

发热伴血小板减少综合征病毒非结构蛋白的表达和定位及宿主 交互蛋白的筛选和分析

骆丽可¹, 程子文¹, 程 廓¹, 李永刚¹, 王大为², 杨宝玲¹

(1. 锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁 锦州 121000;
2. 锦州医科大学畜牧兽医学院基础兽医学教研室, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] **目的:** 通过免疫沉淀联合质谱分析的方法筛选发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)非结构蛋白(NSs)的宿主相互作用(互作)蛋白, 探讨互作蛋白的功能、亚细胞定位及参与的生物途径, 为阐明SFTSV的复制和致病机制提供依据。**方法:** 将真核表达载体pSFTSV-NSs-Flag(实验组)和Flag-CMV-3(阴性组)分别转染进入人胚胎肾293T细胞中, 同时设置空白组(不进行任何处理)。收集各组细胞裂解液, 采用间接免疫荧光和Western blotting法验证SFTSV NSs在宿主细胞中的表达及定位。蛋白裂解液经protein A/G处理, 采用免疫沉淀法富集与NSs结合的宿主蛋白, 通过银染和考马斯亮蓝染色初步分析捕获的互作蛋白, 观察各组蛋白差异条带。采用液相色谱和串联质谱技术得到蛋白质的序列信息, 保留可信蛋白基于UniProt数据库检索, 对鉴定到的蛋白进行基因本体论(GO)功能富集分析、蛋白结构域和功能位点数据库(IPR)、真核生物同源蛋白簇(KOGs)功能注释、京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析、亚细胞定位和转录因子(TF)功能注释, 确定互作蛋白的亚细胞结构、基因功能及参与的生物过程。**结果:** SFTSV NSs在相对分子质量33 000处表达单一特异性条带, 免疫荧光检测其定位于细胞质中, 且聚集呈砂粒体包涵体样。银染和考马斯亮蓝染色, 实验组和阴性组均存在显著差异条带。质谱筛选出46种潜在互作蛋白; GO功能富集分析、KOGs功能注释和KEGG信号通路富集分析, 与病毒翻译、细胞代谢及蛋白质运输相关的生物途径富集到较多数目的蛋白, 注释中有8种蛋白具有中间丝蛋白结构域。亚细胞定位所占百分率最高的是细胞质蛋白; 与NSs定位场所一致。TF功能注释, 有1种蛋白来自NF-Y家族。**结论:** 互作蛋白在协助蛋白质正确折叠、参与核糖体翻译和构成细胞骨架等进程中发挥作用, 可能参与了抗病毒复制, 可作为候选蛋白进一步研究SFTSV的复制机制。

[关键词] 发热伴血小板减少综合征病毒; 非结构蛋白; 蛋白-蛋白相互作用; 免疫沉淀; 质谱

[中图分类号] R373.3 **[文献标志码]** A

Expression and localization of fever with thrombocytopenia syndrome virus nonstructural protein and screening and analysis of host-interacting proteins

LUO Like¹, CHENG Ziwen¹, CHENG Kuo¹, LI Yonggang¹, WANG Dawei², YANG Baoling¹

(1. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Basic Veterinary Medicine, School of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

[收稿日期] 2023-11-06

[基金项目] 辽宁省科技厅科学技术计划项目(2022-BS-325)

[作者简介] 骆丽可(1996-), 女, 河南省濮阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事病毒反向遗传学和寄生虫学方面的研究。

[通信作者] 杨宝玲, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: baolingyang0304@163.com)

ABSTRACT Objective: To screen the host interaction proteins of the severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) nonstructural protein (NSs) by immunoprecipitation combined with mass spectrometry analysis, to discuss the functions, subcellular localization, and biological pathways of these interaction proteins, and to provide the basis for clarifying the replication and pathogenic mechanism of SFTSV. **Methods:** The eukaryotic expression vectors pSFTSV-NSs-Flag (experimental group) and Flag-CMV-3 (negative group) were transfected into the human embryonic kidney 293T cells, and control group (no treatment) was set up. The lysates of the cells in various groups were collected, and the expression and localization of SFTSV NSs in the host cells were verified by indirect immunofluorescence and Western blotting methods. The protein lysates were treated with protein A/G and immunoprecipitation was used to enrich host proteins binding to NSs. The captured interaction proteins were initially analyzed by silver staining and Coomassie brilliant blue staining to observe the differential protein bands in various groups; liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used to obtain the information of protein sequences; the reliable proteins were retained and searched by UniProt database; Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis, IPR, eukaryotic orthologous groups (KOGs) functional annotation, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis, subcellular localization, and transcription factor (TF) functional annotation were used to determine the subcellular structure, gene functions, and biological processes of the interaction proteins. **Results:** The immunofluorescence results showed that the SFTSV NSs expressed a single specific band at relative molecular mass 33 000 and was localized in the cytoplasm in a granular inclusion body-like manner. The silver staining and Coomassie brilliant blue staining results showed there were significant differential protein bands between experimental group and negative group. The mass spectrometry results identified 46 potential interaction proteins. The GO functional enrichment analysis, KOGs functional annotation, and KEGG signaling pathway enrichment analysis results showed that the biological pathways related to viral translation, cellular metabolism, and protein transport were enriched with a considerable number of proteins. Eight annotated proteins had intermediate filament domains. The highest percentage of subcellular localization was cytoplasmic proteins, consistent with the NSs localization site. The TF functional annotation analysis results showed one protein from the NF-Y family. **Conclusion:** The interaction proteins play roles in assisting the proper protein folding, participating in the ribosome translation, and forming the cytoskeleton, which may be involved in antiviral replication. These proteins can be used as candidate proteins for further study on the replication mechanism of SFTSV.

KEYWORDS Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; Non-structural protein; Protein-protein interaction; Immunoprecipitation; Mass-spectrometric technique

发热伴血小板减少综合征 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 是由 SFTS 病毒 (SFTS virus, SFTSV) 引起的一种以长角血蜱^[1] 叮咬传播的感染性传染病, 该病毒可经接触病患的血液发生人间传播。SFTS 患者主要临床特征包括高热、白细胞和血小板数量急剧减少^[2], 部分患者还伴有胃肠道症状, 如腹痛、恶心、呕吐和临床神经功能障碍^[3], 重症患者可出现多脏器衰竭和出血倾向, 严重威胁生命, 病死率高达 30%^[4]。该病毒于本世纪初首次报告^[5], 目前在亚洲国家流行, 对公共卫生和全球经济构成严重威胁^[6]。SFTSV 归属布尼亚病毒目白蛉纤细病毒科

班达病毒属^[7], 病毒基因组为分节段的单股负链 RNA, 分为 L、M 和 S 3 个基因片段; L 段编码病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, M 段编码糖蛋白前体 (Gn 和 Gc), S 片段为双义 RNA, 分别编码核蛋白和非结构蛋白, 其中反向序列 29~910 核苷酸间的开放阅读框编码非结构蛋白 (non-structural protein, NSs)^[8]。

多数白蛉病毒均编码 NSs, 其同源率为 15%~30%。研究^[9]显示: 在 SFTSV 感染宿主细胞时发现一种特有的免疫逃逸机制, 通过病毒编码的 NSs 形成包涵体发挥“隐藏”作用, 阻断多种类型干扰素发挥作用。有研究^[10]显示: NSs 感染宿主细胞

形成的类病毒包涵体样结构,实质是脂质小体,对病毒的免疫逃逸有积极影响^[11]。NSs作为SFTSV潜在的重要毒力因子,可抑制宿主固有抗病毒反应,促进病毒复制^[12]。本课题组前期研究^[13]成功构建了靶向SFTSV NSs的短发夹RNA,证明其能抑制SFTSV复制,但NSs蛋白质与宿主蛋白质之间的相互作用(互作)及蛋白质互作对病毒复制的影响尚不明确。本研究采用免疫沉淀联合质谱分析技术筛选与SFTSV NSs互作的宿主蛋白,为后续解析病毒致病机制研究和制订有效治疗策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器

人胚胎肾(human embryonic kidney, HEK) 293T细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。兔来源NSs多克隆抗体(新西兰大白兔)血清由锦州医科大学病原生物学实验室制备并保存,pSFTSV-NSs-Flag真核表达载体由锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室构建并保存,Flag抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)、NP-40细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonylfluoride, PMSF)和Protein A+G Agarose均购自广州碧云天生物技术有限公司,4×蛋白上样缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司,In-Fusion[®] HD Cloning Kit和RNaseA均购自日本TaKaRa公司,杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、Opti-MEM、胎牛血清和青-链霉素均购自美国Gibco公司。EASY-nLCTM 1200纳升级UHPLC和Q Exactive[™] HF-X质谱仪购自美国Thermo公司。

1.2 HEK-293T细胞培养和转染

将HEK-293T细胞以 6×10^5 /孔的密度接种至DMEM中,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养过夜。次日,待细胞融合度达到80%左右,每孔采用10 μL Lipofectamine 2000转染4 μg pSFTSV-NSs-Flag质粒,采用250 μL Opti-MEM稀释质粒。同时设置阴性组(转染空载体Flag,接种至6孔细胞培养板中,加入提前配置并预热至37℃、含10%胎牛血清的DMCMV-3)和空白组(未作处理)。将配制好的转染试剂室温放置5 min,逐滴加入至6孔细胞培养板中,置于细胞培养箱中培养

48 h。

1.3 间接免疫荧光法检测SFTSV NSs蛋白表达和定位

转染48 h后,吸弃培养基,每孔滴加1 mL 4%多聚甲醛固定1 h,1 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤3次,每次2 min。每孔加入1 mL 0.1% Triton X-100进行细胞破膜15 min, PBS缓冲液洗涤3次,加入1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭1 h, PBS缓冲液洗涤3次后,加入对应的鼠抗Flag和NSs兔多抗,稀释比例为1:200,37℃孵育1 h。吸弃一抗, PBS洗涤3次,避光加入二抗Alexa Flour 488山羊抗小鼠IgG(H+I)和Alexa Flour 488山羊抗兔IgG(H+I),稀释比例为1:500;37℃避光孵育1 h,弃二抗, PBS洗涤3次,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色后,置于荧光显微镜下,使用488 nm激发波长观察蛋白定位情况。

1.4 Western blotting法检测各组细胞中SFTSV NSs蛋白表达水平

转染48 h后,弃去培养液,每孔加入250 μL细胞裂解液NP40和2.5 μL蛋白酶抑制剂PMSF,置于冰上裂解。收集每组细胞裂解液,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min,取部分上清加入4×蛋白上样缓冲液置于沸水浴中加热10 min变性,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE),剩余上清样本收集置于-80℃冻存备用。蛋白样品经凝胶电泳分离后,通过半干转印仪15 V、12 min转膜。5%脱脂奶粉封闭2 h,弃封闭液;1:2 000稀释鼠抗β-actin抗体(一抗)、1:3 000稀释鼠抗Flag抗体(一抗),4℃孵育过夜。磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffer solution with Tween, PBST)洗涤3次,每次10 min。加入以辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(H+L)(二抗),稀释比例为1:3 000,室温摇床孵育1 h。PBST洗涤3次,每次10 min。配置比例为1:1的增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液,均匀滴至聚偏氟乙烯膜上。将转染pSFTSV-NSs-Flag质粒的HEK-293T细胞蛋白样品作为实验组,转染空载体Flag-CMV-3的HEK-293T细胞作为阴性组,空白组采用抗Flag标签抗体识别目的蛋白。采用全自动化学发光成像仪观察

各组细胞中 SFTSV NSs 蛋白在 33 000 条带处的表达情况。

1.5 免疫沉淀富集与 NSs 蛋白互作的宿主蛋白

于 6 孔细胞培养板中培养 HEK-293T 细胞至融合度 80% 左右时, 设置转染空载体 Flag 的阴性组和转染 SFTSV NSs 的实验组, 转染质粒和制备细胞裂解液后, 每组细胞裂解液上清中加入 1.5 μL 抗 Flag 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动 1 h, 再加入 20 μL protein A/G, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 小心弃去上清, 加入 500 μL PBS 缓冲液进行洗涤, 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 小心吸除上清, 重复 4 次。沉淀中加入 30 μL PBS 重悬, 加入上样缓冲液沸水浴处理 10 min 后, 进行银染和考马斯亮蓝染色, 观察实验组和阴性组的差异蛋白条带。富集 3 次均可得到相同且具有显著差异的条带, 即可进行质谱检测。

1.6 LC-MS/MS 质谱分析和生物信息学分析

1.6.1 样品处理 将免疫沉淀富集到的蛋白液进行 SDS-PAGE, 当样本刚过浓缩胶进入分离胶 1 cm 时, 停止电泳, 经考马斯亮蓝染色再脱色后, 切下阴性组和实验组的差异条带, 脱色处理后酶解, 上机检测。

1.6.2 液相检测 配制流动相 A 液 (100% 水和 0.1% 甲酸) 和 B 液 (80% 乙腈和 0.1% 甲酸)。采用 10 μL A 液溶解粉末, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 g 离心 20 min, 取上清中 1 μg 样品进样, 进行液质检测。采用 EASY-nLCTM 1200 纳升级 UHPLC 系统, 预柱为自制预柱 (4.5 cm \times 75 μm , 3 μm), 分析柱为自制分析柱 (15 cm \times 150 μm , 1.9 μm), 液相色谱洗脱。

1.6.3 质谱检测 采用 Q ExactiveTM HF-X 质谱仪和 Nanospray FlexTM (电喷雾电离) 离子源, 设定离子喷雾电压为 2.1 kV, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$, 质谱全扫描范围为 350~1 500 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$, 一级质谱分辨率设为 60 000 (200 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$), 动态单分子荧光光镊系统 (C-trap) 最大容量为 3×10^6 , C-trap 最大注入时间为 20 ms; 选取全扫描中离子强度排名为前 40 位的母离子, 采用高能碰撞解离方法碎裂, 进行二级质谱检测, 二级质谱分辨率设为 15 000 (200 $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$), C-trap 最大容量为 1×10^5 , C-trap 最大注入时间为 45 ms, 肽段碎裂碰撞能量设为 27%, 阈强度设为 2.2×10^4 , 动态排阻范围设为 20 s, 生成质谱检测原始数据导入 Proteome

Discoverer 2.5 版进行数据库检索, 参数设置如下: 前体离子的质量容差为 10 ppm, 碎片离子的质量容差为 0.02 Da, 固定修饰为氨基甲酰化, 可变修饰为氧化修饰, 允许最多 2 个漏切位点。对检索结果进一步过滤: 可信度在 99% 以上的肽段-图谱匹配 (peptide spectrum matches, PSMs) 为可信 PSMs, 至少包含 1 个特有肽段的蛋白作为可信蛋白, 只保留可信 PSMs 和可信蛋白, 并进行错误发现率 (false discover rate, FDR) 验证, 去除 FDR 大于 1% 的肽段和蛋白。

1.6.4 蛋白质的功能注释分析 采用 Interproscan^[14] (5.22-61.0 版) 软件, 通过 Pfam 数据库比对得到蛋白基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能注释和蛋白质结构域和功能位点数据库 (IPR), 从细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 分类了解基因功能。采用真核生物同源蛋白质组 (EuKaryotic Orthologous Groups of proteins, KOGs) 注释分析^[15] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/KOG/>) 和直系同源蛋白簇 (Clusters of Orthologous Group of Proteins) 数据库推测蛋白序列功能, 京都基因与基因组百科全书^[16] (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。亚细胞定位信息分析采用网站 Cell-mPLOC 2.0^[17], 将鉴定得到的蛋白进行 BLAST (2.2.26 版) 比对 (blastp, $\text{evaluate}\leq 1\text{e-}4$), 选取分数最高的对比结果进行注释, 了解蛋白分泌和转运的位置。转录因子 (transcription factor, TF) 注释方法: 将鉴定到的蛋白采用 BLAST (2.2.28 版) 和 hmmer (3.1 版) 软件对 PlantTFDB^[18] 数据库进行比对, 采用 iTAK (1.7 版) 软件对 AnimalTFDB^[19] 数据库进行比对, 预测筛选蛋白是否为转录因子以及所属的 TF 家族。

2 结果

2.1 SFTSV NSs 的表达和定位 将真核质粒 SFTSV NSs 转染 HEK-293T 细胞, 分别采用 Flag 标签抗体和 NSs 兔多抗作为一抗进行免疫荧光检测, 结果表明: 实验组 Flag 抗体和 NSs 兔多抗均可特异性识别重组质粒 SFTSV NSs。表达信号定位于细胞质中, 且聚集呈包涵体样, 空白

组和转染空载质粒的阴性组中均无荧光信号。见图1和2。

2.2 SFTSV NSs蛋白表达水平 实验组在相对分子质量33 000处出现明显条带,符合预期蛋白大小,阴性组和空白组均未识别目标条带,表明重组pSFTSV-NSs-Flag质粒可以表达带有Flag标签的NSs蛋白。见图3。

2.3 与SFTSV NSs互作的宿主蛋白 实验组和阴性组均可见差异性条带,见图4A。蛋白液经过浓缩胶,进入分离胶1 cm时,经考马斯亮蓝染色,实验组和阴性组有明显的差异性条带,说明实验组成功富集到与SFTSV NSs相互作用的宿主蛋白,见图4B。

2.4 蛋白检索和筛选 实验组鉴定到46个蛋白,

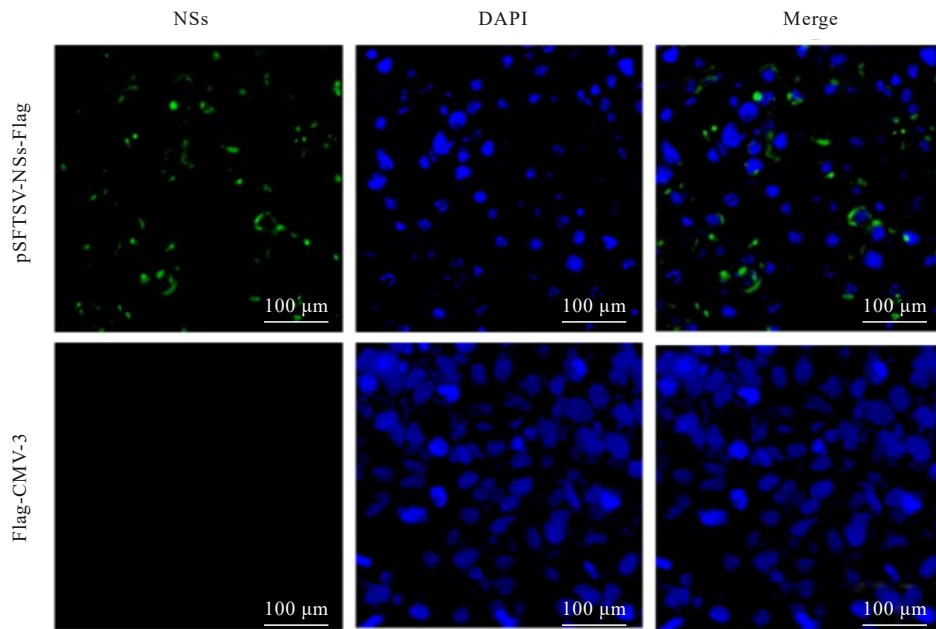


图1 Flag抗体作用后SFTSV NSs的表达和定位

Fig. 1 Expression and localization of SFTSV NSs after treated with Flag antibody

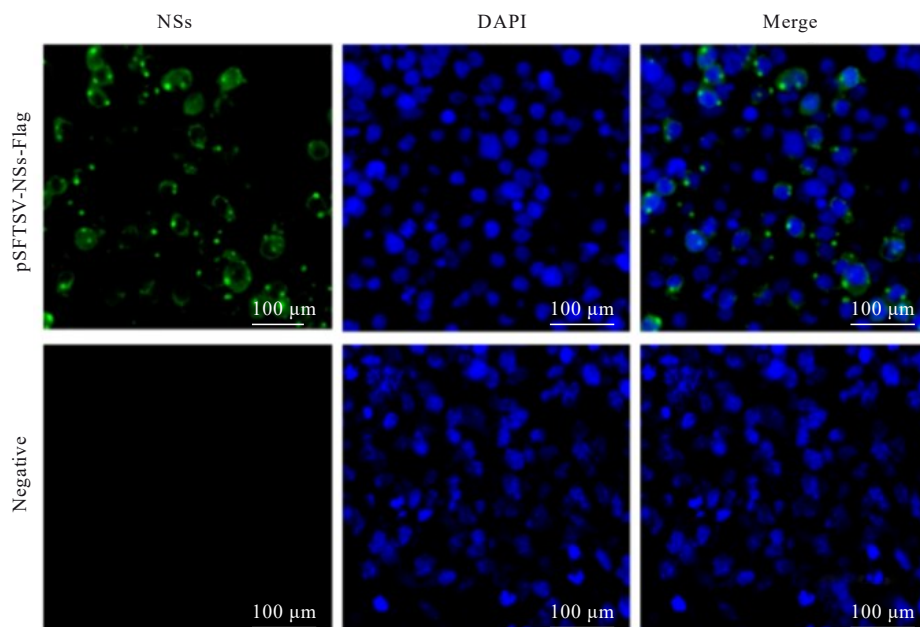
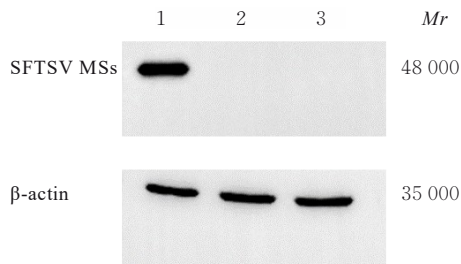


图2 NSs抗体作用后SFTSV NSs的表达和定位

Fig. 2 Expression and localization of SFTSV NSs after treated with NSs antibody



Lane 1: HEK-293T cell samples transfected with SFTSV NSs;
Lane 2: HEK-293T cell samples transfected with Flag-CMV-3;
Lane 3: Untreated cells.

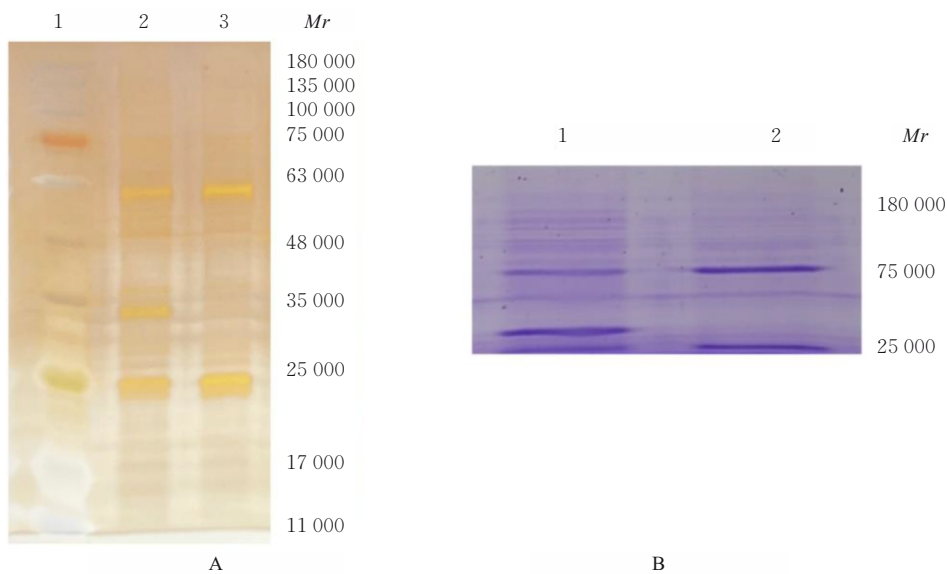
图3 SFTSV NSs蛋白在细胞中的表达

Fig. 3 Expressions of SFTSV NSs protein in cells

按照 PSMs 值由高到低排序, 蛋白特异性肽段数量越高, 蛋白丰度越高, 越能减少对结果的干扰。依据评分标准, 取蛋白丰度较高的 25 个差异蛋白进行检索作详细分析。见表 1。

2.5 蛋白功能注释 通过数据库比对实验组鉴定到的 46 种蛋白并进行功能注释, 了解不同蛋白质

的功能特性。GO 功能注释、KEGG 信号通路富集分析、COG 数据库和 IPR 数据库共同注释到 34 种蛋白; IPR 和 KOGs 注释分析及 KEGG 信号通路富集分析共同注释到 11 种蛋白; KEGG 信号通路富集分析和 KOGs 注释分析共同注释到 1 种蛋白。见图 5A。GO 功能注释结果: BP 结果显示蛋白主要富集在翻译和维持细胞氧化还原稳态的生物进程中; CC 结果显示中间丝蛋白富集最多, 其次是核糖体和胞外区; MF 结果显示富集到的蛋白具有结构分子活性、核酸与结合活性、ATP 与 DNA 结合活性。见图 5B。COG 数据库中的真核生物 KOGs 注释分析结果显示: 富集蛋白在翻译、核糖体结构和生物发生过程中富集最多, 其次是翻译后修饰、蛋白质运输和分子伴侣, 同时参与细胞骨架的构成。见图 5C。KEGG 信号通路富集分析结果显示: 富集蛋白与细菌、寄生虫和病毒等引起的感染性疾病有关, 参与遗传信息的翻译、转录及帮助蛋白折叠, 参与信号转导、新陈代谢和内分泌系统的调节。见图 5D。



A: Silver staining (Lane 1: Marker; Lane 2: Experimental group; Lane 3: Negative group); B: Coomassie brilliant blue staining (Lane 1: Experimental group; Lane 2: Negative group).

图4 免疫富集后的银染检测与考马斯亮蓝染色结果

Fig. 4 Results of silver staining and Coomassie brilliant blue staining after immunoenrichment

2.6 IPR 检索信息、TF 注释和亚细胞定位信息

中间丝蛋白是预测结构域最高的蛋白, 其次是免疫球蛋白 V 组结构域、热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 家族、免疫球蛋白 C1 组、L 型角蛋白头部结构域、RNA 识别基序结构域、微

管蛋白/FtsZ (GTP 酶结构域和两层夹心结构域)、硫氧还蛋白、血清白蛋白、聚 ADP 核糖聚合酶 1 型结构域、核因子和髓源性生长因子, 见图 6A。TF 包含植物和动物的 TF 及 TF 家族信息, TF 注释结果显示: 1 种蛋白属于核因子 Y-B 亚基 (nuclear

表1 检索筛选出的高丰度蛋白
Tab. 1 High abundance proteins screened by retrieval

Protein	Gene	PSM	Feature or function
H6VRF8	KRT1	8	Cytoskeletal cross-linking
A0A7I2YQB2	HSPA9	7	Cooperative immunity
A0A7P0TAI0	HSPA5	7	Protein folding companion
A5A3E0	POTEF	3	Promote apoptosis
Q15084	PDIA6	1	Inhibition of misfolded protein aggregation
A0A7S5EUS7	IGHV1-69	1	Activated in response to cellular stress
B4DI39	HSP70-1	3	ATP-dependent protein folding chaperone
Q14257	RCN2	1	Calcium binding
Q4VB24	HIST1H1E	1	Structural components of chromatin
E7EUT5	GAPDH	1	Catalytic activity
B4DJ30	Neutral alpha-glucosidase AB	2	Hydrolase activity
Q6LC01	β -Tubulin	2	Structural components of the cytoskeleton
Q05639	EEF1A2	1	Promoting GTP-dependent binding of aminoacyl tRNAs to the ribosomal A site
V9HWE1	HEL113	1	Binding protein
A6NG45	PRDX4	1	Antioxidant protein
A0A8I5KW59	ERP44	2	Regulation of calcium release
B2R4R0	HIST1H4J	1	Protein transmembrane transport
P36578	RPL4	1	Protein synthesis in cells
H3BT71	RBMX	1	Antiviral activity
A0A024R943	TOR3A	1	Binding protein
Q969H8	MYDGF	1	Secretory protein
J3KRX5	RPL17	1	Structural protein
P69905	HBA1	1	Oxygen transportation
Q6GMX0	Ig-like domains	1	Structural domain protein (SDP)
S6BAN6	IgG L	1	Structural protein

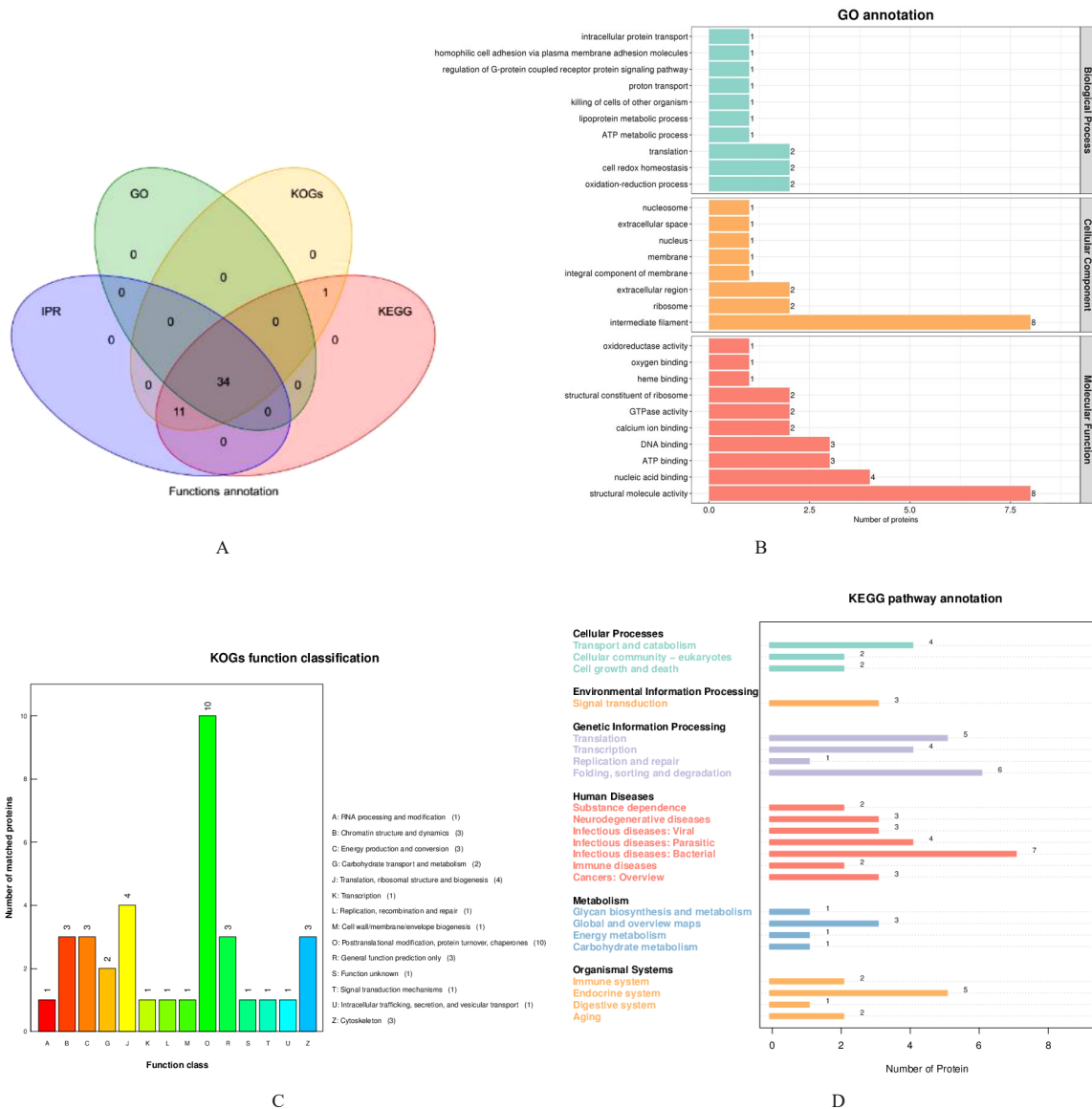
factor Y-B subunit, NF-YB), 见图6B。NF-YB来自NF-Y TF家族, 具有一段类似组蛋白折叠元件的保守域, 是DNA结合或蛋白互作的功能域。亚细胞定位结果显示细胞中各类物质占比分别为: 细胞质蛋白百分率23.08%, 细胞外蛋白百分率17.95%, 线粒体蛋白百分率15.38%, 核蛋白百分率12.82%, 细胞骨架蛋白百分率10.26%, 内质网蛋白百分率7.69%, 质膜蛋白百分率5.13%, 中心体蛋白百分率5.13%, 溶酶体蛋白百分率2.56%。见图6C。

3 讨论

蛋白质组学在生命科学研究中广泛应用, 质谱技术凭借快速、高灵敏度和高特异性的优点, 将蛋白质组学研究从蛋白质鉴定发展推至结构研究, 以及多种蛋白质之间的互作研究。本研究采用免疫沉淀联合质谱分析将带有Flag标签的SFTSV NSs真

核重组质粒转染HEK-293T细胞, 采用标签抗体捕获与NSs互作的宿主蛋白, 经电泳初步鉴定, 捕获到的蛋白样品与阴性组存在差异性条带, 将分离得到的差异性样本上机检测, 得到差异蛋白的生物学信息。本研究将转染Flag标签的空载体设置为阴性组, 与实验组比对, 筛去2组同时鉴定到的蛋白, 很大程度上减少了因单一标签引起的非特异性蛋白结合, 理论上使筛选结果更加可信。采用Proteome Discoverer 2.5对结果进行过滤并统一在蛋白数据库(UniProt)中进行检索, 通过鉴定蛋白对应的唯一性肽段来匹配相应蛋白, 利用相对定量的方法比较实验组和阴性组蛋白的差异, 分析与SFTSV NSs可以形成互作的潜在蛋白质。

SFTSV的病毒核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complexes, RNPs)在膜融合后释放到细胞质中, 子代RNPs携带新合成的病毒糖蛋白进入高尔基体, 组装成子代病毒颗粒运往胞外



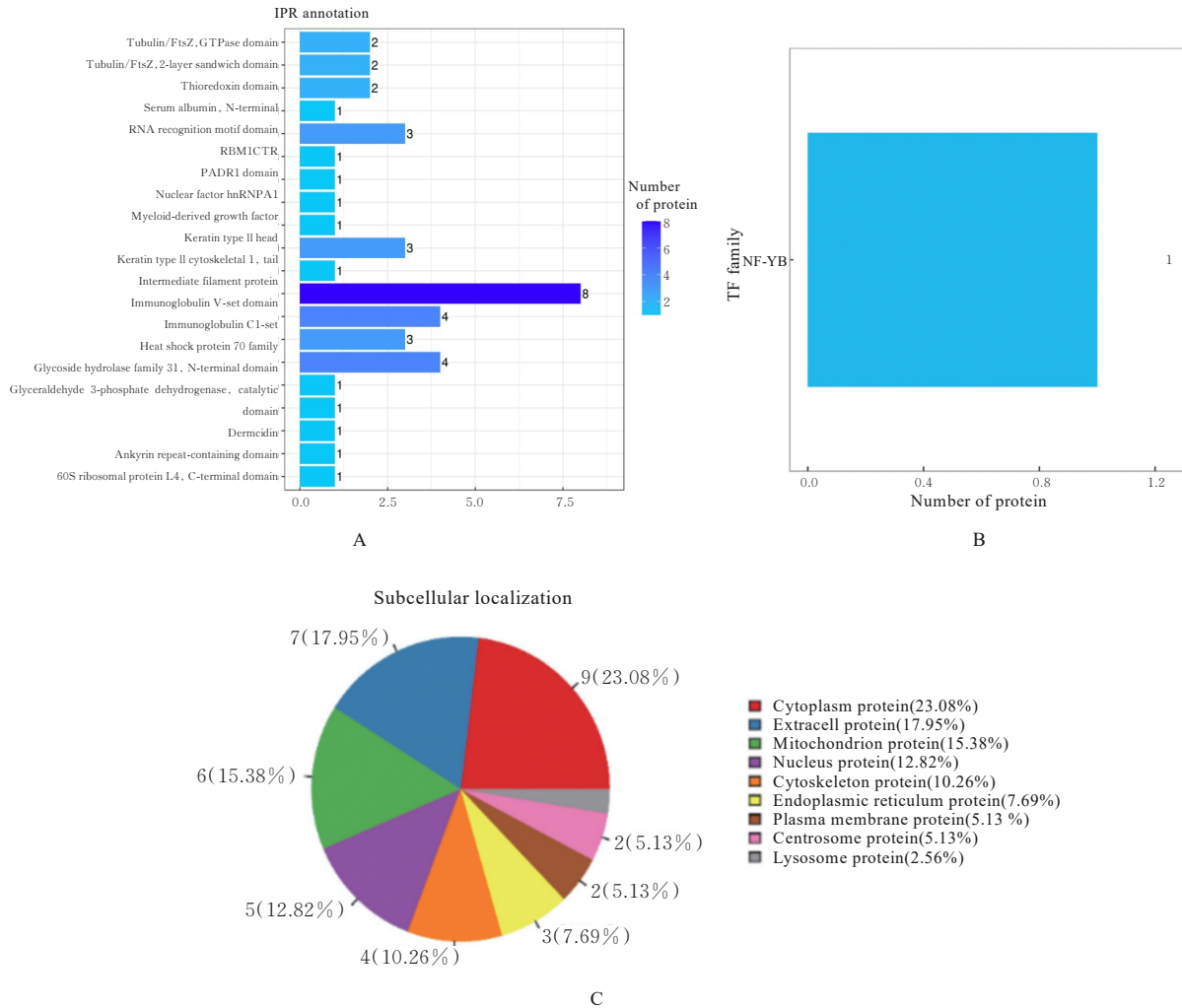
A: Wayne diagram; B: GO functional annotation; C: KOGs annotation analysis; D: KEGG signaling pathway enrichment analysis.

图5 功能注释韦恩图、GO功能注释、KOGs注释分析和KEGG信号通路富集分析

Fig. 5 Wayne diagram of functional annotation, GO functional annotation, KOGs annotation analysis, and KEGG signaling pathway enrichment analysis

区^[20-23]。研究^[24]显示：NSs诱导宿主蛋白结合成类包涵体结构，使TF无法进入细胞核，干扰信号传导，促进病毒复制。研究^[25]显示：NSs与信号转导与转录激活因子1/2和TF干扰素调节因子7存在互作，同样隐藏为包涵体结构，影响原有的细胞生物学进程。本实验共筛选出46种潜在靶标蛋白，其中特异性肽段数较高的包括角蛋白(keratin, KRT)1、HSP70、葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)、内质网蛋白44(endoplasmic reticulum protein 44, ERP44)和与HSP70高度相似的HSP70-1，均参与翻译后修饰

和蛋白分子伴侣的进程。核糖体翻译、翻译后修饰和蛋白转运均检测到高丰度富集，多数定位于细胞质中，与SFTSV NSs表达定位一致。KRT1是细胞骨架蛋白，与高尔基体膜互作并参与高尔基体结构的维持^[26]，SFTSV颗粒通过高尔基体运输，微管或肌动蛋白丝的破坏导致高尔基体碎裂并造成胞内运输的损害^[27]。GRP78常作为分子伴侣发挥作用，增加内质网的体积并提供更多的伴侣蛋白以辅助折叠，为病毒颗粒转运和核糖体翻译提供了条件，SFTSV感染时GRP78表达水平上调^[28]。研究^[29]显示：NSs蛋白是HSP90主要的作用靶标蛋



A: Structural domains; B: TF; C: Subcellular localization annotation.

图6 结构域、TF和亚细胞定位注释

Fig. 6 Structural domains, TF, and subcellular localization annotation

白, HSP90抑制剂以剂量依赖的方式抑制SFTSV复制。该类分子伴侣还有HSP70, 其抑制剂也可降低NSs表达, 且HSP70多个异构体均与NSs共定位。布尼亚病毒感染HEK-293T细胞时, 激活内质网应激是一种普遍感染效应, 同时细胞中未折叠蛋白反应信号通路也被激活, 对病毒感染导致的内质网应激进行动态调节^[30]。此外, ERP44也参与调节内质网应激^[31]; 蛋白质二硫异构酶A6 (protein disulfide isomerase A6, PDIA6) 参与内质网应激, 过氧化物酶4是一类具有过氧化氢酶活性的抗氧化蛋白, 与炎症和氧化应激密切相关, GO功能富集分析检测到高通量的氧化还原和抗氧化过程, 说明NSs感染细胞后引起细胞明显的应激反应并发生内质网应激, PDIA6表达上调, 细胞损伤趋向严重^[32]。真核翻译延伸因子1A2 (eukaryotic

translation elongation factor1A2, EEF1A2) 通过促进氨基tRNA与核糖体A位点的结合, 在蛋白质合成过程中对新生多肽的延伸发挥重要作用, 使EEF1A上调, 细胞迁徙能力明显增强^[33-34]。

本研究初步筛选到与NSs蛋白互作的潜在宿主蛋白, 分析宿主因子与NSs蛋白可能存在的互作靶点和发挥的生物学功能, 进一步考虑其能否作为抑制剂或结合位点干扰NSs的表达, 通过减弱SFTSV的毒力作用抑制病毒感染进程。后续研究可通过免疫共沉淀或酵母双杂交等方法对所获的互作蛋白进行验证和分析, 借助靶标蛋白深入了解SFTSV的感染机制可作为后续研究的新方向, 同时为寻找有效的新型抗病毒药物靶点和疫苗模型提供依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

骆丽可参与实验操作、数据分析和论文撰写, 程子文参与绘制图表, 程廓参与论文修改, 李永刚和王大为参与实验设计, 杨宝玲参与实验选题、实验指导及论文审阅。

[参考文献]

- [1] LUO L M, ZHAO L, WEN H L, et al. Haemaphysalis longicornis ticks as reservoir and vector of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(10): 1770-1776.
- [2] BACHILLER S, JIMÉNEZ-FERRER I, PAULUS A, et al. Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response [J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 488.
- [3] LI Z F, HU J L, CUI L B, et al. Increased prevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Eastern China clustered with multiple genotypes and reassorted virus during 2010-2015[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6503.
- [4] GAI Z T, ZHANG Y, LIANG M F, et al. Clinical progress and risk factors for death in severe fever with thrombocytopenia syndrome patients [J]. J Infect Dis, 2012, 206(7): 1095-1102.
- [5] YU X J, LIANG M F, ZHANG S Y, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [6] LI J C, WANG Y N, ZHAO J, et al. A review on the epidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi, 2021, 42(12): 2226-2233.
- [7] 李春晶, 刘庆华, 全传松, 等. 发热伴血小板减少综合征免疫系统损伤的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2023, 46(2): 189-195.
- [8] LI J, LI S, YANG L, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: a highly lethal bunyavirus[J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47(1): 112-125.
- [9] NING Y J, FENG K, MIN Y Q, et al. Disruption of type I interferon signaling by the nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus via the hijacking of STAT2 and STAT1 into inclusion bodies[J]. J Virol, 2015, 89(8): 4227-4236.
- [10] WU X D, QI X, LIANG M F, et al. Roles of viroplasm-like structures formed by nonstructural protein NSs in infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. FASEB J, 2014, 28(6): 2504-2516.
- [11] SUN Q Y, QI X, ZHANG Y, et al. Synaptogyrin-2 promotes replication of a novel tick-borne bunyavirus through interacting with viral nonstructural protein NSs[J]. J Biol Chem, 2016, 291(31): 16138-16149.
- [12] TAO X L, WANG X F, YUAN Y, et al. Preparation of a polyclonal antibody against the non-structural protein, NSs of SFTSV[J]. Protein Expr Purif, 2021, 184: 105892.
- [13] LEE J K, SHIN O S. Nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome phlebovirus inhibits TBK1 to evade interferon-mediated response[J]. J Microbiol Biotechnol, 2021, 31(2): 226-232.
- [14] FINN R D, ATTWOOD T K, BABBITT P C, et al. InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D190-D199.
- [15] GALPERIN M Y, KRISTENSEN D M, MAKAROVA K S, et al. Microbial genome analysis: the COG approach[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(4): 1063-1070.
- [16] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D353-D361.
- [17] SHEN H B, CHOU K C. A top-down approach to enhance the power of predicting human protein subcellular localization: hum-mPLOC 2.0 [J]. Anal Biochem, 2009, 394(2): 269-274.
- [18] JIN J P, ZHANG H, KONG L, et al. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D1182-D1187.
- [19] ZHANG H M, CHEN H, LIU W, et al. AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(Database issue): D144-D149.
- [20] KANG L J, WENG N D, JIAN W Y. LC-MS bioanalysis of intact proteins and peptides [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34(1): e4633.
- [21] LI J P, ZHU H J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based proteomics of drug-metabolizing enzymes and transporters [J]. Molecules, 2020, 25(11): 2718.
- [22] NARDONE V, CHAVES-SANJUAN A, NARDINI M. Structural determinants for NF-Y/DNA interaction at the CCAAT box[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2017, 1860(5): 571-580.
- [23] LUNDU T, TSUDA Y, ITO R, et al. Targeting of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

- structural proteins to the ERGIC (endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment) and Golgi complex[J]. *Biomed Res*, 2018, 39(1): 27-38.
- [24] QU B Q, QI X, WU X D, et al. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *J Virol*, 2012, 86(16): 8388-8401.
- [25] SANTIAGO F W, COVALEDA L M, SANCHEZ-APARICIO M T, et al. Hijacking of RIG-I signaling proteins into virus-induced cytoplasmic structures correlates with the inhibition of type I interferon responses[J]. *J Virol*, 2014, 88(8): 4572-4585.
- [26] FANG H C, WU B Q, HAO Y L, et al. KRT1 gene silencing ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via the activation of the Notch signaling pathway in mouse models[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3634-3646.
- [27] WU Y, ZHU Y H, GAO F, et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(36): E7564-E7573.
- [28] IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: a cell's response to stress[J]. *Life Sci*, 2019, 226: 156-163.
- [29] 王 博. 未折叠蛋白应答及HSP90在SFTSV复制过程中的功能研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- [30] HWANG J, QI L. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(8): 593-605.
- [31] XIA T, TIAN H, ZHANG K W, et al. Exosomal ERp44 derived from ER-stressed cells strengthens cisplatin resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1003.
- [32] GROENENDYK J, PENG Z L, DUDEK E, et al. Interplay between the oxidoreductase PDIA6 and microRNA-322 controls the response to disrupted endoplasmic reticulum calcium homeostasis [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(329): ra54.
- [33] RUMPANSUWON K, PROMMAHOM A, DHARMASAROJA P. eEF1A2 knockdown impairs neuronal proliferation and inhibits neurite outgrowth of differentiating neurons[J]. *Neuroreport*, 2022, 33(8): 336-344.
- [34] 魏 迅, 秦新萌, 马 力, 等. 阿伐曲泊帕治疗慢性肝病相关性血小板减少症临床疗效分析[J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(7): 567-570.