

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.02.004
文章编号: 1005-8982(2020)02-0022-05

纳尔逊海湾病毒 μ NS 蛋白 与 σ NS 蛋白的表达分析

董晗¹, 郑国峰¹, 张军¹, 李永刚²

(1. 中国医科大学附属第四医院 呼吸内科, 辽宁 沈阳 110005; 2. 锦州医科大学
病原微生物教研室, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 研究呼肠孤病毒科纳尔逊海湾病毒非结构蛋白 μ NS 与 σ NS 在感染及转染细胞中的表达和分析。**方法** 在感染细胞中, 通过免疫荧光方法在共聚焦显微镜下观察 μ NS 蛋白的表达, 以及 μ NS 和 σ NS 共定位情况; 同时通过转染质粒的方法观察非感染细胞中 μ NS 和 σ NS 的表达及共定位情况。**结果** μ NS 蛋白在感染细胞和单独转染质粒细胞中都形成包涵体样结构, σ NS 和 μ NS 蛋白相互作用, σ NS 和 μ NS 蛋白共定位存在于包涵体样结构内。**结论** μ NS 不仅可以在病毒感染细胞中, 而且可以在单独转染的细胞中形成包涵体样结构, σ NS 可以与 μ NS 相互作用, 共定位于感染和转染细胞的包涵体样结构中。

关键词: 病毒; 蛋白; 基因表达调控, 病毒

中图分类号: R563.19

文献标识码: A

Expression and analysis of Nelson Bay orthoreovirus μ NS protein and σ NS protein

Han Dong¹, Guo-feng Zheng¹, Jun Zhang¹, Yong-gang Li²

(1. Department of Respiratory, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110005, China; 2. Department of Pathogenic Microorganism, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To study the expression and analysis of Nelson Bay orthoreovirus non-structural protein μ NS and σ NS in infected and transfected cells. **Methods** The expression of μ NS protein and the colocalization of μ NS with another non-structural protein σ NS were observed by immunofluorescence assay through confocal microscopy in infected cells. The expression and colocalization of μ NS and σ NS were observed in non-infected cells which were transfected by plasmids. **Results** μ NS protein formed inclusion bodies in both infected and transfected cells. The σ NS protein interacted with μ NS protein. σ NS and μ NS protein were colocalized in inclusion bodies. **Conclusion** μ NS can form inclusion bodies not only in virus-infected cells but also in cells transfected. σ NS can interact and was colocalize with μ NS in the inclusion bodies of infected and transfected cells.

Keywords: viruses; proteins; gene expression regulation, viral

纳尔逊海湾病毒 (nelson bay virus, NBV) 是呼肠孤病毒科中的一种双链核糖核酸 (dsRNA) 病毒, 包含 10 个分节段 dsRNA。根据 RNA 的大小, 将其分为

大 (L1 ~ L3)、中 (M1 ~ M3) 及小 (S1 ~ S4) 3 组。 μ NS 蛋白由 M3 基因组区段编码, σ NS 蛋白由 S3 基因组区段编码, 这 2 种蛋白在病毒增殖过程中发挥重

收稿日期: 2019-07-23

[通信作者] 张军, E-mail: zhangjun661108@126.com; Tel: 18900912588

要作用。本研究利用免疫荧光及共聚焦的方法研究 NBV 病毒 μ NS 和 σ NS 蛋白的表达及两者的相互作用,深入研究病毒增殖机制及感染机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

BSR 细胞购于美国 ATCC 细胞库,DMEM 培养基、opti-MEM 培养基、山羊抗兔 γ -488、山羊抗鼠 γ -594、转染试剂 Lipofectmine 2000、HRP 羊抗兔抗体、HRP 羊抗鼠抗体、Alexa594 羊抗鼠抗体及 Alexa488 羊抗兔抗体均购于美国 Invitrogen 公司,PMSF 购于北京索莱宝生物科技有限公司, μ NS 多克隆抗体(兔制备)由锦州医科大学病原微生物教研室自制^[1],pCAG-M3、pCAG-S3 及 NBV 病毒[本研究采用的毒株是 2007 年从印度尼西亚巴厘岛返回日本的呼吸道感染患者身上分离出的 NBV 病毒株,该病毒株被命名为 Miyazaki-Bali/2007 (MB)^[2-3]], σ NS 多克隆抗体(鼠制备)由日本大阪大学微生物病研究所病毒免疫研究室小林刚教授惠赠。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及病毒感染 将 BSR 细胞培养于含 8% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,细胞达到所需数量时,将 BSR 细胞以 3×10^6 个/板的密度接种在 6 cm 细胞培养板上做质粒转染。将 BSR 细胞培养于含 8% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,细胞达到所需数量时,接种于带有细胞爬片的 24 孔板内,次日用 NBV 病毒感染,24 h 后进行免疫荧光检测。

1.2.2 质粒转染 将 10 μ g pCAG-M3 及 pCAG-S3 分别转染或共同转染至细胞。质粒与 200 μ l Opti-MEM 培养基混合 5 min,将 25 μ l 转染试剂与 200 μ l Opti-MEM 培养基混合 5 min,再将稀释好的质粒及转染试剂混合,室温孵育 20 min 后,添加到细胞培养基中。细胞在 37 $^{\circ}$ C 下条件温育 4 ~ 6 h,更换血清培养基,继续 37 $^{\circ}$ C 温育 24 ~ 48 h 后做免疫荧光检测。

1.2.3 免疫荧光 将感染病毒 24 h 后的细胞用 PBS-4% 多聚甲醛固定 20 min,用 PBS 洗净后分别或共同与 μ NS 及 σ NS 多克隆抗体在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h。用 PBS 冲洗 3 次后,将细胞分别或共同与 Alexa 594 羊抗鼠抗体及 Alexa 488 羊抗兔抗体在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h,然后 PBS 洗 3 次。采用荧光显微镜观察并获

取图像。分别或共同转染 pCAG-M3 及 pCAG-S3 质粒 BSR 细胞的免疫荧光实验方法同上,所用抗体同上。通过免疫荧光方法在共聚焦显微镜下观察 μ NS 和 σ NS 蛋白在 NBV 感染细胞和质粒转染细胞中的定位。为确定 μ NS 和 σ NS 是否在病毒包涵体样结构中定位,将 NBV 病毒以 0.1 PFU/细胞的感染复数感染 BSR 细胞,孵育 24 h,免疫荧光后用共聚焦显微镜观察。先后用 μ NS 多克隆抗体、Alexa488 的羊抗兔抗体对 μ NS 蛋白进行免疫染色。先后用 σ NS 多克隆抗体、Alexa594 的羊抗鼠抗体对 σ NS 蛋白进行免疫染色,未感染细胞作为对照。为证明当在没有其他 NBV 蛋白表达的情况下, μ NS 可以形成病毒包涵体样结构,用 pCAG-M3 质粒(含有来自 NBV 的 M3 基因表达载体)转染 BSR 细胞,通过免疫荧光方法在 24 h 共聚焦显微镜下观察 μ NS 在细胞中的分布。将 pCAG-M3 及 pCAG-S3 质粒共转染至 BSR 细胞,细胞孵育 24 h 后用共聚焦显微镜观察。先后用 μ NS 多克隆抗体和 Alexa488 羊抗兔抗体对 μ NS 蛋白进行免疫染色。先后用 σ NS 多克隆抗体和 Alexa594 羊抗小鼠抗体对 σ NS 蛋白进行免疫染色。未转染质粒的细胞用作对照。

1.2.4 免疫印迹检测细胞 μ NS 的表达 用 PBS 将细胞从培养皿上吹下,以 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加入 500 μ l NP-40 细胞裂解液、5 μ l PMSF 于 4 $^{\circ}$ C 摇动 1 h 裂解细胞,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液。取 20 μ l 上清液加入 10 μ l 2 \times 样本液 106 $^{\circ}$ C 加热 10 min,静置为室温后取实验组及对照组各 20 μ l 蛋白样品于聚丙烯酰胺凝胶上行 SDS-PAGE,结束后 20V 电转印至 PVDF。使用 5% 脱脂牛奶封闭液中室温封闭 1 h,稀释 μ NS 或 σ NS 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗膜 4 次,加入稀释 HRP 羊抗兔抗体或 HRP 羊抗鼠抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜。加入电化学发光液曝光显色。为进一步证明 NBV 病毒感染细胞中 μ NS 及 σ NS 蛋白的表达,将 NBV 病毒感染细胞的裂解物进行免疫印迹分析,一抗使用 μ NS 和 σ NS 多克隆抗体,二抗使用 HRP 羊抗兔抗体和 HRP 羊抗鼠抗体。转染 pCAG-S3 质粒细胞的免疫印迹分析使用兔制备的 μ NS 多克隆抗体作为一抗,二抗使用 HRP 羊抗兔抗体。转染 pCAG-M3 质粒细胞的免疫印迹分析实验使用兔制备的 μ NS 多克隆抗体作为一抗,二

抗是 HRP 羊抗兔抗体。

2 结果

2.1 感染细胞中确认 μ NS and σ NS 的蛋白表达

μ NS 和 σ NS 蛋白都以类似的点状致密结构呈现, 这种小的点状致密结构即为包涵体样结构, 且这

2 种蛋白在细胞质中, 尤其是在病毒包涵体样结构中共同定位 (见图 1)。在未感染的细胞中未观察到 μ NS 和 σ NS 蛋白。免疫印迹结果可见感染细胞裂解物 75 kD 大小处有蛋白表达即为 μ NS 蛋白, 感染细胞裂解物 34 kD 处有蛋白表达即为 σ NS 蛋白, 未感染的细胞作阴性对照 (见图 2)。

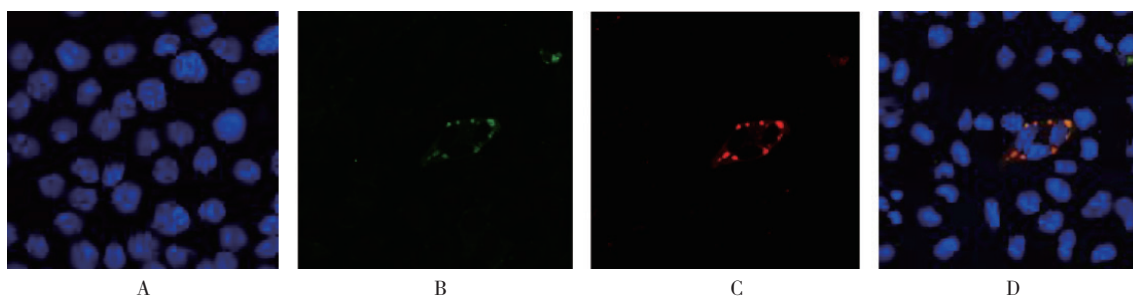


图 1 μ NS 和 σ NS 蛋白在 NBV 感染 BSR 细胞中的定位 ($\times 400$)

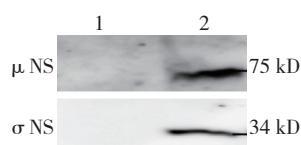


图 2 μ NS 和 σ NS 蛋白在 NBV 感染 BSR 细胞中的表达

2.2 单独转染 pCAG-M3 或 pCAG-S3 质粒细胞中 μ NS 和 σ NS 蛋白的表达

细胞质中观察到小点状结构, 即病毒包涵体样结

构。用 pCAG-S3 质粒 (含有来自 NBV 的 S3 基因表达载体) 转染 BSR 细胞时, 观察到 σ NS 蛋白在整个细胞质中表现出弥散分布, 没有形成点状结构。未转染细胞为阴性对照。见图 3。

免疫印迹结果可见质粒转染细胞裂解物 75 kD 大小处有蛋白表达即为 μ NS 蛋白, 未转染细胞用作对照。免疫印迹结果可见质粒转染细胞裂解物 34 kD 处有蛋白表达即为 σ NS 蛋白, 未转染细胞用作对照。见图 4。

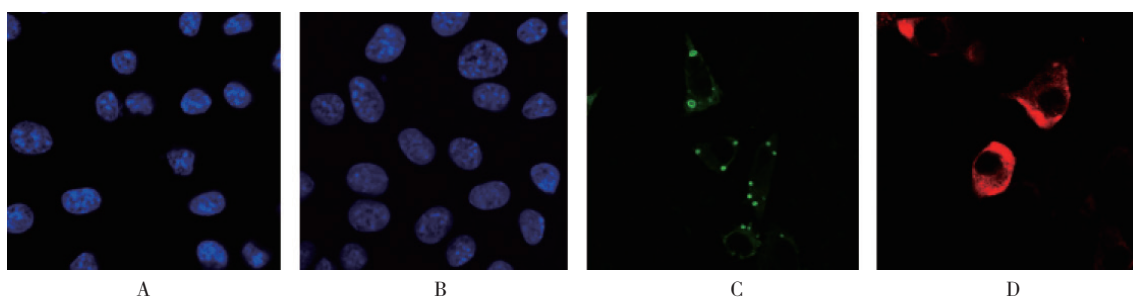


图 3 单独转染细胞中 NBV μ NS 和 σ NS 蛋白的定位 ($\times 400$)

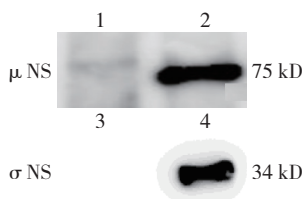
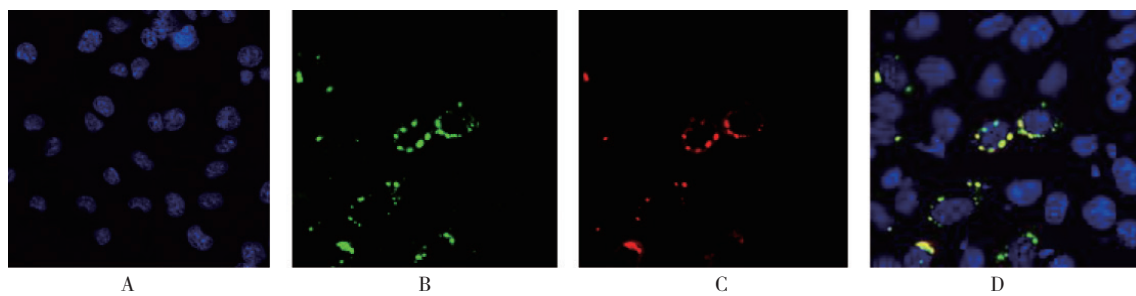


图 4 单独转染质粒的细胞中 μ NS 和 σ NS 蛋白的表达

2.3 μ NS 和 σ NS 蛋白共定位于 pCAG-M3 和 pCAG-S3 质粒共转染的 BSR 细胞

在 μ NS 和 σ NS 2 个质粒共转染 24 h 后的 BSR 细胞中, 观察到与 NBV 病毒感染的 BSR 细胞相同现象: μ NS 和 σ NS 蛋白在细胞质中, 特别是在病毒包涵体样结构中共同定位, 可知 σ NS 蛋白通过与 μ NS 蛋白的相互作用和 μ NS 蛋白在细胞中共定位。见图 5。



A: 未转染质粒细胞; B: 免疫染色 μ NS 蛋白; C: 免疫染色 σ NS 蛋白; D: μ NS 和 σ NS 蛋白共染色。

图5 μ NS 和 σ NS 蛋白在共转染 pCAG-M3 及 pCAG-S3 细胞的细胞质中共定位 ($\times 400$)

3 讨论

NBV 是融合性正呼肠孤病毒家族中的一员, 在呼肠孤病毒的培养过程中, 根据病毒在感染细胞时是否具有诱导细胞融合的能力, 将呼肠孤病毒分为细胞融合病毒与非融合病毒。禽类呼肠孤病毒 (avian reovirus, ARV)、狒狒呼肠孤病毒、爬行类呼肠孤病毒、Broome 呼肠孤病毒及 NBV 属于融合病毒。典型的哺乳动物呼肠孤病毒 (mammalian reoviruses, MRV) 属于非融合病毒^[4-6]。正常情况下, 非融合病毒 MRV 十分常见, 可引起人类无症状感染。融合性病毒感染虽可引起严重的动物疾病。在 2006 年之前, 还未有过该病毒引起人类疾病的报道。然而 2006 年, NBV 病毒先后在马来西亚、香港等地的急性呼吸道感染患者体内被分离出来^[7]。由此可知, NBV 已经进化成一种可以引起人畜共患病的病原体。

NBV 病毒感染细胞早期, 细胞质中可观察到一种小型相密包涵体结构^[8], 随着感染的进展逐渐变得更大且向细胞核移动。有研究称这种小型的相密包涵体结构为 inclusion body, 笔者将其译为包涵体样结构。有文献证明, 包涵体样结构是由 dsRNA、多种蛋白质和完全组装的颗粒组成^[9]。 μ NS 是呼肠孤病毒一种主要的非结构蛋白, 由 M3 基因组区段编码, 蛋白质大小为 75 kD。针对 MRV 和 ARV 的研究表明, 非结构蛋白 μ NS 在细胞中独自表达, 即可以在胞质内形成包涵体样结构, 显微镜下观察该包涵体样结构与某些呼肠孤病毒株感染细胞期间形成的结构极为相似^[10-11]。其他 MRV 和 ARV 的研究结果还表明, μ NS 在质粒转染和病毒感染的细胞中都可形成包涵体样结构。当通过 RNA 干扰敲除 μ NS 表达时, 包涵体样结构的形成和病毒增殖被严重抑制; 当以野生型 μ NS 通过质粒转染方式在该细胞内表达时, 病毒又得以继续增殖^[12-13]。这些结果有力的表明, 包涵体样结构的

形成是 MRV 成功增殖的重要且必要的条件。第 2 种主要的呼肠孤病毒非结构蛋白 σ NS 也与包涵体样结构的形成有关^[14]。 σ NS 是由 S3 基因组区段编码的含有 366 个残基、大小为 41 kD 的蛋白质。 σ NS 蛋白对包括呼肠孤病毒 mRNA 在内的单链 RNA 具有很强的亲和力。有研究在从感染的细胞中分离呼肠孤病毒时, 用核糖核酸酶 A 处理后发现有大的 (40 ~ 60 S) 复合物解离^[15], 这暗示 σ NS 和 RNA 在感染期间形成大的核蛋白复合物。在相关的 MRV 研究中, 已从病毒感染细胞后形成的单链 RNA 复合物中分离出 σ NS、 μ NS 蛋白和结构蛋白 $\sigma 3$, 表明这些蛋白质参与制备用于负链合成的病毒转录物, 并将其包装到子代病毒的核心中。由于 σ NS 在感染过程中在包涵体样结构内定位, 所以被认为可招募其他病毒蛋白并且参与 dsRNA 的合成^[16]。还有研究表明, 其他呼肠孤病毒 σ NS 和 μ NS 蛋白有重塑内质网, 构建新细胞器的功能^[17]。本研究发现, μ NS 与 σ NS 可以相互作用, 且这种相互作用是造成病毒感染细胞中包涵体样结构中 σ NS 存在的直接原因。关于 MRV、ARV 的研究都已说明 μ NS、 σ NS 蛋白在病毒增殖过程中的重要作用, 但这 2 种蛋白在可引起人类疾病的 NBV 中的表达情况至今还未见报道。

本研究中笔者观察到, 尽管 σ NS 在感染期间与包涵体样结构中的 μ NS 共定位, 但当在没有 μ NS 表达的情况下, 其在整个细胞中弥散分布。当与 μ NS 共表达时, σ NS 被重新分布并与 μ NS 在包涵体样结构中共定位。因此, σ NS 对于功能性病毒包涵体样结构的形成是必需的, 但是在不存在 μ NS 蛋白的情况下不能建立包涵体样结构。 μ NS 和 σ NS 在没有其他病毒蛋白的情况下相关联, 表明这种关联可能介导 σ NS 定位于病毒感染细胞的包涵体样结构。与 MRV 和 ARV 的 μ NS 和 σ NS 蛋白相同, 笔者的结果还表明,

NBV 的 μ NS 蛋白在转染细胞中可独立表达, 且在无任何其他病毒蛋白表达时即具有形成包涵体样结构的能力。上述结果说明, μ NS 是 NBV 病毒感染期间包涵体样结构形成的关键因素, 且该蛋白质是包涵体形成所需的最小病毒成分。因此可知, μ NS 在 NBV 病毒增殖的早期阶段, 通过形成病毒复制位点及募集病毒复制所必需蛋白的方式起重要作用。

综上所述, μ NS 蛋白可在 μ NS 转染和 NBV 病毒感染细胞中形成包涵体, σ NS 蛋白可与 μ NS 蛋白相互作用。上述结果揭示 σ NS 蛋白可通过与 μ NS 蛋白关联的方式被招募到包涵体样结构中, 这对于病毒的复制和装配都非常重要, 对呼肠孤病毒感染机制的研究、抗呼肠孤病毒药物的研发具有重要意义。

参 考 文 献:

- [1] 陈江曼, 李永刚, 王佳美, 等. 人致病性呼肠孤病毒 M3 编码蛋白纯化及多克隆抗体制备 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(18): 18-21.
- [2] YAMANAKA A, IWAKIRI A, YOSHIKAWA T, et al. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus[J]. PLoS One, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0092777.
- [3] SINGH H, YOSHIKAWA T, KOBAYASHI T, et al. Rapid whole genome sequencing of Miyazaki-Bali/2007 pteropine orthoreovirus by modified rolling circular amplification with adaptor ligation-next generation sequencing[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16517.
- [4] YAN X, PARENT K N, GOODMAN R P, et al. Virion structure of baboon reovirus, a fusogenic orthoreovirus that lacks an adhesion fiber[J]. J Virol, 2011, 85(15): 7483-7495.
- [5] DUNCAN R, CORCORAN J, SHOU J, et al. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species[J]. Virology, 2004, 319(1): 131-140.
- [6] THALMANN C M, CUMMINS D M, YU M, et al. Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian fruit bat[J]. Virology, 2010, 402(1): 26-40.
- [7] VOON K, TAN Y F, LFONG P P, et al. Pteropine orthoreovirus infection among out-patients with acute upper respiratory tract infection in Malaysia[J]. Journal of Medical Virology, 2015, 87(12): 2149-2153.
- [8] BUSSIÈRE L D, CHOUDHURY P, BELLAIRE B, et al. Characterization of a replicating mammalian orthoreovirus with tetracysteine-tagged μ NS for live-cell visualization of viral factories[J]. J Virol, 2017, DOI: 10.1128/JVI.01371-17.
- [9] MILLER C L, ARNOLD M M, BROERING T J, et al. Localization of mammalian orthoreovirus proteins to cytoplasmic factory-like structures via nonoverlapping regions of μ NS[J]. J Virol, 2010, 84(2): 867-882.
- [10] BECKER M M, PETERS T R, DERMODY T S, et al. Reovirus sigma NS and mu NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection[J]. J Virol, 2003, 77(10): 5948-5963.
- [11] BROERING T J, PARKE J S, JOYCE P L, et al. Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells[J]. J Virol, 2002, 76(16): 8285-8297.
- [12] ARNOLD M M, MURRAY K E, NIBERT M L. Formation of the factory matrix is an important, though not a sufficient function of nonstructural protein mu NS during reovirus infection[J]. Virology, 2008, 375(2): 412-423.
- [13] KOBAYASHI T, CHAPPELL J D, DANTHI P. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference[J]. J Virol, 2006, 80(18): 9053-9063.
- [14] MBISA J L, BECKER M M, ZOU S, et al. Reovirus mu2 protein determines strain-specific differences in the rate of viral inclusion formation in L929 cells[J]. Virology, 2000, 272(1): 16-26.
- [15] ZAMORA P F, HU L, KNOWLTON J J, et al. Reovirus nonstructural protein σ NS acts as an RNA stability factor promoting viral genome replication[J]. J Virol, 2018, DOI: 10.1128/JVI.00563-18.
- [16] de CASTRO I F, ZAMORA P F, OOMS L, et al. Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes[J]. MBio, 2014, DOI: 10.1128/mBio.00931-13.
- [17] TENORIO R, DECASTRO I F, KNOWLTON J J, et al. Reovirus σ NS and μ NS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles[J]. mBio, 2018, DOI: 10.1128/mBio.01253-18.

(唐勇 编辑)