

# 病毒细胞受体研究技术及其应用现状

杜翔宇<sup>1</sup>,胡桂学<sup>2</sup>,张甜甜<sup>1</sup>,董浩<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学生命科学院,长春 130118; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

[收稿日期] 2015-12-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 02-0063-04 [中图分类号] Q81

**[摘要]** 病毒感染宿主细胞的过程实质是病毒受体与配体之间的相互作用。病毒受体和配体的研究明确病毒致病机理的关键,因此关于病毒细胞受体的研究一直是近年来病毒学研究的重点领域。病毒受体的鉴定可通过多种生物技术手段进行,如酵母双杂交法、病毒覆盖蛋白结合技术等。文章对当前的病毒细胞受体研究技术及其应用现状进行了综述,以期今后的相关研究提供参考。

**[关键词]** 病毒;细胞受体;生物技术;应用

## Application Status of Research Techniques of Virus Receptors

DU Xiang-yu<sup>1</sup>, HU Gui-xue<sup>2</sup>, ZHANG Tian-tian<sup>1</sup>, DONG Hao<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** Virus infecting the cellular receptors is the essence of interaction between virus receptor and the ligand. Virus receptors and ligands researches have been regarded as the key points for clearing the virus pathogenic mechanism, so the researches of virus cell receptors have been become the important virology research field in recent years. The biological technologies could be used to identify virus receptors, such as yeast two hybrid methods, virus overlay protein binding assay, etc. The application status of the research techniques of virus cell receptors were summarized in this paper in order to provide reference for the future related research.

**Key words:** virus; cellular receptor; biological technologies; application

近些年来,关于病毒细胞受体的研究一直是病毒学研究的领域。病毒细胞受体是病毒进入靶细胞的入口,细胞受体可以特异性的与病毒发生结合,然后介导病毒入侵。研究病毒的细胞受体可以揭示病毒与宿主细胞之间相互作用的关系,而且是明确病毒的致病机理的关键,同时可以为研究病毒的增殖与免疫机制之间的关系和作用提供参考依据,也可

为开发靶向性强的抗病毒药物和疫苗提供帮助。

所谓病毒的细胞受体,是指能被病毒的吸附蛋白所识别并与之发生特异性结合,介导病毒侵入细胞,启动病毒感染的特殊性细胞表面位点。大多数病毒受体的本质是蛋白质,所以研究蛋白质相互作用的方法都可用于病毒细胞受体的研究。随着研究技术的发展与进步,关于病毒细胞受体的研究也

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20130522086JH);吉林省教育厅科学技术研究项目(2015209)

作者简介:杜翔宇,硕士研究生,从事分子病原微生物与分子免疫学研究。

通讯作者:董浩。E-mail:donghao\_jlau@163.com

取得了进展,在不同程度上部分病毒受体的结构和功能得到了研究。鉴定病毒受体可通过生物技术手段进行,如酵母双杂交法、病毒覆盖蛋白结合技术、噬菌体表面展示技术、亲和层析技术、串联亲和纯化技术以及 GST pull down 技术等。本文对病毒细胞受体的研究技术及其应用现状进行了综述,以期为今后的相关研究提供参考。

## 1 酵母双杂交法

酵母双杂交法是研究活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术方法,其主要原理是利用酵母菌的生长转录因子 GAL4 含有的两个结构域, DNA 结构域(BD)及转录激活域(AD),一个杂交蛋白为诱饵蛋白(X)与 DNA 结构域(BD)融合而成,另一个杂交蛋白为猎物蛋白(Y)与 DNA 转录激活域(AD)融合而成<sup>[1]</sup>。X 和 Y 分别为诱饵蛋白猎物蛋白,通过筛选基因组文库或 cDNA 文库可以直接找到与诱饵蛋白相互作用蛋白的 DNA 序列。

酵母双杂交法是在迅速生长且易操作的酵母体系内研究蛋白质之间的相互作用,现在许多研究已采用这种方法成功筛选了大量的互作蛋白。侯佩莉等通过酵母双杂交筛选与流感病毒 PB1 - F2 蛋白相互作用的宿主蛋白, PB1 - F2 各突变体均与宿主蛋白 G $\beta$ 2 发生相互作用,表明 G $\beta$ 2 和 PB1 - F2 存在多个结合位点,也提示了 G 蛋白信号通路可能在流感病毒感染过程中发挥作用<sup>[2]</sup>。王维新利用酵母双杂交系统筛选虾白斑综合症病毒(WSSV)的受体基因,共获得两个 cDNA 片段,为寻找 WSSV 的受体基因奠定了基础<sup>[3]</sup>。高淑娟将 JEV E 蛋白基因片段克隆到表达载体 pGSKT7 中,并转化入酵母菌 AH109,获得了以 JEV E 为诱饵蛋白的酵母双杂交系统,研究结果表明获得的流行性乙型脑炎 E 蛋白、E 蛋白的结构域 III 以及以 JEV 的 E 蛋白为诱饵蛋白的酵母双杂交系统可用于流行性乙型脑炎 E 蛋白的结构与功能以及与其受体蛋白相互作用的研究<sup>[4]</sup>。胡淳玲利用酵母双杂交方法研究麻疹病毒血凝素蛋白和 H 蛋白的相互作用,研究结果表明麻疹病毒血凝素蛋白分子上与 H 蛋白起关键作用的部位是 N 端 27 ~ 135 位氨基

酸<sup>[5]</sup>。李铁强利用酵母双杂交系统从基因文库中筛选与 IBDV 弱毒株 VP2 蛋白相互作用的受体蛋白编码基因,并通过间接免疫荧光实验证明了两个蛋白在活体内存在相互作用<sup>[6]</sup>。

Timmusk 等利用酵母双杂交系统筛选与 PCV2、ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 相互作用的细胞蛋白,研究发现与 ORF1 Rep 蛋白相互作用的是中间丝状蛋白和致癌基因<sup>[7]</sup>。Finsterbusch 等分别用 PCV1 和 PCV2、ORF1、ORF2 作为诱饵蛋白,以猪脾细胞为靶细胞,利用酵母双杂交系统筛选到与 ORF2 相互作用的锌指蛋白,核小体装配蛋白,前列腺细胞凋亡反应蛋白,核磷蛋白和热休克蛋白<sup>[8]</sup>。

## 2 病毒覆盖蛋白结合技术

病毒覆盖蛋白结合法的关键在于病毒与受体可以进行特异性的结合,紧密依靠 Western 印迹技术,达到对病毒受体高效鉴别的目的。获得病毒易感细胞表面的膜蛋白后,通过电泳技术对蛋白进行分离,使蛋白转移到硝酸纤维素膜上,然后用病毒液孵育,感作使其与受体相结合,能与病毒发生特异性结合的蛋白条带则可以通过化学方法显示。病毒覆盖蛋白结合法主要优点是灵敏度高,在实验室中得到了广泛的应用。

郭爱珍等应用病毒覆盖蛋白结合法筛选犬瘟热病毒(CDV)的细胞受体,结果找到了多个能与 CDV 相结合的细胞受体蛋白,一类是低分子量组蛋白,另一类是高分子量蛋白<sup>[9]</sup>。尹崇等利用病毒覆盖蛋白结合法方法筛选斜纹夜蛾核多角体病毒的细胞受体并进行鉴定检测,结果表明,在斜纹夜蛾肠敏感细胞总蛋白中找到了 40 kD、73 kD、85 kD 三种蛋白质可以作为受体与病毒相结合<sup>[10]</sup>。陆慧君以重组 HEV S1 蛋白代替全病毒进行病毒覆盖蛋白结合法,并成功获得一条与 HEV - S1 蛋白特异结合的分子量为 90 kD 的蛋白条带,推测此蛋白可能是 PK - 15 细胞表面的 HEV 受体,该受体的鉴定为进一步研究猪体原代细胞受体奠定了基础<sup>[11]</sup>。

## 3 噬菌体表面展示技术

噬菌体表面展示技术是目前国内外常用的一种基因表达筛选技术。以改造的噬菌体为载体,将外

源蛋白基因与噬菌体衣壳蛋白基因整合到一起,噬菌体自我复制增殖装配时,使外源基因随衣壳蛋白一起表达,使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面,经过筛选、感染、增殖过程后进行再筛选,然后将获得的重组噬菌体外源基因片段插入序列并进行测序,通过进一步分析得到受体蛋白序列。

Tang 等成功在 T7 噬菌体表面展示了乙肝病毒 PreS1 肽,进而研究 PreS1 肽基因进入肝癌细胞 HepG2 的可能性<sup>[12]</sup>。卢燕应用噬菌体表面展示技术从噬菌体随机七肽库中筛选转铁蛋白黏附肽,筛选获得的 4 个 TfB,有望于实现转铁蛋白与药物的非共价连接,靶向治疗疾病,同时也有利于以黏附 Tf 为策略的长效化蛋白质药物的深入研究<sup>[13]</sup>。在对虾白斑综合症的研究中袁丽采取噬菌体展示技术对病毒中和抗体及感染相关蛋白进行研究,筛选 T7 噬菌体展示的 WSSV cDNA 文库,得到能与对虾的细胞受体作用的 WSSV 定向靶蛋白,也就得到了该病毒感染相关基因<sup>[14]</sup>。何永刚应用噬菌体展示技术筛选 Pres 结合肽寻找乙型肝炎病毒特异性结合蛋白,构建了 M13 噬菌体 P III 蛋白融合的表面展示随机肽文库,并为研制抗乙型肝炎病毒感染的新药提供前导分子<sup>[15]</sup>。孙东波利用噬菌体展示技术初步确定 PEDV S 蛋白的第 249 ~ 529 位氨基酸区域 (MRR) 是猪氨基肽酶 (pAPN) 潜在的一个受体结合区域,这个研究结果将为 PEDV S 蛋白受体结合域进一步深入的研究提供信息<sup>[16]</sup>。

#### 4 亲和层析技术

亲和层析的理论基础是细胞膜的受体蛋白能够与病毒本身的特异性配体结合,可以达到对细胞受体鉴定的目的。将病毒或者诱饵蛋白偶联到 Sepharose 溶胶柱载体上,当蛋白溶液通过层析柱时,其中可与亲和载体配基相互作用的受体被吸附剂结合,而不被吸附的无关成分则流出柱体,而后利用高浓度的底物溶液或亲和力更强的底物衍生溶液洗脱,使目标蛋白脱离层析柱上的载体。据此, Tallet 等在获取人体 T 细胞白血病病毒 (HTLV-1) 膜蛋白时,选择了两步亲和层析与高浓度的盐和非离子型的表面活性剂<sup>[17]</sup>; Maurer 等获

得了牛病毒性腹泻病毒的细胞受体 CD46<sup>[18]</sup>。

#### 5 串联亲和纯化技术

串联亲和纯化技术是近年发展起来的一种新的纯化蛋白复合物的方法。利用一种特殊设计的蛋白标签,重组构建带有两种纯化亲和标签的融合靶蛋白,然后转染到宿主细胞或组织,带标签的靶蛋白表达并结合上相关蛋白质后,利用标签与相应磁珠作用,经过两步连续的亲和纯化,使得蛋白质复合物更接近天然状态。

宋方丽通过串联亲和纯化技术分离 MCF-7-pCTAP-DNAJC12-V1 细胞中的 DNAJC12-V1 蛋白复合体以及 MCF-7-pCTAp-DNAJC12-V2 细胞中 DNAJC12-V1 蛋白复合体,通过相互作用分析,得出 MYH9 与 MRCL2 间有直接的相互作用,因此 DNAJC12 可能通过调节 MYH9 蛋白的 ATP 酶活性来影响 MYH9 蛋白功能的发挥,研究均表明 DNAJC12 蛋白表达的改变在乳腺癌的发生发展过程中起重要作用<sup>[19]</sup>。Gloeckner 等使用 StrepII/FLAG 标签在 HEK293 鉴定了 Raf 和其相互作用蛋白 MEK1 和 14-3-3,并且建立了该纯化标签使用标准流程<sup>[20]</sup>。刘侠联合串联亲和纯化技术和质谱鉴定乳腺癌细胞中 LOX 相互作用蛋白,即利用 StrepII/FLAG 标签纯化富集 LOX 的复合体,经过纯化获得 LOX-SF 重组蛋白复合物,质谱共鉴定到 425 个与 LOX 相互作用蛋白,可信度为 95%<sup>[21]</sup>。江月等利用串联亲和纯化技术筛选与肠病毒 71 型 3D 聚合酶相互作用的宿主细胞蛋白,结果表明 Cyclin G1 仅在转染重组质粒 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 的 RD 细胞免疫共沉淀复合物中检测到,而在未转染 pcDNA3.0-3D-Flag-HA 的 RD 细胞中未检测到,3D 聚合酶蛋白可能引起宿主细胞凋亡及细胞周期改变,还可能与炎症反应及中枢神经损伤有关<sup>[22]</sup>。马培培采用串联亲和层析方法筛选出了三个与猪嗜血支原体 MSG1 蛋白相互作用的红细胞膜蛋白,切取蛋白条带经质谱分析鉴定这三种蛋白分别是猪乳铁蛋白、带三蛋白、肌动蛋白<sup>[23]</sup>。

#### 6 GST-pull down 技术

GST-pull down 是在 GST 融合蛋白的基础上发展起来的,利用基因重组技术构建含有 GST 标签的重

组载体进行原核表达,利用重组技术将诱饵蛋白与谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合,GST亲和纯化柱进行蛋白纯化获得高纯度的融合蛋白,再利用GST亲和纯化柱进行蛋白间的相互作用检测,可以从中捕获与之相互作用的目的蛋白,洗脱结合物后通过电泳分析,从而找到与靶蛋白相互作用的目的蛋白。

刘冬梅利用GST-pull down联合质谱鉴定BAG结构域相互作用蛋白,实验结果证明在Hela细胞中鉴定到370个潜在的能够与BAG结构域相互作用蛋白,主要为核糖体蛋白、翻译起始因子、翻译延长因子、泛素化-蛋白酶体相关蛋白及HSP40家族蛋白,其中BAG1和核受体相互作用,使核受体调控细胞增殖和存活的能力增强,成为促进乳腺癌、前列腺癌等发生的一个重要原因<sup>[24]</sup>。侯佩莉利用GST pull down试验从正反两方向验证了流感病毒PB1-F2与热休克蛋白Hsp40相互作用,初步证实了流感病毒PB1-F2在体外能与Hsp40发生相互作用,将有助于揭示A型流感病毒的致病机理,从而为流感病毒感染的预防和治疗提供参考<sup>[25]</sup>。

病毒与受体的相互作用是一个非常复杂的过程,并且病毒的受体可能不止一个,在今后的研究工作中如何将研究方法联合使用,为病毒受体的研究提供更加精确和完善的鉴定方法,将成为研究的重点。另外,当前的研究方法都存在一定的缺陷,开发和探索更简便、高效的方法将成为病毒受体的研究关键,同时对病毒细胞受体的相互作用机制研究也有待于进一步深入。

## 参考文献:

- [1] Hamdi A, Colas P. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2012, 33(2): 109-118.
- [2] 侯佩莉,关振宏,张茂林. GSTpull\_down验证流感病毒PB1-F2蛋白与热休克蛋白40的相互作用[J]. 生物技术通报, 2011, 1:202-207.
- [3] 王维新. 酵母双杂交系统用于对虾白斑综合症病毒WSSV受体基因的筛选[D]. 中国海洋大学,2004.
- [4] 高淑娟. 流行性乙型脑炎病毒E蛋白及其结构域Ⅲ的原核表达及酵母双杂交系统的初步构建[D]. 第四军医大学, 2007.
- [5] 胡淳玲. 麻疹病毒血凝素蛋白与受体的相互作用及麻疹病毒感染机制研究[D]. 武汉大学, 2004.
- [6] 李铁强. 用酵母双杂交系统筛选IBDV弱毒株VP2蛋白CEF受体的初步研究[D]. 东北农业大学, 2008.
- [7] Timmusk S, Fossum C, Berg M. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein[J]. J Gen Virol, 2006, 87(11): 3215-3323.
- [8] Finsterbusch T, Steinfeldt T, Doberstein K, et al. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins[J]. Virology, 2009b, 386(1): 122-131
- [9] 郭爱珍,陆承平. 犬瘟热病毒细胞膜受体的鉴定[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 156-157.
- [10] 尹崇,余健秀,庞义. 斜纹夜蛾多角体病毒包埋型病毒受体的鉴定[J]. 中国病毒学, 2002, 17(1): 66-68.
- [11] 陆慧君. 猪血凝性脑脊髓炎病毒的分离鉴定及其受体的筛选[D]. 吉林大学, 2008.
- [12] Tang K H, Yusoff K, Tan W S. Display of hepatitis B virus PreS1 peptide on bacteriophage T7 and its potential in gene delivery into Hep G2 cells[J]. Virol Meth, 2009, 159(2): 194-199.
- [13] 卢燕. 利用噬菌体表面展示技术筛选转铁蛋白特异性黏附肽的研究[D]. 大连工业大学, 2010.
- [14] 袁丽. 应用噬菌体展示技术对对虾白斑综合症病毒(WSSV)中和抗体及感染相关蛋白的研究[D]. 中国科学院, 2006.
- [15] 何永刚. 应用噬菌体展示技术筛选Pres结合肽寻找乙型肝炎病毒特异性结合蛋白[D]. 兰州大学, 2006.
- [16] 孙东波. 猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原表位鉴定及受体结合域的初步筛选[D]. 中国农业科学院, 2010.
- [17] Tallet B, Astier-Gin T, Londos-Gagliardi D, et al. Expression purification and biological properties of the carboxyl half part of the HTLV-I surface envelope glycoprotein[J]. Chroma togr B Biomed Sci Appl, 2000, 737(1/2): 85-95.
- [18] Maurer K, Krey T, Moennig V, et al. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus[J]. Virology, 2004, 78(4): 1792-1799.
- [19] 宋方丽. 串联亲和纯化技术联合质谱技术对对DNAJC12两种剪切体相互作用蛋白的鉴定[D]. 南方医科大学, 2010.
- [20] Gloeckner C J, K Boldt, A Schumacher, et al. Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag[J]. Methods Mol Biol, 2009, 564: 359-372.
- [21] 刘侠. 串联亲和纯化技术联合质谱鉴定乳腺癌细胞中LOX相互作用蛋白[D]. 广西医科大学, 2014.
- [22] 江月,丛浩龙,王健. 串联亲和纯化技术筛选肠病毒71型3D聚合酶的相互作用蛋白[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(6): 526-529.
- [23] 马培培. 猪嗜血支原体MSG1蛋白与猪红细胞膜蛋白相互作用的研究[D]. 南京农业大学, 2013.
- [24] 刘冬梅. GSTpull\_down联合质谱鉴定BAG结构域相互作用蛋白[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(4): 1-10.
- [25] 侯佩莉. 酵母双杂交筛选流感病毒PB1-F2蛋白相互作用的宿主蛋白[D]. 吉林农业大学, 2011.