



## KPNB1 和 Ran 蛋白共同介导新城疫病毒基质蛋白的入核转运

段志强<sup>1\*</sup>, 嵇辛勤<sup>1</sup>, 许厚强<sup>1</sup>, 赵佳福<sup>1</sup>, 许海旭<sup>2</sup>, 胡顺林<sup>2,3</sup>, 刘秀梵<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

<sup>2</sup> 扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏 扬州 225009

<sup>3</sup> 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

**摘要:**【目的】鉴定与新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)基质蛋白(matrix protein, M)入核相关的细胞蛋白, 以阐明 NDV M 蛋白细胞核定位的分子机制。【方法】从鸡胚成纤维细胞中分别克隆核转运受体蛋白 KPNA1-KPNA6 和 KPNB1 基因, 将其构建到真核表达载体, 并与表达 NDV M 蛋白的重组真核表达载体分别共转染 HEK-293T 细胞, 通过免疫共沉淀方法鉴定与 NDV M 蛋白相互作用的核转运受体蛋白。另外, 将 M 蛋白与 Ran 蛋白突变体或与 M 蛋白互作的核转运受体蛋白缺失体分别共表达, 通过荧光共定位确定 M 蛋白入核转运相关的细胞蛋白。【结果】构建的重组真核表达载体在 HEK-293T 细胞中能够正确表达; 通过间接免疫荧光观察发现, 重组蛋白中除 Myc-KPNA2 蛋白定位在细胞质外, 其它核转运受体蛋白均与 M 蛋白表现出相同的细胞核定位。免疫共沉淀试验结果表明, M 蛋白与 KPNA1 蛋白和 KPNB1 蛋白均存在相互作用。进一步通过荧光共定位观察发现, M 蛋白与 KPNA1 蛋白缺失体(DN-KPNA1)共表达不改变 M 蛋白的细胞核定位, 而与 KPNB1 蛋白缺失体(DN-KPNB1)共表达后导致 M 蛋白变为细胞质定位, 说明 M 蛋白入核转运需要 KPNB1 蛋白的参与。另外, 将 M 蛋白与 Ran 蛋白突变体 Ran-Q69L 共表达, 荧光观察发现 M 蛋白同样由细胞核定位变为细胞质定位, 说明 M 蛋白入核转运还需要 Ran 蛋白的辅助。【结论】KPNB1 和 Ran 蛋白共同介导 NDV M 蛋白的入核转运, 其过程是 KPNB1 蛋白首先和 M 蛋白发生相互作用并形成复合物, 然后通过 Ran 蛋白的辅助作用完成入核转运。

**关键词:** 新城疫病毒, 基质蛋白, 转运受体蛋白, 细胞核定位

新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)是一种有囊膜、含有单股负链不分节段基因组的 RNA 病毒, 其基因组结构为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 至少编码 6 种病毒蛋白<sup>[1-3]</sup>。其中基质蛋白(matrix protein, M)是 NDV 编码的一种非糖基化膜相关蛋白, 主要位于病毒囊膜内表面, 构成病毒内膜与

基金项目: 国家自然科学基金(31502074); 教育部“促进与美大地区科研合作与高层次人才培养项目”(教外司美[2014]2029 号); 公益性行业(农业)科研专项(201303033); 贵州大学引进人才科研项目(贵大人基合字(2014)10 号)

\*通信作者。段志强, Tel: +86-851-88298005, E-mail: zqduan@gzu.edu.cn; 刘秀梵, Tel: +86-514-87991416, E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

收稿日期: 2016-05-19; 修回日期: 2016-07-30; 网络出版日期: 2016-08-17

核衣壳蛋白连接的支架<sup>[4]</sup>。同其它副黏病毒 M 蛋白一样,NDV M 蛋白在病毒感染早期可通过自身携带的核定位信号(nuclear localization signal ,NLS)进入细胞核<sup>[5-7]</sup>。大量的研究证实,病毒蛋白完成入核转运除需要自身携带的 NLS,还需要依赖于宿主细胞内核转运受体蛋白和 Ran 蛋白的参与<sup>[8-10]</sup>。但是到目前为止,何种核转运受体蛋白识别和结合 NDV M 蛋白 NLS,并且 M 蛋白是否依赖 Ran 蛋白的辅助作用来完成入核转运过程尚不清楚。因此,鉴定 NDV M 蛋白入核转运相关的细胞蛋白对阐明 M 蛋白细胞核定位的分子机制具有重要意义。

核转运受体蛋白是一类与核孔选择性运输有关的蛋白分子,包括 karyopherin alpha (KPNA)和 karyopherin beta (KPNB) 2 个家族成员,它们可以单独或联合识别蛋白质中包含的 NLS,协助此类蛋白质分子进入细胞核<sup>[11-12]</sup>。Ran 蛋白是一种 G 蛋白,与单分子鸟嘌呤核苷酸形成结合体(Ran-GTP)调节被转运物复合体的组装和解体,在细胞核中释放出携带 NLS 的靶蛋白<sup>[12]</sup>。在病毒蛋白入核转运机制研究方面,Pryor 等<sup>[13]</sup>研究发现登革热病毒非结构蛋白 5(non-structural protein 5 ,NS5)通过核转运受体蛋白 KPNA2 识别 NS5 蛋白 NLS,再与 KPNB1 形成 KPNA2-NS5/NLS-KPNB1 复合物进入细胞核,此过程需要 KPNA2 和 KPNB1 的共同作用。Cai 等<sup>[14]</sup>证实水痘-带状疱疹病毒 ORF9 蛋白仅需要 KPNB1 识别其 NLS,并且此入核过程还需要 Ran 蛋白的参与。最近 Pumroy 等<sup>[15]</sup>在研究 A 型流感病毒 PB2 蛋白入核转运机制中发现,PB2 蛋白进入细胞核仅需要 KPNA4 和 KPNA6 的协同作用。目前,在副黏病毒 M 蛋白细胞核定位的分子机制研究方面,Ghildyal 等<sup>[16]</sup>首次证实核转运受体蛋白 KPNB1 可直接识别人呼吸道合胞体病

毒(human respiratory syncytial virus ,HRSV) M 蛋白的 NLS 而不需要 KPNA2 的参与,并且 Ran 蛋白在 HRSV M 蛋白入核过程中发挥了重要作用。由于 NDV 和 HRSV M 蛋白分子量均小于 40 kDa,两者 M 蛋白具有相似的 NLS 和核定位功能,这提示 NDV M 蛋白入核转运也可能依赖核转运受体蛋白和 Ran 蛋白的参与。因此,本研究从鸡胚成纤维细胞中克隆 KPNA1-KPNA6 基因和 KPNB1 基因,利用免疫共沉淀方法鉴定与 NDV M 蛋白相互作用的核转运受体蛋白,再通过荧光共定位分析来确定介导 M 蛋白入核转运相关的细胞蛋白,这为进一步开展 NDV M 蛋白细胞核定位的功能研究奠定了重要基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、毒株和菌株

鸡胚成纤维细胞(DF-1)购自中国科学院细胞库;HEK-293T 细胞、表达绿色荧光蛋白重组新城疫病毒 rZJ1GFP、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

真核表达载体 pCMV-HA、pCMV-Myc、pEGFP-C1、pDsRed-C1 购自 Clontech 公司;TRIzol Reagent、cDNA 第一链合成试剂盒、pfu *Taq* DNA 高保真聚合酶、DNA Marker、限制性内切酶、Lipofectamine<sup>®</sup> 2000、Opti-MEM<sup>®</sup>培养基、胎牛血清购自 Thermo Fisher 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 AxyGen 公司;anti-HA 兔多克隆抗体、anti-Myc 小鼠单克隆抗体、Protein A+G Agarose、FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、HRP 标记山羊抗小鼠

IgG(H+L)、DAB 显色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 中公布的鸡 KPNA1 (Importin  $\alpha$ 5)(序列号 NM\_001030774)、KPNA2 (Importin  $\alpha$ 1)(序列号 NM\_001006209)、KPNA3 (Importin  $\alpha$ 4)(序列号 XM\_015275679)、KPNA4 (Importin  $\alpha$ 3)(序列号 NM\_001007963)、KPNA5 (Importin

$\alpha$ 6)(序列号 NM\_015284586)、KPNA6 (Importin  $\alpha$ 7)(序列号 NM\_001012841)、KPNB1 (Importin  $\beta$ 1)(序列号 XM\_015299473)、Ran (序列号 NM\_205258)基因序列以及 NDV 毒株 ZJ1 (序列号 AF431744)基因序列,设计合成扩增目的基因 ORF 的特异性引物,引物两端带有酶切位点用于定向插入到相应的重组真核表达载体(表 1)。引物由上海生物工程有限公司合成。

表 1. 构建重组真核表达载体所用引物

Table 1. Primers used for the construction of recombinant expression plasmids

Recombinant plasmids	Primer name	Primer sequence (5'→3') <sup>a</sup>	Restriction sites	Size/bp	$T_m/^\circ\text{C}$
pCMV-HA-M	HA-M-F	<u>TTGAATTC</u> GGATGGACTCATCC	<i>EcoR</i> I	1115	57
	HA-M-R	GCA <u>CTCGAG</u> TTATTTCTGAAAG	<i>Xho</i> I		
pCMV-Myc-KPNA1	Myc-KPNA1-F	<u>ACGTCGAC</u> CATGACGACCTCAGG	<i>Sal</i> I	1634	60
	Myc-KPNA1-R	GAGG <u>TACCT</u> CAGAGCTGAAAGCCTTC	<i>Kpn</i> I		
pCMV-Myc-KPNA2	Myc-KPNA2-F	GCT <u>GTCGAC</u> CATGTCTACTAATGAG	<i>EcoR</i> I	1611	60
	Myc-KPNA2-R	AAGAT <u>CTGCAG</u> TGCCTAGAAGTTG	<i>Xho</i> I		
pCMV-Myc-KPNA3	Myc-KPNA3-F	<u>ACGGAATTC</u> CCATGGCCGAGAACGCC	<i>EcoR</i> I	1605	60
	Myc-KPNA3-R	GACGCGCTG <u>CTCGAG</u> TTTGAACCTAAAAAT	<i>Xho</i> I		
pCMV-Myc-KPNA4	Myc-KPNA4-F	<u>ACGAATTC</u> CCATGGCCGACAAC	<i>EcoR</i> I	1588	60
	Myc-KPNA4-R	CGCA <u>ACTCGAG</u> TCTAAAACCTGGAACC	<i>Xho</i> I		
pCMV-Myc-KPNA5	Myc-KPNA5-F	GGCAG <u>AATTC</u> CGATGGACATCATGTC	<i>EcoR</i> I	1642	60
	Myc-KPNA5-R	CTT <u>CTCGAG</u> TTCACAACCTGAAACCCC	<i>Xho</i> I		
pCMV-Myc-KPNA6	Myc-KPNA6-F	<u>CGGTCGAC</u> GATGGACAGCATGGCGA	<i>Sal</i> I	1632	60
	Myc-KPNA6-R	GCCTGGG <u>GATCCT</u> TATAGCTGGAAGCC	<i>Kpn</i> I		
pCMV-Myc-KPNB1	Myc-KPNB1-F	<u>AGGTCGAC</u> CATGAACCAATGGCCTGAGC	<i>Sal</i> I	2289	60
	Myc-KPNB1-R	CCC <u>GATGGTACC</u> AGATCAAGCTTGATTCTTCAG	<i>Kpn</i> I		
pEGFP-M	GFP-M-F	<u>TCGGAATTC</u> AATGGACTCATCCAG	<i>EcoR</i> I	1115	57
	GFP-M-R	GCA <u>GTCGACT</u> TTATTTCTGAAAGG	<i>Sal</i> I		
pDsRed-DN-KPNA1	Red-KPNA1-F	<u>TACTCGAG</u> GTCCAGAACAGCAGCTTTCAG	<i>Xho</i> I	1350	60
	Red-KPNA1-R	GAGG <u>ATCCT</u> CAGAGCTGAAAGCCTTC	<i>Bam</i> H I		
pDsRed-DN-KPNB1	Red-KPNB1-F	<u>AGCTCGAG</u> CTATGAACCAATGGCCTGAGC	<i>Xho</i> I	2032	60
	Red-KPNB1-a	GCAGGACGTTCTGGAGAGTAGCACAGAGGAG			
	Red-KPNB1-b	CTGTGCTACTCTCCAGAACGTCCTGCGGAAG			
	Red-KPNB1-R	CCC <u>GATGGATCC</u> AGATCAAGCTTGATTCTTCAG	<i>Bam</i> H I		
pDsRed-Ran-Q69L	Ran-Q69L-F	AAA <u>CTCGAG</u> GCATGGCCGCCAAGGAG	<i>Xho</i> I	677	60
	Ran-Q69L-a	ACCAAACCTCTCCAGGCCAGCTGTGTCCCATAC			
	Ran-Q69L-b	GTATGGGACACAGCTGGCCTGGAGAAGTTTGGT			
	Ran-Q69L-R	CTCCAGCTT <u>GATCCT</u> CACAGGTCATCATC	<i>Bam</i> H I		

<sup>a</sup>: restriction sites are given in italics and underlines.

#### 1.4 目的基因的 RT-PCR 扩增

按照 TRIzol 试剂说明书分别从 NDV 毒株 rZJ1GFP 鸡胚尿囊液和 DF-1 细胞中提取总 RNA, 加入 14.5  $\mu\text{L}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$  和 2  $\mu\text{L}$  6 nt 随机引物, 混匀后于 70  $^\circ\text{C}$  孵育 10 min, 迅速冰浴 2 min; 接着加入 5  $\mu\text{L}$  5 $\times$ RT 缓冲液, 2  $\mu\text{L}$  dNTPs Mixture (2.5 mmol/L), 0.5  $\mu\text{L}$  核糖核酸酶抑制剂 (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  M-MLV 反转录酶 (200 U/ $\mu\text{L}$ ); 混匀后于 42  $^\circ\text{C}$  作用 1 h, 70  $^\circ\text{C}$  作用 10 min。反转录完成后将产物置于 -20  $^\circ\text{C}$  保存备用。

以反转录的 cDNA 为模板, 用合成的目的基因特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 体系为: 3  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 1  $\mu\text{L}$  dNTPs Mixture (2.5 mmol/L), 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR 缓冲液, 1  $\mu\text{L}$  上游引物 F (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  下游引物 R (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  Pfu *Taq* 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 加灭菌 dd $\text{H}_2\text{O}$  至 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 94  $^\circ\text{C}$  5 min; 94  $^\circ\text{C}$  40 s, 60(或 57)  $^\circ\text{C}$  50 s, 72  $^\circ\text{C}$  1 min, 25 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 观察结果并对目的基因片段切胶回收。

#### 1.5 重组真核表达载体的构建

将上述所获目的基因片段与真核表达载体 pCMV-HA、pCMV-Myc、pEGFP-C1 和 pDsRed-C1 分别双酶切, 胶回收后进行连接并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单菌落培养后提取重组质粒, 将酶切鉴定正确的质粒送上海 Invitrogen 公司测序。重组真核表达载体 pDsRed-DN-KPNA1、pDsRed-DN-KPNB1 和 pDsRed-Ran-Q69L 的构建是通过引物在目的基因中引入氨基酸缺失或突变, 其中 DN-KPNA1 是在 KPNA1 蛋白中缺失第 1-95 位氨基酸, 因此不能结合 KPNB1 蛋白; DN-KPNB1 是在 KPNB1 蛋白中缺失第 334-419

位氨基酸, 因此不能结合 Ran 蛋白; Ran-Q69L 是将 Ran 蛋白中的第 69 位 Q 突变为 L, 因此不能水解 GTP。

#### 1.6 细胞培养及转染

HEK-293T 细胞培养用含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37  $^\circ\text{C}$ 、含 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养。在转染前, 将细胞以  $2 \times 10^6$  cells/well 的密度铺于 6 孔板内, 待细胞完全贴壁生长至 80%-90% 时, 用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 将构建的重组真核表达质粒分别或共同转染 HEK-293T 细胞。同时设空载体转染的细胞作为对照。转染 8 h 后, 将培养基换成含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 36-48 h, 收集转染后的细胞用于后续重组蛋白的 Western blot 和免疫荧光实验。

#### 1.7 重组蛋白的 Western blotting 检测

转染后 48 h 分别收集重组质粒转染的 HEK-293T 细胞, 用细胞裂解液将细胞裂解后, 离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 随后将蛋白转印至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂乳将 PVDF 膜于 4  $^\circ\text{C}$  封闭过夜后, 加入 1:1000 稀释的一抗于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 2 h; TBST 洗 3 次后, 加入 1:2000 稀释的 HRP 标记的二抗于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h; TBST 洗 3 次后, 用 DAB 显色试剂盒进行显色, 检测重组蛋白的表达情况。

#### 1.8 重组蛋白的间接免疫荧光检测

重组质粒转染 HEK-293T 细胞后 36 h, PBS 洗涤细胞 3 次, 用预冷的 4% 多聚甲醛室温固定 20 min; 弃掉液体, 加入 0.25% Triton X-100 透化处理细胞 5 min; PBS 洗 3 次, 加入含 10% 小牛血清的 PBS 室温封闭 1 h; 加入 1:200 稀释的一抗于 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h; PBS 洗 3 次, 加入荧光素标记的二抗于 37  $^\circ\text{C}$  作用 1 h; 最后用 DAPI 进行细胞

核染色。PBS 洗 3 次后,于倒置荧光显微镜下观察重组蛋白的亚细胞定位。

### 1.9 免疫共沉淀试验

将 pCMV-HA-M 和 pCMV-Myc-KPNA1-pCMV-Myc-KPNA6、pCMV-Myc-KPNB1 等重组质粒分别共转染 HEK-293T 细胞,培养 48 h 后收获细胞;PBS 洗涤细胞 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 °C 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 裂解液洗涤 protein A+G Agarose,重复 3 次后加入 20 μL SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min,对蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,用 anti-Myc 抗体进行蛋白质免疫印迹分析,检测蛋白之间是否存在相互作用。反之,以 anti-Myc 抗体进行免疫共沉淀,用 anti-HA 抗体进行 Western blot 检测。

### 1.10 荧光共定位试验

将重组质粒 pEGFP-M 与 pDsRed-C1、pDsRed-DN-KPNA1、pDsRed-DN-KPNB1 和 pDsRed-Ran-Q69L 分别共转染 HEK-293T 细胞,

培养 36 h 后,用预冷的 4%多聚甲醛室温固定 20 min;PBS 洗 3 次,用 0.25% Triton X-100 透化处理细胞 5 min;PBS 洗 3 次,加入 DAPI 染细胞核 10 min;PBS 洗 3 次,自然干燥后,在倒置荧光显微镜下观察重组蛋白的荧光共定位。

## 2 结果和分析

### 2.1 目的基因的 RT-PCR 扩增

以提取的 NDV 和 DF-1 细胞总 RNA 反转录后的 cDNA 为模板,用设计合成的特异性引物分别进行 PCR 扩增,均得到与预期大小相符的目的基因条带(图 1)。

### 2.2 重组真核表达载体的酶切鉴定

重组真核表达载体经过相应酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果显示:pCMV-HA-M、pCMV-Myc-KPNA1-pCMV-Myc-KPNA6、pCMV-Myc-KPNB1 经双酶切后均获得约 3800 bp 的载体条带和与目的基因大小相符的条带(图 2-A);pDsRed-DN-KPNB1、pDsRed-DN-KPNA1、pDsRed-Ran-Q69L、pEGFP-M 经双酶切后同样获得 4700 bp 的载体条带和与目的基因大小相符的条带(图 2-B),表明目

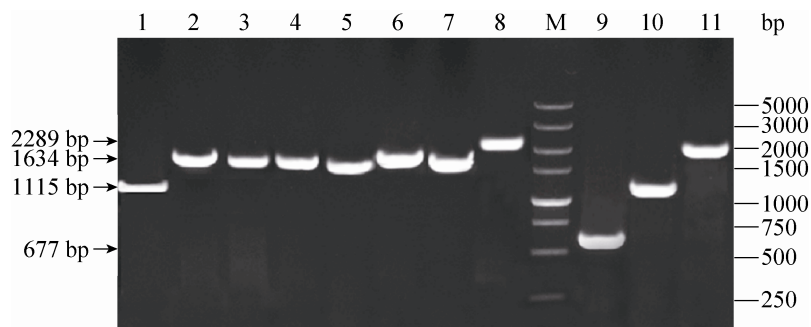


图 1. 目的基因的 PCR 产物电泳检测

Figure 1. Electrophoresis detection of PCR products of the target genes. M: DL5000 DNA marker; lane 1-11: PCR-amplified M, KPNA1, KPNA2, KPNA3, KPNA4, KPNA5, KPNA6, KPNB1, Ran-Q69L, DN-KPNA1 and DN-KPNB1 genes, respectively.

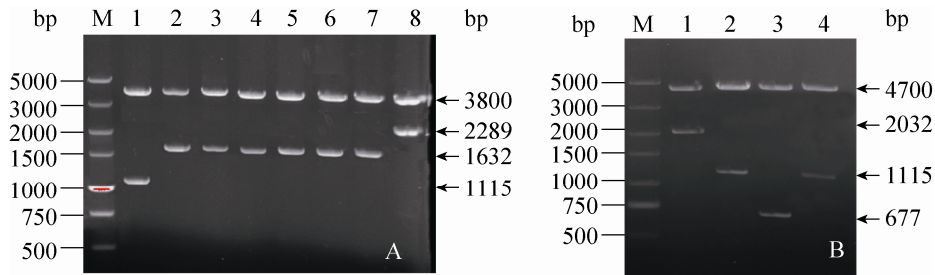


图 2. 重组表达载体的酶切鉴定

Figure 2. Identification of the recombinant plasmids by double restriction endonuclease digestion. A: M, DL5000 DNA marker; lane 1–8, enzyme-digested products of pCMV-HA-M, pCMV-Myc-KPNA1~pCMV-Myc-KPNA6, and pCMV-Myc-KPNB1, respectively; B: M, DL5000 DNA marker; lane 1–4, enzyme-digested products of pDsRed-DN-KPNB1, pDsRed-DN-KPNA1, pDsRed-Ran-Q69L and pEGFP-M, respectively.

的基因正确插入到真核表达载体中。进一步测序结果证实，插入的目的基因均未发生基因突变和开放阅读框的移码。

### 2.3 重组蛋白的表达与亚细胞定位分析

重组真核表达载体分别转染 HEK-293T 细胞后 48 h, 收获细胞裂解液上清进行 Western blotting 检测。结果显示：重组蛋白 HA-M, Myc-KPNA1~Myc-KPNA6, Myc-KPNB1 表达后均获得与预期大小相符的蛋白条带，大小分别在 40、60、59、58、58、60、57 和 85 kDa 左右(图 3-A)。对重组真核表达载体转染后 36 h 的 HEK-293T 细胞进行固定，并通过间接免疫荧光染色观察重组蛋白的亚细胞定位。荧光观察结果表明：重组蛋白 HA-M 主要定位在细胞核和核仁，这与前期的报道结果一致<sup>[6,17]</sup>(图 3-B, a)；而重组核转运受体蛋白中除 Myc-KPNA2 主要定位在细胞质外(图 3-B, c)，其它 6 个重组核转运受体蛋白均定位在细胞核(图 3-B, b 和 d-h)。

### 2.4 免疫共沉淀鉴定与 M 蛋白相互作用的转运受体蛋白

我们将重组真核表达载体 pCMV-HA-M 和 pMVCV-Myc-KPNA1~pCMV-Myc-KPNA6、pCMV-

Myc-KPNB1 分别共转染 HEK-293T 细胞后 48 h，通过免疫共沉淀方法鉴定与 NDV M 蛋白入核相关的核转运受体蛋白。检测结果显示：用 anti-HA 抗体和 protein A+G Agarose 免疫共沉淀后，以 anti-Myc 抗体通过 Western blot 可以检测到重组蛋白 Myc-KPNA1 和 Myc-KPNB1 的目的条带(图 4-A)；反之，用 anti-Myc 抗体和 protein A+G Agarose 免疫共沉淀后，通过 anti-HA 抗体分别在 HA-M+Myc-KPNA1 和 HA-M+Myc-KPNB1 组均可检测到 HA-M 的目的条带(图 4-B)。试验结果表明 M 蛋白与核转运受体蛋白 KPNA1 和 KPNB1 均存在相互作用。

### 2.5 M 蛋白入核转运受体蛋白的确定

早期的研究结果已证实，核转运受体蛋白 KPNA1 和 KPNB1 两者之间存在相互作用，因此，本试验的免疫共沉淀方法不能确定 M 蛋白与 KPNA1 和 KPNB1 中的哪个蛋白存在直接相互作用。为了进一步确定与 M 蛋白入核相关的核转运受体蛋白，我们将 pEGFP-M 与 pDsRed-C1、pDsRed-DN-KPNA1 和 pDsRed-DN-KPNB1 分别共转染 HEK-293T 细胞，Western blot 检测结果显示重组蛋白在 HEK-293T 细胞中均可正常表达(图 5-A, lane 1–3)。荧光共定位观察结果显示：

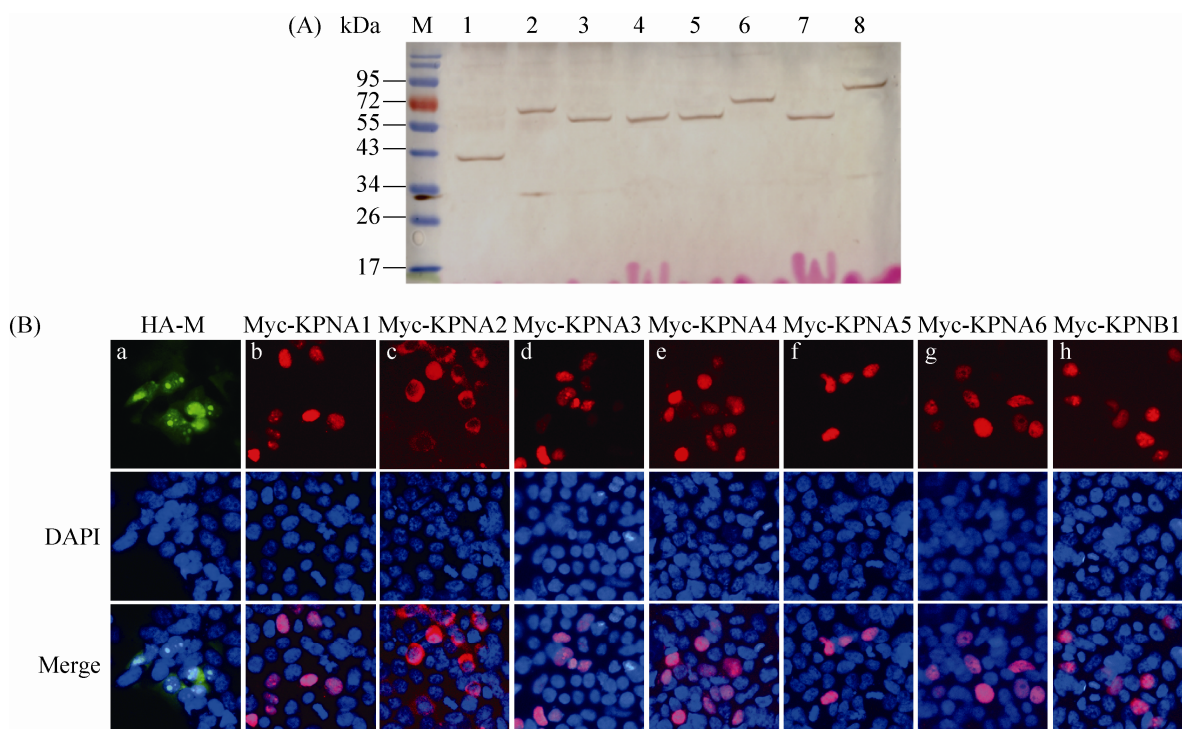


图 3. 重组蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达与亚细胞定位分析

Figure 3. Expression and subcellular localization analysis of the recombinant proteins in HEK-293T cells. A: M, prestained protein marker; lane 1–8, recombinant proteins of HA-M, Myc-KPNA1–Myc-KPNA6 and Myc-KPNB1 expressed in HEK-293T cells, respectively; B: lane a–h, subcellular localization of recombinant proteins of HA-M, Myc-KPNA1–Myc-KPNA6 and Myc-KPNB1 in HEK-293T cells, respectively. DAPI was used to stain nuclei. The representative images are shown in the graph (200×).

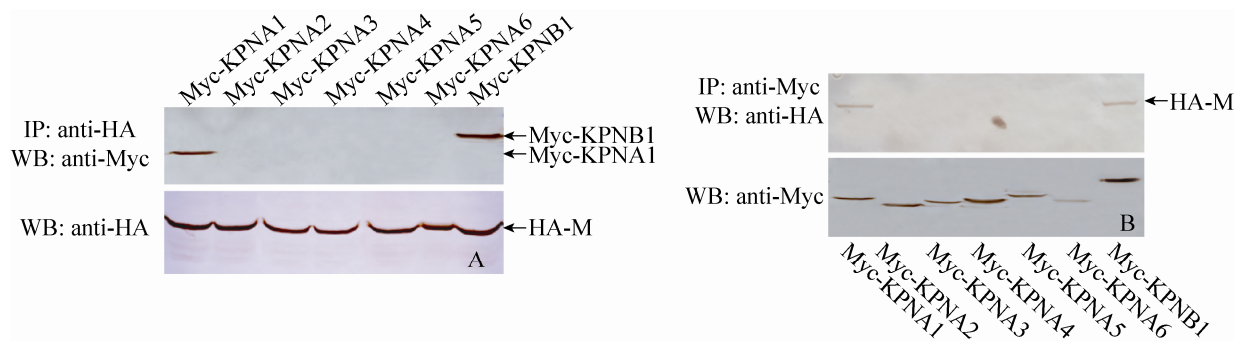


图 4. 免疫共沉淀鉴定 M 蛋白与核转运受体蛋白的相互作用

Figure 4. Interaction between M and nuclear transport proteins by co-immunoprecipitation assay. HEK-293T cells were collectively transfected with plasmids and were then lysed at 48 hours post-transfection. A co-immunoprecipitation assay was performed using either anti-HA (A) or anti-Myc (B) antibodies. Immunoprecipitated proteins were detected by Western blotting using anti-Myc (A) or anti-HA (B) antibodies. The input samples were shown in down panel.

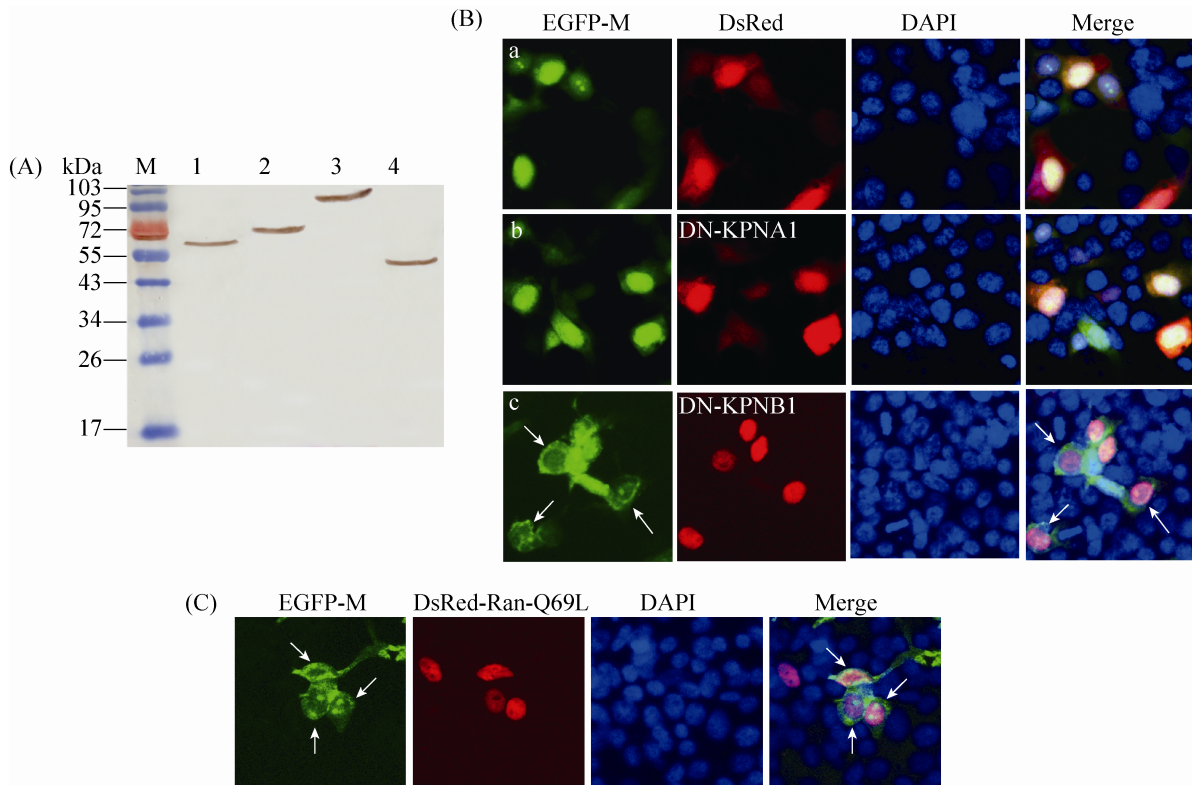


图 5. 重组蛋白的荧光共定位分析

Figure 5. Fluorescent co-localization analysis of the recombinant proteins. A: M, prestained protein marker; lane 1–4, recombinant proteins of EGFP-M, DsRed-DN-KPNA1, DsRed-DN-KPNB1 and DsRed-Ran-Q69L expressed in HEK-293T cells, respectively; B: fluorescent co-localization of EGFP-M and DsRed (a), EGFP-M and DsRed-DN-KPNA1 (b), EGFP-M and DsRed-DN-KPNB1 (c) in HEK-293T cells; C: Fluorescent co-localization of EGFP-M and DsRed-Ran-Q69L in HEK-293T cells. The representative images are shown in the graph (200 $\times$ ).

作为对照组, EGFP-M 与 DsRed 共表达后, 不改变 EGFP-M 的细胞核定位(图 5-B, a); EGFP-M 与 DsRed-DN-KPNA1 共表达后, EGFP-M 仍表现为细胞核定位(图 5-B, b), 说明 M 蛋白的入核不需要 KPNA1 蛋白的参与; 而 EGFP-M 与 DsRed-DN-KPNB1 共表达后, EGFP-M 则由原来的细胞核定位变为细胞质定位(图 5-B, c), 说明 M 蛋白的入核需要 KPNB1 蛋白的参与。有研究表明, KPNB1 蛋白与靶蛋白形成复合物后进入细胞核, 两者完成解离还需要 Ran 蛋白水解 GTP 完成<sup>[12]</sup>。由于 DN-KPNB1 不能结合 Ran 蛋白, 因此, 图 5-B 的结果暗示 M 蛋白入核可能还需要 Ran 蛋白的辅助。

为了证实这一推测, 我们构建了鸡 Ran 蛋白

突变体融合蛋白的重组质粒 pDsRed-Ran-Q69L, 转染后可在 HEK-293T 细胞中正确表达(图 5-A, lane 4)。由于 Ran-Q69L 突变体蛋白第 69 位氨基酸 Q 突变为 L, 不能水解 GTP, 因此不能使靶蛋白从 KPNB1 蛋白与靶蛋白所形成的复合物中解离。通过荧光共定位观察发现, EGFP-M 与 DsRed-Ran-Q69L 共表达后, EGFP-M 蛋白同样由细胞核定位变为细胞质定位(图 5-C), 进而证实 M 蛋白的入核过程还需要 Ran 蛋白的辅助。以上试验结果表明, KPNB1 蛋白是 NDV M 蛋白入核转运受体蛋白, M 蛋白与 KPNB1 蛋白发生相互作用并形成复合物, 然后通过 Ran 蛋白水解 GTP 使之解离来完成入核转运过程(图 6)。



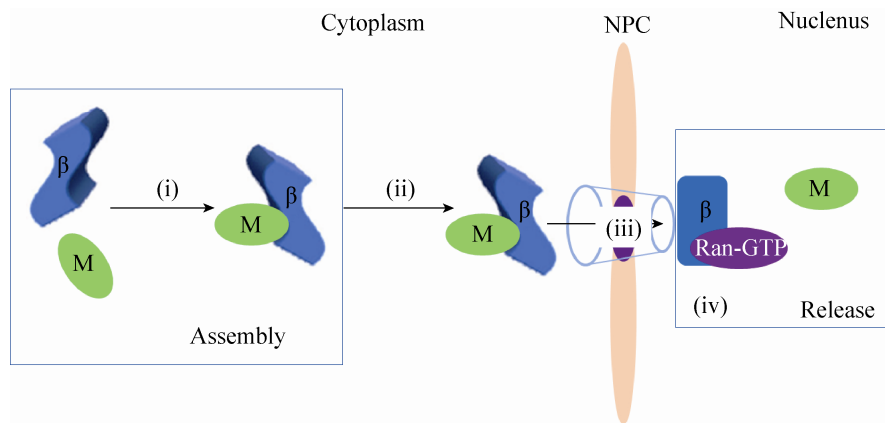


图 6. NDV M 蛋白的入核转运过程

Figure 6. The nuclear import process of NDV M protein. (i) KPNB1 forms a binary complex with NDV M protein in the cytoplasm. (ii) The binary complex docks at the nuclear-pore complex (NPC) and (iii) translocates into the nucleus. (iv) Binding of Ran-GTP triggers the dissociation of the binary complex in the nucleus.

### 3 讨论

副黏病毒 M 蛋白是一种细胞核-细胞质穿梭蛋白, 并且在病毒的整个生活周期中发挥了重要作用<sup>[18-19]</sup>: 在病毒感染早期, M 蛋白大量聚集在细胞核, 其作用是抑制宿主细胞 mRNA 的转录和蛋白质的合成; 而在病毒感染后期, M 蛋白则进入细胞质, 通过与细胞膜、病毒 RNP 和囊膜糖蛋白相互作用促进子代病毒粒子的装配和释放。已有的研究结果证实, 副黏病毒 M 蛋白完成核质穿梭过程主要依赖于自身携带的核定位信号(NLS)和核输出信号(NES)<sup>[19-20]</sup>。目前对 HRSV M 蛋白核质穿梭的分子机制阐述的较为清楚, 即 HRSV M 蛋白由核转运受体蛋白 KPNB1 识别其 NLS 序列, 并在 Ran 蛋白的协助下进入细胞核<sup>[16]</sup>; 而在出核转运过程中, 则主要依赖 CRM-1 识别其 NES 序列介导 M 蛋白的核输出<sup>[21]</sup>。最近的研究结果证实 NDV M 蛋白存在 3 个 NES, 并且通过 CRM-1 非依赖的方式完成出核转运<sup>[22]</sup>。但是到目前为止, 国内外对 NDV M 蛋白的入核转运机制仍不清楚。

近年来, 研究发现病毒蛋白的入核通常需要

核转运受体蛋白 KPNA 和 KPNB 联合或单独识别和结合靶蛋白 NLS, 并且依赖 Ran 蛋白的入核转运方式进行<sup>[23-24]</sup>。目前鉴定与病毒蛋白入核相关的核转运受体蛋白, 可采用体内免疫共沉淀结合荧光共定位的方法<sup>[25-27]</sup>。我们前期的试验结果表明, 重组质粒转染 HEK-293T 细胞后表达的 M 蛋白与病毒感染细胞后的 M 蛋白具有相似的核质穿梭过程<sup>[6]</sup>。另外, 我们对鸡和人的核转运受体蛋白氨基酸序列进行比较, 发现在核转运受体蛋白功能区域均保守, 因此, HEK-293T 细胞可作为体外研究 NDV M 蛋白入核转运受体蛋白的细胞模型。在本研究中, 我们首先对 NDV M 蛋白和鸡的 KPNA1-KPNA6 蛋白以及 KPNB1 蛋白分别在 HEK-293T 细胞中进行亚细胞定位观察, 发现除 KPNA2 蛋白外, 其它几个核转运受体蛋白均与 M 蛋白表现出相同的细胞核定位, 这暗示它们与 M 蛋白之间可能会存在相互作用。通过免疫共沉淀试验发现, NDV M 蛋白与 KPNA1 和 KPNB1 蛋白存在相互作用。为了进一步确定 M 蛋白入核转运受体蛋白, 在细胞内共表达 M 蛋白与 KPNA1

蛋白或 KPNB1 蛋白的缺失体,通过荧光共定位证实 M 蛋白入核需要核转运受体蛋白 KPNB1 的参与。此外,我们在细胞内共表达 M 蛋白与 Ran 蛋白的突变体 Ran-Q69L,发现 M 蛋白由细胞核定位变为细胞质定位,进而证实了 M 蛋白入核过程还依赖于 Ran 蛋白的辅助。目前,这一方法可简便快速的鉴定病毒蛋白入核转运需要核转运受体蛋白中的一种还是几种,并且是否依赖于 Ran 蛋白的辅助,这为病毒蛋白入核转运机制研究提供了方法借鉴。

在蛋白质的入核机制研究方面,靶蛋白究竟是由核转运受体 KPNA 蛋白还是 KPNB 蛋白识别,这与靶蛋白的 NLS 类型有关。早期的研究表明,由单簇碱性氨基酸或两簇碱性氨基酸组成的经典 NLS 通常由 KPNA 蛋白识别,而碱性氨基酸残基不单独成簇且构成上没有明显特征的 NLS 通常由 KPNB 蛋白识别<sup>[28]</sup>。但是近年来研究发现,许多携带经典 NLS 特征的蛋白也可直接由 KPNB 蛋白识别和结合。如 Cai 等<sup>[14]</sup>2011 年报道了水痘-带状疱疹病毒 ORF9 蛋白携带的由两簇碱性氨基酸组成的双重 NLS(<sup>16</sup>RRKTTPSYSGQYRTARR<sup>32</sup>)可直接由 KPNB1 蛋白结合。Bai 等<sup>[29]</sup>2014 年证实细胞蛋白 TopBP1 进入细胞核也仅需要 KPNB1 蛋白识别 TopBP1 蛋白中由单簇碱性氨基酸组成的 NLS(<sup>1496</sup>RKRK<sup>1499</sup>)。本研究同样发现携带经典双重 NLS(<sup>247</sup>KKGKKVIFDKIEEKIRR<sup>263</sup>)的 NDV M 蛋白入核只需要结合 KPNB1 蛋白,而不需要 KPNA1 蛋白的参与。因此,核转运受体蛋白 KPNB1 结合多类型蛋白的 NLS,并且介导此类蛋白分子的入核正得到越来越多的关注<sup>[12]</sup>。

目前,副黏病毒 M 蛋白细胞核定位的功能在呼吸道合胞体病毒和麻疹病毒中报道较多,如 M 蛋白在细胞核中一方面抑制宿主细胞基因的转录

和翻译,促进病毒基因组的复制和转录<sup>[30]</sup>;另一方面与核衣壳蛋白相互作用,调控病毒基因组在细胞质中的复制和转录水平<sup>[31]</sup>。然而,以上两种副黏病毒 M 蛋白核定位功能在 NDV M 蛋白中尚未得到证实。我们的研究结果表明 NDV M 蛋白与核转运受体蛋白 KPNB1 具有直接的相互作用,两者形成复合物后在 Ran 蛋白的辅助下进入细胞核。本研究作为下一步利用 RNAi 技术干扰 DF-1 细胞中 KPNB1 蛋白表达,并通过转录组学方法寻找病毒感染细胞后细胞核中差异表达基因,进而阐明 NDV M 蛋白细胞核定位的功能奠定了重要基础。

## 参 考 文 献

- [1] Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Research*, 2014, 184: 71–81.
- [2] Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10(1): 26–35.
- [3] Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 2001, 30(5): 439–455.
- [4] Battisti AJ, Meng G, Winkler DC, McGinnes LW, Plevka P, Steven AC, Morrison TG, Rossmann MG. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(35): 13996–14000.
- [5] 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.
- [6] Duan ZQ, Li QH, He L, Zhao G, Chen J, Hu SL, Liu XF. Application of green fluorescent protein-labeled assay for the study of subcellular localization of Newcastle disease virus matrix protein. *Journal of Virological Methods*, 2013, 194(1/2): 118–122.
- [7] 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.
- [8] Labokha AA, Fassati A. Viruses challenge selectivity barrier of nuclear pores. *Viruses*, 2013, 5(10): 2410–2423.
- [9] Li J, Yu M, Zheng WN, Liu WJ. Nucleocytoplasmic shuttling of influenza A virus proteins. *Viruses*, 2015, 7(5): 2668–2682.
- [10] Wulan WN, Heydet D, Walker EJ, Gahan ME, Ghildyal R. Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 553.
- [11] Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin  $\alpha$ : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(9): 505–514.
- [12] Lott K, Cingolani G. The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2011, 1813(9): 1578–1592.
- [13] Pryor MJ, Rawlinson SM, Butcher RE, Barton CL, Waterhouse TA, Vasudevan SG, Bardin PG, Wright PJ, Jans DA, Davidson AD. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin  $\alpha/\beta$ -recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic*, 2007, 8(7): 795–807.
- [14] Cai MS, Wang S, Xing JJ, Zheng CF. Characterization of the nuclear import and export signals, and subcellular transport mechanism of varicella-zoster virus ORF9. *Journal of General Virology*, 2011, 92(3): 621–626.
- [15] Pumroy RA, Ke S, Hart DJ, Zachariae U, Cingolani G. Molecular determinants for nuclear import of influenza A PB2 by importin  $\alpha$  isoforms 3 and 7. *Structure*, 2015, 23(2): 374–384.
- [16] Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, Bardin P, Jans DA. Nuclear import of the respiratory syncytial virus matrix protein is mediated by importin  $\beta 1$  independent of importin  $\alpha$ . *Biochemistry*, 2005, 44(38): 12887–12895.
- [17] Duan ZQ, Chen J, He L, Xu HX, Li QH, Hu SL, Liu XF. Matrix protein of Newcastle disease virus interacts with avian nucleophosmin B23. 1 in HEK-293T cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(7): 730–736. (in Chinese)  
段志强, 陈坚, 何亮, 许海旭, 李群辉, 胡顺林, 刘秀梵. 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. *微生物学报*, 2013, 53(7): 730–736.
- [18] Ghildyal R, Ho A, Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(5): 692–705.
- [19] Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, 42(9): 1416–1429.
- [20] Duan ZQ, Hu SL, Liu XF. Function comparison of the matrix protein between Newcastle disease virus and other paramyxoviruses. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(7): 1070–1078. (in Chinese)  
段志强, 胡顺林, 刘秀梵. 新城疫病毒与其它副黏病毒基质蛋白功能的比较. *微生物学报*, 2016, 56(7): 1070–1078.
- [21] Ghildyal R, Ho A, Dias M, Soegiyono L, Bardin PG, Tran KC, Teng MN, Jans DA. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *Journal of Virology*, 2009, 83(11): 5353–5362.
- [22] Duan ZQ, Song QQ, Wang YY, He L, Chen J, Zhu YM, Hu SL, Liu XF. Characterization of signal sequences determining the nuclear export of Newcastle disease virus matrix protein. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2589–2595.
- [23] Caly L, Wagstaff KM, Jans DA. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: potential target for antivirals? *Antiviral Research*, 2012, 95(3): 202–206.
- [24] Ding Q, Zhao L, Guo H, Zheng AC. The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Virologica Sinica*, 2010, 25(2): 79–85.
- [25] Huang YZ, Zhang J, Halawa MA, Yao SL. Nuclear localization signals of varicella zoster virus ORF4. *Virus Genes*, 2014, 48(2): 243–251.
- [26] Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, Yanagawa H. Design of peptide inhibitors for the importin  $\alpha/\beta$  nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(9): 940–949.
- [27] Li ML, Wang S, Cai MS, Guo H, Zheng CF. Characterization of molecular determinants for nucleocytoplasmic shuttling of PRV UL54. *Virology*, 2011, 417(2): 385–393.
- [28] Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(8): 5101–5105.
- [29] Bai LP, Michael WM, Yan S. Importin  $\beta$ -dependent nuclear import of TopBP1 in ATR-Chk1 checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cellular Signalling*, 2014, 26(5): 857–867.
- [30] Ghildyal R, Baulch-Brown C, Mills J, Meanger J. The matrix protein of human respiratory syncytial virus localises to the nucleus of infected cells and inhibits transcription. *Archives of Virology*, 2003, 148(7): 1419–1429.
- [31] Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 2009, 83(20): 10374–10383.

# The nuclear import of Newcastle disease virus matrix protein depends on KPNB1 and Ran protein

Zhiqiang Duan<sup>1\*</sup>, Xinqin Ji<sup>1</sup>, Houqiang Xu<sup>1</sup>, Jiafu Zhao<sup>1</sup>, Haixu Xu<sup>2</sup>, Shunlin Hu<sup>2, 3</sup>, Xiufan Liu<sup>2, 3\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Animal Infectious Diseases, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

<sup>3</sup> Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to identify the transport proteins that mediates the nuclear import of Newcastle disease virus (NDV) matrix (M) protein. [Methods] Chicken KPNA1 to KPNA6 gene and KPNB1 gene were cloned from DF-1 cells and then inserted into eukaryotic expression vectors. The constructed recombinant plasmids with a combination of grouping were transfected into HEK-293T cells to identify the transport proteins interacting with NDV M protein by co-immunoprecipitation (Co-IP) assay. Moreover, fluorescent co-localization assay was used to verify the transport proteins by co-expressing M and Ran protein mutant or M and its interactive protein deletant. [Results] The recombinant proteins could normally express in plasmid-transfected HEK-293T cells. Indirect immunofluorescence detection showed that the recombinant proteins except for Myc-KPNA2 displayed the same nuclear localization as NDV M protein. The results of Co-IP revealed that M protein could interact with KPNA1 and KPNB1. Further fluorescent co-localization indicated that co-expression of M and DN-KPNA1 did not change the nuclear localization of M, whereas co-expression of M and DN-KPNB1 or M and Ran-Q69L disrupted the nuclear localization of M, demonstrating that the nuclear import of M protein was dependent on KPNB1 and Ran protein. [Conclusion] KPNB1 and Ran protein jointly mediated the nuclear import of NDV M protein, showing that KPNB1 protein interacted with NDV M protein to form binary complex and then entered into the nucleus with the assistance of Ran protein.

**Keywords:** Newcastle disease virus, matrix protein, transport receptor protein, nuclear localization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31502074), by the Scientific Research Cooperation Project with America and Oceania Region, Ministry of Education (JWSM-2014-2029), by the Chinese Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303033) and by the Scientific Research Project of Guizhou University Talents Fund (GDRJHZ-2014-10)

\*Corresponding authors. Zhiqiang Duan, Tel: +86-851-88298005, E-mail: zqduan@gzu.edu.cn; Xiufan Liu, Tel: +86-514-87991416, E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 19 May 2016; Revised: 30 July 2016; Published online: 17 August 2016