

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2014.00655

大鲵虹彩病毒流行株的分离及其主衣壳蛋白编码基因序列比较分析

徐进, 张辉, 肖汉兵, 曾令兵

中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 大鲵虹彩病毒(giant salamander iridovirus, GSIV)是近年中国大陆新发现的引起人工养殖大鲵(*Andrias davidianus*)大规模死亡的病毒病原。为了揭示大鲵虹彩病毒流行株的基因型差异, 本研究对 2010–2012 年采集自全国不同大鲵养殖区域的患虹彩病毒病的大鲵样本进行了分子检测、病毒分离培养以及病毒主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因测序与比对分析。结果显示, 采自陕西、湖北、湖南、浙江、江西、福建等省的 10 个样本检测为阳性, 通过细胞培养获得 10 株病毒流行株。对该 10 株流行株 MCP 基因的测序与比对分析发现, 核苷酸序列相似性达到 99.7%~100%, 其推测的氨基酸序列无明显差异, 证实中国大鲵虹彩病毒流行株属同一基因型。系统进化树分析结果表明, 所选大鲵虹彩病毒与蛙病毒分别聚为一枝, 但其亲缘关系较近。本研究结果旨为大鲵虹彩病毒病的疫苗研制及其免疫防控技术研究奠定基础。

关键词: 大鲵虹彩病毒; 流行株; 主衣壳蛋白; 基因序列; 比对分析

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2014)04-0655-06

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼, 属于两栖纲(Amphibia)有尾目(Caudata)隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)大鲵属, 是中国二级保护动物, 并且被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约(CITES)》种类目录中, 是现存个体最大的两栖类动物, 在中国大陆主要分布于长江、黄河及珠江中上游支流的山涧溪流中^[1]。由于大鲵具有极高的经济价值, 最近几十年来, 因人为捕杀的原因, 大鲵的野生种群数量锐减^[2]。出于保护、开发和利用的目的, 中国大陆于 1978 年突破了大鲵的人工繁育技术^[3], 开始了大鲵的规模化人工养殖。目前大鲵已作为重点开发的养殖种类, 在陕西、山西、浙江、湖北、湖南、江西、福建、贵州等地广泛开展了人工养殖^[4]。

大鲵虹彩病毒(giant salamander iridovirus, GSIV)属虹彩病毒科(Iridoviridae), 蛙病毒属(*Ranavirus*), 是近年发现的感染大鲵的唯一病毒性病原^[5-6]。该病症主要表现为皮肤出现白点、出

血、溃疡, 四肢肿胀、溃烂, 头部肿胀。其危害巨大, 死亡率高, 发病快, 易传染, 目前在全国范围广泛流行, 造成重大经济损失, 已成为大鲵人工养殖业健康稳定发展的重要制约因素。本研究针对全国大鲵虹彩病毒病开展流行病学研究, 分离、鉴定来自不同养殖区的病毒流行株, 并对病毒的主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因进行测序与比对分析, 以期为大鲵虹彩病毒病的疫苗研制与免疫防控技术研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病鱼材料

大鲵在中国大陆的主要养殖区包括陕西、山西、湖北、湖南、浙江、江西、福建等地的自然发病养殖池采集患疑似病毒病大鲵样本。病鲵临床症状主要表现为烂肢、皮肤溃烂、全身性出血、腹水等症状。将濒死大鲵置于冰上保存, 立即送

收稿日期: 2014-01-02; 修订日期: 2014-02-22.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(201203086-05); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助(2012A0505).

作者简介: 徐进(1982-), 男, 助理研究员, 从事水生动物疾病研究. E-mail: xujin@yfi.ac.cn

通信作者: 曾令兵, 研究员. E-mail: zlb@yfi.ac.cn

至实验室进行病毒分离培养与鉴定。

1.2 细胞、菌种与主要试剂

鲤鱼上皮瘤细胞(EPC)为本实验室保存。感受态*E. coli* DH5 α 为本实验室制备与保存。新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, MEM细胞培养基为Sigma公司产品。pMD-19T载体、rTaq DNA聚合酶、DL2000 DNA Marker为宝生物工程(大连)有限公司产品; DNAzol试剂、DNA凝胶回收试剂盒为Invitrogen公司产品。

1.3 引物合成与DNA测序

根据GenBank上已发表的大鲈虹彩病毒的MCP基因序列(登录号: JN615141)设计扩增引物, 病毒检测引物P1: P1F: GACTTGCCACTTATGAC, P1R: GTCTCTGGAGAAGAAGAA, 扩增片段大小为531bp; MCP ORF全长扩增引物P2: P2F: ATGTCTTCTGTAACCGGTTTCAG, P2R: TTACAA GATTGGGAATCCCATC, 扩增片段大小为1 392 bp。引物合成与DNA序列测定委托北京天一辉远生物科技有限公司完成。

1.4 病毒分离与培养

病鱼组织匀浆液的制备: 取患病大鲈肝、脾、肾等内脏组织, 称重后加入10倍体积的鱼用生理盐水(0.68% NaCl溶液)于冰上匀浆, 匀浆液冻融3次后, 4 000 r/min、4℃离心30 min, 将上清液通过0.22 μ m微孔滤膜除菌, 滤液分装后于-80℃保存。

病毒接种培养: 取过滤的匀浆液, 再次10倍稀释后接种培养24 h的EPC细胞, 接种量为1 mL/T25瓶, 25℃吸附1 h后补加含2% FBS的MEM培养基至5 mL, 置20℃培养。同时设置空白阴性对照(加同样体积的生理盐水)与阳性对照。观察细胞病变效应(CPE), 待CPE达80%左右, 收获病毒于-80℃保存。样品首次接种细胞7 d内若无CPE出现, 则需盲传3次, 若仍无CPE出现, 则判定为阴性。阳性样品需进一步采用PCR法进行确认。

1.5 病毒DNA提取与PCR检测

取10 mL过滤的大鲈组织匀浆液或病毒培养液上清, 于4℃、28 000 r/min离心2 h, 收集沉淀用DNAzol试剂提取病毒基因组DNA, 方法参照

DNAzol试剂的使用说明。DNA沉淀用50 μ L的无酶水溶解, -80℃保存待用。

取5 μ L病毒基因组DNA模板, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, dNTPs 1 μ L, 引物P1F、P1R(20 μ mol/L)各1 μ L, rTaq 0.5 μ L(2.5 U), 补水至50 μ L, 混匀后进行PCR扩增。先94℃预变性5 min, 再94℃ 0.5 min, 55℃ 0.5 min, 72℃ 0.5 min, 35次循环, 然后72℃ 10 min, 最后4℃保温。PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳分析。

1.6 MCP基因扩增、克隆、测序与比较分析

取上述病毒基因组DNA 5 μ L作为PCR模板, 取10 $\times$ PCR buffer 5 μ L, dNTPs 2 μ L, 引物P2F、P2R(20 μ mol/L)各1 μ L, rTaq 0.5 μ L(2.5 U), 补水至50 μ L, 混匀后进行PCR扩增。先94℃预变性5 min, 再94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35次循环, 然后72℃ 10 min, 最后4℃保温。PCR产物在1%琼脂糖凝胶上电泳分析。

将琼脂糖胶上的目的条带切下, 用DNA凝胶回收试剂盒回收纯化DNA, 连接pMD-19T载体, 连接产物转化感受态*E. coli* DH5 α 细胞, 涂布于含氨苄青霉素、IPTG和X-gal的LB平板, 挑取白色菌落, 用PCR鉴定后, 将重组质粒进行序列测定。

应用DNASTAR以及MEGA 4.0分析软件对扩增的核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性进行比较。应用MEGA 4.0软件进行系统发育分析, 在GenBank上选择6株两栖类虹彩病毒以及3株鱼类虹彩病毒的MCP基因进行聚类分析: 大鲈虹彩病毒(GenBank登录号: KC465189, 以下同), 虎纹蛙病毒(AY033630), 饰纹汀蛙虹彩病毒(AY187046), 蛙病毒(U36913), 牛蛙病毒(AB474588), 鳖虹彩病毒(DQ335253), 流行性造血器官坏死病毒(AY187045), 欧鲇病毒(FJ358608), 短鳍鳗蛙病毒(FJ358612)。采用Neighbor-Joining聚类分析法构建进化树, bootstrap值为1 000次重复。

2 结果与分析

2.1 病毒流行株的分离培养与鉴定

2010–2012年, 本实验室分别在陕西、山西、湖

北、湖南、浙江、江西、福建等大鲵主要人工养殖区采集到 22 份疑似病毒病样本, 其中的 10 份样本(表 1)采用细胞培养的方法, 从内脏组织中分离到病毒病原, 其组织浆提取物接种 EPC 细胞后能产生明显的细胞病变效应(图 1)。从组织浆提取物以及接种组织浆的 EPC 细胞培养物中提取病毒 DNA, 用 GSIV 检测引物 P1 进行 PCR 扩增, 均能扩增出符合预期的特异 DNA 片段, 检测结果显示阳性(图 2)。

2.2 病毒 MCP 序列分析

对上述 10 株 GSIV 流行株的 MCP 基因开放阅读框(ORF)分别进行克隆与测序, 通过基因序列比对分析发现, 这 10 株 GSIV 流行株的 MCP 基因差异不大, 其中 HZ243、JGS430 与 LS913 株的 MCP 基因完全一致; LY126、NS126、PN110 与 SZ319 株的完全一致; 其他流行株之间的差异也在 99.7%以上(图 3)。通过对推测的氨基酸序列

表 1 大鲵虹彩病毒流行株信息表
Tab.1 Information of GSIV epidemic strains

病毒株名称 virus strain	采样日期 sampling date	采样地点 sampling location	主要临床症状 clinical symptoms	发病大鲵规格 specification
JZ104	2010-10-04	湖北省荆州市 Jingzhou, Hubei	全身性出血 systemic haemorrhage	成鲵, 幼鲵 mature & young individuals
PN110	2011-11-10	福建省屏南县 Pingnan, Fujian	烂肢、出血 ulcerationin limbs&haemorrhage	成鲵 mature individuals
LY126	2011-12-06	陕西省略阳县 Lueyang, Shaanxi	烂肢、腐皮 ulcerationin limbs& skin	成鲵 mature individuals
NS126	2011-12-06	陕西省宁陕县 Ningshan, Shaanxi	烂肢、腐皮 ulcerationin limbs& skin	成鲵 mature individuals
CS129	2011-12-09	湖南省长沙市 Changsha, Hunan	烂肢、出血 ulcerationin limbs&haemorrhage	成鲵 mature individuals
CS239	2012-03-09	湖南省长沙市 Changsha, Hunan	烂肢、出血 ulcerationin limbs&haemorrhage	成鲵 mature individuals
SZ319	2012-03-19	湖南省桑植县 Sangzhi, Hunan	腹部出血 abdominal haemorrhage	幼鲵 young individuals
HZ243	2012-04-03	浙江省湖州市 Huzhou, Zhejiang	烂肢 ulcerationin limbs	幼鲵 young individuals
JGS430	2012-04-30	江西省井冈山 Jinggangshan, Jiangxi	烂肢 ulcerationin limbs	成鲵 mature individuals
LS913	2012-09-13	浙江省丽水市 Lishui, Zhejiang	出血、腐皮 haemorrhage& ulceration in skin	成鲵、幼鲵 mature & young individuals

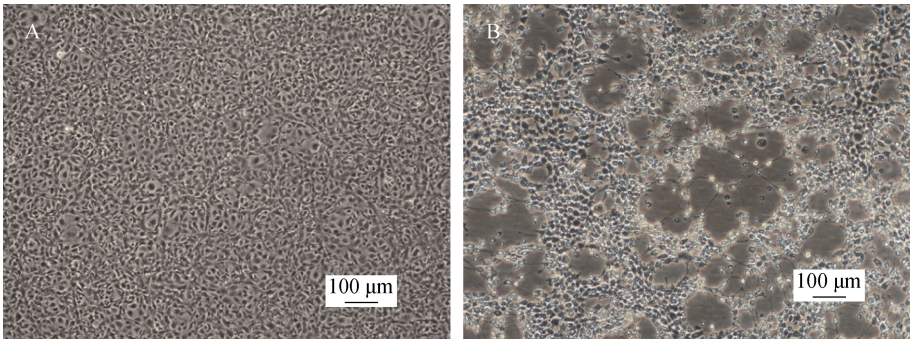


图 1 大鲵虹彩病毒 JZ104 株在 EPC 细胞上引起的细胞病变效应
A 为 EPC 正常细胞对照; B 为接种 GSIV JZ104 株第 2 代细胞毒第 6 天引起的细胞病变效应。
Fig. 1 The CPE of GSIV JZ104 strain infection in EPC cell line
A: Normal EPC cells; B: The CPE of GSIV JZ104 strain at 2nd passage at 6 dpi.

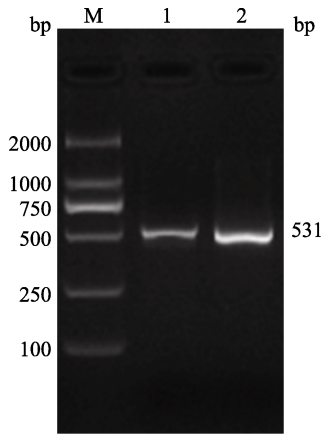


图 2 大鲵虹彩病毒 JZ104 株 PCR 检测结果
M 为 DL2000 DNA Marker; 1 为组织匀浆样本; 2 为细胞培养样本。
Fig. 2 PCR assay of GSIV JZ104 strain infected samples.
M: DL2000 DNA Marker; 1:tissue homogenate sample;
2: infected cell sample.

进行比对分析发现, 除了 CS129、CS239、JZ104 株分别在第 126、373、430 位氨基酸与其他流行株各有一个氨基酸的差异外, 其他流行株的 MCP 基因的氨基酸序列完全一致(图 4)。

2.3 系统进化树分析

系统进化树分析结果(图 5)表明, 所选取的 5 株有部分 DNA 序列差异的 GSIV 流行株与中国大鲵虹彩病毒聚为一枝, 各种蛙病毒株与鳖虹彩病毒株聚为一枝, 尽管大鲵虹彩病毒与蛙病毒分别聚类, 但其距离较近, 表明其亲缘关系较近, 而 3 种鱼类虹彩病毒则与蛙病毒以及大鲵虹彩病毒亲缘关系相对较远。

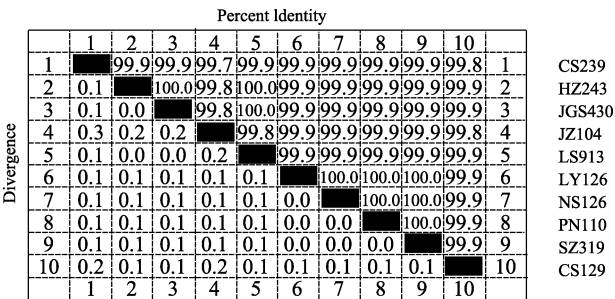


图 3 大鲵虹彩病毒各流行株 MCP 基因差异比较
Fig. 3 Divergence comparison of GSIV epidemic strains on MCP sequences

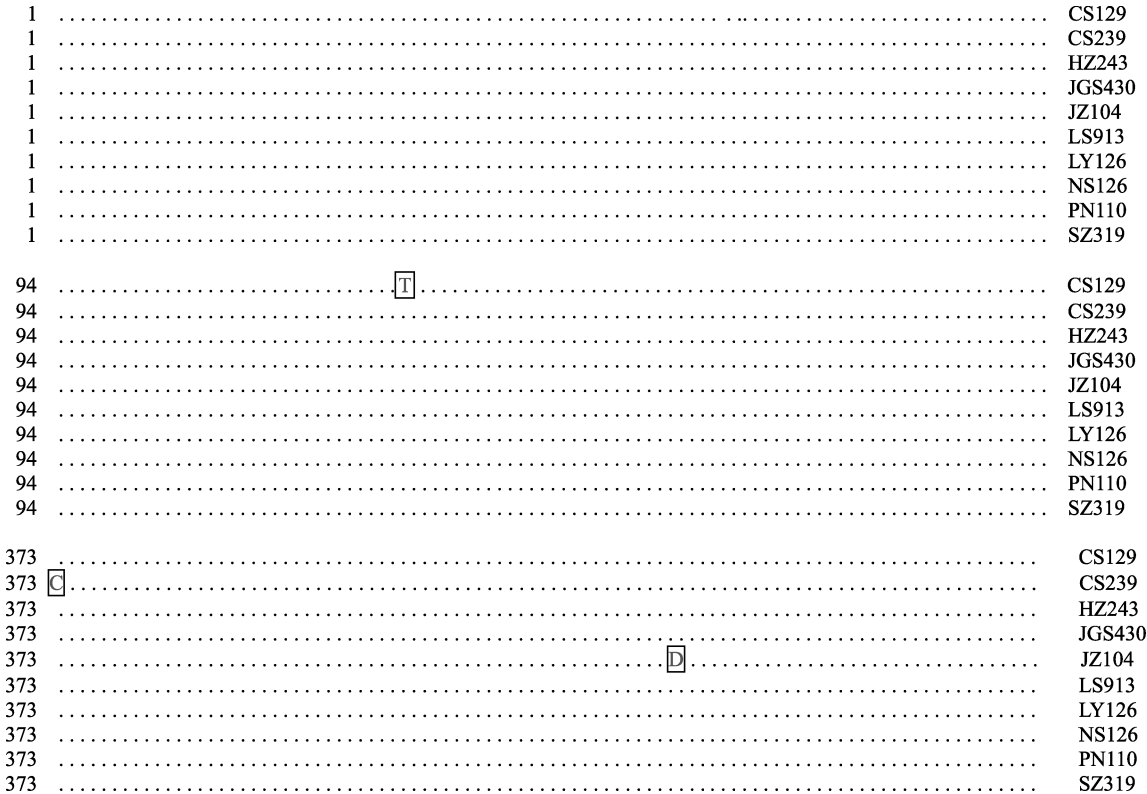


图 4 大鲵虹彩病毒各流行株 MCP 氨基酸序列差异比较
Fig. 4 Divergence comparison of GSIV epidemic strains on MCP aa sequences

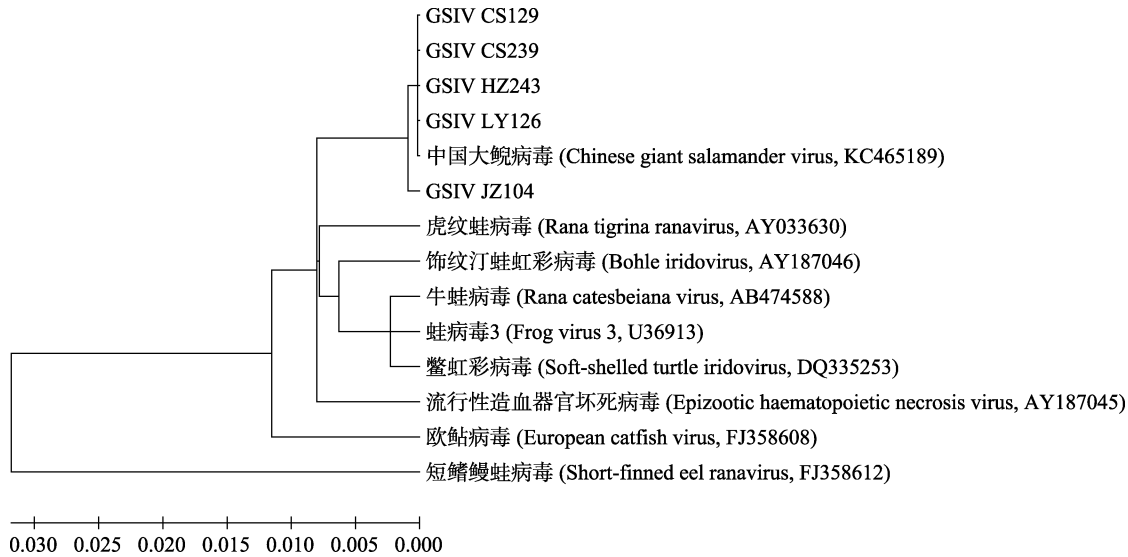


图 5 基于 MCP 基因的系统进化树分析

Fig. 5 The phylogenetic analysis based on MCP sequences

3 讨论

大鲵虹彩病毒病是目前中国大鲵人工养殖中危害最严重的疾病，其传染性强，致死率高，并且感染所有发育阶段的大鲵。本研究的流行病学调查结果显示，该病对大鲵的规格无专一性，从尚未完成变态发育的幼鲵到性成熟的成鲵，所有生长阶段的大鲵都可感染该病。从症状上看，该病的外部症状主要有出血和溃烂两种，出血症状通常表现为全身性出血，或者腹部皮肤出血；溃烂通常表现为体表局部溃疡，包括躯干皮肤溃烂（腐皮）、口腔溃烂、烂肢、烂趾等。2010年耿毅等^[7]报道了一例蛙病毒感染大鲵引起大规模死亡的病例，该病例体表症状既有体表溃疡与烂趾症状，也有腹部出血症状；而江育林等^[5]2011年报道的一例虹彩病毒感染大鲵的病例只以体表溃疡和烂趾为典型症状。也有研究资料显示，从患腐皮病的大鲵体内能分离到杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*)^[8]，但其采用猴胚胎肾上皮细胞Marc145进行病毒分离，未分离到病毒病原。通常病毒都有很强的宿主专一性，用哺乳动物细胞系来分离感染两栖类的病毒病原，分离不到病毒病原也属正常。结合我们的研究以及其他学者的研究结果，我们认为杀鲑

气单胞菌的感染应属继发感染，这种继发感染加快了疾病的进程，加速病鲵死亡。

EPC 细胞是大鲵虹彩病毒的敏感细胞系，所有通过 PCR 检测出来的阳性样本均能通过细胞培养的方法分离到病毒，因此采用 EPC 细胞培养法能有效分离并获得病毒株。

MCP 是虹彩病毒的主要衣壳蛋白，也是虹彩病毒的主要中和抗原蛋白^[9]，对病毒 MCP 基因全序列的对比分析有利于揭示病毒流行株之间的基因型差异，进而间接比较其血清型差异。对上述 10 株流行株的 MCP 基因 ORF 全长序列测序比对分析发现，尽管这 10 株流行株分别分离自全国 6 个省的 10 个大鲵养殖场，地理分布上北至陕西，南至福建，区域跨度很大，但这 10 株流行株的 MCP 基因差异不显著，同源性达 99.7%以上，部分流行株完全一致；对推测的蛋白氨基酸序列进行比对发现，除了 CS129、CS239、JZ104 的个别氨基酸位点有差异外，其他流行株的氨基酸序列完全一致。由此可以推测，目前全国大鲵虹彩病毒流行株都属同一个基因型。

基于 MCP 基因的系统进化树分析结果表明，本研究分离的 10 株 GSIV 流行株与 GenBank 上公布 MCP 序列的 GSIV 毒株聚为一枝，而各种蛙病毒株以及鳖虹彩病毒株聚为一枝，但亲缘关系较

近,表明其在进化上关系密切。

中国自 1978 年突破了大鲵的人工繁育技术以来,由于其在药用、食用、观赏等方面具有很高的经济价值^[10],大鲵的人工养殖业蓬勃发展,成为我国重要的名优养殖种类之一。高密度的养殖以及养殖环境的恶化必然会导致疾病的发生。由于不同地区间大鲵苗种与亲本的流通交换频繁,更加促使了疾病的快速传播与广泛流行。从本研究的流行病学调查结果来看,除了山西以外,全国其他主要大鲵养殖区都有大鲵虹彩病毒病暴发,造成了巨大的经济损失。因此,目前亟需建立严格的大鲵虹彩病毒病检疫制度,禁止患病大鲵的流通,并研究有效的疾病防控技术,特别是疫苗免疫防控技术,为中国的大鲵养殖业健康发展而保驾护航。

参考文献:

- [1] 牟洪民,李媛,姚俊杰,等.大鲵生物学研究的新进展[J].水产科学,2011,30(8):513-516.
- [2] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, et al. The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation[J]. Cambridge J, 2004, 38: 197-202.
- [3] 阳爱生,刘国钧.大鲵人工繁殖的初步研究[J].淡水渔业,1979(2):1-5.
- [4] 桂庆平.南方山区大鲵仿生态繁殖新技术初探[J].淡水渔业,2013,43(S1):58-61.
- [5] 江育林,张旻,景宏丽,等.患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J].病毒学报,2011,27(3):274-282.
- [6] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) [J]. JCompPath, 2011, 145: 95-102.
- [7] 耿毅,汪开毓,李成伟,等.蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J].中国兽医科学,2010,40(8):817-821.
- [8] 王印,林跃华.大鲵腐皮病病原的分离鉴定与药敏试验[J].黑龙江畜牧兽医,2009(7):89-90.
- [9] Young R K, Jun-ichi H, Ho B J, et al. Identification and determination of antigenic proteins of Korean ranavirus-1 (KRV-1) using MALDI-TOF/TOF MS analysis[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2011, 34: 237-245.
- [10] 侯进慧,朱必才,童玉玮,等.中国大鲵研究进展[J].四川动物,2004,23(3):262-266.

Isolation and analysis of MCP gene in giant salamander iridovirus epidemic strains

XU Jin, ZHANG Hui, XIAO Hanbing, ZENG Lingbing

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Giant salamander iridovirus (GSIV) is a viral pathogen, recently discovered in China, that causes mass mortality of farmed giant salamander (*Andrias davidianus*). Our objective was to evaluate the epidemiology of the disease and document genotype differences among strains isolated during epidemics at the major giant salamander breeding areas in China between 2010 and 2012. We performed molecular detection, virus isolation and propagation, and viral titer determination. Additionally, the major capsid protein (MCP) genes of the virus strains were sequenced and analyzed. The 10 samples that were collected from Shaanxi, Hubei, Hunan, Zhejiang, Jiangxi, and Fujian provinces tested positive. We subsequently obtained 10 GSIV epidemic strains by cell culture. Sequencing and comparative analysis of the MCP genes of the 10 epidemic strains revealed the nucleotide sequences had 99.7%-100% similarity and there was little difference among the deduced amino acid sequences. This suggests that all the epidemic strains are of the same genotype. The phylogenetic analysis suggested that the GSIV and frog virus strains clustered into different two branches, but the distance between branches was relatively minor. Our results provide a foundation for the development of a GSIV vaccine.

Key words: giant salamander iridovirus (GSIV); epidemic strains; major capsid protein (MCP); gene sequence; alignment analysis

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zlb@yfi.ac.cn