对虾白斑综合症病毒重组 cDNA 克隆的构建与分析

宋晓玲[1] 黄 倢[1] Kathy F. L Tang[2] 杨 冰[1] Donald V. Lightner[2]
(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071;
2. 美国亚利桑纳大学兽医与微生物系, 图森 AZ85721)

摘要: 取经人工注射感染了对虾白斑综合症病毒 40—45h 的凡纳对虾鳃组织, 分离 mRNA, 以 mRNA 为模板合成双链 cDNA, 并克隆于 PUC 质粒的 Not I/Sal I 位点, 构建了 1000 余株对虾感染后期鳃细胞的重组 cDNA 克隆。重组质粒经 PCR 鉴定插入片段, DNA 斑点杂交分析目的片段, 测定了 20 株对虾白斑综合症病毒的重组 cDNA 克隆的末端 DNA 序列, 并对其进行了包含存在的开放阅读框架、启动区上游序列、编码产物的特性等分析。结果显示: PCR 产物在 0.3—1.6kb 之间; 大于 1kb 的克隆中有 31.8% 的克隆为白斑综合症病毒的重组 cDNA 克隆。已测序的不包含同源序列的 13 株克隆中含有 14 个开放阅读框, 其中 11 个上游可检出启动子基序, 4 个可检出启动子调制元件。ORF 转译产物的特性基序分析显示: 有 2 个 ORFs 可检出锌指基序, 3 个 ORFs 可检出亮氨酸拉链基序, 2 个 ORFs 可检出 NTP 结合基序, 未检出核定位信号基序。

关键词: 白斑综合症病毒; cDNA 克隆; 构建; 分析
中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)05-0444-08

对虾白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是目前危害全球对虾养殖业的一种最严重的对虾病毒。这是一种新分离到的对虾病毒, 主要对虾养殖品种, 部分野生虾类、蟹类、小型甲壳类生物等都是 WSSV 的感染宿主[1]。由于该病毒分布范围广、宿主域宽、危害严重, 目前多以切断传播源, 增强对虾本身抵抗力来控制该病毒的发生和流行。借助于分子生物学等技术, 在该病毒的病原生物学、流行病学及分类学等领域取得了许多重要研究成果[2,3]。本文从研究病毒功能蛋白的目的出发, 构建了 1000 余株对虾感染后期鳃细胞的重组 cDNA 克隆, 对其中部分 WSSV cDNA 克隆进行了初步分析, 内容与结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 对虾鳃细胞感染率的确定 无特定病原感染的凡纳对虾(*Litopenaeus vannamei*, SPF population No. 14—99), 取自美国亚利桑那大学兽医与微生物系实验动物中心, 体重为:

收稿日期: 2001-09-03; 修订日期: 2001-11-30
基金项目: 国家重点基础研究规划项目(G1999012002)资助
作者简介: 宋晓玲(1962—), 女, 河北省宣化县人; 副研究员; 主要从事水产动物疾病学研究。组织病理切片由美国亚利桑纳大学 Rita Redman 女士完成, 特此致谢

4—5g。感染前饲养在 90L 玻璃水槽内, 温度: 25—26℃, 盐度: 20‰, 投喂人工配合饲料。

感染毒种为 WSSV(95—46, Thailand) 病毒粗提液, 使用前用 2% 的 NaCl 稀释 20 倍。感染方式为第二腹节注射感染, 0.1mL/尾。自感染 17h 起, 每隔一定时间使用 Davidison's AFA 固定 2 尾对虾, 直至实验结束。固定的对虾样品经脱水、包埋、切片、H-E 染色等, 制成组织病理切片; 光学显微镜检查对虾鳃细胞的感染率。

1.2　感染后期对虾鳃细胞 mRNA 的制备　组织病理学方法确定了 WSSV 对对虾鳃细胞的感染率后, 取同等规格的SPF 南美白对虾, 用同一毒种重新布置感染实验。

总 RNA 的制备: 取上述感染实验中感染了 WSSV 40—45h 的对虾鳃组织, 经液氮速冻, 加入总 RNA 抽提液 TRIZOL REAGENT(GIBCO BRL) 研磨, 离心后的上清经氯仿抽提, 异丙醇沉淀 RNA, A260 估计总 RNA 浓度。

mRNA 的制备: 总 RNA 通过 Oligo(dT) 纤维素柱分离 Poly(A)$^+$ mRNA, 实验步骤见 MESSAGEMAKER mRNA Assembly Kit (GIBCO BRL)。A260 估计 mRNA 的产量。

1.3　cDNA 的合成与克隆　以 mRNA 为模板经反转录酶合成 cDNA 第一条链; 将 cDNA 第一条链与 mRNA 的杂合体变性分开, 以第一条 cDNA 链引导 RNA 酶 H 和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I klenow 片段置换合成 cDNA 第二条链; 用限制性 DNA 内切酶 Sal I 切割双链 cDNA, 同聚物加尾克隆双链 cDNA; cDNA Size Fractionation 柱选择 cDNA 克隆的大小; 克隆 cDNA 与质粒载体 pSPORT 在 T4 DNA 连接酶参与下进行体外连接反应。具体实验步骤参见 SUPERSCRIPT™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning Kit(GIBCO BRL)。

1.4　重组 cDNA 的转导　取约 10ng 连接反应完毕的 cDNA 与 100μL XL10—Gold™ 大肠杆菌感受态细胞(Stratagene) 混合, 冰浴后 42℃热转导, 转导后的细胞经 37℃震荡培养, 涂布于 LB 琼脂培养基上(含 Ampicillin 100μg/mL), 培养基上预先分别涂布了 50μL 20ng/mL X-gal 和 100μL 100mmol/L IPTG。37℃恒温培养 24h 后, 根据 Xgal-IPTG 显色反应挑选含有插入片段的重组质粒转化克隆的白色菌落进行下一步分析。

1.5　PCR 确定插入片段的大小　以 PUC/M13 Primer(GIBCO BRL) 为引物, 用无菌牙签轻轻沾取少量白色菌落的菌液为模板, 按以下反应条件: 94℃ 30min 预变性; 94℃ 0.5min, 55℃ 0.5min, 72℃ 1.5min 扩增 30 个循环; 72℃延伸 7min 进行 PCR 扩增。扩增产物以 1kb DNA ladder 为标准, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外仪观察和记录每一克隆插入片段的大小。

1.6　DNA 斑点杂交鉴定目的克隆　WSSV DNA 和对虾 DNA 的制备参见文献[2,4], 地高辛标记 DNA, 标记反应及标记产物的测定见 DIG DNA Labeling and Detection Kit (BOEHRINGER MANNHEIM)。

碱裂解法制备质粒 DNA: GTE (50mmol/L glucose, 25mmol/L Tris•HCl, 10mmol/L EDTA) 重悬离心后的细菌培养物: 新鲜配制的 0.2mol/L NaOH/0.1% SDS 裂解菌液; 醋酸钾沉淀 DNA; 上清经 RNA 酶 37℃消化 30min 后氯仿抽提; 异丙醇沉淀 DNA; 沉淀以 0.4mol/L NaCl/7.5% PEG8000 重悬, 离心回收质粒 DNA。

DNA 斑点杂交: 将纯化的重组质粒 DNA 变性; 点样于硝酸纤维素膜上; 80℃交联; 置入探针杂交液(每 mL 含 WSSV DNA 探针或对虾 DNA 探针 20ng) 中 65℃孵育过夜; 次日洗膜后, 加入碱性磷酸酶标记的 DIG 抗体反应; 以 NBT/BCIP 为底物显色; TE 终止显色。

1.7　重组 cDNA 克隆的序列测定　挑选 20 株经 DNA 斑点杂交筛选而得的 WSSV 重组

cDNA 克隆,测定了其末端 DNA 序列。序列测定委托美国亚利桑纳大学生物技术中心、大连宝生物公司和上海生物工程公司完成。

1.8 重组 cDNA 同源性分析 使用软件 Primer Premier (PREMIER Biosoft International) 对已测序的重组 cDNA 克隆的 DNA 序列,cDNA 克隆序列与 NCBI 登录的 WSSV 基因组序列之间进行同源性分析。

1.9 重组 cDNA 克隆的表达分析 将已末端测序的 DNA 序列输入软件 OMIGA 2.0(Oxford Molecular Ltd.),进行酶切位点和存在的开放阅读框架(Open Reading Frame, ORF)分析,制作其物理图谱。并对部分 ORF 的启动区上游序列,编码产物的特性进行分析。

1.10 氨基酸序列比较 利用互联网 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 软件,在 NCBI 数据库(GenBank) 中查找 cDNA 克隆部分 ORF 推导的氨基酸序列的同源蛋白质。

2 结果

2.1 WSSV 对南美白对虾鳃细胞感染率的测定

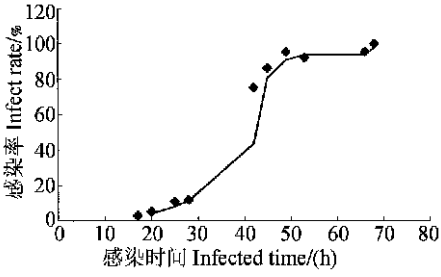

图 1 白斑综合症病毒对南美白对虾鳃细胞的感染率

Fig. 1 The gill's infected rate of Litopeaeus vannmei by WSSV

检查在不同感染时间固定的对虾鳃组织,观察到在感染前期(< 30h)有 10% 左右的鳃细胞呈被感染状态;在感染后期(> 40h)60% 以上的鳃细胞呈被感染状态,其中在感染后的 41—43h 内有 70% —80% 的鳃细胞呈被感染状态(图 1)。

2.2 PCR 法确定插入片段的大小

应用 PCR 法筛选了 1260 个 X-gal/IPTG 阳性克隆,PCR 产物 0.3—1.6kb 之间,部分克隆 PCR 结果见图 2。其中大于 1kb 的克隆共 313 个,占总克隆数的 31.5%;小于 1kb 的克隆共 666 个,占总克隆数的 52.9%;另有 279 个克隆未扩增到相应片段,究其原因是直接挑取细菌菌落作为 PCR 模板,而非细菌 DNA,模板量无法精确控制造成的。本研究保留了 PCR 产物大于 1kb 的含重组 cDNA 质粒的大肠杆菌克隆做下一步分析。

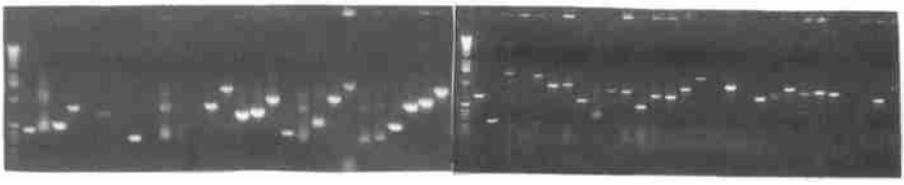

图 2 重组质粒 PCR 鉴定插入片段大小

Fig. 2 The result of PCR screening to detect the length of cDNA insert

2.3 DNA 斑点杂交鉴定目的克隆

应用 DNA 杂交技术,将重组质粒 DNA 与标记的 WSSV DNA、对虾 DNA 分别进行杂交,杂交结果显示:31.8% 的 cDNA 克隆为 WSSV 重组 cDNA 克隆,68.2% 的 cDNA 克隆为对虾重组 cDNA 克隆。

2.4　cDNA 同源性分析

测定了 20 株 WSSV cDNA 克隆的末端 DNA 序列, 并对 DNA 序列进行了同源性分析。结果显示有 13 株克隆未检索到同源序列, 有 7 株克隆检索到同源序列。将 13 株 cDNA 克隆的 DNA 序列与 NCBI 登录的 WSSV DNA 序列做同源性比较, 结果显示: 13 株克隆在 AX151396 中均检索到同源序列, 克隆 867 与 AF376807(WSSV mRNA) 同源; 克隆 100、克隆 631 与 AF099142 部分同源。

2.5　cDNA 克隆的序列分析

不包含同源序列的 13 株 WSSV 重组 cDNA 克隆共包含 14 个完整或不完整的开放阅读框(每一 ORF 内的氨基酸残基数等于或大于 50) , ORF 启动区上游序列、可能的编码产物的特性等分析结果见表 1。表 1 中 ORF 的编号按照 cDNA 克隆的初期筛选编号顺序列出, 每个 ORF 的位置、长度及转录方向均列于表中。由于只测定了 DNA 的末端序列, 因而部分 ORF(如 S4、S10、S11 等) 只能推导出其部分氨基酸残基。

表 1　WSSV cDNA 克隆所包含的主要开放阅读框的分析

Tab. 1　Analysis on main Open Reading Frame of cDNA clones of WSSV

ORF	cDNA 克隆	位置方向 Location	氨基酸	启动子 Promoters	启动调制元件 Enhancer	Kozak 规则	终止密码子	转译产物基序 Protein Motif
1	25	141⇒356	72	TATA		K	TGA	
2	100	7⇐243	76	TATA, TAAG	CCAAT	N	TAA	
3	242	115⇒675	187	TATA, TAAG	G+ C 富集序列	N	TGA	锌指基序
4	249	109⇐> 630	> 174				TAG	亮氨酸拉链
5	355	496⇒660	55	TATA, CGTGC, CAGT, TAAG		K	TGA	
6	355	419⇐616	66	CAGT		N	TGA	
7	504	136⇐354	73	TATA, CAGT		N	TGA	
8	631	183⇒521	113			K	TAG	亮氨酸拉链
9	639	184⇒336	51	TATA, CAGT		N	TGA	
10	747	310⇒> 634	> 108				TAA	
11	837	132⇐> 618	> 160			N	TAA	锌指基序
12	867	53⇒> 621	> 189		G+ C 富集序列	K		NTP 结合基序
13	1007	119⇒> 671	> 184	TAAG	G+ C 富集序列	K		NTP 结合基序
14	1007	77⇐> 671	> 198				TAG	亮氨酸拉链

每一 ORF 上游启动子检索包括了早期启动子的加帽位点基序, 即 mRNA 起始位点同感序列(CAGT) 及启动子元件 Prihnow 盒(TATA) 和增强子类似元件(CGTGC) , 晚期启动子的 TAAG 和 TTGAGA 基序。从表中结果可以看出: ORF1、ORF2、ORF3、ORF5、ORF6、ORF7、ORF9 可检出早期启动子基序, ORF2、ORF3、ORF5、ORF13 可检出晚期启动子基序, 而 ORF2、ORF3 和 ORF5 即可检出早期启动子基序又可检出晚期启动子基序。启动子调制元

件主要检索了 G+ C 富集序列和 CCAAT 序列, 有 4 个 ORF 可检出启动子调制元件, 且大多为 G+ C 富集序列。表 1 中 ORF 转译起始密码子附近碱基序列符合 Kazak 规则的以 K 表示, 不符合的以 N 表示, 其中有 5 个 ORF 符合 Kazak 规则。终止密码子 TAA、TGA、TAG 均在表中出现过, 但以 TGA 密码子出现的频率最高。

将每一 ORF 的碱基序列翻译成氨基酸序列, 并对其翻译产物进行了包含特性基序的初步分析。ORF3、ORF11 可检出锌指基序(胱氨酸/ 组氨酸基序), ORF4、ORF8、ORF14 可检出亮氨酸拉链基序, ORF12、ORF13 可检出 NTP 结合基序, 未检出核定位信号基序。含有锌指基序和亮氨酸拉链基序的蛋白质多为 DNA 结合蛋白, 常作为启动子一部分, 或作为转录必须蛋白来调节转录。

2.6 氨基酸序列比较

除对有转译可能的 ORF 进行了初步的分析外, 还在 Internet 上与数据库的蛋白质序列进行了相似性检索, 在 14 个 ORFs 中只有 1 个 ORF 检索到相近序列, 其比较内容见表 2。

表 **2** 数据库中检索的开放阅读框推导的氨基酸序列的同源序列

Tab. 2 The alignments with ORF of cDNA clones of WSSV in NCBI using BLASTP

克隆表达产物		Patitive protein sequence		数据库蛋白质	Protein sequence in NCBI		比较数值
ORF	cDNA 克隆	长度 Length	比较范围 Amino acids	名称 Protein name	长度 Length	比较范围 Amino acids	Bit score
13	1007	> 184	1—177	非结构蛋白(WSSV) white spot syndrome virus	194	1—177	170

3 讨 论

DNA 重组技术创建于 20 世纪 70 年代, 并随着分子生物学和分子遗传学等学科的发展日趋完善并得到广泛应用。重组 DNA 技术主要包括基因组 DNA 重组技术和配对 DNA (cDNA) 重组技术。其中 cDNA 拷贝由 mRNA 反转录而成, 也就是说重组 cDNA 主要克隆基因组 DNA 中的转录区段的序列, 因而, 可以根据克隆的 cDNA 分子的核苷酸序列的直接推导出蛋白质的氨基酸序列。由于生物的基因组大多十分庞大, 其复杂度是蛋白质和 mRNA 的许多倍, 而且含有大量重复序列, 因而 cDNA 克隆是基因组表达特性分析的有力工具[5]。cDNA 以 mRNA 为模板构建, 其源于 mRNA, 但不会超出 mRNA, 因而选择含有高丰度目标 mRNA 的组织细胞为材料, 是构建目标 cDNA 文库的基础。WSSV 通过对虾消化器官结缔组织感染宿主, 消化道、鳃上皮组织是 WSSV 感染的主要靶组织。作者选择对虾鳃为构建 cDNA 文库的 RNA 材料, 是考虑相比较与 WSSV 的其他靶组织, 鳃具有以下优点: 组织量大, 可占到虾总体重的 1.0% —1.5%; 解剖容易, 而缩短解剖过程所需时间可有效降低 RNA 的降解; 病毒含量高, 鳃组织由鳃上皮细胞和上皮下结缔组织细胞组成, 这两种细胞都是 WSSV 的主要靶细胞; 对虾鳃组织是一相对分化不活跃的组织, 而病毒感染鳃细胞处于增值活跃期时, 鳃细胞分化受抑制, 因而提取的 RNA 中病毒 RNA 占有较大的份额; 易处理, 由于鳃组织肌肉含量少, 又有少量甲壳质存在, 缩短了研磨时间, 提高了 RNA 产量。DNA 斑点杂交结果证实了, 选择被感染对虾的鳃组织为制备 RNA 的材料是恰当

的。

近年来, 基于 WSSV 的感染复杂性及分类地位的未确定性, 其基因组研究受到科研工作者的关注。最早的报道是利用 DNA 酶切物理图谱推测 WSSV 基因组 DNA 的大小, 尽管不同的研究者取得了不同结果[2, 6], 但 WSSV 相比较与其他病毒基因组数目巨大得到了大家的共识。自 2000 年开始, WSSV 基因组 DNA 开始在 GenBank 上登录, 截止到 2001 年 6 月 27 日, 登录的 WSSV 核苷酸序列已达 177 个条目。尤其是在 2001 年 1 月 22 日, XU 等在 GenBank 上登录了 WSSV 基因组全序列(收录条款 No. AX 151396), WSSV 基因组全长 305 107bp, 为今后 WSSV 基因组学和后基因组学的研究和创新提供了极大的便利。将本研究中已测序的 WSSV cDNA 克隆序列与 WSSV 基因组全序列作 Dot-Plot 分析, 结果显示了虽然 20 株 WSSV cDNA 克隆均可在 WSSV 基因组全序列中找到同源序列, 但多数克隆的同源序列集中在全序列的 23 600—94 000bp 之间, 因而推测这段序列除与病毒 DNA 复制有关外, 部分序列可能是 WSSV 感染后期的转录序列或转录调控序列。另外 DNA 与 cDNA 的 Dot-Plot 分析还显示基因组 DNA 不仅存在有大量重复序列, 而且还有许多不表达的内含子存在。

除病毒核酸外, 蛋白质是病毒的另一主要组成成分, 蛋白质又分为结构蛋白和非结构蛋白。病毒的结构蛋白主要包括核衣壳蛋白和囊膜蛋白。病毒囊膜除起保护病毒核酸的作用外, 还可识别细胞的受体蛋白, 在病毒的吸附和入侵宿主过程中起重要作用, 核衣壳蛋白则在病毒感染、复制等过程中起重要的辅助作用。黄　最早报道通过完整病毒和去囊膜病毒的 SDS-PAGE 图谱分析, WSSV 病毒囊膜蛋白有 12 种主要多肽, 病毒核衣壳蛋白有 2 种主要多肽[7]。Nadala 分析认为 WSSV 由三条主要多肽, 分别为: 27. 5KDa、23. 5KDa 和 19KDa[8]。Wang 测定了 2 条主要囊膜蛋白(25KDa, 19KDa) 和 1 条主要病毒核衣壳蛋白(23KDa) 的末端氨基酸序列[6]。Hulten 报道 WSSV 主要有 4 条蛋白区带: 28KDa, 26KDa, 24KDa 和 19KDa, 其中 VP26 和 VP24 为核衣壳蛋白, VP19 和 VP28 为囊膜蛋白, 并在 GenBank 上登录了它们相对应的核苷酸序列[9]。作为基因产物的病毒非结构蛋白, 在病毒入侵及病毒基因组复制过程中起调控作用。目前 WSSV 病毒非结构蛋白主要由病毒核苷酸序列包含的 ORF 推导而出, Helten 报道了由一个 12. 3kb 的 WSSV 重组 DNA 克隆分析出含有核苷酸还原酶大小亚基的核苷酸序列及氨基酸序列[3]; Tsai 进一步分析认为该核苷酸还原酶基因为一早期表达的基因[10]; 周国瑛进行了含有一个可能的 WSSV 早晚期基因 DNA 克隆的序列分析[11]; 石正丽从基因组序列中筛选了一个含有 DNA 多聚酶基因片断的克隆[12]; Tsai 分析了一个由 ORF 推导的核苷和核苷酸激酶基因, 并进行了该基因的体外表达研究。从 20 株 WSSV 重组 cDNA 克隆中推导的 14 个 ORFs, 在 NCBI 数据库(GenBank) 中未查找到同源蛋白质。这与 Helten 等报道的结果相近[3], 从一个侧面支持 WSSV 与昆虫杆状病毒在进化上相差甚远的观点。14 个 ORFs 与上述报道的病毒结构蛋白和非结构蛋白的氨基酸序列做同源性比较, 仅有 ORF13 与 Helten 报道的一段 WSSV 非结构蛋白同源。具体每个 ORF 表达的可能性与表达产物的功能, 及其在病毒侵染、复制等环节中所起的作用有待进一步研究、验证。

参考文献:

[1] 黄　, 宋晓玲, 于佳, 等. 杆状病毒性的皮下及造血组织坏死—对虾暴发性流行病的病原和病理学[J]. 海洋水产

研究, 1995, **16**(1): 1—10

[2] Yang F, Wang W, Chen R Z, et al. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA[J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, **67**: 1—4

[3] Marielle C W van Hulten, Meng-Feng Tsai, Christel A Schipper, et al. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions [J]. *Journal of General Virology*, 2000, **81**: 307—316

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989

[5] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京: 农业科技出版社, 1998, 177—274

[6] Wang Q, Poulos B T, Lightner D V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus [J]. *Arch Virol*. 2000, **145**(2): 263—274

[7] 黄 , 于佳, 宋晓玲, 等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J]. 海洋水产研究, 1995, **16**(1): 11—23

[8] Nadala E C B Jr, P C Loh. A comparative study of three different isolates of white spot virus [J]. *Dis. Aquat. Org*. 1998, **33**: 231—234

[9] Marielle C W van Hulten, Westenberg M, Goodall S D, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. *Virology*, 2000, **266**(2): 227—236

[10] Meng-Feng Tsai, Chu-Fang Lo, Marlelle C W van Hulten, et al, Transcriptional Analysis of the Ribonucleotide Reductase Genes of Shrimp White Spot Syndrome virus [J]. *Virology*, 2000, **277** (1): 92—110

[11] 周国瑛, 吴建华, 沈学仁, 等. 核酸对对虾白斑病毒的一个可能的早晚基因的体外切割[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, **32**(3): 253—257

[12] 石正丽, Durand Stephanie, Bonami Jearr Robert. 用简并寡核苷酸探针筛选对虾白斑综合症病毒 DNA 多聚酶基因片断[J]. 中国病毒学, 2000, **15**(3): 302—307

THE CONSTRACTION AND ANALYSIS FOR cDNA CLONES OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS OF SHRIMP

SONG Xiao-ling[1], HUANG Jie[1], Kathy F. L TANG[2], YANG Bing[1] and Donald V. LIGHTNER[2]

([1] *Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;*

[2] *The Veterinary and Microbiology department, The University of Arizona, Tucson AZ 85721*)

Abstract: Shrimp gills of *Litopenaeus vannamei*, which have been infected by White Spot Syndrome Virus of shrimp, were collected after injecting 40-45 hours. The Poly(A)$^+$ mRNA were selected from purified gill's total RNA using Oligo(dT) cellulose in a filter syringe format. The double strand cDNA were catalyzed by AMV reverse transcriptase and *E. coli* DNA polymerase I in combination with *E. coli* RNase H and *E. coli* DNA ligase using the mRNA as a template. After ligating of Size-Fractionated cDNA to the Plasmid Vector PUC19 and introducing into *E. coli*, more than 1000 cDNA clones were harvest. We analysis the insert by PCR, analysis aim clones by dot-blot hybridization and sequenced terminal DNA sequence of 20 cDNA of White Spot Syndrome Virus clones. We still analysis the Open Reading Frame of cDNA clones by some computer software and Web server, analysis upstream DNA sequence of ORF and the character of putative protein. We have look up the alignment DNA and protein of cDNA in NCBI database. The results of PCR shown that the PCR products are from 0.3kb to 1.6kb. There are 313 clones its products are more than 1kb, this occupied 31.5% of all cDNA clones. There are 31.8% clones are WSSV cDNA clones by DNA dot-blot hybridization. 14 full or not full ORFs have been found in 13 clones. The upstream DNA sequence analysis shown that there are 7 ORFs have early promoter motifs and there are 4 ORFs have later promoter motifs, among of them there are 3 ORFs which have early and later promoter motifs too. And the enhancer motifs can be found in 4 ORFs, the G+C rich sequence is the common motif. The analysis of the special protein motif of ORF shown that the Zinc-finger motif can be found in 2 ORFs, Leucine Zipper motif can be found in 3 ORFs, the NTP binding motif can be found in 2 ORFs, and the nuclear localization signal motif can't be found in 14 ORFs. ORF S13 has alignment protein by BLAST in NCBI database.

Key words: White Spot Syndrome Virus; cDNA; Synthesis; Analysis