

文章编号: 1674-5566(2010)04-0482-07

# 神经坏死病毒对卵形鲳鲹的致病性及外壳蛋白基因序列分析

许海东<sup>1,2</sup>, 区又君<sup>1</sup>, 郭志勋<sup>1</sup>, 苏友禄<sup>1</sup>, 王瑞旋<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 2008年5月, 湛江市某网箱养殖场的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 幼鱼发生大规模死亡, 调查发现病鱼呈现体色发黑、反应迟钝、呈螺旋状或旋转游动等典型的病毒性神经坏死症症状, 在鱼体没有发现寄生虫或细菌感染, PCR检测发现病鱼感染了鱼类神经坏死病毒 (NNV)。利用已经发表的 NNV 核酸序列设计引物, 克隆外壳蛋白基因并测序, 根据同源性比较和系统进化分析, 该病毒与斜带石斑神经坏死病毒 (ECNNV) 碱基相似率达 99.2%, 属于赤点石斑鱼神经坏死病毒基因型 (RGNNV)。同时进行人工感染试验, 采用 4 种方法感染该病毒, 累计死亡率均达 100%, 并对感染样品进行克隆测序鉴定, 证明导致此次湛江卵形鲳鲹大规模死亡的病原为神经坏死病毒。

**关键词:** 卵形鲳鲹; 神经坏死病毒; 序列分析

**中图分类号:** S941.4      **文献标识码:** A

## The pathogenicity of nervous necrosis virus to *Trachinotus ovatus* and sequence analysis of the coat protein gene

XU Hai-dong<sup>2</sup>, OU You-jun<sup>1</sup>, GUO Zhi-xun<sup>1</sup>, SU You-lu<sup>1</sup>, WANG Rui-xuan<sup>1</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Investigation on mass mortality of *Trachinotus ovatus* juveniles cultured in sea cage in Zhannjiang was carried out. The symptom of the sick fish was as follows: the skin was nigriscent, it swam wistly or circularly, responded slowly and anorexia. There was no infection of parasites or bacteria. The fish nervous necrosis virus was observed in the fish by PCR analysis. Two pairs of primers were designed based on the homogenous gene sequences from other fish nervous necrosis virus (NNV) submitted to GenBank and the coat protein gene of *Trachinotus ovatus* nervous necrosis virus (PNNV) was cloned and sequenced. According to the analysis of similarity and phylogenesis, the coat protein gene from PNNV had the highest identity of 99.2% to *Epinephelus coioides* nervous necrosis virus (ECNNV) at nucleotide level. Based on the result of molecular phylogenetic analysis, PNNV belongs to red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) genotype. The cumulative mortality of all groups infected were 100% in artificial infection experiment by four

收稿日期: 2009-09-21

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2008YD02/2008TS06)

作者简介: 许海东 (1986-) 男, 硕士研究生, 专业方向为渔业生物病害防治。E-mail: markxu0418@hotmail.com

通讯作者: 郭志勋, E-mail: guozhixun@163.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

kinds of infection. The infected samples were cloned and sequenced. These results suggested that the pathogen of mass mortality of *Trachinotus ovatus* juveniles cultured in sea cage in Zhanjiang was NNV.

**Key words:** *Trachinotus ovatus*; nervous necrosis virus; sequence analysis

卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes), 鲈亚目 (Percoidae), 鲹科 (Carangidae), 鲳属 (*Trachinotus*), 俗称白鲳、金鲳、黄腊鲳等<sup>[1]</sup>, 体呈卵形, 分布于印度洋、印度尼西亚、澳洲、日本、美洲的热带及温带的大西洋海岸及我国黄渤海、东海、南海。卵形鲳鲹肉白色细嫩、脂肪含量高、鲜美可口, 是高级食用海水鱼, 在人工养殖条件下生长速度快, 养殖半年多, 可达 500 g 是优良的海水网箱养殖品种, 广东、福建、海南等地均有大规模的网箱养殖<sup>[2]</sup>。随着养殖规模的扩大和养殖环境的恶化, 在养殖过程中病害开始不断出现, 到目前为止, 已经报道过的嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*)<sup>[3]</sup>、美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*)<sup>[4]</sup>、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)<sup>[5]</sup> 引起的细菌性疾病以及刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 引起的寄生虫病等<sup>[6]</sup>。2008年春季, 广东湛江一些网箱养殖的卵形鲳鲹幼鱼发生大规模死亡, 每个网箱每天死亡数十至上百尾鱼, 总死亡率超过 90%。患病鱼呈现出体色变黑、游泳异常, 身体失去平衡等典型的病毒性神经坏死症症状。王江勇等<sup>[7]</sup>曾对广东省阳江市养殖的卵形鲳鲹幼苗大规模死亡进行了调查, 发病症状与本次相似, 并认为是由于神经坏死病毒感染引起的, 但是没有进一步深入的研究。本文通过病原检测和人工感染实验, 发现鱼类神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 是引发此次大规模死亡的主要原因, 对此湛江株 (PNNV) 的外壳蛋白基因进行克隆测序, 与已发布的 4 种基因型 NNV 病毒株进行同源性比对及分子进化分析, 确定其分类地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样地点

采样地点为广东省湛江市某网箱养殖场, 时间是 2008年 5月与 7月。

### 1.2 样品

2008年 5月从发病存活下来的卵形鲳鲹鱼苗中, 选择症状典型的 3尾鱼用于寄生虫、细菌

和神经坏死病毒检测; 另外, 随机采集 10尾鱼苗, 平均体长为 (7.7 ± 0.5) g, 全鱼冻存于 -80℃ 冰箱备用。同年 7月再次从发病存活下来的卵形鲳鲹鱼苗中, 随机采集 100尾, 进行 NNV 检测。

### 1.3 寄生虫检查

解剖呈现发病症状的病鱼, 肉眼观察鱼的体表、鳃、肠等的病变及寄生虫的出现情况, 并做水封片用显微镜检查。

### 1.4 细菌检查

用显微镜检查病鱼的体表、鳃、肠、心、肝、脾脏、肾脏等部位, 并接到 2216E 和脑心浸液培养基上进行细菌培养。

### 1.5 病毒检查

#### 1.5.1 引物设计

根据 GenBank 中登陆的 NNV 外壳蛋白的核苷酸序列 (GenBank accession no. NC004136), 在 RNA2 的保守区域设计了如下 2对引物, 进行巢式 PCR 检测。一扩正向引物 NNVF 序列为: 5'-ATGGTACGCAAAGGIGAGAAG-3'; 反向引物 NNVR 序列为: 5'-TTAGTTTTCCGAGTCAACCCTG-3', 扩增片段长 1 017 bp。二扩正向引物 NNVEN 序列为: 5'-TGGTGGGAAAGCAGAACAA-3'; 反向引物 NNVRN 序列为: 5'-CCAGTAAACAGCACGGTCA-3', 扩增片段长 387 bp。

#### 1.5.2 核酸抽提

取鱼脑组织, 用 TRIzol (Invitrogen) 按照使用说明抽提总 RNA。

#### 1.5.3 cDNA 合成

采用 ReverTra Ace (Toyobo) 反转录试剂盒, 按照使用说明合成鱼脑组织总 cDNA。

#### 1.5.4 nested-PCR 检测

一扩反应体系包含 0.5 μL dNTP (10 mmol/L), 2.5 μL 10 × PCR buffer, 0.25 μL rTaq polymerase (5 U/μL) (Takara), 正向及反向引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 18.75 μL 灭菌双蒸水以及 2.0 μL cDNA 模板, 混合均匀后于 PCR 仪上按下程序扩增: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 55℃ 40

§ 72 °C 2 m in 35个循环, 72 °C延伸 10 m in 以一扩产物为模板进行二扩, 反应体系及程序与一扩相同。

### 1.5.5 PCR产物纯化和克隆

一扩产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 采用 TIANGel Midi琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Tiangen)进行 PCR产物纯化, 与 pMD18-T vector连接后转化到 DH5α感受态细胞中, 在含有 X-Gal IPTG和 Amp的 LB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 NNVF (5'-ATGGTACGCAAAGGTGAGAAG-3')和 NNVR (5'-TTAGTTTTCCGAGTCAACCCCTG-3')为引物做 PCR验证。

### 1.5.6 序列测定和分析

将阳性菌落扩大培养后送上海英骏公司测序, 测序结果用 DNASTAR BLAST等软件分析。

## 1.6 人工感染实验

### 1.6.1 病毒液制备

取通过以上检测确定阳性的卵形鲳鲹脑组织, 按 1:10(质量比)加入预冷 PBS冰浴充分后匀浆, 然后 3 000 § 4 °C离心 30 m in取上清液, 再 6 000 § 4 °C离心 1 h上清液经 0.22 μm滤膜过滤, 4 °C冰箱保存备用。

### 1.6.2 病毒感染及采样

实验分 A B C D和 E共 5组, 每组 20尾健康鱼。A组肌肉注射 50 μL ind病毒液; B组腹腔注射 50 μL ind病毒液; C组将病毒液用海水稀释为 1:2 500 浸泡感染 3 h D组为投喂组, 即将取样于湛江的典型症状鱼切碎, 每日投喂 3次, 共投喂 2 d E组注射 50 μL PBS作为对照。观察并记录每组死亡率。

### 1.6.3 病毒确认

为进一步确认人工感染实验中发病的鱼是由 PNNV引起, 提取症状典型鱼的脑组织总 RNA并进行 PCR扩增及克隆测序, 与 PNNV进行比对。

## 2 结果

### 2.1 病鱼临床症状

病鱼体表发黑、厌食、反应迟钝、游动时出现螺旋状或旋转状游动以及静止时出现腹部朝上、漂游于水面等现象, 无其他明显外观病变。剖检

病鱼, 鳃、肛门、肠道、肝脏等内脏器官无腹水、颜色变白、溃疡等异常现象出现。

### 2.2 寄生虫检查

在病鱼体表检出少量本尼登虫 (Benedenia sp.) 在鱼鳃部发现少量锚首虫 (Ancyrocephalus sp.)、车轮虫 (Tnchodina sp.), 但这些寄生虫感染强度很低, 不足以引发卵形鲳鲹鱼苗的急性死亡。

### 2.3 细菌检查

病鱼鳃、鳍条等部位均正常, 心、肝、脾脏、肾脏等用肉眼观察均无异常, 无红肿、出血、炎症、结节、溃疡、坏死等细菌病常见症状, 无典型病灶, 心、肝、脾脏、肾脏等器官内没有细菌生长。因此, 可排除细菌感染导致鱼苗死亡的可能性。

### 2.4 NNV检测及序列分析

#### 2.4.1 PCR检测

采用 PCR检测, 典型症状鱼 NNV阳性, 而对随机采集的 10个样品进行扩增后, 其中有 6个样品获得了与理论值相符的扩增片段 (约 385 bp) (图 1), 初步证明样品感染了 NNV。对 7月份随机采集的 100尾鱼进行 PCR检测, 其中 NNV一扩阳性有 5%, 二扩阳性 40%。

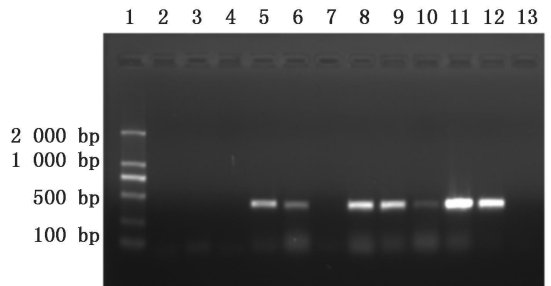


图 1 10个卵形鲳鲹样品 PCR扩增产物电泳图

Fig 1 Agarose gel of analysis of PCR products of 10 samples

1 Marker DL2000 2-11 10个样品, 12 阳性对照, 13 阴性对照

#### 2.4.2 克隆与测序

经过 PCR扩增, 得到长度约为 990 bp的片段。通过克隆、转化, 经蓝白斑筛选和菌落 PCR (图 2)筛选出阳性菌株。将阳性菌落扩大培养后进行序列测定得到含 1 017个碱基的外壳蛋白基因 (图 3)。采用 DNASTAR软件对该序列进行分析, 发现其编码 1个由 338个氨基酸组成, 分子量 37 069.92 ku的蛋白质, 等电点为 8.87。

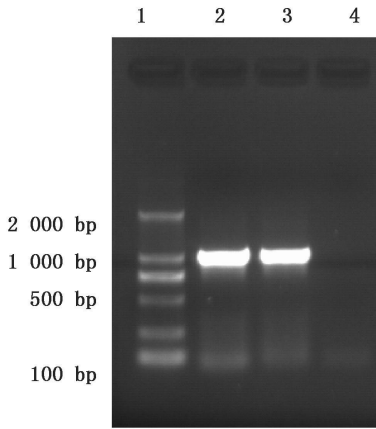


图 2 对转化产物的 PCR 鉴定结果

Fig 2 PCR electrophoresis of transformed product

1. Marker DL2000 2 转化产物; 3 阳性对照; 4 阴性对照.

### 2.4.3 序列分析

采用 DNAsar Mega 等软件对卵形鲳鲆神经坏死病毒湛江株外壳蛋白基因与 4 种基因型 20 株神经坏死病毒外壳蛋白基因 (表 1) 进行同源性

比较。结果表明,湛江病毒株 PNNV 和赤点石斑鱼神经坏死病毒 (red-spotted grouper nervous necrosis virus RGNNV) 基因型病毒株的相似率为 79.3%~99.2%, 其中与斜带石斑神经坏死病毒 (ECNNV) 的同源性最高, 只有 8 个核苷酸的差异; 与条斑星鲷神经坏死病毒 (barfin flounder nervous necrosis virus BFNNV) 基因型病毒株的相似率为 67.6%~81.8%; 与拟鲆神经坏死病毒 (striped jack nervous necrosis virus SJNNV) 基因型病毒株的相似率为 79.0%; 与红鳍东方鲀神经坏死病毒 (tiger puffer nervous necrosis virus TPNNV) 基因型病毒株的相似率为 65.0%。

对 PNNV 与 4 种基因型 20 株神经坏死病毒外壳蛋白基因进行分子进化分析并绘制系统进化树 (图 4)。结果显示, PNNV 处于 RGNNV 基因型主干分枝上, 并且与 YGNNV 处于同一分枝上, 亲缘关系最近, 而与 BENNV, SJNNV 和 TPNNV 3 种基因型亲缘关系较远。

1	ATG	GTA	CGC	AAA	GGT	GAG	AAG	AAA	TTG	GCA	AAA	CCC	GCG	ACC	ACC	AAG	GCC	GCG	AAT	CCG	60
1	M	V	R	K	G	E	K	K	L	A	K	P	A	T	T	K	A	A	N	P	20
61	CAA	CCC	CGC	CGA	CGT	GCT	AAC	AAT	CGT	CGG	CGT	AGT	AAT	CGC	ACT	GAC	GCA	CCT	GTG	TCT	120
21	Q	P	R	R	R	A	N	N	R	R	R	S	N	R	T	D	A	P	V	S	40
121	AAG	GCC	TCG	ACT	GTG	ACT	GGA	TTT	GGA	CGT	GGG	ACC	AAT	GAC	GTC	CAT	CTC	TCA	GGT	ATG	180
41	K	A	S	T	V	T	G	F	G	R	G	T	N	D	V	H	L	S	G	M	60
181	TCG	AGA	ATC	TCC	CAG	GCC	GTC	CTC	CCA	GCC	GGG	ACA	GGA	ACT	GAC	GGA	TAC	GTC	GTT	GTT	240
61	S	R	I	S	Q	A	V	L	P	A	G	T	G	T	D	G	Y	V	V	V	80
241	GAC	GCA	ACC	ATC	GTC	CCC	GAC	CTC	CTG	CCA	CGA	CTG	GGA	CAC	GCT	GCT	AGA	ATC	TTC	CAG	300
81	D	A	T	I	V	P	D	L	L	P	R	L	G	H	A	A	R	I	F	Q	100
301	CGA	TAC	GCT	GTT	GAA	ACA	TTG	GAG	TTT	GAA	ATT	CAG	CCA	ATG	TGC	CCC	GCA	AAC	ACG	GGC	360
101	R	Y	A	V	E	T	L	E	F	E	I	Q	P	M	C	P	A	N	T	G	120
361	GGT	GGT	TAC	GTT	GCT	GGC	TTC	CTG	CCT	GAT	CCA	ACT	GAC	AAC	GAC	CAC	ACC	TTC	GAC	GGC	420
121	G	G	Y	V	A	G	F	L	P	D	P	T	D	N	D	H	T	F	D	A	140
421	CTT	CAA	GCA	ACT	CGT	GGT	GCA	GTC	GTT	GCC	AAA	TGG	TGG	GAA	AGC	AGA	ACA	GTC	CGA	CCT	480
141	L	Q	A	T	R	G	A	V	V	A	K	W	W	E	S	R	T	V	R	P	160
481	CAG	TAC	ACC	CGT	ACG	CTC	CTC	TGG	ACC	TCG	TCG	GGA	AAG	GAG	CAG	CGT	CTC	ACG	TCA	CCT	540
161	Q	Y	T	R	T	L	L	W	T	S	S	G	K	E	Q	R	L	T	S	P	180
541	GGT	CGG	CTG	ATA	CTC	CTG	TGT	GTC	GGC	AAC	AAC	ACT	GAT	GTG	GTC	AAC	GTG	TCG	GTG	CTG	600
181	G	R	L	I	L	L	C	V	G	N	N	T	D	V	V	N	V	S	V	L	200
601	TGT	CGC	TGG	AGT	GTT	CGA	CTG	AGC	GTT	CCA	TCT	CTT	GAG	ACA	CCT	GAA	GAG	ACC	ACC	GCT	660
201	C	R	W	S	V	R	L	S	V	P	S	L	E	T	P	E	E	T	T	A	220
661	CCC	ATC	ATG	ACA	CAA	GGT	CCC	CTG	TAC	AAC	GAT	TCC	CTT	TCC	ACA	AAT	GAC	TTT	AAC	TCC	720
221	P	I	M	T	Q	G	P	L	Y	N	D	S	L	S	T	N	D	F	K	S	240
721	ATC	CTC	CTA	GGA	TCC	ACA	CCA	CTG	GAT	ATT	GCC	CCT	GAT	GGA	GCA	GTC	TTC	CAG	CTG	GAC	780
241	I	L	L	G	S	T	P	L	D	I	A	P	D	G	A	V	F	Q	L	D	260
781	CGT	CGG	CTG	TCC	ATT	GAC	TAC	AGC	CTT	GGA	ACT	GGA	GAT	GTT	GAC	CGT	GCT	GTT	TAT	TGG	840
261	R	P	L	S	I	D	Y	S	L	G	T	G	D	V	D	R	A	V	Y	W	280
841	CAC	CTC	AAG	TTT	GCT	GGA	AAT	GCT	GGC	ACA	CCT	GCA	GGC	TGG	TTT	CGC	TGG	CGC	TGG	ATC	900
281	H	L	K	K	F	A	G	N	A	G	T	P	A	G	W	F	R	W	G	I	300
901	TGG	GAC	AAC	TTC	AAT	AAG	ACG	TTC	ACA	GAT	GGC	GTT	GCC	TAC	TAC	TCT	GAT	GAC	CCC	960	
301	W	D	N	F	N	K	T	F	T	D	G	V	A	Y	Y	S	D	E	Q	P	320
961	CGT	CAA	ATC	CTG	CTG	CCT	GTT	GGC	ACT	GTC	TGC	ACC	AGG	GTT	GAC	TCG	GAA	AAC	TAA	1017	
321	R	Q	I	L	L	P	V	G	T	V	C	T	R	V	D	S	E	N	*	340	

图 3 卵形鲳鲆神经坏死病毒湛江株 PNNV 测序结果及其推导的氨基酸序列

Fig 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of panpano nervous necrosis virus (PNNV)

表 1 用于分子进化分析的病毒株  
Tab 1 Sources of NNV isolates used for molecular phylogenetic analysis

病毒株	GenBank登录号	编码的蛋白质	基因型
大西洋鲱鱼神经坏死病毒	AH45800	Coat protein gene partial cds	BFNNV
庸鲈神经坏死病毒	AH60473	coat protein gene partial cds	BFNNV
条纹星鲈神经坏死病毒	AH046377	Coat protein gene partial cds	BFNNV
舌齿鲈脑炎病毒	U39876	coat protein gene complete cds	RGNNV
龙海蛾鱼神经坏死病毒	AF245004	coat protein gene complete cds	RGNNV
青铜石斑脑炎病毒	AY284963	EA-040799-IL coat protein gene complete cds	RGNNV
斜带石斑鱼神经坏死病毒	AF534998	coat protein gene complete cds	RGNNV
巨石斑鱼神经坏死病毒	AF281657	coat protein gene complete cds	RGNNV
孔雀花鲈神经坏死病毒	AH99774	coat protein gene complete cds	RGNNV
牙鲆神经坏死病毒	D38527	gene for coat protein partial sequence	RGNNV
尖吻鲈脑炎病毒	AY284974	LC-121100-IL coat protein gene complete cds	RGNNV
黑线鳢神经坏死病毒	AY547549	Ha02 ac2 coat protein mRNA complete cds	BFNNV
鲮鱼脑炎病毒	AY284962	coat protein gene complete cds	RGNNV
玛拉巴石斑鱼神经坏死病毒	AF245003	coat protein gene complete cds	RGNNV
赤点石斑神经坏死病毒	NC_008041	RNA 2 complete sequence	RGNNV
红鳍笛鲷神经坏死病毒	AY140797	Firespot snapper nervous necrosis virus isolate FS99PD coat protein gene partial cds	RGNNV
黄石斑神经坏死病毒	AF283554	Yellow grouper nervous necrosis virus major coat protein gene partial cds	RGNNV
七带石斑神经坏死病毒	AY324870	Sua in SGW a97 coat protein gene complete cds	RGNNV
条纹鲈神经坏死病毒	NC_003449	RNA2 complete sequence	SNNV
虎斑东方鲀神经坏死病毒	D38637	gene for viral coat protein partial sequence	TPNNV

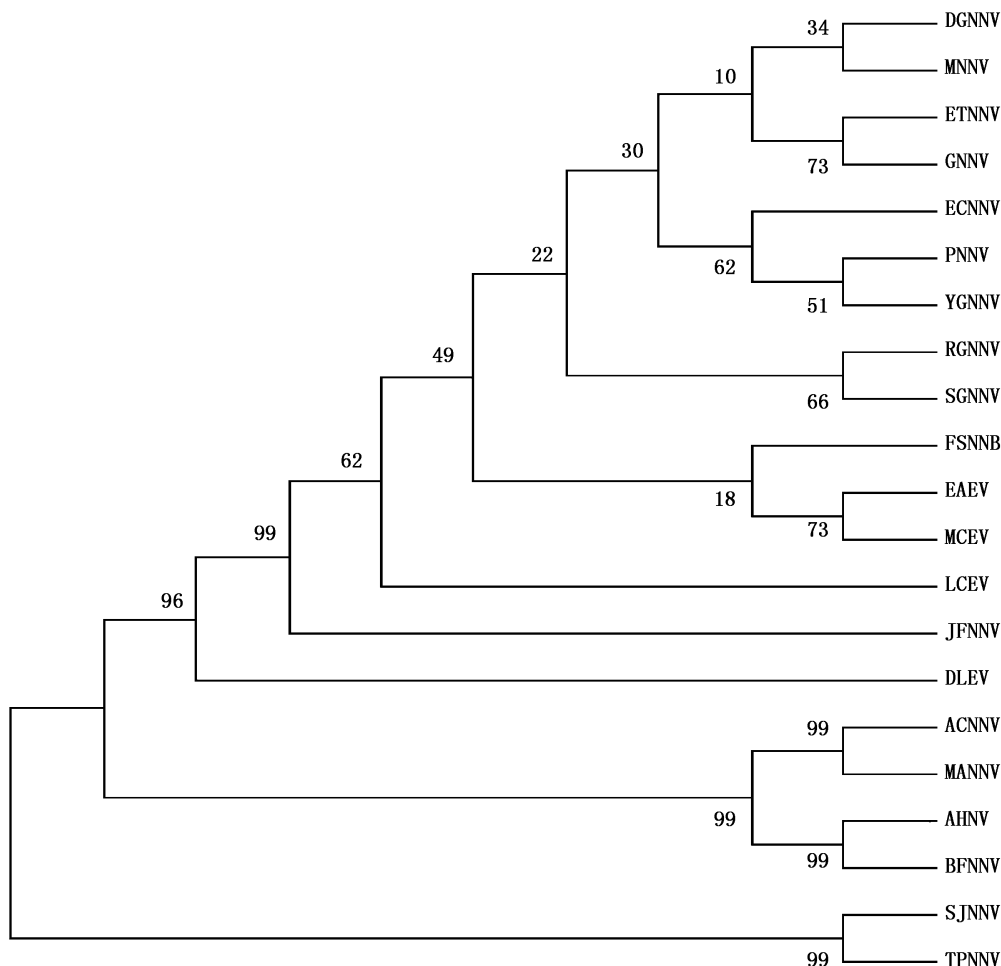


图 4 根据 PNNV 与其他 20 株神经坏死病毒外壳蛋白基因核苷酸序列建立的分子系统进化树

Fig 4 Molecular Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of PNNV and other twenty NNV isolates

## 2.5 人工感染试验

实验鱼感染病毒 4 d后,陆续出现食欲下降、体色较深或发黑、游动无力、行为反应迟钝、身体失去平衡等病毒性神经坏死病典型症状。死亡集中在攻毒后 8~11 d攻毒后 12 d各感染组累计死亡率均达 100%,而对照组无死亡。

对人工感染实验中典型症状鱼脑组织提取总 RNA 并进行 PCR 扩增,一扩阳性 90%。将 PCR 产物进行克隆测序,得到含 1 017 个碱基的外壳蛋白基因。采用 DNA star 对测序所得到的序列与 PNNV 进行比对,二者完全相同。

## 3 讨论

鱼类病毒性神经坏死症 (Viral nervous necrosis VNN) 是一种世界性的鱼类流行性传染病<sup>[8]</sup>,感染的鱼种类繁多,包括 5 个目<sup>[9-13]</sup> 17 科的 40 多种鱼类。鱼类神经坏死病毒对仔鱼和幼鱼危害很大,严重者在一周内死亡率可达 100%<sup>[14]</sup>。此次湛江爆发的大规模死亡的卵形鲳鲹症状与神经坏死病毒感染产生的症状相同,对症状典型的个体进行检测,未发现能引起大规模死亡的细菌、寄生虫等病原体,经 nested-PCR 检测发现有 60% 以上的样品携带有鱼类神经坏死病毒。2008 年 7 月份我们对存活下来的鱼进行大批量采样进行检测,结果显示一扩阳性有 5%,而二扩阳性有 40%。检测结果阳性率较低,可能是由于采样在发病高峰期以后,感染 NNV 的鱼已经死亡,而存活下来的鱼对该病毒已具有部分抗性,本身免疫系统可以将病毒清除体外。

根据 NNV 外壳蛋白基因序列,NNV 分为 4 种基因型<sup>[15]</sup>。到目前为止,我国报道的养殖鱼类感染的 NNV 都属于 RGNNV<sup>[16-17]</sup>。本研究中克隆的 PNNV 外壳蛋白的基因序列长 1 017 bp 编码 1 个由 338 个氨基酸所组成的蛋白。将 PNNV 与 4 种基因型中的 20 株病毒株进行同源性比对和分子进化分析,结果显示,PNNV 与 ECNNV 外壳蛋白核酸序列相似率最高,达到 99.2%,并且在分子系统进化树中与 RGNNV 的亲缘关系较其他 3 种基因型的病毒更近。Nishizawa 等<sup>[18]</sup>认为 SNNV 外壳蛋白基因上的中和表位很可能位于氨基酸序列 C 末端可变区,并且其 254-256 位的氨基酸残基 PAN 最有可能是一个主要的抗原中和表位,而 RGNNV、TPNNV 和 BFNNV 在该位

置的氨基酸残基分别为 PDG、PPG 和 PEG,同时这些氨基酸残基在各自的基因型中是绝对保守的。经 DNA tool 等软件对 PNNV 分析并推导氨基酸序列后,发现 PNNV 氨基酸序列在该位置含有的氨基酸残基为 PDG,因此卵形鲳鲹神经坏死病毒湛江株 PNNV 属于 RGNNV 基因型。

Peducass 等<sup>[19]</sup>证明 NNV 可经口服感染流行,宋振荣<sup>[20]</sup>认为病毒可由水体经皮肤侵入鱼的神经组织。本文对卵形鲳鲹的 4 种感染方式,累积死亡率均达到 100%,证明 PNNV 对卵形鲳鲹致病性高,发病后死亡率高,同时也证明了 NNV 可以通过以上两种方式感染卵形鲳鲹。对典型症状鱼脑组织总 RNA 进行 PCR 扩增,一扩阳性 90%,而克隆测序所得序列也与 PNNV 完全相同。综上所述,神经坏死病毒感染可能是导致此次卵形鲳鲹大规模死亡的主要原因。

## 参考文献:

- [1] 成庆泰,郑葆珊.中国鱼类系统检索[M].北京:科学出版社,1987:341-342.
- [2] 张邦杰,梁仁杰,王晓斌,等.卵形鲳鲹 *Trachinotus ovatus* (Linnaeus) 的引进、咸、海水池养与越冬[J].现代渔业信息,2001,16(3):16-20.
- [3] 周永灿,朱传华,张本,等.卵形鲳鲹大规模死亡的病原及其防治[J].海洋科学,2001,25(4):40-44.
- [4] 赵典惠,刘丽波,孙际佳,等.用美人鱼弧菌与创伤弧菌人工感染卵形鲳鲹的组织病理学研究[J].大连水产学院学报,2007,22(6):455-459.
- [5] Li Guifeng, Zhao Dianhui, Huang Lu, et al. Identification and Phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture [J]. *Aquaculture*, 2006, 261: 17-25.
- [6] 但学明,李安兴,林小涛,等.卵形鲳鲹对刺激隐核虫的免疫应答和免疫保护研究[J].水生生物学报,2008,32(1):13-18.
- [7] 王江勇,郭志勋,黄剑南,等.一起卵形鲳鲹幼鱼死亡原因的调查[J].南方水产,2006,2(3):54-56.
- [8] Compston P, Pinn J, F Bonami J R. Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lateolabrax niloticus* and *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquaculture*, 1996, 12: 1-10.
- [9] Chi S C, Shieh J R, Lin S J. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55: 221-228.
- [10] Johnson S C, Sperker S A, LeGros C T, et al. Identification and characterization of a piscine neuropathy and nodavirus from juvenile Atlantic cod from the Atlantic coast of North America [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2002, 14: 124-133.

- [ 11] Bovo G, Nishizawa T, Maltese C, et al. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy [ J]. *Virus Res* 1999, 63: 143—146
- [ 12] Bergh O, Nilsen F, Samuelsen O B, et al. Diseases prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review [ J]. *DisAquatOrgan* 2001, 48 (1): 57—74
- [ 13] Munday B L, Kwang J, Moody N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review [ J]. *JFISH Dis* 2002, 25: 127—142
- [ 14] Mori K, Nakai T, Muroga K, 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.
- [ 15] 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
- [ 16] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in China [ J]. *Fish Pathology* 2001, 36: 186—188
- [ 17] 陈晓艳, 何建国. 斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白抗体的制备 [ J]. *中国水产科学*, 2006, 13(5): 841—844.
- [ 18] Nishizawa T, Takano R, Muroga K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus [ J]. *Journal of General Virology* 1999, 80: 3023—3027
- [ 19] Peducasse S, Castre J, Thiery R, et al. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways [ J]. *DisAquat Organ* 1999, 36: 11—20.
- [ 20] 宋振荣. 神经坏死症病毒对长缙鲆仔鱼的感染及在体内的传播 [ J]. *中国水产科学*, 2003, 10(6): 462—468.

## 欢迎订阅 2011年《上海海洋大学学报》

《上海海洋大学学报》为上海海洋大学主办, 面向全国的以海洋、水产科学技术为主的综合性学术刊物。前身为《上海水产大学学报》, 2009年起因学校更名而变更刊名。主要刊登研究论文, 少量刊登综述、评述、简讯, 并酌登学术动态和主要书刊评介等。目前学报是《中国科学引文数据库》来源期刊, 《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊, 万方数据—数字化期刊群全文收录期刊, 中国科技论文统计源核心期刊, 水产渔业类中文核心期刊。

本刊为双月刊, 大 16开, 国内外公开发行。每期单价: 10.00元。国际标准刊号: ISSN 1674—5566 国内统一刊号: CN31—2024/S 国内邮发代号: 4—604 国际发行代号: 4822Q 读者可在当地邮局订阅, 也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部联系地址: 上海市临港新城沪城环路 999号, 上海海洋大学 201信箱

邮政编码: 201306

联系人: 张海宁, 孙海燕

联系电话: 021—61900229

传 真: 021—61900227

E-mail: xueba@shou.edu.cn