

猪源 P[6] 型轮状病毒 GST-VP8* -Z84 蛋白的表达及受体结合特征

王萌璇¹ 王璐瑶² 李丹地¹ 张佳艳³ 胡继宏² 段招军¹

¹中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,北京 102206; ²甘肃中医药大学公共卫生学院,兰州 730000; ³广西科技大学鹿山学院食品与化学工程系,柳州 545000

通信作者:李丹地,Email:dandili@126.com,电话:010-58900899

【摘要】 **目的** 通过基因工程技术表达我国猪源 P[6] 基因型轮状病毒 (rotaviruses, RVs) GST-VP8* -Z84 蛋白,研究该蛋白与寡糖、唾液受体的结合特征。**方法** 以猪源 P[6] 型 RV Z84 为研究对象,利用 GST 大肠杆菌表达系统及亲和层析、凝胶过滤层析法纯化得到病毒 GST-VP8* -Z84 蛋白,通过 ELISA 唾液结合实验及寡糖结合实验分析该基因型与唾液及寡糖受体的结合特征。**结果** 猪源 P[6] GST-VP8* -Z84 蛋白与黏蛋白核心 2 具有很好的结合。**结论** P[6] RV 的潜在受体可能是黏蛋白核心,为轮状病毒与受体间的作用机制及研发 RV 疫苗和高效治疗药物提供实验基础与理论依据。

【关键词】 轮状病毒; GST-VP8* -Z84 蛋白; 组织血型抗原; 受体结合

基金项目: 国家自然科学基金 (81601813, 81472003, 31500139)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 02. 022

Expression and receptor binding characteristics of porcine P[6] genotype rotavirus GST-VP8* -Z84 protein

Wang Mengxuan¹, Wang Luyao², Li Dandi¹, Zhang Jiayan³, Hu Jihong², Duan Zhaojun¹

¹National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China; ²School of Public Health, University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; ³Department of Food and Chemical Engineering, Lushan College of Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545000, China

Corresponding author: Li Dandi, Email: dandili@126.com, Tel: 0086-10-58900899

【Abstract】 **Objective** The gene engineering technique was used to express the P[6] genotype rotavirus (rotaviruses, RVs) GST-VP8* -Z84 protein from pigs, and the binding characteristics of the protein to oligosaccharide and salivary receptor were studied. **Methods** The GST-VP8* -Z84 protein was purified by GST Escherichia coli expression system and affinity chromatography using porcine P[6]. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) saliva binding test and oligosaccharide binding test were used to analyze the binding characteristics of the genotype to receptors. **Results** Porcine P[6] GST-VP8* -Z84 protein bound well to mucin core 2. **Conclusions** The potential receptor of P[6] RV may be the core of mucin, which may provide the experimental basis and theoretical basis for the mechanism of rotavirus and receptor interaction and the development of RV vaccine and highly effective therapeutic drugs.

【Key words】 Rotavirus, GST-VP8* -Z84 protein, Histo-blood group antigens, Receptor binding

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81601813, 81472003, 31500139)

DOI: 10. 3760/cma.j.issn.1003-9279. 2019. 02. 022

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠弧病毒科中的一个属,可引起人类与动物的病毒性腹泻,是导致人胃肠炎的主要常见原因之一。该病毒由 3 层蛋白衣壳包被核心基因组构成,而核心基因组由不连续的 11 个双链 RNA 片段构成,分别编码 6 种结构蛋白 (VP1 ~ VP4, VP6 和 VP7) 和 6 种非结构蛋白

(NSP1 ~ NSP6)。RV 最外层的刺突蛋白 VP4 被认为在 RV 与受体结合进入细胞的过程中起关键作用。基于 VP4 的序列差异,至少发现和定义了 50 个 P 基因型^[1-4],人类最常见的基因型为 P[4]、P[6]、P[8]^[5]。P 基因型可进一步分为 5 个基因亚群 (P[I]-P[V])^[6],其中主要感染人类的为 P[II]

组,感染动物的为 P[Ⅰ]和 P[Ⅴ]组,人与动物均可感染的为 P[Ⅲ]和 P[Ⅳ]组。VP4 可通过胰蛋白酶被裂解为 VP5* 和 VP8* 两种亚单位蛋白^[7-8],分别对应于刺突蛋白的“刺”和刺突末端的“突”。由于 VP8* 位于蛋白最外端,其受体结合蛋白的多样性及不同基因型与宿主之间的复杂关系,决定了 RV 与宿主细胞表面多糖受体类型的复杂性。

宿主细胞表面的特异性受体被病毒识别并结合是感染细胞的关键一步。RV 通过黏附宿主细胞获得自我复制能力而形成新病毒颗粒使相邻细胞被感染^[9]。目前发现 P[Ⅲ]亚群中的 3 个基因型 P[9]、P[14]、P[25]能特异性识别 A 型 HBGAS, P[Ⅳ]亚群中的 P[11]基因型能够特异性识别 2 型 HBGA 前体 H2,以及双糖前体的多聚糖链^[10]。P[Ⅱ]基因群中 P[6]及 P[19]型 RV 在猪感染中较为常见,而人群感染较少,有研究表明 P[19]型 RV 在猪与人群中存在共同受体^[11]。为探讨 P[6]型 RV 是否具有跨种传播的潜在可能,对其进行受体结合特征的研究,通过基因工程技术表达纯化得到 GST-VP8*-Z84 融合蛋白,利用寡糖及唾液结合功能实验分析其与受体的结合特征,为 RV 与受体间的作用机制及研发 RV 疫苗和高效治疗药物提供实验基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 感受态 *E.coli* DH5 α 和 BL21(DE3)(北京天根生物公司),pGEM-T Easy(北京 Promega 公司),质粒 pGEX-4T-1 由本病毒性腹泻室保存;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I, T4 连接酶、cutsmart、DNA Marker (TaKaRa 公司);Ampicillin 氨苄青霉素(美国 Sigma 公司);谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B (Glutathione Sepharose 4B)和 superdex200^{10/300GL}柱子(GE Healthcare 公司);四甲基乙二胺 TEMED(美国 Thermo 公司);异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG)(上海 Sangon 生物公司);ZB-2305 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(北京中山金桥公司)。

1.2 原核表达质粒 pGEX4T-1-P[6] GST-VP8*-Z84 的构建 由擎科新业生物公司根据 VP8* 蛋白基因全长序列合成引物,以实验室保存的质粒为 PCR 扩增反应的模板,得到其编码区基因的序列。上游引物(F): 5'-GGAATTCATATGTTCTGGATGGTC-3',引入限制性内切酶 *Bam*H I 酶切位点;下游引物(R): 5'-CCGCTCGAGCCGGTGTAAATG

TATTC-3',引入限制性内切酶 *Xho* I 酶切位点。*Bam*H I、*Xho* I 限制性核酸内切酶双酶切 pGEX4T-1 载体与 P[6] GST-VP8*-Z84 片段,鉴定是否存在目的片段并回收纯化,16 $^{\circ}$ C 连接过夜后转化至 DH5 α 感受态细胞,于氨苄抗性的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日挑取单克隆菌于同抗性液体 LB 培养基中培养 3 h 送公司测序,序列正确的返回质粒保留备用,命名为 pGEX4T-1-P[6] GST-VP8*-Z84。

1.3 蛋白预表达 重组质粒转至 BL21(DE3)感受态,挑取单克隆菌于同抗性 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、180 \times g 摇至 OD_{600} 约 0.6 后留样,22 $^{\circ}$ C IPTG(终浓度为 0.4 mmol/L)、150 \times g 诱导培养过夜,次日留样并 6 000 \times g 离心 10 min 收菌,10 ml PBS 重悬,80%功率冰浴超声,上清及菌体分别留样,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定并分析蛋白表达情况。

1.4 蛋白大量表达和纯化 取预表达成功的菌液于少量 LB 中活化,次日接种于 1.5 L 的 LB 培养基中扩大培养,接种比例为 LB:菌液:氨苄青霉素=1:100:1 000。37 $^{\circ}$ C、180 \times g 摇至 OD_{600} 约 0.6,22 $^{\circ}$ C、150 \times g、IPTG(终浓度为 0.4 mmol/L)诱导培养过夜,次日收菌,PBS 重悬后 80%功率冰浴超声,将细胞裂解液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 1 h,上清液中即含有可溶性表达的 GST-VP8*-Z84 蛋白。向收集的上清液中加入 2~3 ml 谷胱甘肽琼脂糖磁珠(Glutathione sepharose 4B),置于摇床上室温结合 60 min 转至琼脂糖凝胶 4B 柱,将非特异性结合蛋白用 50 ml PBS 清洗 beads 5 次,并收集洗液;再用 15 ml Elution Buffer 洗脱液(还原型谷胱甘肽 0.3 g、5 ml pH 8.0 Tris HCl 溶于 100 ml 蒸馏水)洗脱目的蛋白 4 次,收集洗脱液。SDS-PAGE 鉴定,将浓缩条带明显含目的蛋白的洗脱液至浓度约 8 mg/ml,先水洗 superdex200^{10/300GL}柱,再用含 20 mmol/L Tris-HCl 和 50 mmol/L NaCl 的缓冲液过一个柱体积后上样 2 ml 进行分子筛层析纯化,根据 UV280 nm 处的吸收值收集目的蛋白,处理样品并鉴定分析。

1.5 寡糖结合实验 将纯化后的 P[6] GST-VP8*-Z84 融合蛋白稀释包被至 96 孔酶标板中 4 $^{\circ}$ C 过夜,蛋白浓度为 0.2 mg/ml。PBST 洗液洗板 5 次(每步操作前均需洗板 5 次),以 200 μ l/孔的 5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。2%脱脂奶粉 500:1 稀释生物素标记的寡糖,100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜。链霉素(streptavidin)1:1 000 用 2%脱脂奶粉稀释,100 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。TMB 显色液显色,1 mol/L 磷酸

终止,于 450 nm 处检测吸收值。

1.6 唾液结合实验 将 A、B、AB、O 分泌型(O⁺)、O 非分泌型(O⁻)唾液 1:1 000 用 PBS 稀释包被至 96 孔酶标板 4 °C 过夜,100 μl/孔。PBST 洗液洗板 5 次(每步操作前均需洗板 5 次),5%脱脂奶粉 200 μl/孔,37 °C 孵育 1 h。2%脱脂奶粉 500:1 稀释原浓度为 0.2 mg/ml 的 GST-VP8* -Z84 融合蛋白,100 μl/孔,4 °C 过夜。鼠抗 GST 血清以 1:3 000 用 2%脱脂奶粉稀释,100 μl/孔,37 °C 孵育 1 h。辣根酶标记的羊抗鼠以 1:10 000 稀释,100 μl/孔,37 °C 孵育 1 h。TMB 显色液显色,1 mol/L 磷酸终止,于 450 nm 处检测吸收值。

2 结果

2.1 重组质粒 pGEX4T-1-P[6] GST-VP8* -Z84 的构建 由擎科新业生物公司合成的 P[6]型 RV VP8* 引物经 PCR 扩增得到 VP8* 片段,大小为 697 bp。经 BamH I、Xho I 双酶切纯化回收的目的片段与质粒 pGEX4T-1, T4 DNA 酶连接过夜,产物转化至 DH5α,挑取单克隆菌送测序,序列正确则构建成功,对其抽提质粒保留备用。

2.2 蛋白表达与纯化 将重组质粒转化至 BL21 (DE3)感受态细胞,IPTG 诱导表达,经 GST 标签亲和层析纯化得到可溶性的 GST-VP8* 融合蛋白,相对分子质量约为 53×10³,GST 标签约为 26×10³。将目的蛋白浓缩换液测定浓度后上样分子筛层析纯化,SDS-PAGE 分析鉴定其为 GST-VP8* -Z84 融合蛋白,纯度显著提高。

2.3 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白与寡糖结合

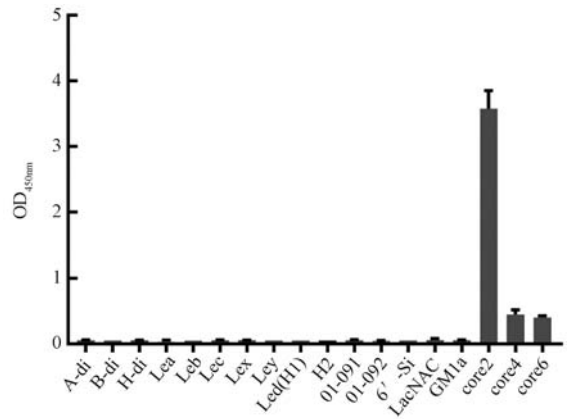
以 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白作为包被物,检测其与多种寡糖中受体的结合特征,结果表明,该蛋白与 mucin core 2、mucin core 4、mucin core 6 都有结合,而 mucin core 2 与其结合良好,但与 A、B、Lewis 型等其他寡糖均无明显结合(图 1)。

2.4 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白与唾液结合

以不同型别的唾液作为包被物,检测其与 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白的结合特征,结果表明,P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白与 A、B、O 和 O⁻(非分泌型)型唾液均有结合(图 2)。

3 讨论

RV 的 P[II]基因亚群包括 P[4]、P[6]、P[8] 和 P[19]型^[6],P[19]型 RV 可感染动物猪与人,但

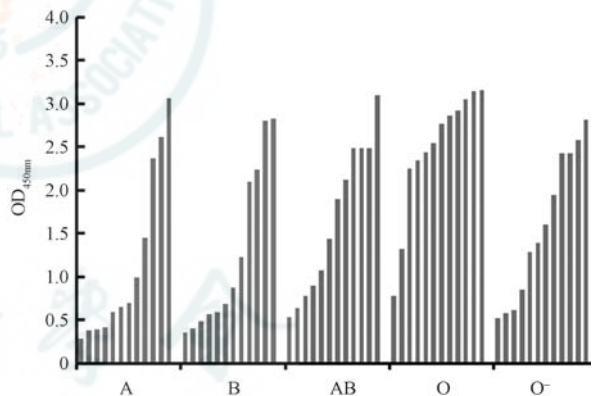


注:结果为 3 次平行实验的均值;A-di、B-di、H-di、Lea、Leb、Lec、Lex、Ley、Led(H1)、H2、01-091、01-092、LacNAC 为 HBGA;6'-Si 为唾液酸;GM1a 为神经节苷脂;core 2、4、6 为黏蛋白核心

图 1 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白与各寡糖的结合

Note: The result is the mean value of three parallel experiments; A-di, B-di, H-di, Lea, Leb, Lec, Lex, Ley, Led(H1), H2, 01-091, 01-092, LacNAC are different kinds of HBGA; 6'-Si is sialic acid; GM1a is ganglioside; core 2, 4, 6 are mucin cores

Fig.1 Binding of P[6] GST-VP8* -Z84 fusion protein to various oligosaccharides



注:O⁻指非分泌型个体,每一型别包括 12 个唾液样本

图 2 P[6] GST-VP8* -Z84 融合蛋白与 A、B、AB、O 型唾液样本的结合

Note: O⁻ represents non-secretory type; Every type includes 12 saliva samples

Fig.2 Binding of P[6] GST-VP8* -Z84 fusion protein to the A, B, AB and O saliva samples

以感染猪为主,而 P[4]、P[6]、P[8] 型主要流行在人群中,有研究表明人类 RV 感染的 99% 以上为该 3 种 P 基因型^[12]。基因多样性形成的重要原因之一则是基因重组,近年来多个国家发现人-猪重配的 G5、G9、G11、G12 等基因型 RV 感染已遍及全球^[13-17],因此加强重组毒株的研究对于流行病学的

监测以及明确 RV 感染机制的研究具有重要意义。

以我国猪源 P[6] 型 RV 为研究对象, 通过其寡糖受体的结合特征分析得到该基因型 RV 与粘蛋白核心中的 mucin core 2 有非常好的结合, 与 mucin core 4、mucin core 6 结合较弱。本课题组之前报导人 P[6] 型 RV 与 mucin core 2 也有很好的结合^[18], 这说明 mucin core 2 可能是 P[6] 型 RV 跨种传播的一种重要介质, 广泛存在于人与动物的各种细胞组织中, 且 mucin core 2 为猪 P[6] 与人 P[6] 的共同结合体, 因此推测猪 P[6] 型 RV 亦存在感染人的可能性, 并通过唾液结合实验对其进行验证, 得到猪 P[6] GST-VP8*-Z84 与人的 A 型、B 型、O 分泌型、O 非分泌型唾液均有一定结合, 因此应同时监测人间及猪群中 P[6] 型 RV 的流行情况。综上, 本研究通过寡糖及唾液结合功能实验分析其与受体的结合特征, 为轮状病毒与受体间的作用机制及研发 RV 疫苗和高效治疗药物提供实验基础与理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王萌璇: 实验设计、实验实施、论文撰写; 王璐瑶: 实验实施、数据处理; 李丹地、张佳艳: 实验设计、实验评估、论文审校; 胡继宏、段招军: 提供实验指导、监督及建议

参考文献

- [1] Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function [J]. *Microbiol Rev*, 1989, 53(4): 410-449.
- [2] Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald S M, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(8): 1397-1413. DOI: 10.1007/s00705-011-1006-z.
- [3] Trojnar E, Sachsenröder J, Twardziok S, et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses [J]. *J Gen Virol*, 2013, 94 (Pt1): 136-142. DOI: 10.1099/vir.0.0473-81-0.
- [4] Rojas MA, Gonçalves JLS, Dias HG, et al. Identification of two novel Rotavirus A genotypes, G35 and P[50], from Peruvian alpaca faeces [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 55: 71-74. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.08.019.
- [5] Matthijssens J, Bilcke J, Ciarlet M, et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1303-1316. DOI: 10.2217/fmb.09.96.
- [6] Liu Y, Huang P, Tan M, et al. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens [J]. *J Virol*, 2012, 86 (18): 9899-9910. DOI: 10.1128/JVI.00979-12.
- [7] Lopez S, Arias C F. Early steps in rotavirus cell entry [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 309(1): 39-66.
- [8] Denisova E, Dowling W, LaMonica R, et al. Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes [J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 3147-3153.
- [9] 郑继航, 杨学磊. 轮状病毒感染及其致病机制 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2015, 42(3): 194-197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2015.03.013.
- [10] 孙晓曼, 郭妮君, 徐子乾, 等. P[14] 型轮状病毒 VP8* 蛋白特异结合 A 型组织血型抗原 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2016, 30(3): 315-318. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2016.03.015.
- [11] 王莉鸿, 孙晓曼, 李丹地, 等. 猪源 P[19] 轮状病毒 VP8* 蛋白的表达及受体结合特征 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(1): 89-92. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.01.019.
- [12] Komoto S, Wandera Apondi E, Shah M, et al. Whole genomic analysis of human G12P[6] and G12P[8] rotavirus strains that have emerged in Kenya: identification of porcine-like NSP4 genes [J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 27: 277-293. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.08.002.
- [13] 李丹地, 段招军, 章青, 等. G5 型人 A 组轮状病毒 LL36755 株的 VP4、VP6 和 NSP4 编码基因的分子特征 [J]. *病毒学报*, 2007, 23(3): 195-201. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.001810.
- [14] Mukherjee A, Dutta D, Ghosh S, et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(5): 733-746. DOI: 10.1007/s00705-009-0363-3.
- [15] Than VT, Park JH, Chung IS, et al. Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(11): 2385-2393. DOI: 10.1007/s00705-013-1720-9.
- [16] Ghosh S, Kobayashi N, Nagashima S, et al. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172 [J]. *Virus Genes*, 2010, 40(3): 382-388. DOI: 10.1007/s11262-010-0454-y.
- [17] Than VT, Kang H, Lim I, et al. Molecular characterization of serotype G9 rotaviruses circulating in South Korea between 2005 and 2010 [J]. *J Med Virol*, 2012, 85(1): 171-178. DOI: 10.1002/jmv.23436.
- [18] Sun X, Li D, Qi J, et al. Glycan Binding Specificity and Mechanism of Human and Porcine P[6]/P[19] Rotavirus VP8*s [J]. *J Virol*, 2018, 92(14): e00538-18. DOI: 10.1128/JVI.00538-18

(收稿日期: 2018-10-25)

(本文编辑: 唐浏英)