

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620071151922

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒极早期基因鉴定及功能的初步研究

Identification and Characterization of White Spot Syndrome viral immediate-early genes

李 明 圆

指导教师姓名: 徐 洵 教 授

郝秀敏 副研究员

李 钊 副研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 6 月

答辩委员会主席: 曾润颖 研究员

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 06 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
1 前 言	1
1.1 对虾养殖概况	1
1.2 对虾白斑综合症杆状病毒研究概况	2
1.3 DNA 病毒极早期基因简介以及 WSSV 极早期基因研究现状	16
1.4 RNAi 作用机理及其应用	19
1.5 本论文的研究目的和意义	22
2 材料与方 法	24
2.1 材 料	24
2.2 常用溶液和培养基的配置	26
2.3 方 法	30
3.结果与分析	39
3.1 WSSV 对螯虾血淋巴细胞感染情况分析	39
3.2 候选的 WSSV 极早期基因的鉴定	43
3.3 对 WSSV 极早期基因 <i>WSV069</i> ( <i>IE1</i> ) 和 <i>WSV056</i> 功能的初步研究	51
4.讨论	60
5.小结与展望	64
6.参考文献	66
附录一	78
附录二	81
附录三	82
致谢	83

## CONTENTS

<b>Chinese Abstract</b> .....	<b>I</b>
<b>English Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Shrimp culture current status .....	1
1.2 Research status of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) .....	2
1.3 Introduction of DNA virus immediate-early (IE) genes and current research status .....	16
1.4 Mechanism and application of RNAi .....	19
1.5 Purpose and signification of this dissertaion .....	22
<b>2 Material and Method</b> .....	<b>24</b>
2.1 Meterial .....	24
2.2 Solution .....	26
2.3 Method .....	30
<b>3. Result and Analyse</b> .....	<b>39</b>
3.1 WSSV infection in primary cultured crayfish hemocyte in vitro .....	39
3.2 Indentification of candidate WSSV IE genes .....	43
3.3 Charaterization of WSSV IE genes-wsv056 and wsv069 .....	51
<b>4. Discussion</b> .....	<b>60</b>
<b>5. Summary and Perspect</b> .....	<b>64</b>
<b>6. References</b> .....	<b>66</b>
<b>Appendix I</b> .....	<b>78</b>
<b>Appendix II</b> .....	<b>81</b>
<b>Appendix III</b> .....	<b>82</b>
<b>Acknowledge</b> .....	<b>83</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

对虾白斑综合症病毒 (White Spot Syndrome Virus, WSSV) 是危害对虾养殖业的最主要病原, 它是一种具有囊膜、无包涵体的杆状型双链环状 DNA 病毒。病毒极早期基因编码的调控蛋白在病毒的感染过程中起着至关重要的作用。本文阐述了在体外原代培养的螯虾血淋巴细胞中 WSSV 基因转录和基因组复制的情况。前期的研究工作成功的构建了基于原代螯虾血淋巴细胞体外培养的 WSSV 感染模型; 利用 WSSV 全基因组芯片杂交技术对用蛋白抑制剂-放线菌酮 (CHX) 处理的原代培养的螯虾血淋巴细胞的样品进行 WSSV 极早期基因的筛选。本文对芯片筛选得到的候选基因进行 RT-PCR 鉴定和转录时相分析, 最终确定了 16 个 WSSV 极早期基因, 其中包含了一个已知的极早期基因 (*ie1*); 其中的 12 个极早期基因集中在 WSSV 中国株基因组 (全长 305kb) 中 36052 到 50300 bp 间大约 14kb 长的区域, 可推断这种组织方式可能有利于病毒在感染的前期高效的启动其极早期基因的表达。通过基因序列的比对, 我们发现了另外一个与 *wsv069* 在核苷酸及蛋白序列上相似度极高的病毒基因 *wsv056*。经检测, *wsv056* 被确认是漏筛的 WSSV 的极早期基因。我们利用 dsRNA *wsv056* 和 *wsv069* 成功的完全抑制了其基因在昆虫细胞 *high-five* 和原代培养的螯虾血淋巴细胞中的表达, 并证实了注射 dsRNA *wsv056* 和 *wsv069* 的螯虾能有效的抑制 WSSV 基因组在其体内的复制。虽然 dsRNA 转染螯虾细胞的稳定性和活体实验 dsRNA 抑制的特异性还没有得到最好的优化, 但我们的研究为筛选被 *wsv056* 和 *wsv069* 编码的蛋白所调节的下游基因以及了解病毒的感染机制提供了一条有效的途径。

**关键词:** 对虾白斑综合症病毒 (WSSV); 极早期基因; dsRNA

## Abstract

White Spot syndrome virus (WSSV) is the major viral pathogen of shrimp industry, which is kind of enveloped, no inclusion stage, rod-shaped, double-strand DNA virus. During viral infection, viral immediate-early (IE) genes encode regulatory proteins critical for the viral life cycle. This thesis demonstrated WSSV genes' expression and genome replication in primary cultured crayfish hemocyte in vitrol. In our previous study, we established successfully a viral infected model based on primary culture of crayfish hemocyte in vitrol and screened white spot syndrome virus (WSSV) IE genes with cycloheximide (CHX)-treated primary culture of crayfish hemocyte and a WSSV genome tiling microarray. In this dissertation, Sixteen ORFs, including a known WSSV IE gene (*ie1/wsv069*), were identified and confirmed by RT-PCR and time course studies. 12 of the identified WSSV IE genes cluster in a 14 kb genomic region (WSSV China isolate: 36,052 to 50,300 bp). This type of arrangement may facilitate the coordinate control and rapid expression of IE genes. According to the alignment of nucleotide and deduced amino sequence, we found another WSSV gene-*wsv056* exhibited high similarity with *wsv069*. By RT-PCR and time course studies, we confirmed it as an IE gene which was missed in microarray hybridization. Using *wsv056* and *wsv069* dsRNA, we completely inhibited their transcription and expression in High-five cells and primary cultured crayfish hemocyte. Furthermore, by injecting their dsRNA into the crayfish body, these dsRNA-treated crayfish were able to inhibit the viral genome replication. Though the stability of dsRNA transfection into primary cultured crayfish hemocyte and the specific inhibition of dsRNA in crayfish's body is not as good as we expected, we contributed a good method to the further research which are able to focus on the downstream genes which are regulated by *wsv056* or *wsv069* encoded proteins and enlighten the mechanism of WSSV infection.

**Key words:** White Spot syndrome virus (WSSV); immediate-early genes; dsRNA

## 1 前言

### 1.1 对虾养殖概况

对虾是温暖浅海最占优势的甲壳动物。在分类上隶属节肢动物门，有鳃亚门，甲壳纲，软甲亚纲，十足目，游泳亚目，对虾科，对虾亚科，对虾属。

对虾是人们最喜欢的海产食品之一，因此对虾养殖具有较高的经济价值。世界对虾养殖业从 50 年代开始，就以惊人的速度增长，对虾的消费量也逐年递增。我国对虾养殖业虽从近二十年才发展起来，但已成为养殖业中最具经济价值的水产品之一。我国当前的对虾养殖品种主要有斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 和日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 等<sup>[1,2]</sup>。

对虾养殖业在发展迅速的同时，同时造成了对虾养殖环境恶化，种质资源退化，疾病滋生等一系列问题<sup>[3]</sup>。1993-1994 年，由于对虾病毒性疾病的暴发，对虾养殖业步入了低谷，养殖对虾总产量急剧下降。从 1993 年的 8.7 万吨下降到 1994 年的 5.5 万吨，经济损失达到数十亿。与此同时，国家政府投入了大量的人力和财力到对虾养殖领域的研究中，自 1996 年以后，对虾病害的科研工作取得了阶段性的突破进展，对虾养殖业开始复苏，养殖产量开始回升。目前以国内外市场的需求来看，对虾养殖的市场潜力还很大，对虾养殖业的前途是乐观的<sup>[4]</sup>。

病害特别是病毒流行病是目前困扰我国对虾养殖业生存和发展最突出的问题。已报道的对虾疾病种类有数十种，病原种类包括病毒、细菌类、真菌类、寄生虫类、原生动物类。目前中国、瑞典、日本、台湾和新加坡的一些研究机构已经进行了虾病毒的病原、病理、传播途径及快速诊断方法的研究，并且取得了一定的进展，但还没有最终研究出有效的预防和治疗方法。

人工养殖对虾的疾病主要由细菌和病毒引起。虽然细菌病可用抗生素控制，但大量使用抗生素，不仅可导致细菌产生抗药性，而且还可抑制对虾自身免疫力的发挥。同时，对病毒病目前尚无特殊治疗方法。故国内外治疗对虾病普遍采用的方法是“以防为主”，其根本目的是通过提高对虾自身免疫能力以增强其抗病

力。因此研究甲壳类动物的免疫机制，有效的提高虾类本身的抗病能力，是解决病害问题的一条非常有效的途径。自 60 年代以来，瑞典，美国，日本等国的学者发表了大量的论文集专著，对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。而在影响对虾养殖业的众多病害中，对虾白斑综合症杆状病毒至今仍旧是对虾养殖业最大的威胁<sup>[5]</sup>。

## 1.2 对虾白斑综合症杆状病毒研究概况

对虾白斑综合症杆状病毒（white spot syndrome virus, WSSV）是一种有囊膜的双链环状 DNA 病毒。属于 Whispovirus 属，并且是 Nimaviridae 新科中目前唯一的成员<sup>[6]</sup>。WSSV 可以感染许多宿主<sup>[7]</sup>，传染力强，致死率高，是目前已测序的最大的动物病毒之一。生物信息学分析，预测该病毒约有 180 个开放阅读框（open reading frames, ORFs），但是大多数 ORFs 编码的蛋白和数据库中的蛋白几乎没有同源性，即便是与在形态上很相似的昆虫杆状病毒。仅有少数基因与其他病毒或生物的已知蛋白或结构域有较高的同源性，大部分是一些与核苷酸代谢和 DNA 复制有关的酶类<sup>[8]</sup>。

此前，WSSV 的蛋白研究重点主要在病毒的结构蛋白上。VP28 是 WSSV 中含量最丰富的结构蛋白之一，最早由 Van Hulten 等<sup>[9]</sup>从纯化的病毒中分离鉴定，Western blot 分析显示 VP28 定位于 WSSV 的囊膜部分。随着研究的深入，WSSV 非结构蛋白功能以及病毒研究已成为热点，例如与 DNA 复制相关的极早期和早期基因的蛋白，这些蛋白被研究证明具有转录调节因子活性（IE1），或者与泛素化过程相关（WSV249）。目前的研究对 WSSV 感染机制，特别是 WSSV 的调控机制，以及病毒与宿主的相互作用等仍缺乏了解，对 WSSV 的防治缺乏有效的方法。

### 1.2.1 对虾白斑综合症杆状病毒的发现

1992 年，台湾养殖的斑节对虾、长毛对虾、日本对虾开始出现在短期内大量死亡的现象，发病严重的对虾头胸甲部位可见大量的白斑。通过电镜观察在对虾病变细胞核中发现大量无包涵体的杆状病毒。用此病毒感染健康对虾后，也出现相同的结果，白斑综合症开始成为对虾养殖中危害最大的病害之一。1993 年春，日本养殖对虾大量发生白斑综合症而死亡。同年 5-8 月，中国沿海从南到北的对

虾养殖场暴发全国性大规模白斑综合症，养殖对虾产量锐减。随后白斑综合症开始传遍亚洲和印度太平洋地区的绝大多数对虾养殖场。1995年10月，西半球报道了第一例对虾白斑病。目前，对虾白斑综合症（WSSV）是全球范围内限制养虾业发展的最主要因素。WSSV感染力强，被感染的对虾在一周内死亡率90-100%。对虾白斑杆状病毒危害极大，因此引起了水产养殖科技人员的广泛关注<sup>[10]</sup>。

### 1.2.2 对虾白斑综合症症状和组织病理学特征

在感染 WSSV 的早期，染病虾首先出现昏睡、减少觅食等症状；继而完全停止觅食，时时浮到水面，行动迟缓失去平衡；最后阶段发生细胞解体以及器官坏死，病虾死亡。感染的对虾在甲壳上会出现白色的斑点，这种斑点是异常的钙沉积，在头胸甲上尤为明显，是对虾白斑综合症的典型特征<sup>[11]</sup> 患病对虾体内氨基酸、脂类、糖类等基础物质代谢紊乱，免疫机能也明显衰退。<sup>[12-13]</sup> WSSV 可以广泛的侵染对虾的外胚层以及中胚层组织，组织病理学研究发现，在病虾的鳃组织、胃和肠上皮细胞及粘膜下层结缔组织、淋巴器官、触角腺、心脏、肝胰腺及肌肉等组织器官中都发生了不同程度的病变。上皮组织和造血组织是病毒侵染的主要部位，其中对虾甲壳下表皮的表皮细胞和胃的上皮细胞最易感染病毒，鳃的上皮细胞、中肠的结缔组织及其它部位的结缔组织对 WSSV 敏感程度仅次于上述组织<sup>[14-17]</sup>。

电镜分析表明，在感染前期，病变组织细胞核膨胀，核仁消失，核外膜破损，染色质靠核的边缘分布，内质网断裂，核糖体从内质网脱落，线粒体肿胀，高尔基体萎缩，溶酶体空泡化；感染中期，病毒粒子在细胞核内大量复制，直至充满整个核，细胞核核膜及质膜皱缩；感染后期，核膜破裂，病毒粒子从核内释放，细胞核呈空囊状，胞质内髓样结构明显，细胞器解体，细胞功能丧失<sup>[18,19]</sup>。

### 1.2.3 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径

WSSV 主要感染甲壳纲十足目的动物，以虾类为主，几乎所有的对虾都能够被 WSSV 感染，如：斑节对虾（草虾）(*Penaeus monodon*)、日本对虾(*P. japonicus*)、刀额新对虾（砂虾）(*Metapenaeus ensis*)、中国对虾(*P. chinensis*)、印度对虾(*P. indicus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)、熊虾(*P. semisulcatus*)、美国蓝对虾 (*P. setiferus*)等。此外 WSSV 还感染其它生活在海水、淡水，以及半咸水的

甲壳动物, 例如螯虾、蟹、龙虾、寄居蟹; 以及轮虫、箭虫、多毛虫、甚至一些水生昆虫<sup>[7, 20-22]</sup>。但其中一些动物感染 WSSV 后并不一定发病, 它们可能只是 WSSV 感染对虾的中间宿主。

在天然条件下, WSSV 可以通过污染的水、排泄物, 以及病虾残体等, 借助取食, 鳃的呼吸和体表部位的接触等途径来进行水平传播; 在实验室条件下通过口服或者注射途径都可以使虾感染该病毒; WSSV 还可以通过垂直传播来感染子代<sup>[23]</sup>。从目前的数据来看, 白斑综合症的发生不仅与病原体的存在有关, 而且受环境压力、宿主动物的密度、感染的程度等条件的影响。相对野生环境而言, 养殖场里的对虾养殖密度很大, 面临的环境压力大, 一旦出现 WSSV 的感染很容易就形成爆发之势, 难以控制。

#### 1.2.4 对虾白斑综合症病毒的基本性质

WSSV 是一种新型的无包涵体的双链 DNA 杆状病毒, 完整的病毒粒子约 260-350 nm×110-130nm, 病毒粒子的最外层是由 2 层单位膜组成的囊膜, 两膜之间有较宽阔的间隙; 紧接囊膜向内是核衣壳, 核衣壳结构为螺旋排列的亚单位形成的圆柱体, 两端各有一帽状结构, 一端为较扁的梯形, 另一端为三角锥形; 核酸存在于核衣壳中。病毒粒子主要存在于对虾的细胞核中<sup>[24-26]</sup>, 但也有报道从福州地区分离到的白斑病毒仅存在于细胞质中<sup>[27]</sup>。

目前 3 株 WSSV 分离株的全基因组序列已经测定。分别是: (1) 中国株 (WSSV-CN, Accession No. AF332093)<sup>[8]</sup>: 病毒分离自中国大陆的日本对虾(*Penaeus japonicus*), 序列全长 305,107 bp。基因组约有 97% 是特异的。整个基因组中 G + C 含量占 41%。序列分析整个基因组包含有 531 个开放阅读框(ORFs), 其中 181 个 ORFs 可能具有编码蛋白的功能, 相应每个基因平均长度为 1.7 kb。通过 cDNA 文库鉴定和筛选, 有 36 个 ORFs 被证实具有编码功能蛋白的能力, 另外有 52 个 ORFs 通过 RT-PCR 的方法被确认具有转录功能。在 181 个 ORFs 中, 80% 下游具有 poly(A) 结构。(2) 泰国株(WSSV-TH, Accession No. AF369029), 病毒分离自泰国的斑节对虾(*Penaeus monodon*), 用克氏螯虾(*Procambarus clarkia*)作宿主感染增殖 WSSV 用于测序, 序列全长 292,967 bp。根据 ORF 序列重叠最少的原则, 分析选出 184 个 ORFs, 占全基因组的 92%。序列比对发现只有 6% 的 ORFs 与数据库里的蛋白有同源性, 主要是一些涉及核酸代谢、DNA 修复、蛋白修饰的酶类。在 184 个

ORFs 中，72%有真核生物翻译起始的 Kozak 结构，46%的启动子有 TATA 框。9 个同源重复区散布于整个基因组，每个同源区域由数个 250 核苷酸重复单位串联组成。(3) 台湾株(WSSV-TW, Accession No. AF440570): 病毒分离自台湾的斑节对虾(*Penaeus monodon*)，序列全长 307,287 bp，是 3 株 WSSV 分离株中最大的。3 株 WSSV 分离株的性质比较见表 1-1:

表 1-1: 3 株 WSSV 分离株的性质

Table 1-1 Characterization of 3 isolates of WSSV

	中国株 (WSSV-CN)	泰国株 (WSSV-TH)	台湾株(WSSV-TW)
基因组大小(bp)	305,107	292,967	307,287
G + C 含量(%)	41.0	41.1	41.0
病虾收集时间	1996 年 10 月	1996 年 5 月	1994 年 11 月
病虾种类	<i>Penaeus japonicus</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Penaeus monodon</i>

目前将 WSSV 归类于 Whispovirus 属，它是 Nimaviridae 新科中的唯一的成员。

### 1.2.5 对虾白斑综合症杆状病毒的生活周期

目前对 WSSV 的生活周期的认识还不完善，已有的认识主要集中在新病毒颗粒生成的部分。WSSV 的复制和组装是在宿主细胞核内进行的，活体感染实验表明病毒通常在 24 小时内完成一个生命周期。研究表明 WSSV 的形态发生大致包括了以下几个阶段<sup>[23, 40]</sup>:

(1) 在病毒感染的早期，感染细胞的细胞核出现轻微的肥大，由病毒的蛋白形成的纤维状结构组成的病毒核小体出现。细胞的内质网膨大，出现许多游离的核糖体。

(2) 细胞核内的纤维状物质介导了病毒膜结构的形成，病毒的核心物质被包裹到膜结构中，这时在病毒来源的基质和边聚的染色质之间出现了 Crowdry A 氏包涵体。细胞核膨大，变圆。

(3) 病毒核衣壳逐渐由一端到另一端生成，同时囊膜逐步包裹核衣壳。此时细胞内的 Crowdry A 氏包涵体变小，边聚染色质消失，核膜破裂，细胞器出现异常。

(4) 病毒核衣壳完成组装，随后核衣壳被囊膜完全包裹。

(5) 病毒粒子呈卵圆形、形成尾状结构，此时病毒的核衣壳在 DNA 与 VP15 的包装作用下被压缩变短。

(6) 成熟的病毒颗粒呈椭圆形，外有封闭的囊膜及尾状结构，内含成熟核衣壳。在有些情况下病毒的核衣壳形成是单独进行的，在最后的阶段再统一由囊膜进行包裹。在病毒感染的最后阶段，细胞破裂，释放成熟子代病毒颗粒。

根据已有的数据，研究者对 WSSV 可能的生活周期进行了推测，绘制了 WSSV 复制周期的示意图，但是有其中关 WSSV 是如何进入细胞，并被运送到细胞核的过程实际上并不清楚（图 1-1）。

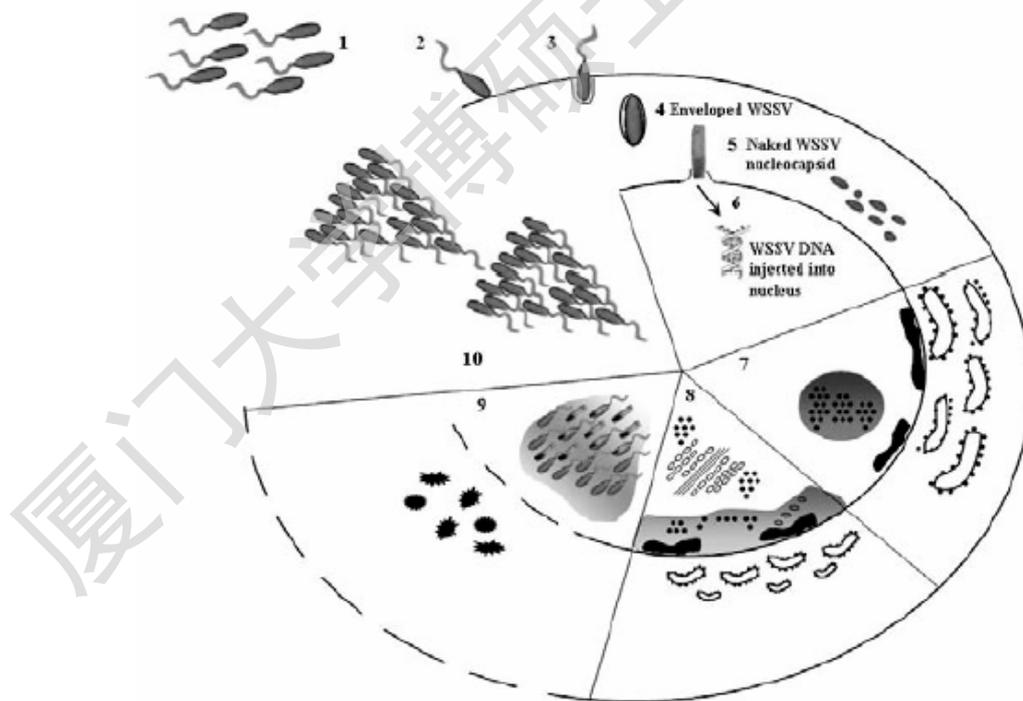


图 1-1 WSSV 生活周期示意图<sup>[40]</sup>

Fig. 1-1 A model of the replication cycle of white spot syndrome virus

1-3.游离的病毒在与宿主细胞膜识别之后通过内吞进入细胞

质；4-6.脱去囊膜之后核衣壳进入细胞核；裸露基因组 DNA 并进行复制；7.细胞核内出现早期病毒基质，染色质边缘化粗面内质网膨大；8.边缘化的染色质转变为高密度环状区，核内有由膜物质形成的囊泡和丝状的病毒核小体形成；9.新病毒组装核膜破裂，细胞器被破坏；10.细胞解体，新病毒释放。

### 1.2.6 对虾白斑综合症杆状病毒的形态结构及基因组学研究概况

WSSV 是一类杆状的非包涵体病毒。完整病毒颗粒约 210-380nm 长，70-167nm 宽。病毒的结构主要由囊膜、核衣壳、以及两者之间的被膜层构成。有些纯化的病毒颗粒上具有一个尾状结构，它可能是病毒囊膜的延伸。病毒的核衣壳位于囊膜之内，长度为 180-420nm，宽 54-85nm，厚 6nm。由 14-19 个沿长轴排列的结构单元组成，每个结构单元约为 23nm 厚，两两之间有约 6nm 的间隔。每个结构单元由一些小环沿长轴叠加而成，每一个小环由两列平行排列的 12-14 个直径 8-10nm 的球状蛋白亚基构成，这些球状亚基主要成分是 VP664 蛋白。核衣壳内部是一高电子密度的区域，由病毒基因组 DNA 和 DNA 结合蛋白 VP15 构成。核衣壳形状由球状亚基的组织方式决定，包括圆柱形和卵圆形两种<sup>[23]</sup>。图 1-1<sup>[23]</sup>展示了 WSSV 病毒的结构。

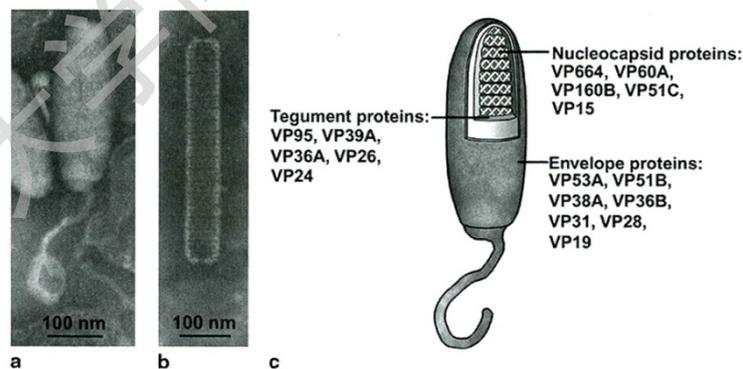


图 1-2 对虾白斑综合症病毒结构<sup>[23]</sup>

**Fig. 1-2 The structure of white spot syndrome virus**

a.完整病毒颗粒；b.核衣壳；c.病毒结构示意图

WSSV 基因组中包括一些重复区。以中国株为例<sup>[8]</sup>，WSSV 基因组约有 3%是由 9 个同源重复区(homologous region, hr)组成，其它 97%是特异的。这些重复区

均匀分布在基因组上, 包含 47 个小的重复片段, 其中有串联重复、非典型的反向重复、以及不完全的回文序列。在杆状病毒中这类重复也是普遍存在的, 主要与早期基因转录起始、DNA 复制原点有关。但是 WSSV 的重复区功能目前还不清楚。此外, WSSV 病毒存在一定的变异性, 在这 3 株测序的病毒序列中存在 5 类基因变异: (1) WSSV 泰国株中存在一个 13kb 的缺失; (2) WSSV 泰国株中存在一个大约 750bp 的可变区; (3) WSSV 台湾株中存在一个 1337bp 的转座子; (4) WSSV 基因组重复区在重复单位个数上存在变异性。(5) 其他核酸突变, 包括插入、缺失、以及单核苷酸多态性<sup>[28]</sup>。在中国株中, 与 13kb 缺失对应的区域包含 13 个 ORF, 这一变异区编码的蛋白对于 WSSV 的生存可能不是必须的, 但是它们与病毒的毒力存在相关性<sup>[29]</sup>。

WSSV 是目前已测序的最大的动物病毒之一。虽然该病毒与昆虫杆状病毒在形态上很相似, 但它的基因组序列和预测的蛋白质序列与已知的昆虫杆状病毒几乎没有同源性。生物信息学分析<sup>[41,8]</sup>WSSV 所有 ORFs, 发现大部分 ORFs 编码的蛋白和数据库中已知的蛋白几乎没什么同源性, 仅有少数几个基因与其它病毒或生物的已知蛋白质或结构域有较高的同源性, 大部分是一些与核苷酸代谢和 DNA 复制有关的酶类。WSSV 基因组中还包含一个类胶原蛋白 (Collagen) 基因, 这是 WSSV 一个非常独特的属性, 因为在以前发现的所有病毒中都不包含该基因。预测与已知的蛋白质有较高同源性的 ORFs。基于 WSSV 基因的独特性, 国际病毒分类委员会第 8 次报告把 WSSV 归为线形病毒科 (*Nimaviridae*) 白斑病毒属 (*Whispovirus*), 它是此新科中唯一的成员<sup>[42-44]</sup>。

近几年, 一些研究者利用 DNA 微阵列 (Microarray) 技术对 WSSV 的基因组突变和基因转录进行了深入探索。Lan 等<sup>[45]</sup>根据 WSSV 全基因组序列设计了 190 对引物, 覆盖了中国株全基因组绝大多数预测的 ORFs。通过这些引物对扩增相应基因片段制备了 DNA microarray, 并在此基础上分析了 WSSV 基因的转录图谱。研究发现 81.7% 的 WSSV ORFs 在感染过程中有转录, 其中的 47 个 ORFs 在感染 6 小时后有转录, 说明这些基因可能是早期基因。在进行 microarray 的研究过程中, 研究者还发现不同来源的病毒株在基因组的同一区域均有大小不同的缺失。用缺失片段的变异病毒感染的螯虾, 与全长病毒感染的螯虾相比, 存活时间显著增长, 说明病毒缺失的基因片段, 可能与病毒的毒力有关<sup>[29]</sup>。Marks 等<sup>[46]</sup>用相似

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库