

WSSV 蛋白酶性质的研究

刘庆慧, 黄 捷, 宋晓玲, 刘 莉

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:从感染白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)的对虾中提取和纯化 WSSV, 对其蛋白酶活力进行分析。结果表明, WSSV 蛋白酶具广泛的 pH 稳定性, 当 pH 达 7.5 时, 蛋白酶活性最大; pH 高于 10.0 时, 酶活力很低, 其蛋白酶偏碱性。丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氨(PMSF)对酶活性有抑制作用。 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 可降低 WSSV 蛋白酶活性, 但 Mg^{2+} 有轻微的激活作用。胰蛋白酶抑制剂在浓度为 12.5 ~ 25.0 mg/L 时, 对 WSSV 蛋白酶活性无影响。Leupeptin 使蛋白酶活性降低 12.29%。Chymostatin 在质量浓度为 12.5 ~ 25.0 mg/L 时, 对 WSSV 蛋白酶活性有强烈的抑制作用, 表明 WSSV 蛋白酶类属胰凝乳蛋白酶。蛋白质修饰剂对 WSSV 蛋白酶活性影响的研究结果表明, 组氨酸残基为 WSSV 蛋白酶活性基团, 而巯基为非必需基团, 说明 WSSV 蛋白酶为非巯基依赖型的蛋白酶。

关键词: WSSV; 蛋白酶; 特性

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)01-0020-06

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是养殖对虾的主要病原, 给全世界对虾养殖业造成了毁灭性的打击。目前 WSSV 的病原学、流行病学、诊断学、感染机理等方面的研究已不同程度地深入到了分子水平^[1-6]。WSSV 的基因组全序列已先后被 3 个研究小组测定并在 GenBank 上公布, 已确定 WSSV 全基因(约 300 kb)含有 180 个开放阅读框^[7-9]。随着 WSSV 基因组序列的确定, 有关 WSSV 功能蛋白的研究成为新的研究热点。

有研究表明^[10], 许多动物和植物病毒的感染和扩散都伴随着对宿主组织细胞的蛋白质的分解, 病毒编码的蛋白酶参与病毒多肽前体的切割、组装和成熟, 病毒蛋白酶通常在病毒感染循环中起到必不可少的作用。每种病毒采用不同的方式产生特定的切割产物以适应病毒组装所需的特定的细胞环境, 因此, 对病毒蛋白酶生物学功能的调节是有效控制 WSSV 感染的重要策略之一, 病毒蛋白酶特性的研究对于抗病毒制剂的研究具有重要的指导意义。有关 WSSV 蛋白酶功能特性的研究较少报道。近年来本实验室发现 WSSV 具有一种蛋白酶活性^[11], 本实验在此基础上, 对 WSSV 蛋白酶性质进行进一步的研究, 旨在研制和发展抗病毒治疗剂提供理论依

据。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

健康中国对虾, 实验前均饲养于水箱中, 观察 4 ~ 5 d, 挑选健康虾供实验用。取患白斑综合症(WSSV)的病虾鳃部染液 100 μL , 肌肉注射后, 饲养于水箱中, 至对虾濒临死亡, 立即去除附肢甲壳和肝胰腺取鳃, 迅速冷冻于 -76 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。同时健康对虾取鳃, -76 $^{\circ}\text{C}$ 冻存作为对照。

1.2 方法

1.2.1 WSSV 的提取 取 5 g 患白斑综合症(WSSV)的病虾鳃, 于等量的 PPB^[12]中匀浆, 经 7 000 r/min (RP65T-856, Hitachi)离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 上清液铺于 35% (W/W)蔗糖垫层, 25 000 r/min (RP65T-856)离心 60 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 沉淀用 35% (W/W)蔗糖溶液重悬, 上清液铺于 40% ~ 65% (W/W)蔗糖梯度上, 36 000 r/min (RPS65T-704)离心 3 h (4 $^{\circ}\text{C}$), 离心后取病毒区带用 PPB 稀释后, 于 20 000 r/min (RP65T-856)离心 60 min (4 $^{\circ}\text{C}$), 沉淀用无菌双蒸水溶解, 分装 100 mL, 冻存于 -76 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。

收稿日期: 2003-04-04; 修订日期: 2003-09-03.

基金项目: 国家重点基础研究项目(G1999012002)资助。

作者简介: 刘庆慧(1962-), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事海洋生物技术、生物制品方面的研究。

通讯作者: 黄 捷. E-mail: aquadis@public.qd.sd.cn

1.2.2 健康虾鳃 PPB 提取液 取 5 g 无 WSSV 感染的健康虾鳃料,于等体积的 PPB 缓冲液中匀浆,以下操作同 1.2.1 WSSV 提取方法相同,经差速和蔗糖梯度离心后,沉淀用无菌双蒸水溶解,分装 100 μL ,冻存于 $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。

1.2.3 蛋白酶活性的测定 采用改进的微量蛋白酶测定方法^[11],以酪蛋白为底物与酶作用,通过酪氨酸生成量表示酶的活性。具体步骤为:取 0.5% 酪蛋白(硼酸—硼砂, pH 8.4) 100 μL , 50 μL 酶液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温诱导后,加 100 μL 三氯醋酸,离心,取 200 μL 上清液,加 200 μL 0.4 mol/L Na_2CO_3 和 100 μL 福林试剂, 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温显色 15 min, 用酶标仪测 680 nm OD 值。同时作空白,并做酪氨酸不同浓度标准曲线。酶活定义为:特定温度时,每毫克酶蛋白在每分钟水解底物产生 1 微克酪氨酸为一个酶活单位。比活力 [$\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$] 为酶活除以酶蛋白浓度。

$$A_R = A_S \div A_C \times 100\%$$

式中, A_R 为相对酶活力; A_S 为样品酶活力; A_C 为对照酶活力。

1.2.4 WSSV 蛋白酶粗提液的制备 采用 Sephadex-75 柱层析方法,将 1.2.1 方法中提纯的 WSSV 进行柱层析、洗脱,分步收集洗脱液并测定蛋白酶活性,合并具蛋白酶活性的各洗脱液,低温真空干燥,重溶于无菌双蒸水中,为以下 1.2.8 和 1.2.9 项中研究备用。

1.2.5 病毒蛋白浓度的测定 采用 Bradford 比色法^[13],以牛血清白蛋白为蛋白质标准。

1.2.6 病毒的电镜观察 分别吸取蔗糖密度梯度离心后的病毒带 10 μL ,滴加于铜网上, 3~4 min 后,用滤纸吸去多余液体,滴加 3% 磷钨酸 (PTA) 染色 5 min,吸去多余的染料,于室温风干,在电镜下观察。

1.2.7 pH 值对酶活力的影响 以酪蛋白的不同 pH 值的缓冲液为底物,测定在不同 pH 值时的蛋白酶活性。

1.2.8 金属离子和抑制剂对酶活力的影响 在相同的 pH 基质缓冲液条件下,分别加入 CaCl_2 、 MgSO_4 、 MnSO_4 、 FeSO_4 、 CuSO_4 、PMSF、EDTA、5% 乙醇、0.5% SDS、Triton-100、胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin inhibitor)、亮抑制肽 (Leupeptin)、甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮 (TPCK) 及胰凝乳蛋白酶抑制剂 (Chymostatin),测其对蛋白酶活性的影响,以不加上述化学物质的酶活力为 100,其余条件下测定的酶活换算

成相对酶活。

1.2.9 氨基酸残基修饰剂对酶活力的影响 以酶活性最高的 pH 基质缓冲液,测定各种化学修饰剂对蛋白酶活性的影响,以不加修饰剂的酶活力为 100,其余条件下测定的酶活换算成相对酶活。

2 结果

2.1 蔗糖梯度离心纯化的杆状病毒粒子

图 1 示病毒和正常虾蔗糖梯度离心后,形成病毒区带图及正常虾蔗糖梯度离心结果。从图 1 中可看出,病虾经蔗糖梯度离心后形成明显的病毒区带,而正常虾经蔗糖梯度离心后未形成明显的梯度带。将病毒样品进行磷钨酸负染,电镜下观察可见完整病毒粒子呈椭圆形(图 2),一端略平,一端稍细,有一小尾巴结构,不完整病毒为核衣壳结构,呈长棒形,依稀可见螺旋状的核酸结构。图 2 示电镜下观察的完整和不完整病毒粒子。

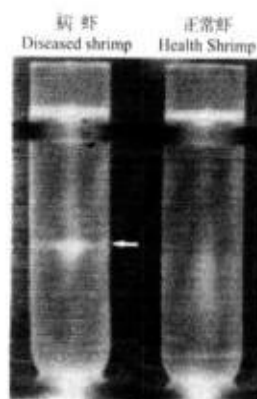
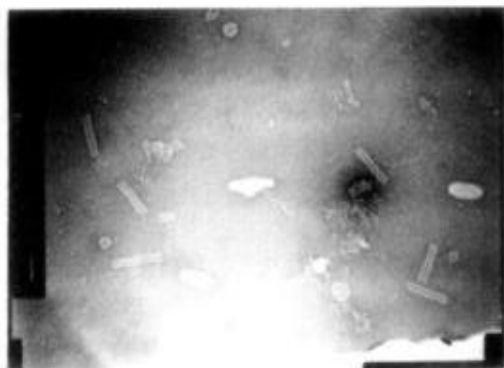


图 1 病虾和正常虾蔗糖梯度离心区带图(箭头示区带)
Fig. 1 Sample position after centrifugate sucrose gradient

2.2 pH 对 WSSV 蛋白酶活性的影响

图 3 显示,无 WSSV 感染和 WSSV 感染的对虾中,等量、等蔗糖密度梯度提取的对虾组织细胞中和 WSSV 中的蛋白酶活性在不同 pH 下的变化。从图 3 可以看出,WSSV 蛋白酶对 pH 具有较广泛的稳定性,pH 对其酶活性有明显的影响。在实验条件下,当 pH 为 7.5 时酶活性最高;在偏碱性 (pH 为 9.3) 酶活次之,在 pH 为 10.0 以上时,酶活性很低,说明该蛋白酶为偏碱性蛋白酶。无 WSSV 感染的健康虾组织细胞中蛋白酶活性变化与病毒中蛋白酶活性随 pH 变化有相近之处。比较相同 pH 条件下,各病毒

图2 电镜下观察的病毒粒子($\times 25\ 000$)Fig. 2 Negative stained virions($\times 25\ 000$)

中蛋白酶与无 WSSV 感染的健康虾组织细胞中蛋白酶比活性可以发现,在各相同 pH 条件下,病毒中蛋白酶比活性均高于无 WSSV 感染虾组织细胞中蛋白酶比活性。说明 WSSV 中存在病毒蛋白酶。

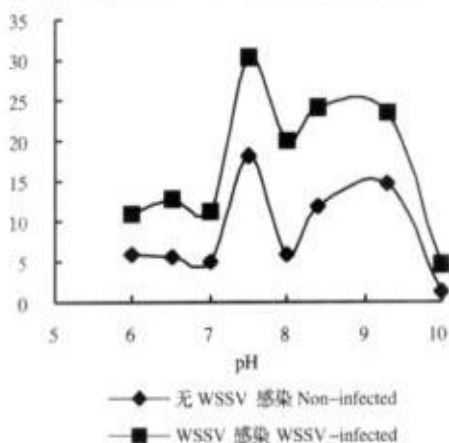


图3 pH 对健康虾组织提取液及病毒提纯液蛋白酶活性影响

Fig. 3 Effects of pH on protease activity of non-infected and WSSV-infected shrimp

2.3 几种试剂对 WSSV 蛋白酶活性的影响

将各种抑制剂与 WSSV 蛋白酶提取液混合,置 37 °C 保温 60 min,测相对酶活,分析各种抑制剂对病毒蛋白酶活性的作用,其结果见表 1。结果表明, PMSF 对 WSSV 蛋白酶有一定抑制作用,表明 WSSV 蛋白酶为丝氨酸蛋白酶。EDTA 在终浓度为 5.0 ~ 15.0 mmol/L 时,随其浓度增加,对 WSSV 蛋白酶活

性抑制作用也增强,表明金属离子为该酶活性所必需。此外低浓度乙醇也显著影响 WSSV 蛋白酶活性,而 SDS 在实验浓度下对酶活影响甚微。

表1 几种试剂对病毒蛋白酶活性的影响

Table 1 Effects of reagents on viral protease activity

分组 Group	浓度 Final concentration	pH	相对酶活力/% Relative activity
PMSF/ (mmol · L ⁻¹)	0.5	8.0	38.15
	1.0	8.0	49.23
EDTA/ (mmol · L ⁻¹)	5.0	8.0	43.08
	10.0	8.0	40.62
	15.0	8.0	35.38
乙醇	0.5%	8.0	43.69
SDS	0.5%	8.0	96.20
Control	0.0	8.0	100

2.4 金属离子对 WSSV 蛋白酶活性的影响

将 5 种金属离子与 WSSV 蛋白酶提取液混合,使其终浓度分别达到 1.0 mmol/L,30 °C 保温 60 min,测相对酶活,其酶活变化情况见表 2。由表 2 可见, Mg²⁺ 对蛋白酶有一定的激活作用, Ca²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺ 对酶活有抑制作用。

表2 几种金属离子对病毒蛋白酶活性的影响

Table 2 Effects of metal ions on viral protease activity

金属离子 Reagents	浓度/(mmol · L ⁻¹) Final concentration	pH	相对酶活力/% Relative activity
Ca ²⁺	1.0	8.0	49.59
Mg ²⁺	1.0	8.0	105.18
Mn ²⁺	1.0	8.0	37.60
Fe ²⁺	1.0	8.0	37.06
Cu ²⁺	1.0	8.0	52.86
control	0.0	8.0	100.00

2.5 6 种蛋白酶抑制剂对 WSSV 蛋白酶活性的影响

表 3 列出 6 种蛋白酶抑制剂对 WSSV 蛋白酶活性的影响, Trypsin inhibitor 为胰蛋白酶抑制剂,在 12.5 ~ 25.0 mg/L 时, Trypsin inhibitor 对 WSSV 蛋白酶活性无影响。另一种胰蛋白酶抑制剂 Leupeptin 在 25.0 mg/L 时,使蛋白酶活性下降 12.29%,说明 WSSV 蛋白酶对不同来源胰蛋白酶抑制剂的敏感性不同。Chymostatin 为胰凝乳蛋白酶抑制剂,在浓度为 12.5 ~ 25.0 mg/L 时, Chymostatin 对 WSSV 蛋白酶抑制作用明显,而另一种胰凝乳蛋白酶抑制剂 TPCK 对 WSSV 蛋白酶活性却几乎无抑制作用,这

可能是由于抑制剂的专一性不同所致。由于目前尚未得到胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶的专性底物,因此该结果尚需进一步的实验验证。

表3 几种蛋白酶抑制剂对病毒蛋白酶活性的影响
Table 3 Effects of inhibitors on viral protease activity

试剂 Reagents	浓度/(mg·L ⁻¹) Final concentration	pH	相对酶活力/% Relative activity
Trypsin inhibitor	12.5	8.7	100.0
Trypsin inhibitor	25.0	8.7	100.0
Chymostatin	12.5	8.7	0
Chymostatin	25.0	8.7	0
Leupeptin	25.0	8.7	87.71
TPCK	5.0mmol/L	8.4	100.00
Control	0.0	8.7	100.0

2.6 氨基酸残基修饰剂对 WSSV 蛋白酶活性的影响

2-巯基乙醇能使二硫键断裂,当加入2-巯基乙醇时,其相对酶活增加(表4),表明WSSV蛋白酶不属于巯基蛋白酶。DEPC为组氨酸残基的修饰剂,当其浓度为5%时,其相对酶活为58.6%,表明组氨酸为WSSV蛋白酶活性必需基团。碘乙酸为半胱氨酸残基修饰剂,在浓度为1mmol/L时,其相对酶活为96%,进一步证实巯基不是WSSV蛋白酶必需残基。由于目前尚未得到色氨酸残基的化学修饰剂N-溴化琥珀酰亚胺(NBS),因此有关其对WSSV蛋白酶的影响将在得到试剂后进行。

表4 氨基酸残基修饰剂对病毒蛋白酶活性的影响
Table 4 Effects of modifications on viral protease activity

试剂 Reagents	浓度/(mmol/L) Final concentration	相对酶活力/% Relative activity
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	0-60	58.6
2-ME(2-mercaptoethanol)	1.0	>100
IAA (Iodoacetic Acid)	1.0	96
Control	0.0	100

3 讨论

由于目前甲壳类动物的细胞尚处于研究阶段,病毒的提取尚不能通过细胞培养方法,大量的病毒只能从感染的虾组织中获得,虽然采用高速研磨匀浆、差速离心和蔗糖密度梯度离心的方法提纯WSSV病毒粒子,但纯化病毒中仍含有组织细胞杂质,特别是组织中含有的溶酶体酶与病毒粒子的密

度接近,易在纯化过程的等密度梯度处夹杂于病毒粒子中,因此实验中采取称取等量病虾和健康虾鳃组织,梯度离心后,从病毒区带等密度蔗糖梯度处取样,测定病毒和组织中的蛋白酶,以扣除组织细胞杂质中的蛋白酶对WSSV蛋白酶测定的影响。同时在提纯病毒后,采用柱层析法,初步纯化WSSV蛋白酶,以进一步减少组织细胞对WSSV蛋白酶的影响。

许多DNA病毒可编码蛋白激酶基因,病毒编码的蛋白酶主要有4类,即丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶^[14-16]。许多病毒编码的蛋白酶类似细胞中的胰凝乳蛋白酶^[10]。在所有测序的杆状病毒中,已确定有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因^[17-18]。Liu等^[19]采用克隆方法,研究了WSSV基因编码的蛋白激酶,多肽的基因分析表明WSSV蛋白激酶与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PK)具有很高的同源性,并通过体外转录和翻译,经SDS-PAGE得到分子量为87kD的蛋白激酶。Marielle^[20]研究发现在WSSV囊膜蛋白(Vp28)EcoRI酶切的8.4kb片段上有蛋白激酶基因,此蛋白激酶基因位于2193bp的开放阅读框上。该蛋白激酶基因与其他病毒及胚胎激酶基因具有很高的同源性,并且该蛋白激酶为丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶。Jiraporn^[21]采用EST(Expressed sequence tags)方法,研究了感染和未感染对虾血细胞cDNA文库,发现WSSV感染的对虾血细胞cDNA文库中编码有丝氨酸蛋白酶和蛋白酶抑制剂基因,并进一步推断该类蛋白酶作为酚氧化酶原的激活因子,而蛋白酶抑制剂调节酚氧化酶系统参与防御作用。该结果也说明蛋白酶在WSSV感染中具有重要作用。

本实验采用生物化学的方法研究WSSV蛋白酶的性质,结果表明,WSSV蛋白酶活性被丝氨酸蛋白酶抑制剂PMSF抑制,说明WSSV蛋白酶属于丝氨酸/苏氨酸蛋白酶类。进一步的实验结果显示,WSSV蛋白酶活性被胰凝乳蛋白酶抑制剂chymostatin所抑制,由此推测WSSV蛋白酶属胰凝乳蛋白酶类。

蛋白酶的化学修饰是研究蛋白酶结构与功能的重要基础手段,侧链基团的化学修饰的一个非常重要的作用是探明活性部位的结构。氨基酸残基修饰结果表明组氨酸残基为WSSV蛋白酶必需活性基团,而巯基乙醇和碘乙酸对WSSV蛋白酶活性影响的结果均表明巯基为WSSV蛋白酶非必需活性基团。

许多蛋白酶活性受金属离子的影响,WSSV蛋白酶活性被EDTA抑制,说明金属离子为WSSV蛋白酶活性所必需。实验结果表明 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 可抑制WSSV蛋白酶活性,而在实验浓度下 Mg^{2+} 对WSSV蛋白酶活性具有弱的激活的作用,说明WSSV蛋白酶活性中心对 Mg^{2+} 有一定的依赖性。一般认为SDS为蛋白质和酶的变性剂,而在本实验条件下,0.5% SDS仅使WSSV蛋白酶活性下降3.8%,可能是由于SDS的浓度较低,或病毒编码的蛋白酶与生物中的蛋白酶三维构象不同所致。

此外WSSV蛋白酶具有广泛的pH稳定性,并且WSSV蛋白酶活性随pH的变化与对虾组织蛋白酶活性随pH的变化一致,表明WSSV蛋白酶活性与宿主本身的生物学特性密切相关。

参考文献:

- [1] 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[J].海洋水产研究,1995,16(1):1-10.
- [2] 黄健,蔡生力,宋晓玲,等.对虾暴发性流行病病原后的人工感染研究[J].海洋水产研究,1995,16(1):51-57.
- [3] 战文斌,俞开康,孟庆星.中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒的研究[J].中国水产科学,1995,2(3):22-28.
- [4] Wang C H, Lo C F, Leu J H, et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome(WSBV) of *Penaeus monodon*[J]. Dis Aquat Org, 1995,23:239-242.
- [5] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, 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.
- [6] Lo C F, Leu J H, Ho C H, et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome(WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction[J]. Dis Aquat Org, 1997, 25,133-141.
- [7] Yang F, He J, Lin X, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. J Virol, 2001, 75(23): 11 811-11 820.
- [8] Tsai M F, Yu H T, Tzeng H F. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus(WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase[J]. Virology, 2000, 277(1):100-110.
- [9] Van Hulten M C, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence[J]. J Virology, 2001, 286(1):7-22.
- [10] Babe I A, Craik C S. Viral proteases; evolution of diverse structural motifs to optimize function[J]. Cell, 1997, 91:427-430.
- [11] 刘庆慧,黄健,宋晓玲,等.1种可用于检测WSSV蛋白酶的微量酶活测定技术[J].中国水产科学,2002,9(2):190-192.
- [12] Huang J, Song X-L, Yu J, et al. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis*[J]. Methods in Cell Sci, 1999, 21:225-230.
- [13] 奥斯特伯R布伦特.精编分子生物学试验指南[M].北京:科学出版社,1998.
- [14] Bazan J F, Fletterick R J. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 7 872-7 876.
- [15] Gorbalenya A E, Blinov V M, Donchenko A P. Poliovirus-encoded proteinase 3C: a possible evolutionary link between cellular serine and cysteine proteinase families[J]. FEBS Lett, 1986, 194:253-259.
- [16] Gorbalenya A E, Donchenko A P, Blinov V M, et al. Cysteine protease of positive strains RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases A distinct protein superfamily with a common structural fold[J]. FEBS Lett, 1989, 243:103-114.
- [17] Gomis, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1 323-1 337.
- [18] Hayakawa T, Ko R, Okano K, et al. Sequence analysis of the xestia C-nigrum granulovirus genome[J]. Virology, 1999, 262: 277-297.
- [19] Liu Wang-Jing, Hon-Tsen Yu, Shao-En Peng, et al. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase[J]. Virology, 2001, 289(20):362-377.
- [20] Marielle C W, Van Hulten Just, M Vlak. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus[J]. Virus Genes, 2001, 22:2,201-207.
- [21] Jiraporn R, Ikuro H, Toshiaki I, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13: 69-83.

Characterization of white spot syndrome virus (WSSV) protease

LIU Qing-hui, HUANG Jie, SONG Xiao-ling, LIU Li

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The healthy Chinese shrimp were infected artificially by white spot syndrome virus (WSSV). To analyze the characters of WSSV protease, the purified WSSV was prepared from the extraction of the dying shrimp. The results show that WSSV contains virus protease as well as indigenous protease. The highest activity of the protease is attained at pH 7.5. Anyway, the protease activity is stable with pH within a wide range that when pH is over 10.0, the activity of the protease is low. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), a serine inhibitor, has the inhibiting effect on enzymatic activity, which indicates that it is the responsibility of serine protease. Under the presence of Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} , the protease activity is reduced, but Mg^{2+} has a little active effect. Trypsin inhibitor has no effect on protease activity of WSSV at concentration between 12.5 mg/L and 25.0 mg/L, and Leupeptin can reduce the protease activity of WSSV by 12.29%. Strong inhibit effect was observed when the concentration of chymostatin was at 12.5 – 25.0 mg/L. This suggested that WSSV-encoded protease is related to the chymotrypsin-like protease. Based on the effect of protein modification on WSSV protease activity, it is indicated that Histidine residue is necessary for WSSV protease, but SH-residue is not. This supports that the protease of WSSV is not SH-residue dependent protease.

Key words: WSSV; protease; characterization

Corresponding author: HUANG Jie. E-mail: aqudis@public.qd.sd.cn

中国牧业网概要

网址: www.china-ah.com 实名: 中国牧业网

中国牧业网是目前中国畜牧行业最大的商务信息网站,注册用户达 13 000 多家,每天有超过畜牧行业上网人数 95% 的网民浏览。今年 3 月,中国牧业网被评为全国农业网站前十名,畜牧行业综合网站第一名。中国牧业网内容涵盖了畜牧行业的所有版块:饲料原料、兽药添加剂、畜禽养殖、生物工程、畜禽产品、畜禽饲料设备等,是畜牧业朋友进行信息查询、技术交流、推荐产品、寻求合作的最佳去处。已在畜牧行业牢牢的树立起“网络央视”的地位。

您的企业需要什么样的网络服务,中国牧业网将为您量身订做,优惠多多,不容错过。

电话:0371-7896745 7896746 传真:0371-7896747

E-mail: service@china-ah.com

地址:(450001)郑州高新技术产业开发区瑞达路 96 号孵化大厦 C 区三层