



VP35 蛋白对 II 型草鱼呼肠孤病毒增殖的影响

姜霖, 涂加钢, 张永安*

(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: II 型草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 基因片段 S11 编码外衣壳蛋白 VP35。为深入探究 VP35 蛋白在病毒增殖中发挥的作用, 实验扩增了 S11 基因并插入载体 pCMV-3×flag 中, 构建 pCMV-3×flag-S11 真核表达质粒, 转染草鱼肾细胞 (CIK) 后感染 II 型 GCRV, 收集感染后的上清液与细胞。首先利用实时荧光定量 PCR 中相对定量的方法检测细胞样品中 II 型 GCRV-S6 基因的 mRNA。结果显示, 过表达 VP35 在病毒 mRNA 水平促进 II 型 GCRV 的增殖; 然后扩增 S6 基因并插入到载体 pET-32a(+) 中, 构建重组原核表达质粒, 纯化 II 型 GCRV-VP4 蛋白并制备多克隆抗体, 用 Western blot 检测收集的细胞样品中的 VP4 蛋白, 结果表明过表达 VP35 在病毒蛋白水平促进 II 型 GCRV 的增殖; 最后使用 pET-32a-S6 质粒作为阳性标准质粒并制作标准曲线, 建立 II 型 GCRV 病毒基因拷贝数的绝对定量检测方法, 利用该方法检测细胞上清液中的病毒颗粒, 结果表明过表达 VP35 增加 II 型 GCRV 病毒拷贝数。本研究从 3 个维度证明过表达 VP35 蛋白促进 II 型 GCRV 增殖, 有助于深入解析 VP35 蛋白功能, 也为进一步探究 II 型 GCRV 的致病机制提供理论基础。

关键词: 草鱼; II 型草鱼呼肠孤病毒; VP35 蛋白; VP4 蛋白; 多克隆抗体; 增殖

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国养殖规模最大的淡水经济鱼类。《2020 年中国渔业统计年鉴》^[1] 显示, 2019 年我国草鱼产量达 553.3 万 t, 占淡水养殖产量的 18.36%, 但草鱼也是病害极其多发的鱼类, 其中草鱼出血病危害最为严重。近年来病毒性出血病的频繁暴发, 严重影响了草鱼养殖业的发展, 而其发病机制仍不清楚。因此, 研究病毒增殖机制从而开发有针对性的治疗方法, 仍然是解决该病毒病的重要思路。

病毒性草鱼出血病是由草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 引起。GCRV 属于水生动物呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*)。根据基因序列可将目前已经报道的 GCRV 分为 3 个基因型

(I、II 和 III 型)^[2], 它们在毒力、细胞敏感性、免疫原性和致病性方面差异很大^[3]。II 型 GCRV 作为目前的主要流行株^[4], 对草鱼的致病性较强、致死率较高, 由于其在现有细胞系中都不产生细胞病变效应, 故对其滴度的定量较为困难^[5]。II 型 GCRV 基因组由 11 个双股 RNA 片段组成^[6], 这 11 个片段编码病毒的结构或非结构蛋白^[7-9]; 这些蛋白在病毒生命周期中具有不同的功能和表达模式, 与 I 型和 III 型相应蛋白之间的氨基酸序列相同率小于 20%, 因此功能也可能不同^[10]。I 型和 III 型 GCRV 的 S11 片段编码非结构蛋白 (分别为 NS26 和 VP8/VP15), 而 II 型的 S11 片段编码 VP35 蛋白, 在其 51~74 位氨基酸区域处存在锌结

收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-09-18

资助项目: 国家自然科学基金 (31930114, 31725026)

第一作者: 姜霖 (照片), 从事草鱼出血病致病机制研究, E-mail: linjiang0609@163.com

通信作者: 张永安, 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: yonganzhang@mail.hzau.edu.cn



合基序 CxxC-n16-HxC^[11]，该区域在 I 型 GCRV 的外衣壳蛋白 VP7 中同样存在，因此推测 VP35 蛋白为 II 型 GCRV 的外衣壳蛋白^[12]，可能在病毒入侵与病毒增殖过程中起重要作用^[13]。当前有关 VP35 蛋白的研究多数针对其可用作亚单位疫苗或口服疫苗的抗原，从而诱导免疫反应以保护草鱼免受 GCRV 感染^[12,14]。

VP35 蛋白作为 II 型 GCRV 外衣壳蛋白，可能承担着与受体结合促进病毒进入宿主细胞的重要功能，也可能通过与细胞内蛋白互作从而促进病毒的增殖。本研究通过过表达 VP35 以探究其对病毒增殖的影响。首先使用相对定量的方法，在 mRNA 水平上检测到过表达 VP35 促进病毒增殖；其次通过制备 II 型 GCRV 另一个外衣壳蛋白 VP4 抗体^[15]，在蛋白水平上进一步验证过表达 VP35 能促进病毒增殖；最后建立了病毒基因拷贝数的绝对定量检测方法，证明过表达 VP35 增加病毒拷贝数。本研究为后续探究 VP35 蛋白促进病毒增殖的作用机制奠定了良好的基础，为进一步研究 II 型 GCRV 病毒提供了蛋白水平的检测途径，为快速、准确地定量病毒滴度提供了新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

II 型 GCRV-AH528 毒株由本实验室分离并保存。草鱼肾 (CIK) 细胞由本实验室保存，用含有 10% 热灭活胎牛血清 (Gibco, 新西兰)、青霉素 (100 μg/mL) 和链霉素 (100 μg/mL) 的 M199 培养基 (HyClone, 美国) 培养，CIK 细胞培养于 28 °C 培养箱中。载体 pCMV-3×flag 和 pET-32a(+) 由本实验

室保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) trans 5α 感受态细胞和 TransIntro™ EL 转染试剂购自北京全式金生物技术股份有限公司。大肠杆菌 Rosetta 2 (DE3) 感受态细胞购自上海昂羽生物技术有限公司。质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自广州美基生物科技有限公司。反转录试剂盒和限制性内切酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。无水乙醇、氯仿、异丙醇、冰醋酸、Tween-20 等国标试剂购自国药集团化学试剂有限公司。实时荧光定量 PCR (qPCR) 试剂 2×TSINGKE Master qPCR Mix 购自武汉擎科创新生物技术有限公司。病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 引物合成

根据 GenBank 上发表的 II 型 GCRV 的 S6、S11 的基因序列 (登录号: KR180373.1、KR180378.1)，利用 Primer premier 5.0 软件设计引物，其中下划线为限制性内切酶酶切位点，送至武汉擎科生物有限公司进行合成。相关引物序列见表 1。

1.3 pET-32a-S6 和 pCMV-3×flag-S11 重组表达质粒的构建

使用感染 GCRV-AH528 的 CIK 细胞，提取 RNA 并反转录成 cDNA，以 cDNA 为模板，用合成的上下游引物进行 PCR，扩增 S6、S11，扩增程序：98 °C 变性 10 s，58 °C 退火 5 s，72 °C 延伸 15 s，共 30 个循环。PCR 结束后，用琼脂糖凝胶电泳分离，目的片段用胶回收试剂盒回收、纯化。将 S6 PCR 产物和原核表达载体 pET-32a(+) 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 进行双酶切，将 S11 PCR 产物和真核表达载体 pCMV-3×flag 用

表 1 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primers for PCR amplification

引物 primers	序列 sequences
S11-FW	TT <u>AAGCTT</u> ATGGAATCAGCAAAACCATTGACGTTT
S11-RW	CTGGTACCGACTGTCCCTGGATCTCAGGTTTGAAG
S6-FW	TTTATTTTCAAGGTA <u>AAGCTT</u> ATGGGAAACGTCCAGACGAA
S6-RW	TGGTGGTGGTGGTGC <u>TCTCGAGCTA</u> AGACGGAGGAGGCCAGTATC
qPCR-β-actin-FW	CACTGTGCCCATCTACGAG
qPCR-β-actin-RW	CCATCTCCTGCTCGAAGTC
qPCR-S6-FW	GATGGCGAGGATAAAGGG
qPCR-S6-RW	CGCTGGGTGATAGGACA

限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 进行双酶切。1 h 后将酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳分离, 用胶回收试剂盒进行回收、纯化。采用 Clone Express One Step Cloning Kit 将纯化回收的 S6、S11 分别与回收的载体 pET-32a(+)、pCMV-3×flag 连接, 22 °C 孵育 50 min。将连接产物转化至大肠杆菌 *trans* 5α感受态细胞中, 步骤为冰浴 30 min; 42 °C 水浴 90 s 后立刻冰浴 5 min; 加入 400 μL LB 液体培养基后放入 37 °C 摇床中培养 1 h; 吸取 150 μL 菌液均匀涂布在含氨苄的 LB 固体培养基中; 37 °C 培养 12 h 后挑取单克隆菌落进行培养。用片段特异性引物进行菌落 PCR 鉴定, 挑选阳性单克隆送至武汉擎科生物有限公司测序。

1.4 VP4 重组蛋白的表达和纯化

VP4 重组蛋白的表达 将测序正确的重组表达质粒 pET-32a-VP4 转化至 Rosetta 2 (DE3) 感受态细胞中, 挑选菌落 PCR 结果为阳性的菌落, 接种在含氨苄的 LB 培养基中, 在 37 °C, 180×g 的摇床中振荡培养。当菌液 OD 值达到 0.6 时加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至其终浓度为 1 mmol/L, 在 37 °C, 180×g 的摇床中振荡 4 h 诱导蛋白表达。离心收集诱导表达的菌液, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬洗涤 2 次, 进行高压破碎, 在 4 °C, 12 000×g 离心 50 min, 收集上清液和沉淀, 进行 SDS-PAGE 鉴定分析。经鉴定, 重组蛋白表达在包涵体中。

VP4 重组蛋白的纯化 使用蛋白洗涤液 I (50 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mmol/L 脲, 10 mmol/L β-巯基乙醇, pH 8.0) 重悬溶解包涵体, 12 000×g 离心 20 min, 收集上清液; 将上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜; 过滤后的上清液与适量的平衡过的 Ni-NTA 树脂混合, 室温孵育 60 min 后收集流穿液。使用蛋白洗涤液 II (配方同蛋白洗涤液 I, pH 6.3) 洗涤至无蛋白流出, 收集洗涤液。再用蛋白洗脱液 (配方同蛋白洗涤液 I, pH 4.5) 分管洗脱, 每次 0.5 mL, 收集洗脱液。

VP4 重组蛋白的复性 采用分步透析的办法对收集到的 VP4 重组蛋白进行脲的去除和蛋白的重折叠。首先使用含 3 mol/L 脲的复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 400 mmol/L L-精氨酸盐酸盐, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 0.005% Tween-20) 进行透析, 其次使用含 1 mol/L 脲的复性缓冲

液进行透析, 最后使用不含脲、谷胱甘肽和 Tween-20 的复性缓冲液进行透析。每一步透析都在 4 °C 进行 12 h。

1.5 多克隆抗体的制备与 Western blot 检测

多克隆抗体的制备 将纯化后的重组 VP4 蛋白抗原与等量弗式完全佐剂混合, 充分乳化后, 皮下注射新西兰大白兔; 分别在第 2 和 4 周加强免疫, 即用 VP4 蛋白抗原与等量的弗式不完全佐剂混合, 乳化后注射大白兔。第 3 次免疫 7 d 后自大白兔心脏取血, 4 °C 静置过夜, 5 000×g 离心 30 min, 收集血清, 检测抗血清中多克隆抗体 (多抗) 的效价, 并将血清保存在 -80 °C 冰箱备用。

Western blot 检测 取蛋白或细胞样品, 经蛋白上样缓冲液处理后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot 分析, 采用湿转法将凝胶上的蛋白样品转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 将一抗 (VP4 抗血清 1 : 1 000 稀释) 4 °C 过夜孵育, TBST (1 mol/L Tris-HCl 20 mL, NaCl 8.8 g, 0.5 mL Tween-20, ddH₂O 定容至 1 L) 缓冲液清洗 3 次, 每 15 min 1 次; HRP 标记的羊抗兔 IgG (ABclone, 中国) 作为二抗孵育 1 h; TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 15 min。将 PVDF 膜置于 ECL 发光液中, 采用化学发光法显色拍照分析。

1.6 细胞转染与病毒感染

细胞转染实验 转染前 1 天, 使用胰酶消化 CIK 细胞并离心, 用培养基重悬后计数, 使其均匀地加入细胞板中, 待细胞生长至 70%~80% 时, 将质粒在 Opti-MEM 培养基 (Invitrogen, 美国) 中与 TransIntro™ EL Transfection Reagent (TransGen Biotech, 中国) 混匀后室温共同孵育 15~20 min, 混合液转入细胞孔板中孵育 6 h, 换为含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 M199 培养基继续培养。

病毒感染实验 攻毒前 1 天, 使用胰酶消化细胞并离心, 用培养基重悬细胞后计数, 使其均匀地加入细胞板中。待细胞长满单层后, 加入 GCRV-AH528 感染 CIK 细胞, 孵育 2 h 后换为含有 5% FBS 的 M199 培养基继续培养。根据实验需求, 在规定的时间内收取细胞样品。

1.7 RNA 的提取

细胞总 RNA 的提取 加入 1 mL TRIzol 裂解细胞, 将其从细胞板中转至 RNase-free EP 管中, 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡后置于冰上静置 10

min; 在 4 °C, 12 000×g 离心 15 min; 取上清液至新管中, 加入与上清液等量的异丙醇, 冰上静置 10 min; 在 4 °C, 12 000×g 离心 10 min; 弃上清液后加入 1 mL 75% 的乙醇, 轻微混匀; 在 4 °C, 12 000×g 离心 10 min, 弃去上清液保留白色沉淀; 静置 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 260~280 nm 处的吸光值。结束后立即进行反转录, 或者将样品置于-80 °C 超低温冰箱中保存。

病毒 RNA 提取 收集感染病毒后的细胞上清液。取 200 μL 上清液至 RNase-free EP 管中, 加入 500 μL TRIzol 裂解液, 涡旋混匀后转移至吸附柱中; 12 000×g 离心 1 min 后弃滤液; 将吸附柱装回 2 mL 收集管中, 加入 600 μL 漂洗液; 12 000×g 离心 30 s 后弃滤液; 洗 2 次; 将吸附柱装回收集管中, 12 000×g 空柱离心 2 min; 将吸附柱转移至新的 1.5 mL 收集管中, 加入 50 μL 洗脱液至吸附柱的膜中央, 室温放置 1 min; 12 000×g 离心 1 min; 弃去吸附柱, 所得到的 RNA 在超微量分光光度计 Nano Drop 2000 上测定 RNA 浓度以及 260~280 nm 处的吸光值; 结束后立即进行反转录, 或者将样品置于-80 °C 超低温冰箱中保存。

1.8 qPCR

绝对定量 用超微量分光光度计 Nano Drop 2000 测定 pET32a-S6 质粒浓度, 用 DNA/RNA copy number calculator (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) 计算单位体积 (μL) DNA 样品中质粒的拷贝数; 将质粒按 10 倍倍比稀释并作为模板, 使用 2×TSINGKE Master qPCR Mix (SYBR Green I with UDG) 试剂、引物对 qPCR-S6-FW/qPCR-S6-BW 进行 qPCR 扩增, 每个浓度设置 4 个重复, 阴性对照用灭菌 ddH₂O 代替模板, 制作标准曲线。qPCR 反应在 BIO-RAD CFX Connect™ Real-Time System 进行。反应体系为 20 μL: 2×Mix 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, DNA 1 μL, ddH₂O 7.4 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 40 个循环。将待测样品以相同条件进行 qPCR 扩增, 并通过已建立的标准曲线得到样品中的病毒拷贝数。

相对定量 分别用定量引物和内参引物扩增目的基因片段, 反应体系及扩增条件同绝对定量, qRT-PCR 结束后, 分析熔解曲线以确保反应

的特异性。以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据。

1.9 数据分析

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

2 结果

2.1 GCRV-AH528 S11 基因的克隆及表达

使用 GCRV-AH528 感染 CIK 细胞 48 h 的样品 RNA, 将其反转录为 cDNA 并作为模板, 使用引物对 S11-FW/S11-RW 进行 PCR 扩增, 目的片段经回收后用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 得到约 950 bp 的片段, 大小与预期一致 (图 1-a)。将目的片段进一步克隆至载体 pCMV-3×flag 中, 对构建的重组质粒进行测序及酶切鉴定 (图 1-b), 酶切结

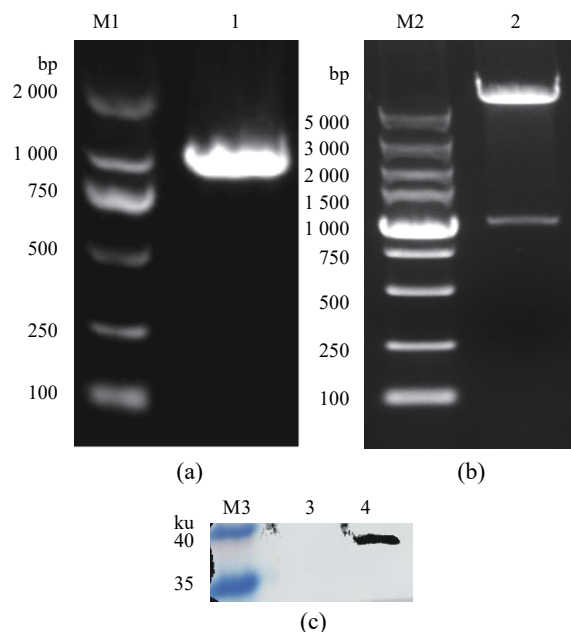


图 1 GCRV-AH528 S11 的克隆及表达

(a) GCRV-AH528 S11 的 PCR 扩增, (b) GCRV-AH528 S11 的酶切鉴定, (c) GCRV-AH528 S11 的表达; M1. DL2000 DNA marker, M2. DL5000 DNA marker, M3. 蛋白 marker, 1. GCRV-AH528 S11, 2. *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切真核质粒 pCMV-3×flag-S11, 3. 转染 pCMV-3×flag, 4. 转染 pCMV-3×flag-S11

Fig. 1 Cloning and expression of GCRV-AH528 S11

(a) PCR amplification of GCRV-AH528 S11, (b) restriction enzyme digestion of the GCRV-AH528 S11, (c) expression of GCRV-AH528 S11; M1. DL2000 DNA marker, M2. DL5000 DNA marker, M3. protein marker, 1. GCRV-AH528 S11, 2. enzyme digestion of pCMV-3×flag-S11 by *Hind* III/*Kpn* I, 3. transfection with pCMV-3×flag, 4. transfection with pCMV-3×flag-S11

果中有 950 bp 目的片段,表明重组真核质粒 pCMV-3×flag-S11 构建成功。将 pCMV-3×flag-S11 真核质粒转染进 CIK 细胞中,使用 flag 抗体作为一抗进行 Western blot 分析,得到 37 ku 的蛋白条带,大小与预期一致(图 1-c)。pCMV-3×flag 载体转染的 CIK 细胞作为对照,没有检测到蛋白条带。

2.2 过表达 VP35 在 mRNA 水平促进 GCRV-AH528 增殖

将 pCMV-3×flag-S11 真核质粒转染 CIK 细胞,然后用 GCRV-AH528 感染 CIK 细胞,用 pCMV-3×flag 载体转染的 CIK 细胞作为对照。以 qPCR-S6-FW/qPCR-S6-RW 为引物,qPCR 检测细胞中 S6 基因的表达。结果表明,过表达 VP35 在 mRNA 水平上会显著促进 S6 基因的表达,即促进 GCRV-AH528 的增殖(图 2)。

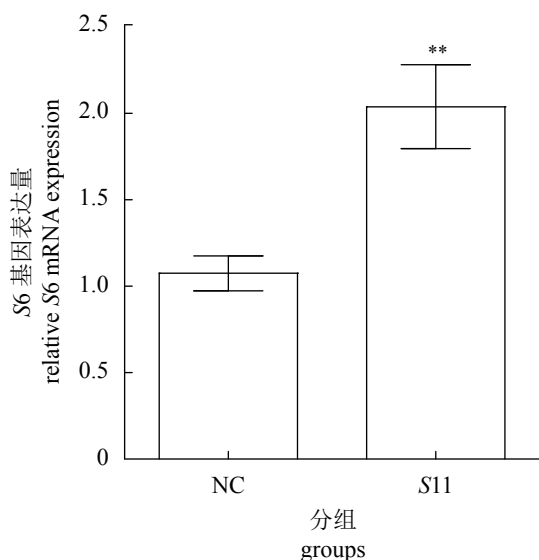


图 2 过表达 VP35 促进 GCRV-AH528 增殖

NC. 转染 pCMV-3×flag, S11. 转染 pCMV-3×flag-S11; **. 差异极显著, $P<0.01$; 下同

Fig. 2 Overexpression of VP35 promoting GCRV-AH528 replication

NC. transfection with pCMV-3×flag, S11. transfection with pCMV-3×flag-S11; **. extremely significant difference, $P<0.01$; the same below

仅通过 mRNA 水平的检测尚不能完全验证 S11 基因对 GCRV-AH528 增殖的影响,因此,实验将通过制备 GCRV-AH528 另一个衣壳蛋白 VP4 (由基因片段 S6 编码)的抗体,从蛋白水平进一步验证。

2.3 GCRV-AH528 S6 基因的克隆

使用 GCRV-AH528 感染 CIK 细胞 48 h 的样品作为模板,使用引物对 S6-FW/S6-RW 进行扩增,

目的片段回收后用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,得到约 2 000 bp 的片段,大小与预期一致(图 3-a)。将其进一步克隆至载体 pET32a(+) 中,通过对质粒测序及酶切鉴定(图 3-b),酶切结果可以看到 2 000 bp 目的片段,表明得到序列正确的重组原核质粒 pET32a-S6。

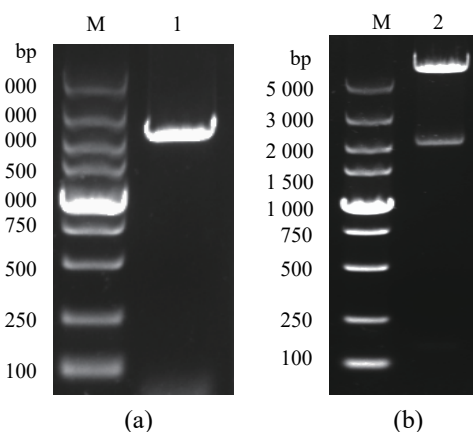


图 3 GCRV-AH528 S6 的 PCR 扩增和克隆

(a) GCRV-AH528 S6 的 PCR 扩增, (b) GCRV-AH528 S6 的双酶切鉴定; M. DL5000 DNA marker, 1. GCRV-AH528 S6, 2. Hind III 和 Xho I 酶切的表达质粒 pET32a-S6

Fig. 3 PCR amplification and cloning of GCRV-AH528 S6

(a) PCR amplification of GCRV-AH528 S6, (b) restriction enzyme digestion of the GCRV-AH528 S6; M. DL5000 DNA marker, 1. GCRV-AH528 S6, 2. enzyme digestion of pET32a-S6 by Hind III/Xho I

2.4 VP4 重组蛋白的表达和纯化

使用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 对重组大肠杆菌进行诱导表达,收集诱导前、诱导后、细胞裂解上清液及沉淀的蛋白,分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,结果表明,该融合蛋白在包涵体中表达,蛋白大小约 72 ku,与目的蛋白大小一致。使用不同 pH 值的蛋白洗脱液来调节目蛋白与 Ni 离子的结合力,得到纯化的 VP4 蛋白(图 4)。纯化后的蛋白采用分步透析法去除尿素,使 VP4 蛋白复性。

2.5 多克隆抗体的制备及特异性检测

用纯化后的 VP4 蛋白免疫新西兰大白兔,收集血清获得 VP4 蛋白的多克隆抗体。GCRV-AH528 感染 CIK 细胞后,收集细胞样品,通过 Western blot 进行分析,检测 VP4 蛋白多克隆抗体的特异性。未感染 GCRV-AH528 的 CIK 细胞作为对照。结果显示,感染 GCRV-AH528 的蛋白样品

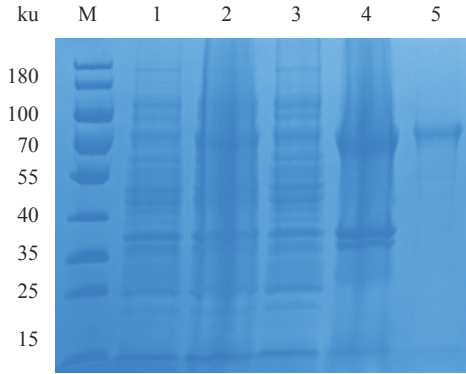


图 4 VP4 蛋白表达与纯化结果

M. 蛋白 marker, 1. 诱导前的蛋白, 2. 诱导后的蛋白, 3. 上清液中的总蛋白, 4. 沉淀中的总蛋白, 5. 纯化后的蛋白

Fig. 4 Results of VP4 protein expression and purification

M. protein marker, 1. pre-induction protein, 2. induced protein, 3. total protein in the supernatant, 4. total protein, 5. the purified protein

有 1 条单一的条带, 大小约 72 ku, 与目的蛋白大小一致, 而对照组没有发现蛋白条带 (图 5), 表明制备的多克隆抗体能特异性识别 VP4 蛋白。

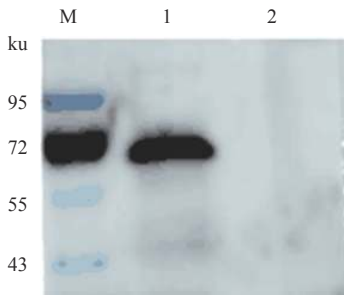


图 5 Western blot 检测 VP4 蛋白

M. 蛋白 marker, 1. 感染 GCRV-AH528 的 CIK 细胞样, 2. 未感染 GCRV-AH528 的 CIK 细胞样

Fig. 5 Detection of VP4 protein using Western blot

M. protein marker, 1. infected CIK cell sample, 2. uninfected CIK cell sample

2.6 过表达 VP35 在蛋白水平促进 GCRV-AH528 增殖

将 pCMV-3×flag-S11 真核表达质粒转染进 CIK 细胞, 然后感染 GCRV-AH528, 通过 Western blot 分析 VP4 蛋白表达情况。结果表明过表达 VP35 促进 VP4 蛋白的表达, 即促进 GCRV-AH528 的增殖 (图 6)。

2.7 过表达 VP35 增加 GCRV-AH528 拷贝数

将 pET32a-S6 质粒进行 10 倍倍比稀释后作为模板, 以 qPCR 检测 S6 表达情况, 绘制标准曲线。其线性关系: $Y = -4.41X + 45.56$, 相关系数 R^2

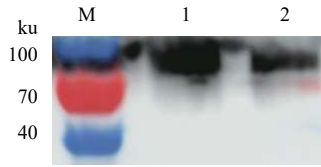


图 6 过表达 VP35 在蛋白水平促进 GCRV-AH528 增殖
M. 蛋白 marker, 1. 转染 pCMV-3×flag-S11, 2. 转染 pCMV-3×flag

Fig. 6 Overexpression of VP35 promoting GCRV-AH528 replication at protein level

M. protein marker, 1. transfection with pCMV-3×flag-S11, 2. transfection with pCMV-3×flag

为 0.997, 表明该 qPCR 的 CT 值与拷贝数的对数之间有较好的线性关系。

将 pCMV-3×flag-S11 真核表达质粒转染 CIK 细胞, 然后感染 GCRV-AH528, qPCR 检测上清液中 S6 的表达情况。将获得的 CT 值带入标准曲线, 得到细胞上清液中的病毒拷贝数。用 pCMV-3×flag 载体转染 CIK 细胞作为对照组。结果表明过表达 VP35 会显著增加细胞上清液中 GCRV-AH528 的拷贝数 (图 7)。

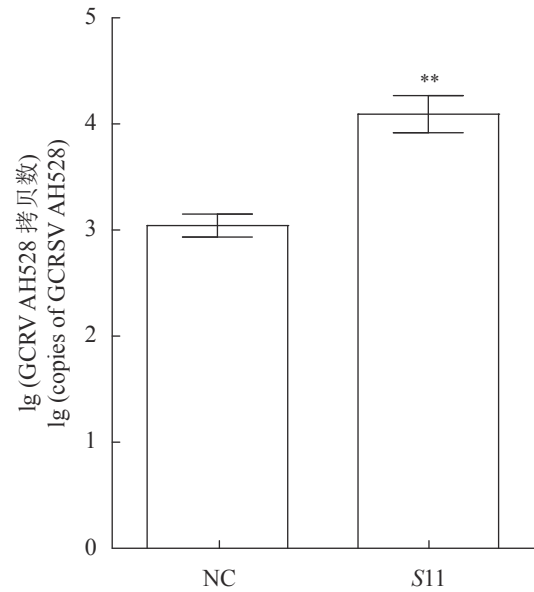


图 7 过表达 VP35 增加 GCRV-AH528 拷贝数

Fig. 7 Overexpression of VP35 increasing the copy number of GCRV-AH528

3 讨论

GCRV 感染引起的草鱼出血病严重危害我国草鱼养殖业的健康发展。流行病学调查结果表明我国流行的 GCRV 90% 以上是 II 型毒株, 目前, II 型 GCRV 各基因编码蛋白的功能尚不完全清楚^[16]。在病毒入侵宿主的过程中, 病毒蛋白与宿

主蛋白发生复杂的相互作用, 每个病毒蛋白都承载着重要的生物学功能。例如病毒编码的结构蛋白会保障病毒的复制、维持病毒颗粒的形态等, 非结构蛋白在病毒的组装过程中主要起调控作用等^[17-18]。其中, 病毒的外衣壳蛋白会保护病毒核酸、介导病毒吸附宿主细胞, 因而在病毒增殖过程中发挥重要作用。

II 型 GCRV VP35 蛋白由于具有锌结合基序 CxxC-n16-HxC, 被认为与 I 型 GCRV VP7 蛋白和 III 型 GCRV VP38 蛋白是同源蛋白, 均为病毒外衣壳蛋白的组成成分, 起到保护病毒颗粒、介导病毒与细胞结合的功能^[18]。I 型 GCRV VP7 能与 VP5 蛋白协同作用促进病毒与细胞的结合^[19], 还能与 CIK 细胞中核糖体蛋白 S20 (RPS20) 和真核翻译起始因子 3 亚基 b (eIF3b) 相互作用, 从而促进病毒增殖^[20]。III 型 GCRV VP38 蛋白可与宿主的剪切和多聚腺苷酸化特异性因子 (CPSF5)、高迁移率组蛋白核小体结合结构域 2 (HMGN2)、葡萄糖转运体 X (GLUTX) 和蛋白酶体亚基 β 7 (PSMB7) 等发生相互作用^[21], 且 VP38 通过与 PSMB7 互作, 干扰 PSMB7 在蛋白酶体组装中的作用, 扰乱蛋白酶体功能, 防止病毒被宿主降解从而促进病毒增殖^[22]。I 型 GCRV VP7 与 II 型 GCRV VP35 也可与宿主 PSMB7 相互作用^[22]。II 型 GCRV VP35 还可通过自噬途径降解线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondria antiviral signaling protein, MAVS), 从而抑制宿主干扰素的产生^[10]。因此, 关于 VP35 的研究目前多集中在疫苗研制与免疫逃逸方面^[10,12,14], 而与宿主受体互作方面的研究尚未开展。

I 型 GCRV VP7 蛋白可与草鱼 Fibulin-4 蛋白共同作用促进病毒结合宿主细胞^[23], 但 I 型 GCRV 缺乏 II 型 GCRV 所具有的外纤维蛋白 VP56, 故 II 型 GCRV 的 VP35 蛋白是否介导病毒吸附宿主细胞及其具体机制有待进一步研究。本研究结果显示, 过表达 VP35 促进 II 型 GCRV 增殖, 表明 VP35 蛋白在 II 型 GCRV 增殖过程中发挥重要的作用。由于 II 型 GCRV 感染 CIK 细胞不产生细胞病变效应, 无法通过传统的半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 检测方法或空斑实验检测细胞上清液中的病毒滴度, 故本研究创建病毒拷贝数的绝对定量检测方法, 标准曲线的相关系数达 0.997, 其线性关系较好、线性范围较广, 并且标准品性质稳定, 可快速、准确地定量样品中病毒的拷贝数, 为 II 型 GCRV 病毒滴度的检测提供了新的方法。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2020[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [2] 汤亚方. 草鱼呼肠孤病毒 II 型结构蛋白的鉴定及部分结构蛋白的免疫原性分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
Tang Y F. Identification of the structure protein of the grass carp reovirus type II and immunogenicity analysis of partial structure protein[D]. Yangling: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [3] Tang Y F, Zeng W W, Wang Y Y, *et al.* Comparison of the blood parameters and histopathology between grass carp infected with a virulent and avirulent isolates of genotype II grass carp reovirus[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 139: 103859.
- [4] 喻飞, 王浩, 宗乾坤, 等. 草鱼呼肠孤病毒 GCRV VP56 相互作用蛋白的鉴定[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 371-378.
Yu F, Wang H, Zong Q K, *et al.* Screening of potential host proteins interacting with VP56 of type II grass carp reovirus by yeast two-hybrid system[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 371-378 (in Chinese).
- [5] 高彩霞, 曾伟伟, 汤亚方, 等. 两株 II 型草鱼呼肠孤病毒的分离、鉴定及生物学特性比较[J]. *水产学报*, 2020, 44(6): 1013-1024.
Gao C X, Zeng W W, Tang Y F, *et al.* Isolation and identification of two new isolates of genotype II grass carp reovirus and comparison of their biological characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(6): 1013-1024 (in Chinese).
- [6] 肖雪, 颜其贵, 欧洋, 等. 草鱼呼肠孤病毒的研究进展[J]. *水利渔业*, 2006, 26(5): 106-109.
Xiao X, Yan Q G, Ou Y, *et al.* Advances in the research of reovirus from grass carp[J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(5): 106-109 (in Chinese).

- [7] Yu F, Wang L L, Li W J, *et al.* Aquareovirus NS31 protein serves as a specific inducer for host heat shock 70-kDa protein[J]. *Journal of General Virology*, 2020, 101(2): 145-155.
- [8] Attoui H, Fang Q, Jaafar F M, *et al.* Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family Reoviridae)[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(8): 1941-1951.
- [9] Wu M L, Li H Y, Chen X W, *et al.* Studies on the clinical symptoms, virus distribution, and mRNA expression of several antiviral immunity-related genes in grass carp after infection with genotype II grass carp reovirus[J]. *Archives of Virology*, 2020, 165(7): 1599-1609.
- [10] Lu L F, Zhang C, Li Z C, *et al.* Grass carp reovirus VP35 degrades MAVS through the autophagy pathway to inhibit fish interferon production[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 613145.
- [11] Liu J, Pei C, Gao X C, *et al.* Fish reovirus GCRV-109 VP33 protein elicits protective immunity in rare minnows[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(3): 573-582.
- [12] Gao Y, Pei C, Sun X Y, *et al.* Novel subunit vaccine based on grass carp reovirus VP35 protein provides protective immunity against grass carp hemorrhagic disease[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 91-98.
- [13] 宗乾坤. II型草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白的免疫原性及其相互作用宿主蛋白的初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- Zong Q K. Immunogenicity of outer capsid proteins and screening of potential host proteins interacting with these proteins in Type II GCRV[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [14] Mu C Y, Zhong Q W, Meng Y, *et al.* Oral Vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with baculovirus-expressed grass carp reovirus (GCRV) proteins induces protective immunity against GCRV infection[J]. *Vaccines*, 2021, 9(1): 41.
- [15] Su H, Fan C J, Liao Z W, *et al.* Grass carp reovirus major outer capsid protein VP4 interacts with RNA sensor RIG-I to suppress interferon response[J]. *Bio-molecules*, 2020, 10(4): 560.
- [16] Gao Y, Pei C, Sun X Y, *et al.* Plasmid pcDNA3.1-s11 constructed based on the S11 segment of grass carp reovirus as DNA vaccine provides immune protection[J]. *Vaccine*, 2018, 36(25): 3613-3621.
- [17] Fang Q, Seng E K, Ding Q Q, *et al.* Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases[J]. *Archives of Virology*, 2008, 153(4): 675-682.
- [18] 许焯琦, 王龙龙, 徐宁, 等. 草鱼III型呼肠孤病毒外衣壳蛋白VP38的表达分析及多克隆抗体制备[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(3): 176-184.
- Xu Y Q, Wang L L, Xu N, *et al.* Expression analysis and polyclonal antibody preparation of outer shell protein VP38 encoded by genotype III grass carp reovirus[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(3): 176-184 (in Chinese).
- [19] 刘玮莎. 草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白相互作用机制及入侵途径研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Liu W S. Research on the interaction between outer capsid proteins of grass carp reovirus and pathway involved in viral cellular entry[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [20] Yan X Y, Xie J G, Li J, *et al.* Screening and analysis on the protein interaction of the protein VP7 in grass carp reovirus[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 425-433.
- [21] 王龙龙. 草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白与草鱼蛋白酶体亚基 $\beta 7$ (PSMB7)相互作用的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Wang L L. Characterization of the interaction between grass carp reovirus outer-capsid proteins and proteasome subunit β type 7 (PSMB7) of grass carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [22] 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.
- [23] Yu F, Wang H, Liu W S, *et al.* Grass carp *Ctenopharyngodon idella* Fibulin-4 as a potential interacting partner for grass carp reovirus outer capsid proteins[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 169-174.

Effect of VP35 protein on the proliferation of type II grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus

JIANG Lin, TU Jiagang, ZHANG Yongan*

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

Abstract: In recent years, the frequent outbreaks of viral hemorrhagic diseases have seriously affected the development of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) aquaculture, but its pathogenesis is still unclear. The viral hemorrhagic disease of *C. idella* is caused by grass carp reovirus (GCRV). Type II GCRV, as the main epidemic strain at present, is highly pathogenic to *C. idella* and has a high lethality rate. The VP35 protein encoded by the fragment S11 of type II GCRV is the outer capsid protein. VP35 protein may play an important role in binding to receptors to promote virus entry into host cells, and may also promote virus replication by interacting with intracellular proteins. In order to explore the role of VP35 protein in virus replication, the S11 gene was amplified and inserted into the vector pCMV-3×flag to construct the S11 plasmid, which was transfected into *C. idella* kidney (CIK) cells, and then infected with type II GCRV. After infection, the supernatant and cells were collected. First, real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect S6 mRNA in cell samples. The results showed that overexpression of VP35 promoted the replication of type II GCRV at the level of viral mRNA by about two-fold. Then the S6 gene was amplified and inserted into the vector pET-32a (+) to construct a recombinant plasmid, and the recombinant protein His-VP4 were purified and polyclonal antibodies was prepared to determine the effects of VP35 on type II GCRV at viral protein level. The results showed that overexpression of VP35 promoted the replication of type II GCRV at the level of viral protein. Finally, the pET-32a-S6 plasmid was used as a positive standard plasmid to establish an absolute quantitative detection method for the gene copy number of type II GCRV. The pET32a-S6 plasmid was diluted 10-fold, and then used as a template, qPCR was used to detect the expression of the S6 gene, and a standard curve was drawn. The quantitative method was used to determine the effects of VP35 on type II GCRV particles in supernatants. The results showed that overexpression of VP35 increased the copy number of type II GCRV. This study proved from three dimensions that overexpression of VP35 protein promoted type II GCRV replication, which is helpful for in-depth analysis of the function of VP35 protein, and laid a foundation for the subsequent exploration of the mechanism of VP35 protein in promoting virus proliferation, provided a protein-level detection method for further study of type II GCRV virus, and a new technical means for rapid and accurate quantification of virus titer.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; grass carp reovirus type II; VP35 protein; VP4 protein; polyclonal antibody; proliferation

Corresponding author: ZHANG Yongan. E-mail: yonganzhang@mail.hzau.edu.cn

Funding project: National Natural Science Foundation of China (31930114, 31725026)