

國立臺灣大學醫學院  
微生物學研究所微生物及免疫學組

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

A型流行性感冒病毒PA蛋白質與細胞蛋白質

hnRNP M之交互作用

The interaction between Influenza A viral PA protein and  
cellular protein hnRNP M

王玟文

Wen-Wen Wang

指導教授：王萬波 博士

Advisor : Won-Bo Wang, Ph. D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

## 致謝

在微生物所學習的過程中，感謝王萬波老師在實驗觀念及操作上給予的指導，讓我對科學研究有另一層的認識。謝謝鄧述諄老師、施信如老師及楊宏志老師在每一次進度報告時給予的指點與建議，讓我學習到實驗設計的邏輯性與執行實驗時應該注意的各個面向。

謝謝這兩年來，在研究生活中遇到的每一個人，尤其是 R752 的大家。首先感謝潔如學姊，從進研究所前的心得分享，到進實驗室後的實驗指導與經驗傳授，都讓我受益良多！感謝維彬學長在實驗上的帶領與解惑，每次跟你聊天都很歡樂，雖然你一直指控我抽屜裡有兩個便當…。感謝溫柔的嘉齡學姊，在我實驗遇到問題時，幫我解答了很多疑難雜症。感謝淑萍學姊，分享許多與老師相處的經驗。感謝紹宇，傳授我很多實驗技巧，容忍我一開始的狀況外(雖然現在也只是往狀況內移動了一小步)。感謝可愛的玫伶，在我遇到困難時都會很貼心地給我鼓勵和加油！感謝志成，在實驗上幫了我很多忙，祝福你未來的研究生涯一路順利。有時候覺得比起阿波家，我跟張鑫家的同學似乎更熟稔，在此也謝謝實驗室的另一群夥伴們！感謝佩純，我永遠記得和你一起在實驗室待很晚，彼此加油打氣的那段時光，希望你的未來一路順遂，努力朝自己的夢想邁進。感謝一開始實在很不熟到最後卻變好夥伴的佩吟，跟你一起奮鬥(雖然我失敗了…)一起玩樂的生活體驗實在太有趣了！現在你正往生命中的另一個里程碑前進，祝福你一切順利。感謝好姊妹倖慈，活潑的你讓實驗室有很不一樣的氣氛，而在許多事情上的細心關照，也讓我覺得好窩心，祝福你的澳洲行能夠帶著滿滿的收穫回來。感謝宏維，我一直拿實驗的問題打擾你，但是你都會耐心的解說和幫忙，我真的從你身上學到很多實驗的觀念和技巧，謝謝；也謝謝你在 Seminar 把我電的七葷八素的，讓我知道甚麼叫做砍掉重練！感謝子翊學長，同為公衛轉行人(雖然現在我決定細軟款一款回本行了…)，和我分享了不少做研究的經驗，希望你的實驗能夠越來越順利，帶領你們實驗室殺出一條血路！在微生物所的第二年裡，新加入的學弟妹們也讓實驗室變得更熱鬧。感謝季書，每次都聽我抱怨，在實驗上也幫了我很多忙，貼心的你總是讓我很感動，接下來的一年加油了！感謝畫畫+攝影天才的雨柔，也感謝學弟劉璿、瑋嘉和崇安，你們總是讓實驗室有很多有趣的話題。另外，也謝謝在八樓的寄蟲助教，雖然不常看到你，但是每次跟你聊天都很開心！

最後，我要謝謝我的家人，謝謝你們時時刻刻無條件的支持，也謝謝爸媽在水深火熱的最後一個月，每天半夜來接我回家。沒有你們，我不可能完成這兩年的旅程。最後的最後，一個小小的位置，我要謝謝 CSI 影集，在我最苦悶壓力超大的時候，看 CSI 總是可以幫我分憂解勞。

兩年的碩士生涯說長不長，但是回顧這段路程，我學到了很多東西，遇到了很多人。在鑽研知識的過程中，愈加瞭解到研究是建立在一群人的努力和貢獻上的，在此謝謝所有幫助過我及這項研究的每個人，謝謝你們！

## 中文摘要

流感病毒的PA、PB1及PB2蛋白質構成了病毒特有的RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)，參與病毒複製轉錄的過程，在病毒生活史扮演重要的角色。本實驗室為了更了解病毒複製轉錄的機制，挑選PA進行更進一步的研究。首先，以PA為餌，利用酵母菌雙雜合系統(yeast two-hybrid system)篩選Hela細胞的cDNA資料庫，找出八個可能與PA有交互作用的細胞蛋白質，並對其中的HNRPM進行更深入探討。

我們利用帶有tag的PA與HNRPM蛋白質進行免疫共沉澱法(Co-IP)以及GST pull-down assay，確認兩者之間具有交互作用；在RNase A的作用下，也證實兩者之間並非透過RNA而結合。接著，我們將PA及HNRPM分別分成多個片段，再以免疫共沉澱法找尋彼此間交互作用的區域。實驗結果顯示，PA與HNRPM皆是用本身的N端與對方進行交互作用。最後，我們利用免疫螢光分析的技術，在螢光顯微鏡下看到PA與HNRPM共同定位在細胞核中，再一次驗證兩者具有交互作用的可能性。

我們接著想了解此交互作用對病毒或宿主有甚麼生理意義。首先，使用FGFR2 minigene系統，將其送到293T細胞中，再利用semi-quantitative PCR (semi-qPCR)來觀察splicing的產物。結果發現PA的多寡並不會影響HNRPM調控alternative splicing的功能。而在能夠測試病毒聚合酶複製及轉錄功能的螢光酶報導系統實驗中，發現在細胞中過量表現HNRPM會有抑制病毒聚合酶功能的效果。以上結果顯示，PA與HNRPM的交互作用可能會引導HNRPM負向調控病毒複製轉錄的功能，其中的詳細機制需要透過更多的實驗才能證實。

關鍵字：流行性感冒病毒；PA蛋白質；HNRPM；流感病毒轉錄與複製

## Abstract

Influenza A virus contains an RNA-dependent RNA polymerase(RdRp) which consists of viral proteins PA, PB1 and PB2. It plays an important role in influenza viral transcription and replication. PA had been shown to be involved in vRNA synthesis and to activate viral mRNA synthesis by regulating the ‘cap-snatching’ process. To further investigate the role of PA protein in virus life cycle, our lab used yeast two-hybrid system to identify cellular factors that may interact with PA protein. We found that hnRNP M, an mRNA splicing factor, is one of the candidates of PA-interacting cellular proteins. To further confirm the interaction between PA and hnRNP M, co-immunoprecipitation (co-IP) and GST pull-down assays were performed. The results demonstrated that PA did specifically interact with hnRNP M. The interaction between PA and hnRNP M (both are RNA-binding proteins) was not mediated through RNA because RNase A treatment did not abolish their interaction. The immunofluorescence assay (IFA) also indicated that PA and hnRNP M co-localized in the nucleus, further confirming the interaction between these two proteins. Next, we used PA and hnRNP M deletion mutants to map the interaction regions on each protein. Our data indicated that both PA and hnRNP M use their N-terminal regions to interact with each other. Knowing the interaction between PA and hnRNP M, we then tested whether PA would affect hnRNP M’s alternative splicing activity. hnRNP M is known to promote alternative splicing of the FGFR2 minigene. By quantifying the splicing products of the FGFR2 minigene in the presence or absence of PA, we found that PA did not affect hnRNP M’s activity on alternative splicing. We then tested whether hnRNP M would affect influenza A viral replication. An influenza replication-reporter system was used to measure the transcription and replication activity of viral RdRp. It turned out that overexpression of hnRNP M reduced the activity of RdRp. Further investigation is required to clarify the role of hnRNP M in viral transcription and replication.

Keywords : Influenza virus, PA, HNRPM, influenza viral transcription and replication

# 目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	ii
目錄.....	iii
圖目錄.....	vi
緒論.....	1
研究目的.....	7
材料與方法.....	8
◆ 實驗材料.....	8
一、化學藥品及試劑.....	8
二、套組試劑.....	11
三、抗體.....	12
四、酵素.....	12
五、其它.....	13
六、細胞株 (Cell line).....	13
七、質體 (Plasmid).....	14
◆ 實驗方法.....	17
一、質體建構 (Construction).....	17
二、細菌轉形 (Transformation).....	18
三、勝任細胞的製備 (Preparation of competent cells).....	18
四、小量質體製備 (Mini-preparation).....	19
五、大量質體製備 (Large-scale plasmid isolation).....	20
六、質體轉染 (Transfection).....	22
七、慢病毒製備 (Preparation of Lentivirus).....	24
八、慢病毒定量 (quantification of Lentivirus).....	25

九、慢病毒感染 (Lentivirus infection).....	26
十、細胞核糖核酸萃取 (RNA extraction).....	27
十一、反轉錄反應 (Reverse transcription).....	27
十二、即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR) .....	28
十三、半定量聚合酶鏈鎖反應 (semi-quantitative PCR).....	29
十四、螢光酶分析 (Luciferase assay).....	30
十五、細胞全蛋白質之收取.....	30
十六、蛋白質定量.....	30
十七、西方墨點法 (Western blot).....	31
十八、流感病毒感染及增殖 (Influenza virus infection and amplification).....	31
十九、流感病毒之溶斑分析法 (Plaque assay of Influenza virus).....	32
二十、Glutathione S-transferase (GST) pull-down 分析.....	33
二十一、免疫共沈澱法 (Co-Immunoprecipitation).....	35
二十二、免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay, IFA).....	36
實驗結果.....	37
一、利用酵母菌雙雜合篩選(yeast two-hybrid system) 確認病毒蛋白質 PA 與細胞 因子 HNRPM 的交互作用 .....	37
二、透過免疫共沈澱(Co-immunoprecipitation)與 GST pull-down assay 確認 PA 蛋 白質與 HNRPM 蛋白質之間有交互作用.....	37
三、PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質之間的交互作用並非透過 RNA.....	38
四、利用免疫螢光分析(IFA)法觀察到PA蛋白質與HNRPM蛋白質共同位於 (co-localize)細胞核中.....	38
五、利用免疫共沈澱法確認 PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質之間的結合片段.....	39
六、PA 不會影響 HNRPM 的 alternative splicing 功能.....	39
七、在 NPC-TW04 細胞中過量表現 HNRPM 蛋白質會抑制流感病毒螢光酶報導	

系統的表現.....	40
討論.....	42
附圖.....	46
附表.....	59
參考文獻.....	61



## 圖目錄

圖一、A型流行性感冒病毒結構圖.....	46
圖二、A型流感病毒的生活史.....	47
圖三、酵母菌雙雜合系統顯示PA與HNRPM有交互作用.....	48
圖四、利用免疫共沉澱法確認PA與HNRPM的交互作用.....	49
圖五、GST pull-down分析也顯示PA與HNRPM在 <i>in vitro</i> 下有交互作用.....	50
圖六、PA與HNRPM之間的交互作用並非透過RNA.....	51
圖七、PA蛋白質與HNRPM蛋白質共同位於(co-localize)細胞核中.....	52
圖八、以免疫共沉澱法找出PA蛋白質上與HNRPM蛋白質結合的片段.....	53
圖九、以免疫共沉澱法找出HNRPM蛋白質上與PA蛋白質結合的片段.....	54
圖十、PA不會影響HNRPM的alternative splicing功能.....	55
圖十一、細胞過量表現HNRPM蛋白質會抑制流感病毒螢光酶報導系統的表現.	57



## 緒論

流行性感冒病毒 (influenza virus) 屬於正黏液科病毒屬 (family Orthomyxoviridae)，為具有外套膜之負股RNA病毒，依照病毒核蛋白 (nucleoprotein) 和基質蛋白 (matrix protein) 抗原性的不同，可以分為A、B及C型流感病毒。A型流感病毒又可依其血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 的抗原性不同而分類為不同亞型。目前，血球凝集素可分成16種不同亞型 (H1–H16)，而神經胺酸酶則被分為9種亞型 (N1–N9)。A型流感病毒主要感染禽鳥類及哺乳類，侵襲上呼吸道內皮細胞，在人類造成發燒、肌肉疼痛、頭痛及咳嗽等症狀，嚴重時可能會有肺部出血、水腫或因細菌二次感染引發肺炎而死亡 (WHO)。B型及C型流感病毒主要感染人類，在海豹及豬身上也曾分離出，其所造成的症狀較輕微 (Fouchier, Munster *et al.* 2005)。

流感病毒的演化速度很快，病毒變異使宿主免疫系統的辨識能力降低，造成感染率上升，嚴重時爆發流行疫情。流感病毒主要透過兩種方式改變基因物質：(一) 抗原微變 (antigenic drift)：藉由插入、刪除或點突變等方式改變基因序列，多與區域性的流行 (epidemics) 有關；(二) 抗原突變 (antigenic shift)：藉由基因重組 (reassortment) 改變遺傳物質組成，若產生跨宿主的RNA片段交換，則會大幅改變其抗原性，多與全球性流行 (pandemics) 有關 (Webster, Bean *et al.* 1992)。目前主要流行在人類間的流感病毒為A型及B型，其中以A型流感病毒造成的疫情較嚴重，20世紀曾有三次嚴重的全球流行，包含1918年的西班牙流感 (Spanish flu, H1N1)，造成全球逾4000萬人死亡，1957年的亞洲流感 (Asian flu, H2N2)，造成逾200萬人死亡，以及1968年香港流感 (Hong Kong flu, H3N2)，造成約100萬人死亡 (WHO)。時至今日，流感病毒仍持續造成大大小小的疫情，1997年香港爆發H5N1人類禽流感，18個臨床病例中有6人死亡 (Webster 2001)，2009年的新流感疫情 (2009 Flu pandemic) 也造成人員死傷。綜觀現今的流感疫情，可知研究如何防治以及控制流感病毒的感染與傳播是全球公共衛生領域的重要議題之一。

## A 型流感病毒(Influenza A virus)的結構與生活史

流感病毒大多成球狀，直徑約為 80-120nm，外表具有來自宿主細胞膜的外包脂質套膜(envelope)，其上覆蓋許多棘蛋白質(spikes)，由 HA 及 NA 組成，病毒套膜上另有 M2 蛋白質形成的離子通道(Nayak, Balogun *et al.* 2009)(圖一)。外套膜下為 M1 蛋白質構成的基質，幫助維持病毒顆粒的構造形狀，病毒基因組即包覆在這樣的結構內(Aad, Abbott *et al.*)。

A 型流感病毒的基因組(genome)由八段反義股 RNA 組成。分別表現出不同的病毒蛋白質：polymerase basic protein 2(PB2)、polymerase basic protein 1(PB1)、polymerase acidic protein(PA)、hemagglutinin (HA)、nucleoprotein (NP)、neuraminidase (NA)、matrix protein 1 (M1)、matrix protein 2(M2)、non-structural protein 1 (NS1) 及 non-structural protein 2 (NS2)(Webster, Bean *et al.* 1992)，轉譯出 PB1 的 RNA 也可以表現另一種含 87 個胺基酸的非結構性蛋白質，PB1-F2(Noda and Kawaoka 2010)。PA、PB1 及 PB2 構成了 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)(Hara, Schmidt *et al.* 2006)，結合在病毒 RNA 上，RNA 並由具保護功能的病毒核殼體(NP)附著，形成完整的核糖核蛋白體(ribonucleoprotein, RNP)(Lamb and Choppin 1983)存在病毒顆粒中。

流感病毒的生活史如圖二所示，其感染宿主細胞時，先利用其外套膜上的血球凝集素和細胞膜上的唾液酸受器(sialic acid)結合，透過 clatherin 進行內吞作用(clatherin-dependent endocytosis)，進入細胞核內體(endosome)。核內體中較低的 pH 值引發 HA 的構型發生改變，進而促使病毒外套膜與核內體融合(Skehel and Wiley 2000; Das, Aramini *et al.* 2010)；同時，酸性的環境亦使病毒的 M2 離子通道開啟，質子進入而破壞了 vRNP 與 M1 蛋白質的結合，vRNP 被釋放到細胞質中(Pinto and Lamb 2006)，接著再透過 NP 上的細胞核定位訊號(nuclear localization signal, NLS)穿過核孔，進入核內(Wu and Pante 2009)。在核內病毒的 RdRp 利用 PB2 結合到宿主 pre-mRNA 的帽蓋(5'-cap)上(Ulmanen, Broni *et al.* 1981)，PA 隨

即以內切酶活性(endonuclease activity)將帽蓋及其後 10-13 個核苷酸切下，供 RdRp 作為引子進行 vmRNA 的合成，這個過程稱為 cap-snatching(Plotch, Bouloy et al. 1981; Hara, Shiota et al. 2001; Yuan, Bartlam et al. 2009)。之後 vmRNA 被送到細胞質進行蛋白質合成，轉譯出的病毒表面蛋白質 HA、NA 及 M2 先在內質網進行修飾，再移動至高基氏體進行醣基化(glycosylation)，之後送到細胞膜上等待組裝。而新合成的 PA、PB1 及 PB2 會回到核內形成病毒聚合酶，將反義股的 vRNA 轉錄成正義股的 cRNA，以其做為模板大量複製病毒基因，這個過程不需要引子的協助(primer-independent transcription)。在 vRNA 的複製過程中，NP 會結合上延伸中的 vRNA，促進合成作用，並且防止 vmRNA 的再次轉錄(Newcomb, Kuo et al. 2009)。新合成的 vRNA 與 RdRp 結合組成 vRNP，並與 NS2 及 M1 形成複合體，NS2 可以與細胞的 CRM1 蛋白質進行交互作用，促使 vRNP 運送到細胞質(Crm1 protein-dependent pathway)(Neumann, Hughes et al. 2000)，M1-vRNP 複合體同時防止 vRNP 再次被運入核內。M1-vRNP 接著移動到細胞內近管腔面(apical membrane)的組裝位(assembly)(Nayak, Hui et al. 2004)，與細胞膜上的 HA、NA 及 M2 作用，組裝(packaging)並以出芽(budding)的方式釋出細胞外。最後 NA 會將與病毒相連的細胞唾液酸切除以讓病毒真正離開細胞(Das, Aramini et al. 2010)。

### PA – 流感病毒聚合酶之次單元

A 型流感病毒的 PA 與 PB1、PB2 蛋白質共同組成流感病毒的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，在病毒生活史中扮演重要角色，負責病毒複製及基因轉錄時的 RNA 合成；其中，PA 的 C 端結合在 PB1 的 N 端，PB1 的 C 端結合在 PB2 的 N 端。PB1 是 RdRp 最重要的次單元，它可以結合到病毒的啟動子上，並進行 RNA 的合成與延長(Biswas and Nayak 1994)。PB2 參與 vmRNA 的轉錄，在轉錄起始時結合到宿主 pre-mRNA 的帽蓋上(Fechter, Mingay et al. 2003)。PA 的功能則尚未完全明瞭。過去報導 PA 在病毒 RNA 轉錄與複製

時都是必須存在的，也可能參與在病毒組裝的過程中；PA 具有蛋白酶活性，2009 年透過結構分析，發現其也具有內切酶的特性，主導 cap-snatching 過程中宿主 pre-mRNA 的截切。

PA 是由流感病毒的 segment 3 RNA 所表現出之 716 個胺基酸，大小約 80kD 的蛋白質。經過胰蛋白酶(trypsin)處理後，PA 會分解成兩部分，分別為大小約 25kD 的 N 端及 55kD 的 C 端(Hara, Schmidt et al. 2006)，兩者透過一段胜肽鏈(linker)連接彼此。此段胜肽鏈被報導與 PA-PB1 的交互作用有關，只有在 PA 存在完整胜肽鏈的狀態下，PB1 與 PA 才有穩定的交互作用(Guu, Dong et al. 2008)。

PA 的 N 端已被報導和許多功能相關，由點突變的研究中發現 PA 的 L109、Y110、D111、R116 及 F117 是維持 PA 穩定度的胺基酸，而 K102 若產生突變，會抑制聚合酶 cap-binding 的過程(Hara, Schmidt et al. 2006)；此外，N 端也被報導會幫助 PB1 結合到 vRNA 或 cRNA 的啟動子上，以幫助轉錄與複製(Maier, Kashiwagi et al. 2008)。2009 年兩個研究團隊分別透過解開 H3N2 人流感及 H5N1 禽流感 PA 的結構，指出 PA 可能屬於 DX(N)(D/E)XK 內切酶家族，並參與在 cap-snatching 時宿主 pre-mRNA 的截切(Dias, Bouvier et al. 2009; Yuan, Bartlam et al. 2009)。由點突變的實驗及結構分析中可以發現參與在內切酶酵素功能的重要胺基酸有 P107、D108、E119 及 K134；另外，也有報導指出 C 端的 H510 和內切酶活性有關(Fodor, Crow et al. 2002)。

PA 的 C 端被報導會和 PB1 作用，所形成的穩定結構進而結合到 vRNA 的啟動子上(Deng, Sharps et al. 2005)。此外，PA 的 507 及 508 胺基酸與病毒的組裝有關(Regan, Liang et al. 2006)；而 T515 被認為與病毒的致病性相關(Hulse-Post, Franks et al. 2007)。當 T515 點突變為丙胺酸(alanine)時，會使得病毒對禽類的致病性消失，但是用注射的方式打入禽類卻發現病毒的複製、傳播及致死率沒有改變，顯示此點突變影響的是病毒較早期的致病步驟。

除了內切酶活性外，PA 也被報導具有廣泛性的蛋白酶活性，可以截切病毒

本身或宿主的蛋白質，例如宿主 RNA Pol II 的大次單元(Rodriguez, Perez-Gonzalez et al. 2007)，S624 為其活性位(Hara, Shiota et al. 2001)。此蛋白酶活性被指出可能與病毒的複製有關，點突變 T157A 會使 PA 完全失去截切蛋白質的能力，並降低 RdRp 合成 cRNA 的能力，而 vmRNA 的轉錄則不受影響(Perales, Sanz-Ezquerro et al. 2000; Huarte, Falcon et al. 2003)；但也有研究指出它們之間並無關連(Naffakh, Massin et al. 2001)，因此目前還不完全清楚此蛋白酶功能對於病毒由何種重要性。

目前已知會與 PA 有交互作用的蛋白質有 hCLE 及 MCM，二者皆與 PA 的 C 端作用。hCLE 的構造屬於轉錄活化因子家族，可調控宿主 RNA 聚合酶的活性，其與 PA 進行交互作用推測是為了促進病毒 RdRp 進行 pre-mRNA 的竊取，幫助 vmRNA 的轉錄，但還不清楚其對於病毒複製是否有影響(Huarte, Sanz-Ezquerro et al. 2001)。MCM(minichromosome maintenance)在細胞中的角色為 DNA 複製螺旋酶(replication helicase)，其也被發現參與在病毒複製的過程中。研究認為 MCM 可當成 RdRp 與新合成 RNA 中間的腳架(scaffold)，穩定複製起始時 RdRp 複合物的結構，而讓 RNA 複製順利進行(Kawaguchi and Nagata 2007)。

相較於 PB1 及 PB2，PA 的功能仍然有很多尚待釐清的部分。為了探討 PA 是否還具有其他未知的功能，本實驗室利用 PA 做為酵母菌雙雜交篩選系統的餌，釣出可能與 PA 有交互作用的細胞因子，而其中找到了 HNRPM。因此，本研究著重在確認其交互作用之真實性與 HNRPM 對於流感病毒可能的影響。

### **異質性細胞核核糖核蛋白 M (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M, HNRPM, hnRNP M) :**

HNRPM 全名為 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M，大小約 77kDa，為 RNA-binding protein，屬於 hnRNP 家族中的一員，參與在 RNA processing 的過程中。在 *in vivo* 實驗中，發現 HNRPM 可以和 pre-mRNA 結合，在 *in vitro* 中

也可以和 poly (G)以及 poly (U) RNA homopolymers 結合(Datar, Dreyfuss et al. 1993)。利用其蛋白質序列在蛋白質功能性區域資料庫進行比對，可得到 HNRPM 的蛋白質特定功能區域性大多與 RNA 的結合相關。HNRPM 也被發現存在於 spliceosome 中(Neubauer, King et al. 1998)。其可以調控 FGFR2 mRNA alternative splicing，促進 FGFR2 mRNA 外顯子 IIIc 跳躍 (exon IIIc skipping)(Hovhannisyan and Carstens 2007)。在果蠅 (*Drosophila*) 中的 HNRPM 同源蛋白質 (homolog) Rumpelstiltskin 蛋白質則被報導可以與調控發育所需的 nanos mRNA localization，Rumpelstiltskin 的突變會使運送至果蠅胚胎後端 (embryo posterior) 的 nanos mRNA 減少(Jain and Gavis 2008)。

近年有實驗室利用融合 TAP tag 之流感病毒 PB1 一起與 PB2 及 PA 送入 HEK 293T 細胞中表現，再經由管柱 (column) 純化出此 TAP-tagged polymerase complex，並使用 MALDI-TOF MS 分析與此複合體有交互作用之細胞蛋白質，其中可發現 HNRPM 的存在(Jorba, Juarez et al. 2008)。此外，本實驗室先前利用 1996 年 James 等人所設計的基因體資料庫篩選(genomic library screening)和酵母菌株 PJ69-4A 進行酵母菌雙雜合篩選，找出可能與流感病毒 PA 次單元有交互作用的細胞因子，其中也包含 HNRPM。所以本研究希望能夠探討流感病毒的 PA 蛋白與細胞蛋白質 HNRPM 之間的是否真的具有交互作用，並了解 HNRPM 在流感病毒複製過程中的重要性。

## 研究目的

目前針對流行性感冒病毒的預防與控制，疫苗及抗病毒藥物是最重要的兩項防疫武器。疫苗大量製備的速度緩慢，無法應付流感流行之防疫即時性，因此研發並儲備抗病毒藥物成為流感防治的重要議題之一。

早期抗流行性感冒病毒之藥物多著重在抑制病毒生活史的早期階段，例如阻止 NA 切除唾液酸以及阻礙 M2 離子通道，但是近年來這些藥物已陸續傳出不良反應及抗藥性病毒株的出現，因此研發新的抗病毒藥物成為首要之急。相較於流感病毒表面蛋白 HA 及 NA 的高突變性，參與病毒複製轉錄的蛋白質 PA、PB1、PB2 及 NP 在不同病毒株間的基因相似度較高，因此若能針對這些保守性高的蛋白質進行研究，找出可能與之有交互作用而影響病毒複製過程的細胞因子，便能提供研發抗病毒藥物新的發展與方向。

本研究針對可能與流感病毒聚合酶之 PA 次單元有交互作用的細胞因子進行探討，選擇 HNRPM 進一步研究其與 PA 作用的真實性，及此交互作用可能對流感病毒複製轉錄造成的影響，希望能提供未來研發抗病毒藥物的線索與方向。

# 材料與方法

## ◆ 實驗材料

### 一、化學藥品及試劑

Acrylamide	Promega
Agar	BioShop
Agarose Type D-1 LE	Alpha Biosciences, Inc
Ammino acids	Sigma
Ammonium persulfate	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
BES	Sigma
Bovine serum albumin (BSA)	Bionovas
Bromophenol Blue (BPB)	東京化成工業株式會社
Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Cesium chloride (CsCl)	MDBio, Inc
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Mallinckrodt
Complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Crystal violet	Sigma
D (+) -Glucose anhydrous	Merck
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMEM/HIGH GLUCOSE	HyClone
D-Sorbitol	Sigma

Ethanol	J.T. Baker
Ethidium bromide	Amersham Biosciences
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Merck
FBS	GIBCO
Formaldehyde, 37% solution	J.T. Baker
G418	MDBio, Inc
Glacial acetic acid 100%	Merck
Glucose	Life Technologies Inc.
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Glycerol	JT Baker
Glycine	Bionovas
HEPES, minimum 99.5% titration	Sigma
Hydrochloric acid (HCl)	Merck
Isoamylalcohol (IAA)	Sigma
Isopropanol	Merck, Bionovas
Isopropylthio-beta-D-galactopyranoside (IPTG)	Bionovas
Kanamycin sulfate	MDBio, Inc
L-Glutamine 200 mM (100X)	GIBCO
Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> )	FisherScientific
Magnesium sulphate heptahydrate (Mg•H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O)	Merck
MEM Non-essential amino acid solution 100X	Sigma
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck, Bionovas
Milk (安佳脫脂奶粉)	安佳
Mounting medium	DAKO

MOPS	amresco
MTS	Promega
MTT	Sigma
Non-essential amino acid (NEAA)	GIBCO
Nonidet P 40 Substitute (NP-40)	Fluka
OPTI-MEM I	GIBCO
Penicillin/streptomycin/amphotericin B (PSA)	Life Technologies Inc.
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Polyethylene glycol average mol wt 3,350 (PEG-4000)	Sigma
Potassium acetate (CH <sub>3</sub> COOK)	Merck
Potassium chloride (KCl)	Sigma
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T. Baker
Protein G Sepharose	Millipore
Rubidium chloride	Sigma
Sodium acetate (NaOAc)	Merck
Sodium azide (NaN <sub>3</sub> )	Sigma
Sodium BES	Sigma
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Sodium chloride (NaCl)	Sigma
Sodium dihydrogen phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Promega
Sodium fluoride (NaF)	Sigma
Sodium hydrogen carbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma

Sodium phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	J.T. Baker
Sodium pyruvate 100mM (100X)	GIBCO
TEMED	Stratagene
Tris (Base)	J.T. Baker
Trizol	Invitrogen
Trypan Blue	Sigma
Trypsin, TPCK treated, from bovine pancreas (TPCK-Trypsin)	Sigma
Trypsin-EDTA 0.5%	GIBCO
Tryptone	Bionovas
Tween 20	Sigma, Bionovas
Water (L. C. Grade)	皓峰企業股份有限公司
Yeast Extract	Bionovas
	
二、套組試劑	
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit DF100	Geneaid, Biomark
Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution	Millipore
Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System GF2002	Viogene
Plasmid Midiprep Purification Kit DP01MD-100	GeneMark
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer

### 三、抗體

Mouse-anti-FLAG M2 antibody	Sigma
Rabbit-anti-myc antibody	
Mouse-anti-HNRPM antibody	
Rabbit-anti-PA antibody	
Rabbit-anti-GST antibody	Santa Cruz
Alexa Flour 594-conjugated goat-anti-mouse IgG antibody	Santa Cruz
Anti-mouse Ig horseradish peroxidase-conjugated linked whole antibody (from sheep)	Amersham Biosciences
Anti-rabbit Ig horseradish peroxidase-conjugated linked whole antibody (from sheep)	Amersham Biosciences
Mouse IgG TrueBlot™	eBioscience
<h3>四、酵素</h3>	
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs
<i>Pfu</i> DNA polymerase	Promega
<i>Bam</i> HI	
<i>Cla</i> I	
<i>Eco</i> RI	
T4 DNA ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA polymerase	Bionovas
<i>Xho</i> I	New England Biolabs

## 五、其它

Cover glass (12mmΦ)	Deckgläser
Millex-GP filter unit (0.22 μm)	Millipore
PVDF membrane	Millipore
X-ray film	FUJI

## 六、細胞株 (Cell line)

### • HEK293 細胞

由人類胚胎腎細胞 (human embryonic kidney cell) 經腺病毒第五型 (adenovirus type 5) 的 DNA 片段轉形得到的細胞株 (Graham, Smiley et al. 1977)。培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱，以含 10% FBS 及 1% Penicillin/streptomycin/amphotericin B (PSA) 的 DMEM 培養。

### • 293 FT 細胞

由 Invitrogen 所販售之 HEK 293 細胞之衍生物，生長快速。含有 SV40 large T antigen，可以大量表現含 SV40 origin 之質體，轉染效率比母細胞株 HEK293 高，多使用來進行轉染並大量表現蛋白質。缺點為貼覆強度低。培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱，以含 10% FBS、1% PSA 及 600 μg/ml G418 的 DMEM 培養。

### • MDCK 細胞

自正常成熟雌性西班牙長耳獵犬之腎臟所取得之上皮細胞株。於 1958 年由 S.H. Madin 及 N.B. Darby 所分離出來，故命名為 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞。此種細胞可用以大量增殖流感病毒，較其它種細胞株可得到較高之病毒量。生長速度快，貼附能力好。培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱，以含 10% FBS、1% PSA 的 DMEM 培養。(由黃立民醫師提供。)

- NPC-TW04

人類鼻咽癌細胞株 (human nasopharyngeal carcinoma cell line)，為 HER2/neu low-expressing 細胞株，培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱，以含 10% FBS、1% PSA 的 DMEM 培養。除了以上述條件培養外，NPC-TW04 各混合細胞株 (NPCTW04-shHNRPM 及 NPCTW04-shLuc 細胞株) 建構之初以 2 µg/ml puromycin 進行篩選，平時加入 1 µg/ml puromycin 進行繼代培養。

## 七、質體 (Plasmid)

- pcDNA3

含有巨細胞病毒之早期基因啟動子 (cytomegalovirus promoter, CMV promoter) 之表現載體 (Invitrogen)，帶有 ampicillin/neomycin 抗藥性基因。

- pcDNA3-PB1, pcDNA3-PB2, pcDNA3-PA, pcDNA3-NP

將 Influenza A/WSN/33 病毒 (H1N1) 之 PB1、PB2、PA 和 NP 等基因之 cDNA 利用 *NgoMIV* 自 pPOLI-PB1-RT、pPOLI-PB2-RT、pPOLI-PA-RT 及 pPOLI-NP-RT (Fodor, Devenish et al. 1999) 切下；同時將 pcDNA3 利用 *Hind*III 切開後，再以自我接合的方式接上含 *Age*I 切割位之 5'-AGCTTACCGGTA-3' linker 後，以 *Age*I 切割後，再將上述等基因之片段接入 pcDNA3 載體 (Fodor, Crow et al. 2002)，帶有 ampicillin/ neomycin 抗藥性基因。(由英國 George G. Brownlee 提供)。

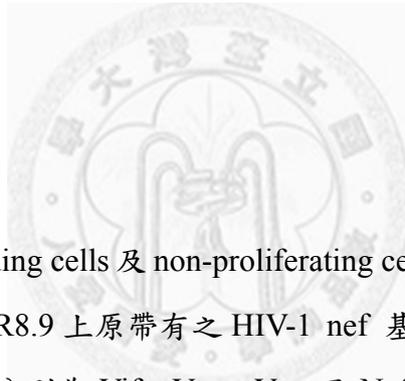
- pPOL I-vLuc-RT

將由 George G. Brownlee 提供的似病毒基因的報導基因 CAT 質體 (pPOL I-vCAT-RT) (Pleschka, Jaskunas et al. 1996) 中的反義股 (antisense) CAT 基因切下後，接入自 pGL3-basic 質體上以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 所放大的反義股螢光酶 (luciferase) DNA。pPOL I-vLuc-RT 上，反義股螢光酶片段的五端和三端側翼帶有

A 型流感 PR/8/34 病毒株 (H1N1) 第八段基因片段 (NS segment) 的五端和三端非轉譯區尾 (nontranslated end) 形成似病毒基因片段(Luytjes, Krystal et al. 1989)。此似病毒基因片段是由截短的人類 RNA polII 啟動子 (truncated human RNA polII promoter, nt-250~-1) 所驅使 (drive) 的。為了確保表現出的 RNA 的三端是正確的，在此似病毒基因片段的三端尾端接上 D 肝病毒 (hepatitis delta virus) genomic ribozyme 序列。此質體的骨架是 pUC19 質體，帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由施潔如學姊提供)

- pRL-CMV

含有巨細胞病毒之早期基因啟動子，可表現 Renilla luciferase，帶有 ampicillin 抗藥性基因。



- pCMVdeltaR8.91

HIV-1 可以感染 dividing cells 及 non-proliferating cells。此質體是 pCMVΔR8.9 之衍生物。其將 pCMVΔR8.9 上原帶有之 HIV-1 nef 基因移除。nef 基因會表現 4 個 accessory proteins，分別為 Vif、Vpr、Vpu 及 Nef。此質體在刪除這些基因後，仍可有效的 transduce growth-arrested cells、monocyte-derived macrophages in culture 及成人的 neurons。此質體可表現 HIV-1 Gag、Polymerase (RT) 及 HIV-1 之 2 個 accessory proteins (Tat 及 Rev)。另外，此質體並不帶有 HIV-1 病毒複製之所需之 cis-elements。帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由中研院 RNAi core 提供)

- pLKO.1-puro

為 shRNA 之載體，所帶之 cis-elements 為 HIV-1 衍生物。帶有生產 lentiviral particles 時，packaging、反轉錄及 integration 所需之 cis-elements。帶有 ampicillin/puromycin 抗藥性基因。以下實驗所使用之特定基因之 shRNA 序列皆是建構在此質體上。(由中研院 RNAi core 提供)

- pGEX-6P-1

為大腸桿菌表現蛋白質體。含有 tac promoter、Glutathione S-transferase (GST) 基因及 PreScission™ Protease 切割位。可在 IPTG 誘導下表現 GST 蛋白，在 GST 蛋白與 multi-cloning site 之間有 PreScission™ Protease 切割位，可利用 PreScission™ Protease 將融合蛋白和 GST 蛋白切割分開。帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由張鑫老師提供)

- pINX-N-FF-B vector

可表現 N-terminal 2FLAG tags 之表現載體，帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由 Russ P. Carstens 提供)

- pINX-N-FF-HNRPM

HNRPM 之基因前後分別利用 EcoRV/AgeI sites 接入 pINX-N-FF-B vector 中，使 HNRPM 之 N 端接合 2 個 FLAG tags (Hovhannisyan and Carstens 2007)。帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由 Russ P. Carstens 提供)

- pI-11-FS

帶有 genomic FGF-R2 exonIIIb 至 exonIIIc 之間的 DNA 片段，為觀察 FGF-R2 exonIIIb、exonIIIc splicing 之 minigenome。利用特定引子 PCR 放大出 AT3 細胞之 genomic FGF-R2 部分基因片段 (exonIIIb 至 exonIIIc) 長度約 1804nt，經過 SpeI 和 XhoI 酵素切割後，接入前後帶有 adenoviral exon 的 splicing construct pPIP11 之中 (Carstens, McKeehan et al. 1998)。帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由 Russ P. Carstens 提供)

- pFLAG-CMV2 vector

含有巨細胞病毒之早期基因啟動子之表現載體 (Sigma)，可以表現 N-terminal

FLAG tag，帶有 ampicillin 抗藥性基因。

- pFLAG-CMV2-FTH1

帶有 Ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)之 cDNA 基因，於 FTH1 之 N 端接合 FLAG tag。帶有 ampicillin 抗藥性基因。(由徐維彬學長提供)

- pEGFP-C1

含有巨細胞病毒之早期基因啟動子，可表現 N-terminal 綠色螢光蛋白 (GFP) epitope tag (BD Bioscience)。帶有 kanamycin/neomycin 抗藥性基因。

#### ◆ 實驗方法

##### 一、質體建構 (Construction)

利用不同的特殊引子進行 PCR，大量放大 PB2 或 PB2 片段 (引子序列見附表)，再將其進行 DNA 膠體電泳分析後，利用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 萃取。將 PCR 所得之序列及載體分別以 0.5~1  $\mu$ l 限制酶於總體積 50  $\mu$ l 之反應溶液中反應 1~16 小時後，再進行 DNA 膠體電泳分析。之後利用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 萃取經限制酶切割完全之 DNA 片段，以 Vector : Insert = 1:3~1:8 的比例取適當量於含 1  $\mu$ l T4 DNA Ligase 且總體積 10  $\mu$ l 之反應溶液中，在 16°C 水浴槽中反應 16 小時。將裝有反應容液之微量離心管放入 65°C 水浴槽 20 分鐘以去除 T4 DNA Ligase 之活性，之後將 DNA 加入 200  $\mu$ l 勝任細胞 (competent cell) 進行細菌轉形。轉形後所得之菌落再以 PCR 確認或進行小量質體製備及限制酶切割來確認片段大小是否正確，最後利用 Mini Plus<sup>TM</sup> Plasmid DNA Extraction System GF2002 將質體抽出並送定序比對序列是否正確。

## 二、細菌轉形 (Transformation)

將質體加入 100~200  $\mu\text{l}$  勝任細胞中混合均勻，靜置於冰上 30 分鐘後，於 42°C 水浴槽中熱休克 (heat shock) 90 秒，即轉置於冰上 5~30 分鐘使菌體稍做恢復。之後再加入 1 ml LB 培養液，37°C 下振盪培養 1 小時使菌體恢復活性。以 4,000 rpm 離心 5 分鐘以去除大部分 LB，留下約 200  $\mu\text{l}$  LB，使細菌重新懸浮並均勻塗佈於含有 ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 或其他抗生素的 LB 瓊脂平板 (LB agar plate) 上。將盤子倒置於 37°C 下培養約 16-20 小時，即可得到轉形的菌落。

## 三、勝任細胞的製備 (Preparation of competent cells)

將大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  或 Rosetta gami 培養在 3 ml LB 培養液中 (Rosetta gami 需養在含 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chloramphenicol 及 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin 的 LB 中，以下皆是)，於 37°C 震盪培養 16 小時 (Rosetta gami 需培養 24 小時)。之後取出 700  $\mu\text{l}$  菌液加入 70 ml LB 培養液中繼續培養 2~5 小時 (Rosetta gami 需 4~8 小時) 至 O.D.<sub>600</sub> 約 0.3~0.5 之間。取出菌液靜置於冰上 10 分鐘後離心 (3,000 rpm，10 分鐘，4°C)。除去上清液，加入 14 ml 冰 Buffer I，溫和地使細菌懸浮於 Buffer I 後靜置於冰上 2~3 小時。之後以 3,000 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘後，去除上清液。將菌塊重新懸浮在 4 ml 之冰 Buffer II 後，於冰上迅速取 200  $\mu\text{l}$  含勝任細胞之溶液分裝於 1.5 ml 微量離心管中，並丟至液態氮中急速冷凍後，將勝任細胞置於 -80°C 保存。

### Buffer I

130 mM	KOAc
50 mM	MnCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
15%	Glycerol

\*依少量 ddH<sub>2</sub>O→Glycerol→ KOAc→ MnCl<sub>2</sub>→ RbCl→ CaCl<sub>2</sub> 之順序加入後，利用 0.2 M Acetic acid 調整 pH 值至 5.8，並補 ddH<sub>2</sub>O 至正確體積後，利用 0.22 μm filter 過濾至無菌容器中。

#### Buffer II

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O
10 mM	RbCl
15%	Glycerol

\*依少量 ddH<sub>2</sub>O→Glycerol→ MOPS → CaCl<sub>2</sub>→ RbCl 之順序加入後，利用 1 N NaOH 調整 pH 值至 6.8，補 ddH<sub>2</sub>O 至正確體積後，利用 0.22 μm filter 過濾至無菌容器中。

#### 四、小量質體製備 (Mini-preparation)

此法乃根據 Ish-Horowicz 和 Burke 於 1981 年發表的方法 (Ish-Horowicz and Burke 1981)，簡稱為 "miniprep"。將單一菌落接種在內含抗生素的 3 ml LB 培養液，於 37°C 下振盪培養 12~16 小時。將菌液移至離心管中以 14,000 rpm 離心 1 分鐘。倒去上清液後，加入 100μl solution I，充分搖晃使菌體均勻散佈。再加入 200μl solution II，靜置 2 分鐘使菌體溶解破裂，此時會呈現透明黏稠狀。接著加入 150μl solution III，混合均勻後置於室溫下 3~5 分鐘，全速離心 10 分鐘。離心後，可見由染色體 DNA、SDS 以及蛋白質等聚集形成的白色固狀物沉澱於下方管壁。小心取出上清液至另一個離心管並加入 0.6~0.8 倍體積的異丙醇 (isopropanol) 混合均勻，室溫靜置 2 分鐘後，再以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，使質體沉澱。接著使用 70% 酒精清洗兩次，最後真空抽乾，以無菌水溶解質體 DNA，貯存在 -20°C。之後利用分光光度計 (spectrophotometer) 測定 O.D.260/280 吸光度，定量質體 DNA 濃度 (1 O.D.260 = 50 μg/ml)。以特定限制酶切割出的片段大

小初步推斷質體 DNA 之正確性，再利用 Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction kit 抽取較乾淨之質體後定序。確認小量抽出之質體序列正確後，將此 DNA 重新轉形至細菌中使 agar plate 中之菌落皆具相同質體 DNA，以利後續製備大量質體。

### 【材料】

Solution I (保存於4°C)：

100 µg/ml	RNase A
50 mM	glucose
50 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	EDTA

Solution II (保存於密閉瓶內或新鮮配製)：

0.2 M	NaOH
1 %	SDS

Solution III：

3 M	potassium acetate
12 %	glacial acetic acid

### 五、大量質體製備 (Large-scale plasmid isolation)

將單株 (single colony) 含質體之大腸菌 DH5α 挑出，置於 5 ml LB 培養液中 (含 ampicillin 50µg/ml 或 kanamycin 50µg/ml) 中，以 37°C 振盪培養 12~18 小時後將之倒入 500 ml 含篩選抗生素之 LB 中，再將之置於 37°C 振盪培養 12~18 小時。之後以 7,500 rpm 離心 10 分鐘 (4°C, Beckman, JA-10 rotor)，取其沉澱物，加入 10 ml 的 Solution I 並劇烈振盪或利用 pipetting 使其混合成菌體懸浮液後，放置於

冰上 10 分鐘，再加入新鮮配製的 Solution II 20 ml，輕輕搖晃至溶液呈黏稠狀。接下來置於冰上 10 分鐘後，加入 15 ml 的 Solution III，輕輕搖晃後可見白色棉絮狀沈澱物產生。置於冰上 15 分鐘後以 7,500 rpm (Beckman, JA-10 rotor) 離心 25 分鐘。離心時將適量棉花塞入 30 ml 針筒後壓扁，並將離心後上清液利用塞有棉花之針筒過濾至已滅菌的 250 ml 離心管中。過濾後之液體加入 0.8 倍體積的異丙酮 (Isopropanol)，混合均勻後室溫靜置 20 分鐘以進行 DNA 沈澱，之後以 8,000 rpm (Beckman, JA-14 rotor) 離心 15 分鐘後，去掉上清液並將白色沈澱物於室溫倒置約 30 分鐘讓異丙酮完全揮發後，加入 8 ml 的 TE buffer 重新溶解，再加入 10.3 g 氯化銫 (CsCl) 和 1.5 ml EtBr (5 mg/ml)。混合均勻後，利用 5 ml 針筒將其滴入 Beckman quick seal 離心管中秤重並平衡 (差異小於 0.001g) 後加熱密封並密閉於 Beckman Vti 65.1 的 rotor 中進行超高速離心 (25°C, 55,000 rpm)。16 小時後，在紫外光下以帶 18 G 針頭之針筒抽取超螺旋型 (supercoiled form) 的質體。之後再重複一次 CsCl-EtBr 密度梯度離心，以求更高純度之超螺旋型質體。抽出之超螺旋型質體加入用等體積水飽和過之 1-butanol 上下搖晃均勻後靜置分層，吸除上層帶有 EtBr 之 1-butanol，反覆此動作至上層澄清透明後，去除 1-butanol (上層)，並將含質體之溶液(下層)放入透析袋中以低濃度 TE buffer (low salt TE buffer) 於 4°C 透析三次。之後以等體積之 phenol:chloroform:iso-amyl alcohol (25:24:1) 進行萃取兩次，去除蛋白質。加入 0.1 倍體積的 3M NaOAc 及 2.5 倍體積純酒精亦或是 0.6 倍體積之 isopropanol，混合均勻。在 -70°C 下沈澱 1 小時 (-20°C, 3~4 小時) 後以最高轉速離心 15 分鐘，之後去掉上清液，白色沈澱物以 5 ml 70% 酒精清洗離心兩次後，在無菌操作台內抽乾酒精，靜置至酒精完全揮發後，以 100~500 µl 之 low-salt TE buffer 溶解 DNA，測定 DNA 溶液之 O.D.260/280 吸光度。

#### 【材料】

#### Solution I

50 mM glucose  
25 mM Tris-HCl (pH=8.0)  
10 mM EDTA

#### Solution II

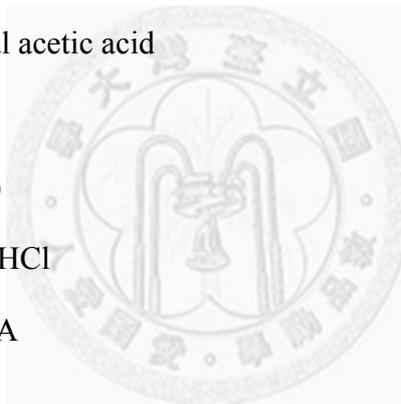
0.2 N NaOH  
1 % SDS

#### Solution III

3 M potassium acetate  
12 % glacial acetic acid

#### low-salt TE buffer (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA



### 六、質體轉染 (Transfection)

#### • BBS 轉染

第一天先在 6 well 或 10-cm 盤中種植  $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  顆細胞，第二天轉染實驗開始前 2-4 小時，更換一次新鮮的培養液 2ml 或 8 ml。為了確定 DNA 轉染效率，於每一個轉染樣本中同時共同轉染 (co-transfection) 0.5~1  $\mu\text{g}$  報導基因 pEGFP-C1 以做參考。先取出無菌蒸餾水 344  $\mu\text{l}$  均勻加入 40 $\mu\text{l}$  2.5 M 磷酸鈣 ( $\text{CaCl}_2$ )，之後加入質體 DNA 總量 16  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 共 400  $\mu\text{l}$ 。待混合均勻後，轉動 tip 一滴一滴加入 400  $\mu\text{l}$  之 2 $\times$ BBS，此步驟需於 30 秒內完成。自第一管加入 2 $\times$ BBS 的時間算起，在室溫靜置 18~30 分鐘，再依同樣的順序每 30 秒將 400

$\mu\text{l}$  或 800  $\mu\text{l}$  的混合液加入 6 孔盤或 10-cm 培養皿中，並於 35°C，3% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 16~20 小時。隔日將含有轉染緩衝液之培養液吸去，以 PBS 洗去細胞上多餘的磷酸鈣沉澱物，重複清洗 2~3 次之後，再重新加入含血清之培養液繼續培養 48 小時以進行後續實驗。

**2× BBS buffer (pH=6.95) :**

1.17 g                      Sodium BES

1.63 g                      NaCl

21.3 mg                     Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

加 dd.H<sub>2</sub>O 至 100 ml，過濾滅菌，分裝後儲存在 -20°C

• HEPES 轉染

細胞前置步驟與 BBS 轉染相同，唯有轉染時步驟及取量稍異。以 10-cm 培養皿之細胞為例，進行轉染時，先取 352  $\mu\text{l}$  之無菌蒸餾水均勻加入 32  $\mu\text{l}$  2.5 M CaCl<sub>2</sub>，之後加入 16  $\mu\text{l}$  轉染用 DNA。將裝有上述溶液之微量離心管置於 vortex machine 上使之保持震盪狀態(注意：勿使溶液震盪出管壁)，緩慢滴入 400  $\mu\text{l}$  2×HEPES 溶液後置於冰上 20 分鐘，最後再依順序將溶液滴入細胞培養皿內，培養皿置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 16~20 小時。隔日將含有轉染緩衝液之培養液吸去，以 PBS 清洗 2~3 次，再重新加入含血清之培養液繼續培養 48 小時以進行後續實驗。

**2× HEPES buffer (pH=7.14) :**

280 mM                     NaCl

50 mM                      HEPES

1.5 mM                     Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

15 mM D-glucose

10 mM KCl

過濾後分裝並儲存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## 七、慢病毒製備 (Preparation of Lentivirus)

### • DNA 製備

由於製備慢病毒之質體較難抽取，因此必須利用 Terrific Broth (TB) 培養 12~16 小時後，以小量 kit 或大量抽取較多的 DNA 質體。

### Terrific Broth

YTG base		potassium phosphate solution	
24 g	yeast extract		
12 g	tryptone	2.31 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ monobasic
4 ml	glycerol	12.54 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ dibasic
補 ddH <sub>2</sub> O 至 900 ml		補 ddH <sub>2</sub> O 至 100 ml	

\*將 YTG base 及 potassium phosphate solution 分別利用滅菌釜滅菌後，冷卻至  $60^{\circ}\text{C}$  後混合在一起。

### • 慢病毒製備

前一天種植  $5 \times 10^5$  的 293 FT 細胞於含有 5 ml 培養液的 6-cm 培養皿中。隔日，細胞約六、七成滿，依下表比例，

Reagent	per 6-cm plate
pCMV- $\Delta$ R8.91	2.25 $\mu\text{g}$
pMD.G	0.25 $\mu\text{g}$
hairpin-PLKO.1	2.5 $\mu\text{g}$
2.5 M $\text{CaCl}_2$	20 / 16 $\mu\text{l}$

ddH <sub>2</sub> O	to 200 $\mu$ l
Transfection Reagent (2 $\times$ BBS / 2 $\times$ HEPES)	200 $\mu$ l

混合均勻後，靜置 20 分鐘(BBS 於室溫, HEPES 於 4°C)。再以一滴一滴的方式將 DNA mixture reagent 加入培養皿中，並輕輕搖晃培養皿使混合均勻。將培養皿置於培養箱中培養。

16 小時後，將含 transfection reagent 之培養液換成 5 ml 10% FBS、1% BSA 及 1% PSA 的 DMEM 培養液。於 24 小時後，收取病毒液並利用 0.22  $\mu$ m filter 過濾後，分裝於 1.5 ml 微量離心管中置於- 80°C 冰箱保存。再加入 5 ml 10% FBS、1% BSA 及 1% PSA 的 DMEM 培養液。

#### 八、慢病毒定量 (quantification of Lentivirus)

##### Day 1

於96孔盤中每個well種植100  $\mu$ l 293細胞 (細胞密度為 $6\times 10^5$  細胞/mL)，輕輕搖晃使細胞平均分佈在孔盤中，將細胞於37°C，5% CO<sub>2</sub>培養箱過夜。

##### Day 2

移除95  $\mu$ l培養液並加入40  $\mu$ l含有10  $\mu$ g/ml polybrene的培養液。之後依下表製備序列稀釋之病毒液：

Dilution No.	Virus stock or previous dilution ( $\mu$ l)	Media ( $\mu$ l)	Total Volume ( $\mu$ l)	Volume removed ( $\mu$ l)	Volume remaining ( $\mu$ l)	$\mu$ l virus per 5 $\mu$ l
1	80	20	100	50	50	4
2	50	50	100	50	50	2
3	50	50	100	50	50	1

4	50	50	100	50	50	0.5
5	50	50	100	50	50	0.25
6	50	50	100	0	100	0.125
Blank	0	50	50	0	50	0

取5  $\mu$ l稀釋病毒液加入於各相對之well中，最後polybrene的濃度為8  $\mu$ g/ml。之後將培養皿置於37°C，5% CO<sub>2</sub>培養箱培養過夜。

### Day 3

移除病毒液，加入200  $\mu$ l含2  $\mu$ g/ml puromycin之培養液，並培養在37°C，5% CO<sub>2</sub>培養箱48小時。

### Day 5

48小時後，每個well加入20  $\mu$ l MTS mixture (2 ml MTS及100  $\mu$ l PMS)，於37°C培養4小時後，利用ELISA reader測定O.D.<sub>490</sub>吸光度。(此步驟也可利用MTT assay來測細胞之生存曲線。)

將各個well中之O.D.值除以未感染病毒且未加puromycin之細胞所測得之O.D.值（設為100%），計算出相對生存曲線，取曲線之linear range來決定相對病毒效價。(譬如當細胞被0.4  $\mu$ l 病毒感染時，生存率約為88%。這就相等於約88% $\times$ 6000 (=5280) 的細胞被感染。意即，0.4  $\mu$ l的病毒液含5280具感染力的病毒，病毒效價即為5280/0.4 $\times$ 1000=1.3 $\times$ 10<sup>7</sup> R.I.U./ml。)

\*R.I.U : relative infection unit

## 九、慢病毒感染 (Lentivirus infection)

於感染前一天種植2 $\times$ 10<sup>5</sup>之細胞，隔日將培養液置換成含8  $\mu$ g/ml polybrene及2 $\times$ 10<sup>5</sup> R.I.U 病毒的培養液。待病毒感染細胞24小時後，除去病毒液，置換成含2  $\mu$ g/ml puromycin之培養液。之後利用含2  $\mu$ g/ml puromycin之培養液將未被病毒感染之細胞篩除一個星期後，得到穩定表現shRNA之混合細胞株。再利用

西方墨點法及 Real-time PCR 分析混合細胞株中特定基因之 mRNA 及蛋白質表現量是否下降。

#### 十、細胞核糖核酸萃取 (RNA extraction)

將一盤 10-cm、約 8 成滿的細胞上清液倒去，加入 1ml Trizol (若 6 well 則加入 0.5 ml Trizol<sup>®</sup> reagent) 後均勻搖晃並以 pipet 抽吸數次，使溶液作用完全，之後收集在 1.5 ml RNase-free 之 eppendorf tube 中即可進行 RNA 萃取步驟或保存於 -80°C 冰箱。首先在收下的細胞-Trizol 混合物中加入 200  $\mu$ l 氯仿 (chloroform) (若 6 well 則加入 100  $\mu$ l)，管蓋蓋緊後劇烈震盪兩分鐘，即置於室溫三分鐘。之後以 4°C、14,000 rpm 離心 20 分鐘，吸取 RNA 所在的透明上清液部分至另一乾淨微量離心管中 (勿吸到水層與有機溶液間之白色絲狀物質)，並加入 500  $\mu$ l 的異丙酮 (Isopropanol) 均勻混合 (若 6 well 則加入 250  $\mu$ l)，於室溫下作用 10 分鐘；之後將此混合溶液以 4°C，14,000 rpm 離心 20 分鐘，RNA 即沉澱於管壁底層；最後以 500  $\mu$ l、75%酒精清洗 RNA 兩次，即得到乾淨的 RNA 沉澱物，待 RNA 自然風乾後即加入適當體積之 DEPC 水回溶。之後將 RNA 溶液以 NanoDrop 測定 O.D.<sub>260</sub>、O.D.<sub>280</sub> 及其濃度，將 RNA 最終濃度調整為 1  $\mu$ g/ $\mu$ l；取 1 $\mu$ g RNA 跑 1.5% TAE agarose gel 確定 RNA 純度。

#### 十一、反轉錄反應 (Reverse transcription)

進行反轉錄反應前，先利用 DNase I, Amplification Grade (Invitrogen) 去除殘餘之 DNA。取 1  $\mu$ l RNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 加入 1  $\mu$ l DNase I (1 U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ l 10X DNase I reaction buffer 及 7  $\mu$ l DEPC 水，室溫下作用 15 分鐘後再加入 1  $\mu$ l EDTA (25 mM)，以 65°C 加熱十分鐘中止 DNase I 酵素反應。接下來以 SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) 進行反轉錄反應。首先將 1  $\mu$ l oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500  $\mu$ g/ml, 以 DEPC 水溶解) 或是 1  $\mu$ l 2  $\mu$ M gene-specific primer 與 1  $\mu$ l dNTP

mixture (10 mM) 加入先前經DNase I處理過之1 µg RNA溶液中混合均勻，以65°C 加熱5分鐘後快速置於冰上三分鐘，以去除RNA二級結構。之後在此RNA溶液中依序加入4 µl 5X First-Strand Buffer buffer、1 µl DTT (0.1M)、1 µl RNaseOUT (40 units/µl) 及1 µl SuperScript™ III RT (200 units/µl)。混合均勻後離心，將管子置於50°C作用60分鐘 (如果是gene-specific primer，則需55°C作用60分鐘)，最後以70°C，15分鐘中止反應即得到cDNA，加入80 µl DNase/RNase-free ddH<sub>2</sub>O，使最終濃度為10 ng/µl並將其保存於-20°C。

## 十二、即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)

取 50 ng cDNA 以 2× Real-QPCR Master Mix (Ampliqon III) 進行即時聚合酶鏈鎖反應，使用引子序列見附表，偵測機型為 ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem)。

各反應詳細取量如下：

	Internal control EX : GAPDH	Target gene EX : HNRPM
cDNA	5 µl (10 ng/µL)	5 µl (10 ng/µL)
Primer mixture	2 µl (1 µM)	4 µl (1 µM)
dd H2O	5.5 µL	3.5 µL
2× Real-QPCR Master Mix	12.5 µL	12.5 µL
Total volumn	25 µL	25 µL

反應 cycle、溫度及時間如下

cycle	溫度	時間
1	50.0°C	2 分
1	95.0°C	10 分

40	95.0°C	15 秒
	60°C	1 分
Dissociation curve		
1	95.0°C	15 秒
	60°C	1 分
	95.0°C	15 秒

### 十三、半定量聚合酶鏈鎖反應(semi-quantitative PCR)

抽取細胞之 total RNA 後，經過 NanoDrop 測定 O.D.<sub>260</sub>、O.D.<sub>280</sub> 及其濃度後，使用 oligo (dT)<sub>12-18</sub> 或是 gene-specific primer 來夾出 RNA 片段，將 1 µg RNA 反轉錄成 cDNA，調整最後濃度為 10 ng/µl 即可進行半定量聚合酶鏈鎖反應。以流感病毒 M segment 為例，利用 M1、M2、mRNA3 以及 M mRNA specific primers (各序列如附表)來進行 PCR，各時間點樣品組 cDNA 取 250 ng 加入混合了不同引子之溶液中，利用 *Taq* DNA polymerase 來進行 PCR。而此時 PCR cycle 需設計在線性擴增區 (linear range of amplification) 範圍之內 (約 15~30 cycle)，才能使各樣品組之擴增倍數在指數期 (exponential rate)。最後將 DNA 於 2% agarose gel 進行電泳分析，染 EtBr 後拍照並使用軟體 (UVP software, UVP BioSpectrum 500 imaging system) 分析各個樣品組之亮度值，依照 control 組的量來作為基準比較各樣品組的量之多寡。

\*PCR 擴增過程可遵循一基本公式： $Y_n=(1+R)^n$ ， $Y_n$  代表  $n$  個 cycle 之後的 amplification factor， $R$  表各 cycle 的擴增效率 (amplification efficiency)。假定各個 cycle 的效率可達 100% ( $R=1$ )，則得到之擴增子(amplicons)可在各 cycle 兩倍複製 (doubling)。但大部分的 PCR 反應中，效率都小於 100%，通常在第 15~第 30 cycle 之間的效率是 70%~80%，依起始原料濃度可能有些許差異。在擴增範圍達指數期時可能只有幾個 cycle 的時間，之後達到飽和(plateau) (Ferre 1992)。

#### 十四、螢光酶分析 (Luciferase assay)

將12或24孔盤中細胞培養液去除，加入30  $\mu$ l 1 $\times$ PBS於well中，再加入30  $\mu$ l 含 Dual-Glo. Luciferase Substrate之Dual-Glo. Luciferase Buffer。之後將well中的細胞利用此混合液以pipetting的方式打破細胞後，吸取50  $\mu$ l至96孔白色盤靜置10分鐘後，利用Top Count (Packard microplate scintillation counting) 儀器偵測Firefly luciferase之螢光強度。接著將Renilla luciferase substrate - Dual-Glo. Stop & Glo<sup>®</sup> Substrate和Dual-Glo. Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer以1 : 100的比例混合均勻後，加入25  $\mu$ l 混合液至well中，靜置10分鐘後，再利用Top Count (Packard microplate scintillation counting) 偵測螢光強度。將Firefly luciferase的螢光強度利用Renilla luciferase的螢光強度來標準化，以減低因細胞轉染效率不同所造成的螢光表現差異。

#### 十五、細胞全蛋白質之收取

將細胞以1 $\times$ PBS清洗2次，加入1 ml 1 $\times$ PBS並使用刮棒將細胞輕輕刮下，將細胞液吸入微量離心管中，1,500 rpm, 4 $^{\circ}$ C離心10分鐘，將上清液PBS吸除留下細胞 pellet，再加入60~200  $\mu$ l 的 lysis buffer (lysis buffer : 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail)，於4 $^{\circ}$ C每10分鐘劇烈震盪一次以充分打破細胞，30~60分鐘後以14,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C離心20分鐘，收集上清液即為細胞的全蛋白質，可暫時儲存於-80 $^{\circ}$ C。

#### 十六、蛋白質定量

根據Bradford蛋白質分析法進行蛋白質定量。配取不同濃度(0、1、2、4、8、12、16、32  $\mu$ g/ml)之牛血清蛋白(BSA)溶液400  $\mu$ l。同時以200 $\times$ 稀釋蛋白質樣品(取5  $\mu$ l 蛋白質樣品於995  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O)。接著將50  $\mu$ l 蛋白質分析染劑(Bio-Rad protein assay dye) 加入96孔盤，再加入200  $\mu$ l 不同濃度之BSA溶液及

蛋白質樣品稀釋液，小心以 pipetting 混合均勻後，以 ELISA reader 測量 O.D.<sub>595</sub> 吸光值，畫出標準曲線。最後將樣品測得之 595 nm 吸光值與標準曲線進行比對，則可估算樣品的蛋白質濃度。

#### 十七、西方墨點法 (Western blot)

各樣品取 20~50  $\mu\text{g}$  的蛋白質進行 10% 的膠體電泳 (SDS-PAGE)，電泳結束後將凝膠上的蛋白質以 250 mA 的電流轉漬到 PVDF membrane 上 2 小時。將轉漬後的 PVDF membrane 浸泡在 5% 的脫脂牛奶 (脫脂牛奶溶於 TBST buffer 中，TBST buffer: 1.5 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、0.1% Tween 20) 中 1 小時，之後再將 membrane 移入含有不同比例之一級抗體的 5% 脫脂牛奶中於 4°C 作用 16 小時。以 TBST buffer 洗去 PVDF membrane 上非特異性結合的抗體，每 10 分鐘換一次 TBST buffer 共 30 分鐘，再換上含有二級抗體的 5% 脫脂牛奶，室溫下作用 1 小時。以 TBST buffer 洗 membrane，分別為 10、10、10 分鐘換一次 TBST buffer，再以不含 Tween 20 的 TBS buffer 洗 5 分鐘。因二級抗體上帶有 horse radish peroxidase，故加入 ECL system 與 membrane 反應進行反應，並以 X 光片偵測其發出之化學冷光。

#### 十八、流感病毒感染及增殖 (Influenza virus infection and amplification)

第一天先將 10-cm 培養盤中全滿之 MDCK P69 利用 Trypsin-EDTA 打下後，混入 4~5 ml 10% FBS DMEM，取四分之一的量種植至新的 10-cm 盤中。隔日細胞約呈 5、6 分滿度後，移除培養皿中的 10% FBS DMEM，以 PBS 清洗 1~2 次，之後加入 10 ml influenza infection medium，再利用 200  $\mu\text{l}$  tip 吸取 plaque assay 中培養 2~3 天後生成之 plaque 中的 Influenza A/WSN/33 病毒株 (H1N1，由施信如老師提供)，將沾有病毒之 tip 以 pipetting 的方式將病毒加入 medium 內。24 小時後，約有 5 成的 MDCK 細胞飄起，此時，收取此盤內之 medium，以 300 $\times$ g 於 4°C

離心 15 分鐘後，吸取上清液，並將病毒液依所需分裝至 1.5 ml 微量離心管後置於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存一年，如需保存一年以上，可保存於  $-150^{\circ}\text{C}$  中。

#### Influenza virus infection medium ( $4^{\circ}\text{C}$ )

1 ×	DMEM
3 %	Bovine serum albumin
1 mM	Sodium pyruvate
1 mM	NEAA
10 mM	1M HEPES buffer (pH 7.0)
2 $\mu\text{g/ml}$	TPCK-trypsin

\*HEPES 和 TPCK-trypsin 需在感染前 30 min 內加入。

#### 十九、流感病毒之溶斑分析法 (Plaque assay of Influenza virus)

前一天傍晚種植  $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  之 MDCK 細胞於 6 孔盤培養皿中 (或  $3 \times 10^5$  於 12 孔盤培養皿中)。隔日，細胞呈 monolayer 鋪滿整個培養皿，將培養液吸除後，以 PBS 清洗兩次後，將病毒液依 10 倍序列稀釋於 500  $\mu\text{l}$  influenza virus infection medium 中，取 500  $\mu\text{l}$  病毒液或不含病毒之 infection medium 加入於 well 中 (或 300  $\mu\text{l}$  於 12 孔盤培養皿中)，置於  $37^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  的培養箱。於感染半小時後，將 0.9% agarose (一般電泳用之 agarose 溶於水中) 微波，之後將 agarose 及 2× Influenza virus infection medium 於  $42^{\circ}\text{C}$  水浴槽中預熱。感染一小時後，將病毒液吸除，以 PBS 清洗兩次，取等量 0.9% agarose 及 2×Influenza virus infection medium (加入 agarose 前，先加入 HEPES buffer 及 TPCK-trypsin) 混合均勻。待混合液溫度約為  $38 \sim 39^{\circ}\text{C}$  後迅速加入 2 ml 於各 well 中 (1 ml 於 12 孔盤)。待凝後，將培養皿置於  $37^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  的培養箱培養 2~3 天。2~3 天後，觀察是否有溶斑 (plaque) 之形成。當溶斑可於肉眼觀察後 (直徑約 0.5 cm)，將 1 ml 4%

Formaldehyde/1×PBS 加入各 well 中固定細胞，約 15~30 分鐘後，將 Formaldehyde 及 agarose 倒掉。之後加入 1 ml 0.5% crystal violet/20% methanol 染色，至細胞呈藍紫色後，以清水溫和清洗，置於室溫風乾後，計算溶斑之數目，並乘上稀釋倍數後，計算病毒液之 plaque-forming unit (pfu) (Gaush and Smith 1968)。

#### 2× Influenza virus infection medium (4°C)

2 ×	DMEM
6 %	Bovine serum albumin
2 mM	Sodium pyruvate
2 mM	NEAA
20 mM	1M HEPES buffer (pH 7.0)
4 µg/ml	TPCK-trypsin

\*HEPES 和 TPCK-trypsin 需在加入 agarose 前內加入。以上步驟除種植細胞外，其他步驟皆需在 P2 操作台進行。

#### 二十、Glutathione S-transferase (GST) pull-down 分析

##### • GST 融合蛋白之製備

將含有 GST 或 GST-PB2 表現質體之菌株 Rosetta gami 以 3 ml LB (含 50 µg/ml ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenico, 15 µg/ml Kanamycin) 在 37°C 震盪培養 20~24 小時，隔天取出 1 ml 菌液加入至 100 ml 2×YT medium 於 37°C 培養 4~6 小時。當 O.D.<sub>595</sub> 為 0.6~0.8 時，加入 1 ml 100 mM isopropylthio-beta-D-galactopyranoside (IPTG)使最終 IPTG 濃度為 1 mM 以誘導 (induction) GST 或 GST-PB2 蛋白質表現。於 16°C 震盪培養 16~20 小時後將菌液離心 (4,000 rpm, 10mins, 4°C)，去掉上清液後，加入 10 ml 0.1% NP-40 NETN buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40)，接著將菌塊打散後，將菌液進行 Freeze-and-Thaw 三次後，進行超音波振破法

(sonication) 至菌液澄清 (12~15W, 秒數 on-10, off-10, 總共約 5~10 分鐘)。再將菌液以 11,000 rpm 於 4°C 離心 20 分鐘後取上清液, 保存於 -80°C 中。(如果融合蛋白主要出現在沉澱物內, 則在 Freeze-and-Thaw 完後, 加入 0.15 g Sarkosyl (final 濃度為 1.5%) 使蛋白可溶於上清液中。)

2×YT

16g/L Tryptone

10g/L Yeast extract

5g/L NaCl

- 製備含大量 HNRPM 蛋白之細胞萃取液

將  $2 \times 10^6$  之 293 FT 細胞接種至 10-cm 培養皿中。隔天再以 BBS 或 HEPES 轉染法將 16  $\mu$ g 之 FLAG-HNRPM 質體或控制組 FLAG-FTH1 質體送入細胞表現。48 小時後, 以 PBS 清洗兩次, 加入 1 ml 1×PBS 並使用刮棒將細胞輕輕刮下, 將細胞液吸入微量離心管中, 1,500 rpm, 4°C 離心 10 分鐘, 將上清液 PBS 吸除留下細胞 pellet, 加入 300  $\mu$ l 1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1×protease inhibitor cocktail, 1 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>), 置於冰上 30 分鐘 (每 10 分鐘劇烈震盪一次)。接著以 4°C 全速離心 10 分鐘後, 取上清液, 可至 -80°C 保存。

- \*RNase A treatment :

在細胞加入含有 RNase A 之 1% NP-40 lysis buffer (final 200  $\mu$ g/ml RNase A) 後, 將微量離心管置於 30°C 搖晃 10 分鐘, 之後放回 4°C 冰上 20 分鐘並且每 10 分鐘劇烈震盪一次, 最後以 4°C 全速離心取出蛋白質上清液。

- GST 結合 (binding) 分析

取已分裝好之含 GST 融合蛋白上清液 1 ml, 加入 20  $\mu$ l Glutathione Sepharose 4B beads (50% slurry), 在 4°C roller drum (50~100 rpm) 旋轉 2 小時, 之後以 500 $\times$ g 離心 5 分鐘後, 去掉上清液, 加入 1 ml 0.1% NETN buffer (含 1 mM PMSF) 劇烈振盪 10 秒後, 以 500 g 離心 5 分鐘。反覆清洗五次後, 去掉上清液, 加入 10  $\mu$ l PBS。之後取 1  $\mu$ l 及將 1  $\mu$ l 以 PBS 10 倍稀釋後的 beads 進行 SDS-PAGE, 利用 coomassie brilliant blue 染色進行粗略定量後, 取含約等量之 GST 蛋白或 GST 融合蛋白之 beads 加入於 1 mg 含大量 FLAG-HNRPM 蛋白或 FLAG-FTH1 蛋白之細胞萃取液中 (總體積 500  $\mu$ l), 混合液於 4°C 反應 4 小時後, 於 4°C 以 500 $\times$ g 離心 5 分鐘, 去掉上清液, 以 1 ml 1% NP40 NETN buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF) 清洗 beads 5 次, 每次於 4°C 搖晃 10 分鐘。加入 10  $\mu$ l 2 $\times$ SDS loading dye, 於 100°C 煮 5 分鐘後進行西方墨點法分析。

#### • Glutathione sepharose 4B beads preparation

取 133  $\mu$ l 之 Glutathione sepharose 4B beads (約 75% slurry) 於 1.5 ml 微量離心管中, 以 500 $\times$ g, 4°C 離心 5 分鐘後, 去除上清液。以 1 ml PBS 清洗 2 次後, 再以 500 $\times$ g, 4°C 離心 5 分鐘, 去除上清液, 加入 100  $\mu$ l 1 $\times$ PBS 使變成 50% slurry。

#### 二十一、免疫共沈澱法 (Co-Immunoprecipitation)

將 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 之 293 FT 細胞接種至 10-cm 培養皿中。隔天再以 BBS 或 HEPES 轉染法將 16  $\mu$ g 之 FLAG-HNRPM 質體或控制組 FLAG-FTH1 質體送入細胞表現。48 小時後, 以 PBS 清洗兩次, 加入 1 ml 1 $\times$ PBS 並使用刮棒將細胞輕輕刮下, 將細胞液吸入微量離心管中, 1,500 rpm, 4°C 離心 10 分鐘, 將上清液 PBS 吸除留下細胞 pellet, 加入 300  $\mu$ l 1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail, 1 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>), 置於冰上 30 分

鐘 (每 10 分鐘劇烈震盪一次)。接著以 4°C 全速離心 10 分鐘後，取上清液並定量取出 1 mg 蛋白質，補充 1% NP-40 buffer 使最後體積達到 500 $\mu$ l。在溶液中加入特定的一級抗體(final 1 $\mu$ g)於 4°C roller drum 利用利用 旋轉 4 小時，之後加入已用 2% BSA blocking 之 Protein G Sepharose beads(50% slurry) 25  $\mu$ l 再於 4°C roller drum (50~100 rpm) 旋轉 4 小時。最後以 500 $\times$ g 離心 5 分鐘，去掉上清液，以 1 ml 1% NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40,, 1 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1mM PMSF)清洗 beads 5 次，每次於 4°C 搖晃 10 分鐘。加入 10  $\mu$ l 2 $\times$ SDS loading dye，於 100°C 煮 5 分鐘後進行西方墨點法分析。

## 二十二、免疫螢光分析 (Immunofluorescence assay, IFA)

將 HEK293 細胞 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 種於已鋪有 12 mm 蓋玻片(Deckgläser)之 12 well 盤中，隔日進行 DNA 質體轉染後再經過 48 小時即可進行免疫螢光分析之準備工作。首先將 12 well 內的細胞培養液吸除，加入 300  $\mu$ l acetone:methanol=1:1 之混合液，將盤子置於 -20°C 5 分鐘。置回室溫，將 well 內使用 1ml 1 $\times$ PBS 清洗一次過後，利用 5% BSA/1 $\times$ PBS 於室溫靜置 blocking 1 小時。再使用 1 $\times$ PBS 清洗一次，將玻片拿出置於鋪有 parafilm 之大細胞培養盤中，玻片之細胞面朝上，在其上滴入 50  $\mu$ l 特定溶於 1% BSA/1 $\times$ PBS 之一級抗體(抗體稀釋比例 1:200~1:500)，避光靜置於 4°C，待隔日將玻片夾回 12 well 盤中，使用 1 $\times$ PBS 輕微搖晃清洗 3 次，每次 5 分鐘。吸除 PBS 後避光，隨後加入 50  $\mu$ l 溶於 Hoechst/1 $\times$ PBS 特定之二級抗體(抗體稀釋比例 1:500)，室溫靜置 1 小時後利用 1 $\times$ PBS 輕微搖晃清洗 5 次，每次 5 分鐘。待玻片清洗後即進行封片，先在載玻片點上些許 mounting medium (DakoCytomation S3023)，將蓋玻片由 12 well 取出，用衛生紙吸除大部分水分後，將細胞面朝向載玻片的方向，沿著 45° 角放於 mounting medium 所在位置，最後輕壓一下蓋玻片以除去氣泡及過多之 mounting medium。將完成之玻片放至 4°C 保存，即可使用螢光顯微鏡觀察。

## 實驗結果

### 一、利用酵母菌雙雜合篩選(yeast two-hybrid system)確認病毒蛋白質 PA 與細胞因子 HNRPM 的交互作用

本實驗室先前已利用 1996 年 James 等人所設計的基因體資料庫篩選(genomic library screening)和酵母菌株 PJ69-4A 進行酵母菌雙雜合篩選，找出可能與流感病毒 PA 次單元有交互作用的細胞因子，其中包含 HNRPM。為了再次確認兩者的交互作用，將 pGBDU-PA(全長)與 pGAD-HNRPM(全長)共轉型到 PJ69-4A 中，另外將兩空載體(pGBDU-C1 及 pGAD-C1)、pGBDU-PA 與 pGAD-C1 以及 pGBDU-C1 與 pGAD-HNRPM 分別共轉型至 PJ69-4A 中當作控制組(圖三, A)。之後將得到的轉型株分別塗到缺乏 uracil 和 leucine 的培養皿上，結果顯示四株轉型株皆有成功共轉型(圖三, B)；另外也將四株轉型株塗在缺乏 uracil、leucine、histidine 及 adenine 的培養皿上，最後只有共轉型 pGBDU-PA 與 pGAD-HNRPM 的酵母菌株可以生長(圖三, C)，此結果初步證實病毒蛋白質 PA 與細胞因子 HNRPM 可能有交互作用。

### 二、透過免疫共沈澱(Co-immunoprecipitation)與 GST pull-down assay 確認 PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質之間有交互作用

為了避免酵母菌雙雜合篩選系統的結果是偽陽性，我們進一步使用免疫共沉澱法與 GST pull-down 法確認二者之間的交互作用。在免疫共沉澱法中，將 3Myc-PA 與 FLAG-HNRPM 共同轉染到 293FT 細胞中，48 小時後收取全細胞蛋白質，利用 anti-Myc 抗體抓下 PA，再用 protein G beads 抓下此複合物。經過五次清洗動作除去其上非特異性結合之蛋白質後，以西方墨點法分析，使用 anti-FLAG 抗體來確認 FLAG-HNRPM 是否也結合在此複合物中，可以被抗體偵測到。另一方面，我們也從反方向來確認兩者的作用，將全細胞蛋白質收下後，以 anti-FLAG 抗體抓下 FLAG-HNRPM，再以同樣的步驟進行分析，使用 anti-Myc

抗體偵測 3Myc-PA 的存在。

結果顯示，以抗體抓下 FLAG-HNRPM 後，可以看到 3Myc-PA 也被一起抓下來，反之亦然，表示二者間具有交互作用(圖四)。為了排除彼此是透過 tag 而進行結合，使用 3Myc-Cul4A 作為 3Myc-PA 之 3myc tag 控制組；FLAG-FTH1 作為 FLAG-HNRPM 之 FLAG tag 控制組。由結果可以看出這些控制組並不能被複合物抓下，顯示 PA 與 HNRPM 的確具有交互作用且此作用並非透過 tag 造成。

另外，我們也嘗試用 GST-PA 在 *in vitro* 的情形下，檢視其是否能和 HNRPM 結合。首先利用 Rosetta-gami<sup>TM</sup> 大量表現出 GST-PA，收取蛋白質液後，加入 Glutathione sepharose beads 4B 抓下 GST-PA，再將其與有轉染 FLAG-HNRPM 的全細胞蛋白質混合。Beads 經過清洗後，進行西方墨點法分析，以 anti-FLAG 抗體偵測 FLAG-HNRPM 是否存在。結果顯示，FLAG-HNRPM 可以被此複合物同時抓下，而做為控制組的 FLAG-FTH1 則不行(圖五)；而這樣的作用再以 GST 取代 GST-PA 之後即消失，顯見 PA 與 HNRPM 之間的交互作用並非透過 GST 或 FLAG 所造成。

### 三、PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質之間的交互作用並非透過 RNA

由文獻可知 PA 與 HNRPM 皆可以結合上 RNA，為了排除 PA 和 HNRPM 之間的交互作用是透過 RNA 造成，因此在進行免疫共沉澱的實驗前，先使用足夠量的 RNase A 除去細胞內的 RNA(圖六, A)，而在抗體抓下 FLAG-HNRPM 後，仍可偵測到 3myc-PA 的存在(圖六, B)，此結果顯示 PA 與 HNRPM 之間的交互作用並非透過 RNA 而產生。

### 四、利用免疫螢光分析(IFA)法觀察到 PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質共同位於 (co-localize)細胞核中

以 MOI=3 的 A/WSN/33 流感病毒株感染固定於蓋玻片上的 NPC-TW04 細胞，

於感染後八個小時收取細胞並固定之。使用 anti-HNRPM 一級抗體辨認細胞中的 HNRPM，再使用發綠光的二級抗體辨認；同時使用 anti-PA 一級抗體辨認 PA，並用發紅光的二級抗體辨認之。於顯微鏡之呈像可觀察到發綠光的 HNRPM 與發紅光的 PA 共同聚集於細胞核中(圖七)，顯示此蛋白質-蛋白質交互作用發生於細胞核內。本實驗利用 Hoechst 呈現細胞核的位置。

#### 五、利用免疫共沈澱法確認 PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質之間的結合片段

由以上實驗顯示 PA 蛋白質可以與 HNRPM 蛋白質進行結合，為了找出二者各是用本身哪一段特定區域進行作用，分別以不同引子夾出 PA 及 HNRPM 各種片段進行實驗。我們將 3Myc-PA 分成 3Myc-PA 1/3N(a.a 1-259)、3Myc-PA 2/3N(a.a 1-515)及 3Myc-PA 2/3C(a.a 252-717)三種片段(圖八, A)，加上 3Myc-PA 全長，與 FLAG-HNRPM 做免疫共沈澱分析。利用 anti-Myc 抓下各個片段後，可以看到只有 3Myc-PA 全長、3Myc-PA 1/3N 及 3Myc-PA 2/3N 可以抓下 FLAG-HNRPM(圖八, B)，顯示 PA 對於 HNRPM 的結合位置可能是在 1/3N 的片段，即 PA 第一至第 259 個胺基酸之間。

另外，我們也將 FLAG-HNRPM 依照不同功能區塊分成四個片段，包含 FLAG-HNRPM a.a 1-654、a.a 1-411、a.a 1-279 及 a.a 1-149 (圖九, A) (由實驗室志成同學提供)。同樣與 3myc-PA 進行免疫共沈澱實驗，在使用抗體抓下 FLAG-HNRPM 的各個片段後，每個片段也都同時抓下 3Myc-PA(圖九, B)，因此推測 FLAG-HNRPM 是用其 N 端第一至第 149 個胺基酸與 PA 進行交互作用。

#### 六、PA 不會影響 HNRPM 的 alternative splicing 功能

經由先前實驗確認流感病毒 PA 和細胞因子 HNRPM 有交互作用後，我們希望能了解此交互作用對病毒或細胞有何意義。首先探討 PA 對於 HNRPM 的功能是否有影響。HNRPM 被報導可以調控 FGFR2 mRNA alternative splicing，在使用帶有

FGFR2 exonIIIb、exonIIIc 以及 intron 的 FGFR2 minigene 質體(pl-11-FS) (圖十, A)時發現有促進外顯子 IIIc 跳躍(exon IIIc skipping)的情形(Hovhannisyan and Carstens 2007)。

將 Carstens 實驗室分享之 FGFR2 minigene 質體與流感病毒 PA 質體一同轉染入 293T 細胞中,於 48 小時後收取細胞全 RNA,以 oligo-dT 為引子將細胞內 mRNA 轉為 cDNA,再利用設計在 minigene 前後的 upstream adenoviral exon (U) 及 downstream adenoviral exon (D) 上的專一性引子進行 semi-quantitative PCR,產物由電泳分析後再以軟體定量之。此系統已由實驗室佩芸學姐進行測試過。當細胞只表現 minigene 時,利用引子進行 RT-PCR 會產生 238bp 左右之片段,此產物為 U-exon IIIb/exon IIIc-D (U-B/C-D),若表現 HNRPM 則可以產生一個在 138bp 左右的產物 U-D,當送入越多 HNRPM 質體,此產物量也會增多(圖十, B)。

共同轉染 minigene、pFLAG-HNRPM 和不同量 pcDNA3-PA 質體至 293T 細胞內,抽取 RNA 並進行分析可發現,與單獨表現 HNRPM 的組別相比,額外加入低量至高量的 PA 質體,U-D 產物產生的比例皆無太大變化(圖十, C),顯示 PA 對於 HNRPM alternative splicing 的功能沒有顯著的影響。U-D 產物比例的計算是先求出 U-B/C-D 以及 U-D 的總值,再以 U-D 產物除之而得。(圖十, D)

#### 七、在 NPC-TW04 細胞中過量表現 HNRPM 蛋白質會抑制流感病毒螢光酶報導系統的表現

由於 PA 屬於病毒聚合酶的一員,與病毒基因的轉錄與複製有關,因此我們使用螢光酶報導系統來測試 HNRPM 會不會藉由與 PA 結合而影響病毒聚合酶的功能。先前由實驗室施潔如學姊所構築之質體 pPOL I-vLuc-RT 帶有負股 luciferase 基因序列,在細胞中由細胞 polymerase I 做出具負股 luciferase 序列的 RNA 後,流感病毒之 PB1、PB2、PA 以及 NP 便可將此負股 RNA 轉錄為帶有正股 luciferase 序列的 mRNA,進而做出 luciferase 蛋白質,因此螢光酶報導系統可模擬流感病

毒轉錄與複製的過程(圖十一, A)。透過偵測螢光強度可推算病毒聚合酶的效力。

將螢光酶報導系統所需之質體 pPOL I-vLuc-RT、PA、PB1、PB2、NP 以及表現 renilla 的控制組質體共同轉染入 NPC-TW04 細胞、NPC-TW04 細胞過量表現 FLAG-HNRPM 及過量表現 FLAG vector 的控制組細胞中，於轉染後 72 小時偵測 luciferase 值，並以 renilla 值作為 internal control 進行標準化。結果顯示，過量表現 HNRPM 的細胞，其 luciferase 值於 72 小時有下降的現象(圖十一, B)，顯示過量表現細胞內的 HNRPM 可能會抑制流感病毒的轉錄或複製過程。



## 討論

PA 在流感病毒中主要的功能為組成病毒聚合酶，參與複製與轉錄的過程，在病毒生活史中扮演重要的角色。相較於流感病毒表面蛋白 HA 及 NA 的高突變性，PA 在不同病毒株間的基因保守性較高，因此我們希望能透過對 PA 進行研究，找出可能與之有交互作用而影響病毒複製過程的細胞因子，期望在未來提供研發抗病毒藥物新的發展與方向。

本實驗室先前已利用酵母菌雙雜合系統找出若干個可能與 PA 有交互作用的細胞因子，其中也包含被報導過的蛋白質如 hCLE(Huarte, Sanz-Ezquerro *et al.* 2001)，顯示這樣的篩選系統具有一定的可信度。本研究在找到的細胞因子中，選取 HNRPM 進行進一步的探討。HNRPM 屬於 hnRNP 家族的一員，存在於 spliceosome 中(Neubauer, King *et al.* 1998)，參與 pre-mRNA 的 processing 過程。我們希望透過探究 HNRPM 與病毒蛋白質 PA 的作用關係，瞭解此作用對於病毒或細胞會造成甚麼影響。

首先，我們再重複一次酵母菌雙雜合實驗，結果證實了將 PA 當餌時，其可以結合至 HNRPM 上，轉錄出下游的報導基因，使得這一株酵母菌能夠正常生長在缺乏 histidine 及 adenine 的培養皿上，其生成單一菌落的時間較 YPD 培養皿上的菌落還長，約需 4-5 天。由於酵母菌雙雜合系統有時候可能會有偽陽性的結果，我們接著使用免疫共沉澱法來進一步確認兩蛋白質的交互作用，結果顯示，PA 和 HNRPM 互相可以抓下對方，而與控制組的不作用也排除了透過 tag 結合的可能性。接著我們使用 GST 融合的 PA 蛋白質進行 GST pull-down assay，檢視其在 *in vitro* 的情形下，是否也與 HNRPM 有交互作用。由結果得知，只有 GST-PA 可以抓下 FLAG-HNRPM，而 GST 則否。然而相較於 Input，經由 GST-PA 抓下的 HNRPM 量少很多，這可能是因為在實驗過程中，HNRPM 降解了或是在 Glutathione beads 抓下 GST-PA 的過程中，有太多的 GST-PA 已形成 inclusion body，而無法進行 GST pull-down 的動作，間接減少了相對應的 HNRPM 量。PA 屬於

病毒聚合酶的一員，具有與 RNA 結合的能力，而 HNRPM 也可以結合在 RNA 上，進行 RNA processing。為了排除二者間可能是透過 RNA 而有交互作用，我們再次進行免疫共沉澱分析，此次先將細胞蛋白質液加入 RNase A 作用除去其內 RNA 再進行共沉澱反應。結果發現無論有沒有經過 RNase A 的作用，FLAG-HNRPM 皆可以抓下 3Myc-PA，顯見二者的交互作用並非透過 RNA 存在。

最後，我們希望可以在病毒感染的情形下，可以看見細胞內生性的 HNRPM 與病毒所帶的 PA 有交互作用，如此更能確認前述實驗的結果為真。然而，以 MOI=3 的 A/WSN/33 流感病毒株感染 NPC-TW04 細胞並收取感染後 3-6 小時的細胞蛋白質液進行免疫共沉澱分析後，我們並沒有辦法用 anti-PA 抗體辨識到 PA，因此無法確認二者在自然感染的情形下，是否也具有交互作用的特性。無法辨識到 PA 的原因可能是因為 PA 的抗體敏感度或專一性不夠好，而細胞內因病毒感染而產生的 PA 又太少，因此若要繼續進行此實驗，必須先取得更好的 PA 抗體或者使用敏感度更高的蛋白質偵測方法。由於無法透過免疫共沉澱的方式看到自然感染下交互作用的現象，我們另外使用免疫螢光分析(IFA)法，對病毒感染過後的 NPC-TW04 細胞進行染色，在顯微鏡下可以看到 PA 與 HNRPM 都存在於細胞核中，這個現象也間接證實病毒感染下 PA 與 HNRPM 有交互作用的可能性。

接著我們藉由兩個蛋白質的分段表現，探討二者各是用其上哪一部分進行交互作用。在 PA 分段的分析中，顯示 PA 是透過其 N 端(a.a 1-259)與 HNRPM 進行作用，這個現象有別於目前已知的，與 PA 有交互作用的兩個細胞因子(hCLE 及 MCM)皆是透過 PA 的 C 端進行作用(Huarte, Sanz-Ezquerro *et al.* 2001; Kawaguchi and Nagata 2007)。PA 的 N 端具有許多功能，例如幫助 PB1 結合到 vRNA 或 cRNA 的啟動子上(Maier, Kashiwagi *et al.* 2008)、維持 PA 穩定度並參與在 cap-binding 的過程(Hara, Schmidt *et al.* 2006)，同時 PA 目前被發現的兩種酵素活性(內切酶活性與蛋白酶活性)也位於 PA 的 N 端(Huarte, Falcon *et al.* 2003; Dias, Bouvier *et al.* 2009)。細胞內 HNRPM 結合在 PA 的 N 端是否會影響上述所知的 PA 功能，是未

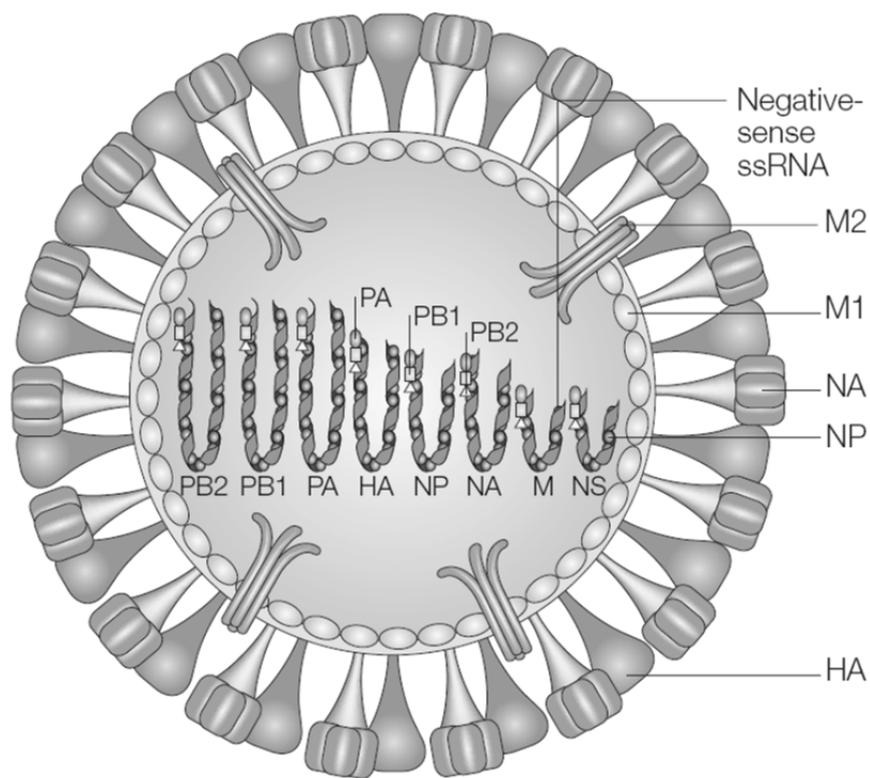
來可以深入探討的方向。而在 HNRPM 分段的分析中，我們發現四段從 C 端截短的分段皆可以結合 PA，因而推測 HNRPM 的結合位置是在其上的 N 端(a.a 1-149)，這一個片段已知有 RNA-binding domain。為了更進一步確認 HNRPM 的作用片段，我們正在建構缺少 N 端的 HNRPM 突變株，希望能透過證明這一片段並不會與 PA 有交互作用，加強 HNRPM 以 N 端為作用部位的假設。然而此片段的表現一直很不穩定，目前並沒有報導以 HNRPM 做分段的研究，或是 HNRPM 的 N 端具有穩定結構的功能假設，我們接下來會使用不同的培養條件，繼續嘗試表現此一分段。

在確認彼此的交互作用後，接著我們想知道 PA 與 HNRPM 的作用對於病毒生活史或宿主本身有甚麼生理意義。首先我們探討 PA 可能對於 HNRPM 的功能有甚麼影響。HNRPM 目前研究最主要的功能就是調節基因的 alternative splicing，因此我們使用 FGFR2 minigene (pI-11-FS)質體來進行 HNRPM 之功能測試，當 FGFR2 minigene 與 FLAG-HNRPM 質體同時送入 293T 細胞內表現時，HNRPM 可以促進 FGFR2 minigene 之 exon IIIc skipping，使 splicing 產物增加。我們另外送入低量至高量的 PA 質體，檢視其對產生 splicing 產物的影響。結果顯示，PA 送入的量並不會影響 HNRPM 產生 splicing 產物的比例，推論 PA 與 HNRPM 的交互作用並不會影響 HNRPM 調節 splicing 的功能。然而，目前已有越來越多 HNRPM 調控 splicing 機轉的報導(Lleres, Denegri *et al.* 2010; Marko, Leichter *et al.* 2010)，過去實驗室佩芸學姐也有發現 HNRPM 可能參與在病毒 M2 mRNA splicing 的過程中，是否 PA 影響的是 HNRPM 在其他 alternative splicing 上的調控，進而促進病毒的複製繁殖，是未來可以進一步探討的方向。

接下來我們想了解 HNRPM 對於 PA 的功能是否會有影響。首先我們先利用 luciferase reporter assay 檢視 HNRPM 對於病毒整體複製轉錄的過程是否有影響。Luciferase reporter assay 在病毒 PB1、PB2、PA 和 NP 存在下，可以將負股 luciferase 基因轉錄為正股並做出 luciferase 蛋白質，因此可以模擬流感病毒 RdRp 進入細

胞核後轉錄及複製的行為。實驗結果顯示，在過量表現 HNRPM 的細胞中，RdRp 複製轉錄的功能會被抑制。然而這個分析只能檢視病毒 RdRp 辨認病毒啟動子後進行轉錄複製的過程，而不能完整反應病毒複製的每一個步驟，因此我們也會再使用 plaque assay 確認這個結果。目前由 luciferase reporter assay 的結果可知，HNRPM 會影響 RdRp 中某個或某幾個次單元，進而降低其功能性。經由先前交互作用的研究中，已發現 PA 會與 HNRPM 有交互作用，因此我們假設 HNRPM 可能是透過和 PA 作用而影響 RdRp 的功能；而由於 HNRPM 是結合在 PA 的 N 端，也是 PA 具有較多功能的區段，我們推論 HNRPM 是影響 PA 蛋白質 N 端與複製轉錄過程有關的功能，進而降低了病毒 RdRp 的能力。2009 年兩個研究團隊分別發表 PA 的結構分析，報導 PA 的 N 端可能屬於 DX(N)(D/E)XK 內切酶家族，參與在病毒轉錄早期 cap-snatching 的過程中(Dias, Bouvier *et al.* 2009; Yuan, Bartlam *et al.* 2009)。因此，我們未來想要研究的重點是 HNRPM 的結合會否導致 PA 內切酶活性的改變，進而影響病毒 cap-snatching 及轉錄的功能。

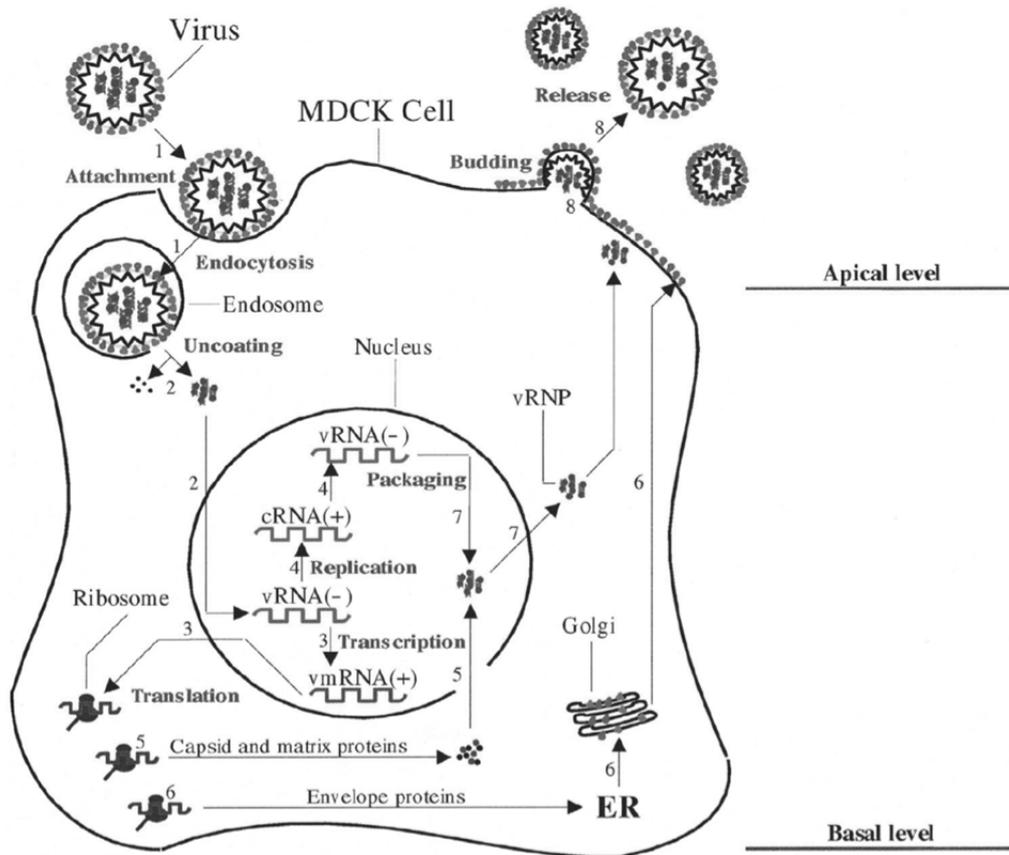
總結以上的研究結果，A 型流行性感冒病毒 PA 蛋白質和宿主內 HNRPM 蛋白質之間具有交互作用，並且由 luciferase reporter assay 得知，HNRPM 可能藉此交互作用負向調控病毒聚合酶的功能，其中的調控機制需要更深入的探討。另外，目前只知道 PA 不會影響 HNRPM 調控 FGFR2 minigene alternative splicing 的功能，PA 是否影響 HNRPM 其他的調節機制仍然未知，這也是之後需要進一步研究的重點。最後希望透過研究 HNRPM 對流感病毒轉錄及複製機轉的影響，能夠對病毒有更深一層的了解，以期能找出新的抗病毒方向。



{Horimoto, 2005 #73}

圖一 A 型流行性感冒病毒結構圖

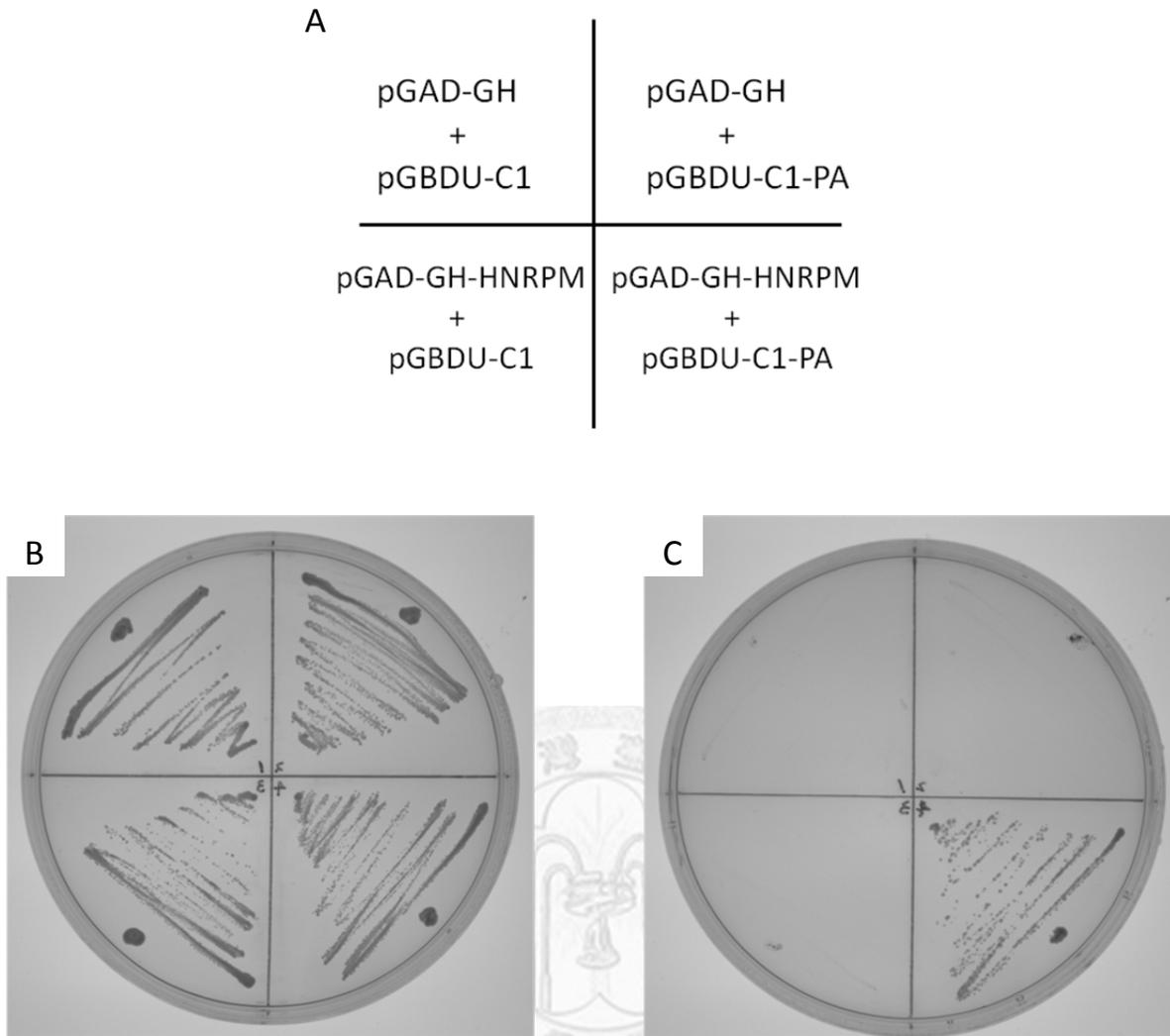
流感病毒大多成球狀，直徑約為 80-120nm，外表具有來自宿主細胞膜的外包脂質套膜(envelope)，其上覆蓋許多棘蛋白質(spikes)，由 HA 及 NA 組成，病毒套膜上另有 M2 蛋白質形成的離子通道(Nayak, Balogun *et al.* 2009)。外套膜下為 M1 蛋白質構成的基質，幫助維持病毒顆粒的構造形狀，病毒基因組即包覆在這樣的結構內(Aad, Abbott *et al.*)。A 型流感病毒的基因組(genome)由八段反義股 RNA 組成。分別表現出不同的病毒蛋白質：PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 及 NS2(Webster, Bean *et al.* 1992)，轉譯出 PB1 的 RNA 也可以表現另一種含 87 個胺基酸的非結構性蛋白質，PB1-F2(Noda and Kawaoka 2010)。



(Sidorenko, 2004 #92)

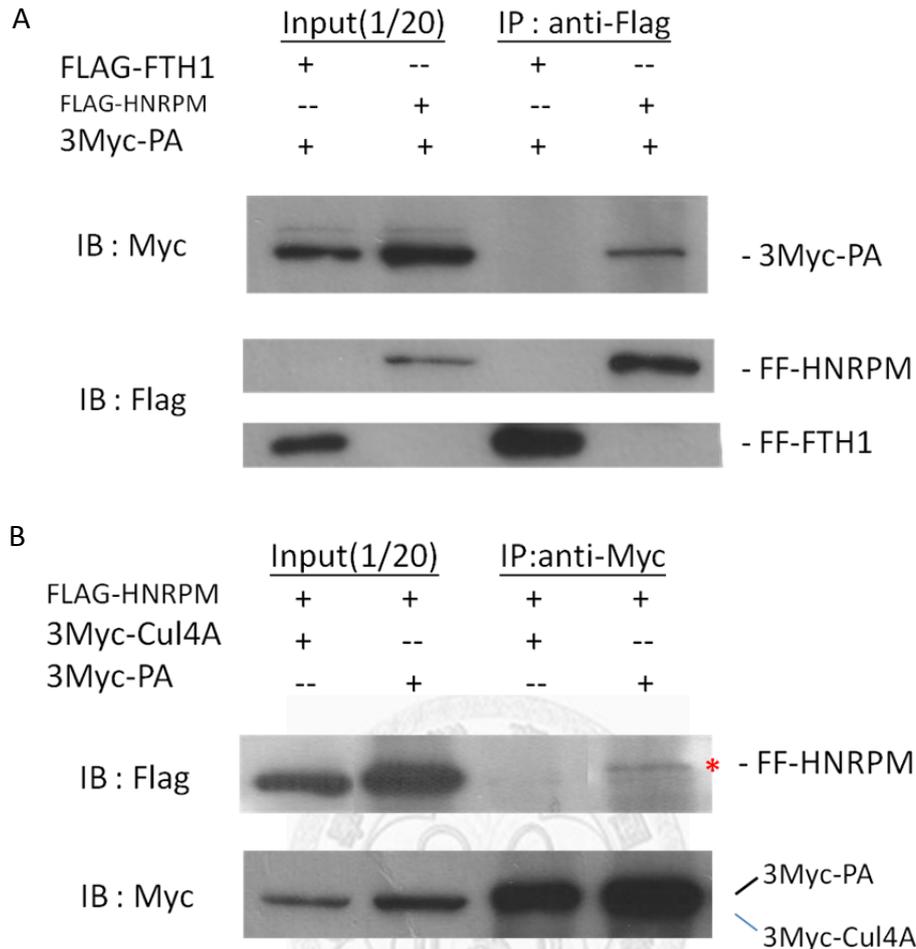
圖二 A 型流感病毒的生活史

1. 流感病毒附著 (attachment) 至細胞膜上之唾液酸受器 (sialic acid) 並以胞噬作用 (endocytosis) 進入細胞。2. 病毒套膜和核內體 (endosome) 融合後進行脫套 (uncoating), vRNP 進入核內。3. 進入核內的 vRNA 被病毒聚合酶轉錄 (transcription) 成 mRNA, 並輸出至細胞質進行轉譯 (translation), 新合成的 PA、PB1 及 PB2 會回到核內形成病毒聚合酶。4. vRNA 先被病毒聚合酶轉錄 (transcription) 成互補的 cRNA 後再以 cRNA 為模板複製 (replication) 成 vRNA。5. 在細胞合成的殼蛋白 (capsid)、基質蛋白 (matrix) 及非結構性蛋白 (nonstructural protein) 運入核內和 vRNA 作用或進行 mRNA 剪接 (mRNA splicing)。6. 病毒表面蛋白質 HA、NA 及 M2 先在內質網進行修飾, 再移動至高基氏體進行糖基化 (glycosylation), 之後送到細胞膜上等待組裝。7. 新合成的 vRNA 和病毒聚合酶形成 vRNP 複合體後, 運出核外至組裝位。8. vRNP 和組裝位上的套膜蛋白作用, 進行出芽 (budding) 並釋出 (release) 胞外。



圖三 酵母菌雙雜合系統顯示 PA 與 HNRPM 有交互作用

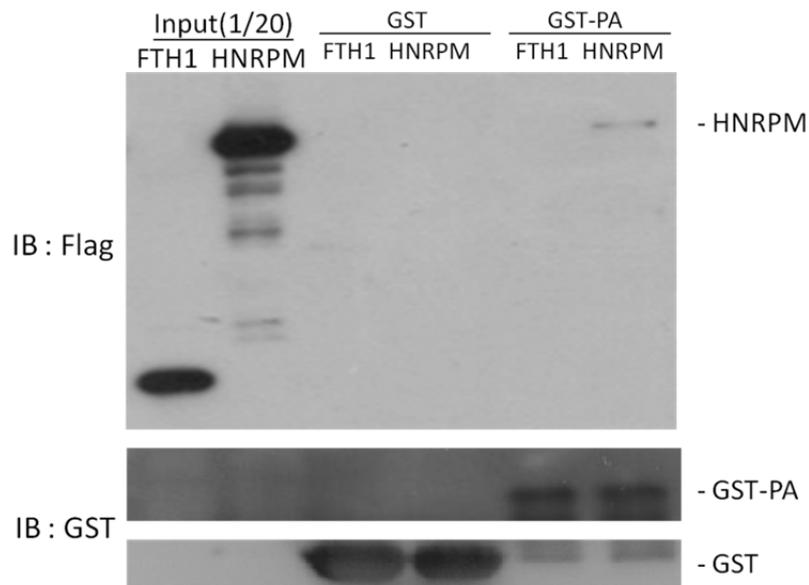
(A) 培養皿上四個區域所塗之酵母菌各帶有共轉型進去的不同質體。左上方為兩個空的載體，右上方帶有 PA 與對應之空載體，左下方為 HNRPM 與對應之空載體以及右下方為同時帶有 PA 與 HNRPM 質體的酵母菌。(B) SC-Ura-Leu 培養皿，四種酵母菌皆可正常生長在此培養皿中，表示質體共轉型成功，每株酵母菌皆帶有對應的兩種質體。(C) SC-Ura-Leu-His-Ade 培養皿，只有右下角的酵母菌株可以正常生長，顯示當 PA 與 HNRPM 同時存在時，二者結合啟動轉錄活化區與 DNA 結合區協同作用並轉錄出下游基因，因此能生長在缺乏 adenine 與 histidine 的培養皿上。



圖四 利用免疫共沉澱法確認 PA 與 HNRPM 的交互作用

(A) 種植  $2 \times 10^6$  顆 293FT 細胞於 10cm plate 中，隔日以 HEPES 轉染 3Myc-PA、FLAG-HNRPM 及 FLAG-FTH1 各  $6\mu\text{g}$ ，48 小時後以 0.5%NP-40 與 300mM NaCl 的 Co-IP buffer 收取細胞全蛋白質。取出 2mg 的蛋白質並補體積至  $500\mu\text{l}$ ，加入  $1\mu\text{g}$  anti-FLAG 抗體進行免疫沉澱，於  $4^\circ\text{C}$  作用一夜後加入 protein G sepharose beads 結合 4 小時，最後再以 0.6% NP-40 buffer 清洗五次。進行西方墨點法分析，結果顯示只有 FLAG-HNRPM 可以抓下 3Myc-PA，而控制組 FLAG-FTH1 則否。

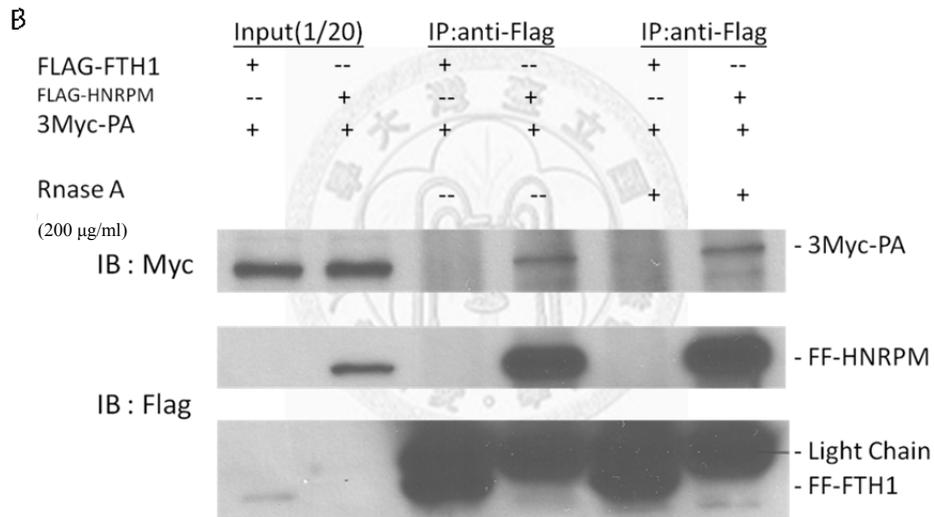
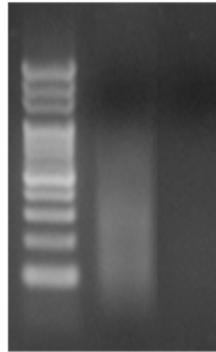
(B) 做法與(A)同，轉染 FLAG-HNRPM、3Myc-PA 及 3Myc-Cul4A 至 293FT 細胞後收取全蛋白質，以  $0.5\mu\text{g}$  anti-Myc 進行免疫沉澱，隔日加入 protein G sepharose beads 結合 4 小時後，以 0.7% NP-40 buffer 清洗五次。由西方墨點法的結果可以看出，只有 3Myc-PA 可以抓下 FLAG-HNRPM，而 3Myc-Cul4A 不行，再次證實 PA 與 HNRPM 之間有交互作用。



圖五 GST pull-down 分析也顯示 PA 與 HNRPM 在 *in vitro* 下有交互作用

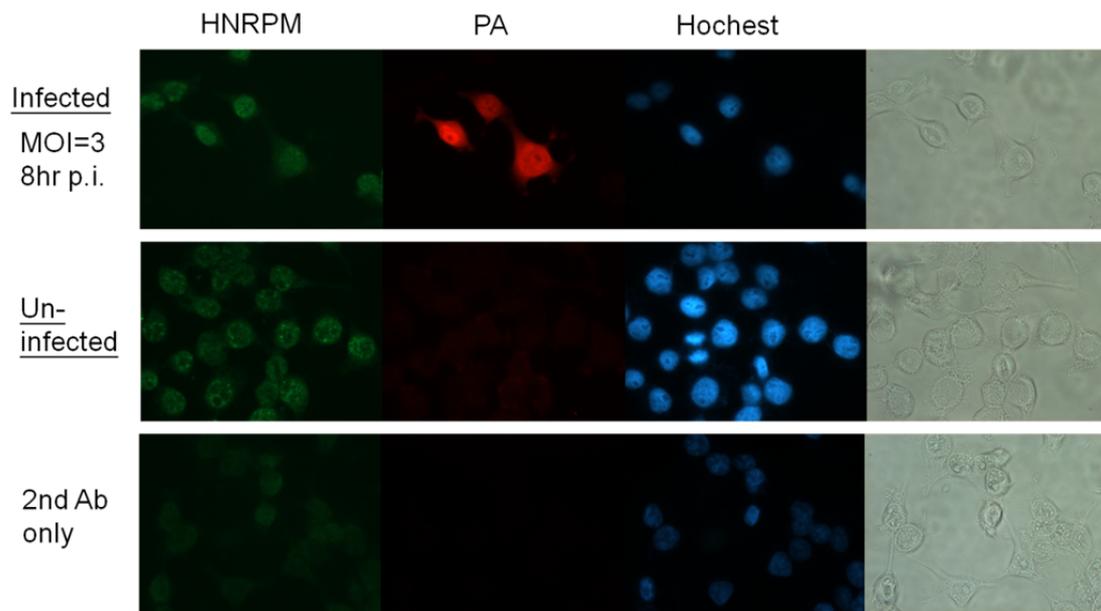
將 GST-6p-1-PA 轉型到 Rossetta-gami 酵母菌內，隔日以 2YT 放大體積至 200ml 培養四小時後，加入 IPTG 隔夜培養以誘導 GST-PA 的表現。使用含 lysozyme 之 NETN buffer 破菌，經超音波震盪並離心後取上清液，加入 Glutathione beads 抓下 GST-PA。取定量 GST-PA 或 GST beads 分別加入大量表現 FLAG-HNRPM 或 FLAG-FTH1 之細胞蛋白質液中共同培養一夜，之後清洗 beads 再以西方墨點法分析。結果顯示 FLAG-HNRPM 只可以被 GST-PA 抓下，而無法與 GST 作用。

A RNaseA Treatment  
before Co-IP:  
(30 °C, 10 min)  
M (-) (+)



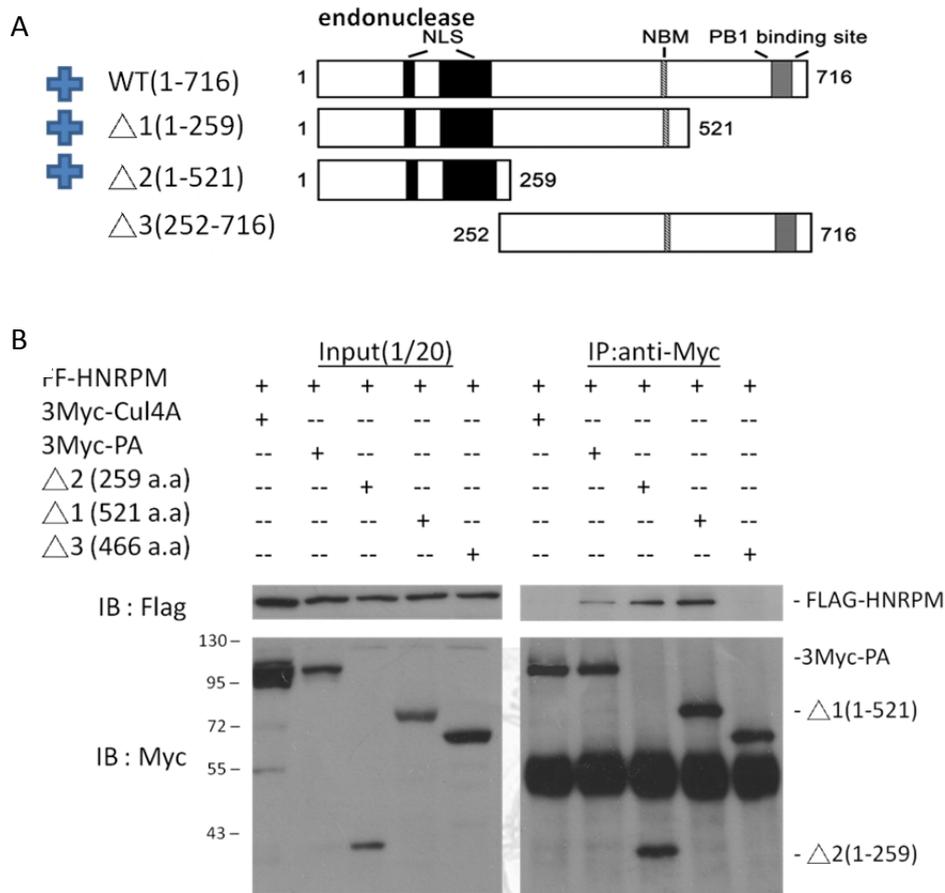
圖六 PA 與 HNRPM 之間的交互作用並非透過 RNA

(A) 首先確認 RNase A 的作用是否完全。抽取 293FT 細胞的全 RNA，加入 200 µg/mL RNase A，於 30°C 培養 10 分鐘後置於冰上 20 分鐘，再使用 2% agarose gel 進行電泳分析，可以發現 RNA 已被 RNase A 完全降解。(B) 於 293FT 細胞轉染 3myc-PA、FLAG-HNRPM 或 FLAG-FTH1 質體後 48 小時，使用 0.5% NP-40 co-IP buffer 打破細胞，加入 200µg/mL RNase A 先在 30°C 培養 10 分鐘，後置於冰上 20 分鐘，再將細胞蛋白質液進行免疫共沉澱分析。以 anti-FLAG 抗體抓下 FLAG-HNRPM 後，其仍可抓下 3myc-PA，顯見此交互作用並非透過 RNA 形成。



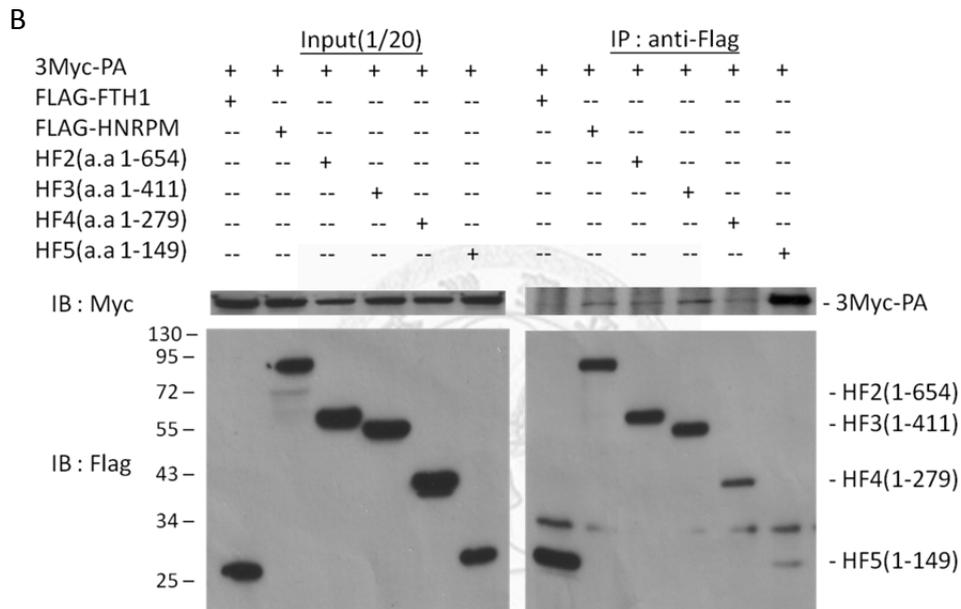
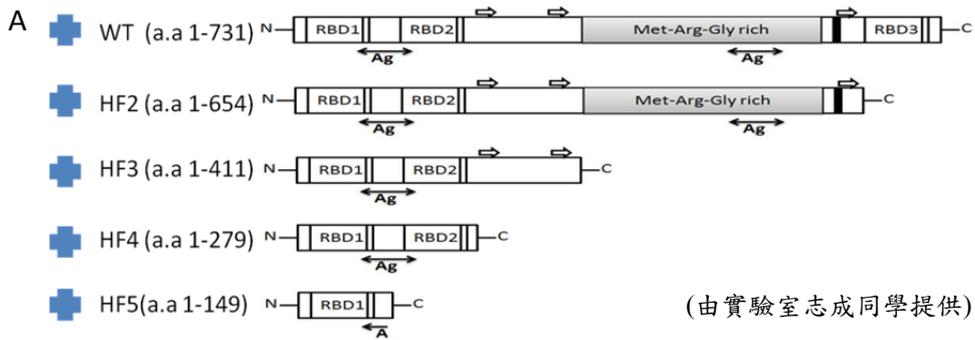
圖七 PA 蛋白質與 HNRPM 蛋白質共同位於(co-localize)細胞核中

以 MOI=3 的 A/WSN/33 流感病毒株感染固定於蓋玻片上的 NPC-TW04 細胞，於感染後八個小時收取細胞並固定之。使用 anti-HNRPM 一級抗體辨認細胞中的 HNRPM，再使用發綠光的二級抗體辨認；同時使用 anti-PA 一級抗體辨認 PA，並用發紅光的二級抗體辨認之。透過螢光顯微鏡觀察，可以看到發綠光的 HNRPM 與發紅光的 PA 共同聚集於細胞核中。Hoechst 染劑表細胞核所在位置。



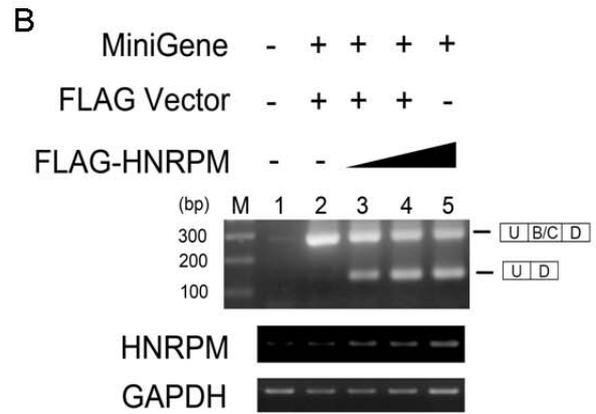
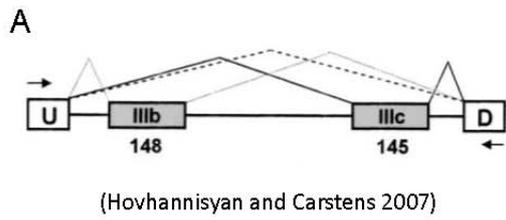
圖八 以免疫共沉澱法找出 PA 蛋白質上與 HNRPM 蛋白質結合的片段

(A) 將 PA 分成三種片段，包含 3myc-PA 2/3N(Δ1；a.a 1-515)、3myc-PA 1/3N(Δ2；a.a 1-259)及 3myc-PA 2/3C(Δ3；a.a 252-717)。(B) 將此三片段、全長 PA 及做為控制組的 Myc-Cul4A 分別與 FLAG-HNRPM 轉染入 293FT 中大量表現。之後收取細胞全蛋白質，以 0.5μg anti-Myc 進行免疫沉澱，隔日加入 protein G sepharose beads 結合 4 小時後，以 0.7% NP-40 buffer 清洗五次，進行西方墨點法分析。結果顯示，除了全長的 3Myc-PA 外，3myc-PA 2/3N 及 3myc-PA 1/3N 也可以抓下 FLAG-HNRPM，推測 PA 與 HNRPM 交互作用的位置是在其上第一至第 259 個胺基酸之間。

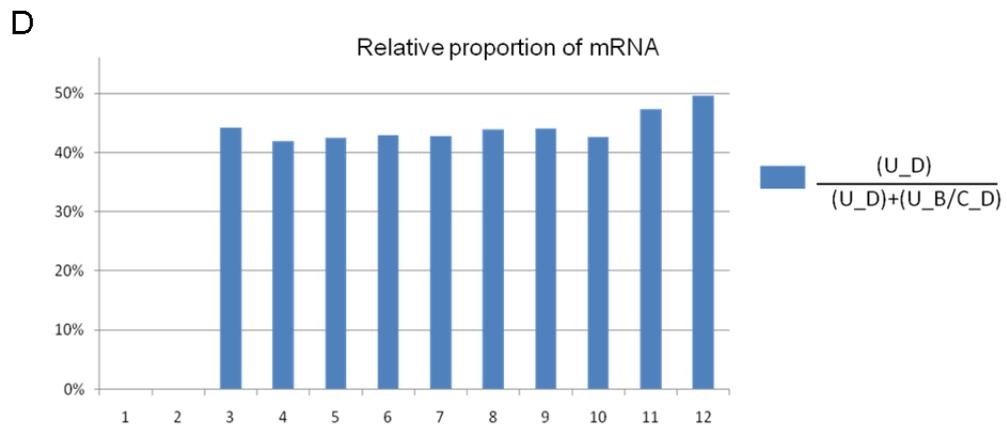
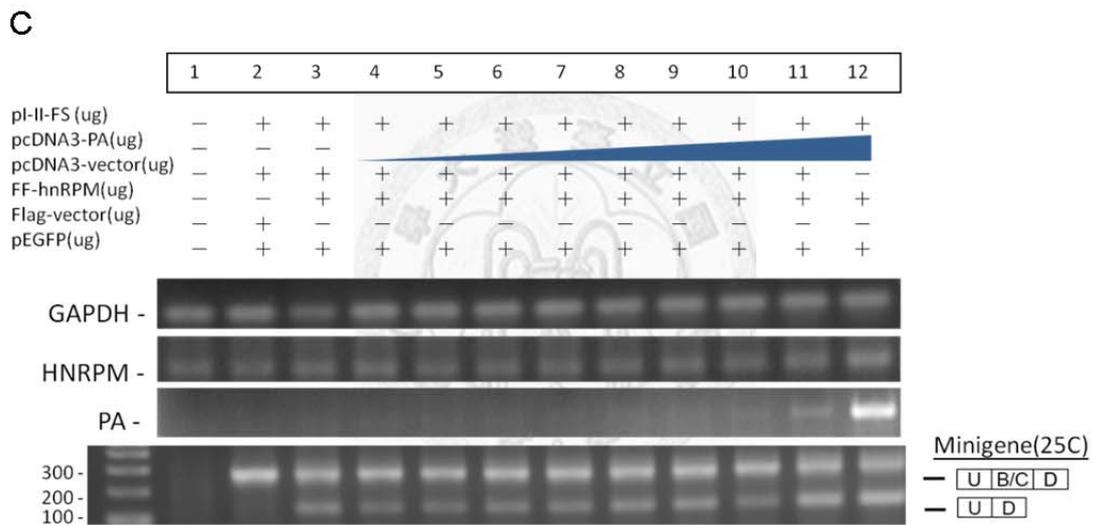


圖九 以免疫共沉澱法找出 HNRPM 蛋白質上與 PA 蛋白質結合的片段

(A) 將 HNRPM 依照不同功能區塊分成四個片段，包含 FLAG-HNRPM a.a 1-654、a.a 1-411、a.a 1-279 及 a.a 1-149 (由實驗室志成同學提供)。(B) 將此四片段、全長 HNRPM 及做為控制組的 FLAG-FTH1 分別與 3Myc-PA 轉染入 293FT 中大量表現。之後收取細胞全蛋白質，以  $1\mu\text{g}$  anti-FLAG 進行免疫沉澱，隔日加入 protein G sepharose beads 結合 4 小時後，以 0.6% NP-40 buffer 清洗五次，進行西方墨點法分析。由結果可以看出，除了控制組的 FLAG-FTH1 外，HNRPM 及其每一個分段皆可以抓下 3Myc-PA，推測 HNRPM 上和 PA 行交互作用的位置是在第一至第 259 個胺基酸之間。



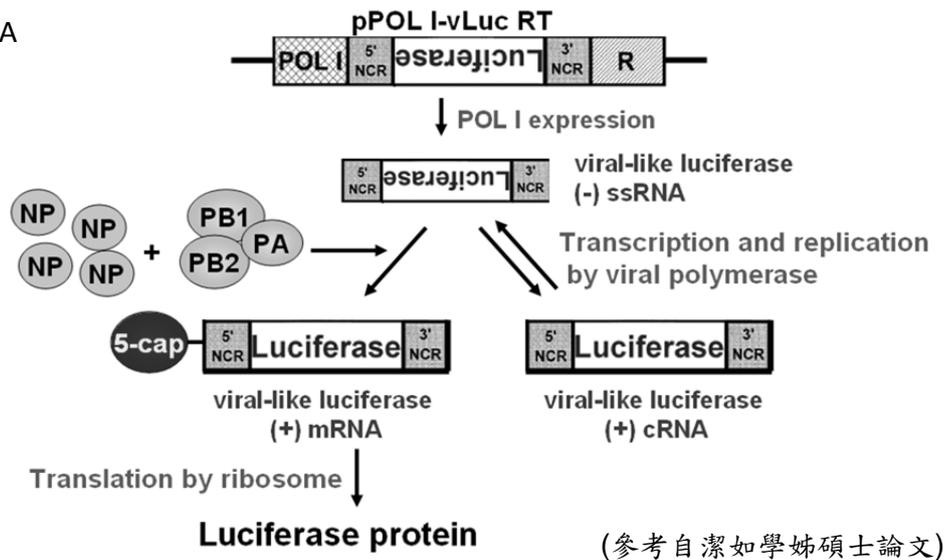
(由實驗室佩芸學姐提供)



圖十 PA 不會影響 HNRPM 的 alternative splicing 功能

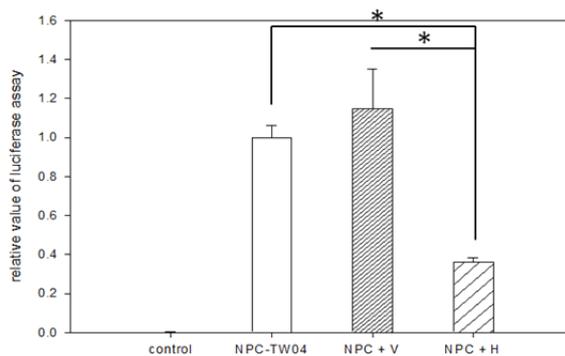
(A) 由 Carstens 實驗室分享之 FGFR2 minigene 質體帶有 FGFR2 exon IIIb 和 exon IIIc，以及在 minigene 前後的 upstream adenoviral exon (U) 和 downstream adenoviral exon (D)。箭頭所示為在 U、D 序列內設計之引子，用來偵測 splicing 產物。(B) 此系統已由實驗室佩芸學姐進行測試過。於  $3 \times 10^5$  293T 細胞送入 1  $\mu$ g minigene 質體，另外再外送 FLAG-HNRPM 0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g 及 1.5  $\mu$ g (lane 3-5)，並使用 FLAG vector 質體將不足的組別補至 2.5  $\mu$ g。於轉染後 48 小時收取細胞全 RNA，再使用 oligo-dT 轉為 cDNA 並使用圖(A)箭頭所標示之引子進行 semi-qPCR，進行電泳分析。當細胞只表現 minigene 時，會產生 238bp 左右之片段，此產物為 U-exon IIIb/exon IIIc-D (U-B/C-D) (lane 2)，若表現 HNRPM 則可以產生一個在 138bp 左右的產物 U-D，當送入越多 HNRPM，此產物量也會增多 (lane 3-5)。(C) 於  $5 \times 10^5$  293T 細胞轉染 minigene、FLAG-HNRPM 和不同量的 pcDNA3-PA 質體。於轉染後 48 小時抽取 RNA，以 oligo-dT 轉為 cDNA 並使用引子進行 semi-qPCR，再於 2% agarose gel 進行電泳分析。(D) 將圖(C)之電泳分析圖利用軟體對 U-B/C-D 和 U-D 產物進行定量，再將兩者產物的值加總當作 100%，計算出 lane 2-12 各組 U-D 產物所佔的比例。PA 量的多寡並不會改變 U-D 產物的比例，顯示 PA 對於 HNRPM alternative splicing 的功能沒有顯著的影響。

A



B

	N	Mock	Vec(0.5ug)	M(0.5ug)
pCDNA3-PA (ug)	--	0.2	0.2	0.2
pCDNA3-PB1(ug)	0.2	0.2	0.2	0.2
pCDNA3-PB2(ug)	0.2	0.2	0.2	0.2
pCDNA3-NP(ug)	0.2	0.2	0.2	0.2
pPOLI-vLuc-RT(ug)	0.2	0.2	0.2	0.2
pRL-CMV(ug)	0.1	0.1	0.1	0.1
Flag-vector(ug)	--	--	<b>0.5</b>	--
FF-hnRPM(ug)	--	--	--	<b>0.5</b>



FF-HNRPM -



IB : flag



GAPDH -



圖十一 細胞過量表現 HNRPM 蛋白質會抑制流感病毒螢光酶報導系統的表現

(A) pPOL I-vLuc-RT 上具有人類的 RNA POL I 啟動子，因此可利用人類的 RNA polymerase I 進行轉錄，做出兩端帶有病毒基因五端及三端序列的反義股螢光酶片段。此段類病毒基因在 RdRp 及 NP 的結合下，可以被反轉錄成正股的螢光酶基因並被轉譯，產生螢光酶蛋白。同時，此段類病毒基因也會被大量複製，因而可以放大訊號。(B) 將螢光酶報導系統所需之質體以及表現 renilla 的控制組質體轉染入 NPC-TW04 細胞、NPC-TW04 細胞過量表現 FLAG-HNRPM 及過量表現 FLAG vector 的控制組細胞中，72 小時偵測 luciferase 值，並以 renilla 值作為 internal control 進行標準化。結果顯示，過量表現 HNRPM 的細胞，其 luciferase 值於 72 小時有下降的現象，顯示過量表現細胞內的 HNRPM 可能會抑制流感病毒的轉錄或複製過程。



## 附表

PCR primer 及 shRNA target sequence

[ 建構質體所用之 primer ]

質體	引子	
pFlag-CMV-2 -HNRPM(1-730)	Forward	5'-CCATCGATAATGGCGGCAGGGGTC -3'
	Reverse	5'-CGGGATCCTTAAGCGTTTCTATCAATTC -3'
pFlag-CMV-2 -HNRPM(1-654)	Forward	5'-CCATCGATAATGGCGGCAGGGGTC -3'
	Reverse	5'-CGGGATCCTTACTGGCAGGCCTTCCT -3'
pFlag-CMV-2 -HNRPM(1-411)	Forward	5'-CCATCGATAATGGCGGCAGGGGTC -3'
	Reverse	5'-CGGGATCCTTAGAGGCGGTCAATGCC-3'
pFlag-CMV-2 -HNRPM(1-279)	Forward	5'-CCATCGATAATGGCGGCAGGGGTC -3'
	Reverse	5'-CGGGATCCTTAATCCATCTTGACGTGCAT -3'
pFlag-CMV-2 -HNRPM(1-149)	Forward	5'-CCATCGATAATGGCGGCAGGGGTC -3'
	Reverse	5'-CGGGATCCTTAATCAGGATCTTCTTTGAC -3'
pGEX-4T-1-HNRPM (full-length)	Forward	5'-CGGGATCCATGGCGGCAGGGGTC-3'
	Reverse	5'-TCCCCGGGTAAAGCGTTTCTATCAATTC-3'

[ Real-time PCR, semi-quantitative PCR 所用之 primer ]

基因	引子	
GAPDH	Forward	5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
	Reverse	5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'
HNRPM	Forward	5'- ACGTGCTGTACGCCGACAT-3'
	Reverse	5'-ATCATCCGGCAGGCTCTCT -3'
FGFR2	Forward	5'- GCTGGAATTCGAGCTCACTCTCTTC -3'

minigenome	Reverse	5'- CCCGGGACTAGTAAGCTTAGGCTCTTGGCGTT -3'
------------	---------	--

[ shRNA target sequence ]

質體編號	Target gene	Target sequence
TRCN0000001247	HNRPM	5'- GATGGCTACGACTGGTGGGAT-3'
shLuc	Luciferase	5'-CTTCGAAATGTCCGTTCCGGTT-3'
shGFP	GFP	5'-CGACCACATGAAGCAGCACGA-3'



## 參考文獻

- Aad, G., B. Abbott, et al. (2011). "Measurement of Dijet Azimuthal Decorrelations in pp Collisions at  $\sqrt{s}=7$  TeV." Phys Rev Lett **106**(17): 172002.
- Biswas, S. K. and D. P. Nayak (1994). "Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1." J Virol **68**(3): 1819-1826.
- Carstens, R. P., W. L. McKeehan, et al. (1998). "An intronic sequence element mediates both activation and repression of rat fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA splicing." Mol Cell Biol **18**(4): 2205-2217.
- Das, K., J. M. Aramini, et al. (2010). "Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets." Nat Struct Mol Biol **17**(5): 530-538.
- Datar, K. V., G. Dreyfuss, et al. (1993). "The human hnRNP M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins." Nucleic Acids Res **21**(3): 439-446.
- Deng, T., J. Sharps, et al. (2005). "In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex." J Virol **79**(13): 8669-8674.
- Dias, A., D. Bouvier, et al. (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." Nature **458**(7240): 914-918.
- Fechter, P., L. Mingay, et al. (2003). "Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding." J Biol Chem **278**(22): 20381-20388.
- Ferre, F. (1992). "Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth." PCR Methods Appl **2**(1): 1-9.
- Fodor, E., M. Crow, et al. (2002). "A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs." J Virol **76**(18): 8989-9001.
- Fodor, E., L. Devenish, et al. (1999). "Rescue of influenza A virus from recombinant DNA." J Virol **73**(11): 9679-9682.
- Fouchier, R. A., V. Munster, et al. (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." J Virol **79**(5): 2814-2822.
- Gaush, C. R. and T. F. Smith (1968). "Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells." Appl Microbiol **16**(4): 588-594.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Guu, T. S., L. Dong, et al. (2008). "Mapping the domain structure of the influenza A

- virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit." Virology **379**(1): 135-142.
- Hara, K., F. I. Schmidt, et al. (2006). "Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding." J Virol **80**(16): 7789-7798.
- Hara, K., M. Shiota, et al. (2001). "Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site." Genes Cells **6**(2): 87-97.
- Hovhannisyan, R. H. and R. P. Carstens (2007). "Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons." J Biol Chem **282**(50): 36265-36274.
- Huarte, M., A. Falcon, et al. (2003). "Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses." J Virol **77**(10): 6007-6013.
- Huarte, M., J. J. Sanz-Ezquerro, et al. (2001). "PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators." J Virol **75**(18): 8597-8604.
- Hulse-Post, D. J., J. Franks, et al. (2007). "Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks." J Virol **81**(16): 8515-8524.
- Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." Nucleic Acids Res **9**(13): 2989-2998.
- Jain, R. A. and E. R. Gavis (2008). "The Drosophila hnRNP M homolog Rumpelstiltskin regulates nanos mRNA localization." Development **135**(5): 973-982.
- Jorba, N., S. Juarez, et al. (2008). "Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors." Proteomics **8**(10): 2077-2088.
- Kawaguchi, A. and K. Nagata (2007). "De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM." EMBO J **26**(21): 4566-4575.
- Lamb, R. A. and P. W. Choppin (1983). "The gene structure and replication of influenza virus." Annu Rev Biochem **52**: 467-506.
- Lleres, D., M. Denegri, et al. (2010). "Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice." EMBO Rep **11**(6): 445-451.
- Luytjes, W., M. Krystal, et al. (1989). "Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus." Cell **59**(6): 1107-1113.
- Maier, H. J., T. Kashiwagi, et al. (2008). "Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding." Virology

**370(1): 194-204.**

- Marko, M., M. Leichter, et al. (2010). "hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures." Exp Cell Res **316(3): 390-400.**
- Naffakh, N., P. Massin, et al. (2001). "The transcription/replication activity of the polymerase of influenza A viruses is not correlated with the level of proteolysis induced by the PA subunit." Virology **285(2): 244-252.**
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, et al. (2009). "Influenza virus morphogenesis and budding." Virus Res **143(2): 147-161.**
- Nayak, D. P., E. K. Hui, et al. (2004). "Assembly and budding of influenza virus." Virus Res **106(2): 147-165.**
- Neubauer, G., A. King, et al. (1998). "Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex." Nat Genet **20(1): 46-50.**
- Neumann, G., M. T. Hughes, et al. (2000). "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." EMBO J **19(24): 6751-6758.**
- Newcomb, L. L., R. L. Kuo, et al. (2009). "Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication." J Virol **83(1): 29-36.**
- Noda, T. and Y. Kawaoka (2010). "Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions." Rev Med Virol **20(6): 380-391.**
- Perales, B., J. J. Sanz-Ezquerro, et al. (2000). "The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis." J Virol **74(3): 1307-1312.**
- Pinto, L. H. and R. A. Lamb (2006). "Influenza virus proton channels." Photochem Photobiol Sci **5(6): 629-632.**
- Pleschka, S., R. Jaskunas, et al. (1996). "A plasmid-based reverse genetics system for influenza A virus." J Virol **70(6): 4188-4192.**
- Plotch, S. J., M. Bouloy, et al. (1981). "A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." Cell **23(3): 847-858.**
- Regan, J. F., Y. Liang, et al. (2006). "Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA." J Virol **80(1): 252-261.**
- Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez, et al. (2007). "Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II." J Virol **81(10): 5315-5324.**
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley (2000). "Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin." Annu Rev Biochem **69: 531-569.**

- Ulmanen, I., B. A. Broni, et al. (1981). "Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7355-7359.
- Webster, R. G. (2001). "Virology. A molecular whodunit." Science **293**(5536): 1773-1775.
- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." Microbiol Rev **56**(1): 152-179.
- Wu, W. W. and N. Pante (2009). "The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein." Virology **6**: 68.
- Yuan, P., M. Bartlam, et al. (2009). "Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site." Nature **458**(7240): 909-913.

