

草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定

张超^{1,2}, 王庆¹, 石存斌¹, 曾伟伟¹, 刘永奎^{1,2}, 江海明¹, 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 从浙江省湖州地区采集发病草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)样本中, 取症状明显病料的肝、脾、肾组织, 经过滤除菌处理后接种草鱼肾脏细胞(CIK)。盲传 8 代, CIK 细胞未出现明显细胞病变, 但感染细胞固定后经电镜观察发现, 细胞质内有大量病毒聚集, 病毒无囊膜, 近球形, 直径约 70 nm, 形态与已报道的草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)相似。将病毒提纯后分别经 DNA 酶、RNA 酶和绿豆核酸酶消化, 证实为双链 RNA(dsRNA)病毒。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果显示, 病毒基因组由 11 个 dsRNA 组成, 呈现水生呼肠孤病毒基因组典型特征。采用 RNA 水平 3'末端加接头的方法获得了 S6 节段的全长序列, 测序结果表明, S6 由 2 030 个核苷酸组成, 推测其编码一个分子量约为 68.4 kD 的蛋白。聚类分析结果显示, 该病毒为水生呼肠孤病毒, 但在氨基酸水平上与草鱼呼肠孤病毒代表株 873 株的差异较大, 同源性的 33%, 提示该病毒为一株新型的草鱼呼肠孤病毒。本研究旨在为草鱼出血病防治方法的深入研究奠定基础。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1257-1263]

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; 病毒分离; 病毒鉴定

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1257-07

草鱼出血病是一种危害草鱼的高度传染性、致死性的病毒性传染病。1978 年首次证实该病的病原体是一种病毒^[1]。1983 年从草鱼出血病中分离出一株草鱼出血病病毒 (Grass Carp Haemorrhage Virus, GCHV), 并鉴定为呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)成员^[2]。1991 年国际病毒分类委员会第五次会议将该病毒正式命名为草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV), 并纳入水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*)^[3]。水生呼肠孤病毒不仅能引起淡水鱼类的感染, 还能感染海水鱼类, 已在世界范围造成了较广泛的危害。草鱼呼肠孤病毒是中国大陆分离鉴定的第一株鱼类病毒, 现在已有资料证实该病毒是水生呼肠孤病毒属中致病力最强的毒株之一, 可导致当年草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼种大批死亡, 还能感染青鱼(*Mylopharyn-*

godon piceus)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)和稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[3]。

目前国内已报道了多株草鱼呼肠孤病毒分离株^[1-6], 其中对 GCRV 873 株研究的较为深入, 它是第一株完成全基因组序列分析的草鱼呼肠孤病毒^[7], 对于草鱼呼肠孤病毒的深入分析具有重要参考价值。但目前对其他分离株的研究报道则较少, 尤其是在基因组序列方面, 而不同的分离株在细胞敏感性、对草鱼的致病力等方面是有较大差异的^[3]。本实验室通过分析来自浙江省湖州地区的发病草鱼样品, 在排除细菌感染的可能后, 应用草鱼肾脏细胞(CIK)分离到一株病毒, 暂定名为 HZ08, 并通过电镜观察、核酸分析、序列测定等方法对该病毒进行研究, 旨在鉴定新毒株, 分析病毒基因组差异, 为病害的防治奠定基础。

收稿日期: 2009-12-25; 修订日期: 2010-01-21.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资金资助项目(200803013); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-49-14).

作者简介: 张超(1981-), 男, 博士研究生, 从事鱼类病害研究. E-mail: shandongneau@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴淑勤, 研究员, 博士生导师, 研究方向为鱼类病害与免疫. E-mail: wushuqin001@21cn.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

草鱼肾脏细胞(CIK)由本实验室保存; M199 培养基、犊牛血清、胰酶为 Gibco 公司产品; 高保真 Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 购自 TAKARA 公司; Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司; DNA 酶(RNAase free)、RNA 酶、绿豆核酸酶(MB)及其反应缓冲液, 购自 NEB 公司; 反转录试剂盒购于东洋纺(TOYOBIO)公司; T₄ RNA ligase 购自 Promega 公司; 胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 样品的采集及处理

病鱼组织于 2008 年 10 月取自浙江湖州地区的发病草鱼。主要症状表现为鱼体变黑、肝脏局部出血、脾脏和肾脏充血。采取病鱼的肝、肾、脾, 用 500 mL/L 的甘油磷酸缓冲液保存, 置冰上带回实验室, -70℃ 保存。

1.3 病毒的分离与传代

参考方勤等^[6]方法进行病毒分离和传代, 略有修改。先用 PBS(pH 7.2)将保存于甘油磷酸盐缓冲液中的组织漂洗 3 次, 称取重量, 将组织剪成小块, 用组织匀浆器磨碎, 制成 0.1 g/L 的粗制悬液。匀浆液在 -20℃ 反复冻融 3 次, 用普通滤纸过滤, 滤液经 8 000 r/min(SIGMA) 离心 30 min, 去沉淀, 上清液经滤膜孔径为 0.22 μm 的微孔滤器过滤除菌, -70℃ 保存。将长成致密单层的 CIK 细胞去掉培养液后, 用 PBS 液洗 2 次, 加入病毒滤液, 室温下吸附 1 h 左右, 吸弃病毒液, 加入与培养液等量的维持液, 28℃ 恒温培养。每日观察细胞形态。病毒传代时, 将病毒细胞培养物反复冻融 2 次, 再按上述接种方法做传代培养。

1.4 超薄切片电镜观察

收集病毒感染后至少 3 d 的细胞, 用戊二醛和四氧化锇双固定, 酒精系列脱水, 苯二甲酸二丙烯酯包埋, 制备超薄切片, 在透射电镜下观察和拍片。

1.5 病毒基因组提取、核酸性质分析

病毒的提纯参考 Qiu 等^[8]的方法。双链 RNA(dsRNA)的提取采用 Trizol Reagent, 按说明

书的步骤进行。用无 RNAase(RNAase free)水稀释 DNA 酶、RNA 酶至终浓度分别为 10 U/μL 和 2.5 U/μL、绿豆核酸酶浓度为 10 U/μL, 根据酶液 0.5 μL, 10×反应缓冲液 0.5 μL, 核酸 4 μL(约 100 ng), 37℃ 水浴消化 30 min 的反应条件消化提纯的核酸, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察消化结果。电泳条件为: 5 V/cm, 1.5 h。

1.6 病毒基因组的 SDS-PAGE

病毒基因组的 SDS-PAGE 参照方勤等^[6]的方法, 略有修改。SDS-PAGE 分离胶浓度为 7.5%, 在 80 V 条件下电泳 20 h。硝酸银染色后拍照。

1.7 S6 节段(Segment 6, S6)的全长克隆与序列测定

S6 全长扩增采用 Attoui 等^[9]的单引物扩增技术, 首先在 S6 节段的 3'端连接接头引物 Pa(5' PO₄-AGG TCT CGT AGA CCG TGC ACC-NH₂ 3'), 然后利用 Pa 的互补引物 Pb(5' GGT GCA CGG TCT ACG AGA CCT 3')反转录, 最后利用 Pb 进行 PCR 扩增, 得到 S6 的全长序列。具体步骤如下:

1.7.1 S6 末端加接头 病毒核酸经琼脂糖电泳后, 割取 S6 片段, 经 QIA quick Gel Extraction Kit 胶回收。20 μL 的连接酶反应体系包括 50 mmol/L HEPES-NaOH(pH 8.0, 25℃), 200 ng dsRNA, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 10 mmol/L ATP, 1 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA), 50 pmol/L Pa, 500 mL/L 甘油, 20 U T₄ RNA 连接酶。反应在 16℃ 保温 16 h 进行后, 用苯酚+氯仿+异丙醇混合液(体积比 25:24:1)抽提一次除去 T₄ RNA 连接酶, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 2.5 倍体积的冰乙醇混匀后在 -70℃ 静置 2 h。在 4℃ 条件下 12 000 g 离心 15 min 取沉淀回收 dsRNA, 用无 RNase 水溶解。

1.7.2 cDNA 的合成 将加上接头的 dsRNA 在 15 mL/L 的 DMSO 溶液中 99℃ 保温 5 min 后, 迅速置冰上冷却 2~5 min。用 Superscript III 逆转录酶在 42℃ 保温 1 h 进行逆转录, 20 μL 反应体系包括 50 pmol/L Pb, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L dNTP 混合液, 200 U 逆转录酶以及 5 μL dsRNA 样品, 而后加 EDTA 至终浓度 20 mmol/L 终止反应。

1.7.3 单引物 PCR 扩增 总体积 50 μL 的反应体系包括 5 U/ μL TaKaRa Ex Taq, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg^{2+} Plus), 2.5 mmol/L NTP Mixture, 2 μL 模板, 20 $\mu\text{mol/L}$ Pb, 40.75 μL ddH₂O。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.7.4 PCR 产物的克隆和鉴定 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶回收后, 与 pMD18-T 载体连接过夜, 连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 涂布含氨苄的 LB 平板, 挑取白色菌落抽提质粒, 电泳挑选阳性克隆, 并进行 PCR 鉴定。挑选 3 个阳性克隆委托上海生物工程有限公司测序。

1.8 序列分析

应用 SEQMAN(Lasergene, DNASTar)拼接序列。分别将核苷酸序列及推测的氨基酸序列进行 BLAST 搜索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), 并用 CLUSTAL-X version 1.83, 对 S6 推导的氨基酸序列进行比对分析。用 MEGA 4.0.2 软件构建系统进化树。比对采用的毒株及其序列登录号为: 草鱼呼肠孤病毒 873 株(GCRV)(AF403392), 美国草鱼呼肠孤病毒(American grass carp reovirus, AGCRV)(NC_010589), 水生呼肠孤病毒 A (Aquareovirus A, Aqu A)(NC_007592), 美洲金体鲮呼肠孤病毒(Golden shiner reovirus, GSV)(NC_005171), 哺乳动物呼肠孤病毒(Mammalian orthoreovirus, MRV)T1L(NC004262)、T2J(AF461-683)、T3D(M19408), 禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)ARV176(AY750053)、ARV918(AY635945)、ARV919(AY635939)、S1133(AY635934)。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离培养

病料接种 CIK 后, 连续观察 7 d, 没有出现明显的细胞病变, 盲传至第 8 代, 连续观察仍未出现明显的细胞病变。

2.2 电镜观察

透射电镜下感染组织悬液的 CIK 细胞胞浆中观察到有大量呈晶状排列的病毒粒子, 直径约 70 nm, 病毒颗粒近六边形或近球形, 无囊膜结构, 中央有一电子密度致密区域(图 1、图 2)。

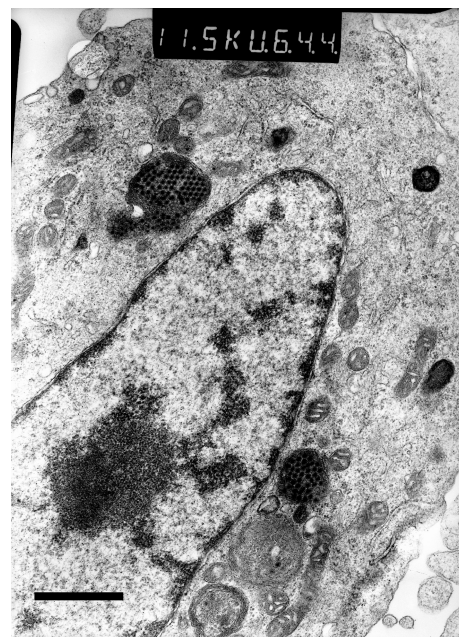


图 1 草鱼肾脏细胞(CIK)胞质中包涵体内的病毒粒子
(标尺为 1 μm)

Fig. 1 Viral particles in inclusion body in cell plasma of grass carp CIK (bar=1 μm)

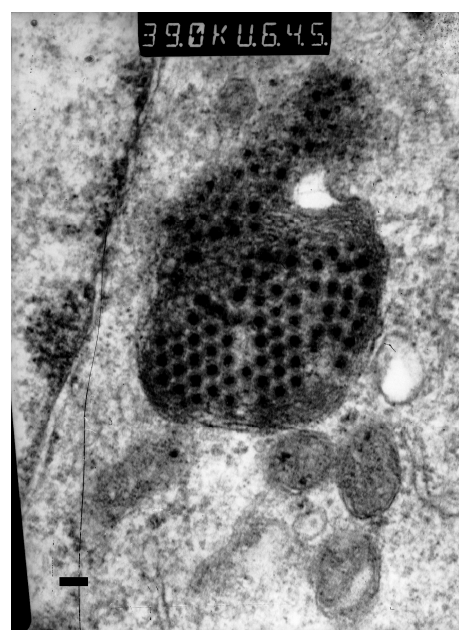


图 2 草鱼肾脏细胞(CIK)胞质中病毒粒子呈晶格状排列(标尺为 100 nm)

Fig. 2 Paracrystalline array of viral particles in cell plasma of grass carp CIK (bar=100 nm)

2.3 病毒基因组的核酸类型分析

提取的病毒核酸经 DNA 酶、绿豆核酸酶和 RNA 酶消化后电泳, 结果显示, 经过 DNA 酶和

绿豆核酸酶消化后,病毒核酸没有明显差别(图 3 中 1、2 泳道),说明病毒核酸对 DNA 酶和绿豆核酸酶不敏感。经过 RNA 酶消化后,观察不到电泳条带(图 3 中 3 泳道),说明病毒核酸对 RNA 酶敏感。由于绿豆核酸酶只降解单链 DNA 或 RNA,说明该分离株的核酸类型为双链 RNA。分节段的 dsRNA 符合草鱼呼肠孤病毒的基因组特征。

病毒基因组跑出 7 条明显条带,推测共有 11 个节段,按节段大小分为 3 组, L 组包括 3 个节段: S1、S2、S3, M 组包含 S4、S5、S6, S 组包含 S7、S8、S9、S10、S11, 其中节段 S1、S2、S3 存在共移(co-migration), S4 和 S5 存在共移, S7 和 S8 存在共移,符合草鱼呼肠孤病毒的基因组特点(图 3)。这种节段的共移现象在其他水生呼肠孤病毒中也是存在的。对比文献中 GCRV873 株和美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV)的琼脂糖凝胶电泳图谱^[10],发现 873 株 S1、S2、S3 存在共移, S7 和 S8 存在共移, AGCRV 株 S1、S2、S3 存在共移, S6、S7、S8 存在共移现象。

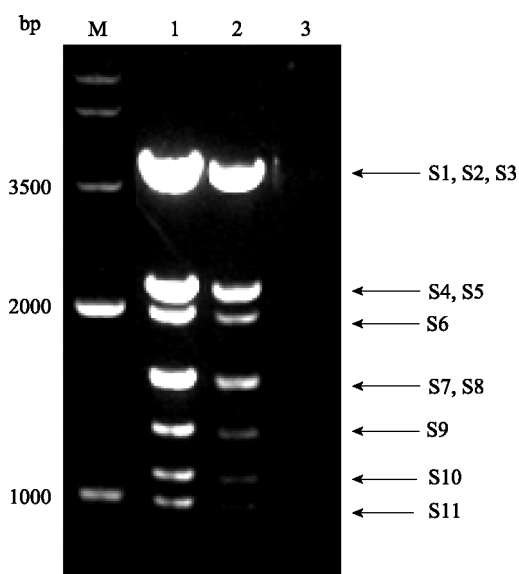


图 3 病毒核酸经 DNA 酶、RNA 酶和绿豆核酸酶(MB)消化结果

M: DNA maker; 1: DNA 酶消化; 2: 绿豆核酸酶消化;
3: RNA 酶消化

Fig. 3 Results of viral nucleic acid digested with DNase, RNase and Mung Bean Nuclease
M: DNA maker; 1: digested with DNase; 2: digested with Mung Bean Nuclease; 3: digested with RNase

2.4 病毒基因组的 SDS-PAGE

为了进一步验证病毒基因组是否由 11 条 dsRNA 组成,样品经 SDS-PAGE 20 h 后,硝酸银染色结果显示,病毒基因组跑出 10 条清晰条带,其中 S1 和 S2 由于分子量接近,两条带不能完全分开(全基因组测序结果已经证实为 S1 和 S2 两条带,资料未在本文显示),节段分布情况与病毒基因组琼脂糖凝胶电泳相似(图 4)。

2.5 S6 节段的序列分析

根据测序结果并通过计算机分析, GCRV HZ08 株完整的 S6 节段由 2 030 个碱基对组成,其正链上拥有一个长的单一 ORF。4 种碱基含量差别不大,其组成为 25.91% 的腺嘌呤, 25.86% 的鸟嘌呤, 22.96% 的尿嘧啶和 25.27% 的胞嘧啶。5'端的非编码区长度为 42 个碱基,而下游 3'端的非编码区长度为 35 个碱基。ORF 起始自 43~45 核苷酸位置的第一个 AUG,终止于第 1 951~1 953 核苷酸位置(UAG)。起始位点 AUG 的-3 位为碱基为 A, +4 位为碱基 G(AUCAUGG),符合 Kozak^[11]的强初始序列的特点。HZ08 株序列的两端拥有保守

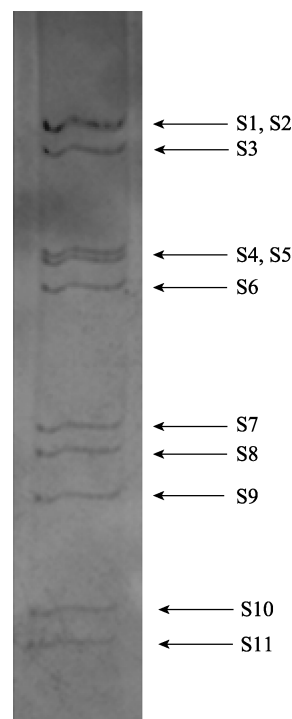


图 4 病毒基因组的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE of the virus genome

的核苷酸序列 5'GUAUUU……UUCAUC3'和短的节段特异的不完全的倒转重复序列: 5'端的 5' AAGCAUAGCG 3'(核苷酸 8~17)和 3'端的 5' CGCUUUGCAUU 3'(核苷酸 2 014~2 024)在 10 个碱基的范围内互补。

推测 GCRV HZ08 S6 能够编码一个长达 650 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 68.37 kD, 等电点为 6.019, 中性条件下带电荷为-3.373。Blast 结果显示, HZ08 S6 编码的蛋白与水生呼肠孤病毒 VP4 蛋白(S6 编码)、哺乳动物(MRV) μ L 蛋白(M2 编码)、禽呼肠孤病毒(ARV) μ B 蛋白(M2 编码)具有较高的同源性。BlastP 结果如下: 与美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV)、草鱼呼肠孤病毒 873 株(GCRV873)、水生呼肠孤病毒 A(Aqua A)、美洲金体鳊呼肠孤病毒(GSV)、MRV 血清型 2、MRV 血清型 3、MRV 血清型 1 和 ARV 的同源性分别为: 30%、33%、31%、33%、24%、24%、24%和 23%, 相似性分别为: 49%、51%、48%、51%、42%、43%、42%和 40%。表明 VP4 与 MRV 的 μ L 和 ARV 的 μ B 蛋白有很近的亲缘关系。另外, 在其氨基酸序列的第 42 和 43 位发现与 MRV、ARV 和其他水生呼肠孤病毒相同的天冬酰胺-脯氨酸蛋白酶裂解位点^[12]。

从 GenBank 中查找与 VP4 具有同源性的呼肠孤病毒的序列, 构建系统进化树(图 5), 发现

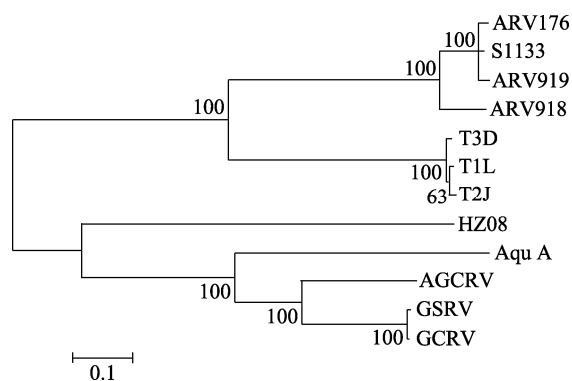


图 5 基于 VP4 序列构建的系统进化树

采用邻位相连法, 步长(Bootstrap)为 1 000。

Fig. 5 Phylogenetic trees based on the amino acid sequence of HZ08 VP4 with counterpart segments from other reoviruses. The tree was constructed by Neighbor-Joining method. The frequencies at which the branches cluster were tested by bootstrap analysis (1 000 replicates)

HZ08 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇, 但是单独列为 1 个分支, 应该为水生呼肠孤病毒属中的新成员。

3 讨论

3.1 HZ08 的细胞增值特性

邓初夏等^[13]观察了草鱼呼肠孤病毒在的草鱼肾脏细胞(GCK-84)的超薄切片, 病毒粒子在细胞内的分布方式主要有: ①散布于胞质内; ②成团聚集于膜状结构内, 膜的层次多少不等, 少的 1~2 层, 有的 5~6 层、多的 8~9 层。③成团聚集于胞质中, 但无膜状结构包裹。另外, 还发现在未被病毒感染的细胞中也有类似的膜层结构, 他认为这种膜层结构不是病毒本身的结构, 而可能是溶酶体。在病毒发生的较早阶段, 这种膜就已经存在了, 表明该病毒也可能和哺乳类中的呼肠孤病毒一样, 是通过 1 种吞噬过程进入宿主的。本实验通过对新分离株 CIK 细胞超薄电镜观察, 也发现病毒粒子存在这 3 种分布形式, 说明 HZ08 与其他草鱼呼肠孤病毒分离株在细胞内的增殖形式是相同。

李军等^[14]曾对 GCRV 861 和 873 病毒株进行比较研究。结果显示, 两者形态结构相似, 但其基因组核酸电泳图谱及感染不同细胞时的细胞病变(CPE)有显著差异, 861 株感染草鱼肾细胞(GCK)和 CIK 细胞未能观察到明显 CPE; 相反, 873 株在这两个细胞系上出现典型的 CPE, 说明草鱼呼肠孤病毒的不同分离株对草鱼肾脏细胞的敏感性是有差异的。本实验观察了新分离株在 CIK 细胞上的增殖特性, 传至第 8 代, 无明显 CPE, 这个特点跟 861 株相似。

3.2 HZ08 株 S6 节段特点

为了从分子水平上进一步确认病毒, 作者根据 GenBank 中发表的 GCRV 873 株和其他呼肠孤病毒的序列设计了 18 对引物, 对 HZ08 株的基因组进行扩增, 都没有得到预期的目的片段, 说明 HZ08 株与 GCRV 873 株和其他已发表部分序列的呼肠孤病毒的基因组序列差异较大, 而根据李军等^[14]的 861 株 S6 的引物能特异性的检测到 HZ08

株,说明 HZ08 株在基因组序列方面与 861 株有一定的相似性,但是 861 株没有基因组序列发表,因此无从基因序列上进行比较。为了分析比较病毒新分离株的序列差异,作者采用单引物扩增技术对 HZ08 株的 S6 节段进行了全长克隆。由 Blast 的比对结果可见, HZ08 株 S6 编码的蛋白与 GCRV 873 株 VP4 同源性最高,为 33%。序列分析表明 S6 的 3'末端(UCAUC)与 873 株相同, 5'末端(GU-AAUU)与 873 株(GUUAUU)相差一个碱基^[7-8]。除了末端保守序列, HZ08 株的 5'末端存在一段短的核苷酸序列与存在于 3'末端附近的另一段核苷酸序列倒转重复。呼肠孤病毒科所有病毒的基因组节段的两端都普遍存在着保守的末端序列,并且同属病毒之间的末端保守序列相似。在同一 dsRNA 节段的 5'端和 3'端的 2 个末端保守序列附近存在一对完全的或不完全的倒转重复序列,这对倒转重复序列在同一病毒的不同 dsRNA 节段间是不同的。呼肠孤病毒的这两个特点具有重要意义,也是鉴别呼肠孤病毒的重要依据^[15-16]。

3.3 草鱼呼肠孤病毒的基因多样性

利用 VP4 的氨基酸序列构建 HZ08 株的系统进化树,可见 HZ08 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇,但是与包括 GCRV 873 在内的其他水生呼肠孤病毒距离较远,说明 HZ08 株 S6 节段与已报道的呼肠孤病毒分离株差异较大。由于 GenBank 草鱼呼肠孤病毒 S6 的序列只有 GCRV 873 株,无法获得更多的草鱼呼肠孤病毒分离株的序列信息,根据现有的数据分析, HZ08 株与 GCRV 873 株在基因组序列差异较大。早在 20 世纪 80 年代,鱼病科技工作者就发现某一地区的草鱼出血病疫苗对本地区有效,免疫其他地区效果不佳,推测不同地区的草鱼呼肠孤病毒流行株存在较大差异,曾令兵等^[17]对牡蛎类呼肠孤病毒(13P)、大鳞大麻哈鱼呼肠孤病毒(CSV)、美洲金体鲃呼肠孤病毒(GSV)、斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(CRV)、GCRV 南湖株和 854 株的聚丙烯酰胺电泳图谱比较表明,各病毒基因组总分子量相差不大,但基因组各个片段分子量有较大差异。本研究结果也从侧面证明了这一点。

综上所述,通过对病毒基因组的 SDS-PAGE 凝胶电泳和核酸类型鉴定,说明该病毒是多节段的 dsRNA 病毒,其基因组有 11 条 dsRNA 组成。新分离株的电镜形态与草鱼呼肠孤病毒形态一致,结合 S6 节段的全基因组序列分析和病毒来源可以基本确定新病毒分离株为草鱼呼肠孤病毒,但其与之前报导的 GCRV873 株基因序列差异较大,应为水生呼肠孤病毒属中新成员,其特性仍需要进一步的实验分析。

参考文献:

- [1] 中国科学院水生所三室病毒组. 草鱼出血病病原的研究[J]. 水生生物学集刊, 1978, 6(3): 321-329.
- [2] 柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153-159.
- [3] 李军, 王铁辉, 陆仁后, 等. 草鱼出血病病毒的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 445-453.
- [4] 毛树坚, 邵建忠, 杭绮, 等. 草鱼出血病的病原研究[J]. 水产学报, 1989, 13(1): 1-5.
- [5] 曾令兵, 贺路. 草鱼出血病病毒 854 株的纯化及其理化特性[J]. 淡水渔业, 1992(2): 3-5.
- [6] 方勤, 肖调义, 李旅, 等. 草鱼呼肠孤病毒新分离株(GCRV991)的病毒学特性分析[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 178-181.
- [7] Attoui H, Fang Q, Jaafar F M, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreoviruses revealed by genome characterization of Golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus (genus *Aquareovirus*, family *Reoviridae*)[J]. J Gen Virol, 2002, 83: 1941-1951.
- [8] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhagevirus (GCHV), anaquareovirus[J]. Arch Virol, 2001, 146: 1391-1397.
- [9] Attoui H, Billoir F, Cantaloube J F, et al. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes[J]. J Virol Methods, 2000, 89: 147-158.
- [10] Jaafar F M, Goodwin A E, Belhouchet M, et al. Complete characterisation of the American grass carp reovirus genome (genus *Aquareovirus*: family *Reoviridae*) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus[J]. Virology, 2008, 373: 310-321.
- [11] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. Cell, 1986, 44: 283-292.

- [12] Noad L, Shou J, Coombs K M, et al. Sequences of avian reovirus M1, M2 and M3 genes and predicted structure/function of the encoded μ proteins[J]. Virus Res, 2006, 116: 45–57.
- [13] 邓初夏, 陈宏溪. 几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究[J]. 水生生物学报, 1985, 9(4): 353–358.
- [14] 李军, 王铁辉, 周立冉, 等. 两种草鱼出血病病毒株的比较[J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 115–118.
- [15] Anzola J V, Xu Z, Asamizu T, et al.. Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumour virus genome and defective interfering RNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 8301–8305.
- [16] Xu Z, Anzola J V, Nalin C M, et al. The 3' terminal sequence of wound tumor virus transcripts can influence conformational and functional properties associated with the 5' terminus[J]. Virology, 1989, 170: 511–522.
- [17] 曾令兵, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 株基因组 SDS-PAGE 分析及其核酸类型鉴定[J]. 淡水渔业, 1991(5): 17–19.

Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08

ZHANG Chao^{1,2}, WANG Qing¹, SHI Cunbin¹, ZENG Weiwei¹, LIU Yongkui^{1,2}, JIANG Haiming¹, WU Shuqin¹

(1. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Diseased Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were collected from Huzhou, Zhejiang Province. After filtration treatment, the tissue suspension was inoculated in CIK cells, but no obvious cytopathic effects (CPE) were observed even after passages of eight times. However, plenty of nonenveloped virus particles with subsphaeroidal shape were observed under electron microscope (EM), which was highly similar to reported grass carp reovirus (GCRV). The nucleic acid of purified virus was digested by DNases, RNases and Mung-bean Nuclease respectively. The results showed the nucleic acid of the virus was double-stranded RNA, and the SDS-PAGE electrophoresis further suggested the virus possessed 11 segments of dsRNA, which was the typical characteristic of GCRV. In order to classify the strain on the molecular level, the complete nucleotide sequence of S6 was determined. The S6 comprised 2 030 nt and was predicted to encode a 68.4 kD protein. The result of cluster analysis revealed that the new isolate was a member of aquareovirus, but identity between it and representative strain GCRV873 was 33%. The deduced amino acid sequence shared highest identity (33%) with grass carp reovirus 873 strain, indicating that the new isolate was presumed to be a new type of GCRV.[Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1257–1263]

Key words: grass carp reovirus; virus isolation; virus identification

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com