

利用噬菌体展示技术筛选草鱼呼肠孤病毒VP39蛋白相互作用多肽

龙晨 徐宁 谢雅晴 吕利群

SCREENING OF PEPTIDES INTERACTING WITH GRASS CARP REOVIRUS VP39 PROTEIN BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

LONG Chen, XU Ning, XIE Ya-Qing, L Li-Qun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0179>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

感染草鱼呼肠孤病毒对肠道菌群多样性的影响

EFFECTS OF REOVIRUS INFECTION ON THE INTESTINAL MICROBIOTA DIVERSITY OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2019, 43(1): 109–116 <https://doi.org/10.7541/2019.014>

青prdm14的原核表达、多克隆抗体制备及其应用

PROKARYOTIC EXPRESSION, PREPARATION AND APPLICATION OF ANTI-PRDM14 POLYCLONAL ANTIBODY OF MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*) PRDM14

水生生物学报. 2017, 41(4): 748–754 <https://doi.org/10.7541/2017.93>

中国绿水螭抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆、抗体制备及表达分析

MOLECULAR CLONING, ANTIBODY PREPARATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF ASCORBATE PEROXIDASE IN *HYDRA SINENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 305–314 <https://doi.org/10.7541/2019.038>

鲤春病毒血症病毒糖蛋白酵母表面展示系统的建立

ESTABLISHMENT OF YEAST EXPRESSION SYSTEM FOR SPRING VIRERNIA OF CARP VIRUS GLYCOPROTEIN

水生生物学报. 2019, 43(5): 977–982 <https://doi.org/10.7541/2019.116>

两株副溶血弧菌烈性噬菌体的分离鉴定

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO LYTIC PHAGES AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

水生生物学报. 2017, 41(4): 793–799 <https://doi.org/10.7541/2017.99>

克氏原螯虾嗜水气单胞菌噬菌体的分离鉴定和应用

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PRELIMINARY APPLICATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA* PHAGE FROM *PROCAMBARUS CLARKII*

水生生物学报. 2021, 45(2): 366–375 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.282>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0179

利用噬菌体展示技术筛选草鱼呼肠孤病毒VP39蛋白相互作用多肽

龙晨¹ 徐宁¹ 谢雅晴² 吕利群¹

(1. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306)

摘要: VP39是草鱼呼肠孤III型病毒(GCRV Genotype III, GCRV-III)S9基因编码的蛋白, 为研究VP39蛋白在GCRV-III感染草鱼细胞过程中行使的生物学功能, 将克隆VP39基因序列并构建原核表达载体pET32a-VP39, 通过原核表达得到VP39-HIS融合蛋白; 利用VP39蛋白溶液免疫小鼠, 制备鼠抗VP39多克隆抗体, 通过Western Blot对抗体进行评估; 利用制备的多克隆抗体探究GCRV-III感染细胞过程中VP39蛋白表达动力学; 利用噬菌体展示技术筛选与VP39蛋白特异性结合的多肽序列并进行分析。SDS-PAGE电泳结果显示, VP39-HIS融合蛋白可良好溶于PBS中, 蛋白大小约为39 kD; Western Blot检测表明实验所制备的VP39多克隆抗体在1:10000稀释比例下, 既能识别原核表达的VP39-HIS融合蛋白, 也能识别GCRV-III感染CIK细胞后表达的VP39蛋白, 具有良好的效价与特异性; 在病毒侵染过程中, VP39前期表达量较少, 在中后期大量表达; 噬菌体展示技术筛选出两条多肽与VP39蛋白有高度亲和性, 经过在NCBI上比对后发现草鱼基因组中有7个基因与筛出的多肽具有同源性, 表明其可能与VP39存在相互作用。研究制备了鼠抗VP39多克隆抗体, 为GCRV-III的免疫学检测方法提供了新的路径; 结合多肽的筛选也为VP39在GCRV-III侵染过程中参与的生物学功能研究奠定了基础。

关键词: III型草鱼呼肠孤病毒; VP39蛋白; 多克隆抗体; 噬菌体展示技术

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2023)06-0859-07



草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)作为我国重要的养殖鱼类, 是水产养殖产业的主要经济支柱。根据2021年中国渔业统计年鉴, 2020年我国草鱼年产量达到近560万吨, 产量远高于其他养殖鱼类^[1]。然而由于养殖水平的差异以及缺乏专业的管控, 巨大的产业规模也带来了一些负面影响, 水生生物疾病暴发的风险也在不断增加。据2021年中国水生动物卫生状况报告显示, 仅2021年草鱼因各种病原传播而导致的亏损便达到了惊人的20.9亿元^[2]。水产疾病的暴发不仅会对水产行业的经济造成一定的破坏, 而且也会对自然环境构成威胁, 导致野生鱼类的疾病污染。其中草鱼出血病对草鱼养殖产业的影响非常大, 每年都会导致大量鱼苗死亡, 而草鱼呼肠孤病毒是造成这一现象的主要病原^[3]。

草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)早在20世纪80年代就被我国科学家鉴定并分离。

GCRV是一种双链RNA病毒, 具有11个基因, 共编码13种蛋白质^[4]。目前GCRV已有超过30种病毒株被鉴定并分离, 而经全基因测序的毒株仅占1/3^[5]。根据比对核酸序列将草鱼呼肠孤病毒分为I、II和III型3种, 分别以GCRV-873、GCRV-HZ08和GCRV-104为代表性毒株^[6], 而不同基因型的草鱼呼肠孤病毒在毒力强弱及对细胞敏感性等方面均有不同程度的差异^[7]。GCRV-104是GCRV-III的唯一毒株, 2009年在湖北地区某处草鱼养殖场发现, 并成功从患病鱼体中分离且得到鉴定^[8]。经NCBI的基因库中对比后, 发现GCRV-104的S2片段与其他呼肠孤病毒相似性最高(达到42%—46%), S1、S3、S4、S5、S6和S8序列相似性仅在20%—30%, 而S7、S9、S10与S11这4个片段与其他呼肠孤病毒没有相似性^[5, 9]。在GCRV疫苗的研究中, Kai等^[10]将编码衣壳蛋白VP7基因的pcDNAvp7转入大肠杆

收稿日期: 2022-04-25; 修订日期: 2022-06-17

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-45)资助 [Supported by the China Agriculture Research System (CARS-45)]

作者简介: 龙晨(1998—), 男, 硕士研究生; 主要从事分子病毒学方向研究。E-mail: m200100237@st.shou.edu.cn

通信作者: 吕利群, 男, 博士; 教授; 主要从事水产动物病原学研究。E-mail: lqlv@shou.edu.cn

菌 *E. coli* DH5 α ghost 中,发现其免疫诱导的免疫应答强于裸pcDNAvp7。与GCRV-I、II型相比,对GCRV-III的研究相对较少。在抗病毒药物的研究方面,盐酸莫洛氧丁(Moroxidine hydrochloride, Mor)和利巴韦林(Ribavirin, Rib)被发现可抑制GCRV-104的增殖,通过间接降低GCRV-104诱导的CIK细胞的免疫应答来达到保护CIK细胞的作用, Mor和Rib还显著抑制了vp5、vp6和NS66基因的表达^[11]。也有研究表明槲皮素(Quercetin)可以抑制GCRV-JX01及GCRV-104在CIK细胞上的扩增^[12]。此外,EGCG也被发现对GCRV-JX01在鱼体内及体外的扩增有明显的抑制效果^[13],而对于GCRV-104是否具有相同作用尚不清楚。在前期的研究中,我们发现了GCRV-104的S7序列编码的VP55外衣壳蛋白被发现与细胞外基质蛋白 Fibulin4存在相互作用^[14, 15];通过酵母双杂交技术,蛋白酶体亚基 β 7 (Proteasome subunit beta 7, PMSB7)被发现与S10序列编码的VP38蛋白存在多点相互作用^[16, 17]。目前来看,由S9序列编码的VP39(GenBank登录号: JN 967637.1)蛋白在病毒感染过程中发挥的生物学功能仍然未知。

噬菌体展示技术(Phage display technology)最早可以追溯到1985年,噬菌体基因组被重组上外源片段,其编码的多肽便会在噬菌体外衣壳上得到展现,而大量带有外源多肽的噬菌体的集合组成了噬菌体文库。在噬菌体文库中加入目的蛋白经3—5轮的结合与洗脱,与目的蛋白具有相互作用的多肽序列则被筛选出来^[18]。周菁等^[19]通过噬菌体7肽库筛选结合分歧杆菌PPE17蛋白的特异性结合多肽,成功筛选出多肽序列LKWGHVY。张帆等^[20]通过噬菌体展示技术筛选与人乳腺髓样癌细胞特异性结合多肽,也取得了良好的结果,筛选多肽可能成为乳腺癌早期诊断和治疗的新靶点。张艺璇^[21]利用噬菌体展示技术成功构建了猪源噬菌体单链抗体库,通过四轮筛选获得了能与猪 δ 冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)蛋白特异性结合的噬菌体单链抗体(Single-chain variable fragment antibody, scFv)。

本研究构建了pET32a-VP39表达载体,利用大肠杆菌表达系统纯化出VP39-HIS融合蛋白,通过免疫小鼠制备多克隆抗体并进行分析。以VP39作为诱饵蛋白,利用噬菌体展示技术获取与VP39具有高度亲和性的多肽序列,并通过生物信息学分析预测与VP39互作的宿主蛋白。这将为GCRV-III的免疫学检测方法提供新路径,也为深入研究VP39蛋白在病毒侵染过程中参与的生物学功能奠

定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GCRV-104病毒株及草鱼肾脏细胞(*Ctenopharyngodon idellus* kidney, CIK)由本实验室保藏,大肠杆菌感受态细胞DH5 α 与BL21均采购自天根生物有限公司,限制性核酸内切酶BamH I 与Xho I、T4连接酶、PrimeSTAR Max DNA Polymerase均在TaKaRa公司处购买,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海傲义生物科技有限公司,HRP标记的羊抗鼠IgG购自上海威奥生物科技有限公司。

1.2 VP39基因的扩增

利用GCRV-104感染CIK细胞,72h后出现明显CPE,去除细胞上清后加500 μ L的TRIzol,通过TRIzol-氯仿法提取样品的RNA,将提取出的RNA进行逆转录。得到的cDNA可在-20 $^{\circ}$ C冰箱内保存。设计构建原核表达质粒pET28a-VP39的引物: F5'-AGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGCGCAATCTGGCTTCAAT-3'; R5'-TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGGATTGGCGCAATGGCCGTACA-3'。引物由生工生物工程股份有限公司合成。将上述cDNA作为模板,利用PCR技术对目的基因VP39进行克隆,PCR扩增程序设置:预变性98 $^{\circ}$ C 3min, (98 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 5s, 72 $^{\circ}$ C 10s)35次循环,继续延伸72 $^{\circ}$ C 3min,反应结束后4 $^{\circ}$ C暂存;1.5%琼脂糖凝胶电泳使上述PCR样品分离,确认扩增后的目的条带,大小约为1100 bp左右,并进行切胶纯化回收处理(步骤详见Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System 说明书)。

1.3 重组质粒pET28a-VP39的构建与鉴定

利用双酶切技术分别对目的片段与载体pET28a进行酶切,酶切反应体系为: BamH I 和Xho I 各2 μ L、载体/目的片段2 μ g,用无菌水补足100 μ L。混合好的酶切体系在30 $^{\circ}$ C下反应20min,然后37 $^{\circ}$ C下反应20min。酶切反应完成后,对目的片段和质粒再次纯化。在T₄ DNALigase的作用下,将VP39基因与质粒16 $^{\circ}$ C放置12—16h。将连接产物转化到大肠杆菌DH5 α 菌株中,准备好LB培养平板(含卡纳霉素),取50 μ L转化后的大肠杆菌于平板上涂布均匀至被吸收,在37 $^{\circ}$ C条件下培养12—16h。待LB平板长出菌落后,随机选择5个进行菌落PCR鉴定。将阳性菌置于100 μ L含卡纳霉素的LB培养基(不含琼脂)中培养2h,随后转移到30 mL培养基中继续生长6h。用FineQuick快速小量质粒柱式提取试剂盒提取目的质粒,将获取的质粒送至生工生物公司确认序列是否正确。

1.4 VP39蛋白表达及纯化

取BL21(DE3)感受态细胞(-80°C 保藏)置于冰上融化, 将经过测序确认的pET28a-VP39质粒转化入大肠杆菌中。将菌液涂布于LB(含Kana)平板上 37°C 培养12—16h, 然后从平板上挑取单菌落于 $100\text{ }\mu\text{L}$ LB(含Kana)中在摇床上 37°C 150 r/min 培养3h, 再将这 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液转移至 200 mL 的LB(含Kana)中继续培养8h; 加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 0.5 mol/L 的IPTG于菌液中, 在条件为 16°C 、 120 r/min 的摇床上培养12h, 以诱导蛋白表达; 菌液在 4°C 、 8000 r/min 条件下离心10min, 将LB培养液去除, PBS重悬洗涤1次, 再次去除上清; 加 20 mL 的PBS重悬, 此外滴加适量蛋白酶抑制剂以避免蛋白降解; 将菌液置于冰上, 通过超声仪使细胞膜破碎, 为防止温度过高, 每次超声持续5s, 间隔8s后再次超声, 功率设定为300W, 直到样品逐渐澄清; 离心收集沉淀于上清, 确认上清内含有目的条带后, 用His60 Ni Superflow Resin纯化VP39-HIS蛋白。

1.5 VP39多克隆抗体的制备

将纯化的VP39蛋白与弗氏佐剂混合, 注射入Bab/c小鼠的腹腔中。每只小鼠每次注射的 0.2 mg 左右的VP39蛋白。计划1个月内分4次注射, 平均每7天进行1次注射。初次注射小鼠时, 将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的VP39蛋白溶液(0.2 mg/mL)与100弗氏完全佐剂用一次性注射器吹吸混匀, 直至形成乳白色混合物, 在小鼠腹腔内注射; 接下来的两次小鼠注射均将弗氏完全佐剂替换为弗氏不完全佐剂, 重复上述操作; 第4次免疫可直接注射VP39蛋白溶液于小鼠腹腔中。腹腔注射对小鼠生理状态有一定影响, 在此期间需要保证小鼠处于正常存活状态。第4次免疫5d后, 配置10%水合氯醛溶液作为麻醉剂, 向小鼠腹腔内注射 $100\text{ }\mu\text{L}$ 麻醉剂; 确认小鼠已被麻醉后, 摘除小鼠一侧眼球, 用 15 mL 的EP管收集血液, 将EP管在 37°C 环境中放置1h, 然后将EP管置于 4°C 冰箱中12h, 第2天将血液离心后对血清进行回收, 取 $30\text{ }\mu\text{L}$ 血清放置在 4°C 冰箱用于多克隆抗体检测实验, 剩余血清分装后保藏在 -80°C 冰箱中备用。

1.6 噬菌体文库包被与筛选

向12孔板中加入 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的VP39蛋白溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$ (用 0.1 mol/L 的 NaHCO_3 稀释)。将12孔板在 4°C 条件下放置12—16h, 期间保持湿度以避免挥发; 去除蛋白溶液, 加 3 mL 封阻缓冲液, 4°C 下孵育1h; 倒掉封阻缓冲液, 向孔板中加 1 mL 的TBST缓冲液润洗6—8遍; 去除残留在孔板壁上的TBST缓冲液; 根据Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit操作说明, 将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 文库噬菌体溶于 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的TBST

缓冲液, 混合后加入经过包被的孔板中, 在室温条件下摇动1h后去掉上清, 并用TBST缓冲液润洗10次; 将VP39蛋白溶液以 1 mmol/L 的浓度溶于TBS, 加入孔板中以竞争结合噬菌体, 在室温下摇动1h后回收洗脱液; 将洗脱下来的噬菌体转入ER2738中 37°C 剧烈摇动4h以扩增噬菌体; 在 4°C 10000 r/min 下离心扩增产物10min, 取上清重复上述离心操作; 向上清中加入1/6体积PEG8000/NaCl, 将混合物在 4°C 冰箱中放置16h; 在相同条件下离心PEG沉淀, 去除上清后, 加 1 mL 的TBS缓冲液吹打混匀, 即完成噬菌体的首轮淘选与扩培。继续将上述过程重复4次, 得到经过5轮筛选的噬菌体洗脱物。

1.7 结合多肽序列分析

每一轮噬菌体筛选完成后都对其进行滴度测定, 经过5轮筛选后, 将噬菌体洗脱物用M13法涂布于平板上并随机选择25个噬菌斑, 送至金唯智生物科技有限公司天津测序部以序列分析。利用Ex-pasy对测序结果进行分析并翻译为氨基酸序列, 在NCBI的草鱼文库中鉴定含有目标多肽的蛋白序列。

2 结果

2.1 基因的扩增与质粒的构建

感染GCRV-104的CIK细胞出现明显CPE后提取RNA并反转录为cDNA, 通过PCR扩增得到大小约为 1089 bp 的条带。通过双酶切法将目的基因连接到pET-32a载体上, 连接产物转化到大肠杆菌中以筛选阳性菌, 结果表明所筛选菌落为阳性菌, 条带位置正确。阳性菌在含有Kana抗性的LB培养基中扩增并提取质粒。将质粒送至生工测序, 结果表明pET32a-VP39质粒构建成功, 条带大小正确。

2.2 蛋白表达与可溶性分析

重组载体转化到大肠杆菌(BL21菌株)中, 利用IPTG使VP39蛋白大量表达并纯化。对VP39蛋白样品进行10% SDS-PAGE凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色。结果显示, 与IPTG诱导前的蛋白样品相比, 诱导后的蛋白样品在 40 kD 左右的条带异常显著; 菌体经超声破碎后离心得到的上清在相同位置也出现单一条带, 而在沉淀中整体上呈现不均匀杂带分布, 这表明VP39-HIS蛋白可以良好地溶于PBS; 目的蛋白经过纯化洗脱后, 洗脱1次的样品条带清晰且杂带较少。

2.3 VP39多克隆抗体分析

将VP39蛋白溶液免疫小鼠, 制备鼠抗VP39多克隆抗体。通过Western Blot方法分析所制抗体的有效性, 检测结果发现VP39多抗在1:10000的稀释

条件下仍然能够VP39-HIS蛋白, 同样地, 所制备的多克隆抗体也能够特异性识别感染了GCRV-104的CIK细胞内含有的VP39蛋白, 而没有被GCRV-104感染的CIK细胞则没有被识别, 这表明鼠抗VP39多克隆抗体可以准确识别VP39蛋白, 具有很好的特异性识别能力。在GCRV-104感染细胞过程中, 每12h取1次蛋白样品以分析VP39的表达趋势, Western Blot结果可以看出VP39在24h有微量表达, 并随着感染时间延长, 表达量逐渐上升(图1)。

2.4 噬菌体筛选的滴度分析

根据Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit说明书, 对每轮噬菌体洗脱及扩增后的滴度进行检测(图2)。结果显示, 每经过1次噬菌体淘选, 噬菌体的滴度也不断增加, 二者呈正相关, 这表明每经过一轮筛选都会使与VP39蛋白存在特异性结合的噬菌体富集程度提高(表1)。

2.5 噬菌体筛选的多肽鉴定

经过5轮噬菌体筛选后, 挑取25个噬菌斑进行

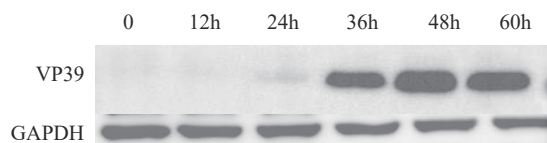


图1 在GCRV-104感染CIK过程中VP39蛋白的表达变化

Fig. 1 Changes of VP39 protein expression during CIK infection by GCRV-104

DNA测序。根据Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit说明书, 将测序结果与噬菌体核酸序列进行比对并翻译为氨基酸序列。测序结果得到多个基因序列, 其中5'-GCTCCGCGCCTTAGTCATCATATTGCGCATCATCAT-3'及5'-TGGCCTCTTTTGCTAGTAATGATCCGGTGTATGGG-3'两条基因序列分别重复了15次和8次, 翻译得到的相应氨基酸序列分别为N'-APRLSHHIAHHH-C'和N'-WPLFASNDPVYGG-C'。这表明上述两条12个氨基酸的多肽与VP39蛋白存在相互作用, 具有较强的结合能力。通过NCBI在草鱼文库中进行蛋白序列对比, 预测以下7个草鱼相关基因与VP39具有潜在的相互作用(表2)。

3 讨论

蛋白是病毒与宿主对抗过程中的行使各种生物功能的重要媒介, 而想要了解病毒在宿主体内复制机制以及宿主产生的免疫应答机理, 对于GCRV不同基因及其编码蛋白的功能的研究是非常必要的。噬菌体展示随机多肽库最大的特点在于其库容的多样性、筛选的高通量和成本的低价性, 因此目前噬菌体展示文库是抗病毒药物研究领域中最常用的文库之一^[22]。为了探索VP39在GCRV-104感染过程中参与的功能, 本研究首先克隆并纯化出VP39基因, 构建了pET32a-VP39重组质

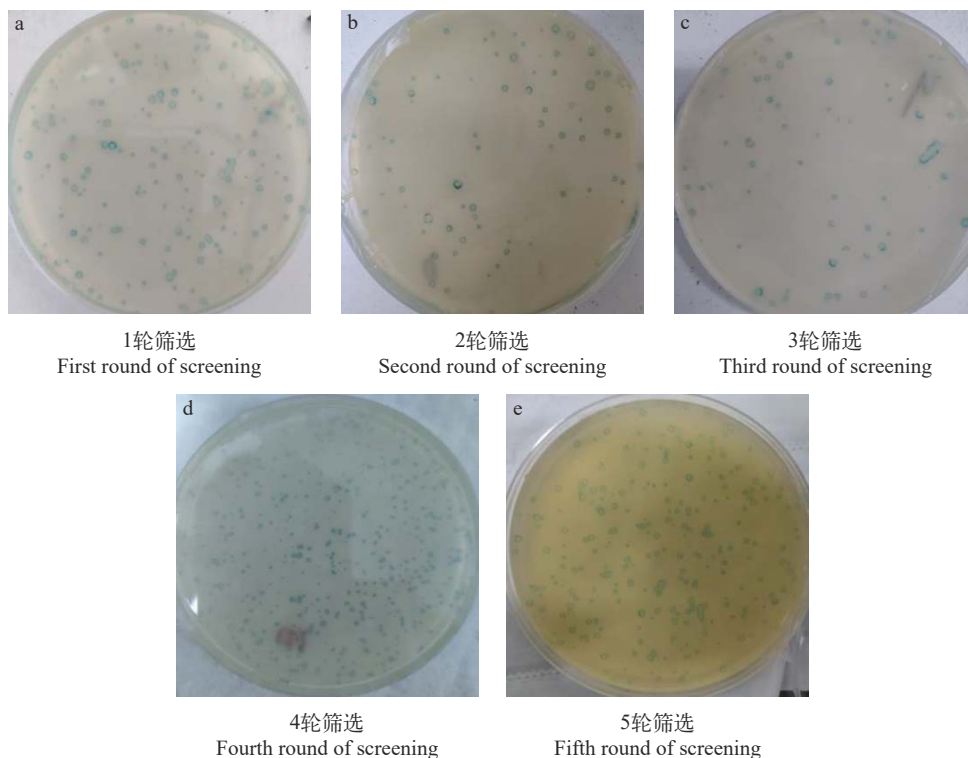


图2 噬菌体空斑培养照片

Fig. 2 Photographs of phage plaque culture

表 1 噬菌体展示回收率

Tab. 1 Phage display recovery rate

淘选轮数 Panning rounds	投入滴度 Input amount (PFU)	回收滴度 Recovery amount (PFU)	回收率 Recovery rate
1	3.12×10^{11}	2.2×10^5	7.09×10^{-7}
2	8.2×10^{10}	2.46×10^5	3×10^{-6}
3	3.1×10^{10}	1.2×10^6	3.8×10^{-5}
4	8.6×10^{10}	4.1×10^6	4.7×10^{-5}
5	2.1×10^{10}	4.2×10^6	5×10^{-4}

注: 回收率=回收滴度/投入滴度

Note: Recovery rate=Recovery amount/Input amount

表 2 与VP39互作的宿主基因预测

Tab. 2 Host gene prediction for interaction with VP39

基因Gene name	蛋白序列Peptide sequence
溶质载体家族5成员1 Solute carrier family 5 member 1	WPLFASNDPVYG
白介素-1受体相关激酶M/IRAK-M	WPLFASNDPVYG
趋化因子配体25 Chemokine ligand 25a	WPLFASNDPVYG
维甲酸诱导蛋白I Retinoic acid inducible protein I	APRLSHHIAHHH
雌激素受体αEstrogen receptor-alpha	APRLSHHIAHHH
Toll样受体18 Toll-like receptor 18	APRLSHHIAHHH
C-X-C基序趋化因子受体 C-X-C motif chemokine receptor 3.1	APRLSHHIAHHH

注: 下划线部分表示相关基因与所筛选多肽的同源片段

Note: The underlined part indicates the homologous fragment of the relevant gene with the screened polypeptide

粒, 通过大肠杆菌表达系统得到了VP39-HIS融合蛋白, SDS-PAGE实验说明VP39蛋白可溶于PBS, 蛋白大小约为39 kD。通过将VP39蛋白溶液注射小鼠腹腔, 使小鼠产生免疫反应以制得VP39多克隆抗体, Western Blot结果显示所制多克隆抗体既可以识别由大肠杆菌表达的VP39-HIS融合蛋白, 也能特异性识别GCRV-104感染CIK细胞产生的VP39蛋白, 具有良好的效价与特异性。另一方面, VP39的表达量在感染前期微量表达, 而随着感染时间的推移其表达量也逐步提高。通过噬菌体展示技术淘选出与VP39蛋白具有较强结合能力的12个氨基酸的多肽, 经过5轮筛选后, 随机挑选25个噬菌斑进行DNA测序。结果筛选出两条多肽序列, 分别是重复了15次的N'-APRLSHHIAHHH-C'多肽和重复8次的N'-WPLFASNDPVYG-C'多肽。将得到的多肽序列在NCBI的草鱼蛋白文库中比对, 发现了7个草鱼基因编码的蛋白与筛选出的多肽序列具有同源序列, 提示其可能与VP39蛋白存在相互作用。

进一步了解所筛选的草鱼基因的相关研究。其中, 白介素-1受体相关激酶M(Interleukin-1 receptor-associated kinase M, IRAK-M)和RIG-I样受

体(RIG-I-like receptors, RLRs)在抗病毒免疫方面的作用在已有的文献中被多次提及, 进一步实验也将依据此展开。

IRAK-M又称IRAK3, 是一种丝/苏氨酸激酶, 在TLRs通路的负调控过程中起关键作用^[23]。IRAK-M的表达与肿瘤及一些自身免疫性疾病的发生有密切联系^[24]。2018年, 草鱼体内的IRAK-M基因得到鉴定, 研究表明IRAK-M蛋白可在CIK细胞中与MyD88共定位并相互作用。抑制CIK细胞中的IRAK-M则会导致包括白介素8(IL-8)、IL-6等炎症细胞因子的产生^[25]。而MyD88作为关键蛋白参与的TLR22信号通路在抗病毒免疫应答中具有非常重要的作用^[26], 这可能暗示IRAK-M在对抗病毒感染中也行使一定的功能。

RIG-I样受体是一个细胞质模式识别受体(Pattern Recognition Receptors, PRRs), 可感知病毒病原相关分子模式(Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs), 以RIG-I(维甲酸诱导基因I, 也称DDX58)为代表^[27]。RIG-I包含3个结构域: N端两个串联半胱氨酸天冬酶相关和招募结构域(CARD), 中心的DExD框解旋酶/ATP酶结构域(DExD/H)和C端抑制结构域(RD)^[28]。在病毒感染后, RD结构域识别钝端碱基对RNA的5'端PPP末端, 解旋酶结构域结合到双链RNA的糖-磷酸主干上, 释放出CARDs。RIG-I的CARD与RLRs的衔接蛋白IPS-1的CARD相互作用, 激活下游信号级联^[29, 30]。研究表明, 受到GCRV感染后, 草鱼的脾脏和肝脏中RIG-I的表达显著增加, 在双链RNA类似物[poly(I:C)]刺激后, CiRIG-I转录本也在体外显著增强^[29]。在最近的研究中, 苏航等^[30]揭示了GCRV-097的结构蛋白VP4可与RIG-I的CARD和RD域结合, 并促使RIG-I的降解。VP4降低了RLR通路关键基因的mRNA和启动子活性以及IFN的表达, 这也导致了GCRV复制的增加, 导致细胞病变效应增强。敲除VP4则得到相反的效果。这表明VP4与RIG-I相互作用, 抑制干扰素反应, 并协助GCRV入侵^[31]。对于GCRV-104病毒而言, RIG-I可能同样在病毒侵染过程中发挥重要作用, 而VP39蛋白与其的互作关系依然值得关注。

与真核表达系统相比, 利用大肠杆菌表达系统获取蛋白成本更低、实验步骤更简单且效率也比较高^[32, 33], 因而被广泛运用于体外蛋白表达及纯化实验, 因此本研究选择通过原核表达系统纯化出VP39蛋白。通过免疫小鼠制备了效价良好的VP39多克隆抗体, 为GCRV-104的免疫学鉴定及分析提供了新的路径。而通过噬菌体展示技术筛选出与VP39存在特异性结合的两条多肽序列, 也为VP39

在GCRV-104侵染过程中的功能性研究指出了新的方向。

参考文献:

- [1] Luo Y. China fishery statistical yearbook [J]. *Ocean and Fishery*, 2020(6): 12-13. [罗茵. 中国渔业统计年鉴 [J]. *海洋与渔业*, 2020(6): 12-13.]
- [2] Zhu Y T. Report on Aquatic Animal Health in China in 2021 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 45. [竹攸汀. 2021年中国水生动物卫生状况报告 [M]. 中国农业出版社, 2021: 45.]
- [3] Liu X C, Wang X J, Zhang L, *et al.* Effect on virulence of grass carp reovirus with culture and long-time passage *in vitro* [J]. *Ludong University Journal* (Natural Science Edition), 2013, **29**(2): 139-143. [刘晓晨, 王晓洁, 张莉, 等. 体外培养及长期传代对草鱼呼肠孤病毒毒力的影响 [J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2013, **29**(2): 139-143.]
- [4] Lu J, Wang H, Zhang Y, *et al.* Grass carp reovirus NS26 interacts with cellular lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α factor, LITAF [J]. *Virus Genes*, 2016, **52**(6): 789-796.
- [5] Rao Y, Su J. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp [J]. *Journal of Immunology Research*, 2015(2015): 670437.
- [6] Jiang L, Tu J G, Zhang Y A. Effect of VP35 protein on the proliferation of type II grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(2): 261-269. [姜霖, 涂加钢, 张永安. VP35蛋白对II型草鱼呼肠孤病毒增殖的影响 [J]. 水产学报, 2022, **46**(2): 261-269.]
- [7] Wang Q, Zeng W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China [J]. *Journal of Virology*, 2012, **86**(22): 12466.
- [8] Fan Y, Rao S, Zeng L, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China [J]. *The Journal of General Virology*, 2013, **94**(10): 2266-2277.
- [9] Wang H, Liu W, Sun M, *et al.* Inhibitor analysis revealed that clathrin-mediated endocytosis is involved in cellular entry of type III grass carp reovirus [J]. *Virology Journal*, 2018, **15**(1): 92.
- [10] Hao K, Chen X H, Qi X Z, *et al.* Protective immunity of grass carp induced by DNA vaccine encoding capsid protein gene (vp7) of grass carp reovirus using bacterial ghost as delivery vehicles [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(64): 414-425.
- [11] Yu X B, Hao K, Li J, *et al.* Effects of moroxydine hydrochloride and ribavirin on the cellular growth and immune responses by inhibition of GCRV proliferation [J]. *Research in Veterinary Science*, 2018(117): 37-44.
- [12] Xu N, Fu J, Wang H, *et al.* Quercetin counteracts the proviral effect of heat shock response in grass carp cells with its therapeutic potential against *Aquareovirus* [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(7): 3164-3173.
- [13] Wang H, Chen Y, Ru G, *et al.* EGCG: Potential application as a protective agent against grass carp reovirus in aquaculture [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, **41**(8): 1259-1267.
- [14] Wang L, Yu F, Sun H, *et al.* Characterization of the interaction between outer-fiber protein VP55 of genotype III grass carp reovirus and Fibulin-4 of grass carp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(86): 355-360.
- [15] Yu F, Wang H, Liu W, *et al.* Grass carp Ctenopharyngodon idella Fibulin-4 as a potential interacting partner for grass carp reovirus outer capsid proteins [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(48): 169-174.
- [16] Wang L, Yu F, Xu N, *et al.* Grass carp reovirus capsid protein interacts with cellular proteasome subunit β -type 7: evidence for the involvement of host proteasome during *Aquareovirus* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(98): 77-86.
- [17] Wang L L, Qiu J Q, Yu F, *et al.* Yeast two-hybrid screening of host proteins that interact with VP6 or VP38 encoded by type III reovirus of grass carp [J]. *Journal of Biology*, 2018, **35**(4): 16-20. [王龙龙, 邱军强, 喻飞, 等. 利用酵母双杂交技术筛选草鱼III型呼肠孤病毒VP6和VP38相互作用蛋白的研究 [J]. 生物学杂志, 2018, **35**(4): 16-20.]
- [18] Wang X Y, Yu L F, Jia Z, *et al.* Overview and application of phage display technology [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, **33**(10): 930. [王欣瑀, 于丽凤, 贾真, 等. 噬菌体展示技术的概况与应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, **33**(10): 930.]
- [19] Zhou J, Ren Y, Chen J, *et al.* Screening specific binding peptides of *Mycobacterium tuberculosis* PPE17 protein by Phage display technique [J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2020, **31**(5): 18-20. [周菁, 任易, 陈军, 等. 噬菌体展示技术筛选结核分枝杆菌PPE17蛋白的特异性结合肽 [J]. 公共卫生与预防医学, 2020, **31**(5): 18-20.]
- [20] Zhang F, Jia X, Yao H, *et al.* Selection of peptide specifically binding to human mammary medullary carcinoma cells by phage display [J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2019, **50**(2): 159-162. [张帆, 贾昕, 姚红, 等. 噬菌体展示技术筛选人乳腺髓样癌细胞特异性结合肽 [J]. 山西医科大学学报, 2019, **50**(2): 159-162.]
- [21] Zhang Y X. Construction of porcine PDCoV phage single-chain antibody library and selection of antibody to PDCoV N protein [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021: 33. [张艺璇. PDCoV猪源噬菌体单链抗体库的构建及抗N蛋白单链抗体的筛选 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2021: 33.]
- [22] Sidhu S S. Phage display in pharmaceutical biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, **11**(6): 610-616.
- [23] Jin P P. A preliminary study of the regulatory mechanisms for IRAK-M expression [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2016: 1. [金培培. IRAK-M表达调控机制的初步研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016:]

- 1.]
- [24] Chu P, He L, Zhu D, *et al.* Identification, characterisation and preliminary functional analysis of IRAK-M in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(84): 312-321.
- [25] Kobayashi K, Hernandez L D, Galán J E, *et al.* IRAK-M is a negative regulator of toll-like receptor signaling [J]. *Cell*, 2002, **110**(2): 191-202.
- [26] Ji J, Liao Z, Rao Y, *et al.* Thoroughly remold the localization and signaling pathway of TLR22 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020(10): 3003.
- [27] Chen L, Su J, Yang C, *et al.* Functional characterizations of RIG-I to GCRV and viral/bacterial PAMPs in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(7): 42182.
- [28] Chen N. Research on the mechanism of EV71 immune evasion through inhibiting host RIG- I ubiquitination [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2017: 37-38. [陈宁. EV71病毒抑制RIG- I 泛素化逃避宿主天然免疫的机制研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2017: 37-38.]
- [29] Yang C, Su J, Huang T, *et al.* Identification of a retinoic acid-inducible gene I from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and expression analysis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **30**(3): 936-943.
- [30] Su H, Liao Z, Yang C, *et al.* Grass carp reovirus VP56 allies VP4, recruits, blocks, and degrades RIG-I to more effectively attenuate IFN responses and facilitate viral evasion [J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, **9**(2): 100021.
- [31] Su H, Fan C, Liao Z, *et al.* Grass carp reovirus major outer capsid protein VP₄ interacts with RNA sensor RIG-I to suppress interferon response [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(4): 560.
- [32] Wan S J, Yu F, Lyu L Q. Eukaryotic expression of the NS31 protein of grass carp reovirus in insect cells and screening of interacting peptides [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2021, **37**(6): 1448-1458. [万偲佳, 喻飞, 吕利群. 草鱼呼肠孤病毒NS31蛋白在昆虫细胞中表达及互作多肽筛选 [J]. 病毒学报, 2021, **37**(6): 1448-1458.]
- [33] Zeng W W, Wang Q, Zhang L S, *et al.* Prokaryotic expression and purification of VP₄ protein of grass carp reovirus HZ08 strain and preparation of polyclonal antibody [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2011, **24**(12): 1482-1485. [曾伟伟, 王庆, 张乐生, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08株VP4蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备 [J]. 中国生物制品学杂志, 2011, **24**(12): 1482-1485.]

SCREENING OF PEPTIDES INTERACTING WITH GRASS CARP REOVIRUS VP39 PROTEIN BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

LONG Chen¹, XU Ning¹, XIE Ya-Qing² and LÜ Li-Qun¹

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: VP39 is a protein encoded by S9 gene of type III grass carp reovirus (GCRV-III). In order to study the biological function of VP39 protein in the process of GCRV infection of grass carp cells, the sequence of VP39 gene was cloned and the prokaryotic expression vector PET32A-VP39 was constructed. The fusion protein VP39-HIS was obtained by using prokaryotic expression method. Mouse anti-VP39 polyclonal antibody was prepared by immunizing mice with VP39 solution protein, and the antibody was evaluated by Western Blot. The polyclonal antibody was used to investigate the expression dynamics of VP39 protein in GCRV infected cells. The results of SDS-PAGE showed that the fusion protein of vp39-his was well soluble in PBS and the protein size was about 39 kDa. Western Blot analysis showed that the prepared VP39 polyclonal antibody could recognize both the prokaryotic expression of VP39-HIS fusion protein and the expression of VP39 protein after GCRV infection with CIK cells at the dilution ratio of 1:10000, showing good titer and specificity. In the process of virus infection, the expression of VP39 was low in the early stage and high in the middle and late stage. Two peptides were screened by phage display technology for specific binding to VP39 protein, and further bioinformatics analysis also found that 7 genes in grass carp genome had homology with the peptide, indicating that these genes may interact with VP39. In this study, mouse anti-VP39 polyclonal antibody was prepared, which provided a new immunological method for GCRV-III detection. The screening of binding peptides also laid a foundation for the study of the biological function of VP39 in the process of GCRV infection.

Key words: Grass carp reovirus type III; VP39 protein; Polyclonal antibody; Phage display technology