

学校编码: 10384
学号: 21620121152329

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 (WSSV) 三种主要囊
膜蛋白相互作用位点的鉴定及其与几丁质
相互作用的研究

The Research on the Interaction Domains among Three
Major envelope Proteins and their Interaction with Chitin

李在鹏

指导教师姓名: 徐 洵 教 授

杨 丰 研 究 员

李 钊 副 研 究 员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 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 日

目录

目录.....	I
缩略词.....	VII
摘要.....	VIII
ABSTRACT.....	X
前言.....	1
1、对虾白斑综合症病毒（WSSV）及其分子生物学研究.....	1
1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况.....	1
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现、命名形态学特征及其分类学地位.....	1
1.1.2 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径.....	3
1.1.3 对虾白斑综合症的症状、组织病理学分析以及感染动物模型.....	3
1.2 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究.....	4
1.3 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究.....	6
1.3.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白的研究.....	6
1.3.2 对虾白斑综合症病毒的非结构蛋白的研究.....	12
2、蛋白质相互作用主要的研究技术.....	13
2.1、免疫共沉淀.....	14
2.2、Pull-down 技术.....	15
2.3、Far-Western blot.....	15
2.4、双杂交系统.....	15
2.5、噬菌体展示.....	15
2.6、蛋白质亲和层析.....	16
3、本论文的研究目的、意义以及研究内容.....	16
第一部分：对虾白斑综合症病毒（WSSV）.....	18
主要结构蛋白 VP28 与 VP24 相互作用位点的鉴定.....	18
1、前言.....	18

2、材料和方法	18
2.1 材料.....	18
2.2 方法.....	20
2.2.1 重组质粒的构建.....	20
2.2.2 突变体蛋白的表达和相互作用	23
3、结果	27
3.1 VP24 和 VP28 的相互作用	27
3.1.1 VP24 与 VP28 相互作用位点的鉴定	27
3.1.2 VP28 和 VP24 的相互作用	35
4. 讨论	40
第二部分：对虾白斑综合症病毒（WSSV）	43
主要结构蛋白 VP28 与 VP26 相互作用位点的鉴定.....	43
1、前言	43
2、材料和方法	43
2.1 材料.....	43
2.2 方法.....	45
2.2.1 重组质粒的构建.....	45
2.2.2 突变体蛋白的表达.....	45
2.2.3 突变体蛋白的相互作用分析	45
2.2.4 多肽封闭.....	46
3、结果	47
3.1 VP26 和 VP28 的相互作用	47
3.1.1 鉴定 VP26 与 VP28 相互作用的区域	47
3.1.2 VP28 和 VP26 的相互作用	52
4. 讨论	55
第三部分：WSSV 病毒粒子与几丁质结合的研究.....	57
1、前言	57
2、材料和方法	58

2.1 材料.....	58
2.2 方法.....	60
2.2.1 重组质粒的构建.....	60
2.2.2 WSSV 完整病毒粒子以及膜蛋白和核衣壳蛋白的制备.....	60
2.2.3 突变体蛋白的表达.....	61
2.2.4 免疫沉淀.....	61
2.2.5 封闭实验.....	63
2.2.6 多肽对 WSSV 病毒粒子在对虾体内增殖的抑制.....	64
3、结果.....	66
3.1 WSSV 病毒粒子与几丁质的结合.....	66
3.1.1 WSSV 病毒粒子的几丁质结合分析.....	66
3.1.2 几丁寡糖对 WSSV 病毒粒子与几丁质结合的抑制.....	67
3.2 WSSV 病毒膜蛋白、核衣壳蛋白的几丁质结合分析.....	67
3.3 四种主要的病毒膜蛋白与几丁质的结合.....	68
3.3.1 四种主要的病毒膜蛋白的几丁质结合分析.....	68
3.3.2 几丁寡糖对 VP24 与几丁质结合的阻断.....	69
3.4 WSSV 病毒膜蛋白 VP24 与几丁质结合位点的鉴定.....	70
3.4.1 VP24 突变体设计.....	70
3.4.2 VP24 突变蛋白诱导表达.....	71
3.4.3 几丁质结合分析.....	71
3.4.4 多肽 P-VP24 ₁₄₈₋₁₆₂ 、P-VP24 ₁₈₆₋₂₀₀ 对 VP24、WSSV 病毒粒子与几丁质结合的体外封闭.....	73
3.5 多肽对 WSSV 病毒粒子在对虾体内增殖的抑制.....	75
4. 讨论.....	77
参考文献.....	80
硕士期间发表的文章.....	89
致 谢.....	90

Contents

Contents	I
Abbreviation	IV
Chinese abstract	V
English abstract	VII
Introduction	1
1 White spot syndrome virus (WSSV) and molecular biological research	1
1.1 Research of white spot syndrome virus.....	1
1.1.1 Finding、 naming、 morphology and taxonomy of WSSV.....	1
1.1.2 Host and propagation of WSSV.....	3
1.1.3 Pathology and animal model of WSSV.....	3
1.2 Genomics of white spot syndrome virus.....	4
1.3 Proteomics of white spot syndrome virus.....	6
1.3.1 Structural proteins of WSSV.....	6
1.3.2 Nonstructural proteins of WSSV.....	12
2 Main research techniques in proteins interaction studying	13
3 Contents and significance of this thesis	16
Part 1 Identification of the interaction domains between VP28 and	
VP24	18
1 Introduction	18
2 Materials and methods	18
2.1 Materials.....	18
2.2 Methods.....	20
2.2.1 Construction of mutant gene vecotrs.....	20
2.2.2 Expression and inteaction of the mutant proteins.....	23
3 Results	27

Contents

3.1 The interaction between VP24 and VP28	27
3.1.1 Identification of active domains of rVP24 in the interaction	27
3.1.2 Identification of active domains of rVP28 in the interaction	35
4 Discussion	40
Part 2 Identification of the interaction domains between VP28 and VP26.....	43
1 Introduction.....	43
2 Materials and methods	43
2.1 Materials.....	43
2.2 Methods.....	45
2.2.1 Construction of mutant gene vecotrs	45
2.2.2 Expression of the mutant proteins	45
2.2.3 Inteaction assays of the mutant proteins	45
2.2.4 Peptide blocking assays.....	46
3 Results.....	47
3.1 The interaction between VP26 and VP28	47
3.1.1 Identification of active domains of rVP26 in the interaction	47
3.1.2 Identification of active domains of rVP28 in the interaction	52
4 Discussion	55
Part 3 The interaction between WSSV and Chitin.....	57
1 Introduction.....	57
2 Materials and methods	58
2.1 Materials.....	58
2.2 Methods.....	60
2.2.1 Construction of mutant gene vecotrs	60
2.2.2 Preparation of intact virions, envelope proteins and nucleocapsids	60
2.2.3 Expression of the mutant proteins	61
2.2.4 Chitin-binding assays	61
2.2.5 Blocking assays.....	63

Contents

2.2.6 <i>In vivo</i> protection assay with peptides by oral delivery	64
3 Results	66
3.1 Analysis of the interaction between WSSV and Chitin	66
3.1.1 Chitin binding assays of WSSV	66
3.1.2 <i>In vitro</i> oligochitosan blocking assays for the WSSV-Chitin binding ...	67
3.2 Analysis of the interaction between envelope, nucleocapsid and Chitin	67
3.3 Analysis of the interaction between major envelope proteins and Chitin	68
3.3.1 Chitin binding assays of the four major envelope proteins.....	68
3.3.2 <i>In vitro</i> oligochitosan blocking assays for the VP24-Chitin binding	69
3.4 Identification of the Chitin-binding domains between VP24 and Chitin	70
3.4.1 Construction of mutant gene vecotrs	70
3.4.2 Expression of the VP24 mutant proteins	71
3.4.3 Analysis of the interaction between VP24 mutants and Chitin	71
3.4.4 <i>In vitro</i> Peptide blocking assays for the VP24-Chitin binding and WSSV-Chitin binding using P-VP24 ₁₄₈₋₁₆₂ , P-VP24 ₁₈₆₋₂₀₀	73
3.5 <i>In vivo</i> protection assay with peptides by oral delivery	75
4 Discussion	77
Reference	80
Publications	89
Acknowledgements	90

缩略词

aa: amino acids, 氨基酸

NEM: N-ethylmaleimide, N-乙基顺丁烯二酰亚胺

CO-IP: Co-Immunoprecipitation, 免疫共沉淀

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

Kan: kanamycin, 卡那霉素

AP: alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶

BSA: bovine serum albumin, 牛血清白蛋白

CP: capsid protein, 衣壳蛋白

DTT: dethiothreitol, 二硫苏糖醇

EDTA: thylene minetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

His: Histidine, 组氨酸

V5: 来自猿猴病毒 5(SV5)副粘病毒的 P 和 V 蛋白的 14 氨基酸肽

TEM: Transmission electron microscopy, 透射电镜

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

ORF: open reading frame, 开放阅读框

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

PTA: phosphotungstic acid, 磷钨酸

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠

EDTA: thylene minetetraacetic acid, yieransiyisua, 乙二胺四乙酸

WSSV: white spot syndrome virus, 对虾白斑综合症杆状病毒

摘要

对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 是严重阻碍对虾养殖业健康发展的主要病害之一。WSSV 是一种无包涵体、具双层囊膜、杆状型的双链环状大型 DNA 病毒, 其基因组大约为 300 kbp, 隶属于线形病毒科 (*Nimaviridae*) 白斑病毒属 (*Whispovirus*)。WSSV 宿主范围广, 能对对虾和多种甲壳动物造成高致病性、高死亡率的感染, 然而病毒侵染宿主的机制至今仍不清楚。在本研究中, 我们鉴定了病毒 3 种主要囊膜蛋白 VP24、VP26 和 VP28 之间的相互作用位点。此外, 我们也首次发现 WSSV 可以与几丁质结合, 且 VP24 在结合过程中起关键作用。本研究工作的内容主要包括以下几部分:

(1) 通过构建 VP24 和 VP28 的一系列缺失突变体, 利用免疫共沉淀和多肽阻断技术, 鉴定了这两个蛋白的具体作用位点。结果表明, VP24 上有 2 个 VP28 结合位点, 分别位于 aa 46-61 和 aa 148-160; VP28 上有 1 个 VP24 结合位点, 位于 aa 31-44。

(2) 通过构建 VP26 和 VP28 的一系列缺失突变体, 利用免疫共沉淀和多肽阻断技术, 鉴定了这两个蛋白的具体作用位点。发现, VP26 上的 VP28 结合位点位于 aa 167-177; VP28 上的 VP26 结合位点位于 aa 31-44, 与 VP24 结合位点相同。

(3) 在自然条件下, 摄食感染 WSSV 的病虾或死虾是 WSSV 造成对虾感染的主要途径。由于对虾的整个消化道都含有几丁质成分, 因此病毒入侵可能与几丁质相关。为此我们进行了几丁质结合分析, 发现 WSSV 病毒粒子能与几丁质有效结合, 而且 VP24 在结合过程中发挥关键作用。系列缺失突变分析和多肽抑制实验表明 VP24 的 C 端 aa 186-200 是结合几丁质的结构域。攻毒实验表明, 与对照组相比, 口腔灌注 WSSV 与 P-VP24₁₈₆₋₂₀₀ 的混合溶液 4h 后, 对虾消化道内的病毒粒子的数量明显下降, 且 P-VP24₁₈₆₋₂₀₀ 在 96h 内有效抑制了病毒的增殖。这是首次发现病毒囊膜 VP24 是一种几丁质结合蛋白, 而且涉及 WSSV 对对虾的入侵, 这为防治 WSSV 病毒提供了新的思路和方法。

关键词: 对虾白斑综合症病毒; 蛋白相互作用; 几丁质结合分析

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the major pathogens that seriously obstructed the development of the shrimp aquaculture. It has caused enormous economic losses to shrimp farming industry since 1993. The WSSV is a large, nonoccluded, enveloped, rod- or elliptical-shaped, doubled-stranded DNA virus of approximately 300 kbp and it belongs to the Nimaviridae family. As a major pathogen in the shrimp farming, WSSV also has wide range of hosts in crustacean with high infection and mortality rate. In this study, the specific interaction domains among the virus envelope proteins VP28, VP26 and VP24 were identified. In addition, the interaction between WSSV and chitin was also studied for the first time, and the essential envelope protein including the chitin binding domain in the envelope protein was identified. The work mainly includes the three following aspects:

(1) In this study, we mapped the interaction domains of VP28 and VP24 by constructing a series of truncated and deletion mutants. By co-immunoprecipitation and peptide blocking assay, two VP28-binding domains of VP24 were located at residues 46-61 and residues 148-160, while VP24-binding domain of VP28 was located at residues 31-44.

(2) In this study, the interaction domains between VP28 and VP26 were identified by co-immunoprecipitation by using a series of truncated and deletion mutants of VP28 and VP26. One VP28-binding domains of VP26 were located at residues 167-177, while VP26-binding domain of VP28 was located at residues 31-44.

(3) The infection of WSSV via oral ingestion is a major route of natural infection. As the digestive tract of shrimp was covered with chitinous component, which indicating that the chitin may be associated with the invasion of WSSV. In the present study, we showed that WSSV virions could bind to chitin through one of its major envelope proteins, VP24. Mutagenesis analysis and peptide blocking assay indicated that amino acid (aa) 186-200 in the C-terminus of VP24 was required for the chitin binding of VP24 and WSSV. Moreover, oral inoculation experiment showed that

ABSTRACT

P-VP24₁₈₆₋₂₀₀ treatment reduced the number of virus that remained in the digestive tract in the early stage of infection (4 hpi) and greatly hinder WSSV proliferation in the animal (96 hpi). These data indicate that binding of WSSV to chitin through viral envelop protein VP24 is essential for WSSV *per os* infection, and provide new ideas for preventing WSSV infection in shrimp farms.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV), Protein intreraction, Chitin-binding assays

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、命名形态学特征及其分类学地位

对虾为甲壳动物（*Crustace*）十足目（*Decapoda*）对虾科（*Penaeidae*）的统称，是一种具有十分重要经济价值的海产虾类。上世纪 90 年代，白斑综合症病毒成为对虾养殖产业危害最大的病害之一，并给台湾对虾养殖产业造成了巨大的经济损失。1993 年春，日本养殖对虾因大量发生白斑综合症而死亡；同年 5-8 月，白斑综合症在中国沿海的对虾养殖场中大规模暴发，1994 年底，白斑综合症在包括泰国南部、印度以及马来西亚等在内的养殖场中大规模暴发。随后，白斑综合症传遍印度太平洋地区和亚洲地区的绝大多数对虾养殖场。该病毒以其发病快，致死率高，传播速度快等特征，目前已成为全球范围内限制对虾养殖产业发展的最主要因素之一。

1992-1995 间，各地研究人员在对白斑综合症的研究中相继分离纯化到一种新型的非包涵体型杆状病毒（主要致病病原），并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，对各个分离株进行命名^[1-14]。如表 1 所列，出现了 16 个不同的名称。1995 年，Lo 等^[15]通过对从印度、中国、泰国以及美国分离的对虾白斑病毒 DNA 进行研究，结合发病对虾在流行特点、临床症状、感染组织、病理变化等，发现各地的白斑综合症病毒差异极小，可能为同一种新型病毒。1996 年，Lightner^[16]等建议将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)。此后，该命名逐渐得到认可，并于 2005 年，在国际病毒分类委员会(ICTV) 第 8 次报告中，正式将 WSSV 归属为线形病毒科(*Nimaviridae*) 白斑病毒属(*Whispovirus*)^[17]。

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

电子显微镜负染观察表明来自不同分离株的病毒粒子其形态结构十分相似^[18-21]。观察发现，WSSV为纺锤形、无包涵体，个体大小约250-380 nm×70-150 nm，病毒粒子一端略平且存在轻微凹陷，一端略细，且略细端带有一细长鞭毛状结构(约40 nm×50 nm，在日本学者报道的病毒粒子中并未发现类似结构)，病毒粒子形态结构如图1所示。完整的病毒粒子由囊膜和核衣壳组成。囊膜为2层膜结构，厚度约为6-7 nm，两膜之间有较宽阔的间隙；紧接囊膜向内是核衣壳，由螺旋排列的亚单位形成，大小约为380-330 nm×80-60 nm，两端各有一帽状结构，一端为三角锥形，另一端为较扁的梯形，核衣壳内部充满了由核酸组成的髓核。病毒粒子主要存在于对虾的细胞核中^[19, 22-28]。

带格式的：正文文本缩进，缩进：首行缩进：2字符，行距：1.5倍行距

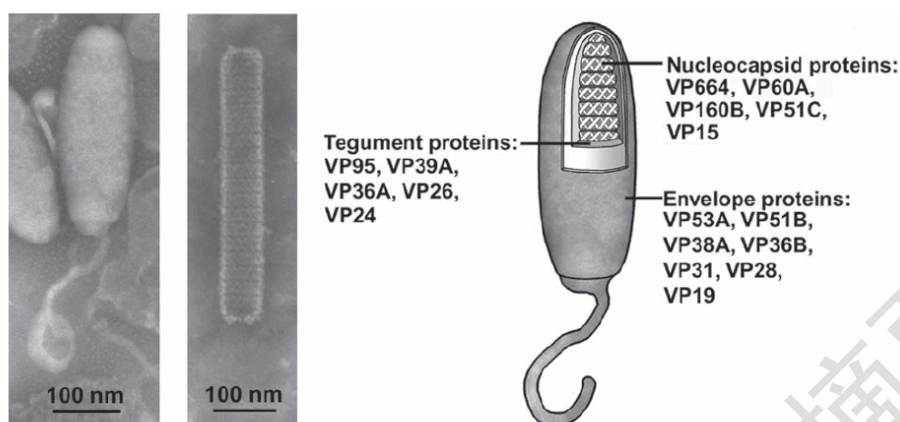


图 1: WSSV 形态结构图

左一为全病毒，左二为核衣壳，右图为病毒结构图

资料来源: van Etten, James L.(Ed.): Lesser Known Large dsDNA Viruses, Springer, 2009.

1.1.2 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径

WSSV 具有非常广泛的宿主，以虾、蟹等十足目动物为主^[18, 22, 29-35]，尤以对虾对 WSSV 最为敏感，目前已有多种养殖对虾感染 WSSV 而发病的报道。除此之外，WSSV 还能感染多种宿主，使其成为 WSSV 感染对虾的中间宿主^[36]，它们不一定发病，也不一定出现病毒感染的可见症状。

自然条件下 WSSV 经口摄食而感染的途径已被证实，有报道称 WSSV 在实验条件下可通过共居方式传播，但只能以潜伏的方式存在于感染对虾体内^[37]。朱山^[38]证明 WSSV 在野生脊尾白虾中可经卵垂直传播。Lo 等^[39]发现可以在病虾的精巢、精荚、卵巢中检出 WSSV。

1.2.3 对虾白斑综合症的症状、组织病理学分析以及感染动物模型

WSSV 是一种病程短，死亡率高的对虾疾病。一口虾池从发现少量病虾到绝大部分虾死亡约历时一周。患病对虾浮头、靠岸、离群、静卧池边，厌食、昏睡，对外界的刺激反应迟钝，部分病虾鳃及体表附着聚缩虫、丝状细菌、藻类及其他污物，病虾头胸部肿大，甲壳易被揭开而不粘真皮，濒死对虾血液不凝集，肝胰腺颜色变淡^[40]。一般对虾感染 WSSV 36 小时后即出现红体症状，48 h 后甲壳可见白斑，病情严重时白斑联成一片而使甲壳呈白色（图 2），白斑在光镜下呈梅花瓣状，直径 0.5-2.0 mm。对虾患病组织经石蜡切片，用苏木精—伊红染色后发

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.