



草鱼细胞蛋白酶亚基 $\beta 7$ 与草鱼呼肠孤病毒非结构蛋白 NS12 相互作用

阙顺政¹, 王龙龙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: 为研究草鱼 I 型呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 非结构蛋白 NS12 的功能, 实验利用酵母双杂交实验、GST 融合蛋白沉降技术 (GST pull-down) 和对 GCRV 感染过表达宿主蛋白酶体亚基 $\beta 7$ (proteasome subunit beta type 7, PSMB7) 的草鱼卵巢细胞 (grass carp ovarian cell, GCO) 中 *ns12* 转录水平的表达量进行实时荧光定量 PCR 检测, 研究 PSMB7 和 NS12 的相互作用。酵母双杂交实验结果表明, PSMB7 与 GCRV 编码的膜相关的非结构蛋白 NS12 也存在着潜在相互作用。GST-pull-down 检测结果证实 PSMB7 与 GCRV 编码的膜相关的非结构蛋白 NS12 存在相互作用; PSMB7 过表达能够上调 *ns12* 在病毒感染过程中的转录水平表达量; 免疫印迹验证 NS12 对于蛋白降解并不敏感。本实验室先前研究证实 PSMB7 在病毒感染过程中表达恒定。综上所述, 这些结果揭示 GCRV NS12 与 PSMB7 存在分子间相互作用, 但并没有作为 PSMB7 的底物。表明其可能竞争性地阻碍蛋白酶体复合物的形成。病毒蛋白干扰蛋白酶体复合物胞内 PSMB7 的积累可能是其一种针对蛋白酶体介导的先天免疫的免疫逃逸策略。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; NS12; PSMB7; 蛋白酶; 相互作用

中图分类号: S 942

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国主要的淡水养殖鱼类之一, 年产超过 500 万 t, 广泛分布于我国各地^[1]。草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 是草鱼出血病的病原体, 其引发的草鱼出血病给我国草鱼养殖产业带来了巨大的经济损失^[2], 危害草鱼养殖产业的绿色可持续发展。GCRV 属于呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*), 是一种无包膜的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 病毒。在过去的几十年中, 我国已分离并鉴定多株 GCRV 毒株, 根据其基因型被分为 3 种类型, 类

型及其代表株分别是 I 型 (GCRV-873)^[3]、II 型 (GCRV-HZ08)^[4-5] 和 III 型 (GCRV-104)^[6]。其中, I 型代表株 GCRV-873 于近 40 年前最早被分离出来, 成为 GCRV 病毒的典型株。I 型 GCRV 包含 11 个节段的双链 RNA, 编码 7 个结构蛋白 (VP1~VP7) 和 6 个非结构蛋白 (NS80、NS26、NS38、NS16、NS31 和 NS12)^[7-9]。一个完整的 GCRV 病毒颗粒由外衣壳 (VP5/VP7) 和内衣壳复合物 (VP1/VP2/VP3/VP4/VP6/dsRNA) 所组成^[10-11]。根据本实验室近期的研究表明, GCRV-S7 节段与禽呼肠孤病毒 (avian

收稿日期: 2021-01-12 修回日期: 2021-03-05

资助项目: 国家重点研发项目 (2019YFD0900104; 现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-45-19)

第一作者: 阙顺政 (照片), 从事水产动物病原学研究, E-mail: 760841034@qq.com

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn



reovirus, ARV) S1 节段类似, 能够编码 NS16、NS31 和 NS12 等 3 种非结构蛋白, 是一个三顺反子^[9]。其中 NS16 功能明确, 诱导宿主细胞的细胞膜融合, 形成合胞体, 促进病毒在宿主细胞内部扩散, 有利于提高病毒感染和增殖效率; NS31 则能诱导热休克蛋白 70 (hot shock protien 70, HSP70) 使其促进 GCRV 的合成^[9]; NS12 是最近发现的非结构蛋白, 对其结构域进行生信分析预测发现其存在一段跨膜结构域, 但对其具体生物学功能尚不明确^[9]。

蛋白酶体广泛存在于真核生物细胞的蛋白质复合物中, 是蛋白质降解的主要引擎^[12-13]。蛋白酶体是一种多催化复合物, 参与各种细胞过程, 如真核生物中的蛋白质和 RNA 转化、细胞分裂、信号转导、转录和翻译。细胞内病原体是其酶活性的目标, 已知许多动物病毒会干扰这些酶的活性^[13]。蛋白酶体由 28 个亚基的桶形核心颗粒组成, 在顶部和底部覆盖有 19 个亚基调节颗粒。形成催化室的核心颗粒包含 3 个具有蛋白水解活性的苏氨酸残基。催化室 2 侧的 7 个 α 环控制底物进入该空间^[14-16]。蛋白酶体亚基 B7 (PSMB7) 是 20S 蛋白酶体亚基之一, 对蛋白酶体的组装具有重要意义, 并显示出类似于胰蛋白酶的活性。本实验室前期研究中发现, PSMB7 与 GCRV-JX01 的外衣壳蛋白 VP7 和 GCRV-104 的外衣壳蛋白 VP6 及 VP38 存在着广泛相互作用, 但对于 PSMB7 与草鱼 I 型呼肠孤病毒非结构蛋白相互作用还没有相关报道。通过对宿主蛋白和病毒非结构蛋白相互作用的验证有利于我们了解在病毒感染过程中病毒非结构蛋白可能起到的调控作用, 有助于进一步理解病毒的生物学功能和致病机理。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、病毒、质粒及耗材

酵母 AH109 菌株购自 Clontech 公司, 并保存在上海海洋大学国家水生动物病原库。GCRV-JX01 由上海海洋大学国家水生动物病原体收集中心分离并保存。草鱼卵巢细胞 (GCO) 为本实验室培养 (27.5 °C 培养箱)。pGEXT-4T-3、pDsred-N1、pGBKT7、pGADT7 和酵母阳性质粒 pGBKT7-53/pGADT7-T 购自 Clontech 公司由本实验室所保存; pGADT7-PSMB7 为本实验室构建保存。鼠抗 GFP

单克隆抗体、鼠抗 GST 单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 单克隆抗体 (Abcam, 中国)。

1.2 细胞 RNA 提取与逆转录

用 TRIzol 法提取 GCRV-JX01 感染后的 GCO 细胞 RNA。吸除培养基, 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 加入 TRIzol™ Reagent, 将细胞吹打重悬, 将重悬液转移至灭菌 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μ L 氯仿, 颠倒 5 次混匀, 常温静置 10 min; 4 °C, 12 000 \times g 离心 20 min, 将上层透明水相转移至新的 1.5 mL 离心管中; 取约 400 μ L 异丙醇进行混匀, 室温静置 15 min; 4 °C, 12 000 \times g 离心 20 min, 弃上清液, 加入 800 μ L 由 DEPC 水配置的 75% 乙醇重悬沉淀, 4 °C, 12 000 \times g 离心 20 min, 弃上清液, 室温放置 5 min 晾干沉淀, 加入 20 μ L 去 RNA 酶水重悬溶解 RNA 沉淀, -70 °C 保存, 根据 TaKaRa 公司 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。

1.3 引物的设计与合成

根据 NCBI 数据库基因序列使用 Primer premier 5.0 软件设计构建 pGEX-4T-3-NS12、pDsred-N1-NS12 和 pGBKT7-NS12 的引物 (表 1), 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.4 *ns12* 的扩增和质粒构建

以上述 cDNA 作为模板进行 *ns12* 的扩增。参考 TaKaRa 公司 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 步骤设定 PCR 程序: 预变性 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 57 °C 10 s, 72 °C 5 s, 34 个循环。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 DNA 片段纯化试剂盒进行回收。根据上海碧云天生物技术有限公司 In-Fusion Cloning Kit 说明书, 用无缝克隆的方法构建重组载体。将所提取质粒送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司检测正确后, 进行扩增备用。

1.5 酵母双杂交筛选

从酵母抽提物蛋白胨葡萄糖腺嘌呤培养基 (Yeast extract peptone dextrose adenine, YPDA) 培养平板上挑取 AH109 酵母菌单菌落, 置于 5 mL YPDA 液体培养基中 30 °C 振荡培养过夜, 从 5 mL 已扩增酵母菌的 YPDA 培养基中吸取约 100 μ L 液体置于装有 50 mL 新鲜 YPDA 液体培养

表 1 引物序列

Tab. 1 The sequence of primers

引物 primers	序列 sequence	酶切位点 recognition sites	用途 application
4T-3-NS12	F: GTTCCGCGTGGATCCCC <u>GAATTC</u> ATGGTAGGTGCCCTCTTG R: GCTCGAGTCGACCCGG <u>GAATTC</u> TAGACGAAGGGATTAGTA	<i>EcoR</i> I	pGEX-4T-3-NS12
BD-NS12	F: ATGGCCATGGAGGCC <u>GAATTC</u> ATGGTAGGTGCCCTCTTG R: TCGACGGATCCCCGG <u>GAATTC</u> TAGACGAAGGGATTAGTA	<i>EcoR</i> I	pGBKT7-NS12
qRT-NS12	F: GCACTAACCAACCTCTCGCT R: GCCTCAGGCGTATTCTGT		实时荧光定量PCR (qPCR)
18S	F: ATTTCCGACACGGAGAGG R: CATGGGTTTAGGA TACGCTC		qPCR
qRT-PSMB7	F: GTCAACAGACAAACTGCCCTAC R: TA TCGCA TCCCGACAAG		qPCR

注: 下划线部分为酶切位点

Note: The underlined part is the recognition site

基的 250 mL 锥形培养瓶中 30 °C 振荡培养 16~20 h 至 OD₆₀₀ 为 0.15~0.3, 将扩增后菌液 700×g 离心 5 min, 弃上清液, 加入 100 mL 新鲜 YPDA 液体培养基 30 °C 振荡培养 3~5 h 至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.5。将菌液 700×g 离心 5 min, 弃上清液, 用 1.5 mL 1.1×TE/LiAc 重悬菌液 12 000×g 离心 15 s, 用 600 μL 1.1×TE/LiAc 重悬, 此为酵母感受态, 置于冰上待用。将 Carrier DNA 95 °C 加热 5 min, 待用; 100 ng pGBKT7-NS12 与约 2 μL 草鱼文库质粒混合, 加入 5 μL 变性 Carrier DNA; 将混合物加入 50 μL 酵母感受态混匀; 加入 500 μL PEG/LiAc, 混匀, 30 °C 加热 30 min; 加入 DMSO 20 μL, 混匀, 42 °C 加热 15 min; 12 000×g 离心 15 s, 1 mL 0.9% NaCl 溶液重悬酵母菌, 60~100 μL 涂于二缺 SD 培养板 (SD/-Trp-Leu), 30 °C 培养 3~5 d; 挑取单菌落使用 0.9% NaCl 溶液重悬, 接种于四缺 SD 培养基平板 (SD/-Trp-Leu-His-Ade/X-α-gal); 30 °C 培养 3~5 d 观察菌落生长和颜色变化。从四缺板上挑选变为蓝绿色的菌落并扩增培养, 提取酵母质粒, 通过 PCR 扩增并鉴定后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测得片段与草鱼转录组数据库进行比对, 根据对比结果扩增所需片段进行酵母双杂交反向验证。

1.6 蛋白表达与纯化

将质粒 pGEX-4T-3-NS12 转化入 BL21(DE3) 感受态细胞中; 涂布 LB(Amp+) 培养板 (50 mg/L)、37 °C 培养过夜; 挑取单菌落置于 5 mL LB(Amp+) 抗性培养基 (50 mg/L) 中 37 °C 振荡培养过夜, 将培养后小体积菌液接种至 200 mL LB(Amp+) 抗性培养基 (50 mg/L) 中, 37 °C 振荡培养 4~5 h 至 OD₆₀₀ = 0.6; 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L, 16 °C 低温诱导菌液过夜, 10 000×g 离心 30 min, 弃上清

液; 将沉淀用 PBS 重悬清洗 2 次后加入 20 mL GST Wash/Binding buffer 重悬, 加入苯甲基磺酰氟 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 超声波碎 100 次 (6 s 间隔, 超声 4 s, 功率 50%) 至重悬液澄清。10 000×g 离心 30 min, 将上清液转移至干净 50 mL 离心管中, 加入已平衡的 GST 树脂, 冰上孵育 4 h。将孵育后的树脂离心收集, 使用 GST Wash/Binding buffer 洗涤 5 次, 加入 GST Elution Buffer (PH=8.0) 进行洗脱。以上每步进行取样, 使用 SDS-PAGE 进行电泳, 最后用考马斯亮蓝染色验证, 使用 anti-GST 抗体进行 Western bolt 验证。

1.7 GST 融合蛋白沉降技术 (GST pull-down)

根据 Lipofectamine[®]3000 转染试剂的说明书。将 GCO 细胞传至 6 孔板中, 过夜生长至 70%~80%。将 800 ng pGFP-N1-PSMB7 质粒转染至 GCO 细胞, 27 °C 培养 24 h, 使用荧光显微镜观察质粒转染情况。加入 500 μL 预混有 PSMF 的 NP-40 裂解液于冰上孵育 30 min 后吹打重悬; 12 000×g 离心 5 min, 取上清液并加入先前孵育 GST-NS12 的树脂, 冰上孵育 4 h。将孵育后的树脂离心收集, 使用 GST Wash/Binding buffer 洗涤 5 次, 加入含有谷胱甘肽 (GSH) 的 GST Elution Buffer (PH=8.0) 进行洗脱。同时以孵育 GST 标签蛋白的树脂作为阴性对照同步孵育, 取样; 样品加入 2×蛋白上样 buffer, 100 °C 水浴变性 10 min, 加入 10% SDS-PAGE 胶中 80 V 电泳 30 min, 后转 120 V 电泳 60 min, 然后采用湿转法将蛋白转至经甲醇活化的 PVDF 膜上, 于含 5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液中室温孵育 1 h; 鼠抗 GST 抗体和鼠抗 GFP 抗体 1 : 5 000 稀释于 2.5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液, 室温孵育 1.5 h 或 4 °C 过夜; 用 PBST 漂洗 4 次, 每

次 10 min; 二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG 单克隆抗体 1 : 5 000 稀释于 2.5% 脱脂牛奶的 PBS 溶液中, 室温孵育 1 h; PBST 漂洗 4 次, 每次 10 min; 使用天能 ECL 化学发光成像系统对 PVDF 膜进行信号捕捉并拍照。

1.8 过表达 PSMB7 和病毒感染

根据 Lipofectamine[®]3 000 转染试剂的说明书。将 GCO 细胞传至 6 孔板中, 过夜生长至细胞密度达到 70%~80%。将 1 000 ng pGFP-N1-PSMB7 质粒转染至 GCO 细胞, 27 °C 培养 24 h, 使用荧光显微镜观察质粒转染情况。加入 GCRV-JX01 (MOI=1) 感染细胞, 分别于 0、4、8、12 和 16 h 使用 1 mL TRIzol[™] Reagent 取样。同时转染 pGFP-N1 质粒至 GCO 细胞作为阴性对照。

1.9 实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析

根据“细胞 RNA 提取与逆转录”中实验步骤, 提取所得样品的总 RNA 并进行逆转录。参照 TaKaRa 公司 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 的说明书, 使用荧光定量 PCR 仪 CFX96 Real-Time PCR Detection System 进行 qPCR。检测过表达 GFP-PSMB7 后 GCO 中 *psmb7* 的表达水平以及 GCRV 病毒感染的过表达 PSMB7 的 GCO 细胞中 *ns12* 转录水平的表达量。通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算 *ns12* 和 *psmb7* 的相对表达量, 内参基因为 18S RNA。使用 GraphPad Prism 进行数据分析, 检测数据差异性。

2 结果

2.1 *ns12* 扩增和质粒构建

根据 NCBI 数据库提供基因序列设计 *ns12* 扩增引物, 从感染 GCRV-JX01 的 GCO 细胞中提取总 RNA 逆转录为 cDNA 作为扩增模板, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的基因大小约 380 bp 与预期结果一致 (图 1)。

2.2 酵母双杂交筛选

在酵母双杂交实验中, 我们筛选出 PSMB7 作为 GCRV NS12 的潜在相互作用对象。通过本实验室先前的构建的 pGADT7-PSMB7 与 pGBKT7-NS12 共转化入 AH109 酵母菌, 证实了 PSMB7 与 NS12 存在相互作用, 并使用质粒 pGBKT7/pGADT7-PSMB7、pGADT7/pGBKT7-NS12 作为阴性对

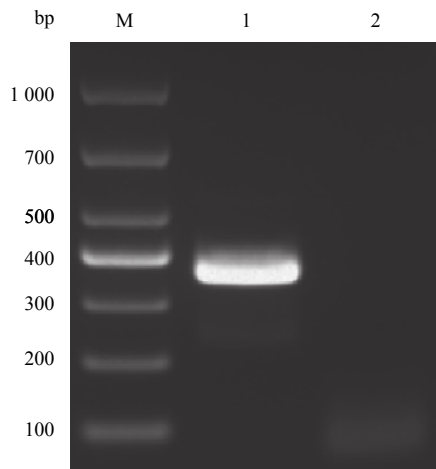


图 1 *ns12* 的 PCR 扩增产物电泳图

M: Marker 1 000; 1. PCR 产物; 2. 阴性对照

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR product of *ns12* gene

M: Marker 1 000; 1. PCR product; 2. negative control

照, pGBKT7-53/pGADT7-T 作为阳性对照 (图 2)。

2.3 重组蛋白 GST-NS12 诱导表达及纯化

将重组质粒 pGEX-4T-3-NS12 转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L。将菌液 16 °C 低温诱导过夜, 超声破碎细菌沉淀, 经 GST resin 纯化后, 得到较为单一的条带, 蛋白大小约为 35 ku。Western blot 检测显示, 重组蛋白能与 GST 抗体结合, 与 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色后结果一致, 确认为 GST-NS12 重组蛋白 (图 3)。

2.4 PSMB7 与 GCRV-JX01 NS12 的体外相互作用

成功表达和纯化 GST-NS12 可溶性蛋白后, 我们通过 GST pull-down 验证了 NS12 与 PSMB7 存在相互作用。结果显示, GFP-PSMB7 与 GST-NS12 能够进行有效结合, 同时 GST-NS12 与 GFP、GFP-PSMB7 与 GST 无法相互吸附 (图 4)。进一步证实了 GCRV NS12 与草鱼宿主蛋白 PSMB7 之间存在相互作用。

2.5 PSMB7 过表达对于 GCRV *ns12* 在感染过程中 mRNA 水平变化的影响

免疫印迹分析表明在转染实验中实现了 GFP-PSMB7 的过表达 (图 5-a)。实时荧光定量 PCR 结果显示, *psmb7* 在转录水平的表达量明显上调 (图 5-b)。在 GCRV-JX01 感染期间, PSMB7 的过

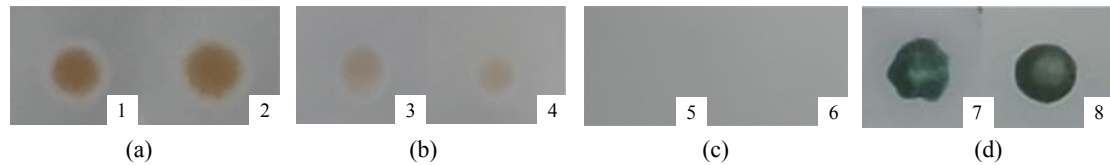


图 2 酵母双杂交实验结果

(a) (b) 二缺培养基 (SD/-Trp-Leu) 上质粒共转化酵母生长结果, (c) (d) 四缺培养基 (SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- α -gal) 上质粒共转化酵母生长结果: 1. pGBKT7/pGADT7-PSMB7, 2. pGADT7/pGBKT7-NS12, 3. pGBKT7-NS12/pGADT7-PSMB7, 4. pGADT7-53/pGBKT7-T, 5. pGBKT7/pGADT7-PSMB7 (阴性对照组), 6. pGADT7/pGBKT7-NS12 (阴性对照组), 7. pGBKT7-NS12/pGADT7-PSMB7 (实验组), 8. pGADT7-53/pGBKT7-T (阳性对照组)

Fig. 2 The results of yeast 2-hybrid

(a) (b) growth of yeast transformed with constructed plasmids in selective media(SD/-Trp-Leu), (c) (d) growth of yeast transformed with constructed plasmids in selective media(SD/-Trp-Leu-His-Ade/X- α -gal); 1. pGBKT7/pGADT7-PSMB7, 2. pGADT7/pGBKT7-NS12, 3. pGBKT7-NS12/pGADT7-PSMB7, 4. pGADT7-53/pGBKT7-T, 5. pGBKT7/pGADT7-PSMB7 (negative control), 6. pGADT7/pGBKT7-NS12 (negative control), 7. pGBKT7-NS12/pGADT7-PSMB7 (test group), 8. pGADT7-53/pGBKT7-T (positive control)

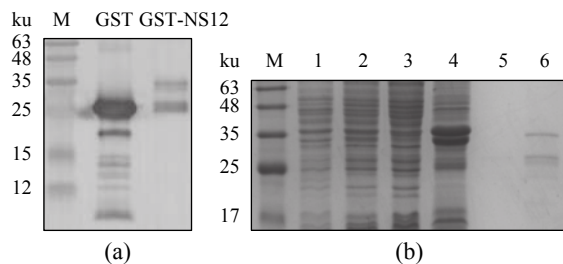


图 3 重组 GST-NS12 的表达纯化及 Western blot 检测结果

(a) 纯化 GST 与 GST-NS12 的免疫印迹法分析, GST 单克隆抗体 (1b: 5 000), (b) GST-NS12 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析; M. 蛋白质分子量标准; 1. 未诱导 GST-NS12 菌液沉淀, 2. 诱导后 GST-NS12 菌液沉淀, 3. 超声后 GST-NS12 菌液上清, 4. 超声后 GST-NS12 菌液沉淀, 5. 洗涤后 Wash/Binding Buffer, 6. GST-NS12 蛋白

Fig. 3 Western blot and SDS-PAGE analysis of purified GST-NS12

(a) Western blot analysis of purified GST and GST-NS12(GST monoclonal antibody (1 : 5 000)), (b) SDS-PAGE analysis of purified GST-NS12; M. protein molecular weight marker, 1. non-induced bacteria of GST-NS12, 2. induced bacteria of GST-NS12, 3. precipitation of induced bacteria of GST-NS12, 4. induced bacteria of GST-NS12 after ultrasonic, 5. Wash/Binding Buffer after washing, 6. purified GST-NS12

表达促进 GCO 细胞中 *ns12* 的转录表达 (图 5-c)。

3 讨论

病毒蛋白的特定功能通常通过研究其与宿主蛋白的相互作用来实现。GCRV-JX01 是基因型 I GCRV 的代表性菌株^[17]。GCRV-JX01 基因组的 S7 片段编码新的非结构蛋白 NS12, 而 NS12 的功能尚不清楚。为了探索 NS12 在病毒感染中的可能作用, 实验采用酵母双杂交系统在草鱼 cDNA 文库中鉴定了 NS12 的潜在伴侣, 并发现

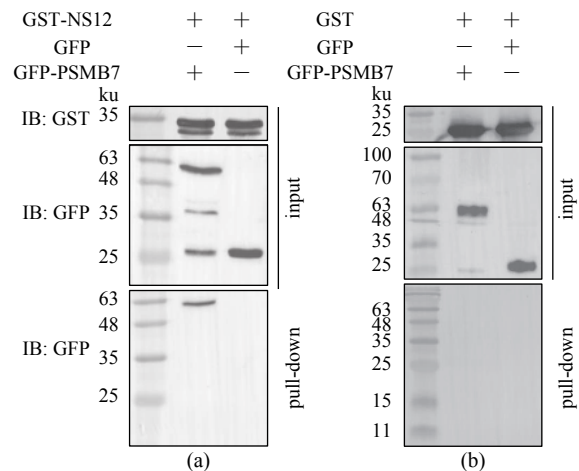


图 4 GST pull-down 验证 NS12 与 PSMB7 的相互作用

IB: GST. 以 GST 为标签; IB: GFP. 以 GFP 为标签

Fig. 4 GST-NS12 pulls down GFP-PSMB7

IB: GST. GST labeled protein; IB: GFP. GFP labeled protein

PSMB7 与 NS12 有潜在的相互作用。使用原核细胞中表达的 GST-NS12 和 GCO 细胞中表达的 GFP-PSMB7, 我们验证了 NS12 和 PSMB7 的体外结合。通过过表达 PSMB7 验证了 PSMB7 在 GCRV-JX01 感染过程中对 *ns12* 在 mRNA 水平的表达效率的影响。

作为重要的细胞机制, 蛋白质的蛋白酶体降解途径具有许多不同的功能, 例如细胞分化、先天免疫、控制细胞周期进程、免疫反应、调节基因表达以及对蛋白毒性应激的反应^[18-20]。病毒可以在其生命周期的不同阶段使用蛋白酶体增强病毒活性并逃避宿主的抗病毒反应^[21]。例如, 当小鼠冠状病毒进入宿主细胞时, 蛋白酶体可以促进其从内体进入细胞质^[22], 2 型猪圆环病毒

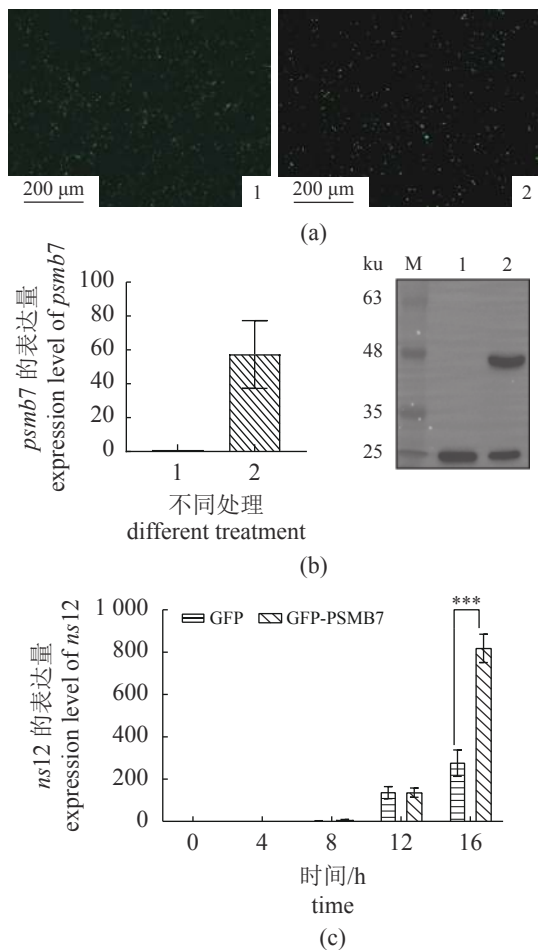


图 5 PSMB7 过表达在 mRNA 水平促进了 ns12 在 GCRV-JX01 感染过程中表达效率

(a) 转染后 GFP 与 GFP-PSMB7 在细胞中的表达情况; (b) 转染后 PSMB7 在 mRNA 水平表达效率和 Western blot 验证, 1. GFP, 2. GFP-PSMB7; (c) 过表达 PSMB7 对于 ns12 在 GCRV-JX01 感染过程中 mRNA 水平的表达影响; ***. 差异极显著

Fig. 5 The over-expression of PSMB7 promotes the expression of ns12 at transcriptional level during the GCRV-JX01 infection

(a) expression of GFP and GFP-PSMB7 in cells after transfection; (b) expression efficiency of PSMB7 at mRNA level and protein level after transfection, 1. GFP, 2. GFP-PSMB7; (c) the effect of over-expression of PSMB7 on the expression of ns12 mRNA during GCRV-JX01 infection; ***. very significant difference

复制的早期阶段需要蛋白酶体的干预, 蛋白酶体的蛋白水解酶活性非常重要^[23]。在逆转录病毒感染过程中, 蛋白酶体抑制剂会干扰人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的 Gag 多聚蛋白的加工, 阻止新生成 HIV 颗粒的成熟和释放^[24]。同样在禽呼肠孤病毒 (ARV) 中, 该病毒促进 PSMB6 引起核糖体蛋白降解, 然后下调 AKT 信号传导并诱导自噬^[25]。已有研究表明, 抑制蛋白酶体会阻止轮

状病毒的复制, 这表明病毒的复制周期需要功能性蛋白酶体^[26]。结合本实验, 我们发现 PSMB7 的过表达可以在病毒感染过程中提高 ns12 的转录水平, 表明被 PSMB7 诱导的 NS12 的功能可能与宿主细胞中 GCRV 的复制呈正相关, 揭示 NS12 可能参与了 GCRV 病毒在宿主细胞中的早期复制周期, 并通过竞争性募集 PSMB7 避免了病毒蛋白的降解。本课题组在前期工作中利用酵母双杂交系统筛选出了 GCRV104 编码衣壳蛋白 VP38 与 VP6 作为草鱼 PSMB7 潜在相互作用对象, 并通过一系列体外与体内验证发现, PSMB7 与 VP38 之间存在多位点相互作用, 但并未进行具体相互作用位点的寻找。本研究中发现, PSMB7 不但能与 GCRV 结构蛋白存在相互作用, 还能与非结构蛋白 NS12 结合, 表明 PSMB7 在 GCRV 病毒感染过程中可能起到较为复杂的作用, 因此 PSMB7 与 GCRV 编码蛋白之间相互作用的功能值得进一步研究。

总之, 本实验证明了 GCRV-JX01 的 NS12 与 PSMB7 相互作用, GCRV 通过竞争性招募 PSMB7 成功避免了病毒蛋白的蛋白酶降解。结合已有的关于 PSMB7 和 GCRV 外衣壳蛋白相互作用的研究, 为进一步解释宿主蛋白参与病毒复制的生物学机制和研发疫苗和抗病毒药物提供了新的思路 and 基础。

参考文献 (References):

- [1] Wang L L, Yu F, Xu N, *et al.* Grass carp reovirus capsid protein interacts with cellular proteasome subunit beta-type 7: evidence for the involvement of host proteasome during aquareovirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 77-86.
- [2] Yang S, Wu S Q, Li N Q, *et al.* A cross-sectional study of the association between risk factors and hemorrhagic disease of grass carp in ponds in Southern China[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2013, 25(4): 265-273.
- [3] Pei Y Y, Huang R, Li Y M, *et al.* Characterizations of four toll-like receptor 4s in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* and their response to grass carp reovirus infection and lipopolysaccharide stimulation[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(3): 1098-1108.
- [4] Pei C, Ke F, Chen Z Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional

- distribution[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435-2440.
- [5] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [6] Fan Y D, Rao S J, Zeng L B, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2266-2277.
- [7] Jaafar F M, Goodwin A E, Belhouchet M, *et al.* Complete characterisation of the American grass carp reovirus genome (genus *Aquareovirus*: family *Reoviridae*) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus[J]. *Virology*, 2008, 373(2): 310-321.
- [8] Wang H, Liu W S, Yu F, *et al.* Disruption of clathrin-dependent trafficking results in the failure of grass carp reovirus cellular entry[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 25.
- [9] Yu F, Wang L L, Li W J, *et al.* Identification of a novel membrane-associated protein from the S7 segment of grass carp reovirus[J]. *The Journal of General Virology*, 2019, 100(3): 369-379.
- [10] 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.
- [11] Cheng L P, Zhu J, Hui W H, *et al.* Backbone model of an aquareovirus virion by cryo-electron microscopy and bioinformatics[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(3): 852-863.
- [12] Ballut L, Drucker M, Pugnière M, *et al.* HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(Pt 9): 2595-2603.
- [13] Chen S B, Wu J Y, Lu Y, *et al.* Structural basis for dynamic regulation of the human 26S proteasome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(46): 12991-12996.
- [14] Beck F, Unverdorben P, Bohn S, *et al.* Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(37): 14870-14875.
- [15] Lander G C, Estrin E, Matyskiela M E, *et al.* Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle[J]. *Nature*, 2012, 482(7384): 186-191.
- [16] Lasker K, Förster F, Bohn S, *et al.* Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1380-1387.
- [17] Wang T, Li J L, Lu L Q. Quantitative *in vivo* and *in vitro* characterization of co-infection by two genetically distant grass carp reoviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(6): 1301.
- [18] Finley D, Chen X, Walters K J. Gates, channels, and switches: elements of the proteasome machine[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(1): 77-93.
- [19] Kish-Trier E, Hill C P. Structural biology of the proteasome[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2013, 42: 29-49.
- [20] Tomko Jr R J, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82(1): 415-445.
- [21] Contin R, Arnoldi F, Mano M, *et al.* Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2781-2792.
- [22] Yu G Y, Lai M M C. The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(1): 644-648.
- [23] Cheng S, Yan W D, Gu W, *et al.* The ubiquitin-proteasome system is required for the early stages of porcine circovirus type 2 replication[J]. *Virology*, 2014, 456-457: 198-204.
- [24] Schubert U, Ott D E, Chertova E N, *et al.* Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(24): 13057-13062.
- [25] Huang W R, Chi P I, Chiu H C, *et al.* Avian reovirus p17 and σA act cooperatively to downregulate Akt by suppressing mTORC2 and CDK2/cyclin A2 and upregulating proteasome PSMB6[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5226.
- [26] Pang Y, Li M, Zhou Y, *et al.* The ubiquitin proteasome system is necessary for efficient proliferation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 253: 108947.

Cellular proteasome subunit beta type-7 interacts with grass carp reovirus non-structural protein 12 (NS12)

QUE Shunzheng¹, WANG Longlong², LÜ Liqun^{1*}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Ctenopharyngodon idella* is one of the main freshwater aquaculture fishes in China, with an annual output of more than 5 million tons, which is widely distributed throughout China. Grass carp reovirus (GCRV) is a member of the *Aquareovirus* genus of the family *Reoviridae*, a large family of double-stranded RNA (dsRNA) viruses infecting plants, insects, fishes and mammals. Proteasome subunit beta type-7 (PSMB7) is one of the major components of the 20S core proteasome complex and displays a trypsin-like activity. Capsid protein VP7 of GCRV has been shown to interact with PSMB7 both *in vitro* and *in vivo*. To investigate the interaction between GCRV non-structural protein 12 (NS12) and *C. idella* host protein PSMB7 and the effect of PSMB7 on the expression of *ns12* during GCRV infection, yeast two-hybrid experiment, GST pull-down experiment and Real time PCR detection of *ns12* transcription level after GCRV infection of grass carp ovarian cells (GCO) overexpressing PSMB7 were conducted in this research. The results of yeast two-hybrid experiments showed that PSMB7 and GCRV-encoded membrane-associated non-structural protein NS12 also had potential interactions; The results of Western blot showed that PSMB7 interacted with the membrane-related non-structural protein NS12 encoded by GCRV; The overexpression of PSMB7 by about 60 times can up-regulate the expression level of *ns12* during viral infection by about three times; Western blot verified that NS12 was not sensitive to protein degradation. Previous studies in our laboratory have verified that PSMB7 expression is constant during viral infection. In summary, these results revealed that GCRV NS12 had an intermolecular interaction with PSMB7, but it did not act as a substrate for PSMB7. This indicates that the function of NS12 induced by PSMB7 may be positively correlated with the replication of GCRV in host cells, revealing that NS12 may participate in the early replication cycle of GCRV virus in host cells and avoid degradation of viral proteins by competitively recruiting PSMB7. The interference of viral proteins with the accumulation of intracellular PSMB7 of the proteasome complex may be a viral strategy to escape from proteasome-mediated innate immunity.

Key words: grass carp reovirus (GCRV); NS12; PSMB7; protease; interaction

Corresponding author: LÜ Liqun. E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Funding projects: National Key R&D Program of China (2019YFD0900104); the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45-19)