 - 1178.
- [10] Marz P , Probst A , Lang S , et al. Ataxin-10 , the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein ,is essential for survival of cerebellar neurons. *the Journal of Biological Chemistry* ,2004 ,279 :35542 - 35550.
- [11] Ishikawa T ,Fujio Y ,Morita M ,et al. An adult case of acute cerebellitis after influenza A infection with a cerebellar cortical lesion on MRI. *Rinsho Shinkeigaku* ,2006 ,46(7) :491 - 495.
- [12] Hiroshi S ,Toshiro Y. Acute Cerebellar Ataxia after Influenza Vaccination with Recurrence and Marked Cerebellar Atrophy. *The Tohoku journal of experimental medicine* ,1989 ,158 :95 - 103.
- [13] 维基百科 2009-03-12 <http://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%9C%9F%E6%A0%B8%E8%B5%B7%E5%A7%8B%E5%9B%A0%E5%AD%90>

Screening cellular proteins interacted with M2 protein of influenza A virus by Coimmunoprecipitation

Yaodong Li^{1,2}, Zhenhong Guan³, Jinghua Yan^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract [Objective] To screen cellular protein interacted with influenza A M2 protein(A/M2). **[Methods]** We cloned A/M2 gene fragment into pCAGGS-CFlag vector, and the resulting plasmid was transfected into human embryonic kidney(HEK) 293T cells. The recombinant Flag fusion protein, A/M2-Flag was absorbed specifically by Anti-Flag Monoclonal Antibody M2-Conjugated Agarose beads, we loaded the beads on 12% SDS-PAGE after we washed it with lysis buffer. Silver staining of the gel revealed that several proteins were co-purified with A/M2. To identify the proteins, we excised the protein bands and analysed them by mass spectroscopic sequencing. **[Results]** We got two kinds of proteins, ataxin 10 and eukaryotic initiation factors(eIFs). **[Conclusion]** Interaction between Ataxin 10 and A/M2 would explain why influenza virus infection or influenza vaccine inoculation causes acute cerebellar ataxia. A/M2 interacting with eIFs would imply that A/M2 is involved in the regulation of influenza virus protein synthesis.

Keywords : coimmunoprecipitation ; A/M2 ; mass spectrometry ; protein interaction

(本文责编 :王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30670091, 30870118)

* Corresponding author. Tel/Fax :+ 86-10-64807598 ;E-mail :yanjh@im.ac.cn

Received 21 April 2009/ Revised 10 May 2009

科学出版社新书推介(2009 - 06)

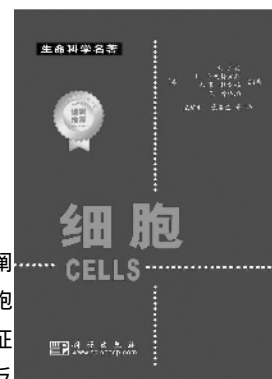
细胞(翻译版)

[美] B. 卢因 L. 卡西梅里斯 V. R. 林加帕 G. 普洛珀 编著 桑建利 连慕兰 等译

978-7-03-024674-5 ¥190.00 2009 年 6 月 出版

内容简介:本书从细胞和分子水平对细胞生物学的内容做了全面系统的阐述。全书共 17 章,分别阐述细胞的基本概念、物质的跨膜运输及胞内运输、细胞核的结构与功能、染色体的结构与功能、细胞骨架的结构与功能、细胞周期调控、细胞凋亡、细胞信号转导与细胞外基质和细胞粘连的基本特征与分子机制,还对癌细胞、原核细胞和植物细胞进行了专门阐述。每一章既涵盖了基本内容,又反映了相关领域的最新进展。全书有大量有助于正确理解相关内容的图表和照片,书末附有词汇表和索引。

本书可作为生物学、医学、农学、林学等专业的高年级本科生、研究生和相关学科的教师的参考书,也可供对细胞生物学有兴趣的其他学科的科技人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 李韶文 联系电话 010-64031535 64000849

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目