

# 应用逆转录聚合酶链反应直接检测 草鱼出血病病鱼组织的研究

李 军 王铁辉<sup>1</sup> 周立冉 易咏兰<sup>1</sup> 刘汉勤<sup>1</sup> 陆仁后<sup>1</sup> 陈宏溪<sup>1</sup>

(青岛海洋大学海洋生物系, 266003)

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)<sup>1</sup>

**摘 要** 人工感染 GCHV-861 后, 对处于潜伏期、发病期和恢复期等不同时期的草鱼内脏组织匀浆上清液进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增, 除恢复期的 1 条草鱼外, 其余样品均得到特异扩增带, 而对照组都没有, 预示着 RT-PCR 技术对于草鱼出血病的早期诊断、防治及抗病育种具有重要意义。另外, 对于显症出血病草鱼的肝、肾、脾、鳃、肌肉和肠道等组织器官进行检测, 结果都为阳性, 首次证实了 GCHV 存在于肝脏中, 并对此作了进一步的讨论。

**关键词** 草鱼出血病, 病鱼组织, 逆转录聚合酶链式反应, 直接检测

草鱼出血病病毒(Hemorrhagic Virus of Grass Carp, GCHV)是草鱼出血病的病原体, 可导致当年草鱼鱼种大批死亡[中国科学院水生生物研究所三室等 1978、1980, 毛树坚等 1989]。电镜观察结果表明, GCHV 主要感染草鱼的肾脏和肠道等组织器官, 而在肝脏、鳃及肌肉等组织中未发现 GCHV 病毒颗粒存在[中国科学院水生生物研究所三室等 1980, 中国科学院武汉病毒研究所等 1983, 毛树坚等 1988, 丁清泉等 1990]。RT-PCR 是检测 GCHV 的敏感、特异、快速而有效的方法[王铁辉等 1997]。本文首次报道了应用 RT-PCR 技术对草鱼出血病病鱼组织的检测结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料鱼

2~3 寸长的当年龄草鱼鱼种, 由本实验室繁殖和饲养。

### 1.2 病毒

GCHV-861 株由本室分离[王铁辉等 1994]。

### 1.3 主要试剂

AMV 反转录酶、dATP、dCTP、dGTP、dTTP 为 Promega 产品, Taq DNA 聚合酶购自中国科学院遗传研究所, 1kb DNA Ladder 为 GIBCO BRL 产品。

## 1.4 引物

本实验所用的 PCR 引物 PS6 (5'-AGTTC TCAAA GCTGA GACAG-3' 和 5'-ACGTGC-GATTGGAAGAGCTT-3') 是根据已克隆的 GCHV-861 株基因组第 6 片段的部分 cDNA 序列设计 [Wang 等 1993], 它们扩增的靶序列长度预计为 320bp。引物由中国科学院微生物研究所合成。

## 1.5 人工感染

病毒悬液制备:按照本实验室常规方法制备 GCHV-861 [王铁辉等 1994]。

人工感染:取 2~3 寸长草鱼鱼种 80 尾进行腹腔注射感染, 0.4 mL/尾, 饲养于 28℃ 的恒温水族箱中。同时另取 20 尾注射无菌蒸馏水的健康草鱼作对照组。在感染后 1~23 天每天随机取样, 解剖取各组织并用 PBS 洗去血污, 置 1.5 mL 离心管中于 -20℃ 保存待用。

## 1.6 病毒核酸样品的制备

取 0.1 克病鱼组织, 加 1 mL STE (50 mM 的 Tris-HCl, pH 为 8.0, 100mM 的 NaCl, 1mM 的 EDTA) 制成匀浆, -20℃ 至室温冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 10 分钟后, 取上清液 400 μL, 加入 0.5% N-十二烷基肌氨酸钠和蛋白酶 K (200 μg/mL), 55℃ 保温 1 h, 用饱和酚、酚/氯仿/异戊醇各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 用 70% 及 100% 乙醇各洗一次后, 溶解于适量双蒸水中, -20℃ 冰冻保存备用。

## 1.7 RT-PCR 扩增及产物分析

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 [王铁辉等 1997]。

## 2 结果

GCHV-861 株人工感染草鱼种, 在 28~30℃ 水温条件下, 第 3 天开始发病, 4~7 天内出现典型的出血病症状: 开始出现游动失常, 不吃食物, 继之离群独游或停留在水面, 或沉卧于水底, 有的身体失去平衡, 时而在水面打转, 时而垂直在水中不动; 病鱼体表呈暗黑色, 眼球外突。出现上述症状草鱼, 在一天内即死亡。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; 还有的是内脏器官充血或出血、少腹水。7 天后存活的 12 条草鱼一直未见死亡, 外表也逐渐恢复正常。

分别在发病前期 (1~3 天)、发病期 (4~7 天) 及发病后期 (8~23 天) 取样进行 RT-PCR 检测, 发病前期和发病期的所有样品均能检测到 GCHV 的存在; 在人工感染第 23 天后的 5 尾鱼中, 也有 4 尾检测到 GCHV 的存在 (表 1 和图 1)。发病前期和后期无症状携带者特异扩增带较弱, 二次 PCR 后, 特异扩增带加强 (图 2)。

表 1 GCHV-861 株人工感染草鱼的 RT-PCR 检测结果

Table 1 Detection of GCHV-861 in grass carp after artificial infection by RT-PCR

时期	发病前期			发病期	发病后期	对照
取样时间	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4~7 天	第 8~23 天	第 1~23 天
检测尾数	5	5	5	15	5	10
阳性尾数	5	5	5	15	4	0
阳性率(%)	100	100	100	100	80	0

图 1 人工感染 GCHV-861 草鱼  
内脏组织的 RT-PCR 检测结果Fig.1 Results of detection of GCHV-861 in tissues of  
grass carp artificially infected by RT-PCR

1.1kb 分子量标准(GIBCO BRL);2.健康草鱼组织 DNA  
作阴性对照;3.质粒模板作阳性对照;4-9.对感染后不同  
时间取样提取 dsRNA 的 RT-PCR 检测结果;第 1-4、7 和 23 天

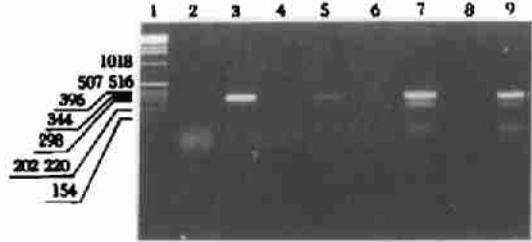


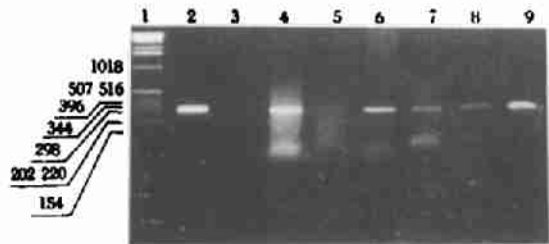
图 2 二次 PCR 扩增结果

Fig.2 Results of a 2nd round PCR amplification  
1.1KB 分子量标准(GIBCO BRL);2.健康草鱼组织 DNA  
作阴性对照;3.质粒模板作阳性对照;4、6、8.分别为  
第 1、2 和第 23 天的样品一次 RT-PCR 扩增  
结果;5、7、9 为二次 PCR 扩增结果

对典型出血病病鱼不同组织(器官)进行 RT-PCR 扩增,在病鱼肝脏、肾脏、脾脏、肠道、肌肉和鳃丝等组织(器官)中均能检测到病毒核酸的存在(图 3),其中,在肝脏、肠道和肾脏等组织(器官)的扩增条带较强,说明这些组织中有较多的病毒颗粒存在。

### 3 讨论

草鱼出血病病毒 GCHV-861 株对草鱼种有极强的致病性;人工感染当年草鱼种,在 28~30℃ 条件下,一般 72 小时后即发病,且死亡率极高;GCHV-861 株人工感染草鱼种主要表现为红肌肉型和肠炎型。对人工感染实验鱼的检测结果表明,RT-PCR 不仅能够检测发病期显症病鱼体内的病毒,还能够检测发病前期及发病后期外表正常的病毒携带鱼中的病毒,而且病毒感染 24 小时后就从鱼体内脏组织中检测出 GCHV 核酸的存在,预示 RT-PCR 可以用于草鱼出血病的早期诊断,为草鱼出血病的防治提供依据。对 5 条处于恢复期(感染后第 23 天)的草鱼进行检测,其中有 4 条检出了

图 3 出血病草鱼不同组织  
或器官中 GCHV 的 RT-PCR 检测结果Fig.3 Results of RT-PCR amplification with dsRNA  
of GCHV from different tissues or organs of hemorrhagic fish

1.1kb 分子量标准(GIBCO BRL); 2.阳性对照;  
3.阴性对照;4-9.分别为肝脏、脾脏、肾脏、  
肌肉、鳃和肠道组织的 RT-PCR 结果

GCHV,对未检出鱼重复试验及二次 PCR 扩增,结果仍为阴性,说明所取样品中无 GCHV,可能已被从鱼体内排除掉。这为草鱼抗病个体的筛选和鉴定提供了技术手段,对抗病育种有着重要意义。

据电镜观察结果表明,GCHV 主要存在于草鱼出血病病鱼肾脏和肠道等组织细胞内及弥散于肾、脾、肌肉等组织间隙或微血管腔内,而在肝脏、脾脏、肌肉和鳃中未发现病毒颗粒[中国科学院水生生物研究所三室等 1980,中国科学院武汉病毒研究所等 1983,毛树坚等 1988,丁清泉等 1990]。作者利用 RT-PCR 从草鱼出血病病鱼肝、肾、脾、肠道、肌肉和鳃等六种器官组织中均能检测出 GCHV,其中肝脏、肠道和肾脏扩增条带较亮,肌肉组织和鳃次之,脾脏最弱,这说明 GCHV-861 在各组织(器官)中病毒颗粒的多少不同。作者对肝脏匀浆上清液进行扩增得到较强的扩增带,且肌肉和鳃等也有稍弱的特异扩增带,这可能是其它组织中的病毒颗粒释放到血液中,随血液循环抵达这些器官并在这些组织器官的血管、微血管内皮细胞内增殖的结果,前人通过电镜在观察病鱼的肌肉[毛树坚等,1988]和鳃[王铁辉等,1993]等组织时也有类似的报道。作者应用 RT-PCR 技术首次从肝脏匀浆上清液中检测到 GCHV 的存在,且得到较强的扩增带,说明肝脏中含有较多的病毒颗粒,和以往电镜观察结果不一致。究其原因,作者认为,除上述分析外,也不能排除 GCHV 可以在上述器官和组织中增殖的可能性,因为 PCR 技术的灵敏度较电镜技术要高得多,况且电镜观察结果与电镜样品的制备有很大的关系,往往有较大的漏检性。关于 GCHV 可寄生的敏感组织和器官问题,需要作进一步的研究。脾脏的特异性扩增带最弱,说明 GCHV 对脾不敏感,脾脏中 GCHV 的存在可能是脾脏细胞吞噬作用的结果,这和文献报道是一致的[王铁辉等 1993]。

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

## 参 考 文 献

- 丁清泉等.1990.草鱼出血病病鱼主要器官的超薄切片观察及感染力的比较.水产学报,14(1):66~69.
- 王铁辉等.1993.草鱼出血病病毒人工感染稀有鮰鲫出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察.水生生物学报,17(4):343~346.
- 王铁辉等.1994.稀有鮰鲫对草鱼出血病病毒敏感性的初步研究.水生生物学报,18(2):144~149.
- 王铁辉等.1997.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,28(1):1~7.
- 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组.1978.草鱼出血病病原的研究.水生生物学集刊,6(3):321~329.
- 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组.1980.草鱼出血病病原的研究(II)电镜观察.水生生物学集刊,7(1):75~79.
- 中国科学院武汉病毒所等.1983.草鱼出血病病毒电子显微镜观察初报.淡水渔业,3:39~40.
- 毛树坚等.1988.草鱼出血病两种病原病毒的细胞病理学观察.海洋与湖沼,19(5):435~438.
- 毛树坚等.1989.草鱼出血病的病原研究.水产学报,13(1):1~5.
- Wang T H, et al.1993.Purification of hemorrhagic virus of grass carp and the cDNA synthesis. Cloning and sequencing of its genome. Annual Report of FEBL. Beijing: International Academic Publishers. 153~156.

## DIRECT DETECTION OF GRASS CARP HEMORRHAGIC VIRUS IN INFECTED FISH BY REVERSE TRANSCRIPTION(RT)- POLYMERASE CHAIN REACTION(PCR)

LI Jun, WANG Tie-Hui<sup>1</sup>, ZHOU Li-Ran, YI Yong-Lan<sup>1</sup>,

LIU Han-Qin<sup>1</sup>, LU Ren-Hou<sup>1</sup>, CHEN Hong-Xi<sup>1</sup>

(*Department of Marine Biology, Ocean University of Qingdao, 266003*)

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072*)<sup>1</sup>

**ABSTRACT** After artificial infected with GCHV-861, the grass carp were collected and detected during developing period, pre- and post-developing period by RT-PCR, respectively. All the infected fish gave positive results except one of five piece of covalenscent fish, and the controls are negative. These indicated that RT-PCR is significant for the early diagnosis and the viral disease-resistant breeding of grass carp. Moreover, we also first detected GCHV from the liver of infected hemorrhagic grass carp and discussed it.

**KEYWORDS** Hemorrhage of grass carp, Hemorrhagic tissues, Reverse transcription polymerase chain reaction, Direct detection