

# **兔瘟病毒（RHDV）的基因组序列分析及 衣壳蛋白VP60的结构和功能预测**

**报告人：繆秋红**

**小组成员：繆秋红 伍妙梨  
梁瑞英 郭艳红**

**2012年6月10日**

# 汇报内容

RHDV相关介绍

衣壳蛋白**VP60**的结构预测

衣壳蛋白**VP60**的功能预测

讨论

# 一、RHDV的介绍

兔出血症( Rabbit hemor rhagic disease , RHD)俗称“兔瘟”、兔出血热。1984年2月,该病首次在我国江苏省无锡、江阴一带地区暴发,并在一年内迅速传播蔓延至全国25个省、市、自治区。随后,在亚洲、欧洲、北美洲、非洲和大洋州等地区的许多国家相继有该病流行的报道,后经确定本病是由兔出血症病毒(Rabbit hemor rhagic disease virus , RHDV)引起的兔的一种急性、败血性烈性传染病,以呼吸系统出血、肝坏死及实质脏器水肿、淤血及出血性变化为主要特征。因该病常呈暴发性流行,发病率及死亡率极高,给养兔业带来了巨大的经济损失

杯状  
病毒科

兔病毒属

**RHDV:**兔出血症病毒

**EBHSV:** 欧洲褐色兔综合征病毒

诺瓦克病毒属

扎幌样病毒属

水疱疹病毒属

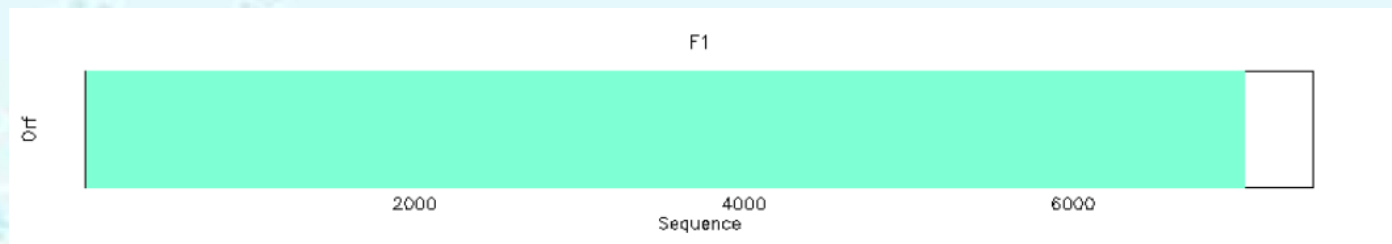
# RHDV:兔出血症病毒

本课程试验利用实验室提交的基因组序列进行：

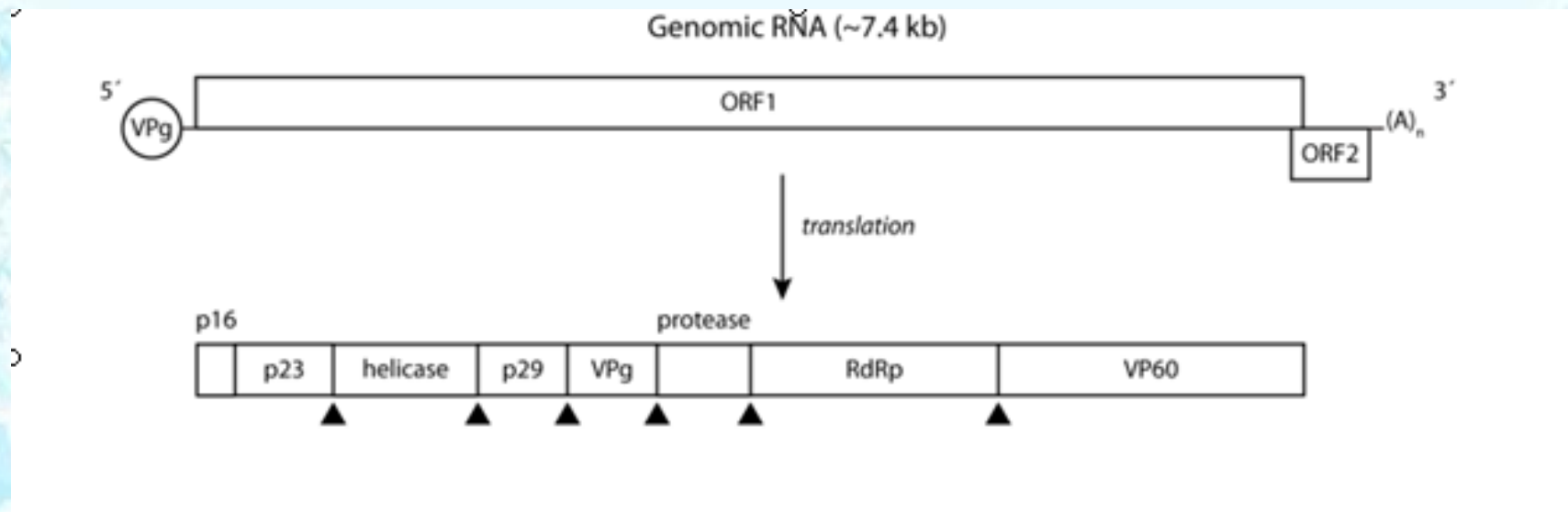
Locus: DQ205345 7464bp mRNA linear VRL 05-OCT-2005

Definition: Rabbit hemorrhagic disease virus strain JX/CHA/97 polyprotein (RHDV), major capsid protein VP60 (VP60), and structural protein VP12 (VP12) mRNAs, complete cds.

# 利用plotorf进行基因组读码框分析：读码框呈现连续状态



根据相关文献资料得知：RHDV存在两个读码框，ORF1和ORF2,它们在7025-7378存在重叠区域



# 有关VP60

病毒基因组ORF1编码一个257kDa的蛋白的多聚蛋白前体，该多聚蛋白在蛋白酶水解过程中可以产生七种非结构蛋白和一种重要的结构蛋白（VP60），有研究表明，VP60可以自我装配成病毒的衣壳，包裹核酸后即形成具有感染性的病毒粒子，但是，VP60其在RHDV致病机制中的作用以及它的病毒侵染力尚不清楚。为此，我们对其进行分析，并且将病毒衣壳蛋白编码区的部分基因删除，观察其功能变化。

## 二、VP60的结构预测

提取uniprot中的审核过的RHDV的序列的VP60区段进行比对，分析其序列差异性，构建进化树。

序列：

P27410 : (strain Rabbit/Germany/FRG/1989)  
(Ra/LV/RHDV/GH/1989/GE) (RHDV-FRG)

Q86119 : (strain AST89) (Ra/LV/RHDV/AST89/1989/SP)  
(RHDV-AST89)

P27411 : (strain V-351) (Ra/LV/RHDV/V351/1991/CK)  
(RHDV-V351)

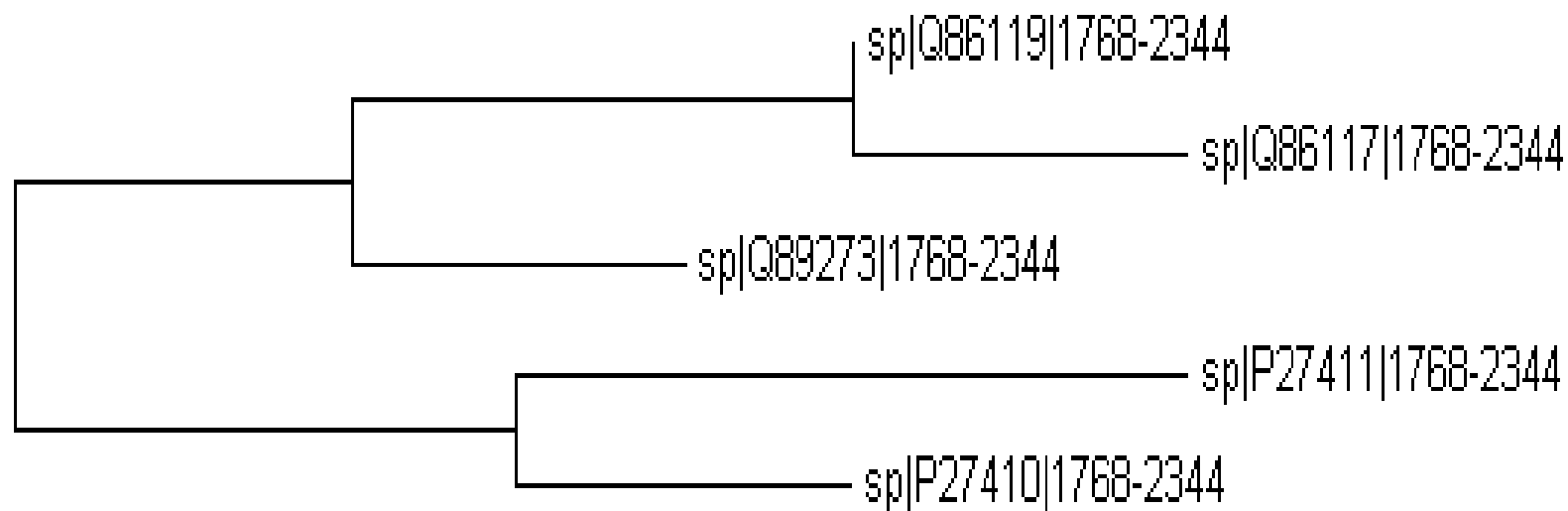
Q89273 : (strain BS89) (Ra/LV/RHDV/BS89/1989/IT)  
(RHDV-BS89)

Q86117 : (strain BS89) (Ra/LV/RHDV/BS89/1989/IT)  
(RHDV-BS89)

其中Capsid protein VP60 为577AA,位于1768 – 2344 位



# 构建VP60的进化树



0.002

# Uniprot中的VP60

## Names and origin

Protein names	<i>Recommended name:</i> <b>Subgenomic capsid protein VP60</b>
Organism	<b>Rabbit calicivirus (Ra/LV/RHDV/RCV/1995/IT) (RHDV)</b>
Taxonomic identifier	314539 [NCBI]
Taxonomic lineage	Viruses › ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage › Caliciviridae › Lagovirus
Virus host	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit) [TaxID: 9986]

## Protein attributes

Sequence length	576 AA.
Sequence status	Complete.
Protein existence	<a href="#">Evidence at transcript level</a>

# VP60进行结构预测

```
>sp|Q85433|CAPSD_RHDVR Subgenomic capsid protein VP60  
OS=Rabbit calicivirus PE=2 SV=1  
MEGKARITPQGEAAGTATTASVPGTTTTDGMDPGVVATTSVVT  
TENASTSVATAGIGGPPQQVDQQETWRTNFYYNDVFTWSVA  
DAPGSILYTVQHSPQNNPFTAVLSQMYAGWAGGMQFRFIVA  
GSGVFGGRLVAAVIPPGIEIGPGLEVRQFPHVVIDARSLEPVTI  
TMPDLRPNMYHPTGDPGLVPTLVLSVYNNLINPFGGSTSAIQV  
TVETRPSDEFEFVMIRAPSSKTVDSTPAGLLTTPVLTGVGTD  
NRWNCQIVGLQPVPGLSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFTDI  
DHRRGASQPGGNNVLQFWYANAGSAVDNPICQVAPDGFPD  
MSFVPLNGPNVPTAGWVGFGAIWNSNSGAPNVTTVQAYELG  
FATGAPNNLQPATNTSGSQIVAKSIYAVSTGANQNPAGLFVM  
ASGVISTPTARAITYTPQPDRIVNAPGTPAAAPVGKNVPIMFAS  
VVRRTGDVNAEAGSDNGTQYGTGSQPLPVTIGLSLNNYSSAL  
TPGQFFVWQLNFASGFMEIGLNVDGYFYAGTGASTT  
LIDLTELIDIRPVGPRPSTSTLVFNLGGATSGFSYV
```

# 提交至swiss-model:

**Model information:**

**Modelled residue range:18 to 567**

**Based on template: [\[2gh8A\]](#) (3.20 Å)**

**Parent PDB: 2gh8 Chain: A ,从18-567位**

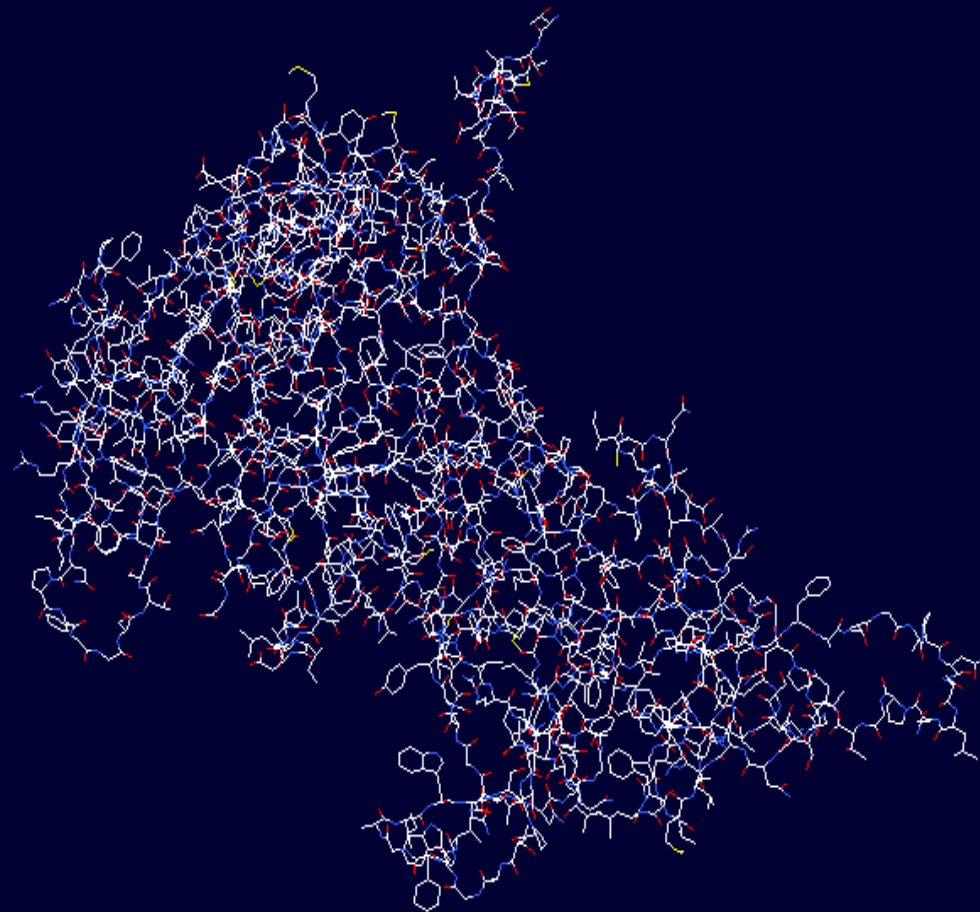
**Sequence Identity [%]:24.87**

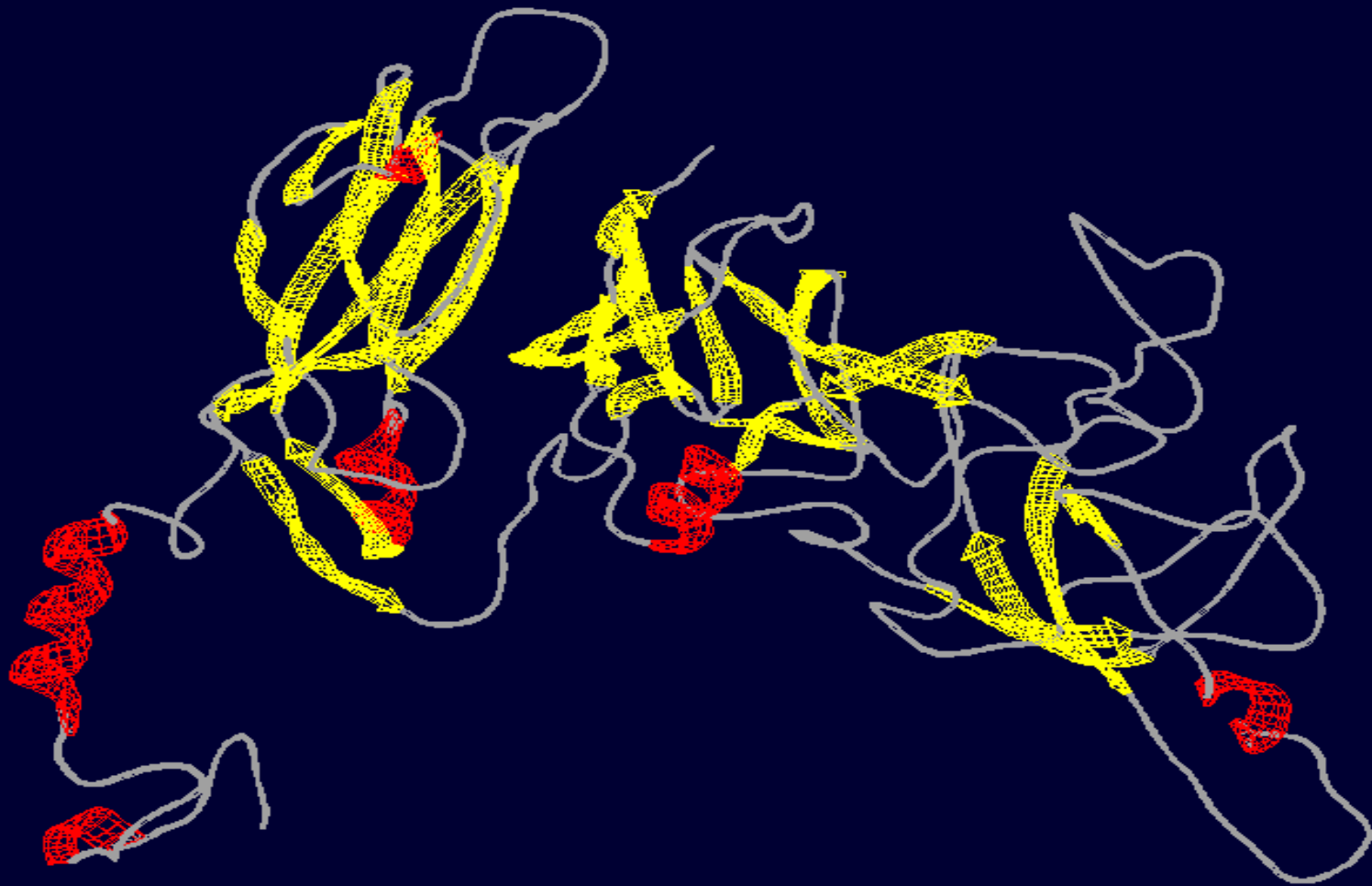
**Evalue:0.00e-1**

**Quality information:[details]**

**QMEAN Z-Score: -6.15**

**Warning: Low QMEAN Z-scores! Only membrane proteins or models of poor quality are expected to reach such low scores.**

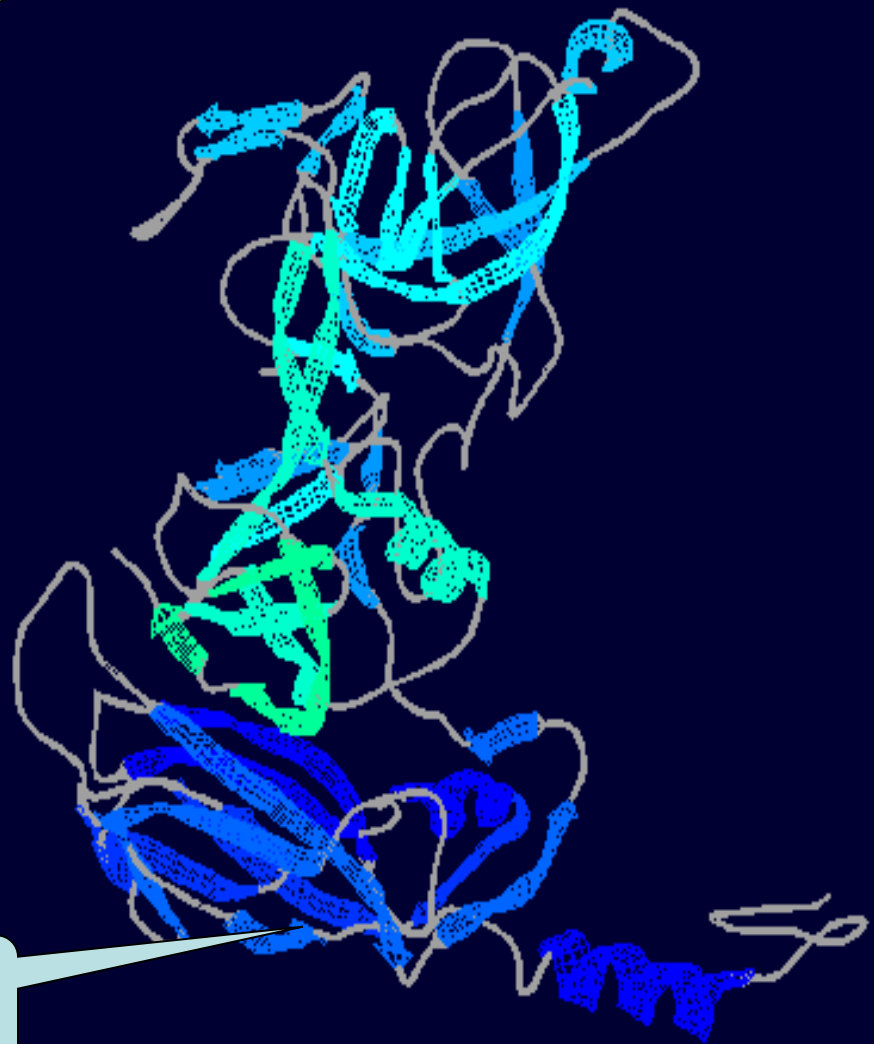
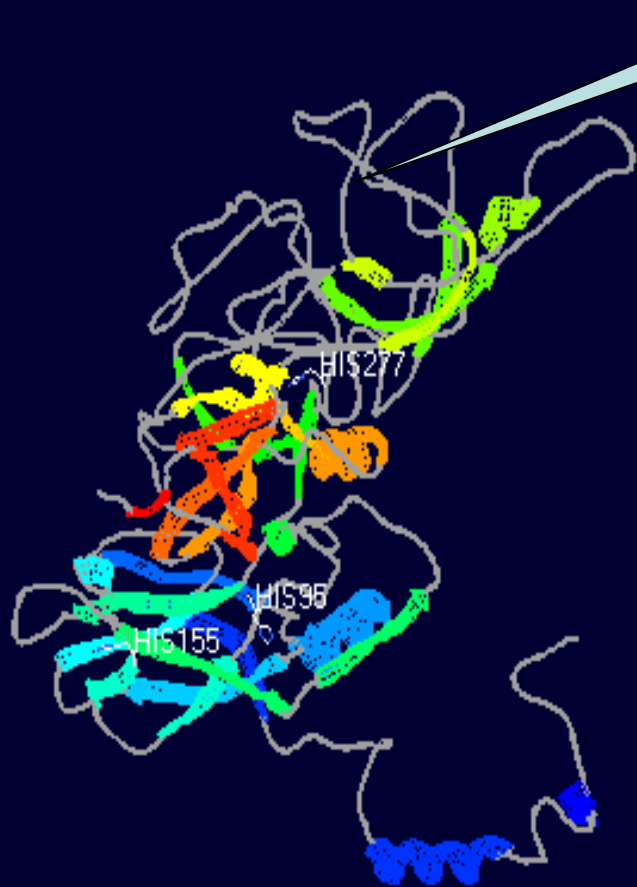




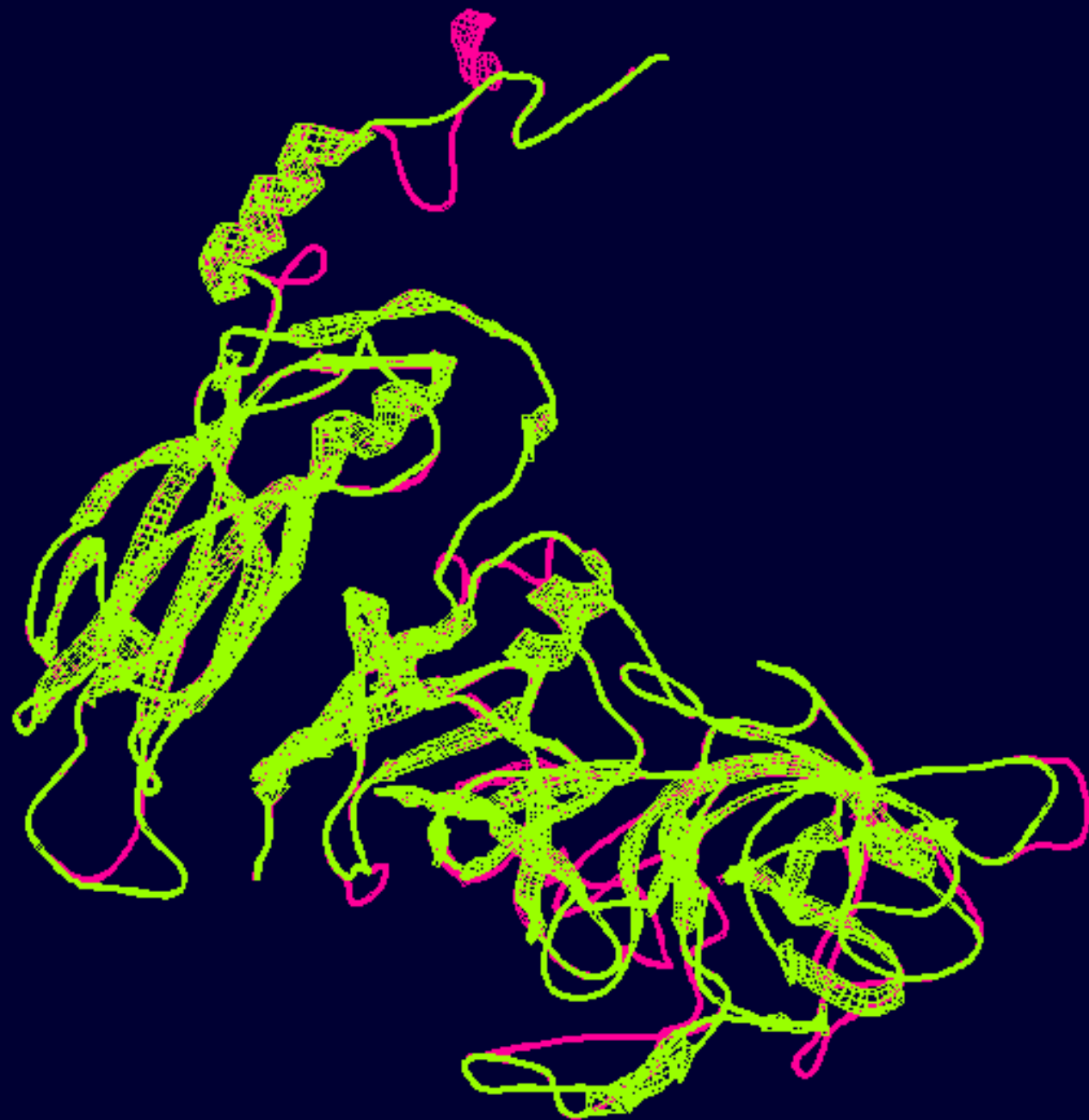
对其进行分析：

存在6个螺旋，位于28-30,44-55,101-108,1489-150,391-394,490-497处，仅仅存在5个His（位于95，155，179，277，297位），有研究表明组氨酸是结合、包裹核酸的位点。

RHDV\_VP60



2gh8\_A





3ZUE



# Rabbit Hemorrhagic Disease Virus (RHDV) capsid protein

Chain(s): A,B,C

Authors: Luque, D., Gonzalez, J.M., Gomez-Blanco, J., Marabini, R., Chichon, J., Mena, I., Angulo, I., Carrascosa, J.L., Verdaguer, N., Trus, B.L., Barcena, J., Caston, J.R.

Release: 2012-05-23

Classification:

Virus

Experiment: ELECTRON MICROSCOPY

Compound: 1 Polymer [ [Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#) ]

Citation: **Epitope Insertion at the N-Terminal Molecular Switch of the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus T=3 Capsid Protein Leads to Larger T=4 Capsids.**

(2012) J.Virol. **86**: 6470 [ [Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#) ]



## ↑ Molecular Description

Hide

Classification: Virus

Structure Weight: 180796.19

Molecule: CAPSID STRUCTURAL PROTEIN VP60

Polymer: 1 Type: protein Length: 579

Chains: A, B, C

EC#: 2.7.7.48 EC 3.4.22.66 EC 3.6.1.15 EC

Organism: Rabbit hemorrhagic disease virus

UniProtKB: Q86119

# 三、VP60的功能预测

在RHDV基因的N2端(5325nt处)和C2端(6945nt处)分别进行突变，制造*Nar* I 酶切位点。

设计四条突变引物：

F5325:

5'-GGGCAAACCCGCACGGCGCCGCAAGGCGAAGC-3'

R5325:

5'-GCTTCGCCTTGCGGGCGCCGTGCGGGTTTTGCCC-3'

F6949:

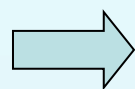
5'-GGAGCCTCAACGGCGCCCATTGACTTGACTG-3'

R6949:

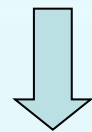
5'-CAGTCAAGTCAATGGGCGCCGTTGAGGCTCC-3'

## RHDV突变体的构建

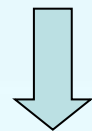
*Nar* I 酶消化上述重组突变体，将编码衣壳蛋白的基因从pBIHDV中删除，再用T4DNA连接酶，将缺口链接起来，转化JM109细胞，涂布含有氨苄青霉素的琼脂糖平板，于37℃孵化16h,最后，挑取阳性克隆，提取质粒并进行鉴定



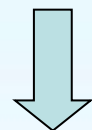
体外转录物RNA转染RK-13细胞



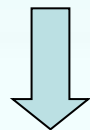
转染产物接种于RK-13细胞



RT-PCR法检测病毒基因组



间接免疫荧光法检测  
病毒突变体蛋白的表达



荧光定量RT-PCR检测病  
毒突变体的复制

# 结论:

5325-6931nt区域缺失以后，病毒的侵染性没有明显改变，但是病毒的复制能力有所下降，可见该区域可能含有与病毒复制有关的调控序列和元件。

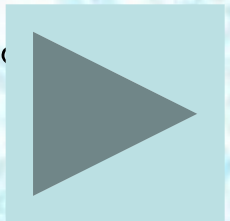
# 四、讨论

一、基于2gh8\_A链建立的RHDV\_VP60蛋白结构，存在很大程度的相似性，但比分较低。如果基于3ZUE的基础上，其可信度可能会高很多。

## 二、577vs576


可能是某个AA在翻译过程中裂解掉了一个氨基酸

三、可以考虑将组氨酸突变后观察其是否能够包裹核酸，然后看是否具有感染性。



# 参考文献：

1. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review
2. 谢玉柱等 兔出血症病毒缺失突变体的构建和鉴定
3. 相关网站



Thank you  
for your attention!