

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 21620071151961

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒(WSSV)RNA 干扰及  
膜蛋白 VP19 在病毒组装中功能的初步研究

Researches into the RNA interference of White Spot Syndrome  
Virus (WSSV) and the Role of Envelope Protein VP19 in Virus  
Assembly

邱 怀 娜

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: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 05 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 曾润颖 研究员

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 05 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

缩 略 词.....	V
摘 要.....	VI
ABSTRACT.....	VII
<b>1 前 言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 对虾白斑综合症病毒研究进展</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及命名.....	1
1.1.2 对虾白斑综合症的症状及病理变化.....	2
1.1.3 对虾白斑综合症病毒的形态结构.....	2
1.1.4 对虾白斑综合症病毒的感染宿主、传播途径及感染动物模型.....	3
1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化.....	4
1.1.6 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究.....	5
1.1.7 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究.....	5
<b>1.2 RNA干扰的研究进展</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 RNA干扰现象的发现.....	12
1.2.2 RNA干扰的作用机理.....	12
1.2.3 RNA干扰技术的主要应用.....	13
<b>1.3 本论文研究的内容、目的和意义</b> .....	<b>18</b>
<b>2 材料与方 法</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 材 料</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 方 法</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 WSSV 完整病毒和核衣壳的制备.....	20
2.2.2 dsRNA 的体外合成.....	21
2.2.3 dsRNA体内注射.....	25

2.2.4 实时荧光定量PCR	26
2.2.5 逆转录PCR	27
2.2.6 宿主组织中病毒粒子的检测	27
2.2.7 VP19 重组蛋白的表达与纯化	28
2.2.8 多克隆抗体的制备	29
2.2.9 Western blotting	29
2.2.10 免疫电镜检测	30
2.2.11 病毒制备物的检测	30
2.2.12 数据分析	31
<b>3 结果</b>	<b>32</b>
3.1 实时荧光定量PCR分析双链RNA对WSSV复制的抑制作用	32
3.2 逆转录PCR分析双链RNA对病毒基因转录的抑制作用	33
3.3 超薄切片的电镜观察结果	34
3.4 抗体特异性分析结果	40
3.5 免疫电镜检测结果	41
3.6 病毒制备物检测结果	42
3.7 SDS-PAGE结果	43
<b>4 讨论</b>	<b>45</b>
<b>5 论文总结</b>	<b>49</b>
<b>参考文献</b>	<b>50</b>
<b>附录 主要仪器设备、常规溶液配制和常规实验方法</b>	<b>61</b>
<b>硕士期间待发表的文章</b>	<b>70</b>
<b>致 谢</b>	<b>71</b>

## Contents

<b>Abbreviation</b> .....	<b>V</b>
<b>Chinese Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>English Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Research of White Spot Syndrome Virus</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Finding and naming of White Spot Syndrome Virus .....	1
1.1.2 Symptom and pathology of White Spot Syndrome .....	2
1.1.3 Size and structure of White Spot Syndrome Virus .....	2
1.1.4 Host, propagation path and animal model of White Spot Syndrome Virus .....	3
1.1.5 Isolation and Purification of White Spot Syndrome Virus .....	4
1.1.6 Genomics of White Spot Syndrome Virus .....	5
1.1.7 Proteomics of White Spot Syndrome Virus .....	5
<b>1.2 Research of RNA interference(RNAi)</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Finding of RNA interference phenomenon .....	12
1.2.2 Mechanism of RNA interference .....	12
1.2.3 Main application of RNA interference technology .....	13
<b>1.3 Investigation of this thesis and their significance</b> .....	<b>18</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Preparation of WSSV intact virions and nucleocapsids .....	20
2.2.2 Synthesis of dsRNA <i>in vitro</i> .....	21
2.2.3 Injection of dsRNA <i>in vivo</i> .....	25

2.2.4 Real-time PCR	26
2.2.5 Reverse transcription PCR	27
2.2.6 Detection of viral particles in the tissue of host	27
2.2.7 Expression and purification of the recombination protein VP19	28
2.2.8 Preparation of ployclonal antibodies	29
2.2.9 Western blotting	29
2.2.10 Immunoelectron microscope (IEM)	30
2.2.11 Detection of virus preparation	30
2.2.12 Data analysis	31
<b>3 Results</b>	<b>32</b>
3.1 Analysis of the inhibition of WSSV replication by dsRNA using real-time PCR method	32
3.2 Analysis of the suppression of WSSV gene transcription by dsRNA using reverse transcription PCR method	33
3.3 Microscopic observation of ultrathin section	34
3.4 Antibody specificity	40
3.5 Immunoelectron microscopic detection	41
3.6 Transmission electron microscopic detection	42
3.7 SDS-PAGE results	43
<b>4 Discussion</b>	<b>45</b>
<b>5 Summaries of thesis</b>	<b>49</b>
<b>Reference</b>	<b>50</b>
<b>Appendix</b>	<b>61</b>
<b>Papers to be published during postgraduate study</b>	<b>70</b>
<b>Acknowledge</b>	<b>71</b>



## 缩 略 词

Actin: 肌动蛋白基因

AP: alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶

BSA: bovine serum albumin, 牛血清白蛋白

dsRNA: double-stranded RNA, 双链 RNA

DTT: dethiothreitol, 二硫苏糖醇

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定法

ESI Q-TOF: electrospray ionization-time of flight, 电喷雾串联质谱法

His: Histidine, 组氨酸

IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, 异丙基-β-D-半乳糖苷

LC-ESI-QTOF: quadrupole time of flight hybrid, 杂交四矩飞行时间质谱

MBP: maltose binding protein, 麦芽糖蛋白

MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

ORF: open reading frame, 开放阅读框

OG: octyl glucopyranoside, 辛基葡萄糖苷

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

PBS: Phosphate Buffered Saline, 磷酸盐缓冲液

PMSF: phenylmethyl sulfonyl fluoride, 苯甲基磺酰氟

PTA: phosphotungstic acid, 磷钨酸

RNAi: RNA interference, RNA 干扰

RGD: Arg-Gly-Asp, 细胞粘附结构域

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠

TEM: transmission electron microscopy, 透射电镜

IEM: immunoelectron microscopy, 免疫电子显微镜

VP: virus protein, 病毒蛋白

## 摘要

RNA 干扰是一个由 dsRNA 引导的 mRNA 序列特异的降解过程。在本研究中, 体外合成对应于对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 12 个膜蛋白 (分子量均小于 60 kDa) 基因以及一个不相关的绿色荧光蛋白(GFP)基因的长双链 RNA(dsRNA), 分别对淡水螯虾 (*Procambarus clarkii*) 进行肌肉注射。这 12 个 WSSV 膜蛋白基因包括: vp19, vp24, vp28, vp31, vp32, vp33, vp38, vp39, vp41A, vp41B, vp52A 和 vp52B。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 GFP 组或阳性对照组相比, 基因特异的 dsRNA 对 WSSV 的复制有较强的抑制作用( $P < 0.05$ )。为进一步确定 vp19, vp28, vp32 和 vp52A 这四个基因对应的 dsRNA 的抑制效果, 进行了逆转录 PCR 实验, 结果表明, 在这四个基因中, vp52A 对应的 dsRNA 抑制 WSSV 转录的效果最好。作为 WSSV 四个主要膜蛋白(VP28, VP26, VP24 和 VP19)之一, VP19 的功能研究相对较少, 本研究发现, 通过对感染 WSSV 的螯虾注射对应于 vp19 的 dsRNA, 能明显降低 WSSV 的感染力。超薄切片结合免疫电镜观察表明, WSSV vp19 基因被抑制后, 产生了大量缺少最外层膜的病毒样颗粒(VLP)。透射电镜观察显示, 病毒样颗粒主要是包裹着松散外膜的纺锤状核衣壳。SDS -PAGE 显示, 病毒样颗粒的组成与正常病毒一致, 然而 VP19 和其它三个主要膜蛋白的含量明显下降。以上结果表明 VP19 在病毒组装中起重要的连接作用, 当其被抑制后, 外膜不能有效地包裹形成成熟的 WSSV。基因特异 dsRNA 的使用, 将为 WSSV 特定基因功能的进一步研究提供一定的科学依据。

关键词: 对虾白斑综合症病毒, RNA 干扰, VP19 蛋白

## Abstract

RNA interference (RNAi) is the process by which dsRNA directs sequence-specific degradation of messenger RNA. In this study, freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*, were intramuscularly injected with double-stranded RNA(dsRNA) corresponding to 12 envelope protein genes (protein molecular mass < 60 kDa) of White Spot Syndrome Virus (WSSV): vp19, vp24, vp28, vp31, vp32, vp33, vp38, vp39, vp41A, vp41B, vp52A, vp52B, and an unrelated dsRNA of a green fluorescence protein (GFP) gene. Quantitative RT-PCR analysis showed that gene-specific dsRNA resulted in higher inhibition of WSSV replication, compared with the GFP group and positive control ( $P < 0.05$ ). RT-PCR was carried out to further determine the suppressive degree of dsRNA corresponding to vp19, vp28, vp32 and vp52A, the results showed that vp52A-dsRNA was of most efficiency in inhibiting WSSV transcription among the four genes selected. As one of the four major virus envelope proteins (VP28, VP26, VP24 and VP19), the function study of VP19 is limited. Our study showed that VP19 could significantly reduce virus infectivity in WSSV-challenged crayfish by injection with vp19-dsRNA. Ultrathin section and immunoelectron microscopy (IEM) showed that knocking down the WSSV VP19 could result in abundant virus-like particles (VLP), which lacked the outer layer membrane. Transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that the VLP was mainly spindly nucleocapsid loosely coated by a thin envelope. SDS-PAGE demonstrated that the protein composition of VLP was identical to normal virus particles, while the content of VP19 and the other 3 main envelope proteins decreased significantly. These results showed that VP19 played a vital role in connection during virus assembly. When it was knocked down, the outer layer membrane could not coat efficiently to form the mature WSSV particles. The use of gene-specific dsRNA may provide some scientific evidence for the further study of WSSV specific gene function.

**Key words:** White spot syndrome virus (WSSV); RNA interference (RNAi) ; VP19 protein

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 对虾白斑综合症病毒(WSSV)RNA 干扰及膜蛋白 VP19 在病毒组装中功能的初步研究

## 1 前言

### 1.1 对虾白斑综合症病毒研究进展

#### 1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及命名

对虾白斑综合症于20世纪90年代初首先在中国台湾地区发生,1994年扩展到整个亚洲的对虾养殖地区<sup>[1]</sup>。1995年10月,西半球出现首例对虾白斑综合症,1999年美国中部和南部也有类似的报道。2001年欧洲和澳洲也出现对虾白斑综合症。目前,对虾白斑综合症是全球范围内限制养虾业发展的最主要因素之一。

对虾白斑综合症的病原为一种无包埋体类杆状病毒,不同研究者根据所分离病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要病理症状,给不同分离株不同的命名<sup>[1-10]</sup>,见表1。由于1995年第6次国际病毒学会议后,无包涵体型杆状病毒不再归属于杆状病毒科,Lightner<sup>[11]</sup>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。2005年,国际病毒分类委员会(ICTV)第8次报告把WSSV放在线形病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus)<sup>[12]</sup>。

表 1: 各地报道的对虾白斑病毒的命名

缩写(Abbreviation)	英文全称(Whole name)
LNBV	Lymphoid cell nuclear baculovirus
RV-PJ	Rod-shaped nuclear virus of <i>Penaeus japonicus</i>
HHNBV	Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus
NOSV	Non-occluded shrimp virus
PcBLV	<i>Penaeus chinensis</i> baculo-Like virus
SEMBV	Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus

PmNOB II	<i>Paeneis monodon</i> non-occluded baculovirus II
MBV	<i>Penaeus monodon</i> type baculovirus
PRDV	Penaeid rod-shaped DNA virus
PAV	Penaeid acute viremia
CBV	Chinese baculovirus
PCBV	<i>Penaeus chinensis</i> baculovirus
WSBV	White spot syndrome baculovirus
WSDV	White spot disease virus
WSV	White spot virus
WSSV	White spot syndrome virus

### 1.1.2 对虾白斑综合症的症状及病理变化

发病对虾不喜进食，在池边打圈，离群孤游，体色轻度变红，经解剖可见肝肿大，胃肠空瘪；病虾体质明显虚弱，常静卧水底，活动缓慢，弹跳无力，对外界反映迟钝；大多数病虾头胸甲膨大，易被剥离，甲壳上有明显的白色斑点。在光学显微镜下观察，病虾的不同组织均存在广泛的变性、坏死，上皮细胞大量解体、脱落；部分细胞核肿大、游离；粘膜下层结构组织空泡化，结缔组织糜烂，只剩少量核及细胞残屑；坏死上皮及肌束间均有肿大的离散细胞核，约为正常核的1.5倍<sup>[13]</sup>。电镜观察显示，病虾在感染前期，病变组织细胞核膨胀，核仁消失，核外膜破损，染色质靠边分布，内质网断裂，核糖体脱落，线粒体肿胀，高尔基体萎缩，溶酶体空泡化；感染中期，病毒粒子在细胞核内大量复制，直至充满整个核，细胞核内无结构化，核膜及质膜皱缩；感染后期，核胀破，病毒粒子从核内释放，细胞核呈空囊状，胞质内髓样结构明显，细胞器解体，细胞功能丧失<sup>[13]</sup>。

### 1.1.3 对虾白斑综合症病毒的形态结构

电子显微镜负染观察表明：WSSV是一种无包涵体的杆状病毒，外面包有一层囊膜。完整粒子大小为(250-380) nm × (70-150) nm，一端有尾状突出物，核衣壳为(330-350) nm × (58-67) nm<sup>[10]</sup>。核衣壳的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，此端延伸出一条长尾；帽状结构之间有14圈螺旋，螺旋与核衣壳的长轴垂直<sup>[14]</sup>。WSSV 的形态结构十分相似，完整的病毒粒子横切

面为圆形,纵切面为杆状而略带椭圆,粒子外被囊膜,囊膜为双层结构,囊膜内可见杆状的核衣壳和核衣壳内致密的髓核<sup>[8, 15]</sup>。

#### 1.1.4 对虾白斑综合症病毒的感染宿主、传播途径及感染动物模型

##### (1) WSSV 的感染宿主

WSSV 具有广泛的宿主谱, 在甲壳纲(软甲壳亚纲、桡足亚纲) 和昆虫纲动物中均有其敏感宿主, 软甲壳亚纲动物宿主多为十足目的种类, 并以虾蟹为主。WSSV 除了能使众多种类的虾蟹感染发病外, 还能感染其它更多种类的虾蟹, 但这些虾蟹不一定发病, 也不一定出现感染对虾典型的甲壳下白斑肉眼可见症状, 它们只是作为WSSV 感染对虾的中间宿主。

##### (2) WSSV 的传播途径

WSSV 的经口摄食自然传播感染途径已得到认可, 浸泡或共居是否为WSSV 的传播感染途径还不很明确, 而KV Rajendran 等<sup>[16]</sup>用PCR 和原位杂交均检出了共居感染对虾阳性。显然由于使用了原位杂交和PCR 这样灵敏的检测方法才检出WSSV, 说明WSSV在实验条件下确实可通过共居方式传播, 只是共居感染的病毒的量很微, 不足以使对虾发病, 只以潜伏的方式存在于感染对虾体内。自然状态由于水体大小、水质以及动物行为有异, 不能确定是否如此, 但这种可能性不容忽视。自然状态下,WSSV 似乎也不排除垂直传播的可能。朱山<sup>[17]</sup>用差异PCR 在发病野生脊尾白虾组织及其卵扩增阳性, 表明该病毒在野生脊尾白虾可经卵垂直传播。另外,Lo ChuFang 等<sup>[18]</sup>用光镜组织病理学检查、电镜观察和原位杂交相结合检查WSSV 在发病野生斑节对虾中的组织分布时, 发现虾的精巢、精荚、卵巢中都能检出病毒阳性。

##### (3) WSSV 感染动物模型

WSSV 没有可用于增殖的细胞系, 感染用对虾价格昂贵, 饲养不易, 带毒者多, 使得在实验室尤其在那些远离海洋的实验室很难展开WSSV 的研究工作。研究者们尝试用克氏原螯虾(*Procambarus clarkia* 简称螯虾)作为增殖WSSV的动物模型, 获得成功, 取得了该病毒研究领域的重要突破<sup>[19]</sup>, 实验表明 WSSV 在螯虾内的增殖过程和增殖特性与其在对虾体内的相应行为具有相似性<sup>[20]</sup>, 证实了克氏原螯虾作为WSSV 感染动物模型的可靠性<sup>[21]</sup>。

### 1.1.5 对虾白斑综合症病毒的分离纯化

分离WSSV是确诊白斑病的依据, 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, 台湾地区最早报道了WSSV的分离纯化<sup>[10, 22]</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。研究表明该病毒具有双链DNA, 至少有22个*HindIII*酶切位点, 大小超过150 kb, 但是以后的研究结果证实所获得的病毒DNA是不完整的。1997年, 本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>[23]</sup>, 解决了以往方法中病毒得率低的问题, 突破了以往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>[24, 25]</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>[26]</sup>。

以往大部分病毒纯化的方法并不理想, 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。到目前为止, 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>[27]</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>[28]</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 $1.8 \times 10^9/5$  ml血清。另外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)。

本实验室2005报道了一种简单有效的从感染螯虾的组织中提取大量完整病毒粒子的方法<sup>[29]</sup>。它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, 绝大多数病毒粒子囊膜结构均完整。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, 能从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



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