论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0526-04

串联亲和纯化技术筛选肠病毒71型3D聚合酶的相互作用蛋白

江 月[1,2],丛浩龙[2],王 健[2],李 梨[1] (400016 重庆,重庆医科大学:生物化学与分子生物学教研室[1];100101 北京,中国科学院微生物研究所[2])

[摘要] **目的** 利用串联亲和纯化技术筛选与肠病毒71型3D聚合酶相互作用的宿主细胞蛋白。**方法** 利用RT-PCR方法从EV71BrCr株全基因组中获得3D聚合酶全长基因,构建pcDNA3.0-3D-Flag-HA真核表达载体并转染RD细胞,48 h后收集细胞。用Western blot方法检测3D蛋白在RD细胞内的表达情况。串联亲和纯化技术筛选与3D聚合酶相互作用的宿主蛋白并进行质谱分析,确定与3D聚合酶相互作用的蛋白或多肽。并采用免疫共沉淀实验,对候选蛋白CyclinG1与3D的相互作用进行验证。**结果** 成功构建了pcDNA3.0-3D-Flag-HA载体,在RD细胞内检测到3D蛋白的表达。经串联亲和纯化和质谱分析得到LATS2、Nek2、APC5、CyclinG1、PI3K等一系列参与细胞凋亡及细胞周期调控的蛋白。免疫共沉淀实验证实3D蛋白与CyclinG1的相互作用。**结论** 3D聚合酶可能与宿主细胞内蛋白相互作用,引起细胞凋亡及细胞周期改变。

[关键词] 肠道病毒71型;3D聚合酶;串联亲和纯化;液相色谱-质谱分析法
[中图法分类号] R373.2;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Screening of host proteins interacting with enterovirus 71 3D RNA polymerase by tandem affinity purification

Jiang Yue[1,2], Cong Haolong[2], Wang Jian[2], Li Li[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen host proteins interacting with enterovirus 71 (EV71) 3D RNA polymerase by tandem affinity purification (TAP). **Methods** The full-length 3D RNA polymerase gene was amplified from the whole genome of EV71 BrCr strain by RT-PCR, and then the fragment was inserted into vector pcDNA3.0-Flag-HA to construct pcDNA3.0-3D-Flag-HA eukaryotic expression vector. The recombinant plasmid was transferred into RD cells, and after 48 h the RD cells were collected. Western blotting was applied to detect the expression of 3D RNA polymerase in the RD cells. TAP and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) were performed to screen 3D RNA polymerase-interacting host proteins. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was applied to confirm the interaction between candidate proteins (such as cyclin G1) and 3D RNA polymerase. **Results** Recombinant plasmid pcDNA3.0-3D-Flag-HA was successfully constructed and 3D RNA polymerase was expressed in the RD cells. A number of 3D RNA polymerase-interacting proteins including LATS2, Nek, APC5, Cyclin G1 and PI3K that were involved in cell apoptosis and regulation of cell cycle were identified by TAP purification and LC/MS. The interaction between Cyclin G1 and 3D RNA polymerase was confirmed by Co-IP. **Conclusion** EV71 3D RNA polymerase may interact with host proteins to induce cell apoptosis and cell cycle changes.

[**Key words**] enterovirus 71; 3D RNA polymerase; tandem affinity purification; LC/MS

Corresponding author: Li Li, E-mail: lili_cq@yahoo.com.cn

肠道病毒71型(EV71)是引起手足口病的主要病毒之一。婴幼儿及儿童感染EV71可导致无菌性脑膜炎、脑炎和脊髓灰质炎样麻痹等多种与神经系统相关的疾病[1]。1969年从美国加利福尼亚州1例脑膜炎患儿的脑脊液、脑组织和粪便中首次分离得到EV71。此后,该病毒在世界范围内多次暴发与流行[2]。近年来,EV71的感染在亚太地区呈上升趋势,2010年1-4月,我国感染EV71的病例数为192 300例,比2009年

[通信作者] 李 梨,E-mail:lili_cq@yahoo.com.cn

同期增长 40% 左右[3]。

EV71 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,基因组为单股正链 RNA。其基因组仅有一个开放阅读框,编码一个含 2 194 个氨基酸的多聚蛋白体。该多聚蛋白体可进一步被切割成 P1、P2 和 P3 3 个前体蛋白。P1 前体蛋白可被自身蛋白酶降解成 4 个病毒外壳蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP4。P2 和 P3 前体蛋白可被切割为 7 个非结构蛋白,包括 2A(非特异性蛋白水解酶)、2B(99 个氨基酸)、2C(329 个氨基酸)、3A、VPg (5′端结合蛋白)、3C(特异性蛋白水解酶)和 3D(RNA 聚合酶组分)[4]。3D 聚合酶是 RNA 聚合酶复合物组分,可以使 VPg 发生尿酰苷化反应,而 VPg 在病毒复制起始中扮演重要角色[5]。3D 聚合酶的前体蛋白 3CD 不仅参与病毒多聚蛋白的加工,而且促进病毒蛋白的成熟与 RNA 合成,其 3D 端的核定位信号可引导 3CD 进入宿主细胞核。实验证实,在同属小 RNA 病毒的脊髓灰质炎病毒中,突变 3D 聚合酶可导致小鼠体内病毒数量减少[6]。

然而,在宿主细胞中,3D 聚合酶如何行使其正常功能,是否需要其他宿主内蛋白分子辅助,以及 3D 聚合酶是否通过与宿主细胞内的蛋白分子相互作用从而影响宿主细胞的正常功能,都少文献报道。本实验应用串联亲和纯化技术筛选宿主细胞内与 3D 聚合酶相互作用的蛋白,为 EV71 3D 聚合酶蛋白功能的研究提供有用的线索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pcDNA3.0-Flag-HA 载体和 RD 细胞株由本实验室保存。感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。*Taq* DNA Polymerase 限制性内切酶、T_4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品。MEM 培养基为 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品,转染试剂 lipofectamine 2000 购自 Roche,anti-HA 和 anti-Flag 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,FLAG HA 串联亲和纯化试剂盒购自 SIGMA 公司。

根据 NCBI 中肠道病毒 71 型 3D 聚合酶基因序列,利用 DNA STAR 软件设计引物:上游引物 5′-CGGGATCCATGGGAGAGATCCAGTGGATGAAGCC-3′,下游引物 5′-CGGAATTCTAACTCGAGCCAATTTCTTCTCA-3′。

1.2 方法

1.2.1 载体构建[7] 将 RD 细胞接种 10 cm 培养皿,使其第 2 天长至 70%。用 PBS 将 200 μl EV71 病毒原液稀释 10 倍后感染 RD 细胞 1 h,用 PBS 清洗 3 次后更换新的 MEM 培养基,放入孵箱培养,直到细胞发生病变。收集上清,提取病毒 RNA 并反转录为 cDNA,PCR 扩增 3D 聚合酶基因片段并克隆入 PMD19T 载体,测序验证。以测序验证正确的克隆为模板,PCR 扩增 3D 聚合酶基因片段。PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min 预变性后进入循环,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环,72 ℃延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收目的片段。用 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ分别双酶切目的片段和 pcDNA3.0-Flag-HA 载体,将酶切产物进行胶回收,16 ℃连接过夜。连接产物转化 DH5α 感受态细胞,挑选阳性克隆并 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ双酶切验证。将鉴定正确的克隆测序。

1.2.2 瞬时转染 以每孔 1.4×10^5 细胞的数量,将 RD 细胞接种至含有圆形玻片的 12 孔板中培养 12 h。按照转染试剂说明,将重组质粒 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 转染至 RD 细胞内,24 h 后用 anti-HA 抗体进行免疫荧光实验。

1.2.3 融合蛋白表达 将 RD 细胞接种至 10 cm 培养皿,培养 12~16 h 使得细胞密度达到 80%。按照转染试剂说明操作,分别将重组质粒 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 及 pcDNA3.0-Flag-HA 转染至 RD 细胞内,细胞转染 12 h 后换液,48 h 后收集细胞,分别用 anti-Flag 一抗和 anti-EV71 一抗进行免疫杂交实验,检测融合蛋白的表达情况。

1.2.4 串联亲和纯化 按上述方法将重组质粒转染至 RD 细胞,48 h 后,从细胞培养箱里取出细胞皿,立即置于冰上。先用预冷的磷酸盐缓冲液 PBS 清洗细胞 2 次,在吸尽磷酸盐缓冲液后,加入 350 μl 预冷的 0.3% DDM 裂解液,冰上裂解 30 min 4 ℃,15 kg 离心 15 min,取上清。取 100 μl anti-Flag M2 beads,用 100 μl DDM 裂解液平衡。将细胞裂解上清与 anti-Flag beads 4 ℃孵育过夜,用 100 μl DDM 平衡液洗去未结合的杂蛋白。再用 200 μl 的 3×Flag 肽溶液(150 ng/ml)洗脱 beads 上的蛋白复合体,离心,收集洗脱液。将洗脱液与 100 μl anti-HA beads 4 ℃孵育 2 h,DDM 洗去杂蛋白后,用 8 mol/L 尿素洗脱蛋白复合体。

1.2.5 质谱分析 将纯化的样品进行 SDS-PAGE 电泳后银染,切下差异蛋白条带,送至集思生物公司做 LC/MS 质谱分析,对结果进行 NCBI 蛋白质数据库检索。

1.2.6 免疫共沉淀 将 RD 细胞接种于 6 cm 培养皿,使第 2 天细胞密度达到 80%。按照 lipofectamine 2000 转染试剂说明,将重组质粒 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 转染至 RD 细胞内,细胞转染 6 h 后换液,12 h 后收细胞。用 350 μl 0.3% DDM 裂解液冰上裂解 30 min,4 ℃离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。将 protein-G beads 与 anti-HA 抗体 4 ℃孵育 2 h,用 PBS 清洗后加入细胞上清液,4 ℃孵育过夜。用 DDM 裂解液清洗 1 次,PBS 清洗 2 次,加入上样 Buffer 煮样。SDS-PAGE 电泳后 200 mA 恒流转膜,用 10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,用 anti-CCNG1 抗体(1∶1 000 稀释)进行免疫杂交实验,检测 3D 蛋白与 Cyclin G1 的相互作用。

2 结果

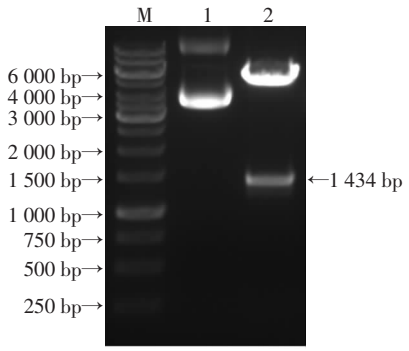
2.1 质粒的构建与鉴定

3D 聚合酶 PCR 产物两端存在 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ两个酶切位点,构建的重组质粒经 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ双酶切后应出现约 5.5 kb 和 1.5 kb 的两条带。酶切鉴定结果初步表明连接正确(图 1)。测序结果证明所构建的载体完全正确。

2.2 瞬时转染

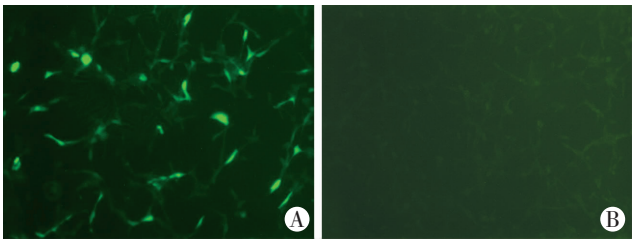
将 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 转染至 RD 细胞,用 anti-HA 进

行免疫荧光实验，荧光显微镜观察。图2A为转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA的RD细胞，图2B为正常RD细胞。可见转染效率约30%。



M：DNA分子标准；1：重组质粒pcDNA3.0-3D-Flag-HA；2：重组质粒pcDNA3.0-3D-Flag-HA双酶切

图1 重组载体pcDNA3.0-3D-Flag-HA双酶切鉴定

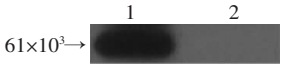


A：转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA的RD细胞(×40)；B：正常RD细胞(×10)

图2 免疫荧光检测瞬时转染效率

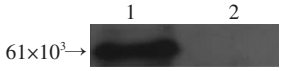
2.3 融合蛋白表达

采用脂质体瞬时转染法，将重组质粒转染RD细胞。Western blot检测融合蛋白的表达情况。3D聚合酶蛋白相对分子质量为59×10^3，串联标签FLAG-HA约2×10^3，所以排除蛋白折叠高级结构的影响，表达的融合蛋白相对分子质量约为61×10^3。用anti-EV71一抗进行免疫杂交证明细胞内有3D聚合酶蛋白表达(图3)，为检测细胞内是否同时表达了串联标签，故用anti-Flag一抗进行免疫杂交实验(图4)，证实细胞内表达融合蛋白3D-Flag-HA。



1：转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA RD细胞；2：转染pcDNA3.0-Flag-HA RD细胞

图3 anti-EV71一抗检测融合蛋白表达

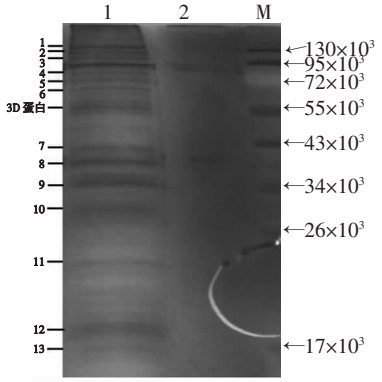


1：转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA RD细胞；2：转染pcDNA3.0-Flag-HA RD细胞

图4 anti-Flag一抗检测融合蛋白表达

2.4 3D聚合酶蛋白复合体的分离与鉴定

为消除串联亲和纯化过程中的非特异蛋白，以转染pcDNA3.0-Flag-HA的RD细胞作为pcDNA3.0-3D-Flag-HA RD细胞的对照。经过纯化、电泳、银染后得到未知的差异蛋白条带。如图5所示，经过HA和Flag双标签的2轮亲和纯化，共得到13条差异蛋白带，送至集思生物公司进行LC/MS质谱分析，结果进行NCBI蛋白质数据库检索，结果见表1。



M：蛋白分子量标准；1：转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA的RD细胞；2：转染pcDNA3.0-Flag-HA的RD细胞

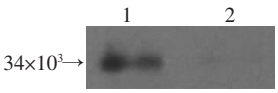
图5 串联亲和纯化银染胶结果

表1 LC/MS分析结果

蛋白名称	蛋白序列号
磷脂酰肌醇激酶p85 β	NP_005018.1
肿瘤抑制基因LATS2	NP_055387.2
中心体相关蛋白激酶Nek2	NP_002488.1
细胞周期素G1	NP_004051.1
转录辅助因子HES-6	NP_061115.2
丝/苏氨酸蛋白激酶36	NP_001230242.1
细胞周期末期促进复合蛋白APC5	NP_057321.2

2.5 免疫共沉淀验证3D相互作用蛋白

3D蛋白与RD细胞总蛋白进行免疫共沉淀，对免疫复合物进行SDS-PAGE电泳，转膜后用anti-Cyclin G1抗体进行Western blot分析。结果显示，Cyclin G1仅在转染重组质粒pcDNA3.0-3D-Flag-HA的RD细胞免疫共沉淀复合物中检测到，而在未转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA的RD细胞中未检测到(图6)。



1：转染pcDNA3.0-3D-Flag-HA RD细胞；2：正常RD细胞

图6 免疫共沉淀实验验证3D与Cyclin G1的相互作用

3 讨论

细胞内蛋白质间相互作用的分析是蛋白质组学研究的一个重要内容。近年发展起来的高分辨率质谱技术为蛋白质复合体的鉴定提供了有力工具，因此确定蛋白质复合体的限制因素不是蛋白质鉴定，而是蛋白质复合体纯化[8]。串联亲和纯化(TAP)技术特别适用于研究蛋白质在生理条件下的相互作用。TAP技术经过2次亲和，严格的纯化过程可以显著降低结果的假阳性率[9]。

本研究利用TAP技术筛选纯化出一系列与3D聚合酶相互作用蛋白：参与细胞周期调控的LATS2、Nek2、APC5、CyclinG1，信号转导分子PI3K beta亚基，转录调节因子STK36、HES-6等。LATS2、Nek2、APC5、

CyclinG1 是重要的细胞周期调控蛋白。LATS2 属于丝苏氨酸蛋白激酶,可以通过降低 cyclin E/CDK2 激酶活性,抑制细胞从 G_1 期进入 S 期,LATS2 还可以使转录共激活物 yes 相关蛋白(YAP)磷酸化,使其不能进入细胞核行使其重要功能,如调节细胞增殖、凋亡和迁移[10]。Nek2 位于中心体,是一种参与有丝分裂调节的蛋白激酶[11]。G_1 期细胞内无法检测到 Nek2,但 S 期逐渐积累,G_2 后期达到最大量。APC5 是 APC/C 的组分之一,APC/C 是一个 11 亚基的 E3 泛素连接酶,通过泛素化降解特定的细胞周期蛋白,使细胞由有丝分裂中期进入有丝分裂后期[12]。Cyclin G1 是发现较晚的一种细胞周期素,在骨骼肌、卵巢及肾中表达水平较高。目前对 Cyclin G1 的确切功能尚未完全认识。一方面,Cyclin G1 作为 p53 的靶基因,能被野生型 p53 转录激活,提示 Cyclin G1 在细胞周期中可能作为负调节因子,参与 DNA 损伤后 G_2/M 期的阻滞、DNA 的损伤修复及细胞凋亡等过程。另一方面,Cyclin G1 在细胞周期中又可作为正调节因子,促进细胞生长增殖[13-14]。在质谱分析中出现 LATS2、Nek、APC5、CyclinG1,提示 EV71 病毒感染宿主细胞后,可能通过 3D 聚合酶蛋白作用于 LATS2、Nek2、APC5、Cyclin G1,引起细胞周期的改变。

PI3K beta 亚基的功能尚少文献报道,但已知 PI3K 参与多条信号通路,可以激活 PKB,从而对 mTOR 信号通路起到调节作用。已有研究表明 mTOR 信号通路与细胞凋亡、自噬以及细胞周期调节相关,而细胞自噬有利于病毒复制[15-16]。依据 PI3K 的以上功能推测 EV71 病毒感染细胞后,病毒利用在宿主细胞内合成的 3D 聚合酶蛋白作用于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,引起宿主细胞凋亡、自噬,促进病毒复制。PI3K/PKB 信号转导通路在中性粒细胞活化过程中发挥重要作用,PI3K 磷酸化可介导 PI3K/PKB 信号转导通路活化,促进中性粒细胞释放炎症介质[17-19]。3D 聚合酶蛋白是否与病毒感染后组织的炎性病变有关,还需要进一步的研究。

STK36 属丝苏氨酸蛋白激酶,通过调节 GLI 转录因子,在 sonic hedgehog (Shh)信号途径中发挥重要作用。而 sonic hedgehog (Shh)信号途径与神经干细胞分化,中枢神经细胞及小脑的发育有密切联系[20]。HES-6 参与细胞分化、神经系统发育、从 RNA 聚合酶Ⅱ启动子起始的转录调节及 DNA 依赖的转录调节,可能作为转录因子或转录辅助因子[21]。以上结果表明,3D 聚合酶蛋白可能引起宿主细胞凋亡及细胞周期改变,还可能与炎症反应及中枢神经损伤有关,其具体机制尚有待研究。

参考文献:

[1] Lee T C, Guo H R, Su H J, *et al*. Diseases caused by enterovirus 71 infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(10): 904-910.
[2] Lin T Y, Twu S J, Ho M S, *et al*. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(3): 291-293.
[3] Cui S, Wang J, Fan T, *et al*. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease[J]. J Mol Biol, 2011, 408(3): 449-461.
[4] 刘丽艳, 朱启镕. 肠道病毒 71 型分子生物学研究进展[J]. 微生物与感染, 2010, 5(1): 57-60.
[5] Jiang H, Weng L, Zhang N, *et al*. Biochemical characterization of enterovirus 71 3D RNA polymerase[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1809(3): 211-219.
[6] Kung Y H, Huang S W, Kuo P H, *et al*. Introduction of a strong temperature-sensitive phenotype into enterovirus 71 by altering an amino acid of virus 3D polymerase[J]. Virology, 2010, 396(1): 1-9.
[7] 黄轶, 曾昭淳. 应用酵母双杂交方法筛选与鉴定组蛋白乙酰基转移酶 hTIP60 B 相互作用蛋白[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(14): 1495-1498.
[8] 洪奇华, 陈安国. 串联亲和纯化技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(5): 694-698.
[9] 徐峰, 穆昕, 王嵬, 等. 串联亲和纯化技术筛选 hCLP46 的相互作用蛋白[J]. 中国科学院研究生院学报, 2011, 28(2): 210-216.
[10] Li Y, Pei J, Xia H, *et al*. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition[J]. Oncogene, 2003, 22(28): 4398-4405.
[11] Fry A M. The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure[J]. Oncogene, 2002, 21(40): 6184-6194.
[12] Jin L, Williamson A, Banerjee S, *et al*. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex[J]. Cell, 2008, 133(4): 653-665.
[13] Kimura S H, Ikawa M, Ito A, *et al*. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery[J]. Oncogene, 2001, 20(25): 3290-3300.
[14] 张惠, 岳利民, 张金虎, 等. Cyclin G1 在小鼠卵巢颗粒细胞的表达及调控[J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28(2): 54-56.
[15] 黄淑真. 细胞自噬及血管内皮生长因子在感染肠病毒七十一型的细胞内之研究[D]. 台南: 台湾成功大学微生物及免疫学研究所, 1994.
[16] Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, *et al*. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy *via* PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition[J]. Autophagy, 2011, 7(2): 176-187.
[17] 张成, 栾正刚, 葛春林, 等. 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号转导通路在重症急性胰腺炎中性粒细胞活化中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(20): 1987-1991.
[18] 李建平, 杨少光, 董春兰, 等. IL-27 通过信号通路 p38 MAPK 和 PI3K 途径调节中性粒细胞 Mac-1、fMLP-R 及 IL-1β 表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 391-395.
[19] Wrann C D, Tabriz N A, Barkhausen T, *et al*. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions [J]. J Immunol, 2007, 178(9): 5940-5948.
[20] Murone M, Luoh S M, Stone D, *et al*. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(5): 310-312.
[21] Hartman J, Lam E W, Gustafsson J A, *et al*. Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(6): R79.

(收稿:2011-09-09;修回:2011-12-27)
(编辑 邓强庭)