

# 山东沿海部分地区真鲷虹彩病毒病初步调查与分析

赵玉然<sup>1,2</sup> 岳志芹<sup>2</sup> 谭乐义<sup>2</sup> 马 亚<sup>1</sup> 李 琼<sup>3</sup> 梁成珠<sup>2</sup> 李八方<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup> 山东出入境检验检疫局技术中心, 青岛 266002)

(<sup>3</sup> 江西出入境检验检疫局综合技术中心, 南昌 330046)

**摘 要** 2008 年 11 月~2010 年 11 月, 采集山东海域大菱鲆、石鲈、鲈鱼各 20 批, 按照世界动物卫生组织推荐的 PCR 检测方法对真鲷虹彩病毒病(Red Sea Bream Iridoviral Disease, RSIVD)进行初步调查。结果显示, 共检出 4 例 RSIVD 感染样品。以真鲷虹彩病毒(Red Sea Bream Iridovirus, RSIV)和传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)主要衣壳蛋白基因为基础, 设计简并引物, PCR 扩增本次检出阳性样品的 RSIV/ISKNV MCP 基因。将 MCP 基因 PCR 扩增产物测序, 提交 GenBank, 并以 MCP 基因为基础, 对被检出的阳性样品进行虹彩病毒属系统分类, 绘制进化树。由进化树得出, 4 例阳性病毒株均属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属。

**关键词** 真鲷虹彩病毒 传染性脾肾坏死病毒 PCR MCP 基因 同源性

**中图分类号** S943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)06-0031-06

## Preliminary investigation and analysis of red sea bream iridoviral disease (RSIVD) in some coastal areas of Shandong Province

ZHAO Yu-ran<sup>1,2</sup> YUE Zhi-qin<sup>2</sup> TAN Le-yi<sup>2</sup> MA Ya<sup>1</sup> LI Qiong<sup>3</sup>  
LIANG Cheng-zhu<sup>2</sup> LI Ba-fang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Shandong Technical Center of Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002)

(<sup>3</sup> Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanchang 330046)

**ABSTRACT** During Nov. 2008~Nov. 2010, 20 batches of turbot *Scophthalmus maximus*, stone flounder *Kareius bicoloratus*, and perch *Perca fluviatilis* were respectively collected from some coastal areas of Shandong Province, and the infection of red sea bream iridoviral disease (RSIVD) was investigated using PCR method recommended by the World Organization for Animal Health. The result showed that the RSIVD was detected in four samples. Based on the major capsid protein (MCP) gene of the two standard strains of red sea bream iridovirus and infectious spleen and kidney necrosis virus, degenerate primers were designed for PCR, and the MCP gene in the four positive samples were amplified and submitted to GenBank. The phylogenetic tree was drawn, and it was found that all of four isolated virus strains belonged to Megalocytivirus genus of Iridoviridae.

**KEY WORDS** Red Sea bream iridovirus Infectious spleen and kidney necrosis virus

国家质量监督检验检疫总局科研项目(2007IK267)和质检总局公益性项目(10-71)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: bfli@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82031852

收稿日期: 2011-02-28; 接受日期: 2011-05-12

作者简介: 赵玉然(1983-), 女, 博士, 主要从事水生动物疫病检验检疫研究。E-mail: ran-007@163.com

## PCR Major capsid protein gene Homology

虹彩病毒(Iridovirus)是一类大型的胞浆型 DNA 病毒。根据国际病毒分类学委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)第八次报告,虹彩病毒科 Iridoviridae 分为 5 个属,包括感染脊椎动物的蛙病毒属 *Ranavirus*、细胞肿大病毒属 *Megalocytivirus* 和淋巴囊肿病毒属 *Lymphocystivirus*,以及感染无脊椎动物的虹彩病毒属 *Iridovirus*、绿虹彩病毒属 *Chloriridovirus*(Jakob *et al.* 2001),前 3 个属的虹彩病毒可感染多种水生经济动物并分布全球,目前对其研究较为广泛。

真鲷虹彩病毒病(Red Sea Bream Iridovirus Disease, RSIVD)是目前流行较广、研究较多的虹彩病毒病,该病最早暴发于日本(Inouye *et al.* 1992),随后,在东亚、东南亚国家相继暴发(Chou *et al.* 1998; Chua *et al.* 1994; Do *et al.* 2005; Gibson-kueh *et al.* 2004)。RSIVD 暴发突然,致死率高,给水产养殖业带来巨大的损失,严重影响经济鱼类的进出口贸易。鉴于其危害性,多年来该病一直被列为世界动物卫生组织必检疫病,我国农业部将其列为二类疫病。OIE 水生动物疾病诊断手册(Office International Des Epizooties, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic animals)(2009)认为,RSIVD 是由真鲷虹彩病毒(Red Sea Bream Iridovirus, RSIV)和传染性脾肾坏死病毒(Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus, ISKNV)两种病毒引起的(Inoue *et al.* 1992; He *et al.* 2001)。两种病毒基因同源性较高,但对感染宿主又有着明显的区别。近年来,随着越来越多的真鲷虹彩病毒同源变异病毒株的发现,真鲷虹彩病毒家族也在不断壮大。

本实验采用 OIE 推荐的真鲷虹彩病毒病检测方法,对山东海域部分地区进行了 RSIVD 的初步调查,应用 PCR 技术扩增了阳性样品的病毒 MCP 全基因,并以 MCP 基因为分类依据,对检出的病毒株进行了虹彩病毒科的同源性比对与系统分析,以便及时了解我国 RSIVD 的流行动态,为该病的防控奠定良好的实验基础,促进水生动物贸易的良好发展。

## 1 材料

### 1.1 实验样品

2008 年 11 月~2010 年 11 月,在山东沿海黄岛、青岛、威海、日照、荣成共采集鲜活鲈鱼 20 批、石鲮 20 批、大菱鲆 20 批,每批样品 30 尾。RSIV、ISKNV 核酸由本实验室保存。

### 1.2 试剂与仪器

#### 1.2.1 试剂

DNA 提取试剂盒(TaKaRa)、EX *Taq*(TaKaRa)、Marker DL2000(TaKaRa)、BigDye Terminator V1.1 试剂盒(ABI)。

#### 1.2.2 仪器

PCR 仪(Eppendorf),紫外凝胶成像分析仪(天能),离心机(Eppendorf),ABI 3130 基因测序仪。

## 2 方法

### 2.1 样品的前处理

取每批样品脑、脾、肾组织,每 5 尾混合为一个平行样进行低温快速研磨,−80 °C 保存备用。

### 2.2 引物的设计

用于 RSIVD 初步调查的 PCR 引物参照 OIE(2009),该引物扩增 RSIV/ISKNV 基因 570bp 的核苷酸片段,引物序列为:

RSIVD-F:5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3'

RSIVD-R:5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3'

通过对 RSIV(GenBank Accession No:BD143114)和 ISKNV(GenBank Accession No:AF371960)MCP 基因的相似性比对,由 Primer 5.0 软件设计 RSIVD MCP 基因的 PCR 扩增简并引物,扩增片段长 1 367bp(含 MCP 全基因 1 362bp 的核苷酸序列),引物序列为:

MCP-F:5'-TTACAGGATAGGGAAGCCT-3'

MCP-R:5'-TCATCATGTCTGCRATCTCA-3'

### 2.3 RSIVD 初步调查

参照 OIE(2009)推荐的方法,利用 RSIV-F、RSIV-R PCR 引物对山东海域采集到的待检样品进行 RSIV/ISKNV 检测。采用 DNA 提取试剂盒(TaKaRa)从鱼样品组织匀浆液中提取核酸,进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:核酸 2  $\mu$ l,12.5  $\mu$ l ExTaq(含 dNTP、Mg<sup>2+</sup> 的 Buffer 混液, TaKaRa),上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l,加水补充至总体积 25  $\mu$ l。PCR 反应参数:94  $^{\circ}$ C 变性 4 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、58  $^{\circ}$ C 退火 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 次循环;72 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保温。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

### 2.4 RSIVD 阳性检出样品 MCP 基因的序列分析

#### 2.4.1 RSIV/ISKNV MCP 基因 PCR 扩增

利用设计的 RSIV/ISKNV MCP 基因简并引物对 RSIVD 阳性样品进行虹彩病毒 MCP 基因的 PCR 扩增。反应体系为:核酸样品 2  $\mu$ l,0.5  $\mu$ l LA Taq (5U/ $\mu$ l),上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l,10 $\times$ LA Taq PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> plus) 5  $\mu$ l,dNTP MIX(dNTP 各 2.5 mmol/L)8  $\mu$ l,加水补充至总体积 50  $\mu$ l。PCR 扩增参数:94  $^{\circ}$ C 变性 1 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、54  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 次循环;72 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保温。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

#### 2.4.2 RSIV/ISKNV MCP 基因的序列分析

利用 ABI 3130 基因测序仪,对阳性样品 RSIV/ISKNV MCP 基因 PCR 产物进行测序,测序反应采用 ABI BigDye Terminator V1.1 试剂盒,测序结果提交 GenBank。

#### 2.4.3 系统树的绘制

利用 MegAlign 软件将检出的阳性病毒株与虹彩病毒科各个属代表株进行 MCP 基因的相似性比对并绘制系统树,对阳性病毒株进行系统分析,各属代表病毒株详情见表 1。

## 3 结果

### 3.1 RSIVD 的初步调查结果

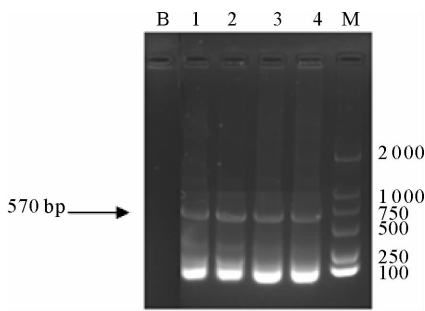
在被调查的 60 批鱼类样品中,4 批样品呈 PCR 阳性(570bp)(图 1),受感染鱼类包括鲈鱼、石鲮、大菱鲆 3 种海水鱼类。

### 3.2 RSIV/ISKNV MCP 基因的 PCR 扩增与测序结果

4 例阳性病毒株 MCP 基因的 PCR 扩增电泳见图 2(1 367bp,含 MCP 全基因 1 362bp)。将 4 例 RSIVD 阳性样品信息与 RSIV/ISKNV MCP 基因 PCR 扩增产物测序结果提交 GenBank,获得基因序列号分别为 HQ263622、HM596017、HQ263621、HQ263620。阳性检出样品信息与 GenBank 序列号对应关系见表 2。

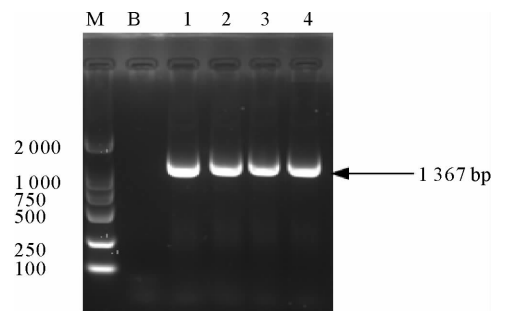
### 3.3 系统树的绘制

将获得的 4 例病毒株与表 1 中代表株进行 MCP 基因比对,绘制系统树(图 3)。从图 3 可以得出,4 例病毒株均归属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属,HQ263622、HM596017、HQ263621 与 AB166788(TBIV)、AY590687 (TRBIV)同源关系最近,HQ263620 与 AY894343(OSGIV)、AY532606(RBIV)同源关系最近。



M: DL2000; B: 空白对照; 1: 石鲈(2008年11月, 黄岛);  
2: 大菱鲆(2008年11月, 黄岛);  
3: 鲈鱼(2008年12月, 荣成); 4: 石鲈(2010年10月, 日照)  
M. DL2000; B. Blank Control; 1. Stone flounder (Nov. 2008, Huangdao); 2. Turbot (Nov. 2008, Huangdao);  
3. Perch (Dec. 2008, Rongcheng);  
4. Stone flounder (Oct. 2010, Rizhao)

图1 RSIVD初步调查阳性检出样品PCR扩增产物电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of four RSIVD positive samples



M: DL2000; B: 空白对照;  
1~4: 分别是 HQ263622、  
HM596017、HQ263621、HQ263620;  
M: DL2000; B: Blank control; 1~4: HQ263622,  
HM596017, HQ263621, HQ263620 respectively  
图2 4例RSIVD阳性样品MCP基因PCR  
扩增产物电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of MCP gene in four RSIVD positive samples

表1 虹彩病毒科各属病毒基因序列号

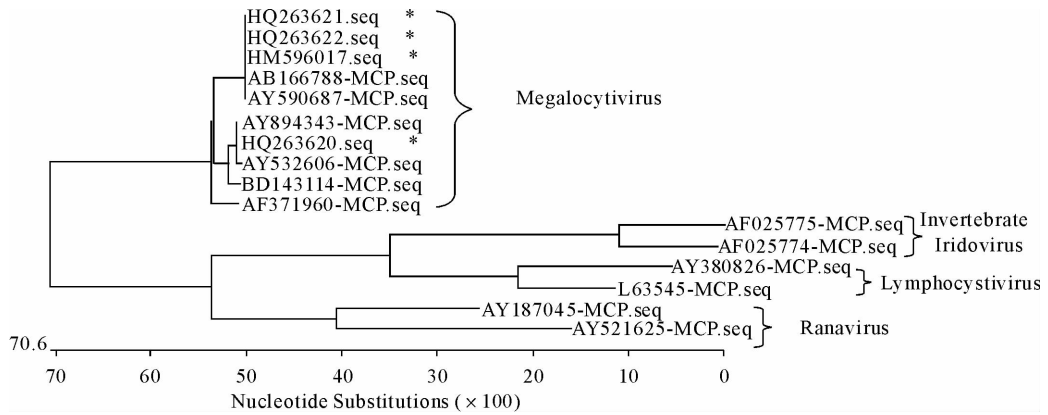
Table 1 The viruses in family Iridoviridae and their GenBank accession number

属 Genus	基因序列号 GenBank accession number	病毒株 Strain
无脊椎动物虹彩病毒 Invertebrate iridovirus	AF025775	新西兰肋翅鳃金龟虹彩病毒 Costelytra zealandica iridescent virus (CZIV)
	AF025774	昆虫虹彩病毒 Wisearia iridescent virus (WIV)
细胞肿大病毒属 Megalocytivirus	AF371960	传染性脾肾坏死病毒 Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)
	AY894343	斜带石斑鱼虹彩病毒 Orange-spotted grouper iridovirus (OSGIV)
	AY532606	条石鲷虹彩病毒 RBIV-KOR-TY1 病毒株 Rock bream iridovirus strain RBIV-KOR-TY1 (RBIV)
	AB166788	大菱鲆虹彩病毒 Turbot iridovirus (TBIV)
	AY590687	大菱鲆红体病虹彩病毒 Turbot reddish body iridovirus (TRBIV)
淋巴囊肿病毒属 Lymphocystivirus	BD143114	真鲷虹彩病毒 Ehime-1 病毒株 Red sea-bream iridovirus Ehime-1 strain (RSIV)
	AY380826	淋巴囊肿病毒-C Lymphocystis disease virus-C (LCDV-C)
	L63545	淋巴囊肿病毒-1 Lymphocystis disease virus-1 (LCDV-1)
蛙病毒属 Ranavirus	AY187045	流行性造血器官坏死病毒 Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)
	AY521625	新加坡石斑鱼虹彩病毒 Singapore grouper iridovirus (SGIV)

表 2 阳性检出样品信息

Table 2 Information of the four RSIVD positive samples

病毒株 Strain	GenBank 序列号 GenBank accession No.	种类 Species	时间、地点 Sampling time and location
Turbot iridovirus strain	HM596017	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	2008 年 11 月, 黄岛
Stone flounder 603-3 strain	HQ263622	石鲈 <i>Kareius bicoloratus</i>	2008 年 11 月, 黄岛
Perch 603-2 strain	HQ263621	鲈鱼 <i>Perca fluviatilis</i>	2008 年 12 月, 荣成
Stone flounder 724 strain	HQ263620	石鲈 <i>Kareius bicoloratus</i>	2010 年 10 月, 日照



HQ263622\*、HM596017\*、HQ263621\*、HQ263620\* :新分离病毒株 Newly isolated strains

图 3 根据虹彩病毒 MCP 基因序列绘制的系统树

Fig. 3 The phylogenetic tree based on the MCP gene of Iridovirus

### 4 讨论

真鲷虹彩病毒是目前研究较多的一类虹彩病毒,该病毒流行范围广、致死性强。真鲷虹彩病毒病是由真鲷虹彩病毒及其变异病毒株引起的一类破坏性病毒病,该病主要感染真鲷、石鲈、大菱鲆、鲈鱼等 30 多种鱼类。被感染的鱼类具有昏睡、严重贫血、鳃有淤点、脾肿大的症状。通过革兰氏染色对患病鱼的脾、肾、心脏进行组织病理学观察,可观察到肿大的细胞着色较深,这是该病的主要特征(Jung *et al.* 1997)。夏季水温在 25℃ 或高于此温度时,该病易暴发。1990 年,该病首次暴发于日本,引起了日本西部养殖鱼类的大量死亡。随后,在亚洲的东部和东南部国家也被发现。2003 年,我国深圳出入境检验检疫局在台湾送检的两批海水鲈鱼苗中检出该病,在山东沿海城市也陆续出现了相近虹彩病毒变异株。ISKNV 为我国首次发现的可感染淡水鱼类的虹彩病毒(He *et al.* 2001; Sudthongkong *et al.* 2002),在 OIE(2009)水生动物疫病诊断手册中该病原被列为真鲷虹彩病毒病病原之一。

按照 OIE(2009)推荐的检测方法,对我国山东海域 RSIVD 进行初步调查。结果表明,山东沿海海域共检出 4 批 RSIVD 阳性样品,受感染鱼种为石鲈、大菱鲆和鲈鱼,此 3 种鱼类为山东地区主要经济鱼类,该病原的发现对山东渔业养殖经济、经济鱼类的进出口贸易带来了不利影响,必须采取积极有效的防治措施,控制病原携带个体的运输,防止病毒的传播。虽然,由于温度和宿主自身条件等因素的影响,该病目前未暴发疫情,但由于病原的检出,必须做好相应的监管工作,以防止疫病的暴发与蔓延。

由于 RSIV/ISKNV 没有合适的细胞培养系,无法进行病毒增殖培养与分离,PCR 检测方法仍旧是 OIE(2009)推荐的主要检测方法,又由于 PCR 检测方法具有灵敏度高、特异性好、操作简便且普遍适用的优点,该检测方法已成为我国水生动物病毒检测的主要方法,与其他水生动物检测方法如荧光定量 PCR、酶联免疫检测方法(ELISA)、组织病理学相比较,该检测方法不需要设计昂贵的探针,成本低廉,不需要昂贵的仪器,适用于未出现临床症状期间的早期检测,可用于疫病的防控,更适合在我国有效推广。

目前,针对虹彩病毒 PCR 检测的靶序列有很多种,包括 DPOL、ATP 酶基因、*Pst* I 限制性位点、核酸还原酶小亚基(RNRS)基因等(Jeong *et al.* 2006),但由于 GenBank 不能提供上述基因的详尽的比对序列,因此本实验设计了以 MCP 基因做为靶序列的检测方法,可以更好地研究病毒株的分类地位,而 MCP 基因由于其特异性、保守性(Tidona *et al.* 1998; Paperna *et al.* 2001),更适合作为虹彩病毒科系统分类的依据。本实验通过对 RSIV 与 ISKNV MCP 基因的同源性比较,设计简并引物,PCR 扩增了 RSIVD 病原 MCP 基因的全序列,建立了以 MCP 基因为基础的 RSIVD PCR 检测方法,该方法的建立可以满足 RSIVD 常规检测的要求,并为虹彩病毒的系统分类奠定了实验基础。

通过此次调查,获得 4 例 RSIVD 阳性病毒株,通过与虹彩病毒科 5 个病毒属(包括 3 个脊椎动物病毒属和两个无脊椎动物病毒属)代表病毒株同源序列的比对,绘制系统进化树,可以得出,所分离病毒株均属于虹彩病毒科细胞肿大病毒属,是我国目前主要流行的虹彩病毒属,遗传性质稳定,他们的最大相似株分别是 OSGIV、TRBIV 和 TBIV,其中 TRBIV 和 TBIV 这两株病毒株都是近些年来在我国被检出(Shi *et al.* 2004),该病毒属与蛙病毒属、无脊椎动物虹彩病毒(包括绿病毒属和虹彩病毒属)、淋巴囊肿病毒属这些早期发现的病毒属有较远的亲缘关系。本次系统分析,可做为今后虹彩病毒分类以及命名的参考,具有一定的实际应用价值,为该病更深入的研究奠定了一定的理论基础。

## 参 考 文 献

- Chou, H. Y., Hsu, C. C., and Peng, T. Y. 1998. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan. *Fish Pathol.* 33(4): 201~206
- Tidona, C. A., Schnitzler, P., Kehm, R., and Darai, G. 1998. Is the major capsid protein of Iridovirus a suitable target for study of viral evolution? *Virus Genes.* 16(1): 59~66
- Chua, F. H. C., Ng, M. L., Ng, K. L., Loo, J. J., and Wee, J. Y. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, "Sleepy Grouper Disease", affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. *Fish Dis.* 17(4): 417~427
- Do, J. W., Cha, S. J., Kim, J. S., An, E. J., Park, M. S., Kim, J. W., Kim, Y. C., Park, M. A., and Park, J. W. 2005. Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.* 150(2): 351~359
- Gibson-Kueh, S., Ngoh-Lim, G. H., Netto, P., Kurita, J., Nakajim, A. K., and Ng, M. L. 2004. A systematic iridoviral disease in mullet, *Mugil cephalus* L. and tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forskal: a first report and study. *Fish Dis.* 27(12): 693~699
- He, J. G., Deng, M. S., Weng, P., Li, Z., Zhou, S. Y., Long, Q. X., Wang, X. Z., and Chang, S. M. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology.* 291(1): 126~139
- Inoue, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y., and Sorimachi, M. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 27(1): 19~27
- Jakob, N. J., Muller, K., Bahr, U., and Darai, G. 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo iridescent* virus. *Virology.* 286(1): 182~196
- Jeong, J. B., Kim, H. Y., Chung, J. K., Komisar, J. L., and Jeong, H. D. 2006. Molecular comparison of iridoviruses isolated from marine fish cultured in Korea and imported from China. *Aquaculture.* 255(1-4): 105~116
- Jung, S., Miyazaki, T., Miyata, M., Danayadol, Y., and Tanaka, S. 1997. Pathogenicity of iridovirus from Japan and Thailand for the red sea bream *Pagrus major* in Japan, and histopathology of experimentally infected fish. *Fisheries Sci.* 63: 735~740
- Office International Des Epizooties. 2009. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 6th Edition. Paris: OIE, 251~261
- Paperna, I., Vilenkin, M., and deMatos, A. P. A. 2001. Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis. Aquat. Org.* 48: 17~25
- Sudthongkong, C., Miyata, M., and Miyazaki, T. 2002. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.* 48(3): 163~173
- Shi, C. Y., Wang, Y. G., Yang, S. L., Huang, J., and Wang, Q. Y. 2004. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture.* 236(1-4): 11~25