

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 与 WSSV 的体外相互作用*

关广阔^{1,2} 刘庆慧^{2,3}① 黄 健^{2,3}

(1. 上海海洋大学 上海 201306; 2. 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; 3. 青岛国家海洋科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 Tetraspanin-3 是四跨膜蛋白超家族的一员, 在信号转导和免疫等过程中起到重要作用。本研究将中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 (FcT₃)的大胞外环区(Large extracellular loop, LEL)基因片段克隆, 与原核表达载体 pBAD/gIII A 连接, 获得重组表达载体 pBAD/gIII A-T₃L, 转化入大肠杆菌 TOP 10 中, 用 L-阿拉伯糖(L-Arab)诱导并经钴离子亲和层析纯化得到重组蛋白。质谱分析显示, 纯化的重组蛋白为 FcT₃。用地高辛将 FcT₃L 标记并与 WSSV 作用, Far-western 分析显示, FcT₃L 与 VP26 结合。ELISA 实验结果显示, FcT₃L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 量的增加而增强。推测 FcT₃ 通过与 VP26 作用介导病毒核衣壳的入胞过程。

关键词 中国明对虾; Tetraspanin-3; WSSV; 相互作用

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0056-07

对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)自 20 世纪 90 年代被发现以来, 在世界范围内给对虾养殖业造成了巨大损失(Chou *et al.*, 1995; 黄健等, 1995; Zhan *et al.*, 1998)。WSSV 具有宿主范围广、致死率高等特点(何建国等, 1999), 国内外学者针对 WSSV 的致病机理开展了大量的研究, 取得了明显的进展, 但限于 WSSV 基因组的复杂性, WSSV 如何利用宿主分子进行感染尚有许多未知之处。

Tetraspanin-3 蛋白是四跨膜蛋白超家族的一员, 该超家族蛋白在细胞膜表面进行四次跨膜, 在细胞膜外侧形成大、小两个胞外环(Large Extracellular Loop, LEL 和 Small Extracellular Loop, SEL)及在细胞膜内侧形成 N 端和 C 端末部, 且各区域表现出不同的功能(Maecker *et al.*, 1997)。LEL 区主要介导蛋白与蛋白间的相互作用(Stipp *et al.*, 2003)。四跨膜蛋白参与细胞活化、增殖、粘附、分化等过程, 此外, 在病毒侵染、癌变和免疫过程中也起到重要作用(Hemler, 2003;

Meerlo *et al.*, 1992)。Todd 等(1998)从人 cDNA 库中鉴定并测序得到 Tetraspanin-3 序列。Wang 等(2010)首次从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中克隆得到 Tetraspanin-3 (FcT₃), 荧光定量分析显示, 其表达量在 WSSV 侵染后明显上调。Gui 等(2012)通过 FcT₃ 抗体中和及 RNAi 技术证明, 封闭 FcT₃ 的 LEL 区可以抑制 WSSV 的侵染, 说明 FcT₃ 蛋白可能在 WSSV 侵染中起重要作用, 但 FcT₃ 是否直接通过与 WSSV 作用进而参与 WSSV 的感染尚不清楚。本研究将 FcT₃ 蛋白 LEL 区(FcT₃L)进行原核表达, 利用 Far-western 及 ELISA 技术筛选出 FcT₃ 与 WSSV 的相互作用蛋白, 为深入探讨 FcT₃ 介导 WSSV 的感染提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

WSSV、表达载体 pBAD/gIII A 由中国水产科学

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、泰山学者"建设工程专项经费"和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。关广阔, E-mail: guan871026@sina.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-11, 收修改稿日期: 2015-01-26

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保存; 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞、海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; *Taq* 酶、RNAiso、PrimerScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 及 DNA 标准(DNA Marker DL2000)购自 TaKaRa 公司; T_4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 及蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 地高辛(DIG)购自 Roche 公司; 氨苄青霉素、L-阿拉伯糖(L-Arab)、质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; 胶回收试剂盒购自 ZYMO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中国明对虾肌肉 cDNA 合成 剪取中国明对虾肌肉组织, 加入 RNAiso, 依照 RNAiso 试剂盒说明书提取 RNA。提取的 RNA 用 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒进行反转录成 cDNA, -20°C 保存备用。

1.2.2 FcT_3L 基因的克隆 根据 GenBank 公布的中国明对虾 T_3 (FcT_3) mRNA 序列(EF032649), 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 并分别于上下游引物添加限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 酶切位点, 引物序列为: F: 5'-GACTCGAGACCGATGAAGCTGAA-GA-3'; R: 5'-CGTCTAGAGCATTCTGCAGATCATC-3'。以反转录的 cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因。PCR 程序为: $25\ \mu\text{l}$ 体系, 94°C , 预变性 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 扩增 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带用胶回收试剂盒回收纯化。

1.2.3 重组表达载体 pBAD/gIII A- T_3L 的构建 用 *Xba* I 和 *Xho* I 对已纯化的目的条带及载体 pBAD/g III A 进行双酶切, 酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收目的条带, 用 T_4 连接酶连接目的片段及载体, 将重组载体转化到 *E. coli* TOP 10 感受态细胞中, 涂布 LB 平板(氨苄青霉素浓度为 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$), 在 37°C 培养 14 h 后, 挑取单克隆菌落至 LB 液体培养基中(氨苄青霉素浓度为 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)培养, 菌落 PCR 检测重组转化结果, 选取阳性菌液送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.2.4 重组载体 pBAD/gIII A- T_3L 的诱导表达 将测序正确的菌液以 1% 比例接种至 LB 培养基中(氨苄青霉素浓度为 $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)扩大培养, 37°C 振荡培养 5 h 后 ($OD_{600\text{nm}}=0.5-0.6$), 添加 L-阿拉伯糖至终浓度为 $0.2\ \text{g}/\text{L}$, 继续诱导表达 4 h。8000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 加入 PBS 重悬后超声波破碎, 破碎液进行 SDS-PAGE 检测分析。以未诱导的重组菌体破碎液作为对照。

1.2.5 Co^{2+} 亲和层析纯化蛋白 破碎液经 12000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 将沉淀用 A 液(含 $6\ \text{mol}/\text{L}$ 盐酸胍)溶解后, 于 4°C 条件下, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 上清液分别经 $0.8\ \mu\text{m}$ 和 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。将树脂装入层析柱中, 先用 PBS 平衡洗柱, 用 A 液将紫外吸收峰洗至 0, 加入蛋白上清液, 先用 A 液将峰值洗脱至 0, 然后用 $150\ \text{mmol}/\text{L}$ 咪唑洗脱, 收集重组蛋白, 尿素梯度复性液中复性透析, SDS-PAGE 分析纯化结果。

1.2.6 质谱分析 MALDI-TOF-MS 考染样品的酶解与混合肽段提取: 用手术刀准确切割经 SDS-PAGE 分离后的蛋白质亚基条带, 置于小离心管中。加入 $100\ \mu\text{l}$ 50% 乙腈 + $50\ \text{mmol}/\text{L}$ 碳酸氢铵, 将之脱色 20 min 左右; 重复此步骤两次; 加入 $100\ \mu\text{l}$ 100% 乙腈, 干胶约 10 min; 然后弃去乙腈, 放入烘箱中 37°C 条件下 5-10 min; 加入 $12.5\ \text{ng}/\mu\text{l}$ 的 Trypsin 酶溶液 5-10 μl , 置于 4°C 冰箱中 30 min, 取出后于 37°C 条件下酶解过夜; 加入 $60\ \mu\text{l}$ 50% 乙腈 + 0.1% TFA, 常温下放置 30-40 min, 将溶液转移至 96 孔板中, 重复 2-3 次; 然后将此肽段溶液于氮气流下吹干浓缩, 备用。

MALDI-TOF-MS 鉴定: 重新将干燥肽段溶解于 $0.7\ \mu\text{l}$ $0.5\ \text{g}/\text{L}$ CHCA 溶液(溶剂, 0.1% TFA + 50% ACN)中, 然后将其点到 MALDI 靶板上, 自然干燥。用 4700 串联飞行时间质谱仪[4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, 美国)]进行质谱分析, 将质谱所得所有肽段的质量数及其 MS/MS 图谱(碎片离子质量数)用 Mascot (网址: <http://www.matrixscience.com>, Matrix Science Ltd, UK)中的搜索功能(MS/MS Ions Search)与数据库中相应肽段的理论质量数以及其 MS/MS 裂解图谱进行相关性比较、检索、鉴定。

1.2.7 DIG 标记 FcT_3L 及 VP26 用枪头取少量 DIG 粉末溶于 DMSO 中, 分别加入纯化的 FcT_3L 和 VP26 蛋白, 旋转混合仪中混匀 2 h, 4°C PBS 溶液中透析, 去除过量的 DIG。

1.2.8 Far-western 分析 FcT_3L 与 WSSV 蛋白的相互作用 将已提纯的 WSSV 病毒液进行 15% SDS-PAGE 后, 转印至 PVDF 膜上, 4°C 条件下封闭液(PBS+5% BSA)中封闭过夜, PBS-T 清洗后加入 FcT_3L 蛋白, 4°C 条件下孵育 12 h, PBS-T 清洗后加入 1:5000 稀释的 HRP-6 \times His 抗体, 于 4°C 条件下孵育过夜, PBS-T 清洗后用 DAB 试剂盒显色。将已表达纯化的 WSSV 重组蛋白 VP26、VP28C、VP28N、VP37 按上述方法转印至 PVDF 膜上, 4°C 条件下封闭液中封闭过夜, PBS-T 清洗后加入 DIG 标记的 FcT_3L 蛋白, 4°C 条件下孵育 12 h, PBS-T 清洗后加入 Anti-DIG-AP (1:3000), 4°C 条件下

孵育过夜, PBS-T 清洗后用 BCIP/NBT 显色液显色。

1.2.9 ELISA 检测 VP26 与 FcT₃L 的相互作用 用包被液将纯化的重组蛋白 FcT₃L 稀释为 0.02 μg/μl, 向 96 孔板的每孔中加入 50 μl 稀释液, 4℃ 过夜包板。PBST 清洗后, 加入封闭液, 37℃ 封闭 2 h, PBST 洗板。加入 50 μl 含不同总量的 DIG-VP26 蛋白(50 μl 中所含蛋白总量分别为 0.01、0.1、1.0、5.0 μg), 37℃ 孵育 2 h, PBST 洗板。加入碱性磷酸酶(AP)标记的抗 DIG 抗体(Anti-DIG-AP, 1 : 5000 稀释), 37℃ 孵育 2 h, PBST 洗板后, 加入 50 μl PNPP 显色液, 室温下至出现明显颜色时, 加入 0.3 mol/L 的 NaOH (50 μl) 中止反应。酶标仪测定 405 nm 处吸光度值。同时设 BSA 为阴性对照组, 每组设 3 个平行。P/N 计算公式: $P/N = (OD_{405\text{ nm}} - OD_{405\text{ nm 空白}}) / (OD_{405\text{ nm BSA}} - OD_{405\text{ nm 空白}})$ 。

2 结果

2.1 重组表达载体 pBAD/gIII A-T₃L 的构建

用设计的引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 扩增片段为 300 bp, 与理论值一致(图 1)。将 PCR 扩增产物经胶回收纯化及双酶切后, 与酶切的 pBAD/g III A 质粒连接并转化感受态细胞 TOP10 中, 菌落 PCR 结果显示(图 2), 在 500 bp 左右有目的条带, 初步确定为阳性克隆。将 PCR 阳性克隆进行测序, 测序结果显示, 重组体序列正确。

2.2 基因表达产物的分析

将诱导后的菌液进行超声波破碎后, 将破碎液进

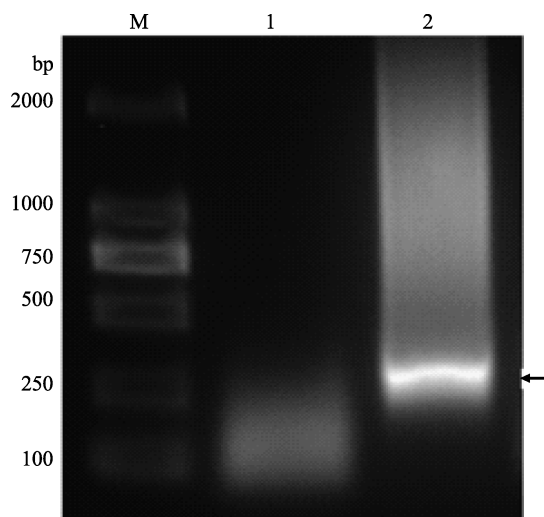


图 1 PCR 扩增 FcT₃L
Fig.1 PCR amplification of FcT₃L

M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照 Negative control;
2: FcT₃L

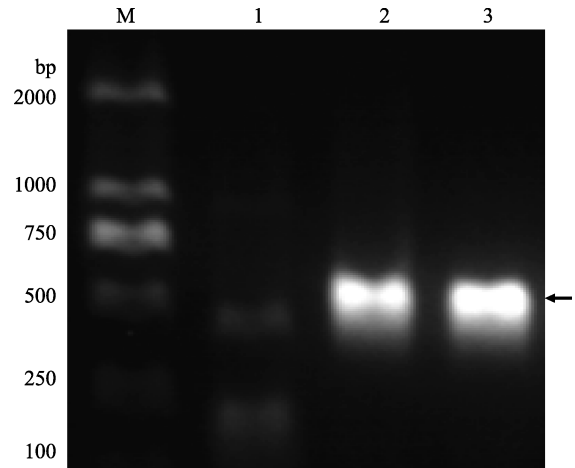


图 2 菌落 PCR 结果
Fig.2 PCR result of the colony

M: DNA 标准品 DL2000; 1: 阴性对照; 2-3: 重组 FcT₃L
M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control; 2-3:
Recombinant FcT₃L

行 SDS-PAGE 电泳, 以未诱导菌液为对照。电泳结果显示, 与未诱导菌液相比, 诱导菌液在分子量约为 20 kDa 出现明显诱导蛋白带(图 3)。将目的条带切胶进行质谱分析, 结果表明, 该蛋白为中国明对虾 Tetraspanin-3(表 1)。

2.3 目的蛋白的纯化

表达载体 pBAD/gIII A 上带有 6×His 标签, 可利

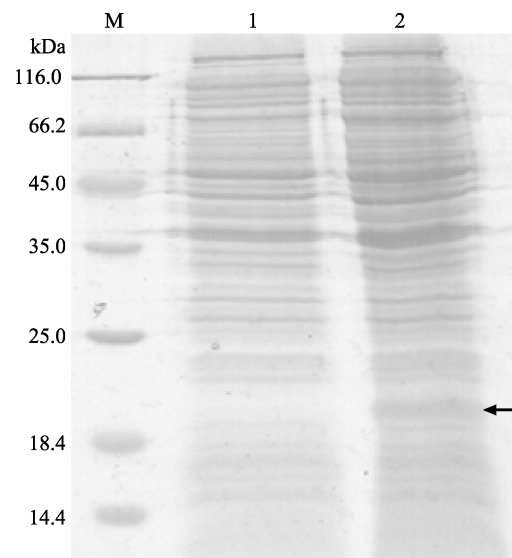


图 3 SDS-PAGE 分析在 *E. coli* 中表达的 FcT₃L
Fig.3 SDS-PAGE analysis of FcT₃L expressed in *E. coli*

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导的重组 FcT₃L;
2: 诱导重 FcT₃L

M. Protein molecular weight Marker; 1: Recombinant FcT₃L
before induction; 2: Induced recombinant FcT₃L

表 1 FcT₃L 质谱分析结果
Tab.1 Results of MS analysis of FcT₃L

肽段分子量 Observed Mr of peptide	肽段实验分子量 Expected Mr of peptide	肽段理论分子量 Calculated Mr of peptide	起始位点 Start position	终止位点 End position	肽段 Peptide
902.4186	901.4113	901.4869	131	138	SLDLAQQK
1094.3867	1093.3794	1093.4685	139	148	LHCCGVDGYK
1514.6532	1513.6459	1513.7599	188	200	QTIYIQGCYQAVK
1641.6505	1640.6432	1640.7682	117	130	VFNEYGQQDEALTK
3437.3577	3437.3577	3436.9567	2	33	GFFSKFALFVLNFIVFGVGVATVVVLASIFISK

用 Co²⁺亲和层析法对其进行纯化,洗脱液经尿素梯度复性后得到正确折叠的蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 检测分析, 结果显示, 经纯化的蛋白纯度较高, 可用于进一步实验(图 4)。

2.4 FcT₃L 与 WSSV 结构蛋白的相互作用

将纯化的 WSSV 病毒经 SDS-PAGE 分离后转印到 PVDF 膜上, 与 FcT₃L 蛋白孵育, 然后再与 6×His 抗体孵育后显色发现, FcT₃L 与 VP26 有条带显色(图 5)。为进一步验证与 FcT₃L 相作用的病毒蛋白, 将已表达纯化的 VP26、VP28C、VP28N 和 VP37 蛋白进行 SDS-PAGE 并转印, 与 DIG 标记的 FcT₃L 蛋白孵育后, 用 DIG 抗体孵育显色。结果显示, 只有 VP26 条带处显色, 而 VP28C、VP28N 和 VP37 条带处没有显色, 说明这 3 种蛋白与 FcT₃L 没有相互作用, 只有 VP26 与 FcT₃L 有相互作用(图 6)。

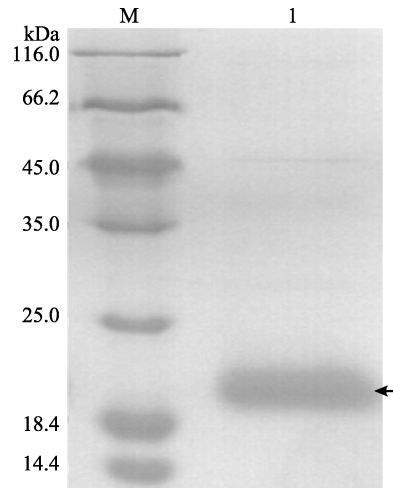


图 4 SDS-PAGE 分析纯化的 FcT₃L
Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified FcT₃L

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化后的 FcT₃L
M: Protein molecular weight Marker; 1: Purified FcT₃L

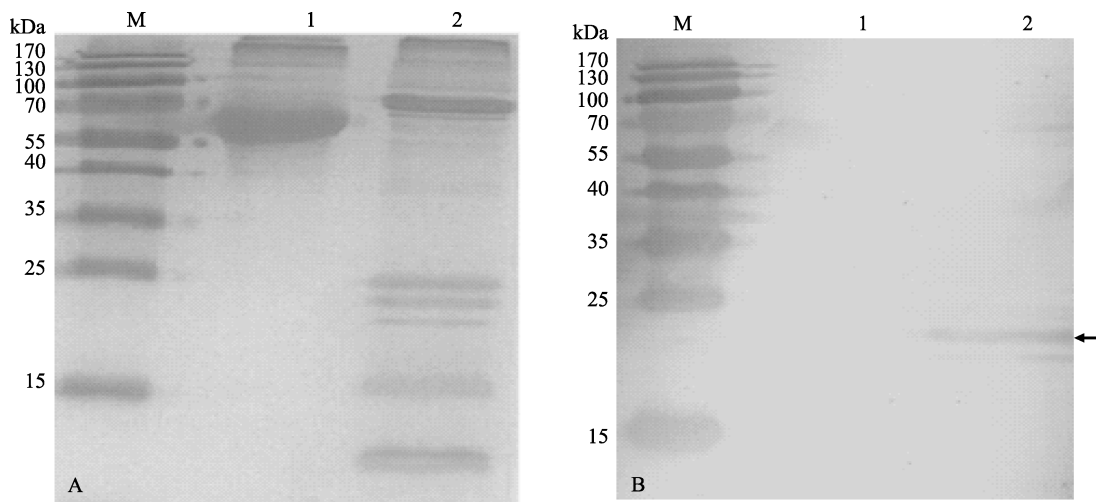
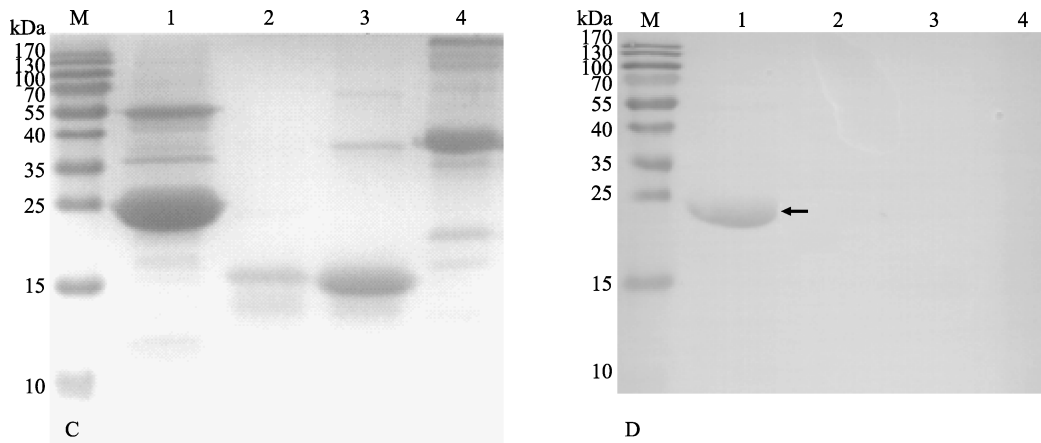


图 5 FcT₃L 与 WSSV 的相互作用分析
Fig.5 Interaction between FcT₃L and WSSV protein

A: SDS-PAGE 结果; B: Far-western blot 结果
M: 蛋白分子质量标准; 1: BSA; 2:WSSV
A: Profile of SDS-PAGE; B: Far-western blot analysis
M: Protein molecular weight Marker; 1: BSA; 2: WSSV

图6 FcT₃L与WSSV重组蛋白的相互作用Fig.6 Interaction of FcT₃L with recombinant protein of WSSV

C: SDS-PAGE 结果; D: Far-western blot 结果

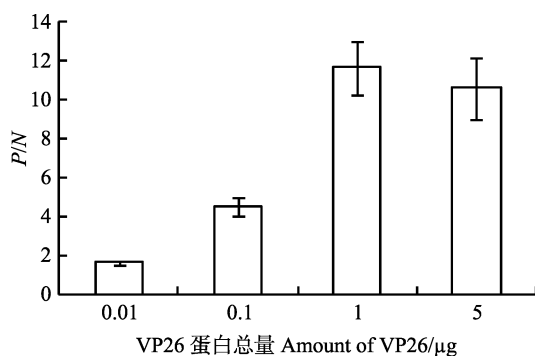
M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28C; 3: VP28N; 4: VP37

C: Profile of SDS-PAGE; D: Far-western blot analysis

M: Protein molecular weight Marker; 1: VP26; 2: VP28C; 3: VP28N; 4: VP37

2.5 ELISA 分析

通过将 FcT₃L 蛋白包板与 DIG 标记的 VP26 蛋白相互作用, 并与 Anti-DIG-AP 抗体孵育后经 pNPP 显色进行 ELISA 分析。结果显示, FcT₃L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 蛋白量的增加而增强, 当 VP26 为 0.01 μg 时, P/N 值仅为 1.61, VP26 增加至 0.1 μg 时, P/N 值为 4.46, 当 VP26 蛋白量达到 1 μg 时, 相互作用达到最高值(P/N=11.63), 继续增加 VP26 用量, P/N 值不再随之增加(图 7), 表明两蛋白的结合达到饱和。

图7 ELISA 分析 VP26 与 FcT₃L 蛋白的相互作用Fig.7 ELISA analysis of VP26 interaction with FcT₃L

3 讨论

蛋白与蛋白的特异性结合是病毒与宿主细胞相互作用的分子基础。病原蛋白与宿主蛋白相互作用是诱发感染、致病的关键环节。WSSV 感染宿主是多分

子相互作用的复杂过程, 已报道包括 Rab7 (Sritunyalucksana *et al*, 2006)、β-整联蛋白(Li *et al*, 2007)、β-肌动蛋白(Xie *et al*, 2005; Liu *et al*, 2011)、几丁质结合蛋白(Chen *et al*, 2009)、热休克蛋白 70(Xu *et al*, 2009)、F₁ 和 F₀-ATP 合成酶(Liang *et al*, 2010; Li *et al*, 2013)、凝集素(Zhao *et al*, 2009)、抑制素(Lan *et al*, 2013)、精氨酸激酶(Ma *et al*, 2014)和腺嘌呤核苷转移酶(Ma *et al*, 2014)等诸多宿主蛋白与白斑综合征病毒结构蛋白存在相互作用, 参与病毒的侵染过程。但 WSSV 借助宿主哪些分子穿过细胞膜进入宿主细胞内感染宿主尚不清楚。

本研究通过将 FcT₃L 区域进行原核表达, 纯化获得重组蛋白。Far-western 实验结果显示, FcT₃L 重组蛋白可以特异性地与 VP26 蛋白相互作用, 而与 VP28 及 VP37 则无结合作用。进一步用 ELISA 方法分析显示, FcT₃L 与 VP26 蛋白的相互作用随 VP26 蛋白量的增加而增强。VP26 蛋白被认为是一种主要的被膜蛋白, 连接囊膜蛋白和核衣壳(Tsai *et al*, 2006)。主要囊膜蛋白 VP37 和核衣壳蛋白 VP51 被鉴定出与 VP26 存在相互作用关系, 三者可能通过形成复合体起到稳定病毒结构的作用(Wan *et al*, 2008; Liu *et al*, 2009)。Xie 等(2005)和 Liu 等(2013)报道, VP26 蛋白与 β 肌动蛋白存在相互作用, 而 β 肌动蛋白在细胞内物质和器官运输过程中起重要作用, 并被报道参与到一些病毒的入侵、细胞内转运和释放等过程中(Gouin *et al*, 2005), 因此, VP26 通过与核衣壳蛋白相互作用引导病毒核衣壳进入细胞内部。本研究进一步发现, FcT₃L

与 VP26 存在相互作用, 推测 VP26 可能通过与 FcT₃ 相互作用引导 WSSV 核衣壳入胞, 并进一步与 β 肌动蛋白相互作用完成病毒核衣壳向细胞核部位的转运过程, 具体分子机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 65-70
- 黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 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, 1995, 16(1): 1-10
- Chen KY, Hsu TC, Huang PY, *et al.* *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(3): 460-465
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org*, 1995, 23(3): 165-173
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(1): 35-45
- Gui L, Wang B, Li FH, *et al.* Blocking the large extracellular loop (LEL) domain of FcTetraspanin-3 could inhibit the infection of white spot syndrome virus (WSSV) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(6): 1008-1015
- Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 397-422
- Lan JF, Li XC, Sun JJ, *et al.* Prohibitin interacts with envelope proteins of white spot syndrome virus and prevents infection in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*. *J Virol*, 2013, 87(23): 12756-12765
- Li DF, Zhang MC, Yang HJ, *et al.* β -Integrin mediates WSSV infection. *Virology*, 2007, 368(1): 122-132
- Li Q, Liu QH, Huang J. F₀ATP synthase β -chain of *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Virus Genes*, 2013, 47(1): 42-48
- Liang Y, Cheng JJ, Yang B, *et al.* The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Viol J*, 2010, 7: 144
- Liu BL, Tang XQ, Zhan WB. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2011, 314(1-4): 13-17
- Liu QH, Ma CY, Chen WB, *et al.* White spot syndrome virus VP37 interacts with VP28 and VP26. *Dis Aquat Org*, 2009, 85(1): 23-30
- Ma FF, Chou ZG, Liu QH, *et al.* White spot syndrome virus VP12 interacts with adenine nucleotide translocase of *Litopenaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol*, 2014, 118(4): 28-33
- Ma FF, Liu QH, Guan GK, *et al.* Arginine kinase of *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Gene*, 2014, 539: 99-106
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 1997, 11(6): 428-442
- Meerloo T, Parmentier HK, Osterhaus AD, *et al.* Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells: An immunoelectron microscopic study. *Aids*, 1992, 6(10): 1105-1116
- Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, *et al.* PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *J Virol*, 2006, 80(21): 10734-10742
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(2): 106-112
- Todd SC, Doctor VS, Levy S. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochim Biophys Acta-Gene Structure and Expression*, 1998, 1399(1): 101-104
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al.* Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol*, 2006, 80: 3021-3029
- Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *J Virol*, 2008, 82(24): 12598-12601
- Wang B, Li F, Xiang J, *et al.* Three tetraspanins from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, may play important roles in WSSV infection. *J Fish Dis*, 2010, 33(1): 15-29
- Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, 336(1): 93-99
- Xu H, Yan F, Deng X, *et al.* The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsc70 is specific and ATP-dependent. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26(3): 414-421
- Zhan WB, Wang YH, Fryer JL, *et al.* White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J Aquat Anim Health*, 1998, 10(4): 405-410
- Zhao ZY, Yin ZX, Xu XP, *et al.* A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 2009, 83(1): 347-356

Interaction of Tetraspanin-3 in *Fenneropenaeus chinensis* with WSSV *in vitro*

GUAN Guangkuo^{1,2}, LIU Qinghui^{2,3①}, HUANG Jie^{2,3}

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is a widespread and disastrous viral pathogen of cultured shrimp that infects many different species of crustaceans. Tetraspanin-3 protein belongs to the tetraspanin superfamily, which plays an important role in signal transduction and immune process. Increasing evidence has shown that tetraspanins play important roles in virus invasion, penetration and fusion events. Antibody to the large extracellular loop (LEL) of Tetraspanin-3 of *Fenneropenaeus chinensis* can block the WSSV infection. However, whether the *F. chinensis* Tetraspanin-3 is involved directly with WSSV remained largely unknown. In this research, we cloned the LEL fragment of Tetraspanin-3 from shrimp *F. chinensis* (FcT₃L) and ligated it with prokaryotic expression vector pBAD/g IIIA to get recombinant expression vector pBAD/g IIIA-FcT₃L. After transformed into *E. coli* (TOP 10) and induced using the L-arabinose, we successfully obtained the pure recombinant protein using Co²⁺ affinity chromatography purification. Mass spectrometry analysis showed the correctness of the recombinant protein. Moreover, FcT₃L was labeled with DIG and incubated with WSSV and the results showed that FcT₃L can interact with VP26. Furthermore, recombinant VP26, VP28N, VP28C and VP37 were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After incubating with DIG-labeled FcT₃L, a positive band was shown with VP26. To confirm the interaction of FcT₃L with VP26, FcT₃L was coated with 96-well plates and different amount of VP26 was added. ELISA assay showed that the interaction between FcT₃L and VP26 grew stronger with the increasing concentration of FcT₃L. Results suggested that VP26 might bind to the Tetraspanin-3 and act to help the WSSV diffuse and penetrate into the cytoplasm. The detailed mechanism needs further investigation.

Key words Tetraspanin-3; *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV; Interaction

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn