

分类号:

密级:



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

鸡 CCT5 蛋白与禽流感病毒 NP、PB2 蛋白互作促进病毒复制的研究

RESEARCH OF THE INTERACTION BETWEEN CHICKEN
CCT5 PROTEIN AND AVIAN INFLUENZA VIRUS NP AND
PB2 PROTEIN TO PROMOTE VIRUS REPLICATION

研 究 生: 张筱涵
CANDIDATE: ZHANG XIAO HAN
学 号: 2017302110180
STUDENT NO.:
专 业: 预防兽医学
MAJOR: PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE
导 师: 金梅林 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR JIN MEI LIN

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二〇二〇年六月
JUNE, 2020

华中农业大学硕士学位论文

鸡 CCT5 蛋白与禽流感病毒 NP、PB2 蛋白互作促进病毒复制的研究

Research of the Interaction Between Chicken CCT5 Protein and Avian Influenza Virus NP and PB2 Protein to Promote Virus Replication

研 究 生：张筱涵

学 号：2017302110180

指导教师：金梅林 教授

指导小组：刘正飞 教授

钱 平 教授

李祥敏 教授

张安定 教授

周红波 教授

专 业：预防兽医学 研 究 方 向：动物传染病

获得学位名称：农学硕士 获得学位时间：2020 年 6 月

华中农业大学动物医学院

二〇二〇年六月

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密，解密时间	
--------------	---	-----------	--

独创声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的声明，并表示了谢意。

研究生签名：张筱涵

时间：2020 年 6 月 20 日

学位论文使用授权书

本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定，即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本；学校有权保留论文的印刷版本和电子版，并提供目录检索和阅览服务，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存，汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容，为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务，同时，本人保留在其他媒体发表论文的权利。

注：保密学位论文（即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在的需要提交保密的论文）在解密后适用于本授权书。

学位论文作者签名：张筱涵

导师签名：金梅林

签名日期：2020 年 6 月 20 日

签名日期：2020 年 6 月 20 日

目录

目录	I
摘要	i
Abstract.....	iii
缩略语表 (Abbreviation)	v
1 前言.....	8
1.1 问题的由来	8
1.2 文献综述	8
1.2.1 H5N6 流感病毒流行性.....	8
1.2.2 流感病毒的结构	9
1.2.3 流感病毒的生命周期	10
1.2.4 流感病毒与宿主蛋白互作研究现状	11
1.2.5 宿主因子对流感病毒的影响	12
1.2.6 含 TCP1 的胞质伴侣蛋白 CCT5	13
1.2.7 RNAi 筛选、免疫沉淀试验结合液相色谱-串联质谱技术简介.....	14
1.3 目的意义	15
2 材料和方法.....	16
2.1 材料来源	16
2.1.1 细胞与毒株	16
2.1.2 菌株与质粒	16
2.1.3 抗体	16
2.1.4 引物及 siRNA	17
2.1.5 主要酶、试剂及试剂盒	18
2.1.6 主要培养基及其配制	19
2.1.7 主要仪器设备	21
2.2 实验方法	22
2.2.1 质粒构建基因组模板的制备	22
2.2.2 提取 RNA 并制备 cDNA 作为模板	22
2.2.3 目标载体克隆构建质粒	23

2.2.4 质粒提取以及鉴定	27
2.2.5 无内毒素质粒提取	28
2.2.6 细胞相关实验	29
2.2.6.1 细胞复苏	29
2.2.6.2 贴壁细胞传代	29
2.2.6.3 细胞冻存	30
2.2.6.4 细胞计数	30
2.2.6.5 细胞转染	30
2.2.6.6 细胞间接免疫荧光	31
2.2.6.7 流式分析细胞术	31
2.2.6.8 细胞活力测定	31
2.2.6.9 细胞核蛋白与细胞浆蛋白分离实验	32
2.2.7 病毒相关实验	32
2.2.7.1 流感病毒的增殖	32
2.2.7.2 流感病毒的细胞接种	32
2.2.7.3 流感病毒空斑实验	33
2.2.7.4 TCID ₅₀ 的测定	33
2.2.8 蛋白表达检测实验	34
2.2.8.1 细胞总蛋白的提取及样品制备	34
2.2.8.2 CO-IP 免疫共沉淀实验及质谱技术	34
2.2.8.3 聚合酶活性测定	35
2.2.8.4 SDS-PAGE 电泳	36
2.2.8.5 Western Blotting	36
2.2.8.6 银染色实验	37
2.2.9 荧光定量实验	38
2.2.9.1 RNA 提取	38
2.2.9.2 相对荧光定量分析	39
3 结果与分析	40
3.1 鉴定与禽流感病毒的 NP 蛋白相互作用的宿主蛋白	40
3.2 CCT5 与 NP 蛋白相互作用。	46

3.3 IAV 感染上调 DF-1 细胞中 CCT5 的表达.....	50
3.4 CCT5 基因敲低限制了 IAV 在 DF1 细胞中的复制	54
3.4.1 CCT5 沉默不影响 DF1 细胞活性.....	54
3.4.2 CCT5 敲低下调流感病毒的增长曲线.....	54
3.4.3 CCT5 影响流感病毒 RNA 的生成	55
3.4.4 CCT5 影响流感病毒 NP 蛋白的表达.....	57
3.5 CCT5 增强病毒聚合酶活性.....	57
3.6 CCT5 促进 NP 出核.....	59
4 讨 论.....	61
5 结 论.....	63
参考文献.....	65
附录 A	73
致谢	74

摘要

禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 属于正黏病毒科, 禽流感病毒属。禽类是禽流感病毒的易感宿主, 但部分亚型的禽流感病毒也可以感染人。在家禽中流行的部分 H5 亚型流感病毒属于高致病性禽流感 (High pathogenic avian influenza, HPAI), 对人类健康和禽类养殖业均带来严重威胁和巨大挑战, 因此, 研究并认识禽流感病毒致病机制, 对流感病毒防控具有重要理论指导意义。禽流感病毒与宿主蛋白之间的相互作用是病毒复制和致病的关键环节, 近 20 年来, 大量研究结果阐述了人源宿主因子在流感病毒生命周期中发挥关键作用。然而, 人们对禽源宿主因子在流感病毒复制过程中的作用了解甚少。对此, 本研究采用免疫沉淀-质谱联用法, 挖掘与流感病毒互作的禽源宿主因子, 结果发现鸡的 CCT5 蛋白 (一种含有 TCP1 亚基 5 的胞质伴侣蛋白) 与禽流感病毒 NP 和 PB2 有直接相互作用。进一步的研究表明, 病毒感染显著促进 DF-1(鸡胚成纤维细胞)内 CCT5 的表达水平, 上调的 CCT5 反过来促进 NP 蛋白的核输出, 进而促进禽流感病毒的增殖。综上结果, 显示禽类 CCT5 在支持禽流感病毒复制方面具有重要作用。

本课题的主要研究内容如下:

1. 免疫沉淀-质谱联用技术筛选与病毒蛋白互作的禽源宿主因子

本研究构建了 pCAGGS-HA-NP 质粒转染 DF1 细胞, 在用流感病毒 H5N6 感染表达了 NP 蛋白的 DF1 细胞后, 通过免疫沉淀技术特异性 NP 抗体垂钓互作蛋白, 利用 SDS-PAGE 电泳并进行银染, 找到差异蛋白, 并对差异蛋白条带进行蛋白质谱分析, 鉴定了 72 个潜在的 NP 蛋白互作宿主因子。与文献报道的 NP 互作蛋白进行筛查比对, 发现 CCT5, FARSA, MTHFD1L, NOP56 和 RUVBL1 五个蛋白有可能与 NP 蛋白互作。接下来本研究利用 siRNA 分别沉默这五个候选宿主因子, 检测其对流感病毒 NP 蛋白及 mRNA 含量的影响。结果显示, CCT5, FARSA, MTHFD1L 三个基因的沉默对流感病毒 NP 蛋白的表达都具有明显的抑制作用, 其中, CCT5 基因沉默对 NP/PA/PB2 表达量的抑制效果最为明显。

2. 构建 CCT5 表达质粒、验证 CCT5 与病毒结构蛋白的互作关系

实验中克隆了禽源 CCT5 基因, 并将其连接到 p3Xflag 载体上, 将其与 HA-NP/PB2 表达质粒共转染到 DF1 细胞中, 通过免疫共沉淀技术分别使用 HA, Flag

抗体相互垂钓并检验互作关系；单独表达 CCT5-Flag 蛋白感染病毒后使用内源性抗体 CCT5 和 NP/PB2 相互垂钓。同时免疫荧光技术验证了这一结果，CCT5 与 NP、PB2 蛋白无论是过表达还是在感染流感病毒条件下都会产生互作，因此有这样一种猜测，即 CCT5 可能是 NP、PB2 蛋白的配体，并参与流感病毒的复制过程。

3. 验证 CCT5 与流感病毒复制的关系

根据荧光定量的结果说明，si-CCT5 对流感病毒 NP、PA、PB2 蛋白的表达都具有明显抑制作用，使用流式分析方法后发现，CCT5 沉默的 DF1 细胞能够抑制带 GFP 荧光标记的 H5N6 流感病毒的复制，后续的结果表明，CCT5 的表达量随 H5N6 以及 H1N1(HM/DW)流感病毒感染时间以及感染梯度的增加而增殖，这说明流感病毒促进了 CCT5 的表达。当研究 CCT5 对流感病毒 RNA 生成的影响时，发现 CCT5 的沉默能够抑制流感病毒 RNA 的合成，反之，CCT5 表达能够促进流感病毒 RNA 的合成。为了进一步证实，实验采用间接免疫荧光实验证实 CCT5 与 NP 在细胞中存在共定位，并对 NP 蛋白的出核起到促进作用。

关键词：流感病毒；核蛋白 NP；聚合酶 PB2；胞质伴侣蛋白 CCT5；蛋白互作。

Abstract

Avian influenza virus (Avian influenza virus, AIV) are the part of the Orthomyxoviridae family and placed in the the genus of AIV. AIV occurs naturally among wild aquatic birds worldwide. While, AIV some subtypes of AIV also infect humans. Some H5 subtype influenza viruses prevalent in poultry are highly pathogenic AIV(HIPV), which is a major threat to public health and poultry breeding industry. Therefore, understanding the pathogenic mechanism of AIV has theoretical significance for influenza virus prevention and control. The interaction between AIV and host protein is the key part of virus replication and pathogenicity. In the past 20 years, lots of research have demonstrated that human host factors play a key role in the life cycle of influenza virus. However, little is known about the role of avian host factors in influenza virus replication. In this study, immunoprecipitation-mass spectrometry was used to detect the avian host factors that interact with influenza virus. It was found that chicken CCT5 protein (a cytoplasmic chaperone protein containing TCP1 subunit 5) directly interacted with AIV NP and PB2. Further studies showed that virus infection significantly promoted the expression of CCT5 in DF-1 (chicken embryo fibroblast DF1 cells), and the up-regulated CCT5 in turn promoted the nuclear output of NP protein, promoting the proliferation of AIV. The results show that avian CCT5 plays an important role in supporting AIV replication.

The main research contents of this topic are as follows:

1. Screening of interacting avian host factors by immunoprecipitation-mass spectrometry.

In this study, pCAGGS-HA-NP plasmid was constructed and transfected into DF1 cells. After expressing NP protein, DF1 cells were infected with influenza virus H5N6, and specific NP antibody fishing interaction proteins were detected by immunoprecipitation;. SDS-PAGE electrophoresis and silver staining were used to find differential proteins. 72 potential NP protein interaction host factors were identified by protein spectrum analysis. Compared with the NP interacting proteins published in the literature, it was found that CCT5, FARSA, MTHFD1L, NOP56 and RUVBL1 might interact with NP proteins. Then, siRNA was used to silence these five candidate host factors respectively to detect their roles on influenza virus NP protein and mRNA levels. The results showed that CCT5, FARSA, MTHFD1L silencing significantly inhibited the expression of influenza virus NP protein, among which CCT5 gene silencing had the most obvious inhibitory effect on NP/PA/PB2

expression.

2. Construct CCT5 expression plasmid and verify the interaction between CCT5 and viral structural protein.

In the experiment, the avian CCT5 gene was cloned and ligated to the p3Xflag vector, and co-transfected with the HA-NP/PB2 expression plasmid into DF1 cells, the HA, Flag antibody were used to fish each other and the interaction was tested by immunoprecipitation technique. The endogenous antibodies CCT5 and NP/PB2 were used to fish each other after the virus was infected with CCT5-Flag protein alone. Meanwhile, this result was verified by immunofluorescence technique. CCT5 interacted with NP and PB2 proteins either overexpressed or infected with influenza virus, so there is a guess that CCT5 may be the ligand of NP and PB2 proteins and participate in the replication process of influenza virus.

3. To verify the relationship between CCT5 and influenza virus replication.

Considering the fluorescence quantitative results showed that si-CCT5 could significantly inhibit the expression of NP, PA and PB2 proteins of influenza virus. After using flow analysis, it was found that DF1 cells silenced by CCT5 could inhibit the replication of H5N6 influenza virus with GFP fluorescence labeling. The subsequent results showed that the expression of CCT5 proliferated with the increase of infection time and infection gradient of H5N6 and H1N1 (HM/DW) influenza virus. This indicates that influenza virus promotes the expression of CCT5. When studying the effect of CCT5 on influenza virus RNA production, it is found that CCT5 silencing can inhibit influenza virus RNA synthesis. On the contrary, CCT5 expression can promote influenza virus RNA synthesis. Furthermore, indirect immunofluorescence assay confirmed the co-localization of CCT5 and NP in cells, and promoted the nucleation of NP protein.

Key words: influenza virus; nuclear protein NP; polymerase PB2 protein; cytoplasmic chaperone protein CCT5; protein interaction.

缩略语表 (Abbreviation)

英文缩写 Abbreviations	英文全称 English Name	中文全称 Chinese Name
293T	Human embryonic kidney cell	人胚胎肾细胞
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
Cas	CRISPR-associated proteins	CRISPR 相关蛋白
CCT5	chaperonin containing tcp1 subunit 5	含 TCP1 亚基 5 的伴侣蛋白
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	成簇间隔规律短回文重复
cRNA	Complementary RNA	互补的 RNA
DF1	chicken embryo fibroblasts DF1 cell	鸡成纤维细胞
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	Deoxyrinediamine triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DSB	Double strand break	双链断裂
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IAVs	Influenza A virus	A 型流感病毒
kb	Kilo-base pair	千碱基对
kD	Kilodalton	千道尔顿
KOs	Knock out cell lines	敲除细胞系
LB	Luria broth	LB 培养基
lncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
M	Molar mass	摩尔质量
M1	Matrix protein 1	基质蛋白 1
M2	Matrix protein 2	基质蛋白 2
mA	Milliampere	毫安
MDCK	Madin-Darby canine kidney	犬肾细胞
mg	Milligram	毫克
min	Minute	min

mL	Milliliter	毫升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mol	Mole	摩尔
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
ng	Nanogram	纳克
nm	Nanometer	纳米
NP	Nucleoprotein	核蛋白
NS1	Non-structural protein 1	非结构蛋白 1
NS2	Non-structural protein 2	非结构蛋白 2
PA	Polymerase acid protein	聚合酶酸性蛋白
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PB1	Polymerase basic protein 1	核糖碱性蛋白 1
PB2	Polymerase basic protein 2	核糖碱性蛋白 2
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
polybrene	Hexadimethrine bromide	聚凝胺
Puro	Puromycin	嘌呤霉素
r/min	Revolutions Per Minute	每 min 转速
rcf	Relative centrifugal force	相对离心力
RdRp	RNA dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNA pol II	RNA polymerase II	RNA 聚合酶 II
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
RNase A	Ribonuclease A	核糖核酸酶 A
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
sec	Second	秒
sgRNA	Singe guide RNA	单链向导 RNA

siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
-sRNA	Negative-sense single-stranded RNA	单股负链 RNA
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA	三羟甲基氨基甲烷、乙酸和 乙二胺四乙酸
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
Tris	tir (Hydroxymethyl) Aminomethane	三(羟甲基)氨基甲烷
vRNA	Viral RNA	病毒 RNA
vRNP	Viral ribonucleoprotein	病毒核糖核蛋白
μg	Microgram	微克
μl	Microliter	微升
μm	Micron	微米

1 前言

1.1 问题的由来

流感病毒（IV）是一种重要的人兽共患病病原，是一种在世界各地的人和动物中流行的病原体(Arranz et al 2012)，能够感染哺乳动物以及禽类，给人类的健康以及畜禽的生产经营带来威胁，并且根据抗原性的不同，流感病毒被分为 A 型流感病毒，B 型流感病毒，C 型流感病毒三种类型(Yuanji and Desselberger 1984, Webster et al 1992, Osterhaus et al 2000)。根据神经氨酸酶(NA)和血凝素（HA）存在的差异，又将流感病毒分为很多不同的亚型，目前已知有 18 种 HA 亚型和 11 种 NA 亚型(Kolbourne 1968;Fouchier et al 2005)。其中，A 型流感病毒 Influenza A virus (IAV)是引起人与动物流感的重要病原体，禽类是流感病毒的自然宿主，流感病毒的各类亚型均可在禽类中追溯到源头(Igarashi et al 2008, Dong et al 2020)，其中 H5N6 流感病毒对禽类具有高致病性，给禽类养殖业造成重大打击，同时存在对人类致死的案例，例如 1918 年的“西班牙流感”造成全球高于 2.5%的致死率，以及 1997 年香港报告的 H5N1 病毒感染人的案例(Wu et al 2017, Lee et al 2018)，因此对流感病毒开展研究有着重要意义。禽类动物作为流感病毒的重要自然宿主，在流感病毒重配、进化及传播中发挥重要作用，水禽是 A 型流感病毒最主要的天然病毒库(刘秀梵 2004)。但目前，流感病毒与禽源的宿主因子之间相互作用的研究很少，禽流感病毒如何利用及利用哪些禽源宿主因子完成复制，同时禽源宿主因子如何限制禽流感病毒感染等重大科学问题都等待着被深入挖掘和研究。

1.2 文献综述

1.2.1 H5N6 流感病毒流行性

自 1996 年以来，H5N1、H5N6、H9N2、H5N2 和 H7N9 等禽流感的频发，并且跨越种属间屏障感染人群，对人类造成持续性的威胁，禽流感的研究受到科学家们的高度重视(Salzberg et al 2007, Josset et al 2014)。H5 亚型流感病毒中，H5N6 最早是在 1971 年，从美国绿头鸭体内分离到。到我国 2013 年陆续有报道分离到 H5N6 亚型的禽流感病毒，于 2014 年开始，出现人感染 H5N6 流感病毒并死亡的案例，从此人感染 H5N6 流感病毒的案例陆续发生(Dong et al 2020)。鸟类，特别是水禽，在

保留和传播流感病毒方面发挥核心作用(Hird et al 2018)。H5N6 流感病毒已成为禽类的高致病性病毒,并对水产养殖业造成重大打击,甚至导致人类死亡(Bi et al 2016)。根据调查人们发现,患者多与活禽有过接触。因此,该病毒存在威胁人类健康的趋势,进一步展开对 H5N6 流感病毒的研究很有必要。

1.2.2 流感病毒的结构

流感病毒是正粘病毒科,流感病毒属,多形性单链负链 RNA 病毒,其含有的八个分节段的基因片段(Gamblin and Skehel 2010, Araki et al 2018),每一个节段可以编码一至两种蛋白,其中有十种病毒必需蛋白(Muramoto et al 2013, Rajao et al 2018),分别为 NP, PB1, PB2, PA, NS1, NS2, M1, M2, HA, NA, 这些病毒必需蛋白功能多样,HA(血凝素)是流感病毒吸附和穿膜的关键,与流感病毒的致病性和宿主特异性有着密切的联系(Vogel 1998, Steinhauer 1999)。NA(神经氨酸酶)与 A 型流感病毒的复制有关,参与病毒融合靶细胞细胞膜和病毒粒子的释放过程(Harris et al 2006)。M1 参与 RNA 的核输出以及病毒出芽(Baudin et al 2001); M2 影响离子通道活性,参与病毒的组装。NS1 主要功能在于抑制宿主的免疫反应,直接调控流感病毒复制的生命周期(Chien et al 2004)。NS2(核输出蛋白 NEP)与病毒在宿主细胞上的生长适应有关(Sasaki et al 2015)。PB2, PB1, PA 能够组装成异源三聚体复合物,即流感病毒 RNA 聚合酶(Muramoto et al 2013, Vidic et al 2016)。

NP 蛋白是流感病毒非常重要的一种多功能结构蛋白,分子量约有 56KD,能够包被病毒基因组,与病毒的其他结构蛋白产生互作(Albo et al 1995, Liao et al 2010),参与病毒的转录、复制以及病毒的包装(Dowdle et al 1975, Hsiang et al 2009),介导 RNP 的出核和入核的过程(Portela and Digard 2002),在形成子代的病毒粒子的过程中, NP 蛋白能够与 PA、PB1、PB2 蛋白以及病毒 vRNA 包裹在一起,重配产生新的病毒粒子(Mena et al 1999)。另外 NP 蛋白能够与宿主蛋白互作(Gorlich et al 1995, Portela and Digard 2002, Ozawa et al 2007),可以与宿主细胞的 actin、核输出因子以及其他蛋白因子相结合。根据 NP 蛋白这一特点,采用 NP 蛋白垂钓宿主蛋白,对于流感病毒宿主蛋白互作研究具有积极意义。流感病毒粒子结构图和电镜图,如图 1-1 所示(Nayak et al 2013)。

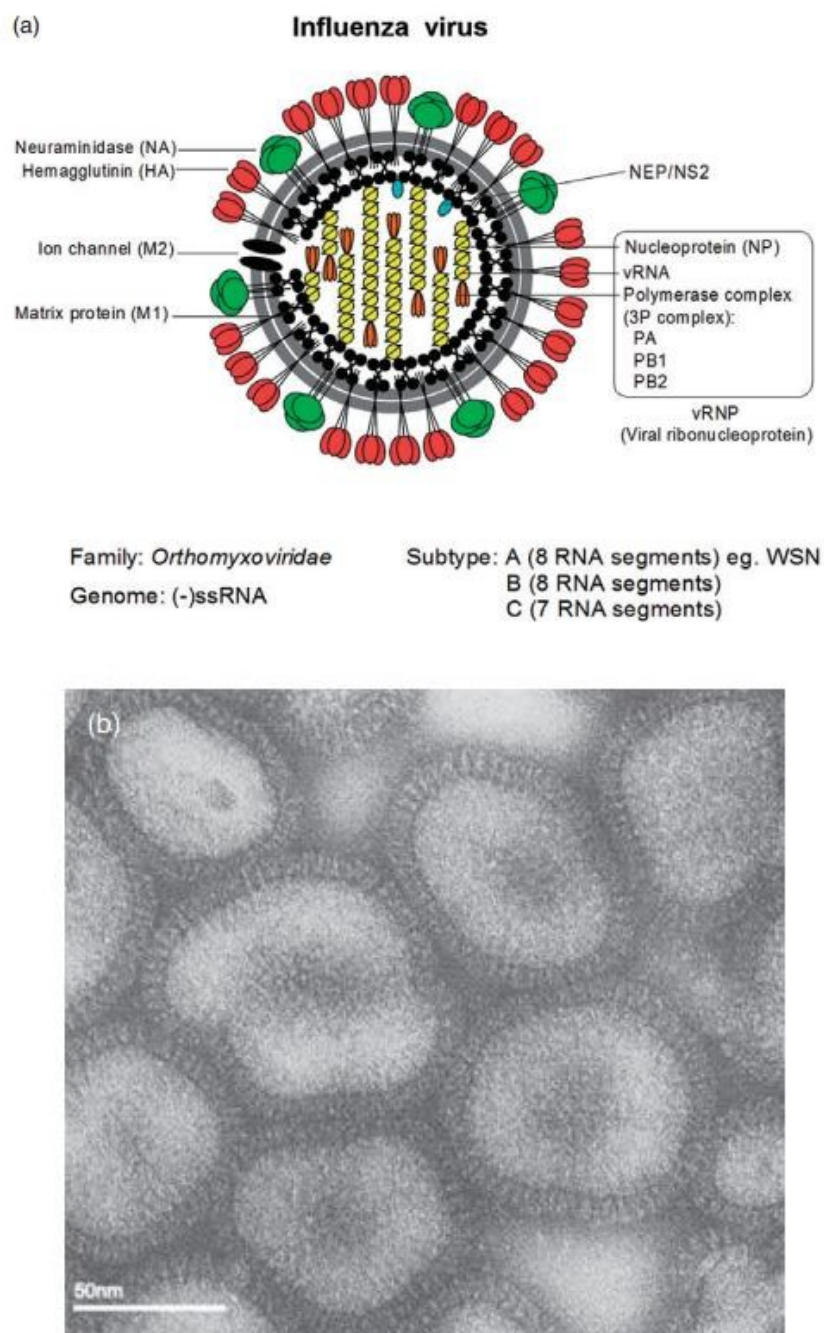


图 1-1 A 型流感病毒粒子结构示意图(a)和电镜图(b)(Nayak et al 2013)

Fig. 1-1 Schematic diagram and electron microscope diagram of particle structure of influenza A virus (Nayak et al 2013)

1.2.3 流感病毒的生命周期

流感病毒在宿主体内通过呼吸道吸附侵入，与宿主体内的受体分子结合，这些受体分子对于人而言分布在呼吸道上皮细胞表面，对于水鸟和家禽而言则分布在肠道，极易通过粪便传播，导致流感病毒跨种传播和再适应(Roebke and Danthi 2019)。

病毒与宿主细胞表面受体结合后，会以内吞的形式进入细胞内部，释放病毒核糖核蛋白复合物（vRNP），vRNP 复合物在 NP 蛋白的作用下，进入细胞核中，合成病毒 RNA(Klumpp et al 1997, Klemm et al 2018)。

在宿主细胞核内合成子代病毒的过程如下：vRNA 在细胞核内会合成病毒 mRNA，cRNA(Akarsu et al 2003)，为病毒子代 RNA 提供翻译功能和模板，生成的 RNA 与 NP 蛋白和病毒聚合酶复合物共同作用下，出核进入细胞质，利用核糖体，高尔基体等细胞器翻译出病毒蛋白。病毒 RNP 与其他蛋白组分共同组装成子代病毒粒子(Klumpp et al 1997, Baudin et al 2001)，经细胞膜出芽释放。病毒 RNP(VRNP)复合体是 IAV 转录和复制的基本单位，它由单链负义基因组 RNA、多个拷贝的病毒核蛋白(NP)和由 PB1、PB2 和 PA 组成的 RNA 聚合酶复合体组成(Fournier et al 2012, Li et al 2014, Te Velthuis and Fodor 2016)。流感病毒复制周期示意图见图 1-2(Mubareka and Palese 2011)。

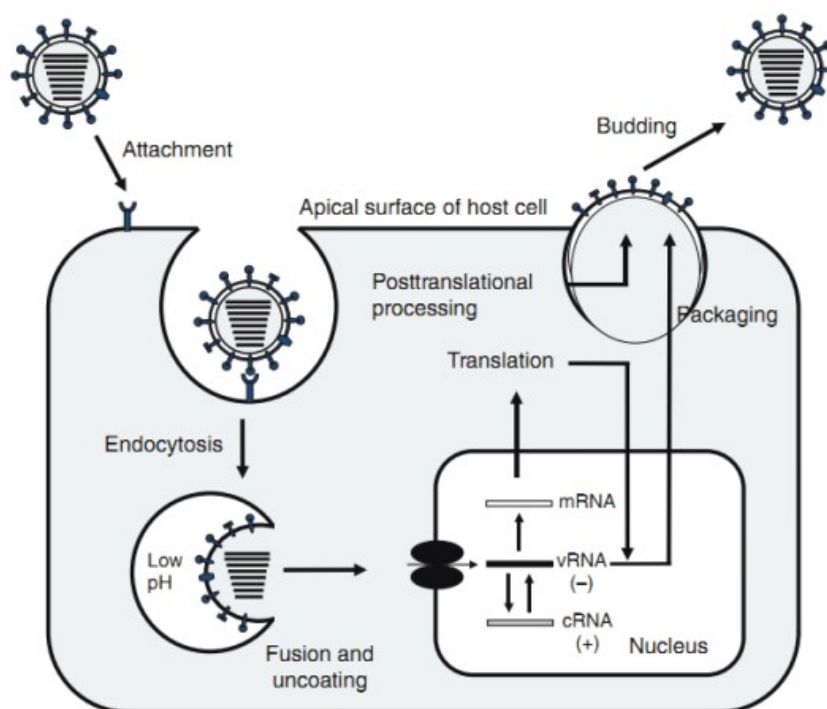


图 1-2 流感病毒复制周期(Mubareka and Palese 2011)

Fig1-2 Model of influenza virus replication cycle. (Mubareka and Palese 2011)

1.2.4 流感病毒与宿主蛋白互作研究现状

虽然禽类和哺乳动物拥有很多保守的基因，但是二者之间的基因组存在差异，且禽类与哺乳动物在抗病毒免疫上有很大不同。众所周知，相比哺乳动物来说，禽

类拥有法氏囊和哈氏腺，禽类不通过 RIG-I 途径介导抗病毒免疫，且二者在介导抗病毒天然免疫上也有很多不同功能的抗病毒分子、细胞因子等(Wang et al , Kaiser et al 2005, Boyd et al 2007, Lynn et al 2007, Temperley et al 2008)。

目前，大部分流感病毒的相关研究，主要围绕流感病毒与哺乳动物宿主蛋白互作展开，而对禽流感病毒与禽源宿主细胞互作研究相对较少。在过去的十年中，科学家们通过 RNAi 筛选、酵母双杂交分析和免疫沉淀试验结合液相色谱-串联质谱等多项实验技术联合应用进行互作蛋白领域的探究，大量的人为因素与流感成分发生了动态的相互作用(Stertz and Shaw 2011, Roux et al 2012, Stynen et al 2012)。值得注意的是，宿主因子阻止或促进 NP 合成到细胞核，可以极大地促进或限制病毒复制(Görlich et al , Görlich and Kutay 1999)。然而，关于禽类宿主因子与流感病毒 NP 相互作用的研究还很有限，实验方法和众多宿主因子的作用机制等问题仍有待继续研究。

1.2.5 宿主因子对流感病毒的影响

流感病毒整个生命周期，离不开宿主的支持，为了产生子代病毒粒子，流感病毒需要劫持宿主功能来完成病毒 RNA 和蛋白质的合成(Jackson et al , Herz et al 1981)。流感病毒在感染宿主细胞时，不仅需要依靠自身蛋白发挥功能，还需要宿主细胞内的生物学过程，通过与宿主因子相互作用，利用宿主细胞内的能量，脂质，蛋白质等物质，创造利于自身复制的环境(Fournier et al 2012)。宿主因子直接或间接对禽流感病毒的调控大体可以分为以下几类：病毒复制早期阶段、病毒基因组的复制转录、病毒蛋白在细胞内的定位、vRNP 的组装和转运。例如已有的相关报道证明：流感病毒蛋白 PB2 能与 MAVS 互作拮抗宿主 I 型干扰素反应(Graef et al 2010)；PB1-F2 与 NLRX1 的直接结合能够抑制线粒体介导的细胞凋亡(Jaworska et al 2014)；流感病毒 NP 蛋白与宿主蛋白 PLSCR1 结合并互作，抑制 NP 和 vRNP 入核，进而抑制流感病毒的增殖(Luo et al 2018)。相反，宿主因子还可以通过影响转录和翻译过程，达到影响流感病毒复制的作用，例如 MicroRNA-340 作为转录后调节因子，通过介导翻译抑制和 mRNA 降解，对抗免疫因子而促进病毒复制(Zhao et al 2019)。正是由于宿主因子对流感病毒整个生命周期产生的影响，使得寻找参与流感病毒复制的宿主因子对更全面地掌握流感病毒复制机制具有重要意义，流感病毒与宿主因子互作网络如图 1-3 所示(Brass et al 2009)。因此，为了更好地了解病毒成分是如何协

同和利用宿主细胞生物学过程的, 对于阐明流感发病机制和开发新型抗病毒药物至关重要。

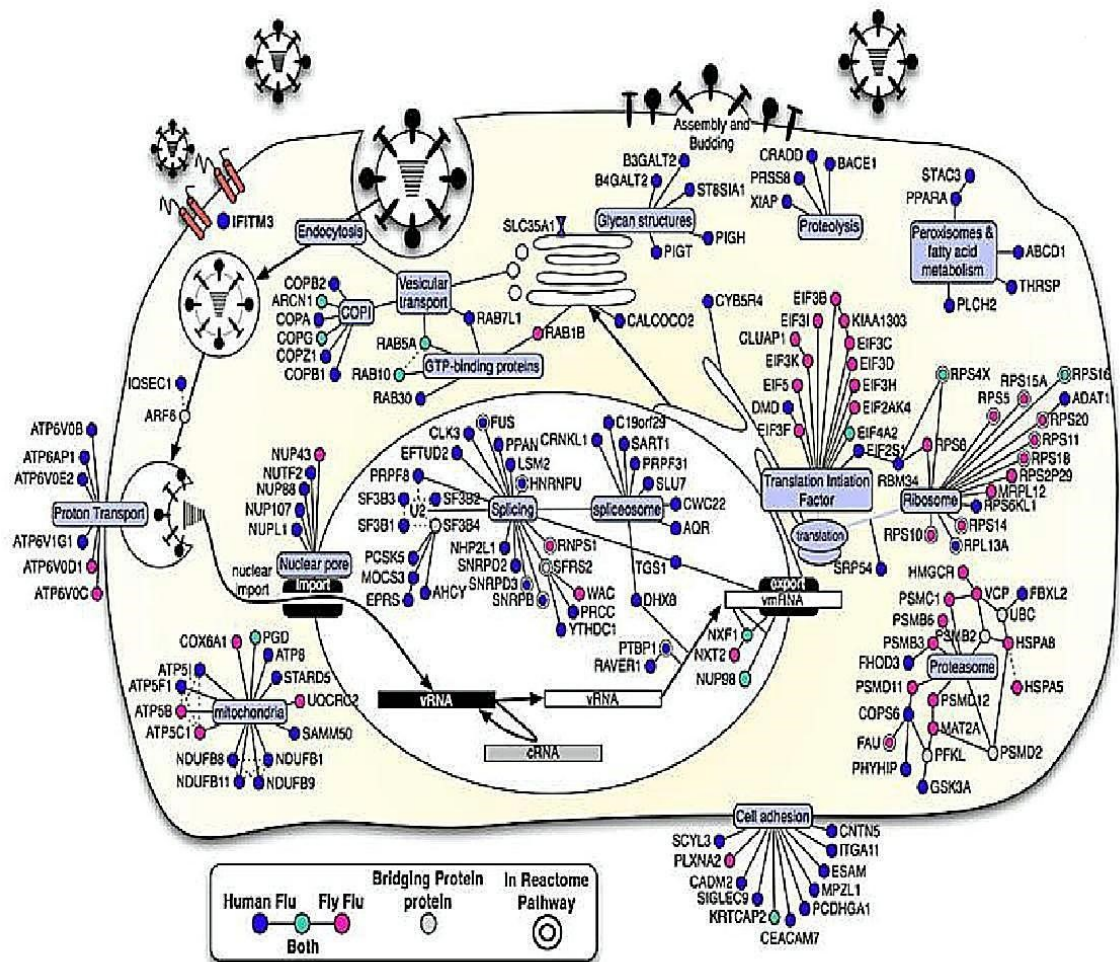


图 1-3 流感病毒与宿主因子互作网络(Brass et al 2009)

Fig. 1-3 Interaction network between influenza virus and host factors(Brass et al 2009).

1.2.6 含 TCP1 的胞质伴侣蛋白 CCT5

TCP1 复合物 (TRiC) 又称含 t-复合物多肽 1(CCT) 的胞浆伴侣蛋白, 是一种 ATP 依赖性的分子伴侣蛋白, 负责新生多肽的高效折叠(Rothman 1989, Broadley and Hartl 2009), 参与细胞中的蛋白质折叠, 从而调节许多流感病毒复制相关的蛋白质表达和细胞周期(Yao et al 2019)。蛋白质折叠在基因表达中起着重要作用(Melville et al 2003)。TRiC 由两个对称环组成, 每个环由 8 个平行的亚基($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta-1$ 或 $\zeta-2, \eta$ 和 θ 由 TCP1、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT6A 或 CCT6B、CCT7 和 CCT8 编码)组成(Kubota et al 1995)。此外, TCP1 亚基的下调导致细胞增殖抑制和细胞周期停滞(Liu et al 2005)。据报道, TCP 的下调还与恶性肿瘤和神经退行性疾病有关,

因为 TCP 的亚单位可以通过减少错误折叠蛋白来阻止疾病的进展(Zhao et al 2016)。因此, 阐明 TCP 的功能和机制具有重要意义。

TCP1 的胞质伴侣蛋白亚基 5 (CCT5) 是本实验研究的宿主蛋白, 属于伴侣蛋白家族(chaperonin, Cpn), 以依赖 ATP 的方式可以引导错误折叠的蛋白转变为天然状态(Hartl 1996), 在维持细胞活性过程中起到重要作用。据研究显示, 伴侣蛋白主要分为两类: 一类是主要存在于原核生物和线粒体等细胞器的内部, 一类是主要存在于古细菌和真核细胞细胞质中(Gao et al 2017)。已知 CCT5 具有很高的 ATP 结合亲和力和抑制突变体蛋白聚集的作用(Reissmann et al 2012, Darrow et al 2015), 甚至, CCT5 在肿瘤组织中表达, 可能通过抑制抑癌蛋白 (TSPs) 的功能影响宿主自身抗体反应而参与肿瘤发展。

胞内寄生的病毒在复制增殖时, 伴随着大量流感病毒蛋白和宿主蛋白加工折叠的过程, 需要借助宿主的蛋白加工修饰系统, 已有相关研究证实某些病毒会利用宿主体内的伴侣蛋白合成或加工流感病毒蛋白并影响流感病毒复制。例如伴侣蛋白家族中的 CCT β 亚基能够与流感病毒 PB2 蛋白互作, 作为 PB2 的配体, 参与 RNA 三聚体复合物的合成, 在流感病毒生命周期中发挥重要作用(Fislova et al 2010); 伴侣蛋白 CCT5 可以与病毒非结构蛋白 NS5B 结合, 参与 HCV 的基因组复制过程(Inoue et al 2011)。因此 CCT5 作为一种重要的宿主伴侣蛋白, 研究流感病毒与禽源宿主因子 CCT5 的关系, 可以发掘禽源 CCT5 蛋白的更多功能, 特别是有利于对病毒利用宿主细胞伴侣素的机制等问题进行进一步的探究, 也为流感病毒的防治工作探索新的方向。

1.2.7 RNAi 筛选、免疫沉淀试验结合液相色谱-串联质谱技术简介

尽管有很多方法可以用以分析蛋白质与蛋白质间的相互作用, 但免疫共沉淀 (CO-IP) 仍然是发现新型蛋白质相互作用, 或者确定蛋白质之间物理关联的最经典且常用的方法之一。免疫沉淀需要在裂解缓冲液中制备总细胞或组织裂解物, 使用特异性抗体捕获裂解物中的目标蛋白, 并使用树脂或磁珠将抗体与结合的蛋白一起沉淀下来。经过一系列洗涤去除裂解物中残余的未结合的蛋白质后, 将获得的免疫复合物进行裂解或变性处理, 进一步使用免疫印迹, 凝胶内蛋白质染色或质谱分析, 可以确定目标蛋白与其他蛋白之间是否存在相互作用关系(Tang and Takahashi 2018)。免疫沉淀 (IP) 是一种利用目标蛋白特异性抗体与 Protein A/G 亲和力珠结合使用的

方法，基于抗原和抗体间的特异性结合的原理，是鉴定与特异性蛋白相互作用的分子的强大工具。因此，CO-IP 被认为是鉴定或确认体内蛋白质相互作用的标准方法之一。联合 IP 实验可以通过直接或间接相互作用或在蛋白质复合物中鉴定蛋白质 (Lin and Lai 2017)。质谱技术是蛋白鉴定方面的重要技术，液相色谱串联质谱 (LC/MS) 技术因具有的高选择性，灵活性和快速的优势，使它们在定量和定性蛋白质表征中得到广泛的应用，LC/MS 分析常被用于蛋白质分析 (Qu et al 2017, Sugimoto et al 2018)。

所有病毒的复制都需要依赖宿主细胞，尤其是流感病毒这样的 RNA 病毒，由于基因组很小，编码能力有限，通过 RNA 干扰实验下调特定基因的 mRNA，可以对编码蛋白功能测定进行查询 (Stertz and Shaw 2011)。双链 RNA 介导的干扰 (RNAi) 是一种沉默多种生物中基因表达的简单快速的方法。基因沉默是 RNA 降解的结果，可以激活核糖核酸以靶向同源 mRNA 的短 RNA。广泛的遗传和生化分析揭示了 RNAi 诱导基因沉默的两步机制。第一步涉及通过 RNase III 样活性将 dsRNA 降解为 21 至 25 个核苷酸长的小干扰 RNA (siRNA)。第二步，siRNA 加入 RNase 复合物 RISC (RNA-诱导的沉默复合物)，作用于同源 mRNA 并使之降解。过程中产生的聚合酶、解旋酶、核酸内切酶等，还可以通过该过程加工许多 microRNA 等非编码 RNA 来控制许多生物的发育。由于 RNAi 具有出色的特异性和高效率，RNAi 被认为是功能基因组学的重要工具 (Downward 2004)，在针对宿主相关基因 mRNA 的基因特异性处理上发挥重要作用，可以利用并设计针对宿主基因组某个基因的小干扰 RNA (siRNA)，沉默该基因的表达，降低蛋白表达量而不影响其他不存在相互作用关系的宿主因子表达，从而可以起到鉴定在流感病毒复制周期中，与被沉默的宿主因子相互作用的蛋白，以及宿主蛋白对流感病毒复制起到那些作用，具有重要的启示意义。

1.3 目的意义

本研究使用免疫沉淀联合质谱技术，通过质谱技术高通量挖掘与禽流感病毒 NP 蛋白存在相互作用关系的宿主蛋白，主要目的在于针对所选的宿主因子，在调控流感病毒的几大方面开展研究，筛选并验证所得宿主蛋白 CCT5 与病毒结构蛋白之间存在的互作关系，结合 si-RNA 沉默宿主因子检测聚合酶活力，并通过荧光定量 PCR 和 Western blot 检测病毒 mRNA、vRNA、cRNA 的表达水平，从蛋白质以及 RNA 水

平探究该蛋白如何调控流感病毒复制。本实验采用的筛选和验证与流感病毒结构蛋白互作的宿主蛋白的方法,可以为宿主蛋白方面的研究提供帮助。

禽流感作为兽医学、病毒学和预防兽医学共同关注的领域,研究禽流感病毒结构蛋白与宿主因子的相互作用具有重要意义。当前大规模筛选技术的提升,为筛选与流感病毒蛋白互作的宿主因子创造了有利条件。为了丰富宿主蛋白在流感病毒复制中所起作用的研究,加深人们对于流感病毒复制的认知,针对禽源宿主开展的互作宿主因子的挖掘,寻找并验证能够调控流感病毒复制的禽源宿主蛋白的系列实验,有利于进一步探究禽流感病毒如何利用禽源宿主因子完成其复制等重大科学问题,发现哺乳动物和禽类在调控流感病毒复制中的差异,有利于理解禽流感病毒在禽宿主主体内的致病机制,为在源头控制禽流感奠定理论基础。

2 材料和方法

2.1 材料来源

2.1.1 细胞与毒株

人胚胎肾细胞 (HEK293T)、鸡胚成纤维细胞 DF-1 细胞系和 Madin-Darby 犬肾 (MDCK)均由本实验室保存。

流感病毒毒株 A/duck/Hubei/WH18/2015 (H5N6), A/duck/Hubei/Hangmei01/2006 (HM, H5N1), and A/chicken/Hubei/327/2004 (DW, H5N1)均由本实验室保存。

本研究按照先前的方法构建了绿色荧光蛋白(GFP)重组 H5N6 病毒(Perez et al., 2013)。所有病毒均用 10 日龄的鸡胚扩增,并保存在本实验室。

2.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

p3XFlag、pCAGGS-HA 均由本实验室保存, CCT5-Flag, HA-CCT5, HA-NP 质粒由本实验室构建。

2.1.3 抗体

CCT5 兔多克隆抗体、鼠单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; NP/PB2 多克隆抗体, β -actin 兔多克隆抗体购自中国武汉 ABclonal 生物科技有限公司; 鼠二抗、兔二抗均购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

2.1.4 引物及 siRNA

实验所用引物由北京 TSingKe 生物科技有限公司(武汉)合成, siRNA 由吉玛基因生物公司合成。主要引物序列如表 2-1 所示。

表 2-1 主要引物序列

Table 2-1 The sequence of primers

名称	序列
CCT5-Flag-F	AAAGGTACCATGTCGGCCATGGGGACGCTGG
CCT5-Flag-R	TTTGGATCCCTCTTCAGATTCTCCAGGCCTA
NP-HA-F	AAAGAATTCATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG
NP-HA-R	TTTCTCGAGTTATTTTCTGCACTACGCAGGG
PB2-HA-F	GAGCTC ATGAACAGAATAAAGGAACTAAG
PB2-HA -R	TTTCTCGAG TTATTTTCTGCACTACGCAGGG
CCT5-HA-F	AAAGAATTCATGTCGGCCATGGGGACGCTGG
CCT5-HA-R	TTTCTCGAGCTCTTCAGATTCTCCAGGCCTA
Lenti F	GCTTGGTAGGTTTAAGAATA
Lenti R	GTCCTGTGTTCTGGCGGCAA
RUVBL-RT-F	CATGAAGATCGAGGAGGTGAAG
RUVBL-RT-R	CAGCCATCTTCTTGCTTTTGAT
CCT5-RT-F	GGCTCTCAAGTCTCACATCAT
CCT5-RT-R	ACCATCATCTTATCCAAGCCAT
FARSA-RT-F	AGGTGATCGAGGCAGAGA
FARSA-RT-R	CTTCATGGCGTCGCTTTG
MTHFD1L-RT-F	AAATCTTTGGCCTCTCTGAAGA
MTHFD1L-RT-R	CATTTCTTGAACCAAAGGAGCA
NOP56-RT-F	TCATCAACATCGAGAGCTTCTC
NOP56-RT-R	GATGAAGGTGGAGTGGAAGATG
DW-NP-RT-F	AACGACCGGAATTTCTGGAGAGG
DW-NP-RT-R	CCGTACACACAAGCAGGCAAGC
HM-NPRT-F	AGTGGCCAGTGGATATGACTTT
HM-NPRT-R	TGCCATCCACACTAATTGACTC
通用 NP-RT-F	CAACCATTATGGCAGCAT
通用 NP-RT-R	CTCCGAAGAAATAAGATCCT
通用 PB2-RT-F	CAAGGAGACGTGGTGTGTAAT
通用 PB2-RT-R	CTAATTGATGGCCATCCGAATT
通用 PA-RT-F	CTATATGAAGCAATTGAGGAG
通用 PA-RT-R	TGGACAGTATGGATAGCAAAT
ACTIN-RT-F	AAATTGTGCGTGACATCAAGGA
ACTIN-RT-R	AGGCAGCTGTGGCCATCTC
H5N6-RT-F	AACGACCGGAATTTCTGGAGAGG
H5N6-RT-R	TACACACAAGCAGGCAAGCCCG
oligo(dT)18	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
cRNA	CCTTGTTTCTACT

vRNA (uni12)	AGCAAAAGCAGG
FARSA-chicken-1	GCUGCUAGAAGUCACUCUUTT AAGAGUGACUUCUAGCAGCTT
FARSA-chicken-2	GGAACUUUGAUGCCCUCUUTT AAGAGGGCAUCAAGUUCCTT
FARSA-chicken-3	GGAGGUCUUCAGCUACCAUTT AUGGUAGCUGAAGACCUCCTT
MTHFD1L-chicken-1	GCUAUUAUCCAGGCACAUATT UAUGUGCCUGGAUAAUAGCTT
MTHFD1L-chicken-2	CCACCAGUCUGAAGGAUAUTT AUAUCCUUCAGACUGGUGGTT
MTHFD1L-chicken-3	CCAAAUUACUCAGCUCUUUTT AAAGAGCUGAGUAAUUUGGTT
NOP56-chicken-1	GGGCCAAGGUGAAGUUCAATT UUGAACUUCACCUUGGCCCTT
NOP56-chicken-2	CCCUGUUCAGGGCUUUGAATT UUCAAAGCCCUGAACAGGGTT
NOP56-chicken-3	GCAAGAACCUGGAGGUCAUTT AUGACCUCAGGUUCUUGCTT
RUVBL1-chicken-1	GCACUGGAAUCUUCUAUUUTT AAAUAGAAGAUUCCAGUGCTT
RUVBL1-chicken-2	GCUGAAGAGUAUGUCCUUTT AAGGAACAUAUCUCUUCAGCTT
RUVBL1-chicken-3	GGAUGUAGUGUCUCCUCAUTT AUGAGGAGACACUACAUCCTT
CCT5-chicken-1	GCAAGUACUCUGAGAACAUTT AUGUUCUCAGAGUACUUGCTT
CCT5-chicken-2	GCACAACGAAGGACAGAAUTT AUUCUGUCCUUCGUUGUGCTT
CCT5-chicken-3	GCAGAUGCCUUGGAGGUAATT UUACCUCCAAGGCAUCUGCTT

2.1.5 主要酶、试剂及试剂盒

T4 DNA Ligase, 1.1×T3 Super PCR Mix 购于北京擎科（武汉）生物有限公司；核酸分子量标准物 Trans 2K Plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

各种限制性内切酶 Kpn1、BamH1、EcoRI、Xho I、Sac I 以及 T4 DNA 连接酶、分子量标准及高保真 Taq 酶 primerstar, 反转录酶 AMV Reverse Transcriptase XL, RNase inhibitor, oligodT (18) 均为大连宝生物公司产品。

细胞总 RNA 提取试剂盒购自 Magen 公司。

lipofectamine2000 (lip2000) 购自美国 Invitrogen 公司；
 lipo 8000 (lip8000) 购自碧云天生物技术公司；
 7.5% BSA 购自北京索莱宝科技有限公司；
 0.25%胰酶 (EDTA)、青霉素及链霉素均购自吉诺生物医药有限公司；
 Western 及 IP 细胞裂解液、银染色试剂盒 (P0017S)，细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (P0028) 均购自碧云天生物技术公司；
 蛋白定量用 G250 染色液购于 TAKARA 公司；
 荧光定量染料 SYBR Green Master (Rox) 购自罗氏；
 胰蛋白胨、酵母粉及琼脂粉均购自生工生物工程有限公司；
 Gen Clean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司；
 细胞增殖-毒性测定试剂盒 (CCK-8 试剂盒) 购自 Dojindo Molecular；
 细胞基因组 DNA 提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司；
 双萤光素酶报告基因检测试剂盒 (货号：11402ES60)，购自上海翊圣生物科技有限公司。
 质粒提取试剂盒 Easy Pure Plasmid MiniPrep Kit 购自全式金生物技术有限公司。
 琼脂糖凝胶回收试剂盒 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (货号：D2500-02)，质粒小提试剂盒 E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Mini Kit II (货号：D6948-02)，购自 Omega Bio-Tek 公司。
 无内毒素大量质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司；
 Trizol Reagent (货号：15596026)，购自北京索莱宝生物有限公司。

2.1.6 主要培养基及其配制

胎牛血清购自 Gibco 公司，使用前经 56℃ 灭活 30min；
 细胞培养基 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)，无血清培养基 Opti-MEM 和 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司；
 DMEM 高糖培养液：DMEM 高糖培养液 445 mL，胎牛血清 50 mL，双抗 5 mL。混匀后分装成 200 mL 于 4℃ 保存。
 PBS 购自美国 HyClone 公司；
 LB 液体培养基：称取胰蛋白胨 10.0 g，酵母粉 5.0 g，NaCl 5.0 g，加入 800 mL ddH₂O，充分搅拌溶解，用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0-7.2，定容至 1,000 mL，高

压灭菌后室温保存备用；

LB 固体培养基：在 LB 液体培养基中，加入琼脂粉至终浓度为 1.5%，高压灭菌后，待溶液冷却至 50℃时，加入所需抗生素后倒平皿，凝固后 4℃保存备用。

50×TAE 缓冲液：称取 Tris 242 g 及 Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g，加入 800 mL 的去离子水，充分搅拌溶解；然后加入 57.1 mL 的醋酸，充分混匀；再加去离子水定容至 1,000 mL，室温保存。

5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液：称取甘氨酸 94.0 g、Tris-base 15.1 g 及 SDS 5.0 g，加入约 800 mL 的去离子水，充分溶解后，定容至 1,000 mL，室温保存备用。

转膜缓冲液：称取甘氨酸 14.4 g 及 Tris-base 3.0 g，加入约 600 mL 去离子水，充分溶解后，定容至 800 mL，加入 200 mL 甲醇，现配现用。

10×TBST 缓冲液：称取 NaCl 88.0 g 及 Tris-base 24.2 g，加入 800 mL 去离子水，充分溶解后，加入 5 mL Tween-20 及 10 mL 浓盐酸充分混匀，定容至 1,000 mL，4℃保存备用。

Western blotting 封闭液：称取 5 g BSA 溶解于 100 mL TBST 中，4℃保存备用。

10% SDS：称取 SDS 粉末 25g 溶解于蒸馏水中，定容至 250ml。

30%聚丙烯酰胺：称取聚丙烯酰胺 145g，甲叉 5g 到蒸馏水中，使用磁力搅拌器搅拌溶解，定容至 500ml，滤纸过滤去除杂质后 4℃避光保存。

Tris 缓冲液（pH 6.8, 1.0mol/L）：称取 Tris Base 121.91g 溶解到蒸馏水中，调节 pH 到 6.8，定容至 1L，过滤去除杂质后 4℃保存。

Tris 缓冲液（pH 8.8, 1.5mol/L）：称取 Tris Base 91.43g 溶解到蒸馏水中，调节 pH 到 8.8，定容至 500ml，过滤去除杂质后 4℃保存。

2××SDS Loading Buffer：称取 SDS 4g 溴酚蓝, 0.2g 甘油 20ml, Tris(pH6.8, 1.0mol/L) 10ml，使用前先加 2%的 DTT，溶解到蒸馏水中，定容到 100 ml。

SDS-PAGE 分离胶(12%, 10ml)：吸取蒸馏水 3.3ml、Tris(pH8.8, 1.5mol/L) 2.5 ml，30%的聚丙烯酰胺 4.0ml，10%的过硫酸铵 0.1ml, 10%的 SDS 0.1ml，TEMED 0.004ml，混匀后加入胶槽 37℃静置凝固。

SDS-PAGE 浓缩胶(5%, 2ml)：蒸馏水 1.4ml，Tris(1.0 mol/L) 0.25 ml，30%聚丙烯酰胺 0.33ml，10%过硫酸铵 0.02ml，10% SDS 0.02 ml，TEMED 0.003ml，混匀。

交联试剂：甲醛；解交联试剂：200mM NaCl；磁力架，亲和素树脂，Protein A/G

beads 来自北京 4A 生物公司。

2×无酚红 DMEM 配方：每 500ml 加 13.4g 2×DMEM 粉剂+3.7g NaHCO₃，定容调节 PH 为 6.8，过滤除菌，加入血清保证使用浓度是 3%，加入双抗保证使用浓度是 1%。

低熔点琼脂糖：每 100ml 1.8g 琼脂糖加到双蒸水中定容至 100ml，高压灭菌放 4 度备用。

2%琼脂糖凝胶：称量琼脂粉 1 g，加入 1×TAE 50 mL，置于微波炉中高火加热 1 min，冷却至不烫手时（大约 50 °C），加入 GoldView 4 μL，充分摇晃混匀，倒入模具（20 μL 或 50 μL 样品孔）中。待琼脂糖凝胶完全凝固后，将胶放入含 1×TAE 700 mL 的电泳槽中即可使用。

5 x×Passive Lysis Buffer（裂解液）：灭菌去离子水稀释到 1×的工作浓度，该裂解液要现用现配；1× Stop & Glo substrate：用 Stop & Glo Buffer 将 50 x Stop & Glo substrate（海肾荧光素酶底物）稀释至 1×的工作浓度，-80℃避光保存，备用。

2.1.7 主要仪器设备

多功能 PCR 仪：北京东胜创新生物科技公司；

摇床：常州澳华仪器有限公司；

超净工作台：北京哈东联仪器制造有限公司；

24 孔冰冻离心机， eppendorf 公司。

恒温生化培养箱，科力有限公司。

倒置荧光显微镜， Nikon 公司。

核酸定量测定仪， Thermo Fisher 公司。

实时荧光定量 PCR 仪， ABl ViiA7。

Western blotting 成像系统， Eastwin 公司。

Biochmi 凝胶成像系统：美国 UVP 公司；

多功能酶标仪：瑞士 Tecan 公司；

蛋白电泳系统和蛋白转膜仪：美国 Bio-Rad 公司；

流式分选仪：美国 Bio-Rad 公司。

移液器， Thermo Fisher 公司。

低温冰箱， Haier 公司。

超纯水仪， MillIPORE 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 质粒构建基因组模板的制备

将培养的 DF1 细胞用适量胰酶消化下来后,用 PBS 洗涤一次。离心 $2000g \times 5min$, 去除上清液后加入 10 倍体积的裂解缓冲液。

- 1) 加等体积饱和酚至上述样品处理液中,温和、充分混匀 3min。
- 2) 离心 $5000g \times 10min$, 取上层水相到另一 1.5ml 离心管中。
- 3) 加等体积饱和酚,混匀,离心 $5000g \times 10min$, 取上层水相到另一管中。
- 4) 加等体积酚/氯仿,轻轻混匀,离心 $5000g \times 10min$, 取上层水相到另一管中。
- 5) 加等体积氯仿,轻轻混匀,离心 $5000g \times 10min$, 取上层水相到另一管中。
- 6) 加 1/10 体积的 3M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇,轻轻倒置混匀。
- 7) 待絮状物出现后,离心 $5000g \times 5min$, 弃上清液。
- 8) 沉淀用 75%乙醇洗涤,离心 $5000g \times 3min$, 弃上清液。向 Genomic-tip 100/G 中加入 4 mL Buffer QBT 平衡柱子,在重力作用下使 Buffer QBT 完全滤过柱子;
- 9) 室温下挥发乙醇,待沉淀将近透明后加 50-100 μ l TE 溶解过夜。

2.2.2 提取 RNA 并制备 cDNA 作为模板

宿主因子基因扩增采用 cDNA 作为模板,模板制备采用裂解 DF1 细胞提取 RNA, 经反转录得到。具体方法如下:

- 1) 弃掉细胞上清,并尽量吸净,加入 500 μ l Trizol 试剂到 12 孔板中,充分裂解后转入 Rnase-free 的 EP 管,充分颠倒混匀,冰上中静置 10min;
- 2) 每个 EP 管加入氯仿 200 μ l,迅速涡漩 18sec,冰浴 15min;
- 3) 12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15min,将上清移至新的 EP 管中,加入等体积异丙醇,轻轻混匀,室温静置 15min;
- 4) 室温 12000rpm 离心 15min,弃上清;
- 5) 用无核酸酶无菌水配制 75%的无水乙醇,并洗涤沉淀,8000rpm 室温离心 5min,用移液器轻柔地吸弃上清;在超净台静置晾干,加入 Rnase-free 水混匀后,取少量测试 RNA 浓度,放置在负 80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

6) 反转录反应：在 20 μ l 反转录体系中进行，依次加入以下组分：

表 2-2 反转录体系

Table 2-2 Reverse transcription system

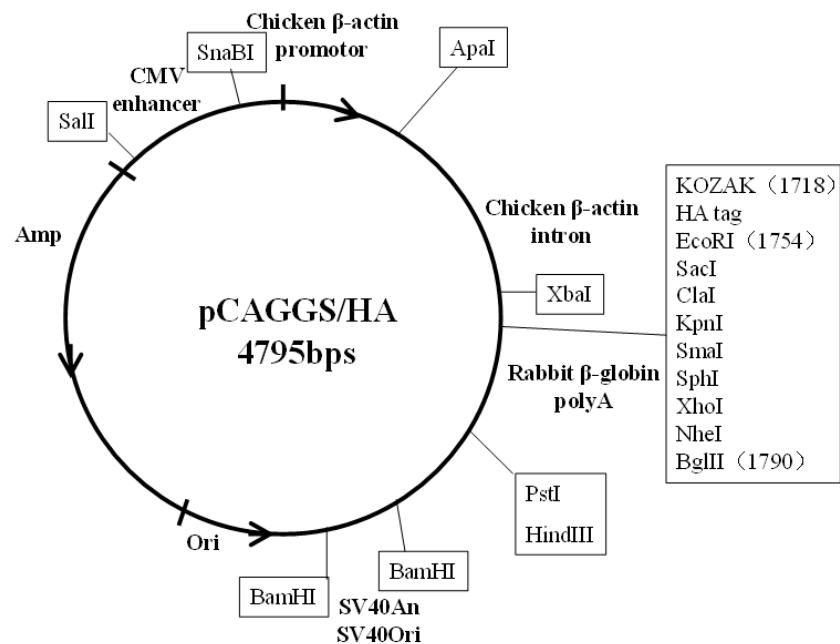
试 剂	用 量
RNA	1 μ g
dNTPs (2.5mM)	2.0 μ l
RNase Inhibition	0.5 μ l
AMV	0.5 μ l
去离子水	补足至 25 μ l

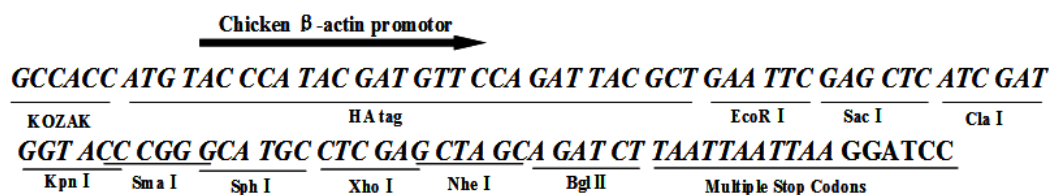
以上体系混匀后，瞬时离心，置 PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 进行反转录 60min，然后 72 $^{\circ}$ C 15min 灭活，得到 cDNA 产物，取出放 4 $^{\circ}$ C 备用。

2.2.3 目标载体克隆构建质粒

构建 pCAGGS-HA-病毒蛋白(H5N6)表达质粒及 p3XFlag-宿主因子表达质粒。

载体 pCAGGS-HA、p3XFlag 限制性酶切图谱及多克隆位点(MCS)如下：





Restriction Map and Multiple Cloning Site(MCS) of pCAGGS-HA

图 2-1. 载体 pCAGGS-HA 限制性酶切图谱及多克隆位点(MCS)。

Fig. 2-1. Restriction map and multiple cloning site(MCS) of pCAGGS-HA

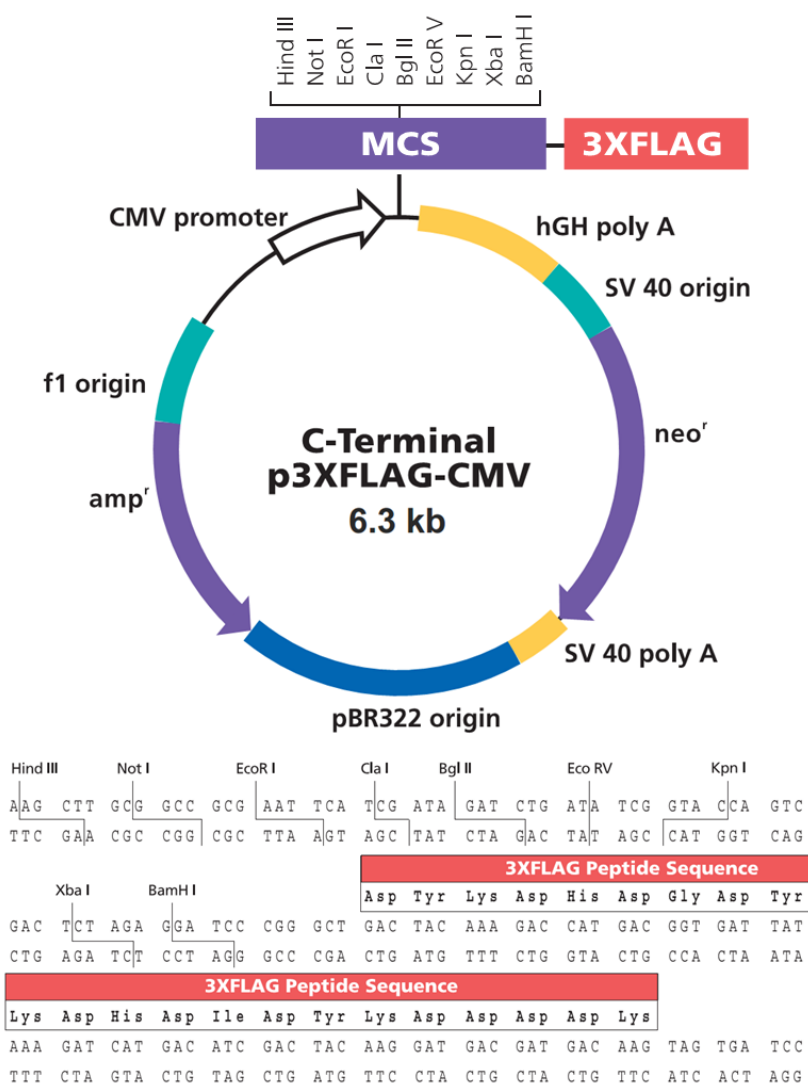


图 2-2. p3XFLAG 限制性酶切图谱及多克隆位点(MCS)。

Fig. 2-2. Restriction map and multiple cloning site (MCS) of p3XFLAG.

构建具体步骤如下：以提取基因组为模板 PCR 扩增序列。PCR 反应体系：

表 2-3 基因扩增 PCR 体系
Table 2-3 PCR system for gene amplification

试 剂	用 量
DNA 模板	100ng
引物 F, 引物 R (10 μ M) 各加	2.5 μ l
PrimerStar 酶	25 μ l
去离子水	补足至 50 μ l

PCR 扩增程序为:

98 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10sec, 56 $^{\circ}$ C 退火 5sec, 72 $^{\circ}$ C 进行延伸 5-10sec/kb, 总共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。反应结束后, 将 PCR 的产物进行回收。回收方法如下:

1) 在紫外灯下切下的含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶, 放入无菌的 1.5ml 的 EP 管中, 加入 750 μ l Binding Buffer。

2) 55 $^{\circ}$ C 水浴至凝胶完全溶化。

3) 将完全溶化的凝胶液体转至回收柱, 室温静置 5min 后 12000 r/min, 离心 1min, 倒掉收集管中的废液。

4) 加入 500 μ l Washing Buffer, 12000r/min, 离心 1min, 倒掉收集管中废液, 重复此步骤一次。

5) 以 12000r/min 转速空转回收柱 2min, 将回收柱转至干净的 1.5ml EP 管中, 室温静置 5-8min 后, 加 30 μ l Elution buffer 洗脱, 室温静置 5min, 12000r/min 离心 1 min, 得到的样品为回收产物。

回收产物与目的载体 pCAGGS-HA 和 p3XFlag 空载经限制性内切酶双酶切, 酶切体系如下:

表 2-4 酶切反应体系
Table 2-4 The reaction system of particular restriction enzyme

试 剂	用 量
限制性内切酶 1	1 μ l
限制性内切酶 2	1 μ l
10x QuickCut Green Buffer	5 μ l
PCR 产物或载体	40 μ l 或 5 μ g
去离子水	补足至 50 μ l

然后对酶切产物进行回收，酶切回收步骤如下：

1) 在紫外灯下迅速切下目的条带，并置入 2 mL EP 管中使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收；

2) 每 100 mg 凝胶溶于 100 μ l GDP 中，根据凝胶的质量加入适量 Buffer GDP；

3) 置于 50-55℃ 水浴，其间颠倒混匀几次，直至凝胶完全溶解；

4) 将 Hisure DNA 柱子套在收集管上，把 700 μ l 溶胶液转移至柱子中，12000 r/min 离心 1 min；

5) 弃去滤液，加入 300 μ l Buffer GDP 至柱子中，静置 1 min 后，12000 r/min 离心 1 min；

6) 弃去滤液，加入 600 μ l 的 Buffer DW2（已加入无水乙醇）至柱中，12,000 r/min，离心 1 min；

7) 重复操作步骤 6)，弃去滤液，空柱 12,000 r/min，离心 2 min；

8) 把柱子套在 1.5 mL EP 管中，在柱子膜的中央加入 30 μ l 的 Elution Buffer，静置 2 min 后，12,000 r/min，离心 1 min，最后用 Nanodrop 核酸定量测定仪检测浓度，保存于 -20℃ 或进行下一步实验。

将回收得到的目的片段与酶切后的空载体，按比例混合配好连接体系，于 4℃ 环境连接过夜。连接体系如下：

表 2-5 酶连反应体系
Table2-5 Ligase reaction system

试 剂	用 量
T4 连接酶	1 μ l
10x T4 连接酶 Buffer	1 μ l
酶切后的 PCR 产物	0.3 pmol
酶切后的载体	0.03pmol
去离子水	补足至 10 μ l

将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中，取 100 μ l 新鲜的感受态细胞 DH5 α 置于冰上（每 10 μ l 连接体系转化，使用 30 μ l 商品化感受态即可）。加入 10 μ l 连接产物轻柔混匀后，置于冰上 30min，42℃ 水浴热激 90S，冰浴 2min，加入 200 μ l 无抗性的 LB 液体培养基，在 200r/min，37℃ 摇床培养 60min 后，吸取 200 μ l 菌体

涂布于氨苄抗性的平板上。37℃培养 12-16h 可出现单菌落。

2.2.4 质粒提取以及鉴定

在氨苄抗性的平板上挑取单菌落，置于细菌瓶中用含 0.1%氨苄霉素的 LB 培养基培养 4-6 h，用终浓度为 25%的灭菌甘油保菌并存放在负 80℃冰箱中。保菌后，用普通质粒小提试剂盒提取质粒，具体步骤如下：

1) 柱平衡步骤：将吸附柱 CP3 放入收集管中，加入 500 μ l BL 平衡液，12,000 r/min 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中；

2) 取 1-5 mL 过夜培养的菌液，加入 1.5ml 离心管中，使用台式离心机 12,000 r/min 离心 1 min，尽量吸弃上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）；

3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ l 溶液 P1（已加入 RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀；

4) 向离心管中加入 250 μ l 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解；

5) 向离心管中加入 350 μ l 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀，12,000 r/min，离心 10 min；

6) 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。12,000 r/min，离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中；

7) 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW（已加入无水乙醇），12,000 r/min，离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中；

8) 重复操作步骤 7)；

9) 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12,000 r/min，离心 2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除；

10) 将吸附柱 CP3 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 60 μ l 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 min，12,000 r/min，离心 2 min 将质粒溶液收集到离心管中保存于-20℃或进行下一步实验。

对提取的质粒进行初步鉴定其是否正确，采用了酶切鉴定和 PCR 鉴定两种方法，体系如下。

表 2-6 PCR 鉴定反应体系

Table 2-6 The reaction system of PCR identification

试 剂	用 量
1.1×T3 Super PCR Mix	10 μ l
10 μ M 鉴定引物-F	1 μ l
10 μ M 鉴定引物-R	1 μ l
质粒	100ng
去离子水	补足至 20 μ l

PCR 扩增程序：98℃预变性 5 min，98℃变性 10 sec，60℃退火 10 sec，72℃延伸 10 sec/kb，变性至延伸阶段循环 22 次，继续 72℃延伸 20 sec。共扩增 70 个反应。

表 2-7 酶切鉴定反应体系

Table 2-7 The reaction system of digestion for identification

试 剂	用 量
质 粒	100ng
10×Buffer	1.0 μ l
enzyme	0.5 μ l
去离子水	补足至 10 μ l

将混合好的体系放到 37℃温箱中酶切 30 min。

将 PCR 产物或酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，成功构建的重组质粒在 PCR 鉴定方法中会出现与目的片段大小一致的条带，而酶切鉴定结果应出现两条带，一条外源片段带，一条载体带。将构建成功的重组质粒进行测序，分析所插入的外源基因的序列是否发生突变等。

2.2.5 无内毒素质粒提取

将测序正确的样品使用无内毒素大量质粒提取试剂盒提取质粒。具体操作步骤如下：

- 1) 将适量测序正确的质粒对应的菌液置于大培养瓶中 37℃摇床中过夜培养；
- 2) 使用 50 mL 离心管分装菌液，4000 r/min，离心 10 min；
- 3) 弃去并尽可能吸尽上清，每管加 500 μ l-1 mL solution I（已加 RNase A）重悬菌体之后分装到 2 mL 离心管中，每管 500 μ l；
- 4) 每管加入 500 μ l solution II，温和颠倒 7-10 次，直至到上清清亮；

- 5) 加入 250 μ l N3 Buffer, 轻柔颠倒至白色絮状。4 $^{\circ}$ C, 12,000 r/min 离心 10 min;
- 6) 将上清转入新的 1.5 mL EP 管中, 加入 0.1 倍体积的 ETR, 混匀后冰上放置, 每 2 min 颠倒 1 次。

HiBindTm DNA Mini 柱 II 中提前加入 200 μ l Buffer GPS 浸润, 静置时间大于 5 min, 以 12,000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的液体;

- 7) 将冰浴去内毒素的 EP 管放入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 5 min, 于室温 12,000 r/min, 离心 3 min, ETR 溶液沉于管底;

- 8) 小心将上清转移到新的 2 mL 的 EP 管中 (切勿吸入蓝色 ETR), 加 0.5 倍体积的无水乙醇, 混匀, 室温静置 1-2 min;

- 9) 转入浸润过的 HiBindTm DNA Mini 柱 II 中, 每次最多 700 μ l, 静置 1-2 min, 12,000 r/min, 离心 1 min;

- 10) 弃去收集管中的液体, 加入 500 μ l Buffer HB, 12,000 r/min, 离心 1 min;

- 11) 弃去收集管中的液体, 加入 700 μ l DNA wash buffer (已加无水乙醇) 洗柱子, 室温 12,000 r/min 离心 1 min;

- 12) 重复操作步骤 11);

- 13) 弃去收集管中的液体, 12,000 r/min, 空柱离心 2 min;

- 14) 将柱子放入新的 EP 管中, 置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中 5 min, 同时将 Endotoxin-free EB 也于 55 $^{\circ}$ C 预热以提高洗脱效率;

- 15) 取 80-100 μ l Endotoxin-free EB 洗脱液至洗脱柱, 静置 2 min 后, 12,000 r/min 离心 2 min, 检测质粒浓度, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.6 细胞相关实验

2.2.6.1 细胞复苏

- 1) 从液氮容器中取出冻存的细胞, 排净渗入的液氮后迅速浸入 37-42 $^{\circ}$ C 温水中, 并快速摇动使其尽快融化;
- 2) 从 37 $^{\circ}$ C 水浴中取出冻存管, 用酒精棉球擦拭管壁后旋开盖子, 吸出细胞液;
- 3) 1,000 r/min, 离心 3-5 min 或直接接种小培养瓶, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱静置培养待细胞贴壁后 (3-6 h 左右), 更换一次完全培养基, 继续培养。

2.2.6.2 贴壁细胞传代

当细胞彼此接触时,倒尽培养基,用无菌 PBS 洗 1 次。50ml 培养瓶需加入 0.25M 的胰酶约 1ml,晃动使消化液铺均匀,置 37℃ 培养箱消化 1min,在显微镜下观察细胞形态,当细胞收缩变圆或有少数脱落时,消化完毕,轻轻振动瓶底可使细胞全部脱落,加入 5ml 完全培养基后,用吸管轻轻吹打,使细胞基本成单个悬浮,然后分置其它培养瓶内,加入 DMEM 完全培养基继续培养。

2.2.6.3 细胞冻存

1) 预先配制冻存液, DMSO: 胎牛血清: 无血清培养基比例为 1:3:6, 于 4℃ 冰箱保存预冷;

2) 以 5ml 培养瓶为例, 将长满并且状态良好的贴壁细胞用无菌 PBS 洗 1 次, 将长满单层的细胞用胰酶消化至单个悬浮状态, 转移到 15 mL 离心管中, 1000 r/min, 离心 5 min 后弃上清;

3) 用配好的冻存液重悬细胞沉淀, 每支冻存管中加入 1-1.5 mL 重悬细胞液, 密封后标记冻存细胞名称和冻存日期; 置于细胞冻存盒(浸润异丙醇)于-80℃冰箱冻存过夜, 次日转入液氮罐。

2.2.6.4 细胞计数

1) 将血球计数板及盖玻片擦拭干净, 将盖玻片盖在计数板上;

2) 将长满单层的细胞消化吹打呈单个悬浮状态, 将细胞悬液吸出少许根据细胞密度稀释 100-1,000 倍, 吹打混匀后吸取 10 μ l 滴加在盖玻片边缘, 使悬液充满盖玻片与计数板之间, 静置 3 min, 注意不要有气泡;

3) 在显微镜下计四个计数池的总细胞数, 遵循“计上不计下, 计左不计右”的原则排除压线细胞;

4) 计算细胞密度: 细胞数/mL=总细胞数/4 $\times$ 10⁴ $\times$ 稀释倍数。

2.2.6.5 细胞转染

接种到细胞板的细胞在 CO₂ 培养箱中生长到 60%-80% 的细胞密度时可以转染。首先弃去培养基, 加入新鲜的转染专用培养基 Opti-MEM; 以 6 孔板为例, 将最多 4 μ g 的质粒混于 100 μ l 的 Opti-MEM 中, Lip8000 (按照 1 μ g 质粒: Lip8000 = 1:1.6 的比例加入) 混于等体积的 Opti-MEM; 将混合均匀的质粒混合物加入到混合均匀的 Lip8000 中轻柔颠倒混匀; 将上述混合物缓慢滴加到 DF1 细胞中, 在培养箱中培养

12 h 后, 更换新鲜的 10% FBS 完全培养基继续培养。

Lip 2000 方法同上, 按照 1 μ g 质粒: Lip 2000 = 1:2.5。

2.2.6.6 细胞间接免疫荧光

1) 将 DF1 细胞接种到 35mm 激光共聚焦培养皿中, 生长到 40%左右的密度时, 可以转染(按每个培养皿转染 1.5 μ g 质粒或 2nm si-RNA), 待 12h 后用 4%的多聚甲醛室温固定细胞 20min。

2) 吸掉多聚甲醛, 用 PBS 洗 3 遍, 然后用透化处理液(含 0.1% TritonX-100 的 PBS 溶液)透化固定 15min(室温)。

3) 弃去透化液, 用 PBS 洗 3 遍, 用封闭液(同免疫共沉淀封闭液)孵育 1 小时。

4) 弃去封闭液, 用 PBS 洗 3 遍, 加入一抗(1: 500 稀释), 孵育 1 小时。

5) 弃去一抗, 用 PBS 洗 3 遍, 加入荧光二抗 (1: 3000 稀释), 避光孵育 1 小时。

6) 弃去荧光二抗, 用 PBS 洗 3 遍, 加入 DAPI (1:1000) 避光孵育 1-2min, 用 PBS 洗 3 遍后, 在激光共聚焦显微镜下观察。

2.2.6.7 流式分析细胞术

将 DF1 细胞接种到 12 孔板中, 生长到 60%左右时转染 si-CCT5 (si-NC 做阴性对照, 设置三孔作为重复), 在转染后 12h 用带 GFP 荧光标记的 0.1MOI 流感病毒 H5N6 感染, 在 CO2 细胞培养箱中培养 12h, 使用倒置荧光显微镜观察荧光量, 可看到实验组与对照组较为明显的荧光差异。

将经上述处理的 DF1 细胞弃去培养基并用 1 $\times$ PBS 洗 2-3 次, 用胰酶消化下来转移到 1.5ml 的 EP 管中, 1000r/min 离心 2min 再次弃掉上清, 加入 400 μ l 4%的多聚甲醛吹打混悬, 使细胞分散并固定, 最后使用流式细胞分析仪分析平均荧光强度。

2.2.6.8 细胞活力测定

为了检测使用 si-RNA 沉默 DF1 细胞后的细胞活性, 利用 CCK-8 试剂盒测定细胞活性。96 孔板接入等细胞数 DF1 细胞, 待细胞贴壁后转染等量的 si-CCT5, si-NC 作为阴性对照, 于转染后 12、24 和 36 h, 向每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 1.5 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。计算细胞存活率, 细胞存活率 = $[(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100\%$, As: 实验孔 (si-CCT5-DF1 细胞的培养基+CCK-

8); Ac: 对照孔(si-NC- DF1 细胞的培养基+CCK-8); Ab: 空白孔 (培养基+CCK-8)。

2.2.6.9 细胞核蛋白与细胞浆蛋白分离实验

1) 以 6 孔板为例, 转染后的贴壁细胞经 PBS 洗过 2-3 次后, 用细胞刮刮下并以 1000r/min 离心 3min, 弃掉上清每 20 μ l 细胞沉淀加入 200 微升添加了 PMSF 的细胞浆蛋白抽提试剂 A (PMSF 最终浓度为 1mM), 使用涡旋仪剧烈混悬 5 秒, 使细胞沉淀完全悬浮并散开。

2) 冰浴 10-15min 后, 加入细胞浆蛋白抽提试剂 B 10 μ l, 涡旋 5 秒并冰浴 1min。12000r/min 4℃离心 5min, 立即吸取上清至预冷的 1.5ml EP 中, 即为抽提得到的细胞浆蛋白。

3) 弃去沉淀的残余上清, PBS 轻缓洗 1 遍, 吸净后加入 50 微升添加了 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂, 剧烈涡旋 5min, 12000r/min 4℃离心 5min, 吸取上清至 1.5ml EP 管中, 即为抽提得到的细胞核蛋白。

2.2.7 病毒相关实验

2.2.7.1 流感病毒的增殖

将病毒原液用灭菌 PBS 稀释 10^{-2} - 10^{-3} 倍, 用 1 ml 的无菌注射器吸取 200 μ l 病毒稀释液注射到接种至 9-11 日龄 SPF 鸡胚的绒毛尿囊腔内, 用蜡烛滴蜡封口, 置于 37℃恒温箱中孵育, 每 12 h 观察一次鸡胚存活情况, 将接种后 48-72 h 内死亡鸡胚放置在 4℃环境 4 h, 用以收缩血管收获尿囊液, 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清后高速离心, 12000 r/min 离心 5 min, 之后 0.22 μ m 的滤器过滤离心后的上清, 测定病毒滴度后, 置于-80℃保存备用。

2.2.7.2 流感病毒的细胞接种

以 12 孔板为例, DF1 细胞生长至 80%-90%时进行流感病毒感染。

1) 首先将病毒原液用无菌 PBS 按所需 MOI 进行稀释, 用无菌 PBS 洗两遍细胞后, 加入稀释好的病毒液, 37℃ CO₂ 培养箱中孵育 1 h;

2) 弃去每孔病毒液, 用无菌 PBS 洗两遍, 每孔加入 1ml 含 1%青链霉素、2.5% BSA 的新鲜 DMEM 培养基;

3) 37℃ CO₂ 培养箱中继续培养, 于不同时间点观察细胞状态并收集上清或将存活细胞于 10% FBS 完全培养基中继续培养扩大。

2.2.7.3 流感病毒空斑实验

1) 以 6 孔板为例, 将 MDCK 细胞在 6 孔板内培养成单层, 取 6 个 EP 管, 每管加入 900μl 的维持液。

2) 病毒完全融化以后混合均匀, 第一个 EP 管中加入 100μl 的病毒原液, 用移液器反复吸吹 6-8 次, 将病毒混匀, 从第一个 EP 管中取 100μl 到第二个 EP 管, 反复吹打 6-8 次后, 重复此操作依次倍比稀释到第 6 管, 冰上放置备用。

3) 取出细胞板, 弃掉维持液, 把稀释好的病毒加进去, 800μl 每孔。

4) 将板子放到 37 度温箱中孵育 1h, 保证病毒覆盖全部细胞, 每隔 20min 摇匀一次。

5) 将 2×DMEM 放到 37℃ 温箱预热, 并将低熔点琼脂糖放到 65 度水浴锅溶解, 待完全溶解以后同样放到 37℃ 温箱中保温备用。

6) 在开始孵育病毒后的半个小时, 配制空斑液 (1ml 含血清和双抗 2×DMEM+1ml 低熔点琼脂糖), 混匀之后放 37 度备用。

7) 病毒孵育完成后, 取出板子, 用未加血清的 DMEM 或者滤过的 PBS 洗细胞板 2-3 次后, 向每个孔内加入 2ml 空斑液。37 度温箱培养 36h-48h, 期间注意观察出斑情况。

8) 出斑后使用 4%多氯甲醛固定 15-20min, 将板子放置到水池中轻柔冲洗, 以去掉凝胶, 随后使用结晶紫染色液染色, 将板子放 37 度 1-2h, 待弃去染料后计算空斑个数。PFU/mL=平均蚀斑数×稀释倍数/接种液体积 (mL)。

2.2.7.4 TCID₅₀ 的测定

将收取的病毒液进行 10 倍比稀释至 10⁻¹¹。PK-15 细胞适量接种到 96 孔细胞培养板上, 当细胞长至约 90% 时, 用无菌 PBS 洗涤细胞 2 次, 然后将每个稀释度接种 96 孔细胞板 1 纵列, 每孔 100 μl, 最后一列细胞只加 100 μl DMEM 培养基作为阴性对照, 1 h 后更换维持液。置于 37℃ CO₂ 细胞培养箱中培养, 72 h 后观察细胞病变, 记录每列 50%细胞发生病变的细胞孔数。Spearman-Kärber 法计算病毒的 TCID₅₀。

2.2.8 蛋白表达检测实验

2.2.8.1 细胞总蛋白的提取及样品制备

弃去细胞样品的培养基,用预冷 PBS 洗 3 遍,用 PBS 将细胞从细胞板上刮下并转移至 1.5 mL EP 管中,1000 r/min 离心 5 min 弃去上清,加入 Western 及 IP 细胞裂解液,使用涡旋仪,涡旋后冰浴 15 min,使用 4℃ 离心机,12000 r/min 离心 5 min,吸出上清转移至新的 1.5 mL EP 管中,采用标准的 Bradford 方法测定蛋白浓度。

2.2.8.2 CO-IP 免疫共沉淀实验及质谱技术

为了获得 NP 相关的宿主因子,实验室接下来进行了 IP/MS 实验。将 DF1 细胞接种于初始浓度为 1×10^5 cells/孔的 6 孔板或 100mm 细胞培养皿中,待细胞生长至 70% 左右时共转染 CCT5-Flag 表达质粒(7.5 μ g)和 HA-NP/PB2 表达质粒(7.5 μ g),用 Lipo8000 转染试剂转染 HA-NP 或 pCAGGS-HA 空载体 24 h 后,用预冷的 PBS 缓冲液洗 2 遍,然后细胞用刮铲刮下收集到 1.5ml EP 管中,1000r/min 离心 5min,弃去上清,向沉淀加入 400 μ l Western 及 IP 裂解液(含 0.5mM DTT protease inhibitor PMSF, RNase inhibitor (50 U/ml final))充分裂解。在 4℃ 离心机中用 12000r/min 转速离心 15min,弃去不溶细胞沉淀,收集裂解液上清于干净的 1.5ml EP 管中备用。

1) 取 50 μ l Protein A/G beads, 用 PBS 洗 3 遍, 加入含 1 μ g FLAG 抗体或 1 μ g IgG 的 200 μ l 裂解液,在转子上室温轻柔旋转 1h 或 4℃ 过夜,将细胞裂解上清分成两份,每份 200 μ l 分别用于 Flag IP 和 Mock IP 实验。

2) 将上清与抗体孵育过的 beads 混匀后在 4℃ 轻柔旋转孵育 4-6 小时。随后 Beads 低速离心 30 秒收集,上清弃去, beads 用 Western 及 IP 裂解液在转子上转洗 3 遍。

3) 接着 beads 用 40 μ l Western 及 IP 裂解液室温放置 15-20min,加入 10 μ l 的 5 $\times$ SDS sample buffer,混匀后 100℃ 带 beads 煮 5-10 min 后,冰浴 5min 并以 12000 r/min 离心,收集的上清为样品。

同样,质谱实验中,前期样品的制备同样使用 CO-IP 免疫共沉淀技术。将 DF1 细胞接种到 6 孔的细胞板后,HA-NP 质粒与 lip 8000 混合,转染到 DF1 细胞中,12h 后感染流感病毒 H5N6-GFP 荧光毒,待感染 12-24h (观察带荧光细胞数占 60%-70% 即可收样,切下 HA-IP 通道的差异条带,连同 IP 实验的最终上样液一同送往上海中

科新生命生物科技有限公司进行质谱分析，最终得到鉴定蛋白质的结果。

2.2.8.3 聚合酶活性测定

将 pCAGGS-PB1 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-PB2 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-PA (0.125 μ g/3 孔), pCAGGS-NP (0.5 μ g/3 孔), 插入病毒片段 NS 启动子的 luc 质粒 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-CCT5 (0.25 μ g/3 孔)以及 10ng 的 TK 共 7 种质粒与 Lipofectamine 8000 (1:1.6) 充分混匀后, 转染到 12 孔板的 HEK293T 细胞单层。对照组将 pCAGGS-PB1 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-PB2 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-PA (0.125 μ g/3 孔), pCAGGS-NP (0.5 μ g/3 孔), 插入病毒片段 NS 启动子的 luc 质粒 (0.25 μ g/3 孔), pCAGGS-HA 空载 (0.25 μ g/3 孔)以及 10ng 的 TK 共 7 种质粒与 Lipofectamine 8000 按 1:1.6 的比例充分混匀转染, 每组做三个孔的重复, 转染后 24 小时收样。

本实验采用的是检测内源性聚合酶表达情况, 实验组转染 Flag-CCT5 质粒和 pPOL1-AVI 质粒到 DF1 细胞, 转染后 12 小时, 感染 0.01MOI 的 H5N6-GFP 流感病毒, 刺激细胞产生禽源聚合酶蛋白, 感染后 24 小时收样。

细胞板样品吸除细胞培养液, PBS 轻柔冲洗细胞 2-3 次, 每孔加入 100 μ l 1x passive lysis buffer 裂解细胞, 在室温条件下的摇床上裂解 15min。收集裂解后样品, 10000r/min 离心 2min, 取 10 μ l 上清液混合 30 μ l 的 luciferase assay substrate, 在酶标仪上检测荧光信号, 测得双萤光数值 1。后添加 30 μ l stop buffer(含 1x stop substrate), 测得双萤光数值 2 (相对荧光强度=数据 1/数据 2)。双萤光素酶报告载体图谱及其作用原理示意图:

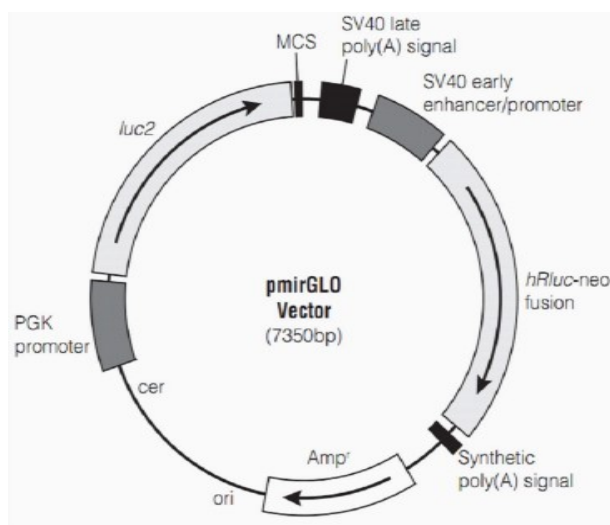


图 2-3 pmirGLO 载体图谱

Fig2-3 Map for the pmirGLO vector

2.2.8.4 SDS-PAGE 电泳

1) 制胶前准备：将玻璃板、样品梳用去离子水冲洗数次洗净，并置于通风处晾干；将洗净的玻璃板在桌面上组装完毕放入玻板夹中，固定好玻璃板与胶条后，开始配制 10% 的 SDS-PAGE 分离胶；将处理好的蛋白上清液取出 40 μ l，加入 10 μ l 的 5 $\times$ SDS sample buffer，混匀后 100 $^{\circ}$ C 煮 5-10 min，取 30 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳。

2) 向 1.5 mm 玻璃板中加入 7 ml 10% 的 SDS-PAGE 分离胶，然后再液面上小心加入 1ml 蒸馏水，置 37 $^{\circ}$ C 温箱中静置 30min 左右直至凝固完全，倒掉上层水，并用吸水纸吸干残留的水分；

3) 配制 5% 的 SDS-PAGE 浓缩胶，吸取 2ml 到胶板上层，然后擦入梳齿（注意不要有气泡），37 $^{\circ}$ C 环境中静置 20min 左右至凝固；

4) 剥离胶条，在电泳槽中将玻璃板固定好，加入新配制的 1 $\times$ 甘氨酸电泳缓冲液，小心地拔掉梳齿，向加样孔中分别加入处理好的样品及蛋白 Marker，调节电压开始电泳，首先在 80 V 下电泳至溴酚蓝跑到分离胶层，此时将电压调至 120 V，待溴酚蓝完全跑出分离胶或蛋白 Marker 条带分开到适宜程度，停止电泳。

2.2.8.5 Western Blotting

膜的选择基于待转蛋白质的分子量，大于 20 kD 的蛋白质使用 0.45 μ m 的 NC 膜，小于 20 kDa 的蛋白质使用 0.2 μ m 的 NC 膜。实验采用湿转法转膜，步骤如下：

1) 凝胶处理：按照蛋白大小将凝胶切下，裁剪合适大小的滤纸和 NC 膜，裁剪好后，浸泡到转膜缓冲液中，转膜缓冲液预冷备用；

2) 打开转膜架，用缓冲液浸湿海绵垫，并置于转膜架黑色筛孔板上，按顺序依次铺好“下层海绵-滤纸-凝胶-NC 膜--滤纸-上层海绵”，整个防止过程注意保湿防止凝胶收缩，凝胶与 NC 膜间要避免产生气泡；

3) 将固定好的转膜架装入缓冲液槽，加入低温的转膜缓冲液，没过转膜架放置凝胶的区域，四周放置冰袋降温；

4) 100 v 电压转膜 1-1.5 h，如果蛋白胶上蛋白 Marker 完全转移到 NC 膜上，则转膜成功，取出 NC 膜放置于含 1% BSA 的 TBST 中，于摇床震荡封闭 1 h；

5) 封闭结束后，使用 TBST 在摇床上震荡洗 3 次，每次更换新的 TBST 洗 5min，

之后加入用 TBST 稀释好的一抗 (1:5000) 覆盖 NC 膜, 震荡孵育 1-2 h 或 4℃ 过夜;

6) 一抗孵育后取出 NC 膜, 在摇床上使用 TBST 洗 3 次, 洗去未与蛋白条带结合的多余一抗, 加入二抗, 用摇床孵育 0.5-1h;

5) 最后用 TBST 洗 3 次 NC 膜, 降低背景, 每次 5-10 min, 采用 Thermo 的 ECL 显色试剂盒进行显色。

Westwen Blot 检测蛋白表达量的结果, 通过计算灰度值进行分析, 分析软件 Image J。

2.2.8.6 银染色实验

实验中为了减轻背景, 使用 Milli-Q 级纯水或双蒸水进行实验, 步骤如下:

1) 固定: SDS-PAGE 电泳结束后, 取凝胶放入约 100ml 固定液中, 在摇床上室温摇动 20min, 摇动速度为 60-70rpm, 或者固定 40min 以上甚至过夜, 可以进一步降低背景 (固定液的配制: 依次加入 50ml 乙醇、10ml 乙酸和 40ml Milli-Q 级纯水或双蒸水, 混匀后即成 100ml 固定液)。

2) 30%乙醇洗涤: 弃去固定液, 加入 100ml 30%乙醇, 在摇床上室温摇动 10min (30%乙醇的配制: 70ml Milli-Q 级纯水或双蒸水中加入 30ml 乙醇, 混匀后即成 100ml 30%乙醇)。

3) 水洗涤: 弃 30%乙醇, 加入 200ml Milli-Q 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 10min, 以降低染色的背景。

4) 增敏: 弃水, 加入 100ml 银染增敏液(1×), 在室温摇床上摇动 2min, (1×银染增敏液的配制: 99ml Milli-Q 级纯水或双蒸水中加入 1ml 银染增敏液(100×), 混匀后即为银染增敏液)。1×银染增敏液配制后需在 2 小时内使用。

5) 水洗涤: 弃原有溶液, 加入 200ml Milli-Q 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 1min。此步骤重复一次。

6) 银染: 弃水, 加入 100ml 银溶液(1×), 在摇床上室温摇动 10min, (1×银溶液配制: 99ml Milli-Q 级纯水或双蒸水中加入 1ml 银溶液(100×), 混匀后即为 1×银溶液)。1×银溶液配制后需在 2 小时内使用。

7) 水洗涤: 弃原有溶液, 加入 100ml Milli-Q 级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动 1-1.5min, 摇动速度为 60-70rpm。注意: 水洗涤的时间不能超过 1.5min。

8) 显色: 弃水, 加入 100ml 银染显色液, 在摇床上室温摇动 3-10min, 直至出

现比较理想的预期蛋白条带，（银染显色液的配制：80ml Milli-Q 级纯水或双蒸水中加入 20ml 5×银染基本显色液，再加入 0.05ml 2000×银染显色加速液，混匀后即为银染显色液。银染显色液配制后需在 20min 内使用。

9)终止：弃去银染显色液，加入 100ml 1×银染终止液，在摇床上室温摇动 10min，（1×银染终止液的配制：95ml Milli-Q 级纯水或双蒸水中加入 5ml 20×银染终止液，混匀后即为 1×银染终止液，宜当天使用）。

10) 水洗涤：弃去银染终止液，加入 100ml Milli-Q 级纯水或双蒸水，在摇床上室温摇动 2-5min，可在 Milli-Q 级纯水或双蒸水中保存，使用扫描仪拍摄照片，或采用适当的方式制备成干胶。

2.2.9 荧光定量实验

2.2.9.1 RNA 提取

1) TRIzol 抽提法

实验步骤与 3.2.1.2 中制备 cDNA 模板时提取 RNA 的方法相同。

2) 细胞、组织 RNA 提取试剂盒

a. 以 12 孔板为例，将待提取 RNA 的 DF1 细胞弃去并吸净培养液后，每孔加入 300μl Buffer RL 裂解液裂解细胞样品，并使用移液器，不断吹吸，直至细胞裂解完全，细胞从细胞板壁上脱落下来，裂解液没有粘稠团块状态。

b. 把 gDNA Filter Mini Column 装到 2 ml 的收集管中，把处理好的细胞裂解液转移到 gDNA 过滤柱内，以 12000 r/min 离心 2 min。

c. 丢弃 gDNA 过滤柱，此时过滤柱膜上为细胞样品的 DNA，将收集管内的滤液转移到 1.5 ml 的 EP 管中，加入 30 μl Buffer MPP 涡旋 15 s 后，使用离心机以 12000r 离心 5 min，可以看到离心管底部有白色沉淀，此白色沉淀即为蛋白质。

d. 吸取离心管内的上清液并转移到新的 1.5 ml 离心管内，注意不要吸到白色沉淀，向 EP 管内加入 300μl 的无水乙醇，用移液器吹吸 3-5 次混匀。

e. 把 HiPure RNA Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移不超过 700 μl 混合液到过滤柱内，以 12000 r 离心 30 s-1 min。

f. 离心后倒弃滤液，把柱子装回收集柱中，转移剩余的混合液到柱子中，继续以 12000 r 的转速离心 30s-1min，直至混合液混合离心完毕。

g. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 600 μl Buffer RW1 至柱子上。12000

r 离心 30 s-1min。(gDNA 过滤柱可去除 95-99%的 DNA 污染)。

h. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600μl Buffer RW2（已用乙醇稀释）至柱子中，12000g 离心 30 s-1min。

i. 重复第 8 步操作，用 Buffer RW2 洗第二次柱子，倒弃流出液，把柱子装回收集管中，以 12000g 空转离心 2min。

j. 将柱子转移至 1.5ml 离心管，加入 30-100μl RNase Free Water 至柱子膜的中央。室温静置 2min, 12000g 离心 1min。HiPure RNA Column 最好的洗脱体积是 30μl，若 RNA 产量超过 30μg，可进行第二次洗脱）。

k. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

2.2.9.2 相对荧光定量分析

1) 反转录反应，配置 20μl 反转录体系 PCR 仪中扩增，得到 cDNA 产物，体系同 3.2.1.2 中所述。

2) 荧光定量 PCR：将合成的 cDNA 产物直接用于荧光定量 PCR 反应中，使用荧光定量酶 SYBR Green mixture，每个样品做三个重复，反应体系如下（20 μl 反应体系）：

表 2-8 荧光定量反应体系

Table 2-8 fluorescence quantitative reaction system

试 剂	用 量
SYBR Green	5μl
上游引物(10pmol)	0.5μl
下游引物(10pmol)	0.5μl
cDNA 模板	1.0μl
去离子水	补足至 20μl

反应步骤：95℃ 预变性 10min，然后 95℃ 30s；60℃ 退火 30s；72℃ 延伸 40s，40 个循环。

整个反应使用 ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪检测。相对定量结果的计算方法：对于所有 mRNA 的检测，使用 ACTIN 作为内参基因，相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算，通过软件 GraphPad Prism 8 作图，并统一通过 t-test 显著性分析。

3 结果与分析

3.1 鉴定与禽流感病毒的 NP 蛋白相互作用的宿主蛋白

了解 IAV 组分与宿主蛋白之间的相互作用可以了解病毒在宿主细胞内生命周期的机制，为了探索与 IAV 核蛋白 NP 相互作用的潜在宿主蛋白，通过 CO-IP 与质谱联用的技术开展实验。实验设置了一组 CO-IP 实验进行银染，使用 0.1MOI 的 H5N6-GFP 病毒感染 DF1 细胞，待 12h 后收取细胞，利用 NP 抗体进行 CO-IP 实验垂钩与 NP 蛋白互作的蛋白质，最终结果（如图 3-1 所示）。

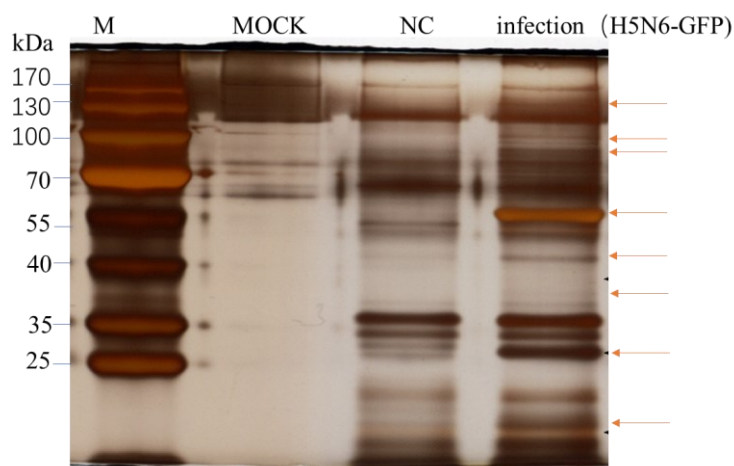


图 3-3. 流感病毒感染 DF1 细胞，利用 NP 抗体 CO-IP 银染结果

Fig. 3-3. DF1 cells were infected with influenza virus and the results were stained with NP antibody CO-IP silver staining

红色箭头指向的部分代表差异条带，MOCK 泳道的样品只含有 loading；NC 为阴性对照，野生型 DF1 细胞；infection 泳道为 H5N6-GFP 病毒感染 DF1 细胞。

The red arrow represents the difference band, the sample of MOCK swimming lane only contains loading; NC as negative control, wild type DF1 cells, and infection swimming lane is the experimental group of DF1 cells infected by H5N6-GFP virus.

另外，在转染带有 HA 标签的 H5N6 流感(A/鸭子/湖北/WH18/2015) NP(HA-NP) 质粒的 DF1 细胞中进行了 IP 分析。以 pCAGGS 空载体转染作为阴性对照。然后，用抗 HA 琼脂糖珠富集和洗脱 HA-NP 及其相互作用组分。进一步对获得的蛋白质混合物进行 Western blot 分析(图 3-2)。

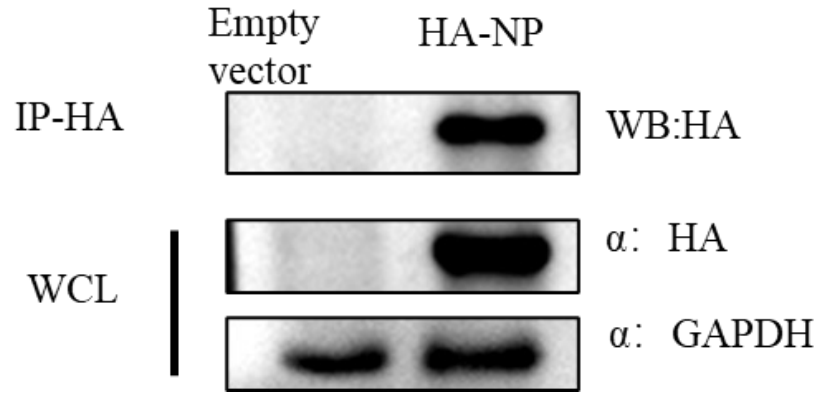


图 3-2. 流感病毒 NP 蛋白 CO-IP 分析

Fig. 3-2. CO-IP analysis of Influenza virus NP protein

HA-NP 过表达的 DF1 细胞中提取的与 HA 相关的免疫沉淀物进行的 SDS-PAGE 实验

SDS-PAGE experiments of HA-related immunoprecipitates extracted from HA-NP-overexpressed DF1 cells

通过 Western 实验得出, IP 实验能够成功表达 HA 和 NP 蛋白后, 接下来进行了银染实验, 挖掘其他存在互作关系的蛋白质, 将 CO-IP 实验获得的混合物进行银染, 得到差异蛋白, 结果如图 3-3 所示。

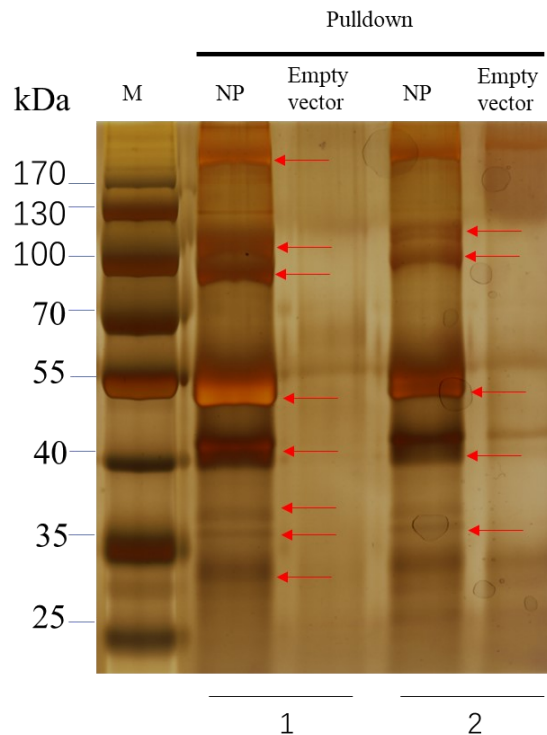


图 3-3. HA-NP 蛋白表达 CO-IP 进行银染分析

Fig. 3-3. HA-NP protein expression CO-IP was analyzed by silver staining.

红色箭头指向区域代表与空载体泳道相比存在的差异条带(NP: 55kDa)

The red arrow points to the area that represents the difference between the lane of the empty carrier and that of the empty carrier (NP: 55kDa)

免疫共沉淀纯化的 NP-HA 蛋白连同其他互作蛋白通过 SDS-10% PAGE 分析, 银染色试剂盒染色。NP 蛋白的位置在 55kDa 处, pCAGGS-HA 为对照组, 与对照组相比差异条带是与 NP 蛋白互作的蛋白。第 1、2 组泳道为相同样品的重复组。与转染空载体的对照组相比, HA-NP 组出现多条特异性条带(红色箭头指向处, 即为 HA 抗体 CO-IP 垂钓下来的差异蛋白, 切割多条特异性条带, 连同液体上样蛋白一同进行 LC-MS/MS 质谱分析。实验在质谱分析后, 将两组质谱结果结合, 一同分析。

根据得到的质谱结果挑选评分较高的蛋白进行初步验证, 挑选的五种蛋白的质谱结果如表 3-1 所示, 分别为 CCT5、FARSA、Mthfd1l、NOP56 和 RUVBL1。

表 3-1 质谱结果
Table 3-1 Results of Mass spectrometry

Accession	GN	Description	Σ # Proteins	IonScore NP	MW [kDa]
Q8BY49	Mthfd1	Uncharacterized protein OS	5	3.24	26.44687
Q5F411	CCT5	T-complex protein 1 subunit epsilon OS	1	22.59	59.67691
Q5ZJQ2	FARSA	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit OS	1	3.16	49.5
FIN8Z4	RUVBL	RuvB-like helicase OS	1	11.84	50.1483
A0A1D5P629	NOP56	Uncharacterized protein OS	3	57.9	59.8
F1NYI3	RTCB	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS	1	4.55	55.20677

通过针对每个候选基因设计了三个不同的 siRNA 来抑制它们在 DF-1 细胞中的表达, 分别转染 si-RNA 到 DF1 细胞后, 提取 RNA 通过荧光定量分别检测每条 siRNA 作用于 DF1 细胞后, 通过相对荧光定量测定该基因 mRNA 的表达量, 选择了沉默效果最高即基因表达量最低的一个 siRNA 进行后续研究(图 3-4)。

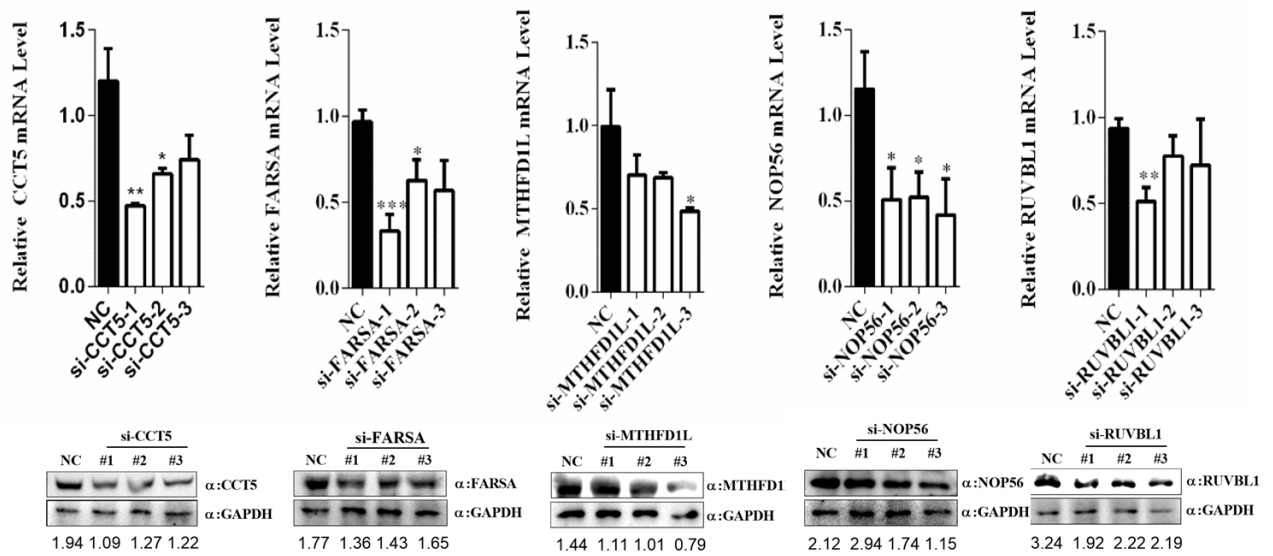


图 3-4. 沉默宿主因子测蛋白表达量

Fig. 3-4. Detection of protein expression by silencing host factor

实时荧光定量 PCR 以及 western blot 检测不同 siRNAs 组转染 DF1 细胞 24h 后的基因敲低效率

Knockdown efficiency test in DF1 cells at 24 h post-transfection with different sets of siRNAs by real-time

PCR and western blot (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, by t-test)

在分别向 DF1 细胞中转染沉默效果最好的 si-RNA 后, 感染 0.1MOI 的 H5N6-GFP 流感病毒, 感染后 24h 提取 RNA 反转录后, 使用 cDNA 进行相对荧光定量检测, 查看沉默对应基因后, NP、PA、PB2 蛋白的表达水平与 NC 阴性对照相比有哪些变化, 结果显示, CCT5 基因沉默对 NP 表达量的影响最为显著, 通过 qRT-PCR 研究了 CCT5、FARSA、Mthfd1、NOP56 和 RUVBL1 表达分别降低, 对病毒 NP、PA 和 PB2 mRNA 的影响。在这些被测试的基因中, CCT5 的敲除导致 NP、PA 和 PB2 mRNA 的丰度与 NC 对照相比显著降低 (图 3-5), 从而表明它与病毒复制密切相关。

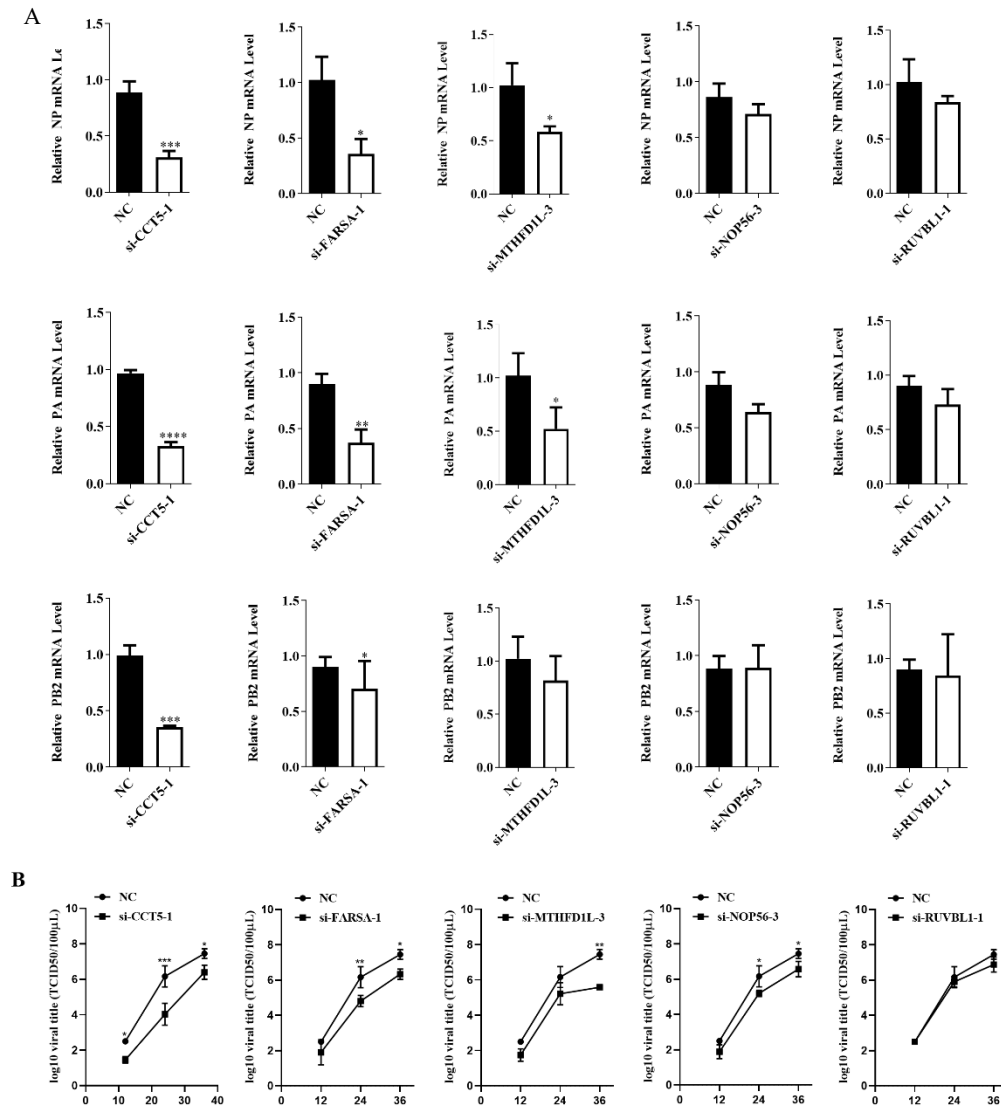


图 3-5. 沉默宿主因子测流感病毒蛋白 mRNA 表达水平荧光定量结果

Fig 3-5. Real-time PCR results of mRNA expression level of influenza virus protein measured by silencing host factor

A) 病毒感染分别沉默不同宿主因子的 DF1 细胞，实时荧光定量 PCR 检测流感病毒蛋白 NP、PB2、PA 的 mRNA 表达水平。用 H5N6-GFP 病毒(MOI 为 0.1)感染 DF1 细胞 24h 后，DF1 细胞中病毒 NP/PA/PB2 mRNA 的丰度以三个独立实验的平均值±SD 表示 B) TCID₅₀ 测定流感病毒滴度(*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, by t-test)

A) DF1 cells with different host factors were silenced by virus infection, and the mRNA expression levels of influenza virus proteins NP, PB2 and PA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Viral NP/PA/PB2 mRNA abundance in DF1 cells that were transfected with indicated siRNAs or a negative control and then infected with H5N6-GFP virus (MOI of 0.1) for 24 h. The data are presented as the means ±SD from three independent experiments B) Determination of influenza virus titer by TCID₅₀ (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001, by t-test).

由于 CCT5 对 NP、PA、PB2 mRNA 的表达水平影响是五个候选宿主因子中最

强的，因此，为了进一步确认 CCT5 对流感病毒复制的影响，通过转染 si-CCT5 到 DF1 细胞，感染 H5N6-GFP 病毒 24 小时后，在倒置显微镜下观察与 NC 阴性对照相比，病毒复制情况，即细胞荧光强度。通过观察发现，CCT5 表达受 si-RNA 的影响下调，会导致病毒感染细胞的荧光强度降低，即 CCT5 表达下调可影响病毒复制，表现为抑制效果（图 3-6）。因此，将选择 CCT5 基因作为进一步研究的对象。

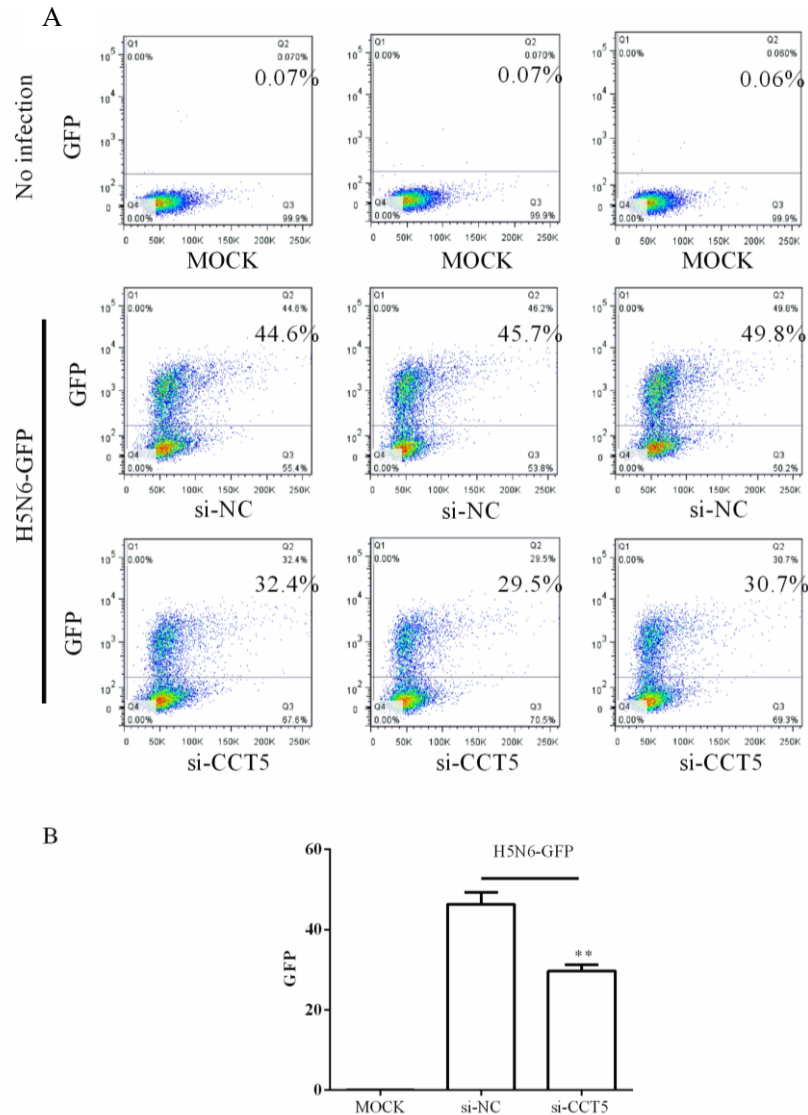


图 3-6. CCT5 表达下调抑制病毒复制流式分析图

Fig. 3-6. Down-regulation of CCT5 expression inhibits virus replication by flow analysis

A) 流式细胞仪检测转染 si-CCT5 和 si-NC 的 DF1 细胞和野生型 DF1 细胞感染 0.1MOI H5N1/GFP 病毒后的荧光强度。B) 根据荧光强度得到更为清晰的柱状图。以未感染的 DF1 细胞作为阴性对照。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, by t-test)

A) the fluorescence intensity of DF1 cells transfected with si-CCT5 and si-NC and wild-type DF1 cells infected with 0.1MOI H5N1/GFP virus was detected by flow cytometry. B) A clearer histogram is obtained according to the fluorescence intensity. Uninfected DF1 cells were used as negative control (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, by t-test).

3.2 CCT5 与 NP 蛋白相互作用。

利用抗原抗体的特异性结合的原理，CO-IP 实验能够将与抗体存在直接或间接相互作用关系的蛋白垂钓出来，由于 CCT5 是由 NP-HA 抗体垂钓经过质谱检测得出的蛋白结果，因此我们进一步验证了 CCT5 是否与病毒 NP 蛋白存在相互作用关系。通过将 HA-NP 与 Flag 标记的 CCT5 质粒共转染 DF1 细胞，然后分别用抗 Flag 或抗 HA 标签的单克隆抗体进行免疫共沉淀实验，并分别以空载体（pCAGGS-HA 或 P3xFlag）为阴性对照。经过 CO-IP 垂钓以及 Western blot 蛋白印迹检测，得出 Flag-CCT5 与 HA-NP 共转染的情况下，抗 Flag 抗体可沉淀垂钓到 HA-NP 条带，而空载体未见 HA-NP 条带；在用 HA 抗体沉淀 Flag 蛋白时，也观察到了相同的结果，即相比于对照组，HA 抗体垂钓到 CCT5 蛋白，Flag-CCT5 是在 HA-NP 存在的情况下用抗 HA 抗体沉淀的(图 3-7)。同样的实验，使用 HA-PB2 质粒与 CCT5-Flag 共转染，结果证明 CCT5 与 NP 和 PB2 蛋白都存在相互作用关系（图 3-8）。

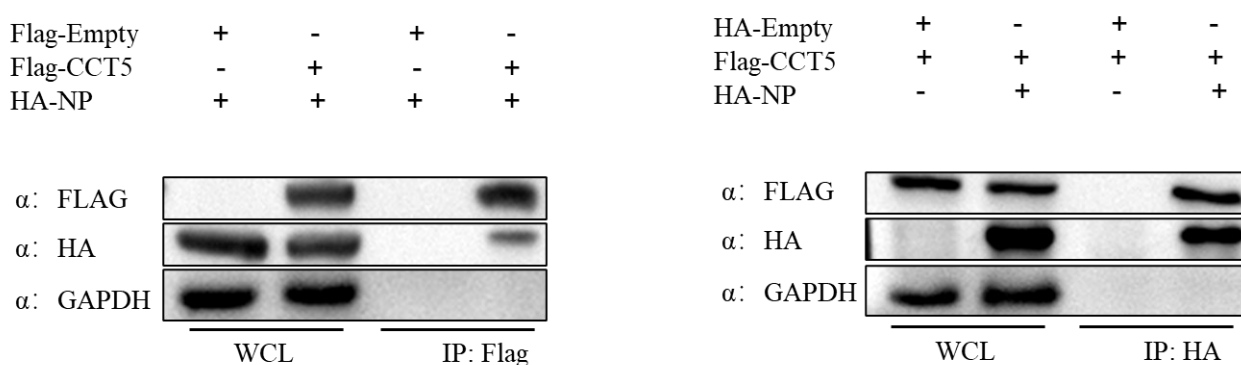


图 3-7. CCT5 与流感病毒蛋白 NP 互作的 CO-IP 分析

Fig. 3-7. CO-IP analysis of interaction between CCT5 and influenza virus NP protein

DF1 细胞共转染 HA-NP 和 CCT5-FLAG 质粒，使用 HA 或 FLAG 抗体分别垂钓互作蛋白，并利用 Western blot 实验检测 FLAG 或 HA 蛋白的表达。以 p3XFlag 与 NP-HA 共转染作为阴性对照。对于所有的实验，通过使用三个独立的实验来检验结果

DF1 cells were co-transfected with HA-NP and CCT5-FLAG plasmids, HA or FLAG antibodies were used to fish for interaction proteins, and Western blot assay was used to detect the expression of FLAG or HA proteins. The expression of flag or HA protein was detected by Western blot analysis. The co-transfection of p3XFlag and NP-HA or PB2-HA was used as negative control. For all experiments, the results were examined by using three independent experiments

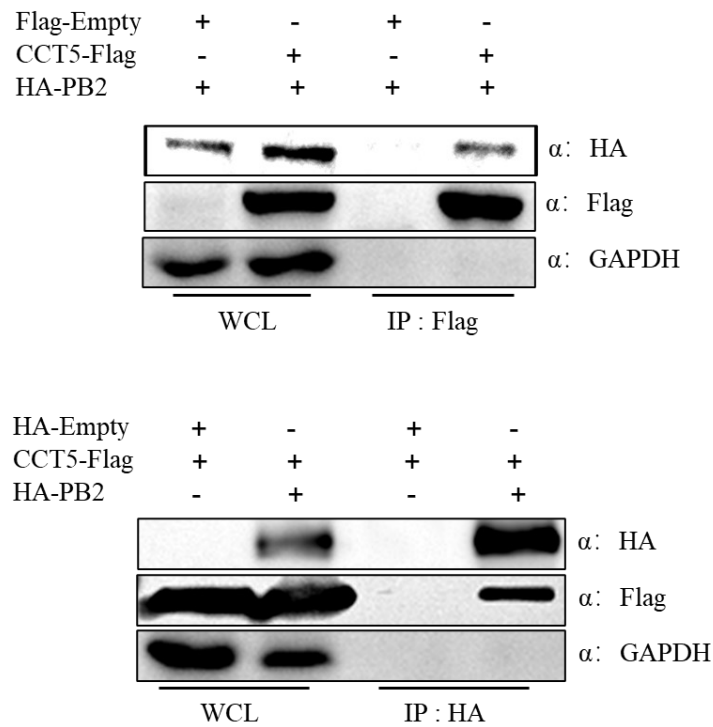


图 3-8. CCT5 与流感病毒蛋白 PB2 互作 CO-IP 分析

Fig. 3-8. CO-IP analysis of interaction between CCT5 and influenza virus PB2 protein

DF1 细胞共转染 HA-PB2 和 CCT5-FLAG 质粒，使用 HA 或 FLAG 抗体分别垂钩互作蛋白，并利用 Western blot 实验检测 FLAG 或 HA 蛋白的表达。以 p3XFlag 与 PB2-HA 共转染作为阴性对照。对于所有的实验，通过使用三个独立的实验来检验结果

DF1 cells were co-transfected with HA-PB2 and CCT5-FLAG plasmids, HA or FLAG antibodies were used to fish for interaction proteins, and Western blot assay was used to detect the expression of FLAG or HA proteins. P3XFlag and PB2-HA co-transfection was used as negative control. For all the experiments, the results were tested by using three separate experiments

此外，鉴于 vRNP 在流感病毒的复制过程中发挥着重要作用，在发现 CCT5 与 NP、PB2 蛋白存在互作关系后，实验接下来探究了在 H5N6 病毒感染的 DF-1 细胞中，检测 CCT5 与 RNP 的其他组分之间是否存在相互作用。结果证明，CCT5 可能与病毒 NP 和 PB2 互作，但与 PB1 或 PA 无相互作用关系（图 3-9）。

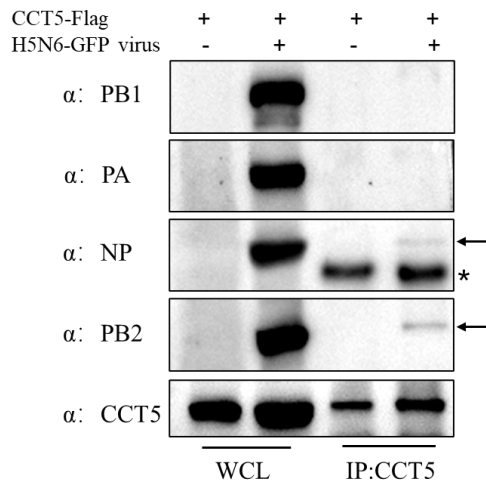


图 3-9. CCT5 与 vRNP 组分的互作关系

Fig. 3-9. Interaction between CCT5 and vRNP components

Western blot 检测 vRNP 各组分的表达。星号表示从琼脂糖珠中释放的残留蛋白 A 的位置和/或在 Western blot 分析中使用的抗体交叉反应 IgG 重链的位置

The expression of components of vRNP was detected by Western blot analysis. Asterisks indicate the position of the residual protein A released from agarose beads and/or the position of the IgG heavy chain of antibody cross-reaction used in Western blot analysis

重要的是，在 H5N6 感染的 DF-1 细胞中，内源性 CCT5 与病毒 NP、PB2 蛋白互作（图 3-10）。在质粒表达细胞和 H5N6 感染细胞中，CCT5 与病毒 NP 和 PB2 共定位。因此，CCT5 与流感病毒感染密切相关。

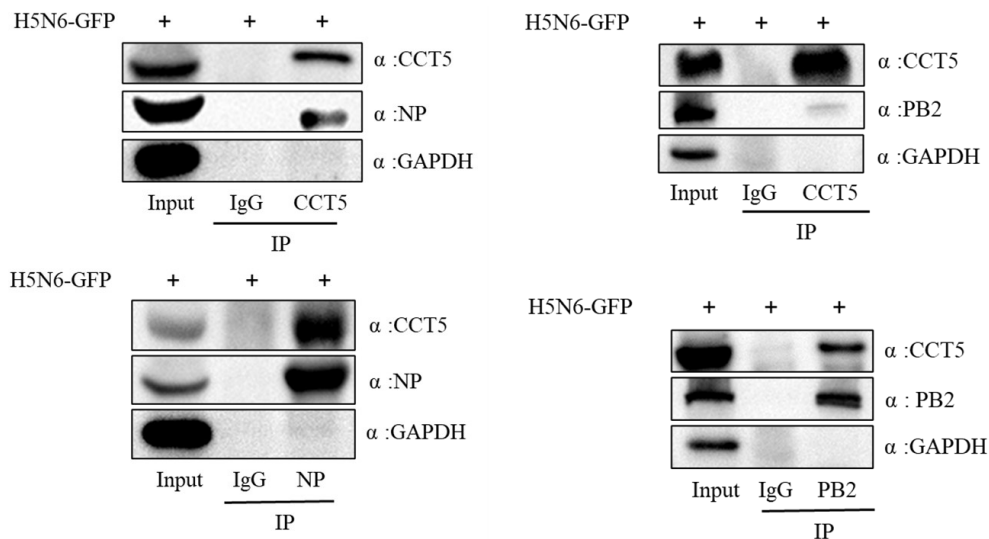


图 3-10. 内源性 CCT5 与 NP、PB2 互作 Western blot 图

Fig. 3-10. Western blot diagram of the interaction between endogenous CCT5, NP and PB2

采用 IgG 抗体共沉淀法作为对照组。对于所有的实验，通过使用三个独立的实验来检验结果

IgG antibody coprecipitation was used as the control group. For all experiments, the results were examined by using three independent experiments

通过使用免疫荧光和共聚焦显微镜检测 CCT5 与 NP 之间的共定位情况，进而补充验证 CCT5 与 NP、PB2 蛋白互作关系。将 HA-NP 或 HA-PB2 与 Flag-CCT5 质粒共转染 DF1 细胞(以 HA-NP 或 HA-PB2 与 p3XFlag 共转染为阴性对照)。对照细胞间接免疫的实验步骤，将 HA-兔抗体和 FLAG-小鼠抗体孵育处理好的 DF1 细胞后，使用相应的荧光抗体孵育，并用共聚焦显微镜(LSM880; 蔡司, 德国)观察荧光蛋白的分布(CCT5-Flag 与 HA-NP/PB2 在 DF1 细胞中共转染 24h 后固定，使用抗 Flag 鼠抗体和抗 HA 兔抗体分别对 CCT5-Flag 和 NP-HA 标记，使用抗小鼠 594 红荧光二级抗体，488 绿荧光抗兔抗体进行染色，DAPI 染色细胞核)。在转染细胞中，CCT5 主要定位于细胞质，并与 NP 或 PB2 蛋白共定位(图 3-11)。

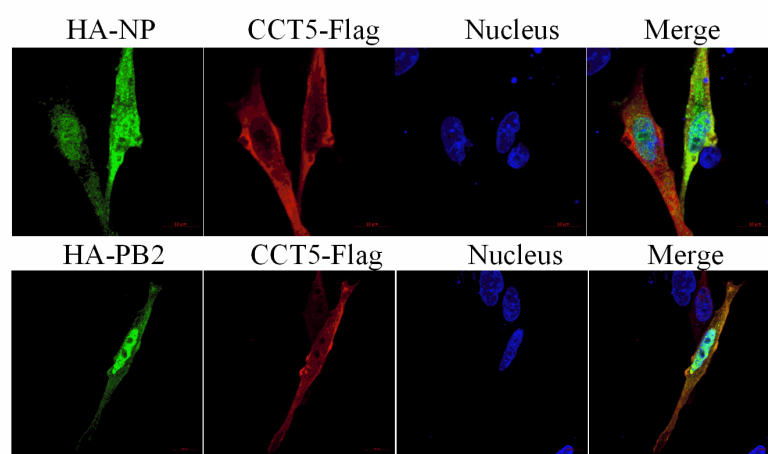


图 3-11. CCT6 与 NP、PB2 蛋白共定位

Fig. 3-11. CCT6 co-localized with NP and PB2 proteins

CCT5-Flag 与 HA-NP 或 HA-PB2 质粒共表达免疫荧光图。实验用来自三个独立实验的共聚焦显微镜(LSM 880; Zeiss)检查。刻度 10 微米

Co-localization of CCT5 and NP, PB2 in transfected cells. Experiments were examined with a confocal microscope (LSM 880; Zeiss) from three independent experiments. The scale is 10 microns

在 0.1mol/L 的 IAV-H5N6-WT 感染 DF1 细胞 12h 后，也检测到内源性 NP 或 PB2 和 CCT5 蛋白的定位，在未感染的 DF1 细胞中，只有内源性 CCT5 呈点状均匀分布在细胞质中。病毒感染 DF1 细胞 12h 后，CCT5 荧光增强，CCT5 表达量增加，NP 蛋白几乎完全释放到细胞质中，CCT5 和 NP 蛋白主要共定位在靠近细胞膜的细胞质中，内源性 PB2 蛋白主要与 CCT5 共定位在细胞质中(图 3-12)。因此，IAV 感染可能促进 CCT5 的表达，同时 CCT5 与 NP 共定位。

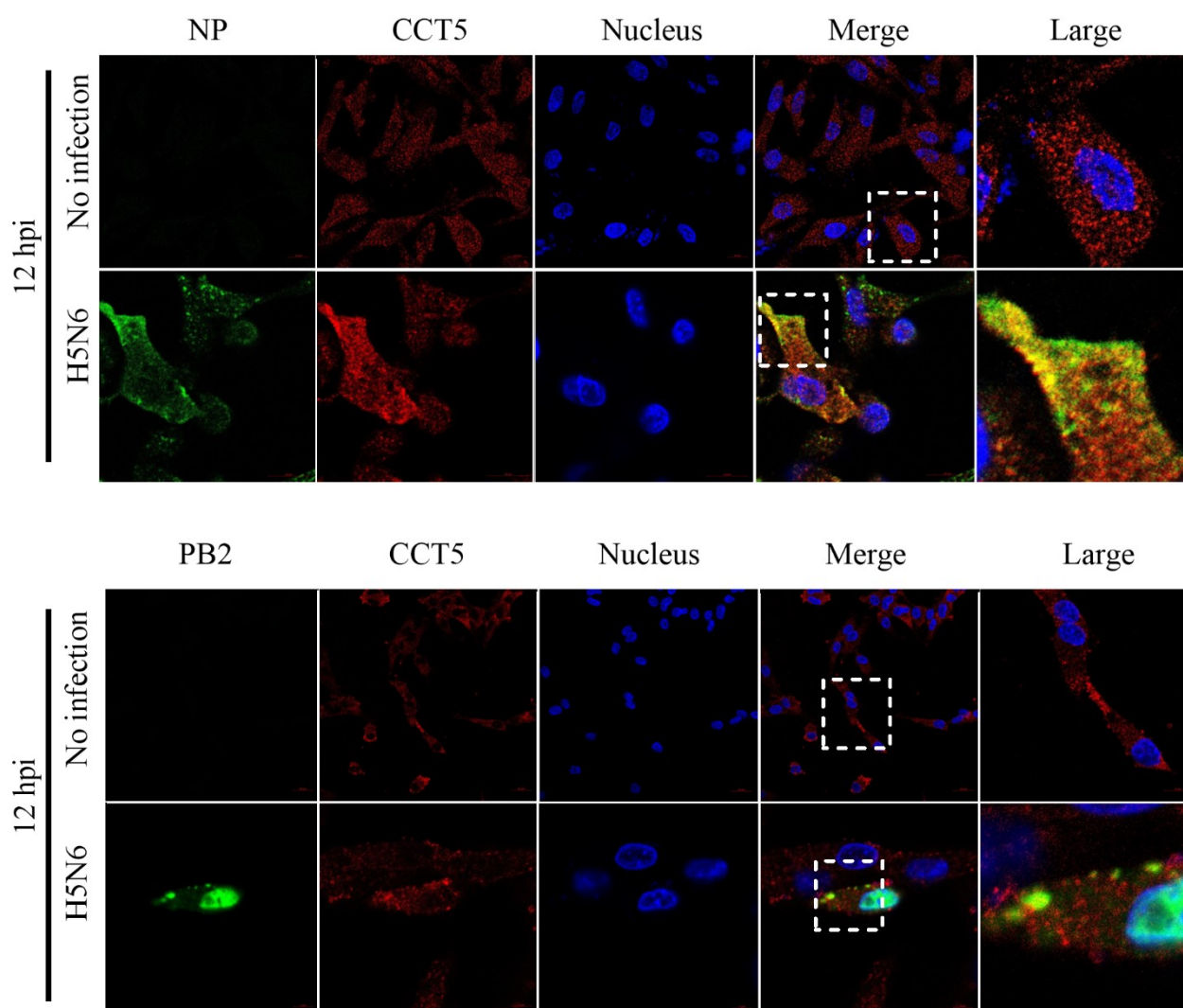


图 3-12. 病毒感染后，检测的内源性 CCT5 与病毒 NP、PB2 蛋白的共定位情况。

Fig. 3-12. Co-localization of endogenous CCT5 and NP in DF1 cells.

3.3 IAV 感染上调 DF-1 细胞中 CCT5 的表达

在得到 CCT5 与流感病毒 NP、PB2 蛋白存在互作以及共定位关系后，已知 CCT5 表达沉默可以抑制流感病毒结构蛋白的 mRNA 表达量，随后检测在流感病毒感染过程中，CCT5 的表达是否受到调控。用 H5N6 病毒感染 DF-1 细胞，分析 CCT5 和 NP 的 mRNA 和蛋白水平。病毒感染以病毒剂量依赖的方式在 mRNA 和蛋白水平上增强细胞 CCT5 的表达(图 3-13)。

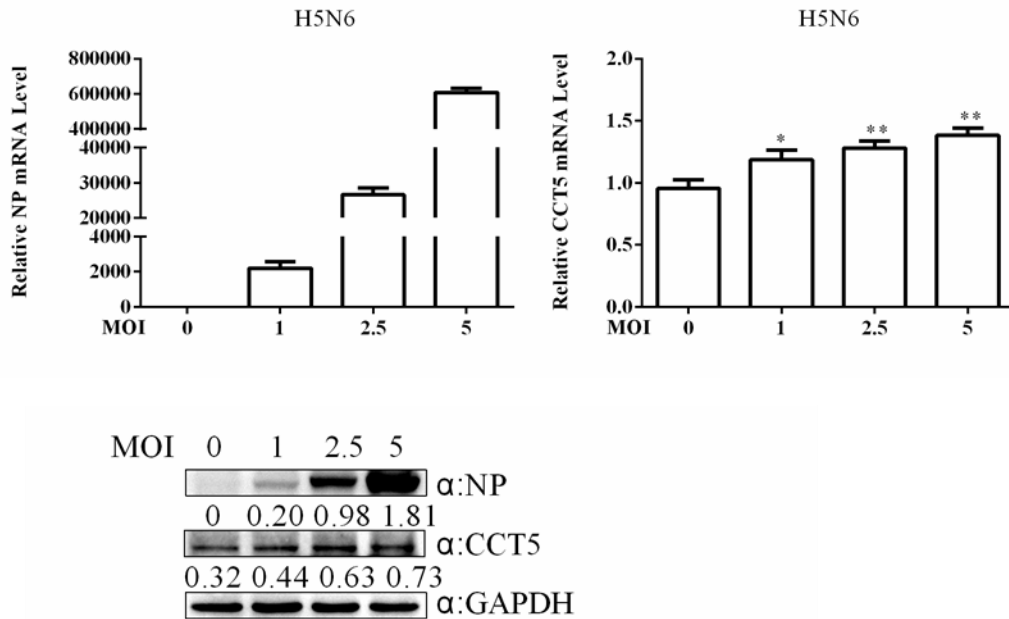


图 3-13. 流感病毒 H5N6-GFP 感染 DF1 细胞受病毒剂量的影响，促进 CCT5 的表达。

Fig. 3-13. Influenza virus H5N6-GFP infection of DF1 cells is affected by the dose of influenza virus, which promotes the expression of CCT5.

分别利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测流感病毒感染 DF1 细胞后，NP、CCT5 的表达情况。以 GAPDH 作为对照，以鸡的 Actin 作为 RT-PCR 分析对照。（*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ ）

QRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NP and CCT5 in DF1 cells infected with influenza virus. GAPDH was used as control, and chicken Actin was used as RT-PCR analysis control. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, from three independent experiments by two-tailed Student's t test).

此外，在感染 H5N6 的 DF-1 细胞中，CCT5 mRNA 和蛋白的丰度增加，并且这一参数与感染过程中病毒复制呈正相关(图 3-14)，即 CCT5 的表达水平会随时间梯度而递增。

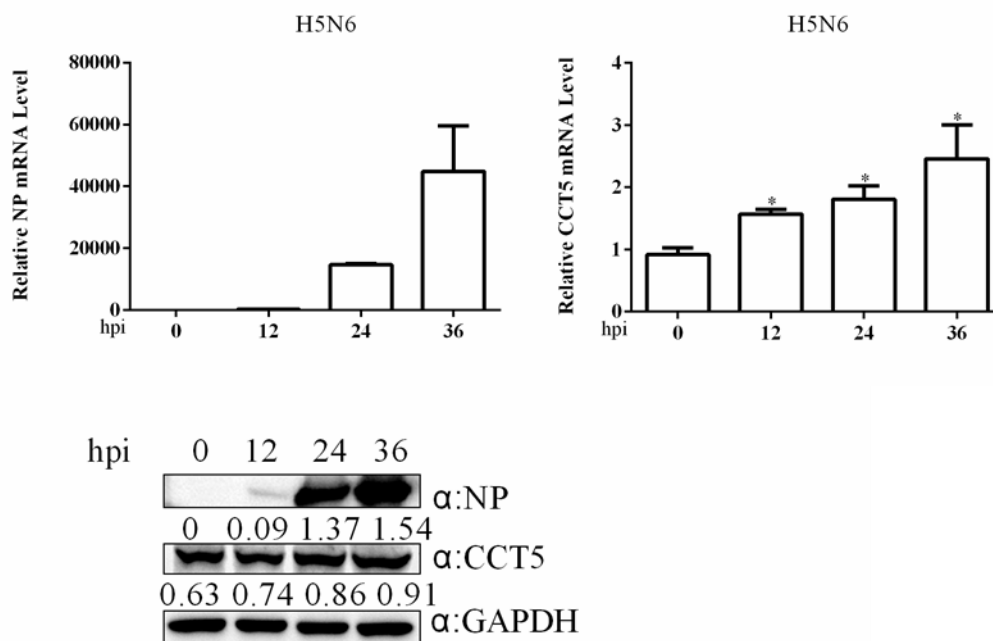


图 3-14. 流感病毒 H5N6-GFP 感染 DF1 细胞受时间梯度影响，促进 CCT5 的表达

Fig. 3-14. DF1 cells infected with influenza virus H5N6-GFP were affected by time gradient and promoted the expression of CCT5

分别利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测流感病毒感染 DF1 细胞后，NP、CCT5 的表达情况。以 GAPDH 作为对照，以鸡的 Actin 作为 RT-PCR 分析对照。（*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ）

The experiments of qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NP and CCT5 in DF1 cells infected with influenza virus. GAPDH was used as control, and chicken Actin was used as RT-PCR analysis control. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, from three independent experiments by two-tailed Student's t test).

为了确定 CCT5 的上调是否是特异性的针对 H5N6 流感病毒，并选择了另外两个 IAV 株 H5N1/HM 和 H5N1/DW 进行进一步的评估。结果与 H5N6 一致，H5N1/HM(图 3-15)和 H5N1/DW(图 3-16)感染也导致 CCT5 在 mRNA 和蛋白水平的表达增加。这些结果表明，细胞 CCT5 在流感病毒感染后会出现上调趋势，这一结果暗示着，病毒刺激 CCT5 表达，CCT5 可能在流感病毒增殖过程中具有很大的潜在作用。

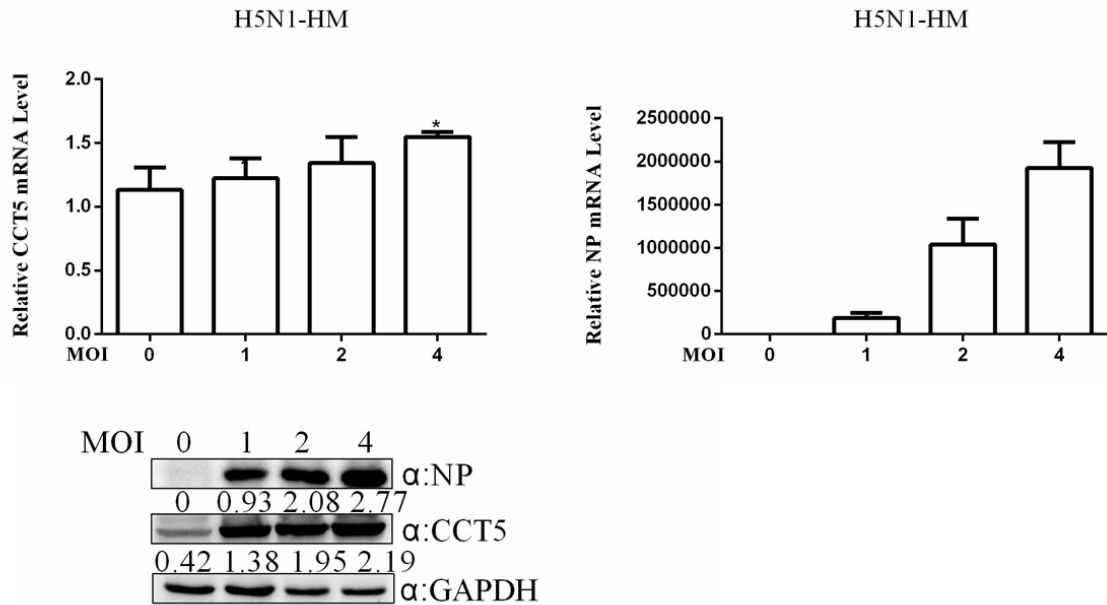


图 3-15. 流感病毒 H5N1-HM 感染 DF1 细胞, NP、CCT5 检测结果

Fig. 3-15. Test results of NP and CCT5 when influenza virus H5N1-HM infected DF1 cells

分别利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测流感病毒感染 DF1 细胞后, NP、CCT5 的表达情况。以 GAPDH 作为对照, 以鸡的 Actin 作为 RT-PCR 分析对照。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

The experiments of qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NP and CCT5 in DF1 cells infected with influenza virus. GAPDH was used as control, and chicken Actin was used as RT-PCR analysis control. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, from three independent experiments by two-tailed Student's t test).

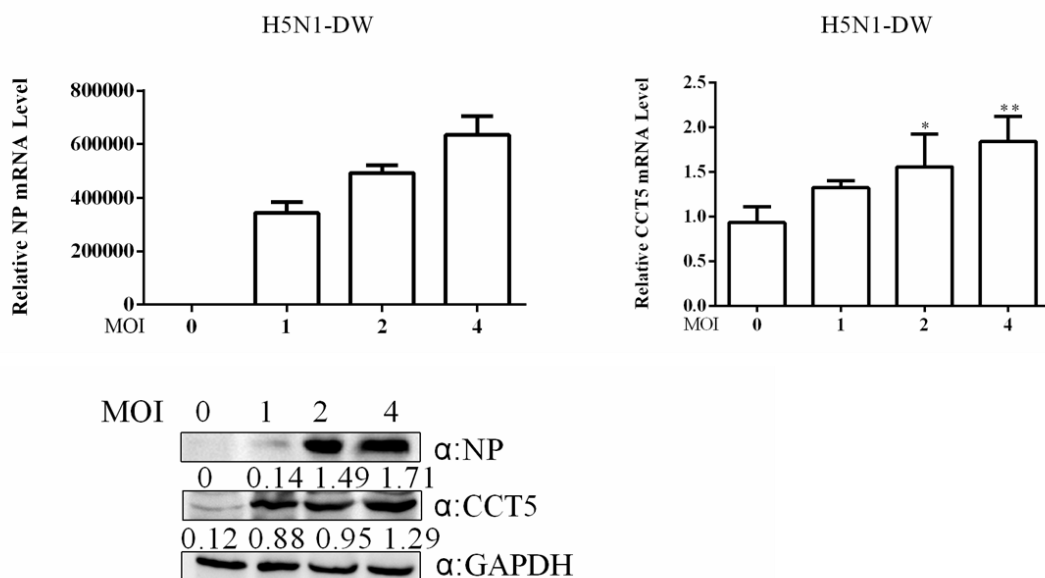


图 3-16. 流感病毒 H5N1-DW 感染 DF1 细胞, NP、CCT5 检测结果

Fig. 3-16. Test results of NP and CCT5 when influenza virus H5N1-HM infected DF1 cells

3.4 CCT5 基因沉默限制了 IAV 在 DF1 细胞中的复制

3.4.1 CCT5 沉默不影响 DF1 细胞活性

考虑到 H5N6 流感病毒促进了 CCT5 的表达,进一步确定了 CCT5 在流感病毒复制中的存在某些作用。为了排除沉默 CCT5 可能导致 DF-1 细胞活性低下而影响了流感病毒蛋白表达的可能性,进行了细胞存活率测定,结果显示,CCT5 敲低对细胞活性无明显影响(图 3-17)。

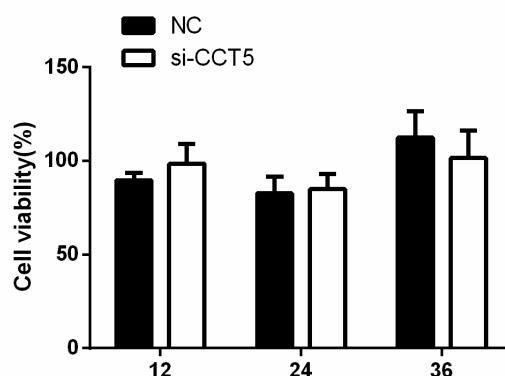


图 3-17. si-CCT5 对 DF1 细胞活性的影响

Fig. 3-17. Effect of CCT5 on viral replication

用 si-CCT5 处理 DF1 细胞,以 si-NC 为阴性对照。转染后 12h 用 CCK-8 检测细胞活性

Effect of si-CCT5 on DF1 cell activity. DF1 cells were treated with si-CCT5, and si-NC was the negative control. Cell activity was measured by CCK-8 at 12 h post-transfection

3.4.2 CCT5 沉默下调流感病毒的增长曲线

随后进一步用 H5N6-GFP 病毒以 0.1 的初始 MOI 感染 siCCT5 或 NC 转染的 DF-1 细胞 12、24 和 36h,然后收集培养上清进行病毒滴度测定,并测定感染后 24h 收集的感染细胞的荧光强度,以未感染的 DF1 细胞作为阴性对照,在 3 个时间点采集细胞样品进行 Western blot 和 qRT-PCR 分析。实验结果的数据显示,与 NC 转染相比,CCT5 表达受损后 24 小时和 36 小时培养上清液中的病毒的滴度显著降低(图 3-18)。

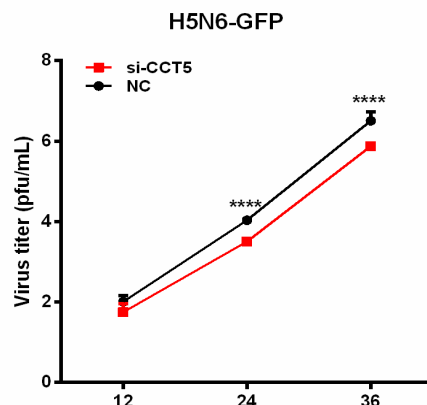


图 3-18. 病毒在 CCT5 沉默的 DF1 细胞中的生长曲线

Fig. 3-18. The growth curve of the virus in CCT5-silenced DF1 cells

将图 3-15 中收集的上清与 MDCK 细胞孵育，于感染后 72h 测定病毒滴度。

The supernatant collected from Fig 3-15 was incubated with MDCK cells, and the virus titer was determined 72 hours after infection.

3.4.3 CCT5 影响流感病毒 RNA 的生成

此外，CCT5 的表达降低导致病毒 NP 蛋白的 vRNA、mRNA、cRNA 和 NP 蛋白的丰度降低。相反，使用 H5N6-GFP 病毒同样感染 CCT5-Flag 质粒转染的 DF1 细胞时，结果发现表达的 CCT5 通过增加病毒 RNA(图 3-19)和蛋白质水平(图 3-20)而增强了 H5N6 的复制。总体而言，这些数据表明 CCT5 在支持 DF-1 细胞中 IAV 复制方面发挥了重要作用。

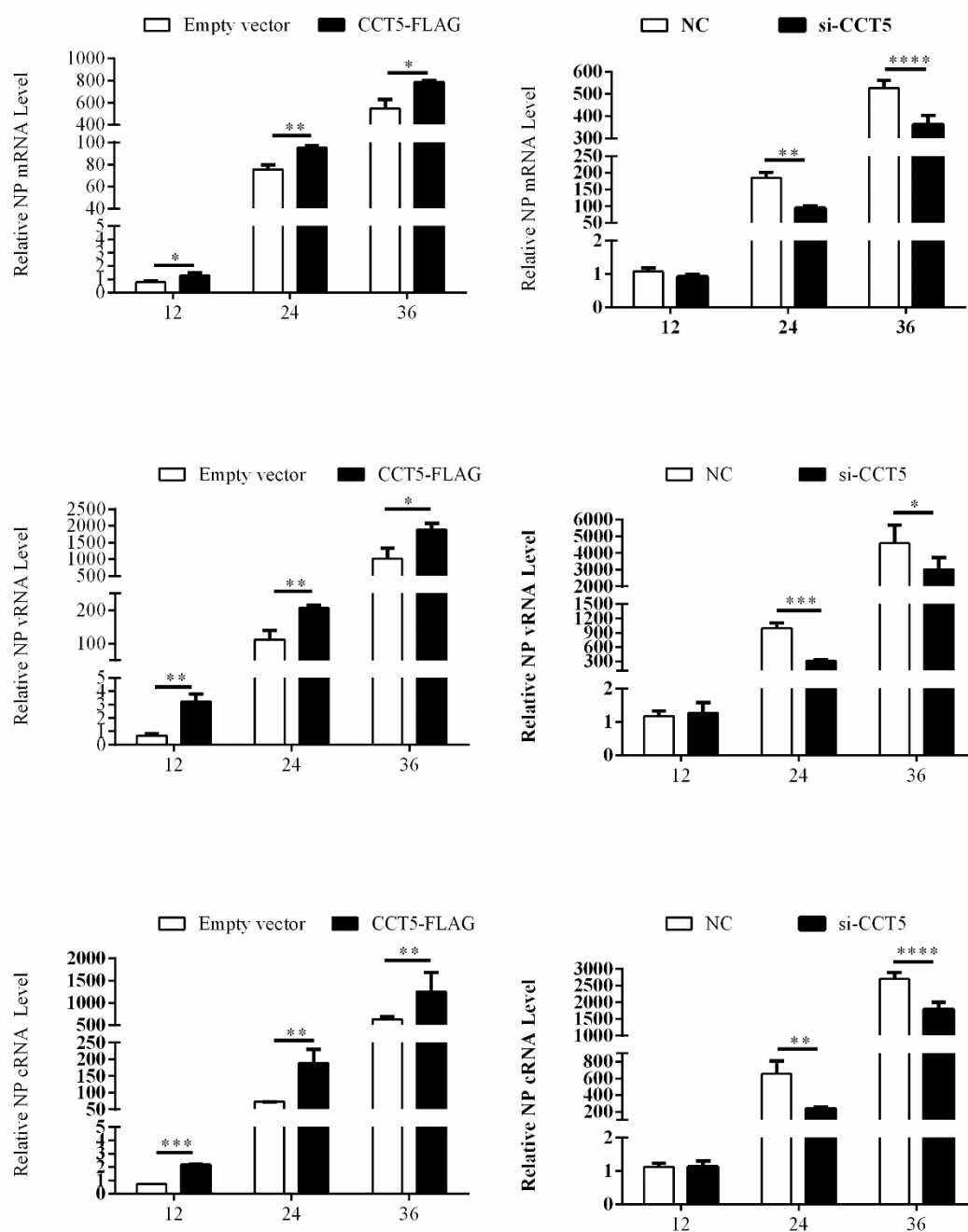


图 3-19.CCT5 影响流感病毒 RNA 合成的实时荧光定量结果

Fig3-19. The Real-time results of the effect of CCT5 on RNA synthesis of influenza virus

0.1MOIH5N6-GFP 病毒感染转染 CCT5-Flag 或 si-CCT5 的 DF1 细胞 Q-PCR 检测沉默或表达 CCT5 对流感病毒 NP RNA 合成的影响。以鸡的 Actin 作为 RT-PCR 分析对照 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

DF1 cells transfected with CCT5-Flag or si-CCT5 and infected with 0.1 MOI H5N6-GFP virus. The levels of three kinds of RNAs of viral nucleoprotein NP were determined by real-time PCR. ACTIN-chicken was used as the control. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, from three independent experiments by t-tests).

3.4.4 CCT5 影响流感病毒 NP 蛋白的表达

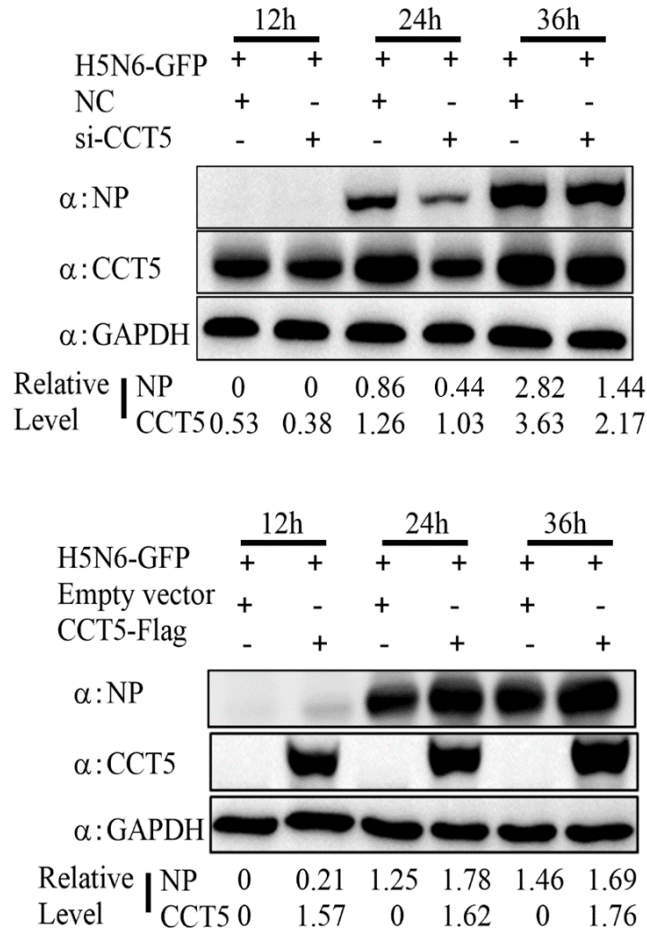


图 3-20. CCT5 影响 NP 蛋白表达 Western Blot 图

Fig. 3-20. Effect of CCT5 on NP protein expression by Western Blot

用 0.1MOI H5N6-GFP 病毒感染转染 CCT5-Flag 或 si-CCT5 的 DF1 细胞。Western blot 检测沉默或表达 CCT5 对流感病毒 NP 表达的影响。以 GAPDH 作为上样对照和标记。

DF1 cells transfected with CCT5-Flag or si-CCT5 and infected with 0.1 MOI H5N6-GFP virus. The levels of three kinds of RNAs of viral nucleoprotein NP were determined by Western blot analysis. GAPDH was used as a loading control and marker.

3.5 CCT5 增强病毒聚合酶活性

通过探究 CCT5 能否通过调节聚合酶活性来影响病毒复制，进一步考察 CCT5 对流感病毒复制的促进作用机制，使用 DF1 细胞共转染 Flag-CCT5 与 pPOL1-AVI 质粒，转染后 12h，感染 H5N6-GFP 流感病毒。Flag 空载体与 pPOL1-AVI 质粒共转染并感染病毒的 DF1 细胞作为对照组。24h 小时后，通过双萤光素酶实验检测细胞样品的双萤光数值，测定聚合酶活性(图 3-21)。由结果图示可知，病毒刺激下三组聚

合酶活性与阴性空白对照相比有了明显提升, 而且表达 CCT5-Flag 的实验组中, 聚合酶活性显著增强, 对应 Western blot 结果可以看到, CCT5 蛋白表达的情况下, PA、NP、PB1、PB2 蛋白的表达均有不同程度的增加。因此有想法认为, CCT5 的存在能够以促进流感病毒聚合酶活性, 并与流感病毒部分结构蛋白互作的形式, 促进流感病毒的复制。

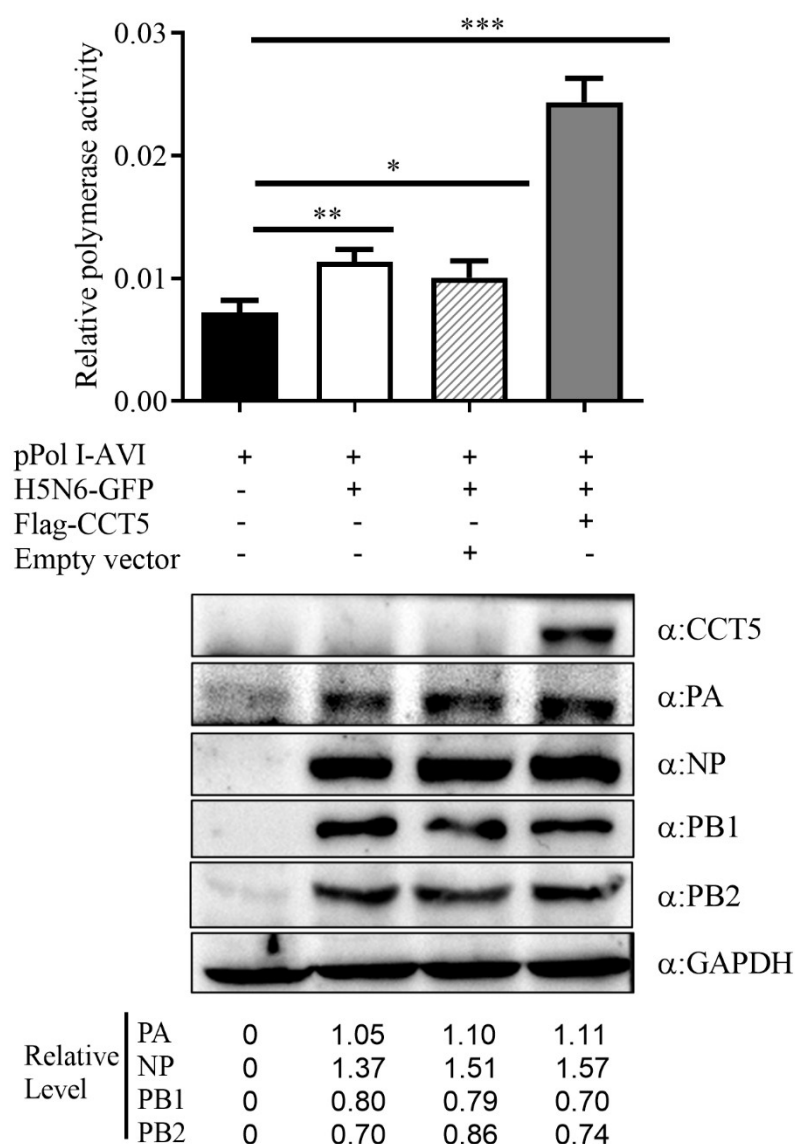


图 3-21. CCT5 促进聚合酶活性

Fig. 3-21. CCT5 promotes polymerase activity

双萤光酶活性检测聚合酶活性, Western blotting 检测 PB1、PB2、PA、NP 和 CCT5 的表达情况(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

Polymerase activities were detected by dual luciferase reporter assay, expression of PB1, PB2, PA, NP and CCT5 were detected by Western Blot (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, from three independent experiments by t-test.)

3.6 CCT5 促进 NP 出核

已知 CCT5 表达可通过与 NP 蛋白互作, 增加 NP 蛋白表达来促进流感病毒复制; 而 CCT5 沉默可通过降低 NP 蛋白的表达, 显著抑制流感病毒的复制。CCT5 与流感病毒蛋白 NP、PB2 互作, 并能够刺激流感病毒聚合酶活性, 促进流感病毒复制。由于 vRNP 的合成过程与流感病毒 NP 蛋白以及聚合酶亚基相关, 因此我们设想 CCT5 是否会通过与 NP 蛋白互作, 促进 NP 核输出, 同样起到促进流感病毒的复制的作用和效果的。因此, CCT5 对入核、出核的影响有待进一步探讨。通过使用 0.1MOI H5N6 野生型流感病毒, 感染高表达 CCT5 的 DF1 细胞。然后分别在感染后 3h、6h、9h 进行免疫荧光检测。使用激光共聚焦显微镜观察 NP 和 CCT5 在细胞内的分布, 分别用抗 HA 兔抗体和抗 NP 鼠抗体标记 CCT5 和病毒 NP 蛋白, 并用 Alexa Fluor 594 标记的 AffiniPure 山羊抗鼠二抗, 和 Alexa Fluor 488 标记的 AffiniPure 山羊抗兔抗体进行染色, 红色荧光代表宿主蛋白 CCT5, 绿色荧光代表流感病毒蛋白 NP。结果显示, CCT5 过表达细胞的 NP 蛋白在细胞核内的定位明显低于转染空载体的对照细胞(图 3-22)。

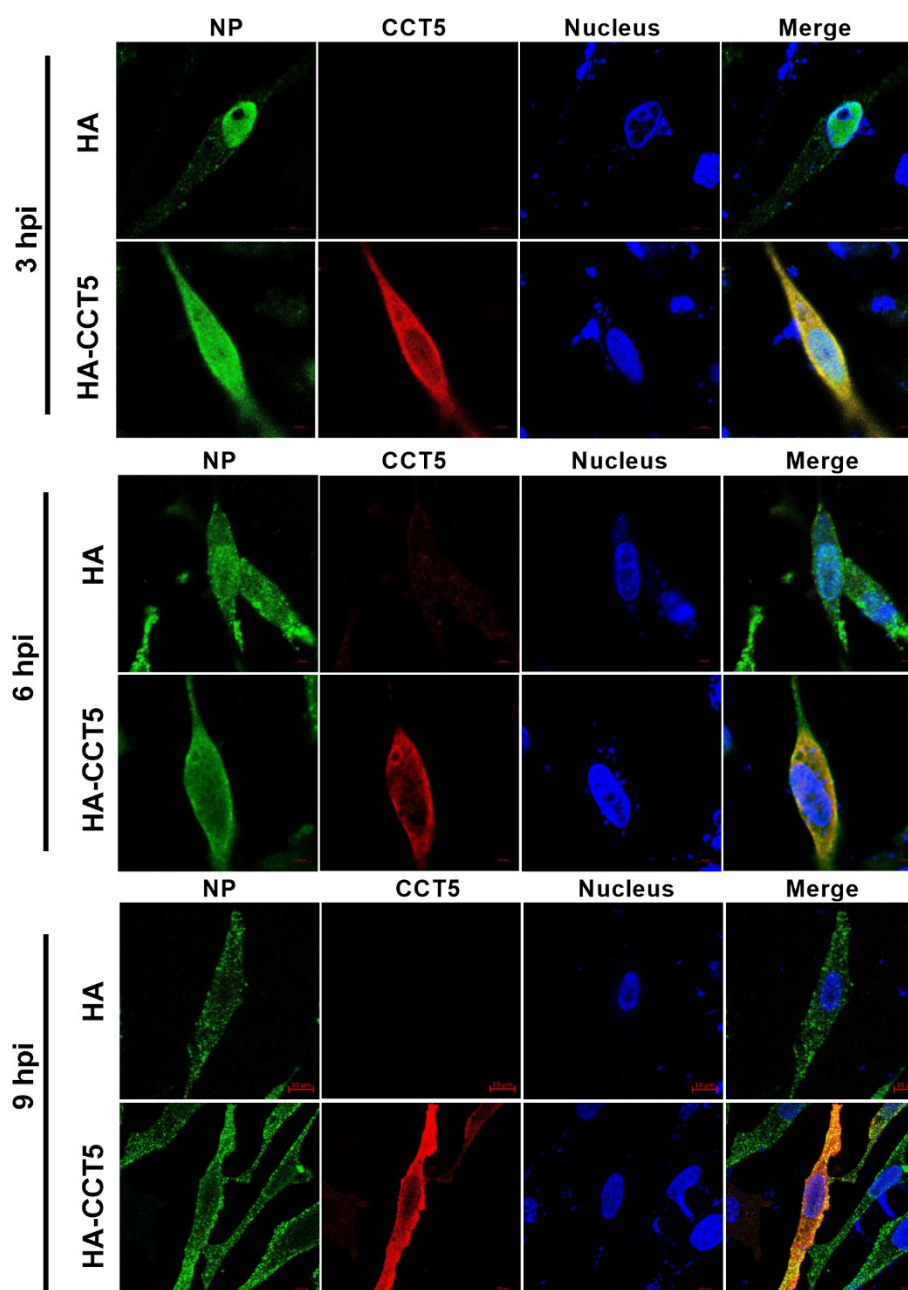


图 3-22. CCT5 和病毒 NP 蛋白在 DF1 细胞感染后不同时间点的定位

Fig. 3-22. Localization of CCT5 and viral NP in DF1 cells at different time points after infection

细胞核用 DAPI(蓝色)染色。图像由 10 微米尺度的共聚焦显微镜(LSM 510; Zeiss)采集。

The nucleus was stained by DAPI (blue). Images were acquired by confocal microscopy (LSM 510; Zeiss) with a scale of 10 microns.

感染 3h 的细胞 CCT5 均匀分布于胞浆和胞核，而阴性对照细胞中 NP 蛋白的分布主要集中在胞核。与对照细胞相比，感染后 6h，NP 蛋白更靠近细胞质，而不是细胞核。感染 9h 后，高表达 CCT5 的 DF1 细胞，NP 蛋白几乎全部出现在胞浆区域，

而对照细胞的荧光显示 NP 蛋白仍留在细胞核内。因此,在病毒感染的早期和中期,CCT5 的存在可以显著促进 NP 核输出。此外,通过感染了同一时间点沉默和过表达 CCT5 的 DF1 细胞,通过核质分离实验以及 Western blot,检测胞浆和细胞核内 NP 蛋白的表达量的差异(图 3-23)。CCT5 沉默导致核内 NP 蛋白滞留,胞浆内 NP 蛋白含量低于 NC 组。CCT5 过表达促进 NP 核输出。胞质内 NP 蛋白含量相对增加。

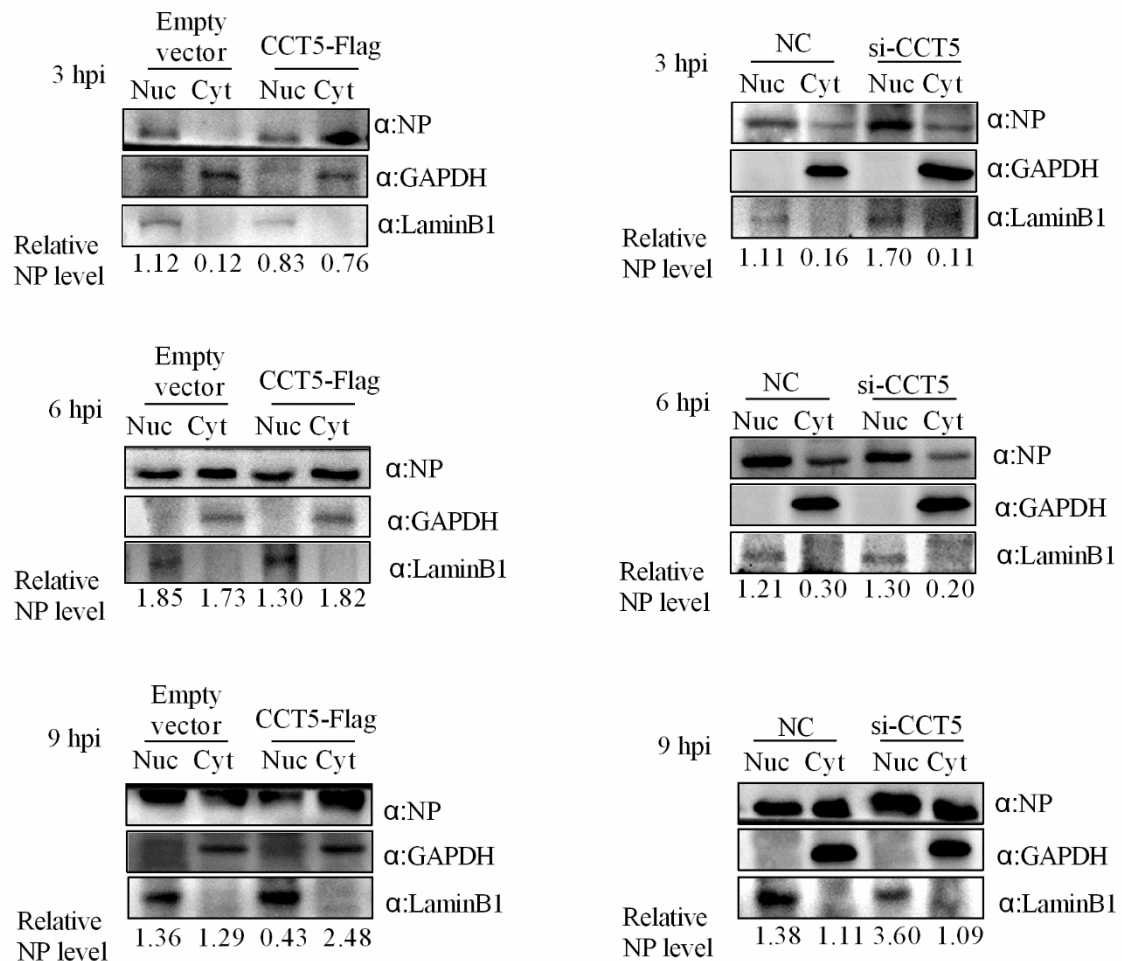


图 3-23. 病毒感染表达或沉默 CCT5 的 DF1 细胞 Western blot 结果图

Fig. 3-23. The results of Western blot infection of DF1 cells expressing or silencing CCT5

用 LaminB1 作为核负荷控制和标记物。以 GAPDH 作为胞浆负荷控制和标记物。

LaminB1 was used as a nuclear loading control and marker. GAPDH was used as a cytosolic loading control and marker.

4 讨论

vRNP 复合体对于流感病毒在感染细胞的细胞核中启动和完成病毒基因组的转录和复制是必不可少的(Mayer et al 2007, Tafforeau et al 2011)。重要的是,流感病毒

vRNP 是由 vRNA, RNA 聚合酶亚基 PA、PB1、PB2 以及 NP 蛋白组成, vRNP 复合体需要病毒 NP 蛋白包裹, 该蛋白包含至少 2 个核定位信号, 这些信号负责通过细胞导入蛋白 α/β 途径, 将 vRNP 导入细胞核(Gabriel et al 2008, Resa-Infante et al 2008, Zhong et al 2012)。到目前为止, 在人类细胞中发现了许多参与调节 vRNP 复合体的宿主蛋白。然而, IAV 与禽类宿主之间的相互作用却知之甚少。在本研究中, 通过 IP-MS 在禽类 DF-1 细胞中, 鉴定了 CCT5 是流感病毒 NP 蛋白相互作用的蛋白。实验结果显示, 在过表达和感染内源性表达的条件下, NP 和 CCT5 均可共定位并相互作用。此外, 流感病毒感染在很大程度上促进了 CCT5 的表达, 进而促进了病毒的复制。

IAV 必须利用宿主的各种机制, 支持病毒自身在感染细胞中的生命周期。作为病毒成分的重要组成部分, vRNP 复合体是病毒致病性和宿主适应的重要决定因素, 其功能受宿主因素的影响(Cros et al 2005, Ozawa et al 2007, Zhang et al 2016)。例如, 最近的一份实验发现, 宿主 PLSCR1 可能与 NP 和 Importin α 形成三聚体复合物, 以阻止 Importin β 的掺入, 从而损害 NP 的核入口并抑制病毒复制(Luo et al 2018)。为了鉴定 DF-1 细胞中可能与 NP 相互作用的蛋白质, 采用了亲和纯化和质谱技术。挑选了 72 个与流感病毒 NP 蛋白有相互作用关系的细胞蛋白。在这些被识别的蛋白中, HSP70 已被证明与 vRNP 复合物相互作用, 并抑制其在宿主细胞中的组装(Conti et al 2001, Hirayama et al 2006)。此外, 在之前的研究中, 一些蛋白如 NOP56, FARSA, CCT5, RUVBL1 也被指出与 vRNP 相关(Heaton et al 2016)。之后的实验结果显示, 沉默宿主因子 NOP56、RUVBL1 对 DF-1 细胞中流感病毒 RNA 水平没有影响。而 FARSA、CCT5 和 Mthfd1l 的表达受损明显降低了病毒 mRNA 的丰度, 表明它们对病毒复制具有潜在的调节作用。

分子伴侣是一类能够防止和破坏蛋白质在折叠、组装过程中出现错误结构的蛋白分子, 并非是蛋白折叠后的产物, 具有促进细胞内蛋白质正确折叠的重要作用(Ditzel et al 1998)。CCT 作为分子伴侣中含 TCP1 (含 T 复合物多肽) 的伴侣蛋白, 是 Hsp60 家族中的一员(Bukau and Horwich 1998), 在新合成的多肽的折叠中发挥作用(Freund et al 2014), 有趣的是, 有报告指出, Hsp 是结构较为保守的应激蛋白, CCT 表达量的上调可能是机体为了应对环境, 产生的增强机体适应能力的应激反应, 而 CCT5 下调会产生毒性反应, 进而导致疾病的发生(Trinidad et al 2013, Zhang et al 2013)。因此, 综上可以得出一种猜测, CCT5 含量升高可能是由于宿主为了抵御病

毒刺激，一定程度的增强了机体抵抗力，而 CCT5 沉默后，宿主自身可能会因细胞毒反应等问题，出现机体抵抗力下降的情况，导致流感病毒复制和病毒蛋白表达受到的抑制作用减弱，从而产生了促进流感病毒复制的作用。

以前，在人类 A549 细胞中，Tatiana 等人确定 CCT5 可以与流感 PB2 相互作用，但不能与 PB1 和 PA 相互作用，然而，它是否与 NP 相互作用还没有被研究(Fislova et al 2010)。在本研究中提供了禽类 CCT5 也能与流感 PB2 相互作用的证据，我们试图探究 CCT5 与流感病毒聚合酶的其他蛋白的互作关系，结果发现 CCT5 不能与 PB1 和 PA 相互作用。更重要的是，CO-IP 和免疫荧光数据都表明，在病毒感染过程中，禽类 CCT5 与流感 NP 蛋白有很好的互作。本实验的数据结合以前的研究表明，CCT5 在人和禽类细胞中都可以与 vRNP 形成多组分复合物。此外，研究还发现，过表达的 CCT5 在很大程度上抑制了 NP 的核入口，而下调 CCT5 的表达则促进了 NP 的核入口。以前的报告已经证明，伴侣分子辅助的蛋白折叠途径，在流感复制中起着关键作用(Guan et al 2010, Jirakanwisal et al 2015)。CCT5 可能作为伴侣分子调控 NP 或 vRNP 在核质之间的转运。然而，CCT5 调控 NP 蛋白在细胞内分布的确切机制仍需进一步研究。

综上所述，我们发现了禽类 CCT5 是病毒 NP 蛋白的相互作用的配体，其表达可被禽流感病毒感染上调。CCT5 与 NP 的结合似乎促进了病毒的复制，因为 CCT5 的过表达增加了病毒 vRNA、cRNA 和 mRNA 的合成，并增加了细胞培养中的病毒滴度。而 CCT5 基因的沉默则起到相反的作用。重要的是，实验发现了 CCT5 在病毒感染过程中促进了 NP 的核输出。总体而言，本实验的数据表明 CCT5 在促进流感病毒复制方面发挥着重要作用，而流感病毒复制可能具有作为抗流感靶点的潜力。

5 结 论

- 1) 根据质谱实验结果显示，筛选到的 CCT5 宿主因子能够与 NP 蛋白相互作用，发现禽类宿主因子 CCT5 是禽流感病毒 NP 蛋白的相互作用的伴侣蛋白，而且 CCT5 的表达可随禽流感病毒感染而上调。
- 2) 在验证了 CCT5 与 NP 互作后，实验通过免疫共沉淀技术证明了，CCT5 与流感病毒 PB2 蛋白同样互作，而与流感病毒聚合酶其他组分 PA、PB1 不产生直接互作，CCT5 通过与 NP、PB2 蛋白的相互作用关系，促进流感病毒聚合酶活性，以促进病毒复制的。

- 3) 由于 CCT5 过表达可以增加流感病毒 vRNA、cRNA 和 mRNA 的合成，可以增加细胞培养中的病毒滴度，促进流感病毒结构蛋白的表达，而 CCT5 基因的沉默则起到相反的作用，流感病毒复制受到抑制。在流感病毒感染 DF1 细胞的过程中，CCT5 的过表达能够促进 NP 的核输出。vRNP 组装离不开 NP 蛋白的参与。因此，根据以上实验数据的结果可以得出，禽源宿主因子 CCT5 能够起到促进流感病毒复制的重要作用，但 CCT5 发挥作用的具体机制仍有待探索，CCT5 的发现有机会作为抵抗流感病毒的药物靶点，比较具有研究潜力。

参考文献

1. 刘秀梵. 家养水禽在我国高致病性禽流感流行中的作用. *中国家禽*, 2004, 26(12).
2. Nuclear Import of Influenza Virus RNA Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and Transport Factors Required for Protein Import. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39): 22701-22704
3. Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Müller CW, Ruigrok RW, Baudin F. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J*, 2003, 22(18): 4646-4655
4. Albo C, Valencia A, Portela A. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol*, 1995, 69(6): 3799-3806
5. Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y, Nakagawa O. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells. *Angiogenesis*, 2018, 21(2): 415-423
6. Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Ortín J, Martín-Benito J. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science*, 2012, 338(6114): 1634-1637
7. Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RW. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, 2001, 281(1): 102-108
8. Bi Y, Chen Q, Wang Q, Chen J, Jin T, Wong G, Quan C, Liu J, Wu J, Yin R, Zhao L, Li M, Ding Z, Zou R, Xu W, Li H, Wang H, Tian K, Fu G, Huang Y et al. Genesis, Evolution and Prevalence of H5N6 Avian Influenza Viruses in China. *Cell Host Microbe*, 2016, 20(6): 810-821
9. Boyd A, Philbin VJ, Smith AL. Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird-borne zoonoses. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 6): 1504-1507
10. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*, 2009, 139(7): 1243-1254

11. Broadley SA, Hartl FU. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett*, 2009, 583(16): 2647-2653
12. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 1998, 92(3): 351-366
13. Chien CY, Xu Y, Xiao R, Aramini JM, Sahasrabudhe PV, Krug RM, Montelione GT. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*, 2004, 43(7): 1950-1962
14. Conti G, Portincasa P, Visalli S, Chezzi C. Inhibition by prostaglandin PGA1 on the multiplication of influenza virus is a dose-dependent effect. *Virus Res*, 2001, 75(1): 43-57
15. Cros JF, Garcia-Sastre A, Palese P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*, 2005, 6(3): 205-213
16. Darrow MC, Sergeeva OA, Isas JM, Galaz-Montoya JG, King JA, Langen R, Schmid MF, Chiu W. Structural Mechanisms of Mutant Huntingtin Aggregation Suppression by the Synthetic Chaperonin-like CCT5 Complex Explained by Cryoelectron Tomography. *J Biol Chem*, 2015, 290(28): 17451-17461
17. Ditzel L, Löwe J, Stock D, Stetter KO, Steinbacher S. Crystal Structure of the Thermosome, the Archaeal Chaperonin and Homolog of CCT. *Cell*, 1998, 93(1): 125-138
18. Dong Z, Ya X, Wang D, Liu C, Shen Q, Xia Y. Genetic Characterization of a Novel Reassortant H5N6 Avian Influenza Virus Identified from a 10-Year-Old Girl. *Jpn J Infect Dis*, 2020, 73(1): 36-43
19. Dowdle WR, Davenport FM, Fukumi H, Schild GC, Tumova B, Webster RG, Zakstelskaja LY. Orthomyxoviridae. *Intervirology*, 1975, 5(5): 245-251
20. Downward J. RNA interference. *BMJ*, 2004, 328(7450): 1245-1248
21. Fislova T, Thomas B, Graef KM, Fodor E. Association of the influenza virus RNA polymerase subunit PB2 with the host chaperonin CCT. *J Virol*, 2010, 84(17): 8691-8699
22. Fournier E, Moples V, Essere B, Paillart JC, Sirbat JD, Cavalier A, Rolland JP, Thomas D, Lina B, Isel C, Marquet R. Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine*, 2012, 30(51): 7359-7367
23. Freund A, Zhong FL, Venteicher AS, Meng Z, Veenstra TD, Frydman J, Artandi SE. Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell*, 2014, 159(6): 1389-1403

24. Gabriel G, Herwig A, Klenk HD. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e11
25. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28403-28409
26. Gao H, Zheng M, Sun S, Wang H, Yue Z, Zhu Y, Han X, Yang J, Zhou Y, Cai Y, Hu W. Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 64170-64179
27. Görlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. 1999, 15(1): 607
28. Gorlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, 1995, 377(6546): 246-248
29. Görlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, 377(6546): 246-248
30. Graef KM, Vreede FT, Lau YF, McCall AW, Carr SM, Subbarao K, Fodor E. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J Virol*, 2010, 84(17): 8433-8445
31. Guan Z, Liu D, Mi S, Zhang J, Ye Q, Wang M, Gao GF, Yan J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. *Protein Cell*, 2010, 1(10): 944-955
32. Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, Steven AC. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(50): 19123-19127
33. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571-579
34. Heaton NS, Moshkina N, Fenouil R, Gardner TJ, Aguirre S, Shah PS, Zhao N, Manganaro L, Hultquist JF, Noel J, Sachs D, Hamilton J, Leon PE, Chawdury A, Tripathi S, Melegari C, Campisi L, Hai R, Metreveli G, Gamarnik AV et al. Targeting Viral Proteostasis Limits Influenza Virus, HIV, and Dengue Virus Infection. *Immunity*, 2016, 44(1): 46-58
35. Herz C, Stavnezer E, Krug R, Gurney T, Jr. Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell*, 1981, 26(3 Pt 1): 391-400

36. Hirayama E, Hattori M, Kim J. Specific binding of heat shock protein 70 with HN-protein inhibits the HN-protein assembly in Sendai virus-infected Vero cells. *Virus Res*, 2006, 120(1-2): 199-207
37. Hird SM, Ganz H, Eisen JA, Boyce WM. The Cloacal Microbiome of Five Wild Duck Species Varies by Species and Influenza A Virus Infection Status. *mSphere*, 2018, 3(5):
38. Hsiang TY, Zhao C, Krug RM. Interferon-induced ISG15 conjugation inhibits influenza A virus gene expression and replication in human cells. *J Virol*, 2009, 83(12): 5971-5977
39. Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A. Genetically destined potentials for N-linked glycosylation of influenza virus hemagglutinin. *Virology*, 2008, 376(2): 323-329
40. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 2011, 410(1): 38-47
41. Jackson DA, Caton AJ, McCready SJ, Cook PR. Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. 296(5855): 366-368
42. Jaworska J, Coplombe F, Downey J, Tzelepis F, Shalaby K, Tattoli I, Berube J, Rousseau S, Martin JG, Girardin SE, McCullers JA, Divangahi M. NLRX1 prevents mitochondrial induced apoptosis and enhances macrophage antiviral immunity by interacting with influenza virus PB1-F2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(20): E2110-2119
43. Jirakanwisal K, Srisutthisamphan K, Thepparit C, Suptawiwat O, Auewarakul P, Paemanee A, Roytrakul S, Smith DR. Identification of Hsp90 as a species independent H5N1 avian influenza A virus PB2 interacting protein. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2015, 43: 28-35
44. Josset L, Zeng H, Kelly SM, Tumpey TM, Katze MG. Transcriptomic characterization of the novel avian-origin influenza A (H7N9) virus: specific host response and responses intermediate between avian (H5N1 and H7N7) and human (H3N2) viruses and implications for treatment options. *mBio*, 2014, 5(1): e01102-01113
45. Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Young JR. A Genomic Analysis of Chicken Cytokines and Chemokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research the Official Journal of the International Society for Interferon & Cytokine Research*, 2005, 25(8): 467-484
46. Klemm C, Boergeling Y, Ludwig S, Ehrhardt C. Immunomodulatory

Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses. *Trends Microbiol*, 2018, 26(7): 624-636

47. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J*, 1997, 16(6): 1248-1257

48. Kubota H, Hynes G, Willison K. The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem*, 1995, 230(1): 3-16

49. Lee EK, Lee YN, Kye SJ, Lewis NS, Brown IH, Sagong M, Heo GB, Kang YM, Cho HK, Kang HM, Cheon SH, Lee M, Park BK, Kim YJ, Lee YJ. Characterization of a novel reassortant H5N6 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.4.4 in Korea, 2017. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 103

50. Li W, Chen H, Sutton T, Obadan A, Perez DR. Interactions between the influenza A virus RNA polymerase components and retinoic acid-inducible gene I. *J Virol*, 2014, 88(18): 10432-10447

51. Liao TL, Wu CY, Su WC, Jeng KS, Lai MM. Ubiquitination and deubiquitination of NP protein regulates influenza A virus RNA replication. *EMBO J*, 2010, 29(22): 3879-3890

52. Lin JS, Lai EM. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: 211-219

53. Liu X, Lin CY, Lei M, Yan S, Zhou T, Erikson RL. CCT chaperonin complex is required for the biogenesis of functional Plk1. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 4993-5010

54. Luo W, Zhang J, Liang L, Wang G, Li Q, Zhu P, Zhou Y, Li J, Zhao Y, Sun N, Huang S, Zhou C, Chang Y, Cui P, Chen P, Jiang Y, Deng G, Bu Z, Li C, Jiang L et al. Phospholipid scramblase 1 interacts with influenza A virus NP, impairing its nuclear import and thereby suppressing virus replication. *PLoS Pathog*, 2018, 14(1): e1006851

55. Lynn DJ, Higgs R, Lloyd AT, O'Farrelly C, Herve-Grepinet V, Nys Y, Brinkman FS, Yu PL, Soulier A, Kaiser P, Zhang G, Lehrer RI. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunol Lett*, 2007, 110(1): 86-89

56. Mayer D, Molawi K, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, Baginsky S, Grossmann J, Garcia-Sastre A, Schwemmle M. Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 672-682

57. Melville MW, McClellan AJ, Meyer AS, Darveau A, Frydman J. The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(9): 3141-3151

58. Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A. Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol*, 1999, 73(2): 1186-1194
59. Mubareka S, Palese P. Influenza Virus: The Biology of a Changing Virus: Birkhäuser Basel; 2011.
60. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, 2013, 87(5): 2455-2462
61. Nayak JL, Fitzgerald TF, Richards KA, Yang H, Treanor JJ, Sant AJ. CD4+ T-cell expansion predicts neutralizing antibody responses to monovalent, inactivated 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus subtype H1N1 vaccine. *J Infect Dis*, 2013, 207(2): 297-305
62. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288(5468): 1051-1053
63. Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol*, 2007, 81(1): 30-41
64. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 4): 723-734
65. Qu M, An B, Shen S, Zhang M, Shen X, Duan X, Balthasar JP, Qu J. Qualitative and quantitative characterization of protein biotherapeutics with liquid chromatography mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 2017, 36(6): 734-754
66. Rajao DS, Anderson TK, Kitikoon P, Stratton J, Lewis NS, Vincent AL. Antigenic and genetic evolution of contemporary swine H1 influenza viruses in the United States. *Virology*, 2018, 518: 45-54
67. Reissmann S, Joachimiak LA, Chen B, Meyer AS, Nguyen A, Frydman J. A gradient of ATP affinities generates an asymmetric power stroke driving the chaperonin TRiC/CCT folding cycle. *Cell Rep*, 2012, 2(4): 866-877
68. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarrero N, Fernandez Y, Juarez S, Ortin J. The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3904
69. Roebke KE, Danthi P. Cell Entry-Independent Role for the Reovirus mu1 Protein in Regulating Necroptosis and the Accumulation of Viral Gene Products. *J Virol*, 2019, 93(11):
70. Rothman JE. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and

related processes in cells. *Cell*, 1989, 59(4): 591-601

71. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 2012, 196(6): 801-810

72. Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Aly MM, Brown IH, Couacy-Hymann E, De Mia GM, Dung do H, Guercio A, Joannis T, Maken Ali AS, Osmani A, Padalino I, Saad MD, Savic V, Sengamalay NA, Yingst S, Zaborsky J et al. Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(5): 713-718

73. Sasaki K, Hayashi K, Lee JB, Kurosaki F, Hayashi T. Characterization of a novel mutation in NS1 protein of influenza A virus induced by a chemical substance for the attenuation of pathogenicity. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121205

74. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258(1): 1-20

75. Stertz S, Shaw ML. Uncovering the global host cell requirements for influenza virus replication via RNAi screening. *Microbes Infect*, 2011, 13(5): 516-525

76. Stynen B, Tourneau H, Tavernier J, Van Dijck P. Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(2): 331-382

77. Sugimoto H, Wei D, Dong L, Ghosh D, Chen S, Qian MG. Perspectives on potentiating immunocapture-LC-MS for the bioanalysis of biotherapeutics and biomarkers. *Bioanalysis*, 2018, 10(20): 1679-1690

78. Tafforeau L, Chantier T, Pradezynski F, Pellet J, Mangeot PE, Vidalain PO, Andre P, Rabourdin-Combe C, Lotteau V. Generation and comprehensive analysis of an influenza virus polymerase cellular interaction network. *J Virol*, 2011, 85(24): 13010-13018

79. Tang Z, Takahashi Y. Analysis of Protein-Protein Interaction by Co-IP in Human Cells. *Methods Mol Biol*, 2018, 1794: 289-296

80. Te Velthuis AJ, Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(8): 479-493

81. Temperley ND, Berlin S, Paton IR, Griffin DK, Burt DW. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics*, 2008, 9: 62

82. Trinidad AG, Muller PA, Cuellar J, Klejnot M, Nobis M, Valpuesta JM, Vousden KH. Interaction of p53 with the CCT complex promotes protein folding and wild-type p53

activity. *Mol Cell*, 2013, 50(6): 805-817

83. Vidic J, Noiray M, Bagchi A, Slama-Schwok A. Identification of a Novel Complex between the Nucleoprotein and PA(1-27) of Influenza A Virus Polymerase. *Biochemistry*, 2016, 55(31): 4259-4262

84. Vogel G. Sequence offers clues to deadly flu. *Science*, 1998, 279(5349): 324

85. Wang Q, Li Q, Liu R, Zheng M, Wen J, Zhao G. Host cell interactome of PA protein of H5N1 influenza A virus in chicken cells. *Journal of Proteomics*: S1874391916300215

86. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1): 152-179

87. Wu H, Lu R, Peng X, Peng X, Chen B, Cheng L, Wu N. Molecular characterization of a novel reassortant H7N6 subtype avian influenza virus from poultry in Eastern China, in 2016. *Arch Virol*, 2017, 162(5): 1341-1347

88. Yao L, Zou X, Liu L. The TCP1 ring complex is associated with malignancy and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(9): 3329-3343

89. Yuanji G, Desselberger U. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol*, 1984, 65 (Pt 11): 1857-1872

90. Zhang J, Huang F, Tan L, Bai C, Chen B, Liu J, Liang J, Liu C, Zhang S, Lu G, Chen Y, Zhang H. Host Protein Moloney Leukemia Virus 10 (MOV10) Acts as a Restriction Factor of Influenza A Virus by Inhibiting the Nuclear Import of the Viral Nucleoprotein. *J Virol*, 2016, 90(8): 3966-3980

91. Zhang J, Wu X, Zan J, Wu Y, Ye C, Ruan X, Zhou J. Cellular chaperonin CCT γ contributes to rabies virus replication during infection. 2013, 87(13): 7608-7621

92. Zhao L, Zhang X, Wu Z, Huang K, Sun X, Chen H, Jin M. The Downregulation of MicroRNA hsa-miR-340-5p in IAV-Infected A549 Cells Suppresses Viral Replication by Targeting RIG-I and OAS2. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 509-519

93. Zhao X, Chen XQ, Han E, Hu Y, Paik P, Ding Z, Overman J, Lau AL, Shahmoradian SH, Chiu W, Thompson LM, Wu C, Mobley WC. TRiC subunits enhance BDNF axonal transport and rescue striatal atrophy in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(38): E5655-5664

94. Zhong C, Li C, Wang X, Toyoda T, Gao G, Fan Z. Granzyme K inhibits replication of influenza virus through cleaving the nuclear transport complex importin α 1/ β dimer of infected host cells. *Cell Death Differ*, 2012, 19(5): 882-890

附录 A

个人简介

姓名：张筱涵

性别：女

出生年月：19950517

出生地：山东威海

专业：动物医学

研究方向：预防兽医学

联系方式：15623278663

E-mail: 337419932@qq.com

通讯地址：华中农业大学动物医学院动物病毒室，430070

个人履历

2013 年 – 2017 年 山东农业大学动物医学院完成本科学习

2017 年 – 2020 年 华中农业大学动物医学院攻读硕士学位

硕士期间发表与参与发表的 SCI 论文：

1. Zhao L, **Zhang X**, Wu Z, Huang K, Sun X, Chen H, Jin M. The Downregulation of MicroRNA hsa-miR-340-5p in IAV-Infected A549 Cells Suppresses Viral Replication by Targeting RIG-I and OAS2. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 509-519.
2. Avian chaperonin containing TCP1 subunit 5 supports IAV Replication by interacting with viral NP and PB2 Proteins. *Frontiers in microbiology*, 修回状态。

致谢

三年的硕士时光如梦一般，情至此处，心中情绪波涌，在这三年之中，有繁忙地奋战，坚守科研，也有安静的沉思，放空思绪，曾因蹉跎时光而懊恼悲伤，也曾因有所收获或解除谜题而欣喜若狂，五味交织的三年成为我人生中无比重要的一段时光。我忘不了刚入校门时，心中对待科研以及学业的憧憬，虽然自己技能不全，但满怀热忱，即使忙碌，心中也只会觉得踏实和充实。研究生这一阶段，似乎和本科没有太大的区别，但又确实与本科生活截然不同，这三年是打开思路，开阔视野的三年，是尝试着调节生活和工作的缓冲期，更是帮助我回顾过去，重新规划人生轨迹的重要际遇，三年中的时光与斑驳的记忆历历在目，心中只是充满了庆幸与感激。

我要感谢我的导师金梅林教授，金老师对待科研精益求精的严谨态度，深深感染着我，每个夜晚都能看到金老师灯火通明的办公室，金老师用亲身实践诠释了什么是敬业，什么是对待科研该有的热情和认真，金老师给予我诸多学习上指导，定期询问实验室的课题进展，并通过实验室会议将学术热点传达给我们，及时调节实验室团队的工作节奏和调动起我们的热情，金老师用春风化雨的温柔照顾着实验室的每一位成员，是我们学生的引路人，是金老师让我明白，作为一位科研工作者应该保有的工作态度，并鼓舞着我像金老师的精神学习，为行业领域的发展做出贡献。感谢华中农业大学微生物学国家重点实验室，以及华中农业大学生猪养殖协同创新中心提供的优秀平台；感谢张安定教授、周红波教授在实验开展过程中提供的帮助。

感谢我的师兄赵联忠博士，在我的实验学习和生活中给予我的关心，正是在师兄的帮助下，我接触学习了各项实验技术，开始有了实验的思路，在我面临困难时为我指点迷津，鼓励我再接再厉不要放弃。感谢博士后林显师兄在实验思路以及方法上给予我的指导，感谢博士后师兄张强、张宇飞、邹忠在实验方向上、思路上的指导和建议；感谢博士师兄龚文孝、黄坤、刘亮、回显锋、赵亚、吴超、李成飞、吕长杰，以及师姐孙小美、杨影、杨丽、王婷给予我的实验上的帮助和指点；感谢我的实验室伙伴胡晓通、余世曼、易海鸣给予我的生活上、实验上的帮助和支持，陪伴我成长；感谢何兴林、杨永、曹磊、任培蕾、毛海英、姜丽丽、章佳丽等师弟师妹的无私付出，感谢大家与我有缘相聚在一起，与我共同探索未知，共同进步。

感谢父母、家人的理解，在我每一次人生抉择时给予我无条件的支持，为我提

供坚强的后盾，让我在自由和幸福的环境中长大，激励着我不断向前实现自我；感谢挚友王樱潼、董佳琳给予我的鼓励和帮助，感谢我的室友兼好友张秀玲，对我生活上的包容和照顾。

最后我想感谢自己，感谢自己的坚持和选择，让自己拥有更加丰富多彩的人生体会，鼓舞着我以更加努力和沉静的姿态，在今后的人生道路上继续向前。

张筱涵

二〇二〇年六月