

对虾白斑综合征病毒(WSSV)囊膜蛋白VP110 部分重组表达及其与对虾鳃细胞膜蛋白结合分析

张平^{1,2} 李晨¹ 黄捷^{1*} 梁艳¹ 刘庆慧¹ 刘莉¹

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学, 上海 201306)

摘要 将VP110基因的部分序列克隆到pET-28a载体中构建pET28a-*vp110b*重组质粒并进行原核表达,获得重组表达的蛋白rVP110-B;用rVP110-B注射凡纳滨对虾*Litopenaeus vannamei*后,经WSSV感染,实验表明,该蛋白注射使凡纳滨对虾感染WSSV的半数死亡时间比对照组延长了20%。用表达纯化的该重组蛋白制备了兔抗rVP110-B多克隆抗体,该抗体用于凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白与rVP110-B的Far-western分析显示,凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白中除90 kDa左右的血蓝蛋白外,在41.7 kDa存在结合条带,经质谱分析表明这条鳃细胞膜蛋白是肌动蛋白。

关键词 WSSV;VP110;原核表达;凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白;Far-western

中图分类号 S963.7 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0066-08

Partial expression of white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP110 and its binding activity with cellular membrane proteins of shrimp gills

ZHANG Ping^{1,2} LI Chen¹ HUANG Jie^{1*} LIANG Yan¹
LIU Qing-hui¹ LIU Li¹

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

(² Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

ABSTRACT VP110, an envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV), with a molecular weight of 110 kDa, has an Arg-Gly-Asp (RGD) structure domain and the ability of binding gill cells of the host. In order to study the role of VP110 in the WSSV infection of *Litopenaeus vannamei*, we designed a pair of primers according to the partial sequence of the gene *vp110* (*vp110-b*). The *vp110-b* was then amplified by PCR and cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-28a successfully. The pET28a-*vp110b* was transformed into *E. coli* BL21 cells, and a fusion protein rVP110-B (50 kDa) was

公益性行业(农业)科研专项经费(201103034)、现代农业产业技术体系(CARS-47)和中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费(20603022013009)、“泰山学者”建设工程专项经费和农业科研杰出人才培养计划项目共同资助

* 通讯作者。E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823062

收稿日期:2013-03-29;接受日期:2013-04-26

作者简介:张平(1988-),女,硕士研究生,主要从事病害分子生物学研究。E-mail: zhangping0716@163.com, Tel: 18604100503

expressed. The rVP110-B was injected into *L. vannamei*, and the protecting effect against WSSV infection was evaluated. The results showed that the half lethal time (LT_{50}) of *L. vannamei* treated with rVP110-B was prolonged by 20% compared to the control. Rabbit anti-VP110 polyclonal antibody, which was prepared with the expressed and purified rVP110-B, was used in the Far-Western analysis of gill cell membrane protein of *L. vannamei* and renatured rVP110-B. The Far-Western showed a protein band at MW of 41 kDa besides the band of hemocyanin at 90 kDa. Analysis of protein band by MALDI-TOFMS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) proved that this 41 kDa protein is actin.

KEY WORDS WSSV; VP110; Prokaryotic expression; Cellular proteins of *Litopenaeus vannamei* gills; Far-Western

近20年我国的对虾养殖业迅速发展,养殖规模不断增大。与此同时,不断暴发的对虾疾病给对虾养殖业带来了重大的经济损失。1992年暴发的对虾白斑综合征(WSSV)给对虾养殖业带来巨大的经济损失(李新新等 2012;孙凡等 2012)。病害暴发后,国内外不少的研究者利用生物学技术在分子水平研究 WSSV 病毒的流行病学(Soto *et al.* 2001;何建国等 1999)、理化特性(黄健等 1995)、基因组(Yang *et al.* 2001)、蛋白特性(朱艳冰等 2005;van Hulten *et al.* 2000)等,已经取得了一些突破性进展,WSSV 致病机理仍在不断深入探索中。病毒侵入宿主细胞进行增殖包括吸附、侵入、复制、装配和子代释放,而病毒阻断的研究主要是针对病毒与宿主靶细胞之间的结合和病毒的侵入过程,因此为了阻断 WSSV 对宿主的感染,找出与宿主结合的 WSSV 囊膜蛋白有重要意义。WSSV 约有 181 个开放性阅读框,其中包括 VP37、VP28、VP26、VP24、VP19、VP15、VP110 等结构蛋白,其中 VP37(Huang *et al.* 2002)、VP28(van Hulten *et al.* 2001;赵新颜等 2004)、VP19 和 VP110(Li *et al.* 2006)是囊膜蛋白,VP26、VP24 和 VP15 是核衣壳蛋白。

VP110 是 WSSV 含量较少的囊膜蛋白之一,有关在病毒侵染宿主中的作用报道较少(Li *et al.* 2006),本研究的目的是研究 VP110 与凡纳滨对虾的鳃细胞膜蛋白是否有结合作用,为研究 VP110 在 WSSV 侵染宿主时的作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料来源及处理

WSSV 病料由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室于 2011 年 6 月采集自河北沧州某养殖场;健康凡纳滨对虾购自山东省青岛市胶州某养殖场,大小约为 6 cm,运输到实验室后,暂养 7 d 后,随机取 3 只虾提取鳃组织 DNA 验证是否带毒。用于 WSSV 提取的病料由本实验室提供。病料经差速离心(Xie *et al.* 2005a)提取病毒种液,通过预实验确定病毒粗提液的最佳注射浓度为粗提液的 10^{-3} 倍。参考梁艳等(2005)方法提取凡纳滨对虾鳃细胞膜。

1.2 WSSV VP110 基因的分析 and 表达区的选取

因 VP110 含 972 个氨基酸,难以有效实现重组表达,因此需要选取能代表该主要基因功能的片段进行部分表达。采用 Accelrys Gene 2.5 对 VP110 基因的开放阅读框(ORF)及其翻译的蛋白序列进行分析,选取了 *vp110* 在 WSSV(GenBank: AF332095) *wsv35* 的第 1168 碱基到第 2457 碱基,命名为 *vp110-b*,此片段的翻译蛋白序列含有 RGD 位点,参考 Li 等(2006)选取 *wsv35* 的第 2281 - 2916 碱基用于抗体制备,命名为 *vp110-ag*。

1.3 WSSV 及其 DNA 的提取

采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN,北京)提取感染 WSSV 凡纳滨对虾的鳃组织 DNA。

参考 Xie 等(2005b)取 3-4 只濒死克氏原螯虾,剥离头胸甲去除肝胰腺后用剪刀剪碎放入 200 ml 预冷 TESP (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, pH 8.5, 使用时加入使用浓度为 1 mmol/L 的蛋白酶抑制剂 PMSF) 中 12000 r/min 冰浴匀浆 4 min, 在 4℃ 于 3836 × g 离心 5 min, 收集上清液, 过筛绢后以 30000 × g 在 4℃ 离心 30 min, 取灰白色沉淀, 重悬于 200 μl PBS, -80℃ 保存备用。

1.4 WSSV 的 *vp110-b* 的克隆

根据 *vp110-b* 的序列, 设计一对 PCR 引物, 并在两条引物 5' 端分别添加 *BamH* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点和保护性碱基 (表 1)。以提取的感染 WSSV 的凡纳滨对虾鳃组织 DNA 为模板, 在 25 μl PCR 体系 (0.8 mmol/L dNTP, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.05 U *exTaq* 酶, 0.4 mmol/L *BamH* I-*vp110bf*, 0.4 mmol/L *Hind* III-*vp110br*, 加 ddH₂O 到 25 μl 体系) 中扩增 *vp110-b* 片段。反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 30 个循环的 94℃ 50 s, 57℃ 90 s 和 72℃ 30 s; 最终于 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 凝胶回收试剂盒 (ZYMO, 美国) 回收, 加 *BamH* I 和 *Hind* III 限制性内切酶 (TaKaRa, 大连) 于 37℃ 水浴中酶切 3 h。经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收 1300 bp 左右的 DNA 片段。双酶切后的 PCR 扩增产物与双酶切后的 pET-28a 以 3:1 混合, 加入 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, 大连) 反应体系, 于 16℃ 连接 1 h, 连接产物中加 50 μl BL21 感受态细胞, 于冰上放置 30 min 后 42℃ 热激 45 s, 在卡那霉素抗性平板筛选, 得到阳性克隆 (命名为 *vp110b-pET28a-BL21*)。对克隆的插入片段采用 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切、菌落 PCR 和插入片段的序列测定验证克隆的正确性。

表 1 WSSV 囊膜蛋白基因 *vp110-b* 克隆引物

Table 1 The primers for the envelope protein gene *vp110-b* cloning

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	3'端位置 3' position
<i>BamH</i> I- <i>vp110bf</i>	5'-TATGGATCCTTG CGT CAA TCT TCT TCC TTG-3'	1187
<i>Hind</i> III- <i>vp110br</i>	5'-GCGAAGCTTGTCTA CTG AAA AAA TAT CGT CGG T-3'	2437

注: 斜体部分为引物 5' 端附加序列。3' 端位置指相对于 *vp110* 开放阅读框的碱基位置

Note: Italics is the 5' end sequence of the primer. The 3' end position relative to the base position in the *vp110* open reading frame

1.5 VP110-B 蛋白的诱导表达、纯化和复性

将 *vp110b-pET28a-BL21* 菌株接种在 LB 培养基 (10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 5 g/L 氯化钠, 30 mg/ml 卡那霉素) 中 37℃ 摇床培养至 $OD_{590nm} = 0.6 - 0.8$, 加 IPTG 至终浓度为 0.02%, 再经 4 h 培养进行诱导表达。培养物于 8000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 再以原菌液体积的 1/10 的 PBS (8 g/L NaCl, 2.8 g/L NaH₂PO₄ · 12H₂O, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L K₂HPO₄; pH 7.4) 重悬菌体, 于冰浴中超声破碎 1 min/ml, 于 10000 r/min 在 4℃ 离心 10 min 收集上清液和沉淀, 沉淀用洗涤液 (2 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 5% Trition-X100; pH 8.0) 洗 3 次以去除沉淀中的细胞壁以及各种脂类成分, 用 Buffer A (6 mol/L 盐酸胍, 50 mmol/L 磷酸盐, 0.3 mol/L NaCl; pH 6.3) 溶解包涵体, 经 0.45 μm 滤膜抽滤, 滤液过 Co²⁺ 树脂 (Clontech, 美国) 亲和层析柱, 目的蛋白纯化后梯度透析 (Maeda *et al.* 1996) 使其正确折叠成有活性的蛋白。纯化复性的 VP110-B 蛋白用 SDS-PAGE 检测。

1.6 VP110-B 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot

分别将 1.5 中经 IPTG 诱导后的 *vp110b-pET28a-BL21* 细胞裂解液上清、沉淀以及 IPTG 诱导前的菌体进行 SDS-PAGE。电泳结束后, 立即将条带电转印至 PVDF 膜 (Roche, 瑞士) 上, 将 PVDF 膜取出后, PBST 洗 3 次, 于 4℃ 用含 2% 牛血清白蛋白 (BSA, Roche, 瑞士) 的 PBST 溶液封闭 PVDF 膜过夜, 膜清洗后在 1:1 的 Anti-His-HRP (Clontech, 美国) 的 PBST 溶液中 37℃ 孵育 2 h, 然后用 PBST 洗 3 次, 最后在 DAB 底物溶液 (Thermo, 美国) 中显色 10 min。

1.7 抗 VP110 兔血清的制备

参考 Li 等(2006),按上述方法克隆并表达纯化预测的位于 VP110(GenBank: AF332095) wsv35 的762-972氨基酸的主要的抗原片段 VP110-Ag,用 VP110-Ag 对新西兰大白兔进行背部皮下免疫注射,每只每次注射量为1 mg,初次使用 1:1 体积的弗氏完全佐剂(Sigma,美国)与 VP110-Ag 制备的疫苗注射,再进行3次加强免疫,用 1:1 体积的弗氏不完全佐剂(Sigma,美国)与 VP110-Ag 制备的疫苗注射,时间间隔依次为 7、14、7、14 d;最后一次加强免疫 7 d 后心脏取血,4℃放置过夜,6000 r/min 离心 15 min 后,兔抗 VP110 抗血清与转化了 pET-28a 空质粒的大肠杆菌 BL21 细胞经超声破碎的沉淀于 37℃孵育 3 h 后于 4℃以 6000 r/min 离心 10 min;取上清液为纯化的抗体,以消除非目的抗原蛋白的干扰。将血清分装成 20 μl/支,储存于 -80℃备用。

1.8 ELISA 检测兔抗 VP110 血清效价

VP110-Ag 与包被液(1.59 g/L Na₂HCO₃, 2.93 g/L Na₂CO₃)充分混合后每孔包被 50 μl,蛋白量为 5 μg;PBST(含 0.5% Tween-20 的 PBS 溶液,pH 7.4)洗 3 次,然后用含 5% BSA 的 PBST 于 37℃封闭 2 h,制备的抗血清经含 5% BSA 的 PBST 稀释成 1/1000 和 1/2500,再按两倍系列稀释至 1/40000,每孔加入 100 μl,每个梯度做 3 个平行,37℃孵育 2 h;PBST 清洗后,每孔加入 100 μl 1:1 的 HRP 标记羊抗兔抗体(TaKaRa,大连),37℃孵育 90 min;清洗后,加 100 μl TMB 底物溶液(天根,北京)显色 10 min,最后加入 2 mol/L H₂SO₄终止反应,在 Thermo Variokan Flash 荧光酶标仪(Thermo,美国)上测定 OD_{450nm}值。

1.9 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白与 VP110-B 的 Far-Western blotting

将提取的凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白、BSA 和 rVP110-B 进行 SDS-PAGE,条带经电转印到 PVDF 膜上,在含 2% BSA 的 PBST 中封闭过夜,PBST 洗膜 3 次后,用 rVP110-B 与 PVDF 膜 37℃孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次,将膜在 1:1 的 6×His 抗体(用 PBST 稀释)中于 37℃孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,再将膜在 1:1 的羊抗兔 IgG-HRP 中于 37℃孵育 1 h,用 PBST 洗 3 次,最后在 DAB 底物溶液(Thermo,美国)中显色 10 min。

1.10 rVP110-B 对 WSSV 感染的保护作用

将暂养 8 d 的 180 尾凡纳滨对虾分为 3 组,分别为阴性对照组(N)、实验组(T)和阳性对照组(P),每组设 3 个平行,每个平行 20 尾凡纳滨对虾。N 和 P 组的对虾注射 50 μl PBS,T 组注射 50 μl 的 0.6 mg/ml 重组蛋白,3 d 后,P 和 T 组注射 50 μl 稀释到 1/1000 的 WSSV 毒种液。

2 结果

2.1 WSSV vp110-B 克隆

WSSV 囊膜蛋白基因 vp110 的 ORF 第 1168-2457 碱基的片段(vp110-b)经 PCR 克隆,被插入到 pET-28a 载体上并转化到 *E. coli* BL21 中。从 vp110b-pET28a-BL21 提取质粒,分别经 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切和 vp110-b 引物的 PCR 扩增表明,vp110-b 已经成功插入到质粒载体上(图 1A、B)。测序表明,重组质粒中插入的外源 DNA 序列与所设计的 vp110-b 序列完全相符。重组表达的蛋白 rVP110-B 为融合表达,其 N 端加上了载体上的 34 个氨基酸,包含 6×His 标签,其 C 端加上了载体上 18 个氨基酸,其中有 6×His 标签的肽段,所形成的融合蛋白共有 482 个氨基酸,估计分子量为 53 kDa。

2.2 重组蛋白 rVP110-B 的原核表达、纯化和复性

在 IPTG 的诱导下,vp110b-pET28a-BL21 成功表达了重组蛋白 rVP110-B。经 IPTG 诱导后的 vp110b-pET28a-BL21 和 pET28a 空质粒转化的 BL21 菌株的细胞用超声破碎,其上清液和沉淀经 SDS-PAGE,显示细胞破碎的上清液和沉淀中均有表达的 rVP110-B 条带(图 2A)。采用抗 6×His 抗体对诱导表达的产物进行 Western blot 分析(图

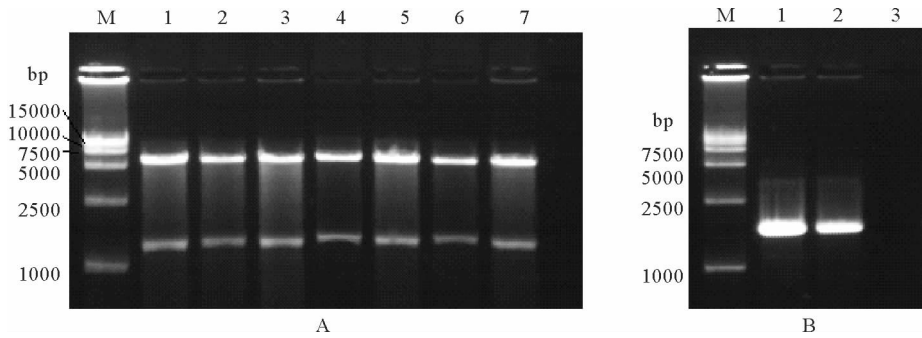


图1 vp110b-pET28a-BL21 质粒的限制性分析和 PCR 扩增验证

Fig.1 Validation of the recombinant plasmid from the vp110b-pET28a-BL21 by restriction analysis and PCR amplification

A. 重组质粒 vp110b-pET28a 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切; M: 分子量标准, 1-7: vp110b-pET28a 重组质粒双酶切。B. 从 vp110b-pET28a-BL21 重组菌中用 PCR 扩增 vp110-B; M: 分子量标准, 1 和 2: vp110-B 的菌落 PCR, 3: 空白对照

A. Restriction analysis of recombinant pET28a-VP110; M: Marker, Lane 1-7: *Hind* III and *Bam*H I cleaved vp110b-pET28a. B. PCR amplification of vp110-B from the colony of vp110b-pET28a-BL21. M: Marker, Lanes 1 and 2: vp110-B amplification by colony PCR; Lane 3: Blank control

2B), 结果显示 vp110b-pET28a-BL21 的包涵体蛋白中存在约 50 kDa 带 6 × His-tag 的融合蛋白带, 该分子量与设计的 rVP110-B 融合蛋白基本相符。蛋白经 Co^{2+} 亲和层析纯化后复性过程中出现沉淀, 使用时离心取上清。

2.3 兔抗 VP110 抗体的制备和效价测定

参考 Li (2006) 对 VP110 ORF 的抗原性进行了分析, 确定 720-972 氨基酸有较强的抗原性。经克隆和表达获得 VP110-Ag (图 3)。经对新西兰大白兔免疫注射, 收集的抗血清经吸附法去除非特异性抗体后, 用 ELISA 测定抗体效价, 结果表明制备的兔抗 VP110 抗血清的抗体效价为 20000:1 (图 4)。

2.4 对虾鳃细胞膜蛋白与 rVP110-B 的 Far-Western blotting 及互作蛋白的鉴定

凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白、rVP110-B 和 BSA 的 SDS-PAGE (图 5A 和图 5a) 转印到 PVDF 膜, 与 rVP110-B 进行 Far-Western blotting, 结果显示, 纯化的 rVP110-B 在 50 kDa 左右出现了预计的条带; 而 BSA 泳道无条带出现, 表明 Far-Western blotting 的显色结果正常; 这时凡纳滨对虾鳃细胞

膜泳道在 41.7 kDa 出现了显色条带, 80 kDa 左右也出现了血蓝蛋白较深的显色条带 (图 5B)。为了排除 Anti-His 抗体与对虾的某些蛋白存在结合的可能性, 直接将转印有上述样品的 SDS-PAGE 的 PVDF 膜与 HRP-His 抗

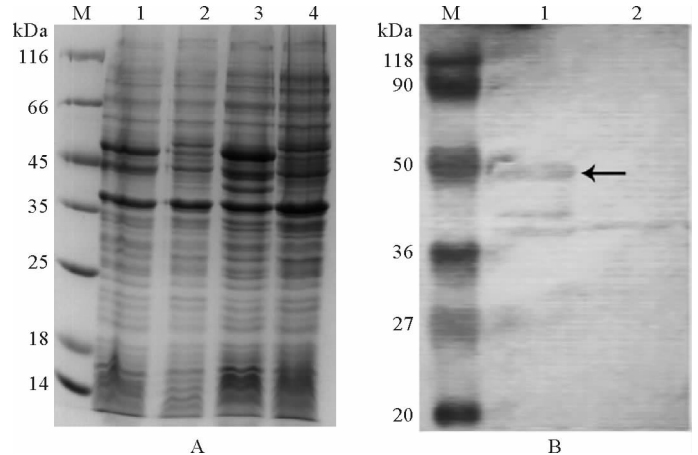


图2 重组融合蛋白 rVP110-B 诱导表达的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig.2 SDS-PAGE and Western blotting of the fusion protein rVP110-B

A. 2% IPTG 诱导的 *E. coli* 细胞经超声破碎抽提物的 SDS-PAGE, M: Marker, 1: vp110b-pET28a-BL21 经处理后的上清液, 2: pET28a-BL21 经处理后的上清液, 3: vp110b-pET28a-BL21 经处理后的沉淀, 4: pET28a-BL21 经处理后的上清液。B. 2% IPTG 诱导的 *E. coli* 细胞经超声破碎提取物的 Western blotting, M: Marker, 1: vp110b-pET28a-BL21 经处理后的沉淀, 2: pET28a-BL21 经处理后的沉淀

A. SDS-PAGE of the ultrasonic debris of *E. coli* BL21 cells induced with 2% IPTG. M: marker, Lane 1: supernatant from pET28a-VP110-BL21 cells, Lane 2: supernatant from pET28a-BL21 cells, Lane 3: sediment from vp110b-pET28a-BL21 cells, Lane 4: sediment from pET28a-BL21 cells; B. Western blotting of the ultrasonic debris of *E. coli* cells induced with 2% IPTG. M: marker, Lane 1: sediment from vp110b-pET28a-BL21 cells, Lane 2: sediment from pET28a-BL21 cells

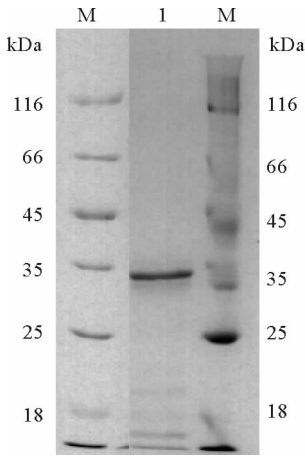


图3 rVP110-Ag 纯化后的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of purified rVP110-Ag

M: Marker; 1: 纯化后 VP110-Ag

M: Marker; 1: purified rVP110-Ag

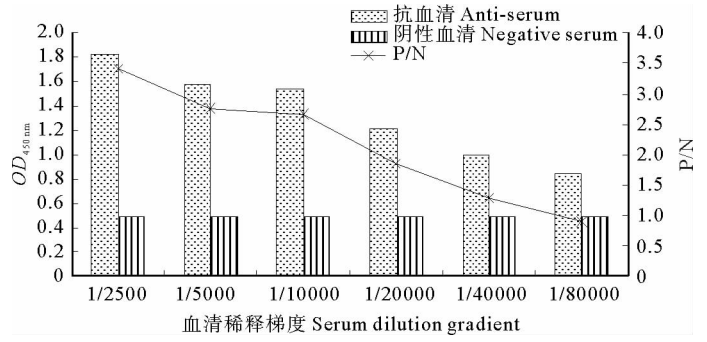


图4 兔抗 VP110 血清的抗体 ELISA 效价测定

Fig.4 ELISA potency determination of rabbit anti-VP110 serum antibody

体孵育后用 DAB 显色,显示对虾鳃细胞膜蛋白在血蓝蛋白处仍出现较弱显色(图 5B),表明 Far-Western blotting 中显色的血蓝蛋白条带不能排除是与抗体的非特异性结合作用,因此 Far-Western blotting 中与 rVP110-B 有特异性结合作用的鳃细胞膜蛋白条带应该是分子量在 41.7 kDa 的那一条。将 SDS-PAGE 中 41.7 kDa 条带切下,进行质谱分析,结果表明这条带为肌动蛋白(Actin)(图 6)。

2.5 rVP110-B 对 WSSV 感染对虾的保护作用

用 30 μg rVP110-B 注射凡纳滨对虾,暂养 3 d 后,再注射稀释度为 10⁻³ 的病毒粗提液,进行 15 d 的暂养观察。结果表明,经 rVP110-B 注射和未经 rVP110-B 注射的凡纳滨对虾的累积死亡率相近,分别达到 100% 和 97%,未经 WSSV 感染的凡纳滨对虾无死亡。但注射过 rVP110-B 的凡纳滨对虾的发病死亡过程较未注射 rVP110 的凡纳滨对虾的明显减缓,死亡过程在感染后 5-8 d 的累积死亡率出现显著差异,使后者的半数死亡

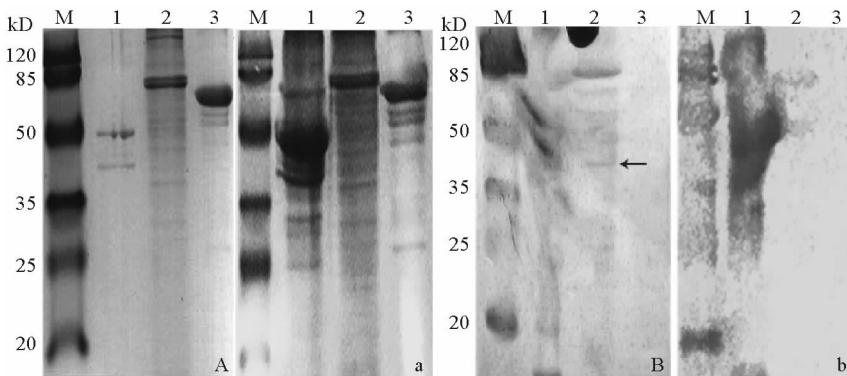
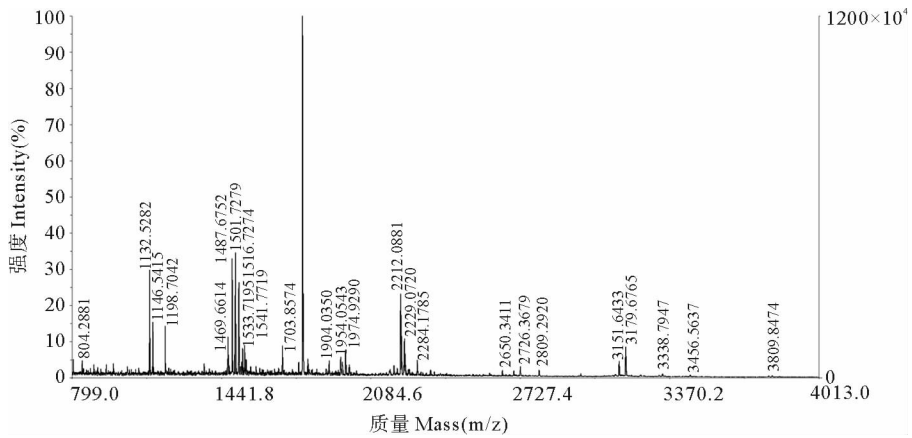


图5 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白的 SDS-PAGE 和 Far-Western blotting

Fig.5 SDS-PAGE and Far-Western blotting of the gill cellular membrane protein of *L. vannamei*

A, a: SDS-PAGE 的考马斯亮蓝染色; B: 用 rVP110-B 和 HRP 偶联的 anti-His 抗体进行的 Far-Western blotting; b: 只用 HRP 偶联的 anti-His 抗体进行的 Western blotting; 泳道 M: Marker, 泳道 1: rVP110-B, 泳道 2: 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白, 泳道 3: BSA

A and a: the Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE; B and b: the SDS-PAGE was processed by Far-Western blotting with rVP110-B and HRP conjunct anti-His antibody subsequently; b: the SDS-PAGE was processed by Western blotting with HRP conjunct anti-His antibody only. Lane M: Marker, Lane 1: rVP110-B, Lane 2: gill cellular membrane protein of *L. vannamei*, Lane 3: BSA



1	MCDDDVSPLV	VDNGSGMVKA	GFAGDDAPRA	VFPSIVGRPR	HQGVVMGMGQ	KDAYVGVDEAQ
61	SKRGILTKY	PIEHGITNW	DDMEKIWHHS	FYNELRVAPE	ESPVLLTEAP	LNPKANREKM
121	TQIMFETFNT	PAMYVAIQAV	LSLYASGRIT	GIVLDTGDGV	THTVPIYEGY	ALPHAILRLD
181	LAGRDLTAYL	MKIMTERGYS	FTTAEEREIV	RDIKEKLCYV	ALDFESEMNV	AAASSSLEKS
241	YELPDGQVIT	IGNERFRCPPE	SLFQPSFLGM	ESVGIHETVY	NSIMRCDIDI	RKDLFANNVL
301	SGGTTMYPGI	ADRMQKEITA	LAPSTIKIKI	IAPPERKYSV	WIGGSILASL	STFQSMWITK
361	EEYDESGPGI	VHRKCF				

图6 凡纳滨对虾鳃细胞膜蛋白与 rVP110-B 交互蛋白的质谱分析 (MALDI-TOFMS)

Fig. 6 MALDI-TOF mass spectrometry of interaction protein between *L. vannamei* gill cell membrane protein and rVP110-B

时间明显延长,前者的平均半数死亡时间为 100 h,后者则为 124 h(图 7),表明 rVP110 的注射对 WSSV 的感染起到了一定的保护作用。

3 讨论

近年来, WSSV 蛋白与宿主细胞之间的相互作用在 WSSV 致病机理的研究中受到较多关注, Liang 等(2005)研究表明, WSSV 囊膜蛋白与对虾细胞存在结合活性,其中 VP37 被鉴定为一种 WSSV 的病毒粘附蛋白(VAP),与 VP37 发生相互作用的对虾细胞膜蛋白也被发现。VP110 被证明是 WSSV 的一种囊膜蛋白(Yang *et al.* 2006),但它在

WSSV 侵染对虾的过程中的作用尚不明确。本研究采用原核表达系统分别成功表达了包含 VP110 的 RGD 功能域的约 472 个氨基酸的片段 VP110-B 和包含 VP110-B 内具有较高抗原性的 210 个氨基酸片段 VP110-Ag。经纯化和复性后的 rVP110-B 蛋白注射到凡纳滨对虾表现出了对 WSSV 感染的一定的保护作用。利用 VP110-Ag 免疫接种新西兰大白兔制备了 VP110 的多克隆抗体。通过 Far-Western blotting 初步筛选出与 rVP110-B 可能存在相互作用的凡纳滨对虾肌动蛋白,为研究 VP110 在病毒侵染宿主细胞时的作用提供参考。

本研究还在 rVP110-B 表达的同时,尝试表达 VP110 全长,实验结果显示,以 pET-28a 为载体以包涵体形式表达,大小约为 118 kDa,包涵体中纯化的目的蛋白在复性时总是出现沉淀,经调整甘油含量、 K^+ 浓度,添加还原型谷胱甘肽,延长复性透析时间(方敏等 2001;高永贵等 2003),使用表面活性剂(弓冈良辅等 2011),均不能获得正常复性的可溶性蛋白,无法对完整的 VP110 蛋白的活性开展研究。

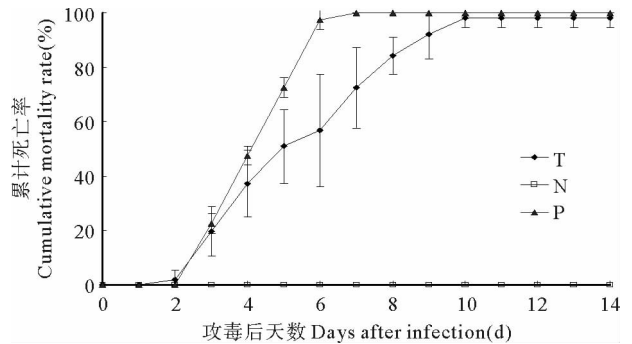


图7 凡纳滨对虾注射 rVP110-B 后对 WSSV 感染的保护作用

Fig. 7 The protection effect of rVP110-B against

WSSV infection in *L. vannamei*

T: 实验组; N: 阴性对照组; P: 阳性对照组

T: Experimental group; N: Negative control; P: Positive control

本研究观察到 rVP110-B 与肌动蛋白可能存在相互作用。研究表明, WSSV 的多个蛋白可与对虾细胞的肌动蛋白发生相互作用, Xie 等(2005b)发现 VP26 与日本对虾的肌动蛋白有结合活性, WSSV 病毒在侵入细胞的过程中与肌动蛋白具有结合作用, 牵引病毒进入宿主细胞内(Ward *et al.* 2001; Rietdorf *et al.* 2001; Hollinshead *et al.* 2001)。本研究结果进一步说明肌动蛋白在 WSSV 侵入宿主时有重要的作用。

参 考 文 献

- 方敏, 黄花樑. 2001. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. 生物工程学报, 17(6): 608-612
- 朱艳冰, 杨丰. 2005. 对虾白斑综合征病毒类锌脂蛋白基因(*wst063*、*wst069* 和 *wst477*)的表达和纯化. 厦门大学学报(自然科学版), 44(5): 697-700
- 孙凡, 刘庆慧, 黄捷. 2012. 白斑综合征病毒感染对凡纳滨对虾热休克蛋白 60 和 90 表达的影响. 渔业科学进展, 33(2): 90-95
- 李新新, 刘庆慧, 张秀丽, 黄捷. 2012. 对虾白斑综合征病毒 VP28 酵母表面展示. 渔业科学进展, 33(1): 61-65
- 何建国, 莫福. 1999. 对虾白斑综合征病毒暴发流行与传播途径、气候和水体理化因子的关系及其控制. 中国水产, 7: 34-37, 41
- 高永贵, 关怡新, 姚善泾. 2003. 包涵体蛋白的变复性研究. 科技通报, 19(1): 11-14
- 黄捷, 于佳, 宋晓玲, 孔杰, 杨丛海. 1995. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究. 海洋水产研究, 16(1): 11-23
- 梁艳, 黄捷, 易志刚, 张培军. 2005. 对虾组织膜蛋白制备方法及其多肽组成. 中国水产科学, 12(3): 348-351
- 弓冈良辅, 江岛大辅. 2011. 蛋白质的折叠方法. P: CN 102089319 A
- 赵新颜, 魏聪, 戴玲芬, 高宏, 戴和平. 2004. 对虾白斑综合征病毒结构蛋白 VP28 的厚核表达和性质研究. 水生生物学报, 28(3): 234-239
- Hollinshead M, Rodger G, Van Eijl H and 4 others. 2001. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. J Cell Biol 154(2): 389-402
- Huang C, Zhang X, Lin Q and 2 others. 2002. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. J Gen Virol 83(10): 2385-2392
- Li L, Lin S, Yang F. 2006. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus. J Gen Virol 87(7): 1909-1915
- Liang Y, Cheng J J, Yang B and 1 other. 2010. The role of F₁ ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Virol J (7): 144-152
- Liang Y, Huang J, Song XL and 2 others. 2005. Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. Dis Aquat Org 66(1): 81-85
- Maeda Y, Ueda T, Imoto T. 1996. Effective renaturation of denatured and reduced immunoglobulin G *in vitro* without assistance of chaperone. Protein Eng 9(1): 95-100
- Rietdorf J, Ploubidou A, Reckmann I and 5 others. 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. Nat Cell Biol 3(11): 993-1001
- Soto MA, Lotz JM. 2001. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. J Invert Pathol 78(1): 9-15
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Snippe M and 1 other. 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virol 285(2): 228-233
- van Hulten MC, Goldbach R, Vlak JM. 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. J Gen Virol 81(10): 2525-2529
- Ward BM, Moss B. 2001. Visualization of intracellular movement of vaccinia virus virions containing a green fluorescent protein-B5R membrane protein chimera. Virol 75(10): 4802-4813
- Xie X, Li H, Xu L and 1 other. 2005a. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. Virus Res 108(1): 63-67
- Xie X, Yang F. 2005b. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. Virol 336(1): 93-99
- Yang F, He J, Lin XH and 4 others. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J Virol 75(23): 11811-11820