

文章编号:1000 - 0615(2004)06 - 0695 - 08

鱼病毒性神经坏死病病毒(VNNV)不同基因型 鉴别方法的建立及在 VNN 检疫和监测中的应用

刘 荭^{1,2}, 史秀杰², 高隆英², 何俊强², 江育林², 陈焕春¹

(1. 华中农业大学动物医学院动物病毒室, 湖北 武汉 430070;

2. 深圳出入境检验检疫局动植食中心水生动物病重点实验室, 广东 深圳 518001)

摘要:从 GenBank 中查找出乙型野田村病毒组中海水鱼类各病毒的序列,并用 Sequencher 多重序列比较软件将其分到条纹¹神经坏死病毒(striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)组、条纹星鲽神经坏死病毒(barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV)组、红点石斑鱼神经坏死病毒(redspotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)组和虎斑东方²神经坏死病毒(tiger puffer nervous necrosis virus, TPNNV)组 4 个基因型的组别中。用 DNAsis 序列比较软件比较同一基因型各基因序列之间的同源性,均在 85 % 以上;不同基因型之间序列的同源性,均在 66 % 以下。结合 Premier 引物设计软件和 Sequencher 序列多重比较软件,设计了 4 对引物,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)来鉴别这 4 个不同的基因型。对从深圳口岸进境的产地为台湾的海水鱼苗和广东、福建两省养殖的主要海水鱼类进行检疫和监测,结果在进境的海水鱼苗中检出有 RGNNV 基因型的 VNNV,在福建和广东省养殖的石斑鱼成鱼和鱼苗的病鱼体内均检测到 RGNNV 基因型的 VNNV,对上述扩增产物基因序列进行比较,相似性均在 96.5 % 以上,推导出的氨基酸序列与玛拉巴石斑鱼神经坏死病毒(MNNV)序列相似性均为 100 %。

关键词:病毒性神经坏死病病毒;基因型;鉴别

中图分类号:Q789

文献标识码:A

Establishment of discriminating method of various genotypes of viral nervous necrosis virus (VNNV) and application in quarantine and surveillance of VNNV

LIU Hong^{1,2}, SHI Xiu-jie², GAO Long-ying², HE Jun-qiang², JIANG Yu-lin², CHEN Huan-chun¹

(1. Laboratory of Animal Virology of Veterinary Medicine College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. The Key Lab of Aquatic Animal Diseases, Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518001, China)

Abstract: All of the sequences of γ -nodavirus were collected from GenBank and divided into four genotype groups, SJNNV (Striped jack nervous necrosis virus) group, BFNNV (Barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV) group, RGNNV (Redspotted grouper nervous necrosis virus) group and TPNNV (Tiger puffer nervous necrosis virus) group. The similarity among the sequences in the same genotypes was more than 85 % and the similarity among different genotypes was less than 66 %. Four pairs of primers were designed using the softwares of Premier and Sequencher. The four genotypes were identified and discriminated by RT-PCR with these primers.

收稿日期:2003-09-08

资助项目:国家质检总局 2002 年科研项目“进出口鱼类病毒病检测技术的研究”(2002IK063)

作者简介:刘 荭(1971 -),女,安徽阜阳人,兽医师,博士,主要从事进出境水生动物病害检疫及水生动物病害方面的研究。E-mail:

liuhong @szciq.gov.cn

Quarantine and supervision were conducted on the larvae of marine fish imported from Taiwan through Shenzhen port and the marine fish cultured in Guangdong and Fujian provinces. The VNNV of RGNNV genotype was detected in the samples of imported larvae of marine fish. The same genotype was also detected in diseased adult fish and larvae of groupers (*Epinephelus* sp.) cultured in Guangdong and Fujian provinces. The similarity of gene sequences among all of these amplification products was more than 96.5% and the similarity of deduced amino acid sequences between these products and Malabaricus nervous necrosis virus (MNNV) was 100%.

Key words: viral nervous necrosis virus (VNNV); genotype; discrimination

病毒性脑病和视网膜病(viral encephalopathy and retinopathy, VER) 又称病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, VNN), 是发生在尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、棕点石斑鱼(*E. fuscogutatus*)、巨石斑鱼(*E. tauvina*)、红鳍东方鲷(*Takifugu rubripes*)、条斑星鲷(*Veraspermoseri*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)等多种海水鱼类中一种严重的疾病^[1,2]。Glazebrook等^[3]和Yoshikoshi和Inoue^[4]较早报道了在海水养殖鱼类种苗中的发病情况,并将该病命名病毒性脑病和视网膜病(VER)。患病鱼临床症状表现为不同程度的神经异常表现和中枢神经组织空泡化,通常在视网膜的中心层会出现空泡,鱼苗受害情况尤为严重^[1]。Hegde等^[5]在患病的淡水观赏鱼孔雀花^[6]中也分离出VNNV, Fukuda等^[6]从七带石斑鱼的成鱼体内检出VNNV,表明VNNV已经从海水鱼传到淡水鱼,从幼鱼传到成鱼。VNN在除非洲以外的世界其它地方迅速蔓延开来,给各国海水养殖业造成巨大的损失^[7]。

VNN的病原为病毒性神经坏死病毒(viral nervous necrosis virus, VNNV),它属于野田村病毒科(Nodaviridae)中的乙型野田村病毒属,病毒粒子直径为25~30 nm,成晶格状排列在细胞质中;病毒无囊膜,呈二十面体^[8,9]。病毒基因组包括两条正义的、非聚腺苷酸化的RNA单链(RNA1和RNA2)^[10,11]。RNA1编码的蛋白A是病毒依赖RNA的RNA聚合酶(RdRp)的组成部分,RNA2编码病毒的衣壳结构蛋白^[12,13]。目前乙型野田村病毒中包括有14种来自不同鱼类的VNNV,在GenBank中可搜索到49个相关的序列(表1)。Nishizawa等^[2]根据衣壳蛋白的序列,建议将乙型野田村病毒分为SJNNV、RGNNV、TPNNV和BFNNV4个基因型,这4个基因型不但在基因序列上存在差异,而且不同基因型的毒株在血清学

方面也有一定的差异。本研究中,用分子生物学软件对到目前为止,GenBank中VNNV各基因型的所有相关基因序列进行分析,并设计合适的引物,对不同基因型进行鉴别。用设计出的引物对进境海水鱼类和对国内发病的海水养殖鱼类进行检测,并对检测结果进行分析。

1 材料和方法

1.1 实验用海水鱼样品

样品编号为20011183的是2001年10月在深圳南澳收集的患病石斑鱼,平均体长13 cm; 20020913为2002年5月在深圳南澳收集的患病巨石斑鱼样品,平均体长25 cm,剖检可见肠道内有大量黑色的内容物;XMSBY为2003年3月在福建厦收集的患病石斑鱼鱼苗样品,患病鱼平均体长10 cm。其余均来自进出境送检的海水鱼苗样品。

1.2 分析软件

本研究中使用的引物设计软件为Premier 4.0,核酸序列多重比较使用的是DNAsis和Sequencher,核酸数据库相似性搜索采用的是美国国立卫生研究院国家生物中心(NCBI)的BLAST程序。

1.3 实验所用引物

由上海生工生物工程技术有限公司合成,使用前用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的超纯水调到 $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。

1.4 其它试剂

Taq DNA聚合酶、CTAB、重蒸酚、 $10 \times$ PCR Buffer和 MgCl_2 等试剂购自上海生工。逆转录酶(AMV酶)、RNA抑制剂和dNTP(含dCTP、dGTP、dATP、dTTP各 10 mmol L^{-1})等购自大连宝生物工程有限公司。

1.5 核酸序列同源性分析及基因型引物的设计
用Sequencher软件将表1中所列各病毒的核

表 1 乙型野田村病毒各病毒在 GenBank 中的核酸序列及其所属的基因型

Tab.1 The sequences of all the *-nodavirus* in GenBank and their genotypes

病毒名称 name of virus	GenBank 中基因接受号 accession no. in GenBank	编码的蛋白质 coded proteins	基因型 genotypes
大西洋鳕鱼神经坏死病毒 Atlantic cod nervous necrosis virus, ACNNV	AF445800	Coat protein gene, partial cds	BFNNV
庸鲈神经坏死病毒 Atlantic halibut virus, AHV	AJ245641	Partial mRNA for capsid protien	BFNNV
条纹星鲈神经坏死病毒 barfin flounder nervous necrosis virus, BFNNV	AB046377	Coat protein gene, partial cds	BFNNV
	D38635	Coat protein gene, partial cds	BFNNV
舌齿鲈脑炎病毒 <i>Dicentrarchus labrax</i> encephalitis virus, DLEV	AJ277810	Partial CP gene for coat pro. Isolate DL-8	RGNNV
	AJ277809	Partial CP gene for coat pro. Isolate DL-7	RGNNV
	AJ277808	Partial CP gene for coat pro. Isolate DL-6	RGNNV
	AJ277807	Partial CP gene for coat pro. Isolate DL-5	RGNNV
	AJ277803	partial CP gene for coat protein, isolate DI-1, genomic RNA	RGNNV
	AJ277804	partial CP gene for coat protein, isolate DI-2, genomic RNA	RGNNV
	AJ277805	partial CP gene for coat protein, isolate DI-3, genomic RNA	RGNNV
	AJ277806	partial CP gene for coat protein, isolate DI-4, genomic RNA	RGNNV
	AF175509	RNA2 strain GR/02 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175510	RNA2 strain GR12 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175511	RNA2 strain PT08 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175512	RNA2 strain ML01 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175513	RNA2 strain IT23 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175514	RNA2 strain IT19 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175515	RNA2 strain SP20 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175516	RNA2 strain SG14 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175517	RNA2 strain IT24 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175518	RNA2 strain TH07 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175519	RNA2 strain JP06 coat protein gene, partial cds	RGNNV
	AF175520	RNA2 strain JPI coat protein gene, partial cds	RGNNV
	U39876	coat protein gene, complete cds	RGNNV
	Y08700	mRNA for coat protein	RGNNV
龙海蛾鱼神经坏死病毒 dragon nervous necrosis virus, DNNV	AF245004	coat protein gene, complete cds	RGNNV
点带石斑鱼神经坏死病毒 <i>Epinephelus coioides</i> nervous necrosis virus, ECNNV	AF534998	coat protein gene, complete cds	RGNNV
巨石斑鱼神经坏死病毒 <i>Epinephelus tauvina</i> nervous necrosis virus, ETNNV	AF326776	segment RNA1, complete sequence	RGNNV
	AF281657	coat protein gene, complete cds3	RGNNV
	NC_004137	RNA1, complete sequence	RGNNV
	NC_004136	RNA 2, complete sequence	RGNNV
	AF319555	segment RNA1 protein A and protein B2 mRNAs, complete cds	RGNNV
	AF318942	segment RNA2 coat protein mRNA, complete cds	RGNNV
孔雀花鲈神经坏死病毒 guppy nervous necrosis virus, GNNY	AF499774	coat protein gene, complete cds	RGNNV
牙鲆神经坏死病毒 Japanese flounder nervous necrosis virus, JFNNV	AB046376	RNA 1 for protein A, partial cds	RGNNV
	AB045980	gene for coat protein, partial cds	RGNNV
	D38527	gene for coat protein, partial sequence	RGNNV
玛拉巴石斑鱼神经坏死病毒 Malabaricus nervous necrosis virus, MNNV	AF245003	coat protein gene, complete cds	RGNNV
红点石斑神经坏死病毒 redspotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV	D38636	gene for viral coat protein, partial sequence	RGNNV
短须石首鱼神经坏死病毒 <i>Umbrina cirrosa</i> nodavirus, UCNV	AJ277811	partial CP gene for coat protein, isolate Uc-1, genomic RNA	RGNNV
黄石斑神经坏死病毒 yellow grouper nervous necrosis virus, YGNNV	AF283554	Yellow grouper nervous necrosis virus major coat protein gene, partial cds	RGNNV

(续表)

病毒名称 name of virus	GenBank 中基因接受号 accession no. in GenBank	编码的蛋白质 coded proteins	基因型 genotypes
条纹 ^{东方} 神经坏死病毒 striped jack nervous necrosis virus, SJNNV	AB025018	RNA1 for protein A (RDRP), protein B, complete cds	SJNNV
	NC_003449	RNA2, complete sequence	SJNNV
	NC_003448	RNA1, complete sequence	SJNNV
	AB056572	gene for coat protein, complete cds	SJNNV
	AB056571	genes for protein A, protein B, complete cds	SJNNV
	D30814	gene for coat protein, complete cds	SJNNV
虎斑东方 ^{神经} 神经坏死病毒 tiger puffer nervous necrosis virus, TPNNV	D38637	gene for viral coat protein, partial sequence	TPNNV

酸序列划分到相应的基因型中,用 DNAsis 对各基因型内的相关序列进行比较,选择保守程度较高的一段序列,用 Premier 软件设计合适的引物。设计出的引物用 BLAST 在 GenBank 中做序列相似性寻找,以判定引物的特异性。引物序列与同基因型组别内的其它序列相似性达 100%,而又与其它基因型的序列完全没有相似性的,才选择作为该基因型特异性的引物。

1.6 核酸抽提

取病鱼的脑、肝、脾和肾脏各 100 mg,放在 1.5 mL 的离心管中,在 10⁴ 条件下,按文献[14]的方法抽提核酸。

1.7 RT-PCR 反应

解二级结构 在 PCR 管中加入模板 10 μ L,正向引物 3 μ L,水 2 μ L,总体积 15 μ L。70^o 加热 5 min 后立即冰浴,稍离心使反应物集于管底。

合成 cDNA 在上述 PCR 管中继续加入 AMV 5 \times buffer 5 μ L, d NTPs (各 10 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, RNasin 1 μ L (20 U), 水 1 μ L, AMV 酶 1 μ L, 共 25 μ L。40^o 60 min 反应后稍离心。PCR 继续在 PCR 管中加入 10 \times buffer 8 μ L, 0.2 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 8 μ L, 正向引物和反向引物各 2 μ L, dNTPs 2 μ L (各 10 mmol \cdot L⁻¹), Taq 酶 1 μ L, 水 52 μ L, 总体积 100 μ L。加 50 μ L 矿物油覆盖,稍离心。先 94^o, 4 min, 再按 94^o 1 min、55^o 1 min、72^o 1.5 min 作 35 个循环;最后 72^o 10 min 延伸, 4 保温。

PCR 产物的检测 用含 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 溴化乙锭(EB)的 1 \times TBE 做电泳缓冲液及配制 1.5% 琼脂糖凝胶。将凝胶板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹及胶面,将 8 μ L 样品和 2 μ L 样品缓冲液混匀后加入样品孔,5V \cdot cm⁻¹ 电泳约 0.5 h,用

凝胶成像仪观察电泳结果。

1.8 PCR 产物纯化和克隆

扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。与 PT7Blue T vector 连接后转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中,在含有 X-Gal、IPTG 和 Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养。从转化平板上挑选白色的单菌落,并以 M13-47 (5'⁻CGC CAG GGT TTT CCC AGT CACGAC-3') 和 RV-M (5'⁻GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3') 为引物做 PCR,检测质粒中插入片段的长度。

1.9 DNA 序列测定和分析

将阳性菌落提取质粒 DNA 后用 M13-47、RV-M 引物进行双向测序,测序由大连宝完成。测序结果用 BLAST 软件进行相似序列搜寻。

2 结果

2.1 VNN 各病毒序列基因型的确定

根据各基因之间相似程度,用 Sequencher 将所有 VNNV 基因序列划分到 SJNNV、RGNNV、BFNNV 和 TPNNV 4 个基因型中(表 1)。BFNNV 基因型包括 ACNNV、AHV、BFNNV; SJNNV 基因型仅有 SJNNV; TPNNV 基因型组仅有 TPNNV; RGNNV 基因型包括 DLEV、DNNV、ECNNV、ETNNV、GNNV、JFNNV、MNNV、RGNNV、UCNV 和 YGNNV。同一基因型的基因序列用 DNAsis 做同源性比较,结果表明 BFNNV 基因型内各基因之间的相似程度在 85% 以上; RGNNV 基因型内各基因之间的相似程度在 87.6% 以上; SJNNV 基因型内各基因之间的相似程度在 89.8% 以上; 各基因型之间序列的相似程度在 66.4% 以下。DLEV 的 JP06 株与其它 DLEV 株的 RNA2 部分衣

壳蛋白编码基因的相似性只有 61.4%,而与 SJNNV 基因型相似性却高达 98%,表明舌齿鲈感染 VNNV 的基因型有 RGNNV 和 SJNNV 两种,从目前已知的病毒基因序列的比较结果来看,从舌齿鲈中分离出的 VNNV 多属于 RGNNV 基因型。

2.2 设计各基因型特异性的引物

结合 Sequencher、Premier 软件和 BLAST 程序,设计各基因型特异的引物。引物序列、扩增片段的长度见表 2。

表 2 各基因型特异性的引物
Tab. 2 The primers designed for 4 VNNV genotypes

引物 primers	引物序列 sequences of priers designed	扩增片段大小(bp) length of amplified fragments
TPNNV-F1	5' GGA CAG GAG CGG ACG GAT AT-3'	523
TPNNV-R1	5' AGG AGG ATG GAA CGA AAC CC-3'	
BFNNV-F1	5' GGA CGG ATA CAT CGT GGT YG-3'	479
BFNNV-R1	5' CAA GGG AGT CGT TGT AGA GTG G-3'	
SJNNV-F1	5' GGA TTT GGA CGT GCG ACC AA-3'	1147
SJNNV-R1	5' GAC AAG ACT GGT GAA GCT GG-3'	
RGNNV-F1	5' GTT CCC TGT ACA ACG ATT CC-3'	294
RGNNV-R1	5' GGA TTT GAC GRG GCT GCT CA-3'	

2.3 进境送检海水鱼样品中检出的 VNNV

2001 年 8 月至 2003 年 7 月两年间,对来自台湾、香港和泰国的鲈 (*Perca*)、石斑鱼 (*Epinephelus*)、鲷 (*Pampus*)、眼斑拟石首鱼 (*Sciaemops ocellatus*)、紫红笛鲷 (*Lutjanus argentimaculatus*)、千年笛鲷 (*Lutjanus sebae*) 等鱼苗和作为鱼类饵料用的杂鱼仔共 200 批进行检测。结果用于检测 RGNNV 基因型的引物在产地为台湾的紫红笛鲷鱼苗、鲈鱼苗、石斑鱼苗和鲷鱼苗,产地为香港的杂鱼仔中均检出有 VNNV (图 1),用其它基因型的引物均未扩出相应的片段。对扩增产物克隆、测序得到的结果进行分析,表明感染上述鱼类的 VNNV 均属于 RGNNV 基因型,扩增出的基因片段序列之间的相似性在 98% 以上。以其中编号为 20030954 的台湾产石斑鱼苗中扩增出的核酸片段的序列(图 2)与 RGNNV 基因型其它毒株的相应序列进行多重比较,相似性均在 94.3% 以上(图 3)。编码的衣壳蛋白的氨基酸顺序与 MNNV 衣壳蛋白的氨基酸顺序(GenBank 中接受号为 AAG22495)相似性为 100%。

2.4 广东和福建两省养殖海水鱼中检出的 VNNV

2001 年 8 月至 2003 年 7 月,在广东、福建两省收集了 3 批患病石斑鱼样品,用 RGNNV 基因型的引物均检出有 VNNV 的感染(图 1)。对扩增产物克隆、测序得到的结果进行分析,结果 20011183、

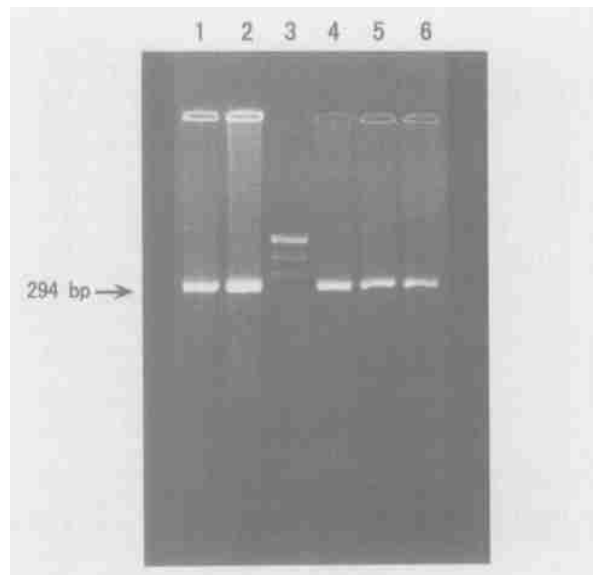


图 1 用 RGNNV 基因型引物对海水鱼类样品进行 RT-PCR 检测的结果

Fig. 1 The amplified products of marine fish samples with the primers of RGNNV genotypes

从左至右:1 为样品 20011183 的扩增片段,2 为样品 20020913 的扩增片段,3 为 DNA 分子量标准(pUC19 DNA/ MspI Marker 23, 从上至下各片段大小分别为 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp 和 111 bp),4 为样品 XMSBY 的扩增片段,5 均为从进境台湾产石斑鱼(样品编号 20030954 中扩增出的片段,6 为从进境台湾产鲈鱼苗(样品编号 20030071)中扩增出的片段

From left to right, Lane 1: the amplified product of 20011183, Lane 2: the amplified product of 20020913, Lane 3: DNA Marker (pUC19 DNA/ MspI Marker 23, From up down, 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp and 111 bp), Lane 4: the amplified product of XMSBY, Lane 5: the amplified product of imported grouper from Taiwan (20030954); Lane 6: the amplified product of imported perch from Taiwan (20030071)

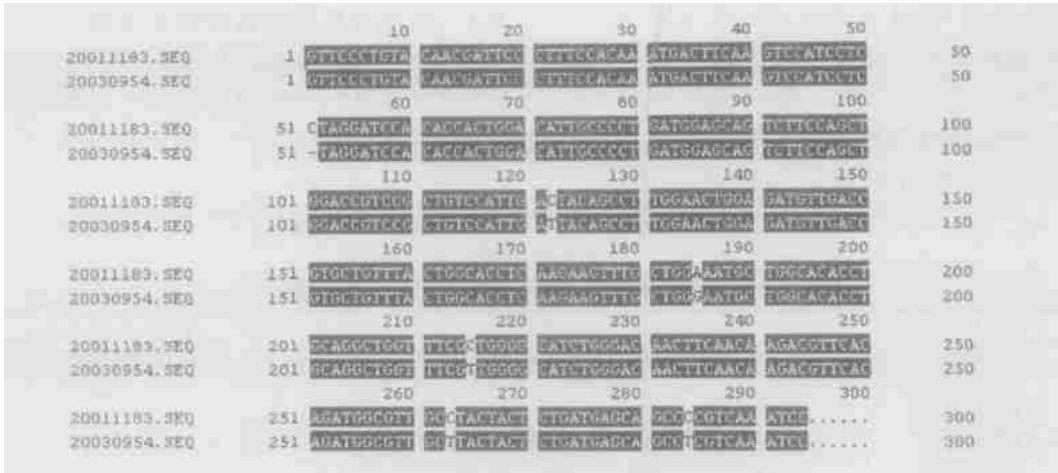


图 2 20030954 产地为台湾的石斑鱼苗用 RGNNV 基因型引物 RT-PCR 反应扩增产物的测序结果与国内患病石斑鱼用 RGNNV 基因型引物 RT-PCR 反应扩增产物的测序结果比较

Fig. 2 Comparing the sequence of RT-PCR amplified products from grouper larvae (20030954) imported from Taiwan with that of diseased groupers in China with the primers of RGNNV genotype

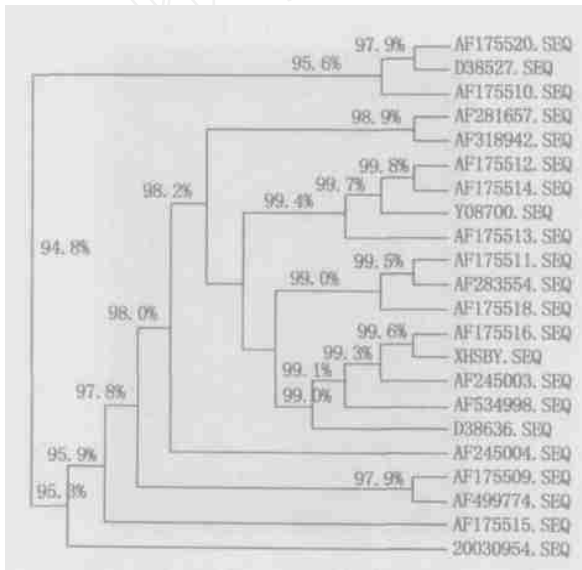


图 3 20030954 扩增产物的基因序列、国内患病石斑鱼扩增产物的基因序列与其它 RGNNV 基因型的基因片段进行相似性比较后得到的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on multiple sequence alignment among the sequences of amplified products of 20030954, diseased grouper and the same fragment of other strains which belong to RGNNV genotype in GenBank

20020913 和 XMSBY 扩增产物核酸序列(图 2)相似程度为 100%，与从台湾进口海水鱼苗中用 RGNNV 基因型引物扩增出的基因片段序列的相似性在 96.5% 以上,与其它 RGNNV 基因型相关

序列的相似程度在 94.8% 以上,与舌齿鲈脑炎病毒的序列相似程度最高,达 99.6% (图 3)。编码的衣壳蛋白的氨基酸顺序与 20030954、MNNV 衣壳蛋白的氨基酸顺序 (GenBank 中接受号为 AAG22495) 相似性为 100%。

3 讨论

Yoshikoshi 和 Inoue^[4]最早将该病命名为病毒性神经坏死,并试图用 RTG-2 (虹鳟性腺)、FHM (胖头)、CHSE-214 (大鳞大麻哈鱼胚胎)、EPC (*Epithelioma papulosum cyprini* 细胞系)等鱼类细胞系来分离病毒,结果在这些细胞中,均未出现细胞病变。Breuil 等^[15]用 BF-2 (兰鳃太阳鱼成纤维细胞)、SBL (尖吻鲈细胞系)来分离病毒,结果仍未成功,只有根据分离出的病毒的理化特性和电镜观察结果,将该病毒初步划分为小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae)。但 Mori 等^[9]对病毒分子量、基因组和编码蛋白的特性进行了研究,结合病毒的形态和生化特性,认为应将该病毒划分为野田村病毒科 (Nodaviridae),该结果被其他研究人员所进一步证实^[16]。

没有合适的细胞系对病毒进行分离,对进一步研究病毒的特性及建立检测方法造成相当大的难度。最初的诊断只能依靠组织病理学和电镜超微切片观察。Arimoto 等^[17]以病鱼组织中分离、纯化出的病毒作为抗原,制备出抗血清,建立了酶

联免疫吸附技术(ELISA),检测灵敏度达到每孔 5 ng,并用该技术对 VNN 的致病性和流行病学进行了大量的探索。但 ELISA 的检测灵敏度还不能检测出于潜伏期感染的鱼或带毒鱼。Nishizawa 等^[18]对 RNA2 进行了克隆测序,并对开放阅读框(open reading frame, ORF)进行了分析,在此基础上,建立了 RT-PCR 方法,对样品中的 VNN 病毒核酸进行检测,检出灵敏度达 100 fg。用 RT-PCR 对繁殖期间的亲鱼进行检测,筛选、使用检测结果为阴性的亲鱼进行繁殖,可有效地切断 VNNV 垂直传播的途径^[19]。Lim 等^[20]建立了尖吻鲈细胞系(SB),从巨石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)中分离出 VNNV。随后在使用 SB 细胞系对 VNNV 进行分离时,发现从不同鱼类中检出的 VNNV,在不同温度下对 SB 细胞的敏感程度不同,SVNNV 基因型的最适分离温度为 20~25、TPNNV 为 20、RGNNV 为 25~30、BFNNV 为 15~20^[21]。这就增加了病毒分离的难度和工作量。到目前为止,在 GenBank 中收录了 14 种从不同鱼类中分离出的 VNNV,分属 4 个基因型^[2]。同一基因型包含有多个寄主感染的 VNNV,而同一种鱼类感染的 VNNV 有可能分属不同的基因型,由此表明基因型与病毒所感染的寄主之间没有相对应的联系^[22]。用扩增衣壳蛋白基因(RNA2)中 426 bp 核酸片段的引物^[18]只能扩增出一部分乙型野田村病毒,因此在检测中可能出现漏检。我们收集了乙型野田村属各病毒的基因序列,经多重比较,将其划分到各基因型中。再对组内和组间各基因序列进行相似性比较,设计了不同的特异性引物,来对不同基因型进行检测,从而能够有效地从样品中检出病毒核酸,而且可明确地将感染病毒划分到基因型。在此基础上,可对 VNN 的流行病学及病原的进化作进一步的研究和分析。

随着我国海水养殖业的迅猛发展,疾病问题也日益突出。海水种苗的引进直接导致了疾病的引入和迅速蔓延。我们在进口海水鱼类种苗中多次检出了 VNNV 病毒核酸,说明外来种苗病原携带问题十分严重。而近年来在广东、福建收集到的患病石斑鱼中扩增到 VNNV 病毒核酸,与流行于法国、意大利、希腊和英国的舌齿鲈脑炎病毒相应的核酸序列有着高度的相似性^[23-26],因此不能排除我国南方养殖海水鱼类 VNNV 与欧洲分

离出的 VNNV 有一定的联系。我国的台湾省养殖海水鱼类已经遭受了 VNNV 所带来的严重损失,而随着海水的流动和海水种苗的贸易往来,VNNV 从台湾传入大陆的风险极高。本研究结果表明,我国海水养殖业正在遭受 VNNV 的威胁,有必要使用快速、准确的监测方法,对引进的海水鱼类种苗进行严格的检疫和检验,对检出带毒的种苗,应进行严格的处理,才能保证我国海水鱼类的健康养殖和海水养殖业的顺利发展。本研究中所建立的检测方法是以前各病毒基因型基因序列之间的差异为研究对象,所建立起来的病毒基因诊断技术。根据检测结果,不但可以确定 VNNV 病毒的感染,而且可以确定其所属的 VNNV 基因型,对 VNNV 的监测和流行病学分析,是一个非常实用的检测工具。

参考文献:

- [1] Munday B L, Nakai T. Special topic review: Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish [J]. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13: 375 - 381.
- [2] Nishizawa T M, Furuhashi T, Nagai T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1633 - 1636.
- [3] Glazebrook J S, Heasman M P, deBeer S W. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch) [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 245 - 249.
- [4] Yoshikoshi K, Inoue K. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 69 - 77.
- [5] Hegde A, The H C, Lam T J, et al. Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata* - comparative characterization and pathogenicity studies [J]. J Arch Virol, 2003, 148 (3): 575 - 586.
- [6] Fukuda Y, Nguyen H D, Furuhashi M, et al. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis [J]. Fish Pathol, 1996, 31 (3): 165 - 170.
- [7] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infectious of teleost fish: a review [J]. J Fish Dis, 2002, 25 (3): 127 - 142.
- [8] Comps M, Pepin J F, Bonami J R. Purification and characterisation of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax* [J]. Aquac, 1996, 12: 1 - 10.
- [9] Mori K T, Nakai K, Muroga M, et al. Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis [J]. Virology,

- 1992, 187: 368 - 371.
- [10] Ball L A, Johnson K L. Reverse genetics of nodaviruses [J]. *Advances in Virus Research*, 1999, 53: 229 - 244.
- [11] Schneemann A, Reddy V, Johnson J E. The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology [J]. *Advances in Virus Research*, 1998, 50: 381 - 446.
- [12] Nakai T, Nishizawa T. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus [J]. *J General Virol*, 1999, 80: 3019 - 3022.
- [13] Nishizawa T K, Nori M, Furuhashi T, *et al.* Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish [J]. *J General Virol*, 1995, 76: 1563 - 1569.
- [14] Liu H, Gao L Y, Shi X J, *et al.* Detection of RNA of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. *J Fish China*, 2002, 26(2): 185 - 188. [刘 荃, 高隆英, 史秀杰, 等. 用逆转录多聚酶链式反应从凡纳对虾中检出传染性皮下组织和造血器官坏死病毒 [J]. *水产学报*, 2002, 26(2): 185 - 188.]
- [15] Breuil G, Bonami J R, Pepin J F, *et al.* Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles [J]. *Aquac*, 1991, 97: 109 - 161.
- [16] Comps M, Pepin J F, Bonami J R. Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquac*, 1994, 123: 1 - 10.
- [17] Arimoto M K, Mushiake Y, Mizuta T, *et al.* Detection of Striped Jack Nervous necrosis (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Fish Pathology*, 1992, 27(4): 191 - 195.
- [18] Nishizawa T K, Mori T, Nakai I, *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) [J]. *Dis Aquatic Org*, 1994, 18: 103 - 107.
- [19] Mushiake K, Nishizawa T, Nakai T, *et al.* Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Fish Pathology*, 1994, 29(3): 177 - 182.
- [20] Lim M C, Chong S Y, Yoshimizu M. A nodavirus isolated from grouper (*Epinephelus tauvina*) and seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *Fish Pathology*, 1998, 33(4): 447 - 448.
- [21] Nakai T, Nakajima K. Recent advances of betanodaviruses and iridoviruses in Asian aquaculture [C]. *Handbook & Abstracts of 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, 2002. 44.
- [22] Tanaka S I, Kuriyama T, Nakai T, *et al.* Susceptibility of cultured juveniles of several marine fish to the sevenband grouper nervous necrosis virus [J]. *J Fish Dis*, 2003, 26(2): 109 - 115.
- [23] Valle L D, Negrisolo E, Patarnello P, *et al.* Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene [J]. *J Arch Virol*, 2001, 146(6): 1125 - 1137.
- [24] Skliris G P, Krondiris J V, Sideris D C, *et al.* Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia [J]. *Virus Res*, 2001, 75(1): 59 - 67.
- [25] Delsert C, Morin N, Comps M. A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing [J]. *J Arch Virol*, 1997, 142(12): 2359 - 2371.
- [26] Sideris D C. Cloning, expression and purification of the coat protein of encephalitis virus (DIEV) infecting *Dicentrarchus labrax* [J]. *J Biochem Mol Biol Int*, 1997, 42(2): 409 - 417.