

白斑综合症病毒对对虾 *Caspase* 基因的调控

金春英¹, 林金清², 王蔚³

- (1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;
2. 华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021;
3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究病毒感染对白斑综合症病毒基因的录调控的影响,将 *Caspase* 调控区的 DNA 进行生物素标记,然后与链霉亲和素修饰的琼脂糖结合.通过下拉发现,*Caspase* 基因的启动子序列与 white spot syndromic virus(WSSV)病毒的两个蛋白 Vp38 和 Vp41B 有相互作用.通过荧光素酶报告基因发现,Vp38 和 Vp41B 对 *Caspase* 启动子活性分别有抑制和激活作用.采用 RNAi 技术下调两个 WSSV 蛋白的表达后,研究发现:Vp38 和 Vp41B 分别对对虾血细胞的凋亡水平有促进和抑制的调控作用.

关键词: 对虾白斑综合症病毒; *Caspase* 基因; 调控; 凋亡

中图分类号: Q 516

文献标志码: A

白斑综合症病毒(white spot syndromic virus, WSSV)是对虾养殖中危害最严重的病原.该病毒传染力强、致死率高、流行范围广,给全球对虾养殖业造成了巨大损失^[1].由于对虾等海洋无脊椎动物的免疫系统不完善,无法用疫苗进行免疫防治,至今仍未能有效控制该病毒病的发生与发展^[2].在以往的研究中,通过抑制差减杂交发现,日本对虾(*Penaeus japonicus*)中 *Caspase* 基因通过细胞凋亡在对虾抗病毒免疫中发挥重要作用^[3-4].为进一步研究 *Caspase* 基因在病毒感染过程中的调控,本文对 *Caspase* 调控区,结合蛋白 Vp38 和 Vp41B,研究了对虾免疫和病毒感染过程中的所起的重要作用.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1) 材料:淡水克氏原螯虾和日本对虾购于厦门第八市场;WSSV 原始病毒提取自厦门同安对虾养殖场收集的感染阳性对虾;大肠杆菌(*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21)、质粒(pGL3-Basic 和 pIZ/V5-his)和细胞(High Five)由本实验室保藏.

2) 试剂:胶回收试剂盒(美国 Omega 公司);组织 DNA 提取试剂盒、Taq 合成酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、pMD18-T 载体和 siRNA 体外转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);细胞培养用培养瓶、多孔板(美国 Corning 公司);荧光素酶分析系统及半乳糖苷酶检测系统(美国 Promega 公司);Express-Five SFM 基础培养基与 *L*-谷氨酰胺、Cellfectin(美国 Invitrogen 公司);链霉亲和素琼脂糖(美国 Thermo 公司);其他化学试剂均为市售分析纯产品.

1.2 仪器

高速冷冻离心机(德国 Beckman 公司);电泳仪和 PCR 扩增仪(美国 Bio-RAD 公司);发光仪(美国 MGM 公司).

收稿日期: 2013-12-28

通信作者: 金春英(1976-),女,实验师,主要从事免疫防治的研究. E-mail:jcying@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272684);国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室开放研究基金项目(HY201102)

1.3 引物

均用设计软件 Primer Premier 由 Invitrogen 公司合成. Cas-Bio-F: Bio-5'-AGCTGCATTCTT-GCTTCCCTC-3'; Cas-Bio-R: Bio-5'-GGGGCAATACTGACACAAG AT-3'; Cas-Luc-F: 5'-CGAGCTCGAGAGGGAACGGGTAGACT-3'; Cas-Luc-R: 5'-AACTCGAGCAAGTAATTATT-GCGATTACAT-3'; pIZ-Vp38-F: 5'-CCCAAGCTTGGGATGTCTTCTTCGTCTTCTG-3'; pIZ-Vp38-R: 5'-CCGGAATTCC GGTATGAACATGTTACAATTATTC-3'; pIZ-Vp41B-F: 5'-CCCAAGCTT-GG GATGGGAGATAAGCAAAAG-3'; pIZ-Vp41B-R: 5'-CCGGAATTCCGGCTAGGAGCATGTG-CATG-3'; Vp38-siRNA: 5'-AAGACATTGTAAATGCTCTAG-3'; Vp38-mutation-siRNA: 5'-AAGA-CAATGTAAATGCTCTAG-3'; Vp41B-siRNA: 5'-AAGCATCCGAAACATATGATA-3'; Vp41B-mutation-siRNA: 5'-AAGCATCC GATACATATGATA-3'.

1.4 方法

1.4.1 Caspase 基因启动子调控蛋白 通过向淡水克氏原螯虾注射 WSSV 病毒株进行人工感染,完整病毒粒子制备和纯化过程参照文献[5]的方法. 将纯化的 WSSV 病毒粒子加入等体积,且体积分数为 2% 的 NP-40 中,在室温下轻柔震荡 1 h,使得病毒粒子中的蛋白得以裂解. 震荡后,在 $3 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下,4 ℃ 离心 20 min,吸取上清为 WSSV 的病毒总蛋白.

对虾基因组 DNA 用组织 DNA 提取试剂盒提取,经质量浓度为 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳,并紫外分光. 测其浓度后,以之为模板,用一对生物素标记的引物(Cas-Bio-F 和 Cas-Bio-R)扩增对虾 Caspase 基因的一 30~—508 部分的上游调控区[6]. 取 100 pmol 的生物素标记 PCR 产物,3 mg 链霉素琼脂糖和经过裂解后的病毒粒子总蛋白,在 25 ℃ 下,用结合缓冲液($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris, pH 值为 7.9; $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl, 体积分数为 5% 的甘油; $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA; $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 , 体积分数为 1% 的 Triton X-100) 孵育 2 h. 然后,用 1 mL 结合缓冲液洗涤 3 次,再用 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 洗去非特异性结合的蛋白. 最后,将琼脂糖与 20 μL SDS-PAGE 上样缓冲液混合后煮沸,以释放强力结合的蛋白.

DNA 结合蛋白用质量分数为 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后,考马斯亮蓝 R250 染色、脱色. 切取 DNA 结合蛋白条带,用基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱得到肽质量指纹图谱数据,利用 MASCOT 软件分析处理.

1.4.2 重组质粒的构建 取带有 Sac I 和 Xho I 酶切位点的引物 Cas-Luc-F 和 Cas-Luc-R,以对虾基因组 DNA 为模板,扩增对虾 Caspase 基因—678 到 141 bp 部分的上游调控区域. 将该序列装载至 pGL3-Basic 载体,命名为 pGL3-ProCas. 根据已公布 Vp38 和 Vp41B 编码基因序列(NCBI 序列号 NC_003225.2),设计含有 Hind III 和 EcoR I 限制性酶切位点两对引物 pIZ-Vp38-F, pIZ-Vp38-R, pIZ-Vp41B-F, pIZ-Vp41B-R. 以纯化的 WSSV 病毒 DNA 为模板,PCR 扩增 Vp38 和 Vp41B 基因,并将其装载至 pIZ/V5-His 表达载体中,分别命名为 pIZ-Vp38 和 pIZ-Vp41B.

1.4.3 瞬时共转染试验 转染前 24 h,在 6 孔板中接种适量 High Five 细胞,细胞密度达到 60%~80% 后进行转染. 转染前 1 h,更换新鲜的不含抗生素和血清的完全培养液,置于 27 ℃ 培养箱中. 将构建的 pGL3-ProCas 报告质粒(1 μg)分别与 pIZ-Vp38, pIZ-Vp41B,以及阴性对照质粒 pIZ/V5-His(1 μg)进行共转染细胞. 每个孔转染 0.5 μg pSV- β -Galactosidase 作为标准内质控,以校正各组之间的差异. 质粒与 2 μL 的 Cellfectin 试剂混匀,将所得的转染工作液在室温下放置 15 min,逐滴加入 500 μL 培养液并混匀,置 27 ℃ 培养箱中培养. 转染 4 h 后,更换培养液,30 h 后按照荧光素酶及半乳糖苷酶检测试剂盒提供的方法,将细胞裂解 15 min,裂解物用发光仪测定相对荧光素酶活性. 每组实验重复 3 次.

1.4.4 siRNA 合成 根据 siRNA 的设计规则,设计 Vp38 和 Vp41B 基因特异的 siRNA,同时以突变 1 个碱基的 siRNA(mutation-siRNA)为阴性对照. 利用 siRNA 体外转录试剂盒合成 siRNA,操作过程参考试剂盒说明书. 日本对体长为 8~10 cm 的对虾,随机选取一组 20 只,暂养在 100 L 海水水族箱,水温为 20 ℃,并向水族箱不间断连续充气. 以浙江科盛饲料股份有限公司生产的南美白对虾配合饲料为基础饲料,每天投饵 2 次(早晚各 1 次). 投饵量为实验对虾体质量的 3% 左右,每天吸污、换水,换水量为 30%. 经室内暂养 3 周后,挑选外观正常,体质健壮的个体作为实验用虾. 对每只对虾同时注射 24

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 siRNA 和 10 000 个 WSSV 病毒粒子, 在注射 2, 24, 36, 48, 72 h 后, 抽取对虾血细胞, 通过 Northern blot 验证干扰对虾后的 Vp38 和 Vp41B 基因转录变化。

1. 4. 5 血细胞凋亡的检测 对虾血淋巴置于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 室温静置 30 min 后, 用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定 30 min. 用质量浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶于甲醇的 DAPI 溶液洗涤一次后, 于 37°C 下, 将其放入盖着铝箔纸的湿盒中染色 15 min. 最后, 弃去 DAPI 溶液, 细胞用 PBS 溶液洗涤以除去多余的染料. 玻片风干后加入抗淬灭剂, 正置荧光显微镜下观察拍照, 每组观察 1 000 个细胞, 计算凋亡细胞所占总细胞的百分比。

2 结果与分析

2.1 *Caspase* 基因启动子调控蛋白的筛选和验证

链霉亲和素与生物素之间因其强的亲和力被广泛用于生物分子间相互作用的研究^[7-8]. 以生物素标记的 *Caspase* 启动子片段, 通过生物素与固定在载体上的链霉亲和素亲和结合. 当与 *Caspase* 启动子片段有相互作用的 WSSV 蛋白与此固相复合物混合时, 蛋白即被吸附而分离. 被吸附的蛋白通过与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合后煮沸分离, 用 SDS-PAGE 电泳染色, 蛋白试验如图 1 所示. 图 1 中: 箭头 1 所示条带为 Vp41B; 箭头 2 所示条带为 Vp 38; 泳道 M 为蛋白 marker; 泳道 1 为煮沸 10 s 的洗脱结果; 泳道 2 为加煮沸 30 s 的洗脱结果; 泳道 3 为无 DNA 结合的阴性对照. 比较结合有 *Caspase* 启动子琼脂糖(泳道 1, 2)和没有结合 *Caspase* 启动子的琼脂糖(泳道 3)的下拉结果, 发现大小分别约为 38, 41 ku 的两个蛋白(箭头所示)可与 *Caspase* 启动子特异结合. 分别割取蛋白条带进行质谱鉴定, 采用 Mascot 在 GenBank 数据库中检索分析得到的多肽序列. 结果发现: 下拉获得的分子量为 38, 41 ku 左右的蛋白分别与 WSSV 的 Vp38 及 Vp41B 蛋白相匹配。

链霉亲和素下拉技术方法简便敏感, 同时避免了使用同位素等危险物质, 在生物分子相互作用研究中有很广泛的应用. 缺点在于分子间相互作用是在非生理状态下进行的, 人为的影响分子浓度对实验结果也有一定影响^[9-10]. 为验证 Vp38 和 Vp41B 对 *Caspase* 基因启动子的调控作用, 文中构建了 *Caspase* 启动子序列调控荧光素酶表达的质粒 pGL3-ProCas, 同时将 Vp38 和 Vp41B 的完整编码区序列克隆到 pIZ/V5-His 载体中以构建 Vp38 和 Vp41B 表达载体. 用 High Five 细胞进行共转染实验. 6 孔板中加入 $1 \mu\text{g}$ 的报告基因, $1 \mu\text{g}$ 表达载体(pIZ-Vp38 或 pIZ-Vp41B)或作为阴性对照的 pIZ/His-V5 载体, 或作为内参的 $0.5 \mu\text{g}$ pSV- β -Galactosidase 载体. 转染 48 h 后, 测定荧光素酶和半乳糖苷酶的活性. 将荧光素酶和半乳糖苷酶的活性进行均一化, 得到相对荧光活性(RLU)以消除因为质粒的转染效率不同而带来的误差, 结果如图 2 所示. pIZ-Vp38 表达载体与报告基因共转后, 其荧光素酶活性比 pIZ/V5-His plasmid 共转低 69%, 说明 Vp38 对 *Caspase* 的启动子活性有抑制作用; 反之, pIZ-Vp41B 表达载体与报告基因共转后, 其荧光素酶活性比 pIZ/V5-His plasmid 共转提高 2 倍, 说明 Vp41B 对 *Caspase* 的启动子活性有激活作用。

2.2 RNAi 对 Vp38 和 Vp41B 基因表达的抑制作用

分别用特异的 siRNA(Vp38-siRNA 和 Vp41B-siRNA)、单碱基突变(Vp38-mutation-siRNA 和 Vp41B-mutation-siRNA)注射对虾. 在注射后不同时间点收集对虾血淋巴, 以 DIG 标记的 Vp38-siRNA, Vp41B-siRNA, β -actin(对照) 特异的探针进行 Northern blot 分析, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知: siRNA 干扰后, Vp38 和 Vp41B 的基因的转录量明显下降, 在 48 h 时达

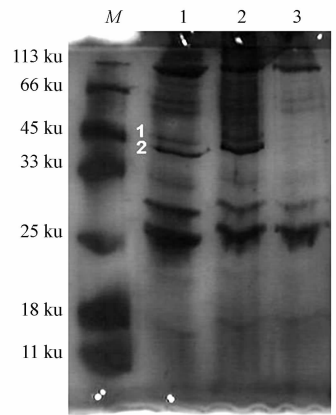


图 1 *Caspase* 启动子的 DNA 蛋白结合试验
Fig. 1 DNA-binding protein assay for the *Caspase* promoter

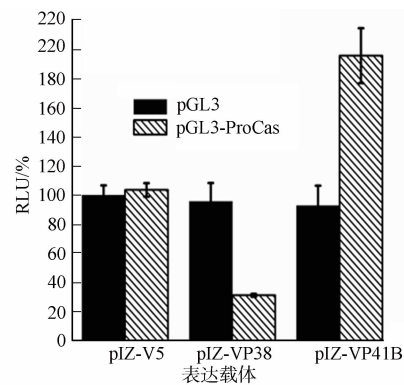


图 2 *Caspase* 启动子在 High Five 细胞中荧光素酶活性分析
Fig. 2 Luciferase reporter assay of the *Caspase* promoter in High Five cells

到最低,用 Northern blot 未检测到基因的转录;在 72 h 后,两个蛋白编码基因转录又开始增加,在注射 mutation-siRNA 的对照组中,Vp38 和 Vp41B 的转录量未变化,作为对照的 β -actin 转录水平始终保持一致. 研究表明:RNAi 具有高度的特异性,而 Vp38 和 Vp41B 基因的转录已被基因特异的 siRNA 抑制.

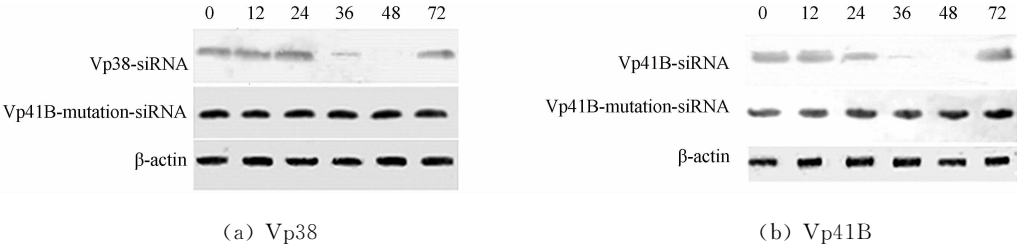


图 3 siRNA 对 Vp38 和 Vp41B 基因转录的抑制效果

Fig. 3 Effect of siRNA on the transcription of Vp38 and Vp41B

2.3 对血细胞凋亡的调控

在 Vp38 和 Vp41B 基因的转录受到抑制的情况下,研究 WSSV 病毒感染对虾血细胞凋亡百分率的变化,对显微镜观察的结果进行统计分析,如图 4 所示. 由图 4 可知:抑制 Vp38 的转录后,血细胞的凋亡百分率(RLU)出现了明显上升;在注射 siRNA 48 h 后,凋亡百分率为原来的 1.3 倍;而注射 Vp41BsiRNA 后,血细胞的凋亡百分率出现了明显下降,凋亡百分率为原来的一半,同时未注射的对照组凋亡百分率无变化;注射 siRNA 72 h 后,实验组和对照组的凋亡百分率差异降低,可能是由于 siRNA 在体内的不稳定性,Vp38 和 Vp41B 基因 mRNA 转录水平逐渐恢复导致. 以上结果说明:Vp38 和 Vp41B 参与了对虾血细胞的凋亡作用,当基因表达受到抑制时,血细胞的凋亡功能也出现变化.

细胞凋亡作为宿主细胞的一种重要免疫策略,在限制病毒增殖及减少或消除自带病毒在宿主细胞内的复制有重要作用. 同时,病毒也有一套有效的相应机制来抑制或者延迟凋亡途径来消除自己的子代病毒. 在病毒感染的后期,当子代病毒大量增殖,由于感染到邻近细胞将会促使凋亡更加活跃. 凋亡途径不仅仅受到宿主的调控,同样病毒也可以对其有所影响. 研究发现:在对虾被 WSSV 感染过程中,Vp41B 蛋白能够激发凋亡反应,并促进 caspase 的表达来保护宿主;相反,Vp38 蛋白通过下调 caspase 来阻断凋亡途径从而增强病毒致病性.

Vp38 和 Vp41B 分别是由 WSV259 和 WSV242 所编码的病毒外膜蛋白^[5]. 病毒的外膜蛋白在病毒的入侵、组装和出芽过程中起重要作用^[11]. Vp41B 能够通过多聚化参与病毒颗粒的组装^[12],生物信息学分析发现其具有潜在的跨膜结构域^[5],可能是由于跨膜域引起 Vp41B 蛋白结构重新定向,使之具有转录因子激活功能. 但是,在 Vp38 中没有找到跨膜结构域^[5]. 研究显示:Vp38 能够直接与 WSSV 外膜蛋白 Vp24 相互作用^[11]. 在 WSSV 病毒中,4 个主要的结构蛋白 Vp28,Vp26,Vp24 和 Vp19 构成了蛋白聚合体^[13],而 Vp26 通过与核衣壳蛋白的 Vp51 相互作用来连接病毒的外膜和核衣壳^[14]. 由此推测,Vp38 可能是通过结合中间蛋白来介导 Caspase 的转录调控,从而对凋亡进行调节.

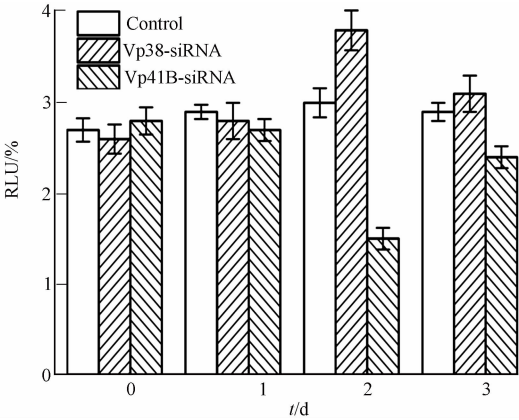


图 4 siRNA 对对虾血细胞凋亡活性的影响

Fig. 4 Effect of siRNA on apoptosis of shrimp hemocytes

3 结束语

通过链霉亲和素下拉、质谱鉴定等分析发现:对虾的凋亡调控基因 Caspase 启动子与 WSSV 蛋白 Vp38 和 Vp41B 之间存在相互作用. 荧光素酶报告实验和 RNAi 特异性干扰结果显示:WSSV 感染过程中 Vp41B 蛋白通过促进对虾 Caspase 基因的表达来激发凋亡反应,从而对宿主本的抗病毒免疫起到重要作用;相反,Vp38 蛋白通过下调 Caspase 的表达来阻断凋亡途径,促进病毒的感染. 研究结果揭示:

Vp38 和 Vp41B 在 WSSV 病毒感染和对虾抗病毒免疫中作用的分子机制,对于白斑综合症的预防和控制具有重要的意义.

参考文献:

[1] 李光,樊景凤,林凤翱,等. 对虾的免疫机制及其疾病免疫预防的研究进展[J]. 水产科学,2007,26(1):56-59.

[2] 韩建山,龙燕,孟小林,等. 鲤鱼生长激素和对虾白斑病毒囊膜蛋白 Vp28 的融合表达及功能研究[J]. 水生生物学报,2008,32(3):308-313.

[3] LAN Yong-shen,XU Xun,YANG Feng,et al. Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray[J]. Arch Virol,2006,151(9):1723-1733.

[4] WANG Lei,ZHI Bin,WU Wen-lin,et al. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection[J]. Dev Comp Immunol,2008,32(6):706-715.

[5] XIE Xi-xian,XU Li-mei,YANG Feng. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus[J]. J Virol,2006,80(21):10615-10623.

[6] 金春英,高浪,王磊,等. 对虾 Pj *Caspase* 基因启动子的克隆及其特征的初步分析[J]. 水生生物学报,2011,35(3):523-527.

[7] IIOKA H,LOISELLE D,HAYSTEAD T A,et al. Efficient detection of RNA-protein interactions using tethered RNAs[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(8):e53.

[8] ROBERTS T L,IDRIS A,DUNN J A,et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA[J]. Science,2009,323(5917):1057-1060.

[9] RYU C J,CHO D Y,GRIPON P,et al. An 80-kilodalton protein that binds to the pre-S1 domain of hepatitis B virus [J]. J Virol,2000,74(1):110-116.

[10] DING Tian-bing,REN Jun-ping,MA Wen-yu. Methods for the study of virus receptors[J]. Virol Sin,2006,21(2):189-193.

[11] JIE Zu-liang,XU Li-mei,YANG Feng. The C-terminal region of envelope protein Vp38 from white spot syndrome virus is indispensable for interaction with Vp24[J]. Arch Virol,2008,153(11):2103-2106.

[12] 丁琦,杨丰. 对虾白斑综合征病毒结构蛋白质 Vp41 的研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006,45(4):549-552.

[13] ZHOU Qing,XU Li-mei,LI Hui,et al. Four major envelope proteins of white spot syndrome virus bind to form a complex[J]. J Virol,2009,83(9):4709-4712.

[14] WAN Qiang,XU Li-mei,YANG Feng. Vp26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with Vp51[J]. J Virol,2008,82(24):12598-12601.

Regulation of Prawn *Caspase* Gene by White Spot Syndromic Virus

JIN Chun-ying¹, LIN Jin-qng², WANG Wei³

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, China)

Abstract: The prawn *Caspase* gene was previously found to play important roles in protecting host from viral infection. In order to further delineate the transcriptional regulation of *Caspase* in response to viral infection, the *Caspase* promoter was biotin-labeled and bind to streptavidin-beads. Through pulldown assay the *Caspase* promoter was founded to interact with two white spot syndromic virus (WSSV) proteins Vp38 and Vp41B. Luciferase reporter assay revealed that Vp38 and Vp41B act as repressor and activator of *Caspase* transcription respectively. RNAi inhibition of Vp38 and Vp41B indicate the two WSSV proteins play roles on the regulation of prawn hymocyte apoptosis. These results provided insights into the immune mechanism of invertebrates, and will also be helpful for shrimp viral disease control.

Keywords: white spot syndromic virus; *Caspase* gene; regulation; apoptosis