维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1): 81-84
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

对虾白斑综合征杆状病毒同源性比较的研究

黄灿华[1,2], 石正丽[2], 张吕平[3], 解云礼[2], 张立人[2], 陈棣华[2], 吴清江[1]

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072;
2. 中国科学院武汉病毒研究所无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉 430071;
3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510275)

Homology Comparison of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV) from Penaeid shrimp

HUANG Can-hua[1,2], SHI Zheng-li[2], ZHANG Lu-ping[3], XIE Yun-li[2], ZHANG Li-ren[2], CHEN Di-hua[2], WU Qing-jiang[1]

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan* 430072, *China*;
2. *Joint laboratory of Invetebrate Virology, Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan* 430071, *China*;
3. *Southern Institute of Oceanography, Academia Sinica, Guangzhou* 510275, *China*)

Abstracts: Homology of three WSSV isolates, which were sampled from representative maritime space of China: Tanghai isolate (Bo Bay of China), Ningbo isolate (East China Sea), Shenzhen isolate (South China Sea) was compared. Both of the genome RFLP patterns and the characteristic structural proteins SDS-PAGE electropherograms showed that they were quite same. It suggested that they were the same kind of WSSV virus that caused explosive epidemic diseases of shrimps (EEDS) throughout southern and northern China. The same large PCR products achieved when using the PCR primers from RV-PJ=PRDV (*P. japonicus*, Japan) and WSBV=PmNOBIII(*P. monodon* Taiwan, China) respectively to amplify the genome from *P. chinensis* (Tanghai, China) with high fidelity Taq Polymerase. The sequence identities of WSSV from *P. chinensis* with those from RV-PJ=PRDV (*P. japonicus*, Japan) and WSBV=PmNOBIII (*P. monodon* Taiwan, China) are 97% and 100% respectively, the results provided additional evidence that WSSV reported in different parts of the Asian and Pacific regions maybe quite the same or just different variants of the same virus.

Key Words: White Spot Syndrome Virus (WSSV); Homology comparison

摘要:比较我国沿海不同海域对虾白斑综合征杆状病毒三个分离株:即唐海分离株(渤海湾)、宁波分离株(东海)、深圳分离株(南海)的同源性。三个WSSV分离株基因组的限制性内切酶(*Sac* I, *Hind* III, *Pst* I)酶切多态(RFLP)以及病毒结构蛋白图谱完全一致,证实造成我国从南至北对虾爆发性流行病的对虾白斑杆状病毒为同一种病毒。利用高保真Taq酶,分别以报道的日本对虾杆状病毒(RV-PJ=PRDV),斑节对虾白斑综合征杆状病毒(WSBV=PmNOBIII)基因组核酸片段特异性引物进行PCR扩增,结果均能从中国对虾白斑杆状病毒(WSSV)基因组中扩增得到相应大小的PCR产物,扩增产物序列分析表明中国对虾白斑杆状病毒(WSSV)与斑节对虾白斑综合征杆状病毒(WSBV=PmNOBIII)、日本对虾杆状病毒(RV-PJ=PRDV)同源率分别为100%与97%,其结果为证实亚洲及太平洋地区对虾白斑综合征杆状病毒为同一种病毒或同一种病毒的不同株系提供了证据。

关键词:对虾白斑综合征杆状病毒(WSSV);PCR;同源性比较

中图分类号:Q939.4 **文献识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)01-0081-04

收稿日期:2000-05-23, 修回日期:2000-08-30

作者简介:黄灿华(1968-),湖北鄂州籍,博士,主要从事水生动物病毒研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

对虾白斑综合征杆状病毒(WSSV)于20世纪90年代初首先在中国台北发现,是1993年以来导致我国沿海人工养殖对虾爆发性流行病大规模频繁发生的主要病毒病原。随后在泰国、印度尼西亚、日本、韩国等亚洲及太平洋海岸国家相继也有类似的报道。此病毒先后被命名为中国对虾无包涵体杆状病毒(*Penaeus chinensis* non-occluded baculovirus CNBV),传染性皮下及造血组织坏死杆状病毒(Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Baculovirus, HHNBV),中国对虾杆状病毒(Chinese Baculovirus, CBV),日本对虾杆状病毒(RV-PJ = PRDV),系统性外皮层与中皮层坏死杆状病毒(SEMBV = PmNOBII),对虾白斑综合征病毒(WSBV = PmNOBIII)等[1-6]。由于第六次国际病毒学会议(ICTV)之后,无包涵体杆状病毒不再归属于杆状病毒科[7],因此其确切的分类地位及命名还有待进一步确定。基于这类病毒大小与形态发生等性质非常相似,Lightner(1996)建议暂统一命名为对虾白斑综合征杆状病毒(White Spot Syndrome Baculovirus, WSSV)。为了深入探讨WSSV不同分离株的同源性关系,本研究在核酸探针斑点杂交基础上,对我国不同海域的三个分离株病毒基因组酶切多态(RFLP)及病毒蛋白结构多肽进行了比较;同时还比较了中国对虾白斑综合征杆状病毒与日本对虾杆状病毒RV-PJ = PRDV,中国台北斑节对虾杆状病毒WSBV = PmNOBIII部份序列的同源性关系。

1 材料与方法

1.1 病毒材料

对虾白斑杆状病毒(WSSV)唐海分离株与宁波分离株分别从该地区发病虾池收集;深圳分离株由中科院南海海洋研究所张昌平博士提供。其它检测样品分别取自沿海发病虾池。

1.2 PCR引物

P1:5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3', P2:5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3' 来自日本对虾杆状病毒RV-PJ = PRDV基因组[8];P3:5'-ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG-3', P4:5'-TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A-3' 来自中国台北斑节对虾杆状病毒WSBV = PmNOBIII基因组(引物均由GIBCO公司合成)[9]。

1.3 主要试剂

高保真Taq酶(High fidelity Taq polymerase)为Boehrin-ger Mannheim公司产品。测序反应试剂:ABI PRISM BigDye™ Terminator cycle sequencing readyreaction kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS(Perkin Elmer)与限制性内切酶为大连宝生物(TAKARA)工程公司产品。蛋白分子量标准为上海华美生物工程公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 我国沿海WSSV三个分离株基因组酶切多态(RFLP)分析:WSSV三个分离株分别经克氏螯虾体内增殖模型进行病毒增殖[10];病毒纯化及病毒基因组核酸的提取参见文献[11]进行。病毒基因组酶切分析:病毒基因组DNA 2 μg,分别加入限制性内切酶 *Hin*d III、*Sac* I、*Pst* I 各 2 μL (15～20 u),37℃消化过夜。0.5×TAE电极缓冲液、0.4%琼脂糖凝胶电泳过夜。EB染色,置凝胶自动成像体系(Gel Doc 2000)扫描记录实验结果。

1.4.2 WSSV三个分离株结构蛋白图谱比较:三株WSSV病毒悬液各10 μL,添加等体积的样品处理液(0.0652 mol/L Tris-HCl pH6.8、20%甘油、4%SDS、10% β-巯基乙醇、1%溴酚兰),煮沸4min。采用不连续SDS-PAGE系统,浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度为11%,40V恒定电压电泳17 h。电泳后凝胶经考马斯亮兰染色,置凝胶自动成象体系(Gel Doc 2000)中扫描记录病毒多肽图谱。

1.4.3 中国对虾白斑杆状病毒WSSV与日本对虾杆状病毒RV-PJ = PRDV,中国台北斑节对虾杆状病毒WSBV = PmNOBIII部份序列比较:分别利用RV－PJ = PRDV, WSBV = PmNOBIII特异性PCR引物扩增中国对虾WSSV基因组DNA:100 μL反应体系中含:10×扩增缓冲液10 μL, dNTP(1.25 mmol/L) 16 μL, $MgCl_2$(25 mmol/L) 6 μL,引物P1和P2(50 pmol/μL)各2 μL, 1 μL模板DNA(10 ng/μL), 1 μL Taq酶(High fidelity, 1 U/μL),灭菌水62 μL。循环参数:Hot Start 94℃ 4 min;接着94℃变性1 min, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min,共30循环。最后,72℃保温7 min。0.8%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4.4 PCR产物序列分析 PCR产物经精制后,由宝生物TaKaRa大连有限公司在ABI: PRISM™ 377XL DNA Sequencer测序仪上作序列分析。

1.4.5 序列的同源性比较:采用Genbank/NCBI数据库中BLAST软件进行同源性比较分析。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结果与讨论

2.1 基因组酶切长度多态(RFLP)研究

选择三个代表性海域的 WSSV 分离株,病毒基因组分别经 *Hin*d III、*Sac* I、*Pst* I 三种酶切,其限制性片段长度多态(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)图谱如图1所示。

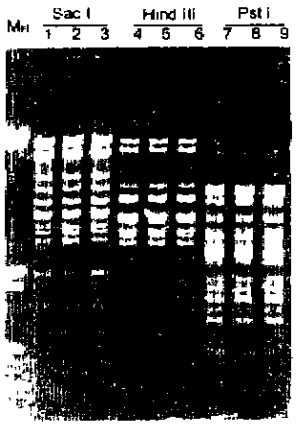

图1　三株对虾白斑病毒基因组酶切图谱比较

1,4,7,宁波;2,5,8,唐海;3,6,9,深圳;MIII,DNA/*Hin* dIII + *Eco*R I

Fig.1　RFLP comparison of three isolates of WSSV

1, 4, 7, Ningbo; 2, 5, 8, Tanghai; 3, 6, 9, Shenzhen; MIII, DNA/*Hin*d III + *Eco*R I.

2.2 WSSV 三个分离株病毒结构蛋白比较

WSSV 三个分离株经 13% SDS-PAGE 凝胶电泳后,病毒结构多肽图谱如图2所示。

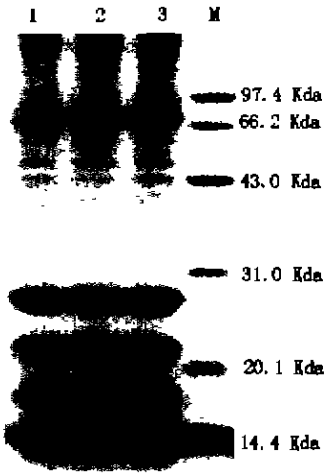

图2　三株对虾白斑杆状病毒(WSSV)结构蛋白比较(13% 分离胶)

M 蛋白分子量标记(道尔顿);1 唐海;2 宁波;3 深圳.

Fig.2　SDS-PAGE comparison of structure proteins from three WSSV isolates

Lane M, Marker(Da); Lane 1, Tanghai; Lane 2, Ningbo; Lane 3, Shenzhen

从图1,图2结果看出,来自我国不同海域的 WSSV 三个分离株无论病毒基因组酶切长度多态(RFLP),还是病毒结构多肽图谱特征均高度一致,结果有力地说明我国不同海域的 WSSV 分离株为同一种病毒。

2.3 PCR 扩增结果

以唐海中国对虾(*P. chinensis*)WSSV 基因组 DNA 为模板,分别以日本对虾(*P. japonicus*)杆状病毒 RV-PJ = PRDV,中国台北斑节对虾(*P. monodon*)杆状病毒 WSBV = PmNOBIII 部份基因组核酸片段的特异性引物序列进行 PCR 扩增,结果均能获得与各自预期 PCR 产物相同大小的核酸片段,即0.9 kb 和 1.4 kb(如图3)。

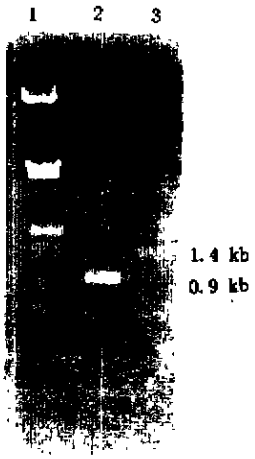

图3　分别利用 RV-PJ = PRDV, WSBV = SEMBV 特异性引物均能从中国对虾白斑综合征杆状病毒基因组中扩增出相同大小的 PCR 产物。

Fig.3　Results of PCR amplification of WSSV genome (*P. chinensis*) with primers from RV-PJ = PRDV, WSBV = SEMBV. The same large PCR products 0.9 kb and 1.4 kb achieved respectively.

在 PCR 扩增反应中,采用高保真 Taq 酶(High fidelity Taq polymerase)以保证扩增出的序列与模板序列一致。PCR 扩增产物经纯化与精制后进行序列分析,结果显示中国对虾白斑杆状病毒 WSSV 与 WSBV = SEMBV 同源率为 100%;而与 RV-PJ = PRDV 比较结果显示 RV-PJ = PRDV 较中国对虾 WSSV 缺少 17 个碱基,同源率为 97%(结果未显示)。虽然目前尚未取得十分充足的证据说明中国对虾白斑杆状病毒(WSSV)与亚洲太平洋地区其它国家报道的对虾白斑病毒完全一致,但该实验结果为证实亚洲及太平洋国家地区对虾白斑杆状病毒为同一种病毒或同一种病毒的不同株系提供了新依据。

孔杰等曾采用 DNA 随机扩增多态性(RAPD)技术证实造成青岛地区 94～95 年度对虾爆发性流行病危害病毒病原为同一种白斑杆状病毒[12] Nadala 采用 RFLP 技术比较了对虾白斑病毒中国分离株(Chinese Baculovirus CBV),印度尼西亚分离

维普资讯 http://www.cqvip.com

株(WSSV Indonesian isolate),美国分离株(U.S isolate)。结果表明三个分离株基因组只有中国分离株的 *Hin*d III 酶切图谱与其它两个存在细微差别,认为印尼与美国分离株同源性更为接近[13]。不过从其酶切图谱来看,这种差异是否由于某个核酸片段不完全酶解所致尚需进一步证实。

综观国内外 WSSV 研究,已有大量证据表明对亚洲太平洋地区人工养殖对虾造成巨大危害的白斑杆状病毒具有极高的同源性。其结果一方面将为人类寻找有效途径控制该病毒对养虾业及野生对虾种群造成危害提供了依据;另一方面也给人们提出了许多值得深思的问题,比如 WSSV 的最终起源与其中间宿主如何?WSSV 自 20 世纪 90 年代初在中国台北首先发现,为什么在短短不到 10 年的时间内迅速在东南亚及太平洋地区主要养虾国家,乃至西方某些非养虾国家的海域蔓延并造成危害?美国 JSA 研究机构关于"WSSV 感染与传播的概念模式"[14]指出未经严格检疫的亲虾与苗种跨国家和地区贸易是造成 WSSV 迅速扩散与蔓延的主要原因。其次,海洋水产养殖业的过度开发与生态环境的恶化,种群的高密度放养,抗生素类药物的盲目使用均是不可忽视的因素。近年来通过对沿海虾场的广泛调研,发现虾农普遍文化程度不高,又缺乏科学指导;只追逐利润而不太顾及养殖及生态环境的保护。比如发病虾池不经处理,立即投放二茬虾苗;虾池废水及废弃物随意排放等。结果不仅给自身虾池埋下隐患,同时病害很快波及邻近虾池乃至野生对虾种群。Lo 调查结果发现野生对虾种群已普遍感染 WSSV[15]。西方国家如美国、法国[14,16]都相继开始有组织地评估 WSSV 对其野生对虾资源的潜在冲击。我国有较辽阔的海域,近年来滩涂的过度开发应该引起政府有关部门的高度重视,尽快制定相关的法律与法规,加大亲虾与苗种贸易过程中监控与检疫的力度,加强对虾场与沿海生态环境的管理,防止病害的进一步恶化与蔓延,以保证海洋资源开发与利用走持续、健康的发展之道。

参考文献

[1] 张立人,张建红,陈棣华,等. 东方对虾杆状病毒在宿主细胞内的装配[J]. 电子显微学报, 1994, 13(5):354.

[2] 黄捷,于佳,宋晓玲,等. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究[J]. 海洋水产研究, 1995, 16(1):11-23.

[3] 黄灿华,石正丽,张立人,等. 两种病毒侵染中国对虾后细胞超微病理学变化与免疫标记[J]. 中国病毒学, 1997, 12(2):171-177.

[4] Inouye K, Yamano K, Ikeda N, *et al*. The penaeid rod shaped DNA virus (PRDV), which caused penaeid acute viremia (PAV) [J]. Fish Pathology, 1994, 31:39-45.

[5] Wongceerasupaya C, Vickers J E, Sriurairatana S, *et al*. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectoderma and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 21:69-77.

[6] Wang C H, Lo C F, Leu J H, *et al*. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon* [J]. Diseases Aquatic Organisms, 1995, 23:239-242.

[7] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al*. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [R] Springer-Verlag/Wien New York 1995 pp 504-507.

[8] Kimura T, Yamano K, Nakano H, *et al*. Detection of Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR[J]. Fish Pathology, 1996, 31(2):93-98.

[9] Lo C F, Lu J H, Ho C H, *et al*. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction [J]. Diseases Aquatic Organisms, 1996, 25:133-141.

[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] 石正丽,黄灿华,陈棣华,等. 中国对虾杆状病毒基因克隆及核酸探针制备与检测[J]. 中国病毒学, 1998, 13(3):263-267.

[12] 孔杰,石拓,刘萍,等. 中国对虾一种 C 型杆状病毒随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(4):394-398

[13] Nadala Jr. E C B, Loh P C. A comparative study of three different isolates of White Spot Virus[J]. Diseases Aquatic Organisms, 1998, 33:231-234.

[14] USJSA. An evaluation of potential shrimp virus impacts on cultured shrimp and wild shrimp populations in the Gulf of Mexico and southeastern US Atlantic Coastal Waters[A]. JSA Shrimp Virus Working Group, Washington DC. USA. 1997, pp23-32.

[15] Lo C F, Ho C H, Chen C H, *et al*. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 30:53-72.

[16] Bonami J R. The crustacean viral diseases: Recent developments [J]. Bull Eur Ass Fish diseases, 1997, 10:139-141.

[17] 黄灿华,陈棣华,吴清江. 对虾病毒病害研究的新进展[J]. 海洋湖沼通报, 1998, 4:69-81.