



猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 Nsp8 与宿主细胞互作蛋白的筛选与鉴定

涂赞¹, 于瑞明¹, 张莉萍², 王永录², 潘丽², 刘霞¹, 杜晓华^{1*}, 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

涂赞, 于瑞明, 张莉萍, 王永录, 潘丽, 刘霞, 杜晓华, 刘新生. 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 Nsp8 与宿主细胞互作蛋白的筛选与鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3932-3944.

TU Yun, YU Ruiming, ZHANG Liping, WANG Yonglu, PAN Li, LIU Xia, DU Xiaohua, LIU Xinsheng. Screening and identification of host proteins interacting with Nsp8 of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3932-3944.

摘要: 猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是一种能引起严重腹泻、脱水的肠道病毒, PEDV 的广泛流行对生猪养殖产业造成巨大经济损失, 目前仍无有效的预防和治疗手段。Nsp8 是一种参与 PEDV 复制的重要非结构蛋白, 其存在相互作用的宿主蛋白尚不清楚。【目的】筛选与 PEDV Nsp8 互作宿主蛋白, 初步探究互作宿主蛋白对 PEDV 复制的影响, 为寻找 PEDV 新的关键性治疗靶点提供理论基础。【方法】利用真核表达载体 pcDNA3.1(+)成功构建 PEDV Nsp8 真核表达质粒, 通过免疫共沉淀、质谱分析及激光共聚焦等技术筛选能够与其相互作用的宿主蛋白, 进一步在 LLC-PK 细胞中通过过表达、敲低等方法探究互作宿主蛋白对 PEDV 复制的影响。【结果】质谱检测筛选到 Nsp8 潜在互作宿主蛋白 36 个, 验证了宿主蛋白热休克蛋白成员 8 (heat shock protein member 8, HSPA8)与 Nsp8 相互作用, 在 LLC-PK 细胞中过表达 HSPA8 能够剂量依赖性抑制 Nsp8 蛋白过表达, 而且在蛋白质和转录水平显著剂量依赖性抑制 PEDV 复制; 干扰内源性 HSPA8 表达能够显著促进 PEDV 复制, TCID₅₀ 和间接免疫荧光试验检测(indirect immunofluorescent assay, IFA)结果进一步证明了 HSPA8 抑制 PEDV 复制。【结论】本研究筛选出 PEDV Nsp8 的互作宿主蛋白 HSPA8, 并且证明 HSPA8 能显著抑制 PEDV 复制, 为设计以 HSPA8 为靶点的预防或治疗药物提供新思路。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; Nsp8; 免疫共沉淀技术; HSPA8

资助项目: 国家生猪技术创新中心项目(NCTIP-XD/C 03)

This work was supported by the National Center of Technology Innovation for Pigs Project (NCTIP-XD/C 03).

*Corresponding authors. E-mail: DU Xiaohua, duxh@gsau.edu.cn; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2024-04-15; Accepted: 2024-06-11; Published online: 2024-06-18

Screening and identification of host proteins interacting with Nsp8 of porcine epidemic diarrhea virus

TU Yun¹, YU Ruiming¹, ZHANG Liping², WANG Yonglu², PAN Li², LIU Xia¹, DU Xiaohua^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

1 College of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is an enterovirus that can cause severe diarrhea and dehydration. The widespread epidemic of PEDV has caused huge economic losses to the pig breeding industry, which, however, lacks effective means for prevention and treatment. Nsp8 is an important non-structural protein involved in the replication of PEDV, while the host proteins interacting with Nsp8 remains unclear. **[Objective]** To screen the host proteins interacting with PEDV Nsp8 and explore the effects of the host proteins on the replication of PEDV, so as to provide a theoretical basis for discovering new key functional receptors or therapeutic targets of PEDV. **[Methods]** The eukaryotic expression plasmid of PEDV Nsp8 was successfully constructed with the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The host proteins interacting with PEDV Nsp8 were screened by co-immunoprecipitation, mass spectrometry, and laser confocal microscopy. The effects of the host proteins on PEDV replication were explored by overexpression and knockdown in LLC-PK cells. **[Results]** Thirty-six potential host proteins interacting with Nsp8 were screened by mass spectrometry, and the interaction between heat shock protein member 8 (HSPA8) and Nsp8 was verified. The overexpression of HSPA8 in LLC-PK cells inhibited the overexpression of Nsp8 in a dose-dependent manner. Meanwhile, it significantly inhibited the replication of PEDV in a dose-dependent manner at the protein and transcriptional levels. Interfering with endogenous HSPA8 expression significantly promoted the replication of PEDV. The 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) and indirect immunofluorescence further proved that HSPA8 inhibited PEDV replication. **[Conclusion]** This study screened out the host protein HSPA8 interacting with PEDV Nsp8 and proved that HSPA8 could significantly inhibit PEDV replication, which provided a new idea for the design of HSPA8-targeted drugs for the prevention or treatment of PEDV.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; Nsp8; co-immunoprecipitation; HSPA8

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) 引起的一种高度接触性肠道传染病, 可导致仔猪急性水样腹泻、脱水、呕

吐、消瘦和精神萎靡等症状, 对全球的生猪产业造成了严重的经济损失。PEDV 可感染各个年龄段的猪群, 成年猪和母猪呈一过性感染, 而仔猪感染率和死亡率可达 80%–100%^[1]。自 1971 年

首次在英国发现和报道 PED 以来,比利时、匈牙利、法国、德国、日本和韩国等多个国家相继出现 PED 的流行^[2]。1986 年我国首次报道了 PED,呈现零星散发状态^[3]。然而 2010 年末,以各年龄猪高发病率和新生仔猪高死亡率为特征的 PED 疫情在我国大范围暴发,造成了巨大的经济损失^[4]。2013 年 4 月,一种强毒力 PEDV 变异株席卷美国,随后加拿大、墨西哥、哥伦比亚、日本、韩国和菲律宾等许多国家也相继暴发了 PED 疫情^[5]。至此, PED 已在全球大部分国家暴发和流行,并且呈现常年高发和逐步扩大蔓延的趋势。

PEDV 是一种有囊膜的单股、正链 RNA 病毒,基因组全长约为 28 kb,属于套式病毒目(Nidovirales)冠状病毒科(Coronaviridae) α 冠状病毒属(Alphacoronavirus)成员^[6]。PEDV 除编码 4 种结构蛋白(刺突蛋白 S、膜蛋白 M、包膜蛋白 E 和核衣壳蛋白 N)外,开放阅读框 3 (open reading frame, ORF3)、ORF1a 及 ORF1b 还编码辅助性蛋白 ORF3 和 16 种非结构蛋白(Nsp1–Nsp16)^[7]。PEDV 非结构蛋白在病毒复制的过程中发挥重要作用。冠状病毒中 Nsp8 是非常保守的蛋白,研究表明,NSP8 能够与 RNA 模板上 5'-(G/U)CC-3'结合来启动互补寡聚核苷酸的合成,被认为具有次级的 RdRp 活性,在病毒基因组的转录和复制过程中为 NSP12 提供 RNA 引物^[8]。Nsp8 会与 Nsp7 形成十六聚体超级复合物的晶体结构,这种独特的空圆柱体结构由 Nsp8 组成,Nsp7 将其固定在一起,该复合物可能具有调控病毒复制的功能^[9-10]。进一步研究发现 SARS-CoV 的 RNA 聚合酶(Nsp12)需要与 Nsp8 和 Nsp9 结合,才能激活其复制 RNA 的能力^[11]。除了参与病毒复制以外,在 SARS-CoV-2 的研究中发现 Nsp8 是一种不完全线粒体自噬诱导剂,它可以通过阻止自噬体和溶酶体的融合,

导致自噬体增加,通过损伤线粒体和诱导自身或线粒体自噬^[12]。上述研究表明,Nsp8 在冠状病毒的复制周期中具有重要作用,而目前关于 PEDV Nsp8 的相关研究报道非常少,因此,筛选与 PEDV Nsp8 互作的宿主蛋白对了解 PEDV 与宿主细胞的相互作用具有重要的意义。

本研究利用免疫共沉淀和质谱分析技术筛选到与 PEDV 非结构蛋白 Nsp8 潜在的互作宿主蛋白 HSPA8, HSPA8 是热休克蛋白 70 家族中一种组成型表达的蛋白质(也称 HSC70),参与多种细胞活动,如蛋白质的折叠与运输、抗原的处理与呈递、内吞和自噬等,此外 HSPA8 还参与调解各种病毒的生命周期,如介导某些病毒的附着、内吞、穿透、转录、复制、组装和出芽等^[13]。宿主细胞在受到病原感染时, HSPA8 可易位到细胞膜上并作为受体或共受体参与病毒侵袭^[14]。通过免疫共沉淀和激光共聚焦明确了 Nsp8 与 HSPA8 的互作关系,进一步在 LLC-PK 细胞上验证 HSPA8 在 PEDV 复制过程中的调控作用,为研究宿主蛋白与 PEDV 相互作用及机理提供参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 病毒、细胞和主要试剂

LLC-PK、Vero 细胞购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),并由本实验室保存;抗 PEDV N 蛋白单克隆抗体由本实验室制备并保存; PEDV 毒株 CH/HBXT/2018 (GenBank 登录号为 MH816969)由本实验室分离鉴定并保存; pcDNA3.1(+)载体由本实验室保存; Promega-AMV 反转录试剂盒购自 Promega 公司; Endo-Free Plasmid Midi Kit 购自 Omega Bio-tek 公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 连接酶均购自 NEB 公司; One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II、

PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 和 RNAIos Plus 均购自 TaKaRa 公司; Protein A+G Agarose、NP-40 细胞裂解液、PMSF 和 Lipofectamine 8000[™] 转染试剂均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; MEM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清和胰酶均购自 ThermoFisher Scientific 公司; Flag、HA-Tag (26D11) mAb 和 Hsc70 Antibody 均购自 Abmart 公司; Mouse Anti- β -actin mAb、HRP 标记山羊抗小鼠抗体、HRP 标记山羊抗兔抗体和 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 山羊抗兔 IgG H&L 购自 Abcam 公司。

1.2 PEDV Nsp8 真核表达质粒的构建及表达

根据 PEDV 毒株 CH/HBXT/2018 (GenBank 登录号为 MH816969) 序列, 使用 SnapGene 软件设计扩增 Nsp8 基因(582 bp)的特异性引物(表 1), 用 RNAIos Plus 提取病毒 RNA, Promega-AMV 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。反转录反应体系: AMV RT 5 \times Buffer 5 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 3 μ L, Oligo dT (0.5 μ g/ μ L) 2 μ L, ddH₂O 7 μ L, RNA 7 μ L, AMV 反转录酶(10 U/ μ L) 0.5 μ L, RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L) 0.5 μ L。反转录反应条件: 42 $^{\circ}$ C 1 h, 以 cDNA 为模板, 使用 PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 对 Nsp8 上、下游特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系

(50 μ L): 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer 10 μ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L) 各 2 μ L, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.2 U/ μ L) 1 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 29 μ L。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。将扩增出的 PEDV Nsp8 目的基因用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 回收酶切产物, 通过 T4 连接酶连接至 pcDNA3.1(+)载体(5 428 bp), 克隆后提取质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将构建成功的真核表达质粒标记为 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 (6 020 bp)。将 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 与 pcDNA3.1(+)分别转染至 LLC-PK 细胞, 24 h 后收取细胞样品进行 Western blotting 验证其过表达情况。

1.3 免疫共沉淀

将 LLC-PK 细胞均匀铺至两个 100 mm 细胞培养皿中, 待细胞贴壁良好且密度达到 80% 以上时, 用 Lipofectamine 8000[™] 转染试剂(1.5 μ g 质粒/2 μ L) 分别转染 pcDNA3.1(+)空载体质粒和 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 质粒各 10 μ g。转染 24 h 后用 1 \times PBS 将细胞清洗 3 次, 各加入 1 mL 的 NP-40 细胞裂解液和 10 μ L PMSF (蛋白酶抑制剂), 4 $^{\circ}$ C、30 r/min 裂解 2 h 后, 收集细胞样品, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃黏稠状细胞沉淀物。取 45 μ L 上清至一新离心管, 加入 15 μ L

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer used in this study

Primer names	Sequences (5'→3')
Nsp8	Forward: CGCGGATCCGCCACCATGGATTACAAGGACGATGACGATAAGGTGGCTTCTACCTACGTGGGG
	Reverse: CGGCTCGAGTCACTGCAGCTTCACGATCCTCTC
HSPA8	Forward: CGCGGATCCGCCACCATGGCAGCACTAACTGCAGCATT
	Reverse: CGGCTCGAGTCAGGCATAGTCAGGCACATCGTAGGGGTAGTCCACTTCTTCGATGGTAGG
PEDV N	Forward: ACTACCTCGGAACAGGACCTCA
	Reverse: AGACGCCTTTCTGACACCCA
GAPDH	Forward: ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA
	Reverse: GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

4×蛋白上样缓冲液作为 Input 样品, 在剩余上清中各加入 3 μL Flag 抗体, 过夜孵育。孵育结束后, 加入 50 μL 混匀的 Protein A+G Agarose, 再次孵育 4 h。1 500 r/min 离心 3 min 弃掉上清, 加入 1 mL 预冷 1×PBS, 4 °C 摇床 35 r/min 洗涤 5 min, 1 500 r/min 离心 3 min, 重复 3 次, 洗涤完吸尽上清, 重新加入 60 μL 1×PBS 稀释, 加入 20 μL 4×蛋白上样缓冲液, 将该样品作为 IP 样品。最后将 Input 样品和 IP 样品于沸水中变性 10 min。

1.4 Western blotting 检测

取 IP 和 Input 样品进行 SDS-PAGE, 将胶体中的蛋白转移至 NC 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗下多余的脱脂乳, 加入 Flag 抗体(1:5 000)过夜孵育。孵育结束后, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 弃掉漂洗液, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠抗体(1:8 000)孵育 1 h, 再次漂洗 3 次, 每次 10 min, 弃掉漂洗液, 通过 ECL 化学发光液指示, 使用曝光仪观察结果。

1.5 PEDV Nsp8 质谱鉴定

将鉴定正确的、大小约为 23 kDa (Nsp8) 的样品送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行质谱分析。

1.6 HSPA8 表达载体的构建及表达

根据猪源 HSPA8 (UniProt 序列号为: A0A286ZPN4_PIG) 的基因序列设计特异性引物(表 1), 并添加 HA 作为标签抗体。提取 LLC-PK 细胞 RNA, 将其反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, HSPA8-F 和 HSPA8-R 为引物扩增出 HSPA8 目的基因(2 121 bp), 用 T4 DNA 连接酶将 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 HSPA8 目的基因连接至 pcDNA3.1(+) 载体, 克隆后提取质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 构建成功的真核表达载体记为 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 (7 493 bp)。将 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 与 pcDNA3.1(+) 分别

行 Western blotting 验证其过表达情况。

1.7 间接免疫荧光试验检测 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 验证 Nsp8 和 HSPA8 表达

将 LLC-PK 细胞铺至 35 mm 细胞培养皿中, 待其生长至 75% 后, 分别转染 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8、pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 与 pcDNA3.1(+), 转染后 24 h 后弃掉培养基, 用 1 mL 1×PBS 洗涤 3 次, 随后加入 1 mL 4% 多聚甲醛放置于 4 °C 冰箱固定 60 min, 弃掉固定液, 加入 1 mL 0.25% TritonX-100 室温条件下作用 10 min, 2 mL 1×PBS 在微量振荡器上清洗 3 次, 每次 3 min, 加入 1 mL 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 60 min, 2 mL 1×PBS 洗涤 3 次, 加入 3% BSA 稀释的 Flag 抗体(1:1 000) 和 HA 抗体(1:1 000) 室温孵育 1 h, 2 mL 1×PBS 洗涤 3 次后用 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 指示目的蛋白, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole) 指示细胞核后在荧光显微镜下观察。

1.8 免疫共沉淀验证 Nsp8 与 HSPA8 相互作用

将 Vero 细胞铺至 100 mm 细胞培养皿中, 待其生长至 80% 后, 共同转染 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 与 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8, 设置共转 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 和 pcDNA3.1(+) 为对照组, 通过免疫共沉淀和 Western blotting 检测进行验证。

1.9 激光共聚焦验证 Nsp8 与 HSPA8 共定位

将 Vero 细胞铺至共聚焦细胞培养皿中, 用 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒共同转染至 Vero 细胞, 同时以单独转染 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒作为对照, 样品制备方法参考 1.7, 用 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 和山羊抗兔 IgG H&L 指示目的蛋白, DAPI 指示细胞核后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.10 HSPA8 对 PEDV Nsp8 过表达的影响

将 0、1、2 和 3 μg 的 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒分别与 2 μg pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 质粒共转染至 LLC-PK 细胞中, 24 h 后收取细胞样品进行 Western blotting 检测分析。

1.11 HSPA8 过表达对 PEDV 复制的影响

采用 2 μg pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒和 2 μg pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 质粒分别转染 LLC-PK 细胞, 24 h 后将 PEDV 以 MOI=0.1 感染细胞。Western blotting 检测: 分别在 PEDV 感染后的 0、24 和 36 h 收取细胞样品进行 Western blotting 检测 PEDV N 蛋白水平变化; RT-qPCR 检测: 取 PEDV 感染后的 24 h 和 36 h 细胞样品, 加入 1 mL RNAios Plus 提取 RNA, 通过 One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II 试剂盒检测 PEDV N 基因转录水平变化, PEDV N 和内参基因 GAPDH 引物见表 1, 每个待测样本设置 3 个重复。RT-qPCR 反应体系: 12.5 μL 2 \times One Step TB Green RT-PCR Buffer 4, 1 μL PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2, 上、下游引物(0.4 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 RNA 2 μL , RNase Free dH₂O 7.5 μL 。RT-qPCR 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。TCID₅₀ 检测: 将 24 h 和 36 h 细胞样品及上清收集反复冻融 3 次后进行 TCID₅₀ 测定, 将 Vero 细胞铺至 96 孔板, 待生长至 80% 左右, 用无菌 1 \times PBS 洗涤 3 遍后, 用 1:1 000 胰蛋白酶稀释的无血清 MEM 培养基将冻融后的样品稀释至 10⁻¹–10⁻⁹, 将稀释好的样品加入 96 孔板中, 每孔 100 μL ,

每个稀释浓度 8 个重复, 阴性对照只加含胰蛋白酶的无血清 MEM 培养基, 观察病变状况并记录, 根据 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。IFA 检测: 通过间接免疫荧光检测 24 h 和 36 h 细胞样品中 PEDV 复制情况, 具体实验步骤参考 1.7。

1.12 不同剂量 HSPA8 过表达对 PEDV 复制的影响

将 0、1、2 和 3 μg 的 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒分别转染至 LLC-PK 细胞中, 24 h 后将 PEDV 以 MOI=0.1 感染细胞, PEDV 感染后 24 h 收取细胞样品进行 Western blotting 检测 PEDV N 水平蛋白变化。按照上述实验操作, 将 0、1、2 和 3 μg 的 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒分别转染至 LLC-PK 细胞中, 24 h 后将 PEDV 以 MOI=0.1 感染细胞, PEDV 感染后 24 h 收取细胞样品进行 RT-qPCR 检测 PEDV N 转录水平变化。RT-qPCR 反应体系及反应条件参考 1.11。

1.13 干扰内源性 HSPA8 对 PEDV 复制的影响

将 3 条浓度为 20 pmol/ μL 的 HSPA8 的 siRNA 引物(表 2)以 120 pmol 剂量转染至 LLC-PK 细胞, 48 h 后收取细胞样品, Western blotting 检测是否有干扰作用。随后将具有干扰效果的 siRNA 转染 PK 细胞, 48 h 后将 PEDV 以 MOI=0.1 感染细胞, 分别在 PEDV 感染后 24 h 和 36 h 通过 Western blotting、RT-qPCR、TCID₅₀ 和间接免疫荧光检测 PEDV 复制情况, 具体实验步骤参考 1.11。

表 2 HSPA8 干扰 RNA 序列

Table 2 The sequences of HSPA8 short interfering RNAs (siRNAs)

Name	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
siRNA-1	CGAUGAGGCUGUUGCUUAUTT	AUAAGCAACAGCCUCAUCGTT
siRNA-2	GGAAAGGAGAACAAGAUUATT	UAAUCUUGUUCUCCUUUCCTT
siRNA-3	GGUAUGUUUCUGUACUGUATT	UACAGUACAGAAACAUACCTT

1.14 数据处理

涉及统计学分析的数据进行至少 3 次重复试验, 通过 GraphPad Prism 8 软件对数据进行 *t* 检验和方差分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增和重组质粒的鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 后获得大小约为 648 bp 和 2 121 bp 的条带, 与目的基因 PEDV-Nsp8 和猪源 HSPA8 相符(图 1A、1B), 克隆至 pcDNA3.1(+)载体后经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后分别得到 5 372 bp 和 648 bp 及 5 372 bp 和 2 121 bp 的条带, 经测序验证后与目的条带符合, 说明重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 构建成功(图 2A、2B)。

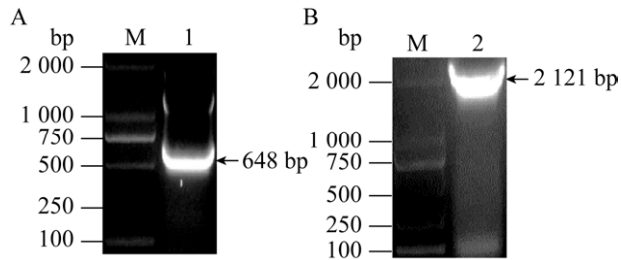


图 1 PEDV Nsp8 基因(A)及猪源 HSPA8 基因(B) PCR 扩增

Figure 1 PEDV Nsp8 (A) and HSPA8 (B) from swine were amplified by PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1: PEDV-Nsp8; 2: HSPA8.

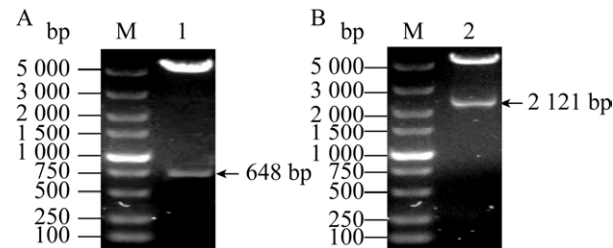


图 2 重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 的酶切鉴定

Figure 2 The recombinant plasmids pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 (A) and pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 (B) were identified by enzyme digestion. M: DL5000 DNA Marker; 1: pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8; 2: pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8.

2.2 重组质粒的表达和鉴定

鉴定正确的重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 转染 LLC-PK 细胞, Western blotting 分析可见大小约为 23 kDa (图 3A)和 77 kDa (图 3B)的条带, 因重组质粒所表达的蛋白携带有标签蛋白, 其真实大小应减去所携带标签蛋白的大小(Flag 标签约 1 kDa, HA 标签约 1.1 kDa), 所以 Nsp8 蛋白大小约为 22 kDa, HSPA8 蛋白大小约为 76 kDa, 与预期大小相符; IFA 结果显示, 与对照组相比, 转染 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 实验组有明显绿色荧光(图 3C、3D), 表明 Nsp8 与 HSPA8 蛋白在 LLC-PK 细胞内表达, Western blotting 和 IFA 结果共同验证了重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 可在 LLC-PK 细胞中表达。

2.3 质谱筛选与 PEDV Nsp8 潜在互作的宿主蛋白

PEDV Nsp8 的免疫沉淀根据质谱结果的肽段覆盖率, 共筛选出 36 个潜在的互作宿主蛋白, 选取热休克蛋白成员 8 蛋白(HSPA8)、转录因子 AP-2 δ (transcription factor AP-2 delta, TFAP2D)和蛋白名称异质核糖核蛋白 M (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, HNRNPM)这 3 个宿主蛋白进行免疫共沉淀(表 3)。

2.4 HSPA8 与 PEDV Nsp8 的免疫共沉淀验证

免疫共沉淀实验验证 PEDV Nsp8 蛋白与上述 3 个潜在宿主蛋白互作结果表明, HSPA8 与 PEDV Nsp8 互作, 其余 2 个蛋白无互作现象。在 HSPA8 与 PEDV Nsp8 互作实验中 HSPA8 与 Nsp8 均表达良好, 相较于对照组, HSPA8 成功与 Nsp8 共沉淀, 说明相互之间存在互作关系(图 4)。

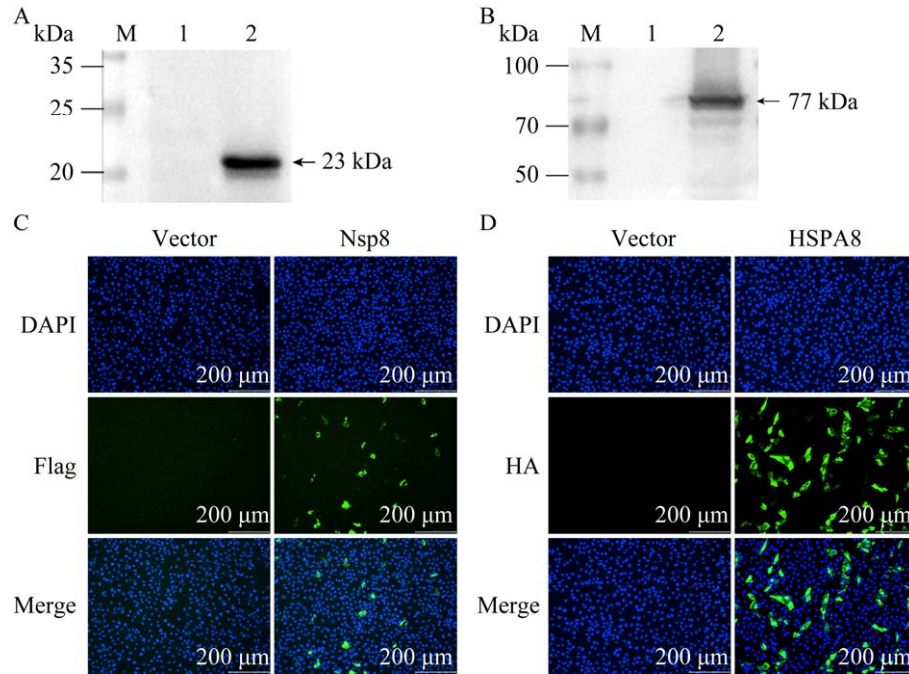


图 3 重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 过表达

Figure 3 Overexpression of recombinant plasmids pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 and pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8. A: Overexpression of PEDV Nsp8. M: Protein molecular quality standard; 1: pcDNA3.1(+); 2: pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8. B: Overexpression of HSPA8. M: Protein molecular quality standard; 1: pcDNA3.1(+); 2: pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8. C: pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 expression in LLC-PK cells was verified by IFA, Vector: The empty plasmid transfected with pcDNA3.1(+) was used as the control group. D: pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 expression in LLC-PK cells was verified by IFA, Vector: The empty plasmid transfected with pcDNA3.1(+) was used as the control group.

表 3 质谱鉴定筛选出的潜在互作宿主蛋白

Table 3 Identification of interacting host protein by mass spectrometry

Protein ID	Gene name	Unique peptide	Coverage (%)	Mass (Da)	Score
A0A286ZPN4	HSPA8	2	12	68 190	79
A0A4X1V0Q4	TFAP2D	2	1	50 147	34
A0A286ZJK2	HNRNPM	5	6	72 326	28

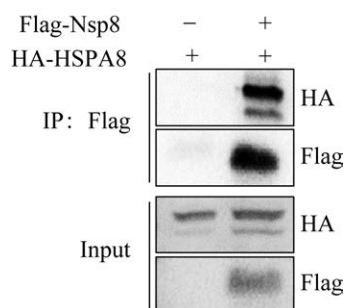


图 4 PEDV Nsp8 与宿主蛋白 HSPA8 互作鉴定

Figure 4 Identification of the interaction between PEDV Nsp8 and host protein HSPA8.

2.5 HSPA8 与 PEDV Nsp8 细胞内共定位

pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 和 pcDNA3.1(+)-HA-HSPA8 质粒共同转染至 Vero 细胞后对样品进行处理, 在激光共聚焦显微镜下可观察到 PEDV Nsp8 和 HSPA8 在细胞质内共定位, 说明 PEDV Nsp8 和 HSPA8 存在互作关系(图 5)。

2.6 过表达 HSPA8 剂量依赖性抑制 PEDV Nsp8 表达

将 0、0.5、1.0、2.0 和 3.0 μg 的 pcDNA3.1(+)-HA-

HSPA8 质粒分别与 2 μg pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp8 质粒共转染至 LLC-PK 细胞后, Western blotting 结果显示:随着 HSPA8 表达量的增加, PEDV Nsp8

表达量逐渐降低(图 6A), 使用 Image J (NIH)对 Western blotting 结果灰度分析, 结果表明过表达 HSPA8 剂量依赖性抑制 PEDV Nsp8 表达(图 6B)。

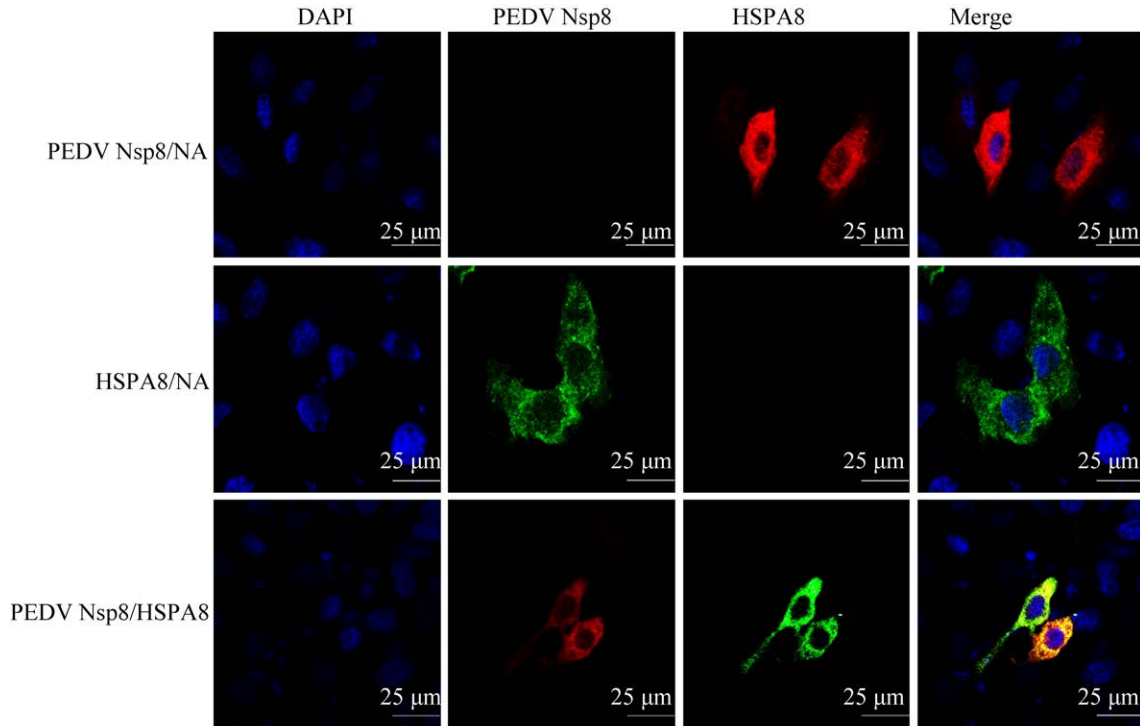


图 5 HSPA8 与 PEDV-Nsp8 在 Vero 细胞内共定位

Figure 5 Colocalization of HSPA8 and PEDV Nsp8 in Vero cells.

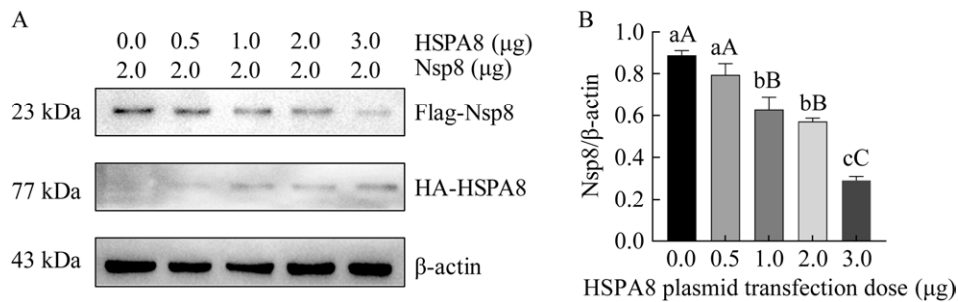


图 6 过表达 HSPA8 剂量依赖性抑制 PEDV Nsp8 表达

Figure 6 Overexpression of HSPA8 inhibited PEDV Nsp8 expression. A: Western blotting was used to detect the effect of gradient overexpression of HSPA8 on the expression of Nsp8 in LLC-PK cells. B: Grayscale analysis of Western blotting results. In different treatment groups, there was no significant difference in the same lowercase letters ($P>0.05$), there was a very significant difference in the different uppercase letters ($P\leq 0.01$), and there was a significant difference between the different lowercase letters and the same uppercase letters ($0.05\geq P>0.01$).

2.7 过表达 HSPA8 抑制 PEDV 复制

在 LLC-PK 细胞中过表达 HSPA8 蛋白, 接种 PEDV 后 0、24 和 36 h 的细胞样品 Western blotting 结果显示, 与只接种 PEDV 组相比, 在 24 h 和 36 h, 过表达 HSPA8 降低 PEDV N 蛋白表达量(图 7A); RT-qPCR 结果显示过表达 HSPA8, PEDV N 基因转录水平明显降低, 与细胞对照组相比, 差异显著(图 7B); 对感染 PEDV 24 h 和 36 h 的细胞样品及上清进行 TCID₅₀ 测定(图 7C), 结果表明 HSPA8 过表达显著抑制 PEDV 复制; IFA 检测结果显示, 在感染 PEDV 24 h 和

36 h 后, 过表达 HSPA8 实验组 PEDV 复制效率均低于对照组(图 7D)。

2.8 HSPA8 剂量依赖性抑制 PEDV 复制

0、1、2 和 3 μ g 的 HSPA8 转染 LLC-PK 24 h 后接种 MOI=0.1 的 PEDV 病毒, 24 h 收取细胞样品进行 Western blotting 分析 PEDV N 蛋白水平变化, 表明随着 HSPA8 转染剂量的增加 PEDV N 蛋白的表达量呈明显的降低趋势(图 8A); RT-qPCR 结果表明, PEDV N mRNA 水平随着 HSPA8 剂量的增加呈剂量依赖性降低(图 8B), 上述结果表明, HSPA8 过表达剂量依赖性抑制 PEDV 复制。

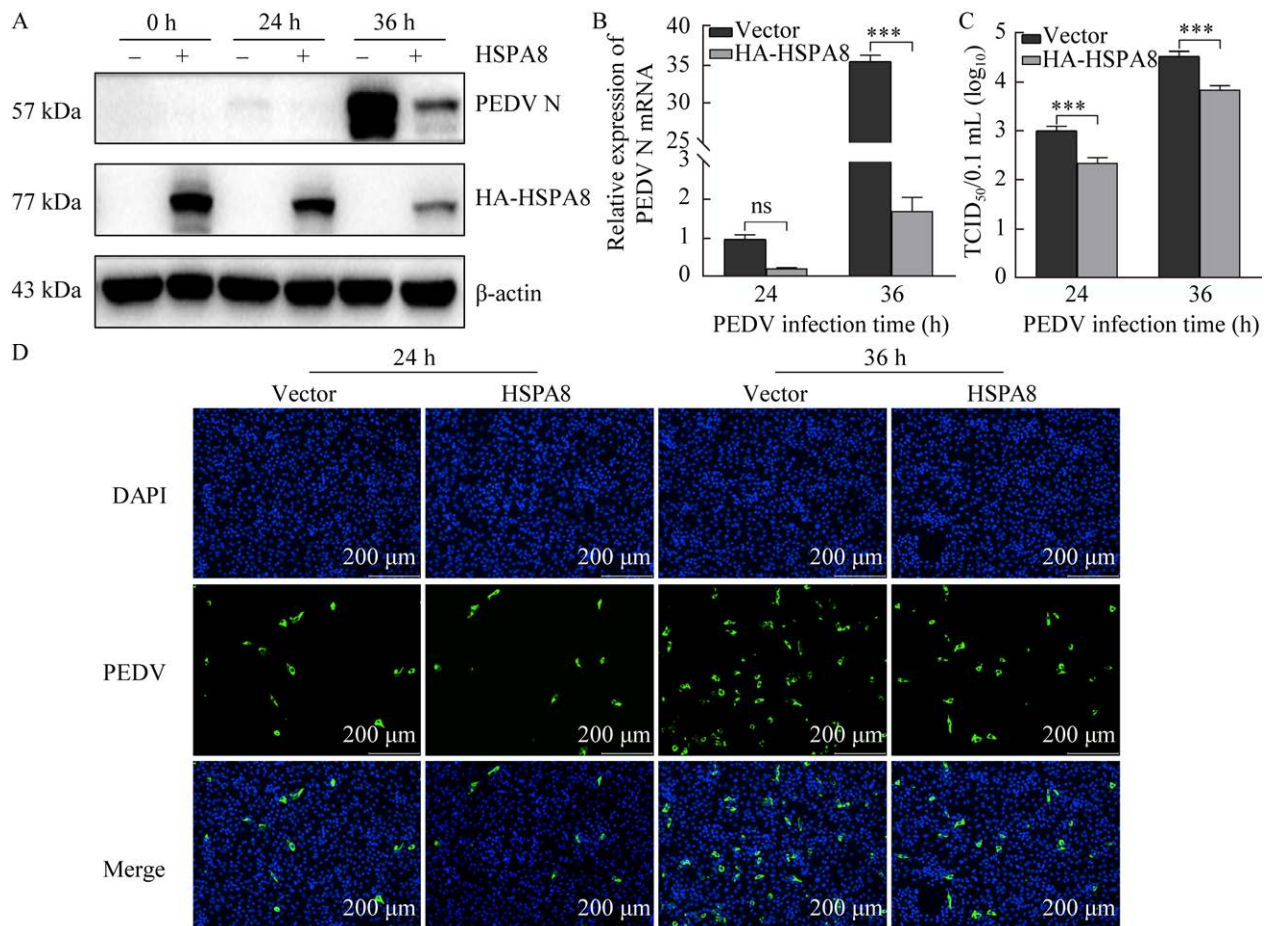


图 7 过表达 HSPA8 抑制 PEDV 病毒复制

Figure 7 Overexpression of HSPA8 inhibits PEDV virus replication. After 24 h of transfection with HSPA8, LLC-PK cells were infected with PEDV (MOI=0.1). Cell samples were collected at 24 h and 36 h, and the effect of knockdown of endogenous HSPA8 on PEDV replication was observed by Western blotting (A), RT-qPCR (B), TCID₅₀ detection (C) and IFA detection (D). Vector: The empty plasmid transfected with qcDNA3.1(+) was used as the control group. ns: $P>0.05$; ***: $P<0.001$.

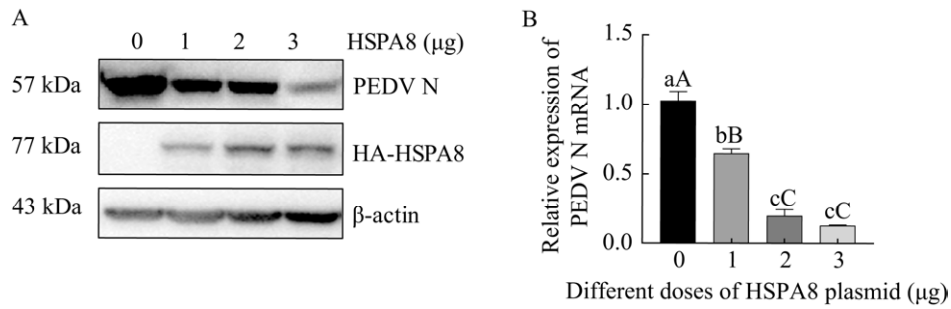


图 8 过表达 HSPA8 剂量依赖性抑制 PEDV 复制

Figure 8 Overexpression of HSPA8 inhibited PEDV replication in a dose-dependent manner. A: Western blotting was used to analyze the effect of different doses of HSPA8 on the expression level of PEDV N protein. B: RT-qPCR was used to detect the effect of different doses of HSPA8 on the transcription level of PEDV N gene. In different treatment groups, there was no significant difference in the same lowercase letters ($P>0.05$), there was a very significant difference in the different uppercase letters ($P\leq 0.01$), and there was a significant difference between the different lowercase letters and the same uppercase letters ($0.05\geq P>0.01$).

2.9 干扰内源性 HSPA8 促进 PEDV 复制

合成的 3 条干扰 RNA (siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3) 转染 LLC-PK 细胞, 48 h 后 Western

blotting 检测干扰效果, 结果显示 siRNA-3 具有明显的特异性干扰效果(图 9A)。将 siRNA-3 转染 LLC-PK 细胞, 48 h 后接种 PEDV 病毒(MOI=0.1),

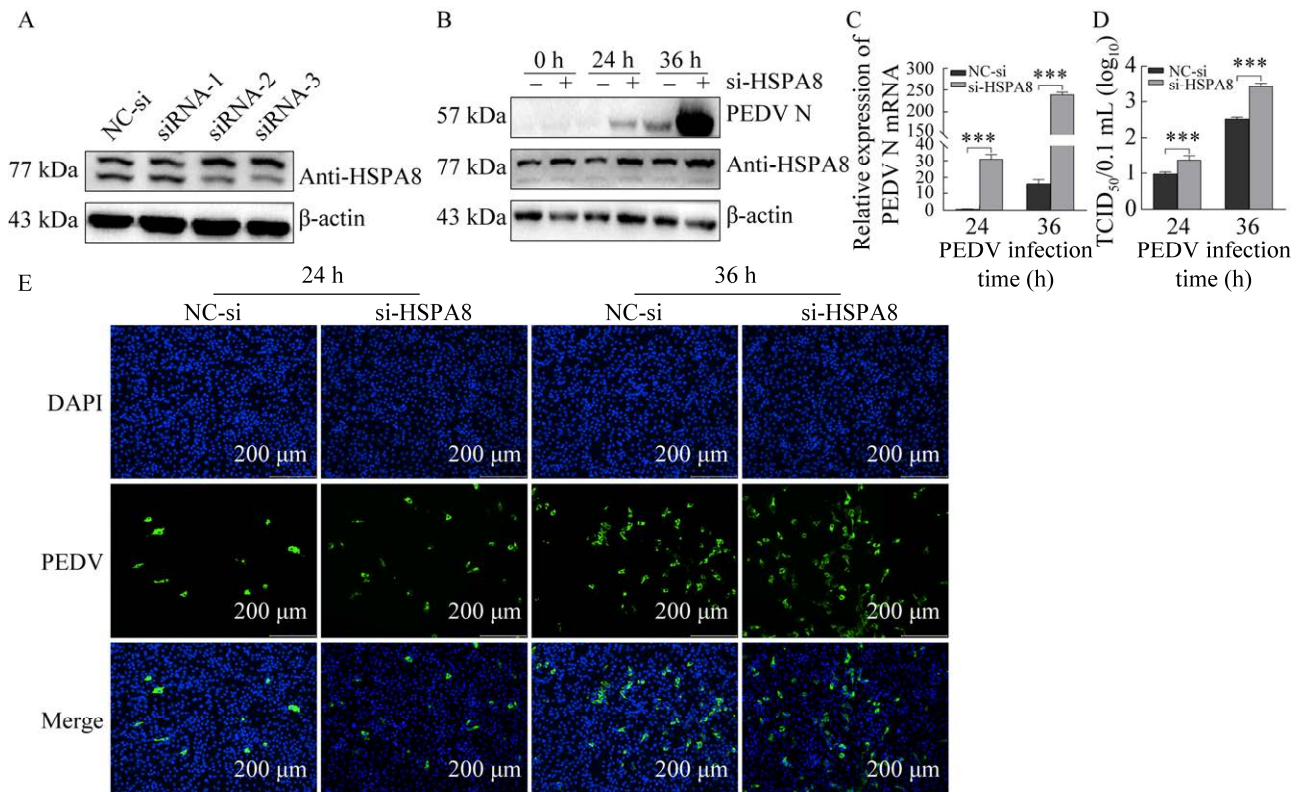


图 9 siRNA 敲低内源性 HSPA8 的表达水平对 PEDV 复制的影响

Figure 9 The effect of siRNA knockdown of endogenous HSPA8 expression on PEDV replication. A: Three siRNAs and siRNA-NC were transfected into LLC-PK cells, and the expression of HSPA8 was analyzed by Western blotting after 48 h. After 48 h of transfection with siRNA-3, LLC-PK cells were infected with PEDV (MOI=0.1). Cell samples were collected at 24 h and 36 h, and the effect of knock down of endogenous HSPA8 on PEDV replication was observed by Western blotting (B), RT-qPCR (C), TCID₅₀ detection (D) and IFA detection (E). NC: Negative control. ***: $P<0.001$.

0、24 和 36 h 的 Western blotting 结果显示干扰内源性 HSPA8 后, PEDV N 的蛋白表达水平显著升高(图 9B), RT-qPCR 结果显示 PEDV N 的 mRNA 水平显著升高(图 9C);对感染 PEDV 24 h 和 36 h 的细胞样品及上清进行 TCID₅₀ 测定(图 9D), 结果表明干扰 HSPA8 显著促进 PEDV 复制; IFA 检测结果显示, 在感染 PEDV 24 h 和 36 h 后干扰 HSPA8 实验组 PEDV 复制效率均高于对照组(图 9E)。

3 讨论与结论

病毒与宿主细胞之间的相互作用一般是通过病毒蛋白与宿主蛋白间的相互作用^[15]。PEDV 在侵入宿主细胞后也一定会与宿主细胞发生相互作用, 已有的研究显示 PEDV M 蛋白能够与 S100A11 和 PPID 相互作用, 并且这两种互作蛋白参与下调感染细胞中的病毒复制^[16]; PEDV N 蛋白与 TARDBP 相互作用, TARDBP 通过蛋白酶体和自噬降解途径降解 N 蛋白, 有效抑制 PEDV 病毒的复制, 并通过上调 MyD88 的 I 型干扰素的信号转导^[17]; PEDV N 蛋白与 Sp1 相互作用并干扰其与启动子区的结合, 从而抑制 HDAC1 的表达实现免疫逃避^[18]。虽然关于 PEDV 与宿主细胞的相互作用已有较多研究报道, 但关于 Nsp8 蛋白与其他宿主蛋白之间的相互作用尚不清楚。因此, 本研究筛选了能够与 PEDV 非结构蛋白 Nsp8 相互作用的宿主蛋白, 为后续进一步阐明非结构蛋白 Nsp8 在 PEDV 复制中的重要作用提供新的思路和依据。

前期研究发现, 猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV) M 蛋白能够协同 HSPA8/HSC70, 通过网格蛋白(clathrin)介导的内吞途径完成病毒的细胞内化过程^[19]。此外, HSPA8 蛋白参与调节病毒的基因组复制, 小鼠潜伏相关核抗原(murine mouse

latent associated nuclear antigen, mLANA)是小鼠 γ 疱疹病毒 68 (murine gammaherpesvirus 68, gammaHV68)的一种与病毒复制相关的蛋白, MHV68 感染的 3T12 成纤维细胞中, mLANA 直接与 HSPA8 相互作用, 并将其募集至细胞核中积累, 这有助于形成病毒复制复合物, 进而促进病毒 DNA 复制^[20]。因此, HSPA8 能够参与对病毒的调控且在不同的病毒中具有不同的机制。本研究结果同样也表明, 宿主蛋白 HSPA8 与 PEDV 非结构蛋白 NSP8 存在相互作用, 能够调控 PEDV 复制并呈现剂量依赖性。

分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)是一种选择性降解具有某种共有氨基酸基序(KFERQ)的蛋白, HSPA8 选择性结合具有这种序列的底物, 并运输底物与受体溶酶体相关膜蛋白 A2 相结合(LAMP2A)以启动降解^[21]。研究发现, Htt-552 蛋白与 CMA 的组成蛋白 HSPA8 和 LAMP2A 相互作用, 通过过表达以及干扰的方法改变 LAMP-2A 和 HSPA8 在细胞中的表达含量改变 CMA 的水平, 在 CMA 激活时, Htt-552 的蓄积减少, 抑制 CMA 活性则 Htt-552 蓄积增多^[22]。在本研究中发现 HSPA8 过表达剂量依赖性抑制 Nsp8 的过表达, 二者之间存在互作关系, 因此有理由怀疑 Nsp8 存在 KFERQ 序列, 被 CMA 途径所自噬降解, 这有待后续试验验证。

本研究结果表明, 在 LLC-PK 细胞中过表达 HSPA8, 可显著抑制 PEDV 的复制。进一步地, 利用 siRNA 敲低 HSPA8 的表达水平, PEDV 的复制显著增加, 表明宿主蛋白 HSPA8 通过与 PEDV Nsp8 相互作用抑制 PEDV 的复制, 但详细作用机制仍需进一步地深入研究。

参考文献

- [1] WANG D, FANG LR, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.

- [2] JUNG K, ANNAMALAI T, LU ZY, SAIF LJ. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 178(1/2): 31-40.
- [3] CHEN JF, WANG CB, SHI HY, QIU HJ, LIU SW, CHEN XJ, ZHANG ZB, FENG L. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(9): 1471-1476.
- [4] SUN RQ, CAI RJ, CHEN YQ, LIANG PS, CHEN DK, SONG CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161-163.
- [5] HOU YX, LIN CM, YOKOYAMA M, YOUNT BL, MARTHALER D, DOUGLAS AL, GHIMIRE S, QIN YB, BARIC RS, SAIF LJ, WANG QH. Deletion of a 197-amino-acid region in the N-terminal domain of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in piglets[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(14): e00227-e00217.
- [6] LIN F, ZHANG HY, LI LQ, YANG Y, ZOU XD, CHEN JH, TANG XC. PEDV: insights and advances into types, function, structure, and receptor recognition[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1744.
- [7] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193.
- [8] 汪梦俊, 申硕. 冠状病毒非结构蛋白的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(1): 100-111. WANG MJ, SHEN S. Progress in research on non-structural protein of coronaviruses[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2022, 35(1): 100-111 (in Chinese).
- [9] TE VELTHUIS AJ, van den WORM SHE, SNIJDER EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both *de novo* initiation and primer extension[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(4): 1737-1747.
- [10] ZHAI YJ, SUN F, LI XM, PANG H, XU XL, BARTLAM M, RAO ZH. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2005, 12: 980-986.
- [11] SUBISSI L, POSTHUMA CC, COLLET A, ZEVENHOVEN-DOBBE JC, GORBALENYA AE, DECROLY E, SNIJDER EJ, CANARD B, IMBERT I. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(37): E3900-E3909.
- [12] ZONG S, WU Y, LI WL, YOU Q, PENG Q, WANG CH, WAN P, BAI T, MA YL, SUN BL, QIAO JL. SARS-CoV-2 Nsp8 induces mitophagy by damaging mitochondria[J]. *Virologica Sinica*, 2023, 38(4): 520-530.
- [13] WANG Z, LI YT, YANG X, ZHAO J, CHENG YN, WANG JK. Mechanism and complex roles of HSC70 in viral infections[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1577.
- [14] VEGA-ALMEIDA TO, SALAS-BENITO M, de NOVA-OCAMPO MA, del ANGEL RM, SALAS-BENITO JS. Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(6): 1189-1207.
- [15] LASSO G, MAYER SV, WINKELMANN ER, CHU T, ELLIOT O, PATINO-GALINDO JA, PARK K, RABADAN R, HONIG B, SHAPIRA SD. A structure-informed atlas of human-virus interactions[J]. *Cell*, 2019, 178(6): 1526-1541.e16.
- [16] DONG SJ, WANG RY, YU RS, CHEN BQ, SI FS, XIE CF, LI Z. Identification of cellular proteins interacting with PEDV M protein through APEX2 labeling[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 240: 104191.
- [17] DONG SJ, KONG N, ZHANG Y, LI YW, SUN DG, QIN WZ, ZHAI HJ, ZHAI XY, YANG XY, YE CQ, YE MQ, LIU CL, YU LX, ZHENG H, TONG W, YU H, ZHANG W, TONG GZ, SHAN TL. TARDBP inhibits porcine epidemic diarrhea virus replication through degrading viral nucleocapsid protein and activating type I interferon signaling[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(10): e0007022.
- [18] XU JD, MAO JY, HAN X, SHI FS, GAO Q, WANG TJ, ZHANG ZN, SHAN Y, FANG WH, LI XL. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits HDAC1 expression to facilitate its replication via binding of its nucleocapsid protein to host transcription factor Sp1[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(18): e0085321.
- [19] JI ZY, DONG H, JIAO RX, ZHU XY, SHI HY, CHEN JF, SHI D, LIU JB, JING ZY, ZHANG JL, WANG XB, YE DD, ZHANG JY, ZHANG X, FENG L. The TGEV membrane protein interacts with HSC70 to direct virus internalization through clathrin-mediated endocytosis[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(4): e0012823.
- [20] VIRGIN HW 4th, LATREILLE P, WAMSLEY P, HALLSWORTH K, WECK KE, dal CANTO AJ, SPECK SH. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68[J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(8): 5894-5904.
- [21] KAUSHIK S, CUERVO AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19: 365-381.
- [22] QI L, ZHANG XD, WU JC, LIN F, WANG J, DiFIGLIA M, QIN ZH. The role of chaperone-mediated autophagy in huntingtin degradation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46834.