



克氏原螯虾白斑病毒株 (WSSV-Cc) 基因组的一个印迹

柯 飞^{1,2}, 桂 朗³, 李 涛^{1,2}, 张奇亚^{1,2*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101;

3. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心,
水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 从自然感染、濒死的克氏原螯虾中分离出的白斑病毒株 (*Cambarus clarkii* whispovirus, WSSV-Cc 或 Cc 株) 是一株基因组较小的新毒株。为寻找白斑病毒进化过程在基因组中留下的印迹, 进行了显微和超微观察、基因组架构与系统发育分析及相关基因扩增等研究。选择 Cc 株 74L、86L、87R、88R、92R 和 95R 的 6 个基因, 与 8 个白斑病毒株的同源基因所编码蛋白序列构建进化树, 结果可分为克氏原螯虾病毒 (Cc 株、CN02 株、Pc 株) 和海水对虾病毒 (CN 株、CN01 株、CN03 株、CN04 株、TW 株和 KR 株) 2 支。再对不同毒株的同源蛋白进行多重序列比对, 显示 Cc-87R 是与海水对虾病毒株同源蛋白差异显著、缺失跨膜区 (TMD) 及其相邻 287 aa 序列、但仍有完整 PI3K_rbd 结构域的病毒膜蛋白。进一步设计和使用 87R-F/87R-R 和 238-F/87R-R 两对引物, 分别以淡水小龙虾病毒 Cc 株和海水对虾病毒 CN 株的基因组为模板进行核酸扩增, 结果从 Cc 株模板中扩增到大小为 709 bp, 含 Cc-87R 全部序列的核酸片段; 而从 CN 株的模板中却扩增到大小分别为 1 600 和 4 810 bp, 仅含 Cc-87R 部分序列的核酸片段, 为 Cc-87R 是 Cc 株基因组中一个序列结构独特的印迹提供了实验证据。这一发现将有助于克氏原螯虾白斑病毒病原的检测及其流行趋势预警。

关键词: 克氏原螯虾; 克氏原螯虾白斑病毒 (WSSV-Cc 或 Cc 株); 基因组; 印迹; 分子标记
中图分类号: S 941 **文献标志码:** A

虾类是重要的水生经济动物, 在全球渔业商品贸易中占比达 15% 或更高, 主要产区在亚洲和拉美地区^[1]。克氏原螯虾 (*Cambarus clarkii* 或 *Procambarus clarkii*), 俗称小龙虾, 2019 年在中国总产值达 4 110 亿元^[2]。然而, 病毒病严重制约该产业的发展, 尤其是白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 病^[3-4], 已在全球造成数十亿美元损失^[5-6]。该病原属于线头病毒科 (*Nimaviridae*) 白斑病毒属 (*Whispovirus*)^[7-8]。是一

类有囊膜的大 DNA 病毒, 有些毒株基因组超过 300 kb^[9-11]。由于其庞大的基因组, 并且缺乏与其他密切相关病毒的比较, 使对这类病毒进化史及印迹的了解有限。当前对白斑病毒的研究主要集中在海水对虾病原鉴定、基因组注释与比较及病毒与宿主相互作用等方面^[12-15]。

近年对克氏原螯虾白斑病毒的研究逐渐增多, 已测定 WSSV-CN02 或 CN02 株 (KT995470)^[16], WSSV-CN-Pc 或 Pc 株 (KX686117)^[17], 及曾称为 P.

收稿日期: 2021-05-31 修回日期: 2021-08-17

资助项目: 国家自然科学基金 (31972839, 31772890); 国家重点研发计划 (2018YFD0900601); 中国科学院项目 (KJZD-SW-L11, XDA24030203); 上海市科学技术委员会资助项目 (21ZR1427200)

第一作者: 柯飞 (照片), 从事水产动物病毒学研究, E-mail: kefei@ihb.ac.cn

通信作者: 张奇亚, E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn



clarkii virus (PCV 株, MH663976)^[18] 的 *C. clarkii* whispovirus (WSSV-Cc 或 Cc 株) 等克氏原螯虾白斑病毒株的基因组序列, 涉及白斑病毒对克氏原螯虾的感染性^[19]、线头病毒与昆虫病毒的起源或关联^[20-21], 及与其他微生物病原共感染^[22] 的相关报道。这些研究表明, 在水产养殖及不同水生环境中存在大量病毒^[23-24], 它们感染宿主, 介导基因水平转移、驱动生物进化、调节生物多样性、影响地球物理化学循环^[25]。在宿主抗病毒反应并施加选择压力的同时, 能导致病毒适应性演变, 经自然选择而形成新的基因或在基因组中留下印迹 (footprint)^[26-27], 包括基因序列或其他遗传标记^[28], 以调控病毒基因复制、表达与感染, 甚至会影响到病毒基因组大小。基因组中留下的印迹不仅可保留病毒进化过程中的复杂化和多样化的信息^[29], 也能为阐释病毒与宿主相互作用、新毒株形成及疾病流行趋势提供重要线索。

为探讨克氏原螯虾白斑病毒 WSSV-Cc 株基因组中是否存在印迹, 或有何特征性核苷酸序列, 本研究结合剖检、显微和超微观察、分子检测、回接感染实验及流行病学调查, 在明确 WSSV-Cc 株是导致克氏原螯虾虾群突发高致死率、但无典型白斑症的病原基础上^[11], 对其全基因组进行测序与进化分析, 并通过易重组或具进化意义的核酸序列^[30-31] 比对, 对 WSSV-Cc 株特异的基因序列进行筛查、验证, 探寻白斑病毒基因组的印迹。

1 材料与方法

1.1 采样、显微与超微观察

从华中地区某养殖场采集感染濒死克氏原螯虾, 用冰盒保存, 速送实验室, 分别进行剖检、组织病理和超薄切片观察^[32]。取感染濒死虾肝胰腺和鳃等组织, 在 Bouin 试剂中固定 24 h, 然后转移到质量浓度为 70% 的乙醇中; 在分级系列乙醇中脱水后, 将样品包埋在石蜡中, 经组织切片机操作获得系列组织切片, 同时以健康克氏原螯虾的样本做平行实验为对照, 然后用苏木精-伊红 (H.E) 染色, 并在光学显微镜下观察。

另取感染濒死克氏原螯虾组织, 分别用 2.5% 戊二醛固定, 再用 1% 锇酸 (O_5O_4) 固定, 不同浓度乙醇脱水, 用 Epon-812 包埋, 并用 Leica 超薄切片机制备切片, 用 1% 醋酸铀和柠

檬酸铅进行双染色, 并在 JEM-1230 电子显微镜 100 kV 下进行观察^[33]。或将提纯的病毒悬液滴在铜网上, 经 1%~2% 的磷钨酸 (PTA) 负染, 干燥后电镜观察。

1.2 病毒的提纯、基因组核酸制备

取濒死样虾的肝胰腺和鳃组织, 匀浆后经差异和密度梯度离心, 提纯病毒。具体操作: 将鳃组织剪碎, 按 1:10 的比例加入磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 在研钵中研磨, 置于 -20°C 冰箱中保存过夜; 再经 2 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液; 20 000 r/min (Beckman SW41) 超速离心 60 min, 收集病毒沉淀, 重悬于 30 μL TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5) 中, 获纯化病毒^[34]。纯化后的病毒与 TES 溶液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, pH 值 8.0, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K) 混合作用, 在 37°C 孵育 2 h。然后氯仿苯酚抽提、乙醇沉淀, 制备病毒基因组核酸, 具体操作参考已有文献^[35]。

1.3 病毒基因组测序及注释分析

使用 Mega Genomics Co. Ltd. (中国北京) 的 Illumina Hiseq X ten 系统进行病毒基因组测序, 用 NGSQC toolkit 和默认参数对原始读数进行质量控制。用 DNASTAR 程序 (Lasergene, Madison, WI, 美国) 对 DNA 的组成、结构和氨基酸序列进行分析; 利用病毒基因组计划 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?Topic=index&group=programs&subgroup=gfindv>) 中的基因发现 (Gene Finding) 软件, 预测开放阅读框 (open reading frames, ORFs)^[36-37]。利用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中与其他病毒进行同源序列比较; 使用 TMHMM 2.0 软件预测跨膜结构域 (TMDs)。使用 ClustalX 1.83 软件进行多重序列比对, 使用 MegAlign 程序计算一致性。

1.4 系统发育分析

在克氏原螯虾白斑病毒株 (WSSV-Cc) 基因组第 1 个多变区周围预测到 6 个低同源基因, 它们编码的蛋白分别为 74L (未注释)、86L (未注释)、87R (囊膜蛋白)、88R (囊膜蛋白)、92R (立即早期蛋白) 和 95R (囊膜蛋白) (图 1), 与其他 8 株白斑病毒 CN02、Pc、CN、CN01、CN02、CN/3、TW 和 KR 株的同源蛋白进行序列串联, 并用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 用

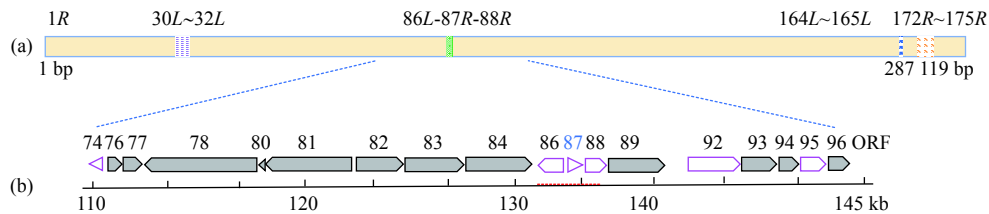


图1 WSSV-Cc株基因组局部模式图

(a) 长框表示 WSSV-Cc 株基因组架构, 上方标注 ORF 及相应位置, 下方为碱基数, 紫色为立即早期基因区段, 30L~32L, 绿色为可变 1 区段 (86L-87R-88R), 蓝色为可变 2 区段, 164L~165L, 橙色为可变 3 区段, 172R~175R; (b) 为 (a) 的局部放大, 箭头标注相应 ORF 的大小、位置和方向, 中空箭头表示与已知白斑病毒低同源, 灰色箭头表示与已知白斑病毒高同源, 有红框的箭头表示用于构建进化树, 红色虚线表示多变区

Fig. 1 Schematic diagram of architecture in WSSV-Cc strain genome

(a) long frame indicates the genomic architecture, with ORFs and their corresponding position, and base pairs under the long frame, purple for immediate-early gene (30L-32L), green for variable region 1(86L-87R-88R), blue for variable region 2 (164L-165L), orange for variable region 3 (172R-175R); (b) the local enlargement of (a), arrows indicate the size, location and orientation of ORFs, hollow arrows indicate low homology between WSSV-Cc strain and other known whispoviruses, gray arrows indicate ORFs sharing high homology between WSSV-Cc strain and most known whispoviruses, the arrows with red boxes indicate that they are used to construct the phylogenetic tree, the red dotted line indicates the variable regions

MEGA-5 软件进行 1 000 次自举检测。

1.5 PCR 扩增

为了验证无症状濒死虾是否带毒, 及“系统发育分析”中分析“印迹”的准确性和可靠性, 针对推测或可能的目的基因进行 PCR 检测。具体操作如下。

步骤一, 参见世界动物卫生组织 (OIE) 的《水生动物诊断手册》中关于白斑综合征病毒感染 (2019)^[38], 按其中 PCR 检测的方案和步骤进行操作, 检测濒死克氏原螯虾是否呈 WSSV 阳性。

步骤二, 据结构分析与预测, Cc-87R 编码病毒囊膜蛋白, 且 Cc 株的 86L、87R 和 88R 基因分别与 CN 株的 wsv-231 (CN-231)、wsv-238 (CN-238) 和 wsv-242 (CN-242) 同源。为验证克氏原螯虾病毒 Cc-87R 与海水对虾病毒 CN 株同源基因结构的异同, 分别设计引物 87R-F (TAGGCTA-GTGTCGAAAGGTACATTT, 登录号 MH663976); 87R-R (AGCTGTTCCACCTTTTGCTTATCTC, 登录号 MH663976) 和 238-F (CGTCAGGTCCCGTATTATATAGGAC, 登录号 AF332093)。

以引物 87R-F/87R-R 或 238-F/87R-R, 分别以 Cc 株或 CN 株基因组为模板进行 PCR 扩增。试剂盒为 TransGen Biotech 公司产品, 扩增体系 (25 μ L): 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 2.5 μ L, dNTP Mix 1 μ L, 引物 87R-F/87R-R 或 238-F/87R-R 各 0.5 μ L, Taq polymerase 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C

延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳 (170 V, 20 min) 分析, 用溴化乙锭染色后, 在凝胶成像分析系统 (syngerg: Box) 分析。用硅胶珠 DNA 凝胶提取试剂盒从凝胶中提取目的片段, 连接 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 Top10 细胞进行培养。阳性克隆经 PCR 筛选, 测序分析。

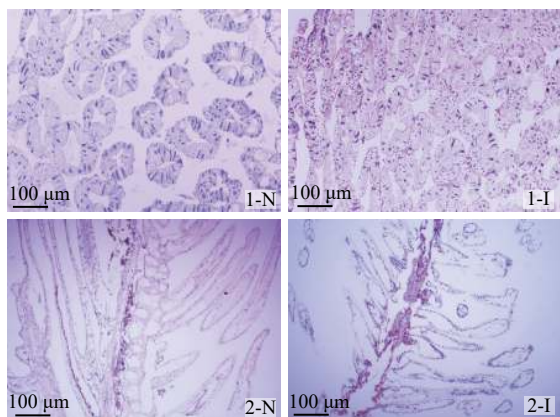
2 结果

2.1 濒死克氏原螯虾的组织病理与超微形态

对濒死虾进行目测、剖检与 PCR 检测。目测并无可察的体表病症, 如未见有白斑症。剖检可见感染虾肠道无食物, 因出血而呈淡蓝色; 肝胰腺呈淡黄或白色; 部分虾鳃发黑。经 PCR 可检出 WSSV 阳性。再进一步对样本进行组织病理或电镜观察。

组织切片观察发现, 健康虾组织结构清晰、排列有序; 而濒死虾的组织结构紊乱、肿胀、出血 (或充血), 局部组织结构损伤、变形, 甚至崩解。在肝胰腺和鳃、肠等组织中都表现出广泛的病理变化 (图版 I)。

超微观察显示, 在濒死克氏原螯虾细胞中有大量病毒颗粒分布在胞质和核质中, 或规则排列在核内膜的周围。完整的有囊膜的病毒粒子平均大小约 300 nm \times 110 nm。当病毒核衣壳从囊膜中释放出, 其长度增加, 大小为 400 nm \times 80 nm (图版 II)。可见 WSSV-Cc 株具有白斑病毒典型的超微形态特征。

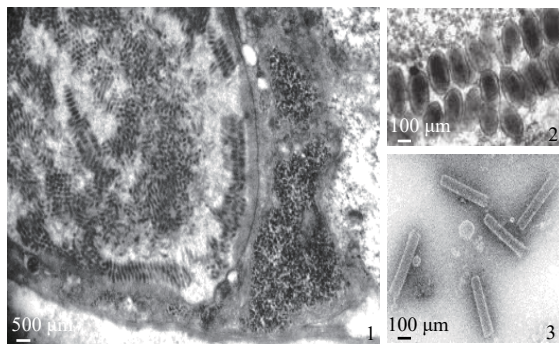


图版 I 健康与濒死克氏原螯虾的组织显微图

1. 肝胰腺, 2. 鳃; N. 显示健康虾的组织结构清晰、排列规则, I. 濒死虾的组织结构紊乱无序或损伤

Plate I Histological micrographs of healthy and endangered *P. clarkii*

1. hepatopancrea, 2. gill; N. healthy, tissue structures are clear and regular, I. endangered, tissue structures are disorderly or damaged



图版 II 克氏原螯虾病毒 WSSV-Cc 株的电镜图

1. 病虾的鳃细胞, 2. 病虾鳃的细胞核中有序排列的病毒颗粒, 3. 病毒核衣壳

Plate II Electron microscopy images of WSSV-Cc strain

1. infected *P. clarkii* gill cell, 2. the viral particles are arranged in an orderly fashion in the gill nuclei of infected *P. clarkii*, 3. viral nucleocapsid

2.2 Cc 株基因组的局部结构

测得克氏原螯虾病毒 WSSV-Cc 株的基因组大小为 287 179 bp, 推导可编码开放阅读框 (ORFs) 为 180 个, 其序列已存入 GenBank 数据库 (登录号 MH663976)。在基因组架构图分别标注了 4 个重要区段及所含相应的开放阅读框, 包括含 30L~32L 的立即早期基因区, 含 86L~88R 的可变区 1, 含 164L~165L 的可变区 2 及含 172R~175R 的可变区 3 (图 1-a)。

绘制 Cc 株在可变区 1 及其相邻区域的结构

示意图, 标注其中相应 ORF 的大小、位置及方向, 并分别标注与已知白斑病毒同源性较高 (>95%) 或低同源的 ORF。分析显示, 在 Cc 株基因组可变区 1 及其相邻区域存在几个与已知白斑病毒相应基因低同源的 ORFs, 包括 74L 和 86L (未注释), 87R、88R 和 95R (囊膜蛋白或含跨膜结构域 TMD), 92R (立即早期蛋白) (图 1-b)。这 6 个预测低同源蛋白, 除未注释外, 多为与病毒入侵相关的膜蛋白或立即早期蛋白。

2.3 用 Cc 株低同源蛋白构建的进化树分为 2 簇

将 WSSV-Cc 株 6 个低同源蛋白 (74L、86L、87R、88R、92R 和 95R) 序列串联, 并与其他 8 株白斑病毒 (CN02、Pc、CN、CN01、CN03、CN04、TW 和 KR) 株同源蛋白的串联序列构建进化树。结果可依据宿主分为 2 支: 1 支是克氏原螯虾病毒, 含 Cc、CN02 和 Pc 株; 另 1 支是海水对虾病毒, 含 CN、CN01、CN03、CN04、TW 和 KR 株 (图 2)。表明这 6 个低同源蛋白与各病毒株对宿主及其生存环境的适应性有关联, 其中可能存在经受选择压力、产生适应性演变所留下的印迹 (footprint)。

2.4 与 Cc-87R 同源蛋白的序列比对

基于上述研究, 选择性对不同毒株的低同源蛋白序列进行多重比对, 结果显示, 来自克氏原螯虾的 Cc 株的 Cc-87R 与 CN02 株的 CN02-238 大小、结构一致, 它们保留含 PI3K_rbd 结构域在内的 199 个氨基酸, 除了 Pc-98 之外, 含跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 在内的 283 个氨基酸序列均缺失。其他所有海水对虾毒株蛋白 (CN01-238、CN-238、TH-119、MX-0119、TW-294 和 KR-2380) 都同时含 TMD 和 PI3K_rbd 结构域, 大小为 480~486 aa (图 3)。该结果显示, Cc 株编码 Cc-87R 蛋白的基因是该毒株的一个印迹, 抑或也可作为克氏原螯虾白斑病毒的一个印迹。

2.5 Cc-87R 与海水对虾白斑病毒株同源基因的结构差异

分别以 WSSV-Cc 株和 CN 株基因组为模板, 各用 87R-F/87R-R 或 238-F/87R-R 引物进行 PCR 扩增的结果显示, 从 CN 株基因组中可扩增到 4 810 和 1 600 bp 2 个片段; 而从 Cc 株基因组中仅扩增到 709 bp 一个片段 (图 4-a)。对所扩增片

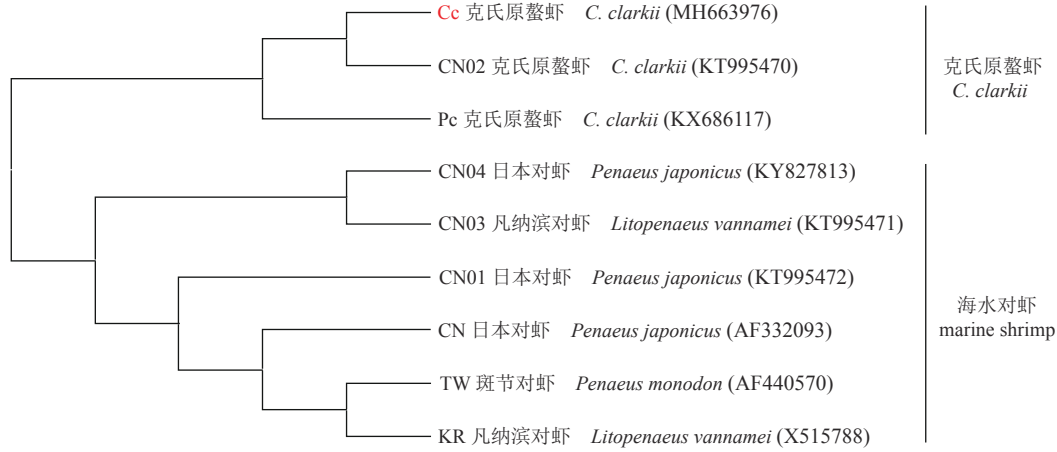


图 2 进化树

分为两簇: 来自克氏原螯虾的 WSSV-Cc(红色表示 Cc)、CN02 和 Pc 株聚为一支; 来自海水对虾的 CN、CN01、CN03、CN04、TW 和 KR 株聚为另一支

Fig. 2 Phylogenetic tree

These virus strains can be divided into two clusters, WSSV-Cc (red, Cc) is clustered with CN02 and Pc, from *P. clarkii* and the another cluster include CN, CN01, CN03, CN04, TW and KR, from marine shrimp

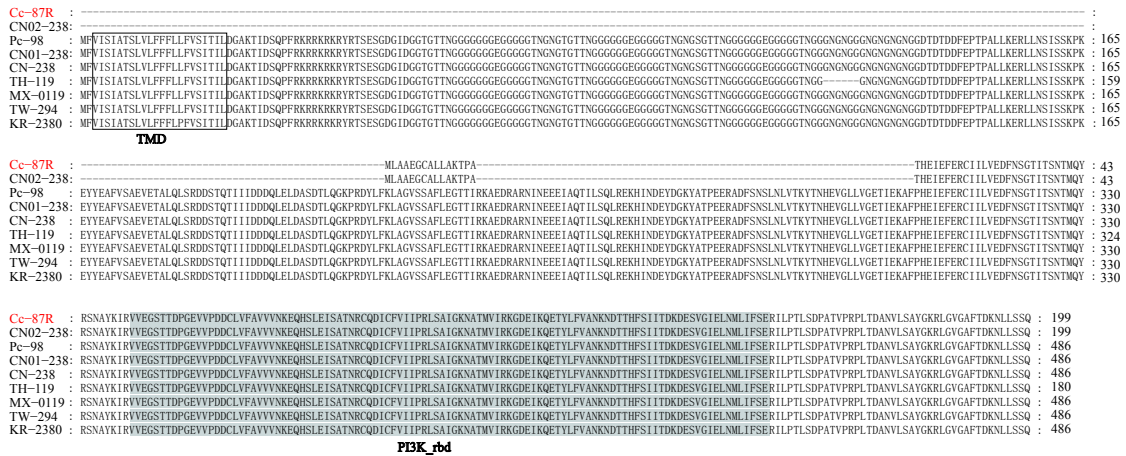


图 3 Cc-87R 蛋白的氨基酸序列多重比对

TMD. 跨膜结构域 (黑色框); PI3K-rbd. 磷脂酰肌醇 3 激酶 ras 结构域 (灰色); -. 无相应氨基酸

Fig. 3 Multiple sequence alignment of Cc-87R

TMD. transmembrane domain (black frame); PI3K-rbd. phosphatidylinositol 3-kinase ras-binding domain (grey); -. no corresponding amino acids

段测序分析, 显示从 Cc 基因组中扩增到 Cc-87R, 而从 CN 基因组中扩增到的是含 CN-238 在内的核酸片段, 与预测一致 (图 4-b)。证明 Cc-87R 的确是克氏原螯虾白斑病毒的一个独特基因。

3 讨论

为了解白斑病毒进化过程中在基因组 DNA 序列中留下的印迹, 实验采集自然感染、含大量病毒颗粒的克氏原螯虾组织, 提纯病毒、制备 Cc 株基因组核酸并测序。剖析基因结构与功

能的关系, 并经特定基因序列扩增验证, 找到 Cc 株与其他毒株有显著差异或分歧的一个印迹基因 Cc-87R。推测 Cc 株的这一印迹可能因病毒株对宿主及其淡水环境选择压力的适应性而形成。已有研究为宿主与病毒相互作用可导致“印迹”出现提供了证据^[39]。

尽管在各种生命形式的进化过程中, 复杂性可增加也可减少, 但基因组缩小是进化的主导模式^[40]。Cc-87R 编码含 199 aa 的蛋白, 显著小于其他毒株的同源基因, 如 CN-238 编码含 486

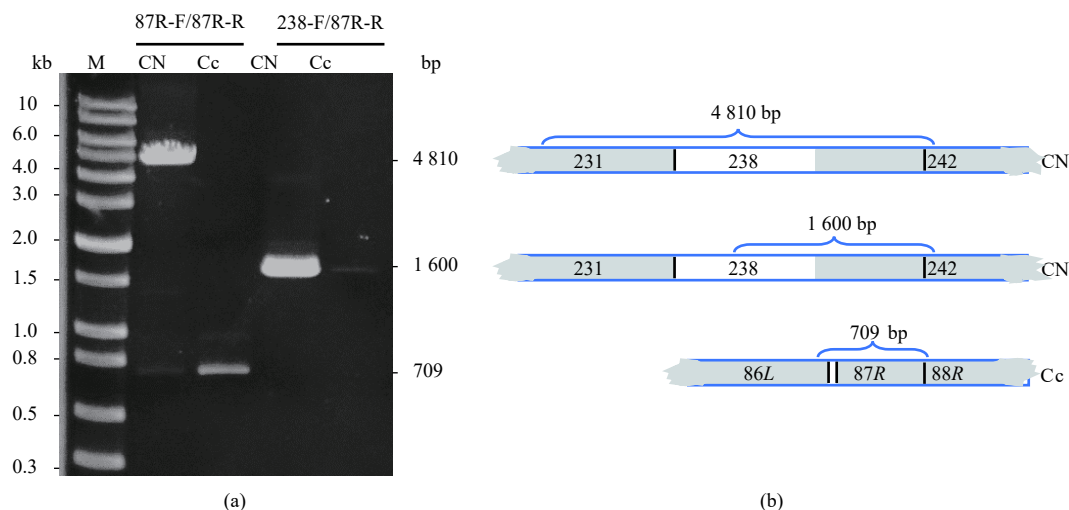


图 4 PCR 扩增产物的电泳 (a) 及结构示意图 (b)

M. DNA Ladder; 长框. 扩增片段及相关区域, 长框中的数字 231、238 及 242, 为 CN 株的 ORF; 86L、87R 和 88R, 为 Cc 株的 ORF; 灰色为与 Cc 株相应序列同源区域; 白色为 Cc 株相应序列非同源区域

Fig. 4 Electrophoresis and schematic diagram of PCR products

M. DNA Ladder; long box. amplified segments, the numbers in the long box represent the ORFs of CN-231, 238 and 242, or Cc-86L, 87R and 88R; gray. homologous region with the corresponding sequence Cc; white. non-homologous region of the sequence corresponding to Cc

aa 的蛋白。这体现出 Cc 株的基因组较小可能是由于简化主导的进化而产生的结果。通常膜蛋白可负责病毒与宿主细胞的附着, 在入侵时起关键作用。对不同病毒株同源蛋白的多重序列比对显示, Cc-87R 缺失跨膜结构域 (TMD) 及相邻 287 aa, 但含 PI3K_rbd 结构域的膜蛋白。PI3K 为脂质激酶, 或称磷脂酰肌醇 3-激酶, 有研究证明, PI3K-rbd 所含 Ras 结构域 (rbd) 可经与活性 GTP-Ras 结合而激活激酶 PI3K^[41]; 其时空调控还对 PI3K 激活后的下游信号传递起决定性作用^[42]。这些信息预示 Cc-87R 是 Cc 株一个能传递信号的重要膜蛋白, 尽管与来自海水对虾病毒株同源蛋白比较, 缺失 TMD 会影响该蛋白与细胞内外的联系, 但也会因分子量变小而能更灵活、更高效地传递信号。当然, Cc-87R 的具体生物学功能还有待后续研究阐明。另外, Pc 株也是克氏原螯虾病毒, 但为何其编码的同源蛋白 Pc-98 不同于克氏原螯虾的 Cc-87R 和 CN02-238 仅含 199 aa, 却是与海水对虾病毒的 CN-238 相同含 486 aa, 推测这可能是因某些基因进化的不平衡性所致。

为减少病毒病给养殖虾产业带来的损失, 人们仍在继续分离鉴定新病毒病原^[43], 并探索白斑病毒检测和分析新方法, 以适应不同需求^[44]。本研究依据筛查出的印迹 Cc-87R, 设计和使用

<https://www.china-fishery.cn>

2 对引物就能分别从不同毒株病毒基因组中扩增出有辨识度的核酸片段。证实克氏原螯虾白斑病毒 Cc 株的“印迹”不仅可作为特定病原检测及其流行病预警的标记, 其原理和操作也简便易学, 这一研究结果具有潜在和重要的应用价值。

柯飞和桂朗为共同第一作者。

参考文献 (References):

- [1] 联合国粮食及农业组织. 2020 年世界渔业和水产养殖状况: 可持续发展在行动 [EB/OL]. (2020-06-29) [2021-05-29]. <https://doi.org/10.4060/ca9229zh>.
FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action [EB/OL]. (2020-06-29) [2021-05-29]. <https://doi.org/10.4060/ca9229zh> (in Chinese).
- [2] 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国小龙虾产业发展报告 (2020) [EB/OL]. (2020-06-22) [2021-05-29]. <http://www.boyar.cn/article/1083701.html>.
National fisheries technology extension center, China society of fisheries. China crayfish industry development report (2020) [EB/OL]. (2020-06-22) [2021-05-29]. <http://www.boyar.cn/article/1083701.html> (in Chinese).
- [3] Longshaw M. Diseases of crayfish: a review [J]. *Journal of the China Society of Fisheries* 2010, 40(1): 1-10. <https://doi.org/10.11967/j.issn1000-0607.2010.40.1.1>

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- of *Invertebrate Pathology*, 2011, 106(1): 54-70.
- [4] Arulmoorthy M P, Anandajothi E, Vasudevan S, *et al.* Major viral diseases in culturable penaeid shrimps: a review[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(5): 1939-1967.
- [5] Flegel T W, Lightner D V, Lo C F, *et al.* Shrimp disease control: past, present and future[M]//Bondad-Reantaso M G, Mohan C V, Crumlish M, *et al.* Diseases in Asian aquaculture VI. Fish health section. Manila: Asian Fisheries Society, 2008: 355-378.
- [6] Verbruggen B, Bickley L K, Van Aerle R, *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments[J]. *Viruses*, 2016, 8(1): 23.
- [7] Meng C, Liu L K, Li D L, *et al.* White spot syndrome virus benefits from endosomal trafficking, substantially facilitated by a valosin-containing protein, to escape autophagic elimination and propagate in the crustacean *Cherax quadricarinatus*[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(24): e01570-20.
- [8] Leu J H, Yang F, Zhang X, *et al.* Whispovirus[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, 328: 197-227.
- [9] Yang F, He J, Lin X H, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(23): 11811-11820.
- [10] Gui L, Chinchar V G, Zhang Q Y. Molecular basis of pathogenesis of emerging viruses infecting aquatic animals[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2018, 3(1): 1-5.
- [11] 张奇亚. 淡水生态系统中的几种大DNA病毒研究概述[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(5): 961-975.
- Zhang Q Y. An overview on several large DNA viruses in freshwater ecosystems[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(5): 961-975(in Chinese).
- [12] Huang J J, Li F, Wu J J, *et al.* White spot syndrome virus enters crayfish hematopoietic tissue cells via clathrin-mediated endocytosis[J]. *Virology*, 2015, 486: 35-43.
- [13] Yang M C, Shi X Z, Yang H T, *et al.* Scavenger receptor C mediates phagocytosis of white spot syndrome virus and restricts virus proliferation in shrimp[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(12): e1006127.
- [14] Wang H C, Hirono I, Maningas M B B, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Nimaviridae*[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(7): 1053-1054.
- [15] Bao W D, Tang K F J, Alcivar-Warren A. The complete genome of an endogenous nimavirus (*Nimav-1_LVa*) from the pacific whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. *Genes*, 2020, 11(1): 94.
- [16] Li F, Gao M L, Xu L M, *et al.* Comparative genomic analysis of three white spot syndrome virus isolates of different virulence[J]. *Virus Genes*, 2017, 53(2): 249-258.
- [17] Jiang L Z, Xiao J Z, Liu L Y, *et al.* Characterization and prevalence of a novel white spot syndrome viral genotype in naturally infected wild crayfish, *Procambarus clarkii*, in Shanghai, China[J]. *Virusdisease*, 2017, 28(3): 250-261.
- [18] 桂朗, 张奇亚. 中国水产动物病毒学研究概述[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 168-187.
- Gui L, Zhang Q Y. A brief review of aquatic animal virology researches in China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 168-187(in Chinese).
- [19] Pace B T, Hawke J P, Subramanian R, *et al.* Experimental inoculation of Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 120(2): 143-150.
- [20] Kawato S, Shitara A, Wang Y Y, *et al.* Crustacean genome exploration reveals the evolutionary origin of white spot syndrome virus[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(3): e01144-e01148.
- [21] Rozenberg A, Brand P, Rivera N, *et al.* Characterization of fossilized relatives of the white spot syndrome virus in genomes of decapod crustaceans[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2015, 15: 142.
- [22] Yuan G L, Zhu L, Jiang X Y, *et al.* Diagnosis of coinfection with white spot syndrome virus and *Aeromonas veronii* in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 736010.
- [23] Zhang Q Y, Gui J F. Diversity, evolutionary contribution and ecological roles of aquatic viruses[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(12): 1486-1502.
- [24] Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 156-169.
- [25] Paez-Espino D, Eloje-Fadros E A, Pavlopoulos G A, *et*

- al.* Uncovering earth's virome[J]. *Nature*, 2016, 536(7617): 425-430.
- [26] Gregory A C, Zayed A A, Conceição-Neto N, *et al.* Marine DNA viral macro and microdiversity from pole to pole[J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1109-1123.e14.
- [27] Lucia-Sanz A, Manrubia S. Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat?[J]. *npj Systems Biology and Applications*, 2017, 3: 34.
- [28] Geoghegan J L, Holmes E C. Evolutionary virology at 40[J]. *Genetics*, 2018, 210(4): 1151-1162.
- [29] Lauber C, Goeman J J, del Carmen Parquet M, *et al.* The footprint of genome architecture in the largest genome expansion in RNA viruses[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(7): e1003500.
- [30] Pradeep B, Shekar M, Karunasagar I, *et al.* Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus[J]. *Virology*, 2008, 376(1): 24-30.
- [31] 刘晓娉, 孙新颖, 刘庆慧, 等. 2017年中国部分地区白斑综合征病毒高变异区的序列分析[J]. *海洋渔业*, 2019, 41(3): 329-337.
- Liu X P, Sun X Y, Liu Q H, *et al.* Variation analysis on highly variable regions of white spot syndrome virus from partial areas of China in 2017[J]. *Marine Fisheries*, 2019, 41(3): 329-337(in Chinese).
- [32] 张奇亚, 袁秀平, 李正秋. 三种水生动物病毒感染鱼类细胞的扫描电镜观察[J]. *水产学报*, 2001, 25(6): 576-578.
- Zhang Q Y, Yuan X P, Li Z Q. Scanning electron microscope observation on the infected fish cells with three aquatic viruses[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(6): 576-578(in Chinese).
- [33] Huang X H, Huang Y H, Yuan X P, *et al.* Electron microscopic examination of the viromatrix of *Rana grylio* virus in a fish cell line[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 133(2): 117-123.
- [34] Zhang Q Y, Zhao Z, Xiao F, *et al.* Molecular characterization of three *Rana grylio* virus (RGV) isolates and *Paralichthys olivaceus* lymphocystis disease virus (LCDV-C) in iridoviruses[J]. *Aquaculture*, 2006, 251(1): 1-10.
- [35] Lei X Y, Ou T, Zhu R L, *et al.* Sequencing and analysis of the complete genome of *Rana grylio* virus (RGV)[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(8): 1559-1564.
- [36] Zeng X T, Chen Z Y, Deng Y S, *et al.* Complete genome sequence and architecture of crucian carp *Carassius auratus* herpesvirus (CaHV)[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3577-3581.
- [37] Ke F, Wang Z H, Ming C Y, *et al.* Ranaviruses bind cells from different species through interaction with heparan sulfate[J]. *Viruses*, 2019, 11(7): 593.
- [38] World Organization for Animal Health (OIE). Infection with white spot syndrome virus[EB/OL]. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, (2019-11-14). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_wsd.pdf.
- [39] Fitzmaurice K, Petrovic D, Ramamurthy N, *et al.* Molecular footprints reveal the impact of the protective HLA-A*03 allele in hepatitis C virus infection[J]. *Gut*, 2011, 60(11): 1563-1571.
- [40] Wolf Y I, Koonin E V. Genome reduction as the dominant mode of evolution[J]. *BioEssays*, 2013, 35(9): 829-837.
- [41] Zhang M Z, Jang H, Nussinov R. The structural basis for Ras activation of PI3K α lipid kinase[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21(22): 12021-12028.
- [42] Orme M H, Alrubaie S, Bradley G L, *et al.* Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in *Drosophila*[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(11): 1298-1302.
- [43] Ke F, Gui L, Li T, *et al.* The features of an emerging whispovirus isolate from freshwater crayfish[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100728.
- [44] Oakey J, Smith C, Underwood D, *et al.* Global distribution of white spot syndrome virus genotypes determined using a novel genotyping assay[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(8): 2061-2082.

A footprint in the genome of freshwater crayfish whispovirus (WSSV-Cc)

KE Fei^{1,2}, GUI Lang³, LI Tao^{1,2}, ZHANG Qiya^{1,2*}

- (1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. The Innovation Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,
Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources,
Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 210306, China)

Abstract: A white spot syndrome virus strain (*Cambarus clarkii* whispovirus, WSSV-Cc or Cc strain) was isolated from naturally infected and moribund freshwater crayfish (*C. clarkii* or *Procambarus clarkii*, *P. clarkii*), which is a new strain with a smaller genome. In order to find the footprints in the genome generated during virus evolution, microscopic and ultramicroscopic investigations, genome architecture and phylogenetic analysis, and specific gene amplification were performed. The products of six genes (74L, 86L, 87R, 88R, 92R and 95R) of Cc strain were selected to construct a phylogenetic tree with their homologs from eight white spot virus strains. Results showed that the strains can be divided into two clusters: one included *P. clarkii* nimavirus (Cc, CN02, and Pc) and the other contained marine shrimp nimaviruses (CN, CN01, CN03, CN04, TW and KR). Multiple sequence alignments of homologous proteins from different viral strains showed that Cc-87R is significantly different from its homologous membrane proteins of marine shrimp nimavirus. It lacks the transmembrane domain (TMD) and its adjacent 287 aa sequence, but still has a complete PI3K_rbd region. Further nucleic acid amplification was performed with two pairs of primers, 87R-F/87R-R and 238-F/87R-R, using the genomes of *P. clarkii* nimavirus Cc strain and marine shrimp nimavirus CN strain as templates respectively. A fragment with size of 709 bp containing the entire sequence of *Cc-87R* was amplified from the Cc genomic template. However, the fragments with size of 1 600 and 4 810 bp, only containing partial sequence of *Cc-87R*, were amplified from the template of the CN strain. The results provided experimental evidence that *Cc-87R* is a footprint with unique sequence structure of the Cc strain. This finding will benefit the detection of the *P. clarkii* nimavirus pathogen and the warning of its epidemic trend.

Key words: *Procambarus clarkii*; *Cambarus clarkii* whispovirus (WSSV-Cc or Cc strain); genome; footprint; molecular marker

Corresponding author: ZHANG Qiya. E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972839, 31772890); National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900601); Chinese Academy of Sciences (KJZD-SW-L11, XDA24030203); Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (21ZR1427200)