

研究报告

大鲵蛙病毒编码 96L 蛋白(ADRV-96L)的腺苷三磷酸酶活性和促进细胞生长作用

张锐^{1,2} 张奇亚^{1,2*}

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 湖北 武汉 430072)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】腺苷三磷酸酶(ATPase, ATP 酶)是控制 DNA 复制起始及宿主对病原微生物的应答开关。近期关于水生动物虹彩病毒基因组学的研究表明,它们共享编码 ATPase 的基因。【目的】大鲵蛙病毒(*Andrias davidianus* ranavirus, ADRV)属于虹彩病毒科,是世界现存最大两栖动物——中国大鲵的致死性病毒病原体。为了鉴定病毒基因及其表达产物对病毒复制和宿主细胞的影响,对 ADRV 编码 ATPase 的基因 ADRV-96L 进行了克隆、表达及功能分析,阐明这个虹彩病毒核心基因的功能。【方法】采用 PredicProtein 软件分析序列,构建重组原核表达质粒 pET32a/His ADRV-96L,经 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)诱导在大肠杆菌 DE3 中表达蛋白,用镍树脂纯化和咪唑液洗脱。钼蓝分光光度法检测产生的无机磷(Pi)以确定纯化 ADRV-96L 的 ATPase 活性。建立表达蛋白的稳定转染细胞系并进行鉴定,再分别通过绘制病毒的一步生长曲线和评估转染细胞的生长速率来测定该蛋白对病毒复制及细胞生长的影响。【结果】多重序列比对显示 ADRV-96L 存在含 Walker A 和 Walker B 基序的 AAA-ATPase (ATPases associated with a variety of cellular activities, 与各种细胞活性相关的 ATPase)结构域(20–159 位氨基酸)及两个高度保守的精氨酸。重组原核质粒表达了含 ADRV-96L 的 52 kD 融合蛋白,该蛋白质具有 ATPase 活性(酶的比活性平均为 4.68 U/mg)。结果未检出 ADRV-96L 对病毒的复制影响,但显示该蛋白可促细胞生长。【结论】大鲵蛙病毒 96L 基因(ADRV-96L)编码一个促细胞增殖和生长的 ATPase。

关键词:大鲵蛙病毒(ADRV), 病毒基因, 腺苷三磷酸酶, 酶活性, 细胞生长

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31430091, 31772890); Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA08030202)

*Corresponding author: E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

Received: November 12, 2017; **Accepted:** February 06, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 16, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(31430091, 31772890); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA08030202)

*通信作者: E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

收稿日期: 2017-11-12; 接受日期: 2018-02-06; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-16

Adenosine triphosphatase activity and cell growth promotion of *Andrias davidianus* ranavirus 96L-encoded protein (ADRV-96L)

ZHANG Rui^{1,2} ZHANG Qi-Ya^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] Adenosine triphosphatase (ATPase) controls DNA replication initiation and host response switch to pathogenic microbes. Recent genomics studies on aquatic animal iridoviruses have suggested that they share a gene encoding ATPase. Here, the function of the core gene in iridovirus will be first elucidated. [Objective] *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV), which belong to the family Iridoviridae, is the viral pathogen of mass mortality in Chinese giant salamander—the world's largest living amphibians. In order to identify virus gene and test the gene expression effects on virus replication and host cell, an ADRV gene, ADRV-96L was cloned, expressed and function analyzed. [Methods] Sequence data were analyzed using PredicProtein software. pET32a/His ADRV-96L recombinant prokaryotic expression plasmid was constructed, and the protein was expressed in *Escherichia coli* DE3 using IPTG induction, purified by Nickel Resin and eluted with imidazole. ATPase activity of the purified ADRV-96L recombinant protein was measured by the production of inorganic phosphorus (Pi) using molybdenum blue spectrophotometry method. Stable transfected cells were constructed and characterized. Then, the effects of ADRV-96L were analyzed by one-step multiplication curve for virus replication and estimating the growth rates of transferred cell, respectively. [Results] The multiple sequence alignments provided that ADRV-96L was characterized by the presence of the conserved AAA-ATPase (The ATPase associated with a variety of cellular activities) domains (20–159 residues) that contain Walker A and Walker B motifs, and two highly conserved arginines. The recombinant prokaryotic plasmid expressed a 52 kD fusion protein containing ADRV-96L, and the protein has ATPase activity 4.68 U/mg. The results show that ADRV-96L has no measurable impact on the ADRV replication, but it has been shown to promote cell growth. [Conclusion] *Andrias davidianus* ranavirus 96L gene (ADRV-96L) encodes an ATPase that is involved in cell proliferation and growth.

Keywords: *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV), Virus gene, ATPase, Enzyme activity, Cell growth

研究者们已从患病水产动物中分离鉴定了不同的病毒病原,并解析了上百株水生动物病毒基因组^[1]。大鲵蛙病毒(*Andrias davidianus* ranavirus, ADRV)就是其中之一,也是本实验室从患系统性出血症的中国大鲵组织中分离到的一株致死性病毒病原^[2]。经鉴定 ADRV 是虹彩病毒科 Iridoviridae 蛙病毒属 Ranavirus 的成员^[3]。ADRV 对我国野生两栖动物和养殖大鲵都造成严重危害,而且蛙病毒属成员也是引起鱼、蛙、鳖等多种水生动物严重系统性疾病的滥感染性病原^[4]。在对亲缘关系分类及对基因组进行多重序列比对之后,明确虹彩病毒科有 26 个核心基因^[5],这些基因结构的高度保守

性预示其功能的重要性,而编码腺苷三磷酸酶(ATPase)的基因位列其中。虽对虹彩病毒 ATPase 基因进行了克隆和表达^[6-7],但迄今尚未见这一虹彩病毒基因功能的相关报道。

ATPase 是参与氧化磷酸化和生物体能量转换的核心酶,在所有生命形式中都有重要作用^[8-12]。因 ATPase 的作用,如 ATP 合成和/或水解、F-或是否含旋转马达结构及运输离子种类等不同而分为不同类型^[13]。本实验室已解析 3 株虹彩病毒基因组^[2,14-15],并在阐明其中多个病毒基因结构与功能^[16-17]的基础上,经序列比对分析得知大鲵蛙病毒开放阅读框 96L (ADRV-96L)不仅是虹彩病毒核心

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

基因之一,而且能编码 AAA-ATPase (与各种细胞活动相关的 ATPase, ATPase associated with a variety of cellular activities)。这类酶是具有高度保守结构域 Walker A 和 Walker B 的蛋白,并与各种细胞活动相关的三磷酸腺苷酶^[18-19]。基于生物信息学分析显示 ADRV-96L 与已知 AAA-ATPase 基因有高度同源序列,推测这是一个与病毒复制或病毒-宿主相互作用的关键基因。但由于虹彩病毒 ATPase 基因表达产物的纯化及其酶活性测定有困难,其功能也一直未被证实。

虹彩病毒呈世界性分布,能感染无脊椎动物、鱼类、两栖类和爬行类^[1]。对虹彩病毒基因结构与功能开展研究,将有助于揭示特定基因对该病毒复制及与宿主相互作用的影响,阐释虹彩病毒广泛的地域性、宿主分布及其跨种传播的分子机制^[20-21],进而为感染鱼、蛙、鳖等多种水生动物的病毒病预警与防控提供依据。因此,拟针对 ADRV-96L 的结构与功能开展研究。为查明 ADRV-96L 是否有 ATPase 活性?对病毒复制和细胞生长又有何影响?本文对大鲵蛙病毒基因 ADRV-96L 的克隆、表达、产物提纯及其对病毒复制和细胞生长影响进行了测试、分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 目的基因、菌种及质粒

ADRV 基因组 DNA 由本实验室制备并保存^[2];基因克隆菌 *Escherichia coli* Top10、原核表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株与质粒 pET32a(+)均为本实验室保藏;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。引物合成和基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.1.2 主要试剂、仪器与培养基

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Hind* III、胶回收试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;T4 连接酶、氨苄青霉素购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA Marker、Protein Marker

购自北京全式金生物技术有限公司;IPTG 购自美国 Sigma 公司;高纯度质粒小量提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;Ni-NTA His-Bind 亲和层析柱购自美国 Novagen 公司;超微量总 ATP 酶测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂为国产或进口分析纯。

核酸电泳仪购自北京市六一仪器厂;PCR 仪、蛋白电泳仪、酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物技术股份有限公司;高压灭菌器购自日本 Hirayama 公司;离心机购自美国 Beckman 公司;水浴锅购自上海新苗医疗器械制造有限公司;凝胶成像系统购自美国 Syngene 公司。

LB (Luria-Bertani)液体培养基(g/L):酵母提取物 5.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0,pH 7.0;LB 固体培养基:在 LB 液体培养基中加入含量为 1.5%的琼脂粉;培养基 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

抗性平板制备:待灭菌后的 LB 固体培养基温度降至 50 °C 左右,加入抗生素至终浓度为 50 μ g/mL,摇匀后倒平板。

1.2 实验方法

1.2.1 序列比对

参照已发表的大鲵蛙病毒(*Andrias davidianus* ranavirus, ADRV)基因组信息^[2],由 ADRV 开放阅读框 ORF 96L 推导蛋白(ADRV-96L)的氨基酸序列。同时,从 NCBI 数据库下载 7 个物种与 ADRV-96L 同源蛋白序列,分别是:沼泽绿牛蛙病毒 *Rana grylio* virus 16R (RGV16R, JQ654586)、虎纹钝口螈病毒 *Ambystma tigrinum* virus 96L (ATV-96L, AAP33264)、淋巴囊肿病毒中国株(Lymphocystis disease virus-isolate China 209R (LCDV-C209R, NC_005902)、传染性脾肾坏死病毒 Infectious spleen and kidney necrosis virus 123L (ISKNV123L, NC_003494)、山羊痘病毒 Goat poxvirus A32L (GTPVA32L, JX683276)、鲫鱼 *Carassius auratus* 线粒体 DNA ATPase6 (CCATPase6, AY714387)和斑马鱼 *Danio rerio* 线粒体 DNA ATPase6 (DRATPase6, AC024175)。

利用 ClustalX 软件对这 8 种同源蛋白进行多重序列对比,同时标注与各种细胞活性相关 ATPase (AAA-ATPase)蛋白家族共享的保守模块序列。

1.2.2 原核表达质粒的构建及融合蛋白表达

参照 ADRV-96L 的核苷酸序列,设计用于该基因 PCR 扩增和构建原核表达载体的引物:F (5'-AAAGAATTCATGGAACAAGTACCCATAAAGGA-3')和 R (5'-GAGAAGCTTAATCGTCCAAGTCCGACTGG-3'),下划线部分为 *EcoR* I 和 *Hind* III 的酶切位点。以制备的 ADRV 基因组 DNA 为模板(制备方法参见本实验室之前的报道^[2]),利用上述引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:10×*Taq* Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL,正、反向引物(1 pmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 1.0 μL, *Taq* Polymerase (1 U/μL) 0.5 μL,双蒸水补足至 25 μL。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 10 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 DNA 纯化回收试剂盒回收纯化,经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切、纯化后与载体 pET32a 连接,转化大肠杆菌 DH5α。经抗性平板筛选后挑取克隆,菌落 PCR 检测含有目的基因的重组子,通过测序验证得到用于原核表达的重组质粒 pET32a-96L。

将 pET32a-96L 转化表达菌 DE3 中,挑取单克隆,经鉴定阳性的菌株接种到 200 mL 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C、250 r/min 振荡培养 2 h。用分光光度计测菌液的 OD₆₀₀ 值以确定细菌细胞密度值,当 OD₆₀₀ 值达到 0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。经 24 °C 振荡培养 10 h 后,分别取 1 mL 诱导或未经诱导的菌液,于 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清与沉淀,对沉淀的菌体用超声波破碎,加上样缓冲液,煮沸使蛋白变性后进行 12% SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮兰染色后观察蛋白表达情况。

1.2.3 蛋白纯化及酶活性测定

将被诱导的菌液于 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,按照培养液:缓冲液=1:10 (体积比)加入

20 mL 结合缓冲液(Binding buffer)重悬。经超声破碎,4 °C、4 000 r/min 离心 30 min 取上清,用组氨酸标签蛋白纯化磁珠,按操作流程介绍进行蛋白纯化。具体步骤是:将经超声波破碎后离心的菌上清样与磁珠混合,室温孵育 1 h,磁性分离后保留磁珠,再依次分别用浓度为 5、10、20、40、60、80、100、120、160、200、250 和 500 mmol/L 的咪唑(Imidazole)洗脱液进行洗脱,收集各组分洗脱液,以未纯化的菌液作对照,取等体积各组分上样,经 12% SDS-PAGE 电泳检测蛋白的纯化效果及相对含量,再辅以分光光度计检测不同洗脱组分中的蛋白含量。

因为 ATPase 分解 ATP 能生成 ADP 及无机磷 Pi,所以测定 Pi 的量就可以判断 ATPase 酶活性的高低,结合 SDS-PAGE 电泳结果,选择目的蛋白量较大、纯度较高的洗脱液组分,使用超微量 ATPase 测定试剂盒,按说明书(<http://www.njjcbio.com/>)进行酶活性测定。同时,也按该方法对经 pET32a 载体表达的硫氧还蛋白(Thioredoxin, Thx)进行纯化,作为测定酶活性时的对对照。步骤包括:将试剂一、二、三按照 13:4:4 (体积比)的比例混合作为基质液备用,分别加入待测洗脱液组分,37 °C 孵育 10 min,再加入终止剂终止反应。3 500 r/min 离心 10 min,分别取各上清液与显色剂反应,在 636 nm 处测定样品的吸光度。分别用双蒸水与 0.02 μmol/mL 磷标准液作为标准对照;将所制备的 Thx 用作酶活性测定的阴性对照,所测数据再按公式计算酶活性:待测样品中 ATPase 酶活性=(待测样 OD₆₃₆ 值-对照 OD₆₃₆ 值)/(标准 OD₆₃₆ 值-空白 OD₆₃₆ 值)×0.02 μmol/mL×6.0×7.8/待测样蛋白浓度(mg/mL)。其中 0.02 μmol/mL 为磷标准液浓度;定义上酶活性单位为 1 h,实际操作为 10 min 反应,并且反应体系是 7.8 倍稀释,因此乘以 6.0 和 7.8。

1.2.4 真核表达质粒与稳转细胞系的构建

构建 ADRV-96L 真核表达质粒的引物是 F (5'-AAAGAAGCTTATGGAACAAGTACCCATAAAGGA-3')和 R (5'-TAGGAATTCCTAATCGTCCAAGTCCGA

CTG-3'), 其中各含 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点(见下划线处), 经过测序验证。

在获得序列验证的重组质粒 pcDNA3.1-96L 后, 使用转染试剂 Lipofectamine 3000 将重组质粒 pcDNA3.1-96L 或空质粒 pcDNA3.1 分别转入大鲵胸腺细胞系 GSTC (Chinese giant salamander thymus cell) 中(参见本实验室之前的报道^[22]), 48 h 后按 1:2 (体积比) 传代至 6 孔板中, 待细胞长成单层, 加入终浓度为 400 μ g/mL G418 进行筛选, 持续筛选 4 周后分别获得稳定转染 pcDNA3.1-96L 或 pcDNA3.1 的 2 株细胞。分别制备这 2 株细胞的总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行 ADRV-96L 基因扩增, 将产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以鉴定稳定转染细胞。

1.2.5 稳定转染细胞生长曲线的绘制

稳定转染细胞生长曲线的测定: 用胰酶消化对数生长期的 pcDNA3.1-96L 稳定转染细胞, 重悬、计数, 通过调整培养液的体积使待测与对照细胞浓度一致。终浓度约为 3×10^4 个/孔, 传至 24 孔板, 25 $^{\circ}$ C 培养。每天各消化 3 孔细胞, 用血球计数板分别计数, 持续数日观察记录; 同时, 将空质粒 pcDNA3.1 转染的细胞设为对照。以时间(d) 为横坐标, 以细胞数($\times 10^4$ 个) 为纵坐标, 绘制两种转染细胞的生长曲线。

1.2.6 病毒一步生长曲线的测定

病毒一步生长曲线能反映病毒在宿主细胞中的复制情况。为了了解 ADRV-96L 过表达对 ADRV 扩增的影响, 测定病毒在稳定转染 pcDNA3.1-96L 细胞中的一步生长曲线, 方法参见本实验室的报道^[23]。具体操作: 将细胞传至 24 孔板中, 待细胞长满单层后弃去培养基, 每孔接入 0.1 MOI (Multiplicity of infection) 的 ADRV, 置于 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 弃去孔中病毒液, 然后加入新鲜培养基继续培养。在感染之后不同时间(0、4、8、12、18、24、36 和 48 h) 分别收取感染细胞培养物, 每个时间点分别收取 3 孔重复样, 测病毒悬液的滴度(TCID₅₀)。同时, 按此操作步骤测定病毒在空质粒 pcDNA3.1 稳定转染

细胞中的生长曲线, 作为对照。以时间(h) 为横坐标, 以 lg(TCID₅₀) 为纵坐标, 绘制 ADRV 的一步生长曲线。

2 结果与分析

2.1 ADRV-96L 的结构特征

大鲵蛙病毒基因 ADRV-96L 编码的 ATPase 含有 315 个氨基酸, 预测该蛋白的分子量约为 35 kD。与 AAA-ATPase 蛋白酶家族其他成员一样, ADRV-96L 拥有含 Walker-A 和 Walker-B 基序的保守模块, 预示其具备结合底物及水解 ATP 的关键条件^[24]。另外与来自沼泽绿牛蛙病毒、虎纹钝口螈病毒、淋巴囊肿病毒中国株、传染性脾肾坏死病毒、山羊痘病毒、鲫鱼线粒体 DNA 和斑马鱼 7 个不同物种线粒体 DNA 的同源蛋白结构却有所不同。前 5 种病毒蛋白都与 AAA-ATPase 共享保守序列模块, 这个模块有 Walker A (GXXXXGK[T/S], X 代表任意氨基酸) 和 Walker B (hhhhD[D/E], h 代表任意疏水性氨基酸) 两个基序; 此外, 它们还共有 2 个保守的精氨酸位点(Arg, R), 位于 ADRV-96L 约 30-160 氨基酸残基及其他同源蛋白相应的位置上(图 1)。

但是, 山羊痘病毒 GTPV32L 缺少完整的 AAA-ATPase 的保守序列模块, 如缺少 Walker A 基序, 仅保留 Walker B 基序; 而最后 2 种来自鱼线粒体的蛋白, 鲫鱼线粒体 DNA 蛋白 CCATPase6 和斑马鱼线粒体 DNA 蛋白 DRATPase6, 则完全缺少 AAA-ATPase 的保守序列模块, 不存在 Walker A 基序和 Walker B 基序。预示这 3 种蛋白不具备、或仅有很低的 ATPase 活性。

2.2 诱导表达的 ADRV-96L 融合蛋白

将经诱导 (IPTG) 和未经诱导 (-) 的上清 (Supernatant) 及沉淀 (Precipitation), 分别经 12% SDS-PAGE 电泳, 结果显示在 52 kD 的位置出现一条明显的差异带(图 2), 与预期融合蛋白分子量大小相符(目的蛋白 ADRV-96L 为 34 kD, 加上 His 标签 18 kD 的融合蛋白)。显示 ADRV-96L 可被 IPTG

	Walker A	Walker B	Arg1	Arg2
ADRV-96L :20	SIDTDLGGTKLVVIGKPGSGKSTLIKALLDSKRHIIP---VKAKAEMGSKKSWLVVITDDCMDNAKMFNDKEVRALFKNGRHWNVLVVIANQYVMDLTPDLRS:159			
RGV16R :20	SIDTDLGGTKLVVIGKPGSGKSTLIKALLDSKRHIIP---VKAKAEMGSKKSWLVVITDDCMDNAKMFNDKEVRALFKNGRHWNVLVVIANQYVMDLTPDLRS:159			
ATV-96L :20	SIDTDLGGTKLVVIGKPGSGKSTLIKALLDSKRHIIP---VKAKAEMGSKKSWLVVITDDCMDNAKMFNDKEVRALFKNGRHWNVLVVIANQYVMDLTPDLRS:159			
LCDV-C209R :20	SIETDIGGMKIVVIGRPGSGKSTLIKSLIASKRHLIP---ITAKN-LLDKMSWLVVITDDCMDNKKLFCDKMVMDFKNGRHWNVLVVIVASQYVMDLKPVIRS:158			
ISKNV35L :17	--DDEMGMKLVVIGKPGSGKSTLIKSLIASKRHIIP---LALKN-VDPEHSWLVVITDDCMDNAKMFNHEAVMDLFGNGRHWNVLVVIVASQYIMDLNASLRC:153			
GTPVA32L :13	SLITNPFRIALVGGSGSGKTAYLLSLFSTLVEKYKHI---KYVETKGNKADMFLLVITDDCMDNKKLFCDKMVMDFKNGRHWNVLVVIVASQYIMDLKPVIRS:151			
CCATPase6 :16	GIPLIAIAIALPWVLYPTSSSRWINNRLITIQWFIN---FTPTTQLSLNMG-FAVPLWLATVVIIGMRNQPTVALGHLLPEGTPVPLIPVLIITETISLFIIRP:154			
DRATPase6 :16	GIPLILVAMLLPWLFPAPTSRWINNRLITVQWLTG---FTPTTQLSLNMG-FAVPLWLATVVIIGMKNQPTVALGHLLPEGTPVPLIPALIIITETISLFIIRP:154			

图 1 ADRV-96L 与来自其它物种的 7 个同源物的氨基酸序列比对

Figure 1 Amino acid sequence alignments of ADRV-96L with 7 homologs from other species

注: Walker A 和 Walker B: 高度保守的基序; Arg1 和 Arg2: 保守的精氨酸位点。

Note: Walker A and Walker B: The highly conserved motifs; Arg1 and Arg2: Conserved arginines.

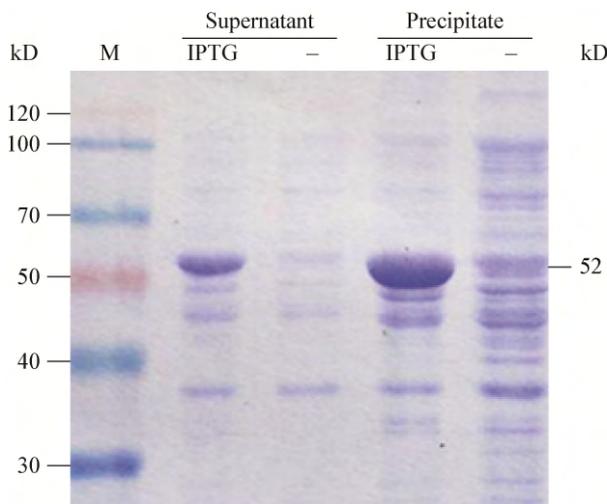


图 2 表达 ADRV-96L 的 SDS-PAGE 图谱

Figure 2 SDS-PAGE of expressed ADRV-96L

注: M: 蛋白分子量标准; IPTG: 诱导表达; -: 未诱导表达。

Note: M: Protein molecular weight marker; IPTG: Induction protein expression; -: Uninduction protein expression.

诱导表达。在经诱导的沉淀样品中这条带更浓, 显示该蛋白在培养基中和菌体内都可表达, 而被诱导的菌体在经超声波破碎后可获更多的目的蛋白。

使用超微量 ATPase 测定法, 对这些原核表达产物中目的蛋白纯度和浓度均较高的洗脱液组分, 如: 含咪唑浓度分别为 80、100 和 120 mmol/mL 的组分进行了测定, 结果显示它们都具有 ATPase 活性。进一步比较测试还显示, 80 mmol/mL 咪唑洗脱液中的相对酶活性更高, 达到 7.47 U/mg; 100 mmol/L 咪唑洗脱液中的酶活性次之, 为 4.68 U/mg; 120 mmol/mL 咪唑洗脱液中酶活性则更低, 约为 1.64 U/mg。这一

结果表明: 虽然 120 mmol/L 咪唑洗脱液中目的蛋白含量显著高于 80 mmol/mL 咪唑洗脱液, 有良好的目的蛋白洗脱效果, 但其中酶活性却显著较低, 说明高浓度咪唑洗脱液对 ADRV-96L 的 ATPase 酶活性有重要影响。因此, 要获得有较高 ATPase 酶活性的 ADRV-96L, 应尽量考虑使用浓度较低(如低于 120 mmol/mL)的咪唑洗脱液。

2.3 纯化的 ADRV-96L 具有 ATPase 酶活性

在镍柱纯化目的蛋白过程中, 不同的洗脱组分中目的蛋白(含 ADRV-96L 的 52 kD 融合蛋白)的含量不同。电泳图谱显示: 有些泳道有杂蛋白条带, 如在未纯化的上清液(Unpurified supernatant, US)中或当咪唑浓度很低为 5–20 mmol/mL 时泳道未见目的蛋白条带。当咪唑浓度由 40、60、80 mmol/mL 升至 120 mmol/mL 时, 目的蛋白的含量也随之增加(图 3)。经检测比较, 在咪唑浓度分别为 80、100 和 120 mmol/mL 的洗脱液中, 目的蛋白 ADRV-96L 的浓度分别为 0.11、0.18 和 0.12 mg/mL。这说明使用 100–120 mmol/mL 的咪唑液洗脱能获得较高含量的 ADRV-96L, 但当咪唑洗脱液浓度超过 160 mmol/mL 后, 目的蛋白含量又会逐渐降低(图 3)。

2.4 建成稳转细胞系

分别对用真核表达载体 pcDNA3.1-96L 和 pcDNA3.1 转染细胞的总 RNA 浓度和纯度进行鉴定, 经电泳显示它们的 28S 和 18S 条带完整, 总量相当(图 4A), 可用于反转录。

分别以来自病毒基因组 DNA 和 2 种稳转细胞

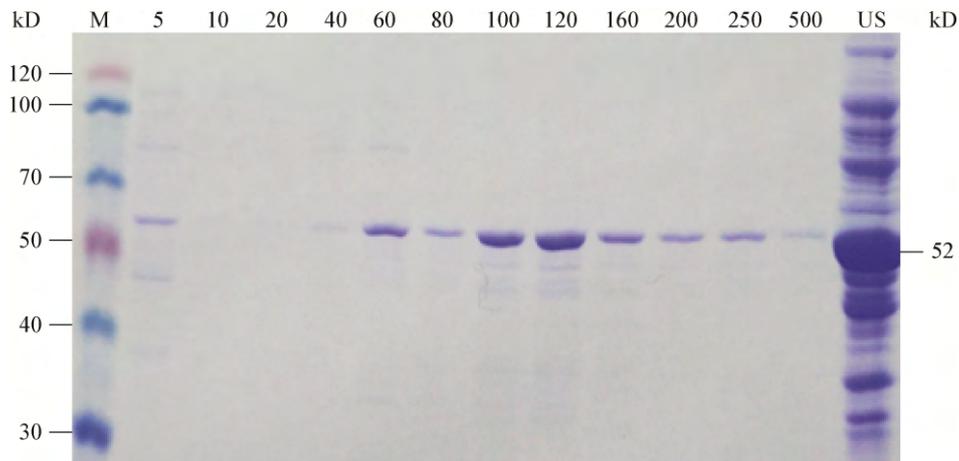


图3 纯化 ADRV-96L 的 SDS-PAGE 图谱

Figure 3 SDS-PAGE of purified ADRV-96L

注：5、10、20、40、60、80、100、120、160、200、250 和 500：不同浓度(mmol/mL)的咪唑洗脱液；US：未经纯化的上清液。
 Note: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 250 and 500: The target protein was eluted by stepwise elution, using different concentrations of imidazole (mmol/mL); US: Unpurified supernatant.

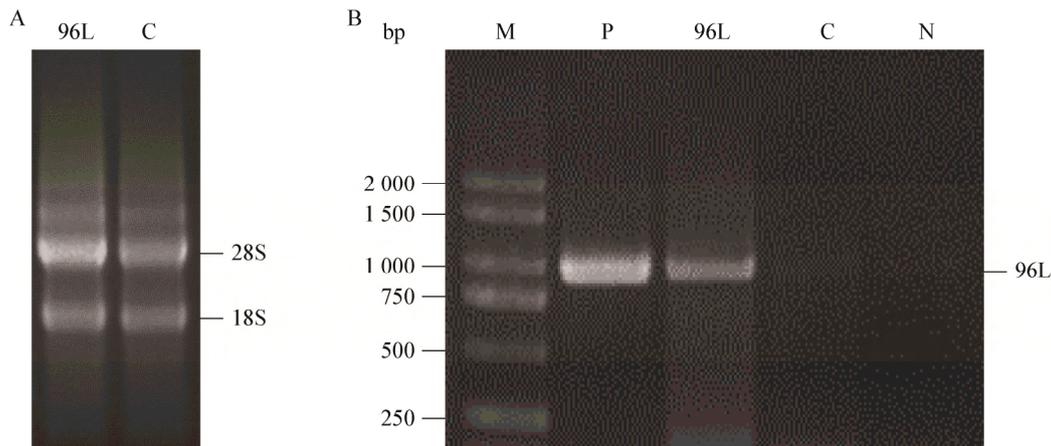


图4 琼脂糖电泳图

Figure 4 Agarose gel electrophoresis

注：A：总 RNA；B：PCR 检测 ADRV-96L 基因。96L：pcDNA3.1-96L 转染细胞；C：空载 pcDNA3.1 转染细胞；M：DL2000 DNA 分子量标准；P：阳性对照，以病毒 DNA 为模板；N：阴性对照。

Note: A: The total RNA; B: PCR detection for ADRV-96L gene. 96L: pcDNA3.1-96L transfected cells; C: Empty vector pcDNA3.1 transfected cells; M: DL2000 DNA Marker; P: Positive control, from virus DNA; N: Negative control.

系总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板，进行 ADRV-96L 基因的扩增和 PCR 检测。结果仅从病毒基因组 DNA 和 pcDNA3.1-96L 稳转细胞的样品中扩增到特异的 ADRV-96L 条带；而从空载体 pcDNA3.1 转染细胞样中没有扩增到 ADRV-96L 条带(图 4B)。这证明稳转细胞系已构建成功，而且能高效表达 ADRV-96L 基因。

2.5 ADRV-96L 对细胞生长和病毒复制的影响

对两种稳定转染的 GSTC 细胞生长曲线进行比较。结果显示，在第 2 天转染重组质粒 pcDNA3.1-96L 的细胞数量就要显著高于转染空质粒 pcDNA3.1 的细胞(图 5)，而且这种状况一直持续到第 4 天。说明 ADRV-96L 能显著促进细胞生长和增殖。

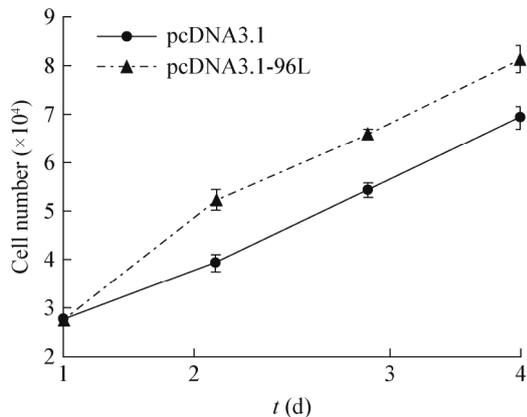


图5 经 pcDNA3.1-96L 和 pcDNA3.1 稳定转染 1-4 d 的 GSTC 细胞的长曲线

Figure 5 Growth curves of GSTC cells that were stably transfected with pcDNA3.1-96L and pcDNA3.1 from 1 d to 4 d

比较 ADRV 在 2 种稳定转染的 GSTC 细胞中的一步生长曲线, 结果显示: 无论是在 pcDNA3.1-96L 或 pcDNA3.1 转染的细胞中, 在感染后 48 h pi (Hours post infection) 的不同时间点病毒滴度都接近, 变化趋势也一致(图 6)。说明 ADRV-96L 对病毒复制的影响不明显。

3 讨论与结论

蛙病毒呈全球性分布^[25], 有广泛的无脊椎动物和低等脊椎动物宿主范围, 还能跨种传播^[26]。与其他大 DNA 病毒一样, 蛙病毒基因组较大, 而且也能编码与核酸、蛋白代谢相关的酶类。因此,

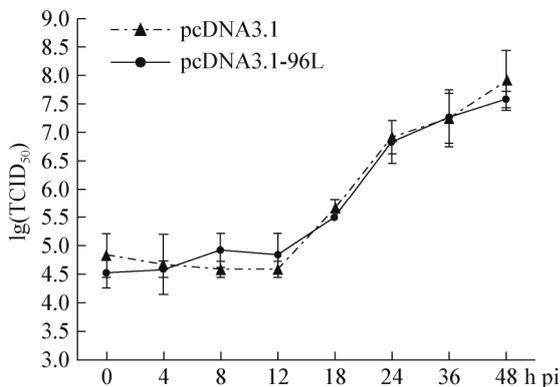


图6 ADRV 在 pcDNA3.1-96L 或 pcDNA3.1 稳定转染 48 h pi 在 GSTC 细胞中的生长曲线

Figure 6 Growth curve of ADRV in GSTC cells that were stably transfected with plasmids pcDNA3.1-96L and pcDNA3.1 for 48 h pi

鉴定和研究病毒酶类就成为认识虹彩病毒复制及病毒与宿主相互作用分子机制的突破口。本研究不仅从感染现存最大两栖动物物种——中国大鲵的虹彩病毒病原 ADRV 基因组中, 克隆和表达了其编码 ATPase 的基因 ADRV-96L, 在构建稳转细胞的基础上, 首次阐明虹彩病毒 ATPase 具有促进细胞生长的功能。这为深入研究虹彩病毒与低等脊椎动物的相互作用、不同虹彩病毒遗传变异和跨种传播提供了有价值的思路与研究材料。

已有文献涉及虹彩病毒的酶类基因, 如密啶脱氧核糖核苷三磷酸酶(dUTPase)、胸苷酸合酶(Thymidylate synthase), 胸苷激酶(Thymidine kinase)^[27-29]等。但由于在当时有活性的病毒酶蛋白进行纯化分析相当困难, 仅报道了这些病毒酶基因的克隆、表达和胞内分布的相关内容, 而无法确定其对病毒复制或宿主细胞的影响等基因功能。近期报道了纯化不同类型 ATPase 的方法^[30], 我们在参照、比较和反复优化这些方法的基础上, 选用超微量法, 从而获得有 ATPase 酶活性的原核表达产物, 其活性可达 7.47 U/mg。借助镍柱纯化和系列浓度咪唑液洗脱的方法, 经反复测试在保持 ADRV-96L 酶活性的同时, 试图获得浓度和活性都更高的纯化产物。虽然 120 mmol/mL 咪唑洗脱液中蛋白量最高, 但酶的比活却不够高; 而在 80 mmol/mL 咪唑洗脱液中蛋白含量较低, 但酶比活最大。这表明用 60-100 mmol/mL 浓度范围的咪唑液洗脱能获得蛋白含量和酶活性都较高的纯化 ADRV-96L。如果继续提升咪唑洗脱液浓度, 虽然洗脱蛋白的含量会随洗脱液浓度升高而增加, 但是会使酶活性显著降低。推测这可能是由于较高浓度的咪唑会使蛋白构象发生改变而使酶活性减弱或丧失。

ATPase 的结构不同, 其类型和功能也有所不同^[31-32]。如山羊痘病毒 A32L, 虽也是大鲵蛙病毒 ADRV-96L 的同源物, 并且具有 ATPase 活性, 但该蛋白不同于 AAA-ATPase 与细胞活动相关, 却被证明与病毒装配相关^[33]。这可能与其缺少完整

AAA-ATPase 的保守序列模块,并在其 C 端有一个 RGD 基序^[33]起作用有关。有证据表明 RGD 基序是病毒起始感染的结合位点,对病毒的感染力有影响^[34]。在我们进行多重序列比对的同源物中,从 ADRV、RGV、ATV、LCDV-C、ISKNV 和 GTPV 这 5 个来自虹彩病毒、与 ADRV-96L 高度同源的蛋白,都具有与 AAA-ATPase 的 Walker A 和 Walker B 高度保守序列模块。推测它们会发挥蛋白降解、膜融合等与细胞活性相关的作用^[35]。结果已证实,作为虹彩病毒的核心蛋白 ADRV-96L 的确有促进宿主细胞增殖的作用,但尚未检测到它对病毒复制的直接影响。这提示 ADRV-96L 是蛙病毒与宿主相互作用的一个重要蛋白,其功能可能类似一些肿瘤病毒的基因功能,如鱼类淋巴囊肿病毒中国株 LCDV-C 的胸苷激酶 Thymidine kinase 基因^[28]、EB 病毒的 IL-13^[36]等,通过这些病毒基因促进宿主细胞增殖,以利于产生更多的子代病毒、病毒的长期潜伏和病毒的再活化及其传播。

综上所述,本研究发现虹彩病毒的核心基因所编码的蛋白 ADRV-96L 具有促细胞增殖和生长的 ATPase 活性,这将可能为阐释虹彩病毒呈世界性分布和在低等脊椎动物之间跨种传播提供一个新的突破口。

REFERENCES

- Zhang QY, Gui JF. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 156-169 (in Chinese)
张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(12): 1236-1252
- Chen ZY, Gui JF, Gao XC, et al. Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV)[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 101
- Chinchar VG, Hick P, Ince IA, et al. ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(5): 890-891
- Chinchar VG, Waltzek TB. Ranaviruses: not just for frogs[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(1): e1003850
- Eaton HE, Metcalf J, Penny E, et al. Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes[J]. *Virology Journal*, 2007, 4: 11
- Wang XW, Chen XH. Cloning and expression of the large yellow croaker iridovirus ATPase gene[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(1): 81-85 (in Chinese)
王小文, 陈新华. 大黄鱼虹彩病毒腺苷三磷酸酶(ATPase)基因的克隆与表达[J]. *病毒学报*, 2004, 20(1): 81-85
- Shimoto H, Taniguchi K, Ikawa T, et al. Phenotypic diversity of infectious red sea bream iridovirus isolates from cultured fish in Japan[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3535-3541
- Lee ML, Hsu WL, Wang CY, et al. Goatpoxvirus ATPase activity is increased by dsDNA and decreased by zinc ion[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(5): 625-632
- Bai DM, Zhang JF, Li TT, et al. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12310
- Wendler P, Ciniawsky S, Kock M, et al. Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2012, 1823(1): 2-14
- Futai M, Nakanishi-Matsui M, Okamoto H, et al. Rotational catalysis in proton pumping ATPases: from *E. coli* F-ATPase to mammalian V-ATPase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2012, 1817(10): 1711-1721
- Zhang MY, Zhang J, Liu L, et al. Influence of key acid-resistant genes in arginine metabolism on stress tolerance in *Lactococcus lactis* NZ9000[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 314-324 (in Chinese)
张明阳, 张娟, 刘龙, 等. 精氨酸代谢途径抗酸关键基因对乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 胁迫抗性的影响[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 314-324
- Li NN, Wu JX, Ding D, et al. Structure of a pancreatic ATP-sensitive potassium channel[J]. *Cell*, 2017, 168(1/2): 101-110
- Zhang QY, Xiao F, Xie J, et al. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(13): 6982-6994
- Lei XY, Ou T, Zhu RL, et al. Sequencing and analysis of the complete genome of *Rana grylio* virus (RGV)[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(8): 1559-1564
- Huang YH, Huang XH, Zhang J, et al. Subcellular localization and characterization of G protein-coupled receptor homolog from lymphocystis disease virus isolated in China[J]. *Viral Immunology*, 2007, 20(1): 150-159
- Ke F, He LB, Pei C, et al. Turbot reovirus (SMReV) genome encoding a FAST protein with a non-AUG start site[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 323
- Zhang XD, Shaw A, Bates PA, et al. Structure of the AAA ATPase p97[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6(6): 1473-1484
- Hanson PI, Whiteheart SW. AAA+ proteins: have engine, will work[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(7): 519-529
- Erzberger JP, Berger JM. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2006, 35: 93-114
- Yan WJ, Guo Y, Li XS, et al. Evolution of hemagglutinin gene of influenza A/H1N1 (09pdm) virus in China, 2009-2015[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 420-427 (in Chinese)
颜文娟, 郭艳, 李小杉, 等. 2009-2015 年中国甲型 H1N1 流

- 感病毒血凝素基因进化分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 420-427
- [22] Yuan JD, Chen ZY, Huang X, et al. Establishment of three cell lines from Chinese giant salamander and their sensitivities to the wild-type and recombinant ranavirus[J]. Veterinary Research, 2015, 46: 58
- [23] Lei CK, Chen ZY, Zhang QY. Comparative susceptibility of three aquatic animal cell lines to two ranaviruses[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(10): 1643-1647 (in Chinese)
雷存科, 陈中元, 张奇亚. 三种水生动物细胞系对两株蛙病毒敏感性的比较[J]. 水产学报, 2016, 40(10): 1643-1647
- [24] Miller JM, Enemark EJ. Fundamental characteristics of AAA+ protein family structure and function[J]. Archaea, 2016, 2016: 9294307
- [25] Gray MJ, Chinchar VG. Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates[M]. New York, USA: Springer, 2015
- [26] Mavian C, López-Bueno A, Balseiro A, et al. The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses[J]. Journal of Virology, 2012, 86(7): 3617-3625
- [27] Zhao Z, Ke F, Gui JF, et al. Characterization of an early gene encoding for dUTPase in *Rana grylio* virus[J]. Virus Research, 2007, 123(2): 128-137
- [28] Zhao Z, Shi Y, Ke F, et al. Constitutive expression of thymidylate synthase from LCDV-C induces a transformed phenotype in fish cells[J]. Virology, 2008, 372(1): 118-126
- [29] Zhao Z, Ke F, Shi Y, et al. *Rana grylio* virus thymidine kinase gene: an early gene of iridovirus encoding for a cytoplasmic protein[J]. Virus Genes, 2009, 38(2): 345-352
- [30] Fedosova NU. Purification of Na, K-ATPase from pig kidney[A]//Bublitz M. P-Type ATPases[M]. New York, NY: Humana Press, 2016: 5-10
- [31] Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(11): 917-929
- [32] Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, et al. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling[J]. Science, 2010, 327(5964): 459-463
- [33] Chan KW, Yang CH, Lin JW, et al. Phylogenetic analysis of parapoxviruses and the C-terminal heterogeneity of viral ATPase proteins[J]. Gene, 2009, 432(1/2): 44-53
- [34] Zheng HX, Guo JH, Jin Y, et al. Infectivity of Asia1 type foot-and-mouth disease virus was increased via an alternative RDD motif[J]. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(14): 1370-1375 (in Chinese)
郑海学, 郭建宏, 靳野, 等. 2010, RDD 基序对口蹄疫 Asia1 型毒株感染力的影响[J]. 科学通报, 2010, 55(14): 1370-1375
- [35] Xia D, Tang WK, Ye YH. Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p[J]. Gene, 2016, 583(1): 64-77
- [36] Tsai SC, Lin SJ, Chen PW, et al. EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines[J]. Blood, 2009, 114(1): 109-118

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2018 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>