

对虾白斑综合症病毒结构蛋白 VP28 的原核表达和性质研究

赵新颜 魏 聪 戴玲芬 高 宏 戴和平

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: VP28 是对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的一个重要的囊膜蛋白。为了便于研究 VP28 在和宿主细胞相互作用过程中扮演的角色, 将 VP28 基因克隆到一个原核表达系统, 对原核表达的 VP28 的特性进行了研究, 并制备了抗 VP28 的多克隆抗体和单链抗体, 对原核表达的和天然病毒的 VP28 蛋白免疫原性进行了比较。结果表明, 原核表达的 VP28 与天然蛋白具有相似的免疫原性。

关键词: 对虾白斑综合症病毒(WSSV); VP28; 原核表达; 噬菌体抗体

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)03-0234-06

对虾属于节肢动物门甲壳纲中枝鳃亚目中的对虾总科。近 20 年来, 对虾的养殖业发展迅速, 养殖规模也越来越大。但是由于对虾疾病的影响, 特别是 WSSV, 给养殖业造成了巨大的经济损失。WSSV 曾称为对虾无包涵体杆状病毒, 是一类具囊膜的双链 DNA 病毒, 毒力极强, 宿主范围较广泛, 感染宿主后 3—5 日致死率高达 100%, 因其标志性的病理症状而得名, 即有时皮下、甲壳及附肢出现白色斑点^[1-4]。WSSV 的 DNA 分子长度为 305Kbp, 约有 181 个开放阅读框^[9], 其病毒粒子至少包含 5 种结构蛋白, 分子大小分别为: 28kDa (VP28)、26kDa (VP26)、24kDa (VP24)、19kDa (VP19) 和 15kDa (VP15), 其中 VP28 和 VP19 是囊膜蛋白, VP26、VP24 和 VP15 是核衣壳蛋白^[5-7]。

WSSV 病毒如何感染宿主细胞, 其囊膜以及病毒蛋白在系统感染过程中所起的作用目前还不清楚。研究表明, WSSV 的囊膜是感染对虾所必须的。VP28 是 WSSV 的一个重要的囊膜蛋白。van Hulten 等人将 VP28 基因成功地克隆到杆状病毒的表达载体上, 并在昆虫细胞中表达, 由该系统表达的 VP28 蛋白所制备的高浓度的抗 VP28 的动物血清对于 WSSV 具有中和作用, 这显示 VP28 可能在 WSSV 感染宿主的过程中起着关键性的作用^[6]。然而在此之后便没有类似的报道了。虽然杆状病毒表达系统能

模拟真核环境, 但操作比原核表达系统要复杂得多, 因此为了简化操作程序, 作者尝试将 VP28 在原核系统中进行表达, 并对其表达产物与野生型 VP28 蛋白的性质进行比较, 确定其是否能用于病毒与宿主细胞相互作用的研究。为了上述目的, 将 VP28 基因克隆到一个 M13 噬菌粒表达载体-Pcantab 5E 上, 然后对原核表达的 VP28 蛋白的特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试剂 HRP/Anti-Etag conjugate, 鼠单抗, Anti-Etag 亲和层析柱, 兔抗鼠 IgG-HRP, Pcantab 5E 载体等, 购自 Pharmacia 公司; 鼠抗 WSSV 血清由本实验室制备; 羊抗兔-HRP 购自博士德公司; 氨卞青霉素, IPTG, TMB, DAB, 葡萄糖等常规生化试剂均购自华美公司; *Sfi* I, *Not* I, *Hind* III 限制性内切酶, 以及 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 WSSV 病毒及 DNA 的提取和抗体库的构建 WSSV 来源于海南岛的被感染的斑节对虾血淋巴液, 其纯化过程如高宏等^[8]。抗 WSSV 噬菌体抗体库由本实验室构建, 方法如 Dai et al.^[10]。

1.3 VP28 基因的克隆 根据已公布的 VP28 基因

收稿日期: 2002-12-24; 修订日期: 2003-10-30

基金项目: 中国科学院择优特别支持费[Sz98-3-05]; 国家自然科学基金[30170727]; 国家 863 计划[2001AA620602]资助。

作者简介: 赵新颜(1976—), 男, 湖北省武汉市人; 硕士研究生; 研究方向为生化及分子生物学

通讯作者: 戴和平 Tel: 027-87647716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

序列^[7,9], 设计一对 PCR 引物(P1, P2), 序列如下: 5' CAGAGCAAGGCCAGCCGGCCAAAAAATCGTCATGG 3' 和 5' TTCTACGTGGCGCCGCTCGGTCTCACTGC 3'。引物中分别加上了 *Sfi* I 和 *Not* I 限制性酶切位点。以纯化的 WSSV 病毒 DNA 为模板, PCR 扩增 VP28 基因。PCR 产物经琼脂糖电泳后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化, 再用 *Sfi* I 于 50℃ 水浴中酶切 3h, 接着再用 *Not* I 于 37℃ 水浴中酶切 4h。然后经琼脂糖电泳, 回收约 600bp 的 DNA 片段。PcantaB 5E 载体同法用 *Sfi* I 和 *Not* I 做双酶切, 然后经琼脂糖电泳回收 4500 bp 的 DNA 片段。以常规操作, 将这两种 DNA 片段连接并转化大肠杆菌 TG1。通过氨苄青霉素平板抗性筛选, 得到阳性克隆株(以下命名为 VP28-TG1)。经 Hind III 和 *Not* I 双酶切检验及 PCR 检验后, 将所得的阳性克隆中的载体插入片段作 DNA 测序验证。

1.4 VP28 蛋白的表达和纯化、以及可溶性单链抗体 B7 的制备 将新鲜的 VP28-TG1 菌株在 2YT-AG 培养基(17g/L 胰蛋白胨, 10g/L 酵母浸粉, 5g/L 氯化钠, 100mmol/L 氨苄青霉素, 2% 葡萄糖)中 30℃ 振荡培养至 OD₅₉₀ 0.6—0.8; 离心 1500r/min, 4℃, 20min; 弃上清, 菌体重悬于 2YT-AI 培养基(17g/L 胰蛋白胨, 10g/L 酵母浸粉, 5g/L 氯化钠, 100mmol/L 氨苄青霉素, 1mmol/L IPTG)中, 37℃ 振荡培养过夜。离心收获菌体后, 先将菌体重悬于 1% 培养基体积的冰浴放置的 1 × TES [0.2mol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.5mmol/L EDTA, 0.5mol/L 蔗糖] 中 10min, 然后加入两倍体积的冰浴放置的 1/5 × TES, 混匀, 冰浴 30min, 离心 1500r/min, 4℃, 20min, 收集上清(周质空间抽提液), 储存于 -20℃ 备用; 菌体沉淀重悬于 10 倍于菌体体积的裂解缓冲液[50mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 50mmol/L NaCl, 5% glycerol] 中, 冰浴 10min 后, 超声波破菌; 离心 8000r/min, 4℃, 20min, 收集上清; 然后将上清超速离心 100, 000r/min, 4℃, 1h, 保留上清(细胞裂解液上清)备用, 部分上清立即用 anti-Etag 亲和层析柱纯化 VP28 蛋白; 沉淀(主要是细胞膜)经双蒸水洗涤后重悬于 4% Triton 100/PBS 溶液中, 储存于 -20℃ 备用; 可溶性单链抗体 B7 的制备方法如上述方法一样, 收获 B7 周质空间抽提物。

M13 噬菌体 P3 蛋白融合型 VP28 的制备方法为: 取过夜培养的 VP28-TG1 菌株以 1:100 的比例接种到 750mL 2YT-AG 培养基中, 37℃ 振荡培养约 1h, 至 OD₅₉₀ 0.3 左右; 接着按 5:1 (噬菌体: 大肠杆菌) 的比例加入 M13K07 辅助噬菌体, 继续 37℃ 振荡培养

1h。离心 (1500r/min, 4℃, 20min), 菌体重悬于 250 mL 2YT-AK (17g/L 胰蛋白胨, 10g/L 酵母浸粉, 5g/L 氯化钠, 100 mmol/L Amp, 50μg/mL 卡那霉素) 中, 37℃ 振荡培养 16h; 离心 (7000r/min, 4℃, 20min), 转移上清至一灭菌的离心管中, 加入 50mL PEG/NaCl (20% PEG 6000, 2.5mol/L NaCl), 冰浴 2h; 离心 (7600r/min, 4℃, 20min); 小心移去上清, 用 4mL PBS 重悬管壁上的白色噬菌体沉淀, 储存于 4℃ 备用。

1.5 抗 VP28 血清的制备和效价检测 用原核表达的 VP28 细胞裂解液上清免疫家兔, 每只每次注射蛋白 800μg, 分 3 处皮下注射: 第一次使用弗式完全佐剂(1:1), 后两次使用弗式不完全佐剂(1:1), 时间间隔 10d; 第四次免疫在第三次免疫一个月之后, 每只注射蛋白量加倍, 不加佐剂; 5d 后兔耳缘采血, 用双向免疫扩散实验测定效价: 7d 后收集兔血清: 离心 9000r/min, 10min 后, 将血清分装成小管, 储存于 -20℃ 备用。用 ELISA 检测抗血清的效价。

1.6 抗原核表达的 VP28 蛋白的单链抗体的筛选及检测 按 Dai et al^[10] 中的方法, 用已经被 WSSV 淘选过 2 轮的噬菌体抗体库对 VP28 蛋白进行淘选。将 100μg VP28 蛋白(细胞裂解液上清)用 PBS 稀释至 5mL, 包被免疫管, 4℃ 过夜。从 3 轮淘选后的 2YT-AG 平板上挑取单菌落于细胞培养板中培养并诱导表达, 然后用 WSSV 包被的 ELISA 板检测抗体的活力。

1.7 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳和 Western blot 分别将 1.5 中收获的细胞裂解液上清, 膜沉淀, 周质空间抽提物以及 IPTG 诱导前的菌体作 12% 的 SDS-PAGE(Tris-Glycin 系统)电泳: 各取 10μL 样品上样, 200V, 电泳 40 min; 电泳结束后, 立即将蛋白带电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 4℃, 100mA, 1h。将 NC 膜取出后, 经丽春红染色 1min, 标出标准分子量蛋白条带的位置。清水洗尽染料后, 用 4% PBSM (PBS 中溶解 4% 的脱脂奶粉) 封闭 NC 膜 10min, 接着将 NC 膜在 1:10, 000 倍稀释的 HRP/Anti-Etag conjugate PBSM 溶液中浸泡 30min, 然后用 PBST (含 0.1% tween 20 的 PBS) 和 PBS 洗 3 次; 最后在 DAB 底物溶液中显色 10min。

1.8 其他检测 ELISA 用抗原包被 96 孔板, 4℃, 过夜; 用 PBS 洗一次, 然后用 4% PBSM 封闭 60min; 将抗血清(免疫前血清作对照)用 PBSM 稀释成 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000, 1/64000 的梯度, 每梯度作一列, 每孔 100μL, 室温反应 1h; 清洗后, 加入 PBSM 5000 倍稀释

的 HRP 标记的第二抗体, 每孔 100 μ L, 室温反应 1h; 清洗后, 加入 100 μ L TMB 底物溶液[2. 5mL 1mol/L 的醋酸钠溶液(pH6. 0), 22. 0mL H₂O, 250 μ L 100mg/ mL TMB, 10 μ L H₂O₂], 显色 10min 后, 加入 2mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应, 每孔 25 μ L, 最后测定 OD₄₅₀ 值。

Dot Blot: 分别取 VP28 细胞裂解液上清, 纯化的 WSSV 和噬菌体型 VP28 悬液 5 μ L 点在 NC 膜上, 用 PBSM 封闭非特异性位点后, 浸泡于 1: 1000 倍稀释的鼠抗 WSSV 血清 PBSM 溶液中 1h, 洗净后, 再浸泡于 1: 2000 倍免抗鼠 1g G-HRP 的 PBSM 溶液中 1h, 然后在 DAB 底物溶液中显色 10min。

注: 抗血清与抗原保温前, 必须预先与未表达外源蛋白的大肠杆菌抽提液保温, 以消除非目的抗原蛋白的干扰。

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 VP28 基因的克隆

通过 PCR 及分子克隆的常规操作, 成功地将 WSSV 病毒囊膜蛋白 VP28 基因插入到了 Pcantab 5E 噬菌粒载体上, 并转化到了大肠杆菌 TG1 中。用 Hind III 识别位点在 *Sfi* I 位点上游约 80bp 处) 和 *Not* I 双酶切该质粒的电泳结果(图 1) 表明 VP28 基因已经成功的插入到了质粒载体上。另外以 VP28-TG1 细

胞中的 DNA 为模板扩增出 VP28 基因片段的实验结果也说明了这一点(图 1)。

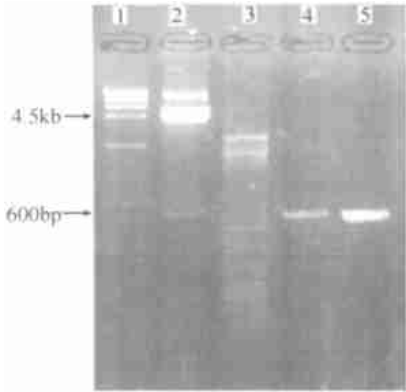


图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 DNA agarose gel electrophoresis

1: Mark (λ DNA/ *Hind* III+ *Eco* R I); 2: VP28 Pcantab 5E/ *Hind* III 和 *Not* I 双酶切后的产物; 3: VP28 的 PCR 检测的阴性对照 (以 Pcantab 5e 空载体为模板); 4: VP28 的 PCR 检测 (以 WSSV 为模板); 5: VP28 的 PCR 检测 (以 VP28 Pcantab 5E 为模板)。

随后的 DNA 测序报告(图 2) 显示插入载体的 DNA 序列和天然 VP28 基因完全一致, 并且没有出现移码突变等影响 VP28 蛋白正确翻译的因素。根据该序列分析得出, 原核表达的 VP28 蛋白在 N 端加上了 41 个氨基酸残基, 包括一段拟于帮助蛋白分泌表达的引导肽, C 端加上了 18 个氨基酸残基- Etag 融合标记肽(GAPVP YPDPLEPR), 共有 263 个氨基酸残基, 估计分子量为 28. 47kDa。

```
ATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTGGAGATTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTT
GTTCCITTCTATGCGGCCAGCCGGCCAAAAAAGCTCGTCAAGGATCTTTCCTTCACCTCTTCGGTTCGTGTCGGCCATCCTCGC
CATCACTGCTGIGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTGGGTATCACAACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACA
ATATCGAGACAAACATGGATGAAAACTCCGCATTCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGT
GTCTTTTGACAGCGACACCTTGGGGCAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCGGA
TCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGAAGTGTGGGGCAGAATCTACCTTTGAGGGAACATTCAAGGT
GTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCCTTTGTTCGGT
AGCTCCAACACCTCCTCTTCACCCCGCTCTATTTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGC
ACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTACCTACTCTGGCACTGAGACCGAGGCGGC
CGCAGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAG
```

图 2 VP28 在 Pcantab 5E 上阅读框的 DNA 测序结果

Fig. 2 the DNA sequence of VP28 in Pcantab 5E

底纹标记的区域为野生型 VP28 的阅读框, 边框标记的分别是 *Sfi* I 和 *Not* I 的限制性内切酶识别位点
Highlighted means the open reading frame of native VP28 gene, flanked means *Sfi* I and *Not* I recognized site. frames

2.2 VP28 蛋白的表达

在Pcantab 5E 表达系统常规的诱导条件下, VP28 蛋白被诱导表达。分阶段收集胞外周质空间提取物, 胞内细胞提取物和细胞膜沉淀。SDS-PAGE 及 Western bolt 的结果(图 3) 显示 VP28 并没有如设计的那样分泌表达, 相反主要出现在胞内和细胞膜上。这些收集产物的 Dot blot 实验也证实这一结果(数据未显示)。Western blot 结果显示, 在 31kDa 附近有 Etag 融合标记的蛋白条带, 比原核表达 VP28 蛋白的估计分子量稍高一点。没有检测到与 M13 噬菌体 gp3 蛋白融合的 VP28(图 4)。

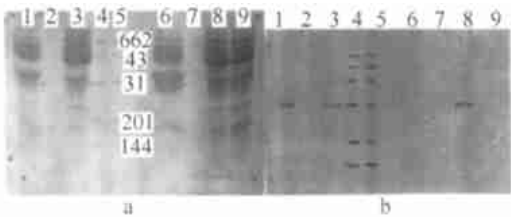


图 3 VP28-TG1 诱导产物的 SDS PAGE(a) 和 Western blot(b) 结果

Fig. 3 SDS PAGE and western blot assay of induced VP28-TG1 products
1,6 道为 VP28-TG1 细胞膜沉淀; 2,7 道为 VP28 周质空间收获物; 3 道为 VP28 细胞裂解液上清; 4,5 道为分子量标准, 从下至上依次为 14 kDa, 20 kDa, 31kDa, 43kDa, 66.2kDa; 8 道为 IPTG 诱导后的 VP28-TG1 全细胞抽提物; 9 道为 IPTG 诱导前的 VP28-TG1 全细胞抽提物。

识别信号用* 号标示

Lane 1 and 6 are VP28-TG1 cell membrane extracts; Lane 2 and 7 are VP28 periplasmic extracts; Lane 3 is the supernatant of VP28 whole cell extracts; Lane 4 and 5 are molecular weight markers, from below to above are 14.1kDa, 20.1kDa, 31kDa, 43kDa, 66.2kDa; Lane 8 is whole cell extract after induced; Lane 9 is whole cell extract before induced. The bands with immunological signal to Etag, were noted with* symbol

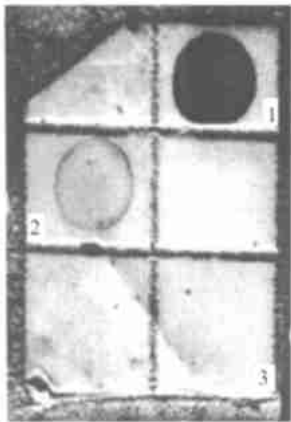


图 4 原核表达的 VP28 蛋白与鼠抗 WSSV 血清的 Dot blot
Fig. 4 Dot blot of prokaryotic expressed VP28 with mouse anti-WSSV antiserum
1 号为纯化的 WSSV; 2 号为 VP28 细胞裂解液上清; 3 号为噬菌体型 VP28 悬液
Spot 1 is pure WSSV; spot 2 is the supernatant of VP28 whole TG1 cell extracts; spot 3 is phage VP28

2.3 VP28 蛋白的免疫原性

原核表达的 VP28 蛋白可以被鼠抗 WSSV 血清所识别(图 5)。用原核表达的 VP28 蛋白所免疫的家兔血清不但可以识别原核表达的 VP28 蛋白, 而且也可以识别天然的 WSSV。这显示了原核表达的 VP28 蛋白和其野生型蛋白具有一致的免疫原性。由此可见兔抗人工 VP28 血清具有很强的识别天然 VP28 蛋白的能力。可进一步应用于 VP28 的相关研究。

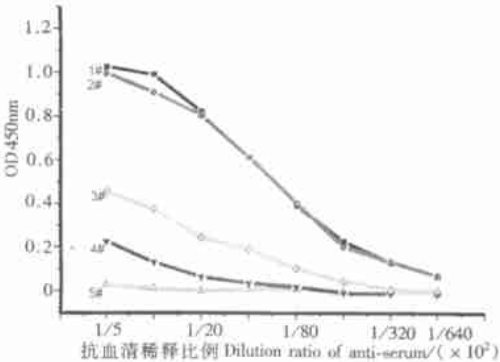


图 5 兔抗原核表达 VP28 血清识别原核表达 VP28 和天然 WSSV 蛋白的 ELISA 信号

Fig. 5 ELISA signals of rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 and native WSSV protein

96 孔板由纯化的原核表达 VP28(0.5μg/well) 或纯化的 WSSV(1μg/well) 包被。抗体-抗原结合曲线为: # 1, VP28 对 R3 号兔抗原核表达 VP28 蛋白血清; # 2, VP28 对 R4 号兔抗原核表达 VP28 蛋白血清; # 3, WSSV 对 R3 号兔抗原核表达 VP28 蛋白血清; # 4, WSSV 对 R4 号兔抗原核表达 VP28 蛋白血清; # 5, VP28 对免疫前兔血清
96 wells plate were coated by purified prokaryotic expressed VP28 protein (0.5μg/well) or purified WSSV (1μg/well). antibody-antigen binding curves: # 1, VP28 vs R3 rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 protein; # 2, VP28 vs R4 rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 protein; # 3, WSSV vs R3 rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 protein; # 4, WSSV vs R4 rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 protein; # 5, VP28 vs pre immunized rabbit serum

2.4 单链抗体 B7 的性质

用原核表达的 VP28 蛋白从抗 WSSV 噬菌体抗体库中淘选出了单链抗体株 B7, 其蛋白质序列(根据其 DNA 测序结果翻译) 如图 6 所示。该单链抗体对 WSSV 和 VP28 的识别能力类似于鼠抗 WSSV 血清(图 7), 均有识别信号。由于 VP28 和 B7 带有一样的 Etag 融合标记肽, 不能直接用 HRP/Anti-Etag 鼠单抗来检测 B7 是否识别 VP28。通过预实验(数据未显示), 先将 HRP/Anti-Etag 鼠单抗和 B7 单链抗体以不同的比例混合, 选择最佳的混合比例温育, 即使所有的 Anti-Etag 鼠单抗与 B7 单链抗体结合而没有

游离状存在,从而防止游离状的 anti Etag 鼠单抗结合到原核表达的 VP28 蛋白上的 Etag 融合标记肽。这种结合了 HRP/Anti Etag 鼠单抗的 B7 抗体复合分

子可以特异性地识别人工 VP28 和天然 WSSV。从图 7 中可以观察到阴性对照和 VP28 的抗体结合信号有显著差距,说明了这种方法的可行性。

MTMITPSFGAFFLEIFNVKKLLFAIPLVVPFYAAQPAMAEVQLQESGPELVKPGASVKISCK
ASGYSFRRSYIHWVKQRPQGQLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQL
SSLTSEDSAVYYCARGTRDYAMDYWGQGTSTVTVSTGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSQ
KFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTVNAWYQKPGQFPKLLIYWASTRRTGVPDRFTGSGSG
TDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPRAA

图 6 单链抗体 B7 的氨基酸序列图(DNA 序列预测值)
Fig. 6 Amino acid sequence of B7 scFv antibody (based on DNA sequencing)

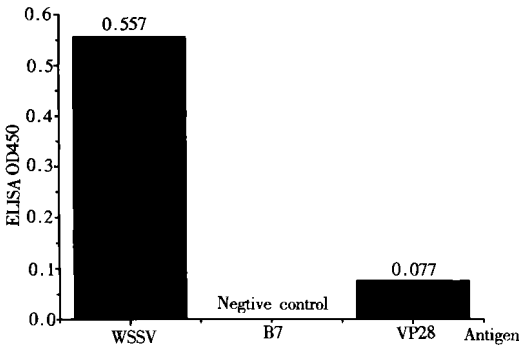


图 7 B7 单链抗体结合原核表达 VP28 蛋白和天然 WSSV 的 ELISA 信号

Fig. 7 ELISA signals of prokaryotic expressed VP28 and native WSSV proteins bound by B7 scFv antibody

检测的抗体比例为:PBSM/ 鼠抗 E tag HRP/ B7 scFv 抗体= 1000/ 0. 05/25, 并保温至少 30min

Detected by the mixed antibodies: PBSM/mouse anti E tag-HRP/ B7 scFv antibody= 1000/ 0. 05/ 25 which pre incubated more than 30 min.

3 讨论

继 WSSV 的基因全序列测定完成以后, WSSV 病毒功能基因及其与对虾宿主细胞之间的相互作用就成为该研究领域的热门。业已证明的 WSSV 囊膜在病毒侵染过程中的必要性, 使得众多的研究集中在 WSSV 囊膜蛋白的研究上, VP28 就是其中之一。在原核系统中表达 VP28 蛋白的主要目的是为了简化操作, 虽然原核系统中蛋白质的翻译后修饰是不完整的。实验结果也说明, 单从分子量的角度上, 原核表达的 VP28 就与野生型蛋白有一定差异: 野生型蛋白的分子量按氨基酸残基之和计算只有 22kDa, 可是由于糖基化修饰等原因实际分子量为 28kDa; 而电泳测定的原核表达 VP28 蛋白的分子量与其氨基酸残基之和是基本相符的。很明显, 原核表达的

VP28 蛋白的翻译后修饰是不完全的。

但是这并不十分影响原核表达 VP28 蛋白的免疫原性: 这种 VP28 蛋白可以被抗天然 WSSV 蛋白的血清所识别, 而由人工 VP28 免疫的兔血清也可以识别天然 WSSV; 由人工 VP28 淘选的噬菌体抗体 B7 也可以识别天然 WSSV。有趣的是, B7 的 DNA 测序结果与实验室以前发现的一株抗 WSSV 的单链抗体 A6 的序列(另文发表) 是一致的, A6 表现出对 WSSV 有一定程度的中和效应。这从一个侧面支持 van Hulten 等人提出的关于 VP28 在 WSSV 病毒侵染过程中可能起关键作用的推论。这还需要更进一步的实验证明。

原核表达 VP28 原设计为分泌表达的形式, 以便于收获纯化。在表达载体上 VP28 上游有一段 M13 gp3 蛋白的引导肽, 它可以引导分泌表达。可是在此实验中, VP28 并没有分泌表达(或分泌到胞外的 VP28 少到无法用实验室现有免疫检测的方法观察到)。这可能与 VP28 本身的结构有关: 天然 VP28 是一种囊膜蛋白, 计算机分析 VP28 的氨基酸残基序列时发现 VP28 的 N 端存在着一个强的疏水区, 其中包括一个可能的穿膜 α 螺旋区。紧跟着穿膜 α 螺旋区的是一端富集正电荷的区域, 在 VP28 的 C 端存在着另一个疏水区。VP28 可能因为其细胞膜过于强大的疏水亲和力而没有分泌到细胞外。SDS-PAGE 和 Western blot 的结果证明 VP28 出现在胞内和膜上。从这点性质上看, 原核表达的 VP28 的结构可能保留了野生型 VP28 蛋白的结构特点。用原核表达的 VP28 代替野生型 VP28 进行部分性质的研究是可行的, 且正在进行之中。

参考文献:

[1] Fan X, Zhang S C. New approaches in ocean biotechnology [M].

- Beijing: ocean publishing Company. 1999. 30—44. 89—100. [范晓, 张士瑾. 海洋生物技术新进展. 北京: 海洋出版社, 1999, 30—44, 89—100]
- [2] Miao H Z , Tong S L. Multiplication of the shrimp baculovirus HHNV with primary cell cultures from lymphoid organ of *Penaeus chinensis* [S]. *Chinese Journal of Biotechnology* 2000, **16**(2): 221—224 [苗宏志, 童寰亮. 利用对虾原代细胞增殖对虾杆状病毒 HHNV 的研究. 生物工程学报, 2000, **16**(2): 221—224]
- [3] Hu C Q. Research on *Penaeus Monodon* white spot disease and its prevention. Theses of the second Chinese science meeting on the prevention of shrimp diseases and management of environment [M] Publishing house of ocean university of qingdao 1996, 46—51 [胡超群. 斑节对虾病毒性白斑病及其防治的研究, 第二届全国人工对虾疾病综合防治和环境管理学术研讨会论文集. 青岛海洋大学出版社, 1996, 46—51]
- [4] Huang J, Song XL, Yu J, et al. Baeuloviral hypodermal and hematopoietic necrosis study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp Marine Fisheries Research 1995, **16**(1): 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[J]. 海洋水产研究 1995, **16**(1): 1—10]
- [5] van Hulten M C, Marcel W, Stephen D G, et al Identification of two major Virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 2002, **266**: 227—236
- [6] van Hulten M C, Wittevekt J, Marjolein S, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology* 2001, **285**: 228—233
- [7] van Hulten M C, Wittevekt J. Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J] *Virology* 2001. **286**: 7—22
- [8] Gao H, Yuan B F, Yuan L, et al. A novel method of screening neutralizing antibody against white spot syndrome virus using primary cultured cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2002, **26**(3): 259—264 [高宏, 袁必锋, 袁丽, 等. 一种筛选对虾白斑综合症病毒中和抗体的新方法. 水生生物学报 2002, **26**(3): 259—264]
- [9] Yang F, He J, Lin X, et al. The complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J. Virol.* 2001, **75**: 11811—11820
- [10] Dai H, Gao H, Zhao X, et al. Construction and characterization of a novel recombinant single chain variable fragment antibody against white spot syndrome virus from shrimp. *J Immuno. Meth.* 2003, **279**: 267—275

RESEARCH ON THE PROKARYOTIC EXPRESSION AND CHARACTERISTICS OF VP28, A STRUCTURE PROTEIN OF *PENAEUS MONODON* WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

ZHAO Xir Yan, WEI Cong, DAI Lir Fen, GAO Hong and DAI He Ping

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: White Spot Syndrome Virus (WSSV) is an enveloped DNA virus, which causes 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. But more and more attention is paid to the function of VP28, which is likely to play a key role in the initial steps of WSSV infection in shrimps. Towards simplifying to study the role of VP28 in the interaction between WSSV and host cells, the gene of VP28 has been cloned into a prokaryotic expression system, induced and expressed for further researching its characteristics. This prokaryotic expression product could not secrete out of the cell membrane, because it is a membrane protein. Rabbit antiserum against prokaryotic expressed VP28 could recognize both prokaryotic expressed VP28 and native WSSV; Mouse antiserum against native WSSV could recognize both WSSV and prokaryotic expressed VP28. A scFv antibody, designated B7, selected from phage display antibody library against WSSV by panning with prokaryotic expressed VP28, could also recognize both prokaryotic expressed VP28 and native WSSV. These data show that the VP28 produced in a prokaryotic expression system has analogous immunogenic characteristics to its native form, although their protein post-modification may differ.

Key words: White Spot Syndrome Virus (WSSV); VP28; Prokaryotic expression; Phage antibody