

# 用逆转录聚合酶链式反应检测草鱼 出血病病毒的研究\*

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

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

<sup>†</sup>(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

**提要** 于1994年5月—1995年7月, 根据已克隆的草鱼出血病病毒 GCHV-861 株 cDNA 的部分序列, 设计合成了两对 PCR 引物, 采用 RT-PCR 技术对 GCHV-861 及 GCHV-873 两病毒株的 dsRNA 进行扩增。结果表明, 两对引物仅能特异地检测出 GCHV-861 病毒株核酸的存在, 而不能对 GCHV-873 病毒株的核酸进行特异扩增, 该方法最小可检测出 0.1pg 纯化的 GCHV-861 病毒 dsRNA; 采用该方法对 GCHV-861 人工感染的草鱼和稀有鮰鲫组织进行 RT-PCR 检测, 不仅能检测到发病期显症病鱼中 GCHV-861 病毒的存在, 还能检测发病前期及愈后无出血病症状的病毒携带者中病毒的存在; 利用该方法还从本所关桥实验场出血病流行季节收集的发病草鱼体内检测出 GCHV 的存在, 说明所设计的引物具有一定的实际意义; 利用该法还能检测出感染病毒的组织培养细胞系 GCK 和 CIK 上清液中 GCHV 的存在。还建立了简易的模板制备方法, 采用该方法整个检测过程只需 3—4h, 可大大缩短检测时间。由此可见, RT-PCR 技术是检测 GCHV 的快速、灵敏而特异的方法, 发展和完善该技术对草鱼出血病的早期诊断和防治、抗病育种具有重要意义。

**关键词** 草鱼出血病病毒 病毒检测 逆转录 聚合酶链反应

草鱼出血病病毒(GCHV)是我国分离成功的第一种鱼类病毒(陈燕新等, 1983), 属呼肠孤病毒科(中国科学院水生生物研究所, 1978; 陈燕新等, 1983; 柯丽华等, 1990)。该病毒引起草鱼鱼种阶段发生出血病, 死亡率高达90%以上。为了有效地防治该病, 必须建立一种灵敏而特异的检测 GCHV 的方法。作者等于1992年开展了 GCHV 基因克隆的研究, 获得了 GCHV-861 株部分 cDNA 序列(Wang et al., 1994)。本研究是在此基础上设计了两对 PCR 引物, 应用 RT-PCR 技术对 GCHV-861 毒株人工感染的草鱼、稀有鮰鲫等实验鱼和培养细胞, 以及自然发病的出血病草鱼等进行了检测, 以

\* 国家“八五”攻关课题, 857220902号。由淡水生态与生物技术国家重点实验室和 International foundation for science 部分资助, A/2200-1号。王铁辉, 男, 出生于1964年4月, 硕士, 助研。

青岛海洋大学徐怀恕教授阅读全文并帮助修改, 谨致谢忱。

收稿日期: 1995年12月14日, 接受日期: 1996年7月20日。

期建立一种更加快速、特异且敏感性强的草鱼出血病病毒的检测方法, 便于生产实践中草鱼出血病的早期诊断和防治, 并为进一步的抗病育种工作提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

GCHV-861 病毒株由王铁辉等(1994)分离, GCHV-873 毒株由柯丽华等(1990)分离。GCK 细胞系(草鱼肾细胞系)由本所建立(邓初夏等, 1985), CIK 细胞系(草鱼肾脏细胞系)来自中国水产科学院长江水产研究所(左文功等, 1984)。细胞传代、病毒感染均按常规方法(王铁辉等, 1994)进行。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼种(5-10cm)及稀有鮰鲫(*Gobiocypris rarus*)(3-5cm)由本实验室繁殖和饲养; 红鲫(*Carassius acwatus*, red var.)、鲤(*Cyprinus carpio*)、团头鲂(*Megabobrama amblycephala*), 来自本所关桥实验场; 泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)购自水果湖集贸市场; 斑节对虾杆状病毒(MBV)由本所江育林提供。

自然发病鱼于1996年春季草鱼发生出血病时, 从本所关桥实验场收集, 解剖检查, 将显症出血病鱼整尾保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

### 1.2 主要试剂

AMV 逆转录酶、dNTPs 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。

### 1.3 引物

两对特异引物 PS6(5'-AGTTC TCAAA GCTGA GACAG-3' 和 5'-ACGTG CGATT GGAAG AGCTT-3') 和 PS9 (5'-ACATC TACTG TGCTT CACCT-3' 和 5'-TAGTG TGTC A ATAGC GTCCA-3') 是根据已克隆的 GCHV-861 株基因组第 6 和第 9 片段的部分 cDNA 序列(Wang et al., 1994)设计的, 由中国科学院微生物研究所合成。其产物预计分别为 320bp 和 223bp。

### 1.4 核酸提取

**1.4.1 鱼、蟹等组织细胞 DNA 的提取** 按照常规方法(萨姆布鲁克等, 1995)提取, 溶于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH=7.6, 1mmol/L EDTA, pH=8.0)中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.4.2 病毒感染细胞** 取病毒感染细胞培养上清液 400 $\mu\text{l}$ , 加入 N-十二烷基肌氨酸钠(0.5%)和蛋白酶 K(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $55^{\circ}\text{C}$  保温 1h, 用饱和酚、酚/氯仿/异丙醇各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 用 70% 及 100% 乙醇各洗一次, 溶解于适量双蒸水中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.4.3 病鱼组织** 取 0.1g 病鱼组织, 加 1ml STE(50 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA)匀浆,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融 3 次, 以 12 000r/min 离心 10min, 取上清液制备病毒核酸样品, 步骤同上。

**1.4.4 RT-PCR 模板的快速制备** 取病鱼组织匀浆上清液(感染病毒的培养细胞裂解液) 400 $\mu\text{l}$ , 加等体积的苯酚: 氯仿(1:1)抽提 1 次, 离心取上清, 再加等体积乙醚, 抽提, 离心, 取下层水相, 置通风橱内 10min 使残存乙醚挥发尽, 即得所需样品。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

**1.5.1 cDNA 合成** 13 $\mu$ l 模板(溶于双蒸水中)煮沸 5min 变性, 加入 7 $\mu$ l 逆转录混合物, 各成分终浓度分别为 Tris-HCl, 50mmol/L, pH=8.3; MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L; KCl, 50mmol/L; DTT, 10mmol/L; 亚精胺, 0.5mmol/L; dNTPs, 1mmol/L; 引物, 1 $\mu$ mol/L; AMV 逆转录酶, 8U。于 42 $^{\circ}$ C, 反应 1h。

**1.5.2 PCR 扩增** 在 50 $\mu$ l 反应体系中, 加 5 $\mu$ l cDNA 产物, 各成分的终浓度为 Tris-HCl (pH=8.3), 10mmol/L; MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L; KCl, 50mmol/L; Tween-20, 0.01%; NP-40, 0.01%; dNTPs, 0.2mmol/L; 引物, 0.2 $\mu$ mol/L; Taq DNA 多聚酶, 1—2U。在 MJ-150 扩增仪中, 按以下条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C, 30s; 56 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min 反应 30 个周期, 继续在 72 $^{\circ}$ C 保温 5min 结束反应。

**1.5.3 扩增产物的分析** 取 5—10 $\mu$ l 扩增产物, 用 1.5% 的琼脂凝胶电泳(TBE 系统), 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察。

## 1.6 灵敏度和特异性实验

分别用 0.01, 0.1, 1, 10, 100 和 1 000pg 等不同量纯化的 GCHV-861 毒株的基因组 dsRNA 为模板, 用 PS6 引物进行 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析, 测试其灵敏度。

分别以 GCHV-861 和 GCHV-873 毒株的 cDNA 为模板, 以草鱼、稀有鮎鲫、红鲫、鲤、团头鲂、泥鳅和中华绒螯蟹基因组 DNA 以及 MBV 的 DNA 为对照, 用双引物 PS6+PS9 进行 RT-PCR 扩增, 测试其特异性。

## 1.7 人工感染实验

以 GCHV-861 株和 GCHV-873 株病毒悬液, 腹腔注射感染 1 龄草鱼种和稀有鮎鲫, 0.4ml/尾, 同时设注射无菌水的对照, 分别饲养于 28 $^{\circ}$ C 的恒温水箱中。在感染后 1—23d 随机取样, 解剖取各组织, 应用 RT-PCR 技术进行检测。

## 2 结果

### 2.1 对 GCHV-861 株的 RT-PCR 扩增结果

用纯化的 GCHV-861 病毒的 dsRNA 合成的 cDNA, 以引物 PS6 和 PS9 对其扩增, 结果表明, 分别扩增出 320bp 和 223bp 两条特异带, 与预期的大小一致; 阴性对照没有特异扩增产物(图版 I: 1)。以 GCHV-873 基因组合成的 cDNA 和草鱼、红鲫、鲤、团头鲂、稀有鮎鲫等基因组 DNA 及斑节对虾杆状病毒 DNA 作模板, 在相应位置均无特异扩增带(图版 I: 3)。表明所设计的两对引物能特异地检测 GCHV-861 的存在。

分别用 0.01—1 000pg 等不同量纯化的 GCHV-861 株病毒核酸为模板进行 RTPCR 扩增, 结果表明, 1 000—0.1pg 均能扩增出特异带, 而 0.01pg 则看不到特异带, 说明本研究建立的方法最小可以检测 0.1pg 的病毒核酸。另外, 随模板浓度的增大, 非特异扩增产物逐渐增强(图版 I: 2)。

### 2.2 对人工感染病鱼的 RT-PCR 检测结果

GCHV-861 株病毒人工感染草鱼鱼种, 在 3—7d 内出现典型的出血病症状并发生死亡, 7d 之后仍存活的草鱼种, 以后未见死亡, 外表逐渐恢复正常。分别在发病前期、发病期及发病后期取样进行 RT-PCR 检测, 结果表明, 发病前期和发病期的所有样品均能检测到 GCHV 的存在; 在人工感染后第 23d 的 5 尾存活鱼中, 有 4 尾检测到

GCHV 的存在。(表 1) GCHV-873 株人工感染草鱼种, 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。

以 GCHV-861 和 GCHV-873 毒株人工感染稀有鮰鲫, 并对感染鱼进行 RTPCR 检测, 也获得和草鱼相同的结果。

### 2.3 对自然发病草鱼的 RT-PCR 检测结果

对从本所关桥实验场收集的出血病草鱼进行 RT-PCR 检测, 也得到阳性结果。

### 2.4 对 GCHV-861 感染细胞的 RT-PCR 检测结果

GCHV-861 株感染 GCK 和 CIK 细胞, 连续传至第十代也未能观察到明显的 CPE (细胞病变效应)。运用 RT-PCR 扩增技术, 对传至第四代以后的感染细胞上清液进行检测, 均能特异地检测到 GCHV-861 的存在。

表 1 GCHV-861 株人工感染草鱼的 RT-PCR 检测结果

Tab.1 Detection results of RT-PCR in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) after artificial infected by GCHV-861

项 目	发病前期 (1—3d)			发病期 (4—7d)	发病后期 (8d—)	对 照
	第 1d	第 2d	第 3d	第 4—7d	第 23d	
取样时间	第 1d	第 2d	第 3d	第 4—7d	第 23d	第 1—23d
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

## 3 讨论与结论

目前国内已报道了多个草鱼出血病病毒的分离株(中国科学院水生生物研究所, 1978; 陈燕新等, 1983; 柯丽华等, 1990; 王铁辉等, 1994), 但对各病毒株的核酸、蛋白电泳图谱、对鱼体的致病性、感染细胞 CPE 的出现、免疫相关性等还没有系统的研究。对 GCHV 基因克隆的工作也刚刚起步(Wang et al., 1994)。作者等对 GCHV-861 和 GCHV-873 两病毒株进行了比较研究, 结果表明, GCHV-861 株与 GCHV-873 株在核酸、蛋白电泳图谱、对鱼体的致病力以及感染细胞时 CPE 的出现等有较大差异(其结果拟另文报道)。GCHV-861 株感染草鱼和稀有鮰鲫, 发病鱼死亡率高达 100%(王铁辉等, 1994), 而感染 GCK 和 CIK 细胞未能观察到 CPE, 运用 RT-PCR 技术却能从传代的感染细胞上清液中检测出病毒的存在, 说明 GCHV-861 确能在 GCK 和 CIK 细胞系中增殖和传代; 相反, GCHV-873 对鱼体的致病力很弱, 而感染细胞出现典型的 CPE。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尚有待于进一步研究。

作者等根据已获得的 GCHV-861 株部分 cDNA 序列设计的两对引物, 对 GCHV-

861 和 GCHV-873 株进行了检测, 结果表明这两对引物仅对检测 GCHV-861 株有较好的特异性, 对 GCHV-873 的检测没有特异扩增产物, 说明两者在扩增片段上没有同源序列。另外, 本文所建立的 RT-PCR 方法最小可以检测到 0.1pg 纯化的病毒核酸, 与国外报道的 RT-PCR 技术检测 dsRNA 病毒的灵敏度一致(Lopez-lastra et al., 1994)。

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的病毒, 而且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, 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。如能用于对外来鱼类进行检疫, 则能防止带入外来病毒, 减少经济损失。

以本文设计的引物, 还能特异地检测草鱼出血病自然发病流行株(分离自本所关桥实验场)中的病毒, 说明流行株病毒在扩增片段上与 GCHV-861 株存在同源序列, 该技术对草鱼出血病的检测具有一定的实际意义, 能否应用于 GCHV 其它流行株的检测尚需进一步验证。由于草鱼出血病给水产养殖业造成巨大损失, 有必要对 GCHV 不同分离株进行系统的比较研究, 在获得 GCHV 不同株核酸序列的基础上, 设计适应性更好的引物, 以建立适应性更广的 RT-PCR 检测技术, 对草鱼出血病进行早期诊断, 为出血病的防治提供依据; 并为抗病毒个体的鉴定打下基础。

另外, 本文所建立的简易模板制备方法, 利用一步酚 / 氯仿抽提去蛋白, 然后用易挥发的乙醚消除残留的酚 / 氯仿, 省略和取代了常规的蛋白酶 K 消化及乙醇沉淀方法, 结果与常规法同样稳定、可靠。该方法不仅大大缩短了样品制备时间, 而且当检测微量标本时, 由于减少了中间环节, 从而可减少样品丢失, 还可减少理化因素破坏模板 dsRNA 完整性的可能性以及外界污染的机会。另一方面, 该方法简易、快速, 更适合大批样本的 RT-PCR 检测。

### 参 考 文 献

- 中国科学院水生生物研究所, 1978. 水生生物学集刊, 6(3): 321 — 329.
- 王铁辉等, 1994. 水生生物学报, 18(2): 144 — 149.
- 邓初夏等, 1985. 水生生物学报, 9(4): 351 — 358.
- 左文功等, 1984. 淡水渔业, 2: 38 — 39.
- 陈燕新, 江育林, 1983. 科学通报, 28: 1 138 — 1 140.
- 柯丽华等, 1990. 水生生物学报, 14(2): 153 — 159.
- 萨姆布鲁克等, J., 1995. 分子克隆 - 实验指南(第二版), 科学出版社(北京), 464.
- Lopez-Lastra M. et al., 1994. *J. Fish Dis.*, 17: 269 — 282.
- Wang Tiehui et al., 1994. Annual Report of Freshwater Ecology and Biotechnology Laboratory, Sciences Press (Beijing). pp.153 — 156.

## DETECTION OF HEMORRHAGIC VIRUS OF GRASS CARP BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION

Wang Tiehui, Li Jun, Yi Yonglan, Zhou Liran<sup>†</sup>, Liu Hanqin, Lu Renhou, Chen Hongxi

(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

<sup>†</sup>(*School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072*)

**Abstract** A rapid, sensitive and highly specific detection method for grass carp hemorrhagic virus (GCHV) based on reverse transcription-polymerase chain reaction was developed after a May 1995 — July 1996 research. Two pairs of PCR primers were synthesized according to the cloned cDNA sequences of the GCHV-861 strain. For each primer combination only one specific major product was obtained when amplification was performed by using the genomic dsRNA of GCHV-861 strain. The length of their expected products were 320 bp and 223 bp, respectively. No products were obtained when genomic nucleic acids other than GCHV-861 genomic dsRNA were used as RT-PCR templates. To assess the sensitivity of the method, dilutions of purified GCHV-861 genomic dsRNA (0.01pg — 1 000pg) were amplified and quantities of as little as 0.1pg of purified dsRNA were detected when the amplification product was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

After about one-year-old grass carp (*Ctenopharyngodon idell*), and 3 — 5cm rare minnow (*Gobiocypris rarus*), were artificially infected with GCHV-861 and GCHV-873 suspensions by the hyperosmotic immersion method, most of the fishes infected by GCHV-861 were dead during the 3rd — 7th day, 7 days later, no fish died. None was dead in the other group infected by GCHV-873. GCHV-861 strain could be detected not only in the diseased fishes with typical syndromes at developing period, but also in the carriers without any hemorrhage symptoms at pre- or post developing period. The virus could also be detected in the naturally diseased grass carp with hemorrhage symptoms collected from Guanqiao Fisheries Farm of our institute in 1996. GCHV-861 could also infect GCK and CIK cell cultures *in vitro* and could be detected from the fluids of their subcultures.

A simple, rapid and reliable dsRNA templates preparation method was developed. It was very suitable for detecting mass or very little samples, and the whole procedure could be finished within 3 — 4hs.

All the results show that the RT-PCR amplification method is a rapid, sensitive and highly specific method for detection of GCHV, and is of significant importance for early diagnosis, prophylaxis and treatment of hemorrhage of grass carp and GCHV-resistant breeding.

**Key words** Hemorrhagic virus of grass carp (GCHV) Virus detection Reverse transcription Polymerase chain reaction