

草鱼热休克蛋白 Hsp70 相互作用多肽的筛选及其初步应用

田 祥¹, 胡光耀², 吕利群¹

(1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源与利用重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 热休克蛋白 Hsp70 是一种分子伴侣和维持细胞稳态的中枢调节因子, 在促进蛋白质折叠、运输、重塑、降解等功能中发挥着重要作用。为了探究 Hsp70 蛋白在草鱼中所发挥的生物学效应, 通过 PCR 技术克隆 Hsp70 蛋白基因全序列, 构建原核表达载体 pET28a-Hsp70。利用原核表达系统, 成功表达 Hsp70-HIS 融合蛋白, 利用噬菌体展示技术筛选出能够高度富集 Hsp70 蛋白的多肽序列, 并通过 NCBI 进行预测分析。SDS-PAGE 电泳结果分析表明, Hsp70-HIS 融合蛋白可在 PBS 中较好地溶解, 蛋白分子量为 70 ku 左右; 通过对噬菌斑的测序发现噬菌体展示文库中存在两条多肽序列能够被 Hsp70 蛋白高度富集; Dot Blot 实验验证筛选出的两条多肽序列与 Hsp70 蛋白存在相互作用; 为了发掘筛选多肽序列的作用, 采用不同浓度的多肽处理 CIK 细胞并感染 GCRV 病毒, qPCR 结果表明多肽处理细胞后, GCRV 的复制水平显著上升。基于以上研究结果, 对 NCBI 数据库进行 BLAST 分析后发现草鱼基因组以及草鱼呼肠孤病毒基因组中存在 6 组蛋白, 这些蛋白可能与 Hsp70 之间存在相互作用的关系。本研究为解析 Hsp70 在草鱼热休克与病毒入侵过程中的生物学功能奠定了良好的研究基础。

关键词: 草鱼; Hsp70 蛋白; 噬菌体展示技术

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 在我国水产养殖业具有重要地位。数据显示, 草鱼的养殖面积和产量已位居全国前列, 成为促进地方经济增长和水产养殖发展的关键因素^[1]。然而, 随着养殖规模的日益扩大, 一系列问题逐渐显现, 包括水质恶化和温度变化等环境因素的影响, 以及携带病原体的苗种和交叉感染导致的病原体传播, 最终引发水产病害的频发。根据中国水生动物卫生状况的统计数据, 因病害造成鱼类直接经济损失已达到 51.58 亿元, 并呈逐年上升趋势^[2]。研究表明, 草鱼病害发病率与环境温度密切相关。当水温升高时, 草鱼容易受到温度应激, 进而诱发出血病^[3-4]。温度在鱼类的生理过程中扮演关键角色, 对其代谢、成长和繁殖能力具有显著影响。适宜的温度环境不仅有助于鱼类的健康生长, 还能增强其生理功能和抗病能力。然而, 极

端温度可能导致应激反应, 甚至严重情况下引发死亡。因此, 维持稳定而适宜的温度对鱼类的生存至关重要。研究温度对鱼类的影响对水产养殖和生态保护非常重要^[5]。外界温度的改变可引起生物体内分子结构的改变。例如温度波动可能干扰蛋白质折叠成特定三维结构的过程, 从而影响生物分子的构成与功能^[6]。急剧的温度波动可能诱发生物体内的高温胁迫, 影响机体内细胞膜的脂类, 导致严重的氧化损伤, 并可能引发细胞分化、凋亡等生物学行为^[7]。尽管近年关于温度与草鱼病害的研究取得了一些进展, 但其具体发病机制仍需进一步探索^[8-9]。

热休克蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 家族包括 Hsp27、Hsp40 和 Hsp70 等^[10]。Hsp70 主要负责促进新生蛋白质的正确折叠、修复受损蛋白质, 并在免疫应答和细胞稳态调控中发挥关键作用,

收稿日期: 2024-11-27 修回日期: 2025-05-08

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-45)

作者简介: 田 祥 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。E-mail: m220100266@st.shou.edu.cn

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

因此被视为细胞内的重要“管家”^[11]。Hsp70 的主要功能包括蛋白质的折叠、重折叠以及细胞区室间的转运^[12]。其结构由两个主要功能域组成: ATP 结合域负责水解 ATP,底物结合域识别并结合疏水性残基,从而促进多肽链的延长和折叠^[13]。Hsp70 还在病毒感染过程中扮演双重角色。一方面,它通过调控免疫系统释放促炎因子,增强宿主的抗病毒能力。另一方面,病毒可以挟持 Hsp70 的正常功能,为自身复制提供支持,加速在宿主细胞中的增殖^[14-15]。总体而言, Hsp70 在病毒感染过程中既能保护宿主细胞,又可能被病毒利用,这一复杂的免疫调节机制值得深入研究。然而,目前关于 Hsp70 在草鱼病害中的作用研究仍较少,需进一步探索。

噬菌体展示技术(Phage display technology)起源于 1985 年,其原理是将外源基因片段插入到噬菌体基因组的特定位置,使编码的多肽或抗体在噬菌体外壳表面展示。从而构建出包含大量多肽序列的噬菌体文库。通过将目标蛋白或靶标分子(如抗原、受体等)加入文库,经过结合、洗涤和洗脱等 3~5 轮筛选,可富集与靶标具有特异性结合能力的噬菌体,并通过测序鉴定其编码序列^[16]。周菁等^[17]利用该技术筛选出特定多肽序列 LKWGHVY 与 PPE17 蛋白具有显著的相互作用。张帆等^[18]进一步应用噬菌体展示技术,筛选出能够特异性结合人乳腺髓样癌细胞的多肽,这些多肽不仅显示良好的靶向性,还可能成为乳腺癌早期诊断和治疗的新靶点。噬菌体展示技术在抗体开发和肿瘤标志物筛选中展现出巨大潜力,为疾病早期诊断和靶向治疗提供了新的工具,推动了生物医学研究发展^[19]。

本研究通过构建 pET28a-Hsp70 重组质粒,利用原核表达系统纯化出 Hsp70-HIS 融合蛋白,并结合噬菌体展示技术筛选出与 Hsp70 具有高度亲和性的多肽序列。随后,利用 NCBI 数据库对这些多肽序列进行生物信息学分析,预测可能与 Hsp70 相互作用的宿主蛋白。本研究旨在探索 Hsp70 的功能及其在细胞应对病毒感染中的作用,为揭示病毒与宿主细胞的相互作用机制提供新见解,并为新型抗病毒策略和治疗方法的开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼肾脏细胞(*Ctenopharyngodon idellus* kidney, CIK)由本实验室保藏,感受态细胞 Trans 5α、BL21、限制性核酸内切酶 *Bam*H I 与 *Xho* I 以及无缝克隆试剂盒均采购于全式金生物,Prime STAR Max DNA Polymerase 采购于 TaKaRa 公司。

1.2 Hsp70 基因的扩增

将 CIK 细胞置于 37 °C 培养箱中 2 h 出现热休克反应,利用热休克反应刺激 CIK 细胞,使其 Hsp70 蛋白过表达,去除培养基后加入 500 μL 的 Trizol,使用 Trizol-氯仿法提取样品中的 RNA 后,逆转录生成 cDNA。设计原核表达质粒 pET28a-Hsp70 的引物: F-5'CCATGGCTGAGATCGGATCCATGTCATCA GCAAAAGGAGTA-3'; R-5'TGGTGGTGGTGGT GCTCGAGCCTTAATCCACCTCTTCAATAGT-3'。利用获得的 cDNA 作为模板,采用 PCR 法扩增 Hsp70 的全长序列。PCR 参数设置为:98 °C 加热 10 s,60 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 90 s,循环 34 次,72 °C 继续延伸 10 min (TaKaRa, R045A)。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对反应后的 PCR 产物进行核酸分离,得到约为 2 200 bp 大小的目标条带,与 NCBI 上所预测的条带大小一致。使用 PCR 纯化试剂盒将核酸胶进行纯化回收处理。

1.3 表达载体 Pet28a-Hsp70 的构建与鉴定

载体 Pet28a 通过双酶切技术进行酶切位点的酶切,体系为:*Bam* H I 1 μL、*Xho* I 1 μL、载体 1.5~2.0 μg、Flycut buffer 5 μL、无菌水补充至 50 μL。将配置好的体系于 37 °C 15 min,80 °C 20 min 充分反应。当酶切反应结束后,立即对目的载体纯化。在 Basic Assembly Mix 的作用下,将纯化好的 Hsp70 基因与空载体按照浓度配好体系,无菌水补充至 10 μL,50 °C 下反应 20 min。反应结束后,将混合物放置于冰上冷却几秒;随后,重组产物转化到 Trans 5α 感受态细胞中,吸取 80 μL 的细菌悬液在含 Kana 的 LB 培养平板上进行涂布,37 °C 培养箱中过夜,随后选取单个菌落进行阳性 PCR 鉴定。将鉴定阳性的菌落在 1 mL 的 LB 培养基(不含琼脂)中培养 2 h,转移菌液至

200 mL 的 LB 培养基中继续培养 3~4 h。提取目的质粒并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 Hsp70 蛋白表达及纯化

将经过测序确认的重组质粒 pET28a-Hsp70 转化 BL21(DE3)感受态细胞。吸取 80 μ L 菌液,在 LB 培养平板(含 Kana)上涂布处理,37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜。挑选单个菌落至 200 mL 含 Kana 抗性的 LB 培养基中扩培,直到 OD₆₀₀ 值达到约 0.6。IPTG 调整至终浓度 1 mmol/L,16 $^{\circ}$ C、120 r/min 下培养过夜以诱导蛋白大量表达。将过夜培养的菌液 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。将沉淀置于超低温冰箱中进行 4 次反复冻融。根据沉淀的湿质量每克添加 5 mL 的非变性裂解液,同时加入 1 mg/mL 的溶菌酶,确保混合均匀后在冰浴中静置 30 min。利用超声破碎仪在冰上对细菌进行超声处理,5 s 处理后间隔 5 s,功率设为 250 W,直到样品变得逐渐清澈。最后,在 4 $^{\circ}$ C 下以 10 000 g 离心 20~30 min,收集裂解液的上清并在冰上保存。确认上清中存在目标蛋白后,参照 his 标签蛋白纯化试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,P2229S)说明书对 HSP70-HIS 蛋白进行纯化。

1.5 噬菌体文库包被与筛选

Hsp70 蛋白用 0.1 mol/L 的 NaHCO₃ 稀释成 100 μ g/mL 的浓度加入 12 孔板中,并将其放入 4 $^{\circ}$ C 孵育 12~16 h;孵育完成后去除蛋白溶液,将 12 孔板加入足量的封阻缓冲液,4 $^{\circ}$ C 封闭 1 h 后用 TBST 缓冲液清洗 6~8 次;根据噬菌体展示文库说明书,向经过包被后的孔板中加入 500 μ L 通过 TBST 缓冲液稀释的文库噬菌体,室温下孵育 1 h 使噬菌体能够与蛋白溶液相结合;去除上清后用 TBST 缓冲液清洗 6~8 次;润洗完成后向孔板中加入 1 mmol/L 的 Hsp70 蛋白溶液将已经结合上的噬菌体竞争洗脱下来。在室温条件下摇动混合物 1 h,将洗脱液进行回收。将洗脱液中的噬菌体转移至 ER2738 菌株中并在 37 $^{\circ}$ C 下以剧烈摇动的方式培养 4 h,实现噬菌体的扩增。4 $^{\circ}$ C 条件下以 10 000 r/min 离心扩增产物 10 min,取上清液加入其 1/6 体积的 PEG8000/NaCl 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜使噬菌体沉淀,过夜后对 PEG 沉淀再

次离心,去除上清液后沉淀使用 TBS 缓冲液进行吹打混匀,第一轮噬菌体筛选以及扩增完成。将以上的步骤重复两次即获得三轮筛选的噬菌体洗脱液。

1.6 Dot blot 结合实验

将经过甲醇活化后的 0.22 μ m 规模的 PVDF 膜室温放置 5 min。梯度稀释多肽溶液,在上样量相同的条件下,将不同浓度的多肽溶液滴加在 PVDF 膜上,常温下放置 5~10 min 使其晾干;使用 5% 的脱脂牛奶(PBS 溶解)封闭处理 2 h;封闭完成后去除封闭液,加入纯化的 Hsp70 蛋白溶液室温孵育 30 min;孵育完成后去除蛋白溶液,加入一抗(Hsp70 兔抗,实验室自制),4 $^{\circ}$ C 过夜放置;随后使用 PBST 洗涤 4 次,每次 10 min;二抗室温结合 1 h;PBST 洗涤 4 次,每次 10 min;使用 ECL 显色液(雅酶,上海)显色 30 s,使用蛋白成像仪进行观察和图像采集。

1.7 多肽药物实验

用六孔板培养 CIK 细胞,待细胞铺满至 80%~90% 后,将筛选得到的多肽设置为不同浓度孵育细胞 30 min(多肽浓度设置为 0、10、20、50、100、150 μ g/mL);使用本实验室分离并保存的 I 型草鱼呼肠孤病毒-JX01 感染 CIK 细胞(其间保持多肽的孵育浓度),1 h 后换 5% 维持培养基并保持多肽浓度。CIK 细胞在 18 h 后出现明显 CPE 后,取样并利用 Trizol 法提取 RNA 并将其逆转录(TaKaRa,RR036A),反应体系如下(表 1)。反应条件为,37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 保存。逆转录后的产物用作定量检测模板,根据 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa,RR820A)说明配置体系(表 2),在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测。以草鱼 β -actin 基因作为内参基因,具体引物序列参照 RT-PCR 引物序列列表(表 3)。目的基因相对表达量根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法运算,利用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析。

表 1 逆转录体系
Tab. 1 Reverse Transcription System

试剂名称 Reagent name	体积 Volume
5X PrimeScript RT Master Mix	4 μ L
总 RNA Total RNA	1 000 ng
灭菌水 Sterilized water	16-X μ L

表 2 荧光定量 PCR 体系	
Tab. 2 Fluorescence Quantitative PCR System	
试剂名称 Reagent name	体积 Volume
TB Green® Premix Ex Taq™	10 μL
正向引物 Forward Primer	1 μL
反向引物 Reverse Primer	1 μL
DNA 模板 DNA template	2 μL
灭菌水 Sterilized water	6 μL

1.8 结合多肽序列分析

根据噬菌体文库说明书使用 M13 法对第三轮的噬菌体洗脱物进行滴度测定,平板上随机挑取 25 个噬菌斑送至金唯智生物公司进行序列分析。使用 SnapGene 软件将测序结果翻译为多肽序列,使用 NCBI 的 BLAST 功能将筛选得到的两条多肽序列与草鱼以及草鱼呼肠孤病毒基因文库进行比对,通过比较相似度和 E 值筛选出与 Hsp70 具有潜在的互作可能性的蛋白。

表 3 使用引物			
Tab. 3 Primers used in this study			
基因 Gene name	正向(5'-3') Forward(5'-3')	反向(5'-3') Reverse(5'-3')	应用 Application
JX01-VP7	CAAGACCATTCAAGACTC	TCACTCACTTCGACTAAT	Real time RT-PCR
β-actin	GATGATGAAATTGCCGCACTG	ACCGACCATGACGCCCTGATGT	Real time RT-PCR

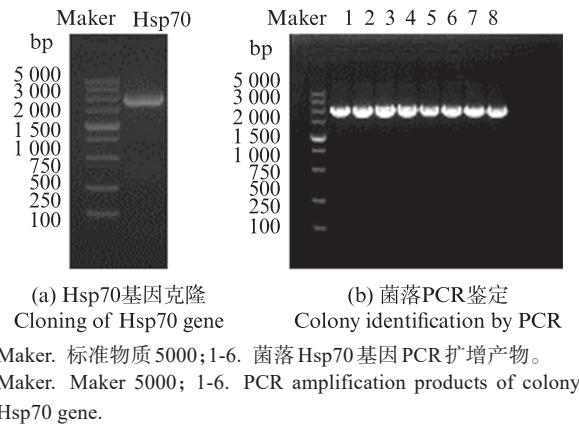


图 1 Hsp70 基因 PCR 扩增产物电泳图
Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of Hsp70 gene

2.2 蛋白表达与可溶性分析

经测序确定的 pET28a-Hsp70 质粒被转化进 BL21 中,筛选出阳性菌落后转入 LB 液体培养基中进行扩增,添加 IPTG 以诱导 Hsp70 蛋白的大规模表达和纯化。使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳对纯化后的蛋白样品进行分离,随后使用考马斯

2 结果

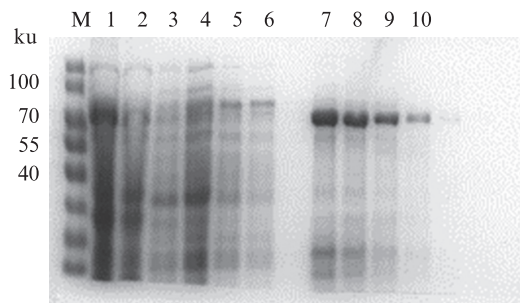
2.1 基因的扩增与质粒的构建

CIK 细胞提取 RNA 并反转录为 cDNA,经 PCR 扩增后得到的大小约为 2 220 bp 的片段(图 1a),扩增后的目标片段连接到 pET-28a 载体中, pET-28a-Hsp70 转化进 Trans 5a 感受态细胞中,以筛选出正确的单克隆。菌落 PCR 的结果表明,所挑选的 8 个单菌落均呈阳性反应,且条带位置准确(图 1b)。将鉴定出的阳性小体系菌液转移至含 Kana 的 LB 培养基中进行扩增培养,以确保目标菌株的选择性生长。经过充分扩增后,从菌液中提取质粒,并将提取的质粒样品送交测序机构进行基因测序分析。测序结果显示, pET28a-Hsp70 质粒构建成功,目标基因插入位置和序列均正确无误。

亮蓝染料进行染色以进行可视化。通过观察胶图可以得出:与诱导前的蛋白样品相比,诱导后获得的蛋白样品在 70 ku 附近的条带变得非常明显,表明目标蛋白的表达得到了有效诱导。在超声破碎处理后,菌体上清中同样在相同位置出现了条带,说明部分 Hsp70-HIS 蛋白已经成功溶解并释放到上清液中。而在沉淀中,则观察到不均匀的杂带分布,提示可能存在未完全溶解的蛋白质或其他细胞成分。这些结果表明, Hsp70-HIS 蛋白能够很好地溶解于 PBS 缓冲液中。经过两次洗涤处理后,目的蛋白在 70 ku 左右形成的条带更加清晰可见(图 2)。

2.3 噬菌体筛选的滴度分析

根据 Ph.D.™-12 噬菌体展示肽库(NEB China)说明书,对每轮噬菌体洗脱及扩增后的滴度进行分析(图 3)。根据投入滴度以及回收滴度的结果显示,随着筛选次数的增加,噬菌体的富集都会显著提升,表明每经过一轮筛选都会使富集程度提高(表 4)。



M. 蛋白标准品;1. 诱导后;2. 诱导前;3. 沉淀;4. 上清;5. 洗涤1次;6. 洗涤2次;7. 洗脱1次;8. 洗脱2次;9. 洗脱3次;10. 洗脱4次。
M. Maker; 1. Induction; 2. Noninduction; 3. Precipitation; 4. Pyrolysis supernatant; 5. First wash.; 6. Secondary wash; 7. First elution;8. Secondary elution; 9. Third elution; 10. Fourth elution.

图2 重组蛋白 Hsp70-HIS 诱导表达及可溶性分析

Fig. 2 Induced expression and solubility analysis of recombinant protein VP39-HIS

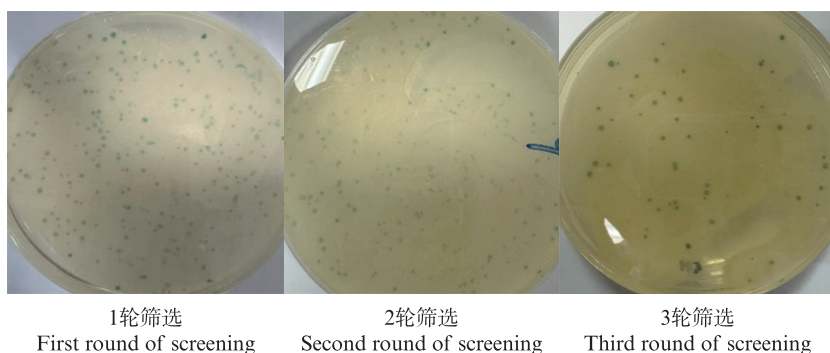


图3 噬菌体空斑培养照片

Fig. 3 Photographs of phage plaque culture

表4 噬菌体展示回收率

Tab. 4 Phage display recovery rate

淘选轮数 Panning rounds	投入滴度 Input amount/(PFU/mL)	回收滴度 Recovery amount/(PFU/mL)	回收率 Recovery rate/%
1	2.13×10^{11}	5.6×10^4	2.6×10^{-5}
2	2.99×10^{11}	3.7×10^6	1.2×10^{-3}
3	2.33×10^9	4.0×10^4	1.7×10^{-3}

注:回收率=回收滴度/投入滴度。

Notes: Recovery rate = Recovery amount / Input amount.

2.4 噬菌体筛选的多肽鉴定

经过3轮噬菌体筛选后,从滴度分析的平板上选取了25个噬菌斑,并送交公司进行DNA测序分析。根据 Ph.D.-12™ 噬菌体展示多肽库试剂盒(NEB, E8110S)的说明书,最终筛选出了两条与 Hsp70 蛋白存在特异性相互作用的12个多肽

序列(表5)。这两条多肽分别为:N'-GWHCTDTVCVDT-C'和N'-TNCTELLCFIDG-C'。两条多肽在筛选过程中分别被重复识别了6次和5次,表明它们与 Hsp70 蛋白具有较强的亲和力和结合能力。

表5 与 Hsp70 蛋白特异性结合的多肽序列分析

Tab. 5 Sequencing of the specific binding peptide of Hsp70 protein

基因序列 Gene sequence	蛋白序列 Binding peptide	重复次数 Number of repetitions
5'-GGTTGGCATTGTACTGATACTGTTTGTGTTGATACG-3'	N'-GWHCTDTVCVDT -C'	6
5'-ACTAATTGTACTGAGTTGTGTGTTTATTGATGGT-3'	N'-TNCTELLCFIDG -C'	5

2.5 多肽互作鉴定

利用 Dot Blot 进一步验证 Hsp70 与两条多肽的互作关系,结果表明两条多肽序列 N'-GWHCTDTVCVDT-C' 和 N'-TNCTELLCFIDG-

C'均与 Hsp70 蛋白存在相互作用,梯度稀释验证的结果也表明二者之间的互作呈现浓度依赖性(图4)。

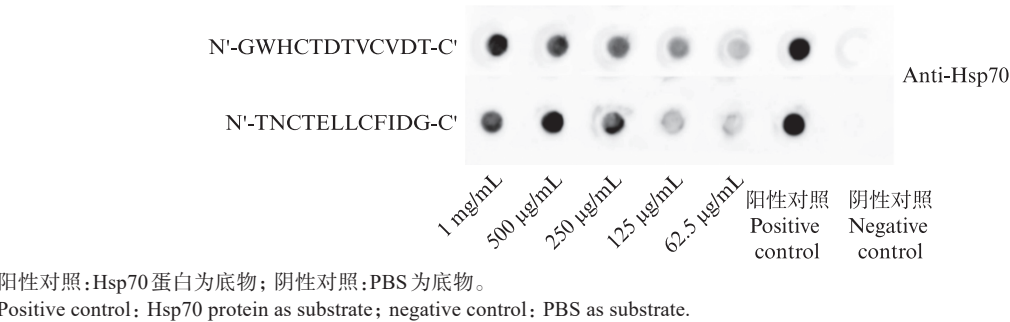
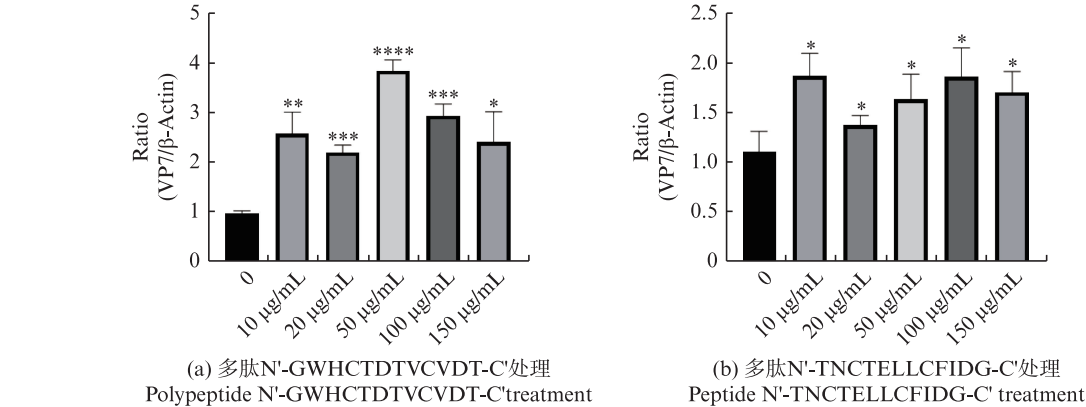


图4 Dot Blot验证分析
Fig. 4 Dot Blot verification analysis

2.6 多肽对病毒复制的影响

将两条多肽序列 N'-GWHCTDTVCVDT-C' 和 N'-TNCTELLCFIDG-C' 梯度稀释后并孵育 CIK 细胞后,观察 GCRV 在细胞中的复制变化,结果显示(图5),多肽 N'-GWHCTDTVCVDT-C'随

着多肽浓度的提高,GCRV 病毒复制呈现出先提升后降低的趋势,但总体上仍是显著促病毒;多肽 N'-TNCTELLCFIDG-C'总体上呈现显著促进病毒复制,但没有明显的浓度依赖性。



柱状图上方含“****”代表差异极显著($P<0.0001$),含“***”代表差异极显著($P<0.001$),含“**”代表差异较显著($P<0.01$);含“*”代表差异显著($P<0.05$)。
The bar chart includes “****” to indicate extremely significant differences ($P<0.0001$), “***” for highly significant differences ($P<0.001$), “**” for relatively significant differences ($P<0.01$), and “*” for significant differences ($P<0.05$).

图5 多肽处理下GCRV复制变化
Fig. 5 Changes in GCRV replication under peptide treatment

2.7 对筛选多肽同源蛋白的预测

通过 NCBI 数据库对筛选出的多肽序列进行比对分析,在草鱼基因文库以及草鱼呼肠孤病毒

基因文库中进行 BLAST 比对,通过对相似性和 E 值的比较筛选出以下 6 种蛋白与 Hsp70 蛋白存在潜在的相互作用(表6)。

表6 Hsp70潜在互作蛋白预测
Tab. 6 Prediction of potential interacting proteins for Hsp70

基因 Gene name	蛋白序列 Peptide sequence	Per.Ident
肿瘤坏死因子受体 Tumor necrosis factor receptor	WHCTDTVCVTCV	94.31%
原纤维蛋白-2b Fibrillin-2b	TNTVCVD	85.71%
草鱼呼肠孤病毒-VP41 GCRV-VP41	TYVCTATVSTM	80%
干扰素诱导的 GTP 酶 Interferon-induced very large GTPase	AEIQELLCFIDKKM	100%
膜结合免疫球蛋白 D Membrane-bound immunoglobulin D	NTSLLCFITGFFPS	85.71%
草鱼呼肠孤病毒-VP2 GCRV-VP2	TWALLCFVSR	80%

3 讨论

在病毒入侵宿主的过程中,宿主蛋白质在免疫反应中发挥着重要作用,参与病毒识别、免疫反应、信号传导和细胞防御等关键过程。部分宿主蛋白通过激活天然免疫系统,诱导干扰素等抗病毒因子抑制病毒复制。研究表明,草鱼在热应激反应下易发生出血病,热休克蛋白家族,尤其是Hsp70,在应对细菌、病毒等免疫原体时发挥重要作用。Hsp70的表达在免疫原刺激下显著增加,既作为分子伴侣参与细胞功能,也作为细胞因子被免疫系统利用^[20-21]。外界诱导的Hsp70不仅作为分子伴侣参与细胞的正常功能,而且还能作为细胞因子被机体的后天免疫以及先天免疫系统所利用^[22-24]。因此,对于Hsp70蛋白的功能的研究是非常必要的。噬菌体展示技术通过高效筛选大量多肽或抗体序列,大大提高了与目标分子高亲和力结合的可能性^[25-26]。为探讨Hsp70在草鱼体内及其在GCRV感染中的作用,本研究首先克隆并纯化Hsp70基因,构建了pET28a-Hsp70重组载体,利用原核表达系统高效表达Hsp70-HIS融合蛋白。SDS-PAGE分析表明,蛋白分子量约为70 ku,与理论预测一致。通过噬菌体展示技术,经三轮筛选,我们获得了两条与Hsp70结合的高重复频率多肽序列:N'-GWHCTDTVCVDT-C'(重复6次)和N'-TNCTELLCFIDG-C'(重复5次)。这些多肽的高重复频率表明它们与Hsp70蛋白可能具有较强的结合能力^[27]。Dot Blot分析验证了这些多肽与Hsp70的相互作用。进一步的多肽孵育实验显示,细胞经筛选后的两条多肽孵育后均能显著促进GCRV病毒的复制。表明这些多肽可能通过抑制Hsp70的抗病毒功能来影响病毒复制^[28]。多肽在病毒生命周期的多个阶段发挥作用,包括病毒入侵宿主细胞、基因组释放、复制调

控及免疫逃逸等,其功能复杂且机制多样。研究表明,多肽可通过多种途径促进病毒入侵宿主细胞。WHITE等^[29]的研究显示,流感病毒血凝素(HA)蛋白中的膜融合多肽在酸性条件下暴露,与宿主细胞膜结合,诱导膜重排并促进病毒基因组的释放。XIA等^[30]的研究证明,ORF8多肽能够抑制宿主的干扰素信号通路,从而增强病毒的复制效率。基于以上研究推测,这些多肽可能在结合过程中干扰宿主细胞的免疫应答,通过免疫逃逸机制为病毒的快速复制提供了条件。在NCBI草鱼和GCRV基因文库中比对分析发现,6组蛋白与这些多肽具有相似性。该结果显示,这些蛋白可能与Hsp70相互作用,揭示Hsp70在草鱼免疫反应中的潜在作用。

肿瘤坏死因子在调节免疫反应、促进炎症发展以及参与组织修复等方面起着至关重要的作用。这种多效的细胞因子通过与其受体结合,进而激活一系列复杂的信号传导过程,而肿瘤坏死因子受体参与机体内的各项生物学功能,如细胞增殖、免疫调节、炎症、细胞死亡和凋亡^[25-26]。但肿瘤坏死因子在硬骨鱼类中的研究相对较少;2019年,相关研究证明了在草鱼细胞的培养液中检测到了肿瘤坏死因子受体的表达,此外,鱼类肿瘤坏死因子受体胞外区的拮抗作用同样支持了受体在限制鱼类的炎症信号转导中发挥着关键的作用^[31-32]。以上研究证实肿瘤坏死因子受体能在草鱼的免疫防御中发挥重要作用。原纤维蛋白是水生动物肌肉中最重要的蛋白之一,主要由肌动蛋白、肌球蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白等组成;其中肌球蛋白主要负责肌肉收缩,具有ATP酶活性;肌动蛋白与肌球蛋白相互作用形成肌结结构;原肌球蛋白和肌钙蛋白则是负责调节肌肉收缩功能。原纤维蛋白在水产品加工、肌肉品质形成、凝胶特性和鱼糜制品等方面起关键作

用。近年来,原纤维蛋白在水生动物中的免疫研究相对较少,2015年,HIONG等^[33]发表的相关研究探究了非洲肺鱼在休眠期间凝血因子和原纤维蛋白的转录和翻译变化,结果表明休眠初期这两类蛋白的表达量上调,可能增强了血液凝固能力;而在休眠维持阶段的表达量下调,可能是为了避免血栓的形成。2021年发表的相关研究中,鉴定并特征化了黑虎虾的原纤维蛋白;结果表明,原纤维蛋白在受到弧菌和白斑综合病感染后出现显著上调;同时重组的原纤维蛋白能够结合并凝集革兰氏阴性和阳性菌,表明其在黑虎虾的先天免疫中起重要作用^[34]。以上研究可推测筛选预测出的原纤维蛋白可能与草鱼中的先天免疫存在一定的关系。干扰素诱导的GTP酶是一类受干扰素调控的GTP结合蛋白,在先天免疫和抗病原体感染过程中发挥重要作用。这类蛋白在水生动物中的研究相对较少,但已有研究表明其在病毒感染、免疫应答和细胞自噬等过程中发挥重要作用。2020年,WANG等^[35]在石斑鱼虹彩病毒(SGIV)感染石斑鱼的相关研究中发现小型GTP酶Rab5c在病毒感染和宿主免疫反应中具有双重功能。Rab5c的表达在SGIV感染后显著增加,敲低Rab5c或过表达其突变体均显著抑制SGIV感染。进一步研究表明,Rab5c的干扰会影响病毒结合、进入以及从早期到晚期内体的转运等关键步骤。而在哺乳动物中,干扰素诱导的GTP酶GBP1被发现对经典猪瘟病毒(CSFV)具有抗病毒活性,其作用依赖于其GTP酶活性。GBP1通过与CSFV的NS5A蛋白相互作用,抑制病毒的翻译效率,从而抑制病毒复制^[36]。以上研究表明干扰素诱导的GTP酶在水生动物的免疫防御中发挥重要作用。膜结合免疫球蛋白是B细胞表面的重要受体,负责识别抗原并启动适应性免疫应答。在水生动物(特别是鱼类)中,在维持免疫稳态和抵御病原体方面发挥关键作用^[37]。近年来,随着分子生物学和免疫学研究的深入,水生动物的膜结合免疫球蛋白结构、功能及其在免疫系统中的作用逐渐被揭示。过去十年间,硬骨鱼类黏膜免疫球蛋白的研究取得了显著进展。研究发现,聚合免疫球蛋白受体(pIgR)在多种硬骨鱼类中被鉴定,并在肠道、鳃、皮肤、口腔和嗅上皮等黏膜部位表达,介导IgM和IgT的跨上皮转运,参与黏膜免疫防御机制^[38]。将筛选得到的

多肽序列与草鱼呼肠孤病毒基因文库比对,发现有两个草鱼呼肠孤病毒基因编码的蛋白与筛选多肽具有相似性,分别为GCRV-VP41和GCRV-VP2。VP41是由草鱼呼肠孤病毒(GCRV)S8节段编码的特有蛋白,属于Ⅱ型草鱼呼肠孤病毒所独有。氨基酸序列分析显示,VP41分子量为41 ku,N端具有一个独特的疏水螺旋跨膜区,这一结构可能与其功能密切相关^[39-40],2017年的研究表明,VP41能与S4节段编码的蛋白相互作用,共同组装病毒工厂^[41],该发现为理解病毒逃逸宿主免疫机制提供了重要线索。VP2是草鱼呼肠孤病毒S2节段编码的结构性蛋白,尽管其生物学功能研究较少,但基因组序列分析表明,VP2是RNA聚合酶的依赖性成分,属于病毒RNA复制复合物的一部分。VP2蛋白内含有多个保守结构域,并且与正呼肠孤病毒λ3蛋白及其他水生呼肠孤病毒的VP2蛋白有约41%的氨基酸序列同一性,这表明GCRV的VP2可能在病毒RNA转录和复制过程中发挥类似MRVλ3蛋白的作用^[42]。

与真核表达系统相比,原核大肠杆菌表达系统具有成本低、操作简便、实验步骤高效以及蛋白表达效率高等优势,因此被广泛应用于体外蛋白的表达和纯化实验^[43]。基于这些特点,本研究选择原核表达系统进行Hsp70蛋白的体外表达和纯化。成功表达的Hsp70蛋白随后被用于噬菌体展示技术的筛选实验。经过多轮筛选,最终获得了两条与Hsp70蛋白具有特异性结合的多肽序列,并通过Dot Blot验证其结合能力。此外,通过多肽药物孵育实验分析,结果显示筛选出的两条多肽能够促进GCRV病毒的复制。这些多肽的筛选不仅为深入研究Hsp70在草鱼免疫过程中的功能及其潜在作用提供了工具,也为后续的功能性研究和应用探索奠定了基础。同时,该研究为进一步探讨Hsp70在草鱼体内及其与草鱼呼肠孤病毒的相互作用机制提供了新的研究思路。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 罗茵.《2020中国渔业统计年鉴》出版广东水产品总产量首次全国第一[J]. 海洋与渔业, 2020(6): 12-13.
LUO Y. 2020 China fishery statistical yearbook [J]. Ocean and Fishery, 2020(6): 12-13.

- [2] 全国水产技术推广总站检疫与病害防治处. 农业部发布《2012年中国水生动物卫生状况报告》[J]. 中国水产, 2013(12): 6-7.
Ministry of Agriculture Releases 2012 China aquatic animal health status report [J]. China Fisheries, 2013 (12): 6-7.
- [3] XU N, SUN W Y, ZHANG H, et al. Effects of temperature on plasma protein binding ratios (PPBRs) of enrofloxacin and ciprofloxacin in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Animals, 2023, 13 (11): 1749.
- [4] 侯国力. 温度调控草鱼呼肠孤病毒(GCRV)致病机理解析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
HOU G L. Pathogenic mechanism of grass carp reovirus (GCRV) regulated by temperature [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
- [5] 龙华. 温度对鱼类生存的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(S1): 254-257.
LONG H. The effect of temperature on fish survival [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2005, 44(S1): 254-257.
- [6] 童娜, 尹晓燕, 李大鹏, 等. 急性热应激对草鱼肾细胞的影响[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(4): 88-92.
TONG N, YIN X Y, LI D P, et al. Effects of acute thermal stress on kidney cell of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(4): 88-92.
- [7] 莫郁坚, 易成琳, 肖扬波, 等. 草鱼 *nrfl* 基因的克隆与表达及其应激响应研究[J]. 水生生物学报, 2024, 48 (3): 461-468.
MO Y J, YI C L, XIAO Y B, et al. Cloning, expression and stress response of *nrfl* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(3): 461-468.
- [8] 王施懿. 草鱼 HSP90 介导 GCRV 感染发病的机理初探 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2022.
WANG S Y. A preliminary study on the mechanism of HSP90-mediated pathogenesis of GCRV infection in grass carp [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2022.
- [9] 倪秦伟, 孙阳, 刘林怡, 等. II 型草鱼呼肠孤病毒在稀有鮡鲫中的传播途径[J]. 水产学报, 2024, 48 (5): 141-150.
NI Q W, SUN Y, LIU L Y, et al. Transmission routes of grass carp reovirus type II in rare minnow *Gobiocypris rarus* [J]. Journal of fisheries of China, 2024, 48(5): 141-150.
- [10] 樊欣, 彭仁. 热休克蛋白 70: 生物学功能与作用机制研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(3): 270-278.
FAN X, PENG R. Heat shock protein 70: biological function and the mechanism for its function [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2019, 31(3): 270-278.
- [11] STEBBING J, SRIVASTAVA P. Heat shock protein - receptor-based pharmacogenomics: the search for new cancer antigens [J]. Pharmacogenomics, 2007, 8 (2): 117-120.
- [12] DAUGAARD M, ROHDE M, JÄÄTTELÄ M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. FEBS Letters, 2007, 581(19): 3702-3710.
- [13] SAIBIL H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(10): 630-642.
- [14] DAS S, LAXMINARAYANA S V, CHANDRA N, et al. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus [J]. Virology, 2009, 385(1): 47-57.
- [15] REYES-DEL VALLE J, CHÁVEZ-SALINAS S, MEDINA F, et al. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells [J]. Journal of Virology, 2005, 79(8): 4557-4567.
- [16] 王欣瑀, 于丽凤, 贾真, 等. 噬菌体展示技术的概况与应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 930.
WANG X Y, YU L F, JIA Z, et al. Overview and application of phage display technology [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2019, 33(10): 930.
- [17] 周菁, 任易, 陈军, 等. 噬菌体展示技术筛选结核分枝杆菌 PPE17 蛋白的特异性结合肽[J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(5): 18-20.
ZHOU J, REN Y, CHEN J, et al. Screening specific binding peptides of *Mycobacterium tuberculosis* PPE17 protein by Phage display technique [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2020, 31(5): 18-20.
- [18] 张帆, 贾昕, 姚红, 等. 噬菌体展示技术筛选人乳腺癌样癌细胞特异性结合肽[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(2): 159-162.
ZHANG F, JIA X, YAO H, et al. Selection of peptide specifically binding to human mammary medullary carcinoma cells by phage display [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2019, 50(2): 159-162.
- [19] 张艺璇. PDCoV 猪源噬菌体单链抗体库的构建及抗 N 蛋白单链抗体的筛选[D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
ZHANG Y X. Construction of porcine PDCoV phage single-chain antibody library and selection of antibody to PDCoV N protein [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021.
- [20] ELIBOL-FLEMMING B, WALDBIESER G C,

- WOLTERS W R, et al. Expression analysis of selected immune-relevant genes in channel catfish during *Edwardsiella ictaluri* infection [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2009, 21(1): 23-35.
- [21] EDER K J, LEUTENEGGER C M, KÖHLER H R, et al. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(1): 182-190.
- [22] MULTHOFF G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70 [J]. International Journal of Hyperthermia, 2002, 18(6): 576-585.
- [23] GABRIELE M. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. 2002 [J]. International Journal of Hyperthermia, 2009, 25(3): 169-175.
- [24] CALDERWOOD S K, GONG J L, THERIAULT J R, et al. Cell stress proteins: novel immunotherapeutics [J]. Novartis Foundation Symposium, 2008, 291: 115-131; discussion 131-140.
- [25] 程星星. 草鱼肿瘤坏死因子受体 15(TNFSF15/TL1A)及其受体 25(TNFRSF25)的进化与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- CHENG X X. Evolution and expression analysis of tumornecrosis factor 15 (TNFSF15/TL1A) and its receptor 25 (TNFRSF25) in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [26] 张胜男. 草鱼肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)和 TNFR2 的分子鉴定和免疫功能研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2018.
- ZHANG S N. Molecular identification and immune function of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in grass carp[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2018.
- [27] LU R H, CHANG Z G, SUN J, et al. Molecular cloning, expression and functional characterization of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-interacting protein (TRIP) in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 406-412.
- [28] 雷文晶, 徐兢, 贾钊, 等. 草鱼抗原加工相关转运蛋白 TAP 的系统进化及其响应细菌和病毒感染的转录表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2025, 34(1): 94-110.
- LEI W J, XU J, JIA Z, et al. Phylogeny of grass carp TAP genes and their expression kinetics in response to bacterial and viral infection [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2025, 34(1): 94-110.
- [29] WHITE J M, WHITTAKER G R. Fusion of enveloped viruses in endosomes [J]. Traffic, 2016, 17(6): 593-614.
- [30] XIA H J, CAO Z G, XIE X P, et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2 [J]. Cell Reports, 2020, 33(1): 108234.
- [31] XU G J, YAN J R, GONG J X, et al. Tumor necrosis factor- α upregulates polymeric immunoglobulin receptor expression by NF- κ B signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) liver cells [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 137: 108745.
- [32] ZHANG S N, WANG X Y, LI C L, et al. Identification and functional characterization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) tumor necrosis factor receptor 2 and its soluble form with potentiality for targeting inflammation [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 86: 393-402.
- [33] HIONG K C, TAN X R, BOO M V, et al. Aestivation induces changes in transcription and translation of coagulation factor II and fibrinogen gamma chain in the liver of the African lungfish *Protopterus annectens* [J]. Journal of Experimental Biology, 2015, 218(23): 3717-3728.
- [34] OANGKHANA P, AMPARYUP P, TASSANAKAJON A, et al. Characterization and functional analysis of fibrinogen-related protein (FreP) in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 109: 87-96.
- [35] WANG L Q, LI C, ZHANG X Y, et al. The small GTPase Rab5c exerts Bi-function in Singapore grouper iridovirus infections and cellular responses in the grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 569505.
- [36] LI L F, YU J H, LI Y F, et al. Guanylate-binding protein 1, an interferon-induced GTPase, exerts an antiviral activity against classical swine fever virus depending on its GTPase activity [J]. Journal of Virology, 2016, 90(9): 4412-4426.
- [37] 陈锋, 黄梦璐, 李家乐, 等. 基于 HRM 技术的草鱼抗小瓜虫 nlr3 基因 SNP 标记开发及关联分析[J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33(1): 1-8.
- CHEN F, HUANG M L, LI J L, et al. Development and association analysis of SNP markers of nlr3 gene in grass carp against *Ichthyophthirius multifiliis* based on HRM technology [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2024, 33(1): 1-8.
- [38] SALINAS I, FERNÁNDEZ-MONTERO Á, DING Y, et al. Mucosal immunoglobulins of teleost fish: a decade of advances[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 121: 104079.
- [39] CHENG L P, FANG Q, SHAH S, et al. Subnanometer-resolution structures of the grass carp reovirus core and virion [J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 382(1): 213-222.
- [40] 孙效迎. 草鱼呼肠孤病毒 VP41 蛋白与包涵体的共定位

- 及其作用研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2019.
- SUN X Y. Colocalization of grass carp reovirus VP41 protein and inclusion body and its role study [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2019.
- [41] LU L F, LI S, WANG Z X, et al. Grass carp reovirus VP41 targets fish MITA to abrogate the interferon response [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(14): e00390-17.
- [42] YAN L M, LIU H, LI X M, et al. The VP2 protein of grass carp reovirus (GCRV) expressed in a baculovirus exhibits RNA polymerase activity [J]. *Virologica Sinica*, 2014, 29(2): 86-93.
- [43] 邬恺正, 王俊亚, 范丁月, 等. 草鱼芳香烃受体 *ahr1a* 基因克隆、表达及进化分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(1): 40-52.
- WU K Z, WANG J Y, FAN D Y, et al. Identification, phylogeny and expression analysis of an aromatic hydrocarbon receptor homologue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(1): 40-52.

Screening and preliminary application of the grass carp heat shock protein Hsp70-interacting peptide

TIAN Xiang¹, HU Guangyao², LYU Liquan¹

(1. *National Aquatic Animal Pathogen Bank, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: Heat shock protein Hsp70 is a molecular chaperone and central regulator in maintenance of cellular homeostasis, which are present within the compartments of almost all organisms and cells and play important roles in promoting protein folding, transport, remodeling, degradation, and other functions. The whole sequence of Hsp70 gene was synthesized in vitro and the prokaryotic expression vector pET28a-Hsp70 was constructed. Using the prokaryotic expression system, the Hsp70-HIS fusion protein was successfully expressed. Peptide sequences that specifically bind to Hsp70 protein by using phage display technology were screened and analyzed by NCBI Blast. SDS-PAGE demonstrated that the Hsp70-HIS fusion protein could be well solubilized in PBS, and the molecular weight of the protein was about 70 kDa. Sequencing of phage spots revealed the presence of two amino acid sequences in the phage display library that can be highly enriched with Hsp70 protein; Dot Blot experiments verified that the two amino acid sequences screened interacted with the Hsp70 protein. In order to uncover the role of screening amino acid sequences, CIK cells were treated with different concentrations of peptides and infected with GCRV virus, and the qPCR results showed that the replication level of GCRV increased significantly after the peptides treatment. Based on the above findings, our homology analysis of the NCBI database revealed the presence of eight groups of proteins in the grass carp genome as well as in the grass carp reovirus genome, and the homology suggests that these proteins may interact with Hsp70. In this study, we screened peptide sequences that could be highly enriched with Hsp70 proteins in phage display libraries using prokaryotic expression system, phage display technology and other technical solutions and verified that, At the same time, homology analysis was performed by NCBI so as to obtain the proteins that may interact with each other, laying a good foundation for the study of the biological effects of Hsp70 involved in the invasion of Hsp70 viruses during heat shock in grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; Hsp70 protein; phage display technology