

对虾白斑综合征病毒 vp28 基因的表达 及其与血细胞的结合

陈文博^{1,2} 谭珍一¹ 刘庆慧^{1*} 侯林² 黄捷¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²辽宁师范大学, 大连 116029)

摘要 根据 GenBank 上 WSSV 囊膜蛋白基因 vp28 的序列, 设计合成引物, PCR 扩增得到 vp28 基因, 成功构建重组表达载体 pBAD/gIII A-VP28 并转化大肠杆菌 *E. coli*。用 L-阿拉伯糖在 37°C 诱导重组基因工程菌, 表达产物经 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测, 显示有与预期大小 31kDa 相符合的目的蛋白。荧光显微镜方法分析显示, 表达的 VP28 可与克氏原螯虾血细胞结合。结果表明, 在合适的培养条件下, 构建的重组表达载体 pBAD/gIII A-VP28 不仅能够表达 vp28 基因, 而且表达的 VP28 具有很高的抗原结合活性。

关键词 白斑综合症病毒 vp28 表达 活性分析

中图分类号 文献识别码 **文章编号** 1000-7075(2009)04-0044-06

Expression and binding activity of vp28 of white spot syndrome virus

CHEN Wen-bo^{1,2} TAN Zhen-yi¹ LIU Qing-hui^{1*} HOU Lin² Huang Jie¹

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Ministry of Agriculture Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Liaoning Normal University, Dalian 116029)

ABSTRACT In this study, a pair of primers was designed by primer design software 5.0 according to the sequence of vp28 gene of white spot syndrome virus (WSSV) in GenBank. The vp28 DNA fragment was amplified by PCR and cloned into *Escherichia coli* (*E. coli*) expression vector pBAD/gIII A successfully. The pBAD/gIII A-VP28 was then transformed into *E. coli*. After L-arabinose induction at 37°C, the fusion protein with 31 kDa was expressed, which was confirmed by SDS-PAGE and Western-blot analysis. Binding assay by fluorescence microscopy in vitro showed that VP28 was capable of binding to shrimp hemocytes. Results confirmed that the recombinant vector pBAD/gIII A-VP28 can express vp28 gene of WSSV and the VP28 had high antigenic activity.

KEY WORDS White spot syndrome virus vp28 Expression Activity analysis

对虾白斑综合征是由对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, 简称 WSSV)感染对虾后引起的

国家自然科学基金项目(30871942)、国家重点基础规划项目(973)(2006CB101801)和国家高技术研究发展计划课题(2006AA100312)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2008-11-19;接受日期:2009-03-16

作者简介:陈文博(1984-),男,硕士研究生。主要从事生物技术研究 E-mail:c990431231@hotmail.com, Tel:(0532)85823062

病毒性传染病(Chen 1995)。自20世纪90年代对虾白斑综合征在世界沿海各地发生以来,许多学者对其征状、病理变化、流行性、诊断和防治等进行了较为全面的研究(Nouye *et al.* 1993;黄健等 1995; Wongteerasupaya *et al.* 1995;Lo *et al.* 1996),WSSV 全基因序列约 300 kb(Chen *et al.* 2002;van Hulten *et al.* 2001a;Yang *et al.* 2001),但有关病原 WSSV 病毒分子生物学方面的研究较少。已知 VP28 是由病毒基因组自身编码的结构蛋白,为 WSSV 的主要囊膜蛋白(van Hulten *et al.* 2001b)。研究表明,囊膜在 WSSV 感染对虾过程中起了关键作用,而 van Hulten 等(2001b)又发现 VP28 与对虾白斑综合征的系统感染有关,最近研究表明,PmRab7 为 VP28 的作用蛋白(Sritunyalucksana *et al.* 2006)。为了弄清 WSSV 感染对虾的分子机制,大量获得 VP28 蛋白非常重要。随着后基因组时代的到来,通过外源表达系统来获得目的蛋白已成为常规的方法。pBAD/gIII A 表达载体是目前有应用价值的原核生物表达载体,其上面携带的组氨酸标签为纯化表达蛋白提供便捷的方式,尤其其高效表达能力越来越受到人们的重视。本文用 pBAD/gIII A 载体表达 WSSV 囊膜蛋白 VP28,为对虾白斑综合征病毒感染的分子机理和防治研究提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* Top10 及质粒 pBAD/gIII A(购自 Invitrogen 公司)均由本实验提供。所使用的限制性内切酶、Taq 酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Biostar 公司。PVDF 膜、Anti-His-HRP 抗体、地高辛和荧光素均购自 Invitrogen 公司。

1.2 WSSV 病毒及病毒 DNA 的提取

1.2.1 WSSV 病毒纯化

在本实验中的病毒是从已感染的克氏原螯虾 *Cambarus proclarki* 中提取,组织匀浆液置于缓冲液中,在 4 °C、5 500 g 离心 20 min,取上清液在 15 000 g、4 °C 条件下离心 60 min,沉淀重悬于含 35 % 蔗糖的缓冲液中,在 12 000 g 离心 10 min,得到的上清经过蔗糖梯度离心获得分离的病毒粒子。将提纯的病毒重悬于 0.4 mol/ml NaCl 中置于 -76 °C 中保存。

1.2.2 病毒 DNA 提取

将提纯的病毒置于 0.2 mg/ml 蛋白酶 K 和 1% 月桂酰肌氨酸钠中,在 65 °C 中静置 2 h。用氯仿和苯酚抽提后将得到的产物溶于 50 μ l TE。-20 °C 保存,作为 PCR 扩增模板。

1.3 PCR 扩增 vp28 基因

根据 GenBank 中已经发表的 vp28 的序列设计引物。

上游引物:CTACTCGAGATGGATCTTTCTTTCACTC(划线处为 *Xho*I 位点),

下游引物:TATAAGCTTTCGGTCTCAGTGCCA(划线处为 *Hind*III)。以病毒 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因 vp28。PCR 反应条件为:50 μ l 反应体系中含 50 μ l 10 \times PCR buffer,4 μ l 25 mmol/L MgCl₂,1 μ l dNTPs,上、下游引物各 0.5 μ l,0.5 μ l Taq DNA 聚合酶(5 U/L),0.5 μ l 模板。PCR 反应条件:94 °C 10 min,94 °C 30 s,51.0 °C 30 s 72 °C 1 min(8 个循环),94 °C 30 s,56.2 °C 30 s,72 °C 1 min(30 个循环),72 °C 10 min。取 2 μ l PCR 产物作 1 % 琼脂糖凝胶电泳,PCR 产物应在约 630 bp 处有 1 条扩增带。

1.4 表达载体质粒的构建、产物的表达及纯化

1.4.1 表达载体的构建

用 *Xho*I 和 *Hind*III 对 vp28 基因片段和质粒 pBAD/gIII A 进行双酶切,酶切片段经过 16 °C 连接过夜,然后转化到大肠杆菌 Top10 中,筛选重组体,提取重组载体质粒,并对该重组载体质粒进行测序鉴定。

1.4.2 目的产物 VP28 的表达

挑单菌落接种到含氨苄青霉素的新鲜丰富 LB 液体培养基中,37 °C 培养 8~10 h,之后按 1% 接种到新鲜的 LB 液体培养基中,37 °C 培养到 OD₆₀₀ 值为 0.6 时加终浓度为 0.4 mmol/L 的阿拉伯糖诱导,离心收集菌体。将菌体裂解后分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot。

1.4.3 纯化产物 VP28

将得到的裂解物沉淀收集,镍琼脂糖(北京正元基因公司)凝胶装柱,用缓冲液平衡 2~5 个床体积,将收集的沉淀重悬(50 mmol/L PBS,pH 7.4,0.5 mol/L NaCl)0.45 μm 滤膜过滤,上样流速 1 ml/min,选择在不同浓度的咪唑缓冲液进行梯度洗脱、收集。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

对诱导表达的包涵体上清、沉淀和空载体进行处理,SDS-PAGE 按 Laemmli(1970)的方法进行。Western-blot 分析是将 SDS-PAGE 分离的蛋白转移到 PVDF 膜上,在 4 °C 包被过夜(1% BSA,5% 脱脂奶粉,50 mmol/L Tris,200 mmol/L NaCl,pH 7.5)。加入抗体 Anti-His-HRP (1:3 000)在室温下孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,最后在 DAB 底物中直到有显色条带。

1.6 荧光显微镜观察 VP28 与对虾血细胞的作用

1.6.1 荧光素标记 VP28

荧光素 FITC 溶于 DMSO 中之后混合于 1 mg VP28 蛋白(1:20)。将混合物在室温下轻微振荡 2 h 后,过 G-50 葡聚糖凝胶柱,使得没有标记的荧光素和与 VP28 蛋白结合的荧光素分离。用相同的方法标记 BSA 作为对照组。

1.6.2 螯虾血细胞原代培养

将健康的克氏原螯虾用 75% 的乙醇拭擦,采用心脏取血。离心分离后,取血细胞重悬于 100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的 M199 培养基中。将细胞培养板密封后置于 28 °C 直到有 70%~80% 的单层贴壁细胞出现。将培养基和培养的血细胞分离之后,用 PBS 缓冲液洗涤细胞。

1.6.3 显微镜方法

每个孔内加入 200 μl 用 FITC 标记好的 VP28 蛋白(约 5 μg),在室温下作用 1 h 后用 PBS 洗两次,同时用 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole,Invitrogen)染核,荧光显微镜观察。FITC-BSA 作对照。

2 结果

2.1 PCR 扩增 WSSV-vp28 基因

根据 WSSV-vp28 核苷酸序列设计 PCR 引物,预测 PCR 所扩增的基因片段大小应为 615 bp 左右。将 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示,扩增出的片段大小与预测大小一致(图 1)。

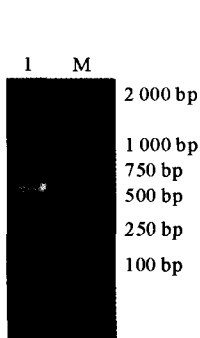
2.2 重组表达载体 pBAD/gIII A-VP28 的构建和鉴定

重组载体的构建如图 2 所示。扩增的 vp28 基因与 pBAD/gIII A 载体连接,转入 TOP10 中,蓝白斑筛选重组体,重组体进一步用双酶切和 PCR 法进行鉴定,结果如图 3。重组体双酶切后出现 1 个 615bp 和 4 kb 的片段,与 vp28 基因和 pBAD/gIII A 基因大小相符,表明目的基因已正确的克隆到表达载体 pBAD/gIII A 中。将重组质粒送到 TaKaRa 公司进行测序,结果表明,vp28 的开放阅读框(ORF)按设计正确插入载体中,且片段无碱基错误。

2.3 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

重组质粒 pBAD/gIII A-VP28 在常规诱导条件下,VP28 蛋白被诱导表达。SDS-PAGE 分析结果(图 4)显

示,在表达后的重悬菌包涵体沉淀中约 31kD 处有一明显的蛋白条带,而诱导后的空载体无 31kD 蛋白表达,初步显示 VP28 基因得以表达。



1. PCR 产物;2. DNA Marker
Lane 1, vp28 gene;
Lane M, DNA Marker
DL2000

图 1 PCR 扩增 WSSV vp28
Fig. 1 PCR amplification of
vp28 gene of WSSV

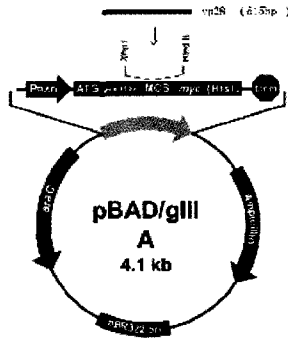
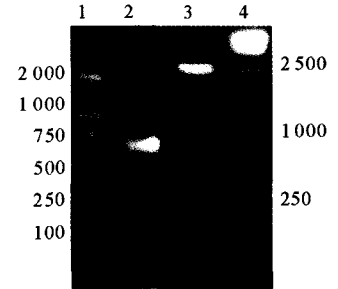


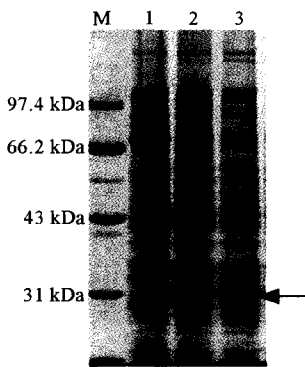
图 2 表达 vp28 基因的 pBAD/gIII A
载体简明构建图。(vp28 基因插入
XhoI 和 HindIII 两酶切位点)
Fig. 2 Schematic structure map of
the vector pBAD/gA carrying vp28
gene (The vp28 gene is inserted in
the XhoI and HindIII sites of the vector)



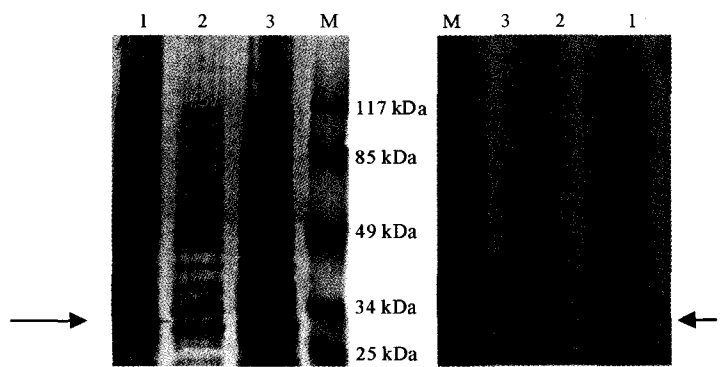
1, DNA Maker 2 000;2,酶切重组质粒;3,重组
质粒;4, DNA Marker 15 000
Lane 1, DNA Marker DL2 000; Lane 2,
restriction recombinants; Lane 3, recombinant;
Lane 4, DNA Marker DL15 000

图 3 双酶切分析重组的 pBAD/gIIIA-
vp28 质粒
Fig. 3 Restriction analysis of
recombinants pBAD/IIIA-vp28

为进一步确证 vp28 基因的表达,将表达的蛋白 SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜,以 Anti-His-HRP 为抗体,进行 Western 印迹分析。结果显示(图 5),表达蛋白能与 Anti-His-HRP 抗体发生特异性反应,进一步表明该融合蛋白含有 6×His 标签,蛋白表达正确。



1. 空载体对照;2,3, 重组 VP28;M,
Marker.
Lane 1, induced pBAD/gIIIA ; Lane
2. Lane 3, induced pBAD/gIIIA-
VP28; Lane M. Protein marker
图 4 SDS-PAGE 分析表达的
VP28(箭头示表达的 VP28)
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of
expressed VP28 in pBAD/gIIIA
(arrow indicated
recombinant VP28)



胶 A:1,重组 VP28 包涵体沉淀;2, 重组 VP28 包涵体上清;3,空载体对照;
M,Marker. 胶 B:1,2,3,M,与胶 A 相同
Gel A: The sample was as Gel B and sample was
analyzed by SDS-PAGE as a control. Lane 1, Induced pBAD/gIIIA-VP28 inclusion body sedi-
ment; Lane 2, Induced pBAD/gIIIA-VP28 inclusion body supernatant; Lane 3, Induced pBAD/
gIIIA; Line M, Protein marker . Gel B: rVP28 protein was separated by SDS-PAGE and
transferred to PVDF membrane and then incubated with anti-His antibody. Lane 1, Lane 2,
Lane 3, M, same as Gel A

图 5 Western-blot 分析表达的 VP28.
Fig. 5 Western-blot analysis of expressed VP28

2.4 荧光显微镜观察 VP28 与螯虾血细胞的作用

实验中复性后的 VP28 蛋白用荧光素 FITC 标记后与原代培养的克氏原螯虾的血细胞进行结合实验,在荧光显微镜下观察,只有 FITC 标记的 VP28 蛋白与螯虾的血细胞结合,而对照组 FITC 标记的 BSA 在荧光显微镜下并未观察到绿色荧光(图 6)。

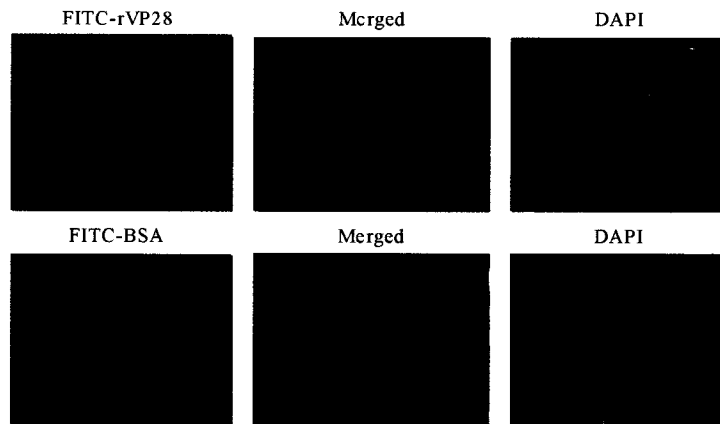


图 6 荧光显微镜下观察荧光素标记的重组蛋白 VP28 和 BSA 与螯虾血细胞的结合

Fig. 6 Observed binding phenomenon between labeled rVP28, BSA and hemocytes in vitro under microscopy

3 讨论

WSSV 主要是靠对虾摄食带病毒宿主而传播的。这一传播特点与该病毒的囊膜有很大的关系。无囊膜的 WSSV 核衣壳不具备感染性(He *et al.* 1999),在具完整囊膜的 WSSV 病毒体中 VP28 含量很高。因此,囊膜蛋白 VP28 在 WSSV 的侵染中起着重要的作用。许雅香等(2003)采用家蚕体系表达 vp28 基因,李方等(2003)采用毕赤酵母表达体系表达出 VP28。与杆状病毒表达系统和毕赤酵母表达系统相比,大肠杆菌表达系统更加具有廉价、高效、简便和无毒等特点,是一个被广泛应用的高效表达系统,在大规模生产中应用广泛,可获得大量纯化的表达产物作为免疫抗原或做其他研究(郑大勇等 2003;高云等 2001)。本实验中应用表达载体 pBAD/gIII A 表达出囊膜蛋白 VP28,SDS-PAGE 中有 1 条明显的条带在 31 kD 处,由于 pBAD/gIII A 载体中含有 $6 \times \text{His}$ 标签,所以人工诱导表达的 VP28 蛋白(31kD)比天然的 VP28 蛋白(28kD)要大一些,在 Western-blot 的结果中,表达的 VP28 蛋白由于包含了 $6 \times \text{His}$ 标签可以和 Anti-His-HRP 产生特异性的结合而显色,显色条带也在位于约 31kD 处,表明重组的 VP28 表达正确。生物活性分析表明,采用 pBAD/gIII A 载体表达的 vp28 蛋白与克氏原螯虾的血细胞有结合活性,这为进一步进行 WSSV 感染机制的研究提供技术依据。

参 考 文 献

- 何建国,周化民,姚泊. 1999. 白斑综合征杆状病毒(WSSV)的宿主范围和传播途径的研究. 中山大学学报,38(2):65~69
- 李方,叶巧真,何建国,王莉真. 2003. 白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP28 基因在毕赤酵母中的表达. 水产学报,27(5):491~494
- 郑大勇,罗荣城,蔡红兵. 2004. 基因工程抗体 anti-HBsAgFab 原核表达体系大规模培养条件的实验研究. 第一军医大学学报,24(5):517~520
- 高云,杨汉春. 2001. PRRS 病毒核衣壳蛋白在大肠杆菌中的高效表达. 中国兽医学报,21(5):438~440
- 黄健,宋晓玲,于佳. 1995. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. 海洋水产研究,16(1):1~10
- Chen, L. L., Leu, J. H., Huang, C. J., Chou, C. M., Chen, S. M., Wang, C. H., Lo, C. F., and Kou, G. H. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of trans-

- fected insect cells. *Virology*, 293: 44~53
- Chen, S. N. 1995. Current status of shrimp aquaculture in Taiwan. *Aquaculture Society Baton Rouge Louisiana, USA*, 29~34
- Lo, C. F., Ho, C. H., and Peng, S. E. 1996. White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organism*, 27: 215~225
- Laemmli UK. 1970. cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(7): 680~685
- Nouye, K., Miwa, S., and Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured Aarurna shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993; Electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol.* 29: 149~158
- Sritunyaluksana, K., Wannapapho, W., Lo, C. F., and Flegel, T. W. 2006. PmRab7 Is a VP28-Binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology*, 10 734~10 742
- van, Hulst, M. C. W., Wittteveldt, J., and Peters, S. 2001a. The white spot syndrome virus DNA genome. *Virology*, 286: 7~22
- van, Hulst, M. C. W., Wittteveldt, J., and Snippe, M. 2001b. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 185(2): 228~233
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J. E., and Sriurairatana, S. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organism*, 21: 69~77
- Yang, F., He, J., Lin, X. H., Li, Q., Pan, D., Zhang, X. B., and Xu, X. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 75: 11 811~11 820