

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15368

2013 年中国典型对虾养殖区白斑综合征病毒流行株高变异区序列的分析比较

孙新颖^{1,2}, 万晓媛¹, 刘庆慧^{1,3}, 黄健^{1,3}

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 为了解中国不同地区白斑综合征病毒的流行变异情况, 本研究取用 2013 年 3—12 月从 7 个省市发病地区采集到的 64 份 WSSV 阳性样本, 以特异的引物扩增目的片段, 通过测序分析不同样本的缺失及变异差异。结果显示, 在开放阅读框 ORF14/15 的扩增中, 分别有 6530 bp、6533 bp 和 5138 bp 的片段缺失, 而在 ORF23/24 扩增中有 12070 bp 大片段的缺失, 不同地区样本中未能成功扩增 ORF75, 而 ORF94 的重复单元数目分别为 0、3、4、12 不等, ORF125 的重复单元数目为 0、7。SNP 分析表明, 含有 3 个重复单元的 ORF94 在 48 位的碱基为 T、T、T, 重复单元数为 4 的在 48 位的碱基为 T、T、T、T, 重复单元数为 12 的在 48 位的碱基分别为 T 及 11 个 A。而 ORF125 所有重复单元数为 7 的情况在 8、18、25、66、69 位置的碱基均为 G、G、G、G、A, 在 9、50、53、61 位的碱基也普遍出现了变异。结果表明, WSSV 在中国不同地区存在一定程度的变异, 其在序列中的缺失、重复单元数目以及 SNP 的差异较为明显。

关键词: WSSV; ORF; 缺失; 变异; PCR

中图分类号: S945

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0693-11

随着全球水产养殖行业的发展, 其面临的病害也呈现日趋严重趋势^[1-3]。线头病毒科(*Nimaviridae*)白斑病毒属(*Whispovirus*)的唯一成员^[4]——对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)引起的白斑病, 自从 20 世纪 90 年代发现以来, 已经给全球各地区的水产养殖业带来不可估量的经济损失。WSSV 为较大的双链、环状的 DNA 病毒, 其基因组大小约为 300 kb, 感染后在数天内可导致 100% 的致死率^[5], 其可感染 40 余种甲壳纲动物以及水生浮游动物。

目前 GenBank 上公布有 4 种不同 WSSV 病毒株的基因组全序列, 分别是中国台湾株(TW,

AF440570)(307287 bp)、泰国株(TH, AF369029)(292967 bp)、中国株(CN, AF332093)(305107 bp)和韩国株(KR, JX515788)。起源于泰国株, 且具有目前最大基因组——312 kb 的 WSSV-TH-96-II (AY753327)则被假定成为祖先株^[6]。不同毒株的基因组之间序列比较相似, 会有 99% 的核苷酸保持一致性, 而其差异主要表现在: (1)大序列插入/缺失; (2)易于发生基因重组的可变区; (3)开放性阅读框(open reading frames, ORFs)内出现的重复单元变化差异(variable number tandem repeat, VNTR); (4)转座酶基因序列只存在于中国台湾株; (5)单核苷酸突变^[7-8]。通过研究 ORF14/15 和

收稿日期: 2015-09-24; 修订日期: 2016-01-11.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114401); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项。

作者简介: 孙新颖(1988-), 女, 硕士, 主要从事水产病害防控研究. E-mail: sxy16@163.com

通信作者: 刘庆慧, 研究员. Tel: 0532-85823062; E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

黄健, 研究员. Tel: 0532-85823062; E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

ORF23/24 的缺失变化, ORF75、ORF94 和 ORF125 的 VNTR 数目以及单核苷酸多态性(singlenucleotide polymorphisms, SNPs)差异已经被应用于 WSSV 流行病学研究^[9-11]。在 ORF75 上有两种重复单元 (repeat units, RUs), 分别为 45 bp 和 102 bp, 其中在 45 bp 片段的 3、15、30、40、42、45 位有 SNP, 102 bp 片段的前 45 bp 与前者一致, 另在 83 位也出现 SNP。在 ORF94 的大小为 54 bp 的 RUs 中, 其 48 位有 SNP。而 ORF125 的 69 bp 的 RUs 前两个与最后一个可由其特有的 SNP 加以区别, 其第三个至倒数第二个 RUs 于 8、18、25、66 和 69 位存在有 SNP, 这 3 个特殊片段在 SNP 分析是暂不涉及, 而对于总 RUs 则计算在内^[12]。之前报道的大多数流行病学研究往往只涉及 RUs 的数量^[10, 12-15], 然而每个 RUs 都可能存在 SNP, 这可能有助于区分含有相同数目 RUs 的两个毒株。流行病学调查的结果可能因为仅仅考虑 RUs 数目而忽略 SNP 而变得不同。

由于地理范围和宿主类别等环境的不同, 导

致了不同的毒株之间存在差异。通过对 WSSV 基因组分析, 不同毒株之间的差异往往体现在 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失, ORF75、ORF94 和 ORF125 的 RUs 数目以及 SNP 的差异。因此本研究针对 2013 年 3 月至 12 月从中国不同地区采集到的 64 份 WSSV 阳性样本, 通过特定的引物扩增目的片段, 继而分析比较不同地区各分离株 ORF14/15 和 ORF23/24 序列缺失情况, 以及 RUs 数目和 SNP 变化情况, 为 WSSV 分子流行病调查研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

实验样本为 2013 年 3—12 月 WSSV 病害爆发期间, 于海南、广西、广东、浙江、山东、河北以及天津七省市采集到的病虾。所有实验样本采集后均置于 -80°C 的冰箱冷冻保存。样本信息如编号、产地、品种以及各个样品的对应 ORF 上的重复单元数目见表 1。

表 1 WSSV 样本采集信息及 ORF75、ORF94 和 ORF125 的重复单元数
Tab. 1 WSSV samples and repeat units (RUs) present in ORF75, ORF94 and ORF125

序号 number	样品编号 sample number	产地 site	品种 species	重复单元 repeat unit			
				ORF75 (45 bp)	ORF 75 (102 bp)	ORF 94 (54 bp)	ORF 125 (69 bp)
1	20130312A	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
2	20130312B	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
3	20130312C	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
4	20130312D	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
5	20130312E	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
6	2013031202	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
7	2013031203	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
8	2013031204	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
9	2013031206	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
10	2013031207	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
11	2013031208	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
12	2013031209	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
13	2013031210	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
14	2013031211	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
15	2013031212	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
16	2013031213	海南三亚 H.Y	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
17	2013032502	广东湛江 G.Z	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
18	2013032505	广东湛江 G.Z	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
19	2013050401	河北沧州 H.C	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	0	7
20	2013050403	河北沧州 H.C	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	0	7

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab.1 continued)

序号 number	样品编号 sample number	产地 site	品种 species	重复单元 repeat unit			
				ORF75 (45 bp)	ORF 75 (102 bp)	ORF 94 (54 bp)	ORF 125 (69 bp)
21	2013050405	河北沧州 H.C	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	0	-
22	2013050406	河北沧州 H.C	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	0	7
23	2013050502	河北黄骅 H.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	0
24	2013051102	山东日照 S.R	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
25	2013051403	天津汉沽 T.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
26	2013052101	山东日照 S.R	中国对虾 <i>Penaeus orientalis</i>	-	-	3	-
27	2013052102	山东日照 S.R	中国对虾 <i>Penaeus orientalis</i>	-	-	-	-
28	2013052701	山东日照 S.R	中国对虾 <i>Penaeus orientalis</i>	-	-	-	-
29	2013060301	山东日照 S.R	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	-	-	-	-
30	2013060302	山东日照 S.R	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	-	-	-	-
31	20130629004	广西北海 G.B	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
32	20130722002	浙江宏野 Z.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	4	7
33	20130722003	浙江宏野 Z.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	4	7
34	20130902041	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
35	20130902044	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
36	20130902066	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
37	20130902052	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
38	20130902062	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
39	20130902064	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
40	20130902065	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
41	20130902068	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
42	20130902069	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
43	20130902070	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
44	20130902071	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
45	20130902072	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
46	20130902073	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
47	20130902078	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
48	20130902079	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
49	20130902080	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
50	20130902081	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
51	20130902083	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
52	20130902086	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
53	20130902092	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
54	20130902094	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
55	20130902095	山东即墨 S.J	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
56	20130926001	山东即墨 S.J	中国明对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
57	20131206001	海南三亚 H.S	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
58	20131207001	海南三亚 H.S	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
59	20131213002	山东潍坊 S.W	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-
60	20131215001	河北唐海 H.T	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	7
61	20131215002	河北唐海 H.T	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	-	-	-	-
62	20131215003	河北唐海 H.T	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	-	-	12	7
63	20131216001	河北黄骅 H.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	12	7
64	20131216002	河北黄骅 H.H	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	-

注: “-”表示未扩增出。

Note: “-” represents not amplified.

1.2 WSSV 核酸提取

从保存的样本中取约 30 mg 鳃组织, 按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)的说明进行 DNA 提取, 后将其保存至-20℃备用。

1.3 PCR 检测

将 WSSV DNA 样本按照 GB/T 28630.2—2012 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法进行检测。PCR 产物通过 TAE 电泳缓冲液配制的 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 PCR 扩增

将得到的 WSSV 核酸样本通过特定的引物进行 ORF14/15、ORF23/24、ORF75、ORF94 以及 ORF125 片段的扩增。实验中用到的 25 μL 体系包括: 2.5 μL 10×PCR 反应缓冲液(含 Mg²⁺), 17.3 μL 双蒸水, 2 μL 脱氧核苷酸混合物, 正向和反向引物各 1 μL, 0.2 μL Ex Taq DNA 聚合酶, 1 μL 待测核酸。PCR 扩增中使用的引物与反应条件见表 2^[10, 13, 16-18]。

表 2 PCR 扩增引物以及反应条件
Tab. 2 PCR primers and cycling conditions

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	预变性 initial denaturation	变性 denaturation	延伸 extension
ORF-14/15F	AATATGGAACGGACGGGTG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-14/15R	GACCAGCGCTCTTCAG			
ORF-23/24F	GTAGTGCATGTTCTCTAAAC	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-23/24R	GTAAGTTATTGCTGAGAAG			
ORF-75F	CTTTCACCGCTCTCA	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-75R	GGGTTCACAGAGAGACAGG			
ORF-94S	CTGGGTGGCATCGGTTAG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-94A	CGTCACTTTCGTGCGTAGT			
ORF-125F	CGAAATCTGATATGTTGTGC	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min	72℃ 7 min
ORF-125R	CCATATCCATTGCCCTTCTC			

1.5 基因克隆及片段分析

扩增后的 PCR 产物通过胶回收试剂盒进行胶回收, 待 Nannodrop 2000 测得 DNA 浓度后, 通过 pMD[®]18-T Vector 连接转化后的菌液送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。将 ORF14/15 片段与 TH-96-II 株比对, 分析序列缺失情况, ORF23/24 片段与中国台湾株(TW)比对, 通过 DNAMAN 软件分析 ORF94 和 ORF125 的 RUs 数目以及 SNP。

2 结果与分析

2.1 套式 PCR 检测结果

在所有采集到的 64 份 WSSV 样本中, 有 57 份样本在第一轮扩增中呈现阳性, 有 7 份样本在第二轮扩增中呈现阳性。

2.2 PCR 扩增结果

在对 WSSV 样本扩增中, 有 5 份样本(20#、22#、60#、62#、63#)出现 ORF14/15 的目的条带, 能够成功扩增样品的比率为 7.81%, 其中 62# 条带与其他条带相比片段较大(图 1), 除了河北省沧

州、黄骅和唐海, 其他地区样本中均未有目的条带出现。而在 ORF23/24 扩增中, 仅有 1 份(62#)河北唐海的样本有目的条带检出, 其余地区样本未有检出, 检出率为 1.56%(图 2)。针对 VNTR 的 ORF75 扩增, 并没有样本出现相应条带(图 3)。而在 ORF94 扩增中, 共有 9 份样本检出(19#、20#、21#、22#、26#、32#、33#、62#、63#), 而海南三亚、广东湛江、广西北海、山东即墨、山东日照、天津汉沽以及部分河北唐海和黄骅的样本未有检出(图 4), 检出率为 14.06%, 其中 26#、62#、63# 样本的目的条带较其他条带明显偏大, 而 32#、33# 的样本有两条扩增条带出现, 这可能是由于样本中 DNA 出现断裂或者是片段不完整造成。在 ORF125 扩增中, 有 25 份样本(17#、19#、20#、22#、23#、25#、32#、33#、36#、39#、42#、46#、47#、48#、49#、50#、51#、52#、53#、55#、56#、58#、60#、62#、63#)出现相应扩增条带, 检出率为 39.06%, 仅有广西北海、山东日照以及潍坊地区的样本未有检出(图 5)。

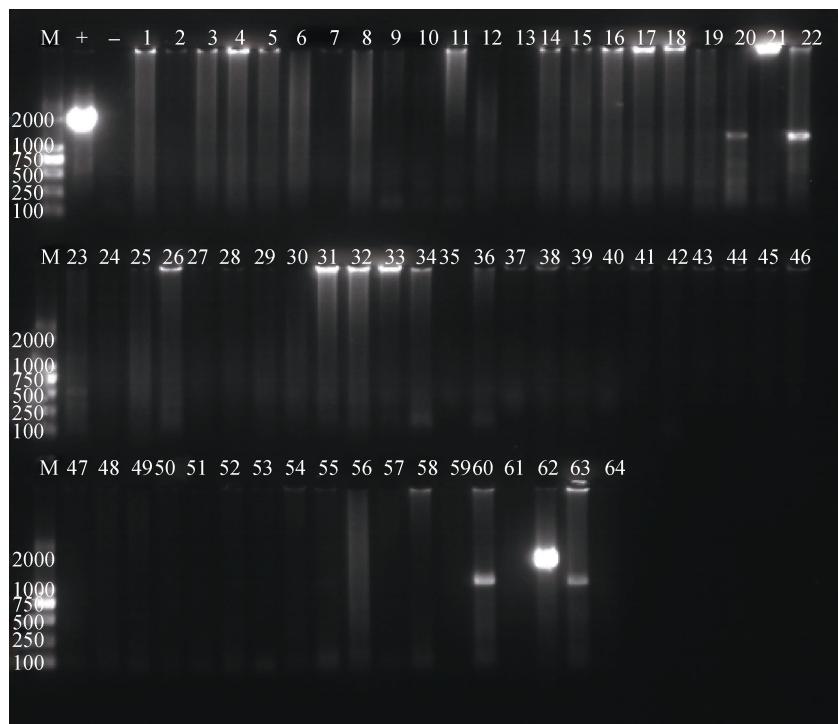


图1 引物 ORF14/15 的扩增结果

M: DNA marker DL 2000; (+)阳性对照; (-)阴性对照; 1~64: 样本编号.

Fig. 1 Amplification result of primer ORF14/15

M: DNA marker DL 2000; (+) positive control; (-) negative control; 1–64: number of samples.

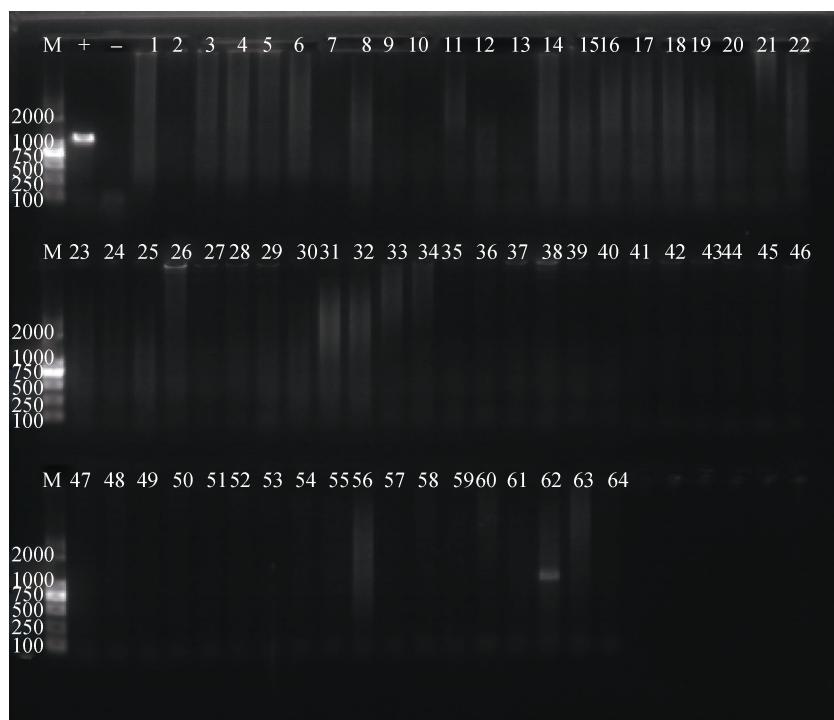


图2 引物 ORF23/24 的扩增结果

M: DNA marker DL 2000; (+)阳性对照, (-)阴性对照; 1~64: 样本编号.

Fig. 2 Amplification result of primer ORF23/24

M: DNA marker DL 2000; (+) positive control; (-) negative control; 1–64: number of samples.

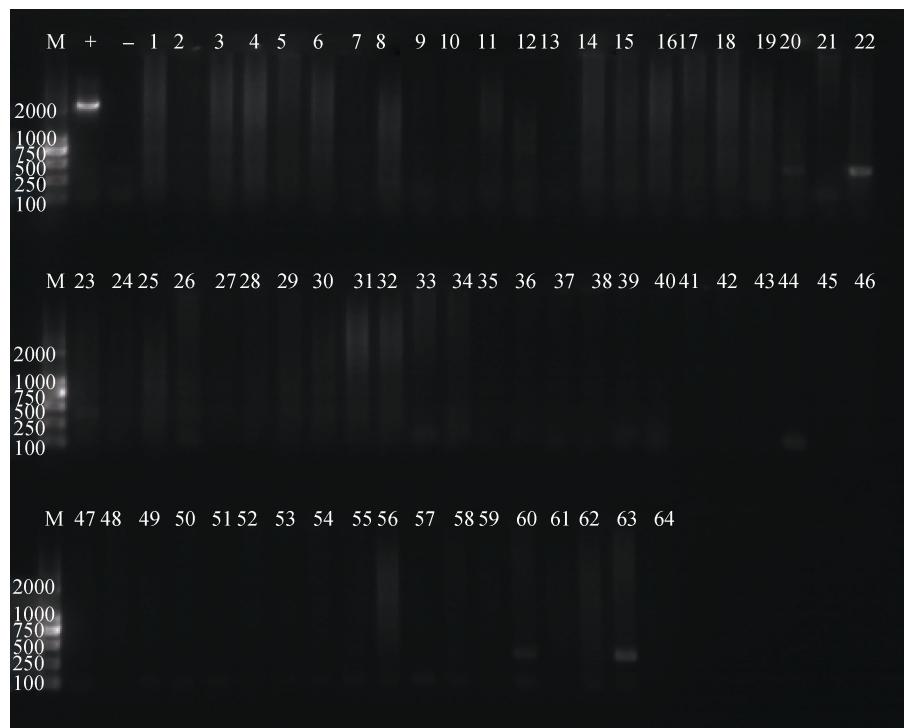


图 3 引物 ORF75 的扩增结果

M: DNA marker DL 2000; (+)阳性对照; (-)阴性对照; 1~64: 样本编号.

Fig. 3 Amplification result of primer ORF75

M: DNA marker DL 2000; (+) positive control; (-) negative control; 1~64: number of samples.

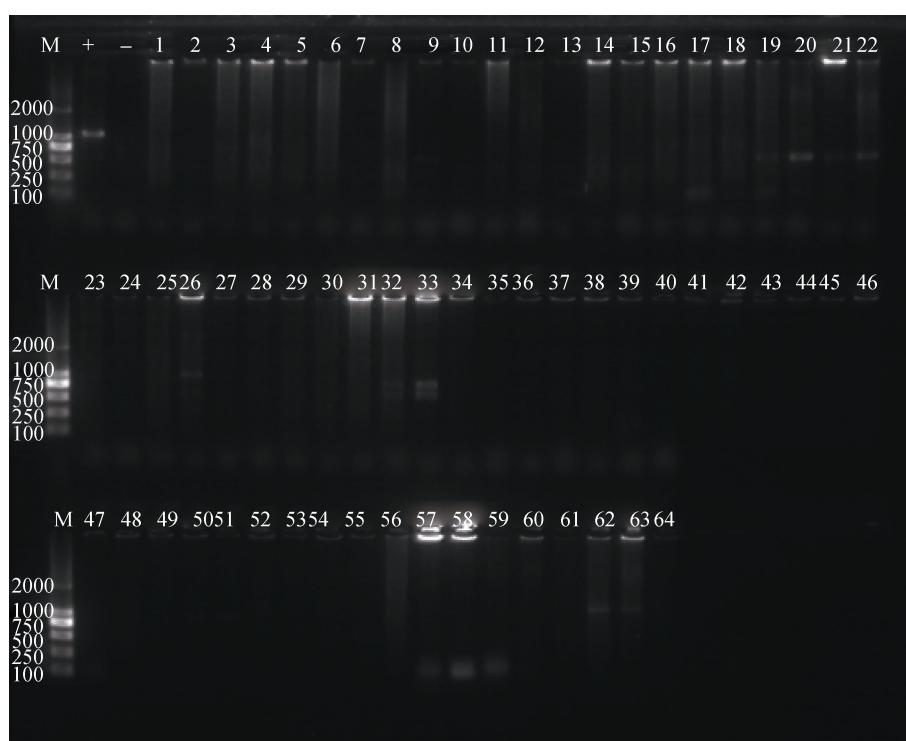


图 4 引物 ORF94 的扩增

M: DNA marker DL 2000; (+)阳性对照; (-)阴性对照; 1~64: 样本编号.

Fig. 4 Amplification of primer ORF94

M: DNA marker DL 2000; (+) positive control; (-) negative control; 1~64: number of samples.

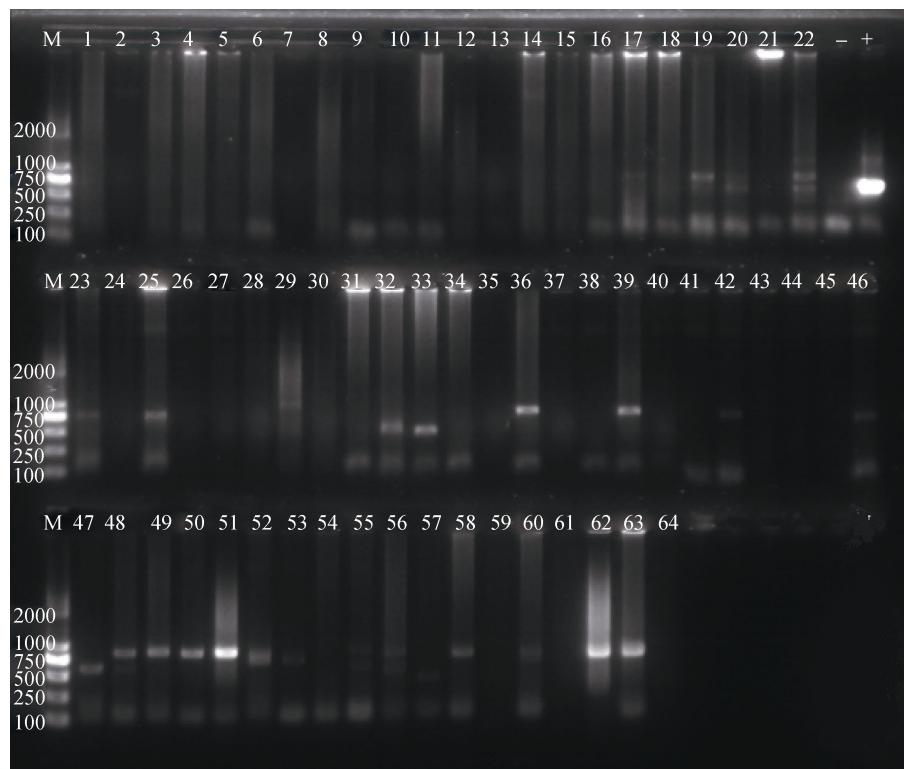


图 5 引物 ORF125 的扩增结果

M: DNA marker DL 2000; (+)阳性对照; (-)阴性对照; 1~64: 样本编号.

Fig. 5 Amplification of primer ORF125

M: DNA marker DL 2000; (+) positive control; (-) negative control; 1~64: number of samples.

2.3 序列比对

在所有样本的 ORF14/15 扩增中, 共有 3 种大小不同的片段可以扩增出来, 即 1270 bp(河北沧州, 河北唐海, 河北黄骅)、1267 bp(河北沧州)和 1892 bp(河北唐海), 通过与 TH-96-II 比对, 分别缺失 6530 bp、6533 bp 和 5908 bp(图 6)。而在 ORF23/24 扩增中, 仅在河北唐海地区样本(62#)中检测出 1140 bp 片段, 同此段区域最为完整的中国台湾株比对, 有 12070 bp 的大片段缺失(图 7)。

在 ORF94 扩增中, 出现了 4 种大小不一的片段, 分别为 591 bp(河北沧州)、482 bp(山东日照)、536 bp(浙江洪野)和 965 bp(河北唐海、河北黄骅), 将片段与重复单元比对可知, RUs 数目分别为 0、3、4、12。而在 ORF125 扩增中, 总共扩增出 2 种不同长度的片段, 一份河北黄骅样本为 810 bp, 其他均为 859 bp, 与特定的小序列对比, 其大小为 810 bp 的样本 RUs 数目为 0, 其余均为 7(表 1)。含有 3 个 RUs 的 ORF94 扩增片段在 48 位的碱基

为 T、T、T, 含有 4 个 RUs 的 ORF94 扩增片段在 48 位的碱基为 T、T、T、T, 含有 12 个 RUs 的 ORF94 扩增片段在 48 位的碱基分别为 T、A、A、A、A、A、A、A、A、A、A、A(表 3)。而 ORF125 不考虑 3 个特殊 RU, 结果显示所有 RUs 为 7 的情况在 8、18、25、66、69 位置的碱基均为 G、G、G、G、A; 在 9、50、53、61 位碱基出现 4 种变异(表 4)。

表 3 ORF94 区域各重复单元在 48 位的单核苷酸多态性
Tab. 3 Single-nucleotide polymorphism (SNP) patterns at position 48 on each repeat unit (RU) of ORF94 region

重复单元数目 no of RUs	SNP 类型 pattern of SNPs
3	T, T, T
4	T, T, T, T
12	T, A, A

3 讨论

本研究分析了 64 份于 2013 年 3—12 月采集后检测呈现 WSSV 阳性的样本, 涉及中国的海

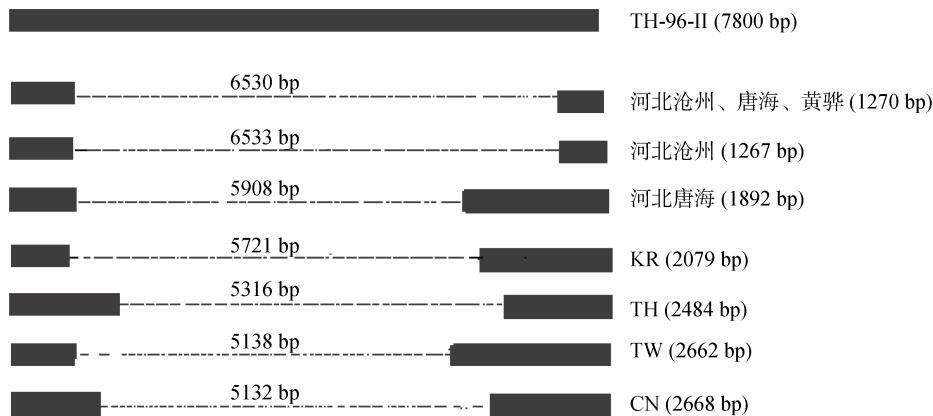


图 6 WSSV 不同毒株 ORF14/15 区域的序列比对

TW: 中国台湾株(AF440570); TH: 泰国株(AF369029); CN: 中国株(AF332093); KR: 韩国株(JX515788). 左右两边的矩形表示用引物 ORF14/15 扩增出的序列, 中间的虚线表示与 TH-96-II 毒株进行序列比对缺失的部分。括号内数字表示扩增片段大小。

Fig. 6 Scheme of deletion region of ORF14/15 in different WSSV strains

TW: strain of Taiwan, China(AF440570); TH: strain of Thailand(AF369029); CN: strain of China(AF332093); KR: strain of Korea(JX515788). Rectangles mean sequences amplified by ORF14/15. The imaginary lines in the middle mean sequences deletion compared to TH-96-II strain. Figures in the brackets mean the length of the amplified fragment.



图 7 WSSV 不同毒株 ORF23/24 区域的序列比对

TW: 中国台湾株(AF440570). 右边粗实线表示引物扩增之外的序列, 左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列, 中间的虚线表示与 TW 毒株进行序列比对缺失的部分, 矩形两边的数字表示与 TW 对应的碱基位置。

Fig. 7 Scheme of deletion region of ORF23/24 in different WSSV strains

TW: strain of Taiwan, China(AF440570). The right heavy line means the region outside the fragment amplified by the primers; the right and left rectangles mean sequences which can be amplified. The imaginary line in the middle means sequence deletion compared to TW strain. Figures on brackets indicate the originated and terminative position corresponding to the TW strain.

表 4 ORF125 区域各重复单元在 9、50、53、61 位点的单核苷酸多态性

Tab. 4 Single-nucleotide polymorphism (SNP) patterns at position 9, 50, 53, 61 on each repeat unit (RU) of ORF125 region

类型 pattern	位置 position			
	9(C)	50(T)	53(T)	61(T)
I	G	-	C	-
II	G	G	-	C
III	A	G	-	C
IV	G	-	C	C

注: 括号内碱基为原碱基。

Note: the base in brackets is the original base.

南、广东、广西、浙江、山东、河北以及天津 7 个省市。研究中对于 ORF14/15 与 ORF23/24 可扩增出的概率分别为 7.81% 和 1.56%, 其中仅有一份河北唐海的样本在两次扩增中均有条带出现。

而在 ORF75、ORF94、ORF125 的扩增中, 分别有 0、14.06% 及 39.06% 的样本出现对应的目的条带, 并且山东潍坊样本在 3 次扩增中均未有条带出现, 其他地区的样本均为部分可扩增, 值得注意的是, 62#河北唐山样本除了 ORF75 不能够扩增外, 其他四种扩增中均有目的条带出现。

在 ORF14/15 扩增中, 有 2 种相近的片段, 即 1267 bp 和 1270 bp, 与 TH-96-II 株相比, 分别有 6533 bp、6530 bp 的缺失。通过两者比对发现, 在第 383 个碱基之后, 1267 bp 的序列相对于 1270 bp 的序列缺失了 TCC 3 个碱基, 两者具有很高的相似性, 可能是由于在位点缺失或者插入碱基形成。扩增出的最大片段有 1892 bp, 其缺失 5908 bp。同一河北唐海地区的样本之间依然表现出缺失程度

的差异。

在样本 ORF23/24 扩增中, 仅 1 份样本成功扩出, 其余 63 份由于样本不完整或者是片段区域内出现了普遍性的变异, 因而导致无法扩增。在目前报道中, 中国株 ORF23/24 具有最小的片段缺失, 仅为 1169 bp; 泰国株的缺失程度最大, 为 13210 bp; 而韩国株的缺失程度中等, 为 5654 bp, 本研究中的缺失情况属于较大程度的大片段缺失。

本研究中, ORF75 均未有条带扩出, 可能是由于提取的片段已不完整, 也可能因为与设计的引物对应的片段区域出现较大幅度的变异。浙江宏野的样本在 ORF94 扩增中的片段最小, 但是河北沧州的 4 份样本虽扩增出 591 bp 的片段, 却不含有重复单元, 可能是由于片段中出现了较大的变异。ORF125 中重复单元为 7 的情况出现在除一份河北黄骅样本之外的其他可以扩增出的地区, 分布范围要相对广一些。Tang 等^[17]发现, ORF75 的重复单元数目均为 3; 而 ORF94 大多数序列缺失, 仅有 2 个样本出现了重复单元数目分别为 7 和 13 的情况; ORF125 的重复单元数目为 6、7、8 不等。Musthaq 等^[11]和 Waikhom 等^[19]的实验表明, 不同宿主中 ORF94 的重复片段序列表现出差异性, 即不稳定性。但最近也有与之完全相反的结论, Nicholas 等^[9]在实验中通过两种基因型分析表明, ORF94 的 VNTR 没有任何差异, Sindhupriya 等^[20]的实验表明, ORF94 的 VNTR 有微小的差异, 而 ORF75 和 ORF125 的 VNTR 没有表现出任何的差异。

通过增加 SNP 的分析有助于对 RUs 数目相同的毒株进行进一步区分。ORF94 中 RUs 数目为 3 的情况在之前的印度、索若拉和墨西哥等地区出现过, 但未进行 SNP 分析, 但可能与 Durán-Avelar 等^[21]发现的相同 RUs 数目的 SNP 类型一样, 即 G、T、T。Simrouni 等^[22]报道过 2 种 RUs 为 3 的情况, 其 SNP 类型分别为 G、G、G 和 T、T、T, 后者与本研究中 RUs 为 3 的 SNP 类型一致。Durán-Avelar 等^[21]报道 RUs 为 4 的有两种类型, 即 G、G、T、T 和 T、T、T、T, 后者类型与本研究相同。对于 RUs 为 12 的 SNP 类型尚未发现有

相同的类型。对于 ORF125 的 SNP 分析发现, 所有样本的特殊位点碱基均一致, 在 RU 之间也未有差异, 表现出了低基因变异概率。但是值得一提的是, 除了之前认可的 5 个位点, RU 在 9、50、53、61 位的碱基也普遍出现了变异。其中 9 位多为 G/A, 50 位为 G, 53 位为 C, 61 位为 C。

本研究结果表明, 中国不同地区 WSSV ORF14/15、ORF23/24 的缺失和 ORF94、ORF125 的 RUs 数目以及 SNP 有明显差异, 表明中国不同地区 WSSV 序列之间的差异确实存在, 而此种差异是否导致不同毒株的致病力差异, 或有利于更好地遗传复制并适应不同环境感染宿主尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Nakano H, Koube H, Umezawa S, et al. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials[J]. Fish Pathol, 1994, 29(2): 135–139.
- [2] Wongteerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, et al. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*[J]. Dis Aquat Org, 1995, 21(1): 69–77.
- [3] Karunasagar I, Otta S K, Karunasagar I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India[J]. Aquaculture, 1997, 153(1–2): 9–13.
- [4] Vlak J M, Bonami J R, Flegel T W, et al. Nimaviridae[R]/// Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2005: 187–192.
- [5] Lightner D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp[S]. Special publication of the World Aquaculture Society. LA, BatonRouge, 1996.
- [6] Balakrishnan P, Malathi S, Iddya K, et al. Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus[J]. Virology, 2008, 376(1): 24–30.
- [7] Tong G X, Li X Z, Wei X X, et al. Comparative analysis of deletion region of white spot syndrome virus genome among isolates in Guangxi[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2004, 23(1): 8–13. [董桂香, 黎小正, 韦信贤, 等. 白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析[J]. 上海海洋大学学报, 2004, 23(1): 8–13.]
- [8] Marks H, Goldbach R W, Vlak J M, et al. Genetic variation

- among isolates of white spot syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 2004, 149(4): 674–697.
- [9] Nicholas G, Mur P, Walker J. Stability of the WSSV ORF94 VNTR genotype marker during passage in marine shrimp, freshwater crayfish and freshwater prawns[J]. *Dis Aquat Org*, 2014, 111(3): 249–257.
- [10] Dieu B T M, Marks H, Siebenga J J, et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(12): 3607–3618.
- [11] Musthaq S S, Sudhakaran R, Ahmed V P I, et al. Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India[J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 34–41.
- [12] Pradeep B, Shekar M, Gudkov N, et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India[J]. *Dis Aquat Org*, 2008, 78(3): 189–198.
- [13] Dieu B T M, Marks H, Zwart M P, et al. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(5): 1164–1172.
- [14] Tan Y W, Shi Z L. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999[J]. *Virol Sin*, 2011, 26(2): 123–130.
- [15] Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. White spot syndrome virus: genotype, epidemiology and evolutionary studies[J]. *Indian J Virol*, 2012, 23(2): 175–183.
- [16] Marks H, van Duijse J J A, Zuidema D, et al. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp[J]. *Virus Res*, 2005, 110(1–2): 9–20.
- [17] Tang K F J, Groumellec M L, Lightner D V. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia[J]. *Dis Aquat Org*, 2013, 106(1): 1–6.
- [18] Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand[J]. *Dis Aquat Org*, 2003, 54(3): 253–257.
- [19] Waikhom G, John K R, George M R, et al. Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 54–63.
- [20] Sindhupriya M, Saravanan P, Otta S K, et al. White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species[J]. *Dis Aquat Org*, 2014, 111(1): 23–29.
- [21] Durán-Avelar M D J, Pérez-Enríquez R, Zambrano-Zaragoza J F, et al. Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010–2012[J]. *Dis Aquat Org*, 2015, 114(1): 11–20.
- [22] Simrouni M M, Mesbah M, Memari H R, et al. Sequence analysis of ORF94 in different white spot syndrome virus (WSSV) isolates of Iran[J]. *Iran J Fish Sci*, 2014, 13(2): 492–502.

Variation sequence comparison of shrimp WSSV from different parts of China in 2013

SUN Xinying^{1,2}, WAN Xiaoyuan¹, LIU Qinghui^{1,3}, HUANG Jie^{1,3}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is highly pathogenic to penaeid shrimp and has caused significant economic losses in the aquaculture industry worldwide. With the constant expansion of the areas and scale of prawn farming, variations between different strains of WSSV have emerged. The differences between isolates may cause variations in the virulence of WSS. Deletions in the ORF14/15 and ORF23/24 variable regions have been used as molecular markers to study the epidemiology of the virus. The repeat units of ORF75, ORF94, and ORF125 vary in different isolates and the numbers of repeat units in these three genomic regions are a useful marker for epidemiological studies and for genotyping strains of WSSV. However, each repeat unit may contain single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that are important for differentiating haplotypes with the same numbers of repeat units. The results of epidemiological studies may differ if the variability provided by these SNPs is not considered and only the number of repeat units is taken into account.

To understand the variations in WSSV ORF14/15 and ORF23/24 and the variable number of tandem repeats (VNTR) and SNPs located in ORF75, ORF94, and ORF125 in different regions of China, we investigated 64 samples that were WSSV-positive on PCR, collected in a disease outbreak area between March and December 2013. The tested samples were from Hainan, Guangdong, Guangxi, Zhejiang, Shandong, Hebei, and Tianjin. Using specific primers, WSSV-positive samples were genotyped with PCR and the amplified fragments were ligated to a T-vector and used to transform Top10 cells. The positive clones were selected and sequenced. After sequencing, the fragments deleted from ORF14/15 and ORF23/24 in different samples were compared with the sequences of Th-96-II and TW respectively, and the three WSSV VNTR regions and SNPs in ORF75, ORF94, and ORF125 from different samples were analyzed with the DNAMAN software. The results showed that there were five samples which had the products of ORF14/15 amplification, and one sample had the products of ORF23/24 amplification. The lengths of the amplified fragments of ORF14/15 were 1267 bp, 1270 bp, and 1892 bp, corresponding to deletions of 6533 bp, 6530 bp, and 5908 bp, respectively, compared with Th-96-II. One type of ORF23/24 was confirmed in this experiment, and the amplified fragment was 1140 bp, corresponding to a deletion of 12070 bp compared with the TW isolate. No fragment was amplified from ORF75. Four different ORF94 VNTRs, including 0, 3, 4, or 12 repeat units, were identified. The ORF125 VNTR, which included 0 or 7 repeat units, was identified. The SNP analysis showed that the bases on the special site in this study were different from the reported types. The bases at site 48 in ORF94 were T, T, T (Type I: 3 RUs), or the bases at site 48 were T, T, T (Type II: 4 RUs), and the base were T and 11 A (Type III: 12 RUs), respectively. The bases at site 8, 18, 25, 66, and 69 in ORF125 (contained 7 RUs), were G, G, G, G, and A, respectively. It is noteworthy that there were also some variations at sites 9, 50, 53, and 61 in ORF125. These results suggest that there are certain degrees of prevalence and variation in WSSV, which causes white spot disease in most parts of China, with clear variations between the different strains in ORF14/15, ORF23/24, ORF75, ORF94, and ORF125.

Key words: WSSV; ORF; deletion; variation; PCR

Corresponding author: LIU Qinghui. E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn; HUANG Jie. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn