

• 动物及兽医生物技术 •

# 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 nsp9 互作宿主蛋白对病毒复制的影响

施朱桂, 吴佳瑜, 朱雅, 周继勇, 胡伯里\*

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

施朱桂, 吴佳瑜, 朱雅, 周继勇, 胡伯里. 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 nsp9 互作宿主蛋白对病毒复制的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4824-4836.

SHI Zhugui, WU Jiayu, ZHU Ya, ZHOU Jiyong, HU Boli. Effects of host proteins interacting with non-structural protein nsp9 of porcine epidemic diarrhea virus on viral replication[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4824-4836.

**摘要:** 猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)导致仔猪和育肥猪发生急性肠道传染病, 是危害养猪业最重要的病原体之一。目前发现 PEDV 能够编码至少 16 个非结构蛋白, 其中 nsp9 能够结合至单链 RNA 中, 但是其功能机制还不清楚。本研究通过免疫沉淀联合蛋白质组分析, 筛选出潜在的与 PEDV nsp9 宿主互作蛋白。通过进一步免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)和激光共聚焦技术确认了 nsp9 与热休克蛋白 HSPA8、Toll 相互作用蛋白 Tollip、热休克蛋白 HSPA9、线粒体外膜蛋白 TOMM70 互作。其中, 过表达 HSPA8 使 nsp9 的表达量先上调而后下调, 并促进 PEDV 的增殖; 过表达 Tollip 使 nsp9 的表达量显著上调, 并抑制 PEDV 的增殖; 过表达 TOMM70 使 nsp9 的表达量显著下调, 但对 PEDV 的增殖无明显影响; 过表达 HSPA9 对 nsp9 的表达以及 PEDV 的增殖均无明显影响。该研究为探索 nsp9 互作蛋白在 PEDV 感染过程中的功能提供了重要信息。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 非结构蛋白 9; 免疫沉淀技术; 质谱技术; 互作蛋白

## Effects of host proteins interacting with non-structural protein nsp9 of porcine epidemic diarrhea virus on viral replication

SHI Zhugui, WU Jiayu, ZHU Ya, ZHOU Jiyong, HU Boli\*

Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Animal Virology, Center for Veterinary Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is a highly pathogenic virus that can cause

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801102)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801102).

\*Corresponding author. E-mail: Bolihu@zju.edu.cn

Received: 2023-02-18; Accepted: 2023-05-26

acute intestinal infectious diseases in both piglets and fattening pigs. The virus encodes at least 16 non-structural proteins, including nsp9, which has been shown to bind to single-stranded RNA. However, its function and mechanism remain unclear. In this study, we aimed to identify potential host proteins that interact with PEDV nsp9 using immunoprecipitation combined with mass spectrometry. The interactions were then confirmed by co-immunoprecipitation (Co-IP) and confocal laser scanning fluorescence techniques. The results showed that nsp9 interacts with HSPA8, Tollip, HSPA9 and TOMM70. Among them, overexpression of HSPA8 resulted in caused first upregulated and then down-regulated expression of nsp9, and promoted the proliferation of PEDV. Overexpression of Tollip significantly upregulated the expression of nsp9 and inhibited the proliferation of PEDV. Overexpression of TOMM70 significantly reduced the expression of nsp9, but did not show significant effect on the proliferation of PEDV. Overexpression of HSPA9 did not show significant effect on the expression of nsp9 and the proliferation of PEDV. These findings may facilitate further investigating the role of nsp9-interacting proteins in PEDV infection.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus; non-structural protein 9; immunoprecipitation; mass spectrometry; interacting proteins

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) 引起的猪接触性肠道传染病, 特征为呕吐、腹泻、脱水, 临床症状与猪传染性胃肠炎极为相似<sup>[1]</sup>。猪流行性腹泻于 1971 年首发于英国, 自 20 世纪 80 年代以来陆续在我国暴发<sup>[2]</sup>。该病多发生在每年 12 月份至翌年 1-2 月份, 也有夏季发病的报道<sup>[3]</sup>, 可发生于任何年龄的猪, 未断奶仔猪症状最重, 死亡率高达 100%<sup>[4]</sup>。

PEDV 是 PED 的病原体, 属于套式病毒目, 冠状病毒科, 甲型( $\alpha$ )冠状病毒属 (Alphacoronavirus), 是一种单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约为 28 kb, 由 4 种结构蛋白 S 蛋白 (刺突蛋白)、M 蛋白 (膜蛋白)、E 蛋白 (包膜蛋白) 和 N 蛋白 (核衣壳蛋白), 16 种非结构蛋白 (nsp1-nsp16) 和辅助蛋白开放阅读框 3 (open reading frame, ORF3) 蛋白构成<sup>[5]</sup>。非结构蛋白 9 (non-structural protein 9, nsp9) 是冠状病毒复制的必需 RNA 结合蛋白, 在冠状病毒家族中高度保守。在感染过程中, nsp9 蛋白结合核苷酸以及其他蛋白的能力对 PEDV 复制复合体的形成是必需的<sup>[6-7]</sup>, 然而, nsp9 的二聚化和核酸结合机制仍然不清楚。同时, 对于 nsp9

调控宿主细胞生命活动的分子机制未见报道, 因此, 筛选出与 PEDV nsp9 互作的宿主蛋白, 明确其对 PEDV 复制的影响, 可为进一步阐明 nsp9 的功能机制提供基础信息。

本研究首次通过免疫沉淀与质谱技术联用的方式, 筛选到与 PEDV nsp9 存在潜在的互作的宿主蛋白, 并通过免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 和共定位观察实验明确了 HSPA8、Tollip、HSPA9 和 TOMM70 为 PEDV nsp9 的互作宿主蛋白, 最后通过病毒滴度测定法明确上述 4 种互作宿主蛋白对病毒复制的影响, 为后续探究 PEDV 胞内复制机制提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

HEK293T、VERO 购自 ATCC 并由本实验室传代并保种; PEDV CV777 毒株由本实验室分离并保存; PEDV M 蛋白单克隆抗体由本实验室筛选制备; pCMV-N-Flag、pCMV-Flag-C、pCMV-N-Myc、pCMV-Flag-HSPA8、pCMV-Myc-HSPA9、pCMV-Myc-TOMM70、pEGFP-GABARAPL2 和 pEGFP-C3-TOMM70 载体由本实验室保存; PCR

试剂盒(P212-03)、T4 DNA 连接酶(C301-01)购自诺唯赞生物技术有限公司;琼脂粉(hx1002)购自Xbio 公司;核酸切胶回收试剂盒(AP-GX-250)、PCR 清洁回收试剂盒(AP-PCR-50)购自杭州新景生物公司;DNA marker (3582Q)、限制性核酸内切酶(1605)购自 TaKaRa 公司;胰酶和 DMEM 培养基购自 Gbico 公司;Flag (0912-1)、Myc (R1208-1)、 $\beta$ -actin (M1210-2)和 GFP 标签兔抗体(ET1602-7)购自杭州华安生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠/兔 IgG、FITC 羊抗鼠(172-1806)、FITC 羊抗兔(172-1506)购自 KPL;A546 驴抗兔(A10040)、A546 驴抗兔(A10036)购自 Invitrogen;胎牛血清(04-001-1ACS)购自 BI;免疫印迹显色液购自 Bio-best;Protein A/G PLUS-Agarose (SC-2003)、硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜、NP40 (P0013F)和 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液(P1016)购自杭州言远科技有限公司;异丙醇、三氯甲烷、乙醇等有机化学试剂购自浙大物资中心。

## 1.2 重组质粒的构建

根据 NCBI 网站公布的 PEDV GD/HZ/2016 基因组序列(GenBank 登录号: OP191700.1)提取 PEDV CV777 毒株的 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板扩增 *PEDV nsp9* 基因,将 *nsp9* 基因克隆至 pCMV-Flag-C (pC-Flag)、pCMV-N-Myc (pN-Myc)载体中,构建 pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9)、

pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9)真核表达质粒,具体引物序列详见表 1。提取猪肾细胞总 RNA,以反转录获得 cDNA 作为模板,利用猪源 *Tollip* 基因上下游引物扩增 *Tollip* 基因,并克隆至 pCMV-N-Flag (pN-Flag)、pCMV-N-Myc (pN-Myc)载体中,构建真核表达质粒 pCMV-Flag-Tollip (pFlag-Tollip)、pCMV-Myc-Tollip (pMyc-Tollip),经测序验证正确,具体引物序列详见表 1。

## 1.3 细胞样品制备

将 HEK293T 细胞铺至 2 个细胞培养皿中,待密度生长到 80%,分别转染 pCMV-Flag-C (pC-Flag)和 pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9)质粒至两组细胞中,并于 48 h 后收集细胞备用。

## 1.4 免疫沉淀

取 1.3 步骤的 2 组细胞,加入 1 600  $\mu$ L NP40 裂解(含 1%苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 4  $^{\circ}$ C 裂解 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入 40  $\mu$ L protein A/G 4  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 1 000 r/min 离心 5 min,弃 protein A/G,取 60  $\mu$ L 上清为 Input,剩余上清加入 20  $\mu$ L 抗 Flag 琼脂糖凝珠,4  $^{\circ}$ C 孵育 4 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集琼脂糖凝珠。用 NP40 裂解液将凝珠洗涤 5 次,用 60  $\mu$ L 强裂解液(5% SDS+1% Triton)重悬,加入 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液;100  $^{\circ}$ C 煮 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
Flag-nsp9-F-1	CAGGCCCGAATTCGGCGTACGGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGA
Flag-nsp9-F-2	GATTACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATFACA
Flag-nsp9-F-3	TATAAGGACGATGATGACAAGGACTACAAAGATGATGACGATAAAAATAATGAGATTATTCCT
Flag-nsp9-R	GTAGTCGCCGGTACCTCGCTGCAAGCGTACAGTGGCACCT
Myc-nsp9-F	GCGAATTCGGAATAATGAGATTATTCCTGGTAA
Myc-nsp9-R	GCGGTACCCTGCAAGCGTACAGTGGCACCTA
Tollip-F	GCGAATTCGGATGGGCGACCACCGTCAGCAC
Tollip-R	GCGGTACCCTAGGACTCCTCGCCCATCTGG

### 1.5 Western blotting 检测

取 1.4 制备的 IP 样品 10  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE, 蛋白条带转印至孔径 0.45  $\mu$ m 的 NC 膜上, 脱脂奶室温封闭 1 h, 用 PBST 漂洗 3 次, 每次置于室温水平摇床 5 min, 一抗孵育:Flag 抗体(1:1 000), 4  $^{\circ}$ C 摇床过夜, 用 PBST 漂洗 3 次, 每次置于室温水平摇床 5 min, 二抗孵育:HRP-羊抗鼠(1:5 000), 37  $^{\circ}$ C 摇床孵育 1 h, 用 PBST 漂洗干净, 置于室温水平摇床 5 min, 重复 3 次, 置于化学发光成像仪中显色。

### 1.6 SDS-PAGE 及银染

SDS-PAGE 结束, 将蛋白胶放入平皿中, 用 ddH<sub>2</sub>O 漂洗, 加入固定液(无水乙醇 0.4 L, 冰乙酸 0.1 L, 双蒸水 0.5 L)室温固定 2 h; 用 ddH<sub>2</sub>O 淋洗干净; 加入敏化液(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3.14 g, 无水乙酸钠 6.8 g, 无水乙醇 0.3 L, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L)室温敏化 30 min; 用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗, 每次置于室温水平摇床 5 min, 重复 3 次; 避光, 加入银染液(AgNO<sub>3</sub> 2.5 g, 甲醛 100  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L)室温银染 30 min, 避光用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2 次, 每次 5 min; 避光加入显色液(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.031 4 g, 甲醛 0.4 mL, 无水 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 g, ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L)显色, 待大部分蛋白条带显出之后加入终止液(5%冰醋酸)终止显色。

### 1.7 质谱鉴定

将 30、50、70 kDa 特异性蛋白条带送至上海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定。

### 1.8 免疫共沉淀鉴定蛋白互作

将 HEK293T 细胞用胰酶消化并 1:3 铺至 6 孔板, 待单层细胞长至 80% 密度, 分别将 pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9) 和 pCMV-Flag-HSPA8 (pFlag-HSPA8)、pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9) 和 pCMV-Flag-Tollip (pFlag-Tollip)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-TOMM70 (pMyc-

TOMM70)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-HSPA9 (pMyc-HSPA9)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pEGFP-C3-GABARAPL2 (pGFP-GABARAPL2) 共同转染 HEK293T 细胞, 每组样品至少设置 2 个孔, 并且设置阴性对照, 36 h 收取样品, 进行 Co-IP 和 Western blotting 分析。

### 1.9 激光共聚焦显微镜实验

将 HEK293T 细胞铺至共聚焦小皿中, 待密度生长至约 40%, 将 pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9) 和 pCMV-Flag-HSPA8 (pFlag-HSPA8)、pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9) 和 pCMV-Flag-Tollip (pFlag-Tollip)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-HSPA9 (pMyc-HSPA9)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-TOMM70 (pMyc-TOMM70)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pEGFP-C3-GABARAPL2 (pGFP-GABARAPL2) 质粒共转染 HEK293T 细胞, 将 pCMV-Flag-C、pCMV-nsp9-Flag 分别与 pCMV-Myc-HSPA9、pEGFP-C3-GABARAPL2 共同转染细胞。转染 48 h 后加入 4% 多聚甲醛室温固定 10 min; 0.1% TritonX-100 室温透化 10 min; 5% 脱脂奶, 37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min; 抗 Flag、Myc 抗体用 5% 脱脂奶 1:300 稀释, 将中心小孔覆盖完全, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h; FITC 羊抗鼠和 A546 驴抗兔二抗均按 1:500 稀释混匀, 将中心小孔覆盖完全, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h; 用 DAPI 染核, 共聚焦显微镜观察、拍照。

### 1.10 梯度过表达互作宿主蛋白对 nsp9 表达的影响

HEK293T 细胞传代铺于十二孔板中, 待细胞密度约 70%, 分别将从低到高不同浓度梯度的 pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-TOMM70 (pMyc-TOMM70)、pCMV-nsp9-Flag

(pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-HSPA9 (pMyc-HSPA9)、pCMV-Myc-nsp9 (pMyc-nsp9) 和 pCMV-Flag-HSPA8 (pFlag-HSPA8)、pCMV-nsp9-Flag (pFlag-nsp9) 和 pCMV-Myc-Tollip (pMyc-Tollip) 共同转染细胞, 其余不足量的质粒由对应空载补齐。待转染 24 h 后, 将细胞用 90  $\mu\text{L}$  强裂解液(5% SDS+1% Triton)、30  $\mu\text{L}$  4 $\times$ 蛋白上样液重悬; 100  $^{\circ}\text{C}$ 煮 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 进行 Western blotting 分析。

### 1.11 过表达互作宿主蛋白对 PEDV M 蛋白表达水平的影响

将 VERO 细胞传代并铺于十二孔板中, 待细胞密度约 70%, 分别将 pCMV-Myc-TOMM70 (pMyc-TOMM70)、pCMV-Myc-HSPA9 (pMyc-HSPA9)、pCMV-Flag-HSPA8 (pFlag-HSPA8) 和 pCMV-Myc-Tollip (pMyc-Tollip) 与 nsp9 真核表达质粒共同转染细胞, 同时将对应的 pCMV-Flag-N (pN-Flag)、pCMV-Myc-N (pN-Myc) 空载转染至细胞中作为对照组。待转染 24 h 后, 采用 1 原液感染复数(multiplicity of infection, MOI) 的 PEDV 感染转染后的 VERO 细胞, 待接毒 24 h 后, 对样品进行处理。将细胞用 90  $\mu\text{L}$  强裂解液(5% SDS+1% Triton)重悬, 加入 4 $\times$ 蛋白上样液 30  $\mu\text{L}$ ; 100  $^{\circ}\text{C}$ 煮沸变性 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 进行 Western blotting 分析。

### 1.12 过表达互作宿主蛋白对 PEDV 增殖的影响

将 VERO 细胞传代并铺于十二孔板中, 待细胞密度约 70%, 分别将 pCMV-Myc-TOMM70 (pMyc-TOMM70)、pCMV-Myc-HSPA9 (pMyc-HSPA9)、pCMV-Flag-HSPA8 (pFlag-HSPA8) 和 pCMV-Myc-Tollip (pMyc-Tollip) 与 nsp9 真核表达质粒共同转染细胞, 同时将对应的 pCMV-Flag-N (pN-Flag)、pCMV-Myc-N (pN-Myc) 空载转染至细胞中作为对照组。待转染 24 h 后, 采

用 1 MOI 的 PEDV 感染转染后的 VERO 细胞, 待接毒 24 h, 收集细胞并反复冻融 3 次后, 进行病毒滴度的测定: 提前铺好一个 96 孔板 VERO 细胞, 待细胞密度达到 80%, 弃上清, 每一列加入 10 倍倍比稀释的病毒液, 从第 1 列到第 11 列记为  $10^{-1}$ – $10^{-11}$ , 最后一列为阴性对照。接毒后 60 h 细胞开始脱落, 在安全柜中吸除带有病毒液的上清, 加入固定液在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中固定 30 min, 固定液的配方为甲醇:丙酮=1:1; 在固定 30 min 后, 倒置 96 孔板轻拍弃去固定液, 然后将样品在通风橱中风干; 风干后向 96 孔板中加入封闭液(5%脱脂奶), 接着在  $37^{\circ}\text{C}$  摇床上封闭 30 min; 封闭结束后弃上清, 加入 PBS 100  $\mu\text{L}$ /孔, 然后置于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床上 5 min, 重复 3 次; 清洗结束弃上清, 之后按 1:1 000 的比例向 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  脱脂奶和 PEDV-M 蛋白单抗 0.1  $\mu\text{L}$ , 置于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床孵育 2 h; 一抗孵育结束后, 同上方法用 PBS 洗 3 次; 之后在避光环境下按 1:500 的比例向 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  脱脂奶和 FITC-YKS 二抗 0.2  $\mu\text{L}$ , 置于  $37^{\circ}\text{C}$  摇床上孵育 30 min; 二抗孵育结束后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。将 96 孔板置于荧光显微镜下观察, 用 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

## 2 结果与分析

### 2.1 真核表达载体的构建及表达

将 PCR 扩增成功后的 PEDV nsp9 基因分别连接至 pCMV-Flag-C (pC-Flag)、pCMV-N-Myc (pN-Myc) 载体中, Tollip 基因分别连接至 pCMV-N-Flag (pN-Flag) 和 pCMV-N-Myc (pN-Myc) 载体中, 经测序后序列比对成功。将构建好的 PEDV nsp9 和 Tollip 载体转染至 HEK293T, 进行 Western blotting 验证, nsp9 和 Tollip 成功表达(图 1)。

## 2.2 免疫沉淀产物检测

利用制备的免疫沉淀 Input 和 IP 样品进行 Western blotting 检测, 结果发现都能在 15 kDa 处检测到 nsp9-Flag 的 2 条蛋白条带, 说明抗 Flag

琼脂糖凝珠已结合了 nsp9-Flag 蛋白(图 2A)。将样品进行 SDS-PAGE 和银染等实验操作, 结果显示, 在 PEDV nsp9 质粒转染组中, 检测到条带位置约 30、50、70 kDa 的特异性条带(图 2B)。

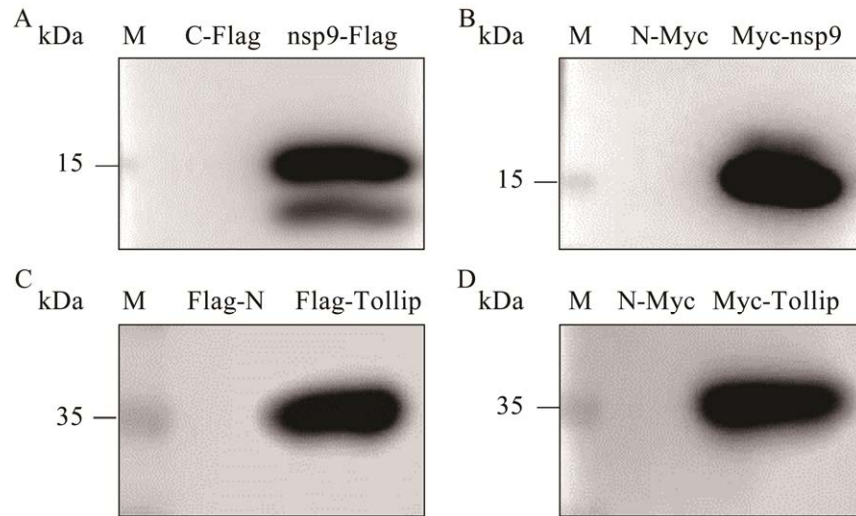


图 1 Nsp9-Flag (A)、Myc-nsp9 (B)、Flag-Tollip (C)和 Myc-Tollip (D)重组质粒表达验证 C-Flag: pCMV-Flag-C; N-Myc: pCMV-N-Myc

Figure 1 Nsp9-Flag (A), Myc-nsp9 (B), Flag-Tollip (C) and Myc-Tollip (D) eukaryotic expression plasmid expression verification. C-Flag: pCMV-Flag-C; N-Myc: pCMV-N-Myc.

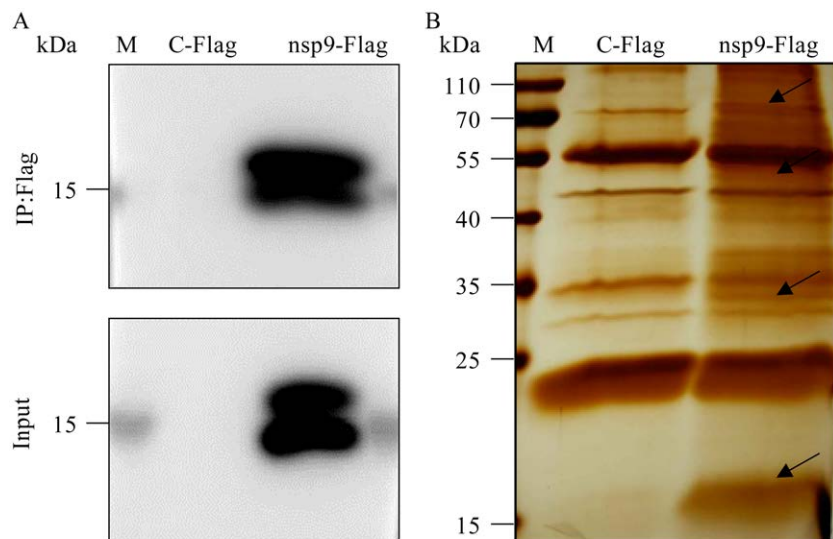


图 2 免疫沉淀 Western blotting (A)、SDS-PAGE 和银染分析(B) C-Flag: pCMV-Flag-C

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

### 2.3 与 nsp9 潜在互作蛋白的质谱鉴定

取 PEDV nsp9 的免疫沉淀样品进行质谱分析, 根据肽段覆盖率, 筛选出与 PEDV nsp9 存在潜在互作的 5 个宿主蛋白: 热休克蛋白家族成员 8 蛋白(HSPA8)、Toll 相互作用蛋白(Tollip)、热休克蛋白 9 (HSPA9)、线粒体外膜蛋白 (TOMM70)和 GABA A 型受体相关蛋白 2 (GABARAPL2) (表 2)。

### 2.4 互作蛋白的免疫共沉淀验证

分别用抗 Flag 琼脂糖凝珠/抗 Myc 磁珠进行 Co-IP 实验, 验证 PEDV nsp9 与宿主蛋白 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 和 GABARAPL2 之间的相互作用, 如图 3 所示, 在空白对照组成立的前提下, PEDV nsp9 蛋白与 HSPA8、Tollip、HSPA9 和 TOMM70 蛋白存在相互作用, 但是与 GABARAPL2 蛋白没有互作现象。

表 2 筛选通过质谱鉴定的潜在 nsp9 相互作用宿主蛋白

Table 2 Identification of PEDV nsp9 interacting host proteins by IP-mass spectrometry

Protein ID	Gene name	Unique peptide	Cover percent (%)	Mass (Da)	Score
P11142	HSPA8	37	49.38	70 897.24	44.62
D6RCD7	HSPA9	24	33.58	73 679.65	64.49
P60520	GABARAPL2	2	10.26	13 666.68	20.54
Q6FIE9	Tollip	6	5.11	30 281.50	28.31
O94826	TOMM70	4	2.63	67 454.07	36.54

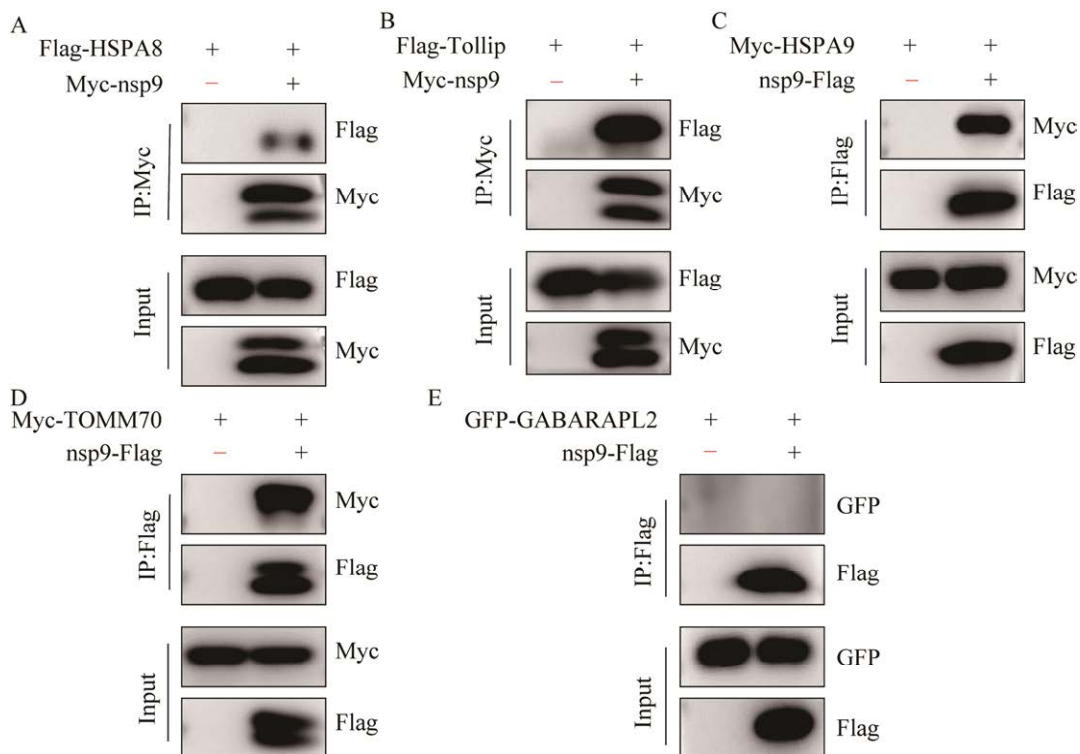


图 3 PEDV nsp9 与宿主蛋白 HSPA8 (A)、Tollip (B)、HSPA9 (C)、TOMM70 (D)和 GABARAPL2 (E) 互作鉴定

Figure 3 Identification of the interaction between PEDV nsp9 and host proteins HSPA8 (A), Tollip (B), HSPA9 (C), TOMM70 (D) and GABARAPL2 (E).

## 2.5 nsp9 和 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70、GABARAPL2 细胞内共定位

将 pMyc-nsp9 分别与 pFlag-HSPA8、pFlag-Tollip、pGFP-TOMM70 质粒共转染 HEK293T 细胞，将 pns9-Flag 分别与 pMyc-HSPA9、pGFP-GABARAPL2 质粒共转染 HEK293T 细胞，转染后对样品进行处理，如图

4 所示，nsp9 主要分布在细胞质中，HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 与 nsp9 在细胞质存在共定位现象，与免疫共沉淀结果一致，进一步说明 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 与 nsp9 存在相互作用，而 GABARAPL2 与 nsp9 不存在共定位现象，结合免疫共沉淀实验结果，说明二者之间不存在相互作用。

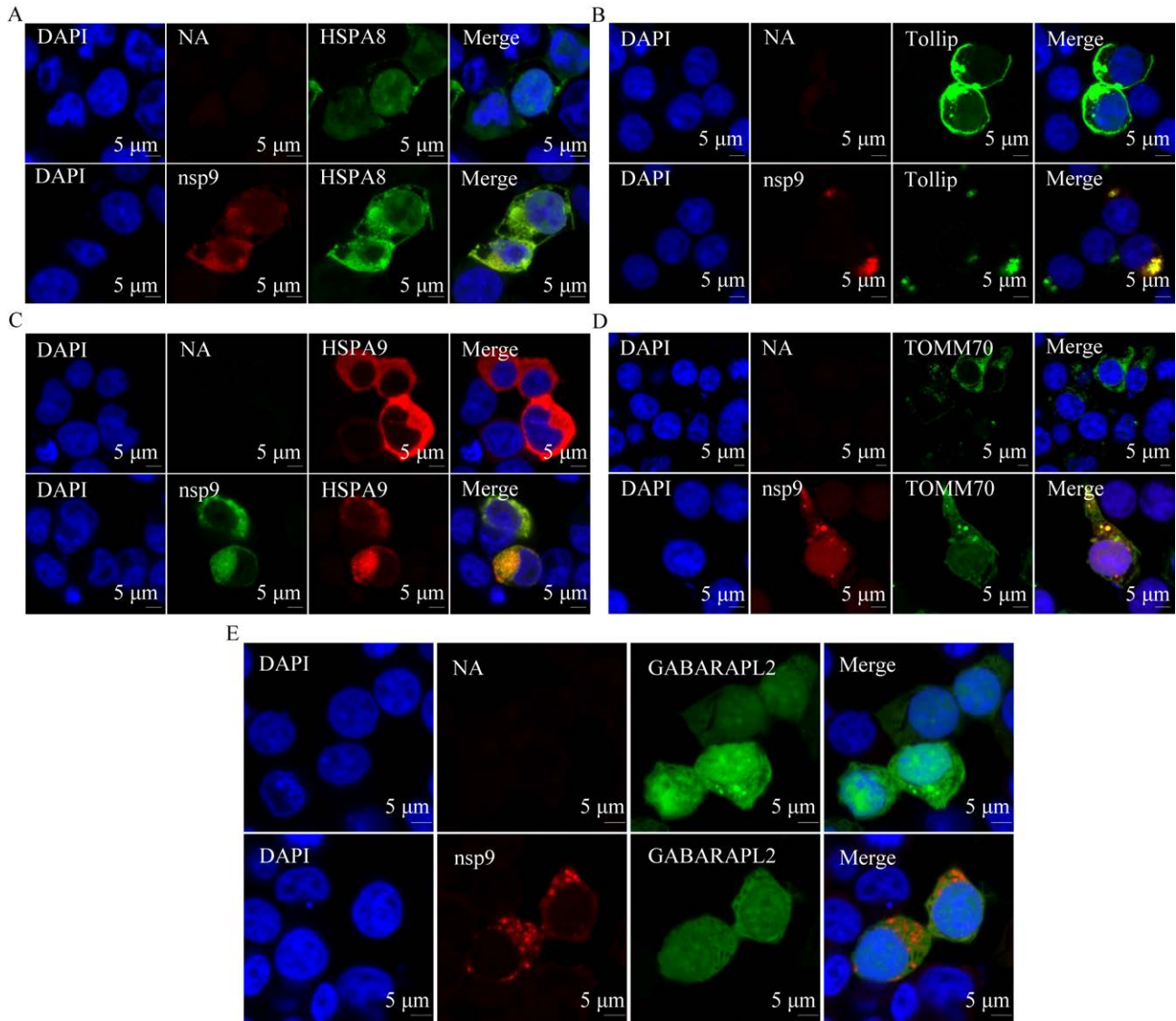


图 4 激光共聚焦分别观察 HSPA8 (A)、Tollip (B)、HSPA9 (C)、TOMM70 (D)和 GABARAPL2 (E)与 nsp9 共定位

Figure 4 Observation of colocalization between PEDV nsp9 and its binding proteins HSPA8 (A), Tollip (B), HSPA9 (C), TOMM70 (D), and GABARAPL2 (E) by confocal laser scanning microscopes.



## 2.6 梯度过表达 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 对 nsp9 表达的影响

将 pFlag-HSPA8、pMyc-Tollip、pMyc-HSPA9 和 pMyc-TOMM70 质粒按梯度递增与 nsp9 共转染 HEK293T 细胞,转染后 24 h 对样品进行处理,如图 5 所示,过表达 HSPA8 组与对照组相比细胞内 nsp9 的表达量先上调而后下调,Tollip 组与对照组相比细胞内 nsp9 的表达量显著上调,过表达 HSPA9 组与对照组相比细胞内 nsp9 的表达无明显影响,过表达 TOMM70 组与对照组相比细胞内 nsp9 的表达量显著下调。

## 2.7 过表达 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 对 PEDV M 蛋白表达水平的影响

将 pFlag-HSPA8、pMyc-Tollip、pMyc-HSPA9 和 pMyc-TOMM70 质粒转染 VERO 细胞,转染

后 24 h,用 PEDV 进行感染,感染 24 h 后对样品进行处理,如图 6 所示,过表达 HSPA8 后,PEDV M 蛋白的表达量显著上调;过表达 Tollip 后,PEDV M 蛋白的表达量显著下调;过表达 HSPA9/TOMM70 后,PEDV M 蛋白的表达量无明显变化。

## 2.8 过表达 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 对 PEDV 增殖的影响

将 pFlag-HSPA8、pMyc-Tollip、pMyc-HSPA9 和 pMyc-TOMM70 质粒转染 VERO 细胞,转染后 24 h 感染 PEDV,24 h 后进行病毒滴度的测定,如图 7 所示,过表达 HSPA8 后,病毒滴度显著上调;过表达 Tollip 后,病毒滴度显著下调;过表达 HSPA9 和 TOMM70 后,病毒滴度未见明显差异。

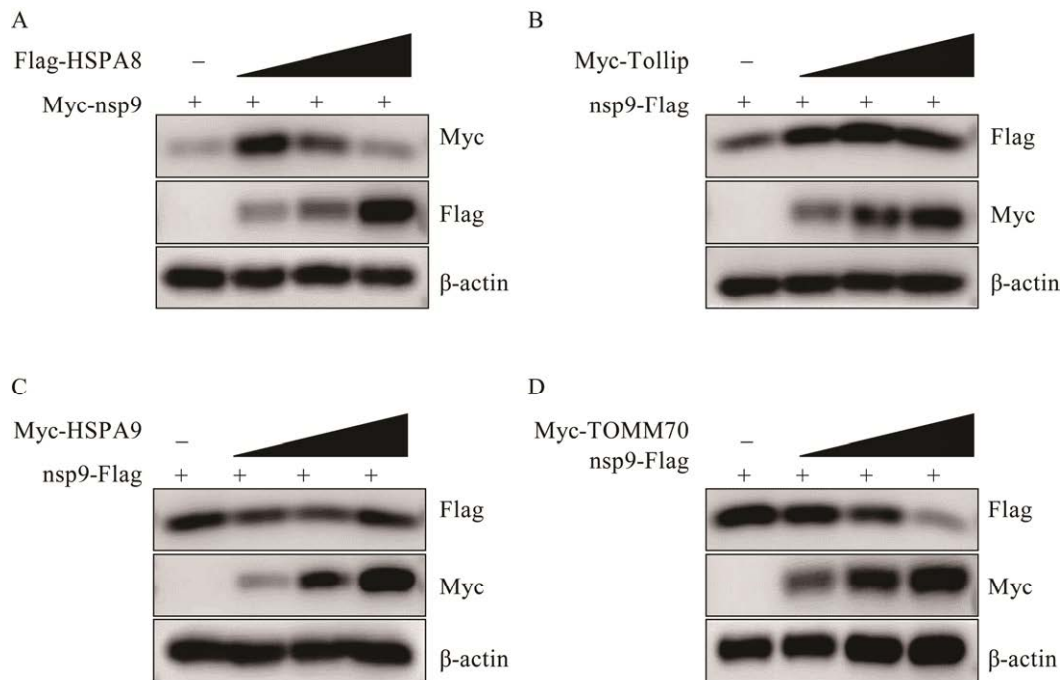


图 5 HSPA8 (A)、Tollip (B)、HSPA9 (C)和 TOMM70 (D)以剂量依赖性影响细胞内 nsp9 的表达水平  
Figure 5 HSPA8 (A), Tollip (B), HSPA9 (C), and TOMM70 (D) effects on level of nsp9 in a dose-dependent manner.

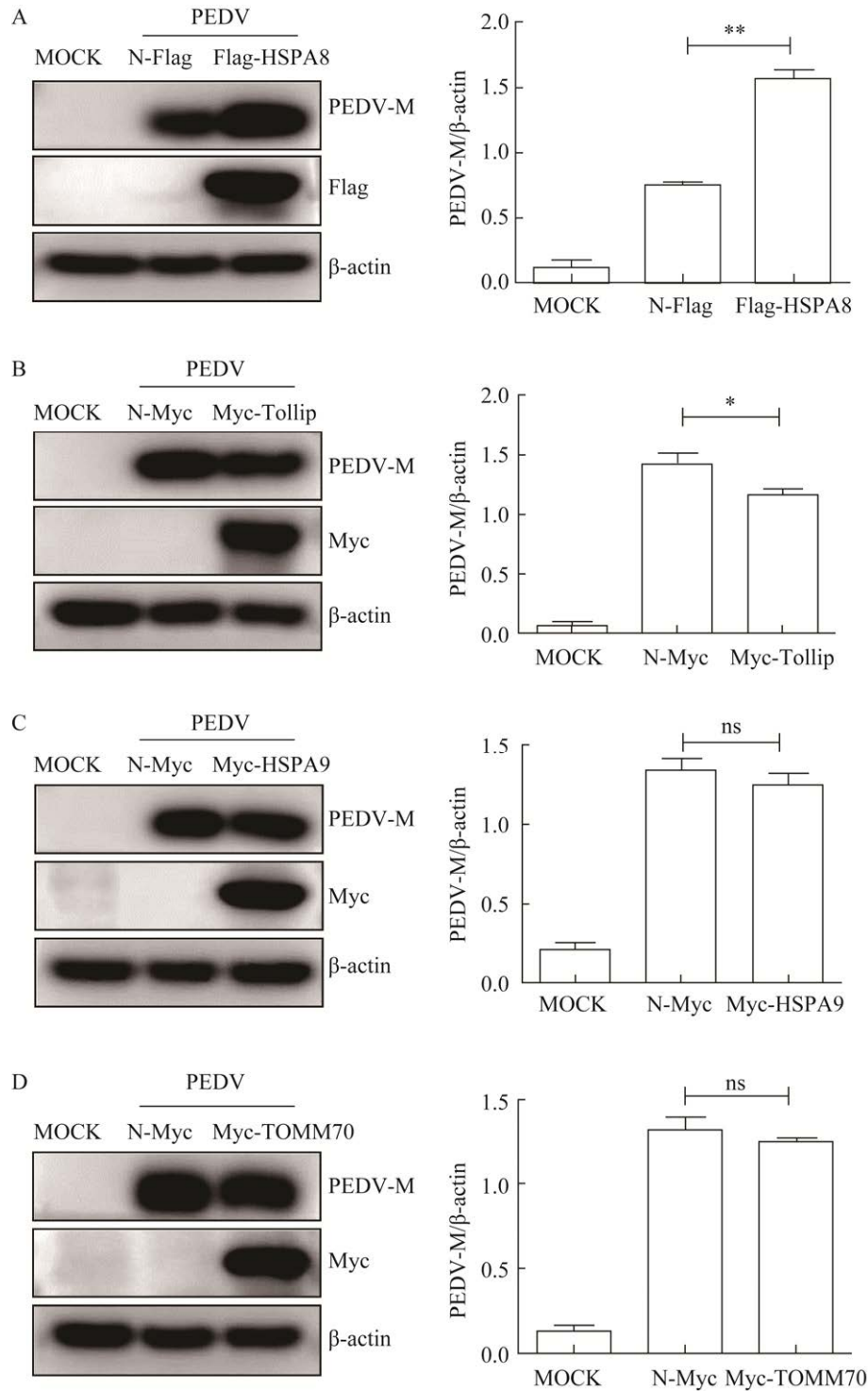


图 6 过表达 HSPA8 (A)、Tollip (B)、HSPA9 (C)和 TOMM70 (D)对 PEDV M 蛋白表达水平的影响  
N-Flag: pCMV-N-Flag; N-Myc: pCMV-N-Myc

Figure 6 Effects of overexpression of HSPA8 (A), Tollip (B), HSPA9 (C), and TOMM70 (D) on the expression level of PEDV M protein. N-Flag: pCMV-N-Flag; N-Myc: pCMV-N-Myc. ns: Not significant; \*: Significant ( $P<0.05$ ); \*\*: Very significant ( $P<0.01$ ).

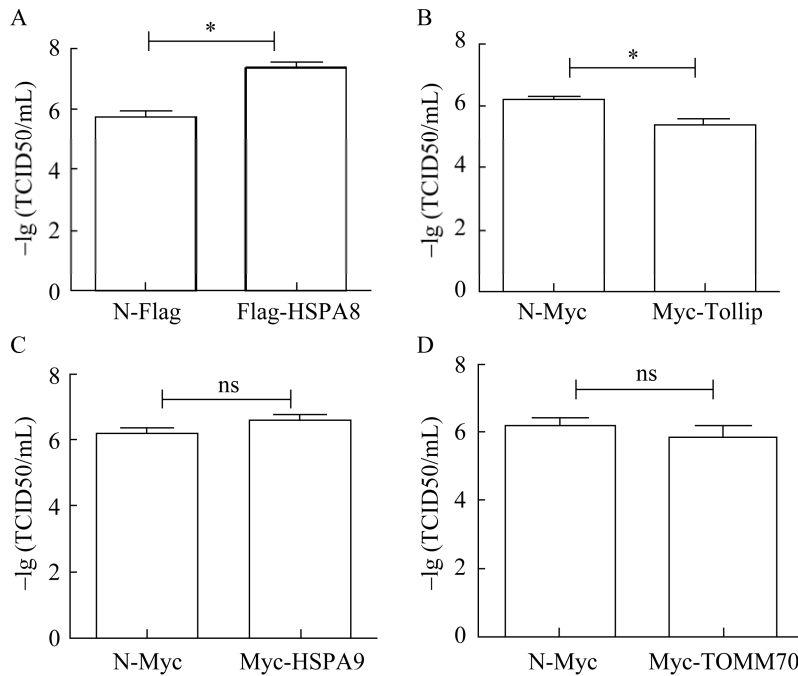


图 7 过表达 HSPA8 (A)、Tollip (B)、HSPA9 (C)和 TOMM70 (D)对 PEDV 增殖的影响 N-Flag: pCMV-N-Flag; N-Myc: pCMV-N-Myc

Figure 7 Effects of overexpression of HSPA8 (A), Tollip (B), HSPA9 (C), and TOMM70 (D) on PEDV virus titers. N-Flag: pCMV-N-Flag; N-Myc: pCMV-N-Myc. ns: Not significant; \*: Significant ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论与结论

猪流行性腹泻病毒(PEDV)自 20 世纪 70 年代出现以来,在世界大部分地区流行。它感染小肠和肠道绒毛细胞,迅速扩散,引起以呕吐、腹泻、脱水为特征的传染性肠道疾病,导致新生仔猪死亡率高,给养猪业造成巨大经济损失。研究病毒结构/非结构蛋白与宿主蛋白之间的联系有利于解析 PEDV 致病分子机制。有研究表明, PEDV N 蛋白通过与 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1)直接相互作用抑制干扰素调节因子 3 (interferon regulator factor 3, IRF3)的激活和 I 型 IFN 的产生<sup>[8]</sup>; nsp1 通过阻断 IRF1 的核转运,导致过氧化物酶体减少,从而抑制 IRF1 介导的 III 型 IFNs 的产生<sup>[9]</sup>; nsp5 通过切割核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor

$\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)基本调节器(NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO)来破坏 I 型 IFN 信号<sup>[10]</sup>。另外,冠状病毒的 nsp6 被认为参与双膜囊泡(double-membrane vesicles, DMV)形成的病毒蛋白<sup>[11-12]</sup>。围绕非结构蛋白的研究,为进一步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提供信息。

本研究通过免疫共沉淀技术和质谱联用的方法,初步筛选出与 nsp9 有潜在相互作用的宿主蛋白 HSPA8、Tollip、HSPA9、TOMM70 和 GABARAPL2。Co-IP 和 IFA 实验结果表明 PEDV nsp9 蛋白与 HSPA8、Tollip、HSPA9 和 TOMM70 相互作用,而与 GABARAPL2 没有互作。HSPA8 作为分子伴侣在蛋白质质量控制系统中起着重要作用,它作为蛋白质折叠催化剂,确保错误折叠蛋白进行重新折叠,并控制该蛋白质的后续降

解过程<sup>[13]</sup>。HSPA8 参与主要组织相容性复合体 II 类(main histocompatibility complexes are class II, MHCII)分子向 CD4<sup>+</sup> T 细胞呈递抗原肽<sup>[14]</sup>。它还作为腺苷 5'-三磷酸酶(triphosphatase, ATPase)在细胞内膜成分运输过程中分解网格蛋白包被的囊泡<sup>[15]</sup>。此外, HSPA8 在自噬中起着关键作用, 尤其是在分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)过程中, 与含有特定 KFERQ 基序的蛋白与溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosomal associated membrane protein 2A, LAMP2A)相结合发挥分子伴侣介导的自噬作用<sup>[16-17]</sup>。本研究发现过表达 HSPA8 条件下, nsp9 表达水平先上调而后下调。原因可能是 HSPA8 在低表达量时可能起到热休克蛋白的功能, 维持 nsp9 结构的稳定; 随着 HSPA8 表达量的增加, 细胞内质网压力也增大, 此时 HSPA8 可能启动分子伴侣介导的自噬降解 nsp9。Tollip (Toll 相互作用蛋白)是核内体隔室的重要协调因子, 与 Mybl 膜运输蛋白靶标蛋白 (target of mybl membrane trafficking protein, Tom1)相互作用以调节货物运输<sup>[18]</sup>。Tollip 与阿尔茨海默病模型中的自噬功能障碍有关<sup>[19]</sup>。Tollip 与线粒体外膜转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20)存在互作并且协助线粒体衍生囊泡的转运<sup>[20]</sup>。此外, Tollip 通过自噬直接清除亨廷顿病相关的 polyQ 聚集物<sup>[21]</sup>。实验发现过表达 Tollip 能够抑制 PEDV 的复制, 推测该蛋白可能是通过选择性自噬途径来实现对 PEDV 复制的抑制。HSPA9 作为热休克蛋白 70 基因家族的成员, 主要定位于线粒体, 但也存在于内质网、质膜和细胞质囊泡中, 在细胞增殖、应激反应和线粒体维持中发挥作用<sup>[22]</sup>。TOMM70 是 TOM 复合物成员之一, 附着在 TOM20 等其他 TOM 蛋白上, TOMM70 作为受体在 HSP70 和 HSP90 的帮助下运输多跨疏水载体蛋白<sup>[23-24]</sup>。TOMM70

还与 SARS-CoV-2 辅助蛋白 Orf9b 存在相互作用使 IFN-I 表达降低, 并使 HSP90 和伴侣相关蛋白的募集受到抑制<sup>[25]</sup>。本研究首次筛选到与 PEDV nsp9 相互作用的宿主蛋白 HSPA8、Tollip、HSPA9 和 TOMM70, 并且初步探究了筛选出的互作蛋白对 nsp9 表达以及 PEDV 复制的影响, 为进一步解析冠状病毒 nsp9 的生物学效应提供信息, 为在 PEDV 感染过程中发挥先天免疫作用以及自噬等机制的研究提供新的思路。

## REFERENCES

- [1] BERTASIO C, GIACOMINI E, LAZZARO M, PERULLI S, PAPETTI A, LAVAZZA A, LELLI D, ALBORALI G, BONIOTTI MB. Porcine epidemic diarrhea virus shedding and antibody response in swine farms: a longitudinal study[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2009.
- [2] WANG D, FANG LR, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [3] GERBER PF, XIAO CT, LAGER K, CRAWFORD K, KULSHRESHTHA V, CAO DJ, MENG XJ, OPRIESSNIG T. Increased frequency of porcine epidemic diarrhea virus shedding and lesions in suckling pigs compared to nursery pigs and protective immunity in nursery pigs after homologous re-challenge[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47(1): 1-9.
- [4] WANG LY, BYRUM B, ZHANG Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(5): 917-919.
- [5] 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.
- [6] BOST AG, CARNAHAN RH, LU XT, DENISON MR. Four proteins processed from the replicase gene polyprotein of mouse hepatitis virus colocalize in the cell periphery and adjacent to sites of virion assembly[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(7): 3379-3387.
- [7] 邓凤. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白受体识别特性与 NSP9 蛋白结构研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2016.  
DENG F. S protein receptor recognition characteristics and NSP9 protein structure of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong

- Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [8] DING Z, FANG LR, JING HY, ZENG SL, WANG D, LIU LZ, ZHANG H, LUO R, CHEN HC, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF<sub>3</sub> and TBK1[J]. Journal of Virology, 2014, 88(16): 8936-8945.
- [9] ZHANG QZ, KE HZ, BLIKSLAGER A, FUJITA T, YOO D. Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF<sub>1</sub> signaling[J]. Journal of Virology, 2018, 92(4): e01677-17.
- [10] WANG D, FANG LR, SHI YL, ZHANG H, GAO L, PENG GQ, CHEN HC, LI K, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving *NEMO*[J]. Journal of Virology, 2016, 90(4): 2090-2101.
- [11] ANGELINI MM, AKHLAGHPOUR M, NEUMAN BW, BUCHMEIER MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles[J]. mBio, 2013, 4(4): e00524-13.
- [12] OOSTRA M, HAGEMEIJER MC, van GENT M, BEKKER CPJ, TE LINTELO EG, ROTTIER PJM, de HAAN CAM. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning[J]. Journal of Virology, 2008, 82(24): 12392-12405.
- [13] BONAM, RUFF, MULLER. HSPA8/HSC70 in immune disorders: a molecular rheostat that adjusts chaperone-mediated autophagy substrates[J]. Cells, 2019, 8(8): 849.
- [14] PANJWANI N, AKBARI O, GARCIA S, BRAZIL M, STOCKINGER B. The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation[J]. The Journal of Immunology, 1999, 163(4): 1936-1942.
- [15] ROTHNIE A, CLARKE AR, KUZMIC P, CAMERON A, SMITH CJ. A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70 kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(17): 6927-6932.
- [16] STRICHER F, MACRI C, RUFF M, MULLER S. HSPA8/HSC70 chaperone protein[J]. Autophagy, 2013, 9(12): 1937-1954.
- [17] ZHU PP, LV CF, FANG CX, PENG X, SHENG H, XIAO P, KUMAR OJHA N, YAN Y, LIAO M, ZHOU JY. Heat shock protein member 8 is an attachment factor for infectious bronchitis virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1630.
- [18] KATOH Y, SHIBA Y, MITSUHASHI H, YANAGIDA Y, TAKATSU H, NAKAYAMA K. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(23): 24435-24443.
- [19] MAKIOKA K, YAMAZAKI T, TAKATAMA M, IKEDA M, MURAYAMA S, OKAMOTO K, IKEDA Y. Immunolocalization of Tom1 in relation to protein degradation systems in Alzheimer's disease[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2016, 365: 101-107.
- [20] RYAN TA, PHILLIPS EO, COLLIER CL, JB ROBINSON A, ROUTLEDGE D, WOOD RE, ASSAR EA, TUMBARELLO DA. Tollip coordinates parkin-dependent trafficking of mitochondrial-derived vesicles[J]. The EMBO Journal, 2020, 39(11): e102539.
- [21] LU KF, PSAKHYE I, JENTSCH S. Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family[J]. Cell, 2014, 158(3): 549-563.
- [22] ROSENZWEIG R, NILLEGODA NB, MAYER MP, BUKAU B. The Hsp70 chaperone network[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(11): 665-680.
- [23] FAN ACY, KOZLOV G, HOEGL A, MARCELLUS RC, WONG MJH, GEHRING K, YOUNG JC. Interaction between the human mitochondrial import receptors Tom20 and Tom70 *in vitro* suggests a chaperone displacement mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(37): 32208-32219.
- [24] YOUNG JC, HOOGENRAAD NJ, HARTL FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70[J]. Cell, 2003, 112(1): 41-50.
- [25] JIANG HW, ZHANG HN, MENG QF, XIE J, LI Y, CHEN H, ZHENG YX, WANG XN, QI H, ZHANG J, WANG PH, HAN ZG, TAO SC. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(9): 998-1000.

(本文责编 陈宏宇)