

文章编号: 1004 - 7271(2008)01 - 0047 - 05

## 白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP31 与 该病毒侵染的相关性

王永杰, 潘庭双, 李艳和, 佘磊

(安徽省农业科学院水产研究所, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 白斑综合征病毒(WSSV)是一种已给世界养虾业造成了严重危害的病原体。根据 GenBank 上公布的 WSSV 囊膜蛋白基因 VP31 的序列,设计并合成特异引物,PCR 扩增得到 VP31 基因,大小为 783 bp。通过引物两端的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点连接该基因,然后将其构建到家蚕杆状病毒表达载体 pFAST BAC HTB 上。重组的家蚕杆状病毒转染 5 龄家蚕幼体内表达,表达产物经 SDS-PAGE 检测,显示与预期 31 kD 大小相吻合的蛋白带。用 Ni<sup>2+</sup> 柱纯化该蛋白免疫新西兰大白兔制备抗体,肌肉注射克氏螯虾进行活体中和病毒试验。中和试验结果显示,囊膜蛋白 VP31 与白斑综合征病毒的侵染性相关,对病毒的侵染性可能起着重要作用。

**关键词:** 克氏螯虾; 白斑综合征病毒; 囊膜蛋白 VP31; 体内中和试验

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Relationship of white spot syndrome virus envelope protein VP31 with precociousness of WSSV

WANG Yong-jie, PANG Ting-shuang, LI Yan-he, SHE Lei

(Institute of Fisheries, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract:** White spot syndrome virus(WSSV) is a devastating viral pathogen of cultured shrimp worldwide. In this paper, two primers were designed according to the sequences of envelope genes, VP31 of white spot syndrome virus(WSSV) in the GenBank. The DNA fragment about 783 bp amplified by PCR were linked to the *Bam*H I and *Eco*R I restriction endonuclease site, then cloned into pFAST BAC HTB and expressed in the 5th instar larvae of silkworm. The molecular weight of the engineered protein was about 31 kD, which was identified by SDS-PAGE analysis. Antiserum of envelope protein VP31 purified by Ni<sup>2+</sup> column chromatography was prepared for immunizing New Zealand rabbit. The VP31 antiserum was used to neutralize the WSSV infection on crayfish by intramuscular injection. A neutralization assay with this antibody demonstrated that envelope protein VP31 is involved in WSSV infection and that VP31 might play a key role during this process.

**Key words:** crayfish; white spot syndrome virus; envelope protein VP31; *in vivo* neutralization

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种具有囊膜的双链 DNA 病毒,在甲壳类生物中有着广泛的宿主域,感染的对象主要有虾、蟹和克氏螯虾(*Panulirus stimpsoni*)等。该病毒已给我国

收稿日期:2007-04-19

基金项目:国家重点基础研究 973 发展计划(2005CB121000);安徽省农科院院长创新基金(2006-76)

作者简介:王永杰(1966-),男,安徽合肥人,副研究员,博士,主要从事分子生物学方面的研究。E-mail: hfwangyongjie@163.com

的养虾业造成了极其严重的危害,而且目前尚未有效的防治方法。在过去的十多年来,人们对虾白斑综合征的病原学、病理学、流行病学以及诊断学等方面研究较多,并已深入到分子水平。随着 WSSV 全基因组序列的公布<sup>[1-2]</sup>, WSSV 的研究已经步入后基因组时代,结构和功能基因的分析,以及致病机理的研究,是目前 WSSV 研究的热点。在白斑综合征病毒致病功能基因的研究中,囊膜蛋白的研究更为人们所关注,并初步证明囊膜蛋白在病毒粒子的入侵、装配和出芽方面起着关键的作用<sup>[3-4]</sup>。蛋白质组学(Proteomics)被认为是研究功能基因组学方面一种有效的方法,它也被应用于 WSSV 的结构蛋白的研究上。Tsai 等<sup>[5]</sup>用一种有效的方法能从感染 WSSV 的小龙虾组织中分离大量完整的结构蛋白,这大大的促进了结构蛋白的鉴定,尤其是低表达量蛋白的鉴定<sup>[6-7]</sup>。目前已报道 39 种 WSSV 的结构蛋白获得了鉴定,采用 Western blot 和免疫电镜等技术发现至少有 6 种是与病毒的囊膜蛋白相关,包括 VP28、VP19、VP39、VP36A、VP36B 和 VP31 等<sup>[8-9]</sup>。本研究是在家蚕杆状病毒(*BmNPV*)表达系统中表达的囊膜蛋白 VP31 基因,以求得到后加工完善的 VP31 囊膜蛋白。用 Ni<sup>2+</sup> 柱纯化该蛋白,免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。以淡水克氏螯虾为动物模型,在其体内对 WSSV 进行中和作用研究。这对于病毒囊膜蛋白 VP31 功能的研究,以及抗白斑综合征病毒药物的产业化研制是一种有益的探索,也为探讨病毒感染的分子机制及白斑综合征的免疫预防提供了物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

克氏螯虾 2006 年 4 月购自合肥水产品批发市场。挑选体格健壮、无伤病、个体大小均匀的。然后转入实验室 60 L 水族箱,每个水族箱放养 10~20 只体重为 20 g 左右,在 28 °C 水温下正常饲养 3 周以上。

*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶均为 TAKARA 公司产品, PCR 纯化回收试剂盒为上海华舜产品,载体购自上海生工,表达载体及大肠杆菌本室保存, His-tag 亲和层析柱购自 Novagen 公司。家蚕细胞培养基、共转染试剂及标准分子量蛋白等均为 GIBCO 公司产品,其它试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 病毒粗提液和健康螯虾粗提液的制备

病毒原材料来源于 2004 年安徽合肥地区白斑综合征发病症状明显的人工养殖克氏螯虾,本实验室保存。病毒粗提液和健康螯虾粗提液的制备方法参考文献[10]。

### 1.3 *BmNPV*-VP31 表达载体的构建及表达

#### 1.3.1 质粒 pFAST BAC HTB-VP31 基因构建与鉴定

根据 GenBank 上 WSSV 囊膜蛋白基因 VP31 序列,设计并合成引物(P1 5'-CGGGATCCATGCTCTAATGGCGCAACT-3'; P2 5'-CGGAATTCCTCCTCCTTAAAAGCAG-3'),在引物的 5' 和 3' 端分别加上 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点和 2 个保护碱基。以 WSSV 病毒粗提液为模板,使用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR,然后将 PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体上。用 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切 pUCm-T 载体-VP31 囊膜蛋白基因阳性克隆,胶回收目的片段,再连接到经 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切的 pFAST BAC HTB 载体上,转化到 DH5 $\alpha$  中。PCR 鉴定筛选阳性克隆。

#### 1.3.2 重组 Bacmid 转染人工培养家蚕细胞(*Bm*)

通过转座重组杆状病毒 Bacmid/VP31 基因,提取重组 Bacmid。准备质粒 DNA/脂质体复合物,溶液 A:分别取 Bacmid/囊膜蛋白基因(5~10  $\mu$ g),加入无血清 TNM-FH 补充体积至 100  $\mu$ L;溶液 B:取脂质体 8  $\mu$ L,加入 92  $\mu$ L 无血清 TNM-FH。将溶液 A 和溶液 B 混匀,室温静置 15 min。取生长良好的 *Bm* 细胞,用无血清 TNM-FH 培养基洗 2~3 次,加入 800  $\mu$ L 无血清的 TNM-FH 培养基后,再加入准备好的质粒 DNA/脂质体复合物 200  $\mu$ L。28 °C 继续培养 2 h 后,加 1 mL 含有 20% 血清的 TNM-FH 继续培养。28 °C 继续培养 60 h 后,观察细胞病变。细胞出现明显病变后,用病毒上清复接种对数生长前期的 *Bm*

细胞。

### 1.3.3 重组囊膜蛋白的 *BmNPV* 在家蚕中表达

将纯化的重组病毒上清液接种五龄起蚕,使重组囊膜蛋白基因在家蚕体内表达。25 °C 正常饲养家蚕,4 d 后蚕发病,剪腹足在冰上收集血淋巴,10 000 × g 离心 10 min,上清液用 PBS 稀释 5 倍后,用等体积的上样缓冲液裂解,置 100 °C 煮 3 ~ 5 min 后,10 000 × g 离心 10 min。取部分过 His-tag 亲和层析柱纯化等,再进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

### 1.4 多克隆抗体的制备

用纯化的蛋白 200 μg 与等体积的完全弗氏佐剂混匀后免疫新西兰大白兔,隔两周再用 200 μg 蛋白加强免疫一次,共加强两次。在最后一次加强的一周后,颈动脉放血制备抗血清。

### 1.5 中和作用分析

将克氏螯虾分成 4 组(试验前已在实验室养殖了三周),分别为 2 倍稀释的抗血清中和组、阳性对照组、阴性对照组和兔正常血清对照组。2 倍稀释的抗血清中和组:将抗血清原液与 WSSV 粗提液等体积混匀,26 °C 下作用 1 h 后,每尾注射 WSSV 粗提液(病毒剂量用定量 PCR 定量,约为  $1 \times 10^8$ ),于倒数第 3 腹节浅层肌肉处注射感染健康克氏螯虾;阳性对照组:WSSV 粗提液用 PBS 稀释 1 倍,26 °C 下作用 1 h 后注射感染健康克氏螯虾;阴性对照组:健康螯虾粗提液 26 °C 下作用 1 h 后注射健康螯虾;兔正常血清对照组:兔正常血清与 WSSV 粗提液等体积混匀,26 °C 下作用 1 h 后注射健康螯虾。注射量 0.15 mL/尾,每组 20 尾,两个重复试验组。在自然气温(18 ~ 26 °C)的条件下投喂配合饲料正常饲养,每天换水并投喂人工虾饲料一次,记录虾死亡的情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 囊膜蛋白基因 VP31 的克隆

PCR 扩增目的基因 VP31,大小为 783 bp。用 PCR 回收试剂盒回收 PCR 产物,并将其克隆入 pUCm-T 载体中,转化大肠杆菌 DH5α,挑白色单菌落提质粒,*Bam*H I、*Eco*R I 酶切筛选鉴定出正确连接的克隆子,酶切鉴定结果如图 1 所示。

### 2.2 PCR 鉴定 Bacmid/VP31 基因的转座重组

Bacmid 重组不能通过酶切或电泳来确认,但可用 pUC/M13 正反向引物进行 PCR,由长度来确定,如果 Bacmid 与 pF<sub>AST</sub>B<sub>AC</sub>HTB-VP31 基因发生了重组,理论长度应为 2 430 bp 加上插入基因的长度 783 bp,合计为 3 213 bp。若未发生重组产物长度为 300 bp,电泳结果显示在 3 213 bp 附近有一条目的片段,表明转座重组 Bacmid/VP31 基因成功(图 2)。

### 2.3 VP31 囊膜蛋白的筛选与纯化

重组转移载体 Bacmid/VP31 共转染 *Bm* 细胞。用显微镜法进行重组病毒鉴定,显微镜下观察重组病毒感染的 *Bm* 细胞应为无多角体。将重组病毒悬液接种家蚕。病蚕血淋巴上清液经 10% SDS-PAGE 电泳分析,以及上清液经 Ni<sup>2+</sup> His-tag 亲和层析柱纯化后的电泳分析,发现在约 31 kDa 处有一特异条带(图 3)。特异性条带大与预计的基本一致,表明 VP31 蛋白能在 5 龄家蚕体内得到了较为完好的表达。

### 2.4 多克隆抗体对病毒的中和作用

在气温 15 ~ 22 °C 的条件下养殖的结果显示,抗血清中和组 LT<sub>50</sub> 为 15 d,死亡率为 55%。而 WSSV

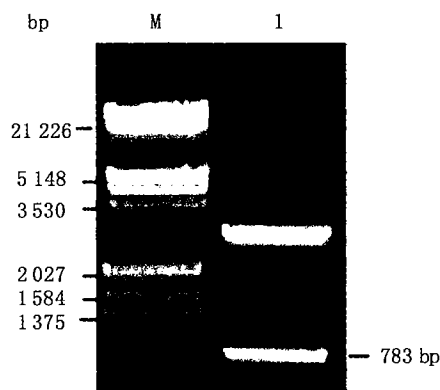


图 1 pUCm-T VP31 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis of pUCm-T VP31

M. Lambda DNA 分子量标准; 1. Bacmid/VP31/*Eco*R I + *Bam*H I 酶切产物

粗提液感染的阳性对照组  $LT_{50}$  为 6 d, 死亡率为 85%; 兔正常血清对照组  $LT_{50}$  为 7 d, 较阳性对照组稍微有所延长, 但死亡率也达到了 80%; 阴性对照组即健康虾粗提液注射组一直健康活泼, 20 d 内基本上无死亡(表 1)。

### 3 讨论

昆虫杆状病毒表达系统与大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞表达系统一起组成了当今基因工程领域的 4 个表达系统。昆虫杆状病毒表达载体系统是目前公认的很有应用价值的真核生物表达系统, 其超高效表达能力、安全性和易操作性越来越受到人们的青睐。昆虫表达系统对转译后的产物能正确加工, 与原核、酵母表达系统相比, 其表达产物具有更好的天然生物活性<sup>[11]</sup>。目前欧美等发达国家广泛应用 AcNPV 表达系统。AcNPV 具有寄主范围较广, 能感染 28 种昆虫, 对 Sf21、Sf9 及 Tn5 等昆虫细胞均具有感染性。但它的缺点是寄主昆虫个体小, 饲养困难, 难以适合产业化生产的要求。家蚕是一种极易饲养的经济昆虫, 家蚕 BmNPV 表达系统具有 AcNPV 表达系统的优点, 克服了其上述的缺点, 并且还可以在家蚕体内进行直接的表达。因此家蚕 BmNPV 表达系统除了蛋白质合成能力强及安全性好等优点外, 同时还具备适合产业化生产的要求。

本研究用重组病毒注射接种 5 龄起蚕, 经 SDS-PAGE 分析, 结果表明, WSSV-VP31 基因在家蚕体内得到了大量表达, 特异性条带大小与预计的基本一致, 约为 31 kD。这也证实了在家蚕体内直接表达该外源蛋白。WSSV 囊膜蛋白 VP31 免疫兔子制备的抗血清具有一定的中和病毒的能力, 其原因可能是病毒囊膜蛋白是病毒致病性的必需蛋白, 病毒的入侵需要病毒与细胞表面受体的特异性结合, 而囊膜蛋白的特异性抗体与病毒粒子的结合阻遏了病毒与受体的结合, 进而影响病毒的吸附和侵入。在本研究的中和试验也证实这一点, 2 倍稀释的抗血清中和组有明显推迟克氏螯虾对白斑综合征病毒的感染, 直到 20 d 后死亡率才达到 55%, 说明囊膜蛋白 VP31 与白斑综合征病毒的感染有一定的关系, 在病毒感染过程中可能起着重要作用。目前关于病毒囊膜蛋白与细胞受体的关系及其作用机理还有待于进一步研究, 但本文研究结果证实囊膜蛋白 VP31 在该病毒感染中的作用。

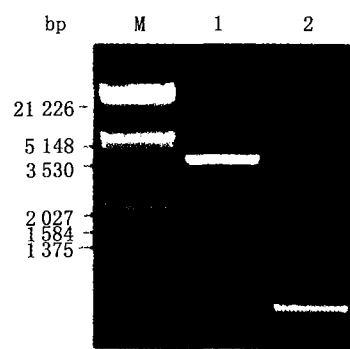


图 2 重组 Bacmid/VP31 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR products of Bacmid/VP31

M. Lambda DNA 分子量标准; 1. Bacmid/VP31 的 PCR 产物; 2. Bacmid 的 PCR 产物

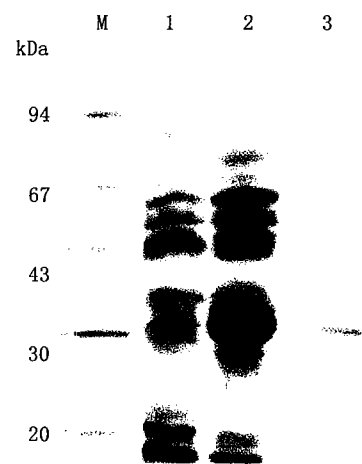


图 3 SDS-PAGE 分析家蚕血淋巴的表达产物

Fig. 3 Analysis of the expressed product of 5th larvae haemolymph by SDS-PAGE

M. 蛋白质分子量标准; 1. 阴性对照; 2. 重组 VP31 病毒粒子; 3. 纯化后的 VP31 蛋白

表 1 抗血清在克氏螯虾体内中和病毒的结果

Tab. 1 Result of VP31 antiserum to neutralize WSSV infection of crayfish upon intramuscular injection

实验组	死亡数/实验数	20 d 内死亡率	$LT_{50}$ (d)
2 倍稀释的抗血清中和组	22/40	55%	15
阳性对照组	34/40	85%	6
阴性对照组	2/40	5%	>20
兔正常血清对照组	32/40	80%	7

## 参考文献:

- [1] Yang F, He J, Xu X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic white spot bacilliform virus[J]. *J Virol*, 2001, 75: 11811 - 11820.
- [2] 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.
- [3] Wang C H, Yang H N, Tang C Y, *et al.* Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures [J]. *Dis Aquat Org*, 2000, 41: 91 - 104.
- [4] Chang P, Lo C, Wang Y, *et al.* Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization[J]. *Dis Aquat Org*, 1996, 27: 131 - 139.
- [5] Tsai J M, Wang H C, Leu J H, *et al.* Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus [J]. *J Virol*, 2004, 78: 11360 - 11370.
- [6] Zhang X B, Huang C H, Tang X H, *et al.* Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS [J]. *Proteins*, 2004, 55: 229 - 235.
- [7] Xie X X, Li H Y, Xu L M, *et al.* A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles [J]. *Virus Res*, 2005, 108: 63 - 67.
- [8] Huang C, Zhang X, Lin Q, *et al.* Characterization of a novel envelope protein (VP28) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 2385 - 2392.
- [9] Huang R, Xie Y, Zhang J, *et al.* A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1357 - 1361.
- [10] Wang Y J, Yao Q, Chen K P, *et al.* Characterization of the genome structure of *Bombyx mori* densovirus (China isolate) [J]. *Virus Gene*, 2007, 35: 103 - 108.
- [11] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 中国农业科技出版社, 1998.