

斜带石斑鱼神经坏死病毒基因组 RNA1 和 RNA2 序列测定及分析*

陈晓艳, 翁少萍, 吕 玲, 黄剑南, 殷志新, 何建国
(中山大学生命科学学院 // 生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 根据 GenBank 数据库公布的鱼类神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 同源序列设计了 7 对特异性引物, 采用 RT-PCR 方法扩增出目的片段, 将 PCR 产物测序和分析。斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 神经坏死病毒 (orange-spotted NNV, OGNNV) 基因组由两个片段 (RNA1 和 RNA2) 组成, RNA1 由 3 103 个核苷酸组成, 含有一个开放阅读框, 编码 982 个氨基酸; RNA2 由 1 433 个核苷酸组成, 含有一个开放阅读框, 编码 338 个氨基酸。OGNNV 基因组与新加坡 GGNNV (greasy grouper NNV) 的基因组有高度的相似性。分析病毒的 RNA2 序列发现: OGNNV 与 DGNNV (dragon grouper NNV)、RGNNV (redspotted NNV) 和 GGNNV 的亲缘关系很近, 并且具有相同的中和位点; 分析病毒的 RNA1 序列, 发现在 OGNNV 的 RNA1 序列中同样可以找到依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的 6 个模序 (motif)。根据同源性比较和系统进化分析, OGNNV 属于 RGNNV 血清型的成员。

关键词: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 神经坏死病毒; 基因组序列测定与分析; β 诺达病毒

中图分类号: S941.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 01-0073-05

鱼类病毒性神经坏死病 (viral nervous necrosis, VNN) 是由诺达病毒科 Nodaviridae 的 β 诺达病毒属 *Betanodaviruses* 的种类感染而致的一种传染病, 海水鱼类的仔稚鱼易受感染, 感染死亡率高达 90% 以上, 甚至 100%, 网箱中养殖的鱼类也可感染。目前, 除非洲以外, 其他各大洲均有海水鱼类受到该病毒感染的报道^[1-3]。受感染的鱼种类众多, 已报道过的患病毒性神经坏死病的海水鱼类达 40 余种^[2,3]。诺达病毒是一类个体细小、呈二十面体、无囊膜病毒, 病毒基因组由两条单链的正链 RNA 组成, 2 条 RNA 的 5' 端都有帽子结构, 3' 端没有 poly (A) 尾^[4]。小片段 RNA2 大小通常为 1.3~1.4 kb, 编码病毒主衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 的前体蛋白; 大片段 RNA1 大小为 3.0~3.2 kb, 编码 A 蛋白, A 蛋白是病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA dependant RNA polymerase, RdRp) 的组成单位^[1,4]。到目前为止, 只有日本的 SJNNV (striped jack NNV) 和新加坡的 GGNNV (greasy grouper NNV) 基因组全序列完成了测序^[1,3]。

我国人工养殖石斑鱼类已有近 20 a 的历史, 广东、福建、海南等沿海地区均有相当规模的网箱养殖。近年来石斑鱼养殖密度增高, 病害日益严重。其中, 病毒性神经坏死病是严重危害鱼苗的重

大病害之一, 可造成重大的经济损失, 甚至使育苗生产被迫停止。广东省大亚湾水产试验中心 1999 年开始进行斜带石斑鱼人工育苗试验^[6], 2000 年育苗期间爆发病毒性神经坏死病, 仅 5 月份第 1 批种苗生产中, 死亡斜带石斑鱼仔鱼达 600 万尾, 直接经济损失达 200 多万元。2001 和 2002 年育苗期间此病再次暴发, 鱼苗死亡率达 90% 以上, 造成巨大经济损失, 神经坏死病毒成为石斑鱼育苗生产最重要的制约因素。

本研究对斜带石斑鱼神经坏死病毒 (orange-spotted NNV, OGNNV) 的基因组进行了克隆、测序和序列分析, 发现该病毒基因组与新加坡的 GGNNV 的基因组有很高的相似性。本文是国内首次报道斜带石斑鱼神经坏死病毒基因组序列测定, 为进一步研究该病毒及其疫苗的研制提供了理论依据, 也为 β 诺达病毒属的分类和命名补充了资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 斜带石斑鱼与病毒 感染 NNV 的濒死斜带石斑鱼苗 (孵出后 25~38 d) 于 2002 年 5 月在发病高峰时期取自广东省大亚湾水产养殖中心, 表现出典型的神经坏死病毒病症状, RT-PCR 检测为阳

* 收稿日期: 2004-05-13

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2003AA603011); 广东省科技厅团队资助项目 (20023002); 广东省科技厅重大专项资助项目 (2001A305030202 和 2001A3050201)

作者简介: 陈晓艳 (1972 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

性, 将之用液氮冷冻后带回实验室, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.2 细胞 SSN-1 细胞由泰国的 Somkiat 博士惠赠。该细胞系来源于淡水鱼纹月鳢的幼体, 由多种形态的细胞组成。

1.1.3 酶类及其他试剂 普通 Taq DNA 聚合酶、dNTP、Trizol Blue 购自上海博采生物有限公司; M-MLV 反转录酶、RNase 抑制剂、L15 培养基、胎牛血清、胰酶购自 Gibco 公司; DL-2000 购自大连宝生物工程公司; 电泳用琼脂糖购自 Sigma 公司; 氨苄青霉素、链霉素购自华美生物工程公司; DL06-2 购自鼎国生物工程公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生物工程公司; 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病毒的增殖和 RNA 的提取 取 1 体积的患病鱼苗的头部加入 9 体积的 Hanks 平衡盐溶液 ($\text{pH } 7.8$), 充分匀浆, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ }000\text{ g}$ 离心 30 min , 取上清液, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤; 取适量感染 SSN-1 细胞。待 $80\%\sim 90\%$ 的细胞出现病变时低速离心收集细胞, 在沉淀的细胞 (含有大量的 OGNNV) 中加入适量的 Trizol Blue 试剂提取总 RNA。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 RNA 模板在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中变性 5 min , 取出迅速放置冰上。在离心管中依次加入下列试剂: $5\times\text{buffer } 2\text{ }\mu\text{L}$, DTT $1\text{ }\mu\text{L}$, $4\times\text{dNTP } 1\text{ }\mu\text{L}$, 随机引物 $1\text{ }\mu\text{L}$, Rnase 抑制剂 $0.2\text{ }\mu\text{L}$, M-MLV 反转录酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, RNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, 加 DEPC 处理水至总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴反应 $50\sim 60\text{ min}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 终止反应, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 PCR 扩增

(1) 引物设计

根据公共数据库 GenBank 公布的其它 3 种海水鱼类神经坏死病毒基因组序列: SJNNV^[5]、DIEV (*Dicentrarchus labrax* encephalitis virus)^[7] 和 GGNNV^[11] 的 RNA1 和 RNA2 序列的保守区设计合成了 7 对特异性引物。引物对 F1-R1、F2-R2、F3-R3 和 F4-R4 用于扩增斜带石斑鱼神经坏死病毒的 RNA1 链, 引物对 F5-R5、F6-R6 和 F7-R7 用于扩增 OGNNV 的 RNA2 链。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。OGNNV 的 RNA1 和 RNA2 测序引物及其在序列中的位置如下:

- F1: 5'-TAACATCACCTTCTGTCTCTG-3' (nt 1-21)
- R1: 5'-CACGACGGTAGTCTTGG-3' (nt 456-472)
- F2: 5'-CACGGGTCACGTCAGTT-3' (nt 418-434)
- R2: 5'-GTGCTCGCGGCTCTTT-3' (nt 1425-1440)
- F3: 5'-AAGCCAAGGCAAGAGC-3' (nt 1415-1431)
- R3: 5'-TAAGCCCGGCACCAAT-3' (nt 2426-2441)
- F4: 5'-AGTCGCCATTAAGAACATTG-3' (nt 2300-2319)
- R4: 5'-GCCGAAGCGTAGGACAG-3' (nt 3087-3103)

- F5: 5'-TAATCCATCACCGCTTGC-3' (nt 1-19)
- R5: 5'-ATCGTTGTCACTTGAATCAGG-3' (nt 411-431)
- F6: 5'-ATGGTACGCAAAGGT-3' (nt 27-41)
- R6: 5'-TTAGTTTCCGAGTC-3' (nt 1029-1043)
- F7: 5'-TGACCGTGCTGTTTATTGG-3' (nt 848-866)
- R7: 5'-GCCGAGTTGAGAAGCGAT-3' (nt 1416-1433)

(2) PCR 反应

以第一链 cDNA 为模板, 用 7 对特异性引物分别进行 PCR 扩增, 并对不同引物所适应的 PCR 反应体系进行了优化。

1.2.4 测序与分析 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检验后, 将其纯化, 直接测序。为确保测序结果的正确性: 先后将 3 次的 PCR 产物分别由上海基康生物技术公司、上海博亚生物技术公司和上海联合生物技术公司进行测序, 每一对引物扩增出的片断都进行了正向 5'端和反向 3'端测序, 并且不同引物扩增的片断之间也有一段重叠区。采用 DNASTar 生物软件包进行序列分析。

2 结果

2.1 OGNNV 基因组序列片断的 RT-PCR 扩增

RT-PCR 反应结束后, 用 $w=0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳检验, 结果如图 1 所示。从图 1a 中可见约 472、1 023、431、586 和 1 017 bp 大小的亮带; 从图 1b 中可见约 1 027 和 804 bp 大小的亮带。这些片断大小与预期的大小相符。

2.2 OGNNV 基因组特征

OGNNV 基因组由 2 个片断 (RNA1 和 RNA2) 组成: RNA1 由 3 103 个核苷酸组成, GC 含量为 52.5% , 含有一个编码病毒 RdRp 的开放阅读框 (ORF) (nt 79-3027), 编码 982 个氨基酸组成的 A 蛋白, 相对分子质量约为 110 740, 5'端的 78 个核苷酸和 3'端的 76 个核苷酸为非编码区 (non coded region, NCR)。RNA2 由 1 433 个核苷酸组成, GC 含量为 53.2% , 含有编码 MCP 的 ORF (nt 27-1043), 编码的 α 蛋白, 由 338 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 37 059, 5'端的 26 个核苷酸和 3'端的 390 个核苷酸为非编码区 (NCR)。

OGNNV 基因组序列提交给美国国立卫生研究院 (NIH) 的国家生物技术信息中心 (NCBI), 得到的公共数据库 (GenBank) 的序列号为: AY369136 (RNA1), AF534998 (RNA2)。OGNNV 是继 SJNNV 和 GGNNV 之后, β 诺达病毒属中第 3 个完成基因组序列测定的病毒。

2.3 OGNNV 基因组序列分析

2.3.1 RNA1 序列分析 将 OGNNV 的 RNA1 与

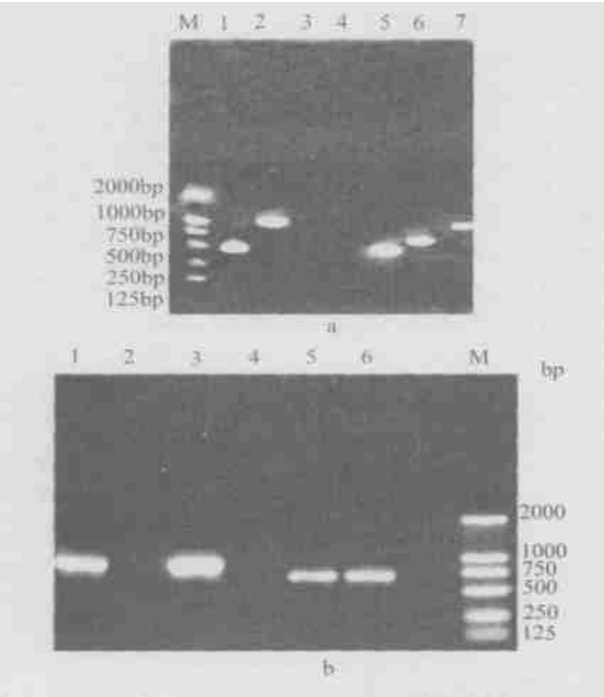


图1 用不同特异性引物扩增
OGNNV 基因组的不同片断

Fig 1 The different segments of genome of
OGNNV amplified with different specific primers

GGNNV 和 SJNNV^[1,5] 的 RNA1 的核苷酸序列和氨基酸序列分别进行比较分析。OGNNV 的 RNA1 核苷酸序列比 SJNNV 的少 4 个核苷酸, 编码的氨基酸比 SJNNV 的少 1 个氨基酸。OGNNV 的 RNA1 核苷酸序列长度和编码的氨基酸序列数量都与 GGNNV 的相同。OGNNV 与 SJNNV 和 GGNNV 的 RNA1 核苷酸序列相似性分别为 80.0%和 96.6%, 编码的氨基酸序列相似性分别为 87.5%和 98.4%。

通过与病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的氨基酸序列比较, 本研究发现 OGNNV 的 A 蛋白的氨基酸序列具有 RNA 聚合酶的 6 个模序 (motif)。这些模序是第 588—590 位点的酸性氨基酸残基, 第 646—651 位点的 SG...T, 第 686—688 位点的 GDD, 第 712 位点的碱性氨基酸残基, 在第 788 位点芳香族氨基酸残基之后的碱性氨基酸残基序列和第 808 位点的碱性氨基酸残基之后的芳香族氨基酸残基。其中 GDD 在正链 RNA 病毒中是保守的。在 SJNNV 和 GGNNV 的蛋白 A 氨基酸序列的相同位点可以找到这 6 个模序^[1,5]。研究表明, α 诺达病毒属的病毒在 RNA1 复制过程中从其 3' 末端还产生一条小片断 RNA3, 编码一个或两个小分子蛋白 B1 和 B2^[4]。有人在受 DIEV 感染的狼鲈幼鱼细胞中检测到了大约 400 个核苷酸大小的 RNA3^[1], 是否编码蛋白 B1 和 B2, 目前还没有这方面的报道。尽管没有证实

OGNNV 的 RNA1 复制过程中是否产生了 RNA3, 但是我们在已测序的 RNA1 的核苷酸序列中也可以找到 2 个与 Kozak 序列相符的 ORF。这两个可能存在的 ORF 编码 B1 蛋白和 B2 蛋白, 其大小和在序列中的位置都与 GGNNV 中的相同^[1]。

2.3.2 RNA2 序列分析 将 OGNNV 的 RNA2 与 ACNNV (Atlantic cod NNV)、AHNNV (Atlantic halibut NNV)、JFNNV (Japanese flounder NNV)、SJNNV、GGNNV、RGNNV、DIEV、BFNNV (barfin flounder NNV)、TPNNV (tiger puffer NNV)、HHNNV (*Hippoglossus hippoglossus* NNV)、DGNNV^[1,5,8,9] 的 RNA2 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列分别进行比较, OGNNV 的 RNA2 核苷酸数量与 GGNNV 的相同, 比 SJNNV 的多 12 个核苷酸, 比 DIEV 的多 27 个核苷酸, 比 DGNNV 的多 43 个核苷酸; 但是 OGNNV 的 RNA2 编码的氨基酸数量比 SJNNV 的少 2 个, 与 GGNNV、DIEV、DGNNV 的相同^[1,7,8], 在氨基酸序列的 237—238 位比 SJNNV 少了 2 个氨基酸残基。OGNNV 的 RNA2 与上述几种 β 诺达病毒 RNA2 的核苷酸序列相似性在 79%~99.0%之间 (表 1), 编码的氨基酸序列相似性在 82.4%~99.3%之间 (表 2), 其核苷酸序列和氨基酸序列与 RGNNV 的相似性最高。

根据 Nishizawa 等^[10] 所述的方法, 将 OGNNV 与 ACNNV、AHNNV、JFNNV、SJNNV、GGNNV、DIEV、TPNNV、RGNNV、BFNNV、HHNNV 和 DGNNV 进行系统进化分析, 利用生物软件 Mega2.1 构建系统树 (图 2), OGNNV 与 RGNNV 和 GGNNV 的亲缘关系最近。

按照 Nishizawa 等^[11] 推测几种 NNV 的中和位点

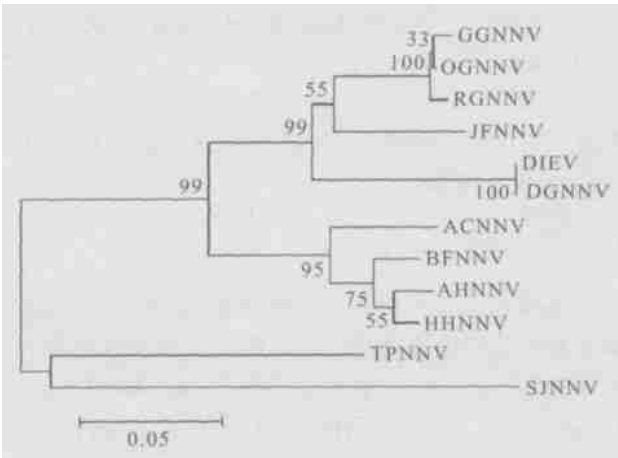


图2 根据 12 种 NNV 的 MCP 基因氨基酸
序列部分片断构建的系统树

Fig 2 Phylogenetic analysis based on
the partial amino acid sequences of MCP

表 1 12 种 NNV 的 RNA2 核苷酸序列的相似距离¹⁾

Tah 1 Nucleotide similarity(%) of RNA2 from 12 NNV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		82.5	83.2	83.5	85.5	85.5	98.7	83.3	91.8	99.0	79.0	80.1
2			91.9	92.0	79.4	79.4	82.1	92.2	81.2	82.2	77.5	79.8
3				98.4	79.5	79.5	83.0	99.3	81.6	83.5	77.5	79.3
4					79.8	79.8	83.2	98.9	82.1	83.7	77.6	79.8
5						100	85.0	79.3	83.3	85.0	76.7	77.7
6							85.0	79.3	83.3	85.0	76.7	77.7
7								82.7	91.2	98.7	78.7	79.8
8									81.9	83.6	77.9	79.8
9										91.5	78.3	79.7
10											78.9	79.9
11												81.0
12												

1) 1 OGNNV, 2 ACNNV, 3 AHNNV, 4 BFNNV, 5 DIEV, 6 DGNNV, 7 GGNNV, 8 HHNNV, 9 JFNNV, 10 RGNNV, 11 SJNNV, 12 TPNNV

表 2 12 种 NNV 的 RNA2 氨基酸序列的相似距离¹⁾

Tah 2 Amino acid similarity (%) of RNA2 from 12 NNV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		87.9	87.9	88.2	89.7	89.7	99.3	87.9	94.9	99.6	82.4	83.1
2			94.9	96.7	83.1	83.1	87.5	95.6	87.1	87.9	82.4	82.7
3				97.1	83.5	83.5	87.1	98.5	86.8	87.9	80.9	82.0
4					83.5	83.5	87.5	97.8	87.9	88.2	80.9	83.5
5						100	89.3	83.5	89.7	89.3	80.1	81.2
6							89.3	83.5	89.7	89.3	80.1	81.2
7								87.1	94.1	98.9	82.0	82.7
8									87.1	87.9	81.2	82.4
9										94.5	82.7	83.5
10											82.0	82.7
11												82.5
12												

1) 1 OGNNV, 2 ACNNV, 3 AHNNV, 4 BFNNV, 5 DIEV, 6 DNNV, 7 GGNNV, 8 HHNNV, 9 JFNNV, 10 RGNNV, 11 SJNNV, 12 TPNNV

图谱，发现 OGNNV 的中和位点与 DGNNV、GGNNV 和 RGNNV 的相同。

3 讨 论

Nishizawa 等^[9] 根据 25 种不同鱼类诺达病毒 MCP 基因编码的氨基酸部分片段将β 诺达病毒分为四种血清型，即 SJNNV 血清型、BFNNV (barfin flounder NNV) 血清型、TPNNV (tiger puffer NNV) 血清型和 RGNNV (red spotted grouper NNV) 血清型。RGNNV 血清型是四种血清型中自然感染宿主最广泛的一类^[12]。目前，已知的可受其感染的鱼类至少有 4 个目 9 个科的 20 多种鱼^[3, 13]，感染石斑鱼类的都属 RGNNV 血清型^[1-3, 12, 13]，根据同源性比

较和系统进化分析，本研究中的 OGNNV 应属于 RGNNV 血清型，并且与新加坡的 GGNNV 具有高度的相似性。OGNNV 与 GGNNV 是否属于同一种病毒，尚须进一步研究证实。该病毒是通过引进鱼种传入我国，或是在我国海域中早已存在，目前尚不清楚。RGNNV 型病毒感染宿主种类众多，地理分布十分广泛，国际间亲鱼、鱼苗及水产品的交往可能是病毒传播的途径之一。目前在我国还未见其他 3 种血清型神经坏死病毒的报道，我们建议在引进国外亲鱼、鱼苗及水产品过程中一定要严格做好检验检疫工作，并调查当地的疫情，以此避免新的病毒株传入我国危害养殖鱼类。

致谢: 感谢泰国的 Somkiat 博士赠送 SSN-1 细胞株, 感谢王晓红博士和林鑫博士提供技术支持。

参考文献:

- [1] TAN C, HUANG B, CHANG S F, et al. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain[J]. J General Virology, 2001, 82: 647—653.
- [2] LIN L, HE J G, MORI K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China[J]. Fish Pathology, 2001, 36 (3): 186—188.
- [3] MUNDAY B L, KWANG J, MOODY N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review[J]. J Fish Diseases, 2002, 25: 127—142.
- [4] SCHNEEMANN A, REDDY V, JOHNSON J E. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology[J]. Advances in Virus Research, 1998, 50: 381—446.
- [5] IWAMOTO T, MISE K, MORI K, et al. Establishment of an infectious RNA transcription system for Striped jack nervous necrosis virus: the type species of the betanodaviruses[J]. J General Virology, 2001, 82: 2653—2662.
- [6] 王云新, 黄国光, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼人工育苗试验[J]. 渔业现代化, 2003, 6: 14—15.
- [7] NISHIZAWA T, MORI K, FURUHASHI M, et al. comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish[J]. J General Virology, 1995, 76: 1563—1569.
- [8] DELSERT C, MORIN N, COMPS M. A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing[J]. Archives of Virology, 1997, 142: 2359—2371.
- [9] NISHIZAWA T, TAKANO R, MUROGA K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus[J]. J General Virology, 1999, 80: 3023—3027.
- [10] NISHIZAWA T, FURUHASHI M, MAGAI T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63 (4): 1633—1636.
- [11] NISHIZAWA T, MORI K, FURUHASHI M, et al. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish[J]. J General Virology, 1995, 76: 1563—1569.
- [12] IKENAGA T, TATECHO Y, NAKAI T, et al. Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish[J]. Neuroscience Letters, 2002, 333: 55—59.
- [13] CHI S C, SHIEH J R, LIN S J. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan[J]. Diseases of Aquatic Organism, 2003, 55: 221—228.

Sequences of RNA1 and RNA2 from Orange spotted Grouper (*Epinephelus coioids*) Nervous Necrosis Virus, China Strain

CHEN Xiao yan, WENG Shao ping, LÜ Ling, HUANG Jian nan, YIN Zhi xin, HE Jian guo

(State Key Laboratory for Biocontrol // School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Several pairs of specific primers are designed according to the published homogeneous sequences of nervous necrosis virus (NNV) from GenBank. The target segments are cloned by means of RT-PCR. The nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from OGNNV, China strain, are determined. OGNNV RNA1 is 3 103 bp long, containing an ORF of 982 aa, while OGNNV RNA2 is composed of 1 433 bp, containing an ORF of 338 aa. Both OGNNV RNAs show high similarity with those from greasy grouper nervous necrosis (GGNNV), Singapore strain. Analysis of OGNNV RNA2 reveals that it is much closely related to dragon grouper nervous necrosis virus (DGNNV), redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) and GGNNV, and that these viruses share the same neutralization epitope. Six predicted RNA-dependent RNA polymerase motifs are affirmed by nucleotide sequence analysis of OGNNV RNA1. According to the analysis of similarity and Phylogenelysis, OGNNV belongs to the member of RGNNV genotype.

Key words: orange spotted grouper nervous necrosis; sequence and analysis of genome; betanodaviruses