网络出版时间:2020-08-13　11:14　　DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.02.003
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1107.002.html

鳜 AKT2 在传染性脾肾坏死病毒增殖中的作用

明　月[1,2],牛银杰[1],付小哲[1],刘礼辉[1],梁红茹[1],林　强[1],李宁求[1]

(1 中国水产科学研究院 珠江水产研究所,农业农村部渔用药物创制重点实验室/广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380;2 上海海洋大学 水产与生命学院,上海 201306)

[**摘　要**] 【目的】研究鳜 AKT2 (ScAKT2)在传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)增殖中的作用,为鳜 ISKNV 防控提供参考。【方法】克隆 *ScAKT2* 基因开放阅读框,构建原核表达载体,进行原核表达及蛋白纯化。用纯化后的 ScAKT2 重组蛋白免疫日本大耳兔后制备多克隆抗体,用间接 ELISA 法检测抗体的效价,用间接免疫荧光和 Western blot 法测定抗体的特异性。克隆鳜 *AKT2* 基因,构建过表达载体 pCMV-EGFP-ScAKT2,将其转染至 CPB 细胞系中构建 ScAKT2 过表达细胞系,用荧光显微镜检测转染效率,用 qRT-PCR 法及 Western blot 法分别测定 *ScAKT2* mRNA 水平和蛋白水平的表达,以鉴定 ScAKT2 过表达细胞系是否构建成功。将 ISKNV 接种至 ScAKT2 过表达细胞系中,用 qPCR 法及 Western blot 法分别测定 ISKNV 病毒拷贝数及 ISKNV-MCP 蛋白的表达,用 qRT-PCR 法测定 *ScIRF3*、*ScIRF7*、*ScMx*、*ScIL8*、*ScTRAF2* 和 *ScTRAF3* 等先天免疫因子 mRNA 水平的表达情况。【结果】PCR 扩增获得 1 400 bp 的 *AKT2* ORF 片段,成功构建了原核表达质粒,诱导表达出 72 ku 的重组蛋白。成功制备了 ScAKT2 多克隆抗体,抗体效价达 1∶256 000,纯化后质量浓度约为 10 mg/mL。成功构建了 pCMV-EGFP-ScAKT2 过表达载体和过表达 ScAKT2 的 CPB 细胞系,过表达 ScAKT2 CPB 细胞可极显著抑制 ISKNV 的增殖,能明显上调 *ScIRF3*、*ScIRF7*、*ScMx*、*ScIL8*、*ScTRAF2* 和 *ScTRAF3* 等先天免疫因子 mRNA 的表达水平。【结论】ScAKT2 通过上调先天免疫因子的表达抑制 ISKNV 的增殖,为鳜 ISKNV 防控提供了新的潜在靶点。

[**关键词**] 鳜;AKT2;传染性脾肾坏死病毒;病毒增殖

[**中图分类号**] S943.127.41^{+}9　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1671-9387(2021)02-0014-09

Role of *Siniperca chuatsi* AKT2 in proliferation of infectious spleen and kidney necrosis virus

MING Yue[1,2], NIU Yinjie[1], FU Xiaozhe[1], LIU Lihui[1], LIANG Hongru[1], LIN Qiang[1], LI Ningqiu[1]

(1 *Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture/Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong* 510380, *China*; 2 *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: 【Objective】This study investigated the role of *Siniperca chuatsi* AKT2 (ScAKT2) in the proliferation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV). 【Method】The *ScAKT2* gene open reading frame was cloned, and the prokaryotic expression vector was constructed for prokaryotic expression and protein purification. After purification, polyclonal antibodies were prepared after immunizing Japanese big ear rabbits with ScAKT2 recombinant protein, ELISA method was used to determine antibody titer, and

[收稿日期] 2019-12-31
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31872589);国家重点研发计划项目(2018YFD0900501,2019YDF0900105);广东省促进经济发展专项(海洋经济发展用途)(GDME-20181007);广东省农业产业技术体系创新团队项目(2019KJ141)
[作者简介] 明　月(1993－),女,甘肃平凉人,硕士,主要从事鱼病与免疫方面的研究。E-mail:987947884@qq.com
[通信作者] 李宁求(1978－),男,湖南长沙人,研究员,主要从事水产病害防治研究。E-mail:liningq@126.com

IFA method and Western blot method were used to detect antibody specificity. The *AKT*2 gene was also cloned to construct overexpression vector pCMV-EGFP-ScAKT2 transfected into CPB cell lines to construct overexpression cell lines. Fluorescence microscope was used to examine the transfection efficiency of the eukaryotic expression vector, and the qRT-PCR method and Western blot method were used to determine the expression of *ScAKT*2 mRNA and protein levels to identify whether the ScAKT2 overexpressing cell line was successfully constructed. Inoculating ISKNV into the ScAKT2 overexpressing cell line, qPCR method and Western blot method were used to determine ISKNV virus copy number and ISKNV-MCP protein expression, respectively. The qRT-PCR method was used to examine the mRNA expression of innate immune factors including *ScIRF*3, *ScIRF*7, *ScMx*, *ScIL*8, *ScTRAF*2 and *ScTRAF*3.【Result】PCR amplification obtained 1 400 bp of *AKT*2 ORF fragments and successfully constructed prokaryotic expression plasmids to induce the expression of 72 ku of recombinant proteins. ScAKT2 polyclonal antibody was successfully prepared with a titer of 1∶256 000 and a concentration of about 10 mg/mL after purification. CPB cell lines pCMV-EGFP-ScAKT2 overexpression vectors and overexpression ScAKT2 were successfully constructed. Overexpression of ScAKT2 CPB cells extremely significantly inhibited ISKNV proliferation and significantly upregulated the mRNA expression levels of innate immune factors including *ScIRF*3, *ScIRF*7, *ScMx*, *ScIL*8, *ScTRAF*2 and *ScTRAF*3.【Conclusion】ScAKT2 inhibited the proliferation of ISKNV by up-regulating the expression of innate immune factors. This study provides a new potential target for the prevention and control of ISKNV.

Key words: *Siniperca chuatsi*; AKT2; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); virus proliferative

鳜(*Siniperca chuatsi*)是我国重要的淡水名优养殖鱼类，具有较高的经济价值。近年来，高密度集约化养殖导致鳜鱼疾病频发，其中传染性脾肾坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)是危害我国鳜养殖的重要病原之一，其致病力强，致死率可达 90%以上，给鳜养殖业造成了巨大的经济损失[1-2]。因此，开展 ISKNV 致病机制研究对该病的防控具有重要意义。

蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)基因，即 *AKT*，是一种原癌基因，普遍存在于静息细胞的胞质中。AKT 分 AKT1、AKT2 和 AKT3 3 种亚型，其中 AKT2 是蛋白激酶 B 家族的主要亚型，具有丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr)激酶的活性[3]，是多种细胞过程的关键调控因子[4]。有研究表明，*AKT* 过表达可激活其下游多种效应因子，调节先天性免疫因子的表达而使其发挥抗病毒作用[5-6]。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus ，HBV)的 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)可激活原代肝细胞中的 AKT，抑制 HBX 介导的细胞凋亡，从而抑制乙型肝炎病毒的复制[7]。在猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染的早期，机体 AKT 被激活，抑制 PRRSV 介导的细胞凋亡，从而发挥其抗病毒作用[8]。水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV)感染时，机体 AKT 被活化，进而依赖 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4)途径发挥抗病毒功能[9]。感染仙台病毒(sendai virus, SeV)的宿主通过活化 AKT，激活干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)的表达，从而增强 β 干扰素(interferon-β, IFN-β)的表达而产生抗病毒效应[10]。可见，AKT 可以作为一个抗病毒靶标用于抗病毒机制的研究。

目前对于鳜 AKT2 在 ISKNV 感染过程中的作用仍不清楚，为此本研究克隆了鳜 *AKT*2 的开放阅读框并进行原核表达，制备重组 ScAKT2 多克隆抗体，构建鳜 *AKT*2 过表达的细胞系，研究 ScAKT2 在 ISKNV 增殖中的作用，以期为鳜 ISKNV 防控提供新的靶点。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　细胞、毒株、载体和试验动物　鳜脑组织细胞系 (Chinese perch brain cell line, CPB)[11]、ISKNV 毒株(QY20091015)[12]及 pET32a 和 pCMV-EGFP 载体，均由中国水产科学研究院珠江水产研究所农业农村部渔用药物创制重点实验室/广

东省水产动物免疫技术重点实验室保存;大肠杆菌(*E. coli*) DH5a 和 BL21(DE3),购自 TaKaRa(大连)公司。日本大耳兔,购于山东恒远养殖基地。

1.1.2 试 剂 L-15 培养基、胰蛋白酶、血清和 Hanks 液,购于 Gibco (美国)公司;Trizol 试剂,购于 Invitrogen(美国)公司;海洋动物基因组提取试剂盒,购于天根生化科技(北京)有限公司;Titanium One-Step RT-PCR Kit 试剂盒、*Taq* Man Real-time PCR Master Mix 和 TB Green Premix Ex *Taq*™ Ⅱ (Tli RNaseH Plus),购于 TaKaRa(大连)公司;胶回收试剂盒,购于 OMEGA(美国)公司;Ni-NTA 镍离子亲和层析柱(1 mL),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,购自 Sigma(美国)公司;FuGENE 6 转染试剂盒和 Pure Yield(TM)质粒中提试剂盒,购于 Promega(美国)公司;ProteoSpin™包涵体分离纯化试剂盒,购买于艾美捷科技(武汉)有限公司;G418 (Geneticin,遗传霉素)、带 FITC 标签的荧光二抗和 DAPI 染料,购自索莱宝生物有限公司(北京);ISKNV-MCP 单克隆抗体,由本实验室保存;*Eco*R Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ酶和 T4 DNA Ligase,购自 TaKaRa(大连)公司。

1.2 方 法

1.2.1 鳜核酸的提取与反转录 用 Trizol 试剂提取 CPB 细胞总 RNA(设 3 个生物学重复),然后立即用 Titanium One-Step RT-PCR Kit 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,用海洋动物基因组提取试剂盒提取感染 ISKNV 后的 CPB 细胞 DNA(设 3 个生物学重复)。

1.2.2 *AKT2* 开放阅读框(ORF)的克隆与重组表达载体的构建 (1)*AKT2* ORF 的克隆。根据本课题组已测定的鳜转录组结果,设计 *AKT2* 引物 ScAKT2-F(5′-CCG***GAATTC***ATGAATGAAGTCA-GTGTTGT-3′,其中斜体部分为 *Eco*R Ⅰ酶切位点)和 ScAKT2-R (5′-ACGC***GTCGAC***TCATTCCCG-TATGCTGGCAGAG-3′,其中斜体部分为 *Sal* Ⅰ酶切位点)。用高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增 *AKT2* 的 ORF,PCR 反应总体系为 50 μL:5×PrimeSTAR Buffer (Mg^{2+} Plus) 10 μL,dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 4 μL,ScAKT2-F 和 ScAKT2-R 各 1 μL,Template 2 μL,PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL,DEPC 水 31.5 μL。反应条件:98 ℃ 10 s,55 ℃ 5 s,72 ℃ 2 min,共 30 个循环。PCR 产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳后测序,并切胶回收 PCR 产物。

(2)原核表达载体 pET32a-AKT2 的构建。用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ同时双酶切 *AKT2* ORF 和 pET32a 载体(16 ℃酶切 12 h),用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效率,切胶回收目的条带和线性化的 pET32a 载体,将其以 3∶1 的比例用 T4 DNA Ligase 连接,反应体系为:T4 DNA Ligase Buffer 1 μL、目的条带 7 μL、线性化载体 1 μL 和 T4 DNA Ligase 1 μL,在 16 ℃低温连接仪上连接 16 h。将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,取 200 μL 产物涂板,过夜培养后,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,取阳性菌落测序。

1.2.3 鳜 AKT2 重组蛋白的诱导表达及纯化 将构建的原核表达载体 pET32a-AKT2 转化大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),并接种至固体牛肉膏蛋白胨培养基(含氨苄青霉素 50 μg/mL)平板中,培养 12~18 h 后,挑取单克隆测序。将测序正确的含重组质粒的菌液接种至液体培养基(含氨苄青霉素 50 μg/mL)中,于 37 ℃振荡培养至菌液在 600 nm 处的吸光度(OD_{600})约为 0.6 时,加入 IPTG 诱导剂(终浓度 1 mmol/L),37 ℃振荡培养 3 h;超声(功率 200 W,工作 3 s、暂停 4 s)破碎菌体 2~3 min;4 ℃、6 000 r/min 离心 30 min,收集上清及沉淀。分别取菌体沉淀和上清,用 1×Loading Buffer 重悬裂解,沸水浴 15 min 后进行 SDS-PAGE 检测。证明重组蛋白在沉淀中以包涵体形式表达后,用 ProteoSpin™包涵体分离纯化试剂盒纯化沉淀(包涵体),并通过 SDS-PAGE 对纯化的重组蛋白进行鉴定。

1.2.4 鳜 AKT2 多克隆抗体的制备 采集日本大耳兔血液,分离血清作为免疫前血清,备用。以纯化的重组 AKT2 蛋白为抗原,背部皮下注射免疫日本大耳兔,免疫剂量 300 μg/只。一免抗原利用弗氏完全佐剂进行乳化,二免、三免和四免抗原用弗氏不完全佐剂进行乳化,最后一次免疫后 2 周,于兔耳缘静脉处取血,分离血清。对免疫前、后血清进行 1∶2 000,1∶4 000,1∶8 000,…,1∶8 192 000 梯度稀释,选择 2 μg/mL 的抗原包被,采用间接 ELISA 方法测定多克隆抗体的效价,以免疫后血清 OD_{450} 值/免疫前血清 OD_{450} 值>2(P/N>2)为判断标准。利用 Ni-NTA 镍离子亲和层析纯化抗体,用 BCA 法测定纯化后抗体的质量浓度,并进行 SDS-PAGE 鉴定。

采用 Western blot 法检测抗 AKT2 多克隆抗体的特异性(蛋白水平)。具体方法如下:利用 RIPA 裂解液提取 CPB 细胞总蛋白(设 3 个生物学重

复），经 BCA 法测定蛋白浓度后，进行 SDS-PAGE 分离并转移至 0.45 μL PVDF 膜上；以制备的兔抗 ScAKT2 多克隆抗体为一抗，羊抗兔 IgG HRP 为二抗，进行 Western blot 检测。

采用间接免疫荧光法检测 AKT2 多克隆抗体的特异性（细胞水平）。方法如下：用预冷的甲醇固定 CPB 细胞，经 TritionX-100 透化及 50 g/L 的 BSA 封闭后，用经 50 g/L BSA 稀释（1∶50）的 ScAKT2 抗体（一抗）和经 50 g/L BSA 稀释（1∶2 000）的带有 FITC 标签的二抗分别孵育，用 DAPI 染色后加入少许洗液，镜检。

1.2.5　过表达鳜 AKT2 细胞系的建立　(1)*AKT*2 ORF 的克隆。根据鳜 *AKT*2 序列，设计引物：AKT2-F（5′-CCG*GAATTC*ATGAATGAAGTCAGTGTTGT-3′，斜体部分为 *Eco*R Ⅰ酶切位点）和 AKT2-R（5′-CGG*GGTACC*TCATTCCCGTATGCTGGCAGAG-3′，斜体部分为 *Kpn* Ⅰ酶切位点）。PCR 扩增 *AKT*2 基因，具体方法同 1.2.2(1)。

(2)过表达载体 pCMV-EGFP-ScAKT2 的构建。利用 *Eco*R Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ将 *AKT*2 ORF 连接至 pCMV-EGFP 载体，构建过表达载体 pCMV-EGFP-AKT2，具体方法同 1.2.2(2)。菌落 PCR 检测后，测序。

(3)过表达 AKT2 细胞系的构建。用 Pure Yield(TM)质粒中提试剂盒提取菌液中的质粒，利用 FuGENE　6 将 pCMV-EGFP-ScAKT2 载体和 pCMV-EGFP 空载质粒转染至 CPB 细胞中，培养 24 h 后观察荧光表达情况。使用半致死质量浓度为 1 000 μg/mL 的 G418 对转染成功的 CPB 细胞进行连续加压，直至绿色荧光蛋白充满整个视野且可以稳定传代。

(4)过表达 AKT2 细胞系的鉴定。以稳定传代的过表达 AKT2 细胞系为试验组，稳定传代 pCMV-EGFP 空载的细胞系为对照组，取 3 个生物学重复，进行转录和蛋白水平上的鉴定。以 18S 为内参，用荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测 *AKT*2 mRNA的表达水平。根据 GenBank 中的 ScAKT2 序列（GenBank 号：KY984992.1），设计引物 F（AGCCACAAGTTCTTCACCTCCATC）和 R（CGCTGATCTGAATCCTCCGCATC），扩增片段大小为 188 bp；以 cDNA 为模板，18S 为内参（所用引物的相关信息见表 1），使用 TB Green　Premix Ex *Taq*™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）检测 *AKT*2 mRNA 的表达水平。总体系为 20 μL：2×SYBR 预混剂 *Taq*™ 10 μL，正、反引物（10 μmol/L）0.5 μL，ROX 参比染料Ⅱ0.5 μL，cDNA 2 μL，水 6.5 μL。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃ 变性 5 s，56 ℃复性 30 s，共 40 个循环。采集荧光信号，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *AKT*2 mRNA 的相对表达量。以 β-actin蛋白为内参，用 Western blot 检测过表达 AKT2 细胞蛋白的相对表达水平。

表 1　荧光定量 PCR 所用的引物及其相关信息

Table 1　Related information of the primers used in fluorescence quantitative PCR

基因名称 Name of gene	引物序列（5′→3′） Sequence of primer（5′→3′）	GenBank 登录号 GenBank accession number	扩增片段大小/bp Product size
*ScIRF*3	F：CAGATTGACAGCGGCAGGTATCC，R：GCCATTGCCACTCGCCTCTG	KY646446.1	150
*ScIRF*7	F：ATCCTCAGCCGGTCCTCAGTTC，R：CGAGTAGGTAGTGGAGCTGGAGAC	KY646451.1	132
*ScIL*8	F：TGTGGTGCTCCTGGCCTTCC，R：TGATCTCAGTCTCCTCGCAGTGG	JQ513375.1	167
ScMx	F：CCACTGCTGAATCCACGCTGAG，R：ACTGCTGCTGTAGGTCCTGTCC	AY392097.1	80
*ScTRAF*2	F：GGTCGCAGGTGTACGGAACTTG，R：GCTGACGGTTGCTGGCTTCC	KP409173.1	115
*ScTRAF*3	F：GAGACTGAACGCTCTGGAACAAGG，R：GCCAATCGGATCTCGTGGACAC	KP409193.1	126
*Sc*18*S*	F：CATTCGTATTGTGCCGCTAGA，R：CAAATGCTTTCGCTTTGGTC	AY452495.1	102
*ORF*007	F：CGAGGCCACATCCAACATC，R：CGCCTTTAACGTGGGATATATTG	NC_003494.1	83
*ORF*007-Probe	FAM-CACCAAACTGACCGCGGACTCGT-Eclipse		

1.2.6　过表达 AKT2 的 CPB 细胞抗病毒能力分析　(1)过表达 AKT2 对 ISKNV 病毒拷贝数的影响。根据 ISKNV 在 CPB 细胞上的增殖周期[13]，用构建成功的过表达 AKT2 和空载的 CPB 细胞分别感染 ISKNV（感染复数（MOI）为 1），在感染后于 ISKNV 的增殖早期（36，48 h）提取 CPB 细胞的 DNA，以提取的 DNA 为模板，用 qPCR 法[14] 测定 ISKNV *ORF*007 基因的病毒拷贝数，所用的 *ORF*007 引物及探针引物 *ORF*007-probe 的相关信息见表 1。

(2)过表达 AKT2 对 ISKNV-MCP 蛋白的影响。在感染 ISKNV 48 h 后，提取 CPB 细胞的总蛋白，设置 3 个复孔，以 ISKNV-MCP（1∶500）单抗、β-actin 抗体（1∶5 000）（内参）为一抗，用 Western blot 检测 ISKNV-MCP 蛋白的表达情况。

(3)过表达 AKT2 对先天免疫因子在转录水平上相对表达量的影响。以 cDNA 为模板，18S 为内

参,用 qRT-PCR 法检测 *ScIRF*3、*ScIRF*7、*ScIL*8、*ScMx*、*ScTRAF*2、*ScTRAF*3 等先天免疫因子在转录水平上的表达情况。根据 GenBank 中公布的相关序列,采用 Primer 5.0 软件设计引物,引物的相关信息见表 1。PCR 反应体系和程序同 1.2.5(4),采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 方法计算各基因 mRNA 的相对表达水平。

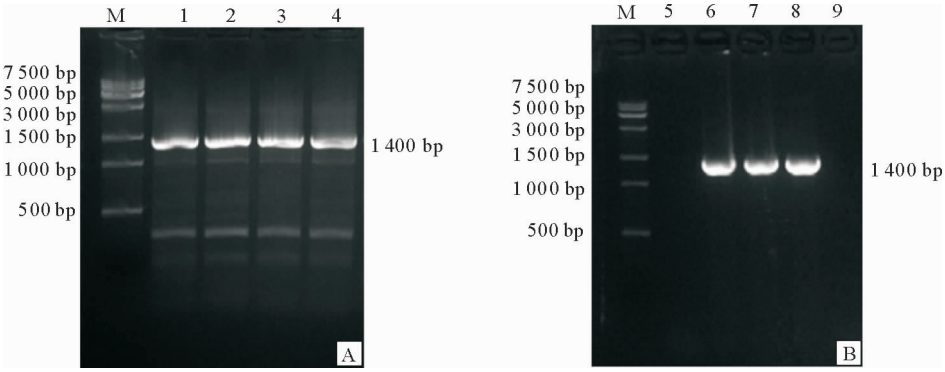
1.3 数据统计与分析

采用 GraphPad prime 6.0进行数据整理和制图,使用 SPASS 21.0 进行数据差异相关性分析。试验数据表示为"平均值±标准误",$n=3$,以"*"代表 $P<0.05$,"**"代表 $P<0.01$。

2 结果与分析

2.1 *ScAKT*2 ORF 的克隆及原核表达质粒的构建

经 PCR 扩增得到约 1 400 bp 的 *AKT*2 ORF 片段(图 1-A),与预期大小相符。测序结果表明,鳜 *AKT*2 的 ORF 为 1 449 bp。原核表达质粒 pET32a-ScAKT2 的 PCR 扩增获得了约 1 400 bp 的片段(图 1-B),测序鉴定获得了 1 449 bp 的片段,表明原核表达质粒 pET32a-ScAKT2 构建成功。



A. 鳜 *AKT*2 ORF 的克隆;B. 原核表达质粒 pET32a-ScAKT2 的 PCR 鉴定;M. DNA Marker DL15000;1~4. *AKT*2 ORF 的克隆;5,9. *AKT*2 ORF 转化失败的样品;6~8. *AKT*2 ORF 转化成功的样品

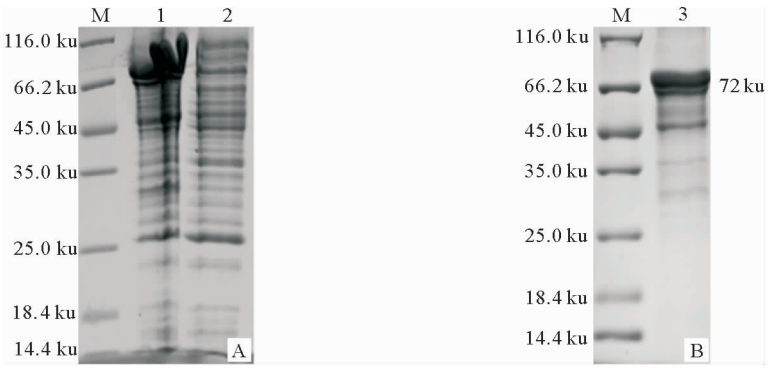
A. Cloning of *AKT*2 ORF;B. PCR identification of prokaryotic expression plasmid pET32a-ScAKT2. M;DNA Marker DL15000;1-4. Cloning of *AKT*2 ORF;5,9. Samples failed transfected with *AKT*2 ORF;6-8. Samples successfully transfected with *AKT*2 ORF

图 1 鳜 *AKT*2 ORF 克隆及原核表达质粒的鉴定

Fig. 1 Cloning of *AKT*2 ORF and identification of prokaryotic expression plasmid

2.2 ScAKT2 重组蛋白的诱导表达及纯化

经 SDS-PAGE 检测,在沉淀中检测到约 72 ku(含标签约 20 ku)的条带(图 2-A),说明 ScAKT2 重组蛋白以包涵体的形式表达。纯化后,重组蛋白主要集中在 72 ku 左右(图 2-B),可以进行后续免疫试验。



A. AKT2 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析;B. AKT2 融合蛋白的纯化;M. 蛋白 Marker;1. 沉淀;2. 上清;3. 纯化后的 AKT2 融合蛋白

A. SDS-PAGE analysis of AKT2 fusion protein;B. Purification of AKT2 fusion protein;M. Protein Marker;1. Precipitation;2. Supernatant;3. ScAKT2 fusion protein after purification

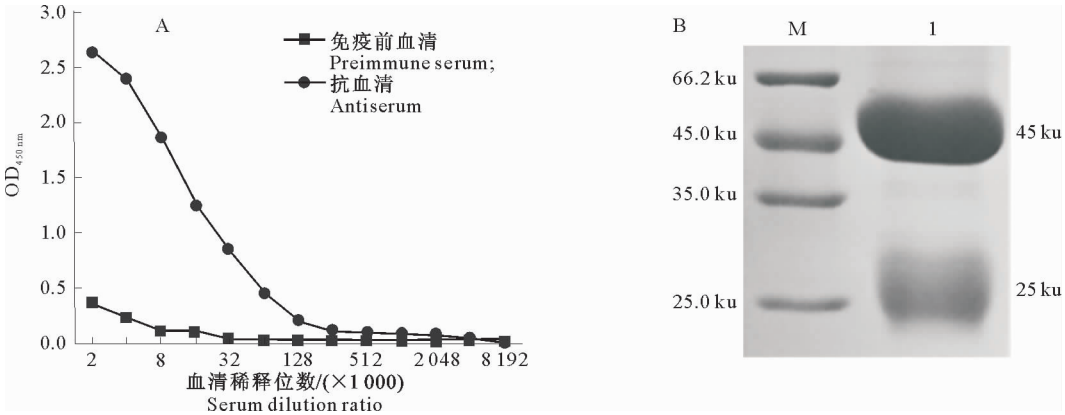
图 2 鳜 AKT2 融合蛋白的诱导表达及纯化

Fig. 2 Induction,expression and purification of ScAKT2 fusion protein

2.3 抗 ScAKT2 多克隆抗体的制备

用纯化的重组 AKT2 蛋白免疫日本大耳兔,间接 ELISA 法测定血清免疫效价可达 1∶256 000(图 3-A)。对纯化的 ScAKT2 多克隆抗体进行 SDS-PAGE 检测,结果有两条条带,其中一条为多克隆抗体的重链(约 45 ku),另一条为轻链(约 25 ku),纯

化效果良好（图 3-B）。经 BCA 法测定，纯化后的抗体质量浓度约为 10 mg/mL。



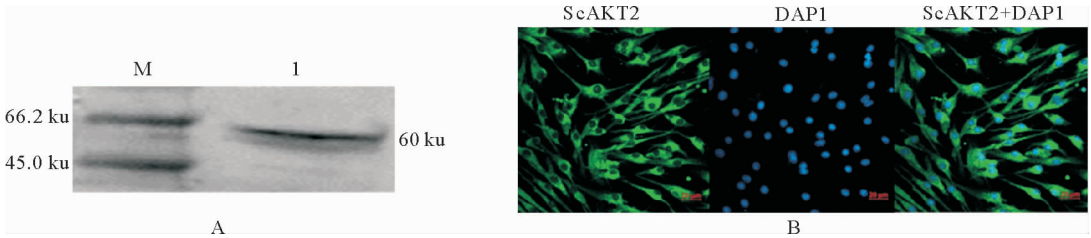
A. 抗 ScAKT2 抗体的免疫效价；B. 抗 ScAKT2 抗体的纯化；M. 蛋白 Marker；1. 纯化后的抗体

A. The immune titer of anti-ScAKT2 antibody; B. Anti-ScAKT2 antibody purification; M. Protein Marker; 1. Purified antibody

图 3　抗 ScAKT2 多克隆抗体效价的测定与纯化

Fig. 3　Determination of anti-ScAKT2 polyclonal antibody titer and purified antibody

制备的多抗经 Western blot 鉴定，在约 60 ku 处有 1 条特异性条带（图 4-A），表明制备的多克隆抗体能特异性识别 CPB 细胞的 AKT2 蛋白。间接免疫荧光试验证实，所制备的抗 ScAKT2 多抗可识别 CPB 细胞，且 ScAKT2 主要在 CPB 细胞的细胞质中表达（图 4-B）。



A. Western blot 结果；B. 间接免疫荧光结果；M. 蛋白 Marker；1. 抗体与 CPB 细胞特异性结合

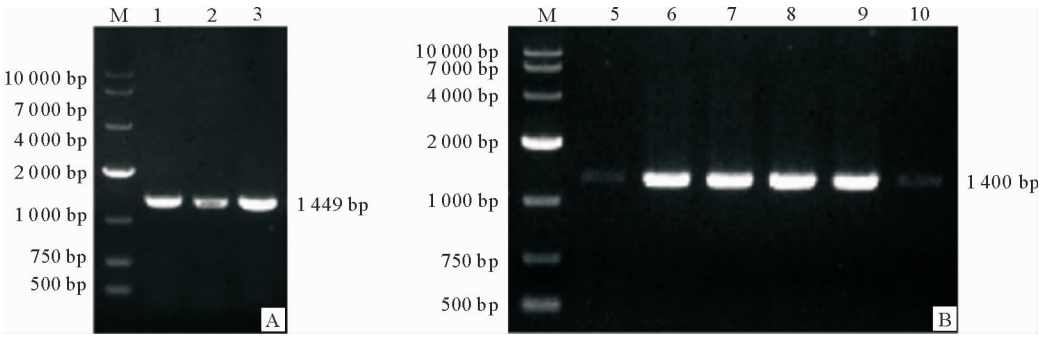
A. Western blot result; B. Indirect fluorescent immune result; M. Protein Marker; 1. Specific binding between antibodies and CPB cells

图 4　抗 ScAKT2 多克隆抗体的特异性分析

Fig. 4　Analysis of specificity of anti-ScAKT2 polyclonal antibody

2.4　ScAKT2 过表达 CPB 细胞系的构建

经 PCR 扩增得到约 1 400 bp 的带有酶切位点 *Eco*R Ⅰ、*Kpn* Ⅰ的 *ScAKT2* ORF 片段（图 5-A）；测序结果显示，成功克隆到 1 449 bp 的 ORF 片段。过表达载体 pCMV-EGFP-ScAKT2 PCR 扩增获得了约 1 400 bp 的片段（图 5-B），测序结果表明，过表达载体 pCMV-EGFP-ScAKT2 构建成功。



A. 鳜 *AKT2* ORF 的克隆；B. 真核表达质粒 pCMV-EGFP-AKT2 的 PCR 鉴定；

M. DNA Marker DL10000；1～3. *AKT2* ORF 的克隆；5，10. 转化失败的样品；6～9. 转化成功的样品

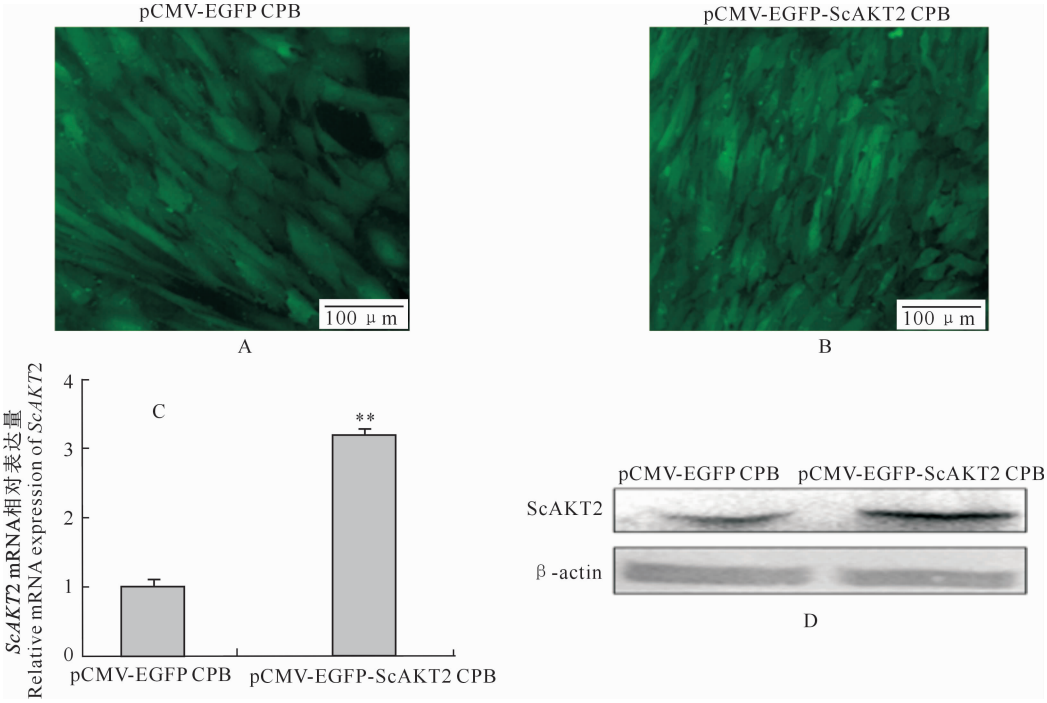
A. Cloning of *AKT2* ORF; B. PCR identification of eukaryotic expression plasmid pCMV-EGFP-AKT2; M. DNA Marker DL10000;

1－3. Cloning of *AKT2* ORF; 5, 10. Samples failed transfected with AKT2 ORF; 6－9. Samples successfully transfected with AKT2 ORF

图 5　鳜 *AKT2* ORF 的克隆及真核表达质粒的鉴定

Fig. 5　Cloning of *AKT2* ORF and identification of eukaryotic expression plasmid

经过 G418 多次加压筛选,pCMV-EGFP 和 pCMV-EGFP-ScAKT2 CPB 的细胞系约有 80%的细胞可稳定表达 EGFP(图 6-A、B)。qRT-PCR 结果表明,在 pCMV-EGFP-ScAKT2 的 CPB 细胞系中,*ScAKT2* mRNA 的相对表达量极显著高于 pCMV-EGFP CPB 细胞系(图 6-C)。Western blot 结果显示,在 pCMV-EGFP-ScAKT2 的 CPB 细胞系中,ScAKT2 蛋白的表达量明显高于 pCMV-EGFP 细胞系(图 6-D)。以上结果表明,已成功获得了 ScAKT2 过表达 CPB 细胞系。



A. 稳定转染 pCMV-EGFP 的 CPB 细胞;B. 稳定转染 pCMV-EGFP-ScAKT2 的 CPB 细胞;C. *ScAKT2* mRNA 相对表达量;D. ScAKT2 蛋白的表达量。图柱上标 * * 表示与 pCMV-EGFP CPB 组差异极显著($P<0.01$)

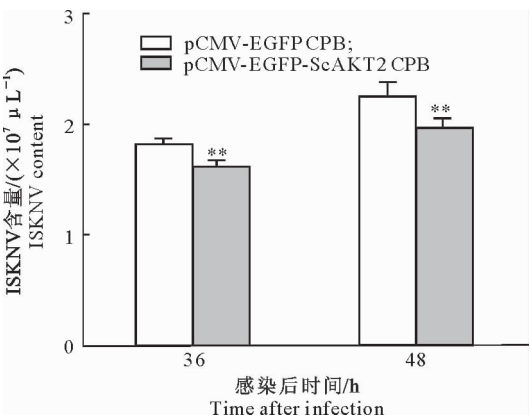
A. CPB cells stably transfected with pCMV-EGFP; B. CPB cells stably transfected with pCMV-EGFP-ScAKT2; C. Relative expression of *ScAKT2* mRNA; D. The expression of ScAKT2 protein. * * indicates extremely significant difference from the pCMV-EGFP CPB group ($P<0.01$)

图 6 过表达 ScAKT2 细胞系的构建与鉴定

Fig. 6 Construction and identification of overexpression ScAKT2 cell lines

2.5 过表达 ScAKT2 CPB 细胞的抗病毒能力分析

分别于感染 ISKNV 后 36 和 48 h 提取 DNA 样品,用 qPCR 法测定 ISKNV 含量。结果(图 7)显示,pCMV-EGFP-ScAKT2 CPB 细胞中的 ISKNV 含量极显著低于 pCMV-EGFP CPB 细胞系。同时,于 48 h 收取总蛋白样品,用 Western blot 法测定 ISKNV-MCP 蛋白的表达情况,结果见图 8。图 8 显示,在过表达 ScAKT2 的 CPB 细胞中,ISKNV-MCP 蛋白的表达被抑制。在感染 ISKNV 后分别于 36 和 48 h 提取细胞总 RNA 样品,用 RT-PCR 法检测先天免疫因子的转录水平,结果(图 9)显示,*ScIRF3*、*ScIRF7*、*ScIL8*、*ScMx*、*ScTRAF2* 和 *ScTRAF3* 的 mRNA 均显著上调,且上调效果具时间依赖性。



图柱上“* *”表示差异极显著($P<0.01$)

* * on the column indicates an extremely significant difference ($P<0.01$)

图 7 过表达 ScAKT2 对 ISKNV 增殖的影响

Fig. 7 Effect of the proliferation of ISKNV with overexpression ScAKT2

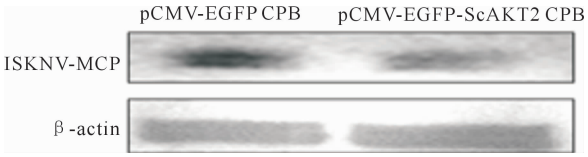
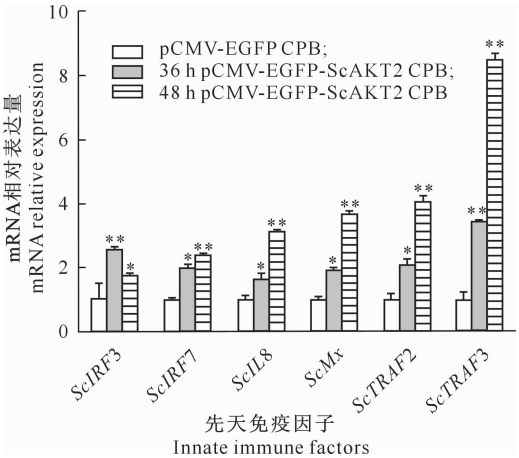


图 8　过表达 ScAKT2 对 ISKNV-MCP 蛋白的影响

Fig. 8　Effect of ISKNV-MCP protein with overexpression ScAKT2



图柱上标 *、* * 表示与 pCMV-EGFP CPB 转染组相比差异显著（$P<0.05$）或极显著（$P<0.01$）

， * on the column indicates a significant difference ($P<0.05$) or an extremely significant difference ($P<0.01$) from the pCMV-EGFP CPB group

图 9　过表达 ScAKT2 对先天免疫因子 mRNA 表达的影响

Fig. 9　Effect of the mRNA expression of innate immune factors with overexpression ScAKT2

3　讨　论

AKT 是多种细胞过程的关键调控因子，在细胞存活和凋亡中扮演着重要角色。已有大量研究表明，病毒侵染细胞期间，AKT 途径被激活，进而抑制病毒的增殖。本研究结果表明，鳜 AKT2 可抑制 ISKNV 复制增殖，这为鳜传染性脾肾坏死病毒病的防控提供了新的靶点。

AKT 作为一个抗病毒靶标，对许多病毒的增殖有抑制作用。登革热病毒（dengue virus，DENV）和日本脑炎病毒（Japanese encephalitis virus，JEV）感染可激活机体的 AKT 途径，抑制病毒的复制增殖[15]。阻断 AKT 的激活，可提高血清型 3 型呼肠孤病毒（the sero-type 3 reovirus）RNA 的增殖[16]。在乙型肝炎（HBV）[17]和丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）[18]持续感染的情况下，机体 AKT 途径被激活，从而抑制病毒复制，促进细胞存活。口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus，FMDV）的 VP1 蛋白可抑制 AKT 途径，从而促进病毒的复制增殖[19]。机体 AKT 的活化，可抑制肠道病毒 71 型（enterovirus 71，EV71）的感染，为 EV71 的防控提供新的靶标[20-21]。在牛流行热病毒（bovine ephemeral fever virus，BEFV）感染后期，机体 AKT 途径被抑制，进而导致病毒的增殖增强[22]。寨卡病毒（ZIKV）的 NS4A 和 NS4B 蛋白可感染人胚胎神经干细胞，导致 AKT 被抑制[23]，使病毒的复制增强，最终导致神经发生缺陷。为了研究 ScAKT2 的抗病毒功能，本试验制备了 ScAKT2 多克隆抗体，间接免疫荧光（IFA）和 Western blot 试验证实，ScAKT2 多克隆抗体可以与 ScAKT2 蛋白进行特异性反应。本试验进一步构建了 ScAKT2 过表达细胞系，并用 qPCR 和 Western blot 法检测了过表达 ScAKT2 后 ISKNV 复制的变化情况，结果显示，ScAKT2 过表达可抑制 ISKNV 的增殖，表明在 ISKNV 侵染细胞过程中，ScAKT2 对 ISKNV 的复制增殖具有抑制作用。

哺乳动物感染呼肠孤病毒（mammalian reovirus）后，机体 AKT 被活化从而会激活 IFN 刺激反应元件（ISRE），并上调 IFN 刺激基因（*ISGs*）[24]。Hrincius 等[25]研究表明，机体感染流感病毒时，AKT 可以通过维甲酸诱导基因Ⅰ（retinoic acid-inducible gene Ⅰ，*RIG*-Ⅰ）依赖性的信号途径被激活，并促进 IRF3 激活和Ⅰ型干扰素表达。有报道指出，AKT3 的敲除可抑制 IRF3 的活化，显著降低 IFN-β 的产生，并提高病毒载量；AKT3 的活化可激活 IRF3，从而提高 IFN-β 的产生和增强抗病毒功能[26]。本试验发现，过表达 ScAKT2 的 CPB 细胞可通过上调先天免疫因子 *ScIRF3*、*ScIRF7* 和 *ScTRAF2* 等的表达来抑制 ISKNV 的增殖，这为鳜病毒治疗药物的研发提供了一个新的靶点，也为更深入地探讨 ISKNV 与寄主互作的致病机制提供了新的方向。

[参考文献]

[1]　Tao J J，Gui J F，Zhang Q Y. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish [J]. Aquaculture，2007，262(1)：1-9.

[2]　Guo C J，Wu Y Y，Yang L S，et al. Infectious spleen and kidney necrosis virus (a fish iridovirus) enters Mandarin fish fry cells via caveola-dependent endocytosis [J]. Journal of Virology，2012，86(5)：2621.

[3]　Zhang D，Wang J，Zhou C，et al. Zebrafish，akt2，is essential for survival，growth，bone development，and glucose homeostasis

[J]. Mechanisms of Development,2017,143:42-52.

[4] Kearney A L,Cooke K C,Norris D M,et al. Serine 474 phosphorylation is essential for maximal Akt2 kinase activity in adipocytes [J]. Journal of Biological Chemistry,2019,294(45):16729-16739.

[5] Carsillo M,Kim D,Niewiesk S. Role of AKT kinase in measles virus replication [J]. Journal of Virology,2010,84(4):2180-2183.

[6] Dunn E F,Fearns R,Connor J H. Akt inhibitor Akt-Ⅳ blocks virus replication through an Akt-independent mechanism [J]. Journal of Virology,2009,83(22):11665-11672.

[7] Rawat S,Bouchard M J. The hepatitis B virus (HBV) HBx protein activates AKT to simultaneously regulate HBV replication and hepatocyte survival [J]. Journal of Virology,2015,89(2):999-1012.

[8] Huo Y,Fan L,Yin S,et al. Involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation [J]. Virology,2013,444(1/2):233-240.

[9] Schabbauer G,Luyendyk J,Crozat K,et al. TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages [J]. Molecular Immunology,2008,45(10):2790-2796.

[10] Yeon S H,Song M J,Kang H R,et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and Akt are required for RIG-I-mediated anti-viral signalling through cross-talk with IPS-1 [J]. Immunology,2015,144(2):312-320.

[11] Fu X,Li N,Lai Y,et al. A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch, *Siniperca chuatsi*: development and characterization [J]. Journal of Fish Biology,2015,86(1):32-45.

[12] Fu X,Lin Q,Liang H,et al. The biological features and genetic diversity of novel fish rhabdovirus isolates in China [J]. Archives of Virology,2017,162(9):2829-2834.

[13] Wu S,Yu L,Fu X,et al. iTRAQ-based proteomic profile analysis of ISKNV-infected CPB cells with emphasizing on glucose metabolism,apoptosis and autophagy pathways [J]. Fish & Shellfish Immunology,2018,79:102-111.

[14] Lin Q,Fu X,Liu L,et al. Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi* [J]. Microbial Pathogenesis,2017,107:98-105.

[15] Lee C J,Liao C L,Lin Y L. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection [J]. Journal of Virology,2005,79(13):8388-8399.

[16] Zhang X,Wu H,Liu C,et al. PI3K/Akt/p53 pathway inhibits reovirus infection [J]. Infection, Genetics and Evolution,2015,34:415-422.

[17] Guo H,Zhou T,Jiang D,et al. Regulation of hepatitis B virus replication by the phosphatidylinositol 3-kinase-akt signal transduction pathway [J]. Journal of Virology,2007,81(18):10072-10080.

[18] Mannova P,Beretta L. Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus:control of cell survival and viral replication [J]. Journal of Virology,2005,79(14):8742-8749.

[19] Ji W T,Liu H. PI3K-Akt signaling and viral infection [J]. Recent Patents on Biotechnology,2008,2(3):218-226.

[20] Zhang F,Liu Y,Chen X,et al. RASSF4 promotes EV71 replication to accelerate the inhibition of the phosphorylation of AKT [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2015,458(4):810-815.

[21] Zhang H,Li F,Pan Z,et al. Activation of PI3K/Akt pathway limits JNK-mediated apoptosis during EV71 infection [J]. Virus Research,2014,192:74-84.

[22] Cheng C Y,Tseng H H,Chiu H C,et al. Bovine ephemeral fever virus triggers autophagy enhancing virus replication via upregulation of the Src/JNK/AP1 and PI3K/Akt/NF-κB pathways and suppression of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Veterinary Research,2019,50(1):79.

[23] Liang Q,Luo Z,Zeng J,et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy [J]. Cell Stem Cell,2016,19(5):663-671.

[24] Jin T,Xiaozhan Z,Hongxia W,et al. Blocking the PI3K/AKT pathway enhances mammalian reovirus replication by repressing IFN-stimulated genes [J]. Frontiers in Microbiology,2015,6:886.

[25] Hrincius E R,Rüdiger D,Anhlan D,et al. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is activated by influenza virus vRNA via the pathogen pattern receptor Rig-Ⅰ to promote efficient type Ⅰ interferon production [J]. Cellular Microbiology,2011,13(12):1907-1919.

[26] Xiao J,Li W,Zheng X,et al. Targeting 7-Dehydrocholesterol reductase integrates cholesterol metabolism and IRF3 activation to eliminate infection [J]. Immunity,2020,52:1-14.