

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01077

草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 株的分离和鉴定

刘永奎^{1,2}, 王庆¹, 曾伟伟¹, 石存斌¹, 张超³, 陈道印⁴, 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, 上海 201306;

3. 济宁市渔业监测站, 山东 济宁 272019;

4. 南昌县莲塘鱼病防治所, 江西 南昌 330200

摘要: 收集江西南昌地区患典型草鱼出血病的病鱼组织, 进行超薄切片电镜观察, 结果显示, 在脾、肾样品中发现大量病毒颗粒, 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。取病鱼肌肉、内脏研磨, 组织液经离心、过滤除菌后进行鱼体人工感染试验和细胞感染实验, 结果发现, 人工感染试验鱼出现死亡, 且具有典型出血症状; 组织滤液感染草鱼肾细胞系(CIK)细胞后, 盲传 6 代未观察到典型细胞病变效应, 但感染细胞固定后经超薄切片电镜观察, 细胞质内有大量病毒存在, 与病鱼组织切片观察到的病毒形态一致。SDS-PAGE 结果进一步揭示, 新分离病毒株(暂命名 JX-0902)基因组由 11 条 dsRNA 组成, 呈现水生呼肠孤病毒基因组典型特征, 但基因组带型与 GCRV 873 株存在差异, 而与 HZ08 株接近。根据 GenBank 上已提交的草鱼呼肠孤病毒 S6 序列(GQ896337)设计特异引物, 以 JX-0902 株的 cDNA 作为模板, 可扩增出特异性条带。基于 S6 序列的聚类分析结果显示, JX-0902 与 GCRV HZ08 株、GD108 株 S6 同源性高达 98%、99%, 该分离株应为草鱼呼肠孤病毒。

关键词: 草鱼出血病; 呼肠孤病毒; 江西分离株; 分离; 鉴定

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1077-07

草鱼出血病是一种由病毒引起的严重危害当年及 2 龄草鱼种的传染性疾病。1955 年浙江省吴兴县菱湖镇鱼病工作者怀疑当年草鱼的肠炎还有其他的病原存在, 例如病毒^[1]。20 世纪 70 年代后期, 在排除寄生虫、细菌、细菌外毒素、支原体感染等因素后, 研究人员认为草鱼出血病的病原为病毒^[2-4]。20 世纪 80 年代初期, 多位研究者利用电镜观察到形态基本相同的病毒颗粒^[5-9], 并根据病毒形态及理化性质确定该病毒为呼肠孤病毒^[7]。之后, 草鱼出血病病毒 854 株、861 株、873 株等相继被分离到^[10-12]。1991 年国际病毒分类委员会第五次会议决定, 将水生呼肠孤病毒属作为

一个新属单列入呼肠孤病毒科^[13], 并将草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV)纳入该属, 正式命名为草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)。江西省作为中国草鱼主产区之一, 每年出血病暴发给渔民带来了巨大损失, 但出血病病原的分离与鉴定鲜有报道。本实验室通过分析来自江西省南昌地区发病草鱼样品, 在排除诸多因素如细菌、寄生虫感染后, 利用草鱼肾细胞分离到一株病毒, 暂定名为 JX-0902, 并通过电镜观察、核酸分析、序列比对等方法对该毒株进行研究, 旨在鉴定新毒株, 为以后的病害防治奠定基础。

收稿日期: 2011-01-18; 修订日期: 2011-03-18.

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

作者简介: 刘永奎(1983-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类病害研究. E-mail: lyk1015@yahoo.cn

通信作者: 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

草鱼肾细胞系(CIK), 草鱼吻端纤维细胞(PSF), 草鱼呼肠孤病毒 GCRV873 株、HZ08 株由本实验室保存; M199 培养基、胎牛血清(FBS)、Hanks 液、胰酶、Trizol Reagent 为 Invitrogen 公司产品; 反转录试剂盒、高保真 Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 购自 TaKaRa 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 2009 年 9 月下旬取自江西南昌地区的 1 龄患出血病草鱼种。主要症状表现为鱼体发黑, 上下颌出血; 剖检发现肌肉呈点状出血, 肝、肠部点状出血(图 1)。取病鱼的肌肉、内脏分别置于甘油磷酸缓冲液中保存, 置冰上运输至实验室, -70°C 保存。另外取肝、肾、脾等组织分别置于 2.5%戊二醛溶液中固定。

1.3 人工感染试验

用生理盐水(0.65%)将保存于甘油磷酸盐缓冲液中的组织洗涤 3 次, 组织用剪刀剪成小块置于研钵(置于冰上)中反复研磨, 直到组织呈糊状, 加入适量生理盐水反复冻融 3 次, 经 10 000 r/min 离心 30 min, 去沉淀, 上清液经 0.22 μm 滤器过滤除菌后置于 -20°C 保存备用。

将体长(12 ± 0.5) cm 的草鱼分成 4 组(实验组、对照组各 2 组), 每组 20 尾, 暂养于水池(100 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm)中, 1 周后进行人工感染试验, 水温保持在(27 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。实验组草鱼每尾注射 0.2 mL 组织悬液, 对照组草鱼每尾注射 0.2 mL 生理盐水, 每天观察 4 次, 记录死亡情况。

1.4 病毒的分离与传代培养

参考方勤等^[14]的方法进行病毒分离和传代, 略有修改。CIK 细胞经传代长成致密单层细胞, 吸弃培养液后, 用 Hanks 液洗涤 2 次, 加入 1.3 所述的组织滤液, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中吸附 1 h 左右, 吸弃组织液, 加入细胞培养维持液(含 2%FBS), 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。每日观察细胞形态。病毒传代时,

将细胞培养物反复冻融 3 次, 按 1.3 中的方法获得细胞滤液, 按上述接种方法传代培养。盲传 6 代之后收集细胞置于 2.5%戊二醛中固定。同时将本实验室保存的 GCRV873、HZ08 株进行传代培养。

1.5 病毒的鉴定

1.5.1 电镜观察 将 1.2、1.4 中用 2.5%戊二醛固定的样品经酒精系列脱水, 苯二甲酸二丙酯包埋, 制备超薄切片, 透射电镜(JEM-2010HR)下观察和拍片。

1.5.2 病毒基因组的 SDS-PAGE 病毒的提纯参考毛树坚等^[11]、Qiu 等^[15]的方法。双链 RNA(dsRNA)的提取采用 Trizol Reagent, 按说明书步骤进行。病毒基因组的 SDS-PAGE 参照邱涛^[16]的方法, 略有修改。SDS-PAGE 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 60 V 条件下电泳 2 h, 100 V 条件下电泳 20 h。经固定、染色、显影后拍照。

1.5.3 S6 节段的序列测定 根据 GenBank 中所提交的 GCRV-HZ08 基因组的第 6 片段序列设计 3 对引物: 引物 1(F5'-GTAATTTAAGCATAGCGTGGAGA-3'; R5'-CTCATTACGCGTCACACCTTC-3'), 引物 2(F5'-CAGCGTCTGGAGTGAGTATGG-3'; R5'-AGGCGTTACCTAGCACAT-3')和引物 3(F5'-GCAGGCAATTACTATCTATGG-3'; R5'-GATGAAAATGCAAAGCGGGGGTTCGG-3')。将提取的 RNA 经反转录后进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶回收后, 与 pMD18-T 载体 16 连接 12 h, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 分别挑取 5 个白色菌落扩大培养并进行菌液 PCR 鉴定。挑选阳性克隆委托上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.5.4 序列分析 应用 SEQMAN(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 检索(<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 GD108(GCRV GD108, HQ231208), 草鱼呼肠孤病毒 HZ08(GCRV HZ08, GQ896337), 美洲金体鳊呼肠孤病毒(Golden Shiner Reovirus,

GSV, NC_005171), 草鱼呼肠孤病毒 873 株(GCRV 873, AF403392), 鲢呼肠孤病毒(Threadfin reovirus, TFV, AY235428), 水生呼肠孤病毒 A(Aquareovirus A, Aqu A, NC_007592), 美国草鱼呼肠孤病毒(American Grass Carp Reovirus, AGCRV, NC_010589), 哺乳动物呼肠孤病毒(Mammalian orthoreovirus, MRV)T1L(NC004262), T2J(AF461683), T3D(M19408), 禽呼肠孤病毒(Avian Reovirus, ARV)ARV176(AY750053)、ARV918 (AY635945)、ARV919(AY635939)和 S1133(AY635934)。

2 结果与分析

2.1 人工感染试验结果

人工感染试验结果显示, 病料组织液中的病毒对 1 龄草鱼种不仅有较强的毒力, 而且能够在鱼体上复制出典型的出血病症状, 表现为: 鱼体色发黑, 尾鳍基部、上下颌充血; 撕开皮肤、剖检内脏发现肌肉呈点状出血, 内脏充血(表 1, 图 2)。

2.2 病毒的分离与传代培养结果

组织液接种 CIK 后, 连续观察 7 d, 没有出现明显的细胞病变, 盲传至第 6 代, 连续观察仍未出现明显的细胞病变。

2.3 病毒的鉴定结果

2.3.1 电镜观察 透射电镜下从南昌采集的组织病料中观察到大量病毒粒子(图 3), 直径约 70 nm, 病毒颗粒近球形, 无囊膜结构, 中央有一电子密度致密区域。在感染组织悬液的 CIK 细胞胞浆中

相似的病毒粒子(图 4)。

2.3.2 病毒基因组的 SDS-PAGE 为了鉴定该毒株是否为呼肠孤病毒, 并且比较新分离株与已有病毒基因组的带型是否存在差别, 将 JX-0902 株与实验室保存的毒株 GCRV873、HZ08 株核酸样品进行 SDS-PAGE 电泳 20 h, 硝酸银染色, 结果显示病毒基因组产生 10 条清晰条带, 其中 S1 和 S2 由于分子量接近, 2 条带不能完全分开(图 5)。JX-0902 株与 HZ08 株基因组条带的分布非常接近, 但与 GCRV873 株存在较大差异。

2.3.3 S6 节段的序列测定结果 为了从分子水平上验证新分离株是否为草鱼呼肠孤病毒, JX-0902 株的 S6 节段全长序列通过 RT-PCR 方法进行了测定和拼接。GCRV JX-0902 株完整的 S6 节段由 2 030 个碱基对(A530, T470, C508, G522)组成, 其正链上拥有 1 个长的单一 ORF。4 种碱基含量差别不大, 其组成为 26.11%的腺嘌呤(A), 25.72%的鸟嘌呤(G), 23.15%的尿嘧啶(U)和 25.02%的胞嘧啶(C)。5'端非编码区长度为 42 个碱基, 而下游 3'端非编码区长度为 35 个碱基。ORF 起始自 43–45 核苷酸位置的第 1 个 AUG, 终止于第 1993–1995 核苷酸位置(UAG)。起始位点 AUG 的–3 位为碱基 A, +4 位为碱基 G(AUCAUGG), 符合 Kozak^[17]的强初始序列的特点。JX-0902 株序列的两端拥有保守的核苷酸序列 5'-GUAAU UU.....UUCAUC-3'和短的节段特异的不完全倒转重复序列: 5'端的 5'-GCAUAGCGUGG-3'(核苷酸 10–20)和 3'端的

表 1 病料组织液人工感染试验结果
Tab.1 Results of artificially infecting experiment with filtered liquid from diseased sample

项目 item	分组 group			
	实验组 1 test group 1	实验组 2 test group 2	对照组 1 control group 1	对照组 2 control group 2
体长/cm body length	12±0.5	12±0.5	12±0.5	12±0.5
感染剂量/mL infection dose	0.2	0.2	0.2	0.2
感染后开始发病时间/h hours from infection to disease	72±1	63±1	0	0
感染后开始死亡时间/h hours from infection to death	82±1	75±1	0	0
感染后第 268 小时累计死鱼尾数 dead nos. in 268 hours after infection	17	18	0	0
死亡率/% mortality	85	90	0	0



图 1 自然发病草鱼症状

Fig.1 The symptom of spontaneously diseased grass carps



图 2 人工感染试验死亡草鱼症状

Fig.2 The symptom of dead grass carps artificially infected

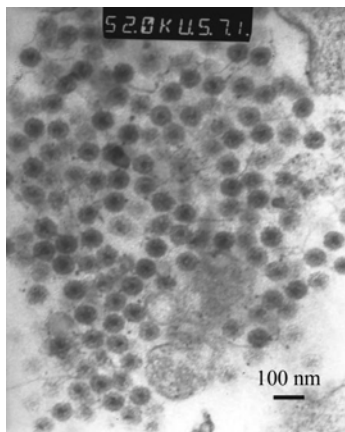


图 3 草鱼脾组织中的病毒颗粒

Fig.3 Viral particles in spleen of diseased grass carp

5'-CCCGCUUUGC-3'(核苷酸 2012-2021)在 11 个碱基的范围内互补。

GCRV JX-09020 S6 能够编码 1 个长达 650 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 68.40 kD, 等电点为 5.863, 中性条件下带电荷为-3.537。Blast 结果显示, 其编码的蛋白与 GCRV GD108、HZ08 的相应蛋白有极高的同源性, 与美洲金体鲃呼肠孤病毒(GSV)、GCRV873(S6 编码)、鲢呼肠孤病毒(TFV, S6 编码)、水生呼肠孤病毒 A(Aqua A)、美国呼肠孤病毒(AGCRV)、MRV 血清型 2、MRV 血清型 3、MRV 血清型 1、ARV 有大小不等的同源性, 依次为 99%、98%、34%、34%、32%、32%、31%、25%、25%、25%、24%。

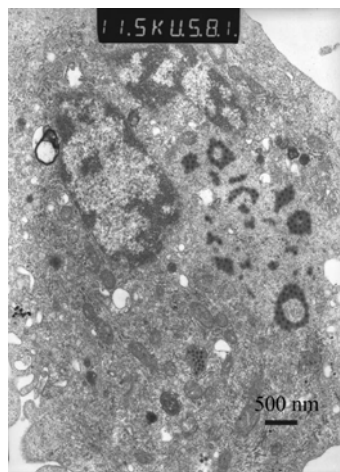


图 4 草鱼肾细胞系(CIK)细胞质中的病毒粒子

Fig.4 Viral particles in cell plasma of grass carp CIK cell

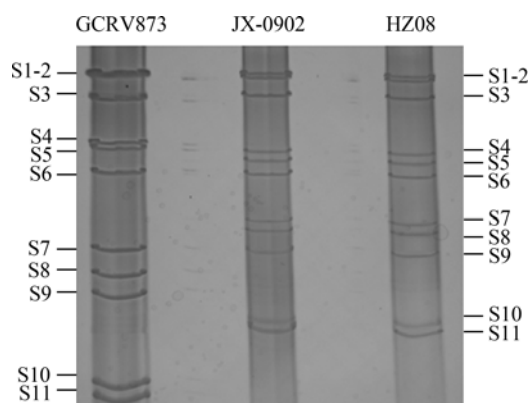


图 5 3 株病毒基因组的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE of genome of three virus strains

从 GenBank 中查找与 GCRV JX-0902 S6 编码的蛋白具有同源性的呼肠孤病毒的氨基酸序列, 构建系统进化树(图 6), 发现 JX-0902 株与 GCRV GD108、HZ08 株聚为一簇。

3 讨论

3.1 草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 株的流行背景

本研究在南昌主要草鱼养殖区进行草鱼出血病流行病学调查发现, 当年鱼种及 2 龄草鱼易发该病, 且呈现典型症状: 肌肉点状出血、内脏出血、鳍条基部充血、上下颌及鳃盖出血。当年鱼种从 8 月中下旬开始发病, 持续到 11 月上旬, 其中 9 月下旬至 11 月上旬较为集中, 死亡率高达 40%; 二龄草鱼在 5-7 月发病率较高, 10-11 月亦偶有发生, 死亡率高达 25%。结合南昌及周边地区的气

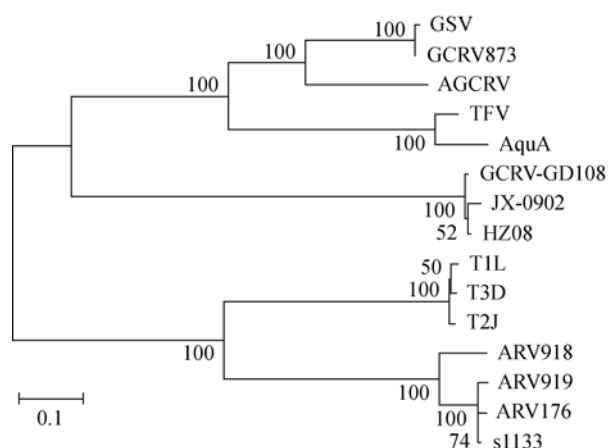


图 6 基于 JX-0902 S6 编码蛋白的氨基酸序列构建的系统进化树

采用邻位相连法, 步长为 1 000。GSV: 美洲金体鳊呼肠孤病毒(NC_005171); GCRV873: 草鱼呼肠孤病毒 873 株(AF403392); TFV: 鲢呼肠孤病毒(AY235428); Aqua A: 水生呼肠孤病毒 A(NC_007592); GCRV-GD108: 草鱼呼肠孤病毒 GD108 株(HQ231208); JX-0902: 本研究分离病毒株; HZ08: 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株(GQ896337); AGCRV: 美国呼肠孤病毒(NC_010589); T2J: MRV 血清型 2(AF461683); T3D: MRV 血清型 3(M19408); T1L: MRV 血清型 1; ARV918, ARV919, ARV176: 禽呼肠孤病毒(AY635945, AY635939, AY750053); S1133: 禽呼肠孤病毒 S1133 株(AY635934)。

Fig.6 Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of JX-0902 S6 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 (1000 replicates). GSV: Golden Shiner Reovirus(NC_005171); GCRV873: grass carp reovirus 873 strain (AF403392); TFV: Threadfin reovirus(AY235428); Aqua A: Aquareovirus A(NC_007592); GCRV GD108: grass carp reovirus GD108 strain(HQ231208); JX-0902: strain isolated in the study; HZ08: grass carp reovirus HZ08 strain(GQ896337); AGCRV: American Grass Carp Reovirus(NC_010589); T1L: mammalian orthoreovirus(NC004262), T2J(AF461683), T3D(M19408), ARV176: Avian Reovirus 176 strain(AY750053), ARV918 (AY635945), ARV919(AY635939); S1133: Avian Reovirus S1133 strain (AY635934)。

候来看, 该病主要发生在昼夜温差较大时期及季节交替阶段, 尤其在水温骤降之后的回温过程中, 这与左文功^[18]的野外观察情况相符, 发病水温在 19~33 之间。另外, 在 6~9 月份温度较高阶段, 由于水质的恶化包括氨氮、亚硝酸盐含量的升高及溶氧的下降等因素对鱼体较长时期的影响, 鱼体的免疫力下降导致其他病原菌侵袭, 使得该病因多种因素的综合作用而暴发。

目前, 对于南昌地区草鱼出血病病毒流行株

的分离鉴定报道不多^[19], 本研究取典型发病草鱼的组织, 进行了病毒的分离与鉴定, 分离到 1 株新的病毒 JX-0902 株。根据已发表的病毒基因组序列设计引物, 获得了 JX-0902 株 S6 的全长序列。再根据 JX-0902 已测定序列设计特异性引物, 对南昌地区的发病草鱼进行检测, 结果显示, 阳性检出率达 90%以上, 说明该类型毒株为南昌地区草鱼呼肠孤病毒的主要流行株。

3.2 草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 的毒力及细胞增殖特性

从攻毒试验可以看出, 该病毒株在 26~28 °C 条件下毒力较强, 出现症状的时间较早, 病程较短, 致死率较高; 另外, 笔者在 19~23 °C 条件下进行攻毒试验, 发现试验草鱼出现症状的时间较晚, 病程较长, 致死率较低。19~23 °C 条件下, 症状的发展过程较为清晰: 首先鳍条变黑, 顺序为尾鳍下叶、尾鳍上叶、臀鳍、背鳍、胸鳍、腹鳍; 接着体色变黑, 胸鳍、腹鳍末端充血; 尾鳍基部、上下颌充血(有的尾鳍会烂掉), 这个阶段草鱼开始离群独游, 继而死亡。将攻毒实验致死的草鱼制成组织液再次感染健康草鱼, 会产生同样的症状, 但死亡率明显降低, 这一点与 GCRV H962^[20]有类似之处, 也许是病毒量较低造成的。

JX-0902 株能在 CIK 细胞上繁殖, 但不能产生细胞病变(CPE), 这个特性与 HZ08^[21]、GCRV861^[22]相似, 而 GCRV873 能在 CIK 上出现明显的 CPE^[23], 再次验证了不同的草鱼呼肠孤病毒株对 CIK 的感染性是有差异的。采用细胞毒进行攻毒实验, 未见死亡, 造成这种结果的原因可能是病毒量少所致, 抑或因长期传代的病毒产生缺损性病毒颗粒所致^[24], 真实原因有待进一步证实。

3.3 草鱼呼肠孤病毒的基因多样性

从 SDS-PAGE 凝胶电泳和序列比对的结果可以看出, 虽然新分离株 JX-0902 与 GCRV873、GSV、TFV、AGCRV、Aqua A 等水生呼肠孤病毒存在较大差异, 却与近来发现的草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株、GD108 株具有极高的同源性, 这不仅证明了草鱼呼肠孤病毒基因组的多样性分布, 还从一定程度上说明 HZ08、GD108、JX-0902 可能是

近年来的主要流行毒株。JX-0902 株于 2009 年 9 月采自江西省南昌县,有文献报道浙江省淡水水产研究所于 2007、2008 年从南昌采集到与 GCRV873 有极高同源性的毒株^[19],说明同一地区同样会存在基因差别较大的毒株,造成这种情况的原因与草鱼苗种的流动性较大有密切的关系,这种情况从侧面解释了目前疫苗效果的不稳定性。

本研究通过对当年草鱼高致死率的攻毒实验,说明新病毒株很可能是导致该地区草鱼出血病的主要病原,新毒株的分离和鉴定为该地区草鱼出血病的防治提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 倪达书. 我国鱼病学研究现状及其发展前景[J]. 现代渔业信息, 1994, 9(3): 1-4.
- [2] 湖北省水生生物研究所鱼病室草鱼出血病研究小组. 草鱼出血病的研究简报[J]. 淡水渔业, 1977(6): 25-27.
- [3] 湖北省水生生物研究所第三室. 草鱼肠炎病原研究的进展[J]. 水生生物学集刊, 1977, 6(2): 245-246.
- [4] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组. 草鱼出血病病原的研究[J]. 水生生物学集刊, 1978, 6(6): 321-330.
- [5] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒学组, 武汉大学病毒研究所电镜室. 草鱼出血病病原的研究 II. 电镜观察[J]. 水生生物学集刊, 1980, 7(1): 75-80.
- [6] 草鱼出血病研究协作组(中国科学院武汉病毒所, 中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所). 草鱼出血病病毒的电镜观察初报[J]. 淡水渔业, 1983, 23(3): 39.
- [7] 陈燕荣, 江育林. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究[J]. 科学通报, 1983(18): 1138-1140.
- [8] 中国科学院武汉病毒所, 中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组. 草鱼出血病病毒精细结构的研究[J]. 淡水渔业, 1984, 24(2): 21-22.
- [9] 中国科学院武汉病毒所, 中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组. 草鱼出血病病毒的电镜观察[J]. 电子显微学报, 1984(3): 48.
- [10] 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.
- [11] 毛树坚, 邵建忠, 张念慈, 等. 草鱼出血病的病原研究[J]. 水产学报, 1989, 13(1): 1-5.
- [12] 柯丽华, 余兰芬, 方勤, 等. 三株草鱼出血病病毒免疫原性的比较[J]. 中国病毒学, 1991, 6(3): 248-251.
- [13] Francki R I B, Fanquet C M, Knudson D L, et al. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses[J]. Arch Virol, 1991, 2(Supp1): 186-192.
- [14] 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.
- [15] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhagevirus (GCHV), an aquareovirus[J]. Arch Virol, 2001, 146: 1391-1397.
- [16] 邱涛. 草鱼出血病病毒基因组研究——病毒核酸纯化, 生长 cDNA 文库构建, 序列分析, 分子杂交, RT-PCR 检测, 基因表达, 免疫检测[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2001.
- [17] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. Cell, 1986, 44: 283-292.
- [18] 左文功. 草鱼出血病发病与水温的关系[J]. 淡水渔业, 1980, 20(1): 21-23.
- [19] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 44-49.
- [20] 陈立祥, 府少辉, 汪冬庚, 等. 草鱼出血病病毒 H962 毒株的生物学特性研究[J]. 湖南农业大学学报, 1998, 24(6): 468-470.
- [21] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1257-1263.
- [22] 李军, 王铁军, 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.
- [23] 方勤, 肖调义, 李旅, 等. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 182-184.
- [24] 邱涛, 张普, 陆仁后, 等. 草鱼出血病病毒 873 株基因组外发现缺损性干扰颗粒的亚基因组成分[J]. 病毒学报, 2001, 17(2): 140-143.

Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902

LIU Yongkui^{1,2}, WANG Qing¹, ZENG Weiwei¹, SHI Cunbin¹, ZHANG Chao³, CHEN Daoyin⁴, WU Shuqin¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. Jining Fishery Monitoring Center, Jining 272019, China

4. Fish Disease Control Center in Liantang Town of Nanchang, Nanchang 330200, China

Abstract: We identified a new strain of reovirus in grass carp from Nanchang city, Jiangxi Province. We collected diseased yearling grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* exhibiting typical hemorrhage symptoms from Nanchang city and observed large numbers of viral cells in ultra-thin sections of the spleen and kidney. The virus had a non-enveloped structure with a diameter of approximately 70 nm, very similar to the characteristics of the grass carp reovirus (GCRV). We isolated samples of the virus by homogenizing the tissue, centrifuging the homogenate, then conducting sterilizing filtration. We were able to replicate the hemorrhaging by artificially infecting grass carp with the purified sample. Artificial infection of grass carp kidney cell line (CIK) revealed no obvious cytopathic effects (CPE) after six passages. However, observations under the electron microscope revealed that the virus was propagated in the cytoplasm, and had the same shape as the virus observed in the tissue sections. The newly isolated virus (temporarily named GCRV JX-0902) consisted of 11 segments of dsRNA, a typical characteristic of aquareovirus. There were significant differences in the genome banding pattern of GCRV873 and JX-0902, but no difference between HZ08 and JX-0902. We designed PCR primers based on sequence segment 6 (GQ896337) of GCRV in GenBank to amplify specific bands using JX-0902 cDNA as the template. The amino acid sequence of JX-0902 S6 had 98% and 99% identity with GCRV-HZ08 and GD108, respectively. Thus, we conclude that the new isolate is a member of the genus of aquareovirus.

Key words: grass carp hemorrhage; reovirus; Jiangxi isolate; separation; identification

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