

文章编号: 1000-0615(2017)08-1319-09

DOI: 10.11964/jfc.20161210657

细胞骨架蛋白actin参与石斑鱼虹彩病毒SGIV释放

王著希¹, 周胜^{2*}, 黄友华², 王劭雯²,
黄晓红², 周永灿¹, 秦启伟^{3*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东广州 510301;

3. 华南农业大学海洋学院, 广东广州 510642)

摘要: 在病毒感染宿主细胞过程中, 病毒利用宿主细胞骨架如微丝、微管等完成进入、运输和释放等过程。为分离鉴定石斑鱼虹彩病毒SGIV囊膜蛋白, 实验应用去污剂溶解病毒囊膜, 然后结合1-D-SDS-PAGE切胶分离和LC-MS/MS质谱鉴定两种方法进行检测, 除了病毒编码的囊膜蛋白外, 还发现7种宿主细胞来源的蛋白, 包括细胞骨架微丝肌动蛋白actin等, 由此推测这些宿主蛋白是与病毒纯化过程中共纯化获得。鉴于actin在病毒感染中发挥着重要的作用, 进一步通过蛋白印迹、免疫电镜实验验证了actin与病毒共纯化, 揭示actin是一种来源于宿主细胞并包装到病毒颗粒表面的宿主蛋白, 且由于特异性作用黏附于病毒粒子表面, 在分离病毒囊膜时与囊膜蛋白共纯化。此外, 荧光显微镜观察发现, 在病毒感染晚期, 细胞变圆, 细胞微丝actin蛋白和SGIV病毒共定位于细胞膜, 提示actin与病毒释放相关。同时电镜观察也表明, 病毒在感染细胞中释放时获得由宿主细胞质膜衍生而来的囊膜, 由此推测actin可能在病毒释放时特异性包裹于SGIV病毒表面。研究表明, actin参与石斑鱼虹彩病毒SGIV的释放过程。

关键词: 新加坡石斑鱼虹彩病毒; 囊膜蛋白; actin; 病毒释放

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

石斑鱼(*Epinephelus* sp.)是我国南方沿海各省市以及东南亚各国名贵的海水养殖鱼类之一。但石斑鱼养殖成活率低, 病害暴发频繁。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原之一。本实验室前期已经完成对SGIV的系统分类与鉴定^[1]、基因组^[2]、转录组和蛋白质组分析等基础研究^[3-4]。随着对病毒致病机理研究的开展, 研究工作深入到分析病毒感染、病毒与宿主细胞的相互作用的分子机制中。

SGIV是一种具囊膜包裹的DNA病毒。在感染宿主细胞初期, 病毒首先黏附于宿主细胞表面, 进而通过内吞或巨胞饮进入宿主细胞^[5]。囊

膜蛋白在SGIV感染过程中具有重要的作用, 可能介导了感染早期病毒与宿主细胞的相互作用。实验通过蛋白质组学技术, 系统分离鉴定了SGIV编码的19个病毒囊膜蛋白^[6]。在鉴定SGIV囊膜蛋白的过程中, 发现一些宿主来源的蛋白如肌动蛋白(actin)等细胞骨架蛋白包含于SGIV病毒囊膜蛋白分离组分中。与SGIV病毒中发现宿主蛋白类似, 研究报道埃博拉病毒中包装了宿主蛋白, 包括微丝肌动蛋白(actin), 丝切蛋白(cofilin), 微管蛋白(tubulin), 热激蛋白90(heat shock protein 90)以及热激蛋白70(heat shock protein 70)等^[7]。作为最重要的细胞骨架蛋白, actin对维持细胞形态、细胞运动与细胞吞噬作用、细胞之间的交

收稿日期: 2016-12-22 修回日期: 2017-03-16

资助项目: 国家自然科学基金青年基金(31502207); 国家自然科学基金重点基金(31330082); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501C01)

通信作者: 周胜, E-mail: zhous@scsio.ac.cn; 秦启伟, E-mail: qinqw@scau.ac.cn

流、细胞器的位置分布均具有重要作用。病毒感染改变细胞正常的功能,使细胞利于病毒复制,其中显著的转变是actin的结构变化,影响病毒的进入、组装和释放^[8]。病毒和actin的相互作用参与了病毒感染与扩散的过程。了解病毒和actin互作能更清晰地掌握病毒复制过程及细胞骨架的功能。

本研究通过分析存在于SGIV囊膜中的宿主蛋白成分,并进一步揭示在SGIV感染细胞晚期宿主actin蛋白与病毒释放的关系。研究结果将从细胞骨架蛋白actin与病毒互作的角度帮助理解SGIV的分子致病机理。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒培养与纯化

SGIV为本实验室从患病的石斑鱼中分离鉴定^[1]。石斑鱼脾细胞(GS)由本实验室建立,被用来进行病毒感染与扩增,细胞培养按本实验室常规方法进行^[9]。扩增病毒时,在75 cm²细胞培养瓶中以10⁸个细胞/瓶的密度接种GS细胞,待细胞贴壁24 h之后的对数生长期,接种SGIV病毒上清液(MOI=1)感染细胞,25 °C培养,待细胞出现完全病变(cytopathic effect, CPE)时,收集病毒悬液,-80 °C冻存。

按照Qin等^[1]的方法,采用蔗糖密度梯度离心法纯化病毒。准备相关溶液和试剂:30%、40%、50%、60%(W/V)的蔗糖溶液,按照50 mmol/L Tris/HCl 150 mmol/L NaCl配置TN buffer,调节pH为7.5。蔗糖密度梯度离心法纯化病毒的基本步骤:(1)收集感染SGIV的GS细胞,冻融2~4次,保证病毒完全释放;(2)取100 mL细胞—病毒悬浮液,12 000×g离心30 min,取出上清SN1,4 °C保存;(3)将沉淀重悬并反复冻融3次后再超声波破碎,4000×g离心20 min,取上清SN2,将SN1与SN2混合4 °C保存过夜;沉淀为细胞碎片;(4)10 000×g 4 °C离心2 h,用2 mL TN buffer重悬病毒沉淀;(5)将病毒悬浮液或细胞碎片加于30%~60%蔗糖密度梯度上,200 000×g 4 °C离心1 h,分别收集各个密度梯度之间的条带,溶解于TN buffer;(6)将各收集带重复进行蔗糖密度梯度离心1次;(7)以20%蔗糖100 000×g 4 °C离心1 h洗糖;(8)收集病毒沉淀,用100 μL TN buffer溶解,-20 °C保存。取5 μL纯化好的病毒,室温吸附于覆膜金网1 h,2%磷钨酸(PTA)染

色1 min,吸干染色液后,透射电镜观察病毒形态并拍照。

1.2 病毒囊膜蛋白样品制备

将纯化的病毒用1% (V/V) Triton X-100室温孵育1 h后,20 000×g 4 °C离心1 h,收集上清液,为保证彻底溶解囊膜,将病毒沉淀再次用1% (V/V) Triton X-100悬浮室温孵育1 h,20 000×g 4 °C离心1 h,收集上清液,将2次收集的上清液混合,-20 °C保存。上清液中含有溶解的病毒囊膜蛋白,剩余的沉淀为核衣壳以及病毒内含物。将得到的囊膜蛋白按照文献^[2]方法直接进行LC-MALDI串联质谱分析或1-DE-MALDI质谱分析。蛋白电泳(1-DE)准备样品方法:分别将溶解的囊膜蛋白、全病毒与2×上样缓冲液混合均匀,煮沸5 min后离心,用中型垂直电泳系统进行蛋白分离。蛋白分离胶进行考马斯亮蓝G250染色,将脱色后的胶块放置于白光背景的玻璃板上,用极细的刀片将电泳分离的蛋白条带分别切割下来,同时在电泳图上标记好切割条带的位置与序号,-80 °C冻存或立即进行质谱鉴定。

1.3 囊膜蛋白质谱鉴定

首先用10 mmol/L二巯基苏糖醇(DTT)和55 mmol/L碘乙酰胺分别还原和烷化蛋白,再分别用100 μL 25 mmol/L的NH₄HCO₃、5%乙腈(ACN)和25 mmol/L NH₄HCO₃、50%ACN各洗涤30 min,然后用200 μL ACN脱水,15 μL胰酶(promega)(12.5 ng/μL)消化,37 °C孵育过夜。用0.2%三氟乙酸(TFA)萃取酶解肽段并真空抽干使之吸附于树脂,然后用0.2%TFA洗涤2次,用0.1%TFA,50% ACN洗脱、收集,真空抽干并再溶解于含5 mg/mL α-氰基-4-羟基肉桂酸的0.1% TFA,50% ACN,点样,进行MALDI-TOF/TOF MS/MS分析。

蛋白质MALDI-TOF/TOF MS/MS分析具体方法参照研究SGIV的全蛋白质组的分析方法^[2]。质谱分析结果搜索用MASCOT搜索引擎和GPS explorer数据库检索软件搜索SGIV ORFs数据库及International Protein Index Human Database Version 3.07中的胰酶解肽段。同时搜索MS和MS/MS的结果,有1个以上期望值(expect value)<0.05的蛋白被认定为匹配的结果;具体方法参照研究SGIV的蛋白质组学的分析方法^[2]。

1.4 Western-blot分析

取含10 μg SGIV囊膜蛋白样品,加入5×上样

缓冲液2 μL, 沸水煮5 min使蛋白变性。通过12% SDS-PAGE电泳分离蛋白样品, 电泳结束后将蛋白转至PVDF膜。甲醇浸泡2 min后用TBST清洗3次, 用5%的脱脂牛奶室温封闭1 h, 用1 : 500 稀释actin抗体(鼠抗, Proteintech)孵育2 h, 用TBST清洗3次, 再用辣根过氧化物酶—羊抗鼠抗体孵育2 h, 稀释度为1 : 1000。使用增强型化学发光检测试剂盒(Thermo)显示免疫印迹。

1.5 免疫电镜

取5 μL纯化后的病毒, 室温吸附于200目镍网1 h, 然后用PBS轻洗镍网3次; 用3%BSA室温下封闭样品1 h, PBS轻洗镍网3次; 用1 : 1000倍稀释的actin抗体(鼠抗, Proteintech)在室温下孵育镍网1 h, 轻洗3次; 然后用10 nm金颗粒标记羊抗鼠IgG(1 : 200)(Sigma)在室温下孵育镍网1 h, 用PBS轻洗镍网3次; 用2%磷钨酸(PTA)染色样品1 min, 吸干染色液后, 通过透射电镜观察并拍照。

1.6 细胞微丝及与病毒共定位观察

重组红色荧光病毒由本实验室构建, 该重组病毒将RFP蛋白基因与主要衣壳蛋白(MCP)编码基因融合重组, 重组病毒感染细胞后在荧光显微镜下发出红色荧光, 可以定位病毒在细胞内的位置。细胞actin定位方法: 用FITC标记的actin抗体(鼠抗, Proteintech)孵育细胞, 在荧光显微镜下观察绿色荧光分布。用DAPI染色细胞核, 通过荧光倒置显微镜(Zeiss, Germany)观察重组病毒与微丝的定位情况。细胞固定方法: 在重组病毒感染细胞后不同时间, 用4%的多聚甲醛固定细胞。

1.7 电镜观察病毒释放

将GS细胞接种SGIV病毒(MOI=1), 待细胞出现50%左右的病变后, 1000×g离心10 min收集细胞。细胞沉淀用2.5%的戊二醛在4 °C固定, 然后用1%的锇酸再次固定。乙醇梯度脱水后用Epon812环氧树脂包埋, 用Leica UC7超薄切片机切片, 然后用醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色。通过JEM-100CXII透射电镜观察、拍照。

2 结果

2.1 病毒纯化

分离纯化囊膜需要选取完整的具有囊膜的病毒。离心浓缩收集的病毒感染细胞后的上清

液样品中含有大量细胞碎片、未包装完全的病毒或无囊膜的病毒组分。蔗糖密度梯度离心将样品中SGIV病毒及细胞碎片根据各自的密度分层分布在不同的蔗糖密度层, 从而将初步浓缩纯的病毒样品进一步纯化。蔗糖密度梯度离心结果显示, 在从下到上各个蔗糖密度梯度之间(50%~60%、40%~50%、30%~40%)均有样品成分分布, 密度最大的病毒集中在50%~60%的蔗糖梯度(图1, 左离心管); 细胞碎片均留在蔗糖梯度最上部缓冲液或30%~40%蔗糖梯度(图1, 右离心管)。细胞碎片不能进入40%~60%蔗糖梯度, 说明得到的纯化病毒中不含有游离的细胞碎片污染。

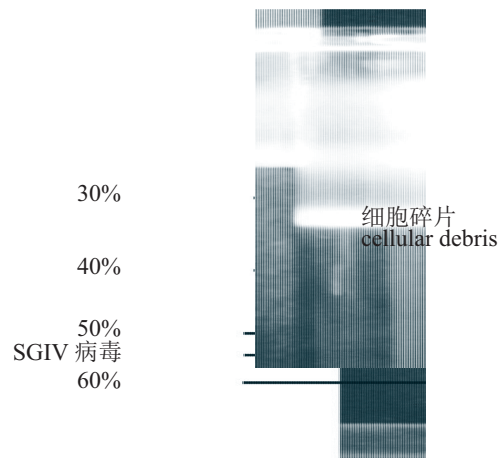


图1 蔗糖密度梯度离心纯化病毒SGIV

左边离心管: 离心分层的病毒SGIV; 右边离心管: 细胞碎片。蔗糖密度梯度离心(从下往上): 60%、50%、40%、30%; 上部为溶解病毒或细胞碎片的TN缓冲液

Fig. 1 Purification of SGIV by sucrose density gradient centrifugation

The tube on the left side showed the layered virus. The tube on the right side showed the cellular debris. The gradient of sucrose density (from down to up): 60%, 50%, 40%, 30%. The virus and cell fragments were dissolved in the TN buffer and were added on the top of the sucrose gradient

将各个密度带病毒样品取出, 进行负染电镜观察, 检查病毒的形态。电镜观察结果显示, 通过蔗糖密度梯度离心纯化的病毒粒子(50%~60%蔗糖梯度), 部分衣壳外具有薄薄的一层囊膜(图2-a)。囊膜层紧紧包裹围绕衣壳层, 组成了病毒的外层膜结构。而处于蔗糖密度梯度其他层的病毒是组装不完全的病毒。不具有囊膜的病毒颗粒外缘轮廓清晰, 从平面图来看, 核衣壳呈规则的正六边形(图2-b)。

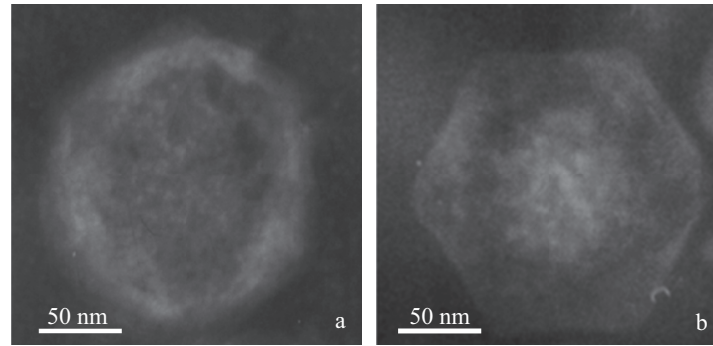


图2 电子显微镜下的SGIV形态结构

Fig. 2 The morphology of SGIV under the electron microscope

2.2 囊膜蛋白电泳分离

将全病毒总蛋白与Triton X-100溶液溶解的病毒囊膜蛋白进行SDS-PAGE分离(图3)。电泳在BIO-RAD大型蛋白电泳装置上恒压进行。由于蛋白组成成分较多,许多蛋白分子量比较接近,为提高分辨率,需要较长的分离胶长度,有利于切胶分离蛋白条带。电泳结果显示,全病毒总蛋白带型和条带数量接近之前的研究报道^[2]。分离的目的囊膜蛋白与总蛋白中的条带一一对应,肉眼可见条带数目超过20个(图3)。这些蛋白条带中,大约有10个条带相对比较明亮,提示这些蛋白丰度较大,是主要囊膜蛋白,其他条带较弱,蛋白丰度比较小,是次要囊膜蛋白。

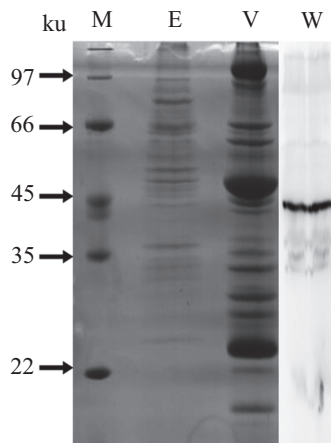


图3 SGIV囊膜蛋白的SDS-PAGE分离及actin免疫印记分析

M. 蛋白Marker; E. 囊膜蛋白; V. 全病毒总蛋白; W. actin蛋白印迹

Fig. 3 Separation of the SGIV viral envelope proteins by SDS-PAGE and Western-blot analysis of actin protein

M. protein marker; E. envelope protein of SGIV; V. the total protein of the virus; W. Western-blot analysis of actin co-purified with SGIV

2.3 来源于宿主的囊膜蛋白组分鉴定

质谱数据搜索SGIV基因组数据库及International Protein Index Human Database Version 3.07(4742362 sequences; 1636675691 residues)数据库。数据库容量扩大,搜索得到的匹配肽段结果增加。除SGIV基因编码的蛋白外,同时搜索到许多非SGIV编码的蛋白,包括4种细胞骨架蛋白以及一些其他细胞蛋白(表1),分别为肌动蛋白(actin)、微管蛋白(tubulin)、类似发动蛋白4(dynamin-like protein 4,该细胞骨架蛋白与细胞的内吞过程紧密相连)、血影蛋白alpha链类似蛋白(similar to spectrin alpha chain spectrin,血影蛋白是类似肌球蛋白的膜外在性蛋白之一)、电压门控离子通道蛋白(voltage-dependent anion channel)、类似核糖体结合蛋白(similar to ribophorin I)、病毒诱导胁迫蛋白(virus-inducible stress protein)。经NCBI序列分析比对,这些蛋白与大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*),牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的蛋白序列同源性较高。

2.4 蛋白印迹与免疫电镜证实actin定位于病毒囊膜

为了对质谱鉴定SGIV囊膜蛋白的结果进行验证,以actin蛋白为例,进行Western-blot实验验证。用actin的抗体(Proteintech)对相应质谱鉴定的囊膜蛋白进行Western-blot分析。结果表明,纯化的SGIV病毒颗粒囊膜成分中含有actin(图3),证实了质谱分析结果。免疫电镜实验表明,金标记颗粒围绕病毒表面(图4),代表actin蛋白定位于病毒囊膜,同时也验证了宿主蛋白包装于病毒的表面。

表 1 质谱鉴定与虹彩病毒囊膜蛋白共纯化的宿主蛋白

Tab. 1 Co-purified host proteins with SGIV envelope proteins identified by MALDI-TOF-MS/MS

序号 no.	蛋白名称 protein name	鉴定方法 identified method	蛋白分子量/u protein molecular mass	蛋白得分 protein score	匹配肽段数 queries matched	蛋白覆盖率/% protein coverage	最佳肽段期望值 best peptide expected value	物种 species
1	肌动蛋白 actin	LC-MALDI	41 710	223	9	32	3.6e-006	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
2	微管蛋白α-1链 tubulin alpha-1 chain	LC-MALDI	49 892	66	3	10	3.8e-005	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
3	类似发动蛋白4 dynamin-like protein 4	1-DE-MALDI	70 644	86	19	27	0.011	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
4	类似血影蛋白α链 similar to Spectrin alpha chain	1-DE-MALDI	232 118	85	19	17	0.016	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
5	病毒诱导胁迫蛋白 virus-Inducible stress protein	1-DE-MALDI	80 076	555	8	19	2.6e-007	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
6	电压门控离子通道 voltage-dependent anion channel	1-DE-MALDI	30 310	315	10	31	1.5e-025	<i>Paralichthys olivaceus</i>
7	类似核糖体结合蛋白I similar to ribophorin I	1-DE-MALDI	67 728	80	6	11	0.044	<i>Danio rerio</i>

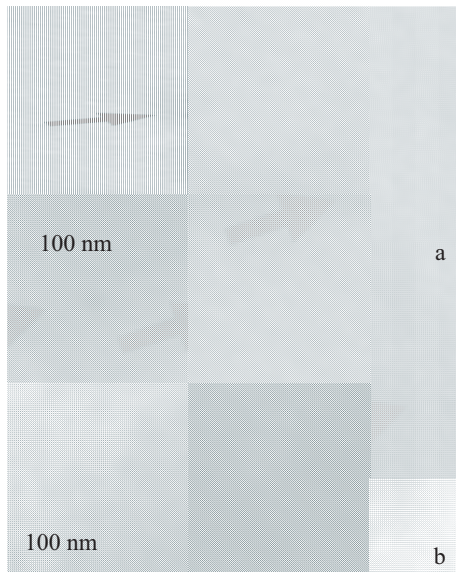


图 4 免疫电镜观察actin蛋白的定位特征

a. actin抗体作为一抗孵育病毒粒子, 金标记抗体作为二抗; b. 对照阴性血清作为一抗孵育病毒粒子, 金标记抗体作为二抗; 箭头指示10 nm金标记颗粒

Fig. 4 Analysis of the localization of actin by immunoelectron microscopy

a. intact of SGIV incubated with anti-actin antiserum as primary antibody followed by gold-labeled secondary antibodies. b. intact SGIV virions incubated with preimmune mouse serum as primary antibody followed by gold-labeled secondary antibodies. 10 nm gold particles were indicated by arrows

2.5 细胞微丝与病毒互作

以上结果表明actin与病毒囊膜蛋白共纯化, 宿主actin蛋白与病毒存在特异性作用, actin在病毒感染过程中可能与病毒相互作用。因

此, 实验检测了细胞actin蛋白和SGIV病毒体外感染过程中病毒的定位。根据文献^[10]方法构建了红色荧光标记MCP基因的重组虹彩病毒RFP-SGIV。实验发现RFP-SGIV在感染细胞后, 在荧光显微镜下能够观察到病毒显示红色荧光, 从而准确跟踪指示SGIV病毒粒子的定位。将重组病毒RFP-SGIV孵育GS细胞后, 随着感染时间的延长, 观察到红色荧光逐渐增多, 并且在病毒感染晚期, 细胞变圆、荧光增强并在包涵体聚集。利用actin抗体(Proteintech)进行免疫荧光实验, 结果发现在SGIV感染24和48 h, actin蛋白指示的微丝边聚化, 绿色荧光分布至细胞的边缘, 而红色荧光也有部分分布在细胞边缘, 和指示actin的绿色荧光共定位(图5)。根据病毒和actin在细胞膜边缘共定位, 而免疫电镜实验观察到actin和病毒直接结合(图4), 认为actin和病毒发生了相互作用, actin在病毒的出芽释放过程中可能发挥了重要作用。

2.6 病毒释放时获得囊膜

为了观察病毒出芽过程中病毒与细胞互作过程, 对SGIV感染的细胞进行了超薄切片并通过电镜观察病毒出芽情况。结果显示, 在病毒感染细胞晚期, 病毒包装成熟, 电镜下呈明显的六边型结构, 但不具有囊膜; 部分病毒远离病毒加工厂, 靠近细胞膜准备出芽释放, 病毒出芽的过程中细胞膜包裹在细胞表面(图6)。说明SGIV的囊膜起源于宿主细胞膜, SGIV在病毒加工厂完成装配后从宿主细胞中释放的同时获得由宿主细胞质膜衍生而来的囊膜。

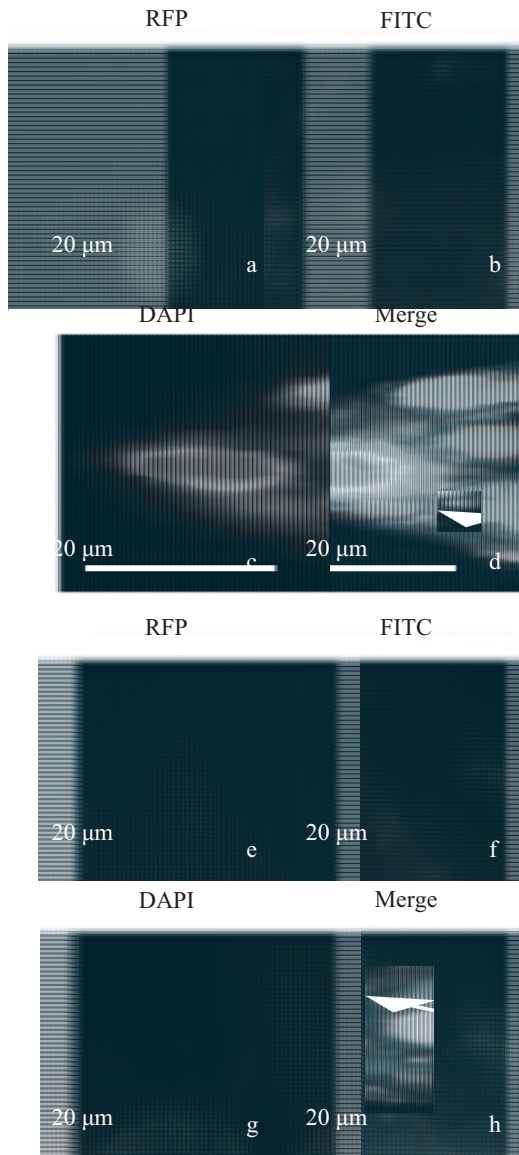


图5 荧光标记重组病毒RFP-SGIV感染GS细胞过程中病毒与actin蛋白的定位特征

a-d. RFP-SGIV感染GS细胞24 h; e-h. RFP-SGIV感染GS细胞48 h。红色荧光代表SGIV感染细胞后病毒的定位; 绿色荧光代表actin蛋白的细胞定位; 蓝色荧光代表细胞核的定位。RFP. 红色荧光蛋白; FITC. 异硫氰酸荧光素; DAPI. 4, 6-二脒基-2-苯基吡啶; Merge. 合成、叠加。白色箭头指示SGIV病毒和actin蛋白共定位

Fig. 5 The cellular localization of the recombinant virus RFP-SGIV and the actin protein during virus infection of GS cells

a-d. RFP-SGIV infection of GS cell at 24 hour; e-h. RFP-SGIV infection of GS cell at 48 hour. Red fluorescence represents the localization of RFP-SGIV; green fluorescence represents the localization of actin protein; blue fluorescent represents the localization of the nucleus. RFP. red fluorescent protein; FITC. fluorescein isothiocyanate; DAPI. 4, 6-diamidino-2-phenylindole; the white arrows indicate the colocalization of the virus and the actin

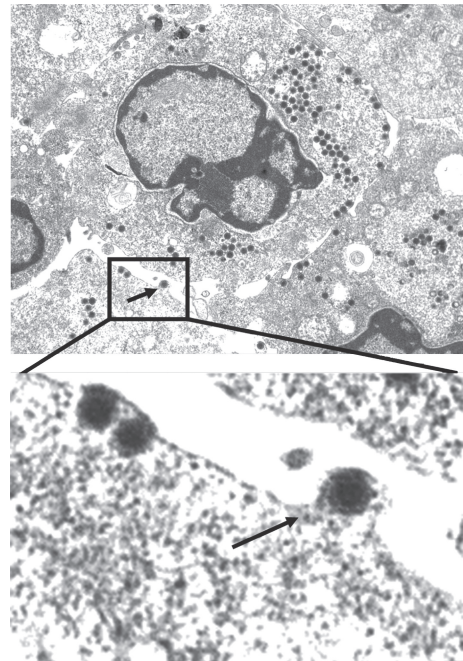


图6 电镜观察SGIV病毒从细胞出芽释放

箭头指示病毒出芽获得囊膜

Fig. 6 SGIV budding from the GS cells observed under electron microscope

The arrow indicates the virus obtained the envelope from the cell

3 讨论

囊膜蛋白在病毒与宿主互动过程中具有重要功能, 因此病毒囊膜蛋白是病毒学研究热点。无脊椎动物虹彩病毒不具有囊膜, 脊椎动物虹彩病毒具有囊膜。SGIV属于具有囊膜型的虹彩病毒。电镜下观察到一部分纯化的SGIV病毒颗粒具有囊膜, 而另外一部分病毒不具有囊膜, 推测病毒在细胞内复制装配后一部分病毒通过出芽获得囊膜; 当细胞裂解时, 大部分病毒没有获得囊膜, 因此不具有囊膜。虹彩病毒的囊膜非常单薄, 所占病毒的组成成分相对小, 只占病毒干物质的7%~9%。病毒囊膜主要由磷脂类物质组成, 蛋白在病毒囊膜中属于次要组成成分, 因此分离纯化囊膜蛋白需要培养大量细胞, 感染增殖病毒, 在浓缩与纯化病毒之后, 从具有囊膜的那一部分病毒中才能分离到囊膜蛋白。在纯化SGIV病毒时, 由于细胞碎片、游离的宿主蛋白密度较小, 不能随病毒进入40%~60%蔗糖梯度, 因此排除了纯化病毒样品被游离细胞碎片及宿主蛋白污染, 同时说明纯化病毒中被鉴定的宿主蛋白来源于病毒, 已

成为病毒的组成成分。

本研究采用了电泳分离—质谱鉴定(ID-MALDI)和色谱—质谱连用鉴定(LC-MALDI)两种方法分离鉴定囊膜蛋白。通过SDS-PAGE将蛋白在较长(12 cm以上)分离胶中根据分子量大小有效分离,得到清晰可辨的蛋白条带。LC-MALDI作为分离鉴定蛋白的方法也能有效鉴定蛋白样品。将质谱分析数据搜索SGIV数据库及NCBI公共数据库,搜索到19个相对应的病毒编码囊膜蛋白^[6],同时也搜索到一些宿主编码的蛋白,包括4种细胞骨架蛋白(肌动蛋白、微管蛋白、类似发动蛋白4、血影蛋白alpha链类似蛋白)和3种其他宿主蛋白(病毒诱导胁迫蛋白、电压门控离子通道蛋白和类似核糖体结合蛋白)。由于石斑鱼基因组数据目前还没有公布,因此搜索到的蛋白序列为同源性较高的已测序物种,如大西洋鲑、牙鲆、斑马鱼等。

在被鉴定的囊膜蛋白中,包装于病毒表面的蛋白存在两种来源:(1)由虹彩病毒本身基因组编码的囊膜蛋白,这符合预期;(2)宿主细胞的蛋白与病毒存在某些结构上的相互联系或功能上的相互作用,在分离纯化病毒与囊膜蛋白过程中这些宿主细胞蛋白被共纯化。这些宿主蛋白可能与病毒存在特异的相互作用,整合于病毒囊膜中。本研究发现SGIV囊膜整合了宿主蛋白,这与人类免疫缺陷病毒、流感病毒、痘病毒、埃博拉病毒等具有宿主细胞起源的特异性整合蛋白的研究结果相似^[11-13]。鉴于actin在病毒感染中的重要作用,通过蛋白印记实验验证了actin存在于病毒蛋白组分中,证明质谱鉴定的7个宿主来源蛋白与病毒共纯化。而且免疫电镜实验观察到actin存在于病毒表面。说明actin可能特异性包装或黏附于病毒表面。

与病毒共纯化的宿主蛋白在病毒感染、复制及释放等生活史中具有重要的功能。文献报道人类免疫缺陷病毒感染宿主细胞时与细胞骨架蛋白互作,细胞骨架蛋白actin等对控制病毒感染与复制、细胞周期、细胞凋亡等发挥重要作用^[14]。整合于病毒的宿主细胞蛋白,可能是在病毒复制过程中病毒在细胞质内组装时利用宿主的某些蛋白组装成病毒的结构蛋白。例如在埃博拉病毒感染宿主细胞后,细胞骨架蛋白actin和tubulin大量集聚在病毒表面,并且在被感染的细胞中actin和tubulin的表达显著增加^[15];宿主的发

动蛋白原本是细胞骨架蛋白,这种蛋白与病毒感染、内吞作用相关连^[16]。病毒可以通过宿主发动蛋白入侵宿主,因此发动蛋白在病毒组装及释放中发挥重要功能。线粒体电压门控离子通道蛋白是与宿主细胞凋亡相关的蛋白,病毒在进入细胞后通过对线粒体电压门控离子通道的调控来参与调节宿主细胞的凋亡^[17];SGIV病毒装配过程中可能利用了线粒体电压门控离子通道蛋白,组装成自身结构蛋白。前期工作表明,将actin和SGIV病毒分别标记后,通过激光共聚焦显微镜观察到在病毒感染早期,病毒颗粒在细胞内运动与微丝密切相关,且病毒粒子与微丝共定位。药物处理破坏微丝后,病毒在细胞内运动速度显著变慢,说明actin参与了病毒在细胞内的运输过程^[18]。本研究进一步发现actin在感染晚期与病毒共定位于细胞膜边缘,且actin直接作用于病毒表面,说明actin与SGIV释放相关,病毒粒子可能通过细胞骨架运送到细胞膜附近进行出芽释放。SGIV在出芽时获得细胞膜,细胞膜上的蛋白及细胞膜附近actin、tubulin等细胞骨架蛋白也同时成为病毒囊膜组成成分,与病毒共同释放。

在本研究中,通过质谱及蛋白印记初步鉴定了7个宿主编码的蛋白存在于虹彩病毒SGIV囊膜成分中,进一步以actin为例探讨与病毒共纯化的宿主蛋白的功能,结果表明actin参与SGIV病毒释放过程。研究结果为理解病毒的释放分子机制提供重要理论基础。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Song W J, Lin Q, Joshi S B, *et al.* Proteomic studies of the Singapore grouper iridovirus[J]. *Molecular Cell Proteomics*, 2006, 5(2): 256-264.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Wang S W, Huang X H, Huang Y H, *et al.* Entry of a novel marine DNA virus, Singapore grouper iridovirus, into host cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis in a pH-dependent manner[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(22): 13047-13063.
- [6] Sheng Z, Qing J W, Huang Y H, *et al.* Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088[J]. *Proteomics*, 2011, 11(11): 2236-2248.
- [7] Johannsen E, Luftig M, Chase M R, *et al.* Proteins of purified Epstein-Barr virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, 101(46): 16286-16291.
- [8] Taylor Matthew P, Koyuncu O, Enquist Lynn W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 427-439.
- [9] Huang X H, Huang Y H, Sun J J, *et al.* Characterization of two grouper *Epinephelus akaara* cell lines: application to studies of Singapore grouper iridovirus (SGIV) propagation and virus-host interaction[J]. *Aquaculture*, 2009, 292(3-4): 172-179.
- [10] Huang Y H, Huang X H, Cai J, *et al.* Construction of green fluorescent protein-tagged recombinant iridovirus to assess viral replication[J]. *Virus Research*, 2011, 160(1-2): 221-229.
- [11] Lodish H F, Porter, M. Specific incorporation of host cell surface proteins into budding vesicular stomatitis virus particles[J]. *Cell*, 1980, 19: 161-169.
- [12] Kolegraff K, Bostik P, Ansari A A. Characterization and role of lentivirus-associated host proteins[J]. *Experiment Biology and Medicine*, 2006, 231: 252-263.
- [13] Saphire A C, Gallay P A, Bark S J. Proteomic analysis of human immunodeficiency virus using liquid chromatography/tandem mass spectrometry effectively distinguishes specific incorporated host proteins[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(3): 530-538.
- [14] Matarrese P, Malorni W. Human immunodeficiencyvirus (HIV)-1 proteins and cytoskeleton: partners in viral life and host cell death[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2005, 12(5): 932-941.
- [15] Gurer C, Cimorelli A, Luban J. Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(9): 4666-4670.
- [16] Bachvaroff R J, Miller F, Rapaport F T. Appearance of cytoskeletal components on the surface of leukemia cells and of lymphocytes transformed by mitogens and Epstein-Barr virus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1980, 77(8): 4979-4983.
- [17] Chiang C F, Flint M, Lin J S, *et al.* Endocytic pathways used by andes virus to enter primary human lung endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164768.
- [18] Lin W, Zhang Z, Xu Z, *et al.* The association of receptor of activated protein kinase C 1(RACK1) with infectious bursal disease virus viral protein VP5 and voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) inhibits apoptosis and enhances viral replication[J]. *Journal Biology Chemistry*, 2015, 290(13): 8500-8510.

Actin filament involved in the release of SGIV from host cells

WANG Zhuxi¹, ZHOU Sheng^{2*}, HUANG Youhua², WANG Shaowen²,
HUANG Xiaohong², ZHOU Yongcan¹, QIN Qiwei^{3*}

(1. *Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China;*

2. *Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;*

3. *College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)*

Abstract: The cytoskeleton such as microfilaments and microtubules play important roles in the mechanism of viral infection, replication release and virus-host cell interactions. In this study, the Singapore grouper iridovirus (SGIV) particles were purified and the viral envelopes were separated from the viral particle by detergent dissolution. The envelope proteins were identified by 1-DE-MALDI TOF and LC-MALDI TOF workflows. Except for viral proteins, 7 host proteins were found to exist in the envelope component including actin. Thus, these host proteins were co-purified with the viral particles. Actin was proved to exist with the envelope by Western-blot. Further, it was observed that the actin proteins existed on the surface of the virus particles by immuno-electron microscopy, suggesting that host original actin is packed to viral particle when SGIV is matured and finally released from the host cell. Actin may be assembled in the viral surface when virus is budding or it is specifically adhered to the viral envelope. This makes actin co-purified with the envelope proteins. Further studies indicated that the virus-infected cell turn round and the viral particles were co-located with the microfilament on the cell surface. This suggested actin was involved in viral release. When the SGIV was released from the cell, the virus obtained the cell membrane as its envelope, which was observed by electron microscopy. It was speculated that actin was specifically packed to the surface of the viral particle when SGIV was released. Together, actin played important roles when the viruses were released from the host cells.

Key words: Singapore grouper iridovirus; envelope protein; actin; viral release

Corresponding author: ZHOU Sheng. E-mail: zhous@scsio.ac.cn;

QIN Qiwei. E-mail: qinqw@scau.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China Young Scholar (31502207); Key Project of National Natural Science Foundation of China (31330082); Project for Guangdong Marine Fishery Science and Technology and Industry (A201501C01)