

宿主细胞内 SARS-CoV N 蛋白相互作用蛋白的筛选与鉴定*

常维山¹⁾ 翟 静²⁾ 宋文刚²⁾ 刘永庆^{1,3)**}

(¹⁾山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; ²⁾泰山医学院基础医学部, 泰安 271000;

³⁾Medical College University of Saskatchewan, Saskatoon S7N 5E3, Canada)

摘要 SARS-CoV N 蛋白可与病毒 RNA 形成复合物, 也可与病毒或宿主细胞中多种蛋白质相互作用, 影响宿主细胞的多个信号转导通路, 干扰宿主细胞的细胞周期, 从而改变宿主细胞的生命活动. 利用酵母双杂交技术筛选了 15 个宿主细胞内与 SARS-CoV N 蛋白的相互作用蛋白, 其中包括信号传导组分 7 种, 蛋白激酶 3 种, 细胞因子 2 种, 未知功能蛋白 3 种. 并利用免疫共沉淀方法进一步证实了趋化因子 CXCL16 是宿主细胞与 SARS-CoV 核衣壳蛋白的相互作用蛋白.

关键词 冠状病毒, 宿主细胞, SARS-CoV N 蛋白, 相互作用蛋白, CXCL16

学科分类号 Q93

SARS 冠状病毒(SARS-CoV)属于冠状病毒属的一个新种, 是严重急性呼吸系统综合症(SARS)的病原体, 它的出现为我们深入研究冠状病毒的分子生物学特性及其与宿主的相互关系提供了宝贵的资料. SARS-CoV 基因组为一条约 30 000 nt 的正链 RNA 分子, 由十余个重叠的开放阅读框架(ORF)和两侧的非编码区组成. 病毒编码的结构蛋白包括核衣壳蛋白(nucleocapsid, N), 包膜蛋白(envelope, E), 膜蛋白(membrane, M), 表面糖蛋白(spike, S)4 种. 其中 N 蛋白在病毒复制中发挥着重要作用. 研究表明, N 蛋白主要分布于细胞质, 也可分布于核内. N 蛋白主要参与 SARS-CoV 核衣壳的形成、基因组 RNA 合成调控、亚基因组 RNA 转录和翻译, 还通过破坏细胞分裂抑制宿主细胞增殖或延缓细胞生长, N 蛋白能与病毒或宿主细胞中多种蛋白质相互作用, 影响宿主细胞的多个信号转导通路、干扰宿主细胞的细胞周期、改变宿主细胞的生命活动. 细胞内已发现的 SARS-CoV N 蛋白结合蛋白包括 hnRNPA1、14-3-3 蛋白、cyclin-CDK 复合物、泛素相关小修饰蛋白 (small ubiquitin related modifier, SUMO)、人泛素结合酶 9(hUbc9)、亲环素 A (cyclophilin A)和延伸因子 -1 α 等^[1~7]. 从基因

组和蛋白质组的角度和已有细胞信号传导的知识来看, 这些已知蛋白质仅是宿主细胞与 SARS-CoV N 相互作用蛋白的一部分. Brunn 等^[8]在研究 SARS 病毒和宿主细胞相互作用的过程中发现, SARS 病毒不同成分之间以及病毒和宿主细胞之间的相互作用是一个复杂的网络. 因此通过先进的技术筛选宿主细胞内与 SARS-CoV N 蛋白的相互作用蛋白, 对于揭示 SARS 冠状病毒的致病机理、探寻新的药物靶标具有非常重要的意义. 鉴于此, 我们利用酵母双杂交方法对宿主细胞内 SARS-CoV N 蛋白的相互作用蛋白进行了筛选, 共筛选到 15 种新的相互作用蛋白. 在此基础上进一步利用免疫共沉淀方法确定了 CXCL16 确实是宿主细胞 SARS-CoV 核衣壳蛋白的相互作用蛋白, 现将研究结果报告如下.

* 山东省科技攻关项目(2006GG2202015)和山东省自然科学基金资助项目(Y2005C21).

** 通讯联系人. Tel: 001-306-9664333/001-306-9664344

E-mail: yongqingl@gmail.com

收稿日期: 2008-05-29, 接受日期: 2008-07-31

1 材 料

1.1 SARS-CoV-N 真核表达质粒 pDC516N

由 Ontario 大学 Jack Gauldie 博士利用 pcDNA3.1V5His 质粒构建^[9], 惠赠.

1.2 酵母双杂交系统

Yeast Two-Hybrid System(Y2H)和人肺 cDNA 双杂交表达文库(LLH)购自 Invitrogen 公司.

1.3 抗体

抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆(鼠)和多克隆(兔)抗体由加拿大 Alberta 大学 Suresh 友好提供^[10], 抗标签蛋白 V5 单克隆抗体(小鼠)购自 Invitrogen 公司.

2 方 法

2.1 诱饵质粒的构建

利用限制性内切酶 *EcoR* I 自 pDC516N 质粒中获取 SARS-CoV-N 基因, 插入到 pHybLex/Zeo 质粒中的相应 *EcoR* I 位点, 转化 DH5 α 大肠杆菌, 在含有 Zeocin 的 LB 平板上挑选阳性克隆, 提取质粒 DNA, 酶切鉴定后进行 DNA 序列测定.

2.2 相互作用蛋白基因的筛选

参考 Y2H 操作手册将诱饵质粒与人肺 cDNA 双杂交表达文库共同转化感受态酵母 EGY48/pSH18-34 细胞, 并在含 Zeocin、缺乏尿嘧啶和色氨酸的双缺 YC 培养基(YC-WU)上进行选择培养, 利用 β 硝酸纤维素膜显色技术挑选阳性菌落. 再利用含 Zeocin、缺乏尿嘧啶、亮氨酸和色氨酸的三缺 YC 培养基(YC-WUL)对阳性菌落进行复选.

2.3 PCR

利用 Y2H 试剂盒提供的 PCR 引物 pYESTrp Forward 和 pYESTrp Reverse 对上述阳性克隆进行 PCR, 并将 PCR 产物进行 DNA 序列测定, 将测序结果输入 GenBank 进行同源性比较, 选择有意义的基因.

2.4 CXCL16 基因的扩增与真核表达质粒的构建

根据 GenBank 中 CXCL16 的 DNA 序列, 设计了一对引物. 上游引物(含有 *Bam*H I 酶切位点): GGAATTCCATGTCTGGGAGTCAGAGCGA; 下游引物(含有 *Kpn*I 酶切位点): GCTCTAGACAGGT-ATTAGAGTCAGGT. 利用该引物自人肺 cDNA 双杂交表达文库中扩增出完整 CXCL16 基因, 序列测定正确. 经 *Bam*H I 和 *Kpn*I 双酶切后, 插入到

pcDNA3.1V5His C 表达载体的相应酶切位点, 构建 CXCL16 真核表达质粒.

2.5 相互作用蛋白基因的确认

将诱饵质粒与构建的 CXCL16 真核表达质粒 pcDNA3.1V5CXCL16 共同转化感受态酵母 EGY48/pSH18-34 细胞, 并在含 Zeocin、缺乏尿嘧啶、亮氨酸和色氨酸的三缺 YC 培养基(YC-WUL)上进行选择培养, 利用 β 硝酸纤维素膜显色技术观察阳性菌落.

2.6 转染人胚肾 HEK293 细胞

利用磷酸钙法将 pDC516N 单独或与 pcDNA3.1V5CXCL16 一起转染 HEK293 细胞, 培养 48 h 后收获 HEK293 细胞.

2.7 表达产物的提纯与鉴定

利用细胞裂解液^[11]裂解上述转染的 HEK293 细胞, 将转染 pDC516N 的细胞裂解液直接进行 10% SDS-PAGE 电泳, 然后利用硝酸纤维素膜进行电转印, 利用抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆(鼠)抗体和碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG 抗体进行 Western blot, 利用碱性磷酸酶显色试剂盒(Sigma 公司)显色. 将部份转染 pcDNA3.1V5CXCL16 的 HEK293 细胞裂解液用 Probond Purification System 试剂盒(Invitrogen 公司)提纯 CXCL16, 将提纯和未提纯的 CXCL16 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 利用硝酸纤维素膜进行电转印后, 通过抗标签蛋白 V5 单克隆抗体进行标记, 再利用化学发光染色试剂盒(BioRad 公司)显色.

2.8 免疫共沉淀

按照参考文献[11], 用细胞裂解液裂解上述已转染的 HEK293 细胞, 15 000 r/min, 离心 30 min, 取上清. 将转染 pDC516N 质粒的 HEK293 细胞裂解上清液分成 A、B 两组(各 500 μ l), A 组加入兔抗 SARS-CoV N 蛋白多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 30 min, 然后与等量转染 pcDNA3.1V5 CXCL16 质粒的 HEK293 细胞裂解上清液混合, 4 $^{\circ}$ C 30 min. B 组直接将转染 pDC516N 质粒的细胞裂解上清液与转染 pcDNA3.1V5 CXCL16 质粒的细胞裂解上清液混合. 再分别将 5 μ l 抗 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体与 A、B 两组反应物及 pcDNA3.1V5CXCL16 和 pDC516N 共转染的 HEK293 细胞裂解液(C 组)混合, 4 $^{\circ}$ C 30 min. 将 100 μ l 葡萄球菌 G 蛋白(protein G)偶联的 Sepharose(GE 公司)加入上述 A、B、C 3 个反应管, 4 $^{\circ}$ C 30 min, 5 000 r/min, 离心 30 s, 利用细胞裂解液洗涤沉淀物 5 次,

5 000 r/min, 离心 30 s, 弃上清.

2.9 Western blot

将 50 μl 聚丙烯酰胺凝胶电泳缓冲液与上述沉淀物混合, 重悬浮沉淀, 95℃ 加热 5 min, 冷却至室温, 取 10 μl 样品上聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转印至硝酸纤维素膜, 利用抗 V5 单克隆抗体与转印的硝酸纤维素膜反应, 漂洗后利用辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体进行反应, 漂洗后利用化学发光染色试剂盒(BioRad 公司)进行显色.

3 结 果

3.1 诱饵质粒的构建

自 36 株可在 Zeocin⁺LB 平板上生长的含有重组 SARS-CoV-N 基因的大肠杆菌中筛选出一株阳性克隆, 经限制性内切酶 *EcoR* I 酶切鉴定(图 1)

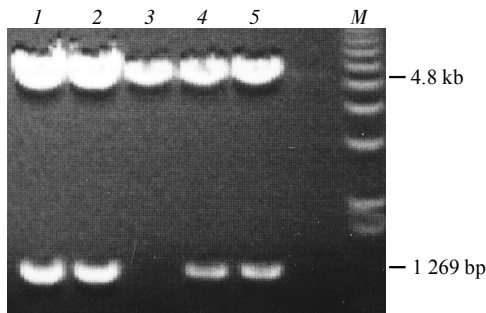


Fig. 1 Construction of the Bait plasmid
1, 2, 4, 5: Positive clones; M: DNA markers DL 15000+2000. 1 269 bp DNA fragment is SARS-CoV-N gene; 4.8 kb DNA fragment is HybLex/Zeo vectors.

后, 进行 DNA 序列测定, 阅读框架准确无误, 命名为 pHybLex/Zeo35.

3.2 酵母双杂交

经 YC-WU 和 YC-WUL 选择培养及 X-gal 硝酸纤维素膜显色技术挑选出 50 株阳性克隆, 经 PCR 扩增(图 2)和 DNA 序列测定, 得到 34 个 DNA 序列, 经同源性比较, 得到 15 个有意义基因克隆(表 1).

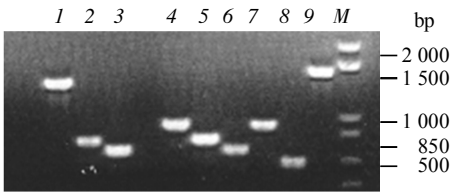


Fig. 2 PCR of interactors
1~9: PCR products of positive yeast clones; M: DNA markers DL2000+15000.

图 2 显示了部分阳性克隆的 PCR 产物, 由图 2 可以看出大多数 PCR 产物长度在 500~1 500 bp. 符合 Invitrogen 公司 cDNA 人肺文库特征.

由表 1 可以看出, 所有 PCR 产物 DNA 与 GenBank 中相应基因的同源性都在 90%以上. 另外除 B2 和 CJ 外其他 PCR 产物均为相应基因的一部分. 3 个未命名的基因中 CJ 株含有的蛋白质在 GenBank 中无任何描述, 为一个新发现 ORF. 鉴于对 SARS-CoV 免疫机理的研究兴趣, 我们选择

Table 1 The interactors between Sars-CoV-N and human embryo lung cell

No.	Clones	PCR /bp	Accession	Description	Significant	Gene/bp	Alignment/%
1	CB	598	NM_001145	ANG	443	488	100
2	CF/G4	866	BC045758	Nek10	575	1 424	100
3	B1	1 023	HSU07707	EPS15	666	2 690	99
4	B2	1 235	BC017382	Usp53	566	566	100
5	B3	992	NM_138392	SETA	831	2 123	99
6	C1	783	BC001231	GSTK	148	3 680	100
7	R23	1 078	NM_022059	CXCL16	729	821	99
8	G6	1 251	NM_033668	ITGB1	830	2 406	91
9	F7/F8/CH	1 045	AP008875	CO1	725	1 541	95
10	D1	198	NM_002228	JUN	161	995	98
11	A5	829	AK021555	Unnamed	561	1 548	96
12	G7	1 261	BC068539	Unnamed	192	3 355	93
13	CJ	1 165	AL161742	Unnamed	198	198	100
14	R11/E4/E9	699	NM_173176	PTK2B	531	4 089	100
15	B4	1 131	NM_018238	AGK	956	1 268	99

ANG: Angiogenin; AGK: Acylglycerol kinase; CO1: Cytochrome oxydase subunit I ; CXCL16: CXC chemokine ligand 16; Eps15: Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15; GSTK1: Glutathione S-transferase kappa 1; ITGB1: Integrin beta 1; JUN: Jun oncogene; Nek10: NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 10; PTK2B: Protein tyrosine kinase 2 beta; SETA: Homo sapiens SH3KBP1 binding protein 1 (SHKBP1); USP53: Ubiquitin specific peptidase 53.

CXCL16 基因继续研究.

3.3 CXCL16 基因的扩增与真核表达载体

选取可在含 AMP 的 LB 上生长的阳性菌落, 提取质粒, 利用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 进行酶切鉴定, 挑选到一株 pcDNA3.1V5His-C 和 CXCL16 的重组阳性克隆(图 3), 命名为 pcDNA3.1V5CXCL16.

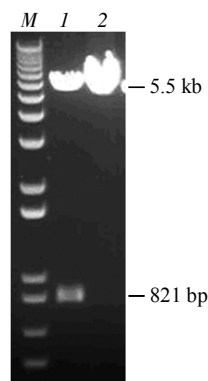


Fig. 3 Screening of the recombinant clone of pcDNA3.1V5His-C and CXCL16

M: DNA markers DL2000+15000; 1: Positive cloning plasmid digested by *Bam*H I and *Kpn* I; 2: Negative cloning plasmid digested by *Bam*H I and *Kpn* I. 821 bp DNA fragment is CXCL16; 5.5 kb DNA fragment is pcDNA3.1V5His-C vector.

3.4 相互作用蛋白基因的确认

将诱饵质粒 pHybLex/Zeo35 与含有 CXCL16 完整基因的 pcDNA3.1V5CXCL16 共同转化感受态酵母 EGY48/pSH18-34 细胞, 并在 YC-WUL 三缺陷培养基上进行筛选, 阳性克隆可在 4 h 内变成蓝色的判为阳性(图 4).

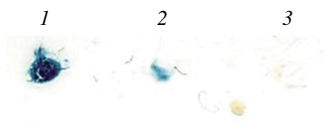


Fig. 4 Confirmation of positive cloning interactors between SARS-CoV N protein and CXCL16

1: Positive control yeast clone; 2: The yeast clone that transfected with pHybLex/Zeo35 and pcDNA3.1V5CXCL16; 3: Negative control yeast clone.

由图 4 可以看出, 阳性对照克隆和转化了 pHybLex/Zeo35 和 pcDNA3.1V5CXCL16 的酵母菌落已变成蓝色, 阴性对照不变色.

3.5 表达产物的检测

利用抗 SARS-CoV 核蛋白单克隆抗体对转染

pDC516N 质粒的表达产物进行 Western blot, 可见到一条约 46 ku 的阳性条带(图 5), 其大小与 SARS-CoV N 蛋白相符合. 利用抗 V5 单克隆抗体对 cDNA3.1V5CXCL16 的表达产物进行 Western blot, 可见到一条约 32 ku 的阳性条带(图 6), 其大小与 SARS-CoV N 蛋白相符合.

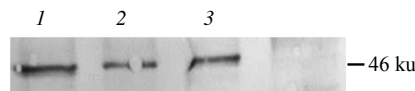


Fig. 5 Western blot for SARS-CoV N protein

1: Transfected HEK293 cell with pDC516N plasmid in the 6 well plate; 2: Transfected HEK293 cell with pDC516N and pcDNA3.1V5HisCXCL16 plasmids in the 6 well plate; 3: Transfected HEK293 cell with pDC516N plasmid in the 500 ml bottle; 4: HEK 293 cell control. 46 ku protein is SARS-CoV N protein.

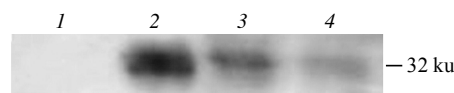


Fig. 6 Western blot for CXCL16/V5 protein

1: HEK293 cell control; 2: Purified CXCL16/V5 protein; 3: Transfected HEK293 cell with pcDNA3.1V5CXCL16 plasmid; 4: Transfected HEK293 cell with pDC516N and pcDNA3.1V5CXCL16 plasmids. 32 ku protein is CXCL16/V5 protein.

3.6 免疫共沉淀

利用抗 V5 单克隆抗体对 Sepharose 共沉淀物进行 Western blot, 可见到一条约 32 ku 和另一条约 24 ku 的阳性条带(图 7). 32 ku 的阳性条带, 其大小与 CXCL16/V5 蛋白相符合, 24 ku 的阳性条带, 其大小与 IgG 轻链蛋白相符合.

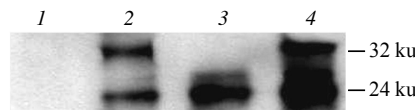


Fig. 7 Western blot for CO-IPs with anti-V5 antibody

1: The supernatant of the transfected HEK293 cell without any antibody; 2: Group B sample; 3: Group A sample; 4: Group C sample. 24 ku protein is mouse IgG light chain; 32 ku protein is CXCL16/V5 protein.

由图 7 可见, 无论 pcDNA3.1V5CXCL16 与 SARS-CoV-N 共转染的 HEK293 细胞裂解液(C 组)还是分别转染 HEK293 细胞后的细胞裂解液再在体外进行结合反应(B 组)的样本, 均可检测到共沉淀

的 CXCL16/V5 蛋白(含融合表达的 V5 标签), 而预先将 pDC516N 表达产物 SARS-CoV N 蛋白与兔抗 SARS-CoV N 蛋白多克隆抗体反应后再进行免疫共沉淀的 A 组, 则不能检测到共沉淀的 CXCL16/V5 蛋白。

4 讨 论

酵母双杂交技术和免疫共沉淀技术是研究蛋白质相互作用的可靠手段, 为了研究 SARS-CoV 病毒感染宿主后与肺细胞的相互作用, 本研究利用酵母双杂交系统以 SARS-CoV 的核衣壳蛋白为诱饵蛋白, 从人肺酵母双杂交表达文库中筛选出了 15 个与 SARS-CoV-N 蛋白相互作用的蛋白质, 并利用免疫共沉淀技术对其中的 CXCL16 蛋白与 SARS-CoV-N 蛋白之间的相互作用做了进一步的鉴定研究, 同时证明 CXCL16 蛋白与 SARS-CoV-N 蛋白的相互作用可被抗 SARS-CoV-N 蛋白抗体阻断。

病毒在宿主细胞中生长繁殖, 需要与宿主细胞发生复杂的相互作用^[12]。CXCL16 是新发现的一种细胞趋化因子, 由 254 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 30 000^[13]。具有趋化功能的 CXCL16 可以膜结合形式或分泌形式存在。CXCL16 可强烈趋化激活的 CD8⁺T 细胞, CXCL16 还可促进抗原递呈细胞(APC)与 T 细胞间的相互作用, 诱导特异细胞亚群的免疫应答, 调节激活的 T 细胞在脾脏红髓中的迁移^[14]。此外, 用 CXCL16 的单抗发现扁桃体和 CD19⁺B 细胞中表达该趋化因子, 表明慢性炎症中 CXCL16 参与了细胞-细胞之间的相互作用^[15]。CXCL16 的唯一受体被命名为 CXCR6, CXCR6 阳性 T 细胞在特定疾病中非常重要^[16]。SARS-CoV-N 蛋白释放到细胞外并与 CXCL16 相互结合后, 可能会阻止或降低 CXCL16 的趋化功能, 导致免疫细胞不能向 SARS-CoV 的感染部位聚集和发挥免疫效应功能。

SARS-CoV-N 蛋白与膜结合型 CXCL16 的结合或可协助宿主细胞内吞 SARS-CoV 病毒。研究表明, 黏膜表面是 HIV 侵入机体的重要部位, 黏膜区 CXCL16 的高表达可能会影响 HIV 感染颗粒利用 CXCL16 受体作为辅受体的能力^[17]。SARS-CoV-N 蛋白也可能具有病毒趋化因子结合蛋白的作用。研究表明, 一些病毒可合成病毒趋化因子结合蛋白, 能结合多种趋化因子并使其失去趋化作用, 如黏液瘤病毒可合成病毒趋化因子结合蛋白

M-T7, 它能抑制单核细胞/MΦ 流动所需要的趋化信号, 即它能结合和抑制 CC 趋化因子, Lalani 等^[18]首次证明了纯化的 M-T7 能结合 CXC、CC 和 C 趋化因子, 这种结合无种属特异性, 纯化的 M-T7 蛋白能抑制感染和炎症部位所涉及的造血细胞的招募和活化的内膜增生。

临床和实验室免疫学研究均已发现 SARS-CoV 感染过程中外周淋巴细胞的数量会发生明显的变化。刘顺爱等^[19]的研究结果显示, 所有治愈的 SARS 病人 T 细胞出现先降后升的可逆性改变, 而死亡的病人在整个病程中维持极低的免疫状态, 张剑平等^[20]的研究结果显示, SARS 病人外周血 B 细胞和 NK 细胞减少, 死亡病例中 B 细胞和 NK 细胞与正常对照组相比持续降低, 说明死亡前病人可能处于免疫功能耗竭状态。随着疾病的好转 CD4/CD8 比值有升高的倾向, 说明 T4 细胞比 T8 细胞上升速度快, 另外随着疾病的好转, 92% 病人的 B 细胞升高。这种变化在普通的病毒感染并不常见, 这是否与 SARS-CoV 病毒与淋巴细胞表面膜结合型 CXCL16 的相互作用有关尚需进一步研究。

本研究筛选出的其他 SARS-CoV N 蛋白的相互作用蛋白中, Eps15 是细胞外来大分子(包括病毒)通过网格蛋白介导内吞途径进入细胞的关键分子, 据报道, SARS-CoV 病毒^[21]和 JC 病毒^[22]均利用 Eps15 进入宿主细胞, ITGB1(整联蛋白)是一类分布广泛的细胞表面受体家族, 它不仅在细胞的生长、移行、增殖和分化等许多方面发挥重要生物学功能, 而且在多种病理过程中发挥重要作用, 许多病毒都能利用整联蛋白分子作为病毒受体或共同受体进入宿主细胞^[23]。Usp53(泛素特异性肽酶)与宿主细胞的一些重要蛋白质通过相互作用, 使病毒能够持续感染, 泛素在病毒粒子出芽过程中也起重要作用, 研究发现, 泛素和泛素连接酶参与逆转录病毒、水泡性口炎病毒和狂犬病毒的出芽过程^[24]。JUN 为一种具有多种功能的癌基因^[25]。其他相互作用蛋白 ANG、AGK、CO1、GSTK1、Nek10、PTK2B、SETA 等参与调节机体或细胞的代谢活动。

参 考 文 献

- 1 Luo H, Chen Q, Chen J, et al. The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. FEBS letters, 2005, 579(12): 2623~2628
- 2 Saikatendu K S, Joseph J S, Subramanian V, et al. Ribonucleocapsid

- formation of severe acute respiratory syndrome coronavirus through molecular action of the N-terminal domain of N protein. *J Virol*, 2007, **81**(8): 3913~3921
- 3 Fan Z, Zhuo Y, Tan X, *et al.* SARS-CoV nucleocapsid protein binds to hUbc9, a ubiquitin conjugating enzyme of the sumoylation system. *J Medical Virology*, 2006, **78**(11): 1365~1373
 - 4 Surjit M, Kumar R, Mishra R N, *et al.* The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol*, 2005, **79**(17): 11476~11486
 - 5 Luo C, Luo H, Zheng S, *et al.* Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **321**(3): 557~565
 - 6 Lindner H A, Fotouhi-Ardakani N, Lytvyn V, *et al.* The papain-like protease from the severe acute respiratory syndrome coronavirus is a deubiquitinating enzyme. *J Virol*, 2005, **79**(24): 15199~15208
 - 7 Su M C, Chang C T, Chu C H, *et al.* An atypical RNA pseudoknot stimulator and an upstream attenuation signal for -1 ribosomal frameshifting of SARS coronavirus. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(13): 4265~4275
 - 8 Von Brunn A, Teepe C, Simpson J C, *et al.* Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFeome. *PLoS ONE*, 2007, **2**(5): e459
 - 9 Zakhartchouk A N, Viswanathan S, Mahony J B, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein expressed by an adenovirus vector is phosphorylated and immunogenic in mice. *J Gen Virol*, 2005, **86**(1): 211~215
 - 10 Bhatnagar P K, Das D, Suresh M R. Sequential affinity purification of peroxidase tagged bispecific anti-SARS-CoV antibodies on phenylboronic acid agarose. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, **863**(2): 235~241
 - 11 Tan Y J, Teng Y J, Shen S, *et al.* A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J Virol*, 2004, **78**(13): 6723~6734
 - 12 刘俊丽, 冯 怡, 李楚芳. SARS 冠状病毒核衣壳蛋白抑制胞质分裂和细胞增殖. *生物技术通讯*, 2006, **17**(6): 138~141
Liu J L, Feng Y, Li C F. *Letter in Biotechnology*, 2006, **17**(6): 138~141
 - 13 Wilbanks A, Zondlo S C, Murphy K, *et al.* Expression cloning of the STRL33/BONZO/ TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol*, 2001, **166**(8): 5145~5154
 - 14 Shashkin P, Simpson D, Mishin V, *et al.* Expression of CXCL16 in human T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**(1): 148~149
 - 15 徐焕宾, 熊思东. 新发现的 CXCL16 趋化因子及其受体. *生命的化学*, 2003, **23**(1): 8~10
Xu H B, Xiong S D. *Chemistry of Life*, 2003, **23**(1): 8~10
 - 16 魏武杰, 文红艳. 趋化因子 CXCL16 与临床疾病. *现代生物医学进展*, 2007, **7**(5): 798~800
Wei W J, Wen H Y. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, **7**(5): 798~800
 - 17 Matloubian M, David A, Engel S, *et al.* A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*, 2000, **1**(4): 298~304
 - 18 Lalani A S, Graham K, Mossman K, *et al.* The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin domains of chemokines. *J Virol*, 1997, **71**(6): 4356~4363
 - 19 刘顺爱, 戴旺苏, 张剑平, 等. SARS 病人外周血 T 淋巴细胞的动态变化及其在发病进程和发病机理中的意义. *中国免疫学杂志*, 2003, **19**: 375~377
Liu S A, Dai W S, Zhang J P, *et al.* *Chin J Immunology*, 2003, **19**: 375~377
 - 20 张剑平, 冯 鑫, 刘顺爱, 等. SARS 病人外周血 NK 细胞和 B 淋巴细胞的动态变化及发病机理初探. *中国免疫学杂志*, 2003, **19**: 380~383
Zhang J P, Feng X, Liu S A, *et al.* *Chin J Immunology*, 2003, **19**: 380~383
 - 21 Wang H, Yang P, Liu K, *et al.* SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Research*, 2008, **18**(2): 290~301
 - 22 Querbes W, Benmerah A, Tosoni D, *et al.* JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin-and eps15-dependent pathway. *J Virology*, 2004, **78**(1): 250~256
 - 23 独军政, 常惠芸, 高闪电, 等. 整联蛋白与口蹄疫病毒感染. *微生物学通报*, 2007, **34**(5): 960~964
Du J Z, Chang H Y, Gao S D, *et al.* *Microbiology*, 2007, **34**(5): 960~964
 - 24 姜少平, 李京京. 宿主细胞泛素系统与病毒相互作用的研究. *湖北师范学院学报(自然科学版)*, 2007, **27**(3): 46~49
Jiang S P, Li J J. *J Hubei Normal University(Natural Science)*, 2007, **27**(3): 46~49
 - 25 方 慧, 张 军. c-jun 原癌基因及其表达产物的研究进展. *国外医学分子生物学分册*, 2002, **24**(5): 263~266
Fang H, Zhang J. *J Medical Molecular Biology*, 2002, **24**(5): 263~266

Screen and Identification of The Protein-protein Interactors in The Host Cell With The SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein*

CHANG Wei-Shan¹⁾, ZHAI Jing²⁾, SONG Wen-Gang²⁾, LIU Yong-Qing^{1,3)**}

¹⁾*College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;*

²⁾*Department of Basic Medicine, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China;*

³⁾*Medical College University of Saskatchewan, Saskatoon S7N 5E3, Canada)*

Abstract 15 SARS-CoV N Protein Interacting Protein (NPIP) were selected from host cells using Yeast Two-hybrid system (Y2H). These are Angiogenin, acylglycerol kinase, cytochrome oxydase subunit I, CXC chemokine ligand 16, epidermal growth factor receptor pathway substrate 15, glutathione S-transferase kappa 1, integrin beta 1, jun oncogene, NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 10, protein tyrosine kinase 2 beta, homo sapiens SH3KBP1 binding protein 1 and ubiquitin specific peptidase 53. With the aid of immunological co-precipitation (CO-IP), it was confirmed that chemokine CXCL16 was the interactor with SARS-CoV N protein in host cells.

Key words SARS_CoV nucleocapsid protein, host cell protein-protein interactor, CXCL16

*This work was supported by grants from The Key Scientific and Technological Programs (2006GG2202015) and The Natural Science Foundation of Shandong Province (Y2005C21).

**Corresponding author.

Tel: 001-306-9664333/001-306-9664344 (Office), E-mail: yongqingl@gmail.com

Received: May 29, 2008 Accepted: July 31, 2008