

# 利用荧光标记的 T7 噬菌体研究配体/ 受体的相互作用

李 姣<sup>1,2</sup> 王爱萍<sup>1\*</sup> 张 红<sup>2,3</sup> 张改平<sup>2</sup> 王选年<sup>2</sup> 易明林<sup>2</sup> 鲁 琨<sup>2</sup> 王秋霞<sup>2</sup> 冯丽丽<sup>2</sup>

(1. 郑州大学 郑州 450001)

(2. 河南省动物免疫学重点实验室 郑州 450002)

(3. 河南教育学院 郑州 450003)

**摘 要:** 将鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)衣壳蛋白 VP2 展示到 T7 噬菌体表面, 以 FITC 标记纯化的重组噬菌体, 通过荧光显微镜观察与流式细胞仪检测, 研究标记噬菌体与病毒受体细胞——法氏囊 B 细胞的相互作用。结果展示有 IBDV VP2 蛋白的噬菌体经 FITC 标记后仍然具有与受体细胞结合的特性, 荧光显微镜下可见绿色荧光, 流式数据显示其平均荧光强度明显高于阴性对照, 且 IBDV 疫苗株 TAD 可明显阻断其结合。由此得出结论, FITC 标记与噬菌体展示技术相结合, 可进行配体/受体间相互作用的研究。

**关键词:** 噬菌体展示, FITC 标记, 传染性法氏囊病病毒(IBDV), VP2 蛋白

## Use of Fluoresceinated Recombinant Phage to Study the Receptor/Ligand Interaction

LI Jiao<sup>1,2</sup> WANG Ai-Ping<sup>1\*</sup> ZHANG Hong<sup>2,3</sup> ZHANG Gai-Ping<sup>2</sup> WANG Xuan-Nian<sup>2</sup>  
YI Ming-Lin<sup>2</sup> LU Kun<sup>2</sup> WANG Qiu-Xia<sup>2</sup> FENG Li-Li<sup>2</sup>

(1. Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

(2. Henan Key Laboratory for Animal Immunology, Zhengzhou 450002)

(3. Henan Educational Institute, Zhengzhou 450003)

**Abstract:** VP2 protein of infectious bursal disease virus(IBDV) was displayed on T7 phage surface, and this recombinant phage was then purified and labeled with FITC. The interaction between fluorescegenic phage and IBDV host cells was detected by fluorescent microscope and flow cytometer(FCM). Data shows that after displayed on labeled T7 phage surface, VP2 protein still remains its binding activities with IBDV host cells, and this interaction can be blocked by IBDV vaccine strain TAD in a dose dependent manner, while no interaction was observed in negative control. The described method should find widespread application in the rapid *in vivo* research of interactions between ligands and receptors.

**Keywords:** Phage display, FITC labeling, Infectious bursa disease virus, VP2 protein

噬菌体展示技术是研究蛋白质相互作用的简单方便有效的技术之一。目的蛋白或多肽通过与噬菌体衣壳蛋白融合表达而展示在噬菌体颗粒表面,因而可以用重组噬菌体来进行蛋白质相互作用的研究及高通量筛目的蛋白。目前常用的噬菌体展示系统主要有大肠杆菌的丝状噬菌体、噬菌体、T7 以及 M13 噬菌体。其中 T7 噬菌体展示系统由于复制周期短、高效克隆、操作方便而得以更为广泛的应用。

鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)是使鸡法氏囊幼龄B细胞大量凋亡而引起法氏囊坏死的一种高致病性病毒,其衣壳蛋白VP2 上存在有病毒中和性抗原表位<sup>[1]</sup>,并认为与细胞受体结合<sup>[2]</sup>、病毒毒力<sup>[3]</sup>以及细胞凋亡<sup>[4]</sup>相关,因此,VP2 与易感细胞及与相关蛋白相互作用的研究对于揭示IBDV的致病机制和免疫机制、疫苗研制都具有重要价值,成为该领域研究的热点。本实验将VP2 蛋白展示在T7 噬菌体表面,再用FITC标记噬菌体,利用其绿色荧光直接观察检测噬菌体展示的配体与细胞受体的相互作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

限制性内切酶、DNA 标准分子量、Ex taq DNA polymerase、pMD19-T 载体均购自大连宝生物工程有限公司; T7Select System 购于 Novagen 公司; FITC 购自 Sigma 公司; FACSCalibur, 美国 BD 公司; 倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司。

### 1.2 IBDV VP2 基因扩增

IBDV NB 毒株基因组 A 片段由本实验室反转录合成并保存于 pCI-neo-IBDV 质粒中。根据其核苷酸序列(AY319768), 设计 IBDV VP2 蛋白基因(1368 bp)扩增引物:

P1: 5'-CGAGAATTCGATGACAAACCTGCAA-3'

P2: 5'-TATAAGCTTCGTGACGGGACGGAGG-3'

分别引入EcoR、Hind 酶切位点。引物由上海生工合成。PCR反应程序为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 58 1 min, 72 1.5 min, 32 个循环; 72 延伸 10 min。产物回收后与pMD19-T载体连接。VP2 基因序列测序由TaKaRa 大连公司完成。

### 1.3 IBDV VP2 基因的 T7 噬菌体包装

IBDV VP2 基因用 EcoR、Hind 双酶切后与 T7Select10-3b 载体臂 16℃过夜连接。噬菌体包装与

滴度测定按说明书进行。同时准备 T7 噬菌体完整基因组(T7Select System 试剂盒提供)包装作为阴性对照。

### 1.4 重组噬菌体的鉴定

随机挑取多个噬菌斑在 100 μL TE 中 65 加热 10 min, 8000 r/min 离心 10 min 后取上清做 PCR 模板, 用 T7 UP/DOWN primer 扩增, 琼脂糖凝胶电泳鉴定噬菌体重组率。PCR 产物与 pMD19-T 载体连接并测序以确定插入片段序列正确。重组噬菌体命名为 T7-VP2。

### 1.5 重组噬菌体的扩大培养及纯化

将 T7-VP2 及阴性噬菌体接种于对数生长期并用 IPTG 诱导 30 min 的 BLT5615 中扩大培养 2 h~3 h, 参考《分子克隆》λ 噬菌体纯化方法, 用 PEG8000 沉淀纯化重组噬菌体颗粒。取纯化的噬菌体 20 μL, 加入等体积 2×SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 煮沸 5 min, SDS-PAGE 检测噬菌体纯度, 以浓缩的噬菌体裂解物作对照。同时计算纯化前后噬菌体滴度。

### 1.6 重组噬菌体的 FITC 标记

以 0.1 mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 透析纯化后的噬菌体, 测其 OD<sub>280</sub>, 用 0.1 mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 将噬菌体浓度调至 1 mg/mL。每毫克噬菌体蛋白滴加 50 μL 1 mg/mL FITC-DMSO 溶液, 室温下闭光反应 2 h, pH 7.4 的 PBS 透析反应物 2 d, 以除去游离的 FITC 分子。测量反应物的 OD<sub>280</sub> 与 OD<sub>495</sub> 的吸光值, 以以下公式计算标记物的 F/P 值。该值在 2~4 之间即可用于活细胞染色。

$$F/P = \frac{2.87 \times A_{495}}{A_{280} - 0.35 \times A_{495}}$$

### 1.7 标记噬菌体与鸡法氏囊 B 细胞的相互作用检测

取 3 周龄雏鸡法氏囊进行涂片, 其余法氏囊 B 细胞制成悬液(1×10<sup>6</sup> 细胞/mL)。细胞涂片自然风干后滴加 50 μL 标记的噬菌体溶液(1×10<sup>10</sup> PFU, 即 50 μg), B 细胞悬液每毫升中加入 50 μL 标记的噬菌体溶液, 4 作用 1 h, PBS 洗 2 次, 涂片细胞于荧光显微镜下观察, 悬浮细胞用流式细胞仪检测。阴性噬菌体对照用量同上。

IBDV 疫苗株 TAD 由本实验室保存。每毫升 B 细胞悬液中分别加入终浓度为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 和 80 μg/mL 的病毒, 4 作用 1 h, PBS 洗 2 次后再与 T7-VP2 作用, 流式细胞仪检测各细胞处

理的荧光强度。

## 2 结果

### 2.1 VP2 基因 PCR 产物检测

VP2 基因经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测观察到 1400 bp 左右的条带, 与预期的大小一致(图 1)。测序结果与收录的 IBDV NB 株 A 片段(AY319768)中 VP2 的基因序列一致。

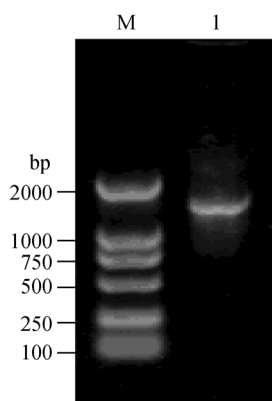


图 1 PCR 扩增 VP2 基因

Fig. 1 VP2 gene by PCR amplification

M: DNA marker DL2000; 1: VP2 基因

M: DNA marker DL2000; 1: VP2 gene

### 2.2 噬菌体包装及重组噬菌体鉴定

噬菌体包装物做系列倍比稀释后与 BLT5615 宿主菌及上层琼脂糖混合铺板, 3 h 后形成噬菌斑, 噬菌斑数量与稀释度成反比, 噬菌体初始滴度为  $2 \times 10^{15}$ 。随机挑取的噬菌斑经 PCR 鉴定(图 2)。DNA 测序结果证明重组的外源 DNA 片段序列正确。

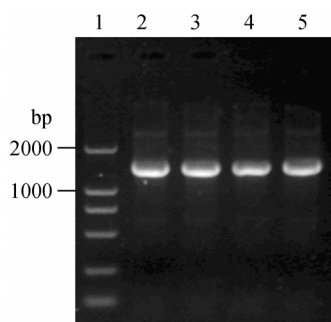


图 2 噬菌体克隆的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of phage clones

1: DNA marker DL2000; 2-5: 噬菌体克隆

1: DNA marker DL2000; 2-5: Phage clones

### 2.3 噬菌体纯化结果

噬菌体经扩大培养后滴度为  $1 \times 10^{15}$ 。PEG8000 纯化后以 SDS-PAGE 检测噬菌体纯度(图 3)。未经纯化的噬菌体裂解液有多条宿主蛋白杂带, 纯化后的阴性噬菌体在 40 kD 左右有 T7 的主要衣壳蛋白 10A 及次要衣壳蛋白 10B, 而 T7-VP2 中由于次要衣壳蛋白 10B 融合有 VP2, 其分子量在 88 kD~90 kD 左右。噬菌体纯度在 90% 左右, 滴度下降到  $2 \times 10^{14}$ 。

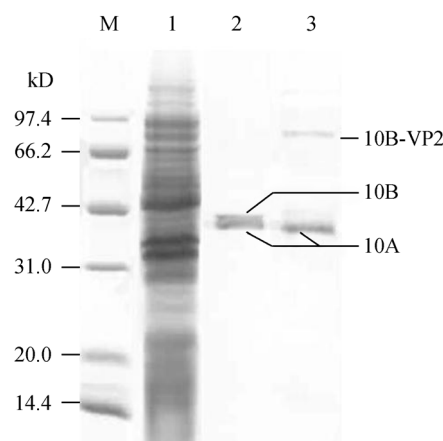


图 3 重组噬菌体纯化结果

Fig. 3 Purification of recombinant phages

M: 低分子量蛋白 marker; 1: 未纯化的噬菌体裂解物; 2: 纯化的阴性噬菌体对照; 3: 纯化的噬菌体 T7-VP2

M: Low-range protein molecular weight markers; 1: Non-purified phage lysate; 2: Purified negative phage control; 3: Purified recombinant phage

### 2.4 重组噬菌体的 FITC 标记结果

纯化的噬菌体 T7-VP2 经 FITC 标记后, 其 F/P 值为 3.12, 而噬菌体滴度下降到  $1.5 \times 10^{13}$ ; 阴性噬菌体 F/P 值为 2.96, 滴度为  $1.0 \times 10^{13}$ 。

### 2.5 标记噬菌体与法氏囊 B 细胞的结合

FITC 标记的噬菌体与法氏囊 B 细胞 4 结合 1 h, PBS 充分洗涤后, 荧光显微镜下可见细胞涂片上有明显的绿色荧光, 其分布与明暗显示出可见光下细胞分布情况, 而阴性对照未发现荧光(图 4)。流式细胞仪检测数据分析而得到的直方图上可看出处理后的 B 细胞的荧光强度大于阴性对照(黑色区域)(图 5A), 预先加入病毒 TAD 能阻断 T7-VP2 的结合, 荧光强度小于不加病毒的对照(黑色区域)(图 5B), 其阻断效果呈浓度依赖性, 即 B 细胞平均荧光强度随病毒浓度的增加而降低(图 6)。

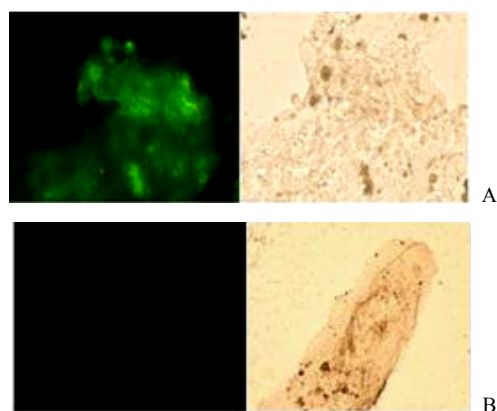


图4 FITC 标记的 T7-VP2 与法氏囊 B 细胞结合的荧光检测

Fig. 4 Detection of interactions between FITC labeled T7-VP2 and bursal B cells by fluorescent microscope

A: T7-VP2 与 B 细胞结合; B: 阴性噬菌体结合对照

A: T7-VP2 binding to B cells; B: Negative control

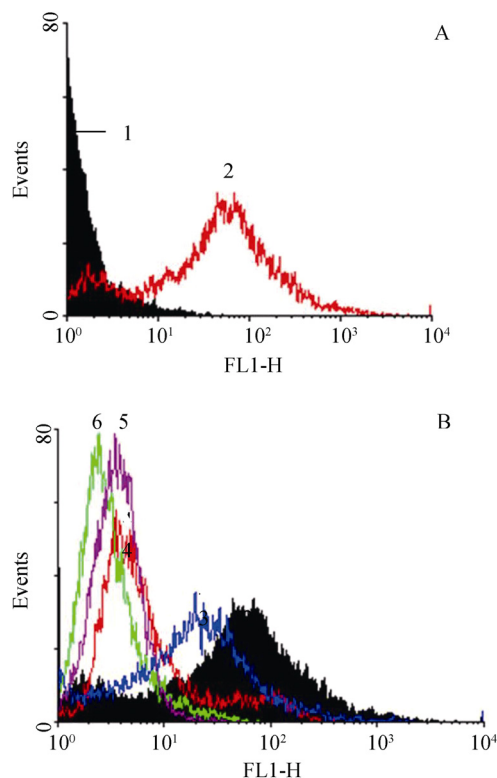


图5 FITC 标记的 T7-VP2 与法氏囊 B 细胞结合的流式检测

Fig. 5 Detection of interactions between FITC labeled T7-VP2 and bursal B cells by flow cytometer

A: T7-VP2, 黑色区为阴性对照; B: TAD 阻断 T7-VP2 的结合, 黑色区为未加 TAD 对照

1: 阴性噬菌体; 2: T7-VP2; 3: 10  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 4: 20  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 5: 40  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 6: 80  $\mu\text{g/mL}$  TAD

A: T7-VP2 binding to B cells, shaded areas represents the background fluorescent signal of the control; B: Reduction of T7-VP2 binding to B cells by different amount of IBDV vaccinal strain TAD

1: Negative phage; 2: T7-VP2; 3: 10  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 4: 20  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 5: 40  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 6: 80  $\mu\text{g/mL}$  TAD

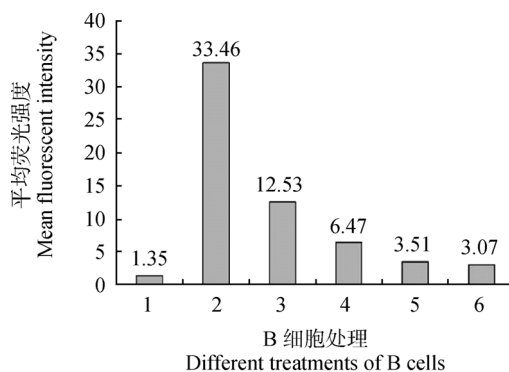


图6 各 B 细胞处理的平均荧光强度

Fig. 6 Mean fluorescence intensity of B cells with different treatment

1: 阴性噬菌体对照; 2: T7-VP2; 3: 10  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 4: 20  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 5: 40  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 6: 80  $\mu\text{g/mL}$  TAD

1: Negative phages; 2: T7-VP2; 3: 10  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 4: 20  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 5: 40  $\mu\text{g/mL}$  TAD; 6: 80  $\mu\text{g/mL}$  TAD

### 3 讨论

噬菌体展示技术通过反复筛选富集目标噬菌体来鉴定并研究生物大分子间的相互作用。而利用荧光标记的重组噬菌体研究体外大分子间的相互作用时可直接检测, 在结合鉴定、靶标筛选与组织定位等研究中有一定的实用意义, 使得噬菌体在研究体外相互作用中有更广泛的应用。FITC在碱性条件下通过与蛋白质的自由氨基经碳酰胺化而形成疏碳氨基键而与蛋白质偶连, 通常用于制备荧光抗体。自Ridha Khelifa等用FITC标记的EB病毒来研究该病毒与淋巴细胞间的相互作用, 发现FITC标记并不会影响病毒与细胞结合并进入细胞<sup>[5]</sup>, 之后又有多篇文献报道用该方法研究各种病毒的生物学特性<sup>[6,7]</sup>。Kimberly A Kelly等同样用FITC标记经亲和淘选而富集的噬菌体, 用来研究配体与受体的相互作用, 也发现标记后的噬菌体仍具有与目的分子的特异亲和性, 而在组织化学中研究目的蛋白或特异细胞的组织定位与分布情况中有一定作用<sup>[8]</sup>。本实验的结果说明FITC标记的噬菌体能显示出较强的绿色荧光, 并且通过流式细胞仪检测得到明显的结果。经FITC标记的噬菌体仍具有裂解宿主菌的活性, 有助于筛选后的扩大培养与富集。滴度下降可能是因为部分噬菌体在纯化过程中失活或丢失造成的。纯化中的反复离心与重悬噬菌体沉淀很容易造成其尾丝断裂, 而无法吸附到宿主细胞并感染增殖。因此使用内壁光滑的离心管更能很好的收集沉淀下来的噬菌体, 尽量减少噬菌体的损失。FITC标记后的各

组噬菌体F/P值应尽量保证一致,以排除流式细胞检测中由于噬菌体颗粒本身荧光强度的不同而造成的干扰。本实验中T7-VP2与阴性噬菌体的F/P值在3.0左右,相差不超过0.2,因此可认为T7-VP2与阴性噬菌体结合B细胞后其荧光强度的差别来自于结合能力的不同。

IBDV核衣壳的外表面由260个VP2蛋白三聚体形成,约占病毒蛋白的51%,并形成凸状结构。研究已经证实VP2蛋白携带病毒主要的中和性抗原表位,而且被认为是与细胞受体结合的关键蛋白。VP2蛋白的晶体结构显示其高变区(180 aa~350 aa)形成一个向外凸起的结构<sup>[9]</sup>,区域中部分氨基酸突变会影响IBDV对细胞的感染,因此猜测该区域是病毒颗粒与细胞受体结合的关键部分。本实验将VP2蛋白展示到T7噬菌体表面,所选用的载体为T7的次要衣壳蛋白10-3B,在噬菌体颗粒表面有5~10个拷贝,比单拷贝的噬菌体展示系统如丝状噬菌体有更强的亲和力。结合实验结果说明T7噬菌体展示的VP2蛋白能与其宿主细胞受体特异结合,该结合特性不受FITC标记的影响,且能被IBDV疫苗株TAD抑制。病毒浓度在10 µg/mL的时候就能明显抑制T7-VP2的结合,而在80 µg/mL时接近饱和,抑制率达到90.3%。该结果为进一步研究VP2与其细胞受体的相互作用打下了基础。

## 参 考 文 献

[1] Becht H, Müller H, Müller HK. Comparative studies on

structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 1988, **69**: 631-640.

[2] Chi Wai Yip, Yin Shan Yeung, Ching Man Ma, *et al.* Demonstration of receptor binding properties of VP2 of very virulent strain infectious bursal disease virus on Vero cells. *Virus Res*, 2007, **123**(1): 50-56.

[3] Brandt M, Yao K, Liu M, *et al.* Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 2001, **75**: 11974-11982.

[4] Rodriguez-Lecompte JC, Nino-Fong R, Lopez A, *et al.* Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2005, **28**: 321-37.

[5] Ridha K, Jose MS. Use of fluoresceinated epstein-barr virus to study epstein-barr virus-lymphoid cell interactions. *J Virol*, 1982, **41**: 649-656.

[6] MT Pho, AAshok, Walter J Atwood. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol*, 2000, **74**: 2288-2292.

[7] Andrea D, Andre G, Ricardo J, *et al.* Migration of vesicular stomatitis virus glycoprotein to the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**: 8268-8273.

[8] Kimberly A, Peter W, Ralph W. *In vivo* imaging of molecularly targeted phage. *Neoplasia*, 2006, **8**(12): 1011-1018.

[9] Fasséli C, Christophe C, Joan P, *et al.* The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 2005, **120**: 761-772.

## 编辑部公告

### 《微生物学通报》创刊以来的全文已经上网

《微生物学通报》自1974年创刊以来的所有文章的全文已经全部上网,供大家免费查看和下载,可以通过点击主页的“过刊检索”进行过刊的检索,欢迎新老读者浏览、下载和引用本刊文章。

另外,创刊以来的全文数据库已制作成DVD光盘,全部内容容纳在一张光盘中,有意购买者可直接联系中国科学院微生物研究所联合编辑部。每盘售价:100元,联系电话:010-64807521;联系人:韩力。

感谢广大读者、作者朋友对我刊一贯的支持!