

文章编号: 1000-0615(2005)03-0429-04

• 研究简报 •

赤点石斑鱼神经坏死病毒外壳蛋白全基因克隆与序列分析

黄剑南^{1,2}, 林 鑫¹, 翁少萍¹, 何建国¹

(1. 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

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

关键词: 赤点石斑鱼; 神经坏死病毒; 外壳蛋白基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S941.41

文献标识码: A

Molecular cloning and sequence analysis of complete coat protein gene of nervous necrosis virus from *Epinephelus akaara*

HUANG Jian-nan^{1,2}, LIN Li¹, WENG Shao-ping¹, HE Jian-guo¹

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Viral nervous necrosis (VNN) is a worldwide disease among teleost fish. In the mainland of China, VNN was first identified in 2 species of hatchery-reared groupers, *Epinephelus akaara* and *E. coioides*. In the present study, samples were collected from larvae of *E. akaara* with signs of VNN in Dayawan bay which is located in southern China. The complete viral coat protein gene was amplified using extracted total RNA as template. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification was performed using primers containing a heterologous restriction site for *Nco*I. PCR products were cloned into pCDNA3 vector and sequenced. The results indicated that the coat protein gene of Dayawan isolate (RG-CN) was 1056 bases in length and contained a single open reading frame (ORF) of 1017 bases encoding a protein of 338 amino acids. The sequence similarities between the coat protein gene of RG-CN and other 8 isolates of NNV from Dayawan, Taiwan, Japan, Singapore and France were 79.1% - 99.5% at the nucleotide level and 83.7% - 100% at the amino acid level, respectively. The homology between RG-CN and the other 5 isolates from groupers was high and relatively lower between RG-CN and guppy nervous necrosis virus (GNNV), sea bass nervous necrosis virus (DIEV), but more divergences existed between RG-CN and striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Compared with SJNNV, RG-CN and the other 7 isolates all lacked 6 nucleotides and 2 amino acids in the same positions. Based on the result of molecular phylogenetic analysis, Dayawan isolate belongs to red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) genotype.

Key words: *Epinephelus akaara*; nervous necrosis virus (NNV); complete coat protein gene; molecular cloning; sequence analysis

由鱼类神经坏死病毒(nervous necrosis virus, NNV)引起的病毒性神经坏死症(viral nervous necrosis, VNN)是一种世界范围内流行的海水鱼类病毒病。患病鱼苗食欲差,体色灰白或者偏黑,通常浮在水面,间或作突发性的螺旋游动。组织切片观察,脑部和视网膜等组织有空泡化病变,鱼苗的死亡率高达90%以上。近十年来,共有6目15

科30多种重要经济鱼类的人工繁殖鱼苗和部分成鱼受到不同程度的影响,甚至波及到淡水中的鲇(*Parasilurus asotus*)^[1-3]。病毒的外壳蛋白和病毒的抗原决定簇、侵染、流行和进化等密切相关,因此对病毒外壳蛋白的研究在疾病防治上具有重要意义。本文克隆了赤点石斑鱼神经坏死病毒外壳蛋白全基因,并进行序列测定和分析。

收稿日期: 2004-05-08

资助项目: 科技部海洋“863”计划项目(2001AA621010); 广东省科技厅团队资助项目(20023002)

作者简介: 黄剑南(1968-), 女, 辽宁海城人, 博士, 从事水产动物疾病与分子生物学研究。Tel: 020-84195177, E-mail: hjn327@yahoo.com.cn

通讯作者: 何建国, Tel: 020-84110976, E-mail: lsbr05@zsu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

2000年广东省大亚湾水产试验中心生产的赤点石斑鱼苗。采集具有病毒性神经坏死症状的垂死的鱼苗,全长1.5~2.0 cm,日龄20~30 d,保存在-85℃的超低温冰箱中。

1.2 RNA提取

采用 Trizol (Invitrogen, USA) 试剂对样品(眼+脑)的总RNA进行抽提。先加入300 μL Trizol进行匀浆,再加入700 μL Trizol混匀;加入200 μL 氯仿混合后在4℃,10 000 × g离心15 min;吸取上清液500 μL,加入到装有500 μL 异丙醇的离心管中,在4℃,10 000 × g离心15 min;用1 mL 70%乙醇将提取的总RNA洗2次,加入100 μL 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的蒸馏水进行溶解,保存在-85℃。

1.3 外壳蛋白基因的RT-PCR扩增

据已发表的神经坏死病毒基因序列,设计引物进行外壳蛋白全基因的RT-PCR扩增,上游引物F和下游引物R分别为:

(5' GCGGCGGCCGCCATGTTACGCAAAGGTGAGAAG-3')

(5' GCGGCGGCCGCCCGATGACCCGTTAGTTT-3')

有下划线的核苷酸序列为引入的 *NotI* 酶特异性酶切位点。先将提纯的病毒和宿主RNA混合物在沸水中煮5 min,然后置于冰上5 min。取1 μL上述RNA,加入到事先配制好的逆转录反应液中,每一反应液含有(5 × First strand buffer 2 μL, 0.1 mol · L⁻¹ DDT 1 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP mixture 4 μL, 20 pmol R引物 0.5 μL, 核酸酶抑制剂(Life Technologies 出品) 0.1 μL, SUPERSRIPT™ ④逆转录酶(Life Technologies 出品) 0.2 μL, 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的蒸馏水 1.2 μL), 42℃反应30 min, 99℃ 10 min 灭活逆转录酶, 4℃中保存。然后向上述逆转录反应产物中加入PCR反应液(10 × Ex buffer 5 μL, 20 pmol F引物 0.5 μL, HiFi Taq DNA聚合酶(Roche 出品) 0.5 μL, DEPC处理过的蒸馏水 34 μL)进行PCR扩增。先在95℃变性2 min,接着反应25个循环,循环条件为95℃, 40 s; 55℃, 90 s; 72℃, 4 min。最后在72℃延伸10 min。RT-PCR在Robotcyler(Stratagene 出品)中进行。反应产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,拍片。

1.4 外壳蛋白基因的克隆与测序分析

克隆用的质粒为pcDNA3(Invitrogen 出品)。PCR产物纯化后,用*NotI*酶切扩增到的外壳蛋白基因片段和pcDNA3质粒。然后采用T4 DNA连接酶,将扩增到的外壳蛋白基因片段连接到pcDNA3质粒上,构建pcDNA3-RGNNV重组质粒。转化大肠杆菌XL-Blue。挑选10个菌落,分别在3 mL含有100 mg · L⁻¹青霉素的液体培养基中培养12 h。采用Mini Plasmid Kit(QIAGEN 出品),按照使用说明提取质粒,用*NotI*酶切确认(图1)。DNA测序在

ABI 3100全自动测序仪上进行。外壳蛋白全基因序列在GenBank上的登录号为AY601879。用Clustal X 1.8分析软件对来自日本、台湾、新加坡、法国和大亚湾的9个神经坏死病毒株进行同源性比对,并用MEGA 2.0进行分子进化分析(图2,表1)。

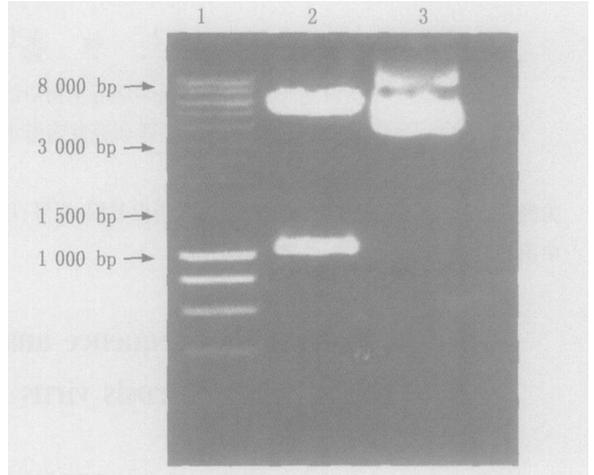


图1 外壳蛋白全基因克隆酶切图谱

Fig. 1 The digestion of complete coat protein gene recombinant plasmid

1. 标准分子量; 2. 质粒, *NotI* 酶切; 3. 质粒, 不酶切

1. Marker; 2 recombinant plasmid digested with *NotI*; 3. not digested recombinant plasmid

2 结果

2.1 克隆与测序

经过RT-PCR扩增,得到长度约为1070 bp的片段。通过克隆、转化,筛选到2个重组质粒(pcDNA3-RGNNV)。用*NotI*酶切鉴定,得到约1056 bp的插入片段(图1)。取质粒pcDNA3-RGNNV1进行序列测定。克隆到的外壳蛋白全基因长1056个碱基,只含有一个长度为1017个碱基的开放阅读框(ORF),编码338个氨基酸。将得到的氨基酸序列与神经坏死病毒4种基因型相应的氨基酸序列进行分子进化分析,结果表明,大亚湾赤点石斑神经坏死病毒株属于赤点石斑神经坏死病毒基因型。

2.2 序列分析

对大亚湾赤点石斑神经坏死病毒外壳蛋白全基因和分布在大亚湾、台湾、日本、新加坡和法国的8株神经坏死病毒外壳蛋白全基因进行分子进化分析(图2)。从核苷酸水平来看,大亚湾病毒株RG-CN和其它病毒株的相似率为79.1%~99.5%,其中与七带石斑神经坏死病毒(SGNNV)的同源性最高,只有5个核苷酸的差异,与同属石斑鱼来源的马拉巴斑神经坏死病毒(MNNV)等4个病毒株的同源性也较高,只有6~11个核苷酸的差异;其次是非石斑鱼来源的古比鱼神经坏死病毒(GNNV)和欧洲鲈神经坏死病毒(DIEV),与拟神经坏死病毒(SJNNV)的

的感染和宿主范围的关系有待于进一步研究。本文所比较的9株病毒外壳蛋白氨基酸序列第115、187和201位点都是半胱氨酸残基,这三个位点是否和维持外壳蛋白的三维结构有关,需进一步研究。

1999年,广东省大亚湾的赤点石斑鱼首次暴发病毒性神经坏死症,但斜带石斑没有发生该病。2000年在赤点石斑和斜带石斑的繁育中均暴发该病,而这两种石斑的亲鱼饲养在同一地点相邻的网箱,种苗繁育也在同一试验中心。从分子水平分析,这两种石斑鱼的神经坏死病毒外壳蛋白的氨基酸序列完全相同,因此该病有从赤点石斑传播到斜带石斑的可能性。本研究的赤点石斑病毒样品采集于2000年,用于比较分析的斜带石斑病毒采集于2002年,这两株病毒的外壳蛋白基因(1017个碱基)有7个位点不相同,二者在核苷酸水平的漂变速度为 3.4×10^{-3} 核苷酸/地点/年。Nishizawa等^[5]对分布在长崎的拟神经坏死病毒株外壳蛋白核苷酸连续5年测定,其漂变速度为 2.6×10^{-3} 核苷酸/地点/年,比本文计算的漂变速度略小,这可能和病毒感染不同宿主有关。

本文作者之一林鑫曾得到中国国家留学基金

委和德国学术交流中心(DAAD)奖学金的资助,特此致谢。

参考文献:

- [1] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25: 127-142.
- [2] Chi S C, Shieh J R, Lin S J. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan[J]. *Dis of Aquat Org*, 2003, 55: 221-228.
- [3] 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: 186-188.
- [4] Nishizawa T, Mori K, Nakai T, *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)[J]. *Dis Aquat Org*, 1994, 18: 103-107.
- [5] Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, *et al.* Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 1633-1636.
- [6] Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, *et al.* Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of nervous necrosis in marine fish[J]. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 1563-1569.