



评述

病毒蛋白质组学: 病毒学研究前沿

周圣涛^{①②†}, 刘锐^{②†}, 赵霞^{①*}, 黄灿华^{②*}, 魏于全^②

① 四川大学华西第二医院妇产科, 成都 610041;

② 四川大学华西医院, 生物治疗国家重点实验室, 成都 610041

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xia-zhao@126.com; hcanhua@hotmail.com

收稿日期: 2010-06-13; 接受日期: 2010-08-09

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB910703)和国家科技重大专项(批准号: 2008ZX10002-009)资助项目

摘要 病毒寄生于宿主细胞中, 需要不断地适应和改变宿主的环境. 它们能够编码多种多功能蛋白质, 这些蛋白能与宿主蛋白发生一系列的相互作用以完成病毒的各种功能. 迄今, 尽管许多病毒的基因组已测序完成, 但由于受到病毒影响而发生相应改变的宿主蛋白组、宿主蛋白翻译后修饰, 以及蛋白酶剪接过程还未被完全阐明. 近年来新兴的高通量技术, 如基于质谱技术的定量或半定量蛋白组方法, 已被广泛应用于病毒宿主相互作用的研究中, 且有望在上述领域取得突破性进展. 本综述主要探讨蛋白质组学研究中的病毒颗粒蛋白质组学, 病毒结构蛋白质组学和病毒影响的宿主蛋白质组学等病毒蛋白质组学中的前沿领域.

关键词

病毒

蛋白质组学

病毒颗粒蛋白质组学

病毒宿主相互作用

各种病毒学研究虽然具有不同程度的生物危害性, 但其在生物学研究中的地位却是无法替代的. 以前的研究极大地加深了人们对病毒蛋白结构、功能以及及与宿主蛋白相互作用等方面的理解. 更重要的是, 这些研究从一定程度上阐释了病毒在基因表达调控、分子伴侣调控、阻遏蛋白-操作基因相互作用、DNA复制、转录延伸和终止、RNA剪接、免疫调控以及细胞癌化等方面对宿主的影响^[1]. 但目前为止, 仅对少数的病毒蛋白质进行了深入的研究, 而有关病毒自身蛋白质以及其与病毒宿主蛋白质相互作用的具体机制尚不完全清楚.

蛋白质组学是一种新兴的高通量分析技术, 它与基因组学方法相结合, 能在总体层面上阐释蛋白-蛋白相互作用以及细胞生物学事件, 有助于发现各

因子之间全新的联系. 特别是基于质谱的蛋白质组学方法, 它不仅能深入分析单个蛋白, 还能对总体蛋白表达谱进行分析^[2,3]. 但是, 蛋白质组学方法也有一定的局限性, 如蛋白质本身的复杂性、亚细胞定位的不均一性以及高丰度蛋白对低丰度蛋白鉴定的干扰等^[4,5]. 近年来, 差异蛋白质组学和定量蛋白质组学方面的进展从一定程度上解决了上述问题, 有望成为蛋白质研究的又一有力工具.

过去的几十年中, 蛋白质组学在病毒学中的应用引起了人们的广泛关注. 针对病毒感染的宿主研究阐释了诸多病毒宿主相互作用的分子事件, 为病毒相关疾病的诊断和治疗提供了重要线索. 本文总结了病毒颗粒蛋白质组学研究 and 病毒宿主相互作用, 同时介绍了应用于病毒学研究的各种相关蛋白质组学技术.

1 病毒颗粒蛋白质组学

病毒的基因组包裹在带正电的蛋白衣壳中以适应宿主环境. 在某些情况下, 病毒颗粒甚至具有更外层的荚膜层和囊膜层. 尽管蛋白衣壳是由病毒编码的蛋白所构成, 但是病毒被膜同时包含了病毒蛋白和来自宿主的成分, 包括蛋白质和碳水化合物. 病毒利用这些构件完成感染、复制及传播, 包括组装、释放、传染、附着、渗透和去衣壳等过程^[6]. 因此对病毒蛋白构件的研究有利于阐释病毒结构和病毒附着及侵入宿主的机制.

与真核细胞蛋白组相比, 病毒蛋白组相对简单而保守. 然而, 目前人类只对极少数的病毒蛋白组有较明确的认识. 常规的病毒颗粒蛋白质组学研究包括病毒颗粒纯化, 基于去垢剂的样本变性, 基于电泳的蛋白质分离, 以及基于免疫杂交或 Edman 降解测序的蛋白质鉴定^[7]. 近年来, 多种技术的联用成为一种有效的策略. 例如, 通过蛋白质双向凝胶电泳和质谱技术联用(称为“鸟枪法”)可以获得大量的病毒蛋白信息. 另一种方法, 利用多种蛋白酶酶解全病毒颗粒或溶解病毒蛋白. 所得的蛋白提取物被降解为肽段, 并通过蛋白质单向凝胶或多向液相色谱进行分离, 最终进行质谱鉴定. 这两种方法都需要专门的数据

库和生物信息学算法, 以鉴定肽段碎片和相当的蛋白质. 这些技术的联用已在病毒蛋白质组学研究中表现出极大的应用价值(表 1).

1.1 无包膜病毒

目前, 也有一些蛋白质组学研究致力于分析无包膜的真核细胞病毒, 其中研究得最为深入的是腺病毒. 2002 年, 一项研究利用单向和双向色谱与质谱联用, 分离和鉴定了 5 型腺病毒颗粒的蛋白构件. 在 154 个肽段中共鉴定得到 11 个病毒蛋白. 尽管 23 kD 的病毒蛋白酶只在双向色谱策略中被鉴定到, 其他主要病毒蛋白构件都在单向和双向色谱策略中同时被鉴定得到^[8]. 该研究认为, 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)为鉴定全病毒(含有 10 个以上拷贝数的病毒)蛋白提供了有力的工具.

1.2 包膜 DNA 病毒

病毒蛋白组最早被确定的 DNA 病毒是鲑鱼疱疹病毒(ictalurid fish herpes virus). 在该研究中, 纯化的病毒颗粒通过 NP-40 增溶, 然后通过凝胶分离, 电印迹以及包括胰蛋白酶在内的多种蛋白酶酶解蛋白条带, 得到大量肽段片段, 最后利用 MALDI-MS 对所得肽段片段进行分析, 并将所得肽指纹在 Swiss-Prot

表 1 基于 MS 的蛋白质组学策略鉴定的病毒蛋白质组

病毒	宿主	蛋白质组学鉴定 蛋白数(新蛋白数)	鉴定的宿主 蛋白数	分离方法/质谱	文献
5 型腺病毒	人	11(2)	ND ^{a)}	RPLC/LC-ESI-MS/MS	[8]
鲑鱼疱疹病毒	鱼	16(ND)	ND	1D-GE/MALDI-MS	[9]
牛痘病毒	人	80(13)	24	2D-LC(SCX 和 RP)/ESI-MS/MS	[10]
牛痘病毒	人	75(10)	23	2D-LC(SCX 和 RP)/ESI-QTOF-MS	[11]
牛痘病毒	人	63(2)	ND	1DE 或 RPLC/ MALDI-TOF/TOF-MS, LC-ESI-QTOF-MS 或 LC-ESI-QIT-MS	[12]
人巨细胞病毒	人	21(6)	ND	负黏度-正密度梯度离心; 1D-GE/MS	[13]
鼠巨细胞病毒	鼠	58(20)	7	1D-GE/nano-RP-HPLC-ESI-QTOF-MS	[14]
EB 病毒	人	41(ND)	6	ICAT/MS/MS	[15]
Kaposi 肉瘤相关疱疹 病毒	人	24(5)	21	1D-GE/nano-RP 偶联 ESI-MS/MS	[16]
恒河猴病毒	猴	33(3)	ND	2D-LC(SCX 和 RP)/ESI-MS/MS	[17]
白斑综合征病毒	虾	18(14)	ND	1D-GE/MALDI-TOF ESI-MS	[18]
白斑综合征病毒	虾	45(13)	ND	RPLC/MALDI-TOF/TOF-MS	[19]
SARS 冠状病毒	人	4(4)	ND	2D-GE/LC-ESI-MS	[20]
I 型人类免疫缺陷病毒	人	14(ND)	253	1D-GE/MALDI-TOF RPLC-ESI-MS/MS	[21]
I 型人类免疫缺陷病毒	人	10(ND)	12	RPLC-MS/MS	[22]
鼠 γ 疱疹病毒 68	鼠	17(5)	5	1D-GE/LC-MS/MS	[23]
人巨细胞病毒	人	71(12)	70	2D-LC(SCE 和 RP)/FTICR/MR 和 LC-MS/MS	[24]

a) ND: 未定

数据库中进行搜索. 最终, 该病毒蛋白质组学研究鉴定得到了包括成熟衣壳蛋白、蛋白酶、C3HC4 型锌指蛋白以及肌动蛋白在内的 16 个结构蛋白^[9]. 上述质谱和序列数据库检索联用的策略已经在解析包括痘类病毒和疱疹病毒在内的 DNA 病毒的蛋白酶解产物中被广泛应用.

虽然多数痘类病毒的基因组已测序完成, 但只有少数研究致力于全面地分析牛痘病毒的蛋白构件^[25]. 尽管早期的蛋白质组学研究尝试解析纯化的牛痘病毒蛋白构件, 但却没能完整地鉴定到病毒颗粒的蛋白构件, 这可能受制于当时落后的病毒纯化方法和蛋白鉴定方法. 近年来, 3 个独立的科研小组利用不同的技术、设备和酶解方法, 全面解析了具有传染性的成熟牛痘病毒颗粒的蛋白构件^[10-12]. Resch 等人^[10]利用 SDS 或尿素变性、固相萃取分离和 LC-ESI-LTQ 傅里叶变换质谱鉴定到 80 个病毒编码蛋白, 在早期由基因组测序得到的 218 个牛痘病毒基因中占 37%. 在鉴定到的蛋白中, 有 13 个蛋白(H5, F8, E3, E6, A6, N1, C22, A11, A19, M1, A50, E9 和 F4)未被报道过.

在过去几年中, 对疱疹病毒的研究加深了人们对病毒结构和早期病毒蛋白功能的认识^[26]. 目前, 蛋白质组学方法已经用于多种疱疹病毒的研究中, 包括 beta 疱疹病毒中的人巨细胞包含体病毒(HCMV)^[13]和鼠巨细胞病毒^[14]以及 gamma 疱疹病毒中的 EB 病毒^[17], Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)^[16,27,28], 恒河猴病毒(RRV)^[17]和鼠 gamma 疱疹病毒 68(MHV68)^[29]. 尽管 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)的病毒学行为已被广泛研究, 但目前关于其所属的 alpha 疱疹病毒的蛋白质组学研究还未见报道.

另一个应用多种蛋白质组学方法研究包膜 DNA 病毒的例子是白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV). WSSV 具有长达 305 kb 的环状 DNA 和 181 个预测的可读框(open reading frame, ORF). 2002 年, Huang 等人^[18]通过蛋白凝胶分离 WSSV 病毒蛋白, 共有 24 个蛋白条带被剪切、酶解, 并进行 MALDI-TOF 和电喷射离子化串联质谱分析. 最终鉴定得到 18 个能与可读框匹配的蛋白, 其中的 14 个蛋白具有未知功能. 除 vp121 外, 其余鉴定到的蛋白都在 WSSV 感染中晚期表达; 在新鉴定得到的 14 个蛋白中, VP466 被进一步鉴定为衣壳蛋白. 有趣的是, 在最近的一项研究中, 利用等比重标记的相对或绝对的定量方法(iTRAQ™)分析病毒蛋白在 WSSV 颗粒

中的定位^[19]. 在该研究中, Li 等人^[19]报道了 45 个病毒蛋白, 其中 13 个蛋白与 WSSV 的相关性是首次报道. 鉴定得到 23 个包膜蛋白和 6 个核衣壳蛋白, 包括 12 个新型的包膜蛋白和 2 个核衣壳蛋白. 该研究是定量蛋白质组学技术成功应用于分析病毒蛋白定位的范例.

1.3 包膜 RNA 病毒

与应用蛋白质组学技术研究 DNA 病毒较多相比, 利用蛋白质组学进行 RNA 病毒研究相对较少, 这可能与 RNA 病毒结构简单, 病毒蛋白数量少有关. 因此, 应用高通量的蛋白质组学方法研究 RNA 病毒似乎没有必要. 目前在包膜 RNA 病毒的蛋白质组学研究中, 关于呼吸综合征相关的冠状病毒(SARS-CoV)和 1 型获得性免疫缺陷病毒(HIV-1)的解析较为深入.

2004 年, Zeng 等人^[20]利用单向蛋白凝胶和 ESI MS/MS 联用以及两相液相色谱和 ESI MS/MS 联用的策略, 解析了 SARS 病毒的蛋白构件. 纯化的 SARS 病毒样本来自被 BJ-01 株感染的 Vero E6 细胞. 他们鉴定到全部 4 个预测的结构蛋白(nucleocapsid [N], spike [S], membrane [M]和 envelope [E]), 同时发现 M 蛋白的一个新型磷酸化位点. 在该研究中, 凝胶依赖和凝胶不依赖方法联用的策略展示出快捷互补的特点, 提示在其他病毒研究中可能存在潜在的应用前景. 另一个关于 SARS 病毒的蛋白质组学研究发现了 3 个全新的病毒蛋白, 分别是 S, N 和 M 蛋白. 在 S 蛋白糖基化修饰的研究中, 通过对比原始的和去糖基化酶 PNGase F 处理的肽段质谱数据, 发现 4 个糖基化位点. 值得一提的是, 凝胶电泳和质谱分析也鉴定到一些较短的 N 蛋白亚型^[30]. 这些研究都表明, 病毒特异性蛋白的质谱鉴定可以有效地应用于筛选病毒、病毒感染细胞以及包含病毒的体液.

另一个研究得较多的 RNA 病毒是逆转录病毒 HIV. HIV 病毒通过特异性攻击巨噬细胞和 CD4⁺T 细胞危害宿主免疫系统. 多个研究组在 HIV 病毒颗粒中鉴定到宿主蛋白. 有研究尝试利用液相色谱与质谱联用的策略整体性地分析 HIV-1 蛋白组. 他们进一步利用传统的生物化学方法证明已知的病毒蛋白和宿主蛋白, 以及新型蛋白构件在 HIV 病毒颗粒中的存在^[21]. 另一个研究小组获得了来自人单核巨噬细胞的高纯度 HIV 病毒^[22]. 通过液相色谱和质谱联用

鉴定得到大量宿主蛋白, 包括 33 个已知蛋白. 这些蛋白质在宿主细胞中参与了细胞骨架装配、细胞黏附、胞内运输、分子伴侣、代谢、泛素依赖降解以及免疫调控等多个生理过程. 另一些鉴定到的蛋白, 如 annexins, annexins 结合蛋白, Rab 蛋白和其他一些蛋白参与了胞膜构成、囊泡运输及晚期内吞体的功能性活动; 而 apolipoprotein E 则参与了胆固醇转运, 免疫调节以及细胞生长分化调控. 以上结果有助于对 HIV 装配、感染和病原学特点的研究.

1.4 噬菌体

噬菌体是数量最多、多样性最强的生命形式, 它在微生物世界中有着不可或缺的地位. 迄今已有大量研究致力于解析噬菌体的蛋白构件. Savalia 等人^[31]利用液相色谱和电喷雾电离质谱法联用策略解析了一种新型的大肠杆菌噬菌体(phiEco32)的蛋白构件, 发现 2 个病毒蛋白(ECF 家族 σ 因子和 RNA 聚合酶结合蛋白)能够与宿主 RNA 聚合酶相互作用. 其中, ECF 家族 σ 因子对于某些病毒基因的转录起重要作用, 而 RNA 聚合酶结合蛋白(能够抑制转录活性)的具体作用机制还需进一步研究. Robert 等人^[32]利用等点聚焦联合 MALDI-TOF 解析了大肠杆菌噬菌体 T1. 早期研究认为, 在成熟的 T1 病毒颗粒中包含 13~15 个结构蛋白. 该研究中, 双向电泳也解析到相应的 15 个病毒蛋白. 质谱分析鉴定到 4 个高丰度蛋白: 主要尾蛋白(gp41)、主要衣壳蛋白(gp49)、主要头部亚基(gp47), 还有一个与主要头部亚基相结合的蛋白(gp48). 2006 年, Naryshkina 等人^[33]完成了对 pYS40(一种能够裂解 *Thermus thermophilus* 的有尾噬菌体)基因组测序. 该病毒基因组长 152372 bp, 包含 170 个预测的可读框和 3 个转运 RNA 基因. 通过与已知的相似的噬菌体或细菌的蛋白比较, 预测了 pYS40 1/4 的基因产物的功能. 这些蛋白的功能包括参与核苷酸补救途径, 如黄素依赖的胸腺嘧啶核苷酸合酶(flavin-dependent thymidylate synthase)、胸苷酸激酶(thymidylate kinase)、核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)和脱氧胞苷酸脱氨酶(deoxycytidylate deaminase)以及 DNA 复制过程, 如 DNA 引物合成酶(DNA primase)、A 型 DNA 聚合酶(type A DNA polymerase). 目前, 关于噬菌体颗粒组成的研究不断增加, 对于噬菌体基因组学及比较基因组学是十分重要的补充.

综上, 尽管越来越多的真核细胞病毒和噬菌体

基因组测序已经完成, 但只有其中很少一部分进行了蛋白质层面的解析. 未知的新基因产物的鉴定不仅能够帮助人们加深对病毒结构的理解, 还有助于阐明病毒宿主的相互作用. 更为重要的是, 病毒蛋白质组学的发展将有助于提高病毒相关疾病的诊断和治疗水平.

2 病毒宿主相互作用

尽管早在 1898 年, Beijerinck^[34]发现烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)时, 病毒宿主相互作用的概念便已存在, 但直到电子显微镜、蛋白质生物化学和核酸测序技术的应用, 病毒宿主相互作用的分子机制才逐步被阐明. 目前, 大量的研究着力于病毒蛋白和病毒或宿主蛋白的相互作用, 以及病毒感染导致的宿主蛋白质组学改变. 虽然已有大量文献报道病毒宿主蛋白相互作用事件, 但是距离全面理解不同病毒的各种生物学行为还相去甚远. 由于病毒感染过程高度复杂, 几乎每一种分子生物学技术都可以应用于该领域. 如今最常用的解析蛋白相互作用的策略是酵母菌双杂交体系(Y2H), 以及免疫共沉淀和质谱联用, 特别是前者适用于任何两个蛋白相互作用的高通量筛选. 而对于宿主蛋白质组学研究, 双向凝胶电泳与质谱联用的策略以及稳定同位素标记技术和质谱联用的策略都得到了很好地应用(表 2).

2.1 相互作用组学

常用的在蛋白组层面研究蛋白质相互作用的策略包括酵母菌双杂交体系和标记蛋白质的免疫沉淀与质谱联用. 两者的不同点在于: 酵母菌双杂交体系适用于二元蛋白相互作用分析, 而亲和技术与质谱联用的策略适合于解析二元或多元的蛋白复合物(图 1).

2.2 酵母双杂交体系

有别于基于质谱的蛋白质组学策略, 由 Fields 和 Song^[35]于 1989 年发明的酵母菌双杂交体系适于分析二元蛋白相互作用. 在酵母菌双杂交体系中, 诱饵蛋白与猎物蛋白能配对结合, 进而检测到同源或异源蛋白结合. 此外, 酵母菌双杂交体系对于实验条件的要求不如亲和实验严格, 因为诱饵蛋白和猎物蛋白的表达量处于相似的水平. 尽管这使得蛋白表达量处于非生理水平, 但却大大提高了系统灵敏度^[36]. 另

一方面，酵母菌双杂交体系也有其不足。首先，因为系统设计的原因，该体系不能解析多于 2 个蛋白的复合物；其次，因为蛋白在核内表达，所以不能模拟整合在胞膜中的蛋白。此外，某些蛋白以及转录因子能够独立激活报道基因的转录。同时，在酵

母菌细胞中，某些高等生物特有的蛋白翻译后修饰可能无法进行，使得这两类蛋白质相互作用无法为酵母菌双杂交体系所检测^[37]。

酵母菌双杂交体系在病毒蛋白相互作用研究领域应用广泛。最新的病毒蛋白相互作用数据库涵盖

表 2 各种病毒研究蛋白质组学策略优点与缺点比较

方法	应用	优点	缺点
酵母菌双杂交体系	蛋白质相互作用	高通量；适用于同种和异种分子间相互作用研究	处于非生理条件下；低检出率；不适用于多种分子间相互作用和翻译后修饰分析
串联亲和和纯化免疫沉淀与质谱技术偶联	蛋白质相互作用	改进后的免疫沉淀；允许多种分子间相互作用分析	低通量；处于非生理条件下
双向电泳与质谱技术偶联	蛋白表达分析	高通量；广泛应用；无需同位素标记	费力；受制于 SDS-PAGE 局限的 pI 和分子量范围
SILAC	蛋白表达分析	允许全蛋白质组分析；低误操作率	只适用于体外实验
ICAT	蛋白表达分析	允许全蛋白质组分析；可用于体内研究	只能分析含半胱氨酸的肽段；高误操作率
iTRAQ	蛋白表达分析	允许全蛋白质组分析；可用于体内和体外研究	高误操作率；依赖于高敏感性设备
¹⁸ O 标记	蛋白表达分析	经济	依赖于高敏感性设备

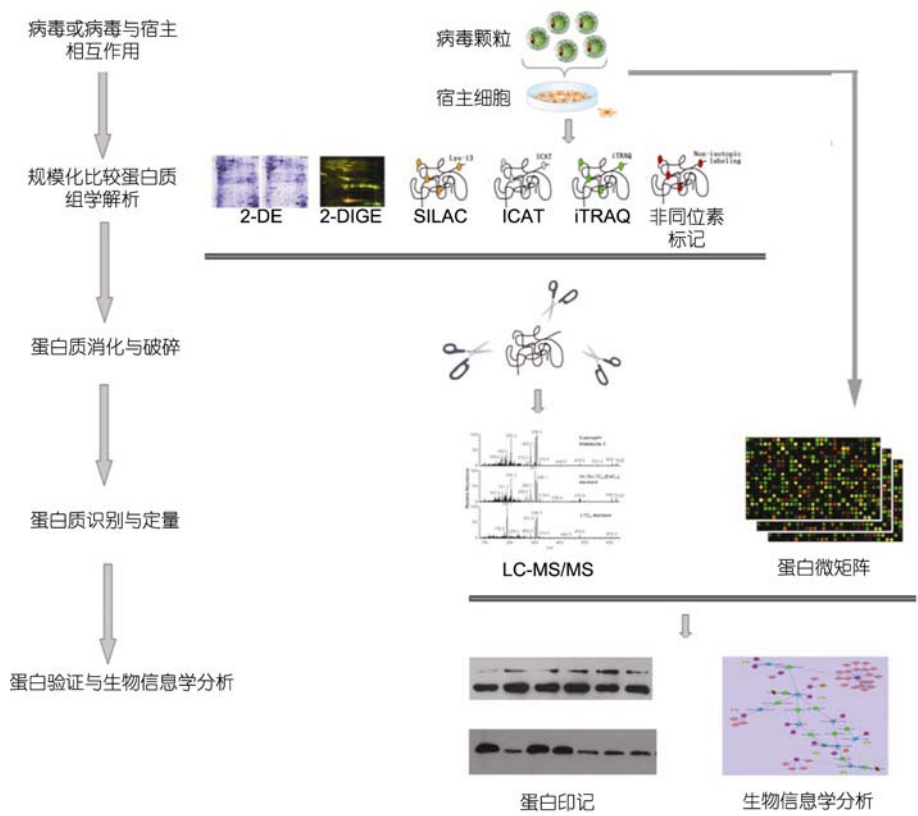


图 1 应用蛋白质组学策略分析规模化蛋白质表达谱研究路线图

病毒或病毒与宿主相互作用后样本蛋白表达谱通过规模化蛋白质组学策略进行分析(如 2-DE-MS, SILAC, ICAT, iTRAQ 或蛋白矩阵). 得到的差异蛋白表达谱通过诸如蛋白印记等方法做进一步验证, 可使用系统生物学软件进行系统分析

了 T7 噬菌体、牛痘病毒、Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒 (KSHV) 及水痘-带状疱疹病毒 (VZV)。早在 1996 年, Bartel 等人^[38]利用酵母菌双杂交系统在 T7 噬菌体的全蛋白水平上鉴定到 25 对蛋白相互作用。其中, 6 对相互作用与病毒 DNA 复制和 DNA 包裹相关; 其余几对都涉及相同的一段多肽序列。这些结果表明, 酵母菌双杂交系统在研究蛋白折叠中的重要作用。McCraith 等人^[39]通过酵母菌双杂交系统检测了牛痘病毒所有蛋白两两组合之间的相互作用。具体而言, 他们构建了一组包含 266 个假定病毒可读框的酵母菌转化子作为 Gal4 激活域杂交蛋白。每个假定病毒可读框所对应的转化子作为一个 Gal4-DNA 结合域杂交子, 并且表达双杂交报道基因的二倍体也被事先定义。在共计 70000 个组合中, 发现了 37 个蛋白-蛋白相互作用, 其中有 28 个未曾报道。这些相互作用的蛋白参与 DNA 复制、转录、病毒结构与形态发生以及病毒-宿主相互作用。另有研究报道了疱疹病毒(包括 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒和水痘-带状疱疹病毒)的病毒内蛋白质相互作用。将 89 个来自 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒基因组的可读框用于接受 12000 个病毒蛋白相互作用的测试, 最终检测到 123 个不重复且能够相互作用的蛋白组合。而在水痘-带状疱疹病毒的 69 个可读框及 10000 检测的诱饵猎物对中, 173 个不重复的病毒内蛋白相互作用关系得到证实。该实验建立了一个包含所有预测病毒内蛋白相互作用关系和已知病毒宿主蛋白相互作用关系的数据库, 预测了 8 个 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒蛋白与 20 个人类蛋白之间的 20 中相互作用关系^[28]。以上研究表明, 规模化的酵母菌双杂交体系对蛋白质相互作用的筛选可用于更为复杂基因组的测序。

2.3 串联亲和纯化

2004 年, Dziembowski 等人^[40]报道了串联亲和纯化技术。该技术需要一段融合的标签, 该标签可以被蛋白酶切割为两段。该技术已被广泛用于病毒学研究中。利用该技术, Jorba 等人^[41]解析了一个在宿主细胞中形成的包含流感病毒聚合酶的蛋白复合物。纯化得到的蛋白复合物包含流感病毒聚合酶的异源三聚体, 而在该实验中一系列不与流感病毒聚合酶结合的蛋白被用作对照。他们通过质谱技术鉴定复合物中的蛋白构成, 并通过免疫印记实验进行验证。在被感染的细胞中, 进一步发现复合物中的

蛋白与病毒核糖核蛋白的亚细胞定位类似, 提示这些蛋白在病毒感染中可能发挥作用。后续研究表明, 大部分与流感病毒聚合酶结合的宿主蛋白是核蛋白, 它们参与细胞 RNA 合成、修饰和出核运输; 而另一小部分蛋白则定位于胞浆, 参与 RNA 翻译和转运。该研究所展示的病毒宿主蛋白相互作用表明, 宿主蛋白不但参与 RNA 的复制和转录, 同时参与了病毒感染周期的调控。Mayer 等人^[42]利用 strep 标记的流感病毒核蛋白(NP-Strep)和 TAP 标记的流感病毒聚合酶亚基(TAP tag)为诱饵, 解析了与流感病毒核糖核蛋白相关复合物。利用 NP-Strep 共鉴定到 41 个蛋白, 其中 4 个蛋白在使用 TAP tag 的实验中也鉴定到, 分别是 importin- β 3, PARP-1 以及另两个聚合酶相关因子。该研究验证了 TAP 技术在蛋白复合物解析中的有效性。然而相比于其他技术, TAP 的通量性较低, 限制了该技术的应用。

2.4 体外 pull-down 实验

由于酵母菌双杂交系统仅是鉴定蛋白相互作用的初步筛选实验, 因此, 其可靠性还需其他 pull-down 实验进行验证。该技术需要在其他生物体中表达其中一个或两个潜在作用的蛋白, 并同在 C 端或 N 端加入 His6 和 GST 标签以便进行后期纯化。如果仅有一个蛋白是重组蛋白, 那么另一个蛋白则必须是天然的纯化产物^[37]。该技术已应用于多项研究中。近期有报道利用 GST pull-down 和免疫共沉淀技术研究在 HBV 相关的肝病中垂体肿瘤转化基因-1(pituitary tumor-transforming gene 1, *PTTG1*)的生物学行为^[43]。结果表明, HBX 蛋白可能通过与 PTTG1 和/或 SCF 结合, 从而破坏原有的 PTTG1 和 Skp1-Cul1-F-box 泛素连接酶复合体(SCF)结合。由此可见, 在病毒学研究中, pull-down 可作为酵母菌双杂交实验的验证实验。该技术在研究病毒宿主相互作用中具有重要意义^[26]。

2.5 GFP 标签研究动态的病毒蛋白结合

尽管酵母菌双杂交体系能够高通量地分析蛋白相互作用, 但是却不能检测病毒感染过程中的动态信息。有报道^[44]将免疫沉淀方法优化, 通过使用绿色荧光蛋白, 能检测病毒蛋白结合的动态信息。该方法包含用 GFP 蛋白标记病毒, 在不同感染时期该蛋白在宿主细胞中的可视化监测, 在不同感染时期利用 GFP 亲和柱纯化相互作用蛋白, 利用质谱进行鉴定。通过该

方法, 解析了 α -virus 的 Sindbis nsP3 蛋白在不同感染时期与宿主蛋白结合情况. 该研究表明, 宿主蛋白随着感染的进行不断被募集到包含 nsP3 的复合体上. 在该过程中, G3BP 在感染初期开始就被不断募集到复合体上; 而 14-3-3 蛋白则在较晚时期才开始募集到复合体上. 该研究不仅证实了 Sindbis 感染能改变 RNA 运输, 同时也是新型高通量技术在病毒感染宿主细胞蛋白质-蛋白质相互作用研究中应用的典型例子.

2.6 蛋白相互作用筛选与基于 RNAi 的功能性筛选

上述技术仅能用于确定蛋白间是否具有相互作用, 却不能确定蛋白相互作用的生物学意义. 近年来发展的基于 RNAi 的基因沉默技术适用于在步入动物细胞内研究某个蛋白的功能. 现在, 大规模 RNAi 库已经建立起来, 使得人们可以沉默所有由人类基因编码的蛋白. 如今, 沉默靶基因 RNA 技术联合生物信息学分析已有效应用于包括 HIV, 黄病毒(flaviviruses)和流感病毒等病毒感染中宿主蛋白因子功能的阐述和分析. 从而使 RNAi 分析和蛋白相互作用分析能够有机地结合^[45]. Brass 等人^[46]和 König 等人^[47]为了筛选 HIV 感染复制所需的宿主蛋白, 分别鉴定到 184 和 295 个蛋白, 其中 13 个蛋白相同. 通过整合 RNAi

分析和蛋白相互作用分析数据, 建立了一个 HIV 宿主相互作用网络, 包括 213 个已确认和 169 个预测的节点蛋白, 2219 对宿主蛋白相互作用, 318 对宿主蛋白与 HIV 蛋白相互作用. 这些研究利用 RNAi 技术确认了 HIV 与宿主相互作用的病毒学表型, 同时也为解释这些表型提供了线索.

3 蛋白表达分析

液相质谱和蛋白质序列数据库搜索的联用已成功应用于总蛋白表达谱的研究, 主要技术包括: 双向凝胶电泳(2-DE)和稳定同位素标记(图 2).

3.1 2-DE

目前, 因为操作简便和实用性广的特点, 基于 2-DE 的蛋白分离技术和基于质谱的蛋白鉴定技术的联合是应用最为广泛的研究全蛋白表达策略. 目前, 这种策略已经应用于病毒学研究中, 包括 HBV, EBV, SARS-CoV, HCV 和 HIV-1. 2008 年, 为了研究 HBV 复制对宿主蛋白表达的影响, Tong 等人^[48]应用 2-DE 和质谱联用策略比较和鉴定了在能分泌 HBV 颗粒的 HepG2.2.15 细胞系和其平行到 HepG2 细胞系中差异

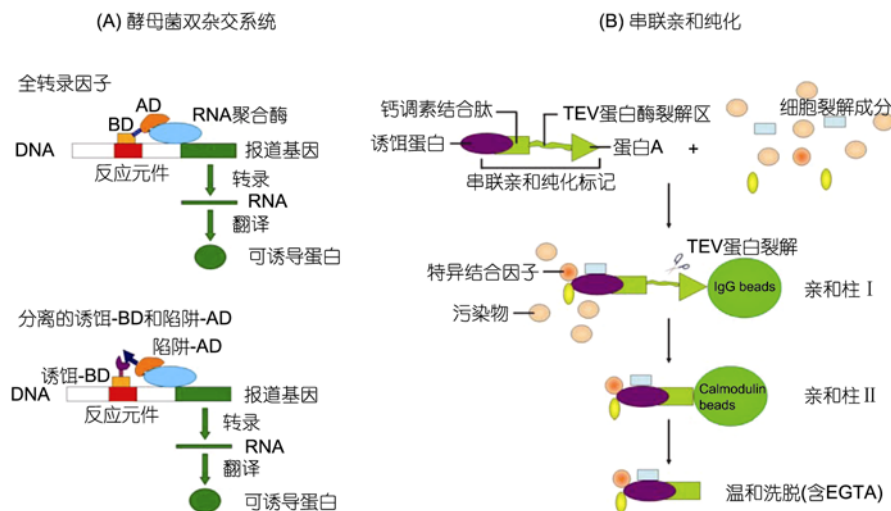


图 2 酵母菌双杂交系统和串联亲和纯化免疫沉淀法用于病毒蛋白质相互作用研究模式图

(A) 酵母菌双杂交系统需构建两种质粒(包括一个与转录因子 BD 的 C 末端相融合的诱饵蛋白和一个与 AD 相融合的猎物蛋白), 然后将这两种质粒转入相应的酵母菌体系中. 如果两种蛋白能够相互作用, BD 和 AD 就能够结合在一起形成具有功能的转录因子. 这种转录因子能够与报道基因上游启动子中特定的激活序列结合, 并激活它们的转录. 通过对报道基因表达的检测, 蛋白质间的相互作用就能够被监测. 而对于串联亲和纯化免疫沉淀, 靶细胞会表达一种融合标记, 它包括一个蛋白 A IgG 结合区域和一个被含有 TEV 蛋白酶特定识别的 spacer 间隔开的 CBP 标记; (B) 蛋白相互作用通过串联亲和纯化免疫沉淀步骤. AD: 激活域; BD: DNA 结合域; CBP: 钙调素结合肽; TAP: 串联亲和纯化; TEV: 烟草病毒

TEV: 烟草病毒

表达的蛋白质, 共鉴定到 62 个差异表达蛋白. 蛋白簇和信号通路分析发现, 这些蛋白涉及视黄醇代谢、钙离子结合、蛋白质降解等功能. 该研究为 HBV 和宿主相互作用以及 HBV 向光的 HCC 发展提供了新观点. 在另一项报道中, 2D-GE-MALDI-TOF-MS 被用来研究 HBV 相关的肝癌临床标本. 共鉴定到 100 个蛋白, 涉及 80 个不同的基因产物. 其中增殖细胞抗原 (proliferating cell antigen) 和微管去稳蛋白 1 (stathmin 1) 的差异表达通过 Western blot 进一步得到确认. 在关于 EBV 引起的宿主蛋白表达改变的研究中, 以 EBV 转化的 B 淋巴母细胞系 (LCLs) 为模型, 通过对比永生化前后的蛋白表达差异, 研究细胞永生过程中的关键蛋白. 共鉴定到来自 32 个蛋白点的 20 个不同蛋白, 包括上调的增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen)、核苷二磷酸激酶 A (nucleoside diphosphate kinase-A) 和泛素 C 末端水解酶 (ubiquitin C-terminal hydrolase), 以及下调的泛素连接酶 N (ubiquitin ligase N) 和微管去稳蛋白^[49]. 在对 HIV 研究中, Coiras 等人^[50]应用 2-D DIGE 和 MS 联用策略来研究 HIV-1 tat 蛋白对 Jurkat T 细胞的影响. 有趣的是, 该研究鉴定得到一系列结构蛋白, 如 actin, β -tubulin, annexin II, gelsolin, cofilin 和 Rac/Rho-GDI complex, 这些蛋白对于 HIV 病毒感染的 CD4⁺ T 细胞持续存活具有重要意义, 而这也是 HIV 病毒在体内能够不断复制的原因.

3.2 SILAC

新兴的差异蛋白组学技术: 细胞培养稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC) 在分析蛋白表达中显示出很高的应用价值. 在 SILAC 技术中, 细胞通过在含有稳定低丰度同位素标记的氨基酸 (如 ^{15}N , ^{13}C 和 ^2D) 或含有稳定高丰度同位素标记的氨基酸 (如 ^{14}N , ^{12}C 和 ^1H) 的培养基中生长, 同时进行标记. 蛋白的丰度通过来自标记和未标记样本的离子峰的强度来计算, 经常用于病毒感染宿主细胞后的蛋白表达分析^[51]. Mannova 等人^[52]应用 2-DE 和 SILAC 技术分析 HCV 对细胞脂筏蛋白组的影响. 2-DE 鉴定得到 100 个蛋白, 而 SILAC 技术则鉴定得到 1036 个蛋白, 其中主要涉及囊泡运输、蛋白转运和信号传导. 通过 RNA 干扰 GTPases Cdc42 和 RhoA 的表达, 发现 HCV 复制水平也随之上升; 相反, 降低 syntaxin 7 的表达则引起

HCV 复制水平的下降. 而在最近的研究中, Zhang 等人^[53]建立了表达 SARS-CoV 亚基因组复制子的细胞系, 以筛选 SARS-CoV 复制的抑制因子. 他们利用 SILAC 与质谱联用的策略比较 SARS-CoV 复制子细胞与其平行的 BHK21 细胞的蛋白表达情况, 以筛选 SARS-CoV RNA 复制中的关键宿主蛋白. 在 1081 个宿主蛋白中, 74 个蛋白出现明显的表达改变; 其中, 对参与了细胞生存、应激、增殖、迁移和凋亡的多功能分子 BCL2-associated athanogene 3 (BAG3) 做了进一步研究. 结果显示, RNA 干扰沉默 BAG3 表达能显著地抑制 SARS-CoV 的复制, 提示其在 SARS-CoV 复制中起关键作用.

3.3 实验后标记法

SILAC 技术依赖于在实验前对细胞进行标记, 只能进行体外实验. 化学同位素标记方法能在细胞裂解后 (实验后标记) 对蛋白质和肽段进行标记. 理论上, 该方法能同时应用于体外和体内实验. 该技术将蛋白质或肽段的 amine-NH₂, thiol-SH 和 -COOH 等活性基团用同位素稳定标记后, 对蛋白质样品等量混合并进行分析. 在该技术中, 同位素编码的亲标签技术 (isotope-coded affinity tag, ICAT) 标记 thiol 基团, iTRAQ 技术能标记所有氨基基团, 而 ^{18}O 标记在酶解过程中标记羧基^[51]. 对于 ICAT, 尽管对于半胱氨酸肽段的亲和纯化很大程度上降低了样品的复杂性, 但也影响了对含有半胱氨酸和胰凝乳蛋白酶切位点肽段的鉴定和定量. 有研究分别应用 ICAT, 2D-GE 及多向液相色谱联合质谱的策略鉴定被传染性造血组织坏死病毒感染的大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 中差异表达的蛋白^[54]. 主要的差异蛋白, 如自然杀伤细胞增强因子 (natural killer cell enhancement factor, NKEF)、组织蛋白酶原 L (procathepsin L)、产超氧化物 NADPH 氧化酶 (superoxide-producing NADPH oxidase) 和干扰素诱导病毒耐药蛋白 Mx (interferon-induced viral resistance protein Mx, IFI-Mx), 都与病毒感染过程相关. 2006 年, Go 等人^[55]应用 ICAT 技术分析被 flock house virus 感染的果蝇. 共鉴定到 1500 个宿主蛋白, 包括 150 个上调蛋白及 66 个下调蛋白. 蛋白功能性分析显示, 差异表达的蛋白涉及细胞增殖、凋亡和代谢信号传导等. 近期, 有学者分别应用 2D-GE 和 ICAT 技术分析在 SARS-CoV 感染的 vero E6 细胞中差异表达的蛋白. 2-DE 法鉴定出 63 个蛋白, 而使用 ICAT 方法共鉴定

到 322 个蛋白, 其中 119 个上调, 48 个下调, 提示 ICAT 在鉴定差异蛋白方面具有比传统 2-DE 更高的灵敏度^[56].

另一个稳定同位素标记方法是 iTRAQ, 它能够完成病毒感染细胞全蛋白提取物的实时定量. Li 等人^[19]利用 LC 系统和 MALDI-TOF MS/MS 联合对 WSSV 病毒做了进一步的蛋白质组学分析. 其中 7 个蛋白具有乙酰化的 N 末端. RT-PCR 确定了 13 个新鉴定到的病毒蛋白的表达. 有趣的是, 他们利用 iTRAQ 技术区分包 WSSV 的膜蛋白与核衣壳蛋白. 共计成功鉴定到 23 个包膜蛋白和 6 个核衣壳蛋白, 提示 iTRAQ 是一种高效鉴定病毒蛋白亚细胞定位的方法. 另一项研究利用 iTRAQ 技术比较了在石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)感染和非感染条件下, 鲈鱼胚胎细胞系(GEC)的蛋白表达情况. 共鉴定到 49 个病毒蛋白, 其中 11 个蛋白是首次报道. 另外, 还鉴定到 743 个宿主蛋白, 这些蛋白可归类到 218 个不同的蛋白分类中. 因此, 使用 iTRAQ 技术分析 SGIV 感染的鲈鱼胚胎细胞系为从蛋白层面上分析病毒宿主基因产物提供了新思路^[57].

在新兴的同位素标记技术中, ^{18}O 标记技术使用重水(D_2O)作为标记, 因此最为昂贵. 但是, 该技术的主要缺陷在于需要使用极高灵敏度的质谱来分析肽段间较低质量的差异, 如 2~4 原子质量单位^[58]. 在最近的研究中, 使用该技术研究 HIV-1 感染的 CD4 淋巴细胞系 CEMx174 中的病毒宿主相互作用. 在 HIV 感染条件下的 CEMx174 蛋白质组学变化通过 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 标记和 AMT 进行比较. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比率通过高敏的 FTICR-MS 质谱进行测定. 共鉴定到 3255 个不同的宿主蛋白, 其中 343 个下调. 蛋白功能分析显示,

差异蛋白的功能涉及核转运、泛素化、细胞周期及柠檬酸循环. 研究人员通过 Western blotting 对 CASP3, DLD, KPNA3, KPNB1, RAN, TPR 和 UBE1 7 个蛋白的表达进行了验证^[59].

综上, 尽管目前已报道的病毒宿主相互作用的高通路分析(HCV, herpesviruses, West Nile virus)令人鼓舞, 但更多病毒宿主相互作用的研究仅限于低通量的分析. 已报道的数据仅能给人们一个非常有限的视角来观察种类繁多且神秘莫测的病毒世界, 因此仍然需要更多的研究和技术, 以加深人们对病毒宿主相互作用的认识.

4 总结与展望

依托于质谱技术的蛋白质组学飞速发展, 不仅促进了病毒蛋白质组学研究的不断进步, 同时也加快了对于病毒颗粒相关的宿主蛋白的鉴定. 酵母双杂交体系、串联亲和纯化技术、体外 pull-down 技术以及名义沉淀技术用于解析病毒和宿主间的蛋白相互作用. 而 RNAi 筛选技术则用于初步研究蛋白相互作用的生物学意义. 新兴的蛋白标记技术与传统的 2-DE 与质谱联合的策略互补用于在病毒感染条件下宿主全蛋白水平的改变. 目前, 大多数用蛋白质组学方法鉴定得到的蛋白相互作用和蛋白差异表达, 仍需进一步验证. 此外, 有上述蛋白质组学策略所获得的数据将会在今后 20 年急速增加, 这需要更加先进的生物信息学技术对这些数据建模, 可视化和分析, 进而更加全面地了解病毒感染过程. 总之, 蛋白质组学技术通过认识病毒蛋白质结构及其与宿主之间相互的作用, 将为病毒相关疾病诊断和治疗的发展产生深远影响.

参考文献

- 1 Karen L M, Lori F. Viral proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71: 398—411
- 2 Yuan K, Lei Y L, Huang C. Application of chemistry-based functional proteomics to screening for novel drug targets. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2010, 13: 414—421
- 3 Liu R, Bai S J, Li Z J, et al. Mechanism of cancer cell adaptation to metabolic stress: proteomics identification of a novel thyroid hormone-mediated gastric carcinogenic signalling pathway. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8: 70—85
- 4 Miklos G L, Maleszka R. Protein functions and biological contexts. *Proteomics*, 2001: 169—178
- 5 Nair K S, Asmann Y W, Short K R, et al. Proteomic research: potential opportunities for clinical and physiological investigators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286: 863—874
- 6 Fields B N, Howley P M. Fundamental virology. In: *Principles of Virus Structure*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Willkins, 1996. 59—100
- 7 Kalkkinen N, Soderlund H, Kaariainen L. Analysis of semliki-forest-virus structural proteins to illustrate polyprotein processing of alpha

- viruses. *Eur J Biochem*, 1980, 108: 31—37
- 8 Chelius D, Shieh C H, Lehmborg E, et al. Analysis of the adenovirus type 5 proteome by liquid chromatography and tandem mass spectrometry methods. *J Proteome Res*, 2002, 1: 501—513
 - 9 Davison A J, Davison M D. Identification of structural proteins of channel catfish virus by mass spectrometry. *Virology*, 1995, 206: 1035—1043
 - 10 Resch W G, Moore R J, Lipton M S, et al. Protein composition of the vaccinia virus mature virion. *Virology*, 2007, 358: 233—247
 - 11 Chung C S, Ho M Y, Huang C Y, et al. Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J Virol*, 2006, 80: 2127—2140
 - 12 Yoder J D, Gagnier C R, Vemulapalli S, et al. Pox proteomics: mass spectrometry analysis and identification of Vaccinia virion proteins. *Virol J*, 2006, 3
 - 13 Baldick C J, Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol*, 1996, 70: 6097—6105
 - 14 Kattenhorn L M, Wagner M, Lomsadze A, et al. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol*, 2004, 78: 11187—11197
 - 15 Johannsen E, Chase M R, Weicksel S, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16286—16291
 - 16 Zhu F X, Wu L J, Yuan Y. Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 2005, 79: 800—811
 - 17 O'Connor C M, Kedes D H. Mass spectrometric analyses of purified Rhesus monkey rhadinovirus reveal 33 virion-associated proteins. *J Virol*, 2006, 80: 1574—1583
 - 18 Huang C H, Lin Q S, Xu X, et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466. *Mol Cell Proteomics*, 2002, 1: 223—231
 - 19 Li Z, Chen J, Wu J L, et al. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 1609—1620
 - 20 Zeng R, Jiang X S, Zhou H, et al. Proteomic analysis of SARS associated coronavirus using two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry and one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by mass spectroemtric analysis. *J Proteome Res*, 2004, 3: 549—555
 - 21 Saphire A C, Bark S J. Proteomic analysis of human immunodeficiency virus using liquid chromatography/tandem mass spectrometry effectively distinguishes specific incorporated host proteins. *J Proteome Res*, 2006, 5: 530—538
 - 22 Chertova E, Coren L V, Roser J D, et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol*, 2006, 80: 9039—9052
 - 23 Bortz E, Whitelegge J P, Jia Q M, et al. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol*, 2003, 77: 13425—13432
 - 24 Varnum S M, Monroe M E, Smith P, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*, 2004, 78: 10960—10966
 - 25 Rozen R, Li Y, Yuan Y. Virion-wide protein interactions of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 2008, 82: 4742—4750
 - 26 Bartel P L, Roecklein J A, SenGupta D, et al. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 2005, 79: 4952—4964
 - 27 Vliet K V, Zhang L L, Villa N Y, et al. Poxvirus proteomics and virus-host protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2009, 73: 730—749
 - 28 Oliver K B, Russel J D, Anthony L C. New insights into viral structure and virus-cell interactions through proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2005, 2: 577—588
 - 29 Bortz E, Whitelegge J P, Jia Q, et al. Identification of proteins associated with murine gammaherpesvirus 68 virions. *J Virol*, 2003, 77: 13425—13432
 - 30 Ying W T, Zhang Y J, Peng W M, et al. Proteomic analysis on structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proteomics*, 2004, 4: 492—504
 - 31 Savalia D, Westblade L F, Goel M, et al. Genomic and proteomic Analysis of phiEco32, a novel Escherichia coli bacteriophage. *J Mol Biol*, 2008, 377: 774—789
 - 32 Robert M D, Martin N L, Kropinski A M. The genome and proteome of coliphage T1. *Virology*, 2004, 318: 245—266
 - 33 Naryshkina T, Liu J, Florens L, et al. Thermus thermophilus bacteriophage phiYS40 genome and proteomic characterization of virions. *J Mol Biol*, 2006, 364: 667—677
 - 34 Beijerinck M J. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. *Verhandelingen der Koninkyke akademie Wettenschappen te Amsterdam*, 1898, 65: 3—21

- 35 Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, 340: 245—246
- 36 Fields S. Interactive learning: Lessons from two hybrids over two decades. *Proteomics*, 2009, 9: 5209—5213
- 37 Mendez-Rios J, Uetz P. Global approaches to study protein-protein interactions among viruses and hosts. *Future Microbiol*, 2010, 5: 289—301
- 38 Bartel P L, SenGupta D, Fields S. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nat Genet*, 1996, 12: 72—77
- 39 McCraith S, Moss B, Fields S. Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4879—4884
- 40 Dziembowski A, Ventura A P, Rutz B, et al. Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J*, 2004, 23: 4847—4856
- 41 Jorba N, Torreira E, Gastaminza P, et al. Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics*, 2008, 8: 2077—2088
- 42 Mayer D, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, et al. Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches. *J Proteome Res*, 2007, 6: 672—682
- 43 Molina-Jiménez F, Murata M, Martín-Vílchez S, et al. Expression of pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1)/securin in hepatitis B virus (HBV)-associated liver diseases: evidence for an HBV X protein-mediated inhibition of PTTG1 ubiquitination and degradation. *Hepatology*, 2010, 51: 777—787
- 44 Cristea I M, Carroll J N, Rout M P, et al. Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem*, 2006, 281: 30269—30278
- 45 Hirsch A J. The use of RNAi-based screens to identify host proteins involved in viral replication. *Future Microbiol*, 2010, 5: 303—311
- 46 Brass A L, Dykxhoor D M, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 2008, 319: 921—926
- 47 König R, Zhou Y Y, Elleder D, et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*, 2008, 135: 49—60
- 48 Tong A P, Gou L T, Lau Q C, et al. Proteomic profiling identifies aberrant epigenetic modifications induced by hepatitis B virus X protein. *J Proteome Res*, 2009, 8: 1037—1046
- 49 Toda T, Sugimoto M, Omori A, et al. Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1814—1822
- 50 Coiras M, Camafeita E, Urena T, et al. Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics*, 2006, 6: S63—S73
- 51 Chen X, Yu Y B, Xue Y, et al. Amino acid-coded tagging approaches in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2007, 4: 25—37
- 52 Mannova P, Wang H, Deng B, et al. Modification of host lipid raft proteome upon hepatitis C virus replication. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 2319—2325
- 53 Zhang L, Zhang X E, Lin F S, et al. Quantitative proteomics analysis reveals BAG3 as a potential target to suppress severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *J Virol*, 2010, 84: 6050—6059
- 54 Booy A T, Ohlund L B, Hardie D B, et al. Application of isotope coded affinity tag (ICAT) analysis for the identification of differentially expressed proteins following infection of atlantic salmon (*Salmo salar*) with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) or Renibacterium salmoninarum (BKD). *J Proteome Res*, 2005, 4: 325—334
- 55 Go E P, Wikoff W R, Shen Z, et al. Mass spectrometry reveals specific and global molecular transformations during viral infection. *J Proteome Res*, 2006, 5: 2405—2416
- 56 Jiang X S, Tang L Y, Dai J, et al. Quantitative analysis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus-infected cells using proteomic approach. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4: 902—913
- 57 Chen L M, Lin Q S, Lim T K, et al. iTRAQ analysis of Singapore grouper iridovirus infection in a grouper embryonic cell line. *J General Virol*, 2008, 89: 2869—2876
- 58 Diamond D L, Jacobs J M, Paepfer B, et al. Proteomic profiling of human liver biopsies: hepatitis C virus-induced fibrosis and mitochondrial dysfunction. *Hepatology*, 2007, 46: 649—657
- 59 Chan E Y, Qian W J, Diamond D L, et al. Quantitative analysis of HIV-1 infected CD4+ cell proteome: dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol*, 2007, 81: 7571—7583