

一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性

柯丽华 方 勤 蔡宜权

(中国科学院武汉病毒研究所)

提 要

从湖南邵阳地区患出血病的草鱼组织中分离到一株病毒,经部分提纯、负染后,电镜观察,揭示为双层衣壳、直径约 71nm 的球形颗粒。其核酸在聚丙烯酰胺凝胶电泳中呈现 11 条带。经核酸酶消化、吡啶橙染色及核酸的变性试验,证明为双链 RNA。病毒在草鱼肾细胞株(CIK)单层细胞上,形成直径约 2mm 的空斑;对温度有一定稳定性;对乙醚、氯仿不敏感;经 pH3、10 处理后仍能保持相对稳定的滴价。此病毒不属业已建立的呼肠孤病毒科 6 个属中的任何一个属,而可能为呼肠孤病毒科中一新成员。

关键词 草鱼出血病病毒,形态结构,基因组,空斑,理化,因素影响

鱼类病毒学是病毒学中较为年轻的一个领域。自 1960 年, Wolf 从鳟鱼(trout)分离病毒^[1,2]以来,迄今发现的鱼类病毒已超过 50 余种^[3,4],分别在病毒的形态学、生物学、生物化学及分子生物学等方面进行过研究。我国对鱼类病毒的研究起步较晚,1978 年以后才开始有关草鱼出血病病毒病原的报道^[1,2]。1983 年,我实验室首次从草鱼出血病病鱼组织中分离到一株病毒^[3],并对此病毒的精细结构^[4]和核酸特征^[5]进行了研究,定名为鱼呼肠孤病毒。不久为另一报道^[7]所证实。近年来,我们又分离了几个毒株,并已进行组织培养(另文报道)。本文仅报道湖南邵阳株 GCHV₈₇₃ 在形态结构、基因组及其理化特性等方面的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 毒株与细胞

病毒(编号 GCHV₈₇₃)从湖南邵阳地区患出血病的草鱼组织中分离。取内脏经 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗后加入 10 mmol/L 的 HEPES (pH7.0) 制成 1:10 匀浆,滤纸过滤,滤液经 8 000r/min 离心 30 分钟,上清液按常量加双抗,过滤除菌后,置 4℃ 备用。

组织培养所用细胞为 CIK 细胞株^[6]。

(二) 病毒增殖与空斑试验

CIK 细胞培养于 MEM-10 (含 10% 小牛血清之 MEM) 培养液中,28℃ 培养至细胞基本铺满,用 GCHV₈₇₃ 感染,使病毒感染复数为 10—20PFU/ 细胞。待 CPE 十分明

草鱼出血病病鱼材料从湖南邵阳水产科学研究所获得。病毒粒子及核酸图谱照片得到本所技术室及本室吴云涛、王炜同志的大力协助,在此一并致谢。

1988 年 12 月 13 日收到。

显时收获。

空斑试验参照 Wolf 的方法^[5]并略加修改。0.1mL 10 倍稀释的病毒悬液于 28℃ 与已铺满的单层细胞(于 6cm 直径平皿)吸附 1 小时,然后加入 2mL 含 1% 低熔点琼脂糖的 MEM-2。待琼脂糖凝固后再加入 4mL MEM-2,置 28℃ 继续培养 2—3 天。倾去上层培养液,再用 10% 甲醛固定 10 分钟,倾去甲醛,以 1% 结晶紫染色。

(三) 理化因素对病毒的影响

病毒抗热能力的测量是将含病毒的培养液分别于 56℃ 水浴中保温 30 分钟、60 分钟及 70℃ 60 分钟,然后滴定效价,28℃ 保温为对照。

分别调整病毒悬液 pH 至 3、10 和 7,28℃ 下保温 30 分钟,滴定效价,以测定病毒对 pH 的稳定性。

对氯仿和乙醚的敏感性测定,分别将 1mL 氯仿、乙醚加入 2mL 病毒悬液,对照管则加入 0.85% NaCl,充分混匀 10 分钟后,低速离心,测定水相病毒效价。

(四) 病毒纯化

病毒感染的细胞裂解液,置 RPR-20-2 转头 (Hitachi), 15℃, 18 000 r/min 离心 3 小时,沉淀悬浮于少量 $1 \times \text{SSC}$ 缓冲液中 (0.015mol/L 的 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7$, 0.15mol/L NaCl pH7.4), 超声波处理 3 分钟后,加入等体积三氯三氟乙烷充分混匀,8 000 r/min 离心 20 分钟,水相经 18 000 r/min 3 小时及 8 000 r/min 20 分钟二次轮转的差异离心。

(五) 病毒核酸制备

纯化的病毒制备加入 SDS,蛋白酶 K,使其最终浓度分别为 2%、100—200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 65℃ 保温 1 小时左右,用等体积酚-氯仿(1:1)提取 3—4 次,氯仿-异戊醇(24:1)提取一次。经乙醇沉淀之核酸置低温下干燥。

(六) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

病毒核酸垂直板凝胶电泳,采用 Leammli 系统^[8]。凝胶浓度为 7%,凝胶板经溴化乙啶染色后,紫外灯下观察结果。

(七) 病毒核酸的鉴定

病毒核酸的核酸酶消化及吡啶橙染色,基本按前述方法^[5]进行。

核酸的变性试验: GCHV₈₇₃ 核酸溶液(约 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)置 100℃ 保温 15 分钟使之变性,立即转入冰浴冷却,室温下于分光光度计测量光密度,此样品在加热前的光密度为对照数值。

(八) 电子显微镜术

纯化的病毒悬浮于蒸馏水中,加 1 小滴悬液于碳膜覆盖的铜网上,用 2% 磷钨酸负染,在 JEM-100C 型电子显微镜下观察。

结 果

(一) 病毒粒子的形态结构

在电镜下观察到经负染的病毒颗粒,大小均一,呈 20 面体对称,近似球形(图 1a),直径约 71nm。具有双层衣壳,外层厚约 9nm,内层 5.2nm,外层衣壳上围绕着 20 个壳粒

(Capsomeres), 中空的颗粒是不完全病毒(图 1b), 从而示出髓腔部分, 直径在 42nm 左右。

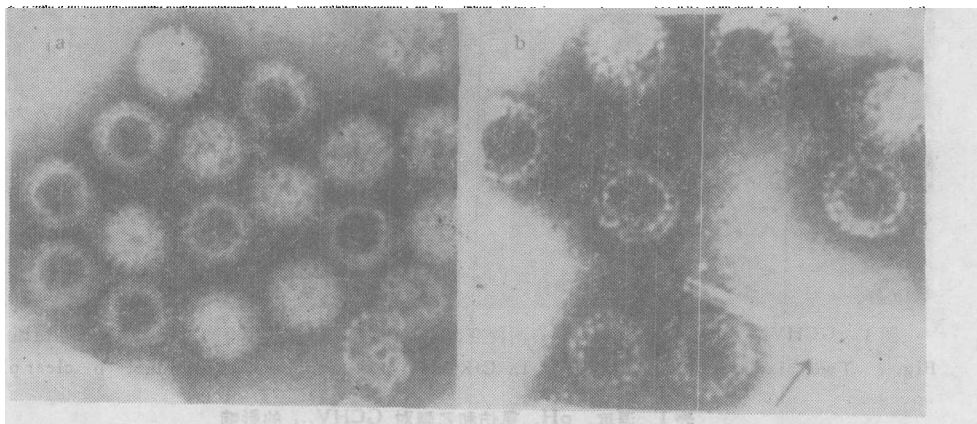


图 1 GCHV₈₇₃ 负染色照片 a $\times 153\,000$; b $\times 173\,000$; 箭头指示 TMV

Fig. 1 Electron micrographs of negatively stained virus GCHV₈₇₃. a $\times 153\,000$; b $\times 173\,000$; arrow shows TMV

(二) 空斑形成

接种于 CIK 单层细胞的病毒, 在双相系统中(凝胶-培养基), 28℃ 培养 24 小时, 出现直径 $< 1\text{mm}$ 的蚀斑, 然后逐渐向边缘扩展, 48—72 小时后, 直径约增至 2mm (图 2b)。有些空斑内保留有残存物 (图 3a), 而大多数为清晰透明的空斑 (图 3b), 未感染的细胞不出现空斑 (图 2a)。

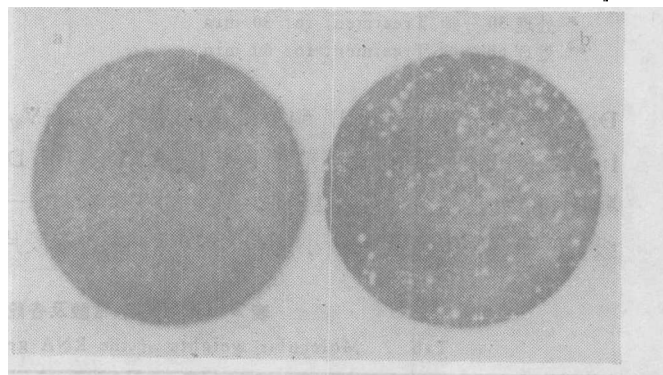


图 2 GCHV₈₇₃ 在 CIK 单层细胞形成的空斑: a 正常的 CIK 细胞; b 感染 GCHV₈₇₃ 的 CIK 细胞

Fig. 2 GCHV₈₇₃ plaque in CIK cells: a normal CIK cells; b infected CIK cells

(三) 理化特性

病毒悬液经 56℃ 半小时处理, 其 TCID_{50} 由 8.9×10^{10} mL 变成 5.9×10^{10} /mL, 而当时间延长至 1 小时, 效价降至 $1.78 \times$

10^8 /mL。70℃ 处理 1 小时, 病毒效价为 0 (表 1)。说明此病毒对温度有一定稳定性, 但其耐热范围约在 56℃ 30 分钟内。

从表 1 结果看出, 病毒对脂溶性的乙醚、氯仿不甚敏感, 处理后的病毒效价没有明显差异, 这种抗性有可能作为此病毒不存在含脂囊膜的证据。

pH3、10 处理也不能使病毒钝化, Winton 报道, pH3 处理大马哈鱼病毒 (CSV) 尚能使病毒效价略有提高^[10]。这些结果与病毒的双层蛋白质外壳结构相关。

(四) 病毒核酸分子量的测定

病毒核酸在 7% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 清晰地展示 11 条带 (图 4), 以 λ -

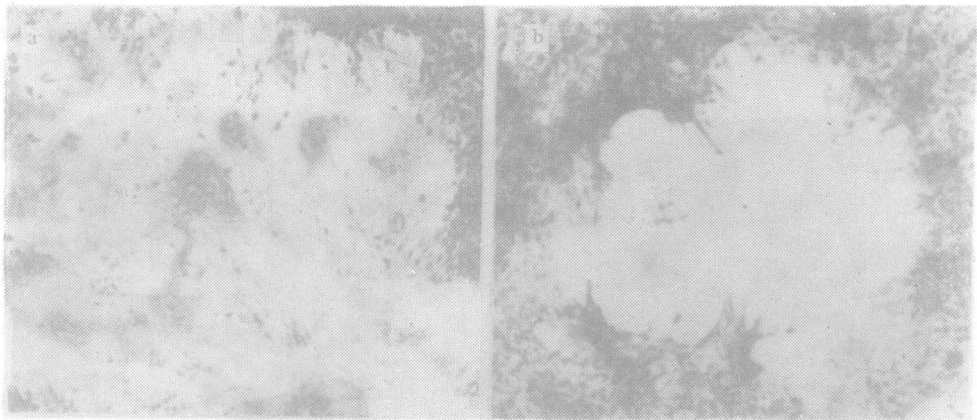


图3 .GCHV₈₇₃ 在 CIK 细胞中表现的两种空斑类型: a 保留有残存物的蚀斑; b·透明空斑
Fig. 3 Two plaque types of GCHV₈₇₃ in CIK cells: a plaque with residue; b clear plaque

表1 温度、pH、氯仿和乙醚对 GCHV₈₇₃ 的影响

Tab. 1 Effects of tempareture, pH, ether and chloroform on GCHV₈₇₃

处理 Treatment	对照 Control	氯仿 Chloroform	乙醚 Ether	56℃	70℃	pH3	pH10
效价 (Titer)	8.9×10 ¹⁰	3.05×10 ¹⁰	2.5×10 ¹⁰	*5.9×10 ¹⁰	0	3.5×10 ¹⁰	4.5×10 ¹⁰
TCID ₅₀ /ml				**1.78×10 ⁸			

* 处理 30 分钟 Treatment for 30 min
** 处理 60 分钟 Treatment for 60 min

DNA 的 EcoRI-HindIII 酶解片段计算出 GCHV₈₇₃ 基因组的分子量为 15.46 × 10⁶ Da-
lton, 这11个段片的大小范围是 3.1—0.55 × 10⁶ Dalton (表 2)。按电泳图谱上的大小
顺序,可大致划分为 4 个级别,最大的 3 个段片 1—3 为 I 级,4—6 为 II 级,7—9 为 III
级,第 IV 级包括两个最小的段片 10 和 11。各段片分子量见表 2。

表2 GCHV₈₇₃ 核酸及各段片分子量

Tab. 2 Molecular weights of the RNA genome segments of GCHV₈₇₃

片段 Segment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	总计 Total
分子量 Mol wt. × 10 ⁶	3.1	2.7	2.33	1.34	1.25	1.21	0.87	0.82	0.72	0.57	0.55	15.46

(五) 病毒核酸性质

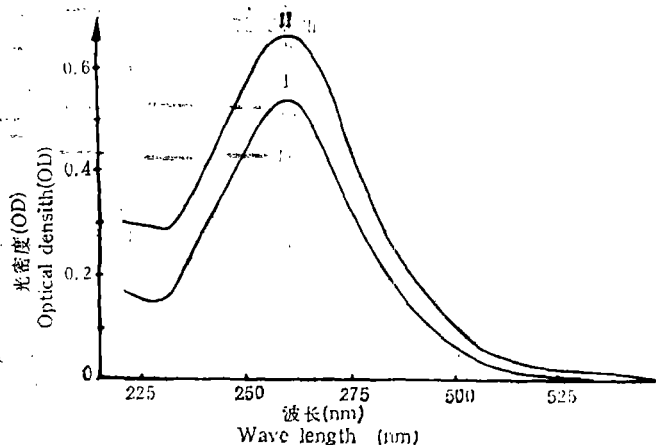
核酸酶消化及吡啶橙染色结果见表 3。

实验证明,病毒核酸只能被 RNase 消化而不为 DNase 酶解,属 RNA。此核酸加热
变性后,室温下测得光密度为 0.633,与变性前同等条件下的光密度 0.512 相比,其 OD 值
增加了 23.4% (图 5),符合双键完全解离的增色效应规律。同时从表 3 列出的吡啶橙染
色结果,GCHV₈₇₃ 核酸与 λ-DNA、CPV-RNA 均呈暗绿色,而 ϕX174-DNA 为火红
色。因此该病毒核酸为双链的核糖核酸。

表 3 GCHV₈₇₃ 和几种病毒核酸的 RNase 或 DNase 消化及吖啶橙染色Tab. 3 RNase or DNase treatment and acridine orange staining for GCHV₈₇₃ and several other viral nucleic acids

样品 Sample	核酸类型 Nucleic acid type	RNase	DNase	吖啶橙染色 Acridine orange staining
GCHV ₈₇₃ 核酸 Nucleic acid	dsRNA	+	-	暗绿 green
λ-DNA	dsDNA	-	+	暗绿 green
CPV-RNA	dsRNA	+	-	暗绿 green
φX174-DNA	dsDNA	-	+	火红 red

* + sensitive 降解; - resistant 不降解

图 4 GCHV₈₇₃ 核酸片段的 PAGE 图谱A GCHV₈₇₃ 核酸; B λ-DNA EcoRI+Hind III 酶解产物Fig. 4 PAGE pattern of the GCHV₈₇₃ genome fragmentsA GCHV₈₇₃ genome segments; B EcoRI + Hind III digestion products of λ-DNA图 5 GCHV₈₇₃ RNA 的增色效应

I 变性前吸收曲线; II 变性后吸收曲线

Fig. 5 Hyperchromic effect of the GCHV₈₇₃ nucleic acidI Absorption curve of the undegraded GCHV₈₇₃ RNAs;II Absorption curve of the degraded GCHV₈₇₃ RNAs

讨 论

经研究, GCHV₈₇₃ 粒子是由双层蛋白质外壳与核酸组成, 呈 20 面体对称; 无囊膜, 其基因组包含 11 个双股 RNA 段片等, 符合呼肠孤病毒科的主要特征^[9]。在段片数目上与轮状病毒属 (Genus *Rotavirus*) 相同, 但它们的电泳图谱却显示了显著差别。前者核酸

的 11 个段片按其图谱上的顺序, 第 I 级包含有 3 个段片 1—3, II 级 3 个, III 级 3 个, IV 级 2 个, 而后的第一级包含 4 个段片 1—4, II 级 2 个、III 级 3 个、IV 级 2 个(图 6)。因此, 从核酸的电泳图谱分析, GCHV₈₇₃ 有别于轮状病毒属。并且两者的形态也不尽相同, 而其他 5 个属的基因组则是由 10 或 12 个段片组成^[9], 在核酸段片数目上已不相同。Winton 报道过 4 种水生动物病毒(其中 3 种为鱼类病毒)的类似结果^[11]。本 GCHV₈₇₃ 可能不属于业已建立的 6 个属中的任何一个, 而可能是呼肠孤病毒科中的一新成员。

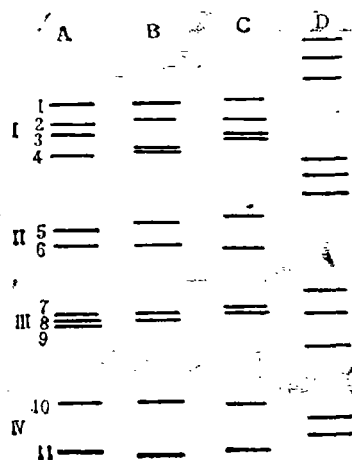


图 6 GCHV₈₇₃ 与几种轮状病毒核酸的 PAGE 模式图谱的比较

A 人轮状病毒 (strain D); B 猴轮状病毒 (SA11);

C 牛轮状病毒 (UK Calf); D 草鱼出血病病毒 (GCHV₈₇₃)

Fig. 6 Comparison between the PAGE patterns of GCHV₈₇₃ genome with several rotaviruses

A Human rotavirus (strain D); B Simian rotavirus (SA11);

C Calf rotavirus (UK calf); D Grass carp hemorrhage virus GCHV₈₇₃)

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所第三研究室病毒组, 1978。草鱼出血病病原的研究。水生生物学集刊, 6(3): 321—329。
- [2] 中国科学院水生生物研究所第三研究室病毒组、武汉大学病毒研究所电镜室, 1980。草鱼出血病病原研究 II 电镜观察。水生生物学集刊, 7(1): 75—80。
- [3] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所, 1983。草鱼出血病病毒的电镜显微观察初报。淡水渔业, (3): 39。
- [4] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所, 1984。草鱼出血病病毒精细结构的研究。淡水渔业, (2): 21—22。
- [5] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所, 1984。草鱼出血病病原——鱼呼肠孤病毒 (FRV) 核酸特性的研究。淡水渔业, (4): 7—9。
- [6] 左文功、钱华鑫、许映芳、杜森英、杨光乐, 1984。草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立。淡水渔业, (2): 38—39。
- [7] 陈燕桑、江育林, 1983。草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究。科学通报 28: 1138—1140。
- [8] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London*. 227: 680—685。
- [9] Matthews, R. F. F. 1982. Classification and Nomenclature of Viruses. *Intervirology*, 17: 81—86。
- [10] Winton, J. R., Lannan, C. N., Fryer, J. L. & Kimuar, T. 1981. Isolation of a new reovirus from chum sal-

- mon in Japan. *Fish Pathology*, 15: 155—162.
- [11] Winton, J. R., Lannan, C. N., Fryer, J. L., Hedrick, R. P., Meyers, T. R., Plumb, J. A. and Yamamoto, T., 1987. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of Reoviruses isolated from aquatic animals. *J. Gen. Virol.*, 68: 353—364.
- [12] Wolf, K., Snieszko, S. F., Dunbar, C. E. and Pyle, E., 1980. Virus nature of infections pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104: 105—108.
- [13] Wolf, K. & Mann, J. A., 1980. Poikilotherm vertebrate cell line and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*, 16: 168—179.
- [14] Wolf, K., 1984. Fish Viruses: their biology, classification, hosts, pathology and control. In *Control of Virus Diseases*, pp. 197—215. Edited by E. Kurstak & R. G. Marusyk: Marcel Dekker.
- [15] Wolf, K. & Darlington, R. W., 1971. Channel catfish virus: a new herpesvirus of ictalurid fish. *J. Virol.*, 8: 525—533.

CHARACTERISTICS OF A NOVEL ISOLATE OF GRASS CARP HEMORRHAGIC VIRUS

Ke Lihua Fang Qin and Cai Yiquan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica)

Abstract

A virus isolated from hemorrhagic grass carp at Shao Yang County, Hunan Province revealed icosahedral particles of approximately 71 nm in diameter with a double capsid under electron microscopic observations. Polyacrylamide gel electrophoresis showed that the viral genome was composed of 11 segments of dsRNA. This was proved by RNase or DNase treatment and acridine orange staining as well as nucleic acid denaturing assay. The virus replicated well in the CIK cell line, forming plaques approximately 2 mm in diameter in monolayer culture. It was ether and chloroform resistant, stable at pH 3,7 and 10, and at a temperature of 56°C for 30 min. This virus is distinct from any of the Min Jiang, Chang Jiang, Yellow River, and may be a novel member of this family.

Key words

Grass carp hemorrhage virus, Genome, Plaque, Morphological structure, Physical, Chemical effects