WSSV 与 IHHNV 竞争对虾鳃细胞膜受体的研究

王筱珊, 胡智博, 费荣梅

南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095

摘要:本研究对白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)与传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus, IHHNV)能否竞争虾鳃细胞膜上的 NM23 蛋白受体进行探索。先用 蔗糖梯度离心法提纯 WSSV 的全蛋白,利用病毒覆盖蛋白印迹技术(VOPBA)与对虾鳃细胞膜 NM23 蛋白作用,将 疑似蛋白条带进行 LC-MS/MS 分析,初步筛选出 3 种 WSSV 蛋白,分别为 WSSV013、Wsv497 和 Wsv035,再构建 这 3 种蛋白的原核表达载体,通过 VOPBA 和免疫共沉淀(co-immunoprecipitation)验证了 Wsv497、Wsv035 能与 NM23 蛋白相互作用,WSSV013 不能与 NM23 蛋白相互作用。初步推测 WSSV 与 IHHNV 可能竞争对虾鳃细胞膜 上的 NM23 蛋白受体,该结果为今后研究两种病毒竞争细胞膜受体和虾病毒蛋白作用机制提供理论基础。

关键词: WSSV013; Wsv497; Wsv035; VOPBA; 免疫共沉淀; NM23 蛋白 中图分类号: S945 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2017)03-0615-08

对虾白斑综合征(White Spot Syndrome, WSS) 是对虾养殖业中危害极为严重的一种高致死率的 病毒病^[1],被世界动物卫生组织划定为必须向其 通报的甲壳类重要疫病,其病原为白斑综合征病 毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)。患病的对 虾表皮出现白色斑点,并伴有虾体泛红的症状^[2]。 1992 年, WSSV 首次在中国台湾地区暴发, 该病 传播迅速,导致了当地养殖的对虾大量死亡^[3]。 WSSV 是已知体积最大的动物病毒, 被分类为线 头病毒科(Nimaviridae)、白斑病毒属(Whispovirus)^[4]。 病毒粒子包被双层囊膜,无包涵体,由管状或分 支状的衣壳环绕^[5]。WSSV 的基因组为环状、双 链 DNA, 大小约为 300 kb^[6]。WSSV 基因组的稳 定性很强,不同株病毒结构特征相似,蛋白质表 达谱相似,限制性内切酶片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)差别不大^[7]。 WSSV 基因组包含 507 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。WSSV蛋白种类繁多,包括结构蛋 白和非结构蛋白两大类,结构蛋白又分为囊膜蛋白和衣壳蛋白。迄今,已经确定了至少 62 种WSSV结构蛋白^[8],其中包括Wsv035。结构蛋白除构成完整的病毒粒子外,还是病毒入侵宿主和宿主相互作用的重要成分。WSSV的非结构蛋白则主要参与病毒 DNA 的复制。

Tang 等^[9]发现, 细角滨对虾(Penaeus stylirostris) 先感染 IHHNV, 随后感染 WSSV, 细角滨对虾的 死亡率显著下降。Melena^[10]在凡纳滨对虾(P. vannamei)上也做了相同的实验, 且结果一致。猜测 IHHNV 与 WSSV 可能竞争同一受体。NM23 是一 种二磷酸核苷激酶(NDPK), 主要位于细胞浆和 细胞核, 也可见于细胞膜^[11]。其分布广泛, 在各 种原核、真核生物中均存在。它通过形成含一个 高能磷酸键的酶中间态催化三磷酸核苷的末端磷 酸转移到二磷酸核苷。本实验室前期工作已证明 IHHNV 的衣壳蛋白可以与 NM23 蛋白相互作用。 本研究采用 VOPBA 方法, 用对虾鳃细胞膜蛋白

收稿日期: 2016-09-05; 修订日期: 2016-10-19.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103034).

作者简介: 王筱珊(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物学与免疫学. E-mail: 2014107045@njau.edu.cn

通信作者:费荣梅,副教授,研究方向为兽医微生物学与免疫学.Tel: 025-84398606; E-mail: feirongmei@njau.edu.cn

NM23 筛选出能与其作用的 WSSV 蛋白,再通过 VOPBA、免疫共沉淀实验验证筛选出的蛋白能否 与 NM23 蛋白作用,为解释感染 IHHNV 的虾再感 染 WSSV 死亡率明显下降这一现象提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒样品 发病凡纳滨对虾中分离的 WSSV 毒株,保存于南京农业大学兽医微生物与 免疫学实验室。

1.1.2 主要酶与试剂 PrimeSTAR HS (Premix)、

Not I、Cop I、T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA Marker 购自 Vazyme 公司; Gel/PCR Extraction Kit 胶回收试剂盒(BIOMIGA); 大肠杆菌 (Escherichia coli) Rosette (DE3)、DH5α 化学感受 态细胞购自北京康为世纪生物科技有限公司; HisTrapTM HP 柱、Glutathione SepharoseTM 4B 购 自 GE 公司; PVDF 膜购自天为生物科技有限公司; His-Tag Mouse mAb、GST-Tag Mouse mAb、HRP 标记羊抗小鼠 IgG、双色预染宽分子量蛋白 Marker、HRP-DAB 底物显色液购自北京鼎国生物 技术有限公司; 原核表达质粒 pET-28a(+)、pET-SUMO 由本实验室保存。

1.1.3 主要仪器 生物安全柜(苏州安泰空气技 术有限公司); 37℃、16℃摇床(太仓市华美生化仪 器厂); PCR 仪(Biometra); 核酸电泳仪及凝胶成像 系统(BIO-RAD); 蛋白电泳仪及凝胶成像系统(北 京六一仪器厂); 二氧化碳培养箱(HIRASAWA WORKS JAPAN, WL-6D) Nanodrop (Thermo); 超 声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公 司); 电转印仪(Amersham); ChemiDoc Touch Imaging System (BIO-RAD); 高速离心机(Beckman Coulter)。

1.2 实验方法

1.2.1 对虾鳃细胞膜蛋白 NM23 的纯化 用本实 验室构建的命名为 BL21-pGEX-4t-1-NM23 的原 核表达载体经 37℃、IPTG 诱导表达 5 h, 超声破 碎, 用 Glutathione SepharoseTM 4B 纯化上清中的 目的蛋白。

1.2.2 WSSV 全蛋白的提纯 取 PCR 鉴定为

WSSV 阳性的虾鳃组织加入 25%蔗糖溶液,石英 砂研磨使细胞破碎,病毒游离至溶液中。溶液分 别经 3000 r/min, 20 min, 4℃; 5000 r/min, 20 min, 4℃; 8000 r/min, 20 min, 4℃差速离心。取上清按 20000 r/min, 1.5 h, 4℃超速离心。取沉淀用适量 25%蔗糖溶液重悬铺于不连续蔗糖密度梯度上 (33%、40%、46%、52%、57%)经 25000 r/min, 2 h, 4℃超速离心。抽取 46%和 52%之间的病毒带,按 1:5体积比加入TNE缓冲液,混匀经25000 r/min, 2 h, 4℃超速离心,沉淀即为纯化的 WSSV。取纯化的 WSSV 与等体积 2% TritonX-100 混合室,温震荡 30 min, 35%蔗糖铺垫经 40000 r/min, 0.5 h, 4℃超 速离心,则病毒蛋白存在于上清中。

1.2.3 VOPBA 实验 WSSV 蛋白上样量为 50 µg/孔, 同时制备 2 块 SDS-PAGE, 一块转印至 PVDF 膜, 另一块留作分析。转印完毕后进行 PVDF 膜上复 性: 30 mL 复性液 A 洗膜 2 次, 20 min/次; 30 mL 复性液 B 洗膜 2 次, 20 min/次; 30 mL 复性液 C 洗 膜 2 次, 15 min/次; 15 mL 复性液 D 洗膜 5 次, 20 min/次 (A: 20 mmol/L Tris-HCl, 20%异丙醇, pH 8.0; B: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β-巯基 乙醇, pH 8.0; C: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β-巯基乙醇, 6 mol/L 盐酸胍, pH 8.0; D: 20 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L β-巯基乙醇, 0.03% Tween-20, pH 8.0)。脱脂奶 4℃封闭过夜, TBST 洗膜, 平衡 Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L MgCl₂, pH 6.5)洗膜 20 min。将纯化好 的 NM23 蛋白用平衡 Buffer(加 0.02% 脱脂奶, 1% Triton X-100)稀释, 孵育 PVDF 膜, TBST 洗膜; 孵 育 GST-Tag Mouse mAb, TBST 洗膜; 孵育羊抗小 鼠二抗, TBST 洗膜; DAB 显色。未孵育 NM23 蛋 白为空白对照。

将另一块相同条件下制备的考马斯亮蓝染色 后的 SDS-PAGE 相应位置的条带切胶做 LC-MS/MS,并用 MASCOT 软件分析(质谱结果由南 京骥鳌生物分析)。

1.2.4 疑似蛋白原核表达载体的构建 根据 LC-MS/MS结果,从64种蛋白中选出3种进行原 核表达,分别为 WSSV013、Wsv497、Wsv035。 由于3种蛋白都存在跨膜结构域,因此由 GenBank 公布的 WSSV013 基因序列(AAL88881.1)、Wsv497 基因序列(AAL33498.1)、Wsv035 基因序列 (AAL33039.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 对引物(表 1),去除其跨膜结构域基因序列,扩增 3 种蛋白的功能结构域基因序列。用同源重组方 法将 Wsv497 构建到 pET-28a 载体,WSSV013 和 Wsv035 构建到 pET-SUMO 载体并转化至 DH5α 感受态细胞中,提取阳性克隆的质粒,酶切鉴定 正确后测序,将质粒转化到 Rosette 感受态细胞中, 将鉴定正确的阳性克隆分别命名为 Rosette-pET-SUMO-WSSV013、 Rosette-pET-28a-Wsv497 和 Rosette-pET-SUMO-Wsv035。

表 1 实验所用引物序列 Tab. 1 Primer sequences for experiment

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
WSSV013-F	CAGA CGGTCCG ATGAGCGCAAGCCTGCTGAC	DNA 扩增
WSSV013-R	ACGA GCGGCCGC ATTATCATAGCGGGTAATCTCTTCCA	DNA amplification
Wsv497-F	CAGA CGGTCCG GAACGCGATAACCTGCAGATGGA	DNA 扩增
Wsv497-R	ACGA GCGGCCGC AAGCTTTTAGCACACTTTAATATCTTTG	DNA amplification
Wsv035-F	CAGA CGGTCCG CCGTCAACCCATAAAGGTCCG	DNA 扩增
Wsv035-R	ACGA GCGGCCGC GGCGAAATAATAGTTTTTGTTTTCCC	DNA amplification

注:由于3种蛋白均存在跨膜结构域,以上引物为去除跨膜结构域截短表达的序列引物.

Note: Since the three proteins have the transmembrane domain, the above primers are the sequence primers truncated from the transmembrane domain.

用本实验室构建的 Rosette-pET-SUMO-WSSV013、Rosette-pET-28a-Wsv497、Rosette-pET-SUMO-Wsv035 原核表达载体经 16℃、IPTG 诱导表达 16 h, 超声破碎, 经 HisTrapTM HP 柱纯化得到 Rosette-pET-SUMO-WSSV013、 Rosette-pET-28a-Wsv497和Rosette-pET-SUMO-Wsv035 3种蛋白,并将包涵体蛋白 Wsv035 进行蛋白复性。

1.2.6 免疫共沉淀进一步验证 3 种蛋白和 NM23 蛋白作用 将 GST-NM23 吸附到 GST 磁珠上, 孵 育 1 h, 用 PBS 洗掉未结合的杂蛋白; 分别加入纯 化后的 WSSV013 蛋白、Wsv497 蛋白、纯化并复 性的 Wsv035 蛋白, 孵育 2 h。孵育后用 PBS 洗掉 未结合的杂蛋白, 用还原性谷胱甘肽洗脱, 洗脱 下的 蛋白做 SDS-PAGE 电泳后转印并 孵育 His-Tag Mouse mAb, 再孵育 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 后进行 ECL 染色曝光。同时设 GST-NM23 未 结合 3 种蛋白、GST 空标签蛋白结合 3 种蛋白、 Glutathione Sepharose[™] 4B 空磁珠结合 3 种蛋白 为对照。

2 结果与分析

2.1 对虾鳃细胞膜蛋白 NM23 的纯化

BL21-pGEX-4t-1-NM23 原核表达载体经诱导, 超声破碎,用 Glutathione Sepharose[™] 4B 纯化上 清得到与预期大小一致的目的蛋白(图 1),大小为 40 kD。

2.2 WSSV 全蛋白的提纯

感染 WSSV 的虾鳃组织经研磨,采用蔗糖梯 度离心法获得均匀分布的 WSSV 全蛋白条带(图 2)。

2.3 VOPBA 初筛 WSSV 蛋白

VOPBA 结果如图 3 所示,第一泳道中 70~100 kD 之间有一明显条带,而第二泳道空白对照 在相应位置没有显色条带,说明 WSSV 蛋白与对 虾鳃细胞膜 NM23 蛋白相互作用的蛋白组分位于 70~100 kD。切下条带进行 LC-MS/MS,初步挑选出 3 种蛋白分别为 WSSV013、Wsv497 和 Wsv035 (表 2)。

2.4 3种蛋白原核表达载体结果

2.4.1 3 种蛋白目的基因 PCR 扩增结果 1%琼 脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 扩增产物大小与预

期扩增片段大小相符(图 4~6)。













Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the whole protein of WSSV M: protein marker; 1: protein of WSSV.

2.4.2 3 种重组质粒双酶切鉴定结果 双酶切鉴 定 DH5α-pET-SUMO-WSSV013、DH5α-pET-28a-Wsv497 和 DH5α-pET-SUMO-Wsv035, 3 段目的条 带与预期片段大小相符, pET-28a 载体条带为 5100 bp(图 8), pET-SUMO 载体条带为 5400 bp(图 7、图 9)。将阳性克隆测序, 测序结果正确。



图 3 VOPBA 的 Western blot

M: 蛋白质 marker; 1: WSSV 蛋白与 NM23 蛋白相互作用后 结合; 2: WSSV 蛋白.

Fig. 3 Western blot of VOPBA

M: protein marker; 1: WSSV protein binding to NM23 protein after interaction; 2: protein of WSSV.

表 2 LC-MS/MS 和 MASCOT 软件分析 VOPBA 结果 Tab. 2 Analysis of VOPBA results by LC-MS/MS and MASCOT program

蛋白名称 protein	特征肽段 unique peptide	分子量/kD molecular weight	数据库编号 GenBank no.
WSSV013	2	90.952	Q77FK7
Wsv497	7	64.612	Q8VAC8
Wsv035	2	108.34	K7XAJ3

2.4.3 3种蛋白的纯化 预期的 3种蛋白截短表 达后的理论大小分别为 WSSV013 72 kD、Wsv497 36 kD、Wsv035 84 kD,将 Rosette-pET-SUMO-WSSV013、Rosette-pET-28a-Wsv497 和 RosettepET-SUMO-Wsv035 原核表达载体诱导、超声破 碎,用 HisTrapTM HP 柱纯化 Rosette-pET-SUMO-WSSV013 和 Rosette-pET-28a-Wsv497 上清、 Rosette-pET-SUMO-Wsv035 包涵体,得到与预期 大小一致的目的蛋白(图 10~12)。

2.5 3 种蛋白和 NM23 蛋白作用的 VOPBA 验证 结果

经验证, Wsv497、Wsv035的一级结构可以和 对虾鳃细胞膜 NM23 蛋白结合(图 13、14), 而 WSSV013 不能和对虾鳃细胞膜 NM23 蛋白结合。 2.6 3种蛋白和 NM23 蛋白作用的免疫共沉淀验 证结果

经免疫共沉淀验证, 纯化后的 Wsv497 蛋白、Wsv035 蛋白可以和对虾鳃细胞膜 NM23 蛋白结 合(图 15、图 16), 而 WSSV013 不能和对虾鳃细 胞膜 NM23 蛋白结合。









3 讨论

病毒在感染有机体时会发生竞争受体的现象。 如猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)与 牛病毒性腹泻病毒(Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)都可以与细胞表面的低密度脂蛋白受体 (Low Density Lipoprotein Receptor, LDLR)结合^[12]。 感染 IHHNV的对虾再感染 WSSV,死亡率明显下 降。因此笔者猜测 IHHNV 与 WSSV 可能存在竞



图 5 Wsv497 目的片段 PCR 电泳图 M: DNA marker DL 2000; 1: 阴性对照; 2-3: Wsv497 片段 PCR 产物.

Fig. 5 Agarose gel electropheresis of Wsv497 PCR products
M: DNA marker DL 2000; 1: negative control; 2–3: Wsv497 PCR products.



图 8 DH5α-pET-28a-Wsv497 酶切鉴定 M: 5000 DNA marker; 1: 质粒 DNA; 2: 酶切产物. Fig. 8 Enzyme identification of DH5α-pET-28a-Wsv497 M: 5000 DNA marker; 1: plasmid DNA; 2: enzyme products.



图 6 Wsv035 目的片段 PCR 电泳图 M: DNA marker DL 2000; 1-5: Wsv035 片段 PCR 产物; 6: 阴性对照. Fig. 6 Agarose gel electropheresis of Wsv035 products

M: DNA marker DL 2000; 1–5: Wsv035 PCR products; 6: negative control.



图 9 DH5α-pET-SUMO-Wsv035 酶切鉴定

M: 5000 DNA marker; 1: 质粒 DNA; 2: 酶切产物. Fig. 9 Enzyme identification of DH5α-pET-SUMO-Wsv035 M: 5000 DNA marker; 1: plasmid DNA; 2: enzyme products.

争受体的现象。本实验室已证明 IHHNV 的衣壳 蛋白可以与对虾鳃细胞膜 NM23 蛋白相互作用。 因此本研究用已知的 NM23 蛋白筛选能与其相互 作用的 WSSV 蛋白,结果表明 Wsv497 和 Wsv035 能与之相互作用。

NM23 具有多种生物学功能,其最初的作用 是在细胞中维持二磷酸核苷储量以用于生物合 成。最近的研究表明 NM23 还参与细胞周期控制、 转录、DNA 修复、细胞增殖、分化、凋亡^[13]。它







35

25



Fig. 12 SDS-PAGE analysis of the purified Rosette-pET-SUMO-Wsv035 recombinant protein M: protein marker; 1-2: the purified recombinant protein.





图 15 Wsv497 蛋白的免疫共沉淀检测 1: Wsv497+NM23 蛋白; 2: Wsv497+GST 空标签蛋白;

3: Wsv497+Glutathione SepharoseTM 4B 磁珠.

Fig. 15 Detection of Wsv497 by co-immunoprecipitation 1: Wsv497+NM23; 2: Wsv497+the purified GST protein; 3: Wsv497+Glutathione SepharoseTM 4B beads.



图 16 Wsv035 蛋白的免疫共沉淀检测 1: Wsv035+NM23 蛋白; 2: Wsv035+GST 空标签蛋白; 3: Wsv035+Glutathione SepharoseTM 4B 磁珠.

Fig. 16 Detection of Wsv035 by co-immunoprecipitation 1: Wsv035+NM23; 2: Wsv035+the purified GST protein; 3: Wsv035+Glutathione SepharoseTM 4B beads.

还是 DNA 糖基化酶,并参与修复被氧化破坏的 DNA^[14]。此外, 它还是一种氧化细胞信号转导的 调节蛋白^[15]。NM23 蛋白参与细胞间期微管的形 成,在细胞分裂期,NM23 的分布有一定的规律, 通过影响细胞骨架对细胞信号反应性的改变,引

起细胞运动而参与侵袭^[16]。由此可以推测, IHHNV CP 与细胞膜上 NM23 蛋白结合后,通过 某种偶联机制使细胞骨架发生了改变,从而促进 宿主细胞内吞病毒粒子,此时 WSSV 再感染对虾, 与 NM23 受体结合的 Wsv497、Wsv035 减少,进 而使对虾的死亡率明显下降。此外, NM23 家族中 的几种类型有 3'-5'核酸外切酶活性,能从核酸的 3'游离羟基端逐一水解核酸链,这在 DNA 的修复 中发挥着重要作用^[17]。推测 IHHNV CP、Wsv497、 Wsv035 与细胞膜上 NM23 蛋白结合后使 NM23 蛋白丧失了原来的 DNA 修复功能。综上所述, NM23 可能介导 IHHNV、WSSV 的细胞入侵,也 可能参与入侵后细胞病变的出现。

Wsv035 又称 VP110, 是 WSSV 的囊膜蛋白之 一。它由 ORF035 编码, 含有跨膜结构域和 1 个 RGD 位点,即 Arg-Gly-Asp 模体,许多病毒利用 RGD 结合宿主细胞表面的整合素,从而介导病毒 进入^[18]。Li 等^[19]使用荧光测定和竞争性抑制试验 发现 Wsv035 能够黏附宿主细胞, Wsv035 的 RGD 模体通过与宿主细胞表面形成 RGDT 肽而在 WSSV 的感染中发挥作用,从另一方面佐证了 Wsv035 能与 NM23 结合。国内外学者对 Wsv497 蛋白的研究很少,尚不明确 Wsv497 的分布、结构 和功能。后期将会对 Wsv497 这一蛋白进行结构 和功能的研究。WSSV013在第一次质谱结果中存 在,经过原核表达并纯化出蛋白后发现 WSSV013 不能与 NM23 相互作用, 而截短表达 WSSV013 时保留了其全部的功能域。所以出现以上结果可 能与质谱前蛋白胶样品的切取有关,可能切到了 非目的蛋白、也可能和质谱实验本身的局限性有关。

对于 IHHNV、WSSV 的受体研究,目前还比较少。这是由于缺乏成熟的对虾细胞系,无法更直观地研究 IHHNV CP、Wsv497、Wsv035 与其受体的相互作用。因此后期需要通过摸索适合IHHNV、WSSV 生存的对虾细胞系和动物实验来进一步验证 IHHNV 和 WSSV 竞争对虾细胞膜受体的机制。

参考文献:

[1] Walker P J, Gudkovs N, Mohan C V, et al. Longitudinal

disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) ponds in Andhra Pradesh, India. II. Multiple WSSV genotypes associated with disease outbreaks in ponds seeded with uninfected postlarvae[J]. Aquaculture, 2011, 319(1–2): 18–24.

- [2] Durand S, Lightner D V, Redman R M, et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV)[J]. Dis Aquat Organ, 1997, 29(3): 205–211.
- [3] Walker P J, Mohan C V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies[J]. Rev Aquac, 2009, 1(2): 125–154.
- [4] van Hulten M C W V, Vlak J M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus[J]. Virus Genes, 2001, 22(2): 201–207.
- [5] Rajan P R, Ramasamy P, Purushothaman V, et al. White spot baculovirus syndrome virus in the Indian shrimp *Penaeus Monodon* and *P. Indicus*[J]. Aquaculture, 2000, 184(1–2): 31–44.
- [6] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, et al. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*[J]. Dis Aquat Organ, 1995, 21(1): 69–77.
- [7] Nadala E C, Loh P C. A comparative study of three different isolates of white spot virus[J]. Dis Aquat Organ, 1998, 33(3): 231–234.
- [8] Chang Y S, Liu W J, Chou T L, et al. Characterization of white spot syndrome virus envelope protein VP51A and its interaction with viral tegument protein VP26[J]. J Virol, 2008, 82(24): 12555–12564.
- [9] Tang K F J, Durand S V, White B L, et al. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus—a preliminary study[J]. Aquaculture, 2003, 216(1): 19–29.
- [10] Melena J, Bayot B, Betancourt I, et al. Pre-exposure to infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus or to inactivated white spot syndrome virus (WSSV) confers protection against WSSV in *Penaeus vannamei* (Boone) post-larvae[J]. J Fish Dis, 2006, 29(10): 589–600.
- [11] Steeg P S, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential 2[J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3): 200–204.
- [12] Xu L, Feng R F, Ma Z R. Progress on virus receptors[J].
 Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(2): 88–92. [徐雷, 冯若飞,马忠仁. 病毒受体研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2): 88–92.]

- [13] Fan Z, Beresford P J, Oh D Y, et al. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTLmediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor[J]. Cell, 2003, 112(5): 659–672.
- [14] Postel E H. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation[J]. J Bioenerg Biomembr, 2003, 35(1): 31–40.
- [15] Song E J, Kim Y S, Chung J Y, et al. Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase and its identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Biochemistry, 2000, 39(33): 10090– 10097.
- [16] Pinon V P, Millot G, Munier A, et al. Cytoskeletal associa-

tion of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit[J]. Exp Cell Res, 1999, 246(2): 355–367.

- [17] Kaetzel D M, Zhang Q, Yang M, et al. Potential roles of 3'-5' exonuclease activity of NM23-H1 in DNA repair and malignant progression[J]. J Bioenerg Biomembr, 2006, 38(3–4): 163–167.
- [18] Van Etten J L. Preface to lesser known large dsDNA viruses[J]. Curr Topics Microbiol Immunol, 2009, 328: 5–7.
- [19] Li L, Lin S, Yang F. Characterization of an envelope protein (VP110) of white spot syndrome virus[J]. J Gen Virol, 2006, 87(7): 1909–1915.

A preliminary study of WSSV and IHHNV competition for receptors on cell membrane of prawn gill tissue

WANG Xiaoshan, HU Zhibo, FEI Rongmei

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: White spot syndrome and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis are primary viral diseases of prawns. Outbreaks of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) arise worldwide and have caused serious economic losses in recent years, including in China. Some researchers found that, given the same conditions, WSSV-infected prawn display lower levels of mortality than IHHNV-infected prawn. Our laboratory previously demonstrated that IHHNV capsid protein (CP) has the ability to combine with NM23 protein in prawn gill membrane. NM23, a kind of nucleoside diphosphate kinase (NDPK), has various biological functions and is located mainly in the cytoplasm and nucleus, but is also evident in the cell membrane. We conducted an experiment to investigate whether WSSV and IHHNV compete with NM23 protein receptor sites on the cell membrane of shrimp gill tissue. First, we purified the total WSSV proteins using sucrose gradient centrifugation, and then we used a virus overlay protein binding assay (VOPBA) to detect protein-protein interaction between the total proteins and NM23. Next, three suspected positive proteins were selected by the combined LC-MS/MS technique: WSSV013, Wsv497 and Wsv035. Wsv035, also known as VP110, is one of the capsule membrane proteins of WSSV and is encoded by ORF035. It contains a membrane structure domain and a RGD locus (namely, the Arg-Gly-Asp motif). Some scholars, using fluorescence assay and competitive inhibition tests, found Wsv035 could stick to the host cell: Wsv035 RGD can form RGDT peptides at the cell surface and it plays a role in WSSV infection. There have been few studies of Wsv497 and WSSV013 proteins, however, and thus their distribution, structure and functions are not yet clear. Therefore, we constructed prokaryotic expression vectors of these three proteins, for purifying WSSV013, Wsv497 and Wsv035 in order to interact with NM23 protein, using VOPBA and co-immunoprecipitation, respectively. The results showed that Wsv497 and Wsv035 have the ability to interact with NM23, while WSSV013 showed an invalid effect on NM23. Accordingly, we surmise that WSSV and IHHNV have the ability to compete with NM23 protein receptors on the cell membrane of prawn gill tissue. This study adds to theories about the mechanism of competition between WSSV and IHHNV for receptor sites on the cell membrane of prawn gill tissue, and lays a foundation for further studies of protein interactions in the context of WSSV and prawn culture.

Key words: WSSV013; Wsv497; Wsv035; VOPBA; co-immunoprecipitation; NM23 protein Corresponding author: FEI Rongmei. E-mail: feirongmei@njau.edu.cn