

学校编码: 10384  
学号: 20120051302064

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 VP32 和类胶原  
蛋白 CLP 的初步鉴定

**Preliminary identification of Envelope Protein VP32 and  
Collagen-like protein CLP of White Spot Syndrome Virus**

高 昀

指导教师姓名: 杨 丰 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2008 年 10 月

论文答辩时间: 2009 年 7 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 10 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):

年 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 年 月 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 日

## 目 录

|  |           |
|--|-----------|
| 中文摘要.....                                | 1         |
| 英文摘要.....                                | 2         |
| 前言.....                                  | 3         |
| <b>1 对虾白斑综合症病毒(WSSV)及其分子生物学研究.....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1 对虾白斑综合症病毒研究概况.....                   | 3         |
| 1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现.....                  | 3         |
| 1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构.....             | 3         |
| 1.1.3 对虾白斑综合症病毒的感染宿主及感染动物模型.....         | 3         |
| 1.1.4 对虾白斑综合症病毒的组织病理学.....               | 4         |
| 1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化.....                | 5         |
| 1.1.6 对虾白斑综合症病毒的检测.....                  | 6         |
| 1.2 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究.....                | 7         |
| 1.3 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究.....               | 8         |
| 1.3.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白.....                | 8         |
| 1.3.2 对虾白斑综合症病毒的功能酶类.....                | 13        |
| 1.4 胶原蛋白研究概况.....                        | 16        |
| 1.4.1 胶原蛋白的组织分布和类型.....                  | 16        |
| 1.4.2 胶原蛋白的氨基酸组成.....                    | 16        |
| 1.4.3 胶原蛋白的结构.....                       | 16        |
| 1.4.4 胶原蛋白稳定性.....                       | 17        |
| 1.4.5 胶原蛋白的功能和应用.....                    | 18        |
| <b>2 本论文研究的内容和意义.....</b>                | <b>19</b> |
| <b>第一部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP32 基因的鉴定.....</b> | <b>20</b> |
| <b>1 前言.....</b>                         | <b>20</b> |
| <b>2 材料与方法.....</b>                      | <b>21</b> |
| 2.1 材料.....                              | 21        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2 方法.....  | 21        |
| 2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备.....  | 21        |
| 2.2.2 基因的克隆表达和蛋白质纯化.....   | 23        |
| 2.2.3 多克隆抗体的制备.....  | 25        |
| 2.2.4 Western blot 分析.....   | 25        |
| 2.2.5 Far-Western 分析.....  | 26        |
| 2.2.6 GST pull-down 分析.....  | 26        |
| 2.2.7 免疫金标电镜定位分析 .....   | 26        |
| <b>3 结果.....</b>   | <b>27</b> |
| 3.1 <i>vp32</i> 基因的结构.....   | 27        |
| 3.2 GST-VP32 和 MBP-VP32 的诱导表达和纯化.....  | 27        |
| 3.3 Western blot 分析.....   | 30        |
| 3.4 免疫电镜定位 .....   | 31        |
| 3.5 VP32与WSSV主要膜蛋白/宿主细胞总蛋白之间相互作用 .....   | 32        |
| <b>4 讨论.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>第二部分 对虾白斑综合症病毒类胶原蛋白 CLP 基因的初步鉴定..</b>   | <b>34</b> |
| <b>1 前言.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2 材料与方法.....</b>  | <b>34</b> |
| 材料.....  | 34        |
| 方法.....  | 35        |
| 2.2.1 pGEX-2T- <i>clpn</i> - (6His), pGEX-2T- <i>clpm</i> - (6His) 和 pET-His- <i>clpc</i> 重组表达质粒的构建 .....                  | 35        |
| 2.2.2 pGEX-2T- <i>clpn</i> - (6His), pGEX-2T- <i>clpm</i> - (6His) 和 pET-His- <i>clpc</i> 在 <i>E. coli</i> BL-21中的表达 ..... | 36        |
| 2.2.3 GST-CLP <sub>n</sub> 和GST-CLP <sub>m</sub> 的纯化 .....   | 36        |
| 2.2.4 Ni-NTA 柱变性条件下纯化重组蛋白.....   | 36        |
| 2.2.5 多克隆抗体的制备.....  | 36        |
| 2.2.6 螯虾各组织总蛋白的制备.....   | 36        |
| 2.2.7 Western blot 分析 .....  | 37        |

|   |    |
|---|----|
| <b>3 结果</b> .....   | 37 |
| <i>clp</i> 基因的结构.....   | 37 |
| 3.2 GST- <i>clp</i> <sup>n</sup> -(6His), GST- <i>clp</i> <sup>m</sup> -(6His) 和 His- <i>clp</i> <sup>c</sup> 在 <i>E. coli</i> BL-21 中的诱导表达和纯化..... | 38 |
| 3.3 Western blot 分析 CLP 在宿主病虾各组织中的分布情况.....   | 41 |
| <b>4 讨论</b> .....   | 43 |
| <b>参考文献</b> .....   | 44 |
| <b>缩略词</b> .....  | 54 |
| <b>附录</b> .....   | 55 |
| <b>致谢</b> .....   | 64 |

## CONTENTS

|   |    |
|---|----|
| <b>Chinese abstract</b> .....   | 1  |
| <b>English abstract</b> .....   | 2  |
| <b>Introduction</b> .....   | 3  |
| <b>1 White spot syndrome virus(WSSV) and molecular biological research</b> .....      | 3  |
| 1.1 Research of white spot syndrome virus.....  | 3  |
| 1.1.1 Finding of white spot syndrome virus.....                                       | 3  |
| 1.1.2 Structure of white spot syndrome virus.....                                     | 3  |
| 1.1.3 Host and animal model of white spot syndrome virus.....                         | 3  |
| 1.1.4 Pathology of white spot syndrome virus.....                                     | 4  |
| 1.1.5 Isolation and purification of white spot syndrome virus.....                    | 5  |
| 1.1.6 Detection of white spot syndrome virus.....                                     | 6  |
| 1.2 Genomics of white spot syndrome virus.....  | 7  |
| 1.3 Proteomics of white spot syndrome virus.....                                      | 8  |
| 1.3.1 Structural proteins of white spot syndrome virus.....                           | 8  |
| 1.3.2 Functional enzymes of white spot syndrome virus.....                            | 13 |
| 1.4 Research of collagen.....   | 16 |
| 1.4.1 Distribution and types of collagen.....   | 16 |
| 1.4.2 Amino acid formation of collagen.....   | 16 |
| 1.4.3 Structure of collagen.....  | 16 |
| 1.4.4 Stability of collagen.....  | 17 |
| 1.4.5 Function and application of collagen.....                                       | 18 |
| <b>2 Investigations in this thesis and their significance</b> .....                   | 19 |
| <b>Part I Identification of <i>vp32</i> gene from white spot syndrome virus</b> ..... | 20 |
| <b>1 Introduction</b> .....   | 20 |
| <b>2 Materials and methods</b> .....  | 21 |

|  |           |
|--|-----------|
| Materials. ....  | 21        |
| Methods. ....  | 21        |
| Preparation of WSSV intact virions and nucleocapsids. ....   | 21        |
| Expression of genes and protein purification. ....   | 23        |
| Antibody preparation. ....   | 25        |
| Western blot. ....   | 25        |
| Far-Western blotting. ....   | 26        |
| GST pull-down analysis. ....   | 26        |
| Immuno-electron microscope location analysis. ....   | 26        |
| <b>3 Results. ....</b>   | <b>27</b> |
| Structural of <i>vp32</i> gene. ....   | 27        |
| Expression and purification of GST-VP32 and MBP-VP32. ....   | 27        |
| Western blot. ....   | 30        |
| Immuno-electron microscope location analysis. ....   | 31        |
| The interaction between VP32 and WSSV envelope proteins or host cell proteins. ....  | 32        |
| <b>4 Discussion. ....</b>  | <b>33</b> |
| <b>Part II Identification of collagen-like protein CLP gene from white spot syndrome virus. ....</b>                               | <b>34</b> |
| <b>1 Introduction. ....</b>  | <b>34</b> |
| <b>2 Materials and methods. ....</b>   | <b>34</b> |
| Materials. ....  | 34        |
| Methods. ....  | 35        |
| Construction of recombinant plasmids of pGEX-2T- <i>clpn</i> -(6His), pGEX-2T- <i>clpm</i> -(6His) and pET-His- <i>clpc</i> . .... | 35        |
| Expression of pGEX-2T- <i>clpn</i> -(6His), pGEX-2T- <i>clpm</i> -(6His) and pET-His- <i>clpc</i> in <i>E. coli</i> . ....         | 36        |
| Purification of GST-CLP <sub>n</sub> and GST-CLP <sub>m</sub> . ....   | 36        |
| Purification of recombinant protein under denatured  |           |



|   |           |
|---|-----------|
| condition.....  | 36        |
| Antibody preparation.....   | 36        |
| Preparation of proteins in tissues from crayfish.....   | 36        |
| Western blot.....   | 37        |
| <b>3 Results.....</b>   | <b>37</b> |
| Structural of <i>clp</i> gene.....  | 37        |
| Expression and purification of GST- <i>clpn</i> -(6His),GST- <i>clpm</i> -(6His) and His- <i>clpc</i> in <i>E. coli</i> ..... | 38        |
| Analysis of distribution of CLP in tissues from host cells by Western blotting.....   | 41        |
| <b>4 Discussion.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>References.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>Abbreviation.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>Appendix.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>Acknowledge.....</b>   | <b>64</b> |

## 摘要:

对虾白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种具有囊膜、无包涵体的杆状型双链环状 DNA 病毒, *Nimaviridae* 属 *Whispovirus* 种中唯一的物种, 也是严重危害对虾养殖业的最主要病原。

目前我们的研究主要围绕 WSSV 的蛋白功能开展研究。这是因为病毒蛋白参与病毒的形态构成、对宿主细胞的入侵、增殖等一系列活动, 并在其中扮演了重要角色。

本论文研究分为以下两个部分:

(1) 质谱发现病毒膜蛋白 VP32 是 ORF wsv198 的编码产物。我们构建了融合表达载体 pGEX-2Th-*vp32* 和 pMAL- *vp32* 并分别在 *E.coli* BL-21 菌株中表达纯化了 GST-VP32 和 MBP-VP32, 制备了相应的抗血清。通过 western-blot 分析进一步证实了 VP32 属于病毒膜蛋白。免疫金标定位显示其分布在病毒囊膜上, 使用去污剂 0.1%Tween-20 轻微处理囊膜后, 金标定位显示其似乎位于囊膜内侧。进一步对其蛋白质功能的研究(主要是蛋白质相互作用方面)遇到了阻力, 推测是耦联的 GST/MBP 影响了 VP32 的正确折叠, 无法形成天然空间构象。

(2) WSSV ORF wsv 001 编码产物类胶原蛋白(collagen-like protein,CLP)是 WSSV 病毒中一个非常独特的蛋白, 由 1684 个氨基酸组成, 预测分子量为 168.2 KDa。经研究分析, 该蛋白含有一段特异的类胶原蛋白序列(Gly-X-Y, 161-1327 aa), 在病毒中发现该序列, 是极为罕见的。我们选取该蛋白的 N 端, 中段, C 端, 分别在 *E.coli* BL-21 菌株中表达蛋白片段, 并制备相应抗体, 随后 western-blot 检测该病毒蛋白在病虾各组织中的分布, 发现具有一定差异性, 并且 C 端蛋白片段的杂交信号不明显, 推测发生了降解或剪切。以上为进一步研究该蛋白的功能和其对于病毒复制, 感染的意义打下了基础。

**关键词:** 对虾白斑综合症病毒; 类胶原蛋白(CLP); VP32

## Abstract

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a large, rod-shaped, enveloped double-stranded DNA virus. The WSSV has been classified to be the sole species of *Whispovirus* in genus of *Nimaviridae*, and the main pathogen harming shrimp industry.

At present, our research mainly focuses on the main proteins of WSSV. These proteins play important roles in the formation construction, invasion, proliferation, etc.

This paper has two parts as below:

(1) Identification by mass spectrum indicated that VP32 is the production of the ORF wsv198. We constructed expression vector pGEX-2Th-*vp32* and pMAL-*vp32*, and expressed and purified GST-VP32 and MBP-VP32 in *E. coli* BL21(DE3) respectively, and then anti GST-VP32 serum was prepared. By using western-blot, we confirmed that VP32 is viral envelop protein and immune-gold microscope (IEM) further approved it. When treated with the detergent 0.1%Tween-20 mildly, we found VP32 apparently located in the inner of viral envelope. The tag of GST/MBP might exert influence on VP32's folding to correct native state, which made against further research of VP32 function (mainly protein interaction aspect).

(2)The collagen-like proteins (CLP) protein coded by WSSV ORF wsv 001 is a really unique envelop protein of WSSV which is consisted of 1,684 amino acids and the predicted molecular weight is 168.2 KDa. Research showed that protein has a particular collagen-like sequence (Gly-X-Y , 161—1327 aa) which is rare in the virus. We chose N-terminal, middle, C-terminal sequence and expressed them in *E.coli* BL-21(DE3) respectively, then the corresponding antibodies were prepared. We detected the distribution of CLP in some tissues of infected shrimps and a certain difference was disclosed. The weak signal of the western blotting in C-terminus indicated the degeneration might occurred. All the above laid the foundation for further research on this protein's function.

**Key words:** White Spot Syndrome Virus; Collagen-like proteins(CLP); VP32

## 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的研究概况

##### 1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现

对虾为甲壳动物(*Crustacea*)十足目(*Decapoda*)对虾科(*Penaeidae*)对虾属(*Penaeus*)的统称, 是具重要经济价值的浅海产大型游泳虾类。上世纪八十年代至九十年代初期是我国对虾养殖业发展的时期, 1991 年我国对虾养殖产量 22 万多吨, 位居世界第一。但是自从 1993 年我国养殖对虾暴发白斑病以来, 产量减少至 4 万吨左右<sup>[1]</sup>。通过研究发现, 引起我国和其他沿海国家大范围暴发对虾流行病的主要病原是对虾白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)<sup>[2-5]</sup>。WSSV 感染力强, 被感染的对虾在一周内死亡率高达 90~100%<sup>[6]</sup>。该病毒不仅能够侵染绝大多数种类的对虾, 还可侵染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, 具有较广泛的宿主范围<sup>[7-9]</sup>。对虾白斑综合症病毒危害极大, 因此引起了水产养殖科技人员的广泛关注。

##### 1.1.2 对虾白斑综合症病毒的大小和形态结构

电子显微镜负染观察<sup>[2,3,10,11]</sup>显示: 完整的病毒粒子横切面为圆形, 纵切面为杆状而略带椭圆, 大小约 380-250 nm × 75-100 nm, 直径约 90-100 nm, 一端略平带轻微凹陷, 一端略细, 略细端有一细长鞭毛状结构, 大小约 40 nm × 50 nm, 无包涵体; 病毒粒子的最外层是由 2 层单位膜组成的囊膜, 两膜之间有较宽阔的间隙; 紧接囊膜向内是核衣壳, 大小约为 380-330 nm × 80-60 nm; 病毒的核衣壳结构为螺旋排列的亚单位形成的圆柱体, 两端各有一帽状结构, 一端为较扁的梯形, 另一端为三角锥形; 螺旋带与核衣壳长轴垂直, 螺距 30nm, 每匝螺旋宽 26 nm, 螺旋间距 4 nm; 核衣壳螺旋由籽粒构成, 每个籽粒单位由 2 个边缘颗粒和 1 个中间颗粒组成, 呈“<”形结构, 籽粒排列周期为 14 nm。核酸存在于核衣壳中。病毒粒子主要存在于对虾的细胞核中<sup>[8,12]</sup>。

##### 1.1.3 对虾白斑综合症病毒的感染宿主及感染动物模型

WSSV 具有非常广泛的宿主谱, 在甲壳纲和昆虫纲动物中均有其敏感的宿主, 以虾、蟹等十足目类为多<sup>[2]</sup>, 已发现该病毒能感染的养殖对虾有: 斑节对

虾(草虾) (*Penaeus monodon*)、日本对虾(*P. japonics*)、刀额新对虾(砂虾) (*Metapenaeus ensis*)、中国对虾(*P. chinensis*)、印度虾(*P. indicus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)、熊虾(*P. semisulcatus*)、美国蓝虾 (*P. setiferus*)等。WSSV 还感染其它种类的虾蟹, 但不一定发病, 它们只是 WSSV 感染对虾的中间宿主<sup>[13]</sup>。由于虾蟹类的迁徙能力极强, 它们广泛存在于自然水体和水产养殖, 特别是对虾养殖水体中, 并随着海水流动或通过自身迁徙的特性而在不同的水体间活动, 或被其他大型生物掠食, 或死亡后腐烂尸体被对虾等直接感染宿主摄食, 造成野生虾或养殖虾的感染和死亡。这不仅给 WSSV 的防治带来很大的困难, 而且对于水产养殖地区的生态环境的安全性构成了潜在的威胁。

WSSV 目前没有可用于增殖的细胞系, 感染用对虾价格昂贵, 饲养不易, 使得在实验室尤其在那些远离海洋的实验室很难开展 WSSV 的研究工作, 所以寻找 WSSV 替代的宿主, 建立感染动物模型是非常必要的。试验表明 WSSV 在淡水克氏螯虾(*Procambarus clarkia*)体内的增殖过程和增殖特性与其在对虾体内的相应行为非常相似; 从发病或死亡螯虾体内观察到的病毒粒子, 其形态大小与从中国对虾中分离的病毒粒子相似或相同<sup>[14-17]</sup>。同时, 因为克氏螯虾具有市场价格低廉, 一年四季可以获得, 室内人工喂养容易等优点, 所以目前克氏螯虾已经成为 WSSV 研究中最常用的替代宿主。它不仅为研究 WSSV 提供了一个良好的病毒增殖体系, 而且为深入研究 WSSV 性质及与宿主之间的关系提供了一个相对理想的实验模型。

#### 1.1.4 对虾白斑综合症病毒的组织病理学

患病对虾一般表现为行动缓慢, 体弱, 无力, 摄食减少或停止, 慢游于水面或伏在池边, 很快死亡。虾壳变软, 体色常常轻度变红或暗红或红棕色, 这是由于表皮色素细胞扩散所致, 也有部分对虾体色不会改变。发病初期在头胸甲上可观察到针尖样大小圆型或不规则白色斑点, 数量不多; 而后期则在病虾的头胸甲外表皮层有许多肉眼可辨的不透明白斑, 严重者白斑遍布整个甲壳<sup>[18]</sup>。

WSSV 感染的对虾组织器官较多, 组织病理观察<sup>[19,20-24]</sup>发现, 在病虾的鳃组织、胃和肠上皮细胞及粘膜下层结缔组织、淋巴器官、触角腺、心脏、肝胰腺及尾扇等组织器官中都发生了不同程度的病变。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表皮细胞最易感染病毒，鳃的表皮细胞、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。在肌肉组织中病毒较少，但在病毒感染严重时，肌肉中也会出现较多的病毒粒子。

### 1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化

分离 WSSV 是进行白斑病监测、预防和进一步研究 WSSV 必须取得的材料。1995 年，台湾科学家最早报道了 WSSV 的分离纯化<sup>[3,19]</sup>。研究者收集了感染 WSSV 的斑节对虾，分离纯化得到 WSSV 病毒粒子。提取的病毒 DNA 用 *SaII* 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 *HindIII* 酶切位点，大小超过 150 kb，而以后的研究结果证实所获得的病毒 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<sup>[25]</sup>，解决了之前病毒得率低的问题，突破了病毒纯化分离技术的瓶颈环节。利用该方法首次获得了纯的完整病毒基因组 DNA，大小约为 290 kb。2000 年，van Hulten 等<sup>[26,27]</sup>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，并通过蛋白 N 端测序鉴定了 3 条主要的 WSSV 结构蛋白(VP28、VP26、VP24)。随后作者又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，并鉴定了另外 2 条主要的 WSSV 结构蛋白(VP19、VP15)<sup>[28]</sup>。

以前病毒纯化的效率极低，纯度也不高，而且纯化的病毒样品中包含较多的细胞污染物，这就制约了 WSSV 结构蛋白的鉴定及其功能研究工作的开展。迄今为止，完整病毒纯化最常用的方法是采用密度梯度超速离心从感染病毒的克氏螯虾的血清中提取。黄等<sup>[29]</sup>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<sup>[30]</sup>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。虽然密度梯度离心可以得到纯度较高的病毒粒子，但是由于螯虾血清中病毒粒子量较少，病毒纯化的效率仍然很低，平均的病毒得率约为  $1.8 \times 10^9 / 5 \text{ ml}$  血清。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<sup>[31]</sup>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为进一步的研究 WSSV 感染包装机制打下良好的基础。

### 1.1.6 对虾白斑综合症病毒的检测

由于对虾患白斑病后很快大量死亡，医治难度很大，为了通过早期诊断来指导疾病的预防，建立快速、敏感和特异的病毒检测技术仍然是目前对虾白斑病研究领域的重点研究内容之一。常用的病毒检测技术有：组织病理学检测，包括光学显微镜法和电子显微镜观察法两种；酶联免疫吸附检测(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法；核酸探针杂交法；PCR 检测法。

其中 PCR 技术是病原检测的强有力工具。由于其快速、特异的优点，该技术已经成为 WSSV 早期快速诊断的一种最常用的方法<sup>[19,32-36]</sup>。PCR 反应的特异性是由引物决定的，特异性引物的设计不是任意的。目前对 WSSV 进行 PCR 检测的引物几乎都是在 WSSV DNA 片断序列的基础上设计的。本实验室在测定的 WSSV 全基因组序列的基础上研制的 PCR 检测试剂盒可以对 WSSV 进行快速准确的检测。近几年来，一些研究者还对 PCR 技术做了不同的改进，发展了 RT-PCR、巢式 PCR、竞争 PCR 等方法，使检测结果更快速、准确<sup>[37-41]</sup>。徐等<sup>[42]</sup>在 WSSV 的定量 PCR 检测的基础上研究 WSSV 感染与发病的关系，初步确定了疾病暴发的危险临界值为每毫克组织含  $10^3$  个病毒粒子。随机引物扩增多态 DNA 分析是 PCR 基础上发展的分子标记技术。其基本原理是采用随机合成的较短的单个随机引物，对病毒或其它生物基因 DNA 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行凝胶电泳形成核酸指纹图谱，不仅可以用来检测同种病毒，还可以用来进行不同种病毒间序列同源性的比较。孔等<sup>[43]</sup>已将这一技术应用于对虾病毒的鉴别。研究显示，1994 年和 1995 年发病的中国对虾中的杆状病毒 DNA 的 RADP 电泳图谱完全一致，证实这两年度引起中国对虾死亡的病原同为 WSSV。Lo 等<sup>[44]</sup>利用一套随机片断作为引物，对从不同地域不同宿主分离的 WSSV 进行随机引物扩增多态 DNA 分析。部分序列的比较结果表明，不同地域不同宿

主分离的 WSSV DNA 与基因库中的 WSSV 序列具有很高的同源性。

## 1.2 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究

随着病毒研究的深入,了解病毒粒子所携带的 DNA 信息显得愈发重要。研究发现 WSSV 基因组是双链环状 DNA,目前 3 株 WSSV 分离株的全基因组序列已经测定。(1) 中国株(WSSV-CN, Accession No. AF332093)<sup>[45]</sup>:病毒分离自中国大陆的日本对虾(*Penaeus japonicus*),序列全长 305,107 bp。序列分析整个基因组包含有 531 个开放阅读框(ORFs),其中 181 个 ORFs 可能具有编码蛋白的功能,相应每个基因平均长度为 1.7 kb。基因组约有 3%是由 9 个同源重复区(homologous region, *hr*)构成,其它 97%是特异的。通过 cDNA 文库鉴定和筛选,有 36 个 ORFs 被证实具有编码功能蛋白的能力,另外有 52 个 ORFs 通过 RT-PCR 的方法被确认具有转录功能。在 181 个 ORFs 中,80%下游具有 poly(A) 结构。(2) 泰国株(WSSV-TH, Accession No. AF369029)<sup>[30]</sup>,病毒分离自泰国的斑节对虾(*Penaeus monodon*),用克氏螯虾(*Procambarus clarkia*)作宿主感染增殖 WSSV 用于测序,序列全长 292,967 bp。分析选出 184 个 ORFs,占全基因组的 92%。在 184 个 ORFs 中,72%有真核生物翻译起始的 Kozak 结构,46%的启动子有 TATA 框。9 个同源重复区散布于整个基因组,每个同源区域由数个 250 核苷酸重复单位串联组成。(3) 台湾株(WSSV-TW, Accession No. AF440570)<sup>[46]</sup>:病毒分离自台湾的斑节对虾(*Penaeus monodon*),序列全长 307,287 bp,是 3 株 WSSV 分离株中最大的。Lan 等<sup>[47]</sup>研究发现,WSSV 基因组 DNA 上存在缺失热点,在自然条件下的增殖过程中病毒基因组出现 4.6kb 至 8.1kb DNA 片段的缺失,片段缺失的病毒株较原始病毒株毒力下降。Marks 等<sup>[48]</sup>用 DNA microarray 技术分析了泰国株 184 个 ORFs 的转录图谱发现,79%的 ORFs 在感染病毒的斑节对虾(*Penaeus monodon*)的腮中被检测到有转录,此结果与 Lan 在中国株中获得的结果基本一致。吴等<sup>[49]</sup>收集了 1996 年和 2002 年感染 WSSV-CN 的对虾,研究发现与 1996 年病毒株相比较,2002 年病毒株缺失了 wsv479、wsv482、wsv489 和 wsv493 ORFs。Liu 等<sup>[50]</sup>通过 microarray 和 RT-PCR 筛选鉴定了 WSSV 的 3 个极早期基因(Immediate-early, IE)。

通过生物信息学分析<sup>[30,45]</sup>,WSSV 病毒基因组的大部分开放阅读框编码的蛋白和已知的蛋白基本没有同源性,仅有少数几个基因与其它病毒或生物的



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库