

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200226016

UDC_____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文
对虾白斑综合症病毒膜蛋白基因的鉴定及基因组同源重复区结合蛋白的初步研究

**Identification of the Envelope Protein Genes and
Primary Characterization of the Protein Binding to
the Homologous Repeat Regions of White Spot
Syndrome Virus**

朱艳冰

指导教师姓名: 杨丰、徐洵 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2005年7月15日

学位答辩时间: 2005年8月28日

学位授予日期: 2005年 月 日

答辩委员会主席: 苏文金

评 阅 人: 张荣庆

孙兵 徐安龙

关雄 李智星

2005年8月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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而产生的权利和责任。

声明人：朱艳冰

2005年7月12日

中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
前言.....	7
1 对虾白斑综合症病毒（WSSV）及其功能基因研究.....	7
1.1 对虾白斑综合症病毒研究概况.....	7
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的基本特征.....	7
1.1.2 对虾白斑综合症的病理特点.....	8
1.1.3 对虾白斑综合症病毒的感染过程.....	8
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的分离纯化.....	8
1.2 对虾白斑综合症病毒功能基因研究.....	10
1.2.1 结构蛋白.....	11
1.2.2 酶类.....	17
2 本论文研究的内容和意义.....	21
第一部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP124、VP39 和 VP187	
基因的鉴定.....	23
1 前言.....	23
2 材料与方法.....	24
2.1 材料.....	24
2.2 方法.....	25
2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备.....	25
2.2.2 VP124、VP39 和 VP187 的质谱分析.....	26

2.2.3	计算机分析 <i>vp124</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187</i> 基因.....	26
2.2.4	<i>vp124</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187</i> 基因的反转录 PCR 分析.....	27
2.2.5	<i>vp124</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187</i> 基因的 cDNA 末端快速扩增.....	29
2.2.6	基因的体外表达和蛋白质纯化.....	32
2.2.7	多克隆抗体的制备.....	35
2.2.8	Western blot 分析.....	36
2.2.9	VP124、VP39 和 VP187 的免疫电镜定位.....	37
3	结果.....	37
3.1	VP124、VP39 和 VP187 的质谱鉴定.....	37
3.2	<i>vp124</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187</i> 基因的结构.....	40
3.2.1	<i>vp124</i> 基因的结构.....	40
3.2.2	<i>vp39</i> 基因的结构.....	43
3.2.3	<i>vp187</i> 基因的结构.....	44
3.3	<i>vp124</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187</i> 基因的时相转录分析.....	44
3.4	<i>vp124p</i> 、 <i>vp39</i> 和 <i>vp187p</i> 基因在 <i>E. coli</i> BL21 中的表达和蛋白质 纯化.....	47
3.5	Western blot 分析.....	49
3.6	VP124、VP39 和 VP187 的免疫电镜定位.....	49
4	讨论.....	55
第二部分 对虾白斑综合症病毒基因组噬菌体展示库的构 建		58
1	前言.....	58
1.1	丝状噬菌体展示技术.....	58
1.1.1	丝状噬菌体的生物学特征.....	58

1.1.2 丝状噬菌体展示技术的原理.....	59
1.1.3 噬菌体展示技术的应用.....	64
1.1.4 噬菌体展示技术的新进展.....	67
1.2 构建 WSSV 基因组噬菌体展示库的意义.....	70
2 材料与amp;方法.....	71
2.1 材料.....	71
2.2 方法.....	71
2.2.1 pCANTAB 5 E 表达载体的改造.....	71
2.2.2 WSSV 基因组 DNA 随机片段的准备.....	72
2.2.3 WSSV 基因组噬菌体展示库的构建.....	72
2.2.4 菌落 PCR 鉴定插入片段的大小.....	73
2.2.5 WSSV 基因组噬菌体展示库的扩增.....	74
2.2.6 噬菌体展示库可溶性蛋白（细胞外和周质空间部分）的制备.....	74
2.2.7 噬菌体展示库可溶性蛋白的点杂交.....	75
3 结果.....	76
3.1 表达载体的改造和 WSSV 基因组 DNA 随机片段的准备.....	76
3.2 WSSV 基因组噬菌体展示库的构建.....	76
3.3 噬菌体展示库可溶性蛋白的点杂交.....	78
4 讨论.....	78
第三部分 WSSV 基因组同源重复区结合蛋白的筛选和初步鉴定.....	81
1 前言.....	81
1.1 WSSV 基因组同源重复区.....	81

1.1.1	基因组 DNA 重复序列.....	81
1.1.2	WSSV 基因组同源重复区.....	82
1.2	DNA 结合蛋白.....	83
1.3	特异性 DNA 结合蛋白的纯化.....	85
1.3.1	亲和层析纯化法.....	85
1.3.2	磁珠纯化法.....	87
1.3.3	生物素/链霉亲和素纯化法.....	88
1.4	凝胶阻滞分析.....	89
1.5	WSSV 基因组同源重复区结合蛋白的研究及其意义.....	89
2	材料与amp;方法.....	90
2.1	材料.....	90
2.2	方法.....	91
2.2.1	同源重复区中小重复片段 DNA(210 bp)的扩增.....	91
2.2.2	点杂交检测生物素标记 DNA 的灵敏度.....	92
2.2.3	DNA 亲和磁珠的制备.....	92
2.2.4	WSSV 基因组噬菌体展示库的扩增.....	92
2.2.5	WSSV 基因组同源重复区结合蛋白的筛选.....	92
2.2.6	计算机分析 <i>wsv021</i> 基因.....	95
2.2.7	RT-PCR.....	95
2.2.8	3'RACE.....	95
2.2.9	<i>wsv021</i> 基因的体外表达和蛋白质纯化.....	95
2.2.10	凝胶阻滞分析.....	97
2.2.11	多克隆抗体的制备.....	98
2.2.12	Western blot 分析.....	98
3	结果.....	99

3.1	同源重复区中小重复片段 DNA 亲和磁珠的制备	99
3.2	WSSV 同源重复区结合蛋白的筛选	99
3.3	<i>wsv021</i> 基因的结构	99
3.4	<i>wsv021</i> 基因的时相转录分析	100
3.5	<i>wsv021</i> 基因在 <i>E. coli</i> 中的表达和蛋白质纯化	101
3.6	凝胶阻滞分析蛋白质-DNA 相互作用	104
3.7	Western blot 分析	104
4	讨论	106
	结论	108
	参考文献	112
	缩略词	132
	附录	133
	致谢	148

CONTENTS

Chinese abstract	1
English abstract	4
Introduction	7
1 White spot syndrome virus (WSSV) and research of its functional genomics	7
1.1 Research of white spot syndrome virus.....	7
1.1.1 Basic characteristics of WSSV.....	7
1.1.2 Pathological characteristics of white spot syndrome.....	8
1.1.3 Infection of WSSV.....	8
1.1.4 Isolation and purification of WSSV virions.....	8
1.2 Research of WSSV functional genomics.....	10
1.2.1 Structural proteins.....	11
1.2.2 Enzymes.....	17
2 Investigations in this thesis and their significance	21
Part I Identification of envelope proteins (VP124, VP39 and VP187) genes from shrimp white spot syndrome virus	23
1 Introduction	23
2 Materials and methods	24
2.1 Materials	24
2.2 Methods	25
2.2.1 Preparation of WSSV virions and nucleocapsids.....	25
2.2.2 Mass spectrometry analysis of VP124, VP39 and VP187.....	26

2.2.3	Computer analysis of the <i>vp124</i> , <i>vp39</i> and <i>vp187</i> genes.....	26
2.2.4	Temporal transcription analysis of the <i>vp124</i> , <i>vp39</i> and <i>vp187</i> genes.....	27
2.2.5	Rapid amplification of <i>vp124</i> , <i>vp39</i> and <i>vp187</i> cDNA ends...29	29
2.2.6	Expressin of genes in <i>E. coli</i> and protein purification.....	32
2.2.7	Antibody preparation.....	35
2.2.8	Western blot.....	36
2.2.9	Immunoelectron microscopy of VP124, VP39 and VP187...37	37
3	Results	37
3.1	Identification of VP124, VP39 and VP187 by mass spectrometry.....	37
3.2	Structures of the <i>vp124</i> , <i>vp39</i> and <i>vp187</i> genes.....	40
3.2.1	Structure of the <i>vp124</i> gene.....	40
3.2.2	Structure of the <i>vp39</i> gene.....	43
3.2.3	Structure of the <i>vp187</i> gene.....	44
3.3	Temporal analysis of the <i>vp124</i> , <i>vp39</i> and <i>vp187</i> genes transcription.....	44
3.4	Expressin of genes in <i>E. coli</i> and protein purification.....	47
3.5	Western blot.....	49
3.6	Localization of VP124, VP39 and VP187 by immunoelectron microscopy.....	49
4	Discussion	55
Part II Construction of white spot syndrome virus (WSSV) whole genome phage display library.....		58

1	Introduction	58
1.1	Phage display technology.....	58
1.1.1	Biological characteristics of filamentous phage.....	58
1.1.2	Principle of phage display technology.....	59
1.1.3	Application of phage display technology.....	64
1.1.4	Recent innovations of phage display technology.....	67
1.2	Significance of construction of WSSV whole genome phage display library.....	70
2	Materials and methods	71
2.1	Materials	71
2.2	Methods	71
2.2.1	Rebuilt of expression vector pCANTAB 5 E.....	71
2.2.2	Preparation of random DNA fragments of WSSV genome.....	72
2.2.3	Construction of phage display library.....	72
2.2.4	Detection of the size of the inserts by colony PCR.....	73
2.2.5	Propagation of phages.....	74
2.2.6	Preparation of the extracellular and periplasmic extracts containing the library soluble proteins.....	74
2.2.7	Dot blot of the periplasmic and extracellular soluble proteins of phage library.....	75
3	Results	76
3.1	Rebuilt of vector and preparation of random DNA fragments.....	76
3.2	Construction of phage display library.....	76
3.3	Dot blot of the periplasmic and extracellular soluble proteins of	

phage library.....	78
4 Discussion.....	78
Part III Isolation and primary characterization of protein	
binding to the homologous repeat regions (<i>hrrs</i>) of	
WSSV.....	
1 Introduction.....	81
1.1 Homologous repeat regions (<i>hrrs</i>) of WSSV.....	81
1.1.1 DNA repeat sequences of genome.....	81
1.1.2 Homologous repeat regions of WSSV.....	82
1.2 DNA-binding protein.....	83
1.3 Purification of proteins specific-binding to DNA.....	85
1.3.1 Affinity chromatography.....	85
1.3.2 Purification using magnetic particles.....	87
1.3.3 Purification using biotin/streptavidin.....	88
1.4 Gel retardation assay.....	89
1.5 Studies on proteins binding to <i>hrrs</i> of WSSV genome and their significance.....	89
2 Materials and methods.....	90
2.1 Materials.....	90
2.2 Methods.....	91
2.2.1 PCR of minifragment DNA (210 bp) in one <i>hrr</i> of WSSV....	91
2.2.2 Dot blot analysis of sensitivity of biotin-labeled DNA.....	92
2.2.3 Preparation of DNA affinity magnetic particles.....	92
2.2.4 Propagation of phages in WSSV genome phage display	

library.....	92
2.2.5 Isolation of protein binding to <i>hrrs</i> of WSSV.....	92
2.2.6 Computer analysis of the <i>wsv021</i> gene.....	95
2.2.7 RT-PCR.....	95
2.2.8 3'RACE.....	95
2.2.9 Expression of <i>wsv021</i> in <i>E. coli</i> and protein purification.....	95
2.2.10 Gel retardation assay.....	97
2.2.11 Antibody preparation.....	98
2.2.12 Western blot.....	98
3 Results	99
3.1 Preparation of minifragment DNA affinity magnetic particles...99	99
3.2 Isolation of protein binding to <i>hrrs</i> of WSSV.....	99
3.3 Structure of the <i>wsv021</i> gene.....	99
3.4 Temporal analysis of the <i>wsv021</i> gene transcription.....	100
3.5 Expressin of <i>wsv021</i> in <i>E. coli</i> and protein purification.....	101
3.6 Gel retardation assay of protein-DNA interaction.....	104
3.7 Western blot.....	104
4 Discussion	106
Conclusion	108
References	112
Abbreviation	132
Appendix	133
Acknowledgement	148

摘 要

对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是对虾的最主要病毒病原之一。它的宿主范围广, 传染力强, 致死率高, 难防治, 不仅严重危害对虾养殖, 还对海洋环境构成威胁。本论文开展了病毒膜蛋白以及可能与病毒复制或调控相关的蛋白基因的研究, 有利于揭示 WSSV 入侵的分子途径, 探索病毒复制或转录的关键蛋白, 为最终建立有效的防治方法提供有力的科学依据。

从感染螯虾 (*Procambarus clarkii*) 组织中大量提取和纯化了完整的白斑综合症病毒粒子。病毒膜蛋白组份经 SDS-PAGE 和质谱分析, 发现三个分子量为 124 kDa、39 kDa 和 187 kDa 的蛋白分别是 WSSV 基因组的开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 中 wsv216、wsv339 和 wsv209 的基因产物, 这些 ORFs 分别包含有 3582 bp、849 bp 和 4818 bp, 预测分别编码 1194、283 和 1606 个氨基酸。这三个蛋白分别被命名为 VP124、VP39 和 VP187, 它们的基因相应地命名为 *vp124*、*vp39* 和 *vp187* 基因。时相转录分析发现, *vp124*、*vp39* 和 *vp187* 都属于病毒感染的晚期基因。*vp124* 和 *vp187* 基因选取部分片段 (分别命名为 *vp124p* 和 *vp187p*), *vp39* 选取整个基因, 将它们克隆到 pET-GST 表达载体, 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中与谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 基因进行融合表达并纯化。纯化的目的蛋白 (GST-VP124P、GST-VP39 和 GST-VP187P) 分别免疫小鼠, 得到各自的特异性抗血清。Western blot 结果显示, 鼠抗 GST-VP124P、GST-VP39 和 GST-VP187P 血清能特异性地与全病毒或病毒膜蛋白部分中的 VP124、VP39 和 VP187 反应, 而不与核衣壳蛋白反应。免疫电镜定位显示, VP124、VP39 和 VP187 位于 WSSV 的表面, 属于病毒的膜蛋白。

噬菌体展示技术是研究蛋白质与蛋白质或蛋白质与 DNA 之间相互作用的有效手段。WSSV 基因组噬菌体展示库的构建有利于对病毒感染、复制或调控相关的功能基因进行深入研究。WSSV 基因组 DNA 经超声波处理,分离 0.8-2.0 kb 的片段并补齐成平末端,克隆于改造的 pCANTAB 5 EE 的 *EcoRV* 位点。构建的病毒基因组噬菌体展示库的原始克隆子数约 3.0×10^5 。经菌落 PCR 鉴定,插入片段大小约 0.12-1.77 kb。整个展示库的噬菌体感染 *E. coli* HB2151 细胞后,将细胞外和周质空间部分的可溶性蛋白点于 PVDF 膜,以病毒蛋白(VP24, WSV026, WSV063, WSV069, WSV112, WSV238, WSV303 和 VP26) 的抗血清为一抗进行点杂交,结果显示展示库能表达大部分的病毒蛋白。

WSSV 基因组序列分析发现,基因组 3% 的区域均匀分布有与昆虫杆状病毒类似的 9 个同源重复区 (homology repeat regions, *hrrs*),很可能具有昆虫杆状病毒 *hrrs* 参与病毒复制起始或转录调控的功能。以 WSSV 基因组同源重复区中一个包含高度保守结构域的小重复片段 DNA (210 bp) 作为配体,利用 WSSV 基因组噬菌体展示库,经过五轮淘选筛选到一个可与 DNA 特异结合的重组噬菌体克隆,包含的外源 DNA 片段长度为 306 bp。通过与 WSSV 基因组序列对比,发现该序列为 WSSV 的 ORFs 中 *wsv021* 的 5' 端部分。推测 *wsv021* 是一个可能与病毒复制或调控相关的重要功能基因。时相转录分析发现, *wsv021* 属于病毒感染的早期基因。将 *wsv021* 基因克隆到 PQE30 表达载体,在 *E. coli* XL1-Blue 中进行融合表达。凝胶阻滞分析显示,体外表达的 (His)₆-WSV021 蛋白可以和同源重复区中小重复片段 DNA 特异性相互作用。体外表达纯化的目的蛋白 (His)₆-WSV021 免疫小鼠,制备 WSV021 的特异性抗血清。Western blot 结果显示,鼠抗 (His)₆-WSV021 血清能特异性地和感染螯虾蛋白粗提取物中一分子量为 8.4 kDa 的蛋白反应。推测 *wsv021* 基因产物存在蛋白质的翻译后

剪切修饰。

关键词：对虾白斑综合症病毒；质谱；*vp124*、*vp39* 和 *vp187* 基因；膜蛋白；基因组噬菌体展示库；同源重复区；*wsv021* 基因

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most virulent pathogens in shrimp culture worldwide. It has a wide range of hosts in crustaceans, a high infection and mortality rate, and is hard to be controlled. Therefore WSSV is not only a major threat to the shrimp industry but also to the marine environment everywhere. In this thesis, some genes related with viral envelope proteins or possibly involved in replication and transcription of WSSV were identified. This will facilitate a better understanding of the molecular mechanism underlying the viral infection and studying some key proteins involved in the replication and transcription of virus. All this will finally provide powerful scientific foundations for the efficient diagnosis and control of WSSV.

Intact viral particles were purified from the tissues of experimentally infected crayfish (*Procambarus clarkii*) with high yield. Based on SDS-PAGE of purified WSSV envelope fraction and mass spectrometry analysis, three proteins with the molecular mass of 124 kDa, 39 kDa and 187 kDa were identified to match three open reading frames (ORFs), wsv216, wsv339, and wsv209 of WSSV genome, respectively. Three ORFs were 3582 bp, 849 bp and 4818 bp in length, encoding 1194 aa, 283 aa and 1606 aa, respectively. The proteins were named VP124, VP39 and VP187 and their genes were termed as *vp124*, *vp39* and *vp187*, respectively. Temporal transcription analysis revealed that *vp124*, *vp39* and *vp187* were all late genes. One part of the whole *vp124* and *vp187* genes (named *vp124p* and *vp187p*, respectively) and *vp39* gene were cloned into pET-GST vector and expressed

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.

厦门大学博硕士论文摘要库