

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*

李杰¹ 闫秀英¹ 丁燊¹ 吴灶和² 简纪常¹ 谢吉国¹

(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 510225)

摘要 采用酵母双杂交技术,对草鱼呼肠孤病毒 096(GCRV096)非结构蛋白 NS38 相互作用的蛋白进行了筛选,并对阳性克隆中的插入序列进行测序与生物信息学分析。结果表明,含有重组质粒 pGBKT7-NS38 的酵母菌 Y2HGold 与含有草鱼肾脏细胞(CIK)cDNA 文库质粒的酵母菌 Y187 融合成功,并筛选得到 3 株阳性克隆;发现两条不同的插入序列,其中一条序列编码的蛋白与 40S 核糖体蛋白 S16 亚基的同源性高达 99%,而另一序列相应的蛋白不存在匹配的蛋白。该结果为进一步深入研究 NS38 蛋白在 GCRV096 复制过程中的生物学功能奠定了基础。

关键词 GCRV096; NS38; 蛋白质相互作用; 酵母双杂交
中图分类号 Q939.94, S942.2

草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)是草鱼出血病的主要病原,病毒粒子具有双层衣壳,基因组共编码 12 种蛋白,其中包含 5 种非结构蛋白,即 NS16、NS26、NS31、NS38、NS80 (Ivanovic *et al*, 2007; Fang *et al*, 2005, 2008; 郭帅等, 2010)。结构蛋白在病毒的侵染和繁殖中的重要作用在业界已达成共识,虽然对非结构蛋白关注较少,但其作用也不可忽视。王炜等(1995)对草鱼出血病病毒多肽的免疫原性研究发现,除了结构蛋白 VP1、VP5 和 VP6 以外,NS38 也能够诱生中和抗体,且抗体效价仅次于 VP6 的,表明 NS38 蛋白具有一定的免疫原性。NS38 还是病毒包涵体形成的引发分子(Benavente *et al*, 2007),但是至目前为止,NS38 在 GCRV 侵染复制过程中的具体作用还不十分明确。Qiu 等(2001)研究了 GCRV S9 片段的分子结构,发现 S9 片段与哺乳动物呼肠孤病毒的非结构蛋白 NS 具有相似性;Shao 等(2010)在大

肠杆菌中实现了 *ns38* 基因的原核表达。这些研究进展对 NS38 蛋白功能和 GCRV 结构的研究具有重要的指导意义。

酵母双杂交系统可以用于检测活细胞内的蛋白-蛋白之间的相互作用,通过该方法已发现大量相互作用的蛋白质对及某些蛋白新的配体(Field *et al*, 1989; Takahashi *et al*, 2001; 肖静等, 2011)。将该系统应用于病毒成分与宿主蛋白相互作用的研究,有助于阐明病毒侵染的分子机制,目前在水生病毒的研究中已得到了一定的应用(张莉, 2010)。黄莉(2005)¹利用酵母双杂交系统,筛选 WSSV 囊膜粘附蛋白 VP1 的相互作用蛋白,得到了一条蛋白酶类似物的基因片段;王维新(2004)²筛选 WSSV 囊膜蛋白 VP28 相互作用蛋白,获得两个新的基因片段;Cai 等(2011)研究 GCRV 非结构蛋白 NS80 与 NS38、VP4 和 VP6 相互作用时发现,NS80 在病毒组装工厂(VFLS)形成和其

* 国家 973 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。李杰, E-mail: lijie172166@126.com

1) 黄莉, 2005. 白斑综合症病毒(WSSV)VAP1 基因在酵母双杂交系统中的应用及对虾鳃膜蛋白 P53 的初步研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 71—85

2) 王维新, 2004. 酵母双杂交系统用于对虾白斑综合症病毒(WSSV)受体基因的筛选. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 67—74

通讯作者: 丁燊, 博士, 教授, E-mail: dingy@gdou.edu.cn; 简纪常, 博士, 教授, E-mail: jianjc@gdou.edu.cn

收稿日期: 2012-01-31, 收修改稿日期: 2012-03-02

他病毒组分的集合中发挥着极其重要的作用。本研究采用 NS38 蛋白作诱饵蛋白, 通过酵母双杂交系统筛选草鱼肾细胞(CIK) cDNA 文库, 以期发现其相互作用蛋白, 为探索 NS38 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株和细胞系 草鱼呼肠孤病毒 096 株(GCRV096), 由本实验室保存; 草鱼肾脏组织细胞系(CIK), 购于深圳进出口检验检疫局。

1.1.2 质粒和菌株 pGBKT7 DNA-BD 克隆载体、pGADT7 AD 克隆载体、pGBKT7-53 对照质粒、pGADT7-T 对照质粒、pGBKT7-lam 对照质粒、pGADT7-Rec 克隆载体, 以及酵母菌株 Y2HGold 和 Y187 购自 Clontech 公司; *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 设计一对特异引物用于扩增 GCRV096 NS38 基因, 引物序列为 F: 5'-CGCGG ATCCATGGCACACACAGGCAC-3' (下划线示 *Bam*H I 酶切位点) 和 R: 5'-ACGCGTTCGACTTACATACCCC CGATC-3' (下划线示 *Sal*I 酶切位点)。由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2.2 诱饵重组载体的构建 参照谢吉国等(2012)的方法进行。先提取 GCRV096 总 RNA, 反转录合成 cDNA 第一链, 作为 NS38 基因 PCR 扩增的模板。PCR 反应体系: 10 \times Ex *Taq* Buffer 2.5 μ l, dNTP (2.5mmol/L) 2 μ l, 引物 F (10 μ mol/L) 1 μ l, 引物 R (10 μ mol/L) 1 μ l, cDNA 2 μ l, Ex *Taq* (5U/ μ l) 0.25 μ l, ddH₂O 16.25 μ l, 总体积 25 μ l。PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 热启动 10min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s、65 $^{\circ}$ C 退火 45s、72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取扩增产物琼脂糖凝胶电泳、回收纯化; 再用内切酶 *Bam*H I 和 *Sal*I 分别对纯化产物和诱饵载体 pGBKT7 进行双酶切, 酶切产物按 3:1 的比例在 T4 DNA 连接酶的催化下, 于 16 $^{\circ}$ C 连接 20h。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 涂布于含 50 μ g/ml 卡那霉素(Kan)的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随即挑取单克隆于 LB 液体培养基中扩大培养后进行菌落 PCR 检测, 再用质粒提取试剂盒提取诱饵重组质粒, 用酶切与 PCR 鉴定重组载体 pGBKT7-NS38。将鉴定正确的送至上海生工生物技术有限公司测序。

1.2.3 pGBKT7-NS38 自激活作用检测和毒性检测

参照 Clontech 公司操作手册与谢吉国等(2012)的方法进行自激活作用检测和毒性检测。转化诱饵重组载体 pGBKT7-NS38 至 Y2HGold 酵母菌后进行自激活作用检测; 将载体 pGBKT7 和诱饵重组载体 pGBKT7-NS38 分别转化至 Y2HGold 酵母菌完成毒性检测。

1.2.4 草鱼肾脏细胞(CIK)cDNA 文库的构建 参照 Clontech 公司操作手册构建 CIK cDNA 文库, 冻存用于 NS38 相互作用蛋白的筛选。

1.2.5 NS38 相互作用蛋白的筛选 在 1.2.3 的平板上挑取 Y2HGold (pGBKT7-NS38) 菌株的克隆接种于 50ml SD/-Trp/Kan 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250-270 r/min 孵育至 $OD_{600} = 0.8$, 1000g 离心 5min, 弃上清, 用 4—5ml SD/-Trp/Kan 重悬沉淀, 细胞浓度大于 1.0×10^8 /ml。取 1ml 冻存的 CIK 文库菌解冻, 取 10 μ l 在 SD/-Trp/Kan 平板上测定文库滴度 ($>2.0 \times 10^7$ cfu/ml) 后, 与 4—5ml 诱饵菌在 2L 无菌烧瓶中融合, 加 45ml 含 50 μ g/ml Kan 的 2 \times YPDA 肉汤, 于 30 $^{\circ}$ C 慢速震荡 (30—50r/min) 培养 20—24h。取一滴上述培养物在相差显微镜下观察融合情况, 如果有接合子形成, 1000g 离心 10min, 用 50ml 0.5 \times YPDA (含 50 μ g/ml Kan) 重悬沉淀, 1000g 离心 10min, 用 10ml 0.5 \times YPDA/Kan 溶解沉淀, 确定总体积。取 100 μ l 按 10 \times 梯度稀释分别涂布于含 SD/-Trp/Kan、SD/-Leu/Kan、SD/-Trp-Leu/Kan 的选择性培养基, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3—5d, 计算筛选到的克隆数并确定结合效率; 将余下的融合培养物, 以每平板 200 μ l 涂平板 SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA/Kan, 30 $^{\circ}$ C 培养 3—5d。挑取生长在 SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA/Kan 平板上的蓝色克隆, 转移到高筛选率的 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA/Kan 平板上反复筛选, 以确定阳性克隆。将多次验证为阳性的文库质粒转化 *E. coli* DH5 α , 筛选阳性克隆并提纯质粒, 将其与 pGBKT7-NS38 共转化酵母菌 Y2HGold 确定相互作用。取阳性克隆由上海生工生物技术有限公司测序, 将测序结果与 NCBI 数据库进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 pGBKT7-NS38 诱饵质粒的构建

提取 GCRV096 总 RNA 后, 反转录合成 cDNA 模板, 用 PCR 扩增获得带酶切位点的 NS38 基因。将 PCR 产物与 pGBKT7 载体连接构建 pGBKT7-NS38 真核表达载体, 经 PCR (图 1a)、双酶切 (图 1b) 鉴定表明克隆成功, 且测序结果与该基因序列一致, 说明 pGBKT7-NS38 诱饵质粒的构建是成功的。

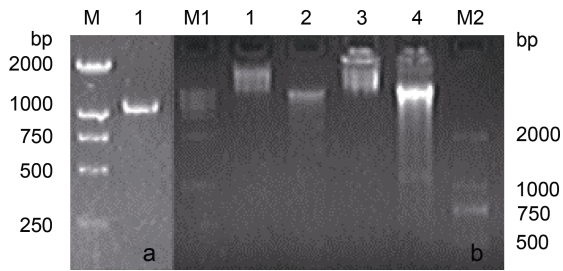


图1 NS38 基因菌落 PCR 与 pGBKT7-NS38 双酶切鉴定结果
Fig.1 Identification results of colony PCR products from NS38 and pGBKT7-NS38 digested with two enzymes
注: a: NS38 基因菌落 PCR. Lane M: DL 2000TM DNA 分子量标准, Lane 1: NS38 基因; b: pGBKT7-NS38 双酶切鉴定。Lane M1: DL-10000 DNA 分子量标准, Lane 1: 质粒 pGBKT7, Lane 2: BamH I 和 Sal I 双酶切的质粒 pGBKT7; Lane 3: 含 NS38 基因的质粒 pGBKT7, Lane 4: 双酶切的质粒 pGBKT7-NS38, Lane M2: DL 2000TM DNA 分子量标准

2.2 pGBKT7-NS38 自激活作用检测和毒性检测

含有 pGBKT7-NS38 的转化菌在 SD/-Trp/Kan、SD/-Trp/X- α -Gal/Kan 培养基上生长良好, 菌落呈白色。而在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA/Kan 培养基上未见菌落生长, 说明诱饵蛋白没有自激活活性; 将 pGBKT7-NS38 转化酵母菌 Y2HGGold 感受态细胞, 转化菌在 SD/-Trp/Kan 平板上生长良好, 与阳性对照无明显差异。接种于 SD/-Trp/Kan 液体培养基培养后, $OD_{600} > 0.8$, 说明诱饵蛋白没有毒性。

2.3 CIK cDNA 文库构建与检测

CIK cDNA 文库构建后, 通过酵母菌落 PCR 检测文库质粒插入片段的大小(图 2), 可见片段大小大多数在 250bp 以上(其中 1000—2000bp 的片段占 46%)。

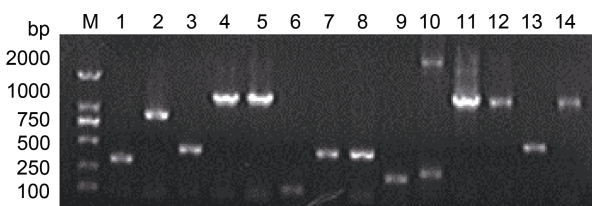


图 2 CIK 文库的菌落 PCR 检测(部分结果)

Fig.2 Identification of CIK library by colony PCR (partial results)
注: M: 分子量 Marker (DL 2000TM DNA 分子量标准); 1—14: 菌落 PCR 的产物

2.4 NS38 相互作用蛋白的筛选

两个单倍体酵母文库菌与诱饵菌配合后的结构如三叶草型(图 3), 说明接合子已形成, 最小的球状体为正在出芽的二倍体细胞, 另外 2 个大的球状体为亲代单倍体。统计 SD/-Trp/-Leu/Kan 平板上的克隆数, 计算筛选克隆数(cfu/ml)结果见表 1。根据表 1 数据计

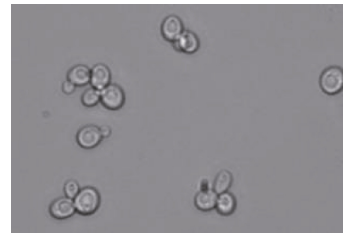


图 3 融合酵母的典型三叶草结构

Fig.3 Typical clover structure of the fused yeasts

算融合效率: NS38 为 4.05%、阳性对照为 4.83%, 融合效率满足实验要求。融合产物经高筛选率培养基反复筛选, 且通过共转化验证相互作用, 最后得到 3 株阳性克隆(图 4)。

表 1 在不同选择培养基上的筛选克隆数(cfu/ml)

组别	选择培养基		
	SD/-Trp/Kan	SD/-Leu/Kan	SD/-Trp/-Leu/Kan
NS38	3.74×10^7	5.92×10^6	2.4×10^5
阳性对照	7.84×10^7	6.63×10^6	3.2×10^5

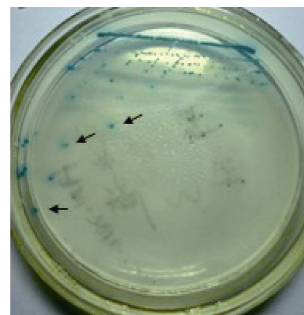


图 4 融合酵母在高选择培养基上的筛选结果

Fig.4 Screening results of yeast zygote on the high selective medium

注: 箭头所示为阳性克隆

对获得文库质粒插入片段的测序结果进行分析, 3 株阳性克隆共得到两条序列。它们的长度分别为: 470bp 和 397bp (测序结果未列出)。将序列在 GenBank 数据库中进行同源性比对分析, 发现一序列编码的蛋白与 40S 核糖体蛋白的 S16 亚基呈高度同源, 同源性高达 99%; 而另一序列编码的蛋白则没有找到典型的同源蛋白。

3 讨论

NS38 蛋白是 GCRV 的非结构蛋白, 存在于病毒感染宿主的过程中, 对它的研究难度要大于结构蛋白(Zhang *et al*, 2008)。因此, 与 GCRV 的结构蛋白相比, 其非结构蛋白在病毒生命循环中的分子机制研究的较少。Fan 等(2009)对 GCRV 非结构蛋白 NS80 的研究表明, 非结构蛋白的某些功能域能够对该蛋白的表达产生影响, 但是 NS38 在 GCRV 侵染和复制中的作用还不是很明确。加强对 NS38 蛋白分子生物学特性的研究可以为该蛋白的功能研究奠定基础, 其中相互作用蛋白的研究有助于人们进一步了解病毒的致病机制。本研究以 GCRV096 NS38 为诱饵蛋

白, 利用酵母双杂交系统, 经筛选鉴定获得两种 NS38 相互作用蛋白, 其中一种与 40S 核糖体蛋白 S16 亚基的同源性高达 99%。这些蛋白在 GCRV 侵染宿主的过程中所起的作用尚未见相关报道, 可见在 GCRV 中极可能存在新的、尚未被人类认识的致病机制, 这是令人振奋的。

核糖体蛋白质是构成核糖体所有蛋白质的统称, 作为核糖体的组成成分, 是生命活动所必需的重要成员。核糖体蛋白需要高浓度的盐溶液和强解离剂才能将其分离, 它们依次与 rRNA 结合形成核糖体的大、小亚基。当前, 对核糖体蛋白质的了解主要来自对大肠杆菌的研究。原核生物的核糖体(70S)分为大亚基(50S)和小亚基(30S), 50S 亚基中含有 34 种核糖体蛋白, 30S 亚基中含有 22 种核糖体蛋白, 它们占核糖体成分的 35%; 而真核生物的核糖体(80S)由 60S 的大亚基和 40S 的小亚基构成, 60S 亚基中含有 49 种核糖体蛋白, 40S 亚基中含有 33 种核糖体蛋白, 这些蛋白占核糖体的 50%。目前为止, 人类所有的 79 个核糖体蛋白的结构与功能都已基本清楚, 在鱼类中核糖体蛋白虽已有一些研究报道(Karsi *et al*, 2002; Patterson *et al*, 2003), 但核糖体蛋白的结构及编码它们的基因还未被完全了解。本研究表明, NS38 蛋白在病毒复制过程中具有一定作用, 并极可能通过 40S 核糖体蛋白与宿主发生相互作用。虽然关于 NS38 蛋白的其它部分功能已有所涉及(王伟等, 1995), 但它与核糖体蛋白相结合的机制以及后续的效应机制还有待进一步深入研究。本研究为深入探讨 GCRV NS38 的生物学功能奠定了基础, 对探讨 GCRV 的侵染与致病机制具有重要的科学意义。

参 考 文 献

- 王 炜, 赵桃英, 方勤等, 1995. 草鱼出血病病毒多肽的免疫原性. 中国病毒学, 10(2): 166—168
- 肖 静, 胡嘉森, 肖小平等, 2011. 利用酵母双杂交系统筛选与人巨细胞病毒皮层蛋白 pUL23 相互作用的病毒编码蛋白. 中国生物化学与分子生物学报, 27(4): 377—383
- 张 莉, 2010. 对虾白斑综合症病毒 VP37 基因诱饵重组载体的构建、转化与自激活作用检测. 海洋湖沼通报, 4: 129—136
- 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
- 谢吉国, 闫秀英, 简纪常等, 2012. 草鱼呼肠孤病毒 vp5 基因诱饵重组载体的构建、转化与自激活作用检测. 广东海洋大学学报, 32(3): 42—48
- Benavente J, Martinez-Costas J, 2007. Avian reovirus: structure and biology. *Virus Research*, 123(2): 105—119
- Cai L, Sun X, Shao L *et al*, 2011. Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80. *Virology Journal*, 8: 168
- Fan C, Zhang L L, Fang Q *et al*, 2009. Expression and identification of inclusion forming-related domain of NS80 nonstructural protein of grass carp reovirus. *Virologica Sinica*, 24(3): 194—201
- Fang Q, Seng E K, Ding Q Q, 2008. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases. *Archives of Virology*, 153(2): 675—682
- Fang Q, Shah S, Liang Y *et al*, 2005. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus. *Science in China Series C*, 48(6): 593—600
- Field S, Song O, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature*, 340: 245—246
- Ivanovic T, Agosto M A, Chandran K *et al*, 2007. A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16): 12210—12219
- Karsi A, Patterson A, Feng J *et al*, 2002. Translational machinery of channel catfish: . A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression. *Gene*, 291: 177—186
- Patterson A, Karsi A, Feng J *et al*, 2003. Translational machinery of channel catfish: . complementary DNA and expression of the complete set of 47 60S ribosomal proteins. *Gene*, 305: 151—160
- Qiu T, Zhang J, Lu R *et al*, 2001. Genome segment S8 of grass carp hemorrhage virus encodes a virion protein. *Intervirology*, 44(5): 317—320
- Shao L, Fan C, Ewa Maj *et al*, 2010. Molecular characterization of nonstructural protein NS38 of grass carp reovirus. *Virologica Sinica*, 25(2): 123—129
- Takahashi T, Hato F, Yamane T, 2001. Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. *Circulation Research*, 88(4): 422—429
- Zhang L L, Shen J Y, Fang Q *et al*, 2008. High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells. *Virologica Sinica*, 23(1): 57—62

SCREENING THE PROTEINS INTERACTED WITH NS38 IN GRASS CARP REOVIRUS BY YEAST TWO-HYBRID SYSTEM

LI Jie¹, YAN Xiu-Ying¹, DING Yu¹, WU Zao-He², JIAN Ji-Chang¹, XIE Ji-Guo¹

(1. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025*; 2. *Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, 510225*)

Abstract The proteins interactive with non-structural protein NS38 of GCRV096 (grass carp reovirus) was screened in a yeast two-hybrid system, and the inserted fragments in positive clones were sequenced and analyzed bioinformatically. The results show that yeast Y2HGold containing the recombinant vector of NS38 gene was successfully fused with yeast Y187 that pre-transformed with cDNA library plasmid of CIK. Three positive clones were obtained, and two inserted cDNA sequences were identified. The protein encoded by a cDNA fragment has higher homology of 99% with S16 subunit of 40S ribosomal protein. These results may provide a basis for further study on the biological function of NS38 in the duplication of GCRV096.

Key words GCRV096; NS38; protein interaction; yeast two-hybrid system