

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170108001

http://www.yykxjz.cn/

秦梦雪, 孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 黄健. 2015年中国典型对虾养殖区WSSV流行株高变异区序列的分析比较. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 128-137

Qin MX, Sun XY, Wan XY, Liu QH, Huang J. Variable sequence comparison of WSSV regions from different parts of China in 2015. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 128-137

2015 年中国典型对虾养殖区 WSSV 流行株高变异区序列的分析比较*

秦梦雪^{1,2} 孙新颖¹ 万晓媛¹ 刘庆慧^{1①} 黄 健¹

(1. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为了解我国白斑综合征病毒(WSSV)流行变异特征,本研究对 2015 年 4~10 月期间在山东、江苏、天津、浙江、海南和广东 6 省市采集到的 57 份 WSSV 阳性的样本,通过特异性的扩增目的片段,根据测序结果分析比较不同地区、不同分离株之间在 ORF14/15、ORF23/24 上的缺失变异情况,以及 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的重复单元(Repeat unit, RU)数目差异。结果显示,在 ORF14/15 扩增中,分别有 6530、5908 和 5725 bp 的片段缺失,而在 ORF23/24 扩增中均有 12070 bp 大片段的缺失,ORF75 的 45 bp 的 RU 数目分别为 1、2 和 3, 102 bp 的 RU 数目均为 1, 而 ORF94 的 RU 数目分别为 4、5、10 和 12 不等, ORF125 的 RU 数目为 3、5 和 6。结果表明, WSSV 在部分开放型阅读框上表现出明显的变异差异,而在某些开放型阅读框上的缺失情况则有显著的稳定性。

关键词 WSSV; ORF; 缺失; 变异

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0128-10

水产养殖行业发展迅猛,而养殖中出现的病害却十分严峻(Nakano *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Karunasagar *et al.*, 1997)。其中,作为危害最为严重之一的白斑病,自 20 世纪 90 年代被发现后,给全球各地的水产养殖行业造成了难以估量的损失。白斑病由对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)引起。WSSV 基因组约为 300 kb,为环状、双链 DNA 病毒,能够感染数 10 种甲壳纲动物和水生浮游动物(Mayo, 2002; Hossain *et al.*, 2001),可使

被感染动物在 3~10 d 内死亡(Lightner, 1996)。

有大约 99%的核苷酸会在不同毒株的基因组序列之间表现出一致性,而导致差异存在的主要原因一般为大序列的缺失或者插入、易于发生基因重组的可变区、开放型阅读框(Open reading frames, ORFs)内重复单元差异(Variable number tandem repeat, VNTR)、单核苷酸突变等(童桂香等, 2004; Marks *et al.*, 2004)。有 4 种毒株已经在 GenBank 上公布了基因组的全序列,分别是中国台湾株(TW, AF440570) (307287 bp)、

* 农业部 948 计划(2016-X56)、国家自然科学基金(31672679)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017017)共同资助 [This work was supported by the 948 Programme of Ministry of Agriculture (2016-X56), the Project of the National Science Foundation of China (31672679), and the Project of YSFRI of Chinese Academy of Fisheries Science(20603022017017)]. 秦梦雪, E-mail: 861258856@qq.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-08, 收修改稿日期: 2017-02-27

泰国株 (TH, AF369029)(292967 bp)、中国株 (CN, AF332093)(305107 bp) 和韩国株 (KR, JX515788)。具有最大基因组的 WSSV 毒株 TH-96-II (AY864666, 312 kb) 被视为祖先株 (Balakrishnan *et al*, 2008)。

同已知毒株基因组序列的比较, 可以研究某些基因片段 (ORF14/15、ORF23/24、ORF75、ORF94 和 ORF125) 的缺失情况以及 VNTR 数目和单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs), 这些方面均已被应用到分子流行病学研究 (Gudkovs *et al*, 2014; Dieu *et al*, 2004; Musthaq *et al*, 2006)。在 ORF75 上有 2 种重复单元 (Repeat units, RUs), 分别为 45 bp 和 102 bp; ORF94 上有 1 种 RU, 大小为 54 bp; 而存在于 ORF125 的 1 种 RU 有 69 bp。根据之前报道的大多数流行病学研究, 从这些 RUs 的数量上的差异 (Dieu *et al*, 2004、2010; Pradeep *et al*, 2008; Tan *et al*, 2011; Shekar *et al*, 2012), 可以更好地解释分子流行病学的调查结果。

本研究应用 2015 年 4~10 月期间在山东、江苏、天津、浙江、海南、广东 6 省市采集到的 57 份 WSSV

阳性的样本, 通过特异性扩增目的片段, 比较不同地区、不同分离株之间在 ORF14/15、ORF23/24 上的缺失变异情况, 以及 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的 RU 数目差异, 以此了解我国 WSSV 在 2015 年的分子流行变异情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验样本主要涉及中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和日本对虾 (*Penaeus japonicus*) (表 1), 所有样本采集后置于 -80°C 冰箱保存。

1.2 实验方法

1.2.1 WSSV 核酸提取 从样本中取鳃组织约 30 mg, 提取 DNA [海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)], 保存于 -20°C 备用。

1.2.2 PCR 检测 按照 GB/T 28630.2-2012 白斑综

表 1 WSSV 样本采集信息及 ORF75、ORF94 和 ORF125RU 数目
Tab.1 WSSV samples and repeat units (RUs) of ORF75, ORF94 and ORF125

序号 No.	样品编号 Sample No.	来源 Source	品种 Species	RU 数目 Repeat unit number			
				ORF75 45 bp	ORF75 102 bp	ORF94 54 bp	ORF125 69 bp
1	jc150803001	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	4	—
2	jc150803002	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	—
3	jc150803003	山东利津 Shandong Lijin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	4	3
4	jc151014001	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	—	3
5	jc151014002	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	3
6	jc151014003	江苏赣榆 Jiangsu Ganyu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	3
7	jc150820001	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	—	—	10	3
8	jc150820002	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	—	—	10	3
9	jc150820003	山东即墨 Shandong Jimo	日本对虾 <i>P. japonicus</i>	1	1	10	3
10	jc150821001	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
11	jc150821002	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
12	jc150821003	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	10	3
13	jc150713001	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
14	jc150713002	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
15	jc150713003	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
16	jc150713004	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	6
17	jc150713005	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
18	jc150713006	山东昌邑 Shandong Changyi	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	—	—	5	3
19	jc150519001	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	5	—
20	jc150519002	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	5	—
21	jc150519003	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	—
22	jc150519004	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	—	5
23	jc150519005	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	—	—	12	—

续表 1

序号 No.	样品编号 Sample No.	来源 Source	品种 Species	RU 数目 Repeat unit number			
				ORF75 45 bp	ORF75 102 bp	ORF94 54 bp	ORF125 69 bp
24	jc150519006	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
25	jc150519007	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
26	jc150519008	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
27	jc150519009	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
28	jc150519010	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
29	jc150519011	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
30	jc150519012	山东即墨 Shandong Jimo	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
31	jc150404019	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	-
32	jc150606029	浙江舟山 Zhejiang Zhoushan	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	5
33	jc150606030	浙江舟山 Zhejiang Zhoushan	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	5
34	jc150519001	山东寿光 Shandong Shouguang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	12	6
35	jc150705001	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
36	jc150705002	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
37	jc150705003	山东威海 Shandong Weihai	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
38	jc150804001	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
39	jc150804002	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	10	5
40	jc150804003	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
41	jc150804004	海南海口 Hannan Haikou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
42	jc150811001	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	5	5
43	jc150811002	天津汉沽 Tianjin Hangu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
44	jc150709035	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	5
45	jc150709036	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	-	5
46	jc150709037	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	1	1	5	5
47	jc150709038	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	10	6
48	jc150709039	天津北辰 Tianjin Beichen	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	2	1	10	6
49	jc150720001	广东广州 Guangdong Guangzhou	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
50	jc150710001	天津宝坻 Tianjin Baodi	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
51	jc150820001	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
52	jc150820003	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
53	jc150820004	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
54	jc150820005	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
55	jc150820006	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	6
56	jc150820007	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	12	6
57	jc150820008	山东潍坊 Shandong Weifang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	3	1	12	6

注：“-”表示未扩增出

Note:“-” represents not amplified

合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法进行 DNA 样本检测, 然后用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 PCR 扩增 将检测呈阳性的 DNA 样本通过特定的引物进行扩增, 体系配置见表 2, 实验过程中引物及反应条件见表 3(于洪涛, 2008; Dieu *et al*, 2004、2010; Marks *et al*, 2005; Tang *et al*, 2013; Wongteerasupaya *et al*, 2003)。

1.2.4 基因克隆及片段分析 PCR 产物胶回收后用 NanoDrop 2000 检测 DNA 浓度, 通过 pMD[®]18-T 连接转化, 将连接成功菌液测序。ORF14/15 和 ORF23/24 片段分别与 TH-96- II 株和中国台湾株(TW)比对(Dieu *et al*, 2004; Zwart *et al*, 2010), 分析序列缺失情况。ORF75、ORF94 和 ORF125 测序结果分别与其相应的 RU 序列比对(Gudkovs *et al*, 2014)。

表 2 反应体系及用量
Tab.2 Reaction system and amount

反应体系 Reaction system	用量 Dosage(μl)
10×PCR 反应缓冲液(含 Mg ²⁺) 10×Buffer solution	2.5
双蒸水 ddH ₂ O	17.3
脱氧核苷酸混合物 dNTP	2
正向和反向引物 Primer	1
Ex Taq DNA 聚合酶 Ex Taq DNA polymerase	0.2
待测核酸 Nucleic Acid	1

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果

样本核酸提取后, 通过套式 PCR 检测, 除 10 份样本在第二轮中呈现阳性目的条带, 47 份样本均在第一轮中出现阳性目的条带。

2.2 扩增结果

通过特定引物扩增, 在 ORF14/15 中, 除 1#、2#、3#、5#、6#、7#、8#、12#、21#、23#、25#、26#、

27#、28#、29#、30#、31#、40#、52#、53#、54#和 55#外, 其余 35 份样本均有目的条带出现, 检出率为 61.40%。13#、14#、15#、16#、17#、35#、36#和 37# 样本的条带较之其他条带略大, 其中, 山东利津 3 个样本均未检出条带(图 1)。在 ORF23/24 扩增中, 共有 14 份样本(9#、24#、32#、33#、34#、39#、40#、45#、46#、47#、48#、51#、56#和 57#)出现目的条带(图 2), 检出率为 24.56%。目的条带之间的大小基本没有差别。山东利津、昌邑、威海、江苏赣榆、天津汉沽、宝坻和广东广州没有目的条带出现。而在 ORF75 中, 共有 10 份样本(4#、9#、32#、33#、34#、45#、46#、47#、48#和 57#)检出(图 3), 检出率为 17.54%, 山东利津、昌邑威海、潍坊、天津汉沽、宝坻、海南海口和广东广州无样本检出。其中, 57#山东潍坊的样本在所有目的条带中, 片段最大。在 ORF94 中, 共有 40 份样本检出, 检出率为 70.18%, 其中, 1#和 3#的目的片段最小(图 4)。江苏赣榆、天津宝坻和广东广州无目的条带出现。在 ORF125, 共有 44 份样本检出, 检出率为 77.19%, 在所有地区的样本中均有发现。仅有 1#、2#、19#、20#、21#、23#、24#、25#、27#、28#、29#、30#和 31#样本无相应目的条带出现(图 5)。

表 3 PCR 扩增引物以及反应条件
Tab.3 PCR primers and reaction conditions

引物 Primer	序列 Sequence(5'~3')	预变性 Initial denaturation	变性 Denaturation	延伸 Extension
ORF-14/15F ORF-14/15R	AATATGGAACGACGGGTG GACCAGCGCTCTTCAG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-23/24F ORF-23/24R	GTAGTGCATGTTTCTCTAAC GTAAGTTTATTGCTGAGAAG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-75F ORF-75R	CTTTCACCGCTCTCA GGGTTACCCAGAGACAGG	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 2 min	72℃ 7 min
ORF-94S ORF-94A	CTGGGTGGCATCGGTTAG CGTCACTTTCGTGCGTAGT	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	72℃ 7 min
ORF-125F ORF-125R	CGAAATCTTGATATGTTGTGC CCATATCCATTGCCCTTCTC	94℃ 5 min	35 cycles: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min	72℃ 7 min

2.3 序列比对

在 ORF14/15 扩增中, 共扩增 3 种不同的片段, 分别为 1270 bp(山东即墨)、1892 bp(山东即墨、潍坊、寿光、浙江舟山、江苏赣榆、天津汉沽、北辰、宝坻、海南海口和广东广州)、2075 bp(山东威海、昌邑), 通过与 TH-96-Ⅱ 比对, 发现分别缺失 6530、5908、5725 bp(图 6)。而在 ORF23/24 中, 所有样本片段大小均为 1140 bp, 与台湾株相比对, 缺失 12070 bp(图 7)。

在 ORF75 扩增中, 有 3 种片段大小出现, 分别为 1246 bp(江苏赣榆、天津北辰)、985 bp(山东即墨、寿光、天津北辰和浙江舟山)和 1738 bp(山东潍坊), 通过与重复片段比对, 45 bp 的重复片段数目分别为

2、1、3, 而 102 bp 的重复片段均为 1(表 1)。在 ORF94 扩增中, 共有 5 种大小不一的片段出现, 分别为 523 bp(山东利津)、742 bp(山东即墨、威海)、769 bp(海南海口)、1024 bp(山东即墨、天津北辰)和 1135 bp(山东潍坊、即墨、寿光、天津汉沽、浙江舟山), 经比对, 重复片段数目分别为 4、5、5、10、12(表 1)。在 ORF125 扩增中, 出现 5 种不同的片段, 分别为 491 bp(山东利津、昌邑、浙江舟山)、518 bp(山东即墨)、703 bp(山东威海、海南海口、天津汉沽、北辰)、722 bp(山东即墨、浙江舟山)、746 bp(山东昌邑、寿光、潍坊、天津北辰、宝坻、广东广州), 经过比对, 其重复片段的数目分别为 3、3、5、5、6(表 1)。

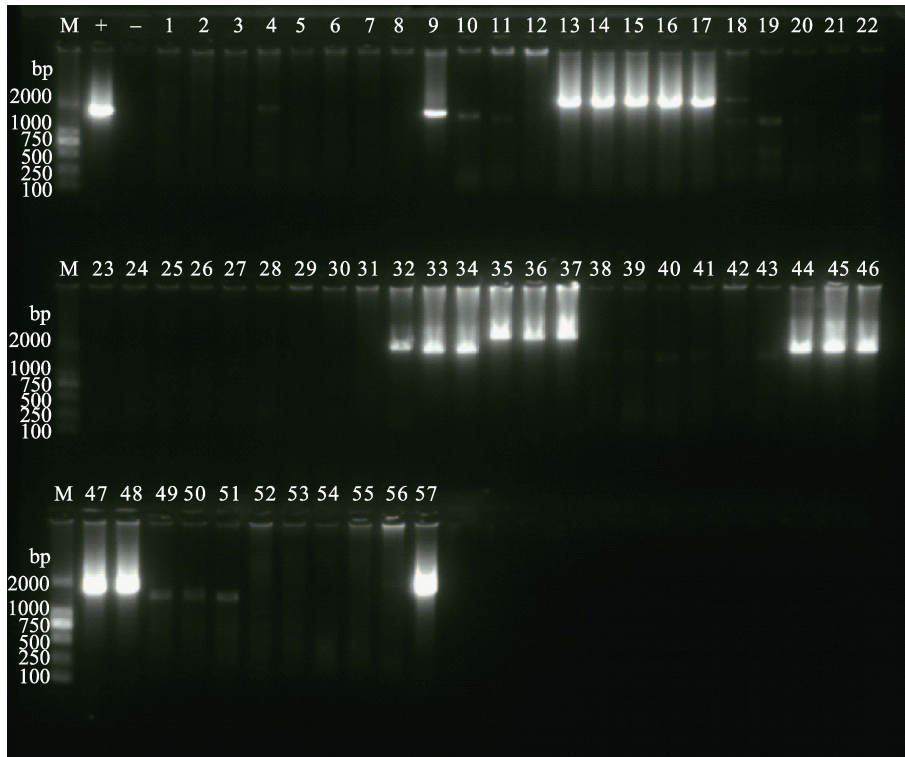


图 1 引物 ORF14/15 的扩增结果
Fig.1 Amplification of primer ORF14/15

M: DNA Marker DL 2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1~57: 样本编号。下图同
M: DNA Marker DL 2000; +: Positive control; -: Negative control; 1~57: Sample number. The same as below

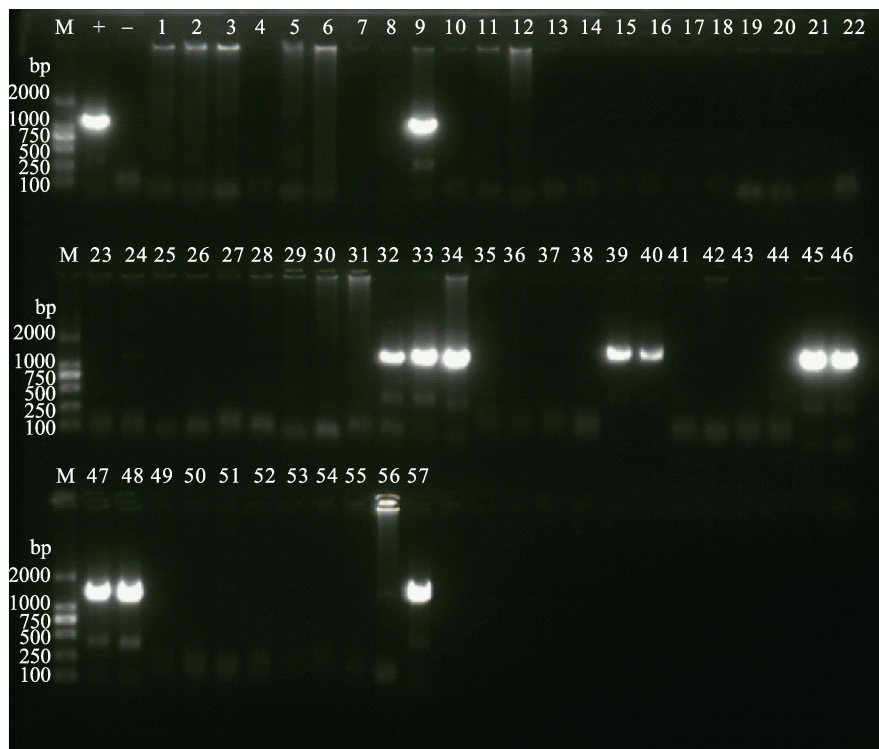


图 2 引物 ORF23/24 的扩增结果
Fig.2 Amplification of primer ORF23/24

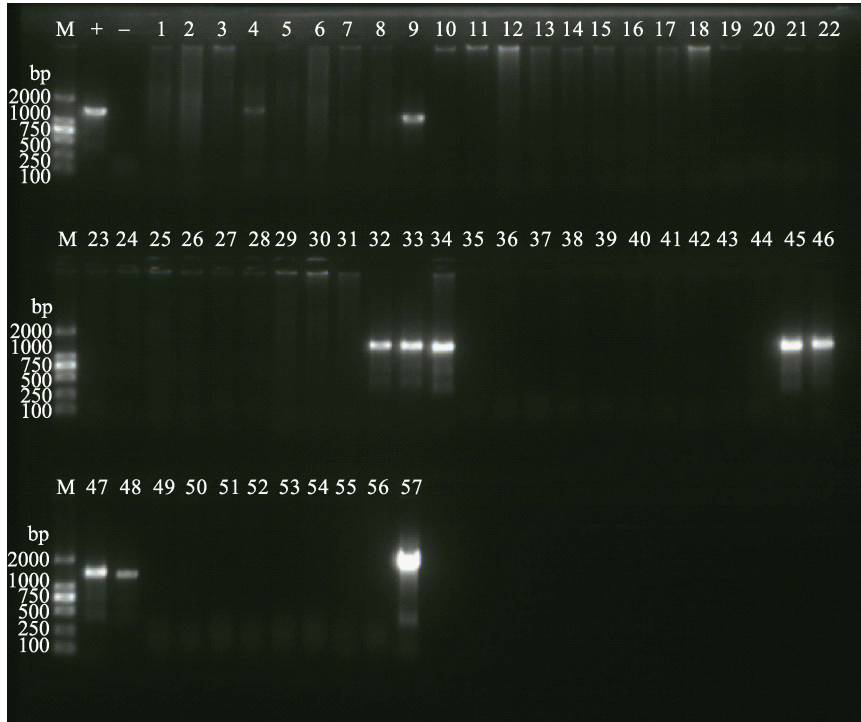


图 3 引物 ORF75 的扩增结果
Fig.3 Amplification of primer ORF75

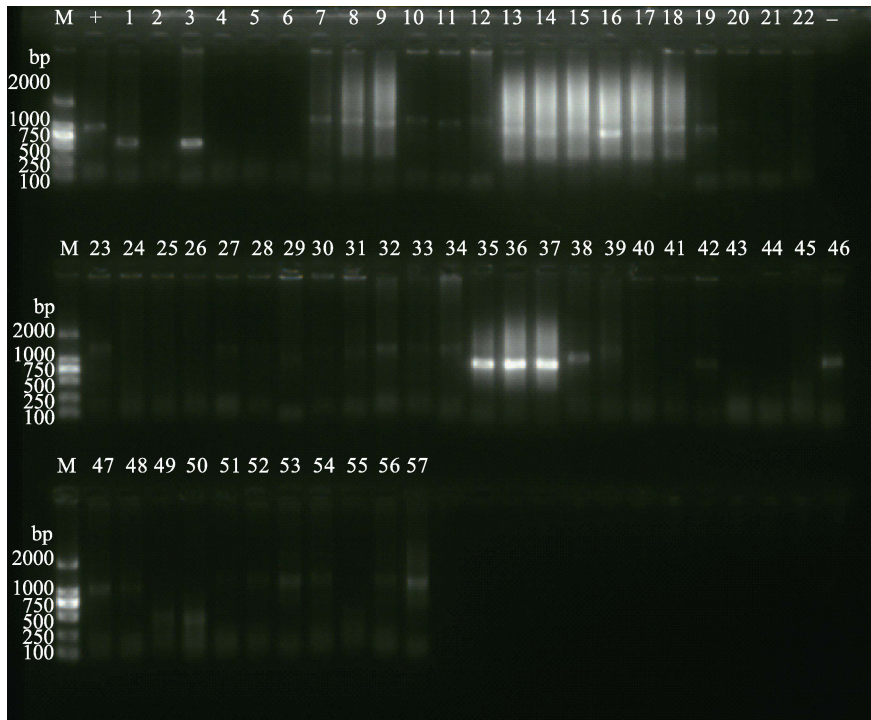


图 4 引物 ORF94 的扩增
Fig.4 Amplification of primer ORF94

3 讨论

本研究所用样本来自于山东利津、即墨、昌邑、寿光、威海、潍坊、江苏赣榆、天津汉沽、北辰、宝

坻、浙江舟山、海南海口和广东广州，采集时间分布于 2015 年 4~10 月 WSSV 病害暴发期间。ORF14/15 和 ORF23/24 的检出率分别为 61.40%和 24.56%，大部分扩增 ORF23/24 成功的样本在 ORF14/15 中

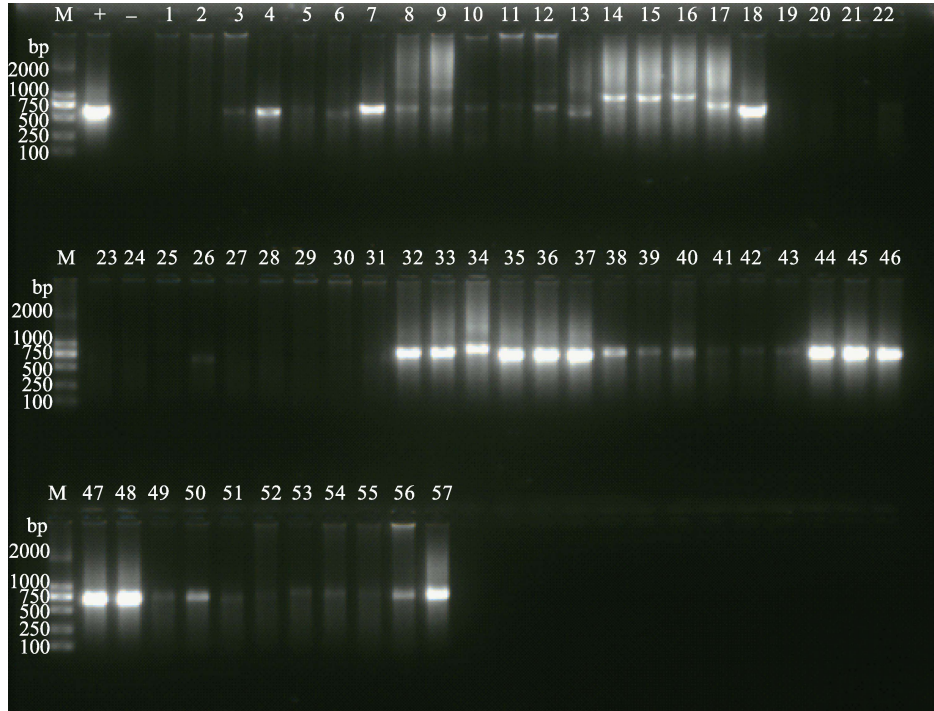


图 5 ORF125 扩增

Fig.5 Amplification of primer ORF125

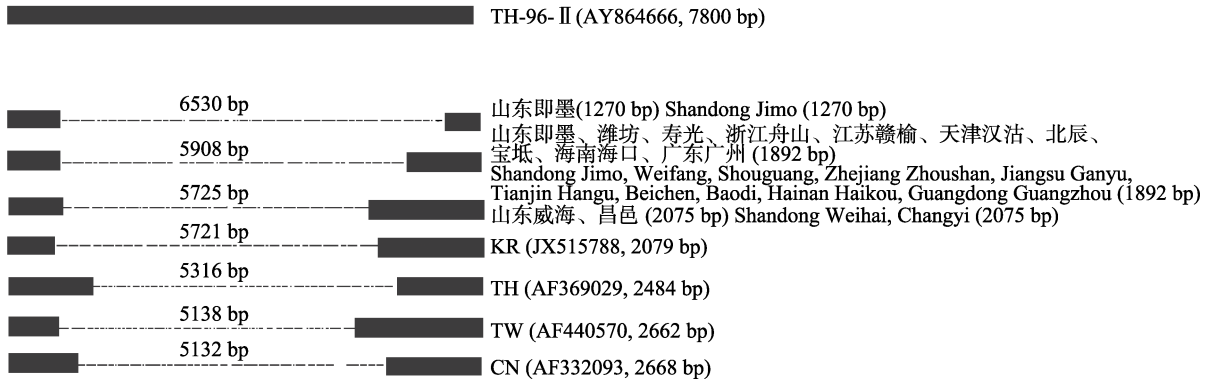


图 6 WSSV 不同毒株 ORF14/15 区域的序列比对

Fig.6 Scheme of deletion region of ORF14/15 in different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物 ORF14/15 扩增出的序列，中间的虚线表示与 TH-96- 毒株进行序列比对缺失的部分
Rectangles mean sequences amplified by ORF14/15. The imaginary lines in the middle mean sequences deletion compared to TH-96- strain



图 7 WSSV 不同毒株 ORF23/24 区域的序列比对

Fig.7 Scheme of deletion region of ORF23/24 in different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的虚线表示与 TW 毒株进行序列比对缺失的部分
The right and left rectangles mean sequences which can be amplified. The imaginary line in the middle means sequence deletion compared to TW strain

均有目的条带出现, 但除去 40#样本(海南海口), 其仅在 ORF23/24 扩增中出现。ORF75、ORF94 和 ORF125 的检出率分别为 17.54%、70.18%和 77.19%, 其中, 2#(山东利津)、21#(山东即墨)、24#(山东即墨)和 25#(山东即墨)样本在 3 种扩增中均无条带出现, 而 9#(山东即墨)、32#(浙江舟山)、33#(浙江舟山)、34#(山东寿光)、46#(天津北辰)、47#(天津北辰)、48#(天津北辰)和 57#(山东潍坊)样本却在 3 种扩增中均有条带出现。在 5 次 PCR 扩增中, 9#(山东即墨)、32#(浙江舟山)、33#(浙江舟山)、34#(山东寿光)、46#(天津北辰)、47#(天津北辰)、48#(天津北辰)和 57#(山东潍坊)样本都出现目的条带, 而 2#(山东利津)、21#(山东即墨)和 25#(山东即墨)样本则在 5 次扩增中均无扩增出目的片段。

对于 ORF14/15, TH-96-Ⅱ最为完整, 为 7800 bp。与 TH-96-Ⅱ相比较, 韩国株有 5721 bp 的缺失, 泰国株缺失 5316 bp, 台湾株缺失 5138 bp, 而中国株缺失 5132 bp。本研究中出现 3 种缺失程度不一样的片段, 且相互之间差别较大, 即其中 2075 bp 的片段与韩国株 KR 的缺失程度相近。6530 bp 和 5908 bp 的 2 种缺失情况也出现在之前的研究中, 而与 6530 bp 相近的 6533 bp 和 6540 bp 的缺失情况分别在 2013 年和 2014 年的研究中出现(孙新颖等, 2016a、2016b)。在 Tang 等(2013)研究中也出现相近程度的情况, 即缺失 5950 bp, 而印度的 1 株和墨西哥地区的 3 株 WSSV 毒株有更接近的缺失程度, 4 株分离株均缺失 5892 bp。从现有研究发现, WSSV 在 ORF14/15 上的缺失均在 5000 bp 以上, 相较于完整的 7800 bp, 缺失程度较大, 可能越短 DNA 片段在复制中占据更多优势。

报道中的中国株 ORF23/24 片段缺失最小, 仅为 1169 bp; 泰国株的缺失程度最大, 为 13120 bp; 而韩国株的缺失程度为中等, 为 5654 bp。Lan 等(2002)发现, 在中国厦门发现 3 种不同宿主感染的 WSSV, 相对中国株的 ORF23/24 序列分别缺失 5717、5926 和 9319 bp。而 Dieu 等(2004)发现, 在越南中部和南部采集的 3 种不同的 WSSV 分离株, 相较于台湾株分别缺少 8539、11450 和 12166 bp。相较于其他地区或大或小的缺失情况, 本研究中所有样本在 ORF23/24 上缺失程度一致, 均缺失 12070 bp, 属于是大片段的缺失, 这与 2013 年样本研究中的缺失情况一致, 而 2014 年样本有 2 种缺失, 即 12064 bp 和 12070 bp, 二者仅是在中间位置相差 6 个碱基(孙新颖等, 2016a、2016b)。ORF23/24 的这种大片段缺失在普遍范围上比较稳定, 结合 ORF14/15 较大的缺失情

况, 推测 WSSV 的进化可能通过逐渐稳定的缺失和更小的基因组来完成, 使得基因组更适合复制, 以适应环境且 WSSV 自身具有更强的毒性。

除了 ORF75 之外, ORF94 和 ORF125 的检出率都比较高。在是否检出方面, 不同地区样本之间的 RU 数目差异比较大, 即使是出自于同一地区的样本之间也依然有差异, 如山东即墨的样本。ORF75 中的 45 bp 的 RUs 数目为 3 以及 102 bp 的 RUs 数目为 1 的情况在之前 2014 年样本研究中有出现, 新出现了 45 bp RU 为 1 和 2 两种类型; ORF94 中 RUs 为 4 的情况在 2013 年和 2014 年样本中均存在, 而 RUs 为 12 只出现在 2013 年样本中, 且样本中的 RUs 或为小数目重复, 或为大数目重复, RUs 为 5 和 10 两种属于新类型; ORF125 的 RUs 数目与 2014 年样本检测中的数据部分一致(孙新颖等, 2016a、c)。Tang 等(2013)研究中仅有 1 种 ORF75 的 VNTR 情况: 共 3 个 RU, 2 个 45 bp RU 和 1 个 102 bp RU; Durán-Avelar 等(2015)发现, ORF75 总 RU 有 5~20 之间共 12 种情况, 而 ORF94 包含有 13 种数目不同的 RU, ORF125 则只有 1 种总 RU 数目为 8 的情况;此外, Sindhupriya 等(2014)的实验中, ORF94 上有 4、6、7、8 和 11 五种不同的 VNTR, 而 ORF125 上有 3 种(4、5 和 6)不同的 VNTR, 部分 VNTR 情况在不同研究中存在交叉情况。相较于 ORF14/15 和 ORF23/24, ORF75、ORF94 和 ORF125VNTR 的研究更多应用于 WSSV 类型的归划(Durán-Avelar *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2013), 从而确定 WSSV 的地理归属, 揭示 WSSV 分子流行情况。

2015 年样本在重复片段数目上的差异依然很大, ORF14/15 上的缺失出现了新的片段, 与韩国株极其相近, 在 ORF23/24 上, 虽然出现大片段缺失, 却表现出了缺失的稳定性。而各个样本在 ORF75、ORF94 和 ORF125 上的 RU 数目则出现差异性和部分稳定性。因此, 推测不同地区 WSSV 毒株为了更好地复制遗传以适应环境, 出现了适应性的变异, 同时本实验也为系统的分子流行病的研究提供了数据基础。

参 考 文 献

- Balakrishnan P, Malathi S, Iddya K, *et al.* Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus. *Virology*, 2008, 376(1): 24-30
- Dieu BTM, Marks H, Siebenga JJ, *et al.* Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of General Virology*, 2004, 85(12): 3607-3618
- Dieu BTM, Marks H, Zwart MP, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of

- virus spread at intermediate spatiotemporal scales. *Journal of General Virology*, 2010, 91(5): 1164–1172
- Durán-Avelar MDJ, Pérez-Enríquez R, Zambrano-Zaragoza JF, *et al.* Genotyping WSSV isolates from northwestern Mexican shrimp farms affected by white spot disease outbreaks in 2010–2012. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 114(1): 11–20
- Gudkovs N, Murwantoko, Walker PJ. Stability of the WSSV ORF94 VNTR genotype maker during passage in marine shrimp, freshwater crayfish and freshwater prawns. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(3): 249–257
- Hossain MS, Chakraborty A, Joseph B, *et al.* Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 2001, 198(1–2): 1–11
- Karunasagar I, Ota SK, Karunasagar I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, 1997, 153(1–2): 9–13
- Lan Y, Lu W, Xu X. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Research*, 2002, 90(1–2): 269–274
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society. LA, Baton Rouge, 1996, 305
- Marks H, Goldbach RW, Vlak JM, *et al.* Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Archives of Virology*, 2004, 149(4): 674–697
- Marks H, van Duijse JJA, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Research*, 2005, 110(1–2): 9–20
- Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002, 147(8): 1655–1663
- Musthaq SS, Sudhakaran R, Ahmed VPI, *et al.* Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. *Aquaculture*, 2006, 256(1–4): 34–41
- Nakano H, Koube H, Umezawa S, *et al.* Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology*, 1994, 29(2): 135–139
- Pradeep B, Shekar M, Gudkovs N, *et al.* Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 78(3): 189–198
- Shekar M, Pradeep B, Karunasagar I. White spot syndrome virus: Genotype, epidemiology and evolutionary studies. *Indian Journal of Virology*, 2012, 23(2): 175–183
- Sindhupriya M, Saravanan P, Ota SK, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 111(1): 23–29
- Sun XY, Wan XY, Liu QH, *et al.* Deletion and variation sequence comparison of prawns WSSV from different parts of China in 2013. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016a, 23(3): 693–703 [孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 2013年中国典型对虾养殖区白斑综合征病毒流行株高变异区序列的分析比较. *中国水产科学*, 2016a, 23(3): 693–703]
- Sun XY, Liu QH, Wan XY, *et al.* Comparison of the missing sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from different regions of China in 2014. *Progress in Fishery Sciences*, 2016b, 37(4): 140–146 [孙新颖, 刘庆慧, 万晓媛, 等. 2014年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较. *渔业科学进展*, 2016b, 37(4): 140–146]
- Sun XY, Wan XY, Liu QH, *et al.* Sequence comparison of WSSV variable regions from different parts of China in 2014. *Progress in Fishery Sciences*, 2016c, 37(2): 127–133 [孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 白斑综合征病毒 2014年中国毒株变异区的序列比较. *渔业科学进展*, 2016c, 37(2): 127–133]
- Tan YW, Shi ZL. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999. *Virologica Sinica*, 2011, 26(2): 123–130
- Tang KFJ, Groumellec ML, Lightner DV. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 106(1): 1–6
- Tong GX, Li XZ, Wei XX, *et al.* Comparative analysis of deletion region of white spot syndrome virus genome among isolates in Guangxi. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2004, 23(1): 8–13 [童桂香, 黎小正, 韦信贤, 等. 白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析. *上海海洋大学学报*, 2004, 23(1): 8–13]
- Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, *et al.* High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 54(3): 253–257
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, 21(1): 69–77
- Yu HT. Analysis of sequence variability among white spot syndrome virus (WSSV) isolates within China. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008, 32–63 [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. *中国海洋大学硕士研究生学位论文*, 2008, 32–63]
- Zwart MP, Dieu BTM, Hemerik L, *et al.* Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13400

Variable Sequence Comparison of WSSV Regions from Different Parts of China in 2015

QIN Mengxue^{1,2}, SUN Xinying¹, WAN Xiaoyuan¹, LIU Qinghui¹①, HUANG Jie¹

(1. *Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071*; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306*)

Abstract In recent years, the fast development of aquaculture has been followed with the increased diseases such as the white spot disease to cause a great loss for the global aquaculture industry. To understand the variations in WSSV ORF14/15 and ORF23/24 and the VNTR in different regions of China in 2015, we investigated 57 samples WSSV-positive on PCR, collected in a disease outbreak area between April and October 2015. The tested samples were from Shandong, Guangdong, Hainan, Zhejiang, Tianjin and Jiangsu. Using specific primers, WSSV-positive samples were genotyped and the amplified fragments were ligated to a T-vector and transformed in Top10 cells. The positive clones were selected and sequenced. After sequencing, the fragments deleted from ORF14/15 and ORF23/24 in different samples were compared with the sequences of Th-96- and TW respectively, and three WSSV VNTR regions in ORF75, ORF94, and ORF125 from different samples were analyzed with the DNAMAN software. The results showed that 35 samples had the products of ORF14/15 amplification, and 14 sample had the products of ORF23/24 amplification. The lengths of the amplified fragments of ORF14/15 were 1270 bp, 1892 bp and 2075 bp, corresponding to deletions of 6530 bp, 5908 bp and 5725 bp, respectively, compared with Th-96-. One type of ORF23/24 was confirmed, and the amplified fragment was 1140 bp, corresponding to a deletion of 12070 bp compared with the TW isolate. Ten fragments were amplified from ORF75, including 1, 2, 3 repeat units with 45 bp, and 1 with 102 bp. Four different ORF94 VNTRs, including 4, 5, 10, or 12 repeat units, were identified. The ORF125 VNTR including 3, 5 or 6 repeat units was identified. The results showed that WSSV exhibited a significant difference in some open reading frames, but a significant stability in others.

Key words WSSV; ORF; Deletion; Variation

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn