

急性病毒性坏死病毒 IAP-86 基因的克隆、表达及抗凋亡研究

张 帅^{1,2}, 王崇明^{1*}, 宋晓玲¹, 白昌明¹, 黄 健¹, 李 晨¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 在已经完成的栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 全基因组序列测序与分析的基础上,设计特异性引物,克隆得到了 ORF86 编码的杆状病毒凋亡抑制蛋白基因 (IAP-86)。IAP-86 基因与 pET32a(+) 质粒连接构建得到重组质粒 pET32a-IAP86,将重组质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中,使用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达,SDS-PAGE 检测显示表达蛋白分子量约为 40 ku,经 Western-blotting 和质谱分析证明,该蛋白即为 IAP-86 融合蛋白,Co²⁺ 柱纯化后得到了纯化的 IAP-86 融合蛋白。将重组的 IAP-86 蛋白用 FITC 标记,荧光显微镜下观察,发现重组的 IAP-86 蛋白最终能够与栉孔扇贝血淋巴细胞的细胞核和细胞质结合。细胞凋亡检测实验发现,重组的 IAP-86 蛋白能够在一定程度上抑制栉孔扇贝血淋巴细胞凋亡,凋亡抑制率为 7%。本实验应用原核表达成功得到了 IAP-86 蛋白,并证明 IAP-86 对栉孔扇贝细胞的凋亡有一定抑制作用,这为进一步研究 AVNV 的侵染机制提供依据。

关键词: 栉孔扇贝; 急性病毒性坏死病毒; 杆状病毒凋亡抑制蛋白; 原核表达; 抗凋亡

中图分类号: S 944.4⁺3

文献标志码: A

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是我国北方沿海主要的养殖品种,在我国贝类养殖业中占有重要地位。20 世纪 90 年代中末期,养殖栉孔扇贝在夏季出现大规模死亡,这给我国扇贝养殖业造成了重大损失,极大地阻碍了这一产业的健康持续发展。已有的研究表明,急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 是导致栉孔扇贝大规模死亡的主要病原^[1-2]。

本实验通过对已测序完成的 AVNV 全基因组序列分析,预测 AVNV 全基因组中含有 123 个潜在的开放阅读框 (open reading frames, ORF),其中 44 个 ORF 具有一定的结构和功能,推测可能与病毒 DNA 复制、核酸代谢修饰以及病毒与宿主相互作用等有关。进一步的生物信息学分析显示,在 AVNV 44 个 ORF 中存在 4 个编码杆状病毒凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 基因,其中 ORF86 编码 170 个氨基酸,含有

一个 IAPS 家族高度保守的杆状病毒 IAP 重复区 (baculovirus IAP repeat, BIR),不含有某些杆状病毒 IAP 基因含有的指环蛋白结构 (RING)^[3]。根据生物信息学分析结果,人们将 ORF86 编码的基因命名为 IAP-86。

细胞凋亡是指在一定的生理或病理条件下,细胞受内在遗传机制的控制,自动结束生命的过程。杆状病毒的凋亡抑制蛋白基因是最早鉴定的 IAP 家族基因,与杆状病毒 P₃₅ 基因有相似的抗细胞凋亡功能^[4]。所有 IAP 基因序列中都含有保守结构域-BIR,该结构域包含一个保守的组氨酸残基以及三个保守的半胱氨酸残基,某些杆状病毒 IAP 基因含有保守的指环蛋白结构 (RING),这个结构可以和 Zn 原子结合^[5]。IAP 重复序列结构蛋白 (BIRP) 调节的酶促反应是无脊椎动物防御病毒感染的重要介质,BIR 基因也存在于其它感染无脊椎动物的大型 DNA 病毒中,如

收稿日期:2013-10-16 修回日期:2013-11-27

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48);黄海水产研究所级基本科研业务费 (20603022013009)

通信作者:王崇明,E-mail:wangcm@ysfri.ac.cn

Baculoviridae, *Poxviridae*, *Ascoviridae* 和 *Iridoviridae*^[6-9],但是在感染脊椎动物的大型 DNA 病毒中却尚未发现含有 BIR 基因。有关水产动物凋亡抑制蛋白的研究尚处于起步阶段,左振华等^[10]报道了鱼类凋亡抑制蛋白 cDNA 序列并用半定量 RT-PCR 方法分析在菌体感染草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 后各组织中的 IAP mRNA 表达水平的变化,分析得到 IAP 可能参与了机体对嗜水气单胞菌感染的免疫应答。Leu 等^[11]在中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 中克隆表达了 IAP 基因并对其作用机制进行了研究,得到对虾体内 IAP 可以通过与 Rpr 蛋白结合,抑制 Rpr 的活性进而抑制细胞凋亡,而且证明了其 BIR2 和 BIR3 结构域可以独立结合并抑制 Rpr 活性,但 BIR1 却不具有此功能。在 WSSV 侵染对虾的研究中,WSSV 表达的凋亡抑制蛋白可以有效的抑制病毒侵染后诱导的宿主细胞凋亡,进而有利于病毒在宿主体内繁殖,最终导致宿主死亡^[12]。通过对 AVNV 的 IAP-86 基因进行分子生物学研究,明确该基因在病毒侵染宿主的过程中的作用,不仅弥补了软体动物大型 DNA 病毒中 IAP 研究的空缺,而且还为了解 AVNV 侵染宿主的机制提供重要的理论依据和实验基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

AVNV 粗提液取自 2009 年 8 月采自青岛沙子口具典型发病症状的栉孔扇贝冻存样品;养殖栉孔扇贝于 2013 年 5 月购自青岛沙子口,放置水实验室养殖箱 (585 mm × 454 mm × 340 mm) 内暂养。

1.2 AVNV 病毒粗提液的制备和病毒总 DNA 的提取

将保存于 -80 °C 超低温冰箱中具有典型 AVNV 发病症状的阳性样品在冰上解冻,取其外套膜、鳃及肝胰腺组织在冰上用过滤海水反复冲洗,加入 9 倍体积的除菌过滤海水,在冰浴中用高速匀浆机 20 000 r/min 匀浆 4~5 次,每次 1 min;匀浆液经 400 目筛绢过滤除去杂质后,1 000 × g, 4 °C 离 30 min,取上清,2 500 × g,4 °C 离心 1 h,取上清 7 500 × g,4 °C 离心 30 min,取上清用 0.45 μm 滤膜过滤除菌即为 AVNV 粗提液,-80 °C 超低温冰箱保存备用。

按照天根公司生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书上的方法提取 AVNV 粗提液的总 DNA。

1.3 PCR 引物设计、IAP-86 基因的克隆及重组表达载体的构建

根据本实验室测定完成的 AVNV 全基因组序列中 ORF86 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件设计上下游引物,由上海生工生物有限公司合成。上游引物 IAP-86-F: 5'-CGGGATCCATGGATATA-GTACC-3',划线部分为添加的 *Bam*H I 酶切位点,下游引物 IAP-86-R: 5'-CCCAAGCTTGATAA-CTGCTAAGT-3',划线部分为添加的 *Hind* III 酶切位点。

以提取的病毒总 DNA 为模板,PCR 反应条件:95 °C 预变性 4 min;95 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 30 s,进行 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min;产物 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。将扩增出约 500 bp 的目的片段进行胶回收,然后将该目的基因连接至 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司)中,做 TA 克隆并测序。从测序正确的 T 克隆菌体中提取质粒,将质粒和原核表达载体 PET32a (+) 经过限制性内切酶 *Bam*H I (NBI 公司)和 *Hind* III (NBI 公司)双酶切后回胶回收,连接得到重组质粒 pET32a-IAP86。将重组质粒转化至 *E. coil* BL21 (DE3) (北京博迈德公司)感受态细胞中,经含氨苄青霉素 (Amp, 50 μg/mL) 的 LB 固体培养基筛选得到转化成功的表达菌株,挑取单菌落进行菌落 PCR 验证,质粒小量提取试剂盒 (天根公司)提取质粒进行双酶切鉴定,同时将菌液送去上海生工进行测序,将测序正确的菌株进行低温保种,表达菌株命名为 BL21-IAP86。

1.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

将表达菌株 BL21-IAP86 接种于含氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LB 液体培养基中,37 °C 摇床过夜,制备种子液;第 2 天按 1:100 接种到 250 mL 新鲜的 LB 液体培养基 (含 Amp, 50 μg/mL) 中,37 °C 摇床培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.6 时,取 30 mL 作为对照进行培养 (不进行诱导),其余菌液加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L,37 °C 诱导表达 4 h,收集菌液,5 000 × g 离心 10 min,弃上清,沉淀中加入 PBS 超声破碎,10 000 × g 离心 10 min,对照组按照上述方法进行

破碎;上清和沉淀加入 $5 \times$ SDS 上样缓冲液,煮沸变性 5 min, 15% SDS-PAGE 电泳观察蛋白表达情况。

将超声裂解的菌液 $10\ 000 \times g$ $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 沉淀用 A 液 (NaH_2PO_4 0.2 mol/L; Na_2HPO_4 0.2 mol/L; Gua-HCl 6 mol/L; NaCl 0.3 mol/L; pH 7.0) 过夜溶解;次日将溶解的包涵体 $10\ 000 \times g$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 将上清首先用 $0.8\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 然后再用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 按 Clontech 公司 Co^{2+} 亲和层析说明书对重组 IAP-86 蛋白进行纯化。

蛋白纯化时先用 ddH₂O 洗柱, 然后用 PBS 洗柱, 再用 A 液洗至洗出液 280 nm 下光吸收为 0, 将过滤后的上清液上柱, 用 A 液洗柱至 A_{280} 为 0, 再用 C 液 (NaH_2PO_4 0.2 mol/L; Na_2HPO_4 0.2 mol/L; Gua-HCl 5.4 mol/L; NaCl 0.27 mol/L; Imidazole 0.15 mol/L; pH 7.0) 洗柱, 当吸收峰升高时开始收集, 收集至峰值不再发生变化时停止收集, 收集液即为纯化的重组蛋白。

1.5 重组蛋白包涵体的复性

将纯化的蛋白先在透析复性 Buffer I (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 4 mol/L; 甘氨酸 1%; Tris-HCl 50 mmol/L; pH 8.4) 中透析 12 h, 再转移至透析复性 Buffer II (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 2 mol/L; 甘氨酸 1%; Tris-HCl 50 mmol/L; pH 8.4) 中透析 12 h, 再在透析复性 Buffer III (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 1 mol/L; 甘氨酸 1%; Tris-HCl 50 mmol/L; pH 8.4) 中透析 12 h, 最后将复性后的重组蛋白在 PBS (pH 11.2) 中透析 12 h, 将复性蛋白 $4\ ^\circ\text{C}$, $5\ 000 \times g$ 下离心 30 min 超滤浓缩, 测定蛋白浓度后将浓缩后的重组蛋白于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 重组蛋白的鉴定和含量测定

将纯化后超滤浓缩的重组蛋白进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳, 用抗 His 标签的抗体进行 Western-blotting 验证, 并将重组蛋白送交上海生工生物有限公司进行质谱分析。

浓缩后的重组蛋白含量的测定参照博迈德公司 BCA 蛋白测定试剂盒说明操作, 测定分离纯化后的重组蛋白含量。

1.7 IAP-86 重组蛋白的细胞定位及功能学分析

栉孔扇贝血淋巴细胞的获取 用 1 mL 的

无菌注射器从活力好的栉孔扇贝闭壳肌血窦中抽取血淋巴细胞, 按 1:1 的比例加入抗凝剂 (2.279 g Glucose, 1.964 g NaCl, 0.397 g 柠檬酸钠, 0.335 g EDTA 溶于 100 mL ddH₂O 中) 保存, $500 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 用 $2 \times$ PBS (4.0 g NaCl, 1.45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g KCl, 0.1 g KH_2PO_4 溶于 1 L ddH₂O 中) 洗涤细胞 2 次, 用 $2 \times$ PBS 重悬细胞, 稀释至细胞数目为 $10^6/\text{mL}$ 左右。

异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记重组 IAP-86 蛋白 取两支灭菌的 1.5 mL 的离心管, 分别加入 400 μL 纯化浓缩的浓度为 0.263 1 mg/mL IAP-86 蛋白和 400 μL 0.26 mg/mL 的 BSA 溶液, 同时向两支离心管中加入 3 μL 的 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 FITC, 室温下避光震荡 2 h; 将标记好的 IAP-86 蛋白和 BSA 放入 PBS 中进行 24 h 透析, PBS 每 4 小时换一次, 将透析好的 FITC-IAP86 和 FITC-BSA 加入甘油后于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中避光保存。

IAP-86 蛋白在栉孔扇贝血淋巴细胞中的定位 取两支灭菌的 1.5 mL 离心管, 分别加入 400 μL 栉孔扇贝血淋巴细胞, 实验组加入 10 μL 的 FITC - IAP86, 对照组加入 10 μL 的 FITC-BSA, 避光孵育 1 h, 然后分别在实验组和对照组中加入 DAPI 进行细胞核染色 10 min, 用 $2 \times$ PBS 洗涤对照组和实验组细胞后, 加入 400 μL $2 \times$ PBS 重悬细胞, 荧光显微镜下观察血淋巴细胞的染色结果。

流式细胞仪检测 IAP-86 对栉孔扇贝血淋巴细胞的凋亡抑制率 每管取血淋巴细胞悬浮液 600 μL , 实验组中每管加入 50 μL 浓度为 0.263 1 mg/mL 的 IAP-86 融合蛋白, 对照组加入 50 μL 的 $2 \times$ PBS 作为对照, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 96 h 后, 参照细胞凋亡检测试剂盒 (上海贝博生物) 操作步骤, 流式细胞仪检测实验组和对照组的细胞凋亡情况。

2 结果与分析

2.1 AVNV IAP-86 基因 PCR 扩增及鉴定

以提取的 AVNV 病毒粗提液总 DNA 为模板, PCR 扩增得到一条约 500 bp 大小的片段, 与预期大小一致 (图 1), TA 克隆后测序, 证实扩增的特异性条带即为目的条带。

2.2 重组 IAP86 蛋白的诱导表达及鉴定

将重组质粒 pET32a-IAP86 转化至表达菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中, IPTG 诱导重组蛋白表达, 经

15% SDS-PAGE 凝胶电泳,在 40 ku 左右处出现一条比预期偏大的特异性蛋白条带(图 2),显示重组蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中。

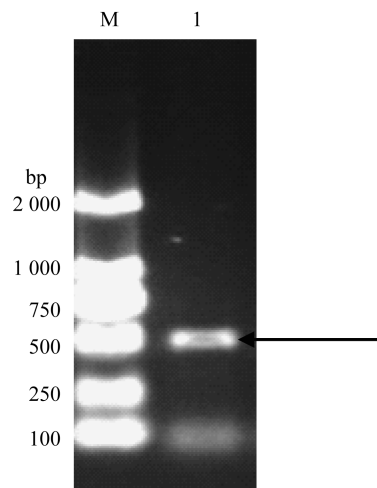


图 1 IAP-86 基因的扩增

M. Marker; 1. PCR 产物

Fig. 1 Amplification of the IAP-86 gene

M. Marker; 1. PCR products

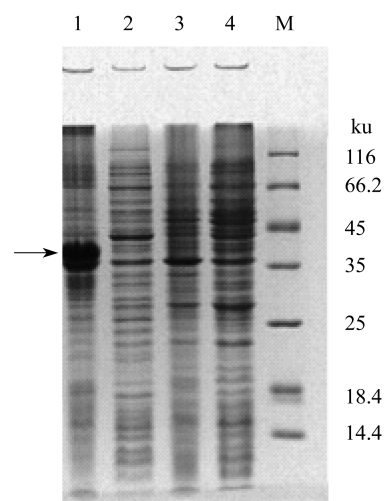


图 2 IAP-86 重组蛋白表达产物 SDS-PAGE 分析结果 (15%)

1. 诱导后重组菌超声沉淀泳道; 2. 诱导后重组菌超声上清泳道; 3. 未诱导重组菌超声沉淀泳道; 4. 未诱导重组菌超声上清; M. Marker

Fig. 2 SDS-PAGE (15%) analysis of recombinant protein IAP-86

1. precipitate after sonication of induced recombinant bacteria;
2. supernatant of induced recombinant bacteria after sonication;
3. precipitate after sonication of uninduced recombinant bacteria;
4. supernatant of uninduced recombinant bacteria after sonication;
M. Marker

2.3 IAP-86 重组蛋白的纯化鉴定和蛋白含量的测定

表达产物经 Co^{2+} 亲和层析分离纯化,尿素梯度复性后得到有活性的 IAP-86 可溶性蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳 (15%) 得到一条约 40 ku 的特异蛋白条带(图 3),Western-blotting(图 4)及质谱分析证实,所表达蛋白即为重组 AVNV IAP-86 蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定纯化的 IAP-86 蛋白含量为 0.263 1 mg/mL。

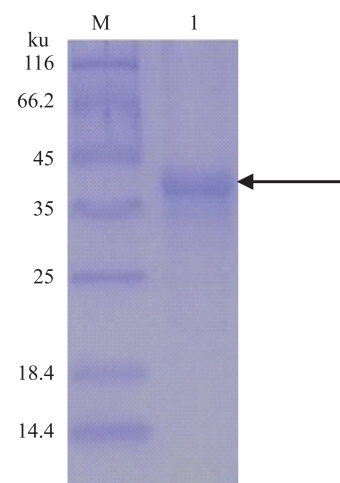


图 3 纯化后的 IAP-86 重组蛋白 SDS-PAGE (15%)

1. M. Marker; 1. 纯化后的 IAP-86 蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE (15%) analysis of purification of IAP-86

1. M. Marker; 1. Purification of IAP-86

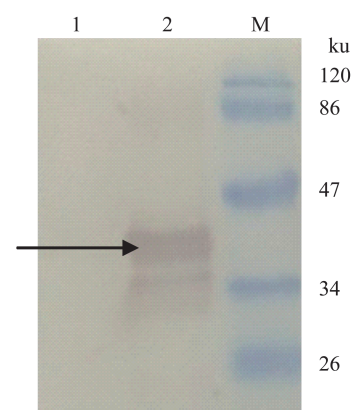


图 4 Western-blotting 分析结果

1. 未诱导重组菌沉淀; 2. 纯化的 IAP-86 蛋白; M. Marker

Fig. 4 Western-blotting analysis

1. precipitate after sonication of uninduced recombinant bacteria;
2. Purification of IAP-86; M. Protein Marker

2.4 IAP-86 蛋白的细胞定位及功能性研究

荧光显微镜下观察 IAP-86 蛋白与栉孔扇贝血淋巴细胞的结合实验,结果显示(图 5) FITC 标记的 IAP-86 蛋白可以先在细胞膜上结合,之后穿过细胞膜,最终结合在细胞核和细胞质中。

流式细胞仪检测 IAP-86 蛋白抑制细胞凋亡

率,结果表明,96 小时后对照组活细胞(图 6-a, Q3)占总细胞数的 17.95%,实验组活细胞(图 6-b, Q3)占总细胞数的 24.78%,因此 IAP-86 对栉孔扇贝血淋巴细胞的凋亡起到一定的抑制作用,凋亡抑制率在 7% 左右。

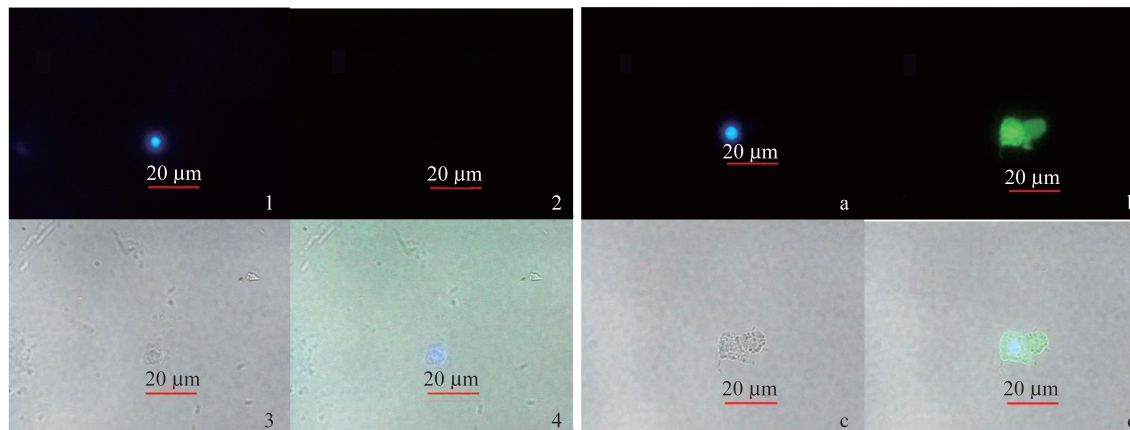


图 5 标记 1 h 后荧光显微镜下观察 IAP-86 蛋白在细胞内的定位

1. 对照组细胞用 DAPI 进行细胞核染色后观察; 2. 对照组细胞用 FITC 标记的 BSA 进行孵育后进行观察; 3. 对照组显微镜下的细胞形态; 4. 对照组 1,2,3 叠加后的效果图; 4-a. 实验组细胞用 DAPI 进行细胞核染色后观察; 4-b. 实验组细胞用 FITC 标记的 IAP-86 进行孵育后进行观察; 4-c. 显微镜下的细胞形态; 4-d. a、b、c 三张图叠加后的效果图

Fig. 5 Observation of the IAP-86 protein in the intracellular localization by fluorescence microscope after 1 hour

1. The observation of control group cells after staining by DAPI; 2. Observation of control group cells after incubating with FITC-BSA; 3. Microscope observation of cell morphology of control group; 4. Superimposed diagram of A, B and C; 4-a. Observation of experimental group cells after staining with DAPI; 4-b. Observation of experimental group cells after incubating with FITC-BSA; 4-c. Microscope observation of cell morphology of the experimental group; 4-d. Superimposed diagram of a, b and c

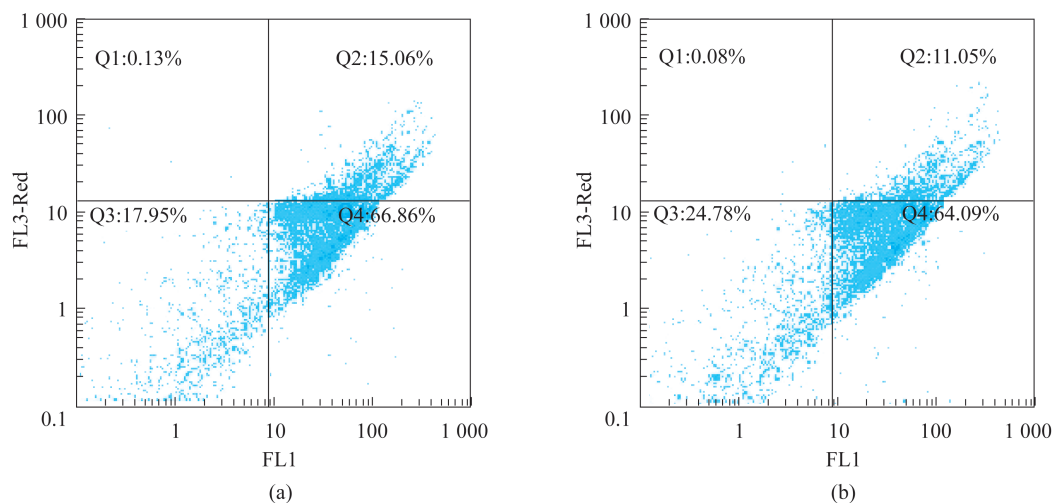


图 6 流式细胞仪分析细胞凋亡率

(a) 对照组细胞凋亡率; (b) 实验组细胞凋亡率

Fig. 6 Analysis of apoptosis rate by flow cytometry

(a) Apoptosis rate of the control group; (b) Apoptosis rate of the experimental group

3 讨论

细胞凋亡一般有两个经典途径,一个是通过细胞表面的受体和他们特异性配体结合来引发凋亡;另一个是细胞内部完整性的改变导致细胞凋亡,如线粒体通路。两条通路均通过激活半胱氨酸蛋白酶(caspase)的活性使细胞凋亡。凋亡抑制蛋白 IAP 是凋亡过程中的一种重要蛋白,它主要通过抑制 caspase 的活性,参与有丝分裂原激活蛋白-Jun 激酶 1 (MAP-JUNK1) 介导的信号通路发挥抵抗细胞凋亡的作用,即 IAP 既参与线粒体介导的凋亡途径,又参与死亡受体介导的凋亡通路^[13-14]。IAPs 不但在细胞凋亡中具有重要作用,而且与许多疾病的发生密切相关^[15-16]。

IAP 家族蛋白虽然最先在杆状病毒中发现,但目前已经从病毒、酵母到人类的多种生物类群中都有发现其同源蛋白,所有该家族中的蛋白都有一个或几个 BIR 区,在进化上高度保守。杆状病毒中 IAP 行使抑制细胞凋亡的功能时 RING 结构域是必不可少的,但在某些哺乳动物中缺失这一结构域,但仍有抑制细胞凋亡功能,甚至在某些哺乳动物中敲除其 RING 结构域后,反而增强其抑制细胞凋亡的功能^[17]。目前有关对 IAP 基因的功能研究在昆虫中研究较多,昆虫杆状病毒的 IAP 可与昆虫凋亡诱导物结合,抑制昆虫细胞的凋亡。果蝇中鉴别了 girm, reaper, doom 和 HID 几种凋亡蛋白, IAP 可结合这些果蝇细胞凋亡蛋白,抑制果蝇细胞凋亡。杆状病毒 IAP 不仅具有抑制昆虫细胞凋亡的功能,也具有抑制哺乳动物细胞凋亡的能力^[18]。不是所有 IAP 基因都具有抑制细胞凋亡的功能,如 Splt-IAP4 不能挽救 vAcAnh 感染诱导的 Sf9 细胞凋亡^[19]。目前对于这些不具有抗凋亡作用的 IAP 基因的研究并不多,人们普遍认为病毒不会保留它们不需要的基因,所以这些基因的存在必有一定的原因。目前对此存在两种假说:一是这些非功能性的 IAP 基因在特定的宿主和组织中具有抑制凋亡作用,但目前还没有被我们所发现;二是这些基因可能有与抑制凋亡无关的功能,如一些细胞内源性 IAP 基因在其他过程中起作用,如细胞分裂,信号转导等^[20]。

生物信息学分析显示,栉孔扇贝 AVNV ORF86 含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白的标志性氨基酸区域-BIR 区,但不含有 RING 结构,预

测该基因编码的蛋白质可能参与抗细胞凋亡的作用。实验中通过基因克隆技术得到了 IAP-86 基因,原核表达获得 IAP-86 蛋白,并对重组蛋白进行了纯化浓缩,获得了纯度好,浓度高的可溶性重组蛋白,为今后深入开展该蛋白的功能研究奠定了良好的基础。

有关原核表达后 IAP 功能验证的方法报道较少,梁重阳等^[21]曾用 FITC 标记的重组灵芝免疫调节蛋白在 NB4 细胞中进行动态定位。本实验用 FITC 标记后的 IAP-86 蛋白与栉孔扇贝的血淋巴进行孵育,然后荧光显微镜下观察到重组的 IAP-86 蛋白能够通过结合在栉孔扇贝血淋巴细胞的细胞膜进入到细胞内结合到细胞核和细胞质上,而对照组中 FITC 标记的 BSA 并没有进入细胞内,推测 IAP-86 蛋白通过与细胞膜表面的某种受体结合后,介导 IAP-86 蛋白进入到细胞内发挥作用,抑制细胞凋亡,具体的作用机制还需要进一步研究。此外,使用细胞凋亡检测试剂盒对 IAP-86 蛋白抗凋亡作用进行检测,结果显示加入 IAP-86 蛋白的实验组比对照组的细胞凋亡率低 7% 左右,这与 Birnbaum 等^[22]和 Crook^[23]对 IAP 的抗凋亡研究结果相符。同时本实验结果还证实了在无脊椎动物的大型 DNA 病毒中, IAP 中的 RING 结构域并不是蛋白行使抑制细胞凋亡功能的必须结构域,单独的一个 BIR 结构域也可以行使抑制细胞凋亡的功能。

国内外在贝类病毒的研究方面尚处于起步阶段,开展贝类病毒致病机理的研究将有助于为贝类流行病的防治提供理论依据。本课题组在 AVNV 的全基因组序列测定完成之后,已经相继开展并完成了 AVNV dUTPase 基因和引物酶基因的克隆表达和酶学活性分析^[24-25]。鉴于 IAP 基因在病毒侵染宿主中的重要作用,本文开展并完成了 IAP-86 基因的克隆表达纯化及抗凋亡研究,从而在分子水平上进一步探究了 AVNV 的致病机制。随着今后有关 AVNV 其它功能基因的进一步研究,将会更深入地了解 AVNV 侵染机制,也为今后更好地防控 AVNV 提供理论依据和实验基础。

参考文献:

- [1] Ai H X, Wang C M, Wang X H, et al. Artificial infection of cultured scallop *Chlamys farreri* by pathogen from acute virus necrobiosis disease [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(5):

- 386 - 391. [艾海新,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究. 中国水产科学,2003,10(5):386 - 391.]
- [2] Wang C M, Wang X H, Ai H X, *et al.* The viral pathogen of massive mortality in *Chlamys farrei*[J]. *Journal of Fishes of China*,2004,28(5):547 - 553. [王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究. 水产学报,2004,28(5):547 - 553.]
- [3] Ren W C. Detection methods, sequence of the complete genome of acute viral necrobiotic virus isolated from scallop *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China,2009. [任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术的研究. 青岛:中国海洋大学,2009.]
- [4] Clem R J, Miller L K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14 (8): 5212 - 5222.
- [5] Deveraux Q L, Leo E, Stennicke H R, *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18 (19): 5242 - 5251.
- [6] Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67 (4): 2168 - 2174.
- [7] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus [J]. *Journal of Virology*,1999,73(1):533 - 552.
- [8] Stasiak K, Demattei M V, Federici B A, *et al.* Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double-stranded DNA genomes [J]. *Journal of General Virology*,2000,81(12):3059 - 3072.
- [9] Jakob N J, Müller K, Bahr U, *et al.* Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo iridescent virus* [J]. *Virology*, 2001, 286 (1): 182 - 196.
- [10] Zuo Z H, Tang J Z, Zhang Z, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression analysis of full-length cDNA of inhibitor of apoptosis protein gene from grass carp [J]. *Journal of Hunan Agricultural University*,2009,35(3):209 - 313. [左振华,唐建州,张钊,等. 草鱼细胞凋亡抑制蛋白基因 cDNA 的克隆与表达分析. 湖南农业大学学报,2009,35(3):209 - 313.]
- [11] Leu J H, Kuo Y C, Kou G H, *et al.* Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*,2008,32(2):121 - 133.
- [12] Leu J H, Lin S J, Huang J Y, *et al.* A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013,34(4):1011 - 1017.
- [13] Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer[C] // *Seminars in cancer biology*. Academic Press,2004:231 - 243.
- [14] Wrzesień-Kuś A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, *et al.* The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias[J]. *Apoptosis*,2004,9(6):705 - 715.
- [15] Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, *et al.* Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury[J]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*,2001,60(5):422 - 429.
- [16] Seidl R, Bajo M, Böhm K, *et al.* Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)-like immunoreactivity in brains of adult patients with down syndrome [J]. *Journal of Neural Transmission*, 1999, 57 (suppl.):283.
- [17] Miller L K, Kaiser W J, Seshagiri S. Baculovirus regulation of apoptosis [C] // *Seminars in virology*. Academic Press,1998:445 - 452.
- [18] Robles M S, Leonardo E, Criado L M, *et al.* Inhibitor of apoptosis protein from *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus provides a costimulatory signal required for optimal proliferation of developing thymocytes [J]. *The Journal of Immunology*,2002,168(4):1770 - 1779.
- [19] Yu Q. Identification and functional analysis of the putative anti-apoptotic gene iap4 of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus [J]. *Virus Genes*, 2010, 41 (2):298 - 304.
- [20] Vaux D L, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,2005,6(4):287 - 297.
- [21] Liang C Y, Xu W Q, Cao Y X, *et al.* Dynamic observation of cellular localization of fluorescein isothiocyanate labeled recombinant ganoderma lucidum immunoregulatory protein(rlz-8) in nb4 apl cell[J]. *Chemical Research In Chinese Universities*,
<http://www.scxuebao.cn>

- 2009,30(3):489-492. [梁重阳,徐蔚青,曹焱鑫,等. FITC 标记重组灵芝免疫调节蛋白(rLz-8)在 NB4 细胞中的动态定位. 高等学校化学学报, 2009,30(3):489-492.]
- [22] Birnbaum M J, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs [J]. *Journal of Virology*, 1994, 68 (4): 2521-2528.
- [23] Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67 (4): 2168-2174.
- [24] Jia Z L, Wang C M, Ren W C, *et al.* Cloning, expression of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus dUTPase gene and the determination of its enzymatic activity [J]. *Journal of Fishes of China*, 2011,35(9):1320-1326. [贾志磊,王崇明,任伟成,等. 急性病毒性坏死病毒 dUTPase 基因的克隆、表达及其产物的酶学活性分析. 水产学报, 2011,35(9):1320-1326.]
- [25] Qiang J, Chong M, Pan L Q, *et al.* Expression and enzymatic activity analysis of primase from acute viral necrosis virus [J]. *Journal of Fishes of China*, 2013,37(9):1401-1408. [钱璟, 崇明, 潘鲁青, 等. 急性病毒性坏死病毒引物酶表达及酶学活性分析. 水产学报, 2013,37(9):1401-1408.]

Cloning, expression of acute viral necrosis virus IAP-86 gene and studies of its anti-apoptotic mechanism

ZHANG Shuai^{1,2}, WANG Chongming^{1*}, SONG Xiaoling¹, BAI Changming¹, HUANG Jie¹, LI Chen¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Acute viral necrosis virus (AVNV) was reported as the causative agent responsible for summer mass mortality of adult Zhikong scallop (*Chlamys farreri*), which is widely cultured along northern China coast. In this study, the open reading frame (ORF) 86 of AVNV was successfully amplified based on the specific primers designed according to the complete genome sequences of AVNV. The gene encoded by ORF86 in AVNV was named IAP-86 in this study, since the homology of ORF 86 was firstly identified as encoding inhibitor of apoptosis protein (IAP) in baculovirus. We subcloned the amplified PCR fragments of IAP-86 into the prokaryotic expression vector pET32a(+), and obtained the recombinant plasmid pET32a-IAP86 through the linking of IAP-86 gene to pET32a(+) plasmid. Then the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain and expressed under the induction of IPTG. The SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the induced recombinant protein was about 40 ku. The expressed protein was verified through the Western-blotting and mass spectrometry analysis. Then the recombinant protein was purified with Co²⁺ purification column and marked with FITC. We found IAP-86 could combine with the nucleus and the cytoplasm and inhibit the apoptosis of blood lymphocyte cell of *C. farreri* through coincubation of them. The cell apoptosis was inhibited by the recombinant of IAP-86 according to the result of apoptosis experiment, and the rate of apoptosis inhibition was about 7%. IAP-86 was successfully expressed through the prokaryotic expression system in our study, and the expressed protein was found to be able to inhibit cell apoptosis of blood lymphocyte of *C. farreri*. These results provide theoretical and experimental basis for studying the infection mechanism of AVNV.

Key words: *Chlamys farreri*; acute viral necrosis virus (AVNV); baculoviral apoptosis inhibitor protein (IAP); prokaryotic expression; anti-apoptotic

Corresponding author: WANG Chongming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn