

# 免疫沉淀联合质谱筛选与纳尔逊湾正呼肠孤病毒 $\sigma$ NS 互作的宿主 RNA 结合蛋白

李润林, 胡思漫, 骆丽可, 贾雪娇, 刘梦琦, 李永刚, 陶晓莉

**摘要** **目的** 筛选出宿主细胞中与纳尔逊湾呼肠孤病毒(NBV)非结构蛋白  $\sigma$ NS 互作的 RNA 结合蛋白并分析其生物信息学功能。**方法** 本研究通过构建 NBV  $\sigma$ NS 真核表达载体 pEF-HA-MB-S3, 验证正确后转染 HEK293T 细胞, 所得的细胞蛋白裂解液经 RNase A 处理后, 利用免疫沉淀富集  $\sigma$ NS 结合蛋白, 经 LC-MS/MS 质谱分析技术鉴定分析互作蛋白, 并且借助相关生信工具挖掘蛋白性质和具体功能。**结果**

本实验成功筛选出 32 个与 NBV  $\sigma$ NS 蛋白存在互作的候选 RNA 结合蛋白; 生物分析结果显示, 这些蛋白主要定位于细胞质与细胞核中, 并且主要参与细胞代谢、生物调控、病毒翻译与转录等生物学过程。**结论** 本研究初步分析与 NBV  $\sigma$ NS 互作的 RNA 结合蛋白功能, 为深入研究  $\sigma$ NS 蛋白在 NBV 生命周期中的作用机制奠定基础。

**关键词** 纳尔逊湾病毒;  $\sigma$ NS 蛋白; RNA 结合蛋白; 宿主蛋白; 免疫沉淀

**中图分类号** R 373

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1546-05  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.018

纳尔逊湾呼肠孤病毒(Nelson Bay orthoreovirus, NBV)是一种人兽共患病病毒, 起初见于果蝠体

2023-08-16 接收

基金项目: 辽宁省自然科学基金(编号: 2022-BS-320)

作者单位: 锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室, 锦州 121000

作者简介: 李润林, 女, 硕士研究生;

陶晓莉, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: 420391072@qq.com

内, 后由急性呼吸道感染患者的痰液分离所得<sup>[1]</sup>。NBV 为分节段双链 RNA, 隶属于呼肠孤病毒科, 其中非结构蛋白  $\sigma$ NS 由 S3 基因表达, 一方面通过与  $\mu$ NS 稳定嵌合, 介导病毒工厂的形成, 汇集 RNA 合成等必须活性成分, 为病毒复制提供稳定场所; 另一方面, 经宿主 RNA 相关因子的招募, 加快病毒包装效率, 并且定向结合单链 RNA 构成核蛋白复合物, 推动 NBV 病毒后续的蛋白表达、递送、组装等相关程序<sup>[2-6]</sup>。然而, NBV  $\sigma$ NS 与宿主 RNA 结合的具体蛋白及相关功能, 尚不明确。因此, 通过构建 NBV S3 的重组质粒 pEF-HA-S3, 经摒除 RNA、转染宿主细胞及免疫沉淀联合质谱技术筛选出 RNA 互作蛋白, 由生物信息学预测相关蛋白的亚细胞定位、潜在功能和作用机制, 以期探究 NBV 复制过程和防控对策提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 重组 NBV-MB 病毒株日本大阪大学病毒复制实验室赠与, HEK293T 细胞和 NBV  $\sigma$ NS 蛋白抗体均为锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室保存; HA 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、PMSF 均购自碧云天公司; 4 × 蛋白上样缓冲液购自 Solorio 公司; In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit 和 RNase A 均购自 Takara 公司; DMEM 培

Compared with the AKI group alone, the serum creatinine, urea nitrogen and blood uric acid in the hyperuricemia + AKI group significantly increased. Pathological staining, Western blot, and qPCR also showed worsening of renal fibrosis and elevated METTL3 expression in the composite model group. The m6A test results showed that the overall methylation level of mice in the experimental group increased, and the composite model group was significantly higher than that in the AKI group. *In vitro* experiments, the METTL3-specific inhibitor STM2457 was given to effectively reduce the injury of renal tubular epithelial cells and reduce the level of inflammation and fibrosis. **Conclusion** Cisplatin can exacerbate renal inflammation and fibrosis caused by high uric acid; STM2457 has therapeutic effects in hyperuricemic nephropathy and cisplatin-induced acute kidney injury, and METTL3 may be a potential target for the treatment of related kidney injury.

**Key words** hyperuricemia; hyperuricemic nephropathy; acute kidney injury; m6A; epigenetics

培养基、胎牛血清、青链霉素均购自美国 Gibco 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 真核载体质粒 pEF-HA-S3 的构建** NBV S3 基因经特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增,经 In Fusion 克隆至 pEF-HA 载体。将连接产物转化到 DH5- $\alpha$  感受态细胞中, LB 固体培养基培养单个菌落并挑取单个菌落提取质粒并经 Western blot 验证。

表 1 目的基因引物序列(5'-3')

基因名称	引物序列
NBV-S3	F:5'-CGCCGAATTCGGATCAATGCGTGTCTCGAGAAA-3'
	R:5'-CGACATCGATGGATCTTATGCGATGCGGCTGCTCTGACA-3'

**1.2.2 细胞转染与 Western blot 检测** 将 HEK293T 细胞接种在六孔板中,加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,放在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜。次日待细胞数量达 70% 后,每孔用 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine2000 转染 4  $\mu\text{g}$  质粒。培养 48 h 后,用 500  $\mu\text{l}$  含 1% PMSF 的裂解液收集细胞,4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 000 r/min,离心 5 min,取上清,加入 4  $\times$  loading buffer 上样缓冲液,沸水浴处理 10 min 后进行 Western blot 检测。

**1.2.3 免疫沉淀富集与  $\sigma\text{NS}$  蛋白相互作用的 RBPs** 于六孔板中培养 HEK-293T 细胞至 80% 左右时,根据不同组别,如上述方法转染质粒与制备细胞裂解液,每组细胞裂解液上清中加入 1.5  $\mu\text{l}$  Anti-HA 抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  缓慢摇动 1h,再加入 20  $\mu\text{l}$  protein A/G,4  $^{\circ}\text{C}$ ,孵育 2 h, 2 500 r/min 离心 5 min,小心弃去上清液。加入 500  $\mu\text{l}$  PBS 进行洗涤, 2 500 r/min 离心 1 min,小心吸除上清液,重复 4 次。加入 30  $\mu\text{l}$  PBS 重悬,并加入 10  $\mu\text{l}$  1  $\times$  上样缓冲液,沸水浴处理 5 min 后,进行银染检测。

表 2 免疫沉淀处理分组

组别	处理方法
对照组	转染 pEF-HA 质粒
转染组	转染 pEF-HA-S3 质粒
酶处理组	转染 pEF-HA-S3 质粒,并在细胞裂解液中加入 RNase A (10 mg/ml)

**1.2.4 LC-MS/MS 质谱分析及生物信息学分析** 将免疫沉淀富集到的蛋白液经 SDS-PAGE 电泳后,通过固定、敏化、银染、显色后,将酶处理组分别与对照组和转染组进行比较,切下特异条带,送至武汉金开瑞公司进行质谱检测。采用 ProteinPilot 与 ProteinPilot 中的 Paragon 算法对质谱结果进行生物信

息学分析。

## 2 结果

**2.1 NBV S3 基因扩增** 以重组 NBV-MB 病毒株为模板,经 S3 基因特异引物体外扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 1 051 kb 左右出现一条明亮条带,与预期大小一致。

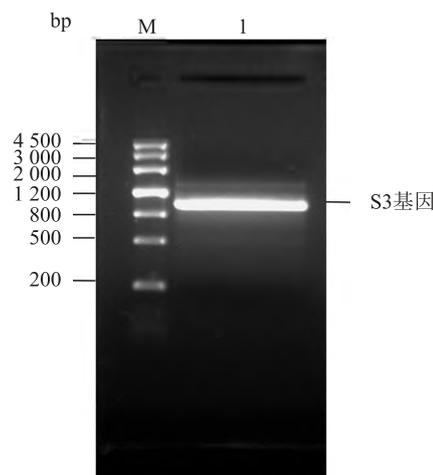


图 1 重组 NBV 病毒 S3 基因扩增产物电泳结果  
M:Maker; 1:S3 基因扩增产物

## 2.2 Western blot 验证 NBV $\sigma\text{NS}$ 融合蛋白的表达

收集转染 pEF-HA-S3 质粒的 293T 细胞的蛋白样品,同时以未经转染 293T 细胞蛋白作为对照,用 Anti-HA 识别融合蛋白, Anti- $\sigma\text{NS}$  检测 S3 基因的表达,对照组在 39 ku 处左右出现明显条带,符合预期蛋白大小。表明重组 pEF-HA-S3 质粒可以表达带有 HA 标签的  $\sigma\text{NS}$  蛋白。

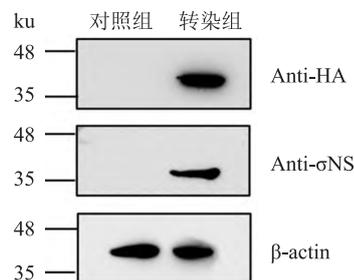


图 2 重组蛋白的 Western blot 鉴定结果

## 2.3 免疫沉淀筛选与 NBV $\sigma\text{NS}$ 互作的 RNA 结合蛋白

用 1mg/ml RNase A 处理细胞裂解液后,经琼脂糖凝胶电泳结果显示,与对照组和空白组相比,酶处理组已去除 RNA。后采用 protein A/G Agarose 与 HA 标签沉淀与  $\sigma\text{NS}$  蛋白相互作用的宿主蛋白,并

以转染空载体 pEF-HA 为空白组对照,如图所示,转染 pEF-HA-S3 质粒并经 RNase A 处理的细胞裂解液的 IP 条带对比,存在多条差异蛋白条带。切下特异条带,处理后经 LC-MS /MS 质谱分析,将结果进行对比,得到 32 个与  $\sigma$ NS 蛋白存在互作的潜在宿主蛋白。

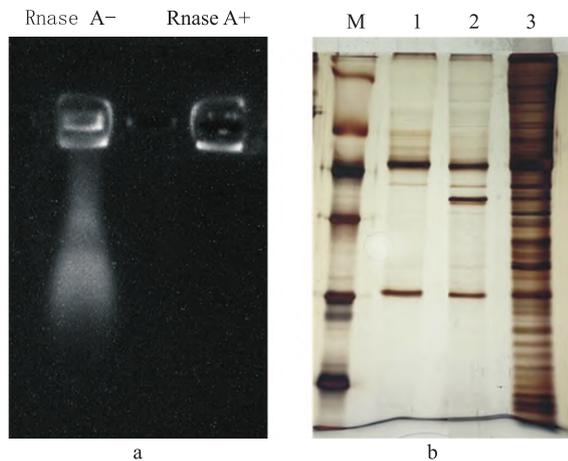


图3 细胞裂解液琼脂糖凝胶电泳结果与 IP 蛋白复合物银染结果  
a: pEF-HA-MB-S3 转染后细胞裂解液经 RNase A 处理前后琼脂糖凝胶电泳结果;b: IP 蛋白复合物银染结果

**2.4 生物信息学分析互作蛋白的功能** 将质谱分析所得结果输入 proteinpilot 软件进行检索分析,通过进行 KEGG 注释,GO 注释等生物信息学分析,同时对蛋白质进行亚细胞定位预测,利用不同来源的数据库全面反映蛋白质的功能、结构、位置。亚细胞定位结果显示主要定位在细胞核中,其中多种蛋白共定位在细胞质与细胞核。GO 注释分析结果显示,参与的生物学过程包括细胞过程、生物调控、代谢过程、刺激反应等;作为细胞组成主要是细胞解剖实体,含蛋白复合物与病毒粒子成分;分子功能主要是结合功能包括与 RNA 结合、DNA 结合、ATP 结合等。KEGG 注释分析结果表明,这些互作蛋白主要参与病毒感染疾病、遗传信息的处理等通路。

### 3 讨论

作为呼肠孤病毒科大家族的一员,NBV 会侵入人或家畜体内,进行核酸复制、病毒颗粒的合成与释放等生命活动<sup>[7]</sup>。在这一过程中,NBV  $\sigma$ NS 与宿主 RNA 有着紧密的联系。研究表明<sup>[8]</sup>, $\sigma$ NS 蛋白是一种 RNA 分子伴侣,通过构型改变整合 ssRNA,在无需能量补给的环境下便可促进 RNA 复制;而且,NBV 必须通过宿主翻译机制来合成病毒蛋白,这可能是由于  $\sigma$ NS 会劫持细胞 RNA 结合蛋白(RBPs)来

表3 质谱分析获得的与  $\sigma$ NS 蛋白互作的候选蛋白

评分	登录号	蛋白名称	蛋白序列长度(ku)
14.96	A0A7P0TB36	78kDa 葡萄糖调节蛋白(GRP78)	623
10.53	A0A7I2YQB2	75kDa 葡萄糖调节蛋白(GRP75)	577
10.05	H0YH81	ATP 合成酶 $\beta$ 亚单位	362
6.45	Q9Y623	肌球蛋白4	1939
5.52	H0YN42	膜联蛋白	256
5.42	A0A0U1RQF0	3-羟酰基-[酰基载体蛋白]脱水酶	2 509
4.15	G5E972	膜相关多肽 2	414
3.85	B4DY09	白细胞介素增强结合因子 2	352
3.7	E9PLL6	60S 核糖体蛋白 L27a	108
3.29	J3QTR3	泛素-40S 核糖体蛋白 S27a	106
3.14	A0A7P0Z4D6	钙连接蛋白	471
2.91	Q99879	组蛋白 H2B1-M 型	126
2.53	Q01469	脂肪酸结合蛋白 5	135
2.51	H7BY11	原肌球蛋白 1	248
2.23	A0A804HL54	异亮氨酸-tRNA 连接酶	1 237
2.22	B1AHC9	依赖 ATP 的 DNA 解旋酶 2	559
2.2	Q9NZT1	钙调蛋白样蛋白 5	146
2.17	A0A140T936	缬氨酸-tRNA 连接酶	1 183
2.08	A0A494C189	组蛋白 H2A	127
2.01	E9PKZ0	60S 核糖体蛋白 L8	205
2	D6RF10	Sideroflexin-1	193
2	B7Z645	异质核糖核蛋白 Q	464
2	A0A0B4J1V0	免疫球蛋白重变量 3 - 15	119
2	A0A7I2YQV4	输出蛋白-1	1 007
2	A0A0C4DGH5	Cullin 相关 NEDD8 游离蛋白 1	770
2	P02538	II 型角蛋白	564
1.89	D6RD18	异质核糖核蛋白 A/B	283
1.89	P14866	异质核糖核蛋白 L	589
1.82	M0R181	60S 核糖体蛋白 L21	122
1.48	B0YJC4	波形蛋白	431
1.44	M0R3D6	60S 核糖体蛋白 L18a	141
1.32	P68032	肌动蛋白	377

辅助其复制和传播。由于宿主细胞 RBPs 可参与 RNA 病毒代谢活动几乎所有阶段,这为我们深入研究 NBV 和宿主细胞 RNA 间互作关系和调控过程有指导性意义<sup>[9]</sup>。

本研究利用免疫沉淀联合质谱技术,在 HEK293T 细胞中筛选到 32 个 RBPs 与 NBV  $\sigma$ NS 互作,通过生信系列分析,揭示参与细胞过程、代谢调节及分子结合等生物学过程。其中,GO 分析展示出互作的蛋白在 RNA 加工和蛋白翻译方面的指数较高;KEGG 发现与 NBV  $\sigma$ NS 结合的相关蛋白会引起病毒性疾病、内分泌和免疫性疾病等应激反应和代谢过程。具体来看,60S 核糖核蛋白是一种广谱的宿主影响因子<sup>[10]</sup>,与  $\sigma$ NS 结合可能会为感染病



以通过免疫共沉淀或酵母双杂交等方法对所获的若干蛋白进行验证和分析,为寻找 NBV 疫苗或药物的新型靶点提供方向。

### 参考文献

- [1] 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*, 2014,9(3): E92777.
- [2] Tan Y F, Teng C L, Chua K B, et al. Pteropine orthoreovirus: An important emerging virus causing infectious disease in the tropics? [J]. *J Infect Dev Countr*, 2017,1(3):215-9.
- [3] Lee C H, Raghunathan K, Taylor G M, et al. Reovirus nonstructural protein  $\sigma$ NS recruits Viral RNA to replication organelles[J]. *mBio*, 2021,12(4): E0140821.
- [4] Zamora P F, Hu L, Knowlton J J, et al. Reovirus nonstructural protein  $\sigma$ NS acts as an RNA Stability factor promoting viral genome replication[J]. *J Virol*, 2018,92(15): E00563-18.
- [5] Gillian A L, Schmechel S C, Livny J, et al. Reovirus protein sigmaNS binds in multiple copies to single-stranded RNA and shares properties with single-stranded DNA binding proteins[J]. *J Virol*, 2000,74(13):5939-48.
- [6] 李藤菲,王诗雨,蒋欣如,等. 纳尔逊湾正呼肠孤病毒非结构蛋白  $\mu$ NS 和  $\sigma$ NS 表达特性的分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021,47(4):934-42.
- [7] Jiang R D, Li B, Liu X L, et al. Bat mammalian orthoreoviruses cause severe pneumonia in mice[J]. *Virology*, 2020,551:84-92.
- [8] Girardi E, Pfeffer S, Baumert T F, et al. Roadblocks and fast tracks: How RNA binding proteins affect the viral RNA journey in the cell[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021,111:86-100.
- [9] Kim B, Arcos S, Rothamel K, Asceno M. Viral crosslinking and solid-phase purification enables discovery of ribonucleoprotein complexes on incoming RNA virus genomes [J]. *Nat Protoc*, 2021,16(1):516-31.
- [10] Li S, Li X, Zhou Y. Ribosomal protein L18 is an essential factor that promote rice stripe virus accumulation in small brown planthopper[J]. *Virus research*, 2018,247:15-20.
- [11] Uddin M H, Zonder J A, Azmi A S. Exportin 1 inhibition as antiviral therapy[J]. *Drug Discov Today*, 2020,25(10):1775-81.
- [12] Jin J, Wang W, Ai S, et al. Enterovirus 71 represses interleukin enhancer-binding factor 2 production and nucleus translocation to antagonize ILF2 antiviral effects[J]. *Viruses*, 2019,12(1):22.
- [13] Yavlovich A, Viard M, Zhou M, et al. Ectopic ATP synthase facilitates transfer of HIV-1 from antigen-presenting cells to CD4 (+) target cells[J]. *Blood*, 2012,120(6):1246-53.
- [14] Dominguez R, Holmes K C. Actin structure and function[J]. *Annu Rev Biophys*, 2011,40:169-86.

## Screening of host RNA binding proteins interacting with Nelson Bay reovirus $\sigma$ NS by immunoprecipitation combined with mass spectrometry

Li Runlin, Hu Siman, Luo Like, Jia Xuejiao, Liu Mengqi, Li Yonggang, Tao Xiaoli

(Laboratory of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000)

**Abstract Objective** To screen the RNA binding proteins interacting with NBV nonstructural protein  $\sigma$ NS in host cells and to analyze their bioinformatics functions. **Methods** In this study, the eukaryotic expression vector pEF-HA-MB-S3 of NBV  $\sigma$  NS was constructed and transfected into HEK293T cells after verification. After RNase A treatment, the obtained protein lysate was enriched by immunoprecipitation to enrich  $\sigma$ NS binding proteins, identified and analyzed by LC-MS/MS mass spectrometry, and the properties and specific functions of proteins were discovered with the help of related Bioinformatics tools. **Results** In this study, 32 candidate RNA binding proteins interacting with NBV  $\sigma$ NS proteins were successfully screened, and the results of bioanalysis showed that these proteins were mainly located in cytoplasm and nucleus, and were mainly involved in biological processes such as cell metabolism, biological regulation, virus translation and transcription. **Conclusion** This study preliminarily analyzes the function of RNA binding proteins interacting with NBV  $\sigma$ NS, which lays a foundation for further study on the mechanism of  $\sigma$ NS protein in NBV life cycle.

**Key words** nelson bay orthoreoviruses; RNA binding proteins;  $\sigma$ NS protein; interaction protein; immunoprecipitation