

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)呼肠孤病毒 (GCRV)VP6 相互作用蛋白的筛选*

丁 燊¹ 李 杰¹ 闫秀英¹ 简纪常¹ 吴灶和²

(1. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 广东海洋大学水产学院 湛江 524025;

2. 仲恺农业工程学院 广州 510000)

提要 为筛选与草鱼呼肠孤病毒 GCRV096 VP6 发生相互作用的宿主蛋白, 先将 VP6 基因的 PCR 扩增产物, 克隆至酵母表达载体 pGBKT7 以构建其诱饵质粒(pGBKT7-VP6); 再将酵母菌 Y2HGold (含 pGBKT7-VP6)与酵母菌 Y187[含草鱼肾脏细胞(CIK)cDNA 文库质粒]进行人工诱导融合, 然后经选择培养筛选阳性克隆。结果共筛选到 4 株阳性克隆, 经测序、生物信息学分析, 分别属于两条不同的核苷酸序列, 其中之一所编码的产物与 GAPDH (3-磷酸甘油醛脱氢酶) 同源性较高。可见, 该酶极可能在 GCRV096 侵染宿主的初期发挥着重要作用。

关键词 酵母双杂交; GCRV096; VP6; 蛋白质相互作用

中图分类号 Q939.94; S942.2 **doi:** 10.11693/hyhz20140700206

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)出血病是草鱼的主要病害之一, 广泛流行于我国鱼类主产区域。它是我国第一例鱼类病毒性疾病, 与其相关的研究也最为深入, 历史最为悠久。该病的病原为草鱼呼肠孤病毒(GCRV), 是水生呼肠孤病毒属的 C 亚型, 且是该属中毒力最强的病毒株型, 因此具有较高的感染率、流行率、致死率、发病季节多等特点(Rangel *et al.*, 1999; 迟妍妍等, 2011; Tian *et al.*, 2013)。除了感染草鱼外, 还能感染鲢、稀有鮠鲫、青鱼、麦穗鱼等鱼类。GCRV 基因组编码产物计 12 种, 其中结构蛋白 7 种 (VP1—VP7), 非结构蛋白 5 种; 结构蛋白中除了 VP2 与 VP4 之外, 其它均是病毒双层衣壳的蛋白组分 (Ivanovic *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2011)。而 VP6 是该病毒粒子内层衣壳的成分, 能够联系内外两层衣壳, 在病毒核酸的复制、转录及病毒装配过程中起着较重要的作用, 与哺乳动物呼肠孤病毒中 $\delta 2$ 蛋白的功能相似(肖波, 2010)。VP6 由基因 S8 编码, 含有氨基酸残基 412 个, 大小为 44.6 kDa 左右。目前国内大多数学者仅关注该蛋白的免疫原性、重组表达、疫苗研制等,

对其相互作用蛋白的研究还未引起足够的重视(孟思好等, 2010; 郭帅等, 2010; 周勇等, 2011), 在一定程度上, 阻碍了该病毒的致病机制、预防性疫苗等研究工作的深入开展。

基因的作用最终是靠其翻译表达的蛋白质来实现的, 而不同蛋白之间的相互作用对其功能的发挥具有重要的意义, 因此了解蛋白质之间的作用是掌握基因及其蛋白功能的一种重要途径, 已成为各领域研究的热点问题。常用的蛋白质研究方法包括噬菌体表面展示技术、酵母双杂交系统、GST 标记的 pull-down 技术、免疫共沉淀法、质谱鉴定、病毒铺覆蛋白印迹技术、基于生物信息学的分析方法等。其中酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)可以直接在体内或胞内分析蛋白质相互作用, 到目前为止该技术平台已广泛应用于各领域以检测蛋白与蛋白之间的相互作用(Field *et al.*, 1989)。对病毒而言, 其相互作用蛋白很有可能是其在宿主细胞上相应的受体, 而病毒受体是病毒侵染宿主细胞的决定因素之一 (Marr *et al.*, 2013), 病毒受体的鉴定及其与病毒蛋白

*国家重点基础研究发展计划“水生动物呼肠孤病毒的致病机理与保护性抗原研究”, 2009CB118704 号。丁燊, 博士, 教授, E-mail: dingy@gdou.edu.cn

通讯作者: 简纪常, 博士, 教授, E-mail: jianjc@gmail.com

收稿日期: 2014-07-18, 收修改稿日期: 2014-08-19

的相互作用过程与机制的阐明对病毒感染机制分析具有重要作用。GCRV 相互作用的蛋白的研究极少,通过相互作用蛋白的筛选与鉴定是研究其致病机理的一种重要途径,本研究采用 GCRV 096 株的 VP6 蛋白作为诱饵蛋白,通过酵母双杂交技术筛选与其相互作用的蛋白,为进一步确定 GCRV 在侵染宿主过程中 VP6 的地位打下良好基础,为进一步阐明 GCRV 的致病机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GCRV 096 株、草鱼肾脏组织细胞系(CIK),由本实验室保存。

质粒 pGEX-KG 购自北京鼎国生物公司,克隆质粒 pGBKT7 DNA-BD、pGADT7 AD 等和对照质粒 pGBKT7-53、pGADT7-T 等,以及酵母菌株(Y2Hgold 和 Y187)均购自 Clontech 公司, E.coli DH5 α 由本实验室保存。

dNTP、ExTaq 酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker 等试剂,及 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒,限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。

反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TransGen 公司); QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN 公司); UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒与酵母质粒小量抽提试剂盒,实验中所用的引物(上海生工生物工程有 限公司); 质粒提取试剂盒(U-gene 公司)。

Matchmaker[™] Gold Yeast Two-Hybrid System、Yeastmaker Yeast Transformation System 2、Make Your Own “Mate & Plate[™]” Library system 试剂盒、酵母菌培养所用各种培养基及 Advantage 2 Polymerase Mix 均购自 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 利用软件 Primer Premier_5.0 设计引物以扩增 GCRV096 VP6 基因,其序列为: F: 5'-CGCGGATCCATGGCACAGCGTCAGTT-3' (*Bam*H I) 和 R:5'-ACGCGT CGACTTAGACGAACATCACC-3' (*Sal*I)。

1.2.2 GCRV VP6 诱饵载体的构建 用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒提取 GCRV 总 RNA,再以此为模板合成 cDNA 的第一条链(采用反转录试剂盒),然后对 VP6 基因用 PCR 法进行扩增。PCR 反应体系与反应参数参照李杰等(2013)的方法。同样按照李杰等(2013)的方法完成 PCR 产物的

回收、产物和诱饵载体的连接、重组质粒的转化、诱饵重组质粒的鉴定等。

pGBKT7-VP6 的自激活作用检测与毒性检测参照 Yeastmaker[™] Yeast Transformation System 2 操作手册与李杰等(2013)的方法进行。

1.2.3 VP6 相互作用蛋白的筛选 相互作用蛋白的筛选鉴定参照李杰等(2013)的方法进行,包括诱饵菌的筛选和纯化、诱饵菌与文库菌的体外融合、接合子的显微观察、克隆数的统计计算、结合效率的确定、阳性克隆的鉴定与测序分析等过程。其中 CIK cDNA 文库($>2.0 \times 10^7$ cfu/mL)由本课题组前期工作中所构建。

2 结果

2.1 pGBKT7-VP6 诱饵质粒

将 VP6 基因 PCR 产物与克隆质粒 pGBKT7 分别进行双酶切,然后用 T4 连接酶连接构建诱饵质粒 pGBKT7-VP6,经双酶切后电泳分析与菌落 PCR 分析鉴定,相应大小的 PCR 产物克隆成功(图 1),且序列测定结果完全吻合。其中图 1a 为菌落 PCR 的结果,说明其基因已存在于细菌的质粒之中;图 1b 为双酶切分析结果,与预期的片段大小、插入位点相符。可见,所需的诱饵质粒 pGBKT7-VP6 构建成功,为 VP6 相互作用蛋白的筛选提供了可靠的质粒。

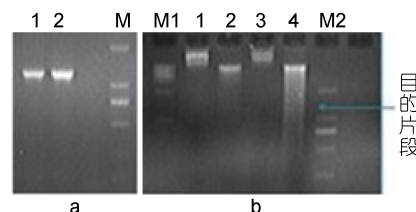


图 1 VP6 基因菌落 PCR 检测与 pGBKT7-VP6 双酶切鉴定结果

Fig.1 Results of colony PCR analysis of VP6 gene and AGE analysis of pGBKT7-VP6 digested with *Bam*H I and *Sal*I

a: VP6 基因菌落 PCR; b: pGBKT7-VP6 双酶切鉴定

Lane M, M2: DL 2,000[™] DNA standard (从上至下大小依次为 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp); Lane M1: DL-10000 DNA Marker (从上至下大小依次为 10000, 6000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250 bp); a: Lane 1, 2, gene of VP6; b: Lane 1, pGBKT7; Lane 2, pGBKT7 digested with *Bam*H I and *Sal*I; Lane 3, pGBKT7-VP6; Lane 4, pGBKT7-VP6 digested with *Bam*H I and *Sal*I

2.2 pGBKT7-VP6 自激活作用检测和毒性检测

在 SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Trp/Kan 培养基上,含有 pGBKT7-VP6 的转化菌生长良好,但在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基上未见其生长,排除了诱饵蛋白的自激活特性。含有 pGBKT7-VP6 的转化 Y2HGold

酵母菌在 SD/-Trp 平板培养基上生长一切正常,且在液体培养基(SD/-Trp/Kan)中振荡培养后, OD₆₀₀ 大于 0.8, 可见诱饵蛋白并无毒性。该结果保证了进一步进行相互作用蛋白筛选试验的可行性。

2.3 VP6 相互作用蛋白的筛选

酵母 CIK 文库菌与 VP6 钓饵菌相互配合, 在显微镜下观察发现已形成了明显的三叶草型结构(图 2), 示 2 个大球形的亲代单倍体细胞与 1 个正在出芽小球形的二倍体细胞。说明形成了有效的接合子, 可以进行下一步的实验, 即将其接种于不同培养基以确定筛选克隆数。筛选克隆数(cfu/mL)的获得是经各培养基中平板菌落数的统计来完成的; VP6 试验组在 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu 等三种不同选择培养基中的筛选克隆数依次为 5.16×10^7 、 3.31×10^6 、 1×10^5 cfu/mL, 而阳性对照组在三种培养基中的筛选克隆数依次为 7.84×10^7 、 6.63×10^6 、 3.2×10^5 cfu/mL (表 1)。经公式: 融合效率 = 二倍体克隆数(或培养基 SD/-Trp/-Leu 中的克隆数)/另两种培养基中克隆数相比较小的值, 可以计算出 VP6、对照组的融合效率分别为 3.02%、4.83%, 介于 2%—5% 之间, 完全满足进一步试验的基本要求。经高筛选培养基 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA 反复对融合产物(即 SD/-Trp/-Leu/ X- α -Gal/AbA 平板上的蓝色克隆)进行多次筛选确定, 通过共转化酵母菌 Y2HGold 等方法验证它们之间的相互作用, 最后共获得 4 株可能的阳性克隆(呈蓝色、圆形的单菌落)(图 3)。

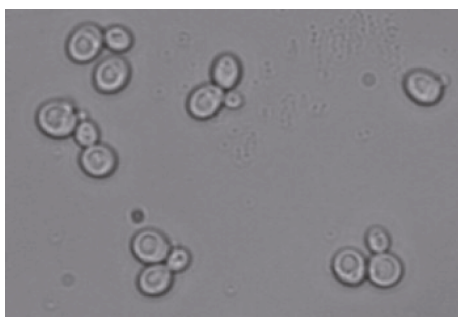


图 2 酵母融合子的形态

Fig.2 Form of the fused yeasts
放大倍数为 $\times 1000$

表 1 筛选克隆数结果(cfu/mL)

Tab.1 Number of screened clones on the selective medium (cfu/mL)

选择培养基	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-Trp/-Leu
VP6	5.16×10^7	3.31×10^6	1×10^5
阳性对照	7.84×10^7	6.63×10^6	3.2×10^5

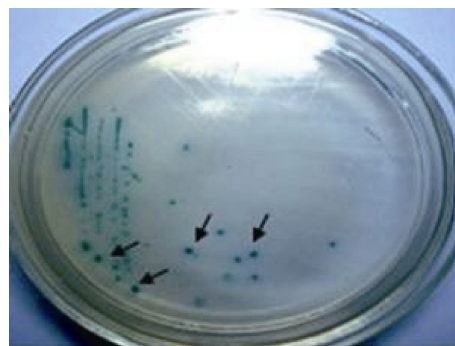


图 3 融合酵母的筛选结果

Fig.3 Screening result of yeast zygote on the medium of SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA
箭头所示为阳性克隆

对获得的 4 株待定阳性克隆文库质粒插入片段分别送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 经序列分析与碱基校正后, 发现它们分别属于两条不同的基因序列, 其有效序列长度分别为 470bp 和 807bp。利用 GenBank 数据库进行同源性比对分析所得序列的结果表明, 一条序列对应的蛋白质序列与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)呈高度同源, 其同源性为 99%, 这种蛋白极可能就是 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 而另一条蛋白质序列暂时并没找到其相应的同源性蛋白, 可能是一种未知蛋白。

3 讨论

酵母双杂交技术是一种筛选和鉴定相互作用蛋白的有效手段, 不同于噬菌体展示技术、免疫印迹技术、质谱分析技术、基于生物信息学的蛋白分析技术等蛋白质研究方法, 它集分子克隆技术、克隆文库技术、蛋白质研究技术与方法于一体, 对实验者的实际操作能力与分子生物学基础理论的要求较高。通过熟练操作, 经它筛选得到的蛋白, 一般而言与该蛋白功能的发挥密切相关, 它们往往通过在胞内的相互作用相互调节, 共同参与某一复杂的生理病理过程。因此, 该技术是蛋白质功能研究的有效手段之一, 有助于人们理解基因通过蛋白作用的分子机制。对病毒而言, 筛选的相互作用蛋白可能是其受体蛋白或其部分功能域, 也可能是在病毒增殖程中除了结构蛋白之外其它相关的蛋白质, 因此在一定程度上, 筛选、鉴定其相互作用蛋白的难度明显增加了(Field *et al*, 1989)。本研究在项目组已建立 CIK cDNA 文库的基础上, 充分利用酵母二倍体细胞来进行 CIK cDNA 文库筛选的方法, 有效地克服了诱饵质粒与文库质

粒共转化酵母菌效率低等技术瓶颈问题(Field *et al*, 1989); 在高效选择培养基上反复筛选得到的阳性结果, 对含有多重 cDNA 插入片段的融合菌株进行了有效的淘汰, 保证了克隆的均质性、有效性(Field *et al*, 1989)。本文的结果也表明在 GCRV 相互作用蛋白的筛选中酵母双杂交技术的高效性与可行性, 该技术在 GCRV 相互作用蛋白方面具有较好的应用价值与借鉴意义, 为呼肠孤病毒属中其它各病毒的功能研究提供了新的途径与方法。

在草鱼呼肠孤病毒粒子双层衣壳中, VP6 蛋白是一种典型的夹合蛋白, 具有联系 GCRV 病毒粒子的内外衣壳、稳定内层衣壳骨架分子 VP3 的作用, 还可能与病毒粒子表面的突起物也同样存在一定的相互作用(Cheng *et al*, 2008)。已有研究表明 VP6 在 GCRV 基因的转录、复制, 及病毒粒子的装配中有着重要的地位(方勤, 2005), 还发现 VP6 蛋白对 dsRNA 有一定的结合能力, 但对其相互作用蛋白尚未进行深究。本研究中, 经酵母双杂交技术获得 VP6 的两种相互作用蛋白, 并通过共转化试验进一步验证了它们之间的相互作用。在得到的两种相互作用蛋白质中, 其中一种与 GAPDH 的同源性高达 99%, 可见其为 GAPDH 的可能性较大, 这是在 GCRV 与宿主相互作用过程中新发现的一种相互作用蛋白。GAPDH 是糖酵解反应中一个重要的代谢酶, 此外它还会参与转录激活、细胞凋亡的启动等非代谢生理过程(方勤, 2005; Tarze *et al*, 2007; Marr *et al*, 2013; Zinsser *et al*, 2014)。作为 VP6 的一种相互作用蛋白, GAPDH 在 GCRV 侵染过程中极可能参与了宿主的代谢调控, 或参与转录调控、细胞凋亡的启动调节等过程。但其具体的机制还有待后续研究深入的阐明, 此外这种相互作用与 VP6 作为夹合蛋白间的联系, 以及这种相互作用与病毒表面突起物间作用的关联性都值得作更深入的探讨。而另一种相互作用蛋白尚属未知蛋白, 加强对其鉴定及其功能研究可能会有更多的发现, 极可能是对 GCRV 致病机理研究的一个突破。尽管对未知蛋白的研究困难重重, 在后续研究中一定要重视对它的研究, 以获取更多的病毒致病机制的相关信息。总之, 本研究为进一步探讨 VP6 的生物学功能以及 GCRV 的侵染机制指明了一定的方向, 该蛋白的结构与功能、相互作用的分子机制及其调节机理等研究工作需要更加深入进行。

参 考 文 献

- 方 勤, 2005. 草鱼呼肠孤病毒的三维结构与衣壳蛋白特性. 中国科学, 35(3): 231—237
- 李 杰, 闫秀英, 丁 燊等, 2013. 利用酵母双杂交系统筛选草鱼呼肠孤病毒 NS38 相互作用蛋白. 海洋与湖沼, 44(2): 305—309
- 肖 波, 2010. 草鱼呼肠孤病毒及其免疫防治研究进展. 鲁东大学学报, 26(1): 48—53
- 迟妍妍, 田园园, 叶 星等, 2011. 南方养殖草鱼呼肠孤病毒的分子特性比较及双重 PCR 检测方法的建立. 病毒学报, 27: 358—365
- 周 勇, 曾令兵, 范玉顶等, 2011. 草鱼呼肠孤病毒 VP6 蛋白与大肠杆菌 LTB 亚基植物融合表达载体的构建. 中国水产科学, 18(1): 1—7
- 孟思好, 孟长明, 陈昌福, 2010. 草鱼出血病(Hemorrhage disease of grass carp)研究现状(下). 渔业致富指南, (9): 54—55
- 郭 帅, 李家乐, 吕利群, 2010. 草鱼呼肠孤病毒的致病机制及抗病毒新对策. 渔业现代化, 37(1): 37—42
- Cai Lin, Sun Xiaoyun, Shao Ling *et al*, 2011. Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80. Virology Journal, 8: 168
- Cheng L P, Fang Q, Shah S *et al*, 2008. Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion. Molecular Biology, 382(1): 213—222
- Field S, Song O, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. Nature, 340: 245—246
- Ivanovic T, Agosto M A, Nibert M L, 2007. A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly. J Biol Chem, 282(16): 12210—12219
- Marr N, Turvey S E, Grandvaux N, 2013. Pathogen recognition receptor crosstalk in respiratory syncytial virus sensing: a host and cell type perspective. Trends in Microbiology, 21(11): 568—574
- Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M *et al*, 1999. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus. Gen Virol, 80: 2399—2402
- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M *et al*, 2007. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. Oncogene, 26(18): 2606—2620
- Tian Y, Ye X, Zhang L *et al*, 2013. Development of a novel candidate subunit vaccine against grass carp reovirus Guangdong strain (GCRV-GD108). Fish & Shellfish Immunology, 35(2): 351—356
- Zinsser V L, Hoey E M, Trudgett A *et al*, 2014. Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1844(4): 744—749

SCREENING OF THE PROTEINS INTERACTED WITH VP6 IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) REOVIRUS

DING Yu¹, LI Jie¹, YAN Xiu-Ying¹, JIAN Ji-Chang¹, WU Zao-He²

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510000, China)

Abstract To screen and identify the proteins that interact with VP6 of GCRV096 strain, VP6 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then inserted into bait plasmid pGBKT7 to construct pGBKT7-VP6. The yeast Y2HGold containing the recombinant vector of VP6 gene was mated with the yeast Y187 pre-transformed with cDNA library plasmid of CIK. Four positive clones were obtained by screening the diploid yeast cells. The inserted fragments were sequenced and analyzed by bioinformatic method. The results show that two different cDNA sequences were identified. The protein encoded by a cDNA fragment has higher homology with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The enzyme may be important for GCRV096 to entry into the cells of *Ctenopharyngodon idellus*.

Key words yeast two-hybrid system; GCRV096; VP6; protein interaction