

草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定

郝贵杰 沈锦玉 潘晓艺 徐 洋 姚嘉赞 尹文林

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘 要 2008 年 6 月从湖州某患病草鱼池塘采集草鱼出血病疑似病样, 将除菌过滤后的患病鱼肝、脾、肾组织滤液, 注射健康的 8~10 cm 的草鱼鱼种。5d 后草鱼开始发病, 且症状与原发病症状一样, 死亡率为 57%, 对照组未有死亡。将无菌处理的病样滤液接种草鱼肾细胞(CIK), 连续接 5 代均出现明显的细胞病变(CPE), 并与草鱼呼肠孤病毒参考株所产生的 CPE 一致。该株病毒的 TCID₅₀ 为 10⁻⁸/0.1ml。内脏组织经超薄切片, 电子显微镜观察, 发现组织内有大量的病毒颗粒, 大小均一, 近似球形, 直径约 70~75 nm。理化鉴定表明, 氯仿、乙醚处理组病毒的感染力和对照组相比并没有多大变化, 说明该株病毒对氯仿和乙醚有一定的抗性。经草鱼呼肠孤病毒特异性的 RT-PCR 检测, 获得阳性的目的片段, 测序的结果与草鱼呼肠孤病毒相应序列的同源性达 99% 以上。上述鉴定结果表明所分离的病毒为草鱼呼肠孤病毒, 将其命名为 HZ2008。

关键词 草鱼 草鱼呼肠孤病毒 草鱼肾细胞 分离 鉴定

中图分类号 文献标识码 A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0047-06

Isolation and identification of a strain of Grass carp reovirus in Huzhou

HAO Gui-jie SHEN Jin-yu PAN Xiao-yi XU Yang
YAO Jia-yun YIN Wen-lin

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, 313001)

ABSTRACT Aquareoviruses, which belong to a newly identified genus of the family *Reoviridae*, are agents infecting all kinds of aquatic animals. Grass carp reovirus (GCRV) is a kind of pathogenic virus which causes disease outbreak of Grass carp fingerling in freshwater region of China. In June 2008, a strain virus had been isolated from the samples of visceral organs of the diseased Grass carp with Hemorrhage symptoms from a fish pond at Huzhou City in Zhejiang Province. Sample of diseased Grass carp visceral organs was filtered and was injected into healthy Grass carp fingerlings. Clinical signs of Hemorrhage symptoms of Grass Carp were replicated after five days. Mortality of the sample was 57%. By contrast, the control group fishes were still alive. The sample was continually inoculated onto CIK cells and induced typical cytopathic effect (CPE) was observed. The typical CPE was the same with that induced by the GCRV873 strain. The TCID₅₀ of the isolated virus strain was 10⁻⁸/0.1ml. The visceral organs examined by electron microscopy showed that there were a number of viral particles approxi-

浙江省科技厅重点项目(2007C22052)和公益性行业(农业)科研专项(200803013)共同资助

收稿日期:2009-12-20;接受日期:2010-03-31

作者简介:郝贵杰(1979-),女,助理研究员,主要从事鱼类病害研究。E-mail:melissa511@sina.com,Tel:(0572)2041403

mately 71~75 nm in diameter with a sphericity shape. Physicochemically, the isolated strain was not sensitive to chloroform and ether. 436bp nucleotide segment was amplified from the isolated virus strain by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleic acid sequence of the amplicon had been sequenced. It showed 99% identity with those of GCRV strains in GenBank. All of the evidences indicated that the isolated virus stain was GCRV and was named as HZ2008 isolate.

KEY WORDS Grass carp Grass carp reovirus *Ctenopharyngodon idellus* kidney cell
Isolation Identification

草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)为中国分离鉴定的第 1 株鱼类病毒,可引起草鱼出血病的大面积暴发。该病毒隶属于水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*, ARV),是该属成员中毒力最强的病毒(Rangel *et al.* 1999),可引起草鱼大批死亡,严重地影响我国淡水养殖业的健康发展,在 GCRV 研究方面,国内相继进行了系统的病毒流行病学、生物化学及分子生物学等研究(方勤等 2003; Fang *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2001; Fang *et al.* 2005; Fang *et al.* 2008)。草鱼出血病一直是我国草鱼养殖中最难控制的疾病,尽管近年来用疫苗免疫进行控制获得了较好的结果,但每年在发病季节依然会出现发病死亡现象。2008 年 6 月,湖州市的某养殖草鱼在发病季节有疑似草鱼出血病的发病情况,虽然死亡率不算高,但会持续性死亡,给养殖户带来了很大的损失。采集具有典型出血病症状的病样,进行病毒分离以及理化和分子生物学的鉴定,结果获得了 1 株草鱼呼肠孤病毒。该毒株是近年来进行草鱼出血病流行病学调查所获得的第 1 株湖州株病毒,为丰富该病的病原库及进行各地分离株比较分析奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源

患病草鱼于 2008 年 6 月采自湖州市郊区某患病草鱼塘(体重约 40~50g)。健康草鱼购于湖州某养殖场,体长 8~10cm,体重 30~40g,健康草鱼在室内暂养 5~7 d,无异常,进行实验,水温 24~26℃。试验所用的阳性对照 GCRV 为本室保存。

1.2 细菌分离及寄生虫观察

从患病鱼的肝、脾、肾等组织进行细菌分离,所用培养基为乙酪胨大豆琼脂(TSA)。同时,取病鱼鳃、鳍条等组织在显微镜下检查寄生虫情况。

1.3 人工感染试验

1.3.1 病鱼组织除菌上清液制备

取具有典型症状的发病草鱼的肝、脾、肠、肾等组织适量,剪碎,置于匀浆器中制成匀浆,加 10 倍体积的无菌生理盐水,反复冻融 3 次。经高速台式冷冻离心机以 6 000 r/min,离心 5 min,取上清液再 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液备用。

1.3.2 健康草鱼的感染试验

取 1.3.1 中制备的滤液对健康草鱼进行攻毒,采用腹腔注射途径,剂量为每尾 0.2ml,每组 15 尾,对照组注射无菌生理盐水,剂量同试验组。

1.4 病毒分离

无菌取患病草鱼肝、脾、肾等组织少许,剪碎,置于匀浆器中制成匀浆,加入 10 倍体积的含 10%小牛血清

的 DMEM 细胞培养液。按 1.3.1 中方法过滤,将滤液按 5% 的比例接种于长成单层的 CIK 细胞(草鱼肾细胞系),28℃ 孵育 1h 后倾去液体,加入含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液即维持液继续培养,并设标准参考株(GCRV873)接种的细胞为阳性对照,不接毒的细胞作为阴性对照。24 h 后开始观察,待细胞病变(Cytopathic effect, CPE) 出现 80 % 以上时收获,若无病变再盲传 3 代,并每日观察 CPE。

1.5 病毒的初步鉴定

1.5.1 电镜观察

将新鲜病鱼的肝、脾、肾组织切成小块,经戊二醛、四氧化钨固定,包埋,常规方法进行切片(殷震等 1997),染色后进行电镜观察。

1.5.2 病毒滴度测定

取 GCRV 阳性对照以及所分离病毒的细胞冻融液,用维持液作连续的 10 倍递进稀释。取 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 5 个稀释度,吸取每一稀释度的病毒液 0.1ml,接种一长满单层 CIK 细胞的 96 孔板,每稀释度接种 6 孔,28℃ 孵育 1h 后倾去,加入维持液继续培养,并设正常细胞为对照,逐日观察病变。根据病变情况按 Karber 氏法计算 $TCID_{50}$, $lgTCID_{50} = L + d(S - 0.5)$ 。式中, L 为病毒最低稀释度的对数, d 为组距,即稀释系数, S 为各组病变数与接种数比值之和(殷震等 1997;郭元吉等 1997)。

1.5.3 乙醚敏感试验

取出现 CPE 的冻融细胞培养物,3000 r/min 离心 20min,除去细胞碎片,吸取病毒上清液,按 20% 比例加入乙醚,设不加乙醚对照管。两管在冰浴上振荡 60 min,以 2000 r/min 离心 20 min,液体分上下两层,吸取上层病毒液,连续吹打使乙醚充分挥发,然后测定处理组和对照组病毒液的 $TCID_{50}$ 。

1.5.4 氯仿敏感试验

按 4.8% 比例加入分析纯氯仿,于 4℃ 条件下振荡混合 10min,随后 500 r/min 离心 5 min,吸取上层液体,测定病毒 $TCID_{50}$ 。对照病毒液内按 4.8% 的比例加入生理盐水,同法处理和滴定。

1.6 特异性逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)鉴定

1.6.1 引物

根据 GenBank 中已发表的草鱼呼肠孤病毒(GCRV)第 6 基因片段核苷酸序列,在保守区设计一对引物:

P1, 5'-ATCCCGTATATCTATGGCTT-3'

P2, 5'-TTGGAGACGAACATAGACGC-3'

该引物扩增片段为 GCRV S6 基因 1330~1776 之间的 436 个核苷酸。该引物的合成和产物测序委托美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司完成。

1.6.2 肝脾肾组织中病毒 RNA 的提取

取发病鱼的组织 100mg 加入 500 μ l DEPC 处理的超纯水捣碎匀浆,10000 r/min 离心 10 min,取上清液,加 40 μ l 蛋白酶 K 和 40 μ l 1% SDS,37℃ 孵育 30 min;再加入 600 μ l 酚氯仿异戊醇,充分混匀 30 s,12000 r/min 离心 5 min,取上层水相;再加入等体积的氯仿异戊醇混合液,充分混匀 30 s,12000 r/min 离心 5 min,取上层水相;加入 1.5 倍体积的异丙醇,混匀后 -20℃ 1h 以上沉淀核酸,12000 r/min 离心 10 min,弃上清液,室温干燥后,加入 13.5 μ l 灭菌的 DEPC 处理的超纯水溶解,备用。

1.6.3 细胞感染病毒的 RNA 的提取

染毒的细胞液反复冻融 3 次,取 250 μ l 病毒悬液,加 750 μ l Trizol 高速混匀,室温 5 min,再加 200 μ l 氯仿剧烈摇晃,室温 5 min;12000 r/min 离心 15 min,吸上清液 500 μ l,再加入 500 μ l 异丙醇,室温沉淀 15~20 min,12000 r/min 离心 15 min,75% 乙醇洗涤,吹干。再加入 13.5 μ l 灭菌的 DEPC 处理的超纯水溶解,备用。

1.6.4 RT-PCR 扩增

RT 反应:反应体系共 25 μ l,取制备的 13.5 μ l 的 RNA 模板,加 1 μ l(100 nmol/L)下游引物或 1 μ l Random 引物充分混匀,置于 72℃ 水浴中作用 10 min,冰浴 5 min。然后依次加入 5 \times AMV Buffer 5.0 μ l,dNTP

4 μl (每种 dNTP 溶液浓度均为 2.5 mmol/L), RNasin 0.5 μl (20U), AMV 反转录酶 1 μl (5U), 将样品于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 r/min 瞬时离心混合均匀后, 置于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 1~2 h, 再 95 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min 灭活 AMV。

PCR 反应: PCR 反应体系为 50 μl , 其中含反转录模板 1.0 μl , 10 \times PCR Buffer 5.0 μl , dNTP 4 μl (浓度同上), Taq DNA 聚合酶 1.25U (0.25 μl), 25mmol/L 氯化镁 4.0 μl , 上下游引物各 1 μl (均为 100 nmol/L), 最后用双蒸水补足余下体积。将样品于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 r/min 瞬时离心混合均匀后, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 共进行 33 个循环, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min, 将温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 发病情况

2008 年 6 月, 湖州市郊区某养殖草鱼塘出现发病、死亡现象, 一口约 0.33hm² 的鱼塘养殖草鱼约 6~7 万尾, 每天死亡 60 多尾。发病草鱼体色暗黑, 口腔及上下颌充血、头盖、眼眶周围、鳃盖及鳍条基部都充血, 肛门红肿, 尾端发白; 剖检可见肠有不同程度的充血, 肾肿大。

2.2 细菌分离及寄生虫观察

对发病草鱼进行细菌分离, 仅在肝组织分离板有个别菌生长, 判定是杂菌, 或是继发感染的细菌, 并非引起草鱼发病的病原菌。取发病鱼的腮及鳍条显微镜下观察未见有寄生虫感染。

2.3 人工感染试验

按照 1.3 中方法进行人工感染试验, 感染 5d 后, 草鱼开始发病, 症状同自然发病的草鱼, 口腔、头盖和眼眶充血, 鳍条充血。15 尾鱼除 1 尾非特异死亡外, 共死亡 8 尾, 死亡率约为 57%, 而有轻微症状的草鱼直到 30d 后未见死亡, 对照组未有死亡。

2.4 病毒分离培养结果

按照 1.4 中方法, 病样经过 2~3 次传代培养分离到病毒, 并可稳定传代, 所出现的病变和 GCRV873 病变一致(方勤等 2002)。病毒感染单层细胞后 24 h 细胞开始出现病变。病变开始时, 单层细胞局部出现边缘不整齐的空洞, 少许细胞脱落, 随着细胞病变效应(CPE)的发展, 单层细胞呈网状收缩, 逐渐脱落崩解, 最后呈现典型破鱼网状。从病毒感染单层细胞开始到细胞病变完毕这一过程一般约需 3~4d。

2.5 病毒鉴定结果

2.5.1 电镜观察结果

在电子显微镜下观察到患病草鱼的组织内有大量的病毒颗粒, 大小均一, 近似球形, 直径约 75 nm。

2.5.2 病毒滴度测定结果

按照 1.5.2 中的方法测定病毒的 TCID₅₀, 根据 Karber 氏法计算 TCID₅₀ 分别计算各接种病毒的 TCID₅₀。GCRV 阳性对照的 TCID₅₀ 为 10^{-8.3}/0.1 ml, 该病毒分离株的 TCID₅₀ 为 10^{-8.0}/0.1 ml。

表 1 氯仿、乙醚对两株分离株的影响

Table 1 Effects of chloroform and ether on two GCRV strains

处理方法 (Treatment method)	处理组 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ of treated group)	对照组 TCID ₅₀ (TCID ₅₀ of control group)
氯仿 Chloroform	10 ^{-7.8} /0.1 ml	10 ^{-8.0} /0.1 ml
乙醚 Ether	10 ^{-7.6} /0.1 ml	10 ^{-8.0} /0.1 ml

2.5.3 氯仿、乙醚敏感试验结果

氯仿、乙醚对分离病毒的敏感性试验结果见表 1。从理化特性结果可以看出, 氯仿、乙醚处理组病毒的感染力和对照组相比并没有多大变化, 说明所分离的两株病毒对氯仿和乙醚有一定的抗性。

2.6 RT-PCR 核酸扩增及测序结果

2.6.1 电泳鉴定结果

按照 1.6.2 和 1.6.3 中方法分别提取患病草鱼的肝、脾、肾组织的混合物,CIK 细胞培养物的第 7 代的 RNA,反转录合成 cDNA 第 1 链,用所设计的 GCRV 特异性引物扩增,均获得阳性结果,扩增片段与目的片段大小一致,均为 436 bp,结果见图 2。

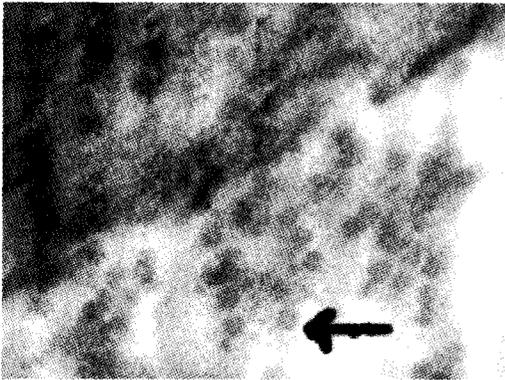
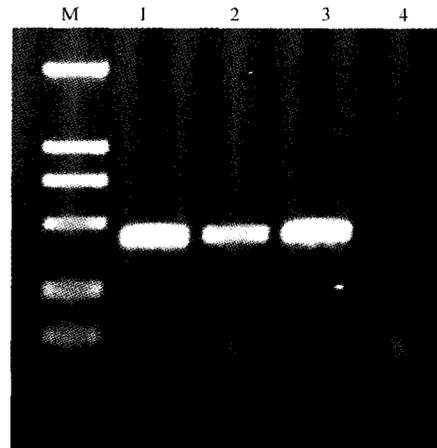


图 1 草鱼组织中的球状病毒颗粒(40 000×)

Fig. 1 Spherical virus in visceral organs of Carp



M. DL2000 分子量标准;1. GCRV 阳性对照;
2. 组织中 HZ2008;3. 细胞中 HZ2008;4. 正常细胞对照
M. DL2000 DNA Marker; 1. Positive control
of GCRV; 2. HZ2008 in organs;
3. HZ2008 in infected cells; 4. Uninfected cells control

图 2 草鱼呼肠孤病毒 RT-PCR 琼脂糖的电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel map of GCRV by RT-PCR

2.6.2 测序结果

将上述 PCR 扩增产物进行测序,共测出 399bp 的序列,用序列同源性分析软件 NCBI/Blast 对该序列进行同源性分析,结果表明该序列与 GenBank 中已发表的 GCRV 第 6 基因片段核苷酸序列(AF239175 和 AF403392)的 1330~1725bp 处序列同源性分别为 99%和 98%,因此可确定该病毒为 GCRV。

序列结果:

```
CCAGAGTGGATAATCGGGGGGAGTGGGTGAGGCTTGGCCTACCTGTGACAGCTTGTGCTGGA
CGGCGAGTCGACTGACGATGGCGCTAGTCGCGGAATCATCCGTTTTTGAGGCGACGGGAATCGCG
TCTCCTACGACATTGGCCAACTTGTGAGATGATTCGACACTAACACGATCGCGTCGTTGGCTAA
GGCAGAGGCGACCTCCTCAGACGTTTGGTTGGCCATGACGGTAGCTGGTACGATAGCGTCAACGA
CTTCGCCCTTGTATGTCGTCTCACGTAGCAGTACGGGGGTGACAGTGAGAAGGCCGTCCATCAGCG
TGGGGTTGGAGAAATTGGAGGAGGATGTGGGTGATGGGATGAGGAATGTGCCCAAGCCATAGTA
TTACGGGATAAA
```

3 讨论

草鱼呼肠孤病毒可引起宿主产生严重的疾病,是中国分离鉴定的第 1 株鱼类病毒,是水生呼肠孤病毒属中致病力最强的毒株。草鱼出血病引起草鱼大批死亡,曾一度给我国淡水养殖业造成严重的危害。此外,GCRV 为中国在国际上首次完成全基因序列分析的第一株水生呼肠孤病毒,是迄今研究最系统深入的水生呼肠孤病毒,其中

GCRV873 为研究较为系统的毒株(方勤等 2003;王炜等 1994)。虽然预防草鱼出血病的疫苗目前已经被推广使用,也取得了较好的结果,但每年在发病季节,各地仍然会陆续出现草鱼出血病,并给养殖户带来巨大的损失。因此本实验室近年来初步开展了草鱼出血病的流行病学调查,以期为更好地控制该病奠定基础。

本实验对 2008 年湖州地区一疑似草鱼出血病的病例进行了病原的鉴定,为了鉴别病原是否为草鱼细菌性肠炎,进行了细菌分离,但仅在肝组织分离板有个别菌生长,判定是杂菌或是继发感染的细菌,并非引起草鱼发病的病原菌。通过组织滤液感染试验,结果表明实验组的发病情况和原发病鱼的症状一致,感染 5d 后,致死率达到 57%。进而采用 CIK 细胞分离的方法对所采病样进行了病毒分离,在试验中采用含 10% 小牛血清的 DMEM 生长液稀释病料,对病毒的感染性起到了保护作用(左文功等 1984;邹桂平等 2000)。病样滤液感染单层细胞后 24h 细胞开始出现病变,病变开始时,单层细胞局部出现边缘不整齐的空洞,少许细胞脱落,随着细胞病变效应(CPE)的发展,单层细胞呈网状收缩,逐渐脱落崩解,最后呈现典型破鱼网状,从病毒感染单层细胞开始到细胞病变完毕这一过程一般约需 3~4d,和标准参考株 GCRV873 病变一致(方勤等 2002)。

电镜观察患病草鱼的组织内有大量的病毒颗粒,大小均一,近似球形,直径约 71~75nm。从理化特性结果可以看出,氯仿、乙醚处理组病毒的感染力和对照组相比并没有多大变化,说明所分离的两株病毒对氯仿和乙醚有一定的抗性。这种抗性可作为此病毒不存在囊膜的证据,也与柯丽华等(1990)报道的一致。草鱼呼肠孤病毒为双股 RNA 病毒,共分 11 个节段,提取接毒细胞和患病草鱼组织中的 RNA,经草鱼呼肠孤病毒特异性的 RT-PCR 检测,获得阳性的目的片段,测序的结果与 GenBank 中 GCRV 相应序列的同源性达 99%,上述研究表明,所分离到的该株病毒为草鱼呼肠孤病毒,将其命名为 HZ2008。该病毒的分离为丰富草鱼出血病病原库及进行毒株变异性分析奠定了基础。

参 考 文 献

- 方勤,丁清泉,汪亚平,朱作言. 2003. 两株水生呼肠孤病毒部分特性的比较. 中国病毒学,18(5):464~467
- 方勤,肖调义,李旅,邹桂平,章怀云,汪亚平. 2002. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究. 中国病毒学 17(2):182~184
- 王炜,蔡宜权. 1994. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位. 中国病毒学,9(4):356~361
- 左文功,钱华鑫,许映方,杜森英,杨先乐. 1984. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立. 淡水渔业, (2):38~39
- 邹桂平,方勤. 2000. 草鱼呼肠孤病毒在 CIK 细胞中复制及形态发生的研究. 中国病毒学,15(2):186~19
- 柯丽华,方勤,蔡宜权. 1990. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性. 水生生物学报,14(2):153~159
- 郭元吉,程小雯. 1997. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京:中国三峡出版社,109~115
- 殷震,刘景华. 1997. 动物病毒学(第2版). 北京:科学出版社,329~330
- Rangel, A. A., Rockemann, D. D., Hetrick, F. M., et al. 1999. Identification of Grass carp haemorrhage virus as a new enogroup of aquareovirus. J. Gen. Virol. 80: 2 399~2 402
- Fang, Q., Attoui, H., Francois, J., et al. 2000. Sequence of Genome Segments 1, 2 and 3 of the grass carp Reovirus(Genus Aquareovirus, Family Reoviridae). BBRC, 274(3): 762~766
- Qiu, T., Lu, R. H., Zhang, J., et al. 2001. The molecular characterization of RNA segment S9 of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus. Aquaculture, 203(1-2): 1~7
- Qiu, T., Lu, R. H., Zhang, J. et al. 2001. Genome segment 38 of grass carp hemorrhage virus encodes a virion protein. Intervirology. 44(5): 317~320
- Fang, Q., Shah, S., Liang, Y., et al. 2005. 3D reconstruction and capsid protein characterization of Grass Carp reovirus. Science in China Series C, 48: 593~600
- Fang, Q., Seng, E. K., and Ding, Q. Q. 2008. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases. Arch. Viro. 153: 675~682