

逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测5种养殖石斑鱼的神经坏死病毒

陈信忠^{1,3}, 苏亚玲², 龚艳清¹, 黄丽莎², 俞秀霞², 苏永全³

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012; 2. 厦门市水产技术推广站, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要:神经坏死病毒(Nervous necrosis virus)是导致多种海水鱼类神经性病害的致病原。发病及死亡的石斑鱼除了表现神经异常症状外,无明显的临床病症,体表及内脏组织也未发现明显病变及寄生虫感染。2003年4-8月,应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术从福建南部人工养殖的5种石斑鱼即紫石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、马拉巴石斑鱼(*E. malabaricus*)、青石斑鱼(*E. awoara*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)和云纹石斑鱼(*E. moara*)中检出5个神经坏死病毒分离株。检测了76份石斑鱼样品,这些石斑鱼NNV病毒的平均感染率约为90%。对这些病毒的RT-PCR产物421 bp核酸进行了测序和序列分析,其相同的序列超过99%。将这些序列与GenBank的石斑鱼(*Epinephelus* spp.)神经坏死病毒相关基因序列作比较,同源性在97%以上。对神经坏死病毒在石斑鱼体内的分布也进行了分析,在脑和眼组织的检出率最高,部分病鱼的肝、脾和肾组织也能检出病毒。结合流行病学特征,可确认神经坏死病毒为该传染病的主要致病原。RT-PCR方法是检测NNV等病原的一种理想的诊断方法。

关键词:石斑鱼;神经坏死病毒;逆转录聚合酶链式反应

中图分类号:S943 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)03-0202-06

鱼类神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)属于野田村病毒科(Nodaviridae)、乙型野田村病毒属(*Betanodavirus*),是多种海水鱼类暴发性传染病的致病原。该病毒主要侵害宿主的脑部和视网膜等组织,又称病毒性脑病和视网膜病(Viral encephalopathy and retinopathy, VER),引起宿主的一系列神经症状,其中危害最大的包括各种石斑鱼(*Epinephelus* spp.)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、黄带喝鲈(*Pseudocaranx dentex*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)。对仔鱼和幼鱼危害极大,对成鱼也有很高的致死率。据报道该病已在亚洲、欧洲、澳洲和拉丁美洲的至少11个科22种鱼中流行,被国际兽疫局(OIE)列为重要的鱼类病害^[1]。国外对石斑鱼神经坏死病毒的危害已有较多的研究^[2-6],对几种石斑鱼神经坏死病毒编码核衣壳蛋白基因的序列进行了全序列或部分序列的测序。Tan^[7]对巨石斑鱼(*E. tauvina*)NNV的RNA 1和RNA 2进行了全序列测序。

Iwamoto^[8]报告了条纹鲈(Striped jack)NNV的RNA 2全序列。Nishizawa^[9]对5种鱼类NNV编码衣壳蛋白的基因进行了比较。Lin^[10]对从马拉巴石斑鱼(*E. malabaricus*)和紫石斑鱼(*E. lanceolatus*)分离的NNV编码衣壳蛋白的RNA 2基因进行了克隆和测序。国内有关石斑鱼神经坏死病的研究尚未见报道。

石斑鱼作为海水养殖最名贵的经济鱼类之一,近年来在我国广东、福建、浙江和台湾等地区开始了大规模的网箱养殖,取得了良好的经济效益。但随之而来的传染性病害给养殖业者带来了巨大的经济损失,其中神经坏死病是危害最大的传染病之一。在我国台湾,养殖石斑鱼不断暴发神经坏死病毒病,造成刚孵化仔鱼和幼鱼大量死亡。大陆也不断有石斑鱼暴发性病害的疫情,2003年4月下旬以来,福建南部一些石斑鱼养殖场养殖的各种石斑鱼,包括青石斑鱼(*E. awoara*)、紫石斑鱼、马拉巴石斑鱼、赤点石斑鱼(*E. akaara*)和云纹石斑鱼(*E. moara*)的幼鱼和成鱼发生急性传染病,每天死亡数尾至数十

收稿日期:2003-11-03; 修订日期:2004-03-05.

基金项目:福建省科技厅科技项目资助(2002N009).

作者简介:陈信忠(1964-),男,高级兽医师,博士研究生,主要从事鱼类病害研究和进出口动物检疫工作. E-mail: xmcchemz@tom.com

通讯作者:苏永全. Tel: 0592-2182501. E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

尾,持续2个多月。幼鱼发病急,死亡快而集中,死亡率达60%~80%;1龄以上的成鱼病程较长,死亡较分散,累积死亡率也有40%~50%。经流行病学调查,应用RT-PCR技术对病原进行检测,从各种石斑鱼中扩增出GNNV的特异性核酸片段,对这些片段进行了测序和分析,并用BLAST软件进行同源性比较,证明神经坏死病毒是导致石斑鱼发病死亡的主要致病原。

1 材料和方法

1.1 材料

青石斑鱼、赤点石斑鱼、紫石斑鱼、马拉巴石斑鱼和云纹石斑鱼采自福建厦门刘五店鳄鱼屿和西柯潘涂港石斑鱼养殖鱼排。从2003年4月初至8月底,每2周采集1次病鱼,发病高峰期每周采集1次,每次6~10尾,体重200~3000g,大多为400~500g的1~2龄成鱼,青石斑鱼和赤点石斑鱼较多,其他3种石斑鱼因养殖数量较少,采集的病鱼也较少。

PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,其序列为世界动物卫生组织(OIE)^[1]推荐的引物。反向引物是:5'-CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3',正向引物是5'-CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3',用于扩增NNV编码衣壳蛋白的基因RNA2的片段(421bp)。

实验所用RNA抽提试剂、Taq酶、M-MuLV逆转录酶、RNA抑制剂、dNTP等为上海生工生物工程技术服务有限公司产品。DNA Ladder购自上海Promega生物产品有限公司。

1.2 方法

检测神经坏死病毒的RT-PCR方法采用OIE推荐的标准监测方法^[1],对各步骤反应条件进行了探索和优化。

1.2.1 样品处理 取病鱼的脑、眼等组织约100mg于1.5mL离心管中,加入500μL DEPC处理过的蒸馏水捣碎匀浆,10000r/min离心10min。取上清液于新的离心管中,加入40μL蛋白酶K(1mg/mL)和40μL 1% SDS,37℃孵育30min。

1.2.2 核酸抽提 在离心管中加入600μL酚、氯仿与异戊醇混合液(体积比25:24:1),充分混匀30s,12000r/min离心5min,取上层水相。再加入等体积的氯仿与异戊醇混合液(体积比24:1),充分混匀30s,12000r/min离心5min,取上层水相。加入

1.5倍体积的异丙醇,混匀后-20℃1h以上沉淀核酸,12000r/min离心1min,弃上清,室温干燥后加入10μL灭菌双蒸水溶解,即为PCR模板。

1.2.3 cDNA合成 将10μL PCR模板置于200μL薄壁PCR管中,先90℃预热变性5min,立即冰浴并加入5μL 5×逆转录酶缓冲液、1μL M-MuLV逆转录酶(20U/μL)、0.5μL RNA酶抑制剂(20U/μL)、2.5μL反向引物(40μmol)、2μL dNTP、5μL 25mmol MgCl₂,于42℃孵育30min。将混合物在99℃加热10min,以灭活逆转录酶,立即冰浴。

1.2.4 PCR扩增 上述混合液中再加入3.5μL正向引物(40μmol)、1μL反向引物(40μmol)、Taq酶5U、1μL dNTP、10μL 10×Taq酶缓冲液、5μL 25mmol MgCl₂、50μL灭菌双蒸水,混匀后置于PCR仪中,程序设定为:先72℃10min、95℃2min,然后95℃40s、55℃40s、72℃40s循环25次,最后72℃延伸5min,4℃保存。

1.2.5 琼脂糖电泳 用TBE电泳缓冲液配制2%的琼脂糖(加0.5μg/mL溴化乙锭)进行电泳,样品孔中加入6μL样品和2μL样品缓冲液(含0.25%溴酚蓝)的混合液,并设立DNA标准Marker作对照。

1.2.6 核酸序列测定 电泳后在紫外检测仪上观察结果,在421bp位置出现亮带者为阳性。将电泳结果在421bp位置出现明显亮带的PCR产物委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行核酸测序。

1.2.7 核酸序列同源性比较 采用GenBank/NCBI数据库中BLAST软件进行同源性比较。

2 结果

2.1 RT-PCR检测结果

对5种养殖石斑鱼的RT-PCR检测结果见图1,采自不同海区、不同养殖鱼排的各种石斑鱼都检出了神经坏死病毒,且不论是幼鱼,还是成鱼,均能检出NNV,在琼脂糖电泳的421bp位置均出现明显亮带。在发病高峰的4~5月份,NNV的检出率可达95%~100%;6~8月份的病鱼NNV检出率也在80%以上。至2003年8月底,共检测了9批76条石斑鱼,平均感染率约为90%。5种石斑鱼的NNV检出率基本相同。对NNV在鱼体内各器官组织的感染情况进行的检测表明,在病鱼的脑组织、眼、肾脏、脾脏和肝脏均能检出NNV,但以脑和眼组织的检出率最高,肝和脾较少,而鳃组织未检测到NNV。

(图2)。

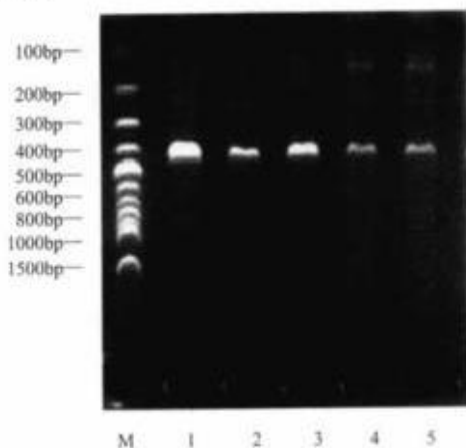


图1 5种石斑鱼神经坏死病毒 RT-PCR 琼脂糖电泳图谱
M:100 bp DNA 分子量标准;1:紫点石斑鱼,2:马拉巴石斑鱼,3:青石斑鱼,4:赤点石斑鱼,5:云纹石斑鱼

Fig. 1 Agarose gel map of NNV RT-PCR detection of five fishes

Lane M:100 bp DNA Ladder; Lane 1: *E. lanceolatus*; Lane 2: *E. malabaricus*; Lane 3: *E. awoara*; Lane 4: *E. akaara*; Lane 5: *E. moara*.

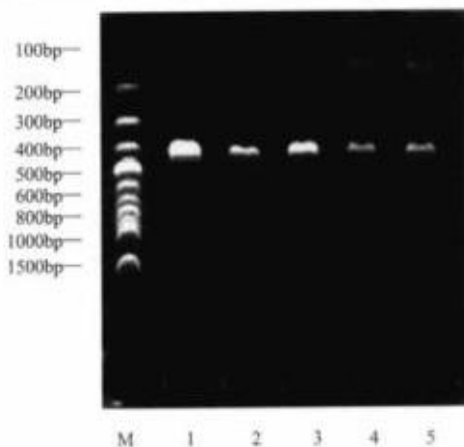


图2 青石斑鱼不同组织 NNV RT-PCR 检测图谱

M:100 bp DNA 分子量标准;1:眼 2:脾 3:肾 4:脑 5:肝 6:鳃

Fig. 2 Agarose gel map of NNV RT-PCR detection from different tissue of *E. awoara*

Lane M:100 bp DNA Ladder; Lane 1: Eye; Lane 2: Spleen; Lane 3: Kidney; Lane 4: Brain; Lane 5: Liver; Lane 6: Gill.

2.2 扩增产物的序列测定和比较

上述 RT-PCR 扩增产物采用双向 2 个反应进行测序,对结果用 ContigExpress 软件进行拼接,拼接结果如图 3 所示。

应用 Internet 查询 GenBank/NCBI 数据库,用 BLAST 软件进行同源性比较,查询结果显示,本实验分离的马拉巴石斑鱼 NNV 的 421 bp 扩增片段与基因库中的马拉巴石斑鱼序列 (GenBank 编号 AF 245003) 同源性为 97.6%^[10];本实验分离的青石斑鱼 NNV 与基因库中青石斑鱼序列 (GenBank 编号 AF 283554) 的同源性为 98.8%;本实验分离的紫点石斑鱼、赤点石斑鱼和云纹石斑鱼 NNV 与基因库中的马拉巴石斑鱼序列同源性大于 98%,与基因库中青石斑鱼序列的同源性也在 98% 以上;本实验分离的 5 株石斑鱼 NNV 之间的同源性则超过 99%。这些石斑鱼 NNV 与其他鱼类 NNV 的同源性则较低,与 NNV 以外的其它病毒的同源性均低于 8%,表明本实验得到的扩增产物是石斑鱼 NNV 的一段保守序列。

3 讨论

PCR 检测技术因其灵敏、快速和简便的特点而被越来越广泛地应用到人和动物传染病的病原检测中。RT-PCR 诊断方法是 OIE 推荐的 NNV 标准诊断程序的诊断方法之一,具有比免疫组织化学方法、荧光抗体技术和细胞培养等诊断方法更快速、灵敏、简便的特点。国内对石斑鱼 NNV 的检测方面的研究还几乎是空白,本研究应用 RT-PCR 技术,针对石斑鱼暴发性传染病进行病原检测,最快可以在 8 h 内完成实验,从发病石斑鱼样品中确诊 NNV 病原。对扩增片段的核酸测序结果证明,本实验所扩增的核酸片断为 NNV 的一段特异性保守序列,表明 RT-PCR 方法是鱼类 NNV 病原检测的理想方法之一,适用于基层实验室进行流行病学调查以及对 NNV 等爆发性传染病的病原检测。

本实验采用的引物为鱼类野田村病毒的通用引物,其最初依据为一种条纹鲷 (Striped jack) 的神经坏死病毒^[8],但它能检测所有的野田村病毒。本实验结果也表明,该引物适用于石斑鱼 NNV 的检测。有关 NNV 的分类地位, Nishizawa^[11] 基于编码衣壳蛋白的 427 bp 核酸序列对 25 株鱼类 NNV 进行了分子系统分类的分析,认为这些病毒可分为 4 群。Valle^[12] 根据 605 bp 核酸序列的比较认为鱼类 NNV 同属于鱼类野田村病毒属 (*Piscinodavirus*),所有地中海鱼类 NNV 分离株均可归为赤点石斑鱼 NNV,显示有限的地理隔离现象。从实验结果看,从本地区不同养殖场采集的所有 5 种石斑鱼的幼鱼和成鱼

GNNV-1	601	ACGTGTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GROP-1		-CGTGTTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GNNV-2	452	ACGTGTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GROP-2		-CGTGTTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GROP-3		-CGTGTTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GROP-4		-CGTGTTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GROP-5		-CGTGTTCAGT	GCTGTGTCGC	TGGAGTGTTT	GACTGAGCGT	TCCATCTCTT	GAGACACCTG
GNNV-1	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GROP-1	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GNNV-2	512	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAGCGATTCC	CTTTCCACAA
GROP-2	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GROP-3	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GROP-4	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GROP-5	661	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC	ATGACACAAG	GTTCCTGTGA	CAACGATTCC	CTTTCCACAA
GNNV-1	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GROP-1	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GNNV-2	572	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	TATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GROP-2	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GROP-3	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GROP-4	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GROP-5	721	ATGACTTCAA	GTCCATCCTC	CTAGGATCCA	CACCACTGGA	CATTGCCCTT	GATGGAGCAG
GNNV-1	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GROP-1	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GNNV-2	632	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GROP-2	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GROP-3	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GROP-4	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GROP-5	781	TCTTCCAGCT	GGACCGTCCG	CTGTCCATTG	ACTACAGCCT	TGGAACCTGA	GATGTTGACC
GNNV-1	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GROP-1	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GNNV-2	692	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GROP-2	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GROP-3	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GROP-4	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GROP-5	841	GTGCTGTTTA	CTGGCACCTC	AAGAAGTTTG	CTGGAAATGC	TGGCACACCT	GCAGGCTGGT
GNNV-1	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GROP-1	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GNNV-2	752	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GROP-2	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GROP-3	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GROP-4	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GROP-5	901	TTCGCTGGGG	CATCTGGGAC	AACCTCAACA	AGACGTTTAC	AGATGGCGTT	GCCTACTACT
GNNV-1	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GROP-1	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GNNV-2	812	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GROP-2	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GROP-3	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GROP-4	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GROP-5	961	CTGATGAGCA	GCCCCGTCAA	ATCCTGCTGC	CTGTTGGCAC	TGTCTTCACC	AGGGTTGACT
GNNV-1	1021	CGGAAAACTA	ACCGGGTCAT	CCGGTTCCCT	AGTGCGTATC	GTTGATGACC	AATTTGAACA
GROP-1	1021	CG-----	-----	-----	-----	-----	-----
GNNV-2	872	CG-----	-----	-----	-----	-----	-----
GROP-2	1021	CG-----	-----	-----	-----	-----	-----
GROP-3	1021	CG-----	-----	-----	-----	-----	-----
GROP-4	1021	CG-----	-----	-----	-----	-----	-----

图3 各种石斑鱼 NNV RT-PCR 产物序列分析

GNNV-1,2 分别为基因库马拉巴石斑鱼和青石斑鱼 NNV 的序列(编号分别为 AF 245003 和 AF 283554),GROP-1,2,3,4,5 分别为本研究中马拉巴石斑鱼、青石斑鱼、紫点石斑鱼和云纹石斑鱼扩增序列,阴影部分表示碱基差异。

Fig. 3 Sequence analysis of amplicon of RT-PCR from NNV

GNNV-1 and GNNV-2 are sequences of NNV from *E. malabaricus* and *E. awoara* in GenBank (Accession No.: AF 245003 and AF 283554); GROP-1,2,3,4 and 5 are sequences of RT-PCR amplicon from *E. malabaricus*, *E. awoara*, *E. lanceolatus*, *E. akaara* and *E. moara* in this study. Shadows show different bases.

中均检出 NNV, 对扩增片段的核酸序列分析表明, 本地地区的 5 个 NNV 分离株的核酸片段序列的同源性超过 99%, 其中紫石斑鱼、赤点石斑鱼和云纹石斑鱼的 NNV 扩增片段序列同源性高达 99.8%, 这些病毒应可归为同一种病毒。因此, 不同品种的石斑鱼 NNV 很可能可以交叉感染。这就要求在对病鱼采取隔离措施时, 不仅要隔离同一种石斑鱼, 还必须对其他石斑鱼采取相应的隔离措施, 以防止该病毒的传染。此外, 由于 NNV 寄主的广泛性, 还必须注意预防其他鱼类感染 NNV。目前大多海区的鱼排多为各种鱼类同时饲养, 虽然近期其他鱼类发病较少, 从采集的真鲷 (*Pagrus major*)、白鲳 (*Pampus argenteus*) 等病鱼中也未检出 NNV, 但因采样量较少, 而且考虑到检测所用引物的适用性, 这些鱼类是否能被 NNV 感染还有待进一步实验确认。另外, 本地地区的石斑鱼 NNV 与基因库中分离自欧洲及日本等地的石斑鱼 NNV 核酸序列存在较大的差异, 显示可能存在一定的地域差异现象。但由于本实验采集的样品仅限于厦门地区, 一些石斑鱼检测的样品数量也较少, 因此这些 NNV 分离株是否存在宿主和地域的差异还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会. 水生动物疾病诊断手册[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Fukuda Y, Nguyen H D, Furuhashi M, et al. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis [J]. *Fish Pathol*, 1996, 31(3): 165-170.
- [3] Chi S C, Lo C F, Kou G H, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* and *Epinephelus akaara* [J]. *J Fish Dis*, 1997, 20: 185-193.
- [4] Husgao S, Grotmol S, Hjeltne B K, et al. Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV [J]. *Dis Aquat Org*, 2001, 45: 33-44.
- [5] Hegde A, Chen C L, Qin Q W, et al. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus taurina*, in Singapore [J]. *Aquaculture*, 2002, 213 (1-4): 55-72.
- [6] Oh M J, Jung S J, Kim S R, et al. A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus* [J]. *Aquaculture*, 2002, 211: 1-7.
- [7] Tan C, Huang B, Chang S F, et al. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus taurina*) nervous necrosis virus, Singapore strain [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82 (Pt 3): 647-653.
- [8] Iwamoto T, Mise K, Mori K, et al. Establishment of an infectious RNA transcription system for striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodavirus [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82 (11): 2 653-2 662.
- [9] Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, et al. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76: 1 563-1 569.
- [10] Lin C S, Lu M W, Tang L, et al. Characterization of virus-like particles assembled in a recombinant baculovirus system expressing the capsid protein of a fish nodavirus [J]. *Virology*, 2001, 290(1): 50-58.
- [11] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(4): 1 633-1 636.
- [12] Valle L D, Negrisolo E, Patarnello P, et al. Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(6): 1 125-1 137.

Detection of nervous necrosis virus from five cultured groupers (*Epinephelus* spp.) using RT-PCR

CHEN Xin-zhong^{1,3}, SU Ya-ling², GONG Yan-qing¹, HUANG Li-sha³, YU Xiu-xia³, SU Yong-quan²

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China; 2. College of Ocean and Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Ximen Aquaculture Technical Generalize Service, Xiamen 361005, China)

Abstract: Nervous necrosis virus (NNV), also called viral encephalopathy and retinopathy (VER), is a serious disease of some cultured marine fish species. The number of fish species affected by this virus has rapidly increased. It has been observed in barramundi (*Lates calcarifer*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*), turbot (*Scophthalmus maximus*), groupers (*Epinephelus* spp.) and other fishes. This disease is characterised by a variety of neurological abnormalities such as erratic swimming behaviour and vacuolation in central nervous tissues and nuclear layers of retina. Some diagnostic measures such as histopathology, fluorescent antibody test, enzyme-labeled antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay, electron microscopy, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection, cell culture and in situ hybridization have been described to detect the nervous necrosis virus in the OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animals, but no diagnosis and treatment report of NNV were found in China. Grouper is becoming a major fish species of mariculture in China and other Southeast Asian countries, as it had a higher economical value than the other commercial farmed fishes. With the rapidly developing grouper aquaculture, mass mortality associated with viral diseases of the fish has been frequently occurred. Among the infectious diseases, viral diseases often caused significant economic losses to the production, and viral nervous necrosis happened most frequently in these countries. In recent years, some cultured groupers in southern China suffered an epidemical disease that caused heavy mortality. The sick or died fishes did not show any pathological signs other than neurological abnormalities. No significant external or internal lesions or parasites were observed. We used two primers, a reverse primer (5' - CGA - GTC - AAC - ACG - GGT - GAA - GA - 3') and a forward primer (5' - CGT - GTC - AGT - CAT - GTG - TCG - CT - 3') to amplify a target sequence which had a fragment of about 421 bases in five isolates of the grouper nervous necrosis viruses isolated from the cultured groupers, *E. lanceolatus*, *E. malabaricus*, *E. awoara*, *E. akaara* and *E. moara* cultivated in southern Fujian, China, by the reverse transcription polymerase chain reaction method from March to August, 2003. A total of 76 fishes were examined and the average infection rate of these groupers infected by NNV was about 90%. The nucleic acid sequences of the five amplicons had been sequenced. They were 99% identical in each other and showed more than 97% homologue with those of NNV strains from other grouper in GenBank. It was proved that the amplified sequence is the conservative area of NNV in grouper. The infected organs of the grouper by the pathogen had also been detected. It was found that the virus could find in most of the brain and eyes of the fishes, and also detected in kidney, spleen and liver in some sick groupers. These results according with the epidemiologic observation indicate that NNV is the major causative agent of the observed mortality occurred in the cultured groupers. The test of RT-PCR was demonstrated a useful method to detect the pathogen of NNV in diagnosis practice because of its quick, simple and accurate properties. The mode of transmission had been discussed, the influent water, sick or died fish and carriage utensils, vehicles, etc might be the most possible factor in this disease.

Key words: *Epinephelus* spp.; nervous necrosis virus; RT-PCR

Corresponding author: SU Yong-quan. E-mail: xmsyq@public.xm.fj.cn

* This study was supported by a Science and Technology Project from the Science and Technology Bureau of Fujian Province (No. 2002N009).