

对虾白斑综合征病毒 *wsv477* 基因的克隆表达与时相分析

韩芳^{1,2}, 王志勇^{1,2}, 巫旗生¹, 王晓清^{1*}

(1.湖南农业大学 动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘 要: 将对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的功能基因 *wsv477* 克隆到原核表达载体 PGEX-4T-2 中, 并转化大肠杆菌 BL21, 37 °C 条件下诱导了 WSV477 蛋白的表达, 并以纯化的融合蛋白作为抗原, 免疫小鼠获得了多克隆抗体。该基因开放阅读框共 624 个核苷酸, 编码 208 个氨基酸, GST 融合蛋白相对分子质量为 49 000, 抗体滴度为 1:10 000。RT-PCR 和 Western blot 分析表明, 该基因在病毒感染 4 h 后开始转录, 6 h 后开始表达, 是 WSSV 感染的早期基因。

关 键 词: 对虾; 白斑综合征病毒; *wsv477* 基因; 时相分析

中图分类号: S945.4⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0344-05

Clone and expression and temporal analysis of *wsv477* gene from white spot syndrome virus

HAN Fang^{1,2}, WANG Zhi-yong^{1,2}, WU Qi-sheng¹, WANG Xiao-qing^{1*}

(1.College of Animal Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: The *wsv477* gene from WSSV was cloned in pGEX-4T vector and expressed in *Escherichia coli* BL21. Then the *wsv477* protein was induced and expressed at 37 °C, and the purified fusion protein was used as antigen to immunize mice, subsequently the specific polyclonal antibody was raised using the purified fusion protein (GST-WSV477). The ORF of *wsv477* gene had 624 base pairs and encoded 208 amino acid peptides, the GST fusion protein was 49 000, and the titer of the antisera was 1:10 000. RT-PCR and Western blot revealed that the *wsv477* gene was first transcribed at 4 h postinfection, and was expressed at 6 h postinfection in vivo, suggesting that it was an early gene.

Key words: prawn; white spot syndrome virus; *wsv477* gene; temporal analysis

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)发现于 20 世纪 90 年代初, 是造成对虾大面积暴发性流行病的主要病原体^[1-2]。该病毒不仅可以广泛感染所有人工养殖的对虾, 还能感染其他淡水及海水甲壳类, 如螃蟹、螯虾等, 甚至可以感染昆虫。目前尚未发现能够耐受 WSSV 的虾群, 而感染的对虾在一周内死亡率高达 90%~100%^[1]。该病害严重阻碍对虾养殖业的发展, 还对海洋环境构成威胁, 已成为全世界广泛关注和研究的热点。

研究表明, WSSV 病毒是一种新型的有囊膜的环状双链 DNA 病毒, 基因组长度约 305 kb^[3-4], 属线头科(Nimaviridae), *Whispovirus* 属^[5]。该病毒与昆虫杆状病毒形态上很相似, 但基因比对没有同源性。生物信息学分析表明, 该病毒约有 181 个开放阅读框, 所编码的蛋白质和已知的蛋白质基本没有同源性。目前的研究主要是对 WSSV 结构和功能基因进行分析, 寻找预防和控制白斑综合征感染的有效方法^[5]。在研究病毒功能基因时, 需要确定可以转录表

收稿日期: 2009-12-27

基金项目: 集美大学优秀创新团队科研基金项目(2006A001)

作者简介: 韩芳(1981—), 女, 河北保定人, 博士研究生, 主要从事海洋生物分子生物学研究, fanghan325@hotmail.com; *通讯作者, wangxiao8258@126.com

达的基因以及转录表达的时相.杨丰等^[3]用生物学软件预测WSSV基因组蛋白质结构域时发现,在基因组274527至275150区间存在1个可能的病毒感染早期基因(wsv477基因).笔者将wsv477基因克隆到原核表达系统中,诱导了这个蛋白的表达,并进行了纯化,制备了多克隆抗体.现将结果报道如下.

1 材料与方法

1.1 材料

成年小白鼠由厦门大学医学院提供;WSSV由国家海洋局第三海洋研究所提供;试验对虾为日本对虾(*Penaeus japonicus*),体长10~15 cm,购于厦门集美菜市场.引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 人工感染试验

试验前将对虾充气养殖3 d.随机抽取5只进行WSSV检测,确定试验用虾为不带WSSV的健康虾.感染时,每只对虾注射100 μ L用生理盐水稀释的WSSV液,分别收集注射后0、2、4、6、12、24、48、96 h的鳃样品(各取2只等量混合),存放于超低温冰箱.

1.2.2 病毒DNA模板的制备

PCR模板的制备参照文献[6]的方法:将20 mg左右的对虾组织置于离心管中,加入200 μ L裂解液(50 mmol Tris-HCl, pH8.0, 25 mmol EDTA, 4 mol guanidinium thiocyanate, 0.5 % N-lauroyl sarcosine)后捣碎,12 000 r/min离心3 min,上清用二氧化硅吸附DNA,乙醇洗涤,60 $^{\circ}$ C烘干后用20 μ L蒸馏水溶解.

1.2.3 wsv477基因克隆和重组质粒构建

wsv477基因ORF克隆.根据已知的WSSV ORF477序列(GenBank登录号DQ121373),设计1对引物,P1:5'-CGCGGATCCATGTATATCTTCGTCGA-3'(BamH I),P2:5'-CCGGAATTCCTATAAGAAATGTACAA-3'(EcoR I),下划线表示加入的BamH I和EcoR I酶切位点.以病毒DNA为模板扩增目的片段.PCR扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,56 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸7 min.取少量PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行检测,剩余的用DNA回收试剂盒(华

舜,上海)回收纯化.

重组质粒构建.将回收的PCR产物经BamH I和EcoR I酶切后,连接到经同样酶切的pGEX-4T-2载体(Pharmacia)中(重组质粒命名pGEX-4T-2-wsv477),然后转化大肠杆菌BL21感受态细胞,少量制备质粒DNA,经双酶切检验后,送上海英骏公司进行测序确认.

1.2.4 重组质粒诱导表达

将测序正确的阳性克隆菌株置于含100 mg/L氨苄青霉素的LB培养基(10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母浸粉,10 g/L氯化钠)中,37 $^{\circ}$ C摇培过夜.次日按1:100转接后,继续培养3 h至 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为0.7,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C振荡培养4~6 h.5 000 r/min离心5 min,收集菌体,每1.5 mL菌液所得的菌体沉淀用100 μ L的TE缓冲液悬浮,加入2 \times SDS-PAGE加样缓冲液煮沸10 min,进行12 % SDS-PAGE电泳,以转化空载体的*E. coli* BL21为对照,电泳结束后,用0.025 %考马斯亮兰R250进行显色后观察.

1.2.5 融合蛋白的可溶性分析和蛋白质纯化

按1%的接种量转接菌液250 mL,37 $^{\circ}$ C摇培诱导.诱导表达的菌液于5 000 r/min离心5 min,收集菌体,加入15 mL裂解液(含1 % Triton X-100的1 \times PBS),冰浴超声(超声10 s,间隔10 s,功率200 W)直至菌液清亮.4 $^{\circ}$ C下15 000 r/min离心20 min后,分别取上清和沉淀,用于SDS-PAGE进行融合蛋白可溶性分析^[7].

将超声裂解的菌液上清与Glutathione Sepharose 4B(Sigma)低温混匀装柱.用冰冷的PBS洗去杂蛋白,至流出液的 $OD_{280\text{ nm}}$ 接近于0.用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L还原型谷胱甘肽, pH 8.0)洗脱目的蛋白.

1.2.6 多克隆抗体的制备

将纯化的wsv477-GST融合蛋白2 mL(质量浓度为100 μ g/mL)与2 mL弗氏完全佐剂(Sigma)乳化,腹腔注射10只小白鼠进行免疫.初次免疫1周后,改用不完全佐剂,每周加强免疫1次,连续4周.小鼠末次免疫3 d后断尾取血,免疫血清利用Protein A进行纯化^[7].纯化后的抗体分装,于-80 $^{\circ}$ C保存备用.

1.2.7 *wsv477* 转录时相分析

分别提取不同 WSSV 感染时间(0、2、4、6、12、24、48、96 h)的对虾鳃组织总 RNA 作为模板,用随机引物 oligo (dT)逆转录合成 cDNA 第一条链,以 *wsv477* 基因特异的引物进行 PCR 扩增,以日本对虾 β -actin 基因作为阳性对照。

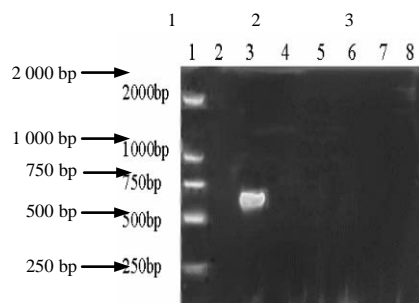
1.2.8 蛋白质印迹(Western blot)检测

用蛋白裂解液(50 mmol Tris, 1.0 mmol EDTA, 150 mmol NaCl, 0.1 % SDS, 1 % TritonX-100, 1 % 去氧胆酸钠, 1 mmol 蛋白酶抑制剂 cocktail)从对虾鳃组织中提取总蛋白。采用文献[8]的方法定量蛋白质后,取 1 mg 蛋白质上样,在 12 % SDS-PAGE 上进行电泳,分离后转移至 PVDF 膜(70 V, 1 h)。用 5 % 脱脂牛奶(溶于 TBST 中)封闭 1 h,以 1:10 000 的比例加入 *wsv477* 的多克隆抗体,与膜杂交反应 1 h, TBST 多次漂洗,再加 HRP 标记的羊抗鼠二抗杂交 1 h,经 TBST 漂洗后,用 TMB 显色^[9]。3 次重复。

2 结果与分析

2.1 *wsv477* 基因克隆

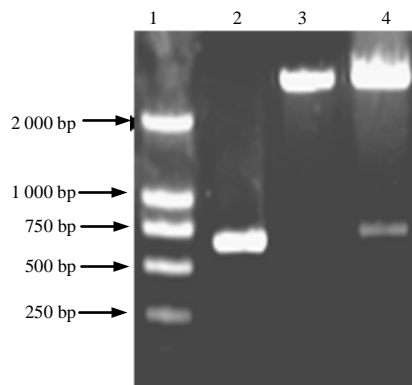
以 WSSV 病毒 DNA 为模板,用 *wsv477* 特异性引物进行 PCR 扩增,经电泳检测得到 1 条 600 bp 左右的目的带(图 1),与预测的大小一致。将 *wsv477* 基因克隆到 pMD-18T 进行测序,比对结果与已知序列完全一致。重新将 *wsv477* 基因克隆到 pGEX-4T-2 表达载体上(重组质粒被命名为 *wsv477*-pGEX-4T-2),转化 *E. coli* BL21 感受态细胞,挑取阳性转化菌培养后,提取质粒进行双酶切检验(图 2)。进一步测序结果表明,插入序列正确,且没有出现移码。该基因编码的开放阅读框(ORF)624 bp,



1 DNA Marker; 2 阴性对照(水作模板); 3 *wsv477* 的 PCR 产物。

图 1 *wsv477* 基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of *wsv477* gene



1 DNA Marker; 2 *wsv477* 基因 PCR 产物; 3 重组质粒单酶切; 4 重组质粒双酶切。

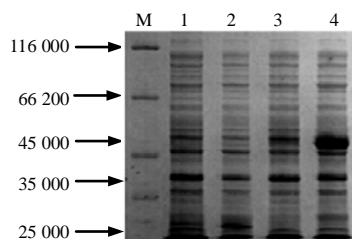
图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Double digestion of the recombinant plasmid.

预测编码 208 个氨基酸,本试验原核表达的 WSV477 蛋白理论相对分子质量约为 24 000。

2.2 WSV477 蛋白质表达和纯化

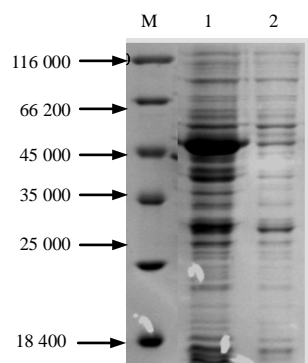
将测序正确的阳性克隆菌株经 IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析。pGEX-4T-2 质粒本身有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的基因,编码蛋白质相对分子质量约为 25 000,当插入外源基因片段后,可表达出外源基因和 GST 基因的融合蛋白。本试验中融合蛋白 GST-WSV477 的预计相对分子质量约为 49 000。重组菌株经 IPTG 诱导后在相对分子质量 49 000 左右处出现一条明显的蛋白条带,而在表达载体 PGEX-4T-2 及不诱导的重组质粒对照中都无此带(图 3),说明 *wsv477* 基因克隆到表达载体后在大肠杆菌中获得了高效表达。超声裂解细菌,高速离心后将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,分析重组蛋白的可溶性,在菌液上清中重组蛋白大量存在,而沉淀中极少(图 4),说明 GST-WSV477 融合蛋白在菌体内为可溶性表达。



M 蛋白质Marker; 1 未诱导空载菌株; 2 诱导空载菌株; 3 未诱导重组菌株; 4 诱导重组菌株。

图 3 GST-WSV477 融合蛋白质表达分析

Fig. 3 Solubility analysis of expressed GST-WSV477 fusion protein

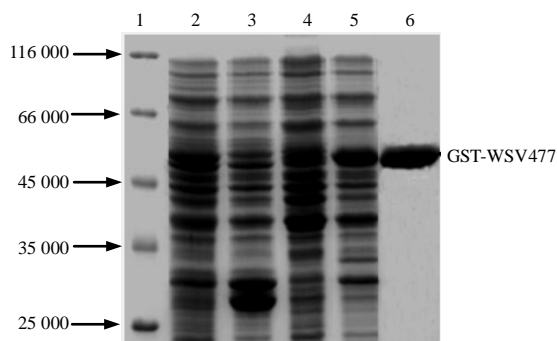


M 蛋白质 Marker; 1 裂解后上清; 2 裂解后沉淀.

图 4 GST-WSV477 融合蛋白质的可溶性分析

Fig.4 Solubility analysis of expressed GST-WSV477 fusion protein

大量摇配重组表达菌, 将菌液裂解上清经 Sepharose 4B 亲和层析纯化, 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE (图 5), 获得了纯度较高的融合蛋白.



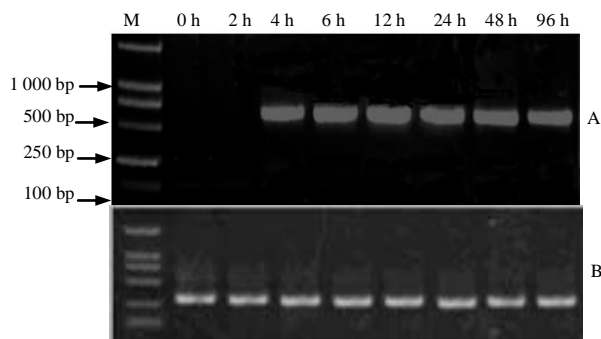
1 蛋白质 Marker; 2 未诱导空载菌株; 3 诱导空载菌株; 4 未诱导重组菌株; 5 诱导重组菌株; 6 纯化后的 GST-WSV477 融合蛋白.

图 5 *wsv477* 在 *E. coli* 中的表达和纯化

Fig.5 Expressed and purified proteins encoded by *wsv477* gene in *E. coli*

2.3 *wsv477* 基因转录时相的 RT-PCR 分析

图 6 结果表明, *wsv477* 基因在病毒感染后 4 h 开始转录(图 6-A).



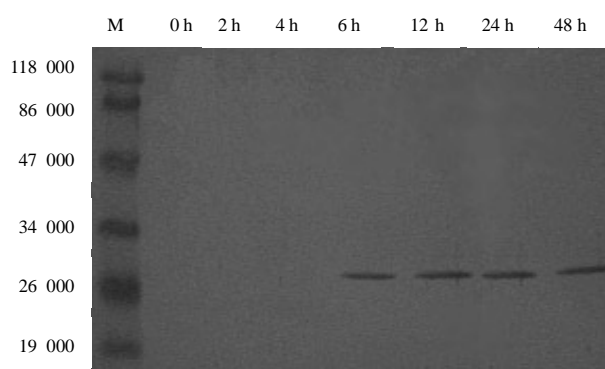
A *wsv477* 的 RT-PCR 分析 B β -actin 的 RT-PCR 分析 M DNA Marker; 0 h, 2 h, 4 h, ..., 96 h 表示病毒感染时间.

图 6 *wsv477* 基因转录时相分析

Fig.6 Temporal transcription analysis of the *wsv477* gene by RT-PCR in vivo

2.4 WSV477 蛋白表达时相的 Western blot 分析

采用 Protein A agarose 亲和柱分离纯化 WSV477 蛋白的抗血清, 得到 WSV477 蛋白的抗体. 采用间接 ELISA 法测定抗体效价, 抗体滴度为 1:10 000. 对各 WSSV 感染时间(0、2、4、6、12、24、48 h)的对虾鳃蛋白质进行 Western blot 分析, 检测 WSV477 蛋白在对虾体内的表达时相. 结果显示, 在病毒感染 6 h 后开始检测到 WSV477 蛋白(图 7), 说明 *wsv477* 基因编码的 WSV477 病毒蛋白在 WSSV 病毒感染 6 h 后开始表达.



M 蛋白质 Marker; 0 h, 2 h, 4 h, ..., 48 h 表示病毒感染时间.

图 7 WSV477 蛋白的表达时相分析

Fig.7 Temporal expression analysis of the WSV477 protein by Western blot in vivo

3 结论与讨论

对虾白斑综合征病毒是世界对虾养殖中虾病的主要病原, 至今未发现有效的防治方法, 有待对病毒分子生物学进行深入研究^[10], 其中与病毒转录和复制相关的功能基因研究是非常重要的方面.

笔者采用 PCR 方法首次克隆了 *wsv477* 基因, 其 ORF 长度为 624 bp, 预测编码 208 个氨基酸. WSSV 基因组分析表明, *wsv477* 编码的蛋白质存在 Cys2/Cys2 型锌指结构域^[3]. 在许多病毒中发现的锌指蛋白, 可以作为蛋白质与核酸或蛋白质与蛋白质相互作用参与病毒的转录和复制等过程^[11-12] 的调控因子. WSV477 锌指蛋白序列与锌指蛋白的典型序列并不完全一致, 可能是类锌指蛋白, 其生物学功能需要通过进一步的试验验证.

本研究中通过转录和表达时相分析, 确定 *wsv477* 基因在病毒感染对虾 4 h 后开始转录, 6 h 后

开始表达,是个典型的病毒感染早期基因^[13]。目前在WSSV中已经确认的早期基因主要有参与核苷酸代谢、DNA复制有关的酶类,包括胸腺嘧啶核苷酸合成酶^[14]、胸腺嘧啶激酶^[9]、核酸内切酶^[15]、DNA聚合酶^[16]等。病毒早期基因的转录表达与否决定晚期基因的转录,进而影响病毒的复制与增殖,在病毒感染中具有非常重要的地位。通过本研究可确认WSSV的*wsv477*基因为早期表达基因,为WSSV的早期诊断提供了理论依据。下一步工作需要采用蛋白质互作的方法,寻找对虾中与WSV477相互作用的蛋白质。通过构建WSV477蛋白的原核表达重组载体,诱导重组表达,获得重组蛋白GST-WSV477。

参考文献:

- [1] Lightner D V, Redman R M, Morre D W. Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp[J]. Aquaculture, 1993, 116: 25-33.
- [2] Flegel T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand[J]. World J Microb Biot, 1997, 13: 433-442.
- [3] Yang F, He J, Lin X H, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. J Virol, 2001, 75: 11811-11820.
- [4] Sandbrink H, Lankhorst R K. The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. Virology, 2001, 286: 7-22.
- [5] 于洪涛,黄捷,张士璀. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)致病相关基因研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7712-7715.
- [6] 吴文林,戴聪杰,王磊. PCR 法分析 WSSV 在日本对虾体内的感染增殖[J]. 泉州师范学院学报: 自然科学版, 2005, 23(2): 77-80.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 457-471.
- [8] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[K]. 北京: 科学出版社, 2000: 55-57.
- [9] Tzeng H F, Chang Z F, Peng S E, et al. Chimeric polypeptide of thymidine kinase and thymidylate kinase of shrimp white spot syndrome virus: Thymidine kinase activity of the recombinant protein expressed in a baculovirus/insect cell system[J]. Virology, 2004, 299: 248-255.
- [10] 孙志良, 符少辉, 陈立祥. 人 α -干扰素对中国对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的作用[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 1999, 25(2): 124-126.
- [11] Joazeiro C A P, Weissman A M. RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity[J]. Cell, 2000, 102: 549-552.
- [12] 朱艳冰, 杨丰. 对虾白斑综合征病毒基因组同源重复区结合蛋白的筛选[J]. 台湾海峡, 2006, 25(3): 318-323.
- [13] Okano K, Mikhailov V S, Maeda S. Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories[J]. J Virol, 1999, 73: 110-119.
- [14] Li Q, Pan D, Zhang J H, et al. Identification of the thymidylate synthase within the genome of white spot syndrome virus[J]. J Gen Virol, 2004, 85: 2035-2044.
- [15] Li L, Lin S M, Yang F. Functional identification of the non-specific nuclease from white spot syndrome virus[J]. Virology, 2005, 337: 399-406.
- [16] Chen L L, Wang H C, Huang C J, et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus[J]. Virology, 2002, 301(1): 136-147.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠