

文章编号: 1000- 0615(2002)01- 0547- 05

## 鳊传染性脾肾坏死病毒核糖核酸酶 III 基因结构及序列分析

翁少萍, 邓 敏, 何建国, 吕 玲, 何华虹, 龙紫新

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘要:**测定了鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)核糖核酸酶 III(RNase III)基因的核苷酸全序列。该基因完整读码框为 771bp, G/C 含量为 52.53%, 编码一个长为 256 个氨基酸、分子量为 28.9kD 的推定蛋白。其上下游序列各有一个 TATA box, 终止子下游有一段回文序列。与其它物种相比, ISKNV 与虹彩病毒(包括 LCDV-1 和 CIV)的核糖核酸酶 III 基因的氨基酸序列同源性较高, 与酵母、线虫等物种的相应基因的同源性较低。

**关键词:**虹彩病毒; 传染性脾肾坏死病毒; 核糖核酸酶 III 基因; 序列分析

中图分类号: S917; Q343.1 文献标识码: A

## Characterization of the ribonuclease III gene of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi*

WENG Shao-ping, DENG Min, HE Jian-guo, LV Ling, HE Hua-hong, LONG Qing-xin  
(School of life science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Ribonuclease III gene of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) of *Siniperca chuatsi* had been sequenced. The open reading frame of the gene is 771 nucleotides long, encoding a putative protein of 256 amino acids with 28.9 kD. The 5' and 3' noncoding regions have TATA boxes. A palindrome is contained downstream of the translation stop codon. Compared with the RNase IIIs found in ISKNV and other species, the higher homology among ISKNV and the two iridovirus is present, and ISKNV has lower identity with other species, especially yeast and rhabditida.

**Key words:** iridovirus; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); ribonuclease III gene (RNase III gene); sequence analysis

传染性脾肾坏死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV) 是名优淡水养殖品种鳊 (*Siniperca chuatsi*) 暴发性流行病的病原, 为虹彩病毒科的成员<sup>[1-5]</sup>。虹彩病毒属于细胞质内寄生的 DNA 病毒, 二十面体结构, 能够感染昆虫和变温脊椎动物, 其基因组具有末端富余 (terminal redundancy) 和环状变换 (circular permutation) 的特点。另外, 脊椎动物虹彩病毒的基因组胞嘧啶具有甲基化现象<sup>[6]</sup>。目前对于虹彩病毒复制、转录和翻译等过程所涉及的功能基因的研究并不多。在我们测定的 ISKNV DNA 序列中, 发现有与核糖核酸酶 III (ribonuclease III, RNase III) 基因同源的序列。核糖核酸酶 III 在

收稿日期: 2001-08-02

资助项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990255)

作者简介: 翁少萍 (1963-), 女, 莆田市人, 助研, 主要从事水生经济动物病害及分子生物学方面的研究。Tel: 020-84113793, E-

mail: lsprc14@zsu.edu.cn

rRNA 和 mRNA 前体加工中起重要的作用,是病毒转录过程的一个重要的酶<sup>[7]</sup>。在虹彩病毒中,该基因在淋巴囊肿病毒 1 型(淋巴囊肿病毒属的代表种,简称 LCDV-1)和二化螟虹彩病毒(虹彩病毒属的代表种,简称 CIV)的基因组序列中也存在,但未见有详细报道。本文测定了 ISKNV 核糖核酸酶 III (ribonuclease III, RNase III) 基因的核苷酸序列,对其结构进行分析,并与其它物种的相应基因进行同源性比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

被 ISKNV 感染的濒死鳊于 1998 年 11 月取自广东省南海市鳊养殖场,组织病理(HE 染色)发现其脾肾中许多肿大的受染细胞,电镜观察可见肿大细胞中大量的 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

参考邓敏等的方法<sup>[8]</sup>,从被 ISKNV 感染的濒死鳊的脾和肾中提取病毒基因组 DNA。

### 1.3 病毒 DNA 的酶切、回收和克隆

按邓敏等的方法<sup>[9]</sup>进行: ISKNV DNA 用限制性内切酶 KpnI (Gibco/ BRL 公司) 于 37 °C 酶切过夜,在 0.6% 琼脂糖凝胶上电泳分离。将含有 ISKNV DNA KpnI C 酶切片段的琼脂块切下,按 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司) 操作说明书回收纯化后,用 T4 DNA 连接酶(Gibco/ BRL 公司) 于 16 °C 连接过夜,插入到质粒 pBluescript  $\text{①KS}$  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- KC。

### 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- KC 上插入片段(ISKNV DNA KpnI C 酶切片段) 的序列。核酸和蛋白质的数据分析采用 Omega2. 0、WDNASIS 和 DNAStar 等序列分析软件,并通过 Internet 输入 GenBank/ EMBL/ DDBJ 用程序 BLAST 进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 ISKNV RNaseIII 基因序列分析

用计算机软件分析表明, ISKNV RNaseIII 基因完整读码框为 771bp, GC 含量为 52.53%, 编码一个含 256 个氨基酸, 分子量为 28.9kD 的推定蛋白, 等电点为 8.13。其上下游序列各有一个 TATA box, 终止子下游有一段回文序列(图 1)。

蛋白质结构域搜索发现 ISKNV RNaseIII 基因含有核糖核酸酶 III 家族(ribonuclease\_3, RIBOe) 的结构域(No. pfam00636)(图 2)。

### 2.2 同源性比较

将 ISKNV 与虹彩病毒 LCDV-1 (accession No. NP\_078726.1)、CIV (accession No. AF003534)、囊病毒 Ascovirus DpAV4 (DpAV4) (accession No. AJ279812)、小球藻病毒 1 型(*Paramecium bursaria* chlorella virus 1, PBCV-1) (accession No. Q98514)、酵母(*Schizosaromyces pombe*, yeast) (accession No. AL049662) 和大肠杆菌 *E. coli* (accession No. AP002562) 的 RNase III 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较, 结果发现这些物种的 RNase III 基因编码的氨基酸序列同源性都不高。ISKNV RNase III 基因与 LCDV-1 的同源性最高(20.7%), 与酵母的同源性最低(12.5%)。另外, CIV 与 DpAV4 的同源性较高(29.3%)(表 1)。

表 1 7 种 RNaseIII 基因氨基酸序列的同源性比较

Tab. 1 Relatedness of 7 RNaseIII genes

	LCDV-1	CIV	DpAV4	PBCV-1	<i>E. coli</i>	yeast
ISKNV	20.7	17.1	18.7	13.6	15.5	12.5
LCDV-1		25.1	23.5	16.7	16.8	14.3
CIV			29.3	14.5	17.3	13.4
DpAV4				15.3	16.8	12.9
PBCV-1					24.8	15.6
<i>E. coli</i>						18.6

1	GGG CCA TAG AGG CCA TCA CCG GCA AAA AAT TTG CAA AAT CAA GAT GTA	48
49	TCA AAA ACC CTG TGA CAG GAC AGC ACC TGG AGC TAG ATT GTT ACA ATA	96
97	GCG CGC TCA AGC TGG CCG TCG AGT ACA ACG GCC GAC AGC ACT ATC AGT	144
145	ACG TGC CCC ATT TTC ACG GGC CCG AGC GCC ATC GGT TTA CGG AGC AGC	192
193	GCT ACA GGG ATG TGA TAA AGG CTC AGT TGT GCA AAG AGC AGG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GTA TAA</span>	240
241	AAC TGA TTG TGG TGC CAT ACA CTG TGG CCG TAG ATG ACA TCG AGG CAT	288
289	ACA TCA GAC GCC ATG TTT AAA GCC TTC ATA GTA GAC TTT ATA CTG GTG	336
1		
	M F K A F I V D F I L V	12
337	CGT TGC TGT GAG ATG GAC CGC GCA TTT GCG CAG GCA ATG TAT GAC AAG	384
13	R C C E M D R A F A Q A M Y D K	28
385	AAC ACA CAG GTG TTC CAC AGC GTC TTT ACG CAC TCC AAG GCA CAC CCT	432
29	N T Q V F H S V F T H S K A H P	44
433	GTG AAC AAC TAT GAG TGG TAC GAA AAG CTC GGA GAT GCC ATT ATT GCC	480
45	V N N Y E W Y E K L G D A I I A	60
481	AGC GTG ATG CCA CAG TAC TAC ATG GAG CGT TTT CCC AAG CTG GCA CAC	528
61	S V M P Q Y Y M E R F P K L A H	76
529	GAT CCA TCC GCC ACG GTG GCA CGA ACC GTG TCC CAG CTG GCA ATC ACC	576
77	D P S A T V A R T V S Q L A I T	92
577	TAT CAG TCG GGC ACC ACC ATG AGC AAT ATC GCT CAA AGG ATG GGC TTC	624
93	Y Q S G T T M S N I A Q R M G F	108
625	CTG AAA TGG GTG GTG GCA CAC CGT GAT GGC GTT GCG CCT GCC AGC TAC	672
109	L K W V V A H R D G V A P A S Y	124
673	AAA GAA CAG CAG CGA CTG CTC GAG GAC ACC TTT GAG GCT ATG GTG GGC	720
125	K E Q Q R L L E D T F E A M V G	140
721	GCC ATA TCA ATC ACC ATG GAC AAC GCC ACG GGC GTC AAG TGC TCT GGC	768
141	A I S I T M D N A T G V K C S G	156
769	CAC ATT GCA TGC TAT CGC TTC CTT AAG TAT GCC TAC GGG CTG ATC AAC	816
157	H I A C Y R F L K Y A Y G L I N	172
817	ATG AGA CTG GAC GGT CTC ATA GAC AAC AAG AGC ATG CTT AAG GAG CTG	864
173	M R L D G L I D N K S M L K E L	188
865	ATT GAC ATG CAC AGC TCT GTC CTC GAC AGC TTT ACG TTT GAA TAC ACA	912
189	I D M H S S V L D S F T F E Y T	204
913	AAC AAT GTG ATG ACA CTG ACC GTG GCC CAT GGC AAA TAT ACG GTG TCG	960
205	N N V M T L T V A H G K Y T V S	220
961	GAG GCC AAC GTC AAC AAC CTG TCA AAA CGT GAG CTC GAG AAG GTT TTG	1008
221	E A N V N N L S K R E L E K V L	236
1009	GCC GGA AAG GTG CTT GCG CAG CTG GCA TCA GAC GGT TAT GTG CAC AAG	1056
237	A G K V L A Q L A S D G Y V H K	252
1057	TCC ATG CGG CTC TAG ACA ACC ATG GTC CAG TCA TGC GGC ACC CGA CAG	1104
253	S M R L *	257
1105	TTC CTG CAC ATG TCC ACG GCG GCA CTG TCG AGT GGC AAT AGC TGG CCA	1152
1153	TCT TTG TAC ACC CCC ACT GCA ATG TAC CGG TGG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GTA TAC</span> AGG GTC TTG	1200
1201	TCG GGG TGT GGG TTA GCA ATC ATG CAA AGG CGA CTG TCA CGA TCG TAC	1248
1249	AAC ATC CCA GGC ATG CCT GGG ACG TCC AAC AGC CCT GCT GTG GCC ACG	1296
1297	GCG GTG ATG GCC GGG GGC CTG ACC ACT TTG GGC ATG AGG CTG CGA TTC	1344
1345	AAT ATG TGC AGC TGC ATT TGG TTA	1368

图1 ISKNV RNaseIII 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 RNaseIII gene.

The initiation codon is blackened and the stop codon is indicated by\* . The putative TATA boxes are boxed.

In the 3' region, the palindrome is indicated by arrows underline.

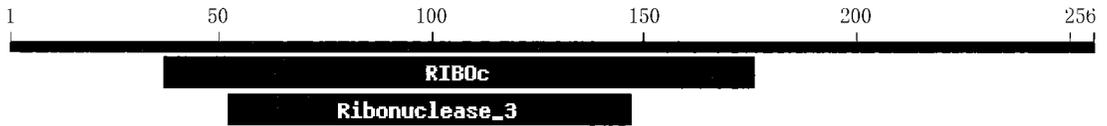


图 2 ISKNV RNaseIII 基因包含的蛋白质结构域

Fig.2 Organization of domains in ISKNV RNase III gene

### 2.3 系统发育分析

根据 7 个物种 RNase III 基因编码的氨基酸序列构建的系统进化树如图 3 所示,可见酵母与其它物种的亲缘关系远,而囊病毒 DpAV4 与虹彩病毒(包括 CIV、LCDV-1 和 ISKNV) 被分为一群,但 ISKNV 与 LCDV-1、CIV 之间的亲缘关系并不近。

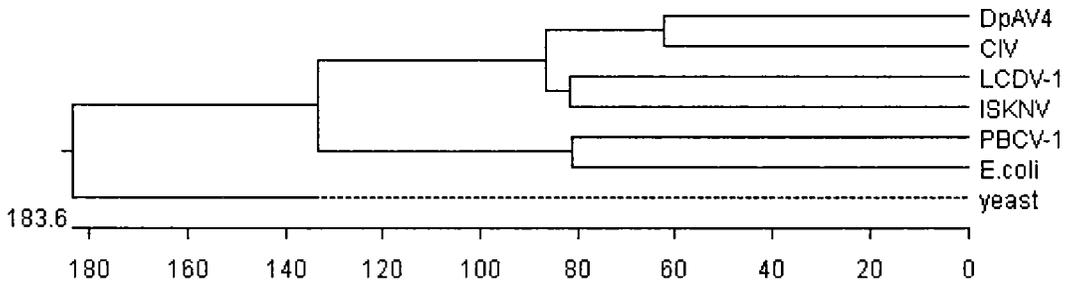


图 3 根据 7 个物种的 RNase III 氨基酸序列建立的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences of the RNaseIII genes.

The phylogenetic tree was constructed using the MEGALIGN program of DNASTAR. Branch length is proportional to the number of amino acid substitutions, which is indicated by the scale beneath the tree

## 3 讨论

ISKNV RNase III 基因序列是继 LCDV-1 和 CIV 之后第 3 种虹彩病毒 RNase III 基因完整序列。从原核生物到真核生物均有 RNase III 的存在,该酶在 rRNA 和 mRNA 前体加工中起重要作用,是病毒转录过程中必不可少的酶。RNase III 可识别 RNA 的茎环结构,并在其茎部进行切割。在大肠杆菌 *E. coli* RNase III 基因序列的一段非编码区中,可能形成“茎—膨大—茎”的二级结构,是 RNase III 的作用位点<sup>[7,10]</sup>。但在 ISKNV RNase III 基因序列的非编码区却没有找到能形成茎环和发夹结构的序列,其作用机制有待于进一步深入研究。目前对于虹彩病毒基因的研究主要有主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因和胞嘧啶 5-甲基转移酶基因等<sup>[11,12]</sup>,这两个基因(特别是 MCP 基因)在虹彩病毒中都高度保守,被广泛地用于研究虹彩病毒的进化及鉴定新分离的虹彩病毒。本文所分析的 RNase III 基因在虹彩病毒中则研究不多,根据对其进行系统进化分析的结果,ISKNV 与 LCDV-1 和 CIV 归为一群,与 ISKNV 是一种虹彩病毒的观点是一致的,另外,也可以看到, RNaseIII 基因不保守,其同源性都不高。

另外,从 RNaseIII 氨基酸序列构建的系统树中看到,囊病毒 Ascovirus DpAV4 和虹彩病毒较接近,它们的该基因可能来源于同一祖先。这一结果与 Bigot 等<sup>[13]</sup>得到的结果一致。比较虹彩病毒和囊病毒的理化特性可以看到二者之间的差别:虹彩病毒为二十面体,感染昆虫和低等脊椎动物,基因组为双链线性,有重复区但不多;而囊病毒的病毒粒子为典型的杆状,只感染昆虫,其基因组为环状,部分形成超螺旋,基因组中散布着大小为 1-3 kb 的重复区。虹彩病毒和囊病毒的基因组都存在甲基化现象,其中,囊病毒 Ascovirus DpAV4 的甲基化程度在目前报道的所有 DNA 病毒中是最严重的。由于对这两种病毒

(尤其是囊病毒)的基本特性和基因组结构所知不多,因此目前对它们在系统进化上的关系还不能进行深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 增刊: 56- 60.
- [2] 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(自然科学版), 1998, 37(5):74- 77.
- [3] 张奇亚,李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到3种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192- 195.
- [4] 方勤,艾桃山,邹桂平,等. 鳊鱼病毒病原及细胞感染特性的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15(3): 297- 301.
- [5] 邓敏,何建国,左涛,等. 鳊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.
- [6] Williams T. The Iridoviruses[J]. Advances in Virus Research, 1996, 46: 345- 412.
- [7] March P E, Ahnn J, Inouye M. The DNA sequence of the gene (*mc*) encoding ribonuclease III of *Escheria dia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 4677- 4685.
- [8] 邓敏,何建国,翁少萍,等. 鳊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.
- [9] 邓敏,何建国,翁少萍,等. 鳊传染性脾肾坏死病毒基因组文库和物理图谱的建立[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 273- 276.
- [10] Lino Y, Sugimoto A, Yamamoto M. *S. pombe pac1<sup>+</sup>*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III- like RNase [J]. EMBO J, 1991, 10: 221- 226.
- [11] Mao J, Tham T N, Gentry G A, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3 [J]. Virology, 1996, 216 (2): 431- 436.
- [12] Kaur K, Rohozinski J, Goorha R. Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene [J]. J Gen Virol, 1995, 76: 1937- 1943.
- [13] Bigot Y, Stasiak K, Rouleux B F, et al. Charaterization of repetitive DNA regions and methylated DNA in ascovirus genomes. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 12): 3073- 3082.