

文章编号: 1000-0615(2001)06-0559-05

虎纹蛙病毒主要衣壳蛋白基因的克隆及其序列

苗素英, 何建国, 张利红, 曾 慷, 王晓红, 张 旻, 江静波

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 从新分离感染虎纹蛙的病毒培养细胞中提取病毒 DNA 作模板, 用分别对应于蛙病毒 3 型(FV3)主要衣壳蛋白(Major Capsid Protein, MCP) 基因读码框两侧的寡核苷酸片段作引物进行 PCR 扩增, 得到预期大小基因片段, 进一步将此基因片段插入到 pGEM-T 载体中, 进行全长片段的序列测定和分析。结果表明, 编码虎纹蛙病毒的 MCP 基因的读码框核苷酸数为 1 392bp, 编码 463 个氨基酸; 基因的核苷酸序列与其他脊椎动物虹彩病毒的 MCP 基因序列比较结果显示, 该病毒与蛙病毒属的 FV3 的同源性(98%) 明显高于囊肿病毒属的 FLDV-1(52%), 并且与虹彩病毒科其他成员的 MCP 基因序列均有所不同, 说明该病毒株是虹彩病毒科蛙病毒属的新成员。

关键词: 虎纹蛙; 虹彩病毒; 衣壳蛋白基因; 克隆; 病毒分类

中图分类号: S917; Q132.1 文献标识码: A

Cloning, sequence analysis of the major capsid protein gene of newly isolated iridovirus from *Rana tigrina*

MIAO Su-ying, HE Jian-guo, ZHANG Li-hong, ZENG Kang

WANG Xiao-hong, ZHANG Min, JIANG Jing-bo

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

Abstract: The complete gene of major capsid protein (MCP) of the recently isolated iridovirus from *Rana tigrina* was amplified using the primers corresponding to the two sides of the frog virus 3 (FV3) MCP gene and was cloned into the pGEM-T easy vector. The MCP gene of the virus was 1 392 bp in size and had much higher identity to FV3 (98%), the type species of the genus *Ranavirus*, than to lymphocystis disease virus (52%), the type species of the genus *Lymphocystivirus*. Comparison of the MCP sequence here with this of other vertebrate iridoviruses showed that the iridovirus examined here was a new member of the genus *Ranavirus*.

Key words: *Rana tigrina*; iridovirus; capsid protein gene; clone; virus taxonomy

近十几年来, 虹彩病毒已被认为是水产养殖上的一类重要病原, 可引起贝类、鱼类、两栖类和爬行类的疾病, 危害较大^[1]。最近我们从人工养殖的泰国虎纹蛙(*Rana tigrina* Cantor) 中分离到一株可引起皮肤溃疡病的病毒, 从病毒形态特点来看, 初步认为是属于虹彩病毒科的种类。为了更进一步明确其分类地位, 我们根据脊椎动物虹彩病毒主要衣壳蛋白(Major Capsid Protein, MCP) 基因的两端保守区序列和对应于蛙病毒 3 型(FV3) 主要衣壳蛋白基因读码框两侧的寡核苷酸片段设计引物, 分别扩增到虎纹蛙病毒 MCP 基因 3' 端 585bp、5' 端 536bp 和全长片段, 并进行了克隆、测序及其序列比较和分析。

收稿日期: 2001-01-15

基金项目: 广东省自然科学基金项目资助(990255)

第一作者: 苗素英(1965-), 女, 浙江慈溪人, 讲师, 主要从事水生动物疾病的研究。Tel: 020-84457947, 84113739 <http://www.cnki.net>

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

实验用虎纹蛙病毒来自于培养细胞,用 M-199 培养基上长成单层的鲤表皮瘤细胞系(EPC) 细胞接种病毒,72 h 后收集细胞培养液,冻融,1000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 15min 离心,取病毒上清液。

1.2 病毒核酸的提取

病毒核酸的提取按文献^[2]进行,上清液直接用酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,溶于双蒸水用作 PCR 反应模板。同时从未感染的 EPC 细胞提取 DNA 作阴性对照。

1.3 PCR 扩增反应

1.3.1 引物

MCP 5' 端 PCR 扩增用寡核苷酸正向引物 P₁(5' GACTTGGCCACTTATGAC^{3'}) 和反向引物(P₂^{5'} CCCGTGTCTCTGGAGAAGAA^{3'}) 是根据 FV3^[3]和比目鱼病毒(LDCV-1)^[4]的 MCP 基因保守区设计的。

MCP 基因 3' 端引物 P₃ 和 P₄、编码区两侧引物 P₅、P₆ 序列参见 Hyatt 等^[5]。所有引物由上海生工公司合成。

1.3.2 PCR 反应

50 μ l 体系中含 10mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH9.0, 10mmol \cdot L⁻¹ KCl, 10mmol \cdot L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2mmol \cdot L⁻¹ MgSO₄, 1% Triton X-100, 200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP, 引物 MPF₁ 和 MPR₂ 各 0.75 μ mol, Taq Plus DNA 聚合酶 2.5U 和病毒 DNA 模板适量,设空白对照和阴性对照。扩增反应在 PTC-100TM 热循环仪上进行,循环参数为 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 20s, 35 个循环后,在 72 $^{\circ}$ C 中延伸 10min。PCR 相关试剂均购自上海生工生物工程公司。

1.4 PCR 产物纯化和克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,采用 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工)纯化,与 pGEM-T (Promega, USA) 载体连接,连接物转化 DH5 α 感受态细胞,用氨苄青霉素(Amp) 抗性筛选阳性克隆,并进行酶切鉴定。

1.5 DNA 序列测定和分析

克隆片段采用 T₇ 和 SP₆ 通用引物进行双向测序,再用 MPR 引物从中间作反向测序,MPR 引物序列为:5' ACGACGGGAGTGACGCAGGTGTAA^{3'},对应于 FV3 MCP 基因的 969-945nt。测序由上海生工生物工程公司完成。核苷酸序列分析采用的是 Blast 和 Genedao 软件。本实验所用的其他虹彩病毒 MCP 参比序列取自 GenBank。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物及其克隆

用引物 P₁ 和 P₂ 扩增到虎纹蛙病毒的 5' 端预期的 510bp 片段;引物 P₃ 和 P₄ 扩增到 3' 端 586bp 片段。扩增片段经纯化后,直接测出序列,测得虎纹蛙病毒 MCP 基因两端的核苷酸序列与 FV3 的 MCP 基因同源性极高,于是尝试用 FV3 MCP 编码区外序列 P₅ 和 P₆ 作引物进行扩增,扩增产物电泳结果可见一明显条带,分子量在 1.5kb 左右(图 1),与 FV3 已知序列两引物间 1 484bp 大小接近,初步定性。空白和阴性对照无相应扩增产物。PCR 产物纯化、连接和转化后的 Amp 阳性克隆经电泳鉴定,结果与预期一致(图 2)。

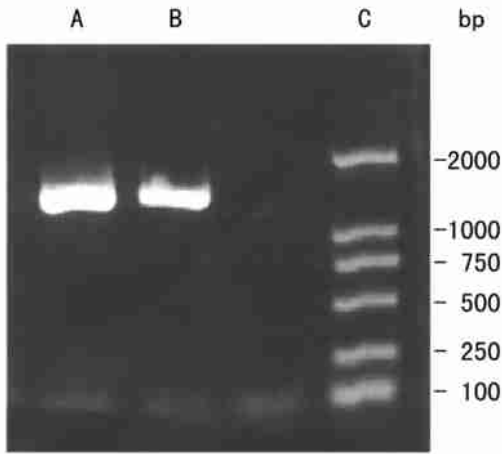


图1 PCR产物电泳图

Fig. 1 Photograph of the agarose gel electrophoresis of PCR products of FV3 DNA. A, B. 虎纹蛙病毒 DNA 的 PCR 扩增产物, C. DNA 分子量标准

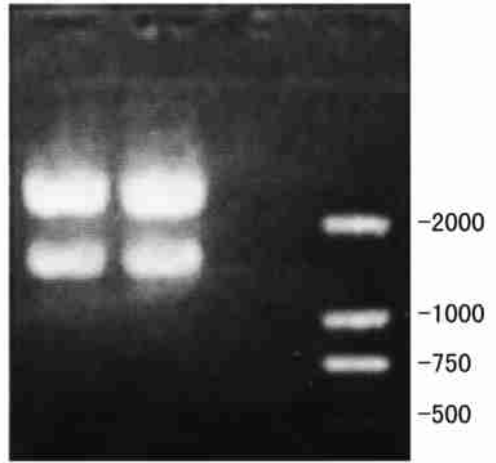


图2 PCR产物重组质粒 EcoRI 酶切鉴定结果

Fig. 2 The restriction pattern of recombinant plasmid with *EcoRI*. A, B. 虎纹蛙病毒, C. DNA 分子量标准

2.2 病毒 MCP 基因序列

克隆片段用三种引物经两次重复测序, 拼接成 MCP 基因的完整序列(图 3)。从虎纹蛙中分离的病毒核酸的 MCP 基因编码区大小为 1392bp, 与 FV3 相同。其中 G+ C 含量较高, 为 59%。

2.3 病毒 MCP 基因分析

利用 Blast 软件和 GenBank 数据库对虎纹蛙病毒的 MCP 基因进行分析比较, 该病毒完整 MCP 基因的核苷酸序列与 FV3 和 LDCV - 1 的同源性分别为 98% 和 52%; MCP 5' 端 536bp 和 3' 端 585bp 片段与 FV3、RGV、*Terrapene carolina* 病毒 (*Terrapene carolina* ranavirus)、*Testudo hermanni* 病毒 (*Testudo hermanni* ranavirus) 的同源性相同, 均为 98%, 与虹鳟病毒 (*Oncorhynchus mykiss* ranavirus) 的同源性为 96%, 与大口鲈病毒 (*Largemouth bass* ranavirus) 的同源性为 81%; 3' 端 585bp 片段与裂唇鱼病毒 (Doctorfish iridoviruses, DFV)、传染性造血组织坏死病毒 (Epizootic haematopoietic necrosis virus, EHNV) 和孔雀鱼病毒 (Guppyfish iridovirus, GV6) 的同源性均为 97%; MCP 基因的核苷酸和氨基酸序列与所有其他虹彩病毒基因均有所不

```

1  caccctgtatcttataataaaaggaaatgtcttctgtaactggttcagggtatcacaaagt 60
                                     M S S V T G S G I T S 11
61  ggtttcatcgacttggccacttatgacaatttgagagagcaatgtacgggggttcggac 120
12 G F I D L A T Y D N L E R A M Y G G S D 31
121 gccaccacgtactttgtcaaggagcactaccocgtggsgtgcaccacagctgcgctct 180
32 A T T Y F V K E H Y P V G W F T K L P S 51
181 ctggctccaagatgtctgtaaccoggtcttcgggcagcagtttccggtcggcgttccc 240
52 L A A K M S G N P A F G Q Q F S V G V P 71
241 aggtcggggatattacatcctcaacgcctggttgactcaagaccctcagggtcagctc 300
72 R S G D Y I L N A W L V L K T P E V E L 91
301 ctggccgcaaacaccagctgggagaaatggccaccatcaggtggacaagaaccaccatgcac 360
92 L A A N Q L G E N G T I R W T K N P M H 111
361 aacatttggagagcgtcaccctctcattcaacgacatcagcgcaccagctcttaacacg 420
112 N I V E S V T L S F N D I S A Q S F N T 131
420 gcatacctggacgcctggagtgagtagaccatccagagcccaagccataggtctat 480
132 A Y L D A W S E Y T M P E A K R I G Y Y 151
481 aacatgataggcaaccagcagctctcaaccaccoccccgcccaagcaggcaggcaggga 540
152 N M I G N T S D L I N P A P A T G Q D G 171
541 gccaggtctctccggccaagaacctgtttctccctccattctctctccagagac 600
172 A R V L P A K N L V L P L P F F S R D 191
601 agcggactggccttcgacgtcgtctccctcccaacagcagatcaggataaacactcaag 660
192 S G L A L P V V S L P Y N E I R I T V K 211
661 ctgaggccatccagcactctctgactctccagcacaacaccacaggggcaatcagcccc 720
212 L R A I Q D L L I L Q H N T T G A I S P 231
721 atcgtggcctccagcctcggggaggtctcccgacaccgtcgaggccaacgtctacatg 780
232 I V A S D L A G G L P D T V E A N V Y M 251
781 accgtgcctcattcaccgggagcagggcagccatgagcagcacagtcaggacatg 840
272 T V A L I T G D E R Q C A M S S T V R D M 271
841 gttgtgagcaggtgcaggtgcgccaccatggtcaaccaccaggaacgcggccacc 900
272 V V E Q V V Q V A P V H M V N P R N A A T 291
901 ttccaccagacatcggttctccacaccagctcaaggccttgaatggttattggtcagaac 960
292 F H T D M R F S H A V K A L M F M V Q N 311
961 gtcacacaccttcgctggctccaattacacctcactccgctcgtggagccggcg 1020
312 V T H P S V G S N Y T C V T P V V G A G 331
1021 aacacggtcctggagccagccttggcgttgatccgctcaagagccagcctggtgtac 1080
332 N T V L E P A L A V D P V K S A S L V Y 351
1081 gaaaacaccacaaggctcccgacatgggagtcgagtactactcgtggtggagccttgg 1140
352 E N T T R L P D M G V E Y Y S L V E P W 371
1141 tactatgccacctccatccagtcagcaccggcaccacctctactcttatgcccctcagc 1200
372 Y Y A T S I P V S T G H H L Y S Y A L S 391
1201 atcgagaccaccaccatccggatcaaccaattacggcagatgccaaccagcagcctt 1260
392 M Q D P H P S G S T N Y G R L T N A S L 411
1261 aacgtacccttgcctgaggccaccacggcggcagggagggagggagggagggagggag 1320
412 N V T L S A E A T T A A A G G G D N S 431
1321 ggggtacaccaccgcaaaagtacgacctcattgcttctgacctcaaccacaacatattc 1380
432 G Y T T A Q K Y A L I V L A I N H N I I 451
1381 cgcacatgaacggctcagatgggtatcccaattctgtaagagtatttttcagcgcaag 1440
452 R I M N G S M G F P I L * 463
1441 tcttttcgctatgggtcctccatgatgaaataaaacatgaaggtgctcgttctgcaaa 1500
1501 aacgggtctt 1512

```

图3 虎纹蛙病毒衣壳蛋白基因的核苷酸及相应的氨基酸序列

注: 划线部分为引物区
Fig. 3 The DNA nucleotide and deduced amino acid sequence of the MCP gene

同。用 Genedao 软件对 DFV、GV6、EHN、FV3 和虎纹蛙病毒根据 MCP 基因 3' 端 585bp 片段作出的进化树见图 4。

3 讨论

虹彩病毒(Iridoviridae)是一类二十面体的胞浆内 DNA 病毒,下分五个病毒属,即宿主为无脊椎动物的虹彩病毒属(*Iridovirus*)、绿虹彩病毒属(*Chloriridavirus*)和宿主为脊椎动物的蛙病毒属(*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)、金鱼病毒型样病毒属(Goldfish virus like viruses)^[6]。该科病毒的一个主要共同特点是它们均具有一大小约 50 kDa, 占病毒总蛋白量 45% 的主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)^[7, 8]。迄今,已测知 7 种虹彩病毒 MCP 基因的完整序列^[4, 5, 9-12]。通过对几十种脊椎动物和无脊椎动物的虹彩病毒 MCP 基因的全部和部分序列的分析,结果显示,该基因既具有高度的保守性,又具有足够的差异性,是进行虹彩病毒分类和演化研究的良好分子标记^[5, 12, 13]。

FV3 和 LDCV-1 分别是蛙病毒属和淋巴囊肿病毒属的代表种,本研究无论从 MCP 基因的 5' 端还是 3' 端来看,虎纹蛙病毒与 FV3 的核苷酸序列同源性均大大高于 LDCV-1,且 3' 端与其他脊椎动物虹彩病毒比较,核苷酸序列均有所不同,因此,该新分离的虎纹蛙病毒应是虹彩病毒科蛙病毒属的一新成员。从 Hyatt 等^[5]根据 MCP 基因的 3' 端 585bp 片段所作的进化树来看,寄生于鱼类和两栖类的虹彩病毒有明显的分支。本文研究的病毒是从两栖类(虎纹蛙)中分离得到的,虽然与两栖类病毒 FV3 的同源性(98%)稍高于鱼类病毒 GV6、DFV 和 EHN(97%),但由于一些主要核苷酸位点的不同,其演化位置却更接近于鱼类虹彩病毒。为方便起见,暂将其命名为 *Rana tigrina ranavirus*,简称 RTV。

Hyatt 等^[5]曾对能引起皮肤溃疡病的十九种脊椎动物虹彩病毒(包括鱼类和两栖类)MCP 基因的 3' 端 585bp 片段进行过比较,结果表明 DFV 和 GV6 与 FV3 的同源性在 90% 以上,而 Mao 等^[14]对 GV6 和 DFV 的 5' 端的研究结果,DFV 和 GV6 与 FV3 的同源性为 77%,这可能与病毒混杂有关,也可能是由于 DFV 和 GV6 MCP 基因在 5' 端和 3' 端的演化速率不同。本研究通过与 FV3 等四种脊椎动物虹彩病毒 5' 端和 3' 端 MCP 基因的比较,表明虎纹蛙病毒的 MCP 基因两端的同源性相同,说明该基因的不同区域,其演化速率相同。

虎纹蛙是从泰国引进,为我国海南和广东的蛙类主要养殖品种。Kauchanckhan 等^[15]曾报道过泰国虎纹蛙养殖中的皮肤溃疡病病毒,从疾病症状、细胞培养特征和宿主地理位置看,很可能与本文所研究的病毒为同一病原。

RTV MCP 基因的扩增、克隆、测序和分析,不仅确定了新分离病毒分类地位,也为今后更好了解该蛋白的免疫原性、侵染和复制机理,并为进而研制基因工程疫苗奠定基础。

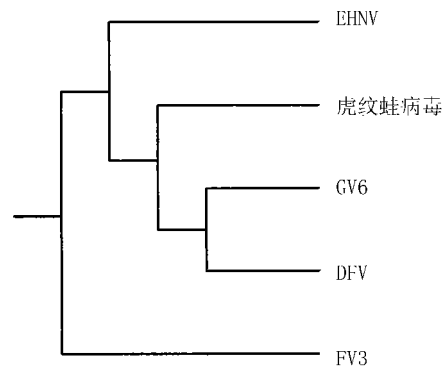


图 4 虎纹蛙病毒的演化位置

Fig. 4 The evolution of the viruses isolated from *Rana tigrina*
EHN 为传染性造血组织坏死病毒, GV6 为孔雀鱼病毒,
DFV 为裂唇鱼病毒, FV3 为蛙病毒 3 型。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 1095-1103.
- [2] Oshima S, Hata J, Segawa C, et al. A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus[J]. Anal Biochem, 1996, 242: 15-19.
- [3] Mao J H, Tham T N, Gentry G A, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the Iridovirus frog virus 3[J]. Virol, 1996, 216: 431-436.
- [4] Schnitzler P, Darai G. Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus[J]. J Gen Virol, 1993, 74: 2141-50.
- [5] Hyatt A D, Gould A R, Zupanovic Z, et al. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses[J]. Arch Virol, 2000, 145: 301-331.
- [6] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Arch Virol, 1995, 10(Suppl): 208-239.
- [7] Willis D B, Goorha R, Miles M, et al. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. X. transcriptional and post-transcriptional regulation of virus gene expression[J]. J Virol, 1977, 24: 324-326.
- [8] Black P N, Blair C D, Butcher A, et al. Biochemistry and ultrastructure of iridescent virus type 29[J]. J Invertebr Pathol, 1981, 38: 12-21.
- [9] Cameron I R. Identification and characterization of the gene encoding the major structural protein of the insect iridescent virus type 22[J]. Virol, 1990, 178: 35-42.
- [10] Stohwasser R, Raab K, Schnitzler P, et al. Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction[J]. J Gen Virol, 1993, 74: 873-879.
- [11] Tajbakhsh S, Lee P E, Watson D C, et al. Molecular cloning, characterisation, and expression of the *Tipula* iridescent virus capsid gene[J]. J Virol, 1990, 64: 125-136.
- [12] Webby R, Kalmakoff J. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses[J]. Arch Virol, 1998, 143: 1949-1966.
- [13] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution[J]? Virus Genes, 1998, 16: 59-66.
- [14] Mao J H, Hedrick R P, Chinchar V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses[J]. Virol, 1997, 229: 212-220.
- [15] Kanchanakhan S, Saduakdee U M, Chinabut S, et al. Isolation and characterisation of a new virus from ulcerative disease tiger frog, *Rana tigrina* Cantor[A]. Proceed of the 37th Kasetsart university annual conference[C]. Text & Journal publication company, 1999. 133.