

白斑综合症病毒膜蛋白 VP124 参与病毒的感染

朱艳冰¹, 吴成林², 杨丰²

(1. 集美大学 生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要: 白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV) 是对虾的最主要病毒病原之一, 给对虾养殖造成了巨大的经济损失。WSSV 分别与三种该病毒膜蛋白 VP39, VP124 和 VP187 的特异性抗血清在体外作用后, 再注射到螯虾体内, 进行中和试验。结果显示, 注射同或未同 VP124 抗血清作用的 WSSV, 8 d 后螯虾的死亡率分别是 100% 和 60%, WSSV 的感染能够被抗 VP124 抗体中和。进一步利用定量 PCR 分析上述三种特异性抗血清对病毒感染的影响, 结果显示, VP124 抗血清可抑制 WSSV 在螯虾体内的增殖。所有结果表明, VP124 在病毒的感染中起作用。

关键词: 白斑综合症病毒; 膜蛋白 VP124; 抗血清; 感染; 中和试验

中图分类号: Q934.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2008)01-0135-05

1 引言

白斑综合症病毒(WSSV)发现于20世纪90年代初,是造成大面积暴发对虾流行病的主要病原^[1-2]。它的宿主范围广,传染力强,致死率高,难防治,不仅严重危害对虾养殖,还对海洋环境构成威胁,因而引起全世界的广泛关注,成为海水养殖病害的研究重点。对WSSV研究表明,该病毒是一种新型的无包涵体的双链环状DNA杆状病毒,基因组全长约305 kb^[3]。目前对WSSV的研究已进入功能基因组时代。

膜蛋白在病毒的入侵、包装和释放中起着重要的作用^[4-5],因此在WSSV的功能基因组研究中膜蛋白吸引了越来越多的注意力,已经鉴定了十几个病毒的膜蛋白基因。但迄今为止,对于关键的病毒感染机理的研究仍为空白,这需要更多的WSSV结构蛋白的鉴定和它们功能的阐明。

病毒膜蛋白各自特异性抗体已经成功地用于中

和试验,来研究膜蛋白是否参与病毒的感染^[6-7]。至今为止,经中和试验鉴定在WSSV的系统感染中起作用的膜蛋白包括VP28^[6],VP68^[8],VP281^[8],VP466^[8],VP76^[9]和VP31^[10]。本研究中,在先前鉴定的VP39^[11],VP124^[12]和VP187^[13]为WSSV新的膜蛋白的基础上,利用中和试验进一步研究它们的抗血清是否能中和病毒的感染。

2 材料和方法

2.1 材料

螯虾(*Procambarus clarkii*)购自厦门第八市场。

2.2 WSSV的PCR检测

WSSV的PCR和定量PCR检测分别参考文献[14-15]。病毒特异性正向引物:5-TATTGTCTCTCCTGACGTAC-3,反向引物:5-CA-CATTCTTCACGAGTCTAG-3。定量PCR检测时,制备的样品DNA模板分别与等体积的10倍系

列稀释的内标模板混合后加入 PCR 反应液中。PCR 反应条件如下: 95 预变性 5 min; 94 45 s, 56 45 s, 72 45 s, 35 个循环; 72 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小。

2.3 WSSV 病毒粒子的制备和定量

病毒粒子的制备参照文献[16]。WSSV 原液经 0.9% NaCl 梯度稀释后, 用定量 PCR 测定病毒原液的拷贝数。

鼠抗三种膜蛋白 VP39, VP124 和 VP187 多克隆抗体在之前的研究中得到^[11-13]。纯化的病毒粒子作为抗原免疫小鼠, 制备抗 WSSV 多克隆抗体^[12]。

2.4 中和试验

选取体重约 35 g, 体长(不包括螯的长度)约 10 cm 的螯虾, 抽取血淋巴细胞, 经 PCR 检测, 选取无 WSSV 感染的螯虾作为实验对象。将终浓度为 1×10^6 的 WSSV 病毒粒子(用 0.9% NaCl 稀释)分别与鼠抗 VP39, VP124, VP187 和 WSSV 血清(血清用 0.9% NaCl 1:40 稀释)混合, 室温反应 1 h 后注射健康螯虾, 注射部位为螯虾的背侧部, 针头由第四腹节向第三腹节插入, 每只注射 100 μ L, 每组使用 20 只螯虾。将四种抗血清、未免疫的鼠正常血清、0.9% NaCl 和 1×10^6 的 WSSV 病毒粒子注射的螯虾作为对照。注射后螯虾置于 25 $^{\circ}$ C 养殖。每天监测螯虾的死亡情况, 死亡的螯虾经 PCR 检测 WSSV 的感染情况。在注射后的不同时间(6, 12, 24, 48 和 72 h), 从各试验组中随机挑选 3 只螯虾, 取小块腮组织进行 PCR 分析。

3 结果

3.1 WSSV 的抗体中和试验

鼠抗三种膜蛋白 VP39, VP124 和 VP187 多克隆抗体及鼠抗 WSSV 多克隆抗体被用于中和试验, 结果见图 1 所示。注射病毒粒子的组, 注射后 8 d 螯虾的死亡率达到 100%。分别注射四种抗血清、未免疫的鼠正常血清和 0.9% NaCl 的组, 螯虾的死亡率极低, 即使有螯虾死亡, PCR 结果呈阴性(结果未示), 说明血清和 NaCl 对螯虾无毒害。分别注射 WSSV 病毒粒子与抗 VP124 或 WSSV 血清混合物的组, 注射后 8 d 螯虾的死亡率为 60%, 虾的死亡被显著地延迟(图 1a), 说明 WSSV 的感染能够被抗 VP124 或 WSSV 抗体中和。分别注射 WSSV 病毒粒子与抗 VP39 或 VP187 血清混合物的组, 结果与

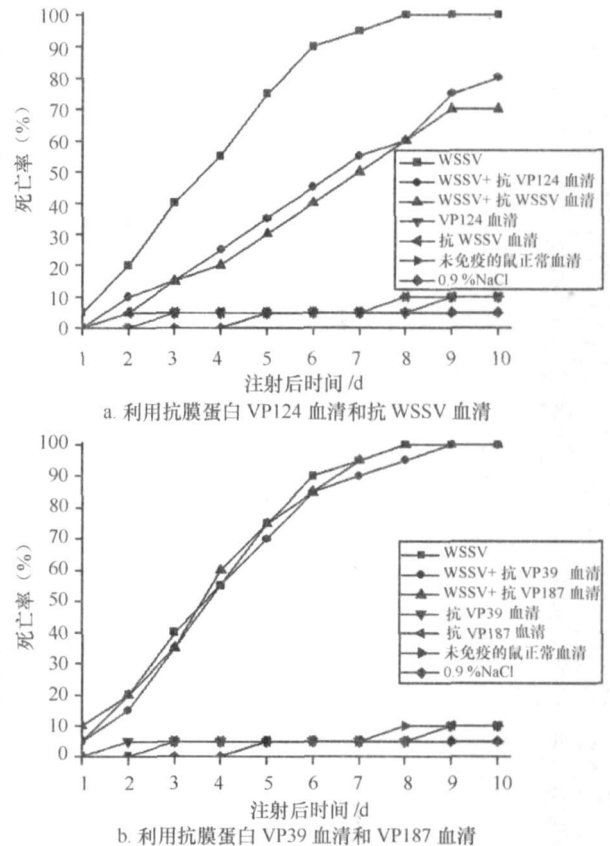


图 1 利用抗膜蛋白 VP39, VP124 和 VP187 血清和抗 WSSV 血清的中和试验结果
右侧示出注射用的溶液

只注射病毒粒子的对照组相似图 1b, 说明抗 VP39 和 VP187 抗体不能中和病毒的感染。

3.2 WSSV 的 PCR 检测

为了分析中和试验中病毒的感染情况, 在注射后的不同时间(6, 12, 24, 48 和 72 h)对螯虾进行 PCR 检测。注射病毒粒子的对照组以及注射病毒粒子分别与抗 VP39 和 VP187 血清混合物的组, 在感染后第 1 天, PCR 结果呈阳性(结果未示)。WSSV 感染被抗 VP124 或 WSSV 抗体中和的组, 在感染后第 2 天, PCR 结果呈阳性(结果未示)。定量 PCR 分析所示(见图 2), 对于注射病毒粒子的对照组, 在感染后 12 和 72 h, 每毫克腮组织中病毒的拷贝数分别约为 10^5 和 10^8 。然而, 分别注射病毒粒子与抗 VP124 或 WSSV 血清混合物的组, 在感染后 48 h, 每毫克腮组织中病毒的拷贝数都约为 10^5 , 在感染后 72 h, 拷贝数分别增至 10^7 和 10^6 。所有结果表明, VP124 的抗血清可有效抑制 WSSV 在螯虾体内的增殖。

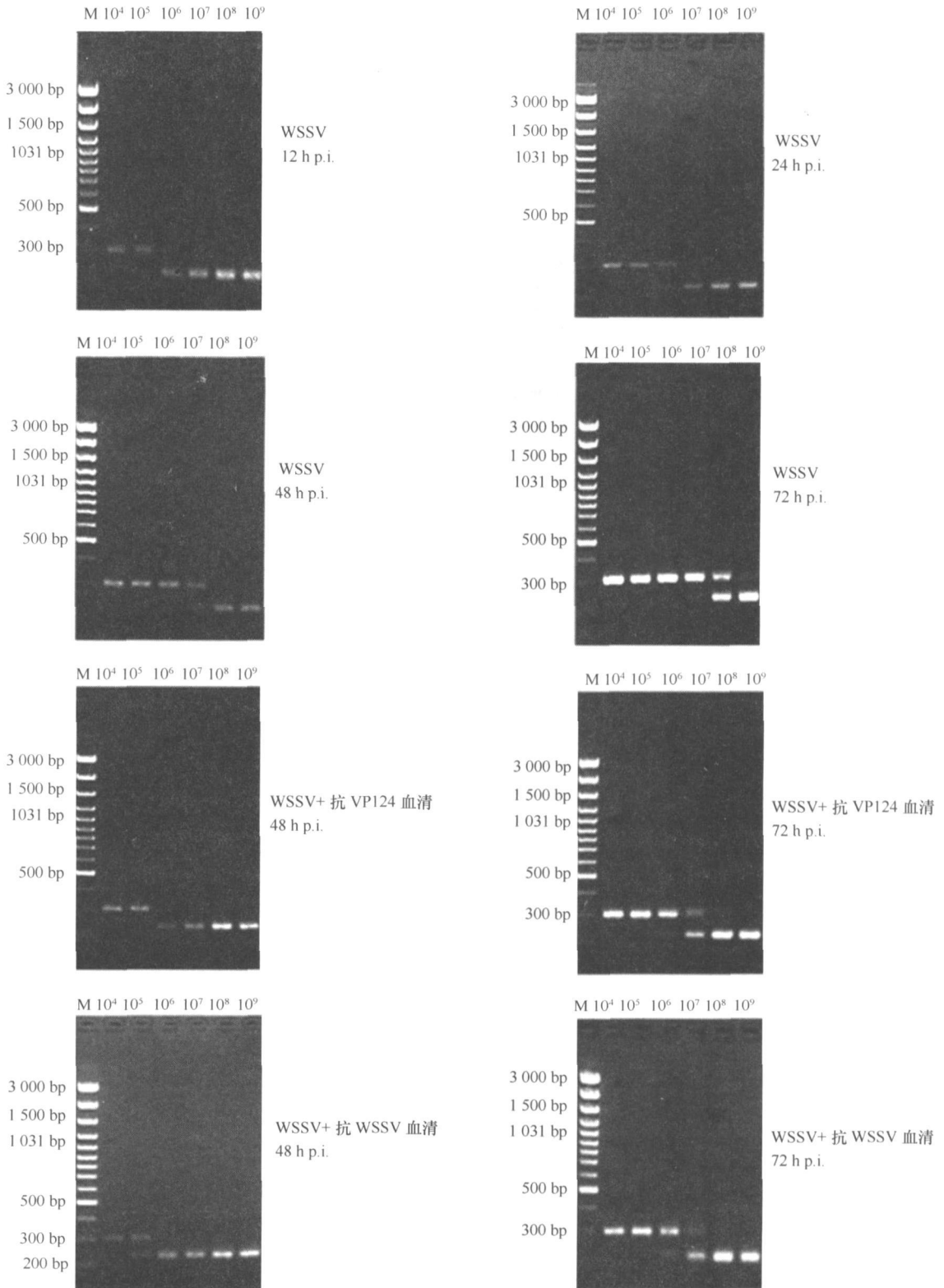


图 2 腮组织中 WSSV 的定量 PCR 分析

M: DNA 分子质量标准; 横标数字表示 WSSV 的拷贝数; 在右侧, 示出注射用的溶液(WSSV 或 WSSV + 抗血清)和注射后时间(12, 24, 48 和 72 h); 扩增出的分子量约为 310 bp 的条带是病毒的模板, 分子量约为 230 bp 的条带是内部标准模板

4 讨论

自从白斑综合症病毒暴发以来,已经给对虾养殖造成了巨大的经济损失。目前对 WSSV 的防治尚无有效的方法,它有待对病毒分子生物学水平研究的深入。膜蛋白在病毒的感染中起着重要的作用。到目前为止,已经鉴定的 WSSV 膜蛋白基因有十几个,这方面的研究重点已经转向寻找病毒感染的相关基因,探讨病毒囊膜蛋白与宿主细胞受体的相互作用。

在先前的研究中,VP39,VP124 和 VP187 三个基因被鉴定为 WSSV 的膜蛋白基因。因为缺乏可传代培养的虾细胞系,为了进一步研究这些膜蛋白是否参与病毒的感染,采用了利用它们各自特异性

抗体的中和试验。结果表明,WSSV 的感染能够被抗膜蛋白 VP124 抗体中和。VP124 与先前鉴定的 VP28,VP68,VP281,VP466,VP76 和 VP31 在病毒对虾的系统感染中起作用,它们的功能值得进一步研究。

本研究中,WSSV 的感染能够被抗膜蛋白 VP124 抗体中和,但抗膜蛋白 VP39 和 VP187 抗体却无明显效果。考虑到 WSSV 是双层膜结构^[2],推测 VP124 定位在病毒的表面,在病毒的感染中起重要作用;VP39 和 VP187 虽然也定位在病毒的膜部分,它们可能只是结构蛋白,不参与病毒的感染。

病毒感染相关基因的深入研究将有助于阐明病毒感染和包装的分子机理,从而为最终建立有效的防治方法提供有力的科学依据。

参考文献:

- [1] CHOU Hsin-yiu, HUANG Chang-yi, WANG Chung-hsiung, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. *Dis Aquat Org*, 1995, 23: 165-173.
- [2] DURAND S, LIGHTNER D V, REDMAN R M, et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV) [J]. *Dis Aquat Org*, 1997, 29: 205-211.
- [3] YANG Feng, HE Jun, LIN Xiong-hui, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus [J]. *J Virol*, 2001, 75: 11811-11820.
- [4] CHIU Wen-ling, CHANG Wen. Vaccinia virus J1R protein: a viral membrane protein that is essential for virion morphogenesis [J]. *J Virol*, 2002, 76: 9575-9587.
- [5] CHAZAL N, GERLIER D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 226-237.
- [6] VANHULTEN 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: 228-233.
- [7] SCHOFIELD D J, GLAMANN J, EMERSON S U, et al. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein [J]. *J Virol*, 2000, 74: 5548-5555.
- [8] WU Wen-lin, WANG Lei, ZHANG Xiao-bo. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection [J]. *Virology*, 2005, 332: 578-583.
- [9] HUANG Ru, XIE Yun-li, ZHANG Jian-hong, et al. A novel envelope protein involved in white spot syndrome virus infection [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 1357-1361.
- [10] LI Li, XIE Xi-xian, YANG Feng. Identification and characterization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein VP31 [J]. *Virology*, 2005, 340: 125-132.
- [11] ZHU Yan-bing, LI Hong-yan, YANG Feng. Identification of an envelope protein (VP39) gene from shrimp white spot syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2006, 151: 71-82.
- [12] ZHU Yan-bing, XIE Xi-xian, YANG Feng. Transcription and identification of a novel envelope protein (VP124) gene of shrimp white spot syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2005, 113: 100-106.
- [13] LI Hong-yan, ZHU Yan-bing, XIE Xi-xian, et al. Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2006, 115: 76-84.
- [14] YANG Feng, WANG Wei, CHEN Rong-zhong, et al. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA [J]. *J Virol Methods*, 1997, 67: 1-4.
- [15] WANG Wei, HE Jun, YANG Feng, et al. Detection of prawn white spot baculovirus by polymerase chain reaction [J]. *Acta Oceanol Sin*, 1997, 18: 591-599.
- [16] XIE Xi-xian, LI Hong-yan, XU Li-mei, et al. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles [J]. *Virus Res*, 2005, 108: 63-67.

White spot syndrome virus envelope protein VP124 is involved in the virus infection

ZHU Yan-bing¹, WU Cheng-lin², YANG Feng²

(1. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is one of the major shrimp pathogens causing large economic losses for shrimp farming. In an attempt to identify the envelope proteins involved in the virus infection, purified WSSV virions were mixed with three antisera against WSSV envelope proteins (VP39, VP124 and VP187), individually. And then they were injected intramuscularly into crayfish to conduct in vivo neutralization assays. The results showed that for groups injected with virions only and groups injected with virions and the VP124 antiserum mixture, the crayfish mortalities were 100% and 60% at 8 days post-infection, individually. The virus infection could be neutralized by antibody against the envelope protein VP124. Quantitative PCR were used to further investigate the influence of three antisera above described on the virus infection. The results showed that the VP124 antiserum could restrain the propagation of WSSV in crayfish. All of the results suggested that the viral envelope protein VP124 played a role in WSSV infection.

Key words: white spot syndrome virus; envelope protein VP124; antibody; infection; neutralization assay