

鲤春血症病毒中国分离株糖蛋白基因和氨基酸序列的初步解析*

刘 茜¹, 付 峰², 黄 健², 何俊强¹, 史秀杰¹, 高隆英¹, 杨锦舜¹, 江育林^{1**}

(1. 深圳出入境检验检疫局动植物中心水生动物病重点实验室, 广东深圳 518001; 2. 中国科学院黄海水产研究所水产病害控制研究室, 山东青岛 266071)

Amino Acid Sequence of a Chinese Isolate of Spring Viraemia Virus of Carp and Preliminary Analysis of the Glycoprotein Gene

LIU Hong¹, FU Feng², HUANG Jie², HE Jun-qiang¹, SHI Xiu-jie¹, GAO Long-ying¹,
YANG Jin-shun¹, JIANG Yu-lin^{1**}

(1. Key Lab of Aquatic Animal Diseases, Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Eight Spring Viraemia Viruses (SVCV) have been isolated from cultured carp and koi in China between 2002 to 2004. Based on the complete genome of SVCV reference strain, primers were designed and the glycoprotein genes from the 8 isolates were amplified, cloned and sequenced. These genes were compared with other SVCVs in GenBank and showed nucleotide identities of more than 92%. There was more than 97.7% nucleotide identities within the eight isolates. The homology was more than 94.5% among the deduced amino acid sequences of the 8 isolates and 92.0~94.0% with other SVCV isolates. Phylogenetic analysis showed that the isolates shared evolutionary direction with USA isolates, and were different from other SVCV isolates from European countries. Nineteen common enzyme sites were found in the 8 isolates. Ten hydrophobic regions, 10 possible antigenic sites and 10 transmembrane domains were also searched by the software and showed almost the same patterns. The functional sites include MYRISTYL, RGD, CK2-PHOSPHO, PKC-PHOSPHO, TYR-PHOSPHO and Asn-glycosylation sites.

Key words: Spring viraemia of carp virus (SVCV); Glycoprotein; Sequences Analyses

摘要: 2002~2004 年间从国内养殖鲤科鱼类和观赏鱼类中分离出 8 株鲤春血症病毒(SVCV)。根据 SVCV 参考株全序列,设计引物,用逆转录聚合酶链式反应扩增出 8 株 SVCV 糖蛋白编码基因片段,并对扩增产物进行了克隆和序列测定。用生物信息学方法对测得的序列进行分析,结果 8 个国内分离株的糖蛋白基因序列与参考株的基因序列相似性均在 92% 以上,8 个国内分离株之间基因序列相似性均在 97.7% 以上;8 个国内分离株之间糖蛋白推导出的氨基酸序列相似性均在 94.5% 以上,与参考株氨基酸序列相似性在 92.9%~94.9% 之间。系统发育树分析结果表明,SVCV 国内分离株与 USA 株、980451 株、980528 株和 970469 株的进化方向一致,与其它 SVCV 毒株在进化方向上不同。8 个毒株有 19 个共同的酶切位点,推导出的氨基酸序列中有 10 个亲水区、10 个可能的抗原位点和 10 个跨膜蛋白区域,其峰值基本一致。对 SVCV 国内分离株的糖蛋白 6 个功能位点(天冬酰胺基化位点、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪氨酸磷酸化位点和肉豆蔻酰基化位点)进行了初步分析。

关键词: 鲤春血症病毒; 糖蛋白; 序列; 解析

中图分类号:Q938.8

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0647-05

收稿日期:2005-04-21,修回日期:2005-05-26

* 基金项目:该项目由农业部中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室资助。
作者简介:刘 茜(1971—),女,安徽省籍,博士,主要从事水生动物病毒学方面的研究工作和进出境水生动物病害的检疫工作。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0755-25592980. E-mail: szapqbxi@163.net

鲤春病毒血症(Spring viraemia of carp, SVC)是鲤科鱼类的一种严重的传染病,主要感染鲤鱼和锦鲤、草鱼、鲢鱼、鳙鱼、黑鲫、鲫鱼、丁鱼岁和欧鲇等,其中,鲤鱼是最敏感的宿主。该病主要流行于欧洲,对欧洲各国鲤科鱼类养殖造成了巨大的损失^[1]。感染了鲤春血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV)的鱼类死亡率很高。由于体内盐水平衡受到破坏,使病鱼在临幊上表现为水肿,以及肾脏、脾脏和肝脏的严重出血。这些临床症状的出现是由于病毒在体内增殖,尤其是在毛细血管内皮细胞、造血组织和肾细胞内增殖所致。养殖水温为10~17℃时,发病率和死亡率最高。

SVCV 属于弹状病毒科的水疱病毒属^[2],其病毒粒子包含5个结构蛋白,分别为核蛋白、磷蛋白、膜蛋白、糖蛋白和依赖RNA的RNA聚合酶^[3]。糖蛋白是SVCV引起宿主免疫学反应的最重要的成分,并决定了病毒的血清学特性^[4]。糖蛋白基因的编码序列在SVCV不同区域分离株的进化关系上是主要的参考序列^[5]。

1998年,英国先后三次分离出SVCV,分离出的毒株在血清学特性和基因序列上和参考有着明显的差异。2002年4月,在美国的北卡罗来纳州和威斯康星州,分别暴发了养殖锦鲤和野生鲤鱼的大量死亡,在病死鱼中均分离出SVCV,而且和在英国1998年分离出的毒株在血清学特性和基因序列上高度一致^[6]。鲤科鱼类从古至今一直是我国的主要淡水养殖品种,在我国从来没有过SVC暴发的报道。但2003年我们分别在北京、天津等地送检的样品中分离出可疑毒株,并用SVCV特异性的引物,扩增出阳性的片段,证实我们所分离出的毒株就是SVC^[7]。本研究的目的就是通过逆转录-聚合酶链式(Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)反应,扩增出SVCV糖蛋白的编码基因片段,并且对扩增出的片段进行克隆、测序,结合生物信息学的研究方法和分析软件,对测序结果及推断出的糖蛋白编码氨基酸序列进行解析,从而确定我国所分离出的SVCV毒株的来源以及与欧洲株和美国分离株在进化上的联系,并对国内分离株糖蛋白基因和氨基酸序列进行初步解析。为制定有效的控制措施,切断SVCV的传播途径,进一步深入研究SVCV致病机理打下基础。同时,糖蛋白基因的克隆还可用于SVCV的快速检测方法的建

立以及基因工程疫苗的制备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SVCV参考株由英国Weymouth的OIE参考实验室赠送。464株分离自锦鲤,772株分离自金鱼,461株、926株、978株、992株、741株和948株均分离自养殖鲤鱼。草鱼性腺细胞系(简称CO)用于本研究中的病毒分离和扩增。PT7Blue T vector和敏感菌 *E. coli* JM109由大连宝生物工程有限公司提供。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如下:

SVCV-GF: 5'-TCAAACATGATGTCTGTTATA-
3'

SVCV-GR: 5'-CTGTTCATGGGAGATTAAGT
T-3'

扩增SVCV糖蛋白基因1663 bp的DNA片段。

1.2 病毒分离

参照文献介绍方法分离病毒^[8]。

1.3 核酸抽提和RT-PCR扩增

核酸抽提采用酚/氯仿/异戊醇抽提方法。RT-PCR扩增参照文献方法^[9]。

1.4 PCR产物纯化和克隆

PCR产物经纯化后,与PT7Blue T vector连接后转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中,在含有X-Gal、IPTG 和氨苄青霉素(Amp)的L-琼脂平板培养基上培养。从转化平板上挑选白色的单菌落,并以M13-47(5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACG AC-3')和RV-M(5'-GAGCGGATAACAATT CACACAGG-3')为引物进行PCR扩增,检测质粒中插入片段的长度。

1.5 DNA序列测定和分析

将阳性菌落提取质粒DNA后用M13-47、RV-M引物进行双向测序,测序在大连TaKaRa公司完成。基因序列、氨基酸序列、亲/疏水性分析、抗原性分析、蛋白功能位点分析等分别采用BLAST、SEQUENCHER、DNAsis、OMIGA、DNAMAN和TREECON等软件进行。

2 结果

2.1 SVCV糖蛋白编码基因的扩增和序列测定

用所设计的引物在分离出的SVCV毒株中均扩增出长度为1663 bp的DNA片段。对扩增产物进行克隆、测序,将其中糖蛋白编码基因序列提交给GenBank,获得461株、464株、772株、926株、978

株和 992 株的接受号分别为 AY842484、AY842485、AY842486、AY842487、AY842488 和 AY842489。SVCV 国内分离株糖蛋白基因长 1530 bp, 编码 509 个氨基酸, 预测分子量为 61 kDa。

2.2 SVCV 糖蛋白编码基因相似序列的多重比较

用 GenBank 中的 Blastn 软件进行相似序列的搜寻, 结果共搜寻到相关基因 27 条, 其中有 3 个完整的病毒基因组序列, 1 个糖蛋白编码基因的全序列, 其它为病毒结构蛋白编码基因部分序列。相似性比较结果(表 1)显示, 8 个国内分离株之间基因序列相似性均在 97.7% 以上, 与 SVCV 参考株(Fijian

株)基因序列相似性均在 92% 以上, 与 USA 株基因序列相似性均在 98.1% 以上; 8 个国内分离株之间糖蛋白推导出的氨基酸序列相似性均在 94.5% 以上, 与 Fijian 株氨基酸序列相似性均在 92.9%-94.9%, 与 USA 株基因序列相似性均在 95.3% 以上。

2.3 糖蛋白编码基因及其推导氨基酸序列变异位点的分析

比较 SVCV 国内分离株、Fijian 株和 USA 株糖蛋白编码基因及其氨基酸序列变异位点(表 2), 发现国内分离株和 USA 株有共同的 14 个氨基酸位

表 1 SVCV 国内分离株与其它株核酸序列及其推导的氨基酸序列相似性的比较。

Table 1 The identity of glycoprotein nucleic acid and the deduced amino acid sequences of SVCV isolated in China and other strains

Strains	461	454	741	772	926	948	978	992	USA	Fijian
461		99.1	98.1	98.8	98.7	98.1	98.9	98.6	98.6	92.2
464	98.6		98.1	98.9	98.5	98.1	98.9	98.6	98.6	91.9
741	98.0	98.0		98.1	98.1	98.3	98.5	98.0	98.6	91.8
772	97.6	98.2	97.6		99.2	97.7	98.5	98.3	98.2	91.8
926	97.2	97.2	97.2	98.0		97.5	98.3	98.1	98.0	91.6
948	96.6	96.6	97.4	98.0	94.5		98.9	97.7	99.4	91.5
978	98.0	98.0	98.2	96.6	95.8	97.6		98.5	99.2	92.4
992	98.4	98.4	98.0	97.0	96.8	96.0	97.6		98.1	92.2
USA	97.4	97.4	97.8	96.0	95.3	98.4	98.0	96.6		91.9
Fijian	93.9	93.3	94.1	92.9	92.7	92.9	93.9	94.9	93.1	

表 2 SVCV 各株编码基因序列和氨基酸序列变异位点
Table 2 The variation sites of nucleic acid (NA) and amino acid (AA) sequences among SVCV isolates

Chinese		USA isolate		Fijian isolate	
Site	NA/AA	Site	NA/AA	Site	NA/AA
47,48	C,A/Thr	57,58	C,A/Thr	47,48	A,C/Asn
332	A/Lys	342	A/Lys	332	G/Arg
343,344	T,C/Ser	353,354	T,C/Ser	343,344	C,A/Gln
437,438	A,G/Lys	447,448	A,G/Lys	437,438	G,A/Arg
564	T/Asp	574	T/Asp	564	G/Glu
629	C/Ala	639	C/Ala	629	T/Val
644	C/Ala	654	C/Ala	644	T/Val
652,653	A,T/Ile	662,663	A,T/Ile	652,653	G,C/Ala
710,711	G,A/Arg	720,721	G,A/Arg	710,711	A,G/Gln
745,747	A,A/Thr	755,757	A,A/Thr	745,747	G,G/Ala
793	T/Tyr	803	T/Tyr	793	C/His
815	C/Ala	825	C/Ala	815	T/Val
1261	G/Ala	1271	G/Ala	1261	A/Thr
1481,1482	A,A/Lys	1491,1492	A,A/Lys	1481,1482	G/Arg

点, 与 Fijian 株有差异。其中国内分离株和 USA 株有 3 个氨基酸位点为疏水性的丙氨酸, 而 Fijian 株相应的氨基酸位点为亲水性缬氨酸; 国内分离株和 USA 株有 1 个氨基酸位点为非极性的丙氨酸, 而 Fijian 株相应的氨基酸位点为极性的苏氨酸。其余位点氨基酸的差异没有引起极性、亲/疏水性和酸碱性的变化。

2.4 SVCV 国内分离株糖蛋白编码基因系统发育树分析

使用 TREECON 软件, 采用邻位相连法(Neighbor-joining)获得系统发育树(图 1), 通过自举分析(Bootstraping)进行系统发育树的评估, 自举数据集为 1000 次。结果发现国内分离株与 USA 株和属于 Ia 基因亚型的 980451 株、980528 株和 970469 株在系统发育树上的进化方向一致, 与其它 SVCV 毒株(毒株分离时间和分离地点见文献^[5])在进化方向上有明显的差异。国内分离株中, 992 株与其它株的进化方向上有差异。

2.5 SVCV 国内分离株糖蛋白基因酶切位点分析

利用 DNAMAN 软件, 对 8 个 SVCV 国内分离

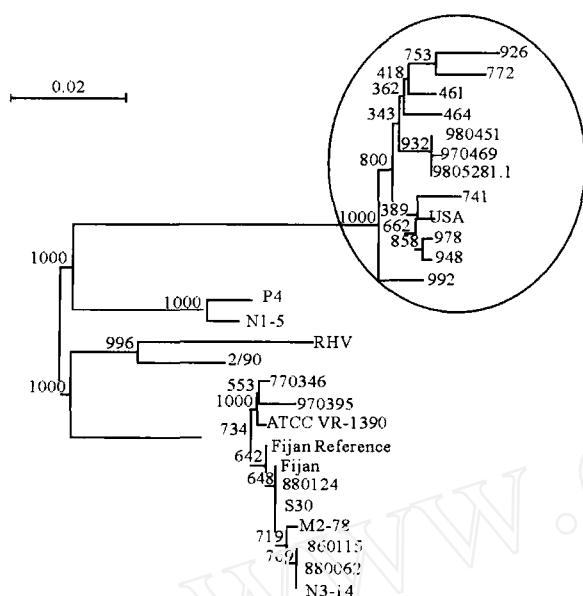


图1 SVCV系统发育树分析结果

Fig. 1 Phylogenetic tree of the isolates of SVCV

株的糖蛋白基因进行酶切位点分析,得到差异酶切图谱和一致酶切图谱。结果8个毒株有19个共同的酶切位点;除978株外,在477 nt处都有*SunI*和*Spl I*酶切位点;461、464、948、978和992在989 nt处有*pfm I*酶切位点;741、948和978在799 nt处有*Ssp I*酶切位点;926株在130 nt和657 nt处分别有*Eam1105I*和*Cla I*酶切位点;992株在663 nt处有*Vsp I*酶切位点。

2.6 SVCV国内分离株推导出的糖蛋白氨基酸序列分析

利用Omiga软件,对8个SVCV国内分离株、USA株和Fijian株从基因序列推导出的氨基酸序列进行亲/疏水性分析,结果在1~50 aa和450~500 aa范围内有2个疏水区,在50~450 aa内有10个亲水区。

用Omiga软件对SVCV国内分离株、USA株和Fijian株糖蛋白进行抗原性分析,结果在50~450 aa内有10个可能形成抗原位点的区域,每个区域的峰值与亲水区的峰值基本一致。

用Omiga软件对SVCV国内分离株、USA株和Fijian株糖蛋白序列跨膜区进行比较,结果有10个可能跨膜区域,每个区域的峰值与亲水区和抗原性位点的峰值基本一致。

2.7 SVCV国内分离株糖蛋白功能位点分析

对SVCV8个国内分离株、USA株和Fijian株进行糖蛋白功能位点对比。

所有8个国内分离株、USA株和Fijian株在第212和250个氨基酸处有2个精氨酸—甘氨酸—天

冬氨酸(RGD)位点。所有8个国内分离株、USA株和欧洲株在第83个氨基酸处都有1个酪氨酸磷酸化(TYR-PHOSPHO)位点。

461、948、978株、USA株和Fijian株都第28、181、338、362和369个氨基酸处有5个天冬酰胺糖基化(Asn-glycosylation)位点;464、741、772、926和992株在28、181、338和369个氨基酸处有4个Asn-glycosylation。

所有毒株在第84、106、119、121和316个氨基酸处都有酪蛋白激酶II磷酸化(CK2-PHOSPHO)位点。除上述6个位点外,461、464、741、772、926、948、978、992和USA株在第149个氨基酸处有1个CK2-PHOSPHO位点;772和926株在第263个氨基酸处有1个CK2-PHOSPHO位点;Fijian株在第263个氨基酸处有1个CK2-PHOSPHO位点。

所有毒株在第60、69、305、464和495个氨基酸处有蛋白激酶C(PKC-PHOSPHO)位点;461、464、772、926、978、992和Fijian株在第25个氨基酸处有1个PKC-PHOSPHO位点;除Fijian株外的其它株在第235个氨基酸处都有1个PKC-PHOSPHO位点。所有毒株在第46、53、204、245、274、328和390个氨基酸处都有7个肉豆蔻酰基化(MYRISTYL)位点。除上述7个位点外,741、948株和USA株在第26个氨基酸处有1个MYRISTYL位点,741株、948和978株在第259个氨基酸处有1个MYRISTYL位点。

3 讨论

SVC在欧洲一些国家的鲤鱼养殖业中曾经造成巨大的危害^[10],但在亚洲,一直未见有暴发SVC的报道。1998年英国环境、渔业和水产养殖科学研究中心(The Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science,简称CEFAS)分离出3株SVCV。2002年美国威斯康星州西北部Cedar湖大量鲤鱼死亡,在死亡鱼中检出SVCV。进一步检测结果表明在北卡罗来纳州和威斯康星州分离出的毒株在血清学上与英国从中国进口锦鲤中分离的毒株相似,而与SVCV参考株都有明显的差异。2001~2004年间,我们在全国范围内进行SVCV的监测,先后在送检的样品中分离出15个SVCV毒株,并首次报道了SVCV的分离和鉴定^[10]。由于许多渔场都是取用地下水,而且养殖用水在排出前,也都经过严格的消毒。分离出病毒的渔场远离其他渔场,水源完全独立,并经过检验检疫部门两年以上的严格监测。因此,对国内SVCV的来源有必要作进

一步调查。

病毒的糖蛋白位于病毒的表面,有高度的抗原性,既是动物机体免疫系统识别的成分,也是病毒感染时细胞与病毒相互作用的重要因子。它能选择性地与宿主细胞受体结合,促使病毒包膜与宿主细胞膜融合,感染性核衣壳进入细胞内而导致感染。弹状病毒的糖蛋白决定着血清学特性^[1]。近年来,随着生物信息学技术的迅速发展,相关软件得到大量应用,通过对基因序列和氨基酸序列的比较和分析,可得到大量关于病毒及其毒株的大量的相关信息。国内分离株与欧洲株基因序列相似性均在92%以上,推导出的氨基酸序列的相似性在91~92%,和其它病毒序列相似性均在60%以下。Stone等^[5]对各地分离出的SVCV毒株部分糖蛋白基因序列进行了分析和系统发育树研究,并根据分析结果将SVCV分为Ia、Ib、Ic和Id四个基因亚型。本研究中,将SVCV国内分离株8株与Stone等^[5]分析的其它16个SVCV毒株的部分糖蛋白序列进行系统发育树研究,结果发现与属于Ia亚型的980528和980451株的亲源关系最近,这表明SVCV国内分离株与在英国从中国进口的观赏鱼中分离出的SVC病毒有着密切的关系。

比较SVCV国内分离株、USA株和Fijian株糖蛋白氨基酸序列的差异,发现有4个位点存在着亲/疏水性的差异,1个位点存在着极性的差异。这些差异在引起SVCV毒力、血清学和致病机理方面所起到的作用,还有待于进一步确认和分析。

对SVCV进行亲/疏水区、抗原性和跨膜蛋白进行初步分析,结果在50~450 aa序列之间寻找到了10个亲水区,10个可能的抗原位点和10个跨膜区域,它们的峰值都基本一致。表明疏水区域、抗原位点和跨膜区域之间有着密切的关系。对这些位点在抗体产生和病毒侵染过程中所起到的作用,还有待于做进一步的分析和研究。

对SVCV糖蛋白功能位点进行分析,结果寻找出了6个主要的功能位点,分别是MYRISTYL位点、RGD位点、CK2-PHOSPHO位点、PKC-PHOSPHO位点、TYR-PHOSPHO位点和Asn-glycosylation位点。Asn-glycosylation是最常见的一种蛋白质翻译后修饰,在内质网中进行,由寡糖结合天冬酰胺残基进行,糖基化改变是细胞恶化的一个主要特征。肉豆蔻(MYRISTYL)酰化作用在细胞正常

功能中起着重要作用。RGD位点一般为细胞外基质蛋白中细胞整合素蛋白家族受体上的识别位点,在细胞吸附中起作用。CK2-PHOSPHO参与细胞的调控,PKC-PHOSPHO被激活后可传递细胞外信号,使细胞进行多种应答,在多阶段致癌作用中起作用,TYR-PHOSPHO在干扰早期信号传递中起作用。在国内分离株和欧洲株糖蛋白基因推导出的氨基酸序列中均有上述6个功能位点,对它们在病毒侵染细胞和细胞凋亡中所起到的作用和机制,有必要做进一步的研究。

参考文献

- [1] Fijian N. Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish[A]. Woo P T K, Bruno D W. Fish diseases and disorders[C]. Oxon: CAB International. 1999. 177-244.
- [2] Walker P J, Benmansour A, Calisher C H, et al. Family Rhabdoviridae[A]. van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. The seventh report of the International Committee for Taxonomy of viruses[C]. San Diego: Academic Pres. 2000. 563-583.
- [3] Hoffmann B, Schutze H, Mettenleiter T C. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus [J]. Virus Res, 2002, 84 (1-2): 89-100.
- [4] Jorgensen P E V, Olesen N J, Ahne W, et al. SVCV and PFR viruses: serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two fish rhabdoviruses[A]. Ahne W, Kurstak E. Viruses of lower vertebrates[C]. Heidelberg: Springer Verlag, 1989. 349-366.
- [5] Stone D M, Ahne W, Denham K L, et al. Nucleotide sequences analysis of the glycoprotein pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroup[J]. Dis Aquat Org, 2003, 53: 203-210.
- [6] Audrey L D, Craig R, Kathy T K. First report of Spring viremia of carp virus (SVCV) in wild common carp in North America[J]. J Aquatic Animal Health, 2004, 16: 169-178.
- [7] Liu H, Gao L Y, Shi X J, et al. Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in P. R. China[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 2004, 24(4): 204-212.
- [8] World Organization for Animal Health: Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases[M]. 3rd. Paris: Office International Des Epizootics, 2000. 79-81.
- [9] 刘 茜,史秀杰,高隆英,等.鱼病毒性神经坏死病病毒(VNN-VN)不同基因型鉴别方法的建立及在VNN检疫和监测中的应用[J].水产学报,2004,28(6):695-702.
- [10] Ahne W, Bjorklund HV, Essbauer S, et al. Spring Viremia of carp (SVC)[J]. Dis Aquat Org, 2002, 52: 261-272.