



乌鳢水泡病毒 P 蛋白异构体的鉴定及其功能初探

秘琮然, 张永安, 涂加钢*

(华中农业大学水产学院, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了鉴定乌鳢水泡病毒 (SHVV) 磷蛋白 (P) 的异构体并研究其在病毒增殖中的作用, 本研究扩增了 SHVV 的 P 基因, 构建了原核表达质粒 pET32a-P, 通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化 His-P 蛋白, 免疫新西兰大白兔制备了多克隆抗体, 利用该抗体对 SHVV 的 P 蛋白异构体进行鉴定。进一步利用增强性绿色荧光蛋白 (EGFP) 研究了 P 蛋白异构体的亚细胞定位, 并通过定量 PCR (qRT-PCR)、Western blot 及 TCID₅₀ 研究了过表达 P 蛋白异构体对 SHVV 增殖的影响。结果显示, SHVV 感染斑点叉尾鲷卵巢巢细胞 (CCO) 出现 3 条 P 蛋白带, 进一步验证表明, 其中 2 条带分别是 P 蛋白 (又称 P1) 及其异构体 P2。亚细胞定位实验发现 P1 和 P2 主要定位在细胞质, 但是可以在核质中穿梭。在 CCO 细胞中过表达 P1、P2 均能促进 SHVV 增殖。因此, SHVV 在感染过程中能产生 P 蛋白 (P1) 及其异构体 P2, 且 P1 和 P2 对 SHVV 增殖发挥重要作用。研究结果有助于阐明 SHVV 的致病机理以及弹状病毒 P 蛋白异构体的功能。

关键词: 乌鳢水泡病毒; 多克隆抗体; P 蛋白; 异构体; 增殖

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

弹状病毒的宿主范围广泛, 涉及哺乳动物、鸟类、鱼类、昆虫、植物等^[1-3]。2017 年国际病毒分类委员会 (ICTV) 发布的报告表明, 弹状病毒共有 185 种, 分为 18 个属, 其中植物弹状病毒 4 个属, 动物弹状病毒 14 个属^[4]。目前, 鱼类弹状病毒约 20 种, 分为 3 个属^[5]。鱼类弹状病毒可以感染多种淡水和海水鱼类, 致病性强, 给鱼类养殖业造成重大经济损失。乌鳢水泡病毒 (snakehead vesiculovirus, SHVV) 是林鑫教授团队于 2014 年从广东省佛山市一个发病的乌鳢 (*Channa argus*) 养殖场分离得到的一株弹状病毒。SHVV 的核衣壳由基因组 RNA (大小约 11 kb)、核蛋白 (nucleoprotein, N)、磷蛋白 (phosphoprotein, P)、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (large protein, L) 组成。

核衣壳外是一层基质蛋白 (matrix protein, M) 形成的包膜^[6], 包膜外是病毒的囊膜, 囊膜上有病毒的糖蛋白 (glycoprotein, G)^[7]。感染 SHVV 的鱼出现脾脏和肝脏出血、肿大等症状^[8]。研究发现, 谷氨酰胺能通过三羧酸循环途径调节 SHVV 增殖^[9-10]。SHVV 感染导致月鳢 (*C. asiatica*) 细胞 (striped snakehead cell, SSN-1) 的 miR-214 下调表达, 下调表达的 miR-214 通过增加 N 和 P 蛋白的表达从而促进 SHVV 增殖^[11]。此外, miR-214 可以靶向宿主蛋白 AMP 依赖的蛋白激酶来正调控干扰素表达, 从而抑制 SHVV 增殖^[12]; 也可以靶向宿主蛋白糖原合成酶来抑制 SHVV 增殖^[13]。

弹状病毒的 P 蛋白是一个多功能的蛋白。P 蛋白能与 N 和 L 蛋白结合, 在 P 蛋白的 N 端和

收稿日期: 2021-06-11 修回日期: 2021-08-13

资助项目: 国家自然科学基金 (31972832)

第一作者: 秘琮然 (照片), 从事病原生物学与流行病学研究, E-mail: beicongran@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 涂加钢, E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn



C 端各有一个 N 蛋白的结合位点^[13], 而 P 蛋白的 N 端 19 个氨基酸是 L 蛋白的结合位点^[14]。L、N、P 蛋白与基因组 RNA 形成核糖核蛋白复合物^[13, 15], 而 P 蛋白与 L 蛋白结合形成聚合酶复合物一起发挥作用, 共同完成病毒的转录、复制^[16-17]。此外, 弹状病毒的 P 蛋白还能诱导细胞自噬体的形成^[18]; 能调节氧化应激以及激活宿主细胞的内源免疫反应^[19-20]; 能抑制宿主细胞 IRF3 蛋白的磷酸化, 从而抑制干扰素的表达^[21-22]。

对于弹状病毒 P 蛋白异构体的研究主要集中在狂犬病毒。研究发现狂犬病毒在感染宿主细胞的过程中, 除了产生全长的 P 蛋白 (P1), 还可以产生 4 种异构体 (P2~P5)^[23]。P1~P5 的亚细胞定位不同, 赋予 P 蛋白异构体不同的功能。狂犬病毒的 P 蛋白异构体 P3 能进入细胞核, 结合核仁素, 促进病毒增殖^[17]。目前, 鱼类弹状病毒 P 蛋白异构体尚缺乏研究, 因此本研究制备了 SHVV P 蛋白的多克隆抗体, 在 SHVV 感染卵巢细胞 (CCO) 中鉴定到全长的 P 蛋白 (P1) 及其异构体 P2。对 P1 和 P2 的亚细胞定位及其对 SHVV 增殖的影响进行了初步探究, 研究结果为揭示 SHVV 的致病机制以及弹状病毒 P 蛋白异构体的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) CCO 细胞由本实验室保存, 培养 CCO 细胞的培养基为必需培养基 (MEM)(HyClone), 培养基中含有 10% 热灭活胎牛血清 (Gibco)、青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和链霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 细胞培养在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中进行。乌鳢水泡病毒 (KP876483.1) 由本实验室保存。

1.2 实验试剂

原核表达载体 pET-32a(+) 和真核表达载体 pEGFP-N1、pCMV-MYC 由本实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) trans5 α 感受态细胞、BL21 感受态细胞、同源重组连接酶试剂盒 (pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit)、TransIntroTM EL 转染试剂均购自北京金全生物技术有限公司; 无水乙醇、氯仿、异丙醇、冰醋酸、盐酸、Tween 20、甘油等国标试剂购自国药集团

化学试剂有限公司; 常用限制性内切酶、Trizol、DNA marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; 去内毒素质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 PCR 引物序列

用于构建 P 基因原核表达质粒的引物 P-FW、P-BW, 用于定量 PCR (qRT-PCR) 扩增 G 和 β -actin 的引物 q-G-FW、q-G-BW、q- β -actin-FW、q- β -actin-BW, 以及构建带有 Myc 标签、EGFP 标签的 P1、P2 基因真核表达质粒的引物具体见表 1。

1.4 SHVV P 基因的原核与真核表达质粒的构建

从感染 SHVV 的 CCO 细胞中提取 RNA, 反转录成 cDNA。以该 cDNA 为模板, 用上下游引物通过 PCR 扩增 P 基因, 扩增程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 30 个循环。用琼脂糖凝胶电泳分离目的片段, 用胶回收试剂盒对目的片段进行纯化。将原核表达载体 pET-32a(+) 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切, 真核表达载体 pEGFP-N1 和 pCMV-MYC 用 *Eco*R I 酶切, 酶切 1 h 后, 将产物经过电泳分离后利用胶回收试剂盒纯化。利用 Clone Express One Step Cloning Kit 将纯化回收的 P 基因连接到载体 pET-32a(+) 上, 用同源重组酶将 P 连接到载体 pEGFP-N1 和 pCMV-MYC 上, 50 $^{\circ}\text{C}$ 连接 15 min 后, 将连接产物直接转化至大肠杆菌 trans 5 α 感受态细胞中, 挑取单克隆菌落进行培养。用特异性引物进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定成功后送至武汉擎科生物有限公司进行测序。

1.5 重组 His-P 蛋白的表达和纯化

试表达 将 pET32a-P 质粒转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取单克隆菌落培养, 菌液经 PCR 鉴定为阳性后接种至含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 培养至菌液 OD 值达到 0.6 时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 将菌液在 16 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 摇床中过夜诱导表达, 离心收集菌液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬洗涤后进行高压破碎 (ATS AH-1500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 分别收集上清液和沉淀, 进行 SDS-

表 1 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primers for PCR amplification

引物 primers	序列 sequences	用途 purpose
P-FW	GCTCTAGATTTTTTTCATATCCCATCAC	原核表达质粒 prokaryotic expression plasmid
P-BW	GCTCTAGATTTTTTTCATATCCTCCTGA	
q-G-FW	ACACCATACATGCCAGAGGC	相对定量PCR relative quantitative PCR
q-G-BW	GCCTCGCTGGGTATCCAAAT	
q- β -actin-FW	CACTGTGCCCATCTACGAG	
q- β -actin-BW	CCATCTCTGCTCGAAGTC	
MYC-P1-t-FW	CTTATGGCCATGGAGGCCGAATGGCAAACAGTTTTCCA	真核表达质粒 eukaryotic expression plasmid
MYC-P-t-BW	CGAGAGATCTCGGTGACCGGAACAGCACCATTGCTGAA	
MYC-P2-t-FW	CTTATGGCCATGGAGGCCGAATGGAGTGTACTGATGAATA	
EGFP-P1-t-FW	GATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATGGCAAACAGTTTTCCA	
EGFP-P-t-BW	CGCGGTACCGTGCAGTATTCATCAGTACACTCCAT	
EGFP-P2-t-FW	GATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATGGAGTGTACTGATGAATA	

PAGE 鉴定。

大量表达 根据试表达结果, 对 His-P 蛋白进行大量诱导表达, 用 Ni-NTA His-Band 树脂亲和层析柱试剂盒 (Qiagen) 从细菌上清液中纯化重组蛋白, 参照生工生物工程有限公司的 Ni-NTA 纯化树脂预装柱操作说明在非变性条件下进行纯化, 再使用蛋白质超滤管 (Millipore, 15 mL, 10 ku) 浓缩蛋白, 浓缩后的蛋白通过 SDS-PAGE 电泳进行浓度和纯度测定。

1.6 多克隆抗体的制备

将纯化后的重组 P 蛋白抗原与等量弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 皮下注射新西兰大白兔; 分别在第 2、4 周加强免疫, 即用 P 蛋白抗原与等量的弗氏不完全佐剂混合, 乳化后注射大白兔。第 3 次免疫 7 d 后从大白兔心脏取血, 4 °C 过夜静置, 5 000 r/min 离心 30 min, 收集血清, 检测多克隆抗体 (多抗) 的效价, 并将血清保存在 -80 °C 冰箱备用。

1.7 Western blot

将蛋白或细胞样品与蛋白上样缓冲液在金属浴中 100 °C 处理 10 min, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot, 原核表达的蛋白用考马斯亮蓝快速染色液进行染色后, 在凝胶成像仪上成像。真核表达的蛋白采用湿转法, 将凝胶上的蛋白样品转移至 PVDF 膜上, 首先加入 5% 脱

脂奶粉封闭 2 h, 然后用相应抗体 (P 蛋白多抗和 β -actin、EGFP 及 Myc 的标签抗体) 与 PVDF 膜室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 15 min, 重复 4 次; 最后用 HRP 标记的羊抗鼠或羊抗兔抗体室温孵育 50 min; TBST 缓冲液洗膜 10 min, 重复 3 次后将 ECL 化学发光液覆盖在膜上, 置于化学发光成像仪中成像。

1.8 细胞总 RNA 的提取

将细胞样从 -80 °C 的超低温冰箱中取出, 置于冰上解冻。加入 20% TRIzol 体积的氯仿, 剧烈振荡, 冰上静置 10 min, 冷冻离心机中 4 °C, 12 000×g 离心 15 min。离心管中的试剂分为 3 层, 吸取无色上清液至新的 RNA-free 离心管中, 加入与上清液等量的异丙醇, 冰上静置 10 min, 4 °C, 12 000×g 离心 10 min。弃上清液, 加入 1 mL 75% 的乙醇, 轻微混匀, 4 °C, 12 000×g 离心 10 min, 弃去上清液保留白色沉淀。干燥 3~5 min 后加入适量的 DEPC 水溶解 RNA, 在超微量分光光度计 Nano Drop 2000 上测定 RNA 浓度以及 260 和 280 nm 处的吸光值。结束后立即进行反转录, 或将样品置于 -80 °C 超低温冰箱中保存。

1.9 SHVV P 蛋白亚细胞定位

利用去内毒素质粒提取试剂盒提取质粒 pEGFP-N1 (空载)、pEGFP-P1 和 pEGFP-P2。转染前 1 天将 293T 细胞铺在含有玻片的 12 孔板中。

将 2 μg pEGFP-N1(空载)、pEGFP-P1 和 pEGFP-P2 分别转 293T 细胞, 在培养基中添加或不添加核输出抑制剂莱普霉素 B (leptomycin B, LMB), 转染 24 h 后, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加入 4% 多聚甲醛 1 mL 室温固定 15 min, PBS 洗细胞 1 次, 用浓度为 100 ng/mL 的 DAPI 染色 15 min, PBS 洗 3 次, 洗去染液后加入 10 μL 荧光淬灭封片剂封片, 用激光共聚焦显微镜观察荧光, 软件 NIS-Elements Viewer 分析荧光结果。

1.10 过表达 P 蛋白异构体对 SHVV 增殖的影响

实验前 1 天将 CCO 细胞铺入 12 孔板中, 将 2 μg pEGFP-N1(空载)、pEGFP-P1 和 pEGFP-P2 分别转染 CCO 细胞, 转染 24 h 后感染 SHVV, 感染 24 h 后收集细胞及上清液。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 SHVV 的 G mRNA 和 G 蛋白。通过 TCID₅₀ 检测上清液中 SHVV 的滴度。

1.11 数据分析

数据处理采用 Graphpad Prism 6.0 软件作图, 利用 *t* 检验进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 SHVV P 基因的克隆

根据 GenBank 数据库中公布的 SHVV 的 P 基因序列设计的引物扩增 SHVV 的 P 基因的 600 bp (5'-3'), 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 (图 1), 可以看到扩增条带大小约为 600 bp, 与目的基因

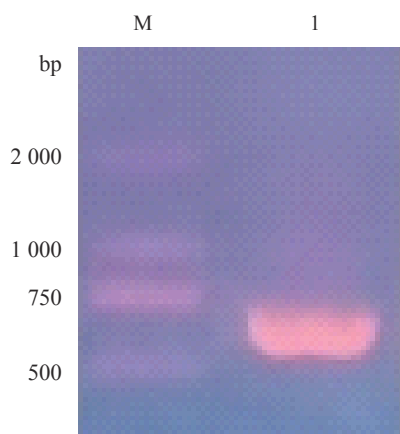


图 1 SHVV P 基因的 PCR 扩增结果

M. DNA Marker 2 000; 1. 目的基因条带

Fig. 1 PCR amplification of the SHVV P gene

M. DNA Marker 2 000; 1. target gene

的预期大小符合。

2.2 重组蛋白 His-P 的原核表达和纯化

将测序正确的 pET32a-P 质粒转化至 BL21 (DE3) 中诱导表达 His-P 蛋白, 将 Ni 柱亲和纯化过程中收集的流穿液和洗脱液中的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析。流穿液中仅有少量目的蛋白, 而用含有咪唑的洗脱液则成功纯化到目的蛋白, 大小为 31 ku (图 2-a)。将收集的蛋白样品用超滤管超滤浓缩后再用 His 标签的抗体进行 Western blot 鉴定, 诱导前蛋白不表达, 诱导表达并纯化的蛋白在 31 ku 左右有一条清晰的带, 进一步证实蛋白的大小符合预期 (图 2-b)。

2.3 SHVV P 蛋白存在异构体 P2

通过分析几种弹状病毒 P 蛋白的 mRNA 序列, 包括 SHVV、鲤春病毒血症病毒 (spring viraemia of carp virus, SVCV)、病毒性出血性败血症病毒 (viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)、狂犬病毒 (rabies virus, RV) 及水泡性口炎病毒 (vesiculovirus, VSV), 发现它们的 P mRNA 都存在产生 P 蛋白异构体的可能 (图 3-a)。根据起始密码子 AUG 的位置预测 SHVV P 的异构体数目及大小, 发现 SHVV P 基因可能存在 6 个异构体 (P1~P6)。用制备的 SHVV P 蛋白多抗通过 Western blot 检测 P 蛋白在 SHVV 感染 CCO 后 24 h 的表达情况, 发现 3 条特异性蛋白条带 (图 3-b)。为了验证 3 条蛋白带, 实验构建了带 Myc 标签的真核表达质粒 pMyc-P1 和 pMyc-P2, 将其转染 293T 细胞, 通过 Western blot 检测, 发现 P1 和 P2 这 2 个蛋白的大小与上述 3 条蛋白条带中的 2 条大小一致 (图 3-c), 这表明 SHVV 的 P 基因除了产生全长的 P 蛋白 (P1) 外, 至少还能产生异构体 P2。关于第 3 条蛋白带需要进一步验证。

2.4 SHVV P 蛋白异构体的亚细胞定位

为了确定 P1 和 P2 的亚细胞定位, 实验构建了真核表达质粒 pEGFP-P1 和 pEGFP-P2。2 种质粒转染 293T 细胞 24 h 后, 分别利用 EGFP 和 P 蛋白抗体通过 Western blot 检测 EGFP-P1 和 EGFP-P2 的表达情况, 结果表明 EGFP-P1 和 EGFP-P2 正常表达 (图 4-a)。将质粒 pEGFP-P1 和 pEGFP-P2 转染 293T 细胞, 在细胞培养基中添加或不添加核输出抑制剂 LMB。对转染 24 h 的细胞经过

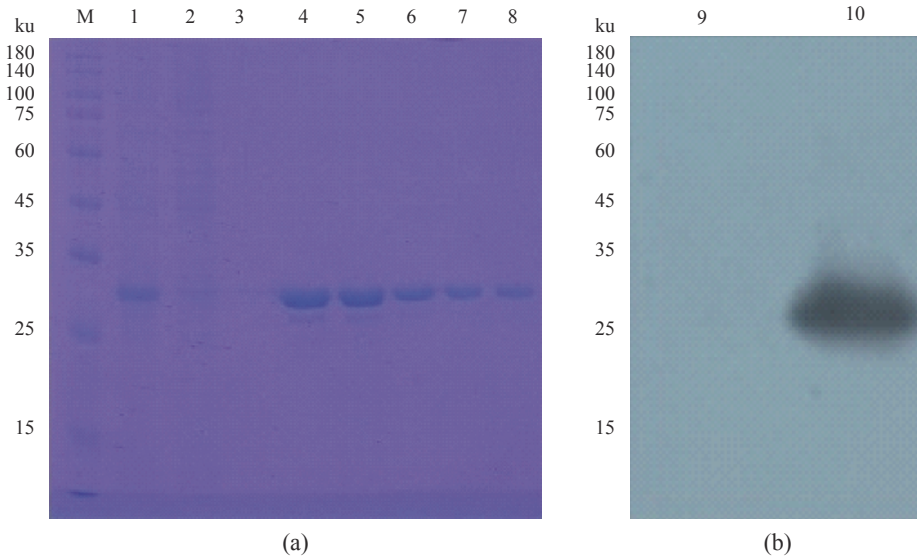


图 2 SHVV P 蛋白的 SDS-PAGE (a) 及 Western blot (b) 分析

M. 蛋白 Marker; 1. IPTG 诱导后菌液上清液; 2. 流穿液; 3~8. 纯化后洗脱的蛋白; 9. IPTG 诱导前菌液; 10. 纯化的 His-P 蛋白样

Fig. 2 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of purified SHVV P protein

M. protein marker; 1. IPTG induced bacterial liquid supernatant; 2. liquid flow-through; 3-8. purified protein eluted after purification; 9. IPTG induction of pre-bacterial fluid; 10. purified protein His-P

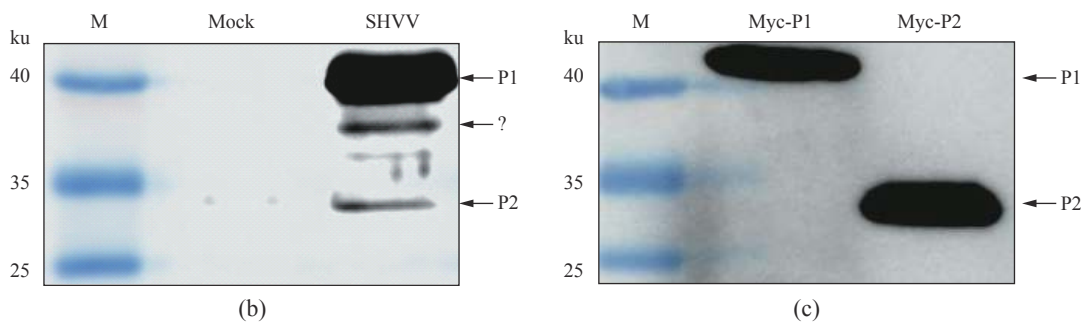
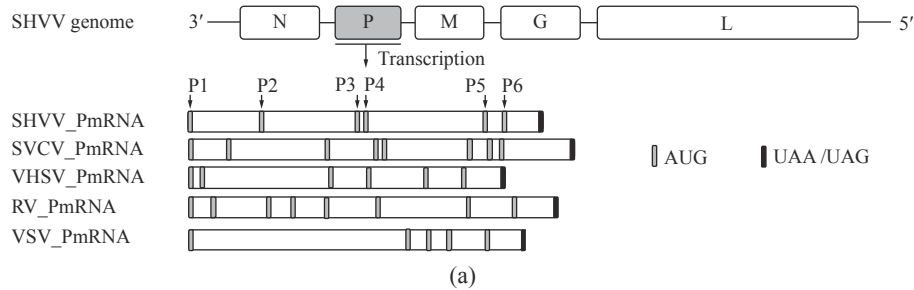


图 3 SHVV P 蛋白异构体的鉴定

(a) 不同弹状病毒 P mRNA 序列分析, (b) SHVV P 蛋白异构体数目及大小的 Western blot 鉴定, (c) SHVV P 蛋白异构体 P1、P2 的 Western blot 鉴定; M. 蛋白 Marker, Mock. 未感染 SHVV 的 CCO 细胞, SHVV. 感染 SHVV 的 CCO 细胞

Fig. 3 Identification of SHVV P protein isomers

(a) P mRNA sequence analysis of different rhabdoviruses, (b) the number and size of SHVV P protein isomers were identified by Western blot, (c) Western blot identification of SHVV P isomers P1 and P2; M. protein marker, Mock. CCO cells without SHVV infection, SHVV. CCO cells infected with SHVV

PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, DAPI 染色 15 min, 然后在共聚焦显微镜下观察。没有

添加抑制剂 LMB 时 P1 和 P2 都定位在细胞质, 而添加 LMB 时 P1 和 P2 主要定位于细胞核, 结

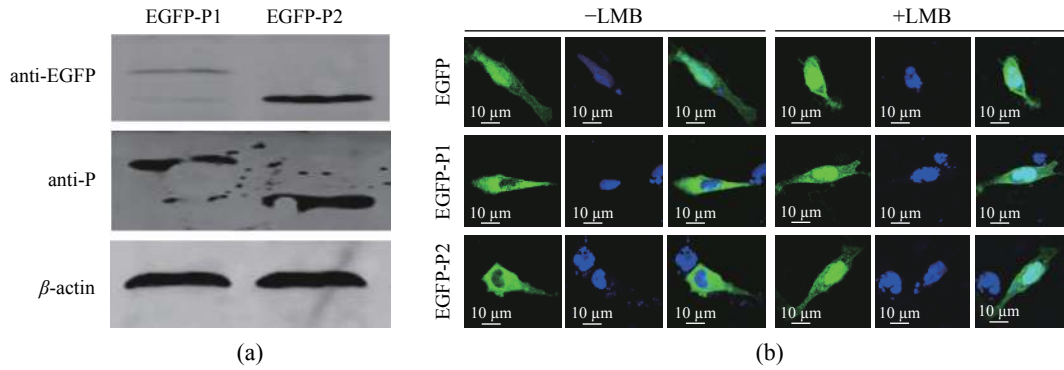


图 4 SHVV P 蛋白异构体的亚细胞定位

(a) Western blot 验证 EGFP-P1 和 EGFP-P2 的表达; (b) P1、P2 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of SHVV P protein isomers

(a) Western blot verification of EGFP-P1 and EGFP-P2 expression; (b) subcellular localization of P1 and P2

果表明 P1、P2 主要定位于细胞质, 但是可以进行核质穿梭 (图 4-b)。

2.5 过表达 P 蛋白异构体促进 SHVV 增殖

为了研究 SHVV P 蛋白异构体对病毒增殖的影响, 实验在 CCO 细胞中过表达 P 蛋白异构体, 分别将 pEGFP-P1 和 pEGFP-P2 转染 CCO 细胞, 转染 24 h 后感染 SHVV, 感染 24 h 后收取细胞及上清液。qRT-PCR 检测细胞中 SHVV 的 G mRNA, 结果显示, 过表达 P1、P2 能增加 G mRNA 的表达水平 (图 5-a); Western blot 检测细胞中 SHVV 的 G 蛋白, 结果表明, 过表达 P1、P2 能增加 G 蛋白的表达水平 (图 5-b); 用 TCID₅₀ 检测细胞上清液的病毒滴度, 结果表明过表达 P1、P2 能促进细胞上清液中 SHVV 的滴度 (图 5-c)。综合病毒 mRNA 水平、蛋白水平和滴度水平, 结果表明过表达 P 蛋白及其异构体 P2 能够促进 SHVV 增殖。

3 讨论

随着国民经济的快速增长, 人们对水产品的需求也在日益增加, 水产养殖业的兴起在满足人们餐桌需求的同时, 也面临许多养殖问题。作为我国重要的淡水名特优养殖品种和中药的重要原材料, 乌鳢深受消费者喜爱。然而 SHVV 的感染给我国乌鳢养殖业带来了巨大的经济损失, 目前 SHVV 的致病机制尚不清楚, 亟需对其开展深入研究。

P 蛋白是高度磷酸化的多功能蛋白, 在病毒增殖过程中发挥重要的作用。P 蛋白不仅能与病

毒蛋白结合, 还能与宿主蛋白结合调节病毒增殖^[24-26]。本研究分析了乌鳢水泡病毒、鲤春病毒血症病毒、病毒性出血性败血症病毒、狂犬病毒、水疱性口炎病毒的 P 基因序列, 发现这几种弹状病毒的 P 基因都存在产生 P 蛋白异构体的现象, 表明弹状病毒 P 基因产生 P 蛋白异构体可能存在普遍性。目前, 只有狂犬病毒被报道能产生 5 种 P 蛋白异构体 (P1~P5)^[27], 其他弹状病毒的 P 蛋白异构体还没有相关报道。根据 SHVV P mRNA 起始密码子的位置和数量, 理论上 SHVV 的 P 基因能产生 6 种 P 蛋白异构体, 而本研究利用 P 蛋白的多抗只鉴定到 3 条蛋白带。为了验证 3 条蛋白带, 实验构建了表达 Myc-P1 和 Myc-P2 的质粒。经过验证确定其中 2 条蛋白带为全长 P 蛋白 (P1) 及其异构体 P2。关于第 3 条蛋白带, 推测可能是异构体 P2 的某种翻译后修饰形式, 需要进一步确定。此外, 利用 P 基因的前 600 bp 制备 P 蛋白的抗体, 能鉴定到 P 蛋白异构体 P2, 证明 SHVV 能产生 P 蛋白异构体。但是如果制备全长 P 蛋白多克隆抗体, 可能会鉴定到更多的 SHVV P 蛋白异构体。

关于狂犬病毒的 P 蛋白异构体, P1、P2 定位于细胞质, P3~P5 定位于细胞核^[27], 通过分段缺失研究发现 P 蛋白的 C 端 (172~297 位氨基酸) 含有一个核定位信号, 而 N 端 (49~58 位氨基酸) 含有一个核输出信号, 2 种定位信号共同作用导致狂犬病毒 P 蛋白及其异构体出现不同的亚细胞定位^[28]。本研究用激光共聚焦显微镜观察 SHVV P1、P2 的亚细胞定位, 发现 P1、P2 在没有核输出 LMB 的情况下定位于细胞质, 在有核输出抑制

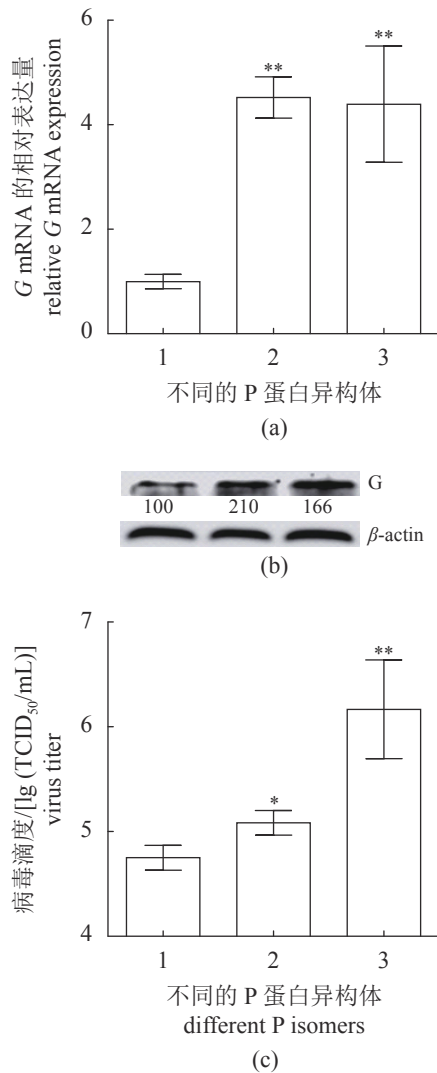


图 5 过表达 SHVV P 蛋白异构体对 SHVV 增殖的影响
将 pEGFP-N1(空载)、pEGFP-P1、pEGFP-P2 转染 CCO 细胞, 转染 24 h 后, 感染 SHVV; 1. pEGFP-N1、2. pEGFP-P1、3. pEGFP-P2; (a) 过表达 EGFP-P1、EGFP-P2 对细胞中 SHVV G mRNA 的影响; (b) 过表达 EGFP-P1、EGFP-P2 对细胞中 SHVV G 蛋白的影响; (c) 过表达 EGFP-P1、EGFP-P2 对上清液中 SHVV 滴度的影响。“*”代表差异显著, $P<0.05$, “**”代表差异极显著, $P<0.01$

Fig. 5 Effects of overexpression of SHVV P protein isomers on SHVV proliferation

CCO cells were transfected with pEGFP-N1(empty vector), pEGFP-P1 or pEGFP-P2, followed by SHVV infection at 24 h post of transfection; 1. pEGFP-N1; 2. pEGFP-P1; 3. pEGFP-P2; (a) effects of overexpression of EGFP-P1 and EGFP-P2 on cellular SHVV G mRNA level; (b) effects of overexpression of EGFP-P1 and EGFP-P2 on cellular SHVV G protein level; (c) effect of overexpression of EGFP-P1 and EGFP-P2 on supernatant SHVV titer level. “*”represents significant difference, $P<0.05$, “**”represents very significant difference, $P<0.01$

剂 LMB 的情况下主要定位于细胞核, 说明 P1、P2 能够进入细胞核, 并进行核质穿梭。这与狂

犬病毒 P1、P2 的亚细胞定位一致^[29]。推测 SHVV P 蛋白同时存在核定位信号及核输出信号, 具体的定位信号以及 P 蛋白的核输出机制均有待进一步研究。

为了研究 P1、P2 对 SHVV 增殖的影响, 实验在 CCO 细胞中过表达 P1、P2 后感染 SHVV, 病毒的 mRNA 水平、蛋白水平、滴度水平均表明过表达 P1、P2 可以促进 SHVV 增殖。其他弹状病毒的 P 蛋白不仅与病毒 N、L 蛋白相互作用, 也会与宿主蛋白相互作用, 调节干扰素的表达, 或者抑制干扰素下游信号通路^[29-32], 从而实现免疫逃逸, 促进病毒增殖。前期研究发现, 过表达 SHVV 的 P1 蛋白能抑制 SHVV 感染, 激活的 IFN 表达, 具有免疫逃逸的功能^[11]。因此推测, 过表达 P1 促进 SHVV 增殖可能是因为 P1 的免疫逃逸功能。但是 P2 蛋白促进 SHVV 增殖是否因为其具有免疫逃逸功能尚不清楚。而且 P1 和 P2 蛋白是单独发挥促进 SHVV 增殖的作用还是协同发挥作用有待进一步研究。因此, 本研究通过制备 SHVV P 蛋白的多克隆抗体, 鉴定了 P 蛋白的异构体, 初步探究过表达 P 蛋白及其异构体 P2 对病毒增殖的影响, 为后续 SHVV 致病机制的解析及 P 蛋白异构体的功能研究奠定基础。

参考文献 (References):

- [1] Kuzmin I V, Novella I S, Dietzgen R G, *et al.* The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009, 9(4): 541-553.
- [2] Walker P J, Dietzgen R G, Joubert D A, *et al.* Rhabdovirus accessory genes[J]. *Virus Research*, 2011, 162(1-2): 110-125.
- [3] 孙伟, 龚祖坝. 弹状病毒的分子生物学研究进展[J]. *病毒学杂志*, 1988(4): 400-408.
Sun W, Gong Z X. Advances in molecular biological studies of Rhabdoviruses[J]. *Virologica Sinica*, 1988(4): 400-408(in Chinese).
- [4] Maes P, Amarasinghe G K, Ayllón M A, *et al.* Taxonomy of the order *Mononegavirales*: second update 2018[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(4): 1233-1244.
- [5] 阮红梅, 张奇亚. 鱼类弹状病毒分子生物学研究动态[J]. *中国水产科学*, 2003, 10(6): 513-519.
Ruan H M, Zhang Q Y. Molecular biology of fish rhabdoviruses—review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 513-519(in Chinese).
- [6] Li Y, Luo L Z, Snyder R M, *et al.* Expression of the M
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- gene of vesicular stomatitis virus cloned in various vaccinia virus vectors[J]. *Journal of Virology*, 1988, 62(3): 776-782.
- [7] Assenberg R, Delmas O, Morin B, *et al.* Genomics and structure/function studies of *Rhabdoviridae* proteins involved in replication and transcription[J]. *Antiviral Research*, 2010, 87(2): 149-161.
- [8] Liu X D, Wen Y, Hu X Q, *et al.* Breaking the host range: mandarin fish is susceptible to a vesiculovirus derived from snakehead fish[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(4): 775-781.
- [9] Li C, Sun L D, Lin H Z, *et al.* Glutamine starvation inhibits snakehead vesiculovirus replication via inducing autophagy associated with the disturbance of endogenous glutathione pool[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 1044-1052.
- [10] Sun L D, Yi L Z, Zhang C, *et al.* Glutamine is required for snakehead fish vesiculovirus propagation via replenishing the tricarboxylic acid cycle[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(11): 2849-2855.
- [11] Zhang C, Lin L Z, Feng S S, *et al.* MicroRNA miR-214 inhibits snakehead vesiculovirus replication by targeting the coding regions of viral N and P[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(7): 1611-1619.
- [12] Zhang C, Feng S S, Zhang W T, *et al.* MicroRNA miR-214 inhibits snakehead vesiculovirus replication by promoting IFN- α expression via targeting host adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1775.
- [13] Zhang C, Li N Q, Fu X Z, *et al.* MiR-214 inhibits snakehead vesiculovirus (SHVV) replication by targeting host GS[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 299-303.
- [14] Chenik M, Schnell M, Conzelmann K K, *et al.* Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(3): 1925-1930.
- [15] Whelan S P J, Barr J N, Wertz G W. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses[M]//Kawaoka Y. *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*. Berlin: Springer, 2004: 61-119.
- [16] Green T J, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleocapsid in complex with the nucleocapsid-binding domain of the small polymerase cofactor, P[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(28): 11713-11718.
- [17] Poch O, Blumberg B M, Bougueleret L, *et al.* Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains[J]. *Journal of General Virology*, 1990, 71(5): 1153-1162.
- [18] Liu J, Wang H L, Gu J Y, *et al.* BECN1-dependent CASP2 incomplete autophagy induction by binding to rabies virus phosphoprotein[J]. *Autophagy*, 2017, 13(4): 739-753.
- [19] Kammouni W, Wood H, Jackson A C. Serine residues at positions 162 and 166 of the rabies virus phosphoprotein are critical for the induction of oxidative stress in rabies virus infection[J]. *Journal of NeuroVirology*, 2017, 23(3): 358-368.
- [20] Kammouni W, Wood H, Saleh A, *et al.* Rabies virus phosphoprotein interacts with mitochondrial Complex I and induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *Journal of NeuroVirology*, 2015, 21(4): 370-382.
- [21] Brzózka K, Finke S, Conzelmann K K. Identification of the rabies virus Alpha/Beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(12): 7673-7681.
- [22] Li S, Lu L F, Wang Z X, *et al.* The P protein of spring viremia of carp virus negatively regulates the fish interferon response by inhibiting the kinase activity of TANK-binding kinase 1[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(23): 10728-10737.
- [23] Okada K, Ito N, Yamaoka S, *et al.* Roles of the rabies virus phosphoprotein isoforms in pathogenesis[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(18): 8226-8237.
- [24] Xu Y B, Liu F, Liu J, *et al.* The co-chaperone Cdc37 regulates the rabies virus phosphoprotein stability by targeting to Hsp90AA1 machinery[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 27123.
- [25] Masatani T, Ozawa M, Yamada K, *et al.* Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase ϵ to the inhibition of type I IFN induction signalling[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(2): 316-326.
- [26] Zhang Y W, Zhang Y A, Tu J G. Hsp90 is required for snakehead vesiculovirus replication via stabilization of the viral L protein[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(16).
- [27] Oksayan S, Wiltzer L, Rowe C L, *et al.* A novel nuclear trafficking module regulates the nucleocytoplasmic localization of the rabies virus interferon antagonist, P protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(33):

- 28112-28121.
- [28] Padeloup D, Poisson N, Raux H, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal[J]. *Virology*, 2005, 334(2): 284-293.
- [29] Vidy A, Chelbi-Alix M, Blondel D. Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(22): 14411-14420.
- [30] Vidy A, El Bougrini J, Chelbi-Alix M K, *et al.* The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(8): 4255-4263.
- [31] Lieu K G, Brice A, Wiltzer L, *et al.* The rabies virus interferon antagonist P protein interacts with activated STAT3 and inhibits Gp130 receptor signaling[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(14): 8261-8265.
- [32] Moseley G W, Lahaye X, Roth D M, *et al.* Dual modes of rabies P-protein association with microtubules: a novel strategy to suppress the antiviral response[J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(20): 3652-3662.

Identification of snakehead vesiculovirus P protein isomers and primary study of their function

BEI Congran , ZHANG Yongan , TU Jiagang *

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Fisheries,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Snakehead vesiculovirus (SHVV) is a kind of fish rhabdovirus that has caused great economic losses in snakehead fish culture in China. However, the mechanism on SHVV's pathogenicity is still unclear. The phosphoprotein (P) isomers have been identified in mammalian rhabdovirus rabies virus and played important roles in the proliferation of rabies virus, but the function of P isomers in fish rhabdovirus has not been investigated. In order to identify the SHVV P isomers and study their roles in virus proliferation, the P gene of SHVV was amplified, and a prokaryotic expression plasmid pET32a-P was constructed. The recombinant His-P protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography column, and polyclonal antibody against the His-P protein was acquired through immunization of New Zealand white rabbits. Using the P protein polyclonal antibody, the SHVV P isomers were determined. Furthermore, the subcellular localization of P isomers was assessed using enhanced green fluorescent protein (EGFP), and the effect of overexpression of P isomers on SHVV proliferation was determined using qRT-PCR, Western Blot, and TCID₅₀. The results showed that three P protein bands were detected during SHVV-infected channel catfish ovary (CCO) cells. Further verification determined that two of the three bands were P protein (also called P1) and its isomer P2. Subcellular localization experiment showed that both P1 and P2 localized mainly in cytoplasm, and P1 and P2 could shuttle between nucleus and cytoplasm. Overexpression of P1 or P2 in CCO cells increased G mRNA level about four times and G protein level around two times. The viral titer of SHVV was also significantly promoted via overexpression of P1 and P2, indicating that P1 and P2 promoted SHVV proliferation. Overall, SHVV can produce P protein (P1) and its isomer P2 during its infection, and P1 and P2 play an important role in SHVV proliferation. Our results will be helpful to understand SHVV pathogenicity and the function of P isomers of rhabdoviruses.

Key words: snakehead vesiculovirus; polyclonal antibody; P protein; isomer; proliferation

Corresponding author: TU Jiagang. E-mail: tujiagang@mail.hzau.edu.cn

Funding project: National Natural Science Foundation of China (31972832)