

文章编号: 1674 - 5566(2014)01 - 0008 - 07

白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析

童桂香¹, 黎小正¹, 韦信贤^{1,2}, 杨先乐², 张益峰¹, 吴祥庆¹, 叶欣宇¹, 黄国秋¹

(1. 广西水产科学研究院, 广西 南宁 530021; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了解广西养殖凡纳滨对虾中白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的感染流行情况,并探讨 WSSV 广西株缺失区 ORF23/24 基因的遗传进化差异及其与各地 WSSV 毒株间的遗传进化关系,2010 年 5 月至 2013 年 9 月在广西凡纳滨对虾主产区北海、钦州和防城港共采集 306 份患病虾样品,应用世界动物卫生组织(OIE)推荐的套式聚合酶链式反应(nested-PCR)方法进行 WSSV 检测;选取第一轮 PCR 为阳性的 53 份样品进行缺失区 ORF23/24 基因的 PCR 扩增,并将 12 份阳性 PCR 产物进行克隆、序列测定与比较分析。结果显示:306 份患病虾样品中有 82 份为 WSSV 感染阳性,阳性率为 26.8%;12 株 WSSV 广西株缺失区 ORF23/24 基因大小均为 2 096 bp,相对于此区域最为完整的 WSSV-TW 株,广西株均在中间缺失了 10 970 bp;12 株 WSSV 广西株的缺失区 ORF23/24 基因差异小,核苷酸同源性均在 99.6%以上,仅存在少数碱基的替换,没有缺失和插入,其中 BH-3、QZ-1、FCG-1 和 FCG-2 的核苷酸序列完全一致;基于缺失区构建的系统发育进化树显示,WSSV 广西地方株在遗传上相距较近,全部与印度株 IN-05- I 聚在一个大的分支,而与台湾株、中国株及韩国株在遗传上相距较远。研究表明,WSSV 感染在广西凡纳滨对虾主要养殖地区存在一定程度的流行;广西 WSSV 毒株缺失区 ORF23/24 基因的变异类型为中间大片段缺失,各毒株间无明显的地域和时间差异;WSSV 广西株与印度株 IN-05- I 的遗传进化关系最近。

研究亮点: WSSV 感染在广西养殖凡纳滨对虾中普遍存在,但迄今为止,未见有广西 WSSV 分子流行病学调查研究的相关资料报道。本研究对广西 WSSV 流行毒株进行缺失区 ORF23/24 基因的比较分析研究,可从分子水平揭示 WSSV 广西株的遗传进化差异及其与各地 WSSV 毒株间的遗传进化关系,是 WSSV 分子流行病学研究的很好补充,可为分析广西 WSSV 毒株的传播途径、进化历程、毒力变异及分子流行病学规律提供基础资料。

关键词: 凡纳滨对虾;白斑综合征病毒;ORF23/24 基因;序列分析

中图分类号: S 945.4; S 917

文献标志码: A

白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)是引起对虾白斑综合征(white spot syndrome, WSS)的主要病原,WSS 以其传染性强、病程短、死亡率高的发病特征成为全球对虾养殖业所面临的危害性最大的病害,被世界动物卫生组织(OIE)列为必须申报的疾病,也被我国列为一类动物疫病。该病 20 世纪 90 年代最先暴发于我国福建,在此后的十年时间内,迅速蔓延到世界主要对虾养殖地区,不仅给世界对虾养殖业以及相关产业造成了不可估量的损失,同时也对整

个海洋生态的平衡造成了严重威胁^[1-3]。WSSV 为大型的双链 DNA 分子病毒,基因组大小约 300 kb,隶属于线头病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus),是该科的唯一成员^[4]。目前 GenBank 上公布了 4 个 WSSV 分离株的基因组全序列:泰国株 292 967 bp(WSSV-TH, AF369029)、中国大陆株 305 108 bp(WSSV-CN, AF332093)、台湾株 307 287 bp(WSSV-TW, AF440570)以及最近公布的韩国株 295 884 bp(WSSV-Korea, JX515788),序列长度差异在 15 kb 之间,这就预示着在 WSSV 的基因组序列中存在有差异的位

收稿日期: 2013-10-11

修回日期: 2013-11-26

基金项目: 广西公益性行业(农业)科研专项(GXIF-2012-18);广西自然科学基金(2013GXNSFBA019122)

作者简介: 童桂香(1982—),女,工程师,硕士,研究方向为水产品检验检疫和渔业病害防治。E-mail:tgx15@163.com

通信作者: 韦信贤,E-mail:Byang15@126.com

点。MARKS 等^[5]通过基因组全序列比对归纳出 WSSV-TH、WSSV-CN 和 WSSV-TW 3 个分离株存在 5 个主要的差异,分别是:(1)大片段序列缺失区 ORF23/24;(2)易于发生基因重组的变异区 ORF14/15;(3)转座酶基因序列存在与否;(4)同源重复区内重复单元数目不等;(5)单核苷酸的缺失、插入及多态性。DIEU 等^[6]研究结果表明大片段序列缺失区 ORF23/24 基因的缺失大小能反映不同地区 WSSV 毒株间的遗传进化关系,可作为分子流行病学及遗传进化追溯研究的首选对象。凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 是广西沿海地区对虾养殖的主要品种,具有优良的生产性能,但对 WSSV 高度易感。为了解 WSSV 在广西养殖凡纳滨对虾中的感染流行情况和分子流行病学特征,本研究对 2010 年 5 月至 2013 年 9 月在广西凡纳滨对虾主产区采集的 306 份患病虾样品进行了 WSSV 检测;并在此基础上选取第一轮 PCR 为阳性的 53 份样品进行缺失区 ORF23/24 基因的 PCR 扩增、克隆和测序分析,希望以此来探讨 WSSV 不同病毒株间的遗传进化差异,为 WSSV 传播、遗传进化以及分子流行病学研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集

本实验室于 2010 年 5 月至 2013 年 9 月在广西凡纳滨对虾主产区北海、钦州和防城港 3 个市共采集 306 份患病虾样品,来源信息见表 1。所有样品采集后当天冷藏运输至实验室后冷冻保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

表 1 样品采集情况

Tab.1 Composition of the samples

| 采样地点 | 采样数量/份 | | | | 合计/份 |
|------|--------|------|------|------|------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | |
| 北海市 | 39 | 23 | 28 | 21 | 111 |
| 钦州市 | 18 | 31 | 18 | 16 | 83 |
| 防城港市 | 26 | 38 | 23 | 25 | 112 |
| 合计 | 83 | 92 | 69 | 62 | 306 |

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 快速提取试剂盒 (DNeasy Blood & Tissue Kit) 购自德国 Qiagen 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、LA Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量

标准 DL2000 和 DL5000、琼脂糖凝胶回收试剂盒、pMD18-T 克隆载体、感受态细胞 DH5 α 均购自宝生物工程(大连)有限公司;LB 培养基、氨苄青霉素购自上海生工生物工程技术有限公司。扩增 WSSV 及其缺失区基因的引物信息^[7-8]见表 2,由宝生物工程(大连)有限公司合成。TC-5000 基因扩增 (PCR) 仪为英国 TECHNE 公司产品;核酸电泳仪为德国 Biometra 公司产品;凝胶成像系统为英国 UVItec 公司产品。

1.2 样品的 PCR 检测

1.2.1 病毒核酸提取

虾苗样品经无菌纱布过滤收集后全部研磨匀浆,对 11 d 和 11 d 以上的幼虾去眼后再研磨,中成虾样品收集所有虾的鳃研磨匀浆;取 20 ~ 30 mg 研磨好的组织至 1.5 mL 离心管,按照 DNA 快速提取试剂盒说明书进行 DNA 提取,最后加 50 μL 灭菌水溶解,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 PCR 反应

参照 OIE《水生动物疫病诊断手册》^[7],用套式 PCR 方法进行 WSSV 的检测。采用 50 μL 反应体系:在 PCR 反应管内加入 $10\times$ buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1 μL , Ex Taq 酶 (5 U/ μL) 0.3 μL , 待检 DNA 5 μL , 引物 146F1 和 146R1 (20 mmol/L) 各 1 μL , 加灭菌水补足 50 μL ; PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应。取 5 μL 产物为模板,采用引物 146F2 和 146R2 按上述反应体系和反应条件进行第二轮 PCR。两轮 PCR 产物均于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并在凝胶成像系统中观察、拍照。被检样品经第一轮 PCR 扩增后电泳能出现 1 447 bp 的条带,或经第二轮 PCR 后电泳出现 941 bp 的条带均可判为 WSSV 阳性(表 2)。

1.3 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因的扩增

挑选 1.2 中第一轮 PCR 为阳性的凡纳滨对虾样品 DNA 用于扩增 WSSV 基因组的缺失区 ORF23/24 基因。50 μL PCR 反应体系包括: $10\times$ buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1 μL , LA Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.3 μL , 待检 DNA 5 μL , 引物对 VR23/24-screenF/R 或 VR23/24-southF/1R (20 mmol/L) 各 1 μL , 加灭菌水补足 50 μL ; PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94

℃变性 30 s,各对引物退火和延伸条件见表 2,进行 35 个循环;72 ℃延伸 10 min;4 ℃结束反应。

PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并在凝胶成像系统中观察拍照。

表 2 引物信息

Tab.2 PCR primer pairs and cycling condition

| 引物名称 | 序列(5'-3') | 退火温度/℃,时间/s /延伸温度/℃,时间/s | 理论产物大小/bp | | |
|------------------------------------|--|-----------------------------|-----------|--------|----|
| | | | TW | CN | TH |
| 146F1 146R1 | ACTACTAAGCTTCAGCCTATCTAG TAATGCCGGGTGTAATGTTCTTACGA | 55,45 / 72,90 | | 1 447 | |
| 146F2 146R2 | GTAAGTGCCTTCATCTCCA TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT | 55,45 / 72,90 | | 941 | |
| VR23/24-screenF VR23/24-screenR | CACACTTGAAAAATACACCAG GTAAGTTTATTGCTGAGAAG | 49,60 / 72,540 | 9 088 | 7 927 | - |
| VR23/24-southF VR23/24-1R | CTACAACGGCCAAGTCAT ATGATTGTATTTCGCGAAGG | 52,60 / 72,780 | 13 066 | 11 905 | - |

注:TH、CN、TW 分别为 WSSV 泰国株、中国大陆株和台湾株,“-”表示该引物扩增不出 TH 株的缺失区基因。

1.4 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因的克隆及序列分析

将 1.3 中的阳性 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收纯化后与载体 pMD18-T 连接、转化 DH5 α 感受态细胞,在含有 IPTG、X-gal 的平板培养基上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落接种于添加氨苄青霉素的 LB 肉汤培养液中 37 ℃振荡培养过夜,取培养物为模板按 1.3 方法进行 PCR 鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 双向测序。采用 DNASTar 软件对测序结果进行序列比对分析,以 WSSV-TW 的 ORF23/24 基因序列作为参照,找出广西株序列缺失的位置及缺失片段大小;同时对广西各毒株和 GenBank 已公布的 WSSV-TH、

WSSV-CN 和 WSSV-TW 等毒株的 ORF23/24 基因序列进行同源性分析;用 MEGA 5.0 软件选用 Neighbor Joining 法进行系统发育进化树的构建,并进行 1 000 次 Bootstraps 重复检验。

2 结果

2.1 WSSV 的 PCR 检测结果

应用套式 PCR 方法对采集的 306 份患病凡纳滨对虾样品进行检测的结果见表 3, WSSV 阳性样品有 82 份,总阳性率为 26.8%,而北海、钦州和防城港 3 个市的阳性率分别为 34.2%、22.9%、22.3%;其中有 53 份样品为第一轮 PCR 阳性,图 1 为部分样品第一轮 PCR 阳性的电泳结果。

表 3 凡纳滨对虾样品 WSSV 检测结果

Tab.3 Investigation of WSSV by PCR among *P. vannamei* samples

| 采样地点 | 样品数/份 | 阳性数/份 | 阳性率/% | 第一轮 PCR 阳性数/份 |
|------|-------|-------|-------|---------------|
| 北海市 | 111 | 38 | 34.2 | 28 |
| 钦州市 | 83 | 19 | 22.9 | 13 |
| 防城港市 | 112 | 25 | 22.3 | 12 |
| 合计 | 306 | 82 | 26.8 | 53 |

2.2 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因的扩增

选择上述 53 份第一轮 PCR 为阳性的凡纳滨对虾样品,通过扩增片段逐渐增大的引物对 VR23/24-screenF/R 和 VR23/24-southF/1R 进行 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因的 PCR 扩增。用引物 VR23/24-screenF/R 对所有 53 份样品进行扩

增,均没有得到阳性 PCR 产物;用引物 VR23/24-southF/1R 进行扩增时,有 12 份样品可扩增出大小约 2 100 bp 的基因片段,从电泳图看,各毒株的扩增片段大小差异不明显,见图 2。12 份样品的具体来源信息见表 4。

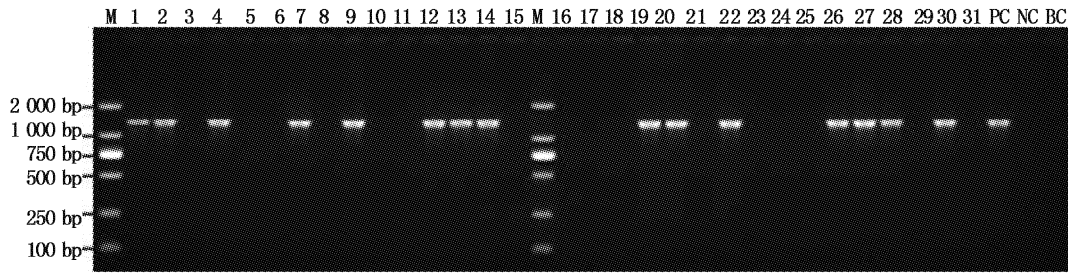


图1 部分被检凡纳滨对虾样品第一轮 PCR 检测结果

Fig. 1 Detection of WSSV by first step PCR among *P. vannamei* samples

M. DL2000 分子量标准; 1-31. 被检样品; PC. 阳性对照; NC. 阴性对照; BC. 空白对照。

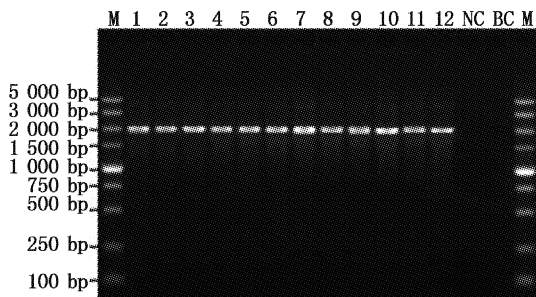


图2 PCR 扩增 WSSV 缺失区电泳结果

Fig. 2 PCR amplification of deletion regions of WSSV

M. DL5000 分子量标准; NC. 阴性对照; BC. 空白对照; 1-12. 对应表 4 的毒株编号 1-12。

表 4 12 份样品来源信息

Tab. 4 Details of *Penaeus vannamei* samples from twelve farms in Guangxi

| 编号 | 毒株 | 采样地点 | 采样时间 | 样品规格 |
|----|-------|------|-----------|------|
| 1 | QZ-1 | 钦州市 | 2010-6-8 | 成虾 |
| 2 | BH-1 | 北海市 | 2010-6-10 | 虾苗 |
| 3 | BH-2 | 北海市 | 2010-9-12 | 成虾 |
| 4 | QZ-2 | 钦州市 | 2010-9-13 | 成虾 |
| 5 | FCG-1 | 防城港市 | 2010-9-14 | 成虾 |
| 6 | QZ-3 | 钦州市 | 2011-5-10 | 虾苗 |
| 7 | BH-3 | 北海市 | 2011-5-24 | 成虾 |
| 8 | QZ-4 | 钦州市 | 2011-9-13 | 成虾 |
| 9 | BH-4 | 北海市 | 2011-9-14 | 成虾 |
| 10 | FCG-2 | 防城港市 | 2011-9-15 | 成虾 |
| 11 | BH-5 | 北海市 | 2012-5-9 | 虾苗 |
| 12 | FCG-3 | 防城港市 | 2012-9-19 | 成虾 |

2.3 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因的克隆及序列分析

将上述 12 份样品的 PCR 产物纯化后克隆入 pMD18-T 载体,重组质粒经 PCR 鉴定均得到相应

大小的目的片段,说明目的片段均成功克隆入 pMD18-T 载体。将 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行 DNA 双向测序,结果显示:12 株 WSSV 广西株缺失区 ORF23/24 基因大小均为 2 096 bp(其中 1 株 GenBank 登录号为 KC484341),存在大片段缺失;以 ORF23/24 区域最为完整的 WSSV-TW 株作为参照,将所得各分离株序列与 GenBank 已公布的 WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-TH、越南株(VN-C)和印度株(IN-05-I)变异区 ORF23/24 基因的核苷酸序列进行比对分析。从比对图(图 3)可见,相对于 WSSV-TW 株,12 株 WSSV 广西株在 ORF23/24 区域都缺失了 10 970 bp,缺失的位置相当于 WSSV-TW 株 ORF23/24 基因的 3 373-14 342 bp 处,比 WSSV-CN 和 VN-C 分别多缺失了 9 802 bp 和 2 431 bp,而比 WSSV-TH 株少缺失了 2 240 bp。

对 12 株广西 WSSV 毒株及 GenBank 已公布的 WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea、IN-05-I 毒株的 ORF23/24 基因核苷酸序列进行同源性分析。结果显示,12 株 WSSV 广西株的缺失区 ORF23/24 基因差异小,核苷酸同源性均在 99.6% 以上,仅存在少数碱基的替换,没有缺失和插入,其中 BH-3、QZ-1、FCG-1 和 FCG-2 的核苷酸序列完全一致;12 株广西株与 WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea、IN-05-I 的同源性分别为 60.3%~60.5%、60.3%~60.5%、60.2%~60.4%、99.4%~99.6%。基于缺失区构建的系统发育进化树结果显示(图 4),WSSV 广西地方株在遗传上相距较近,全部与印度株 IN-05-I 聚在一个大的分支,而与 WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea 均相距较远。

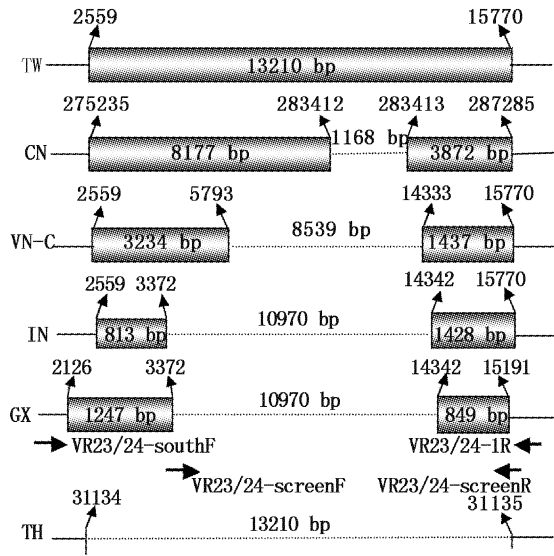


图3 WSSV 不同毒株间 ORF23/24 区域的序列比对
 Fig. 3 Schematic representation of deletion region ORF23/24 of different known WSSV strains

图中 TW、CN 和 TH 株箭头上方数字表示各自在 NCBI 数据库的对应位置；VN-C、IN、GX 分别代表越南中部株、印度株、广西株，其箭头上方数字表示相对于台湾株位置。矩形表示变异区两端序列，矩形内的数字代表核苷酸数目；虚线表示相比台湾株缺失的序列；横线箭头表示引物位置。

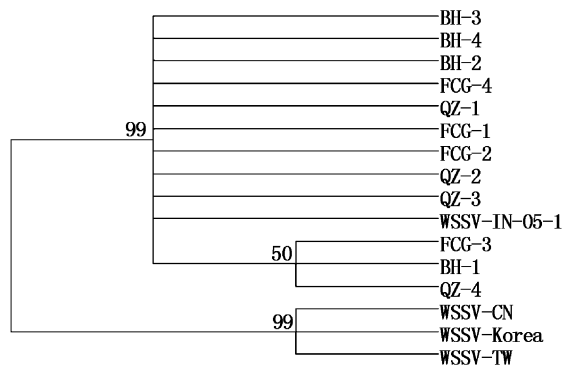


图4 基于 WSSV 缺失区 ORF23/24 基因构建的各分离株进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of WSSV deletion region ORF23/24

3 讨论

本实验室对 2010 年 5 月至 2013 年 9 月从广西凡纳滨对虾主产区北海、钦州和防城港 3 个市采集的共 306 份患病虾样品进行了 WSSV 的检测，总阳性率为 26.8%，其中北海、钦州和防城港 3 个市的阳性率分别为 34.2%、22.9%、22.3%，说明 WSSV 感染在广西凡纳滨对虾主要养殖地

区均存在一定程度的流行，同时也说明 WSS 是广西养殖凡纳滨对虾主要发生的疾病之一。相比而言，北海市是广西凡纳滨对虾 WSSV 感染最为严重的地区，钦州市和防城港市 WSSV 感染情况相近，都略轻于北海市。原因可能是北海市的凡纳滨对虾养殖量、市场流通量都比钦州市和防城港市大，因此，北海市一旦发生 WSSV 疫情，其传播速度更快、受危害的面积更大。经调研，近几年广西养殖凡纳滨对虾的部分虾塘出现不同程度的死虾，死亡率在 6% ~ 100% 不等，这可能与养殖凡纳滨对虾感染 WSSV 有关。因此，急需加强广西 WSSV 防控研究工作，确保凡纳滨对虾养殖业的健康可持续发展；而研究 WSSV 不同病毒株间的遗传进化差异，可为 WSSV 传播、遗传进化以及分子流行病学研究提供参考资料，是 WSSV 防控研究工作的重要组成部分。

病毒的保守基因通常被用于分子进化分析，而 WSSV 保守基因在不同毒株之间具有较高的相似性，其毒株间主要结构蛋白核苷酸同源性达 99.5% ~ 100% [8]，研究 WSSV 的分子进化关系时保守基因便失去了其优势。因此，一般选择可变性最高的区域来分析 WSSV 各分离株的系统进化关系。高变区 ORF23/24 在不同地域的 WSSV 毒株呈现不同程度的缺失，是 WSSV 基因组上重要的变异区，可以反映病毒遗传进化的特征；且是独立进化的，是研究 WSSV 分子流行病学特征的重要线索 [9]。本研究采用扩增片段逐渐增大的两对引物 VR23/24-screenF/R 和 VR23/24-SouthF/1R 对 53 份第一轮 PCR 为 WSSV 阳性的凡纳滨对虾样品进行高变区 ORF23/24 基因的 PCR 扩增，结果仅有 12 份样品采用扩增片段较大的 VR23/24-SouthF/1R 引物进行扩增时得到扩增产物，而有 41 份样品用 VR23/24-screenF/R 和 VR23/24-SouthF/1R 引物进行扩增时均没有得到任何扩增产物，原因可能是这些 WSSV 毒株缺失引物结合位点或者在高变区 ORF23/24 区域缺失大于 13 kb，与 PRADEEP 的研究结果相似 [10]。

将用 VR23/24-SouthF/1R 引物进行扩增得到的 12 份 PCR 产物进行克隆和测序分析，结果 12 株 WSSV 广西株缺失区 ORF23/24 基因大小均为 2 096 bp，相对于 ORF23/24 区域最为完整的 WSSV-TW 株，广西株均在中间缺失了 10 970

bp,缺失的核苷酸数目和位置与印度株 IN-05- I 和部分中国浙江株一致^[10-11],结合前面的结果,WSSV 广西株在 ORF23/24 区域内相比 WSSV-TW 株缺失 10 970 bp 或大于 13 kb;经同源性比较,12 株广西株的缺失区 ORF23/24 基因差异小,核苷酸同源性均在 99.6% 以上,仅存在少数碱基的替换,没有缺失和插入,其中 BH-3、QZ-1、FCG-1 和 FCG-2 的核苷酸序列完全一致;基于缺失区构建的系统发育进化树显示,WSSV 广西地方株在遗传上相距较近,全部与印度株 IN-05- I 聚在一个大的分支,与目前发表的其他毒株均相距较远。综上所述可知,广西 WSSV 毒株缺失区 ORF23/24 基因的变异类型为中间大片段缺失,各毒株间无明显的地域和时间差异;WSSV 广西株与印度株 IN-05- I 的遗传进化关系最近。

DIEU 等^[9]和 MARKS 等^[12]曾假设现在流行的 WSSV 毒株都是由一个共同的祖先株变异而来,这个祖先株起源于台湾海峡通过在 ORF23/24 区域逐渐缺失各种长度(1168 ~ 13210 bp)而传播到世界各地,但其发生缺失的机制目前还不清楚。DIEU 等^[6]研究发现 WSSV 越南分离株在 ORF23/24 区域内相比 WSSV-TW 株缺失 8 539 ~ 13 210 bp,且其缺失的大小具有明显的空间分布特征:最小缺失的毒株出现在越南中部,较大缺失的毒株出现在越南南部和北部;由此推测 WSSV 是由越南中部传入并向越南其他地区扩散传播的,WSSV 基因组缺失的长度有随着时间的推移及其在养殖对虾中的传播而增加的趋势。PRADEEP 等^[10]研究发现 WSSV 印度分离株在 ORF23/24 区域内相比 WSSV-TW 株缺失 10 970 bp 或大于 13 kb;而中国不同地区的 WSSV 毒株相比 WSSV-TW 株在 ORF23/24 区域缺失 5 648 ~ 11 129 bp^[10,13-16],但 WSSV 中国株 ORF23/24 缺失大小与地域和时间无关^[15]。从目前国内外对不同时间和空间 WSSV 毒株 ORF23/24 基因研究的情况来看,WSSV 毒株的进化历程与上述 MARKS 等^[12]和 DIEU 等^[9]提出的假设基本一致,但其缺失的大小与 WSSV 遗传进化之间的联系在不同地区不尽相同;虽然 WSSV 越南分离株在 ORF23/24 区域内的缺失大小可以从空间上说明其进化特征,但对于幅员辽阔的中国,不同地区的 WSSV 毒株 ORF23/24 基因缺失的大小多种多样,其与 WSSV 进化之间的联系还不明确;但

可以肯定的是中国境内存在 ORF23/24 区域缺失大小不同的多种 WSSV 基因型,而不同基因型之间的遗传进化关系尚待进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] 蔡生力,黄健,王崇明,等. 1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报,1995,19(2):112-119.
- [2] LO C F, HSU H C, TSAI M F, et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 35(3): 175-185.
- [3] FLEGEL T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13(4): 433-442.
- [4] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV[J]. Archives of virology, 2002, 147(8): 1655-1656.
- [5] MARKS H, GOLDBACH R W, VLAK J M, et al. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus[J]. Archives of Virology, 2004, 149(4): 673-697.
- [6] DIEU B T M, MARKS H, ZWART M P, et al. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales[J]. Journal of General Virology, 2010, 91(5): 1164-1172.
- [7] Office International Des Epizooties. Manual of diagnostic tests for aquatic animals[DB/OL]. <http://www.oie.int/>.
- [8] MOON C H, DO J W, CHA S J, et al. Highly conserved sequences of three major virion proteins of a Korean isolate of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 53(1): 11-13.
- [9] DIEU B T M, MARKS H, SIEBENGA J J, et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam[J]. Journal of General Virology, 2004, 85(12): 3607-3618.
- [10] 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.
- [11] 余晓巍. 浙东沿海地区对虾白斑综合征病毒分子流行病学研究[D]. 宁波:宁波大学,2009:1-50.
- [12] MARKS H, VAN DUJSE J J A, ZUIDEMA D, et al. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp[J]. Virus Research, 2005, 110(1): 9-20.
- [13] 于洪涛. 中国境内白斑综合征病毒(WSSV)分离株的序列差异分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2008:1-96.
- [14] 薛晖,王晓丰,丁正峰,等. 白斑综合征病毒江苏分离株变异区和缺失区基因的序列比较[J]. 中国水产科学,2011, 18(5):1196-1201.
- [15] TAN Y W, SHI Z L. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998-1999[J]. Virologica Sinica, 2011, 26(2): 123-130.

- [16] TAN Y, XING Y, ZHANG H, et al. Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007 [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2009, 32(9): 777-784.

Comparative analysis of deletion region of white spot syndrome virus genome among isolates in Guangxi

TONG Gui-xiang¹, LI Xiao-zheng¹, WEI Xin-xian^{1,2}, YANG Xian-le², ZHANG Yi-feng¹, WU Xiang-qing¹, YE Xin-yu¹, HUANG Guo-qiu¹

(1. *Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021, Guangxi, China*; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: To understand the prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) of cultured *Penaeus vannamei* (*P. vannamei*) in Guangxi Province and to evaluate the genetic diversity of deletion region ORF23/24 and the genetic evolution lineage among WSSV isolates of Guangxi Province and other places, we collected 306 diseased *P. vannamei* samples between May 2010 and September 2013 from Beihai, Qinzhou and Fangchenggang City in Guangxi Province, and the detection of WSSV among these samples was carried out using the nested polymerase chain reaction (nested PCR) recommended by Office International Des Epizooties (OIE). We selected 53 positive samples found by first step PCR for amplification of the deletion regions ORF23/24 of the WSSV genome, and 12 PCR amplifications were used to clone and sequence. We then conducted a pairwise and multiple alignment analysis to evaluate the degree of genetic divergence among different strains. The results were as follows: 82 of 306 samples were positive for WSSV, and the positive rate was 26.8%; 12 Guangxi strains were 2096 bp in length and carried a 10970 bp deletion in the ORF23/24 region relative to WSSV-TW, which has the longest nucleotide sequence in this region. By comparison of nucleotide sequences of ORF23/24 region, we found that 12 Guangxi strains were above 99.6% homology, only existed nucleotide substitution but no deletion and insert, and BH-3, QZ-1, FCG-1 and FCG-2 strains were complete homology. In the phylogenetic tree of WSSV deletion region ORF23/24, the Guangxi strains were near in genetics and formed a separate branch with India strain IN-05- I, while far from WSSV-TW, WSSV-CN and WSSV-Korea. In conclusion, there was some extent of prevalence of WSSV infection in cultured *P. vannamei* of Guangxi; the results showed that the Guangxi WSSV strains had large deletion in middle region of the ORF23/24 gene, and there were no differences in spatio-temporal and they were closer in genetics to India strain IN-05- I than other strains in GenBank.

Key words: *Penaeus vannamei*; white spot syndrome virus; ORF23/24 gene; sequence analysis