

猪繁殖与呼吸综合征病毒 NSP9 蛋白的 亚细胞定位与功能预测

赵孟孟^{1,2},冯丽丽³,张二芹¹,马红芳¹,冯松林²,崔甜甜²,
杨春辉⁴,王文佳⁵,邢 星⁶,张 雅¹,冯嘉萍²,张桂红^{2*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002; 2. 华南农业大学 兽医学院/国家生猪种业工程技术研究中心/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室,广东 广州 510642; 3. 河南省农业科学院 农业经济与信息研究所,河南 郑州 450002; 4. 河南省舞阳县畜牧局,河南 舞阳 462400; 5. 河南牧业经济学院 制药工程学院,河南 郑州 450046; 6. 广西钦州保税港区出入境检验检疫局,广西 钦州 535008)

摘要: 为了研究猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 非结构蛋白 9 (NSP9) 的亚细胞定位,并探索 NSP9 蛋白在 PRRSV 复制过程中的定位变化,首先预测 NSP9 蛋白的生物信息学功能,之后将含有 NSP9 基因的质粒转染 Marc-145 细胞,并接种 PRRSV,通过间接免疫荧光方法检测 NSP9 蛋白的表达与定位情况。功能预测结果表明,NSP9 蛋白内部存在双向核定位序列、酰胺化位点、N-糖基化位点、酪蛋白激酶磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、细胞结合位点、酪氨酸激酶磷酸化位点、伸展蛋白重复区域、RNA 聚合酶结合区域。间接免疫荧光检测结果显示,PRRSV 感染之初,NSP9 蛋白定位在 Marc-145 细胞质中,围绕在细胞核附近,随 PRRSV 感染时间延长,其逐步往细胞核内转移,转移的面积也逐步增多。可见,PRRSV 感染会引起 NSP9 蛋白向核内转移。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; NSP9 蛋白; 真核表达; 亚细胞定位
中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2016)12-0138-05

Subcellular Localization Analysis and Function Prediction of PRRSV NSP9 Protein

ZHAO Mengmeng^{1,2}, FENG Lili³, ZHANG Erqin¹, MA Hongfang¹, FENG Songlin², CUI Tiantian²,
YANG Chunhui⁴, WANG Wenjia⁵, XING Xing⁶, ZHANG Ya¹, FENG Jiaping², ZHANG Guihong^{2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3. Institute of Agricultural Economics and Information, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
4. Wuyang County Animal Husbandry Bureau, Wuyang 462400, China; 5. School of Pharmaceutical Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China; 6. Guangxi Qinzhou Free Trade Port Area Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinzhou 535008, China)

Abstract: This study aimed to confirm the subcellular localization of NSP9 protein and verify whether PRRSV infection could affect its localization. The biological characters was predicted by softwares. Plasmids containing NSP9 gene were transfected into Marc-145 cells, and Marc-145 cells were infected with

收稿日期:2016-07-16
基金项目:国家自然科学基金项目(31272564);公益性行业(农业)科研专项(201203039);国家生猪现代农业产业技术体系项目(CARS-36);国家重点研发计划课题(2016YFD0500707)
作者简介:赵孟孟(1986-),男,河南汝州人,在读博士研究生,研究方向:猪繁殖与呼吸综合征病毒的致病机制。
E-mail: zhaomengmeng502@163.com
* 通讯作者:张桂红(1968-),女,黑龙江哈尔滨人,教授,博士,主要从事动物传染病研究。
网络出版时间:2016-11-25 14:24:33
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20161125.1424.032.html>

PRRSV. Indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to detect its localization. The results of functional prediction showed that NSP9 protein had two-way nuclear localization sequence, amidation site, a casein kinase phosphorylation site, N-glycosylation site, N-myristoylation site, protein kinase C phosphorylation site, a cell binding site, a tyrosine kinase phosphorylation site, a stretch protein repeat region, and an RNA polymerase binding domain. The results of IFA showed that NSP9 protein was located in the cytoplasm in Marc-145 cells. After PRRSV infection, NSP9 protein gradually transfer to the nucleus, and the area also gradually increased. It demonstrated that PRRSV infection changed the localization of NSP9 protein.

Key words: PRRSV; NSP9 protein; eukaryotic expression; subcellular localization

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的一种引起母猪繁殖障碍和各年龄猪呼吸道症状的高度传染性、接触性传染病。该病呈世界范围流行,在我国 1995 年被首次报道^[1],2006 年大面积暴发^[2],对我国养猪业造成重大的经济损失。PRRSV 是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒,编码 10 个开放阅读框,包括 ORF1a、ORF1b、ORF2—ORF7 和 ORF2a、ORF5a、ORF1a 和 ORF1b 基因约占病毒基因组的 80%,均参与病毒复制,其中 ORF1b 包括编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 的 NSP9 基因, RdRp 是 RNA 复制和转录的引擎,其主要功能是在病毒合成 RNA 的过程中,结合底物参与 RNA 的合成^[3],并且此酶只在病毒复制时出现,这对 PRRS 的诊断有重大意义^[4]。有报道该蛋白和病毒毒力密切相关^[5],针对 NSP9 蛋白及其致病分子机制等方面的研究已成为新的研究热点。

许多 RNA 病毒的结构蛋白在基础研究和应用方面已日趋完善^[6],相比之下,非结构蛋白方面的研究较少,存在许多未知问题,在这些非结构蛋白中,病毒自身编码的 RdRp 对病毒的复制起关键作用。对 RdRp 进行研究可以使 RNA 病毒复制机制得到进一步阐明,并为研制新的抗病毒靶标和诊断试剂提供可能。NSP9 蛋白在 PRRSV 发生中的具体作用尚不清楚,基于该蛋白的信号转导途径和治疗策略还在寻求之中。PRRSV 的 NSP9 蛋白主要由 ORF1b 编码,保守性很高^[7-8],宿主蛋白膜联蛋白 A2、视网膜神经胶质瘤蛋白、DEAD-box RNA 解旋酶与该蛋白相互作用促进 PRRSV 复制^[9-13],因而,将 NSP9 蛋白作为诊断抗原鉴别 PRRSV 感染具有重大意义^[14-19]。有报道可以在体外获取有活性的与 PRRSV 同科的马动脉炎病毒 (EAV) 的 NSP9 蛋白,并且该蛋白可以从头起始 RNA 的复制^[20]。另有报道,NSP9 蛋白可以诱导产生 IFN- γ 和 IL-10^[21-22]。

NSP9 蛋白和宿主蛋白互相作用,促进病毒复

制,抑制该蛋白会抑制病毒的复制,但是 PRRSV 非结构蛋白 NSP9 在病毒复制过程中的具体作用缺乏相应研究,NSP9 的亚细胞定位以及病毒感染对 NSP9 的影响尚未见报道。为此,本研究采用生物信息学对 NSP9 蛋白的功能进行预测,并对其亚细胞定位进行探究,旨在为 PRRSV 致病机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞和培养基 Marc-145 细胞由农业部兽用疫苗创制重点实验室保存,DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生物科技有限公司 (北京),pIRES2-EGFP-NSP9 质粒由农业部兽用疫苗创制重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂与仪器 去内毒素质粒提取试剂盒为 OMEGA 公司产品,聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)、4% 多聚甲醛、4,6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司,裂解液 RIPA 购自北京百泰克生物技术有限公司。PRRSV NSP9 蛋白单克隆抗体由农业部兽用疫苗创制重点实验室保存,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗鼠 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司,罗丹明 (Rhodamine) 标记的山羊抗鼠 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司,脱脂奶粉购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 NSP9 的核定位、核输出信号、结构功能域分析 利用信息学分析网站 http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_y.cgi 预测 NSP9 蛋白的核定位序列,<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/> 预测其核输出序列,http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan 预测其功能域。

1.2.2 pIRES2-EGFP-NSP9 质粒的抽提、转染 将 pIRES2-EGFP-NSP9 质粒转化到大肠杆菌

DH5α 感受态细胞中,通过菌液 PCR 筛选出阳性克隆,送往上海立菲生物科技有限公司测序。序列测定为阳性的菌液,参照 OMEGA 去内毒素质粒提取试剂盒的说明书进行去内毒素重组质粒的抽提。

Marc - 145 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长至 60% 左右,用 Invitrogen 公司的脂体 Lipofectamine 2000 进行转染。

1.2.3 转染细胞的 Western blot 鉴定 转染 48 h 的细胞样品弃去上清,之后用 RIPA 裂解液进行裂解,取上清进行 SDS - PAGE 分析,电泳结束后采用半干转膜方法,在 15 V 电压下转移 60 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, NSP9 蛋白单克隆抗体 (1: 500 稀释) 孵育过夜,加入用 TBST 缓冲液 (TBS + 0. 2% Tween - 20) 按 1: 5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 孵育 1 h,之后 ECL 化学发光拍照记录。

1.2.4 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定 NSP9 在细胞中的表达 转染后的 Marc - 145 细胞继续培养 48 h,经观察可用作 IFA 检测。每孔加入 200 μL 的 4% 多聚甲醛固定,加入 100 μL 0. 25% 的 Triton X - 100,用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,每孔加 200 μL 按 1: 500 倍稀释的 PRRSV NSP9 蛋白的单克隆抗体,孵育后每孔加入 200 μL 按 1: 100 稀释的罗丹明标记的山羊抗鼠 IgG,DAPI 染色 5 min,最后置于免疫荧光显微镜下观察。

1.2.5 PRRSV 感染对 NSP9 蛋白在 Marc - 145 细胞中定位的影响 待 Marc - 145 细胞长至 60% 左右进行转染,24 h 后以 MOI 为 1 的病毒剂量接毒,分别在接毒之后 6 h、12 h、24 h、48 h 进行间接免疫荧光鉴定,方法参照 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析结果

核定位分析表明,有 3 段序列可以在细胞质和细胞核之间穿梭,分别为 RLVRKYLFAHVGKCPPVHRPS-TYPAKNSMA、VTKRGGGLSSGDPITSVSNTIYSLVIYAQH、YFKSGHPHGLLFLQDQLKFEDMLKVQPLI。核输出序列预测结果表明无核输出序列。功能预测结果表明,

NSP9 蛋白内部存在双向核定位序列、酰胺化位点、N - 糖基化位点、酪蛋白激酶磷酸化位点、N - 豆蔻酰化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、细胞结合位点、酪氨酸激酶磷酸化位点、伸展蛋白重复区域、RNA 聚合酶结合区域。

2.2 重组表达质粒 pIRES2 - EGFP - NSP9 在 Marc - 145 细胞中的表达结果

将鉴定正确的重组表达质粒转染生长状况良好的 Marc - 145 细胞,48 h 后荧光显微镜观察,绿色荧光非常明显,表明转染的重组质粒得到了稳定的表达 (图 1)。

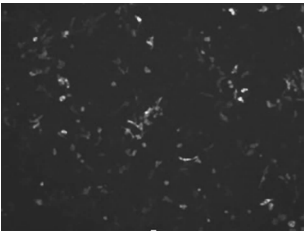
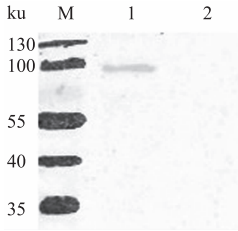


图 1 pIRES2 - EGFP - NSP9 转染 Marc - 145 细胞荧光显微镜观察结果

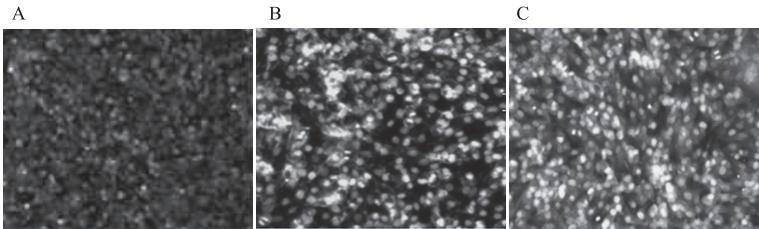
将转染重组质粒后的 Marc - 145 细胞进行裂解,经 Western blot 鉴定,结果表明,在近 90 ku 处出现目的蛋白,与预期一致,说明 NSP9 蛋白得到了正确表达 (图 2)。



M. 蛋白质 Marker; 1. pIRES2 - EGFP - NSP9 转染结果; 2. pIRES2 - EGFP 转染结果

图 2 pIRES2 - EGFP - NSP9 在 Marc - 145 细胞中的 Western blot 验证结果

将转染 48 h 后的 Marc - 145 细胞经过 IFA 检测,可观察到较强的红色荧光,其代表表达在细胞上的 NSP9 蛋白,根据细胞核位置与红色荧光的相对位置,NSP9 蛋白主要定位在细胞质中 (图 3)。



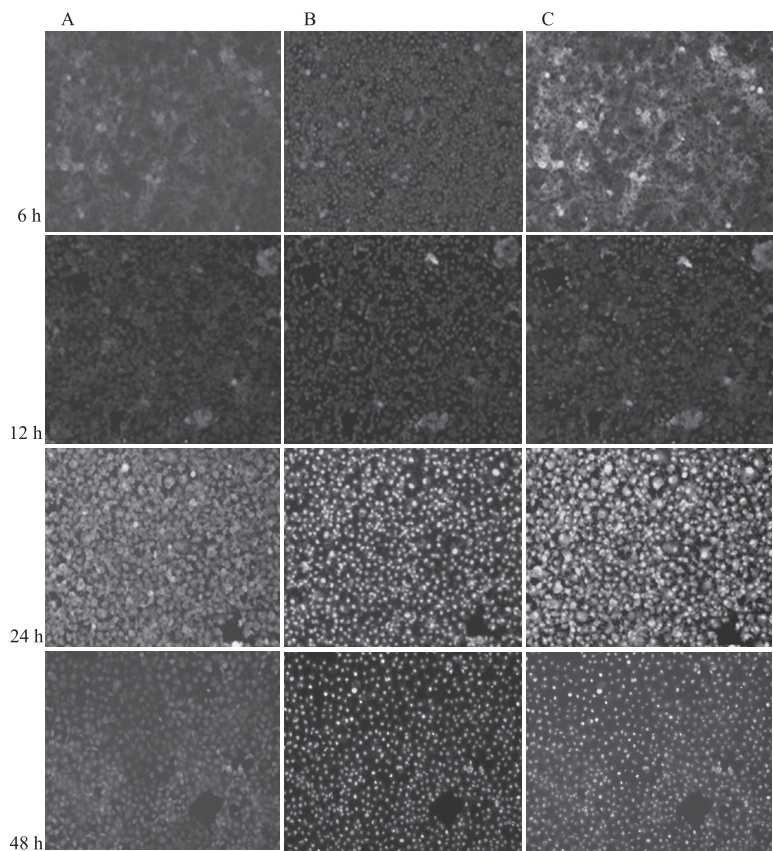
A. NSP9 蛋白; B. DAPI 染色; C. 叠加

图 3 转染细胞的间接免疫荧光鉴定结果

2.3 PRRSV 感染后 NSP9 位置的变化

从图 4 可以看出,初始 NSP9 蛋白处于细胞质内,围绕细胞核。PRRSV 感染后,随着时间的推移,

NSP9 蛋白逐步往细胞核内转移,转移的面积也逐步增多。



A. NSP9 蛋白; B. DAPI 染色; C. 叠加
图 4 NSP9 蛋白在不同时间点位置的变化

3 结论与讨论

通常病毒结构蛋白与非结构蛋白的提取较为困难,因此,将外源基因插入真核表达载体转染真核细胞成为表达此类蛋白质比较有效的方法之一。本研究利用 pIRES2 - EGFP 载体表达 NSP9 蛋白,间接免疫荧光试验结果表明,NSP9 蛋白主要定位于细胞质,细胞核未见表达,这与软件预测结果保持一致。病毒感染细胞之后,随着病毒复制,NSP9 蛋白逐步往细胞核中转移,并且转移面积逐步增多。往细胞核内转移的原因,可能是病毒在细胞核内组装,NSP9 蛋白参与病毒的组装与成熟,在胞浆和胞核之间充当运输载体及进行信号转导。NSP9 蛋白在胞浆和胞核之间介导通路的调控中是否扮演不同的角色还需验证,软件预测 NSP9 蛋白含有双向核定位序列,可能是这些序列介导病毒感染之后进入细胞核,本试验结果验证了软件预测结果。NSP9 蛋白入核之后如何调节细胞因子的变化,是否引起各个通路的变化,在细胞质内以及细胞核内如何与宿主蛋

白相互作用,均需要进一步的试验验证。此外,NSP9 蛋白入核前后如何调节宿主的免疫反应,这种免疫反应是否与病毒逃逸免疫系统以及病毒的毒力相关都是下一步要解决的问题。软件预测结果表明,NSP9 蛋白存在一些核定位序列,其是否参与免疫调节,以及是否与毒力相关也是需要研究解决的问题。

本研究结果为 NSP9 蛋白参与病毒复制研究提供了基础数据,填补该研究的未知领域,为抗病毒药物研发及受体相互作用研究提供新的思路和线索^[23-26],为下一步研究 NSP9 蛋白在病毒复制过程中的位置变化所带来的信号转导通路的变化、探索该蛋白的免疫调控机制以及该蛋白与病毒毒力关系奠定了基础。

参考文献:

[1] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等. 从疑似 PRRSV 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. 中国畜禽传染病,1996,18 (2):1-4.
[2] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV

- variants; Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. PLoS One, 2007, 2: e526.
- [3] Fang Y, Snijder E J. The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins [J]. Virus Res, 2010, 154: 61-76.
 - [4] Cong Y, Huang Z, Sun Y, *et al.* Development and application of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to differentiate antibodies against live and inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virology, 2013, 444: 310-316.
 - [5] Li Y, Zhou L, Zhang J, *et al.* NSP9 and NSP10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10: e1004216.
 - [6] Loula T. Mystery pig disease [J]. Agri Peactice, 1991, 12: 23-34.
 - [7] Zhao M, Ning Z, Wang H, *et al.* Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China [J]. Virus Genes, 2013, 46(1): 88-96.
 - [8] 李嘉彬, 赵孟孟, 李玉谷, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株 FS 的分离鉴定与全基因组序列分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(3): 60-64.
 - [9] Dong J, Zhang N, Ge X, *et al.* The interaction of nonstructural protein 9 with retinoblastoma protein benefits the replication of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro* [J]. Virology, 2014, 464/465: 432-440.
 - [10] Li J, Guo D, Huang L, *et al.* The interaction between host Annexin A2 and viral Nsp9 is beneficial for replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res, 2014, 189: 106-113.
 - [11] Zhao S, Ge X, Wang X, *et al.* The DEAD-box RNA helicase 5 positively regulates the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interacting with viral Nsp9 *in vitro* [J]. Virus Res, 2015, 195: 217-224.
 - [12] Leng X, Li Z, Xia M, *et al.* Mutations in the genome of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentially related to attenuation [J]. Vet Microbiol, 2012, 157: 50-60.
 - [13] Guo B, Lager K M, Schlink S N, *et al.* Chinese and Vietnamese strains of HP-PRRSV cause different pathogenic outcomes in United States high health swine [J]. Virology, 2013, 446: 238-250.
 - [14] Spear A, Faaberg K S. Development of a genome copy specific RT-qPCR assay for divergent strains of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Virol Methods, 2015, 218: 1-6.
 - [15] Xiao S, Chen Y, Wang L, *et al.* Simultaneous detection and differentiation of highly virulent and classical Chinese-type isolation of PRRSV by real-time RT-PCR [J]. J Immunol Res, 2014, 2014: 809656.
 - [16] Rascon-Castelo E, Burgara-Estrella A, Mateu E, *et al.* Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Viruses, 2015, 7: 873-886.
 - [17] Patel K, Whelan P J, Prescott S, *et al.* The use of real-time reverse transcription-PCR for prostate-specific antigen mRNA to discriminate between blood samples from healthy volunteers and from patients with metastatic prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 7511-7519.
 - [18] Xie J, Zhou H, Cui J, *et al.* Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by specific siRNA targeting Nsp9 gene [J]. Infect Genet Evol, 2014, 28: 64-70.
 - [19] Zhou Y, Zheng H, Gao F, *et al.* Mutational analysis of the SDD sequence motif of a PRRSV RNA-dependent RNA polymerase [J]. Sci China Life Sci, 2011, 54: 870-879.
 - [20] Beerens N, Selisko B, Ricagno S, *et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA-dependent RNA polymerase [J]. J Virol, 2007, 81: 8384-8395.
 - [21] Burgara-Estrella A, Diaz I, Rodriguez-Gomez I M, *et al.* Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN-gamma and IL-10 [J]. Viruses, 2013, 5: 663-677.
 - [22] Parida R, Choi I S, Peterson D, *et al.* Location of T-cell epitopes in nonstructural proteins 9 and 10 of type-II porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res, 2012, 169: 13-21.
 - [23] Liu H, Wang Y, Duan H, *et al.* An intracellularly expressed Nsp9-specific nanobody in MARC-145 cells inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication [J]. Vet Microbiol, 2015, 181: 252-260.
 - [24] Gao L, Wang L, Huang C, *et al.* HP-PRRSV is attenuated by de-optimization of codon pair bias in its RNA-dependent RNA polymerase Nsp9 gene [J]. Virology, 2015, 485: 135-144.
 - [25] Gao L, Zhang W W, Sun Y P, *et al.* Cryptosporidium parvum extract inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63767.
 - [26] Yang Q, Zhang Q, Tang J, *et al.* Lipid rafts both in cellular membrane and viral envelope are critical for PRRSV efficient infection [J]. Virology, 2015, 484: 170-180.