



## 谷氨酰胺对斜带石斑鱼GF-1细胞中C-Myc蛋白的表达与神经坏死病毒复制的影响

沈海洋<sup>1,2</sup>, 卢志杰<sup>1,2</sup>, 秦真东<sup>2</sup>, 赵丽娟<sup>2</sup>, 李亚男<sup>2</sup>, 刘春<sup>2</sup>,  
杨光<sup>1,2</sup>, 叶成凯<sup>1,2</sup>, 潘淦<sup>1\*</sup>, 林鑫<sup>2\*</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东广州 510631;  
2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,  
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225)

**摘要:** 为探讨C-Myc表达、谷氨酰胺代谢和神经坏死病毒复制三者之间的关系, 本研究首先克隆了斜带石斑鱼鳍条细胞(GF-1)中的C-Myc基因(GF-1-C-Myc), 结果显示GF-1-C-Myc基因cDNA全长814 bp, 开放阅读框(ORF)为285 bp, 编码95个氨基酸(aa), 有亮氨酸拉链结构域与螺旋-环-螺旋(HLH)结构域。表达和纯化了GF-1-C-Myc蛋白, 并制备其多克隆抗体。采用实时定量PCR技术(qRT-PCR)与免疫印迹法(WB)检测了GF-1-C-Myc基因的表达和神经坏死病毒的复制。结果显示, 缺乏谷氨酰胺会同时抑制GF-1-C-Myc基因的表达和神经坏死病毒(NNV)的复制, 添加谷氨酰胺可同时促进GF-1-C-Myc的表达和NNV的复制; 此外, NNV感染可上调GF-1-C-Myc基因的表达, 并显著消耗GF-1细胞培养液中的谷氨酰胺。研究表明, GF-1-C-Myc基因可调控宿主谷氨酰胺代谢, 从而有利于神经坏死病毒的复制。本结果为防控NNV的感染提供了参考。

**关键词:** 斜带石斑鱼; C-Myc基因; GF-1细胞; 神经坏死病毒; 感染; 谷氨酰胺

**中图分类号:**

**文献标志码:** A

神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)主要感染鱼类脑部和视网膜细胞, 导致其空泡性坏死, 因此其导致的鱼类疾病称为病毒性脑病和视网膜病(viral encephalopathy and retinopathy, VER), 也称为病毒性神经坏死症(viral nervous necrosis, VNN), 是一种世界范围内流行的严重鱼类病毒病<sup>[1]</sup>。据报道, VNN已经危害了30多种重要经济鱼类, 如红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)<sup>[2]</sup>、拟鲈(*Pseudocaranx dentex*)<sup>[3]</sup>、条斑星鲈(*Veraspermoseri*)<sup>[4]</sup>、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)<sup>[5-13]</sup>、孔雀花鲈(*Poicelia reticulata*)<sup>[14]</sup>等鱼苗和部分成

鱼。该病毒可感染海水、淡水鱼类, 给经济鱼类的养殖产业造成了严重损失<sup>[15-16]</sup>。

C-Myc基因是较早发现的一类原癌基因, 具有促细胞分裂并导致细胞无限增殖的特性, 与多种肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[17-21]</sup>。当C-Myc基因被转录激活时, C-Myc表达量上升, 促使细胞发生恶变, 最终导致细胞形态改变、凋亡直到肿瘤的产生<sup>[22-24]</sup>。在生物受到外界细菌或者病毒侵染时, C-Myc基因则会产生表达差异, 从而调控细胞的凋亡和病原的感染。比如有研究表明C-Myc通过和衣壳蛋白互作, 调控腺病毒

收稿日期: 2019-09-17 修回日期: 2019-10-25

资助项目: 国家自然科学基金(31872606); 广东省海洋与渔业局基金(GDME-2018C006, D21822202); 中国—东盟海上合作基金(CAMC-2018F); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项(2019KJ141)

通信作者: 潘淦, E-mail: pg2829@sina.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

的感染, *C-Myc*可通过调控细胞的谷氨酰胺代谢, 从而促进腺病毒的复制<sup>[25-28]</sup>。

斜带石斑鱼(*E. coioides*)属于鲈形目(Perciformes), 石斑鱼科(Epinephelus), 是一种广盐性鱼类。主要分布于北太平洋海域, 我国南海也有分布。其肉质鲜美、营养丰富、生长快、市场价格高, 受广大养殖者的青睐, 已经成为我国主要海水鱼类养殖品种之一<sup>[29-30]</sup>。但是NNV感染可以导致斜带石斑鱼苗种的重大损失, 是制约其健康养殖的重要因素, 至今还缺乏高效防控措施, 因此研究病毒感染和宿主的相互作用, 是防控疾病的重要基础<sup>[31-32]</sup>。

谷氨酰胺(glutamine, Gln)是生物体内丰富的游离氨基酸, 其在谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)的催化下参与化学反应, 产生ATP, 为生物提供能量, 同时还能通过三羧酸循环, 合成其他物质, 提供中间产物<sup>[33]</sup>; 另一方面, 病毒必须依赖宿主细胞来进行自我复制。很多病毒都可以诱导宿主细胞谷氨酰胺代谢途径的改变, 从而能高效自我复制<sup>[34-35]</sup>。而多个研究表明, 缺乏谷氨酰胺会显著抑制NNV的复制, *C-Myc*基因在细胞的谷氨酰胺代谢调控中起到关键作用<sup>[36-38]</sup>, 但是其调控机理还没有被阐明。

目前关于斜带石斑鱼*C-Myc*基因的研究尚未有报道。本研究首次克隆了斜带石斑鱼鳍条细胞GF-1中的*C-Myc*基因, 并研究了谷氨酰胺对*C-Myc*基因在神经坏死病毒感染中的调控作用。研究结果将为防控神经坏死病毒提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用的斜带石斑鱼鳍条细胞系(grouper fin cell line, GF-1 cell)购自中国台湾生物资源研究及保存中心。在6孔板中用含有5% FBS的L-15培养基培养GF-1细胞, 培养温度为28 °C。待细胞密度达到80%~90%时, 用PBS润洗细胞3次, 实验组细胞使用病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)1.0的NNV进行感染, 对照组细胞加入等量PBS。首先置于28 °C培养箱中孵育2 h, 随后去掉孵育液, 用PBS润洗2次, 再加入含2% FBS的L-15培养基, 置于28 °C培养箱中培养, 分别收集感染后0、12、24、36和48 h的样品, 每组样品用3孔细胞作为重复。

<http://www.sxuebao.cn>

### 1.2 斜带石斑鱼GF-1细胞*C-Myc*基因克隆、生物信息学分析和多克隆抗体的制备

斜带石斑鱼GF-1细胞*C-Myc*基因克隆和生物信息学分析 总RNA的提取按照RNAiso Plus试剂说明书进行提取, 提取GF-1的总RNA用Nann0-200分光光度计(ALLSHENG, 杭州奥盛仪器有限公司)测定其纯度和浓度; 然后使用HIScript® Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme)合成cDNA, 在-20 °C保存备用。根据Clone Manager软件所预测的斜带石斑鱼*C-Myc*基因全长序列开放读码框(ORF)设计所需引物(表1)。

表1 实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers and sequences

引物 primer	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	应用 application
<i>C-Myc</i> -F1	GACTACGACTCCCTGCAACC	克隆 <i>C-Myc</i> 基因
<i>C-Myc</i> -R1	CTTCCAGATGTCTTCACTCGGT	
<i>C-Myc</i> -F2	CCCTCGAGGGCGGAGGAGGAGG AGGTAGCCAC	
<i>C-Myc</i> -R2	CGGGATCCCGAGCTGTGACAGTC TCTGCTT	添加酶切位点与 保护碱基
q <i>C-Myc</i> -F1	ACCGATGAAAAGGTGGCCAT	qRT-PCR <i>C-Myc</i> 基因表达
q <i>C-Myc</i> -R1	TGCCGATCATCTGGTGGAT	
$\beta$ - <i>actin</i> -F1	GACATCAAGGAGAAGCTGTG	qRT-PCR $\beta$ - <i>actin</i> 基因表达
$\beta$ - <i>actin</i> -R1	TGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT	
CP-F	TTGTGGCTTCCTGCTGATC	qRT-PCR衣壳蛋白 基因表达
CP-R	ACTGAGGTCGGACTGTTCTGC	

PCR反应体系20  $\mu$ L: 上下游引物各1  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 模板cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq Mix 10  $\mu$ L。反应程序: 95 °C预变性5 min; 随后95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 之后72 °C延伸10 min, 4 °C保存。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)回收条带, 并连接于pMD™18-T Vector(TaKaRa公司, 大连), 转化到*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 中, 涂布于含氨苄(50  $\mu$ g/mL)LB固体培养基平板, 静置4 min后倒扣放置于37 °C恒温培养箱, 培养12~18 h。第2天挑取单菌落于5 mL含氨苄LB液体培养基扩大培养, 然后进行菌液PCR检测, 使用质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)对阳性菌液进行质粒提取后, 送公司测序; 将测序结果序

列与斜带石斑鱼C-Myc基因序列进行比对。

使用下列软件和工具对斜带石斑鱼GF-1细胞C-Myc基因进行生物信息学分析: Clone Manager软件对获得的C-Myc基因序列进行分析, 确定其开放读码框(ORF); DNAMAN 6.0软件进行氨基酸序列分析; BLAST工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析; 在线软件(<http://www.expasy.org/>)分析蛋白质的特性; 在线软件(<http://pfam.xfam.org/>)预测蛋白质的结构域; MEGA 7.0软件构建C-Myc基因的NJ系统进化树; 三级结构预测用SWISS-MOEDL软件完成。

斜带石斑鱼GF-1细胞C-Myc基因原核表达与鉴定及多克隆抗体制备 在普通PCR引物基础上添加合适的酶切位点和保护碱基, 重新设计表达蛋白引物, 扩增C-Myc基因的ORF区域, PCR反应条件相同。将琼脂糖凝胶回收的PCR产物进行双酶切后连接到pGEX-6P-1质粒(TaKaRa公司), 构建含有GST-tag标签的融合蛋白表达重组质粒pGEX-6P-1-C-Myc。将阴性pGEX-6P-1质粒和阳性重组质粒分别转化到原核表达载体*E. coli* BL21(DE3)进行原核蛋白表达。使用0.5 mmol/L异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)在37 °C下180 r/min振荡, 培养4~6 h后分别吸出2 mL菌液, 4 °C下12 000 r/min离心2 min, 用100  $\mu$ L PBS重悬沉淀, 加入25  $\mu$ L 5 $\times$ loading buffer混匀, 沸水煮沸15 min, 12 000 r/min离心1 min。待冷却后取等量上清液上样于浓度为10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE胶), 80 V电泳2.5 h后, 用考马斯亮蓝试剂染色1~2 h, 脱色和照胶, 检测融合蛋白的表达。根据以往对蛋白包涵体的纯化与回收方法<sup>[39-42]</sup>, 并分装成1 mL冻存于-80 °C备用。将纯化的pGEX-6P-1载体和C-Myc融合蛋白按照相同的方法进行SDS-PAGE胶电泳, 2.5 h后进行半干式转膜, 随后在室温条件下, 在含有5%脱脂奶粉的Tris Buffered Saline和1% Tween<sup>®</sup>20去污剂(TBST)中封闭1~2 h, 封闭后在TBST中洗涤5 min, 兔子抗GST-tag抗体(1:1 000)稀释于5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中, 4 °C过夜孵育; TBST洗涤3次, 每次5 min; 再用HRP标记的二抗IgG(1:10 000)(北京博奥森生物技术有限公司)稀释于5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中孵育1 h后, TBST洗涤3次, 每次5 min; ECL显色1 min, 使用ChemiScope 6000拍照。

将获得的重组蛋白进行多克隆抗体的制备, 实验动物为新西兰大白兔(购自广东省医学实验动物中心); 制备程序: 将蛋白浓度调整为1 mg/mL, 每次免疫使用250  $\mu$ g抗原蛋白, 进行4次免疫, 总共使用1 mg抗原蛋白。取250  $\mu$ L抗原蛋白溶液, 加入等体积(1:1)佐剂完全乳化再进行免疫。总共进行4次免疫, 每次免疫都对新西兰大白兔进行多点注射。首次免疫, 使用弗氏完全佐剂(Sigma公司, 美国), 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 二次免疫使用弗氏不完全佐剂(Sigma公司, 美国), 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 三次免疫使用弗氏不完全佐剂, 与抗原蛋白充分混匀后注射; 间隔2周, 四次免疫使用弗氏不完全佐剂与抗原蛋白充分混匀后注射; 1周后心脏取血, 室温静置后取上层血清, 分装后放于-80 °C保存。

### 1.3 GF-1细胞C-Myc基因的mRNA与蛋白表达分析

#### GF-1细胞C-Myc基因的mRNA表达分析

将获得的C-Myc蛋白基因序列设计实时荧光定量PCR的上、下游引物, 以 $\beta$ -actin蛋白作为内参, 引物如表1所示。以不同处理的GF-1细胞总RNA为模板, 按照HiScript<sup>®</sup> Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme公司, 南京)说明书去除总GF-1细胞RNA中的基因组DNA, 并反转录合成cDNA, 置于-20 °C冰箱保存。实时荧光定量PCR反应使用AceQ qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix(Vazyme公司, 南京)试剂, 反应于Roche LightCycler 480(Roche, 美国)上进行。其中每种处理样品的目的基因和内参基因分别进行3次重复。反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C 10 s, 58 °C 10 s, 72 °C 10 s, 45个循环。相对表达数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。数据表示方法为平均值 $\pm$ 标准差, 使用GraphPad Prism 7软件中的单因素和多因素方差分析进行统计分析,  $P < 0.05$ 代表差异显著(以“\*\*\*”表示), 使用GraphPad Prism 7软件绘制柱状图。

#### GF-1细胞C-Myc基因的蛋白表达分析

提取不同处理的GF-1细胞总蛋白样于PBS中, 加入5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液后, 于沸水中煮15 min, 并分装保存于-80 °C冰箱。按照斜带石斑鱼C-Myc基因多克隆抗体特异性检测的步骤检验GF-1细胞C-Myc蛋白的表达, 使用 $\beta$ -actin作为内参, 参照上述“斜带石斑鱼GF-1细胞C-Myc基因



原核表达与鉴定及多克隆抗体制备”中的方法进行Western blot(WB),使用ChemiScope 6000(勤翔科学仪器有限公司,上海)对实验结果进行拍照,并使用Clinux ChemiCapture软件分析斜带石斑鱼的*C-Myc*基因蛋白和β-actin蛋白条带的光密度(OD),通过计算灰度值,得出蛋白的相对表达量,再使用GraphPad Prism 7软件绘制柱状图进行蛋白的表达分析。

### 1.4 谷氨酰胺对GF-1细胞*C-Myc*基因与NNV的感染分析

NNV感染对GF-1细胞培养基中谷氨酰胺含量的影响 配制谷氨酰胺含量为1.0 mmol/L的完全培养基(CORNING公司,美国)培养GF-1细胞,分别设为4组:对照组、GF-1组、NNV组与GF-1+NNV组,对照组不加入GF-1细胞培养,同时在培养0、12、24、48 h后用M-100生物传感器分析仪检测(西尔曼科技公司,深圳)各组培养基中谷氨酰胺含量的变化,并用GraphPad Prism 7软件进行柱状图绘图分析。

谷氨酰胺对受到NNV感染的GF-1细胞*C-Myc*基因的影响分析 使用病毒感染复数为1.0的NNV病毒孵育液感染GF-1细胞,并分别在含有谷氨酰胺(1.0 mmol/L)的完全培养基或无谷氨酰胺的培养基中培养。感染细胞在24 h时收集,根据“GF-1细胞*C-Myc*基因的mRNA表达分析”中提取RNA的方法与“GF-1细胞*C-Myc*基因的蛋白表达分析”中提取细胞蛋白的方法进行提取,并用qRT-PCR测定病毒感染数和病毒mRNA相对表达量,再用WB进一步检测验证,用GraphPad Prism 7软件进行绘图分析。

## 2 结果

### 2.1 斜带石斑鱼GF-1细胞*C-Myc*基因cDNA克隆与生物信息学分析

研究克隆的斜带石斑鱼GF-1细胞*C-Myc*基因cDNA全长814 bp, ORF为285 bp, 编码95个氨基酸(aa), 有亮氨酸拉链结构域与螺旋—环—螺旋(HLH)结构域(图1)。

根据*C-Myc*基因cDNA序列设计克隆载体,使用在线软件BLAST工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析,发现克隆的斜带石斑鱼*C-Myc*基因序列与其他多种鱼类的*C-Myc*基因相比较为保守,它们的相似性达到90%。Protparam在线软件预测其相似结构

<http://www.sxuebao.cn>

```

1 ATCGAGGAGGAGGAGGTAGCCACAGCAGGCTCTCAACAGATCAGCAGCAACCGCAAG
1 M G G G G G S H S R V L K Q I S S N R K
61 TGTTTCGAGTCCCGGACGCTGTGACACGGGAGGACTACGCAAGAGACGGACTCATACGCTG
21 C S S P R T S D T E D Y D K R R T H N V
121 CTGGAGCCCGCAGCGGAGGACGAGCTCAAGCTGAGCTTCTTGCCCTCGGGACGAGATC
41 L E R Q R R N E L K L S F F A L R D E I
181 CCAGAGGTGGCCARCAACGAGAGGGCCAGGTGGTGTCTCTGAAGAAGGCTACAGAG
61 P E V A N N E K A A K V V I L K K A T E
241 TGCATCTACAGCATGCAGTCAGACGACAGAGACTCTCAGCTCAAGAAGACAGCTGAGG
81 C I Y S M Q S D E Q R L L T L R E Q L R
301 AGGAAAAGTGAACITTTAAAGCAGAGACTGTACAGCTGACAGCAGCTCTCAGCGCTTAA
101 R K S E L L K Q R L S Q L Q H V S R A *
  
```

图1 斜带石斑鱼GF-1细胞*C-Myc*的ORF核苷酸序列及氨基酸序列

加粗方框ATG和TAA分别代表起始密码子和终止密码子,“\*”代表蛋白翻译结束,箭头代表亮氨酸拉链结构,下划线区域代表*C-Myc*的HLH结构域

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of ORF of *C-Myc* from *E.coioides* GF-1 cells

The bold box ATG and TAA represents the start codon and stop codon, respectively. The “\*” represents the end of protein translation, the arrow represents the leucine zipper structure. The underlined region represents the HLH domain of *C-Myc*

域氨基酸分子量为36.45 ku, 等电点为10.07, 没有跨膜结构和信号肽。使用MEGA 7.0和DNAMAN软件,对斜带石斑鱼和其他4种鱼类的*C-Myc*基因序列进行了比对。结果显示,克隆的斜带石斑鱼*C-Myc*基因序列和其他鲈形目鱼类的相似度比较高(图2)。利用MAGA 7.0软件,采用NJ算法构建斜带石斑鱼和其他鱼类*C-Myc*基因的系统进化树(图3)。另一方面,SWISS-MODEL结果显示克隆的斜带石斑鱼*C-Myc*基因的三维结构由α螺旋以及无规则卷曲相互连接构成,蛋白结构像发夹状,与其他鲈形目鱼类的结构相似,表明

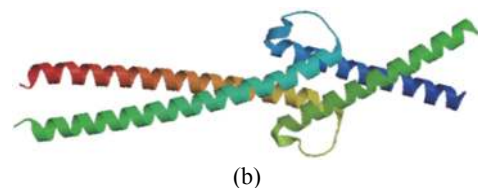
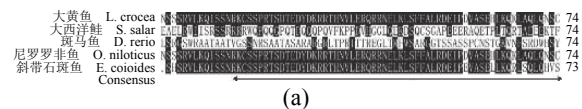


图2 斜带石斑鱼与其他鱼类的*C-Myc*蛋白氨基酸序列比对和预测的三维结构图

(a) 黑色代表相同水平≥90%, 箭头区域表示*C-Myc*的HLH结构域; (b) 预测的GF-1-*C-Myc*蛋白的三维结构图

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of *C-Myc* protein among *E. coioides* and other fish

(a) black denotes the homology level is ≥ 90%, and the arrow represents the *C-Myc* HLH domain; (b) the predicted three-dimensional structure of GF-1-*C-Myc* protein

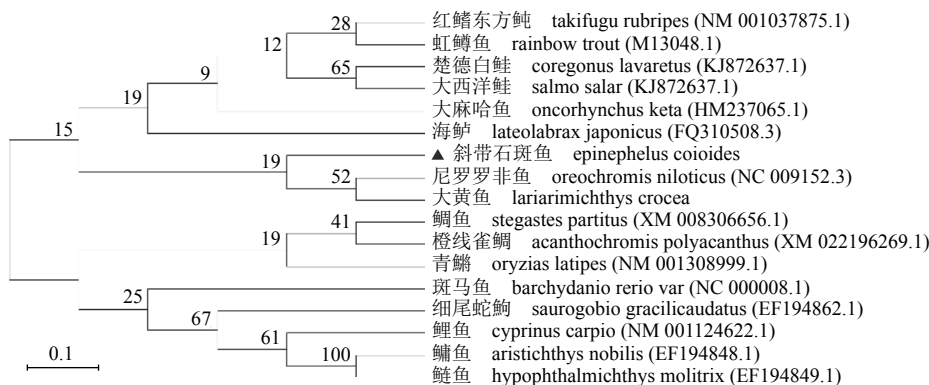


图3 斜带石斑鱼与其他鱼类C-Myc基因的系统进化树

节点处的数字代表置信水平, 黑色三角形标记为斜带石斑鱼C-Myc基因, 括号内为基因的登录号

Fig. 3 Phylogenetic tree of C-Myc gene from *E. coioides* and other fish

The numbers at the branch nodes represent the bootstrap confidence levels. The black triangle is marked as the GF-1-C-Myc gene. The accession number of the gene is in parentheses

其在进化与功能方面有较高的保守性(图2)。

## 2.2 斜带石斑鱼GF-1细胞C-Myc基因原核表达与鉴定及多克隆抗体制备

SDS-PAGE分析结果显示, 重组的C-Myc蛋白主要表达在包涵体中, 因此按照以往的方法进行包涵体蛋白的纯化<sup>[39-42]</sup>, 从而获得重组蛋白。用GST-tag抗体可以检测到重组C-Myc蛋白在36 ku左右处有一条明显的条带, 而且其大小与预测的一致(GST-tag大小为26 ku左右, C-Myc蛋白大小为10.45 ku, 总共36.45 ku), 说明重组蛋白含有GST-tag标签。用C-Myc基因的多克隆抗体进行WB检测GF-1细胞中的C-Myc蛋白, 结果表明可以检测到一条10.45 ku左右清晰的特异蛋白条带, 大小和预测相一致(图4, 图5)。

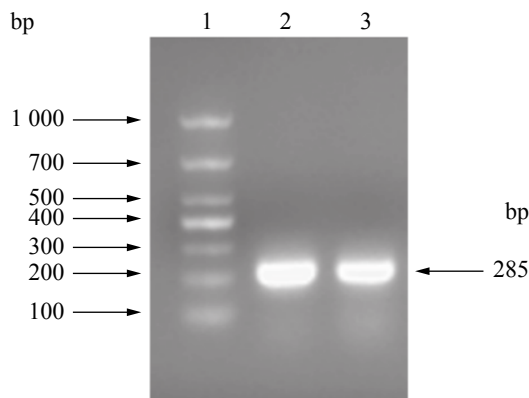


图4 C-Myc基因的克隆电泳图

1. DNA Marker, 2. C-Myc DNA片段, 3. 阳性重组质粒PCR鉴定

Fig. 4 Cloning of C-Myc gene by electrophoresis

1. DNA Marker, 2. DNA fragment of C-Myc, 3. verification of positive recombinant plasmid by PCR

多克隆抗体经ELISA检测后, 效价为5 1200 (图6)。

## 2.3 GF-1细胞C-Myc基因的mRNA与蛋白表达分析

取不同处理的GF-1细胞进行C-Myc基因表达检测。根据实时荧光定量PCR的结果显示, C-Myc基因在不同处理的GF-1细胞中均有表达, 以感染后0 h为对照组作为参照, 设为1, 不同处理的GF-1细胞中C-Myc基因的表达量随着不同处理实验时间在0~48 h内有所增加, 存在显著差异( $P < 0.05$ )。为了进一步验证mRNA水平上的实验结果, 采用WB检测蛋白水平上的表达情况, 结果表明与mRNA水平上的实验结果完全一致(图7)。

## 2.4 谷氨酰胺、C-Myc基因和NNV复制关联分析

通过对照组、GF-1组、NNV组与GF-1+NNV组进行谷氨酰胺浓度的测定, 结果表明, 在0、12、24、48 h培养的GF-1组、NNV组中谷氨酰胺含量变化与对照组相比没有显著性差异, 但是在GF-1+NNV组中, 在培养24与48 h后, 谷氨酰胺含量显著降低, 表明病毒感染可以显著消耗培养基中的谷氨酰胺(图8)。

qRT-PCR检测和WB检测结果表明, 缺乏谷氨酰胺会抑制病毒的复制(图9, 图10)。

在含有谷氨酰胺的条件下, 病毒感染可以显著提高C-Myc基因的表达(图11)。

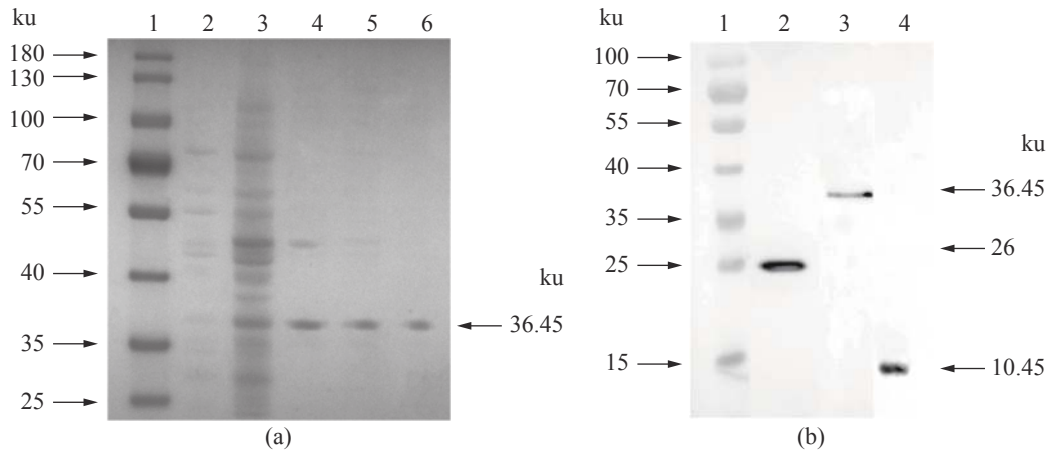


图5 斜带石斑鱼GF-1-C-Myc蛋白表达、纯化与多克隆抗体制备

(a) 表达和纯化C-Myc蛋白, 1. 蛋白Marker, 2. 没加IPTG诱导, 3. IPTG诱导, 4. 经第一次纯化后的重组蛋白, 5. 经第二次纯化后的重组蛋白, 6. 最后纯化的重组蛋白; (b) GF-1-C-Myc蛋白多克隆抗体特异性检测, 1. 蛋白Marker, 2. GST标签, 3. 菌体总蛋白, 4. GF-1细胞中的总蛋白

### Fig. 5 Expression and purification of GF-1-C-Myc protein and preparation of its polyclonal antibody

(a) expression and purification of GF-1-C-Myc protein, 1. protein Marker, 2. without IPTG induction, 3. IPTG induction, 4. the recombinant protein was purified for the first time, 5. after the second purification of the recombinant protein, 6. the final purified recombinant protein; (b) specific detection of polyclonal antibody of GF-1-C-Myc protein, 1. protein Marker, 2. GST tag, 3. total bacterial protein, 4. total protein in GF-1 cells

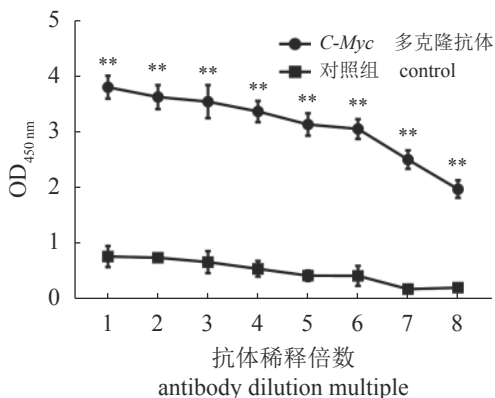


图6 GF-1-C-Myc多克隆抗体的最终效价分析

“\*\*\*”号表示组间有显著性差异,  $P < 0.05$ , 1. 400倍稀释, 2. 800倍稀释, 3. 1 600倍稀释, 4. 3 200倍稀释, 5. 6 400倍稀释, 6. 12 800倍稀释, 7. 25 600倍稀释, 8. 51 200倍稀释

### Fig. 6 Final titer analysis of GF-1-C-Myc polyclonal antibody

“\*\*\*” represents that there was significant difference between the two groups,  $P < 0.05$ , 1. 400 times of dilution, 2. 800 times of dilution, 3. 1 600 times of dilution, 4. 3 200 times of dilution, 5. 6 400 times of dilution, 6. 12 800 times of dilution, 7. 25 600 times of dilution, 8. 51 200 times of dilution

## 3 讨论

谷氨酰胺是一种游离的氨基酸, 在生物体内普遍存在, 其在谷氨酰胺酶(GLS)的催化下, 转化为谷氨酸, 随后在谷氨酸脱氢酶(GDH)的催

化下, 将谷氨酸转化成 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG), 进入三羧酸循环(TCA)。谷氨酰胺可以通过三羧酸循环, 为宿主细胞和病毒复制提供中间产物和能量<sup>[33]</sup>; 多个研究表明, 谷氨酰胺是多种病毒复制所必需的。另外还有研究表明, 谷氨酰胺能合成谷胱甘肽, 为病毒的复制提供良好的氧化还原环境<sup>[43]</sup>, 因此, 缺乏谷氨酰胺还会破坏宿主细胞内的氧化还原环境, 抑制病毒的复制。在水产病毒领域, 以往研究表明神经坏死病毒<sup>[44]</sup>、传染性脾肾坏死病毒<sup>[45]</sup>和弹状病毒<sup>[46]</sup>的复制都需要谷氨酰胺。但是病毒调控宿主谷氨酰胺的代谢机制还没有被阐明。原癌基因C-Myc不仅与肿瘤发生密切相关<sup>[17-21]</sup>, 还与病毒的复制有关<sup>[25-28]</sup>。本研究旨在探索神经坏死病毒复制、C-Myc和谷氨酰胺三者的关系。

本实验首次从斜带石斑鱼鳍条细胞GF-1中克隆到了C-Myc基因的cDNA序列, 构建不同鱼类C-Myc基因系统进化树。尽管鱼类C-Myc基因保守性比较高, 但是斜带石斑鱼C-Myc基因与其他鲈形目鱼类较为接近, 与鲤形目(Cypriniformes)、鲑形目(Salmoniformes)的C-Myc基因差别较远, 这与鱼类的进化一致。GF-1-C-Myc具有亮氨酸拉链结构域与螺旋-环-螺旋(HLH)结构域, 是典型的转录因子结构, 这与它是原癌基因的属性有关<sup>[47]</sup>。

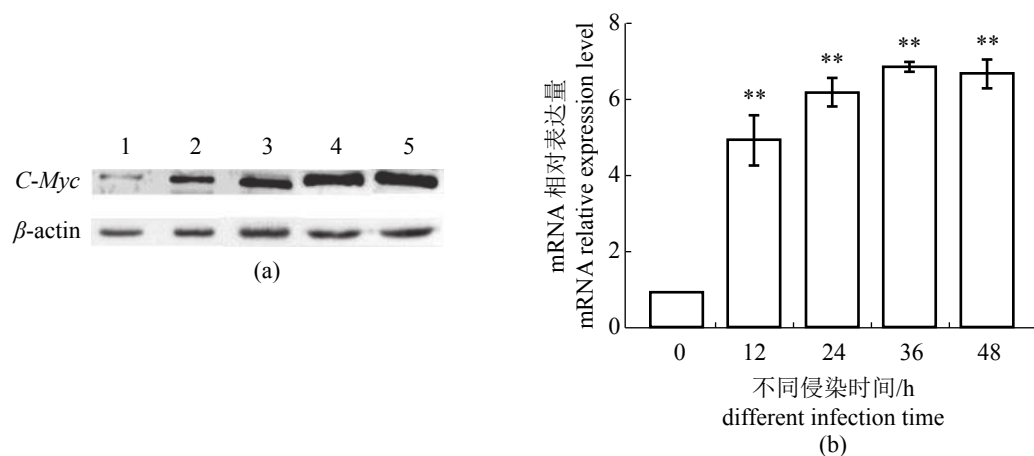


图 7 *C-Myc*基因在GF-1细胞不同感染时间下的mRNA与蛋白表达

(a) WB检测*C-Myc*基因在GF-1细胞不同感染时间下的表达; 1. 0 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 36 h, 5. 48 h; (b) qRT-PCR检测*C-Myc*基因在GF-1细胞不同感染时间下的mRNA表达; 将0 h感染GF-1的mRNA作为对照组, 其他感染时间的数值和0 h作比较。“\*\*”号表示有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 7 mRNA and protein expression of *C-Myc* gene in GF-1 cells at different infection time points

(a) the *C-Myc* gene was detected by WB at different infection time points in GF-1 cells, 1. 0 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 36 h, 5. 48 h; (b) mRNA expression of *C-Myc* gene was detected by qRT-PCR at different infection time points in GF-1 cells, and mRNA infected with GF-1 at 0 h was used as control group, and the value of other infection time was compared with that at 0 h. “\*\*” represents that there is a significant difference in five groups,  $P < 0.05$

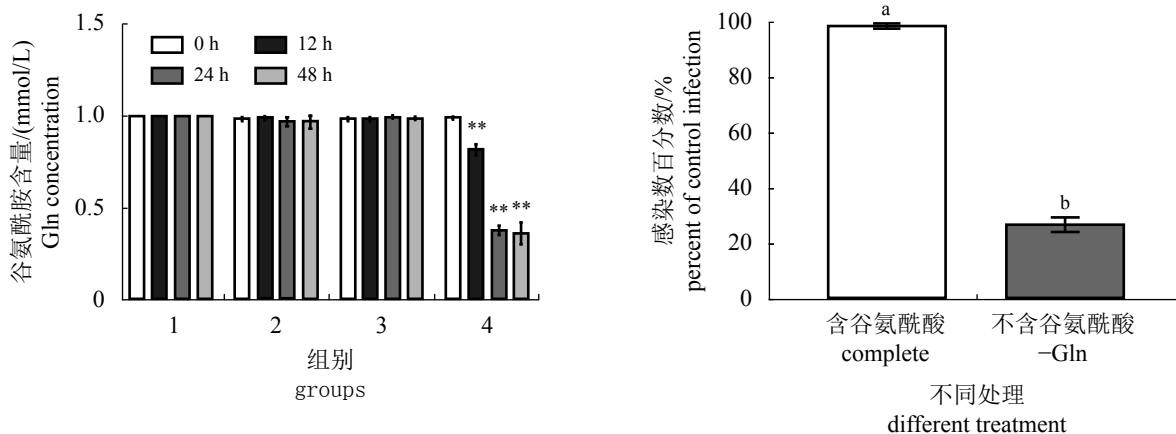


图 8 不同条件下谷氨酰胺含量变化的测定

配制谷氨酰胺含量为1.0 mmol/L的完全培养基, 分别加入4组: 1. 对照组(没有细胞和病毒), 2. GF-1组(只含有细胞, 没有病毒), 3. NNV组(含有病毒, 没有细胞), 4. GF-1+NNV组(含有细胞和病毒), 在培养0、12、24、48 h后检测各组中谷氨酰胺的含量变化。“\*\*\*”号表示有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 8 Determination of glutamine concentration under different conditions

Complete medium supplemented with 1.0 mmol/L of glutamine was divided into four groups: 1. control group (without cell and virus), 2. GF-1 group (only with cell, without virus), 3. NNV group (only with virus, without cell), 4. GF-1+NNV group (with both cells and virus). The concentration of glutamine in each group was detected at the cultural time points of 0, 12, 24 and 48 h. “\*\*\*” represents that there was a significant difference between the four groups,  $P < 0.05$

图 9 NNV在含有谷氨酰胺与不含谷氨酰胺培养基中的感染情况

GF-1细胞用NNV感染, MOI为1, 在含有谷氨酰胺培养基或无谷氨酰胺培养基中培养。感染细胞在24 h时收集, 并用qRT-PCR测定病毒产量。不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Fig. 9 Infection of NNV in medium with or without glutamine

GF-1 cells were infected with NNV at 1 MOI. The cells were cultured in medium with or without glutamine. The infected cells were collected at 24 h and the virus production was detected by qRT-PCR. Different letters indicate significant differences,  $P < 0.05$

神经坏死病毒的复制可以上调*C-Myc*的表达, 并显著消耗谷氨酰胺。缺乏谷氨酰胺可以



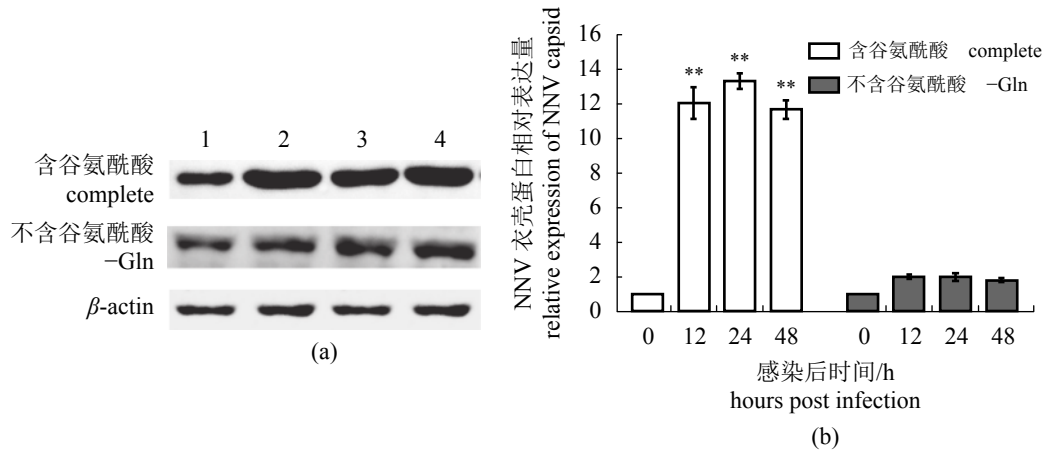


图 10 NNV衣壳蛋白在不同感染时间点的表达

(a) WB检测NNV衣壳蛋白在不同感染时间下的表达: 1. 0 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 48 h; (b) qRT-PCR检测NNV mRNA在不同感染时间下的表达: 将0 h感染作为对照组, 其他感染时间的数值和0 h作比较。“\*\*\*”号表示有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 10 Expression of capsid protein of NNV at different infection time points

(a) The expression of NNV capsid protein was detected by WB at different infection time points: 1. 0 h, 2. 12 h, 3. 24 h, 4. 36 h, 5. 48 h; (b) qRT-PCR was used to detect the expression of NNV mRNA at different infection time, and 0 h infection was used as control group, and the value of other infection time was compared with that at 0 h. “\*\*\*” represents that there is a significant difference in four groups,  $P < 0.05$

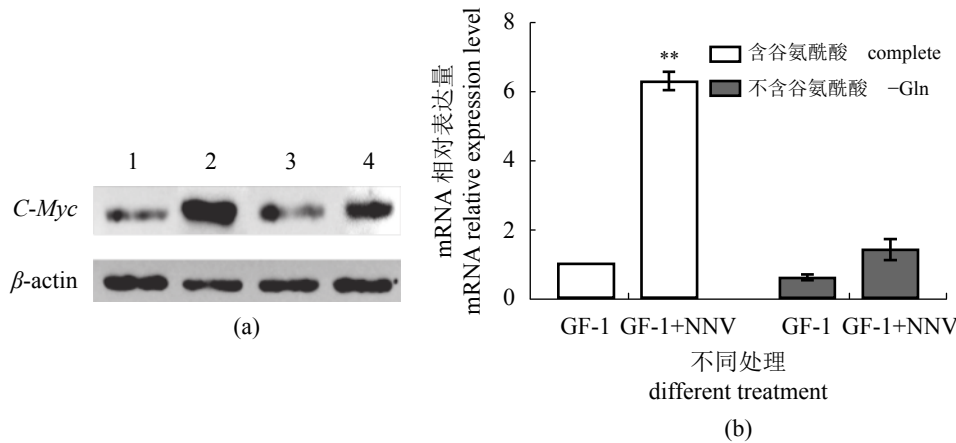


图 11 谷氨酰胺对GF-1细胞中C-Myc基因表达的影响

(a) GF-1细胞分别在含有谷氨酰胺培养基或无谷氨酰胺培养基中培养, 随后感染(GF-1+NNV)和不感染病毒(GF-1), 随后使用WB检测C-Myc的表达。1. 有谷氨酰胺, 细胞没有感染病毒; 2. 有谷氨酰胺, 细胞感染病毒; 3. 无谷氨酰胺, 细胞没有感染病毒; 4. 无谷氨酰胺, 细胞感染病毒; (b) qRT-PCR检测上述4组细胞中C-Myc mRNA, 以第一组(有谷氨酰胺, 细胞没有感染病毒)为对照组。“\*\*\*”号表示有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 11 Effect of glutamine on the expression of C-Myc gene in GF-1 cells

(a) the cells were cultured in medium with or without glutamine, followed by infection (GF-1+NNV) and non-infection with virus (GF-1), and then the expression of C-Myc gene was detected by WB. 1. with glutamine, the cell is not infected with the virus; 2. with glutamine, the cell is infected with the virus; 3. without glutamine, the cell is not infected with the virus; 4. without glutamine, the cell is infected with the virus; (b) C-Myc mRNA was detected by qRT-PCR, the first group (glutamine, cells were not infected with the virus) as the control group. “\*\*\*” represents that there is a significant difference in two groups,  $P < 0.05$

显著抑制神经坏死病毒的复制和C-Myc的表达, 此结果与腺病毒的研究较一致<sup>[48]</sup>。C-Myc通过与腺病毒衣壳蛋白互作, 促进宿主的谷氨酰胺代谢, 从而促进腺病毒自身的复制<sup>[49]</sup>。神经坏死病

毒可能通过与宿主细胞核的C-Myc蛋白相结合, 从而激活C-Myc基因的表达和转录, 因此通过神经坏死病毒的感染可以上调C-Myc基因的表达, 本研究虽然观察到神经坏死病毒感染可以上调C-



Myc, 促进谷氨酰胺的消耗, 从而对病毒的复制有利, 但是, 本研究没有阐明神经坏死病毒是通过哪些病毒或者宿主因子上调C-Myc的表达, 有待进一步研究。本结果为神经坏死病毒的复制和防控提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 黄文, 陈偿, 赵哲, 等. 海水养殖鱼类病毒性神经坏死病防控技术研究进展[J]. 渔业研究, 2016, 38(5): 419-426.  
Huang W, Chen C, Zhao Z, *et al.* Review on disease control researches of marine fish NNV[J]. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(5): 419-426(in Chinese).
- [2] 陈文捷, 刘晓丹, 胡先勤, 等. 鱼类神经坏死病毒研究进展与发展趋势[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1666-1672.  
Chen W J, Liu X D, Hu X Q, *et al.* Trend and research progress of nervous necrosis virus[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1666-1672(in Chinese).
- [3] 粟子丹, 李晋, 史成银. 引起半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther) 鱼苗大规模死亡的神经坏死病毒病[J]. 渔业科学进展, 2016, 37(4): 110-115.  
Su Z D, Li J, Shi C Y. Preliminary study on massive mortality of hatchery-reared half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*, associated with viral nervous necrosis[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 110-115(in Chinese).
- [4] 陈晓艳. 鱼类病毒性神经坏死病研究现状[J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 17-21.  
Chen X Y. Advances in nervous necrosis virus of fish[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, 26(5): 17-21(in Chinese).
- [5] 刘荻, 史秀杰, 高隆英, 等. 鱼病毒性神经坏死病病毒(VNNV)不同基因型鉴别方法的建立及在VNN检测和监测中的应用[J]. 水产学报, 2004, 28(6): 695-702.  
Liu H, Shi X J, Gao L Y, *et al.* Establishment of discriminating method of various genotypes of viral nervous necrosis virus (VNNV) and application in quarantine and surveillance of VNNV[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 695-702(in Chinese).
- [6] 陈晓艳, 何建国. 原位杂交技术在斜带石斑鱼神经坏死病毒检测中的应用[J]. 海洋科学, 2008, 32(6): 1-4.  
Chen X Y, He J G. Application of *in situ* hybridization in testing orange-spotted grouper nervous necrosis virus[J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(6): 1-4(in Chinese).
- [7] 陈晓艳, 翁少萍, 吕玲, 等. 斜带石斑鱼神经坏死病毒基因组RNA1和RNA2序列测定及分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(1): 73-77.  
Chen X Y, Weng S P, Lü L, *et al.* Sequences of RNA1 and RNA2 from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) nervous necrosis virus, China Strain[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(1): 73-77(in Chinese).
- [8] 陈晓艳, 翁少萍, 殷志新, 等. 斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白的原核表达与纯化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(6): 83-86.  
Chen X Y, Weng S P, Yin Z X, *et al.* Expression and purification of major capsid protein of orange-spotted grouper nervous necrosis virus[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(6): 83-86(in Chinese).
- [9] 黄桂菊, 陈健光, 喻达辉, 等. 斜带石斑鱼神经坏死病毒CP基因shRNA干扰载体的构建及效果评价[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 343-349.  
Huang G J, Chen J G, Yu D H, *et al.* Construction and evaluation of short hairpin RNA interference vector targeting CP gene of *Epinephelus coioides* nervous necrosis virus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(3): 343-349(in Chinese).
- [10] 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究[J]. 福建水产, 2011, 33(5): 15-19.  
Lin K B, Fang Q S, Wu J S, *et al.* Preliminary study on blocking transmission of NNV in *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2011, 33(5): 15-19(in Chinese).
- [11] 翟伟锋, 殷波. 石斑鱼神经坏死病毒的RT-LAMP检测方法的建立[J]. 南方农业, 2017, 11(32): 67-69.  
Zhai W F, Yin B. Establishment of RT-LAMP method for detection of *Epinephelus coioides* nerve necrosis virus[J]. *South China Agriculture*, 2017, 11(32): 67-69(in Chinese).
- [12] 葛辉, 林克冰, 周宸, 等. 10种免疫相关基因在斜带石斑鱼组织中的表达分析[J]. 渔业研究, 2017, 39(5): 379-385.  
Ge H, Lin K B, Zhou C, *et al.* mRNA expression of ten immune genes in tissues of *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2017, 39(5): 379-385(in Chinese).
- [13] 林鑫, 黄剑南, 翁少萍, 等. 赤点石斑鱼病毒性神经坏死症的组织病理和电镜观察[J]. 水产学报, 2005, <http://www.scxuebao.cn>

- 29(4): 519-523.
- Lin L, Huang J N, Weng S P, *et al.* Histopathological examination and electron microscopy observation of viral nervous necrosis in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(4): 519-523(in Chinese).
- [14] Hegde A, Teh H C, Lam T J, *et al.* Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*— comparative characterization and pathogenicity studies[J]. *Archives of Virology*, 2003, 148(3): 575-586.
- [15] 朱国华. NNV来源的蛋白转导域入侵机制的研究[D]. 广州: 中山大学, 2017.
- Zhu G H. Study of the entry mechanism of protein transduction domain originated from nervous necrosis virus[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2017(in Chinese).
- [16] 伊丽竹. 抗鱼类神经坏死病毒和抗嗜水气单胞菌卵黄抗体的制备及特性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- Yi L Z. Production and features of egg yolkigy against red-spotted grouper nervous necrosis virus and aeromonas hydrophila[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018(in Chinese).
- [17] 张成香. *c-myc*转基因小鼠生物学特性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- Zhang C X. Study of biological character of *c-myc* transgenic mice model[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2006(in Chinese).
- [18] 孙慧慧. C-Myc单克隆抗体的制备及鉴定[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2011.
- Sun H H. Preparation and identification of *c-myc* monoclonal antibody[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2011(in Chinese).
- [19] Lucas B, Grigo K, Erdmann S, *et al.* HNF4 $\alpha$  reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2005, 24(42): 6418-6431.
- [20] Chang D W, Claassen G F, Hann S R, *et al.* The C-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(12): 4309-4319.
- [21] Shon W, Sukov W R, Jenkins S M, *et al.* MYC amplification and overexpression in primary cutaneous angiosarcoma: a fluorescence *in-situ* hybridization and immunohistochemical study[J]. *Modern Pathology*, 2014, 27(4): 509-515.
- [22] 赵晓航. *c-myc*基因表达的急剧抑制导致人食管癌细胞系的终末分化和凋亡[D]. 北京: 中国协和医科大学, 1993.
- Zhao X H. The rapid inhibition of *c-myc* gene expression leads to terminal differentiation and apoptosis of human esophageal cancer cell line[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 1993(in Chinese).
- [23] Fernandez P C, Frank S R, Wang L Q, *et al.* Genomic targets of the human *c-Myc* protein[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(9): 1115-1129.
- [24] Wang C G, Tai Y H, Lisanti M P, *et al.* *c-Myc* induction of programmed cell death may contribute to carcinogenesis[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2011, 11(7): 615-626.
- [25] 赵冶. 通过反转录病毒侵染建立稳定过表达C-Myc的MIN6细胞系[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- Zhao Y. Establishment of min6 cell line with stable over expression of *c-Myc* through retrovirus infection[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011(in Chinese).
- [26] Battey J, Moulding C, Taub R, *et al.* The human *c-myc* oncogene: structural consequences of translocation into the *igh* locus in Burkitt lymphoma[J]. *Cell*, 1983, 34(3): 779-787.
- [27] Scott N, Martin I, Jack A S, *et al.* Genes mediating programmed cell death: an immunohistochemical study of *bcl-2*, *c-myc* and *p53* expression in colorectal neoplasia[J]. *Clinical Molecular Pathology*, 1996, 49(3): M151-M158.
- [28] Bissonnette R P, Echeverri F, Mahboubi A, *et al.* Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*[J]. *Nature*, 1992, 359(6395): 552-554.
- [29] 林超辉. 斜带石斑鱼的生物学特性及养殖技术[J]. 北京水产, 2007(5): 14-16.
- Lin C H. Biological characteristics and culture techniques of *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Beijing Fisheries*, 2007(5): 14-16(in Chinese).
- [30] 徐大为, 邢克智, 白东清, 等. 点带石斑鱼肌肉中氨基酸组成分析[J]. 中国水产, 2007(4): 62-64.
- Xu D W, Xing K Z, Bai D Q, *et al.* Analysis of amino acid composition in muscle of *Epinephelus punctatus*[J]. *China Fisheries*, 2007(4): 62-64(in Chinese).
- [31] 林克冰, 朱志煌, 葛辉, 等. 斜带石斑鱼(*Epinephelus* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- coioides*)神经坏死病毒感染过程的免疫研究[C]//福建省海洋学会2016年学术年会论文摘要集. 厦门: 福建省海洋学会, 福建省水产研究所, 2016.
- Lin K B, Zhu Z H, Ge H, *et al.* Immunity to nervous necrosis virus infections of nge-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) by vaccination with irus-like particles[C]//Annual meeting of Fujian Marine Society 2016. Xiamen: Fujian Marine Society, Fujian Fisheries Research Institute, 2016(in Chinese).
- [32] 林克冰, 方琼珊, 王涵生, 等. 斜带石斑鱼生态优化与病害防控育苗模式的研究[J]. *福建水产*, 2013, 35(5): 368-374.
- Lin K B, Fang Q S, Wang H S, *et al.* Studies on new breeding model of ecological optimization and disease control and prevention in *Epinephelus coioides*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2013, 35(5): 368-374(in Chinese).
- [33] Denno R, Rounds J D, Faris R, *et al.* Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state[J]. *Journal of Surgical Research*, 1996, 61(1): 35-38.
- [34] Passerini L, Welbourne T C. Organic mercurial diuresis: Inhibition of glutamine utilization in the acidotic rat[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1979, 57(3): 227-234.
- [35] Welbourne T C, Dass P D. Function of renal  $\gamma$ -glutamyltransferase: significance of glutathione and glutamine interactions[J]. *Life Sciences*, 1982, 30(10): 793-801.
- [36] Dang C V. Rethinking the Warburg effect with myc micromanaging glutamine metabolism[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(3): 859-862.
- [37] Gao P, Tchernyshyov I, Chang T C, *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 762-765.
- [38] Wise D R, DeBerardinis R J, Mancuso A, *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(48): 18782-18787.
- [39] 卢志杰, 叶成凯, Sarath B V, 等. 罗氏沼虾谷氨酰胺合成酶基因的克隆与表达[J]. *水产学报*, 2019, 43(3): 549-562.
- Lu Z J, Ye C K, Sarath B V, *et al.* Cloning and expression of glutamine synthetase from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 549-562(in Chinese).
- [40] 叶成凯, 卢志杰, Sarath B V, 等. 罗氏沼虾几丁质酶3B基因的克隆及其在蜕皮周期中的表达[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 751-762.
- Ye C K, Lu Z J, Sarath B V, *et al.* Cloning and expression analysis of chitinase-3B from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during molting cycle[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 751-762(in Chinese).
- [41] 苏国茂, 秦真东, 李嘉波, 等. 罗湖病毒核蛋白的克隆表达、抗体制备及其组织分布[J]. *水产学报*, 2019, 43(12): 2040-2053.
- Su G M, Qin Z D, Li J B, *et al.* Cloning, expression, antibody preparation and tissue distribution of tilapia lake virus nucleoprotein[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2040-2053(in Chinese).
- [42] 李嘉波, 秦真东, 赵丽娟, 等. 罗非鱼湖病毒对吉富尼罗罗非鱼和E-11细胞的感染[J]. *水产学报*, 2020, 44(1): 142-155.
- Li J B, Qin Z D, Zhao L J, *et al.* Infection of Tilapia Lake virus in *Oreochromis niloticus* and E-11 cell[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 142-155(in Chinese).
- [43] Wu G W, Yuan M Q, Shen S Q, *et al.* Menin enhances c-Myc-mediated transcription to promote cancer progression[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15278.
- [44] Muhammad Asim. 谷氨酰胺对赤点石斑鱼神经坏死病毒复制影响的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Muhammad Asim. Effect of glutamine on nerve necrosis virus replication of *Epinephelus akaara* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [45] 付小哲. 鳊传染性脾肾坏死病毒敏感细胞系的建立及病毒增殖依赖于谷氨酰胺的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Fu X Z. Establishment of sensitive cell line of infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi* and study on the mechanism of glutamine-dependent virus proliferation [D]. Yangling: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2017 (in Chinese).
- [46] 郭茜茜, 付小哲, 梁红茹, 等. 鳊弹状病毒调控谷氨酰胺还原性代谢途径促进自身增殖[J]. *中国水产科学*,

- 2019, 26(5): 993-1003.
- Guo X X, Fu X Z, Liang H R, *et al.* *Siniperca chuatsi* rhabdovirus regulates glutamine reductive metabolic pathway to promote self-proliferation[J]. Chinese Aquatic Sciences, 2019, 26(5): 993-1003.
- [47] Ma R R, Wang Y G, Liao M J, *et al.* Diagnosis and ORF gene sequencing analysis of the nervous necrosis virus (NNV) isolated from cultured pearl gentian grouper, *Epinephelus lanceolatus* × *Epinephelus fuscoguttatus*, in China[C]//Proceedings of the 7th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics. Dalian, China: IEEE, 2015.
- [48] Thai M, Graham N A, Braas D, *et al.* Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(4): 694-701.
- [49] Thai M, Thaker S K, Feng J, *et al.* MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8873.

## Influence between the expression of C-Myc protein and the replication of nervous necrosis virus in GF-1 cells treated with glutamine

SHEN Haiyang<sup>1,2</sup>, LU Zhijie<sup>1,2</sup>, QIN Zhendong<sup>2</sup>, ZHAO Lijuan<sup>2</sup>, LI Yanan<sup>2</sup>, LIU Chun<sup>2</sup>, YANG Guang<sup>1,2</sup>, YE Chengkai<sup>1,2</sup>, PAN Gan<sup>1\*</sup>, LIN Li<sup>2\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** In order to investigate the relationships among the C-Myc expression, glutamine metabolism and replication of NNV. First of all, the C-Myc gene (*GF-1-C-Myc*) from *Epinephelus coioides* fin cell (grouper fin cells, GF-1) was cloned. The full length of *GF-1-C-Myc* gene cDNA was 814 bp with 285 bp ORF, encoding 95 amino acid (aa) with leucine zipper domain and helix-ring-helix (HLH) domain. *GF-1-C-Myc* protein was expressed and purified, and its polyclonal antibody was generated. The expressions of *GF-1-C-Myc* gene and the replication of NNV were monitored by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and immunoblotting (WB). The results showed that lack of glutamine could inhibit both the expression of *GF-1-C-Myc* gene and replication of NNV, while additional glutamine could promote both the expression of *GF-1-C-Myc* gene and replication of NNV. In addition, the expression of *GF-1-C-Myc* gene was up-regulated in GF-1 cells infected with NNV, and the glutamine in the medium was significantly consumed. Taken together, *GF-1-C-Myc* gene was involved in the regulation of glutamine metabolism in the cell, subsequently facilitated the replication of NNV. Our results will shed a new light on the prevention and control of NNV infection.

**Key words:** *Epinephelus coioides*; C-Myc gene; GF-1 cell; nervous necrosis virus; infection; glutamine

**Corresponding authors:** PAN Gan. E-mail: pg2829@sina.com;

LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31872606); Foundation of Guangdong Provincial Marine and Fisheries Bureau (GDME-2018C006, D21822202); Foundation of China-Asean Maritime Cooperation (CAMC-2018F); Guangdong Provincial Special Fund For Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2019KJ141)