

利用宿主范围扩大的杂交病毒 HyNPV 在家蚕中表达对虾白斑综合症病毒 VP19 基因

The Expression of VP19 Gene from Prawn White Spot Syndrome Virus in Silkworm , *Bombyx mori* Using Host Range-expanded HyNPV

许雅香^{1,2*}, 吴小锋², 朱玉芳¹, 许梓荣², 沈卫德¹

XU Ya-Xiang^{1,2*}, WU Xiao-Feng², ZHU Yu-Fang¹, XU Zi-Rong² and SHEN Wei-De¹

1. 苏州大学 苏州 215006

2. 浙江大学 杭州 310029

1. Suzhou University, Suzhou 215006, China

2. Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘 要 对虾白斑综合症其病原是对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, 简称 WSSV)。VP19 是 WSSV 的一个囊膜蛋白, HyNPV(Hybrid of AcNPV and BmNPV, 简称 HyNPV)是 BmNPV 和 AcNPV 通过基因重组后得到的一个具有 BmNPV 和 AcNPV 双重优点的新型杂交病毒, 在克隆了 VP19 基因的基础上, 成功构建了重组转移载体 pBlueBicHisC-vp19 和重组杆状病毒 HyNPV-VP19。用重组病毒注射接种 5 龄起蚕, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 结果表明, WSSV-VP19 基因在家蚕体内得到了表达, 特异性条带大小与预计的基本一致, 约为 21kD。

关键词 HyNPV, 对虾白斑综合症病毒, VP19 基因, 家蚕

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)05-0837-03

Abstract Prawn white spot syndrome is caused by the pathogen prawn white spot syndrome virus (WSSV). VP19 is a vesicle membrane protein of WSSV. HyNPV (Hybrid of AcNPV and BmNPV) constructed by the recombination of BmNPV and AcNPV is a new hybrid virus having both of their advantages. The recombinant transfer vector pBlueBicHisC-vp19 and recombinant baculovirus HyNPV-VP19 were constructed on the basis of the successful cloning of VP19. Newly-molted silkworms *Bombyx mori* of fifth instar were inoculated by the recombinant virus. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed a specific band, about 21kD, which was consistent with the expectation suggesting that the WSSV-VP19 gene was successfully expressed in silkworm bodies.

Key words HyNPV, Prawn white spot syndrome, VP19 gene, *Bombyx mori*

Received: January 28, 2005; Accepted: April 1, 2005.

This work was supported by the grants from Jiangsu Higher School Natural Science Research Project (No.03KJB240125) and Doctoral Initial Funding Project of Suzhou University.

* Corresponding author. Tel 86-512-67606492, E-mail: szdxxxyx@163.com

江苏省高校自然科学研究计划项目(No.03KJB240125)和苏州大学博士启动基金项目。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

对虾白斑综合症是由对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, 简称 WSSV)感染对虾后引起的病毒性传染病^[1]。自上世纪 90 年代对虾白斑综合症在世界沿海各地发生以来,许多学者对其症状、病理变化、流行性、诊断、防治等进行了较为全面的研究^[2-4],但有关病原 WSSV 病毒分子生物学方面的研究不多,尤其是关于 WSSV 感染对虾的分子机制几乎未见报道。已知 VP19 是由病毒基因组自身编码的结构蛋白,为 WSSV 的主要囊膜蛋白^[5],我们的研究表明,囊膜在 WSSV 感染对虾过程中起关键作用^[6],Van 等发现另一囊膜蛋白 VP28 与对虾白斑综合症的系统感染有关^[7]。但 VP19 囊膜蛋白是否与对虾白斑综合症的系统感染有关?至今未见报道,于是我们决定对 VP19 进行深入研究,而 P19 蛋白是开展研究的第一步,随着后基因组时代的到来,通过外源表达系统来获得目的蛋白已成为较常规的方法。昆虫-杆状病毒表达载体系统是目前公认的有应用价值的真核生物表达系统,其超高效表达能力、安全性和易操作性越来越受到人们的重视,该表达系统对转译后的产物能正确加工,与原核、酵母表达系统相比,其表达产物具有更好的天然生物活性。HyNPV 是 BmNPV 和 AcNPV 通过基因重组后得到的一个具有 BmNPV 和 AcNPV 双重优点的新型杂交病毒,本研究利用家蚕-HyNPV 表达系统,以家蚕为表达宿主以求得到后加工完善的 VP19 囊膜蛋白。为探讨病毒感染的分子机制提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒、菌株、载体、细胞及家蚕:含 WSSV-VP19 基因的质粒 pGEMVP19 由前文构建^[8],宿主菌 *E. coli* JM109 由浙江大学饲料科学研究所提供,转移载体 pBlueBicHisC、表达载体 HyNPV 和 Sf9 细胞由浙江大学动物科学学院吴小锋博士馈赠,表达宿主家蚕(苏 5×苏 6)由苏州大学蚕桑研究所提供。

酶与试剂:实验中所用的限制酶和 DNA 重组用的酶以及昆虫细胞培养基 TC-100、FBS、共转染试剂 Lipofectin、标准分子量蛋白均为 GIBCO 公司产品,单克隆抗体鼠抗 6His 和 HRP-羊抗鼠 IgG 购于 Sigma 公司,其它试剂均购自上海生工生物工程有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 重组转移载体质粒 pBlueBicHisC-vp19 的构建策略:已克隆的 VP19 基因其 ATG 端带有 *Nco* I 位点,TAA 端带有 *Hind*III 位点。为此,用 *Nco* I 和 *Hind*III 对质粒 pGEMvp19 进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,割胶回收小片段。同时用 *Nco* I 和 *Hind*III 对表达转移质粒 pBlueBicHisC 进行双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,割胶回收大片段。用 T4 DNA 连接酶在 4℃下连接两片段过夜,连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂板含氨苄的 LB 固体培养基,37℃过夜,挑取单菌落于含氨苄的 LB 液体培养基中,37℃,200r/min 振荡培养过夜,抽提质粒,用双酶切和 PCR 法进行重组质粒的鉴定,将重组

质粒命名为 pBlueBicHisC-vp19。重组转移载体质粒 pBlueBicHisC-vp19 的构建策略如图 1。

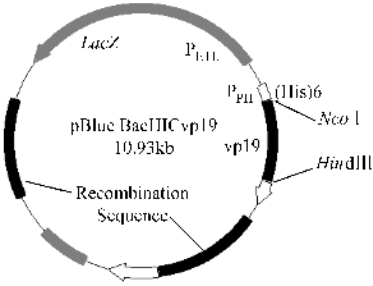


图 1 重组转移质粒 pBlueBacHisCvp19 构建策略

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmids pBlueBacHisCvp19

1.2.2 重组杆状病毒的构建:杂交病毒 HyNPV-DNA 的制备:杂交病毒 HyNPV 在 Sf9 单层细胞中培养增殖,细胞出现明显发病症状后收集培养上清液,5 000r/min 离心 10min,取上清,4℃、30 000r/min 离心 60min,弃上清,病毒沉淀用 1mL TE 缓冲液(pH8.0)溶解,在悬浮液中加入 50μL 10% SDS、2.5μL 蛋白酶 K(20mg/mL),50℃水浴过夜。对消化过夜的混合液,用酚、酚:氯仿各抽提 2 次,氯仿:异戊醇抽提 1 次,取水相,加 2 倍体积无水乙醇,混匀,用玻璃棒钩出丝状 DNA,溶于适量 TE 缓冲液(pH8.0)中。

共转染采用 Lipofectin 共转染法。取直径 40cm 的平皿一付,加入 0.5mL TC-100(含 10% FBS)培养基,铺入 2×10⁵ 个 Sf9 细胞,27℃培养 6h 左右使细胞贴壁。共转染时,取 1.5mL Eppendorf 管 1 支,加入 HyNPV-DNA 约 1μg,重组转移质粒 pBlueBicHisC-vp19 约 20μg,Dosper 试剂 15μL,用水补总体积至 40μL,轻轻混匀,室温放置 15min,期间,将平皿中带 FBS 的 TC-100 培养基吸尽,用无血清的 TC-100 培养基洗涤细胞 3 次。最后加入 1mL 的无血清的 TC-100 培养基,将 Eppendorf 管中的混合液加入其中,混匀,用 Parafilm 封口,27℃培养 24h 左右,加入 1mL 含 20% 的 FBS TC-100 培养基,27℃培养 5~7d 至细胞出现严重发病症状,收集共转染液,4℃、5000r/min,离心 10min,取上清。

将共转染上清液感染 Sf9 细胞进行蓝白斑筛选,待单个蓝斑出现后,用巴斯德吸管将蓝斑挑出,用显微镜法和 PCR 法进行重组病毒鉴定,将纯化的重组病毒接种家蚕五龄起蚕,使 VP19 基因在蚕体内表达。

1.2.3 表达产物的检测:将游离的重组病毒 HyNPV-VP19 5μL(5×10⁵ pfu)注射接种 5 龄起蚕,对照区注射 HyNPV,每区 20 头,25℃正常饲养家蚕,Ad 后蚕发病。剪腹足在冰上收集血淋巴,10 000g 离心 10min,上清液用 PBS 稀释 5 倍后,用等体积的上样缓冲液裂解,置 100℃煮 3~5min 后,4℃、10 000 r/min 离心 10min,取上清液进行 SDS-PAGE(一式二份),取 10μL 上样,用标准分子量蛋白作对照,电泳结束后,一份用考马斯亮蓝 G-250 染色,一份做 Western blotting,方法参照《分子克隆实验指南》。

2 结果与分析

2.1 重组转移载体 pBlueBicHisC-vp19 的鉴定

双酶切和 PCR 法进行重组质粒 pBlueBicHisC-vp19 的鉴定结果如图 2。VP19 基因全长 366bp,由图 2 知,目的基因已正确地克隆入转移载体中。

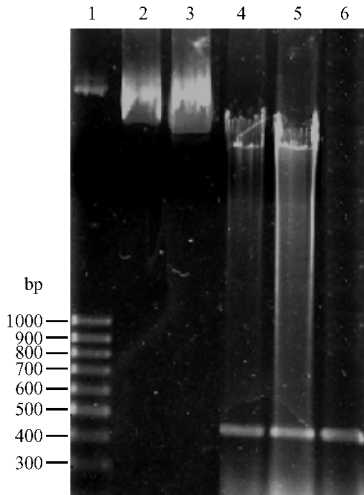


图 2 重组质粒 pBlueBicHisC-vp19 的鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pBlueBicHisC-vp19

1 :marker ; 2,3 : pBlueBicHisC-vp19 ; 4,5 : pBlueBicHisC-vp19/ Nco I + Hind III ; 6 : pBlueBicHisC-vp19/PCR.

2.2 重组病毒的筛选

重组转移载体 pBlueBicHisC-vp19 与 HyNPV -DNA 共转染 Sf9 细胞,共转染上清液进行蓝白斑筛选,挑取重组病毒蓝斑。显微镜下重组病毒感染的 Sf9 细胞中无多角体,说明重组病毒已产生且纯化。

2.3 表达产物的检测

将重组病毒 HyNPV-VP19 悬液接种家蚕。用病蚕血淋巴上清液进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析,结果如图 3,特异性条带大小约 21kD,与预计的基本一致,表明表达产物在蚕体内得到了较完善的后加工。

3 讨论

家蚕-杆状病毒(BmNPV)表达系统由于生产成本低、蛋白质合成能力强、质量高及安全性好等优点而备受欢迎。然而, BmNPV 表达系统存在着明显的缺点,即 BmNPV 寄生专一。目前欧美等发达国家广泛应用的是 AcNPV 表达系统。AcNPV 感染寄主范围较广,能感染 19 种昆虫之多,对 Sf21、Sf9 及 Tn-5 等昆虫细胞均具有感染性,这些昆虫细胞易于培养、生长旺盛、繁殖迅速,对重组病毒的构建等工作十分有利,而且非常适合于大规模用无血清培养基悬浮培养细胞生产重组蛋白。但它的缺点是寄主昆虫个体小,饲养困难,难以适合产业化水平开发的要求。可见, BmNPV 和 AcNPV 各有特点和优势。本研究采用的病毒载体是 BmNPV 和 AcNPV 通过基因重组后得到的一个具有 BmNPV 和 AcNPV 双重优点

的新型杂交重组病毒 HyNPV(Hybrid of AcNPV and BmNPV ,简称 HyNPV)。

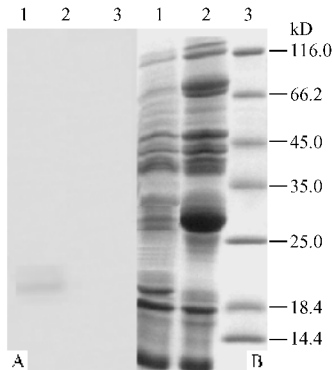


图 3 家蚕血淋巴的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B)检测

Fig. 3 Analysis of expression products by SDS-PAGE(B) and Western blotting(A)

1 :Haemolymph of larvae infected with recombinant HyNPV-VP19 ; 2 : Haemolymph of larvae infected with wide-type HyNPV 3 :protein marker.

本文利用家蚕-HyNPV 这一新型杂交杆状的病毒表达系统,表达了对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP19 的基因,为进一步研究 WSSV 感染对虾的分子机制打下了良好的物质基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Chen SN. Current status of shrimp aquaculture in Taiwan. *Aquaculture Society Baton Rouge Louisiana USA*, 1995, **29** :29 - 34
[2] nouye K, Miwa S, Oseko N *et al.* Mass mortalities of cultured KDAaruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993 :Electrin microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathol*, 1994, **29** :149 - 158
[3] Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S *et al.* Anon-occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organism*, 1995 **21** :69 - 77
[4] Lo CF, Ho CH, Peng SE *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organism*, 1996 **27** :215 - 225
[5] Van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 2001, **196** :7 - 22
[6] Xu YX(许雅香). Cloning and expression of envelope proteins genes of shrimp white spot syndrome virus and study on the resistance of expression products in crayfish. A Ph. D Dissertation of Zhejiang University, 2003
[7] Van Hulten MCW, Witteveldt J, Snippe M. White spot syndrome virus envelope protein VP19 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 2001, **195** (2) :219 - 233
[8] Xu YX(许雅香), Xu ZR(许梓荣), Du HH(杜华华) *et al.* Coning and sequence analysis of protein VP19 gene of white spot syndrome virus from shrimp. *Bulletin of Science and Technology*(科技通报) 2003, **19** (6) :473 - 476