

白斑综合征病毒 2014 年中国毒株 变异区的序列比较*

孙新颖^{1,2} 万晓媛¹ 刘庆慧^{1,3①} 黄 健^{1,3①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 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 上海 201306; 3. 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 青岛 266237)

摘要 为研究白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)在中国不同地区的分子流行病学变异特征,对 2014 年 1-8 月期间在病害暴发区采集到的 48 份 PCR 检测阳性样本,用 ORF75、ORF94 和 ORF125 引物扩增目的片段,连接转化已克隆目的片段,测序分析不同样本 ORF75、ORF94 和 ORF125 重复序列数目的差异。结果显示,不同地区毒株 ORF75 的重复单元数目有 4、10、11、12、13 不等,ORF94 的重复单元数目有 4 和 14,而 ORF125 的重复单元数目有 0、3、5、6、7 不等。结果表明,流行在中国大部分地区的 WSSV 存在一定程度变异,毒株间的变异在 ORF75、ORF94 和 ORF125 上比较明显。

关键词 WSSV; 流行病; ORF; VNTR

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)02-0127-07

随着全球对虾养殖产业的不断发展,其病害也日趋严重,给养殖户造成了严重的经济损失(Nakano *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Karunasagar *et al.*, 1997)。据 Nakano 等(1994)不完全统计,自 20 世纪 90 年代白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)病害暴发以来,出现了大幅度的上升趋势,并且已经成为遏制养殖产业健康发展的致命点(蔡生力等, 1995; Lo *et al.*, 1999; Flegel, 1997)。探究对虾病害的流行变异特点和规律,显得愈发重要和突出。

引起全球范围对虾病害暴发,并导致巨大经济损失的主要病因为病毒类疾病。到目前为止,在已经发现的数十种病毒中,白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)造成的灾害最为严重。WSSV 可感染 40 余种甲壳纲动物以及水生浮游动物,在全球养殖区均有流行,它是一种大型、双链、环状的 DNA

病毒,其基因组大小约为 300 kb,隶属于线头病毒科(Nimaviridae)、白斑病毒属(Whispovirus)(Marks *et al.*, 2005; Mayo, 2002)。

同已经在 GenBank 上公布的中国株(WSSV-CN)、台湾株(WSSV-TW)和泰国株(WSSV-TH)基因组全序列相比较,发现有约 99%的核苷酸保持一致性(于力等, 2008; Marks *et al.*, 2004)。虽然多数基因高度保守,但在有些位点上会出现差异,主要表现在大片段插入/缺失、单核苷酸替换和在开放性阅读框(Open Reading Frames, ORFs)出现的重复序列单元数目的差异(Variable Number Tandem Repeat, VNTR)(van Hulten *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001)。WSSV 毒株间最大的差异往往表现在 ORF75、ORF94 和 ORF125 VNTR 区的变化, VNTR 已被应用于 WSSV 分子流行病学的研究(Gudkovs *et al.*, 2014; Dieu *et al.*, 2004;

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、山东省“泰山学者”建设工程和农业部科研杰出人才创新团队专项经费共同资助。孙新颖, E-mail: sxy16@163.com

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

收稿日期: 2015-04-04, 收修改稿日期: 2015-04-24

1) 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

Musthaq *et al.*, 2006; 于洪涛, 2008¹⁾。

本研究对中国境内 2014 年 1–8 月病害暴发期间采集到的 48 份 WSSV 阳性样本, 进行 ORF75、ORF94 和 ORF125 重复片段的 VNTR 分析, 以此获取 2014 年 WSSV 病毒 ORF75、ORF94 和 ORF125 重复片段变化情况。

1 材料与方法

1.1 WSSV 样本来源

实验用患病样本取自中国各地 2014 年 1–8 月间出现发病症状的养殖池(表 1)。所有样本采集后置于 -20°C 保存备用。

表 1 WSSV 样本采集信息及 ORF75、ORF94 和 ORF125 重复数
Tab.1 WSSV samples and repeat units (RUs) present in ORF75, ORF94 and ORF125

序号 No.	采集时间编号 Date No.	产地/来源 Source	品种 Species	75 RU (45 bp)	75 RU (102 bp)	94 RU (54 bp)	125 RU (69 bp)
1	140104001	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	14	–
2	140104002	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	8	2	–	5
3	140104003	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	8	2	–	5
4	140104004	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	–	–	–	5
5	140104005	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	8	2	–	5
6	140104006	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	8	2	–	5
7	140104007	河北曹妃甸 Caofeidian, Hebei	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	8	2	–	5
8	140409002	浙江宁波 Ningbo, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	–
9	140416001	山东即墨 Jimo, Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	–
10	140418001	山东日照 Rizhao, Shandong	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	–	–	–	–
11	140418010	江苏如东 Rudong, Jiangsu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	–
12	140418013	江苏赣榆 Ganyu, Jiangsu	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	–	–	14	7
13	140418014	江苏赣榆 Ganyu, Jiangsu	脊尾白虾 <i>E. carinicauda</i>	8	3	14	7
14	140418015	江苏如东 Rudong, Jiangsu	三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	–	–	14	7
15	140419001	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
16	140419002	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
17	140419003	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
18	140419004	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
19	140419005	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
20	140419009	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
21	140419010	浙江湖州 Huzhou, Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosebergii</i>	–	–	–	–
22	140422002	辽宁 Liaoning	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	–
23	140422003	辽宁 Liaoning	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	–	–	14	–
24	140428002	福建厦门 Xiamen, Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	3	1	14	3
25	140428003	福建漳浦 Zhangpu, Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	3
26	140508001	山东青岛 Qingdao, Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	–	3
27	140522002	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	11	2	–	3
28	140522003	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>	9	3	4	6
29	140522004	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	4	–
30	140522005	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	4	6
31	140522006	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	4	6
32	140522007	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	4	6
33	140522008	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	–	–	4	6
34	140522009	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	9	3	4	6

续表 1

序号 No.	采集时间编号 Date No.	产地/来源 Source	品种 Species	75 RU (45 bp)	75 RU (102 bp)	94 RU (54 bp)	125 RU (69 bp)
35	140522010	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	4	6
36	140522011	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	4	6
37	140522012	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	4	6
38	140522014	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
39	140522015	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
40	140522016	浙江温州 Wenzhou, Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	4	6
41	140625002	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
42	140625008	广东江门 Jiangmen, Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
43	140716007	山东青岛 Qingdao, Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	-
44	140801003	河北黄骅 Huanghua, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	3	1	-	0
45	140801004	河北黄骅 Huanghua, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	0
46	140801005	河北黄骅 Huanghua, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	-	0
47	140801006	河北黄骅 Huanghua, Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	-	-	4	0
48	140801007	河北黄骅 Huanghua, Hebei	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>	3	1	-	0

- . 未检出; -. Not detected

1.2 样品的套式 PCR 检测

取约 30 mg 鳃组织, 按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)的说明书进行 DNA 提取。对 WSSV DNA 样本的检测采用 GB/T28630 的套式 PCR 方法。PCR 产物通过用 1×TBE 电泳缓冲液配制的 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.3 ORF75、ORF94 和 ORF125 的 PCR 扩增

将所有 WSSV 核酸样本进行 ORF75、ORF94 和 ORF125 的 PCR 扩增。主要混合物与体积在 3 种 PCR 扩增中均一致: 10× PCR 反应缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μl, 双蒸水 17.3 μl, 脱氧核酸混合物 2 μl, 正向与反向引

物各 0.5 μl, Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, WSSV 模板 1 μl, 总体积为 25 μl。PCR 扩增中使用的引物与反应条件见表 2 (Dieu *et al*, 2004; 于洪涛等, 2008¹⁾; Kathy *et al*, 2013; Wongteerasupaya *et al*, 2003)。

1.4 ORF75、ORF94 和 ORF125 基因的克隆及序列分析

VNTR 扩增后的 PCR 产物用胶回收试剂盒获得纯化目的片段 DNA, 用 NanoDrop 2000 测得 DNA 浓度后, 通过 pMD[®]18-T Vector 连接转化后的菌液送至上海生工进行测序。采用 DNAMAN 软件分析 ORF75、ORF94 和 ORF125 重复单元数目的差异。

表 2 PCR 扩增引物与反应条件
Tab.2 PCR primers and cycling conditions

引物 Primer	序列 Sequence	预变性 Pre-denaturation	PCR 条件 PCR cycling conditions	延伸 Extension
ORF-75F ORF-75R	CTTTCACCGCTCTCA GGGTTACACAGAGACAGG	94°C 5 min	35 cycles: 94°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 2 min	72°C 7 min
ORF-94S ORF-94A	CTGGGTGGCATCGGTTAG CGTCACTTTCGTGCGTAGT	94°C 5 min	35 cycles: 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min	72°C 7 min
ORF-125F ORF-125R	CGAAATCTTGATATGTTGTGC CCATATCCATTGCCCTTCTC	94°C 5 min	35 cycles: 94°C 30s, 54°C 30 s, 72°C 1 min	72°C 7 min

1) 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

2 结果与分析

2.1 套式 PCR 检测结果

在 WSSV 病害暴发区采集到的 48 份样本中, 共有 6 份在第 1 轮检测中出现阳性条带, 其余 42 份样本均在第 2 轮检测中出现阳性条带。

2.2 ORF75、ORF94 和 ORF125 扩增结果

在 48 份 WSSV 样本中, 3 次 PCR 扩增均仅有部分地区的样本可检出。其中, 共有 12 份(2#、3#、5#、6#、7#、13#、24#、27#、28#、34#、44#、48#)出现 ORF75 检测条带, 未检出的有 36 份, 包括山东即墨、日照、青岛, 浙江宁波、湖州, 江苏如东, 辽宁, 福建漳浦, 广东湛江、江门的样本。ORF75 的检出率为 25.0%, 其中, 24#、44#与 48#样本扩增条带比其他样本扩增条带略小(图 1)。

PCR 扩增 ORF94 共有 18 个样本(1#、12#、13#、14#、23#、24#、28#、29#、30#、31#、32#、33#、34#、35#、36#、37#、40#、47#)出现检测条带, 有 30 份样本未检出, 包括山东即墨、日照、青岛, 浙

江宁波、湖州, 福建漳浦, 广东湛江、江门的样本。ORF94 检出率为 37.5%, 其中, 前 6 个样本与之后的条带相比, 扩增片段略大(图 2)。

ORF125 的 PCR 扩增中, 共有 28 份(2#、3#、4#、5#、6#、7#、12#、13#、14#、24#、25#、26#、27#、28#、30#、31#、32#、33#、34#、35#、36#、37#、40#、44#、45#、46#、47#、48#)样本出现条带, 未检出的样本主要来自山东即墨、日照, 浙江宁波、湖州, 辽宁, 广东湛江、江门。检出率为 58.3%, 其中, 样本 24#、25#较之其他样本的扩增片段略小(图 3)。

2.3 序列分析

ORF75 主要扩增出 6 种不同大小的片段, 分别为 2205 bp (河北曹妃甸)、2308 bp (江苏赣榆)、2013 bp (福建厦门)、2431 bp (江苏南京)、2352 bp (江苏南京、浙江温州)和 1738 bp (河北黄骅), 将测得的目的片段与重复单元序列比对, 结果显示, 45 bp 的 75RU 数目对应为 8、8、4、11、9 和 3, 而 102 bp 的 75 RU 数目对应为 2、3、1、2、3 和 1。在 ORF94 的扩增中, 主要有两种不同大小的片段, 902 bp (河北曹妃甸、

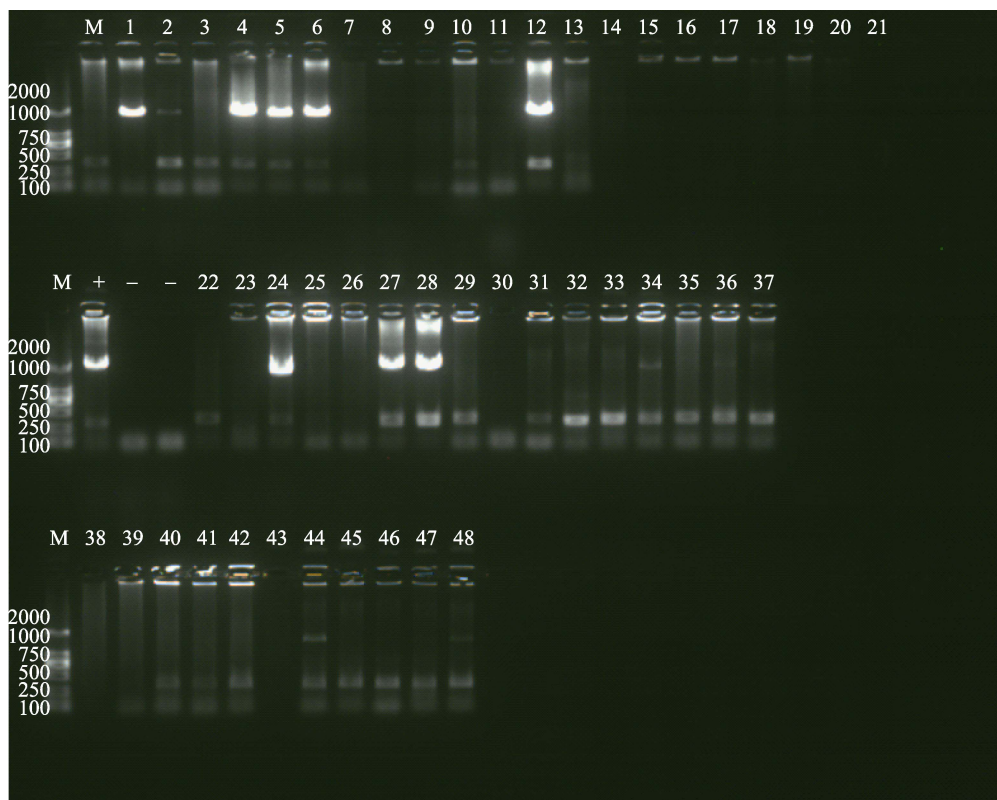


图 1 ORF75 扩增

Fig.1 Amplification of ORF75

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号

M: DNA Marker DL2000; +: Positive control; -: Negative control; 1-48: No. of samples

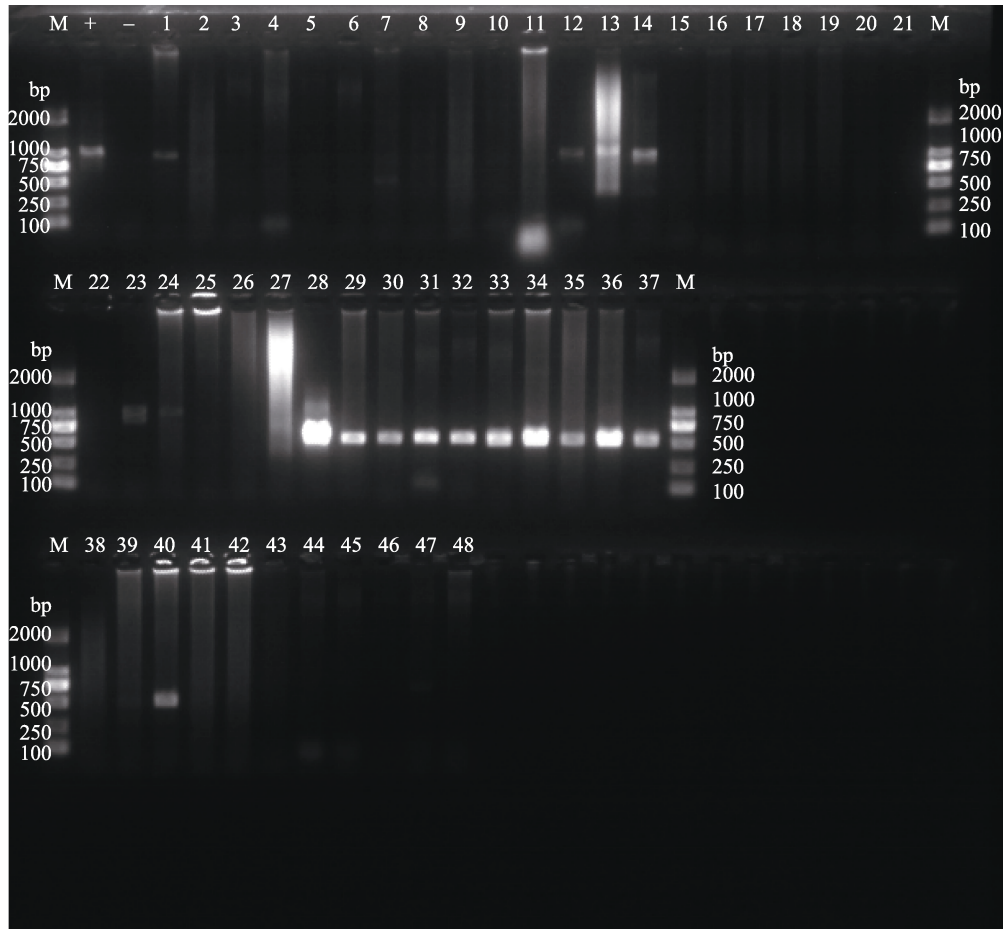


图 2 ORF94 扩增

Fig.2 Amplification of ORF94

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号

M: DNA Marker; +: Positive control; -: Negative control; 1-48: No. of samples

江苏赣榆和如东、辽宁、福建厦门)和 519 bp (江苏南京、浙江温州、河北黄骅), 其中的重复单元数目分别为 14 和 4。而对于 ORF125 的扩增, 扩增出的片段长度有 720 bp (河北曹妃甸)、851 bp (江苏赣榆、如东)、633 bp (福建厦门、漳州)、726 bp (山东青岛、江苏南京)、789 bp (江苏南京、浙江温州)以及 812 bp (河北黄骅), 其中的重复单元数目对应为 5、7、3、3、6 和 0 (表 1)。

3 讨论

本研究分析 2014 年采集的 48 份 WSSV 检测阳性样本, 样本涉及从北向南分布的 7 个省份, 即辽宁、河北、山东、江苏、浙江、福建和广东, 样本采集时间为当地白斑病暴发期间。ORF75、ORF94 和 ORF125 可扩增出来的概率分别为 25.0%、37.5%和 58.3%, 但不同地区、不同样本之间还是存在明显的差异, 其中, 浙江的湖州、宁波, 广东的湛江、江门, 山东的

即墨、日照地区的样本 3 种重复单元均未扩增出, 并且一致性较高。仅在江苏的赣榆、南京部分样本和福建厦门地区的样本中, 3 种重复单元序列同时被扩增出。其他地区的样本有 1 个或者两个 ORFs 可以被扩增出来, 但不同样本之间差异性较大。

在各地区样本的 ORF75 中, 重复单元数目差异比较明显, 在 ORF75 中或许存在相对活跃的变异位点或者序列, 江苏南京的样本中含有的重复片段最多, 且南京样本之间也有差异, 而河北黄骅样本含有的重复片段最少, 推测是由于 DNA 序列缺失较多; 从 ORF94 的扩增结果中可以看出, 仅存在两种重复单元数目, 序列相对比较保守; 在 ORF125 的扩增结果中, 出现了 4 种重复单元数目, 在这 4 种情况中, 福建厦门、漳浦、山东青岛和江苏南京的样本序列中重复片段较之其他样本有差异, 且其片段偏小, 河北黄骅的样本中, 片段大小虽有 812 bp, 但却无重复片段, 猜测此样本序列有很大程度的变异。

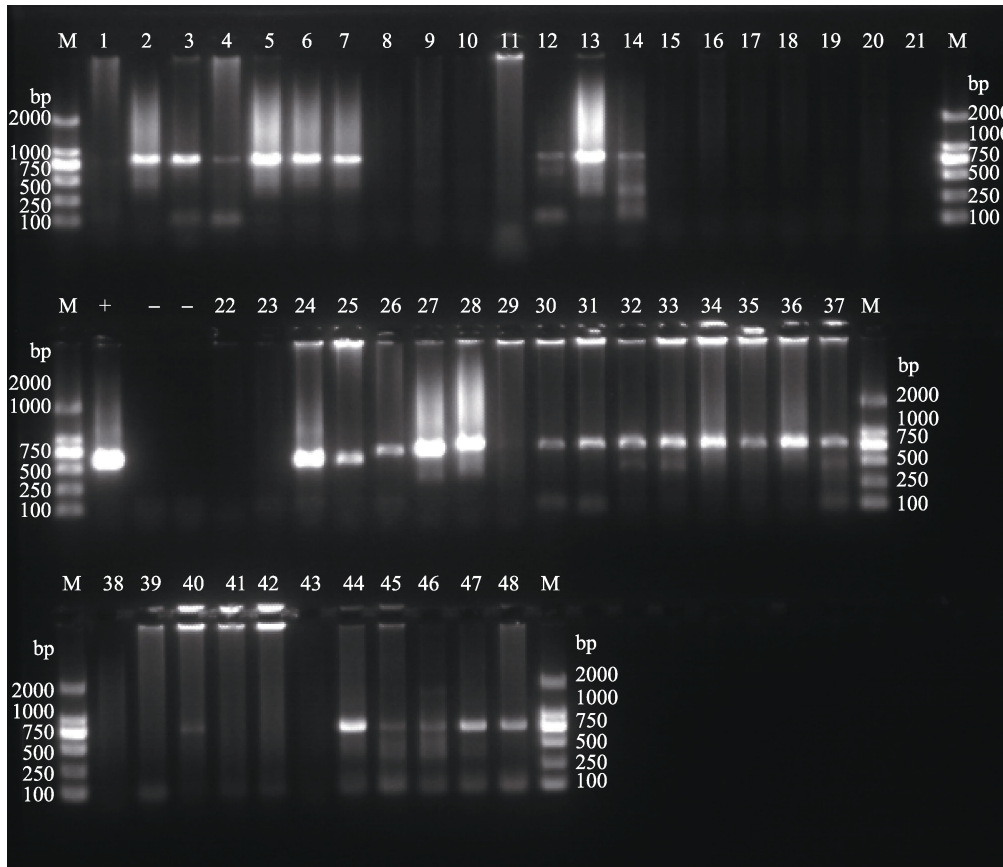


图 3 ORF125 的扩增

Fig.3 Amplification of ORF125

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号
M: DNA Marker DL2000; +: Positive control, -: Negative control; 1-48: No. of samples

在 Kathy 等(2013)对非洲马达加斯加岛、莫桑比亚和沙特阿拉伯王国地区采集的 13 个样本进行的研究中发现, 3 个地区 ORF75 的重复单元数目均为 3, 没有出现差异的情况; 而 ORF94 大多数序列缺失, 仅有沙特阿拉伯地区的两个样本出现了重复单元数目, 分别为 7 和 13; ORF125 的重复单元数目为 6、7、8 不等(Kathy *et al.*, 2013)。Gudkovs 等(2014)研究表明, ORF94 的重复单元数目在海水与淡水虾类及淡水螯虾中也有相对的稳定性。然而, 在 Waikhom 等(2006)的实验中却显示, 在相同或不同对虾物种以及其他少量敏感甲壳纲动物宿主的不同株中, 表现出了 ORF94 的不稳定性(Sindhupriya *et al.*, 2014; Waikhom *et al.*, 2006)。通过实验研究, 发现 3 种 ORFs 的重复单元数目并不确定, 出现了隔离区上的差异, 不同地区之间的差异性比较明显, 推测这可能与不同 WSSV 毒株的致病力强弱有关。

不同 WSSV 毒株在核苷酸序列上的差异必然会造成开放性阅读框和蛋白编码的改变, 差异序列的存

在, 可能会使病毒自身更适应环境, 更利于自身复制并建立感染。因此, 为了更好地做好病害的防御工作以及确保养殖产业的健康发展, 研究 WSSV 不同毒株之间的核苷酸序列差异, 可为 WSSV 的流行病学研究提供重要的参考依据。

参 考 文 献

- 于力, 李庆章. 虾白斑综合征病毒的研究进展. 中国预防兽医学报, 2008, 30(6): 486-489
- 蔡生力, 王崇明. 1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究. 水产学报, 1995, 19(2): 112-119
- Dieu BTM, Marks H, Siebenga JJ, *et al.* Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. J Gen Virol, 2004, 85: 3607-3618
- Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
- Gudkovs N, Murwantoko M, Walker PJ. Stability of the WSSV ORF94 VNTR genotype maker during passage in marine shrimp, freshwater crayfish and freshwater prawns. Dis Aquat Organ, 2014, 111(3): 249-257
- Karunasagar I, Otta 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
- Lo CF, Hsu HC, Tsai MF, *et al.* Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. *Dis Aquat Organ*, 1999, 35(3): 175-185
- Marks H, Goldbach RW, Vlak JM, *et al.* Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch Virol*, 2004, 149(4): 673-697
- Marks H, van Duijse JA, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Res*, 2005, 110(1-2): 9-20
- Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol*, 2002, 147(8): 1655-1656
- 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: 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 Pathol*, 1994, 29: 135-139
- Sindhupriya M, Saravanan P, Otta SK, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) genome stability maintained over six passages through three different penaeid shrimp species. *Dis Aquat Organ*, 2014, 111(1): 23-29
- van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 2001, 286(1): 7-22
- Waikhom G, John KR, George MR, *et al.* Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 54-63
- Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, *et al.* High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis Aquat Organ*, 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*. *Dis Aquat Organ*, 1995, 21(1): 69-77
- Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*, 2001, 75(23): 11811-11820

(编辑 冯小花)

Sequence Comparison of WSSV Variable Regions from Different Parts of China in 2014

SUN Xinying^{1,2}, WAN Xiaoyuan¹, LIU Qinghui^{1,3}①, HUANG Jie^{1,3}②

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266200)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is the most important and harmful pathogen in shrimp farming. As the areas and scales of prawn farming expand, more and more genetic variation in different WSSV strains has been noticed. Three regions of the WSSV variation located in ORF75, ORF94 and ORF125 of the genome, containing various numbers of tandem repeats (VNTR), and VNTR has been widely used as genetic markers in epidemiological studies. In this study we studied the molecular epidemiology of variation characteristics of WSSV in different areas of China. Forty-eight PCR-proved WSSV-positive samples were collected from Liaoning, Hebei, Shandong, Jiangsu, Zhejiang, Fujian and Guangdong during the white spot disease outbreak periods from January 2014 to August 2014. These samples were genotyped by PCR with specific primers of ORF75, ORF94, and ORF125, and the amplified fragments were then connected to T-vector and transformed into *E. coli* Top10. After the sequencing, we assayed the three WSSV VNTR regions in ORF75, ORF94 and ORF125 from different samples. The results confirmed 5 ORF75 VNTR types consisting of 4, 10, 11, 12 and 13 repeat units (RUs). We also identified 2 ORF94 VNTR consisting of 4 and 14 RUs, and 5 ORF125 VNTR consisting of 0, 3, 5, 6, and 7 RUs. The results suggested that there was a certain degree of prevalence and variation in WSSV in most parts of China, and that the variation in ORF75, ORF94 and ORF125 between different strains was obvious. Moreover, there could be a correlation between the specific VNTR variation and the disease outbreaks in different regions, which needs further investigation.

Key words WSSV; Epidemic; ORF; VNTR

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