

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

EIAV Gag 蛋白降解线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 的机制研究

硕士研究生: 王欣慧

学 号: 82101182439

指 导 教 师: 杜承 副研究员

申请学位类别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物疫苗与分子免疫学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2021 年 6 月

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

EIAV Gag 蛋白降解线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 的机制研究

硕 士 研 究 生: 王欣慧

学 号: 82101182439

指 导 教 师: 杜承 副研究员

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物疫苗与分子免疫学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2021 年 6 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences
Thesis**

**The Mechanism of EIAV Gag Targeting Mitochondrial
Antiviral Signaling Protein MAVS**

Candidate: WANG Xinhui

Student ID: 82101182439

Supervisor: Associate Prof. DU Cheng

**Degree Type: Master of Science in Preventive
Veterinary Medicine**

Major: Preventive Veterinary Medicine

**Research Field: Animal Vaccine and
Molecular Immunology**

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute
Graduate School**

June 2021

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		EIAV Gag 蛋白降解线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 的机制研究					
论文作者		王欣慧	专业/领域	预防兽医学	研究方向	动物疫苗与分子免疫学	
指导教师		杜承		培养单位	哈尔滨兽医研究所		
姓名		职称	硕	单 位	专 业	签 名	
评 阅 人	王玉娥	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	/	
	吴云舟	副教授	硕导 <input checked="" type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>	东北农业大学	生物化学与分子生物学		
答 辩 主 席	隋广超	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北林业大学	生物化学与分子生物学		
答 辩 委 员	钟照华	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨医科大学	微生物学		
	徐世文	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学	临床兽医学		
	尹鑫	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学		
	安同庆	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学		
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
				硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input type="checkbox"/>			
会议记录（秘书）							
论文答辩时间地点		2021年5月27日 综合楼 1046					

独创性声明

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，除了文中特别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，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。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作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：王欣慧

时间：2021年6月1日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院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。

研究生签名：王欣慧

时间：2021年6月1日

导师签名：杜承

时间：2021年6月1日

摘要

马传染性贫血病毒(Equine infectious anemia virus, EIAV)可引起马属动物的急性、烈性传染病,患病马表现为发热、黄疸、贫血等,剖检发现脾脏细胞大量死亡。EIAV 相关致病机制研究众多,但却缺少与细胞天然免疫相关的深入研究。RIG-I 与 MDA5 作为细胞内识别外源性双链 RNA(dsRNA)的感受器,可以将信号转导给 MAVS 等下游信号分子,进而激活 I 型干扰素抵抗病毒。

探究 EIAV 是否影响 MAVS 介导的 I 型干扰素的激活,使用 IFN- β 启动子报告系统证实 EIAV 可下调 eqMAVS 的表达并抑制 IFN 生成。为确认 EIAV 是通过直接作用于 eqMAVS 发挥作用,本研究在 HEK293T 细胞中转染 eqMAVS 与不同剂量的 EIAV 感染性克隆质粒 CMV3-8,发现 EIAV 可下调 eqMAVS 的蛋白表达且呈现剂量依赖性,随着共转染时间增长,下调现象更显著。为了验证 EIAV 也下调马属动物细胞内源性 eqMAVS,本研究制备了 eqMAVS 鼠单克隆抗体,可检测马属动物细胞 NBL-6 以及 eMDM 的内源性 eqMAVS。应用该抗体我们证实了 EIAV 确实下调马属动物细胞内源性 eqMAVS。为筛选与 eqMAVS 相互作用的 EIAV 蛋白,本研究利用实验室已构建的 5 种 EIAV 蛋白真核表达质粒与 eqMAVS 真核表达质粒共转染 HEK293T 细胞 Western blot 检测发现 EIAV Gag 蛋白可显著下调 eqMAVS 蛋白的表达水平。经荧光定量 PCR 实验验证 EIAV Gag 不影响 eqMAVS 的 mRNA 水平。经激光共聚焦实验分析不同转染时间点 eqMAVS 与 EIAV Gag 在细胞内的定位情况,发现 eqMAVS 早期与 EIAV Gag 在细胞内定位相同,均弥散于胞质中,而随着时间增加逐渐在线粒体上聚集不再与 EIAV Gag 显著共定位。使用邻位连接方法与免疫共沉淀技术证实两者发生相互作用。进一步探索 EIAV Gag 是如何发挥功能,发现蛋白酶体抑制剂 MG132 可恢复 eqMAVS 的表达,而 EIAV Gag 可增加 eqMAVS 的泛素化水平,证实 EIAV Gag 是通过蛋白酶体途径降解 eqMAVS。克隆表达文献中常见的 E3 泛素连接酶,发现 MUL1 可促进 EIAV Gag 降解 eqMAVS,且能够与 EIAV Gag 发生免疫共沉淀。进一步分析 EIAV Gag 介导降解的主要功能域,发现 P15 与 P26 可以与 eqMAVS 互作且降解 eqMAVS 蛋白的表达。

综上所述,本研究首次发现 EIAV 可下调 MAVS 介导的 IFN- β 的激活,成功制备了 eqMAVS 单克隆抗体验证 EIAV 降解内源性 eqMAVS。进一步筛选到与 eqMAVS 互作的 EIAV Gag 蛋白,并发现其招募 E3 泛素连接酶 MUL1 经泛素-蛋白酶体途径降解 eqMAVS 蛋白。本研究为探索内源性 eqMAVS 变化提供了有效的生物学工具,拓展了慢病毒家族成员对 MAVS 蛋白的调控研究,并为进一步研究 EIAV 和 RIG-I-MAVS 信号通路奠定了重要基础,为深入探索 EIAV 引发持续性感染的机制提供了新的研究方向。

关键词: 马传染性贫血病毒, Gag, 线粒体抗病毒信号蛋白, 蛋白酶体降解途径

Abstract

EIAV can cause acute and severe infectious diseases in equine animals, and the affected horses show fever, jaundice, anemia. A large number of spleen cells were found in necropsy. Many studies have been conducted on the pathogenesis of EIAV-related diseases, but lacking further research on the cellular innate immunity. RIG-I and MDA5 act as receptors for the recognition of exogenous double strands (dsRNA) in cells, and transduce signals to downstream signaling molecules such as MAVS to activate type I interferon(IFN) against viruses.

To investigate whether EIAV affects MAVS mediated IFN activation, and IFN- β promoter system was used to confirm that EIAV can regulate the expression of eqMAVS and inhibits the production of IFN. To confirm the role of EIAV direct on eqMAVS expression, we transfected eqMAVS with different doses of EIAV-infected clone plasmid CMV3-8 in HEK293T cells. Then, we found that EIAV regulated the protein expression of eqMAVS in a dose-dependent manner with co-transfection time significantly. To verify that EIAV also down-regulates endogenous eqMAVS in equine cells, mouse monoclonal antibodies against eqMAVS were prepared in this study, which can detect endogenous eqMAVS in equine cells NBL-6 and eMDM. Using this antibody, we confirmed that EIAV indeed down-regulates endogenous eqMAVS in equine cells. In order to screen out EIAV proteins that interact with MAVS, five EIAV protein plasmids expressing in HEK293T cells along with the eqMAVS expression constructs. Western blot showed that EIAV Gag could significantly down-regulate the expression of eqMAVS. Fluorescence quantitative assay confirmed that EIAV Gag did not affect the mRNA level of eqMAVS. The localization of eqMAVS and EIAV Gag in cells at different transfection time points was analyzed by laser confocal experiments. It was found that eqMAVS and EIAV Gag had the same intracellular localization in the early stage, and were dispersed in the cytoplasm, but gradually accumulated in mitochondria over time, and no significant co-localization with EIAV Gag was found. The interaction between the two proteins was farther confirmed by PLA and immunoprecipitation. We further explored how EIAV Gag functions, and found that the proteasome inhibitor MG132 could restore the expression of eqMAVS, while EIAV Gag could increase the ubiquitin level of eqMAVS, which confirmed that EIAV Gag degrades eqMAVS through the proteasome pathway. Several E3 ubiquitin ligase was cloned and expressed, and it was found that MUL1 could promote the degradation of eqMAVS by EIAV Gag, and could induce co-immunoprecipitation with EIAV Gag. Further analysis of the main functional domains of EIAV Gag mediated degradation revealed that P15 and P26 could interact with eqMAVS and degrade eqMAVS protein.

To our knowledge, the study show that EIAV can regulate MAVS mediated activation of IFN- β and we also produce monoclonal antibodies against eqMAVS to validate the degradation of endogenous eqMAVS by EIAV successfully. The EIAV Gag protein interacting with eqMAVS was further screened. We also found that it recruited the E3 ubiquitin ligase MUL1 to degrade eqMAVS through the ubiquitin-proteasome pathway. This research provides an effective biological tool for the exploration of endogenous eqMAVS changes, expands the research on the regulation of MAVS proteins by lentiviral family members, and lays an important foundation for the further study of the signaling pathways of EIAV and RIG-I-

MAVS, and provides a new research direction for the further exploration of the mechanism of persistent infection induced by EIAV.

Keywords: Equine infectious anemia virus, Gag, MAVS, Proteasome degradation pathway

目 录

第一章 绪论	1
1.1 马传染性贫血病毒概述	1
1.2 EIAV 病毒粒子及基因结构	1
1.2.1 EIAV <i>gag</i> 基因及其编码蛋白	2
1.2.2 EIAV <i>pol</i> 基因	2
1.2.3 EIAV <i>env</i> 基因及其编码蛋白	3
1.2.4 EIAV 附属基因及其编码蛋白	3
1.3 慢病毒相关天然免疫限制因子的研究进展	4
1.4 MAVS 在抗病毒先天性免疫中的作用	4
1.4.1 MAVS 的转录后调控	6
1.4.2 MAVS 的翻译后调控	7
1.4.3 病毒蛋白与 MAVS 的相互作用	8
1.5 本研究的目的是与意义	10
第二章 EIAV 负调控 eqMAVS 的表达	11
2.1 实验材料	11
2.1.1 试验所用质粒菌株细胞及动物	11
2.1.2 试验所用试剂及培养液配置	11
2.1.3 主要仪器	12
2.2 实验方法	13
2.2.1 细胞培养	13
2.2.2 目的基因的扩增及重组质粒的构建	13
2.2.3 重组蛋白的表达及纯化	13
2.2.4 动物免疫及血清抗体效价检测	14
2.2.5 抗体亚型鉴定	14
2.2.6 小鼠腹水抗体的纯化	14
2.2.7 抗体效价	14
2.2.8 细胞转染	14

2.2.9 细胞感染	14
2.2.10 双荧光素酶报告基因的检测	15
2.2.11 Western blot.....	15
2.3 实验结果.....	15
2.3.1 目的基因扩增及重组质粒构建	15
2.3.2 EIAV 负调控 eqMAVS 在 HEK293T 中的瞬时表达.....	16
2.3.3 重组蛋白表达及纯化	17
2.3.4 血清抗体效价检测	19
2.3.5 杂交瘤细胞的筛选和抗体亚型鉴定	19
2.3.6 抗体纯化及效价检测	19
2.3.7 抗体反应性检测	20
2.3.8 EIAV 负调控内源性 eqMAVS 的表达	21
2.3.9 筛选负调控 eqMAVS 表达的 EIAV 蛋白	21
2.4 小结.....	22
第三章 EIAV Gag 降解 eqMAVS 的机制研究.....	23
3.1 实验材料.....	23
3.1.1 质粒、菌株及细胞	23
3.1.2 主要试剂	23
3.1.3 主要仪器	23
3.2 实验方法	23
3.2.1 引物设计及质粒构建与表达	23
3.2.2 细胞 RNA 提取及反转录.....	24
3.2.3 荧光定量检测	24
3.2.4 Western blot.....	25
3.2.5 免疫共沉淀	25
3.2.6 激光共聚焦检测实验	25
3.2.7 邻位连接技术	25
3.2.8 药物处理实验	26

3.2.9 统计学分析	26
3.3 实验结果	26
3.3.1 EIAV Gag 负调控 eqMAVS 呈现剂量依赖性.....	26
3.3.2 EIAV Gag 与 eqMAVS 在细胞中相互作用.....	27
3.3.3 EIAV Gag 通过泛素-蛋白酶体途径降解 eqMAVS	29
3.3.4 E3 泛素连接酶 MUL1 参与 EIAV Gag 降解 eqMAVS	30
3.3.5 EIAV Gag 成熟蛋白降解 eqMAVS.....	32
3.4 小结	33
第四章 全文讨论	35
第五章 全文结论	38
参考文献	39
致 谢	48
作者简历	49

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
CA	Capsid	衣壳蛋白
DU	Deoxyuridine triphosphatase	dUTPase
EIA	Equine infectious anemia	马传染性贫血病
EIAV	Equine infectious anemia virus	马传染性贫血病毒
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
IN	Integrase	整合酶
IRF3	Interferon regulatory factor	干扰素调节因子 3
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2	遗传学和生理学蛋白质 2
LTR	Long terminal repeats	长末端重复序列
MA	Matrix	基质蛋白
MAM	Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane	线粒体相关的内质网膜结构
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling protein	线粒体抗病毒蛋白
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene 5	黑素瘤分化相关基因 5
MHR	Major homology region	主要同源区
NC	Nucleocapsid	核衣壳蛋白
NES	Nuclear export signal	核输出信号域
NF- κ B	Nuclear factor kappa-B	核转录因子- κ B
NLS	Nuclear location signal	核定位信号域
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PLK1	Serine/threonine Polo-like kinase 1	丝氨酸/苏氨酸 Polo 样激酶 I
PR	Protease	蛋白酶
PRR	Proline-rich domain	富含脯氨酸的区域
RBD	RNA-binding domain	RNA 结合结构域
RD	Repressor domain	C 端阻遏物结构域
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I	视黄酸诱导基因 I
RLRs	RIG-I-like receptors	维甲酸诱导基因 I 样受体
RT	Reverse transcriptase	反转录酶
SU	surface glycoprotein	表面糖蛋白
TM	Transmembrane glycoprotein	跨膜糖蛋白
UTR	Untranslated region	非翻译区

第一章 绪论

1.1 马传染性贫血病毒概述

由马传染性贫血病毒(Equine Infectious Anemia Virus, EIAV)引起的马传染性贫血病(Equine Infectious Anemia, EIA), 是马属动物的一种以持续性感染、贫血和发热类型以滞留热与间歇热为主的反复发热为特征的传染病(CARPENTER et al., 1987)。这种周期性发热以一定时间为间隔。反复出现, 随着疾病的进程。发热程度越来越弱, 间隔越来越长, 最终表现为隐性感染终身带毒。该临床症状与此病毒的特性有关(KAISER et al., 2009)。

EIAV 属于逆转录病毒科慢病毒属, 慢病毒可在宿主体内持续的潜伏感染, 是由于其复制过程会经历一段 DNA 中间体, 病毒 RNA 通过反转录合成双股 DNA 形式的前病毒基因, 之后整合于宿主细胞的基因组中。以前病毒序列为模版利用宿主细胞的聚合酶, 转录出新的病毒 RNA, 翻译为病毒蛋白进而组装病毒粒子并释放。这样, 病毒基因组的存在时间与宿主细胞的寿命息息相关(SELLON et al., 1994)。

1.2 EIAV 病毒粒子及基因结构

根据美国 R.C.Montelaro 教授等所构建的 EIAV 病毒粒子模式图片见图 1-1(SALINOVICH and MONTELARO, 1986), 以及病毒的电镜照片图 1-2 可知, 病毒粒子的直径约 100 nm, 含一个锥型核心, 再由脂质囊膜包裹。囊膜(Envelope, Env)中分别含有跨膜糖蛋白(Transmembrane glycoprotein, TM)gp45 和高度糖基化的表面糖蛋白(Surface glycoprotein, SU)gp90。囊膜上的一种微小组分是脂酰化蛋白基质蛋白(Matrix protein, MA)P15, 在脂质双分子层下构成基质。病毒核心还包括衣壳蛋白(Capsid protein, CA)P26、核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein, NC)P11、P9。P26 是数量最多的结构蛋白, 构成病毒核衣壳主体, 其中 P9 为酸性蛋白, P11 为强碱性蛋白。以下是关于 EIAV 编码的各个结构蛋白以及附属蛋白(GONDA et al., 1978)。

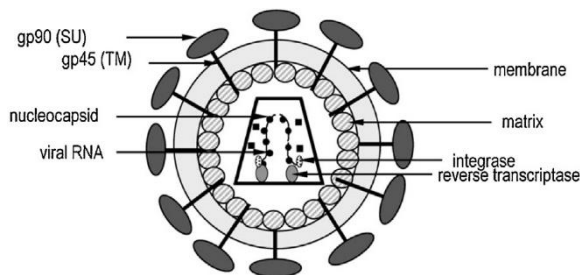


图 1-1 EIAV 结构模式图(LERIUX et al, 2004)

Fig.1-1 Model of an EIAV particle

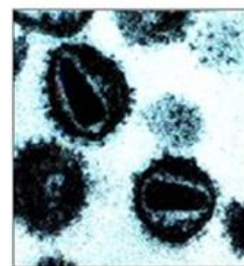


图 1-2 EIAV 电镜图(SALINOVICH,1986)

Fig.1-2 SEM images of EIAV

1.2.1 EIAV *gag* 基因及其编码蛋白

EIAV *gag* 基因的组成与人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)最为相似, 编码 EIAV 的前体蛋白 P55, 后会经病毒自身编码的蛋白酶将其裂解为 P15、P26、P11 和 P9, 裂解位点见图 1-3(STEPHENS et al., 1986)。为了研究 EIAV 的结构组成 Oroszlan 等人制备了针对 Gag 及其裂解后成熟蛋白的高滴度兔多克隆血清。这些血清用于推测的病毒 Gag 的前体蛋白和成熟蛋白组成, 后发现 Gag 前体蛋白会被裂解为 49 kDa、40 kDa 和 35 kDa 等多种不同大小的成熟蛋白组合(HENDERSON et al., 1987)。而由 Gag 前体蛋白裂解的成熟蛋白对于逆转录病毒组装和萌芽至关重要: P15 能够靶向病毒组装位点并促进病毒基因组与胞质膜的结合; P26 可介导自身相互作用, 在病毒装配过程中以有序的方式进行寡聚以确保病毒颗粒的形态; P11 包含一个 RNA 结合域, 可以对病毒基因组进行包装并促进自身的寡聚化(BIENIASZ, 2009)。其他方面, HIV-1 Gag 蛋白的组装主要发生在胞质膜上, 由 N 端肉豆蔻酰化的 P15 蛋白介导, 而其肉豆蔻化对于促进病毒成分锚定在胞质膜上进行组装必不可少。进一步发现, 对其肉豆蔻化基序中保守的碱性氨基酸残基进行突变后, 会导致病毒成分靶向胞质膜的效率降低, 减少病毒的生成(SAAD et al., 2007)。EIAV 的 P26 蛋白与 HIV 对应的蛋白同源性最高, 其中两者都包含一个 20 个氨基酸残基的主要同源区(Major homology region, MHR), 该区域对病毒前体蛋白经历完全裂解到成熟阶段十分重要(COOK et al., 2013)。P11 是一类多功能碱性蛋白, 它们包含两个长度可变的锌指结合基序(CX2CX4HX4C), 并在病毒的 RNA 包装和感染中起着至关重要的作用(AMODEO et al., 2006)。EIAV P9 包含一个 YPDL L 结构域, 此结构域可与内吞小体分选转运复合体(the endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)途径建立联系, 对病毒萌芽后期的释放至关重要(CHEN et al., 2005)。另一方面, P9 作为最小的成熟蛋白是 SUMO 化的主要目标, 研究人员对 P9 的 K30 位点进行突变后可消除其 SUMO 化修饰(WANG et al., 2017)。

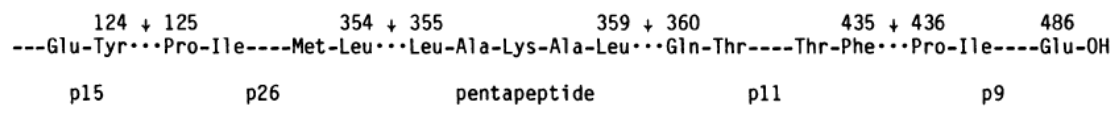


图 1-3 EIAV Gag 蛋白裂解位点(HENDERSON et al.,1987)

Fig.1-3 Proteolytic cleavage sites in EIAV Gag

1.2.2 EIAV *pol* 基因

EIAV *pol* 基因与 *gag* 基因的开放阅读框存在一定程度的重合, 所以 Gag-Pol 多蛋白的合成需要核糖体向-1 方向上移码读取 *gag* 基因 C 端 251 个碱基来翻译 Pol 蛋白, 该部分包含了 P11 部分基因及 P9 全部基因。一般认为, RNA 病毒的核糖体移码机制都需要特定的序列及茎环结构, 有文献报道人为破坏 HIV 的茎环结构后, 会降低移码的效率(STAPLE and BUTCHER, 2003)。EIAV *pol* 基因编码 EIAV 所有的酶, 包括逆转录酶(Reverse transcriptase, RT)P66、蛋白酶(Protease, PR)P12、dUTPase(Deoxyuridine triphosphatase, DU)和整合酶(Integrase, IN)P30(CHEN and MONTELARO, 2003; DULUDE et al., 2002)。研究人员使用亲和层析法纯化逆转录酶时, 发现存在两个同时具备逆转录酶与 RNase H 双重活性的大小不同的蛋白, 分别是 66 kDa 与 51 kDa, 这表明 66 kDa 蛋白

的降解产生 51 kDa 蛋白。在一定程度上丰富了 EIAV 蛋白裂解的多样性(DEVICO et al., 1991)。突变慢病毒属 HIV-1、HIV-2 及 EIAV 逆转录酶的 N 段与 C 段区域都能够在非常大程度上影响逆转录酶的 DNA 聚合酶活性(SHAHARABANY et al., 1993)。EIAV 与 HIV-1 蛋白酶包含 30 个相同的氨基酸, 11 个相似的氨基酸, 它们主要集中在底物结合区和底物作用区(CHIU et al., 1985)。EIAV 蛋白酶的主要作用为裂解病毒的前体蛋白, 裂解位点是锌指结构中第一个半胱氨酸残基的 C 端。而 EIAV dUTPase 在基因结构上位于 RNase H 和整合酶之间, 有数据表明缺乏 dUTPase 的 EIAV 在原代马巨噬细胞上的复制水平很低, 仅为野毒株的 1%(LICHTENSTEIN et al., 1995; SHAO et al., 1997)。EIAV 编码的整合酶是慢病毒属成员中最小的(KAWAKAMI et al., 1987)。科研人员于 1996 年首次在体外纯化了多组氨酸融合表达的整合酶, 并验证其与 HIV 的整合酶具有相似的生化特性, 这也为进一步研究 EIAV 整合酶功能提供了基础(ENGELMAN, 1996)。

1.2.3 EIAV *env* 基因及其编码蛋白

EIAV *env* 基因编码含 862 个氨基酸残基的 Env 前体蛋白, 裂解后形成含有 12 个 N 糖基化位点的 gp90 和仅含有 4 个 N 糖基化位点的 gp45(TALLMADGE et al., 2008)。一般情况下, 病毒通过病毒颗粒表面的蛋白与细胞受体相结合, 而慢病毒的 Env 糖蛋白暴露在病毒颗粒表面形成突起, 其具有重要的生物学功能包括对识别细胞表面病毒相关膜受体、介导病毒-细胞膜融合和病毒的中和作用。而 Env 蛋白的糖侧链则可以帮助病毒完成自身折叠与免疫逃逸(EDMONSON et al., 1998)。针对猴免疫缺陷病毒 Env 蛋白的 N 糖基化研究也表示, 随着糖基化数量的增加, 病毒毒力增强(EDMONSON et al., 1998)。EIAV *env* 基因高度变异性是慢病毒共同的特征, 不同毒株 gp90 的糖基化位点数量差异较大, 但普遍在 13-19 个左右(WANG et al., 2011)。而 gp90 的高度变异性还直接体现在序列差异上, 有研究表明, EIAV_{UK} 的弱毒株 gp90 与强毒株 gp90 之间有 30 个氨基酸差异, 并且都集中分布在 V3 高变区(PAYNE et al., 2004)。由于其变异程度高所以针对 Env 蛋白的抗体制备一直是一个难题, 通过分析平行感染的 13 个分离株, 发现 Env 蛋白序列没有明显的进化模式。继而根据 gp90 或 gp45 上的保守表位研发针对 Env 糖蛋白的中和抗体, 得到的单克隆抗体却无法中和 EIAV 感染(HUSSAIN et al., 1987)。当针对 EIAV 疫苗研发及中和抗体制备均陷入困局时, 沈荣显院士通过在驴白细胞培养物上对 EIAV 驴强毒长期连续传代, 成功培育出了 EIAV 弱毒疫苗(MA et al., 2011)。对传代过程中三株重要毒株的 *env* 基因进行测序分析, 发现疫苗毒株 Env 蛋白的 V4 区域第 236 位氨基酸的缺失突变导致一个 N-糖基化位点的丧失, 而该位点对毒力转变至关重要, 也印证了 EIAV Env 蛋白糖基化与致病性密切相关(LIU et al., 2019)。

1.2.4 EIAV 附属基因及其编码蛋白

反式激活蛋白(Trans-activator of transcription, Tat)是调控慢病毒转录的 RNA 早期结合蛋白(BAYER et al., 1995)。EIAV Tat 蛋白第一外显子的起始密码子为 CUG 而非 AUG 处启动翻译, 其在转录延伸水平上激活宿主 RNA 聚合酶 II 并介导病毒的复制, 其对病毒复制必不可少(DERSE et al., 1990)。Tat 蛋白也可通过结合长末端重复序列(Long terminal repeats, LTR)上的 Tat 激活域(Tat activating region, TAR)招募多种细胞因子, 起始病毒 RNA 的转录翻译。科研人员发现使用亲和层析法纯化与 Tat 蛋白结合的细胞核提取物, 其中包括细胞周期蛋白 T1、Tat 特殊因子 1、细胞周期

蛋白依赖性激酶 9 和至少三种未鉴定的宿主蛋白质(SUNE et al., 2000)。

不同毒株的 S2 差异较大, 编码氨基酸数量在 65-68 个之间, 蛋白约 7.2 kDa。EIAV_{LN40} 在感染马体 150 d 后 S2 存在 10 个稳定的氨基酸突变, 突变率为 14.7%(WANG et al., 2014)。而 2003 年 Li 等人将 EIAV_{UK} 的 S2 基因缺失, 进一步制备的减毒活疫苗, 免疫马体 6 个月可表现出一定的保护力, 这表明 S2 能调节宿主的免疫反应(LI et al., 2003)。且有研究表明 S2 蛋白的表达对于小马驹感染 EIAV 至关重要, 将其突变后小马驹在感染后基本检测不到病毒血症(FAGERNESS et al., 2006)。Covaleda 等人的研究也进一步表明病毒感染巨噬细胞后 S2 可增强促炎性细胞因子和趋化因子的表达(COVALEDA et al., 2010)。最新关于 S2 功能的研究是发现其与 HIV 的 Nef 类似, 可以与宿主限制因子 SERINC5 和 SERINC3 相互作用, 将其从病毒粒子中排除(CHANDE et al., 2016)。

Rev 蛋白包含两部分 RNA 结合结构域, 两者之间间隔 79 个氨基酸残基。Rev 含有 3 个功能域, 分别是 RNA 结合结构域(RNA-binding domain, RBD)、核输出信号域(Nuclear export signal, NES)和核定位信号域(Nuclear location signal, NLS)(UMUNNAKWE et al., 2014)。慢病毒的 Rev 蛋白主要功能是剪切病毒 mRNA 促进核输出。EIAV Rev 与 HIV-1 Rev 具有同源性, HIV-1 Rev 与细胞核结合并结合其同源序列, 随后沿病毒 RNA 寡聚, 并结合细胞核孔转运蛋白 Crm1 转运 RNA-蛋白质复合物至细胞质(POLLARD and MALIM, 1998)。最近关于 Rev 蛋白的研究发现其新功能, EIAV 还可以通过 Rev 介导 SAMHD1 的降解来抵消 SAMHD1 的限制, 逃避宿主细胞的天然免疫反应, 也揭示了 EIAV 附属蛋白的多种功能(REN et al., 2020a)。

1.3 慢病毒相关天然免疫限制因子的研究进展

慢病毒基因组所编码的蛋白较少, 需要借助宿主细胞蛋白来进行自我复制, 而宿主细胞也根据其特性编码多种蛋白调控病毒复制周期, 限制其生成, 这类能够限制病毒复制的宿主蛋白被称为天然免疫限制因子。第一个被发现具有抗 HIV 病毒活性的细胞蛋白质是 APOBEC3G, 该蛋白可以通过包裹进病毒粒子中, 在新一轮感染复制过程中引起逆转录得到的病毒 DNA 胞嘧啶突变为尿嘧啶, 进而被宿主细胞的 DNA 甲基化酶识别后降解, 从而达到抑制病毒复制的效果, 而 HIV Vif 蛋白则可以拮抗 APOBEC3G(KREMER and SCHNIERLE, 2005)。除 APOBEC3G 外, 目前针对 HIV-1 研究较多的限制因子有 TRIM5 α (STREMLAU et al., 2004)、SAMHD1(LAGUETTE et al., 2011)、MX2(GOUJON et al., 2013)、Tetherin 等(COLOMER-LLUCH et al., 2018)。其中宿主限制因子 Tetherin 通过在细胞表面表达来抑制病毒粒子的释放, 而 HIV-1 辅助蛋白 Vpu 则可拮抗其功能(NEIL et al., 2008)。另外 HIV-1 Vpu 还可以通过负调控线粒体抗病毒蛋白(Mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)强烈拮抗干扰素的生成(SANCHEZ et al., 2015)。

1.4 MAVS 在抗病毒先天性免疫中的作用

通过模式识别受体先天性免疫细胞可识别病原体相关分子模式, 并激活细胞内的抗病毒免疫应答信号传导途径(AKIRA et al., 2006)。细胞内的模式识别受体包括位于细胞内的维甲酸诱导基因 I 样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)和细胞膜上的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)。两种 RNA 识别受体, 它们均可在识别病毒 RNA 后启动机体抗病毒免疫反应。RLRs 识别外源性 RNA

后，磷酸化位于线粒体上的信号接头分子 MAVS，并促进干扰素调节因子 3(Interferon regulatory factor, IRF3)的激活以及 I 型干扰素的表达(TAKEUCHI and AKIRA, 2010)。RLRs 介导的信号通路在抗病毒感染和维持免疫系统稳态中发挥着重要的作用；异常活化与多种自身免疫紊乱疾病密切相关。因此，RLRs 的活化应受到严密的调控，在保证迅速有效的清除入侵病毒的同时避免机体自身损伤。

RLRs 家族有 3 个成员：视黄酸诱导基因 I(Retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)，黑素瘤分化相关基因 5(Melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5)和遗传学和生理学蛋白质 2(Laboratory of genetics and physiology 2, LGP2)(LOO and GALE, 2011)。RIG-I 和 MDA5 是典型的模式识别受体，而 LGP2 被认为是两者的信号转导调节器(YONEYAMA et al., 2005)。RIG-I 和 MDA5 识别病毒 RNA 后，MAVS 相互作用，从而诱导 IRF3/7 和核转录因子- κ B(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B)，最终导致的多种炎症因子的表达(XU et al., 2005)。在结构上，RIG-I 和 MDA5 的 N 端都包含两个具有 RNA 解旋酶活性的半胱氨酸天冬氨酸酶激活和募集结构域(Caspase activation and recruitment domains, CARD)，CARD 域两端分别是含 DExD/H 盒子的 ATP 酶结构域和阻遏物结构域(Repressor domain, RD)，其中 RD 在正常生理条件下抑制 RIG-I 和 MDA5 激活(SAITO et al., 2007; YONEYAMA et al., 2004)。LGP2 与 RIG-I 和 MDA5 的不同之处在于它缺少 CARD 和 RD 结构域。RIG-I 优先识别病毒复制过程中产生的含 5'-ppp 的 RNA 序列与 poly(UUC)，且更倾向于识别平末端 RNA 序列(HORNUNG et al., 2006)。而 MDA5 更倾向于识别长链病毒 RNA 和 poly(I:C)(KATO et al., 2008)。RIG-I 与 MAVS 的相互作用启动了一系列复杂的级联反应，以驱动下游信号传导，如图 1-4 所示(BELGNAOUI et al., 2011)。

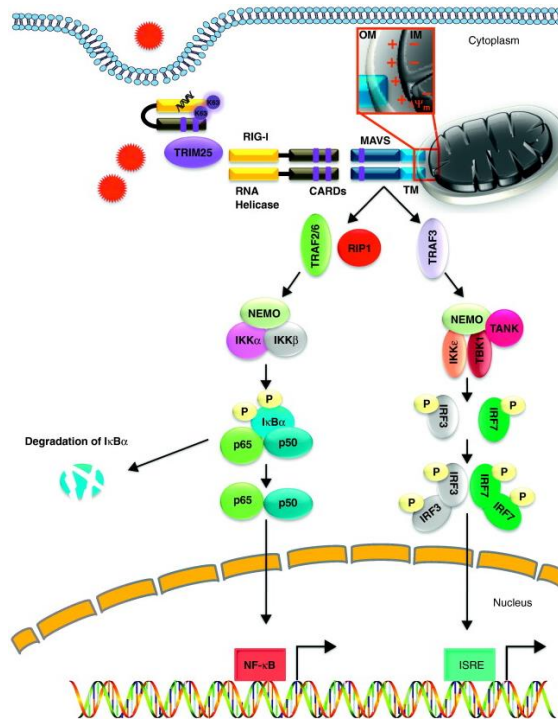


图 1-4 RIG-I 信号通路的示意图(BELGNAOUI et al., 2011)

Fig.1-4 Schematic representation of the RIG-I signaling pathway

MAVS 编码 540 个氨基酸(如图 1-5 所示), 其主要定位于线粒体外膜、过氧化物酶和线粒体相关的内质网膜结构(Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane, MAM)(BENDER et al., 2015; HORNER et al., 2011)。MAVS 包含三个功能域: N 端 CARD、中间富含脯氨酸的区域(Proline-rich domain, PRR)和 C 端跨膜域(Transmembrane domain, TM)。RIG-I 和 MDA5 中存在与 MAVS 相似的 CARD 域结合, 从而诱导 MAVS 激活(MEYLAN et al., 2005)。MAVS 的 TM 域确保 MAVS 定位于线粒体外膜发挥功能(LIU et al., 2013), 而 PRR 域与肿瘤坏死因子受体相关因子家族成员(Tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAFs)结合以促进下游信号转导。RIG-I 和 MDA5 结合病毒 dsRNA 后, 发生构象变化, 暴露出它们的 N 端 CARD 域, 并通过 CARD 形成四聚体(PEISLEY et al., 2014), 并招募多种 E3 泛素连接酶进行 K63-多聚泛素化修饰(OSHIUMI et al., 2010)。随后 MAVS 的 CARD 域相互结合迅速形成病毒样寡聚体, 该寡聚过程对于 MAVS 发挥生物学功能至关重要(HOU et al., 2011)。接下来, MAVS 通过其 PRR 域与 TRAFs 结合, 促进 TBK1 复合物的激活, TBK1 复合物促进 TRAF3 与 TRAF7 的磷酸化和二聚化, 然后易位至细胞核与 IFN 刺激的响应元件结合并诱导靶基因的转录(FANG et al., 2017)。另一方面, MAVS 通过其 PRR 域与 TRAF2 等的结合则形成 TRAF6 和 IKK 复合物, 激活 NF- κ B, 诱导炎症细胞因子的转录(KAWAI and AKIRA, 2009)。因此, MAVS 介导的这两种信号通路在抗病毒先天免疫中起着至关重要的作用(VAZQUEZ and HORNER, 2015)。

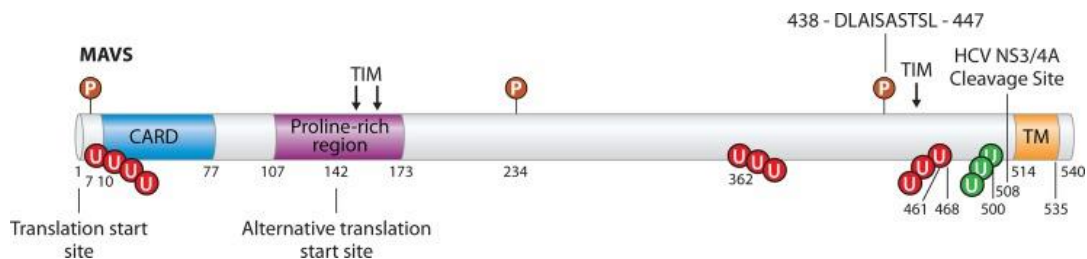


图 1-5 MAVS 结构模式图(VAZQUEZ and HORNER, 2015)

Fig.1-5 Schematic representation of MAVS

1.4.1 MAVS 的转录后调控

MAVS 的 mRNA 是多顺反子结构, 编码六种同工型, 包括全长和五个缺失 CARD 域的蛋白(分别为 FL MAVS 和 MAVS-M142/303/358/367/449)(QI et al., 2017)。在正常生理条件下, MAVS 的截短同工型与 FL MAVS 结合会抑制其自发性寡聚, 已形成的寡聚体会被线粒体自噬降解, 从而维持免疫稳态。但病毒感染期间, MAVS-M142 不能阻止 FL MAVS 的聚集, 但可以阻止其与 TRAFs 的结合。也可通过 5'非翻译区(Untranslated region, UTR)的上游开放阅读框(Open reading frame, ORF)来实现 MAVS 和 MAVS-M142 的调控。核糖体跳过 FL MAVS 的起始位置而启动 MAVS-M142 的翻译。因此, 在一定程度上 MAVS 通过多种同工型比例决定了 MAVS 信号转导的结果(BRUBAKER et al., 2014)。另一方面, MAVS 的 3'UTR 中存在三个富含 A-U 的元素, 其能够介导人 R 抗原与之结合, 这会破坏 MAVS 的 mRNA 稳定性并使得 MAVS 蛋白表达在正常生理条件下维持低水平。除此以外 MAVS 的 3'UTR 中还含有四个 miR-27a 结合位点, miR-27a 的上调即抑制 MAVS 的表达(XU et al., 2019)。

1.4.2 MAVS 的翻译后调控

病毒感染会引发线粒体外膜上 MAVS 发生 K63 多聚泛素化, 进而诱导其寡聚。目前, 已知 E3 泛素连接酶 TRIM31 是 MAVS 寡聚化激活诱导蛋白。当缺乏 RIG-I 或无病毒感染时, TRIM31 介导的 MAVS 寡聚不能发生, 因此认为, 病毒感染后激活宿主蛋白 TRIM31 介导的 MAVS 寡聚化需要 RIG-I 参与(LIU et al., 2017a)。另外, E3 泛素连接酶 TRIM21 对 MAVS 进行 K27 多聚泛素化以促进天然免疫反应。病毒感染后上调 TRIM21 的表达, 促进 TBK1 募集至 MAVS 处并增强下游信号传导(XUE et al., 2018)。众所周知, MAVS 的 K48 多聚泛素化会促进其降解, 那么抑制 MAVS K48 多聚泛素化的蛋白质即可正向调节 RLR 信号通路的传导。例如, 病毒感染后上调内源蛋白质亲环素 A, 其能够与 TRIM25 竞争结合 MAVS 从而有效地抑制 TRIM25 介导的 MAVS 降解(LIU et al., 2017b)。而泛素化是一个可逆的过程, 病毒感染还会上调卵巢肿瘤家族去泛素酶 4 的表达, 去除 MAVS 的 K48 多聚泛素链, 从而降低其降解水平(LIUYU et al., 2019)。所以, 在病毒感染过程中宿主细胞已发展出一套维持 MAVS 水平的机制, 以确保抗病毒免疫信号的正确传导。

目前研究最多的是 MAVS 的翻译后负调控(如图 1-6 所示)。许多 E3 泛素连接酶可介导 MAVS K48 多聚泛素化。此外, 越来越多的证据表明, 各种衔接子蛋白与 MAVS 的结合可调节其泛素介导的蛋白酶体降解效应。例如, PCBP2 蛋白能够与 MAVS 的 TM 域结合, 并招募 E3 泛素连接酶 AIP4。病毒感染后上调 PCBP2 的表达并进一步促进 AIP4 介导的 MAVS K48 多聚泛素化, 从而促进 MAVS 降解(YOU et al., 2009)。TAX1BP1 蛋白也能够与 MAVS 的 CARD 域结合并招募 AIP4(CHOI et al., 2017)。在正常生理条件下, 与 PCBP2 高度同源的 PCBP1 也承担了类似的角色, 由于 PCBP1 介导的降解促使 MAVS 表达维持在低水平, 避免了过度传导免疫信号(ZHOU et al., 2012)。E3 泛素连接酶 SMURF1 介导 MAVS 的 K48 多聚泛素化降解受两个衔接蛋白 OTUD1 和 NDFIP1 的正调控。OTUD1 与 SMURF1 相互作用, 消除 SMURF1 的 K48 多聚泛素链, 防止其自身降解, 并上调其蛋白质水平。而 NDFIP1 与 MAVS 结合后将 SMURF1 招募到 MAVS 附近, 增强了 SMURF1 自身的泛素化水平和酶活性(WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2018)。与 MAVS 降解相关的 E3 泛素连接酶种类众多, 可将其作为病毒感染治疗的靶标。

据报道在病毒感染期间可以通过调控磷酸化和去磷酸化控制 MAVS 的活化(REN et al., 2020b)。丝氨酸/苏氨酸 Polo 样激酶 1(Serine/threonine Polo-like kinase1, PLK1)通过与 MAVS 相互作用, 破坏 MAVS 与 TRAF3 的复合物形成, 进一步抑制干扰素的产生(OSHIUMI et al., 2016; VITOUR et al., 2009)。水疱性口炎病毒诱导酪氨酸激酶 c-Abl 与磷酸化的 MAVS 相互作用, 减弱 MAVS 的激活和干扰素的产生(SONG et al., 2010)。后来研究发现 c-Abl 激酶能够使 MAVS 磷酸化并增加 LC3 与其相互作用, 影响小胶质细胞的活化(CHENG et al., 2017)。另一方面病毒感染可以诱导 MAVS 第 9 位酪氨酸的磷酸化, 从而促进 MAVS/TRAF3/TRAF6 复合物的形成以及 RLR 信号通路的激活(WEN et al., 2012)。而在病毒感染后 MAVS 末端富含丝氨酸的结构域可以直接被 TBK1 磷酸化, 从而募集 IRF3 并促进 IRF3 的磷酸化和 TBK1 的激活(LIU et al., 2015)。机体为保证磷酸化维持在正常水平, 可通过调节磷酸酶的活化对其降解。据报道, PPM1A 可直接去除 MAVS 的磷酸

化，或使 TBK1 去磷酸化，从而抑制 MAVS 介导的抗病毒免疫反应(XIANG et al., 2016)。

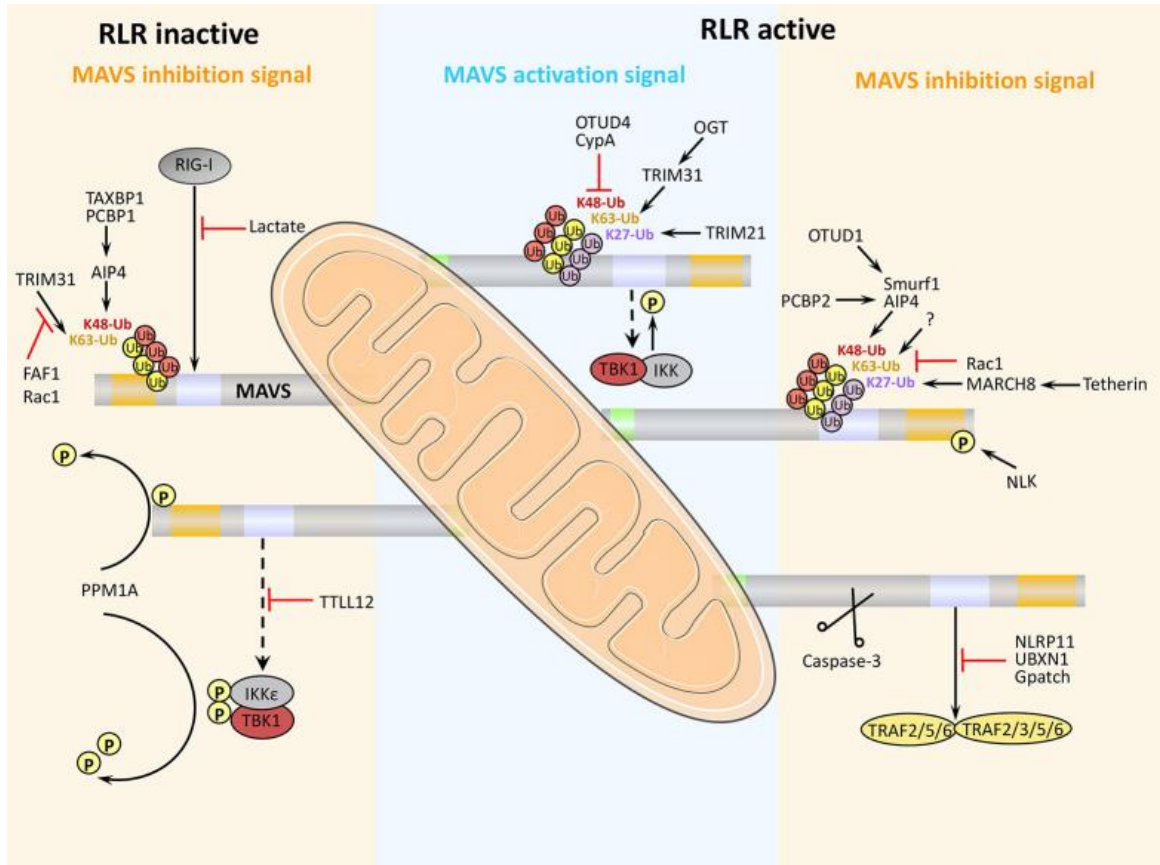


图 1-6 MAVS 在抗病毒免疫反应中的翻译后调控(REN et al., 2020)

Fig.1-6 Post-translational modifications of MAVS activity antiviral immunity.

1.4.3 病毒蛋白与 MAVS 的相互作用

许多病毒都可以通过自身编码的蛋白质酶直接切割 MAVS，从而抑制 RLR 信号传导（如图 1-7 所示）。2005 年首次报道了丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶 NS3/4A 与 MAVS 共定位并将其切割。NS3/4A 切割位点是 MAVS 第 508 处的半胱氨酸残基，可将 MAVS 的 N 末端从线粒体中移除，减少下游信号传导，以实现持续的病毒感染(LI et al., 2005)。小 RNA 病毒科可通过编码半胱氨酸蛋白酶 3C，该蛋白酶针对 MAVS 第 148 处的谷氨酰胺残基，裂解 MAVS 并抑制其活性。且 B3 型柯萨奇病毒还包含第二个裂解 MAVS 的蛋白酶 2A，两个病毒蛋白协同作用于 MAVS，彻底抑制干扰素表达(MUKHERJEE et al., 2011; PANG et al., 2017)。类似的，猪繁殖和呼吸综合症病毒也产生 3C 样丝氨酸蛋白酶，并在 MAVS 第 268 位谷氨酸残基处切割(DONG et al., 2015)。甲型肝炎病毒编码蛋白酶 3ABC 能够切割 MAVS，但从蝙蝠体内分离到的病毒在第 463 位谷氨酸处切割，而从人体内分离到的病毒却在第 427 位谷氨酰胺处切割。这突显了病毒跨物种干扰细胞内信号传导的不同，可能有利于促进甲型肝炎病毒的跨物种传播(FENG et al., 2019)。

除了直接切割外，一些病毒蛋白还可以诱导 MAVS 经蛋白酶体降解。例如，乙型肝炎病毒蛋白 X 与 MAVS 结合并促进其第 136 位赖氨酸的泛素化，导致 MAVS 经蛋白酶体降解(WEI et al., 2010)。冠状病毒编码的 ORF-9b，可通过 PCBP2-AIP4 轴催化 MAVS 的 K48 多聚泛素化降解。

ORF-9b 还导致线粒体分裂蛋白降解并减少干扰素信号传导, 这表明 ORF-9b 也通过操纵线粒体形态来促进病毒逃逸(SHI et al., 2014)。同时轮状病毒也通过多种机制来降解 RLR 信号传导蛋白。其中 VP3 可诱导 MAVS 第 188-193 位的磷酸化, 从而导致 K48 多聚泛素化并经蛋白酶体降解(DING et al., 2018)。而 NSP1 具有 E3 泛素连接酶样活性, 可以结合 MAVS 的 CARD 域或 TM 域, 促进 MAVS 经蛋白酶体降解(NANDI et al., 2014)。

甲型流感病毒是最常见的 RNA 病毒, 由于其变异性和高致病性, 已引起全球范围的大流行。H5N1 亚型流感病毒编码的 PB1-F2 和 PB2 Δ 蛋白, 它们在 MAVS 介导的抗病毒先天免疫中起相反的作用。PB1-F2 与 MAVS 的 TM 域结合降低线粒体膜电位并破坏 MAVS 的信号传导(VARGA et al., 2012), 而 PB2 Δ 直接与 MAVS 相互作用以促进 I 型干扰素的信号传导, 从而抑制病毒复制(BOERGELING et al., 2015)。此外, NS1 蛋白通过去除 TRAF3 上的 K63 多聚泛素链来抑制 TRAF3-MAVS 相互作用, 从而负面调控机体的抗病毒免疫反应(QIAN et al., 2017)。且病毒上调 miRNA-125a 和 miRNA-125b 的表达, 并促进其与 MAVS 的 3'UTR 结合并抑制其翻译, 在转录后水平上抑制 MAVS 的表达(HSU et al., 2017)。此外, 其 M2 蛋白可诱导钙离子依赖性活性氧的产生, 从而增强 MAVS 的寡聚化(WANG et al., 2019)。所以, 病毒多个蛋白可以通过直接或间接途径抑制 RLR 信号转导通路蛋白来阻断 MAVS 介导的信号传导。

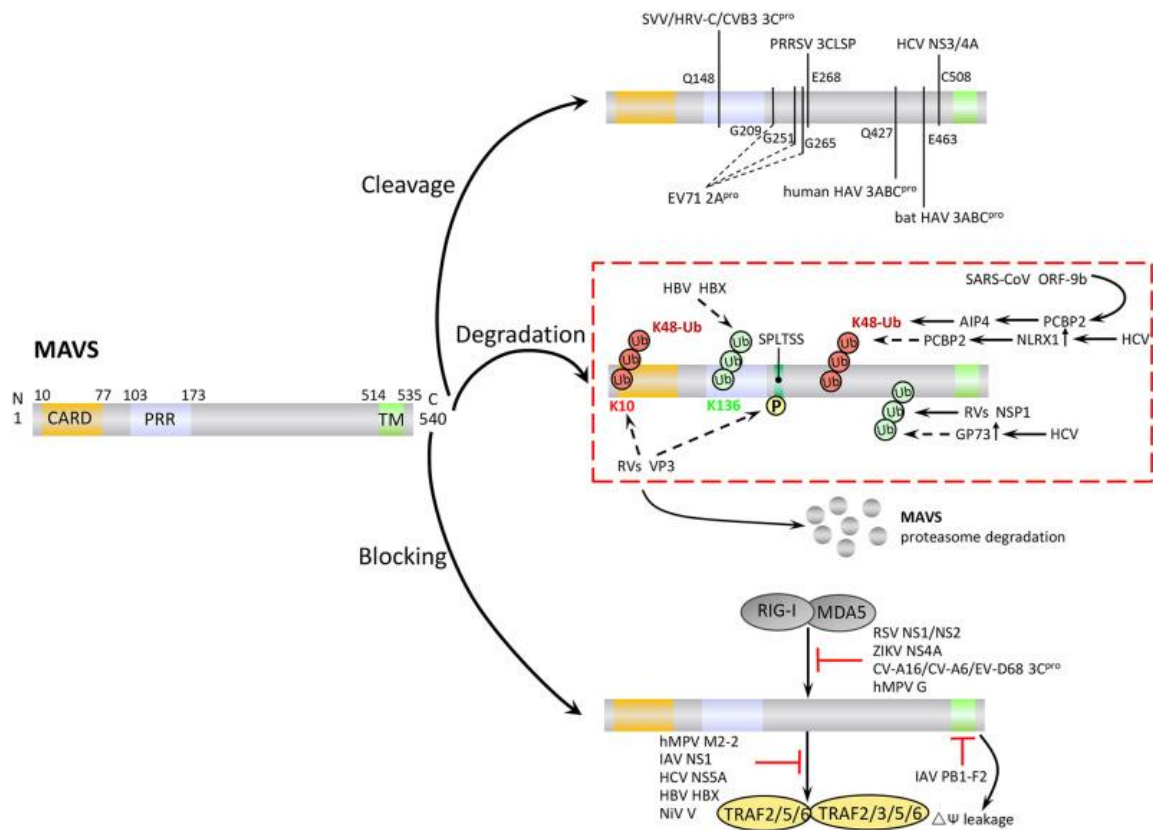


图 1-7 病毒蛋白负调控 MAVS 信号转导示意图(REN et al., 2020)

Fig.1-7 Schematic representation of negative regulation of MAVS signaling by viral proteins.

1.5 本研究的目的是与意义

EIAV 是 RNA 病毒,且引发持续性感染,但机制尚未探究清楚。之前的研究表明病毒感染后,宿主细胞识别病毒 RNA 的感受器 RIG-I/MDA5 磷酸化后将信号传递给线粒体上的信号转导蛋白 MAVS 再继续将抗病毒信号向下传递,增加 IFN 的产生,以抑制病毒复制。目前已发现很多 RNA 病毒与 DNA 病毒均能够通过与 MAVS 相互作用阻断 RIG-I 信号通路的传导,以抵抗细胞的先天性免疫反应。EIAV 感染细胞后释放的病毒基因组 RNA 理应被细胞内感受器 RIG-I/MDA5 识别,而 EIAV 又会怎样应对细胞内的天然免疫反应,能否调控 RIG-I-MAVS 信号通路。由于没有针对此部分的研究,因此,通过研究 EIAV 与 RIG-I 信号通路,不仅可以促进对 EIAV 致病机制的认识,更有利于更新 EIAV 调控细胞信号通路的靶点信息,对慢病毒调控先天性免疫反应具有重要的科学参考价值。

第二章 EIAV 负调控 eqMAVS 的表达

为了探究 EIAV 是否通过下调 eqMAVS 介导的干扰素激活而助于自身复制。前期在 HEK293T 细胞中发现共转染 EIAV 感染性克隆质粒 CMV3-8 可下调 eqMAVS 的蛋白表达。本研究制备了 eqMAVS 鼠单克隆抗体，并用于检测 EIAV 感染马属动物细胞后内源性 eqMAVS 的表达情况，并进一步筛选下调 eqMAVS 表达的 EIAV 蛋白。

2.1 实验材料

2.1.1 试验所用质粒菌株细胞及动物

原核表达载体 pET-32a、pGEX-6p-1 和真核表达载体 VR1012、pcDNA3.1 以及 EIAV 感染性克隆质粒 CMV3-8 由本实验室提供；IgK-IFN-Luc 和 pRL-TK 购买自淼灵生物公司；DH5 α 和 TSsetta(DE3)感受态细胞购买自哈尔滨擎科有限公司；HEK293T 细胞、HEK293T-ELR1 细胞、马胎皮肤细胞 NBL-6、马外周血单核巨噬细胞 eMDM 和 SP2/0 细胞均由本实验室提供；BALB/c 小鼠(6 周龄)购买自辽宁长生生物技术股份有限公司。

2.1.2 试验所用试剂及培养液配置

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 The reagents used in this research

试剂	公司
Simple P 总 RNA 提取试剂盒	博日科技有限公司
TRIzol™ Reagent	Thermo
核酸限制性内切酶	Thermo
反转录试剂盒	Takara
考马斯亮蓝 R250	索莱宝
TRIS	VWR Life Science
Triton X-100	Sigma
KOD 高保真酶	TOYOBO
琼脂糖	擎科
胶回收试剂盒、DNA 小提试剂盒	诺唯赞
T4 DNA 连接酶	NEB
2×Taq PCR StarMix	GenStar
氨苄青霉素、卡那霉素	Biosharp
IPTG 诱导剂	
Tween 20	Sigma
弗氏佐剂、HAT、HT、PEG1450 细胞融合剂	
DMEM 和 RIMP 细胞培养基	
蛋白电泳液和预制胶、High Affinity Ni-Charged Resin FF	Genscript

表 2-1(续)

试剂	公司
盐酸胍	Adamas-beta
DTT	碧云天
新生牛血清	Ausbian
胎牛血清(FBS)	Wesent
HiTrap Protein L HP	GE Healthcare
抗体亚型鉴定试剂盒	Southern Biotech
ELISA 底物单组份显色液	北京博奥龙
Clone Easy	北京博奥龙
脂质体 Polyjet 转染试剂	SignaGen Laboratories
变性蛋白电泳液及	金斯瑞
NC 膜	Millipore
Skim milk	BD
DMEM-high Glucose	Sigma
双抗青霉素链霉素	碧云天
抗 flag 鼠单抗和抗 HA 鼠单抗	Sigma
抗 β -actin 鼠单抗	Sigma
BeyoGold™ His-tag Purification Resin	碧云天

2.1.3 主要仪器

表 2-2 主要仪器

Table 2-2 The instruments used in this research

仪器	公司
PCR 仪(Sure Cycler 8800)	Agilent Technologic
凝胶成像分析系统	伯乐
伯乐蛋白电泳仪(165-8004)	伯乐公司
快速湿转膜仪	金斯瑞公司
恒温振荡器	CRYSTAL SYSTEMS
掌上离心机(5424)	Eppendorf
超纯水仪(GENPURE PRO)	Thermo
台式 pH 计(S210-B)	METTLER TOLEDO
核酸电泳仪(MP-300V)	Major Science
酶标仪(ELx800)	Bio Tek
水平摇床(SYC-2102)	CRYSTAL
高速离心机(CR21GII)	Hi TACHI
微孔板化学发光检测仪	Berthold

表 2-2(续)

仪器	公司
恒温培养箱	上海一恒科技
可见分光光度计	Berthold Detection systems GmbH
Odyssey CTL	LI-COR

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

HEK293T 细胞与马胎皮肤细胞 NBL-6 采用含 1%青链霉素双抗溶液与 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 置于 37°C、5% CO₂ 含水碟的培养箱环境中。

马外周血单核巨噬细胞(Equine Monocyte Derived Macrophages, eMDM)的分离培养: 将新鲜马血经锥形瓶侧壁缓慢倒入瓶中, 静置 30 min, 取上层血清置于离心管中 1 000 rpm 5 min 离心, 弃上清, 用不含双抗的 RPMI 培养液重悬后 1 000 rpm 离心 5 min, 重复洗 2 次, 弃上清后用 30% 马血清、30%新生牛血清、1%双抗与 39% RPMI 1640 将细胞重悬, 铺到 25 cm² 细胞瓶。

2.2.2 目的基因的扩增及重组质粒的构建

RNA 的提取与反转录: 将 eMDM 或 HEK293T 细胞弃掉上清, 按照 Trizol-氯仿法提取细胞总 RNA, 再按照 Takara 反转录试剂盒说明书进行反转录。目的基因的扩增: 以马 cDNA 为模版, 用 eqMAVS-F 和 eqMAVS-R 引物与 TOYOBO KOD 酶试剂盒扩增马 MAVS(equine MAVS, eqMAVS) 全长基因, 以人 cDNA 为模版, 用 huMAVS-F 和 huMAVS-R 引物与 TOYOBO KOD 酶试剂盒扩增人 MAVS(human MAVS, huMAVS)全长基因。并分别以 infusion 的方法连接到以 pcDNA3.1-F 与 pcDNA3.1-R 为引物扩增的 pcDNA3.1 线性化载体上, 测序成功后进行小提质粒。

继续用 eqMAVS Δ TM-F 与 eqMAVS Δ TM-R 扩增不含跨膜区域的 eqMAVS 序列(eqMAVS Δ TM)或用 eqMAVS up-F 与 eqMAVS up-R 扩增上段 eqMAVS 序列(eqMAVS up), 并通过 infusion 酶分别连接到经 BamHI 与 Not I 双酶切的 pET-32a 线性化载体与 pGEX-6p-1 线性化载体上。同样以 eqMAVS down-F 与 eqMAVS down-R 扩增下段 eqMAVS 序列(eqMAVS down), 并通过 infusion 酶分别连接到经 BamHI 与 Not I 双酶切的 pGEX-6p-1 线性化载体上。参照相关试剂说明书进行酶切、连接、转化与鉴定。测序成功的质粒分别命名为于-20°C保存。

2.2.3 重组蛋白的表达及纯化

将重组质粒 pET32a-eqMAVS Δ TM-his、pET32a-eqMAVS up-his 以及 pGEX-6p-1-eqMAVS Δ TM-GST、pGEX-6p-1-eqMAVS up-GST、pGEX-6p-1-eqMAVS down-GST 分别转化入 TSsetta(DE3) 原核表达菌中, 挑菌培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8 时, 按 1.0 mM 加入 IPTG 诱导剂, 诱导 12 h, 诱导温度为: 25°C, 37°C。取 2 mL 菌液 10 000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 用 1.5 mL PBS 重悬, 超声碎菌。将超声后的菌液 10 000 rpm 离心 10 min, 分离上清和沉淀, 沉淀用 1.5 mL PBS 重悬, 上清和沉淀分别取样 80 μ L 煮样后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 随后用考马斯亮蓝染色液染色 15

min, 用脱色液脱色 10 min 分析蛋白表达情况。

按 BeyoGold™ His-tag Purification Resin 说明书纯化 eqMAVS Δ TM-his 蛋白, 及按 BeyoGold™ GST-tag Purification Resin 说明书纯化 eqMAVS Δ TM-GST 蛋白, 将含目的条带的洗脱液测浓度后, 按 1 mL/管分装-80°C 冻存。

2.2.4 动物免疫及血清抗体效价检测

6 周龄 BALB/c 小鼠取 0.5 mL 浓度为 1 mg/mL 纯化的 eqMAVS Δ TM-his 蛋白与 0.5 mL Quick Antibody-Mouse5W 佐剂充分混匀后, 分装 0.2 mL 于 1 mL 注射器免疫 4 只小鼠, 免疫方式为腿部肌肉注射。每次免疫间隔 2 周, 第 3 次免疫后 1 周断尾采血用间接 ELISA 检测血清抗体效价。

杂交瘤细胞融合与铺板技术详见《抗体制备与使用实验指南》(张权庚, 2010)。

2.2.5 抗体亚型鉴定

按照实验指南进行阳性细胞筛选后, 对扩大培养起来的阳性杂交瘤细胞进行抗体亚型鉴定, 取细胞上清液按照 SBA Clonotyping System-HRP(Southern Biotech)说明书操作。

2.2.6 小鼠腹水抗体的纯化

取适量 BALB/C 小鼠, 按 500 μ L/只腹腔注射弗氏不完全佐剂, 3 d 后按 1×10^6 个单克隆细胞注射到小鼠腹腔, 7-10 d 后抽取腹水, 腹水先经 10 000 rpm 离心 15 min 后, 抽取上清用 0.45 μ m 过滤器过滤, 纯化按照 HiTrap Protein L HP 说明书进行, 具体操作方法如下: 吸取 5 倍柱体积 Binding buffer, 连接柱子, 弃滤液, 重复一次; 吸取过滤后的腹水 5 mL, 连接柱子, 滤液再次过滤, 滤液留样; 吸取 5 mL Binding buffer 洗柱子, 用 Elution buffer 洗脱柱子, 滤液留样; 20% 乙醇的 PBS 保存柱子。

2.2.7 抗体效价

将纯化的抗体用 PBS 稀释后分装冻存于-80°C。用纯化的 MAVS Δ TM-GST 蛋白按 50 ng/孔包被 ELISA 板, 按照间接 ELISA 操作方法分析按 1:50 进行 2 倍比稀释的抗体的效价, 当样品孔与对照孔吸光值比例大于 2.1 时, 确定为阳性。

2.2.8 细胞转染

本研究按照脂质体 Polyjet 转染说明书进行操作, 转染后 6-8 h, 每孔加入 2 mL 新的培养液。

2.2.9 细胞感染

本研究使用的细胞感染操作为: 马胎皮肤细胞 NBL-6 均匀铺在六孔板中, 经 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养 16 h 左右, 待细胞生长到 70% 密度时进行感染。弃掉细胞培养上清, 后按照 0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL 加入之前收集的 CMV3-8 毒, 对照组加入无血清 DMEM, 置于 37°C 温箱中培养半小时后, 加入 2 mL 新的细胞培养液。12 h 后弃掉培养液, 再加入新的培养液。

2.2.10 双荧光素酶报告基因的检测

将 HEK293T 细胞铺至 12 孔板中，待细胞汇合达 70-80% 时，每孔转染 5 ng pRL-TK 质粒、100 ng 荧光素酶报告基因质粒及其它共转质粒，用 pcDNA3.1 空载补齐 DNA 总量，按照 2.2.7 方法转染至 12 孔板中。24 h 后，参照 Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书裂解细胞，用微孔板化学发光检测仪检测 Firefly 和 Renilla 的荧光值，两者比值即为报告基因的活性值。

2.2.11 Western blot

将样品加入变性蛋白预制胶中，按照快速湿转依将蛋白转入 NC 膜，5% 的脱脂乳封闭 1 h，换入含一抗的 5% 的脱脂乳中室温孵育 2 h，TBST 洗 3 次，每次 10 min，再加入到含二抗的 5% 脱脂乳中室温避光孵育 1 h，TBST 洗 3 次，每次 10 min，将膜放置于 odyssey 红外扫膜仪中扫描。

2.3 实验结果

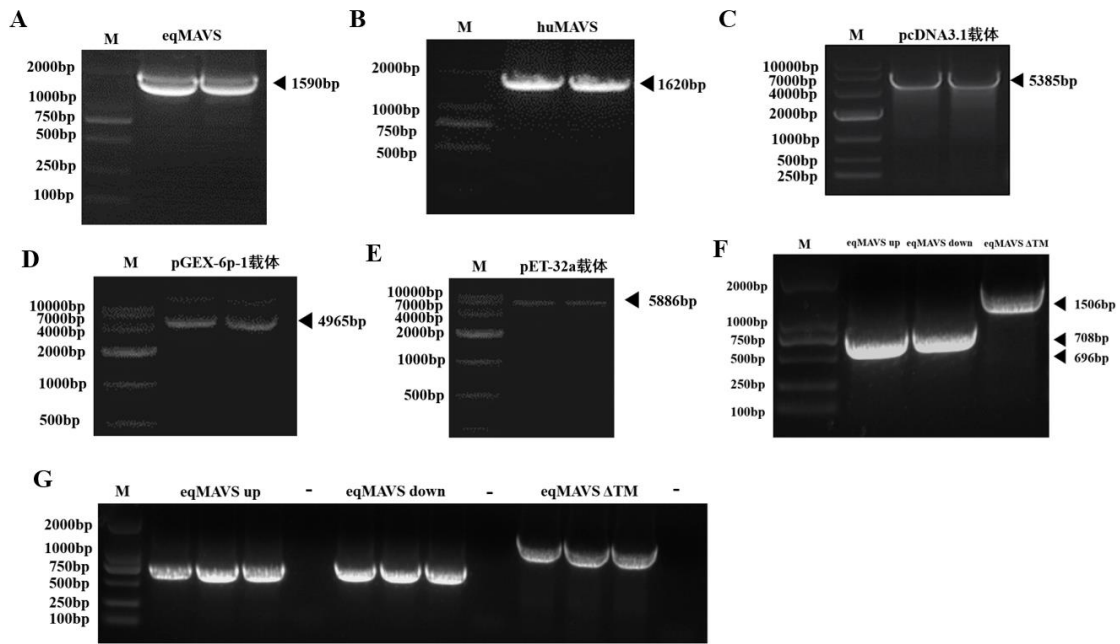
2.3.1 目的基因扩增及重组质粒构建

从马 cDNA 为模版下表基因引物成功扩增出全长 eqMAVS 基因如图 2-1A。从 HEK293T 细胞提取的 RNA 扩增出全长 huMAVS 如图 2-1B 所示。载体 pcDNA3.1 经扩增后如图 2-1C 所示，pGEX-6p-1 经 BamHI 与 NotI 酶切后如图 2-1D 所示，载体 pET-32a 经 BamHI 与 NotI 酶切后如图 2-1E 所示。继续从 eqMAVS 全长基因中扩增出 eqMAVS Δ TM 和 eqMAVS up 与 eqMAVS down 基因如图 2-1F，菌液鉴定全为阳性如图 2-1G。经 infusion 酶连接到不同载体上后，进行菌液鉴定也可以看到与目的片段大小相同的条带，进行测序也与预期的序列相同，将其命名为 pcDNA3.1-eqMAVS-flag、pcDNA3.1-huMAVS-HA、pET-32a-eqMAVS Δ TM-his、pET-32a-eqMAVS up-his 与 pGEX-6p-1-eqMAVS Δ TM-GST、pGEX-6p-1-eqMAVS up-GST、pGEX-6p-1-eqMAVS down-GST。

表 2-3 质粒构建所需引物

Table 2-3 Primers used for construction of plasmids

Primer name	Primer sequences(5'-3')	Products
eqMAVS-F	ATGACGGTTGCCGAGGAC	1590bp
eqMAVS-R	CTGGAGCAGGCGCCTACGG	
huMAVS-F	ATGCCGTTTGCTGAAGACA	1620bp
huMAVS-R	GTGCAGACGCCCGCGTA	
pcDNA3.1-F	TACCCCTACGACGTGCC	5385bp
pcDNA3.1-R	CATAAGCTTAAGTTTAAACG	
eqMAVS Δ TM-F	CGCGGATCCGCGATGACCGTGGCCGAG	1506bp
eqMAVS Δ TM-R	CGCGCGGCCGCCCCAGGCACGGTCCAGCCG	
eqMAVS up-F	CGCGGATCCGCGATGACCGTGGCCGAG	696bp
eqMAVS up-R	CGCGCGGCCGCCCCGGTGGACCTGGCCAGGGGCT	
eqMAVS down-GST-F	CCCGGATCCCGCTCTCGCCTGCCTGGCCCTCC	708bp
eqMAVS down-GST-R	CGCGCGGCCGCCCCGCTAGGGTCCTCGGCGACGT	



A: eqMAVS 基因扩增; B: huMAVS 基因扩增; C: pcDNA3.1 载体扩增; D: 酶切 pGEX-6p-1 载体;
E: 酶切 pET-32a 载体; F: eqMAVS 分段基因扩增(eqMAVS up 为上段基因; eqMAVS down 为下段基因; eqMAVS
 Δ TM 为缺失跨膜结构域的基因); G: eqMAVS 分段基因连接质粒菌液鉴定。

A: Amplification of eqMAVS; B: Amplification of huMAVS; C: Enzyme-digested production of pGEX-6p-1 vector;
D: Enzyme-digested production of pET-32a vector; E: Amplification of eqMAVS segmented gene;
F: Identification of eqMAVS segmented gene.

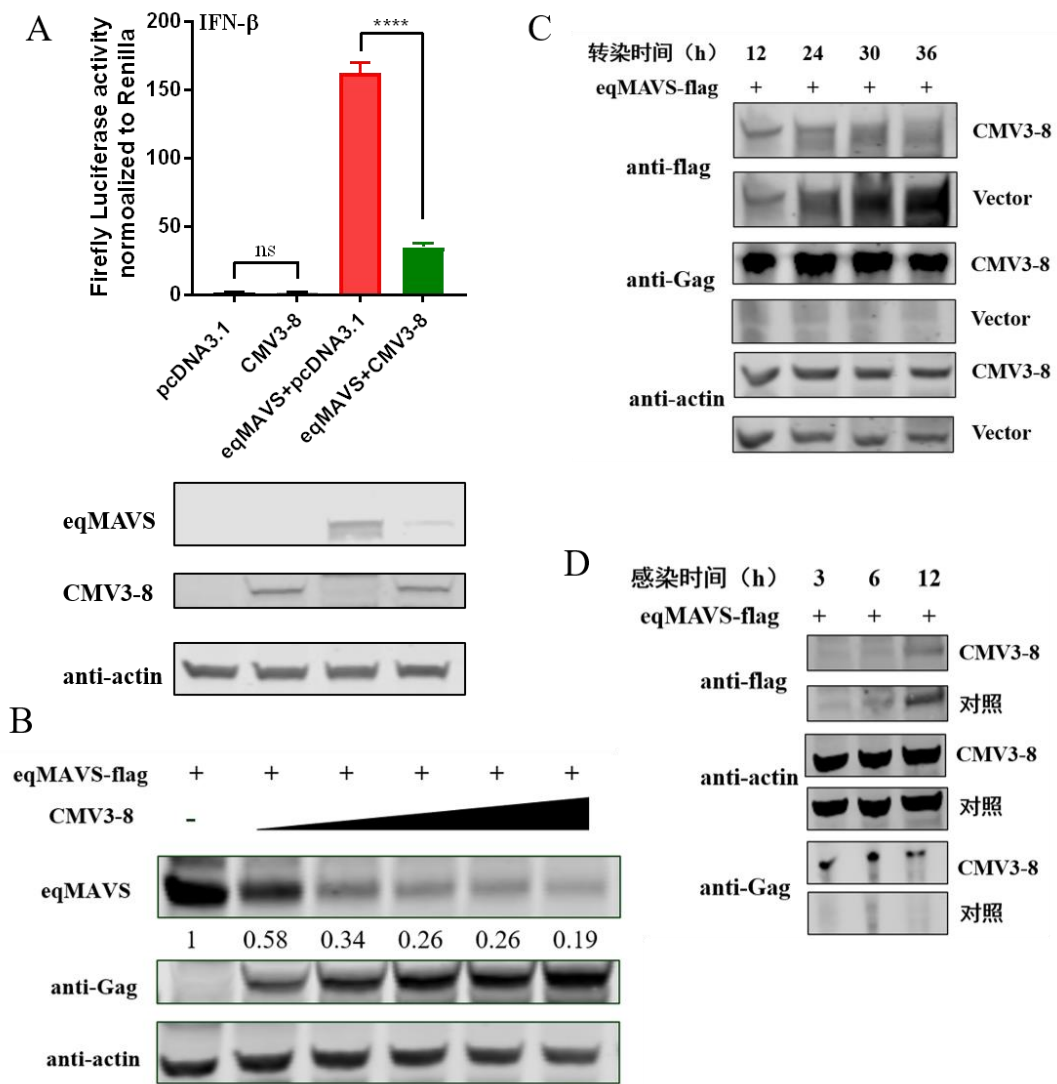
图 2-1 质粒构建及鉴定

Fig.2-1 Plasmid construction and identification

2.3.2 EIAV 负调控 eqMAVS 在 HEK293T 中的瞬时表达

在探究 EIAV 是否影响 MAVS 介导的 I 型干扰素 IFN 的产生, 经双荧光素酶报告系统检测发现 CMV3-8 均显著抑制 eqMAVS 介导的 IFN- β 启动子的激活, eqMAVS 也在一定程度上能够激活人 IFN- β 启动子(图 2-2A)。这些研究结果提示, 这说明了 eqMAVS 在介导人 I 型干扰素 IFN 的产生过程中与 huMAVS 的作用相同。因此, 本研究选用 eqMAVS 在后续实验中进一步探究 EIAV 影响 MAVS 介导的 I 型干扰素 IFN 产生的作用机制。验证 EIAV 通过影响 RIG-I-MAVS 信号通路以限制细胞产生干扰素是否呈现剂量依赖性, 结果如图 2-2B 所示, eqMAVS 的蛋白表达量随 CMV3-8 质粒转染剂量的增加而减少, 这也提示我们 EIAV 能够影响 eqMAVS 的表达。

进而为验证 EIAV 能够持续影响 eqMAVS 表达, 并非一过性的负调控, 我们探究了不同时间点 EIAV 对 eqMAVS 的影响。结果如图 2-2C 所示, eqMAVS 与 Vector 质粒共转时表达量随转染时间的增加而增加, 但与 CMV3-8 质粒共转时表达量显著受到影响, 表明 eqMAVS 表达受到 EIAV 的负调控。那么 EIAV 是在病毒早期感染过程中就影响 MAVS 的表达, 还是在晚期大量表达蛋白时影响呢? 由图 2-2D 可知, 在感染 12 h 时, eqMAVS 的蛋白表达量与对照组存在显著差异, 这也进一步证实了 EIAV 感染细胞早期就会负调控 eqMAVS 的表达。



A: CMV3-8 抑制 eqMAVS 介导的 IFN-β 启动子活性; B: CMV3-8 负调控 eqMAVS 蛋白表达呈现剂量依赖性; C: 不同时间点 CMV3-8 负调控 eqMAVS; D: CMV3-8 病毒感染瞬时表达 eqMAVS-flag 的 HEK293T-ELR1 细胞。

A: CMV3-8 suppresses eqMAVS induced IFN-β reporter activities; B: CMV3-8 negatively regulated of the expression of eqMAVS by dose-dependent; C: CMV3-8 negatively regulated eqMAVS at different time points; D: HEK293T-ELR1 cells expressing eqMAVS-flag were infected with CMV3-8 virus.

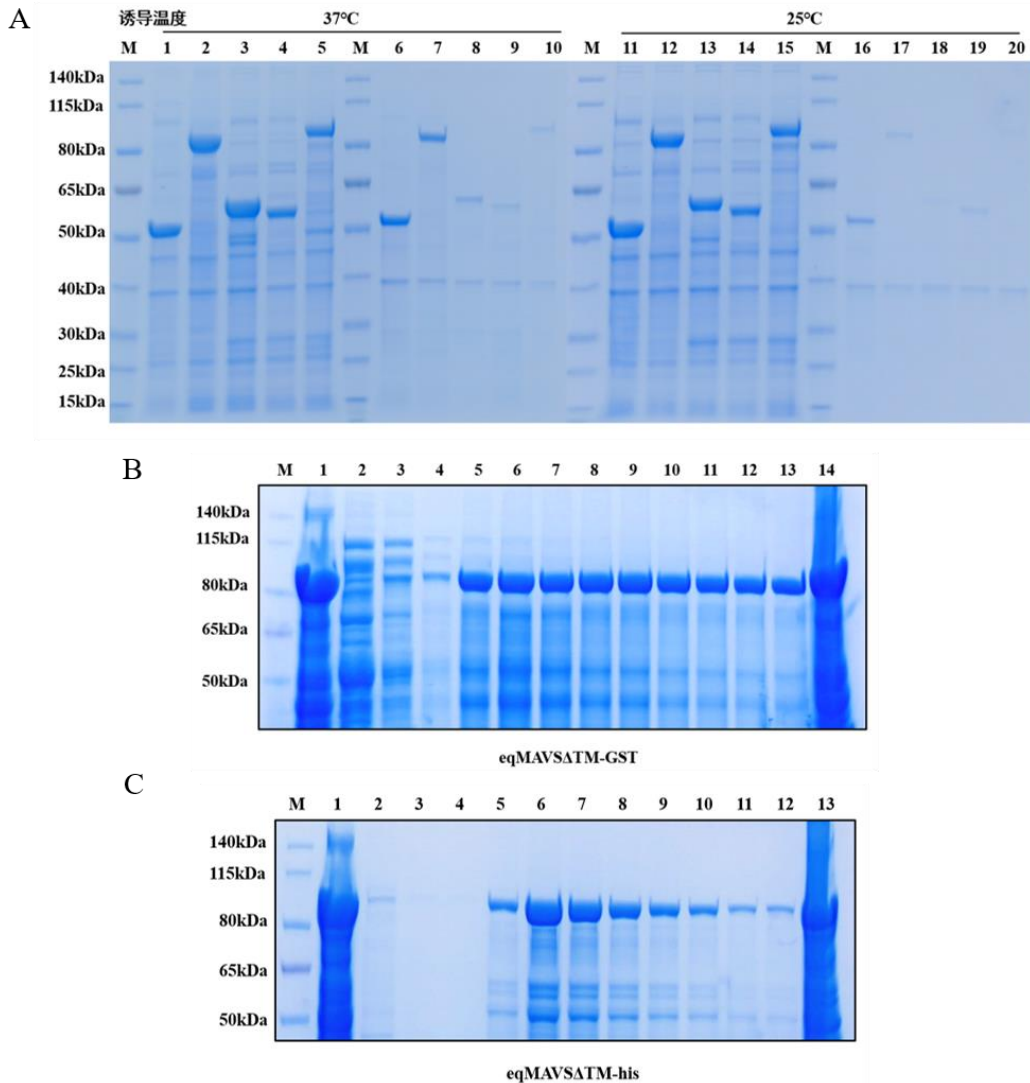
图2-2 EIAV负调控eqMAVS的表达

Fig.2-2 EIAV negatively regulated the expression of eqMAVS

2.3.3 重组蛋白表达及纯化

结果如图所示，诱导的 5 种菌在 25°C 和 37°C 时都能够在上清中表达，而 25°C 诱导条件下沉淀中的蛋白表达量较少，故而选择 25°C 为诱导温度。各个截短长度的 eqMAVS 都能给表达，为获得针对更多抗原表位的抗体，故而选用较大的蛋白 eqMAVS ΔTM-his 与 eqMAVS ΔTM-GST 进行纯化。将表达 pET32a-eqMAVS ΔTM-his 与 pGEX-6p-1-eqMAVS ΔTM-GST 质粒的菌液接到 250

mL 含 Amp 的培养基中扩大培养，并按照 2.2.2 所示方法分别纯化蛋白。经纯化得到 eqMAVS Δ TM-his 蛋白 7 mg 与 eqMAVS Δ TM-GST 蛋白 6 mg，将 eqMAVS Δ TM-his 蛋白用于动物免疫，eqMAVS Δ TM-GST 蛋白用于间接 ELISA 检测。



A: 1、11: eqMAVS up-his超声后上清; 2、12: eqMAVS Δ TM-his超声后上清; 3、13: eqMAVS up-GST超声后上清; 4、14: eqMAVS down-GST超声后上清; 5、15: eqMAVS Δ TM-GST超声后上清; 6、16: eqMAVS up-his超声后沉淀; 7、17: eqMAVS Δ TM-his超声后沉淀; 8、18: eqMAVS up-GST超声后沉淀; 9、19: eqMAVS down-GST超声后沉淀; 10、20: eqMAVS Δ TM-GST超声后沉淀; B: 1: eqMAVS Δ TM-GST超声后流穿液; 2-4: eqMAVS Δ TM-GST洗涤液; 5-13: eqMAVS Δ TM-GST纯化的蛋白; 14: eqMAVS Δ TM-GST菌液; C: 1: eqMAVS Δ TM-his超声后流穿液; 2-4: eqMAVS Δ TM-his洗涤液; 5-12: eqMAVS Δ TM-his纯化的蛋白; 13: eqMAVS Δ TM-his菌液。

A: 1-20: Supernatant and precipitate of eqMAVS, respectively; B: 1-14: Bacterial fluid, supernatant, precipitate and purified protein of eqMAVS Δ TM-GST; C: 1-13: Bacterial fluid, supernatant, precipitate and purified protein of eqMAVS Δ TM-his.

图2-3 目的蛋白表达及纯化

Fig.2-3 Expression and purification of target proteins

2.3.4 血清抗体效价检测

4 只小鼠取第 3 次免疫 1 周后的血清，用间接 ELISA 方法检测血清中的抗体效价水平。结果如图 2-4 所示，1#小鼠的 eqMAVS 的血清抗体效价最高可以达到 2.56×10^4 。

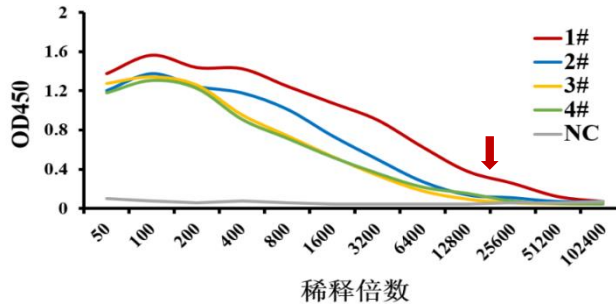
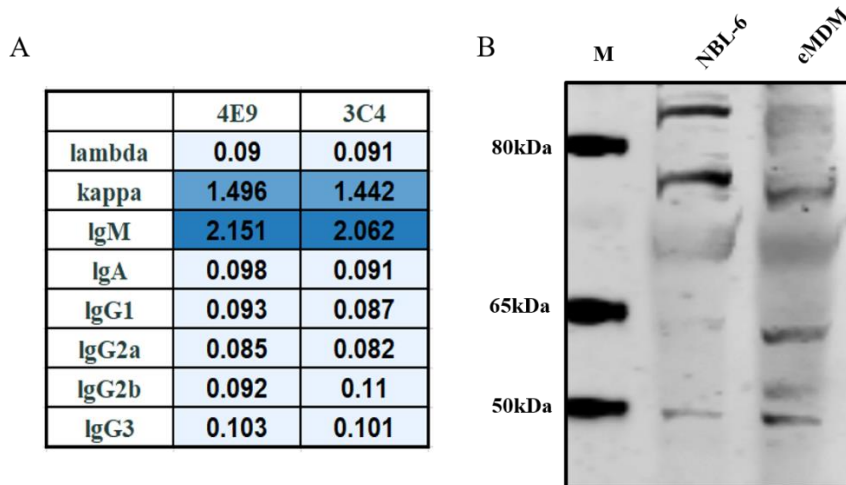


图 2-4 eqMAVS 血清抗体效价检测

Fig.2-4 Detection of serum antibody titer

2.3.5 杂交瘤细胞的筛选和抗体亚型鉴定

加强免疫小鼠一周后，取1#小鼠脾脏与SP2/0细胞融合，经3次杂交瘤细胞筛选，共筛选2株能分泌eqMAVS单克隆抗体的杂交瘤细胞，抗体亚型鉴定均为IgM亚型。取4E9杂交瘤细胞株得细胞培养上清检测内源性eqMAVS蛋白表达(见图2-5B)，并选取其作为腹水纯化的候选杂交瘤细胞。



A: eqMAVS杂交瘤细胞抗体亚型鉴定;

B: eqMAVS杂交瘤细胞株4E9上清有效性检测。

A: Identification of antibody subtypes of eqMAVS hybridoma cells;

B: Efficacy detection of supernatant of eqMAVS hybridoma cell 4E9.

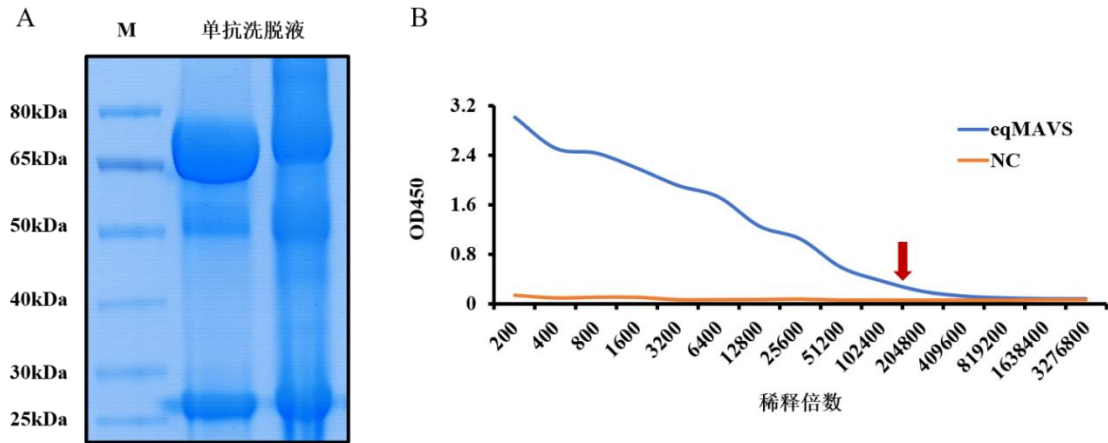
图 2-5 抗体亚型鉴定及有效性检测

Fig.2-5 Identification of antibody subtypes and validity test

2.3.6 抗体纯化及效价检测

将收集的 eqMAVS 单克隆细胞株小鼠腹水经 2.2.5 所示方法纯化 5 mL，共获得 3.5 mg 单克

隆抗体, 1 mg/mL 抗体的效价可达 2×10^5 。



A: eqMAVS抗体纯化; B: eqMAVS抗体效价检测。

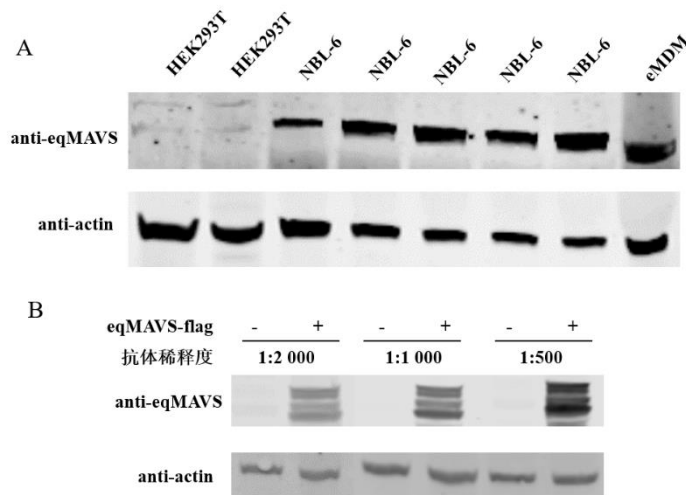
A: eqMAVS antibody purification; B: eqMAVS antibody titer detection.

图 2-6 抗体纯化及抗体效价检测

Fig.2-6 Antibody purification and antibody titer detection

2.3.7 抗体反应性检测

对获得的eqMAVS鼠单克隆抗体按照不同比例(1:500、1:1 000、1:2 000)进行稀释, 用于目的基因的内源性检测, 以确定抗体的反应性。结果如图2-7B所示, 在所有设立的抗体稀释度内, 可以检测到HEK293T瞬时表达的eqMAVS蛋白。同时, 马胎皮肤细胞NBL-6以及马外周血单核巨噬细胞EMDM内也可以检测到内源性eqMAVS特异性条带, 而HEK293T细胞中未检测到大小相同的特异性条带。



A: eqMAVS单抗检测内源性eqMAVS蛋白; B: eqMAVS单抗检测HEK293T细胞过表达的eqMAVS蛋白。

A: Detection of endogenous eqMAVS protein by eqMAVS monoclonal antibody; B: Detection of overexpressed eqMAVS protein by eqMAVS monoclonal antibody.

图2-7 抗体鉴定

Fig.2-7 Antibody identification

2.3.8 EIAV 负调控内源性 eqMAVS 的表达

将 EIAV CMV3-8 毒梯度感染马胎皮肤细胞 NBL-6，感染 48 h 后，收样进行 Western blot 检测。以小鼠 eqMAVS 鼠单克隆抗体按照 1: 1 000 稀释后作为一抗孵育，结果如图 2-8，可知随着 CMV3-8 毒感染剂量的增加，NBL-6 细胞中内源性 eqMAVS 的表达量随之降低。可证实 EIAV 感染马属动物细胞后负调控 eqMAVS 的表达且呈现剂量依赖性。

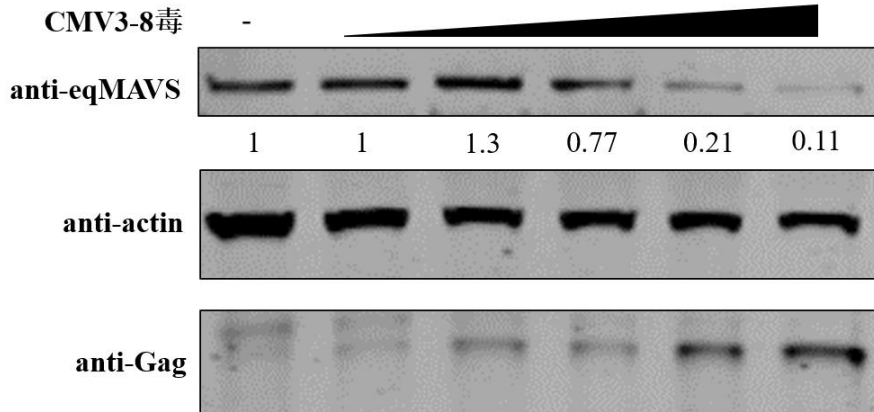


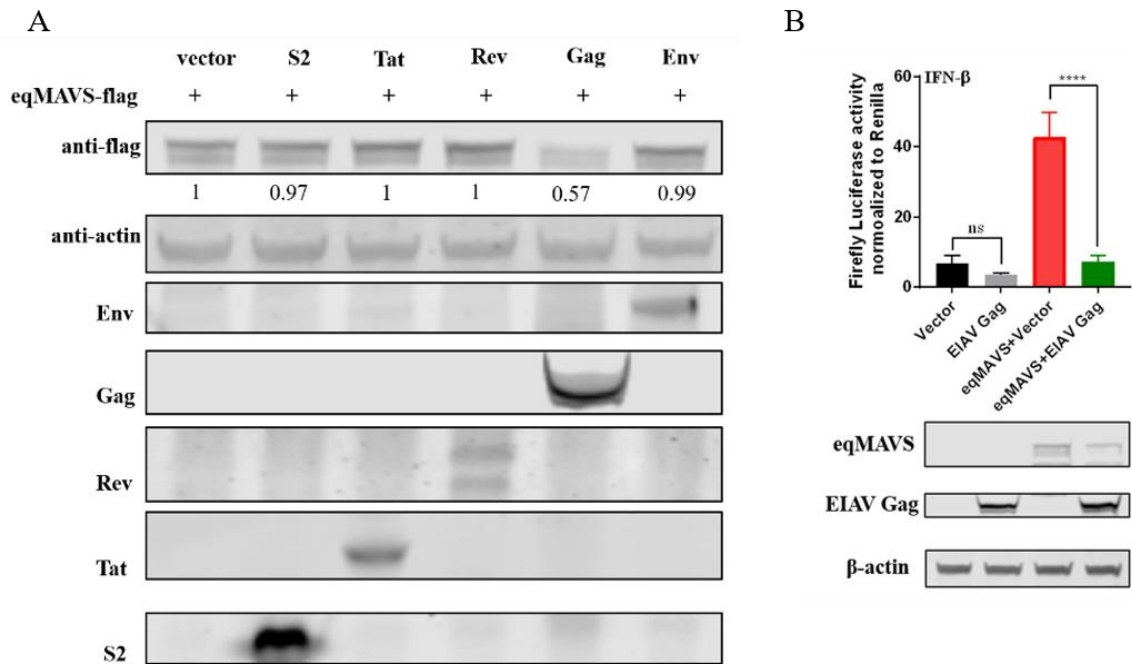
图 2-8 EIAV 负调控内源性 eqMAVS 的表达

Fig.2-8 EIAV negatively regulated the expression of endogenous eqMAVS

2.3.9 筛选负调控 eqMAVS 表达的 EIAV 蛋白

将本实验保存的 EIAV 蛋白真核表达质粒与 eqMAVS 真核表达质粒共转 HEK293T 细胞，进行 Western blot 检测。瞬时转染 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 与 EIAV 蛋白表达质粒(VR1012-EIAV gag、pcDNA3.1-EIAV env-HA、pcDNA3.1-EIAV tat-GFP、pcDNA3.1-EIAV S2-HA、pcDNA3.1-EIAV rev-HA)，24h 后检测 eqMAVS-flag 的蛋白表达情况。如图 2-9A 所示，可知 EIAV Gag 可以在不影响内参对照蛋白表达量的前提下，减少 eqMAVS-flag 的蛋白表达，故而将继续研究 EIAV Gag 对 eqMAVS 的降解现象。

将 VR1012-gag、pcDNA3.1-eqMAVS-flag、IFN- β 报告基因质粒与 TK 质粒共转染至 HEK293T 细胞中，24 h 后，经双荧光素酶报告系统检测发现 EIAV Gag 能够显著抑制 MAVS 介导的 IFN- β 启动子的激活(图 2-9B)。这些结果提示，EIAV Gag 蛋白负调控 MAVS 进而影响其介导的 I 型干扰素 IFN 产生机制。



A: EIAV Gag 特异性降解 eqMAVS 蛋白;

B: EIAV Gag 抑制 eqMAVS 介导的 IFN- β 启动子活性。

A: EIAV Gag degraded eqMAVS specifically;

B: EIAV Gag suppresses eqMAVS induced IFN- β reporter activities.

图 2-9 EIAV Gag 负调控 eqMAVS 的表达

Fig.2-9 EIAV Gag negatively regulates the expression of eqMAVS

2.4 小结

(1) 获得2株eqMAVS单抗细胞株，纯化得到1株eqMAVS单抗(4E9)，抗体总量分别为3.5 mg，效价均可达 2×10^5 ，且该抗体可以特异性识别马内源性eqMAVS蛋白，具有良好的反应性和特异性。

(2) 通过eqMAVS鼠单克隆抗体检测到EIAV可负调控马内源性eqMAVS蛋白的表达，且呈现剂量依赖性。

(3) 进一步筛选到EIAV Gag蛋白可负调控eqMAVS蛋白的表达，且能够负调控eqMAVS介导的IFN- β 启动子的激活。

第三章 EIAV Gag 降解 eqMAVS 的机制研究

3.1 实验材料

3.1.1 质粒、菌株及细胞

质粒 pCMV-Ub-HA 质粒由哈尔滨兽医研究所黄丽老师提供；其他参照 2.1.1。

3.1.2 主要试剂

质粒构建、细胞转染及蛋白表达所需试剂参见表 2-1。其他所需试剂参见表 3-1。

表 3-1 主要试剂

Table 3-1 The reagents used in this research

试剂	公司
DyLight™ 800 羊抗鼠 IgG 二抗	KPL
DyLight™ 680 羊抗兔 IgG 二抗	
抗鼠 flag 单抗和抗兔 HA 单抗、 抗兔 β -actin 多抗、FLAG beads 磁珠	Sigma
新生牛血清(FBS)	Wisent
Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega
MG132、CQ	MCE
DMSO	Thermo Scientific
抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)	碧云天
DMEM, High Glucose	Sigma
Alexa Fluor® 488 驴抗鼠 IgG (H+L)	Invitrogen
Alexa Fluor® 647 驴抗大鼠 IgG (H+L)	
Anti-rabbit IgG (H+L) DyLight 800-labeled	KPL
免疫组织固定液	碧云天
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	Abcam

3.1.3 主要仪器

质粒构建、细胞转染及蛋白表达所需仪器见表 2-2。

3.2 实验方法

3.2.1 引物设计及质粒构建与表达

构建 EIAV P11-HA、EIAV P15-HA、EIAV P26-HA、pcDNA3.1-MUL1-HA、pcDNA3.1-ITCH-

HA、pcDNA3.1-SMURF1-HA、pcDNA3.1-MARCH5-HA 质粒。载体 pcDNA3.1 引物序列参见表 2-1，其余参见表 3-2。

表 3-2 真核表达质粒构建所需引物

Table 3-2 Primers used for construction of eukaryotic plasmids

Primer name	Primer sequences(5'-3')	Products
EIAV P11-F	GTCGACGCCACCATGCTGGCCAAGGCCCTG	246bp
EIAV P11-R	CACGTCGTAGGGGTAGAAGGTCTGCTTCTG	
EIAV P15-F	GTCGACGCCACCATGGGCGACTCCCTGACC	378bp
EIAV P15-R	CACGTCGTAGGGGTAGTACTCCTCCATGGGCT	
EIAV P26-F	GTCGACGCCACCATGCCCATCATGATCGAC	687bp
EIAV P26-R	CACGTCGTAGGGGTACAGGGCCTTGCCAG	
VR1012-HA-F	CCCTACGACGTGCCCCATTACGCCTGATGAGATATCGCGGCCGC	4875bp
VR1012-HA-R	CATGGTGGCGTCGACGACGGTGACTG	
MUL1-F	CTTAAGCTTGCCACCATGGAGAGCGGAGGG	1086bp
MUL1-R	CACGTCGTAGGGGTAGCTGTTGTACAGGGG	
SMURF1-F	CTTAAGCTTGCCACCATGTCGAACCCCGGG	2301bp
SMURF1-R	CACGTCGTAGGGGTACTCCACGGCAAAGC	
MARCH5-F	TTTAAACTTAAGCTTATGCCGGACCAAGCT	975bp
MARCH5-R	CACGTCGTAGGGGTATGCTTCTTCTTGCTC	
ITCH-F	TTTAAACTTAAGCTTATGTCTGACAGTGGA	2616bp
ITCH-R	CACGTCGTAGGGGTACTCTTGCCAAATCC	

将构建成功的 pcDNA3.1-MUL1-HA、pcDNA3.1-MARCH5-HA、pcDNA3.1-SMURF1-HA、pcDNA3.1-ITCH-HA 和 VR1012-P11-HA、VR1012-P15-HA、VR1012-P26-HA 质粒分别转染到 HEK293T 细胞中，验证其表达，转染方法参照 2.2.3。

3.2.2 细胞 RNA 提取及反转录

将培养的 HEK293T 细胞弃掉上清，用 1 mL PBS 将细胞吹下，3 000 rpm 离心 2 min 收集细胞后按照 Simple P 总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞 RNA，经紫外分光光度计测 RNA 浓度后，取 1 µgRNA 按照 Takara 反转录试剂盒说明书进行反转录。

3.2.3 荧光定量检测

将反转录的 cDNA 用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 进行 qPCR(RT-PCR)试验。反应体系如下：TB Green Premix Ex Taq II 10 µL，Forward/ Reverse Primer (10 mM) 1 µL，无菌水 6 µL，cDNA 2 µL。混匀后将样品置于 Aligent Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪中，用 2 步法 PCR 扩增反应收集信号，通过溶解曲线分析扩增产物的特异性，具体程序如下：95 °C 10 min；95 °C 30s，60 °C 60 s，40 cycles；95 °C 60 s，55 °C 30 s，95 °C 30 s 持续。反应结束后使用 $\Delta\Delta C_t$ 法对数据进行分析。用于本研究中的荧光定量 PCR 引物序列如下表所示：

表 3-3 本研究使用的 qPCR 引物序列

Table 3-3 The primers used for qPCR in this study.

Gene name	primers	Sequence(5'-3')
Equine MAVS	eqMAVS-F	AGCACCACAGCAACTTCTCCA
	eqMAVS-R	ACCCAGCCGTTTCTCCTTCT
Human GAPDH	huGAPDH-F	ATCATCAGCAATGCCTCC
	huGAPDH-R	CATCACGCCACAGTTTCC
EIAV Gag	EIAV Gag-F	CGATGCCAAATCCTCCATTAG
	EIAV Gag-R	CTGATCAAAAAGCAGGTTCCATCT

3.2.4 Western blot

参见 2.2.2, 在本章实验中细胞裂解液中加入蛋白酶体抑制剂。

3.2.5 免疫共沉淀

使用一个 25 cm² 细胞培养瓶作为一个样品, 转染 24 h 后弃细胞上清, 用 PBS 洗涤两遍后, 加入含蛋白酶抑制剂的 lysis buffer 裂解细胞, 复孔合在一个 EP 管中, 12 000 rpm 4°C 离心 5 min, 取 60 μL 上清与 15 μL 5×SDS loading buffer 制成 input 样品, 剩余细胞裂解液与 30 μL Flag-beads 混合置于 4°C 旋转混匀仪上, 过夜结合; 瞬离后, 将 EP 管置于磁力架上, 弃掉液体并用 PBS 洗涤 Beads 5 次, 弃尽液体, 只留 Beads, 加入的 75 μL 1×SDS loading buffer 制成 IP 样品。

3.2.6 激光共聚焦检测实验

HEK29T 细胞于爬片小皿中培养 15 h 后转染质粒, 转染 6 h 后更换培养液, 不同时间点弃掉上清, 用 PBS 洗细胞 3 次; 加入 500 μL/孔免疫染色固定液室温固定细胞 15-30 min, 弃固定液, PBS 洗 3 次; 用含 0.1% TritonX-100 的 PBS 室温透膜 20 min, PBS 洗细胞 3 遍; 用含 5% 脱脂乳的 PBS 室温封闭 1 h; 一抗 200 μL/孔(按照 1: 200 用 5% 脱脂乳稀释抗体原液), 4°C 过夜, PBS 洗涤细胞 3 次; 二抗 200 μL/孔(按照 1: 500 用 5% 脱脂乳稀释抗体原液)避光孵育 1 h, PBS 洗细胞 3 次; 弃尽 PBS, 在爬片中央加入含淬灭剂的 DAPI 染色液 4 滴, 避光孵育 5 min, 倒置在涂有松节油的 63 倍物镜上, 进行共聚焦拍照取像。

3.2.7 邻位连接技术(PLA)

HEK29T 细胞于 thermo 小孔径皿中培养 15 h 后转染质粒, 转染 6 h 后更换培养液, 转染 24 h 后弃掉上清, 用 PBS 洗细胞 3 次; 加入 200 μL/孔免疫染色固定液室温固定细胞 15 min, 弃固定液, PBS 洗 3 次; 用含 0.1% TritonX-100 的 PBS 室温透膜 20 min, PBS 洗细胞 3 遍; 加入 40 μL Blocking Solution 37°C 封闭 1 h; 弃掉液体, 加入 40 μL 一抗(按照 1: 100 用 Duolink Antibody Diluent 稀释抗体原液), 4°C 过夜, 1×Wash A 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min; 探针 40 μL/孔(用 24 μL Antibody Diluent 稀释 8 μL PLA probe MINUS 与 8 μL PLA probe PLUS)37°C 孵育 1 h, 1×Wash A 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min; 再加入 40 μL 连接 Buffer(按照 1: 5 用 ddH₂O 释 5×Ligation Buffer,

取 39 μL 与 1 μL Ligase 混合), 37°C 孵育 30 min, 1×Wash A 洗涤细胞 3 次, 每次 5 min; 加入 40 μL 连接 Buffer(按照 1: 5 用 ddH₂O 稀释 5×Ligation Buffer, 取 39 μL 1×Ligation Buffer 与 1 μL Ligase 混合), 37°C 孵育 30 min, 1×Wash A 洗涤细胞 3 次; 加入 40 μL 扩增 Buffer(按照 1: 5 用 ddH₂O 稀释 5×Amplification Buffer, 取 39.5 μL 1×Amplification Buffer 与 0.5 μL Polymerase 混合), 37°C 避光孵育 100 min, 1×Wash B 洗涤细胞 2 次, 每次 10 min, 0.01×Wash B 浸泡细胞 1 min 后弃掉液体; 在爬片中央加入含淬灭剂的 DAPI 染色液 2 滴, 避光孵育 5 min, 倒置在涂有松节油的 63 倍物镜上, 进行共聚焦拍照取像。

3.2.8 药物处理实验

HEK293T 细胞转染 22 h 后每孔加入 2 μL 10 mM MG132 或 10 mM CQ 对照组加入 2 μL DMSO; 放入细胞培养箱中继续培养 2 h 后弃掉上清, 每孔加入 150 μL 含蛋白酶体抑制剂的细胞裂解液, 4°C 裂解 10 min 后, 转移至 EP 管中, 12 000 rpm 4°C 离心 5 min, 取 80 μL 上清与 20 μL 5×SDS loading buffer 混匀制成样品, 95°C 煮样 5 min。

3.2.9 统计学分析

本研究中所有数据均采用 GraphPad prism7 软件通过 Student's t 检验和方差分析进行数据分析。P<0.05 的实验数据认为具有统计学意义。

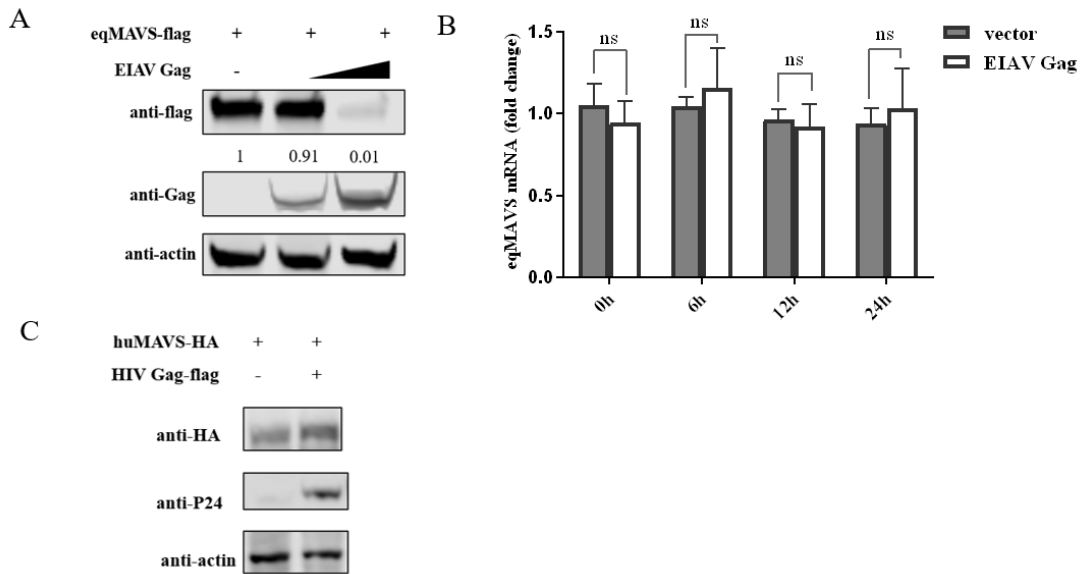
3.3 实验结果

3.3.1 EIAV Gag 负调控 eqMAVS 呈现剂量依赖性

将 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 质粒与不同剂量的 VR1012-EIAV gag 质粒共转入 HEK293T 细胞, 用 VR1012-HA 质粒补足 DNA 差异。结果如图 3-1A 显示, 随着 VR1012-EIAV gag 转染剂量增加, eqMAVS 的表达量呈现剂量依赖性减少。

通过荧光定量的方式研究 EIAV Gag 负调控 eqMAVS 的表达是否影响 eqMAVS 的 mRNA 水平。首先在 HEK293T 细胞中转染 pcDNA3.1-eqMAVS-flag、VR1012-EIAV Gag 或 Vector, 设立三个重复组, 转染后 0 h、6 h、12 h、24 h 按照 simple P 总 RNA 提取试剂盒的方法提取细胞总 RNA 后反转录为 cDNA, 使用设计的荧光定量引物对其进行检测。使用相对荧光定量法以 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法计算组间差异。如图 3-1B 显示所有检测时间点, 共染 Vector 对照组中的 eqMAVS 的 mRNA 与共转 VR1012-EIAV Gag 实验组无显著差异, 故而排除 EIAV Gag 导致 eqMAVS 的 mRNA 水平降低而降低 eqMAVS 蛋白表达量。

结果图 3-1C 显示, 随着 HIV Gag 蛋白表达量的增加, huMAVS 的表达量并未降低, 说明 HIV Gag 蛋白并不降解 huMAVS。



A: EIAV Gag 负调控 eqMAVS 呈现剂量依赖性;B: EIAV Gag 不影响 eqMAVS 的 mRNA 水平;
C: HIV Gag 不负调控 huMAVS 蛋白表达。

A: EIAV Gag degraded eqMAVS in a dose-dependent manner;B: EIAV Gag did not affect the mRNA level of eqMAVS;
C: EIAV Gag did not regulate the expression of eqMAVS protein.

图 3-1 EIAV Gag 负调控 eqMAVS 呈现剂量依赖性

Fig.3-1 EIAV Gag degraded eqMAVS in a dose-dependent manner

3.3.2 EIAV Gag 与 eqMAVS 在细胞中相互作用

3.3.2.1 激光共聚焦检测 EIAV Gag 与 eqMAVS 共定位

激光共聚焦成像可知在转染 6 h 时 eqMAVS 在胞质内弥散性分布，与 EIAV Gag 的细胞定位相同，而转染 12 h 时，eqMAVS 已经有部分蛋白定位于线粒体上，此时 EIAV Gag 仍然定位于胞质中，故而在存在非共定位情况。当转染 24 h，eqMAVS 蛋白基本都定位于线粒体上，与 EIAV Gag 不再共定位。

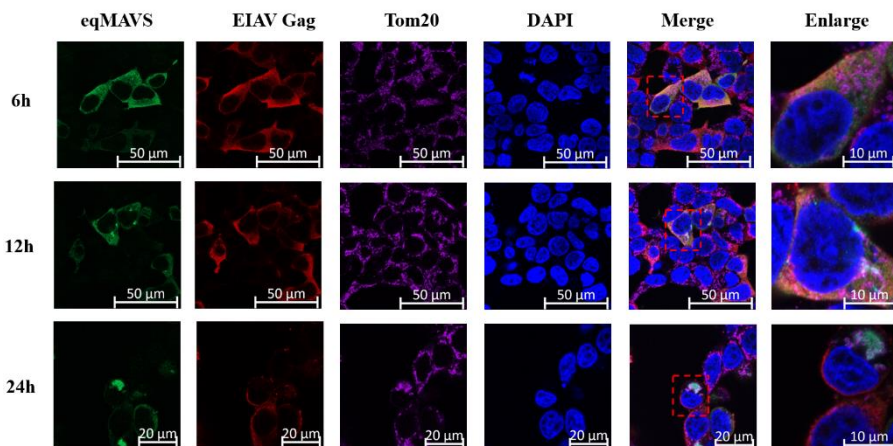


图 3-2 检测转染 EIAV Gag 与 eqMAVS 后细胞内定位

Fig.3-2Detection of EIAV Gag and eqMAVS intracellular locating after transfection

3.3.2.2 PLA 检测 EIAV Gag 与 eqMAVS 共定位

如图所示，HEK293T 细胞转染 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 与 VR1012-EIAV Gag 质粒 24 h 后，共聚焦显微镜下观察到特异性红色荧光斑点，进一步证明两者发生相互作用。

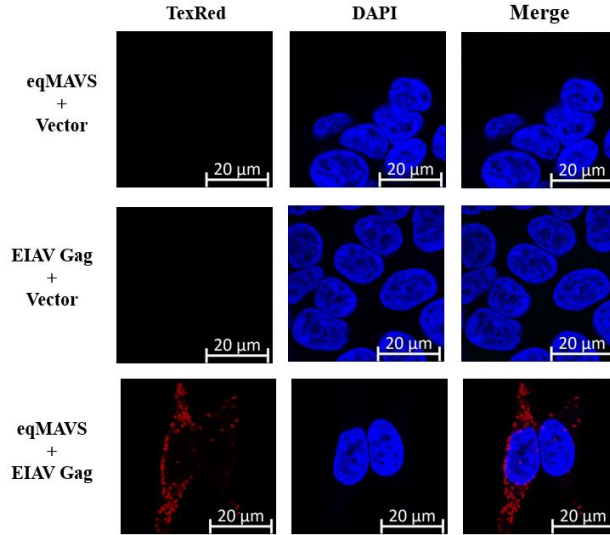
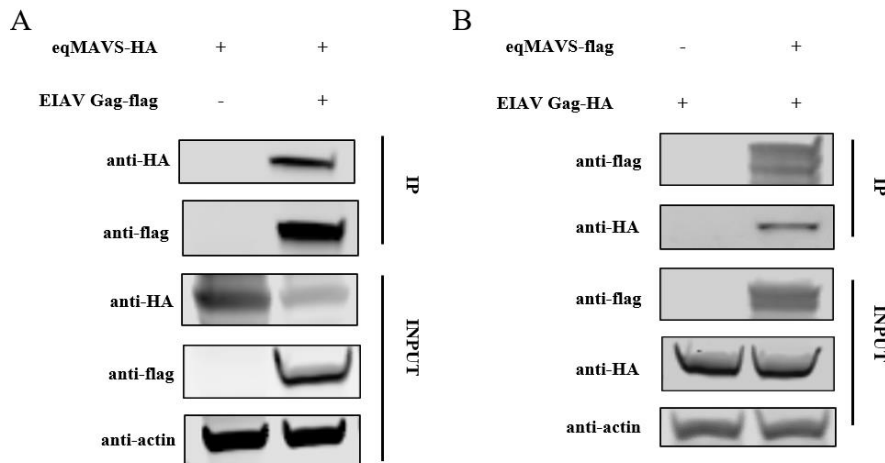


图 3-3 EIAV Gag 与 eqMAVS 蛋白 PLA 实验

Fig.3-3 PLA test for EIAV Gag and eqMAVS proteins

3.3.2.3 免疫共沉淀检测 EIAV Gag 与 eqMAVS 相互作用

使用免疫共沉淀技术检测在 HEK293T 细胞中转染 VR1012-EIAV Gag-HA 与 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 质粒时，Western blot 结果显示 eqMAVS 存在时可以将 EIAV Gag 共沉淀下来，而对对照组 EIAV Gag 不存在如图 3-4A。在 HEK293T 细胞中转染 VR1012-EIAV Gag-flag 与 pcDNA3.1-eqMAVS-HA 质粒，进一步证明 eqMAVS 可以与 EIAV Gag 相互作用如图 3-4B。



A-B: EIAV Gag 与 eqMAVS 的 Co-IP 实验

A-B: Co-IP test for EIAV Gag and eqMAVS

图 3-4 EIAV Gag 与 eqMAVS 蛋白 Co-IP 实验

Fig.3-4 Co-IP test for EIAV Gag and eqMAVS

3.3.3 EIAV Gag 通过泛素-蛋白酶体途径降解 eqMAVS

3.3.3.1 EIAV Gag 通过蛋白酶体途径降解 eqMAVS

HEK293T 细胞中共转 VR1012-EIAV gag 与 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 后, 使用蛋白酶体抑制剂 MG132、自噬抑制剂 CQ 以及对照 DMSO 处理细胞 2 h, 经 Western blot 检测可知 MG132 处理组与 DMSO 处理组相比, eqMAVS 的降解现象有所恢复, 而 CQ 处理组并没有显著差异。故而认为 EIAV Gag 通过蛋白酶体途径降解 eqMAVS。

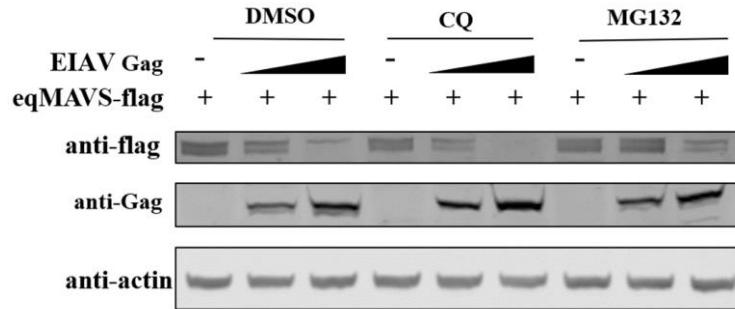


图 3-5 检测 EIAV Gag 降解 eqMAVS 的途径

Fig.3-5 EIAV Gag promotes proteasomal degradation of eqMAVS

3.3.3.2 EIAV Gag 影响 eqMAVS 的泛素化水平

在 HEK293T 细胞中转染 pcDNA3.1-eqMAVS-flag、Ub-HA、VR1012-EIAV Gag, 分别用 DMSO 与 MG132 处理后进行免疫共沉淀。以 flag beads 做 IP, 以 HA 抗体检测泛素水平可知, 与 DMSO 处理组相比, MG132 处理后 eqMAVS 的泛素水平显著升高这可能与 MG132 阻断正常 eqMAVS 的泛素化而致使整体泛素水平有所上升。而 MG132 处理下转染 EIAV Gag 的确影响了 eqMAVS 的泛素化水平, 这对 EIAV Gag 降解 eqMAVS 提供了新的研究方向。

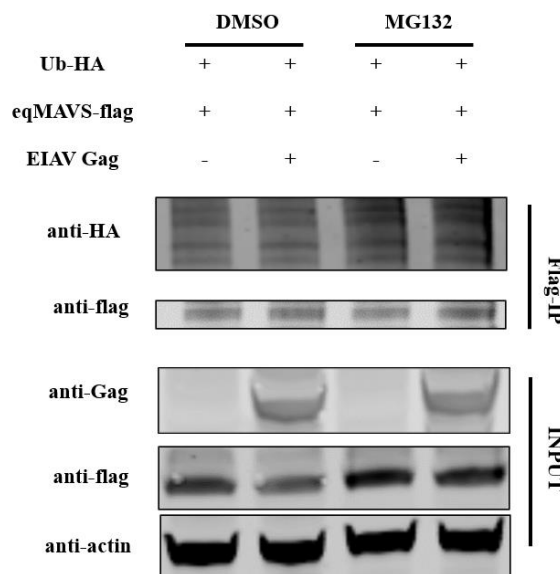


图 3-6 EIAV Gag 增加 eqMAVS 的泛素化

Fig.3-6 EIAV Gag promotes ubiquitination of eqMAVS

3.3.4 E3 泛素连接酶 MUL1 参与 EIAV Gag 降解 eqMAVS

3.3.4.1 E3 泛素连接酶 MUL1 影响 EIAV Gag 降解 eqMAVS

前期查阅文献可知有多种 E3 泛素连接酶能够与 MAVS 相互作用, 并增加其 K48 多聚泛素化, 而 K48 泛素化通常会促进 MAVS 被蛋白酶体降解。筛选几种常发挥作用的 E3 泛素连接酶进行克隆表达, 如 MUL1、SMURF1、MARCH5 等。经 Western blot 检测其能够在 HEK293T 细胞表达后, 将能够表达的 pcDNA3.1-MUL1-HA、pcDNA3.1-SMURF1-HA、pcDNA3.1-MARCH5-HA、pcDNA3.1-ITCH-HA 与 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 和 VR1012-EIAV Gag 共转染 HEK293T 细胞, 24 h 后 Western blot 检测 eqMAVS 的蛋白表达情况。由图 3-6 可知, MUL1 促进了 EIAV Gag 对 eqMAVS 的降解现象。

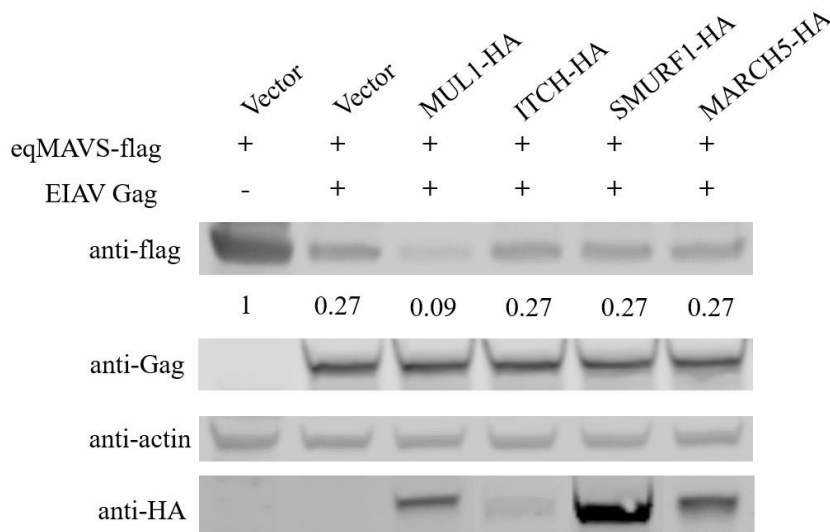
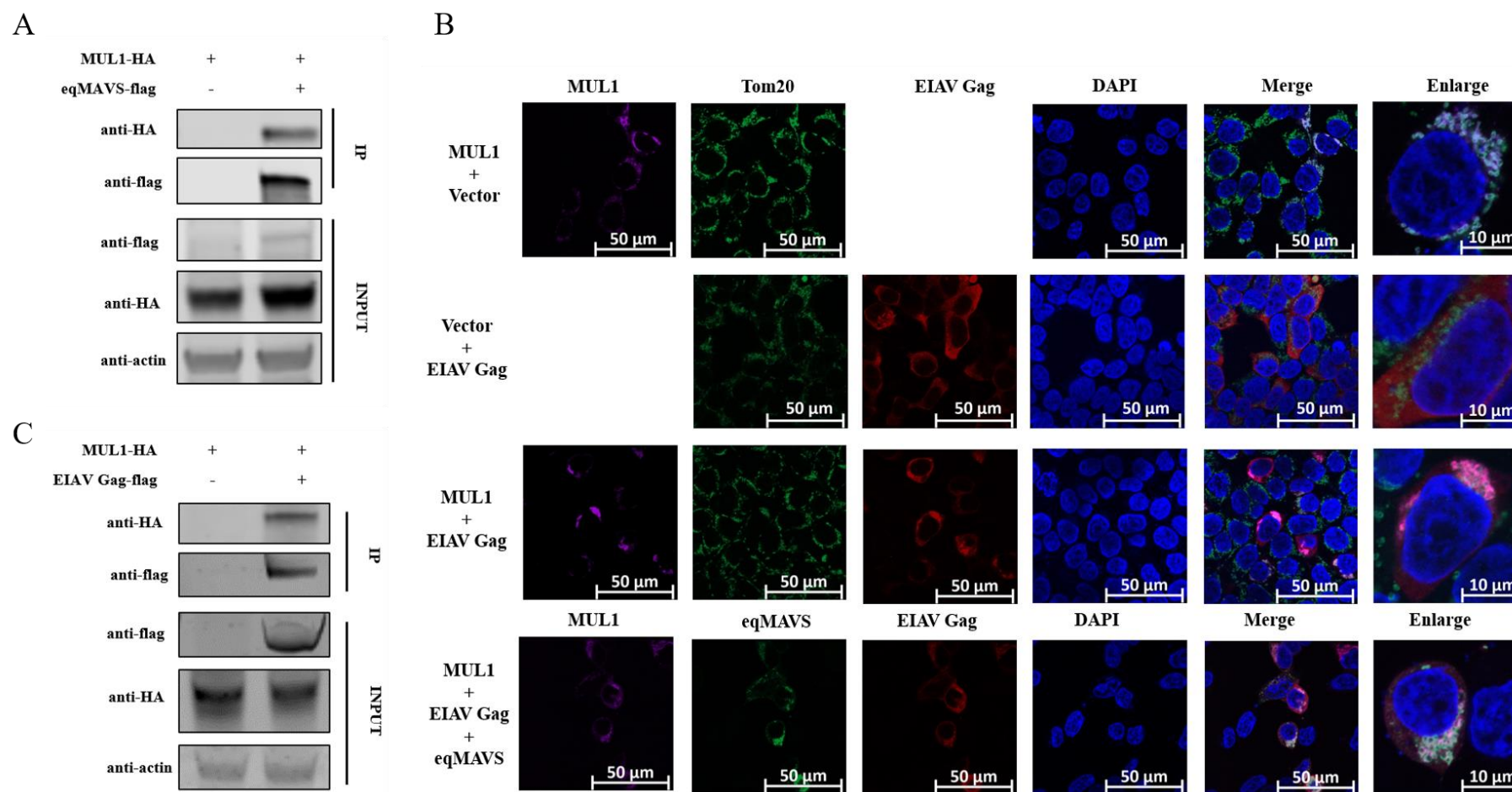


图 3-7 MUL1 有助于 EIAV Gag 降解 eqMAVS

Fig.3-7 MUL1 promoted EIAV Gag degrading eqMAVS

3.3.4.2 E3 泛素连接酶 MUL1 影响 EIAV Gag 细胞内定位并与其互作

为进一步探索 MUL1 在 EIAV Gag 降解 eqMAVS 反应中发挥的作用, 有文献报道 MUL1 能够与 huMAVS 相互作用, 而 eqMAVS 在氨基酸序列上与 huMAVS 存在较大差异, 故而检验 MUL1 是否能够与 eqMAVS 互作。将 pcDNA3.1-MUL1-HA 与 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 共转染 HEK293T 细胞 24 h 后, 进行免疫共沉淀试验。如图 3-7A 所示, eqMAVS 的确能够与 MUL1 发挥相互作用。而 EIAV Gag 与 MUL1 的关系还未知, 我们在 HEK293T 细胞中分别转染 pcDNA3.1-MUL1-HA 或 VR1012-EIAV Gag 或两者共转染或两者与 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 共转染, 发现 EIAV Gag 与 MUL1 共表达后, EIAV Gag 与 MUL1 在胞内的分布情况与单独表达时有所差异。如图 3-7B 所示, 单独表达 EIAV Gag 时, Gag 在胞质中弥散性分布, 而与 MUL1 共表达时, 在线粒体上形成点状聚集, 并与 MUL1 存在共定位情况。当 EIAV Gag、MUL1 与 eqMAVS 在细胞内共表达时, 存在共定位情况。进一步研究 MUL1 是否与 EIAV Gag 存在直接相互作用, 在 HEK293T 细胞中转染 pcDNA3.1-MUL1-HA 与 VR1012-EIAV Gag-flag, 24 h 收样做免疫共沉淀检测。图 3-7C 可知, EIAV Gag 能够与 MUL1 发生相互作用。



A: eqMAVS 与 MUL1 的 Co-IP 试验;B: MUL1 影响 EIAV Gag 的细胞内定位;C: EIAV Gag 与 MUL1 的 Co-IP 试验。

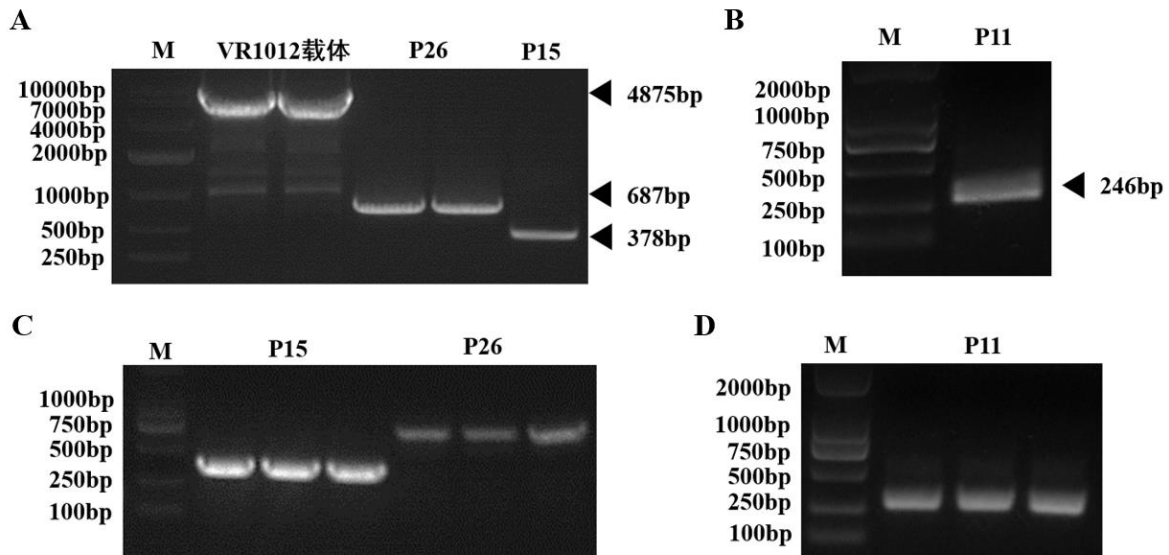
A: Co-IP test of eqMAVS and MUL1;B: MUL1 affected intracellular localization of EIAV Gag;C: Co-IP test of EIAV Gag and MUL1.

图 3-8 MUL1 与 EIAV Gag 相互作用

Fig.3-8 MUL1 interacted with EIAV Gag

3.3.5 EIAV Gag 成熟蛋白降解 eqMAVS

为了研究 Gag 蛋白降解 eqMAVS 的关键功能域, 构建了 VR1012-P15-HA、VR1012-P26-HA、VR1012-P11-HA、VR1012-P15-P26-HA 的真核表达质粒, 经菌液鉴定后送测序, 序列正确的质粒进行质粒提取。



A: EIAV Gag 成熟蛋白 P26、P15 基因扩增及 VR1012 载体序列扩增;

B: EIAV Gag 成熟蛋白 P11 基因序列扩增;

C: EIAV Gag 成熟蛋白 P15、P26 连接 VR1012 质粒菌液鉴定;

D: EIAV Gag 成熟蛋白 P11 连接 VR1012 质粒菌液鉴定。

A: The P26 and P15 genes of EIAV Gag mature proteins were amplified and the VR1012 vector sequence was amplified;

B: HIV Gag degraded huMAVS;

C: EIAV Gag did not affect the mRNA level of eqMAVS.

图 3-9 EIAV Gag 成熟蛋白基因扩增

Fig.3-9 EIAV Gag mature proteins were amplified

将 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 质粒分别与 VR1012-HA、VR1012-P15-HA、VR1012-P26-HA、VR1012-P11-HA、VR1012-EIAV Gag-HA、VR1012-P15-P26-HA 质粒共转入 HEK293T 细胞, 转染 24 h 后, 经 Western blot 检测 eqMAVS 的蛋白表达量。图 3-9 显示与对照组相比, P15 与 P26 单独表达时即能够降解 eqMAVS 蛋白, 且能够与 eqMAVS 发生免疫共沉淀, 而 P15 与 eqMAVS 的互作水平要高于 P26。两者融合蛋白 P15-P26 也能够降解 eqMAVS, 且与 eqMAVS 的互作水平高于 P26 单独表达。Co-IP 实验可知 P11 不能与 eqMAVS 蛋白直接相互作用, 且 P11 也不降解 eqMAVS, 结果相互照应。

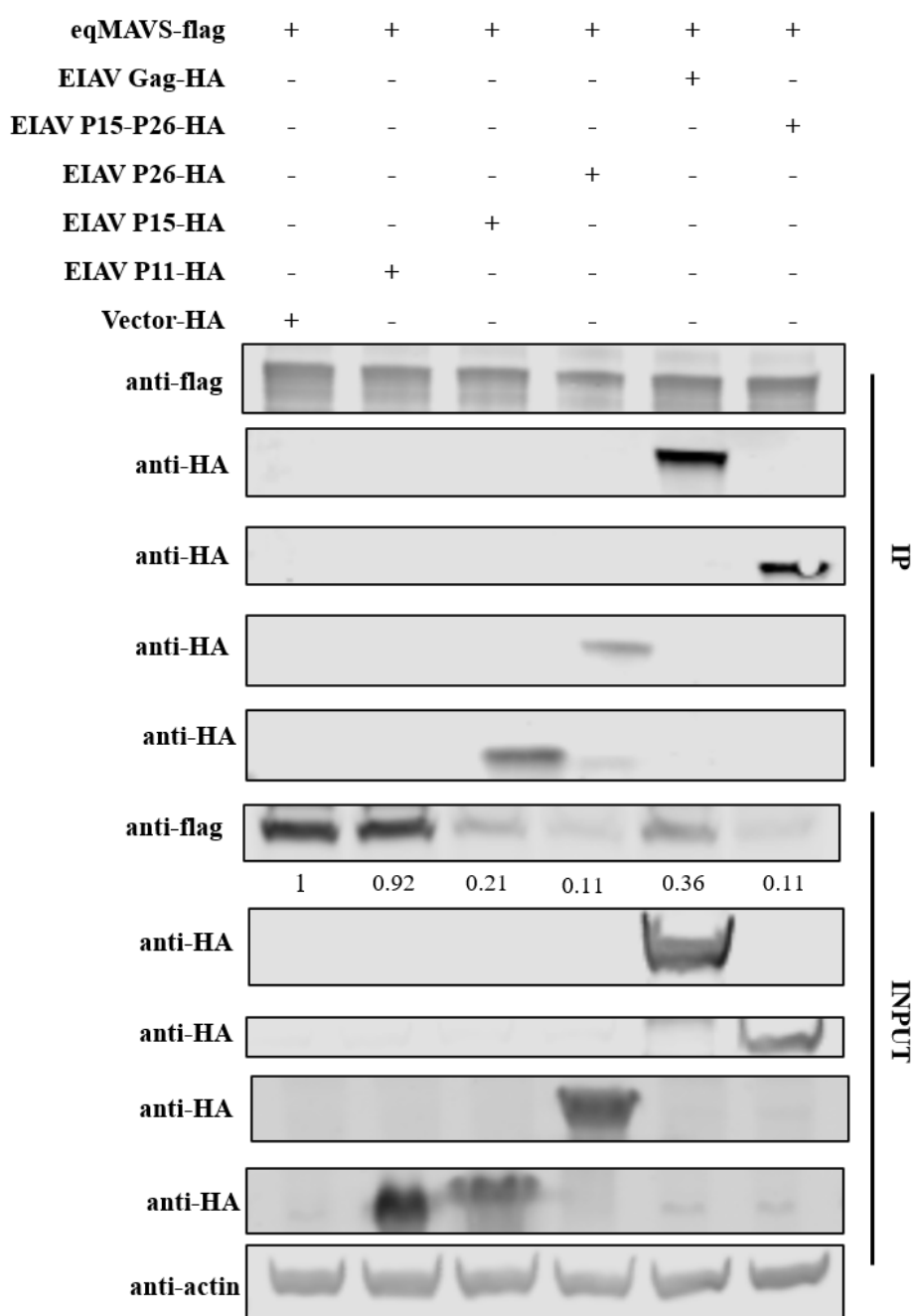


图 3-10 检测 EIAV Gag 成熟蛋白降解 eqMAVS 及免疫共沉淀试验

Fig.3-10 EIAV Gag mature proteins degraded of eqMAVS and Co-IP test

3.4 小结

(1) EIAV Gag 负调控 eqMAVS 蛋白的表达呈现剂量依赖性，但不影响 eqMAVS 的 mRNA 水平，排除 EIAV Gag 通过转录后调控 eqMAVS 蛋白的表达。

(2) EIAV Gag 与 eqMAVS 蛋白在细胞内共定位，经 PLA 与免疫共沉淀试验证实两者能够相互作用。

(3) EIAV Gag 蛋白通过增加 eqMAVS 的泛素化水平，同时依赖泛素-蛋白酶体途径降解

eqMAVS 蛋白。

(4) E3 泛素连接酶 MUL1 能够促进 EIAV Gag 对 eqMAVS 的降解,并能够与 EIAV Gag 互作,且影响 EIAV Gag 蛋白在胞质内的分布情况。

(5) EIAV Gag 成熟蛋白 P15 与 P26 能够发挥降解 eqMAVS 的作用并能够与 eqMAVS 相互作用,而 P11 不能降解 eqMAVS,进一步确认了 EIAV Gag 发挥作用的主要功能域。

第四章 全文讨论

EIAV 作为慢病毒属成员之一, 对该病毒的研究意义不仅仅局限在病毒本身, 也为 HIV 疫苗的制备提供了参考意义。在一定程度上 EIAV 并没有造成完全的免疫缺陷, 这也是它与 HIV 的致病性差距。但 EIAV 是慢病毒属基因结构最简单的成员, 全长只有 8.2kb, 不同毒株间 Env 蛋白突变率高, 这也与 HIV 相同, 那么能否通过研究 EIAV 与宿主细胞相互作用逃避先天性免疫的机制, 进一步丰富慢病毒属成员引发持续性感染的内容(王雪峰, 2011)。

针对病毒等病原体的先天免疫应答异常激活会引起“细胞因子风暴”, 这有时可以为病毒提供复制优势, 从而促进病毒的复制进程。RLRs 识别感染过程中产生的病毒 RNA, 并通过 MAVS 蛋白介导 I 型干扰素的产生。而 EIAV 与 RLRs 有着怎样的关系目前研究较少, 所以本研究首先将重点放在细胞内识别外源 RNA 的 RIG-I-MAVS 信号通路。目前针对该信号通路的广泛研究已经解决了我们的一些疑问, 对此也逐渐揭示了线粒体在细胞信号转导中的中心枢纽作用。线粒体进行细胞内通讯的四个主要机制包括释放细胞色素 c 诱导细胞死亡(HUTTEMANN et al., 2012)、激活 AMP 蛋白激酶以控制线粒体分裂和融合(YOULE and VAN DER BLIEK, 2012)、产生并释放活性氧到细胞中激活转录因子以及释放线粒体 DNA 来激活免疫应答(ANGAJALA et al., 2018)。而线粒体上的 Bcl-2 死亡受体家族成员或线粒体应激而诱导线粒体外膜上的孔形成可作为细胞凋亡的触发因素等(CZABOTAR et al., 2014)。而我们实验室的前期研究显示 EIAV 感染巨噬细胞后会引发内源性细胞凋亡的增加(DU et al., 2019), 这也让我们联想到线粒体相关蛋白是否也受到了病毒的调控。目前针对 RIG-I-MAVS 通路的研究很多都涉及到接头蛋白 MAVS, 且已经证实多种病毒蛋白能够靶向 MAVS, 从而破坏 RIG-I 信号的传导。那么 MAVS 蛋白是否受到 EIAV 的调控也是本文关注的问题。

首先为确认 EIAV 与 RLRs 相关分子反应, 本研究利用 IFN-Luc 报告质粒证明 EIAV 的确能够下调 eqMAVS 介导的 IFN- β 启动子激活, 且观察到 eqMAVS 的蛋白表达量受到了 CMV3-8 的下调。进一步将 eqMAVS 与不同剂量的 CMV3-8 共转染, 验证 eqMAVS 的蛋白表达量受到 EIAV 的调控。利用本实验室稳定表达 EIAV 受体 ELR1 的 HEK293T 细胞系证实 EIAV 病毒感染 HEK293T-ELR1 细胞系 12 h 后, eqMAVS 在 HEK293T 过表达的蛋白量显著下调。在 HEK293T 细胞系内确认了该现象后, 本研究为了进一步探索 EIAV 感染马属动物细胞后, 内源性 eqMAVS 蛋白表达是否受到病毒影响, 故而要得到识别马内源性 eqMAVS 的抗体。但对比 eqMAVS 与 huMAVS 核苷酸序列以及氨基酸序列后, 确认两者的差异较大, 且购买多家 huMAVS 抗体均不能够识别 eqMAVS, 所以本研究制备了 eqMAVS 鼠单克隆抗体, 以解决本研究最根本的问题。在纯化 eqMAVS 原核表达蛋白时遇到一个很大的问题, 全长蛋白不能在上清中表达, 即使变性纯化后, 也不能良好的复性。进一步分析可能是 eqMAVS 结构上的跨膜区对其原核表达的影响较大, 故而采取截短突变体 eqMAVS Δ TM 的形式进行蛋白表达纯化。与之前购买的 huMAVS 抗体相比, huMAVS 大部分为兔多抗, 特异性并不是很好, 且稀释倍数较低, 消耗性大。而本文制备的 eqMAVS 鼠单克隆抗体(细胞株 4E9)虽然抗体类型是 IgM 但特异性较好, 稀释倍数也比 huMAVS 抗体高。而用该抗体检测 HEK293T 细胞中过表达 eqMAVS 时出现多条带现象, 可能是由于 pcDNA3.1-eqMAVS-flag 在过表达过程中启动子活性强, 不止从第一个起始密码子处启动表达, 还启动了多个同功异构体的表达, 而抗体特异性强, 所以检测到多条带。经制备的 eqMAVS 鼠单抗检测不同

剂量 EIAV 感染后马属动物细胞 NBL-6 中 eqMAVS 的表达情况, 可知 eqMAVS 的蛋白表达随 EIAV 感染剂量的增加而减少。这也证实了我们的猜想, EIAV 感染细胞后在胞质内释放病毒 RNA, 难免被 RLR 识别触发先天性免疫反应, 而病毒自身也能够通过锚定 eqMAVS 对抗细胞先天性免疫反应。通过筛选, 得知是 EIAV 的结构蛋白 Gag 下调了 eqMAVS 的蛋白表达量。

为了进一步研究 EIAV Gag 蛋白降解 eqMAVS 的机制, 通过本实验室已有的 IFN- β 报告系统, 在 HEK293T 中转染 EIAV Gag 后, 能够显著下调 eqMAVS 介导的 IFN 启动子激活, 也验证了以上猜想。前期研究表明细胞内表达的 EIAV Gag 定位于胞质中, 弥散性分布, 而有研究表明 huMAVS 是定位于线粒体与过氧化物酶体上, 而 eqMAVS 定位情况还没有细致的研究。且 MAVS 并非线粒体生成蛋白, 而是通过在内质网中加工后由 N 端线粒体定位信号锚定在线粒体外膜上, 故而在转染 eqMAVS 后 6 h、12 h、24 h 不同时间点探索 EIAV Gag 与 eqMAVS 的定位情况。本研究通过激光共聚焦技术分析 eqMAVS 在转染后 6 h 能够在胞质中弥散性分布, 而转染后 12 h 则开始于线粒体上呈现点状定位的情况, 继续延长至 24 h 可以观察到 eqMAVS 与线粒体外膜蛋白 Tom20 出现明显的共定位情况, 表明 eqMAVS 已经被定位到线粒体外膜上。通过免疫共沉淀试验与 PLA 实验进一步验证了 EIAV Gag 与 eqMAVS 存在相互作用。进一步研究 EIAV Gag 发挥作用的关键功能域时, 联想到 EIAV Gag 会被病毒蛋白酶裂解成为几个成熟蛋白, 故而构建 EIAV Gag 成熟蛋白的真核表达质粒, 并证明 P15 与 P26 能够降解 eqMAVS 并与其发生相互作用。

为进一步研究 EIAV Gag 降解 eqMAVS 的机制, 本研究使用了蛋白酶体抑制剂 MG132 以及自噬抑制剂 CQ 阻碍细胞降解蛋白的通路, 是否会影响 Gag 的作用。当加入 MG132 后, EIAV Gag 降解 eqMAVS 的现象相对于对照组减弱, 而加入 CQ 后, EIAV Gag 依旧能够降解 eqMAVS, 说明 EIAV Gag 通过蛋白酶体途径降解 eqMAVS。当加入 CQ 后 eqMAVS 的表达更少, 对此的理解为 CQ 药物加入后培养液的颜色发生变化, 该药物可能导致培养液中 pH 值发生变化, 而影响最后一段时间蛋白的表达量。而细胞对需要降解的蛋白进行泛素化修饰, 以便蛋白酶体识别泛素链信号对其降解。所以, 本研究探究了 EIAV Gag 蛋白是否影响 eqMAVS 的泛素化水平。经检验与 EIAV Gag 共转染时 eqMAVS 的泛素化水平升高, 而 eqMAVS 的泛素化本底值较高可能与该过表达蛋白本身就发生繁琐的泛素化激活与降解有关。

参考 MAVS 经蛋白酶体降解关联的 E3 泛素连接酶相关文献, 克隆表达了多个基因, 并筛选到线粒体定位的 MUL1 蛋白能够显著影响 EIAV Gag 对 eqMAVS 的降解水平。查阅文献可知, 该蛋白的过度激活会负调控细胞的先天性免疫活动, 这也与本实验的结果相符。在过表达 MUL1 的情况下, 增加了 EIAV Gag 负调控 MAVS 介导的 RLR 信号通路。因人与马的 MUL1 蛋白在氨基酸序列上差异极小, 而 eqMAVS 与 huMAVS 差异较大, 通过免疫共沉淀试验验证了 eqMAVS 与 huMAVS 都能与 MUL1 发生免疫共沉淀。而 EIAV Gag 是否与 MUL1 的关联, 这一点也通过激光共聚焦得到解答。单独表达 EIAV Gag 蛋白时, 其在胞质内弥散性分布, 而与 MUL1 蛋白共同表达时, 却发生了点状聚集, 进一步分析该聚集位点为线粒体周围, 且 MUL1 蛋白也呈现聚集状态。进而促使 EIAV Gag 与 eqMAVS 的共定位现象也更显著。通过免疫共沉淀试验本研究也证实了 EIAV Gag 能够与 MUL1 发生直接相互作用。而对于三者是否发生相互作用, 对于该猜想只做过一次在 HEK293T 细胞中过表达此三种蛋白, 以 eqMAVS 与磁珠反应, 沉淀的蛋白中检测到了 MUL1 与 Gag, 但对于是否形成三元复合物还需继续验证, 目前还不能下此结论。推测 EIAV Gag 的加入应该影响了 eqMAVS 与 MUL1 的结合, 才增加了 eqMAVS 的泛素化水平, 某一时间点应

该存在三元复合物的形式，还需继续探索。

为了进一步验证 MUL1 在 EIAV Gag 降解 eqMAVS 的过程中是否起到决定性作用，故而准备构建 *mull* 基因敲除的 HEK293T 细胞系，验证该猜想。并进一步验证 *mull* 基因在 EIAV 复制等方面的功能，以及使用 siRNA 敲低 EIAV 靶细胞马外周血单核巨噬细胞后，EIAV 感染是否受到影响等。

综上所述，经过制备 eqMAVS 单克隆抗体以确认 EIAV 降解 eqMAVS 的现象，并使用 Western blot、激光共聚焦、免疫共沉淀等研究方法深入探索 EIAV Gag 蛋白降解 eqMAVS 的机制，为 EIAV 能够调控先天性免疫反应有助于其持续性感染提供了参考。

第五章 全文结论

- 1.成功制备抗 eqMAVS 鼠单克隆抗体，其能够特异性识别马属动物细胞内源性 eqMAVS 以及 HEK293T 过表达的 eqMAVS 蛋白。
2. EIAV 感染 NBL-6 细胞后，内源性 eqMAVS 蛋白表达减少，且 CMV3-8 抑制 MAVS 介导的 IFN 启动子激活，证实 EIAV 可以负调控 eqMAVS。
3. EIAV Gag 蛋白能够通过泛素-蛋白酶体途径负调控 eqMAVS 的表达，不影响其 mRNA 水平，证实 EIAV 是通过调控 eqMAVS 的翻译后修饰来影响 RLR 信号通路的传导。
4. EIAV Gag、eqMAVS、MUL1 两两之间都能够发生免疫共沉淀，且过表达 MUL1 与 EIAV Gag 会影响两者定位情况，进一步验证了 MUL1 参与了 EIAV Gag 降解 eqMAVS。

参考文献

- 王雪峰, 2011. 马传染性贫血病毒弱毒疫苗致弱过程病毒基因的进化研究. 内蒙古农业大学.
- 张权庚, 2010. 抗体制备与使用实验指南. 北京: 科学出版社: 63-64.
- AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783-801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- AMODEO P, CASTIGLIONE MORELLI M A, OSTUNI A, BATTISTUZZI G, BAVOSO A, 2006. Structural features in EIAV NCp11: a lentivirus nucleocapsid protein with a short linker. *Biochemistry*, 45(17):5517-5526. DOI: 10.1021/bi0524924.
- ANGAJALA A, LIM S, PHILLIPS J B, KIM J H, YATES C, YOU Z, TAN M, 2018. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Front Immunol*, 9:1605. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01605.
- BAYER P, KRAFT M, EJCHART A, WESTENDORP M, FRANK R, ROSCH P, 1995. Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol*, 247(4):529-535. DOI: 10.1006/jmbi.1995.0158.
- BELGNAOUI S M, PAZ S, HISCOTT J, 2011. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol*, 23(5):564-572. DOI: 10.1016/j.coi.2011.08.001.
- BENDER S, REUTER A, EBERLE F, EINHORN E, BINDER M, BARTENSCHLAGER R, 2015. Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog*, 11(11):e1005264. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005264.
- BIENIASZ P D, 2009. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, 5(6):550-558. DOI: 10.1016/j.chom.2009.05.015.
- BOERGELING Y, ROZHDESTVENSKY T S, SCHMOLKE M, RESA-INFANTE P, ROBECK T, RANDAU G, WOLFF T, GABRIEL G, BROSIUS J, LUDWIG S, 2015. Evidence for a Novel Mechanism of Influenza Virus-Induced Type I Interferon Expression by a Defective RNA-Encoded Protein. *PLoS Pathog*, 11(5):e1004924. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004924.
- BRUBAKER S W, GAUTHIER A E, MILLS E W, INGOLIA N T, KAGAN J C, 2014. A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity. *Cell*, 156(4):800-811. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.021.
- CARPENTER S, EVANS L H, SEVOIAN M, CHESEBRO B, 1987. Role of the host immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. *J Virol*, 61(12):3783-3789. DOI: 10.1128/JVI.61.12.3783-3789.1987.
- CHANDE A, CUCCURULLO E C, ROSA A, ZIGLIO S, CARPENTER S, PIZZATO M, 2016. S2 from equine infectious anemia virus is an infectivity factor which counteracts the retroviral inhibitors SERINC5 and SERINC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(46):13197-13202. DOI: 10.1073/pnas.1612044113.
- CHEN C, MONTELARO R C, 2003. Characterization of RNA elements that regulate gag-pol ribosomal

- frameshifting in equine infectious anemia virus. *J Virol*, 77(19):10280-10287. DOI: 10.1128/jvi.77.19.10280-10287.2003.
- CHEN C, VINCENT O, JIN J, WEISZ O A, MONTELARO R C, 2005. Functions of early (AP-2) and late (AIP1/ALIX) endocytic proteins in equine infectious anemia virus budding. *J Biol Chem*, 280(49):40474-40480. DOI: 10.1074/jbc.M509317200.
- CHENG J, LIAO Y, XIAO L, WU R, ZHAO S, CHEN H, HOU B, ZHANG X, LIANG C, XU Y, YUAN Z, 2017. Autophagy regulates MAVS signaling activation in a phosphorylation-dependent manner in microglia. *Cell Death Differ*, 24(2):276-287. DOI: 10.1038/cdd.2016.121.
- CHIU I M, YANIV A, DAHLBERG J E, GAZIT A, SKUNTZ S F, TRONICK S R, AARONSON S A, 1985. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature*, 317(6035):366-368. DOI: 10.1038/317366a0.
- CHOI Y B, SHEMBADE N, PARVATIYAR K, BALACHANDRAN S, HARHAJ E W, 2017. TAX1BP1 Restrains Virus-Induced Apoptosis by Facilitating Itch-Mediated Degradation of the Mitochondrial Adaptor MAVS. *Mol Cell Biol*, 37(1). DOI: 10.1128/MCB.00422-16.
- COLOMER-LLUCH M, RUIZ A, MORIS A, PRADO J G, 2018. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol*, 9:2876. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02876.
- COOK R F, LEROUX C, ISSEL C J, 2013. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Vet Microbiol*, 167(1-2):181-204. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.09.031.
- COVALEDA L, FULLER F J, PAYNE S L, 2010. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology*, 397(1):217-223. DOI: 10.1016/j.virol.2009.11.005.
- CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, ADAMS J M, 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1):49-63. DOI: 10.1038/nrm3722.
- DERSE D, DORN P, DASILVA L, MARTARANO L, 1990. Structure and expression of the equine infectious anemia virus transcriptional trans-activator (tat). *Dev Biol Stand*, 72:39-48.
- DEVICO A, MONTELARO R C, GALLO R C, SARNGADHARAN M G, 1991. Purification and partial characterization of equine infectious anemia virus reverse transcriptase. *Virology*, 185(1):387-394. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90786-b.
- DING S, ZHU S, REN L, FENG N, SONG Y, GE X, LI B, FLAVELL R A, GREENBERG H B, 2018. Rotavirus VP3 targets MAVS for degradation to inhibit type III interferon expression in intestinal epithelial cells. *Elife*, 7. DOI: 10.7554/eLife.39494.
- DONG J, XU S, WANG J, LUO R, WANG D, XIAO S, FANG L, CHEN H, JIANG Y, 2015. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 3C protease cleaves the mitochondrial antiviral signalling complex to antagonize IFN-beta expression. *J Gen Virol*, 96(10):3049-3058. DOI: 10.1099/jgv.0.000257.
- DU C, DUAN Y, WANG X F, LIN Y, NA L, WANG X, CHEN K, WANG X, 2019. Attenuation of Equine

- Lentivirus Alters Mitochondrial Protein Expression Profile from Inflammation to Apoptosis. *J Virol*, 93(21). DOI: 10.1128/JVI.00653-19.
- DULUDE D, BARIL M, BRAKIER-GINGRAS L, 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res*, 30(23):5094-5102. DOI: 10.1093/nar/gkf657.
- EDMONSON P, MURPHEY-CORB M, MARTIN L N, DELAHUNTY C, HEENEY J, KORNFELD H, DONAHUE P R, LEARN G H, HOOD L, MULLINS J I, 1998. Evolution of a simian immunodeficiency virus pathogen. *J Virol*, 72(1):405-414. DOI: 10.1128/JVI.72.1.405-414.1998.
- ENGELMAN A, 1996. Biochemical characterization of recombinant equine infectious anemia virus integrase. *Protein Expr Purif*, 8(3):299-304. DOI: 10.1006/prep.1996.0104.
- FAGERNESS A J, FLAHERTY M T, PERRY S T, JIA B, PAYNE S L, FULLER F J, 2006. The S2 accessory gene of equine infectious anemia virus is essential for expression of disease in ponies. *Virology*, 349(1):22-30. DOI: 10.1016/j.virol.2005.12.041.
- FANG R, JIANG Q, ZHOU X, WANG C, GUAN Y, TAO J, XI J, FENG J M, JIANG Z, 2017. MAVS activates TBK1 and IKKepsilon through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog*, 13(11):e1006720. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006720.
- FENG H, SANDER A L, MOREIRA-SOTO A, YAMANE D, DREXLER J F, LEMON S M, 2019. Hepatovirus 3ABC proteases and evolution of mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS). *J Hepatol*, 71(1):25-34. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.02.020.
- GONDA M A, CHARMAN H P, WALKER J L, COGGINS L, 1978. Scanning and transmission electron microscopic study of equine infectious anemia virus. *Am J Vet Res*, 39(5):731-740.
- GOUJON C, MONCORGE O, BAUBY H, DOYLE T, WARD C C, SCHALLER T, HUE S, BARCLAY W S, SCHULZ R, MALIM M H, 2013. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502(7472):559-562. DOI: 10.1038/nature12542.
- HENDERSON L E, SOWDER R C, SMYTHERS G W, OROSZLAN S, 1987. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. *J Virol*, 61(4):1116-1124. DOI: 10.1128/JVI.61.4.1116-1124.1987.
- HORNER S M, LIU H M, PARK H S, BRILEY J, GALE M, Jr., 2011. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35):14590-14595. DOI: 10.1073/pnas.1110133108.
- HORNUNG V, ELLEGAST J, KIM S, BRZOZKA K, JUNG A, KATO H, POECK H, AKIRA S, CONZELMANN K K, SCHLEE M, ENDRES S, HARTMANN G, 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314(5801):994-997. DOI: 10.1126/science.1132505.
- HOU F, SUN L, ZHENG H, SKAUG B, JIANG Q X, CHEN Z J, 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*, 146(3):448-461. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.041.
- HSU A C, DUA K, STARKEY M R, HAW T J, NAIR P M, NICHOL K, ZAMMIT N, GREY S T, BAINES K J, FOSTER P S, HANSBRO P M, WARK P A, 2017. MicroRNA-125a and -b inhibit A20 and

- MAVS to promote inflammation and impair antiviral response in COPD. *JCI Insight*, 2(7):e90443. DOI: 10.1172/jci.insight.90443.
- HUSSAIN K A, ISSEL C J, SCHNORR K L, RWAMBO P M, MONTELARO R C, 1987. Antigenic analysis of equine infectious anemia virus (EIAV) variants by using monoclonal antibodies: epitopes of glycoprotein gp90 of EIAV stimulate neutralizing antibodies. *J Virol*, 61(10):2956-2961. DOI: 10.1128/JVI.61.10.2956-2961.1987.
- HUTTEMANN M, LEE I, GROSSMAN L I, DOAN J W, SANDERSON T H, 2012. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol*, 748:237-264. DOI: 10.1007/978-1-4614-3573-0_10.
- KAISER A, MEIER H P, STRAUB R, GERBER V, 2009. [Equine Infectious Anemia (EIA)]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 151(4):159-164. DOI: 10.1024/0036-7281.151.4.159.
- KATO H, TAKEUCHI O, MIKAMO-SATOH E, HIRAI R, KAWAI T, MATSUSHITA K, HIIRAGI A, DERMODY T S, FUJITA T, AKIRA S, 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 205(7):1601-1610. DOI: 10.1084/jem.20080091.
- KAWAI T, AKIRA S, 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, 21(4):317-337. DOI: 10.1093/intimm/dxp017.
- KAWAKAMI T, SHERMAN L, DAHLBERG J, GAZIT A, YANIV A, TRONICK S R, AARONSON S A, 1987. Nucleotide sequence analysis of equine infectious anemia virus proviral DNA. *Virology*, 158(2):300-312. DOI: 10.1016/0042-6822(87)90202-9.
- KREMER M, SCHNIERLE B S, 2005. HIV-1 Vif: HIV's weapon against the cellular defense factor APOBEC3G. *Curr HIV Res*, 3(4):339-344. DOI: 10.2174/157016205774370456.
- LAGUETTE N, SOBHIAN B, CASARTELLI N, RINGEARD M, CHABLE-BESSIA C, SEGERAL E, YATIM A, EMILIANI S, SCHWARTZ O, BENKIRANE M, 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 474(7353):654-657. DOI: 10.1038/nature10117.
- LI F, CRAIGO J K, HOWE L, STECKBECK J D, COOK S, ISSEL C, MONTELARO R C, 2003. A live attenuated equine infectious anemia virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *J Virol*, 77(13):7244-7253. DOI: 10.1128/jvi.77.13.7244-7253.2003.
- LI X D, SUN L, SETH R B, PINEDA G, CHEN Z J, 2005. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49):17717-17722. DOI: 10.1073/pnas.0508531102.
- LICHTENSTEIN D L, RUSHLOW K E, COOK R F, RAABE M L, SWARDSON C J, KOCIBA G J, ISSEL C J, MONTELARO R C, 1995. Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J Virol*, 69(5):2881-2888. DOI: 10.1128/JVI.69.5.2881-2888.1995.

- LIU B, ZHANG M, CHU H, ZHANG H, WU H, SONG G, WANG P, ZHAO K, HOU J, WANG X, ZHANG L, GAO C, 2017a. The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination. *Nat Immunol*, 18(2):214-224. DOI: 10.1038/ni.3641.
- LIU C, WANG X F, WANG Y, CHEN J, ZHONG Z, LIN Y, WANG X, 2019. Characterization of EIAV env Quasispecies during Long-Term Passage In Vitro: Gradual Loss of Pathogenicity. *Viruses*, 11(4). DOI: 10.3390/v11040380.
- LIU S, CAI X, WU J, CONG Q, CHEN X, LI T, DU F, REN J, WU Y T, GRISHIN N V, CHEN Z J, 2015. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*, 347(6227):aaa2630. DOI: 10.1126/science.aaa2630.
- LIU S, CHEN J, CAI X, WU J, CHEN X, WU Y T, SUN L, CHEN Z J, 2013. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife*, 2:e00785. DOI: 10.7554/eLife.00785.
- LIU W, LI J, ZHENG W, SHANG Y, ZHAO Z, WANG S, BI Y, ZHANG S, XU C, DUAN Z, ZHANG L, WANG Y L, JIANG Z, LIU W, SUN L, 2017b. Cyclophilin A-regulated ubiquitination is critical for RIG-I-mediated antiviral immune responses. *Elife*, 6. DOI: 10.7554/eLife.24425.
- LIUYU T, YU K, YE L, ZHANG Z, ZHANG M, REN Y, CAI Z, ZHU Q, LIN D, ZHONG B, 2019. Induction of OTUD4 by viral infection promotes antiviral responses through deubiquitinating and stabilizing MAVS. *Cell Res*, 29(1):67-79. DOI: 10.1038/s41422-018-0107-6.
- LOO Y M, GALE M, Jr., 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5):680-692. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.003.
- MA J, SHI N, JIANG C G, LIN Y Z, WANG X F, WANG S, LV X L, ZHAO L P, SHAO Y M, KONG X G, ZHOU J H, SHEN R X, 2011. A proviral derivative from a reference attenuated EIAV vaccine strain failed to elicit protective immunity. *Virology*, 410(1):96-106. DOI: 10.1016/j.virol.2010.10.032.
- MEYLAN E, CURRAN J, HOFMANN K, MORADPOUR D, BINDER M, BARTENSCHLAGER R, TSCHOPP J, 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437(7062):1167-1172. DOI: 10.1038/nature04193.
- MUKHERJEE A, MOROSKY S A, DELORME-AXFORD E, DYBDAHL-SISSOKO N, OBERSTE M S, WANG T, COYNE C B, 2011. The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog*, 7(3):e1001311. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001311.
- NANDI S, CHANDA S, BAGCHI P, NAYAK M K, BHOWMICK R, CHAWLA-SARKAR M, 2014. MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1. *PLoS One*, 9(3):e92126. DOI: 10.1371/journal.pone.0092126.
- NEIL S J, ZANG T, BIENIASZ P D, 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177):425-430. DOI: 10.1038/nature06553.
- OSHIUMI H, KOUWAKI T, SEYA T, 2016. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Front Immunol*, 7:200. DOI:

- 10.3389/fimmu.2016.00200.
- OSHIUMI H, MIYASHITA M, INOUE N, OKABE M, MATSUMOTO M, SEYA T, 2010. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe*, 8(6):496-509. DOI: 10.1016/j.chom.2010.11.008.
- PANG L L, YUAN X H, SHAO C S, LI M Z, WANG Y, WANG H M, XIE G C, XIE Z P, YUAN Y, ZHOU D M, SUN X M, ZHANG Q, XIN Y, LI D D, DUAN Z J, 2017. The suppression of innate immune response by human rhinovirus C. *Biochem Biophys Res Commun*, 490(1):22-28. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.169.
- PAYNE S L, PEI X F, JIA B, FAGERNESS A, FULLER F J, 2004. Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 78(5):2478-2485. DOI: 10.1128/jvi.78.5.2478-2485.2004.
- PEISLEY A, WU B, XU H, CHEN Z J, HUR S, 2014. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature*, 509(7498):110-114. DOI: 10.1038/nature13140.
- POLLARD V W, MALIM M H, 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol*, 52:491-532. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.491.
- QI N, SHI Y, ZHANG R, ZHU W, YUAN B, LI X, WANG C, ZHANG X, HOU F, 2017. Multiple truncated isoforms of MAVS prevent its spontaneous aggregation in antiviral innate immune signalling. *Nat Commun*, 8:15676. DOI: 10.1038/ncomms15676.
- QIAN W, WEI X, GUO K, LI Y, LIN X, ZOU Z, ZHOU H, JIN M, 2017b. The C-Terminal Effector Domain of Non-Structural Protein 1 of Influenza A Virus Blocks IFN-beta Production by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 3. *Front Immunol*, 8:779. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00779.
- REN H, YIN X, SU C, GUO M, WANG X F, NA L, LIN Y, WANG X, 2020a. Equine lentivirus counteracts SAMHD1 restriction by Rev-mediated degradation of SAMHD1 via the BECN1-dependent lysosomal pathway. *Autophagy*:1-18. DOI: 10.1080/15548627.2020.1846301.
- REN Z, DING T, ZUO Z, XU Z, DENG J, WEI Z, 2020b. Regulation of MAVS Expression and Signaling Function in the Antiviral Innate Immune Response. *Front Immunol*, 11:1030. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01030.
- SAAD J S, LOELIGER E, LUNCSFORD P, LIRIANO M, TAI J, KIM A, MILLER J, JOSHI A, FREED E O, SUMMERS M F, 2007. Point mutations in the HIV-1 matrix protein turn off the myristyl switch. *J Mol Biol*, 366(2):574-585. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.11.068.
- SAITO T, HIRAI R, LOO Y M, OWEN D, JOHNSON C L, SINHA S C, AKIRA S, FUJITA T, GALE M, Jr., 2007. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2):582-587. DOI: 10.1073/pnas.0606699104.
- SALINOVICH O, MONTELARO R C, 1986. Comparison of glycoproteins by two-dimensional mapping of glycosylated peptides. *Anal Biochem*, 157(1):19-27. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90190-9.
- SANCHEZ D J, MIRANDA D, Jr., MARSDEN M D, DIZON T M, BONTEMPS J R, DAVILA S J, DEL MUNDO L E, HA T, SENAATI A, ZACK J A, CHENG G, 2015. Disruption of Type I Interferon Induction by HIV Infection of T Cells. *PLoS One*, 10(9):e0137951. DOI:

- 10.1371/journal.pone.0137951.
- SELLON D C, FULLER F J, MCGUIRE T C, 1994. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res*, 32(2):111-138. DOI: 10.1016/0168-1702(94)90038-8.
- SHAHARABANY M, RICE N R, HIZI A, 1993. Expression and mutational analysis of the reverse transcriptase of the lentivirus equine infectious anemia virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 196(2):914-920. DOI: 10.1006/bbrc.1993.2336.
- SHAO H, ROBEK M D, THREADGILL D S, MANKOWSKI L S, CAMERON C E, FULLER F J, PAYNE S L, 1997. Characterization and mutational studies of equine infectious anemia virus dUTPase. *Biochim Biophys Acta*, 1339(2):181-191. DOI: 10.1016/s0167-4838(96)00229-4.
- SHI C S, QI H Y, BOULARAN C, HUANG N N, ABU-ASAB M, SHELHAMER J H, KEHRL J H, 2014. SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *J Immunol*, 193(6):3080-3089. DOI: 10.4049/jimmunol.1303196.
- SONG T, WEI C, ZHENG Z, XU Y, CHENG X, YUAN Y, GUAN K, ZHANG Y, MA Q, SHI W, ZHONG H, 2010. c-Abl tyrosine kinase interacts with MAVS and regulates innate immune response. *FEBS Lett*, 584(1):33-38. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.11.025.
- STAPLE D W, BUTCHER S E, 2003. Solution structure of the HIV-1 frameshift inducing stem-loop RNA. *Nucleic Acids Res*, 31(15):4326-4331. DOI: 10.1093/nar/gkg654.
- STEPHENS R M, CASEY J W, RICE N R, 1986. Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Science*, 231(4738):589-594. DOI: 10.1126/science.3003905.
- STREMLAU M, OWENS C M, PERRON M J, KIESSLING M, AUTISSIER P, SODROSKI J, 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977):848-853. DOI: 10.1038/nature02343.
- SUNE C, GOLDSTROHM A C, PENG J, PRICE D H, GARCIA-BLANCO M A, 2000. An in vitro transcription system that recapitulates equine infectious anemia virus tat-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat activity demonstrates a role for positive transcription elongation factor b and associated proteins in the mechanism of Tat activation. *Virology*, 274(2):356-366. DOI: 10.1006/viro.2000.0480.
- TAKEUCHI O, AKIRA S, 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805-820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- TALLMADGE R L, BRINDLEY M A, SALMANS J, MEALEY R H, MAURY W, CARPENTER S, 2008. Development and characterization of an equine infectious anemia virus Env-pseudotyped reporter virus. *Clin Vaccine Immunol*, 15(7):1138-1140. DOI: 10.1128/CVI.00088-08.
- UMUNNAKWE C N, LOYD H, CORNICK K, CHAVEZ J R, DOBBS D, CARPENTER S, 2014. Computational modeling suggests dimerization of equine infectious anemia virus Rev is required for RNA binding. *Retrovirology*, 11:115. DOI: 10.1186/s12977-014-0115-7.
- VARGA Z T, GRANT A, MANICASSAMY B, PALESE P, 2012. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane

- potential. *J Virol*, 86(16):8359-8366. DOI: 10.1128/JVI.01122-12.
- VAZQUEZ C, HORNER S M, 2015. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J Virol*, 89(14):6974-6977. DOI: 10.1128/JVI.01918-14.
- VITOUR D, DABO S, AHMADI POUR M, VILASCO M, VIDALAIN P O, JACOB Y, MEZEL-LEMOINE M, PAZ S, ARGUELLO M, LIN R, TANGY F, HISCOTT J, MEURS E F, 2009. Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J Biol Chem*, 284(33):21797-21809. DOI: 10.1074/jbc.M109.018275.
- WANG J, WEN S, ZHAO R, QI J, LIU Z, LI W, AN J, WOOD C, WANG Y, 2017. Covalent conjugation of the equine infectious anemia virus Gag with SUMO. *Biochem Biophys Res Commun*, 486(3):712-719. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.103.
- WANG R, ZHU Y, LIN X, REN C, ZHAO J, WANG F, GAO X, XIAO R, ZHAO L, CHEN H, JIN M, MA W, ZHOU H, 2019. Influenza M2 protein regulates MAVS-mediated signaling pathway through interacting with MAVS and increasing ROS production. *Autophagy*, 15(7):1163-1181. DOI: 10.1080/15548627.2019.1580089.
- WANG X, WANG S, LIN Y, JIANG C, MA J, ZHAO L, LV X, WANG F, SHEN R, KONG X, ZHOU J, 2011. Genomic comparison between attenuated Chinese equine infectious anemia virus vaccine strains and their parental virulent strains. *Arch Virol*, 156(2):353-357. DOI: 10.1007/s00705-010-0877-8.
- WANG X F, WANG S, LIU Q, LIN Y Z, DU C, TANG Y D, NA L, WANG X, ZHOU J H, 2014. A unique evolution of the s2 gene of equine infectious anemia virus in hosts correlated with particular infection statuses. *Viruses*, 6(11):4265-4279. DOI: 10.3390/v6114265.
- WANG Y, TONG X, YE X, 2012. Ndfip1 negatively regulates RIG-I-dependent immune signaling by enhancing E3 ligase Smurf1-mediated MAVS degradation. *J Immunol*, 189(11):5304-5313. DOI: 10.4049/jimmunol.1201445.
- WEI C, NI C, SONG T, LIU Y, YANG X, ZHENG Z, JIA Y, YUAN Y, GUAN K, XU Y, CHENG X, ZHANG Y, YANG X, WANG Y, WEN C, WU Q, SHI W, ZHONG H, 2010. The hepatitis B virus X protein disrupts innate immunity by downregulating mitochondrial antiviral signaling protein. *J Immunol*, 185(2):1158-1168. DOI: 10.4049/jimmunol.0903874.
- WEN C, YAN Z, YANG X, GUAN K, XU C, SONG T, ZHENG Z, WANG W, WANG Y, ZHAO M, ZHANG Y, XU T, DOU J, LIU J, XU Q, HE X, WEI C, ZHONG H, 2012. Identification of tyrosine-9 of MAVS as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *PLoS One*, 7(7):e41687. DOI: 10.1371/journal.pone.0041687.
- XIANG W, ZHANG Q, LIN X, WU S, ZHOU Y, MENG F, FAN Y, SHEN T, XIAO M, XIA Z, ZOU J, FENG X H, XU P, 2016. PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1. *Sci Adv*, 2(7):e1501889. DOI: 10.1126/sciadv.1501889.
- XU L, PENG L, GU T, YU D, YAO Y G, 2019. The 3'UTR of human MAVS mRNA contains multiple regulatory elements for the control of protein expression and subcellular localization. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1862(1):47-57. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.10.017.

- XU L G, WANG Y Y, HAN K J, LI L Y, ZHAI Z, SHU H B, 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, 19(6):727-740. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.08.014.
- XUE B, LI H, GUO M, WANG J, XU Y, ZOU X, DENG R, LI G, ZHU H, 2018. TRIM21 Promotes Innate Immune Response to RNA Viral Infection through Lys27-Linked Polyubiquitination of MAVS. *J Virol*, 92(14). DOI: 10.1128/JVI.00321-18.
- YONEYAMA M, KIKUCHI M, MATSUMOTO K, IMAIZUMI T, MIYAGISHI M, TAIRA K, FOY E, LOO Y M, GALE M, Jr., AKIRA S, YONEHARA S, KATO A, FUJITA T, 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 175(5):2851-2858. DOI: 10.4049/jimmunol.175.5.2851.
- YONEYAMA M, KIKUCHI M, NATSUKAWA T, SHINOBU N, IMAIZUMI T, MIYAGISHI M, TAIRA K, AKIRA S, FUJITA T, 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, 5(7):730-737. DOI: 10.1038/ni1087.
- YOU F, SUN H, ZHOU X, SUN W, LIANG S, ZHAI Z, JIANG Z, 2009. PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat Immunol*, 10(12):1300-1308. DOI: 10.1038/ni.1815.
- YOULE R J, VAN DER BLIEK A M, 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098):1062-1065. DOI: 10.1126/science.1219855.
- ZHANG L, LIU J, QIAN L, FENG Q, WANG X, YUAN Y, ZUO Y, CHENG Q, MIAO Y, GUO T, ZHENG X, ZHENG H, 2018. Induction of OTUD1 by RNA viruses potently inhibits innate immune responses by promoting degradation of the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *PLoS Pathog*, 14(5):e1007067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007067.
- ZHOU X, YOU F, CHEN H, JIANG Z, 2012. Poly(C)-binding protein 1 (PCBP1) mediates housekeeping degradation of mitochondrial antiviral signaling (MAVS). *Cell Res*, 22(4):717-727. DOI: 10.1038/cr.2011.184.

致 谢

犹记得第一次来兽研也是这样的天气，风有点大，天很蓝，心中充满了激动的心情，想要在这里留下自己的足迹。三年时光转瞬即逝，耳边还回荡着第一次开会时刘处对我们说要把握好这三年，时间真的很短。短暂的三年收获了很多，从一个懵懂无知的试验小白，到能够合理安排自己的试验，阅读外文文献并提出自己的问题及想法，希望自己能够在成长的路上继续探索。

首先，特别感谢我的导师杜承副研究员。您的好脾气容忍我一次又一次犯错，总能够耐着性子为我解释试验原理方法，您推荐的那些经典文章都为我提供了指导也让我及时了解相关领域的最新研究进展。您对于新方法新仪器的研究有非常大的冲劲，鼓励我跟中心仪器室的老师多交流，也让我慢热的性格在适应新方法时不怕出错。

还要感谢马传染病与慢病毒病创新团队首席科学家王晓钧研究员，您对试验细节的把控，对实验室环境的监管以及对每个人试验思路的指导都令我们在实验中发散思维并付诸于实践。感谢林跃智副研究员、王雪峰副研究员、那雷副研究员、胡哲副研究员、郭巍副研究员、戚亭副研究员、刘荻菽副研究员、孙留克博士对我的帮助。感谢一起奋斗的 2018 级马病团队的硕士研究生陈克伟同学、马官芹同学、张佳琦同学、纪玉洁同学、高敏同学以及吉林农大联合培养硕士张萌萌同学，一起经历开题中期毕业答辩的重要时间点都有你们的相互监督与陪伴。感谢任会玲师姐、郭兴师兄、于萌萌师姐、李继伟师姐，扩展了很多思路。感谢马病团队 2016 级研究生刘聪师兄、林朝辉师兄、孙金辉师兄、宋丹丹师姐、王玉杰师姐在我刚入学时对我的照顾让我熟悉尽快熟悉实验室。感谢马病团队 2017 级研究生段盈伊师姐、刘燕飞师姐、王岩师姐、徐菱师姐、王宁师兄、白博文师兄、郭奎师兄教会我实验室常用的各种试验方法。感谢马病团队的师弟师妹们张媛、张樱智、屈玉杏、王金慧、李帅杰、何聆瑜、杨光璞、李鸿鑫、韩佳岐你们在维护实验室卫生及稳定运行方面做出的贡献。

再次特别感谢兽医学院的老师同学们，对我课程学习阶段以及日常生活中的帮助与鼓励。希望兽医学院 2018 级研究生都能平安顺利，万事胜意，日日自新。由衷的感谢哈尔滨兽医研究所给我们提供了如此全面顶级的科研平台，让我们无惧追梦，奋力前行。

最后感谢我的家人，对我学业的支持，虽然辛丑年还未团圆，待完成学业，归家团聚。

本研究获得国家自然科学基金面上项目(31772720)以及黑龙江省自然科学基金面上项目(C2018071)的资助。

作者简介

王欣慧，女，1995年8月出生，山东省淄博市人。2014年9月考入青岛农业大学动物医学专业，2018年6月获得农学学士学位。2018年9月考入中国农业科学院研究生院攻读硕士学位，并开始进入哈尔滨兽医研究所马传染病与慢病毒病创新团队进行马传染性贫血病毒致病机制课题研究工作，师从杜承副研究员，研究方向为动物疫苗与分子免疫学，主要研究课题为马传染性贫血病毒蛋白与线粒体蛋白之间互作的分子机制。硕士期间的研究课题为“EIAV Gag 蛋白靶向线粒体抗病毒信号蛋白 MAVS 的机制研究”。

硕士期间发表的学术论文：

DU C, DUAN Y, WANG X F, LIN Y, NA L, WANG X, CHEN K, WANG X, 2019. Attenuation of Equine Lentivirus Alters Mitochondrial Protein Expression Profile from Inflammation to Apoptosis. *J Virol*, 93(21). DOI: 10.1128/JVI.00653-19.

段盈伊, 王欣慧, 陈克伟, 刘荻菽, 戚亭, 郭奎, 杜承, 王晓钧. 2020. 马 M2 型 CD163 单克隆抗体的制备及其在巨噬细胞极化类型检测中的应用. *中国预防兽医学报* 42(11): 1159-1166.

王欣慧, 段盈伊, 陈克伟, 王雪峰, 那雷, 杜承, 王晓钧. 2021. 基于 SYNJ2BP^{-/-}HEK293T 细胞系研究 SYNJ2BP 对 EIAV 复制的影响. *中国预防兽医学报*(已接收).