

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152080

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒(WSSV)极早期蛋白
WSV056 和 IE1 与成视网膜瘤蛋白 RB
相互作用的验证以及功能的研究

Research on the interaction between WSSV immediate-early
protein WSV056 or IE1 and Retinoblastoma family protein

冉 晓 卓

指导教师姓名: 杨丰 研究员

李钊 副研究员

专 业 名 称: 生物化学和分子生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人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其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

2012 年 6 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2013 年 12 月 1 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
1 前言	1
1.1 对虾养殖概况	1
1.2 对虾白斑综合症杆状病毒传播途径和生活周期	1
1.2.1 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径.....	1
1.2.2 对虾白斑综合症杆状病毒的生活周期.....	2
1.3. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白的研究	3
1.4 DNA 病毒极早期基因的研究现状.....	4
1.4.1 DNA 病毒极早期基因的定义.....	4
1.4.2 DNA 病毒极早期蛋白的功能.....	4
1.4.3 对虾白斑综合症病毒极早期基因研究现状.....	5
1.5 RB-E2F1 通路在细胞周期的调控	5
1.5.1 RB-E2F1 通路在细胞周期内的调节作用	6
1.5.2 病毒蛋白与 RB-E2F1 通路相互作用的研究近况	7
1.6 酵母双杂交系统	9
1.6.1 酵母双杂交系统的原理.....	9
1.6.2 酵母双杂交技术的优点和缺点.....	9
1.7 双荧光素酶系统	10
1.7.1 报告基因的应用.....	10
1.7.2 萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的反应原理.....	10
1.8 RNAi 作用机理及其应用.....	11
1.8.1 RNAi 的研究历史	11
1.8.2 RNAi 的作用机理	12
1.8.3 RNAi 的应用	12
2 材料与amp;方法	14
2.1 材料	14

2.1.1 实验动物.....	14
2.1.2 酵母细胞、昆虫细胞、病毒及培养基.....	14
2.1.3 质粒载体.....	14
2.1.4 抗体.....	15
2.1.5 试剂盒.....	15
2.1.6 酶类及抗生素.....	15
2.1.7 其他试剂.....	15
2.1.8 主要仪器.....	16
2.3 方法:	21
2.3.1 病毒的感染和增殖.....	21
2.3.2 WSSV 的 PCR 检测.....	22
2.3.3 克隆的构建.....	22
2.3.4 昆虫细胞 High-five 共转染.....	25
2.3.5 细胞固定和免疫荧光.....	25
2.3.6 Co-IP 验证蛋白的结合.....	26
2.3.7 western blotting.....	26
2.3.8 酵母双杂交技术验证蛋白结合:	27
2.3.9 相对荧光素酶活性实验:	28
2.3.10 对虾组织提取总 RNA:	29
2.3.11 总 RNA 的逆转录.....	29
2.3.12 5'-race 和 3'-race 制作.....	30
3 结果与分析	31
3.1 通过酵母双杂交技术验证 RB 与 IE1 的结合.....	31
3.2 通过 Co-IP 验证在 high five 细胞内 RB 与 WSV056 和 IE1 的结合.....	33
3.3 通过荧光素酶相对活性实验, 过表达 WSV056,IE1 下游基因的影响.....	36
3.4 通过 dsRNA 敲除病毒内的 wsv056、ie1, 检测病毒的增殖速度.....	37
3.5 在虾细胞内扩增出与 RB 起着类似功能基因 RBL	39
4 讨论	51

5 小结	53
6 参考文献	54
7 致谢	61

厦门大学博硕士论文摘要库

TABLE OF CONTENTS

Abstract in chinese.....	I
Abstract.....	II
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Summary of shrimp feeding.....	1
1.2 Transmission and life cycle of WSSV	1
1.2.1 Host of WSSV and route of transmission	1
1.2.2 Life cycle of WSSV	2
1.3. Research on structure proteins of wssv.....	3
1.4 Research on immediate-early gene of DNA virus	4
1.4.1 Definition of Immediate-early gene of DNA virus.....	4
1.4.2 Function of Immediate-early gene of DNA function.....	4
1.4.3 Recent research on Immediate-early gene of WSSV	5
1.5 Regulation of RB-E2F1 pathway	5
1.5.1 Regulation in the cell of RB-E2F1 pathway	6
1.5.2 Research on the interaction between virus protein and RB-E2F1	7
1.6 Yeast Two-Hybrid System	9
1.6.1 Principle of Yeast Two-Hybrid System.....	9
1.6.2 Advantage and disadvantage of Yeast Two-Hybrid System	9
1.7 Dual-Luciferase System.....	10
1.7.1 Application of reporter genes.....	10
1.7.2 Reaction Principle of firefly luciferase and renila luciferase.....	10
1.8 Principle and application of RNA Inference.....	11
1.8.1 Research history of RNA inference.....	11
1.8.2 Reaction principle of RNA inference	12
1.8.3 Application of RNA inference.....	12
chapter 2 Materials and Methods	14

2.1 Materials	14
2.1.1 Lab animals	14
2.1.2 Yeast cells,Virus and Mediums	14
2.1.3 Plasmids	14
2.1.4 Antibodies	15
2.1.5 Kits	15
2.1.6 Enzymes and Antibiotics	15
2.1.7The other reagents.....	15
2.1.8 Instruments.....	16
2.3 Methods:	21
2.3.1 Infection of WSSV	21
2.3.2 PCR test of WSSV	22
2.3.3 Clone construction	22
2.3.4 Co-transfection in insect cell	25
2.3.5 Cell fixation and immunofluorescence	25
2.3.6 Co-IP	26
2.3.7 Western blotting.....	26
2.3.8 Yeast Two-Hybrid	27
2.3.9 Dual-luciferase test	28
2.3.10 Total RNA extraction.....	29
2.3.11 Reverse transcription	29
2.3.12 5'race and 3'race.....	30
chapter 3 Results	31
3.1 Interaction between RB and IE1 in yeast	31
3.2 Interaction between RB and WSV056,IE1 in high five cell	33
3.3 Over expression of WSV056 and IE1 with dual-luciferase test	36
3.4 DsRNA inference of wsv056 and <i>ie1</i>	37
3.5 PCR of a similarity in shrimp cell to RB protein	39
chapter 4 Discussion and Conclusion	51

chapter 5 Brief summary	53
Referrences	54
Acknowledge.....	61

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是一种具有囊膜的、无包涵体的、类杆状双链环状 DNA 病毒, 是危害对虾养殖的主要病原之一, 对世界对虾养殖业造成了严重的损失。WSV056 和 IE1 是对虾白斑综合症病毒的极早期蛋白, 它们在病毒进入宿主细胞的 4 小时内即可开始表达, 并且与宿主细胞的某些调控蛋白相互作用, 为病毒在宿主细胞内的增殖做准备。WSV056 和 IE1 在基因序列和蛋白结构上有着很高的相似性。本论文围绕 WSV056 和 IE1 开展研究, 具体包括以下几个方面: 1. 通过酵母双杂交技术, 在酵母 AH109 细胞内验证了 IE1 与 RB 的结合, 同时在昆虫细胞 high five 细胞内验证了 WSV056 和 IE1, 可以分别与 RB 结合; 2. 通过荧光素酶相对活性实验, 推测 WSV056 和 IE1 与 RB 的结合可以释放出更多的 E2F1; 3. 通过 RNA 干扰试验发现, 沉默 wsv056 和 *ie1* 后, 病毒感染宿主细胞后 12 小时内, 病毒的增殖速度减慢; 4. 在凡纳滨对虾体内提取总 RNA, 扩增出类似 RB 的序列, 证明了在虾体内也存在类似 RB 的蛋白。以上实验结果说明, WSV056 和 IE1 在病毒进入细胞的早期与宿主细胞内的 RB 蛋白相互作用, 可能通过影响 RB—E2F1 通路, 从而使细胞内的环境更加有利于病毒的增殖。

关键字: 对虾白斑综合症病毒 (WSSV); WSV056; IE1; RB; E2F1; 病毒增殖

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV), an enveloped, non-occluded, bacilliform and circular dsDNA virus, is one of the major pathogens of shrimp diseases, causing considerable mortality in penaeid shrimp. Both WSV056 and IE1 are viral immediate-early (IE) proteins, which begin producing in only 4 hours after the virus enter the host cell. What's more, they can interact with some proteins in the cell, which make it easier to reproduce in the host cell. WSV056 and IE1 are similar in the gene sequence and protein structure. Based on the similarity, we carried on the research on the WSV056 and IE1, including several aspects below. First of all, based on the yeast twohybrid system, we proved the interaction between IE1 and RB in the AH109 yeast cell and we also proved the interaction between IE1 and RB and the interaction between WSV056 and RB. Second, based on the dual-luciferase system, we estimate that the interaction between the WSV056 and RB or IE1 and RB can release more E2F1 proteins into free. Third, with the RNA interference of *wsv056* and *ie1*, after 12 hours of the infection, the speed of the virus reproduction slows down. At last, we extract the total RNA from the shrimp and get a product from the PCR based on the reverse transcription of the total RNA, which proved that there is a protein in the shrimp cell, which is similar to the RB protein. Based on the experiments above, we can get a conclusion that, both WSV056 and IE1 can interact with the RB protein in the early period and they perform the function through the RB—E2F1 pathway and regulate the cell cycle, to make it easier for virus reproduction in the host cell.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV); WSV056; IE1; RB; E2F1; virus reproduction

1 前言

1.1 对虾养殖概况

对虾是人们最喜欢的海产食品之一，因而对虾养殖具有较高的经济价值。从50年代开始，世界对虾养殖业逐渐发展起来，对虾的消费量也逐年递增。我国当前的对虾养殖品种比较多，但是主要的经济种类只有少数几种，主要有斑节对虾（*Penaeus monodon*）、南美白对虾（*Litopenaeus vannamei*）和中国对虾（*Penaeus chinensis*）^[1,2]。

对虾的疾病主要由两方面引起的：细菌和病毒。研究表明细菌病可用抗生素控制，但大量使用抗生素，可导致细菌产生抗药性，同时还可抑制对虾自身免疫力的发挥。对于病毒病，目前还没有有效的治疗方法。

病毒流行病是目前困扰我国对虾养殖业发展最突出的问题。解决病害问题的一条非常有效的途径就是研究甲壳类动物的免疫机制，有效的提高虾类本身的抗病能力。因此国内外治疗对虾病普遍采用的方法是“以防为主”，其根本目的是通过提高对虾自身免疫能力以增强其抗病力^[3,4]。

目前中国、日本、台湾和新加坡的一些研究机构已经在虾病毒的病原、病理、传播途径及快速诊断方法等方面开展了研究，并且取得了一定的进展，但还没有最终研究出有效的治疗方法。

1.2 对虾白斑综合症杆状病毒传播途径和生活周期

对虾白斑综合症杆状病毒，简称WSSV，是一种有囊膜的双链环状DNA病毒。属于Whispovirus属，是Nimaviridae新科中目前唯一的成员^[5]。

1.2.1 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径

WSSV主要感染甲壳纲十足目的动物^[6]，以虾类为主，几乎所有的对虾都能

够被WSSV感染，例如：日本对虾(*P. japonics*)、中国对虾(*P. chinensis*)以及美国蓝虾 (*P. setiferus*)等等^[7-11]。此外WSSV还感染其它生活在海水、淡水，以及半咸水的甲壳动物^[12-17]，甚至一些水生昆虫^[18-20]。但是并非所有感染病毒的生物都会发病，其中一些动物感染WSSV后并不一定发病，据推测它们可能只是WSSV感染对虾的中间宿主。

在天然条件下，WSSV可以通过污染的水、排泄物，以及病虾残体等，借助取食，鳃的呼吸和体表部位的接触等途径来进行水平传播^[21,22]。在实验室内科研人员通过口服或者注射途径也可以使实验对虾感染该病毒。同时科研人员还发现WSSV还可以通过垂直传播来感染子代^[23]。

1.2.2 对虾白斑综合症杆状病毒的生活周期

目前对WSSV生活周期的认识主要集中在新病毒颗粒生成的部分，其他部分还不是很清楚。WSSV的复制和组装是在宿主细胞核内进行的，现在的活体感染实验表明通常病毒的生命周期在24小时左右。研究表明WSSV的形态发生大致包括了以下几个阶段^[24]：

在病毒感染的第一阶段，感染细胞的细胞核出现轻微的肥大，由病毒蛋白形成纤维状结构组成的病毒核小体出现。同时细胞内质网膨大，出现许多游离的核糖体。在第二阶段，细胞核内的纤维状物质介导了病毒膜结构的形成，病毒的核心物质被包裹到膜结构中，在病毒来源的基质和边聚的染色质之间出现了Crowdry A 氏包涵体，细胞核膨大，变圆。在第三阶段，病毒核衣壳逐渐由一端到另一端生成，同时囊膜逐步包裹核衣壳。此时细胞内的Crowdry A 氏包涵体变小，边聚染色质消失，核膜破裂，细胞器出现异常。在第四阶段，病毒核衣壳完成组装，随后核衣壳被囊膜完全包裹。在第五阶段，病毒粒子呈卵圆形，形成尾状结构，此时病毒的核衣壳在DNA与VP15的包装作用下被压缩变短。在最后的阶段成熟的病毒颗粒呈椭圆形，外有封闭的囊膜及尾状结构，内含成熟核衣壳。在有些情况下病毒核衣壳的形成是单独进行的，在最后的阶段再统一由囊膜进行包裹。在病毒感染的最后阶段，细胞破裂，释放成熟子代病毒颗粒^[25-27]。

根据已有的数据，研究者对WSSV可能的生活周期进行了推测，以下是WSSV

复制周期的推测示意图（图1-1）。

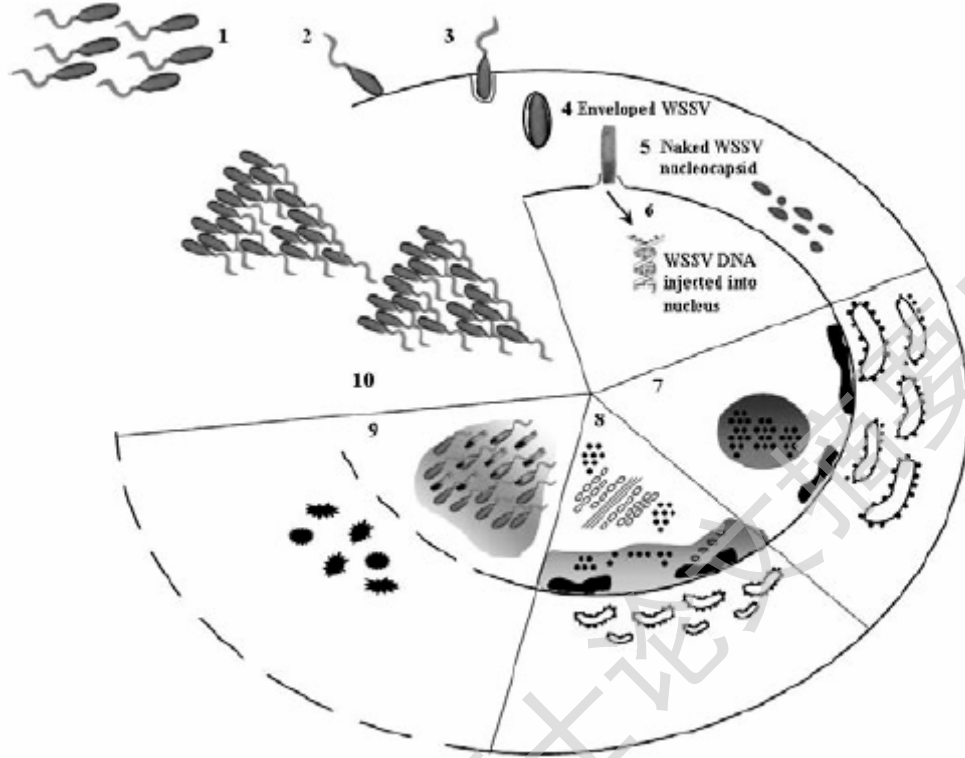


图1-1: WSSV生活周期示意图[28]

注：游离的病毒在与宿主细胞膜识别之后，通过内吞作用进入细胞质。然后脱去囊膜，病毒的核衣壳进入细胞核，同时病毒裸露基因组DNA进行复制，一段时间后细胞核内出现早期病毒基质。细胞的染色质边缘化粗面内质网膨大，边缘化的染色质转变为高密度环状区，核内有由膜物质形成的囊泡和丝状的病毒核小体形成。最后新病毒组装核膜破裂，细胞器被破坏，细胞解体，新病毒释放。

1.3. 对虾白斑综合症病毒结构蛋白的研究

结构蛋白是指构成一个形态成熟的有感染力的病毒颗粒所必需的蛋白质，主要包括核衣壳蛋白、包膜蛋白^[29]。为了进一步了解病毒感染和包装的分子机理，为病毒的防治提供有力的科学依据，WSSV膜蛋白的鉴定和它们功能的阐明十分重要。因此，在WSSV的功能基因组研究中，越来越多的人参与了膜蛋白的研

究。目前已经经过 Western blot 分析和胶体金免疫电镜定位确定的膜蛋白包括很多种,其中包括 VP28 蛋白^[30]。由于 VP28 是病毒的在晚期表达的蛋白,而且 VP28 是一种病毒的结构蛋白^[31-34],那么我们可以通过检测 VP28 的表达来检测病毒的增殖速度。以下主要是有关膜蛋白 VP28 的相关内容:

膜蛋白 VP28^[35-37] (WSV421)是病毒包膜上含量最高的一种蛋白,这种蛋白最早由 van Hulten 从纯化的病毒中分离并进行蛋白 N-末端测序^[38-41]。研究人员通过胶体金免疫电镜定位实验证实 VP28 分布在病毒的外表面。实验数据显示, vp28 在感染后 6 小时,仅能够检测到低水平表达,因此 vp28 定义为一种晚期基因^[42-45]。但是 VP28 在病毒感染过程中的作用至今仍不清楚。通过体内中和实验认为 VP28 在 WSSV 的系统感染中起重要作用^[46],但是缺乏进一步的实验证据。

1.4 DNA 病毒极早期基因的研究现状

1.4.1 DNA 病毒极早期基因的定义

双链DNA病毒基因组的表达呈时序性,分为极早期、早期、晚期三种。极早期基因定义如下:在病毒感染的极早期,在无病毒DNA复制,无新病毒蛋白合成的情况下,少数病毒基因可以被宿主细胞中的“转录机器”启动,并利用宿主细胞RNA聚合酶 II 进行转录^[47],这些基因称为病毒极早期基因^[48-52]。极早期基因编码的蛋白质(极早期蛋白)通常是一些调控因子,这些调控因子在病毒复制过程中对病毒自身和宿主细胞起着非常重要的调节作用^[53],影响着病毒在宿主细胞内的增殖^[54]。

1.4.2 DNA 病毒极早期蛋白的功能

DNA病毒的极早期蛋白在病毒感染细胞过程中起着非常重要的作用,不仅能控制病毒早期和晚期基因的转录与表达,而且在侵染过程中负责对宿主细胞基因表达和蛋白功能的调控^[54]。转录因子是极早期蛋白中最主要的一类成员,这类蛋白还可能通过蛋白质相互作用,蛋白质修饰等多种途径来调控病毒或者宿主蛋白的功能,从而促进病毒的增殖。而且研究发现为了保证病毒调控作用的高效性,许多极早期蛋白可以同时行使多种功能。在许多高等动物病毒的研究中极早

期蛋白在病毒感染中的重要性得到了证实，例如人疱疹病毒EBV (Epstein Barr Virus) 的极早期蛋白Zta (BZLF1/ZEBRA)，该蛋白作为转录因子，是促使病毒从潜伏期进入裂解周期的开关^[55]。

1.4.3 对虾白斑综合症病毒极早期基因研究现状

Liu W.J 2005年首次在活体对虾系统内对WSSV极早期基因进行了筛选，确定了三个WSSV极早期基因*ie1*，*ie2*和*ie3*。该研究组随后的研究表明：IE1蛋白可以形成二聚体，其C端具有与DNA结合的能力^[56]，但是这种结合并非直接通过其中的锌指结构域介导。随后该研究组对IE1的启动子做了相关研究，发现IE1蛋白可以形成二聚体，其C端可以与DNA结合^[57]。将IE1全长基因片段插入有GAL4 DNA结合域 (DBD) 的质粒进行融合表达，发现上游带有5个拷贝GAL4 DNA结合位点 (GAL4 DNA binding site) 的Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus p35启动子控制的下游报告基因激活^[58-59]，这说明IE1具有转录激活功能。最近有文献报道IE1还可以与PmTBP结合，增强病毒基因的表达，有利于病毒的复制。上述结果表明，IE1是WSSV编码的一个极早期转录因子。但是IE1的下游靶基因，以及它在病毒感染中所起的作用以及对宿主的调控目前尚不清楚。

综上，DNA病毒的极早期基因在病毒生命周期中扮演了重要的角色，但是目前对于WSSV极早期基因的研究还十分有限。

1.5 RB-E2F1 通路在细胞周期的调控

RB蛋白(Retinoblastoma family protein)是一个癌症抑制因子，在很多种癌症机理中有着很重要的作用^[60]。RB蛋白最重要的一个作用就是在细胞过度增殖中，抑制细胞的细胞周期，防止其分化，同样它也可以与很多染色体重组酶作用，例如甲基化酶和乙酰化酶。

E2F 基因泛指一个编码转录因子的家族基因，其中有三个成员E2F1,E2F2,E2F3a是活化因子，其余6种是抑制因子，他们都参与到细胞周期调节和DNA合成的过程中。以下着重介绍E2F1的结构和功能。在没有RB蛋白结合的

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.

厦门大学博硕士论文摘要库