

兔出血症病毒(RHDV)的基因组序列分析及 其非结构蛋白VPg的结构和功能预测

The analysis of RHDV genome sequence and the prediction of the structure and function of its unstructured protein VPg

报告人：朱杰

组 员：张悦 邹洁驰 袁炜

2013年6月21日

主要内容



RHDV相关介绍

非结构蛋白VPg的结构预测

非结构蛋白VPg的功能预测

讨论

1、RHDV相关介绍

- **兔出血症** (Rabbit hemorrhagic disease, RHD) 俗称“兔瘟”、**兔出血热**，由**兔出血症病毒** (Rabbit hemorrhagic 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。1984年，中国首次报道。随后，多达40多个国家和地区都报道发生了RHD。RHD在兔肉和兔皮毛行业造成重大的经济损失，并产生重大的生态问题，影响了野兔种群的数量，进而影响以它们为生的肉食动物种群。
- 现在，RHDV仍在全球发生，具有很高的致死率，在欧洲，亚洲、非洲的部分地区、澳大利亚和新西兰成流行性爆发。
- **由于缺乏合适的体外培养细胞系来培养RHDV，从而严重限制了RHDV的研究。**



兔病毒属(Lagovirus) (RHDV)

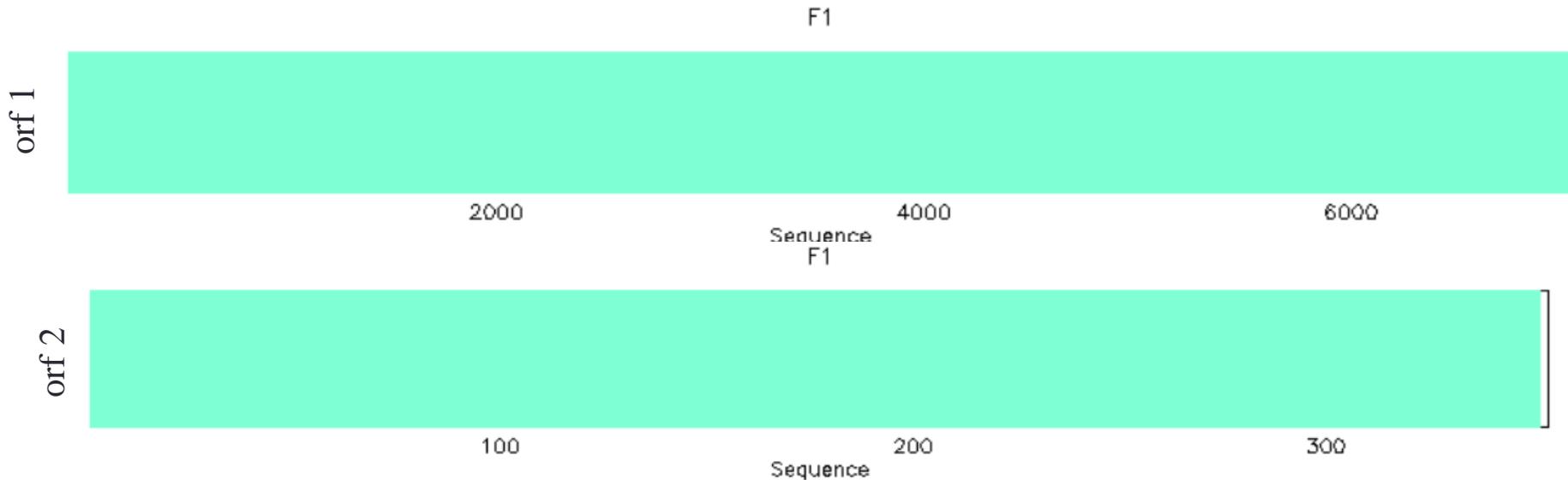
诺瓦病毒属(Norovirus) (NV)

札幌样病毒属(Sappovirus) (SV)

水疱疹病毒属(Vesivirus) (SVEV)

1.1 RHDV基因组分析

- RHDV为单股正链RNA病毒，基因组全长为7464bp。从相关文献中得知：RHDV有两个读码框ORF1和ORF2，它们在7025-7378存在重叠区域。
- 我们利用GenBank中登录号为：DQ205345.1的RHDV全长基因组序列进行分析：
- 利用plotorf(v6.0.1)对全基因组进行分析：显示读码框呈连续状



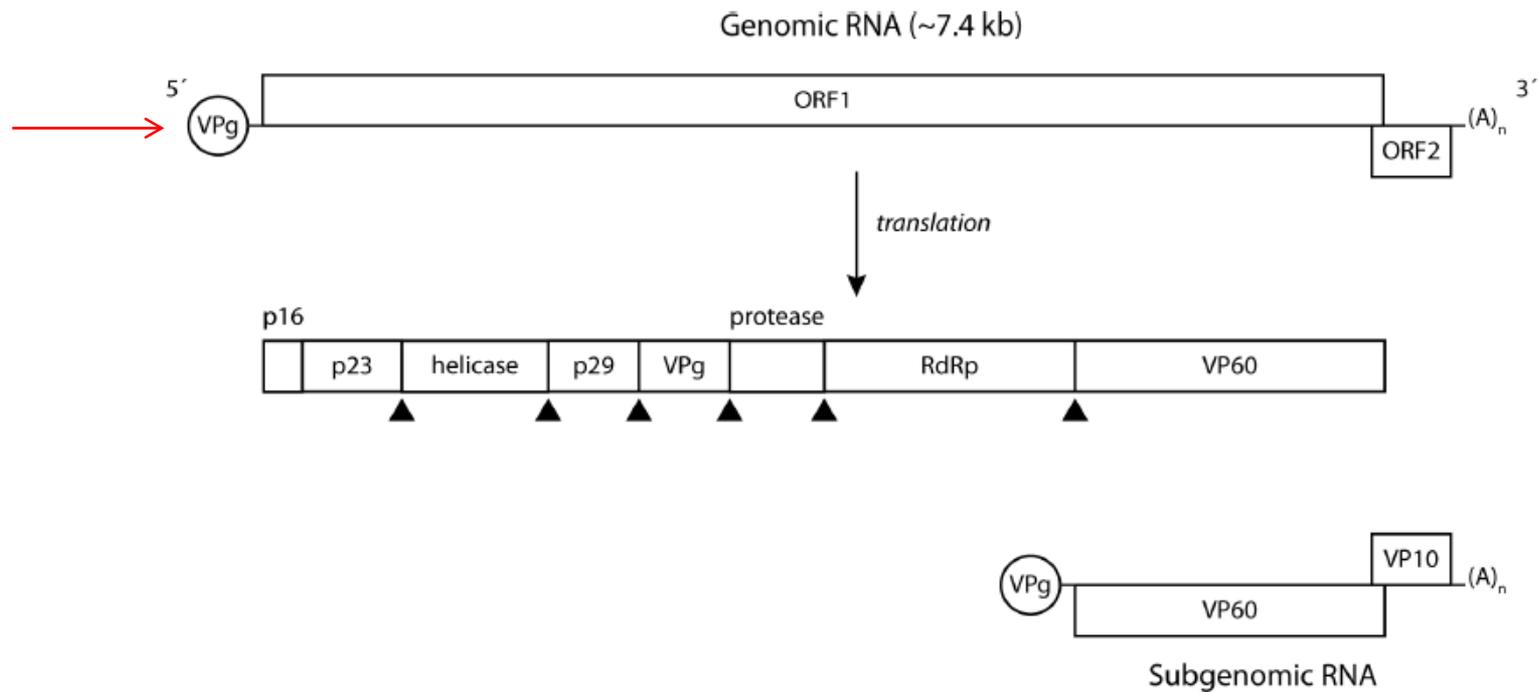


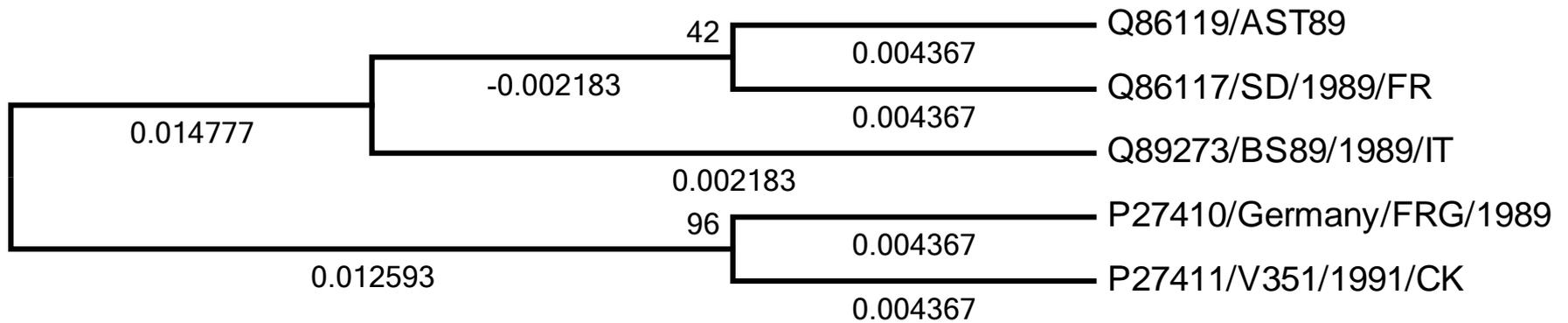
Figure 1 Genomic organization of RHDV. The genome of RHDV is composed of two narrowly overlapping ORFs, ORF1 and ORF2. ORF1 codes for a polyprotein that is cleaved by the virus encoded trypsin like cysteine protease (arrowheads) and originates the major structural protein for the capsid (VP60) and the non structural proteins p16, p23, helicase, p29, VPg, protease and RdRp. ORF2 codes for a minor structural protein, VP10. A subgenomic mRNA encoding both the structural proteins VP60 and VP10 can also be found in viral particles. Both the genomic and subgenomic RNA are polyadenylated at their 3'end and have the virus encoded protein, VPg, covalently attached to their 5' end.

1.2 VPg

- **VPg是由RHDV基因组ORF1编码一个257kDa的蛋白的多聚蛋白前体，该多聚蛋白在胰蛋白样半胱氨酸蛋白酶的水解作用下，产生包括VPg在内的七种非结构蛋白和主要的结构蛋白(VP60)，VPg由114个氨基酸组成。有研究表明，如果将VPg缺失将会导致病毒感染性的丧失，但其具体的作用机制还不是很清楚。因此，我们欲通过对其进行结构分析，定点突变分析来了解VPg中的关键氨基酸位点。**

2、VPg结构预测

- 提取Uniprot中的审核过的RHDV的序列的VPg片段进行比对，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VPg 长度为114AA,位于994-1108位。



西班牙RHDV_AST毒株与法国分离的RHDV_SD毒株的VPg序列的亲缘关系近；捷克分离株RHDV_V351与德国分离株RHDV_FRG的VPg序列亲缘关系近。而与意大利分离株RHDV_BS89相对较远。

2.2、VPg三维空间结构同源模建

选择登录号为Q86119的RHDV非结构蛋白VPg进行三维空间结构同源模建，其蛋白序列为：

```
>sp|Q86119|994-1108
```

- GVKGKTKRGRGARVNLGNDEYDEWQAARREFVNAHDMTA
EEYLAMKNKAAMGSDDQDSVMFRSWWTRRQLRPDEDQVT
VVGRGGVRNEVIRTRVRQTPKGPKTLDDGGFYDNDYE

通过序列比对选择同源模建的模板为登录号为：P27409的FCV的VPg序列。模板空间结构的PDB数据库ID为2M4H。

RHDV的VP_g序列与模板序列进行序列比对

Pairwise Alignment Result

LENGTH	SCORE	IDENTITY	SIMILARITY	GAPS
124	257.0	50/124 (40.3%)	73/124 (58.9%)	22/124 (17.7%)

Q86119/AST89/	1	GVKGTK-----RGRGARVNLGNDEYDEWQAARREFVNAHDMTAE EYLA	44
Template/P274	1	-AKGKTKLKIGTYRGRG--VALTDDEYDEWR--EHNASRKLDLSVEDFLM	45
Q86119/AST89/	45	MKNKAAMGSDDQDSVMFRS WW-TRRQLRPDEDQVTVVGRGGVRNEVIRTR	93
Template/P274	46	LRHRAALGADDNDAVKFRS WWSRRTKMANDYEDVTVIGKGGVKHEKIRTN	95
Q86119/AST89/	94	VRQTPKGPKTLDDGGFYDNDYE--	115
Template/P274	96	TL-----KAVDRG--YDVSF AEE	111

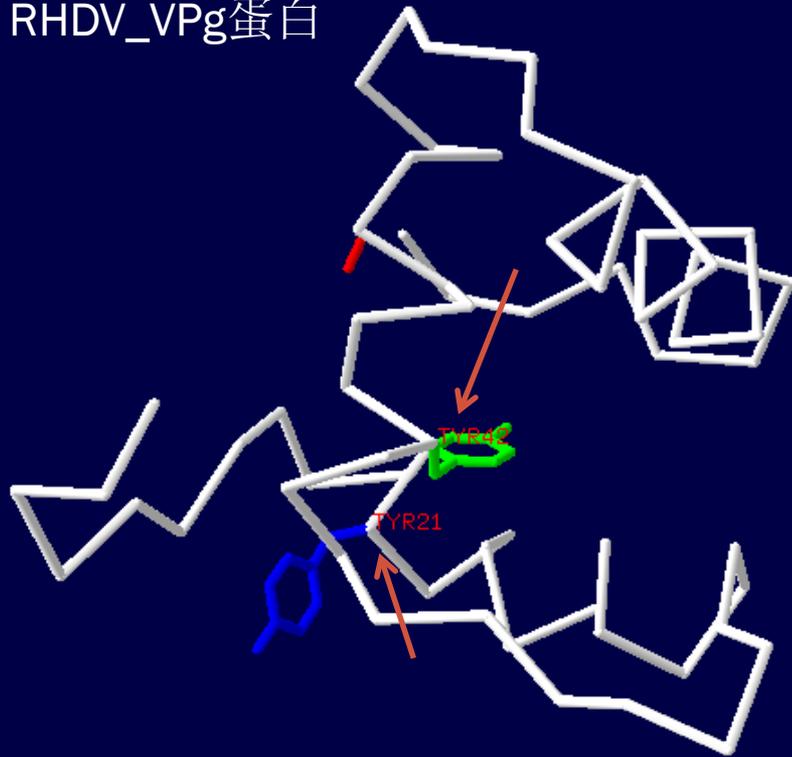
从比对结果中可以看出，RHDV的VP_g序列与模板序列相同的位点为40.3%，大于30%从而可以以该模板同源构建RHDV的VP_g模型。

2.3 使用swiss-model软件进行模建

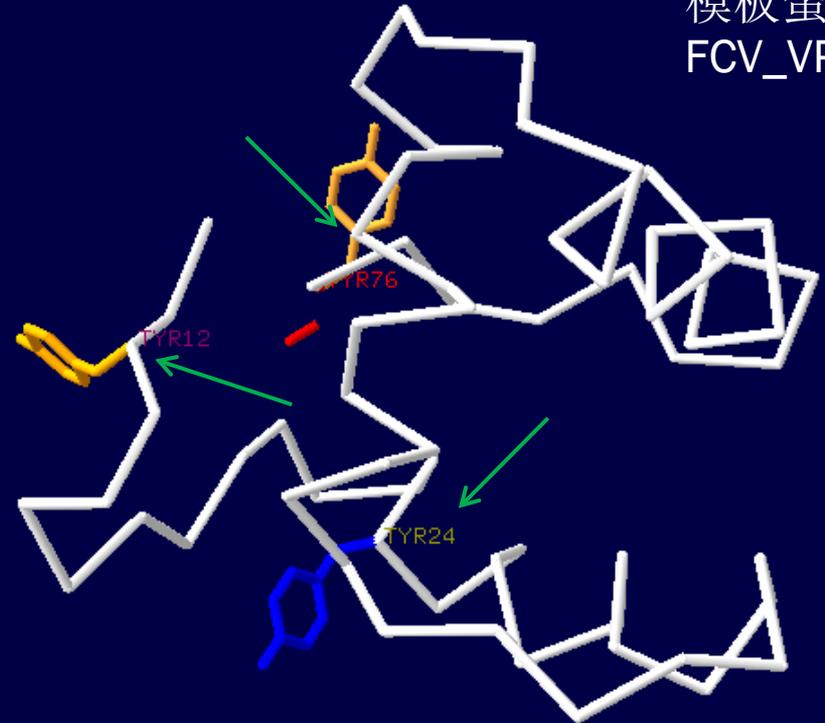
Model information:

Modelled residue range:	10 to 73
Based on template:	[2m4hA] (99.9 Å)
Sequence Identity [%]:	40.63
Evalue:	4.20e-28
Quality information: [details]	QMEAN Z-Score: -1.39

RHDV_VPg蛋白

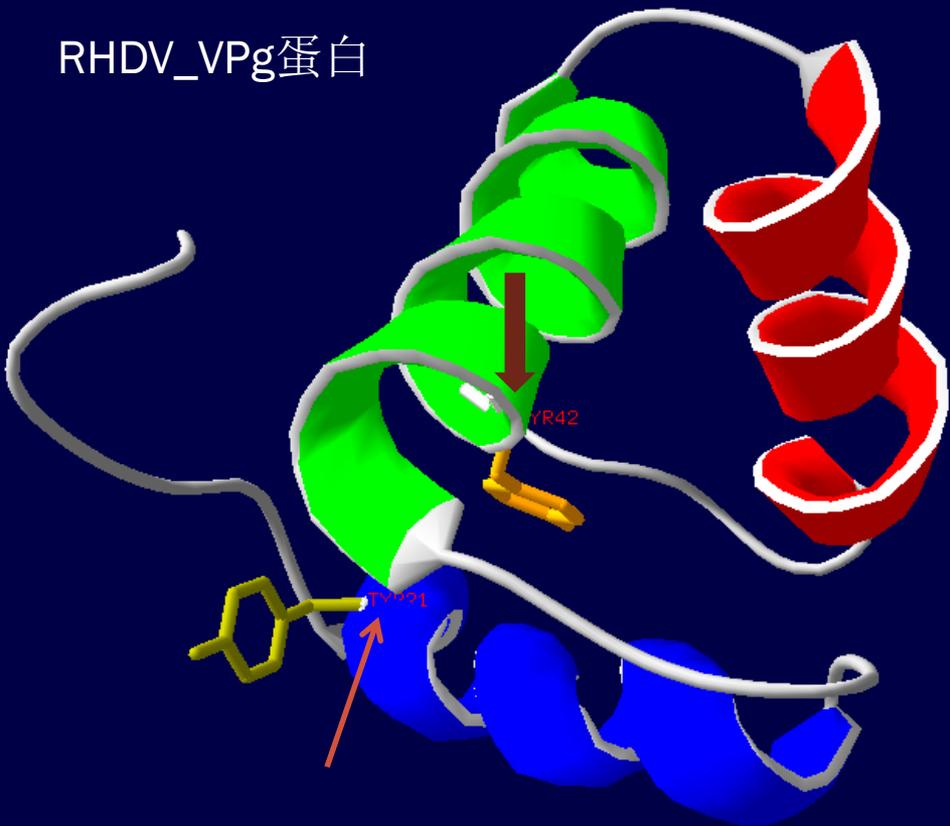


模板蛋白
FCV_VPg

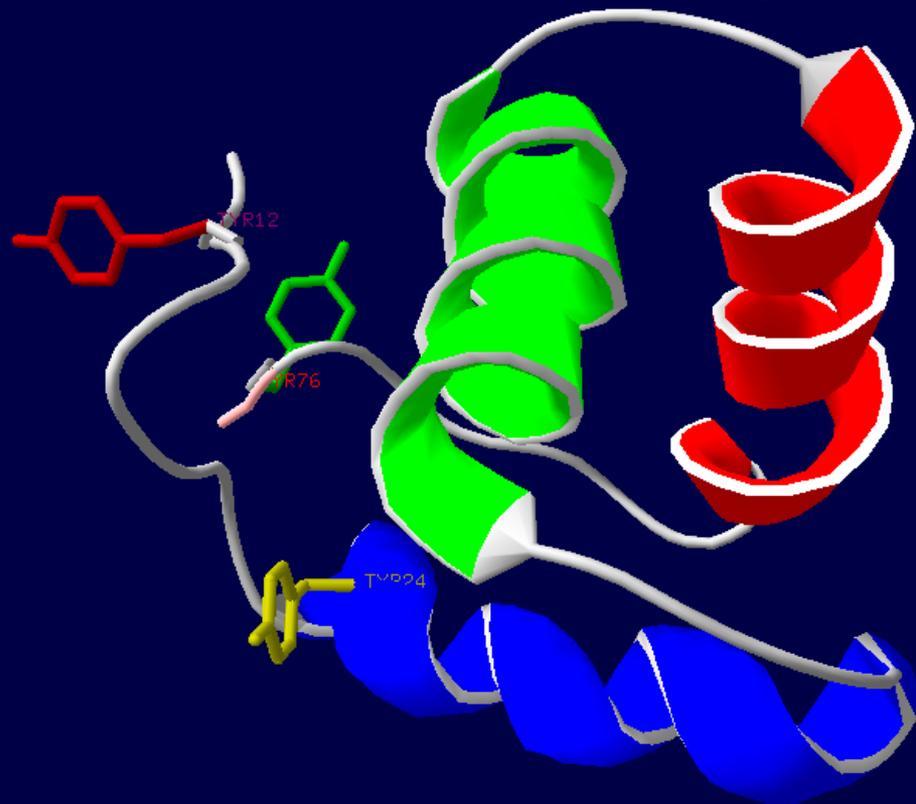


对其进行分析： RHDV_VPg存在3个螺旋，位于19-30, 39-51, 56-66 处. 还有两个Tyr氨基酸，有研究表明，Tyr的尿苷酰化与病毒RNA共价结合。

RHDV_VPg蛋白

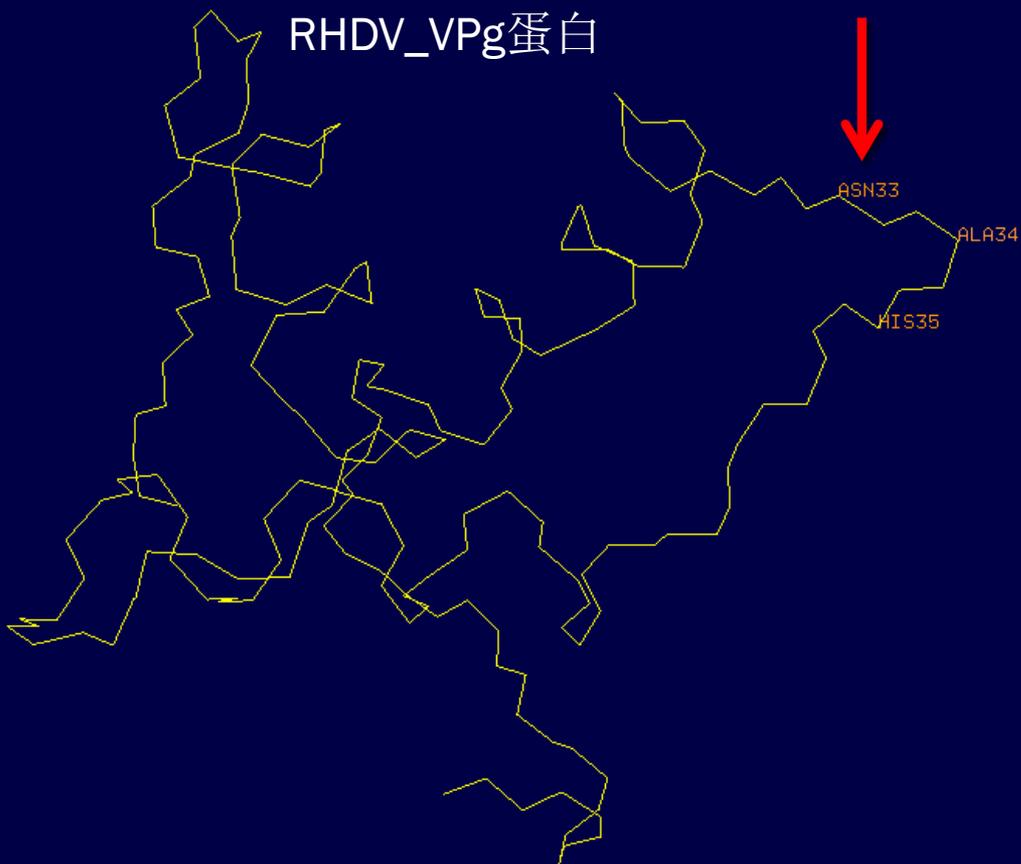


模板蛋白FCV_VPg

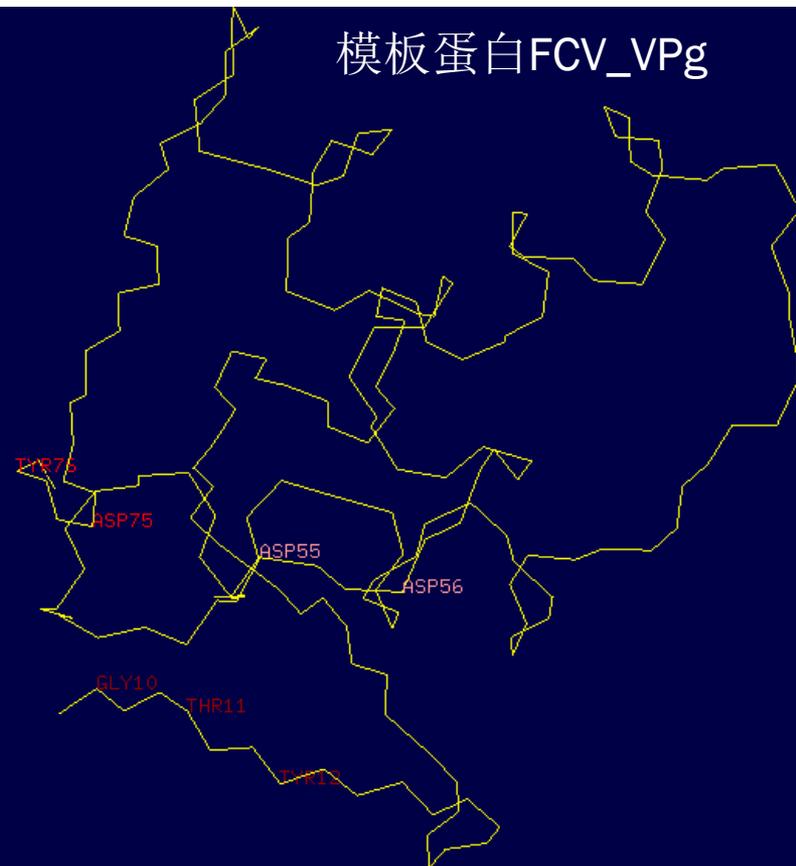


差异蛋白分析

RHDV_VPg蛋白

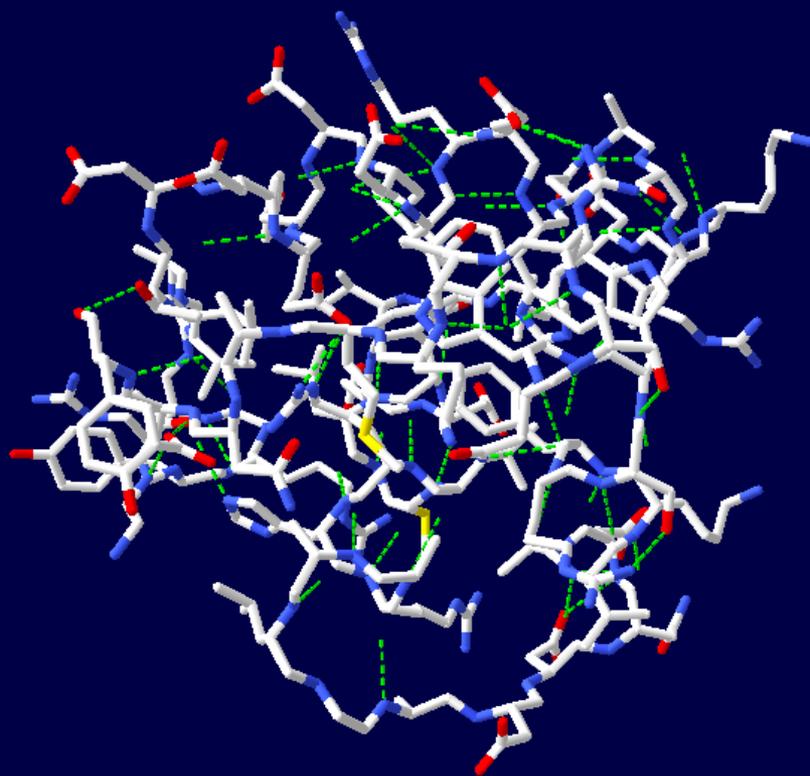


模板蛋白FCV_VPg

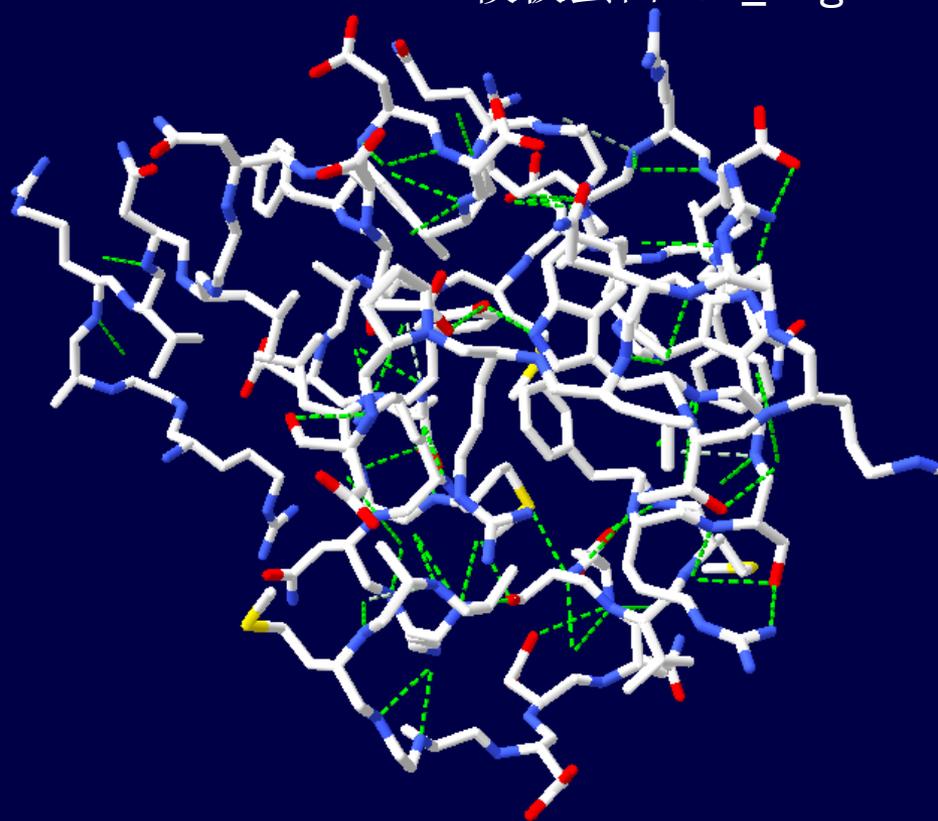


氢键分布图

RHDV_VPg蛋白



模板蛋白FCV_VPg



3、VPg的功能预测

- 在RHDV基因1140nt处和1161nt处的Try分别进行突变，设计突变引物为：
- Tyr-21 to Ala GTTGGTCCAGCCAGAGGTCGTGG
- Tyr-42 to Phe GATGATGAATTTTGATGAATGGAGG
- Tyr-42 to Ser GATGATGAATTCCGATGAATGGAGG

RHDV突变体的构建



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

小结

- 根据Machin的研究成果和Mittra的研究成果，第21位Tyr的突变对RHDV可能是致命性的。
- 最终试验结果需要在实验室完成上述实验工作才能得出结论。

4、讨论

- 1、通过对Uniprot中的审核过的RHDV的序列的VPg片段进行序列比对和遗传发育树构建，了解了该数据库5个毒株VPg片段的亲缘关系。
- 2、用同源建模的方法以FCV的VPg蛋白为模板，构建 RHDV_VPg蛋白的三维结构。并分析了两者的结构，发现两者的结构存在较小的差异。从而预测RHDV的VPg与FCV的VPg具有相似的功能。
- 3、*Lellis A D*等发现如果FCV中的VPg缺失将会导致病毒感染性的丧失，同时也将使FCV的RNA翻译效率急剧下降。同时，*Mitra*等通过定点突变分析，发现FCV的VPg第24位酪氨酸的突变是致死性的。因此我们RHDV_VPg序列的第21位和42位上设计了3个突变，然后将通过实验验证酪氨酸是否为关键性氨基酸。

参考文献

- [1] Abrantes, Wessel van der loo, et al. Rabbit haemorrhagic disease(RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus(RHDV):a review[J]. Veterinary Research, 2012,43:12.
- [2] A´ngeles Machi´n, etc. Identification of the Amino Acid Residue Involved in Rabbit Hemorrhagic Disease Virus VPg Uridylylation[J]. J. Biol. Chem. 2001, 276:27787-27792.
- [3] Tanaji Mitra,etc. Mutagenesis of Tyrosine 24 in the VPg Protein Is Lethal for Feline Calicivirus[J]. J. Virol. 2004, 78(9):4931.
- [4] 相关网站.

由于水平有限，时间仓促，不足之处肯定很多，敬请罗老师与各位同学批评指正！

谢谢！