

· 动物及兽医生物技术 ·

GST pull-down 结合质谱筛选猪圆环病毒 2 型 ORF4 潜在互作蛋白

林翠¹, 唐雯¹, 顾金燕^{1,2}, 金玉兰¹, 董伟仁¹, 廖敏¹, 周继勇¹

1 浙江大学 动物科学学院 农业部动物病毒学重点实验室, 浙江 杭州 310058

2 南京农业大学 免疫研究所, 江苏 南京 210000

林翠, 唐雯, 顾金燕, 等. GST pull-down 结合质谱筛选猪圆环病毒 2 型 ORF4 潜在互作蛋白. 生物工程学报, 2019, 35(1): 40-48.

Lin C, Tang W, Gu JY, et al. Combination of mass spectrometry and GST pull-down techniques to study potential interacting protein of PCV2 ORF4. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 40-48.

摘要: 猪圆环病毒 2 型编码的 ORF4 蛋白是近年来发现的新蛋白。迄今为止, 人们对 ORF4 所参与的细胞生物学过程知之甚少。本研究首先构建了带双标签的真核表达载体 pCMV-N-Flag-GST, 再将 ORF4 基因插入该载体中, 形成 pCMV-N-Flag-GST-ORF4。将质粒转染 293T 细胞表达 ORF4 后, 通过 GST Pull-down 试验捕获细胞内潜在与 ORF4 互作的蛋白库。经 SDS-PAGE 分离及银染后, 对所得的特异性条带进行质谱鉴定, 筛选出 5 个与 ORF4 潜在互作的蛋白, 包括丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 6 催化亚基、 α 心肌蛋白、 β 肌动蛋白、SEC-14 样蛋白 5 和肌球蛋白 myosin 9。上述研究结果为深入揭示 ORF4 在病毒感染细胞过程中发挥的作用提供新的思路与方向。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, ORF4 蛋白, GST pull-down, 互作蛋白

Received: March 17, 2018; **Accepted:** May 16, 2018

Supported by: Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2015BAD12B01), National Natural Science Foundation of China (No. 31230072).

Corresponding author: Jiyong Zhou. Tel: +86-571-88982698; E-mail: jyzhou@zju.edu.cn

国家科技支撑计划项目课题 (No. 2015BAD12B01), 国家自然科学基金 (No. 31230072) 资助。

网络出版时间: 2018-06-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180622.1157.002.html>

Combination of mass spectrometry and GST pull-down techniques to study potential interacting protein of PCV2 ORF4

Cui Lin¹, Wen Tang¹, Jinyan Gu^{1,2}, Yulan Jin¹, Weiren Dong¹, Min Liao¹, and Jiyong Zhou¹

¹ Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

² Institute of Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210000, Jiangsu, China

Abstract: A novel protein encoded by the open reading frame 4 (ORF4) was recently discovered in porcine circovirus type 2 (PCV2). However, little is known about the interaction proteins of ORF4 which hindered better understanding the biological functions of ORF4 in the life cycle of PCV2. In the present study, the *ORF4* was inserted into the multiple cloning site of pCMV-N-Flag-GST, yielding recombinant plasmid pCMV-N-Flag-GST-ORF4. The recombinant plasmid was transfected into 293T cells and the intracellular interaction complex of ORF4 were enriched and separated by GST pull-down and SDS-PAGE, sequentially. The potential interacting proteins of PCV2 ORF4 were stained with silver and identified by mass spectrometry (MS). Finally, five candidate ORF4-interacting proteins, including Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit, alpha cardiac muscle 1, actin, SEC14-like protein 5 and myosin 9 were identified. These results would benefit a better understanding of the biological function of ORF4 in PCV2 infected cells.

Keywords: porcine circovirus type 2, ORF4, GST pull-down, interacting protein

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要病原^[1]。该病流行范围广、传播速度快,是严重影响养猪业发展的重要传染病之一^[2]。PCV2 属于圆环病毒科圆环病毒属,是迄今发现的能在哺乳动物细胞内自主复制的最小动物病毒,病毒粒子直径约为 17 nm,无囊膜,基因组为单链环状 DNA^[3]。PCV2 基因组全长 1 766–1 768 nt,预测含有 11 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF)^[4]。目前仅 5 个 *orf* 的编码产物被证实, *orf1* 编码的 Rep 和 Rep' 蛋白,是病毒的复制酶^[5]; *orf2* 编码衣壳蛋白 Cap,是病毒的结构蛋白,也是病毒引起宿主免疫应答的主要抗原^[6-7]; *orf3*、*orf4* 和 *orf5* 编码的蛋白非病毒复制所必需,前两者与病毒诱导的细胞凋亡相关^[8-9],后者可能与内质网压力及 NF- κ B 的激活相关^[10]。

前期研究报道,ORF4 蛋白的缺失不仅影响病毒诱导的细胞凋亡水平,还影响了宿主体内的免疫细胞数量^[9],提示 ORF4 蛋白与病毒致病力

密切相关。Gao 等对比 *orf4* 缺失毒与野毒感染情况下病毒各蛋白转录水平,发现缺失毒感染后 *orf3* 转录水平显著高于野毒,从而推测 ORF4 蛋白通过降低 *orf3* 转录量间接抑制凋亡诱导^[11]。Lv 等通过酵母菌双杂交试验筛选出 4 个与 ORF4 结合的宿主蛋白,利用激光共聚焦、免疫共沉淀及 GST pull down 试验证实重链铁蛋白 (Ferritin heavy chain, FHC) 与 ORF4 蛋白结合^[12]。深入探究发现 FHC 与 ORF4 结合致使胞内 FHC 浓度减少,随后抑制活性氧簇 (Reaction oxygen species, ROS) 的大量聚集,最终拮抗凋亡^[13]。最近,本实验室研究发现 ORF4 具有核质双重定位特征,定位胞浆的 ORF4 蛋白与线粒体内膜蛋白腺嘌呤易位体 3 (Adenine nucleotide translocator 3, ANT3) 结合激活线粒体凋亡通路,从而诱导细胞凋亡^[14]。现今,对 ORF4 的研究主要与凋亡相关,该蛋白的其他特性及功能仍不甚明了。因此,探讨并揭示 ORF4 的胞内互作蛋白有助于对 ORF4 功能的研究。文中通过 GST pull-down 联合质谱

技术,对细胞中与 ORF4 互作的潜在蛋白进行筛选和鉴定。尝试寻找 ORF4 参与病毒感染的具体通路,为 ORF4 蛋白的生物学功能及其作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 生物材料及主要试剂

PCV2 HZ0201 株 (AY188355) 由本实验室分离、鉴定并保存^[4]; HEK293T cells (ATCC, CRL-11268) 购自 ATCC 细胞库并由本实验室传代保存; 克隆宿主菌 DH5 α 由本实验室保存; 质粒 pGEX-4T-1 购自 GE Healthcare Life Biosciences 公司; pCMV-N-Flag 真核表达载体及 pDsRed2-Mito 购自 Clontech Laboratories 公司; UNIQ-10 柱式病毒基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Flag 鼠单抗购自 Sigma-Aldrich 公司; GST 鼠单抗购自杭州华安生物技术有限公司; ORF4 鼠单抗 6A5 由本实验室保存; FITC 标记羊抗鼠 IgG (H+L) 购自美国 KPL 公司; DAPI 购自 Roche Life Science 公司; 谷胱甘肽琼脂糖珠 (GST) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 pCMV-N-Flag-GST 真核表达载体改造及 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 重组质粒构建

1.2.1 pCMV-N-Flag-GST 真核表达载体改造

以 pCMV-N-Flag 质粒为骨架构建含 Flag 以及 GST 双标签的重组质粒用于后续研究。首先,使用 Hind III 酶切载体 pCMV-N-Flag, 回收备用, 同时以原核表达载体 pGEX-4T-1 为模板扩增 *gst* 片段, 再通过同源重组方法将 *gst* 片段插入至 pCMV-N-Flag 载体多克隆位点 (MCS) 中 Hind III 下游, 且保证不影响 Hind III 下游 MCS 的使用。扩增 *gst* 的引物序列为: GST-上游引物: 5'-CAAG GACGACGATGACAAGCTTATGATTAGTGTACA CCACC-3', GST-下游引物: 5'-CGAATTCGGGC

CTCCATGGCCATTATATCAGCAGAATTTTC-3' (下划线部分为同源重组臂)。

1.2.2 构建 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 重组质粒

使用病毒基因组抽提试剂盒提取的 PCV2 HZ0201 的基因组为模板, 引物: ORF4-上游引物: 5'-CGGAATTCGGATGACGTGTACATTAGTCTT CC-3', ORF4-下游引物: 5'-CCCTCGAG TCAGGG ACAACGGAGTGACCTGTC-3' (下划线部分为酶切位点), PCR 扩增获得 *orf4* 片段, 利用 EcoR I、Xho I 双酶切改造过的 pCMV-N-Flag-GST 载体及 *orf4* 目的片段, 连接后转化 DH5 α 感受态, 阳性克隆经测序完全正确后, 提取质粒用于后续研究。

1.3 细胞培养及细胞转染

长满单层的 293T 细胞, 使用 0.05% 胰酶消化 1–2 min, 待细胞间隙变大后, 使用含 2% 血清的培养基终止消化, 并按 1:2 的比例传代到指定的培养皿内, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12–16 h, 待细胞长满 70%–80%, 即可用于转染。转染过程参见说明书。转染后继续培养 24 h 用于后续试验。

1.4 总蛋白提取、SDS-PAGE 和免疫印迹

收集并裂解细胞样品。首先, 弃掉培养基, 加入预冷 PBS 润洗 3 次, 最后一次加入 PBS 后将细胞收集到 1.5 mL EP 管内, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 90 μ L 的细胞强裂解液 (主要成分为 2% SDS、1% Triton X-100) (以六孔板为例), 并将细胞沉淀吹悬后完全裂解, 随后按比例加入 4 \times 蛋白上样缓冲液, 混匀煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清上样。

按照《精编蛋白质科学实验指南》^[15]中的方法配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 将待检样上样电泳, 80 V、30 min 将样品压成线后再以 120 V 恒压电泳至条带充分分离, 结束电泳。通过半干转印法将蛋

白转移到 0.45 μm 硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose filter membrane, 简称 NC 膜) 上, NC 膜经 5% 脱脂乳封闭处理后进行抗体孵育, 并显色。其中孵育的一抗包括抗 Flag 鼠单抗 (1:2 000), GST 鼠单抗 (1:4 000), ORF4 鼠单抗 (1:200), 对应的二抗为 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:8 000)。

1.5 激光共聚焦显微镜试验

细胞传代后接种到共聚焦小皿内, 待长满 40%–50%, 将 DsRed-mito 分别与 pCMV-N-Flag-GST 和 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 共转染细胞。转染 24 h 后, 使用 4% 多聚甲醛, 室温固定细胞 20 min, 0.2% Triton X-100 透化细胞 2 min, 经 5% 脱脂奶封闭后, 孵育一抗 Flag 鼠单抗, 并用 FITC 标记的羊抗鼠二抗 (1:200) 指示蛋白, DAPI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 室温染核 10 min 指示细胞核, 洗涤加入 PBS, 使用蔡司 LSM780 激光共聚焦显微镜观察。

1.6 GST pull-down 试验

分别收集转染 pCMV-N-Flag-GST 及 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 细胞样品 (约 1×10^7 个细胞), 加入 1 mL NP40 裂解液 (PMSF 终浓度 1 mmol/L), 冰浴裂解细胞 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清; 随后向上清中加入 GST 琼脂糖珠 50 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 混悬仪孵育 4 h, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 再加入 1 mL 的 PBS 洗涤 4 次, 最后一次洗涤后, 弃上清并加入 45 μL PBS, 同时加入 15 μL 的 4 \times 蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 进行 SDS-PAGE (12% 凝胶) 分离蛋白。

1.7 银染试验

GST pull-down 样品经 SDS-PAGE 分离后, 将聚丙烯酰胺凝胶转入固定液 ($V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{冰乙酸}}:V_{\text{双蒸水}}=4:1:5$) 中室温固定 30 min; 双蒸水清洗后转入敏化液 (醋酸钠 68 g, 硫代硫酸钠 3.14 g, 无水乙醇 0.3 L, 加入双蒸水定容至 1 L) 孵育 30 min,

随后双蒸水漂洗 3 次; 再将凝胶放入银染液 (硝酸银 2.5 g, 37% 甲醛 100 μL , 双蒸水配平至 1 L) 中避光孵育 25 min, 双蒸水淋洗后加入显色液 (无水碳酸钠 25 g, 甲醛 0.4 mL, 硫代硫酸钠 0.031 4 g, 加入双蒸水后定容至 1 L) 孵育 3–7 min, 以终止液 (5% 冰乙酸) 终止显色, 双蒸水洗涤后使用 ImageScanner III 扫描仪扫描凝胶并保存图片。选择实验组与对照组之间差异显著的条带进行质谱鉴定。

2 结果与分析

2.1 pCMV-N-Flag-GST 质粒的构建

以 pGEX-4T-1 质粒为模板经 PCR 扩增 *gst* 基因片段, 获得约 700 bp 产物, 与预期 *gst* 片段分子大小吻合 (图 1A)。将目的片段按同源重组的方法插入 pCMV-N-Flag 载体中, pCMV-N-Flag 载体以及经改造后的 pCMV-N-Flag-GST 的图谱见图 1B。经过测序验证, 插入的 *gst* 序列位于 pCMV-N-Flag 载体中 *Hind* III 限制性内切酶位点下游且序列完全正确。

2.2 ORF4 重组质粒构建及融合蛋白表达

以 PCV2 HZ0201 基因组为模板经 PCR 扩增获得 *orf4* 片段, 如图 2A 所示。经双酶切后插入到改造成功的 pCMV-N-Flag-GST 载体中。将构建成功的 pCMV-N-Flag-GST 及 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 瞬时转染到 293T 细胞中, 转染 24 h 后收集细胞, 制备蛋白样品。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blotting 后, 分别使用 Flag 鼠单抗、GST 鼠单抗以及 ORF4 鼠单抗检测融合蛋白的表达, 结果如图 2 所示, Flag-GST 融合蛋白分子量约为 30 kDa, 与预计大小一致, 能够被 Flag 及 GST 标签抗体识别, 但无法与 ORF4 抗体反应; Flag-GST-ORF4 蛋白分子量约为 37 kDa, 能同时与 3 种抗体反应。该结果表明上述构建的重组质粒转染后可成功表达。

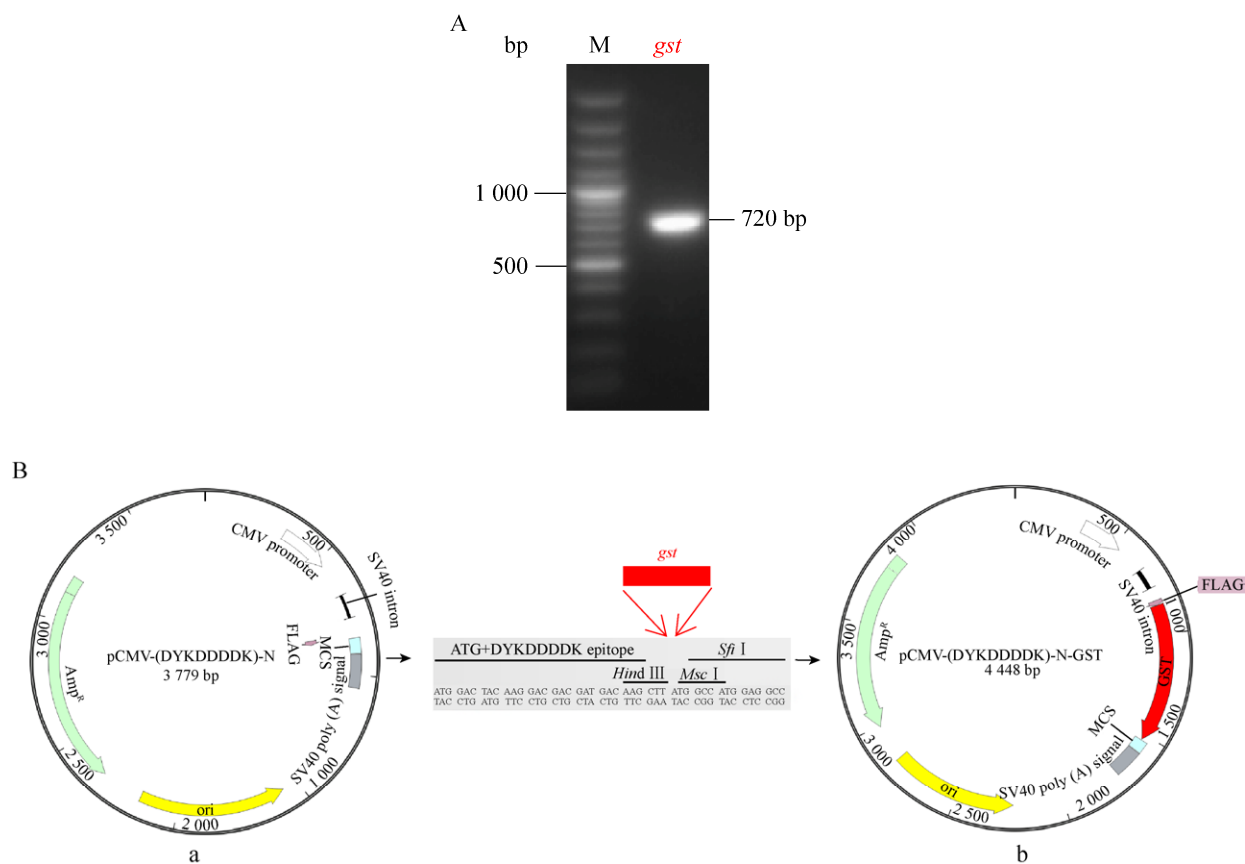


图1 pCMV-N-Flag-GST 载体构建

Fig. 1 The construction of pCMV-N-Flag-GST. (A) Amplification of *gst* gene by PCR. (B) The schematic showing that fragment coding GST was cloned into pCMV-N-Flag vector (a), resulting in pCMV-N-Flag-GST recombinant plasmid (b).

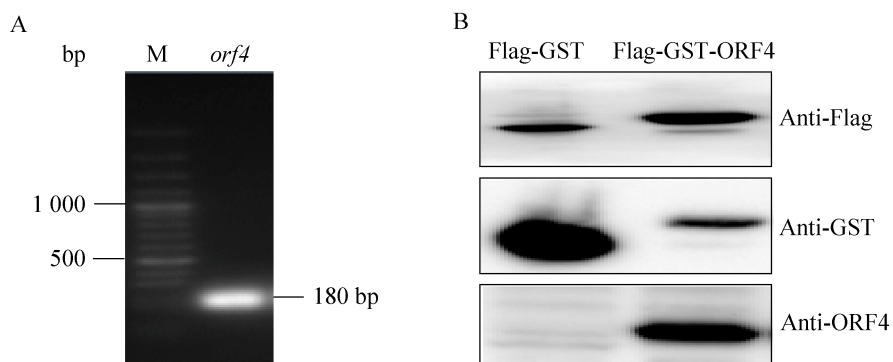


图2 目的基因扩增及重组质粒表达

Fig. 2 Amplification of *orf4* gene and analysis of the expression of the recombinant plasmids. (A) PCR amplification of *orf4* gene. (B) Western blotting analysis of recombinant Flag-GST and Flag-GST-ORF4 proteins with various antibodies.

2.3 ORF4 融合蛋白定位分析

ORF4 蛋白分子量仅有 6.5 kDa, 与大标签融合后有可能会影响蛋白定位。根据前期研究发现 ORF4 蛋白定位于线粒体, 为了检测 GST 标签蛋白是否会影响 ORF4 的胞内定位, 将 pCMV-N-Flag-GST 与 pCMV-N-Flag-GST-ORF4 分别与 pDsRed2-Mito 共转 293T 细胞, 转染 24 h 后, 进行间接免疫荧光试验, 通过激光共聚焦显微镜观察荧光分布。结果如图 3 所示, pDsRed2-Mito 在细胞内呈红色荧光并以点状或杆状分布于胞质内, 指示线粒体; pCMV-N-Flag-GST 转染细胞后呈绿色荧光, 在胞质中呈弥散分布; pCMV-N-Flag-GST-ORF4 转染后呈绿色点状分布, 与线粒体存在共定位。上述结果表明融合蛋白并没有改变 ORF4 蛋白的定位, 重组质粒可用于后续实验。

2.4 GST pull-down 及银染结果

分别收集转染的细胞样品, 一部分样品裂解后直接进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 实验, 检测结果如图 4A 显示, 实验表明质粒转染后可

正常表达 1、3、5 泳道; 一部分裂解样品中加入 GST 琼脂糖珠进行 pull-down 试验, 显示融合 GST 标签的蛋白能与 GST 琼脂糖珠成功结合 2、4、6 泳道。所有蛋白经过 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后进行银染。如图 4B 所示, 与 Flag-GST 经 GST pull-down 捕获的蛋白条带相比, Flag-GST-ORF4 两个重复样品中, 在 170 kDa 以上, 70–50 kDa、35–40 kDa 处均有 1 条差异性条带, 在 40–55 kDa 处有 2 条差异性条带, 对差异性条带进行割胶回收和质谱分析。

2.5 质谱分析结果

以得分高于 40 为筛选标准, 如表 1 所示, 共筛选到 5 个潜在与 ORF4 互作的蛋白, 它们分别是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 6 催化亚基、 α 心肌蛋白、肌动蛋白、SEC-14 样蛋白 5 和肌球蛋白 myosin 9。其中分数相对较高蛋白有肌动蛋白和 myosin 9, 两者均与细胞骨架调节相关, 这预示着 ORF4 蛋白很可能与细胞骨架有关联。这一发现为后续 ORF4 蛋白特性及功能的研究提供指向性及理论依据。

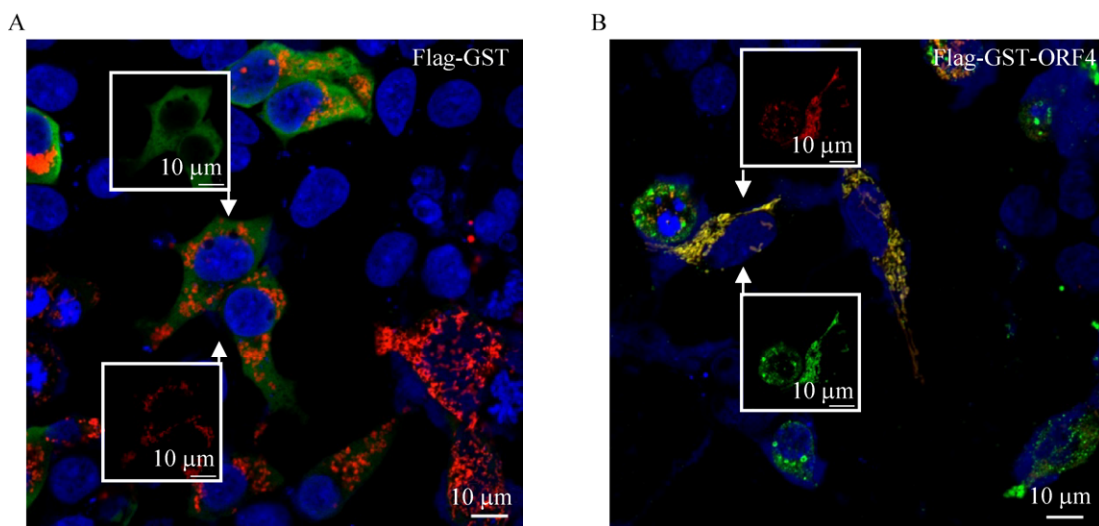


图 3 激光共聚焦显微镜分析 Flag-GST (A) 与 Flag-GST-ORF4 (B) 的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of Flag-GST (A) and Flag-GST-ORF4 (B) were examined by laser scanning confocal microscope. Flag-GST or Flag-GST-ORF4, green; mitochondria, red; nucleus, blue.

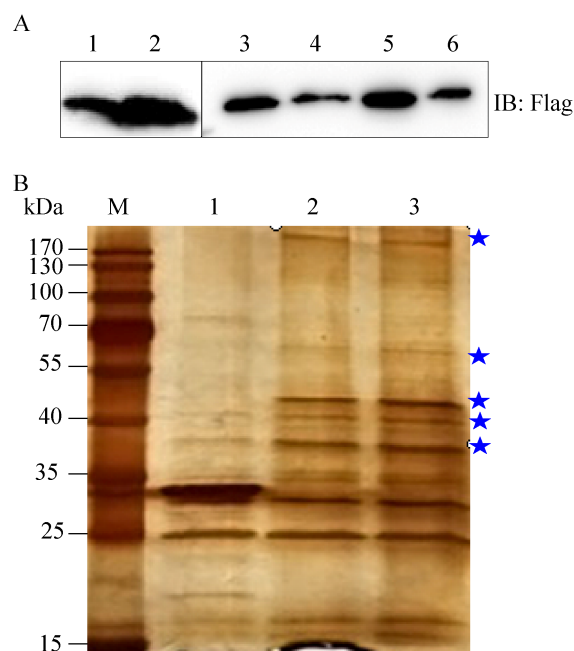


图 4 GST pull-down 样品免疫印迹及银染结果

Fig. 4 Immunoblotting and silver staining results of GST pull-down samples. (A) Lane 1: lysate of Flag-GST; lane 2: the Flag-GST samples after GST pull-down; lane 3, 5: lysates of Flag-GST-ORF4 samples, they are two separate experiments; lane 4, 6 are the Flag-GST-ORF4 samples after GST pull-down, corresponding to 3 and 5 samples. (B) M: marker; lane 1: silver staining of Flag-GST pull down sample; lane 2, 3: silver staining of the two separate Flag-GST-ORF4 pull down assays samples. ★ Differential bands.

表 1 GST pull-down 结合质谱鉴定出潜在与 ORF4 互作的蛋白

Table 1 Potential intercropping proteins with ORF4 identified by GST pul-down combined with mass spectrometry

IPI number	Molecular mass	Score	Description
000743	35 121	41	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit
P68032	41 992	46	Alpha cardiac muscle 1
P60709	41 710	323	Actin, cytoplasmic 1
043304	78 892	46	SEC14-like protein 5
P35579	226 392	95	Myosin9

3 讨论

猪圆环病毒 ORF4 蛋白是近几年发现的蛋白，其相关功能的研究还处于初步探索阶段。迄今为止，人们对 ORF4 蛋白在病毒感染中到底发挥何种作用知之甚少。病毒蛋白通常与宿主蛋白相互作用来发挥其生物学功能，因此，探寻宿主细胞内与 ORF4 的潜在互作蛋白可为后续 ORF4 功能的研究奠定基础。研究利用了真核表达的 Flag-GST-ORF4 蛋白进行 GST pull-down 试验来捕获与 ORF4 蛋白互作的宿主蛋白。将 *gst* 融合到 pCMV-N-Flag 载体上，使用真核表达的 GST 融合蛋白进行试验，而非使用原核表达的 GST 融合蛋白，更有效地筛选出哺乳动物细胞内可能与 ORF4 结合的蛋白；利用该筛选方法较传统的原核 GST pull-down 可信度更高，已有文献通过此种方法成功筛选到了与流感病毒 PB1-F2 互作的两个蛋白^[16]。

本研究利用上述的方法筛选到 5 种宿主蛋白，其中 actin 与 myosin 9 的分值明显高于其余几种蛋白，预示着它们与 ORF4 互作的可能性很大。Actin (肌动蛋白) 是一种重要的细胞骨架蛋白，几乎所有的真核细胞内均含有肌动蛋白。该蛋白对真核细胞的存活至关重要，它为细胞形态维持提供了内部机械支撑，在细胞内部形成微丝，为细胞内物质的运输提供重要通道，并且也是细胞运动的驱动源^[17]。而 myosin 9 蛋白是肌球蛋白超家族中的一员，也是细胞骨架重要组成成分。该家族蛋白是与肌动蛋白 actin 结合的分子马达蛋白，可调节 actin 的作用，与肌丝结合后被活化，活化后蛋白具有 ATP 酶活性，水解 ATP 后产生化学能，从而推动肌丝活动或产生张力^[18]。此外，myosin 9 还参与细胞内许多重要的生理过程，例如细胞骨架重组、肌动蛋白纤维运动、蛋白转运等^[19]。近年来很多研究报道细胞骨架，特别是肌动蛋白微丝对病毒运输起着很重要作用。病毒侵

入细胞后,为实现有效复制,首先需要将自身遗传物质输送到核内或特定的内膜系统膜上。在高度复杂的细胞内部,蛋白大分子若单纯依靠扩散运输效率极低。因此,大部分的病毒会利用细胞骨架或细胞内运输通道来实现胞内运输^[20-21]。很多病毒通过这种方式进行胞内运输,例如杆状病毒利用肌动蛋白微丝实现病毒基因组由胞质到胞核的过程^[22];本实验室前期也证明了圆环病毒可通过病毒衣壳蛋白(cap)劫持宿主细胞原有的微管运输系统进行核靶向运输活动^[23]。此外,本实验室也分析了猪圆环感染后的宿主免疫组织基因表达谱,结果显示解聚因子 confilin1 和肌动蛋白结合蛋白(DSTN)的非磷酸化活性形式发生了上调表达,这提示 PCV2 感染可能促进了肌动蛋白 actin 的解聚和重排,利于病毒入侵与运输^[24]。肌动蛋白参与不同细胞的运动过程是基于微丝的组装及肌球蛋白 myosin 的活化^[25],病毒可利用 actin 或 actin 结合蛋白来实现自身的运输过程^[26-27]。有文献报道 myosin IIA 与 HIV 病毒 gB 蛋白结合后促进病毒入侵^[28]。根据本文研究结果,我们推测 ORF4 蛋白与 myosin 结合,调节 actin 的作用从而间接影响病毒的运输过程;而与 actin 结合很可能直接影响着细胞骨架的排列,进而调控病毒的运输。这为后续研究 ORF4 蛋白是否影响细胞骨架以及病毒的入侵与运输提供了有利的依据。另外,也有研究表明小 GTP 酶 Ras 蛋白通过 cAMP/PKA 信号通路来调控线粒体功能,而 actin 参与调控小 GTP 酶 Ras 蛋白^[29-30]。药物处理使 actin 稳定性下降,可诱发细胞凋亡^[31]。因此,actin 与细胞凋亡息息相关,本实验室已发表数据显示 ORF4 定位线粒体并且与猪圆环病毒诱导线粒体凋亡相关^[14]。然而,ORF4 是否还能通过结合 actin 来间接发挥其诱导线粒体凋亡有待进一步研究。后续研究我们将深入阐明 ORF4 在病毒感染中发挥的作用,尝试揭示影响病毒感染的潜在机制。

REFERENCES

- [1] Harding JCS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod*, 1997, 5(5): 201–203.
- [2] Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest*, 2007, 19(6): 591–615.
- [3] Breitbart M, Delwart E, Rosario K, et al. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *J Gen Virol*, 2017, 98(8): 1997–1998.
- [4] Zhou JY, Chen QX, Ye JX, et al. Serological investigation and genomic characterization of PCV2 isolates from different geographic regions of Zhejiang province in China. *Vet Res Commun*, 2006, 30(2): 205–220.
- [5] Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *J Gen Virol*, 1998, 79(2): 381–384.
- [6] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 2000, 81(9): 2281–2287.
- [7] Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, et al. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine*, 2003, 21(31): 4565–4575.
- [8] Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol*, 2005, 79(13): 8262–8274.
- [9] He JL, Cao JJ, Zhou N, et al. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus Type 2. *J Virol*, 2013, 87(3): 1420–1429.
- [10] Lv QZ, Guo KK, Xu H, et al. Identification of putative ORF5 protein of porcine circovirus type 2 and functional analysis of GFP-fused ORF5 protein. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0127859.
- [11] Gao ZZ, Dong QF, Jiang YH, et al. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs *in vitro*. *Virus Res*, 2014, 183: 56–62.
- [12] Lv QZ, Guo KK, Wang T, et al. Porcine circovirus type

- 2 ORF4 protein binds heavy chain ferritin. *J Biosci*, 2015, 40(3): 477–485.
- [13] Lv QZ, Guo KK, Zhang GF, et al. The ORF4 protein of porcine circovirus type 2 antagonizes apoptosis by stabilizing the concentration of ferritin heavy chain through physical interaction. *J Gen Virol*, 2016, 97(7): 1636–1646.
- [14] Lin C, Gu JY, Wang HJ, et al. Caspase-dependent apoptosis induction via viral protein ORF4 of porcine circovirus 2 binding to mitochondrial adenine nucleotide translocase 3. *J Virol*, 2018, 92(10): e00238–18.
- [15] Coligan JE. *Short Protocols in Protein Science*. Beijing: Science Press, 2007: 294–297 (in Chinese).
科林根 JE. 精编蛋白质科学实验指南. 北京: 科学出版社, 2007: 294–297.
- [16] Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao XY, et al. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog*, 2005, 1(1): e4.
- [17] Pollard TD, Cooper JA. Actin, a Central player in cell shape and movement. *Science*, 2009, 326(5957): 1208–1212.
- [18] Sellers JR, Goodson HV. Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile*, 1995, 2(12): 1323–1423.
- [19] Yam PT, Wilson CA, Ji L, et al. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol*, 2007, 178(7): 1207–1221.
- [20] Sodeik B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol*, 2000, 8(10): 465–472.
- [21] Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science*, 2004, 304(5668): 237–242.
- [22] Charlton CA, Volkman LE. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology*, 1993, 197(1): 245–254.
- [23] Cao JJ, Lin C, Wang HJ, et al. Circovirus transport proceeds via direct interaction of the cytoplasmic dynein IC1 subunit with the viral capsid protein. *J Virol*, 2015, 89(5): 2777–2791.
- [24] He JL. Identification of putative ORF4 within porcine circovirus type 2 and gene expression profile of host immune organ after PCV2 infection[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012 (in Chinese).
何嘉玲. 猪圆环病毒 2 型编码蛋白 4 的鉴定及其感染后的宿主免疫器官基因表达谱分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [25] Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18: 247–288.
- [26] Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, et al. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol*, 2005, 170(2): 317–325.
- [27] Sasaki H, Nakamura M, Ohno T, et al. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(6): 2026–2030.
- [28] Arii J, Goto H, Suenaga T, et al. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature*, 2010, 467(7317): 859–862.
- [29] Moseley JB, Goode BL. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(3): 605–645.
- [30] Heeren G, Jarolim S, Laun P, et al. The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Res*, 2004, 5(2): 157–167.
- [31] Franklin-Tong VE, Gourlay CW. A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J*, 2008, 413(3): 389–404.

(本文责编 郝丽芳)