

• 基础实验研究论著 •

噬菌体展示技术筛选人肠道病毒 71 型 3A 蛋白相互作用蛋白*

唐 瑞, 杨勇波[△]

(华中师范大学生命科学学院, 湖北武汉 430079)

摘要:目的 利用 T7 噬菌体展示技术筛选与人肠道病毒 71 型 3A 蛋白相互作用的蛋白。方法 构建 3A 蛋白的原核表达载体, 表达并纯化 3A 蛋白, 以 3A 蛋白为靶蛋白, 应用 T7 噬菌体展示技术对人肝细胞 cDNA 文库进行筛选, 对筛选到产物进行 DNA 序列分析及同源性研究。结果 表达并纯化了 3A 蛋白, 经过 4 轮筛选后, 选择 37 个阳性克隆, 采用 T7 特异性引物扩增插入片段, 将 PCR 产物送公司进行测序。经过同源性分析, 确定了 2 个与人肠道病毒 3A 蛋白相互作用蛋白。结论 通过 T7 噬菌体展示技术可以得到与 3A 蛋白相互作用蛋白, 通过研究此蛋白的功能就可以初步推测出 3A 蛋白可能的功能, 为进一步研究人肠道病毒的致病机制鉴定了基础。

关键词: 细菌噬菌体 T7; 人肠道病毒 71 型; 3A 蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2129-03

Screening protein interacted with enterovirus 71 3A protein by means of T7-phage display system*

Tang Rui, Yang Yongbo[△]

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

Abstract: Objective To screen and identify protein interacted with enterovirus 71 (EV71) 3A protein by means of T7-phage display system. Methods The prokaryotic expression vector of 3A protein was constructed for expressing and purifying 3A protein. With 3A protein as the target protein, the T7-phage display system was adopted to screen the human hepatocyte cDNA library. The screened products were performed the DNA sequence analysis and the homologous research. Results 3A protein was expressed and purified, after 4 rounds of biopanning, 37 positive clones were selected. The inserted fragments were amplified by PCR using specific T7 primer. The products were sequenced, 2 proteins were identified to interact with 3A protein by homologous analysis. Conclusion Through the T7 phage display system, two proteins interacted with 3A are obtained. The possible function of 3A protein can be speculated by researching the function of these two proteins, which lays the foundation for the further studying the pathogenic mechanism of EV71.

Key words: bacteriophage T7; enterovirus 71; 3A protein

人肠病毒 71 型 是小 RNA 病毒科, 肠道病毒属 (enterovirus) 成员。人肠病毒 71 型病毒是单股正链 RNA 病毒。基因组中仅有一个开放阅读框, 编码含 2194 个氨基酸的多聚蛋白。多聚蛋白可进一步被水解成 P1、P2、P3 前体蛋白, 3A 是 P2 和 P3 前体蛋白编码的非结构蛋白。研究表明非结构蛋白 3A 在病毒复制时与细胞内膜结构相互作用, 这是病毒 RNA 复制的一个前提条件^[1]。为深入理解 3A 的功能, 应用利用 T7 噬菌体展示技术筛选人肝细胞 cDNA 文库中与 3A 蛋白相互作用蛋白, 为研究人肠道病毒的感染和复制机制提供新的理论依据^[2]。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒 pET28a(+) 由本实验室保存, 大肠杆菌 DH5 α 及大肠杆菌 BL21 由本实验室自行制备。

1.2 试剂 蛋白酶抑制剂购自罗氏公司; Taq DNA 聚合酶、BamH I、Hind III 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品; Ni-NTA 树脂、T7 人肝细胞 cDNA 文库和受体菌 BLT5615 购自德国 Novagen 公司; DNA 纯化回收试剂盒、DNA Marker 购买于东盛生物有限公司, 预染蛋白标志为 Fermentas 公司产品; PCR 引物由上海桑尼公司合成。

1.3 方 法

1.3.1 3A 原核表达载体的构建 以构建的 EV71 感染性克隆为模板, 应用桑尼公司合成的引入 BamH I、Hind III 酶切位

点的特异性引物扩增 3A 片段。PCR 产物和 pET-28a(+) 分别双酶切纯化后, 用 T4 DNA 连接酶将目的片段连接至载体上。连接产物用热激法转化大肠杆菌 BL21^[3], 挑取单菌落进行双酶切验证, 验证正确的质粒送桑尼公司测序, 双酶切验证正确的质粒对应的菌液用 80% 甘油按 20% 体积比保种, -20℃ 保存。本研究中将 3A 亲水区片段的重组质粒命名为 3A 重组质粒。

1.3.2 3A 融合蛋白表达及纯化 将菌液按 1:100 比例接种含终浓度为 100 μ g/mL 卡那霉素 (Kan) 的 LB 培养基中, 37℃ 180 r/min 过夜培养。再将活化后的菌液接种于含 Kan 的培养基中, 37℃ 培养至 OD 值为 0.4~0.6, 向其中加入终浓度为 0.6 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 37℃ 诱导 4 h。4℃ 10 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 按照 pET 系统操作手册, 加入 B 缓冲液 (50 mmol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH 7.0) 将菌体重悬, 加入蛋白酶抑制剂 (购买自罗氏公司) 后低温高压破碎, 4℃ 16 000 \times g 离心 20 min, 收集沉淀, 再用 B 缓冲液重悬沉淀, 0.45 μ m 滤膜过滤后的溶液与镍离子金属螯合树脂 4℃ 结合 2 h, 然后用 5 倍柱体积的漂洗缓冲液 (50 mmol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl, 15 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素, pH 7.0) 洗脱杂蛋白, 最后用洗脱缓冲液 (50 mmol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素, pH 7.0) 洗脱目的蛋白^[4], 收集洗脱液做好标记。

* 基金项目: 华中师范大学中央高校基本科研业务费项目资助 (CCNU10A01018)。作者简介: 唐瑞, 女, 硕士研究生在读, 主要从事分子病毒学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: yongboyang@mail.ccnu.edu.cn。

从每一个洗脱液收集管中取 20 μ L 洗脱液用 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳鉴定纯化后蛋白纯度。

1.3.3 免疫印迹检测 将 SDS-PAGE 胶上的蛋白通过半干转膜仪转至甲醇处理过的 PVDF 膜上,用脱脂牛奶室温封闭 1 h (5 mg/mL 脱脂牛奶溶解在 PBS 溶液中),然后用抗-His 标志的鼠抗孵育 2 h (用封闭液 1 : 5 000 稀释抗体),TBST 洗膜 5 min \times 3 次,再用羊抗鼠的辣根过氧化物酶孵育 1 h (用封闭液 1 : 3 000 稀释抗体),TBST 洗膜 5 min \times 3 次,通过化学发光显色验证结果^[5]。

1.3.4 3A 相互作用蛋白的筛选

1.3.4.1 噬菌体滴度测定 将大肠杆菌 BLT5615 接种至含羧苄西林的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD 为 0.4~0.6,加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 30 min。溶解的半固体培养基 (含有 0.7% 琼脂粉的 LB 培养基) 以每管 3 mL 分装作为顶层培养基备用。将待测噬菌体悬液用新鲜 LB 培养基作 10 倍梯度稀释,取 10 μ L 稀释的噬菌液加入 200 μ L 处于中期 BLT5615 菌液中,室温培养 5 min 后加入至顶层培养基中并混匀,再将其混合液倒入固体培养基上,凝固后 37 $^{\circ}$ C 过夜培养^[6]。通过统计空斑数目来计算文库滴度。

1.3.4.2 筛选相互作用蛋白 (1)ELISA 板包被。包被的蛋白分为 3 种浓度:50、100、150 μ g/mL,每种浓度做 3 组平行实验。取 100 μ L 3A 纯化蛋白包被 ELISA 板 (蛋白溶解于 TBS 溶液中),置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜结合。(2)洗脱。用 0.1% TBST (TBS+0.1% 吐温 20) 洗板 10 次,倒扣将板中溶液除净,加入封闭液 (5 mg/mL 脱脂牛奶溶解于 TBS) 4 $^{\circ}$ C 培养 1 h。TBST 洗板 6 次。取 10 μ L 原始文库用 100 μ L 脱脂牛奶 TBST 溶液稀释,再将其加入到 ELISA 包被板中,室温培养 1 h。TBST 洗板 10 次除去未结合的噬菌体,再向板中加入洗脱缓冲液 (1% SDS pH 7.0),室温培养 7 min,用以洗脱结合的噬菌体。取 10 μ L 洗脱噬菌体直接测定滴度,另外取 10 μ L 洗脱噬菌体加入 5 mL BLT5615 细菌的培养液中扩增,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至细菌裂解,8 000 \times g 离心 10 min,将上清转移至干净 EP 管中,加入 10% 体积甘油混匀 4 $^{\circ}$ C 保存,以备下一轮筛选。每轮筛选后均作噬菌体斑分析。重复 4 轮以上的过程^[7]。

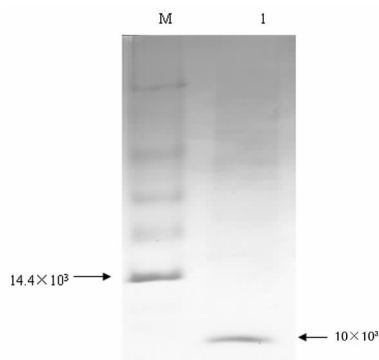
1.3.5 噬菌斑的扩增 挑取第 4 轮筛选后噬菌斑于 100 μ L 噬菌体裂解液 (10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中,涡旋混匀,65 $^{\circ}$ C 加热 10 min,室温冷却后 14 000g 离心 3 min。取 1~2 μ L 噬菌体裂解液作为模板,以 T7 噬菌体特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:1 μ L 模板;2.5 μ L Taq buffer;0.5 μ L T7 上游引物;0.5 μ L T7 下游引物;0.5 μ L dNTPs;1 μ L Taq DNA 聚合酶;双蒸水定容至 25 μ L。上游引物:5'-GGA GCT GTC GTA TTC CAGTC-3';下游引物:5'-AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3'。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 50 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果^[8]。

1.3.6 序列比对及同源性分析 将 PCR 产物送上海桑尼公司测序,利用 NCBI 生物信息学数据库对相互作用蛋白的核酸和对应的氨基酸序列进行分析。

2 结 果

2.1 3A 融合表达及纯化 用 IPTG 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h,收集菌体低温高压破碎。将破碎离心后的沉淀用 B 缓冲液重悬过滤后与 Ni 柱结合,逐步用不同浓度梯度的缓冲液纯化。其中目的蛋白洗脱液进行 15% SDS-PAGE 电泳,结果如图 1 所示,在相对分子质量 10×10^3 左右出现一条单一条带,其大小与大小结

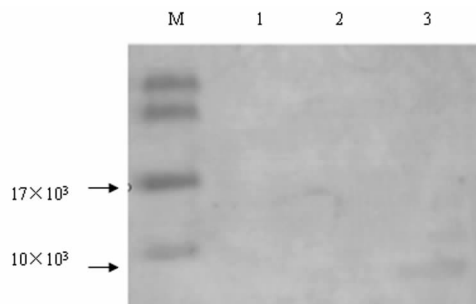
果一致。表明纯化获得 3A 纯度较高。



M: 蛋白质标记; 1: 纯化后 pET-28a(+)-3A 蛋白。

图 1 15% SDS-PAGE 电泳考马斯亮蓝染色图谱

2.2 免疫印迹法检测纯化的融合蛋白 pET28a(+)-3A 经 Ni-NTA 亲和纯化后,用 His 标志的鼠抗作为一抗,辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG 作为二抗,进行免疫印迹法检测,PVDF 膜在 AEC 溶液中显色。结果见图 2,在 10×10^3 左右处有目的条带,与图 1 结果一致,表明纯化的蛋白为含 His 标签的目的蛋白。



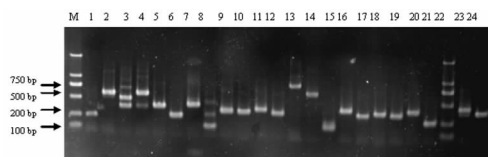
M: 蛋白质标志; 1: 为 pET28a(+)-空载质粒对照; 2: 为 pET28a(+)-3A 重组质粒未诱导; 3: 纯化后的 3A 蛋白样。

图 2 免疫印迹法检测纯化的融合蛋白图谱

2.3 筛选人肝 cDNA 文库中 3A 相互作用蛋白 为了获得与 3A 相互作用蛋白,本实验所用的 T7 噬菌体原始文库包含 4.8×10^{17} 个克隆,通过 4 轮“结合-洗脱-扩增”过程,文库滴度经历了先下降在升高并趋于稳定过程,当文库滴度趋于稳定时,说明噬菌体结合能力已经达到饱和状态,与 3A 蛋白特异性结合的噬菌体得到了富集。筛选结果见表 1。

表 1 4 轮 T7 噬菌体筛选投入量和产出量的结果 (pfu/mL)

筛选轮次	投入量	产出量	投入/产出
1	4.80×10^{17}	3.54×10^9	1.36×10^8
2	2.60×10^{17}	1.92×10^{11}	1.35×10^6
3	4.80×10^{17}	5.72×10^{12}	8.39×10^4
4	3.68×10^{17}	4.96×10^{12}	7.42×10^4



M 为 DNA 标记物; 1~24: 噬菌斑裂解液 PCR 扩增产物。

图 3 噬菌斑裂解液 PCR 扩增结果

2.4 目的基因 PCR 扩增 经过 4 轮筛选,从第四轮的平板上

中随机挑取 37 个噬菌斑至噬菌体裂解液中,裂解充分后以 T7 噬菌体引物进行 PCR 扩增,PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,见图 3。

2.5 序列比对及同源性分析 将图 3 中的 PCR 产物分为 6 类,每一类中选取一个样品送桑尼公司测序。测序结果在 NCBI 的基因数据库中进行同源序列比对,发现了 2 种同源性为 100% 的蛋白序列。

3 讨论

T7 噬菌体表面展示技术。它是研究蛋白质间相互作用的一种有效手段,此技术将基因型和表型联系在一起,可以通过蛋白的相互作用来分离和鉴定出表达有目标蛋白的噬菌体重组子,并且获取到编码目标蛋白的核苷酸序列。本研究中通过测序分析 38 个筛选到的克隆,经基因数据库进行同源序列比对,得到了 2 个同源性 100% 的蛋白序列。

这两个同源性 100% 的蛋白种类:(1)PRL27A 编码核糖体蛋白 L27a(RPL27a),是高度保守的胞质核糖体蛋白。在直肠癌中,核糖体蛋白有异常表达,另外,核糖体蛋白表达的下调同样也与造血细胞的分化、白血病细胞的凋亡相关^[9]。提示 RPL27a 对调节基因的表达具有特异作用并且与细胞增殖相关^[10]。(2)ATP synthase F0 subunit 6 ATP 合成酶存在于所有有机体中,其包括两个部分:F1 可溶性球状体,复制催化。F0 膜结合的质子通道。之前,ATP 合成酶被认为只定位于线粒体内膜,细菌细胞质膜以及叶绿体内囊体膜上,用于合成 ATP 或者产生质子。但是目前新的实验研究表明 ATP 合成酶存在于多种动物细胞表明并作为多种配体的受体参与到多种细胞过程中,如脂代谢、pH 调节以及肿瘤细胞的溶解。除此之外还与一些疾病相关,如亚急性坏死性脑脊髓病,一种神经性疾病,是由于 ATP 合成酶损伤导致。另外,在阿尔茨海默病和早衰痴呆症患者中发现其线粒体中的 ATP 合成酶存在缺陷^[11]。3A 蛋白与 ATP 合成酶相互作用,说明 3A 蛋白可能在细胞中充当受体的作用,在 EV71 感染人体后产生多种神经性疾病起着重要作用^[9]。

研究表明 3A 在病毒复制时与细胞内膜结构相互作用^[12],这是病毒 RNA 复制的一个前提。为了更进一步了解 EV71 的感染及复制过程机制。本研究表达并纯化了 3A 蛋白,采用 T7 噬菌体展示技术,以 EV71 3A 亲水蛋白为靶蛋白,筛选了人肝细胞 cDNA 文库,得到多个可能与 3A 亲水蛋白相互作用

的蛋白,通过对相互作用蛋白功能的分析,可以进一步推测出 3A 在细胞内可能的作用位点。为进一步研究人肠道病毒的致病机制及疫苗的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 黄琴琴,唐瑞.人肠道病毒 71 型 3A 蛋白的原核表达及抗体制备[J].中国病原生物学杂志,2013,8(6):507-509.
- [2] Zhu C, Zheng F, Sun T. Interaction of avian influenza virus NS1 protein and nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1[J]. Virus Genes, 2012, 358(1): 261-273.
- [3] 黄英,张君.用 T7 噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 PreS1 相互作用蛋白[J].重庆医科大学学报,2007,32(4):340-343.
- [4] Szakonyi D, Byrne ME. Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in Arabidopsis thaliana[J]. Plant J, 2011, 65(2): 269-281.
- [5] Frigerio JM, Dagorn JC, Iovanna JL. Cloning, sequencing and expression of the L5, L21, L27a, L28, S5, S9, S10 and S29 human ribosomal protein mRNAs[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1262(1): 64-68.
- [6] Hong S, Pedersen PL. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2008, 72(4): 590-641.
- [7] Ahmad Z, Okafor F, Azim S, et al. ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(15): 1956-1973.
- [8] 王景涛,季平.利用 T7 噬菌体展示技术构建人舌鳞癌细胞多肽文库[J].重庆医科大学学报,2010,35(11):1687-1689.
- [9] 庞华,罗弋.人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选[J].第三军医大学学报,2008,30(22):2082-2085.
- [10] 臧家涛,李淑慧.应用 DNA shuffling 及 T7 噬菌体展示技术定向进化并筛选鉴定 sCD74 突变体[J].第三军医大学学报,2008,30(8):694-697.
- [11] 赵善超,李志杰.用 T7 噬菌体展示系统筛选与晚期糖基化终产物受体胞内段相结合的蛋白[J].解放军医学杂志,2004,29(1):61-63.
- [12] 刘刚.噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白相互作用蛋白[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):26-28.

(收稿日期:2014-02-28)

(上接第 2128 页)

及检测试剂制备的候选特异性片段备选,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 金奇.医学分子病毒学[M].北京:科学出版社,2001:606-613.
- [2] Samuda GM. Monoplegia caused by enterovirus 71: an outbreak in HongKong[J]. Pediatr Infect Dis J, 1987, 6(1): 206-208.
- [3] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-107.
- [4] Yi L, Lu J, Kung HF, et al. The virology and developments toward control of human enterovirus 71[J]. Crit Rev Microbiol, 2011, 37(4): 313-327.
- [5] Wu CN, Lin YC, Fann C, et al. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus[J]. Vaccine, 2001, 20(1): 895-904.
- [6] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to

- 1998[J]. J Virol, 2000, 74(24): 12003.
- [7] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11): 778-790.
- [8] Huang YP, Lin TL, Hsu LC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008[J]. Virol J, 2010, 7(1): 277.
- [9] Brown BA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 1999, 73(1): 9969-9975.
- [10] Derman AI, Prinz WA, Belin D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli[J]. Science, 1993, 262(5140): 1744-1747.
- [11] Wu TC, Wang YF, Lee YP, et al. Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackie A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice[J]. J Virol, 2007, 81(19): 10310-10315.

(收稿日期:2014-02-24)