

禽流感病毒 H5N1 病毒颗粒中鸡胚宿主蛋白的质谱分析

王志武^{1 2} 孙万春¹ 周悦³ 丛中一³ 周庆伟^{* 3} 刘宁^{* 4}

¹(吉林大学人畜共患病教育部重点实验室, 长春 130062)

²(吉林大学公共卫生学院, 长春 130021) ³(吉林大学药学院, 长春 130021)

⁴(吉林大学第二医院中心实验室, 长春 130041)

摘要 在 A 型流感病毒等许多包膜病毒的病毒颗粒中, 除包含病毒基因组编码的结构蛋白外, 还包含来源于宿主细胞的多种蛋白。然而, 在鸡胚内增殖的病毒颗粒所包含的宿主蛋白的种类尚不清楚。本研究采用 20% ~ 60% (w/w) 蔗糖密度梯度离心法分离纯化了繁殖于鸡胚的流感病毒, 并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 结合质谱法对纯化的流感病毒颗粒进行了全面的蛋白质组学分析。结果表明, 在病毒颗粒中, 除包含 9 种病毒编码蛋白外, 还发现了 12 种来源于鸡胚的蛋白, 如膜联蛋白 A2、肽酰脯氨酰顺反异构酶 B、过氧化物酶 1、磷酸甘油酸激酶、丙酮酸激酶肌组织异构酶等, 以及 2 种细胞骨架蛋白(微管蛋白 β -3 和肌动蛋白)。

关键词 鸡胚; 流感病毒; 凝胶电泳; 质谱分析

1 引言:

包膜病毒是一类在核衣壳外包有脂质双层膜的病毒, 包膜来自受感染宿主细胞的细胞膜或核膜。目前认为, 成熟的包膜病毒颗粒中除包含其基因组编码的结构蛋白外, 还包含多种宿主蛋白^[1]。在病毒颗粒中已发现了系列宿主蛋白^[2~5], 其中一些蛋白对病毒的复制和包装有重要作用^[6~8]。流感病毒是一种包膜病毒, 其成熟病毒颗粒含有 9 种病毒基因组编码的结构蛋白。通过蛋白质组学方法可对在 Vero 细胞中增殖的流感病毒进行分析, 发现成熟的病毒颗粒结合有 36 种宿主蛋白^[9]。目前, 此类研究均选择来源于哺乳动物的细胞株作为流感病毒增殖的宿主。

在细胞培养技术发展起来之前, 研究者多采用鸡胚作为流感病毒增殖宿主。由于成本低、产量高, 鸡胚已成为生产流感病毒疫苗的主要宿主。但是, 鸡胚与细胞株在很多方面存在差异。在鸡胚内增殖的流感病毒颗粒结合宿主蛋白的情况尚不清楚, 因此有必要对在鸡胚内增殖的流感病毒颗粒所包裹的来源于宿主鸡胚的蛋白进行全面的分析。据此, 本研究采用 SDS-PAGE 与质谱分析结合的方法, 分析了纯化的在鸡胚内增殖的流感病毒颗粒的蛋白组成谱, 发现除了 9 种病毒编码蛋白外, 还有 12 种鸡胚宿主编码的蛋白结合于病毒颗粒内。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Optima L-400K 超速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); ZipTip C₁₈ Pipette Tips 微量层析柱(美国 Millipore 公司); PicoTip 电喷雾针(美国 New Objective 公司); 纳升电喷雾源(丹麦 Protana 公司); QSTAR 四极杆飞行时间串联质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司); Mini-Cell 垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); GS800 扫描仪(美国 Bio-Rad 公司)。

乙腈和甲醇(HPLC 级, Fisher 公司); 测序级胰蛋白酶(Promega 公司); 抗烯醇化酶 1 和抗溶菌酶 C 的单克隆抗体(Santa Cruz 公司); BCA 蛋白检测试剂盒(Pierce Chemicals 公司); A 型禽流感病毒 H5N1 (Avian influenza virus A/Chicken/Hong Kong/YU22/2002) 在 III 级生物安全实验室(BL-3) 中进行培养。

2011-06-08 收稿; 2011-10-25 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21175055)、吉林省科技厅(Nos. 20090952, 20110739, 20110731) 和吉林大学基本科研业务费(Nos. 450060445316, 450060326056) 资助。

* E-mail: zhouqw@jlu.edu.cn, liu_ning@jlu.edu.cn

2.2 病毒培养和离心纯化

将 A 型禽流感病毒 H5N1 接种于鸡胚中,在 35 °C 条件下孵育 72 h,收集尿囊液;用 0.03% 福尔马林在 4 °C 灭活 72 h;将含有病毒的尿囊液以 5000 r/min 离心 15 min,收集上清液。所有对活病毒进行的实验操作均在三级生物安全实验室完成。

将上述含有灭活病毒的上清液在 4 °C 以 40000 r/min 离心 1 h,弃去上清液,沉淀悬浮于含有 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl 和 25 mmol/L β -巯基乙醇的缓冲液中。取适量病毒悬液,加入到 20% ~ 60% (w/w) 蔗糖梯度溶液液面上,于 4 °C 以 23000 r/min 离心 16 h,收集含有病毒的区带,再以 40000 r/min 离心沉淀病毒颗粒 1 h,用上述缓冲液重悬沉淀。以上操作至少重复 3 次,以保证病毒颗粒的纯度。收集含有病毒的区带,混悬于上述缓冲液中,冻存于 -80 °C 待用。

2.3 SDS-凝胶电泳 (PAGE) 分析

采用 BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白浓度进行测定。取含 10 μ g 蛋白的病毒样品溶液,加入等体积的还原性上样缓冲液 (2% SDS, 20% 甘油, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 160 mmol/L Dithiothreitol, 微量溴酚兰),煮沸 5 min 后,用小型垂直电泳系统进行蛋白分离。电泳结束后,胶片进行考马斯亮蓝 G250 染色,然后用扫描仪进行扫描。

2.4 质谱分析鉴定蛋白

将凝胶的电泳条带切成 30 个连续的 2 mm 宽的条带,脱色后,在 37 °C 用新配制的含测序级胰蛋白酶的溶液进行胶内水解 16 h。用 C_{18} 微量层析柱对消化后的肽进行脱盐和浓缩,然后加于电喷雾针。采用配置纳升电喷雾源的四极杆飞行时间串联质谱仪对样品进行分析。在一级质谱图中,根据各种分子离子峰的同位素分布特征,确定其带电荷状态;对感兴趣的分子离子用二级串联质谱技术进行分析,以得到其多肽序列信息。一级质谱的详细参数设置如下:喷雾电压 (IS) 950 V,第一去簇电压 (DP1) 50 V,第二去簇电压 (DP2) 10 V,聚焦电压 (FP) 100 V,扫描区间 350 ~ 1500 Da,气幕 30。二级串联质谱除了扫描区间为 50 ~ 1000 Da 外,参数设置均同上,碰撞能量 (CE) 根据具体情况在 25 ~ 40 之间调节。

二级串联质谱分析结束后,所得数据用 Analyst QS 1.1 软件 (MDS Sciex) 转换为 MGF 格式文件,并使用 MASCOT 搜索引擎在 Swiss-Prot 数据库中进行蛋白检索。检索参数设置如下:1 个漏切位点,母离子允许误差 0.2 Da,子离子允许误差 0.1 Da,固定修饰为半胱氨酸烷基化,可变修饰为甲硫氨酸氧化。

2.5 蛋白印记分析

取含 20 μ g 蛋白的病毒样品溶液,进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。将电泳分离的蛋白条带电转移到 Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上,分别用抗烯醇化酶 1 和抗溶菌酶 C 的单克隆抗体杂交后,加入相应的连接有 HRP 的二抗,以 ECL 增强化学发光法显色。

3 结果与讨论

3.1 纯化流感病毒颗粒中病毒编码蛋白的鉴定

本研究中,以 20% ~ 60% (w/w) 蔗糖密度梯度超速离心流感病毒,至少重复 3 次得到了高纯度病毒颗粒,确保后续的质谱分析中蛋白成分定性结果的可靠性。

将纯化的病毒颗粒悬浮于等体积的含 1% SDS 的上样缓冲液,煮沸 5 min,用 SDS-PAGE 进行分离,再用考马斯亮蓝 G250 染色 (图 1)。凝胶块中的蛋白经蛋白酶消化后,进行质谱分析鉴定。在鉴定得到的蛋白中,有 9 种蛋白是由流感病毒基因编码的 (表 1)。图 2 为带双电荷的分子离子峰 (m/z 469.2) 的串联质谱图,经数据库检索,该谱峰被鉴定为来源于流感病毒基质蛋白 M1 的一段氨基酸序列 M* VLASTTAK (179-187),其中第 179 位的甲硫氨酸被氧化。从图 2 可以看到连续的 y 系列碎片离子 ($y_1 \sim y_7$),以及部分 a 和 b 离子 (a_2, b_2, b_3 等)。

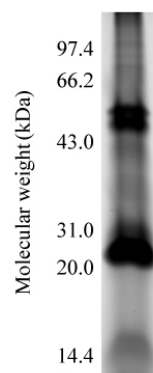


图 1 流感病毒颗粒的 SDS PAGE 图谱
Fig. 1 SDS PAGE of influenza virus

表 1 流感病毒编码蛋白的鉴定

Table 1 Identification of influenza virus-encoded proteins

| 蛋白名称 Protein identity | 登录号 Accession number | Mascot 分值 Mascot score | 匹配肽段数/序列覆盖率 Number of matched peptides/ Sequence coverage (%) | 等电点/理论分子量 pI/Theoretical M_w (kDa) |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---|---|
| PB1 | Q6DNX2 | 87 | 7/11 | 9.26/86.41 |
| PB2 | Q6DNL8 | 109 | 10/16 | 9.44/85.83 |
| PA | Q6DNX6 | 83 | 8/13 | 5.39/82.43 |
| HA | Q6DQ18 | 221 | 8/25 | 6.15/63.21 |
| NP | Q6DPE5 | 454 | 13/69 | 9.47/56.33 |
| NA | Q6DPJ8 | 79 | 2/9 | 6.07/48.95 |
| M1 | Q6DPT4 | 378 | 12/84 | 9.24/27.93 |
| M2 | Q6DPT5 | 58 | 1/12 | 4.88/11.24 |
| NEP | Q6DP63 | 67 | 1/7 | 5.20/14.38 |

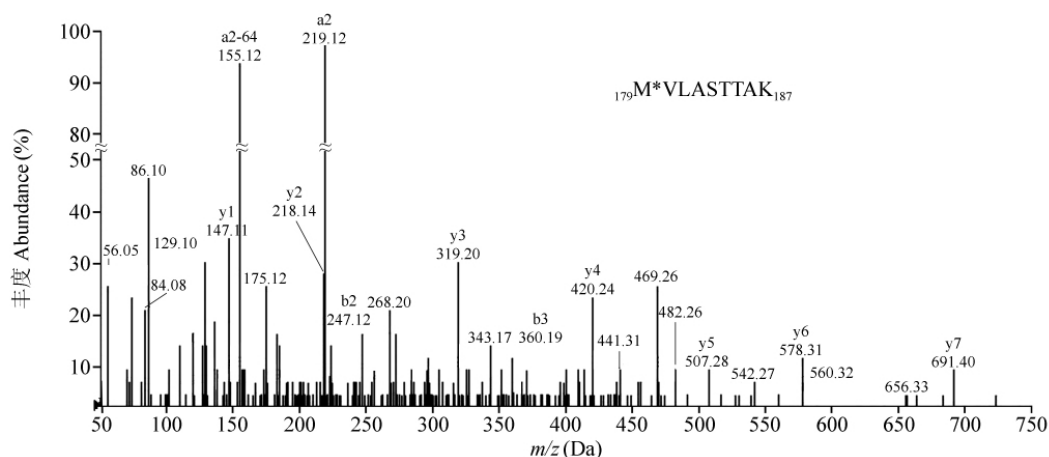


图 2 m/z 469.2 的分子离子峰的串联质谱图。该分子离子峰被鉴定为来源于流感病毒基质蛋白 M1 的一段氨基酸序列 M* VLASTTAK (179-187)

Fig. 2 MS/MS spectrum of a peak with m/z 469.2, which is identified as a tryptic peptide (M* VLASTTAK) from M1 protein of influenza virus

A 型流感病毒基因组包含 11 个基因, 编码 11 种蛋白, 包括 HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2 和 PB2。本研究确定了除 NS1 和 PB1-F2 外的 9 种蛋白在成熟流感病毒颗粒中的表达。值得注意的是, 一些病毒蛋白在多个凝胶小块中被鉴定出来, 尤其是 NP 和 M1。对于离子通道蛋白 M2 和核输出蛋白 NEP, 仅鉴定出单一的肽段, 可能是由于其在病毒颗粒中的含量明显低于其它结构蛋白, 如 HA 和 NA^[10]。

3.2 纯化流感病毒颗粒包装宿主蛋白的鉴定

除了 9 种病毒编码蛋白外, 在纯化的流感病毒颗粒中还鉴定出了 12 种来源于宿主鸡胚的蛋白 (表 2)。图 3a 为带双电荷的分子离子峰 (m/z 877.4) 的串联质谱图, 经数据库检索, 该谱峰被鉴定为鸡胚宿主中溶菌酶的胰酶水解片段 NTDGSTDYGLQINSR (64-79), 共含有 16 个氨基酸残基。从图 3a 可见, 多数 y 系列碎片离子 ($y_1 \sim y_{13}$) 都能得到归属。图 3b 为另一个带双电荷的分子离子峰 (m/z 398.3) 的串联质谱图, 经数据库检索, 该谱峰被鉴定为鸡胚宿主中肌动蛋白的胰酶水解片段 IIAPPER (330-336)。该片段含有 7 个氨基酸残基, 全系列的 y 碎片离子 ($y_1 \sim y_7$) 都很容易得到归属。

3.3 蛋白印迹分析

为了对质谱鉴定的结果进行验证, 分别用抗烯醇化酶 1 和抗溶菌酶 C 的单克隆抗体对相应的质谱鉴定结果进行蛋白印记分析。结果表明, 本研究纯化的流感病毒颗粒中确实含有烯醇化酶 1 (图 4a) 和溶菌酶 C (图 4b), 进一步证实了质谱分析结果。

3.4 小结

本研究利用超速密度梯度离心的方法, 纯化了繁殖于鸡胚的流感病毒颗粒; 并采用质谱法, 分析了

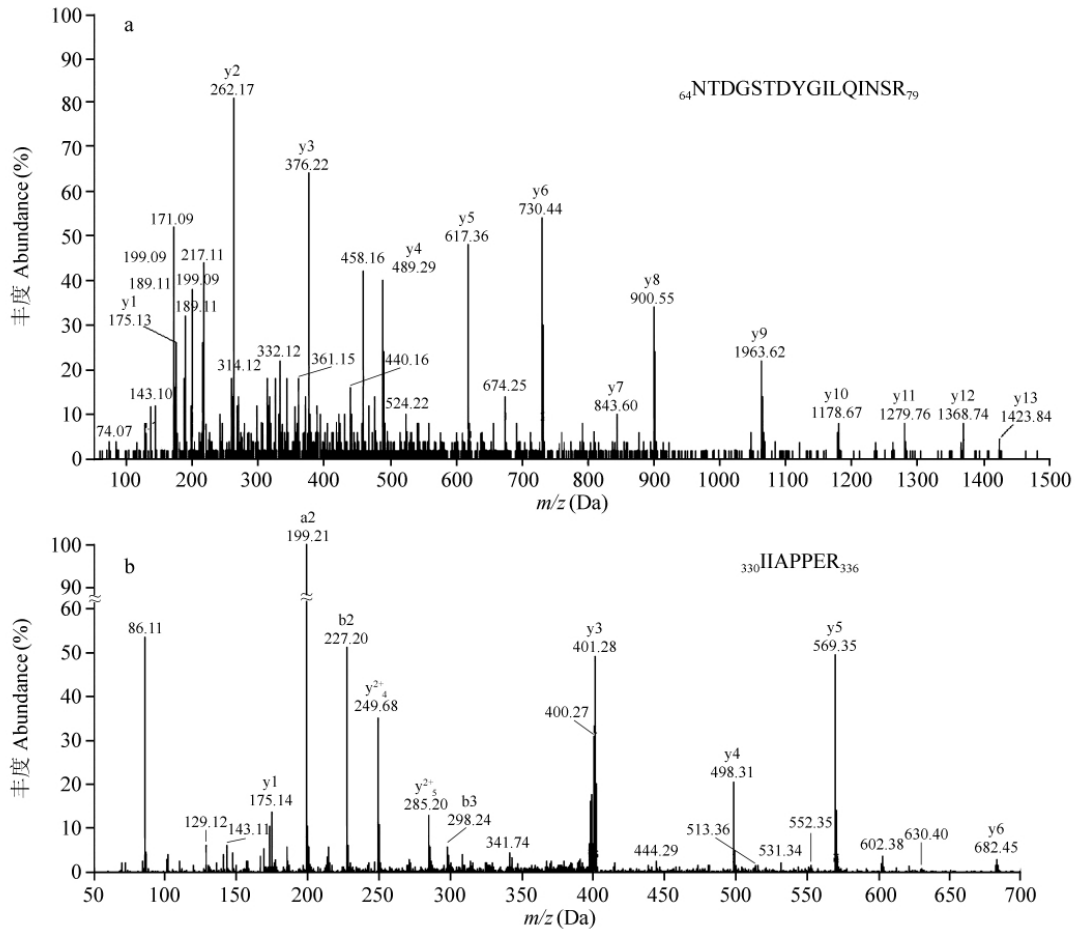


图 3 (a) m/z 877.4 的分子离子峰的串联质谱图; (b) m/z 398.3 的分子离子峰的串联质谱图

Fig. 3 (a) MS/MS spectrum of m/z 877.4 peak; (b) MS/MS spectrum of with m/z 398.3 peak

流感病毒颗粒的蛋白表达谱,除了9种病毒编码蛋白外,还鉴定了12种鸡胚宿主编码的蛋白。本研究

表 2 纯化病毒颗粒中宿主蛋白的鉴定

Table 2 Identification of host proteins packaged in purified virus particles

| 登录号 Accession number | 蛋白名称 Protein identity | Mascot 分值 Mascot score | 匹配肽段数/ 序列覆盖率 Number of matched peptides/Sequence coverage (%) | 等电点/ 理论分子量 pI/Theoretical M_w (kDa) |
|-------------------------|--|---------------------------|---|--|
| P17785 | 膜联蛋白 A2 Annexin A2 | 93 | 4/12 | 6.92/38.64 |
| P51913 | 烯醇化酶 1 Enolase 1 | 133 | 7/30 | 6.17/47.31 |
| P53478 | 肌动蛋白, 细胞质 5 型 Actin, cytoplasmic type 5 | 102 | 5/23 | 5.30/41.84 |
| P00698 | 溶菌酶 C Lysozyme C | 221 | 8/38 | 9.36/16.24 |
| P24367 | 肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶 B Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | 92 | 6/33 | 9.40/22.41 |
| P24479 | S100 钙结合蛋白 A11 S100 calcium-binding protein A11 | 76 | 4/37 | 6.08/11.41 |
| P51903 | 磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase | 139 | 7/23 | 8.31/44.72 |
| P0CG62 | 多聚泛素-B Polyubiquitin-B | 83 | 2/42 | 6.94/34.37 |
| P0CB50 | 过氧化物氧化还原酶-1 Peroxiredoxin-1 | 131 | 4/42 | 8.24/22.31 |
| P00355 | 3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 115 | 5/24 | 8.51/35.84 |
| P00548 | 丙酮酸激酶肌肉同工酶 Pyruvate kinase muscle isoenzyme | 129 | 5/11 | 7.29/58.01 |
| P09206 | 微管蛋白 b-3 Tubulin b-3 | 123 | 5/15 | 4.78/49.86 |

结果为更好地理解流感病毒与鸡胚宿主之间的相互作用提供重要的实验依据,也有助于人们在分析水平上更清晰地认识鸡胚来源的流感病毒疫苗的潜在的过敏反应。

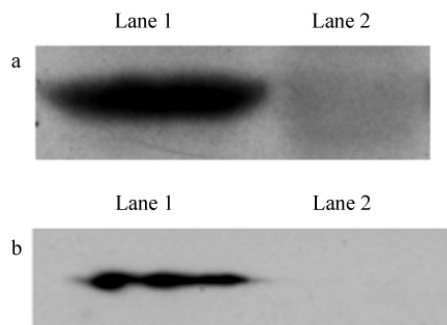


图 4 烯醇化酶 1 (a) 和溶菌酶 C (b) 的蛋白印记分析

Fig. 4 (a) Western blot analysis of enolase 1 (a) and lysozyme C (b) lane 1: 病毒样品 (Virus sample); lane 2: 空白样品 (Blank sample)。

References

- 1 Cantin R, Methot S, Tremblay M J. *J. Virol.*, **2005**, 79(11): 6577 ~ 6587
- 2 Bechtel J T, Winant R C, Ganem D. *J. Virol.*, **2005**, 79(8): 4952 ~ 4964
- 3 Chung C S, Chen C H, Ho M Y, Huang C Y, Liao C L, Chang W. *J. Virol.*, **2006**, 80(5): 2127 ~ 2140
- 4 Saphire A C, Gallay P A, Bark S J. *J. Proteome Res.*, **2006**, 5(3): 530 ~ 538.
- 5 Segura M M, Garnier A, Di Falco M R, Whissell G, Meneses-Acosta A, Arcand N, Kamen A. *J. Virol.*, **2008**, 82(3): 1107 ~ 1117
- 6 Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. *Nature*, **2003**, 424(6944): 99 ~ 103
- 7 Garrus J E, von Schwedler U K, Pornillos O W, Morham S G, Zavitz K H, Wang H E, Wettstein D A, Stray K M, Côté M, Rich R L, Myszka D G, Sundquist W I. *Cell*, **2001**, 107(1): 55 ~ 65
- 8 Demirov D G, Ono A, Orenstein J M, Freed E O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99(2): 955 ~ 960
- 9 Shaw M L, Stone K L, Colangelo C M, Gulcicek E E, Palese P. *PLoS Pathog.*, **2008**, 4(6): e1000085
- 10 Zebede S L, Lamb R A. *J. Virol.*, **1988**, 62(8): 2762 ~ 2772

Identification of Host Proteins Packaged in H5N1 Avian Influenza Virus Particles by Mass Spectrometry

WANG Zhi-Wu^{1,2}, SUN Wan-Chun¹, ZHOU Yue³, CONG Zhong-Yi³, ZHOU Qing-Wei³, LIU Ning^{*4}

¹(Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130062, China)

²(School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

³(Institute of Frontier Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

⁴(Central Laboratory, Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

Abstract In this study, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) coupled with mass spectrometry were used to perform a comprehensive proteomics analysis of the purified influenza virus particles propagated from embryonated chicken eggs, which were purified by 20% - 60% sucrose (*w/w*) density gradient centrifugation. In addition to the virus-encoded proteins, 12 proteins originated from embryonated chicken eggs were identified in the purified virus particles, such as Annexin A2, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B, Peroxiredoxin-1, Phosphoglycerate kinase, and Pyruvate kinase muscle isoenzyme. Two kinds of cytoskeletal proteins, tubulin β 3 and actin, were also detected.

Keywords Embryonated chicken eggs; Influenza virus; Gel electrophoresis; Mass spectrometry

(Received 8 June 2011; accepted 25 October 2011)