

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171129001

http://www.yykxjz.cn/

王中一, 刘庆慧, 黄健. 凡纳滨对虾 RAS 与 WSSV-VP26 的相互作用. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 62-68

Wang ZY, Liu QH, Huang J. RAS from *Litopenaeus vannamei* interacts with WSSV-VP26 *in vitro*. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 62-68

凡纳滨对虾 RAS 与 WSSV-VP26 的相互作用*

王中一^{1,2} 刘庆慧^{1①} 黄 健¹

(1. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室
农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 白斑综合征病毒(WSSV)是对虾养殖中主要的病原之一,病原与宿主作用是介导病毒感染的重要过程。RAS 蛋白是 *Ras* 基因分泌的保守蛋白,为小 G 蛋白家族的一员,普遍存在于从酵母菌到哺乳动物的真核细胞中,具有偶联受体和效应系统传递跨膜信号的功能,在细胞增殖和分化中起双重调节的作用,但关于 RAS 与 WSSV 的作用尚不明确。本研究将凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *Ras* 基因克隆至 pBAD/gIII A 表达载体上,以 *E. coli* Top10 为宿主菌,在 L-阿拉伯糖的诱导下获得 RAS 重组蛋白。以 Co²⁺亲和层析方法,获得纯化的 RAS 蛋白,质谱分析显示,该蛋白为凡纳滨对虾 RAS。采用 Far-western 和 ELISA 检测方法分析 RAS 与 WSSV 结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 的相互作用。Far-western 结果显示, RAS 与 VP26 有明显的结合作用,ELISA 实验结果显示, RAS 与 VP26 蛋白的相互作用随 RAS 量的增加而增强。本研究表明, RAS 参与 WSSV 侵染过程,为进一步研究 WSSV 侵染机制提供了理论基础。

关键词 凡纳滨对虾; RAS 蛋白; WSSV; 互作

中图分类号 S945.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0062-07

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是养殖对虾主要的病害之一,其传播范围广、致病力强,虾群感染 3~7 d 的死亡率高达 90%~100%,给水产养殖业造成了巨大的经济损失(黄健等, 1995; Lo *et al*, 1996; 马晓燕等, 2012; 何建国等, 1999)。研究表明,囊膜蛋白是介导病毒与宿主细胞发生相互作用的重要因子,在病毒侵染早期起关键作用,VP26、VP28 和 VP37 是 WSSV 的主要囊膜蛋白,VP26 存在于囊膜蛋白和核衣壳蛋白之间起联结作用(于力等, 2008); VP28 与病毒抗原性有关,在病毒入侵宿主细

胞过程中起重要作用(van Hulten *et al*, 2000、2001); VP37 是粘附蛋白,可延缓 WSSV 的侵染过程(Liang *et al*, 2005; Liu *et al*, 2009)。

Ras 基因是在生物进化过程中第一个被鉴定出来的非常保守的原癌基因,广泛存在于从酵母菌到人类的真核细胞中,因首先发现于大鼠肉瘤病毒(Rat sarcoma, *Ras*)而得名(Liu *et al*, 1995; Winston *et al*, 1996; Fan *et al*, 1997)。其分泌的 RAS 蛋白是偶联细胞表面受体与胞内效应因子的信号转导子,位于细胞膜内侧,属于小 G 蛋白家族,能结合 GTP 和 GDP。

* 国家自然科学基金(31672679)、国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)和现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助[This work was supported by National Natural Science Foundation of China (31672679), National Key Basic Research Development Plan (2012CB114401), and China Agriculture Research System(CARS-47)]. 王中一, E-mail: liangwang06@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-11-29, 收修改稿日期: 2018-02-07

结合 GTP 时为活性状态, 能够与下游多种效应因子相互作用进行信号传递; 当结合 GDP 时处于非活性状态, 不能传递信号。所以, RAS 蛋白在多种细胞跨膜受体介导的信号通路中起着分子开关的作用, 在细胞增殖、分化、凋亡、癌变等方面也起着非常重要的作用(Wennerberg *et al*, 2005; Winston *et al*, 1996; van der Weyden *et al*, 2007; Castro *et al*, 2005; Greenhough *et al*, 2007)。目前, 关于对虾小 G 蛋白家族的研究多集中在 Rab 蛋白上, Praween 等(2017)研究表明, 在对虾感染传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)和 WSSV 时, Rab5、Rab6、Rab7 三种蛋白的表达量均上调, 说明三者参与了对虾的先天性免疫防御系统。

本研究通过克隆表达获得凡纳滨对虾的 RAS 蛋白, 利用 Far-western 技术在体外筛选出能与 RAS 蛋白相互作用的 WSSV 结构蛋白, 并通过 ELISA 验证二者在数量上的相互作用关系, 为深入全面地探索 WSSV 感染机制和防治措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

WSSV 结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37, 表达载体 pBAD/g III A 由本实验室保存; TRIzol 试剂、PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、Ex Taq 酶及 DNA 标准(DNA Marker DL2000)购自 TaKaRa 公司; *E.coli* Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司; 氨苄青霉素(Amp⁺)、L-阿拉伯糖、质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I、*Xba* I 及蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 地高辛(DIG)购自 Roche 公司; 胶回收试剂盒购自 ZYMO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凡纳滨对虾 cDNA 的合成 剪取凡纳滨对虾的鳃丝, 加入适量 RNAiso 充分研磨后, 按照 RNAiso 试剂盒说明书提取 RNA。依照 PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 凡纳滨对虾 Ras 编码区基因的克隆 按照 GenBank 上的凡纳滨对虾 Ras mRNA 序列, 设计特异性引物(Rass: 5'-TACCATGGAGATGACGGAATACACG-3'; Rasa: 5'-ACTCTAGATCGAACACAATGC-ACTT-3', 划线处为 *Nco* I 和 *Xba* I 酶切位点), 以凡纳滨对虾鳃的 cDNA 为模板, PCR 扩增 Ras 基因序列。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 回收纯化。

1.2.3 重组表达载体 pBAD/g III A-Ras 的构建

PCR 产物和 pBAD/g III A 载体经 *Nco* I 和 *Xba* I 双酶切, T4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达载体, 转化到 *E.coli* Top10 感受态细胞中, 取 100 μ l 转化液涂布到 LB 固体培养基(Amp⁺, 50 μ g/ml)上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养。挑取单克隆, 进行菌液 PCR 筛选阳性克隆, 测序验证。

1.2.4 RAS 生物学分析 利用在线软件 ProtParam tool 分析蛋白的等电点和分子量, 应用 SignalP 3.0 Server 预测氨基酸序列有无信号肽, 利用 NPS Network Protein Sequence Analysis 在线软件, 采用 PHD 方法预测 RAS 蛋白二级结构(王修芳等, 2016)。

1.2.5 RAS 蛋白的表达 测序正确的菌液用新鲜的 LB 培养液(Amp⁺, 100 μ g/ml)培养至 OD_{600 nm} 为 0.5~0.6, 加入诱导剂 L-阿拉伯糖(终浓度为 0.2 g/L), 37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h, 对照组不加诱导剂。10000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, PBS 缓冲液(pH=7.4)重悬, 用超声破碎仪超声破碎后, 10000 r/min 离心 30 min, 分别收集诱导、未诱导菌液的上清液和沉淀, SDS-PAGE 分析 RAS 蛋白表达情况, 并将蛋白条带切下, 送上海复旦大学进行蛋白质谱分析。

1.2.6 Co²⁺柱亲和层析纯化 RAS 蛋白 诱导表达的菌液沉淀用 A 液(含 6 mol/L 盐酸胍, pH=7.4)溶解后, 4 $^{\circ}$ C 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 依次经 0.8 μ m 和 0.45 μ m 滤膜过滤。向层析柱中加入树脂, PBS 缓冲液(pH=7.4)平衡洗柱, A 液将紫外吸收峰洗至 0, 加入蛋白上清液混匀, 冰浴 2 h, A 液洗脱至峰值为 0, C 液(含 150 mmol/L 咪唑, pH=7.4)洗脱, 并收集 RAS 蛋白。RAS 蛋白经尿素梯度复性液(4、2、1、0 mol/L)透析复性后浓缩, SDS-PAGE 检测蛋白纯化效果。

1.2.7 DIG 标记 RAS 蛋白 将 DIG 粉末溶于 DMSO(1:1000)中, 与 RAS 蛋白充分混匀, 4 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液(pH=7.4)过夜透析, 以去除过量的 DIG。

1.2.8 Far-western 检测与 RAS 蛋白互作的 WSSV 蛋白 将 WSSV 的 3 种结构蛋白 VP26、VP28N、VP37 和 BSA(阴性对照)进行 15% SDS-PAGE 后, 转印至 PVDF 膜上, 4 $^{\circ}$ C 5% BSA 封闭过夜, PBS-T 清洗后加入 DIG-RAS 蛋白, 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 5 遍后, 加入碱性磷酸酶(AP)标记的抗 DIG 抗体(Anti-DIG-AP, 1:3000), 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 5 遍后, 用 BCIP/NBT 显色液避光显色。

1.2.9 ELISA 检测 RAS 蛋白与 VP26 的相互作用

VP26 用 Na₂CO₃ 包被液稀释至 0.02 μ g/ μ l, 分别

取 50 μl 稀释好的 VP26 加入 96 孔板中, BSA 为阴性对照, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。PBS-T 清洗后, 5% BSA 常温封闭 2 h, PBS-T 洗板 3 次。加入 50 μl 不同量的 DIG-RAS 蛋白(0.1、1.0、2.5 μg), 常温孵育 2 h, PBS-T 洗板 5 次。加入 50 μl Anti-DIG-AP(1 : 5000 稀释), 常温孵育 2 h, PBS-T 洗板 5 次, 加入 50 μl PNPP 显色液, 直到出现明显颜色时, 加入 50 μl NaOH (0.3 mol/L) 中止反应。酶标仪测定 405 nm 处的吸光值并计算 P/N 值。P/N 计算公式: $P/N = (\text{OD}_{405 \text{ nm}} - \text{OD}_{405 \text{ nm 空白}}) / (\text{OD}_{405 \text{ nm BSA}} - \text{OD}_{405 \text{ nm 空白}})$ 。

2 实验结果

2.1 Ras 基因的克隆

以凡纳滨对虾鳃的 cDNA 为模板, 利用设计的引物扩增 Ras 基因, 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 扩增的片段在 500~750 bp 之间, 与 Ras 基因片段(561 bp) 大小相符。

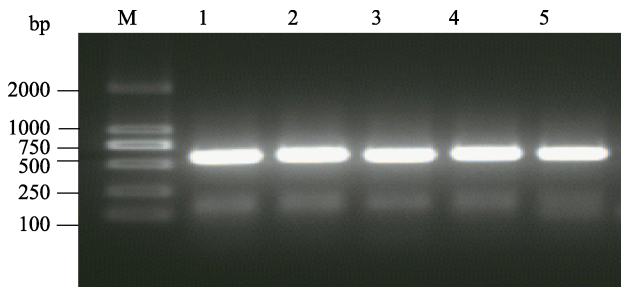


图 1 Ras 基因的克隆

Fig.1 Amplification of Ras gene

M: DNA 标准品 DL2000; 1~5: Ras 基因

M: DNA Marker DL2000; 1~5: Ras gene

2.2 重组表达载体 pBAD/g III A-Ras 的鉴定

T4 DNA 连接酶将双酶切后的目的片段与具有相

同粘性末端的 pBAD/g III A 表达载体连接, 转化到 *E. coli* Top10 细胞中, 经菌液 PCR 鉴定阳性克隆, PCR 产物电泳结果见图 2, 条带大小为 500~750 bp, 菌液测序结果经过 DNAMAN 软件分析, 重组表达载体序列完全正确, 无碱基错配和移码突变。

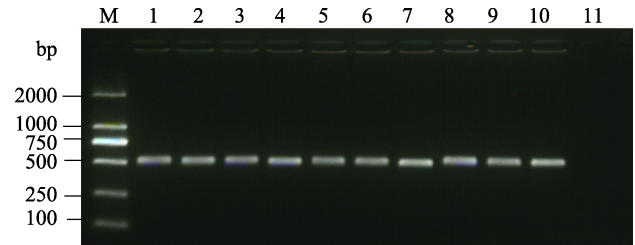


图 2 重组表达载体 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant vector by PCR

M: DNA 标准品 DL2000; 1~10: pBAD/g III A-Ras 重组表达载体; 11: 阴性对照

M: DNA Marker DL2000; 1~10: Recombinant vector of pBAD/g III A-Ras; 11: Negative control

2.3 RAS 蛋白生物学信息

经 ProtParam tool 分析显示, RAS 理论分子量为 21.3 kDa, 等电点为 5.97; SignalP 3.0 Server 分析显示, 该蛋白无信号肽结构, NPS Network Protein Sequence Analysis 预测 RAS 蛋白二级结构(图 3), α 螺旋为 40.64%, β 转角为 36.9%, 延伸链占 22.46%。

2.4 RAS 蛋白的检测

分别取诱导、未诱导菌液的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE(图 4), 与未诱导的上清液、诱导的上清液、未诱导的沉淀相比, 诱导菌液的沉淀在 25 kDa 左右出现一条明显加粗的蛋白条带(图 4 中的红色箭头所示), 将此条带进行蛋白质谱分析(表 1), 结果显示, 该蛋白为凡纳滨对虾的 RAS 蛋白。

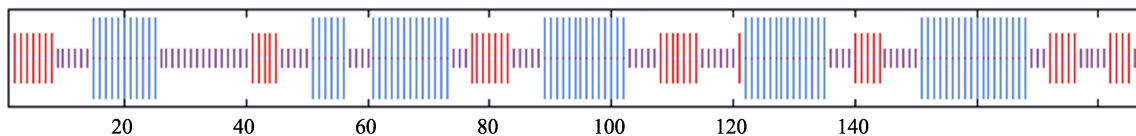


图 3 RAS 蛋白二级结构

Fig.3 Secondary structure prediction of RAS

2.5 RAS 蛋白的纯化

重组 RAS 蛋白带有 6 \times His 标签, 可利用 Co^{2+} 亲和层析法纯化。SDS-PAGE 显示(图 5), RAS 蛋白纯度高, 为单一条带, 可用于下一步实验。

2.6 RAS 蛋白与 WSSV 结构蛋白的相互作用

将 VP26、VP28N 和 VP37 进行蛋白电泳后转印至 PVDF 膜上, 依次经过 DIG-RAS 蛋白和 Anti-DIG-AP 孵育。显色结果显示, 在 VP26 泳道出现明显

的条带(图 6 中的红色箭头所示), 而 VP28N、VP37 和 BSA 泳道无条带, 说明 RAS 蛋白只能与 VP26 特异性结合。

RAS 蛋白的相互作用随 RAS 蛋白量的增加而增强, 当 RAS 蛋白量增加至 2.5 μg 时, P/N 值增加到 16.4, 说明 VP26 与 RAS 蛋白有明显的结合作用。

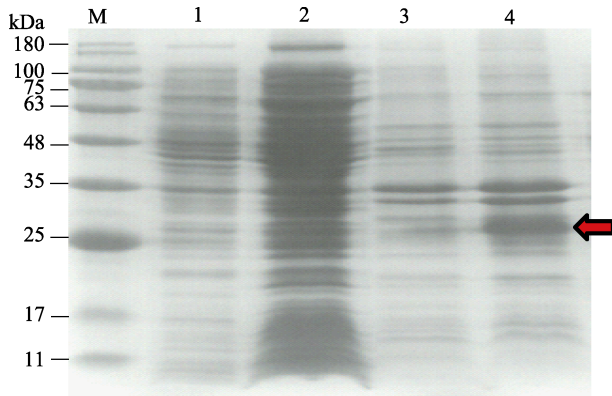


图 4 RAS 蛋白表达检测
Fig.4 Detection of RAS protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导上清液;
2: 诱导上清液; 3: 未诱导沉淀; 4: 诱导沉淀
M: Protein marker; 1: Supernatant protein of non-induced RAS; 2: Supernatant protein of induced RAS;
3: Pellet protein of non-induced RAS;
4: Pellet protein of induced RAS

2.7 ELISA 分析

采用 ELISA 方法, 进一步验证 VP26 与 RAS 互作, 数据分析显示 P/N 值远大于 2(图 7), 且 VP26 与

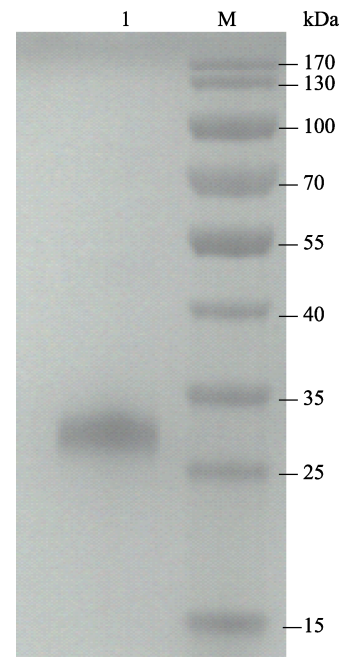


图 5 SDS-PAGE 分析纯化的 RAS 蛋白
Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified RAS

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化的 RAS 蛋白
M: Protein marker; 1: Purified RAS protein

表 1 RAS 蛋白质谱分析结果
Tab.1 Results of MS analysis of RAS

| AET71737.1 | | Score: 472 | 凡纳滨对虾(<i>L. vannamei</i>) RAS | | | |
|-------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|-------------|----------------------------------|--|
| 肽段分子量 Observed | 肽段实验分子量 Mr(expt.) | 肽段理论分子量 Mr(calc.) | 起始位点 Start | 终止位点 End | 肽段 Peptide | |
| 712.3231 | 711.3158 | 711.3010 | 69 | 73 | R.DQYMR.T | |
| 733.3842 | 732.3769 | 732.3589 | 118 | 123 | K.CDLQVR.A | |
| 950.4329 | 949.4256 | 949.4109 | 124 | 131 | R.AMDMQQAR.E | |
| 1087.5304 | 1086.5231 | 1086.4982 | 89 | 97 | K.SFEDISAYR.E | |
| 1386.6968 | 1385.6895 | 1385.6649 | 150 | 161 | R.MGVDDAFYTLVR.E | |
| 1397.7080 | 1396.7007 | 1396.6874 | 136 | 147 | K.NYDIPFIETSAK.T | |
| 1402.6870 | 1401.6797 | 1401.6599 | 150 | 161 | R.MGVDDAFYTLVR.E + Oxidation (M) | |
| 1579.8684 | 1578.8611 | 1578.8406 | 74 | 88 | R.TGEGFLLVFAVNNAK.S | |
| 1583.8523 | 1582.8450 | 1582.8753 | 103 | 117 | R.VKDADVVPMLVGNK.C | |
| 2648.4163 | 2647.4090 | 2647.3282 | 74 | 97 | R.TGEGFLLVFAVNNAKSFEDISAYR.E | |
| 2869.4583 | 2868.4510 | 2868.3521 | 43 | 68 | K.QVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMR.D | |
| 2967.5479 | 2966.5406 | 2966.4298 | 17 | 41 | K.SALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYR.K | |
| 3095.6543 | 3094.6470 | 3094.5247 | 17 | 42 | K.SALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYR.K | |

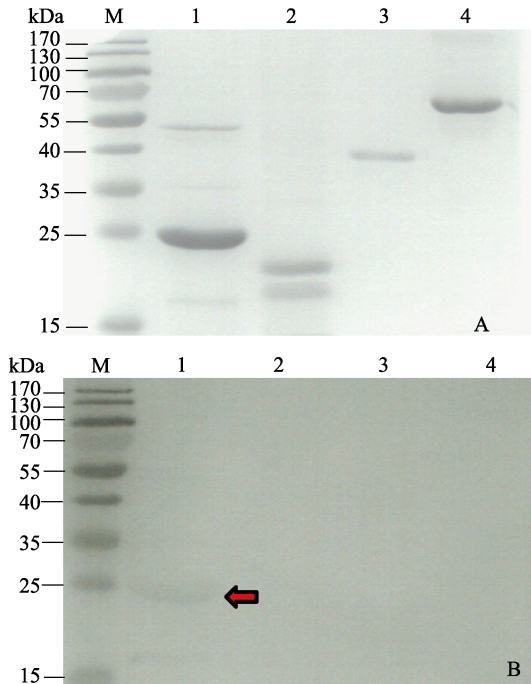


图6 Far-western 分析 RAS 蛋白与 VP26、VP28N 及 VP37 的相互作用

Fig.6 Analysis of interaction of purified recombinant RAS and VP26, VP28N, and VP37 by far-western

A: 聚丙烯酰胺凝胶电泳; B: Far-western; M: 蛋白质分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37; 4: BSA
A: SDS-PAGE; B: Far-western; M: Protein marker; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37; 4: BSA

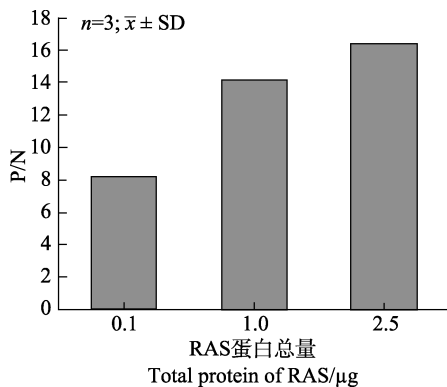


图7 ELISA 分析 RAS 蛋白与 VP26 的相互作用

Fig.7 Analysis of RAS interaction with VP26 by ELISA

3 讨论

大量研究表明,病原蛋白与宿主蛋白相互作用是诱发感染、致病的关键环节。WSSV 侵染宿主细胞是一个很复杂的过程,病毒在复制过程中会与多种宿主细胞蛋白发生作用。近年来,已报道多种宿主分子(包括 Rab5、Rab6、Rab7 等小 G 蛋白)参与 WSSV 的侵染过程(Sritunyalucksana *et al.*, 2006、2013),但关于

RAS 蛋白与 WSSV 的相互作用尚不明确。

本研究根据 Ras 编码区序列设计引物,PCR 获得 Ras 序列,通过原核表达和 Co^{2+} 亲和层析法得到 RAS 蛋白,SDS-PAGE 结果显示,RAS 蛋白存在于诱导沉淀中,属于包涵体蛋白。以 WSSV 的 3 个主要结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 作为研究对象,通过 Far-western 和 ELISA 检测三者是否与凡纳滨对虾 RAS 蛋白相互作用。研究表明,RAS 蛋白虽不能与 VP28N 和 VP37 相互作用,但能与 VP26 特异性结合,且二者的相互作用随着 RAS 蛋白量的增加而增强。VP26 是 WSSV 中含量较高的被膜蛋白,起连接作用(Tsai *et al.*, 2006),既可以与囊膜蛋白 VP28 结合,又可以与核衣壳蛋白 VP51 结合,三者可能通过形成复合体起到稳定病毒结构的作用(Chang *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2008)。VP26 能特异性结合斑节对虾(*Penaeus monodon*)血细胞,参与 WSSV 侵染的初始阶段(刘非等, 2006),中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的 Tetraspanin-3 蛋白在体外也能特异地结合 VP26,参与 WSSV 的感染过程(关广阔等, 2015),VP26 通过与日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)β 肌动蛋白作用,完成 WSSV 的入侵、运输和释放等过程(Liu *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2005; Gouin *et al.*, 2005),说明 VP26 可与多个宿主分子相互作用。

RAS 是细胞内信号通路中的转录因子,在信号传导途径中起着极为重要的作用,RAS 与 VP28 和 VP37 无作用,说明 RAS 不参与 WSSV 吸附宿主细胞的过程。根据研究结果可初步推测,在 WSSV 侵染凡纳滨对虾细胞时,RAS 蛋白通过与 VP26 相互作用,调控信号通路介导 WSSV 进入细胞内,从而加快了 WSSV 在宿主体内的传播,具体作用机制尚需深入研究。本研究结果为进一步揭示 WSSV 侵染宿主细胞的信号通路和病毒-宿主相互作用机制提供了理论基础。

参 考 文 献

- Castro AF, Rebhun JF, Quilliam LA. Measuring Ras-family GTP levels *in vivo*-running hot and cold. *Methods*, 2005, 37(2): 190-196
- Chang YS, Liu WJ, Chou TL, *et al.* Characterization of white spot syndrome virus envelope protein VP51A and its interaction with viral tegument protein VP26. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12555-12564
- Fan J, Bertino JR. K-ras modulates the cell cycle via both positive and negative regulatory pathways. *Oncogene*, 1997, 14: 2595-2607
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of

- intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(1): 35–45
- Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, *et al.* The cannabinoid δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(10): 2172–2180
- Guan GK, Liu QH, Huang J. Interaction of tetraspanin-3 in *Fenneropenaeus chinensis* with WSSV *in vitro*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 56–62 [关广阔, 刘庆慧, 黄健. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) Tetraspanin-3 与 WSSV 的体外相互作用. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 56–62]
- He JG, Zhou HM, Yao B, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) host range and transmission route. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, 38(2): 65–69 [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. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(2): 65–69]
- Huang J, Song XL, Yu J, *et al.* Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis—study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Marine Fisheries Research*, 1995, 16(1): 1–10 [黄健, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死——对虾暴发性流行病的病原和病理学. *海洋水产研究*, 1995, 16(1): 1–10]
- Liang Y, Huang J, Song XL, *et al.* Four viral protein of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(1): 81–85
- Liu B, Tang X, Zhan W. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 13–17
- Liu F, Cun SJ, Yang K, *et al.* Functional analysis on structure proteins VP28 and VP26 of white spot syndrome virus. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2006, 45(4): 83–86 [刘非, 寸树健, 杨凯, 等. 对虾白斑综合症病毒(WSSV)结构蛋白VP28与VP26的功能分析. *中山大学学报(自然科学版)*, 2006, 45(4): 83–86]
- Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, *et al.* Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(7): 3654–3663
- Liu QH, Zhang XL, Ma CY, *et al.* VP37 of white spot syndrome virus interact with shrimp cells. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48(1): 44–50
- Lo CF, Ho CH, Peng SE, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 27(3): 215–225
- van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1776(1): 58–85
- Ma XY, Li P, Yan H, *et al.* A review on shrimp white spot syndrome virus. *Journal of Nanjing Normal University(Natural Science Edition)*, 2012, 35(4): 90–100 [马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合症病毒的概述. *南京师大学报(自然科学版)*, 2012, 35(4): 90–100]
- Choubey PK, Roy JK. Rab11, a vesicular trafficking protein, affects endoreplication through Ras-mediated pathway in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*, 2017, 367(2): 269–282
- Sritunyalucksana K, Utairungsee T, Sirikharin R, *et al.* Virus-binding proteins and their roles in shrimp innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 33: 1269–1275
- Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo CF, *et al.* PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10734–10742
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al.* Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology*, 2006, 80(6): 3021–3029
- van Hulten MCW, Westenberg M, Goodall SD, *et al.* Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, 2000, 266(2): 227–236
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Snippe M, *et al.* White spot syndrome virus envelop protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, 2001, 285(2): 228–233
- Wang XF, Liu QH, Wu Y, *et al.* cDNA cloning of coat-epsilon gene and its tissue distribution in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 147–152 [王修芳, 刘庆慧, 吴垠, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat- ϵ 基因全长 cDNA 克隆及组织分布. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 147–152]
- 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. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12598–12601
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(5): 843–846
- Winston JT, Coats SR, Wang YZ, *et al.* Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene*, 1996, 12(1): 127–134
- Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, 336(1): 93–99
- Yu L, Li QZ. Advances of white spot syndrome virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(6): 486–490 [于力, 李庆章. 虾白斑综合症病毒的研究进展. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(6): 486–490]

RAS from *Litopenaeus vannamei* Interacts with WSSV-VP26 *in vitro*

WANG Zhongyi^{1,2}, LIU Qinghui¹①, HUANG Jie¹

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most harmful pathogens in shrimp farming, which has great impacts by causing economic losses in aquaculture industry. It belongs to the *Whispovirus* genus of the Nimaviridae family. However, how the virus enter the cell is not very clear. Interaction between the virus and host is important for viral infection. Recently, some researchers found that GTP-binding proteins, such as Rab5, Rab6, and Rab7 interacted with infectious hypodermol and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and WSSV. However, the studies did not reveal the interaction between RAS protein and WSSV. The RAS protein belongs to the GTP-binding proteins and exists in eukaryotes from yeast to humans. Being a membrane protein, RAS becomes post-translationally modified after synthesis and is transported *via* the endoplasmic reticulum and Golgi complex route. Thus, in this study, the RAS of *Litopenaeus vannamei* was cloned. Then, it was ligated with prokaryotic expression vector pBAD/gIII A using T4 DNA ligase, transformed into *E.coli* TOP10, and induced with L-arabinose. Pure RAS protein was acquired using Co²⁺ affinity chromatography purification. Mass spectrometry analysis showed the recombinant protein was RAS of *L. vannamei*. Far-western and ELISA assays were applied to determine the interaction of RAS with WSSV-VP26, WSSV-VP28N, and WSSV-VP37. The Far-western assay showed that the RAS protein interacted with VP26. The ELISA assay indicated that the interaction between RAS and VP26 grew stronger with the increasing concentration of RAS. Taken together, the RAS protein was responsible for WSSV infection. This study could provide the basis for research on the mechanism of WSSV invasion.

Key words *Litopenaeus vannamei*; RAS; WSSV; Interaction

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn