

对虾白斑综合征病毒分子生物学研究进展

Advances on molecular biology of white spot syndrome virus

许雅香^{1,2}, 许梓荣², 朱玉芳¹, 杜华华², 魏克强²

(1. 苏州大学 农业科学与技术学院, 江苏 苏州 215006; 2. 浙江大学 饲料科学研究所, 浙江 杭州 310029)

中图分类号: S945.19 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)12-0063-04

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)是引起对虾白斑综合症的主要病原。对虾白斑综合症于20世纪90年代初首先在中国台湾地区发生,1994年扩展到整个亚洲的对虾养殖地区^[1]。1995年11月,西半球首先发现该病毒,1999年美国中部和南部也有类似的报道。2001年欧洲和澳洲都检测到了WSSV。短短10余年,对虾白斑综合症席卷了全球的对虾养殖地区,给世界对虾养殖业造成了不可估量的损失。高密度的对虾养殖模式、日益恶化的环境和世界性的贸易都加剧了此病的发生与传播。WSSV已成了一种动物性传染病,不仅给对虾养殖造成损失,还给海洋生态平衡带来了一定的威胁^[2]。自从对虾白斑综合症发生以来,WSSV就成了人们研究的热点。作者将从以下几方面对WSSV分子生物学的研究进展加以综述。

1 WSSV的一般特性

WSSV的形态结构与杆状病毒十分相似,病毒粒子呈卵圆形至短杆状,在末端有一尾巴状的附属物。完整的病毒粒子外被囊膜,囊膜内包裹杆状的核衣壳,核衣壳由数十条与衣壳长轴垂直的螺旋带构成。核衣壳内包含一个DNA蛋白核,病毒粒子直径约65~70 nm,长约300~350 nm^[3]。WSSV宿主域广,不仅感染对虾,还感染海水以及淡水中的其它甲壳类动物^[4,5],甚至还感染昆虫纲动物^[4]。

2 WSSV基因组结构

WSSV基因组为双链环状DNA分子,呈螺旋状。有关基因组大小的报道相差较大,Yang通过限制性内切酶消化分析,推测的基因组大小为290 kb^[6],1999年中美科学家合作完成了WSSV基因组测序,报道其基因组大小为305 108 bp^[7];Van报道WSSV基因组

为292 967 bp^[8]。

2.1 病毒基因组图谱

病毒基因组物理图谱是详细研究病毒转录、复制和遗传变异的基础,也是病毒基因工程的向导。WSSV基因组图谱已绘制^[8]。在WSSV双链上总共有编码50个以上氨基酸的ORF 684个^[8]。

2.2 病毒基因组基因

Van等从684个ORF中挑出最少重叠的184个进行分析。目前,WSSV基因组184 ORFs中被鉴定的基因才5个^[8~10],推测有功能的基因只有11个^[8]。

2.2.1 病毒结构蛋白基因

通过氨基酸测序和反向遗传学已确定了WSSV病毒粒子的5种结构蛋白^[8~11]。这5种结构蛋白分别是主要囊膜蛋白VP28和VP19^[11];主要核衣壳蛋白VP26,VP24和VP15^[8~11]。VP28囊膜蛋白上有5个拟糖基化位点,C端有一个疏水区,研究表明VP28与病毒的抗原性有关^[11],VP19的氨基酸序列上有2个跨膜区域,使VP19固定在病毒囊膜上^[11]。VP15为基本的DNA结合蛋白^[8]。VP26和VP24也是DNA结合蛋白^[9~11],而且,VP26,VP24与VP28属同一基因家族^[11],核苷酸和氨基酸比较发现,这三种蛋白为同源蛋白,它们可能是基因复制后根据不同的功能分化为

收稿日期:2002-11-05;修回日期:2003-03-22

基金项目:江苏省高校自然科学研究计划项目(03KJB240125)

作者简介:许雅香(1963-),女,江苏武进人,讲师,博士,主要从事分子生物学研究。电话:0512-67606492, E-mail: szdxxyx@163.com

不同的蛋白的^[11]。

2.2.2 病毒酶基因

2.2.2.1 DNA 聚合酶 在大 DNA 病毒的基因中经常能发现一些与 DNA 复制和修饰有关的基因,然而,在 WSSV 中,只确认了其中的一种:DNA 聚合酶家族 B。WSSV DNA 聚合酶基因序列与一些病毒以及真核生物 DNA 聚合酶的序列比较表明:WSSV DNA 聚合酶基因编码的多肽中存在 DNA 聚合酶的所有 7 个保守区^[12]。除了 DNA 聚合酶,在 WSSV 基因中没发现其它基因与 DNA 复制有关^[8]。

2.2.2.2 核糖核苷酸还原酶 绝大多数大 DNA 病毒能编码一组与核苷酸代谢有关的酶^[13]。目前,已知 WSSV 编码参与核酸代谢的酶有 3 个,核糖核苷酸还原酶是其中之一。核糖核苷酸还原酶含大小 2 个亚基(RR1, RR2)^[10,14]。Van 通过对该酶大小亚基的分析发现,WSSV 是完全区别于杆状病毒的一个新的病毒家族的代表^[10]。

2.2.2.3 胸苷/胸苷酸激酶(TK-TMK) 胸苷激酶和胸苷酸激酶也是 WSSV 编码参与核酸代谢的酶。该酶是一个嵌合蛋白,由 ORF 171 编码^[8],这是 WSSV 独有的特性,因为这些蛋白在其它大 DNA 病毒中一般由分散的 ORFs 编码。

2.2.2.4 胸苷酸合成酶(TSY) 胸苷酸合成酶是 WSSV 编码参与核酸代谢的又一个酶^[8]。胸苷酸合成酶促进 dUMP 甲基化变成核苷酸前体 dTMP,在嘧啶的生物合成中具有重要作用^[15]。WSSV 的 ORF 54 包含一个胸苷酸合成酶基因的高度保守区。这种基因只在一些疱疹病毒和噬菌体中发现过^[16]。

2.2.2.5 核酸内切酶 WSSV 含有一个由 311 Aa 组成的非特异性的核酸内切酶,此多肽包含一个狂犬病病毒的信号肽^[8]。核酸内切酶在病毒复制过程中的作用还不清楚,但它可能在 DNA 异化中发挥一定作用^[17]。值得一提的是, Van 等发现, WSSV 的核酸内切酶基因与日本对虾的 *DNaseI* 基因有很高的同源性^[11],由此推测, WSSV 的这个基因可能来自甲壳类宿主动物。

2.2.2.6 蛋白激酶(PK) 蛋白激酶的功能主要是修饰蛋白质。这种酶能使蛋白磷酸化^[18], WSSV 的 ORF 2 和 ORF 61 编码的多肽中存在蛋白激酶的保守区域,其中 ORF 2 编码的多肽中含 PK 的 12 个保守区域^[8]。WSSV 本身的这两种 PK 基因氨基酸序列有 45% 相似, 27% 相同^[18],这两种基因可能是基因复制的结果。

2.2.2.7 dUTP 酶(dUTPase) dUTPase 由很多大 DNA 病毒编码,能调节细胞的 dUTP 水平^[19]。WSSV

的 ORF 71 包含有 dUTP 焦磷酸酶(dUTPase)的同源区, BLASTp 发现该基因与家禽腺病毒 dUTPase 有最高同源性,氨基酸有 46% 的相似性^[8]。

2.2.3 其它基因

2.2.3.1 细胞因子受体 ORF 112 编码的多肽含有一个很长的促红细胞生成素受体^[8],该基因属 gp130 家族。拥有这种区域的基因都属于高等真核生物受体的细胞分裂素家族 I^[20]。由于其与细胞分裂素 I 基因有同源性以及细胞分裂素受体的存在,推测 ORF 112 的产物可能与对虾防御反应系统相关的信号传导有关^[20]。作者推测,该基因可能参与宿主代谢。

2.2.3.2 TATA box 结合蛋白(TBP) TBP 通过 RNA 聚合酶 II 在真核生物基因的活化中发挥作用^[21]。WSSV ORF 149 编码的 N 端的 Aa 与真核生物的转录起始因子^[21](TATA box 结合蛋白)高度相似,与其同源性最高的是一种曲霉菌。WSSV ORF 149 的功能目前尚不清楚。

2.2.3.3 一些特殊的基因 ORF 3 和 ORF 60 包含一个 EF 手的固钙区^[8],推测它们的产物可能属于固钙蛋白。由于它们与基因库里的基因没有同源性,确切的功能还不清楚。ORF 30 编码一个来自胶原蛋白家族的大蛋白(1 684Aa, 168 ku),N 端侧链上存在一个跨膜区域,但没有发现 N 端信号肽^[8]。在病毒中,只有淋巴细胞病毒与这个蛋白有同源性^[22],WSSV 基因的胶原蛋白同源区功能还不清楚。

2.2.4 基因家族

Van 等确定了 WSSV 基因家族,除了 hr 区域,其它 ORF 都作了同源性的相互比较。分析表明, WSSV 可分为 10 组基因家族。基因家族内基因的同源性至少达 40%^[8],推测它们可能由基因复制产生。

基因家族 1 包括 3 个 ORFs(ORF 1, ORF 32, ORF 153),它们编码的蛋白分别是囊膜蛋白 VP28,核衣壳蛋白 VP26 和 VP24,它们 Aa 的相似性为 42%^[8,9]。基因家族 2 包括 2 个 ORFs(ORF 2, ORF 61),编码产物推测为蛋白激酶^[8]。

其它基因家族都是一些未知功能的 ORFs,其中基因家族 7 中的基因有最高的同源性(55% 相同, 73% 相似)^[8]。

3 WSSV 分离株的同源性

把 WSSV 基因全序列与基因库中的其它 WSSV 序列数据比较发现,大部分序列表现出很高的同源性。与从中国对虾中分离的 WSSV 序列(U92007, U89843)、从越南斑节对虾中分离的 WSSV 序列

(AJ297947)、从台湾^[25]分离的 WSSV 序列(AF272669, AF272979, AF272980) 比较, 有 98%~100% 的同源性^[11]。Wang 等分析了 WSSV DNA 的酶切片段^[23], Lo 等分析了 WSSV DNA 的 PCR 片段^[24], 结果表明, 不同分离株 WSSV 存在高度同源性。黄灿华^[25]等比较了中国沿海不同海域(唐海、宁波、深圳) WSSV 3 个分离株的同源性, 他用 3 种限制性内切酶(SacI, PstI 和 HindII) 酶切 3 个分离株, 酶切多态(RFLP) 显示, 3 个分离株的 RFLP 图谱完全一致。

4 WSSV 与其它病毒家族的比较

WSSV 的形态结构与杆状病毒很相似, 但杆状病毒与基因库中的基因有 50% 的同源性, 而 WSSV 只有 6% 的同源性, 与其它病毒也没有特别的相似性。通过 DNA 聚合酶作的 WSSV 与其它相关病毒的系统发生树分析^[11]均表明: WSSV 是一个与已知病毒没有任何同源性的病毒, 是一个新病毒家族的代表。

5 展望

当今, 海水养殖业方兴未艾, 对虾养殖业是海水养殖业的支柱产业之一, 然而, 由于对虾白斑综合症频频暴发流行, 近 10 年来, 全世界的对虾养殖业一蹶不振, 可以说对虾白斑综合症造成的损失不可估量。其防治已成为迫在眉睫的世界性难题, 要彻底防治这样的动物性传染病, 对其发病规律和病原特性的研究是首要的。

21 世纪是生物学世纪, 随着分子生物学的发展, 病毒分子生物学正在逐渐形成一个独立的分支。WSSV 是国际上迄今为止第一个被测得基因组遗传密码的海洋生物 DNA 病毒, 该病毒的遗传密码与已知的陆栖病毒及生物遗传密码极不相同。然而要全面而深入地研究病毒, 弄清病毒未知 ORF 的功能, 首先必须建立该病毒依赖的细胞株, 迄今为止, WSSV 赖以增殖的细胞株尚未建立, 为此, 我们必须先攻克虾细胞培养这一难关。WSSV 的分类地位至今尚未确立, 据现有研究结果: WSSV 是一个完全区别于其它病毒的新代表, 人们知道它存在的历史才 10 a, 对它的研究还远远不够深入, 研究目的已远远超出了最初的宗旨(虾病的防治), 其基因组独一无二的特性给人们展示了一个崭新的领域, 研究 WSSV 的成果必将对海洋与陆地生物分子进化关系的研究产生重大影响, 并为今后科学家进行其它海洋生物病毒的研究提供基础, 为人类从分子水平上认识海洋、研究海洋, 开发海洋开辟新的领域。

参考文献:

- [1] Cai S L, Huang J, Wang C M, *et al.* Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993–1994 [J]. *China Fish.* 1995, 19: 112–117.
- [2] Flegel T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand [J]. *World Microbiol Biotechnol.* 1997, 13: 433–442.
- [3] 张立人, 张建红, 陈棣华, 等. 东方对虾杆状病毒在宿主细胞内装配 [J]. 电子显微学报, 1994, 13(5): 354.
- [4] Lo C F, Ho C H, Peng S E, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSSV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods [J]. *Diseases of Aquatic Organism.* 1996, 27: 215–225.
- [5] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑病杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. 中山大学学报, 1999, 14(4): 358–361.
- [6] Yang F, Wang W, Chen R Z, *et al.* A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA [J]. *Virology Methods.* 1997, 67: 1–4.
- [7] Anonymous. Genome project aims to combat prawn scourge [J]. *Nature.* 1999, 397: 465.
- [8] Van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology.* 2001, 286: 7–22.
- [9] Van Hulten M C W, Goldbach R W, Vlask J M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication [J]. *Gen Virol.* 2000, 81: 2525–2529.
- [10] Van Hulten M C W, Tsai M F, Schipper C A. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions [J]. *Gen Virol.* 2000, 81: 307–316.
- [11] Van Hulten M C W, Westenberg M, Goodall S D, *et al.* Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp [J]. *Virology.* 2000, 266: 227–236.
- [12] Bernak A, Blanco L, Lazaro J M, *et al.* A conserved 3′–5′ exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases [J]. *Cell.* 1989, 59: 219–228.
- [13] Reichard P. Interactions between the deoxyribonucleotide and DNA synthesis [J]. *Annu Rev Biochem.* 1998, 57: 349–374.
- [14] Tsai M F, Lo C F, Van Hulten, *et al.* Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus [J]. *Virology.* 2000, 277: 92–99.
- [15] Carreras C W, Santi D V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase [J]. *Annu Rev Biochem.* 1995, 64: 721–762.

R 研究综述 REVIEWS

- [16] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* The genome of melanoplus sanguinipes entomopoxvirus[J] . **Virol**, 1999, 73: 533– 552.
- [17] Krieser R J, Eastman A. The cloning and expression of human deoxyribonuclease II. Role in apoptosis[J] . **Biol Chem**, 1998, 272: 30 909– 30 914.
- [18] Van Hulten M C W, Vlaskovits J M. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus[J] . **Virus Genes**, 2001, 2: 201– 207.
- [19] Baldo A M, Clure M A. Evolution and horizontal transfer of dUTPase- encoding genes in viruses and their hosts[J] . **Virol**, 1999, 73: 7 710– 7 721.
- [20] Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin- 6 family of cytokines[J] . **Annu Rev Immunol**, 1997, 15: 797– 819.
- [21] Berk A J. TBP- like factors come into focus[J] . **Cell**, 2000, 103: 5– 8.
- [22] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J] . **Virology**, 1997, 230: 207– 216.
- [23] Wang Q, Poulos B T, Lighther D V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus[J] . **Arch Virol**, 1999, 45: 263– 274.
- [24] Lo C F, Hsu H C, Tsai M F, *et al.* Specific genomic fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus[J] . **Diseases of Aquatic Organism**, 1999, 35: 175– 185.
- [25] 黄灿华, 石正丽, 张吕平, 等. 对虾白斑综合症病毒同源性比较的研究[J] . 中国病毒学, 2001, 16(1) : 81– 84.

(本文编辑: 刘珊珊)