

对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 结构蛋白 VP28 与 VP26 的功能分析^{*}

刘 非, 寸树健, 杨 凯, 邓百煌, 杨晓仪, 吴文言

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 / 生物医药中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 结构蛋白功能的研究数据还不多。怎样预测并验证那些新发现的蛋白功能, 为实验研究提供理论参考, 是功能基因及结构蛋白的研究重点之一。利用生物信息学技术对获得的 WSSV 相关数据进行分析 and 归纳。分析数据显示结构蛋白 VP28 与 VP26 在二级结构和跨膜结构域等方面具有很高的相似度; 而且, 这两个蛋白与任何已知的蛋白序列没有明显的同源性, 但二者的氨基酸序列彼此间具 45% 的相似性, 提示这两个蛋白可能执行相似的生理功能。一个特别设计的细胞吸附实验用于进一步研究 WSSV 感染宿主细胞的过程中 VP28 和 VP26 所扮演的角色。实验结果显示, 两个蛋白均可以与对虾鳃组织来源的细胞发生特异的体外吸附, 表明 VP28 和 VP26 可能参与 WSSV 感染宿主细胞的初始阶段。

关键词: WSSV; VP28; VP26; 生物信息学; 细胞吸附

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 04-0083-04

对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是引起对虾爆发性流行病, 并导致急性死亡的“头号杀手”^[1-3]。作为 WSSV 的主要结构蛋白^[3], VP28 与 VP26 蛋白在病毒感染宿主细胞的过程中所扮演的角色令人关注。从病毒结构蛋白入手, 探索其感染机理, 对于病毒防治, 包括人畜共患病毒病的预防与治疗具有重要意义。

为了进行大规模蛋白数据分析工作, 特别构建了一个用于生物信息学分析的工作平台^[4], 对 VP28 与 VP26 蛋白的结构、功能、进化地位等进行了一系列分析、预测。并设计了体外细胞吸附实验, 以杆状病毒 Bac to Bac 系统重组表达的 VP28 和 VP26 为材料, 验证计算机分析所推测的结论。旨在尝试“理论假设—实验验证”的现代生物学研究新模式, 并为病毒与宿主间相互作用的研究提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

患白斑综合症的病虾采自广东阳江, 供提取病毒样品。健康斑节对虾购自广州黄沙水产市场, 采用 PCR 法鉴定其是否感染病毒。antiVP28 和 antiVP26 多克隆抗体由珠海百奥生物工程公司制备。antiGFP 单克隆抗体购自晶美生物工程公司。Bac

to Bac 杆状病毒表达系统购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析系统的构建及分析 参见文献[4]。

1.2.2 制备重组病毒 病毒 DNA 提取与纯化参照 Van Hulten 等^[5]。vp28 和 vp26 基因均通过 PCR 方法获得, 使用的引物对分别为: vp28 [5'-CGGAATTTCATGGATCTTCTTCTTCACT-3' 与 5'-CCAAGCTTTTACTCGGTCTCAGTCCAGA-3']; vp26 [5'-CGGAATTTCATGGAATTTGGCAACCTA-3' 与 5'-CCAAGCTTTTACTTCTTCTTGAATTTC-3'], 下划线部分为 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切位点。所获基因均克隆入 Bac to Bac 杆状病毒表达系统的载体质粒 pFasBac1, 转染 Sf (*Spodoptera frugiperda*) 9 昆虫细胞进行病毒扩增, 获得重组病毒 AdMNPV-WSSV vp28-pFB1 和 AdMNPV-WSSV vp26-pFB1。同时制备空载病毒 AdMNPV-empty-pFB1 作为空白对照, 同样方法制备了插入 *gfp* 基因的重组杆状病毒的 AdMNPV-*gfp*-pFB1 作为后续实验的对照。

1.2.3 感染细胞并获得重组蛋白上清 上述重组病毒分别感染 S9 细胞, 取受感染的 S9 细胞, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 加入裂解缓冲液 [50 mmol/L TrisHCl (pH 8.5), 5 mmol/L β-ME, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L PMSF, φ=1% NP-40] 超

^{*} 收稿日期: 2005-11-8
基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G1999012002); 国家自然科学基金资助项目 (39970583); 广东省自然科学基金资助项目 (001216); 广东省重点攻关资助项目 (A3050303)
作者简介: 刘非 (1980 年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 吴文言; E-mail: ls83@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

声破碎细胞, 离心去除细胞碎片 (10 000 r/min 10 min 4 °C), 获重组蛋白上清。

1.2.4 分离虾鳃细胞 取健康的斑节对虾的鳃组织, 剪切为 1 mm³ 大小的碎块, PBS 缓冲液洗 2 次。φ=0.25%胰蛋白酶于 37 °C 消化约 30 min 至细胞结成团状。轻柔吹打使细胞分散, 用两层无菌纱布过滤细胞液, 离心 (1 000 r/min 5 min) 收集单个细胞。

1.2.5 重组表达的 rVP28 和 rVP26 与对虾鳃细胞的体外吸附 上述方法分离的虾细胞用无菌 PBS 重悬后, 等体积分为 4 份。离心 (1 000 r/min 5 min), 弃上清, 其中 3 份分别加入 100 μL rVP28、rVP26 和 GFP 蛋白上清, 还有 1 份加入 100 μL PBS 轻微混匀, 均置于 28 °C^[6] 水浴中孵育 2 h, 每 30 min 轻微振荡混匀。离心 (1 000 r/min 5 min), 弃上清, 加入 100 μL PBS 漂洗 2 次, 各吸附细胞和第 2 次漂洗的上清进行 western blot 分析。

1.2.6 Western blot 分析 分别取与表达 rVP28、rVP26 或 GFP 的 S9 细胞裂解上清吸附后的虾细胞, 第 2 次漂洗上清, 吸附阴性对照虾细胞进行 Western blot 分析。一抗用 anti VP28/26 抗体 (1: 1000) 或者 GFP 单克隆抗体 (1: 1000) 室温孵育 1 h 用偶联辣根过氧化物酶的二抗孵育 1 h DAB 检测。

2 结 果

2.1 计算机分析与预测

将 vp28 和 vp26 的基因序列翻译成蛋白序列后与 nr 数据库进行同源比对分析, 结果发现 VP28 和 VP26 与数据库中已有的蛋白序列未显示同源性。然而, VP28 (AAR12965.1) 和 VP26 (AAK59320.1) 两个蛋白之间存在 45% 的序列相似性, 并都具有 “α 螺旋—α 螺旋—β 折叠” 的二级结构, 而且在相同的位置存在跨膜区 (图 1),

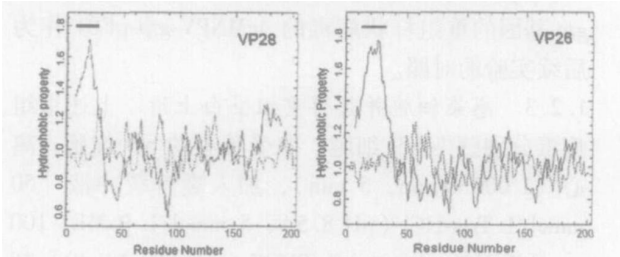


图 1 VP28 和 VP26 蛋白的跨膜结构域预测
Fig. 1 Transmembrane segment plots of VP28 and VP26 proteins

(由 Tmapp 软件预测, 可能的跨膜序列用加粗的黑线标出。纵坐标表示疏水的程度, 横坐标表示氨基酸的残基数)

提示二者在起源上可能有着共同的祖先, 可能执行相似的生理功能。

2.2 VP28 和 VP26 的重组表达

WSSV 结构蛋白 VP28 和 VP26 用 Bac to Bac 杆状病毒表达系统在 S9 昆虫细胞中表达。SDS-PAGE 分析结果表明, 在相应位置上可见 rVP26 和 rVP28 蛋白的表达 (图 2 1-2), 感染 AdMNPV-empty-pFB1 重组杆状病毒的细胞裂解上清作为阴性对照 (图 2 4)。为证明蛋白与细胞表面作用的特异性, 同样构建重组杆状病毒 AdMNPV-gfp-pFB1, 在昆虫细胞中表达 GFP 蛋白作为吸附实验的对照 (图 2 3)。采用昆虫杆状病毒表达系统表达虾来源的 WSSV 结构蛋白可使重组蛋白的构象最接近其天然构象^[7], 为进一步研究蛋白的功能提供了基础。

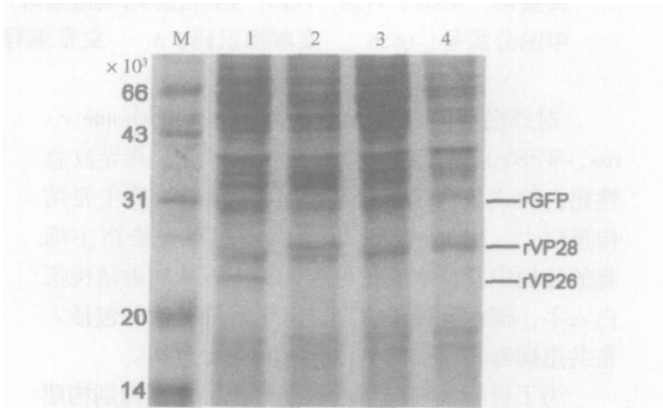


图 2 SDS PAGE 检测 VP28 和 VP26 蛋白在 S9 细胞中的表达

Fig. 2 Detection of VP28 and VP26 proteins expression in S9 cells with SDS PAGE

M: 低相对分子质量蛋白标准; 1-3 分别为用重组杆状病毒 AdMNPV-WSSVvp26-pFB1、AdMNPV-WSSVvp28-pFB1 和 AdMNPV-gfp-pFB1 感染 S9 细胞后的细胞裂解上清; 4 用 AdMNPV-empty-pFB1 感染 S9 细胞后的细胞裂解上清

2.3 细胞吸附实验

重组表达的 rVP28 和 rVP26 蛋白分别与虾鳃细胞一起孵育。用 Western blot 来检测蛋白能否与细胞发生作用。结果显示与 rVP28 和 rVP26 蛋白吸附的细胞样品都能在相应的位置显示特异条带 (图 3 2; 图 4 2)。而吸附阴性对照虾细胞样品和第 2 次 PBS 洗涤的上清中均不能检测出相应的条带 (图 3 3-4; 图 4 3-4), 表明吸附结果中的阳性条带并非来自于未吸附的游离蛋白, 也非来自虾细胞本身。上述结果说明, rVP28 和 rVP26 均可以与虾细胞表面发生吸附。为了证明这种吸附作用是特异的, 我们选择昆虫细胞表达的 GFP 蛋白作为

对照。结果显示 rGFP 蛋白不能与虾细胞表面发生吸附 (图 3、6)。

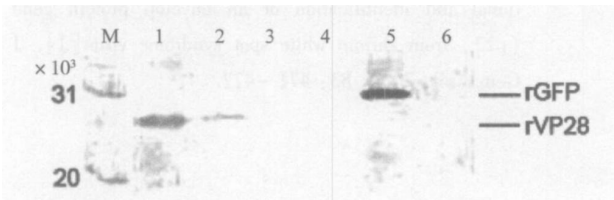


图 3 Western blot 检测 rVP28 与虾鳃细胞的吸附作用
Fig. 3 Western blot analysis of recombinant VP28 binding gill cells of shrimp

M: 低相对分子质量蛋白标准; 1-4 使用多克隆抗体 anti-VP28 1: 表达 rVP28 蛋白的 S9 细胞裂解上清; 2 与 rVP28 作用并经过 PBS 漂洗后的虾细胞; 3 第 2 次 PBS 漂洗后的洗涤上清; 4 吸附阴性对照虾细胞; 5-6 使用 GFP 单克隆抗体 anti-GFP 5 表达 rGFP 蛋白的 S9 细胞裂解上清; 6 与 rGFP 作用并经过 PBS 漂洗后的虾细胞

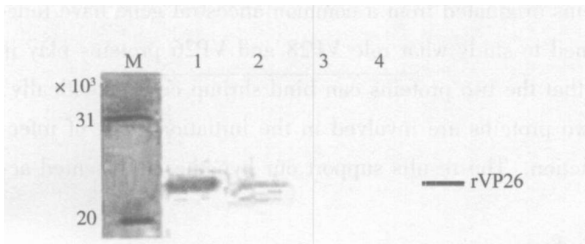


图 4 Western blot 检测 rVP26 与虾鳃细胞的吸附作用
Fig. 4 Western blot analysis of recombinant VP26 binding gill cells of shrimp
(使用多克隆抗体 antiVP26 检测)

M: 低相对分子质量蛋白标准; 1: 表达 rVP26 蛋白的 S9 细胞裂解上清; 2 与 rVP26 作用并经过 PBS 漂洗后的虾细胞; 3 第 2 次 PBS 漂洗后的洗涤上清; 4 吸附阴性对照虾细胞

3 讨 论

WSSV 具有囊膜但不形成包涵体, 故其感染特性很可能由存在于囊膜上的特异蛋白决定。Vlak 等^[3]首先对 WSSV 进行了蛋白序列测定和重组表达, 并进行了序列比较分析, 他们认为 WSSV 可能是一种称之为 *Whipoviridae* 的新的病毒家族的代表。同时, 他们认为 VP28 是囊膜蛋白, 而 VP26 是核衣壳蛋白。但本文综合计算机分析结果和动物 DNA 病毒的特性, 倾向于认为二者的功能是相似的, 并且有可能均为囊膜蛋白。

个共同的基因拷贝, 二者具有相似的跨膜结构域, 因而有可能执行相似的功能。因为对于动物 DNA 病毒而言, 由同一个基因分化出的蛋白执行不同的生理功能是极为罕见的, 祖先相同而功能分化的基因目前仅见于植物病毒^[8-9], 而且结构蛋白在病毒家族中往往是非常保守的。

鉴于目前国内外尚未建立对 WSSV 敏感的细胞系, 为此, 本文特别设计了体外细胞吸附实验。结果显示, 与 rVP28 或 rVP26 重组蛋白温育过的健康对虾细胞, 在后续的免疫检测中出现阳性反应, 而与表达 rGFP 蛋白的昆虫细胞裂解液温育的对虾细胞则呈阴性反应, 同时漂洗对虾细胞后的 PBS 溶液也没有检测到阳性反应, 说明重组蛋白 rVP28、rVP26 在温育的过程中与虾细胞表面发生了特异性吸附。此结果表明 rVP28 和 rVP26 可以各自独立地与宿主细胞表面发生结合, 因而可以推断这两个蛋白极可能参与 WSSV 侵染宿主的初始阶段, 证明 VP28 与 VP26 可能执行相似的功能。而 Zhang 等^[10]的研究结果亦指出, VP26 蛋白应定位于 WSSV 的囊膜, 进一步否定了 VP28 与 VP26 功能分化的结论。

本实验所设计的体外细胞吸附实验, 达到了理论预期的结果。由于尚无一个可用的对虾细胞系, 导致 WSSV 的相关研究至今无法与昆虫杆状病毒的研究成果相提并论。本实验避开了这个困境, 直接从活体中取鲜活状态的细胞用于吸附实验, 在细胞可承受的离体时间内完成了实验工作, 为今后的相关研究提供了一条可行的研究思路。

参考文献:

[1] 孔杰, 刘萍, 石拓, 等. 对虾杆状病毒一个 DNA 片段序列测定[J]. 海洋学报, 2003 25(supp 2): 186-189.
[2] 徐洪涛, 朴春爱, 王雷, 等. 对虾白斑病毒感染的电子显微镜观察及 DNA 杂交证据[J]. 微生物学报, 2000 40(3): 252-255
[3] VAN HULTEN M C W, WESTENBERG M, VLAKE J M, et al Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. Virology 2000 266: 227-236
[4] 寸树健, 邓百煌, 邓日强, 等. 基于 PC/Linux 蛋白序列分析系统的构建及应用[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2004 43(5): 80-82
[5] VAN HULTEN M C W, GOLDBACH R W, VLAKE J M, et al Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. J Gen Virol 2000 81: 2525-2529.
[6] HUANG C G, SONG Y L, Maternal transmission of

- immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Dev Comp Immunol 1999 23: 545–552
- [7] POSSEE R D. Baculoviruses as expression vectors [J]. Curr Opin Biotechnol 1997 8: 569–572
- [8] MCGEOCH D J. Evolutionary relationships of virion glycoprotein genes in the S regions of alphaherpesvirus genomes [J]. J Gen Virol 1990 71: 2361–2368
- [9] BOYKO V B, KARASEV A V, AGRANOVSKY A A et al. Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants [J]. PNAS 1992 89: 9156–9160
- [10] ZHANG X B, HUANG C H, XU X et al. Transcriptional and identification of an envelope protein gene (p22) from shrimp white spot syndrome virus [J]. J Gen Virol 2002 83: 471–477.

Functional Analysis on Structure Proteins VP28 and VP26 of White Spot Syndrome Virus

LU Fei, CUN Shu-jian, YANG Kai, DENG Bai-huang, YANG Xiao-yi, WU Wen-yan

(State Key Lab for Bio-control / Biopharmaceutical Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Research about white spot syndrome virus (WSSV) structure proteins is not enough. Bio-information analysis shows that the structure proteins VP28 and VP26 have 45% similarity of amino acid sequence, besides their high similarity in secondary structure and transmembrane domains, which implies that the two proteins might evolve through gene duplication. It could be supposed that VP28 and VP26 proteins might execute similar function since considering animal DNA viruses there are rarely proteins originated from a common ancestral gene have functionally diverged. A novel cell binding experiment is designed to study what role VP28 and VP26 proteins play in the process of WSSV infecting host cells. The results show that the two proteins can bind shrimp cells specifically, whereas the control protein GFP could not. Possibly, the two proteins are involved in the initiation stage of infectious procedure, that is to say they may perform similar function. The results support our hypothesis presented according to the outcome of bioinformatics analysis.

Key words WSSV; VP28; VP26; bioinformatics; cell binding