

# 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 Nsp15 互作宿主蛋白的筛选及鉴定

孙金磊<sup>1</sup>, 于瑞明<sup>2</sup>, 张莉萍<sup>2</sup>, 张中旺<sup>2</sup>, 王永录<sup>2</sup>, 潘丽<sup>2</sup>, 张全伟<sup>1\*</sup>, 刘新生<sup>2\*</sup>

1 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000

孙金磊, 于瑞明, 张莉萍, 张中旺, 王永录, 潘丽, 张全伟, 刘新生. 猪流行性腹泻病毒非结构蛋白 Nsp15 互作宿主蛋白的筛选及鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4533-4545.

SUN Jinlei, YU Ruiming, ZHANG Liping, ZHANG Zhongwang, WANG Yonglu, PAN Li, ZHANG Quanwei, LIU Xinsheng. Screening and identification of host proteins interacting with the non-structural protein 15 (Nsp15) of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4533-4545.

**摘要:** 为了筛选和鉴定与猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)非结构蛋白 15 (non-structural protein 15, Nsp15)互作的关键宿主蛋白, 通过 IP/pull-down beads 结合质谱技术筛选、鉴定与 PEDV 非结构蛋白 Nsp15 互作的宿主蛋白, 并利用免疫共沉淀(co-immunoprecipitation)、激光共聚焦验证其互作关系, 最后应用 Western blotting 和实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)初步明确宿主蛋白 SLC25a3 与 PEDV 之间的作用关系。本研究成功构建了 Nsp15 重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp15, 并筛选出与 PEDV Nsp15 互作的宿主蛋白 SLC25a3。免疫共沉淀及激光共聚焦结果显示 PEDV Nsp15 与宿主蛋白 SLC25a3 存在互作关系。宿主蛋白 SLC25a3 能够显著抑制 PEDV 复制且呈现剂量依赖性。本研究为进一步探究 SLC25a3 在抗 PEDV 免疫应答中的作用及机制提供了参考。

**关键词:** 猪流行性腹泻; 非结构蛋白; 蛋白互作; 病毒复制

资助项目: 国家生猪技术创新中心(NCTIP-XD/C 03); 所级基本科研业务费项目(1610312021011)

This work was supported by the National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C 03) and the Institute-level Basic Scientific Research Funds (1610312021011).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Quanwei, zhangqw@gsau.edu.cn; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2024-01-29; Accepted: 2024-04-30; Published online: 2024-05-08

# Screening and identification of host proteins interacting with the non-structural protein 15 (Nsp15) of porcine epidemic diarrhea virus

SUN Jinlei<sup>1</sup>, YU Ruiming<sup>2</sup>, ZHANG Liping<sup>2</sup>, ZHANG Zhongwang<sup>2</sup>, WANG Yonglu<sup>2</sup>, PAN Li<sup>2</sup>, ZHANG Quanwei<sup>1\*</sup>, LIU Xinsheng<sup>2\*</sup>

1 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 National Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

**Abstract:** To screen and identify the key host proteins interacting with the non-structural protein 15 (Nsp15) of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The IP/pull-down assay and mass spectrometry were employed to screen and identify the host proteins interacting with Nsp15. The interaction between the host protein and Nsp15 was studied by co-immunoprecipitation and laser scanning confocal microscopy. Finally, Western blotting and RT-qPCR were employed to examine the interaction between SLC25a3 and PEDV. The recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp15 was successfully constructed, and the host protein SLC25a3 interacting with PEDV Nsp15 was screened out. An interaction existed between SLC25a3 and Nsp15, and SLC25a3 significantly inhibited PEDV replication in a dose-dependent manner. SLC25a3 inhibits PEDV replication. The results of this study provide a basis for deciphering the role and mechanism of SLC25a3 in the host immune response to PEDV infection.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea; non-structural proteins; protein-protein interaction; virus replication

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)的病原为猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV),其临床症状为呕吐、腹泻、脱水。患病猪的病理变化及症状与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)相似<sup>[1-2]</sup>。各种发育阶段的猪都能感染 PED,其中哺乳仔猪受害最为严重,仔猪病死率高达 100%<sup>[3]</sup>。PED 于 1971 年在英国被首次发现,20 世纪 80 年代初在我国陆续出现,多发生在每年 12 月至翌年 1-2 月,夏季也有病例出现,严重危害我国生猪养殖业的健康发展<sup>[4-5]</sup>。

PEDV 基因组大小约为 28 kb,可编码纤突蛋白(spike, S)、膜蛋白(membrane, M)、衣壳蛋

白(nucleocapsid, N)和囊膜蛋白(envelope, E)这 4 个结构蛋白、Nsp1-Nsp16 等 16 个非结构蛋白和辅助性蛋白 ORF3<sup>[6]</sup>。非结构蛋白 Nsp15 是一个包含 339 个氨基酸的多肽,是一种核糖核酸内切酶,由主蛋白酶 Nsp5 在 pp1ab 位点<sub>6139</sub>NLQ↓GLE<sub>6144</sub>和<sub>6478</sub>QLQ↓ASE<sub>9483</sub>裂解而成,参与病毒复制,并协助病毒逃避宿主的抗病毒防御机制。有研究发现 PEDV Nsp15 能够抑制宿主细胞干扰素(interferon, IFN)和应激颗粒的产生,从而拮抗宿主天然免疫应答<sup>[7]</sup>。

N 蛋白是一种碱性磷蛋白,包含多个潜在的磷酸化位点,能够与病毒 RNA 结合,是 PEDV 感染早期诊断的靶点。PEDV 病毒感染宿主细

胞后,病毒蛋白中表达量最高的是 N 蛋白,在维持病毒基因组的稳定性与生存力方面起到重要作用,因此本研究以 N 蛋白的表达水平来代表 PEDV 的增殖水平。

溶质载体 25 家族成员 3 (solute carrier family 25 member 3, SLC25a3)在细胞中发挥着重要的功能,它编码一种内膜蛋白,分子量约为 34 kDa。SLC25a3 广泛存在于多个组织和器官中,参与许多重要的生理过程<sup>[8]</sup>。近年来,研究人员还发现 SLC25a3 在肿瘤中的表达与肿瘤发展和治疗反应密切相关,SLC25a3 已经成为治疗癌症的抗体药物和小分子化合物的潜在靶点<sup>[8]</sup>。通过调控 SLC25a3 的表达和功能,可以有效干预肿瘤细胞的代谢途径,抑制其生长和扩散<sup>[9]</sup>。

目前,SLC25a3 在病毒感染方面的相关研究较少,SLC25a3 在病毒中的作用机制及功能尚不明晰,本研究应用 IP/pull-down 结合质谱技术,筛选并鉴定出能够显著抑制 PEDV 复制的 SLC25a3,以期探究 PEDV 在宿主细胞中的复制机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞及病毒

pcDNA3.1(+)载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、猪肾上皮细胞(LLC-PK)、人肾上皮细胞(HEK-293T)、非洲绿猴肾细胞(Vero)及 PEDV 毒株 CH/HBXT/2018 (GenBank 登录号:MH816969)均由本实验室保存。

### 1.2 试剂及耗材

GoScript<sup>TM</sup> 反转录试剂购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。EndoFree Plasmid Midi Kit 购自 Omega Bio-Tek 公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司。One Step PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit、PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase 均购自宝日医(北京)生物技术有限公司。MEM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清和胰酶均购自赛默飞世尔科技公司。Flag 和 Myc 抗体均购自艾比玛特生物医疗(上海)有限公司。 $\beta$ -actin、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗小鼠抗体、HRP 标记山羊抗兔抗体和 488 标记山羊抗小鼠 IgG H&L 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。山羊抗兔 IgG H&L 购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

本研究以 PEDV 毒株 CH/HBXT/2018 (GenBank 登录号:MH816969)序列和 *Sus scrofa* 源的 SLC25a3 基因序列(GenBank 登录号:NM\_001164512.2)作为参考,利用 SnapGene<sup>TM</sup> 1.1.3 软件设计出特异性的 *Nsp15*、*SLC25a3* 上游和下游引物,引物序列见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 真核表达载体构建及表达

提取 PEDV 感染 LLC-PK 细胞的总 RNA,按照反转录 Promega GoScript<sup>TM</sup> 系统说明书操作得到 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
Nsp15-F	<b>CCGGATCC</b> GCCACCATGGATTACAAGGACGATGAC	1 017
Nsp15-R	CC <b>CTCGAGA</b> ACATCGCCTTCAACGTGGTGAAG	
SLC25a3-F	<b>CGCTCGAGG</b> CCACCATGTTCTCGTCCGTGGCGCAC	1 086
SLC25a3-R	<b>CCGGATCC</b> CTGAGTGTAACCAAGCTTCTTCTTC	

The sequences in bold are *Bam*H I and *Xho* I restriction sites.

增。PCR 反应体系：5×PrimeSTAR GXL Buffer 1 mmol/L, dNTP Mix 200 μmol/L, 上游引物 0.3 μmol/L, 下游引物 0.3 μmol/L, cDNA 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 25 μL, PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 1.25 U, 共 50 μL。反应程序为：98 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 40 s, 68 °C 延伸 1 min, 34 个循环; 68 °C 再延伸 5 min。回收 PCR 产物, 将扩增出的目的基因进行双酶切 (*Bam*H I、*Xho* I) 后分别连接至 pCDNA3.1(+), 后利用 EndoFree Plasmid Midi Kit 提取质粒, 将质粒进行双酶切鉴定后, 筛选正确的阳性质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确后将其分别命名为 pcDNA3.1(+)-Flag-Nsp15 和 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3。分别转染 pCDNA3.1(+)-Flag-Nsp15 质粒和 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 质粒至 LLC-PK 细胞中, 24 h 后收取细胞样品进行 Western blotting 验证。

### 1.5 免疫沉淀

将构建好的质粒转染至 LLC-PK 细胞中, 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后取出, 用 4 °C 预冷的 1×PBS 洗 3 次, 后加入 300 μL NP40 裂解液冰上裂解 1 h, 裂解完成后 12 000 r/min 离心 4 min, 取上清 45 μL 至新离心管作为 Input 样品; 取 10 μL 上清利用 BCA 法检测目的蛋白浓度, 并将样品浓度定量至 1 μg/μL, 共 1 mL 体系; 每个样品加入 10 μL PMSF (蛋白酶抑制剂), 3 μL Flag 抗体, 4 °C 摇床过夜。过夜后加入 40–50 μL Protein(A+G), 4 °C 摇床孵育 4 h; 1 500 r/min 离心 3 min 后加入 1 mL 预冷的 1×PBS, 4 °C 摇床洗 5 min, 重复 3 次。第 3 次弃上清后按体积加入 4×Loading Buffer 制备 IP 样品, 后进行 Western blotting 验证。

### 1.6 Western blotting 检测

取 IP 和 Input 样品进行 SDS-PAGE, 将胶体中的蛋白转移至硝酸纤维素膜(nitrocellulose,

NC)上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 在室温封闭 1 h。TBST 洗下多余的封闭液, 加入 Flag 抗体 (1:5 000) 4 °C 过夜孵育。孵育结束后, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 弃掉漂洗液, 加入 HRP-山羊抗小鼠抗体 (1:8 000) 室温孵育 1 h。漂洗 3 次, 每次 10 min, 弃掉漂洗液, 加入超敏增强化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL), 使用 Tanon 5200 仪器观察结果。

### 1.7 银染

根据碧云天快速银染试剂盒进行银染操作: SDS-PAGE 结束后, 将凝胶取出放入约 100 mL 的固定液中, 固定 10 min 以上。弃固定液, 加入 100 mL 30% 乙醇, 在摇床上室温摇动 10 min 进行洗涤。使用 200 mL ddH<sub>2</sub>O 进行洗涤, 100 mL 银染增敏液 (1×) 室温摇动 2 min 进行增敏, 增敏结束后进行 2 次水洗。弃水加入 100 mL 的银溶液 (1×) 室温摇动 10 min。弃原有溶液再次进行水洗, 加入 100 mL 银染显色液进行显色, 直至显示出较为理想的蛋白条带。弃银染显色液, 加入 100 mL 银染终止液 (1×), 室温摇床摇动 10 min。终止结束, 弃去银染终止液后再次进行水洗, 采用 ddH<sub>2</sub>O 保存。

### 1.8 PEDV Nsp15 互作蛋白 LC-MS/MS 蛋白分析

取免疫沉淀样品 20 μL, 进行 SDS-PAGE, 待样品电泳进入分离胶将目的胶条切下转移至新的 1.5 mL 离心管中, -20 °C 保存。互作蛋白的 LC-MS/MS 蛋白分析委托上海鹿明生物科技有限公司基于 UltiMate 3000 RSLCnano 超高效液相串联 Q Exactive Plus 高分辨质谱仪的技术平台, 结合搜库 UniProt 软件, 对不同实验组样本进行蛋白定性(或相对定量)分析。

### 1.9 免疫荧光共聚焦实验

Vero 细胞转染 pCDNA3.1(+)-Flag-Nsp15 和 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3。弃掉培养基, 1×PBS

洗 3 次。加入固定剂 4%多聚甲醛,固定 60 min。加入 0.25% Triton-100 于室温条件下作用 10 min, 1×PBS 洗 3 次。加入 5% BSA 封闭 60 min, PBS 洗 3 次。加入以 1:2 000 稀释的鼠源 Myc 抗体及兔源 Flag 抗体, 4 °C 过夜孵育。PBS 缓冲液洗 3 次, 避光条件下加入 1:2 000 的 488 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L)及 594 标记的 IgG(H+L), 37 °C 孵育 60 min。PBS 缓冲液洗 3 次, 避光加入 2 滴 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (用 PBS 稀释), 室温静置 5 min, PBS 洗 3 次, 在激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.10 实时荧光定量 PCR

提取细胞样品 RNA, 按照 Prime Script™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 试剂盒操作说明加入试剂, RT-qPCR 反应体系: 2×One Step TB Green RT-PCR Buffer 2.5 μmol/L, 上、下游引物各 0.4 μmol/L, 模板 RNA 0.5 μmol/L, H<sub>2</sub>O 7.5 μL。反应条件: 42 °C 5 min; 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。每个待测样本设置 2 个重复。使用 C1000™ Thermal Cycler 仪器对 PCR 样品进行分析。

### 1.11 半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)测定

将病毒液室温融化, 3 500 r/min 离心 2 min, 取上清。用 DMEM 培养基(胰酶浓度 20 μg/mL)将病毒进行连续 10 倍稀释。用排枪吸去细胞铺满 80%左右的 96 孔板中的培养液, PBS 洗 2 次, 再用维持培养基洗 1 次, 每个稀释度取 100 μL 加入 96 孔板, 每个稀释度设 8 个重复。补加 100 μL 维持培养基至终体积为 200 μL。空白对

照为 200 μL 维持培养基, 置于 37 °C 培养, 每日记录细胞病变孔数。用 Reed-Muench 两氏法计算结果。

### 1.12 SLC25a3 对 PEDV 复制的影响

将 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 转染 LLC-PK 细胞, 24 h 后将 PEDV (HBXT-P100)毒株以 MOI=0.1 感染细胞。

感染后的 0、6、12 和 24 h 收取细胞样品及上清; 将 0.2、0.5、1.0、和 1.5 μg 这 4 个不同梯度浓度的 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 质粒分别进行转染。将 3 条 SLC25a3 的 siRNA 引物(表 2)以 120 pmol 剂量转染至 LLC-PK 细胞, 24 h 后收取细胞样品, Western blotting 检测是否有干扰作用。随后将具有干扰效果的 siRNA 进行转染。

收集的细胞样品利用 Western blotting 检测 PEDV N 蛋白的表达水平, RT-qPCR 检测 PEDV mRNA 水平, 收集细胞上清液进行 TCID<sub>50</sub> 检测病毒滴度。分别探究过表达 SLC25a3、梯度过表达 SLC25a3 以及敲低内源性 SLC25a3 对 PEDV 复制的影响。RT-qPCR 反应体系及反应条件参考 1.11。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEDV Nsp15、SLC25a3 真核表达载体的构建

以 PEDV 感染的 LLC-PK 细胞总 RNA 为模板, 反转录后进行 PCR 扩增, 2%的核酸胶电泳结果显示, 可观察到清晰的 1 017 bp 的 PEDV Nsp15 目的条带(图 1A)及 1 086 bp 的 SLC25a3

表 2 SLC25a3 干扰 RNA 序列

Table 2 The sequences of SLC25a3 short interfering RNAs (siRNAs)

Name	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
SLC25a3-667	GCUCCUAUGGAAGCUGCUATT	UAGCAGCUUCCAUAAGGAGCTT
SLC25a3-706	CCAGGUUAUGCCAACACUUTT	AAGUGUUGGCAUAACCGGTT
SLC25a3-973	CCUGCUGAUUCUGUGUAUTT	AUACCACAGAAUCAGCAGGTT

目的条带(图 1B), 均与预期大小相符, 表明成功克隆出 *Nsp15*、*SLC25a3* 这 2 个基因。使用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 分别对 pcDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* 和 pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3* 进行双酶切鉴定(图 1C、1D), 核酸电泳结果显示大小均与预期大小一致, 且测序结果相同。表明重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* 和 pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3* 构建成功。

## 2.2 重组质粒的表达

鉴定正确的重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* 和 pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3* 分别转染 LLC-PK 进行 Western blotting 检测, 结果显示, *Nsp15* 和 *SLC25a3* 蛋白大小约为 38 kDa 和 34 kDa, 与预期大小相符。在 Vero 细胞中重复实验, 发现重组质粒 PCDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* (图 2A、2B)和 pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3*

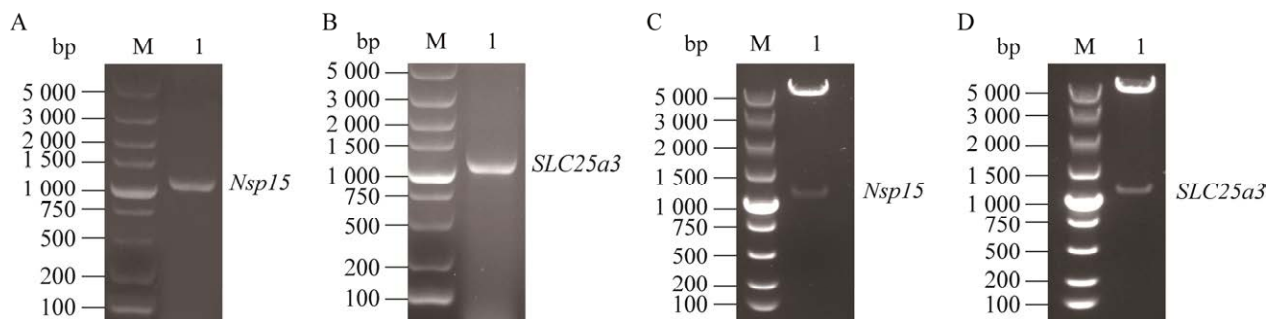


图 1 PEDV *Nsp15* 基因及 *SLC25a3* 基因 PCR 扩增(A, B)和双酶切鉴定(C, D)

Figure 1 Identification of PEDV *Nsp15* gene and *SLC25a3* gene by PCR amplification (A, B) and double digestion (C, D).

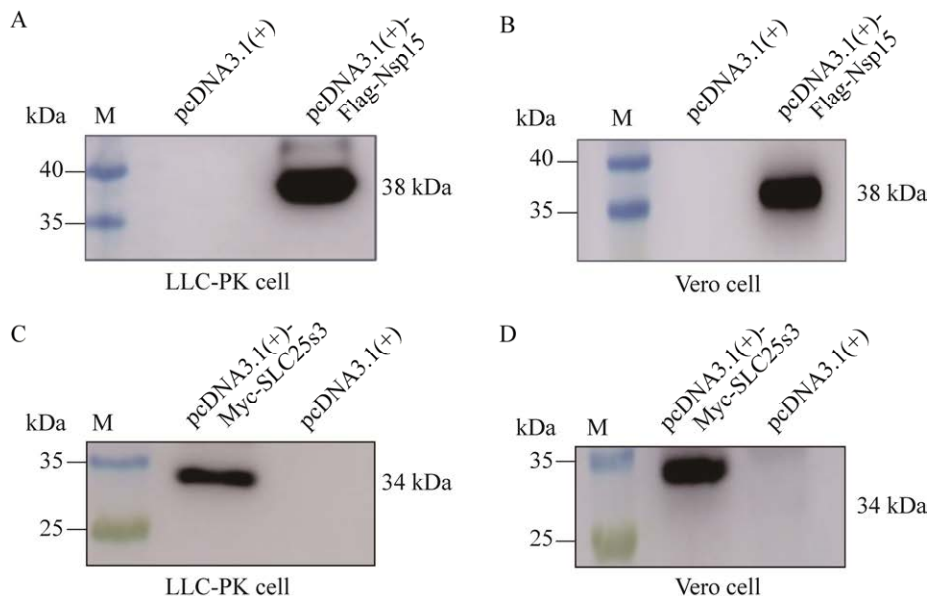


图 2 过表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* (A, B)和 pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3* (C, D)的 Western blotting 鉴定

Figure 2 Over expression of recombinant plasmids pcDNA3.1(+)-Flag-*Nsp15* (A, B) and pcDNA3.1(+)-Myc-*SLC25a3* and Western blotting identification (C, D).

(图 2C、2D)在 LLC-PK 细胞和 Vero 细胞中均能够稳定表达。

### 2.3 PEDV NSP15 互作蛋白的 LC-MS/MS 分析

免疫共沉淀结果显示, 条带中的重链、轻链并无明显干扰, 表明成功沉淀潜在互作蛋白

(图 3A), 为检测凝胶中蛋白质进行银染实验, 实验组与对照组存在显著差异(图 3B), 证明存在结合 PEDV Nsp15 的潜在互作蛋白。根据质谱结果(表 3)共鉴定出 27 个与 PEDV Nsp15 潜在互作的宿主蛋白, 基于肽段覆盖率、假阳性率、肽段覆盖率等数据参考可信度进行筛选,

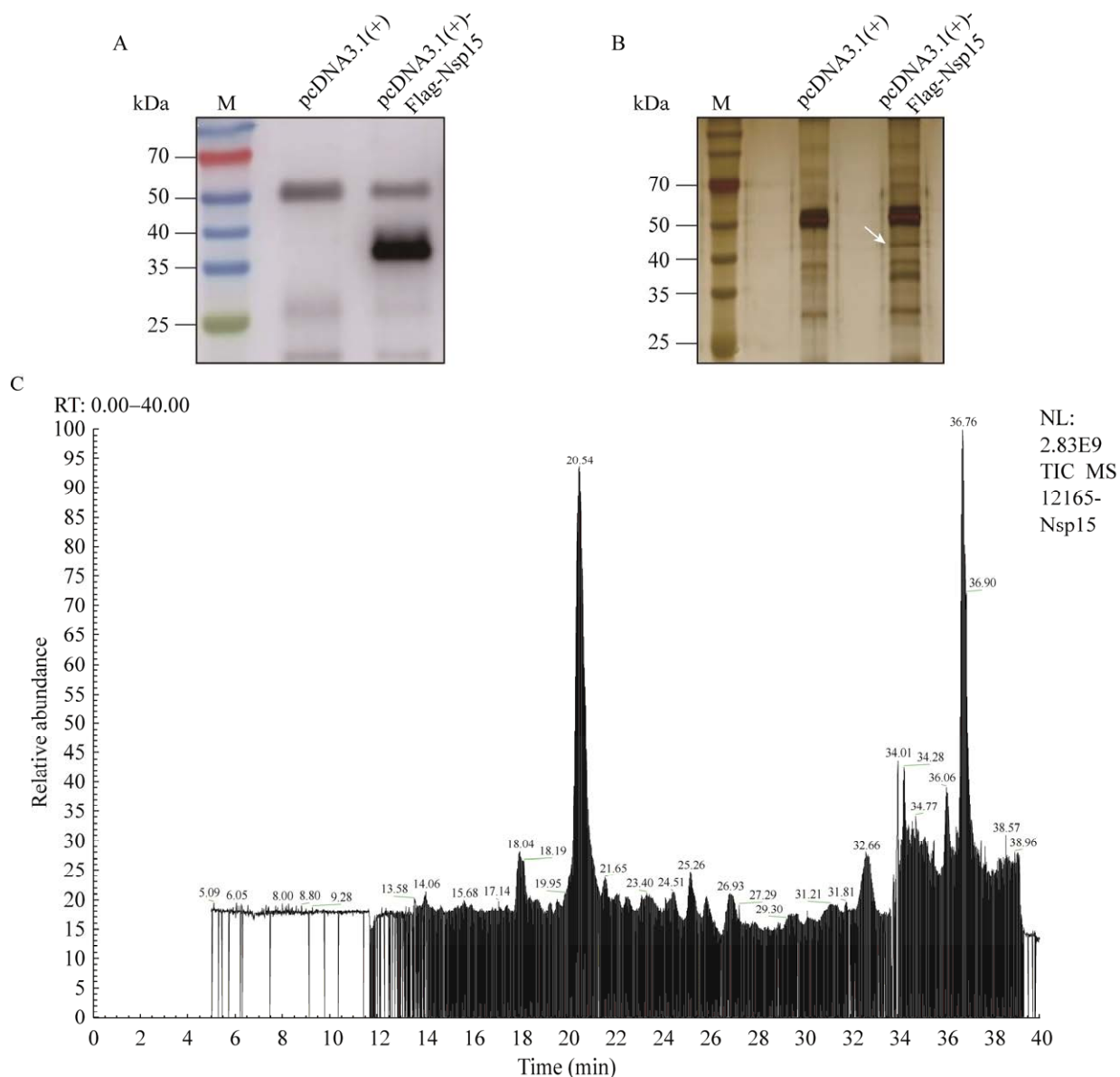


图 3 PEDV Nsp15 互作蛋白的 LC-MS/MS 结果分析 A: 免疫共沉淀. B: 银染检测. C: 总离子流图

Figure 3 LC-MS/MS analysis of PEDV Nsp15 interacting proteins. A: Immunoprecipitation. B: Silver staining results. C: Total ion current plot. “→” represents significant difference bands.



表3 PEDV Nsp15 的互作蛋白部分信息

Table 3 Information on the interacting proteins of PEDV Nsp15

Gene symbol	Accession (UniProt)	Coverage	Unique peptides	Aa numbers	Mw (kDa)	pI	Peptides
<i>SLC25a3</i>	A0A5G2QMB3	4	1	323	34.0	9.2	1
<i>ACTG1</i>	A0A287A5G1	12	4	378	42.0	5.5	4
<i>HSPA9</i>	F1RGJ3	4	2	644	70.1	5.6	2

选取 SLC25a3 进行免疫共沉淀验证。

#### 2.4 PEDV Nsp15 与 SLC25a3 免疫共沉淀验证

通过免疫共沉淀验证 PEDV Nsp15 与宿主蛋白 SLC25a3 之间的互作关系, Western blotting 结果显示, 在 Input 组中, Nsp15 与 SLC25a3 均稳定表达且与目的条带大小与预期相符。IP 实验组表明, 诱饵蛋白 Nsp15 成功将目的蛋白 SLC25a3 沉淀下来, 如图 4 所示, PEDV Nsp15 能够与 SLC25a3 共沉淀, 说明两者存在互作关系。

#### 2.5 PEDV NSP15 与 SLC25a3 细胞内共定位

为进一步验证 SLC25a3 与 PEDV Nsp15 存在互作关系, 进行细胞内共定位实验。重组质粒 pCDNA3.1(+)-Flag-Nsp15 和 pCDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 转染 Vero 细胞 24 h, 染色后使用

激光共聚焦显微镜检测, 结果表明两种不同荧光标记的宿主蛋白 SLC25a3 和病毒蛋白 Nsp15 在空间内重叠, 处于同一区域。表明 SLC25a3 与 Nsp15 在细胞内存在共定位关系(图 5)。

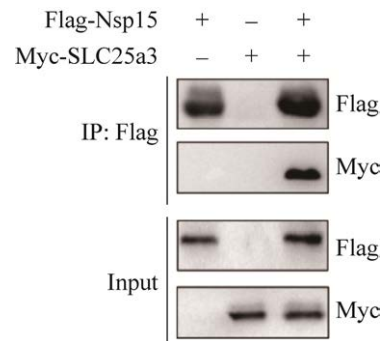


图4 PEDV Nsp15 与 SLC25a3 互作鉴定

Figure 4 Interaction between PEDV NSP15 and SLC25a3 identified by co-immunoprecipitation (CO-IP).

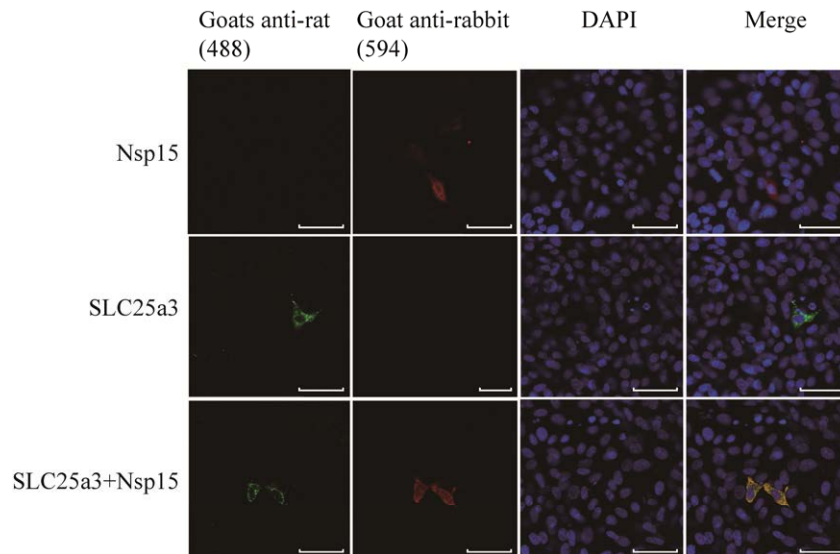


图5 激光共聚焦实验观察 PEDV Nsp15 与 SLC25a3 共定位 比例尺=50 μm

Figure 5 Observation of the colocalization between PEDV Nsp15 and SLC25a3 under a laser confocal microscope. Scale bar=50 μm.



## 2.6 SLC25a3 抑制 PEDV 的复制

转染 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 至 LLC-PK 细胞后接种 PEDV, Western blotting 结果显示, SLC25a3 过表达使 PEDV N 蛋白表达量明显降低(图 6A)。从 RT-qPCR 结果可以看出过表达 SLC25a3, PEDV N 转录水平明显降低, 与细胞对照组相比, 差异显著( $P<0.01$ ) (图 6B), 其转录水平趋势与病毒滴度(图 6D)一致, 证明过表达 SLC25a3 能够抑制 PEDV 复制。

## 2.7 干扰内源性 SLC25a3 基因促进 PEDV 复制

三条干扰 RNA 转染 24 h 后接种 PEDV

(MOI=0.1), Western blotting (图 7A)及 RT-qPCR (图 7B)结果显示, 相较于对照组, 实验组 SLC25a3-667、SLC25a3-973 表达水平明显下降, 同时 PEDV N 蛋白、mRNA 表达水平及病毒滴度水平显著提高(图 7D)。进一步表明 SLC25a3 能够显著抑制 PEDV 复制, 其中 SLC25a3-706 存在特异性干扰效果, 对病毒复制并无显著影响。

## 2.8 剂量依赖性实验

分别使用 0.2、0.5、1.0 和 1.5  $\mu\text{g}$  的 pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3 转染 LLC-PK 细胞, 24 h 后接种 PEDV 病毒(MOI=0.1), 感染 24 h 后收取细胞样品。Western blotting 结果显

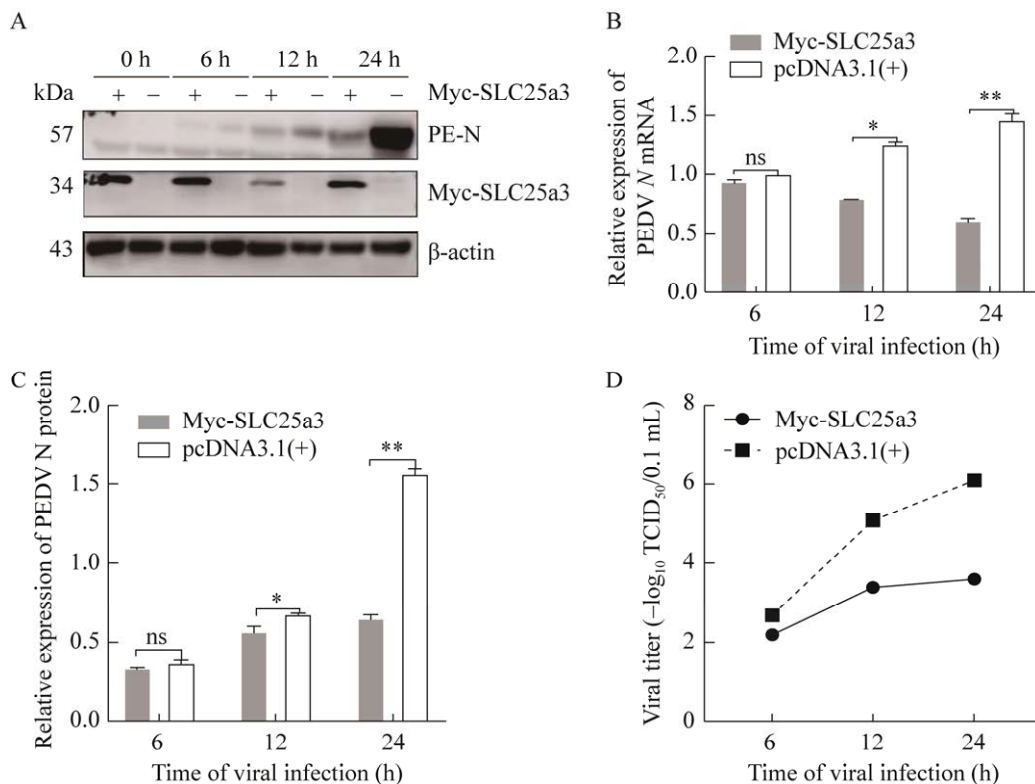


图 6 SLC25a3 抑制 PEDV 病毒复制 A: Western blotting 检测. B: RT-qPCR 检测. C: 灰度分析. D: 病毒滴度检测

Figure 6 SLC25a3 inhibits PEDV virus replication. A: Western blotting to analyze the effect of overexpression of SLC25a3 on the expression level of PEDV N protein. B: RT-qPCR to detect the effect of overexpression of SLC25a3 on the level of PEDV N mRNA. C: Grayscale analysis of PEDV N protein. D: TCID<sub>50</sub> was used to detect cell supernatant virus titer. ns:  $P>0.05$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; PE-N: PEDV N protein.

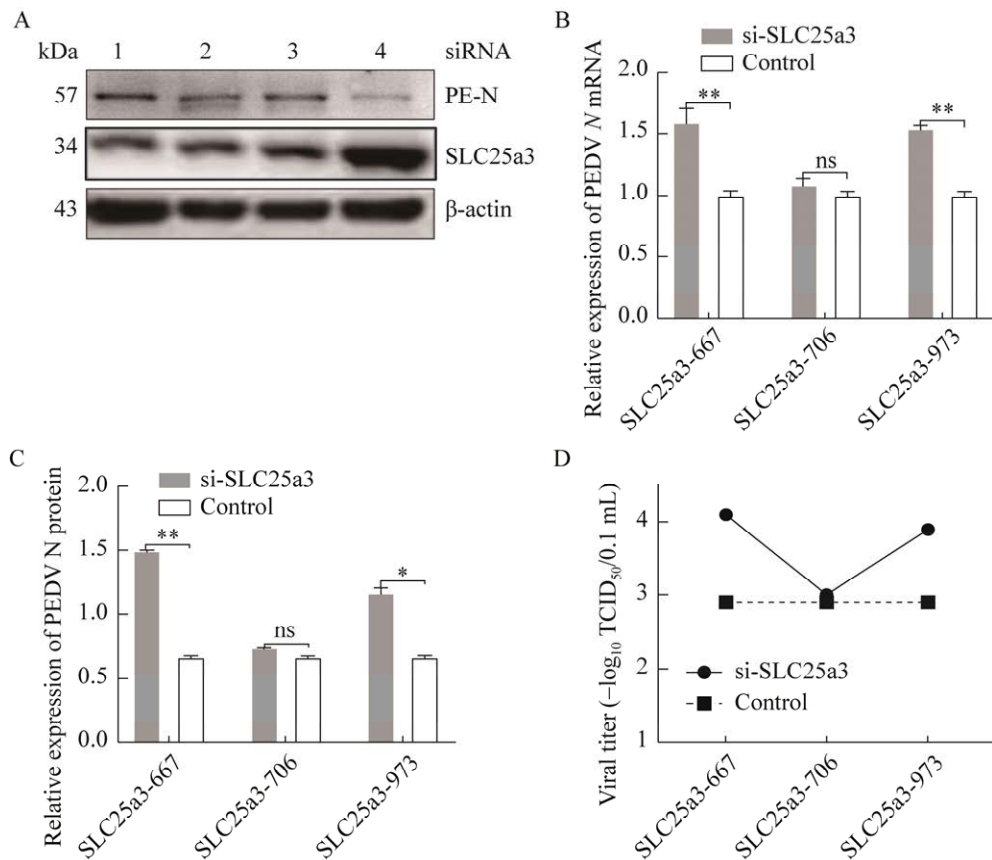


图7 siRNA 敲低 SLC25a3 促进 PEDV 复制 A: Western blotting 检测. B: RT-qPCR 检测. C: 灰度分析. D: 病毒滴度检测

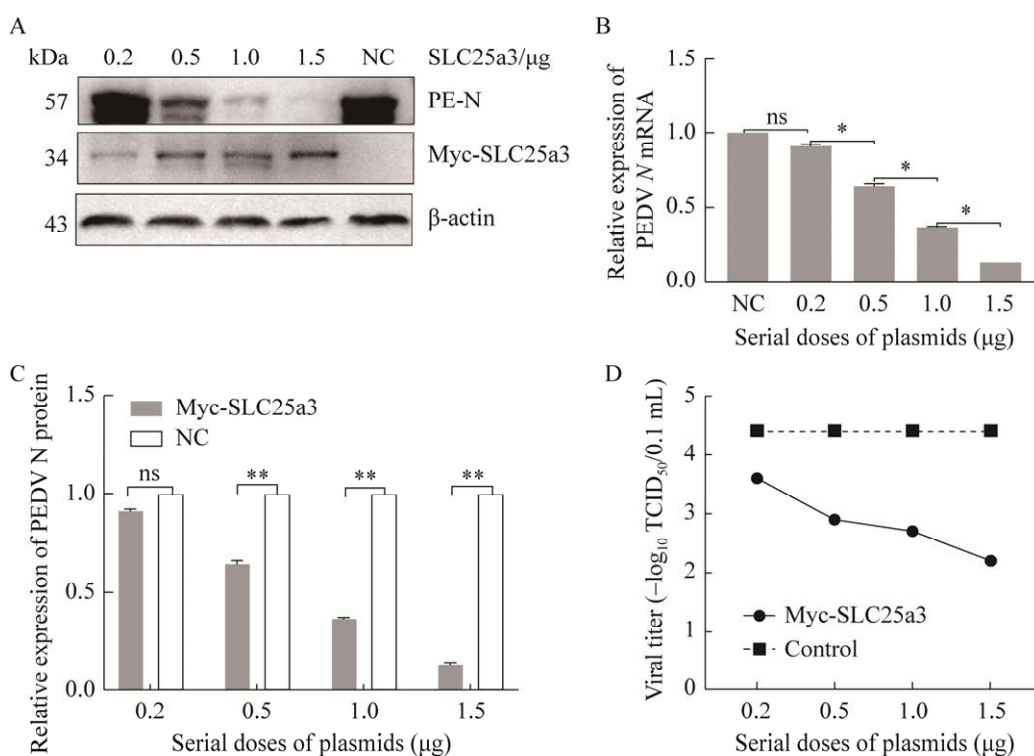
Figure 7 siRNA knockdown SLC25a3 promotes PEDV replication. A: Western blotting analysis of the effect of knocking down the expression of endogenous SLC25a3 on PEDV replication; 1: SLC25a3-667; 2: SLC25a3-706; 3: SLC25a3-973; 4: pcDNA3.1(+)-Myc-SLC25a3. B: RT-qPCR to analyze the effect of knocking down the expression of endogenous SLC25a3 on PEDV replication. C: Grayscale analysis of PEDV N protein. D: TCID<sub>50</sub> to detect cell supernatant virus titer. ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; PE-N: PEDV N protein.

示, 随着 SLC25a3 转染剂量的增加, PEDV N 蛋白的表达量明显降低(图 8A)。同时 RT-qPCR 检测结果表明, PEDV N 基因的表达量随着 SLC25a3 剂量的增加呈剂量依赖性降低(图 8B), TCID<sub>50</sub> 结果的趋势与 Western blotting、RT-qPCR 的结果一致, 能够相互印证(图 8D)。

### 3 讨论与结论

PEDV 是引起仔猪严重腹泻的主要病原体

之一, 目前并无特异性药物可治疗, 且 PEDV 感染的致病机制尚未完全阐明, 因此有必要对其致病分子机制进行研究, 从而有效地预防和治疗由 PEDV 引起的猪流行性腹泻疾病。Nsp15 作为 PEDV 的核糖核酸内切酶(EndoU)发挥作用, 对病毒复制和逃避宿主的抗病毒防御机制至关重要<sup>[10]</sup>。Nsp15 具有独特的酶活性(NendoU)并可以作为潜在的抗病毒药物靶点, 因此受到广泛关注<sup>[11]</sup>。本研究筛选鉴定了 Nsp15 的互



**图 8 SLC25a3 抑制 PEDV 病毒复制呈剂量依赖性** A: Western blotting 检测. B: RT-qPCR 检测. C: 灰度分析. D: 病毒滴度检测

Figure 8 SLC25a3 inhibited PEDV replication in a dose-dependent manner. A: Western blotting to analyze the effect of different doses of SLC25a3 on the expression level of PEDV N protein. B: RT-qPCR to detect the effect of different doses of SLC25a3 on the transcription level of PEDV N gene. C: Grayscale analysis of PEDV N protein. D: TCID<sub>50</sub> to detect cell supernatant virus titer. ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; PE-N: PEDV N protein; NC: Blank control.

作蛋白, 初步研究了 PEDV Nsp15 及其互作蛋白 SLC25a3 的功能, 对于揭示病毒的致病机理, 进行抗病毒药物的研发具有重要的意义。

细胞中各种基本功能的发挥主要通过蛋白质间相互作用完成<sup>[9]</sup>。随着蛋白互作研究的深入, 研究方法也日趋成熟, 常用的有酵母双杂交技术、免疫共沉淀技术、pull-down 技术等<sup>[12]</sup>。冠状病毒的发病机制与病毒和宿主蛋白之间的相互作用有关, 病毒和宿主蛋白间的相互作用可以帮助预防及控制由病原体引起的疾病<sup>[13-14]</sup>。有研究表明, PEDV N 蛋白与 TAR DNA 结合蛋白 (transactive response DNA-binding protein, TARDBP) 相互作用, TARDBP 通过蛋白酶体和

自噬降解途径降解 N 蛋白, 有效抑制 PEDV 病毒的复制<sup>[15-16]</sup>; PEDV N 蛋白也可与 Sp1 相互作用并干扰其与启动子区的结合, 从而抑制 HDAC1 的表达来实现免疫逃避<sup>[17]</sup>。PEDV Nsp15 通过其 EndoU 活性, 可直接降解 TANK 结合激酶 1 (TANK-building kinase 1, TBK1) 和干扰素调节因子 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 的 mRNA, 抑制 IFN 产生并限制 IFN 刺激基因 (IFN stimulates genes, ISG) 进行诱导, 这一研究结果证实了 PEDV Nsp15 能够通过降解 TBK1 和 IRF3 的 RNA 来破坏 IFN 反应<sup>[18]</sup>。本研究筛选出与 PEDV Nsp15 存在互作关系的宿主蛋白, 为后续进一步阐明非结构蛋白 Nsp15 在 PEDV

复制中的重要作用提供新的思路。

溶质载体(solute carrier, SLC)是一组膜转运蛋白,溶质载体超家族是仅次于G蛋白偶联受体后的第二大膜蛋白家族<sup>[19]</sup>,膜转运蛋白在身体各种器官的上皮细胞中广泛表达,包括肝、肠、肾和具有屏障功能的器官等。SLC25转运蛋白家族的成员是最大的溶质载体群,也称为线粒体载体,由于线粒体载体是核编码蛋白,因此必须将其导入线粒体内膜<sup>[20]</sup>。与正常细胞相比,癌细胞的线粒体跨膜电位显著增加,并且癌细胞内大多数转运蛋白形态、功能发生改变<sup>[21]</sup>。SLC25家族的成员被确定为各种癌症的潜在生物标志物,Zhou等<sup>[22]</sup>发现抑制SLC25A10等载体的表达可以重新调控细胞代谢,抑制细胞生长,增加传统抗癌药物的敏感性。但目前SLC25a3在参与病毒调控中发挥的作用以及机制并不清楚。本研究结果表明宿主蛋白SLC25a3与PEDV非结构蛋白Nsp15存在相互作用,且能够呈剂量依赖性抑制PEDV复制,之后还需进一步探究宿主蛋白发挥功能的途径和机制。根据Wu等<sup>[14]</sup>的研究,推测SLC25a3可能通过IFN信号通路和代谢途径来抑制发挥抗PEDV作用。

综上所述,本研究以PEDV Nsp15为研究对象,筛选并鉴定出了与其存在互作关系的宿主蛋白SLC25a3;实验结果表明过表达SLC25a3可呈剂量依赖性抑制PEDV,为预防猪流行性腹泻病毒和抗病毒药物的研发提供了新的思路。

## REFERENCES

- [1] LEE C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193.
- [2] ZHANG H, ZOU CC, OUYANG P, ASHRAF U, XU QP, GONG L, FAN BC, ZHANG Y, XU ZC, XUE CY, WEI XN, ZHOU QF, TIAN XY, SHEN HQ, LI B, ZHANG XB, CAO YC. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(3): msad052.
- [3] WANG D, FANG LR, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [4] LI WT, van KUPPEVELD FJM, HE QG, ROTTIER PJM, BOSCH BJ. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 117-127.
- [5] 牛欣雨, 郑亮, 魏佳琪, 武峰峰, 吴志军, 张华, 曹宏伟. PEDV Nsp10 基因真核表达载体的构建及蛋白的表达[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2023, 35(4): 74-80.
- [6] NIU XY, ZHENG L, WEI JQ, WU FF, WU ZJ, ZHANG H, CAO HW. Construction of eukaryotic expression vector and protein expression of PEDV Nsp10 gene[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2023, 35(4): 74-80 (in Chinese).
- [7] BHARDWAJ K, LIU PH, LEIBOWITZ JL, KAO CC. The coronavirus endoribonuclease Nsp15 interacts with retinoblastoma tumor suppressor protein[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(8): 4294-4304.
- [8] NAKANISHI T, KAWASAKI Y, NAKAMURA Y, KIMURA Y, KAWAMURA K, SHUMBA MN, SHIMOKAWA N. An implication of the mitochondrial carrier SLC25A3 as an oxidative stress modulator in NAFLD[J]. *Experimental Cell Research*, 2023, 431(1): 113740.
- [9] 初而复, 屈玮婷, 李欣, 张明亮, 卢均坤. Slc25a3 基因在低硒大鼠心肌细胞内的表达[J]. *黑龙江医药科学*, 2015, 38(6): 33-34, 37.
- [10] CHU EF, QU WT, LI X, ZHANG ML, LU JK. Expression of Slc25a3 gene in myocardial cells of selenium-deficient rats[J]. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 2015, 38(6): 33-34, 37 (in Chinese).
- [11] JUNG K, SAIF LJ, WANG QH. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): an update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control[J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198045.
- [12] ATHMER J, FEHR AR, GRUNEWALD M, SMITH EC, DENISON MR, PERLMAN S. *In situ* tagged nsp15 reveals interactions with coronavirus replication/transcription complex-associated proteins[J]. *mBio*, 2017, 8(1): e02320-e02316.
- [13] GAO B, GONG XQ, FANG SG, WENG WL, WANG H,

- CHU HY, SUN YJ, MENG CC, TAN L, SONG CP, QIU XS, LIU WW, FORLENZA M, DING C, LIAO Y. Inhibition of anti-viral stress granule formation by coronavirus endoribonuclease nsp15 ensures efficient virus replication[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(2): e1008690.
- [12] 杨桦, 李祥乾, 王帆, 方睿, 杨伟. 长足大竹象信息素结合蛋白 CbuqPBP2 互作蛋白的筛选与验证[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2024, 52(1): 87-97.
- YANG H, LI XQ, WANG F, FANG R, YANG W. Screening and verification of proteins interacting with CbuqPBP2 in *Cyrtotrachelus buqueti*[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2024, 52(1): 87-97 (in Chinese).
- [13] 沈敏, 徐道博, 彭美玲, 卢嘉怡, 李一博, 苏元, 彭雪艳, 刘云峰. 通过免疫共沉淀和蛋白质谱鉴定与拟南芥 DSP1 互作的蛋白[J]. *基因组学与应用生物学*, 2024(3): 1-16.
- SHEN M, XU DB, PENG ML, LU JY, LI YB, SU Y, PENG XY, LIU YF. Identification of proteins interacting with arabidopsis DSP1 by co-immunoprecipitation and protein profiling[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2024(3): 1-16 (in Chinese).
- [14] WU Y, ZHANG HL, SHI ZR, CHEN JF, LI MW, SHI HY, SHI D, GUO LJ, FENG L. Porcine epidemic diarrhea virus nsp15 antagonizes interferon signaling by RNA degradation of TBK1 and IRF3[J]. *Viruses*, 2020, 12(6): 599.
- [15] ZHAI HJ, QIN WZ, DONG SJ, YANG XY, ZHAI XY, TONG W, LIU CL, ZHENG H, YU H, KONG N, TONG GZ, SHAN TL. PEDV N protein capture protein translation element PABPC1 and eIF4F to promote viral replication[J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 284: 109844.
- [16] ZHAO Y, TANG T, ZHAO WC, FU WG, LI T. Inhibition of PEDV viral entry upon blocking N-glycan elaboration[J]. *Virology*, 2024, 594: 110039.
- [17] XU JD, MAO JY, HAN X, SHI FS, GAO Q, WANG TJ, ZHANG ZN, SHAN Y, FANG WH, LI XL. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits HDAC1 expression to facilitate its replication *via* binding of its nucleocapsid protein to host transcription factor Sp1[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(18): e0085321.
- [18] 代红梅, 刘志朋, 张霞, 杨忠, 曾日彬, 王配, 常勇诚, 霍金龙. 猪 GSKIP 基因 ceRNA 调控网络及其蛋白互作分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2022, 51(5): 654-661.
- DAI HM, LIU ZP, ZHANG X, YANG Z, ZENG RB, WANG P, CHANG YC, HUO JL. ceRNA regulatory network of GSKIP gene in pig and corresponding protein interaction analysis[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2022, 51(5): 654-661 (in Chinese).
- [19] LIU XD. SLC family transporters[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1141: 101-202.
- [20] PALMIERI F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications[J]. *Pflügers Archiv*, 2004, 447(5): 689-709.
- [21] ROCHETTE L, MELOUX A, ZELLER M, MALKA G, COTTIN Y, VERGELY C. Mitochondrial SLC25 carriers: novel targets for cancer therapy[J]. *Molecules*, 2020, 25(10): 2417.
- [22] ZHOU XS, PAREDES JA, KRISHNAN S, CURBO S, KARLSSON A. The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 9271-9283.

(本文责编 陈宏宇)