

研究简报

两种草鱼出血病病毒株的比较*

Comparative studies on two isolates of hemorrhagic virus from grass carp

李 军 王铁辉¹ 周立冉 徐怀恕

(青岛海洋大学, 266003)

(1 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

Li Jun Wang Tiehui Zhou Liran Xu Huaishu

(Ocean University of Qingdao, 266003)

(Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072)

关键词 草鱼出血病病毒, 分离株, 比较研究

Key words hemorrhagic virus of grass carp (GCHV), isolates, comparative study

草鱼出血病病毒(GCHV)是我国分离成功的第1种鱼类病毒, 隶属于呼肠孤病毒科水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*)^[7, 14]。GCHV是草鱼出血病的病原体, 可导致当年龄草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼种大批死亡^[5, 8, 15], 还能感染青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)和稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[1]。目前国内已报道了多株草鱼出血病病毒分离株^[3, 5, 8, 15~17], 但对不同分离株尚缺少系统的比较研究。我们从暴发性草鱼出血病病鱼中分离到1株毒性较强的病毒株, 先后对其进行了形态观察、致病性、组织病理学、基因克隆和部分序列测定等研究^[2, 3, 5~8, 14~17, 19, 20], 并在此基础上应用RT-PCR技术建立了快速检测GCHV的方法^[13, 18]。本文研究比较了GCHV-861和GCHV-873(以下分别简称861株和873株)2株草鱼出血病病毒分离株的基因组核酸图谱、致病性及体外组织培养特征。

1 材料和方法

1.1 病毒

861株(草鱼出血病病毒武汉东西湖分离株), 由本实验室分离^[3]; 873株(草鱼出血病病毒湖南邵阳分离株), 由中国科学院武汉病毒研究所提供^[16]。

1.2 细胞系

草鱼肾细胞系GCK由本室建立^[10], CKK来自中国水产科学院长江水产研究所^[11]。细胞传代, 病毒感染均按常规方法进行^[10]。

1.3 材料鱼

1龄草鱼鱼种(5~10 cm)和稀有鮡鲫(3~5 cm)由本实验室繁殖和饲养。

收稿日期: 1997-07-17

* 国家“八五”攻关课题(857220902), 淡水生态与生物技术国家重点实验室和 International foundation for science(A/2200-1)提供部分资助

1.4 人工感染试验

取实验草鱼和稀有鮰鲫各 120 尾, 先于室外水泥池中暂养 1 周以上, 然后移入室内控温水族箱内饲养 3~5 d, 缓慢升温至 28~30℃, 确认为健康鱼, 并等分成 3 组。草鱼采用腹腔注射感染(0.4 ml/尾), 稀有鮰鲫采用高渗浸泡感染^[3], 各 40 尾; 同时设无菌生理盐水注射和浸泡的对照组, 各 40 尾, 饲养于另外的水族箱中, 观察 3 周。取发病鱼和外表正常未发病鱼组织, 保存于 -20℃ 待用。

1.5 病毒核酸提取纯化

培养细胞裂解液和病鱼组织中的病毒按文献方法提取病毒核酸^[4,12]。

1.6 SDS-PAGE 分析

按文献方法制备 4% 的聚丙烯酰胺凝胶^[18], 取 1~2 μl 病毒核酸样品, 150 v, 4 h 电泳, 银染并照相。

1.7 RT-PCR 扩增检测

按照本实验室已建立的方法进行 RT-PCR 扩增及对扩增产物分析^[18]。

2 结果

2.1 病毒基因组 PAGE 图谱

提取的病毒基因组 dsRNA, 经 4% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染, 可见 873 株基因组的 11 条电泳带很清楚, 而 861 株基因组电泳带 L 组的 L₂ 和 L₃ 未区分开, L₁ 和 L₂、L₃ 也靠得很近; M₁ 和 M₂ 也未区分开, M₃ 和 M₄、M₅ 很清楚地区分开来, S 组 5 条带区分得很清楚, 且 2 者第 6 片段大小差别不大, 而第 9 片段前者较后者小得多(图 1)。873 株和 861 株基因组电泳图谱的显著差异, 说明 2 者属于 GCHV 的不同毒株, 并且所提取的病毒基因组是完整的, 纯度较好。

2.2 RT-PCR 扩增结果

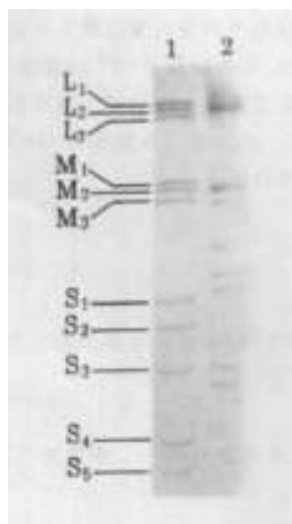


图 1 提取纯化的草鱼出血病病毒基因组 dsRNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of genomic dsRNA isolated from GCHV

1. 873 基因组 dsRNA GCHV-873 genomic dsRNA;
2. 861 基因组 dsRNA GCHV-861 genomic dsRNA.

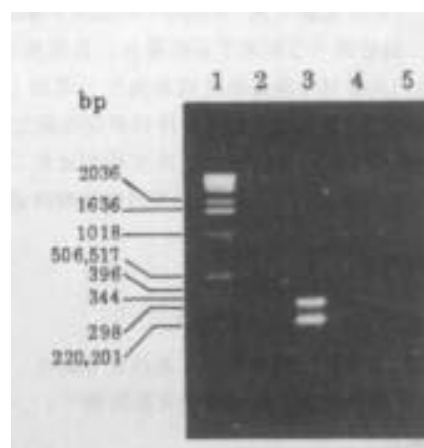


图 2 对 861 和 873 病毒株的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 Results of RT-PCR amplification with viral genome of GCHV-861 and GCHV-873

1. 1KB 分子量标准 (GIBCOBRL) 1KB DNA Ladder (GIBCO BRL);
2. 无模板阴性对照 Negative control without template;
- 3-4. 861 和 873 基因组 dsRNA Viral genomic dsRNA of both GCHV-861 and GCHV-873 strains, respectively;
5. 健康草鱼 DNA 模板 Genomic DNA of non-infectious grass carp.

取 861 株病毒基因组 dsRNA, 合成 cDNA, 用 2 对引物 PS6 和 PS9 能分别扩增出 320 bp 和 223 bp 的特异带, 与预期大小一致。用 873 株制备的病毒核酸合成 cDNA 进行 PCR 扩增, 在完全相同条件下却不能在相应位置形成特异带(图 2)。说明设计的 2 对引物能特异地检测 861 株的存在。

2.3 组织培养特性

873 株感染 CIK 和 GCK 细胞, 28℃ 培养 3~4 d 后, 培养细胞大部分裂解, 出现典型的细胞病变效应(CPE), 而 861 株感染 GCK 和 CIK 细胞, 连续传至第 10 代也未见明显的 CPE。对传至第 4 代后的 861 株感染细胞上清液进行 RT-PCR 扩增, 均能特异地检测到 861 株, 证明 861 株可在 2 种细胞系中增殖和传代。

2.4 致病性

861 株人工感染草鱼种, 在 28~30℃ 水温条件下, 第 3 d 开始发病, 4~7 d 内出现典型的出血病症状: 游动失常, 不吃食; 继之离群独游或停留在水面, 或沉到水底, 有的身体失衡, 时而在水面打转, 时而垂立水中不动; 病鱼体表呈暗黑色, 眼球突出, 1 d 内即死亡。病鱼均表现为全身肌肉充血, 呈鲜红色, 鳃丝呈灰白色, 肝、肠等内脏器官苍白或泛黄, 脾肿大, 肾脏充血变红, 体腔内有淡黄色腹水; 还有的内脏器官充血或出血、少腹水。7 d 后存活的 6 条草鱼一直未见死亡, 外表也逐渐恢复正常。人工感染稀有鮡鲫后, 在 5~12 d 复制出典型的出血病症状, 死亡率达 100%, 体表暗红色, 解剖可见明显的肌肉和内脏出血现象, 这跟以前的报道一致^[3]。分别取试验鱼进行 RT-PCR 检测, 均特异地检测到 861 株的存在。对照组及 873 株人工感染这两种鱼, 在相同的饲养和管理条件下一直未见发病死亡, RT-PCR 检测也为阴性(表 1)。

表 1 861 和 873 病毒株人工感染草鱼和稀有鮡鲫试验结果

Table 2 The results of grass carp and rare minnow artificially infected with GCHV-861 and -873

病毒 virus	草鱼 grass carp				稀有鮡鲫 rare minnow			
	试验鱼尾数 number of tested fish	存活鱼尾数 number of survival fish	存活率/% survival rate	RT-PCR 检测 result of RT-PCR	试验鱼尾数 number of tested fish	存活鱼尾数 number of survival fish	存活率/% survival rate	RT-PCR 检测 result of RT-PCR
GCHV-861	40	6	15	+	40	0	0	+
GCHV-873	40	40	100	-	40	40	100	-
对照 control	40	40	100	-	40	40	100	-

3 讨论

本文对 861 和 873 病毒株研究结果显示, 两者形态结构相似, 但其基因组核酸电泳图谱、对鱼体的致病力及感染细胞时 CPE 的出现等有显著差异: 861 株感染草鱼和稀有鮡鲫发病死亡率可高达 85%~100%, 而感染 GCK 和 CIK 细胞未能观察到 CPE; 相反, 873 株感染培养细胞出现典型的 CPE, 因而对鱼体的致病力很弱, 这可能是由于 GCHV 对培养细胞的特异性较对鱼体的特异性差, 病毒对机体的致病性与体外直接感染培养细胞的能力不一致造成的^[9,10]。关于草鱼出血病病毒对鱼体的致病力与对体外培养细胞的致病变效应之间的关系有待进一步研究。另外, 861 株是从 -20℃ 保存的人工感染发病的草鱼组织中直接提取的, 而 873 株为培养细胞增殖的病毒, 本次试验中, 873 株感染草鱼没有发病死亡, 和以往报道不一致^[16], 可能是由于病毒株经过多年体外培养, 细胞连续传代, 毒力逐渐减弱的结果。

利用 2 对特异引物 PS6 和 PS9 对 861 株、873 株基因组 dsRNA 进行 RT-PCR 扩增的结果为, 861 株获得了预期长度的特异性片段分别为 320 bp 和 223 bp, 而 873 株没出现特异扩增带, 说明 2 株病毒待扩增片段的碱基序列没有同源性, 这从分子水平上证实了 2 者属不同的 GCHV 毒株。目前已开展了对草鱼出血病病毒 861 株和 873 株基因组的序列测定工作^[20], 可望进一步通过比较其基因组序列, 从而彻底了解两者的遗传差异。

由于草鱼出血病给水产养殖业造成巨大损失, 有必要对 GCHV 不同分离株的形态特征、结构组成、血

清型、基因组特性进行深入系统的比较研究,探索草鱼出血病病毒不同分离株的致病机理和免疫相关性,建立灵敏特异的早期诊断和检测技术,为出血病的防治提供依据;同时深入了解不同毒株的精细结构和遗传特性差异,为抗病育种奠定基础。

参 考 文 献

- 1 丁清泉,等.草鱼出血病病毒对其他鱼的感染性研究.中国病毒学,1991,6(4):371~373
- 2 王铁辉,等.草鱼出血病病毒人工感染稀有鮡鲫出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察.水生生物学报,1993,17(4):343~346
- 3 王铁辉,等.稀有鮡鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究.水生生物学报,1994,18(2):144~149
- 4 王铁辉,等.用逆转录聚合酶链式反应检测草鱼出血病病毒的研究.海洋与湖沼,1997,28(1):1~7
- 5 中国科学院水生所三室病毒组.草鱼出血病病原的研究.水生生物学集刊,1978,6(3):21~329
- 6 中科院武汉病毒所,等.草鱼出血病病毒的电镜显微镜观察初报.淡水渔业,1983,3:39~40
- 7 中科院武汉病毒所,等.草鱼出血病病原-鱼呼肠孤病毒核酸特性的研究.淡水渔业,1984,4:7~9
- 8 毛树坚,等.草鱼出血病的病原研究.水产学报,1989,13(1):1~5
- 9 毛树坚,等.草鱼出血病病毒在鱼类细胞中增殖的研究.杭州大学学报,1989,16(4):471~475
- 10 邓初夏,等.几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究.水生生物学报,1985,9(4):351~385
- 11 左文功,等.草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立.淡水渔业,1984,2:38~39
- 12 李 军,等.逆转录聚合酶链式反应中 dsRNA 模板的快速制备.青岛海洋大学学报,1996,26(4):495~499
- 13 李 军,等.用逆转录聚合酶链式反应直接检测草鱼出血病鱼组织的研究.水产学报,1997,21(2):175~179
- 14 陈燕新,江育林.草鱼出血病病毒形态结构及理化性质的研究.科学通报,1983,28:1 138~1 140
- 15 邵建忠,等.草鱼出血病两种病原病毒的分离和致病性的研究.杭州大学学报,1990,17(1):74~79
- 16 柯丽华,等.一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性.水生生物学报,1990,14(2):153~159
- 17 曾令兵,等.草鱼出血病病毒 854 株的纯化及其理化特性.淡水渔业,1992,2:3~5
- 18 Li Jun, et al. A detection method for grass carp hemorrhagic virus(GCHV) based on a reverse transcription - polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 29: 7~12
- 19 Mac Donald R D, et al. Genomic and phenotypic divergences among three serotype of aquatic birnavirus(IPNV). Virology, 1981, 14: 187~195
- 20 Wang Tiehui, et al. Purification of hemorrhagic virus of grass carp and cDNA synthesis, cloning and sequencing of its genome. In: Annual Report of FEBL. Beijing: International Academic Publishers, 1993. 153~156
- 21 Wang Tiehui, et al. Observation on cellular pathology of hemorrhage of the rare minnow. In: Annual Report of FEBL. Beijing: International Academic Publishers, 1993. 147~152