



## 对虾白斑病毒 VP28 基因在聚球藻中的表达与分析

邓元告<sup>1</sup>, 侯李君<sup>1</sup>, 邓丽珍<sup>1</sup>, 施定基<sup>1,2</sup>

(1. 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要:** 通过 PCR 从实验室保存的 pMD-VP28 质粒中扩增得到对虾白斑病毒囊膜蛋白 VP28 基因, 同时在设计的引物起始密码子前添加促进外源基因在蓝藻中表达的 SD 序列, 引物末端添加限制性内切酶位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I, 从质粒 pRL-439 获得强启动子 PpsbA, 酶切连接构建了 pDC-VP28 高效表达穿梭载体. 利用三亲接合转移成功地将构建的载体 pDC-VP28 转化聚球藻 7002. 对转基因聚球藻进行培养, 其表达产物通过 SDS-PAGE 分析, 发现表达量达 3% 左右.

**关键词:** 对虾白斑病毒 VP28 基因; 聚球藻 7002; 穿梭表达载体; 三亲接合转移

**中图分类号:** Q813.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-6510 (2008) 01-0029-04

### Expression and Analysis of the WSSV VP28 Gene in *Synechococcus*

DENG Yuan-gao<sup>1</sup>, HOU Li-jun<sup>1</sup>, DENG Li-zhen<sup>1</sup>, SHI Ding-ji<sup>1,2</sup>

(1. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** The objective of this study was the construction of high-expression of VP28 protein cyanobacteria. The WSSV VP28 gene was acquired and sequenced from the vector pMD-VP28 stored in our laboratory by PCR amplification. The designed primer was added SD sequence which promoting the foreign genes expression in cyanobacteria just before the initiation codon and restriction endonuclease sites *Bam*H I and *Eco*R I, respectively. A strong promoter PpsbA from vector pRL-439 was ligated to the upstream of the SD sequence when the recombinant shuttle high-expression vector PDC-VP28 was constructed. The vector PDC-VP28 was introduced successfully into *Synechococcus sp.* PCC 7002 by triparental conjugative transfer. Examined and analyzed by SDS-PAGE, the expression product accounted for 3% in the recombinant *Synechococcus*.

**Keywords:** WSSV VP28 gene; *Synechococcus sp.* PCC 7002; shuttle expression vector; parental conjugative transfer.

对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 是引发包括我国在内的东南亚各国对虾养殖中大面积暴发性病毒性疾病的主要病原体, 能感染几乎所有的虾类等甲壳动物, 宿主范围广、毒性强、致死率高<sup>[1]</sup>. 其病理症状为皮下、甲壳及附肢出现白色斑点. 从 90 年代初发现该病毒以来, 已遍及亚洲主要对虾养殖国家和地区, 并传播到北美和中南美, 给养殖造成巨大的损失.

近年来, 研究人员对病毒感染对虾的组织、感染的宿主范围、DNA 复制和形态发生做了大量工作, 从分子水平开始对对虾白斑病毒的感染和致病机理进

行研究<sup>[2,3]</sup>. 徐洵等和 Van Hulten 等完成了该病毒基因组的全序列测定<sup>[4,5]</sup>.

完整的病毒粒子含有多种囊膜蛋白突起, 其中 VP28 是囊膜的主要结构蛋白, 分子质量为 28 ku. Van Hulten 等<sup>[6-10]</sup>鉴定并体外表达了 WSSV 的 VP28 和 VP26 蛋白, 并在 2001 年报道 VP28 蛋白在病毒全身性感染对虾的起始步骤中起关键作用. 在昆虫细胞中表达的 VP28 蛋白制备多克隆抗体, 注射到对虾中, 能有效抑制对虾白斑病毒的感染. 含高表达重组 VP28 蛋白的细菌进行口服接种和分离纯化后肌肉注

收稿日期: 2007-07-06; 修回日期: 2007-12-14

基金项目: 天津科技大学自然科学基金资助项目 (20040122)

作者简介: 邓元告 (1974—), 男, 湖南醴陵人, 讲师.

射,对虾均可在一定程度上抵御病毒的感染.张春莉等<sup>[11]</sup>把对虾白斑病毒的 VP28 基因成功转化蓝藻,但检测到的表达量非常低.目前,对虾白斑综合症病毒一直没有一种完全有效的防治方式,而通过基因工程手段进行病毒防治将具有广阔的前景.

蓝藻具有生长速度快、培养成本低、能规模培养、通常不含内毒素、含蛋白酶较少及其产物不形成包含体等优点,是表达外源基因的优良宿主之一.聚球藻 7002 是一种海洋蓝藻,可作为对虾,特别是对虾幼体的天然饵料.本实验中考虑到病毒传播途径主要是在摄食时经口入体,并进行全身性感染.因而可以利用蓝藻作宿主来表达 VP28,期望制备成对虾白斑病毒口服疫苗.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 质粒、菌株和蓝藻藻种

质粒 pRL-489 由美国密歇根州立大学国家植物学实验室 Wolk 教授赠送,质粒 pDC08 由中国科学院水生生物研究所徐旭东博士赠送.菌株 *Escherichia coli* HB101 和 DH5 $\alpha$  购自上海生物工程有限公司.聚球藻 7002 (*Synechococcus sp.* PCC 7002) 由法国巴斯德研究室赠送.

#### 1.1.2 主要试剂

*Bam*H I、*Eco*R I、*Sal* I 等各种限制性内切酶及 Taq 酶、T4DNA 连接酶、DNA Marker、各种抗生素购自日本 TaKaRa 公司;混合纤维素微孔滤膜购自华美生物工程公司;DNA 回收试剂盒为北京博大生物公司产品;其他试剂为国产分析纯产品和进口分装产品.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 引物

由生工生物工程公司合成,设计中在 5' 端分别添加了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶位点,在起始密码子的上游添加了增强子 SD 序列: GGAGAG.

VP28-P1: 5'-AAGGATCCGGAGAGCGTCATGGATCTTTCTTTCAC-3'

VP28-P2: 5'-CCCCCGAATTCCACGATTTATTACTCGGTCTC-3'

#### 1.2.2 中间载体 pRL-VP28 和穿梭表达载体 pDC-VP28 的构建

首先将 PCR 扩增的目的基因 VP28 (起始密码子前带有 SD 序列) 连接到质粒 pRL-489 中 PpsbA 启动子下游的多克隆位点上构建 pRL-VP28;然后将 pRL-VP28 中 PpsbA 启动子和目的基因区域一同切

下,连接到质粒 pDC08 中,构建穿梭表达载体 pDC-VP28.实验中酶切、去磷酸化、连接等方法按照分子克隆方法进行.

#### 1.2.3 蓝藻细胞的转化

采用三亲接合转移法<sup>[12]</sup>.

#### 1.2.4 转基因聚球藻的分子检测

分别以转基因聚球藻和含空质粒对照的聚球藻为模板进行 PCR 扩增,检测 VP28 基因在转基因蓝藻中的存在.

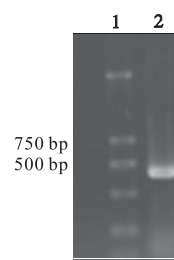
#### 1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

4 °C 下离心收集聚球藻生长后期细胞,收集到的藻细胞中加入适当的破碎缓冲液,反复冻融破碎细胞.4 °C 离心收集上清液,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测.

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 PCR 扩增和测序

PCR 扩增得到一条约 600 bp 的特异性条带,如图 1.经 DNA 序列测定分析,扩增的片段即为含 VP28 基因的阅读框.VP28 基因的编码区为 615 bp,编码 204 个氨基酸,增强子 SD 序列位于 ATG 上游.



1. DL2000 DNA Marker; 2. VP28 基因片段

图 1 PCR 扩增 VP28 基因片段电泳图

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the PCR product of the VP28 gene fragment

### 2.2 中间载体 pRL-VP28 和穿梭表达载体 pDC-VP28 的构建

中间载体 pRL-VP28 和穿梭表达载体 pDC-VP28 的构建过程见图 2,其酶切的电泳图见图 3、图 4.

### 2.3 穿梭表达载体 pDC-VP28 对聚球藻的转化

三亲接合转移方法转化聚球藻后,首先在不含抗生素的 MA 固体平板上培养,然后转膜至含硫酸新霉素的培养基上培养筛选;两周后,转 pDC-VP28 质粒的聚球藻 7002 在膜上长出单藻落,而野生型藻在含硫酸新霉素的培养基的选择压力下已完全死亡,从而筛选出重组子藻落;转移重组子藻落至含有硫酸新霉素的 MA 培养液中,两周后扩大培养,获得了转 VP28 基因聚球藻.

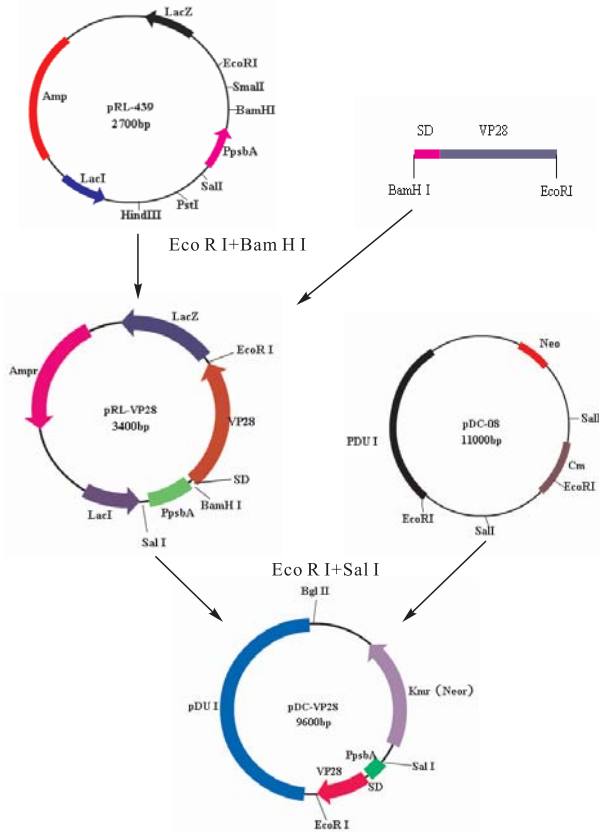


图2 穿梭质粒 pDC-VP28 的构建过程

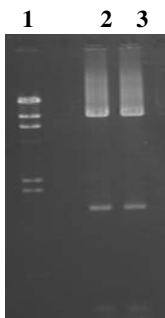
Fig. 2 Construction of shuttle plasmid pDC-VP28



1、2. pRL-VP28/ EcoR I + BamH I ; 3. λ DNA/HindIII Marker.

图3 质粒 pRL-VP28 的酶切图谱

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the digestion of the vector pRL-VP28



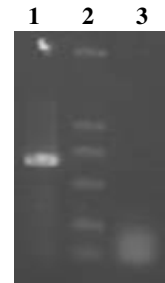
1. λ DNA/HindIII Marker; 2、3. pDC-VP28/ EcoR I + Sal I

图4 质粒 pDC-VP28 的酶切图谱

Fig. 4 Electrophoresis analysis of the digestion of the vector pDC-VP28

### 2.4 转基因聚球藻的分子检测

以含质粒 pDC-VP28 聚球藻和含空质粒 pDC-08 聚球藻分别作为模板进行 PCR 扩增检测,如图 5. 结果显示,含质粒 pDC-VP28 聚球藻扩增出一条约 600 bp 的 DNA 片段,与预期一致. 目的基因已经成功转入了蓝藻聚球藻 7002 中.



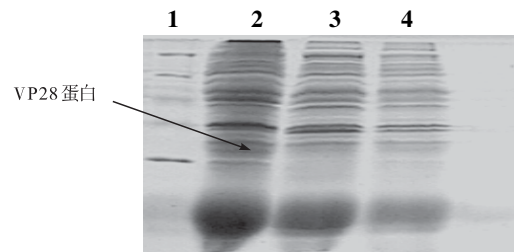
1. 含质粒 pDC-VP28 聚球藻; 2. DL2000 Marker; 3. 含质粒 pDC-08 聚球藻

图5 转基因聚球藻 7002 PCR 鉴定电泳图

Fig. 5 Electrophoresis analysis of the PCR amplification of recombinant *Synechococcus sp.* PCC 7002

### 2.5 转基因聚球藻的目的蛋白质表达检测

反复冻融破碎细胞的方法提取了含质粒 pDC-VP28 聚球藻、含空质粒 pDC-08 聚球藻和野生型聚球藻可溶性蛋白,并进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,见图 6. 结果在含质粒 pDC-VP28 聚球藻 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳带中的 28 ku 处有一特异性条带,经多色凝胶成像系统分析软件分析,表达量为 3% 左右. 而其他两个样品中并未出现,与预期一致.



1. 蛋白质 WM maker, 条带从上至下依次为: 116, 66, 45, 35, 25, 18.4 ku; 2. 含质粒 pDC-VP28 聚球藻; 3. 含质粒 pDC-08 聚球藻; 4. 野生型聚球藻.

图6 转基因聚球藻的目的蛋白表达检测图

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the objective protein expression in recombinant *Synechococcus sp.* PCC 7002

## 3 结论

在蓝藻中表达外源基因通常使用同时可在蓝藻及大肠杆菌复制的穿梭表达载体. 本实验为了提高外源基因在蓝藻中的表达,首先在设计引物时,在起始

密码子 ATG 上游加上了有利于蓝藻表达的 SD 序列 GGAGAG, 意图从翻译水平上提高表达; 从转录水平上考虑, 利用利于蓝藻表达的强启动子 PpsbA 来启动目的基因的表达; 同时, 选用质粒 pDC-08 来构建重组穿梭表达载体, 相对于实验室曾多次用质粒 pRL-489 而言, 其分子质量小、易于转化、表达快、效率高。

通过三亲接合转移法成功获得转基因聚球藻 7002, 检测中意外地发现, VP28 基因被整合到了蓝藻基因组 DNA 上, 推测 pDC-08 质粒可能含有与蓝藻同源的序列, 以至发生同源重组, 使外源基因整合到蓝藻基因组中, 获得的转基因蓝藻更稳定。

与大多数基因工程宿主细菌相比, 蓝藻不含内毒素, 营养丰富, 含蛋白酶较少, 表达产物不易降解, 产物不易形成包含体。同时, 一些蓝藻是对虾幼期的天然饵料, 可直接投喂对虾, 给药方式简单, 因而, 利用转基因蓝藻制备抗病毒药物不需要分离和纯化, 工艺简单。

#### 参 考 文 献:

- [ 1 ] Lo C F, Ho C H, Peng S E, et al. White spot syndrome baculovirus ( WSBV ) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [ J ]. *Dis Aquat Org*, 1996 ( 27 ): 215—226.
- [ 2 ] Durand S, Lightner D V, Redman R M, et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus ( WSSV ) [ J ]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1997 ( 29 ): 205—211.
- [ 3 ] Wang Q, Poulos B T, Lightner D V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus [ J ]. *Archives of Virology*, 2000 ( 145 ): 263—274.
- [ 4 ] Yang Feng, He Jun, Lin Xionghui, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [ J ]. *J Virol*, 2001, 75 ( 23 ): 11811—11820.
- [ 5 ] Van Hulten M C, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [ J ]. *Virology*, 2001, 286 ( 1 ): 7—22.
- [ 6 ] Van Hulten M C, Westenberg M, Goodall S D, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [ J ]. *Virology*, 2000 ( 266 ): 227—236.
- [ 7 ] Van Hulten M C, 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.
- [ 8 ] Witteveldt J, Valk J M, Van Hulten M C, et al. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine [ J ]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004 ( 16 ): 571—579.
- [ 9 ] Witteveldt J, Cifuentes C C, Vlak J M, et al. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination [ J ]. *J Virol*, 2004, 78 ( 4 ): 2057—2061.
- [ 10 ] Witteveldt J, Vlak J M, Van Hulten M C. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus ( WSSV ) infection after oral application of the viral envelope protein VP28 [ J ]. *Dis Aquat Organ*, 2006, 70 ( 1-2 ): 167—170.
- [ 11 ] 张春莉, 施定基, 黄捷, 等. 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 [ J ]. *海洋科学*, 2003, 27 ( 2 ): 72—76.
- [ 12 ] Elhail J, Wolk C P. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria [ J ]. *Methods in Enzymol*, 1988 ( 167 ): 747—754.