

殷 杰, 赵永祥, 薛江东, 等. 核糖体蛋白 L12(RPL12) 在猪繁殖与呼吸综合征病毒复制中的作用[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 686-693.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.017

核糖体蛋白 L12(RPL12) 在猪繁殖与呼吸综合征病毒复制中的作用

殷 杰^{1,2}, 赵永祥², 薛江东¹, 刘 锴¹, 李 彬², 马德慧¹

(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为研究宿主细胞核糖体蛋白 L12(RPL12) 在猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 复制中的作用, 本研究通过荧光定量 PCR 和 Western-blotting 等方法, 检测了 PRRSV 感染对 Marc-145 细胞中 *RPL12* 表达的影响, 以及过表达或敲减 *RPL12* 对 PRRSV 复制的影响。结果显示, PRRSV 感染可上调 Marc-145 细胞中 *RPL12* 基因的表达。过表达 *RPL12* 可促进 PRRSV 的复制, 而敲减 *RPL12* 可抑制 PRRSV 的复制。通过免疫共沉淀和共聚焦显微镜检测, 进一步研究发现 RPL12 蛋白与 PRRSV GP2b 蛋白存在相互作用, 并共定位于细胞质中。本研究首次发现了宿主蛋白 RPL12 能够促进 PRRSV 复制, 并与 PRRSV GP2b 蛋白存在相互作用, 为进一步研究 PRRSV 的感染与复制机制以及与宿主的相互作用提供了新的切入点, 为抗病毒药物的研发提供了有益的探索。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV); 核糖体蛋白 L12(RPL12); PRRSV GP2b 蛋白

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2021) 03-0686-08

Role of ribosomal protein L12(RPL12) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication

YIN Jie^{1,2}, ZHAO Yong-xiang², XUE Jiang-dong¹, LIU Kai¹, LI Bin², MA De-hui¹

(1. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To study the role of host cell ribosomal protein L12 (RPL12) in the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), real-time quantitative PCR and Western-blotting were performed to detect the effect of PRRSV infection on the expression of *RPL12* in Marc-145 cells and the effect of over-expression and knockdown of *RPL12* on the replication of PRRSV. The results showed that PRRSV infection could up-regulate the expression of *RPL12* in Marc-145 cells. Over-expression of *RPL12* promoted the replication of PRRSV, while knockdown of the *RPL12* inhibited the replication of PRRSV. Through co-immunoprecipitation and confocal microscopy analysis, further study found that RPL12 protein interacted with PRRSV GP2b protein and co-localized in the cytoplasm. This study reported for the first time that the

host protein RPL12 could promote PRRSV replication and interact with PRRSV GP2b protein, which provides a new cut-in point for further research on the mechanism of PRRSV infection and replication, and also provides a beneficial exploration for the development of antiviral drugs.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); ribosomal protein L12 (RPL12); PRRSV GP2b protein

收稿日期: 2020-01-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460662); 内蒙古民族大学硕士研究生科研创新项目(NMDSS1942)

作者简介: 殷 杰(1994-), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究。赵永祥为共同第一作者。

通讯作者: 马德慧, (E-mail) mdh1962@ 163.com; 李 彬, (E-mail) li-binana@ 126.com

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的病原体^[1],是一种有囊膜的单股正链RNA病毒,是冠状病毒科成员^[2],在分类上属于动脉病毒属^[3]。该病毒主要引起怀孕母猪早产、流产以及木乃伊胎等繁殖障碍,也会引起公猪精液质量下降,仔猪和育肥猪呼吸困难等症状^[4]。病毒在扁桃体、肺和淋巴器官中持续复制,可抑制宿主先天免疫^[5-8]。另外,PRRSV经常与猪圆环二型(PCV2)猪瘟等病毒和副猪嗜血杆菌等细菌存在混合感染^[9-11],而且PRRSV存在毒力返强、变异以及与临床毒株发生重组的风险,防控难度大,给中国养猪业造成了巨大损失。目前,PRRSV感染与复制机制还未完全阐明,特别是宿主蛋白质在病毒复制中的作用的研究尚不深入,解析这些问题有助于理解PRRSV的致病与免疫机制,有助于制定PRRSV防控措施。

PRRSV基因组包含11个已知的开放阅读框(ORFs): ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3~ORF7、ORF5a和transframe(TF)ORF^[12-14]。ORF1a和ORF1b的长度约占病毒基因组的三分之二,编码病毒复制所必需的16种非结构蛋白(NSPs)^[15],这些非结构蛋白主要参与基因组复制和亚基因组的合成。ORF2~ORF7编码8种结构蛋白[GP2、GP2b、GP3、GP4、GP5a、GP5、M和N],其中GP2b蛋白完全包裹在ORF2中,是一种小的、非糖基化蛋白质,大小只有10 000,但GP2b相对大量存在于病毒粒子中,在2种类型毒株间高度保守^[16],是病毒粒子的重要组成部分^[17]。GP2b已被证明与GP4共价结合,而GP3与GP4结合形成病毒粒子表面的异三聚体复合物,被认为参与病毒的侵入。因此,GP2b在PRRSV的感染与复制过程中可能发挥着重要作用。前期研究中,我们利用PRRSV GP2b作为诱饵蛋白质,通过酵母双杂交试验在猪肺泡巨噬细胞(PAM)cDNA文库中筛选到了与GP2b蛋白相互作用的核糖体蛋白L12(RPL12),而RPL12在PRRSV复制过程中的作用尚未明确,需要进一步探索。

本研究中,我们发现PRRSV感染可上调Marc-145(非洲绿猴胚胎肾细胞)细胞中RPL12基因的表达。为了探索RPL12基因与PRRSV复制之间的关系,我们过表达和敲减了RPL12基因,发现过表达RPL12基因促进了PRRSV的复制,相反,敲减RPL12抑制了PRRSV在Marc-145细胞中的复制。

进一步研究发现RPL12蛋白与PRRSV GP2b蛋白存在相互作用,并共定位于细胞质中。本研究首次发现了宿主蛋白质RPL12能够促进PRRSV复制,并与PRRSV GP2b蛋白存在相互作用,为进一步研究PRRSV的复制机制及与宿主的相互作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞、病毒、抗体 Marc-145、人胚肾A细胞(293A)、PRRSV JS-15毒株、PRRSV N蛋白抗体均由本实验室保存。鼠抗 β -actin单克隆抗体购自爱博泰克生物科技有限公司。兔抗RPL12单克隆抗体、鼠抗HA单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。鼠单抗FLAG单克隆抗体、羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗、DIPA染色液购自碧云天生物技术公司。FITC-山羊抗小鼠IgG、CY3-山羊抗小鼠IgG购自博士德生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂 大肠杆菌感受态Trans 5 α 购自北京全式金生物技术有限公司,干扰片段由锐博生物科技有限公司合成,Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit购自广州飞扬生物工程有限公司,总RNA提取试剂盒(双柱型)购自广州美基生物科技有限公司,5 \times HiScript II、qRT SuperMix II反转录酶、AceQ qPCR Probe Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,细胞高糖培养液DMEM购自上海源培生物科技股份有限公司,SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate购自赛默飞世尔科技公司,其余试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的构建和鉴定 本研究中构建了pCAGGS-RPL12-FLAG、pCAGGS-GP2b-HA重组质粒。参考GenBank中猪源核糖体蛋白基因L12碱基序列(AY550045.1),设计引物RPL12-F、RPL12-R(表1)。以Marc-145细胞总RNA反转录得到的cDNA为模板,利用RPL12引物扩增基因片段,扩增片段产物和pCAGGS载体经EcoR I和Xho I限制性内切酶双酶切后胶回收,利用T4酶连接的方法将RPL12基因片段克隆到pCAGGS载体中,构建N端带有FLAG标签的重组质粒pCAGGS-RPL12-FLAG。

通过RNA提取试剂盒提取PRRSV总RNA,以反转录得到的cDNA为模板,以PRRSV-GP2b-F、

PRRSV-*GP2b*-R 引物扩增 *GP2b* 基因片段, *Kpn* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切 *GP2b* 片段和 pCAGGS 载体, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 确定其大小后紫外灯下切割目的片段, 然后回收。用 T4 DNA 连接酶将 *GP2b* 目的片段及 pCAGGS 载体片段 37 °C 连接 2 h, 连接产物在 Trans 5 α 感受态细胞中转化, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上筛选克隆, 构建 N 端带有 HA 标签的重组质粒 pCAGGS-*GP2b*-HA。以上重组质粒分别进行双酶切和测序验证。

1.2.2 质粒转染 Marc-145 细胞按 1:3 比例传代, 每孔 500 μ l 细胞悬液滴加到 24 孔细胞板中, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养, 细胞密度达到 70% 左右时进行转染。按照 Lipofectamine 3000 操作说明转染 pCAGGS-*RPL12*-FLAG 重组质粒, 同时转染 pCAGGS 空载体作为对照, 具体步骤如下: 分别在 2 个无菌 EP 管中加入 250 μ l Opti-MEM, 1 个加入 2 μ l Lip3000, 另 1 个加入 2 μ l P3000 和 1 μ g 质粒, 分别室温孵育 5 min 后, 将 Lip3000 混合液滴加到 p3000 混合液中, 室温孵育 10 min, 将孵育完成后的混合物逐滴加入到培养板, 最后轻轻晃动培养板混匀培养基, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 36 h, 收取细胞进行检测。

1.2.3 si-RNA 转染 Marc-145 细胞密度达到 70% 左右时进行转染。按照 Lipofectamine 3000 操作说明转染 si-RNA, 具体步骤如下: 取无菌 EP 管, 加入 3 μ l 的转染试剂 Lip3000 与 50 nmol/L 的 si-RNA, 加入 Opti-MEM 补至 50 μ l。同时转染 50 nmol/L 的 si-NC 作为对照。用移液枪轻轻混匀, 室温孵育 10 min, 将转染混合液逐滴加入到细胞培养板中, 最后轻轻晃动培养基, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 36 h, 收取细胞进行检测。

1.2.4 病毒接种与病毒滴度检测 质粒或 si-RNA 转染 24 h 后, 将 PRRSV (*MOI*=0.1) 接种至 Marc-145 细胞中, 在 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中吸附 1 h, 弃去病毒液, 用无菌 PBS 再次清洗细胞后加入 2% 血清 DMEM 维持液。病毒接种 36 h 后收取细胞, 细胞反复冻融 3 次, 离心去除细胞碎片, 取上清液 -80 °C 保存。将 Marc-145 细胞接种到 96 孔板, 当细胞长成单层后, 用无血清 DMEM 1:10 稀释 PRRSV 病毒液, 每个稀释浓度 8 次重复, 每孔 150 μ l 病毒液, 接种到细胞中, 在 37 °C 体积分数的 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 3 d 以上, 逐日观察病变, 记

录病变孔数, 按照 Reed-Muench 方法计算病毒 TCID₅₀。

1.2.5 Western-blotting 检测 将 Marc-145 细胞用蛋白裂解液裂解, 加入 1 \times SDS loading buffer 金属浴 100 °C 煮沸 10 min, 充分裂解细胞获取蛋白质样品。每孔加入 10 μ l 细胞裂解蛋白液, 经 12.5% 硫酸十二烷基钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转移到硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭液室温孵育 2 h, 1 \times PBST 洗膜 3 次, 4 °C 孵育一抗过夜, 洗膜 3 次, HRP 标记二抗在室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 利用 ECL 曝光系统观察结果。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 按照 HiPure Total RNA Mini Kit 总 RNA 小提试剂盒收集细胞并提取细胞中的总 RNA, 参照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 进行 RNA 逆转录, 以获得的 cDNA 为模板进行扩增, PCR 反应总体积为 20.0 μ l, 10.0 μ l 2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix, 0.4 μ l 上游引物, 0.4 μ l 下游引物, 0.2 μ l 10 μ mol/L *Taq* man Probe, 0.4 μ l 50 \times ROX Reference Dye, 1.0 μ l cDNA, 7.6 μ l 水。PCR 反应程序: 95 °C 5 min 预变性, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。进行 PRRSV 拷贝数的 Real-time RT-PCR 检测, 根据标准曲线进行病毒拷贝数的绝对荧光定量计算, 所有处理组均重复检测 3 次, 扩增引物见表 1。TanMan 探针序列为 5'-FAM TC-CCGGTCCCTTGCCTCTGGA-3'。

表 1 本试验中用到的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列 (5'→3')
<i>RPL12</i> -F	CCGGAATTCGCCACCATGCCGCTAAGTTCGAC
<i>RPL12</i> -R	CCGCTCGAGTCACTTATCGTCGTCATCCTTGAATC-GCTAGCTGGGCATTC
PRRSV- <i>GP2b</i> -F	CGGGGTACCGCCACCATGGGCTCTATGCAAAGC
PRRSV- <i>GP2b</i> -R	CCGCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG-GGTATAAGATCTTCTGTAATTG
Ty-GAPDH-F	TGACCTGCCGTGGAAAA
Ty-GAPDH-R	GGAAGAGTGGGTGTCGCTGT
qPRRSV-N-F	TCAGCTGTGCCAAATGCTGG
qPRRSV-N-R	AAATGGGGCTTCTCCGGGTTTT
si-RNA	GAACCATTAAGAGATCCT

1.2.7 激光共聚焦检测 将 Marc-145 细胞经胰酶消化后均匀铺于带有细胞爬片的 24 孔细胞板中, 当

细胞汇合度约为 70% 时, pCAGGS-*RPL12*-FLAG 和 pCAGGS-*GP2b*-HA 共转染 1 μ g, 同时将 2 种质粒分别和空载体共转染 1 μ g, 并设立不转染质粒细胞孔为阴性对照, 转染 36 h 后, 弃掉培养基, PBS 清洗细胞 2 次, 用预冷的 80% 乙醇溶液 4 $^{\circ}$ C 固定细胞 30 min, 弃掉固定液, PBS 洗 3 次, Mouse-Anti-FLAG 按照 1:1 000 (体积比) 稀释, Rabbit-Anti-HA 按照 1:500 (体积比) 稀释, 混合后滴加到细胞孔中, 在恒温孵育箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 清洗细胞 3 次, 使用 FITC-荧光二抗 (1:400) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 清洗细胞 3 次, 用 DAPI 核染料染色 5 min, PBS 清洗细胞 3 次, 取出爬片, 用固封液将爬片固定在载玻片上, 放置在暗处晾干, 使用 Zessi 激光共聚焦显微镜观察结果。

1.2.8 Co-IP 检测 pCAGGS-*RPL12*-FLAG、pCAGGS-*GP2b*-HA 重组质粒在细胞汇合率达到约 70% 的 24 孔 Marc-145 细胞板中共转染 1 μ g, pCAGGS-*RPL12*-FLAG、pCAGGS 空载体共转染 1 μ g。37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中培养 30 h 后, 每孔加入 70 μ l 蛋白质裂解液收集细胞, 5 000 r/min 离心 5 min 以去除细胞碎片, 取 100 μ l 上清液加入 SDS buffer 煮沸为对照

组, 其余上清液与 anti-HA 抗体 (1~1 000) 4 $^{\circ}$ C 轻摇孵育过夜, 再与 protein A+G Agarose 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动偶联 4 h。免疫复合物被沉淀, 采用 Western blotting 检测结果。

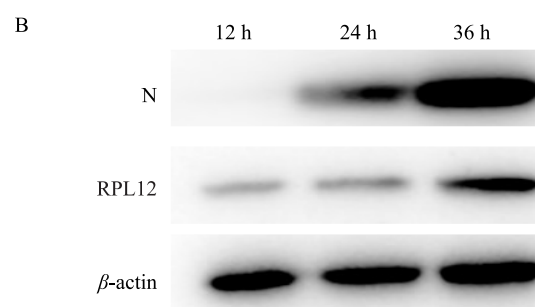
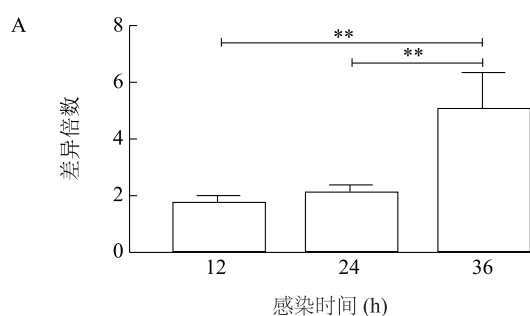
1.3 数据分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据统计分析, 利用 *t* 检验法统计各组标准差及组间差异显著性。 $P < 0.05$ 时差异显著, 标记为 *, $P < 0.01$ 时差异极显著, 标记为 **。

2 结果与分析

2.1 PRRSV 感染促进 Marc-145 细胞中 *RPL12* 的表达

为了检测 PRRSV 感染对细胞内 *RPL12* 表达的影响, 将 PRRSV ($\text{MOI} = 0.1$) 接种到 Marc-145 细胞, 分别于感染后 12 h、24 h 和 36 h 收集细胞, 通过荧光定量和 Western-blotting 方法检测内源基因 *RPL12* 表达的变化, 结果显示, 随着 PRRSV 的复制, *RPL12* 的转录水平 (图 1A) 和蛋白质表达水平 (图 1B) 均明显增强, 说明 PRRSV 感染能够上调细胞中 *RPL12* 的表达。



A: *RPL12* 的转录水平; B: *RPL12* 编码的蛋白质水平。N 为 PRRSV 的 N 蛋白, *RPL12* 为核糖体蛋白 L12, β -actin 为内参基因编码的蛋白质。
** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

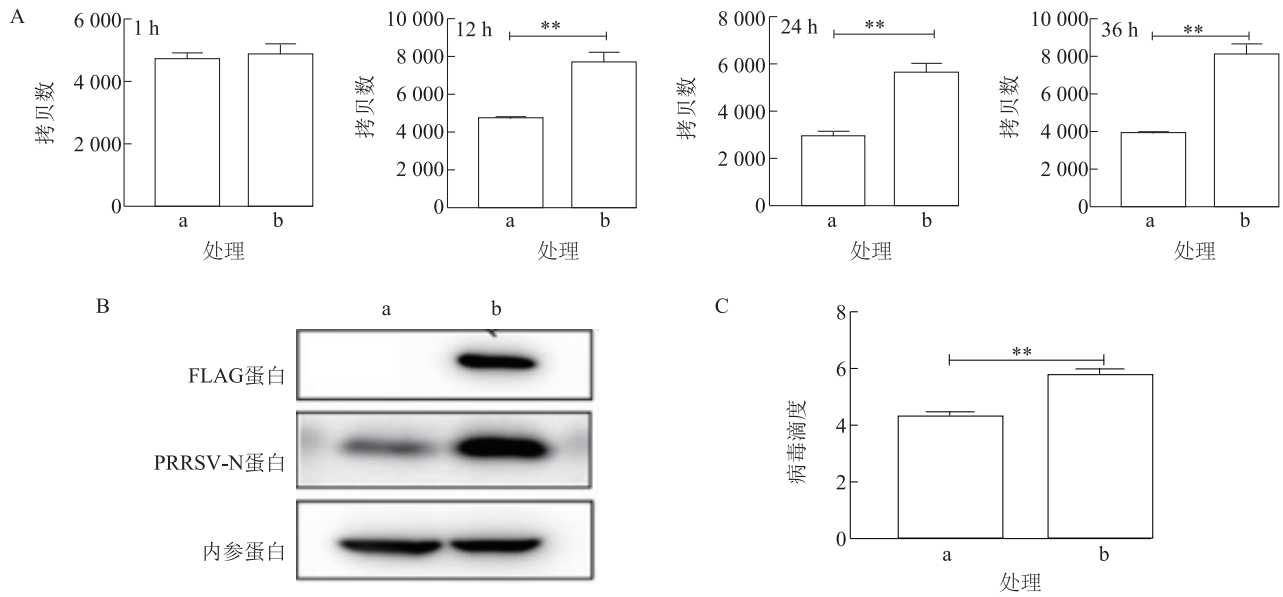
图 1 PRRSV 感染 Marc-145 细胞后上调 *RPL12* 的表达

Fig.1 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection up-regulated the expression of *RPL12* in Marc-145 cells

2.2 过表达 *RPL12* 促进 PRRSV 在 Marc-145 细胞中的复制

将 pCAGGS-*RPL12*-FLAG 重组质粒转染至细胞密度达到 70% 的 Marc-145 细胞中, 24 孔 Marc-145 细胞中, 同时转染空载体质粒作为对照, 转染 24 h 后将 PRRSV ($\text{MOI} = 0.1$) 接种到 Marc-145 细胞后, 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养细胞, 分别在接种病毒后 1 h、

12 h、24 h、36 h 收取细胞, 用 Western-blotting 和荧光定量 PCR 方法检测病毒含量, 结果显示, PRRSV 感染后 12 h、24 h、36 h, 过表达 *RPL12* 对 PRRSV 复制都有促进作用 (图 2A) ($P < 0.01$)。感染后 36 h 的细胞中 PRRSV 的蛋白质含量 (图 2B) 和病毒滴度 (图 2C) 均极显著增加 ($P < 0.01$)。这些结果说明过表达 *RPL12* 对 PRRSV 的增殖有促进作用。



A: 过表达 *RPL12* 后不同时间点 PRRSV N 的表达情况; B: PRRSV N 蛋白表达量。C: 病毒滴度。a: 对照组; b: 过表达 *RPL12* 组; ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

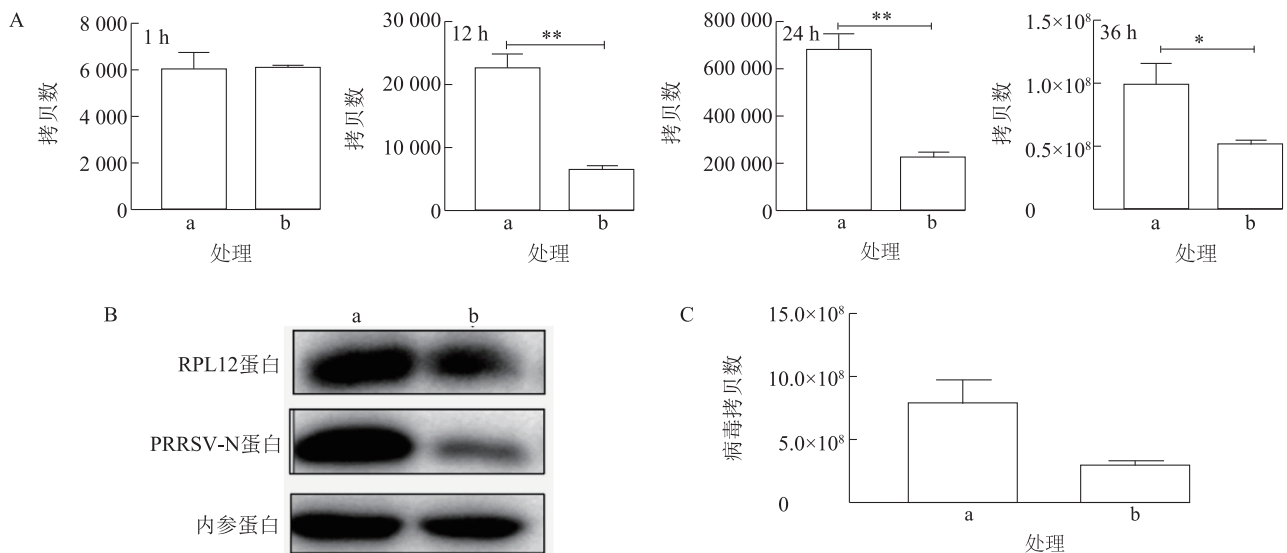
图 2 过表达 *RPL12* 促进 PRRSV 的复制

Fig.2 Over-expression of *RPL12* in Marc-145 cells promoted the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

2.3 敲减 *RPL12* 抑制 PRRSV 在 Marc-145 细胞中的复制

转染干扰片段 24 h 后, 将 PRRSV ($MOI = 0.1$) 接种到 Marc-145 细胞中, 分别在 1 h、12 h、24 h、36 h 后收取细胞样品, 提取并反转录 500 ng RNA 作为模板, 利用荧光定量方法检测 PRRSV N 基因的变

化, 结果显示, PRRSV 感染后的 12 h、24 h、36 h, 敲减 *RPL12* 对 PRRSV 复制都有抑制作用 (图 3A) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同样的, 36 h 收取的细胞中 PRRSV 的 N 蛋白含量 (图 3B)、病毒拷贝数 (图 3C) 均降低。这些结果说明敲减 *RPL12* 会抑制 PRRSV 的增殖。



A: 敲减 *RPL12* 后不同时间点 PRRSV N 的表达情况; B: PRRSV N 蛋白表达量。C: 病毒拷贝数。a: 对照组; b: *RPL12* 干扰片段组; * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 3 敲减 *RPL12* 抑制 PRRSV 的复制

Fig.3 Knockdown of *RPL12* in Marc-145 cells inhibited the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)

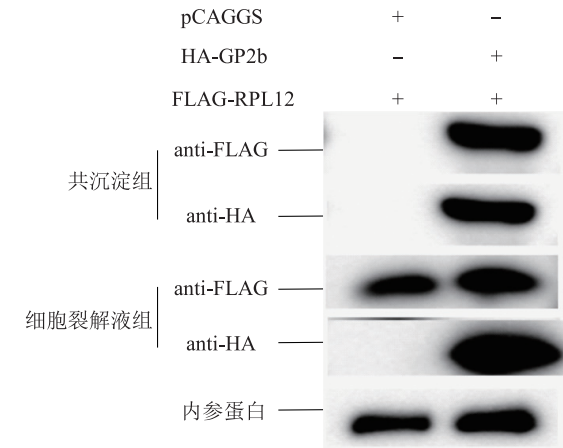
2.4 RPL12 蛋白与 PRRSV GP2b 蛋白的相互作用

为了验证 RPL12 与 GP2b 之间的相互作用,将 pCAGGS-RPL12-FLAG 和 pCAGGS-GP2b-HA 质粒共转染至 Marc-145 细胞,并设置空载体共转染组作为对照。转染 30 h 后用 RIPA 蛋白裂解液收取细胞进行 co-IP 分析。12 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片,取离心后的上清液加入鼠抗 HA 单克隆抗体置于侧摆摇床上 4 ℃ 孵育过夜,再加入 protein(A+G) 琼脂糖凝珠偶联 4 h,洗涤后收取样品进行蛋白质印迹分析。结果表明,RPL12 与 PRRSV GP2b 蛋白存在相互作用(图 4)。

2.5 RPL12 蛋白与 PRRSV GP2b 蛋白共定位于细胞质

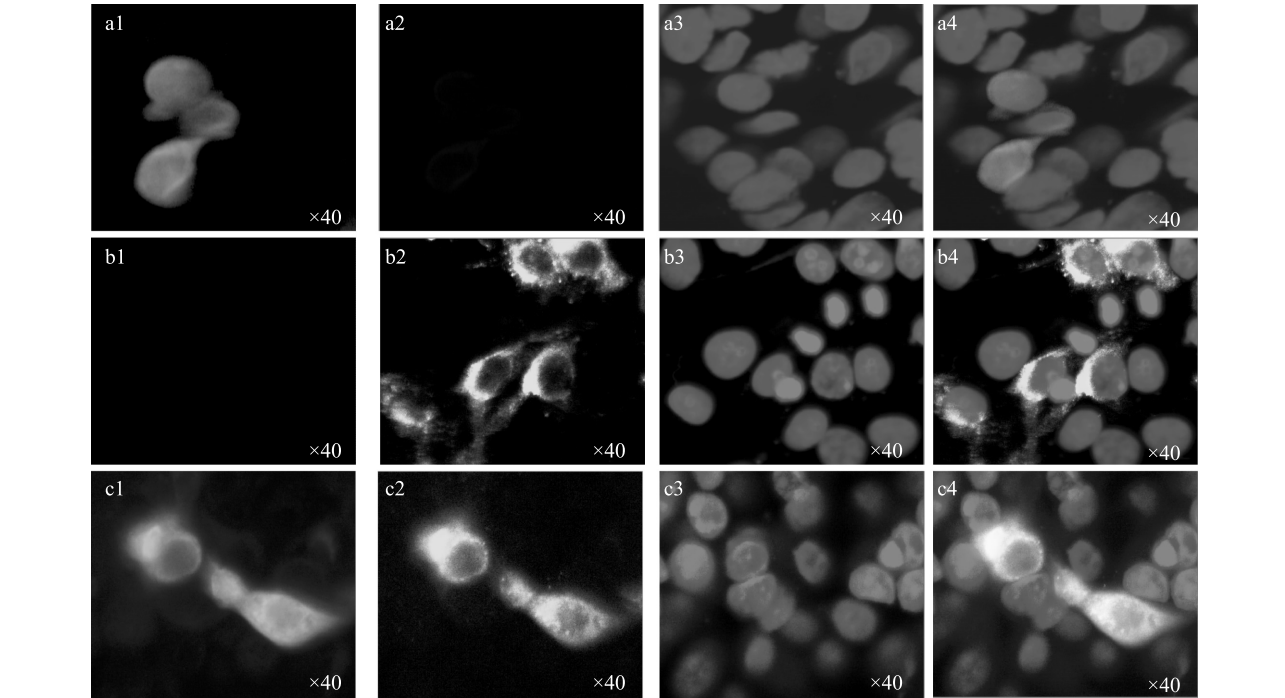
为了进一步验证 RPL12 与 PRRSV GP2b 蛋白的相互作用,将 pCAGGS-RPL12-FLAG 和 pCAGGS-GP2b-HA 重组质粒共转染至 Marc-145 细胞 36 h 后,进行细胞固定,洗涤 3 次后,共孵育 Flag 和 HA 抗体,不同荧光标记二抗孵育后,利用激光共聚焦检测 RPL12 与 PRRSV GP2b 在 Marc-145 细胞中的定

位。结果显示,RPL12 在细胞质和细胞核中均有定位,GP2b 主要定位于细胞质中。当 RPL12 与 GP2b 共表达时,两者在细胞质中存在共定位(图 5)。



pCAGGS 为空载体对照;HA-GP2b 为带有 HA 标签的 PRRSV GP2b;FLAG-RPL12 为带有 FLAG 标签的 RPL12。+:添加基因;-:未添加基因。

图 4 RPL12 蛋白与 PRRSV GP2b 蛋白的相互作用
Fig.4 Interaction between RPL12 protein and PRRSV GP2b protein in Marc-145 cells



a1~a4:pCAGGS-RPL12-FLAG 与空载体质粒,每种质粒转染 0.5 μg,孵育 30 h;b1~b4:pCAGGS-GP2b-HA 与空载体质粒,每种质粒转染 0.5 μg,孵育 30 h;c1~c4:pCAGGS-RPL12-FLAG 和 pCAGGS-GP2b-HA 质粒共转染 1.0 μg,每种质粒 0.5 μg,孵育 30 h,细胞固定,然后用鼠抗 HA 单克隆抗体和兔抗 RPL12 单克隆抗体在恒温孵育温箱中 37 ℃ 共孵育 2 h,FITC-山羊抗小鼠 IgG(绿色)、CY3-山羊抗小鼠 IgG(红色)在恒温孵育温箱中 37 ℃ 共孵育 1 h,DAPI 核染料染核 5 min,最后利用激光显微镜合成图片。

图 5 RPL12 蛋白与 PRRSV GP2b 蛋白共定位于细胞质中
Fig.5 RPL2 protein and PRRSV GP2b protein co-localized in the cytoplasm

3 讨论

2006 年至今,高致病性 PRRSV (HP-PRRSV) 在中国大部分地区持续蔓延^[18],是影响中国养猪产业最严重的病毒之一^[19]。近些年,PRRSV 类 NADC30 毒株迅速在中国大部分地区流行。由于 PRRSV 具有抗原变异^[20-21]、抗体依赖性增强、免疫抑制^[22-23] 以及在猪群中常持续性感染等特点,PRRSV 的防控及根除具有较大难度。目前对 PRRSV 感染与复制机制了解甚少,对病毒的一些功能蛋白的解析也很有限,宿主蛋白在 PRRSV 复制中的作用研究也不深入,这些问题均需要进一步研究,以便阐明 PRRSV 感染与复制机制,为 PRRSV 防控措施的制定提供理论依据。

宿主蛋白在病毒感染与复制过程中发挥着重要作用。目前已发现多个抗病毒蛋白质,例如干扰素(IFN)诱导的先天性免疫抑制因子(Myxovirus resistance 2, Mx2)^[24],干扰素(IFN)刺激蛋白 Viperin^[25],干扰素诱导的四肽重复序列 3 (IFIT3)^[26],胆固醇 25-羟化酶(CH25H)^[27]等。而有关促进病毒复制的宿主蛋白报道较少见。本研究中,我们发现了宿主蛋白 RPL12 能够促进 PRRSV 的复制。RPL12 属于核糖体蛋白 L11P 家族,RPL12 基本上通过调控自身的剪接来调控自身的转录,RPL12 缺失以密码子特异性的方式影响翻译^[28-29]。本研究中,我们发现 RPL12 能够与 GP2b 蛋白互作,这可能是其促进 PRRSV 复制的重要原因之一,而其中的具体机制还有待进一步探索。

GP2b 蛋白是一种非糖基化的膜蛋白,其相对分子质量为 10 000^[30],被认为参与病毒的侵入^[31]和复制^[32]。GP2b 蛋白在 2 种类型 PRRSV 中高度保守且相对大量地存在于病毒粒子中,GP2b 与 GP3、GP4 结合形成病毒粒子表面的异三聚体复合物,在介导宿主细胞免疫、维持病毒糖蛋白间的正确构象及病毒的感染等方面发挥重要的作用^[33]。病毒蛋白与宿主蛋白互作的相关研究对于研究 PRRSV 在细胞内的复制及逃避宿主及宿主抵抗病毒感染的形式都有着非常重要的意义。在细胞水平上研究 PRRSV 与其宿主蛋白互作的机制有利于寻找更加保守、广谱的靶点。*RPL12* 基因编码核糖体的结构蛋白,并参与蛋白质翻译^[34]与蛋白质合成的调节^[35],本研究前期构建了猪肺泡巨噬细胞的酵母双杂交 cDNA 文库,成功地构建了 PGBKT7-2b 钓饵载体和钓饵菌株,筛选出与 GP2b 互作的 RPL12。本

研究中发现宿主蛋白 RPL12 能够与 GP2b 互作,并促进 PRRSV 复制,进一步扩展了 GP2b 的蛋白质功能。由此可见,GP2b 不但在病毒的组装中发挥重要作用,其在病毒和宿主互作过程中也发挥作用。因此,GP2b 有可能成为防控 PRRSV 的靶点之一。

本研究通过免疫共沉淀、激光共聚焦试验发现宿主细胞核糖体蛋白 L12 (RPL12) 与 PRRSV GP2b 蛋白之间的相互作用。另外,随着 PRRSV 的复制,*RPL12* 的转录水平和蛋白质表达水平均明显增强,PRRSV 感染能够上调细胞中 *RPL12* 的表达。同时,荧光定量和 Western-blotting 检测发现过表达 *RPL12* 能够促进 PRRSV 的复制,敲减 *RPL12* 能够抑制 PRRSV 的复制。通过上述研究结果扩展了 PRRSV GP2b 的蛋白质功能,有助于进一步研究 PRRSV 的感染与复制机制以及和宿主之间的相互作用。

参考文献:

- [1] NATHUES H, ALARCON P, RUSHTON J, et al. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level-an economic disease model [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2017, 142: 16-29.
- [2] DOKLAND T. The structural biology of PRRSV [J]. Virus Research, 2010, 154: 86-97.
- [3] ROBINSON S R, RAHE M C, GRAY D K, et al. Porcine reproductive and respiratory virus neutralizing antibodies provide *in vivo* cross-protection to PRRSV 1 and PRRSV 2 viral challenge [J]. Virus Research, 2018, 248: 13-23.
- [4] KIMMAN T G, CORNELISSEN L A, MOORMANN R J, et al. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology [J]. Vaccine, 2009, 27(28): 3704-3718.
- [5] LAMONTAGNE L, PAGÉ C, LAROCHELLE R, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8 high T cells [J]. Viral Immunol, 2003, 16(3): 395-406.
- [6] BEURA L K, SARKAR S N, KWON B, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation [J]. Journal of Virology, 2010, 84(3): 45.
- [7] HUANG C, ZHANG Q, GUO X K, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 4 antagonizes beta interferon expression by targeting the NF- κ B essential modulator [J]. Journal of Virology, 2014, 88(18): 10934-10945.
- [8] YANG L, WANG R, MA Z, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus antagonizes JAK/STAT3 signaling via nsp5, which induces STAT3 degradation [J]. Journal of Virology, 2017, 91(3): e02087.

- [9] 谢丽基, 谢芝勋, 庞耀珊, 等. 广西 PRRSV、PCV、CSF 的混合感染及 PRRSV 分子病原学研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(5):1412-1415.
- [10] 杨 勇, 金 鑫, 张望元, 等. PRRSV、PCV2 和 HPS 混合感染的诊断及病理学分析[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(18): 99-102.
- [11] 邓同炜, 薛亚南, 卢建洲, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型与副猪嗜血杆菌混合感染的诊断及病原分析[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(10): 3401-3409.
- [12] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4(1):129-154.
- [13] FANG Y, TREFFERS E E, LI Y, et al. Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(43):17321-17322.
- [14] LI Y, TREFFERS E E, NAPHINE S, et al. Transactivation of programmed ribosomal frameshifting by a viral protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(21): 2172-2181.
- [15] LI Y, SHANG P, SHYU D, et al. Nonstructural proteins nsp2TF and nsp2N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) play important roles in suppressing host innate immune responses[J]. *Virology*, 2018, 517: 164-176.
- [16] WU W H, YING F, FARWELL R, et al. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b[J]. *Virology*, 2001, 287:183-191.
- [17] WU W H, FANG Y, ROWLAND R, et al. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV[J]. *Virus Research*, 2005, 114(1/2):177-181.
- [18] TIAN K, YU X, ZHAO T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6):e526.
- [19] 徐 雷, 赵 军, 杨晓宇, 等. 猪繁殖与呼吸综合征类 NADC30 与 HP-PRRSV 毒株 RT-PCR 鉴别方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1):109-113.
- [20] GUO Z, CHEN X X, LI X, et al. Prevalence and genetic characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in central China during 2016-2017: NADC30-like PRRSVs are predominant[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 135:103657.
- [21] RENUKARADHYA G J, MENG X J, CALVERT J G, et al. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction[J]. *Vaccine*, 2015, 33(33): 4069-4080.
- [22] CANCEL S M. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102(3):249-262.
- [23] KE H, YOO D. The viral innate immune antagonism and an alternative vaccine design for PRRS virus - ScienceDirect[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209:75-89.
- [24] WANG H, BAI J, FAN B, et al. The interferon-induced Mx2 inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research the Official Journal of the International Society for Interferon & Cytokine Research*, 2016, 36(2):129.
- [25] FANG J, WANG H, BAI J, et al. Monkey viperin restricts porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5):e0156513.
- [26] ZHANG L, LIU J, BAI J, et al. Poly(I:C) inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in MARC-145 cells via activation of IFIT3[J]. *Antiviral Research*, 2013, 99(3):197-206.
- [27] KE W, FANG B L, JING B H, et al. Cholesterol 25-hydroxylase inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication through enzyme activity dependent and independent mechanisms[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(19):e00827.
- [28] LOUIE R J, GUO J, RODGERS J W, et al. A yeast phenomic model for the gene interaction network modulating CFTR-ΔF508 protein biogenesis[J]. *Genome Medicine*, 2012, 4(12):103.
- [29] WAWIÓRKA L, MOLESTAK E, SZAJWAJ M, et al. Functional analysis of the uL11 protein impact on translational machinery[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(8):1060-1072.
- [30] JEENINGA R E, VENEMA J, HA RAUÉ. Rat RL23a ribosomal protein efficiently competes with its *Saccharomyces cerevisiae* L25 homologue for assembly into 60 S subunits[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 263(5):648-656.
- [31] MAORONG Y, XIAOLING L, LEI S, et al. Subcellular localization and topology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus E protein[J]. *Virus Res*, 2010, 152(1/2):104-114.
- [32] LEE C, YOO D. The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties[J]. *Virology*, 2006, 355(1):30-43.
- [33] HOU Y, CHEN J, TONG G Z, et al. A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets[J]. *Vaccine*, 2008, 26(11):1438-1449.
- [34] FRIEDMAN D I, SCHAUER A T, BAUMANN M R, et al. Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78(2):1115-1118.
- [35] GREBENYUK E S, DOKRUNOVA A A, DAVYDOV I I, et al. Studying the copy number of ribosomal protein L7/L12[J]. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine*, 2009, 147(5):587-591.

(责任编辑:陈海霞)