

文章编号 :1004-0374(2011)01-0081-05

# 白斑综合症病毒感染相关蛋白质相互作用的研究进展

左华丽<sup>1</sup>, 金春英<sup>2</sup>, 王蔚<sup>1\*</sup>

(1 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005; 2 华侨大学化工学院, 厦门 361021)

**摘要:** 白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是危害对虾的主要病原, 给全球水产养殖业带来了巨大经济损失, 但至今仍未发现有效的防治方法。研究病毒与宿主的相互作用对于深入了解病毒的致病机理和宿主的免疫机制, 从而寻找合适的抗病毒措施具有非常重要的理论意义和实际应用价值。该文主要介绍了蛋白质相互作用的研究方法, 以及 WSSV 病毒蛋白之间、病毒—宿主蛋白之间和宿主蛋白之间相互作用的研究进展, 为有效地防治 WSSV 及相关科研提供参考。

**关键词:** 蛋白质相互作用; 对虾; 白斑综合症病毒

中图分类号: S945.46; S963.11 文献标识码: A

## Advances of proteins interaction involved in white spot syndrome virus infection

ZUO Hua-Li<sup>1</sup>, JIN Chun-Ying<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>1\*</sup>

(1 Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration (SOA), Xiamen 361005, China;

2 College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** White spot syndrome virus (WSSV) is the causative agent of white spot syndrome disease of cultured penaeid shrimp. It causes high mortalities and severe damage to the global shrimp culture industry. So far, there is no efficient approach to control this virus. Research on the interaction of proteins encoded by virus and host can help to understand the pathogenesis mechanism of virus infection and immune system of the host. The knowledge can provide promising strategies for protection and treatment of viral disease. This article mainly presented the approaches employed to analyze protein-protein interaction, the advances of protein interactions involved in WSSV infection, aiming to provide a useful reference for the disease control and the interrelated research.

**Key words:** protein interaction; shrimp; white spot syndrome virus

白斑综合症病毒(white spot syndromic virus, WSSV)是对虾养殖中危害最严重的病原。该病毒传染力强、致死率高、流行范围广, 在十多年的时间里给全球对虾养殖业造成了巨大的损失<sup>[1-3]</sup>, 但至今仍未找到有效的控制该病毒病发生与发展的方法。

WSSV 病毒外被囊膜, 囊膜内为核衣壳和内部的髓核。病毒侵染宿主时, 病毒上与感染相关的蛋白与靶蛋白结合并发生相互作用, 进而进行感染<sup>[4,5]</sup>。在 WSSV 病毒初次感染或者潜伏感染激活时首先表

达一批极早期基因, 这些基因主要编码一些关键的调控因子, 进而启动早期基因和晚期基因的表达<sup>[6-10]</sup>。另一方面, 病毒的侵染能激发宿主的免疫反应, 减少病毒的进一步扩散。所以, 进行对虾

收稿日期: 2010-7-23; 修回日期: 2010-8-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800857); 福建省自然科学基金计划项目(2010J05074)

\* 通讯作者: E-mail: wangw.sz@gmail.com; Tel: 0592-2195518

- 病毒蛋白互作的分子机制研究, 分别从 WSSV 和对虾两方面入手, 研究 WSSV 与感染和对虾免疫抑制等相关的功能基因及基因调控, 以及研究对虾抗病毒的功能基因及其调控和免疫信号转导, 有助于阐明 WSSV 与对虾之间互作的分子基础, 为对虾病害的防治提供理论支撑。

## 1 常用蛋白质相互作用研究方法简介

近二十年来, 分子生物学技术的发展为病毒 - 宿主互作的研究提供了更多、更有效的方法。其中在 WSSV 病毒与宿主间互作研究中应用较多的, 主要有 GST 下拉、免疫共沉淀、酵母双杂交和 Far-western blotting 等。

GST 下拉技术基本原理是利用重组技术将探针蛋白与 GST(Glutathione S-transferase)融合蛋白通过 GST 与固相化在载体上的 GTH(Glutathione)亲和结合。因此, 当与融合蛋白有相互作用的蛋白通过层析柱时或与此固相复合物混合时就可被吸附而分离。被吸附的蛋白可以通过改变洗脱液或洗脱条件而回收下来。该方法简便灵敏, 同时避免了使用同位素等危险物质, 在蛋白质相互作用研究中有很广泛的应用; 而缺点是 GST 有可能影响融合蛋白的空间结构。另外, 蛋白质的相互作用是在非生理状态下进行的, 人为地影响蛋白质浓度对实验结果也有一定影响<sup>[11-13]</sup>。

免疫共沉淀技术是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的方法。当细胞在非变性条件下被裂解时, 完整细胞内存在的许多蛋白质 - 蛋白质间的相互作用被保留了下来。用探针蛋白的抗体免疫沉淀探针蛋白, 那么与探针蛋白在体内结合的蛋白质也能沉淀下来。免疫共沉淀法的优点是, 所研究的相互作用蛋白均是经翻译后修饰的天然蛋白, 可以表征生理条件下蛋白质间的相互作用; 但该方法需首先针对目标蛋白制备出一定量的多克隆或单克隆抗体, 过程相对复杂。同时, 目的蛋白只有达到一定浓度才能与抗体结合形成沉淀, 因而该法只适用于研究具有高表达量的目标蛋白, 应用范围有较大局限<sup>[14-18]</sup>。

酵母双杂交系统是在酵母体内分析蛋白质 - 蛋白质相互作用的方法。典型的真核生长转录因子含有 DNA 结合结构域 BD 和转录激活结构域 AD 这两个不同的结构域。这两个结构域即使分开时仍各具功能, 但只有当这两部分通过适当的途径在空间上接近才具有激活转录的能力。将探针蛋白基因克隆至

BD 载体, 而将要筛选的 cDNA 库克隆在 AD 载体, 共同转化酵母宿主菌, 如 cDNA 序列编码的某一段蛋白能和探针蛋白发生交互作用, 则启动报告基因的转录。酵母双杂交系统具有非常高的灵敏度, 尤其对蛋白质间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测到; 但是, 该方法也存在缺陷: 一是由于某些蛋白质本身具有转录激活功能, 使目标蛋白 AD 融合基因与探针蛋白 BD 融合基因表达产物无需特异结合就能启动转录系统, 从而产生假阳性结果; 二是该法对相互作用蛋白在细胞内的定位要求严格, 只有定位于核内的相互作用蛋白才能确保报告基因的激活, 而定位于胞浆内或膜上的蛋白则很难采用该技术分析<sup>[19,20]</sup>。

Far-western blotting 是一种基于蛋白质免疫印迹 (western blotting) 的分子生物学方法。在 western blotting 中用抗体来检测目标蛋白, 而 Far-western blotting 则首先通过一种表达克隆载体在大肠杆菌表达带有 His 或 Flag 等特殊亲和和标签的探针蛋白, 而后用探针蛋白结合与之相互作用的蛋白, 再用抗这种探针蛋白标签的抗体显示目的蛋白的结合位置, 这种方法具有较高的特异性和灵敏度, 缺点在于进行 Far-western blotting 过程中必须尽可能维持捕获蛋白的天然构象和维持相互作用蛋白质的结合条件, 变性的蛋白质将不能进行相互作用或者会产生假阳性<sup>[21,22]</sup>。

## 2 WSSV 病毒蛋白与宿主蛋白相互作用的研究进展

WSSV 感染、复制和传播过程中, 病毒编码的蛋白与宿主基因编码的蛋白发生相互作用构成了一个调节网络。病毒感染相关蛋白互作的研究, 有助于在分子水平充分了解 WSSV 的感染机制及宿主的抗病毒免疫机制, 采取合适的方法阻断感染和清除病毒。鉴于缺少有效细胞系, 大多数蛋白相互作用都在体外进行。目前在 WSSV 病毒 - 蛋白之间, 病毒 - 宿主蛋白之间, 及宿主 - 蛋白之间的研究上, 已经取得较大进展。

### 2.1 WSSV 病毒蛋白之间的相互作用

#### 2.1.1 病毒外膜蛋白之间的相互作用

对病毒膜蛋白性质以及它们之间相互作用的研究是了解病毒自身的组装及其侵染宿主机制的前提<sup>[23-25]</sup>。WSSV 病毒中, VP28、VP26、VP24 和 VP19 为病毒的主要膜蛋白, 推测这些主要结构蛋白在病毒入侵、包装、成熟和释放等重要步骤中具

有多种功能。国内外学者针对这些主要膜蛋白进行了大量工作。Jie 等<sup>[26]</sup>利用 Far-western blotting 和 GST pull down 分析发现 VP24 和另一个病毒膜蛋白 VP38 有相互作用, 分别表达 VP38 的 C 端和 VP38 的 N 端, 进一步的 GST pull down 发现 VP38 和 VP24 相互作用位点位于 VP38 的 C 端。Xie 等<sup>[27]</sup>利用 Far-western blotting 和免疫共沉淀技术发现三个主要病毒结构蛋白 VP24、VP26 和 VP28 能相互作用。Chen 等<sup>[28]</sup>利用 GST 下拉技术发现 VP24 与 WSV010 能够相互作用。林兆宇<sup>[29]</sup>利用 GST 下拉和 Far-western blotting 分析发现 VP24 能与 VP13A 相互作用。这些学者的研究表明, VP24 能与 VP10、VP13A、VP26、VP28 和 VP38 等多个膜蛋白相互作用, 由此可以推测, VP24 可能是将多个膜蛋白相联系形成复合体的连接蛋白, 该复合体在病毒的结构形成以及感染上起重要作用。

除了以上介绍的不同膜蛋白之间的相互作用外, 同一膜蛋白也能通过自身结合形成多聚体。Witteveldt 等<sup>[30]</sup>通过 ELISA 和 Far-western blotting 研究发现 VP15 通过自身之间的相互作用形成同源多聚体, 但该蛋白不能与 WSSV 的其他主要结构蛋白结合。由于 VP15 能够非特异性的结合双链 DNA, 且对超螺旋 DNA 的结合性更高, 因此推测 VP15 的自身多聚化可能与核衣壳中基因组的包装有关。

### 2.1.2 病毒外膜蛋白和核衣壳蛋白之间的相互作用

核衣壳蛋白是构成病毒核衣壳结构的蛋白质, 由一条或多条多肽链折叠形成的蛋白质亚基, 是构成核壳体的最小单位<sup>[31-34]</sup>。病毒 WSV311 基因的产物 VP26 是病毒的一个主要的囊膜蛋白, 可能定位于病毒的膜与核衣壳之间。Wan 等<sup>[35]</sup>利用生物素标记转移方法证明 VP26 能够特异性地与核衣壳蛋白 VP51 发生相互作用。随后利用 Far-western blotting 进一步证明了膜蛋白 VP26 与 VP51 之间存在相互作用。并由此认为 VP26 是一个起着“链接”作用的蛋白, 在病毒中通过与 VP51 的相互作用将病毒的囊膜与核衣壳联系起来。

### 2.2 病毒蛋白和对虾蛋白之间的相互作用

WSSV 的囊膜可与靶细胞相互作用从而介导病毒对宿主的感染, 因此探明这一机理并进而阻断病毒结合靶细胞将成为防控 WSSV 感染的重要途径。Xie 等<sup>[36]</sup>通过免疫共沉淀技术, 利用肌动蛋白 Actin 的特异性抗体免疫沉淀 VP26, 发现 VP26 能与螯虾的 Actin 蛋白有相互作用。推测 VP26 与 Actin 的相互作用可能在病毒感染早期起作用。当病毒囊膜与

细胞膜融合后, 病毒核衣壳进入细胞质内, 此时 VP26 可能还继续结合在核衣壳上一起进入细胞。通过与细胞骨架的联系, VP26 可以帮助病毒核衣壳朝细胞核移动。Lu 等<sup>[37]</sup>利用酵母双杂交发现 WSV427 编码的蛋白 WSSV427 与虾的一个蛋白磷酸酶有相互作用, 推测此蛋白磷酸酶通过与 WSSV427 的相互作用参与调控 WSSV 的生命周期。He 等<sup>[38]</sup>利用酵母双杂交发现 WSV222 编码的蛋白 WSSV222 与虾的 1 个类肿瘤抑制蛋白(tumor suppressor-like protein, TSL)有相互作用。TSL 在 BHK 细胞中的瞬时表达可以导致细胞凋亡, 这种凋亡可以被 WSSV222 蛋白所恢复。研究者随后证实了在对虾原代细胞和表达 TSL 的细胞系中, WSSV222 都参与了泛素化和 TSL 降解的过程。

### 2.3 对虾体内蛋白互作

对虾体内蛋白互作的研究对于阐明其体内蛋白参与的信号转导途径, 从而深入了解对虾的免疫应答过程和免疫机制具有重要意义。探索对虾的免疫机制和途径有助于了解对虾抗病的分子机理, 为对虾病害的防治提供新的思路与途径。Xu 等<sup>[39]</sup>在试验中发现对虾的 PjQM 基因在受到病毒刺激后表达上调, 说明其参与了对虾的免疫过程。通过 GST 下拉、质谱鉴定等分析发现, PjQM 蛋白与血蓝蛋白、肌球蛋白(Myosin)之间存在相互作用。鉴于肌球蛋白与细胞吞噬过程相关, PjQM 可能通过酚氧化酶激活系统等途径参与对虾免疫。Wu 等<sup>[40]</sup>对细胞免疫相关基因 PjRab 进行体外表达, 通过 GST 下拉的方法发现 PjRab 蛋白与肌动蛋白(Actin)、原肌球蛋白(Tropomyosin)以及对虾白斑综合症病毒的膜蛋白 VP466 之间形成复合体。开展对这个复合体的研究发现, VP466 既可以与 Rab 蛋白也可以与 Tropomyosin 蛋白互作, 而且都是在 VP466 蛋白的相同区域, 说明 VP466 蛋白与 Rab 或者 Tropomyosin 蛋白之间的结合是一种竞争关系。当 VP466 与 PjRab 结合, 蛋白复合体的作用是提高宿主的抗病毒免疫反应, 当 VP466 与 Tropomyosin 结合, 蛋白复合体有利于病毒的感染, VP466 与宿主的不同蛋白结合可引起完全相反的作用。

## 3 展望

尽管对 WSSV 基因组序列及其结构的研究已经取得了长足的进展, 但目前 WSSV 的侵染机制和对虾的抗病毒免疫还有许多详细的机制并未得到阐明。近年来科学家将注意力转移到蛋白质互作方面

来。病毒感染细胞的第一步是病毒蛋白与宿主靶蛋白结合,封闭宿主的靶蛋白可以阻断病毒的入侵;同时,病毒蛋白间相互作用也是病毒生命周期的各个阶段不可或缺的因素,对转录、复制、装配等各阶段的病毒蛋白互作进行干扰也可以阻断 WSSV 的增殖;而另一方面,感染后病毒蛋白结合宿主蛋白以激发宿主的抗病毒免疫反应,了解对虾的抗病毒免疫的分子机制,有利于找到合适的靶标筛选特异性的免疫增强剂,提高宿主的免疫功能以达到病毒防治的目的。因此,病毒蛋白之间,病毒-宿主蛋白之间,以及宿主蛋白之间的分子互作机制的研究越来越受到人们的重视,为预防和控制 WSSV 提供了新的思路。

### [参 考 文 献]

- [1] 吴兴泰. 南美白对虾白斑综合症的预防与治疗方法. 海洋与渔业, 2007, 3: 41-2
- [2] 雷质文, 黄健, 梁成珠. 白斑综合症病毒的生物学特性. 海洋科学, 2002, 26(3): 26-31
- [3] 程伟, 刘志昕. 对虾白斑综合症病毒的分子生物学研究进展. 水产科学, 2005, 24(5): 41-5
- [4] Jia QJ, Meng XL, Xu JP, et al. Expression of envelope protein VP19 of *Penaeus monodon* WSSV in *E. coli* and the effect against WSSV. *Virology*, 2006, 21(6): 585-8
- [5] 姜有声, 战文斌, 程顺峰. 一种改进的对虾白斑综合症病毒提纯方法. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 372-5
- [6] Buisson M, Manet E, Trescol-Biemont MC, et al. The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J Virol*, 1989, 63(12): 5276-4
- [7] Kenney S, Holley-Guthrie E, Mar EC, et al. The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J Virol*, 1989, 63(9): 3878-83
- [8] Cann AJ. Principles of molecular virology[M]. 4th, ed. Holland: Elsevier Academic Press, 2005
- [9] 邓小昭, 朱反修, 刁振宇. 杆状病毒早期启动子载体的构建及报道基因的表达. 医学研究生学报, 2001, 14(3): 200-7
- [10] 林梵宇, 徐丽美, 杨丰. 对虾白斑综合症病毒极早期基因启动子筛选文库的构建. 台湾海峡, 2010, 29(2): 184-8
- [11] Ryu CJ, Cho DY, Gripon P, et al. An 80-kilodalton protein that binds to the Pre-S1 domain of hepatitis B virus. *J Virol*, 2000, 74(1): 110-6
- [12] 梁华平, 徐祥, 刘东攀. GST Pull-down 实验鉴定 NF- $\kappa$ B 相互作用多肽. 免疫学杂志, 2006, 22(1): 94-7
- [13] Ding TB, Ren JP, Ma WY. Methods for the study of virus receptors. *Virology*, 2006, 21(2): 189-93
- [14] Yuan J, Ghosal G, Chen J. The annealing helicase HARP protects stalled replication forks. *Genes Dev*, 2009, 23(20): 2394-9
- [15] Eriksson M, Samuelsson H, Björklund S. MAP1B binds to the NMDA receptor subunit NR3A and affects NR3A protein concentrations. *Neurosci Lett*, 2010, 475(1): 33-7
- [16] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426(6965): 450-4
- [17] 杨舸, 朱静. 染色质免疫沉淀技术的应用及进展. 检验医学与临床, 2009, 6(5): 367-8
- [18] Moseley JB, Mayeux A, Paoletti A, et al. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature*, 2009, 459(7248): 782-3
- [19] White MA. The yeast two-hybrid system: forward and revers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(19): 10001-3
- [20] Li LY, Liu X, Zhang P, et al. Cloning and functional identification of measles virus receptor on marmoset cells. *Chn Sci Bull*, 2002, 47(16): 1217-25
- [21] 关薇, 王建, 贺福初. 大规模蛋白质相互作用研究方法进展. 生命科学, 2006, 18(5): 507-12
- [22] Machida K, Mayer BJ. Detection of protein-protein interactions by far-western blotting. *Methods Mol Biol*, 2009, 53(6): 313-29
- [23] Luo Z, Huang JZ. Developing strategies available for resistance to white spot syndrome virus(WSSV). *Mar Fish Res*, 2007, 28(5): 116-21
- [24] Hsiao JC, Chung CS, Chang W. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol*, 1999, 73(6): 8750-61
- [25] Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(2): 226-37
- [26] Jie Z, Xu L, Yang F. The C-terminal region of envelope protein VP38 from white spot syndrome virus is indispensable for interaction with VP2. *Arch Virol*, 2008, 153(11): 2103-6
- [27] Xie X, Xu L, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus(WSSV). *J Virol*, 2006, 80(21): 10615-23
- [28] Chen J, Li Z, Hew CL. Characterization of a novel envelope protein WSV010 of shrimp white spot syndrome virus and its interaction with a major viral structural protein VP24. *Virology*, 2007, 364(1): 208-3
- [29] 林兆宇. 对虾白斑综合症病毒(WSSV)膜蛋白VP13A的鉴定及VP31和VP33与宿主细胞相互作用的初步研究[D]. 厦门大学, 2009
- [30] Witteveldt J, Vermeesch AM, Langenhof M, et al. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. *Arch Virol*, 2005, 150(6): 1121-33
- [31] Xu H, Huang J, Yang GP. Advancements on proteomics of white spot syndrome virus in shrimp. *Marine Fisheries Res*, 2008, 29(2): 118-25
- [32] 熊生良, 杨丰. 对虾白斑综合症病毒核衣壳蛋白VP664的鉴定研究. 台湾海峡, 2007, 26(1): 46-52
- [33] 吴成林, 杨丰. 对虾白斑综合症病毒核衣壳蛋白WSV308的鉴定. 台湾海峡, 2007, 215(1): 53-60
- [34] Chen LL, Leu JH, Huang CJ, et al. Identification of a nucleocapsid protein (vp35) gene f shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting vp35 to the nuclei of transfected insect. *Virology*,

- 2002, 293(1): 44-53
- [35] Wan Q, Xu L, Yang F. VP26 of white spot syndrome virus functions as a linker protein between the envelope and nucleocapsid of virions by binding with VP51. *J Virol*, 2008, 82 (24): 12598-601
- [36] Xie X, Li H, Xu L, et al. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus(wssv)viral particles. *Virus Res*, 2005, 108(1-2): 63-7
- [37] Lu L, Kwang J. Identification of a novel shrimp protein phosphatase and its association with latency-related ORF427 of white spot syndrome virus. *FEBS Lett*, 2004, 577(1-2): 141-6
- [38] He F, Fenner BJ, Godwin AK, et al. White spot syndrome virus open reading frame 222 encodes a viral E3 ligase and mediates degradation of a host tumor suppressor via ubiquitination. *J Virol*, 2006, 80(8): 3884-92
- [39] Xu J, Wu S, Zhang X. Novel function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 21(5-6): 473-80
- [40] Wu W, Zong R, Xu J, et al. Antiviral phagocytosis is regulated by a novel Rab-dependent complex in shrimp *Penaeus japonicus*. *J Proteome Res*, 2008, 7(1): 424-31