

淋巴囊肿病毒中国株 TNFR 类似物的原核表达与结构分析*

黄友华, 孙伟, 张奇亚**

(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; 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Analysis and Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor Homolog from LCDV-C

HUANG You-hua, SUN Wei, ZHANG Qi-ya**

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; Graduate school, Chinese Academy of Science, Beijing 10039, China)

Abstract: Tumor necrosis factor receptor (TNFR) plays an important role in the evasion of immune response by large DNA viruses. TNFR is a homologue of cellular receptors. Lymphocystis disease virus, an iridovirus, isolated in China (LCDV-C) is a large DNA virus. Primers were designed based on conserved TNFR nucleotide sequences in iridoviruses and used to amplify the homologue in LCDV-C. A DNA fragment of 834 bp was generated and sequenced. The recombinant prokaryotic expression plasmid containing this fragment was constructed and expressed in *E. coli*. DE3. An expected 45kDa fusion protein was isolated by SDS-PAGE. Computer analysis indicated that LCDV-C TNFR homologue encodes a 278aa putative protein, which contains a typical cysteine-rich domain. It shares 34% identity with flounder TNFR II.

Key words: *Lymphocystis disease virus*; *Iridovirus*; TNFR homologue; Sequence analysis; Prokaryotic expression

摘要: 肿瘤坏死因子受体(TNFR)是细胞因子受体家族中的一员,在大DNA病毒的免疫逃避中起着重要的作用。淋巴囊肿病毒中国株(LCDV-C)是一种大DNA病毒,属于虹彩病毒科。参照已知虹彩病毒TNFR基因设计引物:P1, 5' GGATCCAAA ACTATGATTA AAAATAAAGA 3'; P2, 5' ATTACTCGAGAATGT TAAAAATTAAGCTT 3'。以LCDV-C基因组DNA为模板,PCR扩增得到一个834bp的DNA片段,并对该片段进行测序。构建原核表达重组质粒后,在大肠杆菌DE3中诱导表达,其产物经SDS-PAGE电泳后,显示为45kDa的融合蛋白带。对测序结果进行计算机辅助分析的结果显示,LCDV-C TNFR类似物是一个含278个氨基酸的多肽,具有典型的半胱氨酸富集区功能结构域,与宿主牙鲈TNFR II氨基酸同源性为34%。

关键词: 淋巴囊肿病毒; 虹彩病毒; 肿瘤坏死因子受体类似物; 序列分析; 原核表达

中图分类号: Q938.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)06-0652-04

从患病牙鲈中分离到的淋巴囊肿病毒中国株(Lymphocystis disease virus isolated from China, LCDV-C)不仅是牙鲈的病原,也能引起淡水鱼类细胞产生病变^[1]。LCDV-C基因组全长186 247bp,除了编码病毒复制和转录所需的酶类及结构蛋白,还能编码与宿主同源的免疫调节蛋白基因^[2]。

已有报道,一些大DNA病毒通过编码宿主细胞基因的同源物,如细胞因子及其受体、趋化因子及

其受体等,来帮助病毒逃避宿主免疫系统的识别。这些病毒的一个共同特征就是能够长期潜伏宿主体内^[3]。淋巴囊肿病毒能够在多种鱼类长期感染^[4],是什么机制导致病毒不易被宿主的免疫系统识别并清除,目前还没有相关的报道。

通过PCR,从LCDV-C基因组中扩增得到一个与宿主同源的免疫调节蛋白基因—肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor TNFR)类似物,

收稿日期:2005-04-30,修回日期:2005-05-26

* 基金项目:国家973计划项目资助(CB117403)

作者简介:黄友华(1981-),男,博士研究生,研究方向:水生动物病毒学及分子生物学

** 通讯作者. Corresponding author. Tel:027-68780792, E-mail:zhangqy@ihb.ac.cn

并成功构建该基因的原核表达重组质粒,进行了原核表达,同时对测序结果进行了计算机辅助分析。

1 材料与方 法

1.1 病毒核酸的提取

病毒核酸用酚/氯仿抽提,具体步骤按文献进行^[2]。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

参照虹彩病毒 TNFR 基因核苷酸序列,设计一对引物: P1, 5' GGATCCAAAACACTATGATTAA AATAAAGA 3'; P2, 5' ATTACTCGAGAATGT TAAAAATTAAGCTT 3'(划线处为限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点),以 LCDV-C 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 5min,充分变性后,94℃ 30s,45℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环,然后 72℃ 延伸 5min。取 PCR 产物 5μL 电泳检测。

1.3 原核重组质粒的构建与鉴定

用 DNA 回收试剂盒 (DNA Extraction Kit, Fermentas) 纯化目的片段,并与 pMD18-T 载体于 4℃ 连接,转化 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆并测序,阳性重组质粒命名为 pMD-TNFR。将 pMD-TNFR 和 pET32a 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,回收酶切后的目的片段,16℃ 连接过夜,转化大肠杆菌 DE3 感受态细胞,PCR 检测筛选含有目的基因的重组子,并通过测序验证。

1.4 融合蛋白的诱导表达

将测序验证正确的重组菌涂平板,过夜培养后挑取单菌落接种于含 100μg/mL 氨苄青霉素的 100mL LB 液体培养基中,25℃ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.8。加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,在 37℃ 继续振荡培养 5h。收集 1mL 菌液于 4℃ 8 000 r/min 离心 5min。菌体沉淀重悬于 20μL 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液中,并加入等体积的加样缓冲液。沸水浴 5min,取 15μL 于 12% SDS-PAGE 上电泳。

1.5 计算机辅助分析

将 LCDV-C TNFR 类似物的核苷酸序列及其所推测编码的氨基酸序列输入到 GenBank 数据库,用 Blast 程序进行同源性搜索;用 DNASTar 对 LCDV-C TNFR 类似物的序列特点进行了分析;用 ClustalX 对包括 LCDV-C 在内的五种病毒编码的 TNFR 相关蛋白氨基酸序列进行比对,它们分别是:痘苗病毒细胞因子反应调节剂 (Vaccinia virus cytokine response modifier E, VV CrmE),疱疹病

毒介体 (herpes virus entry mediator, HVEM),鼠痘病毒 TNFR (Ectromelia virus TNFR, EV TNFR) 和粘液瘤病毒 M-T2 (Myxoma virus T2 protein, M-T2)。并重点对功能结构域进行了分析。

2 结果

2.1 LCDV-C 的特异 PCR 扩增产物

以 LCDV-C 基因组 DNA 为模板进行 TNFR 类似物的 PCR 扩增,产物电泳检测显示,在 834bp 的位置有一特异条带(图 1)。

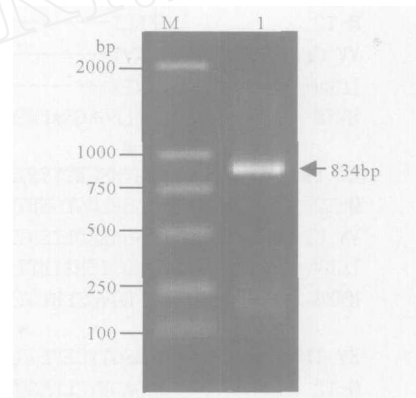


图 1 TNFR 类似物的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of TNFR homolog
M, Marker (DL2000); 1, TNFR homolog.

2.2 LCDV-C TNFR 类似物的原核表达产物

将重组质粒 pET32a-TNFR 转化大肠杆菌 DE3 后诱导表达。诱导前后的总蛋白经 SDS-PAGE 电泳结果显示,在 45kDa 的位置处出现一条差异明显的蛋白条带(图 2)。

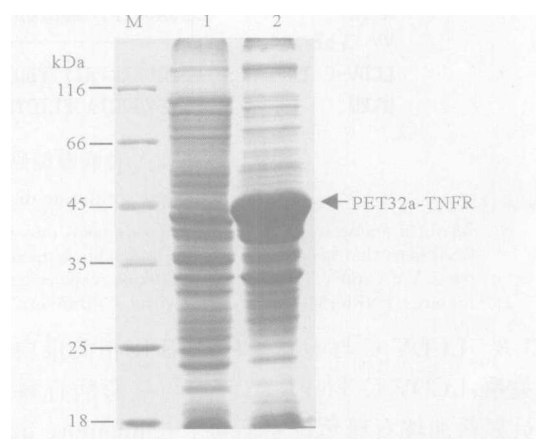


图 2 TNFR 类似物表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed TNFR
M, protein marker; 1, pET32a-TNFR (uninduced); 2, pET32a-TNFR (induced)

2.3 LCDV-C TNFR 类似物的计算机辅助分析结果

2.3.1 LCDV-C TNFR 类似物的序列特征:对 PCR 扩增产物进行测序,结果表明 LCDV-C TNFR 类似物(GenBank Accession No: YP_073525)全长 834bp,编码一个含 278 个氨基酸的多肽。该多肽与牙鲆 TNFR II 的同源性为 34%。

2.3.2 LCDV-C 与其他病毒 TNFR 的功能结构域特点:肿瘤坏死因子受体超家族的一个典型特征是在 N 端具有多个半胱氨酸富集区(cysteine-rich domains, CRDs),每个 CRD 含有 6 个半胱氨酸^[5]。在

选择的四株病毒编码的 TNFR 成员中,VV CrmE、EV TNFR、HVEM、M-T2 与 LCDV-C TNFR 的氨基酸序列同源性分别为 34%、28%、26%、26%。序列比对结果显示:LCDV-C TNFR 类似物在 N 端从 37 位至 142 位氨基酸为富含半胱氨酸的区域,共有 16 个半胱氨酸的位置和其他病毒编码的 TNFR 基因具有一致性(图 3)。而这五株病毒编码的 TNFR 除了在 N 端的 CRDs 功能区域比较保守之外,C 端的同源性却很低。

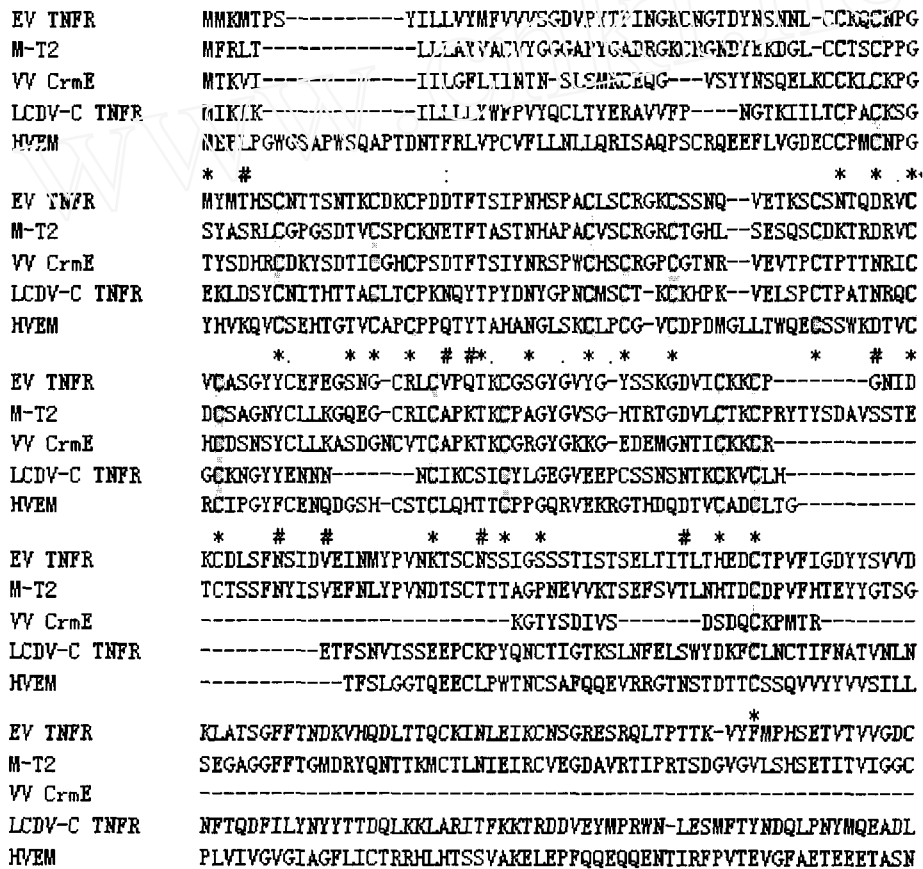


图 3 5 种病毒编码的 TNFR 相关蛋白氨基酸序列比对
Fig. 3 Multiple amino acids sequence alignment of TNFR from 5 viruses.

Identical amino acids are denoted by asterisks, dots indicate the position of well conserved amino acids. Dashes indicate artificial gaps that have been introduced to achieve maximal amino acid matching. The conserved cysteines are marked by shadows. VV CrmE, Vaccinia virus cytokine response modifier E; HVEM, Herpes virus entry mediator; EV TNFR, Ectromelia virus TNFR; M-T2, Myxoma virus T2 protein; LCDV-C TNFR, Lymphocystis disease virus TNFR homolog.

2.3.3 LCDV-C 与不同物种 TNFR 相关蛋白的同源关系:LCDV-C TNFR 类似物与虹彩病毒科其他成员如新加坡石斑鱼虹彩病毒^[6](Singapore group-er iridovirus, SGIV)、LCDV-1、LCDV-2、鳎鱼传染性脾肾坏死病毒^[7](infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)和真鲷虹彩病毒^[8](rock bream iridovirus, RBIV)编码的肿瘤坏死因子受体相关蛋白的同源性分别为 17.3%、13.1%、11.7%、

11.2%、5.8%,而与自然宿主牙鲆 TNFR II 的同源性达到 34%。

3 讨论

通过 PCR 从 LCDV-C 基因组 DNA 中扩增得到完整的 TNFR 类似物基因,原核表达得到了相应的表达产物。为进一步研究其在病毒与宿主相互作用中的功能提供了条件。

LCDV-C 与其它的大 DNA 病毒类似,基因组不仅编码病毒复制必须的酶,如胸苷酸合酶基因^[9],还编码结构蛋白以及一些细胞基因的同源物,如 TNFR、Bcl-2 等。对 LCDV-C TNFR 的计算机辅助分析表明它含有 TNFR 超家族成员普遍具有的半胱氨酸富集区功能结构域,而且与 M-T2 基因的功能位点即半胱氨酸的位置具有一致性。对 M-T2 的突变研究表明在 N 末端的两个 CRDs 对于病毒抗凋亡作用是必需的^[10]。由此推测 LCDV-C TNFR 类似物可能在病毒免疫逃避过程中起着重要的作用。

LCDV-C 是在中国分离的脊椎动物虹彩病毒,与同为淋巴囊肿病毒属成员的欧美分离株 LCDV-1、LCDV-2 比较,LCDV-C TNFR 类似物与 LCDV-1、LCDV-2 的同源性低于 20%,但是后两者编码的 TNFR 之间的同源性高达 66%^[4];另外,LCDV-C TNFR 类似物与虹彩病毒科其他属的成员如 SGIV、ISKNV、RBIV 编码的 TNFR 相关蛋白的同源性也很低,最低仅为 5.8%。由此推测,这可能是因病毒来源于不同宿主,或是因病毒受地域条件影响的缘故。

病毒编码宿主基因同源物的这种现象,在其它大 DNA 病毒中也存在。而且已有研究揭示,病毒在与宿主的共进化过程中,所编码的宿主基因同源物能够干扰宿主的免疫系统,从而有利于病毒在宿主体内的增殖与复制^[11]。LCDV-C TNFR 类似物与自然宿主牙鲈 TNFR II 的同源性为 34%,高于与其它虹彩病毒成员的同源性。这进一步佐证了“LCDV-C TNFR 类似物与宿主来源有关”的推测。

因此,进一步研究 TNFR 类似物的功能及与宿主细胞的相互作用,有助于了解 LCDV 是如何逃避宿主免疫识别,进而可阐明病毒导致宿主形成淋巴

囊肿的病变过程与机理。

参考文献

- [1] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, *et al.* Infection and propagation of lymphocystis virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines [J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 57: 27-34.
- [2] Zhang Q Y, Xiao F, Xie J, *et al.* Complete Genome Sequence of Lymphocystis Disease Virus (LCDV-C) Isolated from China [J]. *J Virol*, 2004, 78: 6982-6994.
- [3] McFadden G, Murphy P M. Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3: 371-378.
- [4] Essbauer S, Fischer U, Bergmann S, *et al.* Investigations on the ORF 167L of Lymphocystis Disease Virus (Iridoviridae) [J]. *Virus Genes*, 2004, 28: 19-39.
- [5] McFadden G, Lalani A, Everett H, *et al.* Virus-encoded receptors for cytokines and chemokines [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1998, 9: 359-368.
- [6] Song W J, Qin Q W, Qiu J, *et al.* Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis [J]. *J Virol*, 2004, 78: 12576-12590.
- [7] He J G, Deng M, Weng S P, *et al.* Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. *Virology*, 2001, 291: 126-139.
- [8] Do J W, Moon C H, Kim H J, *et al.* Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus [J]. *Virology*, 2004, 325: 351-363.
- [9] 赵哲,张奇亚. 中国淋巴囊肿病毒胸苷酸合酶基因结构特点及分析[J]. *中国病毒学*, 2004, 19: 602-606.
- [10] McFadden G, Schreiber M, Sedger L. Myxoma T2 protein as a model for poxvirus encoded TNF receptor homologs [J]. *J Neuroimmunol*, 1997, 72: 119-126.
- [11] Seet B T, Johnston J B, Brunetti C R, *et al.* Poxvirus and immune evasion[J]. *Annu. Rev. Immunol*, 2003, 21: 377-423.