

对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP19 的融合表达 及其抗病毒感染作用

贾启军, 孟小林^{**}, 徐进平, 王 健, 鲁 伟

(武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

Expression of Envelope Protein VP19 of *Penaeus monodon* WSSV in *E.coli* and the Effect against WSSV

JIA Qi-jun, MENG Xiao-lin^{**}, XU Jin-ping, WANG Jian, LU Wei

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

Abstract: The *vp19* gene of White spot syndrome virus (WSSV) was amplified by PCR with specific primers and subcloned into the prokaryotic expression vector pET32b to get the recombinant plasmid pET32b-*vp19*. A positive plasmid was transformed into the host cell Origami(DE3)pLysS and the target gene was successfully expressed as a fusion protein when induced with IPTG. The molecular weight of the engineered protein was about 37kDa as demonstrated by SDS-PAGE and Western-blot. The engineered protein Trx-VP19 purified by Ni²⁺-column chromatography was injected into crayfish or used as a supplement to feed crayfish. Crayfish vaccinated by intramuscular injection with Trx-VP19 showed lower cumulative mortality due to WSSV compared to vaccination with bacteria expressing the empty vectors.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV); VP19; Anti-infection to WSSV

摘要: 根据 GenBank 上 WSSV 囊膜蛋白基因 *vp19* 的序列, 设计并合成引物, PCR 扩增得到 *vp19* 基因并克隆到 pGEM-T 载体中, 经过 *Bam*H I / *Hind* III 酶切、连接并将 *vp19* 插入到 pET32b 表达载体中。用重组质粒 pET32b-*vp19* 转化大肠杆菌 Origami(DE3)pLysS, 在 IPTG 诱导下, 融合蛋白 Trx-VP19 以可溶性的形式得到表达, 经 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测显示其分子量与预期的大小相符合。目的蛋白经 Ni²⁺柱纯化并定量后分别直接注射鳖虾和包被饲料投喂鳖虾。实验结果表明注射 Trx-VP19 可以提高鳖虾个体抗 WSSV 感染力的作用。

关键词: 对虾白斑综合症病毒 (WSSV); VP19; 抗 WSSV 感染

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0585-04

对虾白斑综合症 (White Spot Syndrome) 是由对虾白斑综合症病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 引起的对虾爆发性传染病, 自 20 世纪 90 年代初在亚洲地区发生以来, 至今已席卷了世界各国的对虾养殖地区, 造成了巨大的经济损失, 而目前尚未有有效的防治方法。WSSV 属于新设立的 *Nimaviridea* 科, 是一种有囊膜的环状双链 DNA 病毒^[1,2], 它有两个主要的囊膜蛋白 VP28、VP19^[3,4]。关于 WSSV 感染对虾的分子机制还不清楚, 但是可

以确定的是囊膜在 WSSV 感染对虾的过程中起关键作用。Van Hulten 等报道, 囊膜蛋白 *vp28* 与对虾白斑综合症系统感染有关^[5], 但是关于 VP19 囊膜蛋白的研究甚少, 本研究以 pET32b 为表达载体在 Origami (DE3) pLysS 中, 经 IPTG 诱导获得了可溶性表达的融合蛋白 Trx-VP19, 经纯化后分别用来直接注射鳖虾和包被饲料投喂鳖虾, 结果表明注射 Trx-VP19 重组蛋白有显著提高鳖虾抗 WSSV 感染力的作用。

收稿日期: 2006-05-10, 修回日期: 2006-05-29

作者简介: 贾启军(1981-), 男, 安徽省籍, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

^{**} 通讯作者: 孟小林(1956-), 男, 山东省籍, 教授, 从事基因工程药物及昆虫病毒分子生物学研究。
Corresponding author. Tel: 86-27-68754217, E-mail: Mengxiaolin8@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鳖虾购自武汉水产市场, WSSV 来源于广西北海养殖场发病斑节对虾, 经过鳖虾活体增殖后提纯, -70°C 保存。克隆载体 pGEM - T 为 Promega 公司产品, 质粒 pUCm-*vp19*, 表达载体 pET32b 及大肠杆菌 JM109, 兔抗 VP (19+28) 由本室保存, 大肠杆菌 Origami (DE3) pLysS 及 His - tag 亲和层析柱购于 Novagen 公司, Tag DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 TAKARA 公司, DNA 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品。

1.2 设计引物扩增 *vp19* 基因

根据 GenBank 登录的 WSSV 基因组, 利用引物设计软件 Oligo6.0 设计 *vp19* 引物, 上游引物: ggatcctatggccacgactaac (划线处为 *Bam*H I), 下游引物: aagcttctgcctcctcctgggtaagac (划线处为 *Hind* III), 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.3 *vp19* 的扩增与 pGEM-*vp19* 的构建

以质粒 pUCm-*vp19* 为模板, PCR 扩增 *vp19* 目的基因, PCR 反应条件: 95°C 5min, 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s (29 个循环), 72°C 10min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 按胶回收试剂盒说明进行目的片段的回收。PCR 产物克隆入 pGEM - T 载体, 挑取单菌落培养, 小量法提取质粒, 用 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切鉴定阳性克隆, 阳性克隆命名为 pGEM - *vp19* 并送往上海博亚生物技术有限公司进行测序。

1.4 重组表达质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 对重组质粒 pGEM - *vp19* 和表达载体 pET32b 同时进行双酶切, 胶回收目的条带, 16°C 过夜连接后转化大肠杆菌 Origami (DE3) pLysS 感受态细胞, 涂布 LB 琼脂平板 (含 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素, $34\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素, $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 置 37°C 培养箱培养 18h, 用 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切鉴定阳性克隆, 重组质粒命名为 pET32b-*vp19*。

1.5 Trx 蛋白和融合蛋白 (Trx-VP19) 的表达与纯化

分别挑取含空载体和含重组表达质粒的单菌落接种到 LB (含 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素, $34\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素, $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 培养基中, 37°C 培养 10h, 4°C 存放过夜, 第 2 天活化菌液以 4% 接种到新鲜的丰富 LB (含 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素, $34\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素, $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素) 培养基中, 37°C 培养到 OD_{600} 值为 0.6 时加终浓度为 $0.8\text{ mmol}/\text{L}$ IPTG 37°C 诱导, 取诱导 0, 1, 2, 3, 和 4h 的培养物各 1mL,

收集菌体, 重悬于 $1\times\text{SDS}$ - PAGE 凝胶电泳上样缓冲液中, 100°C 变性 5min, 再进行 SDS - PAGE 电泳, 分析表达结果, 并用 Western - blot 检测目的蛋白的表达。以优化的条件扩大培养, 菌体反复冻融 3 次, 超声波破碎, 离心 ($12000\text{r}/\text{min}$, 4°C , 10min) 收集上清, Trx 蛋白和融合蛋白的纯化按 His Band Kit 说明书进行, SDS - PAGE 检测蛋白的纯化结果。

1.6 融合表达的 Trx-VP19 蛋白提高虾体抗 WSSV 感染力作用实验

将体重约 10g 的健康鳖虾分成 5 组 (实验前已在实验室养殖了 3 周), 每组 20 尾。注射组 I: 按照虾体重每克注射 $10\mu\text{L}$ $0.8\text{ mg}/\text{mL}$ 的重组 Trx-VP19 蛋白量, 于倒数第 3 腹节浅层肌肉处注射健康鳖虾, 分 2 次注射, 间隔 5d, 第 2 次注射的 2d 后, 将经过定量的 WSSV 粗提液经 TN buffer 稀释^[6], 注射感染鳖虾^[7]; 注射组 II: 按照虾体重每克注射 $10\mu\text{L}$ $0.8\text{ mg}/\text{mL}$ 的重组 Trx 蛋白量, 于倒数第 3 腹节浅层肌肉处注射健康鳖虾, 分 2 次注射, 间隔 5d, 第 2 次注射的 2d 后, 按同样的方法注射 WSSV 粗提液感染对虾; 投喂组: 每天按照虾体重的 2.5% 投喂饲料, 每克饲料中含有 $320\mu\text{g}$ 纯化的 Trx-VP19 蛋白^[8], 7d 后按同样的方法注射 WSSV 粗提液感染对虾; 阳性对照组: 按照虾体重每克注射 $10\mu\text{L}$ TN buffer 的量, 分 2 次注射, 间隔 5d, 第 2 次注射的 2d 后, 按同样的方法注射 WSSV 粗提液感染对虾; 阴性对照组: 按照虾体重每克注射 $10\mu\text{L}$ TN buffer, 分两次注射, 间隔 5d。在 $22^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 的条件下养殖, 每天换水并投喂人工饲料 1 次, 记录虾死亡的情况^[9]。以上感染实验每组设 3 个重复。

2 结果

2.1 *vp19* 的扩增和重组表达载体的鉴定

取 $10\mu\text{L}$ PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外灯下观察表明扩增得到一条 370bp 的条带 (图 1), 与目的基因 *vp19* 大小相符。将 PCR 产物克隆到 pGEM - T 载体中, 经 *Bam*H I / *Hind* III 双酶切鉴定, 获得了阳性克隆 (图 1), DNA 序列测定结果表明 *vp19* 的基因序列完全正确。通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切将 *vp19* 基因定向插入表达载体 pET32b, *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定 pET32b-*vp19* 质粒, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上呈现两个条带, 大小分别为 5900bp 和 370bp (图 1), 分别对应于表达载体 pET32b 和 *vp19* 基因, 表明该质粒已正确插入表达载体 pET32b 中。

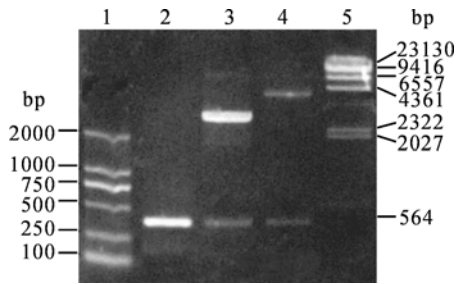


图1 目的基因的获得与重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 The identification of the recombinant plasmids

1, DL2000 Marker; 2, PCR product of vp19; 3, pGET-vp19/ BamH I +Hind III; 4, pET32b-vp19/ BamH I +Hind III; 5, Lambda DNA/ Hind III Marker.

2.2 融合蛋白的诱导表达及纯化

将 pET32b 和重组质粒分别转化 Origami(DE3) pLysS 宿主菌, 构建了 pET32b-VP19 和 pET32b 的表达菌株, IPTG (0.8mmol/L) 诱导后在不同时间收集菌样, 经 SDS - PAGE 电泳发现目的蛋白 Trx-VP19 获得了表达 (见图 2), 分子量约为 37-kDa, 与预期的大小相符, 如图 2 中的箭头所示, 并在诱导后 4h 表达量最大。用 Western Blot 也检测到 Trx-VP19 蛋白的表达。将菌体反复冻融 3 次, 超声波破碎, 离心 (12 000 r/min, 4°C, 10min) 收集上清, 镍离子亲和树脂纯化带 6×His 标签的融合蛋白后, 约 37 kDa 处为单一的条带 (见图 3)。同样的方法纯化得到 pET32b 空载体的表达产物 Trx, 在 18kDa 处为单一的条带 (见图 3)。

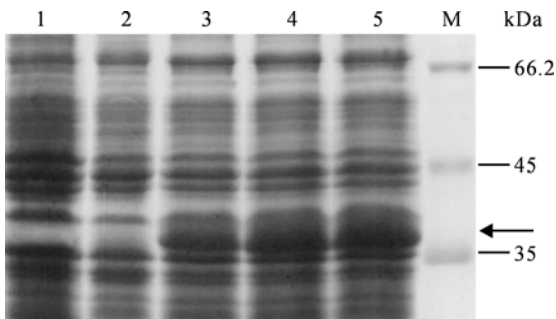


图2 Trx-VP19 表达产物的时相分析

Fig.2 Analysis of recombinant Trx-VP19 expression

1, pET32b-VP19 uninduced; 2, pET32b-VP19 induced with IPTG for 1h; 3, pET32b-VP19 induced with IPTG for 2h; 4, pET32b-VP19 induced with IPTG for 3h; 5, pET32b-VP19 induced with IPTG for 4h; M, Marker. The arrow indicated the location of recombinant Trx-VP19.

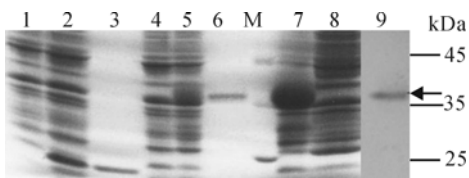


图3 表达产物的纯化和检测

Fig.3 Analysis of expressed protein and purified protein

1, pET32b uninduced; 2, pET32b induced with IPTG for 4h; 3, Purified Trx; 4, pET32b-VP19 uninduced; 5, pET32b-VP19 induced with IPTG for 4h; 6, Purified Trx-VP19; M, molecular weight standard; 7, Supernatants of the induced recombinant strains with IPTG for 4h; 8, Pellets of the induced recombinant strains with IPTG for 4h; 9, Western-blot of purified Trx-VP19; The arrow indicated the location of recombinant Trx-VP19.

2.3 融合表达的 Trx-VP19 蛋白提高虾体抗 WSSV 感染力作用

在气温 22°C~25°C 的条件下养殖的结果显示, 注射纯化 Trx-VP19 蛋白组的鳌虾 8d 后累积死亡率为 50%, 注射纯化 Trx 蛋白组的鳌虾 8d 后的累积死亡率为 95%, 说明注射重组蛋白 Trx-VP19 可以明显提高对虾抗 WSSV 感染力。投喂纯化 Trx-VP19 蛋白组的鳌虾 8d 后累积死亡率为 90%, 说明口服重组蛋白 Trx-VP19 的鳌虾对 WSSV 的感染没有明显的保护作用。阳性对照组的鳌虾在感染 WSSV 9d 后累积死亡率达到了 100%, 并在 3~5d 达到死亡高峰, 而注射了 TN buffer 的阴性对照组鳌虾无任何病理现象。以上实验数据均为 3 组重复实验所得, 结果见图 4。

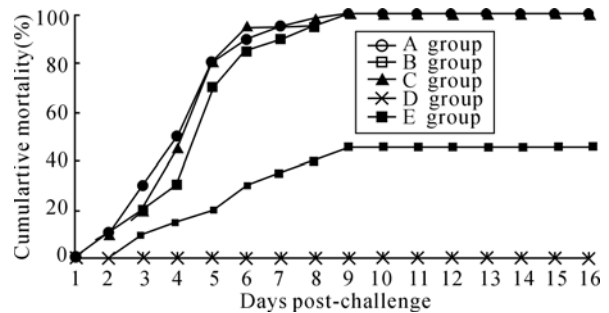


图4 感染 WSSV 后各组鳌虾的累积死亡率曲线

Fig.4 Cumulative mortality of each group of crayfish after infected WSSV

A group injected with WSSV: injected with TN buffer twice at 5 days interval and then infected WSSV 2 days later; B group injected with Trx-VP19: injected with purified Trx-VP19 twice at 5 days interval and then infected WSSV 2 days later; C group of oral administrated with Trx-VP19: feeded with purified Trx-VP19 for 5 days and infected WSSV 2 days later; D group injected with TN buffer: injected with TN buffer twice at 5 days interval and infected with TN buffer 2 days later; E group injected with Trx: injected with purified Trx twice at 5 days interval and infected WSSV 2 days later.

3 讨论

Van Hulten 等分离并鉴定了 WSSV 的囊膜蛋白 VP19, 它主要具有两个跨膜结构域, 通过这两个结构域锚定在囊膜上^[2]。由于囊膜在 WSSV 感染对虾过程中起关键作用, 目前 VP19 囊膜蛋白是否与对虾白斑综合症的系统感染有关还未见报道。Jeroen Witteveldt 等用 pMAL-c2 载体在 DH5α 中表达了 VP19^[7], 而许雅香等用 pET30a 作为表达载体在 *E.coli* BL21 (DE3) 中未能表达出 VP19, 推测 VP19 对大肠杆菌有毒性作用^[10]。本研究选择 pET32b 作为表达载体, 该载体中有编码大肠杆菌硫氧化还原蛋白 (Thioredoxin, Trx), Trx 作为原核生物的组成蛋白, 具有与分子伴侣相似的功能, 可以帮助蛋白质正确折叠。实验证明 *trx* 基因和外

源基因一同表达,可以增加外源蛋白的可溶性^[11]。而 Origami (DE3) pLysS 菌株与表达载体 pET32b 组合,能最大限度的得到可溶有活性的目的产物。本文通过 pET32b 载体在 Origami (DE3) pLysS 菌株中成功共表达了 Trx-VP19,纯化的重组蛋白分别注射和投喂了鳌虾后,进行了 WSSV 攻击试验。实验结果表明注射 Trx-VP19 可以明显提高虾体抗 WSSV 感染力的作用,这进一步证实了 WSSV 的结构蛋白可以被鳌虾免疫系统识别。这将对 VP19 与 VP28 间相互作用的机理研究和亚单位疫苗研究具有重要意义。

References

- [1] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Vlaskovits J M, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286: 7-22.
- [2] Van Hulten M C W, Goldbach, R W & Vlaskovits J M, Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2525-2529.
- [3] Van Hulten M C W, Reijns M, Vlaskovits 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, Tsai M F, Schipper C A, *et al.* Analysis of a genomic segment of WSSV containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 307-316.
- [5] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Vlaskovits 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] Li H X, Meng X L, Xu J P, *et al.* Protein 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.
- [7] Witteveldt J, Vlaskovits J M, Van Hulten M C W, *et al.* Protein of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 571-579.
- [8] Long Y, Xu J P, Lu W (龙燕, 徐进平, 鲁伟) *et al.* Expression of envelope protein VP28 of *Penaeus monodon* WSSV in *E.coli* and the effect against WSSV [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 21(2): 178-180.
- [9] 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.
- [10] Xu Y X (许雅香). Cloning and expression of envelope proteins gene of shrimp white spot syndrome virus and study on the resistance of expression products in crayfish [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003.
- [11] An N L, Zhang Zh Q, Wang S (安乃莉, 张智清, 王嵩) *et al.* Co-expression of thioredoxin increased the solubility of foreign protein expression in *E.coli* [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 1999, 5 (2): 130-135.