

对虾白斑综合症病毒结构蛋白 60B 的原核表达 和其基本氨基酸序列的初步分析

李 佳¹ 肖 因² 王玉珍² 袁 丽² 徐 涛² 张晓华² 戴和平²

(1. 武汉大学生命科学院, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: VP60B 是对虾白斑综合症病毒(WSSV) 中含量很少的一个结构蛋白。VP60B 的一段序列与腺病毒纤维蛋白(Adenovirus type 5 fiber protein) 的 knob domain 的一段序列具有同源性。本试验将 VP60B 基因克隆到原核表达系统中, 在低温条件下, 诱导了 VP60B 蛋白的表达。结果显示 VP60B 在该系统主要是以包含体的形式存在。原核表达的 VP60B 不能被鼠抗 WSSV 多克隆血清所识别, 预示该蛋白的免疫原性较弱。通过对 VP60B 氨基酸序列的分析, 发现有一个跨膜区, 这预示着该蛋白可能位于 WSSV 病毒的囊膜上。

关键词: 对虾白斑综合症病毒(WSSV); VP60B; 原核表达

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 1006-3207(2007)05-0712-06

对虾白斑综合症病毒(WSSV) 是一类具囊膜的双链 DNA 病毒, 是目前对虾养殖业中危害性最大的病原体^[1]。WSSV 的 DNA 分子长度为 305kb, 约有 181 个开放阅读框^[2]。通过二维凝胶电泳分析, 可得到 60 多个蛋白斑点^[3], 但是该病毒到底有多少种结构蛋白, 目前还没有最后的定论。

WSSV 病毒如何感染宿主细胞, 其囊膜以及核衣壳蛋白在系统感染过程中所起的作用正是目前研究的焦点。Tsai 等人^[4] 用 SDS-PAGE 分离到 30 多条可见的病毒蛋白条带, 用质谱法鉴定了 33 个病毒结构蛋白。通过数据库检索和比对, 发现其中标号为 VP60B(ORF WSSV474) 的蛋白的氨基酸序列有一段与腺病毒的纤维蛋白的部分序列相似。腺病毒的纤维蛋白是该病毒进入宿主细胞的关键蛋白^[5], 那么 VP60B 中这段与之同源的序列具有什么意义? 它在 WSSV 感染宿主细胞的过程中有何作用? VP60B 的功能到底是什么? 为了解决这些问题, 我们首先从 WSSV 病毒 DNA 中克隆了 VP60B 的基因, 并在大肠杆菌中实现了表达, 为进一步研究该蛋白的性质和功能打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 pET32a 质粒载体购至 Novagen,

PCR 引物为上海华诺公司合成, 限制性酶 *EcoR* V、*Sal* I 为 NEB 生产, HRP/Anti-Etag conjugate 鼠单抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 等, 购自 Amersom-Pharmacia 公司; 鼠抗 WSSV 血清由本实验室制备; 氨苄青霉素、IPTG、TMB、DAB、葡萄糖等常规生化试剂均购自华美公司; T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司; Pfu 酶及 PCR 反应系统购自 Gene 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Biostar 公司。

1.2 SSV 病毒及其 DNA 的提取和纯化 WSSV 来源于汕头南澳岛的病毒株, 经感染克氏螯虾进行扩增。按扬丰等人的方法纯化病毒^[6], 按 van Hulten 等人的方法提取病毒 DNA^[7]。

1.3 VP60B(wssv474) 基因的克隆 根据已经公布的 VP60B(wssv474) 的基因序列^[4], 设计了一对特异引物(P1, P2): 5' *cgg/gat/atc/atg/ttc/cgt/caa/ttc/tgt/tc3'*, 5' *cgg/ttg/tcg/acg/gta/taa/tgg/ctg/cac/gtt/ttg3'* 并根据 pET32a 质粒载体的酶切位点, 在引物中分别添加了限制性酶 *EcoR* V、*Sal* I 的酶切位点(斜体)。以纯化的 WSSV 病毒 DNA 为模板, PCR 扩增 VP60B 基因。PCR 的反应条件为: 94 °C, 1min; 57 °C, 1min; 72 °C, 2min, 经 30 个循环后, 72 °C 保温 5min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 以玻璃奶法回收纯化, 再用 *EcoR* V 和 *Sal* I 于 37 °C 水浴中酶切

收稿日期: 2005-06-16; 修订日期: 2006-09-15

基金项目: 国家自然科学基金(30471339); 国家 863 计划(2001AA620602) 资助

作者简介: 李佳(1984—), 女, 湖北省武汉市人; 本科生; 研究方向为分子生物学。E-mail: lijia@ihb.ac.cn

通讯作者: 戴和平, Tel: 027-68780716, E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

4h, 再经琼脂糖凝胶电泳, 回收约 1600bp 大小的 DNA 片段。pET32a 质粒载体同法用 *EcoR V* 和 *Sal I* 双酶切, 然后经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳回收, 将经纯化的质粒载体酶切产物进行去磷酸化, 再经琼脂糖凝胶电泳回收, 定量后, 以常规方法, 用 T_4 连接酶, 在 16 °C 反应过夜的条件下, 将质粒载体同外源片段连接。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α (克隆宿主菌株) 中, 通过含氨苄青霉素的平板筛选, 得到阳性克隆株。接种阳性单克隆, 提取质粒, 用 *EcoR V* 和 *Sal I* 进行双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳检验, 将连接了外源片段的质粒转化到表达宿主菌株大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 用含氨苄青霉素的平板进行筛选阳性克隆(以下称 VP60B- BL21(DE3))。将所得的阳性克隆中的载体插入片段作 DNA 测序验证。

1.4 VP60B 的诱导表达 将新鲜转化的 VP60B- BL21(DE3) 菌株在 LB+ A 培养基(10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母浸粉, 10g/L 氯化钠, 50mg/L 氨苄青霉素) 中, 37 °C, 振荡过夜。取 10mL 过夜培养物到 200mL LB+ A 培养基中, 37 °C, 振荡至 OD₆₀₀ = 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 15 °C 诱导过夜(约 15h 至 20h)。将菌液在 4 °C 下离心, 6000r/ min, 5min, 去上清, 将沉淀重悬于 25mL 20mmol/L Tris-HCl pH7.5 中, 用 French pressure 破碎细胞, 然后在 4 °C 下离心, 15000r/ min, 10min, 分别收集沉淀和上清。表达产物 N 端带有 S-tag。

1.5 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳和 Western Blot 分别将前步收获的菌液, 细胞裂解上清液, 膜沉淀, 周质空间及 IPTG 诱导前的菌液用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 然后将蛋白带电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜) 上, 4 °C, 100mA, 1h。将 NC 膜取出后, 经丽春红染色 1min, 标出标准分子蛋白条带的位置, 清水洗去染料后, 用 4% PBSM(含 4% 脱脂奶粉的 PBS 溶液) 封闭 NC 膜 1h, 接着将 NC 膜在 1: 5000 倍稀释的 S-protein-HRP 的 4% PBSM 溶液中保温 1h, 然后用 PBST(含 0.1% 吐温 20 的 PBS 溶液) 和 PBS 各洗三次, 最后在 DAB 底物溶液中显色 15min。

另将同样经过电转移的 NC 膜, 经丽春红染色 1min, 标出标准分子蛋白条带的位置, 清水洗去染料后, 用 4% PBSM(用 PBS 配置 4% 的脱脂奶粉溶液) 封闭 NC 膜 1h, 接着将 NC 膜在 1: 500 倍稀释的鼠抗 WSSV 多克隆抗血清的 4% PBSM 溶液中保温 1h, 然

后用 PBST(含 0.1% 的吐温 20 的 PBS 溶液) 和 PBS 各洗三次, 接着在 1: 1000 倍稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 的 4% PBSM 溶液中浸泡 1h, 最后在 DAB 底物溶液中显色 15min。

1.6 对 VP60B 基因的序列分析和氨基酸序列比较 采用 DNASTar、Cluster X 等软件对 VP60B 的氨基酸序列进行分析。

1.7 Dot Blot 以 WSSV 为阳性对照, 分别细胞裂解上清液, 膜沉淀, 各 5 μ L 点在 NC 膜上, 用 PBSM 封闭后, 与 1: 1000 倍稀释的鼠抗 WSSV 血清 PBSM 溶液保温 1h, 洗净后, 再与 1: 1000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 的 4% PBSM 溶液保温 1h, 然后在 DAB 底物溶液中显色 10min。

1.8 DNA 测序 DNA 测序工作由上海基康公司代理, 步骤按照常规系统程序, 使用 BDT 2.0 试剂盒和 ABI DNA 测序仪。

2 结果

2.1 VP60B 基因的克隆

通过 PCR 扩增和外源片断与质粒载体的连接转化等常规分子生物学操作, 将 VP60B 基因插入到了 pET32a 载体上, 并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 用 *EcoR V* 和 *Sal I* 双酶切鉴定阳性克隆, 电泳结果(图 1) 表明 VP60B 基因已经成功插入到质粒载体上。随后的 DNA 测序报告(图 2) 显示插入载体的 DNA 片断 3' 端 300nt 和 5' 端 500nt 左右的序列与公布的天然 VP60B 基因 3' 端和 5' 端的序列完全相同, 并且没有出现移码。根据该序列分析得出, 原核表达产物在 VP60B 蛋白的 N 端连接了 S-tag, 含 15 个氨基酸残基, 及 Trx-tag, 含 109 个氨基酸残基, 共计增加了 124 个氨基酸残基。PCR 扩增的天然 VP60B 基因有 1635nt, 编码 545 个氨基酸, 理论大小为 60.8kDa, 本实验原核表达的 VP60B 理论大小为 74kDa。

2.2 VP60B 蛋白的诱导表达

利用 pET32a 表达系统, 选用表达宿主菌株 BL21(DE3), 在 15 °C 条件下, VP60B 蛋白可被较高的诱导表达(图 3)。30 °C 和 37 °C 条件下的表达效果都不好(数据未显示)。SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳结果(图 4a) 及利用 S-protein-HRP 检测的 Western Blot (图 4b) 结果表明破碎细胞后 VP60B 主要存在于沉淀中, 说明该条件下表达的 VP60B 主要以包涵体形式存在。

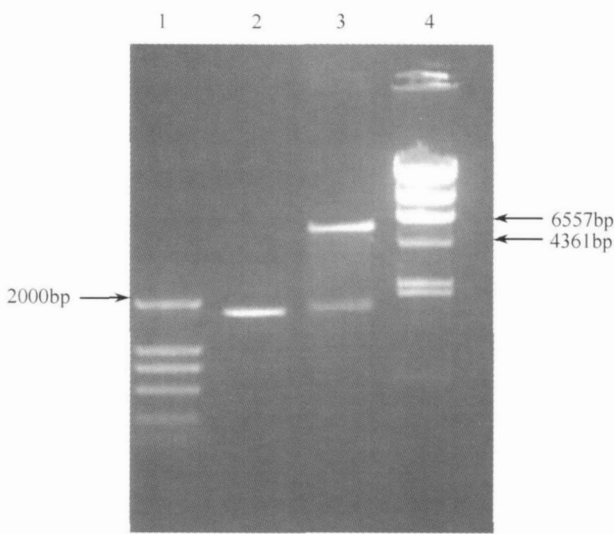


图1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel (0.8%) showing the results of PCR and the digested clone fragments
 1: DL2000 DNA Marker; 2: VP60B 基因 PCR 检测; 3: VP60B pET32a 质粒的双酶切检测(*EcoR V*, *Sal I*); 4: λDNA/*Hind III* DNA Marker
 Lane 1, DL2000 DNA Marker; Lane 2, PCR Product of the VP60B gene;
 Lane 3, digested clone fragments with *EcoR V* and *Sal I*; Lane 4, λ DNA/*Hind III* DNA Marker

ACCACAAGGCCATGGCTG**ATATC**ATGTTCCGTC AATTCTGTTCACTATATCTTCTTCAACGCCGGGTTA
 ACGACAATCTTAGATCCACGGCGTCCGCTTCGGCAGCGGCCTCAITAAAAGGAGATGGAACCTGAAITT
 ATAACCGGAGAACCACCTTCTCATAAAATGAGGGACCTTCTTATAGCGTTTTAGGACCTGATCCGTGC
 GAGGACCCAGAAAAGGTAATGTTGATATGTAGTGTCTATTTGCAGACAAATAATATACAGGTAACA
 AAAGAATGGGAATTGTTTTCCGATAAGTTGAGAAAATGGGTCCATGGATTGATAGGAGCGGAATTGA
 GAATAATGGCGAAGGAGAAGAAGATGGAGATGAAAATGAAGACGGGGGTGGAAATGGGGGAAGAAT
 TGAAGACAGAGAAGCACATCGACGAAAAATGATGAAGAAATGTCCTTTGTTGGAAGAGAAGATCCA
 GTCGCTGTAGATTTACCCACGTGGCGAGAAAACAGTACAGAAATTCACGTCGTTTAACTCAAGGA
 ATGTGCGAATTAATAGTTGAATGTGGATGCATCAAATCAAAAGAGGAACTCTTTGACTTCATTTTGA
 AGAACC-----TTTAAACATCTTTGTTCCCTGTCTTTGCCTCTAAAGACACTGGTGCGAATAT
 CTTATTTTTTATCAAATGAAATCCTTTGCAAGTGCATCTTACTCCTCCCTGGACTTTTTAGACACCCC
 AAAAATTTCTCAACGGGCCGTGCAAATGGATGACTCTAGCAGAAAACAACATCAACGACAACAACA
 TAAACTCTCCACGATGTGGAGTTACACGCTAGCAGATTATGTCCTCTGGGCTATTACACCCAAGAGA
 GCCCTCAACCCTATCAGACATGCGGCAATTTACTTCGACTACAAAACAAGAGACTACAAAACGTGCAG
 CCATTATA**CCGTCGACA**AGCTTTCGGGCCCACTCGAGCACCACCACCACACTGAGATCCGGCTG
 CTAACAAAGCCCGAAAGGAAG

图2 VP60B pET32a 测序结果

Fig. 2 The DNA sequence of VP60B in pET32a

下划线表示与天然 VP60B 基因序列相同, 黑体表示酶切位点

The underlined region means the open reading fram of native VP60B gene, the bolded region means *EcoR V* and *Sal I* recognized site

2.3 VP60B 蛋白的免疫原性

用鼠抗变性 WSSV 多克隆血清作为一抗的 Western Blot 结果表明, 原核表达的 VP60B 无法被鼠抗 SDS 变性的 WSSV 的多克隆血清识别。Dot Blot 结果表明原核表达的 VP60B 不能被鼠抗天然 WSSV 多克隆抗血清识别。可能原因有: VP60B 在天然 WSSV 中的含量很少, 其抗原性不强, 原核表达时主要是以包涵体形式表达。

2.4 VP60B 基因氨基酸序列的分析

编码 VP60B 的阅读框 wssv474 含有 1635nt, 编码

544aa, 理论分子量大小为 60.8kDa。其中大肠杆菌很少用到的稀有密码子如: AGA (Arg), AGG (Arg), CGG (Arg), GGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Ieu), GGA (Gly), CCC (Pro) 共有 60 个, 占总数的 11%。由计算机对 VP60B 序列进行分析, 预测其在 450aa 处左右到 469aa 处左右有一段跨膜结构域。在 InterPro 数据库中发现 VP60B 蛋白的一段序列与腺病毒纤维蛋白的 knob domain 的一段序列具有同源性(图 6)^[4], 该两段序列经 EMBOSS 网站 Alignment local 下的 Matcher 工具将两序列进行同源比对, 相似程度高达 70%。

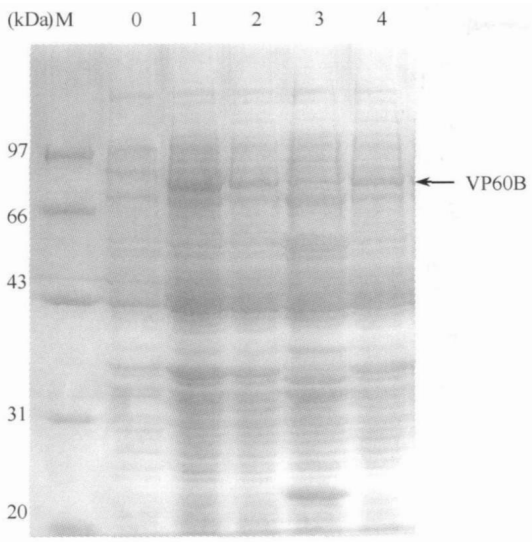


图3 VP60B BL21(DE3) 15°C 表达的 10%SDS PAGE 蛋白质凝胶电泳图 (箭头示意 VP60B)。

Fig 3 Ten percent Coomassie brilliant blue stained SDS PAGE gel of VP60B BL21 (DE3) expressed at 15°C with IPTG induction

M: 低分子量蛋白质 Marker; 0: 诱导前 VP60B BL21(DE3); 1: 15°C 诱导 17h 菌液; 2: 15°C 诱导 19h 菌液; 3: 15°C 诱导 22h 菌液; 4: 15°C 诱导 24h 菌液

Lane M: low molecular weight protein marker; Lane 0: VP60B BL21 (DE3) before induction; Lane 1: 17h after induction; Lane 2: 19h after induction; Lane 3: 22h after induction; Lane 4: 24h after IPTG induction

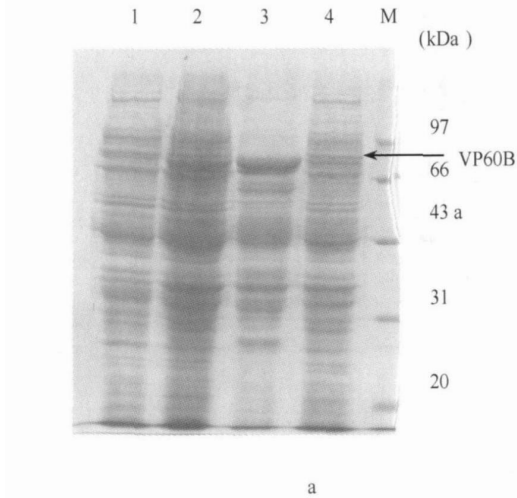


图4 SDS- PAGE 蛋白质凝胶电泳图(a) 和使用 S protein HRP 检验的 Westerr blot 图(b)

Fig 4 10% coomassie brilliant blue stained SDS- PAGE gel of induced VP60B BL21 (DE3) (a) and western blot of VP60B(b)

箭头示意原核表达的 VP60B 蛋白(73kDa)M: 低分子量蛋白质 Marker. 1: 诱导前菌液; 2: 15°C 诱导 17h 后的菌液; 3: 破菌后沉淀; 4: 破菌后上清

S protein HRP is used to detection Lane M: low molecular weight protein marker; Lane 1: VP60B BL21 (DE3) before induction of IPTG; Lane 2: 17h after IPTG induction; Lane 3: cell membrane extracts of VP60B BL21(DE3) after IPTG induction; Lane 4: supernatant of VP60B whole cell extracts after IPTG induction

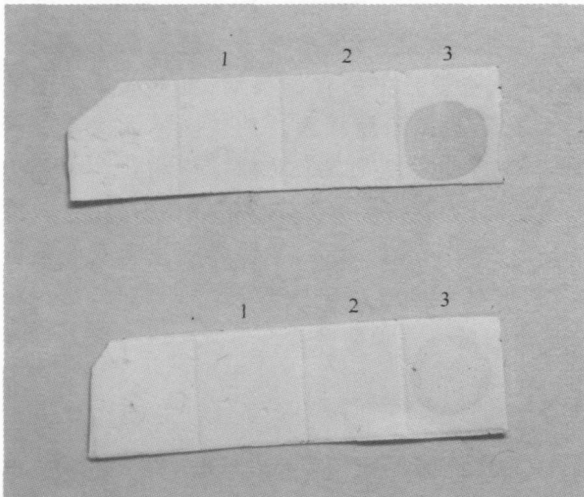


图5 原核表达的 VP60B 对鼠抗天然 WSSV 多克隆抗血清的 Dot blot 结果(a 为实验结果 b 为阴性对照)

Fig. 5 Dot blot to VP60B expressed in VP60B BL21 (DE3) at 15°C after IPTG induction, polyclonal antiserum of rats against WSSV is used to detect

1: IPTG 诱导 17h VP60B BL21 (DE3) 破菌后沉淀(重悬于水后点样); 2: IPTG 诱导 17h VP60B BL21(DE3) 破菌后上清; 3: 纯化的 WSSV

Spot 1: Cell membrane extracts of VP60B BL21 (DE3) after IPTG induction; Spot 2: Supernatant of VP60B whole cell extracts after IPTG induction; Spot 3: Purified WSSV

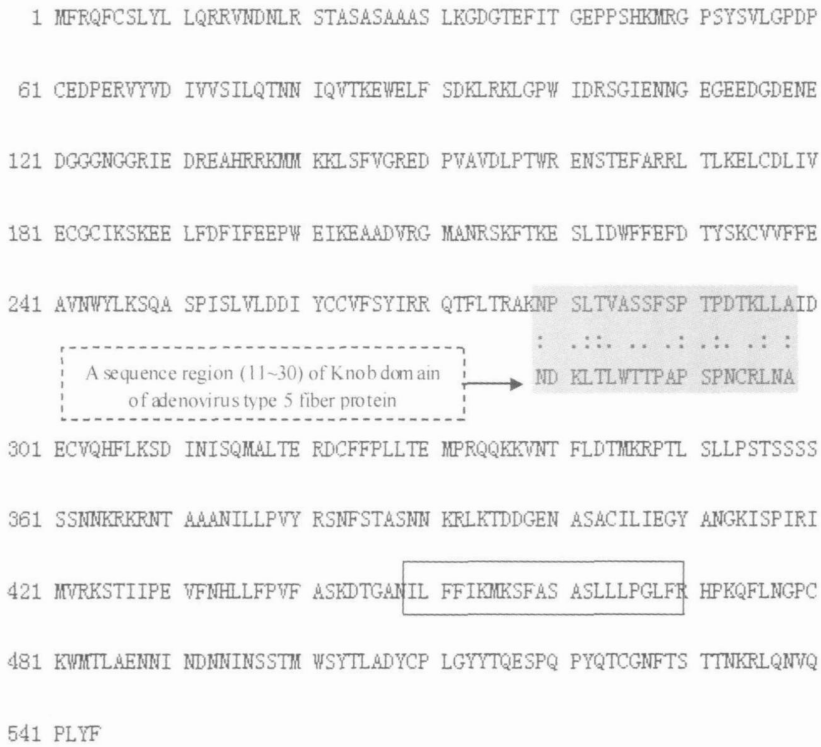


图6 VP60B蛋白的序列分析及与腺病毒纤维蛋白(Knob domain)的同源性比对

Fig. 6 The amino acid sequence of VP60B and the alignment between VP60B and the knob domain of adenovirus type 5 fiber protein

阴影区域表示和腺病毒纤维蛋白的同源性比对,方框区域表示计算机预测的跨膜区域

Shaded region means the alignment between the VP60B and the Knob domain of adenovirus type 5 fiber protein. Framed region means the predicted transmembrane domain of VP60B

3 讨论

根据对虾白斑综合症病毒基因组的序列分析,发现该病毒与所有其他病毒都没有同源性,是一个新病毒。因此国际病毒分类委员会将WSSV归属为新的Whispovirus属, Nimaviridae种(www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm)。由于这是一个全新的病毒,所以绝大多数WSSV病毒结构蛋白与其他病毒没有同源性,因此这些蛋白的功能无法通过与其他病毒蛋白的同源性分析进行预测。在InterPro数据库中找到,VP60B的一段序列与腺病毒纤维蛋白(Adenovirus type 5 fiber protein)的knob domain的一段序列(图6)相似^[4]。而该蛋白的这个结构域在腺病毒感染宿主细胞时介导了病毒吸附到宿主细胞,并引发了胞吞作用,从而使腺病毒成功感染宿主细胞。通过对VP60B氨基酸序列的分析,发现有一个跨膜区,这预示着该蛋白可能位于WSSV病毒的囊膜上,有可能与病毒感染宿主细胞有关。

鉴于此,我们认为有必要对WSSV VP60B蛋白功能进行深入地研究。我们首先克隆了该蛋白基因,并在大肠杆菌中进行了表达。由于该蛋白中有

大肠杆菌很少用到的稀有密码子共60个,占总数的11%,因而在高温(37℃)表达时,大肠杆菌稀有密码子的tRNA会不足,影响表达,因而表达量极少或不表达,而采取低温(15—20℃)诱导,延长诱导时间(15—20h),可以使VP60B得到较高的表达。由于本实验的表达系统是非分泌型,而氨基酸序列分析显示有跨膜区域,所以实验结果表明主要表达产物为包涵体形式。

该原核表达的VP60B蛋白并不能被鼠抗WSSV多克隆抗血清所识别,这个结果可能是由于该蛋白在WSSV病毒颗粒中的含量很低,也可能是它的免疫原性很低,再由于原核表达的包涵体无法正确折叠,所以表现出不能与WSSV的抗体结合。因此下一步还需尝试将VP60B在分泌型原核表达系统、或真核表达系统中进行表达,争取得到正确折叠的蛋白,以利于对VP60B蛋白在WSSV感染对虾细胞中的作用进行较深入地研究。

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, **161**: 1—10 [黄捷, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒的皮下及造血组织坏死 对虾爆发性病的病原和病理学. 海洋水产研究, 1995, **161**: 1—10]
- [2] Yang F, He J, Lin X, *et al.* The complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *J. Virol.*, 2001, **75**: 11811—11820
- [3] Zhang X, Huang C, Tang X, *et al.* Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome Virus (WSSV) by 2DE MS [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2004, **55**: 229—235
- [4] 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]. *Journal of Virology*, 2004, **78**: 11360—11370
- [5] Xia D, Henry L J, Gerard R D, *et al.* Crystal structure of the receptor binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution [J]. *Structure*, 1994, **2**: 1259—1270
- [6] 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
- [7] van Hulten M C, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, **286**: 7—22

PROKARYOTIC EXPRESSION OF VP60B OF SHRIMP WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND PRIMARY ANALYSIS ON ITS AMINO ACID SEQUENCE

LI Jia¹, XIAO Nan², WANG Yu-Zhen², YUAN Li², XU Tao², ZHANG Xiao-Hua² and DAI He-Ping²

(1. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072; 2. Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) from shrimp was first found in Taiwan in 1992. Since 1993, white spot syndrome disease of shrimp caused by this virus was widely spread throughout China, Asia and Part-Pacific Ocean. It can cause 100% cumulative mortality of cultured shrimps in 3—4 days. The virus particles contain five major proteins: VP28, VP26, VP24, VP19 and VP15. The mode of entry and systemic infection of WSSV in shrimp and the functions of these virion proteins are not clear. VP60B is a kind of minor structure proteins in WSSV particles. Using interproscan to analysis on homology to VP60B, a piece of sequence of amino acid in VP60B was found homology with adenovirus type 5 fiber protein knob domain. In this study, the gene of VP60B had been cloned into a prokaryotic expression system, and induced to express at low temperature. The result showed that the expressed protein was existed mainly as inclusion body in this expression system. Prokaryotic expressed VP60B could not recognize by polyclone antiserum against WSSV, which suggested that this protein might be a weak immunogen. According to the analysis of the sequence of amino acid, a trans-membrane domain was found, which suggested that this protein might locate on the envelop membrane of WSSV.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV); VP60B; Prokaryotic expression