

所分离的大多数草鱼出血病病毒毒株,在形态结构与基因图谱上具有相同特征,仅个别毒株在基因带型上有些差异^[6],但未见深入研究。近年来,我们从湖南长沙分离到一株新的 GCRV 毒株 (GCRV₉₉₁),该毒株对草鱼具有强的致病性。为进一步弄清该病毒特性,进行了形态学,细胞感染特性,抗原性与病毒结构蛋白分析等比较研究。该结果不仅将为揭示草鱼出血病病毒各分离株间的差异提供依据,同时对草鱼出血病基因工程疫苗研究及草鱼抗病育种的毒株筛选具有十分重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用 CIK(草鱼肾细胞)由本实验室保存,传代 156 代。FHM(肥头鲤细胞)由法国马赛地中海医科大学分子病毒学系 Houssam Attoui 博士馈赠,传代 145 代。BF2(蓝鱼细胞)与 EPC(鲤鱼上皮瘤细胞)细胞系由德国慕尼黑大学动物学院 S. Essbauer 博士馈赠,传代次数分别为 168、175 代。草鱼呼肠孤病毒湖南邵阳株^[5](GCRV-873)本实验室分离,-30℃保存;兔抗 GCRV₈₇₃抗体由本实验室制备,-30℃保存。草鱼呼肠孤病毒湖南长沙株(GCRV-991)由湖南农业大学提供^[9]。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养、病毒感染与中和实验 草鱼肾细胞系(CIK)的细胞培养及病毒接种传代与滴度测定按本实验室常规方法进行^[10,23]。采用本实验室常规固定病毒量与倍比稀释血清法进行中和效价测定。实验设置 3 组重复,于 24 孔 Cast 板中进行。同时设病毒感染与正常细胞对照各一组。按 Reed-Muech 法计算 50%中和滴价。

1.2.2 GCRV-991 毒株的分离及免疫电镜观察

本实验采用差异离心法提取病毒粒子,采用 CsCl 密度梯度离心(20%、30%、40%、50%)获得纯化的病毒蛋白,分带收集纯化的样品,在双蒸水中透析 24h 除去样品中的 CsCl。免疫复合物的制备按如下方法进行:取一滴兔抗 GCRV₈₇₃抗体,与 9 倍体积的 GCRV₉₉₁病毒培养液混合,37℃保温 1h,于 12 000g 离心 10min,沉淀溶于适量无菌双蒸水中,上述样品经 2%RTA 负染、F-700FA 型电镜下观察结果。

1.2.3 病毒核酸与结构蛋白的 SDS-PAGE GCRV 的核酸提取按实验室常规方法进行^[5],采用 Leammli 系统^[11]对 GCRV 核酸进行分离;SDS-PAGE 浓度为 7%,在 30mA 条件下电泳 12hr。EB 染色后在紫外下观察结果。纯化的病毒蛋白与 2×样品缓冲液(0.0625mol/L Tris, HCL pH6.8, 2% SDS, 5% β-巯基乙醇)混匀后,95℃变性 5min,于 12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离。考马斯亮蓝染色后观察结果^[12]。

2 结 果

2.1 GCRV₉₉₁的细胞感染与中和滴定

本实验采用四株水生动物细胞(CIK, FHM, BF2 及 EPC)与 2 株哺乳动物细胞(BHK, Vero)对 GCRV₉₉₁进行了细胞敏感性比较实验。病毒感染细胞后 2-3d,可观察到 CIK, FHM 细胞产生明显的细胞病变作用(Cytopathic effect, CPE),而 BF2, EPC 细胞无任何病理变化。将原代培养的细胞病毒悬液进行传代培养,发现 GCRV₉₉₁在 CIK, FHM 细胞上传代 2-3 次,病毒滴价趋于稳定,而在 BF2, EPC 细胞上仍无 CPE 产生。此外,选用与人类亲缘关系较为接近的哺乳动物非洲绿猴肾(Vero)和地鼠肾细胞系(BHK)进行了细胞感染实验,结果表明,37℃培养条件下,GCRV 能使 CIK 细胞产生 CPE,

表 1 GCRV₉₉₁的细胞感染及中和实验

Table 1 CPE(TCID₅₀ determination of GCRV₉₉₁ and its serum neutralization test

Cell line	Aquatic cells (28℃)					mammalian cells (37℃)	
	BF2	CIK*		EPC	FHM	BHK	Vero
		28℃	37℃				
F1	0	1.2 × 10 ⁴	5.6 × 10 ¹	0	8.4 × 10 ³	0	0
F2	0	7.5 × 10 ⁶	3.2 × 10 ³	0	6.8 × 10 ⁷	0	0
F3	0	2.8 × 10 ⁹	8.2 × 10 ³	0	4.9 × 10 ⁶	0	0
SNT	ND	+	+	ND	+	ND	ND

Note: F1, F2 and F3 present generating time in cell culture cycles, CIK* present 37℃ as Control

SNT; Serum Neutralization Test

而对哺乳动物 BHK, VERO 细胞不敏感(表 1)。根据对三株 GCRV 毒株的免疫原性比较研究^[13],选

用免疫原性强的 GCRV₈₇₃毒株抗体与 GCRV₉₉₁毒株进行了细胞中和实验,结果表明 GCRV₈₇₃抗体能有

效地中和 GCRV₉₉₁ 抗原(表 1), 说明 GCRV₉₉₁ 抗原具有与 GCRV₈₇₃ 抗体的结合能力。

2.2 GCRV₉₉₁ 病毒的形态结构与免疫复合物

将 GCRV₉₉₁ 组织浸取液感染 CIK 细胞, 经 2~3 次传代, 收集裂解的细胞病毒悬液。该病毒悬液经 -30℃ 冻融 3 次, 离心浓缩病毒样品, 然后采用 CsCl 密度梯度离心分离不同结构的病毒蛋白。收集的不同密度病毒样品, 在电镜下观察到三种不同结构的病毒颗粒即完整病毒颗粒, 病毒空壳和核心(图 1A, B, C)。图 1A 显示完整的病毒结构, 图 1b 为失去病毒核酸的外层与内层衣壳, 图 1C 病毒表面可见明显的钉状物突起, 这是外层衣壳裂解后的病毒核心结构。推测其钉状物为病毒转录复制时核蛋白运送通道^[14]。此外, 将 GCRV₉₉₁ 细胞病毒悬液与 GCRV₈₇₃ 在 37℃ 浮育 1h, 离心沉淀后, 在电镜下观察到大量成片的结构不很清晰的病毒颗粒即免疫复合物, 这是因为病毒颗粒的表面为特异抗体所包被(图 1D)。此结构表明 GCRV₈₇₃ 抗体能与 GCRV₉₉₁ 抗原产生特异性免疫反应。

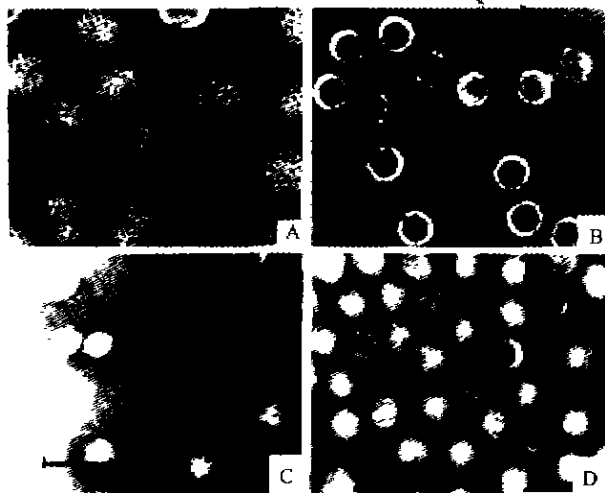


图 1 GCRV₉₉₁ 的结构与免疫复合物

Fig. 1 Fine Structure of GCRV₉₉₁ and its immunocompound with GCRV₈₇₃ antibody

A, Intact Virus; B, 2 Layer Capsides; C, Virus Core; D, Virus Immunocompound Bar = 100nm

2.3 GCRV₉₉₁ 的核酸与结构蛋白分析

将纯化的 GCRV₉₉₁ 与 GCRV₈₇₃ 核酸在相同的电泳条件下进行分离, 所得结果见图 2A。从图中可以看出, GCRV₉₉₁ 的核酸大小与带型与 GCRV₈₇₃ 十分相似。以 DNA Marker 为标准, 测得各基因片段分子量近似值见表 2。为确定成熟病毒颗粒的多肽组

分, 我们对梯度纯化的完整病毒颗粒进行了结构蛋白分析; SDS-PAGE 电泳计算机凝胶扫描结构显示, GCRV₉₉₁ 含有 5 条主要与 2 条微量结构多肽。其中 3 条高分子量多肽为 138、136、132kD, 2 条中分子量多肽为 82、65kDa, 另外 2 条低分子量多肽各为 43、34kDa(图 2B)。根据已发表的 GCRV₈₇₃, GCRV₈₇₅ 核酸蛋白研究报道, 本研究结果在结构多肽的数量与分子量测定上与先前的报道差异很大^[6], 但符合呼肠孤病毒科及水生呼肠孤病毒属结构蛋白特性^[15]。我们认为过去报道的 GCRV 结构蛋白为 11 条多肽的结论可能与样品纯度等实验误差有关。

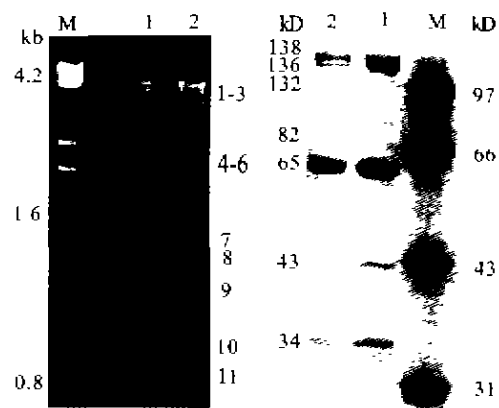


图 2 GCRV₉₉₁ 核酸与结构多肽的分析

Fig 2 GCRV₉₉₁-dsRNA and its structural polypeptide
A, Electrophoresis of GCRV₉₉₁-dsRNA; B, GCRV₉₉₁ structural polypeptide. 1, GCRV₉₉₁; 2, GCRV₈₇₃; 3, λ-DNA/EcoR I + Hnd III

3 讨论

根据对水生呼肠孤病毒基因组研究, 表明其基因组由 11 条双链分段的 RNA 组成, 而这一特性与呼肠孤病毒科轮状病毒相似。血清学研究发现, 水生呼肠孤病毒与哺乳动物呼肠孤病毒无免疫相关性, 其抗原不能为哺乳动物呼肠孤病毒所中和^[16]。核酸杂交实验表明, 与轮状病毒有着相同基因数目水生呼肠孤病毒与其无杂交同源性^[17]。GCRV₈₇₃ 基因组序列分析与氨基酸同源性比较研究揭示, GCRV 与正呼肠孤病毒在氨基酸水平上的相似率为 26%~41%^[18]。对 GCRV₉₉₁ 细胞感染特性研究表明, 在细胞生长温度许可范围内, GCRV 对细胞的感染性可能与细胞受体相互作用有关^[19]。对 GCRV₉₉₁ 下 GCRV₈₇₃ 的免疫学分析表明, GCRV₈₇₃ 抗体能有效地中和 GCRV₉₉₁ 抗原, 表明这两种 GCRV 具有相同的抗原性。

表 2 GCRV₉₉₁核酸及各片段分子量Table 2 The dsRNA Molecular Weight of GCRV₉₉₁

Segment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
Mol Wt · 10 ⁶ Da.	2.61	2.55	2.28	1.39	1.34	1.27	0.89	0.81	0.71	0.58	0.55	14.48
bp	4106	3828	3624	2194	2100	2005	1405	1278	1116	920	860	23,43

王伟等曾对 GCRV₈₇₅ 毒株进行了较为细致的研究, 他们认为 GCRV₈₇₅ 的核酸带型与 GCRV₈₇₃ 相似, 但分子量不同。本研究将 GCRV₉₉₁ 与 GCRV₈₇₃ 在同一条件进行了 SDS-PAGE 电泳分析, 表明两者的核酸分子量相同。对 GCRV₉₉₁ 的结构蛋白分析表明, GCRV₉₉₁ 与 GCRV₈₇₃ 在多肽电泳图谱上表现相同的特性, 成熟病毒粒子含 5 条主要与 2 条微量结构蛋白。非结构蛋白为病毒基因所编码, 但仅在病毒复制过程中产生, 可能在复制中行使某种功能, 但不为成熟病毒颗粒蛋白组分。进一步的研究需通过体内外翻译与精确的基因定位进行确定。

GCRV₉₉₁ 为近年来分离的毒株, 上述研究表明, GCRV₉₉₁ 所具有的特性与 GCRV₈₇₃ 十分相似, 两者在核苷酸与氨基酸序列上是否存在很高的同源性, 目前还不能加以定论。研究报道显示, GCRV₈₇₃ 为研究得较为系统的毒株^[20-23], 但已丧失对草鱼的感染力。基因序列研究表明, 这一变异可能是因为频繁的传代使病毒在复制或包装时产生了缺损性干扰颗粒^[24]。GCRV₉₉₁ 对草鱼具有很强的致病性, 两者在基因水平上是否存在一定的差异, 乃是值得探讨的课题。

参考文献

[1] Meyers TR. A Reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. J Gen Virol, 1979, 43: 203 - 212

[2] Plumb, J A, Browser P R, Grizzle J M, Mitchell A J. Fish Viruses: a double-stranded RNA icosahedral virus from a North American cyprinid [J]. J fish Res Bd Can, 1979, 36: 1390 - 1394

[3] 中国科学院武汉病毒研究所, 中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病病毒研究协作组. 草鱼出血病病毒的电镜显微观察初报 [J]. 淡水渔业, 1983, 3: 39.

[4] 陈燕新, 江育杯. 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, 28: 1138 - 1140

[5] 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

[6] 王伟, 陈延, 柯丽华, 等. 草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及其多肽的研究 [J]. 病毒学报, 1990, 6(1): 44 - 49

[7] Aymara A C Rangel, Dantel D Rockemann, Frank M Herrck and Samal S K. Identification of grass carp haemorrhage virus as a

new genogroup of aquareovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2399 - 2402.

[8] 曾令兵, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 基因组 SDS-PAGE 分析及其核酸类型鉴定 [J]. 淡水渔业, 1991, 5: 17 - 18

[9] 章怀云, 肖调义, 章学文, 等. 草鱼出血病病毒 GCHV-99 1 理化性质研究 [J]. 湖南农业大学学报, 1991, 25(3): 350 - 356.

[10] 方勤, 柯丽华, 蔡宜权. 草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养 [J]. 病毒学杂志, 1989, 4(3): 315 - 319.

[11] Laemmli U K. Leavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680 - 685

[12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. USA, NY: Cold Spring Harbor, 1989

[13] 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, 5(3): 252 - 255.

[14] Ralph S J, Harvey J D, Bellamy A R. Subunit structure of the reovirus spike. J Virol, 1980, 137: 1 - 8

[15] Winton J R, Lannon C N, Fryer J L et al. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals [J]. J Gen Virol, 1987, 68(2): 353 - 363

[16] Winton J R, Lannon C N, Fryer J L et al. Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan [J]. Fish Pathol, 1981, 15: 155 - 162

[17] Lupiani B, Hetrick F M, Samal S K. Genetic Analysis of aquareovirus by using RNA-RNA Blot hybridization [J]. Virology, 1993, 197: 475 - 479.

[18] Qin Fang, Houssam Attoui, Jean Francois Philippe Baguin, Zuoqian Zhu, Philippe de Micco, Xavier de Lambro. Sequence of Genome Segments 1, 2 and 3 of the Grass Carp Reovirus (Genus Aquareovirus, Family Reoviridae) [J]. BBRC, 2000, 274(3): 762 - 766.

[19] Paul R W, Choi A H C, Lee P W K. The a-anomeric form of sialic acid is the minimal receptor determinant recognized by reovirus [J]. Virology, 1989, 172: 382 - 385

[20] 王伟, 蔡宜权, 方勤, 等. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位 [J]. 中国病毒学, 1994, 9(4): 356 - 361

[21] 傅静, 邹桂平, 方勤. 草鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及序列分析 [J]. 中国病毒学, 1999, 14(1): 87 - 92

[22] 邹桂平, 方勤. 草鱼呼肠孤病毒在 CLK 细胞中复制及形态发生的研究 [J]. 中国病毒学, 2000, 15(2): 186 - 192

[23] 左文功, 钱华鑫, 许映方, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CLK 的建立. 淡水渔业, 1984, 2(1): 38 - 39.

[24] 邱涛, 张青, 陆仁后, 朱作言. 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. 病毒学报, 2001, 17(2): 140 - 143