

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170712001

http://www.yykxjz.cn/

吴明林, 李海洋, 江河, 何吉祥, 侯冠军, 蒋阳阳. 草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组特征及进化分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 36-43

Wu ML, Li HY, Jiang H, He JX, Hou GJ, Jiang YY. Genomic characterization and phylogenetic analysis of grass carp reovirus AH528 strain. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 36-43

草鱼呼肠孤病毒 AH528 株全基因组 特征及进化分析*

吴明林 李海洋 江 河 何吉祥^① 侯冠军 蒋阳阳

(安徽省农业科学院水产研究所 合肥 230031)

摘要 草鱼出血病是由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)引起的严重危害 1~2 龄草鱼的一种传染性疾病。本研究从安徽合肥地区患典型草鱼出血病的病鱼组织中分离到 1 株新的 GCRV 致病株, 暂命名为 GCRV-AH528。鱼体人工感染实验结果显示, 实验鱼出现典型的出血病症状: 体背发黑, 鳍基部、腹部、口腔、鳃丝、肠道充血发红。全基因组特征分析显示, GCRV-AH528 由 11 个双链 RNA 节段组成, 节段大小在 1027~3925 bp 之间, AT 平均含量为 50.2%, GC 平均含量为 49.8%。与其他 GCRV II 型毒株相比, L1 节段在 701~702 位置缺少 3 个核苷酸(TAT), 少编码 1 个酪氨酸; M4 节段出现突变, 含 2 个开放阅读框, 编码 2 个非结构蛋白 NS9 和 NS69。所有节段两端均含有 6 bp 保守的末端核苷酸序列 5'-GUAA^U/cU···U^U/gCAUC-3'; 另除 L1、M6 节段外, 其余 9 个节段均在编码区两侧发现 5~9 bp 的颠倒互补序列。GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒核苷酸平均相似度在 37.1%~98.1%之间; 编码蛋白平均相似度在 24.3%~98.3%之间。基于 VP1 蛋白的聚类分析结果显示, 该病毒属于水生呼肠孤病毒属, 在氨基酸水平上与典型株 GCRV-873 株的进化关系较远。本研究结果表明, 该毒株为一株新的草鱼呼肠孤病毒 II 型致病株。

关键词 草鱼出血病; 草鱼呼肠孤病毒; VP1 蛋白; 水生呼肠孤病毒

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0036-08

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国淡水养殖的主要品种之一, 除西藏、青海零星养殖外, 在我国各地均有较大规模的养殖。中国渔业统计年鉴显示, 2015 年我国淡水鱼类养殖产量为 3062.27 万 t, 其中, 草鱼的养殖产量为 567.62 万 t, 为我国所有养殖鱼类之首(农业部渔业渔政管理局, 2016)。草鱼养殖为保

障我国农产品市场供给和人民生活水平的提高做出了重要贡献。然而, 草鱼也是水产养殖动物中病害最为多发的一种鱼类, 主要病害包括草鱼出血病、肠炎病、赤皮病、烂鳃病等(程文超等, 2016)。在感染草鱼的所有病原中, 由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)感染引起的草鱼出血病是草鱼养殖

* 安徽省农业科学院学科建设项目(17A0515)、现代农业产业技术体系(CARS-46)、国家星火计划项目(2015GA710004)和安徽省农业科学院科技创新团队(13C0506)共同资助 [This work was supported by the Subjects Construction Fund of Anhui Academy of Agricultural Sciences (17A0515), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46), China Spark Program (2015GA710004), and the Scientific and Technological Innovation Fund of Anhui Academy of Agricultural Sciences (13C0506)]. 吴明林, E-mail: flyinghu2017@qq.com

^① 通讯作者: 何吉祥, 副研究员, E-mail: flyinghu2008@foxmail.com

收稿日期: 2017-07-12, 收修改稿日期: 2017-07-27

中最为常见的疾病,成为我国淡水水产养殖中最为突出的问题之一,于 2008 年被农业部规定为水生动物二类疫病。据不完全统计,我国每年由草鱼出血病导致的经济损失在 10 亿元以上(Liang *et al.*, 2014; Rodger, 2016)。

GCRV 是中国分离的第一种鱼类病毒,属于呼肠孤病毒科、水生呼肠孤病毒属,其变异性强,不同地区存在不同的毒株(Fan *et al.*, 2013; 郝贵杰等, 2011; 刘永奎等, 2011)。GCRV 毒株的地域差异性给该病的防治带来巨大困难。不同分离株在毒力水平、细胞培养特性、免疫抗原性和对草鱼的致病力等方面都具有较大的差异性(Fan *et al.*, 2013; 柯丽华等, 1990; 张超等, 2010)。GCRV 不同分离株的基因组均由 11 个节段组成,按分子量大小可分为 3 组,即较大节段(L1、L2 和 L3)、中等节段(M4、M5 和 M6)和较小节段(S7、S8、S9、S10 和 S11)(张超等, 2010)。研究表明,分节段的双链 RNA 病毒,易于发生抗原变异及遗传变异(Jiang, 2009; 黄毅昌等, 2016)。根据现有的分离株序列信息进行核苷酸序列与氨基酸序列比对以及构建系统进化树分析, GCRV 至少存在 3 种基因型,按照基因序列差异分为 I 型(代表株 GCRV-873)、II 型(代表株 GCRV HZ08)和 III 型(代表株 GCRV104)(Wang *et al.*, 2012)。

本研究通过对采集自安徽合肥的发病草鱼样品进行病毒分离纯化,获得 1 株 GCRV 致病株,暂定名为 GCRV-AH528。通过人工感染实验、核酸分析、序列测定、进化分析等方法对该毒株进行研究,解析草鱼出血病的分子流行病学特征,为该病害的防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Trizol、*Taq* DNA 聚合酶、pMD™18-T Vector、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;青霉素、链霉素购自碧云天;T4 RNA ligase 购自 Promega 公司;引物、琼脂粉、LB 培养基购自生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 TIANGEN;PCR 仪为 ABI Veriti 96 孔;超微量分光光度计为 Quawell Q5000。

1.2 样品的采集与处理

发病草鱼采集自安徽合肥,临床症状表现为鱼体变黑,鳍基部、鳃盖、鳃丝、眼眶、口腔和肠道充血发红,肛门红肿。收集病鱼的肝、肾、脾和肠组织,

用无菌剪刀剪碎,加入 10 倍体积含双抗(100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)。在冰浴下研磨成组织匀浆液,将组织匀浆液转移至 50 ml 离心管中,在-80℃冷冻后于室温再融化,反复冻融 3 次。随后在 4℃、8000 r/min 离心 30 min,上清液经 0.22 μm 滤器除菌后,置于-80℃保存备用。

1.3 人工感染实验

将体重为(100±20) g 的健康草鱼随机分成 2 组,每组 30 尾。实验鱼饲养水温保持在(28±1)℃,每天投喂 3 次,投喂量占鱼体重的 3%~4%。实验组通过腹鳍注射上述制备的病料组织悬液(0.5 ml/尾),对照组注射等量的 PBS。

1.4 病毒细胞培养

草鱼肾脏组织细胞系(CIK)在塑料培养瓶中传代培养,至细胞长成单层后,吸出培养基。每瓶接种 0.5 ml 病毒悬液,28℃吸附 1 h,每隔 15~20 min 轻微晃动培养瓶以便均匀吸附。吸附结束后,吸出多余的组织匀浆滤液,加入含 2%血清的 DMEM 细胞培养基,显微镜下观察细胞增殖情况。病毒传代时,将病毒细胞培养物反复冻融 2 次,继续按上述接种方法传代培养。病样组织匀浆液接种 CIK 后,连续观察 7 d,没有出现明显的细胞病变(CPE),盲传至第 8 代,连续观察仍未出现明显的 CPE。

1.5 病毒基因组提纯与克隆

将含病毒的细胞培养物,-80℃至室温反复冻融 2 次,4℃、4000 r/min 离心 30 min,上清液 0.22 μm 滤器过滤,滤液 20000 r/min、4℃离心 2 h,弃上清液,沉淀用超纯水重悬后提纯病毒(Qiu *et al.*, 2001)。Trizol 法提取病毒 RNA 后,采用加接头引物的 RT-PCR 法扩增病毒基因组节段(Attoui *et al.*, 2000)。首先在核酸的 3'端连接接头引物 A(5'-PO₄-AGGTC-TCGTAGACCGTGCACC-NH₂-3'),然后利用 A 的互补引物 B(5'-GGTGCACGGTCTACGAGACCT-3')反转录,最后利用 B 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶回收后,与 pMD™18-T 载体连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5α,挑选阳性克隆委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 序列分析

应用 Lasergene 数据包中的 SeqMan 程序对核苷酸序列进行拼接(Burland, 1999);使用 NCBI 的 ORFfinder 推测开放阅读框(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);用 ExPASy 在线完成蛋白质理化特性分析

(<http://web.expasy.org/protparam/>)。使用 Motif Scan 进行蛋白基序的分析(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)；用蛋白质分析软件 Antheplot 中的 GOR I method 对蛋白序列进行二级结构预测(Deléage *et al*, 2001)。应用 Lasergene 数据包 MegAlign 模块中的 ClustalW 对呼肠孤病毒核苷酸及其氨基酸序列进行同源性分析(Burland, 1999)。根据 Neighbor-Joining(NJ)法, 用 MEGA 软件构建进化树(Tamura *et al*, 2013)。

2 结果

2.1 人工感染实验

人工感染实验结果表明, GCRV-AH528 对草鱼具有较强的毒力。草鱼被攻毒后, 出现典型的出血病症状: 体色发黑, 鳍基部、腹部、口腔、鳃丝和肠道充血发红(图 1)。

2.2 GCRV-AH528 全基因组序列特征

GCRV-AH528 全基因组由 11 个双链 RNA 组成, 核苷酸序列长度在 1027~3925 bp 之间(登录号: KR180368-KR180378), 序列两端含保守的核苷酸序列 5'-GUAA^U/_CU...U^U/_GCAUC-3'。GCRV-AH528 的

11 个节段 AT 含量为 48.42%~54.23%, 平均 AT 含量为 50.20%; GC 含量为 45.77%~51.58%, 平均 GC 含量为 49.80%, AT 含量略大于 GC 含量。进一步比较分析发现, 除 L1、M6 节段外, 其他 9 个节段均在编码区两侧发现 5~9 bp 的颠倒互补序列(表 1)。所有节段中, M4 节段含有 2 个终止密码子, 编码 2 个蛋白, 其余 10 个节段均编码 1 个蛋白。

2.3 L 组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 L1 节段全长 3925 bp, 编码 1 个含 1293 个氨基酸的 VP1 结构蛋白, 该蛋白与鸟苷酸转移酶/甲基转移酶同源, 属于呼肠孤病毒 L2 超家族。GCRV-AH528 L1 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 37.1%~98.6%、24.2%~98.6%。

GCRV-AH528 L2 节段全长 3867 bp, 编码 1 个含 1272 个氨基酸的 VP2 结构蛋白, 该蛋白为 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)。GCRV-AH528 L2 具有呼肠孤病毒科 RdRp 的 3 个保守基序: motif I (IKACDASITPD YFLS) 位于 591~605 氨基酸; motif II (SG) 位于 687~688 氨基酸; motif III (GDD) 位于 738~740 氨基酸。GCRV-AH528 L2 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 46.2%~98.5%、43.3%~98.2%。



图 1 草鱼出血病典型症状

Fig.1 The typical symptoms of grass carp hemorrhage disease

A: 体色发黑; B: 腹部出血; C: 口腔充血; D: 鳃丝红肿; E: 肠道出血

A: Blackened dorsum; B: Abdominal bleeding; C: Oral cavity hyperemia; D: Red and swollen gill; E: Intestine hemorrhage

表 1 GCRV-AH528 全基因组序列特征
Tab.1 Characteristics of GCRV-AH528 genome segments

节段 Segment	长度 Length (bp)	非编码区 Non-coding region (bp)		保守末端序列 Conserved terminal sequence	颠倒互补序列 Inverted complementary sequence	登录号 GenBank No.
		5'	3'			
L1	3925	17	26	5'-GUAACU UUCAUC-3'		KR180368
L2	3867	15	33	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-CUGAU AUCAG-3'	KR180369
L3	3753	15	39	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGTGC GCACA-3'	KR180370
M4	2265	24	89	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGAGC GCUCA-3'	KR180371
M5	2230	12	37	5'-GUAACU UUCAUC-3'	5'-UGCGAU AUCGCA-3'	KR180372
M6	2028	40	35	5'-GUAUUU UUCAUC-3'		KR180373
S7	1604	17	48	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UACUGCCAA UUGGCAGUA-3'	KR180374
S8	1560	47	427	5'-GUAUUU UGCAUC-3'	5'-GACCUU AAGGUC-3'	KR180375
S9	1320	22	41	5'-GUAACU UUCAUC-3'	5'-GAGUCGACUC-3'	KR180376
S10	1124	24	62	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-CUCUG CAGAG-3'	KR180377
S11	1027	34	60	5'-GUAUUU UUCAUC-3'	5'-UGUGCU AGCACA-3'	KR180378

GCRV-AH528 L3 节段全长 3753 bp, 编码 1 个含 1232 个氨基酸的内壳体蛋白 VP3, 该蛋白具有解旋酶及 NTP 酶的功能。序列分析发现, GCRV-AH528 VP3 有 1 个保守的锌指结构域(Cys-His-Cys-His), 位

于氨基酸的第 137~158 位(CKVCLLEFDSLDKLQY-HQALAH)。GCRV-AH528 L3 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 40.1%~98.4%、29.9%~99.3%(表 2 和表 3)。

表 2 GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒同源蛋白比较
Tab.2 Comparison of homologous proteins encoded by GCRV-AH528 and other reovirus

GCRV-AH528	GCRV-873	GCRV104	AGCRV	MRV	ARV
蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length	蛋白/长度 Protein/Length
VP1/1293	VP1/1299	VP1/1294	VP1/1298	Lambda2/1289	Lambda-C/1285
VP2/1272	VP2/1274	VP2/1274	VP2/1274	Lambda3/1267	Lambda-B/1259
VP3/1232	VP3/1214	VP3/1224	VP3/1215	Lambda1/1275	Lambda-A/1293
NS9&NS69/76&624	NS1/742	VP66/715	NS73/735	Mu-NS/721	Mu-NS/635
VP5/726	VP5/728	VP5/638	VP5/728	Mu-2/736	Mu-A/732
VP4/650	VP4/648	VP4/609	VP4/650	Mu-1/708	Mu-B/676
VP56/512	-	-	-	Sigma1/455	-
VP41/361	-	-	-	-	-
VP6/418	VP6/412	VP6/418	VP6/413	Sigma2/418	Sigma-A/416
NS38/345	-	-	-	-	Sigma-NS/367
VP35/310	-	-	-	-	-

草鱼呼肠孤病毒 AH528(GCRV-AH528): AMR58955.1-AMR58965.1; 草鱼呼肠孤病毒 873(GCRV-873): AAG10435.1-AAG10437.1, AAM92735.1-AAM92743.1; 草鱼呼肠孤病毒 104(GCRV104): AFG73672.1-AFG73681.1, ADM25848.3; 美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV): YP_001837094.1-YP_001837105.1; 哺乳动物呼肠孤病毒(MRV): ABP48913.1-ABP48922.1; 禽呼肠孤病毒(ARV): YP_004226521.1-YP_004226530.1

表3 GCRV-AH528与其他呼肠孤病毒核苷酸及氨基酸相似度比较(%)
Tab.3 Comparison of nucleotide and amino acid sequence identity between GCRV-AH528 and other reovirus (%)

节段 Segment	株型 Strain											
	GCRV-873		GCRV HZ08		GCRV104		AGCRV		MRV		ARV	
	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA
L1	43.7	30.2	98.6	98.6	41.5	28.9	43.9	30.8	41.4	27.8	37.1	24.2
L2	52.1	47.0	98.5	98.2	49.0	45.1	51.5	46.0	47.8	43.3	46.2	45.2
L3	48.8	37.3	98.4	99.3	48.2	38.0	47.3	37.0	40.7	31.4	40.1	29.9
M4	39.7	18.1	98.7	98.6	37.4	21.2	39.5	18.3	34.5	18.3	29.9	19.4
M5	43.2	27.6	97.5	98.3	39.0	21.2	44.5	26.9	33.5	18.8	38.1	20.1
M6	47.4	37.3	96.6	98.1	43.5	32.4	45.2	34.7	36.4	20.6	28.7	23.8
S7	-	-	97.1	95.9	-	-	-	-	39.1	13.9	-	-
S8	-	-	99.1	98.1	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	41.1	21.8	97.4	98.1	36.1	19.4	40.0	21.8	36.4	20.6	33.9	22.0
S10	-	-	99.0	100.0	-	-	-	-	-	-	42.6	17.9
S11	-	-	98.5	97.7	-	-	-	-	-	-	-	-
均值 Average	45.1	31.3	98.1	98.3	42.1	29.5	44.6	30.8	38.7	24.3	37.1	25.3

草鱼呼肠孤病毒 873(GCRV-873): AH009795.2, AF403390.1-AF403397.1, AAG10435.1-AAG10437.1, AAM92735.1-AAM92743.1; 草鱼呼肠孤病毒 HZ08(GCRV HZ08): GQ896334.1-GQ896337.1, GU350742.1-GU350748.1, ADJ75335.1-ADJ75345.1; 草鱼呼肠孤病毒 104(GCRV104): JN967629.1-JN967639.1, AFG73672.1-AFG73681.1, ADM25848.3; 美国草鱼呼肠孤病毒(AGCRV): NC_010584.1-NC_010594.1, YP_001837094.1-YP_001837105.1; 哺乳动物呼肠孤病毒(MRV): EF494435.1-EF494444.1, ABP48913.1-ABP48922.1; 禽呼肠孤病毒(ARV): NC_015126.1-NC_015135.1, YP_004226521.1-YP_004226530.1; 核苷酸: NT; 氨基酸: AA

2.4 M组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 M4 节段全长 2265 bp, 含 2 个开放阅读框, 编码 2 个非结构蛋白 NS9(76 个氨基酸)、NS69(624 个氨基酸), 2 个蛋白由 46 bp 的非编码区间隔。GCRV-AH528 M4 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 29.9%~98.7%、18.1%~98.6%。

GCRV-AH528 M5 节段全长 2230 bp, 编码 1 个含 726 个氨基酸的 VP5 蛋白, 该蛋白属于呼肠孤病毒微管相关蛋白 Mu-2 超家族。GCRV-AH528 M5 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 33.5%~97.5%、18.8%~98.3%。

GCRV-AH528 M6 节段全长 2028 bp, 编码 1 个含 650 个氨基酸的 VP4 蛋白, 属于呼肠孤病毒主要结构蛋白 Mu-1/Mu-1C(M2)超家族。该蛋白含 2 个保守的自溶性切割位点, 分别位于 Asn 42 和 Pro 43。GCRV-AH528 M6 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别为 28.7%~96.6%、20.6%~98.1%(表 2 和表 3)。

2.5 S组节段核苷酸序列分析及编码的蛋白功能预测

GCRV-AH528 S7 节段全长 1604 bp, 编码 1 个含 512 个氨基酸的 VP56 蛋白, 该蛋白与水生呼肠孤病毒无同源性蛋白, 但与哺乳动物呼肠孤病毒(MRV) Sigma 1

和人腺病毒(Human adenovirus)fiber 具有同源性。

GCRV-AH528 S8 和 S11 节段分别编码 VP41(361 个氨基酸)和 VP35(310 个氨基酸)蛋白, 2 个蛋白与其他呼肠孤病毒无同源性蛋白。

GCRV-AH528 S9 节段全长 1320 bp, 编码 1 个含 418 个氨基酸的 VP6 蛋白, 该蛋白属于呼肠孤病毒科 Sigma1/Sigma2 超家族。GCRV-AH528 S9 与其他呼肠孤病毒相似节段的核苷酸、氨基酸同源性分别在 33.9%~97.4%、19.4%~98.1%。

GCRV-AH528 S10 节段全长 1124 bp, 编码 1 个含 345 个氨基酸的 NS38 蛋白, 该蛋白有 1 个保守的结构域, 属于 PolyG-pol 超家族, 具有 poly(C)依赖的 poly(G)聚合酶活性。GCRV-AH528 S10 与 ARV sigma NS 的核苷酸、氨基酸同源性分别为 42.6%、17.9%(表 2 和表 3)。

2.6 GCRV-AH528 与其他呼肠孤病毒典型株基因组特征比较

水生呼肠孤病毒有 11 个节段, 而正呼肠孤病毒仅有 10 个节段, 2 个属的病毒编码 7 个同源性蛋白, 同源蛋白平均相似度为 24.3%~98.3%(表 3)。进一步分析显示, 2 个属的病毒 5'末端序列相差较大, 但 3'末端序列较保守, 存在共同的序列 UCAUC-3'(表 4)。

表 4 呼肠孤病毒保守末端序列比较
Tab.4 Comparison of conserved terminal nucleotide sequences

呼肠孤病毒 Reovirus	节段数 Segment number	保守末端序列 Conserved terminal sequence
GCRV-AH528	11	5'-GUAA ^U / _C U...U ^U / _G CAUC-3'
GCRV873	11	5'-GUUAUU...U ^U / _A UCAUC-3'
GCRV104	11	5'-GAAUU ^U / _A ...UCAUC-3'
AGCRV	11	5'-GUUUUA...U ^U / _A UCAUC-3'
MRV	10	5'-GCUA...UCAUC-3'
ARV	10	5'-GCUUUU...U ^U / _C UCAUC-3'

2.7 GCRV-AH528 系统进化分析

在 GenBank 数据库中搜索与 GCRV-AH528 VP1 蛋白具有同源性的序列, 构建系统进化树(图 2)。研究表明, VP1 同源性蛋白至少分布于 2 个属, 分别为水生呼肠孤病毒属和正呼肠孤病毒属。GCRV-AH528 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇, 为草鱼呼肠孤病毒 II 型株中的 1 个成员。

3 讨论

3.1 草鱼出血病流行病学特征

近年来, 草鱼的高密度养殖造成其病害频发, 细

菌、寄生虫等引起的疾病较易控制, 但由 GCRV 引起的草鱼出血病较难治疗。草鱼出血病疫情主要有以下流行病学特征: 发病鱼主要为 1~2 龄草鱼, 5~11 月均有发病, 同一渔场内的鱼塘相互感染, 发病时呈急性大规模死亡, 2~3 d 内可死亡养殖草鱼总量的 30% 左右。水质较差的鱼塘还容易造成多种病原菌的继发感染, 从而加重疫情, 如出现烂鳃、赤皮、肠炎等。调查还发现, 季节交替阶段、昼夜温差大的气候天气, 特别是大雨后水温在回温过程中, 病害较易发生。从攻毒实验可以看出, 本研究获得的病毒使当年草鱼种出现典型的出血病症状, 可见 GCRV-AH528 具有极强的致病性。以 VP1 蛋白为基础构建系统进化树, GCRV-AH528 株与水生呼肠孤病毒聚为一簇, 进一步聚类于 GCRV-II 型株, 与 GCRV-I 型(GCRV-873)、GCRV-III 型(GCRV104)在内的其他水生呼肠孤病毒属于不同的分支, 距离较远。GCRV-AH528 株与 GCRV-873 株、GCRV104 株存在较大差异, 却与近来发现的浙江湖州地区的 HZ08 株、湖北省的 GCRV-109 株具有极高的同源性(Pei *et al*, 2014), 这不仅证明了草鱼呼肠孤病毒基因组的多样性分布, 还从一定程度上说明 GCRV-II 型株是近年来的主要流行毒株。

3.2 呼肠孤病毒基因多样性分析

呼肠孤病毒末端结构在病毒组装与功能识别方

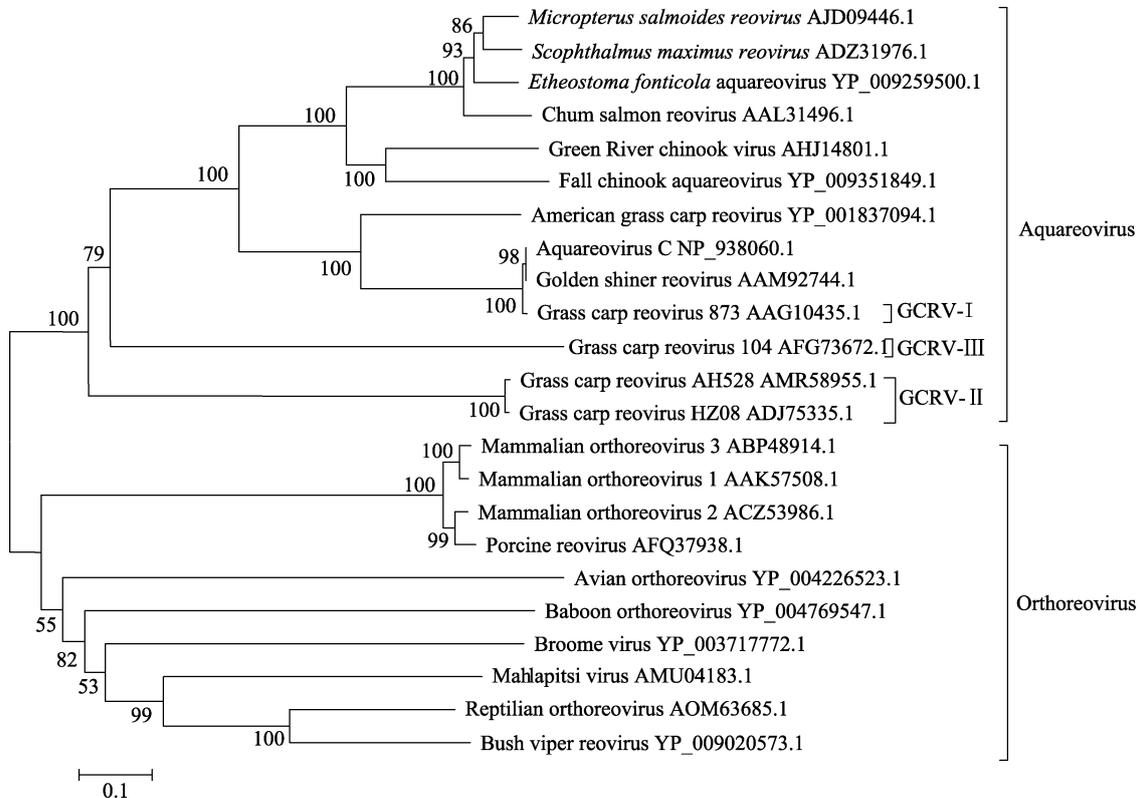


图 2 基于 VP1 构建的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic trees based on VP1

面发挥极其重要的作用,也是鉴别呼肠孤病毒的重要依据。GCRV 相同基因型的毒株其末端特征基本一致,但不同基因型的毒株之间存在个别碱基的差别(Fan *et al.*, 2013; 柯丽华等, 1990; 张超等, 2010)。GCRV-AH528 基因组在 5'和 3'末端含有特异的保守序列和短的节段特异的颠倒互补序列。Anzola 等(1987)推测末端保守序列是病毒基因组的信号区域,而颠倒互补序列为病毒基因组某一节段的信号序列。与其他 II 型 GCRV 相比,本实验室分离的 GCRV-AH528 毒株 L1 节段编码区在 701~702 位置缺少 3 个核苷酸,少编码 1 个氨基酸; M4 节段在 253~255、2174~2176 位置均出现终止密码子 UAG,因此, M4 节段存在 2 个开放阅读框,编码 2 个蛋白。研究结果充分说明,在进化过程中, GCRV 毒株在一定程度上发生碱基的缺失或突变,导致核苷酸编码区发生变化,编码的蛋白发生差异,可见, GCRV 存在较强的变异性。

不同类型、不同来源的呼肠孤病毒,其基因组序列、功能蛋白序列存在一定程度的差异。水生呼肠孤病毒均含有 11 个节段,而正呼肠孤病毒仅含有 10 个节段,这 2 个属的病毒基因组各个节段分子量有较大差异,但基因组总分子量相差不大(曾令兵等, 1991)。另对这 2 个属病毒编码的蛋白分析表明,它们之间仅 7 种蛋白存在同源性,可见呼肠孤病毒不同属之间存在一定的差异。序列相似度分析表明, GCRV-AH528 与正呼肠孤病毒核苷酸、氨基酸的同源性低于水生呼肠孤病毒。但进一步研究发现, GCRV-AH528 与 GCRV-I 型(GCRV-873)、GCRV-III 型(GCRV104)仅存在 7 种同源性蛋白,却与 MRV、ARV 存在 8 种同源性蛋白。GCRV-AH528 S7、S10 节段编码的 VP56、NS38 蛋白与水生呼肠孤病毒无同源性蛋白,但分别与 MRV Sigma 1 蛋白、ARV sigma NS 蛋白存在同源性序列,暗示 GCRV-AH528 在进化上比 GCRV-873 更趋于正呼肠孤病毒。

4 结 论

本研究从分子生物学角度对 GCRV-AH528 新毒株进行鉴定,为安徽合肥地区草鱼出血病的防治提供了理论依据,同时,为免疫工作的开展提供了基础性的参考资料。在实际生产中应及早对该病病原进行检测,尽早预防和治疗。

参 考 文 献

Anzola JV, Xu ZK, Asamizu T, *et al.* Segment-specific inverted

- repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(23): 8301-8305
- Attoui H, Billoir F, Cantaloube JF, *et al.* Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *Journal of Virological Methods*, 2000, 89(1-2): 147-158
- Burland TG. DNASTAR's lasergene sequence analysis software. Humana Press, 1999, 71-91
- Cheng WC, Zhou Y, Li WW, *et al.* Analysis of old and new three diseases in grass carp. *Ocean and Fishery*, 2016(4): 68-70 [程文超, 周亚, 李万文, 等. 草鱼老三病与新三病的分析. *海洋与渔业*, 2016(4): 68-70]
- Deléage G, Combet C, Blanchet C, *et al.* ANTHEPROT: An integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Computers in Biology and Medicine*, 2001, 31(4): 259-267
- Fishery Bureau of Department of Agriculture. China yearbook of fishery statistics. Beijing: China Agriculture Press, 2016 [农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2016]
- Fan YD, Rao S, Zeng LB, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2266-2277
- Hao GJ, Shen JY, Pan XY, *et al.* Isolation and identification of a strain of Grass carp reovirus in Huzhou. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 47-52 [郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 47-52]
- Huang YC, Lei Y, Yang YT, *et al.* Molecular epidemiology of hemorrhage disease of grass carp and the diversity research of GCRV. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(11): 120-125, 153 [黄毅昌, 雷燕, 杨玉滔, 等. 草鱼出血病分子流行病学及 GCRV 多样性研究. *安徽农业科学*, 2016, 44(11): 120-125, 153]
- Jiang YL. Hemorrhagic disease of grass carp: Status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2009, 61(3): 188-197
- Ke LH, Fang Q, Cai YQ. Characteristics of a novel isolate of grass carp hemorrhagic virus. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1990, 14(2): 153-159 [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. *水生生物学报*, 1990, 14(2): 153-159]
- Liang HR, Li YG, Zeng WW, *et al.* Pathogenicity and tissue distribution of grass carp reovirus after intraperitoneal administration. *Virology Journal*, 2014, 11(1): 1-8
- Liu YK, Wang Q, Zeng WW, *et al.* Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(5): 1077-1083 [刘永奎, 王庆, 曾伟伟, 等. 草鱼呼肠孤病毒 JX-0902 株的分离和鉴定. *中国水产科学*, 2011, 18(5): 1077-1083]
- Pei C, Ke F, Chen ZY, *et al.* Complete genome sequence and

- comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2435–2440
- Qiu T, Lu RH, Zhang J, *et al.* Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus. *Archives of Virology*, 2001, 146(7): 1391–1397
- Rodger HD. Fish disease causing economic impact in global aquaculture. In: Adams A (Ed.), *Fish Vaccines*. Springer, Basel, 2016, 1–34
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729
- Wang Q, Zeng WW, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466
- Zeng LB, Zuo WG. Genome SDS-PAGE analysis and nucleic acid identification of grass carp hemorrhage virus strain 854. *Freshwater Fisheries*, 1991(5): 17–19 [曾令兵, 左文功. 草鱼出血病病毒 854 株基因组 SDS-PAGE 分析及其核酸类型鉴定. *淡水渔业*, 1991(5): 17–19]
- Zhang C, Wang Q, Shi CB, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1257–1263 [张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒 HZ08 株的分离与鉴定. *中国水产科学*, 2010, 17(6): 1257–1263]

(编辑 冯小花)

Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Grass Carp Reovirus AH528 Strain

WU Minglin, LI Haiyang, JIANG He, HE Jixiang^①, HOU Guanjun, JIANG Yangyang

(*Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031*)

Abstract Grass carp haemorrhage is an epidemic disease, which is caused by grass carp reovirus (GCRV). Grass carp fingerlings and yearlings are vulnerable to GCRV. A virulent reovirus, tentatively named GCRV-AH528, was isolated from a diseased grass carp exhibiting typical hemorrhage symptoms in Hefei, Anhui Province. Intraperitoneal injection with the virus suspension led to hemorrhage similar to the observed clinical symptoms of blackened dorsum and hemorrhage around the mouth cavity, gill, intestine, belly, and base of the fin ray. The GCRV-AH528 genome contained 11 double-stranded RNA segments ranging from 1027 to 3925 bp, and its average content of AT and GC was 50.2% and 49.8%, respectively. Compared with registered GCRV II strains, the GCRV-AH528 L1 segment had lost three continuous nucleotides (TAT) at nt 701~702, leading to the loss of a tyrosine, and the M4 segment mutated two ORFs encoding two non-structural proteins (NS9 and NS69). All segments had 6 bp-conserved terminal nucleotides 5'-GUAA^U/_CU...U^U/_GCAUC-3'. Except for the L1 and M6 segments, the two ends in the coding region of the other nine segments existed at 5~9 bp short specific inverted complementary sequences. GCRV-AH528 showed 37.1%~98.1% nucleotide and 24.3%~98.3% AA sequence identities with other reovirus. A phylogenetic tree based on VP1 protein revealed that GCRV-AH528 clustered with members of the genus Aquareovirus and was far from GCRV-873. These results indicated that the GCRV-AH528 isolate was a new GCRV II type virulent strain.

Key words Grass carp haemorrhage disease; Grass carp reovirus; VP1 protein; Aquareovirus

① Corresponding author: HE Jixiang, E-mail: flyinghu2008@foxmail.com