

学校代码: 10285

学 号: 20184221019

苏州大学
SOOCHOW UNIVERSITY

硕士学位论文

(学术学位)



BmCPV编码小肽vsp10的鉴定
及在凋亡中的功能研究

Identification of vsp10 encoded by BmCPV
and its function in apoptosis

研究生姓名	曹满满
指导教师姓名	曹广力
专业名称	遗传学
研究方向	家蚕病毒基因的功能
所在院部	基础医学与生物科学学院
论文提交日期	2021年6月

苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

研究生签名：曹满满 日期：2021年5月25日

学位论文使用授权声明

本人完全了解苏州大学关于收集、保存和使用学位论文的规定，即：学位论文著作权归属苏州大学。本学位论文电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。苏州大学有权向国家图书馆、中国社科院文献信息情报中心、中国科学技术信息研究所（含万方数据电子出版社）、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社送交本学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存和汇编学位论文，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索。

涉密论文

本学位论文属 _____ 在 _____ 年 _____ 月解密后适用本规定。

非涉密论文

论文作者签名: 曹满满 日期: 2021年5月27日

导师签名: 曹 日期: 2021年5月27日

BmCPV 编码小肽 vsp10 的鉴定及在凋亡中的功能研究

摘要

小开放读码框 (small open reading frame, sORF) 编码的多肽 (sORF-encoded polypeptide, SEP) 是一类来源于 sORF 的生物活性肽, 并在许多生物进程中发挥着非常重要的作用。本研究通过 sORF Finder 软件预测发现家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) S10 dsRNA(+) 链的 393-572 nt 区域具有编码一个长度为 59 个氨基酸残基的小肽 vsp10 的潜能。通过原核表达蛋白免疫小鼠制备 vsp10 多克隆抗体, Western blotting 和免疫组化结果显示, vsp10 存在于 BmCPV 感染的家蚕中肠中; 免疫荧光结果显示 vsp10 定位在细胞质中。为了研究 vsp10 的来源, 首先验证了其来源于线性 RNA 转录本的可能。用 *DsRed* 替代含有 S10 全长 cDNA 的重组质粒 pIZT-CS10 中 vsp10 的 sORF 构建 pIZT-CS10-sORF-null 重组质粒, 在转染 pIZT-CS10-sORF-null 的 BmN 细胞中能观察到 *DsRed* 的表达; 通过 IRESite 软件预测发现 vsp10 的 sORF 上游存在一个核糖体结合位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 位点, 将含有该 IRES 位点和 vsp10 的 sORF 片段体外转录成线性 RNA 并转染 BmN 细胞, 发现 vsp10 可以表达; 通过对 BmCPV 感染中肠组织的 circRNA 高通量测序数据分析发现, S10 dsRNA (+) 链可以产生两个含有 vsp10 开放阅读框的 circRNA 即 S10-circ1 和 S10-circ7 (两个 circRNA 均位于 S10 片段的中间, 且 S10-circ1 包含 S10-circ7 的全序列), 对这两个 circRNA 进行反向 PCR、Sanger 测序和 Northern blotting 鉴定, 发现这两个 circRNA 真实存在; 为了验证 vsp10 是否可以由 circRNA 编码, 我们选择了分子量较大的环 S10-circ1 进行试验, 并设计了针对 S10-circ1 接头位点和环中间区域的 siRNA (circ1-siRNA-1 和 circ1-siRNA-2), 以及针对 S10-circ1 表达载体 pIZT-LcR-circ1 产生的线性分子的 siRNA (linear-siRNA), 通过 Western blotting 检测敲降这些 RNA 分子对 vsp10 水平的影响, 结果显示, 下调 S10-circ1 水平对 vsp10 的水平无明显影响, 但下调 S10-circ1 的亲本基因的转录产物的水平时 vsp10 水平随之下调, 推测 vsp10 可能是它的线性 RNA 编码产生的, 而非来源于已知的 circRNA。通过对

vsp10 的表达时相研究发现, 随着感染时间的增加, vsp10 的表达与病毒增殖复制呈正相关。这些结果表明 S10 dsRNA 正义链 (+) 的线性 RNA 的 sORF 可以编码小肽 vsp10, 为病毒编码小肽 vsp10 的进一步功能研究奠定了基础。

为了研究 vsp10 的功能, 首先从 vsp10 对 BmCPV 自身及宿主细胞的影响这两个方面进行研究。通过 qRT-PCR 和 Western blotting 发现 vsp10 可以延缓 BmCPV 的增殖复制。为了探明 vsp10 延缓病毒增殖复制的作用机制, 通过 qRT-PCR 检测发现, 过表达 vsp10 可提升细胞凋亡相关基因 *Caspase*、*Apaf*、*P53* 和 *Sur2* 的表达水平, 并下调凋亡抑制基因 *Bcl-2* 和 RNAi 通路基因 *Bmdrc2* 的表达水平。流式细胞仪检测结果显示, 过表达 vsp10 可以抑制细胞周期, 并促进细胞凋亡。进一步通过 Western blotting 和 TUNEL 检测发现, 过表达 vsp10 可以使细胞的凋亡水平上升。本研究还发现 vsp10 可以降低线粒体膜电位, 并且通过免疫荧光实验发现 vsp10 可以定位在线粒体上。这些结果说明 vsp10 可诱导细胞凋亡。结合实验室前期的研究, 通过 IP 实验及质谱鉴定初步筛选到了与 vsp10 互作的候选蛋白, 并从中选取了凋亡相关蛋白 PHB2 进行后续研究。通过 Co-IP 和免疫共定位证实 vsp10 与 PHB2 的互作。进一步研究发现, 敲降 PHB2 基因表达后, vsp10 对 BmCPV 病毒的抑制和对宿主细胞凋亡的促进作用都受到了削弱。

综上, BmCPV S10 片段正义链的线性 RNA 上存在一个 sORF, 并可以由 IRES 启动翻译一个 59 aa 的小肽 vsp10, 在进一步的研究中发现, vsp10 可能通过与 PHB2 互作诱导凋亡负调控病毒的增殖复制。研究结果探明了 BmCPV 编码的 vsp10 的来源和功能, 为理解 BmCPV 基因组信息、病毒复制增殖的调节和病毒编码小肽的生物学功能提供了新线索。

关键词: vsp10、PHB2、IRES、线性 RNA 转录本、凋亡、线粒体、BmCPV

作 者: 曹满满

指导教师: 曹广力

Identification of vsp10 encoded by bmcpv and its function in apoptosis

Abstract

Small open reading frame (sORF) - encoded polypeptide (SEP) is a class of bioactive peptides derived from sORF and plays an important role in many biological processes. In this study, the 393-572 nt region of S10 dsRNA (+) chain of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) has the potential to encode a micropeptide vsp10 with 59 amino acid residues. The polyclonal antibody of vsp10 was prepared by immunizing mice with prokaryotic expression protein. Western blotting and immunohistochemistry results showed that vsp10 existed in the midgut of *Bombyx mori* infected with BmCPV; immunofluorescence results showed that vsp10 was located in the cytoplasm. In order to study the origin of vsp10, the possibility of its origin from linear RNA transcripts was verified. DsRed was used to replace the sORF of vsp10 in pIZT-CS10 vector to construct the recombinant plasmid of pIZT-CS10-sORF-null. The expression of DsRed was observed in BmN cells transfected with pIZT-CS10-sORF-null. There was an IRES site in the upstream of sORF of vsp10 predicted by IRESite software. The ORF fragment containing the IRES site and vsp10 was transcribed into linear RNA in vitro and transfected into BmN cells, and it was found that vsp10 can be expressed; Through the analysis of high-throughput sequencing data of circRNA in midgut tissues infected with BmCPV, it was found that S10 dsRNA (+) strand could produce two circRNAs containing vsp10 open reading frame, namely S10-circ1 and S10-circ7 (both located in the middle of S10 fragment, and S10-circ1 contained the complete sequence of S10-circ7). The two circRNAs were identified by reverse PCR, Sanger sequencing and Northern blotting. In order to verify whether vsp10 can be encoded by circRNA, we chose the circRNA S10-circ1 with larger molecular weight for experiment, and designed siRNA (circ1-siRNA-1 and circ1-siRNA-2) for S10-circ1 junction site and middle region of the circRNA, and siRNA for linear molecule produced by S10-circ1 expression vector pIZT-LcR-circ1 (linear-siRNA). The effect of knocking down these RNA molecules on the level of vsp10 was detected by Western blotting. The results showed that the

down-regulation of S10-circ1 had no significant effect on the level of vsp10, but the down-regulation of the transcripts of S10-circ1 parental gene resulted in the down-regulation of vsp10. It is speculated that vsp10 may be produced by its linear RNA coding, rather than from known circRNA. Through the study of the expression phase of vsp10, it was found that with the increase of infection time, the expression of vsp10 was positively correlated with virus proliferation and replication. These results indicate that the micropeptide vsp10 can be encoded by the sORF of S10 dsRNA sense chain (+) linear RNA, which lays a foundation for further functional research of virus encoded micropeptide vsp10.

In order to study the function of vsp10, the effects of vsp10 on BmCPV itself and host cells were studied. qRT-PCR and Western blotting showed that vsp10 could delay the proliferation and replication of BmCPV. In order to explore the mechanism of vsp10 delaying virus proliferation and replication, qRT-PCR detection showed that overexpression of vsp10 could increase the expression levels of apoptosis related genes *Caspase*, *Apaf*, *P53* and *Sur2*, and down regulate the expression levels of *Bcl-2* (inhibitor of apoptosis gene) and *Bmdrc2* (RNAi pathway). Flow cytometry showed that overexpression of vsp10 could inhibit cell cycle and promote apoptosis. Further Western blotting and TUNEL analysis showed that vsp10 overexpression could increase the level of apoptosis. We also found that vsp10 could decrease mitochondrial membrane potential, and vsp10 could be located in mitochondria by immunofluorescence assay. These results indicate that vsp10 can induce apoptosis. Together with the previous studies from our laboratory, we initially selected candidates interacting with vsp10 by IP experiments and mass spectrometric identification, from which the apoptosis related protein PHB2 was selected for subsequent studies. The interaction of vsp10 with phb2 was confirmed by CO-IP and co immunolocalization. Further study found that both the inhibition of BmCPV virus and the promotion of host cell apoptosis by vsp10 were impaired after knockdown of PHB2 gene expression.

In conclusion, a sORF is present on the linear RNA of the positive sense strand of the BmCPV S10 fragment and can be translated by an IRES initiation of a micropeptide of 59 aa, vsp10, which was shown in further studies to negatively regulate viral proliferation and replication, possibly by interacting with PHB2 to induce apoptosis. The results provide insight into the source and function of BmCPV encoded vsp10 and provide new insights into understanding BmCPV genomic information, regulation of viral replication

proliferation and biological functions of virus encoded micropeptide.

Key words: vsp10, PHB2, IRES, linear RNA transcript, apoptosis, mitochondria, BmCPV

Writer by: Cao Manman

Supervised by: Cao Guangli

目 录

第一章 文献综述.....	1
1 SEPs 功能的研究进展.....	1
1.1 SEPs 的概述.....	1
1.2 SEPs 的研究方法.....	2
1.3 SEP 的种类.....	4
1.4 SEPs 的生物学功能.....	5
1.5 病毒 SEP 的研究进展.....	6
2 BmCPV 的研究进展.....	6
2.1 BmCPV 概述.....	6
2.2 BmCPV 的的入侵途径研究.....	7
2.3 宿主对 BmCPV 入侵的免疫应答.....	8
3 研究目的与研究内容.....	9
3.1 研究的目的与意义.....	9
3.2 研究内容.....	9
3.3 技术路线.....	10
参考文献.....	10
第二章 BmCPV S10 正义链编码 vsp10 的鉴定.....	16
1 引言.....	17
2 材料与方法.....	18
2.1 实验材料.....	18
2.2 试剂配制.....	20
2.3 常用实验方法.....	22
2.4 反向 PCR.....	26
2.5 Northern blotting.....	26
2.6 vsp10 表达蛋白样品的制备.....	27
2.7 vsp10 多克隆抗体的制备.....	27
2.8 免疫组化.....	28

2.9 细胞免疫荧光.....	30
2.10 体外制备带有 IRES 位点的 vsp10 sORF 线性序列.....	30
2.11 pIZT-CS10-sORF-null 和 pIZT-LcR-circ1 载体的构建.....	31
2.12 数据处理与统计.....	32
3 结果与分析.....	32
3.1 vsp10 的预测及分析.....	32
3.2 vsp10 抗体的制备及在 BmCPV 感染的家蚕中肠的检测.....	33
3.3 vsp10 在 BmCPV 感染的细胞中的定位.....	36
3.4 BmCPV S10 线性 RNA 转录本可编码 vsp10.....	37
3.5 vsp10 可能并非由 circRNA 编码.....	41
3.6 vsp10 的表达时相.....	45
4 讨论.....	46
5 结论.....	48
参考文献.....	48
第三章 vsp10 促进细胞凋亡的功能研究.....	52
1 引言.....	52
2 材料与方法.....	54
2.1 实验材料.....	54
2.2 试剂配制.....	55
2.3 实验方法.....	55
3 结果与分析.....	60
3.1 vsp10 可延缓 BmCPV 的复制增殖.....	60
3.2 vsp10 对免疫和凋亡相关通路基因的影响.....	62
3.3 vsp10 抑制细胞周期.....	63
3.4 vsp10 促进细胞凋亡.....	64
3.5 vsp10 促使线粒体损伤.....	67
3.6 vsp10 与线粒体共定位.....	68
3.7 vsp10 可与 PHB2 蛋白相互作用.....	69
3.8 vsp10 可以促进 PHB2 的表达.....	73
3.9 干扰 PHB2 减弱 vsp10 对病毒的抑制和凋亡的促进.....	74

4 讨论.....	77
5 结论.....	79
参考文献.....	80
结 论.....	84
附录一 缩略词表.....	85
附录二 质粒图谱.....	86
附录三 常用仪器.....	94
致 谢.....	95

第一章 文献综述

1 SEPs 功能的研究进展

生物信息学分析中，常常通过设定开放阅读框的最小参数以了解基因组中开放阅读框的情况，因此也常常忽略了一些比较短小的开放阅读框，通常的基因注释流程都默认忽略掉 100 aa 以下的多肽，认为这些都是噪音。实际上，研究者早就发现小开放阅读框（small open reading frame, sORF）具有重要作用。酵母的 *GCN4* 基因的产物为反式作用因子，可识别顺式作用元件 TGACTC 重复序列，*GCN4* 基因 mRNA 有一个约 600 bp 的前导序列，含 4 个很短的 ORF（仅编码 1-2 个氨基酸残基），*GCN2* 和 *GCD1* 基因为 *GCN4* 基因的反式作用因子基因，控制第 3、4 个 sORF。*GCD1* 起抑制效应，*GCN2* 克服其抑制效应。而第 1、2 个 sORF 可解除第 3、4 个 sORF 的抑制作用。这一例子说明了 sORF 的重要性，已成为教科书实例^[1]。随着翻译组（核糖体图谱，ribosome profiling, ribo-seq）技术的普及，发现这些“非编码”RNA（noncoding RNA, ncRNA）分子是普遍翻译的，这才打开了小肽研究的大门。

近年来，小分子 RNA 和小分子多肽（小肽）等生物学小分子的研究一直是分子遗传学的研究热点之一，其中包括了 sORF 及其编码小肽研究。本课题研究侧重关注一类来源于小开放阅读框（small open reading frame, sORF），且编码的生物活性肽（sORF encoded peptides, sORF encoded polypeptides, micropeptides, SEPs）的研究进展。

1.1 SEPs 的概述

小开放阅读框架 sORF 由一个起始密码子、一串小于 100 的连续密码子和一个终止密码子组成。不同于经典的激素肽和神经肽，小开放阅读框编码的肽 SEPs 由 sORF 直接编码^[2-5]，不需要进行水解加工^[6,7]。研究表明 SEPs 在许多基础的生物进程中发挥着重要的调节作用，例如能量代谢、生长发育、转录翻译和细胞死亡等。玉米花粉的一个优势基因 *Zm908*，具有几个假定的短开放阅读框架（sORFs），其最长的 sORF 编码一种 97 个氨基酸的小肽 *Zm908p11*。*Zm908p11* 作为一种新的配体与 profilins 结合，在玉米花粉管生长代谢过程中起着必需的作用^[8]。在果蝇中

Pri sORF 基因编码的一个小肽可以通过修饰转录因子 Shavenbaby (Svb) 来控制果蝇表皮的分化^[4]。来源于斑马鱼胚胎发育过程中表达的候选信号蛋白, 可以调控生长发育的小肽 Toddler, 它的缺失和过量产生都会减少斑马鱼原肠胚形成过程中中胚层细胞的运动^[2]。此外, 也有研究表明小肽可以作为拯救因子发挥作用。例如 Humanin (HN) 基因可以编码一种小肽, 其可以消除由多种不同类型的家族性阿尔茨海默氏病基因和 A β 淀粉样蛋白引起的神经元细胞死亡^[9]。虽然如此, 目前对于 SEPs 的研究报道还较为稀少, 因此我们对其生物活性、基因表达和调控还知之甚少, 对 SEPs 的发现和研究表明我们将丰富我们对基因组和蛋白质组组成的认知, 并为分子遗传学和细胞生物学提供新的见解, 具有重大的研究前景。

SEPs 的小尺寸使得它们难以通过计算和实验方法的发现, 所以在发现 sORF 和确定真正的编码 sORF 方面存在许多挑战。一方面, 利用生物信息学技术通过简单的复制用于大蛋白基因的预测算法来预测 sORF 的表达是非常困难的。由于 sORF 结构简单, 其用来评估 ORF 的编码潜力的特征不如长蛋白编码基因那样丰富。另一方面, 非注释的 SEPs 在数据库中无法通过直接检索发现。即便是数据库中存在的 SEPs, 也会因为尺寸小, 丰度低, 甚至寿命短从而导致他们难以被检测到。随着计算方法和实验技术的改进, 在应对这些挑战方面取得了很大的进展, 但是在发现 sORF 和确定真正的编码 sORF 方面任然存在着许多挑战。

1.2 SEPs 的研究方法

随着技术的发展, 越来越多的 SEP 开始被鉴定到。如核糖体图谱, 质谱和蛋白质组学等。

1.2.1 核糖体图谱

核糖体图谱 (ribosome profiling, RIBO-seq) 是一种由 Weissman 课题组于 2009 年首次发表的翻译组学研究技术^[10], 主要通过对核糖体保护的基因片段进行深度测序来确定核糖体分布的位置信息, 由此可得到各转录本上核糖体的分布和密度, 从基因组水平检测蛋白质的翻译状况^[11]。通过这种技术, 我们可以直接监测体内蛋白质的合成过程, 并且通过这种方法发现了许多之前被注释为非编码 RNA 的转录本可以被翻译。

虽然 RIBO-seq 技术已被广泛使用, 但是它仍然存在着一些弊端。一方面, 核糖体保护片段 (ribosome protected fragment, RPF) 并不能区分转录本是否具有编

码潜力^[12]。另一方面, 由于核糖体是一个大的 RNA-蛋白质复合体, 任何核酸酶都不可避免地会消化 rRNA, 从而损害核糖体的完整性, 导致实验偏差和信息丢失^[13]。Aspden^[14]等通过改善核糖体谱的生化基础解决了这个问题。利用 poly-RIBO-seq 技术在多聚体部分进行核糖体足迹, 按照典型的蔗糖梯度分离多聚体片段, 明确地识别了可以活跃翻译并与几个核糖体结合的转录物。但由该技术分辨率低, 因而不适合鉴定少于 30 个密码子的 sORF。

1.2.2 质谱

质谱分析 (Mass Spectrometry, MS) 通过将物质离子化后测量各离子谱峰的强度, 再确定化合物的分子量^[15]。质谱分析的原理是按照质荷比的顺序排列带电的原子或分子, 并画出相应的谱线, 再将实验光谱与参考或定制蛋白质数据库中所有候选肽的理论光谱进行匹配, 从消化的蛋白质样品中检测 sORF 编码的产物^[16]。理论上, 作为一种强大的技术, 质谱可以检测从 sORF 翻译而来的 SEPs, 从而可以直接验证转录本的编码潜力。

与核糖体图谱相比, MS 的优势在于可以直接从开放阅读框检测肽, 从而验证肽的生产^[17, 18]。然而, 质谱偏向于更丰富的蛋白质意味着它只检测细胞中丰富的肽, 限制了鉴定 SEPs 的可能性^[19]。该方法还包含一些其他的潜在问题, 例如样品制备, SEPs 的丰度和大小, 以及某些蛋白质的半衰期过短都会使检测出现偏差, 导致 MS 无法观察 SEPs^[20]。随着更有效的策略出现和仪器的改进, 将在不久的将来发现更多的天然形式和成熟状态的 SEPs。内源性 SEPs 仍然是肽组学的重要组成部分。

1.2.3 蛋白质基因组学技术

蛋白质基因组学技术结合了基因组学、转录组学和蛋白质组学, 是直接研究基因组注释的工具^[21, 22]。SEPs 也已经通过蛋白质基因组学得到了鉴定。例如在 C2C12 细胞脂滴中鉴定到的总共 15 种新的 SEPs 中, 脂滴 (lipid droplet, LD) 相关的非编码 RNA 编码蛋白 1 (LD-associated noncoding RNA-encoded protein 1, LDANP1) 被证明定位在 LDs 上并通过蛋白酶体降解。LDANP1 的稳定表达抑制了油酸 (oleate, OA) 处理过的成肌细胞中三酰 (triacylglycerol, TAG) 甘油的积累, 并且棕榈酸对胰岛素敏感性降低的挽救受到抑制^[23]。

1.2.4 生物信息学和计算方法

最初的生物信息学技术是通过对核苷酸组成、内含子剪接位点、启动子和翻译起始位点等的分析来区分编码序列和非编码序列的。但是在预测较小的 ORF 时，由于多个标准的集成增加容易导致预测时出现假阴性信号。为了解决这些问题，已经开发了一些用于鉴定编码 sORF 的基因预测程序。调用比较分析的编码区识别工具（coding region identification tool invoking comparative analysis, CRITICA）是一种新的预测程序，它可以通过结合比较分析和编码序列的统计分析来识别可编码的 sORF^[24]。转录本蛋白编码潜能预测工具（coding potential calculator, CPC）可以基于对开放阅读框的大小、覆盖范围、完整性和保守性的分析来评估转录本的蛋白质编码潜力^[25]。后来，有研究表明表达的开放阅读框对密码子的使用是偏向性的，sORF finder 就是由此应运而生的一个程序^[17]。它可以根据核苷酸序列组成和氨基酸水平的保守性来鉴定高编码潜能的 sORF^[26]。所有这些方法都在一定程度上依赖于序列保守性，但是一些物种、组织或细胞特异性蛋白质和一些起调节作用的功能性转录因子可能几乎没有序列保守性，所以很容易被遗漏。另外，虽然理论上假定的 sORF 可以在任何给定的序列中找到，但是它们中的大多数从来没有被翻译过，也没有任何功能。最后，尽管通过这些计算方法已经发现了数千个 sORF，但重要的是结合实验来证实这些 sORF 是否可以被翻译成新的 SEPs。生物信息学技术对于 sORF 的发现起着非常重要作用，但是用来鉴定和评估给定 sORF 的蛋白质编码潜力的实验技术也是不可或缺的。

1.3 SEP 的种类

SEPs 的产生机制可能有以下几种方式。其一，SEPs 可由带注释的蛋白质编码基因借助选择性剪接翻译产生^[27]。例如，编码 DEDD2-SEP 的 sORF 是 DEDD2 转录物的主 CDS（coding sequence）内的移码序列，它无法被传统的核糖体扫描机制所翻译。后续研究也揭示了 DEDD2 RNA 存在两种剪接变体，其中一种用于表达全长 DEDD2 蛋白，而另一种则是截短的 mRNA 序列，它的第一个起始密码子即为 DEDD2-SEP s(m)ORF 的起始密码子^[16]。其二，SEPs 也可通过给定的 RNA 转录物的多顺反子翻译产生。果蝇中的 pri (tal) mRNA 作为一个典型的多顺反子转录本，它具备四个独立的 sORFs，其分别编码三个长度为 11 个氨基酸的小肽以及一个长度为 32 个氨基酸的小肽^[5]。最后，非编码 RNA（non-coding RNA, ncRNA）

也是 SEPs 的重要来源之一^[17]。ncRNA 家族可细分为小核仁 RNA (small nucleolar RNAs, snoRNAs)、微小 RNA (microRNAs, miRNAs)、环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 以及长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs)。全基因组翻译谱和核糖体图谱的快速发展表明, ncRNA 上的少量 sORFs 实际上也可具有肽或蛋白质编码潜力。例如, 研究报道 lncRNA HOXB-AS3 可编码一个 53 个氨基酸的 SEP, 且该 SEP 能通过调节丙酮酸激酶 M (pyruvate kinase M, PKM) 的选择性剪接和肿瘤代谢重编程来抑制结肠癌的生长^[28]。此外, 当 circRNAs 上具备核糖体结合位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 或存在 N6-腺苷酸甲基化 (N6-methyladenosine, m6A) 修饰时, 它也可编码和翻译蛋白^[29, 30]; circ-ZNF609 就是此类可以翻译并且能在肌生成中发挥作用的环状 RNA^[31]。

1.4 SEPs 的生物学功能

研究人员在 SEPs 的编码潜力得到充分证实时, 还希望验证 SEPs 的生物学作用。通过研究发现 SEPs 的亚细胞分布可能为其生物学功能提供有用的信息。一些由基因 5'UTR 内的 sORFs 编码的小肽可以在与分化和发育相关的基因表达中起调节作用^[32, 33]。例如, 在多个个体组织中, 含有 uORFs (upstream open reading frames) 的基因的蛋白表达水平要低于不含 uORFs 的基因^[34]。同样, 由 mRNA 中的重叠编码区或 lncRNA 编码的 SEPs, 可以作为转录调节因子参与无义介导的 RNA 衰变途径 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) ^[35, 36]。

另一些由线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 上 sORF 编码的 SEP, 可以调节代谢稳态。例如在线粒体 12S rRNA 内的 sORF, 编码一个 16 个氨基酸的小肽 (mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c, MOTS-c), 它调节胰岛素敏感性和代谢稳态。它的主要靶器官似乎是骨骼肌, 通过抑制叶酸循环和嘌呤的生物合成, 导致 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 活化。MOTS-c 治疗小鼠可预防年龄依赖性和高脂肪饮食诱导的胰岛素抵抗, 以及饮食诱导的肥胖^[37]。

由于一些 SEPs 可以与一些大蛋白或大分子结合, 因此我们就可以根据已知的相互作用伙伴的功能来研究 SEP 的功能。与其他蛋白质互作在已知 SEP 中的重要性意味着 SEP 与蛋白质相互作用的鉴定将是表征 SEP 分子功能的一条有效途径。例如, 在 HEK293 细胞中 MRI-2-SEP 可以通过与 Ku70/Ku80 异二聚体的互作在非

同源性末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 通路中发挥作用^[38]。此外一些 SEP 通过与 SERCA 的结合从而影响肌肉的正常收缩^[39, 40]。

1.5 病毒 SEP 的研究进展

由于病毒本身需要依靠宿主细胞才能进行生物活动, 因此病毒自身的 sORF 需要借助宿主细胞才能翻译。迄今为止的研究发现, 不管是 DNA 病毒还是 RNA 病毒都可以借助宿主产生 SEP。人乳头状瘤病毒 (human papillomaviruses, HPVs) 是一种双链 DNA 病毒, 它可以产生一种叫做 circE7 的环状 RNA。circE7 定位在细胞质中, 可以与多聚体结合。由于其是被 N6-甲基腺苷 (N6-methyladenosine, m⁶A) 修饰过的, 因此并产生 E7 癌蛋白。特异性破坏 circE7 可以降低 E7 癌蛋白的表达并抑制肿瘤细胞的生长, 因此 HPV 病毒编码的 circE7 产生的小肽可能与人乳头状瘤病毒的转化特性有关^[41]。

我们的团队最近发现 RNA 病毒也可以编码 SEP。家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cypovirus, *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 是一种双链 RNA 病毒, 其基因组 S5 片段的负链鉴定出一个小的开放阅读框 (S5-SORF), 并且可以编码 27 aa 的小肽。该小肽可以抑制病毒的增殖^[42]。研究表明宿主通过病毒基因组产生抗病毒小肽, 为宿主细胞的抗病毒机制提供了新的思路, 也打破了病毒 dsRNA 负链不能编码蛋白的传统观念。

2 BmCPV 的研究进展

2.1 BmCPV 概述

质型多角体病毒 (cypovirus, cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) 是一种双链 RNA (dsRNA) 病毒, 属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 质型多角体病毒属 (Cypovirus) ^[43]。CPV 的基因组通常由 10 条双链 RNA 片段组成^[44]。家蚕质型多角体病毒 BmCPV 属于 1 型 CPV 病毒, 其病毒粒子为一个直径在 60-80 nm 之间的对称的二十面体结构, 并且没有囊膜包裹。BmCPV 基因组的每条双链 RNA (S1-S10) 均含有一个完整的开放阅读框^[45]。其中 S1、S2、S3、S4、S6 和 S7 片段编码 6 个结构蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4、VP6 和 VP7 从而组成完整的病毒粒子结构。VP1 可以自组装成单层衣壳结构, 是主要的结构蛋白^[46]。VP2 位于衣壳内部, 其功能类似于 RNA 依赖 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) ^[47]。VP3

作为病毒的刺突蛋白具有一个保守的 RGD 基序, 可以结合宿主细胞表面的受体^[48]。VP4 可以与多角体蛋白互作, 促进多角体蛋白的装配和病毒粒子的包埋^[49]。此外, VP4 还能与 GTP 和 UTP 结合帮助病毒 RNA 的 5'端加帽。VP6 同时包含 AP 核酸内切酶结构域和 RNA 剪接因子结构域, 推测其可能参与了病毒基因组转录后的加工过程^[50]。VP7 经翻译修饰后会发生不同程度的切割产生 40 kDa 的衣壳蛋白并促进衣壳蛋白的稳定^[51]。

BmCPV 基因组的 S5, S8-10 片段分别编码非结构蛋白 p101 (NSP5), p44 (NSP8), NS5 (NSP9), 和一个多角体蛋白。NSP5 的羧基末端有一个锌指结构域 C2H2, 且 NSP5 经切割会形成 NSP5a 和 NSP5b 两个蛋白, 其可能与病毒基因组的转录有关^[52]。NSP8 通过 SMART 分析发现可能属于 GcrA 家族, 发现其可能通过充当转录因子调控宿主基因的转录。NSP9 上有类似于膜攻击复合物的结构域, 并且能够与病毒 dsRNA 结合, 推测其可能参与宿主细胞的裂解和病毒 mRNA 的聚集^[53]。多角体蛋白由 S10 片段编码, 它可以包裹并保护病毒粒子, 在中肠碱性条件下会裂解释放病毒粒子。

2.2 BmCPV 的入侵途径研究

BmCPV 可以特异性感染家蚕中肠上皮柱状细胞, 感染周期较长, 表现出典型的慢病毒感染特征。BmCPV 多角体首先经口感染, 多角体会在中肠的碱性条件下裂解释并放病毒粒子。病毒粒子首先感染中肠的后部, 然后蔓延至整个中肠, 导致患病家蚕食欲下降, 生长缓慢, 发育不良并最终导致幼虫死亡^[54]。整个过程会持续 2-3 个龄期甚至更久。

近年来的研究发现, 依赖 $\beta 1$ 整联蛋白内化的受体介导的内吞作用是哺乳动物呼肠孤病毒感染的主要途径^[55]。例如 Belloncik 等通过研究发现白地老虎质型多角体病毒 (*Euxoa scandens* CPV, EsCPV) 病毒粒子通过胞吞入侵宿主细胞^[56]。虽然普遍认为呼肠孤病毒是通过网格蛋白介导的内吞途径入侵细胞的, 但也有例外, 棉铃虫质型多角体病毒 (*Heliothis armigera* CPV, HaCPV) 同为呼肠孤病毒属的一员, 其病毒粒子通过表面突起附着于微绒毛表面, 然后通过突起将遗传物质注入到宿主细胞内并逐步向核内转移, 而病毒的衣壳则被留在胞外^[57]。这说明不同的呼肠孤病毒可能通过不同的途径入侵细胞。

早期的研究发现 BmCPV 在入侵细胞时, 会通过表面突起吸附在膜上并将

dsRNA 注入进细胞内, 病毒衣壳并不会进入细胞而是留在细胞表面^[58]。Tan 等通过电镜观察感染不同时间的中肠组织切片, 在中肠组织的各类细胞中都发现了 BmCPV 的病毒粒子的入侵, 但是最后仅在柱状细胞中观察到了病毒发生基质和组装好的子代病毒^[59]。不同于先前的研究, 该研究表明病毒粒子会整个侵入细胞, 而不是只有髓核进入细胞。同样孙京臣等通过透射电镜对感染 BmCPV 不同时间的中肠组织样本观察后, 发现感染 1.5 h 后, 多角体就可以被完全裂解并释放病毒粒子。感染 6 h 后病毒侵入微绒毛内, 并于 9 h 后在圆筒形细胞质中观察到病毒粒子^[60]。因为 BmCPV 也同属于呼肠孤病毒科, 因而它的入侵途径可能也与内吞途径有关, 但是具体的途径还需要进一步的研究。

2.3 宿主对 BmCPV 入侵的免疫应答

到目前为止, 对家蚕的抗病毒系统和宿主细胞与 BmCPV 相互作用机制的研究仍处于起步阶段, 在此基础上通过对 BmCPV 感染和正常家蚕中肠的基因转录变化进行微阵列分析, 发现感染 72 h 后, 有 258 个基因表现出明显的表达水平差异。视黄醇代谢和维生素 B6 代谢等的相关基因表达水平被下调, 相反参与核糖体和蛋白酶体途径等的基因表达水平被上调, 表明 BmCPV 的感染可以引起一系列重要的生理和病理变化^[61]。通过数字基因表达谱 (digital gene expression profiling, DGE) 对感染 BmCPV 后的家蚕的中肠转录组变化进行研究, 总共检测到 752 个差异表达的基因, 其中很多都与核糖体和 RNA 的转运途径有关^[62]。此外, 有研究表明 microRNAs (miRNAs) 已被证明在调节宿主-病原体相互作用中起关键作用, 在 BmCPV 感染的家蚕中肠中发现有 58 种 miRNA 差异表达。这些 miRNA 的靶基因主要参与了家蚕的刺激和免疫系统相关过程^[63]。最近有研究发现外源 RNAi 途径在对抗病毒感染中也能起到重要作用, 通过对病毒小 RNA (virus small RNA, vsRNA) 进行深度测序发现 exo-RNAi 可以有效抵抗 BmCPV 的持续性感染, 同时发现一个退化基序在不同长度的 vsRNAs 的切割位点显著富集, 它将 vsRNAs 的生物发生和分布的起源同一个未知的 RNase 联系起来, 因此 RNase 活性可能是鳞翅目宿主抗病毒防御的重要因素^[64]。这些研究不仅为病毒入侵的分子机制提供了基础, 也为进一步研究家蚕对 BmCPV 的抗病毒机制提供了新的方向。

3 研究目的与研究内容

3.1 研究的目的与意义

家蚕作为我国最重要的经济昆虫之一，为养蚕业的发展做出了巨大的贡献。长期以来，病毒感染给家蚕养殖业造成了巨大的经济损失。家蚕质型多角体病毒（BmCPV）特异性侵染家蚕中肠组织，造成家蚕中肠脓病的发生，致使家蚕食欲不振，发育迟缓并最终导致家蚕死亡，严重影响蚕丝的产量。家蚕为鳞翅目昆虫的模式生物，因此有关 BmCPV 的研究对家蚕病毒的防治和针对鳞翅目昆虫的生物农药研发具有重大意义。

SEP 是一类来源于小开放阅读框（sORF）的生物活性肽，且在多种不同的生物进程中发挥着非常重要的作用。由于 SEP 片段较小，所以对 SEP 的研究主要集中在病毒以外的生物上。近年来发现的来源于病毒的 SEP，主要参与病毒的侵染过程，而关于其他的功能性病毒 SEP 的报道仍然稀少。由于病毒必须借助宿主细胞来进行相应的生物活动，因此对病毒自身 SEP 功能的研究除了需要自身基因组的调控，还涉及宿主细胞的调控。本研究通过预测发现 BmCPV S10 片段具有编码 59 aa 的小肽 vsp10 的潜力。在确认 vsp10 真实存在的基础上，探讨 vsp10 的来源、功能及作用机制，旨在从一个全新的角度理解 BmCPV 基因组的遗传信息、病毒编码小肽的作用及 BmCPV 与宿主细胞的互动，为宿主细胞的抗病毒机制提供新的思路，并有可能为 BmCPV 病毒的防治提供新的分子靶标。

3.2 研究内容

3.2.1 BmCPV S10 正义链编码 vsp10 的鉴定

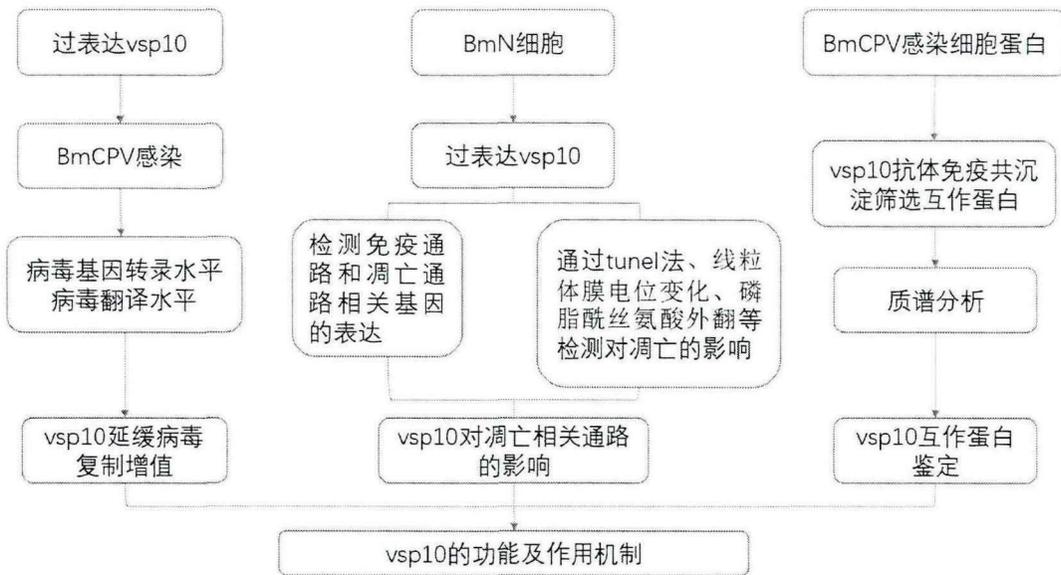
- (1) vsp10 的预测及分析
- (2) vsp10 抗体的制备及在 BmCPV 感染的家蚕中肠的检测
- (3) vsp10 在细胞和中肠组织中的定位
- (4) vsp10 的来源鉴定
- (5) BmCPV S10 dsRNA 及其编码的小肽 vsp10 的表达时相

3.2.2 vsp10 促进细胞凋亡的功能研究

- (1) vsp10 可延缓 BmCPV 的复制增值
- (2) vsp10 对免疫和凋亡相关通路基因的影响

- (3) vsp10 抑制细胞周期并促进细胞凋亡
- (4) vsp10 促使线粒体损伤
- (5) vsp10 相互作用蛋白的筛选与鉴定
- (6) vsp10 可与 PHB2 蛋白相互作用并促进 PHB2 的表达
- (7) vsp10 定位在线粒体上
- (8) 干扰 PHB2 减弱 vsp10 对病毒的抑制和凋亡的促进

3.3 技术路线



参考文献

- [1] 孙乃恩. 分子遗传学 [M]. 南京大学出版社, 1990.
- [2] Pauli A, Norris ML, Valen E, et al. Toddler: An embryonic signal that promotes cell movement via apelin receptors [J]. Science, 2014, 343(6172):1248636.
- [3] Magny E G, Pueyo J I, Pearl F, et al. Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames [J]. Science, 2013, 341(6150): 1116-1120.
- [4] Kondo T, Plaza S, Zanet J, et al. Small peptides switch the transcriptional activity of shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis [J]. Science, 2010, 329(5989): 336-339.

- [5] Galindo M I, Pueyo J I, Fouix S, et al. Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family [J]. PLoS Biol, 2007, 5(5): e106.
- [6] Holst J J. The physiology of glucagon-like peptide 1 [J]. Physiol Rev, 2007, 87(4): 1409-1439.
- [7] Steiner D F. The proprotein convertases [J]. Curr Opin Chem Biol, 1998, 2(1): 31-39.
- [8] Dong X, Wang D, Liu P, et al. Zm908p11, encoded by a short open reading frame (sORF) gene, functions in pollen tube growth as a profilin ligand in maize [J]. J Exp Bot, 2013, 64(8): 2359-2372.
- [9] Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β [J]. PNAS, 2001, 98(11): 6336-6341.
- [10] Ingolia N T, Ghaemmaghami S, Newman J, et al. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling [J]. Science, 2009, 324(5924): 218-223.
- [11] Ingolia N T, Hussmann J A, Weissman J S. Ribosome profiling: global views of translation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11(5):a032698.
- [12] Guttman M, Russell P, Ingolia N, et al. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding mas do not encode proteins [J]. Cell, 2013, 154(1): 240-251.
- [13] Gerashchenko M V, Gladyshev V N. Ribonuclease selection for ribosome profiling [J]. 2016, (2): 2.
- [14] Aspden J L, Chen E, Phillips R J, et al. Extensive translation of small Open Reading Frames revealed by Poly-Ribo-Seq [J]. eLife, 2014, 3.
- [15] Leney A C, Heck A. Native mass spectrometry: what is in the name? [J]. 2017, 28(1): 5-13.
- [16] Slavoff S A, Mitchell A J, Schwaid A G, et al. Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells [J]. 2013, 9(1): 59.
- [17] Xinqiang, Yin, Yuanyuan, et al. Mining for missed sORF-encoded peptides [J]. 2019, 16(3).
- [18] Rothnagel J, Menschaert G. Short Open Reading Frames and Their Encoded Peptides [J]. 2018, 18(15).
- [19] Fouzia Y, Tetsushi Y, Nobuyoshi A. Micropeptides Encoded in Transcripts

- Previously Identified as Long Noncoding RNAs: A New Chapter in Transcriptomics and Proteomics [J]. 2018, 9: 144.
- [20] Antonio V J, Attila C, Noemi D T, et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools [J]. 2016, (D1): D447-D456.
- [21] Barbieri R, Guryev V, Brandsma C A, et al. Proteogenomics: Key Driver for Clinical Discovery and Personalized Medicine [M]. Proteogenomics, 2016.
- [22] Locard-Paulet M, Pible O, Peredo A D, et al. Clinical implications of recent advances in proteogenomics [J]. 2015, 14789450. 2016. 1132169.
- [23] Huang T, Bamigbade A T, Xu S, et al. Identification of a Micropeptide on Lipid Droplet That Mediates Lipid Storage and Insulin Sensitivity [J]. 2020.
- [24] Frith M C, Forrest A R, Nourbakhsh E, et al. The Abundance of Short Proteins in the Mammalian Proteome [J]. 2006, 2(4): e52.
- [25] Kong L, Yong Z, Ye Z Q, et al. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine [J]. 2007, 35(Web Server issue): W345-9.
- [26] Hanada K, Akiyama K, Sakurai T, et al. sORF finder: a program package to identify small open reading frames with high coding potential [J]. 2010(3): 399-400.
- [27] Zhang T, Walensky L D, Saghatelian A. A Nonapoptotic Role for BAX and BAK in Eicosanoid Metabolism [J]. 2015, 10(6): 1398-1403.
- [28] Huang J Z, Chen M, Chen D, et al. A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth [J]. 2017, 68(1): 171-184. e6.
- [29] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine [J]. 2017, 27(5).
- [30] Chen C Y, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs [J]. 1995, 268(5209): 415-417.
- [31] Legnini I, Timoteo G D, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis [J]. 2017, 66(1).
- [32] Sendoel A, Dunn J G, Rodriguez E H, et al. Translation from unconventional 5' start sites drives tumour initiation [J]. Nature, 2017, 541(7638): 494-499.
- [33] Duncan C D, Mata J. The translational landscape of fission-yeast meiosis and sporulation [J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(7): 641-647.
- [34] Ye Y, Liang Y, Yu Q, et al. Analysis of human upstream open reading frames and

- impact on gene expression [J]. 2015, 134(6): 605-612.
- [35] Tani H, Torimura M, Akimitsu N. The RNA Degradation Pathway Regulates the Function of GAS5 a Non-Coding RNA in Mammalian Cells [J]. 2013, 8(1): e55684.
- [36] Smith J, Alvarez-Dominguez J, Kline N, et al. Translation of Small Open Reading Frames within Unannotated RNA Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. 2014, 7(6): 1858-1866.
- [37] Lee C, Zeng J, Drew B, et al. The Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance [J]. 2015, 21(3): 443-454.
- [38] Slavoff S A, Heo J, Budnik B A, et al. A Human Short Open Reading Frame (sORF)-encoded Polypeptide That Stimulates DNA End Joining [J]. 2014, 289(16): 10950-10957.
- [39] Kang S, Dahl R, Hsieh W, et al. Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 5185-5198.
- [40] Singh D R, Dalton M P, Cho E E, et al. Newly Discovered Micropeptide Regulators of SERCA Form Oligomers but Bind to the Pump as Monomers [J]. 2019, 431(22).
- [41] Zhao J, Lee E E, Kim J, et al. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2300.
- [42] Hu X, Chen F, Zhu L, et al. *Bombyx mori* cypovirus encoded small peptide inhibits viral multiplication [J]. 2019, 96.
- [43] Payne C C, Mertens P. Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses [J]. 1983.
- [44] Fujii-Kawata I, Miura K I, Fuke M. Segments of genome of viruses containing double-stranded ribonucleic acid [J]. 1970, 51(2): 247, IN1, 51-50, IN1, 253.
- [45] Zhong-Hua, Pan, Kun, et al. dsRNA interference on expression of a RNA-dependent RNA polymerase gene of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. 2015, 565(1).
- [46] Hagiwara K, Naitow H. Assembly into single-shelled virus-like particles by major capsid protein VP1 encoded by genome segment S1 of *Bombyx mori* cypovirus 1 [J]. 2003, 84(9): 2439-2441.
- [47] Rao S, Carner G R, Scott S W, et al. Comparison of the amino acid sequences of

- RNA-dependent RNA polymerases of cypoviruses in the family Reoviridae [J]. 2003, 148(2): 209-19.
- [48] Hagiwara K, Rao S, Scott S W, et al. Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori* cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively [J]. 2002, 83(Pt 6): 1477-1482.
- [49] Ijiri H, Coulibaly F, Nishimura G, et al. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture [J]. 2009, 30(26): 4297-4308.
- [50] 张轶岭. BmCPV 受体蛋白的筛选鉴定及家蚕翅原基发育的分子机制研究 [D]. 苏州大学, 2014.
- [51] Hagiwara K, Matsumoto T. Nucleotide sequences of genome segments 6 and 7 of *Bombyx mori* cypovirus 1, encoding the viral structural proteins V4 and V5, respectively [J]. 2000, 81(Pt 4): 1143-1147.
- [52] Hagiwara K, Kobayashi J, Tomita M, et al. Nucleotide sequence of genome segment 5 from *Bombyx mori* cypovirus 1 [J]. 2001, 146(1): 181-187.
- [53] Cao G, Meng X, Xue R, et al. Characterization of the complete genome segments from BmCPV-SZ, a novel *Bombyx mori* cypovirus 1 isolate [J]. 2012, 58(7): 872-883.
- [54] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学 [M]. 昆虫病毒分子生物学, 1998.
- [55] Maginnis M S, Forrest J C, Kopecky-Bromberg S A, et al. β 1 Integrin Mediates Internalization of Mammalian Reovirus [J]. 2006, 80(6): 2760.
- [56] Belloncik S, Rocheleau H, Arella M, et al. Replication of a cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) in cultured insect cells [J]. 1989.
- [57] 罗曦霞. 棉铃虫细胞培养与细胞质型多角体病毒入侵、复制的超微形态学研究 [D]. 中国农业科学院研究生院, 1986.
- [58] Kobayashi M . Penetration of polyhedrosis viruses into the cultured midgut cells of the silkworm, *Bombyx moli* [J]. Journal of Insect Biotechnology & Sericology, 2010, 41.
- [59] Tan Y R, Sun J C, Lu X Y, et al. Entry of *Bombyx mori* cypovirus 1 into midgut cells in vivo [J]. 2003, 52(5): 485-489.
- [60] 孙京臣, 陈冬妮, 杨艺峰, et al. 质型多角体病毒在家蚕体内入侵与复制研究 [J]. 2006, 045(002): 78-82.

- [61] Ping W, Xiu W, Qin G X, et al. Microarray analysis of the gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. 2011, 38(1): p.333-341.
- [62] Gao, Kun, Qin, et al. Digital Gene Expression analysis in the midgut of 4008 silkworm strain infected with cytoplasmic polyhedrosis virus [J]. 2014, 115:8-13.
- [63] Ping W, Han S, Chen T, et al. Involvement of MicroRNAs in Infection of Silkworm with *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (BmCPV) [J]. 2013, 8(7): e68209.
- [64] Zografidis A, Nieuwerburgh F V, Koliopoulou A, et al. Viral Small-RNA Analysis of *Bombyx mori* Larval Midgut during Persistent and Pathogenic Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Infection [J]. 2015, 89(22).

第二章 BmCPV S10 正义链编码 vsp10 的鉴定

摘要：小开放读码框（small open reading frame, sORF）编码的多肽（sORF-encoded polypeptide, SEP）是一类来源于 sORF 的生物活性肽，并在许多生物进程中发挥着非常重要的作用。本研究通过 sORF Finder 软件预测发现家蚕质型多角体病毒（*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV）S10 dsRNA（+）链的 393-572 nt 区域具有编码一个长度为 59 个氨基酸残基的小肽 vsp10 的潜能。通过原核表达蛋白免疫小鼠制备 vsp10 多克隆抗体，Western blotting 和免疫组化结果显示，vsp10 存在于 BmCPV 感染的家蚕中肠中；免疫荧光结果显示 vsp10 定位在细胞质中。为了研究 vsp10 的来源，首先验证了其来源于线性 RNA 转录本的可能。用 DsRed 替代含有 S10 全长 cDNA 的重组质粒 pIZT-CS10 中 vsp10 的 sORF 构建 pIZT-CS10-sORF-null 重组质粒，在转染 pIZT-CS10-sORF-null 的 BmN 细胞中能观察到 DsRed 的表达；通过 IRESite 软件预测发现 vsp10 的 sORF 上游存在一个 IRES 位点，将含有该 IRES 位点和 vsp10 的 sORF 片段体外转录成线性 RNA 并转染 BmN 细胞，发现 vsp10 可以表达；通过对 BmCPV 感染中肠组织的 circRNA 高通量测序数据分析发现，S10 dsRNA（+）链可以产生两个含有 vsp10 开放阅读框的 circRNA 即 S10-circ1 和 S10-circ7（两个 circRNA 均位于 S10 片段的中间，且 S10-circ1 包含 S10-circ7 的全序列），对这两个 circRNA 进行反向 PCR、Sanger 测序和 Northern blotting 鉴定，发现这两个 circRNA 真实存在；为了验证 vsp10 是否可以由 circRNA 编码，我们选择了分子量较大的环 S10-circ1 进行试验，并设计了针对 S10-circ1 接头位点和环中间区域的 siRNA（circ1-siRNA-1 和 circ1-siRNA-2），以及针对 S10-circ1 表达载体 pIZT-LcR-circ1 产生的线性分子的 siRNA（linear-siRNA），通过 Western blotting 检测敲降这些 RNA 分子对 vsp10 水平的影响，结果显示，下调 S10-circ1 水平对 vsp10 的水平无明显影响，但下调 S10-circ1 的亲本基因的转录产物的水平时 vsp10 水平随之下调，推测 vsp10 可能是它的线性 RNA 编码产生的，而非来源于已知的 circRNA。通过对 vsp10 的表达时相研究的发现，随着感染时间的增加，vsp10 的表达与病毒增殖复制呈正相关。这些结果表明 S10 dsRNA 正义链（+）的线性 RNA 的 sORF 可以编码小肽 vsp10，为病毒

编码小肽 vsp10 的进一步功能研究奠定了基础。

关键词: BmCPV, vsp10, circRNA, IRES, 线性 RNA 转录本

1 引言

家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 是呼肠孤病毒科, 质型多角体病毒属的一员^[1]。BmCPV 是家蚕的主要病原体之一, 会导致蚕桑业歉收造成严重的经济损失。BmCPV 多角体会在家蚕中肠的碱性环境下裂解释放出病毒粒子, 并通过感染中肠上皮细胞致使中肠型脓病的发生, 病毒还会随着粪便排出, 感染其他家蚕^[2]。感染了 BmCPV 的家蚕会表现出食欲不振, 发育迟缓的现象, 并最终导致死亡^[3]。

BmCPV 的基因组由 10 个双链的 RNA 片段组成, 并且每个片段都包含一个完整的开放阅读框, 其中 S1、S2、S3、S4、S6 和 S7 六个片段分别编码病毒的结构蛋白^[4-6], S5、S8、S9 三个片段编码非结构蛋白, S10 编码多角体蛋白^[6-8]。BmCPV 在宿主细胞内会进行不对称转录, 先以负链 RNA 为模板合成正链 RNA, 再以正链 RNA 为模板合成负链 RNA 和蛋白并组装成病毒粒子。S10 片段编码的多角体蛋白大小在 27-31 kDa 之间, 其在病毒感染期间会结晶形成多面体并包裹病毒粒子^[9]。

蛋白质组在不同的生物之间有很大的差异, 这种差异不仅来源于蛋白质编码基因的直接表达, 还来源于选择性转录起始位点和过程的使用, 如选择性剪接、转录后修饰和翻译后修饰, 最近的研究已经确定了蛋白质组的一个新的组成部分: 小开放阅读框架 (small open reading frame, sORF) 的翻译。sORF 是指由小于 100-150 个连续密码子所组成的基因片段, 由这些 sORF 编码的生物活性肽被称为 SEP (sORF-encoded peptides) ^[10-13]。SEP 普遍存在于真核细胞和原核细胞中^[14], 说明蛋白质组中 sORFs 的翻译和生物活性小肽的产生是非常丰富的。在多种不同的基因组区域都发现可以编码 sORF, 包括 5'-UTR、miRNA、多顺反子基因或一些长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs) ^[15]。这些 sORF 在基因组中的一个共同特征是主要位于非编码 RNA 序列和蛋白质编码基因的 5'-UTR (5' untranslated region) 序列中^[16, 17]。例如目前已知的最短的小肽 (6 aa) 就定位在基因的 5'-UTR 序列中, 其可以根据多胺水平调控 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶 (AdoMetDC)

的合成^[18]。

随着计算方法、蛋白质组学和下一代测序策略的改进，已经在越来越多的物种中鉴定到了小肽的存在，但大多数都是在非病毒的生物体中。在金黄色葡萄球菌中，有一种 20-22 aa 的小肽，在感染宿主的过程中可以破坏中性粒细胞膜，导致细胞溶解，帮助细菌抵御人免疫系统的攻击^[19,20]。*Brick1* (*Brk1*) 编码一种 76 aa 的小肽，并且在植物和动物中高度保守。在玉米中，它通过促进多种叶表皮细胞中的肌动蛋白依赖性细胞极化事件参与了叶表皮的形态发生^[21]。在近期的研究中，发现病毒的基因组也可以编码 sORF，并可以借助宿主细胞翻译成小肽，这种现象在 RNA 病毒和 DNA 病毒中普遍存在^[22,23]。在自然选择的过程中，病毒为了更高效的完成基因扩增产生子代病毒并向新的宿主传播，进化出了比其他生物更小尺寸的基因组，因此病毒自身可以编码许多非常小的蛋白质或小肽，这些小肽表现出很高的灵活性，相关的病毒通常会编码一些序列不同但功能相似的小肽。例如，甲型流感病毒编码的 M2 蛋白 (A/M2) 和乙型流感病毒编码的 M2 蛋白 (B/M2)，虽然它们的编码序列大相径庭，但是都可以充当质子通道，并且跨膜方向相反的 SH 蛋白可以相互替换^[24-26]。这种序列的灵活性表明，序列保守性并不是评估小肽执行类似功能的可能性的唯一标准。

在前期的研究中，我们分析发现 BmCPV 的基因组 S10 片段的正链上存在一个 sORF，本文将其编码的小肽命名为 vsp10 (virus small peptides, S10-encoded)。本研究中，我们通过 Western blotting、免疫组化和免疫荧光实验对 vsp10 的真实存在进行了确认，并且对其来源于线性 RNA 转录本编码，或 S10 dsRNA 产生的 circRNA 中 sORF 编码的可能性进行了鉴定，最后通过 vsp10 的表达谱研究了其于 BmCPV 复制增殖的相关性，相关结果为病毒编码小肽的研究提供了新的思路。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 生物材料

家蚕卵巢细胞系 (BmN)、pIZT-V5/His 载体、DH5 α 菌株、BL21 表达菌株、pIZT-V5/His 载体中带有 BmCPV S10 全长片 cDNA 的 pIZT-CS10 质粒^[27]、原核表达载体 pET-28a (+) 和 BmCPV 均由本实验室保存；用 *DsRed* 替代 pIZT-CS10 载

体中 vsp10 的 sORF 构建的 pIZT-CS10-sORF-null 质粒、siRNA 由生工生物工程(上海)股份有限公司(以下简称上海生工)合成。

2.1.2 试剂

本研究中所涉及的主要试剂(试剂盒)如表 2.1 所示。

表 2.1 本研究所涉及的重要试剂

公司名称	试剂
Roche 公司	脂质体, 生物素标记 NTP
Applichem 公司	昆虫细胞培养基 TC-100
Biological 公司	胎牛血清 (fetal calf serum, FBS)
TaKaRa 公司	RNAiso Plus, T4 DNA 连接酶, pMD19-T 载体, T7 RNA 聚合酶, Taq DNA 聚合酶
北京全式金公司	反转录试剂盒, qPCR 试剂盒
New England Biolabs	T4 RNA Ligase
Axygen 公司	质粒抽提试剂盒, 胶回收试剂盒
Solarblo 公司	Zeocin 抗生素, 琼脂糖, 酵母提取物, 胰蛋白胨, 甘氨酸, Tris 碱, 酚, 卡那, 氨苄, Tris-tricine-SDS-PAGE 凝胶试剂盒, 10×Tris-tricine-SDS 缓冲液
Thermo scientific 公司	蛋白分子 Marker
Amresco 公司	PVDF 膜
上海生工	高灵敏 ECL 发光试剂
碧云天	SDS 配胶试剂盒, 流式周期检测试剂盒, 一二抗稀释液, 封闭液。0.2 μm FVDF 膜, DAPI
Proteintech	alpha Tubulin Mouse McAb , HRP-labeled 6×His monoclonal antibody
Epicentre	Ribonuclease R (RNase R)
TIANGEN	CY3 标记的山羊抗兔荧光二抗
Bioword	FITC 标记的山羊抗鼠荧光二抗
北京博奥龙免疫技术有限公司	Annexin VPE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒
中科泰瑞	彩虹预染超低分子量 Marker
Promega 公司	Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒
武汉塞维尔生物	HRP-labeled Goat Anti-mouse IgG (H+L) 、 HRP-labeled Goat Anti- rabbit IgG (H+L)

2.2 试剂配制

2.2.1 昆虫细胞培养基

碳酸氢钠	0.35 g
TC-100 粉末	22.09 g

用蒸馏水溶解，pH 调至 6.10，然后定容至 1 L。在无菌环境下用 0.22 μm 的滤膜（2 层）过滤除菌，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。使用前分装至 200 mL 玻璃瓶，并添加 10% 的 FBS。

注：本文中所有蒸馏水、双蒸水（ddH₂O）均为超纯水机制备的超纯水替代。

2.2.2 1×PBS

称量 0.24 g KH₂PO₄、0.2 g KCl、8.0 g NaCl、1.44 g Na₂HPO₄，溶解在 950 mL 蒸馏水中，pH 调至 7.4，用超纯水定容至 1 L，高压灭菌，4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。

2.2.3 5×TBE 贮存液

硼酸	27.5 g
Tris 碱	54 g
0.5 mol/L EDTA	20 mL

pH 调至 8.0，用双蒸水定容至 1 L，于室温避光保存，工作液稀释为 0.5×TBE。

2.2.4 1%琼脂糖凝胶（Agarose）

琼脂糖	0.5 g
0.5×TBE 缓冲液	50 mL

加热溶解固体粉末，待温度下降但还未凝固时加入 5 μL GelRed，摇匀后倒胶。

2.2.5 75 mmol/L CaCl₂

称量 CaCl₂ 粉末 0.825 g，加入超纯水定容至 100 mL，灭菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.6 LB 培养基（液体）

胰蛋白胨	10 g
NaCl	10 g
酵母浸粉	5 g

用双蒸水定容至 1 L，分装到试管中（每管 3 mL），121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min。

2.2.7 LB 培养基（固体）

NaCl	10 g
酵母浸粉	5 g
胰蛋白胨	10 g
琼脂粉	15 g

用超纯水定容至 1 L，高压灭菌 30 min，取出待稍微冷却按 1:1000 的比例稀释抗生素，倒入灭菌的玻璃平板中。

2.2.8 10×Tris-SDS 电泳缓冲液

Tris 碱	60 g
甘氨酸	288 g
SDS	20 g

用超纯水溶解，定容至 1 L，室温贮存备用。

2.2.9 10% AP：称量过硫酸铵粉末 0.5 g，加入超纯水定容 5 mL，-20℃保存备用。

2.2.10 3% BSA：称量 1.5 g BSA 粉末溶解于 50 mL PBST 中，现配现用。

2.2.11 1×PBST

KCl	0.2 g
Tris 碱	3 g
NaCl	8 g
吐温	200 μL

用双蒸水定容至 1 L，于室温保存备用。

2.2.12 转膜缓冲液

甘氨酸	2.9 g
Tris 碱	5.8 g
SDS	0.37 g
甲醇	200 mL

用超纯水定容至 1 L，室温保存备用。

2.2.13 考马斯亮蓝 R250 染色液

考马斯亮蓝	0.25 g
甲醇	45 mL
冰醋酸	10 mL

加入双蒸水定容至 100 mL，滤纸过滤，室温保存。

2.3 常用实验方法

2.3.1 细胞转染

(1) 将 2×10^6 个 BmN 细胞平铺在六孔板培养板上，待细胞贴壁且状态良好时进行转染；

(2) 取两个空管 A 和 B，A 中加入 100 μ L 无血清培养基和 2 μ L 脂质体，B 中加入 100 μ L 无血清培养基和 4 μ g 质粒，然后将两管中的液体混合到一起，静置 30 min，让脂质体充分包裹质粒；

(3) 将六孔板里的旧培养基去掉，在混合液里加入 800 μ L 无血清培养基混匀，加入培养板。在 26 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4~6 h 后更换新的有血清培养基，48 h 后收集细胞进行后续实验。

2.3.2 RNA 的提取

(1) 收集细胞或组织样本，用 1 \times PBS 清洗三次，吸去 PBS 后向培养板中加入 500 μ L RNAiso Plus 裂解液，冰上静置 5 min，吸入 RNase-free EP 管中；

(2) 向步骤 (1) 的 EP 管中加入 100 μ L (1/5 RNAiso Plus 体积) 三氯甲烷，置于混匀仪上剧烈震荡 30 sec，而后将其于 0 $^{\circ}$ C 静置 10 min，直至出现分层；

(3) 4 $^{\circ}$ C，12000 r/min，15 min，取上清；

(4) 加入与上清等体积的异丙醇，颠倒混匀，0 $^{\circ}$ C 静置 10 min；

(5) 4 $^{\circ}$ C，12000 r/min，15 min，弃上清；

(6) 加入 750 μ L 预冷的乙醇 (75%)，颠倒混匀清洗沉淀，4 $^{\circ}$ C，12000 r/min，15 min，弃上清；

(7) 室温晾干沉淀至透明，加入 20 μ L DEPC 水溶解沉淀，于 -80 $^{\circ}$ C 保存；

注：若所提取的 RNA 样品用于 circRNAs 的鉴定，需将提取出的 RNA 用 RNase R 酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 15 min (按 1 U R 酶可消化 2 μ g RNA 配制反应体系)，而后再通过反转录进行 PCR 实验。

2.3.3 RNA 反转录成 cDNA

参照全式金公司反转录试剂盒说明书步骤操作如下:

(1) 在 RNase-free EP 管中加入 RNA 模板 4 μg , Random Primer 1 μL , 加 RNase-free Water 补充至 8 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后, 0 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 分钟;

(2) 在上一步混合液中加入 Reaction Mix 10 μL , Enzyme Mix 1 μL 和 Remover 1 μL 充分混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 sec (若产物用于 PCR, 则 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 若产物用于 qPCR, 则 42 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 15 min)。

2.3.4 琼脂糖凝胶电泳

(1) 将 1% 放入电泳槽中, 并倒入 0.5 \times TBE 作为电泳缓冲液;

(2) 将 27 μL PCR 产物与 3 μL 10 \times Loading Buffer 混匀, 而后在琼脂糖凝胶上点样, 进行电泳分离。设置电压 80~130 V, 时间 40 min;

(3) 电泳结束后将凝胶放置于紫外曝光仪器中曝光拍照, 参照 DNA 分子标准 Marker, 用刀片割取目的条带凝胶于 1.5 mL EP 管中, 用于胶回收。

2.3.5 胶回收 (Axygen 公司试剂盒)

步骤详见 Axygen 公司胶回收试剂盒说明书。

2.3.6 感受态细胞制备

(1) 3 μL DH5 α 或 BL21 菌液接种于 3 mL LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中活化 12 h;

(2) 从活化的菌液中吸取 30 μL 重新接种于 3 mL LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 3~4 h;

(3) 将 3 mL 培养液倒入两个 1.5 mL EP 管中, 0 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min (整个操作在无菌条件下, 避免污染);

(4) 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 r/min, 5 min, 弃上清, 用移液枪吸尽剩余培养基, 加入 750 μL 预冷的 75 mmol/L CaCl₂, 轻轻重悬沉淀, 0 $^{\circ}\text{C}$, 30 min;

(5) 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000 r/min, 5 min, 弃上清, 加入 200 μL 预冷的 CaCl₂, 轻轻重悬沉淀, 0 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h 以上 (如需要长期保存, 应加入 20 μL 灭过菌的甘油吹打混匀, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存)。

2.3.7 连接转化

胶回收产物与 pMD19-T 载体连接, 体系如下 (20 μL):

10×buffer	2 μL
目的片段	5 μL (根据胶回收浓度确定)
pMD19-T 载体	0.5 μL
T4 DNA ligase	1 μL
ddH ₂ O	11.5 μL

16℃孵育过夜。

(1) 在连接产物加入 200 μL 感受态细胞，轻轻吹打混匀，而后于 0℃冰箱中静置 30 min；

(2) 42℃热击 90 s，而后于 0℃冰箱中静置 3~5 min；

(3) 加入 1 mL 预热的 LB 液体培养基，于 37℃摇床中培养 1 h；

(4) 5000 r/min 离心 5 min (4℃)，留 200 μL 上清重悬沉淀，涂布于含抗生素的 LB 固体培养基上，37℃正置培养 30 min，然后倒置培养 12~16 h；

(5) 待长斑后挑取菌落于含抗生素的 3 mL LB 液体培养基中。

2.3.8 质粒抽提

具体步骤参照 Axygen 公司质粒抽提试剂盒说明书。

2.3.9 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

TransStart Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒 (Transgene 公司产品)。反应体系为: 2×Mix 10 μL, 上、下游引物各加 0.5 μL (1 μmol), 反转录模板 1 μL, 加 RNase-free Water 补至 20 μL。反应程序为: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 55℃ 1 min 扩增 39 个循环。荧光检测读板设置在 55℃ 1 min 阶段, 每个样品进行 3 个重复。

2.3.10 细胞蛋白收集

操作步骤参照 RIPA 强裂解液 (Beyotime, Shanghai, China) 和 NP-40 裂解液 (Beyotime, Shanghai, China) 使用说明进行。RIPA 强裂解液适用于全蛋白的提取, NP-40 裂解液较温和, 适用于进行 CO-IP 实验的蛋白样品提取。

2.3.11 SDS-PAGE

按表 2.2 配制 12% 的分离胶和 5% 浓缩胶。

表 2.2 聚丙烯酰胺凝胶的配方

成分	12%分离胶 (5 mL)	5%浓缩胶 (2 mL)
Tris-Cl	1.9 mL pH 8.8	0.25 mL pH 6.8
H ₂ O	1.0 mL	1.4 mL
30%聚丙烯酰胺	2.0 mL	0.33 mL
10% SDS	0.05 mL	0.02 mL
10% AP	0.05 mL	0.02 mL
TEMED	0.002 mL	0.002 mL

(1) 将玻璃板洗净烘干, 用夹板固定;

(2) 按照上述表格配制分离胶, 搅拌混匀后缓慢加入玻璃板的夹层中, 分离胶加完后用双蒸水封面;

(3) 分离胶凝固后, 将水倒去并用滤纸擦干, 按照上述表格配制浓缩胶, 搅拌混匀后加入玻璃板的夹层中, 插入点样梳;

(4) 待胶凝固后, 将胶板放入电泳槽, 倒入 1×Tris 电泳缓冲液, 而后拔去点样梳, 用移液器吹打上样孔除去残胶;

(5) 根据蛋白浓度用微量加样器加样, 每个孔的蛋白上样量为 50 μg, 蛋白 Marker 上样量为 3 μL, 接通电源, 先用 60 V 电压跑 30 min, 让样品压成一条直线, 待样品进入分离胶时调至 120 V 跑 1 h;

(6) 电泳结束后取出凝胶备用。

2.3.12 Western blotting

(1) 根据凝胶大小裁剪 PVDF 膜, 用甲醇活化 5 min, 将五层滤纸、凝胶、PVDF 膜、五层滤纸按顺序依次放置于夹板的负极, 放于转膜槽中。倒入转膜缓冲液接通电源, 100 V 电转 30~60 min (根据蛋白分子量大小确定转膜时间);

(2) 将 PVDF 膜放入 3% BSA 中, 室温摇床孵育 2 h 以上;

(3) 取出 PVDF 膜, 倒入一抗稀释液稀释的一抗 (根据抗体确定稀释倍数), 4°C 过夜;

(4) 回收一抗, 用 PBST 在摇床上快速洗 3 次, 每次 7 min;

(5) 吸去 PBST, 倒入二抗稀释液稀释的二抗 (1:5000), 室温摇床孵育 1.5~2 h;

(6) 回收二抗, 加入 PBST 在摇床上快速洗 3 次, 每次 10 min;

(7) 将曝光液 A 和 B 等体积混匀, 滴加到 PVDF 膜上, 机器曝光。

2.4 反向 PCR

通过对 BmCPV 感染中肠组织的 circRNA 通过高通量测序数据分析发现, S10 dsRNA (+) 链可以产生两个含有 vsp10 开放阅读框的 circRNA, 针对 vsp10 sORF 的序列设计发散引物 circ-S10 (circ-S10-F: ATATAGCTCCATTTTCGCTAG 和 circ-S10-R: CATTTTGATGGTGCGTACAT)。从 BmCPV 感染的家蚕中肠中提取总 RNA, 然后用 RNase R 酶去除线性 RNA, 取 2 μg 回收的 RNA 反转录成 cDNA, 用发散引物 PCR 扩增, 体系如下:

10 \times PCR buffer	2.5 μL
Mg ²⁺	2.5 μL
dNTPs (2.5 mmol/L)	1 μL
模板 cDNA (0.1 -0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1 μL
引物 1 (100 pmol/L)	0.5 μL
引物 2 (100 pmol/L)	0.5 μL
Taq 酶 (1 U/ μL)	1 μL
ddH ₂ O 补足体积至	25 μL

PCR 程序设置如下:

95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	} 35 cycle
95 $^{\circ}\text{C}$	50 s	
55 $^{\circ}\text{C}$	50 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的条带, 克隆进 pMD19-T 载体后送上海生工进行 Sanger 测序。

2.5 Northern blotting

(1) 实验器具用 RNA 酶去除剂进行处理备用;

(2) 配制变性琼脂糖凝胶: 称取 0.5 g 琼脂糖至 45 ml DEPC 水进行融胶, 胶融之后再向其中加入 5 ml 甲醛, 摇匀后室温倒胶;

(3) 准备 RNA 电泳样品: 20 μg RNA 与 5 μL loading 缓冲液及 1 μL GelRed 混匀;

(4) 以 5 V/cm 电泳 30 min, 电泳结束后将凝胶用一次性塑料手套包好, 在紫外成像仪器上拍照 (时间不得超过 5 min);

(5) 用虹吸法转膜过夜, 结束后将膜于紫外灯照射下交联 15 min;

(6) 预杂交: 然后将膜放入 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热的预杂交液中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 1 h;

(7) 杂交: 根据发散引物扩增得到的两个 circRNA 的接头序列 (S10-circ1 和 S10-circ7), 设计生物素标记的探针 (Bio-circ1-probe: 5'Biotin-GTATTTACGAGCGTCACCCTATCCGAAGACCGGGCGCG 和 Bio-circ7-probe: 5'Biotin-GGTATTTACGAGCGTCACATGATTGGAAGACGTCC) 并送由上海生工合成, 用 10 pmol/L 探针 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜;

(8) 洗膜: 用低强度洗膜液快速洗膜 2 次 (室温), 每次 4 min, 然后用高强度洗膜液快速洗膜 2 次 (42 $^{\circ}\text{C}$), 每次 2 min;

(9) 曝光: 用检测生物素标记的核酸的试剂盒检测杂交信号。

2.6 vsp10 表达蛋白样品的制备

(1) 接种 3 μL 含有 pET28-S10-sORF 质粒的 BL21 菌液至 3 mL 液体培养基中 (含 Kan 抗生素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床活化过夜;

(2) 接种 30 μL 过夜活化菌液至 3 mL 液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 3 h;

(3) 加入 3 μL IPTG (1 mol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 6 h 后离心收集菌体沉淀, 加入 1 mL 1 \times PBS 超声破碎 (工作 2 s, 间隔 3 s), 12000 r/min 离心 30 min 取上清, PH 调制 8.0;

(4) 在上清中加入 Ni-NTA 凝胶, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后缓慢倒入层析柱, 用不同浓度的咪唑洗脱液进行洗脱并收集。

2.7 vsp10 多克隆抗体的制备

(1) 取含目的蛋白的洗脱液与四分之一体积 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 进行 SDS-PAGE。

(2) 电泳结束后将凝胶取出, 用考马斯亮蓝染色液进行染色 2 h, 而后脱色至出现明显条带 (与目的蛋白分子量一致) 后取出凝胶并割取目的条带。

(3) 将割取的凝胶条带充分研磨后, 转移至透析袋中并加入少许 $1\times$ Tris-SDS, 于转膜槽中 110 mA 电转 3 h, 然后反向电转 10 min。电转结束后将透析袋放入 $1\times$ PBS 中, 4°C 透析过夜。

(4) 将透析袋中的液体吸出检测浓度为 4 mg/mL, 加入等体积弗氏佐剂 (第一次为完全佐剂混合, 后为不完全佐剂), 4°C 震荡 4~5 h。

(4) 选用 SPF 级雌性小鼠进行腹腔注射免疫, 每只小鼠每次注射 200~300 μg 蛋白混合液, 一共免疫 4 次, 间隔时间为一周。最后一次免疫一周后, 进行小鼠眼球取血。采集的小鼠血液 37°C 1 h, 4°C 过夜。3000 r/min 离心 10 min, 取上清, -80°C 保存备用。

2.8 免疫组化

(1) 相关溶液配制:

枸橼酸盐缓冲液 (0.01M, pH 6.0):

2.941g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 100 mL 超纯水中, 即为 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液 (A 液);

2.101g 枸橼酸 ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$) 用双蒸水定容至 100 mL, 即为 0.1 mol/L 的枸橼酸溶液 (B 液);

使用前将 41 mL B 液与 9 mL A 液混合, 并补足超纯水至 500 mL, pH 调至 6.0, 即为 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液。

0.05 mol/L TB (pH 7.6):

Tris	60.75 g
1 mol/L HCL	约 420 mL

溶于 950 mL 双蒸水中, 调节 pH 值至 7.6, 最终定容至 1 L。

过氧化物酶阻断溶液 (3%过氧化氢): 取 5 mL 30%过氧化氢至 45 mL 双蒸水中;

DAB (Diaminobenzidine) 显色液:

DAB (3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐)	50 mg
0.05 mol/L TB	100 mL
30%过氧化氢	30 μL ~40 μL

充分混匀后避光过滤, -20°C 保存备用, 显色前再加入 30%过氧化氢 (现配现用)。

- (2) 烤片: 实验开始前将石蜡切片置于 60℃ 烘箱 2 h, 或者 80℃ 30 min;
- (3) 脱蜡水化: 将切片按照如下顺序分别漂洗: 二甲苯 I (7 min) → 二甲苯 II (7 min) → 二甲苯 III (7 min) → 无水乙醇 (3 min) → 95%乙醇 (5 min×2 次) → 75%乙醇 (3 min) → 自来水 (3 min) → 1×PBS (3 min);
- (4) 抗原修复: 使用枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 将切片完全覆盖后, 微波高火 5 min, 自然冷却至室温后, 更换新鲜枸橼酸盐缓冲液, 再次微波高火 5 min 并自然冷却至室温;
- (5) 免疫组化笔画圈: 距离组织边缘 2~3 mm 处画圈, 小心不要刮伤组织;
- (6) 灭活内源性过氧化物酶: 滴加过氧化物酶阻断溶液, 室温孵育 20 min (时间可在 10~30 min 之间调整, 血供丰富的组织, 如肾、脑等可适当延长孵育时间), 孵育结束后, 使用 1×PBS 漂洗三次, 每次 3 min;
- (7) 封闭: 除去 1×PBS, 滴加封闭液, 室温孵育 15 min;
- (8) 回收封闭液, 滴加用一抗稀释液稀释的一抗 (vsp10, 1:20), 4℃ 过夜或 37℃ 孵育 60 min (难结合的组织、抗体可适当延长孵育时间), 不同抗体的稀释比例参考抗体使用说明书, 孵育结束后回收一抗, 1×PBS 漂洗三次, 每次 5 min;
- (9) 滴加生物素标记的二抗 (山羊抗鼠抗体, 1:50), 室温孵育 10 min, 孵育结束后回收二抗, 1×PBS 漂洗三次, 每次 5 min;
- (10) 滴加 HRP 标记链霉亲和素溶液 (Solarbio, beijing, china), 室温孵育 10 min, 孵育时间不可过长, 以免造成假阳性, 孵育结束后, 1×PBS 漂洗三次, 每次 5 min;
- (11) 滴加 DAB 显色液, 显微镜下观察显色情况 (大约 3~10 min), 自来水冲洗终止显色;
- (12) 自来水冲洗, 充分去除切片上残留的 PBS (PBS 会增强苏木素的吸附, 造成切片背景不清晰), 苏木素染液 (Solarbio, beijing, china) 复染 1 min, 自来水冲洗返蓝;
- (13) 将切片按照如下顺序分别漂洗: 75%乙醇 (3 min) → 95%乙醇 (3 min) → 无水乙醇 (3 min) → 二甲苯 (5 min), 此处二甲苯的作用是透明, 可增加组织折光性, 如倒入二甲苯后发现溶液中起白雾, 说明可能由于脱水时间不足或无水乙醇中已含有较多水分导致脱水不彻底, 需要更换乙醇后重新脱水, 漂洗结束后

将切片晾干并使用中性树胶封片；

(14) 镜检：将切片置于正置显微镜 (BX51, OLYMPUS) 下观察。

2.9 细胞免疫荧光

(1) 实验试剂配制

5%封闭液：称取 2.5g BSA 粉末溶于 50 mL PBST 中，4℃ 保存；

1%透化液：用 PBST 稀释 Trixon-100 (比例 1:1000)，现配现用；

DAPI 染色液：用 PBST 稀释 DAPI 母液 (比例 1:1000)，可回收利用，-20℃ 保存；

(2) 用 1×PBS 清洗表面长有感染 BmCPV 病毒 48 h 的细胞的爬片；

(3) 加入 500 μL 4%多聚甲醛避光孵育 15 min，弃去固定液，用 PBST 洗 3 次，每次 5 min；

(4) 加入 500 μL 透化液，摇床孵育 5 min；弃去透化液，用 PBST 洗 3 次，每次 5 min；

(5) 加入 500 μL 封闭液，摇床孵育 2 h；

(6) 弃去封闭液，将封口膜裁剪成载玻片大小，平铺在载玻片上，并滴加 10 μL 1:10 稀释的一抗 (vsp10，一抗稀释液稀释)，将细胞爬片从 24 孔板中取出，倒扣在抗体上，4℃ 过夜；

(7) 将爬片放回 24 孔板中，用 PBST 洗 3 次，每次 5 min；

(8) 更换一块裁剪好的封口膜，并滴加 10 μL 按 1:50 稀释的荧光二抗 (FITC 标记的山羊抗鼠/兔抗体，二抗稀释液稀释)，取出爬片倒扣在抗体上，37℃ 避光孵育 2 h；

(9) 将爬片放回 24 孔板中，用 PBST 避光洗 3 次，每次 5 min；

(10) 加入 500 μL 稀释过的 DAPI，室温避光孵育 5 min，用 PBST 避光洗 3 次，每次 5 min；

(11) 取出细胞爬片避光晾干，随后用封片剂封片，封片后用荧光显微镜 (TE2000U, Nikon) 镜检。

2.10 体外制备带有 IRES 位点的 vsp10 sORF 线性序列

为了探讨 vsp10 sORF 上游 IRES 位点 (S10 dsRNA 的 219-236 nt) 的作用，以

pIZT-CS10 为模板, 用带有 T7 启动子的引物对 IRES primers (表 2.3), 通过 PCR 扩增获得带有 IRES 的 vsp10 sORF 线性全长序列。同时, 以 NIRES primers 为引物 (表 2.3), pIZT-CS10 为模板, PCR 扩增不带有 IRES 位点的 vsp10 sORF 线性序列作为对照, 将上述 PCR 产物作为模板进行体外转录, T7 体外转录体系如下:

10×T7 RNA Polymerase Buffer	5 μL
10mM NTP Mix	5 μL
50 mM DTT	5 μL
Template DNA	50 ng-1 μg
T7 RNA Polymerase	50 units
DEPC 水补至	50 μL

37°C 孵育 3 h, 反应结束后, 加入 2U DNase I, 37°C 孵育 15 min, 之后通过酚、氯仿法纯化 RNA, 步骤如下:

- (1) 用 DEPC 水将上一步的样品补至 150 μL;
- (2) 加入 75 μL 的氯仿和 75 μL 的苯酚, 震荡混匀后, 0°C 静置 10 min;
- (3) 12000 r/min 离心 10 min (4°C), 取上清至新管;
- (4) 加入 800 μL 异丙醇, -80°C 静置 1 h;
- (5) 4°C, 12000 r/min 离心 15 min, 弃上清。加入 1 mL 75% 的乙醇清洗沉淀, 12000 r/min 离心 5 min (4°C), 弃上清;
- (6) 沉淀室温晾干后用 20 μL DEPC 水溶解, 于 -80°C 保存。

表 2.3 体外制备带有或不带有 IRES 位点的 vsp10 sORF 所需引物

Genes Name	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
IRES primers	TAATACGACTCACTATAGGAGTACAAAGTTG GCG	CTAGCGAAATGGAGCTATATTC
NIRES primers	TAATACGACTCACTATAGGATGTACGCACCA TCA	CTAGCGAAATGGAGCTATATTC

*: 加粗部分为 T7 启动子序列。

2.11 pIZT-CS10-sORF-null 和 pIZT-LcR-circl 载体的构建

(1) pIZT-CS10-sORF-null 的构建: 通过无缝克隆将 pIZT-CS10 (实验室保存, 在 pIZT-V5/His 的 kpn I 和 Sac II 位点之间插入 BmCPV S10 全长片段反转录 DNA 的重组质粒) 中 vsp10 的 sORF 序列用 DsRed 序列取代, 构建 pizt-CS10-sORF-null。

(2) pIZT-LcR-circ1 的构建: 通过无缝克隆将 S10-circ1 插入倒 pIZT-LcR (实验室保存, 插入了果蝇 *laccase2* 基因内含子序列的 pIZT-V5/His 载体) 的 Lac-1 和 Lac-2 序列的中间, 构建 S10-circ1 表达载体 pIZT-LcR-circ1。

2.12 数据处理与统计

本研究中的所有结果均使用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 并使用 GraphPad Prism8.3 软件做图。定量资料采用正态性, 检验数据以均数 \pm 标准差 (Means \pm SD) 表示, 统计分析时两组样本使用独立样本 *t* 检验, 多组样本采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以 $\alpha=0.05$ 为检验标准, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 vsp10 的预测及分析

通过 sORF Finder 软件 (<http://evolver.psc.riken.jp/>) 预测发现^[28], 在 BmCPV 基因组 S10 dsRNA (+) 链的 393-572 区域可以编码一个长度为 59 个氨基酸残基的 sORF, 本研究中将其编码的小肽命名为 vsp10 (图 2.1 A)。通过 multalin 软件 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) 比对同源性发现 vsp10 的氨基酸序列在马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus* CPV, DepuCPV, DpCPV) 株系、舞毒蛾质型多角体病毒 (*Lymantria dispar* CPV, LydiCPV, LdCPV) 株系和冬尺蠖蛾质型多角体病毒 (*Operophtera brumata* CPV, OpbuCPV, ObCPV) 株系中高度保守 (图 2.1 B)。从侧面证实了 BmCPV S10 dsRNA 可以编码 vsp10 的真实性。

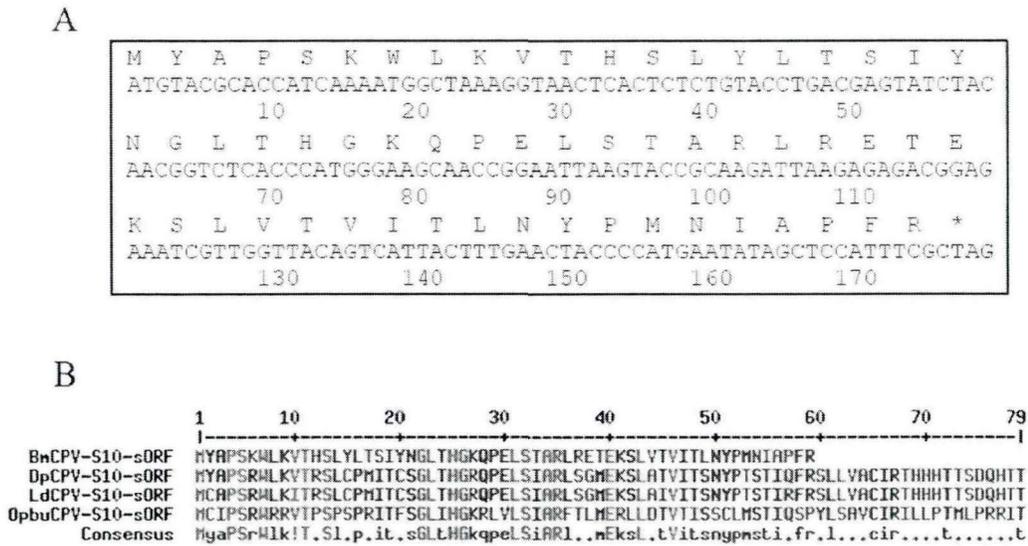


图 2.1 vsp10 的生物信息学分析

A, BmCPV 基因组 dsRNA S10 正链的 393-572 nt (GenBank: KR704196.1) 编码的 vsp10 的序列。B, BmCPV、马尾松毛虫质型多角体病毒 (DpCPV)、舞毒蛾质型多角体病毒 (LdCPV) 和冬尺蠖蛾质型多角体病毒 (OphuCPV) 中 vsp10 的氨基酸序列比对。

Figure 2.1 Bioinformatics analysis of vsp10

A, The sequence of vsp10 encoded by 393-572 nt (GenBank: KR704196.1) of S10 positive strand of BmCPV genome dsRNA. B, Amino acid sequence alignment of vsp10 in BmCPV, DpCPV, LdCPV and OphuCPV.

3.2 vsp10 抗体的制备及在 BmCPV 感染的家蚕中肠的检测

为了检测 BmCPV 感染的家蚕中肠细胞中的 vsp10 存在与否, 首先进行了 vsp10 多抗的制备。将实验室前期保存的 pET28-S10-sORF 及 pET28a(+) 转化表达菌 BL21, 经 1 mol/L IPTG 在 37°C 诱导 6 h 后, 收集诱导表达的蛋白 (带有 6×His 标签) 进行 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝染色发现在 10~15 kD 之间存在差异带 (图 2.2 A), 主要存在于诱导细胞的破碎后沉淀中。用 6×His 抗体进行 Western blotting 检测, 发现在约 13 kD 处检测到特异性条带, 与理论分子量一致, 表明 vsp10 已经成功表达 (图 2.2 B)。将诱导表达过的裂解菌体上清与 Ni-NTA 凝胶孵育后, 用不同浓度的咪唑洗脱液进行洗脱。将洗脱液进行 SDS-PAGE 并用考马斯亮蓝染色后发现, 当洗脱液的咪唑浓度为 100、200 和 300 mmol/L 时洗脱浓度最佳 (图 2.2 C)。将纯化后的蛋白与等体积的佐剂混合, 免疫小鼠 4 周后收集血清。通过 Western

blotting 检测多克隆抗体的效价, 发现多克隆抗体稀释比为 1:1000 时可以检测到特异性条带, 而后通过与 6×His 抗体检测到的条带对比, 发现结果一致, 表明抗体特异性良好 (图 2.2 D, B)。用 vsp10 的抗体对感染 BmCPV 的家蚕的中肠样本进行检测时, 同样可以检测到一条带。但是在 BmCPV 感染的家蚕中肠里检测到的 vsp10, 分子量要大于原核诱导表达的 vsp10 蛋白, 可能是因为在细胞中 vsp10 可以被修饰。该结果为 vsp10 的存在提供了初步的证据 (图 2.3)。

为了进一步证实 vsp10 的存在, 取感染 BmCPV 96 h 的 3 龄家蚕中肠制备石蜡切片, 通过免疫组化对感染了 BmCPV 的家蚕中肠细胞中的 vsp10 进行检测, 一抗为自制的 vsp10 多克隆鼠抗 (1:1000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 (1:5000)。结果显示, 在感染 BmCPV 的家蚕中肠中可以观察到代表 vsp10 的棕黄色阳性信号, 但在正常家蚕中肠中并未检测到非常明显的阳性信号 (图 2.4)。

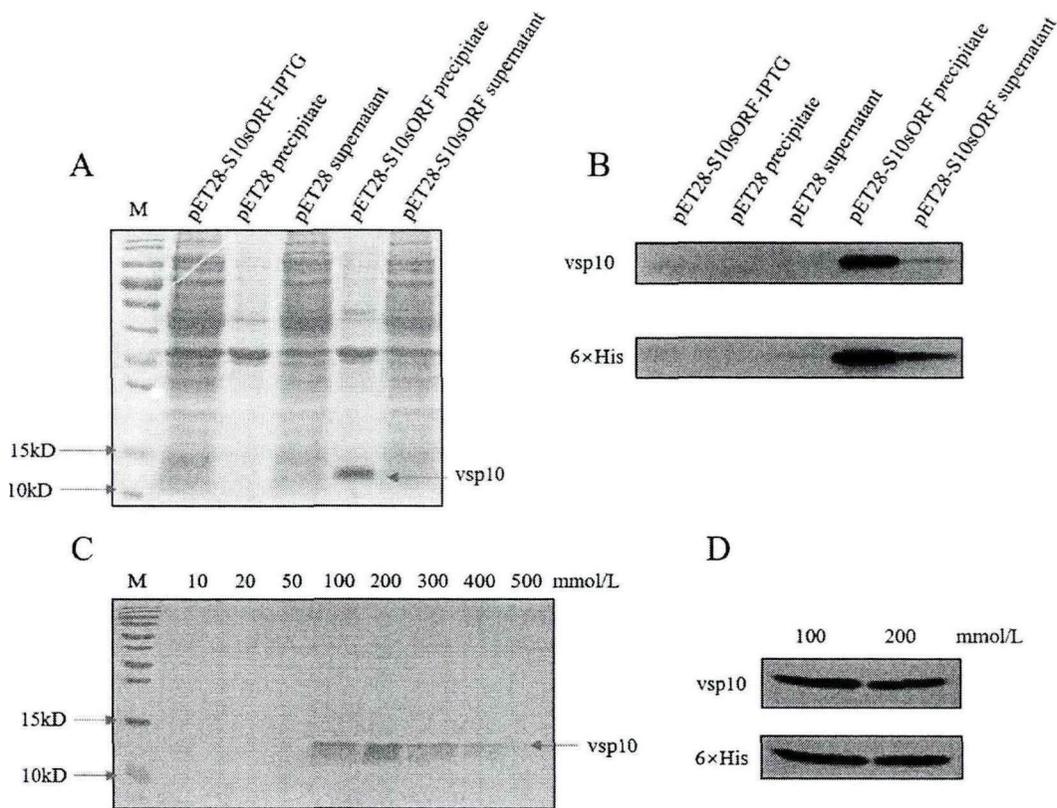


图 2.2 vsp10 多克隆抗体的制备

A, pET28-S10sORF 原核表达蛋白的 SDS-PAGE 检测。pET28-S10sORF-IPTG: pET28-S10sORF 转化菌未加 IPTG 诱导; pET28 precipitate: pET-28a(+) 转化菌加 IPTG 诱导破碎后沉淀; pET28 supernatant: pET-28a(+) 转化菌加 IPTG 诱导破碎后上清; pET28-S10sORF precipitate:

pET28-S10sORF 转化菌加 IPTG 诱导破碎后沉淀; pET28-S10sORF supernatant: pET28-S10sORF 转化菌加 IPTG 诱导破碎后上清。B, pET28-S10sORF 原核表达蛋白的 Western blotting 检测。泳道同前图。一抗使用自制鼠源的 vsp10 抗体 (1:1000) 和鼠源的 6 × His 抗体 (1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 (1:5000)。C, SDS-PAGE 检测梯度洗脱蛋白纯化。10~500: 梯度浓度咪唑洗脱液 (10~500 代表的浓度依次为: 10、20、50、100、200、300、400 和 500 mmol/L)。D, Western blotting 检测蛋白纯化。一抗使用自制鼠源的 vsp10 抗体 (1:1000) 和鼠源的 6 × His 抗体 (1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 (1:5000)。

Figure 2.2 Preparation of vsp10 polyclonal antibody

A, SDS-PAGE detection of pET28-S10sORF prokaryotic expression protein. pET28-S10sORF-IPTG: pET28-S10sORF transformed bacteria were not induced by IPTG; pET28 precipitate: pET-28a(+) transformed bacteria plus IPTG induced and then precipitated; pET28 supernatant: pET-28a(+) transformed bacteria plus IPTG induced and disrupted Supernatant; pET28-S10sORF precipitate: pET28-S10sORF transformed bacteria plus IPTG induces and then precipitates; pET28-S10sORF supernatant: pET28-S10sORF transformed bacteria plus IPTG induces the supernatant after disruption. B, Western blotting detection of pET28-S10sORF prokaryotic expression protein. The swimming lane is the same as the previous figure. The primary antibody was a homemade mouse vsp10 antibody (1:1000) and a mouse 6 × His antibody (1:2000), and the secondary antibody was HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000). C, SDS-PAGE detection gradient elution protein purification. 10~500: Gradient concentration imidazole eluent (10~500 represents the concentration in order: 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 mmol/L). D, Western blotting detects protein purification. The primary antibody was a homemade vsp10 antibody (1:1000) and a mouse 6 × His antibody (mouse, 1:2000), and the secondary antibody was HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000).

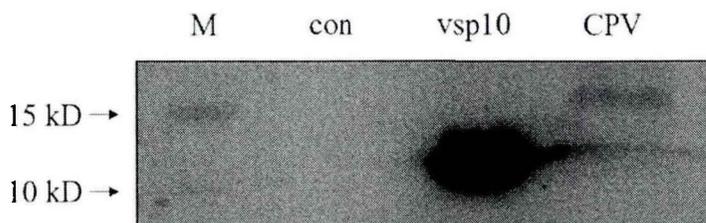


图 2.3 Western Blot 验证 vsp10 的存在

con: 正常家蚕中肠蛋白 (阴性对照); vsp10: 原核诱导表达的 vsp10 蛋白 (阳性对照); CPV: BmCPV 感染的家蚕中肠蛋白。一抗为自制鼠源的 vsp10 抗体 (1:1000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 (1:5000)。每个泳道蛋白的上样量为 40 μg。

Figure 2.3 Western Blot verifies the existence of S10-sORF

con: normal silkworm midgut protein (negative control); vsp10: prokaryotically induced vsp10

protein (positive control); CPV: BmCPV-infected silkworm midgut protein. The primary antibody were homemade mouse-derived vsp10 antibody (1:1000), and the secondary antibody was HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000). The amount of protein loaded in each lane is 40 μ g.

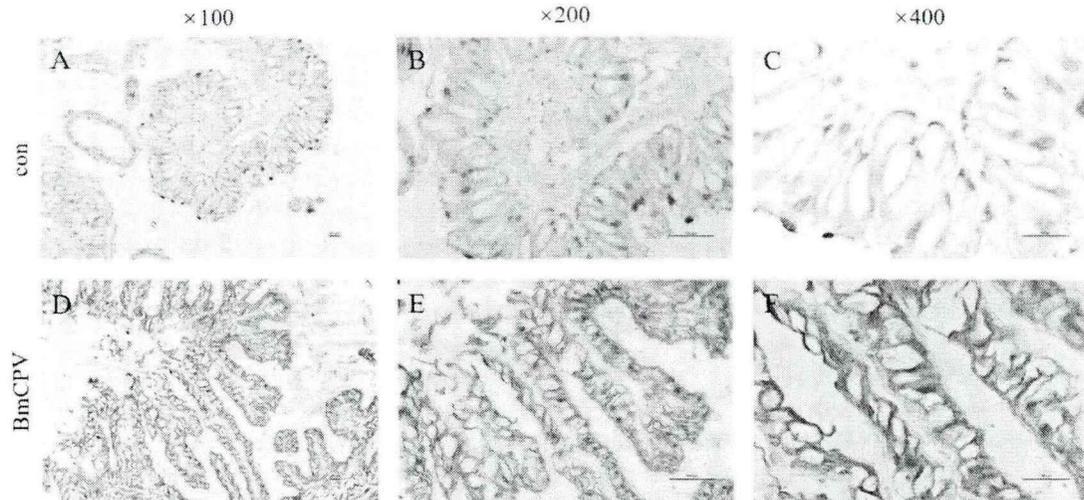


图 2.4 免疫组化检测 BmCPV 感染的家蚕中肠中的 vsp10 蛋白

利用免疫组化的方法对正常家蚕或感染 BmCPV 96 h 的 3 龄家蚕中肠细胞中的 vsp10 蛋白的表达水平进行检测，棕黄色代表 vsp10 蛋白，蓝色代表细胞核。A、B、C，对照的正常家蚕中肠 (con)。放大倍数分别为 100、200 和 300 倍。D、E、F，BmCPV 感染的家蚕的中肠 (BmCPV)。放大倍数分别为 100、200 和 300 倍。

Figure 2.4 Immunohistochemical detection of vsp10 protein in the midgut of BmCPV-infected silkworm

Immunohistochemistry was used to determine the expression levels of vsp10 protein in the enterocytes of normal silkworm or third instar silkworm infected with BmCPV for 96 h, with brown yellow representing the vsp10 protein and blue representing the nucleus. A, B, C: control normal silkworm midgut (con). The magnifications are 100, 200 and 300 times respectively. D, E, F: the midgut of BmCPV-infected silkworm (BmCPV). The magnifications are 100, 200 and 300 times respectively.

3.3 vsp10 在 BmCPV 感染的细胞中的定位

在组织上明确 vsp10 的存在后，用 vsp10 多克隆鼠抗通过免疫荧光的方法检测了感染 BmCPV 48 h 后的家蚕卵巢培养细胞株 BmN 中 vsp10 的表达情况。结果显示，在感染 BmCPV 的 BmN 细胞中可以检测到代表 vsp10 的绿色荧光信号，并且荧光信号显示 vsp10 存在于细胞质中，而在正常的 BmN 细胞中并未观察到荧光信

号 (图 2.5)。免疫荧光与免疫组化结果一致, 进一步证实了 vsp10 的存在。

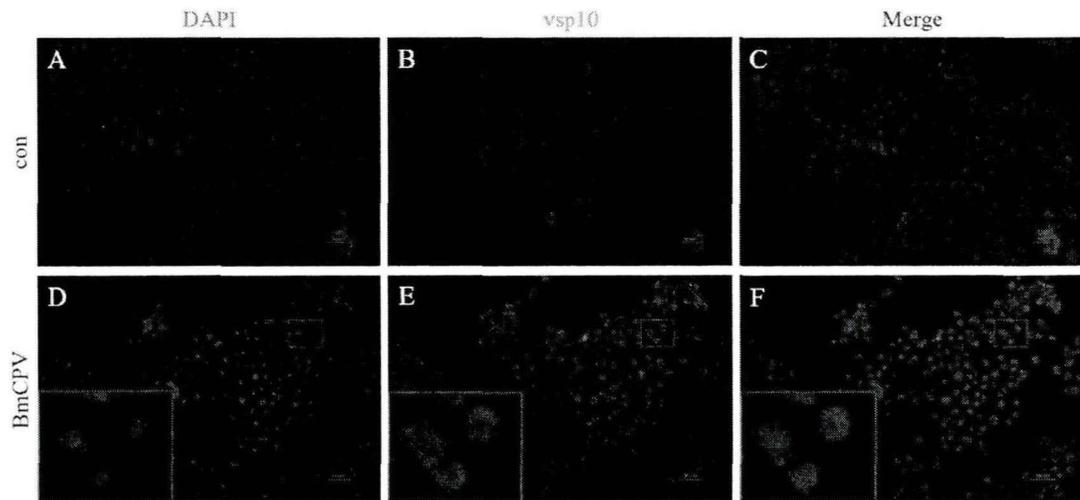


图 2.5 免疫荧光检测 BmCPV 感染的家蚕中肠中的 vsp10 蛋白

BmN 细胞 (1×10^4) 感染 BmCPV 48 h 后进行细胞免疫荧光实验, 并以正常 BmN 细胞 (1×10^4) 为对照。一抗使用 1:10 稀释的 vsp10 抗体, 二抗使用 1:50 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠抗体 (绿色), 细胞核用 1:1000 稀释的 DAPI 染色 (蓝色)。A、B、C, 正常 BmN 细胞。D、E、F, BmCPV 感染的 BmN 细胞。

Figure 2.5 Immunofluorescence detection of vsp10 protein in the midgut of BmCPV-infected silkworm

BmN cells (1×10^4) were infected with BmCPV for 48 h after cell immunofluorescence experiments, and normal BmN cells (1×10^4) were used as control. The primary antibody uses a 1:10 dilution of vsp10 antibody, the second antibody uses a 1:50 dilution of FITC conjugated goat anti-mouse antibody (green), and the nucleus is stained with a 1:1000 dilution of DAPI (blue). A, B, C: normal BmN cells. D, E, F: BmN cells infected with BmCPV.

3.4 BmCPV S10 线性 RNA 转录本可编码 vsp10

为了确定编码 vsp10 的小开放阅读框的上游是否具有驱动蛋白翻译的顺式元件, 通过无缝克隆将之前实验室保存的带有 BmCPV S10 完整序列的质粒 pIZT-CS10 中 vsp10 的 sORF 序列序列用红色荧光蛋白基因 *DsRed* 序列取代, 并将新构建的质粒命名为 pIZT-CS10-sORF-null (图 2.6 A), 将 2 μ g pIZT-CS10-sORF-null 或 pIZT-V5/His 质粒分别转染家蚕卵巢细胞株 BmN, 48 h 后, 可以在倒置荧光显微镜下观察到转染成功的细胞会发出绿色荧光 (pIZT-V5/His 带有 GFP 基因), 并且只有转染 pIZT-CS10-sORF-null 的部分细胞可以观察到红色荧光, 而在对照组

中没有观察到红色荧光信号的产生,说明 *DsRed* 基因成功表达(图 2.7),即 vsp10 的 sORF 上游可能存在驱动 sORF 转录或 vsp10 翻译的顺式作用元件。将转染的细胞收集后,通过 Western blotting 检测发现只有在转染 pIZT-CS10-sORF-null 的细胞蛋白中可以检测到 *DsRed* 蛋白,而在转染了 pIZT-CS10 或 pIZT-V5/His 的细胞中并不能检测到特异性条带(图 2.6 B)。上述结果进一步表明,pIZT-CS10 能够编码产生 vsp10。

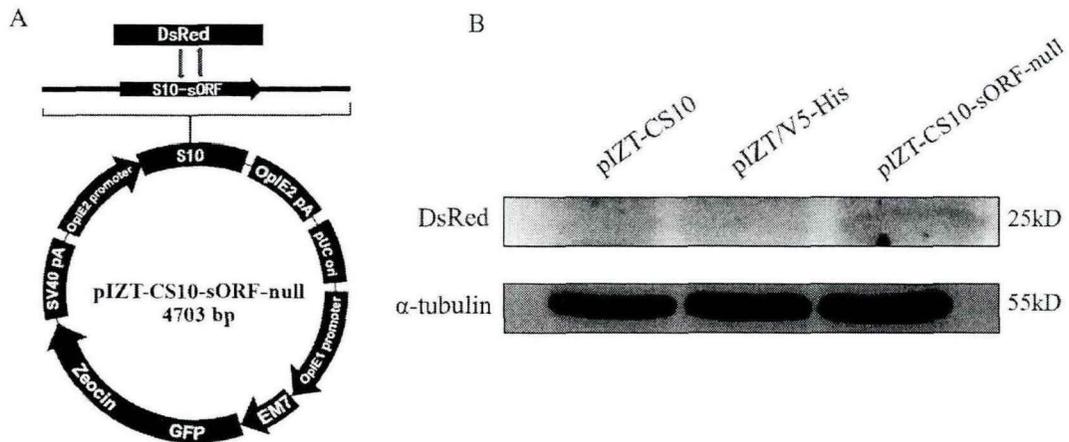


图 2.6 pIZT-CS10-sORF-null 能够编码 *DsRed*

A, pIZT-CS10-sORF-null 重组质粒构建示意图。通过同源重组的方法用体外合成的 *DsRed* 序列替换 pIZT-CS10 上 vsp10 的 S10-sORF 区域,构成重组的 pIZT-CS10-sORF-null。**B**, BmN 细胞 (1×10^6) 转染 $2 \mu\text{g}$ 的 pIZT-CS10-sORF-null, 48 h 后,提取细胞总蛋白,用 *DsRed* 抗体(兔源, 1:2000)进行 Western blotting 实验,内参为 α -tubulin (鼠源, 1:2000),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:5000)。泳道 pIZT-CS10、pIZT-V5/His 和 pIZT-CS10-sORF-null 分别为细胞转染 pIZT-CS10、pIZT-V5/His 和 pIZT-CS10-sORF-null 质粒,每个泳道的上样量为 $40 \mu\text{g}$ 。

Figure 2.6 pIZT-CS10-sORF-null can encode *DsRed*

A, schematic diagram of pIZT-CS10-sORF-null recombinant plasmid construction. The S10-sORF region of vsp10 on pIZT-CS10 was replaced with the *DsRed* sequence synthesized in vitro by the method of homologous recombination to form the recombinant pIZT-CS10-sORF-null. **B**, BmN cells (1×10^6) were transfected with $2 \mu\text{g}$ of pIZT-CS10-sORF-null, 48 hours later, total cell protein was extracted, and Western blotting experiment was performed with *DsRed* antibody (rabbit, 1:2000), the internal reference was α -tubulin (mouse, 1:2000), the secondary antibody is HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000). Lanes pIZT-CS10, pIZT-V5/His, and pIZT-CS10-sORF-null are cells transfected with pIZT-CS10, pIZT-V5/His, and pIZT-CS10-sORF-null plasmids, respectively. The loading amount of each lane is $40 \mu\text{g}$.

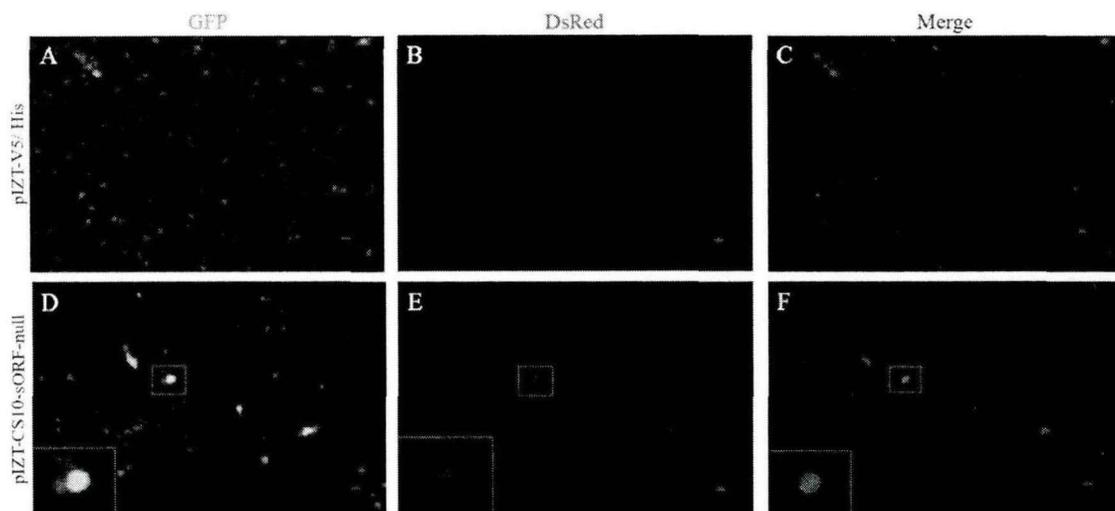


图 2.7 pIZT-CS10-sORF-null 质粒过表达后的荧光检测

BmN 细胞 (1×10^4) 分别转染 0.5 μg 的 pIZT-V5/His 和 pIZT-CS10-sORF-null, 48 h 后, 部分转染 pIZT-CS10-sORF-null 的细胞观察到红色荧光。红色部分为 DsRed 表达后发所出的荧光, 绿色为转染 pIZT-V5/His 和 pIZT-CS10-sORF-null 的阳性细胞。A、B、C, 转染 pIZT-V5/His 的细胞。D、E、F, 转染 pIZT-CS10-sORF-null 的细胞。

Figure 2.7 Fluorescence detection after overexpression of the pIZT-CS10-sORF-null plasmid BmN cells (1×10^4) were transfected with 0.5 μg of pIZT-V5/His and pIZT-CS10-sORF-null. After 48 h, red fluorescence was observed in some cells transfected with pIZT-CS10-sORF-null. The red part is the fluorescence after DsRed expression, and the green part is the positive cells transfected with pIZT-V5/His and pIZT-CS10-sORF-null. A, B, C: cells transfected with pIZT-V5/His. D, E, F: cells transfected with pIZT-CS10-sORF-null.

为了验证 BmCPV S10 dsRNA 线性转录本编码 vsp10 的可能性, 用 IRESite (<http://iresite.org/>) 对 S10 片段正链上的 IRES 位点进行预测, 结果显示, BmCPV S10 dsRNA 中有 3 个区域的序列可以与已知的 IRES 序列匹配 (表 2.4), 并且有一个 IRES 位点在 vsp10 编码序列的上游 (图 2.8 A), 因此该位点很有可能为 S10 dsRNA 线性转录本翻译 vsp10 的必要原件。为了验证该 IRES 位点是否有效, 我们通过带有 T7 启动子的引物将这段涵盖或不涵盖 IRES 位点, 并且带有 vsp10 的 sORF 序列的片段扩增出来 (扩增引物见表 2.3), 随后通过体外转录获得线性 RNA。将线性 RNA 转染进 BmN 细胞, 48 h 后提取细胞总蛋白, 并检测 vsp10 的表达。结果显示, 相较于转染无 IRES 位点的 RNA 的对照组, 在转染带有 IRES 位点的 RNA 的细胞中, vsp10 的表达量更高, 表明该 IRES 是有效的, 且 vsp10 很可能来源于

其线性 RNA 转录本 (图 2.8 B)。

表 2.4 BmCPV S10 dsRNA 存在 IRES

Table 2.4 The internal ribosome entry sites of BmCPV S10 dsRNA

#	Position*	Sequence
1	219-236	gcgtttcagagacattca
2	571-586	agcagtaagtgggtga
3	740-751	gatattaacaat

*, 以 BmCPV S10 dsRNA 5'端为“1”位点, 按多角体基因的编码方向对 BmCPV S10 dsRNA 中的核苷酸进行排位。

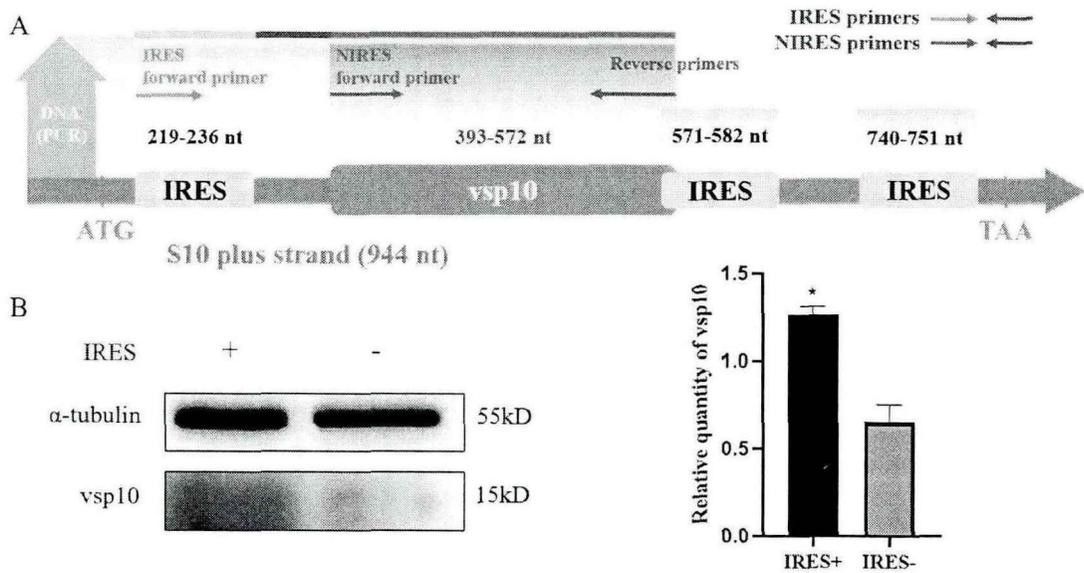


图 2.8 位于 S10 dsRNA 的 219-236 nt 区域的 IRES 可启动 vsp10 的翻译

A, 克隆涵盖或不涵盖 IRES 位点并且带有 vsp10 sORF 序列的引物设计策略图。B, BmN 细胞 (1×10^6) 转染 50 pmol/L 涵盖或不涵盖 IRES 位点并且带有 vsp10 序列的体外转录的 RNA, 48 h 后收集细胞总蛋白, 用 vsp10 抗体 (鼠源, 1:1000) 进行 Western blotting 实验 (左列), 以 α -tubulin (鼠源, 1:2000) 为内参。右列为 vsp10 条带的灰度扫描分析结果。(* $p < 0.05$, 实验重复 3 次, Error bars, $n=3$)。

Figure 2.8 An IRES site located in the 219-236 nt region of S10 dsRNA can initiate translation of vsp10

A, Diagram of primer design strategy for cloning encompassing or not the IRES site and with the vsp10 sORF sequence. B, BmN cells (1×10^6) were transfected with 50 pmol/L in vitro transcribed

RNA covering or not covering the IRES site and with vsp10 sequence. After 48 hours, the total cell protein was collected and the vsp10 antibody was used (mouse, 1:1000) for Western blotting experiment (left column), with α -tubulin (mouse, 1:2000) as the internal control. The right column shows the gray-scale scanning analysis results of vsp10 bands (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 3$).

3.5 vsp10 可能并非由 circRNA 编码

前期的研究中, 我们通过高通量测序发现 BmCPV S10 dsRNA 的 324-856 nt 区域可以产生 circRNA, 并且 circRNA 上包含了 vsp10 的 sORF 序列。由于 circRNA 可帽子结构非依赖的方式翻译蛋白, 因此我们推测 vsp10 也可能由 circRNA 编码, 因此, 为验证 circRNA 的编码可能, 首先对 circRNA 进行了鉴定。根据 vsp10 的 sORF 序列的位置我们在其两端设计了发散引物 (divergent primers F: ATATAGCTCCATTTTCGCTAG 和 R: CATTTTGATGGTGCGTACAT), 克隆 circRNA 的环接头 (back-spliced junction) 序列 (图 2.9 A)。取感染 BmCPV 的家蚕中肠并提取总 RNA, 用 RNase R 去除线性 RNA 后反转录成 cDNA, 最后用 circRNA 的发散引物进行反向 PCR 扩增, 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示有两条目的条带 (图 2.9 B), 随后将目的条带进行胶回收后克隆进 pMD19-T 载体上, 通过 Sanger 测序鉴定, 结果显示通过发散引物扩增到了两个 circRNA 的连接位点 (图 2.9 C), 表明可能存在两个 circRNA, 分别将大环 (533 bp, 324-856 nt) 命名为 S10-circ1, 将小环 (327 bp, 325-651 nt) 命名为 S10-circ7。为了排除 S10-circ1 和 S10-circ7 的环接头位点是由于 PCR 非特异性扩增或基因重组的产物, 在 S10-circ1 和 S10-circ7 的环接头 (split junction) 位置设计了由生物素标记的单链 DNA 探针, 通过 Northern blotting 技术检测发现, 在 BmCPV 感染的家蚕中肠的 RNA 样本中成功检测到了两个环 RNA 分子的阳性信号, 而在正常家蚕中肠样本中未检测到 S10-circ1 和 S10-circ7 的存在 (图 2.10 A), 上述结果表明在 BmCPV 感染的家蚕中肠细胞中存在 S10-circ1 和 S10-circ7。

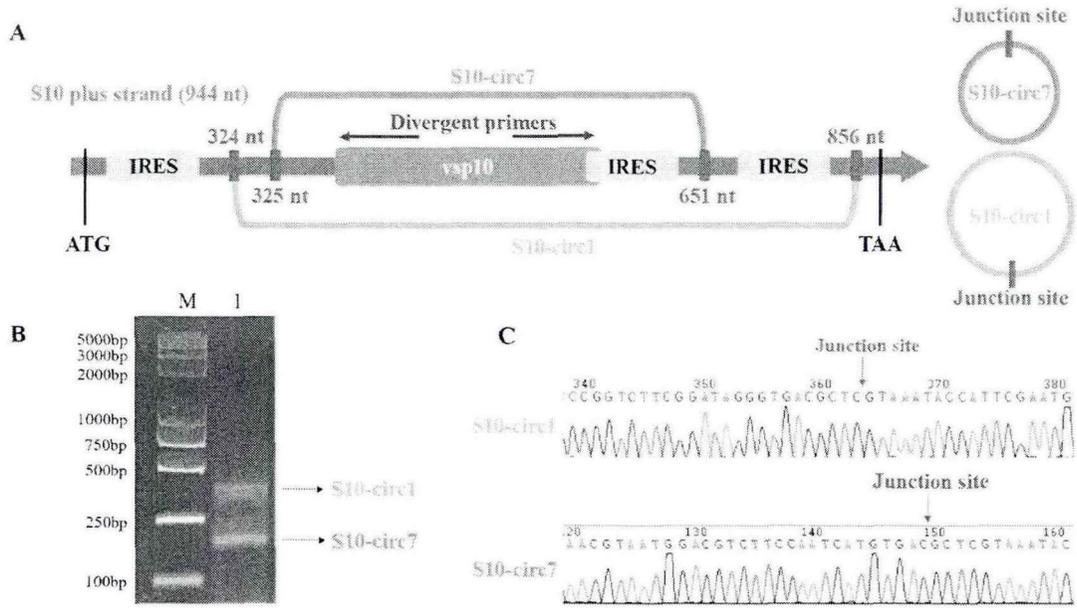


图 2.9 BmCPV S10 dsRNA 可以产生 circRNA

A, 克隆 BmCPV S10 dsRNA 上 circRNA 连接位点的引物设计策略图。B, 提取感染 BmCPV 的家蚕中肠总 RNA, 用 RNase R 酶消化线性 RNA 分子后反转录成 cDNA, 使用发散引物对 circRNA 接头进行 PCR 扩增的产物电泳图。泳道 M: DNA marker; 泳道 1: 发散引物 PCR 产物。C, 图 B 的特异性条带中检测到的 S10-circ1 和 S10-circ7 的接头序列的 Sanger 测序结果。

Figure 2.9 BmCPV S10 dsRNA can produce circRNA

A, The strategy map of primer design for cloning circRNA junction site on BmCPV S10 dsRNA. B, The total RNA was extracted from the midgut of *Bombyx mori* infected with BmCPV. The linear RNA was digested by RNase R and then reverse transcribed into cDNA. The electrophoretic map of the product was amplified by PCR using divergent primers. C, Sanger sequencing results of S10-circ1 and S10-circ7 junction site sequences detected in the specific band of Fig. B.

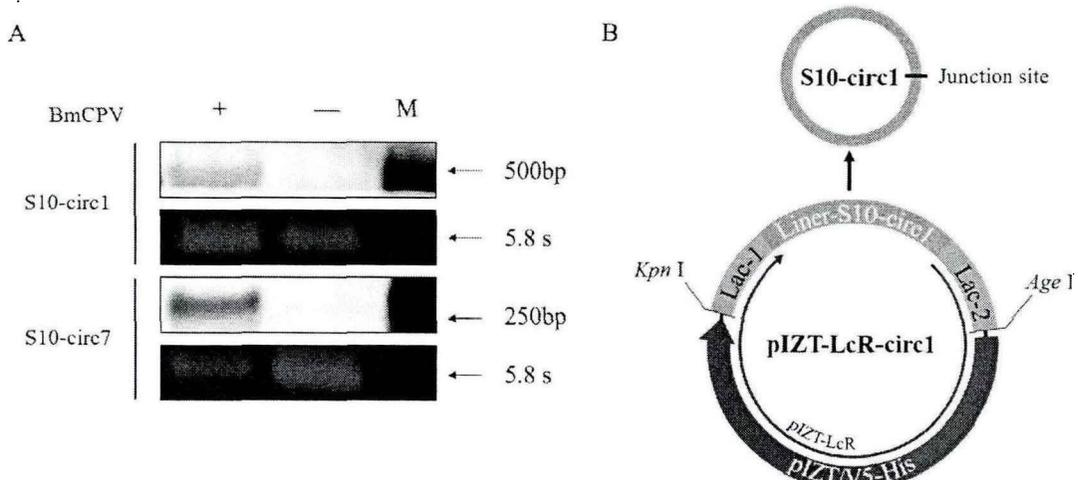


图 2.10 S10-circ1 和 S10-circ7 的 Northern blotting 验证及表达载体的构建

在 S10-circ1 和 S10-circ7 的 junction site 处设计了生物素标记的单链 DNA 探针。A, Northern blotting 验证。提取 BmCPV 病毒感染或者正常的 5 龄家蚕中肠的总 RNA, 去除基因组 DNA 和线性 RNA 污染后, 使用生物素标记的探针进行 Northern blotting 验证, 并使用 5.8 S rRNA 作为内参。B, pIZT-LcR-circ1 表达载体的结构示意图。通过无缝克隆将 S10-circ1 插入倒 pIZT-LcR (实验室保存, 插入了果蝇 *laccase2* 基因内含子序列的 pIZT-V5/His 载体) 的 Lac-1 和 Lac-2 序列的中间, 构建 S10-circ1 表达载体 pIZT-LcR-circ1。紫色代表 S10-circ1 序列, 灰色 Lac-1 和 Lac-2 为果蝇 *laccase2* 内含子序列。

Fig. 2.10 Northern blotting validation of S10-circ1 and S10-circ7 and construction of expression vector

Biotin labeled single stranded DNA probes were designed at junction sites of S10-circ1 and S10-circ7. A, Northern blotting verification. Total RNA was extracted from the midgut of five-instar *Bombyx mori* infected with BmCPV or normal. After removing the contamination of genomic DNA and linear RNA, biotin labeled probe was used for Northern blotting verification, and 5.8 S rRNA was used as internal reference. B, Schematic representation of the structure of the pIZT-LcR-circ1 expression vector. Purple represents S10-circ1 sequence, gray Lac-1 and Lac-2 are *laccase2* introns of *Drosophila melanogaster*.

表 2.5 siRNA 序列

Genes Name	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
circ1-siRNA-1	CUUCGGAUAGGGUGACGCUC	GAGCGUCACCCUAUCCGAAG
circ1-siRNA-2	GGUGUACACAAGAACCCAUTT	AUGGGUUCUUGUGUACACCTT
linear-siRNA	GGGUUUAGGGCGUGGCAAATT	UUUGCCACGCCCUAAACCCTT
Control-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

由于 S10-circ1 的全序列也包含了 S10-circ7 的序列, 所以选用 S10-circ1 来进行 vsp10 来源的验证。首先通过无缝克隆将 S10-circ1 的线性分子的 cDNA 序列插入实验室保存的 circRNA 表达载体 pIZT-LcR (插入了果蝇 *laccase2* 基因内含子序列的 pIZT-V5/His 载体) 中, 构建了 S10-circ1 的表达载体 pIZT-LcR-circ1 (图 2.10 B), 但是该表达载体的转录产物并不是 100%形成 S10-circ1 的, 有部分分子仍以线性分子的形成存在。为了探究 vsp10 来源于 circRNA 或者线性分子, 同时设计了针对 S10-circ1 接合位点和环中间位点的 siRNA (circ1-siRNA-1 和 circ1-siRNA-2), 以及特异性针对 pIZT-LcR-circ1 线性转录本的 siRNA (linear-siRNA) (表 2.5), 其中针对环内部的 siRNA 可以同时敲降 S10-circ1 和 pIZT-LcR-circ1 线性分子 (图

2.11 A)，并通过 Western blotting 检测 vsp10 的表达水平。将 pIZT-LcR-circ1 转染进 BmN 细胞 48 h 后再将三种 siRNAs 分别转入，48 h 后提取细胞蛋白检测 vsp10 蛋白的表达水平。结果显示，特异性敲降 S10-circ1 对 vsp10 蛋白的表达水平影响不大，但是用靶向 circRNA 接合位点以外 circ1-siRNA-2 或特异性地靶向线性转录本的 linear-siRNA 处理，可明显降低了 vsp10 的表达水平（图 2.11 B），这一结果表明 vsp10 可能并非由 S10-circ1（或 S10-circ7）编码产生的，而可能源于它的线性 RNA 的转录本。

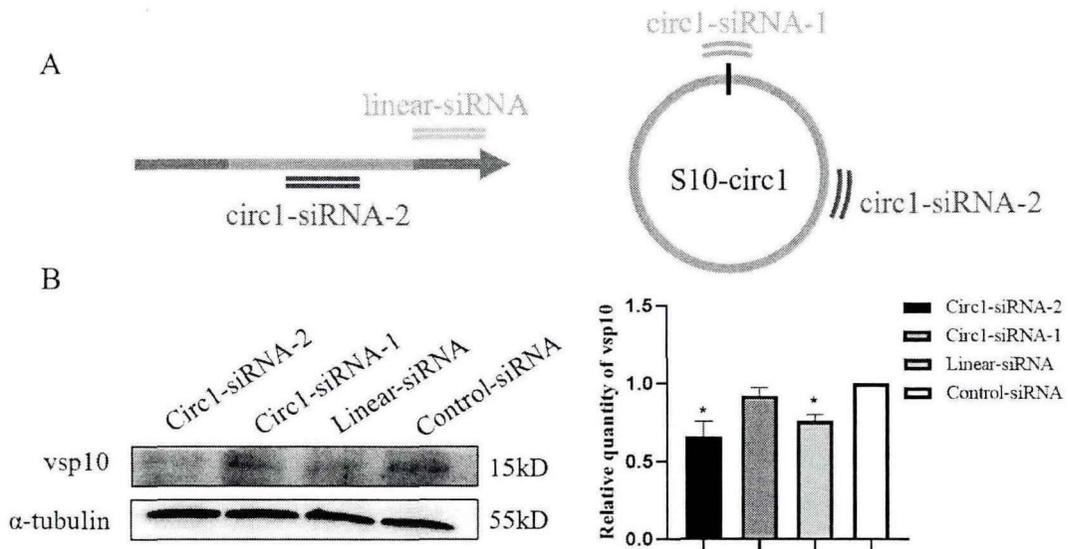


图 2.11 vsp10 的来源鉴定

A, pIZT-LcR-circ1 载体 siRNA 干扰的示意图。双橙色短线为线性分子干扰的位点；双绿色短线为 circRNA 接头干扰的位点；双灰色短线 circRNA 内部干扰的位点。**B**, BmN 细胞 (1×10^6) 在 6 孔板中培养 24 h 后，转染 2 μg 的 pIZT-LcR-circ1 载体 48 h，再分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 linear-siRNA、circ1-siRNA-1 和 circ1-siRNA-2 处理 48 h 后提取细胞总蛋白，并使用相同剂量的 control-siRNA 做对照。用 vsp10 抗体（鼠源，1:1000）进行 Western blotting 实验（左列），以 α -tubulin（鼠源，1:2000）为内参，二抗分别为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体（1:5000）。右列为 vsp10 条带的灰度扫描分析结果。（* $p < 0.05$ ，实验重复 2 次，Error bars, $n=2$ ）。

Figure 2.11 Identification of the origin of vsp10

A, The schematic diagram of siRNA interference of pIZT-LcR-circ1 vector. Double orange short line was the site of linear molecular interference; double green short line was the site of circRNA junction site interference; double gray short line was the site of circRNA internal interference. **B**, BmN cells (1×10^6) were cultured in 6-well plates for 24 h, transfected with 2 μg of pIZT-LcR-circ1 vector for 48 h, and then treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ linear-siRNA, circ1-siRNA-1 and circ1-siRNA-2 for

48 h respectively. The total protein was extracted and the same dose of control siRNA was used as control. vsp10 antibody (mouse, 1:1000) was used for Western blotting (left column). α -tubulin (mouse, 1:2000) was used as internal reference. The second antibody was HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000). The right column is the result of gray scan analysis of vsp10 band. (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 2$).

3.6 vsp10 的表达时相

为了解 BmCPV 的复制增殖与 vsp10 表达水平的相关性, 使用 BmCPV 感染 BmN 细胞, 并分别于 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 时提取细胞总 RNA 和蛋白, 然后通过 Western blotting 和 qRT-PCR 检测多角体蛋白、vsp10 蛋白和 S10 基因的表达水平。结果显示, 随着病毒感染时间的增加, 病毒 S10 基因的表达水平从 12 h 开始迅速升高 (图 12A), vsp10 和线性亲本 RNA 转录本 S10 基因翻译的多角体蛋白的表达水平也都呈现逐步上升的趋势 (图 12B), 三者的表达模式基本一致。综上结果表明, vsp10 的表达水平与 BmCPV 的复制增殖呈正相关。

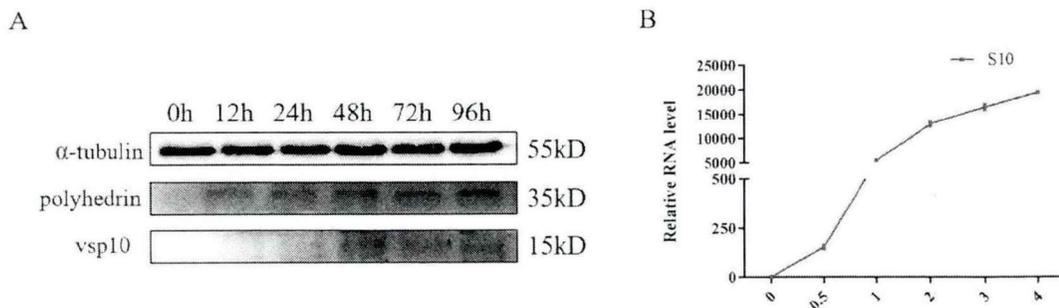


图 12 BmCPV S10 基因、多角体蛋白和 vsp10 的表达时相

BmN 细胞 (1×10^6) 在六孔板中培养 24 h 后, 用 $5 \mu\text{L}$ BmCPV 病毒粒子 ($\text{MOI} = 2$) 分别感染 0、12、24、48、72、96 h 后提取 RNA 和总蛋白。A, 分别使用 vsp10 抗体 (自制抗体, 鼠源 1:1000) 和多角体蛋白抗体 (实验室制备, 鼠源 1:1000) 进行 Western blotting 实验, 以 α -tubulin (鼠源, 1:5000) 为内参, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (1:5000), 每个泳道的蛋白上样量为 $40 \mu\text{g}$ 。B, 通过 qRT-PCR 检测病毒 S10 基因的表达水平。

Fig. 12 Expression phase of S10 gene, polyhedrin and vsp10 of BmCPV

BmN cells (1×10^6) were cultured in six well plates for 24 h, and then infected with $5 \mu\text{L}$ BmCPV virus particles ($\text{MOI} = 2$) for 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h, respectively. A, vsp10 antibody (self-made antibody, mouse, 1:1000) and polyhedrin antibody (prepared in laboratory, mouse, 1:1000) were used for Western blotting. α -tubulin (mouse, 1:5000) was used as internal reference, and the second antibody was HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000). The protein loading amount of each

swimming lane was 40 μ g. B, The expression level of S10 gene was detected by qRT-PCR.

4 讨论

目前,在原核细胞和真核细胞中的小肽研究已有一些报道,但是对于病毒编码小肽的研究依旧很少。最先在一系列 RNA 和 DNA 病毒中鉴定到的小肽是一类短的跨膜蛋白^[15],并已证明参与各种病毒侵染过程,包括病毒的进入、基因组复制、病毒粒子的组装和释放等过程。甲型流感病毒编码的 M2 蛋白(A/M2),它可以寡聚化形成离子通道,介导膜弯曲和断裂,对病毒释放至关重要^[29,30]。另一类在病毒中发现的小肽由开放阅读框上游的 sORF 编码(uORF),并可以调节 ORF 的翻译。在人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)中,病毒 UL4 蛋白的翻译会受 uORF 翻译的调节^[31]。除了上述两种功能性 SEP 外,还有一些其他具有各种分子并和细胞作用的功能性病毒 SEP。在家蚕质型多角体病毒(BmCPV)中,其 dsRNA S5 片段的负链存在一个小的开放阅读框(S5-SORF),并且可以翻译一个 27aa 的小肽,该小肽可以抑制病毒的复制增殖^[23]。在本研究中,BmCPV S10 片段的正链区域预测了编码肽 vsp10 的小的开放阅读框,包含 59 个氨基酸残基。通过自制抗体进行 Western blotting、免疫荧光及免疫组化实验发现 vsp10 在 BmCPV 感染的样本中真实存在,且定位在细胞质中。因此推测 vsp10 由 BmCPV 编码产生,并在宿主细胞质中发挥作用。

有研究表明,在 mRNA 的 5'UTR 或 3'UTR、mRNA 的 CDS 序列内或与其重叠处、以及部分非编码 RNA(ncRNA)的各种转录本中(包括 lncRNA、circRNA、基因间转录本和反义转录本)都发现了可翻译的 sORF^[15,32]。为了明确 vsp10 的来源,我们用 DsRed 基因替代 pIZT-CS10 中的 vsp10 的 sORF,在转染细胞中可观察到红色荧光并可以通过 Western blotting 检测到代表 DsRed 的特异性条带,证明在编码 vsp10 的小开放阅读框上游存在驱动蛋白翻译的必需元件。

本研究中发现的 vsp10 可能与多角体蛋白共用一个转录本,即 vsp10 的 sORF 在多角体的 ORF 的中间,因此推测在 vsp10 编码序列的上游可能存在着某些顺式作用元件。通过 IRESite 软件(<http://iresite.org/>)对 S10 片段正链进行预测,并在 vsp10 的 sORF 的上游确认到一个 IRES 位点,因此 vsp10 可能是通过其上游的 IRES 位点直接从亲本 mRNA 的中间起始了翻译。

内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)的存在可以使蛋白质

的翻译不依赖于 mRNA 5'端的帽子结构,从而直接从 mRNA 的中间起始翻译。最初,在某些病毒和细胞 mRNA 的序列中发现了这些 IRES 序列,它们可以介导翻译起始,而无需通过 5'端的帽子结构对 40S 核糖体亚基和翻译起始因子进行招募。因此,40S 小亚基通过直接与 IRES 元件结合,或首先在 mRNA 的 5'UTR 结合,然后转移到 IRES,进入含有 IRES 的 mRNA^[33, 34]。也有研究表明,当细胞处于应激状态时,会通过 IRES 元件启动翻译过程,以应对生理和环境应激条件,如热休克、缺氧或病毒感染,在这些情况下翻译的蛋白质可能对维持细胞在应激条件下的存活至关重要^[35]。随着对病毒 IRES 位点研究的深入,其价值也逐渐体现了出来,以 IRES 位点介导的翻译起始已成为了治疗 RNA 病毒引起的疾病的重要靶标之一。例如, Kunio Kikuchi 等通过体外选择程序来分离得到了能够结合 IRES 结构域 III-IV 的 RNA 适体,并且其在体外和体内均可抑制 IRES 依赖性翻译,使 HCV 增殖能力降低,达到对病毒的防治^[22, 23, 36]。本研究通过将带有该 IRES 位点和 vsp10 sORF 的序列体外转录后转染进细胞,发现当该 IRES 位点存在时,体外转录的线性 RNA 可以翻译 vsp10。上述结果可知,存在于 vsp10 的 sORF 上游的 IRES 位点具有活性,并且可以启动 vsp10 的翻译。因此猜测 vsp10 的翻译除了由帽子结构介导,也可以由 IRES 位点介导。由帽子结构介导时,由于 vsp10 与多角体蛋白共用一个转录本,翻译机器可以选择不同的起始密码子进行翻译;由 IRES 位点介导时, vsp10 的翻译可以从线性 RNA (多角体基因) 转录本的中间起始。

近期有研究表明,病毒可以产生 circRNA,且 circRNA 可以编码小肽。例如,人乳头状瘤病毒 (HPVs) 可以产生一种叫做 circE7 的环状 RNA,且 circE7 可以翻译 E7 癌蛋白;靶向性破坏 circE7 可降低 E7 癌蛋白水平,并抑制肿瘤细胞生长。这些结果表明病毒编码的 circRNA 及其编码的小肽具有生物学功能,并与 HPV 的某些转化特性有关,为 HPV 相关的人类恶性肿瘤发生的分子机制提供了新的证据^[22]。在前期的研究中,我们通过高通量测序技术发现, BmCPV S10 片段的正义链上存在包含包含 vsp10 的 sORF 的 circRNA,因此我们推测 vsp10 也可能来源于 S10 dsRNA (+) 连产生的 circRNA。通过反向 PCR、Sanger 测序和 Northern blotting 我们鉴定到了两个包含 vsp10 的 sORF 的 circRNA, S10-circ1 和 S10-circ7。由于 S10-circ1 的分子量较大且包含了 S10-circ7 的全序列,因此在后续研究中我们选择 S10-circ1 进行实验。在后续的研究中,通过分别对转染 pIZT-LcR-circ1 表达载体

后产生的 S10-circ1 和 pIZT-LcR-circ1 线性分子进行干扰, 结果显示干扰 S10-circ1 对 vsp10 的表达量几乎没有影响, 但是干扰 pIZT-LcR-circ1 线性分子会使 vsp10 的表达量明显降低。由此推测 vsp10 可能来源于它的线性 RNA 转录本而非由 S10-circ1 编码。

为了研究 vsp10 的表达量与 BmCPV 的复制增殖的相关性, 通过 qPCR 检测了 vsp10 的表达谱, 结果发现 vsp10 的表达水平与 BmCPV 的增殖水平呈正相关, 因此可以推测 vsp10 的功能与 BmCPV 的复制增殖可能存在着相关性, 这为我们下一步对 vsp10 功能的研究提供了思路, 并为 BmCPV 相关疾病的防治提供新的靶点和方向。

5 结论

对 vsp10 的存在和来源进行确认, 证实了 vsp10 的存在并且推测 vsp10 来源于病毒线性亲本 RNA 转录本, vsp10 的表达水平与 BmCPV 的增殖水平相关。

参考文献

- [1] Graham R I, Rao S, Possee R D, et al. Detection and characterisation of three novel species of reovirus (Reoviridae), isolated from geographically separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) on Orkney [J]. 2006, 91(2): 79-87.
- [2] 张轶岭. BmCPV 受体蛋白的筛选鉴定及家蚕翅原基发育的分子机制研究 [D]. 苏州大学, 2014.
- [3] Ping W, Han S, Chen T, et al. Involvement of MicroRNAs in Infection of Silkworm with *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (BmCPV) [J]. 2013, 8(7): e68209.
- [4] Hagiwara K, Rao S, Scott S W, et al. Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori* cyovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively [J]. 2002, 83(Pt 6): 1477-1482.
- [5] Hagiwara K, Matsumoto T. Nucleotide sequences of genome segments 6 and 7 of *Bombyx mori* cyovirus 1, encoding the viral structural proteins V4 and V5, respectively [J]. 2000, 81(Pt 4): 1143-1147.
- [6] Cao G, Meng X, Xue R, et al. Characterization of the complete genome segments

- from BmCPV-SZ, a novel *Bombyx mori* cypovirus 1 isolate [J]. 2012, 58(7): 872-883.
- [7] Hagiwara K, Tomita M, Nakai K, et al. Determination of the Nucleotide Sequence of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Segment 9 and Its Expression in BmN4 Cells [J]. 1998.
- [8] Hagiwara K, Kobayashi J, Tomita M, et al. Nucleotide sequence of genome segment 5 from *Bombyx mori* cypovirus 1 [J]. 2001, 146(1): 181-187.
- [9] Zhao S L, Liang C Y, Hong J J, et al. Molecular characterization of segments 7-10 of *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus provides the complete genome [J]. 2003, 94(1): 17-23.
- [10] Pauli, Andrea, Norris, et al. Toddler: An Embryonic Signal That Promotes Cell Movement via Apelin Receptors [J]. 2014.
- [11] Magny E G, Pueyo J I, Pearl F, et al. Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames [J]. 2013, 341(6150): 1116-1120.
- [12] Kondo T, Plaza S, Zanet J, et al. Small Peptides Switch the Transcriptional Activity of Shavenbaby During *Drosophila* Embryogenesis [J]. 2010, 329(5989): 336-339.
- [13] Galindo M I, Pueyo J I, Fouix S, et al. Peptides Encoded by Short ORFs Control Development and Define a New Eukaryotic Gene Family [J]. 2007, 5(5): e106.
- [14] Maria E, Sousa, Michael H, et al. Micropeptide [J]. 2018, 14(12).
- [15] Andrews S J, Rothnagel J A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames [J]. 2014, 15(3): 193-204.
- [16] Calvo S E, Pagliarini D J, Mootha V K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans [J]. 2009, 106(18): 7507-7512.
- [17] Ladoukakis E, Pereira V, Magny E G, et al. Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila* [J]. 2011, 12(11): R118.
- [18] Law G L, Raney A, Heusner C, et al. Polyamine Regulation of Ribosome Pausing at the Upstream Open Reading Frame of S-Adenosylmethionine Decarboxylase [J]. 2001, 276(41): 38036-38043.
- [19] Wang R, Braughton K R, Kretschmer D, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA [J]. 2007, 13(12): 1510-1514.

- [20] Hemm M R, Paul B J, Miranda-Rios J, et al. Small Stress Response Proteins in *Escherichia coli*: Proteins Missed by Classical Proteomic Studies [J]. 2010, 192(1): 46-58.
- [21] Frank M J, Smith L G. A small, novel protein highly conserved in plants and animals promotes the polarized growth and division of maize leaf epidermal cells [J]. 2002, 12(10): 849-853.
- [22] Zhao J, Lee E E, Kim J, et al. Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus [J]. 2019, 10(1).
- [23] Hu X, Chen F, Zhu L, et al. *Bombyx mori* cypovirus encoded small peptide inhibits viral multiplication [J]. 2019.
- [24] Pinto L H, Holsinger L J, Lamb R A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity [J]. 1992, 69(3): 517-528.
- [25] Pinto L H, Lamb R A. The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses [J]. 2006, 281(14): 8997-9000.
- [26] Wang J, Pielak R M, Mcclintock M A, et al. Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel [J]. 2009, 16(12): 1267.
- [27] 郭睿. BmBDV、BmCPV 反向遗传学系统的建立及不同抗性家蚕对 BmCPV 的感染应答 [D]. 苏州大学, 2015.
- [28] Hanada K, Akiyama K, Sakurai T, et al. sORF finder: a program package to identify small open reading frames with high coding potential [J]. 2010(3): 399-400.
- [29] Rossman J S, Jing X, Leser G P, et al. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission [J]. 2010, 142(6): 902-913.
- [30] Roberts K L, Leser G P, Ma C, et al. The Amphipathic Helix of Influenza A Virus M2 Protein Is Required for Filamentous Bud Formation and Scission of Filamentous and Spherical Particles [J]. 2013, 87(18): 9973-9982.
- [31] Degrin C R, Schleiss M R, Cao J, et al. Translational inhibition mediated by a short upstream open reading frame in the human cytomegalovirus gpUL4 (gp48) transcript [J]. 1993, 67(9): 5514-5521.
- [32] Zhang M, Zhao K, Xu X, et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma [J]. 2018, 9(1).
- [33] Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA

- directed by a sequence derived from poliovirus RNA [J]. 1988, 334(6180).
- [34] Jang S K, Kräusslich H, Nicklin M J, et al. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation [J]. 1988, 62(8): 2636-2643.
- [35] Komar A A, Hatzoglou M. Cellular IRES-mediated translation [J]. 2011, 10(2): 229-240.
- [36] Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, et al. A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III [J]. 2007.

第三章 vsp10 促进细胞凋亡的功能研究

摘要: 为了研究 vsp10 的功能, 首先从 vsp10 对 BmCPV 自身及宿主细胞的影响这两个方面进行研究。通过 qRT-PCR 和 Western blotting 发现 vsp10 可以延缓 BmCPV 的增殖复制。为了探明 vsp10 延缓病毒增殖复制的作用机制, 通过 qRT-PCR 检测发现, 过表达 vsp10 可提升细胞凋亡相关基因 *Caspase*、*Apaf*、*P53* 和 *Sur2* 的表达水平, 并下调凋亡抑制基因 *Bcl-2* 和 RNAi 通路基因 *Bmdrc2* 的表达水平。流式细胞仪检测结果显示, 过表达 vsp10 可以抑制细胞周期, 并促进细胞凋亡。进一步通过 Western blotting 和 TUNEL 检测发现, 过表达 vsp10 可以使细胞的凋亡水平上升。此外还发现 vsp10 可以降低线粒体膜电位, 并且通过免疫荧光实验发现 vsp10 可以定位在线粒体上。这些结果说明 vsp10 可诱导细胞凋亡。结合实验室前期的研究, 通过 IP 实验及质谱鉴定初步筛选到了与 vsp10 互作的候选蛋白, 并从中选取了凋亡相关蛋白 PHB2 进行后续。而后通过 Co-IP 和免疫共定位证实了 vsp10 与 PHB2 的互作。进一步研究发现, 敲降 PHB2 基因表达, vsp10 对 BmCPV 病毒的抑制和对宿主细胞凋亡的促进作用都受到了削弱, 表明 vsp10 可能通过与 PHB2 互作诱导凋亡负调控病毒的增殖复制。相关研究结果对理解 vsp10 延缓病毒增殖的机制, 加深对 BmCPV 复制调节机制的研究有重要帮助。

关键词: vsp10、PHB2、凋亡、线粒体、BmCPV

1 引言

细胞凋亡 (Apoptosis), 坏死样凋亡 (Necroptosis) 和细胞焦亡 (Pyroptosis) 是病毒感染后细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 的三种主要方式^[1,2]。其中, 对细胞凋亡的研究最为广泛。病毒感染引起的细胞凋亡对病毒的复制增殖既有负面影响, 也有正面影响。一方面, 宿主细胞通过凋亡消除受到病毒感染的细胞, 从而阻断病毒的感染。另一方面, 一些病毒也会诱导细胞凋亡来释放和传播子代病毒^[3-5]。在这两种情况下, 都需要病毒的某些产物来阻断或延迟细胞凋亡, 以产生足够的子代病毒并建立完整的病毒复制周期^[6]。

凋亡可以通过两种不同的信号转导途径触发, 即内在途径 (intrinsic pathway)

和外途径 (extrinsic pathway) [7, 8]。内源性凋亡途径又称为线粒体途径 (mitochondrial pathway) 是由多种细胞内应激反应引起的, 包括胞浆 Ca^{2+} 超载、氧化应激、DNA 损伤、细胞因子缺失和内质网应激等。这些异质性凋亡信号汇聚在一起, 会致使线粒体外膜通透性 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) 增加, 促进细胞色素 c 和其他线粒体因子释放到胞质溶胶中, 最终导致激活型凋亡酶 (initiator caspases) 和效应型凋亡酶 (effector caspases) 的产生及随后的细胞死亡^[9]。MOMP 主要受 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族控制。细胞死亡调解子 (Bcl-2 interacting mediator of cell death, BIM) 和 BH3 结构域凋亡诱导蛋白 (BH3 interacting domain death agonist, BID) 作为唯 BH3 域蛋白, 在内源性凋亡信号激活后可与 Bcl-2 相关蛋白 X (BCL2 associated X protein, BAX) 或 Bcl-2 同源拮抗剂 (Bcl-2 homologous antagonist/killer, BAK) 短暂相互作用, 导致 BAX 和 BAK 激活化并且构象变化^[10, 11]。激活的 BAX 和 BAK 可形成高阶同源寡聚体, 并稳定插入线粒体外膜, 促进 MOMP 的增加^[12, 13]。外源性凋亡途径由细胞外应激刺激激活, 通过激活肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族的死亡受体可以感知胞外应激刺激。死亡受体是 I 型跨膜蛋白, 其特征在于细胞外配体结合区包含 1-5 个富含半胱氨酸结构域、一个跨膜结构域和一个 60-80 aa 的胞质死亡结构域^[14, 15]。配体通过与细胞表面的死亡受体结合形成死亡诱导信号复合物 (death-inducing signal complex, DISC) 进行信号转导, 介导随后的凋亡信号转导^[16, 17]。

对于许多病毒来说, 在裂解感染期间或感染的晚期诱导细胞凋亡可能是子代病毒传播到邻近细胞的重要步骤, 同时也可以避免引起宿主的免疫反应。例如, 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 复制时可以通过 HBV 编码抗原 (HBxAg) 依赖性上调 TRAIL-R1/DR4, 增强人类肝细胞中肿瘤坏死因子 (TNF) 相关凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 介导的凋亡。在患有持续性 HBV 感染的患者中, 肝细胞的持续和不受调节的凋亡可能有助于促进肝衰竭和肝纤维化的疾病活动。因此, HBV 调节肝细胞凋亡的机制具有重要的生物学意义^[18]。类似的, 呼肠孤病毒诱导的凋亡也是通过增加 TRAIL 的释放和其细胞受体 DR4 (TRAIL-R1) 和 DR5 (TRAIL-R2) 的表达来介导的^[19]。诱导早期细胞死亡将严重限制病毒的增殖, 并减少或消除子代病毒在宿主体内的传播。因此对于某

些病毒，抑制病毒感染细胞的凋亡可以防止宿主细胞过早死亡对病毒产生的损害，有利于病毒潜伏并促进持续感染，有助于逃避宿主的免疫监视。例如，HBV 核心蛋白通过调节 Fas 细胞表面死亡受体和 Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 的表达来抵制 Fas 介导的细胞凋亡^[20]。丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) E2 蛋白通过激活 I κ B α 的磷酸化，增加抗凋亡 BCL-2 家族蛋白的表达，并赋予 Raji 细胞和原代人 B 淋巴细胞对 Fas 介导的凋亡的保护作用^[21]。因此，在某些情况下，诱导或抑制细胞凋亡的发生可以辅助病毒感染，并有助于病毒的增殖。

线粒体内膜上的蛋白质 prohibitin (PHB) 是一种高度保守的蛋白质，在不同细胞中普遍表达。PHB1 和 PHB2 是线粒体 PHB 复合体的两个高度同源的亚基，并且这两个亚基在蛋白质水平上是相互依赖的^[22]。在线粒体内膜上，12-16 个 PHB1 和 PHB2 的异源二聚体结合形成一个大约 1 MDa 的环状大分子结构，该复合物与线粒体基因组稳定、线粒体形态、氧化应激和凋亡有关^[23, 24]。

在本研究中，我们发现 vsp10 可以抑制病毒的复制增殖，过表达 vsp10 可提升宿主细胞的凋亡水平，vsp10 可以定位在线粒体上，并且与 PHB2 相互作用。干扰 PHB2 表达导致削弱 vsp10 对病毒增殖的抑制作用和对细胞凋亡的促进作用。这些结果表明 vsp10 可能通过与 PHB2 的互作诱导凋亡从而限制了病毒的增殖，为理解宿主细胞的抗病毒机理提供了新的视角，也为 BmCPV 的防治提供了新的靶点。

2 材料与方法

2.1 实验材料

RNA iso Plus (Total RNA 提取试剂) 为 TaKaRa 公司产品。TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 以及 DNA Marker 为北京全式金公司产品。DNA 胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品。RIPA 强裂解液、NP-40 裂解液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times)、PMSF、一抗稀释液、二抗稀释液、DAPI、Protein A+G Agarose 购自碧云天生物。TC-100 昆虫培养基粉末为 AppliChem 公司产品。胎牛血清 FBS 为 Biological Industries 公司产品。脂质体为 Roche 公司产品。兔源的 PHB2 抗体为 Proteintech 公司产品。兔源 Cleaved-Caspase 3 抗体为 Affinity 公司产品。带有 vsp10 的 sORF 编码序列的 pIZT-S10-sORF 质粒和 vsp10 的 sORF 起始密码 ATG 下游的 tacgc 突变为 taaga 的

pIZT-S10-sORF 的突变质粒 pIZT-S10-sORF^{mut} 由本实验室保存。

其他材料同第二章。

2.2 试剂配制

试剂配制同第二章。

2.3 实验方法

2.3.1 过表达 vsp10 对病毒 VP4 和 VP7 蛋白和 BmCPV vp1 基因水平的影响

BmN 细胞 (1×10^6) 在六孔板中培养 24 h 后, 分别转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF 或 pIZT-V5/ His 质粒 48 h, 然后接种 5 μ L BmCPV (MOI=2) 48 h, 收集细胞, 提取蛋白和 RNA。用 Western blotting 检测 VP4 和 VP7 蛋白的表达水平, 一抗为 VP4 和 VP7 抗体 (均为实验室制备, 鼠源 1: 1000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (1:5000), α -tubulin (鼠源, 1:2000) 为内参, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μ g。每个样品重复 3 次。Western blotting 的实验步骤按第二章 2.3.12 所述进行。用 BmCPV vp1 基因引物 (表 3.1) 通过 real-time PCR 检测其表达水平, *TIF-4A* 为内参。

2.3.2 qRT-PCR 检测免疫通路和凋亡通路相关基因表达水平

BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF 或 pIZT-V5/ His 质粒, 48 h 后提取细胞总 RNA, 用 DNaseI 消化基因组 DNA 后, 用随机引物反转录成 cDNA (RNA 提取以及反转录步骤参照第二章), 随后用表 3.1 所列引物通过 real-time PCR 检测免疫和凋亡通路相关基因的表达水平, qRT-PCR 体系和程序设定如下:

(1) 反应体系 (20 μ L)

2 \times TransStart [®] Tip Green qPCR SuperMix	10 μ L
模板 cDNA	0.1 μ g-0.5 μ g
Forward Primer (10 μ mol/L)	0.5 μ L
Reverse Primer (10 μ mol/L)	0.5 μ L
补足 Nuclease-free Water 至	20 μ L

(2) PCR 循环的过程为: 95.0 $^{\circ}$ C 10 min 后, 按 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 30s 扩增 39 个循环, 荧光检测读板设置在 55 $^{\circ}$ C 30 s 阶段, PCR 反应结束后检测溶解曲线; 免疫和凋亡通路相关基因的定量引物见表 3.1, *TIF-4A* 为内参。

表 3.1 Real-time PCR 引物

GenesName	Forward primers (5'→3')	Reverse primers (5'→3')
<i>TIF-4A</i>	GAATGGACCCTGGGACACTT	GAATGGACCCTGGGACACTT
<i>BmCPV vp1</i>	GGTCTCGACGTGAATACCGA	TCGTCTGCTTCACTAGCACG
JAK/STAT (<i>BmSOCS2</i>)	GTGACAGACCGTTGGCTAGG	GCACCGGCGAGTGTGGACAC
JAK/STAT (<i>Bmstat</i>)	GAGCGTTATGGACGAGAAGC	CCTGGTTGCCGTGGACTATG
<i>Imd</i> (<i>BmPGRP</i>)	CACTGCAACAGAAAGCTGTAG	CGCAATATGCCGATCCGTCAC
RNAi (<i>Bmdrc2</i>)	CCAGCGTTCACGTCCGTTGGA	GATCGCCAAGATTTGGTCGAA
RNAi (<i>Bmago2</i>)	GACCTACTACGCGCACTTGGC	ACGGCTCTTTCAGCATGCTG
<i>Caspase</i>	GGTACGGAGAAGGACGACGTTGAATC	GATGCAGCCGTAGTCTCTGAG
<i>Sur1</i>	GGAGACGACGGGTCGCCACTC	CGGCTCGTTGAAGTACGGCTC
<i>Sur2</i>	ACAAGAACAAGTGTAACGTGCG	CAGTGGACTCCCAGCCATCTAG
<i>p53</i>	GAGTCGAGAGATGCATCCAGC	CCGCAGTACTGCACGTCGTTG
<i>Apaf</i>	TCGAGAGTGCAGGCGTGCTCG	CGTATGACGTACGTGATGTTC
<i>Cyct</i>	CGCAACGCGACGATTACGTTG	GTGGCACTGGGCACATCGTTG
<i>Bcl-2</i>	TGATGGCCGTGAAGAAGGTC	CTGAGCGTTGTATTTGGCGG

2.3.3 PI 法检测细胞周期

(1) 细胞收集: 将 BmN 细胞 (1×10^6) 接种于六孔板上, 培养 24 h 后分别转染 4 μg pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/His 和 pIZT-S10-sORF^{mut}。转染 48 h 后, 1 \times PBS 清洗 3 次, 加 1 mL 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化细胞, 轻轻将细胞从六孔板中吹下, 收集到 1.5 mL EP 管中。4 $^{\circ}\text{C}$, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 1 \times PBS 清洗细胞。

(2) 固定: 加入 1 mL 70%乙醇中, 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 3 h。1500 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 1 mL 1 \times PBS 重悬细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 余 50 μL 的 1 \times PBS 吹散细胞;

(3) 染色: 加入 0.5 mL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染色液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴 30 min;

(4) 流式检测和分析: 用流式细胞仪 (FC500, 美国 Beckman Coulter) 在激发波长 488 nm 波长处进行检测。

2.3.4 Annexin V-PE/7-AAD 双染法检测细胞凋亡

(1) 细胞收集: BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/

His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒。转染 48 h 后, 1×PBS 清洗 3 次, 加 1 mL 0.25% 含 EDTA 的胰酶消化细胞, 轻轻将细胞从六孔板中吹下, 收集到 1.5 mL 离心管中。4℃, 1000 r/min 离心 5 min。弃去上清, 加入 1 mL 预冷的 1×PBS 清洗细胞两次。

(2) 细胞处理: 参照北京博奥龙免疫技术有限公司的 Annexin VPE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒。

检测凋亡时, 需要另外设门(划定不同区域的细胞群, 以便单独分析或分选), 取四组正常细胞, 第一组为正常活细胞; 第二组在半死半活细胞(一半细胞 100℃ 煮沸 5min 灭活, 与另一半正常细胞混合)中加入 5 μL Annexin V-PE; 第三组在半死半活细胞中加入 10 μL 7-AAD; 第四组在半死半活细胞中加入 10 μL 7-AAD 和 5 μL Annexin V-PE。

2.3.5 TUNEL 检测细胞凋亡

(1) 细胞处理: 用 1×PBS 清洗表面长有转染 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 48 h 后的 BmN 细胞的爬片。加入 500 μL 4%多聚甲醛固定液孵育 30 min, 弃去固定液, 用 1×PBS 洗 5 min, 然后加入 500 μL 透化液, 室温孵育 5 min。

(2) 细胞染色: 参照碧云天公司一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒。

2.3.6 线粒体膜电位检测

将 BmN 细胞 (1×10^6) 接种于六孔板上, 培养 24 h 后分别转染 4 μg pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒。转染 48 h 后, 1×PBS 清洗 3 次, 轻轻将细胞从六孔板中吹下, 收集到 1.5 mL 离心管中。于冷冻离心机(4℃) 中, 以 1500 r/min 的转速离心 5 min, 弃上清。随后参照北京索莱宝公司线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) 说明书进行操作

2.3.7 过表达 vsp10 对 Active Caspase3 和 PHB2 蛋白水平的影响

BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF^{mut}、pIZT-V5/ His 以及 pIZT-S10-sORF 质粒, 48 h 后提取总蛋白进行 Western blotting 检测, 一抗为 Active Caspase3 抗体(兔源 1:2000)、PHB2 抗体(兔源 1:2000)和 α-tubulin 抗体(鼠源, 1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体(1:5000), 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg。每个样品重复 3 次。Western blotting 的实验步骤按第二章 2.3.12 所述进行。

2.3.8 IP 筛选 vsp10 相互作用的蛋白

(1) 蛋白样品的准备: BmN 细胞(1×10^7)培养 24 h 后, 接种 5 μL BmCPV(MOI=2), 48 h 后去除培养基, 用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗细胞, 而后加入 200 μL NP-40 裂解液。

(2) 取约 1 mg 蛋白样品, 与 5 μg vsp10 抗体混合, 同设未免疫血清作对照, 而后放于混匀仪上 4°C 孵育过夜。

(3) 吸取 30 μL Protein A+G Agarose 于一个新的 1.5 mL EP 管中, 短暂离心后吸弃上清。

(4) 加入 100 μL $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 Protein A+G Agarose, 1500 r/min 离心 3 min, 吸弃上清。重复此步骤 2 次。

(5) 将步骤 (2) 的抗原抗体复合物加入到洗涤后的 Protein A+G Agarose 中, 放于混匀仪上 4°C 缓慢摇动孵育 4 h, 1500 r/min 离心 3 min, 吸弃上清。

(6) 加入 100 μL $1 \times \text{PBS}$ 洗涤, 1500 r/min 离心 3 min, 吸弃上清。重复此步骤 4 次。

(7) 留 80 μL $1 \times \text{PBS}$ 与 20 μL $5 \times \text{SDS-PAGE}$ 电泳上样缓冲液混匀, 100°C 水浴 10 min, 随后进行 SDS-PAGE 并银染观察。

2.3.9 银染与质谱鉴定

(1) 银染相关试剂 (现配现用)

固定液:

无水甲醇	20 mL
冰乙酸	5 mL

用双蒸水补至 50 mL。

敏化液:

硫代硫酸钠	0.1 g
无水甲醇	15 mL
无水乙酸钠	3.4 g

用双蒸水补至 50 mL。

硝酸银溶液: 称取 0.125 g 硝酸银溶, 用双蒸水补至 50 mL, 避光放置。

显色液:

无水碳酸钠	1.25 g
甲醛	20 μL

补充双蒸水至 50 mL。

终止液：称量 0.2 g 甘氨酸溶解于 50 mL 双蒸水中。

- (2) 取出凝胶放于玻璃皿中，倒入固定液，摇床孵育 30 min；
- (3) 吸去固定液，倒入敏化液，摇床孵育 30 min；
- (4) 吸去敏化液，用双蒸水清洗凝胶 3 次，每次 5 min；
- (4) 倒入硝酸银溶液，避光孵育 5 min，加入双蒸水漂洗 2 次，每次 1 min；
- (5) 倒入显色液摇床孵育，待出现明显的蛋白条带时，吸去显色液，倒入终止液，即可观察；
- (6) 割取差异条带，进行质谱鉴定。

2.3.10 细胞水平检测 vsp10 与 PHB2 的共定位

BmN 细胞 (1×10^4) 在二十四孔板中培养 24 h 后，接种 3 μ L BmCPV (MOI=2) 48 h，按照第二章 2.9 所述方法对感染后的 BmN 细胞进行免疫荧光实验检测细胞内 vsp10 与 PHB2 的共定位情况，实验所用一抗为 vsp10 抗体(鼠抗, 1:10)和 PHB2 抗体(兔抗, 1:10)，二抗为 CY3 标记的山羊抗兔(1:50)和 FITC 标记的山羊抗鼠(1:50)，细胞核用 DAPI (1:1000) 进行染色。

2.3.11 Co-IP 实验检测 vsp10 与 PHB2 蛋白的互作关系

- (1) BmN 细胞 (1×10^7) 接种 5 μ L BmCPV (MOI=2)，48 h 后收集细胞，用 1 \times PBS 清洗细胞 3 次；
- (2) 用 120 μ L NP-40 裂解液(购自碧云天公司) 4 $^{\circ}$ C 裂解细胞 30 min，期间可上下颠倒数次以提高裂解效率；
- (3) 4 $^{\circ}$ C，12000 r/min，30 min，取上清至新 EP 管；
- (4) 在上清中加入 5 μ g 目标抗体 (PHB2 抗体购自 Proteintech 公司，vsp10 抗体为自制抗体)，同设未免疫血清作对照，置于混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；
- (5) 用 1mL 预冷的 1 \times PBS 清洗 30 μ L 的 Protein A+G Agarose，4 $^{\circ}$ C 2000 r/min 离心 2min，弃上清，此步骤重复三次；
- (6) 将 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜的混合液加入清洗后的 Protein A+G Agarose 中，置于混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h；
- (7) 4 $^{\circ}$ C，2000 r/min 离心 2 min，弃上清；
- (8) 用预冷的 1 \times PBS 清洗 Protein A+G Agarose，4 $^{\circ}$ C，2000 r/min 离心 2 min，

弃上清。此步骤重复六次；

(9) 向清洗后的 Protein A+G Agarose 中加入 80 μL 1 \times PBS 和 20 μL 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 混匀后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 12000 r/min 离心 5 min, 上清即为蛋白样品, 样品用于 Western blotting 检测蛋白的含量。一抗为 anti-PHB2 抗体 (兔源 1:2000) 和 anti-vsp10 抗体 (兔源 1:1000)。二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/鼠抗体 (1:5000)。每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。

2.3.12 免疫荧光检测 vsp10 与线粒体的共定位

(1) 标记线粒体: 将浓度为 1 mmol/L 的线粒体深红荧光探针 (MitoTracker[®] Deep Red FM), 用培养基稀释成终浓度约为 100 nmol/L 的染色工作液。取 BmN 细胞 (1×10^4) 在二十四孔板中培养 24 h 后, 接种 3 μL BmCPV (MOI=2) 48 h, 随后吸取培养基并加入染色工作液 (37 $^{\circ}\text{C}$ 预热), 于 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 15~45 min。

(2) 免疫荧光检测: 染色结束后按照第二章 2.9 所述方法对感染后的 BmN 细胞进行免疫荧光实验检测细胞内 vsp10 与线粒体的共定位情况。一抗为 vsp10 抗体 (鼠抗, 1:10), 二抗为 FITC 标记的山羊抗鼠抗体 (1:50), 细胞核用 DAPI (1:1000) 进行染色。

2.3.13 干扰 PHB2 检测 Active Caspase3 和 BmCPV VP7 蛋白的表达水平

BmN 细胞 (1×10^6) 在六孔板中培养 24 h 后, 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF 质粒 48 h, 然后接种 5 μL BmCPV (MOI=2), 48 h 后, 再分别转染终浓度为 5 μmol 的 PHB2-siRNA (CAUCGUGCCAUAUGUUCAACAGAATT)。转染 48 h 后提取总蛋白, 用 Western blotting 检测 Active Caspase3 和 VP7 蛋白的表达水平, 一抗为 VP7 抗体 (鼠源, 1:1000) 和 Active Caspase3 抗体 (兔源, 1:1000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠/兔抗体 (1:5000), α -tubulin (鼠源, 1:2000) 为内参, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。每个样品重复 3 次。Western blotting 的实验步骤按第二章 2.3.12 所述进行。

3 结果与分析

3.1 vsp10 可延缓 BmCPV 的复制增殖

在实验室前期的研究中, 初步验证了 vsp10 可延缓 BmCPV 的复制增殖。为了进一步研究 vsp10 的功能, 首先需要明确 vsp10 对 BmCPV 复制增殖的影响。我们

用实验室之前保存的 vsp10 的过表达质粒 pIZT-S10-sORF 转染 BmN 细胞 48 h, 之后接种 BmCPV, 感染 48 h 后收集细胞提取总 RNA 和蛋白, 然后通过 Western blotting 和实时荧光定量 PCR 检测病毒 VP4 蛋白、VP7 蛋白和 *vp1* 基因的表达水平。结果如图 3.1 所示, 与对照相比病毒 VP4 和 VP7 蛋白的表达均受到抑制 (图 3.1 A), 在基因水平上, *vp1* 基因的表达水平也受到了抑制 (图 3.1 B)。这些结果表明 vsp10 确实可延缓 BmCPV 的复制增殖。

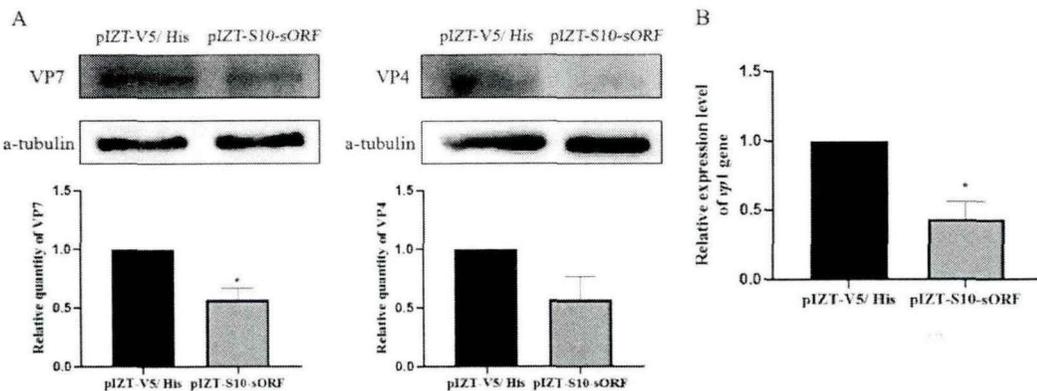


图 3.1 vsp10 延缓 BmCPV 的复制增殖

A, vsp10 对 VP7 和 VP4 病毒蛋白表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF 或 pIZT-V5/His 质粒 48 h, 接种 5 μL BmCPV (MOI=2), 48 h 后提取总蛋白进行 Western blotting 检测 (上列), 一抗为 VP7 和 VP4 抗体 (均为实验室制备, 鼠源 1:1000), 以 α -tubulin (鼠源, 1:2000) 为内参, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体 (1:5000)。泳道 pIZT 和 S10-sORF 分别为细胞转染 pIZT-V5/His 或 pIZT-S10-sORF 质粒, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。对 Western blotting 信号条带进行灰度扫描, 左下列为 VP7 条带的灰度扫描分析结果, 右下列为 VP4 条带的灰度扫描分析结果。(* $p < 0.05$, 实验重复 3 次, Error bars, $n = 3$)。B, vsp10 对病毒 *vp1* 基因表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF 或 pIZT-V5/His 质粒 48 h, 接种 5 μL BmCPV (MOI=2), 48 h 后提取总 RNA, 通过 qRT-PCR 检测病毒 *vp1* 基因相对表达水平, 用 *TIF-4A* 基因作内参。

Figure 3.1 Overexpression of vsp10 delays the replication and proliferation of BmCPV

A, The effect of vsp10 on the expression level of VP7 and VP4. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg pIZT-S10-sORF or pIZT-V5/His plasmids for 48 h, and then inoculated with 5 μL BmCPV (MOI=2). 48 hours later, the total protein was extracted and detected by Western blotting, VP7 and VP4 antibodies (all prepared in laboratory, mouse, 1:1000) were used as the first antibody, respectively, α -tubulin (mouse, 1:2000) was used as internal reference, HRP conjugated goat anti-mouse IgG (1:5000) were used as the second antibody. Top left and top right were the results of

Western blotting, the amount of protein added in each lane was 50 μg . Below left were results of relative gray value of VP7 signaling band to referene α -tubulin. Below right were results of relative gray value of VP4 signaling band to referene α -tubulin (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 3$). **B**, The effect of vsp10 on the expression level of S1 gene. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg pIZT-S10-sORF or pIZT-V5/ His plasmids for 48 h, and then inoculated with 5 μL BmCPV(MOI=2). 48 hours later, total RNA was extracted. The relative expression level of *vp1* gene was detected by qRT-PCR, and *TIF-4A* gene was used as internal reference.

3.2 vsp10 对免疫和凋亡相关通路基因的影响

病毒的入侵一般会激活宿主的免疫反应，并作为外界刺激引起一系列生理反应的发生，为了进一步研究 vsp10 是通过何种途径来延缓 BmCPV 复制增殖的，我们通过转染 pIZT-S10-sORF 使 vsp10 在 BmN 细胞中过表达，并分别对免疫和凋亡相关通路基因进行定量检测。结果显示，在免疫相关的信号通路中，过表达 vsp10 对 JAK/STAT 通路相关基因 (*BmCOCS2*、*Bmstat*)、RNAi 通路相关基因 (*Bmago2*) 和 Imd 通路相关基因 (*BmPGRP*) 的表达水平无明显影响，对 RNAi 通路基因 (*Bmdrc2* 基因，图 3.2 A 中以 Drc2 表示) 能起到一定的抑制作用，与对照组相比降低了 32.85% (图 3.2 A)，而对其他的免疫通路影响不大。在细胞凋亡通路中，过表达 vsp10 对促凋亡基因 *Caspase*、*Apaf*、*p53* 和 *Sur2* 起到一定的促进，并且能够下调凋亡抑制基因 *Bcl-2* (图 3.2 B)。

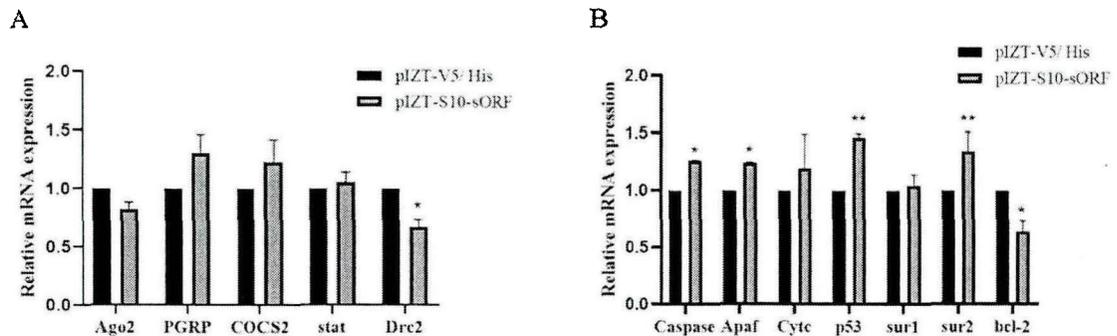


图 3.2 vsp10 对免疫和凋亡通路基因表达的影响

BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF 或 pIZT-V5/ His 质粒，48 h 后提取细胞总 RNA，去除基因组 DNA 后用随机引物反转录成 cDNA，随后通过 qRT-PCR 检测免疫和凋亡通路基因相对于 *TIF-4A* 的转录水平。A，vsp10 对免疫通路相关基因表达的影响。B，vsp10 对凋亡相关基因表达的影响。

Fig. 3.2 Effect of vsp10 on gene expression of immune and apoptotic pathways

BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μ g pIZT-S10-sORF or pIZT-V5/ His plasmids, respectively. After 48 hours, total RNA was extracted from BmN cells, genomic DNA was removed, and then reverse transcribed into cDNA with random primers. The transcription levels of immune and apoptosis pathway genes relative to *TIF-4A* were detected by qRT-PCR. A, The effect of vsp10 on the expression of immune pathway related genes. B, The effect of vsp10 on the expression of apoptosis related genes.

3.3 vsp10 抑制细胞周期

为了更全面的理解 vsp10 的功能, 随后检测了 vsp10 对细胞周期的影响。BmN 细胞分别转染 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后收集细胞用 PI 染色, 上流式细胞仪检测细胞周期各时相的细胞比例。结果显示, 与转染 pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 的对照组相比, 转染 pIZT-S10-sORF 组的细胞处于 G1 期的比例明显增加, 而处在 G2 和 S 期的细胞比例则明显减少 (图 3.3)。综上所述说明 vsp10 可以延缓 BmN 细胞周期的进程。

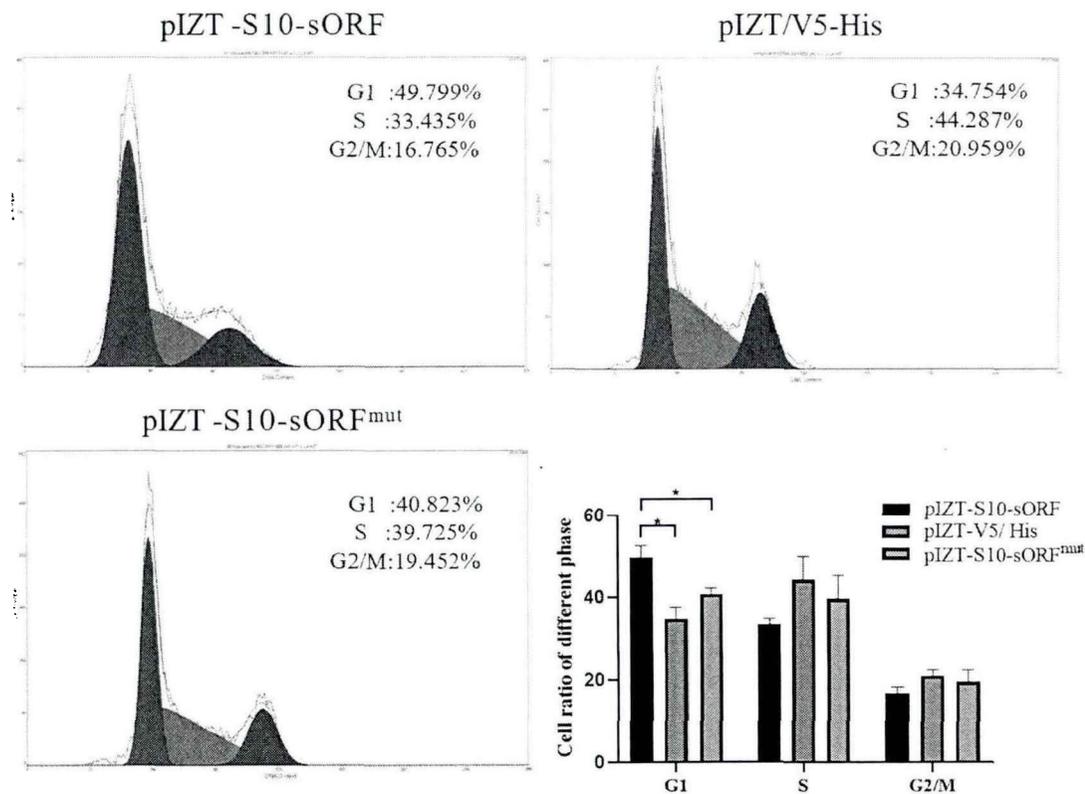


图 3.3 过表达 vsp10 抑制细胞周期

PI 法检测 vsp10 对细胞周期的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒, 48 h 后用流式细胞仪检测处于细胞周期各时相的细胞

比例。 (* $p < 0.05$, 实验重复 2 次, Error bars, $n = 2$)。

Figure 3.3 Over expression of vsp10 inhibits cell cycle

PI method was used to detect the effect of vsp10 on cell cycle. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg plasmids of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut}, respectively. After 48 hours, the proportion of cells in each phase of cell cycle was detected by flow cytometry (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 2$).

3.4 vsp10 促进细胞凋亡

为了明确 vsp10 对细胞凋亡的影响, 将 pIZT-S10-sORF 质粒以 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的用量转染进 BmN 细胞, 对照为转染 pIZT-V5/ His 或不表达 vsp10 的突变质粒 pIZT-S10-sORF^{mut} (实验室保存, 起始码 ATG 下游序列 tacgc 突变为 taaga, 即 vsp10 的第二密码子突变为终止码 TAA), 48 h 后收集细胞用 Annexin V-PE 与 7-AAD 双染法进行细胞染色, 通过流式细胞仪检测发现, 转染 pIZT-S10-sORF 的细胞凋亡比例明显高于转染 pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 的细胞 (图 3.4 A)。

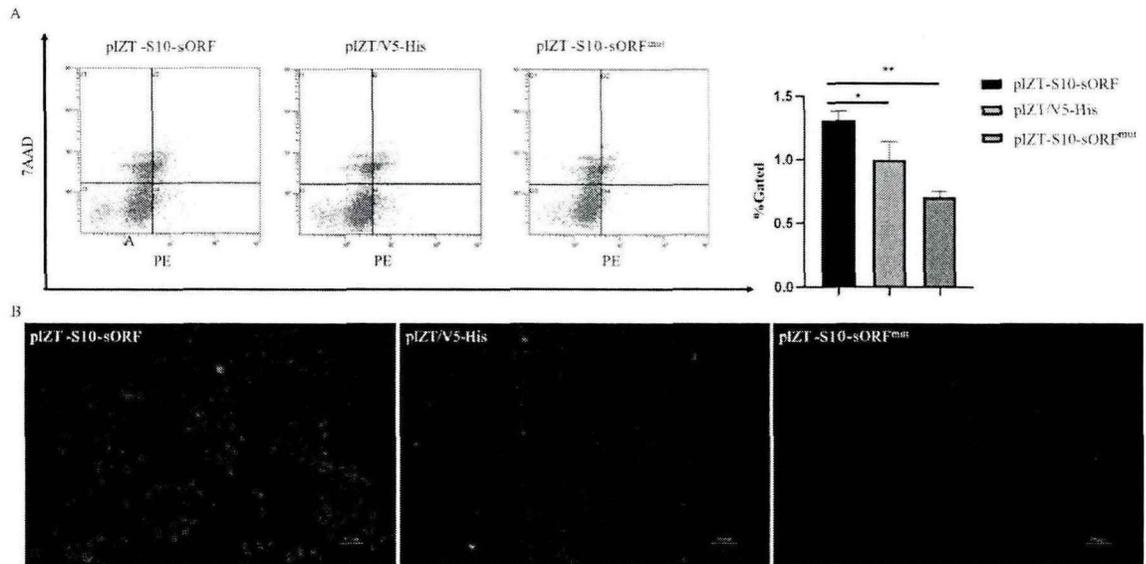


图 3.4 过表达 vsp10 促进细胞凋亡

A, Annexin V-PE/7-AAD 双染法检测 vsp10 对细胞凋亡的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒, 48 h 后用 Annexin V-PE 与 7-AAD 双染法进行细胞染色, 并用流式细胞仪检测处于不同象限细胞的比例。 (* $p < 0.05$, 实验重复 2 次, Error bars, $n = 2$)。B, TUNEL 法检测 vsp10 对细胞凋亡的影响。BmN 细胞 (1×10^4) 分别转染 1 μg 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后用 TUNEL 检测液进行染色 (红色), 并于荧光显微镜下观察。

Figure 3.4 Overexpression of vsp10 promotes apoptosis

A, Annexin V-PE/7-AAD double staining was used to detect the effect of vsp10 on apoptosis. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg plasmids of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut} respectively. After 48 hours, the cells were stained with Annexin V-PE and 7-AAD double staining, and the proportion of cells in different quadrants was detected by flow cytometry (* $P < 0.05$, Error bars, $n=2$). **B**, The effect of vsp10 on apoptosis was detected by TUNEL. BmN cells (1×10^4) were transfected with 1 μg of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut}, respectively. After 48 hours, the cells were stained with TUNEL test solution (red) and observed under fluorescence microscope.

为了确定 vsp10 促进细胞凋亡的真实性, 分别从细胞和分子水平进行了验证。首先在细胞水平, BmN 细胞分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL) 进行检测, 在荧光显微镜下观察发现转染 pIZT-S10-sORF 的细胞所发出的代表凋亡细胞的红色阳性信号要多于对照组 (pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 的细胞) (图 3.4 B)。

随后在分子水平, 分别将三种质粒 (pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut}) 以 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的量分别转染进 BmN 细胞, 并通过 Western blotting 检测 Active Caspase3 蛋白的表达水平, 结果显示转染表达 vsp10 的 pIZT-S10-sORF 质粒的实验组细胞, 相较于转染 pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 的对照组细胞, Active Caspase3 蛋白的水平明显升高 (图 3.5 A)。为了研究 vsp10 对凋亡的促进是否存在剂量依赖, 将 pIZT-S10-sORF 按不同的剂量 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 转染进 BmN 细胞中, 并转染相同剂量的 pIZT-V5/ His 作为对照, 48 h 后收集细胞并提取蛋白, 使用 Western blotting 实验检测 Active Caspase3 的表达水平。结果显示, 当 pIZT-S10-sORF 的转染剂量达到 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Active Caspase3 的蛋白水平达到最高值 (图 3.5 B)。综上所述表明, 无论从细胞水平还是从分子水平来看, vsp10 都可以促进 BmN 细胞的凋亡。

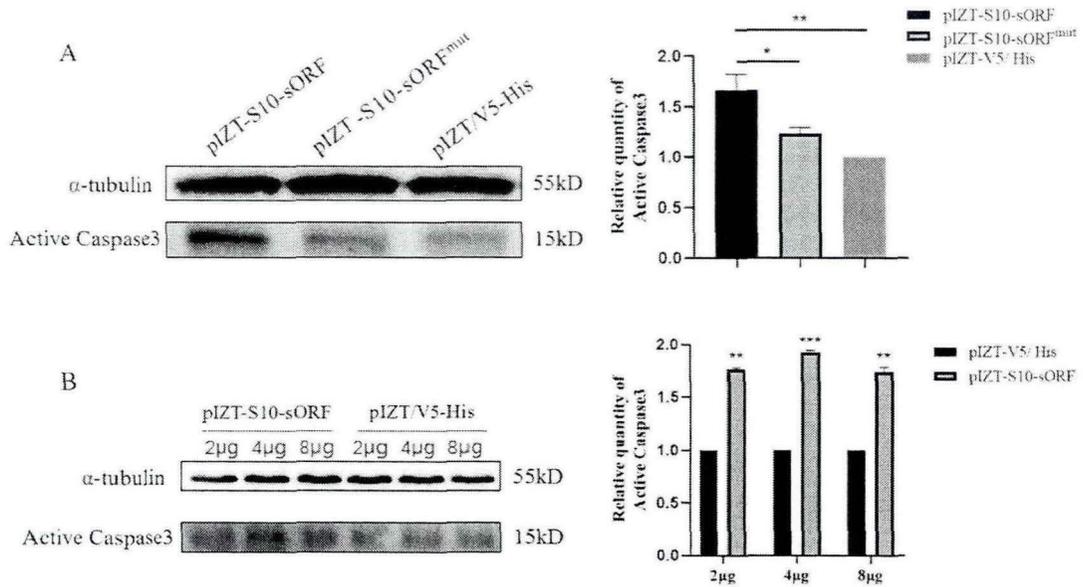


图 3.5 过表达 vsp10 对 Active Caspase3 表达水平的影响

A, 过表达 vsp10 对 BmN 细胞中 Active Caspase3 表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后提取细胞总蛋白, 通过 Western blotting 检测 Active Caspase3 的表达水平, 泳道 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 分别为细胞转染 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。左图为 Western blotting 结果, 一抗分别使用鼠源的 α -tubulin 抗体 (1:2000) 或兔源的 Active Caspase3 抗体 (1:2000), 其中 α -tubulin 为内参, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠/兔抗体 (1:5000)。右图为 Western blotting 条带的灰度扫描分析结果。**B**, 转染不同剂量 pIZT-S10-sORF 对 Active Caspase3 表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 在 6 孔板中培养 24 h 后, 用不同的剂量 pIZT-S10-sORF (终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 转染细胞, 并转染相同剂量 pIZT-V5/ His 做对照, 48 h 后提取蛋白进行 Western blotting 检测, 一抗为 Active Caspase3 抗体 (兔源, 1:2000) 和 α -tubulin 抗体 (鼠源, 1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/鼠抗体 (1:5000), 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。(* $p < 0.05$, 实验重复 3 次, Error bars, $n = 3$)

Figure 3.5 The effect of vsp10 overexpression on the expression of Active Caspase3

A, The effect of vsp10 overexpression on the expression of Active Caspase3 in BmN cells. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut}, respectively. After 48 hours, the total protein was extracted and the expression level of Active Caspase3 was detected by Western blotting. The protein loading of each lane was 50 μg . The left figure shows the results of Western blotting, α -tubulin antibody (mouse, 1:2000) and Active Caspase3 antibody (rabbit, 1:2000) were used as the first antibody, respectively,

HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse IgG (1:5000) were used as the second antibody. The image on the right shows the results of gray scan analysis of Western blotting bands. **B**, The effect of different doses of pIZT-S10-sORF transfection on the expression level of Active Caspase3. BmN cells (1×10^6) were cultured in 6-well plates for 24 h, then transfected with different doses of pIZT-S10-sORF (final concentration: 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$), and transfected with the same dose of pIZT-V5/ His as the control. After 48 h, the protein was extracted and detected by Western blotting, Active Caspase3 antibody (rabbit, 1:2000) and α -tubulin antibody (mouse, 1:2000) were used as the first antibody, the second antibody was HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse antibody (1:5000), and the protein loading amount of each lane was 50 μg (* $P < 0.05$, Error bars, $n=3$).

3.5 vsp10 促使线粒体损伤

线粒体在凋亡的发生过程中起着重要作用，而线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, DYmt) 的下降，往往被认为是凋亡相关级联反应中最先发生的事件。在本研究中，为了再次确认 vsp10 对细胞凋亡的促进作用，我们检测了其 对线粒体膜电位的影响。取正常家蚕卵巢细胞 BmN，分别转染 pIZT-V5/ His、pIZT-S10-sORF 或 pIZT-S10-sORF^{mut}，48 h 后收集细胞并用 JC-1 染色，并于流式细胞仪上检测细胞凋亡情况，FL1 通道为绿色荧光对应着 FITC、FL2 和 FL3 通道为红色荧光对应 PE 和 PE-TR，通过 JC-1 荧光从红色到绿色的转变可以很方便地检测到 DYmt 的下降，因而可以用 FL2/ FL1 的比值或是 FL3/ FL1 的比值作为细胞早期凋亡的检测指标。结果显示，转染表达 vsp10 的 pIZT-S10-sORF 质粒的 BmN 细胞的荧光比值 (FL2/ FL1 或 FL3/ FL1)，要明显低于转染 pIZT-S10-sORF^{mut} 和 pIZT-V5/ His 的对照组细胞 (图 3.6)，结果表明，vsp10 可以导致线粒体膜电位下降促进早期凋亡的形成。

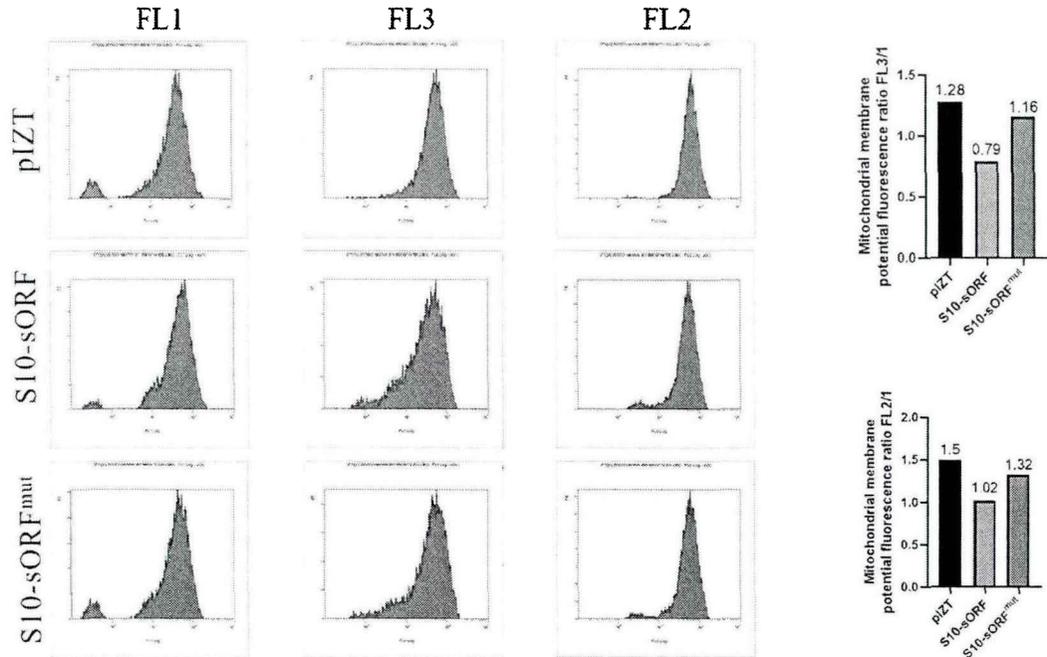


图 3.6 过表达 vsp10 对线粒体膜电位的影响

JC-1 检测 vsp10 对线粒体膜电位的影响。BmN 细胞(1×10^6)分别转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒, 48 h 后用 JC-1 进行细胞染色, 并用流式细胞仪检测不同通道下的荧光值。FL1、FL2 和 FL3 通道分别对应 FITC、PE 和 PE-TR 荧光, 组别 S10-sORF、pIZT 和 S10-sORF^{mut} 分别为细胞转染 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒。

Fig. 3.6 Effect of vsp10 overexpression on mitochondrial membrane potential

JC-1 was used to detect the effect of vsp10 on mitochondrial membrane potential. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μ g plasmids of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut} respectively. After 48 hours, the cells were stained with JC-1, and the fluorescence values under different channels were detected by flow cytometry. FL1, FL2 and FL3 channels correspond to FITC, PE and PE-TR fluorescence, respectively. The S10-sORF, pIZT and S10-sORF^{mut} groups were transfected with pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/ His and pIZT-S10-sORF^{mut} plasmids, respectively.

3.6 vsp10 与线粒体共定位

由于 vsp10 可以使线粒体损伤, 并导致膜电位下降, 所以可以推测 vsp10 可能会定位在线粒体上, 并与某些膜蛋白互作引起一系列级联反应, 从而导致细胞凋亡。为了证实这种猜测, 用线粒体深红探针标记了感染 BmCPV 的 BmN 细胞或正常 BmN 细胞的线粒体, 并通过免疫荧光进行检测。结果显示, 在感染 BmCPV 的实验组细胞中可以观察到代表 vsp10 的绿色荧光信号与线粒体发生重叠, 而在对照

组中未观察到共定位的发生（图 3.7），表明 vsp10 可以定位在线粒体上。

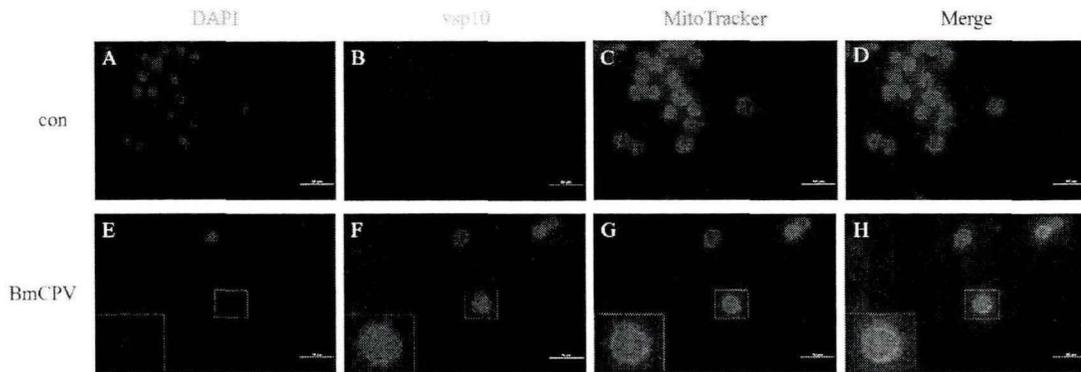


图 3.7 vsp10 与线粒体共定位

BmN 细胞 (1×10^4) 在二十四孔板中培养 24 h 后，接种 3 μ L BmCPV (MOI=2)，对照组为正常 BmN 细胞，48 h 后用线粒体深红荧光探针 (MitoTracker[®] Deep Red FM) 标记线粒体，并通过免疫荧光实验检测 vsp10 与线粒体的共定位情况。一抗使用 1:10 稀释的 vsp10 抗体，二抗使用 1:50 稀释的 FITC 标记的山羊抗鼠抗体（绿色），细胞核用 1:1000 稀释的 DAPI 进行染色（蓝色），红色为被标记的线粒体。A, B, C, D: 为正常 BmN 细胞。E, F, G, H: BmCPV 感染的 BmN 细胞。

Figure 3.7 vsp10 can be co-located with mitochondria

BmN cells (1×10^4) were cultured in 24 well plates for 24 h, then inoculated with 3 μ L BmCPV (MOI=2). The control group was normal BmN cells. 48 h later, MitoTracker[®] Deep Red FM was used to label mitochondria, and the co-localization of vsp10 and mitochondria was detected by immunofluorescence assay. The first antibody was vsp10 antibody (1:10), the second antibody was 1:50 FITC conjugated goat anti-mouse IgG (1:50, green), and the nucleus was stained with 1:1000 diluted DAPI (blue). A, B, C, D: normal BmN cells. E, F, G, H: BmN cells infected by BmCPV.

3.7 vsp10 可与 PHB2 蛋白相互作用

为了进一步理解 vsp10 促进细胞凋亡的机制，通过免疫沉淀 (IP) 对与其相互作用的蛋白进行了筛选与鉴定，用 BmCPV 感染家蚕卵巢细胞 BmN，48 h 后提取总蛋白并用 vsp10 抗体进行免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 实验，沉淀复合物经 SDS-PAGE 后进行银染显色，与对照组未免疫小鼠血清 (IgG) 相比，在 72、38 和 13 kDa 的位置存在差异蛋白带 (图 3.8 A)。在实验室之前的研究中已将 38 kDa 处的差异带进行过质谱分析^[25]，将 72 和 13 kDa 处的差异条带进行质谱鉴定，结果如表 3.2 所示。

表 3.2 IP 筛选获得的 vsp10 小肽的互作蛋白质谱鉴定

kDa	NO.	Protein name	Cover percent
70	1	histone H4-like [<i>Bombyx mori</i>]	13.95%
	2	uncharacterized protein LOC101746198 [<i>Bombyx mori</i>]	10.84%
	3	signal transducer and transcription activator-like, partial [<i>Bombyx mori</i>]	10.71%
	4	glu- + pro-tRNA synthetase, partial [<i>Bombyx mori</i>]	8.96%
	5	actin-4 [<i>Bombyx mori</i>]	6.12%
	6	heat shock cognate protein [<i>Bombyx mori</i>]	4.31%
	7	tubulin alpha chain [<i>Bombyx mori</i>]	3.78%
	8	dipeptidyl peptidase 3 isoform X2 [<i>Bombyx mori</i>]	2.77%
	9	heat shock 70 kDa protein cognate 5-like [<i>Bombyx mori</i>]	2.63%
38*	10	Y-box protein	42.65%
	11	Mitochondrial prohibitin complex protein 2	35.79%
	12	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	30.71%
	13	RAN binding protein	24.35%
	14	Phosphate transport protein	16.20%
	15	Transcription elongation factor S-II	15.97%
	16	Elongation factor 1-alpha	14.69%
	17	Receptor for activated protein kinase C	13.38%
13	18	histone H2B-like, partial [<i>Bombyx mori</i>]	35.09%
	19	cellular retinoic acid binding protein [<i>Bombyx mori</i>]	34.09%
	20	histone H2B [<i>Bombyx mori</i>]	32.26%
	21	ribosomal protein S15A [<i>Bombyx mori</i>]	27.13%
	22	ribosomal protein L31 [<i>Bombyx mori</i>]	22.58%
	23	H2A histone family member V [<i>Bombyx mori</i>]	20.16%
	24	histone H2A [<i>Bombyx mori</i>]	18.55%
	25	thymosin isoform 2 [<i>Bombyx mori</i>]	15.91%
	26	repressor splicing factor 1 isoform X1 [<i>Bombyx mori</i>]	14.38%

*: 38 kDa 处差异条带为前期研究中质谱鉴定结果^[25]。

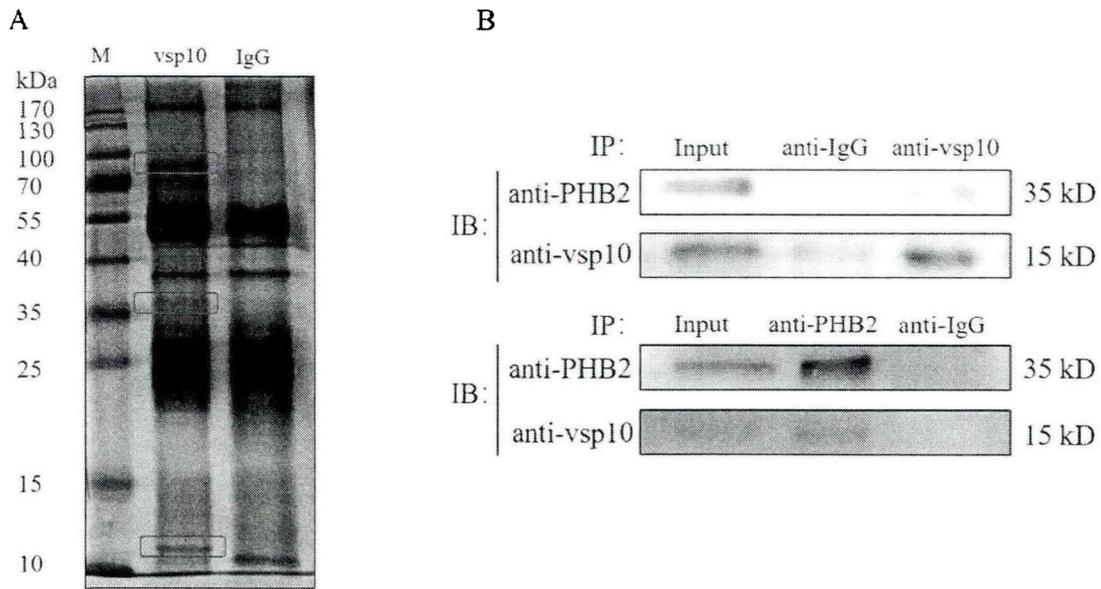


图 3.8 vsp10 可与 PHB2 相互作用

A, BmN 细胞 (1×10^7) 培养 24 h 后, 接种 5 μ L BmCPV (MOI=2), 48 h 后收集细胞制备裂解液, 用 5 μ g vsp10 抗体或未兔鼠血清进行 IP (Immunoprecipitation) 实验, 随后进行 SDS-PAGE 并银染观察。泳道 vsp10 和 IgG 分别为 vsp10 抗体和未兔鼠血清进行 IP 的样品, 红色框为差异条带。**B**, BmN 细胞 (1×10^7) 培养 24 h 后, 接种 5 μ L BmCPV (MOI=2), 48 h 后收集细胞制备裂解液, 用 5 μ g 的 anti-PHB2 或 anti-vsp10 进行 Co-IP (Co-immunoprecipitation) 实验, 同设未兔鼠血清作为对照。免疫沉淀复合物经 SDS-PAGE 分离后, 分别用 anti-vsp10 抗体 (鼠源 1:1000) 和 anti-PHB2 (兔源 1:1000) 进行 Western blotting 实验, 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/鼠抗体 (1:5000)。每个泳道的蛋白上样量为 50 μ g。 (* $p < 0.05$, 实验重复 2 次, Error bars, $n = 2$)

Figure 3.8 vsp10 can interact with PHB2

A, After 24 hours of culture, BmN cells (1×10^7) were inoculated with 5 μ L BmCPV (MOI=2), and the cells were collected after 48 hours to prepare lysate. IP test was performed with 5 μ g vsp10 antibody or normal mouse IgG, followed by SDS-PAGE and silver staining. The swimwear vsp10 and IgG were the samples of vsp10 antibody and normal mouse IgG, and the red frame was the different band. **B**, After 24 hours of culture, BmN cells (1×10^7) were inoculated with 5 μ L BmCPV (MOI=2), and the cells were collected after 48 hours to prepare lysate. Co-IP test was performed with 5 μ g anti-PHB2 and anti-vsp10, and the normal mouse IgG was used as the control. Western blotting was performed with anti-vsp10 antibody (mouse 1:1000) and anti-PHB2 (rabbit 1:1000) respectively. The second antibody was HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse IgG (1:5000). The protein loading amount of each lane was 50 μ g (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 2$).

结合实验室前期的质谱结果^[25], 我们发现 vsp10 相互作用的候选蛋白中, 存在一个线粒体内膜蛋白 PHB2 (Prohibitin 2)。为了验证 vsp10 可与 PHB2 蛋白相互作用, 将 BmCPV 病毒感染家蚕卵巢细胞 BmN, 48 h 后收集细胞, 利用 anti-vsp10 和 anti-PHB2 抗体进行蛋白免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验。结果显示, 同对照 IgG 相比, 在加入 anti- vsp10 抗体的感染 BmCPV 的细胞样本的免疫复合物中, 可以富集到更多的 PHB2 蛋白, 反之亦然; 表明 vsp10 可与 PHB2 蛋白相互作用 (图 3.8 B)。用免疫荧光的方法检测 BmCPV 感染的家蚕卵巢细胞 BmN 或正常 BmN 细胞中 vsp10 与 PHB2 的定位情况。结果显示, 在 BmCPV 感染的细胞中观察到代表 vsp10 的绿色荧光信号与代表 PHB2 的红色荧光在细胞质中重叠 (图 3.9 H), 而在正常 BmN 细胞中则观察不到 vsp10 与 PHB2 的共定位 (图 3.9 D)。以上结果进一步证实 vsp10 能够与 PHB2 相互作用。

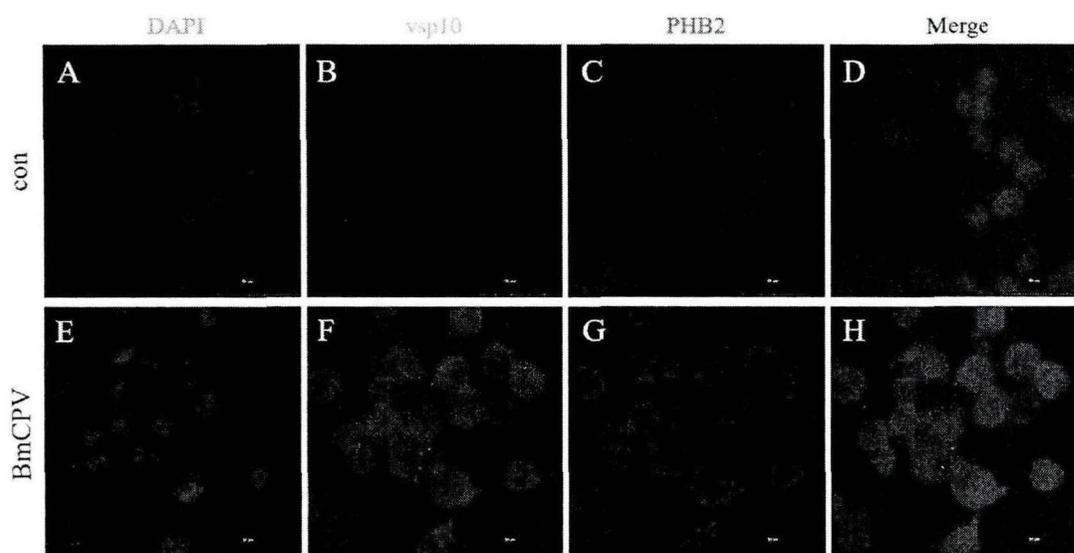


图 3.9 vsp10 可与 PHB2 共定位

BmN 细胞 (1×10^4) 在二十四孔板中培养 24 h 后, 接种 3 μ L BmCPV (MOI=2), 对照组为正常 BmN 细胞, 48h 后进行细胞免疫荧光实验, 一抗使用 1:10 稀释的 vsp10 抗体 (鼠源) 和 PHB2 抗体 (兔源), 二抗使用 1:50 稀释的 CY3 标记的山羊抗兔抗体 (红色) 和 FITC 标记的山羊抗鼠抗体 (绿色), 细胞核用 1:1000 稀释的 DAPI 进行染色 (蓝色)。A, B, C, D: 为正常 BmN 细胞。E, F, G, H: BmCPV 感染的 BmN 细胞。

Figure 3.9 vsp10 can be co-located with PHB2

BmN cells (1×10^4) were cultured in 24 well plates for 24 h and inoculated with 3 μ L BmCPV (MOI=2), The control group was normal BmN cells. 48 hours later, the immunofluorescence test

was performed. The first antibody was vsp10 antibody (mouse, 1:10) and PHB2 antibody (rabbit, 1:10), the second antibody was Cy3 conjugated goat anti-rabbit IgG (red, 1:50) and FITC conjugated goat anti-mouse IgG (green, 1:50), and the nucleus was stained with 1:1000 diluted DAPI (blue). A, B, C, D: normal BmN cells. E, F, G, H: BmN cells infected by BmCPV.

3.8 vsp10 可以促进 PHB2 的表达

在验证了 vsp10 能够与 PHB2 相互作用的基础上, 为明确调节 vsp10 表达对 PHB2 表达水平的影响, 在 BmN 细胞中分别转染 4 μg 的 pIZT-V5/ His、pIZT-S10-sORF 或 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后, 用 Western blotting 检测 PHB2 表达水平的变化。结果显示, 相较于转染 pIZT-V5/ His 或 pIZT-S10-sORF^{mut} 的对照组, 瞬时表达 vsp10 会使 PHB2 蛋白水平上升 (图 3.10 A)。为了确定 vsp10 对 PHB2 表达水平的促进是否存在剂量依赖, 将 pIZT-S10-sORF 按不同的剂量 (2、4、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 转染进 BmN 细胞, 并转染同等剂量的 pIZT-V5/ His 作对照, 48 h 后收集细胞, 使用 Western blotting 检测 PHB2 的表达水平。结果显示, 转染 pIZT-V5/ His 的对照组细胞的 PHB2 的表达水平没有变化, 而转染 pIZT-S10-sORF 的实验组的 PHB2 的表达水平要普遍高于对照组, 且在实验组中 PHB2 的表达水平呈现出剂量依赖性增高 (图 3.10 B)。以上结果表明 vsp10 可以促进 PHB2 的表达, 且 PHB2 的表达水平与 vsp10 有剂量依赖性。

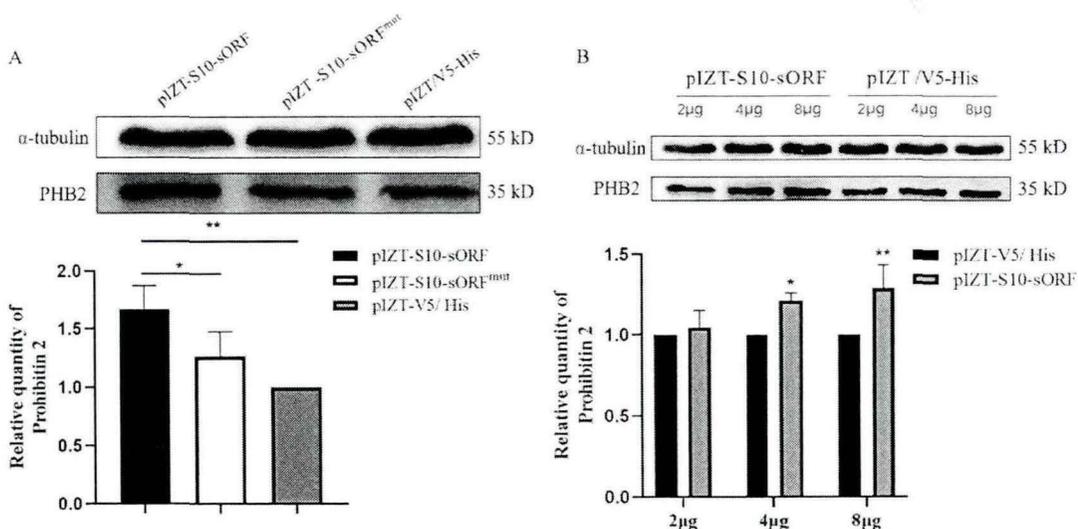


图 3.10 过表达 vsp10 对 PHB2 表达水平的影响

A, 过表达 vsp10 对 BmN 细胞中 PHB2 表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 分别转染 4 μg

的 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut}, 48 h 后提取细胞总蛋白, 通过 Western blotting 检测 PHB2 的表达水平, 泳道 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 分别为细胞转染 pIZT-S10-sORF、pIZT-V5/ His 和 pIZT-S10-sORF^{mut} 质粒, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。上列为 Western blotting 结果, 一抗分别使用鼠源的 α -tubulin 抗体 (1:2000) 或兔源的 PHB2 抗体 (1:2000), 其中 α -tubulin 为内参, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠/兔抗体 (1:5000)。下列为 Western blotting 条带的灰度扫描分析结果。B, 转染不同剂量 pIZT-S10-sORF 对 PHB2 表达水平的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 在 6 孔板中培养 24 h 后, 用不同的剂量 pIZT-S10-sORF (终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 转染细胞, 并转染相同剂量 pIZT-V5/ His 做对照, 48 h 后提取蛋白进行 Western blotting 检测(上列), 一抗为 PHB2 抗体 (兔源, 1:2000) 和 α -tubulin 抗体 (鼠源, 1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/鼠抗体 (1:5000), 每个泳道的蛋白上样量为 50 μg 。下列为 Western blotting 条带的灰度扫描分析结果。 (* $p < 0.05$, 实验重复 3 次, Error bars, $n = 3$)

Figure 3.10 Effect of overexpression of vsp10 on PHB2 expression

A, The effect of vsp10 overexpression on PHB2 expression in BmN cells. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μg of pIZT-S10-sORF, pIZT-V5/His and pIZT-S10-sORF^{mut}, respectively. After 48 hours, the total protein was extracted and the expression level of PHB2 was detected by Western blotting. The protein loading amount of each lane was 50 μg . The results of Western blotting were listed above, α -tubulin antibody (mouse, 1:2000) and PHB2 antibody (rabbit, 1:2000) were used as the first antibody, respectively, in which α -tubulin was internal reference and the second antibody was HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse IgG (1:5000). The following are the results of gray scan analysis of Western blotting bands. B, The effect of different doses of pIZT-S10-sORF transfection on the expression of PHB2. BmN cells (1×10^6) were cultured in 6-well plates for 24 h, then transfected with different doses of pIZT-S10-sORF (final concentration: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and transfected with the same dose of pIZT-V5/ His as control. After 48 h, the protein was extracted for Western blotting (listed above), PHB2 antibody (rabbit, 1:2000) and α -tubulin antibody (mouse, 1:2000) were used as the first antibody, and the second antibody was HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse IgG (1:5000). The protein loading amount of each lane was 50 μg . The results of Western blotting were as follows (* $P < 0.05$, Error bars, $n = 3$).

3.9 干扰 PHB2 减弱 vsp10 对病毒的抑制和凋亡的促进

为了证明 vsp10 是通过与 PHB2 互作来发挥功能的, 实验设计了针对 PHB2 的 siRNA (表 3.3) 并验证了其干扰效率 (图 3.11), 发现 PHB2-siRNA 可以显著降低 PHB2 的表达。在转染了 pIZT-S10-sORF 的细胞中加入 siRNA, 48 h 后提取细胞总蛋白, 使用 Western blotting 检测 Active Caspase3 的表达水平, 发现当 PHB2

被沉默时, Active Caspase3 的水平发生了下降(图 3.12 B)。为了再次确认 vsp10 是通过与 PHB2 的互作促进了细胞凋亡,并通过凋亡抑制了 BmCPV 的增殖,在转染了 pIZT-S10-sORF 并感染了 BmCPV 的细胞中加入 siRNA, 48 h 后收集细胞用 Western blotting 检测 Active Caspase3 和 BmCPV VP7 蛋白的表达水平。结果显示,与转入 siRNA-NC 的对照相比, VP7 蛋白的表达水平明显上升, Active Caspase3 的表达水平发生了下降(图 3.12 A),说明敲降 PHB2 使 vsp10 抑制病毒和促进细胞凋亡的作用受到了削弱,并且 vsp10 可能是通过促进宿主细胞凋亡来抗病毒的。

表 3.3 PHB2 相关 siRNA 序列

Genes Name	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
PHB2-siRNA	CAUCGUGCCAUAUUGUCCAACAGA ATT	UUCUGUUGAACAUAAUGGCACGA UGTT
Control-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

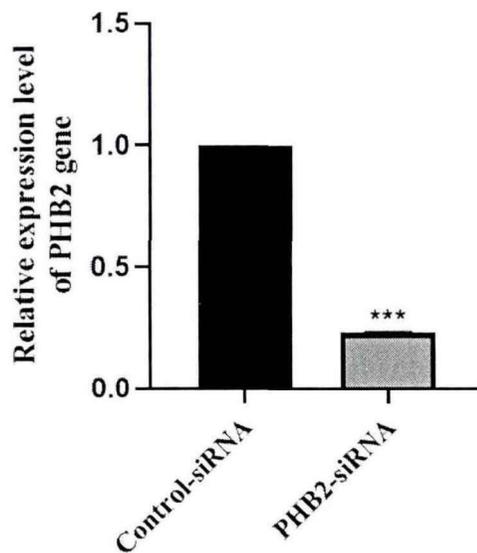


图 3.11 RNAi 对 PHB2 基因表达水平的影响

BmN 细胞 (1×10^6) 转染终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 PHB2-siRNA, 同设转染 Control-siRNA 作为对照。转染 48 h 后提取 RNA, qRT-PCR 检测 PHB2 基因相对表达水平, 用 TIF-4A 基因作内参。

Fig. S3 Effect of RNAi on PHB2 gene expression

BmN cells (1×10^6) were transfected with PHB2-siRNA at the final concentration of $5 \mu\text{mol/L}$, and control siRNA was used as control. After 48 hours of transfection, RNA was extracted and the relative expression level of PHB2 gene was detected by qRT-PCR. TIF-4A gene was used as internal reference.

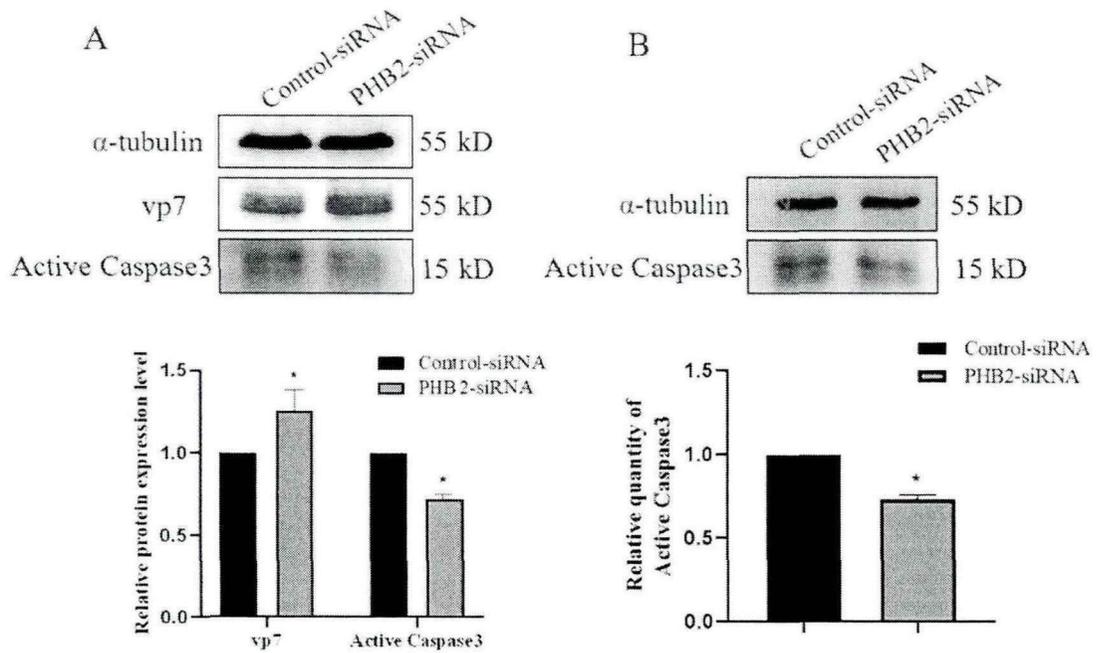


图 3.12 干扰 PHB2 对 vsp10 抑制病毒增殖及促进细胞凋亡的影响

A, 干扰 PHB2 对 vsp10 延缓病毒增殖的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF 质粒 48 h, 然后接种 5 μ L BmCPV (MOI=2) 48 h, 再分别转染终浓度为 5 μ mol/L 的 PHB2-siRNA, 同设转染 Control-siRNA 作为对照。48 h 后提取蛋白进行 Western blotting 检测 (上列), 一抗为 VP7 抗体 (鼠源, 1:1000)、Active Caspase3 (兔源, 1:2000) 抗体和 α -tubulin 抗体 (鼠源, 1:2000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔/鼠抗体 (1:5000), 每个泳道的蛋白上样量为 50 μ g。下列为 Western blotting 条带的灰度扫描分析结果。**B**, 干扰 PHB2 对 vsp10 促进细胞凋亡的影响。BmN 细胞 (1×10^6) 在 6 孔板中培养 24 h 后, 转染 4 μ g 的 pIZT-S10-sORF 质粒, 48 h 后再分别转染终浓度为 5 μ mol/L 的 PHB2-siRNA, 同设转染 Control-siRNA 作为对照。48 h 后提取细胞总蛋白, 通过 Western blotting 检测 Active Caspase3 的表达水平, 泳道 PHB2-siRNA 和 Control-siRNA 分别为细胞转染 PHB2-siRNA 和 Control-siRNA, 每个泳道的蛋白上样量为 50 μ g。上列为 Western blotting 结果, 一抗分别使用鼠源的 α -tubulin 抗体 (1:2000) 或兔源的 Active Caspase3 抗体 (1:2000), 其中 α -tubulin 为内参, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠/兔抗体 (1:5000)。下列为 Western blotting 条带的灰度扫描分析结果。 (* $p < 0.05$, 实验重复 3 次, Error bars, $n = 3$)

Figure 3.11 Effect of PHB2 interference on vsp10 inhibiting virus proliferation and promoting cell apoptosis

A, Interference with PHB2 can delay the proliferation of vsp10. BmN cells (1×10^6) were transfected with 4 μ g of pIZT-S10-sORF plasmid for 48 h, then 5 μ L BmCPV (MOI=2) were inoculated for 48 h,

and then respectively transfected with a final concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ PHB2-siRNA, the same set transfection Control-siRNA as a control. After 48 hours, the protein was extracted and detected by Western blotting (above). The primary antibodies were VP7 antibody (mouse, 1:1000), Active Caspase3 (rabbit, 1:2000) antibody and α -tubulin antibody (mouse, 1:2000), the secondary antibody is HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse antibody (1:5000). The amount of protein loaded in each lane is 50 μg . The following are the gray-scale scanning analysis results of Western blotting bands. **B**, The effect of PHB2 interference on vsp10 induced apoptosis. BmN cells (1×10^6) were cultured in a 6-well plate for 24 hours, and then transfected with 4 μg of pLZT-S10-sORF plasmid. After 48 hours, they were transfected with PHB2-siRNA at a final concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$. The same set transfection Control-siRNA as a control. After 48 hours, the total cell protein was extracted, and the expression level of Active Caspase3 was detected by Western blotting. The protein loading amount in each lane was 50 μg . The results of Western blotting are listed above, α -tubulin antibody (mouse, 1:2000) or rabbit-derived Active Caspase3 antibody (rabbit, 1:2000) were used as the first antibody, in which α -tubulin was the internal control, and the secondary antibody was HRP conjugated goat anti-rabbit/mouse IgG (1:5000). The following are the gray-scale scanning analysis results of Western blotting bands (* $P < 0.05$, Error bars, $n=3$).

4 讨论

vsp10 来源于 BmCPV 基因组 S10 dsRNA 节段的正义链, 而 S10 正义链编码多角体蛋白, 多角体蛋白可以包裹并保护病毒粒子。在本研究中我们发现, S10 dsRNA 片段的正链可以编码一个 59 aa 长的小肽 vsp10, 并且发现 vsp10 的过表达可以延缓病毒的复制增殖, 因此本研究结果拓宽了对 BmCPV 基因组 dsRNA 遗传信息的认识。

细胞凋亡是组织内环境动态平衡的关键调节因子, 由激活和抑制途径的相互作用严格调控。异常诱导的细胞凋亡可能导致神经退行性疾病, 慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病等。最近对凋亡细胞生化特性的研究揭示了凋亡过程的基本特征。细胞凋亡是由各种刺激引起的, 包括病毒感染^[26]。凋亡过程可分为两个阶段: 一个是起始阶段, 这取决于凋亡诱导刺激的类型; 另一个是效应阶段, 这是所有凋亡过程的共同点^[27]。病毒诱导细胞凋亡的现象最早在腺病毒中发现, 腺病毒突变体 E1B-19K 诱导受感染细胞产生严重的细胞病变效应, 并伴随着子代病毒产量的显著下降^[28]。在感染昆虫病毒一段时间后, 观察到病毒感染的细胞发生凋亡并过早的裂解^[29, 30]。对突变杆状病毒和腺病毒的广泛研究发现, 凋亡的主要意义是

通过被感染细胞的过早裂解而使病毒增殖失败,这可能使针对真核细胞中病毒感染的非特异性防御机制^[31]。在本研究中我们发现,过表达 vsp10 可以使部分促凋亡基因的表达水平上升,并使凋亡抑制基因 *Bcl-2* 的表达水平下调。表明 vsp10 可能对细胞凋亡有一定的促进作用。随后通过流式细胞仪检测发现, vsp10 还可以延缓细胞周期进程。当收到外界刺激时细胞可以暂时停留在细胞周期检查点,以便修复细胞损伤,消除外源性细胞应激信号。如果细胞损伤无法精确修复,检查点阻滞也可能导致程序性细胞死亡的激活。因此 vsp10 对周期的抑制从侧面验证了其促进细胞凋亡发生的可能性。

随后通过流式细胞仪、TUNEL 和 Western blotting 检测,分别从细胞和分子水平确认了过表达 vsp10 会促进细胞凋亡。进一步还通过线粒体膜电位下降检测到了早期凋亡的发生,并且发现 vsp10 可以与线粒体共定位。表明 BmCPV 病毒编码的小肽 vsp10 引起的细胞凋亡现象可能与线粒体有关。进一步通过 IP 实验及质谱鉴定对于 vsp10 互作的蛋白进行了筛选。根据本次鉴定得到的候选互作蛋白结合本实验室之前的质谱结果^[25],从中发现了一个与凋亡相关的蛋白 PHB2。其作为 PHB 蛋白主要的亚型之一,在线粒体的正常生长发育、转录调控、细胞增殖和凋亡等过程中起着至关重要的作用,且 PHB 复合体抑制细胞的增殖并诱导凋亡的机制依赖于 NF- κ B 信号的转导^[32]。线粒体 PHB 复合体具有两个高度同源的亚基 PHBPHB2,过度表达 PHB 可以抵抗诱导线粒体凋亡途径的各种刺激,而敲低 PHB 则增加了对细胞凋亡刺激的敏感性。干细胞研究还表明,敲除 PHB2 可导致小鼠细胞大量凋亡和早期胚胎死亡^[33,34]。然而在癌症领域,关于 PHB 是否可以促进癌细胞的存活存在矛盾的发现。一些研究表明,敲除 PHB 会增加癌细胞凋亡^[35,36]。然而,其他研究发现 PHB1 缺乏会加速癌细胞生长,减少细胞凋亡^[37,38]。有趣的是,PHB1 的敲除增加了胃癌细胞 SGC7901 的凋亡^[39],但是 PHB1 的过表达增加了 BGC823 细胞的凋亡^[40],并且两种细胞系都是胃癌细胞。这可能是由于癌细胞的分化程度不同导致的,但总的来说,PHB 的表达、凋亡刺激和细胞类型都可能影响细胞存活和凋亡。

近年来有研究表明,不同细胞中 PHB 对凋亡的作用可能受其亚细胞定位的影响^[41]。在人宫颈癌细胞(HeLa)和小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)中,PHB1 和 PHB2 主要定位于线粒体上,PHB1 或 PHB2 的完全沉默会导

致线粒体网络断裂,然后在不同的凋亡刺激下使线粒体介导的细胞凋亡增加^[22, 42]。在小鼠多能胚胎干细胞(ES)中 PHB2 主要位于线粒体上,敲除 PHB2 会诱导小鼠胚胎干细胞和人多能干细胞的凋亡。PHB2 的异位表达,而非线粒体靶向信号的突变,有效地抑制了细胞凋亡,这表明位于线粒体的 PHB2 对多能干细胞的存活至关重要^[43]。一直以来,在人结肠癌细胞系中,PHB1 仅存在于细胞核中,而 PHB2 似乎同时存在于细胞质和细胞核中,敲除 PHB1 或 PHB2 可抑制该细胞类型中凋亡的发生^[44]。上述的研究表明,在大多数细胞中,定位于线粒体的 PHB 与抗凋亡功能有关。然而,定位于核的 PHB 表现出促凋亡或抗肿瘤的特性。PHB 的亚细胞定位以及翻译后的修饰可能最终决定了其对细胞凋亡的影响。

在后续研究中通过 Co-IP 实验和免疫共定位确定了 vsp10 可以与 PHB2 相互作用。并且在前期的研究中,通过免疫共定位实验发现,vsp10 可以定位于线粒体上。推测 vsp10 可能是通过与线粒体上的 PHB2 互作来发挥功能的。线粒体是真核细胞中最基本的细胞器,它在线粒体凋亡途径中发挥着重要的作用。除了对线粒体动力学、形态学、电子传递链(electron transport chain, ETC)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的影响,线粒体 PHB 复合物还与可以与抗凋亡蛋白 Hax-1 相互作用。造血细胞特异性蛋白相关蛋白 X-1(hematopoietic cell-specific protein-associated protein X-1, Hax-1)是一种核质穿梭蛋白,在上游的凋亡级联中发挥作用并使下游的 caspase 激活。在线粒体中,Hax-1 整合于线粒体外膜,定位于膜间隙。由于 Hax-1 可以被 Omi/HtrA2 蛋白酶水解,因此怀疑它受到 PHB 复合物的保护^[45]。在 Hela 细胞线粒体中,PHB2 可直接与 Hax-1 结合,敲除 PHB2 会降低 Hax-1 的表达,并诱导 caspase 依赖性的细胞凋亡^[46]。

本研究还发现干扰 PHB2 的表达,使 vsp10 对病毒复制增殖的抑制和细胞凋亡的促进作用同时受到了削弱,因此 vsp10 可能是通过与 PHB2 互作来发挥功能的。通过以上结果,我们猜测 vsp10 可能是通过竞争性结合 PHB2,影响了其他抗凋亡蛋白与 PHB2 的互作,从而促进了凋亡的发生。但是关于 vsp10 通过凋亡延缓病毒增殖复制的具体机制还需进一步探讨。

5 结论

vsp10 可以延缓 BmCPV 病毒的复制增值,并促进凋亡的发生,其中的机制可

能是通过与凋亡相关蛋白 PHB2 的互作实现的。

参考文献

- [1] Danthi P. Viruses and the Diversity of Cell Death [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 533-553.
- [2] Teodoro J G, Branton P E. Regulation of apoptosis by viral gene products [J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 1739-1746.
- [3] Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, et al. Viral control of mitochondrial apoptosis [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(5): e1000018.
- [4] Everett H, Mcfadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection [J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7(4): 160-165.
- [5] Shen Y, Shenk T E. Viruses and apoptosis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5(1): 105-111.
- [6] Roulston A, Marcellus R C, Branton P E. Viruses and apoptosis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 577-628.
- [7] Galluzzi I, Vitale I, Abrams J M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 107-120.
- [8] Ichim G, Tait S W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 539-548.
- [9] Pietro R D, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L [J]. *J Cell Physiol*, 2004, 201(3): 331-340.
- [10] Chipuk J E, Bouchier-Hayes L, Green D R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1396-1402.
- [11] Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
- [12] Dewson G, Kratina T, Sim H W, et al. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(3): 369-380.
- [13] George N M, Evans J J, Luo X. A three-helix homo-oligomerization domain

- containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(15): 1937-1948.
- [14] Papoff G, Hausler P, Eramo A, et al. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(53): 38241-38250.
- [15] Siegel R M, Frederiksen J K, Zacharias D A, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations [J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2354-2357.
- [16] Martin-Villalba A, Llorens-Bobadilla E, Wollny D. CD95 in cancer: tool or target? [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(6): 329-335.
- [17] Peter M E, Hadji A, Murmann A E, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 549-559.
- [18] Janssen H L, Higuchi H, Abdulkarim A, et al. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(3): 414-420.
- [19] Clarke P, Meintzer S M, Gibson S, et al. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL [J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 8135-8139.
- [20] Liu W, Lin Y T, Yan X L, et al. Hepatitis B virus core protein inhibits Fas-mediated apoptosis of hepatoma cells via regulation of mFas/FasL and sFas expression [J]. *FASEB J*, 2015, 29(3): 1113-1123.
- [21] Chen Z, Zhu Y, Ren Y, et al. Hepatitis C virus protects human B lymphocytes from Fas-mediated apoptosis via E2-CD81 engagement [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18933.
- [22] Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(4): 476-488.
- [23] Zhou T B, Qin Y H. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2013, 33(1): 28-36.
- [24] Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 21): 3823-3830.

- [25] 陈菲. BmCPV S5,S10 dsRNA 片段编码的 sORF 功能研究 [D]. 苏州大学, 2017.
- [26] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.
- [27] Kroemer G, Petit P, Zamzami N, et al. The biochemistry of programmed cell death [J]. *FASEB J*, 1995, 9(13): 1277-1287.
- [28] Pilder S, Logan J, Shenk T. Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA [J]. *J Virol*, 1984, 52(2): 664-671.
- [29] Clem R J, Fechheimer M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells [J]. *Science*, 1991, 254(5036): 1388-1390.
- [30] Clem R J, Miller L K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus [J]. *J Virol*, 1993, 67(7): 3730-3738.
- [31] Koyama A H, Irie H, Fukumori T, et al. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection [J]. *J Med Invest*, 1998, 45(1-4): 37-45.
- [32] Sanchez-Quiles V, Santamaria E, Segura V, et al. Prohibitin deficiency blocks proliferation and induces apoptosis in human hepatoma cells: molecular mechanisms and functional implications [J]. *Proteomics*, 2010, 10(8): 1609-1620.
- [33] Baris O R, Klose A, Kloepper J E, et al. The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(9): 1459-1468.
- [34] Park S E, Xu J, Frolova A, et al. Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(5): 1989-1999.
- [35] Gregory-Bass R C, Olatinwo M, Xu W, et al. Prohibitin silencing reverses stabilization of mitochondrial integrity and chemoresistance in ovarian cancer cells by increasing their sensitivity to apoptosis [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(9): 1923-1930.
- [36] Wu Q, Wu S. Lipid rafts association and anti-apoptotic function of prohibitin in ultraviolet B light-irradiated HaCaT keratinocytes [J]. *Exp Dermatol*, 2012,

- 21(8): 640-642.
- [37] Zhong N, Cui Y, Zhou X, et al. Identification of prohibitin 1 as a potential prognostic biomarker in human pancreatic carcinoma using modified aqueous two-phase partition system combined with 2D-MALDI-TOF-TOF-MS/MS [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 1221-1231.
- [38] Liu Y, He P, Zhang M, et al. Lentiviral vector-mediated RNA interference targeted against prohibitin inhibits apoptosis of the retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line NB4-R1 [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1288-1292.
- [39] Zhang Y, Chen Y, Qu C, et al. siRNA targeting prohibitins inhibits proliferation and promotes apoptosis of gastric carcinoma cell line SGC7901 in vitro and in vivo [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2014, 60(1): 26-32.
- [40] Zhang L, Ji Q, Ni Z H, et al. Prohibitin induces apoptosis in BGC823 gastric cancer cells through the mitochondrial pathway [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3803-3807.
- [41] Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil C G, et al. Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential [J]. *Chem Biol*, 2013, 20(3): 316-331.
- [42] Sato S, Murata A, Orihara T, et al. Marine natural product aurilide activates the OPA1-mediated apoptosis by binding to prohibitin [J]. *Chem Biol*, 2011, 18(1): 131-139.
- [43] Kowno M, Watanabe-Susaki K, Ishimine H, et al. Prohibitin 2 regulates the proliferation and lineage-specific differentiation of mouse embryonic stem cells in mitochondria [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e81552.
- [44] Guan X, Liu Z, Wang L, et al. Identification of prohibitin and prohibiton as novel factors binding to the p53 induced gene 3 (PIG3) promoter (TGYCC)(15) motif [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(4): 1239-1244.
- [45] Cilenti L, Soundarapandian M M, Kyriazis G A, et al. Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 50295-50301.
- [46] Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, et al. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36401-36410.

结 论

1 已取得的结论

- (1) vsp10 在 BmCPV 感染的家蚕中肠中真实存在, 并定位在细胞质。
- (2) vsp10 来源于 BmCPV S10 线性 RNA 转录本
- (3) vsp10 可以延缓病毒的增殖
- (4) vsp10 可以促进细胞的凋亡

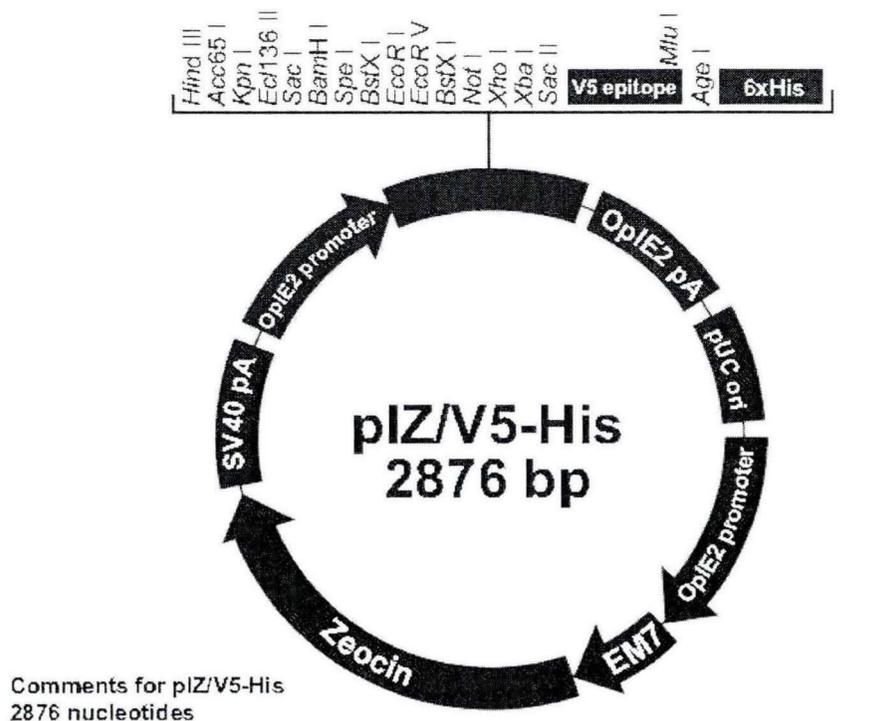
2 有待进一步的研究

- (1) vsp10 促进凋亡的具体途径
- (2) vsp10 其他功能的研究

附录一 缩略词表

缩写	英文	中文
BmCPV	<i>B. mori</i> cypovirus	家蚕质型多角体病毒
BL21	<i>Escherichia coli</i> . BL21	大肠杆菌 BL21
sORF	small open reading frame	小开放阅读框
PCD	programmed cell death	细胞程序性死亡
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization	线粒体外膜通透性
PHB2	Mitochondrial prohibitin complex protein 2	线粒体抑制素复合物蛋白 2
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2
SEPs	sORF encoded peptides	小开放阅读框编码的肽
lncRNAs	long noncoding RNAs	长链非编码 RNA
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
DISC	death-inducing signal complex	死亡诱导信号复合物
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death	细胞死亡调解子
DGE	digital gene expression profiling	数字基因表达谱
RIBO-seq	ribosome profiling	核糖体图谱
RPF	ribosome protected fragment	核糖体保护片段
CPC	coding potential calculator	转录本蛋白编码潜能预测工具
IRES	Internal ribosome entry site	内部核糖体进入位点
HPV	human papillomaviruses	人乳头状瘤病毒
HBV	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCV	hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀
Co-IP	Co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
BID	BH3 interacting domain death agonist	BH3 结构域凋亡诱导蛋白
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer	Bcl-2 同源拮抗剂
BAX	BCL2 associated X protein	Bcl-2 相关蛋白 X

3. pIZT-CS10-sORF-null 质粒



491 CTTATCGCGC CTATAAATAC AGCCCGCAAC GATCTGCTAA ACACAGTTGA ACAGCATCTG TTCGAATTTA
 TATA Box OpiE2 Forward priming site Start of transcription

561 AAGCTT GGT ACC GAG CTC GGA TCC ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT
 Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala Asp
 Aco65 I Kpn I Ecl136 II Sac I Spe I EcoR I EcoR V

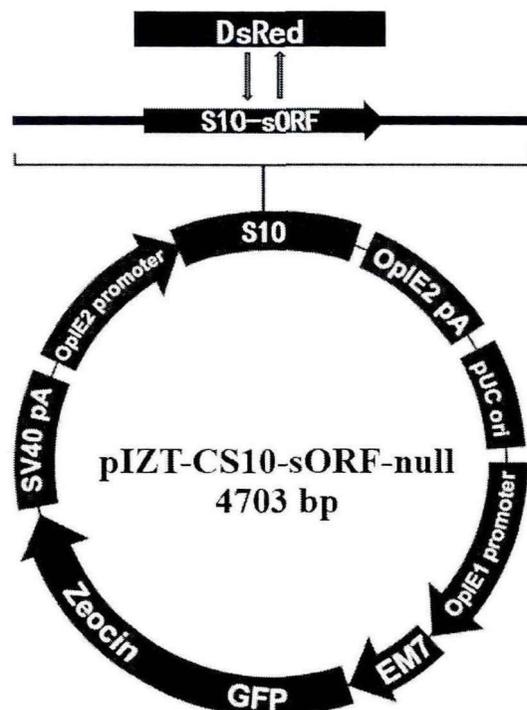
615 ATC CAG CAC AGT GGC GGC CGC TCG AGT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA GGT AAG
 Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gly Lys
 Not I Xba I Dra II Sac II

669 CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC
 Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His
 V5 epitope 6xHis tag

723 CAT CAC CAT TGA GTTTAT CTGACTAAAT CTTAGTTTGT ATTGICATGT TTTAATACAA TATGTTATGT
 His His His *** OpiE2 Reverse priming site

791 TTAAATATGT TTTTAATAAA TTTTATAAAA TAATTTCAAC TTTTATTGTA ACAACATTGT CCATTACAC
 OpiE2 polyadenylation signal
 3' untranslated region of OpiE2

861 ACTCCTTTCA AGCGCGTGGG ATCGATGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA



质粒序列:

黄色部分为 BmCPV S10 片段序列, 蓝色部分为 DesRed 序列。

```

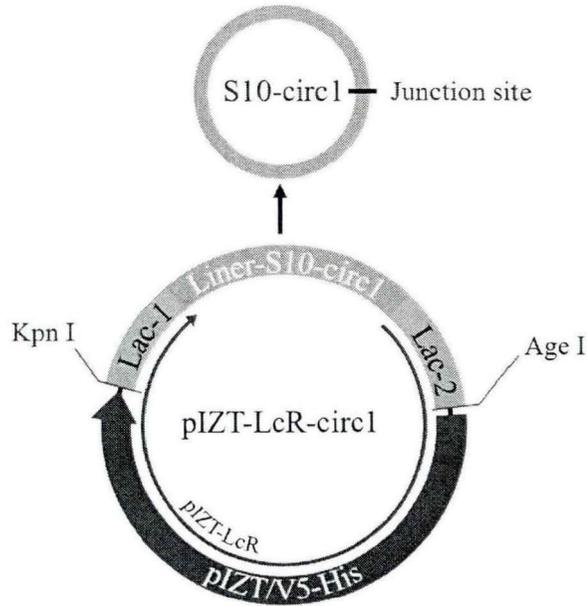
GGATCATGATGATAACAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCT
GTTGAACTGTGTTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATACTCGGTGGCCTC
CCCACCACCAACTTTTTTGCACGTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCC
CATACATAGTACAACTCTACGTTTCGTAGACTATTTTACATAAATAGTCTACA
CCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACCACACATTGAACCTTTTTGCAGTGCA
AAAAAGTACGTGTCGGCAGTCACGTAGGCCGGCCTTATCGGGTCGCGTCCTG
TCACGTACGAATCACATTATCGGACCGGACGAGTGTGTCTTATCGTGACAGG
ACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCAGCAGCCGGACGCAACTCCTTATCGGAA
CAGGACGCGCCTCCATATCAGCCGCGCGTTATCTCATGCGCGTGACCGGACA
CGAGGCGCCCGTCCCGCTTATCGCGCCTATAAATACAGCCCAGCAACGATCTGG
TAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTTGAATTTAAAGCTTGGTACCAGTAAAA
GTCAGTATCTTACCGGCATAATACGTAAAAGATCATGGCAGACGTAGCAGGA
ACAAGTAACCGAGACTTTCGCGGACGCGAACAAGACTATTCAACAGCGAA
CAATACAATAACAACAGCCTAAACGGAGAAGTGAGCGTGTGGGTATACG
CATACTACTCAGATGGGTGAGTGTGCTCGTAATCAACAAGAACTCGCAGTACAA
AGTTGGCGTTTTAGAGACATTCAAGACACTTAAGGAATATCGCGAGGGACAA
CACAACGACACTTACGATGAATACGAGGTGAACCAAGGGATCTATTATCCTAA
TGGCGGTGACGCTCGTAAATACCATTGCAATGCTAAGCCACGCGCGATCCAG
ATCGTCTTCAGTCCTAGTGTGAATGGTGGCGCTCCTCCAAGAACGTCATCAAG

```

GAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCACCGTGAACGGCCACGAG
TTCGAGATCGAGGGGCGAGGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGGCCACAACACC
GTGAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATC
CTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCG
ACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCG
CGTGATGAAC TTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTC
CCTGCAGGACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAAGTTCATCGGCGTGAAC TTC
CCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCC
ACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAG
GCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTC AAGTCCATCT
ACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAA
GCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACGA
GCGCACCGAGGGGCCGCCACCACCTGTTCTGTAGCAGTAAGTGGTGTACACA
AGAACCCATCGTCATACAATGTTGGATCAGCACACAACGTAATGGACGTCTT
CCAATCATGTGACCTGGCTCTTAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCTGAAC TTC
AATTGATCAATCACTACGTTTCACCGAATGCTTACCCATATCTCGATATTAACA
ATCACAGTTATGGAGTAGCTCTGAGTAACCGTCAGTGATTGCTCGTGTAAC TTC
GGATACCGGAAAACATGACGCTGTGATGAATTACGCGCCCGGTCTTCGGATA
GGGTGACGCTCTACCTGCGCCAACAGGATATCGAAAAATTATAACCGGATCCC
GATGCTGACGGGATGCGGTACTGACTGACCGTTAGCCCCGCGGTT CGAAGGT
AAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCAT
CACCATCACCATTGAGTTTATCTGACTAAATCTTAGTTTGTATTGTCATGTTTTA
ATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTTAATAAATTTTATAAAATAATTTCAAC
TTTTATTGTAACAACATTGTCCATTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGATC
GATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
ACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACC
CTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCA
AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACAGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
TCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCA
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTT
TTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTG

GTCATGCGAAACACGCACGGCGCGGCACGCAGCTTAGCACAAACGCGTCCG
TTGCACGCGCCCACCGCTAACCGCAGGCCAATCGGTTCGGCCGGCCTCATATC
CGCTCACCAGCCGCGTCTTATCGGGCGCGGCTTCCGCGCCCATTTTGAATAAA
TAAACGATAACGCCGTTGGTGGCGTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTATC
TTGTTTCGCCATCCGGTTGGTATAAATAGACGTTTCATGTTGGTTTTTGTTCAGT
TGCAAGTTGGCTGCGGGCGCGGCAGCACCTTTGCCGGGATCTGCCGGGCTGC
AGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGA
CAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCGGTAGAAAAATGGCTAGCAAAGGAGA
AGAAGTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTA
ATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGG
AAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGC
CAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCCCCTTATCCGG
ATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTA
CAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGTGCTG
AAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATT
GATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACATA
ACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGC
TAACTTCAAATTCGTCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGAC
CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAA
CCATTACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGT
GACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAGTCTGCTGCTGGGATTACACATGGCAT
GGATGCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCCGC
GGAGCGGTTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCAGGACTTCGTG
GAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGC
GCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTG
CGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTTCGGAGGTCGTGTCCACGAAC
TTCCGGGACGCCTCCGGGCCGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGG
GGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCCTTCGTG
GCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCGCCGGTCCGACGCG
GCCCGACGGGTCCGAGGGGGGTCGACCTCGAAACTTGTATTATGACGTTAT
AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCAAATAAAGCATTTTT
TTCATGCAATCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT
CT

4. pIZT-LcR- circ1 表达载体



质粒序列:

黄色部分为 S10-circ1 片段序列。

```

GGATCATGATGATAAACAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCT
GTTGAACTGTGTTTTTCATGTTTGCCAACAAGCACCTTTATACTCGGTGGCCTC
CCCACCACCAACTTTTTTGCCTGCAAAAAAACACGCTTTTGCACGCGGGCC
CATACATAGTACAACTCTACGTTTCGTAGACTATTTTACATAAATAGTCTACA
CCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACCACACATTGAACCTTTTTGCAGTGCA
AAAAAGTACGTGTCGGCAGTCACGTAGGCCGGCCTTATCGGGTCGCGTCCTG
TCACGTACGAATCACATTATCGGACCGGACGAGTGTTGTCTTATCGTGACAGG
ACGCCAGCTTCCTGTGTTGCTAACCGCAGCCGGACGCAACTCCTTATCGGAA
CAGGACGCGCCTCCATATCAGCCGCGCGTTATCTCATGCGCGTGACCCGGACA
CGAGGCGCCCGTCCCGCTTATCGCGCCTATAAATACAGCCCGCAACGATCTGG
TAAACACAGTTGAACAGCATCTGTTTCAATTTAAAGCTTGGTACCAAACAAG
AGAGAATGCTATAGTCGTATAGTATAGTTTCCCGACTATCTGATACCCATTA
ATCTAGGGGGAATGCGAACCCTAAATTTTATCAGTTTTCTCGGATATCGATAG
ATATTGGGGAATAAATTTAAATAAATAAATTTTGGGCGGGTTAGGGCGTGGC
AAAAAGTTTTTTGGCAAATCGCTAGAAATTTACAAGACTTATAAAATTATGAA
AAAATACAACAAAATTTTAAACACGTGGGCGTGACAGTTTTGGACGGTTTTA
GGGCGTTAGAGTAGGCGAGGACAGGGTTACATCGACTAGGCTTTGATCCTGA
TCAAGAATATATACTTTTATACCGCTTCCTTCTACATGTTACCTATTTTTCAAC
GAATCTAGTATACCTTTTTACTGTACGATTTATGGGTATAATAATAAGCTAAATC

```

GAGACTAAGTTTTATTGTTATATATATTTTTTTTTTATTTTATGCAGGGTGACGCTC
GTAAATACCATTTCGAATGCTAAGCCACGCGCATCCAGATCGTCTTCAGTCCT
AGTGTGAATGTACGCACCATCAAAATGGCTAAAGGTAACACTCTCTGTAC
CTGACGAGTATCTACAACGGTCTCACCCATGGGAAGCAACCGGAATTAAGTA
CCGCAAGATTAAGAGAGACGGAGAAATCGTTGGTTACAGTCATTACTTTGAA
CTACCCCATGAATATAGCTCCATTTTCGCTAGCAGTAAGTGGTGTACACAAGAA
CCCATCGTCATACAATGTTGGATCAGCACACAACGTAATGGACGTCTTCCAAT
CATGTGACCTGGCTCTTAGATTCTGCAACCGCTACTGGGCTGAACTTGAATTG
ATCAATCACTACGTTTCACCGAATGCTTACCCATATCTCGATATTAACAATCAC
AGTTATGGAGTAGCTCTGAGTAACCGTCAGTGATTGCTCGTGTAACCTGGATA
CCGAAAACATGACGCTGTGATGAATTACGCGCCCGGTCTTCGGATAGGTAA
GTATTCAAAATTCCAAAATTTTTACTAGAAATATTCGATTTTTTAATAGGCAG
TTTCTATACTATTGTATACTATTGTAGATTCGTTGAAAAGTATGTAACAGGAAG
AATAAAGCATTTCGGACCATGTAAAGTATATATATTCTTAATAAGGATCAATAG
CCGAGTCGATCTCGCCATGTCCGTCTGTCTTATTATTTTATTACCGCCGAGACA
TCAGGAACTATAAAAGCTAGAAGGATGAGTTTTAGCATACAGATTCTAGAGA
CAAGGACGCAGAGCAAGTTTGTGGATCCATGCTGCCACGCTTTAACTTTCTC
AAATTGCCAAAACACTGCCATGCCACATTTTTGAACTATTTTCGAAATTTTTTC
ATAATTGTATTACTCGTGTAATTTCCATCAATTTGCCAAAAAACTTTTTGTCA
CGCGTTAACGCCCTAAAGCCGCCAATTTGGTCACGCCCACACTATTGAACAA
TTATCAAATTTTTTCTCATTTTATTCCCAATATCTATCGATATCCCCGATTATGA
AATTATTAATTTTCGCGTTTCGCATTACACTAGCTGAGTAACGAGTATCTGATA
GTTGGGGAAATCGACTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTATCTGA
CTAAATCTTAGTTTGTATTGTCATGTTTTAATACAATATGTTATGTTTAAATATGT
TTTTAATAAATTTTATAAAATAATTTCAACTTTTTATTGTAACAACATTGTCCATT
TACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGATCGATGCTCACTCAAAGGCGGTAATA
CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCG
CCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC
CCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA

AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGG
AACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCGAAACACGCACGGCGCG
CGCACGCAGCTTAGCACAAACGCGTCGTTGCACGCGCCCACCGCTAACCGC
AGGCCAATCGGTCGGCCGGCCTCATATCCGCTCACCAGCCGCGTCCTATCGG
GCGCGGCTTCCGCGCCCATTTTGAATAAATAAACGATAACGCCGTTGGTGGC
GTGAGGCATGTAAAAGGTTACATCATTATCTTGTTTCGCCATCCGGTTGGTATAA
ATAGACGTTTCATGTTGGTTTTTGTTCAGTTGCAAGTTGGCTGCGGGCGCGCG
AGCACCTTTGCCGGGATCTGCCGGGCTGCAGCACGTGTTGACAATTAATCAT
CGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATG
GCGGTAGAAAAAATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTC
CCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAG
TGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTT
GCACTACTGGAAAACACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCT
TATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTT
TTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAA
AGATGACGGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAAGTCAAGTTTGAAGGTGATAC
CCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACA
TTCTCGGACACAAACTCGAGTACAATACTCACACAATGTATACATCACG
GCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGTCACAAC
ATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAAT
TGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTGACACAATCTG
CCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTT
TGTAAGTCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGCCAAGTTGACCAGTGCC
GTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGCGAGTTCTGGACC
GACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTG
GTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTG
CCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTAC
GCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGGCCG
GCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGC
GACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCG
ACGCCGACCAACACCGCCGTCCGACGCGGCCCGACGGGTCCGAGGGGGGT
CGACCTCGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
CATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTT
GTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT

附录三 常用仪器

仪器名称	型号	生产公司
PCR 仪	TP600	TaKaRa 公司
电热鼓风干燥箱	CS101-3EB	重庆四达实验仪器有限公司
1 / 10000 分析天平	BS124S	北京赛多利斯仪器系统有限公司
pH 计	Delta320	梅特勒-托利多仪器有限公司
金属浴	CHB-10	杭州大和热磁电子有限公司
台式冷冻离心机	Pico17	Thermo 公司
台式空气恒温振荡器	QYC200	上海福玛实验设备有限公司
垂直电泳槽	Mini Protean 3 Cell	BioRad 公司
水平电泳槽	HE-90	天能公司
生化培养箱	SHP-250	上海精宏实验设备有限公司
凝胶成像系统	GelDoc XR System	BioRad 公司
多功能分析成像仪	ChemiScope6300	Clinx Science Instruments 公司
紫外分光光度计	Nano Drop2000	Thermo Scientific 公司
电泳电源	POWER / PAC 1000	BioRad 公司
超低温冰箱	705	Forma 公司
优普超纯水机	UPT-III-5T	成都超纯科技有限公司
电子显微镜	HT7700	HITACHI 公司
荧光倒置显微镜	Nikon TE2000-U	Nikon 公司
荧光正置显微镜	Leica dm2000 led	莱卡公司
共聚焦荧光显微镜	LSM-800	Carl Zeiss AG 公司
高压蒸汽灭菌锅	LDZX-50KB	申安医疗器械厂
电热恒温水浴锅	H.H.S	上海医疗器械五厂
加热搅拌器	78-1	荣华仪器制造有限公司
核酸电泳仪	DY-A	西巴斯生物技术有限公司
脱色摇床	TS-100	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
超声波清洗器	KQ-500DB 型	昆山市超声仪器有限公司
混合型碾磨仪	SKSI 型	上海必横生物科技有限公司

致 谢

至此，谨向三年来所有帮助和关心过我的师友们表示衷心的感谢！

首先，我想要感谢我的导师曹广力老师，曹老师深厚的专业底蕴及严谨的治学态度给我的实验提供了很大的帮助，同时，曹老师严谨的科研态度及无私的奉献精神，也在我的科研生活中树立了良好的榜样形象，作为曹老师的学生，我深感荣幸。至此，我要向我的导师报以最诚挚的感谢与敬意！

同时，我要感谢贡成良老师和薛仁宇老师，这两位老师在我的科研进展中，给予了我许多专业方面的建议，给我带来了许多的益处，此外在学习生活中，给予我的帮助与关怀，也让我很是感激。我还要感谢胡老师对我的帮助与指导。正是由于各位老师的无私奉献与支持，我的科研任务才能顺利完成，让我在这三年里，不管是专业知识还是实验技能方面，都有了显著的提高。

其次我要感谢实验室的各位师兄、师姐、师弟和师妹们对我三年来的帮助。感谢梁子师姐在我的课题遇到问题时对我的帮助。感谢朱敏师姐的鞭策！感谢云山师兄的鼓励！感谢毒舌评论专家坤哥，不会做实验的lsp不是好诗人。感谢处女座黄金圣斗士瑶总，你快乐，全实验室快乐！感谢风一样的超哥，疾风亦有归途，残血不要去送！此外还要感谢退堂鼓表演艺术家潘师傅，第七宇宙最帅的沈师兄，宝可梦烹饪大师童师妹，三只手人柱力亚昕师弟，勤劳的孙师妹，地狱咆哮邱师妹（结果全靠吼，加样全靠抖），高级生物培育工程师李继杰师弟，李楠师弟和郭仕程师弟，是你们使我的生活变得更加绚烂多姿，充满乐趣。

我还需要特别感谢我的父母，他们是我坚强的后盾，是我避风的港湾，他们的生养之恩我无以为报，但对我无私的爱我铭刻在心，激励我不断前行。

最后，在此向参与论文评阅和答辩的全体专家致以最诚挚的谢意！

曹满满

2021年5月于独墅湖

