



鸭源新城疫病毒 M 蛋白核定位信号突变影响病毒的毒力和复制能力

段志强^{1,2*}, 嵇辛勤^{1,2}, 邓珊珊², 胡焱², 赵佳福^{1,2}, 倪萌萌^{1,2}

¹ 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

² 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025

摘要:【目的】研究鸭源新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)M 蛋白核定位信号(nuclear localization signal, NLS)突变对其毒力和复制能力的影响。【方法】利用鸭源 NDV SS1 株 P 基因和 F 基因上的 Age I 和 Bstz17 I 酶切位点, 将 overlap PCR 方法获得的 M 蛋白 NLS 突变的片段替换到 pNDV/SS1GFP 中获得全长质粒 pNDV/SS1GFP-M/NLSm。通过反向遗传学技术拯救 M 蛋白 NLS 突变体病毒, 并对拯救的病毒进行血凝(hemagglutination, HA)试验、荧光试验和 M 基因测序鉴定。另外, 对突变体病毒进行 M 蛋白的亚细胞定位观察, 以及病毒的生物学特性、空斑形成能力和体外增殖能力测定。【结果】成功构建 M 蛋白 NLS 突变的全长质粒 pNDV/SS1GFP-M/NLSm。细胞转染物接种鸡胚后的第 1 代尿囊液无 HA 效价, 盲传 3 代才能检测到拯救病毒的 HA 效价。进一步的荧光试验和 M 基因测序确定拯救的病毒是突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm。与亲本病毒 rSS1GFP 相比, 突变体病毒 M 蛋白由细胞核定位变为细胞质定位。此外, 突变体病毒的毒力、在鸡胚上的复制能力以及在细胞中的空斑形成能力显著降低, 并且感染细胞后产生的细胞病变轻微, M 蛋白和绿色荧光蛋白的表达量均降低, 说明 M 蛋白 NLS 突变使病毒的体外增殖能力受到抑制。【结论】NLS 突变导致的 M 蛋白细胞核定位功能丧失可明显降低鸭源 NDV 的毒力和复制能力。

关键词: 新城疫病毒, M 蛋白, 细胞核定位, 核定位信号, 病毒复制

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, 是一种有囊膜、含有单股负链不分节段基因组的 RNA 病毒^[1]。

NDV 基因组主要编码 6 个结构蛋白, 其中 M 蛋白是一种非糖基化膜相关蛋白, 位于病毒囊膜内表面, 在调节病毒 RNA 的复制和转录以及促进子代

基金项目: 国家自然科学基金(31760732, 31502074); 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2015]2054 号); 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。Tel: +86-851-88298005; E-mail: zqduan@gzu.edu.cn

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-01-31; 网络出版日期: 2018-03-19

病毒粒子的组装和出芽过程中发挥着重要作用^[2-3]。同大多数副黏病毒 M 蛋白一样, NDV M 蛋白是一种细胞核-细胞质穿梭蛋白^[4]。在 NDV 感染细胞早期, M 蛋白通过自身携带的核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 在转运受体蛋白 KPNB1 作用下进入细胞核^[5-6]; 而在感染后期, M 蛋白则通过携带的 3 个核输出信号(nuclear export signal, NES)以 CRM1 非依赖的方式进入细胞质^[7]。近年来的研究表明, NLS 介导的病毒蛋白细胞核定位对病毒的复制和致病性非常重要。例如 Mori 等^[8]拯救了核心蛋白 NLS 突变的日本乙型脑炎病毒, 与野生型病毒相比, 突变体病毒在抑制细胞基因的转录和翻译能力方面显著下降, 导致病毒在细胞中的复制增殖能力降低。Sanchez 等^[9]对 A 型流感病毒衣壳蛋白 NLS 进行突变, 发现突变体病毒不能有效地形成病毒核糖核蛋白体, 并且病毒粒子的装配受到严重影响。

目前, 在副黏病毒中, 介导呼吸道合胞体病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)、尼帕病毒(Nipah virus, NiV)、仙台病毒(Sendai virus, SeV)和 NDV M 蛋白细胞核定位的 NLS 已相继得到鉴定, 并且 RSV 和麻疹病毒(Measles virus, MeV)M 蛋白细胞核定位的功能也已阐明, 但是国内外至今对 NDV M 蛋白细胞核定位的功能认识仍然较少。我们的前期研究虽然发现 M 蛋白第 42 位碱性氨基酸发生突变(R42A)会影响 M 蛋白的细胞核定位以及 NDV 的复制和致病性, 但 R42 不是决定 M 蛋白细胞核定位的关键氨基酸位点^[10]。Coleman 等^[5]早期研究证实 M 蛋白 250/251KK 和 262/263RR 联合突变可破坏其细胞核定位, 是决定 M 蛋白细胞核定位的重要氨基酸位点。因此, 我们可以利用反向遗传操作技术拯救 M 蛋白 NLS 突变的 NDV, 通过转录组学和蛋白质组学筛选 M

蛋白 NLS 野生型和突变型 NDV 感染细胞后的差异基因和蛋白, 并对其功能进行验证, 这对认识 NDV M 蛋白细胞核定位的确切功能具有重要意义。因此, 本试验首先拯救 M 蛋白 NLS 突变体 NDV, 研究 NLS 突变对 M 蛋白细胞核定位、NDV 生物学特性、空斑形成能力以及体外增殖能力的影响, 为后续探讨 NDV M 蛋白细胞核定位的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、质粒和鸡胚

稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21 细胞克隆株 BSR-T7/5 细胞由 Dr. Buchholz 等^[11]构建, 扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室刘秀梵院士馈赠; DF-1 细胞购自中国科学院细胞库。P 基因和 M 基因之间的非编码区插入 GFP 基因的全长质粒 pNDV/SS1GFP 以及鸭源 NDV SS1 株(GenBank 登录号: KP742770)来源的 3 个辅助质粒 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 由本实验室保存^[12]。SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物公司, 孵化至 10 日龄使用。

1.2 主要试剂

TRIzol、RNase-free H₂O、反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; 6 nt 随机引物购自上海生工生物工程公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Age I、Bstz17 I 和 EcoR I、DNA Ladder Marker 购自 Fermentas 公司; 质粒小提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AxyGen 公司; 质粒提取纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; FuGENE[®] HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司; 细胞核染料 DAPI、Cy3 标记山羊抗小鼠

IgG(H+L)购自 Sigma 公司; 1×RIPA 细胞裂解液、蛋白上样缓冲液、抗 GFP 鼠单克隆抗体、抗 GAPDH 鼠单克隆抗体、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Alexa Fluor 594 标记驴抗鸡 IgY(H+L)购自北京百奥莱博科技有限公司; 鸡抗 NDV 多抗血清、鼠抗 NDV M 蛋白多抗血清由本实验室制备保存; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 M 蛋白 NLS 突变体 NDV 全长感染性克隆的构建与鉴定

根据 NDV SS1 株全基因组序列(GenBank 登录号: KP742770), 利用 P 基因和 F 基因上存在的 Age I 和 Bstz17 I 两个酶切位点设计两对引物(表 1), 通过 overlap PCR 方法将 M 蛋白 250/251KK 以及 262/263RR 位点突变为丙氨酸(A)(图 1-A)。将获得的 PCR 产物与全长质粒 pNDV/SS1GFP 用 Age I 和 Bstz17 I 分别进行双酶切, 胶回收目的片段后进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞。挑取单菌落扩大培养, 碱裂解法提取质粒后, 用 EcoR I 进行单酶切鉴定, 对阳性质粒进行测序鉴定。将测序正确的 M 蛋白 NLS 突变的全长感染性克隆命名为

pNDV/SS1GFP-M/NLSm。具体构建方法见图 1-B。

1.4 M 蛋白 NLS 突变体 NDV 的拯救与鉴定

BSR-T7/5 细胞在转染前用含 1 mg/mL G418 的 10% DMEM 培养基连续筛选 5 代, 然后将 2×10^5 BSR-T7/5 细胞接种于 35 mm 细胞培养皿中培养过夜, 当细胞密度达到 70% 时用于质粒转染。按照 FuGENE® HD Transfection Reagent 说明书, 将全长质粒 pNDV/SS1GFP-M/NLSm (1.0 μ g) 和 3 个辅助质粒 pCI-NP (1.0 μ g)、pCI-P (0.5 μ g)、pCI-L (0.5 μ g) 共转染至 BSR-T7/5 细胞。收集转染后 60 h 的细胞及其上清接种 10 日龄 SPF 鸡胚。弃去 24 h 内死亡的鸡胚, 24 h 后死亡的鸡胚置于 4 °C 冷却后收集尿囊液, 测定 HA 效价。将拯救的病毒在 10 日龄 SPF 鸡胚上连续传代 5 次, 收集鸡胚尿囊液, 按照 TRIzol 试剂说明书提取病毒 RNA, 反转录成 cDNA, 然后用 M 基因特异性引物 M-F 和 M-R(表 1)通过 PCR 扩增 M 基因并进行测序鉴定。另外, 按照文献[13]的方法将拯救的突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 与亲本病毒 rSS1GFP 分别接种 DF-1 细胞, 用鸡抗 NDV 多抗血清检测细胞中是否有针对 NDV 蛋白的特异性荧光出现。

表 1. 本研究所用的引物信息

Table 1. The primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'→3') ^a	Restriction sites ^b	Size/bp	$T_m/^\circ\text{C}$
PM/GFP-F	ACA <i>ACCGGT</i> GCGACACCCCTCTGAATTG	<i>Age I</i>	2592	
NLSm-a	TTCCTCTATCTTGTCAAATATCACTG <i>CCCGCT</i> CCCTTC TTATCTACAGTG			60
NLSm-b	ATATTTGACAAGATAGAGGAAAAGATAG <i>CGGCACTC</i> AATCTATCCGTC			60
PM/GFP-R	GTGG <i>TATAC</i> ATTGACTGCCTTATCTCTCTG	<i>BstZ17 I</i>		
M-F	TCGGAATCAATGGACTCATCCAG		1115	57
M-R	GGCAGTCGACTTATTCCTGAAAGG			

^a The nucleotides shown in underline are the mutated sequence introduced in the primer to change the indicated residues to alanine.

^b The restriction sites used in the primers are shown in bold italic.

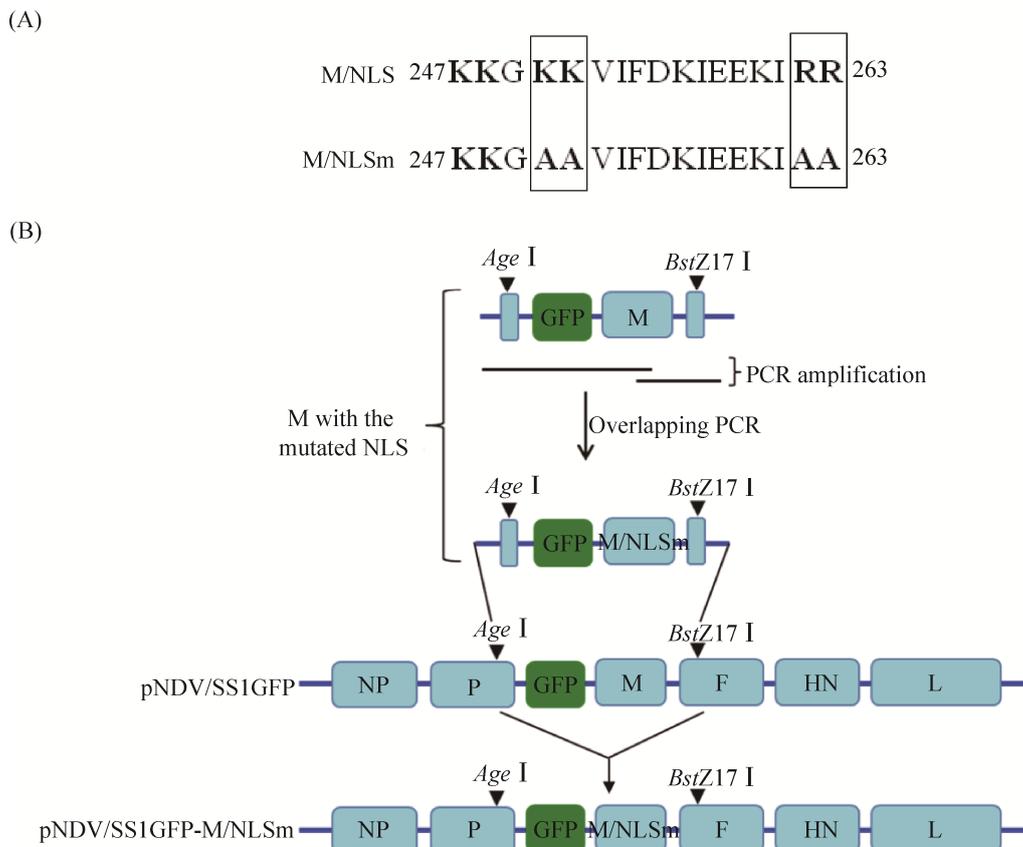


图 1. M 蛋白 NLS 突变体 NDV 全长感染性克隆的构建示意图

Figure 1. The schematic diagram of mutation strategy of the M/NLS motif in the full-length cDNA clone of pNDV/SS1GFP. A: Mutation of the indicated basic amino acids to alanine (A) in M/NLS. B: Schematic diagram of the mutation strategy of pNDV/SS1GFP-M/NLSm.

1.5 M 蛋白的免疫荧光检测

将 3×10^4 DF-1 细胞接种到 12 孔细胞板培养过夜，待细胞密度达到 80% 后将突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 与亲本病毒 rSS1GFP 分别按 0.01 MOI 感染剂量接种 DF-1 细胞，接毒后 24 h 用 PBS 清洗细胞 3 次，然后用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min，PBS 洗 3 遍，用 0.25% Triton X-100 作用 5 min；PBS 洗 3 遍，加入含 10% 小牛血清的 PBS 于 37 °C 封闭 1 h；PBS 洗 3 遍，加入含 10% 小牛血清 PBS 稀释的抗 M 蛋白鼠多抗血清于 37 °C 作用 1 h；PBS 洗 3 遍，加入 PBS 稀释的 Cy3 标记山羊抗鼠 IgG(H+L) 于 37 °C 作用 1 h；PBS

洗 3 遍后，加入 DAPI 染细胞核 5 min；最后将细胞置于荧光显微镜下观察 M 蛋白亚细胞定位。

1.6 病毒的生物学特性测定

将收获的突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 与亲本病毒 rSS1GFP 新鲜尿囊液按文献[14]的方法分别接种 10 日龄 SPF 鸡胚测定病毒致死鸡胚的平均死亡时间(mean death time, MDT)，接种 1 日龄 SPF 雏鸡测定病毒的脑内致病指数(intracerebral pathogenicity index, ICPI)，接种 6 周龄 SPF 鸡翅下静脉测定病毒的静脉接种致病指数(intravenous pathogenicity index, IVPI)。按照 Reed-Muench 法^[15]测定病毒对鸡胚的半数感染剂量(50% egg infectious dose, EID₅₀)。

1.7 病毒的空斑形成能力测定

将 5×10^5 DF-1 细胞接种到 12 孔细胞板直至长成致密的单层细胞, 分别用无抗无血清 DMEM 10 倍倍比稀释突变体病毒和亲本病毒, 接种到细胞中。吸附 1 h 后, PBS 洗 3 遍, 按 1:1 体积加入 1.6% 琼脂和 $2 \times$ DMEM, 37°C 培养 48 h 后, 小心移除覆盖细胞的琼脂, 用 10% 甲醛固定 30 min, 并用 0.1% 的结晶紫染色。染色 1 h 后用 PBS 洗掉结晶紫即可见空斑。随机选取 10 个空斑用 GNU 软件(version 2.8, www.gimp.org)测定空斑大小。

1.8 病毒的体外增殖能力测定

将 5×10^5 DF-1 细胞接种到 6 孔细胞板, 以 0.1 MOI 感染剂量的突变体病毒和亲本病毒分别接种 DF-1 细胞, 吸附 1 h 后, 用 PBS 洗 3 遍, 置于 37°C 5% CO_2 细胞培养箱中培养。在感染后的 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 和 96 h 收集细胞上清, 用测定病毒半数感染量(50% tissue culture infective dose, TCID_{50})的方法测定病毒滴度, 并绘制病毒增殖曲线。实验重复 3 次, 对获得的数据进行统计学分析。另外, 在病毒感染后的 24 h, 观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)以及细胞中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达情况。

1.9 M 蛋白和 GFP 的 Western blotting 检测

在上述突变体病毒和亲本病毒感染 DF-1 细胞后的 24 h, 分别收集细胞, PBS 洗 3 遍, 用 $1 \times$ RIPA 细胞裂解液裂解细胞, 4°C 离心取上清, 加入蛋白上样缓冲液煮沸后进行 SDS-PAGE, 随后将目的蛋白转印至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂乳将 PVDF 膜于 4°C 封闭过夜, 分别加入 1:1000 稀释的抗 M 蛋白鼠多抗血清和抗 GAPDH 鼠单克隆抗体或抗 GFP 鼠单克隆抗体和抗 GAPDH 鼠单克隆

抗体于 37°C 孵育 2 h; TBST 洗 3 次后, 加入 1:2000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)于 37°C 孵育 1 h; TBST 洗 3 次后, 用 ECL 化学发光试剂盒进行显色。最后用 ImageJ 1.2.4 软件分析细胞中 M 蛋白和 GFP 的相对表达量。

2 结果和分析

2.1 M 蛋白 NLS 突变体 NDV 全长感染性克隆的鉴定

以 pNDV/SS1GFP 为模板, 通过 overlap PCR 方法获得与预期大小相符的目的基因片段(图 2-A)。对 PCR 产物直接测序, 序列分析结果表明在 M 蛋白 NLS 中获得了相应的氨基酸位点突变。将目的片段与全长质粒 pNDV/SS1GFP 分别进行双酶切, 连接转化大肠杆菌, 对提取的质粒进行 *EcoR* I 单酶切鉴定, 获得预期的 3 条目的片段, 大小分别在 1.2、1.3 和 16.0 kb 左右(图 2-B), 说明 M 蛋白 NLS 突变体病毒全长感染性克隆构建成功。

2.2 突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 的拯救与鉴定

质粒共转染后的细胞及其上清接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 收获的鸡胚尿囊液无 HA 效价, 但是在鸡胚盲传 3 代后的鸡胚尿囊液检测到 HA 效价, 为 2^4 , 说明 M 蛋白 NLS 突变后导致病毒在鸡胚上的复制能力降低。将拯救的突变体病毒在鸡胚上连续传代 5 次, 取 HA 效价为阳性的鸡胚尿囊液提取病毒 RNA 进行 RT-PCR, 可以获得预期大小的 M 基因片段(图 3-A)。对扩增的 M 基因测序, 发现突变体病毒 M 蛋白 NLS 突变的氨基酸位点未发生回复突变(图 3-B), 说明 M 蛋白 NLS 突变体病毒的稳定性较高。另外, 在病毒感染细胞后的 24 h 用鸡抗 NDV 多抗血清进行间接免疫荧光试

验, 结果发现在亲本病毒和突变体病毒感染的 DF-1 细胞中均有绿色荧光出现, 而未感染病毒的细胞无荧光(图 3-C)。同时, 对病毒感染后的细胞直接在荧光显微镜下观察, 可以发现亲本病毒感

染的细胞发出强烈的绿色荧光, 突变体病毒感染的细胞中出现少量的绿色荧光, 而未感染病毒的细胞无荧光(图 3-D)。以上结果表明成功拯救出 M 蛋白 NLS 突变体病毒。

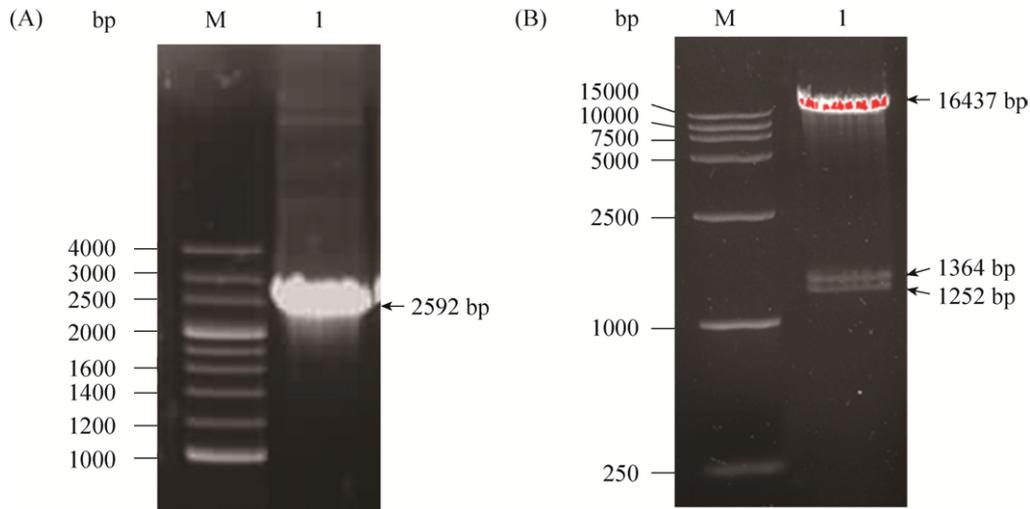


图 2. M 蛋白 NLS 突变体 NDV 全长感染性克隆的鉴定

Figure 2. Characterization of the full-length cDNA clone of pNDV/SS1GFP-M/NLSm. A: M, DNA ladder marker; lane 1, the PCR products obtained by overlap PCR method. B: M, DNA ladder marker; lane 1, enzyme-digested products of pNDV/SS1GFP-M/NLSm.

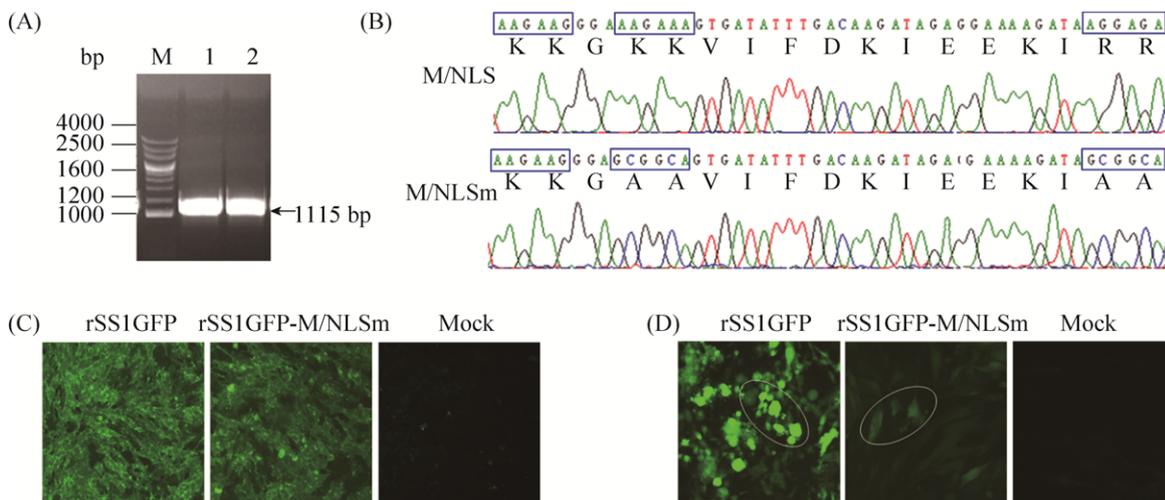


图 3. 突变体病毒的鉴定

Figure 3. Identification of the rescued mutant virus. A: M, DNA ladder marker; 1, PCR products of rSS1GFP M gene; 2, PCR products of rSS1GFP-M/NLSm gene. B: Nucleotide sequence analysis of the mutations introduced in the NLS motif of the M gene. The nucleotide replacements introduced in the M gene were indicated. C: The indirect immunofluorescence assay used to examine the parental and mutant viruses. Representative images are shown in the graph (200×). D: Direct fluorescence observation used to verify the parental and mutant viruses. Representative images are shown in the graph (200×).

2.3 NLS 突变影响 NDV M 蛋白的细胞核定位

将亲本病毒和突变体病毒分别感染 DF-1 细胞, 在感染后的 24 h 用抗 NDV M 蛋白鼠多抗血清进行免疫荧光试验, 结果表明, 亲本病毒的 M 蛋白明显定位在细胞核和核仁中, 而突变体病毒的 M 蛋白则主要定位在细胞质(图 4)。说明 M 蛋白 NLS 突变导致了 M 蛋白的细胞核定位功能丧失。

2.4 M 蛋白 NLS 突变影响 NDV 的生物学特性

对亲本病毒和突变体病毒分别进行生物学特性测定, 结果显示(表 2), 与亲本病毒 rSS1GFP 相比(MDT 为 54 h, ICPI 为 1.88, IVPI 为 2.80, EID₅₀ 为 10^{-8.67}/0.1 mL, HA 效价为 2⁸), 突变体病毒

rSS1GFP-M/NLSm 明显延长了鸡胚死亡时间(大于 120 h), 毒力明显下降(ICPI 为 1.63, IVPI 为 2.03), 在鸡胚上的复制能力显著降低(EID₅₀ 为 10^{-5.24}/0.1 mL), 并且突变体病毒的 HA 效价下降为 2⁴。进一步说明 M 蛋白 NLS 突变降低了 NDV 的毒力和在鸡胚上的复制能力。

2.5 M 蛋白 NLS 突变影响 NDV 的空斑形成能力

对亲本病毒和突变体病毒在 DF-1 细胞上的空斑形成能力进行测定, 结果表明(图 5), 亲本病毒 rSS1GFP 形成的空斑大且多, 空斑平均大小为 (2.85±0.35) mm; 而突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 形成的空斑小且少, 空斑平均大小为 (0.87±0.30) mm。说明突变体病毒在细胞中的复制能力减弱。

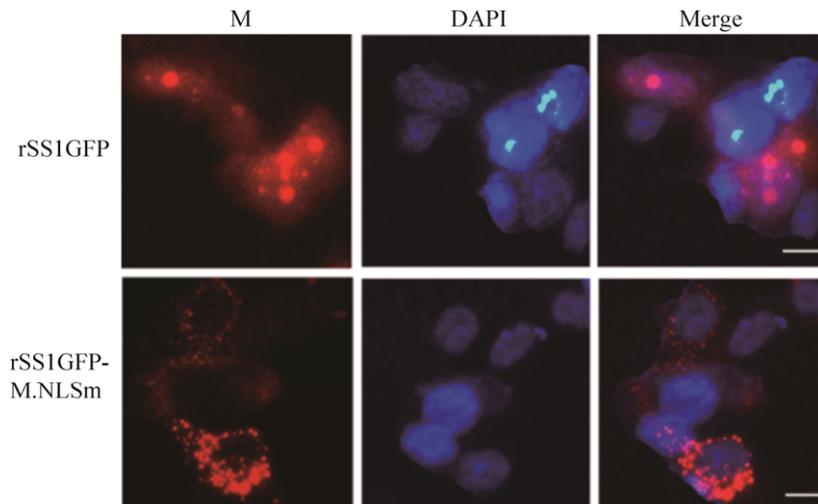


图 4. 亲本病毒和突变体病毒 M 蛋白亚细胞定位观察

Figure 4. Subcellular localization of the M protein in the parental and mutant viruses-infected DF-1 cells. Indirect immunofluorescence assay was used to examine the subcellular localization of M protein. DAPI was used to stain nuclei. The representative images are shown in the graph (200×).

表 2. 亲本病毒和突变体病毒的生物学特性测定

Table 2. The biological characterization of the parental and mutant viruses

Virus	Pathogenicity			Virus titer	
	MDT/h	ICPI	IVPI	EID ₅₀ /mL	HA
rSS1GFP	54	1.88	2.80	10 ^{8.67}	8 log ₂
rSS1GFP-M/NLSm	> 120	1.63	2.03	10 ^{5.24}	4 log ₂

2.6 M 蛋白 NLS 突变影响 NDV 的体外增殖能力

亲本病毒和突变体病毒感染 DF-1 细胞后不同时间点的病毒滴度测定结果表明, 突变体病毒 rSS1GFP-M/NLSm 在 96 h 之前的病毒滴度均显著低于亲本病毒 rSS1GFP 的病毒滴度(图 6-A)。对病毒感染细胞后不同时间点的 CPE 观察发现(图 6-B),

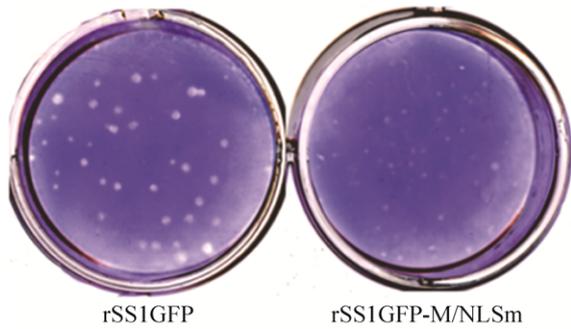


图 5. 亲本病毒和突变体病毒的空斑形成能力测定
 Figure 5. Plaque assay of the parental and mutant viruses in DF-1 cells. The plaques produced by the viruses were measured using the GNU image manipulation program, version 2.8. Representative images are shown in the graph.

亲本病毒感染后的细胞 12 h 开始出现 CPE, 到 48 h 细胞单层已基本被完全破坏, 而突变体病毒在感染细胞后 24 h 才开始出现轻微的 CPE, 并且在 72 h 细胞单层还未被完全破坏。同时, 在病毒感染细胞后的 24 h, 可以明显看到亲本病毒感染细胞造成的 CPE 严重且 GFP 亮度强, 而突变体病毒感染细胞后导致的 CPE 轻微且 GFP 亮度弱(图 6-C)。此外, 对病毒感染后的 24 h 的细胞中 M 蛋白和 GFP 的表达情况进行检测, 发现突变体病毒 M 蛋白和 GFP 表达量均显著低于亲本病毒($P < 0.001$) (图 6-D)。以上结果说明 M 蛋白 NLS 突变降低了 NDV 的体外增殖能力以及病毒基因组的转录水平。

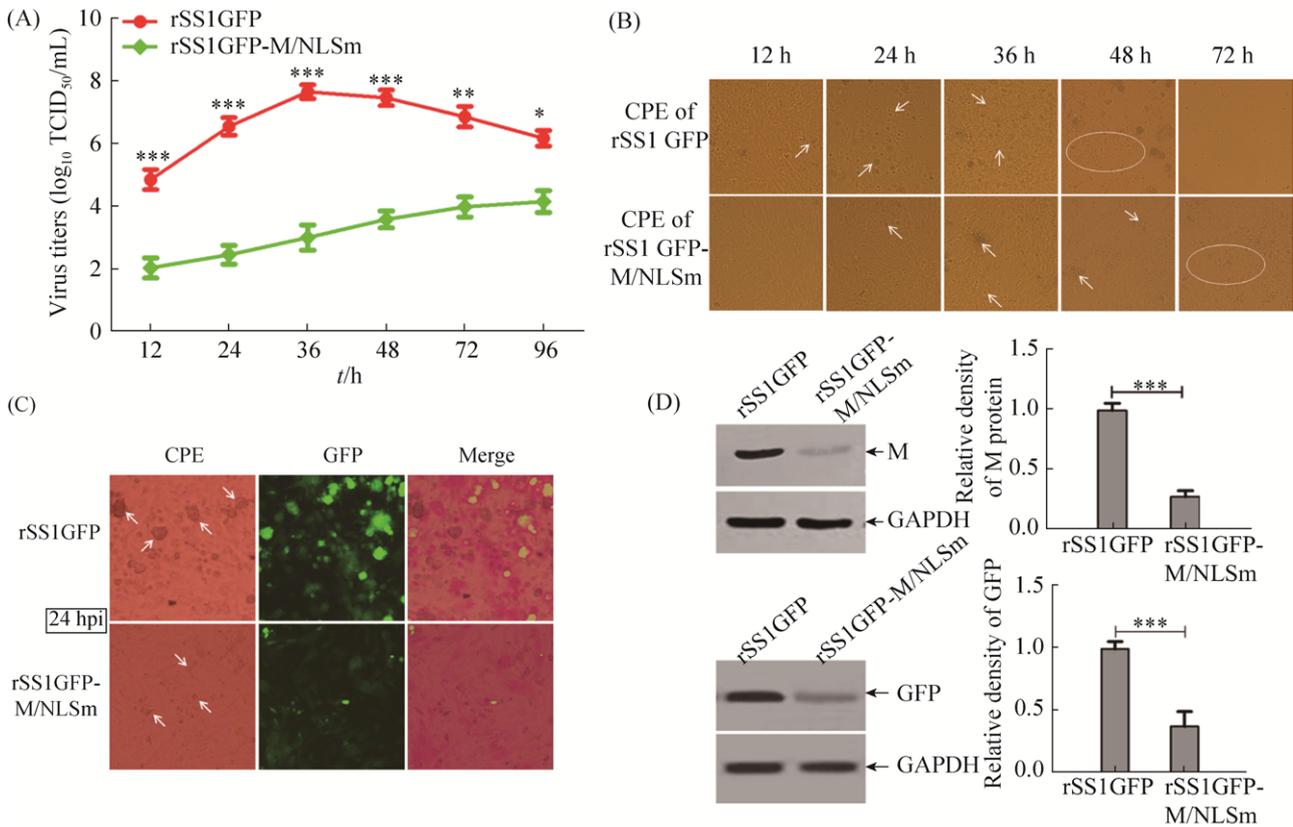


图 6. 亲本病毒和突变体病毒的体外增殖能力测定

Figure 6. The *in vitro* proliferation ability of the parental and mutant viruses in DF-1 cells. A: Growth kinetics curves of the viruses in DF-1 cells at different time points. Each data point on the curve indicates the mean \pm standard deviation of three independent experiments. $P < 0.001$ are represent with ***, $P < 0.01$ are represent with **, $P < 0.05$ are represent with *. B: The CPE was observed in virus-infected DF-1 cells at different time points. The representative images are shown in the graph (200 \times). C: The CPE and green fluorescence were observed in virus-infected DF-1 cells at 24 h post-infection. The representative images are shown in the graph (200 \times). D: The relative expression of M protein and GFP in virus-infected DF-1 cells was detected by Western blotting. $P < 0.001$ are represent with ***.

3 讨论

目前,病毒如何劫持和利用宿主细胞的复制、转录和翻译系统来促进病毒的复制和致病进程逐渐成为国内外研究热点^[16-17]。近年来,有许多研究结果阐明了病毒蛋白细胞核定位的意义。例如猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白的细胞核定位可抑制宿主细胞的抗病毒免疫应答以及促进病毒在细胞内的有效复制^[18]。在副黏病毒 M 蛋白研究方面,研究证实 RSV 和 MeV M 蛋白的细胞核定位可抑制宿主细胞基因转录和蛋白质的合成,有利于病毒基因组的复制和转录以及子代病毒粒子的产生^[19-20];而 NiV M 蛋白通过劫持宿主细胞的蛋白转运系统和泛素化途径进入细胞核,该过程有利于病毒粒子的出芽^[21]。在流感病毒非结构蛋白 1(non-structural protein 1, NS1)研究方面, A 型流感病毒 H5N1 NS1 蛋白的细胞核定位虽然对病毒的复制和致病性不是必需的,但是在抵抗细胞抗病毒应答方面非常重要;而 H1N1 病毒 NS1 蛋白细胞核定位则对抗病毒免疫应答以及病毒的复制和致病性均有重要作用^[22]。因此,病毒基因组编码的部分蛋白进入细胞核对病毒的复制和致病过程具有重要意义^[23-25]。

在副黏病毒家族成员中,目前已证实 RSV、SeV、NiV 和 NDV M 蛋白在病毒感染细胞早期可定位在细胞核^[4]。虽然介导这些副黏病毒 M 蛋白细胞核定位的功能性 NLS 已被鉴定,但是到目前为止,利用反向遗传技术拯救 M 蛋白 NLS 突变体病毒来研究 M 蛋白细胞核定位对副黏病毒的毒力、复制能力和致病性尚未见报道。早期研究证实 NDV M 蛋白中 247/248KK、250/251KK 和 262/263RR 组成的双重 NLS 介导了 M 蛋白的细胞核定位,对其中任意一对碱性氨基酸位点突变不

会影响 M 蛋白核定位,而对其中的任意两对碱性氨基酸位点联合突变则会导致 M 蛋白丧失核定位特征^[5]。因此,本研究通过反向遗传技术拯救 M 蛋白 250/251KK 和 262/263RR 联合突变的 NDV,但在拯救过程中需要将收获的鸡胚尿囊液在 SPF 鸡胚上盲传 3 代才出现 HA 效价。按照文献的方法^[26]将 M 蛋白 NLS 突变体 NDV 在鸡胚上连续传代 5 次,引入的 M 蛋白 NLS 突变位点未发生回复突变,说明拯救的突变体病毒稳定性好。与亲本病毒相比(EID_{50} 为 $10^{-8.67}/0.1$ mL, HA 效价为 2^8),突变体病毒的 EID_{50} 为 $10^{-5.24}/0.1$ mL, HA 效价仅为 2^4 ,并且突变体病毒在细胞中的空斑形成能力远小于亲本病毒。对病毒的体外增殖能力测定结果表明,突变体病毒在细胞上的增殖能力明显减弱,因为在感染细胞后 96 h 之前的病毒滴度均显著低于亲本病毒。从病毒感染细胞后不同时间点产生的 CPE 来看,亲本病毒在 12 h 即可导致 CPE,在 36 h 出现明显的 CPE,并且 48 h 即可完全破坏细胞单层,因而导致亲本病毒在 36 h 以后的病毒滴度逐渐下降;而突变体病毒在 24 h 才出现轻微的 CPE,在 48 h 出现较为明显的 CPE,并且在 72 h 细胞单层也未完全被破坏,因此突变体病毒在 96 h 以前的病毒滴度呈现上升趋势。另外,在病毒感染细胞后的 24 h,突变体病毒在细胞中的 GFP 表达微弱且量少,而且病毒 M 蛋白的表达量也明显低于亲本病毒。以上研究结果说明 M 蛋白 NLS 突变极大地减弱了 NDV 的复制能力。

对大多数病毒而言,毒力与病毒复制能力和致病性呈正相关。有研究表明 NDV 的毒力因子是由多个病毒蛋白共同决定的,其中 F 和 HN 蛋白是 NDV 的主要毒力因子,而 NP、P、L 和 M 蛋白则与 NDV 毒力有一定的相关性^[27]。在 M 蛋白与 NDV 毒力的关系研究方面, Dortmans 等^[28]将

NDV 弱毒株 AV324/94 M 基因替换到强毒株 Herts/33 中降低了病毒的 ICPI, 但是相反方向的替换并没有提高弱毒株的 ICPI。因此, 该研究未能明确 M 蛋白与 NDV 毒力的关系, 其原因可能是 AV324/94 本身是弱毒株, M 蛋白不能单独决定 NDV 的毒力作用。近年来, 扬州大学刘秀梵教授课题组利用反向遗传技术先后拯救出 NDV 强毒株 M 蛋白 FPIV 晚期结构域和在副黏病毒 M 蛋白中都保守的 R42 突变的病毒, 对其生物学特性研究发现 M 蛋白 F23A、P24A 或 R42A 突变均能明显降低 NDV 的毒力(根据 MDT 和 ICPI 判断)^[10,29]。同样, 在本研究中, 与亲本病毒相比, M 蛋白 NLS 突变体 NDV 的毒力也表现为明显的下降, 这与病毒的复制能力下降有关, 因为突变体病毒在鸡胚和细胞中的病毒滴度均发生了显著降低。此外, 国内有学者研究发现基因 VII 型强毒 NDV 比基因 IV 型强毒 NDV 所造成的脾脏免疫损伤更大^[30], 但是这种作用机制并不清楚。Kai 等^[31]利用反向遗传技术在基因 VII 型 NDV 强毒株 JS5/05 与基因 IV 型 NDV 强毒株 Herts/33 之间互换 M、F 和 HN 基因, 结果发现 M、F、HN 单基因以及 F 和 HN 双基因替换不如 M、F 和 HN 三基因替换拯救的重组病毒对鸡脾脏造成的免疫损伤强烈。Pantua 等^[32]研究证实了 M 蛋白通过与含 NP 蛋白的 RNP、F 和 HN 蛋白彼此相互作用完成 NDV 病毒粒子的组装, 其中 M 蛋白是核心因素。因此, 综合以上研究结果, 我们可以确定 M 蛋白需要与 F 和 HN 蛋白协同作用才能发挥其毒力作用。

越来越多的研究结果表明, 副黏病毒 M 蛋白是一种多功能病毒蛋白, 不仅在病毒感染后期是子代病毒粒子装配和出芽的主要驱动力, 而且在病毒感染早期的细胞核定位也具有多种重要功能。目前对 RSV 和 MeV M 蛋白细胞核定位的功

能研究报道较多, 研究证实 M 蛋白在细胞核中主要有两个作用^[19-20]: 一是, 通过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; 二是, 在感染早期减少 M 蛋白在细胞质的含量, 直到病毒基因组在细胞质中的复制和转录水平达到一定水平, 才进入细胞质对子代病毒进行装配和释放。但是以上功能在 NDV M 蛋白中还未得到证实。本研究发现 NLS 突变导致的 M 蛋白细胞核定位特征丧失使 NDV 的复制能力显著下降, 我们推测其原因可能与病毒基因组在细胞中的转录水平下降有关, 因为 M 蛋白 NLS 突变体 NDV 感染细胞后病毒基因组编码的 M 蛋白和 GFP 表达量均发生了显著降低。但是 M 蛋白 NLS 突变如何影响 NDV 的复制增殖过程还需要进一步深入研究。总之, 本研究确定了 M 蛋白 NLS 突变可明显降低 NDV 的毒力和复制能力, 这为下一步开展 M 蛋白 NLS 突变对 NDV 基因组复制转录、病毒装配和出芽的影响, 筛选和分析 M 蛋白 NLS 突变型和野生型 NDV 感染细胞的差异表达蛋白, 进而阐明 M 蛋白 NLS 突变影响 NDV 复制增殖的作用机制奠定了重要基础。

参考文献

- [1] Duan ZQ, Xu HQ, Ji XQ, Zhao JF. Recombinant Newcastle disease virus-vectored vaccines against human and animal infectious diseases. *Future Microbiology*, 2015, 10(8): 1307-1323.
- [2] Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 2001, 30(5): 439-455.
- [3] Duan ZQ, Hu SL, Liu XF. Function comparison of the matrix protein between Newcastle disease virus and other paramyxoviruses-a review. *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.
- [4] 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.
- [5] Coleman NA, Peebles 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, Ji XQ, Xu HQ, Zhao JF, Xu HX, Hu SL, Liu XF. The nuclear import of Newcastle disease virus matrix protein depends on KPNB1 and Ran protein. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 109–120. (in Chinese) 段志强, 嵇辛勤, 许厚强, 赵佳福, 许海旭, 胡顺林, 刘秀梵. KPNB1 和 Ran 蛋白共同介导新城疫病毒基质蛋白的入核转运. *微生物学报*, 2017, 57(1): 109–120.
- [7] 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.
- [8] Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao ZJ, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, Matsuura Y. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *Journal of Virology*, 2005, 79(6): 3448–3458.
- [9] Sanchez A, Guerrero-Juarez CF, Ramirez J, Newcomb LL. Nuclear localized Influenza nucleoprotein N-terminal deletion mutant is deficient in functional vRNP formation. *Virology Journal*, 2014, 11(1): 155.
- [10] Duan ZQ, Li J, Zhu J, Chen J, Xu HX, Wang YY, Liu HM, Hu SL, Liu XF. A single amino acid mutation, R42A, in the Newcastle disease virus matrix protein abrogates its nuclear localization and attenuates viral replication and pathogenicity. *Journal of General Virology*, 2014, 95(5): 1067–1073.
- [11] Buchholz UJ, Finke S, Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *Journal of Virology*, 1999, 73(1): 251–259.
- [12] Duan ZQ, Ji XQ, Xu HQ, Zhao JF, Xu HX, Hu SL, Liu XF. Rescue of duck-origin virulent Newcastle disease virus from cloned cDNA and stable expression of the red fluorescent protein. *Virology Reports*, 2016, 6: 97–103.
- [13] Duan ZQ. The molecular mechanism of the effects of functional domains mutation in the M protein and the interaction of M protein with cellular nucleolar phosphoprotein B23 on the replication of Newcastle disease virus. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2014. (in Chinese) 段志强. 新城疫病毒 M 蛋白功能结构域突变以及 M 蛋白与细胞核磷蛋白 B23 互作影响病毒复制的分子机制. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2014.
- [14] 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.
- [15] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 1938, 27(3): 493–497.
- [16] Sohn SY, Hearing P. Adenovirus early proteins and host sumoylation. *mBio*, 2016, 7(5): e01154–16.
- [17] McEwan DG. Host-pathogen interactions and subversion of autophagy. *Essays in Biochemistry*, 2017, 61(6): 687–697.
- [18] Lee C, Hodgins D, Calvert JG, Welch SK, Jolie R, Yoo D. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology*, 2006, 346(1): 238–250.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Watkinson RE, Lee B. Nipah virus matrix protein: expert hacker of cellular machines. *FEBS Letters*, 2016, 590(15): 2494–2511.
- [22] Mok BW, Liu H, Chen P, Liu S, Lau SY, Huang X, Liu YC, Wang P, Yuen KY, Chen H. The role of nuclear NS1 protein in highly pathogenic H5N1 influenza viruses. *Microbes and Infection*, 2017, 19(12): 587–596.
- [23] Bailer SM, Haas J. Connecting viral with cellular interactomes. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(4): 453–459.
- [24] 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.
- [25] Lopez-Denma AJ, Mackenzie JM. The importance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, 2017, 9: 14.
- [26] Samal S, Kumar S, Khattar SK, Samal SK. A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. *Journal of General Virology*, 2011, 92(10): 2333–2338.
- [27] Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, Peeters BP. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Veterinary Research*, 2011, 42(1): 122.
- [28] Dortmans JCFM, Rottier PJM, Koch G, Peeters BPH. The viral replication complex is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 2010, 84(19): 10113–10120.
- [29] Duan ZQ, Hu ZL, Zhu J, Xu HX, Chen J, Liu HM, Hu SL, Liu XF. Mutations in the FPIV motif of Newcastle disease virus matrix protein attenuate virus replication and reduce virus budding. *Archives of Virology*, 2014, 159(7): 1813–1819.
- [30] Hu ZL, Hu J, Hu SL, Liu XW, Wang XQ, Zhu J, Liu XF.

- Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIIId Newcastle disease virus. *Virology Journal*, 2012, 9(1): 208.
- [31] Kai Y, Hu ZL, Xu HX, Hu SL, Zhu J, Hu J, Wang XQ, Liu XW, Liu XF. The M, F and HN genes of genotype VIIId Newcastle disease virus are associated with the severe pathological changes in the spleen of chickens. *Virology Journal*, 2015, 12(1): 133.
- [32] Pantua HD, McGinnes LW, Peebles ME, Morrison TG. Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles. *Journal of Virology*, 2006, 80(22): 11062–11073.

Nuclear localization signal mutation in the M protein attenuates the virulence and replication of duck-origin Newcastle disease virus

Zhiqiang Duan^{1,2*}, Xinqin Ji^{1,2}, Shanshan Deng², Yan Hu², Jiafu Zhao^{1,2}, Mengmeng Ni^{1,2}

¹ Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in The Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

² College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Abstract: **[Objective]** This study aimed to investigate the effect of nuclear localization signal (NLS) mutation in the M protein on the virulence and replication of duck-origin Newcastle disease virus (NDV). **[Methods]** The target fragment owning M/NLS mutation was obtained by overlap PCR method and then used to replace the corresponding region of pNDV/SS1GFP to construct pNDV/SS1GFP-M/NLSm. The M/NLS mutant virus rSS1GFP-M/NLSm was rescued by reverse genetics technology and identified by hemagglutination (HA) assay, fluorescence assay and sequencing analysis of the M gene. The subcellular localization of M protein, biological characteristics, plaque formation ability and proliferation ability of the rescued virus were also detected. **[Results]** The full-length plasmid pNDV/SS1GFP-M/NLSm was successfully constructed. The allantoic fluid obtained from the first generation had no HA titer, but the HA titer of the rescued virus was detected after three extra chicken egg passages. The results of fluorescence assay and M gene sequencing demonstrated that the rescued virus was rSS1GFP-M/NLSm. In comparison to the parental virus rSS1GFP, the M protein of rSS1GFP-M/NLSm mainly localized in the cytoplasm. In addition, the virulence, the replication ability and the plaque formation capacity of rSS1GFP-M/NLSm were obviously reduced. Moreover, the cytopathic effect and the expression of M protein and green fluorescent protein in rSS1GFP-M/NLSm-infected cells were also markedly decreased, indicating that the *in vitro* proliferation ability of duck-origin NDV was inhibited by M/NLS mutation. **[Conclusion]** The disruption of M's nuclear localization caused by M/NLS mutation could obviously attenuate the virulence and replication of duck-origin NDV.

Keywords: Newcastle disease virus, M protein, nuclear localization, nuclear localization signal, virus replication

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760732 and 31502074), by the Science and Technology Fund of Guizhou Province (QKHJ-2015-2054) and by the Scientific Research Project of Guizhou University Talents Fund (GDRJHZ-2014-10)

*Corresponding author. Tel: +86-851-88298005; E-mail: zqduan@gzu.edu.cn

Received: 8 December 2017; Revised: 31 January 2018; Published online: 19 March 2018