

对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP28 的表达及其抗病毒感染作用

龙 燕, 徐进平, 王 健, 鲁 伟, 刘志毅, 刘 瑶, 孟小林**

(武汉大学病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

Expression of Envelope Protein VP28 of *Penaeus monodon* WSSV in *E.coli* and the Effect Against WSSV

LONG Yan, XU Jin-ping, WANG Jian, LU Wei, LIU Zhi-yi, LIU Yao, MENG Xiao-lin**

(State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A pair of primers was designed according to the sequence of *vp28* gene of White spot syndrome virus (WSSV) in the GenBank. The *vp28* DNA fragment was amplified by PCR and cloned into *E. coli* expression vector pET-22b(+) successfully. Then pET22b-*vp28* was transformed into *E. coli*. After IPTG induction at 37 °C, the fusion protein with 32kDa was expressed, which was confirmed by Western-blot and SDS-PAGE analysis. The envelope protein VP28 purified by Ni²⁺-column chromatography was injected into crayfish or used as a supplement to feed crayfish. The result showed that the engineered protein VP28 expressed in *E. coli* could improve the immunity ability of crayfish to resist WSSV infection.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV); VP28; Resist WSSV infection

摘要: 根据 GenBank 上 WSSV 囊膜蛋白基因 *vp28* 的序列, 设计并合成引物, PCR 扩增得到 *vp28* 基因, 成功构建重组表达载体 pET22b-*vp28* 并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。基因工程菌株 37 °C IPTG 诱导, 表达产物经 Western-blot 和 SDS-PAGE 检测显示有与预期大小 32kDa 相符合的目的蛋白。用 Ni²⁺-柱纯化的目的蛋白分别直接注射螯虾和包被饲料投喂螯虾, 实验结果表明 *vp28* 在大肠杆菌中的表达产物有显著提高虾体抗 WSSV 感染力的作用, 而且注射效果更好。

关键词: 白斑综合症杆状病毒 (WSSV); VP28; 抗 WSSV 感染

中图分类号 S945.4 :

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0178-03

对虾白斑综合症杆状病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是引起包括中国在内的东亚及东南亚地区养殖业对虾暴发性流行病的主要病原体, 其感染性和致病性是对虾养殖业面临的重大问题, 而目前尚未有效的防治方法。WSSV 是一种具有囊膜的双链 DNA 病毒^[1,2], 它有两个主要的囊膜蛋白 VP19 和 VP28^[3,4], 其中 VP28 已被初步证明在病毒吸附与入侵中起着关键作用^[5,6]。目前还没有可用于病毒增殖的细胞系, 在我国, 感染动物常用克氏原螯虾, 已证明口服感染效果差, 通过腹肌注射感染的效果很好^[7,8]。本研究以克氏原螯虾为模型^[9,10], 用大肠

杆菌中表达的 WSSV 囊膜蛋白 VP28 分别直接注射螯虾和包被饲料投喂螯虾, 结果表明 VP28 工程蛋白有显著提高虾体抗 WSSV 感染力的作用, 为对虾白斑综合症的有效防治提供一些借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康克氏原螯虾(*Cambarus proclarkii*)购自武汉水产市场, 体重 10g 左右, 病虾材料来自广西北海养殖场发病斑节对虾及人工感染 WSSV 发病的克氏原螯虾, -70 °C 保存。Taq DNA 聚合酶、T4 DNA

收稿日期: 2004-09-21, 修回日期: 2005-11-08

作者简介: 龙燕(1980-)女, 湖北省籍, 硕士生, 从事基因工程药物与昆虫病毒分子生物学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 86-27-68754217, E-mail: MengxiaoLin 8@hotmail.com

连接酶及限制性内切酶均为 TAKARA 公司产品, DNA 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, pMD18-T 载体购自上海生工, 质粒 pUCm-vp28, 表达载体 pET-22b(+) 及大肠杆菌 JM109, 兔抗 VP(19+28) 血清由本室保存, 大肠杆菌 BL21(DE3) 及 His-tag 亲和层析柱购自 Novagen 公司。

1.2 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: gaattcgatggatctttcttactct (划线处为 *EcoRI* 位点), 下游引物: ctcgagttgctcggtctcagtcccag (划线处为 *XhoI* 位点)。以质粒 pUCm-vp28 为模板, PCR 扩增目的基因 vp28。PCR 反应条件: 95 5min, 94 30s, 54 45s, 72 1min (29 个循环), 72 1min, 72 10min。取 10 μ L PCR 产物作 1% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物应在约 630bp 处有一条扩增带。

1.3 基因工程菌株的构建及表达产物的纯化

1.3.1 重组表达质粒的构建: 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 对重组质粒 PMD18T-vp28 和表达载体 pET22b(+) 同时进行双酶切, 胶回收目的条带, 16 连接后转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 筛选重组子。

1.3.2 VP28 在大肠杆菌中的表达与纯化: 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 培养 8~10h, 4 存放过夜。第二天按 4% 接种到新鲜的丰富 LB 液体培养基中, 37 培养到 OD 值为 0.6 时加终浓度为 0.4mmol/L 的 IPTG 诱导, 离心收集菌体取样, SDS-PAGE 和 Western-blot 检测目的蛋白的表达。菌体 -20 反复冻融几次后, 超声波破碎, 离心收集上清, 用 Ni²⁺-柱纯化, SDS-PAGE 检测蛋白的纯化结果。

1.4 重组 VP28 蛋白提高虾体抗 WSSV 感染力作用实验

重组 VP28 提高虾体抗 WSSV 感染力的作用: 将体重约 10g 的健康螯虾分成 4 组 (实验前已在实验室养殖了三周), 每组 30 尾。注射组: 按照虾体重每克注射 10 μ L 0.4mg/mL 的重组 VP28 蛋白溶液的量, 于倒数第 3 腹节浅层肌肉处注射健康螯虾, 分两次注射, 间隔 5d, 第二次注射的 2d 后, 将 WSSV 粗提液用 TN buffer 稀释一倍^[9], 注射感染螯虾^[11,12]; 投喂组: 每天按照虾体重的 2.5% 投喂饲料, 每克饲料中含有 160 μ g 纯化 VP28, 7d 后按同样的方法注射 WSSV 感染螯虾; 阳性对照组: 按照虾体重每克注射 10 μ L TN buffer 的量, 分两次注射, 间隔 5d, 第二次注射的 2d 后, 按同样的方法注射 WSSV 感染螯虾; 阴性对照组: 按照虾体重每克注射 10 μ L TN

buffer 的量, 分两次注射, 间隔 5d。在自然气温 (22 ~ 25) 的条件下养殖, 每天换水并投喂人工虾饲料一次, 记录虾死亡的情况^[13]。

2 结果

2.1 重组表达载体的鉴定及 VP28 的表达与纯化

EcoRI/*XhoI* 酶切鉴定筛选出重组子 pET22b-vp28。基因工程菌株 BL21(DE3)- pET22b-vp28 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western-blot (图 1) 结果显示, 在大约 32 kDa 处有明显的目的条带。将菌体超声破碎, 离心后的上清液经 Ni²⁺-His-tag 亲和层析柱纯化后, 约 32kDa 处为单一的条带 (图 2)。

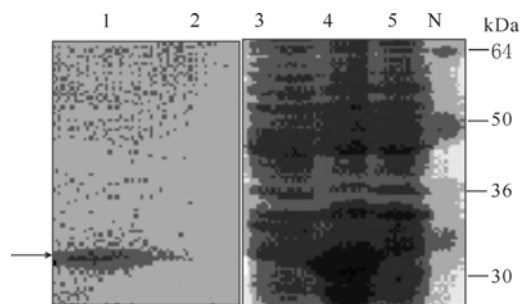


图 1 表达 vp28 蛋白的 Western-blot 检测及 SDS-PAGE 分析
Fig.1 Western-blot and SDS-PAGE analysis of recombinant pET22b-vp28 expression

1, *E.coli* BL21(pET22b-vp28) induced for 4h; 2, *E.coli* BL21 (pET22b-vp28) uninduced; 3, *E.coli* BL21(pET22b-vp28) before induced; 4, *E.coli* BL21 (pET22b-vp28) induced for 4h; 5, *E.coli* BL21 (pET22b-vp28) uninduced; M, Protein molecular marker; the arrow indicated the location of recombinant VP28

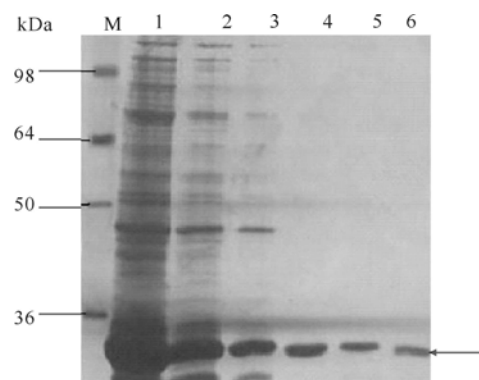


图 2 Ni²⁺-柱纯化的表达产物的检测

Fig.2 Analysis of purified protein
M, Protein molecular marker; the arrow indicated the purified VP28; Lanes 1-6, samples of purified protein eluted from Ni²⁺-column at 10min interval.

2.2 重组 VP28 提高虾体抗 WSSV 感染的作用

在室温 (22 ~ 25) 的条件下养殖的结果显示, 注射纯化 VP28 的效果比投喂纯化 VP28 的效果更好, 注射纯化 VP28 组 8d 后累积死亡率为 30%, 投喂纯化 VP28 组 8d 后累积死亡率为 40%, 而阳性对

照组在感染WSSV10d后累积死亡率达到了100%，阴性对照组一直健康活泼，无死亡。结果见图3。

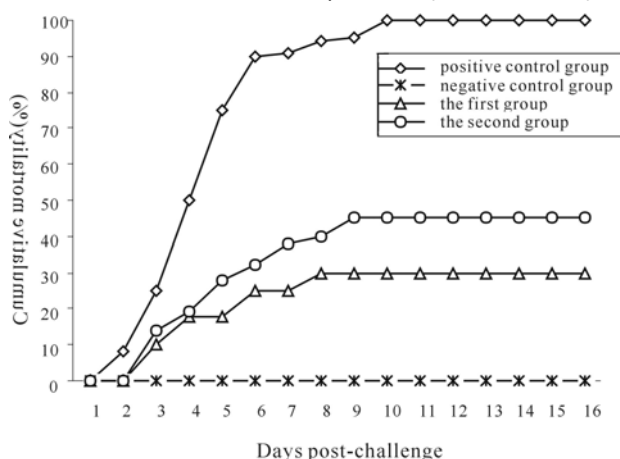


图 3 感染 WSSV 后各组螯虾的累积死亡率曲线

Fig.3 Time-mortality relationship of each group of crayfish after infected WSSV.

Positive control group infected WSSV 2 days after injected with TN buffer twice at 5 days interval; Negative control group injected with TN buffer twice at 5 days interval; The first group infected WSSV 2 days after injected with purified VP28 at 5 days interval; The second group infected WSSV 2 days after feed with purified VP28 at 5 days interval;

3 讨论

本文研究结果表明在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的 WSSV 囊膜蛋白 VP28 以注射和投喂螯虾的方式均有明显的提高螯虾抗 WSSV 感染力的作用，这进一步证实了 WSSV 的结构蛋白可以被螯虾免疫系统识别，但这种准免疫反应的作用机理还有待于进一步阐明。研究表明螯虾注射 VP28 后抗 WSSV 效果优于投喂的方式，这可能是通过注射的方式可以使工程蛋白直接进入虾体内，由其刺激所形成的准免疫反应更直接，更迅速，效果更好。本研究对于 WSSV 囊膜蛋白 VP28 功能的研究及对虾白斑综合症的防治是一种有益的探索，具有一定的理论和潜在的应用价值。

References

- [1] Wang Y C, Lo C F, Chang P S, *et al.* Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in TaiWan [J]. *Aquaculture*, 1998, 164:221-31.
- [2] Lo C F, Ho C H, Peng S E, *et al.* White spot syndrome baculovirus

(WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. *Dis Aquat Organ*, 1996,27:215-25.

- [3] Van Hulten M C W, Reijns M, Vlask J M, *et al.* Identification of vp19 and vp15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83:257-265.
- [4] Van Hulten M C W, Goldbach R W, Vlask J M, *et al.* Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. *J Gen Virol*, 2000,81: 2525-2529.
- [5] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Vlask J M, *et al.* White Spot Syndrome Virus Envelope Protein VP28 Is Involved in the Systemic Infection of Shrimp [J]. *Virology*, 2001, 285: 228-233.
- [6] Zhang X, Huang C, Xu X, *et al.* Identification and location of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1069-1074.
- [7] Huang C H, Zhang X B, Xu X, *et al.* Proteomic analysis of shrimp white syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein VP466 [J]. *Mol Cell Proteom*, 2002,1:223-231.
- [8] Huang C H, Shi Z L, Chen L H (黄灿华, 石正丽, 陈棣华) *et al.* Establishment of a Model for Proliferating White Spot Syndrome Virus in vivo [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 1999, 14:358-363.
- [9] Li H X, Meng X L, Xu J P, *et al.* Protection of crayfish, *Cambarus clarkii*, from white spot syndrome virus by polyclonal antibodies against a viral envelope fusion protein [J]. *Fish Dis*, 2005, 28:285-291.
- [10] Venegas C A, Nonaka L, Mushiaki K, *et al.* Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rodshaped DNA virus (PRDV) [J]. *Dis Aquat Organ*, 2000, 42:83-89.
- [11] Wu J L, Nishioka T, Nishizawa T, *et al.* Time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13:391-403.
- [12] Witteveldt J, Valk J M, Van Hulten M C W *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16:571-579.
- [13] Guan Y, Yu Z, Li C. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus* [J]. *J Invert Pathol*, 2003, 83: 257-260.