

[文章编号] 1671-587X(2024)05-1313-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240515

## 基于酵母双杂交技术对与纳尔逊海湾正呼肠孤病毒 $\sigma$ NS相互作用宿主蛋白的筛选

孙绿茵, 马竹萍, 李润林, 李永刚, 陶晓莉

(锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁 锦州 121000)

**[摘要]** **目的:** 探讨小鼠成纤维L929细胞中与纳尔逊海湾正呼肠孤病毒(NBV) $\sigma$ NS蛋白相互作用(互作)的宿主蛋白, 阐明宿主蛋白对病毒复制的影响。**方法:** 构建表达 $\sigma$ NS蛋白的诱饵质粒pGBKT7-S3, 采用测序技术验证诱饵质粒在Y2H酵母细胞中的准确表达。将pGBKT7-S3和pGADT7质粒分别和共同转化至Y2HGold酵母细胞中, 涂布于固体培养基进行培养, 观察菌落生长情况, 确认 $\sigma$ NS蛋白对酵母细胞无毒性, 不能自行激活报告基因。诱饵质粒pGBKT7-S3与小鼠成纤维L929细胞的cDNA文库进行杂交, 对编码互作蛋白的阳性克隆进行质粒抽提, 阳性测序结果通过Uniprot数据库检索筛选得到与NBV $\sigma$ NS互作的蛋白。对互作蛋白进行基因本体论(GO)功能富集分析、京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析和STRING生物信息学分析。**结果:** 成功筛选出61个阳性克隆。DNA测序分析和BLAST比对分析去除23个未匹配到数据库和测序基本相同的阳性克隆。阳性测序结果通过Uniprot数据库检索筛选得到38个与NBV $\sigma$ NS互作的蛋白, 31个蛋白参与细胞生物过程, 36个蛋白是细胞解剖成分, 31个蛋白具有结合功能, 5个蛋白是线粒体呼吸链组成部分, 7个蛋白是核糖体蛋白和核糖体大小亚基的组成部分, 2个蛋白参与铁代谢稳态。GO功能富集分析, 互作蛋白参与的生物过程(BP)富集在细胞过程、代谢过程、生物学调节、定位和对刺激的反应等; 细胞组分主要是细胞解剖成分和含蛋白复合物; 分子功能集中在结合、催化活性、结构分子活性和转运活性等方面。KEGG信号通路富集分析, 蛋白在遗传信息处理途径的翻译、折叠、分类和降解信号通路中高度富集, 在机体系统中主要与消化系统有关联; 与多种病毒性传染病和癌症有关联。STRING分析, 互作蛋白涉及核糖体蛋白类、蛋白修饰类、代谢类和免疫蛋白类等功能蛋白。**结论:** 成功筛选出与NBV $\sigma$ NS蛋白互作的蛋白, 宿主蛋白在病毒复制中具有重要作用。

**[关键词]** 纳尔逊海湾正呼肠孤病毒; 酵母双杂交实验;  $\sigma$ NS蛋白; 蛋白相互作用; 生物信息学

**[中图分类号]** R373 **[文献标志码]** A

## Screening of host proteins interacting with Nelson Bay orthoreovirus $\sigma$ NS based on yeast two-hybrid technology

SUN Lyuyin, MA Zhuping, LI Runlin, LI Yonggang, TAO Xiaoli

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the host proteins that interact with the Nelson Bay orthoreovirus (NBV)  $\sigma$ NS protein in the fibroblasts L929 of the mice, and to clarify the effect of host proteins on the viral replication. **Methods:** The bait plasmid pGBKT7-S3 expressing  $\sigma$ NS protein was constructed, and

[收稿日期] 2023-12-25

[基金项目] 辽宁省科技厅自然科学基金项目(2022-BS-320)

[作者简介] 孙绿茵(1998-), 女, 辽宁省葫芦岛市人, 在读硕士研究生, 主要从事病毒非结构蛋白方面的研究。

[通信作者] 陶晓莉, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: taoxiaoli@jzmu.edu.cn)

sequencing technology was used to verify the accurate expression of the bait plasmid in the Y2H yeast cells. The pGBKT7-S3 and pGADT7 plasmids were separately and jointly transformed into the Y2HGold yeast cells, plated on solid medium, and the colony growth was observed to confirm that the  $\sigma$ NS protein was non-toxic to the yeast cells and could not self-activate the reporter gene. The bait plasmid pGBKT7-S3 was hybridized with the cDNA library in fibroblasts L929 of the mice, and the plasmids encoding the interacting proteins were extracted from the positive clones. The positive sequencing results were screened for the proteins interacting with NBV  $\sigma$ NS through the Uniprot database. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis, and STRING bioinformatics analysis were performed on the interacting proteins. **Results:** A total of 61 positive clones were successfully screened. The DNA sequencing analysis and BLAST alignment removed 23 positive clones that did not match the database or were similar in sequence. The positive sequencing results identified 38 proteins interacting with NBV  $\sigma$ NS through the Uniprot database. Thirty-one proteins were involved in cellular biological processes; thirty-six proteins were cellular anatomical components; thirty-one proteins had binding functions. Five proteins were part of the mitochondrial respiratory chain; seven proteins were ribosomal proteins and components of the ribosomal subunits; two proteins were involved in iron metabolism homeostasis. The GO functional enrichment analysis results showed that the interacting proteins were enriched in biological processes (BP) such as cellular processes, metabolic processes, biological regulation, localization, and response to stimuli; the cellular components were mainly cellular anatomical components and protein-containing complexes; the molecular functions were concentrated in binding, catalytic activity, structural molecule activity, and transporter activity. The KEGG signaling pathway enrichment analysis results showed that the proteins were highly enriched in translation, folding, sorting, and degradation pathways of genetic information processing and were mainly associated with the digestive system in the organism; they were linked to various viral infections and cancers. The STRING analysis results showed that the interacting proteins included ribosomal proteins, protein modification proteins, metabolic proteins, and immune proteins. **Conclusion:** The host proteins that interact with NBV  $\sigma$ NS protein are successfully screened, and these host proteins play important roles in viral replication.

**KEYWORDS** Nelson Bay orthoreovirus; Yeast two-hybrid assay;  $\sigma$ NS protein; Protein interaction; Bioinformatics

呼肠孤病毒是最大的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 病毒, 可以感染很多不同的生物, 包括真菌、植物、昆虫和哺乳动物, 甚至人类<sup>[1]</sup>。根据诱导感染细胞之间的融合能力, 正呼肠孤病毒属可以进一步划分为融合原性和非融合原性。纳尔逊海湾正呼肠孤病毒 (Nelson Bay orthoreovirus, NBV) 是一种从脊髓灰质炎翼狐心脏血液中发现的融合性呼肠孤病毒<sup>[2]</sup>。近年来, NBV 已经越过物种障碍, 演变成一种新兴的跨种传播频繁的人畜共患传染病病毒, 可引起人类急性呼吸系统疾病<sup>[3]</sup>, 研究 NBV 复制机制具有重要意义。NBV 直径为 60~80 nm<sup>[4-5]</sup>, 其 dsRNA 基因组由 10 个大小不一的片段组成, 其中 4 个小片段为 S1、S2、S3 和 S4<sup>[1, 6]</sup>。NBV 非结构蛋白  $\sigma$ NS 由 S3 基因编码<sup>[7]</sup>。 $\sigma$ NS 是相对分子质量约为 40 000 的

RNA 结合蛋白, 氨基酸序列高度保守, 也是病毒包涵体形成和基因组复制的必需蛋白<sup>[8-12]</sup>。作为胞内寄生的病原体, 宿主蛋白对 NBV 的复制至关重要<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14-15]</sup>显示: NBV 可以感染其自然宿主蝙蝠、人类、小鼠和猴子的各种类型细胞。其中小鼠成纤维 L929 细胞对 NBV 感染的耐受程度较低, 原因是 NBV 和 L929 细胞之间独有的病毒-宿主相互作用能够高效抑制病毒感染及复制并限制合胞体的形成。目前, 病毒-宿主相互作用 (互作) 的分子机制尚不清楚。酵母双杂交系统鉴定方法已经发展了 30 余年, 但仍然是研究和鉴定蛋白质互作最直接且最具性价比的方法之一<sup>[16]</sup>。

本研究通过酵母双杂交技术结合质谱分析筛选出与 NBV  $\sigma$ NS 互作的蛋白, 探讨互作蛋白的生物学功能, 预测其参与的信号通路, 为阐明宿主蛋白

影响NBV复制的分子机制和 $\sigma$ NS的致病机制提供依据。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** NBV-MB病毒株和成纤维L929细胞由锦州医科大学病原生物实验室惠赠。凝胶回收试剂盒和限制性内切核酸酶(*Nde* I和*Bam*H I)购自加拿大MBI Fermentas公司, cDNA文库构建试剂盒、T4 DNA连接酶和Taq DNA聚合酶购自美国Clontech公司, Pfu DNA聚合酶购自香港生命科技有限公司, 质粒提取试剂盒购自美国Axygen公司, 核糖核酸内切酶H(Ribonuclease H, *RNase* H)购自宝生物工程(大连)有限公司, DNA回收试剂盒采购自天根生化科技(北京)有限公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。电热恒温水浴锅和精密生化培养箱购自上海精宏实验设备有限公司, 超低温冰箱购自青岛海尔特种电器有限公司, 倒置显微镜购自上海精密仪器仪表有限公司, PCR仪购自北京东林昌盛科技有限责任公司, 离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

**1.2 小鼠L929细胞cDNA文库的构建和质量检测** 采用TRIzol法提取小鼠RNA, 采用磁珠分离法纯化mRNA。以分离出的mRNA为模板, 通过长距离PCR(long-distance PCR, LD-PCR)反应, 其产物采用分子筛原理纯化并进行均一化处理, 得到cDNA。RNA、mRNA和cDNA均经琼脂多糖凝胶电泳检测其质量。随后, 通过Infusion酶同源重组的方式, 将ds cDNA片段分别与线性化的pGADT7-Smal-1、pGADT7-Smal-2和pGADT7-Smal-3载体连接, 50℃恒温培养1 h, 采用电转方式转化至DH10B感受态细胞, 37℃、225~250 r·min<sup>-1</sup>摇床上培养至少1 h, 构建cDNA文库。采用该文库菌液涂布于Luria-Bertani(LB)培养基(含氨苄青霉素)中培养, 统计菌落数。计算小鼠L929细胞cDNA文库的滴度: 滴度(CFU·mL<sup>-1</sup>) = 培养基中的克隆数/涂布板体积(mL) × 稀释系数。随机挑取20株单克隆, 提取质粒后经PCR扩增, 检测插入片段长度, 计算cDNA文库阳性率。cDNA文库阳性率 = PCR扩增为阳性的单克隆株数/20 × 100%。

**1.3 pGBKT7-S3诱饵质粒的构建** 以NBV S3基因为模板, 采用Pfu DNA聚合酶进行PCR扩增。随后, 对扩增产物进行检测、切胶和胶回收处理。

采用限制性内切核酸酶*Eco*R I和*Bam*H I分别对目的基因片段和pGBKT7载体进行双酶切, 再采用T4 DNA连接酶进行连接。将获得的重组质粒通过42℃热激法转化至TOP10感受态细胞中。涂布于LB固体培养基上, 37℃恒温孵育箱中倒置培养14~16 h。挑取单菌落进行PCR验证, 并对阳性克隆进行测序验证。

**1.4 诱饵质粒毒性检测和自激活检测** 将pGBKT7-S3质粒转化至Y2HGold酵母细胞中, 同时将pGBKT7-S3质粒和pGADT7质粒共转化至Y2HGold酵母细胞中。诱饵单质粒转化的菌液涂布于酵母菌色氨酸合成缺陷型培养基(synthetic dropout medium-tryptophan, SD/-Trp), 共转化的菌液涂布于选择性氨基酸缺陷型培养基(double dropout plate, DDO)、添加3'AT抑制剂的3种氨基酸缺陷型培养基(triple dropout plate/3'AT, TDO/3'AT)和4种氨基酸缺陷型培养基(quadruple dropout plate, QDO)。30℃恒温培养4 d, 观察固体培养基中菌落生长情况, 以判断诱饵蛋白 $\sigma$ NS是否具有自行激活特性和酵母细胞毒性作用。

**1.5 转化文库质粒和阳性克隆的筛选** 挑取SD/-Trp固体培养基上的单个菌落, 接种至SD/-Trp液体培养基中, 30℃恒温225 r·min<sup>-1</sup>摇床中培养18 h。随后转接至50 mL酵母蛋白胨葡萄糖腺嘌呤培养基(yeast peptone dextrose adenine medium, YPDA)中, 使初始600 nm波长处的吸光度(A)值A(600)达到2, 30℃恒温225 r·min<sup>-1</sup>摇床中培养12~14 h, 直至A(600)达到0.6~0.8。菌液室温4 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min, 弃上清液。采用30 mL无菌水重悬菌体, 充分混匀, 菌液室温4 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min, 弃掉上清液。采用1.5 mL TE/LiAc混合液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> TE/LiAc)充分混匀菌体沉淀, 菌液室温4 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min, 弃上清。采用600  $\mu$ L TE/LiAc混合液(0.1 mol·L<sup>-1</sup> TE/LiAc)再次重悬菌体, 获得诱饵菌株感受态细胞。感受态细胞与cDNA文库质粒混合, 同时加入鲑鱼精DNA和乙酸锂/聚乙二醇混合液(LiAc/PEG)剧烈振荡1 min, 直至完全混匀, 30℃水浴锅中孵育45 min, 然后加入160  $\mu$ L二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 42℃水浴锅中热激30 min。菌液再次离心, 弃上清。加入3 mL YPDA, 30℃、225 r·min<sup>-1</sup>培养90 min, 再次将菌液室温4 000 r·min<sup>-1</sup>离心1 min, 弃上清。采用0.9% NaCl

重悬菌体,轻轻混匀,cDNA文库质粒转化至诱饵菌株。将菌液涂布于TDO/X/3'AT固体培养基上,观察菌落生长情况。若诱饵蛋白和文库蛋白在酵母核内互作,可激活报告基因的转录和表达,出现阳性菌落。挑取TDO/X/3'AT固体培养基上的单个菌落,转接至QDO/X固体培养基上,30℃恒温培养4~5 d,进行进一步筛选。

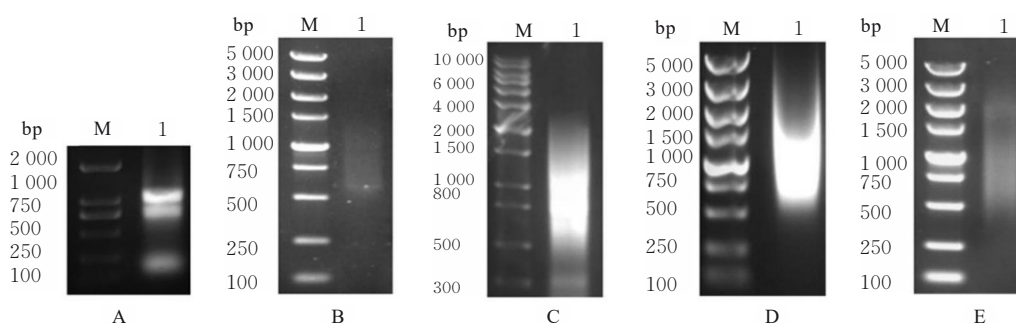
**1.6 猎物质粒的提取和测序比对** 挑取QDO/X固体培养基上的单个菌落,分别接种至TDO液体培养基中,振荡培养12 h,采用酵母小量抽提试剂盒提取猎物质粒。提取的猎物质粒作为模板,利用PCR反应进行扩增。将PCR结果与相同体积的1×上样缓冲液充分混匀,沸水浴10 min,进行琼脂多糖凝胶电泳检测,鉴定文库的插入片段和阳性率。若扩增产物出现阳性条带,则对该样品进行通用引物测序,并对测序结果进行BLAST比对分析。PCR扩增和测序引物序列:pGADT7正向引物TAATACGACTCACTATAGGGCGAGCGCCGCCATG,pGADT7反向引物GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT。

**1.7 猎物蛋白的生物信息学分析** 对与诱饵蛋白互作的阳性测序结果进行质谱检测。采用Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)中对应的目标物种

为检索参考数据库,进行基因本体论(Gene Ontology, GO)(<http://www.geneontology.org>)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)(<http://www.genome.ad.jp/kegg/>)信号通路富集分析。统计学分析与功能注释采用自编脚本perl(v5.32.1)完成,功能注释绘图采用R version 4.0.2版(2020-06-22)和相关ggplot2模块。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用STRING数据库(<https://string-db.org>)为检索参考数据库,识别互作蛋白,分析互作蛋白间的相互作用。采用Cytoscape软件(V.3.8.1)进行采用蛋白-蛋白互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)可视化。

## 2 结果

**2.1 小鼠L929细胞cDNA文库的质量检测** 琼脂多糖凝胶电泳检测结果显示:cDNA文库相对分子质量分布正常,带型分布正确,浓度和纯度数据较好,表明该文库可以用于后续实验,见图1。cDNA文库滴度为 $1.86 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup>。经过PCR法鉴定,80%的文库插入片段长度超过750 bp,文库阳性率超过90%,说明已成功构建了高质量的cDNA文库,见图2。



A: Total cell RNA(M: Marker; Lane 1: Total RNA); B: Purified mRNA(M: Marker; Lane 1: mRNA); C: Double-stranded cDNA synthesized by LD-PCR(M: Marker; Lane 1: LD-PCR product); D: Purified double-stranded cDNA (M: Marker; Lane 1: Purified cDNA); E: Homogenization of double-stranded cDNA(M: Marker; Lane 1: cDNA).

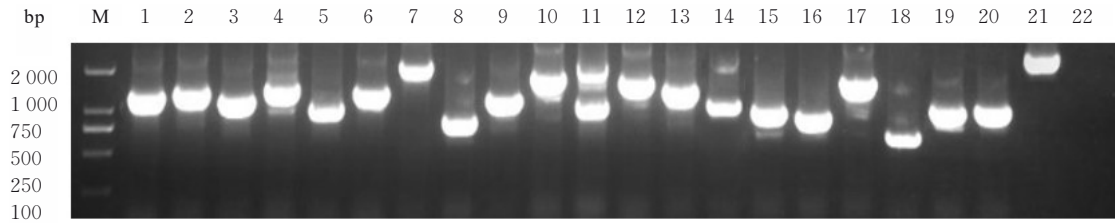
图1 小鼠L929细胞cDNA文库的琼脂多糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of cDNA library of L929 cells of mice

**2.2 构建诱饵质粒PGBKT7-S3** 以NBV S3为模板,通过PCR扩增获得的目的片段序列大小约为1 113 bp,与预期片段大小一致。产物经纯化、双酶切和连接,获得诱饵质粒PGBKT7-S3。诱饵质粒经限制性内切核酸酶Nde I和BamH I双酶切鉴定,获得大小分别约为7 300 bp和1 113 bp的线性

片段,电泳结果与预期相符。由于展开的形状不同,超螺旋环状质粒相较于线性质粒受到的阻力较小,见图3。测序结果与已知序列一致,表明目的基因已成功插入pGBKT7载体。

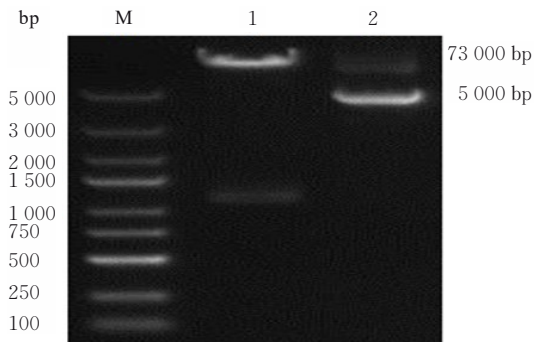
**2.3 诱饵质粒PGBKT7-S3的毒性和自激活** 将PGBKT7质粒和PGBKT7-S3诱饵质粒共同转化至



M: Marker; Lane 1–20: PCR products; Lane 21: Positive control (PCR with PGADT7-T being template); Lane 22: Negative control (PCR with water being template).

图2 琼脂多糖凝胶电泳鉴定 cDNA 文库

Fig. 2 cDNA library identified by agarose gel electrophoresis



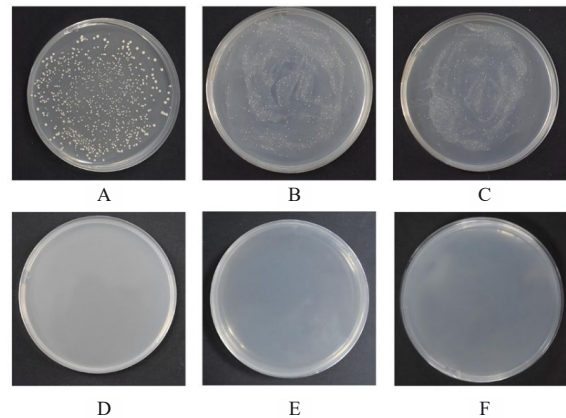
M: Marker; Lane 1: Plasmids digested with restriction endonucleases *Nde* I and *Bam*HI; Lane 2: Undigested plasmid.

图3 双酶切产物的琼脂多糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoretogram of double digested products

Y2H Gold 酵母细胞中, 涂布于 DDO 固体培养基上培养, 观察到菌落生长, 表明诱饵质粒成功转入酵母细胞且对酵母细胞无毒性, 见图 4A。共转染 PGBKT7-S3 和 PGBKT7 的 Y2H Gold 感受态在 TDO 固体培养基上生长, 表明诱饵质粒激活了酵母细胞报告基因 *HIS3* 的表达, 见图 4B。TDO/ $3'AT$   $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  固体培养基上观察到菌落生长, 而在 TDO/ $3'AT$   $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  固体培养基上未见菌落生长, 表明  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $3'AT$  即可使诱饵质粒不能自行激活报告基因 *HIS3* 的表达, 见图 4C~4E。因此可以添加  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $3'AT$  进行下一步筛库实验。在 QDO 固体培养基上未见菌落生长, 表明诱饵质粒不能自行激活酵母细胞报告基因 *ADE2* 的表达, 见图 4F。

**2.4 NBV  $\sigma$ NS 互作蛋白的筛选** 将诱饵质粒 pGBKT7-S3 与小鼠 L929 细胞 cDNA 文库质粒共转至感受态细胞中, 涂布于 TDO/ $3'AT$   $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  固体培养基上进行筛选培养, 见图 5A 和 5B。挑选阳性克隆, 点种至新的 QDO/ $3'AT$  固体培养基上, 筛选与 NBV  $\sigma$ NS 互作的候选蛋白, 见图 5C 和 5D。



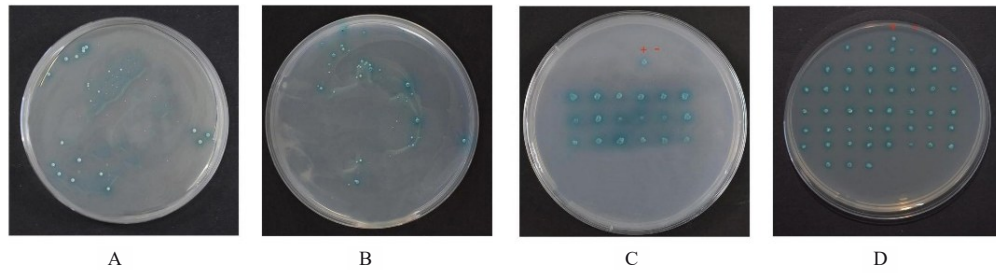
A: DDO solid medium; B: TDO solid medium; C: TDO/ $3'AT$   $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  solid medium; D: TDO/ $3'AT$   $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  solid medium; E: TDO/ $3'AT$   $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  solid medium; F: QDO solid medium.

图4 诱饵质粒对酵母细胞的毒性和对报告基因的自激活

Fig. 4 Toxicity of bait plasmids to yeast cells and autoactivation of reporter genes

**2.5 猎物质粒提取和测序分析** 提取阳性克隆的质粒, 采用通用引物对提取的质粒进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行琼脂多糖凝胶电泳检测, 结果显示: 文库插入片段长度各不相同, 猎物质粒所携带的基因片段大小不一, 为  $500\sim 2000\text{ bp}$ , 见图 6 和 7。

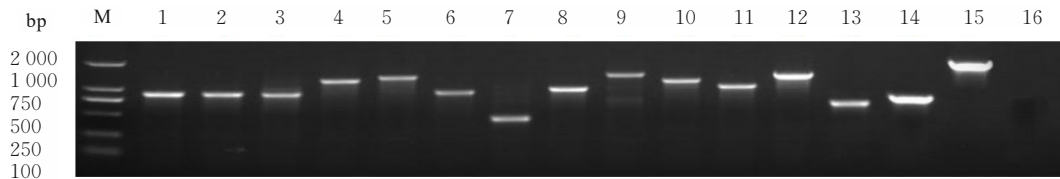
**2.6 生物信息学分析** 阳性测序结果通过 Uniprot 数据库检索筛选得到 38 个 NBV  $\sigma$ NS 互作蛋白。31 个蛋白参与细胞生物过程, 36 个蛋白是细胞解剖成分, 31 个蛋白具有结合功能, 5 个蛋白是线粒体呼吸链组成部分, 7 个蛋白是核糖体蛋白和核糖体大小亚基的组成部分, 2 个蛋白参与铁代谢稳态。对这 38 个互作蛋白进行 GO 功能富集分析、KEGG 信号通路富集分析和 STRING 生物信息学分析。GO 功能富集分析结果显示: 互作蛋白参与的生物过程 (biological process, BP) 富集在细胞过程、



A: Yeast cells for first transformation coated with TDO/X/3'AT  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  solid medium; B: Yeast cells for second transformation coated with TDO/X/3'AT  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  solid medium; C: First transformed yeast cell point QDO/X solid medium (+: PGBKT7-53 and PGADT7-T co-transformed bacteria; -: PGBKT7-lam and PGADT7-T co-transformed bacteria); D: Second transformed yeast cell point QDO/X solid medium (+: PGBKT7-53 and PGADT7-T co-transformed bacteria; -: PGBKT7-lam and PGADT7-T co-transformed bacterial broth spot species).

图5 NBV  $\sigma$ NS 互作蛋白的筛选

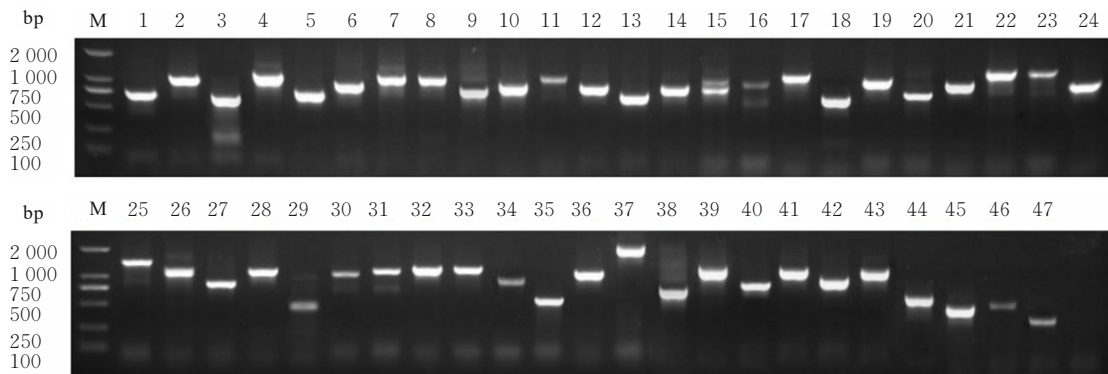
Fig. 5 Screening of NBV  $\sigma$ NS-interacting proteins



M: Marker; Lane 1-14: PCR products; Lane 15: Positive control (PCR with PGADT7-T being template); Lane 16: Negative control (PCR with water as template).

图6 第一次PCR产物琼脂多糖凝胶电泳

Fig. 6 Agarose gel electrophoretogram of first PCR products



M: Marker; Lane 1-47: PCR products.

图7 第二次PCR产物琼脂多糖凝胶电泳

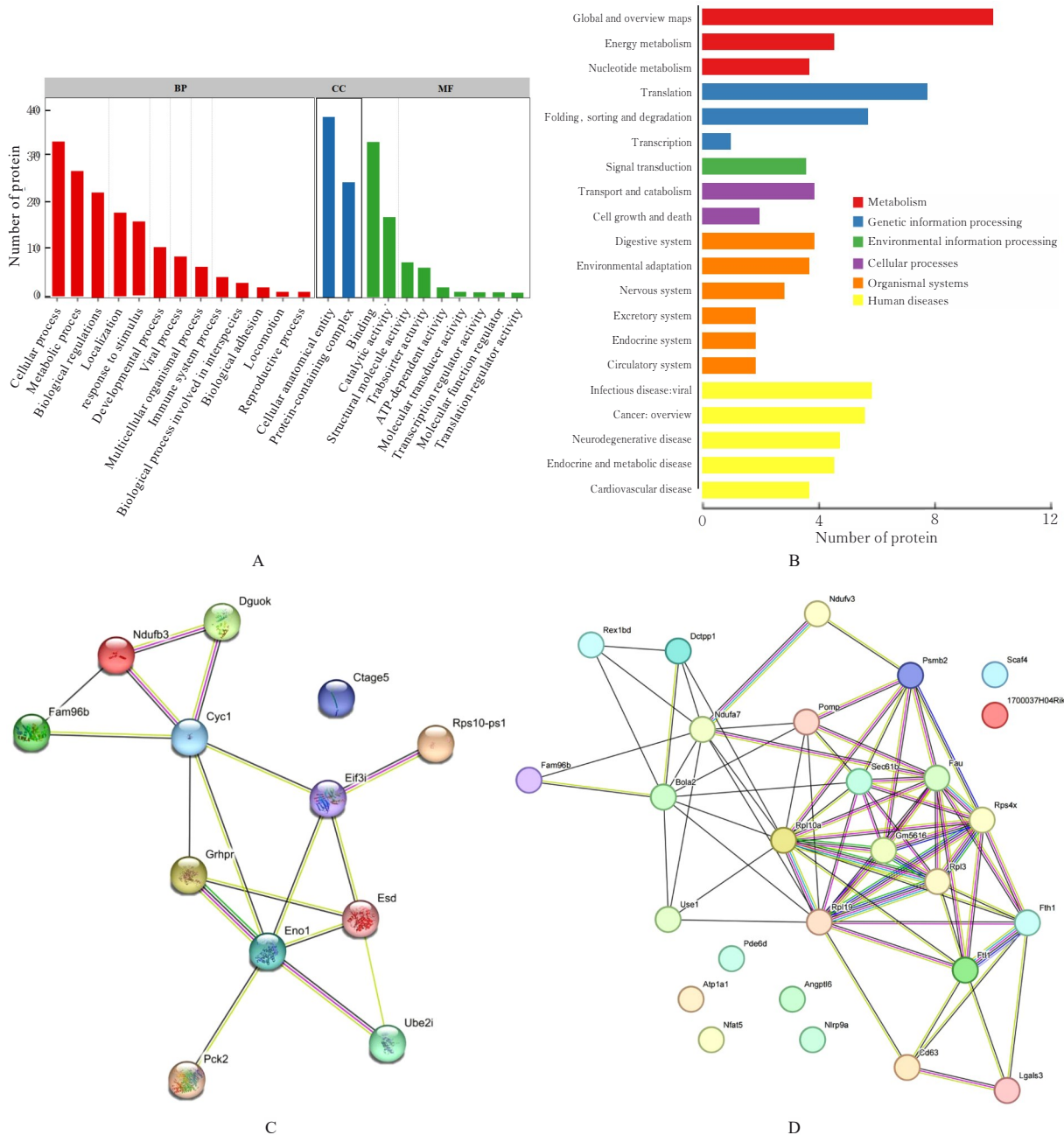
Fig. 7 Agarose gel electrophoretogram of second PCR products

代谢过程、生物学调节、定位和对刺激的反应等；细胞组分 (cellular component, CC) 主要是细胞解剖成分和含蛋白复合物；分子功能 (molecular function, MF) 集中在结合、催化活性、结构分子活性和转运活性等方面 (图 8A)。KEGG 信号通路富集分析结果显示：互作蛋白在遗传信息处理途径的翻译、折叠、分类和降解信号通路中高度富集，在机体系统中主要与消化系统相关联；与多种病毒性

传染病和癌症存在关联，见图 8B。STRING 分析构建了互作蛋白之间的 PPI 网络见图 8C 和 8D。互作蛋白涉及核糖体蛋白类、蛋白修饰类、代谢类和免疫蛋白类等功能蛋白。

### 3 讨论

本课题组构建了 pGBKT7-S3 质粒并通过测序验证了其准确性，将质粒转化至酵母细胞中，通过



A: GO functional enrichment analysis; B: KEGG signaling pathway enrichment analysis; C, D: PPI network

图8 生物信息学功能分析结果

Fig. 8 Bioinformatics functional analysis results

固体培养基进行筛选和检测。本研究结果显示：诱饵质粒 pGBKT7-S3 对酵母细胞无毒性，且不能自行激活报告基因 HIS3 和 ADE2。此外，本课题组成功构建了小鼠成纤维 L929 细胞 cDNA 文库。采用  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TDO /X/3' AT 和 QDO/X 固体培养基进行筛选，并进行菌落 PCR 检测，提取阳性克隆质粒，最终得到 61 个与诱饵蛋白  $\sigma$ NS 互作，且不能自行激活报告基因 HIS3 和 ADE2 的 cDNA 文库质粒。将筛选出的文库质粒进行测序、比对和

分析，最终筛选出 38 个互作蛋白，采用 GO 功能富集分析、BLAST 比对分析和 KEGG 信号通路富集分析对上述蛋白注释、整理和分类，采用 STRING 数据库对 PPI 挖掘，建立 PPI 网络。

NHP2 样蛋白 1 (NHP2-like protein 1, Snu13)、真核翻译起始因子 3 亚基 I (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I, Eif3i)、核糖体蛋白 L3 (ribosomal protein L3, Rpl3)、核糖体蛋白 L19 (ribosomal protein L19, Rpl19)、核糖体

蛋白L10a (ribosomal protein L10a, Rpl10a)、核糖体蛋白S4X (ribosomal protein S4X, Rps4x) 和核糖体蛋白S10 (ribosomal protein S10, Rps10) 均是核糖体蛋白, 与rRNA结合组成核糖体的大小亚基, 是细胞中维持蛋白质合成过程的关键。上述蛋白与NBV  $\sigma$ NS蛋白互作, 可能影响NBV蛋白合成, 继而影响病毒复制。Rpl19定位于细胞质大核糖体亚基上, 主要参与靶向膜的信号肽识别粒子信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 依赖性共翻译蛋白生物过程, PPI网络图显示其可与Rpl10a、Rpl3、Rps4x和Snu13互作, 共同影响核糖体功能。Rpl19是肿瘤的生物标志物<sup>[17]</sup>, 也在黄热病病毒、西尼罗河病毒和寨卡病毒等多种RNA病毒复制过程中起关键作用<sup>[18]</sup>, 可能促进 $\sigma$ NS蛋白的合成; Eif3i参与翻译起始前复合物的形成过程, 与酶结合发挥生物学功能, 可与Rps10相互作用。Eif3复合体可以影响病毒生长, 与病毒蛋白作用还可影响宿主基因的表达, 如Eif3i是水疱性口炎病毒M蛋白的分子伴侣, 影响病毒复制和转录<sup>[19]</sup>; 狂犬病病毒M蛋白可以通过与Eif3h互作来抑制真核翻译的启动<sup>[20]</sup>, 与 $\sigma$ NS蛋白互作所产生的影响尚无相关研究。

细胞色素c1 (cytochrome C, Cyc1)、NADH脱氢酶 [泛醌] 1 $\alpha$ 亚复合物亚基7 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1  $\alpha$  subcomplex subunit 7, Ndufa7)、NADH脱氢酶 [泛醌] 1 $\beta$ 亚复合物亚基3 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1  $\beta$  subcomplex subunit 3, Ndufb3)、NADH脱氢酶 [泛醌] 黄素蛋白3 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, Ndufv3) 和脱氧鸟苷激酶 (deoxyguanosine kinase, Dguok) 是线粒体呼吸链的关键组成部分, 共同参与线粒体电子传递过程, 对细胞能量代谢产生明显影响, 与心血管病、神经退行性疾病和内分泌代谢病等有关联。上述蛋白之间互作可调控线粒体功能, 从而影响疾病的发生发展, 其中Ndufb3在复发性流产发展过程中具有重要意义<sup>[21]</sup>。GUARNIERI等<sup>[22]</sup>在啮齿动物和人类宿主中发现: 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2蛋白可与宿主线粒体蛋白结合, 导致线粒体功能紊乱, 包括下调氧化磷酸化和上调糖酵解。 $\sigma$ NS蛋白与线粒体蛋白结合, 可能导致线粒体功能失调。

铁蛋白轻链1 (ferritin light chain 1, Ftl1) 和

铁蛋白重链1 (ferritin heavy chain 1, Fth1) 在铁代谢稳态中起关键作用, 主要定位于自溶酶体, 协同参与细胞内铁离子隔离和运输过程, 与细胞生长和死亡有密切关联。Fth1基因启动子的低甲基化程度是一种潜在的新型冠状病毒感染诊断和预后指标<sup>[23]</sup>; 人副流感病毒2型V蛋白干扰Fth1和核受体共激活剂4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 之间的互作, 抑制NCOA4介导的铁蛋白降解, 破坏铁稳态<sup>[24]</sup>,  $\sigma$ NS与Fth1结合可能对铁稳态调节产生影响, 具体机制有待进一步研究。

综上所述, 本实验采用酵母双杂交系统结合高通量测序技术筛选出与NBV  $\sigma$ NS互作的蛋白, 采用生物信息学工具对互作蛋白进行分析, 深入了解猎物蛋白的功能、定位、活动及参与的信号通路, 为进一步探讨NBV复制过程中宿主和病毒蛋白互作的后续研究提供依据, 为寻找NBV感染治疗的新靶点提供思路。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

孙绿茵、李永刚和陶晓莉参与实验设计、实验数据分析、结果讨论和论文审校, 孙绿茵、马竹萍和李润林参与文献检索、实验数据收集及分析和论文撰写。

#### [参考文献]

- [1] DAY J M. The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides [J]. *Infect Genet Evol*, 2009, 9(4): 390-400.
- [2] GARD G, COMPANS R W. Structure and cytopathic effects of Nelson Bay virus [J]. *J Virol*, 1970, 6(1): 100-106.
- [3] KUANG G P, XU Z Q, WANG J, et al. Nelson bay reovirus isolated from bats and blood-sucking arthropods collected in Yunnan Province, China [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(4): e0512222.
- [4] MERTENS P. The dsRNA viruses [J]. *Virus Res*, 2004, 101(1): 3-13.
- [5] BENAVENTE J, MARTÍNEZ-COSTAS J. Avian reovirus: structure and biology [J]. *Virus Res*, 2007, 123(2): 105-119.
- [6] HOTANI T, TACHIBANA M, MIZUGUCHI H, et al. Reovirus double-stranded RNA genomes and poly I: C induce down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(4): 1041-1046.

- [7] DUNCAN R. Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreoviruses: a species proposal [J]. *Virology*, 1999, 260(2): 316-328.
- [8] ZAMORA P F, HU L Y, KNOWLTON J J, et al. Reovirus nonstructural protein  $\sigma$ NS acts as an RNA stability factor promoting viral genome replication [J]. *J Virol*, 2018, 92(15): e00563-18.
- [9] TENORIO R, FERNÁNDEZ DE CASTRO I, KNOWLTON J J, et al. Function, architecture, and biogenesis of reovirus replication neorganelles [J]. *Viruses*, 2019, 11(3): 288.
- [10] TENORIO R, FERNÁNDEZ DE CASTRO I, KNOWLTON J J, et al. Reovirus  $\sigma$ NS and  $\mu$ NS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01253-18.
- [11] LEE C H, RAGHUNATHAN K, TAYLOR G M, et al. Reovirus nonstructural protein  $\sigma$ NS recruits viral RNA to replication organelles[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e0140821.
- [12] GORAL M I, MOCHOW-GRUNDY M, DERMODY T S. Sequence diversity within the reovirus S3 gene: reoviruses evolve independently of host species, geographic locale, and date of isolation [J]. *Virology*, 1996, 216(1): 265-271.
- [13] KUMAR R, MEHTA D, MISHRA N, et al. Role of host-mediated post-translational modifications (PTMs) in RNA virus pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 323.
- [14] MOK L, WYNNE J W, GRIMLEY S, et al. Mouse fibroblast L929 cells are less permissive to infection by Nelson Bay orthoreovirus compared to other mammalian cell lines[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 7): 1787-1794.
- [15] MOK L, WYNNE J W, TACHEDJIAN M, et al. Proteomics informed by transcriptomics for characterising differential cellular susceptibility to Nelson Bay orthoreovirus infection [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 615.
- [16] CHIEN C T, BARTEL P L, STERNGLANZ R, et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(21): 9578-9582.
- [17] RAO B C, LI J H, REN T, et al. RPL19 is a prognostic biomarker and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 686547.
- [18] PETROVA E, GRACIAS S, BEAUCLAIR G, et al. Uncovering flavivirus host dependency factors through a genome-wide gain-of-function screen[J]. *Viruses*, 2019, 11(1): 68.
- [19] PAN W, SONG D G, HE W Q, et al. EIF3i affects vesicular stomatitis virus growth by interacting with matrix protein[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 212: 59-66.
- [20] KOMAROVA A V, REAL E, BORMAN A M, et al. Rabies virus matrix protein interplay with eIF3, new insights into rabies virus pathogenesis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(5): 1522-1532.
- [21] YIN X J, HONG W, TIAN F J, et al. Proteomic analysis of decidua in patients with recurrent pregnancy loss (RPL) reveals mitochondrial oxidative stress dysfunction [J]. *Clin Proteomics*, 2021, 18(1): 9.
- [22] GUARNIERI J W, DYBAS J M, FAZELINIA H, et al. Core mitochondrial genes are down-regulated during SARS-CoV-2 infection of rodent and human hosts [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(708): eabq1533.
- [23] MUHAMMAD J S, ELGHAZALI G, SHAFARIN J, et al. SARS-CoV-2-induced hypomethylation of the ferritin heavy chain (FTH1) gene underlies serum hyperferritinemia in severe COVID-19 patients [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 631: 138-145.
- [24] OHTA K, SAKA N, NISHIO M. Human parainfluenza virus type 2 V protein modulates iron homeostasis [J]. *J Virol*, 2021, 95(6): e01861.