

# 猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白与感染细胞核磷蛋白的共定位分析

吕茂杰, 陈建飞, 时洪艳, 陈小金, 范秀萍, 申识川, 冯力\*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001

**摘要:**【目的】阐明猪流行性腹泻病毒(PEDV)核衣壳蛋白与病毒感染细胞核仁成分B23.1蛋白的共定位特征。【方法】分别参照GenBank中PEDV CV777株的N基因序列(AF353511)和编码人细胞核仁蛋白B23.1基因序列(BC050628.1),设计、合成扩增N基因和B23.1基因的引物,利用RT-PCR技术扩增了N基因和Vero E6细胞的B23.1基因的cDNA,分别克隆到真核表达载体pAcGFP1-C1和pDsRed2-N1,获得重组质粒pAcGFP1-C1/N和pDsRed2-N1/B23.1,共转染Vero E6细胞。【结果】Western blots分析表明这些融合蛋白在转染的Vero E6细胞中表达;共聚焦显微镜技术分析表明在共转染Vero E6细胞中猪流行性腹泻病毒N蛋白与Vero E6细胞核磷蛋白B23.1发生共定位。【结论】为进一步鉴定PEDV N蛋白中核仁定位信号和N蛋白核仁定位机制提供可靠依据。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒, 核衣壳蛋白, 核磷蛋白B23.1, 共定位

**中图分类号:** R392      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0643-05

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪的一种急性高度接触性肠道传染病。以严重的肠炎、呕吐和水样腹泻为主要特征,各年龄的猪均易感,尤其对幼龄仔猪表现高的致死率,给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。

冠状病毒N蛋白是一种多功能的磷酸化蛋白,表现为高碱性和高丝氨酸含量,是在病毒感染细胞中产生量最多的病毒蛋白之一<sup>[2–3]</sup>。PEDV具有冠状病毒典型的结构特征<sup>[4–5]</sup>,其N蛋白参与病毒的复制和转录过程<sup>[6–7]</sup>。此外,在对冠状病毒一些成员N蛋白核仁定位的研究中阐明了N蛋

白与细胞核仁蛋白的相互作用,参与细胞核仁功能的调节,细胞周期的调控,从而优化病毒的复制和增殖<sup>[2,8–10]</sup>。

核磷蛋白B23.1是在分裂间期核仁中,在有丝分裂期的染色体周围以及在有丝分裂末期前核仁体(prenucleolar bodies, PNBs)中大量存在的一种磷酸化的酸性氨基酸残基富集的蛋白。B23.1蛋白能够结合核苷酸RNA,与成熟的前核糖核酸蛋白颗粒发生相互作用,具有核糖核酸酶和分子伴侣活性<sup>[11–12]</sup>;研究表明B23.1能够与其他蛋白结合,如HIV-1的Rev蛋白,并可能在细胞核和细胞质之间起到转运作用<sup>[13–14]</sup>。而PEDV的N蛋白与B23.1的蛋白相互作用尚不清楚。“共定位”

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费(200805)

\* 通信作者。E-mail: fengli\_h@163.com

**作者简介:** 吕茂杰(1982–),男,山西静乐县人,硕士,从事病毒免疫及分子生物学研究。

**收稿日期:** 2010-12-16; **修回日期:** 2011-02-24

即“荧光共定位”是指将两种目的蛋白基因分别克隆到带不同荧光的真核表达载体上,然后用这两种载体共转染细胞,结合激光共聚焦显微技术分析两种目的蛋白在同一细胞器中的分布情况及二者之间的相互作用。

本研究通过构建含有标签蛋白的真核表达载体,并共转染哺乳动物细胞,然后通过激光共聚焦显微镜技术直接观察分析 PEDV N 蛋白与 Vero 细胞 B23.1 蛋白的共定位特征,进而为阐明 N 蛋白与 B23.1 蛋白之间的相互作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌种和细胞株:**真核表达载体 pAcGFP1-C1, pDsRed2-N1 购自 Clontech 公司; PEDV CV777 细胞毒由本实验室保存; *E. coli* DH5 $\alpha$  和 Vero E6 细胞由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂:**FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (H + L) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 抗 B23 的单克隆抗体 (MAb) 购自 Santa Cruz 公司; IRDye<sup>TM</sup> 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Green Fluorescent Protein (Aequorea victoria) [Goat] 和 IRDye<sup>TM</sup> 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG (H + L) 购自 ROCKLAND 公司; Lipotamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 N 基因和 B23.1 基因的引物设计及扩增

根据 PEDV CV777 株 N 基因序列 (序列号 AF353511) 设计引物, NF: 5' -GCACTCGAGC TATGGCTTCTGTCAGCTTTC-3' (含 *Xho* I 酶切位点和起始密码子 ATG); NR: 5' -GCCGGTACCTTA ATTCCTGTATCGAAGAT -3' (含 *Kpn* I 位点和终止密码子), 按 TRIzol 试剂盒说明书从 PEDV CV777 株病毒培养液中提取病毒 mRNA, 应用 RT-PCR 扩增 PEDV N 基因。根据人的 B23.1 基因 (序列号 BC050628) 设计特异性引物, 引物 B-F: CGCCTCGAGATGGAAGATTCGATGGACATG (含 *Xho* I 位点和起始密码子 ATG), B-R: GAAGGTACCGT CGAAAGAGACTTCCTCCAC (含 *Kpn* I 位点)。按 TRIzol 试剂盒说明书提取 Vero E6 细胞 B23.1 基因的 mRNA, 应用 RT-PCR 扩增 B23.1 基因。引物由北京英俊生物科技有限公司合成。

### 1.3 pAcGFP-N 和 pDsRed-B23.1 重组表达质粒的构建

将上述所获基因片段与真核表达载体 pAcGFP1-C1 和 pDsRed2-N1, 分别用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶回收酶切产物, 连接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37℃ 过夜培养后, 挑取单个菌落提取质粒 DNA, 进行酶切鉴定并由上海英俊生物技术有限公司测序。

### 1.4 表达重组质粒的共转染

按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书操作步骤将两种重组质粒分别或共转染 Vero E6 细胞。

### 1.5 Western blot 分析

于转染后 48 h 收集 pAcGFP-N 和 pDsRed-B23.1 分别转染的细胞, 同时设空载体转染对照, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂乳封闭, 对于 AcGFP-N 加入 1:5000 稀释的 IRDye<sup>TM</sup> 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Green Fluorescent Protein (Aequorea victoria) [Goat], 室温避光孵育, 而后直接利用近红外双色激光成像系统 Odyssey 进行扫描分析 AcGFP-N 融合蛋白的表达; 对于 B23-DsRed 利用鼠源的抗 B23 MAb 于 4℃ 过夜, 而后加入 1:5000 稀释的 IRDye<sup>TM</sup> 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG 二抗室温避光孵育 45 min, 再用近红外双色激光成像系统 Odyssey 进行扫描分析 B23-DsRed 融合蛋白的表达。

### 1.6 共聚焦分析

将 pAcGFP-N 和 pDsRed-B23.1 共转染 Vero E6 细胞后 24 h, 直接进行激光共聚焦显微镜分析。

## 2 结果

### 2.1 N 基因和 B23.1 基因的获得

通过 RT-PCR 技术分别从病毒培养液和 Vero E6 细胞中扩增出与 PEDV 的 N 基因和 Vero E6 细胞 B23.1 基因大小相符的目的条带, 约为 1340 bp 和 900 bp, 分别与预期的 1346 bp 和 901 bp 相符。

### 2.2 重组阳性质粒的酶切鉴定

重组质粒经过酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果显示: pDsRed2-N1/B23.1 经双酶切后获得约 4700 bp 和 900 bp 的 2 个片段; pAcGFP1-C1/N 经双酶切后获得约 4700 bp 和 1340 bp 大小的 2 个片段。证实目的基因正确插入载体中, 经进一步的测序结果表明,

B23.1 基因和 N 基因序列正确。

2.3 融合蛋白的表达检测

重组质粒转染 Vero E6 细胞后收获48 h 的细胞,进行蛋白凝胶电泳,而后转移到 NC 膜上,经过抗体孵育后进行蛋白表达分析,Western blot 结果显示:在空载体转染细胞中,只有标签蛋白 AcGFP1 和 DsRed2 表达;而融合表达基因表达后分别获得了与预期大小相符的目的片段,AcGFP1-N 和 DsRed2-B23.1 分别为81 kDa和65 kDa (图 1)。

2.4 N 蛋白和 B23.1 蛋白的共定位分析

重组质粒共转染 Vero E6 细胞后24 h,利用共聚焦显微镜分析表达蛋白在活细胞中的分布特征,结果表明在 AcGFP1 和 DsRed 转染的细胞中标签蛋白在细胞质和细胞核中均匀分布;而 AcGFP1-N 融合蛋白主要在细胞质和细胞核的核仁结构中,并且与细胞核磷蛋白 B23.1 发生共定位(见图 2-D, F)

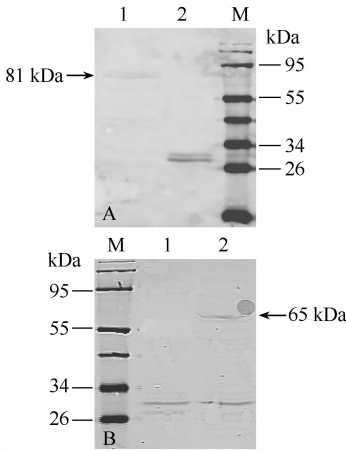


图 1 融合基因在 Vero E6 细胞的表达分析  
Fig. 1 Western blot analysis of the fusion genes expressed in Vero E6 cells. A: 1. AcGFP1-N protein expressed; 2. AcGFP1 protein expressed; M. Protein Marker; B: M. Protein Marker; 1. DsRed2 protein expressed; 2. DsRed2-B23.1 protein expressed.

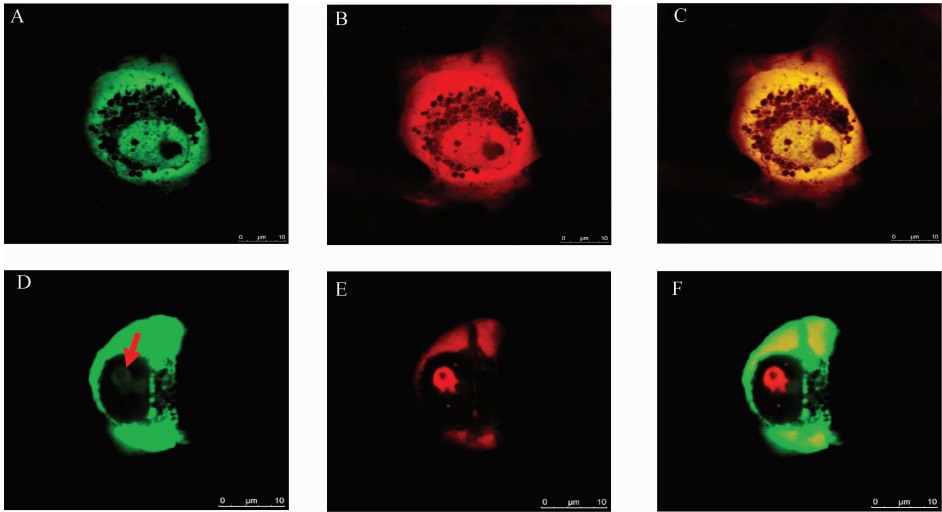


图 2 融合蛋白共定位的共聚焦分析结果

Fig. 2 The co-localization analysis of fusion proteins in co-transfected Vero E6 cells by confocal microscope. A: AcGFP1 protein; B: DsRed2 protein; C: The merged image between A and B; D: AcGFP-N protein; E: DsRed-B23.1 protein; F: The merged image between D and E.

3 讨论

PEDV CV777 N 蛋白是冠状病毒的主要结构蛋白之一,长度为 441 个氨基酸,为碱性氨基酸富集的磷酸化蛋白。本研究中,AcGFP1 和 DsRed 单独表达时蛋白均匀的分布到细胞质和细胞核中;而 AcGFP1-N 融合表达蛋白大小为81 kDa,主要定位到细胞质,有少量蛋白展示出与细胞核磷蛋白 B23.1

的共定位特征,表明 N 蛋白定位到细胞核的结构为细胞核的核仁。蛋白质在细胞质和细胞核之间的物质转运是通过核孔复合体(Nuclear pore complex, NPC)来进行的,而核孔复合体只允许离子和小于 40 – 60 kDa 的蛋白在细胞质和细胞核之间被动扩散,但对于大于60 kDa的蛋白而言,需要通过特异的载体蛋白的辅助来进行主动转运,而且在转运蛋白中需要能够被载体蛋白识别的靶向信号,通过它们之间的相互作用来介导转运蛋白在细胞质和细胞核

之间的转运。这些靶向信号包括:核定位信号(Nuclear Localization Signal, NLS)、核仁定位信号(Nucleolar localization signal, NoLS)和核输出信号(Nuclear Export Signal, NES)<sup>[15]</sup>。

我们在先前的研究中观察到 N 蛋白定位到细胞核的一个结构中<sup>[16]</sup>,推测 N 蛋白借助一些核仁定位信号与载体蛋白相互作用来进入细胞核中,而 N 蛋白是精氨酸和赖氨酸富集的,而这些氨基酸又是核定位信号和核仁定位信号的主要组分。大量研究表明 N 蛋白借助核(或核仁)定位信号转移到细胞核(或核仁),参与核仁功能的调节,用来优化病毒复制。而核仁参与一些宿主细胞进程的调节,包括细胞周期、细胞凋亡和抗病毒反应的诱导的调节。也推测出 N 蛋白在核仁中的作用是通过与核仁蛋白、rRNA 或 rDNA 的相互作用来发挥的。Chen 等研究推断 SARS-CoV N 蛋白与核仁蛋白、纤维蛋白的再分布有关,而且能够与核仁蛋白中的核仁素相互作用来抑制细胞分裂<sup>[2-3,17-18]</sup>。

核仁存在于细胞核中,是最先在普通光学显微镜下发现的一种亚细胞结构,是一个高度专一性的动态亚核结构。核仁仅存在于分裂细胞的间期,在有丝分裂期,核仁不存在或者解离。核仁成分主要包括:核仁蛋白、核仁素、纤维蛋白和细胞核磷蛋白(B23 包括 B23.1 和 B23.2),它们在核仁和细胞质间隙中也有分布<sup>[15]</sup>。B23.1 蛋白作为核仁蛋白参与多个细胞进程中,在核糖体生物发生和细胞周期中起一个关键性的作用<sup>[14]</sup>。在 SARS-CoV N 蛋白与 B23.1 相互作用的研究中表明了 N 蛋白通过竞争性的抑制 B23.1 的磷酸化来影响细胞的核糖体的生物发生,从而抑制宿主细胞的基因表达,进而创造一个有利于病毒增殖的环境<sup>[19]</sup>。我们的研究表明 AcGFP-N 融合表达蛋白与细胞核仁蛋白的共定位,初步表明 N 蛋白与 B23.1 蛋白可能的相互作用特征,由此也可以推测 N 蛋白细胞核仁的定位可能是通过 B23.1 的分子伴侣活性来结合 N 蛋白,引导其暴露出功能性的核仁定位信号,从而被载体蛋白的识别来引导其进入细胞核仁结构中。本研究结果将为 PEDV N 蛋白中核仁定位信号的进一步鉴定,为将来冠状病毒 N 蛋白细胞核仁定位机制的阐明提供可靠依据。

## 参考文献

- [1] Straw BE, D'Aallaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Disease of Swine. 8<sup>th</sup> edition. Ames, IOWA USA: The Iowa University Press, 1999.
- [2] Chen H, Wurm T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. *Journal of Virology*, 2002, 76: 5233-5250.
- [3] Wurm T, Chen H, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins and the protein may disrupt host cell division. *Journal of Virology*, 2001, 75: 9345-9356.
- [4] Pensaert MB, deBOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology*, 1978, 58: 243-247.
- [5] Master PS. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 2006, 66: 193-292.
- [6] Brian D, Baric R. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology Immunology*, 2005, 287:1-30.
- [7] Baric RS, Nelson GW, Fleming JQ, Deans RJ, Keck JG, Casteel N, Stohlman SA. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: Implications for viral transcription. *Journal of Virology*, 1988, 62: 4280-4287.
- [8] Surjit M, Lal s k. The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities. *Infection Genet ics and Evolution*, 2008, 08(4):397-405.
- [9] Dove BK, You JH, Reed ML, Emmett SR, Brooks G, Hiscox JA. Changes in nucleolar morphology and proteins during infection with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Cell Microbiology*, 2006, 8(7): 1462-5822.
- [10] Reed ML, Dove BK, Jackson RM, Collins R, Brooks G, Hiscox JA. Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein. *Traffic*, 2006, 7: 833-848.
- [11] Hingorani K, Szebeni A, Olson, MOJ. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 24451-24457.
- [12] Szebeni A, Hingorani K, Negi S, Olson MOJ. Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein B23. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278, 9107-9115.

- [13] Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 1989, 56:379-390.
- [14] Lechertier T, Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P. A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *Journal of Cell Science*, 2006, 120(2):265-275.
- [15] Hiscox JA. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5: 119-127.
- [16] 吕茂杰,冯力,时洪艳,陈建飞,孙东波,申识川,崔小晨,王承宝,范秀萍.猪流行性腹泻病毒N蛋白的真核表达及其亚细胞定位的初步分析.畜牧兽医学报(*Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*),2009,40(5): 691-696.
- [17] Yoo D, Wootton SK, LI G, Song C, Rowland RR. Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *Journal of Virology*, 2003, 77(22): 12173-12183.
- [18] Hiscox JA, Wurm T, Wilson L, Cavanagh D, Britton P, Brooks G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. *Journal of Virology*, 2001, 75: 506-512.
- [19] Zeng Y, Ye L, Zhu S, Zheng H, Zhao P, Cai W, Su L, She Y, Wu Z. The nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus inhibits B23 phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369:287-291.

# Co-localization analysis between porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein and nucleolar phosphoprotein B23.1

Maojie Lv, Jianfei Chen, Hongyan Shi, Xiaojin Chen, Xiuping Fan, Shichuan Shen, Li Feng\*

Department of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

**Abstract:** [Objective] To elucidate the co-localization characteristic between porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) N protein and B23.1 phosphoprotein. [Methods] Two pairs of primers used to amplify N gene and B23.1 gene were designed and synthesized according to CV777 N gene sequence (AF353511) and human nucleolar phosphoprotein B23.1 gene sequence (BC050628.1), respectively. The PEDV N gene and B23.1 gene were amplified by RT-PCR from PEDV strain CV777 and Vero E6 cells, respectively; then cloned into eukaryotic expression vector pAcGFP1-C1 and pDsRed2-N1, to generate the recombinant plasmids pAcGFP1-C1 / N and pDsRed2-N1/B23.1, respectively. Vero E6 cells were transfected with plasmids pAcGFP1-C1 / N and pDsRed2-N1/B23.1. [Results] The fusion proteins successfully expressed in transfected Vero E6 cells by western blot analysis, and the PEDV N protein and the B23.1 phosphoprotein showed co-localization features in co-transfected cells through confocal microscopy analysis. [Conclusion] The results will help to identify the nucleolar localization signals in PEDV N protein and to elucidate the mechanism of N protein located in nucleus.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus, nucleocapsid protein, nucleolar phosphoprotein B23.1, co-localization

(本文责编:张晓丽)