

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170222002

http://www.yykxjz.cn/

王中一, 刘庆慧, 黄健. 凡纳滨对虾网格重链蛋白与WSSV结构蛋白在体外的相互作用. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 138–145
Wang ZY, Liu QH, Huang J. *In vitro* interaction between domain of clathrin heavy chain in *Litopenaeus vannamei* and WSSV structural proteins. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 138–145

凡纳滨对虾网格重链蛋白 与 WSSV 结构蛋白在体外的相互作用*

王中一^{1,2} 刘庆慧^{1,2}① 黄 健^{1,2}

- (1. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 根据凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)网格重链蛋白(CHC)的 2 个功能结构域 Clathrin Propel Repeat (LvCHC1)和 Clathrin Heavy Chain Repeat Homology (LvCHC2), 分别设计 2 对特异性引物, 扩增目的片段, 并克隆至 pBAD/gIIIa 载体上, 以 *E.coli* Top10 为宿主菌, 在阿拉伯糖的诱导下获得 LvCHC1 和 LvCHC2 重组蛋白。以 Co^{2+} 亲和层析方法, 获得纯化的 LvCHC1 和 LvCHC2 蛋白, 并经质谱分析验证。采用 Far-Western 方法分析 LvCHC1 和 LvCHC2 蛋白与白斑综合征病毒(WSSV)结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 的作用, 结果显示, LvCHC1 和 LvCHC2 与 VP28N 没有结合作用, 但都能与 VP26 和 VP37 结合, 其中与 VP26 的结合作用较强。表明网格蛋白介导的内吞途径在 WSSV 侵染过程中起到了一定的作用。本研究可为深入研究 WSSV 入侵机制提供依据。

关键词 凡纳滨对虾; 网格重链蛋白; WSSV; 体外作用

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0138-08

白斑综合征病毒(WSSV)是水产养殖业中主要的病原之一, 不仅侵染各种野生及养殖对虾, 而且侵染其他水生甲壳类如蟹类、螯虾和龙虾等。该病一旦流行, 对虾在 3–7 d 内的死亡率可达 100%, 不仅给对虾养殖造成严重的损失, 也给海洋生态平衡带来一定的威胁(马晓燕等, 2012)。由于 WSSV 基因的复杂性, 针对 WSSV 的致病机理及 WSSV 侵染宿主细胞的途径尚未得到深入阐释。

网格重链蛋白(Clathrin Heavy Chain, CHC)是网格蛋白的主要成分之一, 是进化上保守的大分子蛋

白, 迄今只在真核生物中发现, 包括近端区、连接区、脚踝区、膝弯曲区、腿远端区、腿近端区和铰链区。网格重链蛋白 N 端有一个衔接蛋白结合结构域(TD), 通过结合衔接蛋白连接要运输的物质(Ter *et al*, 1998; Pearse *et al*, 2000; Zhu, 2015)。网格蛋白具有介导膜蛋白、生长因子、受体、病原体、突触等物质进行内吞的作用(Von *et al*, 2011)。Royle 等(2005)研究表明, 在有丝分裂过程中, 网格蛋白可与纺锤体结合, 提高纺锤体的稳定性, 促进染色体的联会。另外, 网格蛋白可与微管或者微管相关蛋白直接结合来稳定着丝

* 国家自然科学基金(31672679)、国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)和泰山学者“建设工程专项经费”共同资助 [This work was supported by National Science Foundation of China (31672679), National Key Basic Research Development Plan (2012CB114401), and Taishan Scholar “Special Funds to Construction Projects”]. 王中一, E-mail: liangwang06@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-02-22, 收修改稿日期: 2017-03-20

粒。这些研究表明, 网格蛋白参与多种细胞生物学过程, 对细胞生长发育、分化和环境响应具有重要的生物学功能(Royle *et al.*, 2012)。然而, 网格蛋白介导的内吞途径是 G 蛋白偶联受体介导的最主要的经典内吞途径, 同时也是病毒侵染细胞的主要途径之一(Li *et al.*, 2016)。Posiri 等(2015)研究表明, 在敲除斑节对虾(*Penaeus monodon*)的网格重链蛋白基因后, 延迟了感染黄头病毒(Yellow Head Virus, YHV)的斑节对虾的死亡。黄家骏等(2015)也证明, WSSV 是通过网格蛋白介导的内吞途径进入造血组织细胞的。王修芳(2016)首次克隆凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)网格重链蛋白基因, 全长 5052 bp, 编码 1684 个氨基酸, 含有 clathrin propel repeat、clathrin heavy-chain linker、clathrin-H-link、clathrin heavy chain repeat homology 四个结构域, 并利用 RNA 干扰技术可抑制 *CHC* 基因的表达, 感染 WSSV 凡纳滨对虾的死亡率明显降低。

本研究针对凡纳滨对虾网格重链蛋白的 2 个功能基因, 进行重组表达并获得纯化重组蛋白, 利用 Far-Western 技术筛选出能与这 2 个功能蛋白相互作用的 WSSV 蛋白, 为探讨网格蛋白介导 WSSV 的侵染提供理论依据, 同时也为更加深入全面探索 WSSV 感染机制和防治措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

WSSV 结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37, 表达载体 pBAD/gIII A 和凡纳滨对虾网格重链蛋白重组质粒由本实验室保存; *E. coli* Top10 感受态细胞购自 TIANGEN 公司; *Taq* 酶及 DNA 标准(DNA Marker DL 2000)购自 TaKaRa 公司; T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Nco* I、*Xba* I 及蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; 地高辛(DIG)购自 Roche 公司; 氨苄青霉素(Amp⁺)、L-阿拉伯糖(L-Arab)、质粒小提试剂盒购自 Solarbio 公司; 胶回收试剂盒购自 ZYMO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凡纳滨对虾功能基因 *LvCHC1* 和 *LvCHC2* 的克隆 根据 *LvCHC* 的 2 个功能结构域 clathrin propel

repeat(600~1350 bp、200~450 aa)和 clathrin heavy chain repeat homology(1650~2340 bp、550~780 aa), 分别命名为 *LvCHC1* 和 *LvCHC2*(图 1), 设计 2 对引物(CIH1s、CIH1a; CIH2s、CIH2a)(表 1)。将 *LvCHC* 重组载体保种液取出, 在 LB(Amp⁺, 100 μg/ml)固体培养基中划线, 37℃ 倒置过夜培养。PCR 扩增 *LvCHC1* 基因和 *LvCHC2* 基因, 扩增程序: 25 μl 体系, 94℃, 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 分别胶回收, 胶回收的方法按照 ZYMO 公司胶回收试剂盒进行, 并用 NanoDrop 2000c 检测目的基因 *LvCHC1* 和 *LvCHC2* 的浓度。

1.2.2 表达载体的构建 将 pBAD/gIII A 质粒和胶回收的 2 个片段 *LvCHC1*、*LvCHC2* 分别进行 *Nco* I、*Xba* I 双酶切。酶切效果用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察, 将电泳条带切胶回收, 并测定核酸浓度。用 T4 DNA ligase 将目的片段与 pBAD/gIII A 载体连接; 取连接产物 5 μl 加入到 50 μl TOP 10 感受态细胞中, 冰浴 30 min; 42℃ 热激 60 s, 将重组质粒转化入感受态细胞中; 加入 890 μl LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 1 h, 使质粒恢复抗性; 取 100 μl 恢复抗性的菌液涂布在 LB 固体培养基(Amp⁺, 100 μg/ml)中, 37℃ 倒置培养 14 h。挑取单菌落加入 LB 液体培养基 900 μl 中(Amp⁺, 100 μg/ml), 培养 5 h 后, 以菌液为模板, 用 pBAD/gIII A 载体通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 将电泳结果正确的阳性菌液测序。

1.2.3 *LvCHC1* 蛋白和 *LvCHC2* 蛋白的表达 将测序正确的菌液分别按照 1% 的比例加入新鲜的 LB 液体培养基中(Amp⁺, 100 μg/ml), 过夜培养。然后按照 1% 的比例将菌液分别加入 LB 液体培养基(Amp⁺, 100 μg/ml)中扩大培养, 培养 5 h 后, 加入 L-阿拉伯糖(终浓度为 0.2 g/L)诱导蛋白表达, 对照组不加 L-阿拉伯糖, 4 h 后, 菌液以 10000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 缓冲液重悬沉淀, 超声破碎仪超声破碎, 将诱导和未诱导菌液分别取适量的上清液和沉淀于 EP 管中, 沉淀用 PBS 缓冲液重悬, SDS-PAGE 检测分析。

1.2.4 钴离子柱亲和层析纯化蛋白 破碎液经 10000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀用 A 液(含

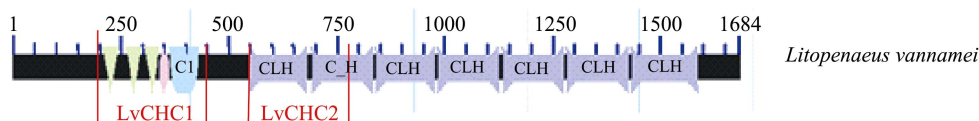


图 1 凡纳滨对虾网格重链蛋白氨基酸序列(摘自王修芳, 2016)

Fig.1 Amino acid sequence of *LvCHC* (By Wang, 2016)

表 1 引物序列
Tab.1 Sequence of primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
CIH1s	TACCATGGAGATTGAAGGTCATGCT
CIH1a	ACTCTAGATGCCCTGAGCTAAGAC
CIH2s	TACCATGGCTGCTGATGTAAACCAG
CIH2a	CATCTAGAGCCTGTCCCCTCTTGCA

6 mol/L 盐酸胍)溶解后, 于 4℃ 条件下, 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并分别经 0.8 μm 和 0.45 μm 滤膜过滤。将树脂装入层析柱中, 先用 PBS 平衡洗柱, 用 A 液将紫外吸收峰洗至 0, 加入蛋白上清液, 混匀后冰浴 2 h, 再用 A 液将峰值洗脱至 0, 然后用 150 mmol/L 咪唑洗脱, 收集重组蛋白, 在尿素梯度复性液中复性透析, 之后用超滤管进行浓缩, 用 SDS-PAGE 检验蛋白纯化效果。

1.2.5 DIG 标记 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白

用枪头取少量 DIG 粉末溶于 DMSO 中, 分别加入纯化的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白, 旋转混合仪中混匀 2 h, 4℃ PBS 溶液中过夜透析, 去除过量的 DIG。

1.2.6 Far-Western 检测与 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白相互作用的 WSSV 蛋白 将表达纯化的 WSSV 重组蛋白 VP26、VP28N、VP37 进行 15% SDS-PAGE 后, 转印至 PVDF 膜上, 4℃ 在 5% BSA 中封闭过夜, PBS-T 清洗后分别加入 DIG 标记的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白, 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 3 遍后加入 Anti-DIG-AP (1:3000), 室温避光孵育 2 h, PBS-T 清洗 3 遍后用 BCIP/NBT 显色液避光显色。将显色结果扫描分析。

2 结果

2.1 LvCHC1 基因与 LvCHC2 基因的克隆

利用设计的 CIH1s、CIH1a 和 CIH2s、CIH2a 两对特异性引物分别扩增 LvCHC1 基因和 LvCHC2 基因, 电泳结果见图 2。前面条带出现在 750 bp 左右, 与 LvCHC1 基因 750 bp 基本相符。后面条带出现在 500 bp 和 750 bp 之间, 与 LvCHC2 基因 590 bp 基本相符。

2.2 pBAD/gIII A-LvCHC1 和 pBAD/gIII A-LvCHC2 重组质粒的鉴定

用 T4 DNA Ligase 将双酶切后的片段与具有相同粘性末端的 pBAD/gIII A 表达载体连接, 将构建好的表达载体转化到 Top 10 大肠杆菌感受态细胞中, 经

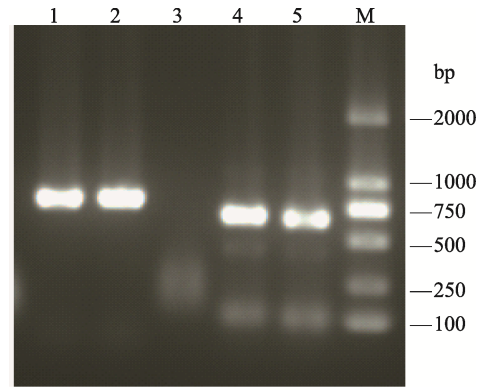


图 2 LvCHC1 和 LvCHC2 基因的克隆
Fig.2 Cloning of LvCHC1 and LvCHC2

M: DNA 标准品 DL2000; 1~2: LvCHC1 基因;
3: 阴性对照; 4~5: LvCHC2 基因
M: DNA Marker DL2000; 1~2: LvCHC1 gene;
3: Negative control; 4~5: LvCHC2 gene

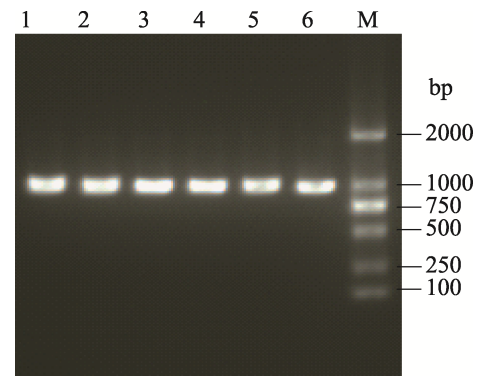


图 3 重组质粒菌液 PCR
Fig.3 PCR identification of the recombinant vector

M: DNA 标准品 DL2000;
1~6: pBAD/gIII A-LvCHC1 重组质粒
M: DNA Marker DL2000; 1~6: Recombinant vector of pBAD/gIII A-LvCHC1

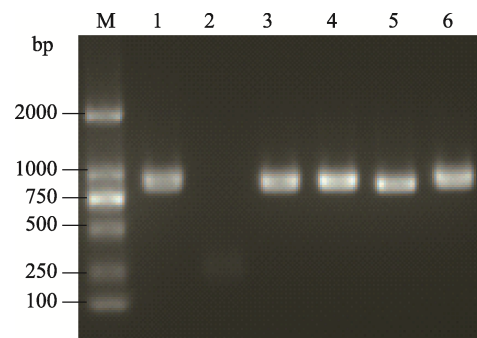


图 4 重组载体菌液 PCR
Fig.4 PCR identification of the recombinant vector

M: DNA 标准品 DL2000;
2: 阴性对照; 1~6: pBAD/gIII A-LvCHC2 重组质粒;
M: DNA Marker DL2000; 2: Negative control
1~6: recombinant vector of pBAD/gIII A-LvCHC2

Amp⁺抗性筛选后, 挑取单克隆, 37℃培养 5 h 后, 进行菌液 PCR 鉴定, PCR 产物电泳结果见图 3 和图 4, 条带大小在 1000 bp 左右, 初步断定为阳性克隆。取阳性克隆菌液测序, 经过 DNAMAN 软件分析, 证明重组表达载体序列完全正确, 无移码错配。

2.3 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白的检测

将重组表达载体正确的菌液进行扩大培养, 经 L-阿拉伯糖诱导后, 将诱导和未诱导的上清液和沉淀分别进行蛋白质凝胶电泳(图 5 和图 6)。分析图 5 发现, 诱导上清液和未诱导的上清液蛋白条带一致, 没有诱导条带; 而诱导沉淀在 25~35 kDa 之间比未诱导的沉淀多 1 条蛋白带(图中红色箭头所指), 其条带大小与 LvCHC1 理论蛋白分子质量 26.19 kDa 相符, 说明该条带有可能是 LvCHC1 蛋白。分析图 6 发现, 诱导上清液和未诱导的上清液蛋白一致, 没有出现

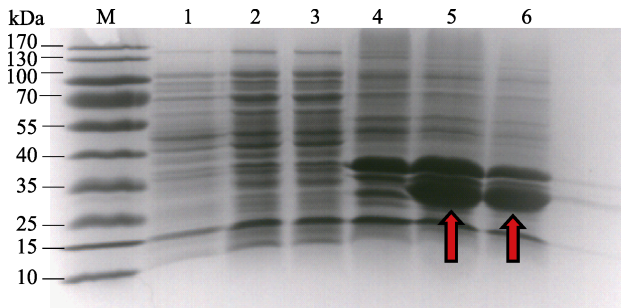


图 5 LvCHC1 蛋白的表达
Fig.5 The expression of LvCHC1 protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导上清液;
2~3: 诱导上清液; 4: 未诱导沉淀; 5~6: 诱导沉淀
M: Protein marker; 1: Supernatant protein of non-induced LvCHC1; 2~3: Supernatant protein of induced LvCHC1;
4: Pellet protein of non-induced LvCHC1;
5~6: Pellet protein of induced LvCHC1

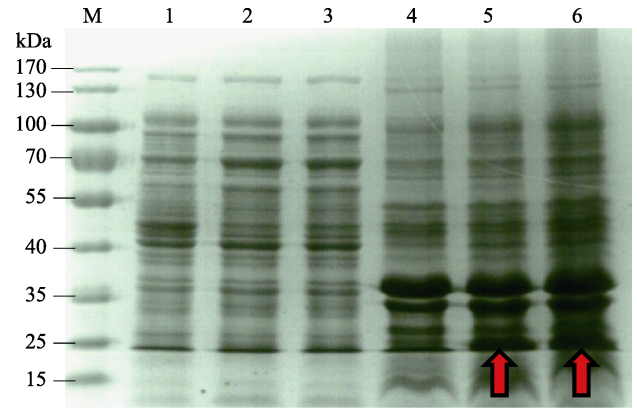


图 6 LvCHC2 蛋白的表达
Fig.6 The expression of LvCHC2 protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导上清液;
2~3: 诱导上清液; 4: 未诱导沉淀; 5~6: 诱导沉淀
M: Protein marker; 1: Supernatant protein of non-induced LvCHC2; 2~3: Supernatant protein of induced LvCHC2;
4: Pellet protein of non-induced LvCHC2;
5~6: Pellet protein of induced LvCHC2

诱导条带; 而诱导沉淀在 25 kDa 左右比未诱导的明显多 1 条蛋白带(图中红色箭头所指), 其条带大小与 LvCHC2 理论蛋白分子质量 17.49 kDa 相符, 说明该条带有可能是 LvCHC2 蛋白。将符合目的蛋白的条带进行蛋白质谱分析, 经验证发现, LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白表达正确(表 2 和表 3)。2 个功能蛋白都出现在诱导的沉淀中, 说明 2 个蛋白为包涵体。

2.4 纯化蛋白检测

表达载体 pBAD/gIII A 上带有 6×His 标签, 可利用 Co²⁺亲和和层析法对其进行纯化, 洗脱液经尿素梯度复性后得到正确折叠的蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 检测分析, 结果显示, 经纯化的蛋白纯度较高, 可用于进一步实验(图 7)。

表 2 LvCHC1 质谱分析结果
Tab.2 MS analysis of LvCHC1 protein

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start	End	Peptide
734.446	733.439	733.376	120	125	K.WISSNK.L
768.391	767.383	767.400	1163	1168	R.YLVMAR.K + Oxidation (M)
841.418	840.411	840.475	1517	1523	R.IAA YLYK.G
905.448	904.440	904.480	676	683	K.AMLTANLR.Q+Oxidation (M)
913.384	912.376	912.438	1047	1053	R.VMDYITR.L+Oxidation (M)
1012.490	1011.482	1011.517	618	626	R.AHIAQLCEK.A
1382.653	1381.645	1381.706	579	590	K.NNRPTEGPLQTR.L
1514.630	1513.623	1513.676	633	6440	R.ALEHYTDMYDIK.R+Oxidation (M)
2168.954	2167.946	2168.079	696	713	K.YHEQLTTNALIDLFESFK.S
2821.281	2820.274	2820.380	714	737	K.SFEGLFYFLGSIVNFSQEPEVHFK.Y
3126.336	3125.329	3125.462	591	617	R.LLEMNLMSAPQVADAILGNQMFTHYDR.A+3 Oxidation (M)

表 3 LvCHC2 质谱分析结果
Tab.3 MS analysis of LvCHC2 protein

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start	End	Peptide
734.446	733.439	733.376	120	125	K.WISSNK.L
768.390	767.383	767.400	1163	1168	R.YLVMAR.K+Oxidation (M)
841.418	840.410	840.475	1517	1523	R.IAAVLYK.G
905.448	904.440	904.480	676	683	K.AMLTANLR.Q+Oxidation (M)
913.384	912.376	912.438	1047	1053	R.VMDYITR.L+Oxidation (M)
1382.653	1381.645	1381.706	579	590	K.NNRPTEGPLQTR.L
1514.630	1513.623	1513.676	633	644	R.ALEHYTDMYDIK.R+Oxidation (M)
2168.954	2167.946	2168.079	696	713	K.YHEQLTTNALIDLFESFK.S
2821.281	2820.274	2820.380	714	737	K.SFEGFLFYFLGSIVNFSQEPEVHFK.Y
3126.336	3125.329	3125.462	591	617	R.LLEMNLMSAPQVADAILGNQMFTHYDR.A+3 Oxidation (M)

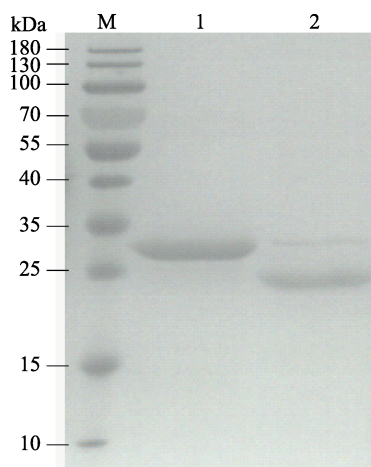


图 7 SDS-PAGE 分析纯化的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白

Fig.7 SDS-PAGE analysis of purified protein LvCHC1 and LvCHC2

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化后的 LvCHC1;
2: 纯化后的 LvCHC2

M: Protein Marker; 1: Purified LvCHC1; 2: Purified LvCHC2

2.5 Far-Western 分析

将 VP26、VP28N、VP37 和蛋白 Marker 对称点样, 转印于 PVDF 膜上, 与 DIG 标记的 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白作用, 图 8 显示, LvCHC1 蛋白与 VP37 和 VP26 有结合活性, 但与 VP26 相比, VP37 处的条带结合较弱。图 9 显示, LvCHC2 蛋白与 VP37 和 VP26 都有结合活性, 但与 VP26 相比, VP37 处的条带也较微弱。

3 讨论

网格蛋白是由三个网格重链蛋白和三个网格轻链蛋白构成的, 每一个网格重链蛋白结合一个轻链蛋

白为基本单位组装成三角蛋白复合体。本研究根据凡纳滨对虾网格重链蛋白基因, 分别设计 2 对特异性的引物, 并克隆它的 2 个功能基因 LvCHC1 和 LvCHC2, 经过 *Nco* I、*Xba* I 双酶切后连接到 pBAD/gIII A 载体并转入到 TOP10 感受态细胞中, 选择阳性克隆的菌落通过原核表达获得 2 个功能蛋白即 LvCHC1 和 LvCHC2, 2 个蛋白分别经过钴离子柱纯化得到纯化的目的蛋白, 之后应用 Far-Western 研究它们分别与 WSSV 病毒结构蛋白 VP26、VP28N 和 VP37 的相互作用。

蛋白检测表明 LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白均出现在诱导的沉淀中, 属于包涵体蛋白。Far-Western 结果表明, LvCHC1 蛋白和 LvCHC2 蛋白与 VP28N 都没有相互结合的能力, 但都能与 VP26 和 VP37 相互作用, 而且 2 个蛋白与 VP26 的结合力强于与 VP37 的结合能力。VP26 是 WSSV 中含量较高的被膜蛋白 (Tsai *et al*, 2006), 可以与囊膜蛋白 VP28、核衣壳蛋白 VP51 结合, 起到连接作用 (Chang *et al*, 2008; Wan *et al*, 2008), 重组表达的 VP26 与中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 和螯虾血细胞都具有结合作用, 经质谱分析, 与 VP26 有结合作用的是 β -肌动蛋白 (Liu *et al*, 2011; Xie *et al*, 2005), 而 β -肌动蛋白在细胞内物质和器官运输过程中起重要作用, 并被报道参与到一些病毒的入侵、细胞内转运和释放等过程中, 推测其主要在病毒粒子的组装中发挥作用, 以及病毒进胞后促进其沿着微丝进行迁移 (Gouin *et al*, 2005)。而 VP37 是 WSSV 病毒的一个重要囊膜蛋白, 它含有一个 RGD 位点, 推测其在 WSSV 感染机制中发挥重要作用, 研究表明, VP37 与虾血细胞和鳃细胞膜蛋白结合的蛋白为 ATP 合酶 β 亚基, 推测其可能为 VP37 在宿主细胞的受体蛋白 (Huang *et al*, 2002;

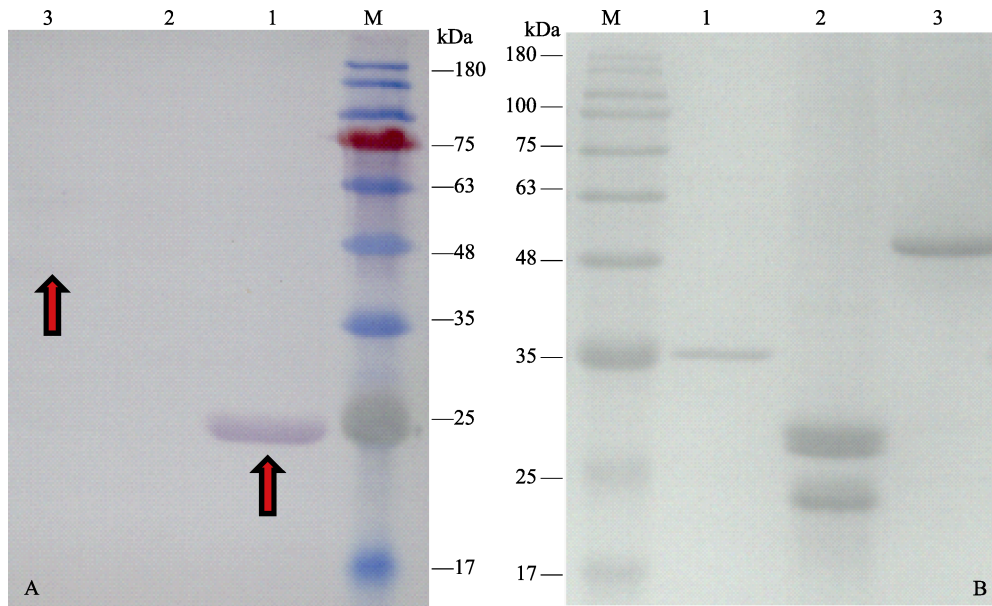


图 8 Far-Western-blot 分析 LvCHC1 与 VP26, VP28N 及 VP37 的相互作用
Fig.8 Far-Western-blot analysis of LvCHC1 interaction with VP26, VP28N and VP37

A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37
A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: Protein marker; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37

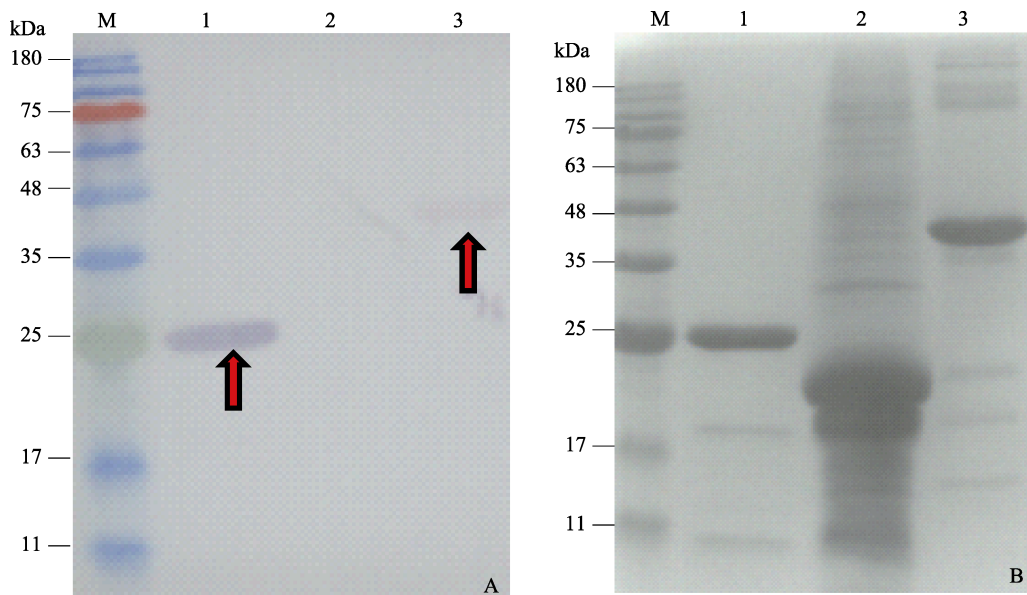


图 9 Far-Western-blot 分析 LvCHC2 与 VP26, VP28N 及 VP37 相互作用
Fig.9 Far-Western-blot detection of LvCHC2 interaction with VP26, VP28N and VP37

A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: 蛋白分子质量标准; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37
A: Far-Western-blot; B: SDS-PAGE; M: Protein marker; 1: VP26; 2: VP28N; 3: VP37

Liang *et al.*, 2005)。根据实验结果可初步推断 WSSV 在入侵凡纳滨对虾的细胞时, VP26 和 VP37 通过与网格重链蛋白作用, 介导 WSSV 进入宿主细胞内, 从而加快了 WSSV 病毒在宿主体内的传播。

虽然本研究得出网格重链蛋白能与 WSSV 病毒的 VP26 和 VP37 相互作用, 但关于网格重链蛋白是

如何调控 WSSV 入侵凡纳滨对虾等分子机制还没有阐明, 仍需要进一步的研究。

参 考 文 献

Chang YS, Liu WJ, Chou TL, *et al.* Characterization of white spot syndrome virus envelope protein VP51A and its

- interaction with protein VP26. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 12555–12564
- Gouin E, Welch MD, Cossart P. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(1): 35–45
- Huang C, Zhang X, Lin Q, *et al.* Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. *Journal of General Virology*, 2002, 83(10): 2385–2392
- Huang JJ, Li F, Yang F. Cloning of clathrin light chain of crayfish, *Cherax quadricarinatus*, and immunological specificity of antibodies. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 35(2): 205–210 [黄家骏, 李钊, 杨丰. 红螯螯虾网格蛋白轻链的克隆及制备抗体的检测. *应用海洋学学报*, 2015, 35(2): 205–210]
- Li S, Bai B, Chen J. Regulatory mechanisms of G protein coupled receptor about desensitization, and resensitization. *Journal of Jining Medical College*, 2016, 39(2): 123–127 [李胜, 白波, 陈京. G 蛋白偶联受体脱敏内吞和复敏调控机制进展. *济宁医学院学报*, 2016, 39(2): 123–127]
- Liang Y, Huang J, Song XL, *et al.* Four viral proteins of white spot syndrome virus (WSSV) that attach to shrimp cell membranes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(1): 81–85
- Liu B, Tang X, Zhan W. Interaction between white spot syndrome virus VP26 and hemocyte membrane of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, 2011, 314(1–4): 13–17
- Ma XY, Li P, Yan J, *et al.* The summary of WSSV. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2012(4): 90–100 [马晓燕, 李鹏, 严洁, 等. 对虾白斑综合症病毒的概述. *南京师范大学报(自然科学版)*, 2012(4): 90–100]
- Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ. Clathrin coat construction in endocytosis. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(2): 220–228
- Posiri P, Kondo H, Hirono I, *et al.* Successful yellow head virus infection of *Penaeus monodon* requires clathrin heavy chain. *Aquaculture*, 2015, 435: 480–487
- Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*, 2005, 434(7037): 1152–1157
- Royle SJ. The role of clathrin in mitotic spindle organization. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(1): 19–28
- Ter EH, Musacchio A, Harrison SC, *et al.* Atomic structure of clathrin: A beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell*, 1998, 95(4): 563–573
- Tsai JM, Wang HC, Leu JH, *et al.* Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology*, 2006, 80(6): 3021–3029
- Von KL, Stahlschmidt W, Bulut H, *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell*, 2011, 146(3): 471–484
- 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. *Journal of Virology*, 2008, 82(24): 598–601
- Wang XF. Cloning and expression of prawn coat-ε, clathrin coat AP17 and clathrin heavy chain and its role in WSSV infection. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2016 [王修芳. 对虾 Coat-ε、CCAP17 和 CHC 的克隆、表达及其在 WSSV 感染中的作用. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Xie X, Yang F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, 2005, 336(1): 93–99
- Zhu MS. Molecular mechanisms of CHC2 in symbiotic signaling pathway in *Lotus japonicas*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 [祝茂生. 网格重链蛋白 CHC2 在百脉根结瘤信号途径中功能及作用机制的研究] 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2015]

(编辑 冯小花)

***In vitro* Interaction Between Domain of Clathrin Heavy Chain in *Litopenaeus vannamei* and WSSV Structural Proteins**

WANG Zhongyi^{1,2}, LIU Qinghui^{1,2}^①, HUANG Jie^{1,2}

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Clathrin heavy chain protein (CHC), a conserved protein only found in eukaryotes, is one of the essential components of clathrin. White spot syndrome virus (WSSV) infection is one of the main diseases in aquaculture. It belongs to the *Whispovirus* genus of the Nimaviridae family. WSSV, a rod-shaped, non-occluded baculovirus with large doubled-stranded DNA, can infect shrimps such as penaeid shrimp and crayfish. WSSV has a wide range of hosts in crustacean with high infection and mortality rate, and it causes up to 100% mortality within 3~7 days, which causes great economic loss in aquaculture industry. Recent research showed that the clathrin mediated endocytosis path regulates WSSV infection in the *Cherax quadricarinatus* hematopoietic cells. However, whether the clathrin heavy chain protein plays an important way in the clathrin mediated endocytosis pathway is unclear. To address this, two primers were designed to clone the LvCHC1 and LvCHC2 according to the two structural domains: clathrin propel repeat (LvCHC1) and clathrin heavy chain repeat homology (LvCHC2) of *Litopenaeus vannamei* CHC. LvCHC1 and LvCHC2 were cloned into prokaryotic expression vector pBAD/gIII A and transformed into *E. coli* TOP 10. The recombinant LvCHC1 and LvCHC2 were successfully obtained by inducing with L-arabinose. The pure LvCHC1 and LvCHC2 were acquired using Co²⁺ affinity chromatography purification. Mass spectrometry analysis showed the correctness of the recombinant LvCHC1 and LvCHC2. Far-Western blot results indicated that LvCHC1 and LvCHC2 interacted with VP26 and VP37 with higher banding activity with VP26, and that LvCHC1 and LvCHC2 did not bind to VP28N. Taken together, the results indicated that clathrin heavy chain-mediated endocytosis is required for WSSV infection.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Clathrin heavy chain protein; White Spot Syndrome Virus; Interaction *in vitro*

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn