

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19168

鲤 Rhbdd3 蛋白的抗病毒功能

邵玲, 汤茜, 张海强

上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433

摘要: Rhbdd3 (Rhomboïd domain-containing protein 3) 蛋白在哺乳动物天然免疫中发挥了重要作用, 但水生动物中 *rhbdd3* 基因的确定序列及 Rhbdd3 蛋白的功能均尚未见报道。为研究鲤(*Cyprinus carpio*)的 Rhbdd3 蛋白在鱼类细胞中的功能, 探讨其过表达对鱼类病毒感染的影响, 本研究通过 PCR 扩增得到了鲤 *rhbdd3* 基因的编码序列, 并将其克隆至 pCI-neo 载体上, 构建了真核表达质粒 pCI-*rhbdd3*。pCI-*rhbdd3* 转染鲤上皮瘤细胞 EPC (epithelioma papulosum cyprinid) 和鲑囊胚细胞 CHSE-214 (chinook salmon embryo) 后利用制备的特异性抗体进行 Western blot, 检测 Rhbdd3 蛋白的表达情况, 并利用 CCK-8 试剂检测其过表达对细胞增殖的影响。转染后分别进行鲤春病毒血症病毒(SVCV)和传染性胰腺坏死病毒(IPNV)的感染实验, 并利用间接免疫荧光、Western blot 和 RT-qPCR 方法检测 Rhbdd3 过表达对 SVCV 和 IPNV 增殖的影响。结果显示, pCI-*rhbdd3* 转染后 Rhbdd3 蛋白在 EPC 和 CHSE-214 细胞中得到了过表达, 且 Rhbdd3 蛋白的过表达能显著抑制 SVCV 和 IPNV 的复制, 但不影响两种细胞的正常活性。本研究为鱼类广谱抗病毒药物的开发提供了新的实验依据, 也为鱼类抗病毒新品种的培育奠定了重要基础。

关键词: 鲤; Rhbdd3 蛋白; 鲤春病毒血症病毒; 传染性胰腺坏死病毒; 抗病毒

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)02-0137-10

伴随着中国水产养殖业的不断发展, 水生动物病毒性疾病的发病率近年来呈现明显的上升趋势^[1]。水生动物病毒性疾病流行区域广, 传染性强, 已成为危害水生动物最为普遍和严重的病害。此外, 水生动物病毒病发病快, 死亡率高, 大多没有有效的疫苗或针对性的药物, 一旦发病很难治愈, 导致巨大的经济损失, 严重制约着中国水产养殖业的健康和可持续发展^[2]。因此, 开发广谱抗病毒药物和培育鱼类抗病毒新品种具有十分重要的实用价值。

天然免疫是机体抵抗病毒侵袭的第一道防线, 最新研究发现, Rhomboid 家族成员 Rhbdd3 (Rhomboïd domain-containing protein 3) 在哺乳动物天然免疫中发挥了重要作用。Rhomboid 家族最先于果蝇中发现, 具有跨膜结构和蛋白酶活性^[3]。基于序列的相似性, 目前共发现 14 种蛋白归于

Rhomboid 家族, 其中 5 种具有蛋白酶活性, 9 种则失去了蛋白酶活性^[4]。研究发现, 在小鼠中 Rhbdd3 主要分布于细胞内, 不具有蛋白酶活性。Poly (I:C) 处理会诱导小鼠 NK 细胞 Rhbdd3 的上调, Rhbdd3 进而又可以调节 NK 细胞和树突状细胞的活性^[5]。然而, 目前公共数据库中尚无鱼类 *rhbdd3* 基因的确定序列, 鱼类 Rhbdd3 蛋白的功能也尚未见报道。

鲤春病毒血症病毒(spring viraemia of carp virus, SVCV)为引起鲤科鱼类急性、暴发性出血病——鲤春病毒血症(spring viraemia of carp, SVC)的病原, 其隶属于弹状病毒科(Rhabdoviridae) *Sprivirus* 病毒属, 基因组为单股负链 RNA。SVC 常于春季水温 10~17 °C 时流行, 并伴有高度传染性, 感染鱼死亡率达 90%, 严重危害渔业生产^[6]。鲤、锦鲤(*Cyprinus carpio* Kio)、草鱼(*Ctenopharyngodon*

收稿日期: 2019-06-02; 修订日期: 2019-07-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31602196); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2014]第 7-3-5 号); 上海市农委青年人才项目(SYXF011719).

作者简介: 邵玲(1986-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事水生动物 RNA 病毒研究. E-mail: lingshao405@163.com

idellus)、鲫(*Carassius auratus*)及其变种、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)等多种鲤科鱼类均能被感染。此外,非鲤科鱼类如太阳鱼(*Lepomis gibbosus*)、狗鱼(*Esox lucius*)、鱼虱(*Argulus foliaceus*)、水蛭(*Piscicola geometra*)、蝾螈(*Cynops orientalis*)甚至虾等也都能被感染^[7-9]。病鱼往往失去平衡而侧游,体色发黑,眼球突出,肛门红肿,呼吸缓慢,常聚集于出水口处。2002 年 4 月,美国北卡罗来纳州和威斯康星州分别暴发了 SVC 疫情,导致养殖锦鲤和野生鲤大量死亡^[10]。在中国,自 1998 年英国从中国进口的观赏鱼中检测出 SVCV 以后,多个省市均有 SVCV 的检出^[11-13]。因其高致病性, SVC 被世界动物卫生组织 OIE 列为必须申报的疫病,并于 2008 年被农业部列为“中华人民共和国进境动物一类传染病”,也是迄今唯一一个被列为一类疫病的鱼类传染病。然而,目前针对 SVC 尚无有效的预防控制措施和特异性的治疗药物,国际上通行的措施是进行 SVCV 的监测,及早发现并进行隔离和扑杀。

传染性胰腺坏死病毒(infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)为鲑科(*Salmonidae*)鱼类高度传染性疾病——传染性胰腺坏死病(infectious pancreatic necrosis, IPN)的病原。IPNV 隶属于双 RNA 病毒科(*Birnaviridae*),基因组分为 A、B 两个节段,是水生双节段 RNA 病毒属(*Aquabirnavirus*)的代表病毒^[14]。IPNV 往往呈急性流行,感染幼鱼死亡率超过 90%。病鱼体色发黑,腹部膨大,皮肤和鳍条出血,组织切片可见胰腺组织坏死^[15]。IPN 常在水温 10~15 °C 时流行,发病后幸存鱼成为 IPNV 携带者,并可以通过尿液、粪便、鱼卵、精液等持续传播病毒^[16]。IPN 最早在美国北部发现,随后在欧洲、日本等多个国家和地区流行,并于 20 世纪 80 年代传入中国^[17],其暴发主要集中在东北地区虹鳟(*Oncorhynchus mikiss*)以及大西洋鲑(*Salmo salar*)的养殖场,且近些年来呈逐步蔓延扩散之势^[18],对中国水产养殖业造成了巨大的经济损失^[19]。

鱼类天然免疫系统主要包括物理屏障、体液免疫因子、天然免疫细胞等,其中巨噬细胞、中

性粒细胞、细胞毒性细胞等在鱼类天然免疫中起到关键作用。与哺乳动物相比,鱼类天然免疫具有自己独特的特点,但也呈现了一定的保守性,例如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等细胞因子, C1q/MBL、C1r/C1s/MASP 等家族补体, Toll 样受体, 瘦素等都与哺乳动物中相应分子的功能及激活的信号通路基本一致^[20]。研究表明,增强鱼类的天然免疫能够提高鱼类对病原侵袭的抵抗。例如, Yazawa 等^[21]发现转溶菌酶基因的斑马鱼能够抵抗细菌感染; Dalmo^[22]报道提高仔鱼的天然免疫可以提高其成活率,进而增加鱼获产量; Robertsen^[23]也报道增强大麻哈鱼天然免疫可以提高其对传染性造血器官坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)等病毒的抵抗性。

为探索 Rhbdd3 蛋白在水生动物细胞中的功能,研究其对鱼类病毒感染的影响,本研究构建了 Rhbdd3 真核表达载体并转染鲤上皮瘤细胞 EPC (epithelioma papulosum cyprinid)和鲑囊胚细胞 CHSE-214 (chinook salmon embryo),检测其过表达对 SVCV 及 IPNV 增殖的影响。结果显示, Rhbdd3 能显著抑制两者的增殖,同时不影响宿主细胞的正常活性,具有广谱的抗病毒特性。本研究为鱼类病毒感染的治疗提供了新的药物靶点,为鱼类抗病毒新品种的培育提供了重要的实验依据,也为解析 Rhbdd3 新的功能提供了科学理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199、DMEM、Opti-MEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素溶液购自 GIBCO 公司; RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒购自 Thermo 公司; LA Taq 酶、DNA 分子量 marker、pMD18-T 载体、*Nhe* I、*Eco* R I 和 *Bam* H I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DH5 α 及 BL21 (DE3) pLysS 大肠杆菌感受态细胞、SYBR Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; pCI-neo 质粒购自 Promega 公司; pRSET-A 质粒、ProBond Purification System His 标签蛋白纯化试剂盒、PCR 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、

脂质体 Lipofectamine 2000、预染蛋白分子量 marker、RIPA 裂解液、Alexa Fluor488 及 Alexa Fluor594 标记的羊抗兔 IgG 购自 Invitrogen 公司; 细胞核染液 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 购自 Roche 公司; HSP90 蛋白内参抗体购自 CST 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(H+L)购自 Jackson ImmunoResearch 公司; 细胞增殖/毒性检测试剂 CCK-8 购自 Dojindo 公司; ECL 化学发光检测试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 细胞和病毒

鲤上皮瘤细胞系 EPC 和鲑囊胚细胞系 CHSE-214 购自中国检验检疫科学研究院。EPC 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 M199 培养基于 25 ℃培养; CHSE-214 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 20 ℃培养。SVCV SH150514 株由本实验分离和保存^[24], IPNV Hecht (He)株购于 ATCC (VR-1320), 病毒滴度采用 50% 组织培养感染剂量法(TCID₅₀)测定, 并采用 Reed-Müench 法进行计算^[25]。

1.3 鲤 rhbdd3 基因 cDNA 的扩增

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 EPC 细胞 RNA, 并按以下体系进行 cDNA 的合成: 1 μg 总 RNA, 1 μL 随机六聚体引物, 补充无 RNA 酶水至

总体积 12 μL; 于 65 ℃反应 5 min, 立即置于冰上, 然后加入 4 μL 5×Reaction Buffer、1 μL Ri-boLock RNase Inhibitor、2 μL 10 mmol/L dNTP Mix 和 1 μL RevertAid M-MuLV RT, 25 ℃反应 5 min, 之后 42 ℃保温 2 h 获得 cDNA。

利用 Primer Express 5.0 和 BioEdit 7.0 软件, 根据 GenBank 数据库中鲤、鲫、斑马鱼(*Danio rerio*)、金线鲃(*Sinocyclocheilus anshuiensis*)等预测的 *rhbdd3* 基因序列保守区设计引物 pMD18-*rhbdd3*-F/R(表 1), PCR 扩增鲤 *rhbdd3* 基因 cDNA。反应体系如下: ddH₂O 30.5 μL、10×LA Buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μL、dNTP Mixture 8 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、LA Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL 和 cDNA 模板 2 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 30 s, 52 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min; 4 ℃保温。扩增片段经 1%琼脂糖凝胶电泳, 切胶纯化回收后连接至 pMD18-T 载体上。连接产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 菌液 PCR 筛选阳性克隆并送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向序列测定。

1.4 pCI-rhbdd3 真核表达载体的构建

设计 *rhbdd3* 基因 ORF 区的正向引物和反向引物 pCI-*rhbdd3*-F/R(表 1), 并分别引入 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切位点, 以 EPC 细胞 cDNA 为模板进行

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Details of the primers used in this study

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	酶切位点 restriction site
pMD18- <i>rhbdd3</i> -F	ACCTCAATATGACAGCGTCGTAAAC	
pMD18- <i>rhbdd3</i> -R	TATCCCTGAGCTATGACGCTGA	
pCI- <i>rhbdd3</i> -F	TTAGCTAGCCACCATGCTCGATCATCTTTTTCAGCAT	<i>Nhe</i> I
pCI- <i>rhbdd3</i> -R	CGGAATTCCTATGACGCTGATGGCTTCTTCC	<i>Eco</i> R I
pRSET- <i>rhbdd3</i> -F	ATTGGATCCATGCTCGATCATCTTTTTCAGCAT	<i>Bam</i> H I
pRSET- <i>rhbdd3</i> -R	TTGGAATTCCTATGACGCTGATGGCTTCTT	<i>Eco</i> R I
Q- <i>rhbdd3</i> -F	CATCCATACCTGCCAGTTTACCAC	
Q- <i>rhbdd3</i> -R	CAAAGGCTCCTGATGCCACTC	
Q-actin-F	TATCCACGAGACCACCTACA	
Q-actin-R	ATCCAGACGGAGTATTTACG	
Q-SVCV-F1	ATCAGGCCGATTATCCTTCCA	
Q-SVCV-R1	AGATAAGCATTACATGCTGTAT	
Q-IPNV-F1	CGACCGACATGAACAAAATCA	
Q-IPNV-R1	AGTTGCAGCTGTATTCGCACA	

PCR 扩增, 扩增片段切胶回收。分别将回收的片段和 pCI-neo 载体用 *Nhe* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶 37 °C 双酶切 3 h, 酶切片段纯化回收, 在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接过夜。转化后利用菌液 PCR 和双酶切鉴定筛选阳性克隆, 并进行双向序列测定验证。

1.5 Rhbdd3 蛋白多克隆抗体的制备

设计引物 pRSET-rhbdd3-F/R(表 1), 扩增 *rhbdd3* 基因 ORF 区全长并将其克隆至 pRSET-A 载体, 转化后挑单克隆进行 PCR 筛选和测序鉴定。提取质粒转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定。阳性克隆于 37 °C 用 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 收取诱导后 5 h 的菌体进行超声破碎, 破碎产物离心后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 并用 ProBond Purification System 蛋白纯化试剂盒进行纯化。纯化后的蛋白 4 次免疫新西兰白兔获得特异性的抗血清(上海友科生物科技有限公司), 抗血清进一步通过 Protein A 柱纯化, 并利用 ELISA 方法测定其效价。

1.6 细胞转染

转染前 1 天铺细胞于 24 孔细胞培养板中, 第 2 天待细胞密度达到 70%~80% 时转染。转染时先将 0.8 µg 质粒溶于 50 µL Opti-MEM 培养基中; 再将 2 µL Lipofectamine 2000 溶于 50 µL Opti-MEM 培养基中, 混匀, 室温放置 5 min; 然后将两者混合, 室温放置 20 min; 期间将细胞用 Opti-MEM 洗两次, 将混合物加入对应孔中, 轻轻混匀, 培养 6 h 后换成含 10% FBS 的完全培养基。转染后 24 h, 收获细胞并利用荧光定量 PCR (RT-qPCR, 引物见表 1) 和 western blot 检测 *rhbdd3* 基因的表达水平。此外, 转染后 24 h 用无血清 M199 或 DMEM 培养基洗细胞两次并分别以 MOI=1 接种 SVCV 或以 MOI=0.5 接种 IPNV。20 °C 孵育 1 h 后, 吸去上清, 换成含 2% FBS 的相应培养基。

1.7 细胞活性检测

利用细胞增殖/毒性 CCK-8 检测试剂检测 Rhbdd3 过表达对细胞活性的影响, 转染前一天, 铺细胞于 96 孔细胞培养板中, 第 2 天待细胞密度达到 70%~90% 时按前述方法转染重组表达质粒 pCI-rhbdd3 和空载体 pCI-neo, 分别于转染后 12 h、

36 h 和 72 h 向每孔中加入 10 µL 的 CCK-8 试剂, 孵育 1 h 后利用 BioTek Synergy2 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 每组 3 个复孔, 重复 3 次。

1.8 免疫印迹分析(western blot)

细胞用 PBS 洗两次, 每次 3 min, 加入 RIPA 裂解液, 冰上孵育 10 min, 4 °C、12000 g 离心 5 min, 取上清加入 5×蛋白上样缓冲液混匀, 95 °C 加热 5 min, 进行 SDS-PAGE 和转膜。PVDF 膜用 5% PBST-牛血清白蛋白(BSA) 37 °C 封闭 2 h; 倒掉封闭液, 加入 1:800 稀释的一抗, 37 °C 孵育 2 h; PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 然后加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG(H+L)二抗, 37 °C 孵育 1 h; 倒掉二抗, PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 最后进行 ECL 化学发光。

1.9 间接免疫荧光(immunofluorescence microscopy, IF)

PBS 洗细胞两次, 24 孔细胞板中每孔加入 300 µL 4%的多聚甲醛, 室温固定 30 min; 吸去固定液, PBS 洗 3 次, 每孔加入 300 µL 含 0.2% Triton X-100 的 PBS 通透 15 min; 吸去通透液, PBS 洗 3 次, 加入 4% BSA 封闭液, 37 °C 封闭 2 h; 吸去封闭液, 加入以体积比 1:800 稀释的一抗(本实验室制备的兔抗 SVCV M 蛋白^[26]或兔抗 IPNV VP2 蛋白抗体。VP2 蛋白抗体的制备步骤与 1.5 中所述相同, 抗体特异性经过了 western blot 和 IF 的验证, 结果如图 1 所示), 37 °C 孵育 2 h; 吸去一抗, PBS 洗 3 次, 加入以体积比 1:2000 稀释的荧光二抗, 37 °C 孵育 1 h; 吸去二抗, PBS 洗 3 次, 加入 1:2000 稀释的 DAPI, 室温染色 10 min, PBS 洗 3 次后每孔加入 500 µL PBS, 置于 Olympus-IX73 荧光倒置显微镜下观察并用 cellSens Standard v2.0.6 软件拍照。

1.10 RT-qPCR

转染后 24 h, 分别收取 pCI-rhbdd3 转染实验组和 pCI-neo 转染对照组的 EPC 和 CHSE-214 细胞; 感染后 12 h、24 h、36 h, 收取实验组和对照组 SVCV 感染的 EPC 细胞; 感染后 18 h 收取实验组和对照组 IPNV 感染的 CHSE-214 细胞; 用 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 采用反转录试剂盒进行 cDNA 合成, 并利用 SYBR Green RT-qPCR

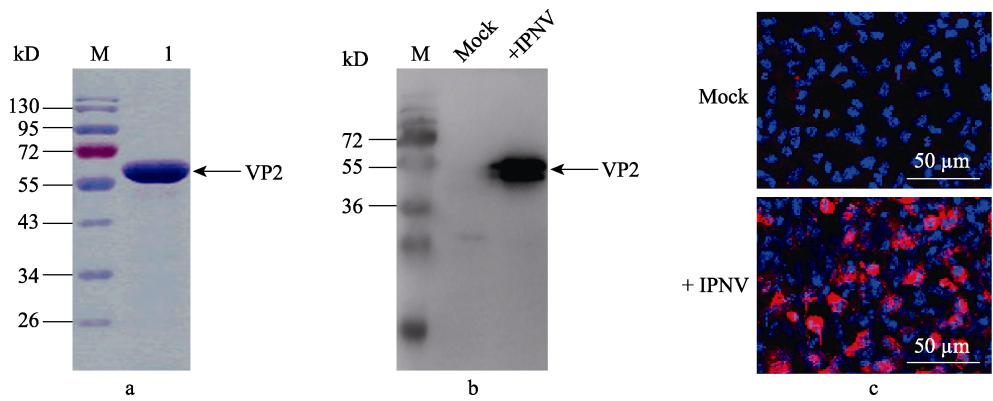


图 1 IPNV VP2 蛋白抗体的特异性验证

a. VP2 蛋白原核表达、纯化后的 SDS-PAGE 电泳鉴定; M: 预染蛋白 marker; 1: 原核表达、纯化后的 VP2 蛋白. b. VP2 蛋白抗体的 western blot 鉴定; M: 预染蛋白 marker; Mock: 正常 CHSE-214 细胞裂解液; +IPNV: IPNV 感染的 CHSE-214 细胞裂解液. c. VP2 蛋白抗体的免疫荧光鉴定; Mock: 正常 CHSE-214 细胞; +IPNV: IPNV 感染的 CHSE-214 细胞; 蓝色为细胞核, 红色为被感染细胞.

Fig. 1 Identification of the specificity of the polyclonal antibody against IPNV VP2 protein

a. SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expressed VP2; M: pre-stained standard protein marker; 1: purified VP2 protein. b. Western blot analysis of the specificity of the VP2 polyclonal antibody; M: pre-stained standard protein marker; Mock: CHSE-214 cell lysate; +IPNV: IPNV infected CHSE-214 cell lysate. c. IF analysis of the specificity of the VP2 polyclonal antibody; Mock: CHSE-214 cells; +IPNV: IPNV infected CHSE-214 cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Infected cells were stained to red.

方法进行 *rhbdd3* 基因 mRNA 相对表达水平和病毒拷贝数的绝对定量测定(引物见表 1)^[24]。反应体系如下: 10 μ L 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq, 浓度 10 μ mol/L 正向引物、反向引物各 0.4 μ L, 0.4 μ L ROX reference dye II 和待测样品 cDNA 2 μ L, 补充双蒸水至 20 μ L。置于 7500Fast 荧光定量 PCR 仪中进行反应, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s, 之后 95 $^{\circ}$ C 3 s、60 $^{\circ}$ C 30 s 40 个循环; 结束后, 立即进行熔解曲线分析, 并计算扩增产物的 T_m 值; 分别将对照组的 SVCV 感染 EPC 细胞后 12 h N 基因拷贝数、IPNV 感染 CHSE-214 细胞后 18 h VP3 基因拷贝数设为 1 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 鲤 *rhbdd3* 基因 cDNA 的克隆结果

目前, 公共数据库中仅有部分鱼类的 *rhbdd3* 基因预测序列, 尚无其确定基因序列。本研究利用生物信息学软件, 根据 GenBank 数据库中鲤、鲫、斑马鱼、金线鲃等物种预测的 *rhbdd3* 基因序列保守区设计了 *rhbdd3* 基因特异性引物。RT-PCR 扩增后, 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示扩增出了约 1200 bp 的特异性片段(图 2)。将目的条带回收纯化并克隆至 pMD18-T 载体, 菌液 PCR 筛选阳性克隆, 双向测序后于 GenBank 数据库中进行 blast 搜寻, 结果显示该片段确属鲤 *rhbdd3* 基因。

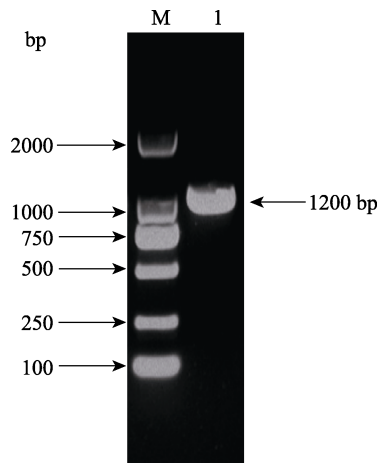


图 2 鲤 *rhbdd3* 基因片段的 PCR 扩增结果

M: DL2000 DNA marker; 1: *rhbdd3* 基因片段.

Fig. 2 PCR amplification of the *rhbdd3* gene fragment

M: DL2000 DNA marker; 1: the *rhbdd3* gene fragment.

2.2 真核表达载体 pCI-*rhbdd3* 的构建

将 *rhbdd3* 基因 ORF(open reading frame)区克隆至 pCI-neo 真核表达载体中, 构建了 pCI-*rhbdd3* 重组质粒。重组质粒进行 *Nhe* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶双酶切鉴定, 结果如图 3 所示, 凝胶电泳后获得了大小分别约 5460 bp 和 1050 bp 的两个特异性条带, 与目标片段大小一致。进一步将重组质粒进行双向测序验证, 结果表明所构建的重组质粒阅读框正确无误。

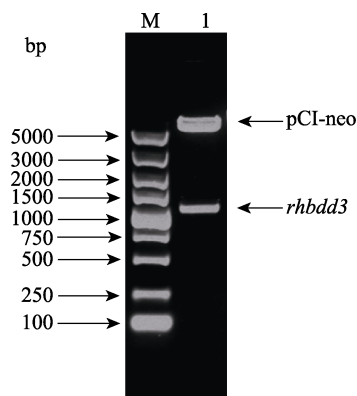


图 3 重组质粒 pCI-rhbdd3 的双酶切鉴定

M: DL5000 DNA marker; 1: pCI-rhbdd3 的 *Nhe* I 和 *Eco* R I 双酶切产物。

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pCI-rhbdd3 by *Nhe* I and *Eco* R I double digestion
M: DL5000 DNA marker; 1: fragments of pCI-rhbdd3 digested by *Nhe* I and *Eco* R I.

2.3 Rhbdd3 蛋白过表达的 western blot 鉴定

因目前尚无针对鱼类 Rhbdd3 蛋白的商业化

抗体, 本研究首先将 *rhbdd3* 基因克隆至原核表达载体 pRSET-A 上, 构建了原核表达质粒 pRSET-*rhbdd3*, 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达, 将纯化后的重组 Rhbdd3 蛋白免疫新西兰白兔, 最终获得了针对鲤 Rhbdd3 蛋白的多克隆抗体。抗体的特异性利用 western blot 进行验证, 结果如图 4a 所示, 在约 40 kD 处出现特异性条带, 而 *rhbdd3* 基因编码蛋白预测分子量为 39 kD, 与预期大小一致, 说明制备的抗体能特异性识别 Rhbdd3 蛋白。此外, pCI-rhbdd3 质粒转染 CHSE-214 和 EPC 细胞后 24 h, 利用上述抗体进行 western blot 检测。结果显示, 两种细胞中存在较低水平的 Rhbdd3 本底表达, 而重组质粒 pCI-rhbdd3 转染后 Rhbdd3 的表达水平显著升高, 说明重组质粒能够在真核细胞中获得正确表达(图 4)。

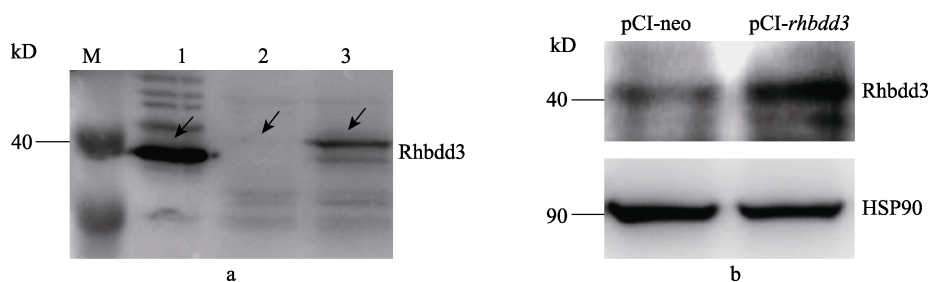


图 4 Rhbdd3 蛋白多克隆抗体的 western blot 验证

a. Rhbdd3 蛋白多克隆抗体特异性验证; M: 预染蛋白 marker; 1: pRSET-*rhbdd3* BL21(DE3)pLysS 诱导表达菌体沉淀; 2: CHSE-214 细胞裂解液; 3: pCI-rhbdd3 转染 CHSE-214 细胞裂解液。b. 转染 EPC 细胞中 Rhbdd3 蛋白的 western blot 检测。

Fig. 4 Western blot identification of the specificity of the polyclonal antibody against Rhbdd3
a. Identification of the polyclonal antibody against Rhbdd3; M: pre-stained standard protein marker; 1: Pellet of the pRSET-*rhbdd3* BL21(DE3)pLysS induced by IPTG for 5 h; 2: CHSE-214 cell lysate; 3: pCI-rhbdd3 transfected CHSE-214 cell lysate. b. Verification of the overexpression of Rhbdd3 protein in transfected EPC cells.

2.4 Rhbdd3 过表达对细胞活性的影响

研究表明, Rhbdd3 蛋白可以调控垂体瘤细胞程序化死亡^[27]。为研究 Rhbdd3 过表达对细胞活性的影响, 首先以 β -actin 基因为内参, 利用 RT-qPCR 方法对 pCI-rhbdd3 转染效率进行了测定。结果显示, 转染后 24 h, EPC 细胞中 *rhbdd3* mRNA 相对表达水平提高了 504 倍, 而 CHSE-214 细胞中提高了 110 倍。进一步, 利用 CCK-8 试剂测定了 pCI-rhbdd3 转染对 EPC 和 CHSE-214 细胞活性的影响。结果如图 5 所示, 与对照组相比, 转

染后 12 h、36 h 和 72 h Rhbdd3 的过表达对 EPC 和 CHSE-214 细胞的活性均无显著影响。

2.5 Rhbdd3 过表达抑制 SVCV 的增殖

为了研究 Rhbdd3 对鱼类病毒感染的影响, 本研究首先检测了 Rhbdd3 过表达对鲤科鱼类重要病原 SVCV 复制的影响。利用本实验室制备的针对 SVCV M 蛋白的抗体^[26]对 pCI-neo 和 pCI-rhbdd3 转染后 SVCV 感染 EPC 细胞进行了免疫荧光分析。结果显示, Rhbdd3 过表达后被感染细胞(绿色)数量与对照组相比显著减少(图 6a, 6b)。进

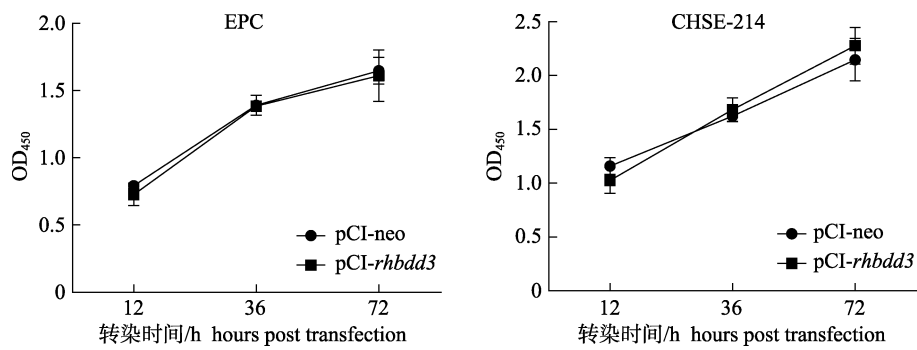


图 5 Rhbdd3 过表达对 EPC 和 CHSE-214 细胞活性影响的测定
Fig. 5 Effect of the overexpression of Rhbdd3 on the viability of EPC and CHSE-214 cells

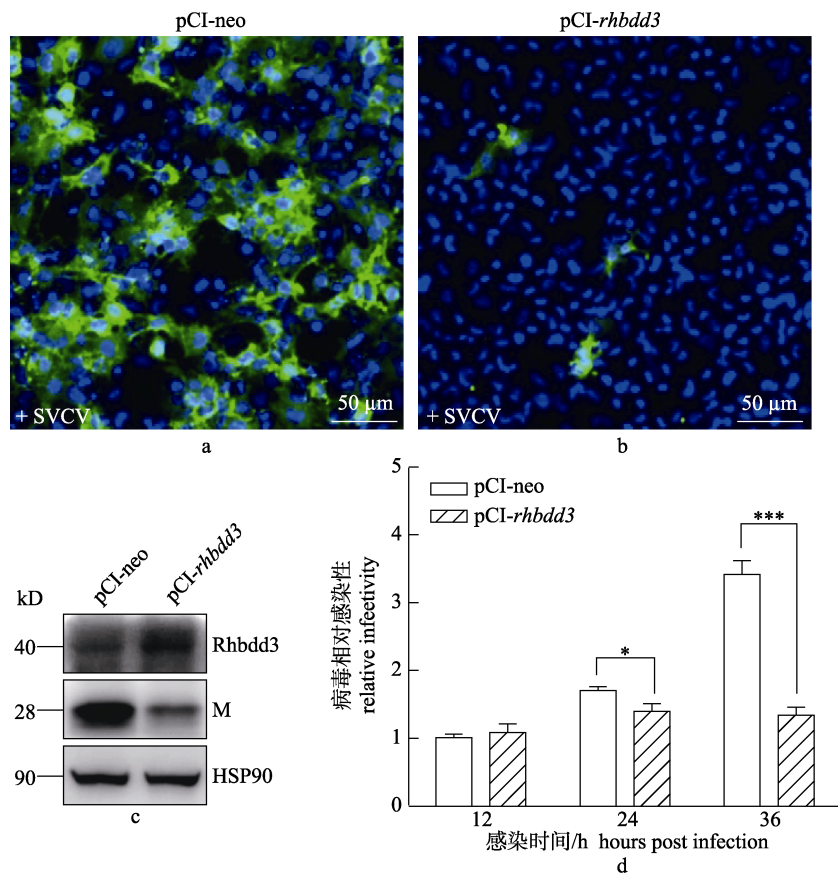


图 6 Rhbdd3 过表达抑制 SVCV 的增殖

a. pCI-neo 转染后 SVCV 感染 EPC 细胞的免疫荧光检测; b. pCI-rhbdd3 转染后 SVCV 感染 EPC 细胞的免疫荧光检测;
c. pCI-neo 或 pCI-rhbdd3 转染后 SVCV 感染 EPC 细胞的 western blot 检测; d. pCI-neo 或 pCI-rhbdd3 转染后 SVCV 感染 EPC 细胞 N 基因的 RT-qPCR 检测. *表示两者在 0.05 水平上差异显著, ***表示在 0.001 水平上差异显著.

Fig. 6 Rhbdd3 overexpression inhibited SVCV infection

a. IF detection of SVCV infected EPC cells post pCI-neo transfection; b. IF detection of SVCV infected EPC cells post pCI-rhbdd3 transfection; c. Western blot analysis of SVCV infected EPC cells post pCI-neo or pCI-rhbdd3 transfection; d. RT-qPCR quantification of the N gene copies in SVCV infected EPC cells post pCI-neo or pCI-rhbdd3 transfection.
*indicates significant difference at 0.05 level, ***indicates significant difference at 0.001 level.

一步对转染后感染的细胞进行了 western blot 检测, 结果发现 pCI-rhbdd3 转染细胞中 Rhbdd3 表达水平升高, 而 M 蛋白的表达水平明显降低(图 6c), 与免疫荧光结果一致。此外, RT-qPCR 检测同样发现, 与对照组相比, Rhbdd3 过表达后 SVCV 的感染得到抑制, 其中在感染后 36 h

SVCV N 基因拷贝数下降了约 70%(图 6d)。以上结果表明, Rhbdd3 的过表达显著抑制了 SVCV 的增殖。

2.6 Rhbdd3 过表达抑制 IPNV 的增殖

为进一步研究 Rhbdd3 在鱼类病毒感染中的作用, 本研究还探索了 Rhbdd3 蛋白过表达对与 SVCV 进化关系较远的另外一种鱼类病毒——IPNV 复制的影响。间接免疫荧光和 western blot 检测结果显示, 与对照组相比, Rhbdd3 过表达后 IPNV 感染的 CHSE-214 细胞数量显著减少(红色)(图 7a, 7b), VP2 蛋白的表达水平也明显降低(图 7c)。此外, RT-qPCR 检测发现 Rhbdd3 蛋白过表达细胞 IPNV 感染后 VP3 基因拷贝数也显著降低, 在感染后 18 h,

其仅为对照组的 3.17%(图 7d)。以上结果均表明, Rhbdd3 的过表达同样可以抑制 IPNV 的增殖。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代首次被分离报道以来^[28], SVCV 流行范围不断扩大, 目前其在全世界多个国家和中国多个省市都有检出^[29], 也曾造成过巨大的经济损失。此外, IPNV 传染性强、致死率高, 能引起鲑科鱼类在短时间内大批死亡, 严重威胁中国鲑、鳟的健康养殖和进出口贸易^[30]。目前, 中国 SVCV 和 IPNV 的防治策略主要是采取病原监测来进行预防, 尚无有效的治疗措施。因此, 针对危害较大的鱼类传染性病原 SVCV 和 IPNV, 加强病毒与宿主相互作用及宿主抗病毒机制的研究, 开发具有广谱抗病毒作用且不影响细胞正常活性的抗病毒蛋白, 具有极为重要的实践价值。本研究表明 Rhbdd3 的过表达能够显著抑制 SVCV 和 IPNV 的感染, 同时不影响宿主细胞的正常活性, 研究结果提示, Rhbdd3 可以作为鱼类抗病毒药物开发的优异分子靶标。此外, 我们还克隆了鲑 *rhbdd3* 基因, 并对其进行了序列测定, 结果发现, 鲤和鲑 *rhbdd3* 基因 ORF 区序列十分保守, 编码氨基酸相似性达 100%(结果未展示), 提示 Rhbdd3 功能具有高度保守性, 也表明其将来可以在多种鱼类中被广泛应用。

目前, Rhbdd3 蛋白功能及调控通路的相关研究比较匮乏, 仅在人类和小鼠中有少量文献报道, 已有研究表明, 哺乳动物中 Rhbdd3 蛋白通过调控 NK 细胞和树突状细胞在天然免疫中发挥了关键作用^[5]。利用基因敲除小鼠, 研究发现 Rhbdd3 可以通过影响泛素化途径中 NEMO 蛋白来影响 NF- κ B 信号通路的激活, 并可与 DAPI2 蛋白互作, 从而抑制树突状细胞和 NK 细胞的成熟, 并负向调节 TLR3 触发的免疫细胞活化, 从而维持体内 Treg、Th1 和 Th17 的平衡^[5]。此外, 研究发现 Rhbdd3 在类风湿性关节炎患者关节滑液的巨噬细胞和结肠炎患者结肠黏膜组织中显著下调^[31]。然而, Rhbdd3 蛋白的其他作用机制尤其是其在鱼类细胞中的抗病毒作用机制仍有待阐明。此外, Bahar 等报道称 Rhbdd3 的过表达并不影响垂体瘤

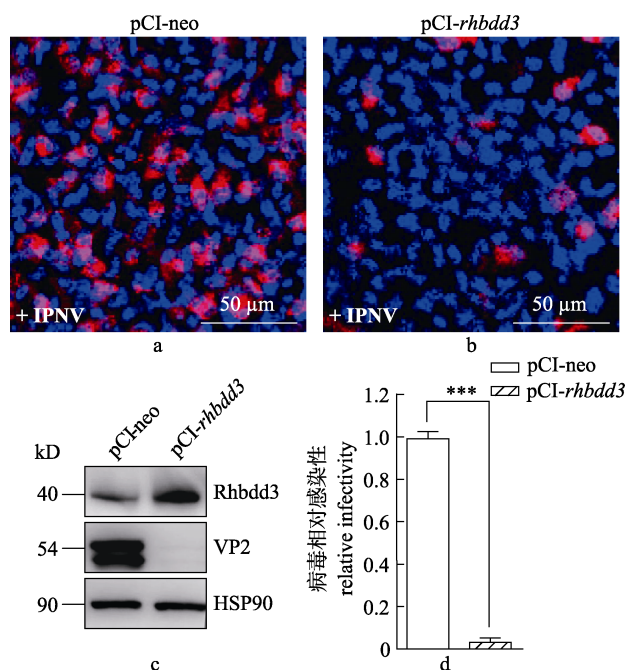


图 7 Rhbdd3 过表达抑制 IPNV 的增殖

a. pCI-neo 转染后 IPNV 感染 CHSE-214 细胞的免疫荧光检测; b. pCI-rhbdd3 转染后 IPNV 感染 CHSE-214 细胞的免疫荧光检测; c. pCI-neo 或 pCI-rhbdd3 转染后 IPNV 感染 CHSE-214 细胞的 western blot 检测; d. pCI-neo 和 pCI-rhbdd3 转染后 IPNV 感染 CHSE-214 细胞 VP3 基因的 RT-qPCR 检测. ***表示在 0.001 水平上差异显著。

Fig. 7 Rhbdd3 overexpression inhibited IPNV infection a. IF detection of IPNV infected CHSE-214 cells post pCI-neo transfection; b. IF detection of IPNV infected CHSE-214 cells post pCI-rhbdd3 transfection; c. Western blot analysis of IPNV infected CHSE-214 cells post pCI-neo or pCI-rhbdd3 transfection; d. RT-qPCR quantification of the VP3 gene copies in IPNV infected CHSE-214 cells post pCI-neo or pCI-rhbdd3 transfection. ***indicates significant difference at 0.001 level.

AtT20 细胞的增殖, 但 Rhbdd3 过表达后细胞对相应药物的刺激更为敏感^[27]。本研究也表明 Rhbdd3 的过表达不影响 EPC 和 CHSE-214 细胞的增殖, 但其是否会影响鱼类细胞对药物刺激的敏感性仍有待进一步探明。

综上所述, 本研究探索了 Rhbdd3 对鱼类病毒感染的影响, 研究结果为鱼类病毒感染的治疗提供了新的药物靶点, 也将对开发鱼类广谱病害防控措施具有积极意义。

参考文献:

- [1] Gui L, Zhang Q Y. Disease prevention and control[M]//Gui J F, Tang Q S, Li Z J, et al. Aquaculture in China: Success Stories and Modern Trends. Chichester: John Wiley & Sons, 2018: 577-598.
- [2] Gui L, Chinchar V G, Zhang Q Y. Molecular basis of pathogenesis of emerging viruses infecting aquatic animals[J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(1): 1-5.
- [3] Freeman M. Rhomboids, signalling and cell biology[J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(3): 945-950.
- [4] Bergbold N, Lemberg M K. Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2013, 1828(12): 2840-2848.
- [5] Liu J, Liu S X, Xia M, et al. Rhomboid domain-containing protein 3 is a negative regulator of TLR3-triggered natural killer cell activation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(19): 7814-7819.
- [6] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, et al. Spring viremia of carp (SVC)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52: 261-272.
- [7] Ahne W. *Argulus foliaceus* L. and *Piscicola geometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVCV) [J]. Journal of Fish Diseases, 1985, 8(2): 241-242.
- [8] Ip H S, Lorch J M, Blehert D S. Detection of spring viraemia of carp virus in imported amphibians reveals an unanticipated foreign animal disease threat[J]. Emerging Microbes & Infections, 2016, 5(9): e97.
- [9] Johnson M C, Maxwell J M, Loh P C, et al. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: Snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Virus Research, 1999, 64(64): 95-106.
- [10] Goodwin A E. First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in North America[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2002, 14(3): 161-164.
- [11] Liu H, Gao L, Shi X, et al. Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in P.R.China[J]. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 2004, 24(4): 194-202.
- [12] Xiao Y, Shao L, Zhang C W, et al. Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: A negatively single stranded RNA virus[J]. Virus Research, 2014, 189: 271-279.
- [13] Ji F, Zhao J Z, Liu M, et al. Isolation and genotype analysis of spring viremia of carp virus strains from Heilongjiang Province in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1141-1148. [纪锋, 赵景壮, 刘森, 等. 黑龙江地区鲤春病毒血症病毒的分离与基因型分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1141-1148.]
- [14] Dobos P, Roberts T E. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: A review[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1983, 29(4): 377-384.
- [15] Saint-Jean S R, Borrego J J, Perez-Prieto S I. Infectious pancreatic necrosis virus: Biology, pathogenesis, and diagnostic methods[J]. Advances in Virus Research, 2003, 62(4): 113-165.
- [16] Eriksson-Kallio A M, Holopainen R, Viljamaa-Dirks S, et al. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) strain with genetic properties associated with low pathogenicity at Finnish fish farms[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 118: 21-30.
- [17] Jiang Y L, Xu B H, Li W, et al. Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from imported rainbow trout (*Salmon gairdneri*) in P. R. China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1989, 13(4): 353-358, 394. [江育林, 徐伯亥, 李伟, 等. 虹鳟传染性胰脏坏死病病毒(IPNV)的初步研究[J]. 水生生物学报, 1989, 13(4): 353-358, 394.]
- [18] Ji F, Zhao J Z, Liu M, et al. Complete genomic sequence of an infectious pancreatic necrosis virus isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in China[J]. Virus Genes, 2017, 53(2): 215-225.
- [19] Hu X L, Li W, Zhao H J, et al. Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout[J]. China Animal Health Inspection, 2012, 29(3): 27-30. [胡晓利, 李伟, 肇慧君, 等. 虹鳟鱼传染性胰脏坏死病病毒的分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(3): 27-30.]
- [20] Aoki T, Takano T, Santos M D, et al. Molecular innate immunity in teleost fish: Review and future perspectives[C]//Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, et al. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress, 2008: 263-276.
- [21] Yazawa R, Hiono I, Aoki T. Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial disease [J]. Transgenic Research, 2006, 15(3): 385-391.
- [22] Dalmo R A. Ontogeny of the fish immune system[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(5): 395-396.
- [23] Robertsen B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9(4): 269-290.
- [24] Shao L, Xiao Y, He Z K, et al. An N-targeting real-time PCR strategy for the accurate detection of spring viremia of carp virus[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 229: 27-34.
- [25] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493-497.

- [26] Zhang H Q, Shao L. Recombinant expression and polyclonal antibody preparation of the nucleoprotein, phosphoprotein and matrix protein of spring viremia of carp virus[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(12): 1919-1927. [张海强, 邵玲. 鲤春病毒血症病毒核蛋白、磷蛋白与基质蛋白的表达、抗体制备及免疫原性比较[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1919-1927.]
- [27] Bahar A, Simpson D J, Cutty S J, et al. Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene[J]. Molecular Endocrinology, 2004, 18(7): 1827-1839.
- [28] Fijan N, Petrinc Z, Sulimanovic D, et al. Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp[J]. Veterinarski Arhiv, 1971, 41(5-6): 125-138.
- [29] Stone D M, Ahne W, Denham K L, et al. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53: 203-210.
- [30] Zhu L, Wang X L, Wang K Y, et al. Outbreak of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout in China[J]. Acta Tropica, 2017, 170: 63-69.
- [31] Luo W W, Shu H B. Emerging roles of rhomboid-like pseudoproteases in inflammatory and innate immune responses[J]. FEBS Letters, 2017, 591(20): 3182-3189.

The antiviral effect of carp (*Cyprinus carpio*) Rhbdd3

SHAO Ling, TANG Qian, ZHANG Haiqiang

Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries Technical Extension Station, Shanghai 200433, China

Abstract: Rhomboid domain-containing protein 3 (Rhbdd3) has been identified as playing an essential role in innate mammalian immunity. However, the products and functions of the *rhbdd3* gene in aquatic animal cells, especially its antiviral characteristics, remain unknown. Spring viraemia of carp virus (SVCV) is a highly pathogenic agent, responsible for significant mortalities in several economically important Cyprinidae fish species. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the causative agent of an acute, highly contagious, and destructive disease named infectious pancreatic necrosis (IPN). The cumulative mortality of young infected salmon can exceed 90%. SVCV and IPNV are difficult to eradicate and there are currently no effective therapeutic strategies or drugs for either viruses. Thus, new interventions need to be developed. Innate immunity also plays an important role in the protection of fish against early viral infections. In the present study, we aimed to obtain the coding region of the common carp (*Cyprinus carpio*) *rhbdd3* gene. Furthermore, we sought to determine the function of Rhbdd3 in fish cells and explore the effects of Rhbdd3 on aquatic viral infections. Firstly, the *rhbdd3* gene of common carp was amplified by RT-PCR, with primers designed according to the conserved regions of the predicted fish *rhbdd3* gene. Then, the open reading frame (ORF) of the *rhbdd3* gene was cloned into the eukaryotic expression vector pCI-neo, to construct the pCI-*rhbdd3* plasmid. Next, EPC (Epithelioma Papulosum Cyprinid) and CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) cells were transiently transfected with pCI-*rhbdd3*, and the expression of Rhbdd3 was detected using western blot analysis. The viability of the transfected cells was examined at 12 h, 36 h, and 72 h post transfection with a CCK-8 kit. SVCV and IPNV infections were conducted at 24 h post pCI-*rhbdd3* transfection. Viral productive replication was assessed via immunofluorescence microscopy, western blot, and RT-qPCR analyses. The results indicated that the *rhbdd3* ORF of common carp is 1050 bp, which encodes a putative peptide of 349 amino acids. Overexpression of Rhbdd3 was verified using western blot analysis post pCI-*rhbdd3* transfection, and the overexpression did not affect the viability of EPC and CHSE-214 cells. Meanwhile, the immunofluorescence microscopy, western blot, and RT-qPCR detection results all showed that Rhbdd3 overexpression inhibited SVCV and IPNV infections. Collectively, our data indicate that Rhbdd3 can inhibit fish viral infections without affecting fish cellular viability. The results presented in this study will facilitate the development of aquatic broad-spectrum antiviral drugs and provide a new insight into the function of Rhbdd3.

Key words: *Cyprinus carpio*; Rhbdd3; SVCV; IPNV; antiviral effect

Corresponding author: SHAO Ling. E-mail: lingshao405@163.com