

# 利用酵母双杂交系统在人脑 cDNA 文库中筛选与禽流感病毒核蛋白相互作用的蛋白质

尹文偲, 胡勇, 金梅林

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:** 禽流感病毒核蛋白 (NP) 在病毒的转录、复制以及决定病毒的宿主特异性方面都具有重要作用。通过酵母双杂交系统筛选与核蛋白相互作用的蛋白, 为进一步了解 NP 蛋白与细胞内蛋白质的相互关系以及流感病毒与宿主的相互关系奠定基础。应用酵母双杂交系统, 构建 NP 诱饵质粒, 进而筛选人脑 cDNA 文库, 寻找可能与禽流感病毒 NP 相互作用的蛋白质。经过酵母双杂交共验证, 得到 7 个与 NP 相互作用的阳性克隆。该结果为深入了解病毒复制的分子机理及其在蛋白质水平上与宿主蛋白的相互作用关系提供了线索。

**关键词:** 禽流感病毒核蛋白, 人脑 cDNA 文库, 酵母双杂交系统, 蛋白间相互作用

## Screening of proteins interacting with avian influenza virus Nucleoprotein by yeast two-hybrid system in human brain cDNA library

Wensi Yin, Yong Hu, and Meilin Jin

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

**Abstract:** Avian influenza virus Nucleoprotein (NP) is important in viral transcription, replication and determining host specificity of influenza virus. Yeast two-hybrid technique was applied to screen for proteins interacting with virus nucleoprotein, so as to further elucidate the interaction between virus nucleoprotein and cellular proteins, as well as the interaction between virus and host. To explore new proteins interacted with NP protein, a human brain cDNA library was screened using yeast two-hybrid system with NP as the bait. DNA inserts of the positive AD/library plasmids were sequenced. By the BLAST analysis against the GenBank databases seven positive clones resulted in seven genes. Our results could help for the further study on the molecular mechanism of virus replication, transcription and protein-protein interaction. Further investigations were needed to characterize these interactions.

**Keywords:** Avian influenza virus Nucleoprotein, human brain cDNA library, yeast two-hybrid system, protein-protein interaction

禽流感 (Avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的家禽和/或野禽的一种疾病综合症<sup>[1]</sup>。禽流

**Received:** February 22, 2010; **Accepted:** May 31, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB534000), National Transgenic Major Program (No. 2009ZX08009-141B), Important National Science and Technology Specific Projects (Nos. 2008ZX10403, 2009ZX10004-109).

**Corresponding author:** Meilin Jin. Tel: +86-27-87286905; Fax: +86-27-87282608; E-mail: jml8328@126.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB534000), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-141B), 国家科技重大专项课题 (Nos. 2008ZX10403, 2009ZX10004-109) 资助。

感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 属 A 型流感病毒, 主要引起禽类以呼吸系统疾病、产蛋下降乃至急性致死的高死亡率等为特征的烈性传染病, 常给养禽业主造成毁灭性打击<sup>[2]</sup>。AIV 的基因组为单股负链 RNA, 含有大小不同的 8 个独立的 RNA 片段, 流感病毒核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 是病毒粒子的主要结构蛋白, 由第 5 节段的 NP 基因编码, 该节段含 1 565 个核苷酸, 编码 498 个氨基酸, 分子量为 56 kDa, pH 6.5 时带正电荷。对从不同宿主分离的病毒株进行分析表明, 核蛋白基因相当保守, 氨基酸差别不超过 11%。

遗传学和生物化学研究显示, 禽流感病毒 NP 在病毒的感染周期中具有重要作用。在病毒的 RNA 合成过程中, NP 对病毒从转录模式转换成复制模式具有重要的作用。体内和体外病毒感染实验均证明, 缺乏可溶性的 NP, 病毒将不能从转录向复制模式转换<sup>[3]</sup>。流感病毒 NP 的磷酸化能增强流感病毒的增殖能力, 而这种磷酸化是由宿主细胞来完成的, 不同的宿主其磷酸化能力不同, 从而影响了流感病毒感染宿主的范围<sup>[4]</sup>。NP 与病毒组 RNA 及病毒聚合酶的 3 个亚单位 PB1、PB2、PA 相连, 参与 RNA 的复制和转录, 在与病毒颗粒 RNA 节段相互作用中充当骨架, 形成核糖核蛋白复合体 (RNP), 影响病毒的转录、复制、装配及转运功能。NP 富含精氨酸、甘氨酸和丝氨酸残基, 这个结构有利于 NP 结合 RNA<sup>[5]</sup>, 而 AIV 的复制需要 NP 与 RNA 结合。

NP 能在细胞浆与细胞核间穿梭, 它可以与细胞多肽如肌动蛋白相互作用, 对禽流感病毒核衣壳蛋白复合体以及相关蛋白的出核运输有较重要的作用<sup>[6]</sup>。

NP 蛋白不仅在流感病毒的复制及感染方面起重要作用, 它还是决定病毒的宿主特异性的一个重要蛋白。现在对于 NP 蛋白是如何与 RNA 结合, NP 蛋白与细胞内哪些蛋白质存在相互作用以及流感病毒与宿主的相互关系仍知之甚少。

酵母双杂交系统是研究蛋白质互相作用和蛋白质功能的一种新技术, 已被广泛应用于生物学研究的诸多领域<sup>[7]</sup>。酵母的遗传能力及易操作性使得通过它可以低成本高通量地评估蛋白间的相互作用。通过酵母双杂交系统从人脑 cDNA 文库中筛选与已

知病毒即禽流感病毒蛋白 NP 相互作用的蛋白质, 以期进一步了解禽流感病毒 NP 在病毒的感染周期中的作用, 并为理解病毒复制的分子机理以及在蛋白质水平上与宿主蛋白相互作用的关系提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒及文库

大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存。酵母菌株 AH109 和 Y187、诱饵质粒 pGBKT7、pGADT7 以及人脑 cDNA 文库购自 Clontech 公司。

### 1.2 重组质粒的构建与鉴定

按禽流感病毒 NP 基因序列设计相应的引物, 以 pcDNA3.1-NP<sup>[8]</sup> (由本实验室周红波副教授赠送) 为模板, PCR 扩增 NP 基因全长, 分别在上游和下游引物上引入 *EcoR* I 及 *Sal* I 酶切位点, PCR 产物纯化后经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切, 回收后与经相同条件酶切回收后的 pGBKT7 载体连接, 构建重组质粒 pGBKT7-NP, 酶切鉴定后, 测序鉴定。

### 1.3 重组质粒转化酵母菌 AH109

重组质粒 pGBKT7-NP 鉴定正确后, 按照 Clontech 公司 Yeast transformation system 操作手册, 应用 PEG/LiAC 方法转化酵母菌 AH109 (记为 AH109 (pGBKT7-NP)), 转化产物涂于 SD/-Trp 平板, 将生长状态良好、直径 2~3 mm 的菌落接种于 SD/-Trp 液体培养基, 过夜培养。

### 1.4 以 pGBKT7-NP 为诱饵筛选正常人脑 cDNA 文库

#### 1.4.1 NP 蛋白的毒性检验与自激活检验

分别将质粒 pGBKT7 以及 pGBKT7-NP 和 pGADT7 (共转化) 转化 AH109 酵母菌, 将它们连同 AH109 (pGBKT7-NP) 菌液分别涂平板培养后挑选直径约 3 mm 的菌落, 分别接种于 500  $\mu$ L 2 $\times$  YPDA 液体培养基, 培养 20 h 后, 稀释 10 倍。将稀释后的 3 种菌液以 100  $\mu$ L/平板各自分别涂于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板, 观察它们在各平板上的生长情况。

#### 1.4.2 人脑 cDNA 文库的筛选

挑取一直径 2~3 mm、生长状态良好的 AH109(pGBKT7-NP) 菌落接种于 20 mL SD/-Trp 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、270 r/min 振摇 10~20 h, 测得  $OD_{600}$

值为 0.2 后, 将此时的菌转接于含 45 mL SD/-Trp 液体培养基的 500 mL 锥形瓶, 30℃、270 r/min 振荡 8 h, 测得  $OD_{600}$  值为 0.8。离心后用 4~5 mL SD/-Trp 液体培养基将菌液沉淀重悬, 与 1 mL 含正常人脑文库的 Y187 酵母菌液共同接种于 50 mL 2×YPDA/Kan 液体培养基, 在 2 L 锥形瓶中 30℃、30~40 r/min 振荡过夜温育 20 h, 倒置显微镜观察二倍体形成情况, 如看到三叶草状的二倍体细胞, 则继续培养 4 h。将培养物离心, 重悬于 10 mL 0.5×YPDA 培养基, 取 100 μL 用于接合效率的检测, 剩下的菌液按 200 μL/平板全部涂于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板, 30℃倒置培养, 直至菌落出现。

#### 1.4.3 接合效率检测

如上所述, 1.4.2 中接合酵母的培养物重悬液取 100 μL 按 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000 稀释, 稀释后每个稀释度按 100 μL/平板分别涂于 SD/-Trp、SD/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu 平板, 培养后计算 SD/-Trp 和 SD/-Leu 平板之中菌落数较少的平板的菌落个数以及 SD/-Trp/-Leu 平板上的菌落个数。

### 1.5 假阳性克隆的鉴定与排除

#### 1.5.1 酵母质粒的营救

将 1.4.2 中得到的阳性克隆接种于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 液体培养基, 提取质粒, 转化大肠杆菌 DH5α, 转化产物涂于 LB/Amp 平板, 挑菌扩增培养后抽提纯化质粒。

#### 1.5.2 阳性蛋白的自激活检验

将上一步骤得到的阳性克隆质粒与 pGBKT7 质粒共转化酵母菌 AH109, 然后挑取直径为 2~3 mm 的菌落接种于 500 μL 2×YPDA 液体培养基, 培养 20 h 后, 稀释 10 倍。稀释后的菌液以 100 μL/平板分别涂布 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板, 观察生长情况。

#### 1.5.3 回复杂交

将 1.5.2 得到的未自激活的阳性克隆与重组的 pGBKT7-NP 质粒共转化酵母菌 AH109, 转化产物涂于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-Gal 平板, 不能生长的克隆作为假阳性排除, 而生长为蓝色单菌落的为阳性克隆。

### 1.6 基因序列的测定与分析

筛选得到的文库阳性克隆质粒进行序列测定后, 将所得基因序列在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLAST 分析。

## 2 结果

### 2.1 诱饵质粒 pGBKT7-NP 的构建

重组质粒 pGBKT7-NP 经酶切并测序鉴定。结果表明插入的 NP 基因序列及插入方向完全正确。酶切鉴定结果见图 1。

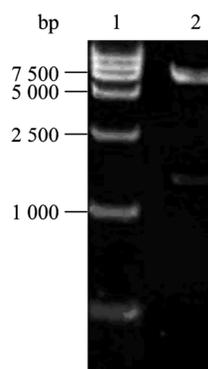


图1 pGBKT7-NP 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 1 Electrophoresis identification of pGBKT7-NP recombinant plasmids by restriction endonuclease digestion. 1: DNA marker; 2: pGBKT7-NP vector digested by *EcoRI* and *SalI*.

### 2.2 人脑 cDNA 文库筛选

#### 2.2.1 NP 蛋白对宿主无毒性且无自激活

将大小相近的转化有 pGBKT7 质粒的 AH109 菌落和 AH109 (pGBKT7-NP) 菌落分别在 3 mL YPDA 液体培养基过夜培养后,  $A_{600}$  分别为 1.20 和 1.24, 表明 NP 蛋白对酵母菌没有毒性, 不影响酵母菌正常生长。pGBKT7-NP 和 pGADT7 质粒共转化的 AH109 菌株在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-Leu 平板能够生长且菌落呈白色, 而在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板不能生长, 表明 NP 蛋白不存在自激活效应。

#### 2.2.2 酵母接合

培养 20 h 后, 在倒置显微镜下观察到了三叶草状二倍体细胞, 说明酵母接合培养成功。

#### 2.2.3 接合效率

SD/-Leu 平板 (1:10 000 稀释) 菌落数为 87 个,

SD/-Trp/-Leu 平板 (1 : 1 000 稀释) 菌落数为 28 个, 接合效率为  $(28 \times 10^4 / 87 \times 10^5) \times 100\% = 3.2\%$ , 符合文库筛选要求。

### 2.3 假阳性的排除

在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上共挑取 233 个克隆, 应用大肠杆菌 DH5 $\alpha$  扩增并经 LB/Amp 筛选获得文库质粒后, 将这些候选质粒和 pGBKT7 共转化 AH109 菌株以检测这些阳性克隆的自激活, 结果转化菌在 SD/-Trp/-Leu 平板上能够生长且菌落呈白色, 而在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上不能生长, 这表明候选蛋白不存在自激活效应。

将这些候选质粒与 pGBKT7-NP 共转化 AH109 酵母进行回复杂交, 总共筛选得到 7 种显色的阳性克隆 (图 2)。

### 2.4 基因序列的测定与分析

将筛选得到的阳性克隆测序后进行 BLAST 分析, 最终鉴定出 7 种与 NP 相互作用的蛋白 (表 1)。这 7 种蛋白分别为蛋白精氨酸 N-甲基转移酶 1

(Protein arginine methyltransferase 1), 网格蛋白 (Clathrin), 肽基脯氨酰顺反异构酶 Pin1 (Protein interaction with NIMA1), 锌指蛋白 668 (Zinc finger protein 668), HIF 缺氧诱发因子-1, 微管相关蛋白 MAP1A (Microtubule-associated protein 1A) 及微管相关蛋白 MAP1B (Microtubule-associated protein 1B)。其中蛋白精氨酸 N-甲基转移酶 1 相同克隆出现 5 次, 微管相关蛋白 MAP1B 相同克隆出现 3 次, 其余都只有 1 个克隆。

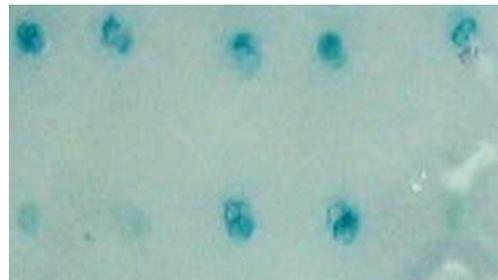


图 2 X-Gal 显色反应结果

Fig. 2 X-Gal filter assay analysis result.

表 1 BLAST 结果

Table 1 Result of BLAST

AD/library plasmid No.	GenBank Accession No.	Name of sequence	Homologous region	Identity (%)
1	NM_198318	Homo sapiens protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1)	21-964	99
2	NM_001076677	Homo sapiens clathrin	255-1 179	99
3	NM_006221	Homo sapiens peptidylprolyl cis/trans isomerase	1-928	98
4	NM_024706	Homo sapiens zinc finger protein 668 (ZNF668)	1 806-2 649	98
5	NM_080732	Hypoxia inducible factor-1	297-1 351	95
6	NM_002373	Homo sapiens microtubule-associated protein 1A	7 918-8 970	98
7	NM_005909	Homo sapiens microtubule-associated protein 1B	6 742-7 905	97

## 3 讨论

通过酵母双杂交筛选到的与已知蛋白相互作用的蛋白质, 往往其功能密切相关, 彼此相互调节, 共同参与某些生理或病理过程, 这可以加深对各种生物现象分子机理的理解, 以及对基因作用机制的了解。本研究以 pGBKT7-NP 质粒为诱饵质粒, 应用酵母双杂交的方法筛选人脑 cDNA 文库, 得到与禽流感病毒 NP 相互作用的 7 种蛋白质, 并在酵母细

胞中初步验证了它们的相互作用。

在这筛选到的几种蛋白质中, 蛋白精氨酸 N-甲基转移酶 1 广泛存在于生物体内, 主要定位于细胞核中, 调节许多重要的生理环节, 如参与转录后调节、RNA 加工、核运输、DNA 修复损伤和信号转导<sup>[9]</sup>。锌指蛋白 668 与转录相关, 可以选择性地结合特异的靶结构, 锌指蛋白在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。HIF 缺氧诱发因子-1 是一种转录因子, 对细胞的缺氧起

稳定作用。上述几种蛋白都是与转录翻译相关的蛋白质, 这提示了 NP 在病毒复制过程中可能有一定的作用。

肽基脯氨酰顺反异构酶 Pin1 在多种肿瘤中过表达, 是多个致癌信号通路的关键效应分子, 可加强和催化多种致癌信号, 使其无限放大, 最终引起细胞转化和增殖失控。Pin1 能特异性地催化磷酸化后的苏/丝氨酸-脯氨酸酰胺键的旋转, 从而改变磷酸化蛋白质的构象, 影响蛋白质的生理功能。如: 蛋白的催化活性、磷酸化状况、蛋白-蛋白互作、亚细胞定位和蛋白的稳定性等<sup>[10]</sup>。Pin1 是目前磷酸化后调节机制研究的一个热门蛋白质。而 A 型流感病毒的 NP 以两种形式存在, 磷酸化形式的 NP 可以移入核内, 另一种是一直留在细胞质内的非磷酸化形式。NP 的磷酸化和宿主细胞有直接的关系, 而 NP 磷酸化后的修饰有可能与 Pin1 相关。

网格蛋白 Clathrin 在胞膜上各种不同的运输和信号作用过程中都扮演一个必不可少的角色, 它在细胞内运输过程中所起的很多作用也开始浮现出来。网格蛋白是所有真核细胞 (从酵母到人) 胞内运输的运载工具, 具有辅助细胞质膜内吞和信号转导的重要功能<sup>[11]</sup>。有文献报道流感病毒进入细胞是通过网格蛋白介导的内吞作用<sup>[12]</sup>。

微管结合蛋白 (Microtubule-associated proteins, MAPs) 在细胞内与微管特异地结合, 是与微管的空间分布密切相关的纤维蛋白的总称<sup>[13]</sup>。MAP1A 和 MAP1B 属于 MAPs 家族, MAPs 对微管的功能起辅助作用。带负电的微管蛋白结合的位点含有几个 Lys-Lys-Glu-X 这样的重复氨基酸序列。这些位点能中和微管中微管蛋白间的电荷, 以维持聚合体的稳定。NP 可以与细胞多肽相互作用, MAP1A 和 MAP1B 与 NP 的相互作用进一步提示了这一作用。这些候选结合蛋白与靶蛋白结合的可靠性需要进一步通过哺乳细胞双杂交、免疫共沉淀等方法研究证实。

## REFERENCES

[1] Gan MH. Avian Influenza. Beijing: China Agricultural University Press, 1997.

甘孟侯. 禽流感. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.

- [2] Zhu JG, Lu P. Research advance on the Avian Influenza Virus Nucleoprotein. *Chin J Prev Vet Med*, 2003, **25**(1): 72-73.  
朱建国, 陆莘. 禽流感病毒核蛋白研究进展. 中国预防兽医学报, 2003, **25**(1): 72-73.
- [3] Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, 1998, **72**(7): 5493-5501.
- [4] Scholtissek C, Burger H, Kistner O, et al. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, 1985, **147**(2): 287-294.
- [5] Elton D, Medcalf L, Bishop K, et al. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol*, 1999, **73**(9): 7357-7367.
- [6] Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, 2002, **83**(4): 723-734.
- [7] Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(21): 9578-9582.
- [8] Zhou HB, Jin ML, Chen HC, et al. Genome-sequencing analysis of the pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated in China in 2004. *Virus Genes*, 2006, **32**(1): 85-95.
- [9] Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. Protein arginine methylation: cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1764**(12): 1890-1903.
- [10] Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinning down the proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol*, 2002, **12**(4): 164-172.
- [11] Deborde S, Perret E, Gravotta D, et al. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 2008, **452**(7188): 719-723.
- [12] Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X, et al. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect*, 2004, **6**(10): 929-936.
- [13] Teng JL, Affiliate, Yosuke Takei, et al. Role of Microtubule-associated proteins (MAPs) in the morphological development of brain and neuron signal transduction. Proceedings of 2005 China Neuropsychology Conference, 2005.  
滕俊琳, 原田彰宏, 武井阳介, 等. 微管相关蛋白 (MAPs) 在脑的形态发育和神经细胞信号转导方面的作用. 2005 年中国神经心理学学术会议论文集, 2005.