

草鱼出血病病毒 854 株的理化、生物学特性 及基因组结构

PHYSICAL-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENOME STRUCTURE OF GRASS CARP HEMORRHAGE VIRUS-854

曾令兵 贺路 左文功

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

ZENG Ling-Bing, HE Lu, ZUO Wen-Gong

(Changjiang Fisheries Research Institute, CAFS, Jingzhou 434000)

关键词 草鱼出血病, 854 株病毒, 理化特性, 繁殖动态, 基因组结构

KEYWORDS Grass carp hemorrhage, Virus 854, Physical-chemical characteristics, Propagative dynamic, Genome structure

草鱼出血病是我国一种十分严重的病毒性鱼病。1978 年, 中国科学院水生生物研究所第三研究室的科研人员首先报道了草鱼出血病是一种病毒性鱼病, 并初步认为其病原是一种疱疹病毒(Herpesvirus)。1983 年, 陈燕新等报道了自己分离的草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性研究的结果。1984 年, 中国科学院武汉病毒研究所和中国水产科学研究院长江水产研究所草鱼出血病研究协作组在对草鱼出血病病毒进行分离和精细结构, 核酸特性研究之后, 首次确定该病原为鱼呼肠孤病毒(Fish Reovirus)。方勤等[1989]对草鱼出血病病毒湖南邵阳株的生长特性和高滴价培养方法作了详细的报道。王炜等[1990]对草鱼出血病病毒武汉南湖株的基因组和多肽结构作了较为细致的研究。张念慈等[1981], 左文功等[1986]分别建立了草鱼吻端组织细胞株 ZG-7901 和草鱼肾脏组织细胞系(CIK), 并观察到了病毒对细胞培养物的致细胞病变作用(CPE)。Winton 等[1987]报道了从鱼体及牡蛎体内分离出的四株呼肠孤病毒的基因组和结构蛋白研究结果。本文报道了草鱼出血病病毒 854 株的提纯方法, 形态结构, 理化特性, 基因组结构及其在草鱼 CIK 细胞培养物上的繁殖动态等研究的结果。

1 材料与方 法

细胞: 草鱼肾脏组织细胞系(CIK)。

病毒: 草鱼出血病病毒 854(GCHV-854)株, 材料来源于本所试验场, 病毒分离于本实验室。在 CIK 细胞培养物上增殖。

病毒纯化: 典型细胞病变材料经差异离心(4 500g/h, 27 000g/4.5h)制成粗提纯样品, 磷钨酸负染, 电镜观察。粗提纯样品再经不连续蔗糖梯度(15%, 40%, 45%, 60%, NTE 缓冲液配制)离心(100 000g/2h), 收集靠近 40% 浓度处呈乳白色的区带, NTE 缓冲液稀释, 离心洗糖(100 000g/1.5h), 收集沉淀, 磷钨酸负染, 电镜观察。理化特性: 采用常规方法研究了病毒对氯仿、乙醚, pH3, pH10, 温度, 冻融的敏感性以及保藏温度和时间对病毒毒力的影响。采用微量组织培养滴定系统测定病毒滴度(TCID₅₀/0.1mL 值)。

病毒繁殖动态:采用组织培养微量滴定系统分别在病毒感染 CIK 细胞培养物后的 2, 6, 12, 24, 48, 72, 84, 96 小时测定病毒滴度 (TCID₅₀/0. 1mL 值), 绘出病毒繁殖动态曲线。

病毒基因组 核酸类型鉴定: 采用氯仿: 酚法 (1: 1) 提取病毒核酸. 病毒核酸, dsRNA 标准和 λ-DNA-EcoR I-Hind III 三种样品在垂直电泳胶板上对称加样, 电泳完毕后中轴线处将胶板一分为二切开, 分别浸在 DNase 消化液中 (每毫升 0. 1 × SSC 含 80μg DNase) 和 RNase 消化液中 (每毫升 0. 1 × SSC 含 200μg RNase), 25℃消化 5 小时, 再用 EB 染色胶板, 紫外灯下观察结果。

病毒基因组 SDS-PAGE 分析: 基因组 SDS-PAGE 缓冲系统采用 Laemmli SDS-PAGE 缓冲系统. 病毒核酸用 7% 垂直板状 SDS-PAGE (20 × 16cm Bio-Rad 电泳仪) 分离. 电泳条件: 电流 20mA, 时间 12 小时, 温度 10℃. 采用 Bio-Rad 银染色方法和试剂观察结果. 以 dsRNA 分子量标准 (六个组份, 分子量分别为 2. 76, 2. 31, 2. 24, 1. 87, 1. 70, 1. 44 × 10⁶ 道尔顿) 的电泳图谱为参照, 计算草鱼出血病病毒 854 株基因组核片断数目和分子量, 并与国外四株鱼呼肠孤病毒以及武汉南湖株草鱼出血病病毒的核酸片断数目和电泳模式图谱比较。

2 结果与讨论

病毒纯化与电镜观察: 采用差异离心和蔗糖梯度离心技术可提纯草鱼出血病病毒. 电镜观察结果表明, 病毒粒子具双层衣壳, 直径约为 65nm (图 1, 图 2)

理化特性: 一般认为, 能使病毒滴度发生两个对数级别以上的改变, 即认为该条件对病毒毒力的影响显著. 研究结果表明, 草鱼出血病病毒 854 株对氯仿、乙醚、酸碱的处理不敏感. 通常无囊膜的病毒对有机溶剂的处理不敏感, 因此, 我们认为, 854 株草鱼出血病病毒不具类脂囊膜. 56℃处理 1 小时可使病毒滴度显著降低. 病毒反复冻融和保藏温度, 时间对病毒毒力影响显著. (表 1, 图 3, 图 4)

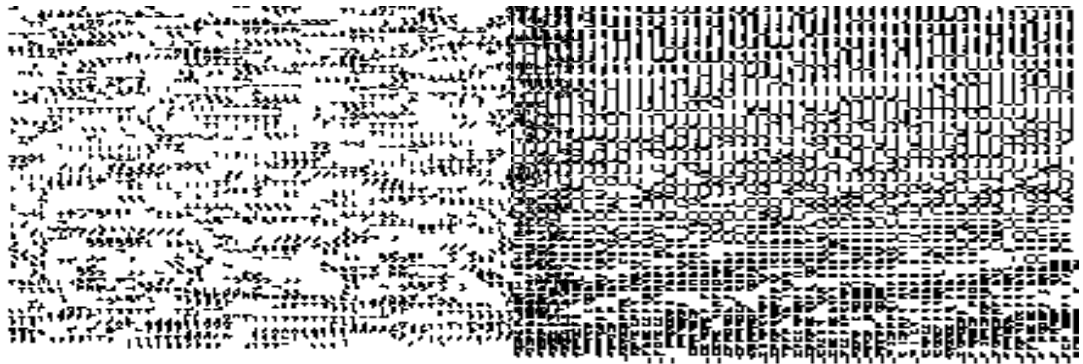


图 1 差异离心技术纯化的草鱼出血病 854 株病毒。× 38 000

图 2 蔗糖梯度离心纯化的草鱼出血病 854 株病毒。× 108 000

Fig. 1 GCHV-854 viral particles purified by differential centrifugation × 38,000

Fig. 2 GCHV-854 viral particles purified by sucrose gradient centrifugation. × 108,000

表 1 氯仿、乙醚、酸碱度和 56℃ 1 小时处理对草鱼出血病病毒 854 株的影响
Tab. 1 Effect of chloroform, ethyl ether, pH and 56℃ 1 h on GCHV-854

处理方法	氯仿	乙醚	pH3	pH10	56℃ 小时
试验组	5. 50	5. 55	3. 26	3. 12	0. 82
对照组	5. 82	5. 82	3. 82	3. 82	4. 37

病毒繁殖动态: 图 5 基本上反映了 GCHV-854 在 CIK 细胞培养物上的繁殖过程. 在病毒感染的早期, 病毒多为残余的原代病毒和早期被最先病变的细胞释放出来的子代病毒, 这时病毒量少, 滴度较低. 在病毒繁殖的对数上升期 (24~ 72 小时) 和后期, 病毒大量繁殖, 细胞病变加快, 病毒被大量释放出来, 病毒滴度迅速升高, 并于 84 小时达到最高点, 此后渐趋平稳. 繁殖动态曲线不仅反映出 GCHV-854 的增殖特性, 还指出收获细胞培养的病毒材料的适宜时间。

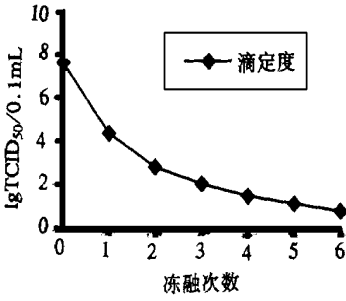


图 3 冻融对 GCHV-854 毒力的影响
Fig. 3 Effect of freeze-thawing on GCHV-854

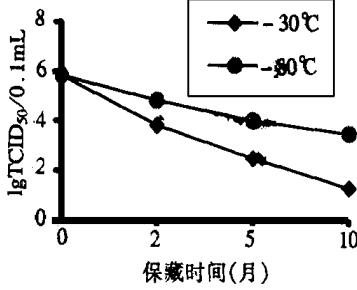


图 4 保藏温度和时问对 GCHV-854 毒力的影响
Fig. 4 Effect of stored temperature and time on GCHV-854

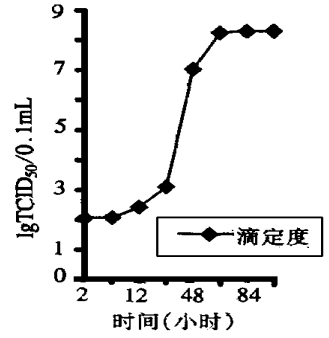


图 5 GCHV-854 繁殖动态曲线
Fig. 5 Propagative dynamic curve of GCHV-854 in CIK cell line

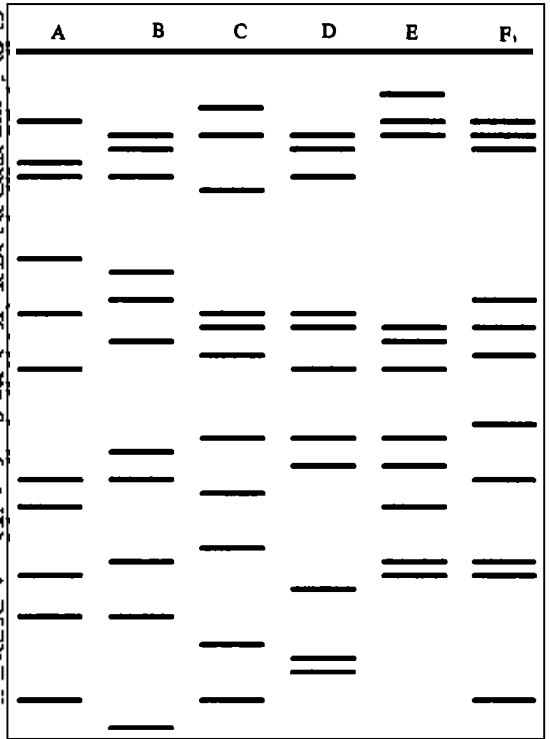
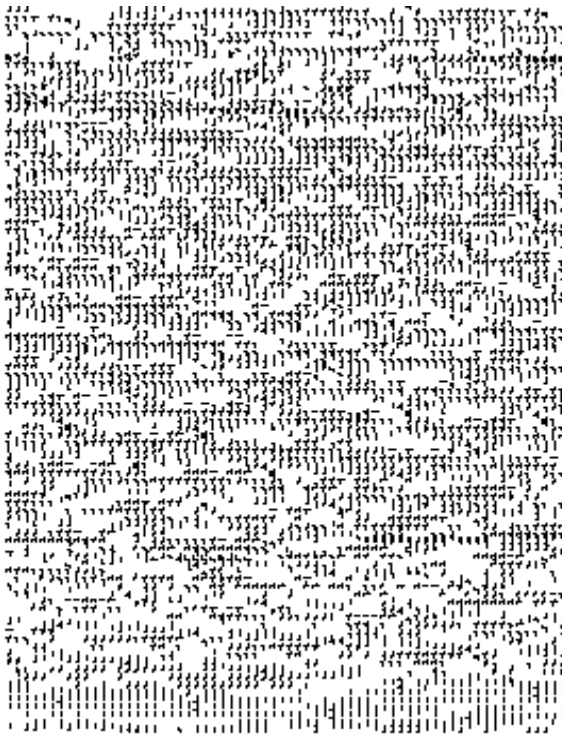


图 6 A: dsRNA 分子量标准和 GCHV-854 基因组 SDS-PAGE 图谱(左);
B: dsRNA 分子量标准和 GCHV-854 基因组 SDS-PAGE 模式图谱(右)
Fig. 6 A: dsRNA mark and GCHV-854 genome SDS-PAGE electropherogram (left);
B: dsRNA mark and GCHV-854 genome SDS-PAGE model electropherogram (right)

图 7 几株鱼呼肠孤病毒基因组 SDS-PAGE 模式图谱
Fig. 7 SDS-PAGE model electropherograms of several strains fish reovirus genome.
A: American oysters reo-like virus(13p₂);
B: Chum salmon virus(CSV);
C: Goldon shiner virus(GSV);
D: Ch annel cat fish reovirus(CRV);
: GCHV-South Lake strain in Wuhan; F: GCHV-854.

基因组特性:核酸类型鉴定结果表明,草鱼出血病病毒 854 株的核酸对 RNase 敏感,对 DNase 不敏感,其核酸类型为 RNA,病毒基因组垂直板状 SDS-PAGE 的结果表明,从我所试验场分离的草鱼出血病病毒 854 株其基因组由 11 个分段的核酸片段组成(图 6a,图 6b)。以 dsRNA 分子量标准的各片段分子量对数对其迁移距离作标准曲线,测得草鱼出血病病毒 854 株基因组的总分子量约为 14.46×10^6 道尔顿,其中最大片段分子量约为 2.45×10^6 道尔顿,最小片段的分子量约为 0.38×10^6 道尔顿(表 2)。草鱼出血病病毒 854 株基因组核酸片段数目与 Winton 等[1987]研究的四株鱼呼肠孤病毒的基因组核酸片段数目以及王伟等研究的武汉南湖株草鱼出血病病毒的基因组核酸片段数目相等,均为 11 个核酸片段,基因组的总分子量相差不大,但基因组核酸片段 SDS-PAGE 模式图谱有较大的差异(图 7),这表明草鱼出血病病毒 854 株具有病毒株的特异性。

表 2 dsRNA 分子量标准和草鱼出血病病毒 854 株基因组各片段分子量($\times 10^6$ 道尔顿)

Tab. 2 dsRNA molecular weight mark and molecular weight of segments of GCHV-854

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	total
A	2.76	2.31	2.24	1.87	1.70	1.44						
B	2.45	2.28	2.24	1.50	1.42	1.30	1.00	0.80	0.55	0.54	0.38	14.46

A: dsRNA 分子量标准 B: GCHV-854 基因组核酸片段分子量

本文系“八·五”国家攻关项目“草鱼出血病细胞培养灭活疫苗大规模生产工艺研究”子专题部分研究内容,项目编号为 85-15-03-02-01

参 考 文 献

- 方 勤,何丽华,蔡宜权. 1989. 草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养. 病毒学杂志, 3(3): 315~ 319.
- 左文功,钱华鑫,许映芳等. 1986. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性. 水产学报, 10: (1): 11~ 17.
- Winton J R, Lannan C N, Fryer J L, et al. 1987. Morphological and biological properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals. Journal of General Virology, 68: 353~ 364.