



# 禽传染性支气管炎病毒 Nsp2 蛋白与宿主蛋白 eIF2 $\alpha$ 的互作鉴定

李念灵<sup>1#</sup>, 李永新<sup>1#</sup>, 樊顺怡<sup>1</sup>, 申玉玺<sup>1</sup>, 李淑芸<sup>1</sup>, 夏静<sup>1</sup>, 王安东<sup>1</sup>, 崔敏<sup>1</sup>, 韩新锋<sup>1</sup>, 黄勇<sup>1\*</sup>, 余松城<sup>2</sup>

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 眉山市东坡区农业农村局, 四川 眉山 620010

李念灵, 李永新, 樊顺怡, 申玉玺, 李淑芸, 夏静, 王安东, 崔敏, 韩新锋, 黄勇, 余松城. 禽传染性支气管炎病毒 Nsp2 蛋白与宿主蛋白 eIF2 $\alpha$  的互作鉴定. 微生物学报, 2022, 62(10): 4047–4056.

Li Nianling, Li Yongxin, Fan Shunyi, Shen Yuxi, Li Shuyun, Xia Jing, Wang Andong, Cui Min, Han Xinfeng, Huang Yong, Yu Songcheng. Identification of eIF2 $\alpha$  interacting with Nsp2 protein of avian infectious bronchitis virus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 4047–4056.

**摘要:** Nsp2 蛋白是冠状病毒的非结构蛋白, 在病毒早期感染中具有重要作用。【目的】为初步筛选可能与禽传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus, IBV) Nsp2 蛋白互作的宿主蛋白, 鉴定 Nsp2 蛋白与真核翻译起始因子 2 $\alpha$  亚基(eIF2 $\alpha$ )的相互作用。【方法】以 pCAGGs-Flag-Nsp2 和 pCAGGs-Flag 载体转染后的鸡胚肾(CEK)细胞为研究对象, 利用免疫共沉淀(Co-IP)和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术筛选出可能与 IBV Nsp2 蛋白发生互作的宿主蛋白 eIF2 $\alpha$ , 通过免疫共沉淀和间接免疫荧光试验进一步验证二者相互作用。【结果】经免疫共沉淀与质谱分析后筛选到 97 个可能与 Nsp2 蛋白互作的宿主蛋白, 其中宿主抗病毒反应的关键蛋白 eIF2 $\alpha$  与 Nsp2 蛋白的相互作用通过免疫共沉淀和间接免疫荧光试验, 表明二者存在直接互作关系, 并共定位于细胞质中; 此外, Nsp2 蛋白表达和 IBV 感染都能显著提高宿主内源性 eIF2 $\alpha$  的转录水平。【结论】利用免疫共沉淀联合质谱技术筛选到 CEK 细胞中存在的 97 种可能与 IBV Nsp2 互作的候选蛋白, 利用免疫共沉淀与间接免疫荧光证明候选蛋白 eIF2 $\alpha$  与 Nsp2 蛋白在细胞质中存在

**基金项目:** “长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRTO848)

Supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRTO848)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: hyong601@163.com

Received: 28 February 2022; Revised: 9 May 2022; Published online: 10 June 2022

直接交互,同时发现 Nsp2 蛋白过表达和 IBV 感染会导致 CEK 细胞内 eIF2 $\alpha$  的转录水平显著增强。本研究为进一步探索冠状病毒非结构蛋白 Nsp2 的生物学功能奠定了基础,并提供了 IBV 入侵宿主时 Nsp2 蛋白的作用机制研究的新线索。

**关键词:** 禽传染性支气管炎病毒; Nsp2 蛋白; 质谱; 免疫共沉淀; 互作蛋白; eIF2 $\alpha$

## Identification of eIF2 $\alpha$ interacting with Nsp2 protein of avian infectious bronchitis virus

LI Nianling<sup>1#</sup>, LI Yongxin<sup>1#</sup>, FAN Shunyi<sup>1</sup>, SHEN Yuxi<sup>1</sup>, LI Shuyun<sup>1</sup>, XIA Jing<sup>1</sup>, WANG Andong<sup>1</sup>, CUI Min<sup>1</sup>, HAN Xinfeng<sup>1</sup>, HUANG Yong<sup>1\*</sup>, YU Songcheng<sup>2</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Dongpo Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Meishan 620010, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] Nonstructural protein Nsp2 of coronavirus plays a critical role in the early viral life cycle. [Objective] To explore the host proteins interacting with avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus (IBV) Nsp2 and the interaction of Nsp2 with translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). [Methods] We performed the experiment by using the chicken embryo kidney (CEK) cells transfected with recombinant expression vector pCAGGs-Flag-Nsp2 and control vector pCAGGs-Flag. The host cell eIF2 $\alpha$  interacting with IBV Nsp2 was obtained by co-immunoprecipitation (Co-IP) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and then Co-IP and indirect immunofluorescence assay (IFA) were further used to determine the interaction. [Results] A total of 97 candidate proteins were found to interact with Nsp2 through Co-IP and LC-MS/MS, with a high credibility. The key candidate protein eIF2 $\alpha$  was further chosen to explore its interaction with Nsp2. The Co-IP and IFA demonstrated that eIF2 $\alpha$  and Nsp2 had a direct interrelationship and co-localized in the cytoplasm. Furthermore, the level of eIF2 $\alpha$  was upregulated in the overexpression of Nsp2 and IBV-infected CEK cells at the early stage. [Conclusion] In our study, the identification of these candidate proteins interacting with Nsp2 showed that Nsp2 played an important role in IBV infection by manipulating a variety of cellular biological process, and these results provided the basis for further research on the role of Nsp2 in the life cycle of IBV.

**Keywords:** avian infectious bronchitis virus; nonstructural protein Nsp2; mass spectrometry; co-immunoprecipitation; protein-protein interaction; eIF2 $\alpha$

禽传染性支气管炎病毒(avian infectious bronchitis virus, IBV)属冠状病毒科(Coronaviridae)、 $\gamma$ 冠状病毒属(Gammacoronavirus),能够引起鸡的急性、高度接触性传染疾病,最早在1937年感染支气管炎的鸟类中首次发现,至今已有84年的历史,目前在世界多个地区广泛分布,

感染不同品种和不同日龄的鸡后均可发病,目前尚未得到有效控制,已经给世界家禽业带来了严重的经济损失。

IBV呈典型冠状病毒形态,病毒粒子多呈球形,主要由纤突蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)、小膜蛋白(envelope, E)、核衣

壳蛋白(nucleocapsid, N)组成,基因组为连续不分节段单股正链 RNA,基因组全长为 27.6 kb 左右,其基因组 3'端的约 1/3 部分主要编码结构蛋白 S、M、E、N。5'端约 2/3 部分为复制酶基因组,其中包含 2 个关键开放阅读框(open reading frame, ORF) ORF1a 和 ORF1b,翻译后产生病毒复制和翻译所必需的两个多聚蛋白 PP1a 和 PP1ab,这两个多聚蛋白可裂解为 IBV 的 15 个非结构蛋白 Nsp2–Nsp16。与其他冠状病毒不同,IBV 无 Nsp1 蛋白。Nsp2 蛋白是冠状病毒之间差异最大的非结构蛋白之一,却稳定存在于冠状病毒中。已有学者证明 Nsp2 的缺失会导致病毒滴度减少 90%<sup>[1]</sup>,说明 Nsp2 蛋白是冠状病毒的重要毒力因子之一,但仅有研究分析 Nsp2 蛋白可能是早期病毒感染的重要蛋白<sup>[2]</sup>,而其具体功能尚不清楚。目前,通过互作网络分析发现冠状病毒 Nsp2 蛋白与大量宿主蛋白之间存在相互作用,比如宿主蛋白 prohibition 1 和 prohibition 2 (PHBI 和 PHB2)<sup>[3]</sup>,PHBI 和 PHB2 在细胞凋亡、细胞分化等生物过程中具有重要作用。SARS-CoV 2 的 Nsp2 蛋白互作研究表明,与 Nsp2 蛋白互作的宿主蛋白参与了核糖体组装、调节细胞内钙离子稳态等生物学过程<sup>[4]</sup>,已经证明 Nsp2 蛋白与调节翻译起始的蛋白 GIGYF2 和 EIF4E2 存在相互作用,此互作现象在 SARS-COV 和 MERS-COV 中也有发现<sup>[5]</sup>。这些研究结果表明冠状病毒的 Nsp2 蛋白可能在病毒感染早期参与宿主的翻译过程影响蛋白合成。

本研究采用免疫共沉淀联合质谱技术初步筛选出了鸡胚肾细胞(chicken embryo kidney, CEK)内 97 个可能与 IBV Nsp2 蛋白互作的宿主蛋白,基于已有研究证实真核翻译起始因子 2 的  $\alpha$  亚基(eIF2 $\alpha$ )是 IBV 的靶向因子<sup>[6]</sup>,但其互作的病毒蛋白并未得到验证,因此挑选出了宿主控制翻译的关键蛋白-eIF2 $\alpha$  作为候选蛋白,

利用免疫共沉淀与间接免疫荧光证明候选蛋白 eIF2 $\alpha$  与 Nsp2 蛋白在细胞质中存在直接互作,同时发现 Nsp2 蛋白表达和 IBV 感染会导致细胞内 eIF2 $\alpha$  的转录水平显著增强。实验结果将为阐明 IBV 在 CEK 内复制机制的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒与细胞

IBV Sczy3 强毒株为实验室保存;CEK 细胞由 17–20 日龄的鸡胚制备;HEK-293T 细胞为实验室保存,重组质粒 pCAGGs-Flag-Nsp2 为实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

STARPremix Ex Tap<sup>TM</sup> II (Til RNaseH Plus) 等购自 TaKaRa 公司;E.Z.N.A<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司;Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Reagent 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;NP-40 裂解液等购自碧云天生物技术公司;标签抗体 Mouse anti Flag 购自北京全式金公司;标签抗体 Rabbit anti MYC、Rabbit anti Flag 等购自 Affinity 公司;HRP-羊抗兔 IgG 购自 Proteintech 公司;Protein A/G 琼脂糖珠购自 Santa 公司;免疫共沉淀试剂盒购自广州辉骏生物公司。

### 1.2 免疫共沉淀筛选互作蛋白

将 CEK 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。待细胞密度至 70%–90%时,以 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Reagent 将 pCAGGs-Flag-Nsp2 质粒转染 CEK,转染后 36 h 收集细胞,以部分上清做 Input,其余上清进行免疫共沉淀试验。同时将 pCAGGs-Flag 空载体作为对照组。具体操作参见免疫共沉淀试剂盒说明书。将上述样品进行 10% SDS-PAGE,银染法对凝胶进行染色。

### 1.3 质谱分析

将实验组和对照组免疫沉淀后的样品经还原、烷基化、酶解等过程后,进行 LC-MS/MS 分析,得到的质谱原始数据用软件 ProteinPilot™ Software 4.5 (version 1656, AB Sciex)进行分析并在 UniProt chlorocebus 数据库中检索对比,经实验组与对照组结果比对差异蛋白后确定可能与 IBV Nsp2 蛋白相互作用的候选细胞内源性蛋白。

### 1.4 重组质粒的构建

提取 CEK 细胞总 RNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增 eIF2 $\alpha$  基因。上游引物 F:5'-CGATCTTAAGTCGCGAATGCCAGCACTAAGCTGTAG-3'; 下游引物 R:5'-TGAGATGAGTTTTTGTTCGTCTTCAGTTTTTCGCTTCCA-3'。PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, Mix 10  $\mu$ L, cDNA (50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 10 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。回收目的片段后利用同源重组法将获得的基因片段插入 pCAGGs-Myc 载体中,经菌落 PCR、双酶切及测序鉴定阳性质粒,命名为 pCAGGs-Myc-eIF2 $\alpha$ 。

### 1.5 免疫共沉淀鉴定蛋白互作

培养 HEK-293T 细胞的细胞密度至 80%时,将 pCAGGs-Flag-Nsp2、pCAGGs-MYC-eIF2 $\alpha$  质粒共转染 CEK 细胞,且分别设置 pCAGGs-Flag-Nsp2、pCAGGs-Myc 共转染组和 pCAGGs-Flag、pCAGGs-MYC-eIF2 $\alpha$  共转染组作为对照,具体操作参照 Lipofectamine™ 3000 Reagent 转染试剂说明书。转染后 36 h 弃除上清,收集细胞;加入 NP-40 裂解液冰浴 30 min,于 4  $^{\circ}$ C 以 8 000 $\times$ g 离心 10 min,收集上清,取部分上清做 Input,其余上清加入鼠抗 Flag 标签的单克隆抗体(1:500 倍稀释),4  $^{\circ}$ C 旋转孵育 12 h,加入经细胞裂解液平衡的 20  $\mu$ L 的 Protein

A/G, 4  $^{\circ}$ C 旋转孵育 12 h。用 1 mL 冷的裂解液清洗,2 500 r/min 离心 5 min,弃上清,反复 4 次,收集琼脂糖珠沉淀,向其中加入 20  $\mu$ L 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,100  $^{\circ}$ C,煮沸 10 min。

Input 样品及 Co-IP 样品通过 SDS-PAGE 电泳后,转印至 PVDF 膜,经含 10%脱脂乳的 TBST 缓冲液 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜,兔源抗 Flag 标签的多抗、兔源抗 Myc 标签多抗为一抗,羊抗兔 HRP-IgG 为二抗进行 Western blotting 鉴定。

### 1.6 间接免疫荧光(IFA)分析蛋白互作

将 CEK 细胞接种于铺有飞片的 12 孔板中,待细胞生长至 80%汇合,将 pCAGGs-Flag-Nsp2 与 pCAGGs-Myc-eIF2 $\alpha$  质粒共转染至 CEK 细胞,同时设立对照组。36 h 后,磷酸缓冲液清洗细胞,重复 3 次后,5%多聚甲醛固定细胞 15 min、0.1% Triton X-100 的 PBS 室温透化细胞 15 min、1%牛血清白蛋白于室温封闭 1 h;以兔源抗 Myc 标签和鼠抗 Flag 标签单克隆抗体为一抗(1:500 倍稀释),488 山羊抗鼠、594 山羊抗兔为二抗(1:500 倍稀释)进行孵育;即用型 DAPI 细胞核荧光染料,200  $\mu$ L/孔室温作用 5 min;PBS 清洗细胞 3 次,双蒸水漂洗 1 次,晾干并封片,荧光显微镜下观察。

### 1.7 相对荧光定量 PCR 检测细胞内源性 eIF2 $\alpha$ 转录水平变化

将 CEK 细胞培养至密度 85%,转染 pCAGGs-Flag-Nsp2 质粒,24 h 后孵育 IBV 病毒液(病毒感染复数 MOI=0.4),同时设立对照组。分别于感染 IBV 后 2、8、12、24 h 收取细胞提取 mRNA,利用反转录试剂盒得到 cDNA,进行实时荧光定量 PCR 扩增,检测各组细胞内 eIF2 $\alpha$  的 mRNA 表达水平变化。各组均设 3 个复孔。采用 *GADPH* 作为内参基因,以 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法表示目的基因的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物、反应程序参考文献[7-8]。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫共沉淀样品的质谱分析

将前期构建好的重组质粒 pCAGGs-Flag-Nsp2 转染 CEK 细胞 36 h 后, 收集细胞样品, 留取部分样品, 通过 Western blotting 检测 Input 组 Nsp2 蛋白的表达水平(图 1A)。其余样品进行免疫沉淀实验, 取 Co-IP 试验的部分样品进行 Western blotting 检测, SDS-PAGE 电泳, 对凝胶进行银染显色。通过 Western blotting 检测结果显示 Co-IP 试验中实验组有大小约 77.5 kDa 的特异性条带, 而对照组没有该条带(图 1A), 符合实验预期, 说明 Flag 标签单抗与 ProteinA/G 琼脂糖珠结合成功。从凝胶上可以清晰地看到: 与对照组相比, 免疫沉淀后, 实验组存在 5 条特异性条带, 分别在 34–43、43–55、75–130 kDa 分布(图 1B)。将 Co-IP 样品经 LC-MS/MS 质谱分析后, 实验组与空载体细

胞对照相比, 去除空载体细胞对照鉴定到的蛋白, 实验组共鉴定出可信度在 95% 以上有 242 个细胞内源性蛋白, 将其中唯一肽段数量  $\geq 2$  的 97 个细胞内源性蛋白作为候选蛋白(表 1), 包含与宿主抗病毒反应的关键蛋白的真核翻译起始因子 2 $\alpha$  亚基 EIF2S1 (eIF2 $\alpha$ )。

### 2.2 Co-IP 验证 eIF2 $\alpha$ 与 Nsp2 蛋白的相互作用

大多数病毒感染后会引发宿主关闭蛋白的合成来限制病毒复制, 其中真核翻译起始因子 eIF2 $\alpha$  对细胞整体翻译水平有较强的调控作用。为了研究鉴定到的 eIF2 $\alpha$  因子是否与 Nsp2 蛋白存在特异性相互作用, 成功构建带有 Myc 标签的重组质粒 pCAGGs-Myc-eIF2 $\alpha$ , 将携带 Flag 标签的 Nsp2 和携带 Myc 标签的 eIF2 $\alpha$  真核表达质粒共转染或与空载体共转染 HEK-293T 细胞, 收取蛋白并分别利用针对 Flag 和 Myc 标签的抗体进行 Co-IP 试验。Western blotting 结果

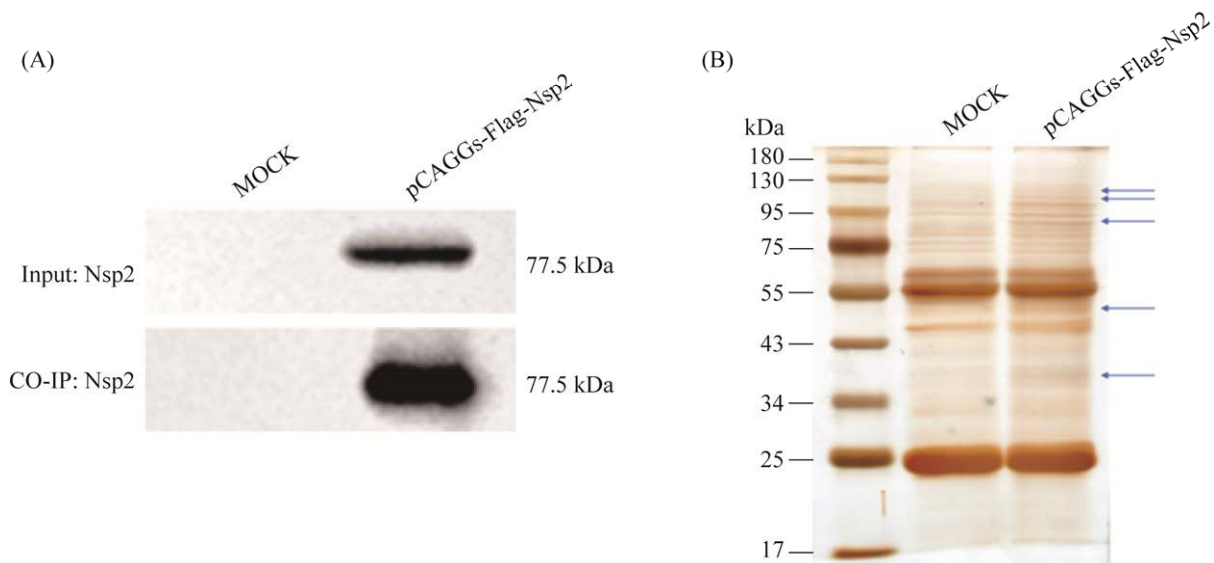


图 1 Co-IP 分析细胞内与 Nsp2 蛋白相互作用的蛋白

Figure 1 Identification of the cellular proteins that interact with Nsp2 protein by Co-IP. A: the expression of Nsp2 detected by Western blotting in Input and Co-IP; B: silver staining of the different proteins immunoprecipitated by Flag antibody in mock or the expression of Nsp2 cells. Arrows: differential protein bands identified in the expression of Nsp2 group compared to mock-infected controls.

表 1 与 Nsp2 蛋白互作的宿主细胞蛋白  
Table 1 The host cellular proteins interacting with Nsp2

Accession	Gene name	Unused	Sequence coverage/ %	Peptides (95%)	Accession	Gene name	Unused	Sequence coverage/ %	Peptides (95%)
A0A3Q2U9M2	FLNB	35.6	10.4	18	E1C3A9	HDLBP	4.0	3.5	2
Q5ZMT0	YWHAE	15.0	40.8	7	A0A1D5PKV6	XYLB	4.0	9.6	2
A0A1D5P198	LOC100859737	11.7	21.7	8	F1NLE7	AIMP1	4.0	10.7	2
R4GM10	ALDOC	9.3	20.9	5	Q5ZMB8	PSMC2	4.0	5.5	2
P12003	VCL	8.8	10.8	5	F1NMT5	RAB10	4.0	11.5	2
O42486	Bcat	8.2	10.1	4	E1BSG5	EIF4G1	4.0	1.8	2
Q5ZKF3	AARS	8.1	10.1	5	A0A452J7V2	RAB2A	4.0	15.0	2
F1NK38	CCT7	8.0	10.5	4	A0A1D5PAU7	ACY1	4.0	6.5	2
F1NZY9	CYB5R1	7.2	20.6	3	F2Z4K6	RPL26L1	3.9	25.5	3
F1NMY1	YWHAG	7.0	23.5	4	Q5ZJX9	PSMA5	3.9	9.5	2
F1NHL2	CAND1	6.9	4.6	3	A0A1D5PQD8	PPP1R9B	3.9	4.1	2
A0A1D5PIZ8	IQGAP3	6.9	4.6	3	Q5ZMA0	RCJMB04_2m6	3.9	17.7	2
E1C784	ATP2B4	6.9	7.5	4	A0A1D5PPF8	HSPA4	3.8	6.0	2
F1NKL4	DYNC1H1	6.6	2.2	4	<b>Q5ZLX2</b>	<b>EIF2S1</b>	<b>3.8</b>	<b>9.5</b>	<b>2</b>
A0A1L1RKB7	ATP2A2	6.5	7.8	4	F1NTM7	GOT1	3.8	6.1	2
Q8AYP7	HK2	6.2	5.2	3	F1NSP7	PSMC1	3.8	9.1	2
Q5ZJQ6	DARS	6.1	14.7	3	Q5ZMR2	RCJMB04_1g10	3.7	5.6	2
Q90XD9	N/A	6.0	7.6	3	A0A1D5PK28	STXBP1	3.7	7.1	2
E1C8W4	USP5	6.0	6.7	3	Q90828	DYNC1LI1	3.7	8.3	2
E1C347	GNAO1	6.0	11.3	3	P0DMQ6	SORD	3.6	7.3	2
A0A3Q2UK59	LOC107051050	6.0	7.7	4	F1NL85	MAGT1	3.5	5.8	2
A0A452J848	RPL13	5.9	19.6	3	Q5ZMK3	SCCPDH	3.5	9.0	2
A0A1L1RMC0	PSMA1	5.8	17.6	3	F1NPF0	EIF2S3	3.4	21.2	2
F1NB64	ACAA1	5.7	6.7	3	Q5F3C0	RCJMB04_22h1	3.3	3.2	2
E1BZ74	AFG3L2	5.5	6.7	5	O93467	cRhoA	3.3	21.8	2
Q9I8D6	tcp-1 delta	5.5	10.1	3	E1C1D1	ANXA7	3.2	4.4	2
F1NPJ4	SDHA	5.3	11.0	2	F1NDD1	SFXN2	3.2	7.8	2
Q5ZJ93	RCJMB04_19o8	5.3	8.8	3	Q5ZLV5	RCJMB04_419	3.1	9.1	2
A0A452J864	CAPZB	4.9	19.2	3	F1NT20	ACAT2	3.1	7.9	2
Q5ZI39	PLS3	4.8	7.6	2	F1NSV6	ATP1B1	3.1	10.5	2
Q5F424	CCT2	4.7	6.4	3	F1P3U1	IMMT	3.1	4.6	2
Q5ZJ86	RCJMB04_20b9	4.7	4.4	2	Q5ZIA5	COPB1	3.0	3.6	2
Q5ZJJ3	RCJMB04_17k23	4.6	13.2	2	Q5ZM80	RCJMB04_2o15	2.9	6.2	2
Q5F428	EIF3L	4.6	7.6	2	A0A1L1RKS2	FASN	2.7	1.6	2
Q5ZLZ6	SLC16A1	4.5	11.8	2	Q5ZLZ0	RCJMB04_4e21	2.6	12.5	2
E1C245	MACF1	4.5	1.9	2	A0A1D5P1W7	KPNB1	2.6	3.2	2
E1C3A1	KIF5B	4.4	4.1	2	E1BQU4	NSF	2.5	3.1	2
P50890	RPSA	4.3	13.9	2	A0A3Q2TWD9	GNAS	2.3	12.7	2

(待续)

(续表 1)

F1P180	GOT2	4.2	16.3	2	F1NPG2	IDH1	2.3	4.8	2
A0A3Q2UA96	CCT3	4.2	10.2	2	A0A452J7S4	MDH1	2.1	4.7	2
A0A3Q3B025	LIMA1	4.2	14.3	3	A0A1D5PX68	SLC25A1	2.0	9.7	2
F1NEF2	CCT8	4.1	10.2	3	A0A1L1RZJ6	ATP5A1W	2.0	31.8	16
A0A1D5NXL7	PSMD3	4.1	6.4	2	P32882	N/A	2.0	21.3	8
E1C2S1	TLN1	4.1	3.5	2	Q5ZLQ6	YWHAB	2.0	21.3	3
E1C1V3	JUP	4.1	6.0	2	A0A1D5PMQ5	LOC420039	1.8	9.4	5
Q5ZKJ2	YWHAH	4.0	22.7	2	Q9DEA3	PCNA	1.8	13.4	2
A0A1D5PC66	PTCHD3L	4.0	4.9	2	A0A1D5P2Q1	SACM1L	1.7	3.2	2
F1NB52	COPG1	4.0	4.7	2	A0A3Q3A7P6	RPS15A	1.6	6.9	2
E1C6A1	NNT	4.0	5.0	2					

N/A is a protein with unknown function; black bold is the information of eIF2 $\alpha$ .

显示, 携带 Flag 和 Myc 标签的 Nsp2 和 eIF2 $\alpha$  均能获得表达, 利用 Flag 抗体进行免疫共沉淀, Nsp2 可以将 eIF2 $\alpha$  沉淀下来(图 2), 表明 IBV Nsp2 蛋白与 eIF2 $\alpha$  蛋白之间存在直接的相互作用。

### 2.3 IBV Nsp2 蛋白与 eIF2 $\alpha$ 的共定位分析

将重组质粒 pCAGGs-Flag-Nsp2 与 pCAGGs-MYC-eIF2 $\alpha$  共转染至 CEK 细胞, 36 h 后固定细胞, 并用抗 Myc 和抗 Flag 的单克隆抗体作为一抗, 有荧光标记的二抗处理细胞, 最后在活细胞超分辨成像系统下观察。如图 3 所示, eIF2 $\alpha$  与 Nsp2 蛋白主要分布在细胞质中, Nsp2 蛋白与 eIF2 $\alpha$  共定位, 共定位区域呈现黄色, 表明 Nsp2 与 eIF2 $\alpha$  蛋白在细胞质内发生相互作用。

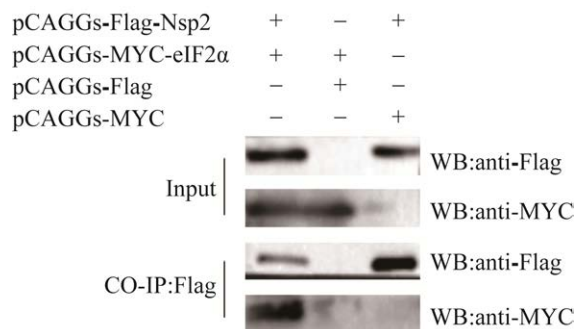


图 2 Nsp2 蛋白与 eIF2 $\alpha$  互作的验证结果

Figure 2 Confirmation of the interaction between the Nsp2 protein and eIF2 $\alpha$ .

### 2.4 Nsp2 蛋白过表达和 IBV 感染对细胞内源性 eIF2 $\alpha$ 转录水平的影响

为探究 Nsp2 及 IBV 对细胞内 eIF2 $\alpha$  表达水平的影响, 将 pCAGGs-Flag-Nsp2 质粒和 pCAGGs-Flag 空载体分别转染 CEK 细胞培养 24 h 后孵育 IBV 病毒液(MOI=0.4), 同时设立未感染 IBV 的 pCAGGs-Flag 空载体对照组, 分别收取感染 IBV 后 2、8、12 和 24 h 的细胞, 应用相对荧光定量 PCR 测定 eIF2 $\alpha$  表达量随时间的变化情况。实验结果如图 4 所示, 未感染 IBV 的 CEK 细胞的 eIF2 $\alpha$  内源性表达量在随时间无明显变化, 同时, 与未感染 IBV 的 CEK 细胞的 eIF2 $\alpha$  内源性表达量进行对比, 感染 IBV 的 CEK 细胞的 eIF2 $\alpha$  内源性表达量在 8、12 h 均呈现极显著上调, 而在 2、24 h 无显著性差异, 说明 IBV 在感染早期能提高细胞内源性 eIF2 $\alpha$  mRNA 的转录水平; 与未过表达 Nsp2 蛋白的 IBV 感染的 CEK 细胞的 eIF2 $\alpha$  内源性表达量进行对比, 过表达 Nsp2 蛋白基础上再感染 IBV 的 CEK 细胞的 eIF2 $\alpha$  内源性表达量在 12 h 时呈现极显著上调, 说明 Nsp2 蛋白能够显著提高细胞内源性 eIF2 $\alpha$  mRNA 的转录水平。

## 3 讨论

冠状病毒是能感染人与动物的重要病原体, 具有毁灭性的潜在危害。冠状病毒的非结构蛋白



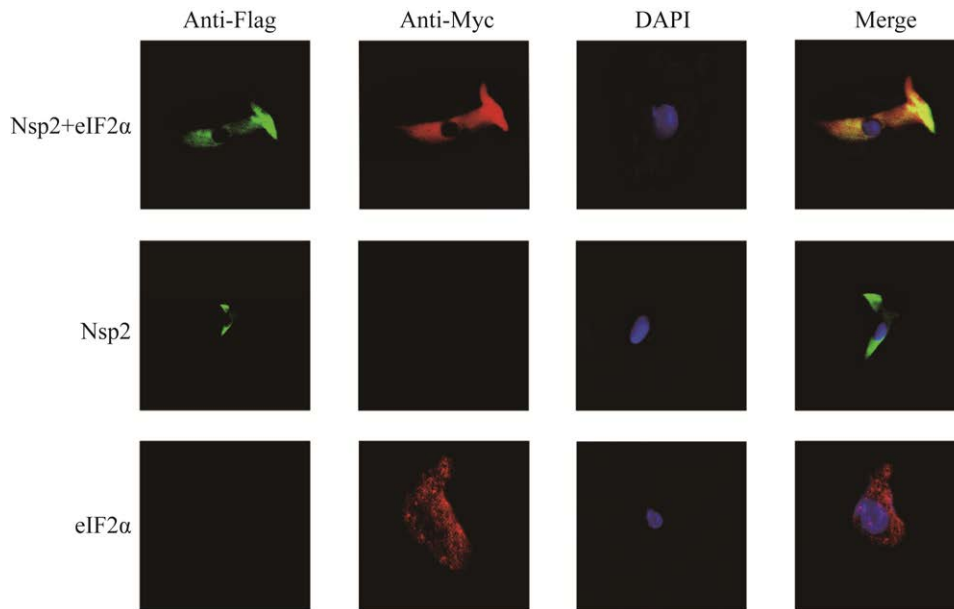


图3 IBV Nsp2 与 eIF2 $\alpha$  的细胞共定位分析

Figure 3 IBV Nsp2 co-localizes with eIF2 $\alpha$ .

是形成病毒复制和转录复合物(replication and transcription complex, RTC), 完成病毒复制、组装与成熟的关键因素, 对冠状病毒至关重要。其中 Nsp2 蛋白是在冠状病毒中首批被翻译和

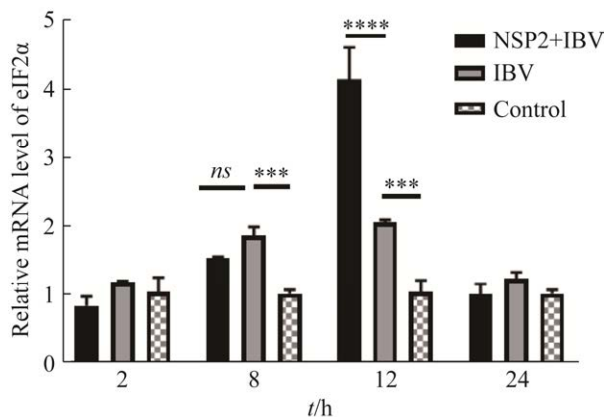


图4 Nsp2 表达和 IBV 感染对细胞内源性 eIF2 $\alpha$  的转录水平的影响

Figure 4 Relative mRNA level of eIF2 $\alpha$  in the expression of Nsp2 and IBV-infected CEK. Data are presented as mean $\pm$ SEM; asterisks indicate *P* values (\*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ ; ns: non-significant) obtained by two-tailed unpaired *t*-tests.

加工的复制蛋白之一, 其能与 RTC 结合<sup>[9]</sup>, 暗示着 Nsp2 可能影响病毒的早期复制。蛋白质序列的进化在很大程度上也决定了病毒-宿主相互作用的差异, Nsp2 蛋白在冠状病毒之间的序列低相似性也可能意味着它在与宿主相互作用中具有宿主特异性<sup>[10]</sup>, 但生物信息学表明冠状病毒的 Nsp2 蛋白有共同的起源, 并且具有一定的保守结构<sup>[5,11]</sup>。因此, 研究 IBV Nsp2 蛋白与宿主蛋白之间的互作可以为解析除了  $\gamma$ -冠状病毒外其他冠状病毒的非结构蛋白的功能提供参考依据。

本研究通过免疫共沉淀联合 LC-MS/MS 质谱技术初步筛选出了宿主内 97 个可能与 IBV Nsp2 蛋白互作的宿主蛋白, 指示 Nsp2 蛋白可能参与了多肽合成、细胞应激等生物学过程, 但此过程仅是初步筛选, 还需进一步对相关蛋白进行验证。其中真核翻译起始因子 eIF2 $\alpha$  能够影响细胞翻译的起始, 控制多肽的合成, 进而调节细胞内应激反应。基于已有研究证实真



核翻译起始因子 2 的  $\alpha$  亚基(eIF2 $\alpha$ )是 IBV 的靶向因子<sup>[6]</sup>,我们选择 eIF2 $\alpha$  作为候选蛋白验证筛选蛋白实验过程的可信性。通过同源重组法构建真核表达载体 pCAGGs-Myc-eIF2 $\alpha$ ,利用 Myc 的标签抗体经过 Western blotting 检测,在转染后能成功地表达目的蛋白。利用 Flag 标签抗体证实 eIF2 $\alpha$  与 Nsp2 可发生免疫共沉淀,二者共定位在细胞质中,表明 IBV Nsp2 蛋白与 eIF2 $\alpha$  存在着直接相互作用。后续进一步证实 Nsp2 蛋白过表达和 IBV 感染会提高宿主内 eIF2 $\alpha$  的表达,可能是由于 IBV 感染早期,细胞应激反应显著,通过增加 eIF2 $\alpha$  的转录来维持细胞内相对稳定的蛋白合成,而 Nsp2 蛋白在其中具有重要作用。

eIF2 $\alpha$  是真核翻译起始因子 2 的  $\alpha$  亚基,是进行翻译起始的关键蛋白。研究表明 eIF2 $\alpha$  能够诱导细胞内应激颗粒的形成,进而关闭蛋白合成和激活天然免疫通路来对抗病毒感染,许多病毒已经进化出相应的逃逸机制。如非洲猪瘟病毒为维持细胞内蛋白合成,会通过 DP71L 蛋白诱导蛋白磷酸酶 1 (PP1)抑制 eIF2 $\alpha$  激活<sup>[12]</sup>;蓝舌病毒(BTV)感染后通过转染 siRNA 证实沉默 eIF2 $\alpha$  会抑制病毒复制<sup>[13]</sup>。由此说明 eIF2 $\alpha$  是病毒干扰宿主抗病毒反应的目标之一。有学者证实过表达 eIF2 $\alpha$  与磷酸化突变 eIF2 $\alpha$  相比提高了 IBV 的复制<sup>[6]</sup>,本研究验证了 Nsp2 蛋白过表达和 IBV 感染会提高宿主内 eIF2 $\alpha$  的转录水平,因此推测在病毒早期感染过程中 IBV 通过 Nsp2 蛋白靶向 eIF2 $\alpha$  提高病毒在细胞内的复制能力。本研究结果将有助于阐明 IBV Nsp2 蛋白在 IBV 侵染宿主过程中的生物学功能提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Graham RL, Sims AC, Brockway SM, Baric RS, Denison MR. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *Journal of Virology*, 2005, 79(21): 13399–13411.
- [2] Yu K, Ming Z, Li Y, Chen C, Bao Z, Ren Z, Liu B, Tao W, Rao Z, Lou Z. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of nonstructural protein 2 (Nsp2) from avian infectious bronchitis virus. *Acta Crystallographica Section F: Structure Biological Crystal Communications*, 2012, 68(Pt 6): 716–719.
- [3] Cornillez-Ty CT, Liao LJ, Yates JR, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *Journal of Virology*, 2009, 83(19): 10314–10318.
- [4] Zheng YX, Wang L, Kong WS, Chen H, Wang XN, Meng QF, Zhang HN, Guo SJ, Jiang HW, Tao SC. Nsp2 has the potential to be a drug target revealed by global identification of SARS-CoV-2 Nsp2-interacting proteins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2021, 53(9): 1134–1141.
- [5] Gupta M, Azumaya CM, Moritz M, Pourmal S, Diallo A, Merz GE, Jang G, Bouhaddou M, Fossati A, Brilot AF, Diwanji D, Hernandez E, Herrera N, Kratochvil HT, Lam VL, Li F, Li Y, Nguyen HC, Nowotny C, Owens TW, Peters JK, Rizo AN, Schulze-Gahmen U, Smith AM, Young ID, Yu ZL, Asarnow D, Billesbølle C, Campbell MG, Chen J, Chen KH, Chio US, Dickinson MS, Doan L, Jin ML, Kim K, Li JR, Li YL, Linossi E, Liu YX, Lo M, Lopez J, Lopez KE, Mancino A, Moss FR, Paul MD, Pawar KI, Pelin A, Pospiech TH, Puchades C, Remesh SG, Safari M, Schaefer K, Sun M, Tabios MC, Thwin AC, Titus EW, Trenker R, Tse E, Tsui TKM, Wang F, Zhang KH, Zhang Y, Zhao JH, Zhou FB, Zhou Y, Zuliani-Alvarez L, Consortium QSB, Agard DA, Cheng YF, Fraser JS, Jura N, Kortemme T, Manglik A, Southworth DR, Stroud RM, Swaney DL, Krogan NJ, Frost A, Rosenberg OS, Verba KA. CryoEM and AI reveal a structure of SARS-CoV-2 Nsp2, a multifunctional protein involved in key host processes. *bioRxiv*, 2021, DOI: 10.1101/2021.05.10.443524.
- [6] Wang XX, Liao Y, Yap PL, Png KJ, Tam JP, Liu DX. Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining *de novo* protein synthesis in virus-infected cells. *Journal of Virology*, 2009, 83(23): 12462–12472.

- [7] Guo HR, Cui HM, Peng X, Fang J, Zuo ZC, Deng JL, Wang X, Wu BY, Chen KJ, Deng J. Nickel chloride (NiCl<sub>2</sub>) induces endoplasmic reticulum (ER) stress by activating UPR pathways in the kidney of broiler chickens. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17508–17519.
- [8] Zhang ZY, Sun MH, Deng JP, Yu JH, Yang XS, Zhao W, Chen GB, Wang PC. Zika virus induced more severe inflammatory response than dengue virus in chicken embryonic livers. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1127.
- [9] Hagemeyer MC, Verheije MH, Ulasli M, Shaltiël IA, de Vries LA, Reggiori F, Rottier PJM, De Haan CAM. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 2134–2149.
- [10] Gordon DE, Hiatt J, Bouhaddou M, Rezeli VV, Ulferts S, Braberg H, Jureka AS, Obernier K, Guo JZ, Batra J, Kaake RM, Weckstein AR, Owens TW, Gupta M, Pourmal S, Titus EW, Cakir M, Soucheray M, McGregor M, Cakir Z, Jang G, O'Meara MJ, Tummino TA, Zhang Z, Foussard H, Rojc A, Zhou Y, Kuchenov D, Hüttenhain R, Xu J, Eckhardt M, Swaney DL, Fabius JM, Ummadi M, Tutuncuoglu B, Rathore U, Modak M, Haas P, Haas KM, Naing ZC, Pulido EH, Shi Y, Barrio-Hernandez I, Memon D, Petsalaki E, Dunham A, Marrero MC, Burke D, Koh C, Vallet T, Silvas JA, Azumaya CM, Billesbølle C, Brilot AF, Campbell MG, Diallo A, Dickinson MS, Diwanji D, Herrera N, Hoppe N, Kratochvil HT, Liu Y, Merz GE, Moritz M, Nguyen HC, Nowotny C, Puchades C, Rizo AN, Schulze-Gahmen U, Smith AM, Sun M, Young ID, Zhao J, Asarnow D, Biel J, Bowen A, Braxton JR, Chen J, Chio CM, Chio US, Deshpande I, Doan L, Faust B, Flores S, Jin M, Kim K, Lam VL, Li F, Li J, Li YL, Li Y, Liu X, Lo M, Lopez KE, Melo AA, Moss FR 3rd, Nguyen P, Paulino J, Pawar KI, Peters JK, Pospiech TH Jr, Safari M, Sangwan S, Schaefer K, Thomas PV, Thwin AC, Trenker R, Tse E, Tsui TKM, Wang F, Whittis N, Yu Z, Zhang K, Zhang Y, Zhou F, Saltzberg D; QCRG Structural Biology Consortium, Hodder AJ, Shun-Shion AS, Williams DM, White KM, Rosales R, Kehrer T, Miorin L, Moreno E, Patel AH, Rihn S, Khalid MM, Vallejo-Gracia A, Fozouni P, Simoneau CR, Roth TL, Wu D, Karim MA, Ghousaini M, Dunham I, Berardi F, Weigang S, Chazal M, Park J, Logue J, McGrath M, Weston S, Haupt R, Hastie CJ, Elliott M, Brown F, Burness KA, Reid E, Dorward M, Johnson C, Wilkinson SG, Geyer A, Giesel DM, Baillie C, Raggett S, Leech H, Toth R, Goodman N, Keough KC, Lind AL; Zoonomia Consortium, Klesh RJ, Hemphill KR, Carlson-Stevermer J, Oki J, Holden K, Maures T, Pollard KS, Sali A, Agard DA, Cheng Y, Fraser JS, Frost A, Jura N, Kortemme T, Manglik A, Southworth DR, Stroud RM, Alessi DR, Davies P, Frieman MB, Ideker T, Abate C, Jouvenet N, Kochs G, Shoichet B, Ott M, Palmarini M, Shokat KM, García-Sastre A, Rassen JA, Grosse R, Rosenberg OS, Verba KA, Basler CF, Vignuzzi M, Peden AA, Beltrao P, Krogan NJ. Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms. *Science*, 2020, 370(6521).
- [11] Neuman BW, Chamberlain P, Bowden F, Joseph J. Atlas of coronavirus replicase structure. *Virus Research*, 2014, 194: 49–66.
- [12] Barber C, Netherton C, Goatley L, Moon A, Goodbourn S, Dixon L. Identification of residues within the African swine fever virus DP71L protein required for dephosphorylation of translation initiation factor eIF2 $\alpha$  and inhibiting activation of pro-apoptotic CHOP. *Virology*, 2017, 504: 107–113.
- [13] Lv S, Sun EC, Xu QY, Zhang JK, Wu DL. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy contributes to bluetongue virus infection via the PERK-eIF2 $\alpha$  pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 466(3): 406–412.