

噬菌体展示筛选与狂犬病毒 P 互作的宿主蛋白

董婉玉, 李有文, 傅振芳, 彭贵青

(华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 首先表达纯化了狂犬病毒 (rabies virus, RABV) P 蛋白, 以纯化的 P 蛋白为靶蛋白, 通过 T7 噬菌体展示的方法筛选相互作用蛋白。通过 5 轮的筛选, 得到多个阳性克隆, 其中核糖体大亚基蛋白 L9 (ribosomal protein L9, RPL9) 与 P 蛋白特异性相互作用, 并通过酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)、GST pull-down 得到验证, 为进一步阐明 RABV 的复制和致病机理奠定基础。

关键词: 家畜病毒学; 狂犬病毒; P 蛋白; 噬菌体展示技术; 相互作用

中图分类号: S855 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2017)15-1722-07

Screening of the host proteins interacting with rabies virus P by phage display system

DONG Wanyu, LI Youwen, FU Zhenfang, PENG Guiqing

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The study firstly expressed and purified the rabies virus (RABV) P protein, and we used the purified P protein as the target to screen the interaction protein by a T7 phage display system. Through 5 rounds of elutriation, we obtained several positive clones. The results showed that ribosomal protein L9 (RPL9) could interacted with P protein specifically, which was demonstrated by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) and GST pull-down. The study laid the foundation to clarify the replication and pathogenesis of RABV further.

Key words: livestock virology; rabies virus; P protein; phage display technology; interaction

0 引言

狂犬病又称恐水症, 是由 RABV 所致的自然疫源性人畜共患神经系统急性传染病, 可以感染人和所有温血动物, 每年导致约 60 000 人死亡^[1]。狂犬病的分布呈全球性^[2~3], 几乎所有国家和地区均有狂犬病疫情, 除南极洲外的地方都有狂犬病例报告, 其中绝大多数病例集中于亚、非、拉^[4~6]。我国近年来狂犬病疫情严重, 平均每年狂犬病报告人数约为 3 000 人, 仅次于印度, 居世界第二位^[7]。

RABV 为不分节段单股负链 RNA 病毒, 基因组全长约 12 kb, 在其两端分布着先导序列 (Le) 和尾部序列 (Tr) 2 个非编码区域, 基因组编码 5 种病毒结构蛋白 (3'~5'): 核蛋白 (N)、磷酸化蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、糖蛋白 (G) 及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (或大蛋白, L)。RABV P 蛋白是多功能蛋白, 主要功能是作为病毒聚合酶 L 蛋白的辅助因子, 在病毒转录与复制中发挥着重要作用。

P 蛋白有 2 个独立的 N 蛋白结合区域。其中, N 端 aa69~177 区域与新合成的没有结合 RNA 分子的

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130146120004)

作者简介: 董婉玉 (1989—), 女, 博士研究生, 主要研究方向: RABV 与宿主蛋白的互作

通信联系人: 彭贵青, 教授, 主要研究方向: 兽医传染病防控理论和技术. E-mail: penggq@mail.hzau.edu.cn

N 蛋白 (N₀) 结合, 形成 N₀-P 复合体, 对新合成的 N 蛋白起着伴侣蛋白的作用, 使其正确折叠, 并只能特异性结合病毒的基因组和反基因组 RNA^[8]; P 蛋白的 C 端 aa186~297 区域与 N-RNA 结合, 对 P 蛋白参与病毒转录的能力相当重要^[9]。目前, 一般认为 P 蛋白 N 端 19 个 aa 负责与 L 蛋白结合^[8]。P 蛋白的第二大类功能就是参与免疫防御。P 蛋白通过 C 端区域分别与干扰素通路相关蛋白 PML、STAT 交互, 抑制细胞干扰素的产生, 从而抑制细胞的先天性免疫反应^[10]。近期还发现, P 蛋白能够通过 PCED 区域 aa106~131 与粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 交互, 调控 RABV 的感染^[11]。P 蛋白的第三类功能是与宿主的其他蛋白或因子作用, 劫持宿主为病毒增殖服务。P 蛋白通过其下游无序区域 aa144~149 与微管运输系统中动力蛋白轻链 LC8 紧密结合, 为病毒高效转录服务, 或在神经元细胞轴突逆向运输^[12]。有研究指出缺失 P 蛋白的 RABV 突变体毒株没有复制能力^[13]。因此, 分析 RABV P 蛋白与宿主蛋白的相互作用不仅对其致病机制的研究至关重要, 也可为抗病毒新药设计、新型疫苗等研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、菌株、细胞、载体

RABV 菌株 (SAD-L16), 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由本实验室保存; T7 噬菌体文库、5403 (噬菌体宿主菌) 购自 Novagen 公司; pET-42b Vector、pGEX-KG Vector 由本实验室保存。

1.1.2 工具酶与主要试剂

TRIzol 试剂 (Invitrogen); 卡那霉素、30% 丙烯酰胺、显色剂 A/B 购自碧云天公司; 2 \times Taq Master MIX 酶, Prime star, dNTP, T4 DNA 连接酶, DNA 标准分子参照物, 限制性内切酶 *Nde* I、*EcoR* I 等购自大连宝生物有限公司; 质粒提取试剂盒购自北京天根生物科技有限公司; 琼脂糖、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Boiful 公司; DNA 纯化回收试剂盒购自 Omega 公司; Ni 柱填料购自美国 Novagen 公司; 低熔点琼脂糖购自 Promega 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

P 单克隆抗体由实验室自制; His 单抗、羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗购自武汉博士得公司; T7 噬菌体抗体购自美国 Novagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 RABV P 蛋白原核表达质粒的构建

用 TRIzol 法提取 RABV SAD-L16 的基因组 RNA, 反转录后用 SAD-L16-P 特异性引物 PCR 扩增 RABV 的 P 基因 (P 蛋白基因片段), 将 P 基因和 pET-42b 载体用 *Nde* I 和 *EcoR* I 同时进行双酶切, 经 T4 连接酶连接, 构建原核表达质粒 pET-42b-P。

1.2.2 RABV P 重组蛋白的诱导表达与纯化

从 RABV SAD-L16 基因组中扩增 P 基因, 将 P 基因全长片段克隆到 pET-42b 载体上, 测序无突变后, 转化质粒到 BL21 感受态细胞中。接种阳性菌 10 mL 于 1 L LB (Kan⁺) 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD=0.6~1.0 后, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h, 集菌并压力破碎 3~5 次, 12 000 r/min 反复离心后取上清液用 0.22 μ m 或 0.45 μ m 的无菌滤器过滤。利用 Ni 亲和柱 (HisTrap HP) 及分子筛 (16/600 Superdex 200) 纯化蛋白。

1.2.3 噬菌体展示筛选

1) ELISA 板的包被

靶蛋白 P (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入 ELISA 板的孔中 (100 $\mu\text{L}/\text{孔}$); 用封口膜封好, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2) 筛选和扩增噬菌体与序列测定

① 筛选与洗脱

将 T7 噬菌体文库加入已包被的板中, 在室温下放置 30 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用 1 \times TBST (200 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 洗板 5 次。加入 200 μL T7 洗脱缓冲液, 室温放置 10~20 min; 将洗脱的噬菌体转移至 1.5 mL 灭菌 EP 管中; 取 10 μL 测定滴度; 余下用于扩增。

② 扩增

取余下的噬菌体洗脱液加入到 50 mL 5403 感受态细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌, 直至细菌裂解 (1~3 h); 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清加入 1/6 体积的 PEG/NaCl (13%), 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清; 500 μL TBS 溶解沉淀后 12 000 r/min 离心 5 min, 取 10 μL 上清测定滴度, 剩余 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用; 如此反复, 结合一洗脱一扩增, 通过 3~5 轮筛选直至洗脱的噬菌体滴度稳定在一定数量级, 铺板, 挑取单个噬菌斑。

③ 滴度测定

将被测噬菌体悬液用 LB 进行 10 倍稀释; 取 100 μL 不同稀释度的噬菌体分别加入 0.25 mL 5403 菌液混匀; 再加入溶化的 0.6% 低熔点琼脂糖, 2.5 mL/管; 倒入制备好的 LB 琼脂平板中, 静置 5 min 待顶层凝固后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中倒置 3~4 h; 计数并计算噬菌体滴度: 噬菌体滴度是指单位体积噬菌斑形成的个数 (pfu), 即平板上噬菌斑的个数乘稀释倍数再乘 10 (计算 1 mL 铺板的噬菌体)。

3) 筛选噬菌的测序数据分析

将最后一轮筛选的噬菌斑用 T7 噬菌体特异引物进行 PCR 扩增, 用琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并将 PCR 产物送至金斯瑞生物公司测序。将测出的序列翻译为氨基酸, 与 NCBI 的 GenBank 数据库中序列进行同源比较。并根据比对结果中对应蛋白的功能特性筛出的频度, 确定研究的备选互作蛋白, 并扩增其噬菌体。

1.2.4 备选蛋白的 ELISA 测定

将 P 蛋白包被于 ELISA 板中, 加入扩增的噬菌体上清液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温孵育 1 h; 去上清, TBST (TBS/0.02% Tween) 洗 3 次; 加入噬菌体抗体 (用 5% Milk TBS 按体积比 1:10 000 稀释) 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 室温孵育 1 h, TBST (TBS/0.02% Tween) 洗 3 次; 加入 100 μL 底物, 室温显色 10 min; 加入 50 μL 1 mol/L 硫酸终止, 酶标仪测定 OD₆₃₀ 值。

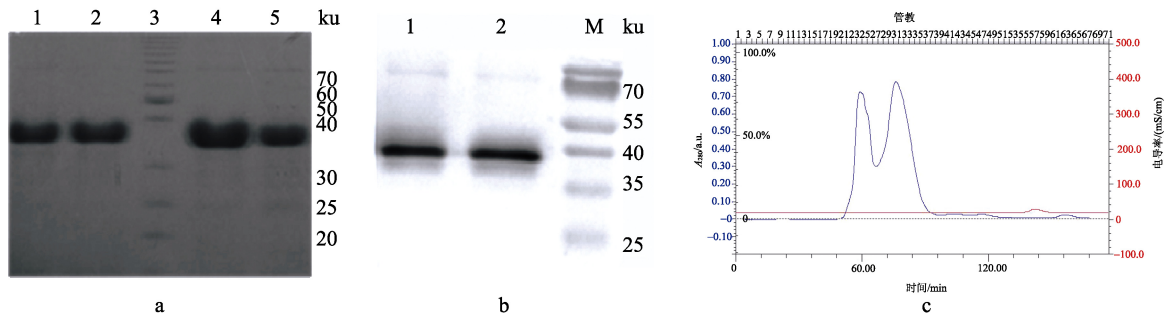
1.2.5 GST pull-down 鉴定

将 13 种备选蛋白克隆至 pGEX-KG 载体上, IPTG 诱导表达。将收集的细胞超声破碎后取上清。加入 GST beat 40 μL 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 转床翻转 2 h。再加入 P-His 蛋白 40 μg , 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 转床翻转 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 沉淀中加入 1 mL TBST 洗脱重悬, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 转床翻转 15 min, 重复 3 次。最后在沉淀中加入 0.1 mol/L 的谷胱甘肽溶液洗脱, 或直接加入 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸。取处理好的样品 10 μL , 小心点到醋酸纤维膜 (NC 膜) 上, 尽量不要太大, 可以重复点样以提高浓度。室温晾干后, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 进行免疫印迹实验。

2 结果

2.1 RABV P 蛋白的表达与纯化

将 P 基因片段连接至 pET-42b 载体, 构建原核表达质粒 pET-42b-P, 转化大肠杆菌 BL21, 37°C 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后经低温超高压破碎仪处理, 离心后取上清过 Ni 柱, SDS-PAGE 结果显示, P 蛋白经 IPTG 诱导后有大量表达 (如图 1a 所示), 用 Western blotting 检测确定所表达的蛋白为目的蛋白 (如图 1b 所示)。将目的蛋白浓缩至 1 mL 过分子筛, 蛋白有两种聚集形式 (如图 1c 所示)。



注: 图 a 中, 1、2、4、5—不同收集管中的蛋白样品; 3—蛋白分子量标准; 图 b 中, 1、2—纯化后的 P 蛋白样品, M—蛋白分子量标准
图 1 P 目的蛋白的表达纯化和鉴定

Fig. 1 Expression, purification and identification of P target protein

a—SDS-PAGE 分析 Ni-NTA 亲和层析纯化的 SAD-P 样品 (考马斯亮蓝染色); b—Western blotting 检测纯化的 P 蛋白;
c—全长 SAD-P 的分子筛层析图

a-SDS-PAGE analysis of Ni-NTA affinity chromatography of the purified SAD-P samples (Coomassie brilliant blue staining);
b-Western blotting detection of the purified P protein; c-Gel filtration chromatography of the full-length SAD-P

2.2 RABV P 相互作用蛋白的筛选与鉴定

2.2.1 T7 人脑 cDNA 文库的筛选

经过 5 轮筛选, 第 4 轮至第 5 轮噬菌体的洗脱量达到 10^8 pfu, 噬菌体的投入量、产出量及投入量/产出量如表 1 所示。可以看出, 随着筛选次数的增加, 投入量/产出量逐步趋于稳定, 表明至第 4 轮后噬菌体的富集程度已趋于饱和, 大多数噬菌体可以与 P 蛋白结合。筛选过程中蚀斑如图 2a 所示。

2.2.2 PCR 鉴定、测序与分析

挑取第 5 轮筛选的噬菌斑进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖电泳的结果如图 2b 所示。共扩增了 263 个克隆, 扩增的 DNA 片段大多在 200~1 500 bp 之间。

为进一步筛选亲和力较强的噬菌体, 用 P 蛋白作为抗原包被 ELISA 板, 选取部分测序后阅读框匹配筛选蛋白的噬菌体结合, 再用噬菌体的抗体进行检测。总共挑选了 90 个筛选蛋白。ELISA 检测部分 OD 值较高的结果如图 2c 所示。可以看出, PBS、空宿主菌、未经筛选的噬菌体库等阴性对照的 OD₄₉₀ 值均为 0.1 以下, 其他筛选蛋白的噬菌体值均高于 0.1, 大部分分布于 0.5~0.6 之间。根据序列分析和 ELISA 测定结果, 选择其中部分蛋白作为后备蛋白研究蛋白可能的生物学功能。部分后备蛋白的情况如表 2 所示。

表 1 不同轮次筛选时噬菌体的投入量和产出量
Tab. 1 Input and output of phages after different rounds of screening

筛选轮次	投入量/pfu	产出量/pfu	投入量/产出量
1	5.4×10^9	2.7×10^6	2.0×10^3
2	4.5×10^{10}	4.5×10^7	1.0×10^3
3	5.6×10^{10}	1.5×10^7	3.7×10^3
4	2.3×10^{10}	1.3×10^8	1.8×10^2
5	2.5×10^{10}	2.3×10^8	1.1×10^2

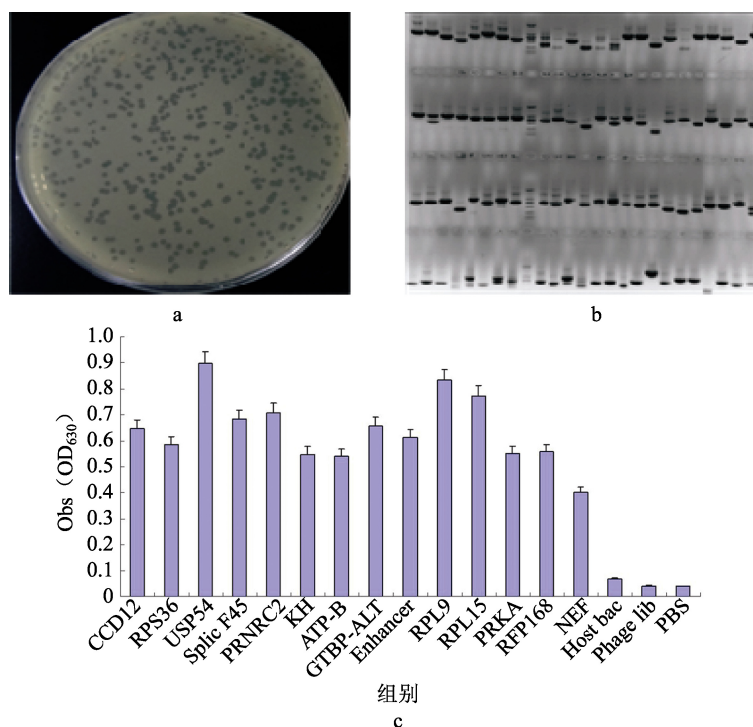


图2 噬菌体展示筛选 RABV P 蛋白的互作蛋白

Fig. 2 Interacting protein screening of the RABV P proteins by phage display system

a—筛选过程中的噬菌斑；b—5 轮筛选后，利用 T7 噬菌体特异性引物扩增出的 PCR 产物的琼脂糖电泳图；c—筛选出的部分候选蛋白的 ELISA 鉴定结果

a-Plaques in the process of screening; b-Agarose electrophoresis figure of PCR products amplified by specific primers of T7 phage as a template after 5 rounds; c-ELISA results of a part of screening candidate protein

表 2 噬菌体展示筛选宿主细胞内与 P 蛋白互作的部分后备蛋白

Tab. 2 Phage display-screened cellular factors of a part of screening candidate protein interacting with the P protein

编号	蛋白名称	频次/次	实长/bp	获长/bp	功能
1	RPL9	4	579	579	60S 核糖体组成成分，蛋白翻译中起校正作用，影响 tRNA 的 P 定位
2	NEF-E	1	1 143	435	参与 RNA 聚合酶 II 的作用，对翻译起负调控
3	Coiled-coil 12	2	540	540	在神经轴突上游走，与营养运输和信号传导有关
4	ATP-binding	1	4 746	258	ABC 超家族，与细胞膜内外运输、脂肪酸辅酶 A 循环代谢有关，引起肾上腺脑蛋白营养不良，脱鞘病
5	KH	1	1 038	1 038	发现人 hnRNA 核酸结合蛋白，负责 RNA 的识别
6	Splicing factor45	1	1 206	723	结合单链的 3'AG，在外显子、内含子催化反应调节使用和拼接
7	Pnrc2	3	420	420	富含脯氨酸的核受体激活

2.2.3 GST pull-down 确定 SAD-P 的互作蛋白 L9

根据候选蛋白的功能并结合 P 蛋白在 RABV 增殖中发挥的作用，且有研究报道 L9 在鼠乳腺瘤病毒 (mice mammary tumour virus, MMTV) 装配中有重要作用，首先通过 GST pull-down 的方法验证 P 蛋白与 L9 的相互作用。将 L9 基因克隆至 pGEX-KG 载体上，IPTG 诱导表达，将收集的细胞超声破碎后取上清。将细胞破碎上清、P-His 蛋白与还原型谷胱甘肽琼脂糖珠共同孵育，结合到琼脂糖珠上的蛋白用含 Triton-X 100 的缓冲液充分洗涤，除去没有结合的蛋白，再加入 SDS-PAGE 上样液煮沸，用 His 单抗作

Western blotting 检测。由图 3 可以看出, GST-L9 可以特异地结合 P 蛋白。

3 讨论

P 蛋白进行分子筛纯化时可看到 2 个峰, 经鉴定 2 个峰均为 P 蛋白, 说明 P 蛋白在体外的存在形式不是单一的, 且两种聚集状态按一定的比例存在。在分子筛纯化中, 将出现 2 个峰中的一个峰回收, 再进行分子筛纯化时, 又会出现 2 个峰, 且峰出现的位置不变。这与资料中显示的二聚体功能蛋白差别较大, 也可能是 P 蛋白全长的结构一直不能被解析的原因。不过, 能够得到大量表达的 P 蛋白, 为进一步研究 P 蛋白的结构和功能, 分析与之相互作用的蛋白或基因奠定基础。还可探索以 P 蛋白为抗原,

建立敏感、特异的免疫诊断的方法, 并系统分析其诱导的免疫应答, 以更详细地探究 RABV 的致病机理。

本文使用噬菌体展示的方法, 用纯化的 P 蛋白作为诱饵识别细胞中的其他目标蛋白。研究发现 13 种细胞因子可能与 P 蛋白作用, 并通过 GST pull-down 验证了 P 蛋白与 L9 的相互作用, 说明本文的筛选方法是可靠的。这些筛选出的候选蛋白为进一步研究 P 蛋白在 RABV 复制过程中的功能以及 RABV 的致病机制提供参考依据。

4 结论

本研究通过构建重组表达质粒 pET-42b-P, 利用大肠杆菌原核表达系统成功表达 RABV P 蛋白, 并经 Ni 柱和分子筛层析方法纯化后获得该蛋白。经过噬菌体展示筛选出人脑噬菌体文库中可能与 P 蛋白有相互作用的蛋白, 共获得了 13 个候选蛋白, 并通过 ELISA 方法进行了初步验证。通过 GST pull-down 确定了候选蛋白之一的 L9 与 P 蛋白的相互作用。互作蛋白的筛选与验证为进一步研究 P 蛋白的生物学功能及阐明 RABV 的复制机制和致病机理奠定了基础。

[参考文献] (References)

- [1] MARTINEZ L. Global infectious disease surveillance[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2000, 4(4): 222-228.
- [2] TAYLOR L H, LATHAM S M, WOOLHOUSE M E. Risk factors for human disease emergence[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2001, 356(1411): 983-989.
- [3] RUPPRECHT C E, HANLON C A, HEMACHUDHA T. Rabies re-examined[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2002, 2(6): 327-343.
- [4] MESLIN F X, FISHBEIN D B, MATTER H C. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1994, 187: 1-26.
- [5] BLANCOU J. Ecology and epidemiology of fox rabies[J]. *Review of Infectious Diseases*, 1988, 10(Suppl. 4): S606-S609.
- [6] KILIC B, UNAL B, SEMIN S, et al. An important public health problem: rabies suspected bites and post-exposure prophylaxis in a health district in Turkey[J]. *International Journal of Infectious Diseases: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2006, 10(3): 248-254.
- [7] BOURHY H, GOUDAL M, MAILLES A, et al. Is there a need for anti-rabies vaccine and immunoglobulins rationing in Europe?[J]. *Euro Surveillance*, 2009, 14(13): 19166.
- [8] CHENIK M, SCHNELL M, CONZELMANN K K, et al. Mapping the interacting domains between the rabies virus

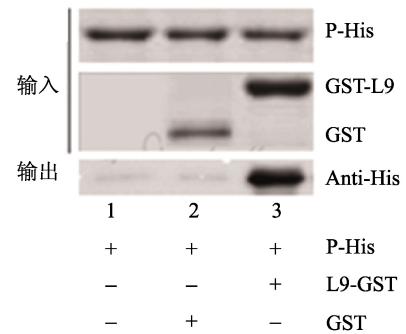


图 3 GST pull-down 验证 RABV P 与 L9 的相互作用

Fig. 3 Identification of the interaction between RABV P and L9 by GST-pull down

- polymerase and phosphoprotein[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(3): 1925-1930.
- [9] MAVRAKIS M, ISENI F, MAZZA C, et al. Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells[J]. *Virology*, 2003, 305(2): 406-414.
- [10] VIDY A, CHELBI-ALIX M, BLONDEL D. Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(13): 14411-14420.
- [11] FOUQUET B, NIKOLIC J, LARROUS F, et al. Focal adhesion kinase is involved in rabies virus infection through its interaction with viral phosphoprotein P[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(3): 1640-1651.
- [12] TAN G S, PREUSS M A, WILLIAMS J C, et al. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(17): 7229-7234.
- [13] SHOJI Y, INOUE S, NAKAMICHI K, et al. Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus[J]. *Virology*, 2004, 318(1): 295-305.