

研究报告

囊泡相关膜蛋白 A 调控牛病毒性腹泻病毒复制

史慧君*, 袁圆圆, 郭妍婷, 陈俊贞, 杨莉, 冉多良, 付强

新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

史慧君, 袁圆圆, 郭妍婷, 陈俊贞, 杨莉, 冉多良, 付强. 囊泡相关膜蛋白 A 调控牛病毒性腹泻病毒复制[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 635-644

Shi Huijun, Yuan Yuanyuan, Guo Yanting, Chen Junzhen, Yang Li, Ran Duoliang, Fu Qiang. Regulation of bovine viral diarrhea virus replication by vesicle-associated membrane protein A[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 635-644

摘要:【背景】牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)是致犊牛腹泻的重要病原之一,而目前 BVDV 与宿主因子互作机理研究较少,成为限制 BVDV 防控的重要原因。【目的】阐明囊泡相关膜蛋白 A (vesicle-associated membrane protein A, VAPA)对 BVDV 复制的影响。【方法】根据 GenBank 中 VAPA 基因,使用 Benchling 和 CHOPCHOP 等平台设计靶向 VAPA 的向导 RNA (small guide RNA, sgRNA),融合后克隆至慢病毒 lentiCRISPR v2 载体中,包装慢病毒后感染牛肾细胞(Madin-Darby bovine kidney, MDBK),使用嘌呤霉素连续筛选 5 代,使用 Western Blot 检测 VAPA 蛋白敲除(knockout, KO)情况;BVDV 感染 VAPA KO 细胞不同时间后,收集细胞提取总 RNA,并将等质量的 RNA 反转录成 cDNA,使用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)和免疫荧光分析(immunofluorescence assay, IFA)分别检测 BVDV 5'-非翻译区(untranslated region, UTR) mRNA 水平和双链 RNA (double strand RNA, dsRNA)积累水平,于 BVDV 感染后不同时间观察致细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况,并收集子代病毒液,使用 Reed-Muench 法计算子代病毒滴度变化。接种等量 VAPA KO 和乱码序列对照 scramble 细胞后不同时间进行活细胞计数,检测 VAPA KO 是否影响细胞活性。【结果】慢病毒感染后使用嘌呤霉素筛选,Western Blot 检测 VAPA 蛋白明显降低,成功获得 VAPA KO 细胞;与对照 scramble 细胞相比,BVDV 感染 VAPA KO 细胞后 5'-UTR mRNA 水平和 dsRNA 积累量均显著性降低,BVDV 感染造成的 CPE 明显推迟并减轻,子代病毒滴度在 12 h 和 36 h 显著下降,在 48 h 极显著下降;与 scramble 细胞相比,VAPA KO 细

基金项目: 国家自然科学基金(31902271, 31760742); 新疆维吾尔自治区天山青年计划项目(2018Q069); 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2018Y019); 新疆维吾尔自治区天山创新团队(2020D14005); 新疆维吾尔自治区百名博士引进计划项目

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31902271, 31760742); Tianshan Youth Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018Q069); Scientific Research Program of Colleges and Universities in Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJEDU2018Y019); Tianshan Innovation Team of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2020D14005); Introduction Plan of 100 Doctors in Xinjiang Uygur Autonomous Region

*Corresponding author: E-mail: shihuijunmm@qq.com

Received: 2021-07-03; Accepted: 2021-09-04; Published online: 2021-12-01

胞活性未受影响。【结论】VAPA KO 后显著性抑制 BVDV 复制, 为 BVDV 防控新技术的建立提供重要靶标。

关键词: 囊泡相关膜蛋白 A; 牛病毒性腹泻病毒; 复制水平; 双链 RNA; 病毒滴度

Regulation of bovine viral diarrhea virus replication by vesicle-associated membrane protein A

SHI Huijun^{*}, YUAN Yuanyuan, GUO Yanting, CHEN Junzhen, YANG Li, RAN Duoliang, FU Qiang

College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is among the important pathogens of calf diarrhea. However, there are few studies on the interaction mechanism between BVDV and host factors, which impedes the prevention and control of BVDV. [Objective] This study aims to explore the effect of vesicle-associated membrane protein A (VAPA) on BVDV replication. [Methods] According to the information of VAPA gene in GenBank, we designed the small guide RNA (sgRNA) targeting VAPA using Benchling and CHOPCHOP, cloned it to lentiCRISPR v2 vector, and then packed the lentivirus. Afterward, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells were transfected with the lentivirus, followed by puromycin screening for 5 generations and detection of VAPA knockout (KO) by Western Blot. Total RNA was extracted from VAPA KO cells at different time after BVDV infection and then reverse-transcribed into cDNA. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and immunofluorescence assay (IFA) were used to detect the 5'-untranslated region (UTR) mRNA level and the accumulation of double strand RNA (dsRNA) of BVDV, respectively. Cytopathic effect (CPE) was observed at different time after BVDV infection. Progeny virus titer was calculated with the Reed-Muench method. The same number of VAPA KO and scramble control cells were inoculated and then the living cells were counted at different time after virus infection to detect whether VAPA KO affected the cell viability. [Results] After lentivirus infection and puromycin screening, the results of Western Blot showed that VAPA protein was significantly decreased and thus VAPA KO cells were successfully established. The 5'-UTR mRNA level and dsRNA accumulation in VAPA KO cells infected with BVDV were significantly reduced compared with those of the scramble control cells. The CPE caused by BVDV infection was significantly delayed and attenuated and the titer of progeny virus decreased significantly at 12 h and 36 h and highly significantly at 48 h. The viability of VAPA KO cells was not affected compared with that of the scramble control cells. [Conclusion] VAPA KO can significantly inhibit BVDV replication. Therefore, this study provides an important target for the prevention and control of BVDV.

Keywords: vesicle-associated membrane protein A (VAPA); bovine viral diarrhea virus; replication level; double strand RNA; virus titer

牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus), BVDV 颗粒呈球形, 外被囊膜, 为对称二十面体。BVDV 是一种单股、正链、RNA 病毒, 主要感染牛、羊和猪等家畜及鹿、羚羊、骆驼和野猪等野生动物^[1]。BVDV 感染幼畜常造成腹泻、急性或慢性黏膜病、病毒血症、免疫耐受和持续性感染、免疫抑制、繁殖障碍等症状, BVDV 感染早期妊娠母牛常造成死胎、流产、产木乃伊胎和畸形胎等, 出生的犊牛再次感染同种 BVDV 后导致严重的腹泻黏膜病, 致死率高达 100%^[2]。BVDV 呈全球流行趋势, 我国 BVDV 感染率远远高于亚洲多数国家和欧美国家, 是严重危害我国养殖业的传染病之一^[3]。另外, BVDV 还常污染牛源生物制品, 如血清、冻精、胚胎、疫苗等, 导致畜牧业生产及其相关商业领域的严重经济损失^[4]。

囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane protein, VAMP)是一种约 13 kDa 的蛋白质, 主要位于突触小泡(synaptic vesicle)、致密核心颗粒(dense core granules)、突触样的微囊泡(synaptic-like microvesicles)等部位^[5]。VAMP 包括囊泡相关膜蛋白 A (vesicle-associated membrane protein A, VAPA)和囊泡相关膜蛋白 B (VAPB)等, 其中 VAPA 也称为 VAP-33, 是一种 II 型膜蛋白, 位于质膜和细胞内囊泡中, 具有面向细胞质的大的 N 末端结构域和一个小的 4-氨基酸 C 末端^[6]。VAPA 主要参与内质网和其他细胞器之间紧密连接的脂质双层的形成, 也可能与细胞骨架有关^[7-8]。VAPA 在囊泡运输、膜融合、蛋白质复合物组装和细胞运动中发挥作用。研究报道称, VAPA 通过激活 MAPK 信号通路参与多种生物过程的调控, 包括致癌基因的激活和肿瘤的发生^[9]。

本实验室前期使用邻近生物素化蛋白标记技术获取与 BVDV 离子通道蛋白 p7 互作的蛋

白, 通过质谱鉴定及免疫共沉淀验证发现 VAPA 与 BVDV p7 相互作用, BVDV p7 属于病毒孔蛋白(Viroporin)家族, 在脂质双分子层膜上形成通道蛋白且具有离子通道的活性, 在病毒复制周期中起关键作用^[10]。然而 VAPA 是否也参与 BVDV 复制过程尚不清楚。本研究通过 CRISPR/Cas9 敲除 VAPA, BVDV 感染不同时间后结合实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)、免疫荧光法 (immunofluorescence assay, IFA)、致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)和病毒滴度等方法检测 BVDV 复制情况, 探究 VAPA 影响 BVDV 复制的作用, 为 BVDV 防控新方法的建立提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

HEK-293T 和 MDBK 细胞, 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 大肠杆菌感受态细胞 Stbl3, 北京博迈德基因技术有限公司; BVDV 毒株 TC 由新疆农业大学传染病实验室冉多良教师惠赠^[11]。

1.2 主要试剂和仪器

lentiCRISPR v2、pSPAX2 和 2 μ g pMD2.G 载体, Addgene 公司; 兔抗 dsRNA 单克隆抗体 J2, SCICONS 公司; CoraLite488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)、兔抗 VAPA 多克隆抗体和 HRP 标记驴抗兔 IgG(H+L)抗体, Proteintech 公司; Trypsin 消化液、孕马血清 HS、ECL 显色试剂盒、嘌呤霉素、聚凝胺、明胶、T4 DNA Ligase、TRIzol 细胞裂解液和 DNase/RNase-free ddH₂O, Thermo Fisher Scientific 公司; cDNA 第一条链合成试剂盒和 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒, Qiagen 公司; BsmB I, NEB 公司; 聚醚酰亚胺(polyetherimide, PEI), 上海起发实验试剂有限公司; Tris-HCl-吐温-20 缓冲液 TBST、

小牛血清白蛋白 BSA、山羊血清、BCA 蛋白定量试剂盒、Western 细胞裂解液和苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 上海碧云天生物技术有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

NanoDrop 2000 微量核酸测定仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 低温离心机, Eppendorf 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, ABI 公司。

1.3 sgRNA 设计及合链

根据 GenBank 数据库中 VAPA 基因(gene ID:516024)序列, 使用 Benchling (www.benchling.com)和 CHOPCHOP (V3, www.chopchop.cbu.uib.no)设计靶向 VAPA 基因的 sgRNA 和乱码序列对照 scramble sgRNA, sgRNA 序列见表 1, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成引物。将 sgRNA-F 和 sgRNA-R 稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$ 后各取 10 μL 混匀后进行融合, 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度降至 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 构建慢病毒载体

使用 *BsmB* I 酶切 lentiCRISPR v2 载体, PCR 反应体系: lentiCRISPR v2 3.0 μg 、10 \times NEB 3.1 buffer 3.0 μL 、*BsmB* I (10 U/ μL) 1.0 μL 、ddH₂O 补足至 30.0 μL ; PCR 反应条件: 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h、85 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 s。酶切反应完成后使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒并参照试剂盒说明书回收 12 000 bp lentiCRISPR v2 载体片段。使用 T4 DNA Ligase 连接 lentiCRISPR v2 与 sgRNA, 连接体系为: T4 DNA Ligase

(400 U/ μL) 1.0 μL , sgRNA 2.0 μL , lentiCRISPR v2 50.0 ng, 10 \times Ligase buffer 2.0 μL , ddH₂O 补足至 20.0 μL , 连接条件为 16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日将连接产物转化至 50 μL 大肠杆菌感受态细胞 Stbl3, 涂布至氨苄青霉素(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)抗性的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜; 次日挑取单克隆菌落, 经扩大培养后送至苏州金唯智生物科技有限公司测序鉴定, 构建成 lentiCRISPR v2-VAPA sgRNA/scramble 质粒。

1.5 慢病毒包装和感染

将 HEK-293T 细胞接种至 0.1%明胶包被的 6 cm 细胞培养皿中, 待细胞密度到 90%时转染质粒。分别取 200 μL dulbecco 改良 eagle 培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、4 μg lentiCRISPR v2-VAPA sgRNA/scramble 质粒、4 μg pSPAX2 和 2 μg pMD2.G, 振荡混匀后加入 1 mg/mL 的 PEI 50 μL , 振荡混匀后静置 10 min; 弃去细胞培养液, 加入 2 mL DMEM 和上述混合液, 转移至细胞培养箱中孵育 4 h 后更换成正常细胞培养液, 转染 48 h 后收集慢病毒悬液, 使用 0.45 μm 滤器过滤后获得 VAPA sgRNA 和 scramble 慢病毒。

将约 5×10^5 个 MDBK 细胞接种至 6 cm 细胞培养皿, 加入 2 mL 正常细胞培养液、2 mL 慢病毒悬液和 4 μL 的 8 mg/mL 聚凝胺; 置于细胞培养箱中孵育 18 h 后换液; 继续培养 48 h 后使用嘌呤霉素(终浓度 3 mg/mL)连续筛选 5 代次, 获得阳性细胞。

1.6 Western Blot 检测 VAPA KO 情况

取 5×10^5 个阳性细胞, 弃掉细胞培养液, 加入 500 μL Western 细胞裂解液和 PMSF (终浓度 1 mmol/L), 冰浴 10 min 后使用细胞刮刮取细胞, 转移至离心管中 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 收集上清, 并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 80 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 操作,

表 1 sgRNA 的序列信息

Figure 1 Information of sgRNA sequences

| Name | Sequence (5'→3') |
|----------------|--|
| VAPA sgRNA | F: CACCGGAAGAGAACCGGCTCTCTGA R: AAATCAGGAGCCGGTTCTCTTCC |
| Scramble sgRNA | F: CACCGCACTACCAGAGCTAACTCA R: AAATGAGTTAGCTCTGGTAGTGC |

120 V 电泳 2 h, 400 mA 将蛋白转印至醋酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉常温封闭 1 h, 兔抗 VAPA 多克隆抗体(1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤后加入 HRP 标记驴抗兔 IgG(H+L)抗体(1:5 000 稀释), 常温下孵育 1 h 后使用 ECL 显色试剂盒进行显色曝光。

1.7 RT-qPCR 检测 BVDV mRNA 水平变化

分别接种 5×10^5 个 scramble 和 VAPA KO 细胞至 6 cm 细胞培养皿中, 待细胞密度达到 70% 时, 加入 10 000 TCID₅₀ BVDV 孵育 2 h 后更换培养液为含 5% HS 的细胞培养液, 此时记为 BVDV 感染 0 h; 于 BVDV 感染后 12、24、36 和 48 h 时收集细胞及培养液, 加入等体积的 TRIzol 细胞裂解液振荡混匀后提取总 RNA, 使用 NanoDrop 2000 微量核酸测定仪测定总 RNA 浓度, 取 500 ng RNA 反转录成 cDNA, 按照 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 RT-qPCR 检测 BVDV 5'-UTR mRNA 水平, 具体的 RT-qPCR 引物、标准曲线参照田瑞鑫等^[12]报道。

1.8 免疫荧光检测 BVDV dsRNA 积累量

分别接种 5×10^4 个 scramble 和 VAPA KO 细胞至铺有细胞爬片的 24 孔细胞培养板中, 待细胞密度达到 70% 时, 加入 10 000 TCID₅₀ BVDV 孵育 2 h 后更换培养液; 分别于感染后 12、24、36、48 h 时弃掉培养液, 加入 4%多聚甲醛固定 30 min, 使用 0.5% Triton X-100 处理 30 min; 加入封闭液(1% BSA、0.5% Triton X-100、1%山羊血清)封闭 1 h; 加入兔抗 dsRNA 单克隆抗体 J2 稀释液(1:1 200 稀释), 4 °C 孵育过夜; 使用 TBST 洗涤后, 加入二抗 CoraLite488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (1:200 稀释), 室温孵育 1 h; 使用抗荧光淬灭剂 PVP 封片液封片, 使用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光数量及分布并拍照记录。

1.9 BVDV 感染细胞 CPE 变化检测

分别接种相同数量的 scramble 和 VAPA KO 细胞至 6 孔板中, 当细胞密度达到 70% 时弃去细胞培养液, 加入 10 000 TCID₅₀ BVDV 感染细胞 2 h 后, 更换含 5% HS 的细胞培养液继续培养, 于病毒感染 12、24、36 和 48 h 时使用倒置显微镜观察细胞形态和 CPE 情况。

1.10 BVDV TCID₅₀ 测定

细胞接种、病毒感染等同 1.8, 分别于病毒感染后 12、24、36、48 h 反复冻融后 8 000 r/min 离心 5 min 收集病毒悬液; 将 MDBK 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞密度约 70% 接种 10 倍梯度稀释的 BVDV 病毒液(10^0 – 10^{-8}), 每个稀释梯度做 8 个重复, 设立正常细胞为阴性对照; 接毒孵育 2 h 后弃掉病毒液, 每孔加入 100 μ L 含 5% HS 的细胞培养液, 培养 6 d 后观察 CPE 情况, 统计 CPE 孔, 使用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀^[13]。

1.11 细胞活性检测

分别接种 2×10^5 个 VAPA KO 和 scramble 细胞至 6 孔细胞培养板中, 加入等量的细胞培养液后继续培养, 分别于 12、24、36、48 和 72 h 弃掉培养液, 加入 Trypsin 消化液孵育 2 min 后转移至离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后经稀释加入台盼蓝溶液染色, 使用细胞计数板进行活细胞计数, 每个时间点平行重复 4 个孔。

1.12 数据统计

使用 SPSS 19.0 对试验数据进行独立样本的 *t* 检验分析, 结果以平均值 \pm 标准误表示, $P < 0.05$ 表示数据差异显著, $P < 0.01$ 表示数据差异极显著。

2 结果与分析

2.1 酶切载体 lentiCRISPR v2 结果

使用限制性内切酶 BsmB I 酶切载体

lentiCRISPR v2, 结果如图 1 所示, lentiCRISPR v2 酶切后出现 2 个 DNA 片段, 大小约为 12 987 bp 和 1 886 bp, 与预期结果一致。

2.2 Western Blot 鉴定 VAPA KO 细胞

包装慢病毒后感染 MDBK 细胞, 于感染后使用嘌呤霉素连续筛选 5 代次, 获得阳性细胞, Western Blot 检测 VAPA 蛋白的敲除情况。结果如图 2 所示, 与对照 scramble 相比, VAPA KO 细胞中的 VAPA 蛋白表达量显著性降低, 表明成功获得 VAPA KO 细胞。

2.3 RT-qPCR 检测 BVDV mRNA 表达情况

BVDV 感染 scramble 和 VAPA KO 细胞不同

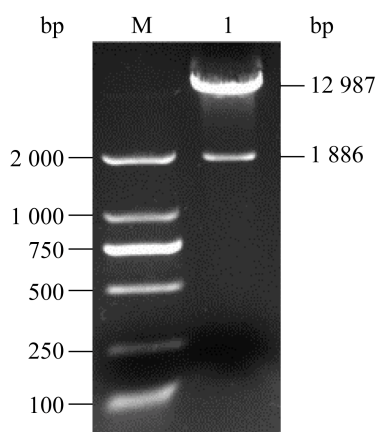


图 1 lentiCRISPR v2 载体酶切结果

Figure 1 Digestion of lentiCRISPR v2 vector. M: DL2000 DNA marker; 1: Digested lentiCRISPR v2 vector.

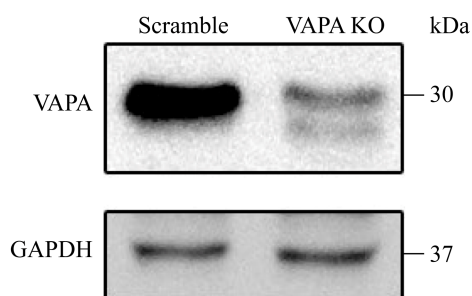


图 2 Western Blot 检测 VAPA 表达情况

Figure 2 Determine of VAPA expression levels by Western Blot.

时间, 提取总 RNA 并反转录成 cDNA, RT-qPCR 检测 BVDV mRNA 表达情况。结果如图 3 所示, 与对照 scramble 相比, BVDV 感染 VAPA KO 细胞 12、24、36、48 h 后 BVDV 5'-UTR mRNA 极显著下降, 并且在感染 VAPA KO 细胞 24 h 后 BVDV mRNA 表达水平趋于稳定。

2.4 免疫荧光检测 BVDV dsRNA 含量变化

BVDV 感染 VAPA KO 和 scramble 细胞不同时间后, 使用抗 dsRNA 抗体进行免疫荧光染色检测 BVDV dsRNA 含量变化。结果如图 4 所示, 与对照 scramble 相比, BVDV 感染 VAPA KO 细胞 12、24、36 和 48 h 时, 细胞中绿色荧光标记的 dsRNA 量明显减少, 表明敲除 VAPA 可抑制 BVDV dsRNA 含量的积累。

2.5 BVDV 感染后 CPE 情况检测

BVDV 感染 scramble 和 VAPA KO 细胞, 分别于感染后 12、24、36 和 48 h 使用倒置显微镜观察 CPE 变化。结果如图 5 所示, BVDV 感染 scramble 细胞 24 h 后细胞形态开始发生明显变化, 细胞内出现小的空斑, 细胞变圆、皱缩、聚集、死亡并开始脱落, 感染 48 h 后细胞数量明显减少, 出现明显 CPE 现象; 相较于对照 scramble 细胞, BVDV 感染 VAPA KO 细胞相同

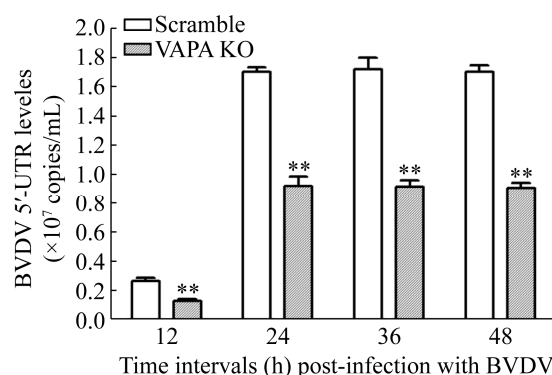


图 3 RT-qPCR 检测 BVDV 5'-UTR mRNA 水平

Figure 3 Detection of BVDV 5'-UTR mRNA levels by RT-qPCR. **: $P<0.01$.

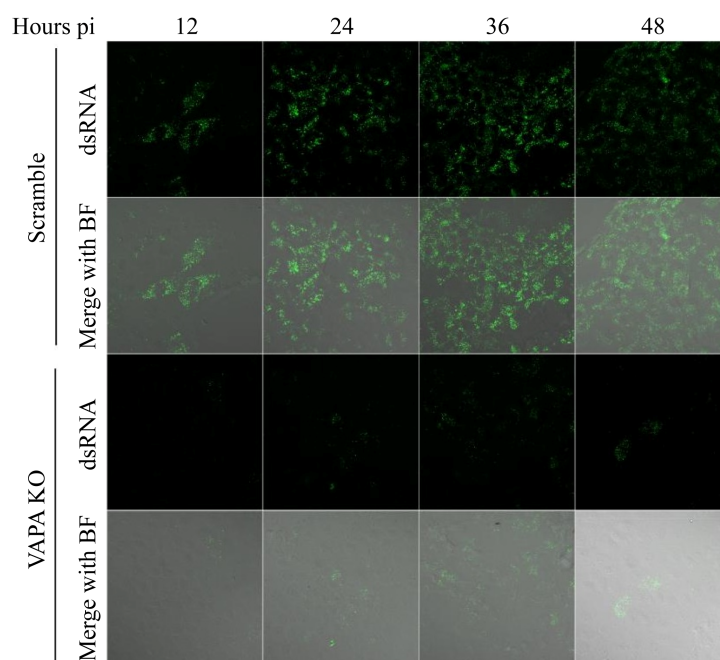


图 4 免疫荧光染色检测 BVDV dsRNA 积累水平

Figure 4 Detection of BVDV dsRNA accumulation by immunofluorescence staining.

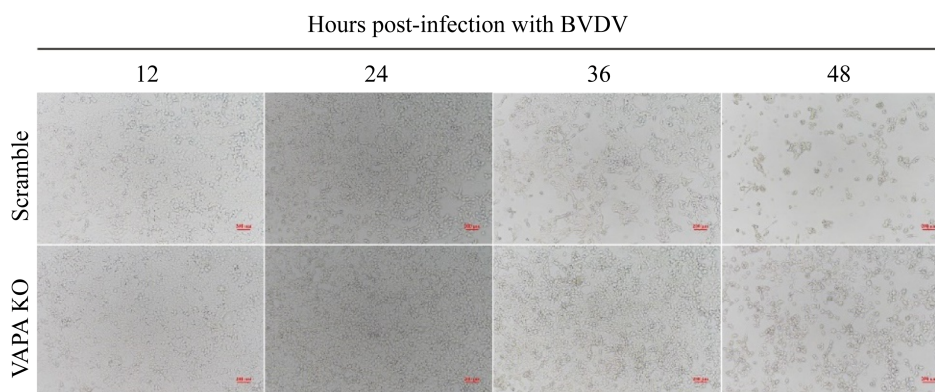


图 5 BVDV 感染不同时间时 CPE 情况检测

Figure 5 Detection of CPE at different time intervals post-infection with BVDV.

时间后 CPE 出现时间明显延迟, CPE 现象明显减弱, 表明 VAPA KO 抑制 BVDV 在细胞内复制, 减轻 BVDV 造成的 CPE 情况。

2.6 BVDV 感染后病毒滴度测定

于 BVDV 感染 scramble 和 VAPA KO 细胞后不同时间收集病毒液, 使用 Reed-Muench 法

测定子代病毒 $TCID_{50}$ 。结果见图 6 所示, 与对照 scramble 细胞相比, BVDV 感染 VAPA KO 细胞 12 h 和 36 h 时子代病毒滴度显著下降, 48 h 时极显著下降, 表明敲除 VAPA 基因减少了子代病毒颗粒的形成与释放, 抑制了 BVDV 胞内复制。

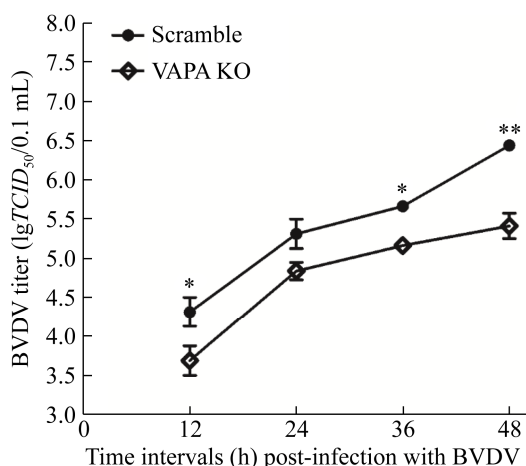


图6 BVDV感染不同时间后子代病毒滴度测定
Figure 6 Detection of progeny virus titer at different time intervals post-infection with BVDV. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.7 VAPA 敲除对细胞活性的影响

为检测 VAPA 敲除是否影响细胞活性,分别接种等量的 VAPA KO 和 scramble 细胞,待接种后不同时间点进行活细胞计数。结果如图 7 所示,与 scramble 对照相比, VAPA KO 细胞的活细胞数量未出现明显变化,仅在接种 36 h 时 VAPA KO 活细胞数量显著高于 scramble 细胞,表明 VAPA 敲除未影响细胞活性。

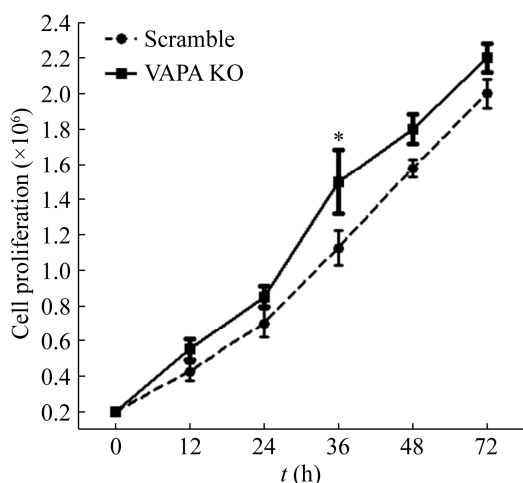


图7 细胞活性检测
Figure 7 Detection of cell viability. *: $P < 0.05$.

3 讨论与结论

病毒是一种严格的细胞内寄生、无完整细胞结构的微生物,主要依赖于宿主细胞代谢系统完成其生命周期^[14]。病毒侵入宿主细胞的方式包括注射式侵入、膜融合和细胞内吞等方式,其中囊膜病毒多采用膜融合或细胞内吞等途径侵入宿主细胞^[15]。囊膜病毒释放也依赖于囊泡转运其核衣壳组分至宿主细胞膜,以出芽方式包裹宿主细胞膜和病毒囊膜蛋白,形成子代囊膜病毒^[16]。VAPA 是一种囊泡相关膜蛋白,主要存在于突触小泡、致密核心颗粒和突触样的微囊泡等部位。研究报道将 VAPA 定义为内质网蛋白,在自噬体发生过程中起重要作用^[17]。然而关于 VAPA 是否影响病毒复制的研究报道较少。基于课题组前期研究发现 VAPA 与 BVDV p7 蛋白互作,可能参与 p7 蛋白成熟转运至细胞膜形成离子孔道^[10],本研究着重研究 VAPA 如何调控 BVDV 复制,结果发现 VAPA 敲除后影响 BVDV 5'-UTR mRNA 水平和 dsRNA 积累,减弱 BVDV 感染造成的 CPE,降低子代病毒滴度,进而表明 VAPA 敲除直接影响 BVDV 复制。然而 VAPA 是否会参与 p7 蛋白形成离子孔道尚不清楚,亟待研究探索。本研究的理论成果将为该机制研究提供重要的参考依据。VAPA 主要参与突触小泡、致密核心颗粒、突触样的微囊泡等形成、成熟和循环等途径,在细胞新陈代谢等中发挥重要作用,而 VAPA 敲除是否通过影响细胞活性造成细胞死亡或凋亡,进而减少细胞数量等方式影响 BVDV 复制。本研究发现 VAPA 敲除未影响细胞活性,表明 VAPA 敲除并不是通过改变细胞活性而抑制 BVDV 复制,具体的分子机制尚不清楚,亟待阐明,该研究成果将为防控 BVDV 提供重要依据和作用靶点。

囊膜相关蛋白包括 VAPA、VAPB 和 VAMP3 等, 其中 VAMP3 在胡新艳^[18]研究报道中捕获到该蛋白能与紧密连接蛋白 occludin 互作, 进而有利于 BVDV 吸附和内化等, 促进 BVDV 复制。结合胡新艳对 VAPA 和 VAMP3 调控 BVDV 复制的研究结果, 可以推测囊膜相关蛋白家族成员在 BVDV 复制过程中起到非常关键的作用, 可能参与 BVDV 侵入宿主细胞形成内体, 也可能参与 BVDV 包装、成熟和释放过程中囊泡转运。

REFERENCES

- [1] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy-eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses[J]. *Viruses*, 2005, 83: 988-992
- [2] Xue WZ, Mattick D, Smith L. Protection from persistent infection with a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1b strain by a modified-live vaccine containing BVDV types 1a and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, parainfluenza 3 virus and bovine respiratory syncytial virus[J]. *Vaccine*, 2011, 29(29/30): 4657-4662
- [3] Nelson DD, Duprau JL, Wolff PL, Evermann JF. Persistent bovine viral diarrhea virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the mountain goat (*Oreamnos americanus*)[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1415
- [4] Laassri M, Mee ET, Connaughton SM, Manukyan H, Gruber M, Rodriguez-Hernandez C, Minor PD, Schepelmann S, Chumakov K, Wood DJ. Detection of bovine viral diarrhoea virus nucleic acid, but not infectious virus, in bovine serum used for human vaccine manufacture[J]. *Biologicals*, 2018, 55: 63-70
- [5] Calakos N, Scheller RH. Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(40): 24534-24537
- [6] Nishimura Y, Hayashi M, Inada H, Tanaka T. Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 254(1): 21-26
- [7] Weir ML, Xie H, Klip A, Trimble WS. VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286(3): 616-621
- [8] Wyles JP, McMaster CR, Ridgway ND. Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (vap-a) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(33): 29908-29918
- [9] Deng Q, Zhang JW, Wang Z, Zhang SP, Zhi F, Liang H. Vesicle-associated membrane protein-associated protein A is involved in androgen receptor trafficking in mouse Sertoli cells[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 2018: 4537214
- [10] 郭妍婷. 牛病毒性腹泻病毒离子通道蛋白 p7 的互作蛋白筛选及功能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2021
- Guo YT. Screening and functional research of interacting proteins of bovine viral diarrhea virus ion channel protein p7[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- [11] 梁霄勇, 季新成, 冉多良. 牛病毒性腹泻病毒 TC 株的分离鉴定及 E0 基因的序列分析[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(7): 36-40
- Liang XY, Ji XC, Ran DL. Isolation and identification of bovine viral diarrhea virus TC strain and sequence analysis of E0 gene[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 48(7): 36-40 (in Chinese)
- [12] 田瑞鑫, 李胜男, 胡新艳, 陈俊贞, 郭妍婷, 赵新艳, 李祯, 董文丽, 如先古丽, 李淑娴, 等. 牛 miRNA-29b 影响牛病毒性腹泻病毒感染 BALB/c 小鼠的作用[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(2): 264-271
- Tian RX, Li SN, Hu XY, Chen JZ, Guo YT, Zhao XY, Li Z, Dong WL, Ru X, Li SX, et al. Effect of bovine miRNA-29b on bovine viral diarrhea virus infection in BALB/c mice[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(2): 264-271 (in Chinese)
- [13] Lei CF, Yang J, Hu J, Sun XL. On the calculation of $TCID_{50}$ for quantitation of virus infectivity[J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36(1): 141-144
- [14] 鲍美美, 杨恺, 元冰. 流感病毒和冠状病毒的细胞表面结合与内化[J]. *物理学报*, 2020, 69(20): 184-194
- Bao MM, Yang K, Yuan B. Influenza virus and coronavirus: cellular binding and internalization[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(20): 184-194 (in Chinese)
- [15] Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2011, 195(7): 1071-1082
- [16] Seo EJ, Leis J. Budding of enveloped viruses:

- interferon-induced ISG15-antivirus mechanisms targeting the release process[J]. *Advances in Virology*, 2012, 2012: 532723
- [17] Zhao Y, Liu N, Miao GY, Chen Y, Zhao HY, Zhang H. The ER contact proteins VAPA/B interact with multiple autophagy proteins to modulate autophagosome biogenesis[J]. *Current Biology*, 2018, 28(8): 1234-1245.e4
- [18] 胡新艳. 紧密连接蛋白 Occludin 影响牛病毒性腹泻病毒感染的作用机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2020
- Hu XY. Investigation on the mechanisms of tight junction protein Occludin affect bovine viral diarrhea virus infection[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2020 (in Chinese)

~~~~~  
(上接 p.605)

## 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 10 人时全部列出, 多于 10 人时列出前 10 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. *Cell*, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Cheng XY, Liu WW, Xu Y, Zhou NY. Screening and characterization of culturable hydrocarbon-degrading strains from the South and East China Seas[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 975-985 (in Chinese)
- 程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 周宁一. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 975-985
- [3] Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

## 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过计算机网络进入国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmcc.cn>)或国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到接受号(Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受享有自主知识产权的原创性论文, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。

(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn); 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>