

# 急性病毒性坏死病毒魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 克隆和生物信息学分析\*

张 帅<sup>1</sup> 王崇明<sup>1①</sup> 岳志芹<sup>2</sup> 宋晓玲<sup>1</sup> 白昌明<sup>1</sup>  
尹伟力<sup>2</sup> 黄 捷<sup>1</sup>

(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. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 青岛 266002)

**摘要** 为深入探讨急性病毒性坏死病毒(Acute Viral Necrosis Virus, AVNV)魁蚶株的致病机理以及 IAP-86 蛋白的功能,从感染 AVNV 的濒死魁蚶外套膜中提取总 RNA,反转录获得 cDNA。根据 NCBI 公布的 AVNV 全基因组序列中 ORF86 序列设计两对反向套式引物,通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得 ORF86 5'端和 3'端的非编码区,拼接获得全长 cDNA 序列。Blast 序列比对显示,该基因与牡蛎疱疹病毒的同源性为 100%,与栉孔扇贝 AVNV 的同源性为 99%,并存在重叠基因。生物信息学分析预测,该蛋白不含信号肽,不存在跨膜区,最大疏水指数为 1.800,最小疏水指数为-3.456。该蛋白存在 8 个潜在的磷酸化位点(包括 5 个丝氨酸、1 个苏氨酸和 2 个酪氨酸),存在 1 个潜在的 O-糖基化位点,不存在潜在的 N-糖基化位点;其抗原表位主要集中在 8-11、14-16、28-39、75-76、88-95、97-100 和 147-158 位氨基酸。推测该株病毒可能为牡蛎疱疹病毒的变异株,并且基因重叠在该类病毒进化过程中可能扮演重要角色。

**关键词** 急性病毒性坏死病毒; 魁蚶; 细胞凋亡抑制蛋白; cDNA 末端快速扩增技术; 生物信息学  
**中图分类号** S944 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0085-06

急性病毒性坏死病毒(Acute Viral Necrosis Virus, AVNV)是 20 世纪 90 年代中、末期导致我国北方沿海栉孔扇贝大规模死亡的主要病原(王秀华等, 2002; 艾海新等, 2003; 王崇明等, 2004; 宋微波等, 2001)。任伟成(2009)<sup>1)</sup>完成了 AVNV 全基因组序列的测定,并预测 AVNV 全基因组中含有 123 个潜在的开放阅读框(Open Reading Frames, ORF),其中 44 个 ORF 具有一定的结构和功能,推测可能与病毒 DNA 复制、核酸代谢修饰以及病毒与宿主的相互作用等有关。

魁蚶(*Anadara uropygimelana*)是一种大型的经济价值较高的贝类,为冷水性贝类,主要分布于我国山

东及辽宁沿海、日本、朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海(王如才等, 2008; 吴彪等, 2013; 田吉腾等, 2013)。近几年来随着魁蚶自然资源破坏严重,人工增殖发展迅猛,魁蚶苗种的需求量不断增大,推动了魁蚶育苗产业的发展,但随之而来的病害问题时有发生。2012 年 5 月本课题组在山东省长岛县进行 AVNV 流行病学调查时,发现某育苗场魁蚶亲贝出现大量死亡,采集魁蚶样品,PCR 检测其 AVNV 呈阳性。2013 年 4 月山东省即墨市某育苗场魁蚶亲贝也出现了大规模的死亡现象,样品 AVNV 检测呈阳性,且阳性率达到 100%。由于该病毒的全基因组序列还未测序完成,

\* 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)和国家质检总局科研项目(2013IK040)共同资助。张 帅, E-mail: wosdzhangshuai@163.com

① 通讯作者: 王崇明, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-02-28, 收修改稿日期: 2014-04-13

1) 任伟成. 栉孔扇贝急性病毒性坏死病毒基因组全序列的测定和核酸诊断技术的研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2009, 27-68

暂且将该株病毒定义为急性病毒性坏死病毒魁蚶株。

杆状病毒凋亡抑制蛋白(Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP)是一类含有 BIR 结构域的家庭蛋白, 该家族蛋白因最先在昆虫杆状病毒中发现而得名。BIR 结构域包含一个保守的组氨酸残基以及 3 个保守的半胱氨酸残基, 某些杆状病毒凋亡抑制蛋白含有保守的指环蛋白结构(Ring), 这个结构可以和 Zn 结合(Deveraux *et al.*, 1999)。IAP 重复序列结构蛋白(BIRP)调节的酶促反应是无脊椎动物防御病毒感染的重要介质, 研究发现 BIR 基因也存在于其他感染无脊椎动物的大型 DNA 病毒中, 如 *Baculoviridae* (Crook *et al.*, 1993)、*Poxviridae* (Afonso *et al.*, 1999)、*Ascoviridae* (Stasiak *et al.*, 2000)和 *Iridoviridae* (Jakob *et al.*, 2001)。Leu 等(2013)在研究 WSSV 感染对虾时发现, WSSV 表达的抑制凋亡蛋白可以有效地抑制病毒感染后诱导的宿主细胞自身凋亡, 便于病毒在宿主体内大量繁殖, 最终导致宿主死亡。

IAP-86 是 AVNV ORF86 编码的含有一个 BIR 结构域的杆状病毒凋亡抑制蛋白, 该蛋白已经成功地在大肠杆菌中进行了原核表达, 细胞凋亡检测试验证明该蛋白能在一定程度上抑制栉孔扇贝细胞凋亡。本研究对 AVNV 魁蚶株进行 IAP-86 基因的全长 cDNA 克隆与分析, 并与已经公布的栉孔扇贝中 AVNV 全基因组序列和牡蛎疱疹病毒全基因组序列进行比对, 不仅有助于通过基因全序列对 IAP-86 基因的功能做进一步研究, 也将为探讨 AVNV 魁蚶株的致病机理提供一定的实验基础和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用魁蚶于 2013 年 4 月取自山东省即墨市某育苗场, AVNV 检测呈阳性。

### 1.2 环化 RACE 克隆 IAP-86 基因全长 cDNA

根据 AVNV 全基因组序列设计的 IAP-86 套式反向引物及特异性引物序列见表 1。

#### 1.2.1 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因 ORF 区的扩增

取 50 mg 魁蚶的外套膜组织, 参照天根公司生产的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书的方法进行病毒总 DNA 提取。

以提取的病毒总 DNA 为模板, 使用 Primer 5.0 引物设计软件设计特异性引物: 上游引物 IAP-86-F, 下游引物 IAP-86-R。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 进行 35 个循环;

表 1 实验所用引物及序列

Tab.1 Primers used for the PCR analysis

引物序列 Primer	Nucleotide sequence(5'-3')
IAP-86-F	CGGGATCCATGGATATAGTACC
IAP-86-R	CCCAAGCTTGATAACTGCTAAGT
SMARTerAoligo Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACG (G/C)GGG
IAP86-Fo	CGAGCTTTATGAATGGGAGGCTGGTG
IAP86-Ro	TGGGGAAATGTCGTCTGTGTTTCGTATG
IAP86-Fi	CTATTTCTGATTGTAACTTAGCAG
IAP86-Ri	CTCTTTATTCTGAGTTCCTTGGATTCT
GSPRo	TGGGGAAATGTCGTCTGTGTTTCGTATG
GSPRi	CACGCATAGAATTCATACGAACAC
Long primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC

最后 72℃ 延伸 10 min; 产物 4℃ 保存。1%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。将扩增出的约 500 bp 的目的片段进行胶回收, 然后将该目的基因连接至 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)中, 做 TA 克隆并测序。

#### 1.2.2 病毒总 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成

取检测为阳性的魁蚶外套膜组织约 50 mg 置于 1.5 ml 灭菌的离心管中, 加入 1 ml 的 TRIzol (Invitrogen), 用研磨棒研磨匀浆, 先氯仿抽提, 然后异丙醇沉淀, 加适量无 RNase 水溶解总 RNA。10 μl 反应体系中含有 2.75 μl RNA 模板(浓度为 340 ng/μl)、2 μl 5×First-Strand Buffer、1 μl SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (10 U/μl)、1 μl DTT (20 mmol/L)、1 μl dNTPs (10 mmol/L)、1 μl SMARTerAoligo Primer (10 μmol/L)、0.25 μl RNase Inhibitor (40 U/μl), 1 μl Random Primer (10 μmol/L)。反转录条件为 25℃ 10 min、42℃ 90 min、72℃ 10 min, 反转录合成 cDNA 的第一条链。

1.2.3 环化 RACE 克隆 IAP-86 的 5'和 3'端 对合成的 cDNA 第一条链进行环化, 根据栉孔扇贝 AVNV 全基因组序列(GenBank 检索号: GQ153938)设计套式反向引物(Inverse primer)进行反向 PCR, 获得 IAP-86 cDNA 的 5'端和 3'端连接片段。25 μl 反应体系中含有 2.5 μl 10×ExTaq Buffer、2 μl dNTP (2.5 mmol/L)、1 μl IAP 86-Fo (10 μmol/L)、1 μl IAP86-Ro (10 μmol/L)、0.2 μl ExTaq 酶(40 U/μl) (TaKaRa)、2 μl cDNA 模板, 通过降落 PCR 进行第一重 PCR 扩增。扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 30 s, 68-48℃ 按照 2℃ 的梯度差 30 s, 72℃ 1 min, 各个温度梯度都进行 3 个循环; 之后 94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 1 min 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

将扩增产物稀释 10 倍作为模板进行第二重 PCR。25  $\mu$ l 反应体系中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l IAP86-Fi (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l IAP86-Ri (10  $\mu$ mol/L)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l) (TaKaRa)、1  $\mu$ l 上述稀释模板, 进行第二重 PCR。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物经胶回收后进行 TA 克隆, 连接转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 取 100  $\mu$ l 转化细胞涂到含有氨苄青霉素的 LB 平板(50  $\mu$ g/ml) 上, 37 $^{\circ}$ C 过夜倒置培养, 第 2 天挑取单菌落。pMD18-T 通用引物 M13 进行菌落 PCR 验证, 将阳性菌株送上海生工生物工程有限公司进行菌落测序, 获得 IAP-86 基因的 5'端和 3'端的连接序列。

**1.2.4 RACE 克隆 IAP-86 基因的 5'端** 以提取的总 RNA(浓度为 340 ng/ml)为模板, 10  $\mu$ l 反应体系中含有模板 2.75  $\mu$ l, 加入 2  $\mu$ l 5 $\times$ First-Strand Buffer、1  $\mu$ l SMART Scribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase、1  $\mu$ l DTT (20 mmol/L)、1  $\mu$ l dNTPs (10 mmol/L)、1  $\mu$ l SMARTer Aoligo Primer (10  $\mu$ mol/L)、0.25  $\mu$ l RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ l 基因特异性引物 GSP-Ro (10  $\mu$ mol/L)。反转录条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min、42 $^{\circ}$ C 90 min、72 $^{\circ}$ C 10 min, 反转录合成 cDNA 的第一条链。

第一重 PCR 的反应体系 25  $\mu$ l 中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP(2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l GSP-Ro (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l UPM (0.4  $\mu$ mol/L long primer+2  $\mu$ mol/L short primer)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l、TaKaRa)、2  $\mu$ l cDNA 模板, 通过降落 PCR 进行第一重 PCR 扩增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68–48 $^{\circ}$ C 按照 2 $^{\circ}$ C 的梯度差 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 各个温度梯度都进行 3 个循环; 之后 94 $^{\circ}$ C 30 s、50 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将扩增产物稀释 10 倍作为模板进行第二重 PCR, 25  $\mu$ l 反应体系中含有 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ ExTaq Buffer、2  $\mu$ l dNTP (2.5 mmol/L)、1  $\mu$ l GSP-Ri (10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ l short primer (10  $\mu$ mol/L)、0.2  $\mu$ l ExTaq 酶(40 U/ $\mu$ l、TaKaRa)、1  $\mu$ l 上述稀释模板, 进行第二重 PCR。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、48 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物经胶回收后进行 TA 克隆, 连接转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 取 100  $\mu$ l 转化细胞涂到含有氨苄青霉素的 LB 平板(50  $\mu$ g/ml)上, 37 $^{\circ}$ C 过夜倒置培养, 第 2 天挑取单菌落, 用 pMD18-T 的通用引物 M13 进行菌落 PCR 验证, 将阳性菌株送上海生工生物工程有限公司进行菌落测序, 获取 IAP-86 基因的 5'末端。

**1.2.5 IAP-86 基因 3'端序列的获取和全长 IAP-86**

**cDNA 的序列拼接** 将获得的 5'端和 3'端连接序列与获得的 5'端序列以及获得的开放性阅读框序列使用 Accelrys Gene 软件找出使用的引物序列, 去除载体序列, 去掉重叠片段, 拼接获得 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因全长 cDNA 序列。

### 1.3 IAP-86 基因的生物信息学分析

运用生物信息学在线软件 TMpred 进行跨膜区预测, SingalP4.1 Server 信号肽切割位点预测, ProtScale 进行疏水性分析, <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>在线软件进行抗原表位分析, Net-O-Glyc 1.0 进行 O-糖基化位点预测, Net-N-Glyc 1.0 进行 N-糖基化预测, Net Phos 2.0 进行磷酸化位点预测, 同时使用 DNASTar 7.1 (Protean)软件对 IAP-86 蛋白进行疏水指数和抗原表位分析。将得到的 IAP-86 基因序列和氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 比对, 寻找与其同源性较高的基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 IAP-86 基因全长 cDNA 的克隆

通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得了 IAP-86 基因的 5'端和 3'端, 将所得到的片段和获得的 IAP-86 的开放性阅读框 ORF86 进行拼接, 获得了 IAP-86 基因的 cDNA 全长序列, 其中 5'端非编码区为 196 bp, 3'端非编码区为 37 bp, 全长为 746 bp, 编码 170 个氨基酸(图 1)。通过与 NCBI 上的牡蛎疱疹病毒和栉孔扇贝 AVNV 序列比对, 结果显示该基因的 cDNA 全长序列与牡蛎疱疹病毒有 100%的相似度, 与栉孔扇贝 AVNV 有 99%的相似度, 其差别在于 3'的非编码区的两个碱基不同, 分别为栉孔扇贝 AVNV 的第 92 个碱基 T 突变为 G, 第 173 个碱基 T 突变为 C。三者的开放阅读框序列完全相同, 并且 5'端的非编码区与 AVNV 的 ORF85 有 181 个碱基发生重叠。

### 2.2 IAP-86 基因的生物信息学分析

通过生物信息学分析软件对 IAP-86 蛋白的二级结构进行分析, 结果显示, IAP-86 蛋白的二级结构中不含有信号肽; 不存在跨膜区; 最大疏水指数为 1.800, 最小疏水指数为-3.456; 其抗原表位主要集中在 8–11、14–16、28–39、75–76、88–95、97–100、147–158 位氨基酸; 存在 1 个潜在的 O-糖基化位点(与第一个丝氨酸位点位置一致), 不存在潜在的 N-糖基化位点; 在进行磷酸化位点预测时, 结果显示, 当阈值取 0.5 时, 其氨基酸存在 8 个潜在的磷酸化位点(包

```

ctgtcatatatacatagatacatcaatgaattactcacaagacatgaaaaggataggcgtgtttttgattgctataactcggggtgtgtgg
tctgaatcaataataatggctgaaatttcaaaaggatattttatcctataaaaagcataactcgtgtataaccattcagtcataatgataaaacacaaac
ATG GATATAGTACCAATATCACCATATGAGAGAATGAGACCTTTGAGAGAATCCAAGG
M D I V P I S P Y E R M R P L R E S K
AACTCAGAATAAAGAGCTTCGATGACCATCGGTGGCCACACAAGAACAATCCAGTTAT
E L R I K S F D D H R W P H K N N P V M
GACGAAGAACATGATAGAAAACTACTTTTACTACATTGGTATAAATGATAAGATACAAT
T K N M I E N Y F Y Y I G I N D K I Q
GTGTACACTGTGGAGGTGTAATTTCCGGGATTTTAGAAGAAGACACGCATAGAATTTCA
C V H C G G V I S G F L E E D T H R I S
TACGAACACAGACGACATTTCCCAAATGTCCTGTTGAAAATATCGGCATCCAGGATA
Y E H R R H F P K C P V G K Y R H P G Y
TCACCTCGATGCCGAGAGATTGAAAAGTTTCAAAAATTGGCGCTATGAGAACATAGTG
H L D A E R L K S F K N W R Y E N I V
AGAAAGATGGACTTGGTTGCAGCGGGATTGTTCTATACCGGCATTGAAGATAGATGTGC
R K M D L V A A G L F Y T G I E D R C A
CTGCCACCAATGTGGGAACGAGCTTTATGAATGGGAGGCTGGTGATAACCCCAAAGAG
C H Q C G N E L Y E W E A G D N P K E
GAACATAAAAGACTATTTCCTGATTGTAACTTAGCAGTTATTAAttttacattacaataaaagatatg
E H K R L F P D C K L S S Y *
taaagttaact

```

图 1 AVNV IAP-86 基因的核苷酸序列及推导出的氨基酸序列  
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of AVNV IAP-86

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用方框标明; 5' UTR 和 3' UTR 用小写字母表示;  
与 ORF85 的重叠序列用下划线标明; 突变碱基上标有箭头; 磷酸化位点用灰色阴影标明

The start codon (ATG) and the stop codon (TAA) were noted in box; 5' UTR and 3' UTR were shown by lower-case letters; The overlapping sequences with ORF85 were marked by underline; The mutational bases were marked with arrows; The phosphorylation sites were shaded in gray

括 5 个丝氨酸、1 个苏氨酸和 2 个酪氨酸位点)。

通过 Blast 比对基因序列, 结果显示, 没有发现同源基因序列, 将氨基酸序列进行 Blast 比对后显示 IAP-86 的氨基酸序列与牡蛎杆状病毒抑制蛋白的氨基酸序列在某些氨基酸区域有一定的同源性, 但同源性不高。

### 3 讨论

Le Deuff 等(1996)研究发现, 牡蛎疱疹病毒在低于 23℃ 的环境下无法组装成完整的病毒粒子。由 AVNV 引起的栉孔扇贝大规模死亡主要集中在水温高于 23℃ 的夏季高温季节, 流行病学调查数据显示魁蚶亲贝发生死亡时的水温较低, 只有 15℃ 左右。鉴于两者的发病环境有较大区别, 因此推测该病毒可能是栉孔扇贝 AVNV 或者牡蛎疱疹病毒的变异株。

IAP 家族蛋白最先在杆状病毒中被发现, 目前已经在病毒、酵母以及人类等多种生物类群中发现其同源蛋白, 虽然 IAP 在脊椎动物的大型 DNA 病毒中还没有发现, 但在无脊椎动物大型 DNA 病毒中广泛存在, 栉孔扇贝 AVNV 属于其中的一种。IAP 对病毒能够在宿主体内大量繁殖起到重要作用, 如果没有 IAP 起抑制细胞凋亡的功能, 那么被感染细胞在病毒感染宿主的早期就可能会发生凋亡, 失去宿主的病毒还没

有获得大量繁殖就被释放, 也就不能在宿主体内持续进行增殖。

根据已经公布的栉孔扇贝 AVNV 全基因组序列, 本研究通过环化 RACE 技术克隆得到 AVNV 魁蚶株 IAP-86 基因的全长 cDNA 序列, 在 NCBI 上进行 blast 序列比对, 显示该基因与牡蛎疱疹病毒有 100% 的相似度, 与栉孔扇贝 AVNV 有 99% 的相似度, 其差别在于 3' 的非编码区的两个碱基不同, 但由于碱基变异位置位于非编码区内, 所以并不影响两者编码的氨基酸的不同。目前有关基因突变的研究主要集中在编码区中, 有关非编码区基因突变的研究较少, 但非编码区的基因突变在控制基因表达以及表达强弱方面发挥着重要作用。在 RNA 病毒中, 5' 和 3' 的 UTR 末端核苷酸可形成保守的二级结构, 并参与病毒的复制和翻译, 某些区域的变化影响着病毒毒力的强弱 (Cahour *et al*, 1995; Men *et al*, 1996)。5' UTR 中的启动子是基因的一个重要组成部分, 控制基因的转录和表达的程度。启动子的重要组成部分包括许多短的核苷酸序列即转录因子结合位点, 这些结合位点对转录既有促进作用又有抑制作用(唐潇等, 2013; Simon-Lorieri *et al*, 2013)。启动子上有一个核心区域对于转录的起始非常重要, 在起始转录时要与 RNA 聚合酶进行特异性结合(Smale *et al*, 2003)。序列比对结果在

一定程度上表明, AVNV 魁蚶株极有可能是从牡蛎疱疹病毒变异而来。序列比对还显示, 在扩增序列的 5'端非编码区与 AVNV 的 ORF85 有 181 个碱基重叠, 表明在该类病毒中存在基因重叠。重叠基因指两个或两个以上的结构基因有一段相同 DNA 顺序的现象。重叠基因不仅可经济利用基因组, 而且可能起表达调控的作用。重叠基因主要存在于噬菌体和病毒中, 而在真核生物中却很少发现重叠基因, 这可能因为前者基因组比较小, 但又必须要编码一些维持其生命和繁殖的基因, 在选择的压力下而保留了这种重叠基因的形式。研究表明, 基因重叠在减少病毒同义基因突变、维持病毒稳定性、减缓病毒进化速率方面发挥重要作用(Torres *et al.*, 2013; Zhang, 1998)。Behura 等(2013)发现, 基因重叠现象也同样存在于昆虫中, 并对其进化过程起到一定作用。

通过生物信息学分析显示, IAP-86 蛋白既不含信号肽也不存在跨膜区, 表明 IAP-86 蛋白合成后不能被分泌到细胞外, 而是在细胞内部发挥作用, 而凋亡抑制蛋白 IAP 主要通过参与在细胞内参与有丝分裂原激活蛋白-Jun 激酶 1 (MAP-JUNK1)介导的信号通路中抑制 Caspase 的活性来发挥抵抗细胞凋亡的作用。分析显示, 该蛋白二级结构以  $\alpha$  折叠和  $\beta$  转角为主, IAP-86 的最大疏水指数为 1.800, 最小疏水指数为-3.456, 其抗原表位主要集中在亲水区。分析还发现 IAP-86 蛋白存在一个 O-糖基化位点和 8 个磷酸化位点, 推测其翻译后修饰主要为磷酸化修饰。将基因序列和氨基酸序列通过 Blast 序列比对, 显示 IAP-86 的氨基酸序列与牡蛎杆状病毒凋亡抑制蛋白的氨基酸序列有一定的同源性, 推测该病毒的部分基因序列可能是从宿主基因组序列中获得的, 而证实这一猜想还需要更进一步的研究工作。

本研究克隆得到了 AVNV 魁蚶株的 IAP-86 基因的全长 cDNA 序列, 通过序列比对证实了 AVNV 魁蚶株的 IAP-86 基因与栉孔扇贝 AVNV 和牡蛎疱疹病毒的同源性分别达到 99%和 100%, 其编码的蛋白质完全相同, 并且证实在该类病毒中存在病毒界普遍存在的基因重叠现象。通过生物信息学分析了该蛋白的二级结构、抗原性、亲水性和疏水性以及糖基化和磷酸化位点, 为进一步从蛋白结构上了解 IAP-86 蛋白的相关功能提供了理论基础。

## 参 考 文 献

王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008

- 王秀华, 王崇明, 李筠, 等. 胶州湾栉孔扇贝大规模死亡的流行病学调查. 水产学报, 2002, 26(2): 149-155
- 田吉腾, 刘志鸿, 杨爱国, 等. 魁蚶 4 个地理群体遗传多样性微卫星分析. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 59-67
- 艾海新, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病原人工感染研究. 中国水产科学, 2003, 10(5): 386-391
- 王崇明, 王秀华, 艾海新, 等. 栉孔扇贝大规模死亡致病病原的研究. 水产学报, 2004, 28(5): 547-553
- 宋微波, 王崇明, 王秀华, 等. 栉孔扇贝大规模死亡的病原研究新进展. 海洋科学, 2001, 25(12): 23-26
- 吴彪, 于涛, 杨爱国, 等. 不同地理群体魁蚶杂交受精过程的荧光观察. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 64-68
- 唐潇, 李辉亮, 郭冬, 等. 巴西橡胶树 HbWRKY1 基因 5'调控序列的克隆及功能初步鉴定. 热带作物学报, 2013, 34(4): 630-635
- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, *et al.* The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. *J Virol*, 1999, 73(1): 533-552
- Behura SK, Severson DW. Overlapping genes of *Aedes aegypti*: evolutionary implications from comparison with orthologs of *Anopheles gambiae* and other insects. *BMC Evol Biol*, 2013, 13(1): 124-135
- Cahour A, Pletnev A, Vazeille-Falcoz M, *et al.* Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology*, 1995, 207(1): 68-76
- Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 1993, 67(4): 2168-2174
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J*, 1999, 18(19): 5242-5251
- Jakob NJ, Müller K, Bahr U, *et al.* Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate Iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo iridescent virus*. *Virology*, 2001, 286(1): 182-196
- Le Deuff RM, Renault T, Gerard A. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org*, 1996, 24(2): 149-157
- Leu JH, Lin SJ, Huang JY, *et al.* A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(4): 1011-1017
- Men R, Bray M, Clark D, *et al.* Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol*, 1996, 70(6): 3930-3937
- Simon-Loriere E, Holmes EC, Pagán I. The effect of gene overlapping on the rate of RNA virus evolution. *Mol Biol*

- Evol, 2013, 30(8): 1916–1928
- Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Ann Rev Biochem*, 2003, 72(1): 449–479
- Stasiak K, Demattei MV, Federici BA, *et al.* Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double-stranded DNA genomes. *J Gen Virol*, 2000, 81(12): 3059–3072
- Torres C, Fernández MDB, Flichman DM, *et al.* Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. *Virol*, 2013, 441(1): 40–48
- Zhang MQ. Identification of human gene core promoters in silico. *Genome Res*, 1998, 8(3): 319–326

(编辑 冯小花)

## Full Length cDNA Cloning and Bioinformatics Analysis of Acute Viral Necrosis Virus IAP-86 Gene From *Anadara uropygimelana*

ZHANG Shuai<sup>1</sup>, WANG Chongming<sup>1</sup>①, YUE Zhiqin<sup>2</sup>, SONG Xiaoling<sup>1</sup>,  
BAI Changming<sup>1</sup>, YIN Weili<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>1</sup>

(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. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002)

**Abstract** Acute viral necrosis virus (AVNV) was reported as the causative agent for summer mass mortality of adult Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) that has been widely cultured along northern China coast. To understand the pathogenesis and the function of IAP-86, a strain of acute viral necrosis virus (AVNV) was isolated from *Anadara uropygimelana*. RNA was extracted from the mantle of moribund *A. uropygimelana* that was infected with AVNV, and cDNA was obtained by reverse transcription. Two pairs of nested reverse primer were designed according to the ORF86 sequence of AVNV complete genome sequence that registered in NCBI. The non-coding region of 5' and 3' end of the ORF86 were amplified using the designed primers by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique, and the full-length cDNA sequences were spliced. Blast sequence alignment illustrated that this gene has 100% homology with oyster herpesvirus and 99% with the AVNV. Moreover, overlapping genes were found in the cDNA sequence. Bioinformatics analysis indicated that the protein contains neither a signal peptide nor a transmembrane region. The maximum hydrophobic index was 1.800 and the minimum hydrophobic index was -3.456. There are eight potential phosphorylation sites (including five serine sites, two tyrosine sites and one threonine site), a potential O-glycosylation site, but no potential N-glycosylation site. The epitope were mainly located on the amino acids of 8–11, 14–16, 28–39, 75–76, 88–95, 97–100 and 147–158. Results suggest that the virus may be a strain of oyster herpesvirus, and gene overlapping may play an important role in the virus evolution.

**Key words** Acute viral necrosis virus; *Anadara uropygimelana*; Inhibitor of apoptosis protein; RACE; Bioinformatics analysis

① Corresponding author: WANG Chongming, E-mail: wangcm@ysfri.ac.cn