

鱼类弹状病毒分子生物学研究动态

阮红梅, 张奇亚

(中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 鱼类弹状病毒(Fish rhabdovirus)是一类引起鱼及其他水生动物致死性和流行性病害的重要病毒病原。对鱼类弹状病毒基因组的结构和功能研究,是深入探讨这类病毒感染和致病机理、研制病毒疫苗及诊断试剂的理论基础。本文就鱼类弹状病毒的基因组结构,包括 *N* 基因、*P* 基因、*M* 基因、*G* 基因、*NV* 基因、*L* 基因及编码的相应蛋白、3' 前导区和 5' 拖尾区、基因连接区等的组成及功能的研究进展作一综述,旨在抗病毒疫苗的研制及建立准确高效的检测方法提供借鉴。

关键词: 鱼类弹状病毒; 基因组; 编码蛋白

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)06-0513-07

迄今见报道的鱼类弹状病毒(Fish rhabdovirus)已有十几种,包括传染性造血器官坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、病毒性出血败血症病毒(Viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)、日本牙鲆弹状病毒(Hirame rhabdovirus, HIRRV)、蛇头鱼弹状病毒(Snakehead rhabdovirus, SHRV)、鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV)、梭子鱼苗弹状病毒(Pike fry rhabdovirus, PFRV)、弹状病毒 903/87(Rhabdovirus 903/87, 903/87)、鳊鱼弹状病毒(Mandarin fish *Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRv)、胭脂鱼弹状病毒(Chinese sucker rhabdovirus, CSRv)及新近分离到的海鲢弹状病毒 28/97(Sea trout rhabdovirus 28/97, STRV 28/97)等^[1-5]。这些病毒在欧、美、亚洲等地,引起淡、海水养殖的多种经济鱼类发生流行性病害,给水产养殖业造成巨大的经济损失和严重威胁。目前尚缺乏控制病毒病的有效药物和方法,随未经

检疫的鱼苗长途运输,使病毒宿主范围和地理分布呈扩大态势^[1,6]。对鱼类弹状病毒基因组结构、功能基因及其编码蛋白的深入了解和认识,将有助于抗病毒疫苗的研制及建立准确高效的检测方法,控制病毒病害的流行。

1 鱼类弹状病毒的特点及分类

鱼类弹状病毒的超微形态、基因组结构及蛋白质组成与哺乳动物弹状病毒基本相同^[7-8],呈弹状或杆状,基因组为不分节段的单股负链 RNA,大小为 11~12 kb,编码 5 种结构蛋白,即核蛋白(Nucleoprotein, N)、磷酸化蛋白(Phosphoprotein, P 或 M1)、基质蛋白(Matrix protein, M 或 M2)、糖蛋白(Glycoprotein, G)和 RNA 聚合酶(Polymerase, L)。IHNV、VHSV、HIRRV、SHRV 等和狂犬病毒(Rabies virus, RV)的蛋白质电泳图谱相似,而 SVCV、PFRV、903/87 等则和水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)相似,因此,在 20 世纪 90 年代初期,通常把这些鱼类弹状病毒划归为狂犬病毒属(Lyssavirus)或水疱性口炎病毒属(Vesiculovirus)^[9-10]。随着对病毒基因组结构的认识,发现原归入狂犬病毒属的鱼类弹状病毒,在 *G* 和 *L* 基因之间存在一个独特的、编码非结构蛋白(Non-virion protein, NV)的基因(后述)。据此,在国际病毒学

收稿日期: 2003-06-26; 修订日期: 2003-08-11.

基金项目: 国家“八六三”计划项目(2001AA626030, 2002AA626010); 国家自然科学基金项目(30170726); 中国科学院及其水生生物研究所创新基金项目(KSCX2-SW-302, 220313).

作者简介: 阮红梅(1973-), 女, 博士研究生, 现从事水生动物弹状病毒的分子生物学研究. E-mail: hongmeiruan@sina.com

通讯作者: 张奇亚. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

分类委员会 (ICTV) 第 7 次报告中, 正式把 IHNV、VHSV、HIRRV、SHRV 等列为弹状病毒科的一个新属: 诺拉弹状病毒属 (Novirhabdovirus), 而 SVCV、PFRV 等仍归为水疱性口炎病毒属的暂定种^[11]。

2 鱼类弹状病毒的基因组及其编码蛋白的研究

现已对 IHNV、VHSV、SHRV 和 SVCV 这 4 种鱼类弹状病毒进行了全基因组 cDNA 序列分析, 对 HIRRV、903/87、STRV 28/97、PFRV 等进行了部分 cDNA 序列分析^[4-5, 12-21] (见表 1)。

鱼类弹状病毒的基因组结构也主要是由 3' 端非翻译前导 (Leader) 区、基因区、基因间连接区及 5' 端非翻译拖尾 (Trailer) 区组成。排列方式有 2 种: 1 种为 3'Leader - N - P (M1) - M (M2) - G - NV - L - Trailer 5', 如 IHNV 等诺拉弹状病毒属成员; 另 1 种为 3'Leader - N - P - M - G - L - Trailer 5', 如 SVCV、903/87、STRV 28/97 等水疱性口炎病毒属成

员。

同属的鱼类弹状病毒, 基因组中各相应核苷酸序列间通常具有较高的同一性或相似性。对蛋白序列比较结果显示: L 蛋白间的同一性最高, 如 VHSV 和 IHNV 之间达 60%, SVCV 和 VSV 之间达 53.6%; 其它结构蛋白次之; 而非结构蛋白 NV 间的同一性则最低, 如 VHSV 和 HIRRV、IHNV 间的同一性分别为 16.5%、23.3%^[14, 16, 19]。

2.1 前导区及拖尾区

前导区内通常含有前导 RNA 转录终止信号及下游基因转录起始信号, 而拖尾区中含有上游基因转录终止和多聚腺苷酸化信号, 且基因组 3' 端和 5' 端呈反向互补, 这也是非节段负链 RNA 病毒的共同特征, 可能对平衡病毒的转录和复制过程起重要作用。此外, 弹状病毒基因组前导和拖尾区内还分别含有基因组核衣壳化、转录及复制起始、和包装等所必须的顺式作用原件^[22]。

表 1 部分鱼类弹状病毒的基因组及其编码蛋白特性
Table 1 Characterization of viral genome and its coding protein of fish rhabdoviruses

病毒 (株) Virus (strain)	GeneBank 登录号 GeneBank accession number	基因组 全长 (nt) Genome	N 蛋白 AA/MW pI	P 蛋白 AA/MW pI	M 蛋白 AA/MW pI	G 蛋白 AA/MW pI	NV 蛋白 AA/MW pI	L 蛋白 AA/MW pI
IHNV (Oregon)	X89213	11137	391/42.0	230/26.0	195/22.0	509/57.0	111/13.0	1986/225.0
IHNV (WRAC)	LA0883	11131	391/42.2 4.7	230/25.9 8.4	195/21.8 10.1	508/56.8 6.5	111/13.2 7.0	1986/225.2 7.6
VHSV (FI)	Y18263	11158	405/44.0	222/25.0	201/20.0	507/57.0	122/13.7 6.2	1984/224.0
VHSV (07-71)	U02624 (M1) U03502 (M2) U28746 (NV)		404/44.6	222/24.0 9.89	201/22.4 10.07		122/13.6	
VHSV (Makah)	U02630 (M1) U03503 (M2) U28745 (NV)			222/24.0 9.46	201/22.3 10.23		122/13.6	
HIRRV (8401H)	D45422 (M1, M2) U24073 (G) U47847 (NV)			227/25.8 8.68	193/21.6 9.7	508/56.6 6.12	111/12.7 8.4	
SHRV	AF147498	11550				512/58		
SVCV	AJ318079	11019	418/47.0 5.57	309/35.5 4.46	223/25.6 8.61	509/57.4 5.54	-	2095/238.0 8.63
903/87	AF434991		426/47.5 5.06	330/37.0 4.97	213/23.9 9.11	517/58.2 6.5	-	
STRV 28/97	AF434992		426/47.5 5.06	329/36.8 5.04	213/23.9 9.11	517/58.3 6.55	-	

注: nt - 为核苷酸数; AA - 蛋白的氨基酸残基数目; MW - 推算分子量大小 (kD); pI - 等电点; - : 表示无 NV 蛋白。

Note: nt - nucleotides; AA - Numbers of amino acids residues; MW - molecular weight (kD); pI - Isoelectric point; - : Gene not found in the viruses.

SVCV 前导区长 69 个核苷酸,其中,1~19 位可能为启动子,50~56 位的 GAAAAAT(指与基因组 RNA 互补的 cDNA 链;以下同)为前导 RNA 转录终止信号,60~64 位的 AACAG 为 N 基因的转录起始信号;拖尾序列长 49 个核苷酸,含有 L 基因的转录终止信号 TATG(A)₇,其末端的 GTCTTCGT 与前导序列末端 ACCAAGAC 的 8 个核苷酸呈反向互补^[19]。

IHNV 和 VHSV 的前导和拖尾序列均较长,前导分别为 174、167 个核苷酸,同一性达 51.8%,尤其是前 12 个核苷酸中有 10 个相同,仅第 5 和第 7 位不同,并且前 12~16 个核苷酸是转录和复制的启动子;拖尾分别为 154、151 个核苷酸,同一性达 43.3%,并且最后的 10 个核苷酸中有 9 个相同^[12-13,16]。最近,通过对 IHNV 和 VHSV 的前导、拖尾区以及报告基因组成的微基因组(Minigenome)研究表明,负责核衣壳化、转录和复制起始的顺式作用元件能被同源或异源的辅助病毒(或蛋白)识别,但只有在同源病毒辅助下,微基因组才能包装入病毒颗粒^[23]。

2.2 基因连接区

基因间的连接区内含有高度保守的上游基因转录终止和多聚腺苷酸化信号、下游基因转录起始信号、以及转录和起始信号间的间隔序列。比较 SVCV、903/87 和 VSV 印第安纳株(Vesicular stomatitis Indiana virus, VSIV)基因连接区显示:起始信号均为 AACAG;终止信号除 903/87 的 P 基因的是 TACG(A)₇外,其他均为 TATG(A)₇;SVCV、903/87 的间隔序列由 2~6 个核苷酸组成,但均含有 VSIV 的二核苷酸间隔序列 CT/GT^[4]。对 VSV 基因连接区的研究表明:在终止信号 TATG 序列中,G 最为重要,若发生突变,则将完全丧失 mRNA 合成的终止;减少 A₇ 序列的长度也将丧失转录终止作用;而间隔序列 CT/GT 对转录终止和起始起重要作用,且对聚合酶来说,间隔序列的特异性比其长度更为重要^[24-25]。

对诺拉弹状病毒属基因组研究的结果表明,各基因之间的连接区具有高度保守序列:IHNV 为 AGANAG(A)₇YGGCAC(N)₄CTG^[12-13],VHSV 为 AGATAG(A)₇YGGCAC(N)₃TRT^[16],HIRRV 为 AG-ATAG(A)₇TGGCAC(N)₄CTG^[18,20],其中,保守序列 AGAYAG(A)₇是转录终止和多聚腺苷酸化信号,类似于 VSV 或 RV 的 NTG(A)₇;而 GGCAC 可能是下

一个基因的转录起始信号,不同于其它弹状病毒共有的起始信号 AACA。AACA 序列也存在于 VHSV 和 HIRRV 基因连接区内,也可能是它们的起始信号,但该序列不存在于 HIRRV 的 G 和 NV 基因间的连接区及 IHNV 的基因连接区内^[12-13,18],因此,对这几类弹状病毒的起始信号还有待进一步研究。

2.3 N 蛋白

N 蛋白和病毒 RNA 紧密结合,形成抗核糖核酸酶的核糖核蛋白体 N-RNA 结构,并构成转录和复制的模板。903/87、STRV 28/97 N 蛋白中间部分 288~292 位是与 RNA 结合的基序(motif)SPYSS^[4-5],该基序在水疱性口膜炎病毒属、狂犬病毒属和暂时热病毒属(Ephemerovirus)中均是保守的,但不存在于诺拉弹状病毒属中^[26]。VHSV 中,N 蛋白和 RNA 结合的结构域也在其中间部位,但该结构域和其它已知的与 RNA 结合的蛋白序列间无明显同源性^[27]。此外,和 VSIV 的 N 蛋白缺乏磷酸化位点不同,鱼类弹状病毒的 N 蛋白含多个潜在的磷酸化位点^[4-5]。

2.4 P(M1)蛋白

P 蛋白是和聚合酶相关的磷酸化蛋白,它和 L 蛋白组成具有完整活性的 RNA 聚合酶复合体,转录 N-RNA 模板。903/87、STRV 28/97 的 P 蛋白内均含有 9 个潜在的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点和 1 个酪氨酸磷酸化位点,且 C 末端和 VSV 高度保守,该保守性结构域在 VSV 中是介导 P 蛋白和 N-RNA 复合体紧密结合^[5]。在 VSV 中,P 蛋白结构域 I 和 II 内的丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化分别调控基因组的转录和复制活性^[28]。

与 VSV、RV 类似,SVCV、903/87 和 STRV 28/97 的 P 蛋白呈酸性^[5-6],但 IHNV、VHSV 和 HIRRV 的 P 蛋白则呈碱性^[12,15,20],目前尚不清楚这种差异与其功能之间的关系。另外,SVCV P 蛋白的实际分子量(约 50 kD)高于推算分子量(35.5 kD),可能是由于 P 蛋白 N 端(45~88 位)存在一个大的负电荷结构域,导致电泳异常^[19],VSV 和 RV 的 P 蛋白也有类似情况。

有报道指出,在 VSV 的 P 基因中还套存着一个重迭的小开放阅读框(Opening reading frame, ORF),编码一个 55 氨基酸的强碱性、富含精氨酸的 C 蛋白,用人工合成的相应多肽制备的多克隆抗体可在受染的细胞中检测到该蛋白^[29]。在 IHNV、VHSV 及 HIRRV 等的 P 基因的相似位置内,也含有

一个类似的小 ORF,可编码大小分别为 42、46、25 个氨基酸、性质类似的蛋白,与 VSV 的 C 蛋白没有明显的序列同一性^[12,16,20]。至于这一推导的蛋白是否都能表达,是否在弹状病毒中具有保守性还不清楚。

2.5 M(M2)蛋白

鱼类弹状病毒的 M 蛋白也富含丝氨酸和苏氨酸,呈磷酸化,且高度碱性^[5,15,20]。M 蛋白具有多种重要的功能作用,主要是通过病毒的螺旋状核衣壳及插入宿主主膜内的 G 蛋白胞浆结构域相互作用,以启动病毒粒子的装配、出芽^[30]。SVCV、903/87、STRV 28/97 等和 VSV、RV 相似,其 M 蛋白 N 端也具有高度保守、富含脯氨酸的基序 PPXY(P 为脯氨酸,Y 为酪氨酸,X 为任意氨基酸),该基序和特异的细胞蛋白 WW 结构域相互作用,可能与病毒出芽紧密相关^[4,31]。实际上,在 VSV 内,若该基序发生突变,将降低病毒粒子的出芽率^[32]。

此外,RV 的基质蛋白还能调节病毒的转录和复制,这可能是非节段的负链 RNA 病毒的一种普遍机制^[33]。SVCV 和 VSV 的 M 蛋白相同,均能完全阻断拼接 mRNA、snRNA 和 snRNP 的核转运,并降低其他物质的核转运速率^[34]。而 IHNV 的 M 蛋白能抑制宿主细胞的基因转录,并能诱导细胞程序性死亡^[35]。

2.6 G 蛋白

G 蛋白即糖蛋白,其 N 端具有一段疏水性的信号肽,在内质网中被切除后成为成熟的糖蛋白。成熟糖蛋白包括胞外结构域、跨膜结构域和胞浆结构域 3 部分,在病毒粒子表面形成三聚体突起。903/87 和 STRV 28/97 的 G 蛋白 N 端前 19 个氨基酸可能形成信号肽;而位于 C 端 476~499 位的疏水区,推测为跨膜结构域^[4-5]。SVCV、HIRRV G 蛋白也含有两个主要的疏水区,分别构成信号肽和跨膜结构域^[18]。

胞浆结构域是一段较短的亲水性序列,可能和病毒粒子内的蛋白(如 M 或 N 蛋白)相互作用,使 G 蛋白集中于出芽位点,并能有效地促进病毒出芽;若缺失该序列,则病毒的出芽率大大降低^[30]。但最近也有报道显示,VSV G 蛋白集中于出芽位点的胞膜时,病毒粒子内的其他蛋白并不起重要作用^[36]。另外,对 IHNV 的研究显示,其 G 基因可被 VHSV 或 SVCV 的 G 基因替换,替换后的 IHNV 和野生型的 IHNV 一样,能在培养细胞内复制,这说明,异源 G 蛋白能插入到 IHNV 囊膜内,而无需胞浆结构域序

列的特异性^[37]。

弹状病毒的 G 蛋白内含有 2~6 个 N-糖基化位点及 12~16 个半胱氨酸残基。对 14 种不同属的弹状病毒 G 蛋白序列比对显示,G 蛋白的半胱氨酸残基、抗原位点和二级结构的重要原件(如 α 螺旋、 β 链及环)等的结构特征均具有显著的保守性^[38]。对诺拉弹状病毒属 4 种病毒的 G 蛋白比较研究结果也显示,位于膜外部分形成 6 个二硫键的 12 个半胱氨酸残基、剪切位点的谷氨酰胺及形成 O 联聚糖的苏氨酸,在 4 种病毒中均是保守的^[17]。半胱氨酸对维持 G 蛋白的结构、功能具重要作用,其位置在同属病毒 G 蛋白内高度保守,不同属内也有部分保守,并由此把弹状病毒分为类 VHSV 病毒、类 VSV 病毒、类 RV 病毒等^[39]。

G 蛋白是病毒的主要抗原,能诱导产生中和抗体和刺激细胞免疫,因此,通常选择 G 基因作为抗原基因来构建 DNA 疫苗^[40]。此外,G 蛋白还参与病毒与细胞受体的识别和结合等过程,并与病毒的毒力直接相关。对多个毒力强弱不同 VHSV 株 G 蛋白序列研究表明,病毒毒力与 G 蛋白的两个区有关,即 R I (135~161 位)和 R II (以 431~433 位为中心),其中 R I 区和弹状病毒 VSV、RV G 蛋白的推导融合肽同源,R II 区则和 VSV、RV G 蛋白发生构像改变的结构域同源,这两个区在结构上可能是相关联的,若同时发生突变,病毒毒力将进一步下降^[41]。而 IHNV 的弱毒株则与 G 蛋白的 78、218 位氨基酸或 276、419 位氨基酸的突变相关^[42]。

2.7 NV 蛋白

NV 基因是诺拉弹状病毒属所特有的基因,编码的 NV 蛋白,可通过特异的抗血清在受染细胞中检测到,但在纯病毒中则检测不到,说明它仅存在于感染细胞中,不存在于成熟病毒粒子中,为非结构蛋白^[43]。但 NV 蛋白在受染细胞中含量水平较低,推测它可能对病毒的感染、复制不具重要作用,或者仅有催化作用。对 SHRV 的 NV 基因敲除和病毒重组的研究表明,NV 蛋白对 SHRV 在鱼类细胞中复制没有重要影响^[44]。对 IHNV 的研究也表明,NV 蛋白不是病毒复制所必须,但它能明显促进病毒的生长,若缺少 NV 蛋白,则病毒增长变慢,病毒诱导的细胞病变速度降低^[45]。NV 基因的表达与 IHNV 感染产生的细胞病变(如细胞变圆)相关^[35]。

2.8 L 蛋白

L 蛋白是病毒最大的结构蛋白,也是病毒 RNA

依赖的 RNA 聚合酶,具有多种酶活性,包括核苷酸聚合活性、甲基化转移酶和鸟苷酸转移酶活性、以及多聚腺苷酸聚合酶活性等。和其他非节段的单链负链 RNA 病毒相似,鱼类弹状病毒的 L 蛋白中也具有 4 个高度保守的催化基序 A、B、C、D^[12-13,16],其中,存在于 IHNV 和 VHSV 的 L 蛋白基序 D 中的一个保守脯氨酸残基,在 VSV、RV 中则为甘氨酸残基所替换,在其它负链 RNA 病毒,如布尼亚病毒科和沙粒病毒科 L 蛋白的相同位置也出现这种变化,但其功能意义还不清楚。

3 结论

部分鱼类弹状病毒的基因组结构已阐明,其编码蛋白的性质和功能也被初步揭示,这为抗病毒研究及应用奠定了坚实的基础。根据 G、N 等基因的保守序列设计引物或制备探针,建立了 RT-PCR、原位杂交等快速、敏感、特异地检测病毒病原的方法^[46]。利用 G 基因构建的 DAN 疫苗也已取得明显的抗病毒成效^[47]。随着对鱼类弹状病毒分子生物学研究的深入,将不仅为在基因水平上揭示这类病毒的致病机理提供更充分的证据,并且有助于建立有效控制水生动物病毒病的方法和途径。

参考文献:

- [1] Granoff A, Webster R G. Encyclopedia of Virology[M]. Second edition. USA: Academic press, 1999. 558-568, 1 541-1 544.
- [2] 张奇亚, 李正秋. 在患病鲤鱼组织中观察到三种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44: 192-195.
- [3] Zhang Q Y, Li ZH Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*[J]. Dis Aquat Org, 2000, 42: 1-9.
- [4] Johansson T, Nylund S, Olesen N J, et al. Molecular characterization of the nucleocapsid protein gene, glycoprotein gene and gene junctions of rhabdovirus 903/87, a novel fish pathogenic rhabdovirus[J]. Virus Res, 2001, 80: 11-22.
- [5] Johansson T, Ostman - Myllyoja L, Hellstrom A, et al. A novel fish rhabdovirus from sweden is closely related to the Finnish rhabdovirus 903/87[J]. Virus Genes, 2002, 25: 127-138.
- [6] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, et al. Spring viremia of carp (SCV)[J]. Dis Aquat Org, 2002, 52: 261-272.
- [7] 沈加丽, 龚祖坝. 弹状病毒研究的新进展: I. 病毒的基因结构[J]. 中国病毒学, 1997, 12: 103-111.
- [8] 沈加丽, 龚祖坝. 弹状病毒研究的新进展: II. 病毒的结构蛋白、转录、复制和核衣壳化的研究[J]. 中国病毒学, 1998, 13: 281-291.
- [9] Kasornchandra J, Engelking H M, Lannan C N, et al. Characteristics of three rhabdoviruses from snakehead fish *Ophicephalus striatus*[J]. Dis Aquat Org, 1992, 13: 89-94.
- [10] Nishizawa T, Yoshimizu M, Winton J, et al. Characterization of structural proteins of hiram rhabdovirus, HRV[J]. Dis Aquat Org, 1991, 10: 167-172.
- [11] Walker P J, Benmansour A, Calisher C H, et al. Family Rhabdoviridae[A]. In: Van Regenmortel MH, Bishop DH, Fauquet CM (eds). The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. San Diego: Academic Press, 2000. 563-583.
- [12] Morzunov S P, Winton J R, Nichol S T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Virus Res, 1995, 38: 175-192.
- [13] Schutze H, Enzmann P J, Kuehling R, et al. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis virus[J]. J Gen Virol, 1995, 76: 2 519-2 527.
- [14] Kurath G, Higman K H, Bjorklund H V. Distribution and variation of NV genes in fish rhabdovirus[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 113-117.
- [15] Benmansour A, Paubert G, Bernard J, et al. The polymerase - associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and an avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus[J]. Virology, 1994, 198: 602-612.
- [16] Schutze H, Mundt E, Mettenleiter T C. Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus[J]. Virus Genes, 1999, 19: 59-65.
- [17] Johnson M C, Maxwell J M, Loh P C, et al. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. Virus Res, 1999, 64: 95-106.
- [18] Bjorklund H V, Higman K H, Kurath G. The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hiram rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses[J]. Virus Res, 1996, 42: 65-80.
- [19] Hoffmann B, Schutze H, Mettenleiter T C. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of spring viremia of carp, a fish rhabdovirus[J]. Virus Res, 2002, 84: 89-100.
- [20] Nishizawa T. Sequence analysis and expression of the M1 and M2 matrix protein genes of hiram rhabdovirus (HIRRV) [J]. Dis Aquat Org, 1997, 31: 9-17.
- [21] Stone D M, Ahne W, Denham K L, et al. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups[J]. Dis Aquat Org, 2003, 53: 203-210.
- [22] Conzelmann K K. Nonsegmented negative - strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes[J]. Annu Rev Genet, 1998, 32: 123-162.
- [23] Hoffmann B, Schutze H, Mettenleiter T C. Recognition of cis -

- acting elements of infectious haematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus by homologous and heterologous helper proteins[J]. *Virus Res*, 2003, 93: 79 ~ 89.
- [24] Barr J N, Whelan S P J, Wertz G W. Cis-acting signals involved in termination of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis include the conserved AUAC and the U7 signal for polyadenylation[J]. *J Virol*, 1997, 71: 8 718 ~ 8 725.
- [25] Stillman E A, Whitt M A. The length and sequence composition of vesicular stomatitis virus intergenic regions affect mRNA levels and the site of transcript initiation[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5 565 ~ 5 572.
- [26] Kouznetsov A, Buckle M, Tordo N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 1 005 ~ 1 013.
- [27] Said T, Bruley H, Lamoureux A, et al. An RNA-binding domain in the viral haemorrhagic septicaemia virus nucleoprotein[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 47 ~ 50.
- [28] Hwang L N, Englund N, Das T, et al. Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P[J]. *J Virol*, 1999, 73: 5 613 ~ 5 620.
- [29] Spiropoulou C F, Nichol S T. A small highly basic protein is encoded in overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus[J]. *J Virol*, 1993, 67: 3 103 ~ 3 110.
- [30] Garoff H, Hewson R, Opstelten D J E. Virus maturation by budding[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1 171 ~ 1 190.
- [31] Harty R N, Paragas J, Sudol M, et al. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding[J]. *J Virol*, 1999, 73: 2 921 ~ 2 929.
- [32] Jayakar H R, Murti K G, Whitt M. Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release[J]. *J Virol*, 2000, 74: 9 818 ~ 9 827.
- [33] Finke S, Mueller-Waldeck R, Conzelmann K K. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication[J]. *J Gen Virol*, 2003, 83: 1 613 ~ 1 621.
- [34] Petersen J M, Her L S, Dahlberg J E. Multiple vesiculoviral matrix proteins inhibit both nuclear export and import[J]. *PNAS*, 2001, 98: 8 590 ~ 8 595.
- [35] Chiou P P, Kim C H, Ormonde P, et al. Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host-directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures[J]. *J Virol*, 2000, 74: 7 619 ~ 7 627.
- [36] Brown E L, Lyles D S. Organization of the vesicular stomatitis virus glycoprotein into membrane microdomains occurs independently of intracellular viral components[J]. *J Virol*, 2003, 77: 3 985 ~ 3 992.
- [37] Biacchesi S, Béarzotti M, Bouguyon E, et al. Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a *Novirhabdovirus*[J]. *J Virol*, 2002, 76: 2 881 ~ 2 889.
- [38] Walker P J, Kongsuwan K. Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1 211 ~ 1 220.
- [39] Einer-Jensen K, Krogh T N, Roepstorff P, et al. Characterization of intramolecular disulfide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus[J]. *J Virol*, 1998, 72: 10 189 ~ 10 196.
- [40] Corbeil S, Lapatra S E, Anderson E D, et al. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines[J]. *Dis Aquat Org*, 1999, 39: 29 ~ 36.
- [41] Gaudin Y, de Kinkelin P, Benmansour A. Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1 221 ~ 1 229.
- [42] Kim C H, Winton J R, Leong J C. Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism[J]. *J Virol*, 1994, 68: 8 447 ~ 8 453.
- [43] Schutze H, Enzmann P J, Mundt E, et al. Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1 259 ~ 1 263.
- [44] Johnson M C, Simon B E, Kim C H, et al. Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication[J]. *J Virol*, 2000, 74: 2 343 ~ 2 350.
- [45] Biacchesi S, Thoulouze M I, Béarzotti M, et al. Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes[J]. *J Virol*, 2000, 74: 11 247 ~ 11 253.
- [46] Bergmann S M, Ariel E, Skall H F, et al. Comparison of methods for detection of an infection with different isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2002, 115: 385 ~ 389.
- [47] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, et al. DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12: 439 ~ 453.

Molecular biology of fish rhabdoviruses—Review

RUAN Hong-mei, ZHANG Qi-ya

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Fish rhabdoviruses are significant viral pathogens in aquaculture, and more than 10 species of rhabdoviruses, such as infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), hiram rhabdovirus (HIRRV), snakehead rhabdovirus (SHRV), spring viraemia of carp virus (SVCV), pike fry rhabdovirus (PFRV), rhabdovirus 903/87 (903/87), mandarin fish *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV), Chinese sucker rhabdovirus (CSRV) and Sea trout rhabdovirus 28/97 (STRV 28/97) have been isolated from cultured fishes. However, efficient remedies controlling the fish viral disease have not been found, and the shipment of infected eggs or fry has extended the viral host range and geographic distribution. Precise knowledge of viral genome is essential for further detailed studies on the replication of fish rhabdovirus and for possible genetic manipulation of the genome, opening up new ways for construction of vaccines and preparation of efficient diagnostic reagents. Here we outlined the advances of research on molecular biology of several fish rhabdoviruses including the structure of viral genome, nucleoprotein gene, phosphoprotein gene, matrix protein gene, glycoprotein gene, non-virion protein gene and polymerase gene and their encoding proteins, leader and trailer region, gene junctions and so on.

Key words: fish rhabdovirus; genome; encoded proteins

Corresponding author: ZHANG Qi-ya. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

(上接第522页 p522 continued)

Analysis on karyotype of diploid and triploid *Meretrix meretrix* (Linnaeus)

LU Zhen-ming¹, CHAI Xue-liang², LIU Bao-zhong³, FANG Jun², ZHANG Jiong-ming², LIN Zhi-hua², LI Tai-wu¹

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China;

3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: With larval chromosome as the research material, the karyotype of diploid and triploid *Meretrix meretrix* were analyzed by using hot dropping method. The results show that the karyotypic formula of diploid and triploid *Meretrix meretrix* are as follows: $2N = 38, 24M + 14SM, NF = 76$; $3N = 57, 36M + 21SM, NF = 114$. There is no significant difference between the two in terms of chromosome composition, and both show no isomerism nor satellite chromosome. Furthermore, the comparison of karyotype is also made between different species of Veneroida order, so as to lay a theoretic foundation for further researches on their evolutionary relationship.

Key words: *Meretrix meretrix*; diploid; triploid; karyotype

Corresponding author: LI Tai-wu.