

石斑鱼虹彩病毒 ORF050 的分子特征和功能初步分析

关丽雅, 黄友华, 蔡佳, 黄晓红, 秦启伟*

(中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要:新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)是导致石斑鱼养殖产业严重经济损失的主要病毒病原之一。SGIV 是大分子 DNA 病毒, 包含 162 个基因开放阅读框, 其中 ORF050 是一个肿瘤坏死因子受体类似物, 可能在 SGIV 的免疫逃避中发挥作用。本研究克隆了 SGIV ORF050 基因, 并构建了全长基因的真核表达重组质粒和四个半胱氨酸富集结构域(CRD)分别缺失的突变体。RT-PCR 和药物抑制实验结果表明, SGIV ORF050 是病毒的一个立即早期基因。亚细胞定位结果表明, 该基因在细胞质内均匀地弥散性分布, 并在细胞核周围聚集; 第一个 CRD 缺失后, 基因的定位发生明显的变化, 即呈点状分布在胞质中, 推测第一个 CRD 对其功能有影响。在过表达 SGIV ORF050 的鱼类细胞中观察 SGIV 感染引起的 CPE, 发现与对照相比没有明显区别; 荧光定量 PCR 检测 SGIV 主要衣壳蛋白 MCP 的转录表达水平, 也没有明显变化, 提示该基因对 SGIV 在宿主细胞内的复制增殖可能没有影响。荧光定量 PCR 检测过表达 ORF050 的细胞在 SGIV 感染后宿主 TNF/TNFR 的转录水平, 结果显示在感染 10 h 后 TNF1、TNF2 和 TNFR2 的表达量升高了 2~3 倍, 而 TNFR1 的表达量没有明显变化, 说明 SGIV 可能通过 ORF050 来调节细胞 TNF 和 TNFR 的表达, 从而逃避宿主的免疫攻击。

关键词:新加坡石斑鱼虹彩病毒; SGIV ORF050; 肿瘤坏死因子受体; 分子特征; 免疫逃避
中图分类号: S 943 **文献标志码:** A

生物体感染病毒时可通过引发的一系列免疫反应或细胞凋亡来抵抗病毒的侵染, 与此同时病毒也发展了一系列的策略来逃避宿主的免疫攻击。一些大 DNA 病毒, 如疱疹病毒、痘病毒等, 能通过编码一些宿主细胞免疫调节蛋白同源类似物来逃避宿主的免疫清除, 如干扰素受体类似物、抗凋亡蛋白 Bcl-2 类似物、肿瘤坏死因子受体类似物等^[1]。

肿瘤坏死因子(TNF)是一类具有生物多效性的促炎症细胞因子, 主要由巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、NK 细胞和 T 细胞分泌, 与细胞表面受体 TNFR1 和 TNFR2 结合, 可引起炎症反应、细胞凋亡、细胞增殖和刺激免疫反应等^[2]。TNFR1 和 TNFR2 均为 I 型跨膜糖蛋白。其中,

TNFR1 在大部分细胞表面表达, 介导了由 TNF α 引起的大多数细胞反应, 如炎症、细胞凋亡、细胞毒性等, 在抗肿瘤和抗病毒感染中发挥重要的作用^[3]。TNFR2 主要在免疫细胞中表达, 与 TNF α 结合可引起细胞增殖、免疫活化等效应^[4]。当机体受到病毒刺激时, 可通过 TNF/TNFR 通路来抵抗其入侵, 相应地, 病毒在不断地与宿主的共同进化中, 也发展了多种途径来阻断 TNF 通路的各个环节, 从而逃避宿主的免疫应答, 如编码可溶性的肿瘤坏死因子受体类似物(vTNFR)、vBcl2、下调细胞表面 TNFR 的表达量、抑制 caspase 的激活、多个阶段调节 NF- κ B、调节线粒体活性等^[5]。越来越多的研究表明, 痘病毒、疱疹病毒等大 DNA 病毒可通过自身编码的 vTNFR 来干扰宿主的免

收稿日期:2013-01-09 修回日期:2013-03-12

资助项目:国家重点基础研究发展计划(2012CB114402);国家自然科学基金项目(30930070)

通信作者:秦启伟, E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

疫系统。它们可以竞争性地与配体 TNF 结合,从而阻断 TNF 通路,抑制宿主细胞的凋亡来帮助病毒在宿主细胞中的复制增殖^[6-7]。黏液瘤病毒的肿瘤坏死因子受体同源物 T2 基因(M-T2)编码了一个早期的糖蛋白,可结合兔 TNF,其结合亲和力与兔 TNFR 相当^[8]。M-T2 是黏液瘤病毒的一个重要的毒力基因,缺失了该基因的病毒表现出明显的毒力下降^[9]。M-T2 可抑制病毒感染的 T 细胞的凋亡,也可抑制兔 TNF 介导的细胞毒性^[10-11]。牛痘病毒编码了 4 个 vTNFR,分别是 CrmB(细胞因子反应调节蛋白,Crm),CrmC,CrmD 和 CrmE,它们与细胞 TNFR 都有一定的序列相似性,在配体结合特异性、表达模式和分布上各有差异,可与 TNF 结合,抑制 TNF 介导的溶细胞作用^[12-15]。其中,CrmB 和 CrmD 可结合 TNF 和 LT- α 。同样是大 DNA 病毒,一些虹彩病毒的基因组中也编码了一个或多个肿瘤坏死因子受体类似物,如石斑鱼虹彩病毒、淋巴囊肿病毒等^[16-19]。然而,到目前为止,这些虹彩病毒编码的 TNFR 在病毒感染过程中发挥了怎样的功能还不清楚^[20-21]。

新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus,SGIV)是从养殖石斑鱼中分离到的一种高致病性病原,可导致石斑鱼死亡率达 90% 以上,给石斑鱼养殖产业带来了严重的经济损失。目前 SGIV 的分类鉴定、全基因组测序与注释、转录组和蛋白质组分析以及快速检测方法等相关基础研究已经完成,对 SGIV 重要功能基因的研究正陆续展开,但对病毒免疫逃避机制的研究甚少^[16,22-23]。基因组生物信息学分析表明,SGIV 编码 3 个 TNFR 类似物基因,分别是 ORF050、ORF051 和 ORF096,它们与人、鼠等其他物种的 TNFR 有较高的同源性,因此推测这 3 个基因可能是病毒编码的免疫调节蛋白,在 SGIV 感染鱼类细胞的免疫逃避中发挥一定的作用。本实验从 SGIV 基因组中克隆了 ORF050 基因,并进行了转录时序分析、亚细胞定位、对病毒复制的影响以及对石斑鱼 TNF、TNFR 基因的调控分析,为揭示 SGIV 感染致病的分子机理提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

新加坡石斑鱼虹彩病毒(SGIV)为本实验室

从患病的石斑鱼中分离鉴定^[22]。石斑鱼脾细胞(GS)用来扩增病毒。肥头鲤细胞(FHM)用来检测细胞凋亡。细胞培养,病毒的扩增以及病毒核酸的制备按本实验室常规方法进行。

1.2 生物信息学分析及进化树构建

选用在线软件 SMART 和 TMHMM 对 SGIV ORF050 相应的氨基酸序列进行保守结构域、跨膜区和信号肽预测;对 ORF050 的核苷酸序列使用在线 Blastx(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源性搜索;选择其他鱼类、小鼠、人和一些大 DNA 病毒的 TNFR 氨基酸序列,包括石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus, AAV91052.1)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, NP_001158656.1)、鲑鱼(*Salmo salar*, NP_001135338.1)、小家鼠(*Mus musculus*, NP_849262.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, XP_001922492.3)、人(*Homo sapiens*, AAB58354.1)和牛痘病毒(cowpox virus, CAC15562.1),用软件 ClustalX 进行比对,并用 GenDoc 编排;用 ClustalX 结合 Mega5 进行进化树的构建。

1.3 PCR 扩增与重组质粒构建

根据 SGIV ORF050 基因的核苷酸序列(GenBank accession number: YP_164145.1),设计相应的特异引物(表 1),以 SGIV 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。为了检测 SGIV ORF050 的 4 个功能结构域 CRD 对基因亚细胞定位的影响,根据保守结构域预测的结果,分别设计 CRD 缺失突变引物,并用重叠延伸 PCR 技术分别从 SGIV 基因组 DNA 中扩增出 CRD 缺失突变体。

载体质粒分别为真核表达载体 pEGFP-N3、pcDNA3.1。用 PCR 回收试剂盒(AXYGEN AxyPrep PCR Cleanup Kit)回收 PCR 扩增片段,用相应的限制性内切酶分别双酶切 PCR 回收产物和质粒,T4 连接酶 16 °C 连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞,37 °C 培养过夜。菌落 PCR 鉴定,阳性克隆送交公司测序。构建成功的重组质粒分别命名为 pEGFP-ORF050, pEGFP- Δ CRD1, pEGFP- Δ CRD2, pEGFP- Δ CRD3, pEGFP- Δ CRD4, pcDNA-ORF050。

1.4 反转录 PCR(RT-PCR)和药物抑制实验

采用 RT-PCR 的方法对 SGIV ORF050 基因的转录时序进行分析。分别在病毒感染 2、4、6、10、16、24、36 和 48 h 后收取细胞,用 SV Total RNA Isolation Kit(Promega)提取细胞总 RNA,根

据 SGIV ORF050 的序列设计 RT-PCR 引物(表 1),RT-PCR 后琼脂糖凝胶电泳检测 ORF050 基因在病毒感染后的转录情况, β -actin mRNA 作为内参。同时采用放线菌酮(CHX)和阿糖胞苷(AraC)2 种药物进行药物抑制实验。前者是蛋

白从头合成抑制剂,后者是 DNA 合成抑制剂。病毒感染 6 h 后,收取 CHX 处理组细胞和对照组细胞;病毒感染 48 h 后,收取 AraC 处理组细胞和对照组细胞,提取总 RNA,RT-PCR 检测 ORF050 基因的转录情况。

表 1 实验中所用到的引物
Tab.1 Primers for PCR analysis

名称 name	引物序列 primer sequence	用途 usage
P1	5'- TTCGAATTCAATAACCATGTTACAGACTGT-3'(Xho I)	构建 pEGFP-ORF050
P2	5'- TATCGGATCCCAATATATTGAAGTAGGGGC-3'(EcoR I)	
P3	5'- AGGACACGTCTTACAATTTTCGCGTTAATAACGGC-3'	构建 pEGFP- Δ CRD1
P4	5'-GCGAAAATTGTGAAGACGTGTCCTCGCGCCACAT-3'	
P5	5'-TTCGGCATGTGCCGTCTTGCATCGCGTCCCGT-3'	构建 pEGFP- Δ CRD2
P6	5'-CGATGCAAGACGGCACATGCCGAAGGATACTATTGC-3'	
P7	5'-GCCGCATTTCTCATGTGCGCACTTGGTATTTGTAGA-3'	构建 pEGFP- Δ CRD3
P8	5'-AAGTGCACATGAGAAATGCGGCAAAGGTACTTAT-3'	
P9	5'-TTTGCTCGTGACTTTCTCGCACACGTAGTTGCGGT-3'	构建 pEGFP- Δ CRD4
P10	5'-GTGTGCGAGAAAGTCACGAGCAAATTTGGACTGTT-3'	
P11	5'- CGCGGATCCATGTTACAGACTGTTGTGGTTTTG-3'(BamH I)	构建 pcDNA-ORF050
P12	5'- TTCGAATCCAATATATTGAAGTAGGGGC-3'(Xho I)	
P13	5'- GAACTGAAACCGCAAATA-3'	RT-PCR
P14	5'- GATCGCCACGGAACATA-3'	

1.5 亚细胞定位

将含重组质粒 pEGFP-ORF050, pEGFP- Δ CRD1, pEGFP- Δ CRD2, pEGFP- Δ CRD3, pEGFP- Δ CRD4 的大肠杆菌 DH5 α 分别接种到含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。用质粒提取试剂盒(Endo-free plasmid Mini Kit II, OMEGA)提取重组质粒。

使用脂质体 LipofectamineTM2000 试剂(Invitrogen)按说明书步骤将上述重组质粒转染 GS 细胞,转染 48 h 后,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h,核染料 DAPI 染色封片后荧光显微镜下观察荧光的分布并拍照。

1.6 SGIV ORF050 对病毒复制的影响

采用观察细胞病变效应(CPE)及荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SGIV 主要衣壳蛋白 MCP 的转录水平的方法,来研究过表达 ORF050 对 SGIV 复制的影响。

按照步骤 1.5,提取 pcDNA-ORF050 重组质粒,转染 GS 细胞和 FHM 细胞。转染 24 h 后加入 SGIV(MOI=1),感染 24 和 48 h 后光学显微镜下观察 CPE 并拍照;收取细胞样,提取总 RNA, qRT-PCR(LightCycler480, Roche)检测 SGIV

MCP 基因的转录水平变化。用石斑鱼 18S 基因作为内参计算基因 mRNA 的相对表达量,每个样品重复 4 次,并用 SPSS 16.0 软件进行 *t*-test 差异显著性分析。

1.7 SGIV ORF050 对宿主 TNF 及 TNFR 的调控

按照上述步骤,把 pcDNA-ORF050 重组质粒转染 GS 细胞,转染 24 h 后加入 SGIV(MOI=1),感染 10 和 24 h 后收样提取总 RNA, qRT-PCR 检测石斑鱼 TNF1、TNF2、TNFR1、TNFR2 基因的转录水平变化。结果以与 pcDNA3.1 空载体对照细胞的倍数显示。每个样品重复 4 次,并用 SPSS 16.0 软件进行 *t*-test 差异显著性分析。

2 结果

2.1 SGIV ORF050 的序列特征、同源性分析和进化分析

用 P1/P2 引物成功从 SGIV 基因组中扩增出 ORF050 基因,送交测序后结果表明,ORF050 全长 660 bp,编码 220 个氨基酸,推定分子量为 23.4 ku。蛋白结构域预测分析表明,SGIV ORF050 含有 4 个保守的 TNFR 功能结构域——半胱氨酸富

集结构域(CRD),在 N 端有信号肽,在 C 端有跨膜区。

Blast 分析表明,SGIV ORF050 编码的基因和斑马鱼、鲑鱼、人及小鼠的 TNFR 的同源性大于 30%;和痘科病毒成员编码的 CrmE 的同源性为 31%(表 2)。氨基酸序列比对的结果显示,同源

性主要集中在 N 端,具有保守的半胱氨酸残基,而 C 端的氨基酸几乎没有同源性(图 1)。

用 Mega5 中的 Neighbor-Joining 方法构建 SGIV ORF050 的系统进化树,从进化树上可以看出,SGIV ORF050 与石斑鱼虹彩病毒(grouper iridovirus)的亲缘关系最近(图 2)。

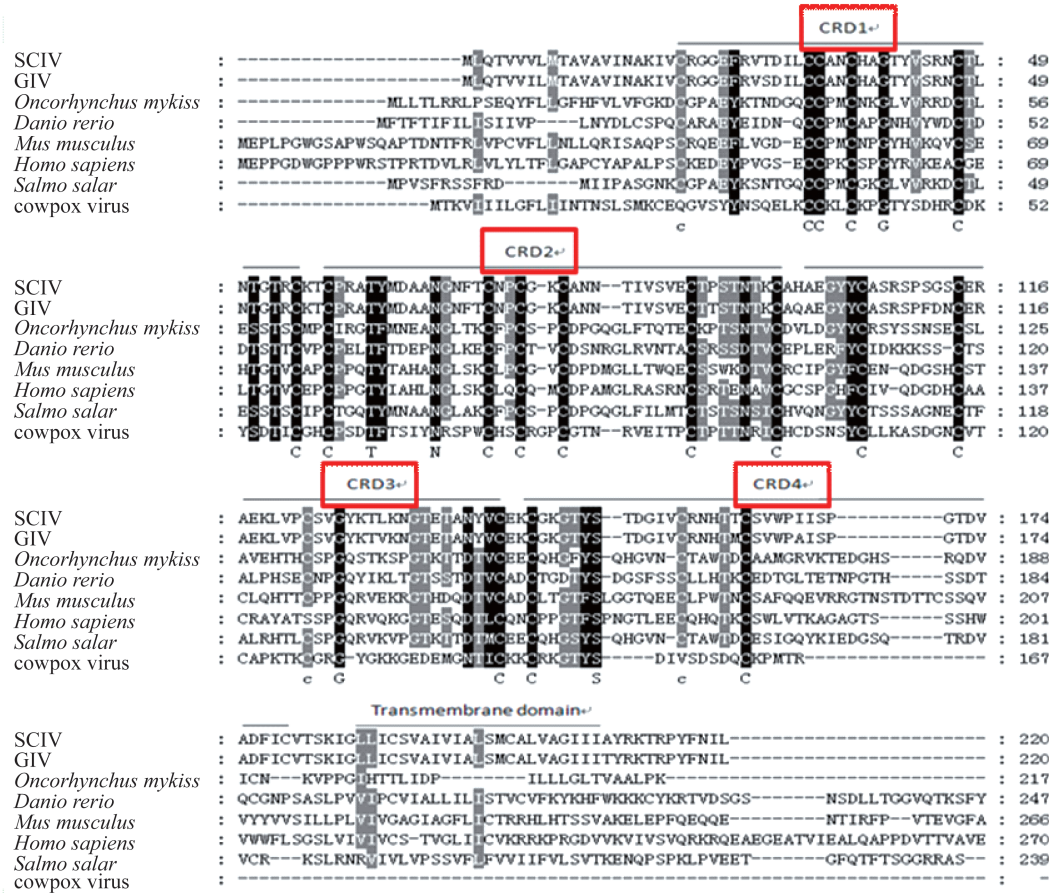


图 1 SGIV ORF050 与人、鼠、鱼及痘科病毒的 TNFR 氨基酸序列比对

在所有物种中完全保守的氨基酸残基用黑色表示;CRD:半胱氨酸富集结构域。

Fig.1 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of SGIV ORF050 protein with TNFRs of other species

Complete conserved residues across all species aligned were shaded in black. CRD:Cysteine-rich domain.

表 2 SGIV ORF050 与其它物种的 TNFR 氨基酸序列的同源性比对

Tab.2 The amino acid sequence identities of SGIV ORF050 with TNFRs from other species

物种 species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	同源性/% identity
石斑鱼虹彩病毒 grouper iridovirus	AAV91052.1	95
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001158656.1	35
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	XP_001922492.3	31
鲑鱼 <i>Salmo salar</i>	NP_001135338.1	30
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_849262.1	32
人 <i>Homo sapiens</i>	AAB58354.1	29
牛痘病毒 cowpox virus	CAC15562.1	31

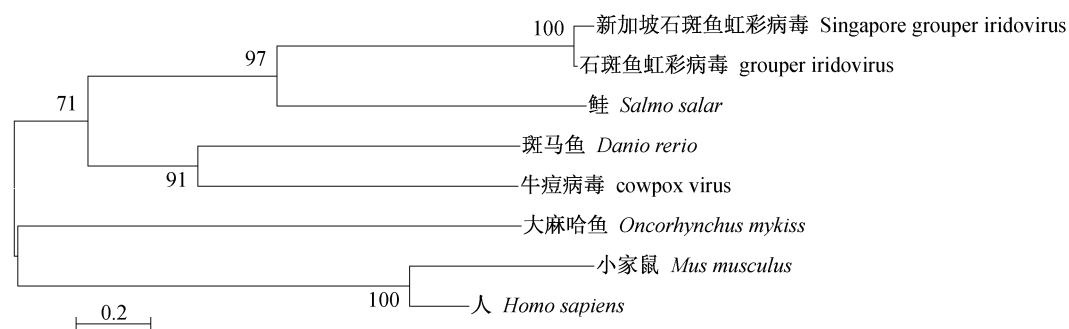


图 2 基于 Neighbor-Joining 方法构建的 SGIV ORF050 系统进化树

Fig 2 Phylogenetic analysis of SGIV ORF050 with other reported TNFRs

2.2 SGIV ORF050 的转录时序分析

为了分析 SGIV ORF050 基因的转录时序,收取病毒感染不同时间段的 GS 细胞,提取总 RNA 后进行 RT-PCR 检测。结果表明,ORF050 基因在 SGIV 感染 2 h 后开始转录,并随着感染时间的

延长转录本增加(图 3-a)。同时采用蛋白合成抑制剂 CHX 和 DNA 合成抑制剂 AraC 进行药物抑制实验。如图 3-b 所示,ORF050 基因的转录本在 CHX 和 AraC 存在和不存在的条件下都能检测到,表明 ORF050 是一个立即早期基因。

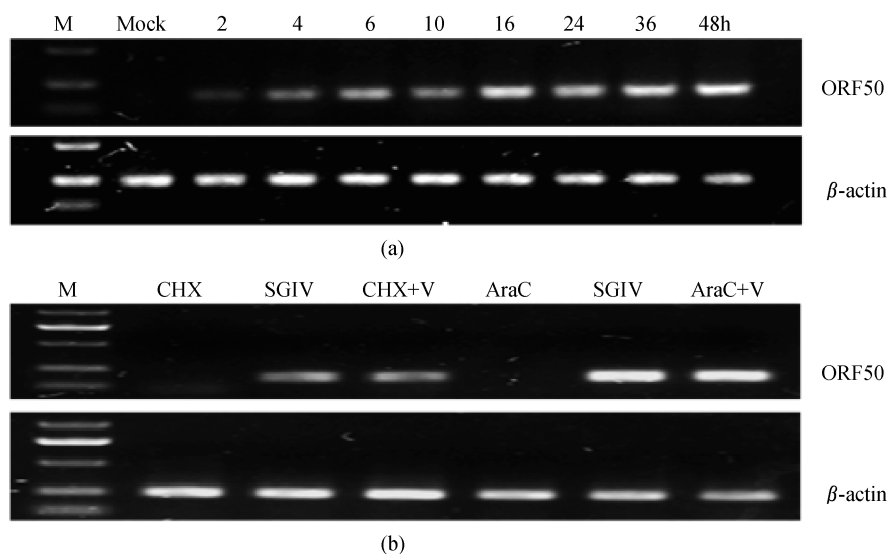


图 3 ORF050 基因在 SGIV 感染 GS 细胞中的转录时序分析

(a) RT-PCR 分析 ORF050 基因在 SGIV 感染不同时间点的转录情况。 β -actin 基因作为内参; (b) 药物抑制实验分析 ORF050 基因在药物处理下的转录情况。CHX:蛋白合成抑制剂; AraC:DNA 合成抑制剂。

Fig. 3 Transcriptional analysis of ORF050 gene in SGIV infected GS cells

(a) RT-PCR analysis of the mRNA transcript of ORF050 gene in different SGIV infection time points. β -actin gene was amplified as an internal control; (b) Drug inhibition analysis of the mRNA transcript of ORF050 gene under drug treatment. CHX: protein synthesis inhibitor; AraC: DNA synthesis inhibitor.

2.3 SGIV ORF050 的亚细胞定位

将真核质粒 pEGFP-ORF050, pEGFP- Δ CRD1, pEGFP- Δ CRD2, pEGFP- Δ CRD3, pEGFP- Δ CRD4 转染 GS 细胞后,固定制片,荧光显微镜下观察。结果显示,pEGFP-ORF050 转染的细胞中,绿色荧光聚集在细胞核周围形成一圈

较亮的荧光,并且在细胞质内均匀地弥散性分布;在 pEGFP- Δ CRD2、pEGFP- Δ CRD3、pEGFP- Δ CRD4 转染的细胞中,绿色荧光的分布与 ORF050 全长融合蛋白的分布一致,而在 pEGFP- Δ CRD1 转染的细胞中,绿色荧光主要呈点状分布在胞质中,同时在胞质内还有弥散分布(图 4)。

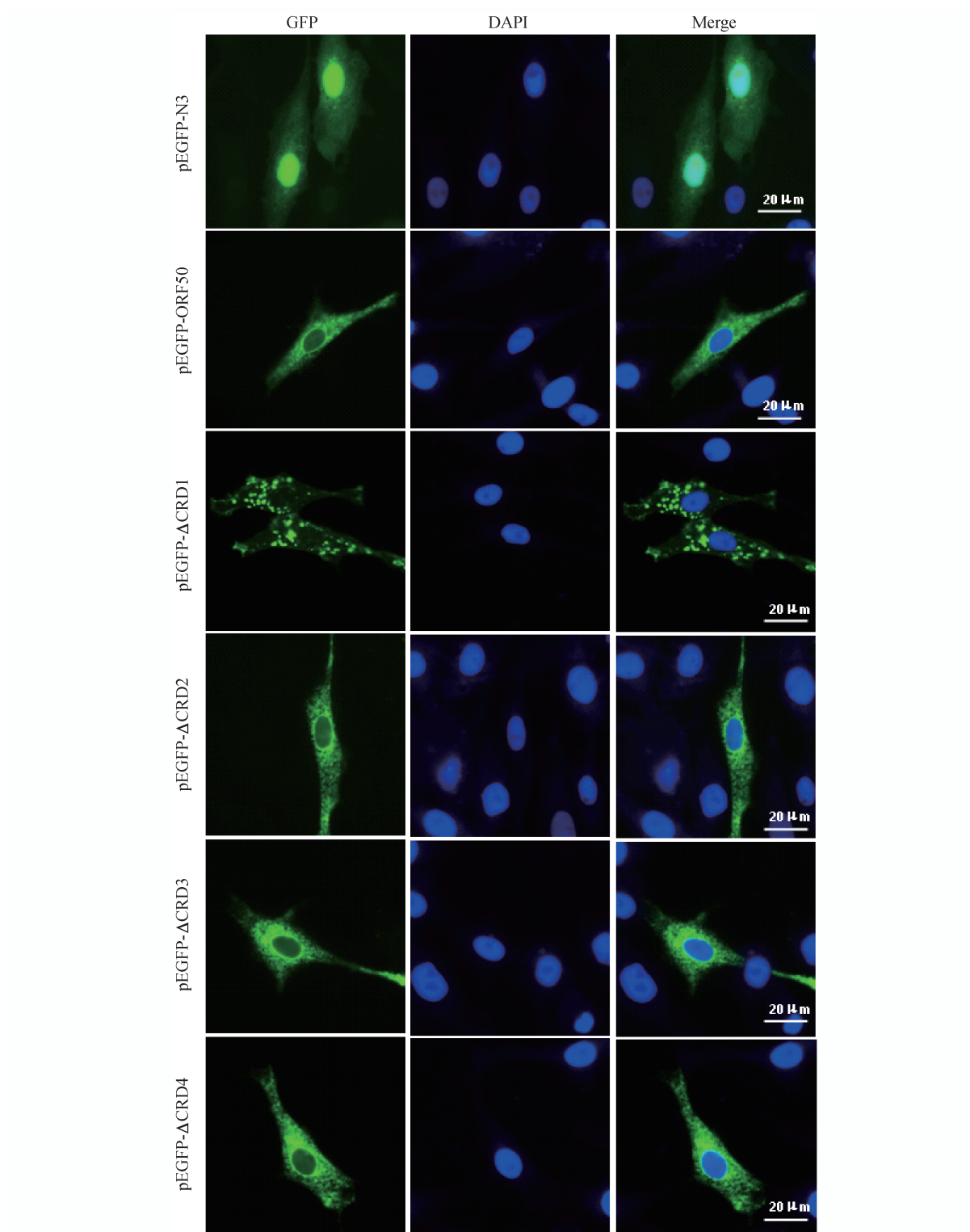


图4 ORF050 全长及其四个 CRD 缺失突变体的亚细胞定位

pEGFP-N3:空载体对照;pEGFP-ORF050:全长基因重组载体;pEGFP- Δ CRD1、pEGFP- Δ CRD2、pEGFP- Δ CRD3、pEGFP- Δ CRD4:分别缺失第一、二、三、四个 CRD 的缺失突变体重组载体;GFP:绿色荧光蛋白;DAPI:细胞核染料。

Fig. 4 Intracellular localization of SGIV ORF050 fusion protein and four CRD deletion mutants in GS cells

pEGFP-N3:empty vector control;pEGFP-ORF050:recombinant vector containing full length gene;pEGFP- Δ CRD1,pEGFP- Δ CRD2,pEGFP- Δ CRD3,pEGFP- Δ CRD4:recombinant vectors containing four Cysteine-rich Domain (CRD) deletion mutants;GFP:green fluorescence protein;DAPI:nucleus dye.

2.4 ORF050 对 SGIV 复制的影响

将 pcDNA-ORF050 重组质粒转染 GS 细胞和 FHM 细胞,感染 SGIV 24 和 48 h 后光学显微镜观察出现的 CPE 情况,同时收取平行样品对 SGIV MCP 基因的表达情况进行 qRT-PCR 分析。

结果显示,在 FHM 和 GS 细胞中过表达 ORF050 并不能显著抑制或促进 SGIV 感染引起的 CPE 现象,对 SGIV 主要衣壳蛋白 MCP 基因的转录水平也没有明显的影响 ($P > 0.05$) (图 5),表明 ORF050 可能对 SGIV 的复制增殖不起重要作用。

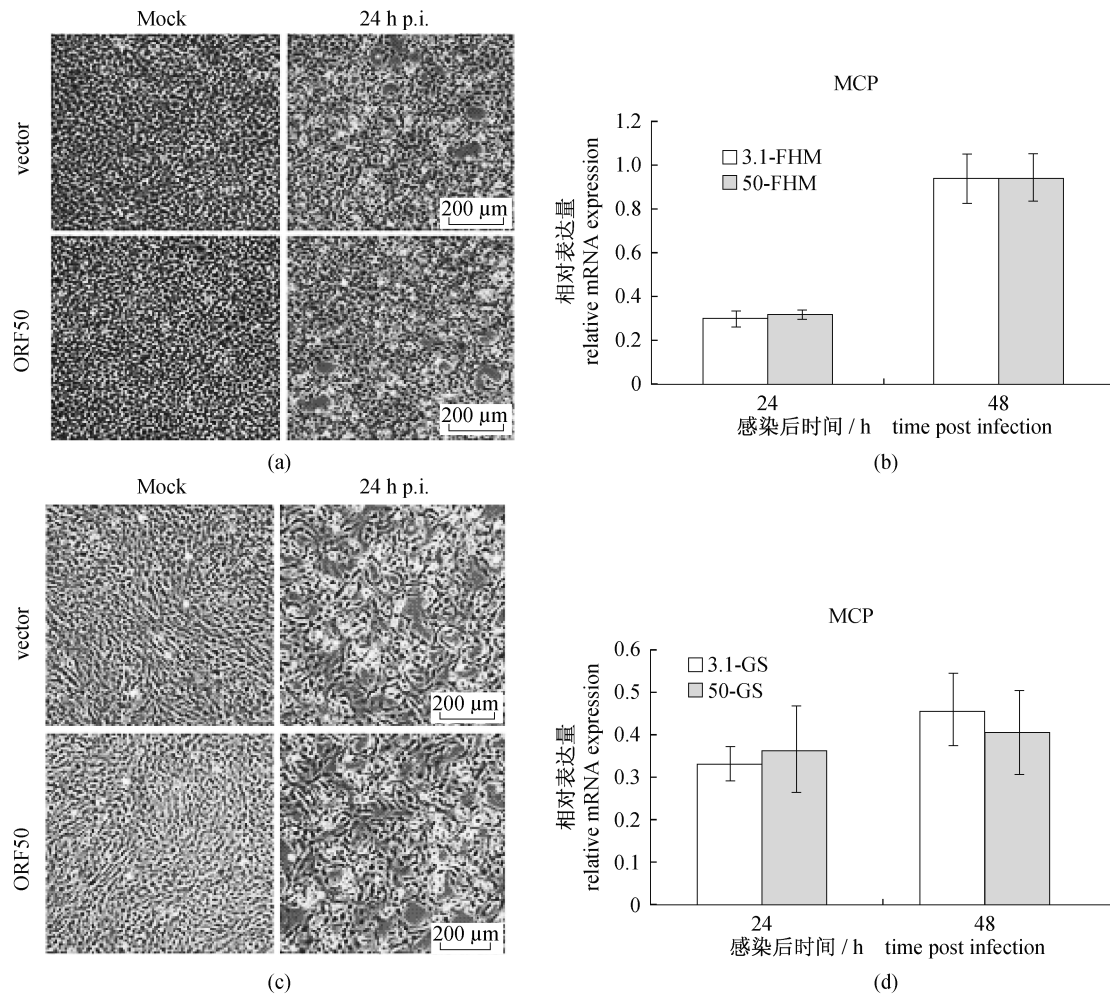


图 5 过表达 ORF050 的细胞中由 SGIV 感染引起的 CPE 及 SGIV MCP 基因的 mRNA 相对表达量 (a,c)过表达 ORF050 的 FHM 细胞和 GS 细胞中由 SGIV 感染引起的 CPE 现象;(b,d)过表达 ORF050 的 FHM 细胞和 GS 细胞中 SGIV MCP 基因的 mRNA 相对表达量。石斑鱼 18S 基因作为内参。

Fig. 5 CPE induced by SGIV infection in ORF050-expressing cells and relative mRNA expression level of SGIV MCP gene

(a,c) Phase microscopy observation of SGIV infection induced CPE in ORF050-expressing FHM cells, GS cells and control cells. (b, d) Relative mRNA expression level of SGIV MCP gene in ORF050-expressing FHM cells, GS cells and control cells. Grouper 18S gene was amplified as an internal control.

2.5 ORF050 对宿主 TNF 及 TNFR 的调控

将 pcDNA-ORF050 重组质粒转染 GS 细胞 24 h 后,感染 SGIV,10 和 24 h 后收取细胞样,对石斑鱼 TNF 和 TNFR 基因的转录情况进行 qRT-PCR 分析。结果显示,ORF050 过表达在 SGIV 感染 10 h 后能明显上调 TNF1、TNF2 以及 TNFR2 基因的转录水平

($P < 0.05$),其中 TNF1 上调了 2.3 倍,TNF2 上调了 3.3 倍,TNFR2 上调了约 2 倍;在感染 24 h 后这 3 个基因的转录都持续增加,但是与对照相比,上调的倍数减少(图 6-a,b,d)。而 TNFR1 的转录水平只有微小的上调,约为对照的 1.2 倍($P > 0.05$),并在感染 24 h 后转录水平下降(图 6-d)。

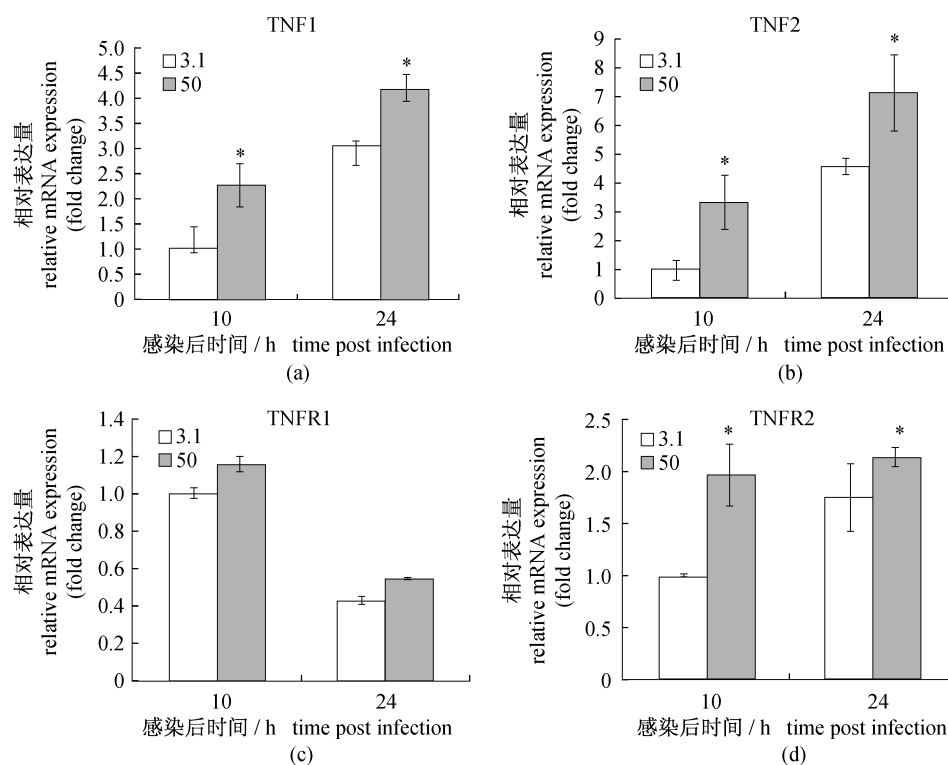


图6 过表达 ORF050 的 GS 细胞中 SGIV 刺激后石斑鱼 TNF、TNFR 的表达

石斑鱼 18S 基因作为内参。* 代表差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 TNF and TNFR mRNA expression levels in SGIV infected ORF050-expressing GS cells

Grouper 18S gene was amplified as an internal control. * represents significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

TNF 和 TNFR 是免疫系统的重要成分,通过刺激免疫反应和诱导感染细胞的凋亡来控制病毒的感染。TNFR 超家族成员都是 I 型跨膜蛋白,其最主要的特征是在胞外 N 端含有 2~6 个半胱氨酸富集结构域(CRD),约 40 个氨基酸,CRD 是与配体 TNF 特异性结合、行使功能的结构域^[5]。生物信息学分析显示,SGIV ORF050 含有 4 个保守的 CRD,结构与包括 TNFR1、TNFR2 在内的大多数 TNFR 超家族成员相似,与其他物种的 TNFR 超家族成员 14 基因有 30%~36% 的同源性,与牛痘病毒编码的 TNFR 类似物 CrmE 的同源性为 31%。CrmE 可结合人、小鼠和大鼠的 TNF,阻断 TNF 与细胞表面受体 TNFR 的结合^[24]。这预示着 SGIV ORF050 可能编码了一个 TNFR 类似物,行使着与细胞 TNFR 类似的功能。

虹彩病毒的基因根据转录的先后顺序可以分为 3 个时期:立即早期(immediate-early, IE)、早期(early, E)和晚期(late, L)^[25]。IE 基因的转录出

现在病毒 DNA 复制之前,即病毒感染后 1~2 h 内,其表达不依赖病毒蛋白的合成,因此在蛋白合成抑制剂如放线菌酮(CHX)存在下仍能表达。对 SGIV ORF050 的转录时序进行 RT-PCR 和药物抑制实验分析,结果都表明了 ORF050 是病毒的一个立即早期基因。黏液瘤病毒的 M-T2 基因在感染早期表达^[9],而牛痘病毒的 CrmB, CrmC 和 CrmD 分别在感染的早期、晚期和晚期表达^[12-14],并发挥着相似又不完全一样的功能。病毒的立即早期基因主要编码转录因子、调节因子等,在调控病毒基因表达、宿主细胞基因表达、调控细胞凋亡、调节宿主免疫反应等方面具有重要功能。与牛痘病毒的 vTNFR 相似,ORF050 基因也在病毒感染早期表达,是 SGIV 的一个立即早期基因,这为 ORF050 可能具有与牛痘病毒的 vTNFR 相似的功能提供了进一步的证明。

病毒蛋白在细胞内的定位可以为其功能研究提供非常有用的线索。通过体外转染 ORF050 全长和 4 个 CRD 缺失突变体的 GFP 融合蛋白,观察绿色荧光的分布来研究 ORF050 的细胞定位。

结果显示,缺失第 1 个 CRD 后,绿色荧光呈点状分布在胞质中,不同于 ORF050 全长的在细胞质内均匀地弥散性分布;而第 2、3、4 个 CRD 缺失突变体的绿色荧光分布没有发生变化,推测第 1 个 CRD 对 ORF050 蛋白在细胞内的定位起着至关重要的作用。CRD 是 TNFR 家族成员行使功能的重要结构域,对黏液瘤病毒 M-T2 的研究发现,M-T2 有两个功能:细胞外 TNF 抑制作用,能特异性抑制兔 TNF,需要前三个 CRD;细胞内凋亡抑制作用,能抑制病毒感染的 CD4 + T 细胞的凋亡,需要前两个 CRD^[10]。缺失第一个 CRD 后,ORF050 基因在细胞内的定位发生了明显变化,推测第 1 个 CRD 不仅对 ORF050 的分布有影响,也可能对基因的功能有影响。牛痘病毒编码的 TNFR 类似物 CrmB、CrmC、CrmD、CrmE,被证明是可溶的分泌蛋白,它们可以分泌到细胞外,与 TNF 结合,抑制 TNF 介导的溶细胞作用^[12-14,24]。SGIV ORF050 的 GFP 融合蛋白聚集在细胞核周围,形成一圈较亮的荧光,同时在细胞质中均匀地弥散性分布,推测其分布在内质网上,并锚定在细胞核膜上。至于 ORF050 是否是分泌蛋白,是否发挥与牛痘病毒 vTNFR 相似的作用,还有待进一步的实验验证。

之前的研究报道指出,痘病毒的 TNFR 类似物可以抑制病毒感染引起的 T 淋巴细胞凋亡,并能抑制 TNF 介导的溶细胞作用^[15,26]。在过表达 ORF050 的 FHM 细胞和 GS 细胞中感染 SGIV,观察出现的 CPE,并通过 qRT-PCR 检测 SGIV 主要结构蛋白 MCP 基因的转录变化。结果显示,和对照相比,过表达 ORF050 并不能明显抑制或促进病毒感染引起的 CPE,SGIV MCP 的转录表达量也与对照一致,推测 SGIV ORF050 对病毒的增殖复制没有明显的影响。之前的研究发现,把黏液瘤病毒的 T2 基因插入失活后,虽然病毒能够正常生长,但病毒的毒力大大下降^[9];在不编码 vTNFR 的牛痘病毒株 WR 中表达 CrmE,病毒的毒力得到了增强^[15]。SGIV ORF050 对病毒的增殖复制没有明显的影响,表明其可能是病毒的一个非必须基因,参与了病毒的免疫调节;或者可能对病毒的毒力产生一定的影响;又或者与 SGIV 的另外 2 个 vTNFR,ORF051 和 ORF096 共同作用,来影响病毒的增殖和感染。

应用 qRT-PCR 在过表达 ORF050 的 GS 细胞

中检测 SGIV 刺激后宿主 TNF/TNFR 基因的转录水平,结果表明,ORF050 能明显上调 TNF1、TNF2 以及 TNFR2 的表达,但对 TNFR1 的表达影响不大,这与前面得出来的实验现象——过表达 ORF050 对病毒感染引起的 CPE 现象没有明显影响一致。因为 TNFR1 被认为参与了大多数由 TNF 介导的细胞反应,如细胞凋亡、炎症反应等,而 TNFR2 则与细胞增殖有关^[27]。另外,有文献报道 TNFR2 可能发挥着把 TNF 传递给 TNFR1 的作用^[28]。在 Jurkat 细胞中表达 M-T2 蛋白并不能改变细胞表面和细胞内的 TNFR1 和 TNFR2 的表达水平,但是能与 TNFR1 形成复合物,抑制 TNFR1 介导的细胞凋亡^[29]。在天花病毒感染的细胞中并不能检测到 TNFR 和 TNFR 信号分子基因的表达变化,说明天花病毒运用了一种非转录和非翻译策略来抑制 TNF 通路^[30]。对 SGIV 之前的研究表明,SGIV 感染非宿主细胞 FHM 细胞能引起典型的细胞凋亡(apoptosis),而在宿主细胞 GS 细胞中则引起非凋亡程序性细胞死亡(nonapoptotic programmed cell death)^[31]。ORF050 不能显著影响宿主 TNFR1 的表达水平,可能通过其他方式,如与 TNFR1 形成抑制复合物,来影响 TNF 通路。SGIV 可能通过 ORF050 调控细胞的 TNF 和 TNFR,达到逃避宿主免疫攻击的目的。至于 ORF050 是否能抑制 SGIV 感染引起的细胞凋亡,是否需要与 SGIV 的另外 2 个 TNFR 类似物共同作用,SGIV 是否利用 vTNFR 来调控宿主 TNF-TNFR 信号通路,还有待进一步的研究。本研究为揭示 SGIV 与宿主细胞相互作用的分子机制,阐明 SGIV 的致病机理奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] Johnston J B, McFadden G. Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77 (11): 6093 - 6100.
- [2] Goetz F W, Planas J V, Mackenzie S. Tumor necrosis factors [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(5): 487 - 497.
- [3] Wiegmann K, Schütze S S, Kampen E, et al. Human 55-kDa receptor for tumor necrosis factor coupled to signal transduction cascades [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (25): 17997 - 18001.

- [4] Grell M, Becke F M, Wajant H, *et al.* TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1 [J]. *European Journal of Immunology*, 1998, 28 (1) : 257 - 263.
- [5] Rahman M M, McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens [J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2 (2) : e4.
- [6] Herbein G, O'Brien W A. Tumor necrosis factor (TNF) - α and TNF receptors in viral pathogenesis [J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 2000, 223 (3) : 241 - 257.
- [7] Seet B T, Johnston J B, Brunetti C R, *et al.* Poxviruses and immune evasion [J]. *Annual Review of Immunology*, 2003, 21 : 377 - 423.
- [8] Schreiber M, Rajarathnam K, McFadden G. Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNF alpha, but the dimer is a more potent TNF inhibitor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (23) : 13333 - 13341.
- [9] Upton C, Macen J L, Schreiber M, *et al.* Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence [J]. *Virology*, 1991, 184 (1) : 370 - 382.
- [10] Schreiber M, Sedger L, McFadden G. Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71 (3) : 2171 - 2181.
- [11] Sedger L, McFadden G. M-T2: A poxvirus TNF receptor homologue with dual activities [J]. *Immunology & Cell Biology*, 1996, 74 (6) : 538 - 545.
- [12] Hu F Q, Smith C A, Pickup D J. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor [J]. *Virology*, 1994, 204 (1) : 343 - 356.
- [13] Smith C, Hu F Q, Smith T D, *et al.* Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha [J]. *Virology*, 1996, 223 (1) : 132 - 147.
- [14] Loparev V N, Parsons J M, Knight J C, *et al.* A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (7) : 3786 - 3791.
- [15] Reading P C, Khanna A, Smith G L. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence [J]. *Virology*, 2002, 292 (2) : 285 - 298.
- [16] Song W J, Qin Q W, Qiu J, *et al.* Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (22) : 12576 - 12590.
- [17] Zhang Q Y, Xiao F, Xie J, *et al.* Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (13) : 6982 - 6994.
- [18] Tsai C-T, Ting J W, Wu M H, *et al.* Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses [J]. *Journal of Virology*, 2005, 79 (4) : 2010 - 2023.
- [19] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus [J]. *Virology*, 1997, 230 (2) : 207 - 216.
- [20] Essbauer S, Fischer U, Bergmann S, *et al.* Investigations on the ORF 167L of lymphocystis disease virus (< i> Iridoviridae) [J]. *Virus Genes*, 2004, 28 (1) : 19 - 39.
- [21] 黄友华, 孙伟, 张奇亚. 淋巴囊肿病毒中国株 TNFR 类似物的原核表达与结构分析 [J]. *中国病毒学*, 2005, 20 (6) : 652 - 655.
- [22] Qin Q W, Chang S F, Ngoh-Lim G H, *et al.* Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53 (1) : 1 - 9.
- [23] Teng Y, Hou Z, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Virology*, 2008, 377 (1) : 39 - 48.
- [24] Saraiva M, Alcamí A. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75 (1) : 226 - 233.
- [25] Chinchar V G. Ranaviruses (family Iridoviridae) : emerging cold-blooded killers [J]. *Archives of Virology*, 2002, 147 (3) : 447 - 470.
- [26] Macen J L, Graham K A, Lee S F, *et al.* Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent

- virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. [J]. *Virology*, 1996, 218 (1): 232 - 237.
- [27] Tartaglia L A, Weber R F, Figari I S, *et al.* The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88 (20): 9292 - 9296.
- [28] Tartaglia L A, Pennica D, Goeddel D V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (25): 18542 - 18548.
- [29] Sedger L M, Osvath S R, Xu X M, *et al.* Poxvirus tumor necrosis factor receptor (TNFR)-like T2 proteins contain a conserved preligand assembly domain that inhibits cellular TNFR1-induced cell death [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80 (18): 9300 - 9309.
- [30] Rubins K H, Hensley L E, Jahrling P B, *et al.* The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (42): 15190 - 15195.
- [31] Huang X, Huang Y, Ouyang Z, *et al.* Singapore grouper iridovirus, a large DNA virus, induces nonapoptotic cell death by a cell type dependent fashion and evokes ERK signaling [J]. *Apoptosis: an International Journal on Programmed Cell Death*, 2011, 16 (8): 831 - 845.

Molecular characterization and tentative functional analysis of Singapore grouper iridovirus open reading frame 050 (SGIV ORF050)

GUAN Liya, HUANG Youhua, CAI Jia, HUANG Xiaohong, QIN Qiwei *

(*Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China*)

Abstract: Singapore grouper iridovirus (SGIV) is a major viral pathogen which can result in heavy economic losses in grouper aquaculture. SGIV is a large DNA virus containing 162 open reading frames (ORFs), among which the ORF050, a tumor necrosis factor receptor like gene, may play possible roles in the virus immune evasion. In this study, the gene of SGIV ORF050 was cloned, and the recombinant vectors containing full length gene or the four Cysteine-rich Domain (CRD) deletion mutants were constructed, respectively. RT-PCR and drug inhibition assay demonstrated that SGIV ORF050 is an immediate-early (IE) gene. Intracellular localization revealed that SIGV ORF050 is distributed in the cytoplasm evenly and gathered around the nucleus. The localization changed when the first CRD was deleted, which presented punctated distribution in the cytoplasm. The cytopathic effect (CPE) was no changed significantly in SGIV infected ORF050-expressing fish cells compared with control cells. In addition, real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis showed that there was not significant change of SGIV MCP gene transcription in ORF050-expressing fish cells, suggesting that ORF050 might not have much effect on SGIV replication. Overexpressing ORF050 could enhance grouper TNF and TNFR transcription levels in SGIV infected fish cells, revealing that SGIV may regulate the host TNF/TNFR signaling pathway to evade the host immune attack via ORF050.

Key words: Singapore grouper iridovirus; SGIV ORF050; tumor necrosis factor receptor (TNFR); molecular characterization; immune evasion

Corresponding author: QIN Qiwei. E-mail: qinqw@scsio.ac.cn