

非洲猪瘟病毒内囊膜蛋白 p17 与宿主互作蛋白的初步鉴定

钟桂芳, 邓婷娟, 徐康, 倪温碧, 王裴, 胡伯里, 周继勇

浙江大学 动物医学中心/农业农村部动物病毒学重点实验室, 浙江 杭州 310058

钟桂芳, 邓婷娟, 徐康, 倪温碧, 王裴, 胡伯里, 周继勇. 非洲猪瘟病毒内囊膜蛋白 p17 与宿主互作蛋白的初步鉴定. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2883-2890.

ZHONG GF, DENG TJ, XU K, NI WB, WANG P, HU BL, ZHOU JY. Identification of host proteins interacting with African swine fever virus inner envelope protein p17. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2883-2890.

摘要: 非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 的感染导致猪的死亡率高达 100%, 给养殖业造成毁灭性灾难。因此, 开展针对 ASFV 感染复制的研究有着重大的意义。目前发现 ASFV 有超过 150 个开放阅读框, 其中 *D117L* 基因编码的内囊膜蛋白 p17 参与病毒二十面体结构的形成, 但是对 p17 调控宿主细胞功能的机制知之甚少。研究通过免疫沉淀技术联合蛋白质组分析, 初步筛选出与 ASFV p17 潜在的宿主互作蛋白。通过进一步免疫共沉淀技术和激光共聚焦实验确认了 p17 与线粒体外膜蛋白 TOMM70 (translocase of outer mitochondrial membrane 70)、热休克蛋白 HSPA8 (heat shock 70 kDa protein 8) 的互作。该研究为进一步探索 p17 在 ASFV 感染过程中的功能提供了重要信息。

关键词: 非洲猪瘟病毒; p17; 免疫沉淀技术; 质谱; 互作蛋白

Identification of host proteins interacting with African swine fever virus inner envelope protein p17

ZHONG Guifang, DENG Tingjuan, XU Kang, NI Wenbi, WANG Pei, HU Boli, ZHOU Jiyong

MOA Key Laboratory of Animal Virology/Center of Veterinary Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: African swine fever virus (ASFV) infection leads to a mortality rate of up to 100%, causing

Received: March 20, 2022; Accepted: May 26, 2022; Published online: May 30, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31941009)

Corresponding author: HU Boli. E-mail: bolihu@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31941009)

devastating disasters to the pig industry. Understanding the ASFV infection and replication is therefore of great importance. ASFV has more than 150 open reading frames, among which the inner coat protein p17 encoded by the *D117L* gene is involved in the formation of the icosahedral structure of the virus. However, little is known about the mechanism how p17 regulates host cell function. In this study, the potential host proteins interacting with ASFV p17 were screened by immunoprecipitation technique combined with protein profiling analysis. The interactions of p17 with mitochondrial membrane protein TOMM70 and heat shock protein HSPA8 were confirmed by co-immunoprecipitation technique and laser confocal experiments. This study provides important information for further exploring the function of p17 during ASFV infection.

Keywords: African swine fever virus; p17; immunoprecipitation; mass spectrometry; interacting protein

非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 是非洲猪瘟病毒科 (Asfarviridae) 家族中唯一成员, 是唯一已知通过节肢动物传播的双链 DNA 病毒^[1]。1921 年首次在东非地区肯尼亚发现非洲猪瘟 (African swine fever, ASF), 自此 ASF 在非洲国家蔓延。ASFV 可以通过直接接触传播, 也可以通过污染材料间接传播^[2]。自 2007 年, ASFV 入侵欧亚大陆, 严重危害野生动物和家畜健康, 随着病毒的传播和变异, 已经演化出至少 24 种 ASFV 基因型^[3]。据 ASFV 基因 p72 的遗传学分析, 2018 年 8 月中国暴发的 ASF 为基因型 II^[4], ASFV 给我国的养猪业造成破坏性影响^[5]。

ASFV 颗粒具有独特的多层结构, 直径约 250 nm^[6]。它包括一个含基因的类核体, 依次被内蛋白衣壳、内脂蛋白膜、外蛋白衣壳和外脂蛋白膜包裹。病毒基因组有 170–190 kb, 含有超过 150 个开放阅读框, 大部分缺乏任何已知或可预测的功能信息^[7]。其中一些基因功能已有研究, 例如 E120R 和 MGF505-7R 等抑制 I 型干扰素^[8-9], E199L 诱导细胞凋亡^[10], S273R 抑制细胞焦亡^[11]。1986 年 Carrascosa 等通过免疫电子显微镜在病毒颗粒内衣壳发现由 ASFV 基因 *D117L* 编码的 p17^[12]。1995 年 Simón-Mteo

等分析出 p17 在转录后期表达, 绘制其结构并测定序列信息^[13]。随后 Suarez 等发现病毒在形成二十面体结构过程中, p17 发挥至关重要的作用。接着 Xia 等学者发现 p17 可以通过内质网应激影响细胞周期, 抑制细胞增殖^[14]。p17 在病毒颗粒形成中发挥着重要作用, 但其调控宿主细胞生命活动的分子机制还存在大量的未解之谜。因此筛选出与 ASFV p17 相互作用的宿主因子对探究 ASF 的致病机制具有重大意义。

本研究采用免疫共沉淀及蛋白质谱技术筛选出与 ASFV p17 互作的宿主蛋白, 通过免疫共沉淀实验和激光共聚焦实验鉴定出线粒体外膜蛋白 TOMM70、热休克蛋白 HSPA8 与 ASFV p17 存在相互作用关系。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

HEK293T、3D4/21 细胞购自 ATCC 细胞库并由本实验室保存; pCMV-N-Flag、pCMV-N-Myc、pEGFP-C3 真核表达载体购自 Clontech Laboratories 公司; pCMV-Myc-HSPA1L、pCMV-Myc-TRAP1 和 pCMV-Flag-HSPA8 真核表达载体由实验室保存; HRP 标记的羊抗鼠抗体、HRP 标记的羊抗兔抗体购自赛默飞世尔公司;

Flag、Myc 抗体购于杭州华安生物技术有限公司；抗 Flag 琼脂糖凝珠购于 Sigma 公司；T4 DNA 连接酶、Bio-Best 转染试剂、高保真酶、PCR mix、蛋白显色底物溶液购自南京诺唯赞生物科技有限公司；RPMI-1640、DMEM 培养基购自英杰生命技术有限公司；限制性核酸内切酶和蛋白质预染 Marker 购自宝生物公司；质粒抽提试剂盒购自北京天根生化科技（北京）有限公司；核酸清洁回收试剂盒、核酸切胶回收试剂盒购自杭州新景生物公司；蛋白上样液购自北京索莱宝科技有限公司；FITC 羊抗鼠购自 KPL 公司；A546 驴抗兔购自 Invitrogen 公司。

1.2 构建 ASFV p17 真核表达质粒

根据网上公布的 ASFV HLJ/2018 基因组序列 (GenBank 登录号: MK333180.1), 合成含限制性酶切位点 *EcoR* I (GAATTC) 和 *Kpn* I (GGTACC) 的 ASFV p17 序列, 通过双酶切连接将目的片段插入到 pCMV-N-Flag、pEGFP-C3 载体中, 经测序验证正确。

1.3 细胞样品制备

将 HEK293T 细胞铺至两个直径 10 cm 的细胞培养皿中, 待单层细胞密度生长达到 80%–90%, 分别转染 pCMV-N-Flag 空载和 pCMV-Flag-p17 至上述细胞中, 36 h 后收集细胞进行后续实验。

1.4 免疫共沉淀

取上述步骤的细胞, 加入 600 μ L 含 PMSF 的 NP40 细胞裂解液, 4 $^{\circ}$ C 裂解 2 h 后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清蛋白液, 加入 35 μ L protein G, 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 除去非特异性结合。再 3 500 r/min 离心 5 min, 弃 protein G 沉淀, 取上清 60 μ L 并且加入 20 μ L 4 \times 蛋白上样液作为 Input, 剩下上清加入 10 μ L 抗 Flag 琼脂糖凝珠, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。3 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 收

集琼脂糖凝珠。用预冷 PBS 洗涤 5 次琼脂糖凝珠, 最后用 45 μ L NP40 重悬, 加入 4 \times 蛋白上样液 15 μ L; 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清备用。

1.5 Western blotting 检测

取免疫共沉淀样品进行 SDS-PAGE, 将蛋白条带转印至硝酸纤维膜上, 用 5% 脱脂奶在室温封闭 2 h, 然后使用 PBST 洗 3 次, 分步进行一抗和二抗孵育, 并于化学发光成像仪中进行显色。使用的抗体为 Flag 鼠单抗 (1:1 000)、Flag 兔多抗 (1:1 000)、HRP-羊抗鼠二抗 (1:8 000)、HRP-羊抗兔二抗 (1:8 000)。

1.6 SDS-PAGE 及银染

剩余免疫沉淀样品进行 SDS-PAGE, 蛋白凝胶使用双蒸水冲洗 3 次, 加入固定液 (无水乙醇:冰乙酸:双蒸水=4:1:5) 室温固定 2 h, 结束固定后取出用双蒸水清洗 3 次, 每次 3 min; 加入敏化液 (硫代硫酸钠 1.57 g, 醋酸钠 34 g, 无水乙醇 0.15 L, 加入双蒸水定容至 0.5 L) 敏化 30 min, 敏化结束用双蒸水冲洗 5 次, 每次 3 min; 加入银染液 (硝酸银 1.75 g, 37% 甲醛 50 μ L, 加入双蒸水定容至 0.5 L) 室温避光银染 30 min, 再使用双蒸水清洗 5 次, 每次 3 min; 加入显色液 (硫代硫酸钠 0.015 7 g, 甲醛 200 μ L, 无水碳酸钠 12.5 g, 加入双蒸水定容至 0.5 L) 避光显色, 观察染色程度, 直至大部分目的条带出现加入终止液 (5% 冰乙酸) 终止显色。

1.7 质谱鉴定

切取对照组和实验组之间的差异蛋白条带, 送至上海中科新生命公司进行质谱鉴定。

1.8 宿主蛋白真核载体的构建

针对猪源宿主蛋白 TOMM70 设计含限制性酶切位点 *EcoR* I (GAATTC) 和 *Kpn* I (GGTACC) 的特异性引物 TOMM70-上游 (5'-C GGAATTC CGATGCGCCCTCTAAACCT-3') 和

TOMM70-下游 (5'-CGGGGTACCTTACAATGT TGGTGGTTTTAAT-3'), 利用实验室保存的猪源 cDNA 扩增出目的基因片段, 构建 pCMV-Myc-TOMM70 真核质粒, 并送至杭州尚亚生物公司测序验证, 转染 HEK293T 细胞中检测表达。

1.9 免疫共沉淀鉴定蛋白互作

分别将 pCMV-Flag-p17 (Flag-p17) 和 pCMV-Myc-TOMM70 (Myc-TOMM70)、pCMV-Flag-p17 和 pCMV-Myc-TRAP1 (Myc-TRAP1)、pCMV-Flag-p17 和 pCMV-Myc-HSPA1L (Myc-HSPA1L)、pCMV-Myc-p17 和 pCMV-Flag-HSPA8 (Flag-HSPA8) 共同转染 HEK293T 细胞进行免疫共沉淀和 Western blotting 分析。

1.10 激光共聚焦显微镜实验

3D4/21 细胞传代铺于六孔板中, 待细胞密度约 70%, 分别将 Flag-p17 和 Myc-TOMM70、Myc-p17 和 Flag-HSPA8 共同转染细胞, 待转染 24 h 后铺板于共聚焦小皿。转染 48 h 后使用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 0.1% Triton X-100 透化细胞 10 min, 经 5% 脱脂奶封闭 30 min 后, 孵育一抗 Flag 和 Myc 抗体, 并用 FITC 羊抗鼠和 A546 驴抗兔二抗 (1:500) 指示目的蛋白, DAPI 指示细胞核, 使用激光共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 真核表达载体的构建与表达

将 PCR 方法扩增获得的 p17 基因和 TOMM70 基因分别克隆至 pCMV-N-Flag 和 pCMV-N-Myc 载体中, 经测序验证载体构建成功。将构建成功的质粒转染至 HEK293T 细胞中, 通过 Western blotting 验证 TOMM70 和 p17 成功表达 (图 1)。

2.2 免疫共沉淀产物的 Western blotting 检测

检验免疫共沉淀 Input 和 IP 样品, p17 质粒转染细胞在 15–25 kDa 显示一目的条带, 说明抗 Flag 琼脂糖凝珠成功结合了带 Flag 标签的 p17 蛋白 (图 2A)。进一步通过 SDS-PAGE 和银染分析免疫共沉淀产物, 结果显示, 在 p17 质粒转染细胞中可检测到约 17 kDa、70 kDa 的蛋白条带 (图 2B)。

2.3 与 p17 潜在互作蛋白的质谱鉴定

取 Co-IP 产物的银染产物进行质谱分析, 根据覆盖肽段的百分率, 筛选出 4 个与 p17 潜在互作的宿主蛋白, 它们分别是线粒体外膜蛋白 (TOMM70)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1)、热休克蛋白家族成员 8 蛋白 (HSPA8)、热休克蛋白家族成员 1 样蛋白 (HSPA1L), 信息见表 1 和图 3。

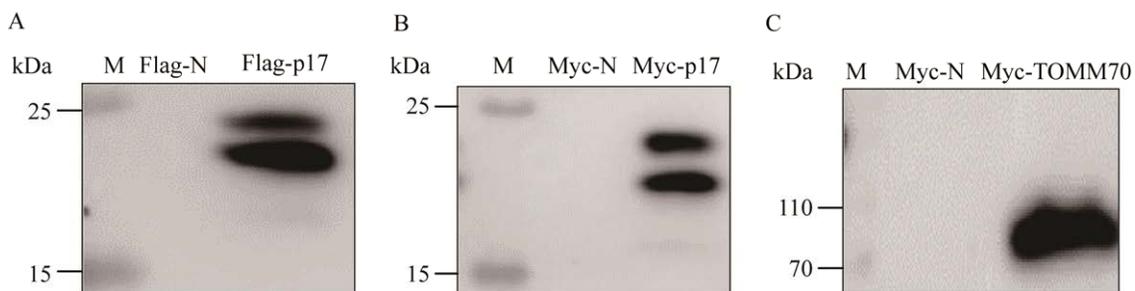


图 1 Flag-p17 (A)、Myc-p17 (B) 和 Myc-TOMM70 (C) 重组质粒表达验证

Figure 1 Western blotting analysis of the expression of recombinant plasmid Flag-p17 (A), Myc-p17 (B) and Myc-TOMM70 (C).

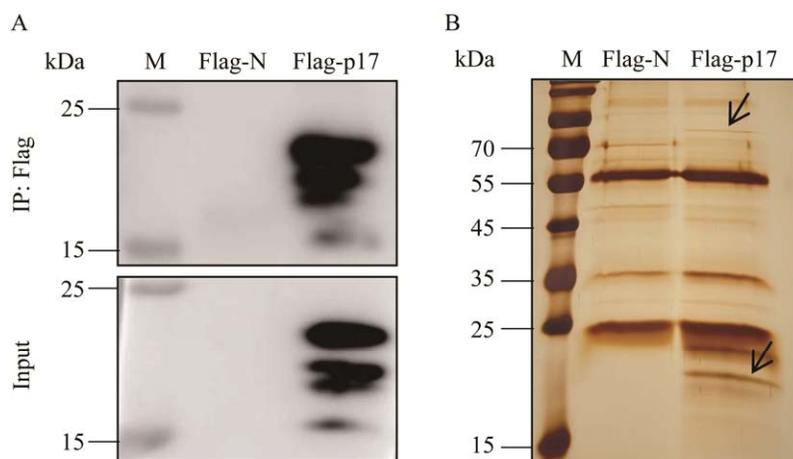


图 2 免疫共沉淀 Western blotting (A)、SDS-PAGE 和银染分析 (B)

Figure 2 Western blotting (A), SDS-PAGE and silver staining assays (B) of co-immunoprecipitated products.

表 1 筛选质谱鉴定的潜在宿主互作蛋白

Table 1 Screening potential P17 interacting host proteins identified by mass spectrometry

| Protein ID | Gene name | Unique peptide | Cover percent (%) | Mass (Da) | Score |
|------------|-----------|----------------|-------------------|-----------|-------|
| O94826 | TOMM70 | 6 | 7.24 | 67 454.07 | 44.78 |
| K0A7K7 | TRAP1 | 6 | 6.36 | 76 927.11 | 42.47 |
| E9PNE6 | HSPA8 | 4 | 6.00 | 54 975.39 | 52.23 |
| P34931 | HSPA1L | 3 | 3.90 | 70 375.16 | 50.74 |

2.4 质谱鉴定互作蛋白的免疫共沉淀验证

在免疫共沉淀实验中用抗 Flag 琼脂糖凝胶验证 ASFV p17 蛋白与候选蛋白之间的相互作用,如图 4 所示,ASFV p17 蛋白可以与 TOMM70、HSPA8 蛋白互作,但是与 HSPA1L、TRAP1 蛋白没有互作。

2.5 p17 和 TOMM70/HSPA8 细胞内共定位

将 Flag-p17 和 Myc-TOMM70、Myc-p17 和 Flag-HSPA8 质粒共转染 3D4/21 细胞,转染后对样品进行处理,如图 5 所示, TOMM70/HSPA8 可以与 p17 在细胞质内存在共定位现象,进一步说明了 TOMM70/HSPA8 可以与 p17 相互作用。

3 讨论

2018 年以来,我国暴发非洲猪瘟 (ASF),

公共卫生环境和养殖业受到巨大冲击,研发治疗 ASF 的药物、疫苗迫在眉睫。研究病毒蛋白与宿主蛋白之间的相互作用可以解析 ASFV 的致病分子机制,并取得了一定进展。已有报道 ASFV 通过激活 eIF4F 复合物增加病毒 mRNA 的翻译^[15],E120R 蛋白与 IRF3 相互作用达到抑制干扰素的目的^[9],E199L 通过与 PYRC2 的相互作用促进自噬^[16]。深入挖掘病毒与宿主蛋白相互作用机制、解析病毒逃逸宿主免疫反应机制,是解决 ASFV 防控难题的重要途径。

作为 ASFV 二十面体结构形成的必要基因,p17 蛋白能够影响细胞增殖,但是调控宿主细胞功能的分子机制有待深入研究。本研究通过免疫共沉淀技术与质谱鉴定,鉴定出与 p17 有潜在相互作用的宿主蛋白 HSPA8、TOMM70、HSPA1L 和 TRAP1。进一步验证,仅发现 AFSV p17

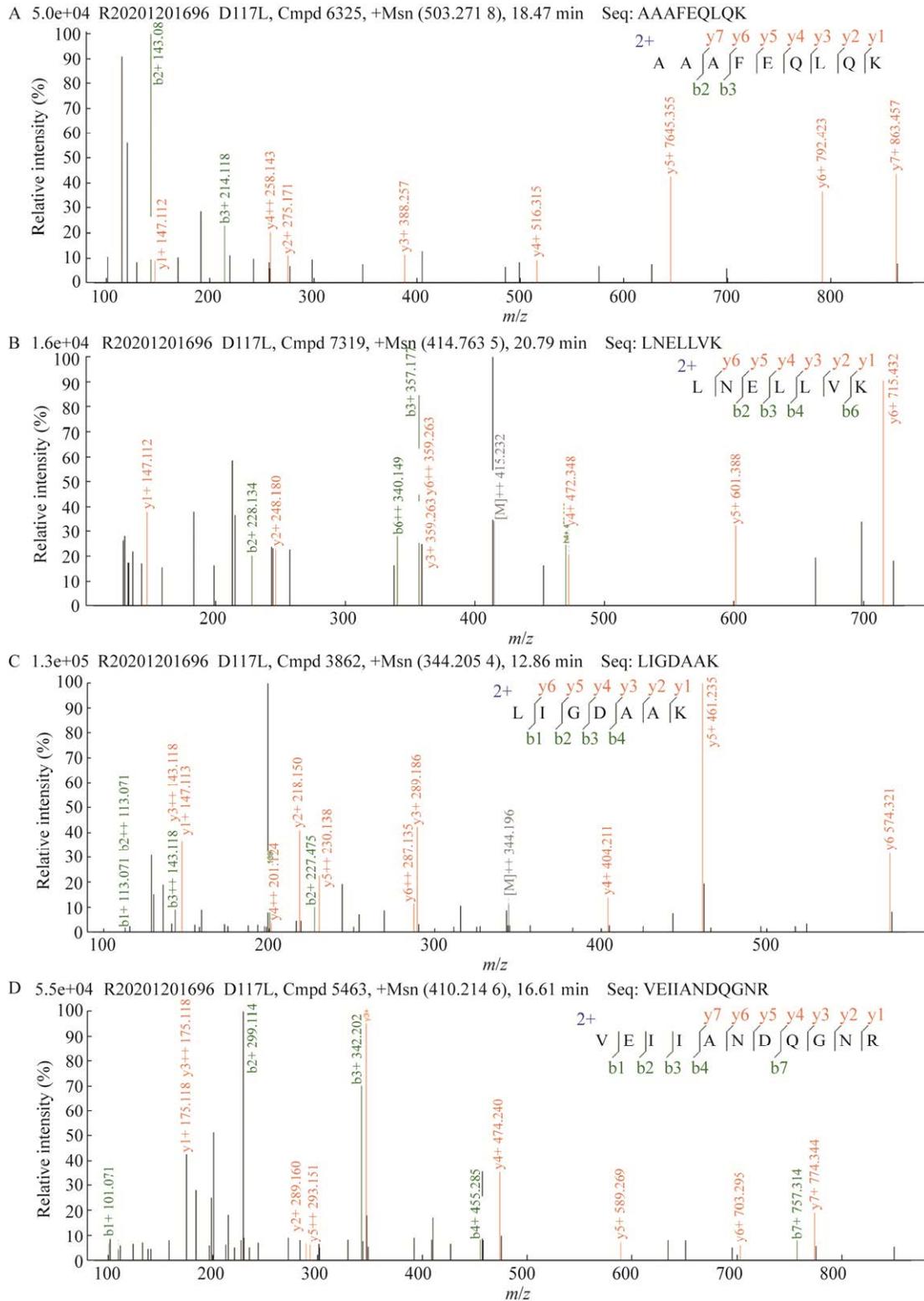


图 3 潜在宿主互作蛋白 TOMM70 (A)、TRAP1 (B)、HSPA8 (C) 和 HSPA1L (D) 的质谱图

Figure 3 Mass spectrum of potential P17 interacting host proteins TOMM70 (A), TRAP1 (B), HSPA8 (C) and HSPA1L (D).

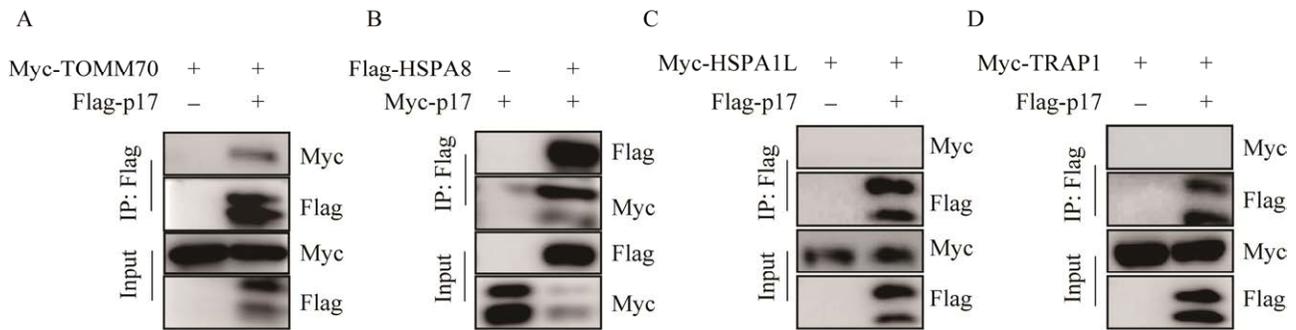


图 4 p17 与宿主蛋白 TOMM70 (A)、HSPA8 (B)、HSPA1L (C) 和 TRAP1 (D) 互作验证

Figure 4 Confirmation of the interaction between p17 and host proteins TOMM70 (A), HSPA8 (B), HSPA1L (C) and TRAP1 (D).

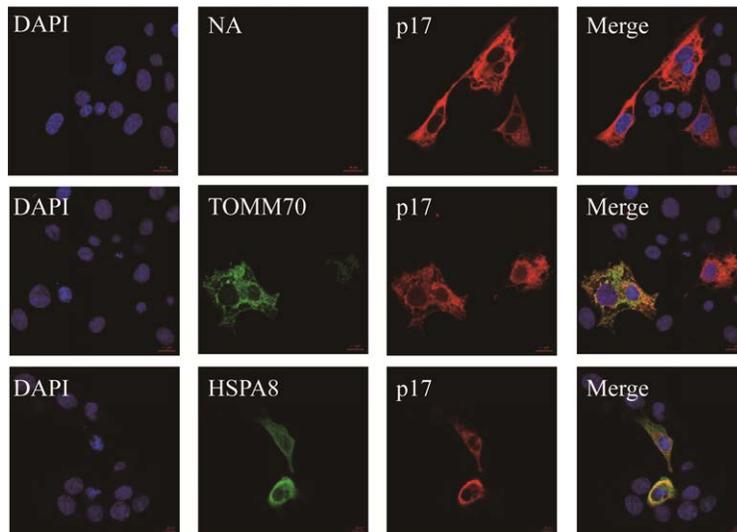


图 5 激光共聚焦 TOMM70/HSPA8 与 p17 共定位验证

Figure 5 Confocal laser co-localization validation of TOMM70/HSPA8 and p17.

蛋白与线粒体外膜蛋白 TOMM70、热休克蛋白 HSPA8 存在相互作用，而与 HSPA1L、TRAP1 没有互作。HSPA8 作为分子伴侣帮助多肽进行正确折叠和转运，依赖于含有特定 KFERQ 基序的蛋白与溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosomal-associated membrane proteins 2A, LAMP2A) 的结合发挥分子伴侣介导自噬作用^[17]，同时也是传染性支气管炎的粘附因子^[18]，参与猪繁殖和呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory

syndrome virus, PRRSV) 的附着和内化^[19]。TOMM70 是线粒体外膜的输入受体，作为分子伴侣参与线粒体前体蛋白的识别与输入^[20]，SARS-CoV-2 Orf9b 与 TOMM70 互作降低 IFN- I 表达，抑制了 Hsp90 和伴侣相关蛋白的募集^[21]。仙台病毒 (SeV) 通过 TOMM70/Hsp90/IRF3/Bax 蛋白复合物诱导细胞色素 c 释放到细胞质中，诱导细胞凋亡^[22]。本研究首次通过质谱技术筛选到与 p17 相互作用的宿主蛋白 HSPA8、TOMM70，

为进一步解析 p17 的生物学效应提供了信息, 提供一些在 ASFV 感染过程中发挥先天免疫作用机制研究的方向。

REFERENCES

- [1] Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, et al. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 215.
- [2] Jori F, Vial L, Penrith ML, et al. Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian Ocean. *Virus Res*, 2013, 173(1): 212-227.
- [3] Dixon LK, Stahl K, Jori F, et al. African swine fever epidemiology and control. *Annu Rev Anim Biosci*, 2020, 8: 221-246.
- [4] Zhao DM, Liu RQ, Zhang JF, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 438-447.
- [5] Sun EC, Zhang ZJ, Wang ZL, et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(5): 752-765.
- [6] Andrés G, Charro D, Matamoros T, Dillard RS, et al. The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes. *J Biol Chem*, 2020, 295(1): 1-12.
- [7] Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, et al. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, 2013, 173(1): 3-14.
- [8] Li JN, Song J, Kang L, et al. pMGF505-7R determines pathogenicity of African swine fever virus infection by inhibiting IL-1 β and type I IFN production. *PLoS Pathog*, 2021, 17(7): e1009733.
- [9] Liu HS, Zhu ZX, Feng T, et al. African swine fever virus E120R protein inhibits interferon beta production by interacting with IRF $_3$ to block its activation. *J Virol*, 2021, 95(18): e0082421.
- [10] Li TT, Zhao GH, Zhang TQ, et al. African swine fever virus pE199L induces mitochondrial-dependent apoptosis. *Viruses*, 2021, 13(11): 2240.
- [11] Zhao GH, Li TT, Liu XM, et al. African swine fever virus cysteine protease pS273R inhibits pyroptosis by noncanonically cleaving gasdermin D. *J Biol Chem*, 2022, 298(1): 101480.
- [12] Carrascosa JL, González P, Carrascosa AL, et al. Localization of structural proteins in African swine fever virus particles by immunoelectron microscopy. *J Virol*, 1986, 58(2): 377-384.
- [13] Simón-Mateo C, Freue JMP, Andrés G, et al. Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology*, 1995, 206(2): 1140-1144.
- [14] Xia NW, Wang H, Liu XL, et al. African swine fever virus structural protein p17 inhibits cell proliferation through ER stress-ROS mediated cell cycle arrest. *Viruses*, 2020, 13(1): 21.
- [15] Sánchez EG, Quintas A, Nogal M, et al. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res*, 2013, 173(1): 58-75.
- [16] Chen S, Zhang XH, Nie Y, et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2. *Virol Sin*, 2021, 36(2): 196-206.
- [17] Stricher F, Macri C, Ruff M, et al. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, 2013, 9(12): 1937-1954.
- [18] Zhu PP, Lv CF, Fang CX, et al. Heat shock protein member 8 is an attachment factor for infectious bronchitis virus. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1630.
- [19] Wang L, Li R, Geng R, et al. Heat shock protein member 8 (HSPA8) is involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0186021.
- [20] Edmonson AM, Mayfield DK, Vervoort V, et al. Characterization of a human import component of the mitochondrial outer membrane, TOMM70A. *Cell Commun Adhes*, 2002, 9(1): 15-27.
- [21] Jiang HW, Zhang HN, Meng QF, et al. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(9): 998-1000.
- [22] Wei B, Cui Y, Huang YF, et al. Tom70 mediates Sendai virus-induced apoptosis on mitochondria. *J Virol*, 2015, 89(7): 3804-3818.

(本文责编 郝丽芳)