

吴 双, 朱善元, 王晓泉, 等. 线粒体蛋白质翻译延伸因子(TUFM)在不同毒力新城疫病毒感染的鸡胚成纤维细胞中的表达水平[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 615-618.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.020

线粒体蛋白质翻译延伸因子(TUFM)在不同毒力新城疫病毒感染的鸡胚成纤维细胞中的表达水平

吴 双¹, 朱善元¹, 王晓泉², 左伟勇¹, 王安平¹, 王永娟¹, 秦 枫¹, 洪伟鸣¹, 刘秀梵²

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300; 2. 扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为研究线粒体蛋白质翻译延伸因子 Tu(TUFM)在不同毒力新城疫病毒(NDV)感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)中表达水平的变化, 运用比较蛋白质组技术分析感染了 NDV 的 CEF 差异表达的蛋白点。与 24 h 的阴性对照组相比, 感染 NDV 后 24 h 时 TUFM 表达量在毒力最弱的 WX-10-07-Pi 感染组中显著升高; 毒力最强的 JS-5-05-Go 引起宿主表达 TUFM 量随感染时间增加逐渐增强。推测 TUFM 的表达水平与 NDV 毒力强弱具有一定相关性。

关键词: 线粒体蛋白质翻译延伸因子 Tu; 新城疫病毒; 表达水平; 毒力

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0615-04

Expression level of mitochondrial Tu translation elongation factor (TUFM) in chicken embryonic fibroblasts (CEFs) infected with different virulent Newcastle disease viruses

WU Shuang¹, ZHU Shan-yuan¹, WANG Xiao-quan², ZUO Wei-yong¹, WANG An-ping¹, WANG Yong-juan¹, QIN Feng¹, HONG Wei-ming¹, LIU Xiu-fan²

(1. *Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College/Jiangsu Provincial Veterinary Bio-pharmaceutical, Key Laboratory of High-tech Research, Taizhou 225300, China*; 2. *Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*)

Abstract: To study the dynamic expression of mitochondrial Tu translation elongation factor (TUFM) in chicken embryo fibroblasts (CEFs), comparative proteomics technique was used to analyze proteomes of CEFs infected with three different virulent Newcastle disease viruses (NDVs) derived from chicken, goose and pigeon. Mass spectrometry results showed the expression level of TUFM was upregulated in the low virulent strain WX-10-07-Pi-infected group compared with

negative control group at 24 h post infection. The expression level of TUFM increased over time in the CEFs infected with high virulent strain JS-5-05-Go. These results suggest that the expression level of TUFM has a great deal of correlation with the virulence of NDVs.

Key words: mitochondrial Tu translation elongation factor; Newcastle disease virus; expression level; virulence

收稿日期: 2015-09-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31440083); 江苏省科技支撑计划项目(BE2012366); 江苏农牧科技职业学院科研项目(NSFPT201501)

作者简介: 吴 双(1983-), 女, 江苏徐州人, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病防控和兽用基因工程疫苗研究。(Tel) 0523-86356818; (E-mail) jswshuang@sina.com.cn

通讯作者: 刘秀梵, (Tel) 0514-87991416; (E-mail) xfliu@yzu.edu.cn

翻译延伸因子(Elongation factor)是参与蛋白质翻译、延伸和翻译后修饰等的一类重要蛋白质, 它是

通过核糖体上催化氨基酸链的延伸来推动和控制诸多蛋白质的合成。其中,线粒体蛋白质翻译延伸因子 Tu (Mitochondrial Tu translation elongation factor, TUFM)在线粒体蛋白翻译中占据核心作用,TUFM蛋白是细胞内与翻译机制有关的蛋白质中含量最高的蛋白,因此,TUFM表达增加或降低都将直接影响线粒体DNA编码蛋白的生物合成,将会直接导致线粒体功能障碍,从而引起拟核结构不稳定,导致线粒体DNA损伤^[1-2]。新城疫病毒是一种严格的胞内寄生物,完全依赖于宿主的翻译系统合成病毒蛋白质从而实现病毒的有效复制,因此,TUFM也是NDV感染过程中重要的调控靶标。詹媛^[3-4]研究证实NDV主要通过PI3K/Akt通路促进延长因子的翻译,从而在一定程度上促进蛋白翻译过程。病毒与宿主之间复杂的相互作用必定会引起宿主蛋白质表达谱的改变,分析病毒感染宿主总蛋白的比较蛋白质组学技术具有能够直观体现蛋白质丰度变化的优势,因此比较蛋白质组学被广泛用来分析病毒感染诱导的细胞蛋白质组变化^[5]。

1 材料和方法

1.1 试验材料

SPF种蛋购自山东省家禽研究所实验种鸡场,自行孵化至10日龄后按常规方法制备原代鸡胚成纤维细胞(CEF)。基因Ⅲ型鸡源NDV JS-7-05-Ch、基因Ⅶd亚型鹅源NDV JS-5-05-Go和基因Ⅵb亚型鸽源NDV WX-10-07-Pi的噬菌斑形成单位分别为 $(1.28 \sim 1.60) \times 10^8$ 、 $(1.02 \sim 1.34) \times 10^9$ 和 $(2.67 \sim 5.00) \times 10^7$,一日龄雏鸡脑内接种指数分别为1.88、1.96和1.40,3株NDV均由扬州大学农业部畜禽传染病学重点实验室鉴定、纯化和保存。

1.2 主要试剂和仪器

硫脲、尿素、碘乙酰胺、四甲基乙二胺、CHAPS、Bio-Lyte pH3-10、蛋白定量试剂盒、17 cm IPG 预制胶条、等电聚焦仪和大容量灌胶器购自Bio-Rad公司,二硫苏糖醇、考马斯亮蓝G-250、溴酚蓝、蛋白酶抑制剂鸡尾酒混合液、DNase I和RNase A购自Sigma公司,PowerLook 2100XL扫描仪购自台湾Umax公司,超声波破碎仪Soniprep 150购自日本SANYO公司,ELX800自动ELISA检测仪和Gene 5软件购自美国BioTek公司,转瓶培养机INTEGRA BIOSCIENCES CELLROLL购自美国BiNDER公司。

1.3 鸡胚 CEF 总蛋白的提取

将铺种于细胞转瓶的 CEF 长至密度为 85% ~ 90% 时分别接种 10 感染复数 (MOI) 的上述 3 种 NDV, 同时设立接种 PBS 的阴性对照组, 接种病毒后 24 h 和 48 h 时收获细胞团块, 采用细胞裂解液结合超声波裂解处理的方法对 CEF 进行总蛋白提取, 具体步骤和方法按照参考文献 [6] 进行。采用 96 孔 Bradford 微量酶标板法测定样品浓度, 操作步骤参照文献 [7]。

1.4 CEF 双向凝胶电泳

采用 17 cm 线性 IPG 胶条, 分别取 1.0 mg 不同样品的细胞总蛋白加入水化液中至终体积 350 μ l, 进行胶条主动水化和等电聚焦, 先用平衡缓冲液 I 平衡 14 min, 然后转入到平衡缓冲液 II 中平衡 14 min, 其中水化液、平衡缓冲液 I 和平衡缓冲液 II 的配方和等电聚焦参数均按照文献 [6] 进行。在 12% 浓度的聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶上进行第二向电泳后采用胶体考染方法染色^[8]。透射扫描脱色后的凝胶图谱运用 PDQuest8.0.1 进行图像分析, 差异显著性分析采用 Student's-T-Test 检验法进行统计学分析。只有 3 个样本中均重复出现的差异点才可被鉴定是差异表达蛋白质。

1.5 质谱鉴定

运用 PDQuest8.0.1 软件分析图谱, 在排除细胞周期蛋白的基础上, 将表达水平差异显著的蛋白点从凝胶中挖出后送至广州慧晶生物科技有限公司鉴定, 胶内酶解后采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定技术 (MALDI-TOF-MS) 分析蛋白点。质谱鉴定数据来源于 NCBI 数据库, 广州慧晶生物科技有限公司判定 MALDI-TOF 鉴定成功的标准是蛋白质得分大于 66。鉴定结果优先选择同一种属 (鸡源) 蛋白质, 否则选择蛋白质得分最高的蛋白质。

2 结果

2.1 鸡胚 CEF 总蛋白样品的制备

Bradford 微量酶标板法测定样品浓度, 其线性方程为 $Y = 0.8074x + 0.7524$ ($R^2 = 0.9971$), Y 代表样品浓度 (mg/ml), x 为 OD_{595} , 蛋白质浓度基本保持在 4.0 ~ 5.5 mg/ml。

2.2 CEF 总蛋白双向电泳图谱

将 1.0 mg CEF 总蛋白先在 17 cm pH 4~7 线性

IPG 胶条中进行第一向分离,蛋白质因其等电点(pI)不同分散在胶条上(水平方向),后在 12%的 SDS-PAGE 凝胶上进行第二向分离,蛋白质因其分子量不同分散在凝胶中(垂直方向)。双向电泳图谱中检测到约 850 个蛋白点(图 1),批内蛋白点在重复样品的匹配率能达到 90%以上,表明本研究中凝胶图谱的分辨率高、重复性好,结果可信。

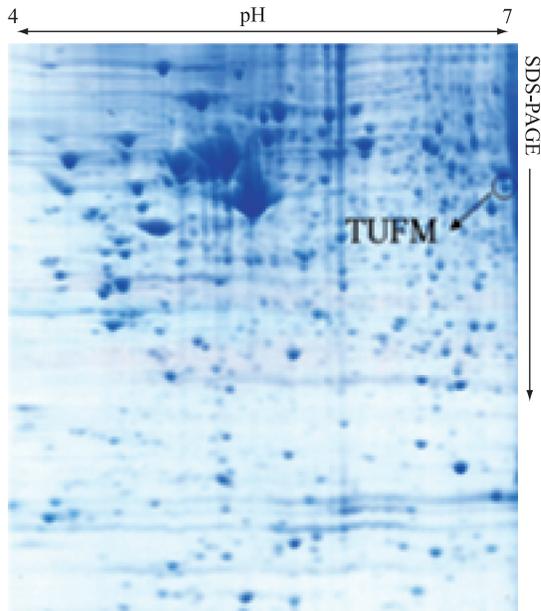


图 1 感染后 24 h 的阴性对照组双向电泳图谱(胶体考染)
Fig.1 2-DE gel of the negative control group in 24 h post infection (stained with blue silver)

2.3 TUFM 质谱鉴定结果和表达水平

双向凝胶图中标注的差异表达的蛋白点经质谱鉴定为 TUFM,结果见表 1。

登录号指 MALDI-TOF/TOF 质谱分析后采用 MASCOT 搜索 NCBI nr 数据库后的结果。以 MASCOT 蛋白分数大于 66 分($P \leq 0.05$)作为蛋白点质谱鉴定成功标准。鉴定成功的肽段给出的是具有统计学显著(置信区间 $\geq 95\%$)意义的离子分数序列。

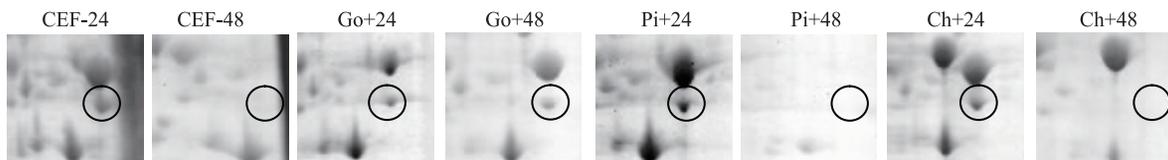
与阴性对照 24 h 时 CEF 相比,在 3 株 NDV 感染 CEF 后 24 h 时,TUFM 表达水平平均上调,与阴性对照 48 h 时 CEF 相比,在感染后 48 h 时,仅在 JS-5-05-Go 感染组中表达上调,双向凝胶图中 TUFM 蛋白点标注位置的截图见图 2。

对照同一时间点的阴性对照组 CEF 蛋白点分析各感染组内的 TUFM 表达水平差异,此外,还分析了同一时间点的感染组间的 TUFM 表达水平差异,结果见表 2。与 24 h 阴性对照组相比,3 株 NDV 感染组中 TUFM 表达水平均出现了增加,但是仅毒力最弱的 WX-10-07-Pi 感染组中 TUFM 表达水平显著增加。与 48 h 阴性对照组相比,JS-7-05-Ch 感染组和 WX-10-07-Pi 感染组中 TUFM 表达水平无统计学意义上差异,毒力最强的 JS-5-05-Go 感染组 TUFM 表达水平极显著增加。

表 1 MALDI-TOF 和 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定成功的差异表达的 TUFM 蛋白点

Table 1 Differentially expressed protein spot about TUFM identified by MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF

蛋白名称	登录号	分子量(预测值/实际值)	等电点(预测值/实际值)	蛋白质分数/最佳离子分数	鉴定成功的肽段
TUFM	gi188909611	38.23/47.30	8.98/6.70	548/100	YEDIDKAP EER GITINAAHVEYSTAR ADAVSDAELL- PLVELELR DVQRPFLLPIEGVH- SIPGR



注:-表示阴性对照,24 和 48 表示 NDV 感染 CEF 后 24 h 和 48 h,Go+表示 JS-5-05-Go 感染的 CEF,Pi+表示 WX-10-07-Pi 感染的 CEF,Ch+表示 JS-7-05-Ch 感染的 CEF。

图 2 TUFM 蛋白点在 2-DE 凝胶中的定位

Fig.2 The location of TUFM protein spots in 2-DE gels

表2 TUFM在感染组内表达水平以及感染组间的关系

Table 2 The expression levels of TUFM in three groups

时间点	感染组内表达水平及感染组间的关系					
	Pi	Go	Ch	Pi-Go	Go-Ch	Pi-Ch
24 h	↑*	↑	↑	↑*	-	↑*
48 h	-	↑**	-	↓**	↑**	-

*和**分别表示差异达到显著($P < 0.05$)和极显著水平($P < 0.01$); ↑和↓分别表示表达量的增加和减弱; Pi-Go表示以JS-5-05-Go感染组为对照, WX-10-07-Pi感染组与JS-5-05-Go感染组之间相应蛋白点相对含量的统计学差异; Go-Ch表示以JS-7-05-Ch感染组为对照, JS-5-05-Go感染组与JS-7-05-Ch感染组之间相应蛋白点相对含量的统计学差异; Pi-Ch表示以JS-7-05-Ch感染组为对照, WX-10-07-Pi感染组与JS-7-05-Ch感染组之间相应蛋白点相对含量的统计学差异; -表示两组数据之间差异不显著。

3 讨论

NDV能成功实现对CEF的感染和复制,一方面需要克服CEF的各种免疫防卫反应,另一方面需要利用CEF物质和能量合成病毒自身物质,这种相互作用会导致CEF蛋白表达谱发生改变。因此,研究NDV感染宿主细胞蛋白质组的变化有助于揭示NDV与宿主细胞的相互作用机制、NDV分子致病机制和不同来源NDV的蛋白表达谱差异的本质等。

TUFM是具有高度保守性和分布普遍性的延伸因子Tu(EF-TU)中的一种,它由细胞核基因在胞浆中合成后转入线粒体,作为线粒体拟核相关蛋白中的一种高丰度蛋白,主要功能是将氨酰tRNA递进核糖体,所以在真核细胞的肽链的延伸中发挥着关键性作用^[9]。TUFM能够维持线粒体蛋白质合成的保真度,其蛋白表达水平上调或下调一定会影响到aa-tRNAs与核糖体A位点的结合,直接影响线粒体DNA编码蛋白的生物合成水平^[10]。与24h的阴性对照组相比,感染后24h时TUFM表达量在毒力最弱的WX-10-07-Pi感染组中显著升高;与48h的阴性对照组相比,感染后48h时TUFM表达量在毒力最强的JS-5-05-Go感染组表达量不降反升且极显著增加,其余两株病毒感染组中TUFM表达量无明显差异且与阴性对照组具有一致的变化趋势。

NDV的基质蛋白(M蛋白)可以抑制宿主细胞RNA转录和蛋白质合成,促进子代NDV的出芽过程^[11]。研究结果^[12]表明M蛋白在上述3株NDV感染宿主细胞中的表达水平随时间的延长呈现一致

的增减趋势,这在一定程度上表明毒力越强的NDV在较长时间内更可能促进宿主合成自身的蛋白质。本研究结果在一定程度上表明TUFM的表达水平与病毒毒力关系更加密切,因此推测超过一定毒力的强毒株NDV引起宿主表达TUFM量随感染时间增加而逐渐增强或与感染毒株的特异性有关。由于本试验涉及的毒株只有3株,时间点也只选择24h和48h 2个时间点,因此该结论需要同一宿主源的同一基因型、不同毒力的多株NDV感染的CEF和多个时间点中TUFM表达水平的研究数据来验证。

参考文献:

- [1] HIROAKI S, TAKUYA U, HIDEKI T, et al. Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(6): 4076-4084.
- [2] 何成武. TUFM在膀胱癌中的表达及对T24细胞生物特性的影响[D]. 广州:南方医科大学, 2014.
- [3] 詹媛. 新城疫病毒通过激活真核翻译起始因子4F促进病毒增殖[D]. 北京:中国农业科学院, 2014.
- [4] 詹媛, 仇旭升, 曲显蓉, 等. 新城疫病毒在感染早期通过Akt/mTOR/4E-BP1和p38/Erk/Mnk1通路激活宿主真核翻译起始因子eIF4E的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(1):1-5.
- [5] 吴永平. 传染性法氏囊病毒感染鸡靶器官的比较蛋白质组研究[D]. 杭州:浙江大学, 2009.
- [6] 吴双, 开妍, 王晓泉, 等. 新城疫病毒感染细胞的双向凝胶电泳方法建立及其初步分析[J]. *中国家禽*, 2010, 32(10):25-29.
- [7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-54.
- [8] CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25:1327-1333.
- [9] RIIS B, RATTAN S I S, CLARK B F C, et al. Eukaryotic protein elongation factors [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1990, 15(11):420-424.
- [10] NAGAO A, SUZUKI T, SUZUKI T. Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria [J]. *Nucleic Acids Symp Ser(Oxf)*, 2007(51):41-42.
- [11] PANTUA H D, MCGINNES L W, PEEPLES M E, et al. Requirements for the assembly and release of Newcastle disease virus-like particles [J]. *J Virol*, 2006, 80(22):11062-11073.
- [12] 吴双. 2005-2008年华东地区NDV遗传进化分析和代表性毒株感染细胞的比较蛋白质组研究[D]. 扬州:扬州大学, 2010.

(责任编辑:陈海霞)