

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00059

## 中国明对虾肝胰腺细小病毒全基因组的克隆及序列分析

张峥<sup>1,2</sup>, 黄捷<sup>1,2</sup>, 高强<sup>1,3</sup>, 成君军<sup>1</sup>, 王明森<sup>1</sup>

1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 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. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 中国明对虾肝胰腺细小病毒是一种单链、线性 DNA 病毒。本研究利用 DNA 末端加尾和嵌套 PCR 首次完成了对虾肝胰腺细小病毒(hepatopancreatic parvovirus, HPV)中国分离株(HPV-Pc)全基因组序列的测定, 研究结果表明, HPV-Pc 株(GenBank 登录号 GU371276)的全基因组由 6 085 个核苷酸组成, 包含 3 个开放阅读框(ORF) (分别代表 *ns1*、*ns2* 和 *cp* 基因)和 2 个非编码区。ORF1、ORF2 和 ORF3 分别编码由 427、578 和 821 个氨基酸组成的蛋白, 分子量分别为 50.4 kD、68.2 kD 和 92 kD。分析 HPV-Pc 基因组结构, 发现该基因组没有末端反向重复序列(ITR), *cp* 基因编码的 CP 区有 HPV 特异的“GAA”正向重复序列, 及富含甘氨酸的上游和下游不同位置存在精氨酸残基, 可造成蛋白裂解。不同地区、不同对虾 HPV 基因组有较大差异, HPV-Pc 株基因组与其他已知 HPV 序列同源性在 78%~91%之间, 差异遍布整个序列中。将 HPV-Pc 各基因片段与已报道的其他地区 HPV 相应序列进行比较, 结果表明, HPV-Pc 各基因片段与 AY008257(韩国株)同源性最高。与已知 HPV 代表株的 NS2、NS1 和 CP 蛋白氨基酸序列同源性比较也显示, HPV-Pc 株与韩国株同源性最高。这些特征表明 HPV-Pc 属于细小病毒科的一个新分离株。[中国水产科学, 2011, 18(1): 59-65]

**关键词:** 肝胰腺细小病毒(HPV); 中国明对虾; 基因组序列

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0059-07

对虾肝胰腺细小病毒(hepatopancreatic parvovirus, HPV)是世界各地养殖和野生对虾的重要病原之一。1984 年 Chong 等<sup>[1]</sup>在新加坡地区野生的墨吉对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)和印度明对虾(*F. indicus*)中首先发现了 HPV, 之后的 4 年中, 又陆续在日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)中发现了该病毒。病毒主要侵染处于幼体和稚虾期的中国明对虾(*F. chinensis*)及处于幼体期的墨吉对虾、短沟对虾(*P. semisulcatus*), 使对虾生长缓慢, 导致慢性矮小残缺综合症(runt deformity syndrome, RDS),

严重时可使幼虾致死率达到 100%<sup>[2-3]</sup>, 造成较大的经济损失。该病毒存在的地理位置很广泛, 从东非到韩国, 包括澳大利亚、太平洋以及美国的大西洋海岸一带<sup>[4]</sup>, 中国、新加坡、科威特、菲律宾、印度尼西亚、朝鲜及泰国等<sup>[5]</sup>均有相关对虾 HPV 的报道。HPV 的宿主范围也较广泛, 目前报道的宿主除上述 6 种外, 还包括食用对虾(*P. esculentus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和细角滨对虾(*L. stylirostris*)<sup>[6]</sup>等。

对虾肝胰腺细小病毒是一种单链、线性 DNA 病毒, 病毒粒子平均直径为 22~24 nm<sup>[7]</sup>, 无囊膜,

收稿日期: 2010-03-07; 修订日期: 2010-04-29.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100306); 国家重点基础研究发展计划项目(2006CB101801); 农业部公益性行业(农业)科研专项(200803012); 国家虾现代产业技术体系(nycytx-46)岗位专家经费项目.

作者简介: 张峥(1984-), 硕士研究生, 主要从事病毒分子生物学研究. E-mail: zhangzhenghappy88@hotmail.com.cn

通讯作者: 黄捷, 研究员. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

呈二十面体对称, 根据其形态学和生化特征, 在分类学上归为细小病毒科(Parvoviridae)、浓核症病毒亚科(Densovirinae)<sup>[8]</sup>。电镜观察并推测其 DNA 长度约为 6 kb, 而且多数病毒粒子包含的基因组单链 DNA 是负链<sup>[2]</sup>。据文献报道, HPV 基因组由 3 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)和两末端的非编码序列构成, 3 个 ORF 分别编码非结构蛋白 1(NS1)、非结构蛋白 2(NS2)和结构蛋白(CP)<sup>[9]</sup>。NS 蛋白主要参与 DNA 的复制和转录的调节, 还参与病毒 DNA 和蛋白质的有效合成以及病毒的增殖<sup>[10]</sup>。cp 基因主要编码病毒粒子的衣壳蛋白, 是刺激机体产生抗体的成分, 还可能与病毒的毒力及致病性有关<sup>[11]</sup>。

近年来, 国外学者在 HPV 的分子生物学方面作了一些探索性研究, GenBank 已经收录了 23 条 HPV 相关序列, 包括 HPV 的泰国分离株、印度分离株、澳大利亚分离株的基因组全序列及部分序列。关于中国 HPV 分子生物学的报道仅限于一些检测技术, 全基因组序列还尚未见公开报道, 这对于开展 HPV 的基因组学、分子致病机理以及分子疫苗等相关研究不利。本研究利用 DNA 末端加尾和巢式 PCR 技术扩增了 HPV 中国分离株 HPV-Pc 的全长基因组, 并与 GenBank 中收录的其他国家的 HPV 全基因组进行了核苷酸同源性比较, 为进一步研究该病毒的分子生物学特性奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病料、菌种和克隆载体** 试验病料为 2008 年 9 月 1 日采自中国河北省唐山市唐海县十里海养殖场疑似感染 HPV 的中国明对虾, 现场采集的对虾样品经 -18℃ 冰冻保存带回实验室, 取其肝胰腺用于以下研究。

**1.1.2 主要试剂及酶** 蛋白酶 K 购自 Merck 公司, SDS、氨苄青霉素(Amp)、X-Gal、IPTG 购自 Sigma 公司; EX Taq DNA 聚合酶、dNTP Mixture、10×Ex Taq buffer、DL2000 Marker、末端脱氧核苷酸转移酶购自大连宝生物工程有限公司; DNA 凝胶回

收试剂盒购自 Omega 公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

**1.1.3 引物** 采用中华人民共和国水产行业标准《对虾肝胰腺细小病毒诊断规程》(SC/T 7203.1-2007)<sup>[12]</sup> HPV 检测引物进行扩增, 正向引物(F): GGT GAT GTG GAG GAG AGA, 反向引物(R): GTA ACT ATC GCC GCC AAC。根据扩增所得序列, 设计扩增 3'端的 2 条正向引物(QS1/QS2)和扩增 5'端的 2 条反向引物(QA1/QA2)。3'端扩增正向引物 QS1: 5'-GGT AGA GTT AGG AAG TGA GCC AGT-3'; 正向引物 QS2: 5'-ATC TAT GTA CGC AGG GTT CAA GTT-3'; 5'端扩增反向引物 QA1: 5'-CAA CCA CGA AAG CCA CTT CAA CG-3', 反向引物 QA2: 5'-GAA CCC TGC GTA CAT AGA TTT AGC-3'及通用引物 Oligo dT: 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'。寡核苷酸序列的合成以及载体的测序由大连宝生物工程有限公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 HPV 基因组 DNA 的提取及鉴定** 根据《SC/T 7203.1-2007 对虾肝胰腺细小病毒诊断规程》<sup>[12]</sup> 第 1 部分, 应用 PCR 检测法检测出感染 HPV 的中国明对虾, 然后提取对虾肝胰腺基因组。取样品冰冻病虾约 5~100 mg, 加入抽提 buffer 缓冲液 500 μL, 按常规方法匀浆后, 37℃ 温浴 1 h。加入 5 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 至终浓度 100 μg/mL, 混匀后置于 50℃ 水浴 3 h, 加入等体积 500 μL 平衡酚, 混匀, 于室温 10 000 r/min 离心 5 min, 水相加入等体积 500 μL 酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 混匀, 于室温 10 000 r/min 离心 3 min, 水相加入等体积 500 μL 氯仿, 混匀, 并于室温下 10 000 r/min 离心 1 min; 取水相加入 100 μL 10 mol/L 乙酸铵, 混匀, 再加入 2 倍体积无水乙醇(-20℃), 混匀, -80℃ 放置 2 h 后 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用 70% 乙醇(-20℃) 洗涤沉淀 2 次, 每次 10 000 r/min, 离心 5 min, 倾去上清, 挥发净乙醇, 沉淀重悬于适量 TE 缓冲液, 于 -80℃ 保存备用。

**1.2.2 HPV DNA 末端加尾** 根据文献<sup>[13]</sup>报道,

细小病毒粒子分成正链与负链两群, 提取过程中由于正负链的退火能形成双链形式。根据这一特性, 用末端脱氧核糖核酸转移酶对DNA正负链的3'末端加poly A。加尾反应体系(25  $\mu$ L)如下: ddH<sub>2</sub>O, 7  $\mu$ L; 5 $\times$ TdT buffer, 5  $\mu$ L; 10 mmol/L dATP, 0.5  $\mu$ L; 0.1% BSA, 2.5  $\mu$ L; 组织DNA, 10  $\mu$ L。94 $^{\circ}$ C, 2~3 min; 冰上, 1 min, 稍离心。在反应体系中加入 1  $\mu$ L TdT(12 U/ $\mu$ L), 37 $^{\circ}$ C 15 min; 65 $^{\circ}$ C, 10 min。

**1.2.3 嵌套PCR扩增** 根据已扩增出的1段序列设计的4条特异性引物(QS1, QS2用于扩增HPV-Pc株3'端片段, QA1, QA2扩增5'端片段), 以末端加poly A的病毒DNA为模板, 利用Oligo d(T)引物和QS1或者QA1进行首轮PCR扩增。在第2轮PCR中, 以第1轮扩增产物稀释 $10^{-3}$ 为模板, 利用Oligo d(T)引物和QS2或者QA2分别扩增出病毒的靠近3'端或5'端的片段。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统观察结果。

**1.2.4 PCR产物的克隆** 上述PCR产物于1%琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外灯下切割目的片段, 然后用凝胶回收试剂盒回收特异的扩增片段, 将回收纯化的PCR产物与pMD18-T载体按载体使用说明进行连接后, 构建成重组质粒, 将其转化感受态细胞DH5a, 涂布含氨苄的LB平板, 最后通过蓝白斑初步筛选阳性克隆。

**1.2.5 序列测定与分析** 每个样品挑取3个阳性克隆菌株, 由大连宝生物生物工程有限公司进行序列测定。最后利用GenBank中的BLAST分析软件包对测序结果进行序列分析, 以确定所扩增序列为对虾肝胰腺细小病毒。

**1.2.6 全基因组序列测定结果的比较** 应用vector NTI软件对测序基因片段进行拼接, 及对整个阅读框架的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行同源性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 HPV-Pc 株的 PCR 鉴定

从病料中提取的DNA模板, 经PCR扩增和1%琼脂糖凝胶电泳后, 可观察到约为628 bp的特

异性核苷酸条带(图1), 与预期的片段大小相符。

### 2.2 HPV-Pc DNA 5'和3'端序列的扩增及克隆

利用Oligo d(T)引物和QS1或QA1进行的首轮PCR未见明显扩增产物。第2次PCR产物在凝胶成像系统LAS-3000中观察: 3'端和5'端各约3033 bp和3222 bp的目的DNA片段, 与预期结果相符(图2)。将扩增片段插入pMD18-T克隆载体中, 并转化大肠杆菌, 经PCR和酶切鉴定出阳性克隆。

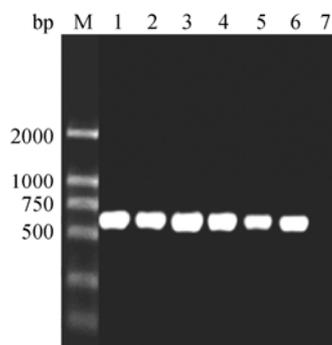


图1 HPV-Pc 毒株的 PCR 鉴定

1-5: 中国明对虾病虾样品; 6: 阳性对照; 7: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000.

Fig. 1 Identification of HPV-Pc by PCR amplification 1-5: diseased samples of *Fenneropenaeus chinensis*; 6: positive control; 7: negative control; M: DNA marker DL2000.

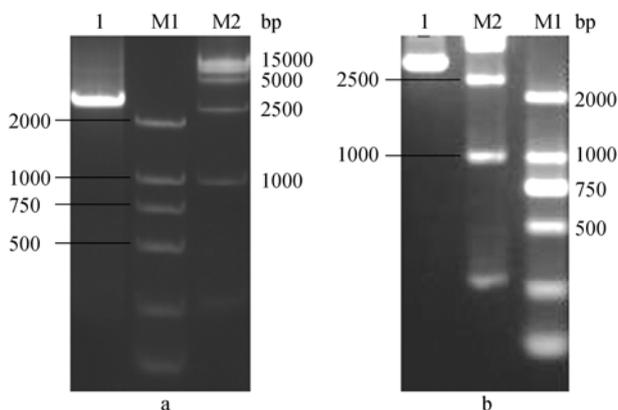


图2 HPV 3'端(a)和5'端(b)PCR扩增产物电泳图

a. 1: 3'端巢式PCR产物; M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker DL15000.

b. 1: 5'端巢式PCR产物; M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker DL15000.

Fig. 2 Agarose gel analysis of 3' and 5' PCR products of HPV a. 1: the nested product of 3' end; M1: DNA marker DL2000; M2: DNA marker DL15000.

b. 1: the nested product of 5' end; M2, DNA marker DL15000; M1, DNA marker DL2000.

### 2.3 HPV 基因组序列测定结果与分析

经大连宝生物生物工程有限公司用自动测序仪 ABI3000 双向测序得到 HPV-Pc 的 3'端和 5'端序列片段,用 vector NTI 软件进行序列拼接,得到病毒基因组为线性,全长为 6 085 bp,序列信息参见 GenBank GU371276。经分析,该病毒基因组包含 3 个 ORF: NS2(62~1 345 nt)、NS1(1 330~3 069 nt)、CP(3 493~5 959 nt)。ORF1 编码 NS1,含有 427 个氨基酸,蛋白分子量约为 50.4 kD; ORF2 编码含 578 个氨基酸的非结构蛋白 NS1,分子量约为 66.8 kD,该基因中含有所有细小病毒所特有的高度保守复制启动基序 I(GPHLHILLE)和基序 II(FKWYMFDRK); ORF3 编码含 821 个氨基酸的 CP 蛋白,为病毒的核衣壳蛋白,分子量约为 92 kD,CP 蛋白含有具典型细小病毒结构蛋白基因特征的氨基酸,其组成为 AAGGGGGGGSGGETA,

富含“G”的上游在精氨酸残基处是 CP 蛋白可能的裂解位点。

### 2.4 病毒基因型分析

应用 vector NTI 序列分析软件对已测定的 HPV-Pc 各基因片段与已报道的其他地区 HPV 相应序列进行比较,结果表明,HPV-Pc 各基因片段与 AY008257(韩国株)同源性最高。与已知 HPV 代表株的 NS2、NS1 和 CP 蛋白氨基酸序列同源性比较也显示,HPV-Pc 株与韩国株同源性最高,分别为 98%(NS1)、94%(NS2)和 82%(CP)。HPV-Pc 株 NS1 与其他株相应序列的同源性为 92%~98%; HPV-Pc 株 NS2 与其他株相应序列的同源性为 86%~94%; HPV-Pc 株 CP 与其他株相应序列的同源性为 72%~82%(表 1),核苷酸和氨基酸序列比对结果发现,不同地理株 cp 基因的突变位点遍布整个基因组,变异较大。

表 1 中国地区 HPV 与 GenBank 中 6 株 HPV 核苷酸序列及氨基酸同源性比较

Tab. 1 Homology analysis of HPV from China and six isolates from GenBank

GenBank 登录号 access. no.	宿主 host	品系 strain	核苷酸同源性 nucleotide homology			氨基酸序列同源性 amino acid homology		
			ns1	ns2	cp	NS1	NS2	CP
FJ410797	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	印度株 India	88	87	78	92	87	72
NC_007218	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	泰国株 Thailand	87	86	78	92	88	73
AY008257	墨吉对虾 <i>P. merguensis</i>	韩国株 Korea	96	96	85	98	94	82
EU247528	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	马达加斯加株 Madagascar	91	87	82	94	88	80
EU588991	斑节对虾 <i>P. monodon</i>	坦桑尼亚株 Tanzania	90	85	81	94	88	78
DQ458781	墨吉对虾 <i>P. merguensis</i>	澳大利亚株 Australia	91	86	80	92	86	75

### 3 讨论

对虾肝胰腺细小病毒是 Chong 等<sup>[1]</sup>于 1984 年最先从新加坡野生墨吉对虾中分离得到的一种病毒。该病毒可使对虾生长缓慢,导致慢性矮小残缺综合征(Runt Deformity Syndrome, RDS),严重时可使幼虾死亡率达到 100%<sup>[14]</sup>。中国许多地区的虾苗被 HPV 感染,造成对虾生长缓慢,规格参差不齐,影响虾农经济收益。目前对 HPV 引起的对虾病害尚无有效的治疗方法,只能以预防为主。为了深入了解 HPV-Pc 的致病机理,对其进行分子生物学水平的研究是非常有必要的。然而目前对对虾肝胰腺细小病毒的研究仅限于一些流行病调

查、Taq-man real-time PCR 等<sup>[15-16]</sup>检测方法探讨和序列测定,还未见对其更加深入的研究。

将本研究测得的中国明对虾 HPV-Pc 全序列与已登录 GenBank 的 3 株 HPV 全基因组进行比对发现,不同国家不同种对虾感染的 HPV 差异较大。各分离株的病毒基因组大小不尽相同,来自印度斑节对虾的病毒株 HPV 全基因组(FJ410797)为 6 310 bp,来自泰国斑节对虾的病毒株 HPV 全基因组(NC\_007218)为 6 321 bp,来自印度墨吉对虾的病毒株 HPV 全基因组(DQ458781)为 6 299 bp,而本研究中的 HPV-Pc 株病毒基因组大小为 6 085 bp。且不同地区各基因片段中编码衣壳蛋白的核

苷酸序列差异最大。这些差异的存在是否与病毒的宿主、致病性等方面相关还有待进一步研究。

本研究表明, HPV-Pc病毒基因组为线性, 全长 6 085 nt, 其负链的碱基组成为 37.05% A, 14.53% C, 24.87% G, 23.55% T; (G+C)的含量 39.39%, (A+T)的含量 60.61%。表明HPV-Pc核苷酸链中的A+T含量较高, 这个特征与对虾细小病毒IHHNV(56.96%)<sup>[17]</sup>、蚊子短杆状浓核症病毒AaeDENV(62.5%)<sup>[18]</sup>和AalDNA (61.8%)<sup>[19]</sup>相似。软件预测HPV-Pc基因组负链包含 3 个主要的ORF: ORF1(62 ~ 1 345 bp)、ORF2(1 330 ~ 3 066 bp)、ORF3(3 493 ~ 5 959 bp), 及非编码区 5'端的 61 个碱基和 3'端的 126 个碱基。其中ORF1 编码推导序列为 427 个氨基酸的非结构蛋白NS2, 在ORF1的上游有 1 个TATA盒, 可能在NS2 蛋白表达的调控过程中发挥作用。ORF2 编码含有 578 个氨基酸的非结构蛋白NS1。非结构蛋白NS可能与DNA的复制和转录的调节、病毒DNA和蛋白质的有效合成以及病毒的增殖有关。ORF3 编码含有 821 个氨基酸的CP蛋白, 为病毒粒子的核衣壳蛋白, 是刺激机体产生抗体的成分, 还可能与病毒的毒力及致病性有关<sup>[15]</sup>, 其在理论上具有细小病毒的特性, 天然状态下可自组装成病毒样粒子。该蛋白的氨基端为甘氨酸富集的疏水性氨基酸区域, 这个区域是细小病毒的一个保守区, 其中有些细小病毒在这个区域上游一定位置含有一个精氨酸“R”残基, 这个特殊结构可能容易使大蛋白水解为小蛋白, 如Sukhumsirichart 等<sup>[11]</sup>对虾HPVmon衣壳蛋白进行电泳发现, 在 57 kD、54 kD 位置有 2 条很浓的带, 97 kD 位置也有 1 条很弱的带, 富含甘氨酸(G)区域的上游(271 aa)和下游(278 aa)各存在着 1 个精氨酸(R)残基; 同样的情况也发生在啮齿类细小病毒, 衣壳蛋白VP2 在富含“G”的上游的“R”残基处水解<sup>[20-21]</sup>。HPV-Pc CP富含“G”的上游和下游不同位置都存在“R”残基, 其是否能造成衣壳蛋白裂解有待进一步的研究。

通常细小病毒基因组DNA的两末端非编码区均存在较长的反向重复序列(Inverted Terminal

Repeats, ITRs), 通常有数百个核苷酸, 其内部的回文结构可折叠形成T型、J型和Y型等构象<sup>[22]</sup>。有人提出细小病毒的复制遵循滚环发夹复制模型(modified rolling hairpin model)<sup>[23]</sup>, 并认为这类特殊的二级结构在细小病毒基因组复制和衣壳形成过程中起着重要作用<sup>[24]</sup>。然而迄今为止, 除了已经报道的泰国株的 5'和 3'端各有短的回文序列, 其他已经测定的HPV基因组末端均未发现明显的ITRs, 且这很短的回文结构不足以形成T型、J型和Y型等特殊结构进行基因组的复制。HPV-Pc株基因组中含有一些典型的细小病毒特征, 如编码区 $ns1$ 与 $ns2$ 基因相互重叠; 也有一些不同于一般细小病毒的特征, 如含有较大的基因组和 $cp$ 基因。另外, 本研究发现HPV-Pc基因组含有一些较短的正向、反向重复序列, 这些特殊结构的功能未知, 特别编码结构蛋白的CP区核酸序列末端存在以“GAA”为重复的正向重复序列, 这样的重复序列的存在是否与衣壳蛋白自组装有关, 是否还具有其他功能, 有待进一步研究。

本研究明确了目前中国地区对虾 HPV-Pc 流行株基因组的分子学特征, 为探讨 HPV-Pc 的基因功能、致病机理、表达调控的机制以及研制新型 HPV-Pc 基因工程疫苗或核酸疫苗奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Chong Y, Loh H. Hepatopancreas clamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore[J]. Singapore Vet, 1984, 9: 51-56.
- [2] Lightner D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp[C]//Baton Rouge, Los Angeles: World Aquat Society, 1996: 119-131.
- [3] Lightner D V, Redman R M. A parvo-like virus disease of penaeid shrimp[J]. Invertebr Pathol, 1985, 45: 47-53.
- [4] Anderson I G, Law A T, Shariff M. A parvo-like virus in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Invertebr Pathol, 1990, 55(3): 447-449.
- [5] 肖连春, 石正丽, 高伟, 等. 中国对虾一种球状病毒的分离提纯及其核酸蛋白特性的研究[J]. 中国病毒学, 1995, 12: 356-361.

- [6] 郑坚川, 杨宝华. 斑节对虾感染肝胰腺细小病毒的调查[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(11): 13–15.
- [7] Phromjai J, Sukhumsirichart W, Pantoja C, et al. Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp[J]. Dis Aquat Org, 2001, 46: 153–158.
- [8] Bonami J R, Mari J, Poulos B T, et al. Characterization of hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps[J]. J Gen Virol, 1995, 76: 813–817.
- [9] Kathy A L, Jennifer E, Leigh O. Molecular characterisation of hepatopancreatic parvovirus (PmergDENV) from Australian *Penaeus merguensis*[J]. Virology, 2007, 362: 397–403.
- [10] Wasana S, Pongsopée A, Vichai B, et al. Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*[J]. Virology, 2006, 346: 266–277.
- [11] Sakurai M, Nishimori T, Ushimi C, et al. Nucleotide sequence of capsid protein gene of porcine parvovirus[J]. Virus Res, 1989, 13: 79–86.
- [12] 黄健, 杨冰, 宋晓玲, 等. 对虾肝胰腺细小病毒病诊断规程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 1–4.
- [13] Mari J, Bonami J R, Lighter D V. Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps: Diagnosis of the disease using a specific probe[J]. J Gen Virol, 1993, 74: 2 637–2 643.
- [14] Flegel T W, Vitaya T, Tirasak P V, et al. Statistical correlation between severity of hepatopancreatic parvovirus infection and stunting of farmed black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 1999, 174: 197–206.
- [15] Kathy A L, Ramon L, Leigh O. TaqMan real-time PCR for detection of hepatopancreatic parvovirus from Australia[J]. J Virol Methods, 2007, 140: 10–16.
- [16] Paisarn K, Warin D, Parin C, et al. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid shrimp[J]. Mol Cell, 2008, 22: 177–183.
- [17] Shike H, Dhar A K, Burns J C, et al. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito brevidensoviruses[J]. Virology, 2000, 277: 167–177.
- [18] Afanasiev B N, Galyov E E, Butchatsky L P, et al. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densonucleosis* virus[J]. Virology, 1991, 185: 323–336.
- [19] Boublike Y, Jousset F X, Bergoin M. Complete nucleotide sequence and genome organization of the *Aedes albopictus* parvovirus(AaPV) pathogenic for *Aedes aegypti* larvae[J]. Virology, 1994, 200: 752–763.
- [20] Paradiso P R, Williams K R, Costantino R L. Mapping of the amino terminus of the H-1 parvovirus major capsid protein[J]. J Virol, 1984, 52(1): 77–81.
- [21] Rhode III S L. Trans-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein[J]. J Virol, 1985, 55(3): 886–889.
- [22] Bergoin M, Tijssen P. Molecular biology of Densovirinae[C]//Faisset S, Rommelaere J. Parvoviruses: From Molecular Biology to pathology and Therapeutic Uses. S. Karger AG, Switzerland, 2000: 12–32.
- [23] Astell C R, Chow M B, Ward D C. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication[J]. Virology, 1985, 54 (1): 171–177.
- [24] Astell C R. Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication[C]//Tijssen P. CRC Handbook of Parvoviruses, Vol.1. Boca Raton: CRC Press, 1990: 59–79.

## Genome cloning and sequence analysis of hepatopancreatic parvovirus (HPV) isolated from *Fenneropenaeus chinensis* in China

ZHANG Zheng<sup>1,2</sup>, HUANG Jie<sup>1,2</sup>, GAO Qiang<sup>1,3</sup>, CHENG Junjun<sup>1</sup>, WANG Mingsen<sup>1</sup>

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

**Abstract:** Hepatopancreatic parvovirus (HPV) is a single-stranded DNA virus. A HPV strain named as HPV-Pc was isolated from infected *Fenneropenaeus chinensis* from Tangshan of Hebei Province, China. In this study, full-length genomic sequence of HPV-Pc (GenBank Accession no. GU371276) was determined. It consists of 6 085 nucleotides and contains three open reading frames which encode for non-structural protein (NS1 and NS 2) and nucleocapsid protein (CP). The ORF1, ORF2 and ORF3 encode for proteins of 427, 578 and 821 amino acids, whose molecular weight are 50.4 kD, 68.2 kD and 92 kD, respectively. No inverted terminal repeat (ITR) was detected in 5' terminal end of the genome. The "R" motif rich in "G" in the region of CP was detected, which may result in cleaving of CP protein. The "GAA" direct repeats were found in the region of CP, which was specific to HPV. Genomes of HPV in different shrimp and from different region were different. All of the acquired fragments were spliced by biological software. Full-length HPV genome shows similarity of 78%–91% with other known HPV genome, and the differences existed throughout its sequence. Comparison analysis between HPV-Pc and other HPV strains submitted to GenBank showed that the HPV-Pc had a larger *cp* gene and longer genome size. The nucleotide homology of HPV-Pc with AY008257 (Korea strain) was the highest. Comparison analysis in NS2, NS1 and CP protein sequence also showed the highest homology existing between HPV-Pc and AY008257. These results suggest that HPV-Pc is a new isolate in Parvoviridae. This is the first nucleotide sequence of *F. chinensis*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 59–65]

**Key words:** hepatopancreatic parvovirus (HPV); *Fenneropenaeus chinensis*; genome sequence

**Corresponding author:** HUANG Jie. E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn

---

### 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、实验报告、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