

重组 WSSV 囊膜蛋白 VP281 和 VP31 的抗菌功能初步分析

孙玉苗^{1,2}, 李富花¹, 相建海^{1*}

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了解白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)两种囊膜蛋白 VP281 和 VP31 的功能, 本实验对二者进行了原核重组表达。利用一种组成型分泌原核表达质粒 pBTA1 为表达载体, 构建了组成型分泌 WSSV 囊膜蛋白 rVP281、rVP28 以及 rVP28 与增强型绿色荧光蛋白 rEGFP 融合蛋白的重组大肠杆菌菌株 DH5 α , 分别命名为 DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP。3 种重组菌在 LB 固体培养基上生长 12 h 的菌落直径分别为 (164.84 \pm 28.44)、(560.47 \pm 46.04) 和 (548.21 \pm 58.54) μ m, 生长 19 h 的菌落直径分别为 (436.31 \pm 47.56)、(1 136.90 \pm 110.88) 和 (1 083.33 \pm 109.83) μ m, 生长 24 h 的菌落直径分别为 (594.19 \pm 57.17)、(1 251.19 \pm 188.86) 和 (1 264.29 \pm 172.78) μ m; 显示在所有培养时间, DhpVP281 的菌落均显著小于 DhpVP28 或 DhpVP28-EGFP 的菌落 ($P < 0.05$), 推测 rVP281 的表达可能抑制大肠杆菌的生长。以 pBTA1 为表达载体, 未能成功构建组成型分泌 rVP31 的重组 DH5 α 。为了解其原因, 使用 pET-30a(+) 为表达载体, 构建了表达 rVP31 包涵体的重组菌株 BL21 (DE3) pLysS。将 rVP31 蛋白纯化并复性后, 采用牛津杯法, 检测到 rVP31 蛋白对溶壁微球菌具有抗菌作用。在动物病毒中发现具有抗菌作用的囊膜蛋白, 可以增加有关 WSSV 的病毒学方面的知识。

关键词: 白斑综合征病毒; 囊膜蛋白; 抗菌活性

中图分类号: Q 789; S 941

文献标志码: A

由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的白斑综合症自 20 世纪 90 年代初在东亚爆发以来, 迅速蔓延至全球, 造成了巨大的经济损失, 成为危害虾产业最严重的传染性病毒病^[1]。WSSV 属于一个新的病毒科 Nimavirida, *Whispovirus* 属^[2]。该病毒是一具有双层囊膜的双链 DNA 病毒, 其基因组大小约 300 kb^[3-4]。WSSV 主要感染十足目(Decapoda)的甲壳动物, 并且可由亲代传递给子代, 致死率高, 危害巨大^[5-7]。自 WSSV 发现以来, 关于该病毒的研究已进行系统研究, 但目前对其感染机制仍然知之甚少。

病毒囊膜蛋白在与宿主细胞受体相互作用, 启动病毒感染的发生或介导病毒的侵入方面起着

重要作用。迄今为止, 已鉴定出 WSSV 结构蛋白 60 余种, 其中囊膜蛋白 30 多种。在不同的囊膜蛋白之间, 如 VP28-VP26、VP28-VP24、VP28-VP19、VP26-VP24、VP24-VP19、VP28-VP37 (又名 VP281、VP33)、VP33-VP24 以及 VP37-VP26, 存在相互作用^[8-12]。VP26 通过与核衣壳蛋白 VP51 结合, 成为连接 WSSV 囊膜与核衣壳的桥梁^[13]。体内中和实验表明, WSSV 囊膜蛋白 VP28、VP281、VP31、VP68、VP466、VP36A 和 VP76 的抗血清皆能够不同程度地减缓 WSSV 感染, 因而被认为参与了 WSSV 感染宿主的起始过程^[11, 14-17]。囊膜蛋白 VP31、VP110、VP187 和 VP33 含有细胞粘附序列——RGD 序列(Arg-Gly-Asp 三肽序列), 且都被证

收稿日期: 2011-10-21 修回日期: 2012-04-15
资助项目: 国家重点基础研究项目(2006CB101804)
通讯作者: 相建海, E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn

明能粘附于宿主细胞; VP31、VP110 和 VP187 的粘附功能取决于 RGD 序列的存在, 而 VP33 的粘附功能同其 RGD 序列无关^[18-20]。目前在虾类中已经鉴定出一些与 WSSV 囊膜蛋白存在相互作用的蛋白, 如 Rab7、 β -integrin 和几丁质结合蛋白(CBP)等^[18, 21-22]。尽管 WSSV 囊膜蛋白在病毒感染宿主中的重要作用已被证实, 但对于不同囊膜蛋白功能的了解还比较缺乏。

本实验尝试利用一种组成型分泌原核表达质粒 pBTA1 为表达载体, 构建表达 WSSV 囊膜蛋白 VP28、VP281 或 VP31 的重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α ^[23]。组成型分泌 rVP28 和 rVP281 的重组菌构建成功, 但含 rVP281 的重组菌与含 rVP28 的重组菌相比生长十分缓慢。而组成型分泌 rVP31 的重组菌的构建未获成功。为弄清组成型分泌 rVP31 的重组菌未能成功构建的原因, 使用 pET-30a(+)为表达载体, 构建了表达 rVP31 包涵体的重组菌株 BL21 (DE3) pLysS。将 rVP31 蛋白纯化并复性后, 采用牛津杯法, 检测 rVP31 的抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 含有组成型分泌表达载体 pBTA1 的重组 DH5 α 的构建及表达检测

组成型分泌原核表达载体 pBTA1 由中国科学院海洋研究所孙黎研究员惠赠。该载体在目的基因插入位点的 5'端含有一个分泌信号肽, 3'端含有一个 His₆ 标签^[23]。

分别使用引物对 VP281F/VP281R、VP31F/VP31R 和 VP28F/VP28R(引物序列见表 1)以 WSSV 基因组为模板扩增获得 VP281、VP31 和 VP28 基因的开放阅读框(ORF)。VP281F、VP31F 和 VP28F 含有 *Nde* I 酶切位点, VP281R、VP31R 和 VP28R 含有 *Xho* I 酶切位点。将扩增产物连入载体 pMD19-T Simple(Takara)并测序检验其序列的准确性。使用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切切下目的片段 VP281、VP31 和 VP28, 连入经过同样双酶切的 pBTA1 载体, 获得的重组质粒分别命名为 pVP281、pVP31 和 pVP28。将重组质粒 pVP281 和 pVP28 分别转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 获得的重组菌分别命名为 DhpVP281 和 DhpVP28。但是将重组质粒 pVP31 转化大肠杆菌菌株 DH5 α 时, 虽经多次试验, 都没有成功。

重组菌 DhpVP281 和 DhpVP28 的表达检测参

照 Zhang 等^[23] 的方法略有改变。具体如下。重组菌 DhpVP281 和 DhpVP28 在含有终浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)中培养至 OD₆₀₀ 为 1.2 左右时终止培养, 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min, 分别收集菌体和上清。上清经 0.45 μ m 滤膜过滤后, 加入终浓度为 2%的三氯乙酸, 4 $^{\circ}$ C过夜以沉淀蛋白。将获得的蛋白沉淀使用 Buffer B(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-Cl, 8 mol/L Urea; pH 8.0)溶解, 获得上清蛋白样品。将菌体用 Buffer B 在室温下裂解, 获得菌体蛋白样品。获得的上清蛋白和菌体蛋白样品经过 SDS-PAGE 电泳, 采用电转法转印至 PVDF 膜。PVDF 膜在含有 0.5%脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4)中封闭过夜, 然后依次在 1:2 000 TBST 稀释的 anti-His 抗体(Tiangen)和 1:400 TBST 稀释的标记有辣根过氧化物酶的二抗(Tiangen)中室温孵育 2 h。使用 DAB 显色试剂盒(Tiangen)检测。

1.2 重组菌 DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 的生长比较

构建的重组菌 DhpVP281(插入片段大小约为 867 bp)生长明显比 DhpVP28(插入片段大小约为 612 bp)缓慢。为了更好地诠释这一现象, 排除插入片段大小对重组菌生长的影响, 又构建了一个插入片段比 VP281 更大的重组菌 DhpVP28-EGFP(插入片段大小约为 1 353 bp)。DhpVP28-EGFP 是组成型分泌表达 rVP28 与增强型荧光蛋白 rEGFP 的重组菌, 其构建方法如下: 使用引物 GFPF(含有 *Xho* I 酶切位点和 6 个甘氨酸 linker)和 GFPR(含有 *Xho* I 酶切位点)(引物序列见表 1), 以质粒 pEGFP-N1 (Clontech)为模板, 扩增得到增强型绿色荧光蛋白的 ORF 序列, 将其插入 pVP28 质粒中的 *Xho* I 酶切位点, 获得的重组质粒转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 获得重组菌 DhpVP28-EGFP; 使用荧光观察及 1.1 所述 Western-blotting 方法, 检测其分泌表达。

为了比较 3 种重组菌的生长情况, 将 10 μ L DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 菌种在 5 mL 含有终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C过夜培养, 分别收集菌体、提取质粒。以 3 种重组质粒分别转化大肠杆菌菌株 DH5 α , 将所得的重组菌菌液以合适倍数稀释后, 均匀涂布于 LB 固体培养基(1% tryptone, 0.5%

yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar), 使得 3 种重组菌在培养基上生长的数目相近且克隆间距适中。将重组菌放于 37 °C 培养。在第 12、19 和 24 小时时观察 3 种重组菌的生长情况, 并在显微镜下测量其菌落直径, 比较 3 种重组菌菌落直径的大小。每个时间每种重组菌至少测 40 个菌落。所得数据使用 SPSS 13.0 软件、采用 One-Way ANOVA(以 $P < 0.05$ 为显著性水平)的方法进行分析。

1.3 重组菌 BLpETVP31 的构建与重组蛋白的表达、纯化

组成型分泌 rVP31 的重组菌的构建未获成功。为弄清组成型分泌 rVP31 的重组菌未能成功构建的原因, 以包涵体的形式表达 rVP31 蛋白并复性, 检验其抗菌活性。

VP31 的扩增和克隆如“1.1”所述。使用 *Nde* I 和 *Xho* I 从克隆载体 pMD19-T Simple(Takara)上切下目的片段, 连入经过同样双酶切的载体 pET-30a(+)(Novagen)。将获得的重组质粒转化大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) pLysS, 得到重组菌 BLpETVP31。

将 BLpETVP31 在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中于 37 °C, 200 r/min 的条件下培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8; 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 诱导表达 3 h。利用 anti-His 抗体(Tiangen)通过 Western-blotting 检测重组菌 BLpETVP31 诱导后的表达情况。收集诱导表达的菌体, 重悬于含有 1% TritonX-100 的 TBS(0.01 mol/L Tris base, 0.15 mol/L NaCl; pH7.4), 将菌体超声破碎, 分离包涵体。将所得包涵体沉淀

溶解于含有 8 mol/L 尿素的 TBS, 使用螯合 Ni^{2+} 的琼脂糖凝胶柱(Bio-Rad)纯化重组蛋白 rVP31。将纯化的 rVP31 利用梯度透析的方法进行复性。透析液成份如下: 50 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1%甘氨酸, 20%甘油和不同浓度的尿素。尿素浓度从 7 mol/L 开始, 以 1 mol/L 的梯度逐步降低至 0 mol/L。pH 控制在 9.0。透析温度为 4 °C, 每次透析时间 12 h。将最终所得 rVP31 蛋白溶解于 1 \times TBS, 经过真空冷冻浓缩约 10 倍后, 使用 Bradford 法测定蛋白浓度^[24]。

1.4 复性的 rVP31 的抗菌作用检测

以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)和大肠杆菌为试验菌, 采用牛津杯法, 检验 rVP31 的抗菌活性, 具体方法如下。大肠杆菌菌株 DH5 α 在液体 LB 培养基中 37 °C 培养过夜, 对其进行活化, 然后转接至新鲜的 LB 液体培养基培养, 稀释 100 倍, 取 150 μL 均匀涂布于 LB 固体培养基平板。溶壁微球菌干粉在液体牛肉汤培养基(1% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl)中 30 °C 过夜培养活化, 然后转接至新鲜的液体牛肉汤培养基培养, 稀释 100 倍, 取 150 μL 均匀涂布于牛肉汤琼脂培养基平板(1% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% agar)。分别在涂布大肠杆菌和涂布溶壁微球菌的培养基平板中放置两个灭过菌的牛津杯, 其中一个牛津杯中加入 rVP31 200 μL , 另一个牛津杯中加入 200 μL pH 调至和 rVP31 一致的 10 \times TBS 为对照。4 °C 放置 12 h 后, 将涂布大肠杆菌和溶壁微球菌的平板分别在 37 和 30 °C 培养 12 h, 观察是否有抑菌圈出现。

表 1 本研究中使用的引物
Tab.1 Primers used in this article

引物 primers	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')
VP281F	CATATGATGGCGTAAACTTGG
VP281R	CTCGAGTGTCACAACATTTAAAAAG
VP31F	CCATATGATGCTAATGGCGCAAC
VP31R	CTCGAGCTCCTCTTAAAAGCAGT
VP28F	GGCCATATGATGGATCTTTCTTCACTCTTTC
VP28R	CTCGAGCTCGGTCTCAGTGCCAG
GFPF	CTCGAGGGAGGAGGAGGAGGAATGGTGAGCAAGGG
GFPR	CCCGGGCTCGAGCTTGACAGCTCGTCCATGCCG

注: 酶切位点斜体表示。

Notes: Restriction enzyme sites are italicized.

2 结果

2.1 含有组成分泌型表达载体 pBTA1 的重组 DH5 α 的构建及表达检测

对重组菌 DhpVP281 和 DhpVP28 的表达产物进行 Western-blotting 分析的结果表明, DhpVP281 和 DhpVP28 的上清中均可检测到各自的表达产物, 说明两种重组菌均能成功地将目的蛋白分泌到菌体外的培养基中(图 1)。两个重组菌的菌体蛋白和上清蛋白中都出现两条带; 分子量较大的蛋白与

目的蛋白大小一致; 另一条分子量小约 10 ku, 而 pBTA1 载体上信号肽的理论分子量约为 12 ku, 所以该条带可能是完整的目的产物信号肽断裂后的片段。然而以 pBTA1 为表达载体, 一直未获得组成型分泌表达 rVP31 的重组 DH5 α 。

2.2 重组菌 DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 的生长比较

首先对新构建的重组菌 DhpVP28-EGFP 的表达情况进行检测; 结果表明该重组菌能够组成型地分泌 rVP28 与 rEGFP 的融合蛋白(图 2)。

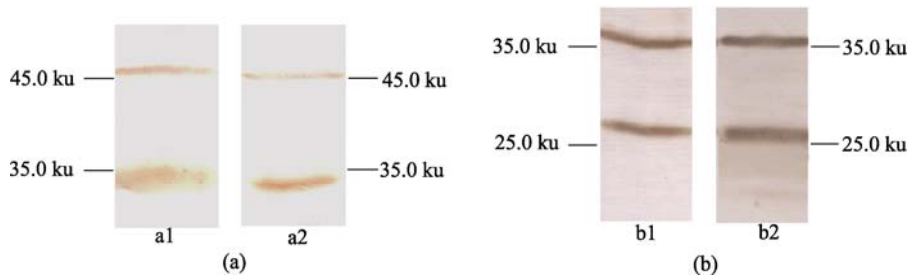


图 1 重组菌 DhpVP281(a)和 DhpVP28(b)的 Western-blotting 分析

a1.DhpVP281 的上清蛋白; a2.DhpVP281 的菌体蛋白; b1.DhpVP28 的上清蛋白; b2.DhpVP28 的菌体蛋白。

Fig. 1 Western-blotting analysis of recombinant bacteria DhpVP281 (a) and DhpVP28 (b)

a1. extracellular proteins of DhpVP281; a2. whole cell proteins of DhpVP281; b1. extracellular proteins of DhpVP28; b2. whole cell proteins of DhpVP28.

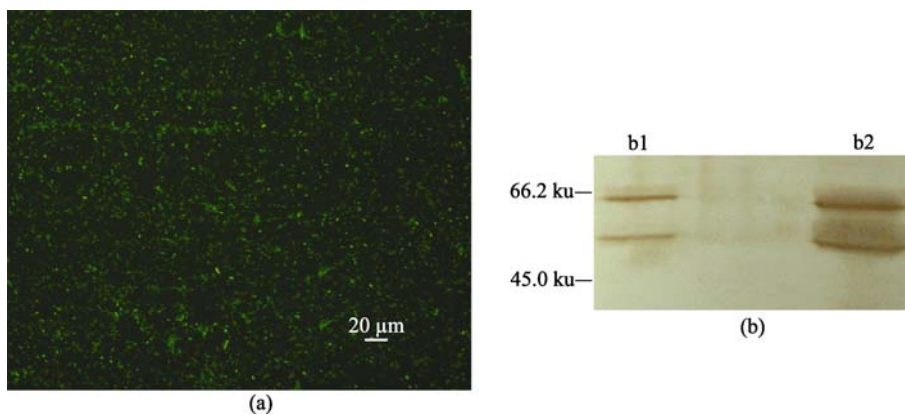


图 2 重组菌 DhpVP28-EGFP 的荧光观察(a)和 Western-blotting 分析(b)

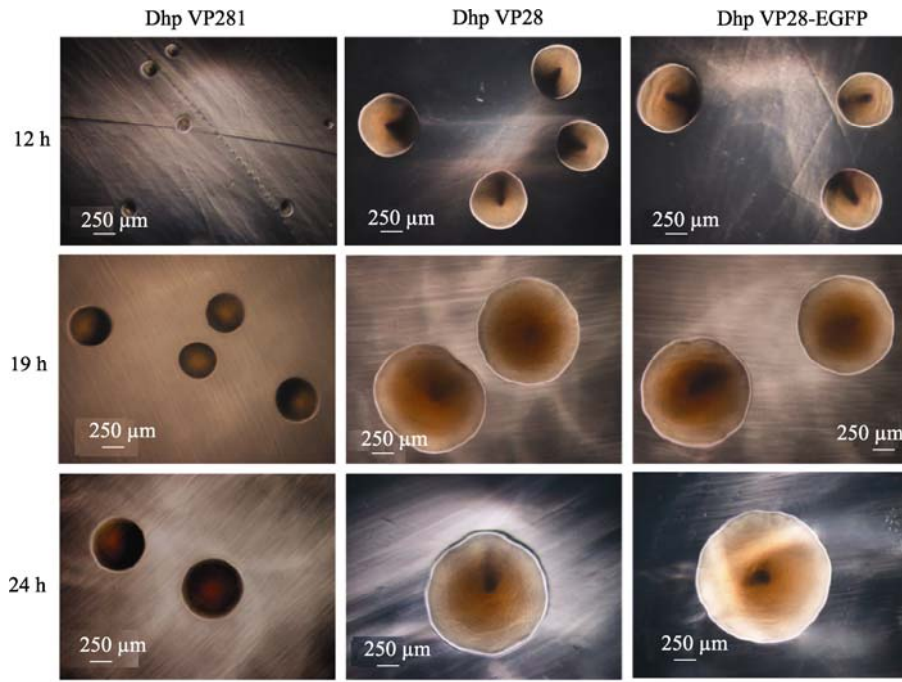
b1.DhpVP28-EGFP 的上清蛋白; b2.DhpVP28-EGFP 的菌体蛋白。

Fig. 2 Fluorescence detecting (a) and Western-blotting analysis (b) of recombinant bacteria DhpVP28-EGFP

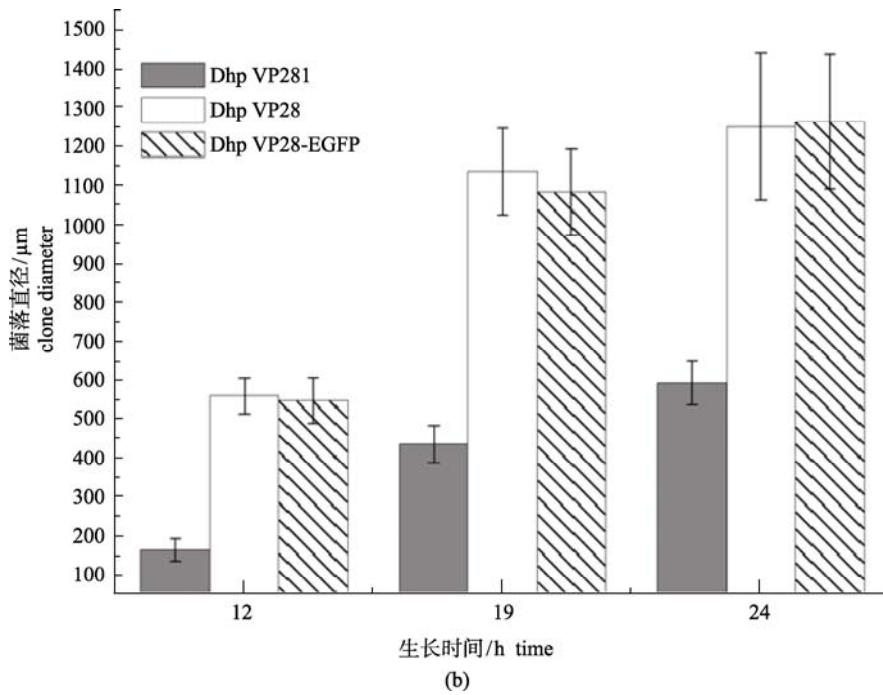
b1. extracellular proteins of DhpVP28-EGFP; b2. whole cell proteins of DhpVP28-EGFP.

DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 在 LB 固体培养基上培养不同时间的菌落生长情况和测量的菌落直径如图 3 所示。3 种重组菌 DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 生长 12 h 的菌落直径分别为(164.84±28.44)、(560.47±46.04)和(548.21±58.54) μm , 生长 19 h 的菌落直径分别为(436.31±47.56)、(1 136.90±110.88) 和(1 083.33±109.83) μm ,

生长 24 h 的菌落直径分别为(594.19±57.17)、(1 251.19±188.86)和(1 264.29±172.78) μm 使用 One-Way ANOVA 的方法对不同重组菌菌落大小的分析显示, 在整个培养过程中, DhpVP281 的菌落直径均显著小于 DhpVP28 或 DhpVP28-EGFP 的菌落直径($P < 0.05$); 而 DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 的菌落直径没有明显差别($P > 0.05$)。



(a)



(b)

图 3 重组菌 DhpVP281、DhpVP28 和 DhpVP28-EGFP 在培养 12 h、19 h 和 24 h 的菌落生长情况(a)及菌落直径(b)比较

Fig. 3 The clones of recombinant bacteria DhpVP281, DhpVP28 and DhpVP28-EGFP cultured for 12, 19 and 24 hours (a) and the comparison of their clone diameters (b)

2.3 重组菌 BLpETVP31 的构建与重组蛋白的表达、纯化

构建的重组菌 BLpETVP31 在 IPTG 的诱导下以包涵体的形式表达 rVP31(图 4-a)。使用螯

合 Ni²⁺的琼脂糖凝胶柱对包涵体蛋白进行纯化后获得了 rVP31(图 4-b)。经过梯度层析法对重组蛋白复性后, 测得 rVP31 浓度约为 66 μg/mL。

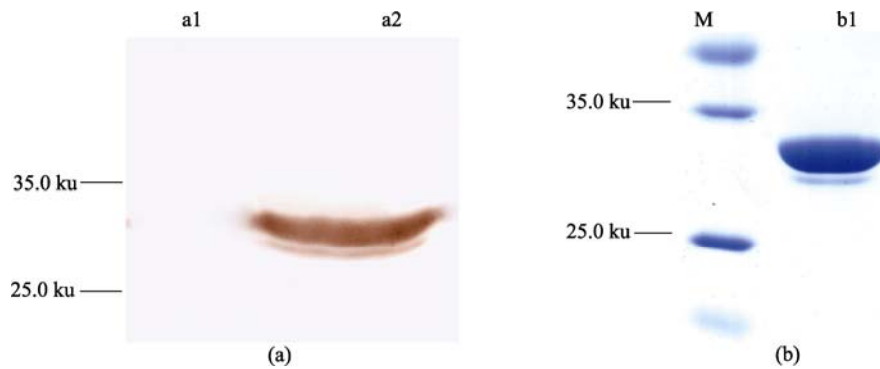


图 4 重组菌 BLpETVP31 的诱导表达与目的蛋白纯化后的电泳检测

(a) 重组菌 BLpETVP31 诱导前(a1)和诱导后(a2)的 Western-blotting 分析; (b) 纯化后 rVP31(b1)的 SDS-PAGE 电泳图; M.Marker.

Fig. 4 Induced expression of recombinant bacteria BLpETVP31 and SDS-PAGE of purified protein product

(a) Western-blotting analysis of BLpETVP31 before (a1) and after (a2) inducement; (b) SDS-PAGE of purified rVP31 (b1); M.Marker.

2.4 复性的 rVP31 的抗菌作用检测

采用牛津杯法,以大肠杆菌和溶壁微球菌为试验菌,对 rVP31 蛋白的抗菌作用进行检测发现,以大肠杆菌作为试验菌,没有发现抑菌圈(图 5);而以溶壁微球菌为试验菌,出现明显的抑菌圈(图 6),推测 rVP31 蛋白对不同类型的菌可能存在不同的作用。



图 5 以大肠杆菌为试验菌的抑菌实验
Fig. 5 Oxford-cup test of rVP31 with *E. coli* as the indicator

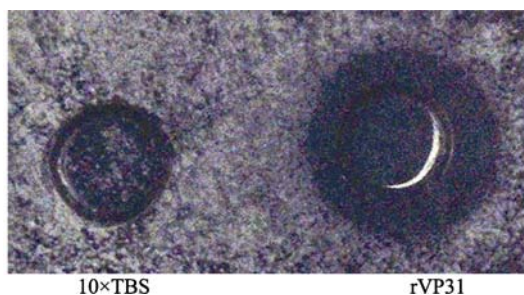


图 6 以溶壁微球菌为试验菌的抑菌实验
Fig. 6 Oxford-cup test of rVP31 with *M. lysodeikticus* as the indicator

3 讨论

在 WSSV 的众多囊膜蛋白中, VP28、VP281

和 VP31 等 8 种囊膜蛋白的抗血清被证明能够不同程度地减缓 WSSV 感染,被认为参与了 WSSV 感染宿主的起始过程^[15-17, 25]。其中 VP281 和 VP31 的基因都存在潜在的 RGD 位点^[17]。RGD 位点是细胞外基质蛋白中细胞整合素蛋白家族受体的识别位点,具有吸附作用^[26]。研究表明,VP31 和 VP281 都能够粘附于宿主细胞,推测这两个蛋白在 WSSV 入侵中发挥重要作用^[19, 26-27]。利用囊膜蛋白提高对虾抵抗 WSSV 侵染已多有报道^[28-31]。原核表达载体 pBTA1 可在不经诱导情况下将目的蛋白以其活性形式递送至菌体外^[23]。所以我们选择这 3 种囊膜蛋白,曾试图利用 pBTA1 载体,构建组成型分泌 3 种囊膜蛋白的重组大肠杆菌,以研究其导入虾体内后的保护效应。组成型分泌 rVP28 蛋白和 rVP281 蛋白的重组菌 DhpVP28 和 DhpVP281 能够构建成功,但是 DhpVP281 生长明显缓慢,推测 rVP281 的表达使大肠杆菌生长受抑。而组成型分泌 rVP31 的重组菌一直未能构建成功;于是以包涵体的形式表达 rVP31 蛋白并复性,检验其抗菌活性,以弄清组成型分泌 rVP31 的重组菌未能成功构建的原因。

本研究中使用原核重组表达产生包涵体的方式获得了 rVP31 蛋白。包涵体蛋白不具天然结构,没有活性,避免了毒性蛋白对宿主细胞的危害;且由于包涵体结构致密,一定程度上可避免宿主蛋白酶的降解^[32]。如何能让包涵体蛋白以正确的方式折叠,恢复活性,是个复杂的难题^[32]。本研究中使用梯度透析的方式逐渐去除尿素,有助于减少蛋白在复性中的沉淀^[33]。但在 rVP31 复性中,仍有部分蛋白发生凝聚析出。有关包涵体的形成和复性机

制尚不完全清楚, 而复性方法对于不同的蛋白往往不具普遍性^[34]。随着生物信息学、结构生物学、蛋白质工程学等学科的发展, 重组蛋白复性的方法将会趋于完善。

rVP281 和 rVP31 对细菌的作用机理是我们感兴趣的另一问题。使用 NCBI 中“Conserved Domain Database”、Pfam 和 Interproscan 4.8 等数种蛋白结构域预测工具, 均未预测到 VP281 和 VP31 蛋白含有任何已知结构及功能域。重组菌 DhpVP281 的生长明显慢于 DhpVP28。通过构建重组菌 DhpVP28-EGFP, 我们排除了插入片段长度的影响, 说明 rVP281 的表达抑制了大肠杆菌的生长, 但抑制机理尚需进一步研究。以包涵体的形式获得 rVP31 蛋白并复性后, 以大肠杆菌为受试菌没有抑菌圈而以溶壁微球菌为受试菌出现抑菌圈, 推测 rVP31 蛋白对不同类型的菌可能存在不同的作用。以大肠杆菌为受试菌没有抑菌圈出现, 但是无法以 pBTA1 载体构建组成型分泌 rVP31 的重组大肠杆菌。我们推测组成型分泌 rVP31 的重组大肠杆菌无法构建可能是 rVP31 蛋白和载体 pBTA1 共同作用的结果。rVP31 可能对大肠杆菌没有直接的作用。Li 等^[19]使用载体 pMBP-P 在大肠杆菌中实现了重组 VP31-MBP (maltose binding protein) 融合蛋白的可溶表达。所以组成型分泌 rVP31 的重组大肠杆菌无法构建的原因需要进一步探究。VP31 在抗菌方面的功能有待深入探讨。

参考文献:

- [1] Chou H, Huang C, Wang C, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 23(3): 165-173.
- [2] Mayo M A. Virus taxonomy-Houston 2002 [J]. *Archives of Virology*, 2002, 147(5): 1071-1076.
- [3] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [4] van Hulst M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22.
- [5] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(2): 65-69.
- [6] Tsai M F, Kou G H, Liu H C, *et al.* Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1999, 38: 107-114.
- [7] Peng S E, Lo C F, Lin S C, *et al.* Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in culture ponds [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 46(3): 165-172.
- [8] Lin Y, Xu L, Yang F. Tetramerization of white spot syndrome virus envelope protein VP33 and its interaction with VP24 [J]. *Archives of Virology*, 2010, 155: 1-6.
- [9] Liu Q H, Ma C Y, Chen W B, *et al.* White spot syndrome virus VP37 interacts with VP28 and VP26 [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 85(1): 23-30.
- [10] Xie X, Xu L, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10615-10623.
- [11] Xie X, Yang F. White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(7): 1903-1908.
- [12] Zhou Q, Xu L, Li H, *et al.* Four major envelope proteins of white spot syndrome virus bind to form a complex [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(9): 4709-4712.
- [13] Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51 [J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12598-12601.
- [14] 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 [J]. *Virology*, 2001, 285(2): 228-233.
- [15] Huang R, Xie Y, Zhang J, *et al.* A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(5): 1357-1361.
- [16] Wu W, Wang L, Zhang X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection [J]. *Virology*, 2005, 332(2): 578-583.
- [17] Li L J, Yuan J F, Cai C A, *et al.* Multiple envelope proteins are involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection in crayfish [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(7): 1309-1317.
- [18] Li D F, Zhang M C, Yang H J, *et al.* [beta]-integrin mediates WSSV infection [J]. *Virology*, 2007, 368(1): 122-132.
- [19] Li L, Lin Z, Xu L, *et al.* The RGD motif in VP31 of white spot syndrome virus is involved in cell adhesion [J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(8): 1317-21.
- [20] Li L, Lin S, Yang F. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus [J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(7): 1909.
- [21] Chen K Y, Hsu T C, Huang P Y, *et al.* *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(3): 460-465.
- [22] Sritunyaluksana K, Wannapapho W, Lo C F, *et al.* PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white

- spot syndrome virus infection in shrimp [J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10734-10742.
- [23] Zhang W W, Sun K, Cheng S, *et al.* Characterization of DegQVh, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20): 6254-6262.
- [24] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [25] Li L, Xie X, Yang F. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31 [J]. *Virology*, 2005, 340(1): 125-132.
- [26] 许华, 黄健, 杨官品. 对虾白斑综合征病毒蛋白质组的研究进展 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(2): 221.
- [27] Liang Y, Huang J, Song X L, *et al.* Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(1): 81-85.
- [28] Fu L L, Li W F, Du H H, *et al.* Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(5): 581-586.
- [29] Ning J F, Zhu W, Xu J P, *et al.* Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Vaccine*, 2009, 27(7): 1127-1135.
- [30] Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, *et al.* DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp [J]. *Vaccine*, 2007, 25(15): 2778-2786.
- [31] Syed Musthaq S, Madhan S, Sahul Hameed A, *et al.* Localization of VP28 on the baculovirus envelope and its immunogenicity against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon* [J]. *Virology*, 2009, 391(2): 315-324.
- [32] 王增, 马会勤, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(7): 102-107.
- [33] 刘晓飞, 裴剑竹, 杜国俊, 等. 蛇毒蛋白原核表达包涵体复性研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(2): 113-119.
- [34] 吉清, 何凤田. 包涵体复性的研究进展 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(6): 516-518.

Preliminary judgment of the antibacterial functions of two recombinant WSSV envelope proteins VP281 and VP31

SUN Yu-miao^{1,2}, LI Fu-hua¹, XIANG Jian-hai^{1*}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to understand the functions of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins VP281 and VP31, the method of prokaryotic expression was used in this study. By using a prokaryotic constitutive secretory expression plasmid pBTA1 as the expression vector, the recombinant *Escherichia coli* strain DH5 α that could constitutively secrete WSSV envelope protein rVP281, rVP28 or the fusion protein of VP28 and the enhanced green fluorescence protein rEGFP were constructed. They were respectively named as DhpVP281, DhpVP28 and DhpVP28-EGFP. The three recombinant bacteria were cultured on the LB plates in the same condition and their clone diameters were respectively (164.84 \pm 28.44) μ m, (560.47 \pm 46.04) μ m and (548.21 \pm 58.54) μ m when cultured for 12 hours, (436.31 \pm 47.56) μ m, (1136.90 \pm 110.88) μ m and (1083.33 \pm 109.83) μ m when cultured for 19 hours and (594.19 \pm 57.17) μ m, (1251.19 \pm 188.86) μ m and (1264.29 \pm 172.78) μ m when cultured for 24 hours. It was displayed that the clones of DhpVP281 were significantly smaller than those of DhpVP28 and DhpVP28-EGFP in the whole culturing period ($P < 0.05$) and we guessed that the expression of rVP281 probably inhibited the growth of *E. coli*. However, recombinant bacteria constitutively expressing VP31 can not be constructed with the vector pBTA1. In order to find out the reason, recombinant bacteria BL21 (DE3) pLysS were constructed with pET-30a(+) as the expression vector and rVP31 was obtained in the form of inclusion body. After renaturation, the antibacterial activity of rVP31 was tested. The result showed that rVP31 has the antibacterial activity against *Micrococcus lysodeikticus*. These findings, reported for the first time, may increase the virology knowledge of WSSV.

Key words: white spot syndrome virus (WSSV); envelope proteins; antibacterial activity

Corresponding author: XIANG Jian-hai. E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn