

学校编码: 10384
学号: 20120051302136

分类号____密级____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP33 的功能研究
和非结构蛋白 wsv406 的初步鉴定

Functional Analysis of Envelope Protein VP33 and
Identification of non-structure protein wsv406 of White Spot
Syndrome Virus

林 易

指导教师姓名: 杨 丰 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 06 月

论文答辩时间: 2008 年 09 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 陈新华

评阅人: _____

2008 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在年解密后适用本授权书。

2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

厦门大学博硕

目录

摘要	1
Abstract	2
前言	4
1 对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 及其分子生物学研究	4
1.1 对虾白斑综合症病毒研究概况	4
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现和命名	4
1.1.2 对虾白斑综合症病毒的形态结构及理化特性	5
1.1.3 对虾白斑综合症病毒的组织病理学特征及感染过程	6
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的传播途径	6
1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化	7
1.2 对虾白斑综合症病毒的分子生物学研究进展	8
1.2.1 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究	8
1.2.2 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究	9
第一部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP33 基因的功能研究	21
1 本次实验的目的和意义	21
2 材料与方法	22
2.1 材料	22
2.2 方法	23
2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备	23
2.2.2 基因的克隆表达和蛋白质纯化	24
2.2.3 多克隆抗体的制备	26
2.2.4 Western blot 分析	26
2.2.5 Far-Western 分析	27
2.2.6 GST pull-down 分析	27
3 结果	27
3.1 <i>vp33</i> 基因的结构	27
3.2 (His) ₆ -VP33 和 GST-VP33 的诱导表达和纯化	29
3.3 Western blot 分析	30

3.4 VP33 与自身以及 VP24 之间的相互作用	32
4 讨论	36
第二部分非结构蛋白 wsv406 的初步鉴定	38
1 本实验的目的和意义	38
2 材料与方法	38
2.1 材料.....	38
2.2 方法.....	38
2.2.1 pGEX-2TH-wsv406 重组表达质粒的构建.....	38
2.2.2 GST-wsv406 在 <i>E. coli</i> BL-21 中的表达.....	39
2.2.3 Ni-NTA 柱变性条件下纯化重组蛋白及蛋白复性.....	39
2.2.4 多克隆抗体的制备	40
2.2.5 Western blot 分析.....	40
3 结果	40
3.1 wsv406 基因的结构	40
3.2 pGEX-2TH-wsv406 在 <i>E. coli</i> BL-21 中的诱导表达和纯化	40
3 讨论	43
参考文献	44
缩 略 词	53
附 录	54

CONTENTS

Chinese abstract	1
English abstract	2
Introduction	4
1 White spot syndrome virus (WSSV) and molecular biological research	4
1.1 Research of white spot syndrome virus	4
1.1.1 Finding and naming of WSSV	4
1.1.2 Characteristics of WSSV	5
1.1.3 Pathological characteristics and infection process of WSSV	6
1.1.4 Transmission and infectivity pattern of WSSV	6
1.1.5 Isolation and purification of WSSV	7
1.2 Advances in molecular biology research of WSSV	8
1.2.1 Genomics of WSSV	8
1.2.2 Proteomics of WSSV	9
Part I Functional identification of <i>vp33</i> gene from white spot syndrome virus	21
1 Investigations in this part of work and their significance	21
2 Materials and methods	22
2.1 Materials	22
2.2 Methods	23
2.2.1 Preparation of WSSV intact virions and nucleocapsids	23
2.2.2 Expression of gene and protein purification	24
2.2.3 Antibody preparation	26
2.2.4 Western blot	26
2.2.5 Far-Western blotting	27
2.2.6 GST pull-down analysis	27

3 Results	27
3.1 Structure of <i>vp33</i> gene	27
3.2 Expression and purification of (His) ₆ -VP33 and GST-VP33	29
3.3 Western blot	30
3.4 Interaction between VP33 and envelope proteins (VP24 and itself)	32
4 Discussion	36
Part II Identification of wsv406 gene from white spot syndrome virus	38
1 Investigations in this part of work and their significance	38
2 Materials and methods	38
2.1 Materials	38
2.2 Methods	38
2.2.1 Construction of recombinant plasmid of pGEX-2TH-wsv406	38
2.2.2 Expression of GST-wsv406 in <i>E. coli</i>	39
2.2.3 Purification of recombinant protein under denatured condition and protein renature	39
2.2.4 Antibody preparation	40
2.2.5 Western blot	40
3. Results	40
3.1 Structure of wsv406 gene	
3.2 Expression and purification of GST-wsv406	40
3 Discussion	43
References	44
Abbreviation	53
Appendix	54

摘要

对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是危害全球对虾养殖业的主要病毒病原之一。它是一种具有囊膜的、无包涵体的、类杆状双链环状 DNA 病毒,具有传染力强,致死率高,难防治的特点。由于其宿主范围广泛,能够侵染多种甲壳纲动物,对养殖业和海洋环境都构成了严重威胁。

本论文主要针对病毒结构蛋白开展研究。这有利于揭示病毒复制过程中的组装机制,从而为最终建立有效的防治方法提供有力的科学依据。研究工作主要分为两部分:(1)膜蛋白 VP33 的鉴定。之前的研究通过对完整病毒的结构蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和质谱鉴定后,结合氨基酸序列比对分析,已确定 VP33 为 WSSV 基因组中 ORF wsv254 编码的膜蛋白。本文分别在 *E. coli* XL₁-Blue 和 *E. coli* BL21(DE3)中表达纯化了带 6×His 和 GST 表达标签的重组 VP33 蛋白,并收集纯化所得的融合蛋白((His)₆-VP33)复性后注射小鼠获得特异性多克隆抗体。之后,利用 GST pull-down 分析和 Far-Western 印迹分析法证明了 VP33 与自身以及另一个主要膜蛋白 VP24 之间存在特异性的相互作用。(2)通过对 WSSV 全基因组的测序分析,我们获得了 ORF wsv406 的 DNA 序列。本文将 wsv406 全序列基因克隆至载体 pGEX-2TH,并在 *E. coli* BL21(DE3)中进行表达,得到以包涵体形式存在的不溶性融合蛋白。纯化收集后经包涵体复性得活性蛋白,注射小鼠获特异性多克隆抗体。

关键词: 对虾白斑综合症病毒; VP33; ORF wsv406。

Abstract

Shrimp white spot syndrome virus (WSSV) is a pathogen causing heavy mortality in shrimp farms throughout the world, which is known to be the most critical shrimp disease known until now. Virion is a rod-shaped, tightly covered with three-layered envelope and has a tail-like appendage at its end. The WSSV genome consists of a double-stranded DNA estimated to be well over 200 kb in size. This virus has an extremely wide range of potential hosts, infecting not only shrimps, but also other decapods. The cumulative mortality of diseased shrimp can reach 100% within 3 - 10 days. White spot syndrome (WSS) affects most of the commercially important shrimps and causes serious economic losses to the shrimp farming industry worldwide.

This paper is concerned about the structure proteins. Two main works are included as below. (1) Functional analysis of an envelope protein VP33, the product of the wsv254 gene of WSSV. It was reported that VP33(VP281) in the virion was identified as an envelop protein using western blot analysis and the transmission electron microscope immunogoldlabelling method. In this study, the wsv254 gene was inserted into the pQE-30 and pGEX-2TH vectors and expressed in *E. coli* XL1-Blue and *E. coli* BL21 (DE3) as (His)₆-tagged fusion protein and GST-tagged fusion protein respectively. The purified (His)₆-VP33 fusion protein was used to immunize 3-4-week-old Swiss Albino mice for the purpose of antibody preparation. Far-Western experiments showed that VP33 interacted with VP24, a major envelope protein of the WSSV virion, and itself. GST pull-down assays further confirmed the interaction between VP33 and VP24, as well as the interaction between VP33 and itself. (2) In this section, full-length recombinant protein encoded by the wsv406 gene of WSSV virion was expressed in bacteria and used as an antigen to generate antibodies in mice. The recombinant plasmid, pGEX-2TH-wsv406, was constructed and then

transformed into *E. coli* BL21(DE3) to express the target protein with a GST tag peptide at the N-terminus for detection. Cell lysates were sonicated and loaded onto a nickel affinity column, and recombinant protein was eluted with 0.25 M imidazole.

Key Words: White spot syndrome virus; VP33; wsv406.

前言

1 对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 及其分子生物学研究

1.1 对虾白斑综合症病毒研究概况

1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现和命名

自 20 世纪 70 年代末, 育苗和人工饵料技术的成功, 在世界范围内出现了对虾养殖热, 到 80 年代末, 人工养殖对虾已成为我国水产业的重要创汇和支柱产业之一, 然而, 病害一直是制约当前对虾养殖业持续发展的瓶颈问题。1992 年起亚洲各国养殖对虾相继暴发一种新的传染病, 不久该病就遍及全世界各国的对虾养殖业^[1]。该病典型症状为对虾甲壳内侧出现 0.5-2.0 mm 大小的白色斑点, 真皮易于剥离, 因此称该病为对虾白斑综合症。研究表明, 感染白斑综合症的的对虾在一周内死亡率高达 90-100%^[6], 而且除了绝大多数种类的对虾之外, 海洋生态体系中多种蟹类、龙虾类、端足类、水蝇类等甲壳纲动物均可感染该症^[7-9]。对虾白斑综合症不仅给对虾养殖业造成了巨大的经济损失, 也给海洋生态平衡带来了一定的威胁, 是生态环境和水产养殖安全等方面的巨大隐患。

造成对虾白斑综合症的病原体是一种无包埋体类杆状病毒^[2-5], 各地研究人员对该病毒进行了分离, 并各自进行了命名。日本学者将分离到的病毒命名为日本对虾杆状病毒 (RV-PJ), 中国学者黄捷等对发病对虾进行病理学研究后, 将分离病毒命名为皮下组织及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV), 台湾学者将之命名为白斑杆状病毒 (WSBV), 泰国及印度学者发现病虾中源自外胚层和中胚层的组织细胞均具有典型核肿大病变, 因此将分离到的病毒命名为系统性外胚层和中胚层杆状病毒 (SEMBV)。各地报道分离结果众多, 命名各异。由于缺少比较学研究, 不能说明这些病毒是同一种病毒, 但从各地研究结果来看, 所有这些在病毒形态特征、病毒病流行特点、感染组织、病理变化、临床症状及 PCR、核酸探针检测等方面具有相似性, 因而至少是紧密相关的同一类无包埋体病毒, Lightner 等建议将这些病毒暂时命名为白斑综合症病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV), 逐渐得到了普遍认同。

1.1.2 对虾白斑综合症病毒的形态结构及理化特性

WSSV 是迄今为止发现的最大的无脊椎动物病毒，国际病毒分类委员会 (ICTV) 第 7 次报告把 WSSV 放在线形病毒科 (Nimaviridae) 白斑病毒属 (Whispovirus)。WSSV 外形呈杆状，纵切面呈椭圆形，横切面为圆形，每个病毒粒子的一端有一个长的尾巴状的囊膜延伸物，类似于杆状病毒的鞭毛，宽约 18-30nm，长约 340-700nm，尾巴经常呈盘旋、卷曲状态，尾尖端膨大成纺锤形，完全伸展的尾部长度可达病毒体长的 1.5 倍以上^[2,12,13]。完整的病毒粒子中间浓染部分为核蛋白构成的髓核 (Nucleoprotein core)，外面包裹一层染色稍浅的蛋白质衣壳 (Capsid or Protein sheath) 共同组成的核衣壳 (Nucleocapsid)，最外层为脂双层囊膜 (Envelope)。密集病毒粒子在核内可形成局部晶状排列，但不形成核型多角体或颗粒体类包埋体 (Occlusion body)。完整的病毒粒子包裹有双层囊膜，内部结构不可见。但纯化的病毒的囊膜有不同程度的丢失现象。完全除去囊膜后，核衣壳呈螺旋圆柱体形，螺旋带几乎与衣壳长轴垂直，由蛋白颗粒环砌而成，每匝螺旋宽 20-26nm 左右，由两条平行螺旋夹一条中间带组成，相应的衣壳结构单位由每匝螺旋中两个边缘颗粒和一个中间颗粒构成，称为子粒。衣壳的两端为一对梯形帽状结构，帽状结构之间有 13-14 圈衣壳螺旋。不同的分离株和不同的宿主，病毒的形态结构可能会发生变化。报道的 WSSV 病毒大小不一，直径从 65nm-152nm 不等，长度从 260nm-404nm 不等。而核衣壳大小也是大小不一。

WSSV 对环境的抵抗力并不强，对乙醚和 56℃，30min 处理敏感，而游离病毒在温度为 28-32℃ 的海水中 4 h 后就失去感染力，但 Yang 等指出该病毒在虾池中的存活时间可以超过 2 年。从日本对虾分离的 WSSV 在 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 的 NaClO 处理 30min 后可失活，浓度加大到 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 时，处理 10min 即可使 WSSV 失活，而从斑节对虾分离的泰国株 WSSV 用 $10 \times 10^{-6} \text{M}$ 处理 30min 才能使它失活。WSSV 经剂量为 $9 \times 10^5 (\mu\text{Ws})/\text{cm}^2$ 的 UV 照 60min 后完全失活，高温 55℃ 处理 90min 或 70℃ 处理 5min 都能使 WSSV 失去活性。同时，室温下强酸 (pH 1.0) 处理 10min 或 pH 3.0 处理 1 h) 或强碱 (pH 12.0 处理 10min) 也能完全使 WSSV 失去感染力。体长 7cm 的死亡斑节对虾 28℃ 空气干燥，其携带的 WSSV 在 50 h 后失去活性。因此，紫外线、变性化学试剂、高盐、强酸、强碱、温度、湿度等对 WSSV 的感染活性均有不同程度的影响，并且不同 WSSV 分离株对外界因素影响的敏感性有所

不同。

1.1.3 对虾白斑综合症病毒的组织病理学特征及感染过程

WSSV 的发展有 3 个阶段:初期,病虾池边游动,拒食,偶尔浮出水面;中期,病虾静窝水底,胃肠空虚,头胸甲和腹甲易被揭开,且不粘连表皮,甲壳上呈现 0.5-2mm 的白斑^[10];后期,病虾对外界刺激反应迟钝,大多虾体微红,腹节肌肉略白,血淋巴稀薄不凝固,3-10 天内死亡率高达 100%。WSSV 对于虾的外胚层和中胚层来源的组织和细胞会造成系统性和广泛性的破坏,上皮组织和造血组织是病毒侵染的主要部位,其中对虾甲壳下表皮的表皮细胞和胃的上皮细胞最易感染病毒,鳃的上皮细胞、中肠的结缔组织及其它部位的结缔组织对 WSSV 敏感程度仅次于上述组织^[9,11]。

病毒通过摄食和呼吸,从口或鳃进入宿主体内;首先,病毒粒子与细胞表面特异受体结合后,病毒膜蛋白(Envelope protein)介导的病毒囊膜与宿主细胞膜融合作用进入细胞,在向核移动过程中,核衣壳蛋白逐渐降解,病毒 DNA 通过核孔进入宿主细胞核;接着,病毒 DNA 在细胞核内复制和转录,进行病毒的组装。病毒 DNA 首先出现在染色质的边缘,引起细胞核增大,病毒的形态形成始于膜在核质中的再形成以及分割的、空长管的形成,这些小管形成裸露的核衣壳,然后膜包被衣壳,核蛋白通过开口端进入衣壳,当完整的核衣壳形成后,囊膜(Envelope)在开口端收缩,形成成熟病毒粒子的顶端尾,无包涵体的病毒粒子形成,细胞破坏后释放出病毒粒子再感染其它细胞。病毒粒子的包装主要在细胞核内进行,有时也可在细胞质中进行^[15-18]。

1.1.4 对虾白斑综合症病毒的传播途径

水平传播是对虾白斑综合症病毒的主要传播途径,这与它广泛的宿主范围有着必然的联系^[19]。人工感染实验证明,通过注射、投食、浸泡三种感染方式均能造成 WSSV 的感染,其中投食感染的致死率最低。在对虾养殖场内,WSSV 通过食物网传播,或以海水为媒介直接进入宿主体内,造成小范围内的水平传播。而水产经济甲壳类动物的交换和贸易,对虾加工场的排污,以及运输过程中的设备污染这些环节造成了世界范围性的水平传播。1993 年日本对虾大量死亡的原因就是从中国福建引入大批带毒日本对虾苗种引起的。另一个典型的例子,在美国发

现几个养虾场的养殖对虾和国家动物园小龙虾被 WSSV 感染,推测可能的原因有:被 WSSV 感染的进口商品对虾在美国包装和加工过程中排放出含 WSSV 的废物和废水,从亚洲进口了发病的小对虾作鱼饵,货船外的带毒附着生物的迁移等。

目前,对对虾白斑综合征病毒是否能够通过患病亲虾垂直传播给其后代,尚没有定论。Lo 等运用 PCR 和原位杂交技术检测 WSSV 感染的靶器官,在对生殖器官的检测中,发现雄虾生精小管外围的结缔组织能被 WSSV 侵染,在雌虾的卵巢中,不同发育阶段的卵细胞均能被 WSSV 侵染,但在发育成熟的卵细胞中没有检测到 WSSV,于是他们推测被侵染的初级卵母细胞在发育成熟过程中被 WSSV 裂解致死。其它研究也证实^[20-22],在对虾的精巢与卵巢等生殖腺组织中均可检测到 WSSV,因此由这些组织释放病毒粒子感染对虾早期幼体的垂直传播存在一定的可能性。最近 Maeda 等用 WSSV 对日本对虾的卵巢原代细胞进行感染,发现 WSSV 的病毒粒子能在该原代细胞里增殖,并且在细胞核内发现有大量的病毒粒子存在。但这些研究结果并没有对 WSSV 的垂直传播问题提供最强有力的证据,仍需进行更多的研究工作。

1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化

对虾白斑综合症病毒的分离纯化工作是进行白斑综合症检测、预防和治疗所必需的基础。1995 年,台湾科学家最早报道了 WSSV 的分离纯化^[3,26]。研究者从感染 WSSV 的斑节对虾中分离纯化得到 WSSV 病毒粒子。并将病毒 DNA 用 *Sa*I 酶切后,克隆到质粒 pUC19 中,构建成 WSSV 基因组 DNA 文库。研究表明该病毒为双链 DNA,至少有 22 个 *Hind*III 酶切位点,大小超过 150 kb,但之后被证实所获得的病毒 DNA 是不完整的。1997 年,我们实验室建立了一种快速有效提取、纯化 WSSV 核衣壳及其完整基因组 DNA 的方法^[27],是病毒纯化分离技术上的极大突破。它不仅解决了之前病毒得率低的问题,也使研究者们首次获得了纯的完整病毒基因组 DNA,大小约为 290 kb。2000 年, van Hulst 等^[28,29]从泰国收集的患病草虾的血清中离心分离到完整的病毒粒子,用蛋白 N 端测序鉴定了 3 条主要的 WSSV 结构蛋白 (VP28、VP26、VP24),并在不久之后利用同样的方法从感染病毒的克氏螯虾的血清中分离到完整的病毒粒子,鉴定了另外 2 条主要的 WSSV 结构蛋白 (VP19、VP15)^[30]。

曾经,效率低下,纯度不高,而且纯化样品中包含较多的细胞污染物的病毒

分离方法严重制约了 WSSV 结构蛋白的鉴定及其功能研究工作的开展。后来,人们最常用的完整病毒纯化方法是密度梯度超速离心。黄等^[31]通过 40%溴化钠梯度超速离心从患病螯虾的血清中分离到较纯的病毒粒子。蛋白电泳显示病毒粒子包含至少 13 条结构蛋白。van Hulten^[32]通过 20-45%蔗糖梯度超速离心分离了病毒粒子,并完成了病毒基因组的测序工作。但是由于螯虾血清中病毒粒子量较少,梯度超速离心分离法仍无法解决病毒得率低的问题,平均的病毒得率约为 $1.8 \times 10^9 / 5 \text{ ml}$ 血清。加之由于螯虾血清中含有大量的血蓝蛋白,纯化的病毒蛋白电泳图谱中经常可见一条明显的血蓝蛋白条带(72 kDa)。

2005 年本实验室 Xie 等^[33]报道了一种简单有效的从感染螯虾组织中大量提取完整病毒粒子的方法。该方法不需要经过复杂的密度梯度超速离心,只需要几步普通的差速离心就可以得到大量的病毒粒子。在电子显微镜下观察,病毒粒子囊膜结构完整。蛋白电泳显示 WSSV 至少包含 23 条主要的结构蛋白。利用定量 PCR 测定病毒得率,从 10 g 的病虾组织中可以提纯约 10^{12} 个病毒粒子。提纯的病毒粒子经再感染健康螯虾证实仍然具有很强的感染活性。大量完整病毒粒子纯化方法的建立大大推动了 WSSV 感染包装机制的研究。

1.2 对虾白斑综合症病毒的分子生物学研究进展

1.2.1 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究

1.2.1.1 对虾白斑综合症病毒基因组结构

尽管在不同的地域、不同的宿主中能分离到不同的 WSSV 分离株,但 WSSV 基因组的差别都不大,都为大小在 300kb 左右的双链 DNA,是目前发现的基因组最大的动物病毒之一。目前发现的三个主要分离株(WSSV-TW、WSSV-CN、WSSV-TH)的全序列都已经测序^[32, 34~37],它们的大小分别为 307, 287bp(序列号:AF440570)、305, 107bp(序列号:AF332093)和 292, 967bp(序列号:AX151396)。序列分析表明 WSSV-CN 基因组有 531 个理论上的开放阅读框(WSSV-TW 为 532 个),其中编码 50 个氨基酸以上蛋白的开放阅读框(ORF)有 181 个(WSSV-TH 为 184 个)。在这 181 个 ORF 中 80%的下游序列含有 poly(A)尾信号(AATAAA)。WSSV 基因序列与其他已知的病毒或生物的序列同源性很低,在这 181 个 ORF 中仅有 18 个与其他已知基因序列有 40~68%的同源性。在整个基因组中,分布了 9 个同源区(homologous region, hr),它们不编码蛋白,每个同源区含有大约 250bp 长的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩