

鳊传染性脾肾坏死病毒 ICR489 基因序列分析^{*}

邓 敏, 何建国, 翁少萍, 吕 玲, 何华虹
(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 报道了鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) 的 ICR489 基因结构及其序列分析。对 ISKNV DNA *Kpn*I B 酶切片段的序列分析结果发现该序列中含有完整的 ICR489 基因。ISKNV ICR489 基因完整读码框为 1 011 bp, GC 含量为 56.97%, 等电点为 6.82, 编码一个长为 337aa、相对分子质量为 38 270 的推定蛋白。结构分析发现该基因起始密码子上游具有启动子元件 TATA box, 有反向重复序列可形成茎环, 并有一段回文序列。ISKNV 与其它 3 种虹彩病毒 (FV3、RRV 和 LCDV-1) 的 ICR489 基因氨基酸序列具有一定的同源性, 但 ISKNV 与它们的同源性不高, 序列比较和系统树分析发现 ISKNV 与蛙病毒属和淋巴囊肿病毒属的病毒都不尽相同。

关键词: 虹彩病毒; 传染性脾肾坏死病毒; ICR489 基因; 序列分析; 系统进化

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 01-0064-04

鳊鱼 *Siniperca chuatsi* 传染性脾肾坏死病毒 (infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 是近年来广东省养殖鳊鱼暴发性流行病的主要病原, 是一种虹彩病毒, 感染鳊鱼脾、肾、肝脏、鳃、心脏和消化道等组织器官, 其中, 脾和肾是其主要感染器官, 该病毒具有很强的致病性, 浸泡感染和注射感染, 在 25~34 °C 范围内, 受感染鳊鱼在 7~12 d 内死亡率为 100%。在发病池中, 鳊鱼一般 10 d 内死亡率达 90% 左右^[1-3]。

在虹彩病毒感染的细胞内, 病毒 DNA 的转录和翻译的控制机制较复杂, 目前仅对蛙病毒属的代表种 FV3 有较为详细的研究。在被 FV3 感染的细胞内, 病毒基因的表达有先后之分, 即病毒 DNA 的转录是一个协同有序的过程。Willis 等^[4] 认为虹彩病毒基因表达主要在转录上控制, 其基因根据表达时序可分为 3 类: 即极早期基因 (immediate early genes)、滞早期基因 (delayed early genes) 和晚期基因 (late genes)。早期基因表达发生在病毒 DNA 复制之前, 主要编码合成与病毒基因组复制以及晚期基因表达相关的酶和调节蛋白如 DNA 聚合酶等, 病毒 DNA 复制依赖于早期基因产物。FV3 极早期基因研究较多的主要有的 ICR169 和 ICR489, 其中 ICR489 编码相对分子质量为 46 000 的推定蛋白, 与 ICR169 一样需要病毒粒子蛋白起反式激活作用。

在放线菌酮存在的情况下, ICR489 过量生产,

这表明 ICR489 的转录可能有负调节机制, 即其转录由一个病毒早期合成的蛋白控制, 以降低其转录的量, 而此蛋白在放线菌酮存在时不合成, 因此造成其过量生产^[5]。随后, 在淋巴囊肿病毒属的代表种淋巴囊肿病毒 1 型 (Lymphocystis disease virus 1, LCDV-1) 和一种蛙病毒 Regina ranavirus (RRV) 基因组中也发现 ICR489 基因^[6]。本文测定了 ISKNV ICR489 基因的核苷酸序列, 对其结构进行分析, 并与其它虹彩病毒的相应基因进行同源性比较。ISKNV ICR489 基因是目前为止发现的第 4 种虹彩病毒的 ICR489 基因完整序列。

1 材料与方法

1.1 材 料 被 ISKNV 感染的濒死鳊鱼于 1998 年 11 月取自广东省南海市某鳊鱼养殖场, 表现典型的传染性脾肾坏死病症状, 经组织病理和电镜检测在其脾和肾发现大量受染的肿大细胞和 ISKNV 粒子, PCR 检测为阳性。将之用液氮冷冻后带回实验室, -70 °C 保存。

1.2 病毒 DNA 提取

按文献 [3] 的方法进行。

1.3 病毒 DNA 的酶切、回收和克隆

ISKNV DNA 用限制性内切酶 *Kpn*I (Gibco/BRL 公司) 于 37 °C 酶切过夜, 在 $\omega = 0.6\%$ 琼脂糖凝胶上电泳分离。将含有 ISKNV DNA *Kpn*I B 酶切片段

* 收稿日期: 2001-07-10;

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990255)

作者简介: 邓敏 (1972-), 女, 博士; 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsbrco5@zsu.edu.cn

1	GTG	TAT	ACA	ATC	ATG	CTA	TAT	ATA	CAC	GGA	CAA	CCA	GTG	TCT	ACA	AAG	48
49	CAT	TTA	CAA	TAT	TCA	AAA	ACG	TTG	CGC	CTT	GGC	TTG	TGA	CCG	CTT	GCG	96
97	ACA	ACG	CAT	AGC	GCC	GGC	AAC	CAC	GGG	CCG	ATG	TGC	CCA	GGG	ACA	GCC	144
145	ACG	GCA	GCA	CCG	CTG	CTG	ACG	CCA	GCT	CGT	ACA	GGC	GTG	CGC	GAC	ATG	192
193	CTC	GGC	GAC	CAA	GGC	CTT	GTG	CTA	TGT	GGT	GCG	CGC	CAT	CGC	CGG	GTA	240
241	GCA	CTT	GCC	GCC	GGC	ATA	AGC	ACC	TCA	TTT	GGA	TGC	CCC	AAA	TGA	GGT	288
289	GTA	TAT	ATA	AAA	ATG	GGC	GAG	CAG	ACA	GAT	GTC	AGT	GAC	GAC	CTG	TGC	336
1					M	G	E	Q	T	D	V	S	D	D	L	C	12
337	ATC	ATC	AAT	GAT	GGC	GTT	GGC	CAA	CGC	GCC	GTA	TAC	ATG	CGC	GGG	GAC	384
13	I	I	N	D	G	V	G	Q	R	A	V	Y	M	R	G	D	28
385	ACT	GTG	TTA	CAT	CAG	GGT	CTG	CCC	TAT	GTG	TCT	GCC	GCC	GTA	CCG	GAG	432
29	T	V	L	H	Q	G	L	P	Y	V	S	A	A	V	P	E	44
433	CAC	TTT	GAA	CAT	GGC	ATG	ATA	ATG	CAG	AGT	GCA	CAT	CAA	GGC	ACG	ATG	480
45	D	F	E	H	G	M	I	M	Q	S	A	H	E	G	T	M	60
481	CTG	CAT	CGG	GTG	TAC	ACC	GGT	ACA	CAC	TTC	ATA	CTG	GGC	ACG	AAT	AAA	528
61	L	H	A	V	Y	T	G	T	H	F	I	L	G	T	N	K	76
529	CGG	CTG	TCG	TGT	GAA	AAT	TCG	CGC	TGG	GCC	TCC	CGT	CAC	ACC	ACG	TTC	576
77	R	L	S	C	E	N	S	R	W	A	S	R	H	T	T	F	92
577	AAG	CAG	TCA	TTT	GAG	GCT	GCA	CTG	TCG	CGC	ATA	TAC	CCA	CTT	CAG	GAG	624
93	K	Q	S	F	E	A	A	L	S	R	I	Y	P	L	Q	E	108
625	GAC	GTG	TAC	GAA	TGG	TTC	ATG	ACC	ACA	AAG	CTG	AAC	CCA	AAG	TTC	AGC	672
109	D	V	Y	E	W	F	M	T	T	K	L	N	P	K	F	S	124
673	TAC	GTG	TTC	CTG	GTC	ATG	GCC	ACG	GAG	GAG	GAG	CGC	CTC	GTG	GCG	CCC	720
125	Y	V	F	L	V	M	A	T	E	E	E	R	L	V	A	P	140
721	GTA	GAC	ACA	TCT	GCG	GCG	GGC	GCC	CTG	CTT	CTG	GCT	ACG	TGC	GCT	GCG	768
141	V	D	T	S	A	A	G	A	L	L	L	A	T	C	A	A	156
769	CCT	GGG	CAC	TTT	ATG	TTC	AAT	GAC	AGC	GAA	CAA	CTA	CTT	GAG	TTC	CCC	816
157	P	G	H	F	M	F	N	D	S	E	Q	L	L	E	F	P	172
817	AGG	CCC	CAC	ATT	GTG	ACG	CCC	CAC	AGC	CTT	GAG	GAA	GTG	CAC	GCG	TGG	864
173	R	P	H	I	V	T	P	H	S	L	E	E	V	H	A	W	188
865	CTG	ACC	GCG	CAC	CCC	CAC	TGC	AGC	GGA	CTG	CTG	GCG	CGG	ACG	GCA	GAC	912
189	L	T	A	H	P	H	C	S	G	L	L	A	R	T	A	D	204
913	AAC	CGC	ACC	GTC	CGC	TTC	AGC	CTG	CCG	CAA	TAC	ACC	AAG	ATG	CTC	AAA	960
205	N	R	T	V	R	F	S	L	P	Q	Y	T	K	M	L	K	220
961	ATC	CGC	GGC	AAC	GTG	CCT	AAC	ATC	AGG	TCC	CGT	GTA	CTG	GAG	CTC	CTA	1008
221	I	R	G	N	V	P	N	I	R	S	R	V	L	E	L	L	236
1009	CAC	AGG	CCG	GAT	GAC	CTT	TTC	CAG	CTG	ACG	GCC	ATC	TTC	CCA	CAC	CTG	1056
237	H	R	P	D	D	L	F	Q	L	T	A	I	F	P	H	L	252
1057	TAC	GAA	TAT	GCC	TTG	GCA	TGC	ATG	AGC	GCG	TAC	CAG	CGT	CTG	ATC	ATG	104
253	Y	E	Y	A	L	A	C	M	S	A	Y	Q	R	L	I	M	268
1105	GCT	ATC	GTG	GCC	ACC	GTA	ATG	AAT	TAT	GCT	ACA	TAT	TGT	GAT	GAC	ATG	1152
269	A	I	V	A	T	V	M	N	Y	A	T	Y	C	D	D	M	284
1153	CAT	GTG	GAC	AGG	GAC	TTC	ATA	AAC	AGG	GTA	CAC	TGG	GCT	CTT	AAC	AAG	1200
285	H	V	D	R	D	F	I	N	R	V	H	W	A	L	N	K	300
1201	CGA	CGC	CAC	GTC	AAT	GTC	GAC	ACC	GTG	CAC	GAT	GTG	TGC	GCC	CGT	TGT	1248
301	R	R	H	V	N	V	D	T	V	H	D	V	C	A	R	C	316
1249	TTC	ATG	CGT	CTG	CCT	GTT	GCC	CGC	AAG	GCC	CGC	CTA	TTG	GCC	ATC	ACG	296
317	F	M	R	L	P	V	A	R	K	A	R	L	L	A	I	T	332
1297	ACA	ACA	CCA	GAG	TAG	CTA	CAA	TGG	CAG	GGC	CTG	GCC	ACG	GGC	CAT	GTC	1344
333	T	T	P	E	*												337
1345	ATT	ATT	TTT	TCG	TAG	TAT	CTT	GGA	AGA	AAA	TGT	ACA	GCC	TAC	TCG	AGA	1392
1393	TTG	GAG	ATG	TAC	TGG	CCG	TGG	CCG	ACC	GAA	CGG	CGG	TGC	AAC	TGA	TGC	1440
1441	ACG	ACC	GTA	ACC	CTG	AGC	ACT	CTA	TCA	CAT	TGG	CTC	AGT	CGG	CCG	AGG	1488
1489	GCT	GTG	TGC	ACG	TGC	AAG	CGG	TGT	CGG	CAA	ACT	CTG	AGC	GGG	TGC	GCC	536
1537	GGT	GCA	TGG	TAG	TGG	CCG	GTC	AAA	TTT	ACG	GCT	CTC	GTC	TGG	TGG	CCC	584
1585	GTA	TTC	GGC	ACC	TGC	ACC	ACA	CCA									1608

图 1 ISKNV ICR489 基因核苷酸序列 及其推导的氨基酸序列

Fig 1 Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the pupative ISKNV ICR489 gene
启动子 TATA box 用方框标出, 5' 端的回文序列和反向重复序列用带箭头的下划线标出

的琼脂块切下, 按 QIAquick Gel Extraction Kit (QIA-GEN 公司) 操作说明书回收纯化后, 用 T₄ DNA 连接酶 (Gibco/BRL 公司) 于 16℃连接过夜, 插入到质粒 pBluescript II KS 中, 转化入 *E. coli* XL1 blue 中, 挑选白色菌落, 碱法提质粒, 用酶切法鉴定重组质粒 pISKN KB。

1.4 DNA 序列分析

重组质粒经纯化后用 ABI PRISM 3700 型 DNA 分析仪 (PE 公司) 测定重组质粒 pISKN KB 上插入片段 (ISKNV DNA *Kpn* I B 酶切片段) 的序列。核酸和蛋白质的数据分析采用 WDNASIS 和 DNAS_{tar} 等序列分析软件, 并输入 GenBank 用程序 BLAST 进行同源性比较。

2 结 果

2.1 序列比较

在数据库 GenBank 上用程序 BLAST 分析所测序列 (ISKNV DNA *Kpn* I B 酶切片段), 结果表明该序列中含有完整的 ICR489 基因。ISKNV ICR489 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中 3 种虹彩病毒 (包括 LCDV -1 和蛙病毒属的 2 种病毒, 即蛙病毒 3 型 (Frog virus 3, FV3, 为蛙病毒属的代表种) 和 Regina ranavirus (RRV)) 和 1 种囊病毒 Ascovirus DpAV4 (DpAV4) 的相应序列具有一定的同源性。用程序 DNAS_{tar} 中的 Clustal 方法比较这 5 种病毒 ICR489 氨基酸序列结果 (表 1), 可见蛙病毒属的 2 种病毒 FV3 和 RRV 的同源性远远高于其它病毒, 为 89.1%; ISKNV ICR489 氨基酸序列与其它 4 种病毒的相应基因编码的氨基酸序列的同源性都不高, 其中, 与 LCDV -1 的同源性相对最高, 与 DpAV4 的同源性相对最低。

表 1 5 种病毒 ICR489 基因氨基酸序列的同源性比较

Tah 1 Amino acid identity of ICR489gene of 5 viruses

项目	LCDV -1	RRV	FV3	DpAV4
ISKNV	16.9	15.1	15.7	11.5
LCDV -1		15.2	15.5	16.1
RRV			89.1	12.7
FV3				14.5

ICR489 基因特性比较如表 2 所示, 其中, 蛙病毒属的 2 种病毒的 ICR489 基因较长, 其特性相近; ISKNV 的 ICR489 基因较短, 推定的相对分子质量

相应也较小; 其等电点 (pI) LCDV -1 最大, 其次为 ISKNV。

表 2 ICR489 基因比较结果

Tah 2 Comparative analysis of the ICR489 gene

序列编码		长度/ aa	相对分子质量	pI
ISKNV	AF371960	336	38 300	6.82
LCDV -1	NP-078648	374	43 500	9.00
FV3	M19872	394	45 800	6.20
RRV	AF367980	395	45 600	5.96
DpAV4	AJ279815	330	37 900	5.62

2.2 ISKNV ICR489 基因序列

ISKNV 的 ICR489 基因完整读码框为 1 011 bp, GC 含量为 56.97%, 根据 DNAS_{tar} 预测该蛋白的等电点为弱酸性, 编码一个长为 336 aa、相对分子质量为 38 270 的推定蛋白。序列分析发现, ISKNV ICR489 基因起始密码子 ATG 上游有启动子 TATA box 序列, 并有一段回文序列和反向重复序列可形成茎环 (图 1)。

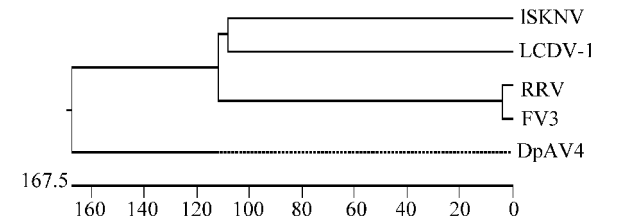


图 2 根据 5 种病毒 ICR489 基因编码的氨基酸序列绘制的系统发育进化树

Fig 2 Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences of the ICR489 genes of 5 viruses

用 DNAS_{tar} 的 MEGALIGN 程序构建系统发育进化对

2.3 系统发育进化分析

根据 5 种病毒 ICR489 基因编码的氨基酸序列绘制的系统发育进化树见图 2。可以看出 5 种病毒被分为 2 个大类: 囊病毒和虹彩病毒。其中, 4 种虹彩病毒又被细分为 3 群: FV3 与 RRV 都为蛙病毒属的病毒, 亲缘关系很近, 为一群, 而 ISKNV 和 LCDV -1 各为一群。

3 讨 论

ISKNV ICR489 基因序列是继 FV3、LCDV -1 和 RRV 之后第 4 种虹彩病毒的 ICR489 基因完整序列。根据对 5 种病毒 ICR489 基因的核苷酸和氨基酸序

列的分析, 可以看到该基因在同为蛙病毒属的 2 种病毒 (FV3 和 RRV) 之间较保守, 而在不同属的病毒之间则相对不保守。Beckma 等^[7] 对 FV3 ICR489 基因的表达调控研究发现, FV3 ICR489 基因转录依赖于其 5' 端起始密码子上游的 CCGCCC 和 CAAT 读码框, 它们与细胞转录因子相结合。但与 FV3 ICR489 不同的是, 对 ISKNV ICR489 基因序列分析发现, 其 5' 端起始密码子上游只有启动子 TATA box 序列, 它们启动子区域的不同表明它们的转录可能不是有共同的信号调节, 而是被不同的过程和不同的细胞转录因子所控制。ICR489 基因为一种极早期基因, 对其功能的研究目前还没有相关的报道, 尚有待进一步的深入研究。

根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 第 7 次报告^[8], 虹彩病毒科有两个属 (淋巴囊肿病毒属和蛙病毒属) 的病毒感染变温脊椎动物 (鱼类、两栖类和爬行类)。淋巴囊肿病毒属的病毒通常不致死, 而蛙病毒属的病毒则造成鱼类和多种水生动物的系统性疾病。邓敏等^[2] 通过对 ISKNV 核苷酸还原酶小亚基基因片段的序列分析发现 ISKNV 与日本的真鲷虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSIV) 同源性很高, 达到 90% 以上, 并且它们都使其宿主的受染细胞肿大, 说明 ISKNV 与 RSIV 等引起受染细胞肿大的虹彩病毒的亲缘关系很近, 但这类虹彩病毒的归属仍未定。本文对 ISKNV ICR489 基因的序列分

析和系统进化分析发现 ISKNV 可能是独立于蛙病毒属和淋巴囊肿病毒属的一群。

参考文献:

- [1] 何建国, 翁少萍, 黄志坚, 等. 鳊暴发流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学报), 1998, 37(5): 74—77.
- [2] 邓敏, 何建国, 左涛, 等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) PCR 检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. 病毒学报, 2000, 16(4): 365—369.
- [3] 邓敏, 何建国, 翁少萍, 等. 鳊鱼传染性脾肾坏死病毒的纯化和酶切分析[J]. 水产学报, 2001, 25(3): 238—243.
- [4] WILLIS D B, GOORHA A. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VII. Transcriptional and post transcriptional regulation of virus gene expression[J]. J Virol, 1977, 24: 326—342.
- [5] WILLIAMS T. The Iridoviruses[J]. Advances in Virus Research, 1996, 46: 345—412.
- [6] TIDONA C A, DARAIG. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J]. Virology, 1997, 230: 207—216.
- [7] BECKMAN W, THAM T N, AUBERTIN A M, et al. Structure and regulation of the immediate early frog virus 3 gene that encodes ICR489[J]. J Virol, 1988, 62: 1271—1277.
- [8] REGENMORIEL M H V van, FAUQUET C M, BISHOP D H L, et al. Seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses[R]. USA: Academic Press, 1999: 167—182.

Characterization of the ICR489 Gene of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus of *Siniperca chuatsi*

DENG Min, HE Jian guo, WENG Shao ping, LÜ Ling, HE Hua hong

(School of Life Sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: ICR489 gene of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) of *Siniperca chuatsi* were sequenced. The open reading frame of the gene is 1 011 nucleotides long, encoding a putative protein of 337 amino acids with M_w of 38 270. The 5' noncoding region has TATA box. A stem loop and palindrome are contained upstream of the translation start codon. The results of comparison of the homology with other iridoviruses ICR489 genes showed that ISKNV ICR489 gene has lower identities with others. Alignment of amino acid sequences and a phylogenetic tree of ICR489 genes of four iridoviruses were constructed. The results indicated that ISKNV is different from the viruses of the genus Ranavirus and Lymphocystivirus.

Key words: iridovirus; ISKNV; ICR489 gene; sequence analysis; phylogeny