

凡纳滨对虾LvRab5B蛋白与IHHNV病毒蛋白的互作

刘青云¹, 李强勇¹, 王韶韶², 朱威霖¹, 彭敏¹,
曾地刚¹, 陈秀荔¹, 杨春玲¹, 赵永贞¹,
彭金霞¹, 何莘萍¹, 韦嫔媛¹, 陈晓汉^{1*}

(1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021;
2. 广西大学动物科技学院, 广西南宁 530005)

摘要: 为了探究LvRab5B蛋白在凡纳滨对虾抗病毒感染中的作用, 实验分别构建了LvRab5B蛋白在昆虫和酵母细胞中的融合表达载体, 将不同的载体导入不同的细胞中, 利用免疫荧光和酵母双杂交的方法研究了LvRab5B蛋白在昆虫细胞中的表达以及LvRab5B蛋白与病毒IHHNV之间的互作关系; 通过qRT-PCR方法研究了该蛋白在健康对虾不同组织中的表达情况以及凡纳滨对虾分别感染IHHNV和WSSV后不同时间点的相对表达量。结果显示, LvRab5B基因融合蛋白能够在昆虫细胞中表达; LvRab5B蛋白与IHHNV病毒衣壳蛋白CP无相互作用, 而非结构蛋白NS1相互作用明显, 与非结构蛋白NS2作用较弱。qRT-PCR结果显示, LvRab5B基因在凡纳滨对虾心脏、鳃腺、肠道、胃、肝胰脏和肌肉中都表达, 在肠道中表达量最高, 肝胰脏次之; LvRab5B蛋白在凡纳滨对虾机体感染病毒前后的表达情况不同, 感染初期表达降低, 随后迅速上升, 末期下降。研究表明, LvRab5B基因参与凡纳滨对虾抵抗IHHNV和WSSV病毒的先天免疫过程, 为进一步研究LvRab5B蛋白在对虾机体中的免疫功能及作用机制奠定了基础。

关键词: 凡纳滨对虾; LvRab5B蛋白; IHHNV; 酵母双杂交

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)亦称南美白对虾, 是世界上对虾养殖的三大品种之一, 也是我国海水养殖的主导品种。由病毒、细菌和真菌等病原体引起的传染性疾病是影响对虾养殖业健康发展的主要障碍之一, 有效控制对虾养殖病害一直是对虾养殖业的研究重点, 对虾免疫学研究是该领域的热点。凡纳滨对虾的免疫系统是非特异性免疫系统, 主要包括细胞免疫(主要是血淋巴细胞吞噬作用)和体液免疫(生物活性分子)。在对虾的体液免疫系统中已经研究发现, 血淋巴中的各种免疫因子通过识别、沉淀、包裹、溶解等方式抑制病原体的生长或释放, 或者直接将其杀灭并排出体外^[1]。因此有

必要针对各种免疫因子在对虾机体中的作用机理进行研究, 阐明对虾的免疫调节机制, 为对虾的病害防控提供科学依据。

近年来很多研究表明, Rab (Ras-like protein in rat brain)蛋白不但参与调节囊泡的转运, 还广泛地参与细胞的生长、增殖、分化、凋亡和细胞内信号转导等过程^[2-6]。Rab蛋白是属于Ras蛋白超家族的一类小G蛋白, 分子量大多为22~25 ku, 细胞内定位十分广泛, 分布于胞内各个细胞器的胞膜浆中, 维持蛋白转运的连续性和细胞器膜的完整性^[7]。所有的真核生物都有Rab分子参与调节囊泡的转运, 目前已经发现有70多种Rab蛋白, 大多数的Rab蛋白都与囊泡转运过程

收稿日期: 2017-08-15 修回日期: 2017-11-03

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 广西科技计划(桂科AB16380189, 201633015); 八桂学者专项(BGXZ-NMBDX); 广西南美白对虾产业创新团队(nycytxgxcxt-d-03-14)

通信作者: 陈晓汉, E-mail: chnxhn@163.com

有关^[8]。Rab家族中的Rab5在这方面的研究相对比较, Rab5通过与其效应分子的作用参与细胞骨架的构建、细胞内信号的转导、细胞内蛋白质的分选和定向运输以及吞噬病原体等过程^[9-11]。有研究发现, Rab5可通过将效应分子AP-PL1从细胞膜中转运到核内而调控表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)引起细胞增殖, 过表达失活突变的Rab5-S34N则能够阻断细胞的增殖^[12]。在研究人的乙肝病毒病的过程中, 发现Rab5的定位直接影响着宿主细胞是否感染乙肝病毒, 认为其参与病毒的转运过程^[13]。Rab5同时参与狂犬病毒的早期入侵^[14]。在癌症研究中发现正常上皮细胞的抗癌作用过程实质上影响了Rab5在相邻转化细胞中的积累, 表明Rab5介导的内吞作用是哺乳动物体内正常和转化的上皮细胞之间竞争性相互作用的关键调节因子^[15]。在胰腺癌研究中发现Rab5具有抑制增殖、侵袭和细胞转移的作用, 有助于胰腺癌患者不良预后和进展^[16]。

鉴于Rab家族蛋白是真核细胞内膜系统转运途径中重要的调控因子并且在细胞免疫中发挥重要作用, 研究*LvRab5B*基因是否在对虾病毒感染方面也发挥作用对于深入解析对虾生长调控和病毒感染分子机理具有重要意义。然而, 目前在甲壳动物中有关*LvRab5B*基因的研究报道极少。本实验拟探讨*LvRab5B*蛋白与对虾传染性皮下及造血组织坏死病毒(infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, IHNV)之间的互作关系; 通过克隆重组的方法构建原核表达载体和真核表达载体进行免疫原性分析; 同时通过荧光定量PCR技术比较*LvRab5B*基因在感染和未感染IHNV病毒的凡纳滨对虾不同组织中的差异表达, 分析*LvRab5B*蛋白在抗IHNV病毒感染中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、菌株及主要试剂

实验用凡纳滨对虾采用广西水产研究所广西国家级南美白对虾遗传育种中心选育的无特定病原(specific pathogen free, SPF)对虾, 体长为12~15 cm, 体质量为20 g。酵母菌Y187、酵母菌Y2HGold, In-Fusion HD Cloning Kit、pGBKT7、pGBKT7-53、pGBKT7-Lam、pGADT7-T质粒、

配制酵母生长培养基所用的必须氨基酸均购自Clotech公司; PGEM-T Easy载体、T₄连接酶购自Promega公司; 大肠杆菌DH5 α 购自TIANGEN公司。pIZ/V5-His载体购自Invitrogen; pIZ/V5-GFP载体由国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室馈赠; 粉纹夜蛾High FiveTM细胞(Trichoplusia ni)购自Life公司; Rabbit anti-V5单克隆抗体购自Millipore; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联的羊抗兔IgG购自Promega公司; pEASYTM-E2载体和anti-6His抗体购自北京金式生物; MagExtractor His-Tag试剂盒、限制性内切酶EcoR I、BamH I、Kpn I和Xho I购自TOYOBO公司; Premix TaqTM (Ex Taq Version 2.0 plus dye)、DNA凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自TaKaRa公司; 测序由invitrogen公司完成。

1.2 *LvRab5B*基因和IHNV病毒CP、NS1和NS2基因的PCR扩增及重组质粒的构建

IHNV病毒CP、NS1和NS2基因的诱饵载体pGBKT7-CP、pGBKT7-NS1和pGBKT7-NS2由本实验室前期构建^[17]。根据NCBI公布的*LvRab5B*基因序列(GenBank Accession No.JQ901103)设计引物, 上游引物*LvRab5BF*: 5'-GGAGGCCAGT-GAATTCATGGCACAGAGAGGAACAGC-3'(下划线为EcoR I酶切位点); 下游引物*LvRab5BR*: 5'-CGAGCTCGATGGATCCTCACTTGCAA-CATCCAGCAGTG-3'(波浪线为BamH I酶切位点), 由深圳华大公司合成。分别以本实验室保存的cDNA为模板, 使用Premix TaqTM (Ex Taq Version 2.0 plus dye)对其进行PCR扩增, 反应体系: Premix TaqTM 25 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各2 μ L, 模板10 ng, 补ddH₂O至50 μ L。PCR扩增程序: 98 $^{\circ}$ C变性10 s, 64 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经1.5%琼脂糖胶验证后, 用TaKaRa胶回收试剂盒回收。

将*LvRab5B*基因进行EcoR I和BamH I的双酶切, 反应体系: BamH I 10 u, EcoR I 10 u, 10 \times Buffer 2 μ L, DNA 1 μ g, 补ddH₂O至20 μ L; 反应条件: 37 $^{\circ}$ C 4 h。酶切产物进行切胶回收纯化后与用相同酶双酶切的pGBKT7线性载体连接。连接产物转化DH5 α 感受态细胞, 培养物涂布在50 μ g/mL卡那霉素的YPDA固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C过夜培养。经PCR初步鉴定后挑选阳性菌落送in-

vitrogen公司测序。测序结果正确的阳性克隆分别命名为pGADT7-LvRab5B, 并将阳性克隆摇菌扩大培养后提取质粒DNA。

1.3 pGADT7-LvRab5B自激活性检测

按照Clotech Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System手册进行。将导入pGADT7-LvRab5B载体, 阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T)、阴性对照(pGBKT7-Lam+pGADT7-T)和空白对照(pGBKT7+pGADT7)质粒的Y187划线于分区的SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-His, SD/-Leu/-X- α -Gal和SD/-Leu/X- α -Gal/AbA平板上, 30 °C培养3~5 d, 观察分析自激活性。

1.4 细胞表达载体构建及免疫荧光观察

设计LvRab5B蛋白昆虫表达载体的特异性引物, 上游引物R5ZF: 5'-GGGGTACCATGGACATGGCACAGAGAGGAACAGC-3'(下画线为Kpn I 酶切位点); 下游引物R5ZR: 5'-CCGCTCGAGCGCTTGCAACATCCAGCAGTG-3'(波浪线为Xho I 酶切位点)。LvRab5B基因扩增产物与pIZT/V5-His载体经Kpn I 和Xho I 双酶切后连接过夜, 连接产物转化Top10感受态细胞, 涂布在50 μ g/mL博来霉素的LB固体培养板中, 37 °C过夜培养。经PCR初步鉴定后挑选阳性菌落送invitrogen公司测序, 测序结果正确的阳性克隆命名为pIZT/V5-LvRab5B, 并将阳性克隆摇菌扩大培养后提取质粒DNA。

在6孔板中接种50%High Five昆虫细胞, 27 °C贴壁培养过夜; 将1 μ g pIZT/V5-LvRab5B质粒与200 μ L培养基混匀于1.5 mL的EP管中制备A液; 另取一个1.5 mL的EP管加入200 μ L培养基和2 μ L cellfectinII (invitrogen), 混匀制备B液; 将A液和B液混合并颠倒混匀, 2 000 \times g离心30 s制备C液, 将C液置27 °C培养箱中预热30 min; 在C液中加入400 μ L 27 °C预热的新鲜培养基混匀, 2 000 \times g离心30 s, 然后加入去除培养基的细胞培养板中, 27 °C培养3 h; 更换新鲜培养基, 观察细胞生长状况, 继续培养48~60 h。

High Five细胞转染质粒48 h后, 弃培养基后用PBS洗1次; 加4% PFA (多聚甲醛)固定细胞, 室温放置10 min; 用PBS洗涤细胞2次; 0.5% Triton-X处理10 min; PBS洗2次; 1% BSA-TBST 200 μ L室温30 min; 加100 μ L一抗溶液(Rabbit anti-V5

1 : 500溶于1% BSA-TBST), 室温放置1 h; 1% BSA-TBST洗2次, 每次5 min; 加100 μ L带有荧光标记的二抗(Rodamine标记的羊抗兔二抗1 : 100溶于1% BSA-TBST), 室温避光放置1 h; TBST洗3次, 每次5 min, 再用PBS洗2次; 0.5 μ g/mL DAPI (溶于PBS)染核3 min; PBS洗2次, 每次5 min; 用Moveil封片, 干燥20 min, 4 °C避光保存, 用荧光显微镜观察。

1.5 LvRab5B基因原核表达及Western-blot检测

LvRab5B基因添加His标签克隆至pEASY™-E2原核表达载体中, 并转化大肠杆菌E.coli BL21 (DE3), 经0.1 mol/L IPTG诱导, 用MagExtractor His-Tag试剂盒纯化目的蛋白, 并用His标签抗体进行Western-blot检测分析。

1.6 总RNA的提取及cDNA的合成

液氮下充分研磨100 mg凡纳滨对虾肌肉组织; 加入2 mL RNA提取试剂TRIzol, 静置至组织完全融化, 研磨至澄清; 将样品转移到2个1.5 mL EP管中, 室温静置5 min; 4 °C 13 500 r/min离心5 min; 将上清液移至新的1.5 mL离心管中; 加入0.2 mL/mL氯仿, 上下颠倒混匀, 室温放置5 min; 4 °C 13 500 r/min离心15 min (离心后分上中下3层); 转移上层液体约500 μ L至新管中; 加入500 μ L异丙醇(等体积); 上下颠倒, 室温静置10 min; 4 °C 13 500 r/min离心10 min, 弃上清液; 加入1 mL 75% 乙醇(750 μ L无水乙醇+250 μ L RNase-Free Water), 轻微上下颠倒, 清洗沉淀; 4 °C 13 500 r/min离心5 min, 弃上清液; 在RNA超净台中室温静置干燥5 min; 加入25 μ L RNase-Free Water溶解, 通过琼脂糖电泳和分光光度计测定260和280 nm的吸光值来确定RNA的质量和浓度。达标后放置-80 °C保存备用。

取1 μ g总RNA参照反转录试剂盒(TaKaRa Code no.RR047A)进行逆转录。以10 μ L反应体系为例, 在PCR管中加入2 μ L 5 \times gDNA Eraser Buffer、1 μ L gDNA Eraser、1 μ g总RNA和RNase Free dH₂O至10 μ L体积, 混匀, 42 °C反应2 min, 取出后迅速放至冰上冷却。继续加入10 μ L反应液, 反应液在冰上配置, 体系为1 μ L PrimeScript RT Buffer Enzyme Mix I、1 μ L RT Primer Mix、4 μ L 5 \times PrimeScript Buffer 2和4 μ L RNase Free dH₂O, 混匀, 反应条件为42 °C 15 min、85 °C 5 s。

1.7 *LvRab5B*基因的荧光定量实验

实验对虾于水族设备中暂养2 d后进行IHHNV病毒感染实验。将IHHNV和对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)病毒液分别注射到健康的凡纳滨对虾中,注射量为100 μL /只(10^6 拷贝数),对照组注射等体积的PBS缓冲溶液,注射后取0、2、4、6、8、12、24、36、48、72、84和108 h采集对虾的心脏、腮、肠道、胃、肝脏、肌肉等组织快速置于液氮中保存。实验所需的引物18SF: 5'-CTCTGCTGAACCGCATTACTTG-3'; 18SR: 5'-TGCCGAGGGTTTTGGTCT-3'; *LvRab5B*-F: 5'-GGAGACCTCTGCTAAGACTGCTATG-3'; *LvRab5B*-R: 5'-CTGTGCTGGCTGGTTATTGG-3'由上海生工合成。PCR反应体系: 2 μL 的cDNA模板, 12.5 μL 2 \times SYBR Premix Ex *Taq* II Buffer, 1 μL 引物(10 $\mu\text{mol/L}$),加水至总体积为20 μL 。PCR反应在7500Fast (ABI)热循环仪上进行,反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s进行40个循环。每个组织设3个平行,基因的相对mRNA水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算,结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,采用SPSS 19.0进行ANOVA单因素方差分析, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 *LvRab5B*基因的扩增及载体构建

PCR扩增*LvRab5B*,胶回收相应的目的片段,与经双酶切的酵母表达载体pGADT7进行IN-Fusion连接,获得pGADT7-*LvRab5B*,测序结果显示,阳性克隆目的片段含*LvRab5B*基因完整序列,且阅读框正确,表明已成功构建了pGADT7-*LvRab5B*载体。*LvRab5B*扩增产物与pIZT/V5-His载体经*Kpn* I和*Xho* I双酶切后连接,通过克隆重组的方法构建pIZT/V5-*LvRab5B*载体,pIZT/V5-*LvRab5B*载体经双酶切验证后送Invitrogen公司测序,测序分析表明,*LvRab5B*基因序列成功链接入载体pIZT/v5中(图1)。

2.2 pGADT7-*LvRab5B*酵母融合载体自激活性检测

将pGADT7-*LvRab5B*载体、阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T)、阴性对照(pGBKT7-Lam+pGADT7-T)和空白对照(pGBKT7+pGADT7-*LvRab5B*)质粒分别转化Y187酵母菌并分别划线

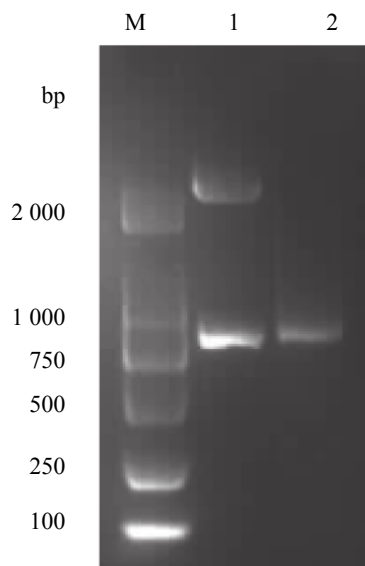


图1 pIZT/V5-*LvRab5B*载体双酶切电泳图

M. DL2000, 1. pIZT/V5-*LvRab5B*载体经*Kpn* I和*Xho* I双酶切, 2. *LvRab5B*

Fig. 1 pIZT/V5-*LvRab5B* electrophoresis by double digestion

M. DL2000, 1. pIZT/V5-*LvRab5B* by *Kpn* I and *Xho* I enzyme digestion, 2. *LvRab5B*

于分区的SD/-Leu、SD/-Trp、SD/-His、SD/-Leu/X- α -Gal和SD/-Leu/AbA平板上。30 $^{\circ}\text{C}$ 培养3~5 d。结果显示,在SD/-Leu每组菌均能生长,说明质粒pGADT7-*LvRab5B*已转入Y187酵母中(图2-1a、1b、1c、1d);在SD/-Trp固体培养基上阳性对照,阴性对照以及空白杂交对照均有生长,而pGADT7-*LvRab5B*组无菌落生长(图2-2a、2b、2c、2d),说明转入pGADT7-*LvRab5B*载体的酵母株无pGBKT7诱饵载体的转入;在SD/-His培养板上只有阳性对照能生长,说明单独的pGADT7-*LvRab5B*载体酵母株不能激活HIS3报告基因(图2-3a、3b、3c、3d);用SD/-Leu/X- α -Gal和SD/-Leu/AbA检验pGADT7-*LvRab5B*是否对MEL1和AUR1-C报告基因有自激活性,结果显示,4组菌均能在SD/-Trp/X- α -Gal固体培养基上生长,但只有阳性对照为蓝色,且颜色很早就出现,其余为粉色,因此可以判断pGADT7-*LvRab5B*载体对MEL1报告基因无自激活性(图2-4a、4b、4c、4d),而在SD/-Leu/AbA固体培养基上除互作的阳性对照能生长外,其余分区未见有菌落生长,表明诱饵载体对AUR1-C报告基因无自激活作用(图2-5a、5b、5c、5d)。

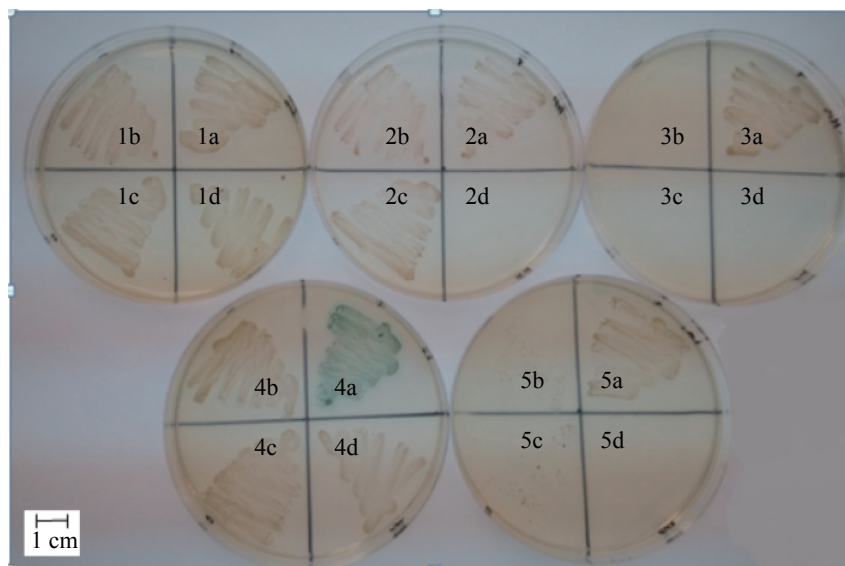


图 2 pGADT7-LvRab5B载体自激活性检测

1. SD/-Leu培养板, 2. SD/-Trp培养板, 3. SD/-His培养板, 4. SD/-Leu/X- α -Gal培养板, 5. SD/-Leu/AbA培养板; a. 阳性对照(pGBKT7-53+pGADT7-T), b. 阴性对照(pGBKT7-Lam+pGADT7-T), c. 空白杂交对照(pGBKT7+pGADT7-LvRab5B), d. pGADT7-LvRab5B

Fig. 2 pGADT7-LvRab5B vector from activity detection

1. SD/-Leu culture plate, 2. SD/-Trp culture plate, 3. SD/-His culture plate, 4. SD/-Leu/X- α -Gal culture plate, 5. SD/-Leu/AbA culture plate; a. positive control (pGBKT7-53+pGADT7-T), b. negative control (pGBKT7-Lam+pGADT7-T), c. blank hybridization control (pGBKT7+pGADT7-LvRab5B), d. pGADT7-LvRab5B

2.3 酵母双杂交mating结果

将经阳性检测后的pGBKT7-CP、pGBKT7-NS1和pGBKT7-NS2诱饵菌株Y2HGold分别与阳性的pGADT7-LvRab5B Y187酵母株进行融合培养, 经显微镜观察融合菌株呈三叶草形状, 表明融合效果良好。将融合酵母菌株稀释涂布于SD/-Trp/-Leu/-X- α -Gal/AbA缺陷平板上, 酵母培养箱中30 °C倒置培养3~5 d。结果发现, 在二缺陷培养板上, 涂布的pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B (图3-a), 涂布的pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B (图3-b), 涂布的pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B (图3-c)都出现蓝色的菌斑; 空白对照组没有出现蓝色的菌斑。

为了进一步确认它们之间是否存在假阳性, 实验将在SD/-Trp/-Leu/-X- α -Gal/AbA缺陷平板上生长的菌斑进行PCR检测, 各挑选蓝色阳性菌斑10株至SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/-X- α -Gal/AbA缺陷培养板上培养3~5 d。结果显示, pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B菌株有8株生长, 并显蓝色(图4-b1)且蓝色较深、菌斑较大; pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B菌株无生长(图4-b2); 而pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B菌株只出现1颗生长, 呈蓝色(图4-b3)。

2.4 免疫荧光观察LvRab5B蛋白在细胞中的表达

High Five昆虫细胞在光学显微镜下呈圆形, 在培养板中贴壁生长, 接种High Five细胞增殖至50%时进行转染实验。免疫荧光结果显示, Rod-amine标记经荧光显微镜观察胞质呈红色, 利用DAPI染胞核经荧光显微镜观察细胞核呈蓝色, 将荧光标记的细胞图片进行merge后形成一个完整细胞的图片(图5), 表明LvRab5B在部分High Five细胞中表达。

2.5 Western-blot分析LvRab5B蛋白

LvRab5B蛋白添加His标签克隆至pEASYTM-E2原核表达载体中, 并转化大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)。诱导、纯化并进行Western-blot分析, 用His标签抗体检测显示表达的蛋白出现单一的条带, 通过氨基酸序列估算分子量结果一致(图6)。结果可以证明其是凡纳滨对虾的LvRab5B蛋白。

2.6 凡纳滨对虾的LvRab5B基因mRNA表达谱分析

qRT-PCR研究LvRab5B基因的mRNA在病毒感染前不同组织中的表达水平。凡纳滨对虾18S

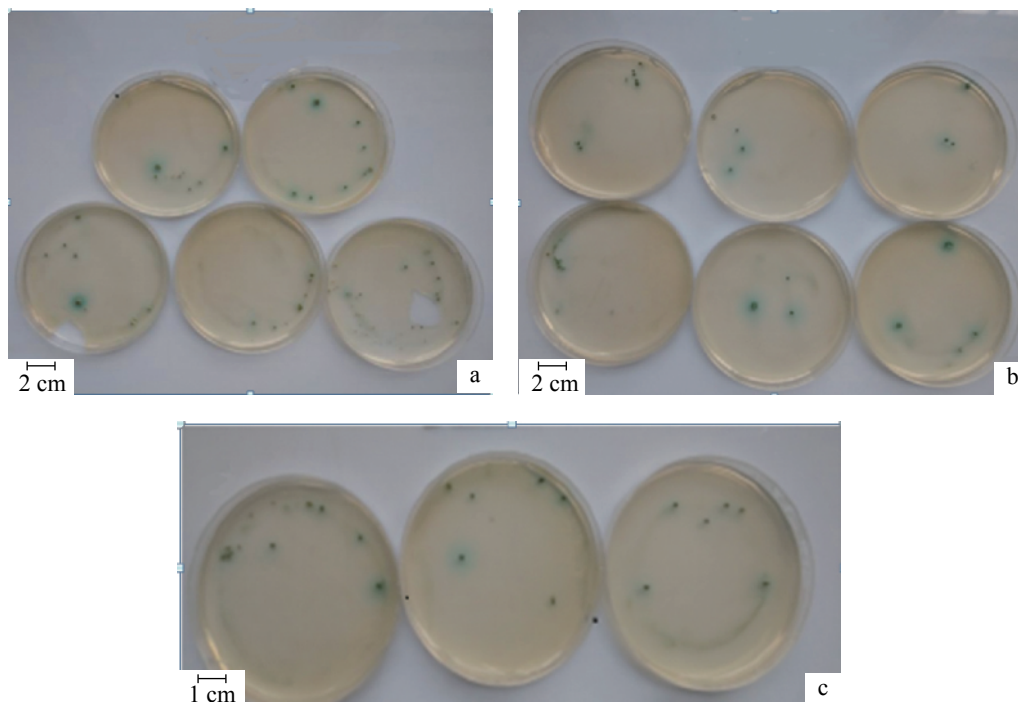


图3 SD/-Trp/-Leu/-X-α-Gal/AbA缺陷平板上融合菌株涂布结果

a.pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B融合菌株, b.pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B融合菌株, c.pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B融合菌株

Fig. 3 Result of yeast fusion coating on SD/-Trp/-Leu/-X-α-Gal/AbA culture plate

a.pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, b. pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, c. pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B yeast fusion

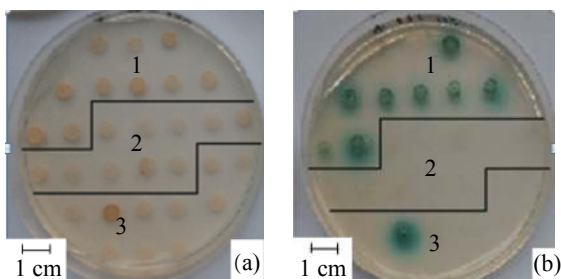


图4 融合菌株在二缺或四缺陷培养板上涂布结果

(a)各点10个阳性菌株在SD/-Trp/-Leu培养板上培养, a-1. pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B融合菌株; a-2. pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B融合菌株, a-3. pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B融合菌株; (b)从a中10个阳性菌株对应拷贝在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/-X-α-Gal/AbA培养板上培养, b-1. pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B融合菌株, b-2. pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B融合菌株, b-3. pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B融合菌株

Fig. 4 Result of yeast fusion coating on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/-X-α-Gal/AbA culture plate

(a)each of the 10 positive strains was cultured on SD/-Trp/-Leu culture plate, a-1. pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, a-2. pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, a-3. pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B yeast fusion; (b)the corresponding copies of 10 positive strains from a were cultured on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/-X-α-Gal/AbA culture plate, b-1. pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, b-2. pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B yeast fusion, b-3. pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B yeast fusion

rRNA 作为内参基因, qRT-PCR结果显示, *LvRab5B* 基因在对虾6个组织中均有表达, 表达量由高到低依次为: 肠道>肝胰脏>心脏>胃>鳃>肌肉。其中, 在肠道中的表达量最高, 极显著高于其他组织($P<0.01$);肝胰脏和心脏的表达量极显著高于胃、鳃和肌肉($P<0.01$);胃、鳃和肌肉的表达量无显著性差异($P>0.05$)(图7-a)。为了探讨 *LvRab5B* 基因的先天免疫反应, 以肝胰脏为例, 研究对虾感染IHHNV和WSSV不同时间点 *LvRab5B* 基因的mRNA表达情况, 取感染病毒0、2、4、6、8、12、24、36、48、72、84和108 h肝胰脏, qRT-PCR显示对虾在感染IHHNV后0~36 h *LvRab5B* 基因mRNA表达水平降低, 48~72 h上升, 在84~108 h后降低; 对虾在感染WSSV后0~72 h *LvRab5B* 基因mRNA表达水平降低, 84上升, 在108 h后降低(图7-b)。

3 讨论

酵母双杂交系统是在酵母体内分析蛋白质—蛋白质相互作用的基因系统, 酵母双杂交系统自建立以来得到了广泛的应用, Lin等^[18]用酵母双杂交技术证明GCRV非结构蛋白NS80与NS38、

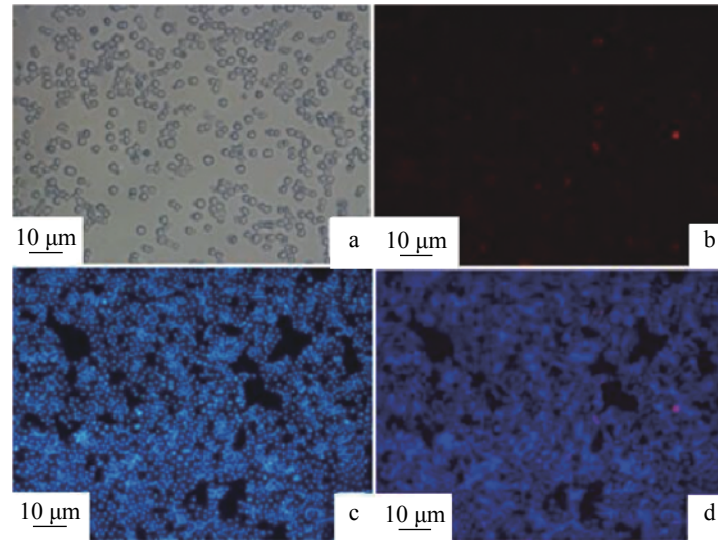


图 5 LvRab5B免疫荧光染色观察

(a) 普通视野下昆虫细胞, (b) Rhodamine 荧光染色, (c) DAP 染核, (d) b 和 c 合并

Fig. 5 Immunofluorescent analysis of LvRab5B localization in High Five cells

(a) brightfield, (b) Rhodamine fluorescence staining, (c) A DAPI staining was performed on the cells, (d) b merge with c

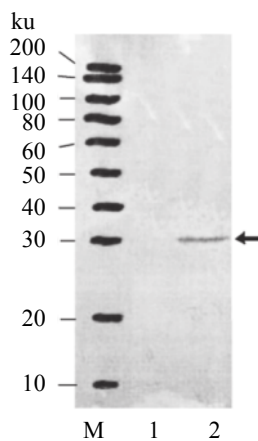


图 6 Western-blot 检测 LvRab5B 蛋白的表达

M. 分子标签; 1. 未诱导组; 2. LvRab5B; 箭头所示为融合蛋白

Fig. 6 Western-blot analysis with monoclonal anti-His antibodies

M. molecular size standards; 1. uninduced culture; 2. LvRab5B by induced culture. The fusion proteins are indicated by an arrow

VP4、VP6 存在相互作用。本实验 pGADT7-Lv-Rab5B 酵母融合载体自激活活性检测中, HIS3、MEL1 和 AUR1-C 均未被激活, 说明本次构建的 pGADT7-LvRab5B 载体无自激活活性。pGADT7-Lv-Rab5B 与诱饵载体融合杂交涂布于 SD/-Trp/-Leu/-X- α -Gal/AbA 二缺陷平板上, 酵母培养箱中 30 °C 倒置培养 3~5 d, 3 组融合菌株长出了蓝色菌斑, 理论上 CP、NS1、NS2 表达的蛋白与 Lv-

Rab5B 蛋白存在相互作用, 空间拉近, 激活了 UAS 下游的启动子, 启动子下游序列得到转录, 激活了报告基因 MEL1 和 AUR1-C^[19]。进一步 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/-X- α -Gal/AbA 四缺陷培养板筛选, 结果显示, pGBKT7-NS1+pGADT7-LvRab5B 菌株有 8 株生长, 并显蓝色且蓝色较深、菌斑较大, 说明 NS1 与 LvRab5B 蛋白具有相互作用, 且作用较强; pGBKT7-CP+pGADT7-LvRab5B 菌株无生长, 说明 CP 与 LvRab5B 蛋白无相互作用, 为假阳性; 而 pGBKT7-NS2+pGADT7-LvRab5B 菌株只出现 1 颗生长, 呈蓝色, 说明 NS2 与 LvRab5B 存在较弱的相互作用。由此推断 LvRab5B 蛋白是 IHHNV 非结构蛋白的靶蛋白, 为研究 IHHNV 感染对虾的作用机制提供重要思路。

Rab5 主要以 Rab5A、Rab5B 和 Rab5C 等 3 种形式存在^[20], 主要存在于质膜、网格蛋白介导的有被小泡和早期内体上^[21], 并且这 3 种异构体在细胞内相互重叠分布^[22], 参与细胞的胞吞作用, 是早期胞吞途径中的一个重要限速因子^[23]。Rab5B 基因与其他 Rab 系列基因有着相似的生物学功能, 都参与膜泡的融合及运输、细胞内胞吞胞吐作用、细胞内蛋白质的分选和定向运输, 也可能参与吞噬白细胞和消化凋亡细胞的过程^[24]。本实验将 LvRab5B 基因克隆至带 His 标签的载体 PET-28a 原核表达载体中, 诱导、纯化进行 Western-blot 分析, 目的条带大小与通过氨基酸序列

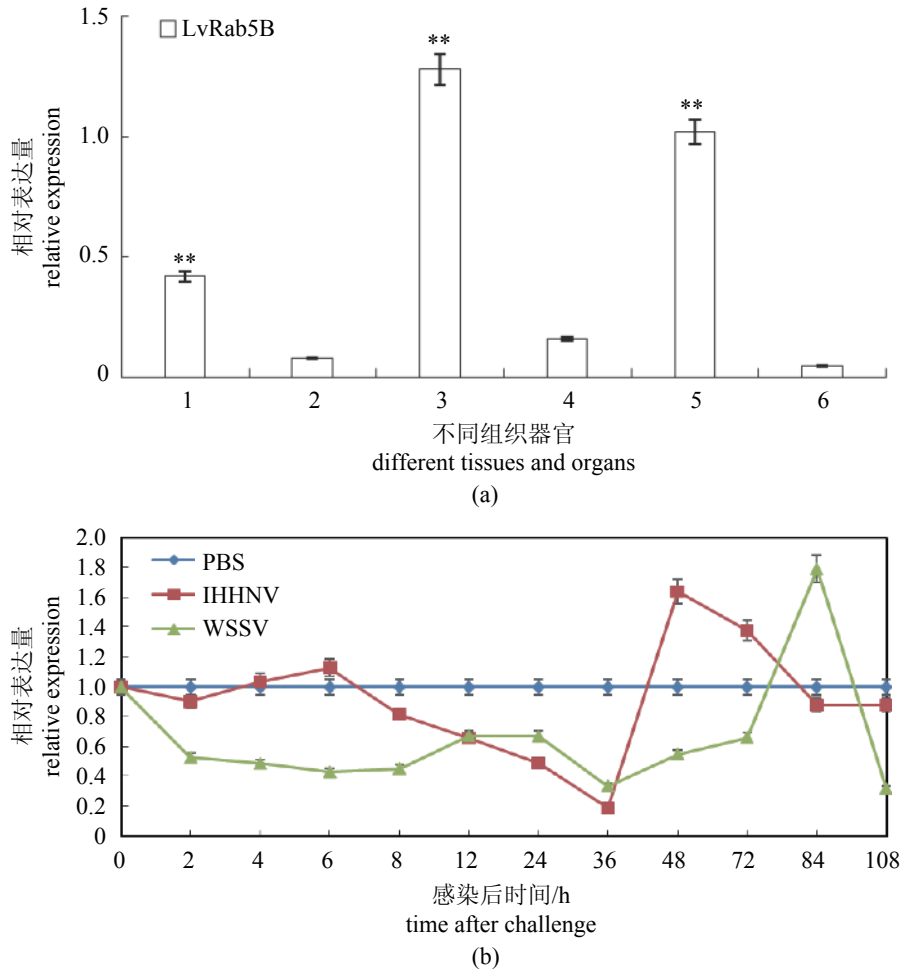


图 7 *LvRab5B*基因mRNA相对表达量分析

(a) *LvRab5B*基因在不同组织器官中的表达, 1.心脏、2.鳃、3.肠、4.胃、5.肝胰脏、6.肌肉; (b) *LvRab5B*在病毒感染不同时间的表达; **代表差异极显著, $P < 0.01$

Fig. 7 *LvRab5B* mRNA relative expression analysis

(a) *LvRab5B* mRNA expression in various tissues and organs from *L. vannamei* before viral infection, 1. heart, 2. gill, 3. intestine, 4. stomach, 5. hepatopancreas, 6. muscle; (b) *LvRab5B* expression in the hepatopancreas of *L. vannamei* after IHHNV and WSSV challenge; ** represents very significant differences, $P < 0.01$

估算的分子量一致。免疫荧光实验说明, *LvRab5B*基因在部分High Five细胞中表达, 表达较弱。本实验qRT-PCR结果显示*LvRab5B*基因在心脏、鳃腺、肠道、胃、肝胰脏和肌肉中都有表达, 在肠道中表达量最高, 肝胰脏次之。肠道是吸收和运输营养物质的重要组织^[25], *LvRab5B*在肠道的高表达由此推测*LvRab5B*参与对虾营养物质吸收和运输营养物质。

IHHNV和WSSV病毒是危害对虾养殖的主要病原体^[26], IHHNV能使对虾生长受阻, WSSV能使感染的对虾3~10 d内全部死亡, 它们严重危害了对虾养殖业的发展。本实验通过qRT-PCR的方法研究对虾感染IHHNV和WSSV不同时间点*Lv-*

*Rab5B*基因的mRNA表达情况, qRT-PCR显示对虾在感染IHHNV后0~36 h *LvRab5B*基因mRNA表达水平降低, 48~72 h上升, 在84~108 h后降低; 对虾在感染WSSV后0~72 h *LvRab5B*基因mRNA表达水平降低, 84 h上升, 在108 h后降低。表明*LvRab5B*参与了对虾感染IHHNV和WSSV病毒的免疫反应。Posiri等^[27]研究发现斑节对虾(*Penaeus monodon*)*Rab5*表达受到抑制后表现出延迟对虾感染YHV后的死亡时间, 表明*Rab5*参与YHV早期内涵体运输, 暗示其在感染早期阶段的作用。Wucherpfennig等^[28]研究表明在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中*Rab5*的功能缺陷将影响内吞作用率。此外, *Rab5*蛋白是许多病毒如博尔纳病病

毒(BDV)、牛流行热病毒(BEFV)、乙型肝炎病毒、口蹄疫病毒(FMDV)在宿主细胞内运输所必需的^[29-31]。Rab5B能与早期胞内自身抗原相互作用, 调节早期内涵体的膜融合, 进而影响胞吞作用^[32]。而且Rab5B在结合细胞内特定的激酶后, 通过突触小泡影响突触神经作用进而调节内吞作用^[33-34]。由此推测, LvRab5B通过胞吞作用参与对虾机体的部分免疫功能。

综上所述, LvRab5B蛋白与IHNV非结构蛋白具有相互作用, LvRab5B基因参与凡纳滨对虾抵抗IHNV和WSSV病毒的先天免疫过程, 本结果为进一步研究LvRab5B蛋白在对虾机体中的功能及作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Loker E S, Adema C M, Zhang S M, *et al.* Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 10-24.
- [2] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(2): 107-117.
- [3] Bucci C, Chiariello M. Signal transduction gRABs attention[J]. *Cellular Signalling*, 2006, 18(1): 1-8.
- [4] Kawauchi T, Sekine K, Shikanai M, *et al.* Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking[J]. *Neuron*, 2010, 67(4): 588-602.
- [5] Cao J, Albertson R, Riggs B, *et al.* Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization[J]. *Journal of Cell Biology*, 2008, 182(2): 301-313.
- [6] Guo P F, Hu T J, Zhang J, *et al.* Sequential action of *Caenorhabditis elegans* Rab GTPases regulates phagolysosome formation during apoptotic cell degradation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(42): 18016-18021.
- [7] Wittinghofer A, Pal E F. The structure of Ras protein: A model for a universal molecular switch[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16: 382-387.
- [8] Grosshans B L, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States America*, 2006, 103(32): 11821-1187.
- [9] Poteryaev D, Fares H, Bowerman B, *et al.* *Caenorhabditis elegans* SAND-1 is essential for RAB-7 function in endosomal traffic[J]. *The EMBO Journal*, 2007, 26(2): 301-312.
- [10] McLauchlan H, Newell J, Morrice N, *et al.* A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits[J]. *Current Biology*, 1998, 8(1): 34-45.
- [11] Nielsen E, Severin F, Backer J M, *et al.* Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules[J]. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(6): 376-382.
- [12] Barbieri M A, Fernandez-Pol S, Hunker C, *et al.* Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2004, 83(6): 305-314.
- [13] Macovei A, Petrareanu C, Lazar C, *et al.* Regulation of hepatitis B virus infection by rab5, rab7, and the endolysosomal compartment[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(11): 6415-6427.
- [14] Ahmad W, Li Y Y, Guo Y D, *et al.* Rabies virus co-localizes with early (Rab5) and late (Rab7) endosomal proteins in neuronal and SH-SY5Y cells[J]. *Virologica Sinica*, 2017, 32(3): 207-215.
- [15] Saitoh S, Maruyama T, Yako Y, *et al.* Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12): E2327-E2336.
- [16] Igarashi T, Araki K, Yokobori T, *et al.* Association of RAB5 overexpression in pancreatic cancer with cancer progression and poor prognosis via E-cadherin suppression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 12290-12300.
- [17] 彭敏, 苏绍萍, 陈秀荔, 等. IHNV编码蛋白酵母双杂交诱饵载体的构建及自激活研究[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(8): 2004-2008.
- [17] Peng M, Su S P, Chen X L, *et al.* Construction and identification of yeast two hybrid bait vector for screening of IHNV encoding protein[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(8): 2004-2008(in Chinese).
- [18] Cai L, Sun X Y, Shao L, *et al.* Functional investigation of grass carp reovirus nonstructural protein NS80[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 168.
- [19] Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.

- [20] Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, *et al.* The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(21): 12394-12401.
- [21] Bucci C, Wandinger-Ness A, Lutcke A, *et al.* Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(11): 5061-5065.
- [22] Chiariello M, Bruni C B, Bucci C. The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated *in vitro*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 453(1-2): 20-24.
- [23] Gorvel J P, Chavrier P, Zerial M, *et al.* rab5 controls early endosome fusion *in vitro*[J]. *Cell*, 1991, 64(5): 915-925.
- [24] Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, *et al.* Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation[J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 241-245.
- [25] Martin G G, Simcox R, Nguyen A, *et al.* Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, formation, and permeability[J]. *The Biological Bulletin*, 2006, 211(3): 275-285.
- [26] Tang K F J, Navarro S A, Lightner D V. PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 74(2): 165-170.
- [27] Posiri P, Panyim S, Ongvarrasopone C. Rab5, an early endosomal protein required for yellow head virus infection of *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2016, 459: 43-53.
- [28] Wucherpfennig T, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M. Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 161(3): 609-624.
- [29] Cheng C Y, Shih W L, Huang W R, *et al.* Bovine ephemeral fever virus uses a clathrin-mediated and dynamin 2-dependent endocytosis pathway that requires Rab5 and Rab7 as well as microtubules[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13653-13661.
- [30] Clemente R, de la Torre J C. Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(20): 10406-10416.
- [31] Johns H L, Berryman S, Monaghan P, *et al.* A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: Implications for virus entry[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(12): 6247-6256.
- [32] Callaghan J, Nixon S, Bucci C, *et al.* Direct interaction of EEA1 with Rab5b[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265(1): 361-366.
- [33] Shin N, Jeong H, Kwon J, *et al.* LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis[J]. *Experimental Cell Research*, 2008, 314(10): 2055-2065.
- [34] Blaabjerg M, Baskys A, Zimmer J, *et al.* Changes in hippocampal gene expression after neuroprotective activation of group I metabotropic glutamate receptors[J]. *Molecular Brain Research*, 2003, 117(2): 196-205.

Interaction between *Litopenaeus vannamei* Rab5B protein (LvRab5B) and IHHNV proteins

LIU Qingyun¹, LI Qiangyong¹, WANG Shaoshao², ZHU Weilin¹, PENG Min¹,
ZENG Digang¹, CHEN Xiuli¹, YANG Chunling¹, ZHAO Yongzhen¹,
PENG Jinxia¹, HE Pingping¹, WEI Pinyuan¹, CHEN Xiaohan^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Health Cultivation of Guangxi,
Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China;

2. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: To study the antiviral function of LvRab5B in the virus resistance of *Litopenaeus vannamei*, we constructed the fusion expression vectors of LvRab5B protein in insect cells and in yeast cells, respectively; studied the expression of LvRab5B protein in insect cells using immunofluorescence technique; studied the interaction between LvRab5B protein and IHHNV proteins using yeast two-hybrid technique; studied the expression of *LvRab5B* in different tissues of normal *L. vannamei* and the relative expression of *LvRab5B* at different time points after infection in *L. vannamei* infected with IHHNV or WSSV using qRT-PCR technique. The results showed that the fusion LvRab5B protein was able to express in insect cells. LvRab5B protein had no interaction with capsid protein (CP) of IHHNV, while it interacted with nonstructural protein (NS1) of IHHNV, and was weakly interacted with nonstructural protein (NS2) of IHHNV. qRT-PCR showed that *LvRab5B* was expressed in the heart, gills, intestine, stomach, hepatopancreas and muscle of normal *L. vannamei*, and the expression was the highest in the intestine, followed by the hepatopancreas. The relative expression of *LvRab5B* was different after viral infection. The expression decreased at the initial stage of infection, then increased rapidly, finally decreased at the end stage. This study shows that LvRab5B is involved in the innate immune process of *L. vannamei* against IHHNV or WSSV infection, which lays a foundation for further studies of the immune function and mechanism of LvRab5B protein in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; LvRab5B; infection hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV); yeast two-hybrid

Corresponding author: CHEN Xiaohan. E-mail: chnxhn@163.com

Funding projects: Modern Technology System of Agricultural Industry (CARS-47); The Guangxi Scientific Research and Technology Development Project (AB16380189 and 201633015); Eight Osmanthus Scholars Special Funding (BGXZ-NMBDX-04); Guangxi Fishery Science and Technology Promotion Application Project (nycytxgxcxtd-03-14)