

草鱼出血病的病原研究*

毛树坚 邵健忠 杭 绮 张念慈

(杭州大学生物研究所)

(浙江省淡水水产研究所)

提 要 草鱼出血病的病原研究,始于50年代。1978—84年,分离到一种病原病毒,定名为草鱼呼肠孤病毒或鱼呼肠孤病毒。本文报道从出血病病鱼组织的电镜研究中发现两种病毒颗粒,一种即是呼肠孤病毒,另一种是20-30nm大小的病毒。经病毒的核酸分析,前者是双股RNA病毒;后者为单股RNA病毒。用分离到的这两种病毒分别注入1足龄健康草鱼,可发生两类不同症状的出血病:呼肠孤病毒主要导致“肠出血型”症状;另一种病毒(经初步鉴别属于小RNA病毒科病毒)主要导致“肌肉出血型”出血病。由此,可以证实两种病毒都是草鱼出血病的病原病毒,同时也初步解释出现两种不同症状出血病的原因。

关键词 草鱼,出血病,呼肠孤病毒,小RNA病毒,鱼类病毒学

草鱼(*Ct. nopharyngodon idellus* C. et. V.)是一种草食性鱼类,饲养成本低,养殖地域广,是我国淡水养殖鱼的主要品种,其产量约占淡水养殖总产量的20%。但草鱼病害多,以草鱼出血病(Hemorrhage of Grass Carp)最甚。从鱼苗到商品鱼的成活率仅10—15%,当年和1足龄草鱼极易发病死亡。因此,草鱼出血病是我国水产研究中的一个重要课题。早在50年代,倪达书等已注意到草鱼容易发生出血症状的鱼病,以后,陈燕桑等(1972)用分离病毒的方法从病鱼组织得到的滤液感染草鱼,获得典型的出血病症状。中国科学院水生生物研究所(1978,1980)分离出一种病毒,暂名为草鱼疱疹病毒(Herpesvirus of Grass Carp)^[1,2]。但陈燕桑等(1983,1984)根据病毒的形态和理化特性,更改为草鱼呼肠孤病毒(Reovirus of Grass Carp)^[3]。以后又有报道,认为应称作鱼呼肠孤病毒(Fish Reovirus)^[3,4]。郑德崇等(1986)用光镜研究了草鱼出血病的病理组织,观察到病鱼的小血管内皮广泛受损,引起出血^[5]。本文从电镜观察病变细胞入手,分离纯化得到两种病原病毒。

材 料 和 方 法

一、实验鱼

1. 实验用鱼是当年或1足龄草鱼,体长4—6厘米或10—13厘米,由浙江省淡水水产研究所、杭州市水产研究所提供。实验前从鱼塘抽山管养于水泥池7天以上,选取健康鱼为材料。

2. 取有典型出血病症状的濒死病鱼的脏器,匀浆,加10倍量生理盐液混匀,过滤,滤液即为组织病

* 本研究得到杭州市水产研究所的大力支持。杨广智、邱启任、陈汉民、尹文林、刘惠芬等同志参加部分工作,沈一雨老师曾给予技术上的帮助。特此一并致谢。

收稿年月:1988年3月。

毒液。

3. 用组织病毒液以每尾 0.5 毫升的量, 注入健康鱼, 25—30°C 水温饲养, 5 天后陆续复制出草鱼出血病病鱼。

二、病毒的分离纯化

取人工复制病鱼的脏器, 匀浆后离心取上清液, 经氯仿反复处理, 除尽脂肪和杂蛋白。用 PEG 或硫酸铵分离病毒, 所得病毒液再经鱼精蛋白沉淀。沉淀后的上清液中得到一种小病毒颗粒; 沉淀的鱼精蛋白经 1M NaCl 液洗脱, 得到一种大病毒颗粒。

三、电镜观察

1. 取病鱼肝、肾、脾、肠、肌肉、血管等组织, 戊二醛固定, 常规制作超薄切片, H-300、H-600 电子显微镜观察。

2. 取已分离纯化的病毒悬液制成电镜标本, 3% 磷钨酸负染后观察。

四、病毒的核酸分析

1. 纯化的病毒悬液于 TEN × 1 缓冲液中透析, 加 10% SDS 液, 再加含饱和酚的氯仿除去蛋白质。加适量 3M NaAc 与无水乙醇, -20°C 过夜, 最后离心取沉淀, 用 TEN × 1 缓冲液溶解备测。

2. 用苔黑酚—FeCl₃ 溶液与二苯胺试剂分别同待测核酸反应, 鉴别 RNA 与 DNA。用标准酵母 RNA (100 μg/ml)、小牛胸腺 DNA (100 μg/ml) 作对照。

3. 小病毒颗粒的核酸进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶浓度 6%, 巴比妥—Tris 缓冲系统。甲烯兰染色。凝胶柱用牛胰 RNA 酶处理作对照。

4. 凝胶柱经固定与漂洗后, 0.01% 吖啶橙染色, 鉴别核酸的双股或单股。以 λDNA 的 EcoRI 内切酶消化片段作对照。

五、病原性试验

两种分离的病毒分别用磷酸缓冲生理盐液配制成 10⁻¹ 浓度的悬液, 以每尾 0.3 毫升的量注入健康草鱼。用灭活病毒液及生理盐液作对照。25—30°C 水温饲养, 观察病毒侵染后致病情况。

结 果

1. 电镜观察病鱼 6 种器官组织的细胞, 发现有两种不同的病毒颗粒。一种大颗粒, 80—100nm, 双层衣壳, 主要存在于肾管上皮细胞、肾间质细胞、肠上皮细胞及血管、微血管的内皮细胞; 另一种小颗粒, 仅 20—30nm, 除也存在于上述细胞外, 还发现于脾网状细胞、嗜酸性白细胞中。受侵染细胞发生细胞病变: 线粒体变态, 内质网及核周隙肿胀不规则, 细胞内结构紊乱, 直至细胞解体。在肾、脾、肌肉等组织间隙或微血管腔内, 可以见到红细胞及解体的细胞, 病毒颗粒弥散细胞外。

2. 电镜观察分离后的两种病毒颗粒。大病毒颗粒呈六角形, 直径 80nm, 核心部分 50nm, 双层衣壳清晰, 可辨出 20 面体中三角形边的衣粒数为 4, 因此病毒的总衣粒数为 92; 无囊膜; 这种形态结构是呼肠孤病毒 (Reovirus)^[5]。另一种小病毒颗粒约 24nm, 可辨出六角形, 衣粒也可辨, 但数目不清; 无囊膜 (图 1)。

3. 两种病毒的核酸与苔黑酚的反应都呈强阳性; 与二苯胺呈阴性反应; 说明两者都是 RNA。小病毒颗粒的核酸用吖啶橙染色呈火红色, 证明是单股 RNA 病毒。聚丙烯酰胺凝胶电泳显示出两条区带, 一条是强带, 位于指示剂之后, R_m = 0.159, 一条是弱带, 在指示剂之前, R_m = 1.127 (图 2)。用牛胰 RNA 酶处理后, 两条区带消失。



图 1 小 RNA 病毒。(A) 存在于血管内皮细胞内，内皮细胞中可见粘连带、胞饮泡、微管、微丝束等。50Kx, H-300 电子显微镜。(B) 分离后的病毒。10Kx, H-600 电子显微镜。

Fig.1 Electron micrographs showing Picornaviridae virus. (A) Viral particles in the endothelial cell of blood vessel. x 50K, H-300EM. (B) The purified virions. x 10K, H-600EM.

4. 健康草鱼分别注入呼肠孤病毒与小病毒颗粒的悬液后，25—30°C 饲养，发生典型的草鱼出血病症状，并导致病鱼死亡。呼肠孤病毒组的死亡率平均为 66.13%；小病毒颗粒组平均为 64%；而灭活病毒或生理盐液的对照组均不发病，无死亡。

在发病草鱼中，不同病毒所引起的出血病症状是不同的：呼肠孤病毒侵染致病的病鱼主要呈肠道出血，极少数肌肉出血；而小病毒侵染致病，主要是肌肉出血。也有一部份病鱼是出现肠道与肌肉都出血的混合型(图 3)

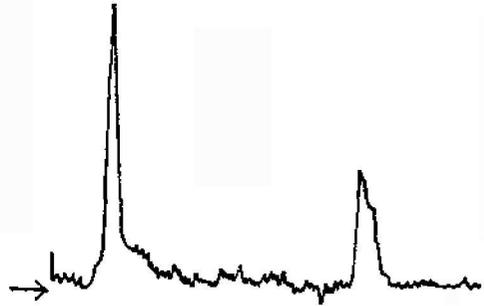


图 2 小 RNA 病毒核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳光密度扫描图(630nm 处扫描，样品不含指示剂)

Fig. 2 The OD(630nm) Scanning graphic record of the virion RNA of Picornaviridae virus on 6% polyacrylamide gel electrophoresis.

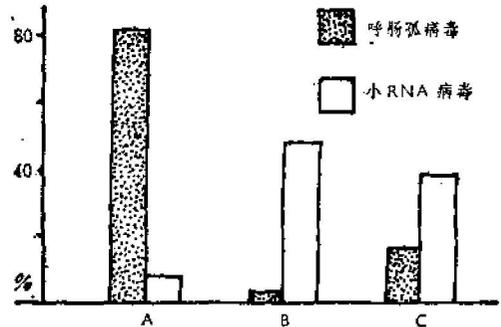


图 3 两种病原病毒引起不同类型出血症状的比率图 (A) 肠出血型；(B) 肌肉出血型；(C) 混合型

Fig.3 The percentage illustration about the different kinds of hemorrhagic symptom which caused by Reovirus and Picornaviridae virus. (A) Hemorrhage of intestinal tract. (B) Hemorrhage of musculature. (C) Synthetic symptom.

讨 论

电镜观察到呼肠孤病毒与一种小病毒颗粒主要因侵染草鱼血管与微血管的内皮细胞而导致出血症状，这与光镜的研究相一致。以往生产上早已发现出血病的症状有“肠出血(肠炎)型”、“红肌肉型”、“混合型”等，一直不明原因。本文初步说明不同类型的出血症状是由两种不同的病毒病原所造成。

草鱼出血病最早被当作细菌性鱼病，1978—1984 年才分离出一种呼肠孤病毒。本研究根据病变细胞中发现两种病毒颗粒而进一步分离出另一种小病毒颗粒。根据小病毒颗粒的核酸分析，确证为单股 RNA；对照病毒的形态大小，初步鉴别为小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 病毒^[7]。

小 RNA 病毒科有 200 多种和更多的型和亚型。作为致病病毒,有肠道病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒及脑心肌炎病毒、甲型肝炎病毒,主要危害人和牛、马、猪、狗、猫、鸡、鸭等禽畜;近年又有分离到鸟肾炎病毒(ANV), Berkely 蜂小 RNA 病毒(BBPV)以及草蛾 (*Lymantria ninayi*) 幼虫中一种小 RNA 病毒的报道^[9-10]。作为鱼类的致病病毒,在国内尚未见报道。

对小 RNA 病毒的核酸研究,比较多的是脊髓灰质炎病毒、肠道病毒和鼻病毒,其 RNA 都是单股单分子^[11]。在本研究中显示出 RNA 的两片段,其中一个片段分子量较小。

由于草鱼出血病的病原病毒已经基本查明,因而可以采用免疫方法防治该病,也可以进而进行抗病因子及抗病育种的生物技术研究。

参 考 文 献

- [1] 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):321-330.
- [2] 中国科学院水生生物研究所第三室病毒组等, 1980. 草鱼出血病病原研究, II电镜观察. 水生生物学集刊, (7):75-79.
- [3] 中国科学院武汉病毒研究所等, 1984. 草鱼出血病病毒精细结构的研究. 淡水渔业, (2):21-22.
- [4] ——, 1984. 草鱼出血病病原—鱼肝肠孤病毒核酸特性的研究. 淡水渔业, (4):7-9.
- [5] 陈燕梁、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.
- [6] 郑德崇等, 1985. 草鱼出血病的组织病理研究. 水产学报, 10:151-159.
- [7] Ginsberg, H. S., 1980. *Picornavirus*, 1097-1098. In *Virology*, eds. R. Dulbecco et al., Harper and Row Publishers, Inc. Hagerstown.
- [8] Imada, T., 1985. Pathogenicity of newly isolated Picornavirus (avian nephritis virus) for chicken, *JPN Agric. Res. Q.*, 19: 137-144.
- [9] Lommel, S. A. et al., 1985. Characterization of nucleic acid associated with Arkansas bee virus *Interferology*, 23: 199-207.
- [10] Pullin, J. S. K. et al., 1985. Characterization of a small RNA-containing virus in field-collected Larvae of the tussock moth, *Lymantria ninayi*, from Papua New Guinea, *Appl. Environ Microbiol.*, 48: 505-507.
- [11] Rekosh, D. M. K., 1977. *Picornavirus*, 67-69. In *The molecular biology of animal viruses*, vol. I, ed. D. P. Nayak, Marcel Dekker Inc., New York.

ON PATHOGEN OF HEMORRHAGE OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS* C. ET V.)

Mao Shujian, Shao Jianzhong and Hang Qi

(*Biological Research Institute, Hangzhou University*)

Zhang Nianci

(*Freshwater Fisheries Institute of Zhejiang Province*)

ABSTRACT The pathogen of hemorrhage of grass carp was studied as early as
下接第79页(continued on page 79)

刚毛数,多于同一期别的第 1 颚足外肢末端的羽状刚毛数 1~2 根。蚤 1、蚤 2、蚤 3 的数目固定,而蚤 4 以后,同一期别中的不同个体之间,刚毛的数目略有差异,与期数不呈 $2(S+1)$ 的关系;腹肢原基的出现时间,我们观察在蚤 5 出现,同于寺田而异于八塚的观察结果。蚤状幼体尾凹上的刚毛数,我们观察除蚤 3 外,其余各期皆与寺田相同,而自蚤 3 开始,各期尾凹中部的刚毛数与八塚所观察的有差异,笔者认为,各期蚤状幼体尾凹中部的刚毛数一般是固定的。

2. 关于蚤状幼体的蜕皮次数,八塚刚(1957)认为:由于饲养条件的不同,蚤状幼体的蜕皮次数也会出现差异。但根据我们的大量观察,认为日本蜆幼体蜕皮次数是固定的,环境的不适只会减弱蜕皮活性,并使蜕皮周期拉长,甚至造成幼体的死亡,但未见增加或减少蜕皮次数的现象。如 1984 年在幼体培育过程中,在 $27\sim 29^{\circ}\text{C}$ 的水温下,由于幼体密度过大,且供饵不足,蚤 1 延续 9 天而不变态。1985 年也发现延续 6 天以上的蚤 1 幼体。当环境条件好转后,有些个体在蜕皮中死亡,而蜕皮后存活的个体,仍以既定的蜕皮次数,完成幼体发育的全过程。三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (Miers)、中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards、锯缘青蟹 *Scylla serrata* (Forsk.) 幼体蜕皮次数,也是固定的。

3. 关于前期蚤状幼体的存在时间,据 John E. Bardach *et al.* (1972) 论及,在短尾类中,有少数卵子可以过早地做为前期蚤状幼体 *Prezoeae* 而破膜孵出,又在半小时之内即蜕变为蚤状幼体。但我们通过对日本蜆的观察认为,在室内人工孵化中,正常情况下破膜而出的皆为第 1 期蚤状幼体,而前期蚤状幼体是在卵膜内度过的。1984 年曾从一刚死的抱卵亲蟹摘取部分将卵卵子,放入培养皿中继续培养,后来一部分卵子孵出后即为第 1 期蚤状幼体,而另一部分在前期蚤状幼体阶段即破膜而出,但这些幼体活力甚弱,不久即全部死亡。1985 年,我们未曾见到前期蚤状幼体孵出者。这一观察结果,与梁象秋(1974)观察之中华绒螯蟹的发育及笔者观察之三疣梭子蟹的发育结果相类似。

参 考 文 献

- [1] 孙颖民等, 1984. 三疣梭子蟹的幼体发育. 水产学报, 8(3):219—226.
- [2] 梁象秋等, 1974. 中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) 的幼体发育. 动物学报, 20(1): 61—75.
- [3] 黄胜南等, 1965. 锯缘青蟹 *Scylla serrata* (Forsk.) 幼体发育的研究. 水产学报, 2(4):24—34
- [4] 八塚刚, 1952. イシガニ幼生の変態成長について. 水産学会誌, 17(11):359—358
- [5] —, 1957. カニ *Brachyura* のゾエア幼生について. 水産学集成:571—590. 東京大学出版会.
- [6] 寺田正之, 1979. ワタリガニ科力ガザ亜科ゾエア幼生の分類. 動物学雑誌, 88(3):254—263
- [7] John, E, Bardach *et al.*, 1972. Culture of crabs (*Brachyura*). *Aquaculture*, 668—673

上接第4页(continued from page 4)

the beginning of the 1950s. Until 1978—84 the reovirus was isolated, which was denominated Grass Carp Reovirus (GCR) or Fish Reovirus. This paper deals with two kinds of virosome: one is Reovirus and the other is 20—30 nm in diameter. They were observed in the tissue of diseased fish under electron microscope. By analysing the nucleic acid of virus, the former virus is dsRNA virus and the later is ssRNA virus. These two virus were infected by injection to 1 year old healthy Grass carp respectively. Two typical symptoms of hemorrhage appeared: the symptom of hemorrhage of intestinal tract caused by Reovirus and the symptom of musculature caused by the other virus. It is obvious that both viruses are the pathogen of hemorrhage of grass carp of different kinds. The virus which is 20—30 nm in diameter was temporary defined as Picornaviridae.

KEYWORDS grass carp, hemorrhage, reovirus, picornavirus, fish virology