

桃拉综合征病毒中国株 ZHZC3 全基因测序及分子结构预测

黄新新, 陆承平**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

Genome Sequencing and Structure Prediction of ZHZC3 Strain of Taura Syndrome Virus Isolated in China

HUANG Xin-xin, LU Cheng-ping**

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Eight overlapping clones covering the whole viral genome of TSV ZHZC3 isolate were amplified by RT-PCR and the 5' and 3' ends were amplified with RACE. The PCR products were cloned into pMD-18T vector and sequenced. The result showed that the genome of ZHZC3 consisted of 10202nt excluding the poly (A) tail, and contained two ORF_S (ORF_S1-2) which encoded polyproteins of 2107aa and 1011aa. No insertions or deletions were detected in the coding regions while 3nt of A were deleted at 5' UTR when compared with HI94. The overall nucleotide sequence identity between ZHZC3 and HI94 was 97.6%. Compared with HI94 and BLZ01, the ORF1 of ZHZC3 shared 97.6% and 97.7% nucleotide sequence identity. The ORF2 shared 98.3 and 97% sequence identity at the nucleotide level. Compared with partial sequences of ORF2 from foreign isolates, both ZHZC3 and the Taiwan isolates shared higher nucleotide identity with HI94. Amino acid sequence analysis of six TSV isolates from different regions of mainland China revealed unique aa changes at 312 (S), 449 (A), 451 (Q), and 468 (H) in the highly variable region CP2 of ORF2, indicating that the isolates spread through the South-eastern China most closely related to the other isolates with its own evolutionary character.

Key words: *Taura syndrome virus* (TSV); Genome; CP protein; Homology modeling

摘要: 设计 8 对引物片段扩增桃拉综合征病毒中国分离株 ZHZC3 全基因组, 病毒两末端序列采用末端快速扩增方法 (RACE) 获取。扩增产物克隆到 pMD18-T 载体并测序, 用 DNASTAR 软件拼接全序列及同源性比较。结果显示 ZHZC3 全序列除去 3' poly (A) 尾, 由 10202 个碱基组成, 有两个开放阅读框, 分别编码 2107 和 1011 个氨基酸的聚蛋白。与美国参考株 HI94 相比, 在编码区没有核苷酸的缺失和插入, 但在 5' UTR 缺失 3 个 A, 两者整体核酸同源性达 97.9%。ORF1 中 ZHZC3 与 HI94 及巴西株 (BLZ01) 的核酸同源性分别为 97.6%、97.7%, 在 ORF2 中 ZHZC3 与 HI94、BLZ01 的核酸同源性则分别为 98.3、97%。与国外株 ORF2 的部分序列比较发现: ZHZC3 和中国台湾株均与美国株 HI94 同源性最高。克隆分析 6 株 TSV 中国大陆株主要结构蛋白 CP2 基因, 发现其编码的氨基酸存在三个高变区, 中国大陆株更有其独特的氨基酸变异模式, 312 (S), 449 (A), 451 (Q) 和 468 (H)。表明该病毒的整体变异性不高, 但中国的流行株已形成其自己的遗传演变特征。在此基础上, 利用生物学软件对 CP2 蛋白功能域和三维结构进行了预测, 为进一步分析 CP2 蛋白结构与功能关系奠定了基础。ZHZC3 株是第一个测定全序列的 TSV 中国株。

关键词: 桃拉综合征病毒 (TSV); 基因组; CP2 蛋白; 同源建模

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0267-06

收稿日期: 2005-11-28, 修回日期: 2005-12-28

作者简介: 黄新新 (1974-), 女, 江苏海门籍, 博士生, 主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-85396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

桃拉综合征病毒 (*Taura syndrome virus*, TSV) 是近年来严重危害我国对虾养殖业的病毒, 凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 对其尤其敏感。TSV 为单股正链 RNA, 全长 10kb, 属双顺反子病毒科 (*Dicistroviridae*), 但尚未确定属。TSV 具有两个开放读码框架 (ORF), ORF1 编码非结构蛋白, 有解旋酶、蛋白酶、RNA 依赖的 RNA 聚合酶; ORF2 则编码三种结构蛋白, 分别为 CP1 (40kDa)、CP2 (55kDa) 及 CP3 (24kDa)^[1]。在中国株 ZH3C3 测序之前, TSV 只有一美国株 (HI94, AF277675) 测通了全序列。中国各地的凡纳滨对虾养殖场虽在 2003 年及 2004 年大面积暴发过桃拉综合征, 但对中国流行的 TSV 毒株基因特性研究尚处空白。为阐明中国流行毒株与国外流行株的差异, 了解病毒来源、致病性及抗原性等分子基础, 本研究对来源于福建漳州的 ZH3C3 株进行了全基因组序列测定, 并扩增了来源于中国不同地区的 6 个地方株 TSV 主要结构蛋白 CP2 基因。分析它们与世界其他毒株的遗传进化关系, 揭示 TSV 中国株的变异特点和流行规律。在此基础上又分析了 CP2 蛋白的分子量、等电点和二级结构, 预测了该蛋白的功能域和三维结构, 为进一步分析 TSV 中国株特征、阐述 CP2 蛋白结构与功能关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病毒株 ZH3C3 于 2004 年 10 月采自漳州发病对虾, 另外 5 个地方株于 2004 年随机取自深圳、阳江、广州、宁波及厦门等地。大肠杆菌 TOP10 购自 invitrogen 公司, 本实验室保存。pMD18-T 克隆载体为宝生物工程 (大连) 公司产品。Trizol 购自 invitrogen 公司, AMV、LA Tag polymerase、Rnasin、dNTP、PCR 回收试剂盒及各种限制性内切酶 *Sal* I、*Bgl* II、*Cla* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Hinc* II、*Xho* I、*Xba* I 均购自宝生物工程 (大连) 公司。SMART RACE 试剂盒为 CLONTECH 公司产品, 其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 TSV 全基因组引物设计

利用 Primer 5.0 软件, 根据 GenBank 美国参考株 HI94(AF277675) 的序列设计 5'、3' RACE 及其余 8 对引物, 用于扩增 TSV 全基因组, 扩增片段之间相互重叠。另外一对引物 TSCP2F 及 TSCP2R 用于扩增含有 TSV 高变区的 CP2 基因。所有引物由宝生物工程 (大连) 公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物位置及序列

Table 1 Positions and nucleotide sequences of oligonucleotide primers

| Primer | Polarity | Nucleotide sequence(5'→3') | PCR product position(nt) ^a | Product size(bp) |
|--------|-----------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| TS5R | Antisense | TCGACTGACACGTAACAGGTGCCCGC | -45-826 | 871 |
| TS011 | Sense | TTTGCTAACCTCGGGTCTGGAAAGAAG | 654-1289 | 636 |
| TS012 | antisense | GGGGGTGTTATGTAGCTGATCTAACAAAT | | |
| TS021 | sense | TGAAGGGAATGTCTTTACGTGTCGGATTG | 1163-2558 | 1396 |
| TS022 | antisense | TAAGTCCTTAACTGAATTGCGTGCCTCC | | |
| TS031 | Sense | CAACTACTTTCACGACACGGTAGATGCT | 2381-3379 | 999 |
| TS032 | antisense | GTTTCTTGGGATAACTCGTGCAGTCTAG | | |
| TS041 | Sense | TTATTGCAGGAACATAAAGATCACTCC | 3160-4563 | 1404 |
| TS042 | antisense | ACAACATTCGTCCATACGCGAATAAACC | | |
| TS051 | Sense | CTATCAGGTGGAGTGGACCGATTTGAGAAC | 4406-5936 | 1531 |
| TS052 | antisense | GAAATCACCAGCAATCACCTTGTCACCAA | | |
| TS061 | sense | GTTTCTTGGACCATGTGATGACGAACAG | 5803-7613 | 1809 |
| TS062 | antisense | TGACTCAGAACGGAAGCCGAATAGAAT | | |
| TS071 | Sense | CGACGACTCTTACAGAACACCTACGCT | 7436-8792 | 1357 |
| TS072 | antisense | CTTCCCCAAAGACACCTTCGTATCCTG | | |
| TS081 | Sense | CTTCAATTATCCAGCAGATGTTCTCTGAG | 8680-9487 | 808 |
| TS082 | antisense | TCTGAGAGAGACAACTGTTACCCATT | | |
| TS3R | sense | TCATTGGTCGCATTGTCCGTAGAGTGGC | 9306-10205 +57 | 957 |
| TSCP2F | Sense | AGCCTGTTTCTGGGTGTCGGGCGTAGT | 7881-9487 | 1607 |
| TSCP2R | Antisense | TCTGAGAGAGACAACTGTTACCCATT | | |

a: Nucleotide positions are in accordance with the 10205 nt sequence of the HI94 isolates obtained in the present study

1.3 总 RNA 提取

取适量待检对虾肌肉组织, 加入 1mL TN 缓冲

液 (0.02 mol/L Tris-HCL, pH 7.4, 0.4M NaCL), 用研磨棒充分混匀。4000r/min 于 4°C 离心 10min, 取

上清 300 μ L 加入 1mL Trizol。以下操作按说明书进行, 最后用 20 μ L DEPC 处理水溶解 RNA 沉淀。

1.4 RT-PCR

采用 20 μ L 反转录体系合成 cDNA, RNA 模板 5 μ L, 5 \times RT Buffer 4 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, AMV1 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, 下游引物 1 μ L, 加 DEPC 水至 20 μ L。RT 反应条件: 72 $^{\circ}$ C 7min, 立即冰浴。42 $^{\circ}$ C 反应 90min, 95 $^{\circ}$ C 5min。取 3 μ L 反转录产物进行以下的 PCR 反应: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, LA Tag 0.25 μ L, d₂H₂O 调整终体积至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min 后, 94 $^{\circ}$ C 15sec、52 $^{\circ}$ C 30sec、72 $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.5 末端快速扩增方法 (RACE)

按照 CLONTECH 公司的 SMART RACE 试剂盒说明书进行操作, 所用引物分别为 TS5R 及 TS3R。

1.6 PCR 扩增产物的纯化、克隆及测序

PCR 产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离, 回收纯化后克隆至 pMD18-T 载体上, 连接产物按常规方法转化宿主菌 TOP10。用含氨苄青霉素抗性的 LB 平皿筛选重组质粒, 碱裂解法提取质粒经 PCR 及酶切鉴定正确后送上海博亚生物工程公司测序。

1.7 全基因组序列分析

测序结果用 DNASTAR 软件拼接成基因组全长 cDNA 序列, MegAlign 软件比较中国及 GenBank 上公布的其余 TSV 核苷酸序列同源性。使用 Anthepro 5.0 计算 ZH3C3 CP2 蛋白分子量和等电点, 预测二级结构。由蛋白质专家系统 ExPaSy 确定 ZH3C3 CP2 蛋白结构功能域 (<http://www.expasy.org>), 蛋白质三级结构预测工具 Swiss-Model 分析 ZH3C3 株 CP2 蛋白的空间结构, 用 RasMol 显示工具查看三维结构模型。

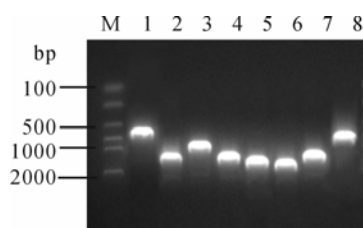


图1 RT-PCR 扩增的 ZH3C3 株 8 个 cDNA 片段

Fig.1 Eight cDNA fragments of the genome of ZH3C3 by RT-PCR

M, Marker; 1-8, Amplified products of cDNA 1-8.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增

利用 RACE 及 RT-PCR 方法, 优化扩增条件, 成功的从漳州发病虾 ZH3C3 中扩出覆盖全基因组的目的片段 (图 1, 2), 其余 5 个地方株也成功扩出 CP2 基因片段 (图略)。

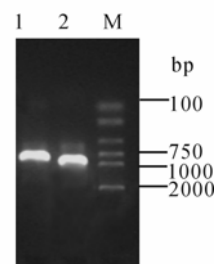


图2 TSV ZH3C3 5', 3' RACE 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of the 5', 3' RACE of ZH3C3
M, Marker; 1, 3' RACE of ZH3C3; 2, 5' RACE of ZH3C3

2.2 TSV ZH3C3 株的基因结构

ZH3C3 株 Genbank 登录号 DQ104696, 全基因组除去 3' 端 poly(A)尾, 长度为 10202nt。基因组中碱基比例为: A (28%)、U (29%)、G (23%)、C (20%)。5' UTR 为 374nt, 比美国参考株 HI94 少 3 个 A。ORF1 第 1 个起始密码子 AUG 在 375-377, 但围绕起始密码子的为: UAGAUGC, 不符合无脊椎动物病毒起始密码子特征: ANNAUGG。从 414 开始的第 2 个密码子, 周围序列为 ACUAUGG, 符合了上述特征, 可作为转录起始位点。3' UTR 去除 Poly (A)尾, 全长 226nt, 没有加 A 信号(AAUAAA)。5' UTR 与 3' UTR 之间有 2 个 ORF, ORF1 从 414 到 6734 核苷酸, 编码 2107aa。ORF2 从 6944 到 9976 核苷酸, 编码 1011aa, ZH3C3 株与 HI94 株整体核酸同源性达 97.9%。5' UTR 除了在相应于 HI94 151-153 的位置少了 3 个碱基外, 两者还有 3 个碱基的差异。3' UTR 两者差异 4 个碱基, 同源性达 98.2%。TSV 巴西株 BLZ01 (AF590471)测通了 ORF1 至 ORF2 的序列, 将这三株比较发现, 在 ORF1 中 ZH3C3 与 HI94、BLZ01 的核酸同源性分别为 97.6%、97.7%; 氨基酸同源性为 97.5%、98.3%。在 ORF2 中 ZH3C3 与 HI94、BLZ01 的核酸同源性分别为 98.3%、97%; 氨基酸同源性为 97.9%、96.9%。到目前为止, 只有以上三株测通了 ORF1 及

ORF2 全序列,其余已报道的地方株只测通了 ORF2 序列,或 ORF2 编码三种结构蛋白 CP1、CP2 及 CP3 的部分序列。ZH3C3 与中国台湾、美国、墨西哥及巴西株在 CP1 基因中 849nt 的核苷酸同源率为 98.6%~99.2%、98.3%、97.8%~98.3%及 97.7%。在 CP2 基因中 1164nt 的核苷酸同源率为 98.5%~99%、98%、96.6%~97.3% 及 96.4%~96.5%。在 CP3 基因中 507nt 的核苷酸同源率为 99.6%~99.8%、99%、97.2%~98% 及 97.8%~98.2%。

2.3 6 株 TSV 中国地方株高变区 CP2 分析

CP2 为 TSV 的主要结构蛋白,也是该病毒的高变区所在部位。将 6 株中国大陆地方株与其余已在 GenBank 上公布了 CP2 完整序列的毒株比较,发现 CP2 存在 3 个高变区,分别在 290-320aa、360-400aa、430-490aa。进一步比较发现中国大陆株有独特的氨基酸变化模式:312 (S),449 (A),451 (Q) and 468 (H) (图 3);若与文献^[2,3]报道的其它毒株比较,来自东南亚的毒株在 CP2 区域也有其独特的氨基酸变化特点:83 (V,结果未显示),383 (G),399 (K);中国大陆株与台湾株还有共同的变异位点:455 (R)。

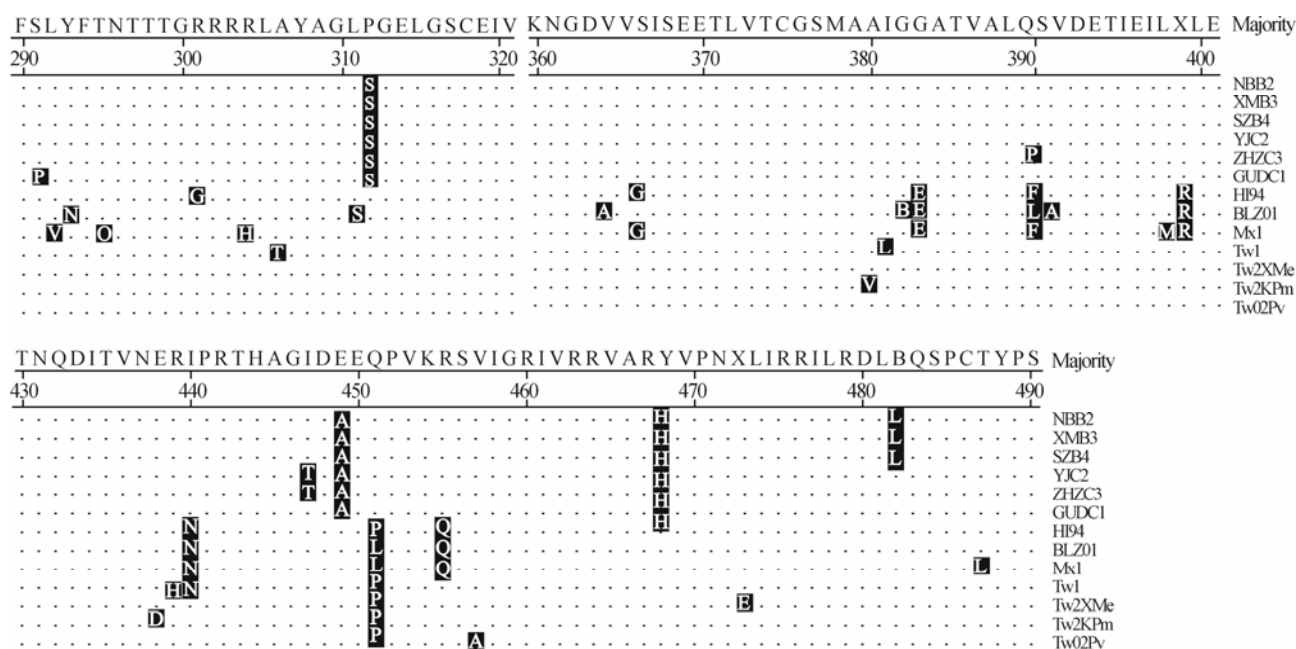


图 3 TSV CP2 蛋白高变区氨基酸序列比较

Fig.3 Comparison of the amino acid sequences of the hypervariable region in the CP2 protein of TSV isolate.

Dots indicate amino acids that were identical to the top sequence, different amino acids were marked with shade. GenBank-Accession: HI94 (AF277675), MX1 (AF277378), BLZ01 (AF590471), TW1 (AF406789), Tw02Pv (AY355311), Tw2KMe (AY355310), Tw2Kpm (AY355309).

2.4 TSV ZH3C3 株 CP2 蛋白一级和二级结构分析

TSV ZH3C3 CP2 蛋白由 492 个氨基酸组成,等电点为 6.77,分子量为 53.76kDd。二级结构中含螺旋 (19%)、片层 (42%)、转角 (19%) 及卷曲 (21%)。用 PROSITE search 搜索发现,CP2 蛋白中有 6 个肉豆蔻酰位点 (MYRISTYL),2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PKC-PHOSPHO-SITE),3 个天冬酰胺 N 糖基化位点 (ASN-GLYCOSYLATION-SITE),9 个肌酸激酶 II 磷酸化位点 (CK2-PHOSPHO-SITE),1 个酰胺化位点 (AMIDATION)

及 1 个双向核定位序列 (BNLS)。

用 SMART 服务器分析 TSV ZH3C3 株 CP2 蛋白序列的结构功能域,在 1-263 位氨基酸位置有单股正链 RNA 病毒蛋白超家族,跨膜区之一 (208-215aa) 位于该区域,另一跨膜区在 375-383aa。

2.5 TSV ZH3C3 5' UTR 的特征序列和二级结构分析

TSV ZH3C3 株与 HI94 株的 5' UTR RNA 序列的二级结构见图 4。两者主要茎环结构大致相似,但由于 ZH3C3 株在 151-153nt 处缺少 3 个 A,

引起相应位置的茎杆形状及折叠角度发生改变。

2.6 TSV ZH3C3 CP2 蛋白三维结构预测

将 ZH3C3 CP2 氨基酸序列递交给 Swiss-Model, 用显示工具 RasMol 查看三维结构。结果显示, ZH3C3 CP2 蛋白的同源蛋白为蟋蟀麻痹病毒 (CrPV) 衣壳蛋白。二级结构在三级结构中位置基本不变, 都由反向平行的 β 片层形成三明治结构。ZH3C3 CP2 蛋白由 2 条主链构成, 366 个基团, 174 个 H 链, 6 个 α -螺旋, 19 个 β -折叠, 44 个 γ -转角 (图 5)。

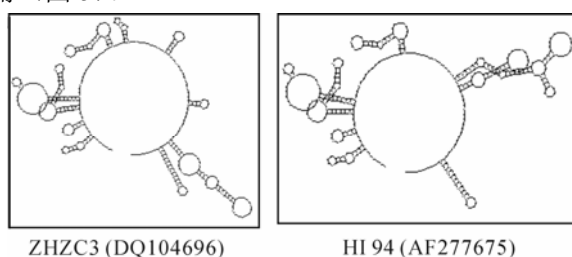


图 4 TSV 2 毒株 5' UTR 的二级结构模型

Fig.4 The secondary structure model of 5' UTR of two TSV strains

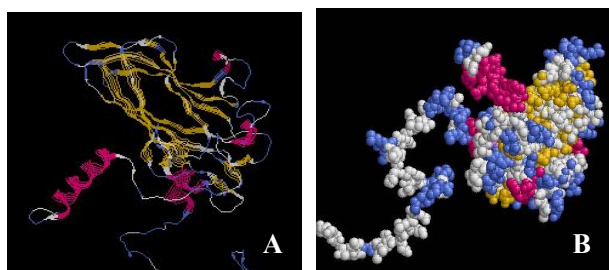


图 5 ZH3C3 株 CP2 蛋白三维结构预测图

Fig. 5 The predicted 3-D structure of CP2 protein

A: Ribbons model; B: Spacefill model.

3 讨论

自 1999 年我国台湾首次报道东半球出现桃拉综合征后, 中国内地的养殖场也相继暴发该病。作者在 2004 至 2005 年对福建漳州等地六个地区共 26 个养殖场进行了流行病学调查, 发现各地凡纳滨对虾均有不同程度的感染 TSV, 将 PCR 产物进行测序比对后发现, 中国地区的流行株与美国株核苷酸序列高度同源, 达到 98.3%~100%^[4]。为进一步了解 TSV 中国流行株基因组特征, 本研究测通了 ZH3C3 株全序列, 这是继 HI94 株后测通的第二个 TSV 全序列, 也是第一个 TSV 中国株全序列。

经分析, ZH3C3 株两个非编码区中, 3' UTR 没有显著差异, 而 5' UTR 则在相应于美国参考株

HI94151~153 处缺失 3 个 A, 并引起 RNA 二级结构发生变化。这种在 5' UTR 缺失连续几个 A 的现象在其它病毒中也有发生, 更有学者研究发现: 猪瘟病毒 5' UTR 上连续缺失 5 个 A 后, 引起蛋白翻译的显著减少^[5], 因而 5' UTR 某些核苷酸的变化可能会很大程度地影响病毒的特性, 但 ZH3C3 株这种变异有何意义目前尚不清楚。

通过对病毒基因组整体分析发现, 中国 ZH3C3 株与美国参考株 HI94 整体核苷酸同源性达到 97.8%。在 ORF2 编码的结构蛋白基因中, ZH3C3 株与国内外其它毒株或这些毒株相互之间同源性也高达 95% 以上。这个情况符合双顺反子病毒科的特征, 在该科的一些昆虫病毒中同样存在核苷酸高度同源达到 90%~100% 的现象^[6]。在 TSV ORF1 中, ZH3C3 株与巴西株较为接近, 而在 ORF2 中, ZH3C3 株则与美国株同源性更高。由于 ORF2 编码结构蛋白, 因而 ZH3C3 株抗原性与美国株更相似。在位于 ORF2 的 CP1、CP2、CP3 部分序列中, ZH3C3 株与台湾株遗传特性最接近, 某些报道认为台湾发病虾来源于从美国进口的虾^[7], 中国大陆 TSV 毒株是否与台湾株有相似的来源还需进一步验证。

对 ORF2 基因进一步研究发现, 在其编码的 CP2 区域中存在高变区, 尤其是靠近 3' 端。某些毒株由于该区域中若干氨基酸的改变而引起毒株抗原性及致病性的改变^[2, 8-10], 但上述大部分研究只扩增了 CP2 蛋白的 400aa (全长 492aa)。本研究通过对中国 6 个不同地区 TSV 毒株 CP2 基因全长扩增, 并与其它研究报道的序列进行比较, 明确了 CP2 高变区具体位置: 290-320aa、360-400aa、430-490aa。提示在以后的研究中, 若想更全面地分析毒株遗传特征与生物性状间的关系, 需要完整地扩增 CP2 基因。另外, 在分析 CP2 基因时, 发现中国大陆株及东南亚毒株有其独特的氨基酸变化模式, 表明各地的流行株在演变过程中已形成了自己的变异规律。

TSV 是双顺反子病毒科中唯一感染非昆虫的病毒, 其蛋白与该科许多昆虫蛋白高度同源, 并有保守的结构域。但到目前为止, 对 TSV 结构蛋白的研究还只局限在比较氨基酸序列差异与毒株抗原性及致病力方面的关系, 对病毒蛋白特征、分子结构及功能还知之甚少。本研究用软件预测了 TSV CP2 蛋白二级和三级结构, 既为该病毒的分子生物学研究积累了新的信息, 又对今后进一步分析病毒结构特征、抗原表位等研究提供了理论指导。

References

- [1] Mari J, Poulos B T, Lightner D V, *et al.* Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (4): 915-926.
- [2] Tang K F, Lightner D V. Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants [J]. *Virus Res*, 2005, 112 (1-2): 69-76.
- [3] Nielsen L, Sang-oum W, Cheevadhanarak S, *et al.* Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 63 (2-3): 101-106.
- [4] Huang X X, Mo S L, Lu C P, (黄新新, 莫胜兰, 陆承平). RT-PCR detection of Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* from southeast seaside of China [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2005, 20 (5): 546-548.
- [5] Simon P, Richard J. Peditivirus Internal Ribosome Entry Site (IRES) Structure and Function: Elements in the 5' untranslated Region Important for IRES Function [J]. *Virology*, 2002, 5: 5024-5033.
- [6] Johnson K N, Christian P D. Molecular characterization of *Drosophila C virus* isolates [J]. *J Invertebr Pathol*, 1999, 73 (3): 248-254.
- [7] Tu C, Huang H T, Chuang S H, *et al.* Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan [J]. *Dis Aquat Organ*, 1991, 38, 159-161.
- [8] Chang Y S, Peng S E, Yu H T, *et al.* Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* in Taiwan [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85 (10): 2963-2968.
- [9] Erickson H S, Poulos B T, Tang K F, *et al.* Taura syndrome virus from Belize represents a unique variant [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, 64 (2): 91-98.
- [10] Erickson H S, Zarain-Herzberg M, Lightner D V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp [J]. *Dis Aquat Organ*, 2002, 52(1): 1-10.

(上接第 216)

(文章首页地脚处)

Received (收稿日期): Month Day, Year. **Accepted (修回日期):** Month Day, Year. (由本刊填写)

* **Foundation item (基金项目):** 基金名称 (编号)

** **Corresponding author (通讯作者). Tel:** , **E-mail:**

Text

Introduction: 介绍本研究领域的历史背景, 前人所获得的主要成果, 本研究的目的意义。

Materials and Methods: 材料和方法部分主要介绍: 研究对象来源、主要试剂厂家、主要实验步骤和检测方法和技术, 要求简明准确、材料完整及可信, 常规方法应尽量简述。

Result: 介绍实验的主要结果, 对结果应是随机客观地加以分析, 不应有意无意地加以挑选。文中不要重复叙述图表中数据, 行文要求组织严密、符合逻辑, 突出重点, 以便作者容易理解全文。

Figures: 图题置图下方, 以 FIG.X 表示, X 代表图序号, 如有分图应以大写 A、B、C、D——标示并置图左上角, 图注应置图题下方, 分图内容应在图注中加以说明。**Tables:** 表格请用三线表, 表题置表格上方, 如对表内内容有附加说明, 应在说明处右上方标注小写字母, 在表格下方对标注处给以解释。

Discussion: 讨论的主要是针对实验的客观结果发表作者的主观判断, 内容包括: (1) 主要的原理和概念; (2) 实验条件的优缺点; (3) 本人结果与他人结果的异同, 突出新发现、新发明; (4) 解释因果关系, 说明偶然性与必然性; (5) 尚未定论之处, 相反的理论; (6) 急需研究的方向和存在的主要问题“讨论”的内容也以精简为原则, 要能讲清楚主要的论点, 已经谈过的不宜在这一节里予以重复。在结论的问题中避免以假设来“证明”假设, 以未知来说明未知, 并依次循环推论。

References: (参考文献录入格式, 中文期刊需全部改为英文格式)

期刊: 作者. 题名[J]. 刊名, 年, 卷: 起—止页。

图书: 作者. 书名[M]. 版次 (初版不写), 出版地: 出版者, 年. 起—止页。

论文集: 作者. 题名[A]. 论文集名[C]. 出版地: 出版者, 出版年. 页次。

专利文献: 专利所有者. 专利题名[P]. 专利国别: 专利号, 出版日期。

学位论文: 作者. 题名[D]. 地点: 学位授予单位, 出版年.

数据库: 责任者. 联机网上数据库[DB/OL]. 网址/引用日期.

(**文献作者录入格式:** 姓氏列前(首字母大写), 名缩写以大写字母列后, 中间无任何标点(如 Allan GM, 请注意原引文献姓和名的顺序), 多个作者之间用 ‘,’ 隔开, 限列 3 名, 第 4 名之后的作者用 ‘*et al*’ 表示, 但 ‘*et al*’ 前应有 3 位作者。