

文章编号: 1000- 0615(2002)01- 0542- 05

# 鳊传染性脾肾坏死病毒 p31 基因结构及序列分析

邓 敏, 何建国, 翁少萍, 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:**报道了鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)的 p31 基因结构及其序列分析。对 ISKNV DNA HindIII E 酶切片段的序列分析结果发现该序列中含有完整的 p31 基因。ISKNV p31 基因完整读码框为 675bp, GC 含量为 49.78%, 等电点为 7.61, 编码一个长为 225aa、分子量为 25.3 kD 的推定蛋白。结构分析发现该基因具有启动子元件 TATA box 和 CAAT motif, 下游有反向重复序列可形成茎环, 另外还有一段直接重复序列和二联体结构。ISKNV 与其它 3 种虹彩病毒(包括 FV3、LCDV-1 和 EHNV)的 p31 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; p31 基因; 序列分析; 系统进化

中图分类号: S917; Q343.1 文献标识码: A

## Characterization of the p31 gene of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi*

DENG Min, HE Jian-guo, WENG Shao-ping, LV Ling, HE Hua-hong, LONG Qing-xin

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** P31 gene of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) of *Siniperca chuatsi* had been sequenced. The open reading frame of the gene is 675 nucleotides long, encoding a putative protein of 225 amino acids with 25.3kD. The 5' noncoding region has a TATA box and CAAT motif. A stem loop, a direct repeat sequence and a short dyad are contained downstream of the translation stop codon. The results of comparison of the homology with other iridoviruses p31 genes showed that ISKNV p31 gene has lower identities with others. Alignment of amino acid sequences and a phylogenetic tree of p31 genes of four iridoviruses have been constructed. The results indicated that ISKNV is different from the viruses of the genus Ranavirus and Lymphocystivirus.

**Key words:** iridovirus; infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV); p31 gene; sequence analysis; phylogeny

鳊(*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暴发性流行病的主要病原<sup>[1-4]</sup>, 是一种虹彩病毒<sup>[2,5,6]</sup>, 感染鳊脾、肾、肝、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<sup>[7]</sup>。该病毒具有很强的致病性, 浸泡感染和注射感染, 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: 邓 敏(1972- ), 女, 重庆市人, 博士, 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- 84113739, E-

mail: mdeng@163.net

25~ 34 °C 范围内, 受染鳃在 7~ 12d 内死亡率为 100%。在发病池中, 鳃一般 10d 内死亡率达 90% 左右<sup>[8]</sup>。

虹彩病毒科 (Iridoviridae), 又名二十面体胞浆型脱氧核糖核酸病毒群 (Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses), 病毒 DNA 的复制既发生在宿主细胞核又发生在宿主细胞质内, 与其它动物病毒比较, 有其独特的结构, 首先, 其基因组是双链线状 DNA, 有末端过剩 (terminal redundancy) 和环状变换 (circular permutation) 的特点, 其次, 脊椎动物虹彩病毒基因组胞嘧啶 5' 端高度甲基化<sup>[9]</sup>。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蛙病毒 3 型 (Frog virus 3, 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<sup>[10]</sup> 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, 晚期基因表达发生在病毒 DNA 复制之后, 病毒 DNA 复制依赖于早期基因产物。

对虹彩病毒基因的研究相对并不多, Schmitt 等<sup>[11]</sup> 最早报道了 FV3 p31 基因的核苷酸序列, p31 为 FV3 的滞早期基因, 编码一个长 261aa、分子量为 29.5 kD 的蛋白。其编码区上下游各有反向重复序列 (Inverted repeat sequence), 可形成茎环 (Stem loop), 近 3' 端有 2 个相隔不远的由 7 个谷氨酸残基相连的区域。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) 和流行性造血组织坏死病毒 (Epizootic hematopoietic necrosis virus, EHN) 基因组中也发现了 p31 基因<sup>[12-13]</sup>。本文测定了 ISKNV 的 p31 基因核苷酸序列, 对其结构进行分析, 并与 FV3、EHN 和 LCDV-1 的相应基因进行同源性比较。ISKNV p31 基因是目前为止发现的第 4 种虹彩病毒的 p31 基因完整序列。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

被 ISKNV 感染的濒死鳃于 1998 年 11 月取自广东省南海市鳃养殖场, 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感染的阳性细胞和 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[6]的方法进行: 取被 ISKNV 感染的濒死鳃的脾和肾, 称重, 剪碎后于液氮中研磨成粉, 随后加入 10 倍体积 PBS (pH7.2) 于玻璃匀浆器冰浴匀浆后, 4 °C, 6 500g 离心 20 min, 上清于 4 °C, 25 000g 离心 30 min, 沉淀用 PBS (pH7.2) 重悬。重复差速离心 1~2 次后, 沉淀用 TMP 缓冲液 (100mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF) 重悬后, 用 DNaseI 和 RNaseA 于 37 °C 温育 15min。然后补加适量 PBS, 再重复差速离心 1~2 次后, 将病毒重悬液铺于 20%~50% (w/w) 蔗糖梯度上用 Beckman SW40 Ti 转子 4 °C, 23 000r·min<sup>-1</sup> 离心 2h。收集病毒带加适量 PBS 重悬后, 4 °C, 50 000g 离心 30 min, 沉淀用 PBS (pH7.4) 悬浮。纯化的病毒粒子悬液加入 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 0.5% 和 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 于 55 °C 消化 3 h, 随后用酚法抽提、乙醇沉淀病毒 DNA。

### 1.3 病毒 DNA 的酶切、回收和克隆

按文献[14]的方法进行: ISKNV DNA 用限制性内切酶 HindIII (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 HindIII E 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 ①KS 中, 转化入 *Escherichia 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-HE。

### 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-HE 上插入

片段(ISKNV DNA HindIII E 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/DBJ 用程序 BLAST 进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 ISKNV p31 基因序列及分析

在数据库 GenBank 上分析我们所测定的序列(ISKNV DNA HindIII E 酶切片段),结果表明该序列中含有完整的 p31 基因。ISKNV 的 p31 基因完整读码框为 675bp, GC 含量为 49.78%, 等电点(pI)为 7.61, 编码一个长为 225aa、分子量(Mr)为 25.3 kD 的推定蛋白。ISKNV 的 p31 基因起始密码子 ATG 上游有一个 TATA box 和一个 CAAT motif。与 FV3 相似, ISKNV 的 p31 基因终止密码子 TAA 下游有反向重复序列可形成茎环,另外还有一段直接重复序列和二联体结构。

截止目前, GenBank 中已有 3 种虹彩病毒的 p31 基因序列, 它们是 LCDV-1 (accession No. NP\_078713.1) 和 FV3 (accession No. X52986) 及 EHNV (accession No. AJ007358)。4 种虹彩病毒 p31 基因特性比较如表 1 所示, 蛙病毒属的 2 种病毒的 p31 基因较长, 其特性相近; ISKNV 的 p31 基因最短, 推定的分子量相应也最小, 其等电点(pI)与 LCDV-1 相近, 而比蛙病毒属的 2 种病毒大较多。

表 1 虹彩病毒 p31 基因特性比较

Tab. 1 Comparative analysis of the p31 gene of the iridoviruses

	Length (aa)	Mr (kD)	pI
ISKNV	225	25.3	7.61
LCDV-1	237	27.6	7.30
FV3	261	29.5	5.22
EHNV	262	29.6	5.47

### 2.2 序列比较

用程序 DNASTar 中的 Clustal 方法比较 4 种虹彩病毒 p31 基因编码的氨基酸序列结果, 发现 ISKNV p31 基因编码的氨基酸序列与其它 3 种虹彩病毒的相应基因编码的氨基酸序列具有一定的同源性, 但同源性不高, 低于 15%; 而蛙病毒属的 FV3 和 EHNV 的同源性十分高, 为 98.1% (表 2)。

表 2 4 种虹彩病毒 p31 基因氨基酸序列的同源性比较

Tab. 2 Relatedness of p31 genes of the 4 iridoviruses

	FV3	LCDV-1	ISKNV
EHNV	98.1	27.4	13.8
FV3		26.2	14.7
LCDV-1			13.3

4 种虹彩病毒 p31 基因氨基酸序列的排比见图 1, 可见 FV3 和 EHNV 的 p31 基因编码的氨基酸序列很保守, 仅有几个氨基酸不一致; 而 ISKNV 和 LCDV-1 的 p31 基因编码的氨基酸序列则大部分不一致, 它们的近 3' 端也没有 FV3 和 EHNV 的 p31 基因所具有的 2 个相隔不远的由 7 个谷氨酸残基(E)相连的区域。

### 2.3 蛋白质特性分析

用程序 Protean 对 ISKNV p31 基因编码的蛋白质的二级结构、抗原性、疏水性/亲水性等特性的预测结果如图 2 所示, 可见其抗原区几乎都在亲水区, 并且表现高度的柔性。

### 2.4 系统发育进化分析

根据 4 种虹彩病毒 p31 基因编码的氨基酸序列绘制的系统发育进化树见图 3。可以看出, 这 4 种虹彩病毒被分为 3 群: FV3 与 EHNV 亲缘关系很近, 为一群, LCDV-1 与 ISKNV 各为一群, 其中, ISKNV 与其它 3 种虹彩病毒的亲缘关系较远。

## 3 讨论

ISKNV p31 基因序列是继 FV3、LCDV-1 和 EHNV 之后第 4 种虹彩病毒的 p31 基因完整序列。根据对 4 种虹彩病毒 p31 基因的核苷酸和氨基酸序列的分析, 可以看到 p31 基因在同为蛙病毒属的 2 种病毒(FV3 和 EHNV)之间十分保守, 然而在同一科不同属的病毒之间则不保守。一般来说, 虹彩病毒的

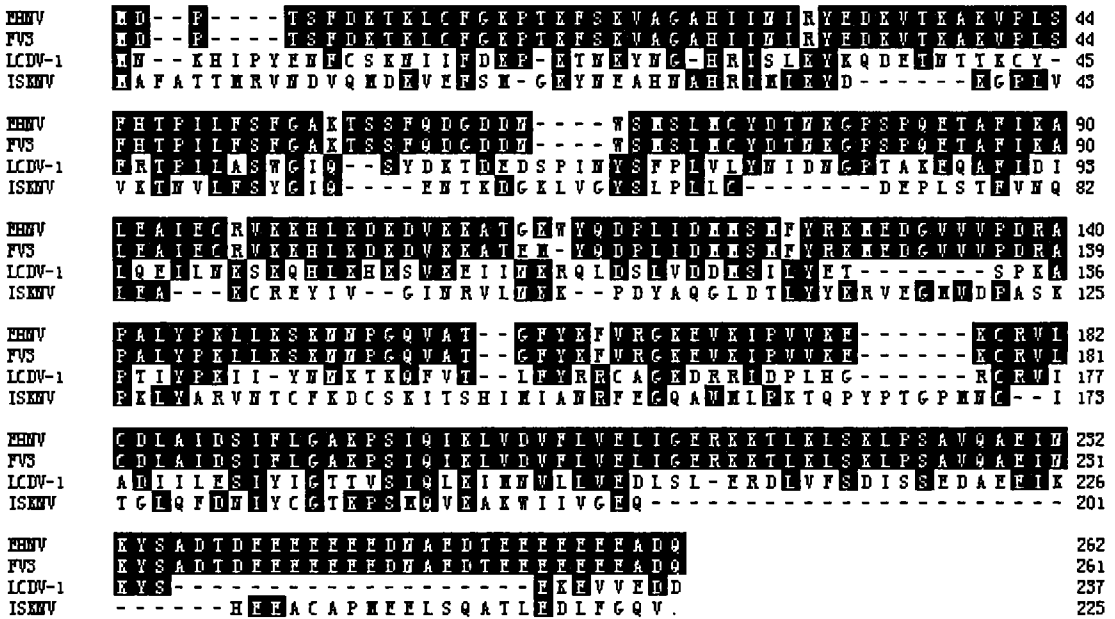


图 1 4 种虹彩病毒 p31 基因氨基酸序列比较

Fig. 1 Amino acids sequence alignment of p31 genes of the 4 iridoviruses

The identical amino acids are indicated by shading. Gaps are indicated by a dash (-).

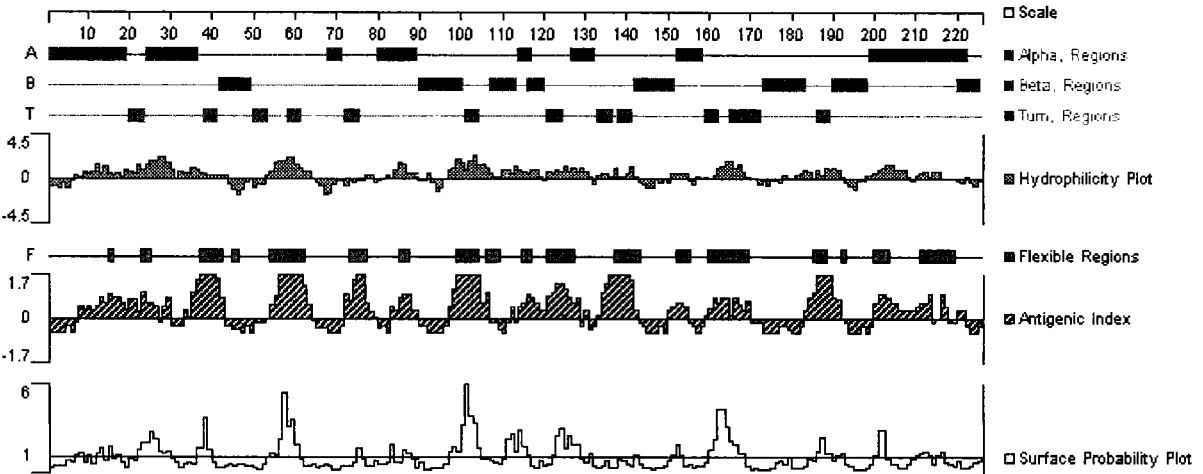


图 2 ISKNV p31 基因编码的蛋白质的二级结构、抗原性及其疏水性/亲水性预测

Fig. 2 Secondary structure, antigenicity predictions and hydropathy plot of ISKNV p31 protein

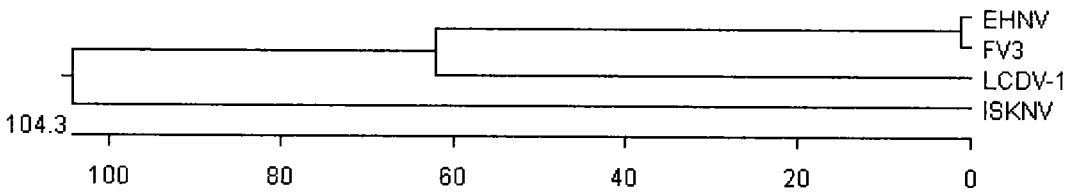


图 3 根据 4 种虹彩病毒 p31 基因编码的氨基酸序列绘制的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequences of p31 genes of the 4 iridoviruses.

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.

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,而 p31 基因作为一种滞早期基因<sup>[11]</sup>,可能具有类似的功能,但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。

虹彩病毒对包括鱼类、两栖类和爬行类动物在内的水生动物具有广泛的感染性,80 年代以来,陆续在英、法、德、日、澳、泰、中等国家及香港、台湾等地区的患病鱼、蛙和龟中分离到多种虹彩病毒,这类病毒流行快,对宿主有较强的致病性,极易引起暴发性死亡,给海淡水养殖业造成了严重的经济损失<sup>[15]</sup>。根据国际病毒分类委员会( ICTV)第 7 次报告<sup>[16]</sup>,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,其中,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脊椎动物的系统性疾病。Mao 等<sup>[17]</sup>和 Hyatt 等<sup>[18]</sup>对引起造血组织坏死的多株脊椎动物虹彩病毒进行其形态结构、免疫交叉反应、蛋白图谱、酶切图谱、核酸探针杂交和 MCP 基因序列等研究结果,认为它们与 FV3 的亲缘关系比它们与 LCDV-1 的亲缘关系更近。因此,ICTV 第 7 次报告将引起造血组织坏死的虹彩病毒 EHNV、ECV、ESV、LMBV、DFV、GV6 等归于蛙病毒属。邓敏等<sup>[5]</sup>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 p31 基因的序列分析发现,ISKNV 与 FV3、EHNV 和 LCDV-1 的 p31 基因氨基酸序列的同源性不高,系统进化分析发现 ISKNV 是独立于蛙病毒属和淋巴囊肿病毒属的一群。因此,结合本实验室对 ISKNV 的回归感染、组织病理、RFLP 等实验结果,我们认为 ISKNV 和 RSIV 等病毒可能是独立于蛙病毒属和淋巴囊肿病毒属的一个新的类群。

#### 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(自然科学报), 1998, 37(5): 74- 77.
- [3] 张奇亚,李正秋. 在患病鳊组织中观察到 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] 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.
- [7] He J G, Weng S P, Zeng K, et al. Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basillewsky), in China[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 219- 222.
- [8] 曾慷,何建国,翁少萍,等. 鳊传染性脾肾坏死病毒(ISKNV) 感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究[J]. 中国病毒学, 1999, 14(4): 353- 357.
- [9] Williams T. The Iridoviruses[J]. Advances in Virus Research, 1996, 46: 345- 412.
- [10] 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.
- [11] Schmitt M P, Tondre L, Kim A, et al. The nucleotide sequence of a delayed early gene (31K) of frog virus 3[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 4000.
- [12] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J]. Virology, 1997, 230: 207- 216.
- [13] Yu Y X, Bearzotti M, Vende P, et al. Partial mapping and sequencing of a fish iridovirus genome reveals genes homologous to the frog virus 3 p31, p40 and human eIF2 $\alpha$ [J]. Virus Res, 1999, 63: 53- 63.
- [14] 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.
- [15] He J G, Weng S P, Zeng K, et al. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. Aquaculture, 2001: in press.
- [16] Regenmortel 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.
- [17] Mao J, Hedrick R P, Chinchir V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses [J]. Virology, 1997, 229: 212- 220.
- [18] Hyatt A D, Gould A R, Zupanovic Z, et al. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses[J]. Arch Virol, 2000, 145: 301- 331.