

## 新加坡石斑鱼虹彩病毒 ICP46 核输出信号序列的定位与功能鉴定

夏立群<sup>1</sup>, 张红莲<sup>1,2</sup>, 秦启伟<sup>2\*</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301)

**摘要:** 新加坡石斑鱼虹彩病毒(SGIV)是一种重要的鱼类传染性病毒, 可导致石斑鱼死亡率达 90%以上, 给石斑鱼的养殖造成巨大的经济损失。SGIV ICP46(infected cell polypeptides 46)是一个立即早期基因, 可能参与细胞的生长调控, 并对病毒复制有重要作用。在 SGIV ICP46 序列中存在一段富含亮氨酸(Leucine, L)的潜在核输出信号(nuclear export signal, NES)。为了深入研究该段 NES 序列在 SGIV ICP46 核转运过程中的作用, 实验构建了 3 个 NES 缺失的突变体: 仅含 NES 之前片段的突变体( $\Delta$ NESa)、仅含 NES 之后片段的突变体( $\Delta$ NESb)和不含 NES 的全长片段( $\Delta$ NESc), 并在真核细胞中表达, 观察这些突变体在细胞内的定位情况。转染细胞实验结果表明, 野生型 EGFP-ICP46 重组蛋白可以有效地被输出细胞核, 荧光信号主要分布在胞质区; 相反, NES 缺失的 EGFP-ICP46- $\Delta$ NES 重组蛋白不能被有效地输出细胞核, 呈现与 EGFP 对照相同的泛细胞分布特征。突变实验证明, NES 对 SGIV ICP46 输出细胞核具有决定性作用。

**关键词:** 新加坡石斑鱼虹彩病毒; ICP46; 核输出信号; 绿色荧光蛋白

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

新加坡石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)是 2001 年分离自石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)的一种能引起全身性疾病的病原体, 该病毒可导致石斑鱼死亡率达 90%以上<sup>[1-2]</sup>。目前 SGIV 的快速检测、培养鉴定、全基因组、转录组、蛋白质组等相关基础研究已经完成<sup>[3-5]</sup>, 对 SGIV 重要功能基因的研究正陆续展开<sup>[6-13]</sup>。

立即早期基因(immediate early gene, IE 基因)的转录出现在病毒 DNA 复制之前, 其表达不依赖病毒蛋白合成, IE 基因转录后产生的早期蛋白对病毒复制和细胞周期进程有很重要的影响<sup>[14-17]</sup>。SGIV 转录图谱、药物抑制实验、RT-PCR 及 Western blot 都确定 SGIV ICP46 是一个立即早期基因<sup>[5-6]</sup>。前期研究表明, 过量表达 SGIV ICP46 可以明显提高石斑鱼胚胎细胞(grouper embryo cells, GP)的生长速度, 并显著提高 SGIV 的滴度, 说明 ICP46 可

能参与细胞生长调控, 并对病毒复制有重要作用<sup>[6]</sup>。虹彩病毒科全基因组测序的比较基因组研究揭示 ICP46 是虹彩病毒科的核心基因之一<sup>[18]</sup>, 可能在虹彩病毒科病毒感染过程中具有重要作用。

由于虹彩病毒利用宿主细胞的细胞核与细胞质进行其生命复制周期中的不同事件, 因此对于病毒蛋白在细胞内的定位可以为其功能研究提供非常有用的线索。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达可用荧光显微镜直接观察, 其亚细胞定位表现为胞浆和胞核泛表达分布, 因此其亚细胞定位的改变直接反应与其连接序列的核输入或核输出功能<sup>[19]</sup>。通过将 SG IV ICP46 和 GFP 基因融合表达、真核转染和荧光显微镜观察, 发现 SGIV ICP46 在 GP 和 FHM 两种细胞内主要分布于细胞质中, 在感染晚期也少量分布于细胞核和病毒加工厂区域<sup>[6, 8]</sup>。NetNES 生物信息学分析显示,

收稿日期: 2012-03-22 修回日期: 2012-06-05  
资助项目: 国家“九七三”计划项目(2012CB114402)  
通讯作者: 秦启伟, E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

在 SGIV ICP46 序列中存在一段富含亮氨酸 (Leucine, L) 的潜在核输出信号(nuclear export signal, NES)aa 250-LVRFLQLKEAGEDGEEEDI-267。NES 通常由一段富含疏水氨基酸的特征序列组成, 其中疏水氨基酸主要为亮氨酸, 在已知文献报道或 NESbase 登陆的核输出信号序列中, 72% 左右具有以下结构: [LIVFM]-x-(2,3)-[LIVFM]-x(2,3)-[LIVFM]-x-[LIVFM](x 代表任意氨基酸)<sup>[20]</sup>。为深入研究 NES 在 SGIV ICP46 蛋白亚细胞定位过程中的作用, 实验构建 NES 缺失的 ICP46-GFP 突变株, 转染 GP 细胞并观察野生型与缺失型 ICP46-GFP 在细胞内的定位情况。对 SGIV ICP46 核输出信号序列的定位与功能鉴定的研究, 将为今后进一步研究 SGIV ICP46 的功能和抗 SGIV 病毒感染奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞和质粒

新加坡石斑鱼虹彩病毒、GP 细胞、质粒 pEGFP-N3、受体菌 DH5 $\alpha$  由中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室保存提供。

### 1.2 工具酶和试剂

PrimeSTAR DNA 聚合酶, 限制性核酸内切酶 *Bam*HI, *Sac*I, *Xho*I, T<sub>4</sub> 连接酶, DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; 质粒微量提取试剂盒购自 U-gene 公司; M199 培养基, 胰酶(含 EDTA)购自 Gibco 公司; 提取无内毒素质粒试剂盒(Endo-Free plasmid mini kit)购自 Omega 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.3 SGIV 总 DNA 的提取

取适量 SGIV 病毒悬液, 加入等体积的碱裂解缓冲液, 37 °C 作用 15 min 至病毒悬液变得较为澄清, 再加入等体积的 2% SDS 和 25  $\mu$ L 蛋白酶 K(10 mg/mL), 50 °C 作用 30 min, 至病毒悬液完全澄清, 12 000 r/min 离心 5 min, 除去碱解不溶物。吸取上清用酚、酚-氯仿(1 : 1)与酚-氯仿-异戊醇(25 : 24 : 1)依次轻柔抽提, 上清用 2.5 倍体积的 95% 冰乙醇沉淀病毒 DNA, 12 000 r/min 离心 20 min。沉淀用冰冷的 70% 乙醇洗涤 2 次, 12 000 r/min 离心 1 min, 沉淀溶于 TE 缓冲液后, -20 °C 保存。

### 1.4 NES 缺失的 ICP46-GFP 融合表达载体的构建

应用 CBS 在线分析工具 CBS online service

NetNES 1.1 Server-prediction (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) 分析 SGIV ICP46 的核输出信号, 根据 ICP46 缺失 NES 后的序列和质粒 pEGFP-N3 酶切位点设计引物:

P1: 5'-GCCTCTCGAGTTGTGGAAGATTTAA-3'(XhoI)

P2: 5'-CTTGTTCGACAGACCCGACAAGCGG G-3'(SacI)

P3: 5'-GCTGTTCGACGTATTCGCACAGCAC-3'(SacI)

P4: 5'-CGTGGATCCTTCAGCTGACTCTTCT-3'(BamHI)

用 PrimeSTAR DNA 聚合酶高保真扩增目的片段, 用引物 P1/P2 扩增得到 SGIV ICP46 的 NES 之前的片段 ICP46- $\Delta$ NESa, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 再 72 °C 延伸 8 min; 用引物 P3/P4 扩增得到 SGIV ICP46 的 NES 之后的片段 ICP46- $\Delta$ NESb, 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 再 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物经 DNA 片段纯化试剂盒纯化, 酶切后以摩尔数比 1 : 3(质粒/插入片段)的比例克隆入质粒 pEGFP-N3, 菌落 PCR 后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序, 得到质粒 pEGFP- $\Delta$ NESa 和 pEGFP- $\Delta$ NESb。将 ICP46- $\Delta$ NESa 高保真 PCR 片段与已构建成功的质粒 pEGFP- $\Delta$ NESb 酶切连接, 菌落 PCR 后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序, 获得 pEGFP- $\Delta$ NESc。

### 1.5 去内毒素质粒的提取和转染

按 Omega 公司说明书提取无内毒素 pEGFP-ICP46<sup>[6]</sup>、pEGFP- $\Delta$ NESa、pEGFP- $\Delta$ NESb、pEGFP- $\Delta$ NES 和 pEGFP-N3 质粒。将 GP 细胞传代至 24 孔细胞培养板中, 于 25 °C 恒温培养箱中培养, 待细胞长满单层的 90%~95% 开始转染。每孔转染需 1  $\mu$ g 质粒, 2  $\mu$ L 转染试剂(Lipofectamin 2 000)。将质粒和转染试剂分别用 Opti-MEM 培养基稀释至 50  $\mu$ L, 两者混匀后静置 20 min。在静置期间, 吸走培养板孔中的培养液, 加入 300  $\mu$ L Opti-MEM 培养基洗涤 1 次, 吸走洗涤液。加入质粒和 Lipofectamin 2 000 的混合液, 轻摇培养板以使混合液与细胞充分接触。25 °C 恒温培养箱中培养 4 h 后, 吸走混合液, 加入 500  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清

的 M199 培养液, 转染完成。

### 1.6 GFP 重组蛋白亚细胞定位及缺失 NES 分析

转染后 48 h, 将转染的细胞消化后传到置于 6 孔板中的无菌盖玻片上, 继续培养 12~24 h 后, 吸去培养基, PBS 漂洗一次, 然后用 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)室温固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 加入终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DAPI(Sigma 公司产品)染核 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 然后用抗荧光淬灭封片剂封片, 置 Zeiss 荧光显微镜观察拍照。用荧光显微镜(ZEISS)观察。

## 2 结果

### 2.1 SGIV ICP46 基因 NES 缺失片段的高保真 PCR 扩增

SGIV ICP46 基因 NES 缺失片段的高保真 PCR 扩增产物, 用 1% 的琼脂糖凝胶作电泳分析(图 1), 分别得到大小约为 780 bp 的 ICP46- $\Delta$ NESa 和 369 bp 的 ICP46- $\Delta$ NESb 两个目标带, 与理论结果相符合, 证明扩增目标带成功。

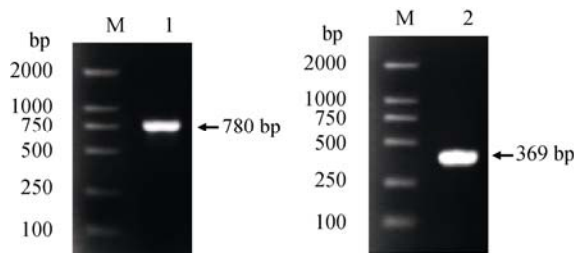


图 1 SGIV ICP46 基因 NES 缺失片段的高保真 PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of ICP46- $\Delta$ NESa and ICP46- $\Delta$ NESb

M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1. ICP46- $\Delta$ NESa; 2. ICP46- $\Delta$ NESb.

### 2.2 NES 缺失的 ICP46-GFP 融合表达载体的构建

分别将扩增片段 ICP46- $\Delta$ NESa、ICP46- $\Delta$ NESb 与 pEGFP-N3 载体连接后, 转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞, 挑取转化平板上生长的单菌落进行菌落 PCR(图 2 和图 3), 将阳性克隆进行测序, Clustalx 1.83 的比对分析结果表明, 重组质粒的插入序列与预期的序列完全一致, 将成功构建的重组质粒命名为 pEGFP- $\Delta$ NESa 和 pEGFP- $\Delta$ NESb。将扩增片段 ICP46- $\Delta$ NESa 和重组质粒 pEGFP- $\Delta$ NESb 连接后, 转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$  细胞, 挑取转化平板上生长的单菌落进行菌落 PCR(图 4), 阳性克隆测序和序列比对后, 表明重组质粒的插入序列与预期

的序列完全一致, 成功构建的重组质粒命名为 pEGFP- $\Delta$ NESc。

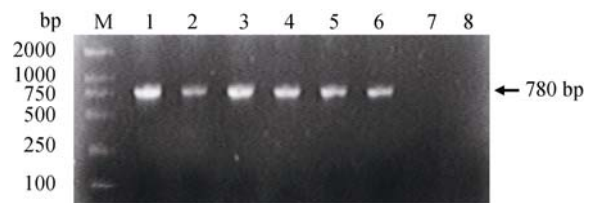


图 2 重组质粒 pEGFP- $\Delta$ NESa 菌落 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant vector pEGFP- $\Delta$ NESa by colony PCR

M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1~6. 阳性克隆。

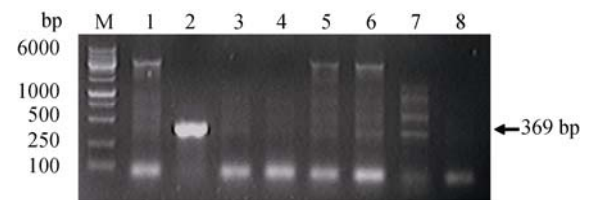


图 3 重组质粒 pEGFP- $\Delta$ NESb 菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant vector pEGFP- $\Delta$ NESb by colony PCR

M. DL 6000 DNA 分子量标准; 2. 阳性克隆。

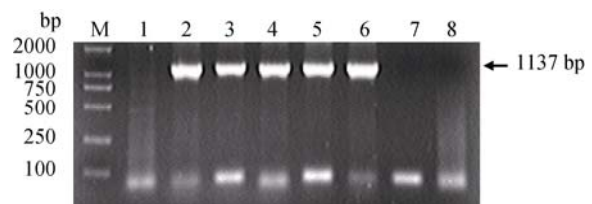


图 4 重组质粒 pEGFP- $\Delta$ NESc 菌落 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant vector pEGFP- $\Delta$ NESc by colony PCR

M. DL 2000 DNA 分子量标准; 2~6. 阳性克隆。

### 2.3 GFP 重组蛋白亚细胞定位及缺失 NES 分析

将真核表达重组质粒 pEGFP- $\Delta$ NESa、pEGFP- $\Delta$ NESb 和 pEGFP- $\Delta$ NESc 转染到真核细胞后, 重组质粒能表达带有绿色荧光蛋白标签且缺失 NES 的 ICP46 相应片段的融合蛋白, 通过绿色荧光蛋白可以用来研究相应缺失 NES 的 ICP46 片段蛋白在 GP 细胞中的定位情况。实验以空载体 pEGFP-N3 和 pEGFP-ICP46 转染的 GP 细胞为对照。

荧光显微镜观察结果显示(图 5), 在 NES 序列存在的情况下, 野生型 EGFP-ICP46 可以被输出细胞核, 荧光信号主要分布在细胞质中; 相反, 缺失 NES 序列后, EGFP- $\Delta$ NESa、EGFP- $\Delta$ NESb 和 EGFP- $\Delta$ NESc 不能被有效地输出细胞核, 呈现与 EGFP 对照相似的泛细胞分布。以上结果说明, NES 对 SGIV ICP46 的出核转运具有决定性作用。

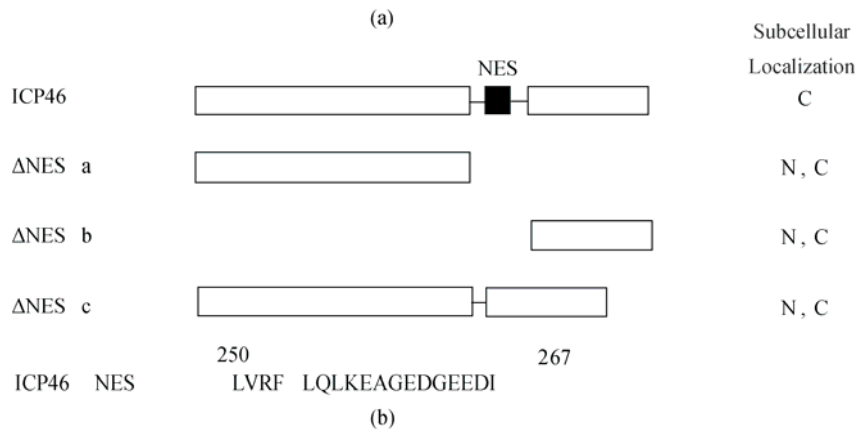
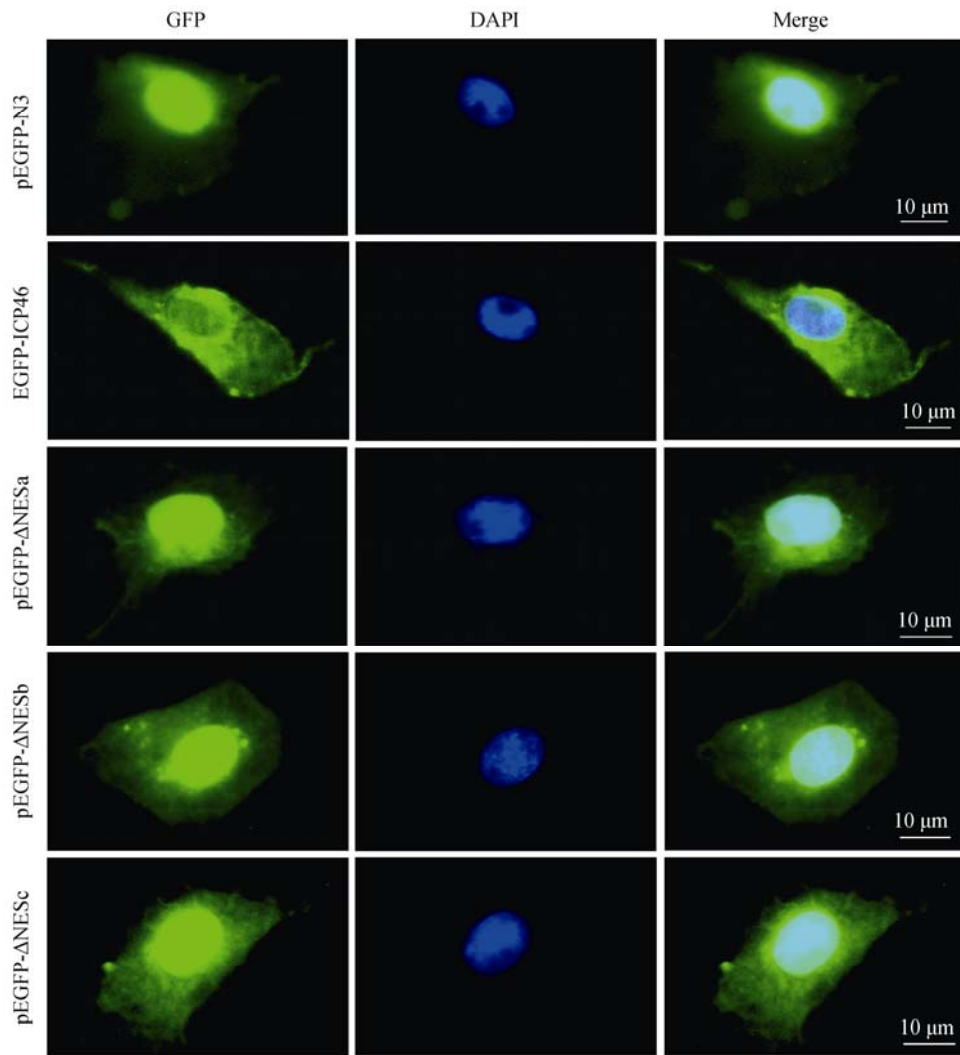


图 5 NES 依赖型的 SGIV ICP46 出核转运

Fig. 5 NES dependent SGIV ICP46 protein translocation

(a) GP cells were transfected with expression vectors pEGFP-N3, pEGFP-ICP46 and pEGFP-ΔNES; (b) Schematic drawing of the GFP fusion proteins and summary of their intracellular localization as displayed in (a); C: cytoplasm ; N: nuclear. Also shown is the sequence of the predicted ICP46 NES.

### 3 讨论

核输出信号对于蛋白的亚细胞定位具有非常重要的调节作用, 这种调节对于转录及其他细胞

核内的进程有巨大影响。研究表明, 含有 NES 的蛋白常参与诸如信号传导、细胞周期调控、细胞分化和癌症等重要的分子生物学过程<sup>[20-22]</sup>。本实验室前期研究表明, SGIV ICP46 是一个病毒立即早期

基因, 为包装于核衣壳部分的病毒结构蛋白, 可能参与细胞的生长调控并对病毒复制有重要作用<sup>[6]</sup>, 但其参与细胞的生长调控和促进病毒复制的具体机制尚不清楚。之前 SGIV ICP46 亚细胞定位的研究还发现, 其在宿主细胞内主要均匀分布于胞质区, 在感染晚期也少量分布于细胞核和病毒加工厂区域<sup>[6]</sup>。为了进一步研究 SGIV ICP46 的功能, 实验对 SGIV ICP46 的潜在 NES 片段进行缺失。发现 NES 缺失后, SGIV ICP46 无法正常输出细胞核, 证明 NES 序列对 SGIV ICP46 输出细胞核起决定性作用。这是首次在 ICP46 家族中发现 NES 介导的核输出转运机制。

含有 NES 序列的病毒蛋白在以往的研究中也 有所报道, 这些蛋白包括很多转录调节蛋白, 如单纯疱疹病毒编码的 ICP27、狂犬病病毒的 P 蛋白、Nipah 病毒的 V 蛋白等<sup>[23-25]</sup>; 也包括一些负责病毒 mRNA、核糖核蛋白出核转运的蛋白, 如甲型流感病毒的 M1 蛋白、EB 病毒的 EB2 蛋白、腺病毒的 E4orf6 蛋白等<sup>[26-28]</sup>; 还包括大量的结构蛋白, 如单纯疱疹病毒 I 型的 UL47 蛋白、单纯疱疹病毒 II 型的 UL37 蛋白、传染性气管炎冠状病毒的 N 蛋白等<sup>[29-31]</sup>。此外, 本实验室还发现 SGIV dUTPase 的氨基酸序列近 C-端存在一段核输出信号, 该基因和核酸代谢相关<sup>[10]</sup>。这些含有 NES 序列的病毒蛋白, 在病毒感染过程中的基因表达调控、病毒复制和病毒粒子组装等方面都具有非常重要的作用。SGIV ICP46 的胞质分布特征提示, 病毒感染细胞后, ICP46 主要在细胞质起重要作用; 而 SGIV ICP46 中 NES 序列的存在, 提示我们 SGIV ICP46 在某些情况下进入细胞核后, 可以被再转运回细胞质, 该机制可能在 SGIV ICP46 发挥功能的信号通路中具有重要作用。要进一步揭示 SGIV ICP46 参与细胞的生长调控和促进病毒复制的具体机制和信号通路, 还需要借助抑制基因表达、基因敲除及与其他 SGIV 重要功能基因和宿主相关基因相互作用的研究。

#### 参考文献:

- [1] Qin Q W, Lam T J, Sin Y M, *et al.* Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 98(1): 17-24.
- [2] Qin Q W, Chang S F, Ngoh G H, *et al.* Characterization of a novel ranavirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(1): 1-9.
- [3] Song W J, Qin Q W, Qiu J, *et al.* Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(22): 12576-12590.
- [4] Song W, Lin Q, Joshi S B, *et al.* Proteomic studies of the Singapore grouper iridovirus[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5(2): 256-264.
- [5] Teng Y, Hou Z, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Virology*, 2008, 377(1): 39-48.
- [6] Xia L Q, Liang H Y, Huang Y H, *et al.* Identification and characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF162L, an immediate-early gene involved in cell growth control and viral replication[J]. *Virus Research*, 2010, 147(1): 30-39.
- [7] Xia L Q, Cao J H, Huang X H, *et al.* Characterization of the Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication [J]. *Archives of Virology*, 2009, 154(9): 1409-1416.
- [8] 夏立群, 梁海鹰, 张红莲, 等. RNA干扰技术抑制新加坡石斑鱼虹彩病毒感染细胞多肽ICP46与绿色荧光蛋白融合基因的表达[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 611-617.
- [9] Wan Q J, Gong J, Huang X H, *et al.* Identification and characterization of a novel capsid protein encoded by Singapore grouper iridovirus ORF038L [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(3): 351-359.
- [10] Gong J, Huang Y H, Huang X H, *et al.* Nuclear-export-signal-dependent protein translocation of dUTPase encoded by Singapore grouper iridovirus[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(7): 1069-1076.
- [11] Xu D, Wei J, Cui H, *et al.* Differential profiles of gene expression in grouper *Epinephelus coioides*, infected with Singapore grouper iridovirus, revealed by suppression subtractive hybridization and DNA microarray[J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 77(2): 341-360.
- [12] Huang X H, Huang Y H, OuYang Z L, *et al.* Singapore grouper iridovirus, a large DNA virus, induces nonapoptotic cell death by a cell type dependent fashion and evokes ERK signaling [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(8): 831-845.
- [13] Zhou S, Wan Q J, Huang Y H, *et al.* Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088 [J]. *Proteomics*, 2011, 11(11): 2236-2248.
- [14] Preston V G, Davison A J, Marsden H S, *et al.* Recombinants between herpes simplex virus types 1 and 2: analyses of genome structures and expression of imme-

- diate early polypeptides[J]. *Journal of Virology*, 1978, 28(2): 499–517.
- [15] Moss B, Shisler J L. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes[J]. *Semin Immunol*, 2001, 13(1): 59–66.
- [16] Hobbs W E, DeLuca N A. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(10): 8245–8255.
- [17] Kinchington P R, Fite K, Seman A, *et al.* Virion association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(19): 9106–9113.
- [18] Eaton H E, Metcalf J, Penny E, *et al.* Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae: re-annotating and defining the core set of iridovirus genes[J]. *Journal of Virology*, 2007, 19(1): 4–11.
- [19] Gerdes H H, Kaether C. Green fluorescent protein: applications in cell biology[J]. *FEBS Letter*, 1996, 389(1): 44–47.
- [20] Fu S C, Imai K, Horton P. Prediction of leucine-rich nuclear export signal containing proteins with NESsential[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(16): 111.
- [21] La Cour T, Kierner L, Mølgaard A, *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals [J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 2004, 17(6): 527–536.
- [22] 周鸣, 郭驰, 李夏雨. BRD7核输出信号序列的定位与功能鉴定[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2011, 36(7): 634–639
- [23] Lengyel J, Guy C, Leong V, *et al.* Mapping of functional regions in the amino-terminal portion of the herpes simplex virus ICP27 regulatory protein: importance of the leucine-rich nuclear export signal and RGG Box RNA-binding domain[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(23): 11866–11879.
- [24] Passetoup D, Poisson N, Raux H, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the rabies virus P protein requires a nuclear localization signal and a CRM1-dependent nuclear export signal[J]. *Virology*, 2005, 334(2): 284–293.
- [25] Rodriguez J J, Cruz C D, Horvath C M. Identification of the nuclear export signal and STAT-binding domains of the Nipah virus V protein reveals mechanisms underlying interferon evasion[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(10): 5358–5367.
- [26] Shimizu T, Takizawa N, Watanabe K, *et al.* Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP[J]. *FEBS Letter*, 2011, 585(1): 41–46.
- [27] Hiriart E, Farjot G, Gruffat H, *et al.* A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(1): 335–342.
- [28] Weigel S, Dobbstein M. The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(2): 764–772.
- [29] Williams P, Verhagen J, Elliott G. Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47 [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(21): 10946–10952.
- [30] Watanabe D, Ushijima Y, Goshima F, *et al.* Identification of nuclear export signal in UL37 protein of herpes simplex virus type 2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(3): 1248–1254.
- [31] Reed M L, Howell G, Harrison S M, *et al.* Characterization of the nuclear export signal in the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein[J]. *Journal of Virology*, 2007, 81(8): 4298–4304.

## Definition and function identification of nucleus export signal of SGIV ICP46

XIA Li-qun<sup>1</sup>, ZHANG Hong-lian<sup>1,2</sup>, QIN Qi-wei<sup>2\*</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** Singapore grouper iridovirus (SGIV) was an important piscine infectious virus. The virus caused more than 90% mortality in grouper and resulted in heavy economic losses in grouper aquaculture. SGIV ICP46 was an immediate-early (IE) gene, may be associated with cell growth control and could contribute to virus replication. A leucine-rich nuclear export signal (NES) in SGIV ICP46 was predicted. To identify the function of the NES in protein translocation, three recombinant plasmids including pEGFP- $\Delta$ NESa (containing the fragment before NES), pEGFP- $\Delta$ NESb (containing the fragment after NES) and pEGFP- $\Delta$ NESc (containing the complete ICP46 fragment without NES) were constructed and used to track the movement of the protein lacking the NES in GP (Grouper embryo) cells. As the results showed, in pEGFP-ICP46-transfected cells, the fluorescence signal was observed mainly in the cytoplasm, outside of the nucleus. However, in pEGFP-ICP46- $\Delta$ NES-transfected cells, the fluorescence signal was scattered throughout the whole cell. These results indicated that the NES is essential for the translocation of SGIV ICP46 from the nucleus to the cytoplasm.

**Key words:** Singapore grouper iridovirus (SGIV); ICP46; nuclear export signal; green fluorescent protein

**Corresponding author:** QIN Qi-wei. E-mail: qinqw@scsio.ac.cn