

学校编码: 10384  
学号: 20120051302106

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 VP38 和 VP150  
的鉴定和功能的初步研究

Identification and Functional Analysis of Envelope Proteins  
VP38 and VP150 of White Spot Syndrome Virus

揭祖亮

指导教师姓名: 杨 丰 研究员  
专 业 名 称: 生物化学与分子生物学  
论文提交日期: 2008 年 06 月 日  
论文答辩时间: 2008 年 07 月 日  
学位授予日期:

答辩委员会主席: 邵宗泽 研究员  
评阅人:

2008 年 07 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 对虾白斑综合症病症及组织病理学.....	3
1.1.3 对虾白斑综合症病毒的形态特征.....	3
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的感染宿主及感染动物模型.....	4
1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化.....	5
1.2 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究.....	6
1.3 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究.....	7
1.3.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白.....	7
1.3.2 对虾白斑综合症病毒的功能酶类.....	12
<b>2 本论文研究的内容和意义.....</b>	<b>15</b>
<b>第一部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP38 基因的鉴定.....</b>	<b>16</b>
<b>1 前言.....</b>	<b>16</b>
<b>2 材料与方法.....</b>	<b>17</b>
2.1 材料.....	17
2.2 方法.....	18
2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备.....	18
2.2.2 基因的克隆表达和蛋白质纯化.....	19
2.2.3 多克隆抗体的制备.....	20
2.2.4 Western blot 分析.....	21
2.2.5 Far-Western 分析.....	21
2.2.6 GST pull-down 分析.....	22

<b>3 结果</b> .....	22
3.1 vp38 基因的结构.....	22
3.2 GST-VP38、GST-VP38n 和 GST-VP38c 的诱导表达和纯化.....	23
3.3 Western blot 分析.....	25
3.4 VP38 与 VP24 之间的相互作用.....	26
3.5 GST pull-down 分析 VP38n, VP38c 和 VP24 的相互作用.....	28
<b>4 讨论</b> .....	29
<b>第二部分 对虾白斑综合症病毒膜蛋白 VP150 基因的初步鉴定</b> .....	31
<b>1 前言</b> .....	31
<b>2 材料与方法</b> .....	31
2.1 材料.....	31
2.2 方法.....	31
2.2.1 pGEX-2T- <i>vp150n</i> -(6His) 和 pGEX-2T- <i>vp150c</i> -(6His)重组表达质粒的构建.....	31
2.2.2 GST-VP150n-(6His)和 GST-VP150c-(6His)在 <i>E.coli</i> BL-21 中的表达... ..	32
2.2.3 Ni-NTA 柱变性条件下纯化重组蛋白及蛋白复性.....	32
2.2.4 多克隆抗体的制备.....	33
2.2.5 Western blot 分析.....	33
2.2.6 从感染病毒的螯虾血液中提取 WSSV.....	33
2.2.7 WSSV 病毒蔗糖密度梯度超速离心.....	33
2.2.8 WSSV 膜蛋白蛋白酶活性的测定.....	33
<b>3 结果</b> .....	33
3.1 <i>vp150</i> 基因的结构.....	34
3.2 GST-VP150n-(6His)和 GST-VP150c-(6His)在 <i>E. coli</i> BL-21 中的诱导表达和纯化.....	34
3.3 Western blot 分析.....	37
3.4 血液提取 WSSV 和组织提取 WSSV 中 VP150 的降解分析.....	38
3.5 WSSV 膜蛋白的蛋白酶活性初步测定.....	39
<b>4 讨论</b> .....	39

参考文献.....	41
缩略词.....	51
附录.....	52
致谢.....	62

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 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 Pathology of white spot syndrome virus.....	3
1.1.3 Structure of white spot syndrome virus.....	3
1.1.4 Host and animal model of white spot syndrome virus.....	4
1.1.5 Isolation and purification of white spot syndrome virus.....	5
1.2 Genomics of white spot syndrome virus.....	6
1.3 Proteomics of white spot syndrome virus.....	7
1.3.1 Structural proteins of white spot syndrome virus.....	7
1.3.2 Functional enzymes of white spot syndrome virus.....	12
<b>2 Investigations in this thesis and their significance</b> .....	15
<b>Part I Identification of <i>vp38</i> gene from white spot syndrome virus</b> .....	16
<b>1 Introduction</b> .....	16
<b>2 Materials and methods</b> .....	17
2.1 Materials.....	17
2.2 Methods.....	18
2.2.1 Preparation of WSSV intact virions and nucleocapsids.....	18
2.2.2 Expression of genes and protein purification.....	19
2.2.3 Antibody preparation.....	20
2.2.4 Western blot.....	21
2.2.5 Far-Western blotting.....	21

2.2.6	GST pull-down analysis.	22
3	<b>Results.</b>	22
3.1	Structural of <i>vp38</i> gene.	22
3.2	Expression and purification of GST-VP38, GST-VP38n and GST-VP38c.	23
3.3	Western blot.	25
3.4	Interaction between VP38 and VP24.	26
3.5	GST pull-down of GST-VP38n, GST-VP38c with VP24.	28
4	<b>Discussion.</b>	29
<b>Part II Identification of <i>vp150</i> gene from white spot syndrome virus.</b>		
	<b>virus.</b>	31
1	<b>Introduction.</b>	31
2	<b>Materials and methods.</b>	31
2.1	Materials.	31
2.2	Methods.	31
2.2.1	Construction of recombinant plasmids of pGEX-2T- <i>vp150n</i> -(6His) and pGEX-2T- <i>vp150c</i> -(6His).	31
2.2.2	Expression of GST-VP150n-(6His) and GST-VP150c-(6His) in <i>E.coli</i> .	32
2.2.3	Purification of recombinant protein under denatured condition and protein renature.	32
2.2.4	Antibody preparation.	33
2.2.5	Western blot.	33
2.2.6	Purification of white spot syndrome virus from infected shrimp blood.	33
2.2.7	WSSV purification with sucrose density gradient centrifugation.	33
2.2.8	Detection of WSSV envelope proteins protease activity.	33
3	<b>Results.</b>	33
3.1	Structural of <i>vp150</i> gene.	34
3.2	Expression and purification of GST-VP150n-(6His) and	



GST-VP150c-(6His).....	34
3.3 Western blot.....	37
3.4 Degradation analysis of VP150 from WSSV isolated from blood and tissue.....	38
3.5 Detection of WSSV envelope proteins protease activity.....	39
<b>4 Discussion.....</b>	<b>39</b>
<b>References.....</b>	<b>41</b>
<b>Abbreviation.....</b>	<b>51</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>52</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>62</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,也是严重危害对虾养殖业的最主要病原。本论文围绕病毒膜蛋白开展研究,包括以下两个部分。(1) 质谱分析发现病毒膜蛋白 VP38 是 ORF wsv259 的编码产物。随后在 *E.coli* BL-21 菌株中表达纯化了 GST-VP38 并制备了相应的抗血清。利用 Far-Western blotting 和 GST pull-down 分析发现 VP38 和另一个病毒膜蛋白 VP24 有相互作用。进一步分别重组表达了 VP38 的 N-端 VP38n (aa 1-142) 和 C-端 VP38c (aa 143-309), GST pull-down 分析结果表明 VP38 与 VP24 的相互作用位点在 C-端。(2) WSSV ORF wsv 011 编码产物 VP150 是病毒中一个比较独特的膜蛋白,由 1301 个氨基酸组成,预测分子量约 144kDa。质谱分析发现在病毒粒子中 VP150 存在降解现象。从 vp150 基因的两端各选约 600 bp,分别命名为 *vp150n*、*vp150c*,而后在 *E. coli* BL-21 菌株中表达纯化了 VP150n 和 VP150c 并制备了相应的抗血清。通过 Western blot 初步发现从血液中和组织中提纯的 WSSV 病毒粒子中 VP150 降解程度存在区别,推测它是病毒成熟过程中的重要蛋白。对病毒膜蛋白性质以及它们之间相互作用研究是了解病毒入侵、包装、成熟和释放的重要步骤,将为防治病毒奠定科学依据。

**关键词:** 对虾白斑综合症病毒; 膜蛋白; VP38; VP150

## Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is a large, rod-shaped, enveloped double-stranded DNA virus that has caused massive losses in the shrimp farming industry. This paper is concerned about the envelope proteins, including two major parts below. (1) Recently, ORF wsv259 was showed to encode an envelope protein VP38 by proteomic analysis. In this study, VP38 gene was expressed as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein and a polyclonal antibody was raised against GST-VP38 to investigate its biological function. Far-Western blotting showed that VP38 interacted directly with VP24, a major WSSV envelope protein. Furthermore, GST pull-down assay confirmed this interaction. In addition, to delineate the region of interaction of VP38 with VP24, GST-VP38n (aa 1-142) and GST-VP38c (aa 143-309) were expressed. GST pull-down assay revealed that VP38c played a crucial role in the interaction between VP38 and VP24, i.e. VP38 binds via its C-terminal region to VP24. (2) VP150 containing 1301aa that encoded by ORF wsv011 was a special envelope protein which had the property of degradation. Two fragments were chosen from N and C terminals of wsv011 and named as *vp150n* and *vp150c*, respectively. VP150n and VP150c were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose. Then polyclonal antiserums of VP150n and VP150c were raised. Western blot analysis indicated that VP150 proteins in WSSV isolated from tissue and blood were different in degradation phenomenon. We postulate that VP150 is a crucial protein that related to the maturation of WSSV envelope. To sum up, it will make great sense to study the properties and interactions between envelope proteins which may help us to better understand the invasion, assembly, maturation and release mechanisms of WSSV.

**Key words:** White spot syndrome virus; Envelope proteins; VP38; VP150

## 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

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 对虾白斑综合症病症及组织病理学

患病对虾一般表现为行动缓慢,体弱,无力,摄食减少或停止,漫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>[10]</sup>。通过组织病理观察发现,在对虾的各种组织中,WSSV主要侵染皮下组织、造血组织、结缔组织等。在病虾的鳃、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,但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<sup>[9, 11]</sup>。

##### 1.1.3 对虾白斑综合症病毒的形态特征

对虾白斑综合症病毒流行以来,研究者通过病虾的组织切片或病毒提取物的电子显微镜负染观察<sup>[2, 12, 13]</sup>表明,完整病毒粒子横切面为圆形,纵切面为杆状且略微呈椭圆形,大小约250-380 nm × 75-100 nm。一端略平带轻微凹陷,另一端

略细，略细端有一条很长的鞭毛状结构。两层单位膜组成的包膜构成了病毒粒子最外层，两层膜之间有较宽阔的间隙。紧接包膜向内是核衣壳，大小约 350 nm × 80 nm，为 15 条螺旋排列的亚单位形成的圆柱体，螺旋与衣壳长轴垂直，螺距 30 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，直径约为 8 nm。WSSV 的核酸存在于核衣壳中。对虾的细胞核或细胞质都发现有病毒粒子，但以细胞核中居多。

#### 1.1.4 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>[2,14-20]</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>[21]</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>[22-25]</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。

### 1.1.5 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>[3,26]</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>[27]</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 Hulst等<sup>[28,29]</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>[30]</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>[31]</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 Hulst<sup>[32]</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>[33]</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。

## 1.2 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>[34]</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>[32]</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>[35]</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>[36]</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>[37]</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>[38]</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>[39]</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>[32,34]</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已知

蛋白质或结构域有较高的同源性，大部分是一些与核苷酸代谢和DNA复制有关的酶类（如胸腺嘧啶核苷酸合成酶、非特异性核酸内切酶、dUTPase和核苷酸还原酶等）、类胶原蛋白和三个病毒结构蛋白<sup>[32, 34]</sup>。而具有类胶原蛋白基因是WSSV的一个独特的属性，之前发现的所有病毒都没有该基因。国际病毒分类委员会基于WSSV基因的特性将其归类于Whispovirus属，是Nimaviridae新科中唯一的成员<sup>[40,41]</sup>。

### 1.3 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究

WSSV 研究进入了后基因组时代，目前的研究主要集中在病毒的结构蛋白和一些病毒增值所必需的酶类功能的鉴定上。

#### 1.3.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白

结构蛋白是指构成成熟病毒颗粒所必需的蛋白质，包括膜蛋白和核衣壳蛋白。膜蛋白是构成病毒囊膜结构的蛋白质，通常包括包囊膜糖蛋白和基质蛋白两类。核衣壳蛋白是构成病毒核衣壳结构的蛋白质，是构成核壳体的最小单位。病毒的结构蛋白除了支撑维持病毒的基本形态，保护病毒的核酸，还与病毒对宿主的吸附和侵入过程有关。目前通过蛋白N端测序(N-terminal sequencing)<sup>[42-44]</sup>、质谱(Mass spectrometry)<sup>[45-48]</sup>技术已经鉴定了超过 30 条的WSSV结构蛋白。以下是一些已经鉴定的主要结构蛋白：

##### (1) VP28 (wsv421)

VP28 是WSSV含量最丰富的结构蛋白之一，最早由van Hulst等<sup>[42]</sup>从纯化的病毒中分离鉴定，Western blot分析显示VP28 定位于WSSV的囊膜部分。Zhang等<sup>[49]</sup>通过病毒的DNA和cDNA文库发现了 *vp28* 基因，胶体金免疫电镜定位显示VP28 属于病毒的膜蛋白。进一步研究发现，宿主感染WSSV后 6 h和 18 h才能检测到低水平 *vp28* 基因和VP28 蛋白，推测 *vp28* 属于WSSV晚期基因。蛋白序列分析表明VP28 在N-末端和C-末端都具有穿膜结构，并具有许多N-或O-糖基化位点，但在实验中并未发现VP28 有糖基化修饰<sup>[44]</sup>，但是有Thr磷酸化修饰<sup>[48]</sup>。van Hulst等<sup>[50]</sup>使用抗VP28 的特异性多克隆抗体可以在一定程度上中和WSSV在对虾体内的感染，并且这种中和机制具有浓度依赖性。研究者还发现在养殖对虾的食物中添加含重组表达VP28 的细菌可以显著降低患病对虾的死亡率<sup>[51]</sup>，推测该蛋白在病毒感染的起始阶段起着重要作用。Yi等<sup>[52]</sup>发现与绿色荧光蛋白(Green



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