

以 WWSV ORF234 片段诊断罗氏沼虾白斑病毒病及片段分析

杨 贺¹, 王晓兰², 陈 辉³, 韩凤丽¹, 贡成良¹, 曹广力¹, 薛仁宇¹

(1. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123 2 常熟理工学院, 江苏 常熟 215500

3 江苏省水生动物疫病控制中心, 江苏 南京 210036)

摘要: 根据 GenBank 中登录的对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 全基因组序列中和 ORF234 相应的序列来设计 1 对引物, 从疑似病例的罗氏沼虾中提取总 DNA, 并以此为模板, 经 PCR 扩增出约 885 bp 的特异性片段, 克隆进质粒载体 pET-28a(+), 进行序列测定和分析。结果显示: 扩增序列共编码 294 个氨基酸, 预测的相对分子质量为 34kDa 与 GenBank 中登录序列的对应区域同源性达 99%, 由此确认该罗氏沼虾患有白斑综合症病毒病。该序列所编码的蛋白在 22~96 氨基酸位置有一段球状结构, 在 142~272 氨基酸位置有一个与 DUF1335 蛋白同源的将近 130 个氨基酸残基的保守区, 其功能未知。同时还对克隆出的片段进行序列分析和蛋白预测, 以进一步深入开展蛋白的功能及对该病毒病的防治的研究。

关键词: 对虾白斑综合症病毒; ORF234 基因; 克隆; 序列分析; 罗氏沼虾

中图分类号: Q74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2008)02-0101-06

对虾白斑综合症病毒 (White Spot Syndrome Virus WSSV) 又称对虾白斑杆状病毒 (White Spot Bacilliform Virus WSBV), 是对全球对虾养殖业危害最大的病原之一 (张家明, 刘志昕, 2002)。WSSV 具比较广泛的宿主域, 中国对虾、斑节对虾、南美白对虾、刀额新对虾、脊尾对虾、天津厚蟹、日本大眼蟹等为其天然宿主, 哈氏美人虾、短脊鼓虾、克氏原螯虾、肉球近方蟹、滕壶也能被人工感染 (雷质文等, 2002; 何建国等, 1999)。2007 年有报道人工养殖的罗氏沼虾也能在自然状态下被该病毒感染 (王晓兰等, 2007)。目前 WSSV 全基因序列 (约 300 kb) 已有 3 个版本, 共有编码序列 186 个: 第 1 种病毒序列全长 292 967 bp GenBank 登录号为 Na AF369026 分离自泰国对虾; 第 2 个版本序列全长 305 107 bp GenBank 登录号为 NO. AF332093, 病毒来自日本对虾; 第 3 种序列全长 307 287 bp GenBank 登录号为 Na AF440570 病毒分离自台湾养殖对虾 (Yang F et al 1997; Van Hulten M C W et al 2001; FENG YANG et al 2001)。关于对虾白斑综合病毒的病原学、诊断学、流行病学、感染机理等研究已深入到了分子水平 (黄捷等, 1995; 战文斌等, 1995)。由于 WSSV 基因组许多基因的功能是未知的, 并且缺乏开展相关病

毒研究的虾细胞株, 因此对该病毒基因功能的预测大部分来自序列分析的结果。关于对该病毒的衣壳蛋白和囊膜蛋白的结构和功能已有一定的了解 (Mariñel C et al 2001), 但对众多开放阅读框所具有的功能了解还不够或无法开展深入的研究 (易志刚等, 2004; 傅铃琳等, 2005)。本实验以患疑似白斑病的罗氏沼虾总基因组 DNA (含病毒基因组) 为模板, 进行 PCR 扩增, 电泳检测出相应片段后将产物克隆进 pET-28a(+) 载体, 测序证实所获得序列为 WSSV 中的一个片段, 与所公布 WSSV ORF234 同源性达 99%, 显示用于扩增 ORF234 的引物可以用来进行 WSSV 的诊断; 同时还对克隆出的片段进行序列分析和蛋白预测, 以进一步深入开展蛋白的功能及对该病毒病防治的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 病虾为罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*), 来自于江苏省高邮人工养殖场, 由江苏省水生动物疫病控制中心采集并固定于 75% 乙醇溶液中。

1.1.2 菌株与质粒载体 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TG1, BL21, 质粒 pET-28a(+) 为本实验室保存。

1.1.3 酶和试剂 *Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III, *Eco*R I 和配套的缓冲液为 *Signa* 公司产品。基因组提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒等购自上海生物工程有限公司。

收稿日期: 2007-11-14 修回日期: 2008-07-16

基金项目: 苏州市攻关课题 (编号: SNZ0518)。

通讯作者: 薛仁宇, E-mail: xuer@ suda.edu.cn

作者简介: 杨贺, 1980 年生, 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 从事水产动物病害与防治研究。E-mail: yanghe-ji@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 病毒基因组提取 用超纯水将病虾充分清洗后,完全磨碎,按动物基因组提取试剂盒说明书提取样品中的总 DNA(该混合 DNA 中含有病毒 DNA),最终溶在 50 μ L TE 中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 WSSV ORF234 基因的 PCR 扩增 根据已公开的 WSSV 基因全序列上(GenBank 登录号 AF332093)相应的 ORF234 基因序列设计 1 对引物: P₁: 5' - CCGAATTCACCATGGAGTATATAGGGG - 3', P₂: 5' - CGAAGCTTGATACAGTGACCGTCCCTG - 3'(下划线分别为加入的 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点)。引物由上海生工公司合成。PCR 反应条件为: 50 μ L 反应体系中含 5 μ L 10 \times PCR buffer, 4 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 1 μ L dNTPs, 0.5 μ L P₁, 0.5 μ L P₂, 0.5 μ L 模板 DNA, 0.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。样品 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后按下述条件进行 PCR 扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 50s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 扩增完毕后置 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 WSSV ORF234 基因 PCR 产物的回收与克隆 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果后按照凝胶回收试剂盒的操作指南切胶回收。将回收的 PCR 产物经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后, 连接到经同样酶切并通过凝胶回收的 pET-28a(+) 中, 转化感受态细胞, 在 LB 平板培养基上(含卡那霉素, K^{an}) 挑选数个菌落, 接种于含 K^{an} 抗生素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 用质粒抽提试剂盒提取质粒, 将 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定呈阳性的质粒进行测序。

2 结果与分析

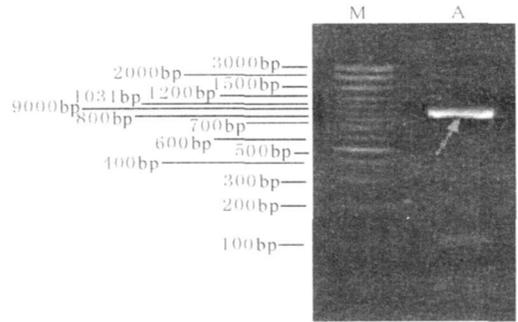
2.1 WSSV ORF234 基因克隆鉴定

经 PCR 扩增得到特异性片段, 琼脂糖凝胶电泳检测显示该片段大小约为 880 bp, 与公布的 WSSV ORF234 相一致。将回收的 PCR 产物酶切后克隆进 pET-28a(+), 筛选出的重组质粒用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切后, 可产生 1 条 880 bp 左右的条带(图 1 箭头所示), 经测序进一步确认, 并将重组质粒命名为 pET-28a(+)-WSSV ORF234。

2.2 WSSV ORF234 的核酸序列分析

本实验得到的片段经测序, 全长 885 bp(已登录 GenBank, 登录号: No EF524224), 编码 294 个氨基酸(图 2)。通过 BLAST 与对虾白斑综合病毒基因组相应区域比对, 仅有 1 个碱基的突变, 密码子由 GAA 突变为 GCA, 编码该位点的氨基酸相应地由

Glu(谷氨酸)突变为 Gly(甘氨酸), 同源性达 99% 以上(No AF332093 No AF369029 No AF440570)。证实其为白斑综合病毒基因片段。



M: 100bp MARKER; A: WSSV ORF234 特异性条带

图 1 PCR 产物电泳

Fig 1 Amplification by PCR

2.3 生物信息学分析

用 Peptool 软件对 WSSV ORF234 基因编码氨基酸序列的基本特征进行分析, 结果显示(表 1): 其编码的蛋白相对分子质量为 34 kDa, 等电点为 (PI) 5.6, 氨基酸组成中带正电荷氨基酸 (Arg, Lys, His) 45 个, 占 15.3%; 带负电荷氨基酸 (Asp, Glu) 46 个, 占 15.6%; 疏水性氨基酸 129 个, 含量为 52%; 极性氨基酸 121 个, 含量为 48%; 碱性氨基酸 (Arg, Lys) 40 个; 酸性氨基酸 (Asp, Glu) 46 个。疏水性分析结果如图 3。

WSSV ORF234 基因编码氨基酸序列含 1 个 N-糖基化位点, 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 3 个 MYRISTYL 位点和 4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 如图 4。特征序列及位置列于表 2。

二级结构分析显示(图 5), WSSV ORF234 基因编码的蛋白二级结构中以 α -螺旋和 β -折叠为主, 间或 β -转角与无规则卷曲。

通过密码子偏爱性分析发现, WSSV ORF234 片段上各种密码子的出现次数及编码同一种氨基酸所使用不同密码子出现的偏爱性如表 1。起始密码子为 AUG, 终止密码子为 UAA, 编码色氨酸的偏爱密码子为 UGG, 编码苯丙氨酸的偏爱密码子为 UUU, 编码酪氨酸的偏爱密码子为 UAU, 编码谷氨酰胺的偏爱密码子为 CAA。天冬酰胺的偏爱密码子为 AAU。编码亮氨酸和缬氨酸的密码子没有显著的偏爱性。值得注意的是 CCG, ACC, UCG 的使用频率为 0, 其内在的因素有待进一步研究。密码子位置的偏爱性如表 3。第 1 位为 G 的密码子含量最高, 达到 32%; 第 2 位为 A 的密码子含量高达 36%; 末位为 A 的密码子含量为 32%。

```

1      ATGGAGTATATAGGGGAACAAAACACTGATAAATCTCTGGATGAGACACCTGAAGAAGAC
1      METGluTyrIleGlyGluGlnLysLeuIleAsnLeuLeuAspGluThrProGluGluAsp
61     GAGTTACAGCTACGCTCTTCTTTCTAATGATTGGAGAAAAACAATATGAAAAGTATGAA
21     GluLeuGlnLeuArgSerPheLeuMETIleGlyGluLysGlnTyrGluLysTyrGlu
121    GGAGTAATGAGTACATTTGAAGCAGTTGAAACTATCCGAAAGAGTGAATTTAGAGACGGC
41     GlyValMETSerThrPheGluAlaValGluThrIleArgLysSerGluPheArgAspGly
181    GTTTTCATTGTACAATTAAGGAAAATAAACACATTACTTTTGAAGGGGACTGAAAGAA
51     ValPheIleValGlnLeuLysGluAsnLysHisIleThrPheGluGlyGlyLeuLysProGln
241    TTAAGAGAGCTCACAGGGGACAATCCCTCAAGATAGAATCATTATATCCTCTATTAAG
81     LeuArgGluSerThrGlyAspAsnSerLeuLysIleGluSerLeuLeuSerSerIleLys
301    CCTGAGAAAGGACACGTTTACTTAAAAACAGTCTACAACACTACTGATGACGAGTGGCTT
101    ProGluLysGlyHisValIleLeuLysAsnThrSerThrThrAspAspGluTrpLeu
361    GCTTCTCAAGACAAAGACGTACAGGAAGTAAATAAGCTCGTAAAGGAAAAGACACGGATG
121    AlaSerGlnAspLysAspValGlnGluValAsnLysLeuValLysGluLysThrArgMET
421    TTGTTTAGAGGGTTTTATTTTCAGTCCAACCTACAGGTATATAACAAAAGTCTTCTCAA
141    LeuPheArgGlyPheTyrPheSerProThrTyrArgTyrIleThrLysSerLeuProGln
481    ATACCTTTGCGGGAAAAGGAACGTTTTTGTGTTAGCACAGATTTTGTGATTGGTCTCGGT
151    IleProPheGlyGluLysGluArgPheValValSerThrAspPheLeuIleGlyLeuGly
541    TTTAGTGCTGATGATGTCATGGAAAAATTAATAGCGATAGAGGGAATATGCGGAAAAGT
181    PheSerAlaAspAspValMETGluLysLeuIleAlaIleGluGlyAsnMETArgLysSer
601    GGTCTGAAATATACATGGGTGCCTGTGGCCGAAGTGTGCCATCTCAAAAATACAAGGGT
201    GlyLeuLysTyrThrTrpValProValAlaGluValCysHisLeuLysLysTyrLysGly
661    GATATTGTGCGTAAACCCCATTTTCAAGAGTTATCATTCCCATTGCCTAGTTATCCACTG
221    AspIleValValAsnProIlePheLysSerTyrHisSerHisCysLeuValIleProLeu
721    GTGTATCTAGGGTACATGTTTTCCGTAATGTTCAACCCCATCTCTAGAAGTGGAGACG
241    ValTyrLeuGlyTyrMETPheSerArgAsnValGlnProProSerLeuGluValGluThr
781    TATCTGTTGGCGTTAGCGTTTGTCTATTGATTGTACGCGAGGGAAGAAATGCGCAAGTCT
261    TyrLeuLeuAlaLeuAlaPheAlaIleAspLeuTyrGlyArgGluGluMETArgLysSer
841    TGCATGCGATTATGTGAGGATATTTCTGAGGTGAAAAGGGGGTAA
281    CysMETArgLeuCysGluAspIleSerGluValLysArgGly***

```

图 2 WSSV ORF234核苷酸序列和推导的氨基酸序列

Fig 2 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence

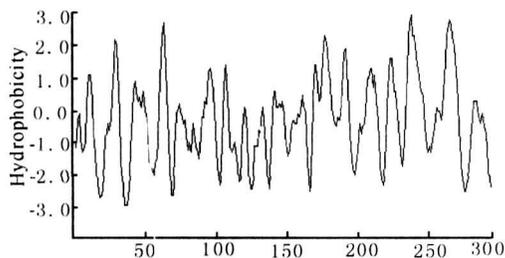


图 3 WSSV ORF234编码蛋白疏水特性

Fig 3 Hydrophobicity of WSSV ORF234 gene encoded protein

通过 SWISS-MODEL 对所推导的蛋白进行在线分析, 结果系统显示该蛋白和 2g₂A 结构相似, 在 22~ 96 的氨基酸位置有一球状结构 (图 6), 与所比较的 2g₂A 蛋白晶体结构序列的同源性为 41%。E 值为 9.34e-11, 球状结构能量为 -2 479.691 kJ/mol。

3 讨论

密码子是核酸携带信息和蛋白质携带信息间对应的基本规则, 是生物体内信息传递的基本环节。

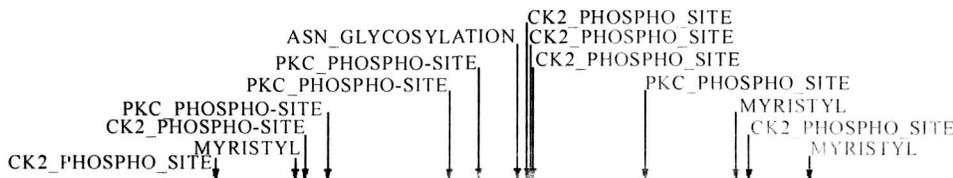


图 4 WSSV ORF 234编码蛋白模式位置

Fig 4 Motif pattern of predicted protein

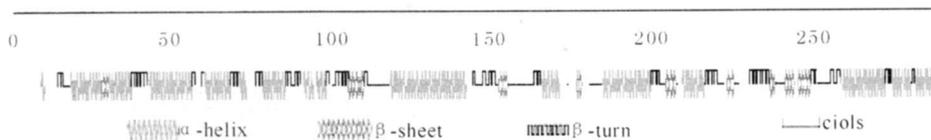


图 5 WSSV ORF234 的二级结构

Fig. 5 Second structure of WSSV ORF234

表 1 WSSV ORF234 基因编码蛋白氨基酸含量

Tab 1 Amino acid content of WSSV ORF234 gene encoded protein

氨基酸 Amino acid	数量 Number	含量 % Fract	密码子 及数量 Codon and Number	密码子 偏爱 % Condon preferences	氨基酸 Amino acid	数量 Number	含量 % Fract	密码子 及数量 Codon and Number	密码子 偏爱 % Condon preferences
丙氨酸 Ala(A)*	8	2.72	GCU 3 GCC 1 GCA 1 GCG 1	38 13 13 38	蛋氨酸 Met(M)*	9	3.06	AUG 9	100
精氨酸 Arg(R)#	14	4.76	AGA 3 AGG 3 CGU 2 CGC 2 CGA 2 CGG 2	21 21 14 14 14 14	脯氨酸 Pro(P)*	10	3.40	CCU 5 CCC 2 CCA 3 CCG 0	50 20 30 0
胱氨酸 Cys	4	1.36	UGU 1 UGC 3	25 75	丝氨酸 Ser(S)#	21	7.14	AGU 7 AGC 1 UCU 8 UCC 4 UCA 1 UCG 0	33 5 38 19 5 0
甘氨酸 Gly(G)	18	6.12	GGU 4 GGC 2 GGA 5 GGG 7	22 11 27 39	苏氨酸 Thr(T)#	15	5.10	ACU 5 ACC 0 ACA 8 ACG 2	33 0 53 13
组氨酸 His(H)#	5	1.70	CAU 3 CAC 2	60 40	色氨酸 Trp(W)*	2	0.68	UGG 2	100
异亮氨酸 Ile(I)*	19	6.47	AUU 10 AUC 1 AUA 8	53 5 42	酪氨酸 Tyr(Y)*	13	4.42	UAU 9 UAC 4	69 31
亮氨酸 Leu(L)*	32	10.89	CUU 3 CUC 6 CUA 5 CUG 6 UUA 8 UUG 4	9 19 16 19 25 13	缬氨酸 Val(V)*	21	7.14	GUU 7 GUC 2 GUA 6 GUG 6	33 10 29 29
赖氨酸 Lys(K)#	26	8.85	AAA 14 AAG 12	54 46	天冬酰胺 Asn(N)	8	2.72	AAU 6 AAC 2	75 25
苯丙氨酸 Phe(F)*	15	5.10	UUU 11 UUC 4	73 27	天冬氨酸 Asp(D)	14	4.76	GAU 8 GAC 6	57 43
					谷氨酰胺 Gln(Q)#	8	2.72	CAA 6 CAG 2	75 25
					谷氨酸 Glu(E)#	32	10.89	GAA 22 GAG 10	69 31
					合计 total	294	100		

注: * 疏水氨基酸; # 亲水氨基酸

Note * Hydrophobic; # Hydrophilic

编码 20 种氨基酸的密码子共 61 种。物种间对密码子的使用频度是不同的, 因而有不同的密码子偏爱性 (范三红等, 2003)。寄主在长期的进化中形成了包括代谢在内的对宿主一定的依赖性, 并产生专一性。在密码子上是否存在同样的关联, 能否从密码子偏爱方面获得宿主与寄主 WSSV 之间的相互关系值得关注。经 BLAST 分析 (NCBI), 该基因序列所

编码的蛋白, 在 22~ 96 氨基酸位置与 WSSV 病毒的 VP 9 所编码的一段被命名为 *zg2A* 的序列同源 (Schwede T et al 2003; Guex et al 1997; A mold K et al 2006)。VP 9 为 WSSV 的一个非结构蛋白基因, *zg2A* 为一段具有紧密球状结构的蛋白链。其结构显示该蛋白链是含有 1 个金属结合位点的铁还原蛋白。蛋白 BLAST 分析 (NCBI), 得知在 142~ 272 氨

表 2 WSSV ORF234编码蛋白序列模式分析结果

Tab 2 Analysis motif of predicted amino acid

模块名称 Motif	位置 Position	特征序列 Specific sequence
ASN_GLYCOSYLATION(N-糖基化位点)	110	NTST
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	16	TPEE
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	44	SFFE
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	113	TTTD
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	114	TTDD
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	115	TDDE
CK2_PHOSPHO_SITE(酪蛋白激酶II磷酸化位点)	182	SADD
MYRISTYL(N-)	41	GVMSTF
MYRISTYL(N-)	178	GLGFSA
MYRISTYL(N-)	201	GLKYTW
KC_PHOSPHO_SITE(蛋白激酶C磷酸化位点)	51	TR
KC_PHOSPHO_SITE(蛋白激酶C磷酸化位点)	89	SIK
KC_PHOSPHO_SITE(蛋白激酶C磷酸化位点)	98	SK
KC_PHOSPHO_SITE(蛋白激酶C磷酸化位点)	150	TYR

表 3 密码子位点偏爱 %

Tab 3 codon bias

位点 Position	U	C	A	G
位点 1	20	17	31	32
位点 2	33	16	36	16
位点 3	31	14	32	23



图 6 蛋白结构比对

Tab 6 Structure alignment

氨基酸位置,可能有 1 个与 DUF1335 蛋白同源的将近 130 个氨基酸残基的保守区,其功能未知。此保守区可能对 WSSV 有特殊意义。因此,本实验所获得的基因序列所编码的蛋白在这些区域的功能仍有待于进一步研究。

已有的研究显示, WSSV 自然感染的宿主广泛(魏静等, 1998), 并且危害巨大。目前随着研究的深入,对 WSSV 基因的功能及其表达调控成为该研究领域的热门。WSSV 主要靠对虾摄食带病毒宿主而传播,通过 PCR 扩增对病毒的检测方法,会因为环境和试验条件的影响而出现假阳性。本实验根据 GenBank 所公布 WSSV 的全基因序列相应区域设计引物,扩增出了功能未知的 ORF234 片段,并装载于可用于大肠杆菌 BL21 表达的载体中。显示用于扩增 ORF234 的引物可以用来对 WSSV 进行有效诊断。

用 OMEGA 2 Q Peptool 等生物学软件对所获得的 WSSV ORF234 片段进行分析,发现该蛋白有多个位点可以发生磷酸化修饰,个别位点可以发生糖基化修饰。蛋白的磷酸化和脱磷酸化在细胞信号传导中起重要作用。磷酸化、糖基化位点可能是 WSSV

ORF234 蛋白完成其生理功能的结构基础。特别是该蛋白序列中酪蛋白激酶 II 磷酸化位点有 6 个,提示该蛋白可能受酪蛋白激酶 II (CK II) 的调节。

对 WSSV 基因编码蛋白的分析与预测,有助于进一步对 WSSV 基因功能的深入研究。目前通过导入病毒蛋白对应的反义 RNA 到对虾体内,进行 RNA 干扰的方法来抑制 WSSV 的基因的最终翻译和病毒复制的研究已经有了报道(Yue Wu et al 2007)。探讨 WSSV 各个基因的功能,不仅可以查明 WSSV 感染及分布广泛的特点,也有助于利用新的手段来防治 WSSV。

参考文献:

- 范三红,郭蔼光,单丽伟,等. 2003 拟南芥基因密码子偏爱性分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 30(2): 221-225.
- 傅铃琳,帅江兵,许梓荣. 2005 对虾白斑综合症病毒的分子生物学研究进展[J]. 中国兽医杂志, 41(4): 42-44.
- 何建国,周化民,姚伯,等. 1999 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 38(2): 65-69.
- 黄捷,蔡生力,宋晓玲,等. 1995 对虾暴发性流行病病原的人工感染研究[J]. 海洋水产研究, 16(1): 51-57.
- 雷质文,黄捷,史成银,等. 2002 白斑综合症病毒(WSSV)的宿主调查[J]. 海洋与湖沼, 33(3): 250-258.
- 魏静,陆承平,黄捷,等. 1998 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾[J]. 南京农业大学学报, 21(4): 78-82.
- 王晓兰,贡成良,薛宇醒,等. 2007 罗氏沼虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP28 基因的克隆及分析[J]. 淡水渔业, 33(3): 12-16.
- 易志刚,黄捷,李筠. 2004 WSSV 结构、功能及基因组学研究概况[J]. 海洋水产研究, 25(1): 79-84.
- 战文斌,俞开康,孟庆显. 1995 中国对虾(*Penaeus chinensis*)杆状病毒的研究[J]. 中国水产科学, 2(3): 22-28.

- 张家明, 刘志昕. 2002 对虾白斑综合症的研究进展 [J]. 华南热带农业大学学报, 8(3): 22-27
- A mold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006 A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, The SWISS-MODEL Workspace, 22: 195-201.
- FENG YANG, JUN HE, XINGHUI LIN, et al 2001 Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus [J]. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 11: 811-820.
- Guex N, Peitsch M C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch M C. 2003 An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Research* 31: 3381-3385.
- Marielle C, W van Hulten, Jeroen W ittevekt, Sander Peters et al 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology* 286: 7-22
- Van Hulten M C W, W ittevekt J, Peters S, et al 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. *Virology* 286: 7-22
- Yang F, Wang W, Chen R Z, et al 1997. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA [J]. *Virology Methods* 67: 1-4
- Yue Wu Ling L, Li Shi Yang, Shao Ping Weng, Sui Ming Chan, et al 2007. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific sRNA [J]. *Aquaculture*, 271: 21-30

(责任编辑 张俊友)

Diagnosis of White Spot Syndrome Virus Disease by ORF234 of *Macrobrachium rosenbergii* and Sequence Analysis

YANG He¹, WANG Xiao-lan², CHEN Hui³, HAN Feng-li¹,
GONG Cheng-liang¹, CAO Guang-li¹, XUE Ren-mu¹

(1. School of Life Sciences, Soochow University, Soochow 215123, China

2. Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China

3. Jiangsu Center for Control and Prevention of Aquatic Animal Infectious Disease, Nanjing 210036, China)

Abstract A pair of primers was designed based on white spot syndrome virus (WSSV) released from GenBank to amplify a fragment with total DNA template from *Macrobrachium rosenbergii* which was suspicious of being infected with WSSV. The fragment then was cloned into vector of pet-28a(+). Nucleotide sequence analysis showed the sequence amplified was 99% identity with the ORF234 of total sequence of WSSV from GeneBank. It is believed that the shrimp was infected with WSSV. The sequence encoded 294 amino acids, the estimated molecular weight was 34KD. A protein encoded by the sequence has a globular structure at 22~96 amino acid and at 142~272 amino acid there was a nearly 130 amino acid residues conservative district homologous with DUF1335, which function was unknown. Meanwhile sequence analysis and protein prediction has been studied for further research of the protein function and the control of virus disease.

Key words WSSV; ORF234 gene; clone; sequence analysis; *Macrobrachium rosenbergii*