

新城疫病毒基质蛋白与禽细胞核磷蛋白 B23.1 在 HEK-293T 细胞中的相互作用

段志强, 陈坚, 何亮, 许海旭, 李群辉, 胡顺林, 刘秀梵*

扬州大学, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009

摘要:【目的】探讨新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) 基质(matrix, M) 蛋白和禽细胞核磷蛋白 B23.1 在 HEK-293T 细胞中的相互作用。【方法】分别参照 GenBank 中 NDV JS/5/05/Go 株全基因序列(JN631747) 和禽细胞核磷蛋白 B23.1 基因序列(NM_205267), 设计、合成扩增 M 基因和 B23.1 基因的引物, 利用 RT-PCR 扩增出 M 基因和 DF1 细胞的 B23.1 基因, 分别克隆至真核表达载体获得重组表达质粒 pEGFP-M、pCMV-HA-M 和 pDsRed-B23.1; 将 pEGFP-M 和 pDsRed-B23.1 共转染 HEK-293T 细胞, 利用荧光显微镜观察 M 蛋白与 B23.1 蛋白的共定位; 利用免疫共沉淀(Co-IP) 技术进一步验证两种蛋白的相互作用。【结果】Western blot 结果表明构建的重组质粒在转染的 HEK-293T 细胞中正确表达; 荧光显微镜观察显示 M 蛋白与 B23.1 蛋白在核仁具有共定位特征; Co-IP 进一步证实两者能发生相互作用。【结论】NDV M 蛋白与禽细胞核磷蛋白 B23.1 存在相互作用, M 蛋白可能通过与 B23.1 蛋白的相互作用进入核仁。

关键词:新城疫病毒, 基质蛋白, 核磷蛋白 B23.1, 蛋白相互作用

中图分类号:S852 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2013)07-0730-07

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV) 属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属成员, 是有囊膜、单股负链不分节段的 RNA 病毒, 其基因组结构为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 编码的 6 种结构蛋白主要涉及病毒 RNA 的转录和复制、病毒粒子的装配和病毒进入细胞^[1-2]。基质(matrix, M) 蛋白是 NDV 编码的一种非糖基化膜相关蛋白, 在病毒粒子中含量最为丰富且高度保守, 主要位于病毒囊膜内表面, 构成病毒囊膜的支架^[3-4]。M 蛋白在 NDV 整个感染周期中扮演着重要的角色, 它不仅能抑制宿主细胞基因的转

录和翻译, 协助子代病毒的组装和释放, 还可抑制宿主细胞表达固有促炎因子, 促进病毒在体内复制^[5-8]。对 M 蛋白的亚细胞定位研究表明, M 蛋白在病毒感染细胞的早期主要定位在细胞核和核仁, 其功能是通过抑制宿主细胞核糖体和蛋白质的合成, 优化病毒的复制与增殖^[5]。

核磷蛋白 B23 是真核细胞核仁的主要蛋白组分之一, 在细胞有丝分裂的染色体周围以及在有丝分裂末期前核仁体中大量存在的一种酸性氨基酸残基富集的磷酸化蛋白, 包括 B23.1 和 B23.2 两种形

基金项目:教育部“长江学者和创新团队”发展计划资助项目(IRT0978); 国家蛋鸡产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-41-G07); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 公益性行业(农业)科研专项经费(201303033)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介:段志强(1985-), 男, 湖北襄阳人, 博士研究生, 研究方向为新城疫病毒蛋白与宿主蛋白的相互作用。E-mail: dzq2040847@yahoo.com.cn

收稿日期:2012-12-25; **修回日期:**2013-02-28

式^[9]。其中 B23.1 蛋白是一种多功能核仁蛋白,在核糖体生物发生和细胞周期中起关键性作用,具有核苷酸结合、核糖核酸酶和分子伴侣活性^[10]。同时,B23.1 蛋白可通过核定位信号在细胞核与细胞质之间穿梭,参与蛋白的核质间运输。此外,研究还证实 B23.1 蛋白可以与具有核仁定位特征的蛋白结合,如 HIV-1 的 Rev 蛋白和 Tat 蛋白,促进它们运输到核仁^[11-12]。早期研究发现 NDV M 蛋白具有明显的核仁定位特征,因此,我们推测 B23.1 蛋白与 M 蛋白之间可能存在相互作用,参与了 M 蛋白的核仁定位。

本研究通过构建表达 NDV M 蛋白和禽细胞核磷蛋白 B23.1 的真核表达载体,通过共转染 HEK-293T 细胞,首先通过荧光显微镜直接观察到 M 蛋白与 DF1 细胞 B23.1 蛋白存在明显的核仁共定位特征,然后利用免疫共沉淀实验进一步证实两种蛋白之间的相互作用,为后续鉴定 M 蛋白核仁定位信号及阐明 M 蛋白的核仁定位机制提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株:真核表达载体 pEGFP-C1, pDsRed-C1, pCMV-HA 购自 Clontech 公司; NDV JS/5/05/Go 毒株由扬州大学农业部畜禽传染

病学重点开放实验室保存; *E. coli* DH5 α , DF1 细胞和 HEK-293T 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:TRIzol, M-MLV 反转录酶, *pfu* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶购自美国 Invitrogen 公司;限制性内切酶 *EcoR* I, *Sal* I, *Xho* I 购自 Fermentas 公司;质粒小提试剂盒购自 Qiagen 公司;抗 B23.1 蛋白单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;抗 GFP 鼠单克隆抗体,抗 HA 鼠单克隆抗体,Protein A + G Agarose 购自 Abcam 公司;HRP 标记山羊抗鼠 IgG (H + L) 购自 Sigma 公司;FuGENE[®] HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。凝胶成像仪、PCR 仪、DNA 电泳仪、蛋白电泳仪购自 Bio-Rad 公司;倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 M 基因和 B23.1 基因的引物设计及 RT-PCR 扩增

分别根据 NDV JS/5/05/Go 株全基因组序列(序列号 JN631747)和鸡的 B23.1 基因序列(序列号 NM_205267)设计扩增 NDV M 基因和 DF1 细胞 B23.1 基因 ORF 序列的特异性引物,用于将 M 基因和 B23.1 基因构建到真核表达载体中。引物序列见表 1,由上海生工生物工程技术有限公司合成。按照 TRIzol 试剂盒说明书分别从 NDV JS/5/05/Go 株鸡胚尿囊液和 DF1 细胞中提取 RNA,运用 RT-PCR 技术扩增出 M 基因和 B23.1 基因。

表 1. 构建重组表达质粒所用引物

Table 1. Primers used for construction of recombinant expression plasmids

Specific primer	Primer sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction sites ^a
GFP-M-F	TCGGAATTC AATGGACTCATCCAG	1115	<i>EcoR</i> I
GFP-M-R	GCACTCGACTTATTTCTGAAAGG		<i>Sal</i> I
HA-M-F	TTGAATTCGGATGGACTCATCC	1115	<i>EcoR</i> I
HA-M-R	GCACTCGACTTATTTCTGAAAG		<i>Xho</i> I
Red-B23.1-F	AGCTCGAGAGATGGAGGACAGCG	907	<i>Xho</i> I
Red-B23.1-R	GCGAATTCCTTACAGAGTCTGTC		<i>EcoR</i> I

^a Restriction sites are given in italics.

1.3 pEGFP-M、pCMV-HA-M 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 pEGFP-C1、pCMV-HA 和 pDsRed-C1 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I, *EcoR* I 和 *Xho* I, *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后,经琼脂糖凝胶回收酶切产物,连接转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,37℃ 过夜培养后,挑取单菌落提取质粒

DNA,酶切鉴定正确后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 重组表达质粒的转染

按 FuGENE[®] HD Transfection Reagent 说明书操作步骤将重组表达质粒 pEGFP-M, pCMV-HA-M 和 pDsRed-B23.1 分别或共转染 HEK-293T 细胞。

1.5 Western blot 分析蛋白的表达

于转染后 36 h 收集 pEGFP-M, pCMV-HA-M 和 pDsRed-B23.1 分别转染的 HEK-293T 细胞,同时设空载体转染的细胞作为对照,将细胞处理后进行 12% SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜上;用 5% 脱脂乳 4℃ 封闭过夜后,加入 1:3000 稀释的 anti-GFP 或 anti-HA 鼠单克隆抗体于 37℃ 孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次后,加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗于 37℃ 孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次后显色。

1.6 荧光共定位实验

将重组质粒 pEGFP-M 和 pDsRed-B23.1 共转染 HEK-293T 细胞,培养 24-48 h 后,用预冷的 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; PBS 洗 3 遍,用 0.25% Triton X-100 透化处理细胞 5 min; PBS 洗 3 遍,加入 DAPI 染细胞核 10 min; PBS 洗 3 遍,自然干燥后,利用荧光显微镜观察融合蛋白的定位。

1.7 免疫共沉淀实验

将重组质粒 pCMV-HA-M 和 pDsRed-B23.1 共转染 HEK-293T 细胞,培养 48 h 后收获细胞; PBS 洗细胞 3 次,加入 1 × RIPA 细胞裂解液裂解细胞,冰上作用 20 min; 离心后收集细胞裂解上清,加入 2 μg anti-HA 抗体, 4℃ 旋转混合过夜; 加入 40 μL protein A + G Agarose 继续混合 3 h; 用预冷的 1 × RIPA 洗涤 protein A + G, 重复 5 次后加入 20 μL SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min, 对蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 电泳,用 anti-GFP 抗体进行 Western blot 免疫印迹分析,检测蛋白之间是否存在相互作用。反之,以 anti-GFP 抗体进行免疫共沉淀,用 anti-HA 抗体进行 Western blot 检测。

2 结果

2.1 M 基因和 B23.1 基因的 RT-PCR 扩增

设计适当引物,以 NDV 和 DF1 细胞 RNA 反转录后的 cDNA 为模板分别扩增出与 M 基因和核磷蛋白 B23.1 基因大小相符的目的条带,约为 1100 bp 和 900 bp,分别与预期的 1115 bp 和 907 bp 相符(图 1-A)。

2.2 重组表达质粒的酶切鉴定

重组表达质粒经过相应酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果显示:pEGFP-M 经双酶切后获得约 4700 bp 和 1100 bp 的 2 个片段;pCMV-HA-M 经双酶切后获

得约 3800 bp 和 1100 bp 的 2 个片段;pDsRed-B23.1 经双酶切后获得约 4700 bp 和 900 bp 大小的 2 个片段(图 1-B),证实目的基因正确插入到载体中。进一步测序结果表明 M 基因和 B23.1 基因序列正确,均未发生基因突变和开放阅读框移位。

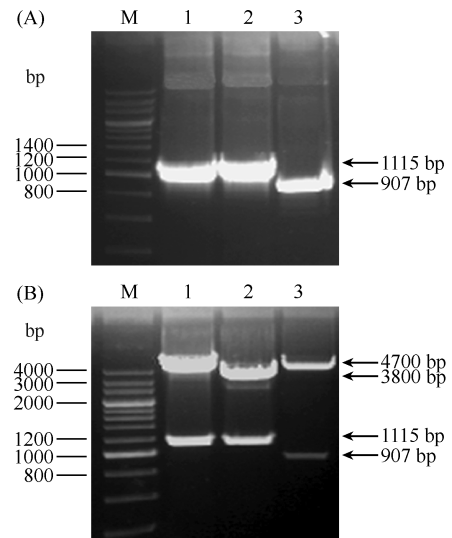


图 1. M 基因和 B23.1 基因 PCR 产物的电泳鉴定及其重组表达质粒的酶切鉴定

Figure 1. Electrophoresis analysis of PCR products of M gene and B23.1 gene and identification of the recombinant plasmids by double restriction endonuclease digestion. A: M, DNA Marker; Lane 1 and 2, PCR-amplified M gene; lane 3, PCR-amplified B23.1 gene; B: M, DNA Marker; Lane 1-3, enzyme-digested products of pEGFP-M, pCMV-HA-M and pDsRed-B23.1, respectively.

2.3 融合蛋白的表达检测

重组质粒 pEGFP-M、pDsRed-B23.1、pCMV-HA-M 分别转染 HEK-293T 细胞后 36 h,收获转染细胞并制备蛋白上样样品,进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 NC 膜,经过 anti-GFP 抗体或 anti-HA 抗体孵育后进行蛋白表达分析。Western blot 结果显示:在空载体转染的细胞中,只有标签蛋白表达;而融合蛋白表达后均获得与预期大小相符的蛋白条带,EGFP-M、DsRed-B23.1 和 HA-M 分别为 67、65 和 40 kDa(图 2-A 和 2-B)。

2.4 M 蛋白与 B23.1 蛋白的共定位分析

重组质粒共转染 HEK-293T 细胞后 24 h,利用荧光显微镜观察融合蛋白在细胞中的分布特征。结果表明:在空载体转染的细胞中,EGFP 和 DsRed 均匀分布在细胞质和细胞核(图 3A-D);而 EGFP-M 主要分布在细胞核和核仁中,并且与核磷蛋白 B23.1

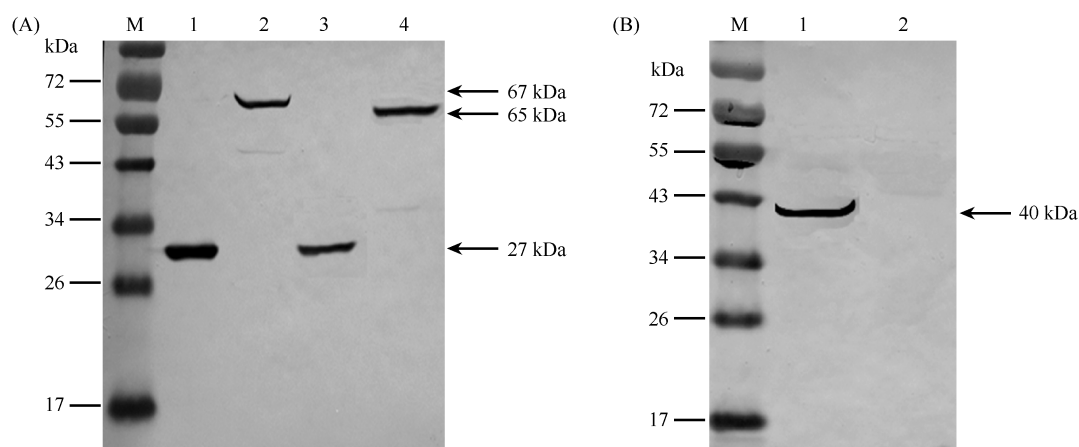


图 2. Western blot 检测融合蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达

Figure 2. Western blot analysis of the fusion genes expressed in HEK-293T cells. A; M, Protein Marker; Lane 1, EGFP protein expressed; lane 2, EGFP-M protein expressed; lane 3, DsRed protein expressed; lane 4, DsRed-B23.1 protein expressed; B; M, Protein Marker; lane 1, HA-M protein expressed; lane 2, HA protein expressed.

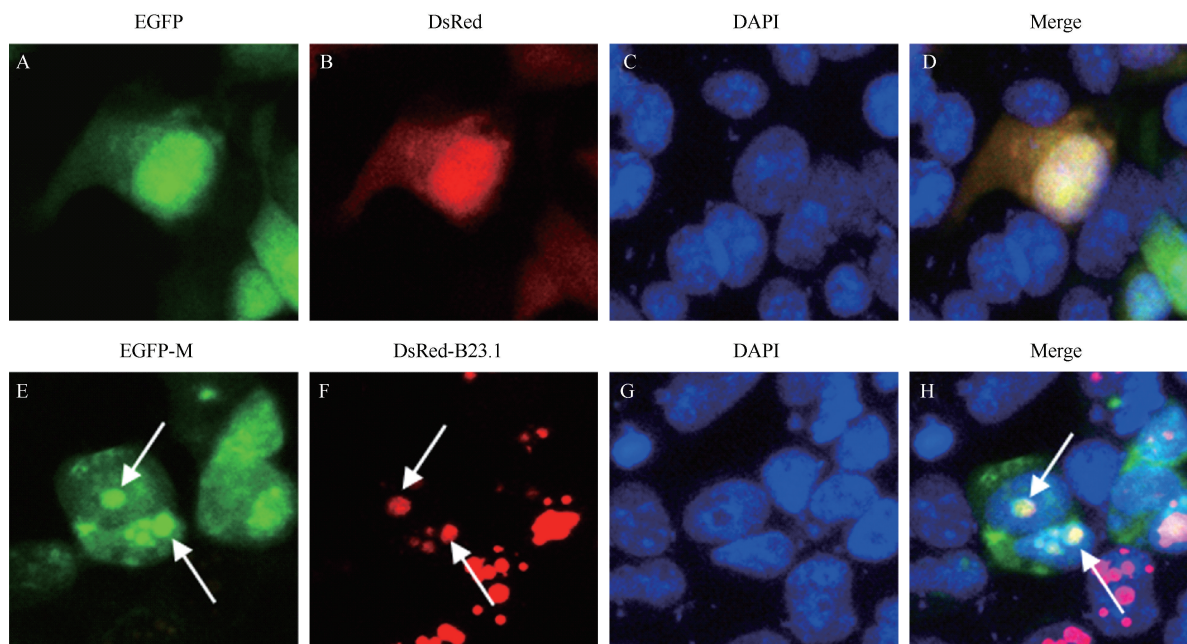


图 3. 融合蛋白荧光共定位分析

Figure 3. The co-localization analysis of fusion proteins in co-transfected HEK-293T cells by fluorescence microscopy. A; EGFP protein; B; DsRed protein; C; nuclei stained by DAPI; D; The merged image among A, B and C; E; EGFP-M protein; F; DsRed-B23.1 protein; G; nuclei stained by DAPI; H; The merged image among E, F and G. Arrows indicate the nucleolus.

在核仁发生明显的共定位(图 3E-H)。

2.5 M 蛋白与 B23.1 蛋白在细胞中的相互作用

M 蛋白与 B23.1 蛋白在核仁发生共定位,提示两者可能存在相互作用。为了进一步证实两者在真核细胞中具有相互作用,我们将重组质粒 pCMV-HA-M 和 pDsRed-B23.1 共转染 HEK-293T 细胞后,用 anti-HA 抗体和 protein A + G 进行免疫共沉淀,以

anti-GFP 抗体通过 Western blot 检测共沉淀蛋白质。反之,用 anti-GFP 抗体和 protein A + G 进行免疫共沉淀,以 anti-HA 抗体进行 Western blot 检测。结果显示,DsRed-B23.1 可与 anti-HA 抗体共沉淀,并且显示与单独转染 DsRed-B23.1 的阳性对照一致的条带,反之亦然(图 4)。表明 M 蛋白和 B23.1 蛋白在细胞中能特异地发生相互作用。

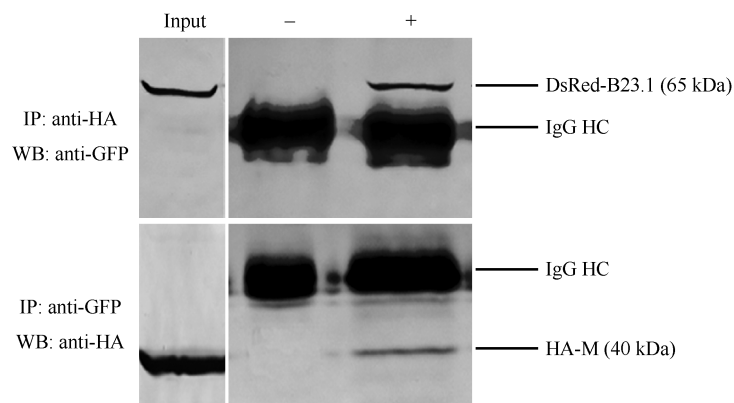


图 4. 免疫共沉淀验证 M 蛋白与 B23.1 蛋白的相互作用

Figure 4. Interaction between M and B23.1 in transfected HEK-293T cells revealed by Co-IP assays.

3 讨论

M 蛋白是 NDV 的主要结构蛋白之一,长度为 364 个氨基酸,为碱性氨基酸丰富的非糖基化膜相关蛋白,分子量约为 40 kDa^[3]。本研究中,表达的 EGFP-M 融合蛋白大小为 67 kDa,主要定位在细胞核和核仁,与表达的 DsRed-B23.1 融合蛋白在核仁发生共定位。研究表明,蛋白质在细胞核和细胞质之间转运是通过核孔复合体进行的,而核孔复合体只允许离子和小于 40–60 kDa 的蛋白通过;对于大于 60 kDa 的蛋白而言,则需要转运蛋白携带特定的靶向定位信号(如核定位信号、核仁定位信号和核输出信号),并在相关载体蛋白的辅助下实现正确的亚细胞定位^[13]。早期的研究证实,NDV M 蛋白通过核定位信号进入细胞核^[14],但介导 M 蛋白核仁定位的信号及其核仁定位机制尚不清楚。

核磷蛋白 B23.1 是细胞核仁中含量丰富的蛋白组分之一,在促进带有核仁定位信号的蛋白运输到核仁方面发挥重要作用。目前已知的病毒蛋白或细胞蛋白,如 HIV-1 的 Rev 蛋白^[12]和 Tat 蛋白^[11]、SARS-CoV N 蛋白^[15]、核仁蛋白 C23^[16]及脯氨酸核受体辅活因子^[17]等都能与 B23.1 蛋白存在核仁共定位,后续的研究证实它们是通过与 B23.1 蛋白的相互作用进入核仁。本研究发现 NDV M 蛋白与禽细胞核磷蛋白 B23.1 具有明显的核仁共定位特征,为进一步验证两种蛋白的相互作用关系,我们通过免疫共沉淀的方法证实 M 蛋白与 B23.1 蛋白能在细胞中发生相互作用,表明 B23.1 蛋白可能是 M 蛋

白进入细胞核仁的一个关键结合蛋白。

核仁是核糖体 RNA 合成和核糖体形成、装配的场所,其形态和功能的完整性对细胞维持正常形态和发挥正常功能具有重要意义^[10]。病毒属于胞内寄生,病毒与核仁的相互作用是一个普遍现象,包括 DNA 病毒、RNA 病毒和逆转录病毒,尤其是 RNA 病毒能更有效地利用宿主细胞组分进行增殖^[18]。研究证实,病毒将其蛋白定位到核仁更有利于病毒的转录和翻译,使病毒充分利用宿主细胞的蛋白和细胞的结构与功能来促进病毒的复制和释放。Dove 等在对传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)的研究中发现,感染 IBV 的细胞核仁形态学发生变化,核仁蛋白裂解呈点状分布,病毒通过破坏细胞核仁的结构和核仁蛋白的功能使宿主细胞新陈代谢下调,从而增强病毒的复制能力^[19]。同样,作为 RNA 病毒的 NDV,其 M 蛋白在病毒感染早期就快速定位在细胞核仁,通过影响核糖体的合成和功能、抑制宿主蛋白质的合成来促进病毒更好地复制^[5]。

我们的研究表明 NDV M 蛋白与细胞核磷蛋白 B23.1 具有核仁共定位且存在相互作用,由此推测 M 蛋白的核仁定位可能是通过 B23.1 蛋白的分子伴侣活性来结合 M 蛋白,引导其暴露出功能性的核仁定位信号,促进 M 蛋白进入核仁完成对细胞蛋白表达的抑制。本研究将为进一步鉴定 NDV M 蛋白核仁定位信号,阐明 M 蛋白的细胞核仁定位机制及探讨二者互作在 NDV 致病过程中的作用提供了线索。

参考文献

- [1] Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique*, 2000, 19(2):443-462.
- [2] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002, 147(8):1655-1663.
- [3] Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus. macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 2001, 30(5):439-455.
- [4] Seal BS, King DJ, Meinersmann RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Research*, 2000, 66(1):1-11.
- [5] Peeples ME, Wang C, Gupta KC, Coleman N. Nuclear entry and nucleolar localization of the Newcastle disease virus (NDV) matrix protein occur early in infection and do not require other NDV proteins. *Journal of Virology*, 1992, 66(5):3263-3269.
- [6] Pantua HD, McGinnes LW, Peeples ME, Morrison TG. Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of Virology*, 2006, 80(22):11062-11073.
- [7] Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(9):1416-1429.
- [8] Wang L, Chen F, Zheng S, Suo X. Inducing effect of Newcastle disease virus (NDV) matrix (M) protein on the production of inflammatory factors *in vitro*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(4):14-15. (in Chinese)
王蕾,陈福勇,郑世军,索勋.新城疫病毒(NDV)基质(M)蛋白在体外对炎症因子诱导的作用.中国兽医杂志,2008,44(4):14-15.
- [9] Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 125(1-2):127-137.
- [10] Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, 2005, 433(7021):77-83.
- [11] Li YP. Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *Journal of Virology*, 1997, 71(5):4098-4102.
- [12] Fankhauser C, Izaurralde E, Adachi Y, Wingfield P, Laemmli UK. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(5):2567-2575.
- [13] Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(13):1439-1457.
- [14] Coleman NA, Peeples ME. The matrix protein of Newcastle disease virus localizes to the nucleus via a bipartite nuclear localization signal. *Virology*, 1993, 195(2):596-607.
- [15] 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(10):5233-5250.
- [16] Li YP, Busch RK, Valdez BC, Busch H. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 237(1):153-158.
- [17] Wang Y, Chen B, Li Y, Zhou D, Chen S. PNRC accumulates in the nucleolus by interaction with B23/nucleophosmin via its nucleolar localization sequence. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(1):109-119.
- [18] Ahlquist P. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(5):371-382.
- [19] 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. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(7):1147-1157.

Matrix protein of Newcastle disease virus interacts with avian nucleophosmin B23.1 in HEK-293T cells

Zhiqiang Duan, Jian Chen, Liang He, Haixu Xu, Qunhui Li, Shunlin Hu, Xiufan Liu*

Ministry of Education Key Lab for Avian Preventive Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: [**Objective**] To identify the interaction between Newcastle disease virus (NDV) matrix (M) protein and avian nucleophosmin B23.1 in HEK-293T cells. [**Methods**] Specific primers used to amplify M gene and B23.1 gene were designed and synthesized according to JS/5/05/Go whole gene sequence (JN631747) and avian nucleophosmin B23.1 gene sequence (NM_205267). Viral RNA and cellular RNA were extracted from allantoic fluid of NDV JS/5/05/Go strain and DF1 cells with TRIzol reagent, respectively. The M gene and B23.1 gene were amplified by RT-PCR and then subcloned into eukaryotic expression vectors to generate the recombinant plasmids pEGFP-M, pCMV-HA-M and pDsRed-B23.1. To investigate the localization features of M protein and B23.1 protein, we transfected the plasmids pEGFP-M and pDsRed-B23.1 simultaneously into HEK-293T cells and observed the results by fluorescence microscopy. We further confirmed the interaction between the two proteins by co-immunoprecipitation (Co-IP) assays. [**Results**] The fusion proteins were successfully expressed in transfected HEK-293T cells by Western blot analysis. The NDV M protein and avian nucleophosmin B23.1 showed co-localization features in the nucleolus in co-transfected HEK-293T cells. Furthermore, the binding of M with B23.1 was demonstrated by Co-IP assays. [**Conclusion**] These results suggested that NDV M protein interacted with avian nucleophosmin B23.1 and the nucleolar localization of M might be regulated via interaction with B23.1.

Keywords: Newcastle disease virus, matrix protein, nucleophosmin B23.1, protein-protein interaction

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0978), by the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (nycytx-41-G07), by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions and by the Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303033)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 25 December 2012/Revised: 28 February 2013