

# 鸡法氏囊 B 淋巴细胞中与鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 相互作用蛋白筛选

高玉龙<sup>1,2,3</sup>, 孙芬芬<sup>2</sup>, 侯磊<sup>2</sup>, 高宏雷<sup>2</sup>, 祁小乐<sup>2</sup>, 刘娣<sup>1</sup>, 华育平<sup>3</sup>, 王笑梅<sup>2</sup>

1 黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨 150086

2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

3 东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨 150040

**摘要:** 为了获得鸡法氏囊 B 淋巴细胞中与鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) VP2 相互作用的蛋白质, 利用酵母双杂交系统, 用 IBDV VP2 蛋白为诱饵蛋白, 筛选鸡法氏囊 B 淋巴细胞 cDNA 表达文库。将表达文库质粒转化含 IBDV VP2 诱饵质粒的酵母感受态细胞, 检测报告基因在相应的营养缺陷型培养基 (SD/-Leu/-Trp/-His) 上表达情况, 进一步经  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因检测, 筛选到 16 个阳性克隆。提取阳性克隆质粒, 经测序分析获得 5 个原鸡基因序列, 分别是: 线粒体 DNA、蛋白质 O 位 N-乙酰葡萄糖胺糖基化转移酶、肿瘤蛋白 p53 结合蛋白、微管解聚相关蛋白质和软骨蛋白硫酸 GalNAcT-2。Co-IP 试验进一步证实 VP2 蛋白能够与肿瘤蛋白 p53 结合蛋白、蛋白质 O 位 N-乙酰葡萄糖胺糖基化转移酶和软骨蛋白硫酸蛋白相互作用。为研究 IBDV 与宿主细胞相互作用以及细胞受体筛选奠定了基础。

**关键词:** 传染性法氏囊病病毒, B 淋巴细胞, cDNA 表达文库, 蛋白相互作用, 酵母双杂交

## Screening proteins interacting with infectious bursa disease virus Gt VP2 from cDNA library of B lymphoid cells of the bursa of fabricius

Yulong Gao<sup>1,2,3</sup>, Fenfen Sun<sup>2</sup>, Lei Hou<sup>2</sup>, Honglei Gao<sup>2</sup>, Xiaole Qi<sup>2</sup>, Di Liu<sup>1</sup>, Yuping Hua<sup>3</sup>, and Xiaomei Wang<sup>2</sup>

1 Postdoctoral Research Center, Heilongjiang Academy of Agriculture Science, Harbin 150086, China

2 State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

3 Postdoctoral Research Station, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Received:** June 17, 2010; **Accepted:** August 11, 2010

**Supported by:** National Basic Research Programs of China (973 Program) (No. 2005CB523202), Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2006BAD06A04).

**Corresponding author:** Xiaomei Wang. Tel: +86-451-85935004; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2005CB523202), “十一五” 国家科技支撑计划 (No. 2006BAD06A04) 资助。

**Abstract:** To screen the interactive proteins with IBDV Gt VP2 protein from cDNA library of B Lymphoid cells of the bursa of fabricius. The expression cDNA library plasmids was transformed to the yeast competent cells, which have the bait plasmid-Gt VP2. After testing for growth in synthetic complete medium lacking histidine and uracil and for production of  $\beta$ -galactosidase (X-gal), we obtained 16 positive clones. We searched the gene sequences of positive clones in the NCBI website. The blast results showed that five positive clones were the gallus sequences. They were Gallus gallus breed mitochondrial DNA, O\_GlcNAc transferase, Tumor protein p53 binding protein, Stathmin and Chondroitin sulfate GalNAcT-2, respectively. This study is helpful for the further identifying the receptors of IBDV in B Lymphoid cells of the bursa of fabricius.

**Keywords:** infectious bursa disease virus (IBDV), B Lymphoid cells, cDNA expression library, protein-protein interactions, yeast two-hybrid system

鸡传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种急性、高度接触性、病毒性传染病。IBDV 属于双 RNA 病毒科 (Birnaviridae) 禽双 RNA 病毒属 (Avibirnavirus)。法氏囊是 IBDV 感染宿主及其复制的组织基础, IBDV 的易感细胞为法氏囊 B 淋巴细胞, IBDV 感染鸡后, 首先在法氏囊 B 淋巴细胞中复制、增殖, 进而引起发病, 导致严重的免疫抑制<sup>[1]</sup>, 以致诱发多种疾病或引起多种疫苗免疫失败<sup>[2-4]</sup>。

VP2 蛋白是 IBDV 的主要宿主保护性抗原, 具有一个构象依赖性的中和抗原决定簇, 可诱导机体产生中和抗体, 是病毒的主要衣壳蛋白, 构成病毒的外表面, 决定病毒毒力和细胞嗜性<sup>[5-6]</sup>。研究发现, VP2 蛋白的 206~350 位氨基酸是影响病毒与细胞受体相互作用的位点<sup>[7]</sup>, 所以推测其与宿主细胞作用及病毒感染有密切关系<sup>[8]</sup>。对 IBDV 的晶体结构研究表明, 几个嗜性决定簇定位于 VP2 蛋白顶端, 暴露于最外侧, 推测这些氨基酸残基直接与细胞受体相互作用<sup>[9]</sup>。为了研究 IBDV 与宿主细胞的相互作用, 筛选法氏囊 B 淋巴细胞上与 VP2 蛋白相互作用的蛋白, 本研究利用酵母双杂交系统, 以 IBDV Gt VP2 蛋白为诱饵蛋白, 从鸡法氏囊 B 淋巴细胞 cDNA 表达文库中筛选与其相互作用的蛋白质分子, 为鉴定 IBDV 细胞受体、研究 IBDV 与宿主细胞相互作用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及主要试剂

酵母双杂交表达载体 pDEST<sup>TM</sup>32、Mav203 酵母菌株、鲑鱼精 DNA、酵母质粒小提试剂盒、BP Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix、LR Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix 均购自美国 Invitrogen 公司; 各种营养缺陷型培养基、X-gal、二甲基甲酰胺 (DMF)、3-Aminotriazole (氨基三唑) 购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存; pMD18-T、2 $\times$ HotStart *Taq* PCR MasterMix 购自 TaKaRa 公司。HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗、硝酸纤维素膜、Flag 单克隆抗体均购自 Sigma 公司。

### 1.2 酵母感受态制备及文库质粒转化

携带有 IBDV VP2 诱饵质粒 (pDEST<sup>TM</sup>32-GtVP2) 的酵母菌 Mav203 为本实验室构建保存<sup>[10]</sup>。接种该菌株于 250 mL 三角烧瓶中, 加 20 mL SD/-Leu 液体培养基, 30  $^{\circ}$ C 过夜培养。次日稀释至 300 mL SD/-Leu 液体培养基中 ( $OD_{600}=0.1$ ), 继续摇至  $OD_{600}=0.5$ 。室温下 2 500 r/min 离心 8 min, 弃上清; 30 mL 无菌水重悬沉淀, 室温下 2 500 r/min 离心 5 min, 弃上清。沉淀悬于 1.5 mL 1 $\times$ 乙酸锂 (LiAc)/0.5 $\times$ TE, 室温孵育 10 min。将上述感受态细胞悬液分装到 30 个 1.5 mL EP 管中, 每管 50  $\mu$ L。加 1  $\mu$ g 表达文库质粒<sup>[11]</sup>和 5  $\mu$ L 高质量灭活的鲑鱼精 DNA 于每个 EP 管中, 加 300  $\mu$ L 1 $\times$ LiAc/40% PEG-3350/1 $\times$ TE 到每管, 30  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。每管中加 40  $\mu$ L 二甲基亚砷 (DMSO), 42  $^{\circ}$ C 作用 10 min。

将 30 管转化菌液分别涂布于 30 个 15 cm SD/-Trp/-Leu/-His/30 mmol/L 3AT 平板, 30 °C 培养 4 d, 待酵母菌长到 3 mm 左右备用。

### 1.3 $\beta$ -半乳糖苷酶 (X-gal) 活性的检测

观测转化平板上阳性克隆的生长, 其间逐步将生长出的阳性克隆全部划线到 SD/-Trp/-Leu 筛选平板上, 同时每个平板分别设强阳性、弱阳性和阴性对照酵母菌, 制作 Master 平板, 30 °C 培养 24 h。然后将其转印到灭菌 NC 膜上, 将膜放入 YPAD 平板上, 30 °C 培养 18~24 h。称取 10 mg X-gal 溶于 100  $\mu$ L DMF, 加 60  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇和 10 mL Z buffer, 取 2 层直径为 125 mm 的滤纸浸入上述溶液, 将多余的液体吸出。将长出菌落的 NC 膜置于液氮中 10~30 s 后取出恢复至室温, 将其平铺在浸泡有 X-Gal 缓冲溶液的滤纸上, 放于 37 °C 温箱孵育过夜。将呈现蓝色的克隆在 SD/-Trp/-Leu 选择平板上连续划线培养 1 次后, 再次进行 X-gal 试验以进一步排除假阳性。

### 1.4 阳性克隆鉴定及基因信息分析

对 X-gal 试验为阳性的酵母菌, 从 Master 板上挑菌摇于 5 mL 的 SD/-Trp/-Leu 液体培养基中, 用酵母质粒小提试剂盒提取酵母质粒。取 5  $\mu$ L 质粒, 用相应载体引物进行 PCR 扩增, 扩增产物胶回收后连接到 pMD18-T 载体上, 挑取阳性克隆进行序列测定。利用 Blast 分析基因信息。

### 1.5 相互作用蛋白 Co-IP 验证

分别将酵母双杂交筛选到的候选基因克隆到 pCAGGS 的多克隆位点, 构建真核表达质粒, 其 C 末端引入 Flag 标签, 同时构建 IBVD VP2 基因的真核表达质粒。经酶切鉴定及测序正确的阳性克隆, 提取质粒后分别与 VP2 真核质粒共转染 Vero 细胞, 培养 48 h 后, 用 700  $\mu$ L 细胞裂解液裂解细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 7 min, 吸取上清置一新的 EP 管中, 加入 10  $\mu$ L Protein G 后, 加抗 VP2 单克隆抗体 7  $\mu$ L, 4 °C 低速旋转过夜, 次日 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 裂解液重悬, 离心后弃上清, 加入 15  $\mu$ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲

液, 运行 SDS-PAGE 后转印到 NC 膜, 用抗 Flag 单克隆抗体作为一抗, 二抗用 HRP 标记的抗鼠 IgG 二抗, 进行 Western blotting 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡法氏囊 B 淋巴细胞 cDNA 文库筛选

将 cDNA 表达文库质粒转化入 Mav203 酵母菌 (含有诱饵质粒 pDEST<sup>TM</sup>32-VP2), 在 SD/-Trp/-Leu/-His/30 mmol/L 3AT 筛库平板上有 200 多个阳性克隆, 将生长出的阳性克隆全部接种到 SC-Trp-Leu 营养缺陷型平板制作 Master 板, 生长 3~4 d 后, 进行 X-gal 显色反应, 初步筛到 16 个阳性克隆, 见图 1。

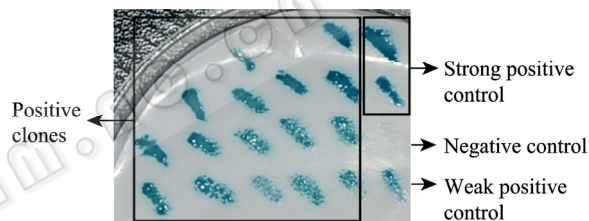


图 1 X-gal 蓝斑显色试验结果

Fig. 1 Results of LacZ reporter gene.

### 2.2 阳性克隆的 PCR 鉴定

将 X-gal 筛选的 16 个阳性克隆用酵母质粒小提试剂盒提取质粒, 并用 Prey 质粒重组位点两端引物进行 PCR 扩增, 以 0.8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 结果表明从 1、2、3、4、10 和 12 号质粒共扩增得到 6 个不同的基因片段 (图 2), 其他质粒为假阳性。

### 2.3 阳性克隆测序及基因信息分析

将 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体进行序列测定, 测序结果进行 Blast 同源性比对。结果发现, 筛选到的文库质粒 cDNA 插入片段均为已知原鸡序列, 与原鸡序列同源性均在 99% 以上。其中 4 号和 12 号质粒为同一个基因, 是原鸡线粒体 DNA。其他基因编码不同蛋白, 详细结果见表 1。对这 5 个蛋白进行了跨膜结构预测分析, 结果表明 5 个蛋白均没有跨膜区, 其中软骨蛋白硫酸 GalNAcT-2 存在一个信号肽区。

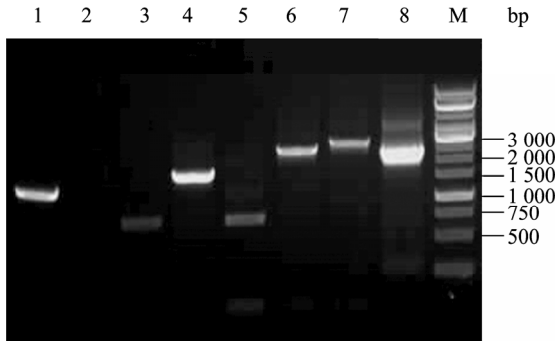


图2 酵母质粒 PCR 电泳图

Fig. 2 PCR products of yeast positive plasmids. 1: No. 10 plasmid; 2: negative control; 3: No. 12 plasmid; 4: No. 1 plasmid; 5: No. 4 plasmid; 6: No. 2 plasmid; 7: No. 3 plasmid; 8: pDEST22 control; M: 1 kb DNA marker.

表1 法氏囊 B 淋巴细胞中与 IBDV VP2 蛋白相互作用蛋白生物学信息

Table 1 Biology information of proteins of B lymphocyte of bursa interacting with IBDV VP2

Plasmids	GenBank Accession No.	Gene name	Homology* (%)
1	XM_413957.2	Tumor protein p53 binding protein	99
2	XM_001232518.1	O_GlcNAc transferase	99
3	XM_421516.2	Chondroitin sulfate GalNAcT-2	100
4	AP003321.1	Gallus gallus breed Mitochondrial DNA	99
10	X65458.1	Stathmin	99
12	AP003321.1	Gallus gallus breed mitochondrial DNA	99

\*Homology comparison with Gallus sequences.

#### 2.4 Co-IP 试验结果

免疫共沉淀试验可用于检测蛋白之间的相互作用, 为了进一步验证酵母双杂交筛选到的候选蛋白与 IBDV VP2 蛋白相互作用, 分别构建了带 Flag 标签的真核表达质粒, 分别与 VP2 共转染 Vero 细胞后进行 Co-IP 检测, 结果见图 3。肿瘤蛋白 p53 结合蛋白 (泳道 1)、蛋白质 O 位 N-乙酰葡萄糖胺糖基化转移酶 (泳道 2) 和软骨蛋白硫酸 GalNAcT-2 (泳道 4) 均出现了与预期大小一致的蛋白条带, 表明 VP2 蛋白可以分别与它们作用, 将其沉淀下来, 而 VP2 蛋白不能沉淀微管解聚相关蛋白 (泳道 5)。

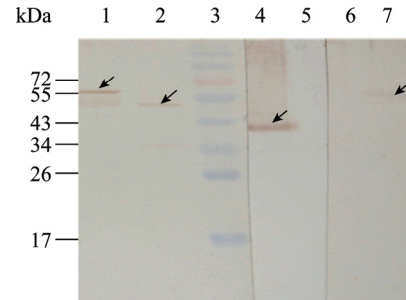


图3 免疫共沉淀检测结果

Fig. 3 Results of Co-IP assay. 1: tumor protein p53 binding protein+VP2; 2: O\_GlcNAc+VP2; 3: marker; 4: chondroitin sulfate GalNAcT-2+VP2; 5: stathmin+VP2; 6: vero cell only; 7: VP2 only.

### 3 讨论

病毒能否吸附到相应的细胞是该病毒能否完成感染的关键环节。病毒与细胞特异性结合的本质是病毒蛋白(配体)与细胞膜表面特定蛋白(受体)的特异性结合<sup>[12]</sup>。病毒粒子上与细胞受体结合的蛋白质(配体), 一般都是病毒表面蛋白。VP2 蛋白是 IBDV 的主要衣壳蛋白, 构成了 IBDV 的外表面。IBDV 的配体主要集中在 VP2 蛋白, 推测其与宿主细胞作用及病毒感染有密切关系<sup>[12]</sup>。所以本研究选取 IBDV VP2 蛋白为诱饵蛋白来筛选鸡法氏囊 B 淋巴细胞 cDNA 表达文库。希望从中筛选到与 IBDV 相互作用的蛋白, 为研究病毒与宿主细胞相互作用以及 IBDV 细胞受体筛选奠定基础。

本研究利用酵母双杂交系统从鸡法氏囊 B 淋巴细胞 cDNA 表达文库中筛选到 16 个阳性克隆, 经反复筛选及序列测定得到 5 个不同的候选基因, 均为原鸡序列。它们分别为线粒体 DNA (Gallus gallus breed mitochondrial DNA)、蛋白质 O 位 N-乙酰葡萄糖胺糖基化转移酶 (O\_GlcNAc transferase)、肿瘤蛋白 p53 结合蛋白 (Tumor protein p53 binding protein)、微管解聚相关蛋白质 (Stathmin) 和软骨蛋白硫酸 GalNAcT-2 (Chondroitin sulfate GalNAcT-2)。肿瘤蛋白 p53 是一种核蛋白, 其在调控细胞周期中起重要作用。该蛋白包含 DNA 结合寡聚化域和转录激活域, 肿瘤蛋白 p53 蛋白与结合位点结合后, 形

成四聚体结构, 激活下游基因的表达, 从而抑制细胞生长<sup>[13]</sup>。软骨蛋白硫酸 GalNAcT-2 广泛分布于高尔基体中, 其能与金属离子结合, 具有转移酶功能<sup>[14]</sup>。微管解聚相关蛋白 (Stathmin), 是脊椎动物细胞中普遍存在的胞质内可溶性磷蛋白, 能够高效调节细胞的增殖与分化<sup>[15-16]</sup>。蛋白质 O\_GlcNAc 糖基化转移酶促进蛋白质的 O-GlcNAc 糖基化, 在蛋白质-蛋白质相互作用的调节中发挥着重要的作用<sup>[17]</sup>。

为了进一步在体外验证这些蛋白与 IBDV VP2 蛋白的相互作用, 本试验又分别构建了真核表达质粒, 进行了 Co-IP 试验, 结果表明 VP2 蛋白能够将肿瘤蛋白 p53 结合蛋白、蛋白质 O 位 N-乙酰葡萄糖胺糖基化转移酶和软骨蛋白硫酸蛋白沉淀下来, 进一步证实了它们能够相互作用。而与微管解聚相关蛋白的 Co-IP 试验, 我们重复了 3 次, VP2 蛋白均不能将其沉淀下来, 推测这两个蛋白不能够相互作用, 酵母双杂交结果可能为假阳性。

跨膜结构预测分析表明这几个蛋白均没有跨膜区, 不是膜蛋白, 那么这些蛋白是怎样与 IBDV VP2 蛋白相互作用、在 IBDV 感染 B 淋巴细胞中充当什么角色还不清楚, 还有待于进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Müller H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Arch Virol*, 1986, 87(3/4): 191-203.
- [2] LuKert PD, Saif YM. *Infectious bursal disease//Disease of Poultry*. 10th. USA: Iowa state University Press, 1997: 914-937.
- [3] Nagarajan MM, Kibenge FS. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can J Vet Res*, 1997, 61(2): 81-88.
- [4] Montgomery RA, Dallman MJ. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic ontogeny. *Cytokine*, 1997, 9(10): 717-726.
- [5] Saugar I, Luque D, Oña A, et al. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic  $\alpha$  helix as a molecular switch. *Structure*, 2005, 13(7): 1007-1017.
- [6] Luque D, Saugar I, Rodríguez JF, et al. Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 2007, 81(13): 6869-6878.
- [7] van Loon AA, de Haas N, Zeyda I, et al. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Gen Virol*, 2002, 83(1): 121-129.
- [8] Brandt M, Yao K, Liu MH, et al. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 2001, 75(24): 11974-11982.
- [9] Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, et al. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 2005, 120(6): 761-772.
- [10] Li TQ, Gao YL, Gao HL, et al. Construction of "bait vector" for GxVP2 and GtVP2 of IBDV and detection of its self-activation in yeast two-hybrid system. *Chin J Prevent Vet Med*, 2008, 30(1): 1-4.
- [11] 李铁强, 高玉龙, 高宏雷, 等. IBDV 强、弱毒 VP2 诱饵载体构建及在酵母双杂交系统中自激活作用的检测. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(1): 1-4.
- [12] Gao YL, Liu W, Gao HL, et al. Construction of three-frame cDNA expression library of B Lymphoid cells in the bursa of Fabricius. *Chin J Prevent Vet Med*, 2008, 30(1): 10-13.
- [13] 高玉龙, 刘伟, 高宏雷, 等. 鸡法氏囊 B 淋巴细胞三框 cDNA 表达文库的构建. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(1): 10-13.
- [14] Haywood AM. Virus receptors: binding, adhesion strengthening, and changes in viral structure. *Virology*, 1994, 68(1): 1-5.
- [15] Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol*, 2006, 209(1): 13-20.
- [16] Uyama T, Kitagawa H, Tanaka J, et al. Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyl transferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate. *J Biol Chem*, 2003, 278(5): 3072-3078.
- [17] Rubin CL, Atweh GF. The role of Stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biol*, 2004, 93(2): 242-250.
- [18] Hasegawa A, Hisatomi O, Yamamoto S, et al. Stathmin expression during newt retina regeneration. *Exp Eye Res*, 2007, 85(4): 518-527.
- [19] Chikanishi T, Fujiki R, Hashiba W, et al. Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(4): 865-870.