

中国大菱鲆虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的 PCR 扩增及序列分析

史成银^{1,2}, 王印庚¹, 黄 健¹, 王清印¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学 海洋生命科学院, 山东 青岛 266003)

摘要:应用同源 PCR 技术, 从被一种球状病毒感染的患病大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 脾脏和肾脏组织中扩增出了一段长度为 620 bp 的 DNA 片段。序列测定和 Blast 分析表明, 该 DNA 片段与鱼类虹彩病毒主要衣壳蛋白 (MCP) C 末端编码区的 DNA 序列高度相似, 由此证实感染养殖大菱鲆的这种球状病毒为一种鱼类虹彩病毒, 暂命名为大菱鲆红体病虹彩病毒 (TRBIV)。多序列比对和分析发现, TRBIV MCP C 末端的 205 个氨基酸序列与 GenBank 中 20 种虹彩病毒相应序列的相似性分别为 99.47% (韩国大菱鲆虹彩病毒)、97%—98% (待指定病毒属的 7 种病毒), 以及 50% 以下 (鲑病毒属、淋巴囊肿病毒属、虹彩病毒属的 12 种病毒), 由此绘制出了包含 TRBIV 在内的 21 种虹彩病毒的系统发育树。研究结果表明, 感染中国养殖大菱鲆的 TRBIV 属于虹彩病毒科待指定病毒属, 位于该属 ISKNV 亚群和 RSIV 亚群之间, 是该病毒属的一个新成员。

关键词:大菱鲆; 虹彩病毒; 主要衣壳蛋白基因; 聚合酶链反应; 序列分析

中图分类号:S941.41 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0588-06

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 原产于欧洲, 于 1992 年引进中国, 目前已成为中国北方沿海地区重要的工厂化养殖鱼类。但从 2002 年起, 山东半岛的多个大菱鲆养殖场流行一种传染性疾病。疾病的流行病学调查、病原的人工感染实验和病理学研究显示, 该病是一种病毒性感染症, 即大菱鲆病毒性红体病 (viral reddish body syndrome, VRBS), 其病原是一种感染大菱鲆的球状病毒。依据该病毒的精细结构、感染特征以及组织病理学特征, 推测该球状病毒是一种虹彩病毒^[1-3]。

国内外研究表明, 虹彩病毒的主要衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 既有高度的保守性, 又具有足够的变异性, 已成为虹彩病毒进化和分类的重要依据, 在虹彩病毒的分子生物学分类鉴定中得到充分的应用^[4-8]。为了在分子生物学水平上对感染养殖大菱鲆的球状病毒进行鉴定, 明确其分类地位, 本研究采用 PCR 技术, 使用依据鱼类虹彩病毒基因组保守区序列设计的特异性引物, 对该球状病毒进行基因克隆和序列分析, 构建病毒的系统发育树, 旨在对该病的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

患病大菱鲆于 2003 年 11 月分别取自山东省威海市乳山和烟台市莱州的两个大菱鲆养殖场。取病鱼脾脏、肾脏等组织冷冻于 -80℃ 冰箱中备用。同时从莱州的大菱鲆养殖场取 1 尾健康大菱鲆, 作为无病毒对照大菱鲆样品。暴发病鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 的脾组织由中国水产科学研究院珠江水产研究所惠赠, 作为虹彩病毒阳性对照样品。

1.2 显微观察

在显微镜下对患病大菱鲆的体征及组织进行观察。

1.3 PCR 引物

采用两对虹彩病毒的 PCR 引物进行病毒核酸的扩增, 第一对引物为: IRD-1F (5'-CTCAACACT CTGGCTCATC-3') 和 IRD-2R (5'-GCGT-TAAAGTAGTGAGGGCA-3'), 该对引物由 Kurita 等^[9]根据 RSIV 基因组 DNA 的一段 959 bp 长的 *Pst* I 酶切片断序列设计, 预期扩增产物 848 bp 左右, 由上海博亚生物技术有限公司合成。第二对引

收稿日期: 2004-12-08; 修回日期: 2005-03-09。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展项目 (2003AA622070); 国家自然科学基金项目 (30471338)。

作者简介: 史成银 (1971-), 男, 副研究员, 博士, 从事水生生物疾病与控制研究。E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

物为: MCP-irido5 (5'-GGAAGCTTCAAGTGAG-GAGCGTGA-3') 和 MCP-irido6 (5'-GGGAATTCAC-AGGATAGGGAAGCC-3'), 该对引物由 Sudthongkong 等^[6]根据 SBIV 主要衣壳蛋白的 cDNA 序列设计, 预期扩增产物 620 bp 左右, 由上海生工生物工程技术有限公司(简称上海生工)合成。

1.4 DNA 的提取和 PCR 扩增

取患病大菱鲆、健康大菱鲆及患暴发性鱼病鳊鱼等实验鱼的脾脏或肾脏组织各 50 mg, 采用 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH 公司)进行 PCR 模板的制备, 具体操作按试剂盒说明书进行, 最后溶解在 40 μ L pH 8.5 的 10 mmol/L Tris 缓冲液中。

对提取的各实验鱼的 DNA 样品, 分别使用 2 对 PCR 引物进行扩增。PCR 扩增的总体积为 20 μ L, 采用 AccuPower[®] PCR PreMix 试剂盒进行(韩国 BioNeer 公司), 反应体系包括: Taq DNA 聚合酶 1U, 4 种 dNTP 各 250 μ mol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, KCl 40 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 1 μ L 样品 DNA, 正向和反向引物各 25 pmol。PCR 扩增使用英国 Thermo Hybaid 公司的 PCR Express 仪进行。反应结束后, 取 10 μ L 反应产物在含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 置于紫外灯下观察、照相。

以 RSIV 的 959 bp *Pst* I 酶切片断为目标产物的扩增, 采用引物 IRD-1F 和 IRD-2R 进行反应, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

以虹彩病毒 MCP C 末端编码区为目标产物的扩增, 采用引物 MCP-irido5 和 MCP-irido6 进行反应, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.5 TRBIV MCP C 末端编码区的扩增、克隆和测序

为了克隆 TRBIV MCP 的 C 末端编码区, 采用以下 100 μ L 体系进行 PCR 扩增: TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶(宝生物工程大连有限公司, 简称大连宝生物)2.5 U, 4 种 dNTP(美国 Invitrogen 公司)各 250 μ mol/L, 10 $\times$ ExTaq 反应缓冲液(含 Mg²⁺)

10 μ L, 5 μ L 样品 DNA, 引物 MCP-irido5 和 MCP-irido6 各 50 pmol, 反应参数同 1.3。

620 bp 的目标产物通过凝胶电泳分离, 用凝胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)纯化后, 插入 T-A 克隆载体 pUCm-T(上海生工)中, 转化 *E. coli* DH5 α , 挑选白色菌落, 碱裂解法提取质粒, 用 *Pst* I(大连宝生物)单酶切鉴定插入片断。

将含插入片断的转化菌液提供给上海博亚生物工程有限公司, 使用 ABI PRISMTM 377 型 DNA 测序仪以 M13 通用引物和 T7 启动子引物进行双向测序并拼接出完整的序列, 对同一个克隆进行 2 次重复测序以保证序列的准确性。

1.6 虹彩病毒系统发育树的构建

采用 Blast 和 Omega 2.0 软件对拼接出的 TRBIV MCP 的 C 末端编码区核苷酸序列和推导出的氨基酸序列分别进行相似性比对和分析。分析过程中所用到的其他虹彩病毒 MCP 参比序列取自 GenBank。这些病毒的缩写、全称和 MCP 氨基酸序列的 GenBank 检索号详见表 1。

截取各虹彩病毒 MCP 的 C 末端氨基酸序列, 以 CLUSTAL W(1.60)软件排序后, 用 TREECON 软件^[10]通过邻位相连法构建虹彩病毒系统发育树, 分析大菱鲆红体病病毒的分类地位。

2 结果与分析

2.1 患病鱼特征

病鱼具有典型的病毒性红体病症状。电镜观察证实, 病鱼组织内存在球状病毒, 并严重感染。

2.2 TRBIV 的 PCR 扩增

应用第一对 PCR 引物(IRD-1F 和 IRD-2R)成功地从广东暴发性鳊鱼脾组织 DNA 样品中扩增出了 850 bp 的目标产物, 但未能从患病大菱鲆和健康大菱鲆的脾、肾组织 DNA 样品中扩增出任何产物。

应用第二对 PCR 引物(MCP-irido5 和 MCP-irido6)从乳山和莱州的患病大菱鲆脾、肾组织 DNA 样品以及广东暴发性鳊鱼脾组织 DNA 样品中均扩增出了与预计大小相符的大约 620 bp 的单一核苷酸片断。而从健康大菱鲆脾组织 DNA 样品中未能扩增出任何产物(图 1)。由此证明, 大菱鲆病致病病毒是一种不同于 RSIV 的鱼类虹彩病毒。

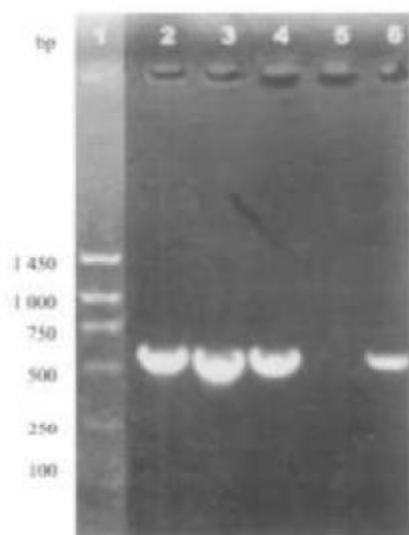


图1 使用引物 MCP-irido5 和 MCP-irido6 对大菱鲆病毒性红体病病毒(TRBIV)进行 PCR 扩增的结果

1: 250 bp DNA marker(上海生工); 2: 乳山病毒性红体病大菱鲆脾组织; 3: 莱州病毒性红体病大菱鲆脾组织; 4: 莱州病毒性红体病大菱鲆肾组织(与3属同一条鱼); 5: 莱州健康大菱鲆脾组织(阴性对照); 6: 广东暴发病鳊鱼脾组织(阳性对照)。

Fig.1 PCR amplification of turbot reddish body iridovirus (TRBIV) using primers MCP-irido5 and MCP-irido6

1: 250 bp DNA marker (Sengen, Shanghai); 2: Splenic DNA from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Rushan region; 3: Splenic DNA from diseased turbot in Laizhou region; 4: Kidney DNA from diseased turbot in Laizhou region (the same individual as 3); 5: Splenic DNA from healthy turbot in Laizhou region (negative control); 6: Splenic DNA from diseased mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) in Guangdong Province (positive control)

2.3 TRBIV MCP C 末端编码区的扩增、克隆和测序

用 TaRaKa Ex Taq DNA 聚合酶和引物对 MCP-irido5 & MCP-irido6, 从乳山和莱州的患病大菱鲆脾、肾组织 DNA 样品以及暴发病鳊鱼脾组织 DNA 样品中均扩增出了与预计大小相符的大约 620 bp 的单一核苷酸片段。PCR 扩增产物经凝胶电泳回收, 与 pUCm-T 载体连接, 然后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 次日含氨苄青霉素的各个 SOB 平板上均长出数百个克隆, 其中 80% 以上是白色克隆。随机挑取 18 个白色克隆, 抽提质粒后以 *Pst* I

酶切, 结果发现有 15 个克隆含有大小约 620 bp 的插入片段, 表明 PCR 扩增产物已成功克隆到了 pUCm-T 载体中。选取 4 个重组质粒重复测序并拼接, 得到 TRBIV MCP 的 C 末端编码区的序列。所得 DNA 序列长度为 620 bp, 编码 205 个氨基酸。该 DNA 序列和推导的氨基酸序列已登录到 GenBank 数据库中, 它们的检索号分别为 AY590687 和 AAT01301.1。

2.4 TRBIV MCP C 末端编码区序列分析和病毒系统发育树的构建

用 CLUSTAL W 软件对推测出的 TRBIV MCP 的 C 末端 205 个氨基酸序列和 GenBank 数据库中 20 种虹彩病毒 MCP 的 C 末端相应序列进行多序列排列和比对, 结果发现: TRBIV 和 2004 年在韩国养殖大菱鲆中发现的虹彩病毒(turbot iridovirus, TuIV)相似性最高(达 99.47%), 在 188 个氨基酸残基中(韩国学者测定的 TuIV 的 MCP C 末端编码区不完整, 未测出最末端的 17 个氨基酸序列), 仅有 1 个氨基酸残基不同(第 74 位); TRBIV 和 ALIV、DGIV、GSDIV、ISKNV、RSIV、SBIV 的相似性均达到 98%, 在 205 个氨基酸残基中, 分别有 2~4 个残基不同(第 30、81、163、170 和 173 位); TRBIV 和 RBIV 的相似性为 97%, 在 205 个氨基酸残基中, 有 5 个残基不同(第 30、163、170、173 和 194 位);除此之外, TRBIV 与其他虹彩病毒的相似性均在 50% 以下, 其中和 BIV、CIV、EHNIV、FV3、GIV、IIV6、ATV、TFV、LCDV 的相似性为 48%~49%, 和 SIV、TIV、WIV 的相似性最低, 仅为 41%~42% (表 1)。

根据以上虹彩病毒 MCP 的 C 末端 205 个氨基酸序列, 用 TREECON 软件构建的病毒系统发育树(图 2)。可以看出, 21 种虹彩病毒可以明显地分为 5 个组, 分别对应着虹彩病毒科 4 个不同的病毒属, 即: 第 1 组(包括 ALIV、DGIV、ISKNV、TuIV、TRBIV、GSDIV、SBIV、RSIV、RBIV)对应为待指定病毒属, 第 2 组(包括 TFV、FV3、BIV、ATV、EHNIV、GIV)对应为蛙病毒属, 第 3 组(LCDV)对应为淋巴囊肿病毒属, 第 4 组和第 5 组(包括 CIV、IIV6、WIV、TIV、SIV)对应为虹彩病毒属。在构建的虹彩病毒系统发育树上, TRBIV 与 RSIV 和 ISKNV 在分类地位上相近, 同属于第一组(待指定病毒属), 但它们处在不同的分支上。

表1 TRBIV和20种虹彩病毒MCP C末端205个氨基酸序列的相似性

Tab.1 Percentage amino acid sequence identity of MCP C terminal of TRBIV and 20 other iridoviruses

虹彩病毒缩写 Abbreviation of iridoviruses	虹彩病毒全称 Full names of iridoviruses	与 TRBIV 的相似性/% Identity to TRBIV	GenBank 检索号 Accession numbers in GenBank
ALIV	African lampeye iridovirus	98	BAC77293
ATV	Regina ranavirus	49	YP_003785
BIV	Bohle iridovirus	49	AAC32316
CIV	Chilo iridescent virus	48	AAK82135
DGIV	Dwarf gourami iridovirus	98	AAP37441
EHNV	Epizootic haematopoietic necrosis virus	48	AAC32315
FV3	Frog virus 3	49	Q67473
GIV	Grouper iridovirus	48	AAM00286
GSDIV	Grouper sleepy disease iridovirus	98	BAC77295
IIV6	Invertebrate iridescent virus 6	48	NP_149737
ISKNV	Infectious spleen and kidney necrosis virus	98	NP_612228
LCDV	Lymphocystis disease virus1	48	NP_044812
RBIV	Rock bream iridovirus	97	AAS59849
RSIV	Red sea bream iridovirus	98	BAC66968
SBIV	Sea bass iridovirus	98	BAC77297
SIV	Simulium iridescent virus	41	AAA66585
TFV	Rana tigrina ranavirus	49	NP_572010
TIV	Tipula iridescent virus	42	AAA46245
TRBIV	Turbot reddish body iridovirus	100	AA101301.1*
TuIV	Turbot iridovirus	99	BAD12494
WIV	Wiseana iridescent virus	41	AAE82568

注: *表示本研究结果。

Note: * means the result of present study.

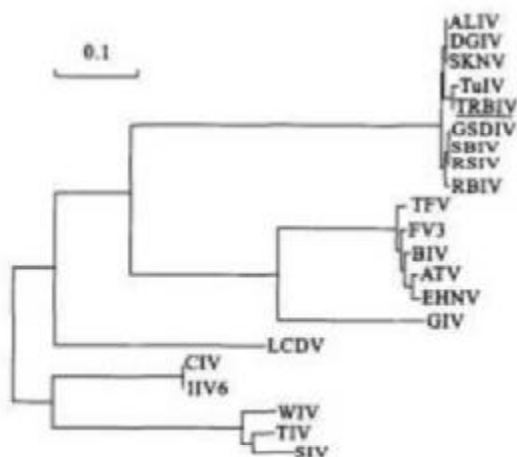


图2 根据 TRBIV 和 21 种虹彩病毒 MCP C 末端 205 个氨基酸序列绘制的虹彩病毒系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on deduced 205 amino acid sequences and the MCP C terminal in 21 iridoviruses

3 讨论

本研究采用鱼类虹彩病毒的 MCP 基因保守区 PCR 引物,成功地从患病大菱鲆组织 DNA 中扩增出了病毒特异性片段,从而首次证实感染中国养殖大菱鲆的球状病毒是一种鱼类虹彩病毒。迄今为止,文献[11]中已报道的感染大菱鲆的病毒有 8 种,分布在 6 个病毒科中。其中虹彩病毒自然感染大菱鲆的病例仅有丹麦学者 Bloch 等^[12]的报道,该病毒直径 160~185 nm,曾造成丹麦大菱鲆鱼苗大量死亡,死亡率高达 70%。而感染中国养殖大菱鲆的虹彩病毒明显较小,直径仅 120~130 nm。因此,本研究发现的感染大菱鲆的虹彩病毒与在丹麦发现的感染大菱鲆的虹彩病毒并不相同。为了与丹麦学者报道的大菱鲆虹彩病毒相区别,在此建议将在中国养殖大菱鲆中发现的虹彩病毒命名为“大菱鲆红体病虹彩病毒(turbot reddish body iridovirus, TRBIV)”。

本实验使用的另一对引物(IRD-1F 和 IRD-2R)是 Kurita 等^[9]根据真鲷虹彩病毒(RSIV)的 959 bp

Pst I 酶切片断设计的。文献[9,13-16]报道,使用该对引物可以从被 RSIV、SBIV (sea bass iridovirus) 和 TGIV (grouper iridovirus in Taiwan) 等鱼类虹彩病毒感染多种海水养殖鱼类如真鲷 (*Pagrus major*)、石斑鱼 (*Epinephelus* spp.)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 等组织内扩增出病毒特异性的目标片断。本研究使用该对引物也从被鳕鱼虹彩病毒 (ISKNV) 感染的淡水养殖鱼类——鳕鱼组织内扩增出了相应的目标片断。但是,使用该对引物却不能从 TRBIV 感染的大菱鲆组织内扩增出任何产物。这一结果说明,TRBIV 与广泛流行于日本、韩国、泰国和中国台湾省、广东省、香港地区的 RSIV、SBIV、TGIV 和 ISKNV 都不相同。至于 TRBIV 与 RSIV 和 ISKNV 在基因序列方面的具体差异,还有待于更深入地研究。

TRBIV MCP 的 C 末端 205 个氨基酸序列构建的病毒系统发育树清楚地显示,21 种虹彩病毒可以明显地分为 5 个组,前 3 组和由第 4、5 组组成的分支分别对应着虹彩病毒科 (Iridoviridae) 的 4 个病毒属,即将指定病毒属 (genus unassigned)、蛙病毒属 (Ranavirus)、淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*) 和虹彩病毒属 (*Iridovirus*)^[6-8,17]。其中待指定病毒属 (即第 1 组) 中的 9 种病毒又可以分为 3 个亚群,即 ISKNV 亚群 (包括 ALIV、DGIV、ISKNV), Tu-IV、TRBIV 亚群 (包括 TuIV、TRBIV) 和 RSIV 亚群 (包括 RBIV、GSDIV、SBIV、RSIV), 感染中国养殖大菱鲆的 TRBIV 处在 ISKNV 亚群和 RSIV 亚群之间。因此,TRBIV 应该属于虹彩病毒科待指定病毒属,是该病毒属的一个新的成员。大菱鲆红体病虹彩病毒分类地位的确定,为该病毒的分子生物学特性和检测技术的研究奠定了基础,对大菱鲆病毒性红体病的防治具有重要的意义。

在本研究发现 TRBIV 之后,韩国丽水国立大学 (Yosu National University, Yeosu, Korea) 的研究学者 Kitamura 等于 2004 年在韩国养殖的大菱鲆中也发现了一种大菱鲆虹彩病毒 (未发表)。在病毒 MCP C 末端编码区 568 bp 核苷酸序列中,中国大菱鲆红体病虹彩病毒 (TRBIV) 和韩国大菱鲆虹彩病毒仅有 3 个核苷酸的差异 (第 14、223 和 524 位)。因密码子的简并性,在推导的含 188 个氨基酸残基的多肽序列中,仅有 1 个氨基酸残基的差异 (第 74 位),这说明感染中国养殖大菱鲆的 TRBIV 和感染韩国养殖大菱鲆的虹彩病毒非常相似,很可能是同

一种虹彩病毒。但由于可供比较的资料太少,TRBIV 和 TuIV 的关系还需要进一步的调查和研究。

参考文献:

- [1] Shi C Y, Wang Y G, Yang S L, et al. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China [J]. *Aquaculture*, 2004, 236:11-25.
- [2] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) for virus isolation [J]. *Dis Aquat Org*, 2004, 60:241-246.
- [3] 史成银,王印庚,秦 雷,等.我国养殖大菱鲆病毒性红体病及其流行情况调查[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(1):1-6.
- [4] Mao J, Thiem T N, Gentry G A, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3 [J]. *Virology*, 1996, 216:431-436.
- [5] 张奇亚,肖 枫,李正秋,等.从我国分离的 3 株虹彩病毒与蛙病毒 3 型主要衣壳蛋白基因同源性的比较[J]. *病毒学报*, 2001, 17(4):272-274.
- [6] Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki T. Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries [J]. *Arch Virol*, 2002, 147:2 089-2 109.
- [7] He J G, Deng M, Weng S P, et al. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus [J]. *Virology*, 2001, 291:126-139.
- [8] Jancovich J K, Mao J, Chinchir V G, et al. Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America [J]. *Virology*, 2003, 316:90-103.
- [9] Kurita J, Nakajima K, Hirose I, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV) [J]. *Fish Pathol*, 1998, 33:17-23.
- [10] van de Peer Y, de Vachter R. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites [J]. *Comput Appl Biosci*, 1997, 13:227-230.
- [11] 史成银,王印庚,黄 健,等.大菱鲆病毒性红体病研究进展[J]. *高技术通讯*, 2005, 13(9):99-105.
- [12] Bloch B, Larsen J L. An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* fry in Denmark [J]. *Dis Aquat Org*, 1993, 15:235-240.
- [13] Chou H Y, Hsu C C, Peng T Y. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan [J]. *Fish Pathol*, 1998, 33:201-206.
- [14] Chao C B, Yang S C, Tsai H Y, et al. A nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) in cultured hybrid grouper, giant sea perch, and largemouth bass [J]. *J Aquat Anim Health*, 2002, 14:104-113.

- [15] Kim Y J, Jung S J, Choi T J, et al. PCR amplification and sequence analysis of irido-like virus infecting fish in Korea[J]. J Fish Dis, 2002, 25:121-124.
- [16] Wang C S, Shih H H, Ku C C, et al. Studies on epizootic iridovirus infection among red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), cultured in Taiwan [J]. J Fish Dis, 2003, 26:127-133.
- [17] Williams T, Chinchai, G. D, Durai G, et al. Family Iridoviridae. In "Virus Taxonomy. VIIth Report of the ICTV" (van Regenmortel, M H V, Fauquet, C M, Bishop, D H L, et al. Eds.) [M]. New York: Academic Press, 2000.

PCR amplification and sequence analysis of major capsid protein gene of turbot reddish body iridovirus (TRBIV)

SHI Cheng-yin^{1,2}, WANG Yin-geng¹, HUANG Jie¹, WANG Qing-yin¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Qingdao 266071, China; 2. Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Turbot, *Scophthalmus maximus*, has become an important marine aquaculture species in North China. Recently, more and more epizootic diseases of farmed turbot in China occurred because of high density stocking and improper management. In a disease survey of farmed turbot, a 'reddish body syndrome' (RBS) in both juveniles and adults was found. Further researches showed that an iridovirus-like agent was the causative pathogen of RBS that afflicts farmed turbot in China. To determine the taxonomic position of the virus, a genomic fragment of the virus was amplified and sequenced by PCR and DNA cloning techniques. Briefly, spleens and kidneys were removed from diseased turbot and DNA was extracted. A pair of PCR primers corresponding to the consensus sequence of piscine iridovirus genome was applied and a 620 bp of virus-specific DNA fragment was amplified successfully. After amplification, the PCR product was cloned into pUCm-T vector and sequenced by DNA cloning techniques. The determined nucleotide sequence was deposited into GenBank and the accession number is AY590687.1 (AAT01301.1). Blast analysis showed that the sequence is highly identical to the major capsid protein (MCP) gene of piscine iridovirus. The result showed that the virus was a new piscine iridovirus and subsequently named as turbot reddish body syndrome iridovirus' (TRBIV). Further analysis revealed that the sequence encoded 205 amino acid residues which were corresponding to the C-terminal of TRBIV MCP. Alignment of the deduced amino acid sequence of TRBIV MCP C-terminal and those from other 20 iridoviruses in GenBank showed that they had a degree of identity from 41% to 99%. Calculation of the match ratio showed that the deduced sequence of the TRBIV MCP C-terminal shared 99% amino acid identity with that of turbot iridovirus in Korea, 97% - 98% identity with red seabream iridovirus (RSIV) and infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), below 50% identity with those viruses belonging to genus *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* and *Iridovirus*. Based on the alignment, a phylogenetic tree of iridoviruses was yielded. The phylogenetic tree indicated that TRBIV was more closely linked to RSIV or ISKNV than to lymphocystis disease virus 1 or frog virus 3. TRBIV should be a new member of genus unassigned, family *Iridoviridae* and located between the subgroup of RSIV and subgroup of ISKNV in this genus.

Key words: *Scophthalmus maximus*; iridovirus; *Iridoviridae*; major capsid protein gene; PCR; sequence analysis