

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: B200127012

UDC _____

厦 门 大 学
博 士 学 位 论 文

石斑鱼病毒性神经坏死病研究

Study on the Viral Nervous Necrosis in Grouper

陈 信 忠

指导教师姓名: 苏永全 教授 博导

专 业 名 称: 海 洋 生 物 学

论文提交日期: 2 0 0 5 年 12 月

论文答辩日期: 2 0 0 6 年 1 月

学位授予日期: 2 0 0 6 年 月

答辩委员会主席: 雷霖霖 研究员 院士

评 阅 人: 赵法箴 教授 院士

聂 品 研究员 博导

王桂堂 研究员 博导

2005 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

本学位论文是本人在导师的指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有并承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2005年12月18日

目 录

摘要	VII
Abstract	X
第一章 绪论	1
第一节 养殖石斑鱼的主要病原及其危害	1
一. 病毒性传染病	1
二. 细菌性传染病	5
三. 寄生虫病	7
四. 其它病因	12
五. 病害的防治	13
第二节 鱼类病毒性神经坏死病研究进展	15
一. 鱼类神经坏死病毒的种类和地理分布	15
二. 鱼类神经坏死病毒的分子结构和理化特性	22
三. 鱼类神经坏死病毒的危害	26
四. 神经坏死病毒的传播途径	30
五. 神经坏死病毒的检测方法	33
六. 病毒性神经坏死病的防治	39
第二章 福建南部养殖石斑鱼神经坏死病流行病学调查	42
前言	42
第一节 养殖石斑鱼病害流行情况	43
一. 材料与方法	43
二. 结果	43
1. 流行病学特点	43
2. 病原学调查结果	45
三. 讨论	48
第二节 神经坏死病毒的确认及其组织病理学观察	52
一. 材料与方法	52
二. 结果	55
1. VNN 的 RT-PCR 检测结果	55
2. RSIV 的 PCR 检测结果	56
3. 组织病理学观察结果	56
三. 讨论	57
小结	60

第三章 RT-PCR 检测石斑鱼神经坏死病毒方法的建立和应用 ···	61
前言 ·····	61
第一节 RT-PCR 检测石斑鱼神经坏死病毒方法的建立 ·····	63
一. 材料和方法·····	63
二. 结果·····	66
1. 核酸抽提结果比较 ·····	66
2. cDNA 结果比较 ·····	67
3. 一步法 RT-PCR 扩增结果·····	67
三. 讨论·····	68
第二节 RT-PCR 方法检测 5 种养殖石斑鱼 NNV ·····	70
一. 材料和方法·····	70
二. 结果·····	70
1. RT-PCR 检测结果 ·····	70
2. 扩增产物的序列测定和比较 ·····	71
三. 讨论·····	74
小结 ·····	76
第四章 荧光定量 RT-PCR 法检测石斑鱼神经坏死病毒 ·····	77
前言 ·····	77
一. 材料与方法·····	79
二. 结果·····	82
1. 阳性控制品的克隆及鉴定·····	82
2. 标准曲线的建立·····	82
3. Mg^{2+} 浓度的优化·····	83
4. 退火温度的选择·····	84
5. 石斑鱼 NNV 的检测结果·····	84
三. 讨论·····	84
小结 ·····	88
第五章 鞍带石斑鱼神经坏死病毒 RNA1 和 RNA2 基因组	
序列测定和分析 ·····	89
前言 ·····	89
第一节 鞍带石斑鱼 NNV 的 RNA1 和 RNA2 基因组序列测定 ·····	91
一. 材料与方法 ·····	91
二. 结果 ·····	93
1. RT-PCR 结果 ·····	93

2. 鞍带石斑鱼 NNV 核苷酸序列检测结果	94
3. DGNNV 的 RNAs 二级结构预测	98
4. 在基因库中的编号	102
三. 讨论	102
第二节 鞍带石斑鱼神经坏死病毒(DGNNV)基因组分析	105
一. 材料与方法	105
二. 结果	106
1. 核苷酸同源性比较	106
2. 氨基酸序列比较	107
3. 非编码区(non-coded region, NCR) 基因序列比较.....	112
4. 系统发育进化分析.....	115
三. 讨论.....	117
小结	120
图版.....	121
参考文献.....	123
缩略词.....	141
在学期间已取得的成果和发表的论文.....	143
致谢.....	145

Contents

Abstract (Chinese)	VII
Abstract (English)	X
Chapter One Introduction	1
Section 1 Epidemiology and pathogenicity in cultured grouper	1
1. Viral diseases	1
2. Bacterial diseases	5
3. Parasitic diseases	7
4. Other diseases	12
5. Cure and prevention of the disease	13
Section 2 Advance in the study of fish viral nervous necrosis	15
1. Species and geographical distribution of fish NNV	15
2. Molecular structure and physical-chemical properties of fish NNV	22
3. Damage to grouper of VNN	26
4. Transmission mode of NNV	30
5. Detection methods of NNV	33
6. Cure and prevention in VNN	39
Chapter Two Epidemiology study on the viral nervous necrosis in cultured groupers in southern Fujian, China	4
Preface	2
Preface	42
Section 1 General situation of the diseases in cultured groupers	43
1. Material and methods	43
2. Results	43
(1) Epidemical properties	43
(2) Pathogen investigation	45
3. Discussion	48
Section 2 Nervous necrosis virus in grouper and its histopathology observation	52
1. Material and methods	52
2. Results	55
(1) RT-PCR detection in NNV	55
(2) PCR detection in RSIV	56
(3) Histopathology observation	56
3. Discussion	57
Summary	60

Chapter Three	RT-PCR method to detect grouper NNV	61
Preface		61
Section 1	Construction of the RT-PCR method for grouper NNV	63
1.	Material and methods	63
2.	Results	66
(1)	Comparison of RNA extrication	66
(2)	Comparison of cDNA	67
(3)	Result of one-step RT-PCR	67
3.	Discussion	68
Section 2	Detection of NNV from Five Cultured Groupers Using RT-PCR	70
1.	Material and methods	70
2.	Results	70
(1)	Detection result of RT-PCR	70
(2)	Sequence and analysis of the amplicon of RT-PCR from GNNV	70
3.	Discussion	74
Summary		76
Chapter Four	Detection of grouper NNV by real time fluorescence quantitative PCR	77
Preface		77
1.	Material and methods	79
2.	Results	82
(1)	Clone and identification of the positive control	82
(2)	Standard curve	82
(3)	Choice of the concentration of Mg ²⁺	82
(4)	Choice of the anneal temperature	82
(5)	Detection of NNV in groupers	82
3.	Discussion	84
Summary		88
Chapter Five	Sequence determination and analyses of RNA1 and RNA2 of NNV from the dragon grouper <i>E. lanceolatus</i>	89
Preface		89
Section 1	Sequence determination of RNA1 and RNA2 of DGNNV	91
1.	Material and methods	91
2.	Results	93
(1)	RT-PCR results	93
(2)	Nucleotide sequence of DGNNV	94

(3) Prefigure of the second structure of RNAs in DGNNV.....	98
(4) Nucleotide sequence accession numbers in GenBank.....	102
3. Discussion.....	102
Section 2 Analysis of the gene in DGNNV	105
1. Material and methods	105
2. Results	106
(1) Comparison of nucleotide sequence of <i>Nodaviridae</i>	106
(2) Comparison of amino acid sequence of <i>Nodaviridae</i>	107
(3) Comparison of non-coden region sequence of <i>Nodaviridae</i>	112
(4) Phylogenetic analysis of DGNNV.....	115
3. Discussion.....	117
Summary	120
Diagram	121
References	123
Breviary	141
Publication	143
Acknowledge	145

摘 要

应用流行病学调查方法，对福建南部地区海水养殖石斑鱼近年来日益严重的暴发性传染病进行调查和研究。首次阐明了该地区养殖石斑鱼传染病的主要种类及其流行病学特征，病毒性神经坏死病(viral nervous necrosis, VNN)是该地区最常见、危害也最大的传染病，常导致大批石斑鱼鱼苗和幼体发病死亡。该传染病具有典型的神经症状，游动异常，中枢神经和视网膜组织出现空泡坏死病变。病鱼除了神经异常外，无其它临床症状，体表及体内也无明显的病理变化或寄生虫寄生。该病通过鱼卵行垂直传播，也可经养殖水体行水平传播。来自受感染亲鱼的垂直传播是鱼苗感染的主要途径。各种石斑鱼以及不同日龄的石斑鱼均易感，但对幼体的危害更严重。该病具有明显的季节性，通常每年的4—8月份为发病高峰期。从发病的石斑鱼分离出溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)和河流弧菌(*V. fluvialis*)等10株病原菌，大多为继发感染的条件致病菌，加剧了病情，导致更多石斑鱼死亡。匹里虫(*Pleistophora*)和本尼登虫(*Benedenia*)是石斑鱼最常见的寄生虫，由于这些虫的寄生导致石斑鱼免疫力和抵抗力降低，容易引发其它传染性病原的感染。

在国内首次建立了逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测鱼类神经坏死病毒(NNV)的检测操作规程，并应用到传染病调查和厦门口岸进出境鱼类病害检疫中。同时，用组织切片法对石斑鱼脑部和视网膜的特征性病变进行验证，证明该方法是一种快速、简便、准确的检测方法。应用该方法对厦门地区网箱养殖的鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)、点带石斑鱼(*E. malabaricus*)、青石斑鱼(*E. awoara*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)和云纹石斑鱼(*E. moara*)等5种石斑鱼共100多份样品进行检测，NNV平均检出率约90%。对上述5种石斑鱼的NNV PCR扩增产物进行核酸测序和同源性比较，同源性超过99%，与基因库中其它石斑鱼的NNV的同源性也大于97%。石

斑鱼不同组织 NNV 的感染率也不同，脑部和眼睛的检出率最高，部分病鱼的肝、肾等组织也能检出 NNV。

采用 TaqMan 探针技术，并且将假病毒技术构建的含有神经坏死病毒 RNA2 基因组的 MS2 噬菌体假病毒作为阳性质控品，建立了 TaqMan 探针检测石斑鱼神经坏死病毒的荧光定量 PCR 方法，对影响 PCR 反应的 Mg^{2+} 浓度和退火温度等条件进行了优化，在实际检测中取得很好的效果。该方法在一个封闭的小管内自动完成检测，避免了因交叉污染引起的假阳性结果，比普通 PCR 具有更高的灵敏度、准确性和特异性，而且该方法可以实时观察 PCR 过程，还可实现对病毒核酸模板的定量分析。目前，国内外尚未见 TaqMan 探针技术用于检测水生动物病原的报道。

本文还首次测定了鞍带石斑鱼神经坏死病毒 (DGNNV) RNA1 和 RNA2 基因组的全序列。RNA1 由 3103 个核苷酸组成，含有一个编码 982 个氨基酸的开放阅读框，分子量为 110.40 kD.；RNA2 由 1433 个核苷酸组成，含有一个编码 338 个氨基酸的开放阅读框，分子量为 37.06 kD。对 RNA1、RNA2 以及 RdRp 和 MCP 的二级结构进行了预测和分析。对 DGNNV RNA1 和 RNA2 序列以及推导的氨基酸序列与 GenBank 中的其它罗达病毒的基因序列进行了同源性比较。结果表明所有已知的石斑鱼神经坏死病毒的基因序列具有很高的同源性，与其它鱼类 NNV 的同源性也比较高，与感染昆虫的罗达病毒的同源性则较低。系统进化分析也证明所有石斑鱼神经坏死病毒在进化上都处于同一水平。DGNNV 属于 RGNNV 基因型的成员。

关键词：石斑鱼；神经坏死病毒；快速检测；基因组测定。

本文的创新点：

1. 首次阐明病毒性神经坏死病毒是近年来我国南方养殖石斑鱼暴发性病害的主要致病原；
2. 在国内首次建立了 RT-PCR 检测神经坏死病毒操作规程，并应用于口岸动物检疫中；
3. 首次应用 TaqMan 探针和假病毒技术建立了荧光定量 PCR 检测石斑鱼神经坏死病毒的方法；
4. 首次测定了鞍带石斑鱼神经坏死病毒 RNA1 和 RNA2 的基因组全序列，并对其系统进化进行了分析。

Abstract

In recent years, some cultured groupers in southern Fujian, China have been suffered a fulminant infectious disease causing mass mortalities. The main pathogens and their epidemiological properties were illustrated by using epidemiological investigation. It indicated that the viral nervous necrosis virus has been the most important pathogen infected by the fishes, and heavy mortalities often occur from juvenile to young stages due to this virus. This disease is characterised by a variety of neurological abnormalities such as erratic swimming behaviour and vacuolation of the central nervous tissues and nuclear layers of the retina. The sick or dying fish did not show any pathological signs other than neurological abnormalities, no significant external or internal lesions or parasites were observed. The disease is transmitted both horizontally via the water pathway and vertically via the egg. Vertical transmission from infected spawners is a major route for larvae and juveniles infection. All of the groupers have a high susceptibility to this pathogen, but younger fish have more severe lesions. It outbreaks in special season, generally from March to August every year. More than ten bacteria such as *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* and *V. fluvialis* had been identified. Most of them were conditional pathogen that caused secondary infection and made for aggravation of the disease. The *Pleistophora* and *Benedenia* were mostly common parasites found in the farmed grouper and made the fish decreased in immunity and resistance to diseases.

A regulation of the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect nervous necrosis virus was developed and used in the infection investigation and fish disease quarantine of intro-exit animal in

Xiamen port. It was validated by the special pathological changes in the tissue of brains and eyes of the infected grouper. The test of RT-PCR is demonstrated a useful method to detect the pathogen of NNV in diagnosis practice because of its quick, simple and accurate properties. A total of more than 100 samples from five species groupers i.e. *E. lanceolatus*, *E. malabaricus*, *E. awoara*, *E. akaara* and *E. moara* were examined by the reverse transcription polymerase chain reaction and the average infection rate of NNV was about 90%. The nucleic acid sequences of the amplicon amplified from five strains NNV had been sequenced. They were 99% identical each other and showed more than 97% homologue with those of NNV strains from other grouper in GenBank. It was proved that the amplified sequence is the conservative area of NNV in grouper. The infected organs of the grouper by NNV were also detected. It showed that the virus could be found in the brain and eyes in most of the fishes, and also in kidney, spleen and liver in some sick groupers.

The TaqMan probe was applied in the real-time fluorescence quantitative PCR to detect grouper nervous necrosis virus and a false-virus containing a partial RNA2 gene of grouper nervous necrosis virus developed from bacteriophage MS2 was used as positive contrast. The optimal concentration of Mg^{2+} and anneal temperature of RT-PCR affected the reaction mostly were also tested. It gives a good practice in detecting the grouper NNV. The fluorescence quantitative RT-PCR performs automatically in a closed tube so that the cross contamination causing false positive is avoidable. It had high sensitivity, veracity and specificity compared with ordinary PCR. The process of PCR could be observed in real time and it is possible for quantitative analysis of the templet from viral nucleic acid. This is the first report that TaqMan probe be

used to diagnose pathogens from aquatic animals in the world.

The nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from dragon grouper *E. lanceolatus* nervous necrosis virus (DGNNV) of China strain were firstly determined in this study. The RNA1 of DGNNV is 3103 nucleotides, containing an open reading frame encode a protein of 982 amino acids with 110.40 kD. The RNA2 is 1433 nucleotides and the ORF encodes a protein of 338 amino acids with 37.06 kD. The secondary structure of the RNA1, RNA2 and proteins RdRp and MCP were predicated and analysed. The homology or similarity of the nucleotide and its deduced amino acid sequence of the RNA1 and RNA2 from DGNNV were compared with those nodavirus in GenBank. It was found that all of the known grouper NNV possessed very high homology. The similarity between DGNNV and other fish nodavirus is also high, but it is low than those of insects. Phylogenelysis also indicated that all of the grouper NNV seemed at the same level of evolution. DGNNV belongs to the member of RGNNV genotype.

Keywords: Grouper; Nervous necrosis virus; Instant analyse; Gene sequence determination.

第一章 绪 论

第一节 养殖石斑鱼的主要传染病及其病原

石斑鱼是鲷科 (Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*) 鱼类的总称，世界上已报道有 400 多种，我国大陆沿海已记录的有 45 种 (邹记兴, 2001)。石斑鱼肉质细嫩鲜美，体色斑斓吉祥，是海水养殖最名贵的经济鱼类之一，在国内外市场供不应求，日本、中东、东南亚国家以及中国大陆、台湾和香港地区，尤其是华人、华裔社区极受欢迎，经济价值很高。石斑鱼分布于热带、亚热带暖水海域。我国香港地区从 70 年代开始人工网箱养殖，80 年代起，菲律宾、泰国、印尼等国家开始养殖，随后我国广东、福建、浙江和台湾等地区也开始了大规模的网箱养殖。近年来，我国南方省区的石斑鱼网箱养殖规模迅速扩大，石斑鱼的各种病害也呈现迅速上升的势头。在每年的春末和夏秋高温季节，常暴发各种急性传染病，造成大批石斑鱼死亡，给养殖业带来巨大经济损失，严重制约了石斑鱼养殖业的发展。国外对养殖石斑鱼病害的研究起步较早，对常见的几种致病性病毒已有较深入的研究，基本阐明了病毒的生物学特性和核酸组成，并在病毒细胞培养，病原之间的关系，环境因素的影响等方面取得了一些研究成果，有的已建立 PCR、ELISA、基因探针等快速检测方法 (Comps et al., 1996; Chi et al., 1997; Chang et al., 1997; Huang et al., 2001)。国内石斑鱼养殖的历史较短，有关其病害的研究报告也比较少，近两年在石斑鱼病毒性神经坏死病的诊断、病原特性以及流行病学特点等方面的研究取得了一些进展。

一. 病毒性传染病

由病毒感染引起的传染性疾病是鱼类病害中最难预防和治疗的传染病，由于病毒性传染病传播快、诊断难、危害大，加上人工养殖环境的特殊性，常给水产养殖业带来毁灭性打击。至今已经发现的能导致养殖石斑鱼传染病的病毒有神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV)、虹彩病毒 (Iridoviridae) 和传染性胰坏死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 等。

1. 病毒性神经坏死病

病毒性神经坏死病是鱼类最常见、危害最严重的传染病之一，是世界范围的流行性病害。至今已有报告的受该病危害的鱼类包括鳗鲡目 (Anguilliformes)、鲈形目 (Perciformes)、鲷形目 (Pleuronectiformes)、鲉形目 (Tetraodontiformes)、鳕形目 (Gadiformes) 中的 40 余种，各种石斑鱼均可感染此病。该病对仔鱼和幼鱼危害很大，严重者在一周内死亡率可达 100%，且近年受感染的鱼类种类和受危害程度迅速增加 (Mori et al., 1991; Naikai et al., 1994; Fukuda et al., 1996)。病鱼表现厌食，飘游于水面，可出现螺旋状或旋转状游动，或静止时腹部朝上，有的鳃部肿大，无其它明显外观病变。组织学检查可见中枢神经组织脑细胞和视网膜细胞空泡化。该病的致病原是一种无包囊的 RNA 病毒，大小约 25-30nm，包含 2 条正意义的，非聚腺苷酸化的 RNA 单链，根据其核酸特性和蛋白结构而归为罗达病毒科 (Nodaviridae)。该病被国际兽疫组织 (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES, OIE) 列为重要的鱼类病害，OIE 推荐的诊断程序包括的诊断方法有：免疫组织化学方法、荧光抗体技术、细胞培养、ELISA 和 PCR 技术等 (OIE, 2000)。近年来我国台湾的养殖石斑鱼不断暴发该传染病，造成刚孵化仔鱼和幼鱼大规模死亡 (Chi et al., 1997)。电镜观察、

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库