

WSSV 具蛋白酶活性肽段的检测

刘庆慧^{1,2}, 黄 健¹, 贾佩峤¹, 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:在已有对虾白斑综合症病毒(WSSV)蛋白酶活性研究的基础上,从分子水平上确定 WSSV 呈蛋白酶活性的肽段。采用凝胶电泳技术的蛋白酶谱分析法确定 WSSV 蛋白酶活性,研究非变性条件下 WSSV 多肽裂解的条件,确定低温(20℃)裂解 WSSV 多肽可满足实验的要求。同时使用 SDS-PAGE 分离胶切割法结合蛋白洗脱分离出 Vp19、Vp22、Vp24、Vp26 和 Vp28 共计 5 个肽段,并对分离的 5 个组分进行蛋白酶活性的检测,初步结果表明, Vp19 具有蛋白酶催化活性。

关键词:WSSV;蛋白酶;活性肽检测

中图分类号:Q945.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0531-06

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是养殖对虾的主要病原。目前 WSSV 的病原学、流行病学、诊断学、感染机理等研究已不同程度地深入到了分子水平^[1-6]。WSSV 全基因序列也已公布,已确定 WSSV 全基因(300 kb)含有 180 个开放阅读框^[7-9]。随着 WSSV 基因序列测定的完成, WSSV 基因编码的蛋白特性与功能及阻断病毒感染的机制的研究已成为国内外 WSSV 研究领域中新焦点。国内外对 WSSV 的囊膜和核衣壳的结构蛋白、多种有功能的酶类等进行了诸多分子水平上的研究。本研究在已有 WSSV 蛋白酶活性研究的基础上^[10],进一步采用电泳及蛋白洗脱技术,分离并检测 WSSV 中呈蛋白酶活性的组分,旨在为进一步研究 WSSV 蛋白酶在病毒感染和复制中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

克氏原螯虾(Crayfish, *Procambarus clarkii*)购于市场,实验前均饲养于水箱中,观察 4~5 d,健康者供实验用。取对虾粗提病毒液 100 μ L,于肌肉注射螯虾后,饲养于水箱中,至螯虾濒临死亡,立即取螯,迅速冷冻于 -76℃ 冻存,同时无 WSSV 感染的克氏原螯虾取螯;-76℃ 冻存作为对照。

1.2 方法

1.2.1 WSSV 的提取 取感染 WSSV 克氏原螯虾螯,于等量的 PBS 中匀浆,经 7 000 r/min (RP65T-856, Hitachi)离心 20 min (4℃),上清液铺于 30% (质量分数)蔗糖垫层,25 000 r/min (RP65T-856)离心 60 min (4℃),沉淀用 30% (质量分数)蔗糖溶液重悬,上清液铺于 35%~62% (质量分数)蔗糖梯度上,36 000 r/min (RPS65T-704)离心 3 h (4℃),离心后取病毒区带用 PBS 稀释后,于 20 000 r/min (RP65T-856)离心 60 min (4℃),沉淀用 ddH₂O 溶解,分装 100 μ L,冻存于 -76℃ 超低温冰箱中。

1.2.2 蛋白酶的酶谱分析法 样品首先经 SDS-PAGE 分离,将一块凝胶进行考马斯亮蓝染色,另一块电泳胶置于含 2% 的酪蛋白液中 (50 mmol/L MTris-HCL, pH 7.5),消化 2~3 h,蛋白酶会消化凝胶中的底物,将凝胶用考马斯亮蓝染色,凝胶上显现出透明带,透明带标示了蛋白酶的位置,与未消化的凝胶进行比照,可粗略确定蛋白酶的条带位置。

WSSV 多肽分离采用 SDS-PAGE 电泳,分离胶 12%,浓缩胶浓度 5%,电泳后电泳胶以考马斯亮蓝液染色,并以 250 mmol/L KCL 脱色至蛋白带清晰为止。另一块电泳胶在染色前先浸于 2% 酪蛋白液中然后以蒸馏水冲洗并染色,观察清晰亮斑带,同时以胰蛋白酶作阳性对照。

收稿日期:2004-01-02; 修订日期:2004-04-30.

基金项目:国家重点基础研究项目课题资助(G1999012002).

作者简介:刘庆慧(1962-),女,副研究员,主要从事生物技术、生物制品等方面的研究.

通讯作者:黄 健. E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

1.2.3 WSSV 多肽的分离 不连续 SDS-PAGE 采用 Laemmli 系统,分离胶 15%,浓缩胶 5%,分别采用电泳载样缓冲液 I(2% SDS + 10% 甘油 + 0.1% 溴酚蓝 + 50 mmol/L MTris-HCL, pH 6.8)和载样缓冲液 II(载样缓冲液 I + 100 mmol/L MDTT),蛋白质分子量标准为兔磷酸化酶 B(97.4 kD)、牛血清白蛋白(66.2 kD)、兔肌动蛋白(43 kD)、牛碳酸酐酶(31 kD)、胰蛋白酶抑制剂(20.1 kD)、鸡蛋清溶菌酶(14.4 kD),电泳结束后,将含分子量标准及 WSSV 样品的胶进行切割,并用考马斯亮蓝 R-250 染色,然后再用 250 mmol/L KCL 脱色至蛋白带清晰为止;另一块胶按已染色并脱色的 WSSV 蛋白条带位置切割,并将切割胶浸入电洗脱管中,进行电洗脱 3 h,将洗脱蛋白液移于透析袋中,蒸馏水透析过夜,低温真空浓缩,然后测蛋白酶活性,同时以无蛋白条带的胶洗脱液做空白对照。

1.2.4 WSSV 多肽分子量的测定 WSSV 经 SDS-PAGE 后,采用 Gel-pro3.1 软件,以低分子量标准蛋白为参照,计算 WSSV 多肽分子量。

1.2.5 蛋白酶活性的测定 采用改进的微量蛋白酶测定方法^[10],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。在本实验中采用方法为:取 0.5% 酪蛋白(硼酸-硼砂, pH 8.4) 50 μ L,加入 50 μ L 多肽洗脱回收液,30 $^{\circ}$ C 诱导反应 2 h,加 50 μ L 三氯醋酸终止反应,离心,取 120 μ L 上清液,加 60 μ L 0.6 mol/L Na_2CO_3 和 100 μ L 福林试剂,40 $^{\circ}$ C 恒温显色 15 min,用酶标仪测 680 nm OD 值,同时作空白对照。

2 结果

2.1 WSSV 蛋白酶谱实验结果

从感染的克氏原螯虾鳃中提取的 WSSV,进行磷钨酸负染,电镜下观察,可见大量全病毒粒子和病毒核衣壳结构(图 1)。图 2 示胰蛋白酶经 SDS-PAGE 电泳图和胰蛋白酶经 SDS-PAGE 并酪蛋白孵育后染色图,图中亮斑示出胰蛋白酶消化酪蛋白的活性位点。图 3 为 WSSV 非变性 SDS-PAGE 电泳图谱和 WSSV 非变性 SDS-PAGE 并经酪蛋白孵育后染色图。图中亮斑表明 WSSV 中蛋白酶的活性,从 SDS-PAGE 电泳结合电泳胶孵育实验看出, WSSV 蛋白中低分子量区域呈现蛋白酶活性。

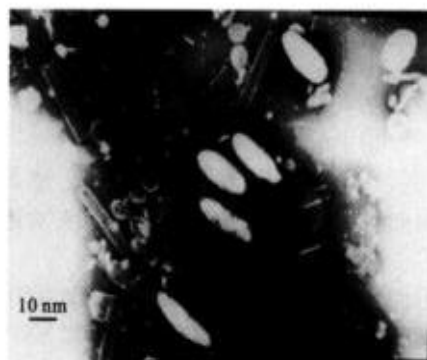


图 1 克氏原螯虾中提取 WSSV 负染电镜
Fig.1 Electron micrograph of negatively stained WSSV virions from crayfish

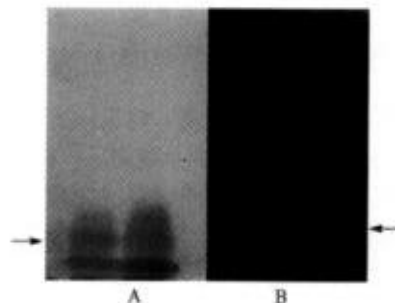


图 2
A:胰蛋白酶经 SDS-PAGE 电泳图
(箭头示胰蛋白酶)
B:胰蛋白酶经 SDS-PAGE 并酪蛋白孵育后染色图
(箭头示胰蛋白酶消化斑)

Fig.2
A:Electrophoresis of trypsin by SDS-PAGE
Arrow indicates trypsin band
B:Trypsin incubation with casein after SDS-PAGE
Arrow indicates trypsin visulation

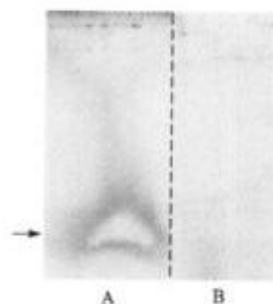


图 3
A:WSSV 非变性 SDS-PAGE 电泳图
(箭头示酪蛋白酶消化斑)
B:WSSV 经 SDS-PAGE 并酪蛋白孵育后染色图
Fig.3
A:Incubation with casein after SDS-PAGE
Arrow indicates protease visulation
B:Electrophoresis of WSSV by SDS-PAGE

2.2 不同处理条件对 WSSV 多肽分离效果的影响

图4和图5示出不同处理条件对 WSSV 多肽解离的影响。结果表明,温度在 40~50℃,SDS 载样缓冲液 I 对 WSSV 多肽解离无显著影响(图5);采用载样缓冲液 II 时,DTT 在低温条件下对 WSSV 多肽解离无显著影响,在加热条件下,DTT 对

WSSV 多肽有明显的裂解作用;考虑 WSSV 蛋白酶对温度易感性,因此采用室温下(20℃)将 WSSV 与 SDS 载样液 I 混合,通过 SDS-PAGE 分离 WSSV 各多肽进行蛋白酶活性测定,以确定 WSSV 具蛋白酶活性的肽段。

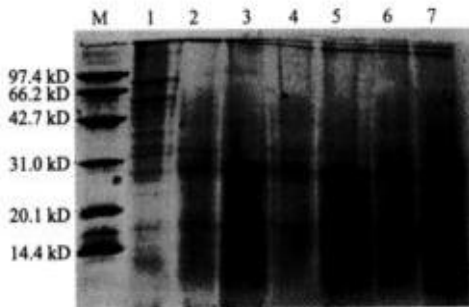


图4 DTT 对 WSSV 多肽解离的影响

1:样品煮沸(5 min)(含 DTT);2,3:20℃(不含 DTT);4,5:振荡 20 min(含 DTT);6,7:振荡 20 min(不含 DTT);M:分子量标准。

Fig.4 Effect of DTT on separation peptide of WSSV

1:Heat at 100℃(5 min)(with DTT);2 and 3:20℃(without DTT);4 and 5:Stirring for 20 min(with DTT);6 and 7:Stirring for 20 min(without DTT);M:Marker.

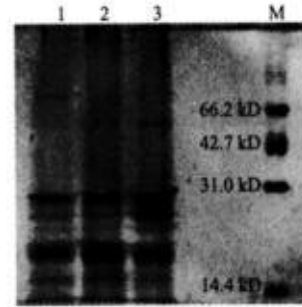


图5 不同处理条件对 WSSV 多肽解离的影响

1.50℃加热 15 min;2.40℃加热 15 min;3.样品不加热;M:分子量标准。

Fig.5 Effect of temperature on separation of WSSV

1:Heat at 50℃(15 min);2:Heat at 40℃(15 min);3:No heat;M:Marker.

2.3 WSSV 多肽的分离及蛋白酶活性的检测

WSSV 经 SDS-PAGE 电泳分离,各多肽进行洗脱回收,真空干燥,用双蒸水定容各分离组份于相同体积,测定各组份蛋白酶活性,其结果见表1。表1的结果表明,与空白对照组相比,Vp19 组份的蛋白酶活性最高,而 Vp24、Vp26 和 Vp28 的蛋白酶活性不显著,因此 WSSV 所表现的蛋白酶活性,其主

导活性组份是 Vp19。图6示出在最佳 WSSV 多肽分离条件下,克氏原螯虾中提取 WSSV 的 SDS-PAGE 图。图7示出 WSSV 多肽经 SDS-PAGE 分离和洗脱回收各组份的 SDS-PAGE 图。从图中可看出,洗脱回收的 Vp19、Vp24、Vp26、Vp28 均为单一组份,表明实验采用的蛋白洗脱方法所得到的蛋白纯度很高。

表1 WSSV 经 SDS-PAGE 分离洗脱回收蛋白质测定的各多肽蛋白酶活性

Table 1 Proteinase activity of WSSV after elution from SDS-PAGE

项目 Item	Vp19	Vp22	Vp24	Vp26	Vp28	空白 Control
OD ₆₈₀	0.263	0.061	0.174	0.177	0.188	0.049
对照 OD-control	0.214	0.012	0.125	0.128	0.139	0.000

3 讨论

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,蛋白水解酶参与了结构和非结构蛋白的分离、RNA 聚合酶的产生、病

毒粒子的组装和成熟,因此蛋白酶对许多病毒基因表达起重要作用。其功能的发挥与病毒和宿主细胞的相互作用以及病毒的致病机理等方面也有重要关系。对病毒蛋白酶生物学功能的调节是发展抗病毒药物重要的策略之一,因此有关病毒蛋白酶的研究

具有重要的意义。

随着 WSSV 基因组研究的不断深入,该病毒的一些基因被证明编码不同的酶。van Hulten 等^[14]确定 WSSV 染色体中含有 2 种核苷还原酶基因。Lin 等^[15]采用昆虫杆状病毒表达系统表达了 WSSV 核苷还原酶,研究表明,该酶在 WSSV 侵染对虾细胞过程中活性增加,说明它对 WSSV 感染有作用。Tsai 等^[16]确定了 WSSV 基因中编码胸苷激酶和胸苷酸激酶,继而 Tzeng 等^[17]用杆状病毒表达系统表达了该酶的基因,重组 WSSV 胸苷激酶和胸苷酸激酶类似于真核细胞质中的胸苷激酶,胸苷激酶活性随着 WSSV 对对虾感染的增强而增加,认为胸苷激酶参与 WSSV 对对虾的感染。Liu 等^[18]研究了 *Eco*R I 酶切 WSSV 基因,发现在 8 421 bp 的开放阅读框上编码含 715 个氨基酸的多肽,多肽的序列分

析表明,其与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(PK)有很高的同源性,通过体外转录和翻译,得到分子量为 87 kD 的蛋白激酶。van Hulten 等^[19]研究发现在 *Eco*R I 酶切的 WSSV 囊膜蛋白 Vp28 基因的 8.4 kb 片段上有蛋白激酶基因,此蛋白激酶基因位于 2 193 bp 的开放阅读框上,与其他病毒及胚胎蛋白激酶基因具有很高的同源性,并且是丝氨酸/苏氨酸类蛋白激酶^[20-21]。本研究采用 SDS-PAGE 方法分离蛋白质,结合洗脱从胶中回收蛋白质。表 1 列出 WSSV 经 SDS-PAGE 分离,再洗脱回收蛋白质,测定各多肽蛋白酶活性的结果,结果表明,Vp19 的蛋白酶催化活性最高。这一结果提示 Vp19 在 WSSV 复制与组装过程中起重要作用,有关 Vp19 在 WSSV 复制及侵染对虾过程中的功能值得进一步研究。

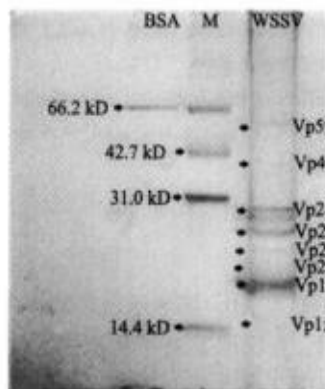


图6 克氏原螯虾中提取 WSSV 的 SDS-PAGE 图
(BSA:牛血清白蛋白;M:分子量标准;)

Fig.6 SDS-PAGE of WSSV virions from crayfish
(BSA: Bovine serum albumin M: marker)

由于 WSSV 中含有大量的疏水蛋白,加入表面活性剂可增强疏水性蛋白的溶解性,但大量的离子型表面活性剂(如 SDS)可使蛋白酶变性,使用非离子表面活性剂如 TritonX-100, Nonidet P-40 与蛋白结合难以转到 SDS-PAGE 凝胶中,而采用还原剂可破坏蛋白质的二硫键,此外蛋白酶活性与温度密切相关,过高的温度将导致蛋白酶失活,因此本实验采用低温裂解 WSSV 多肽。WSSV 经 SDS-PAGE 后,清晰可见 10 条带。采用 Gel-pro3.1 软件分析各蛋白的分子量,各多肽的分子量分别为 Vp15、Vp19、Vp22、Vp24、Vp26、Vp28、Vp40、Vp59 以及大于 97 kD 的 2 个多肽。Marielle^[11]的研究表

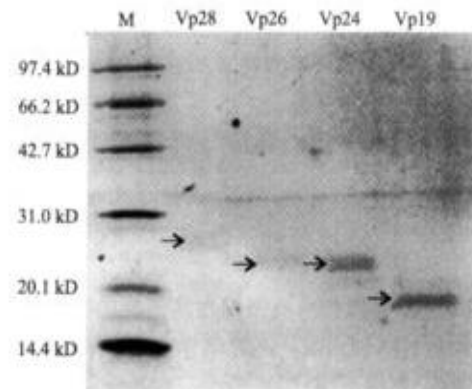


图7 WSSV 多肽经 SDS-PAGE 分离和洗脱回收各蛋白质的电泳图

Fig.7 SDS-PAGE of protein from WSSV by electric-elution

明,WSSV 主要含有 4 种结构蛋白,分别为 Vp28、Vp26、Vp24 和 Vp19。Vp26 和 Vp24 为核衣壳结构蛋白,Vp28 和 Vp19 为囊膜蛋白。氨基酸序列分析及同源性分析表明,Vp24、Vp26 和 Vp28 具有很高的同源性,表明这些结构蛋白在病毒组装过程中分化形成不同的蛋白而在囊膜和核衣壳结构中发挥不同的生物学功能。Huang 等^[12]采用蛋白分析的方法分析 WSSV 中的多肽,从 WSSV 的 SDS-PAGE 图谱中的 24 个蛋白条带中确定了 18 种 WSSV 结构蛋白基因,除 Vp28、Vp26、Vp22、Vp19 为囊膜蛋白外,Vp466 也为囊膜蛋白,而 Vp15 和 Vp24 为核衣壳蛋白^[11,13]。采用低温裂解 WSSV 多肽,在低

分子量区域, WSSV 各结构多肽与 Marielle^[11] 和 Huang 等^[12] 所报道的结果一致, 但在分子量大于 31 kD 以上区域, WSSV 多肽条带明显少于 WSSV 在完全变性条件下 SDS-PAGE 图中的 WSSV 条带(图 4), 表明 WSSV 全病毒中有大量含有巯基的结构区域。初步的蛋白酶谱的实验结果(图 3)表明, WSSV 中具蛋白酶活性的组份位于低分子量区域, 因而采用低温裂解 WSSV 多肽可满足实验的要求。

酪蛋白是蛋白酶的通用性底物, 胰蛋白酶经 SDS-PAGE 后, 在 SDS-PAGE 电泳凝胶板上可分解酪蛋白, 经考马斯亮蓝染色后, 在被降解的位置就出现透明带或透明斑, 即蛋白酶的活性带。WSSV 经 SDS-PAGE 后, 蛋白酶谱结果也显示出白斑, 表明 WSSV 中存在有蛋白酶的活性。由于 WSSV 在 SDS-PAGE 胶中各蛋白条带较多, 且蛋白条带位置相距较近, 因此从蛋白酶谱图上难以定位蛋白酶, 该方法对 WSSV 蛋白酶可作为定性分析。

SDS-PAGE 作为一种常规的蛋白质分离及分析手段, 具有简便、迅速的优点, 由于蛋白质经考马斯亮蓝染色及固定后, 凝胶中蛋白质几乎不再溶解, 因此实验中将 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 将含分子量标准和样品的凝胶切下进行常规蛋白质染色, 以确定 WSSV 各蛋白的分子量, 另一部分凝胶, 按已染色、脱色蛋白条带清晰的 WSSV 各蛋白位置切下, 然后进行蛋白质回收, 分析各部分蛋白的蛋白酶活性。此外由于 WSSV 蛋白组成复杂, 且纯化的病毒样品量少, 采用柱层析等方法难以满足实验要求, 因此, 从 SDS-PAGE 中回收蛋白在本项研究中较为实用。图 7 为 WSSV 多肽经 SDS-PAGE 分离和洗脱回收各蛋白质电泳图, 验证结果显示, Vp28、Vp26、Vp24 和 Vp19 均为单一带, 说明该分离纯化方法可靠。为减少染色、脱色时间, 防止未染色凝胶中的蛋白扩散, 实验中采用考马斯亮蓝 R250 染色液短暂染色后, 直接用 250 mmol/L KCl 溶液脱色, 其染色、脱色清晰度与常规染色、脱色法接近, 但整个过程仅需 1 h^[22]。

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, 孟庆显. 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]. Journal of Virology, 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] VanHulten M C, Wittereldt J, Peter S. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. Virology, 2001, 286, 7-22.
- [10] 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.
- [11] Marielle C W, van Hulten, Rob W, et al. Three functionally diverged major structural proteins of White Spot Syndrome Virus evolved by gene duplication [J]. Journal of General Virology, 2000, 81: 2 525-2 529.
- [12] Huang C, Zhang X, Lin Q, et al. Proteomic analysis of shrimp white spot syndrome viral proteins and characterization of a novel envelope protein Vp466 [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2002(1): 231-233.
- [13] van Hulten M C, Reijns M, Vermeesch A M, et al. Identification of Vp19 and Vp15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins [J]. Journal of General Virology, 2002, 83: 257-265.
- [14] Van Hulten M C, Westerber M, Goodall S D, et al. Identification of two major protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. Virology, 2000, 266: 227-236.
- [15] Lin S T, Chang Y S, Wang H C, et al. Ribonucleotide reductase of shrimp white spot syndrome virus (WSSV): expression and enzymatic activity in a baculovirus/Insect cell system and WSSV-infected shrimp [J]. Virology, 2002, 304(2): 282-290.
- [16] Tsai M F, Yu H T, Tzeng H F, et al. 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.
- [17] Tzeng H F, Chang Z F, Peng S E. Chimeric polypeptide of thymidine kinase and thymidylate kinase of shrimp white spot

- syndrome virus: thymidine kinase activity of the recombinant protein expressed in a baculovirus/insect cell system[J]. *Virology*, 2002, 299(2): 248 – 255.
- [18] Liu W J, Yu H T, Peng S E, et al. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase[J]. *Virology*, 2001, 289(2): 362 – 377.
- [19] van Hulten M C W, Vlak J M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus[J]. *Virus Genes*, 2001, 22(2): 201 – 207.
- [20] Gomis, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1 323 – 1 337.
- [21] Hayakawa T, Ko R, Okano K, et al. Sequence analysis of the *hestia C-nigrum granulovirus* genome [J]. *Virology*, 1999, 262: 277 – 297.
- [22] 康 彬. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS – 聚丙烯酰胺凝胶电泳染色 – 脱色方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(2): 210 – 211.

Identification of peptide with protease activity from white spot syndrome virus (WSSV)

LIU Qing-hui^{1,2}, HUANG Jie¹, JIA Pei-qiao¹, WANG Qing-yin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is a major pathogen in the cultivated shrimp. In this research, the protein fraction of protease activity was identified. The protease activity from shrimp WSSV was characterized with protease profile using a combination of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and protease digestion. The result showed that there was a digestion band when electrophoresis gel was incubated with casein after SDS-PAGE. In order to identify the peptide with protease activity, the effect of DTT and temperature for separation polypeptide of WSSV was identified. The optimum condition for splitting polypeptide of WSSV was at low temperature (20 °C). The peptide component was separated by SDS-PAGE combination with electric elution. Protease activity of five elution component of WSSV (Vp19, Vp22, Vp24, Vp26, Vp28) was evaluated. The primary result was that Vp19 of WSSV is of the main component of protease-activity.

Key words: WSSV; protease; peptide identification

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