

白斑综合症病毒 (WSSV) 囊膜蛋白 VP28 基因的克隆及在蓝藻中表达载体的构建*

张春莉¹⁻⁴ 施定基² 黄³ 张海霞¹ 彭国宏¹

(¹中国科学院海洋研究所 青岛 266071);(²中国科学院植物研究所 北京 100093)

(³中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071);(⁴中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 用蔗糖密度梯度离心法分离纯化白斑综合症病毒 (WSSV)。设计并合成引物,提取 WSSV 中国株的基因组 DNA 作为模板,通过 PCR,扩增克隆出 VP28 基因,利用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切点将 VP28 基因插入克隆载体 pUC19 的多克隆位点上,得到 VP28 基因的重组克隆质粒,对其进行双向 DNA 测序。测序结果表明,该基因含有 615 个核苷酸,与 GenBank 中已有不同来源的 WSSV 的序列片段同源性为 100%。利用 *Bam*HI 切点将 VP28 的基因插入到穿梭表达载体启动子 P_{psbA} 的下游, *Eco*RI 酶切鉴定,得到正向连接的可在蓝藻表达的重组穿梭表达载体,命名为 pRL-VP28。

关键词 白斑综合症病毒(WSSV),囊膜蛋白,VP28 蛋白,基因克隆,穿梭表达载体
中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)02-0072-05

白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, 简称 WSSV) 是 1993 年来引发我国大面积暴发对虾病毒性疾病的主要病原^[1], 并给世界对虾养殖造成了巨大的损失^[2]。中美学者徐洵等和荷兰学者 van Hulten 等先后完成了 WSSV 的基因组全序列的测定^[5,6]。但从分子水平对 WSSV 的感染和致病机理的研究报道不多。结构蛋白的分析和功能基因的解析,探索 WSSV 的致病机理是目前 WSSV 研究的热点之一。

寻找及克隆病毒致病基因和构建含该基因的体外表达载体是用基因工程方法探索基因表达和蛋白质功能的重要基础。VP28 是 WSSV 主要的囊膜蛋白, 分子量为 28 u^[7]。而病毒囊膜蛋白往往与病毒的感染密切相关。最近, van Hulten 又初步证明 VP28 可能在病毒全身性感染对虾的起始步骤中起关键作用^[8], 为这种探索提供了有力的线索。

本研究设计一对特异性引物,以 WSSV 中国株囊膜组分中基因组 DNA 为模板,用 PCR 法扩增得到 VP28 基因,并比较不同地理株中 VP28 相关基因核酸序列的同源性。又构建了含 VP28 基因的穿梭表达载体。为进一步的工作提供关键的技术基础。

将 WSSV 中国株 VP28 基因构建在蓝藻穿梭表达

载体上在国内外尚未见其他报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和患病对虾 病料取自青岛大麦岛养殖场发病中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 及人工感染 WSSV 发病的克氏原螯虾 (*Parastacus clarkii*)。-70℃ 保存。

1.1.2 质粒和试剂 *Taq plus* I DNA 聚合酶是上海生工公司的产品, *T*₄ 连接酶及限制性内切酶为 TAKARA 产品, 玻璃奶 DNA 回收试剂盒为博大产品, 其他相关试剂购自上海生工公司和大连宝生物公司。pRL-489 质粒由 P. Wolk 教授(密执安州立大学)赠送。

* 国家重点基础研究发展规划项目 G1999012002 号“对虾病毒病的分子与细胞学机理”资助。

第一作者: 张春莉, 出生于 1978 年, 硕士研究生, E-mail: chunlizh@yahoo.com

收稿日期: 2002-07-08; 修回日期: 2002-07-12

1.2 方法

1.2.1 病毒的纯化 方法参见文献[1]。

1.2.2 病毒核酸 DNA 的提取 方法参见文献[1]。

1.2.3 基因克隆 根据 VP28 蛋白的编码序列^[7],用软件 primer premier 5.0 设计一对引物。引物由上海生工公司合成。PCR 法扩增基因片段方法参见分子克隆实验指南,按博大公司玻璃奶 DNA 回收试剂盒的说明书回收 PCR 产物。

1.2.4 载体构建及基因序列分析 按文献[3]、[4],提取质粒,酶切,连接,转化,鉴定,筛选。克隆载体上 VP28 基因的序列测定由大连宝生物公司完成。

2 结果

2.1 引物设计和目的片段的 PCR 扩增

根据 van Hunten 的序列^[7]设计引物,上游 P1: AA~~g~~ATCC~~g~~AgAgC~~g~~TCA~~T~~ggATC~~T~~TTC~~T~~TTCAC, 引入一个 *Ba*mHI 位点,下游 P2: CCCCC~~g~~AA~~T~~TCCAC~~g~~AT~~T~~TACTC~~g~~TCTC, 引入一个 *Eco*RI 位点。并在 ATG 前添加上适合于蓝藻表达系统表达的 SD 序列。引物设计好后,由上海生工公司合成。以感染 WSSV 的中国对虾中分离纯化的病毒的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获取从起始密码子 ATG 到终止密码子后的片段 655 bp。PCR 反应采用 *Taq* 高保真 DNA 聚合酶,考虑到两个引物中分别添加了 14 bp 和 12 bp 的非特异性的寡核苷酸,为了保证引物能和模板充分结合,所以扩增时退火条件采用 56℃,退火 1 min;5 个循环后 60℃,退火 1 min,30 个循环;经 PCR 扩增得到特异性片段,琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段为 655 bp (图 1),与理论推测相一致。将纯化后的 PCR 产物(655bp),*Ba*mHI 和 *Eco*RI 进行双酶切后,将 VP28 基因插入克隆载体 pUC19 的多克隆位点上,得到 VP28 基因的重组克隆质粒 pUC VP28。

2.2 DNA 序列测定与分析

2.2.1 DNA 序列测定 以 2 次活化的转化 pUC VP28 的新鲜菌液为样品,采用通用引物对克隆载体进行双向测序。测序结果见图 2。68bp-692bp 是 VP28 基因的编码区(615bp),编码 204 个氨基酸。在蓝藻中的高效表达的 SD 序列位于 ATG 上游。

2.2.2 核酸序列的比较分析 用 BLAST 方法在 GenBank 中比较测序序列的同源性发现,该序列与这 7 个序列的同源性为很高。与 WSSV 中国株(登记号 AF332093)、WSSV 泰国株(登记号 AF369029)、WSSV 台湾株(登记号 AF440570.1) 基因组全序列中 VP28

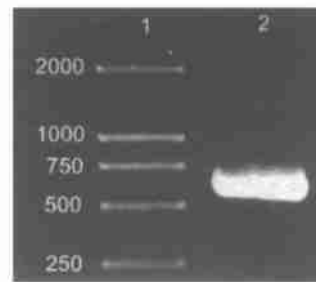


图 1 VP28 基因片段的 PCR 产物
(质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶)

Fig.1 PCR product of VP28 DNA segment (1.2% gel)
1 DNA marker; 2 Amplified product of PCR

基因同源性 100%,与 WSSV 台湾株 VP25 蛋白基因(登记号 AF272979)、WSSV 中国株结构蛋白 mRNA(登记号 AF227911)、WSSV 泰国株 VP28 的基因(登记号 AF173993) 同源性为 100%,仅与 WSSV 韩国株 VP28 基因序列(登记号 AF380842) 同源性为 99%。并与 WSSV 泰国株蛋白激酶(登记号 AY0088431) 的 3' 端有 106 bp 是重叠。

2.3 穿梭表达载体的构建

将 *Ba*mHI 单切克隆载体 pUC VP28 得到的 3.3 kb 大小的片段,与 *Ba*mHI 单切 pRL489 后得到的 9.0 kb 左右的大片段,分别电泳回收后,连接,构建(如图 3)所示的重组穿梭表达载体。用具有氨苄青霉素和卡那霉素双抗浓度梯度的平板筛选重组穿梭表达质粒。双抗浓度梯度从常规浓度 1/4~1/2 可以得到超过 20 个以上的重组质粒,而阴性对照没有任何克隆出现。但当抗生素浓度提高到常规浓度时,很难得到重组质粒。*Ba*mHI 单酶切后连接,将导致外源基因从正和反两个方向插入到启动子 *PpsbA* 的下游。正连重组中 VP28 位于 *PpsbA* 启动子的下游,能有效表达;而反连重组中 VP28 距离启动子较远,使得外源 VP28 基因不能得到表达。利用 *PpsbA* 启动子上游和 VP28 基因 3' 端的 *Eco*RI 位点,单酶切筛选正反重组穿梭表达载体。*Ba*mHI 单切重组载体得到 9.0 kb 左右的大片段和 3.3 kb 大小的小片段,表明 VP28 基因及克隆载体插入到在 pRL489 的两个 *Ba*mHI 位点之间(图 4,样品 4)。经 *Eco*RI 单酶切得到 1.0 kb 的小片段(图 4,样品 5),表明 VP28 基因插入正向连接的重组穿梭表达载体 *PpsbA* 启动子的下游。

3 讨论

本文选用的穿梭表达载体 pRL489,能够转化丝

```

AGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGAGAGCGTC
68  ATG GAT CTT TCT TTC ACT CTT TCG GTC GTG TCG GCC ATC CTC GCC ATC ACT
    M D L S F T L S V V S A I L A I T
119  GCT GTG ATT GCT GTA TTT ATT GTG ATT TTT AGG TAT CAC AAC ACT GTG ACC
    A V I A V F I V I F R Y H N T V T
170  AAG ACC ATC GAA ACC CAC ACA GAC AAT ATC GAG ACA AAC ATG GAT GAA AAC
    K T I E T H T D N I E T N M D E N
221  CTC CGC ATT CCT GTG ACT GCT GAG GTT GGA TCA GGC TAC TTC AAG ATG ACT
    L R I P V T A E V G S G Y F K M T
272  GAT GTG TCC TTT GAC AGC GAC ACC TTG GGC AAA ATC AAG ATC CGC AAT GGA
    D V S F D S D T L G K I K I R N G
323  AAG TCT GAT GCA CAG ATG AAG GAA GAA GAT GCG GAT CTT GTC ATC ACT CCC
    K S D A Q M K E E D A D L V I T P
374  GTG GAG GGC CGA GCA CTC GAA GTG ACT GTG GGG CAG AAT CTC ACC TTT GAG
    V E G R A L E V T V G Q N L T F E
425  GGA ACA TTC AAG GTG TGG AAC AAC ACA TCA AGA AAG ATC AAC ATC ACT GGT
    G T F K V W N N T S R K I N I T G
476  ATG CAG ATG GTG CCA AAG ATT AAC CCA TCA AAG GCC TTT GTC GGT AGC TCC
    M Q M V P K I N P S K A F V G S S
527  AAC ACC TCC TCC TTC ACC CCC GTC TCT ATT GAT GAG GAT GAA GTT GGC ACC
    N T S S F T P V S I D E D E V G T
578  TTT GTG TGT GGT ACC ACC TTT GGC GCA CCA ATT GCA GCT ACC GCC GGT GGA
    F V C G T T F G A P I A A T A G G
629  AAT CTT TTC GAC ATG TAC GTG CAC GTC ACC TAC TCT GGC ACT GAG ACC GAG
    N L F D M Y V H V T Y S G T E T E
680  TAA ATA AATCGTGAATT CACTTGGCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT GGG
    
```

图2 VP28的核酸序列和蛋白质序列分析

Fig.2 The nucleotides and amino acid sequence of VP28

状体蓝藻和单细胞蓝藻^[4]。本研究采用的连接路线是利用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 切点将 VP28 基因插入 pUC19 的多克隆位点上,再利用 *Bam*HI 切点将 VP28 插入到 pRI-489 启动子 *PpsbA* 的下游。这种连接路线的优点是,可以通过 pUC19 上的 *Amp^r* 和 pRI-489 上的 *Ne^{o^r}*, 双抗性筛选重组载体,消除假阳性。缺点则是:重组载体较大(12.3 kb),连接和筛选中存在一定的困难。在本研究中发现设定抗生素的筛选浓度梯度有助于双抗较快、较准确的筛选到较大的重组载体。常规浓度很难得到重组子,推测与该质粒大小、结构有关。该重组质粒大小为 12.3 kb,其中一个 *Bam*HI 位点距离大肠杆菌中的复制子 *OriV* 很近,酶切后,复制子受到影响,复制效率降低,导致转化后复苏期的拷贝数减少。

Beachy 等发现,经遗传转化的植物产生对病毒抗性^[9]。这一发现,已广泛地应用于植物病毒病的预防中。中国科学院植物研究所把黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMVCP)基因转入蓝藻中表达时,发现部分转基因蓝藻自身对病毒外壳蛋白产生抗性,保护光系统 II 活

性不被破坏(未发表)。这一现象启示我们,蓝藻作为宿主,可能对病毒致病蛋白存在一种拮抗机制,如制成疫苗,可应用于病毒病防治中。这也是我们构建在蓝藻中表达穿梭表达载体的一个重要原因。

对于病毒病最有效的控制措施是早期诊断和疫苗的制备。Teunissen 等制备了有效的对虾弧菌疫苗^[10]。疫苗的给予方式是多种的,特别是对于商业化生产,浸泡或投喂是对虾疫苗的最佳给予途径,最好的口服疫苗载体是能够将疫苗包成囊膜的活的生物。考虑到病毒传播途径主要是在摄食时经口入体。用蓝藻作宿主来表达 VP28,然后作粗提后给对虾口服,探讨 VP28 蛋白在 WSSV 感染对虾中的功能,这将为 WSSV 的防治和转基因蓝藻的应用提供一条新的途径。

感谢:对中国水产科学研究院黄海水产研究所病害防治研究室的易志刚同学和宋晓玲老师及中国科学院植物研究所的杨明丽老师在本实验中给予的极大帮助,特表感谢!

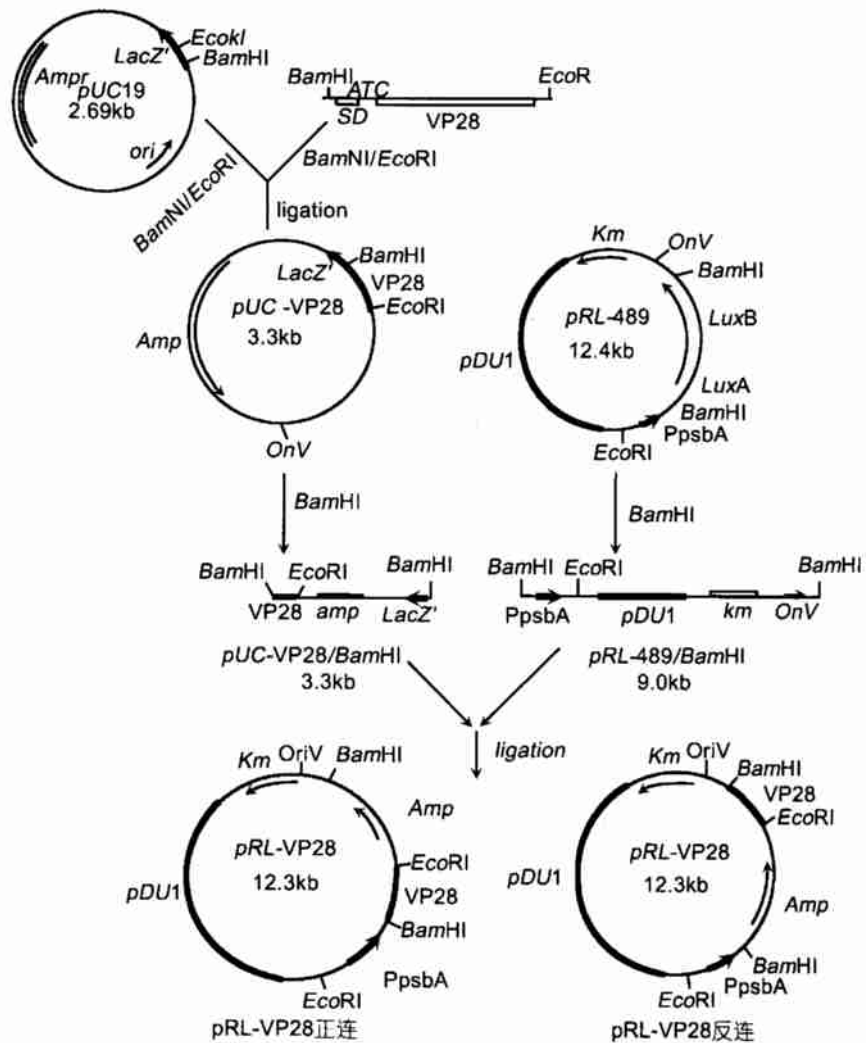


图3 重组克隆载体 pRL- VP28 的构建

Fig.3 Construction of recombinant shuttle vector pRL- VP28

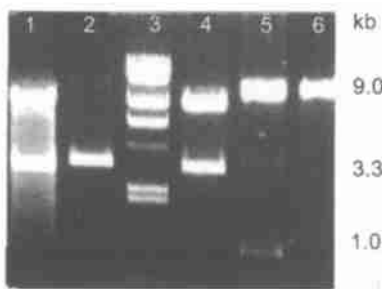


图4 重组穿梭表达载体 pRL-VP28 酶切鉴定图谱

Fig.4 Restriction pattern of recombinant shuttle vector pRL-VP28
1 pRL-489/ BamHI ; 2 pUC-VP28/ BamHI ; 3 λ/ Hnd III ; 4 pRL-VP28/ BamHI ; 5 pRL-VP28/ EcoRI ; 6 pRL- 489/ EcoRI

参考文献

- 1 黄 ,于佳,宋晓玲,等.对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸多肽及血清学研究.海洋水产研究,1995,16(1):11-23
- 2 雷质文,黄 ,梁成珠,等.白斑综合症病毒的生物学活性.海洋科学,2002,26(3):26-31
- 3 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南.第2版.北京:科学技术出版社,1995.
- 4 戴薇,施定基,张卉,等.人表皮生长因子(hEGF)在蓝藻中的表达.植物学报,2001,43(12):1260-1264
- 5 Yang F, He J, Lin X, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. J Virol, 2001, 75(23): 11 811 - 11 820

- 6 van Hulst M C W, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 2001 (286) :7 - 22
- 7 van Hulst M, Westenberg S, Goodall D, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, 2000(266) :227 - 236
- 8 van Hulst M C W, Witteveldt J, Snippe M, et al. White spot syndrome Virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 2001(285) : 228 - 233
- 9 Patricia P A, Richard S, Nelson B D, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Sciences*, 1986(232) :738 - 743
- 10 Teunissen O S P, Faber R, Booms H R, et al. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 1998(164) :359 - 366

CLONE OF ENVELOPE PROTEIN VP28 GENE OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) AND EXPRESSION VECTOR CONSTRUCTION FOR CYANOBACTERIA

ZHANG Chun Li¹⁻⁴ SHI Ding Ji² HUANG Jie³ ZHANG Hai Xia¹ PENG Guo Hong¹

(¹ Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

(² Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100093)

(³ Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

(⁴ Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

Received: Jul., 8, 2002

Key Words: White spot syndrome virus (WSSV), Envelope protein, VP28 protein, Gene clone, Shuttle expression vector

Abstract

This paper deals with the molecular mechanism of the infection of *Penaeus chinensis* by white spot syndrome virus. A strain of WSSV was isolated and purified from *P. chinensis* with sucrose gradient centrifugation. Protein VP28 was identified by SDS-PAGE. Genome DNA of WSSV was extracted. The primer was designed and synthesized according to the reported sequence in the GenBank. The gene of VP28 protein was cloned from Genome DNA with PCR amplification. The product of PCR digested by restriction enzyme *Bam*HI and *Eco*RI was constructed on the clone vector pUC19. The recombinant vector was identified with double digestion of *Bam*HI and *Eco*RI. The gene was sequenced and the results showed that the VP28 gene contains 615 nucleotides encoding 204 amino acids and 100% identity with WSSV sequences reported in GenBank. The clone vector was named as pUC VP28. Then, plasmid pUC VP28 digested by *Bam*HI (3.3 kb) was ligated with pRL-489 digested by *Bam*HI (9.0 kb). Recombinant was selected with double antibiotics and was identified with digestion with *Bam*HI. The VP28 gene inserted at the same site at downstream of the promoter PpsbA moves towards different directions. There are two *Eco*RI sites: one is at upstream of the promoter PpsbA and the other located at the 3' end of vp28 gene. The recombinant was digested with *Eco*RI and 1.0kb was seen in the gel of 0.6%. The result showed that the vp28 gene was located at the downstream of PpsbA. The recombinant shuttle expression vector for cyanobacteria was named as pRL-VP28. It was the key step for expression of VP28 protein in cyanobacteria.

(本文编辑:刘珊珊)