



# 白斑综合征病毒广西流行株的 遗传变异分析

广西水产科学研究院

报告人：韦信贤



# 一、研究背景

白斑综合征病毒（**WSSV**）是引起养殖对虾暴发性流行病白斑综合征（**WSS**）的主要病原，**WSS**以其传染性强、病程短、死亡率高的发病特征成为全球对虾养殖业所面临的危害性最大的病害，被世界动物卫生组织（**OIE**）、联合国粮农组织（**FAO**）及亚太地区水产养殖发展网络中心（**NACA**）列为**必须申报的疾病**，也被我国列为一类动物疫病。

WSSV为大型的双链DNA分子病毒，基因组大小约**300kb**，隶属于线头病毒科（Nimaviridae）白斑病毒属（Whispovirus），是该科的唯一成员。目前Genbank上公布了4个WSSV分离株的基因组全序列：泰国株**292967bp**（WSSV-TH）、中国大陆株**305108bp**（WSSV-CN）、台湾株**307287bp**（WSSV-TW）以及最近公布的韩国株**295884bp**（WSSV-Korea），**序列长度差异在15kb之间**，这就预示着在WSSV的基因组序列中存在有差异的位点。

**MARKS**等通过基因组全序列比对归纳出**WSSV-TH**、**WSSV-CN**和**WSSV-TW** 3个分离株存在5个主要的差异，分别是：(1)大片段序列缺失区**ORF23/24**；(2)易于发生基因重组的变异区**ORF14/15**；(3)转座酶基因序列存在与否；(4)同源重复区内重复单元数目不等；(5)单核苷酸的缺失、插入及多态性。

**Dieu**等、**Pradeep**等研究结果表明**WSSV**缺失区**ORF23/24** 和变异区**ORF14/15**的差异能反映不同地区**WSSV**毒株间的遗传进化关系，可作为分子流行病学及遗传进化追溯研究的首选对象。

广西对虾产业是广西水产领域产业化程度最高、产业链最完整的行业之一，其产量2010和2011年连续2年跃居全国第2位，产值居广西水产养殖业第1位。北海、钦州、防城港三市，是广西对虾养殖的优势产业带，三市对虾养殖产量占全区总产量95%以上。凡纳滨对虾（*Penaeus vannamei*）原产于中、南美洲，也称南美白对虾，具有对盐度适应性广、抗病力强、生长迅速等优点，是广西对虾养殖的主要品种。

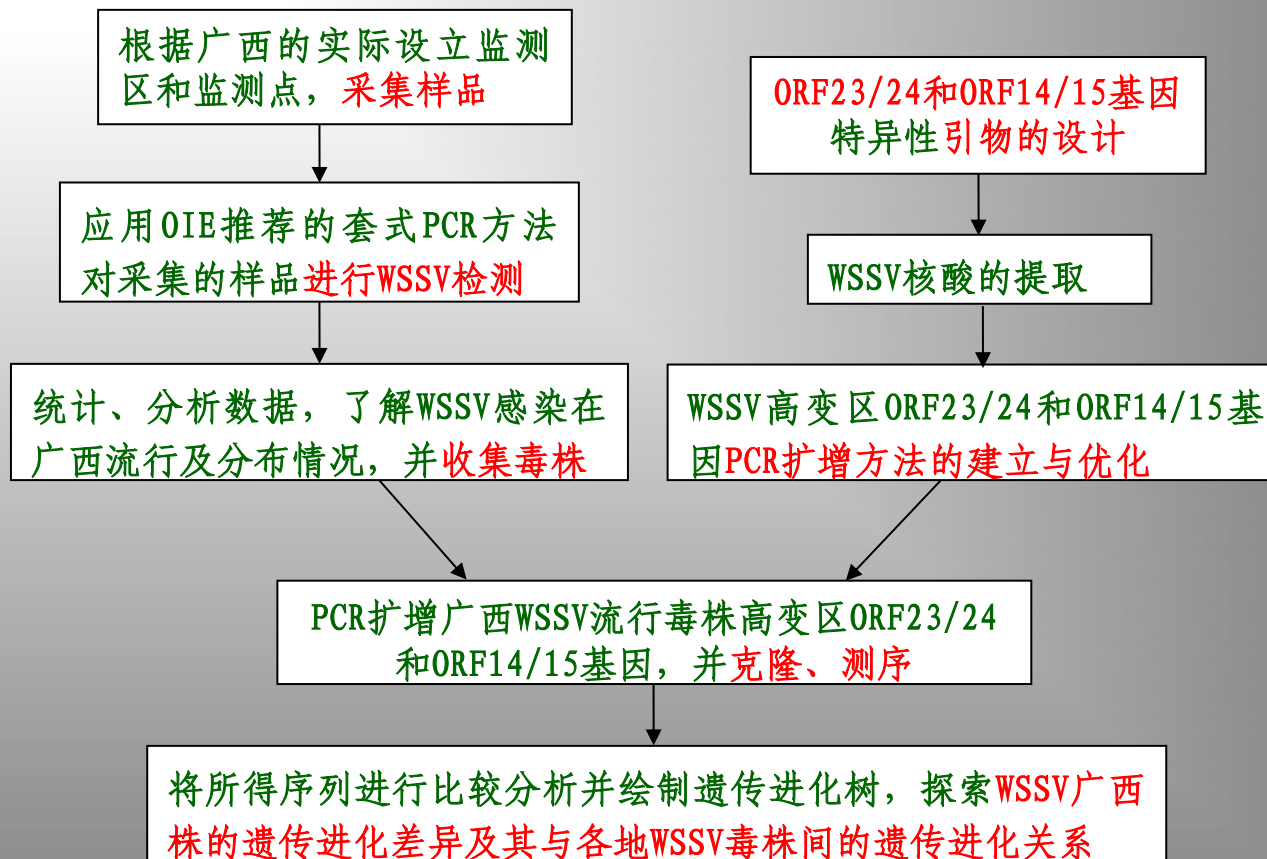
凡纳滨对虾对WSSV高度易感！从2010年开始，本实验室一直承担广西对虾WSS监测工作的检测任务，结果显示WSSV感染在广西对虾主要养殖区呈现出流行趋势。

**WSSV**感染在广西养殖凡纳滨对虾中普遍存在，但迄今为止，未见有广西**WSSV**分子流行病学调查研究的相关资料报道。本研究对广西**WSSV**流行毒株进行缺失区**ORF23/24**和变异区**ORF14/15**基因的比较分析研究，可从分子水平揭示**WSSV**广西株的遗传进化差异及其与各地**WSSV**毒株间的遗传进化关系，是**WSSV**分子流行病学研究的很好补充；为分析我区**WSSV**毒株的传播途径、进化历程、毒力变异及分子流行病学规律提供基础资料，也为广西凡纳滨对虾**WSS**的综合防控提供参考。



## 二、 研究方案

## 本研究拟采用以下技术路线：



### 三、研究进展

## （一）广西养殖凡纳滨对虾中WSSV感染的流行情况

采样地点	样品数/份	阳性数/份	阳性率/%	第一轮PCR阳性数/份
北海市	111	38	34.2	28
钦州市	83	19	22.9	13
防城港市	112	25	22.3	12
合计	306	82	26.8	53

说明WSSV感染在广西凡纳滨对虾主要养殖地区北海、钦州和防城港三个市均存在一定程度的流行，同时也说明WSS是广西养殖凡纳滨对虾主要发生的疾病之一。

## (二) WSSV广西株缺失区ORF23/24基因的比较分析

### 1、WSSV缺失区ORF23/24基因的扩增

引物信息  
PCR primer pairs and cycling  
condition

引物名称	序列(5'-3')	退火/延伸 温度 (°C) 和时间 (s)	理论产物大小(bp)		
			TW	CN	TH
146F1 146R1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA	55,45 / 72,90		1447	
146F2 146R2	GTAAGTGCCCCCTTCCATCTCCA TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	55,45 / 72,90		941	
VR23/24- screenF VR23/24- screenR VR23/24- southF VR23/24- 1R	CACACTTGAAAAATACACCAG GTAAGTTTATTGCTGAGAAG  CTACAACGGCCAAGTCAT ATGATTGTATTCGTCGAAGG	49,60 / 72,540  52,60 / 72,780	9088  13066	7927  11905	-  -

选择上述**53**份第一轮**PCR**为阳性的凡纳滨对虾样品，通过扩增片段逐渐增大的引物对**VR23/24-screenF/R**和**VR23/24-southF/1R**进行**WSSV**缺失区**ORF23/24**基因的**PCR**扩增。用引物**VR23/24-screenF/R**对所有**53**份样品进行扩增，均没有得到阳性**PCR**产物；用引物**VR23/24-southF/1R**进行扩增时，有**12**份样品可扩增出大小约**2100bp**的基因片段。

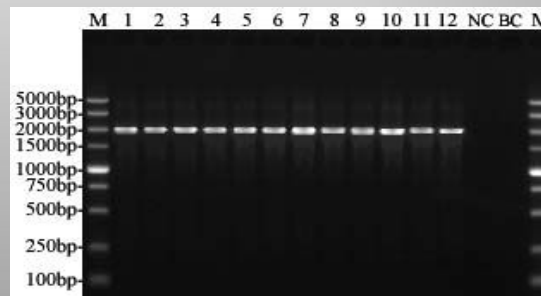


图2 PCR扩增WSSV缺失区电泳结果

M: DL5000分子量标准; NC: 阴性对照; BC: 空白对照。1-12: 对应表4的毒株编号1-12

Fig.2 PCR amplification of deletion regions of WSSV

M: DL5000 DNA marker; NC: negative control; BC: blank control;

1-12: Numbers at the top of lanes are shown in tab.4.

### 12份样品来源信息

Details of *Penaeus vannamei* samples from twelve farms  
in Guangxi farms

编号	毒株	采样地点	采样时间	样品规格
1	QZ-1	钦州市	2010-6-8	成虾
2	BH-1	北海市	2010-6-10	虾苗
3	BH-2	北海市	2010-9-12	成虾
4	QZ-2	钦州市	2010-9-13	成虾
5	FCG-1	防城港市	2010-9-14	成虾
6	QZ-3	钦州市	2011-5-10	虾苗
7	BH-3	北海市	2011-5-24	成虾
8	QZ-4	钦州市	2011-9-13	成虾
9	BH-4	北海市	2011-9-14	成虾
10	FCG-2	防城港市	2011-9-15	成虾
11	BH-5	北海市	2012-5-9	虾苗
12	FCG-3	防城港市	2012-9-19	成虾

## 2、WSSV缺失区ORF23/24基因的克隆及序列分析

12株WSSV广西株缺失区ORF23/24基因大小均为**2096bp**；相对于ORF23/24区域最为完整的WSSV-TW株，12株WSSV广西株在ORF23/24区域都**缺失了10970bp**，缺失的位置相当于WSSV-TW株ORF23/24基因的3373-14342bp处，比WSSV-CN和VN-C分别多缺失了9802bp和2431bp，而比WSSV-TH株少缺失了2240 bp。



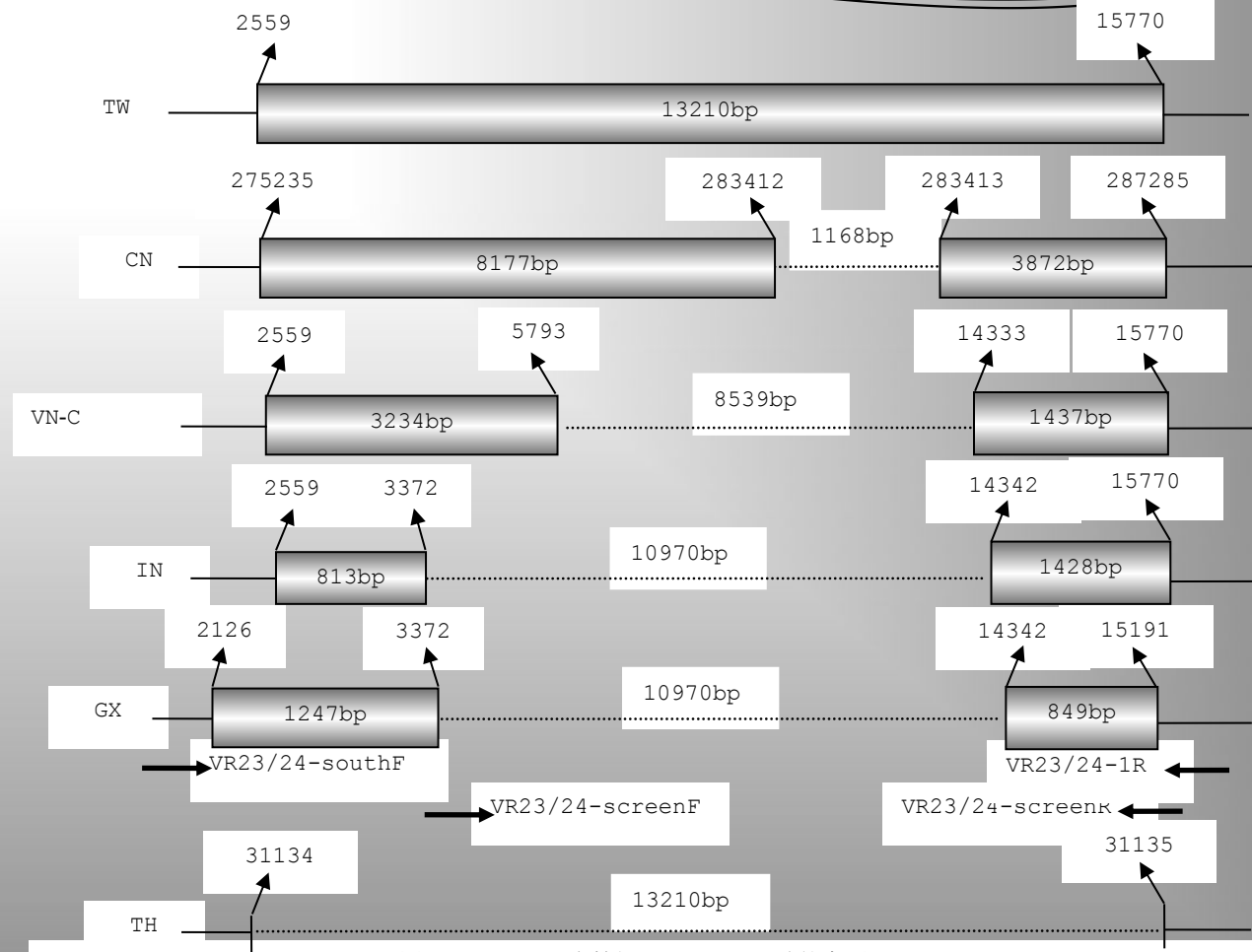


图3 WSSV 不同毒株间ORF23/24区域的序列比对

Fig3. Schematic representation of deletion region ORF23/24 of different known WSSV strains

注：图中TW、CN和TH株箭头上方数字表示各自在NCBI数据库的对应位置；VN-C、IN、GX分别代表越南中部株、印度株、广西株，其箭头上方数字表示相对于台湾株位置。矩形表示变异区两端序列，矩形内的数字代表核苷酸数目；虚线表示相比台湾株缺失的序列；横线箭头表示引物位置。

对12株广西WSSV毒株及GenBank已公布的WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea、IN-05- I 毒株的ORF23/24基因核苷酸序列进行同源性分析。结果显示，12株WSSV广西株的缺失区ORF23/24基因差异小，核苷酸同源性均在99.6%以上，仅存在少数碱基的替换，没有缺失和插入，其中BH-3、QZ-1、FCG-1和FCG-2的核苷酸序列完全一致；12株广西株与WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea、IN-05- I 的同源性分别为60.3%~60.5%、60.3%~60.5%、60.2%~60.4%、99.4%~99.6%。基于缺失区构建的系统发育进化树结果显示（图4），WSSV广西地方株在遗传上相距较近，全部与印度株IN-05- I 聚在一个大的分支，而与WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-Korea均相距较远。

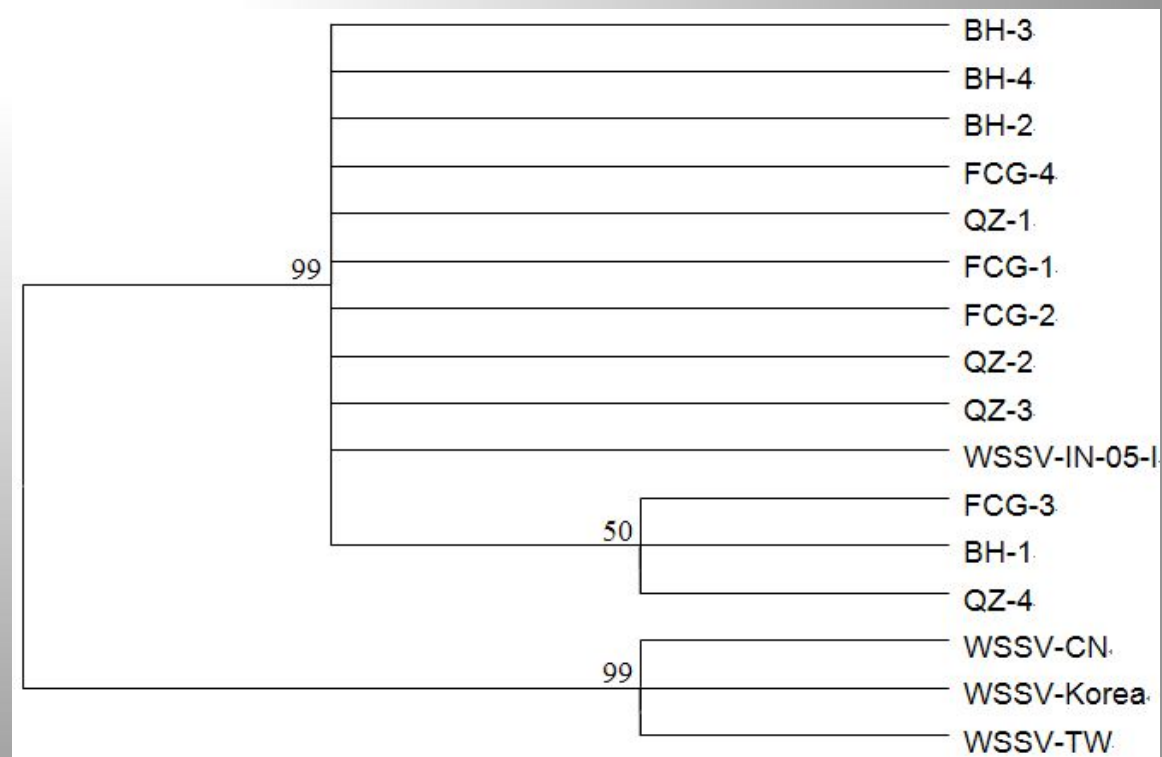


图4 基于WSSV 缺失区ORF23/24基因构建的各分离株进化树  
 Fig.4 Phylogenetic tree of WSSV deletion region ORF23/24

## 小结

(1) 306份患病虾样品中有82份为WSSV感染阳性，阳性率为26.8%；说明WSSV感染在广西凡纳滨对虾主要养殖地区存在一定程度的流行，同时也说明WSS是广西养殖凡纳滨对虾主要发生的疾病之一。

(2) 12株WSSV广西株缺失区ORF23/24基因大小均为2096bp，相对于ORF23/24区域最为完整的WSSV-TW株，广西株均在中间缺失了10970bp；41份样品没有得到任何扩增产物，原因可能是这些WSSV毒株缺失这些引物结合位点或者在高变区ORF23/24区域缺失大于13kb。

(3) 12株WSSV广西株的缺失区ORF23/24基因差异小，核苷酸同源性均在99.6%以上，仅存在少数碱基的替换，没有缺失和插入，其中BH-3、QZ-1、FCG-1和FCG-2的核苷酸序列完全一致。

(4) 基于缺失区构建的系统发育进化树显示，WSSV广西地方株在遗传上相距较近，全部与印度株IN-05- I 聚在一个大的分支，而与台湾株、中国株及韩国株在遗传上相距较远。

## 讨论

**MARKS**等和**Dieu**等曾假设现在流行的**WSSV**毒株都是由一个共同的祖先株变异而来，这个祖先株起源于台湾海峡通过在**ORF23/24**区域逐渐缺失各种长度（**1168~13210bp**）而传播到世界各地，但其发生缺失的机制目前还不清楚。

**Dieu**等研究发现**WSSV**越南分离株在**ORF23/24**区域内相比**WSSV-TW**株缺失**8539~13210bp**，且其缺失的大小具有明显的空间分布特征：最小缺失的毒株出现在越南中部，较大缺失的毒株出现在越南南部和北部；由此推测**WSSV**是由越南中部传入并向越南其他地区扩散传播的，**WSSV**基因组缺失的长度有随着时间的推移及其在养殖对虾中的传播而增加的趋势。

**Pradeep**等研究发现**WSSV**印度分离株在**ORF23/24**区域内相比**WSSV-TW**株缺失**10970bp**或大于**13kb**。

## 讨论

中国不同地区的WSSV毒株相比WSSV-TW株在ORF23/24区域缺失**5648~11129bp**，但WSSV中国株ORF23/24缺失大小与地域和时间无关。

从目前国内外对不同时间和空间WSSV毒株ORF23/24基因研究的情况来看，WSSV毒株的进化历程与上述Marks等和Dieu等提出的假设基本一致，但其缺失的大小与WSSV遗传进化之间的联系在不同地区不尽相同；虽然WSSV越南分离株在ORF23/24区域内的缺失大小可以从空间上说明其进化特征，但对于幅员辽阔的中国，不同地区的WSSV毒株ORF23/24基因缺失的大小多种多样，其与WSSV进化之间的联系还不明确；但可以肯定的是中国境内存在ORF23/24区域缺失大小不同的多种WSSV基因型，而不同基因型之间的遗传进化关系尚待进一步研究和探索。

### **(三) WSSV广西株变异区ORF14/15基因的比较分析**

#### **1、WSSV变异区ORF14/15基因的扩增**

引物序列为：

**VR14/15-screenF: 5'-GAGATGCGAACCCTAAAAG-3';**

**VR14/15-screenR: 5'-ATGGAGGCGAGACTTGC-3',**

预期产物大小相对于WSSV-TW、WSSV-CN和WSSV-TH分别为  
**1431bp、1439bp和1254bp。**

对**40份WSSV**阳性的凡纳滨对虾样品进行变异区**ORF14/15**基因的**PCR**扩增，其中**25份**样品可扩增出大小约**600bp**的基因片段。

毒株命名	采样地点	采样时间
Virus strain	Sampling place	Sampling date
BH-1~BH-4	北海市	2010
BH-5~BH-7	北海市	2011
BH-8~BH-10	北海市	2012
BH-11~BH-12	北海市	2013
QZ-1~QZ-2	钦州市	2010
QZ-3	钦州市	2011
QZ-4	钦州市	2013
FCG-1~FCG-3	防城港市	2010
FCG-4~FCG-5	防城港市	2011
FCG-6~FCG-7	防城港市	2012
FCG-8~FCG-9	防城港市	2013



## 2、WSSV变异区ORF14/15基因的克隆及序列分析

25株WSSV广西株中有22株变异区ORF14/15基因核苷酸大小为619bp，3株为620bp；相对于TH-96-Ⅱ株，25株WSSV广西株变异区ORF14/15基因均在中间缺失了5949bp，剩下的619bp（620bp）可分为5'端的58bp和132bp（共190bp）及3'端的429bp（430bp）共三个片段。25株WSSV广西株变异区ORF14/15基因缺失大小和位置与印度株IN-05-Ⅰ完全一致，广西株5'端的190bp片段和3'端的429bp（430bp）片段在TH-96-Ⅱ、WSSV-CN和WSSV-TH相对应的区域均有出现；而在WSSV-TW，仅出现广西株5'端的58bp片段和3'端的429bp（430bp）片段，在VN-A株仅出现广西株5'端的190bp，在WSSV-Korea株仅出现广西株3'端的429bp（430bp）片段。

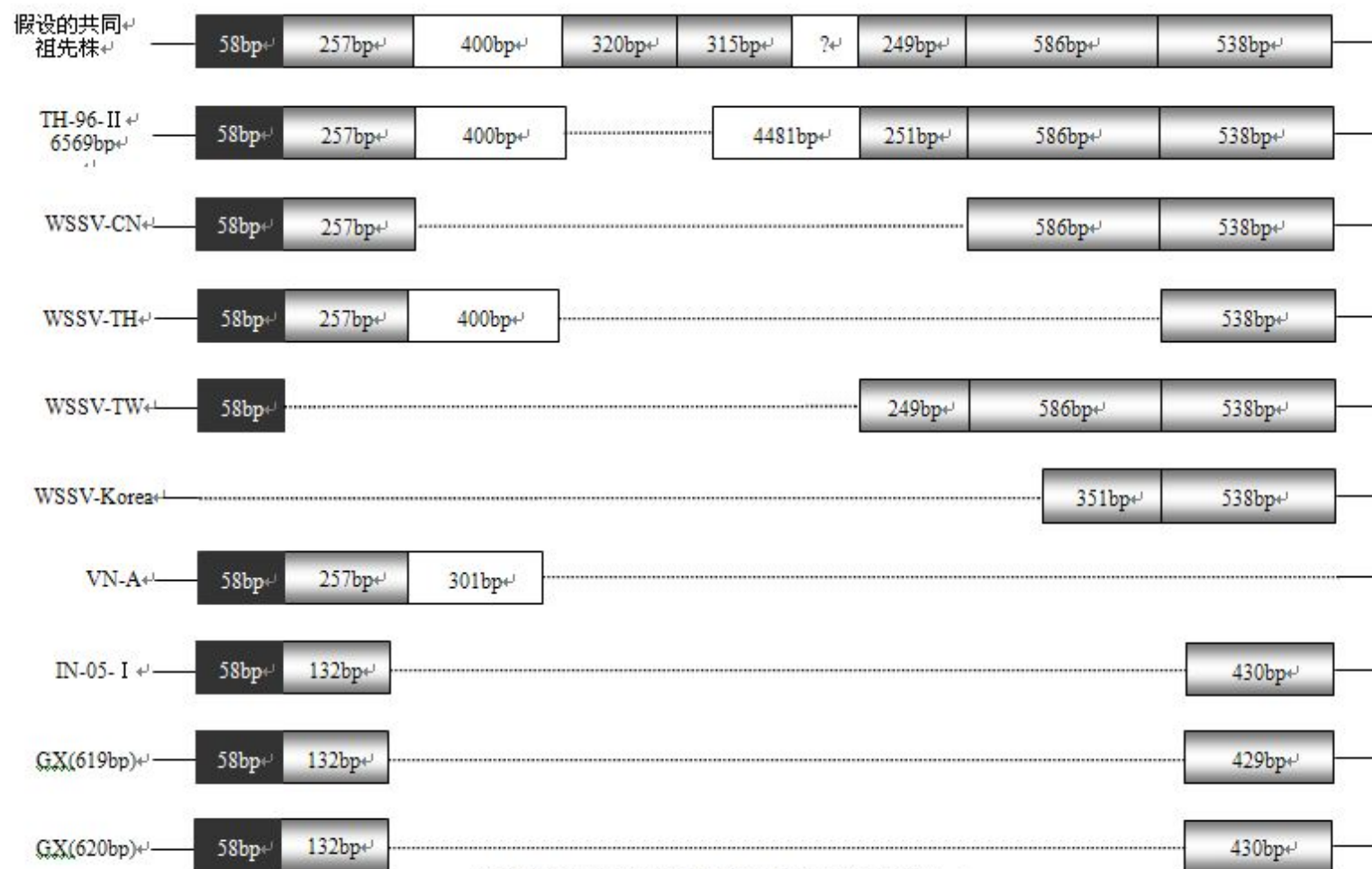


图 2 WSSV 不同毒株间 ORF14/15 区域的序列比对

Fig.2 Schematic representation of variable region ORF14/15 of different known WSSV strains

同源性分析结果显示，25株广西株中有BH-1、BH-2、BH-5、BH-6、BH-8、BH-9、FCG1、FCG3、FCG4、FCG6、FCG8、FCG9、QZ1、QZ2、QZ3和QZ4共16株的核苷酸序列同源性为100%（包括了除北海2013年的毒株外的本研究中三个地区所有年份的毒株），其余毒株间的同源性也在97.9%以上；但存在单个碱基的替换、插入或缺失，其中有23株（除BH-3和FCG-2外）在3'端的305bp处相对于GenBank公布的其他毒株缺失了1个核苷酸A，而有1株（BH-7）在3'端的182bp处插入了1个核苷酸T；25株广西株与TH-96- II 株、WSSV-CN、WSSV-TW、WSSV-TH、WSSV-Korea、IN-05- I 的同源性分别为97.3%~99.0%、97.4%~99.2%、80.8%~83.5%、97.4%~99.2%、74.7%~77.1%、98.1%~99.8%。系统发育进化树结果显示（图3），WSSV广西地方株在遗传上相距较近，全部与印度株IN-05- I 聚在一个大的分支，而与目前发表的其他毒株均相距较远。

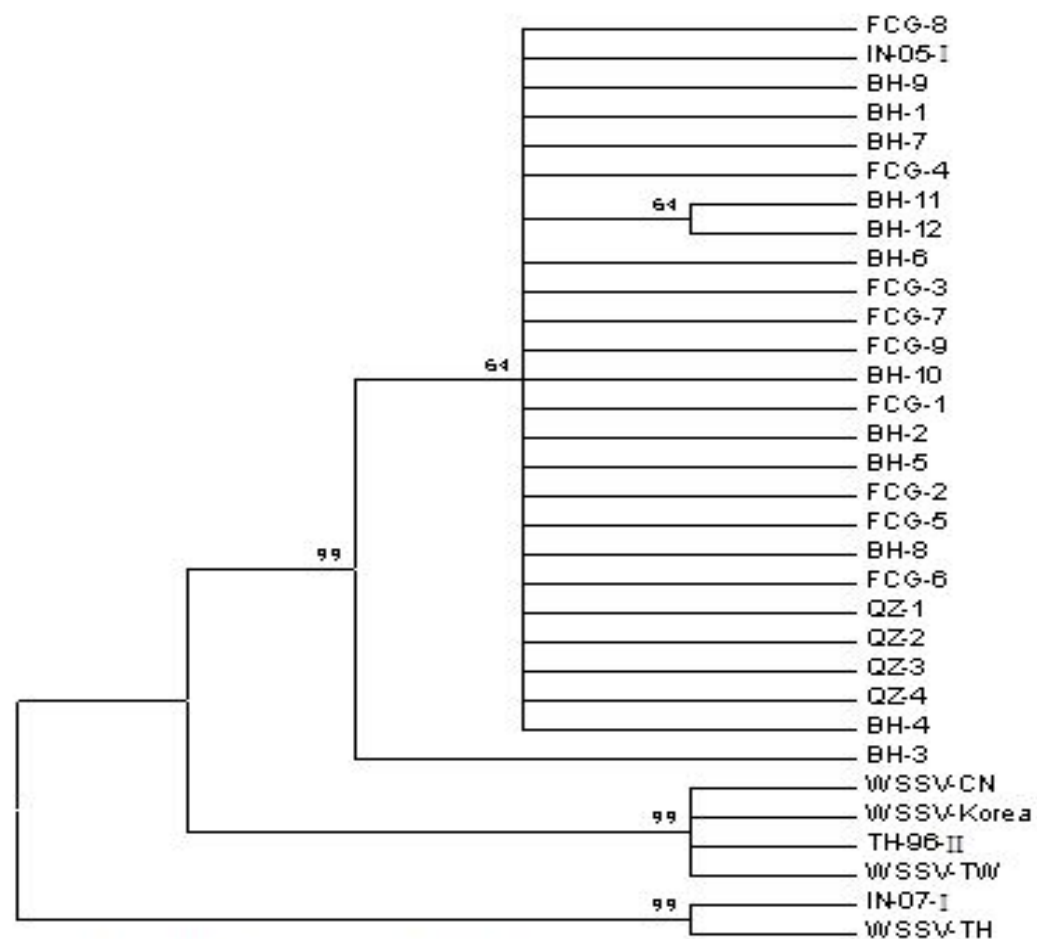


图3 基于WSSV 变异区ORF14/15基因构建的各分离株进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of WSSV variable region ORF14/15

## 小结

(1) 40份WSSV阳性样品中有25份可变异区ORF14/15基因被成功克隆和测序，其中22株为619bp，3株为620bp；15份没有得到任何扩增条带的样品，可能是由于这些WSSV毒株变异导致引物无效结合或者是在此区域序列有更大的缺失致无引物结合位点。

(2) 相对于ORF14/15区域最为完整的TH-96- II株，25株WSSV广西株变异区ORF14/15基因均在中间缺失了5949bp，仅剩5'端的190bp和3'端的429bp（430bp），与印度株IN-05- I 缺失大小和位置相同。

(3) 在变异区25株WSSV广西株中有16株核苷酸序列同源性为100%，其余毒株间的同源性也在97.9%以上，仅存在单个碱基的变异。

(4) 基于变异区构建的系统进化树显示，WSSV广西地方株在遗传上相距较近，全部与印度株IN-05- I 聚在一个大的分支，而与目前发表的其他毒株均相距较远。

## 讨论

Pradeep等综合自己及前人的研究结果提出WSSV变异区ORF14/15基因至少存在8个可缺失的片段，即58bp、257bp、400bp、320bp、315bp、249bp、586bp和538bp，每个片段都可能产生不同大小的核苷酸缺失；通过对更多WSSV毒株ORF14/15基因进行序列分析，可能还会发现其他的缺失类型和片段。

薛晖等和Tan等的研究发现中国各地WSSV毒株的ORF14/15基因变异类型主要为缺失，相比较TH-96-Ⅱ株，缺失大小在4749bp～5622bp之间，而广西株缺失片段达5949bp，说明国内WSSV毒株的ORF14/15基因随着时间的推移可能会趋向于逐渐增大的缺失。

本次测序的25株WSSV变异区ORF14/15基因序列在所有广西株的变异形式比较单一，都表现为中间大片段缺失，与地域和时间并无明显相关性，可能是由于WSSV在广西的传播主要是人为的传播，如苗种引育、商品虾贸易等，并不是自然传播的结果。

## 讨论

**WSSV**广西株**ORF14/15**基因的缺失类型与印度株**IN-05- I** 一致，且到目前为止的文献中，此种缺失片段大小只出现在印度株和广西株中，系统进化树也显示广西株与印度株**IN-05- I** 聚在一个大的分支；同时，本实验室对**WSSV**广西株的另外一个高变区**ORF23/24**基因进行研究时，也发现广西株与印度株的遗传进化关系最近这些**研究结果提示我们WSSV广西株和印度株在WSSV的传播历程中也许存在某些联系。**

综合其他地区及广西**WSSV**变异区**ORF14/15**基因序列分析结果，相对于**Marks**等提出的**ORF14/15**是一段倾向重组的高度变异区，**我们更倾向于ORF14/15是通过缺失方式进化的观点。**



## 结 论

- 1、WSSV感染在广西凡纳滨对虾主要养殖地区存在一定程度的流行。
- 2、广西WSSV毒株缺失区ORF23/24和变异区ORF14/15基因的变异类型为均为中间大片段缺失，各毒株间无明显的地域和时间差异。
- 3、WSSV广西株与印度株IN-05- I 的遗传进化关系最近。



## 四、后续研究

**WSSV**广西株ORF75、ORF94和ORF125  
(同源重复区内重复单元数目)的比较分析。



謝謝.....

