

WSSV 囊膜蛋白 $\nu p37$ 和 $\nu p39$ 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及其激活作用检测

王维新^{1, 2, 3} 黄 健² 高天翔³

(1. 辽宁医学院, 动物科学技术学院, 锦州 121001; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 青岛 266071; 3. 中国海洋大学, 生命科学与技术学部, 青岛 266003)

CONSTRUCTION OF $\nu p37$ AND $\nu p39$ BAIT VECTOR AND DETECTION OF ITS SELF-ACTIVATING EFFECT IN YEAST TWO HYBRID SYSTEM

WANG Wei-Xin^{1, 2, 3}, HUANG Jie² and GAO Tian-Xiang³

(1. College of Animal Science, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071; 3. Department of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

关键词: WSSV; $\nu p37$; $\nu p39$; 酵母双杂交; 载体; 激活作用

Key words WSSV; $\nu p37$; $\nu p39$; Yeast two hybrid system; Vector; Self-activating

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)03-0552-04

对虾暴发性流行病是近十年来危害对虾养殖业发展的重要病害之一,其主要病原为对虾白斑综合症病毒(WSSV)^[1]。近年来对 WSSV 的研究主要集中在其囊膜蛋白、黏附蛋白等结构蛋白方面^[2]。本实验室经病毒结合分析^[3]和病毒铺覆蛋白印迹技术(Virus overlay protein blot assay, VOPBA)初步研究,已证实 WSSV 存在 4 种病毒黏附蛋白(VAP),其中 VAP1 已确定为 WSSV 囊膜蛋白 $\nu p37$ ^[4],该蛋白存在有特征性的细胞结合域(RGD)。编码的蛋白包含 281 个碱基,与 Huang C. *et al.*^[5]报道的 $\nu p37$ 一致,其序列分析中有一细胞吸附序列(Cell attachment sequence)基序 RGD (Arg-Gly-Asp),RGD 一般为细胞外基质蛋白中细胞整合素(Integrin)家族受体上的识别位点,在细胞吸附中起作用^[6],印证了 $\nu p37$ 的细胞吸附能力。而 WSSV 结构蛋白 $\nu p39$ 缺乏相应的 RGD 位点,但在基因上与 $\nu p37$ 具有同源性。本文通过扩增 $\nu p37$ 、 $\nu p39$ 基因,构建诱饵载体,并检测其在酵母菌株 AH109 及 Y187 中的转录激活作用,目的是进一步利用酵母双杂交系统约取 WSSV 受体基因的 cDNA。

1 材料与方法

1.1 $\nu p37$ 和 $\nu p39$ 基因的 PCR 扩增 利用 Primer Premier 软件设计引物,以 NCBI 公布的 WSSV 全序列(GenBank Accession No. AF369029)为运算模板,分别在正、反向引物的 5' 引入 *Nde* I/*Pst* I 酶切识别序列,由上海生工生物公司合成。引物设计结果为: $\nu p37$ -Sense 5'-TTC GGC ATA TGG CGG TAA ACT TGG AT-3' (下划线为添加的 *Nde* I 酶切位点), $\nu p37$ -Antisense 5'-GAG CCT GCA GTG TCC AAC AAT TTA AAA AGA AG-3' (下划线为添加的 *Pst* I 酶切位点); $\nu p39$ -Sense 5'-TTC GGC ATA TGG CGG TAA ACT TGG AT-3' (下划线为添加的 *Nde* I 酶切位点), $\nu p39$ -Antisense 5'-GAG CCT GCA GTG TCC AAC AAT TTA AAA AGA AG-3' (下划线为添加的 *Pst* I 酶切位点)。

用 WSSV DNA 做 PCR 扩增模板,反应条件以热启动方式进行,随后的反应参数为 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环。72°C 延伸 7 min。

1.2 $\nu p37$ 和 $\nu p39$ 的定向克隆与鉴定 将 $\nu p37$ 、 $\nu p39$ 分别做

收稿日期: 2007-10-08 修订日期: 2008-12-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划课题(2006CB101801); 国家 863 计划课题(2006AA100306); 公益性行业(农业)专项(200803012); 国家自然科学基金课题(30871942)资助

作者简介: 王维新(1973-),男,汉族,河北人;硕士生;主要从事病毒分子生物学研究。E-mail: buyuzheshou@163.com

通讯作者: 黄健, E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

Nde I/*Pst* I 的双酶切, 然后进行产物纯化, 把酶切产物与同样做双酶切的 pGBKT7 线性载体连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞。培养物涂布在 50 μ g/mL 卡那霉素的 SOB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养约 12–16h。从平板上随机挑取几个菌落做菌落 PCR, 反应参数为 95 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环。72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应结束后, 每管取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检查有否扩增物。对有插入片段的菌落再次扩增培养。用 SDS 裂解法从培养物中提取质粒 DNA。取质粒样品做 *Nde* I/*Pst* I 的双酶切鉴定; 分别将 200 μ L 含 pGBKT7- ψ 37, pGBKT7- ψ 39 重组质粒的 DH5 α 菌株 (LB 液体培养基), 送上海博亚公司测序。

1.3 酵母感受态细胞的制备 感受态细胞制备以前, 挑取少量 Y187 原始菌株冻存物, 划线培养于 YPDA 平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养, 直至菌落出现 (0–3d)。克隆出现以后, 用 Parafilm 膜密封, 4 $^{\circ}$ C 下可保存 1 个月。挑取一个克隆 (\leq 4 周, 直径 2–3mm) 置于 1 个 15 mL 含 3 mL YPDA 液体培养基的

灭菌离心管中, 30 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 8h 转移 5 μ L 培养物于 1 个 250 mL 含 50 mL YPDA 液体培养基的锥形瓶中, 30 $^{\circ}$ C, 230–250 r/min 16–20h, OD₆₀₀ 应达到 0.15–0.3。培养物在室温下, 3000 r/min 离心 5min 弃上清, 重悬细胞在 100 mL YPDA 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 3–5h (OD₆₀₀ = 0.4–0.5); 培养物在室温下, 3000 r/min 离心 5min 弃上清, 重悬细胞在 60 mL 灭菌去离子水中, 培养物在室温下, 3000 r/min 离心 5min 弃上清, 重悬细胞在 3 mL 1.1 \times TE/LA 溶液中, 分装细胞悬液在 2 个 1.5 mL 的微量离心管中, 高速离心 15min 弃上清, 重悬细胞在 600 μ L 1.1 \times TE/LA 溶液中, 即为感受态细胞。

1.4 重组质粒转化酵母感受态细胞 设置 6 个灭菌的 Eppendorf 管, 按表 1 加入各组分。详细操作步骤参照 BD MatchmakerTM Library Construction & Screening Kits (Clontech, Cat No. K16015-1) 使用手册进行。

表 1 重组质粒转化酵母的组分及对照设置
Tab. 1 Components and control of recombinant transforming into yeast

Eppendorf 管编号	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]
500ng/ μ L pGBKT7 (μ L)	—	—	—	0.5	0.5	—
50ng/ μ L pGBKT7- ψ 37 (μ L)	3	3	—	—	—	—
50ng/ μ L pGBKT7- ψ 39 (μ L)	—	—	3	3	—	—
10mg/mL Herring Testes Carrier DNA (μ L)	5	5	5	5	5	5
AH109 感受态细胞 (μ L)	50	—	50	—	50	—
Y187 感受态细胞 (μ L)	—	50	—	50	—	50
PEG/LA 溶液 (μ L)	500	500	500	500	500	500

1.5 重组子的自激作用检测 将 1.4 中制备的混合物各取 100 μ L 按 1:10, 1:100 和 1:1000 稀释度分别涂在含 SD/-Trp/-X- α -Gal SD/-Trp/+HIS/-X- α -Gal SD/-Trp/-Ade/-X- α -Gal 选择培养基的 100 mm 培养皿上, 培养箱中 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3–5d。其中 Y187 (pGBKT7) 平板用以计算转化效率。

1.6 DNA-BD 融合蛋白毒性检测 在 1.5 的平板上分别挑取 AH109 (pGBKT7- ψ 37)、Y187 (pGBKT7- ψ 37)、AH109 (pGBKT7- ψ 39)、Y187 (pGBKT7- ψ 39)、Y187 (pGBKT7) 菌株的较大单克隆 (2–3 mm), 分别接种于含有 50 mL SD/-Trp/Kan (20 μ g/mL) 液体培养基的锥形瓶中; 30 $^{\circ}$ C, 140 r/min 过夜培养 (16–24h); 取少量培养物, 用紫外分光光度计检测 OD₆₀₀ 通过光密度值的大小判断融合蛋白有无毒性。

2 结果

2.1 ψ 37, ψ 39 基因扩增结果

由图 1 看出, 扩增效果较理想, ψ 37, ψ 39 均与理论产物大小吻合, 说明引物设计、反应条件合理。

2.2 重组子的酶切鉴定及测序

pGBKT7- ψ 37, pGBKT7- ψ 39 酶切后, 小片段分别约

840bp, 830bp 与目标产物大小吻合, 大片段与对照酶切质粒位置一致 (图 2 图 3), 说明 pGBKT7- ψ 37, pGBKT7- ψ 39 融合质粒的构建是正确的。另外由测序结果看, 与目标基因的序列完全一致。

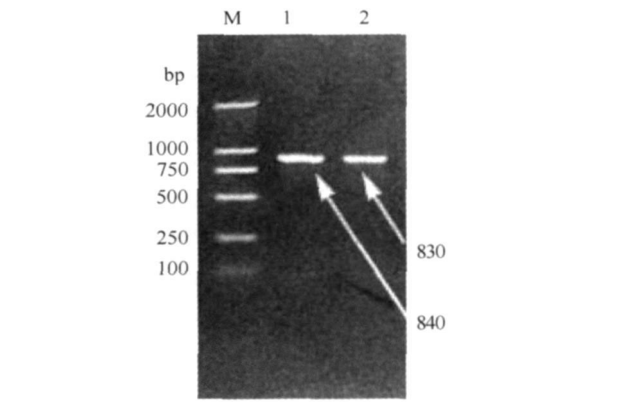


图 1 ψ 37, ψ 39 基因的 PCR 产物
Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from ψ 37 and ψ 39
Lane M: DNA 2000M arker Lane 1: ψ 37 gene Lane 2: ψ 39 gene

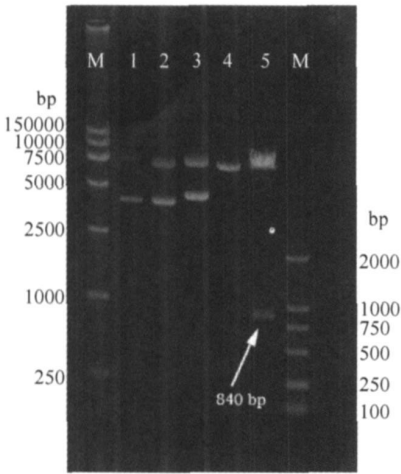


图2 pGBKT7-*vp37* 双酶切鉴定

Fig. 2 AGE analysis of pGBKT7-*vp37* digested with *Nde* I and *Pst* I
Lane M: DNA 15000 Marker; Lane 1 and Lane 2: pGBKT7; Lane 3:
pGBKT7-*vp37*; Lane 4: pGBKT7 digested with *Nde* I and *Pst* I; Lane
5: pGBKT7-*vp37* digested with *Nde* I and *Pst* I

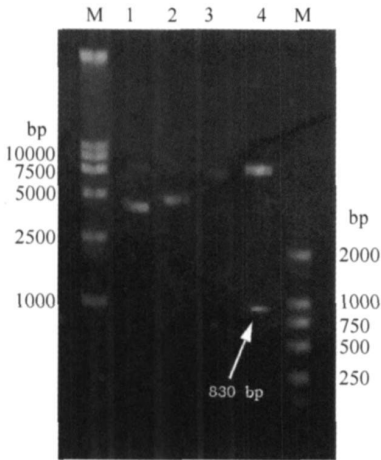


图3 pGBKT7-*vp39* 双酶切鉴定

Fig. 3 AGE analysis of pGBKT7-*vp39* digested with *Nde* I and *Pst* I
Lane M: DNA 15000 Marker; Lane 1: pGBKT7; Lane 2: pGBKT7-
vp39; Lane 3: pGBKT7 digested with *Nde* I and *Pst* I; Lane 4:
pGBKT7-*vp39* digested with *Nde* I and *Pst* I

2.3 Y187(pGBKT7) 平板的转化效率

以 1: 1000 稀释板为计算依据, 计算的转化效率为 8×10^5 cfbnies/ μ g DNA, 符合实验要求。

2.4 DNA-BD融合蛋白的自激作用检测

AH109 (pGBKT7-*vp37*) 在 SD/-Trp/X- α -Gal SD/-Trp/-His/X- α -Gal SD/-Trp/-Ade/X- α -Gal 上生长, 菌落大小在 3mm 左右, 在培养基上实际呈蓝色 (图 4), 表明有较强烈的自激作用。Y187 (pGBKT7-*vp39*) 在 SD/-Trp/X- α -Gal SD/-Trp/-His/X- α -Gal SD/-Trp/-Ade/X- α -Gal 培养基上表现正常, 无自激作用。AH109 (Library) 在 SD/-Trp/X- α -Gal SD/-Trp/-His/X- α -Gal SD/-Trp/-Ade/X- α -Gal 培养基也无生长,

说明文库中的 dDNA 插入片段表达产物无结合域功能, 可用于双杂交系统。另外, 对照菌株 Y187 (pGBKT7-53)、Y187 (pGBKT7-Lan)、Y187 (pGBKT7) 在平板上的表型正常, 符合实验要求。

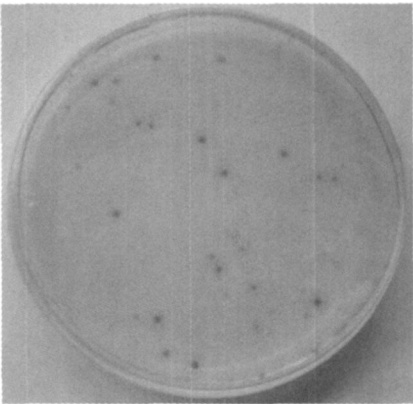


图4 AH109 (pGBKT7-VP37) 菌株在 SD/-Trp/-His/-Ade/-X- α -Gal 的培养结果

Fig. 4 Culture of AH109 (pGBKT7-VP37) on SD/-Trp/-His/-Ade/-X- α -Gal medium

2.5 DNA-BD融合蛋白的毒性检测

经紫外分光光度计检测 OD₆₀₀均大于 0.8 符合实验要求, 表明 *vp37* 和 *vp39* 的 DNA-BD 融合蛋白在 AH109 Y187 中能大量表达, 均不呈现毒性作用。

3 讨论

病毒蛋白铺覆技术研究结果表明, VP37 具有体外实验条件下与宿主细胞膜结合的活性, 这提示 VP37 在 WSSV 感染宿主的过程中可能起一定的作用, 找到与 VP37 相互作用蛋白, 进而为定位 WSSV 的受体以及确定防控 WSSV 引发的对虾暴发性流行病对策奠定基础。

酵母双杂交是一种灵敏度高的研究蛋白相互作用的技术, 但假阳性是一个较突出的问题^[7]。靶基因的自身激活作用就是造成假阳性结果的重要原因^[8-9]。在应用双杂交系统研究蛋白与蛋白相互作用, 尤其是筛选 dDNA 文库之前, 首先要排除诱饵融合蛋白的自激活功能, 否则假阳性结果会大大增加。

由本实验结果看, *vp37* 将 His3 Ade2 MEL1 三个报告基因全部激活, 说明有较强烈自激活作用, AH109 (pGBKT7-*vp37*) 表达的融合蛋白应该有转录激活域。我们没有使用 LacZ (α 半乳糖苷酶) 报告基因, 因为 LacZ 发挥作用的最适 pH 为中性, 而酵母的最适生长 pH 为酸性。另外, LacZ MEL (β 半乳糖苷酶) 属于显色性报告基因, 颜色变化受菌落密度、显色底物的浓度及均匀程度等的影响, 不好判断相互作用蛋白的结合强弱, 只适合于同其他营养缺陷型报告基因配合使用。

根据可能出现的假阳性结果, 有几种办法可消除假阳性的干扰: 一、如果融合菌株只在 SD/-His 培养基有少量生长,

可通过在培养基中加入 3-AT (3-氨基三唑) 来降低或消除背景; 二、如果在 SD/-His 和 SD/-Ade 均生长, 可以利用定点突变或基因重组的方式, 删除诱饵蛋白基因内部的激活域, 然后重新检测改造后基因的转录活性, 或尝试用弱的启动子^[10]。但是, 删除操作也可能消除相互作用蛋白的结构域; 三、可以调换载体, 比如把 $\psi 37$ 基因与 DNA-BD 结合, 文库的构建采用含 AD 的质粒, 但这样做比较麻烦的是, $\psi 37$ 扩增引物以及 pGADT7 的连接方式都要改变, 文库的构建方式也要调整; 四、试用不同的双杂交系统。目前根据酵母双杂交系统诱饵蛋白表达载体中融合蛋白的不同, 酵母双杂交系统主要分为 LexA 系统和 Gal4 系统, 而选用不同的融合蛋白诱饵表达载体与构建的重组诱饵蛋白的子激活作用有关。例如, 分化抑制因子 ID1 重组入 Gal4 系统的诱饵表达载体后, 将导致自激活的发生^[11], 而重组入 LexA 系统就不发生自激活作用^[12]。

本实验验证了 $\psi 37$ 在酵母双杂交系统中有自激活作用, 而 $\psi 39$ 无自激活作用, 这为我们应用 $\psi 37$ 、 $\psi 39$ 筛选 cDNA 文库奠定了初步基础。下一步的工作是对 $\psi 37$ 进行改造, 消除其自激活作用。然后利用酵母双杂交系统筛选与 $\psi 37$ 、 $\psi 39$ 有相互作用的蛋白。

参考文献:

- [1] Huang J, Song X L, Yu J, *et al* Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis—study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp [J]. *Marine Fisheries Research*, 1995, **16**(1): 1—10 [黄健, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死一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]
- [2] Zhao X Y, Wei C, Dai L F, *et al* Research on the prokaryotic expression and characteristics of $\psi 28$ —a structure protein of penaeus monodon white spot syndrome virus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 234—239 [赵新颜, 魏聪, 戴玲芬, 等. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP28 的原核表达和性质研究. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 234—239]
- [3] Song X L, Liang Y, Huang J, *et al* In vitro binding between white spot syndrome virus and hemocytes of penaeid shrimp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(1): 386—393 [宋晓玲, 梁艳, 黄健, 等. 白斑综合症病毒与对虾血淋巴细胞的外结合实验. 水生生物学报, 2006, **30**(1): 386—393]
- [4] Liang Y, Huang J, Song X L, *et al* Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, **66**(1): 81—85
- [5] Huang C, Zhang X, Lin Q. Characterization of a novel envelope protein (VP37) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry [J]. *Journal of Gene Virology*, 2002, **83**(10): 2385—2392
- [6] Wang C Q. Basis of molecule immunology [M]. Beijing: Peking University Press, 1997, 171—172 [王重庆. 分子免疫学基础. 北京: 北京大学出版社, 1997, 171—172]
- [7] Xu X, Liang H P, Liu X, *et al* Cloning and expression of NF- κ B p50 subunit DNA binding domain and detection of its self-activation in the yeast two-hybrid system [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2003, **25**(2): 123—126 [徐祥, 梁华平, 刘昕, 等. p50 DNA 结合域的克隆、表达及其酵母双杂交自身激活作用检测. 第三军医大学学报, 2003, **25**(2): 123—126]
- [8] Ruden D M. Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids [J]. *Chromosome*, 1992, **101**: 342—348
- [9] Ruden D M, Ma J, Li Y, *et al* Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences [J]. *Nature*, 1991, **350**: 250—251
- [10] Gabet G, Toby Erica A. Golenis Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approach [J]. *Methods (San Diego, Calif)*, 2001, **24**: 201—217
- [11] Bounphening M A, Meinkova I N, Dinas J. Identification of a new transcriptional activity of mammalian Id proteins [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(7): 1740—1746
- [12] Jia S Y, Qi J, Luo X D. Construction of ID1 bait vector and detection of its self-activating effect in yeast two hybrid system [J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*, 2003, **4**(2): 84—86 [贾思远, 齐洁, 罗向东. 分化抑制因子 ID1 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及自激活作用的检测. 西北国防医学杂志, 2003, **4**(2): 84—86]