

# 中蜂囊状幼虫病毒结构蛋白预测与鉴定

马鸣潇<sup>1</sup>, 马 臣<sup>2</sup>, 程 健<sup>1</sup>, 谢振声<sup>3</sup>, 李 明<sup>1</sup>, 费东亮<sup>1</sup>

(1. 辽宁医学院实验动物中心, 锦州 121001; 2. 赤峰市翁牛特旗中蒙医院, 乌丹 024500;  
3. 中国科学院生物物理研究所蛋白质组学平台, 北京 100101)

**摘要** 采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法、生物信息学软件和质谱分析对中蜂囊状幼虫病毒(CSBV)辽宁株(CSBV-LN)全基因组进行了分子克隆、序列测定、分子生物学特性分析及结构蛋白预测和鉴定。结果表明,CSBV-LN全基因组序列长度为8863个核苷酸,编码一个大的开放阅读框,其中包括178 nt的5'非编码区的前导序列和79 nt的3'非编码区,后面跟着一个poly(A)的尾巴。通过软件分析表明,CSBV-LN蛋白序列类似于哺乳动物的小RNA病毒蛋白序列,预计存在VP1,VP2,VP3和VP4等4个小的结构蛋白;系统进化分析表明,CSBV、囊状幼虫病毒(SBV)和残翅病毒(DWV)的起源相同,推测CSBV有着类似DWV的结构蛋白序列5'-VP2-VP4VP1VP3-3。基于此,根据PAGE蛋白条带的大小,利用NetPicoRNA软件预测结构蛋白的裂解位点。在此基础上,对纯化后的CSBV进行SDS-PAGE分离,对分离到的4个蛋白进行质谱分析,结果鉴定出VP1,VP3和VP0 3个蛋白。

**关键词** 中蜂囊状幼虫病毒; 反转录聚合酶链反应; 结构蛋白; 质谱分析

中图分类号 O629; S895.1+33 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2011)08-1768-06

中蜂囊状幼虫病是由中蜂囊状幼虫病毒(CSBV)引起的一种分布广、发病率高且传染快的传染病,一旦发生就会对中蜂幼虫造成毁灭性打击,甚至引起整个蜂群毁灭<sup>[1,2]</sup>。该病于1972年在广东首次发生,随后迅速蔓延至全国乃至东南亚。目前,该病的危害日趋严重,不但严重威胁着养蜂业的发展,而且也严重影响虫媒植物的生长,破坏了生态平衡。特别是2008年以来,辽宁地区多次发生中蜂囊状幼虫病<sup>[3]</sup>,造成了重大经济损失,严重影响了中蜂业的发展和保种工作。CSBV属于小RNA病毒,其结构、生理及生化性质与西蜂的囊状幼虫病毒(SBV)相似。目前已完成了SBV-UK(Genbank No. AF092924.1)全基因组测序<sup>[4]</sup>和CSBV广州株CSBV-GZ(Genbank No. AF469603)编码区基因测序<sup>[5]</sup>。SBV-UK和CSBV-GZ均包括一个大的开放阅读框,编码一个大的多聚蛋白,比典型的哺乳动物微小核糖核酸病毒(约7500 bp)要长,且CSBV-GZ的编码区比SBV-UK的还要长。但目前对CSBV和SBV的基因组研究仅局限于一些毒株的测序,而对其分子生物学特性、遗传进化关系,尤其是结构蛋白的研究尚未见报道。本文以在辽宁地区分离到的毒株CSBV-LN作为参考毒株,对CSBV全基因组进行了克隆、遗传进化分析及结构蛋白的预测和鉴定,该研究结果为CSBV结构蛋白的免疫原性研究、致病机理研究以及体外培养等奠定了基础。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

1.1.1 CSBV病毒 CSBV-LN病料取自辽宁清原自然感染的某蜂场。

1.1.2 试剂与仪器 AMV反转录酶和exTaq DNA聚合酶、pMD-18-T载体及各种限制性内切酶均购自Takara公司; TRIzol购自Invitrogen公司; SDS-PAGE试剂购自Bio-RAD公司; PCR产物纯化试剂盒购自北京威格拉斯技术有限公司产品。

XL-100K型超高速离心机(德国Beckman公司); JEM-12000EX透射电子显微镜(日本电子公

收稿日期: 2011-01-06.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30972200)和辽宁省教育厅项目(批准号: 2009A464)资助。

联系人简介: 马鸣潇,男,博士,副教授,主要从事分子病毒研究。E-mail: lnjzmmx@163.com

司); PX2 型 96 孔 PCR 扩增仪( Biometrapersonal 公司); PCA300 型电泳仪( Bio-RAD 公司); Axima-CFR + -MALDI-TOF 生物质谱仪( 日本岛津公司) .

## 1.2 实验过程

1.2.1 CSBV 病毒的提纯 参照文献[6]方法,对感染 CSBV 的幼虫进行处理,得到足够浓度和高纯度的病毒. 取病毒悬液经磷酸钨( 质量分数为 2% , pH = 6. 8) 负染,在透射电镜下直接观察病毒的形态<sup>[7]</sup>.

1.2.2 病毒基因组的克隆 以 CSBV-GZ 株( Genbank accession No. AF469603) 和 SBV-UK 株( Genbank accession No. AF092924. 1) 作为参考毒株,借助 DNASTAR 软件,设计了 10 对共 20 条 PCR 引物用于 CSBV 的扩增. 具体引物见表 1,其中 S1 ~ S9 引物对参照 CSBV-GZ 的序列设计, S10 引物对参照 SBV-UK 序列设计.

Table 1 Synthetic oligonucleotides for amplification

No.	Primer	Position	No.	Primer	Position
S1 <sup>a</sup>	5'-GACCCGTTTTCTGTGAGTTTATG-3'	41—64	S6 <sup>a</sup>	5'-CGGTGCGTTATGAACCTTTT-3'	4243—4262
S1 <sup>b</sup>	5'-GTGTAGCGTCCCCCTGAATAGAT-3'	611—633	S6 <sup>b</sup>	5'-AATGCGTAGATTGAGGTGCC-3'	5333—5352
S2 <sup>a</sup>	5'-TATTCAGGGGACGCTACAC-3'	614—633	S7 <sup>a</sup>	5'-GCGCAACTGGCACCTCAAT-3'	5325—5343
S2 <sup>b</sup>	5'-TATTCATCGGGGTTATTG-3'	1713—1732	S7 <sup>b</sup>	5'-TCCAAATATACTTCCCACTGC-3'	6249—6270
S3 <sup>a</sup>	5'-GGAGACGCCATGTTAAAGA-3'	1644—1663	S8 <sup>a</sup>	5'-GTGACGGCAGTGGGAAGTAT-3'	6262—6243
S3 <sup>b</sup>	5'-GCGCGTAAATAAACACTCG-3'	2365—2384	S8 <sup>b</sup>	5'-GCAGCCTCTCAGGTGTTACT-3'	7454—7474
S4 <sup>a</sup>	5'-ATGGGGTAAAGGACAATCTG-3'	2290—2310	S9 <sup>a</sup>	5'-TTTGGTAGCGGGGTGTAAG-3'	7322—7340
S4 <sup>b</sup>	5'-TGCTCTAACCTCGCATCAAC-3'	3423—3442	S9 <sup>b</sup>	5'-CATTGCGTGGTATCATT-3'	8501—8517
S5 <sup>a</sup>	5'-TTACGGGAGCAGCACAAACA-3'	3391—3409	S10 <sup>a</sup>	5'-TACGAATCGTATTGAT-3'	1—18
S5 <sup>b</sup>	5'-ATTCCGATTACCGATACC-3'	4287—4306	S10 <sup>b</sup>	5'-TAAACAAATCGGTATAAGAGTCC-3'	379—401

a. Sense; b. antisense.

采用 TRIzol 提取病毒总 RNA,并以病毒总 RNA 为模板,随机引物为反转录引物,在 AMV 逆转录酶和 exTaq DNA 聚合酶作用下进行 RT-PCR 反应. 反应条件为 94 °C , 3 min; 94 °C , 1 min; 50 ~ 55 °C , 1 min; 72 °C , 50 ~ 60 s; 30 个循环; 72 °C , 10 min , 3'端通过 3'-RACE 试剂盒进行克隆. PCR 扩增的特异性片段经质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化,分别克隆至 pMD-18-T 载体,并用限制性内切酶进行鉴定.

1.2.3 DNA 序列测定和分析 由大连宝生物公司在 ABI377 核酸序列自动测定仪上测定基因片段的 DNA 序列. 利用 DNASTAR 和 DNASIS 软件包完成序列拼接,并对全部 DNA 序列及由 ORF( 开放阅读框) 所推导的氨基酸序列进行排列分析和同源性比较,用 NetPicoRNA( from <http://www.expasy.ch/tools/>) 预测推导蛋白的酶切位点.

1.2.4 病毒的 SDS-PAGE 分离 分离提取纯的病毒悬液,用 10% ( 质量分数) 的分离胶参照文献[8]方法进行 SDS-PAGE 分离,同时设阴性对照,将凝胶用考马斯亮蓝染色<sup>[9]</sup>.

1.2.5 质谱分析 将凝胶染色、脱色后,切下目的条带进行质谱分析. 具体步骤: 将切下的蛋白条带分别置于 1.5 mL Eppendorf 管中,经双蒸水反复冲洗后,加入新制备的脱色工作液( 质量分数 50% ACN 的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液) 进行脱色. 用双蒸水冲洗终止反应,直至条带呈无色透明. 将条带捣成碎片,用 50% 乙腈冲洗胶块 1 ~ 2 次,每次 15 min. 再加无水乙腈脱水,至胶块完全变成白色后,移除乙腈,加入 50 μL 含 10 mmol/L 二硫苏糖醇的 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液吸胀 5 min 后,于 56 °C 作用 1 h,冷却至室温去掉溶液,加入含 55 mmol/L 碘代乙酰胺的 25 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,置于暗处放置 30 min,移除溶液,加入 50 μL 无水乙腈脱水至胶块完全变成白色后,移除乙腈,置于真空干燥仪中冷冻干燥. 将 0.01 μg/μL 的胰蛋白酶在 25 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液中于 4 °C 吸胀 30 min,移除多余的酶液,加入 50 μL 25 mmol/L 的 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液,于 37 °C 水浴酶解 15 h. 酶解后用吸头将上清液移至另一新的 Eppendorf 管中,剩下的胶块用 50 μL 萃取液 [V( 5% TFA) : V( 100% ACN) = 1:1] 超声萃取 2 次. 将 3 次获得的溶液合并,在真空干燥仪中抽干,用 5 μL 含质量分数 0.1% TFA 的双蒸水溶解. 待酶解肽段脱盐后,取 1 μL 样品和 1 μL 基质用涡旋混合器充分混合均匀后,再点到点样板上,自然

风干. 将制备好的样品采用 Axima-CFR + -MALDI-TOF 生物质谱仪进行分析. 参照文献 [10, 11] 方法进行蛋白质鉴定, 将所得的肽质量指纹图谱 (PMF) 在 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 上进行搜索, 肽片段的相对分子质量误差控制在万分之一, 允许一个酶切位点未切, 酶为胰蛋白酶, 固定修饰选择碘代乙酰胺修饰半胱氨酸, 可变修饰选择氧化的甲硫氨酸.

## 2 结果与讨论

### 2.1 电镜观察和 SDS-PAGE 分离

采用电子显微镜可观察到大量的病毒粒子, 其直径约为 26 nm [图 1 (A)], 纯化后的病毒经 SDS-PAGE 分离得到 4 个蛋白, 大小分别为 30500, 31600, 37800 和 44200 [图 1 (B)], 结果与冯建勋等<sup>[6]</sup>报道的 CSBV-GZ 结果一致.

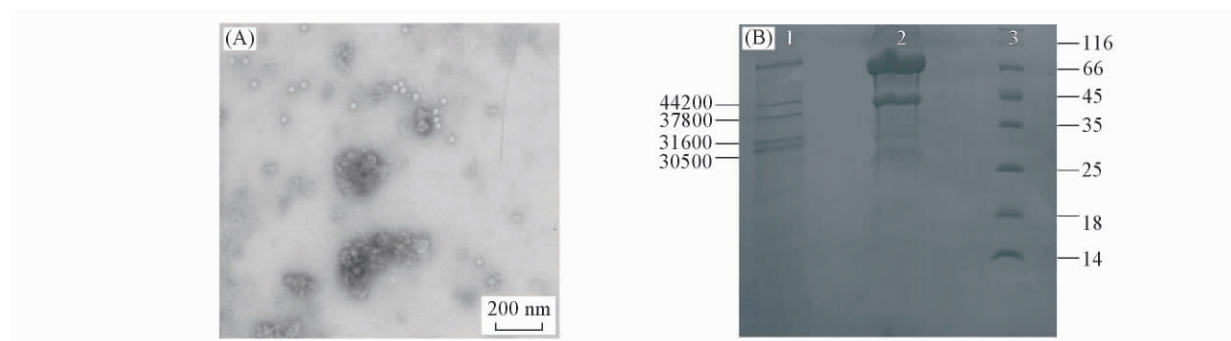


Fig. 1 Electron microscopy images of virus particles of CSBV (A) and the SDS-PAGE of CSBV (B)

(B) Lane 1: structural proteins; lane 2: negative control; lane 3: protein marker.

### 2.2 核苷酸序列测定及分析比较

经核苷酸序列测定发现, CSBV-LN 全基因组长度为 8863 个核苷酸, 整个基因组中 A 占 30.06%, U 占 29.52%, G 占 24.40%, C 占 16.02%. 鸟嘌呤核苷酸和尿嘧啶核苷酸较丰富 ( $G + C = 40.43\%$ ), 其中 5'-UTR 类似于 SBV-UK, 长 178 nt; 3'-UTR 长 79 nt, 类似于哺乳动物小 RNA 病毒 40 ~ 126 nt, polA 61 nt, 其余部分编码一个大的开放阅读框. CSBV-LN 株有 2 个起始密码子 AUG, 分别位于 178 和 418 nt, 两者相距 240 个核苷酸, 与 SBV-UK 的不同, SBV-UK 的第二个起始密码子 AUG 位于 197 nt. CSBV-LN 位于 AUUAUGG 之间的起始密码子类似于许多无脊椎动物的起始密码子位置 (ANNAUGG)<sup>[12]</sup>, 更符合强起始密码子的特征序列, 因此更可能真正起作用. CSBV-LN 株的开放阅读框编码一个长度为 2848 个氨基酸的多聚蛋白, 分子量为 319613.75, 终止密码子 TAA 位于 8721 nt 处. 核苷酸序列比较表明, CSBV-LN 株与 GSBV-GZ 株的同源性最高, 达到 93.7%, 其推导氨基酸序列与 GSBV-GZ 的同源性为 96%, 与 SBV-UK 相比, 其核苷酸序列及推导氨基酸序列同源性分别为 90.5% 和 95.3% (图 2).



Fig. 2 Comparison of CSBV-LN with CSBV-GZ and SBV-UK

(A) The homologies of ORF sequences is 93.7% and 90.5% to CSBV-GZ and SBV-UK, respectively;

(B) the homologies of deduced amino acid is 96% and 95.3% to CSBV-GZ and SBV-UK, respectively.

### 2.3 氨基酸序列分析

通过软件分析表明, CSBV-LN 蛋白序列类似于哺乳动物的小 RNA 病毒蛋白序列, 其结构蛋白和非结构蛋白分别位于多聚蛋白的 N 端和 C 端. 同源性分析表明, CSBV-LN 528—612aa 与哺乳动物小

RNA 病毒和昆虫小 RNA 病毒相似, 该位置在感染性软化病毒( IFV) 和残翅病毒病( DWV) 的 VP1 位置, 但在口蹄疫病毒( FMDV) 和脑心肌炎病毒( EMCV) 的 VP3 位; 257—419aa 类似于 FMDV, EMCV 和 DWV 的 VP2 位置, 但该位置在 IFV 的 VP3 位置( 图 3) .

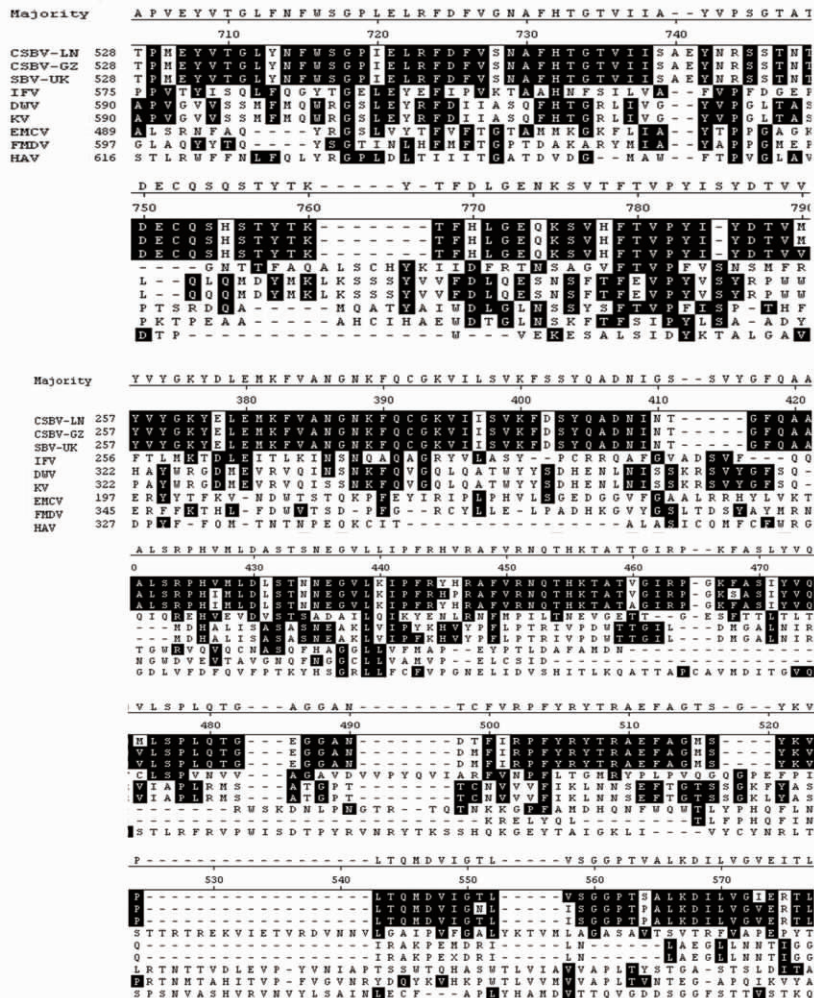


Fig. 3 Alignment of amino acids residues

Alignment of residues 528—612 and 257—419 of CSBV-LN was compared with CSBV-GZ, SBV-UK, infections flacherie virus( IFV) , deformed wing virus( DWV) , encephalomyocarditiss( EMCV) , hepatitis A virus( HAV) , foot and mouth disease virus( FMDV) .

通过 RdRp 遗传进化分析表明, CSBV-LN, CSBV-GZ 和 SBV-UK 都属于 SBV, 它和 DWV 及克什米尔病毒病( KV) 同属于一个种属( 图 4) . Gaetana 等<sup>[13]</sup> 研究发现, DWV 的结构蛋白排序为 5′-VP2VP4-VP1VP3-3′. 因此推测 CSBV 也存在着类似 5′-VP2VP4VP1VP3-3′ 的结构蛋白序列. 基于此, 根据 PAGE 蛋白条带的大小, 借助 NetPicoRNA 软件<sup>[14]</sup> 预测了结构蛋白的裂解位点. 结果表明, 1078 位氨基酸 ( GAAQ<sup>1078</sup>LTAS) 符合病毒 3C 蛋白酶的经典模式, 在谷氨酸盐或谷氨酸之后酶切, VP3 蛋白可能从多聚蛋白该位置裂解出来. 依次类推, CSBV 多聚蛋白的其它 3C 蛋白酶的裂解位点为 161 位氨基酸 ( KESIQ<sup>161</sup>GDAT) , 392 位氨基酸 ( VPLTQ<sup>392</sup>MDVI) , 428 位氨基酸 ( QSHNQ<sup>428</sup>DKPK) 和 743 位氨基酸 ( LPRVQ<sup>743</sup>MDTG) . 其中, 在 161 位氨基酸可能从多聚蛋白上裂解出前导多肽( L 蛋白); 在 392 位和 428 位可能从多聚蛋白上裂解出 VP4, VP4 和 VP1 形成前导蛋白

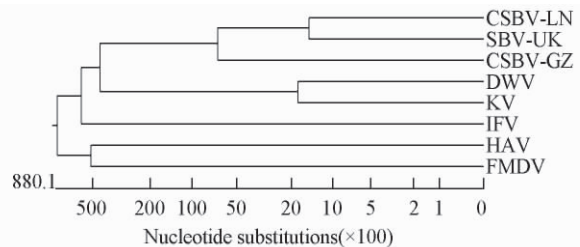


Fig. 4 Phylogenetic analysis of RdRp amino acid sequence

Phylogenetic analysis of RdRp amino acid sequence from CSBV-LN, CSBV-GZ, SBV-UK, DWV, KV, IFV, HAV and FMDV. HAV and FMDV were used as an outgroup.

(VP0)的一部分;在428位可能使VP1从多聚蛋白上裂解下来.在1655位氨基酸(FVTTQ<sup>1655</sup>GDEA)可能从多聚蛋白上裂解下来解旋酶.2308位氨基酸侧翼序列(QPVVQ<sup>2308</sup>LEDW)与已经确认的1078位氨基酸(GAAQQ<sup>1078</sup>LTAS)非常相似,可能对3CD蛋白的N端进行裂解处理,3CD蛋白由3C蛋白酶和依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)组成<sup>[15]</sup>.保守的蛋白区域分析和蛋白酶裂解位置表明,前导蛋白(L蛋白)在VP2蛋白之前,然后依次是VP4,VP1,VP3,VPg,3C蛋白酶和RdRp,所有这些蛋白都有保守的蛋白酶位于特定区域.

#### 2.4 质谱分析

将所得的PMF在Mascot上进行搜索,肽片段的相对分子质量误差控制在万分之一,允许一个酶切位点未切,酶为胰蛋白酶,固定修饰选择碘代乙酰胺修饰半胱氨酸,可变修饰选择氧化的甲硫氨酸.分子量为30500的结构蛋白VP3分析结果如表2所示,除了VP3蛋白在数据库中找到了可参考蛋白序列外,其它蛋白在数据库中未搜索到可参考的蛋白序列.为此,对预测的蛋白序列进行了理论酶切,然后对4个蛋白分别进行质谱分析,发现分子量大约为30500的结构蛋白VP3与网上获得的数据一致;而分子量为37800和31600的蛋白均有9个峰与预测结构蛋白VP1理论产生的肽段相匹配(结构见表3).说明37800蛋白是VP4和VP1形成的前导蛋白VP0的一部分,而31600蛋白是VP0裂解后产生的VP1,结果与理论预测值相符.但分子量为44200的蛋白和预测的VP2蛋白均没有获得理想结果,分子量为44200的蛋白是否为其它蛋白,VP2蛋白是否存在,CSBV是否存在不同于其它小RNA病毒结构蛋白等问题,还有待进一步研究.

Table 2 Mass spectrographic analysis of VP3

STAR—End	Observed	$M_r$ ( expt. )	$M_r$ ( calcd. )	Miss	Sequence
2—20	2232.0210	2231.0137	2231.0317	1	R. WNEYSSAYLPRVQMDTGSK. E
80—84	732.3380	731.3307	731.2982	0	R. MMQYK. S 2 Oxidation( M)
85—94	1154.6400	1153.6327	1153.5364	1	K. SGDKETSFQR. L
99—109	1261.7580	1260.7507	1260.6649	0	R. TPQAAIMNLF. F
99—109	1277.7320	1276.7247	1276.6598	0	R. TPQAAIMNLF. F Oxidation( M)
117—140	2728.2560	2727.2487	2727.3882	0	R. YTIHSTDGHPIYVTHVPHTG. NR. V
147—155	1117.6250	1116.6177	1116.5564	0	K. VNNLHEYTK. V
199—203	725.3800	724.3727	724.3293	0	R. NYSWR. D

Table 3 Mass spectrographic analysis of VP1

Mass	Position	#MC	Artif. modification/s	Peptide sequence
1339.7943	42—53	0		DISSITHPKPR
2232.0910	70—89	0		VNPVALTSFQDVNAYPDEPR
1336.5910	102—114	0		STFSWGSQDAHGK
1373.7423	115—126	0		ELFNTVLDPGLR
2388.1618	157—177	0		FDFVSNAFHTGTVHSAEY. N
1827.9098	202—216	0	MSO: 215, 1843.9047	SVHFTVPYIYDTVMR
815.5046	280—287	0		NYALHGLK
1017.5476	331—339	0		FLPANVSNR
1640.8067	340—352	1		WNEYSSVYLP. RVQ

### 3 结 论

本研究通过对结构蛋白的分析、预测和鉴定,不仅为CSBV结构蛋白的免疫原性研究、致病机理研究以及体外培养等奠定了基础,而且也为其它蜂病毒的相关研究提供了借鉴,最终将实现对蜂病毒病的有效控制.

#### 参 考 文 献

- [1] LI Zi-Lun(李紫伦), OU Xia(欧霞), HU Jun-Jun(胡军军). Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine(广西畜牧兽医) [J], 2006, 22(6): 276—277
- [2] QIN Han-Rong(秦汉荣). Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine(广西畜牧兽医) [J], 2000, 16(6): 276—

277

- [ 3 ] MA Ming-Xiao( 马鸣潇 ), LI Ming( 李明 ), YUAN Chun-Ying( 袁春颖 ), LI Peng-Fei( 李鹏飞 ), ZHANG Yi-Bo( 张颐博 ), SU Yu-Hong( 苏玉虹 ), QU Zu-Yi( 曲祖乙 ). *Chin. J. Biologicals( 中国生物制品学杂志 [J] )*, 2010, **23**( 4 ): 29—31
- [ 4 ] Ghosh R. C. , Ball B. V. , Willcocks M. M. , Carter M. J. . *J. Gen. Virol. [J] , 1999, 80: 1514—1549*
- [ 5 ] ZHANG Qin-Fen( 张勤奋 ), YANG Yi-Feng( 杨艺峰 ), LIANG Yu-Yao( 梁玉尧 ), LU Xin-Ying( 卢忻英 ), ZHANG Jing-Qiang( 张景强 ). *Journal of Chinese Electron Microscopy Society( 电子显微学报 [J] )*, 2002, **21**( 3 ): 331—334
- [ 6 ] FENG Jian-Xun( 冯建勋 ), LU Xin-Ying( 卢忻英 ), ZHANG Qin-Fen( 张勤奋 ), MA Ze-Wei( 马泽微 ), ZHANG Jing-Qiang( 张景强 ), HANG Wen-Zhong( 黄文忠 ), ZHANG Xue-Feng( 张学峰 ). *Journal of Chinese Electron Microscopy Society( 电子显微学报 [J] )*, 1998, **17**( 4 ): 387—388
- [ 7 ] LIN Zhang-Xiang( 林章祥 ), LI Zhao-Hui( 李朝晖 ), WANG Xu-Xu( 王绪绪 ), FU Xian-Zhi( 付贤智 ), YANG Gui-Qin( 杨桂芹 ), LIN Hua-Xiang( 林华香 ), MENG Chun( 孟春 ). *Chem. J. Chinese Universities( 高等学校化学学报 [J] )*, 2006, **27**( 4 ): 721—725
- [ 8 ] Weaver R. F. . *Molecular Cloning, 3rd Ed. [M] , Xi'an: World Publishing Company, 2002*
- [ 9 ] Simpson R. J. . *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual [M] , Beijing: Science Press, 2003: 52*
- [ 10 ] Zhou H. Q. , Huang H. Q. , Jin H. W. , Huang L. . *Chem. Res. Chinese Universities [J] , 2008, 24( 1 ): 84—89*
- [ 11 ] HUANG Lin( 黄琳 ), CHEN Dong-Shi( 陈东仕 ), YAN Li( 颜利 ), FANG Cai-Wang( 方财旺 ), Huang He-Qing( 黄河清 ). *Chem. J. Chinese Universities( 高等学校化学学报 [J] )*, 2009, **30**( 2 ): 314—319
- [ 12 ] Cavener D. R. , Ray S. C. . *Nucleic Acids Res. [J] , 1991, 19: 3182—3195*
- [ 13 ] Lanzi G. , Miranda J. R. . *Journal of Virology [J] , 2006, 80( 10 ): 4988—5009*
- [ 14 ] NetPicoRNA 1. 0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPicoRNA/> [OL] , 2009
- [ 15 ] Hinton T. M. , Ross-Smith N. , Warner S. , Belsham G. J. , Crabb B. S. . *J. Gen. Virol. [J] , 2002, 83: 3111—3121*

## Prediction and Identification of Structural Proteins of Chinese Sacbrood Virus LN Isolate

MA Ming-Xiao<sup>1\*</sup> , MA Chen<sup>2</sup> , CHENG Jian<sup>1</sup> , XIE Zhen-Sheng<sup>3</sup> , LI Ming<sup>1</sup> , FEI Dong-Liang<sup>1</sup>

- ( 1. *Department of Laboratory Animal Center Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. Wengniute Country Chinese Traditional Medicine and Mongolian Medicine in Chifeng Town, Wudan 024500, China;*  
3. *Proteomic Platform, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

**Abstract** Chinese sacbrood virus( CSBV) belongs to the small RNA virus family, the Picornaviridae. CSBV infection will cause lethal disease in individual bees or the collapse of entire colonies. But the CSBV was only finished sequence at the genetic level, and the structural proteins haven't been reported; thus it has restricted the prevention and control of CSBV. In the paper, the genome of CSBV purified from diseased insects was cloned and sequenced, and its molecular and biological characterization was analyzed, and its structural proteins were predicted and identified by reverse transcriptase polymerase chain reaction( RT-PCR), bioinformatics software and mass spectrography, respectively. The genomic RNA of CSBV is 8863 nucleotides in length and contains a single large open reading frame encoding a 319614 polyprotein. The coding sequence is flanked by a 178-nucleotide 5' nontranslated leader sequence and a 79-nucleotide 3' nontranslated region, followed by a poly( A) tail. Four major structural proteins, VP1, VP2, VP3 and VP4, were estimated and mapped to the N-terminal section of the polyprotein of which the genes were predicted. Phylogenetic analysis using RdRp of selected picorna-like viruses showed that CSBV/SBV and Deformed wing virus( DWV) tended to group together, which possessed an RNA of similar size and gene order. The results predicted the probable size and gene order of CSBV/SBV. Structural proteins, VP1, VP3 and VP0, were identified after four proteins were analysed by mass spectrography. This study have paved the way for immunogenicity of CSBV structural proteins, researching on pathogenesis, *in vitro* cultivation and so on.

**Keywords** Chinese sacbrood virus( CSBV); RT-PCR; Structural protein; Mass spectrographic analysis

( Ed. : H, J, K)