

急性病毒性坏死病毒 dUTPase 基因的克隆、 表达及其产物的酶学活性分析

贾志磊^{1,2}, 王崇明^{2*}, 任伟成³, 梁彦韬², 曲朋^{1,2}, 李赞¹

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 哥德堡大学, 瑞典 哥德堡 S-413 46)

摘要: 根据已测定完成的栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 基因组序列, 设计特异性引物, 以提取的发病扇贝组织总 DNA 为模板, PCR 扩增得到编码 AVNV dUTPase 的开放阅读框 ORF074, 将产物克隆至原核表达载体 pET32a(+) 中, 构建表达质粒 pET32a-dut。然后, 将其转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达。SDS-PAGE 检测显示, 诱导表达蛋白分子量约为 46 ku, 与预期表达蛋白大小一致。经 Western-blotting 及质谱分析鉴定, 所表达蛋白即为重组 dUTPase。表达产物经 Co^{2+} 柱纯化后进行酶学活性测定。结果显示, 重组 dUTPase 能特异性催化 dUTP, EDTA 可以抑制 dUTPase 的活性, 而 Mg^{2+} 可以增强其活性。

关键词: 栉孔扇贝; dUTP 焦磷酸酶; 急性病毒性坏死病毒; 原核表达; 酶学活性

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

急性病毒性坏死病毒 (acute viral necrosis virus, AVNV) 是引起我国北方沿海养殖栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 夏季大规模死亡的致病病原, 为双链 DNA 病毒, 病毒颗粒为具囊膜的二十面体结构, 直径大小为 130 ~ 170 nm^[1-5]。通过对 AVNV 全基因组序列的测定分析, 预测 AVNV 基因组中含有 123 个潜在的开放阅读框 (open reading frames, ORF), 其中 44 个 ORF 具有一定的结构和功能, 推测可能与病毒 DNA 复制、核酸代谢、修饰以及病毒与宿主相互作用等有关。而 ORF074 推测为编码脱氧尿苷焦磷酸酶 (dUTP pyrophosphatase, dUTPase) 的基因, 主要与病毒 DNA 复制有关^[6]。

dUTPase 是 DNA 合成中的一种重要的酶, 广泛存在于真核、原核细胞和病毒等生物有机体中, 它通过催化水解脱氧尿苷三磷酸 (dUTP), 减少尿嘧啶在 DNA 合成中的错误掺入, 降低细胞中的 dUTP/dTTP 比例, 保证 DNA 复制的正确性和

顺利进行^[7]。病毒 dUTPase 与病毒的毒力和高效复制密切相关。研究发现 I 型疱疹病毒 dUTPase 基因的缺失可导致病毒的神毒性、神经感染力和从潜伏期再激活能力的相应减弱^[8]; 逆转录病毒的 dUTPase 可以降低逆转录过程中局部 dUTP 水平, 减少 dUTP 在逆转录过程的错配及降低基因重组突变频率和点突变的发生水平^[9]; COTTONE 等^[10]发现痘病毒 (Orf virus) 强毒株 dUTPase 活性明显高于弱毒株 dUTPase 活性。由于 dUTPase 在病毒感染、复制中的独特作用, 多种哺乳动物病毒的 dUTPase 已被广泛研究^[11-15]。但在水产动物病毒中, 类似的研究报道仅涉及对虾白斑综合征病毒^[16]和沼泽绿牛蛙虹彩病毒^[17]。

目前国内外很少有关于 AVNV 功能基因研究的相关报道, 本研究在本实验室完成的 AVNV 全基因组测序基础上, 尝试对 AVNV 致病相关的 dUTPase 基因展开研究, 以便在分子水平上加深

收稿日期: 2011-04-02

修回日期: 2011-05-09

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA100307); 现代农业产业技术体系建设专项资助 (nycytx-47)

通讯作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

对 AVNV 感染扇贝机制的认识,并为从分子水平探究 AVNV 的致病机理及急性病毒性坏死症 (acute viral necrosis disease, AVND) 的防治提供可能的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

表达载体 pET32a(+) 由本实验室保存; DH5 α 菌株、BL21(DE3) 菌株为天根公司产品; 限制性内切酶、T₄ 连接酶、*Ex Taq* 酶分别购自 MBI 公司、北京全式金公司和 TakaRa 公司; 脱氧核苷酸为 Promega 公司产品; BCA 蛋白定量测定试剂盒购自博迈德公司; Co²⁺ 琼脂糖凝胶纯化柱为 Clontech 公司产品; 胶回收及质粒提取试剂盒均为 OMEGA 公司产品; PCR 引物合成和 DNA 的测序由上海生工生物有限公司完成。

1.2 AVNV 粗提液的制备与总 DNA 提取

取 2009 年 8 月采自青岛沙子口具典型发病症状的栉孔扇贝冻存样品, 将扇贝组织在冰上用海水反复冲洗解冻, 加 10 倍体积除菌海水后, 用高速匀浆机 20 000 r/min 匀浆 4~5 次, 每次 1 min; 将匀浆液以 1 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 弃沉淀, 将上清 2 500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C, 离心 1 h, 弃沉淀, 将其上清 7 500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C, 离心 30 min, 取上清即为 AVNV 粗提液, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

AVNV 病毒粗提液总 DNA 提取按照天根公司生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书要求的方法进行。

1.3 PCR 引物设计、AVNV-DUT 基因的克隆及重组表达载体的构建

根据本实验室测定完成的 AVNV 基因组序列中的 ORF074 序列, 运用 Premier 5 设计上、下游引物, 由上海生工生物有限公司合成。上游引物 F1: 5'-GGATCCATGAGTTTCATAGTCGAGA-3', 划线部分为添加的 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物 R1: 5'-AAGCTTTTAAACTCATAATAACTT-3', 划线部分为添加的 *Hind* III 酶切位点。

以提取的病毒粗提液总 DNA 为模板, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。将扩增出的约 750 bp 的 PCR 产物切胶回收并连接至 pEasy-T1 载体中, 做 TA 克隆并测序。T 克隆质粒

经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后回收目的片段, 与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的原核表达载体 pET-32a(+) 连接、转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 小量提取质粒酶切鉴定。鉴定正确的重组表达载体命名为 pET32a-dut。

1.4 重组蛋白的诱导表达、纯化

验证的 pET32a-dut 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日按 1:100 接种到新鲜 LB 培养液(含 Amp 100 μ g/mL) 中, 待培养至 OD₆₀₀ = 0.6 左右时, 取 1 mL 另行培养(不进行诱导), 其余菌液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4~5 h, 收集菌液离心, 弃上清, 沉淀中加入裂解 Buffer 超声破碎, 10 000 r/min, 离心 10 min, 上清及沉淀分别取样加入 SDS 上样缓冲液, 75 $^{\circ}$ C 煮沸变性 10 min, 12% SDS-PAGE 电泳观察表达情况。

按 Clontech 公司 Co²⁺ 亲和层析说明书进行重组 dUTPase 的纯化。先将超声裂解的菌液 10 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 3~5 min, 弃上清; 加洗涤 buffer (Tris-HCl pH = 8.0, 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; NaCl 50 mmol/L; 尿素 2 mol/L; Triton X-100 0.5%) 反复吹打, 充分洗涤菌液, 10 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 2 min, 弃上清, 重复 3 次; 加 A 液 (NaH₂PO₄ 0.2 mol/L; Na₂HPO₄ 0.2 mol/L; Gua-HCl 6 mol/L; NaCl 0.3 mol/L; pH = 7.0) 溶解, 10 000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 2 min, 收集上清并用 0.45 μ m 滤膜过滤; 用 A 液洗柱, 至洗出液 280 nm 光吸收为 0, 加溶解的重组蛋白, 用 A 液洗柱, 至洗出液 280 nm 光吸收再次为 0; 加 C 液 (NaH₂PO₄ 0.2 mol/L; Na₂HPO₄ 0.2 mol/L; Gua-HCl 5.4 mol/L; NaCl 0.27 mol/L; Imidazole 0.15 mol/L; pH = 7.0), 当吸收值升高开始收集, 收集至吸收值不再变化, 收集液中即含纯化的重组蛋白。

1.5 重组蛋白包涵体的复性

将纯化的蛋白先在透析复性 Buffer I (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 4 mol/L; 甘氨酸 1%; Tris-HCl pH = 8.0, 50 mmol/L) 中透析 24 h, 再转移至透析复性 Buffer II (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; 甘油 10%; 尿素 2 mol/L; Tris-HCl pH = 8.0, 50 mmol/L) 中透析 24 h, 最后在透析复性 Buffer III (NaCl 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; Tris-HCl pH = 8.0, 50

mmol/L)中透析 24 h,超滤离心,5 000 × g,30 min。将浓缩后的重组蛋白 -80 ℃ 保存备用。

1.6 重组 dUTPase 的鉴定、含量测定

将纯化的重组 dUTPase 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,用抗 His 标签的抗体进行 Western-blotting 验证并将重组蛋白送交上海博苑进行质谱分析。

重组 dUTPase 蛋白含量的测定参照博迈德公司 BCA 蛋白测定试剂盒操作说明,测定分离纯化后的重组 dUTPase 的蛋白含量。

1.7 重组 dUTPase 的酶学活性分析

PPi 标准曲线的绘制 参照 GRINDEY 等^[18]的方法绘制焦磷酸的标准曲线,先配制 100 mmol/L 的焦磷酸储存液,待用时 1:100 稀释成 1 mmol/L 的工作液。取 10 个 1.5 mL 离心管,分别加入 0、10、20、……90 μL 焦磷酸工作溶液(1 mmol/L),补加双蒸水至 800 μL,混匀。每管依次加入 50 μL 钼酸试剂、100 μL 亚硫酸试剂(A)及 50 μL 10% β-巯基乙醇,混匀,室温下显色 10 min。再依次加入 100 μL 亚硫酸试剂(B)、50 μL 10% β-巯基乙醇及 100 μL 无水乙醇并混匀,测定 575 nm 处的 OD 值,绘制吸光值与焦磷酸浓度的线性相关曲线。

重组 dUTPase 的底物特异性试验 将分离纯化的重组 dUTPase 37 ℃ 预热 5 min,在 12 个 1.5 mL 离心管中加入 3 μL dUTPase 和 3.5 μL 10 mmol/L dUTP、dATP、dGTP、dCTP 或 dTTP 的不同组合(正常体系),同时设相应的只加酶或底物的阴性对照(对照体系)。用 Tris-HCl(0.05 mol/L,pH 8.0)补齐反应总体积至 60 μL,混匀,37 ℃ 水浴 10 min,再加双蒸水至 800 μL 并混匀,其它步骤同“1.5”,检测 575 nm 处的 OD 值。

重组 dUTPase 的活力、活力单位和比活力的测定 取 5 个 1.5 mL 离心管分别加入 10、20、30、40 和 50 μL 重组 dUTPase(2.863 mg/mL),37 ℃ 预热 5 min。各管分别加入 1 μL dUTP(100 mmol/L),37 ℃ 水浴 1 min 后终止反应,再加双蒸水至 800 μL 并混匀,检测 575 nm 处的 OD 值。

金属离子和 EDTA 对重组 dUTPase 活力的影响 取 13 个 1.5 mL 离心管,在酶反应体系中加入不同量组合的 EDTA(0.5 mmol/L)和金属离子(1 mmol/L),其它步骤同“PPi 标准曲线的绘制”,检测 575 nm 处的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 AVNV dUTPase 基因 PCR 扩增及鉴定

以提取的 AVNV 病毒粗提液总 DNA 为模板,PCR 扩增得到一条约 750 bp 大小的片段,与预期大小一致(图 1)。TA 克隆并测序,经证实扩增条带即为目的条带。

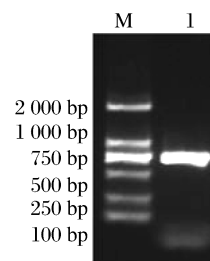


图 1 AVNV dut 基因编码框的 PCR 扩增结果

M. DNA marker; 1. PCR 产物。

Fig. 1 PCR amplification products of the AVNV dut open reading frame(ORF)

M. DNA marker; 1. PCR products.

2.2 重组 dUTPase 的诱导表达及鉴定

将经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切、测序验证正确的重组质粒 pET32a-dut 转化至表达菌 BL21(DE3),IPTG 诱导重组蛋白表达,经 12% SDS-PAGE 电泳,在 46 ku 处出现一条预期大小的蛋白条带(图 2)。图 2 显示重组蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中。Western-blotting(图 3)及质谱分析证实所表达蛋白即为重组 AVNV dUTPase。

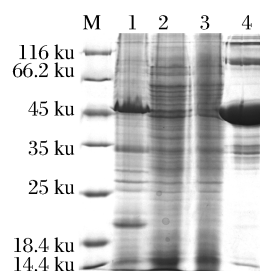


图 2 pET32a-dut 重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE(12%)电泳图

M. 蛋白分子量 marker; 1. 诱导后重组阳性菌超声沉淀; 2. 诱导后重组阳性菌超声上清; 3. 未诱导重组阳性菌; 4. 纯化后的重组蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE(12%) analysis of recombinant protein pET32a-dut

M. protein molecular marker; 1. precipitate after sonication of pET32a-dut; 2. supernatant of induced pET32a-dut after sonication; 3. pET32a-dut uninduced; 4. purified recombinant dUTPase.

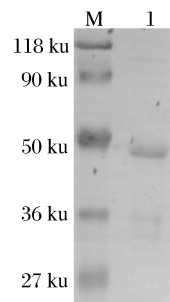


图3 Western-blotting 检测重组蛋白以 His 标签抗体作为一抗

M. 蛋白分子量 marker; 1. 重组 dUTPase。

Fig.3 Recombinant protein detected by Western-blotting using His-tag antibody

M. protein molecular marker; 1. Recombinant dUTPase.

2.3 dUTPase 纯化和蛋白含量的测定

表达产物经 Co^{2+} 琼脂糖凝胶分离纯化,得到一条约 46 ku 的特异蛋白条带,其纯度可达 90% 以上。用 BCA 蛋白测定试剂盒测定纯化 dUTPase 的蛋白含量为 2.53 mg/mL。

2.4 dUTPase 酶活性测定

标准曲线的绘制 焦磷酸的量与 575 nm 光吸收值的标准曲线(图 4),各组数据间的相关性为 0.980 8。

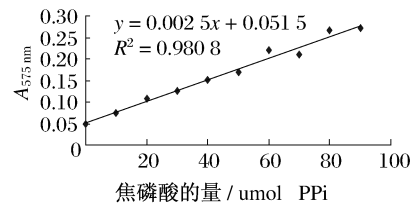


图4 PPi 物质的量与在 575 nm 处吸光度的标准曲线

Fig.4 The standard curve of PPi determined at 575 nm

底物特异性试验 dUTPase 与 dUTP、dATP、dTTP、dGTP、dCTP 等不同底物的催化反应结果见图 5。结果表明,dUTPase 对 dUTP 的催化活性与其他几种脱氧核苷酸之间存在显著差异,能比较特异的催化 dUTP。

dUTPase 的活力测定 计算表 1 中 5 组 dUTPase 添加量与产物 PPi 之间的相关性,1~5 组数据中酶的添加量与代谢产物 PPi 之间的线性相关系数是 0.983 4。重组 dUTPase 每分钟水解 1 nmold UTP 所需的酶量为 17.210 9 μg ,纯化的 dUTPase 1 个酶活力单位为 17.210 9 μg ;因此纯化的 AVNV 重组 dUTPase 的比活力为 58.1027 U/mg。

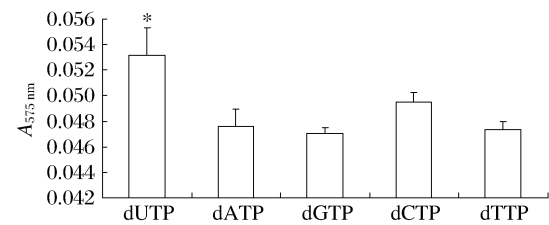


图5 dUTPase 的底物特异性反应

“*”表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig.5 Specificity of the recombinant dUTPase for different substrates

A asterisk(*) indicates significant differences($P < 0.05$).

表1 不同浓度重组 dUTPase 575 nm 处的光吸收值

Tab.1 Absorbency of recombinant dUTPase at 575 nm

	dUTPase/ μg	$A_{575\text{nm}}$	PPi/(nmol/L)
1	25.3	0.056 669	2.067 6
2	50.6	0.057 853	2.541 2
3	75.9	0.059 517	3.206 8
4	101.2	0.060 09	3.436
5	126.5	0.061 877	4.150 8

不同金属离子和 EDTA 对重组 dUTPase 活力的影响 根据图 6 结果可知,EDTA 可以抑制 AVNV dUTPase 的活性,使 dUTPase 的活性降低了 17.77%; Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 可以增强其活性;其中 Mg^{2+} 对 dUTPase 活性的增强作用最明显,使 dUTPase 的活性增加了 26.7%。同时金属离子可以恢复被 EDTA 抑制了的 dUTPase 的活性,其中以 Mg^{2+} 的效果最明显,可以使抑制了的 dUTPase 恢复 99.77% 的活性, Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ca^{2+} 的恢复能力分别依次为 87.8%、87.53%、87.9%。

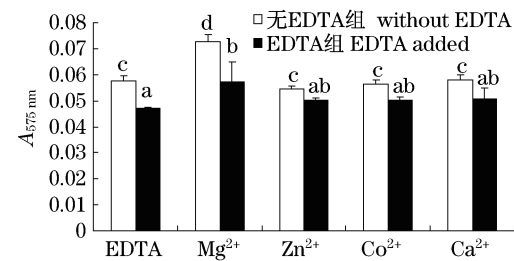


图6 EDTA 和金属离子对重组 dUTPase 活性的影响

字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig.6 The effect of EDTA and metal ion on the activity of dUTPase

Different letters indicate significant differences($P < 0.05$).

3 讨论

通过对本实验室测定完成的 AVNV 全基因组序列分析,发现了可能编码 dUTPase 的基因。dUTPase 具有重要作用,它可以减少 DNA 复制过程中尿嘧啶的错误掺入,保证 DNA 复制过程的正确性和顺利进行,且与病毒的毒力和高效复制密切相关^[7,24]。为进一步从分子水平上探究扇贝大规模死亡的暴发机制,在对 AVNV 全基因组分析的基础上,作者设计了特异性引物,扩增出编码 AVNV dUTPase 的基因,进行了原核表达、纯化并进行了 SDS-PAGE、Western-blotting 及质谱分析鉴定。鉴定结果表明,我们表达和纯化所得的重组 dUTPase 与预期相符。本实验中,重组 dUTPase 主要以包涵体形式存在于细胞裂解后的沉淀中,对重组 dUTPase 包涵体复性后,重组 dUTPase 能以可溶形式存在,并且复性后的重组 dUTPase 显示了一定的活性,用 Co^{2+} 琼脂糖凝胶对复性后的重组 dUTPase 进行纯化,得到纯度达 90% 以上的重组 dUTPase。对重组 dUTPase SDS-PAGE 分析可知,AVNV 重组 dUTPase 具有一个或多个相同的亚基,根据 MCGEEHAN 等^[19]的报道,包括无脊椎动物、鱼类、两栖动物等的疱疹病毒在内的 I 型疱疹病毒所编码的 dUTPase 也说明 AVNV 病毒可能属于疱疹病毒,这与任伟成等^[6]从基因组水平推测的 AVNV 病毒可能属于疱疹病毒的推论相一致。

目前 dUTPase 活性的测定方法有 3 种:(1)测定水解反应中 H^+ 释放量的酸碱指示光度分析法;(2)用放射标记的 dUTP 作薄层分析或液相层析分析;(3)利用磷钼酸与产物焦磷酸的显色反应来测定产物的量。前两种方法虽然灵敏度高,但操作麻烦,进行多次不连续的检测时很不方便。而第三种方法,通过实验确定反应体系后,可以建立适合进行多次不定期检测的方法,且该方法不需要特殊仪器,灵敏度较高,结果直观,可对酶的比活和影响酶活性的各因素进行研究^[21-22]。鉴于这 3 种方法的特点,结合本实验需要,采用第三种方法进行 dUTPase 活性的相关测定。本实验中,相对于其他几种单核苷酸来说,重组 dUTPase 对 dUTP 显示了较强的催化活性,能比较特异的催化 dUTP,这与之之前关于 dUTPase 性质的相关报道相符^[16,21-22]。另外,在本实验中

表达的 AVNV 重组 dUTPase 对包括 dUTP 在内的各种单核苷酸的催化活性都不是很强,这可能与 AVNV 重组 dUTPase 包涵体复性过程中造成了重组 dUTPase 部分活性丧失有关。

金属离子是 dUTPase 维持空间结构稳定性和发挥酶学活性的重要辅助因子, Mg^{2+} 可以保持 dUTPase 5'末端三磷酸亚基的正确空间构象,并且在 dUTPase 与底物结合的亲核攻击中起着定位的作用^[23]。EDTA 竞争性的与金属离子形成螯合物而减弱了 dUTPase 的活性;再次加入金属离子时酶的活性又能得到恢复。金属离子与 dUTPase 结合除了受离子所带电荷的影响外,金属离子的离子半径大小也起到了一定的作用^[24]。本文参考刘振勇等^[21]的方法选取了与 Mg^{2+} 所带电荷和离子半径都较接近的其它 3 种离子,结果表明 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子均能增强重组 dUTPase 的催化活性,其中 Mg^{2+} 作用效果最显著,影响效果由强到弱依次为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$;EDTA 能抑制重组 dUTPase 的活性,而 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子能在一定程度上解除这种抑制作用,研究验证了 Mg^{2+} 是 dUTPase 发挥酶学活性的重要辅助因子,与刘振勇等^[21]的相关报道结果一致。

目前,国内外尚未见关于 AVNV 功能基因研究的相关报道,而这些功能基因的研究对于从分子水平探究 AVNV 的致病机理具有重要作用。本文首次对 AVNV 致病相关的 dUTPase 基因进行了克隆、表达、纯化及酶活测定的相关研究,从分子水平上加深了我们对 AVNV 致病机制的认识。今后随着更多 AVNV 功能基因的发掘与探索研究的开展,必将在更高层次水平上揭示 AVNV 的感染机制,也将为 AVND 的防治提供必要的理论基础。

参考文献:

- [1] 宋微波,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展[J]. 海洋科学,2001,25(12): 23-26.
- [2] 王秀华,王崇明,李筠,等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查[J]. 水产学报,2002,26(2): 149-156.
- [3] 艾海新,王崇明,王秀华,等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究[J]. 中国水产科学,2003,10(5):386-391.

- [4] 王崇明,王秀华,宋晓玲,等. 栉孔扇贝一种球形病毒的分离纯化及其超微结构观察[J]. 水产学报, 2002,26(2):180-184.
- [5] 王崇明,王秀华,艾海新,等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(5): 547-553.
- [6] 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [7] ANDREW J D, NIGEL D S. New genes from old: redeployment of dUTPase by herpesviruses [J]. Journal of General Virology, 2005, 79 (20): 12880-12892.
- [8] PYLES R B, SAWTELL N M, THOMPSON R L. Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency [J]. Journal of Virology, 1992,66(11):6706-6713.
- [9] THREADGILL D S, STEAGALL W K, Flaherty M T. Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant [J]. Journal of Virology, 1993, 67 (5): 2592-2600.
- [10] COTTONE R, BUTTNER M, BAUER B. Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701 [J]. Virus Research, 1998,56(1):53-67.
- [11] STEVEN S, BROYLE S. Vaccinia virus encodes a functional dUTPase [J]. Virology, 1993, 195 (2): 863-865.
- [12] ELDER J H, LERNER D L, HASSELKUS-LIGHT C S. Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase [J]. Journal of Virology, 1992,66(3):1791-1794.
- [13] OLIVEROS M, GARCIA-ESCUADERO R, ALEJO A. African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages [J]. Journal of Virology, 1999,73 (11):8934-8943.
- [14] WEISS R S, LEE S S, PRASAD B V. Human adenovirus early region 4 open reading frame 1 genes encode growth-transforming proteins that may be distantly related to dUTP pyrophosphatase enzymes [J]. Journal of Virology, 1997,71(3):1857-1870.
- [15] WOHLRAB F, FRANCKE B. Deoxyribopyrimidine triphosphatase activity specific for cells infected with herpes simplex virus type 1 [J]. Proc Natl Acad Sci, 1980,77(4):1872-1876.
- [16] LIU X Q, YANG F. Identification and function of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a dUTPase [J]. Virus Research, 2005, 110 (1-2):21-30.
- [17] ZHAO Z, KE F, GUI J F. Characterization of an early gene encoding for dUTPase in *Rana grylio* virus [J]. Virus Research, 2007,123(2):128-137.
- [18] MCGEOCH D J. Protein sequence comparisons show that the pseudoproteases encoded by poxviruses and certain retroviruses belong to the deoxyundine triphosphatase family [J]. Nucleic Acids Research, 1990,18(14):4105-4110.
- [19] MCGEEHAN J E, DEPLEDGE N W, MCGEOCH D J. Evolution of the dUTPase gene of mammalian and avian herpesviruses [J]. Curr Protein Pept Sci, 2001,2 (4):325-333.
- [20] TINKELENBERG B A, HANSBURY M J, LADNER R D. dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cancer Research, 2002,62(17):4909-4915.
- [21] 刘振勇,吕志慧,郑亚东,等. 猪囊尾蚴 dUTPase 基因的克隆、表达及其产物的酶学活性分析 [J]. 中国农业科学, 2010,43(1):192-199.
- [22] 陈巧林,任宏伟,康巧华,等. 人细胞核 dUTPase 的克隆表达及其酶学活性 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003,19(5):606-611.
- [23] CHAN S, SEGELKE B, LEKIN T. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* dUTPase: insights into the catalytic mechanism [J]. Journal of Molecular Biology, 2004,341(2):503-517.
- [24] ERSSON R, MCGEEHAN J, WILSON K S. Cloning, expression, purification, and characterisation of the dUTPase encoded by the integrated *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP β [J]. Protein Expression and Purification, 2005,42(1):92-99.
- [25] 招丽婵,程安春,汪铭书,等. 病毒 dUTPase 研究进展 [J]. 生命科学, 2008,20(2):304-308.
- [26] 招丽婵,程安春,汪铭书,等. 鸭瘟病毒 dUTPase 基因克隆、原核表达及在病毒感染宿主亚细胞中的定位分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8): 1087-1093.

Cloning, expression of *Chlamys farreri* acute viral necrosis virus dUTPase gene and the determination of its enzymatic activity

JIA Zhi-lei^{1,2}, WANG Chong-ming^{2*}, REN Wei-cheng³, LIANG Yan-tao², QU Peng^{1,2}, LI Yun¹

(1. Key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

3. Department of Rheumatology and Inflammation Research, University of Gothenburg, Gothenburg S-413 46, Sweden)

Abstract: Acute viral necrosis virus (AVNV) was reported as one causative agent responsible for summer mass mortality of adult Zhikong scallop (*Chlamys farreri*), which is widely cultured along northern China coast. To explore its pathogenesis at the molecular level, we cloned a gene which was predicted to encode AVNV dUTPase based on the genomic sequence of *C. farreri* AVNV completed by our laboratory. The gene encodes a protein of 248aa with a predicted molecular mass of 26.4 ku. To obtain the *C. farreri* AVNV Open Reading Frame 074, which probably encodes AVNV dUTPase, a pair of specific primers was designed based on the genomic sequence of *C. farreri* AVNV. Then this paper amplified the expected DNA by PCR, using the total genomic DNA extracted from infected *C. farreri* tissues as template. Amplified PCR fragments were subcloned into the prokaryotic expression vector pET-32a(+). After that, we transformed the recombinant plasmid pET32a-dut into *E. coli* BL21 (DE3) strain and expressed it under IPTG induction. SDS-PAGE analysis showed that the molecular mass of the induced recombinant protein was about 46 ku. The Western-blotting and mass spectrometry analysis proved that the expressed protein is the target protein. Then we purified recombinant protein with Co^{2+} purification column and got the recombinant protein with a purity of more than 90%. The analysis of the enzymatic activity indicated that the recombinant dUTPase could specifically catalyse the hydrolysis of dUTP and the activity of enzyme was enhanced by Mg^{2+} while inhibited by EDTA.

Key words: *Chlamys farreri*; dUTP pyrophosphatase; acute viral necrosis virus (AVNV); prokaryotic expression; enzymatic activity

Corresponding author: WANG Chong-ming. E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn