

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01196

白斑综合征病毒江苏分离株变异区和缺失区基因的序列比较

薛晖, 王晓丰, 丁正峰, 唐建清

江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017

摘要: 为了解白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)在养殖克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中的感染流行情况和分子流行病学特征, 以及探讨不同病毒株间的遗传进化差异, 2008 年 7 月至 2010 年 6 月在江苏各主要克氏原螯虾养殖产区共采集了 83 份样品, 应用环介导等温扩增技术(LAMP)检测 42 份样品为病毒感染阳性, 阳性率达 50.6%。在此基础上考虑地理和时间因素选取了兴化、盱眙等地的 6 份样品, PCR 扩增、克隆了样品中所携带病毒的变异区和缺失区基因并对其进行了测序。分析结果显示, 在变异区除兴化毒株为 1 829 bp 之外, 其余各分离株间差异微小, 均在 1 440 bp 左右; 而在缺失区各毒株大小均为 384 bp, 且核苷酸序列完全一致。随后将各分离株序列与 GenBank 已公布的毒株做进一步的序列比较分析, 结果表明在江苏境内流行的兴化毒株与其余毒株间存在明显差异, 在遗传上相距较远, 并且推测 WSSV 变异区和缺失区可能是各自独立进化变异的; 同时, 缺失变小的病毒基因组更易于适应宿主和环境的变化。

关键词: 白斑综合征病毒; 变异区; 缺失区; 序列分析

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1196-06

近年来克氏原螯虾养殖产业发展迅速, 已成为最具特色、最具潜力的养殖品种之一。伴随集约化养殖程度的不断提升, 产业的快速发展中也凸现出诸多问题, 白斑综合征病毒病即为其中之一。2007 年 5 月江苏省首次发现白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行, 并造成克氏原螯虾的批量死亡^[1]。白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是一种基因组大小约 300 kb 的双链环状 DNA 病毒, 隶属于线头病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(*Whispovirus*)^[2]。由 WSSV 引起的对虾白斑综合征最早暴发流行于中国福建省, 随后迅速波及东南亚其他地区, 现已广布世界各地, 给对虾养殖业造成了巨大的经济损失^[3]。WSSV 宿主范围十分广泛, 近年来的研究发现养殖克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)自然条件下也能够感染发病, 死亡率最高达 52%^[1], 使尚处于发展中的克氏原螯虾产业面临诸多挑战。

迄今已有 3 个分离株的 WSSV 基因组全序列在 GenBank 公布^[4], 分别是台湾株 (WSSV-TW, AF440570)、中国大陆株 (WSSV-CN, AF332093)和泰国株(WSSV-TH, AF369029)。Marks 等^[5]发现这 3 株病毒总体上的序列相似度达 99.32%, 差异主要体现在: (1)大片段序列缺失区 ORF23/24; (2)易于发生基因重组的变异区 ORF14/15; (3)转座酶基因序列存在与否; (4)同源重复区内重复单元数目不等; (5)单核苷酸的缺失、插入及多态性。Pradeep 等^[6]将 WSSV 缺失区 ORF23/24 和变异区 ORF14/15 列为分子流行病学、遗传进化追溯的首选研究对象。基于上述考虑, 本研究对 2008 年 7 月至 2010 年 6 月在江苏省内各地采集的 83 份克氏原螯虾样品进行了 WSSV 检测, 随后选取其中的 6 份 WSSV 阳性样品, PCR 扩增、克隆并测序分析病毒的变异区和缺失区基因, 希望以此来探讨不同病毒株间的遗传进化差异。

收稿日期: 2011-01-26; 修订日期: 2011-04-08.

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201003070); 江苏省农业科技支撑计划项目 (BE2010378).

作者简介: 薛晖(1968-), 男, 高级工程师, 从事水产病害研究. E-mail: jsxuehui@163.com

1 材料与方法

1.1 样品采集

本实验室于 2008 年 7 月至 2010 年 6 月先后赴江苏盱眙、泗阳、南京等克氏原螯虾主产区采集了 83 份样品, 单尾平均体质量约 21 g, 所有样品均冷冻保存在-20 ℃ 冰箱, 用于进一步分析 WSSV 遗传进化特征的 6 份样品信息详列于表 1。

表 1 克氏原螯虾样品来源信息
Tab.1 Details of *Procambarus clarkii* samples from six farms in Jiangsu Province

毒株命名 denomina- tion	采样地点 sampling place	采样时间 sampling date	体长/cm length	体质量/g weight
XH	兴化	2008-09-01	7.20	27.76
SY	泗阳	2008-10-09	6.83	19.66
XY	盱眙	2009-07-01	7.05	26.13
DF	大丰	2010-04-26	6.77	18.08
DY	丹阳	2010-06-02	6.51	17.32
PK	浦口	2010-06-21	6.62	18.02

1.2 试剂

Bst DNA 聚合酶(M0275)购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; 高保真 DNA 聚合酶、*pEASY-T1* 克隆试剂盒及凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 增菌用 LB 肉汤购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 LAMP 技术检测 WSSV

参照文献[3]制备病毒 DNA 模板, 并运用环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术对采集的 83 份小龙虾样本进行 WSSV

检测, 检测所需引物序列系参考文献[7]由上海生工生物工程技术有限公司合成。25 μL 检测反应体系包括: 10×ThermoPol 反应缓冲液 2.5 μL, dNTP 的终浓度各为 0.2 mmol/L, 甜菜碱的终浓度为 1.6 mol/L, 外引物对 WSSV- F3/B3 各 0.2 μmol/L, 内引物对 WSSV-FIP /BIP 各 1.6 μmol/L, 8 U/μL 的 *Bst* DNA 聚合酶 1 μL, DNA 模板 1 μL, 双蒸水补齐体积。检测反应程序是: 95℃预变性 5 min; 冰上冷却加酶, 65℃恒温 60 min, 80℃ 10 min 终止反应。

1.4 PCR 扩增 WSSV 变异区和缺失区基因

挑选 6 份经 LAMP 技术检测阳性的小龙虾样品(表 1)用于扩增病毒基因组的缺失区 ORF23/24 和变异区 ORF14/15, 25 μL PCR 反应体系包括: 10×PCR 反应Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL, 4 种 dNTP 的终浓度为 200 μmol/L, 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL, 5 U/μL 的高保真 DNA 聚合酶 0.3 μL, DNA 模板 2 μL, 余者以双蒸水补齐体积。扩增 ORF14/15 的反应程序是: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 5 个循环; 94℃变性 30 s, 53℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 25 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。扩增 ORF23/24 的反应程序仅在前后 2 次循环的退火温度上有所改变, 分别是 54℃和 52℃。引物序列信息列于表 2。

1.5 PCR 产物克隆及测序分析

上述 PCR 产物经凝胶回收之后, 参照 *pEASY-T1* Cloning Kit 使用说明书对纯化产物进行 TA 克隆, 并在含有 IPTG、X-gal 的平板培养

表 2 扩增 WSSV 变异区和缺失区基因的引物序列信息
Tab.2 Primers used to amplify the variable and deletion region of WSSV

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	理论产物大小/bp size of PCR product		
		TH	CN	TW
ORF14/15-F	TGGAAATGGAGATGCGAACC	1265	1450	1442
ORF14/15-R	ATAATGGAGGCGAGACTTGC			
ORF23/24-F	CTCTATGGAACGCCAGTAC	—	5115	6276
ORF23/24-R	GACATTCGAGACATTCTAAAG			

注: TH、CN、TW 分别指 WSSV 泰国株、中国大陆株和台湾株, 引物即参照这 3 株病毒序列设计, “—”表示引物 ORF23/24-F/R 无法扩增 TH 株。

Note: TH, CN and TW mean WSSV strains which were isolated from Thailand, China and Taiwan. Primers above were designed referring to these three WSSV isolates, and “—” denotes primer pair ORF23/24-F/R can not amplify deletion region of WSSV-TH strain.

基上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落接种添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 过夜振荡培养, 按 1.4 方法鉴定阳性重组子, 剩余菌液送上海生物工程技术服务有限公司测序。测序结果提交 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 T-Coffee (<http://www.tcoffee.org/>) 进行序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 WSSV 检测结果

应用 LAMP 技术检测所采集的 83 份小龙虾样品, WSSV 阳性样品有 42 份, 阳性率 50.6%, 图 1 显示了部分阳性样品的电泳结果。

2.2 WSSV 变异区和缺失区基因扩增结果

选择 6 份经 LAMP 技术检测为阳性的小龙虾样品, 用于扩增病毒基因组的缺失区 ORF23/24 和变异区 ORF14/15, PCR 扩增结果见图 2。

2.3 PCR 产物克隆及测序结果

将 PCR 产物的目的条带切胶回收后进行 TA 克隆, 蓝白斑筛选并且 PCR 鉴定阳性者送测序, 测序结果显示: 在 ORF14/15 变异区, 除 XH 株为 1 829 bp 之外, 其余各分离株间差异微小, 均在 1 440 bp 左右; 而在 ORF23/24 缺失区各毒株大小均为 384 bp, 且核苷酸序列完全一致。

随后将各分离株序列与 TW、CN、TH 及推定的 WSSV 祖先毒株^[6](TH-96-II, Acc.No.AY

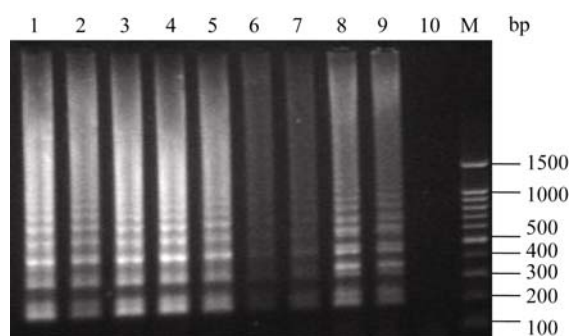


图 1 LAMP 技术检测小龙虾样品部分阳性电泳结果
M: 100bp DNA ladder, 1~9 号泳道分别是不同来源小龙虾阳性样品, 10 号泳道是阴性对照。

Fig.1 Electrophoresis results of some WSSV-positive *Procambarus clarkii* samples detected by LAMP method
M: 100 bp DNA ladder; lanes 1–9 are different *P. clarkii* samples; lane 10 is negative control.

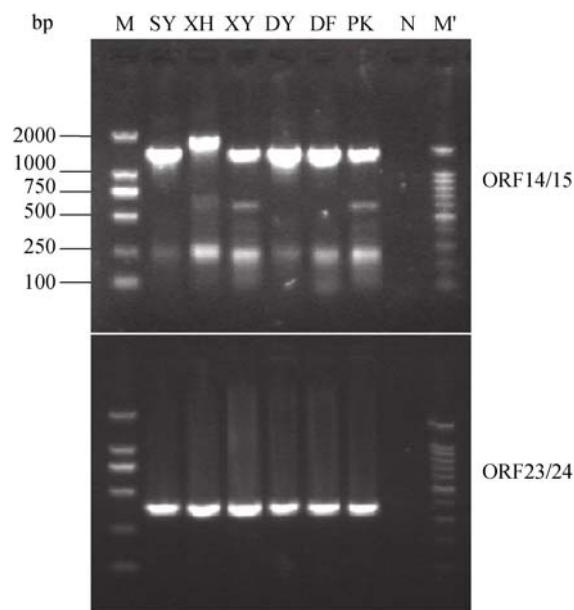


图 2 PCR 扩增 WSSV 变异区和缺失区电泳结果
M: Trans2K DNA marker; M': 100 bp DNA ladder; N: 阴性对照;
其余泳道上端缩写参看表 1。

Fig.2 PCR amplification of variable and deletion regions of WSSV

M: Trans2K DNA marker; M': 100 bp DNA ladder; N: negative control; abbreviation at the top of lanes are shown in tab. 1.

864665) 分别进行了序列比对分析。在 ORF23/24 区域, 江苏本地毒株与 TW 株比, 均缺失了 5 892 bp; 而相较于 CN 株, 则均缺失了 4 731 bp, 该结果与于洪涛^[8]对山东、河北等地采集的凡纳滨对虾及中国对虾的 WSSV 研究完全一致。在 ORF14/15 区域, TH-96-II 毒株序列最为完整, 实验中所用引物理论上能够扩增出 6 580 bp, XH 株扩增出的 1 829 bp 与之有 99.7% 的相似性, 变异区 5'端有 518 bp, 3'端有 1 311 bp, 中间部分缺失 4 751 bp。其余 5 个实验毒株与 TW 株最为相近, TW 株与 TH-96-II 毒株相比, 变异区 5'端有 66 bp, 3'端有 1 376 bp, 中间部分缺失 5 138 bp。因此, 相较于 TW 株, PK、DF、DY、SY 和 XY 5 个毒株在变异区 5'端的 66 bp 完全相同, 而在 3'端也都仅有 1 个核苷酸的变异, 无一例外地由胸腺嘧啶突变为胞嘧啶; 并且 DY 株缺失 1 个核苷酸, SY 和 XY 株缺失 2 个核苷酸。图 3、4 详细绘制了不同毒株在不同遗传区域的序列比较情况。

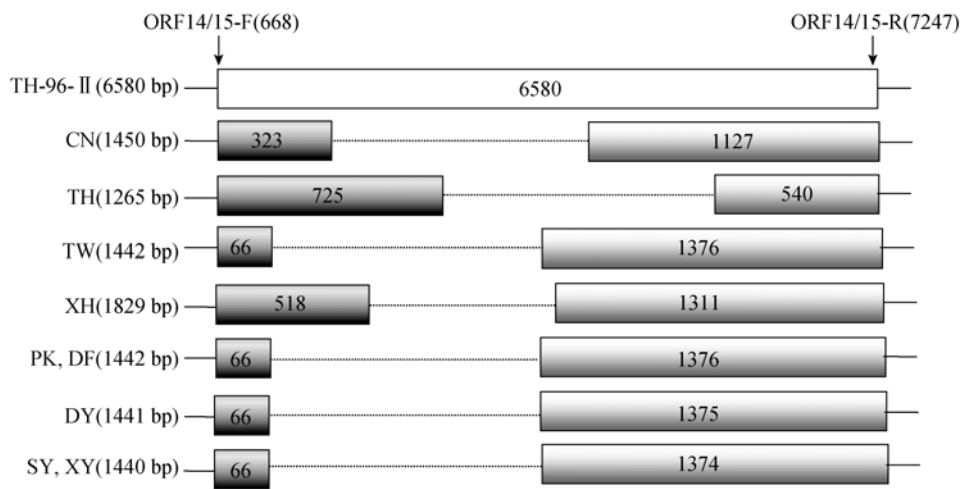


图 3 WSSV 不同毒株间 ORF14/15 区域的序列比对

深色矩形表示变异区 5'端基因序列, 浅色矩形表示 3'端序列, 矩形内的数字代表核苷酸数目。引物后括号内的数字表示引物在 TH-96-II 毒株上的对应起始位置, 点状虚线表示与 TH-96-II 毒株相比有缺失。短划线表示引物扩增区域之外的 ORF14/15 区域。

Fig.3 Schematic representation of variable region ORF14/15 of different WSSV strains

Dark rectangle represents the 5' end sequence of variable region, while light-colored rectangle represents the 3' end sequence. Figures within the rectangles are nucleotide numbers. Figures in brackets after the primer name indicate the originated and terminative position corresponding to the TH-96-II strain, dotted line means sequence deletion compared to TH-96-II strain. Segment-shaped line indicates the region outside amplified fragment of the the primer.

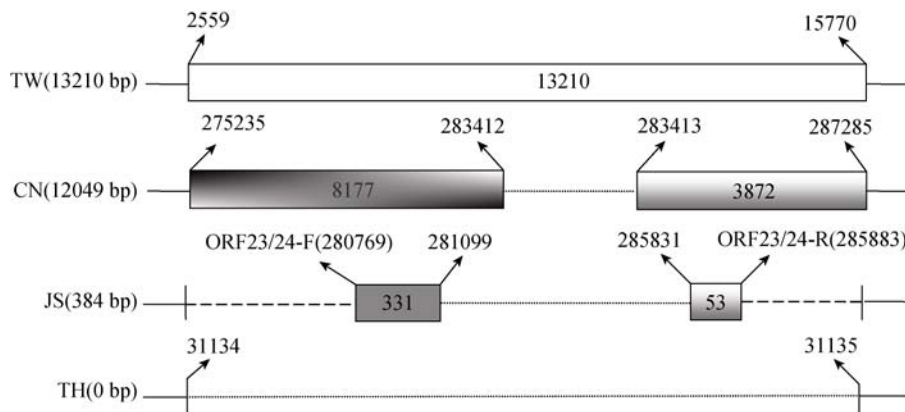


图 4 WSSV 不同毒株间 ORF23/24 区域的序列比对

图中 TW、CN 和 TH 毒株黑色箭头上方数字表示各自在 NCBI 数据库的对应位置, 深色矩形表示变异区 5'端基因序列, 浅色矩形表示 3'端序列, 矩形内的数字代表核苷酸数目。引物后括号内的数字表示引物在 TH-96-II 毒株上的对应起始位置, 点状虚线表示与 TH-96-II 毒株相比有缺失。JS 代表试验用的 6 份江苏毒株, 其黑色箭头上方的数字参考对应 CN 毒株, 短划线表示引物扩增区域之外的 ORF23/24 区域, 其余图例参照图 3。

Fig.4 Schematic representation of deletion region ORF23/24 of different WSSV strains

The map numbers above the black arrows are in accordance with the numbers in NCBI database for genomic sequence of each isolate. Dark rectangle represents the 5' end sequence of variable region, while light-colored rectangle represents the 3' end sequence. Figures within the rectangles were nucleotide numbers. Figures in brackets after the primer name indicate the originated and terminative position corresponding to the TH-96-II strain, dotted line means sequence deletion compared to TH-96-II strain. JS represents six WSSV strains used in the research, and the numbers at the top of its black arrows are according to the WSSV-CN annotation. Segment-shaped line indicates the region outside the primers amplified fragment of the primer. Rest of the legend is similar to fig. 3.

3 讨论

2008 年 7 月至 2010 年 6 月, 本实验室先后在江苏盱眙、泗阳、南京等克氏原螯虾主产区采集

了 83 份样品, 检测 WSSV 阳性率达 50.6%, 不同塘口发病、死亡率约在 5%~20%, 因此亟需加强 WSSV 的防控研究工作, 确保养殖克氏原螯虾产

业的健康可持续发展。

WSSV 起初仅仅暴发流行于海水养殖的东方对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 等, 而在淡水养殖中从未见有暴发流行。有研究表明, 源于海水分离的 WSSV 毒株在 25℃ 海水中能存活 60~120 d, 而在 25℃ 低盐度海水中仅能存活 7 d^[9], 在淡水中有限的存活时间也许是 WSSV 未能在淡水养殖中感染致病的原因之一。黄灿华等^[10]研究显示, 即使在实验室条件下, WSSV 也仅能感染致死淡水克氏原螯虾, 而对于淡水养殖罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)、日本沼虾 (*M.nipponense*) 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 则均不能感染。不过, 随着凡纳滨对虾的淡化养殖发展, 该病对淡水养殖虾、蟹的影响也逐步显现出来, 以往在半咸水甚至淡水中都很少出现的病况越来越多^[11]。对于这种看似矛盾的结论最有可能的解释就是 WSSV 在发生着遗传变异, 本研究中就 6 个毒株的 ORF14/15 区域绘制进化树(结果未显示)发现, XH 株趋近于 CN 株和 TH 株, 而其余 5 株则很明显地与 TW 株聚为一支, 这表明在江苏境内至少存在两类在遗传上相距较远的 WSSV。而在 ORF23/24 区域, 这 6 株病毒序列则表现地完全一致, 除去缺失部分的剩余序列与 CN 株 100% 相同。据此推测 WSSV 这两个区域可能是各自独立进化变异的, 并且 ORF14/15 区域的基因缺失是一个渐进的扩大的过程。目前 WSSV 的缺失、变异机制尚不明确, 但环境选择压力可能是其原因之一, 推测病毒基因组的缺失使其本身更为稳定, 也更易于病毒复制并建立感染。

本研究还发现, 除 XH 株外的 5 个毒株几乎完全一致, 但与 TW 毒株相比较, 在 ORF14/15 区域均存在 1 个核苷酸的变异(T→C)。此外, DY 株还

存在 1 个核苷酸的缺失, SY 和 XY 株存在 2 个核苷酸的缺失, 这些缺失和突变必然造成阅读框架及蛋白编码的改变, 这种改变对病毒自身的影响还未可知, 病毒序列的变异、缺失和病毒毒力的关系尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 丁正峰, 薛晖, 夏爱军, 等. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(4): 129-133.
- [2] Marks H, van Duijse J J, 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.
- [3] Dieu B T, 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.
- [4] 于力, 李庆章. 虾白斑综合征病毒的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6): 486-489.
- [5] 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): 673-697.
- [6] Pradeep B, Shekar M, Karunasagar I, et al. Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus [J]. Virology, 2008, 376(1): 24-30.
- [7] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59-65.
- [8] 于洪涛. 中国境内白斑综合征病毒(WSSV)分离株的序列差异分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008: 33-40.
- [9] Maeda M, Kasornchandra J, Itami T, et al. Effect of various treatments on white spot syndrome virus(WSSV) from *Penaeus japonicus*(Japan) and *P. monodon*(Thailand)[J]. Fish Pathol, 1998, 33(4): 381-387.
- [10] 黄灿华, 石正丽, 张建红, 等. 对虾白斑综合征杆状病毒体内增殖模型的建立 [J]. 中国病毒学, 1999, 14(4): 358-363.
- [11] 潘良坤, 王薇. 南美白对虾白斑综合症的防治[J]. 中国水产, 2003(8): 86-87.

Comparative analysis of variable and deletion regions of white spot syndrome virus genome among isolates in Jiangsu Province

XUE Hui, WANG Xiaofeng, DING Zhengfeng, TANG Jianqing

Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China

Abstract: We evaluated the prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured crayfish (*Procambarus clarkii*) in Jiangsu Province, China. We collected 83 crayfish during the period between July 2008 and June 2010. Of these, 42 were tested positive for WSSV using the loop-mediated isothermal amplification method (LAMP). Based on geographical and time considerations, we selected six positive samples for amplification of the variable and deletion regions of the WSSV genome. In addition, we used PCR amplification to clone and sequence these regions. We then conducted a pairwise and multiple alignment analysis to evaluate the degree of genetic divergence between different strains. The variable region was ~1 440 bp in length in most strains, except in isolate WSSV-XH (1 829 bp). The deletion region was 384 bp in length in six strains, and there was complete homology among the nucleotide sequences. We compared the isolate sequences to those in GenBank and found at least two distinct types of WSSV in Jiangsu Province. Given this, we hypothesize that the WSSV variable region and the deletion region may have evolved independently.

Key words: WSSV; variable region; deletion region; sequence analysis

期刊简介

《中国渔业质量与标准》是由中国农业部主管、中国水产科学研究院主办的综合性学术刊物。其宗旨是刊载我国渔业领域质量安全和标准等方面的政策法规、技术资讯及研究成果,搭建渔业质量与标准工作沟通交流的平台,提高渔业质量和标准水平,促进渔业可持续发展。主要收录水产品检测技术、标准管理、认证工作等方面的具有创新性和学术价值的研究论文,少量收录领导讲话、试验报告、检测结果、专题综述等方面的研究成果。国内统一刊号: CN 11-6018/S。

编辑部主任: 刘巧荣

副主任: 穆迎春

地址: 北京丰台区永定路南青塔 150 号 邮编: 100141

电话: 010-68690728 传真: 010-68673907

E-mail: cafsqs@cafs.ac.cn