



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112662633 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 202011581620.0

(22) 申请日 2020.12.28

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: V202086 2020.11.27

(71) 申请人 中国水产科学研究院珠江水产研究所

地址 510380 广东省广州市荔湾区兴渔路1号

(72) 发明人 赵长臣 江小燕 陈总会 巩华 刘春花 王庆 黄志斌

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11465

代理人 王敏

(51) Int. Cl.

G12N 7/00 (2006.01)

A61K 35/765 (2015.01)

A61K 39/15 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/46 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

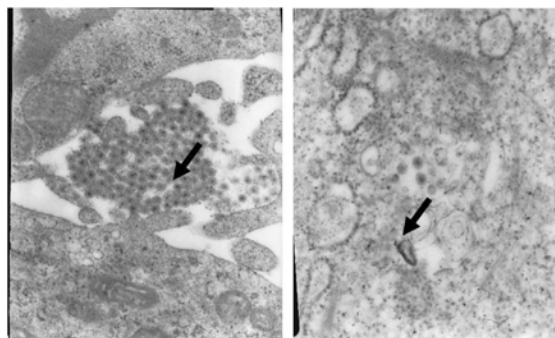
权利要求书1页 说明书11页  
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用

(57) 摘要

本发明公开了II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用,属于鱼类病毒性出血病防治技术领域。本发明冷适应致弱疫苗株GCRV-GD108ca对草鱼病毒性出血病具有良好的保护效果,可有效抵御同源或异源的II型草鱼呼肠孤病毒攻击。安全实验表明,GCRV-GD108ca株对靶动物安全,超剂量注射草鱼,未引起实验鱼的发病及死亡现象。在细胞及鱼体上连续传代并进行易感动物攻毒实验,结果表明弱毒株毒力稳定,无毒力增强现象;同居感染实验表明,对鲢、鲫等不同草鱼混养品种均安全,未产生水平传播现象,无副作用,本发明可为草鱼病毒性出血病防治提供技术方案,具有重要的经济价值和社会意义。



A

B

1. II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca,其特征在于,其保藏号为CCTCC NO: V202086。

2. 权利要求1所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备用于预防II型草鱼呼肠孤病毒产品中的应用。

3. 权利要求1所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备用于预防II型草鱼呼肠孤病毒引起的鱼类疾病产品中的应用。

4. 权利要求1所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备预防和治疗鱼类病毒性出血病药物中的应用。

5. 权利要求1所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备诊断或检测鱼类病毒性出血病试剂中的应用。

6. 一种预防鱼类病毒性出血病的疫苗组合物,由权利要求1所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca和药学上可接受的冻干保护剂组成。

7. 根据权利要求6所述的一种预防鱼类病毒性出血病的疫苗组合物,其特征在于,每100ml所述冻干保护剂含5g蔗糖、2g明胶、15g脱脂奶粉,其余为注射用水。

## II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及鱼类病毒性出血病防治技术领域,更具体的说是涉及II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用。

### 背景技术

[0002] 草鱼出血病毒(grass carp hemorrhage virus,GCHV,国际病毒分类委员会称之为reovirus of grass carp,GCRV)是中国分离的第一种鱼类病毒,隶属呼肠孤病毒科,水生动物呼肠孤病毒属,直径70~80nm,20面体球形颗粒,含有11个片段的双链RNA。不同地区存在不同的毒株。目前已报道了10个分离株。

[0003] 该病毒主要引起中国淡水养殖主要品种草鱼在鱼种阶段发生出血病,死亡率高达90%以上,给水产养殖业造成巨大损失。病原体是隶属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)的呼肠孤病毒(Re-ovirus),定名为草鱼呼肠孤病毒(GrassCarp Reovirus,简称GCRV)。病毒颗粒呈球形或六边形,平均直径70nm,无囊膜构造,具两层衣壳结构。外层衣壳可见有外周子粒20个,外层衣壳可被糜蛋白酶消化除去,免疫电镜观察到病毒颗粒与其相应的抗体结合成免疫复合物并聚集成团。病毒对酸(pH3)和氯仿不敏感,对热(56℃)稳定,其复制不受氧尿核苷酸抑制。为双股RNA类型病毒。草鱼出血病流行于湖北、湖南、广东、广西、江西、福建、浙江、江苏、上海、安徽、河南、河北、四川等省、市、自治区的主要养鱼地区。

[0004] 病鱼的症状主要是体内外各个器官和组织表现出斑点状或块状出血,诸如鳍条、鳃盖、鳃丝、眼眶、口腔、下颚等表皮组织,不用解剖就可以看到出血现象。病鱼眼球突出,鳃丝苍白或出血。脑膜腔、肌肉、肠道、肠系膜、鳃壁、胆囊、肝、脾、肾等器官,也往往出现出血现象,故依症状定名为草鱼出血病。草鱼出血病发病季节长,每年6月下旬至9月底是主要流行季节,高峰在8月,水温25~30℃时最为流行;死亡率高,高密度饲养的鱼种池危害更甚,常发生全塘覆没,对提高淡水鱼产量是一个严重的威胁。人工感染健康草鱼,从感染到发病死亡,约需4~15d,一般7~10d。其病程有潜伏期、前趋期和发病期三个阶段。

[0005] 目前所分离草鱼呼肠孤病毒根据核酸序列可分为三个株型,即I型、II型和III型,2000年以前I型占主导流行地位,2000年后流行株逐渐转变为II型为主,根据流行病学调查显示,当前全国范围内II型草鱼出血病占比高达95%以上,III型报道相对较少。与I型相比草鱼呼肠孤病毒II型致病力更高,体外细胞培养不会产生CPE现象,且二者核酸序列同源性低于50%。

[0006] 当前草鱼出血病无特效药物用于治疗,免疫接种是该病的最为有效的防治手段,目前市场上已有I型的草鱼呼肠孤病毒疫苗应用,但因其基因水平上与II型病毒存在较大差异,致使现有I型疫苗不能有效防止II型流行株的攻击,防治效果不理想。基于此,研发新的具有较好保护力的II型草鱼呼肠孤病毒弱毒疫苗显得尤为重要。

[0007] 因此,提供II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用是本领域技术人员亟需解决的问题。

## 发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明提供了II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用。

[0009] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca,其保藏号为CCTCC NO:V202086,已保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,地址中国.武汉.武汉大学,保藏日期为2020年11月27日,分类命名为草鱼呼肠孤病毒II型GD108ca株(GCRV-GD108ca),Grass carp reovirus genotype II GD108ca(GCRV-GD108ca)。

[0011] 进一步,所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备用于预防II型草鱼呼肠孤病毒产品中的应用。

[0012] 进一步,所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备用于预防II型草鱼呼肠孤病毒引起的鱼类疾病产品中的应用。

[0013] 进一步,所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备预防和治疗鱼类病毒性出血病药物中的应用。

[0014] 进一步,所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca在制备诊断或检测鱼类病毒性出血病试剂中的应用。

[0015] 进一步,一种预防鱼类病毒性出血病的疫苗组合物,由所述的II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca和药学上可接受的冻干保护剂组成。

[0016] 进一步,每100ml所述冻干保护剂含5g蔗糖、2g明胶、15g脱脂奶粉,其余为注射用水。

[0017] 病毒GCRV-GD108ca株为分节段的双链RNA病毒,其基因组由S1-S11十一个双链RNA节段组成。

[0018] 其中,通过测序,GCRV-GD108ca株S9基因序列如下:

[0019] AAAAACCATTGACGTTTTTGGATCTACCCGACTCAATGAGGCAATCTGCTCTCGGGCTCTCTCTTT  
GATAATGATAACAACCTGCTGGTCTGTGTCTCCAATCGCCCCAAGGCAAGCCAAATCCATGACTCAGTTGTTTGTA  
TTCGATGTGGAGCGCCCATGACAAAGTCCATGCAATGTCAATTCACCACCCCCTGTGCATGGCTGCATTCCGAT  
GCTGGAGCATAGCCAATGGGAAGATCTGTATGAGTTGGCTGATGATATGGGTCGCTGTATTTGGTGGGCTAAAAAG  
CAACTGATCATCTGGATGGAGGGAATAGTGAATCTGAAGGCTGGTAAGGTGTATAACGATAATGTGAGTAACCGCA  
GCGAGTGGCCAGATGAGGTGTGGGATGAAACATGCAAAATCTTCTGCAAAATGGGCAACGCAAAATCGTGTGGCGAG  
CCGTTGGATACAGTCACCATCACGTGTGTACAAGTTTCTTTGTGACCAGGAAAGTAAGATGAACATTGATGCTCTG  
GAGCTATCCAACCATCAGATTTTTTCAGGCACCACCGAAATGGCCGAGCTAGCTATGGCTGTCCCGCATTGGTCCC  
CATCCGTGCATGAGATGCTAAATGGTCACAAAATGGTGATGATTGTGCCCCGCTTGCCATGCCAGTCATATTTGA  
TCCCGCAACGGTTACGTCGCCCAATCTACACCGCGGCCATGATCAGTCTCCCGTCCCAATGGTGGGTGTACAA  
TACGTAAGTTTCATGGAAGCCACATGGTGCCACGTTTGTATGGTGATGACGTCCCAACCTTACGTTCCCGCTGC  
GAAATGCTTCTACCACAACCTCCACTCTCATACGCAACTCTGATGCTGCCTGAAGCTCAATCGACCTTCAAACC  
TGAGATCCAGGGACAGTAATGACTGATTCCATACC;SEQ ID NO.1。

[0020] S11基因序列如下:

[0021] TGGGGCGATCCCTTACATATCTGCACCCCAGGCTTCTTCGGCGGAATGTCCGCCTTTTAAACAA  
TAGACATAACGATCTACGACGGTGGTAATACGCTTTGGAATGCGCGCGGTACGATGCTTTCAGGACTTACCC  
TAAAGTGGTATCTCATGAGAAGGATTTCCCTCTAATTTATACAGAGCAGTTTACATTCAACTTGCTTATTGGCGCC

TTCCTCCAGCAACCCCTACTGCAGAACTCGATTGACCGACAATGGAGGGGTATGATTTGGACATCTGATCGGCTTA  
GCTCGTTGCGTATAGCGCCACCGAATTCACGTGCTGCTGATCTGCCTCGCGCATATCGTACGTTGGACCTTGCGAA  
TTACCCACTATGGGGAAGTGCACCTGCTGCCCTACAGACACTATGGATGGACAGTTGTCTGATGACATTAGAGAGT  
TTATCTGCGAGAGGACCTTTTCTTTACCTCCGGCATCCTCAAGCTCGACCAGACGGGAATGTTTTACGAGCCTTAC  
AGCAGCATATTTCCAAGCCAATGGAGGCCATAGTCTCGGAAGCCTACCAATCAATAGCTATGGGACCTTTGACATT  
GCAAGACGGGTATTATCGCGCTCTGTCAGTGATCACCTCATCTATCTAGCCTCTCTGACCGGTCGTCTGGGCCCT  
GACCGTACATATTATGGTTTCTACGTCCAATTCCTAAGAAACGGAAATTTGAGGATCTCGGATACTTTGCGTACA  
ATGCTGATGGACGTAACGTCGCTGTCCTGCAATCCATTAACGCCTACATCTACTGTGCTTACCTGACTGGCAGTA  
CAGCTGTGCCCTCTACTACTTGCACGTCCTTTCTGCCCTATCGCTCTCCTGGACTGATCCAGTTGGAATGATAGAT  
GGTTTCTCGTGTGTCATCAATTCACGGACGTTCTGGTTGGTCTGCCACAAACCGTGCTTTGCACACGCATAGCT  
TCAACTGGTTCAACCTACTGGAGGACGCTATTGACACACTAGTTGCACGTAGATACTGGACCAATGCCGAGGGACA  
GGCCATACGGCAGGAATGGACGGCGGCGGAGACAGGTGGCGAGTGATCATGGACGCAACCCGTGATGAGGATGAC  
TTGGTGGTGTCCGTACGCCAGACGATTGTCGTAGAAGGCTTAAACCTTATGGGGACAATAATTGGACGCGTGCTT  
ACGATACTGCCGATGTGGTGGGGTGTGGATCGCTTATCCCTAGACCTATCCAGCCCGG;SEQ ID NO.2。

[0022] S9或S11基因序列,用于作为本发明病毒GCRV-GD108ca株的特征与其他来源的毒株进行区分。

[0023] 经由上述的技术方案可知,与现有技术相比,本发明公开提供了II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用,本发明冷适应致弱疫苗株GCRV-GD108ca具有良好的免疫保护效果;对草鱼病毒性出血病具有良好的保护效果,可有效抵御同源或异源的II型草鱼呼肠孤病毒攻击。效力实验表明,4月龄(体重10克左右,体长10~12cm)草鱼每尾注射0.2ml(病毒含量 $\geq 1 \times 10^4$ 拷贝/ml)病毒液,相对保护率可达90%以上;安全实验表明,GCRV-GD108ca株对靶动物安全,以免疫剂量的10倍剂量注射草鱼,均未引起实验鱼的发病及死亡现象。同居感染实验表明,对鲢、鲫等不同草鱼混养品种均安全,不会产生水平传播现象,无副作用,本发明可为草鱼病毒性出血病防治提供技术方案,具有重要的经济价值和社会意义。

## 附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0025] 图1附图为本发明GCRV-GD108ca株、GD108株电镜观察结果;

[0026] 其中,A为GD108株透射电镜下的形态,黑色箭头所指即为病毒离子,病毒为二十面体,呈晶格状排列;B为GCRV-GD108ca株在透射电镜下的形态,黑色箭头所指即为病毒离子,病毒为二十面体结构,呈分散状;

[0027] 图2附图为本发明草鱼呼肠孤病毒GD108株20℃连续传代病毒滴度测定结果;

[0028] 图3附图为本发明GCRV GCRV-GD108ca株、GCRV GD108株免疫荧光实验结果;比例尺为100 $\mu$ m;

[0029] 其中,A为阴性对照,红色荧光为PI染料结合细胞核DNA后在荧光显微镜下所激发

的光线;B:红色荧光为PI染料结合细胞核DNA后在荧光显微镜下所激发的光线,绿色荧光为GD108株与FITC标记II型草鱼呼肠孤病毒多抗结合,在荧光显微镜下激发产生的光线;C:红色荧光为PI染料结合细胞核DNA后在荧光显微镜下所激发的光线,绿色荧光为GCRV-GD108ca株与FITC标记II型草鱼呼肠孤病毒多抗结合,在荧光显微镜下激发产生的光线。

### 具体实施方式

[0030] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0031] 以下所述实施例中所用实验材料,如无特殊说明,均为常规商品化实验药品及耗材。实例中的定量实验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0032] II型草鱼呼肠孤病毒GD108株、PSF细胞株均为中国水产科学研究院珠江水产研究所水产疫苗工程技术中心保存。

[0033] 实施例1冷适应毒株的的培育和鉴定

[0034] (1) 病毒株GD108株的冷适应传代致弱

[0035] 病毒培养采用传代接种法,即PSF细胞长满单层后,用无血清M199培养基稀释GD108病毒液,1ml/瓶接种细胞瓶,接种完成后28℃恒温孵育1h,弃去孵育的病毒液,加入含2%血清的M199培养基细胞维持液,置20℃恒温生化培养箱培养,持续7天后放置-20℃冻融两次,作为下一代继代毒种;按上述方法持续继代30代,最终使得病毒在20℃条件下能够获得稳定表达,低温培养获得的病毒命名为GCRV-GD108ca株,每继代一次均测定病毒含量。

[0036] 在20℃,GD108株在PSF细胞上传至30代,期间PSF未发生CPE现象,且病毒滴度逐渐由低到高。P30代病毒细胞培养5天后进行固定、磷钨酸负染后,电镜下观察,结果见图1。

[0037] 图1结果显示,在透射电镜下GD108病毒离子大小为70~80nm,病毒颗粒呈六边形,二十面体结构,无包膜,在细胞质中呈聚集晶格状排列;GCRV-GD108ca株病毒结构及大小与GD108相同,经低温多代培养后病毒外观形状未发生明显改变,在细胞质中病毒呈单个分散状排列。

[0038] 利用II型草鱼呼肠孤病毒特异性引物进行RT-PCR检测,特异性引物序列如下:

[0039] F:5'-ACGTGCGATTGGAAGAGCTT-3';SEQ ID NO.3;

[0040] R:5'-AGTTCTCAAAGCTGAGACAG-3';SEQ ID NO.4。

[0041] 病毒RNA提取及第一链cDNA合成按商品化试剂盒说明书进行。

[0042] RT-PCR检测外源病毒反应体系配置:5×buffer 5.0μl;dNTP(10mM)1.0μl;引物(F、R)终浓度为0.6μM;taq酶0.5μl;cDNA 1.0μl;补去核酶水使反应体系至25μl。

[0043] 反应条件:95℃5min预变性;94℃30s,60℃30s,72℃60s,35个循环(检测35个循环);72℃10min终末延伸。PCR产物置1%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶观测仪观察结果,有320bp大小条带出现,证明所检测病毒为II型草鱼呼肠孤病毒。

[0044] (2) 病毒含量的测定

[0045] 参照TRIZOL说明书提取病毒总RNA,并反转录为DNA,进行qPCR扩增,扩增片段长度为156bp。

[0046] qPCR扩增引物序列如下:

[0047] 上游引物F:5' -CCGATACTCACCA-3' ;SEQ ID NO.5;

[0048] 下游引物R:5' -CGCTGATGTAATTGATGCC-3' ;SEQ ID NO.6;

[0049] Taqman探针:5' -GGATCATTTACGTCGTAT-3' ;SEQ ID NO.7;

[0050] 探针5' 端标记FAM,3' 端标记TAMRA。

[0051] 反应体系为:qPCR反应体系为Premix ExTaq (Probe qPCR) (2×) 12.5μL,PCR上下游引物各0.5μL (终浓度均为0.25μmol/L),TaqMan探针1.0μL (终浓度为0.25μmol/L),ROX Reference Dye II (50×) 0.25μL,DNA或cDNA模板2μL,加ddH<sub>2</sub>O至总体积为25μL。

[0052] qPCR反应程序为:预变性1个循环,95℃30s;扩增反应40个循环,变性95℃5s,60℃退火/延伸35s。

[0053] qPCR扩增结果见表1和图2。

[0054] 表1 GD108株冷适应传代病毒含量测定结果

代次	病毒含量 (1×10 <sup>5</sup> 拷贝/ml)
1	2.4
2	2
3	0.86
4	0.64
5	0.68
6	0.44
7	0.44
8	0.4
9	0.32
10	0.36
11	0.24
12	0.22
13	0.56
14	1.6
15	1
16	4.42
17	5.67
18	6.48
19	8.52
20	12
21	12.4
22	10.8
23	12.2
24	12.6
25	12.2
26	12.8
27	12
28	11.8
29	12
30	12.4

[0055]

[0056] qPCR病毒含量测定显示细胞1-12代,病毒滴度逐渐降低至2.2×10<sup>4</sup>拷贝/ml,13-

20代病毒含量逐渐升高至 $1.2 \times 10^6$ 拷贝/ml,自21代病毒含量稳定于 $1 \times 10^6$ 拷贝/ml。

[0057] (3) 免疫荧光实验-冷适应株的血清学鉴定

[0058] ① II型草鱼呼肠孤病毒多克隆抗体的制备

[0059] A、S10基因片段的扩增

[0060] 根据GenBank中II型草鱼呼肠孤病毒代表性毒株GCRV-HZ08株S10基因序列设计引物,上下游引物分别插入BanH I和Hand III酶切位点(带下划线序列),以HZ08株反转录cDNA基因组序列为模板进行PCR扩增,反应条件为:95℃预变性5min;94℃45s,54℃45s,72℃1min,共33个循环;72℃延伸7min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后回收。

[0061] 所述上下游引物序列如下:

[0062] 上游引物:5' -ATAGGATCCATGGCGGGTGTGTCTCTCAACA-3';SEQ ID NO.8;

[0063] 下游引物:5' -GCTAAGCTTCAGCATCTGCGCAAATATACGTC-3';SEQ ID NO.9。

[0064] B、PET-32a-S10表达载体构建

[0065] 将纯化后的PCR产物和表达载体PET-32a(+)经双酶切处理(BanH I 1 $\mu$ l,Hand III 1 $\mu$ l),分别进行凝胶回收,回收后产物用T4DNA连接酶进行连接反应,反应体系按试剂盒说明书进行,连接产物转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆并提质粒,质粒经双酶切、测序验证,命名为PET-32a-S10。

[0066] C、S10蛋白的表达及纯化

[0067] 将PET-32a-S10质粒转化至大肠杆菌BL21(DE3),筛选阳性克隆,于LB/Amp培养基中加入终浓度为0.5mmol/L的TPTG诱导表达。将诱导表达菌液10000r/min离心收集菌体、重悬、超声裂解,然后参照Ni-凝胶纯化试剂盒说明书纯化目的蛋白,纯化蛋白经透析浓缩后-20℃进行保存。

[0068] D、多克隆抗体制备

[0069] 将纯化后的(基因工程表达制备)II型草鱼呼肠孤病毒S10蛋白用无菌PBS稀释至200 $\mu$ g/ml,1:1与弗氏完全佐剂混合乳化,200 $\mu$ l/只皮下注射小鼠;共进行三次免疫,每次免疫间隔14日,第二次、第三次免疫佐剂为弗氏不完全佐剂。第三次免疫后断尾取血,ELISA法测定抗体效价,如若效价未达到预期,可再进行加强免疫一次,如若抗体效价满足要求,则在第三次免疫后摘取眼球采血,血样37℃静置1h,4℃冰箱静置过夜,第二天3000r/min离心10min,吸取上层血清,混匀后分装,-80℃保存备用,即为II型草鱼呼肠孤病毒多抗。对照组注射无菌PBS制备阴性抗血清。

[0070] ② 免疫荧光实验

[0071] 将原始毒株GCRV GD108株及20℃分别培养至30代的冷适应株GCRV-GD108ca株分别接种PSF细胞,培养5d后用-20℃预冷的甲醇固定30min,PBS洗涤3次,加0.3%的Triton-100常温通透30min,PBS洗涤三次,加2%的PBS 37℃封闭1h分钟,PBS洗涤3次,将鼠抗GCRV-II阳性抗血清(II型草鱼呼肠孤病毒多克隆抗体)和阴性抗血清用PBS按1:100稀释后加入各抗原孔,37℃湿盒内孵育1h,PBS洗涤3次,加入FITC标记的羊抗兔IgG二抗37℃孵育1h,加入用PBS稀释的5 $\mu$ g/ml的PI,室温作用10min,再荧光显微镜下观察结果。

[0072] PI燃料染色后,可发现成纤维细胞细胞核发射红色荧光,核型完成,细胞均处于细胞分裂前期,均有致密细胞核结构,FITC标记抗体反应如图3。阴性对照仅显示红色点状荧光,未见绿色荧光,说明阴性对照仅PI染色,FITC标记抗体未与阴性对照细胞发生结合,接



种GCRV GD108株病毒及GCRV-GD108ca株病毒的细胞同时可见红色点状荧光及弥漫性绿色荧光,且接种GD108株细胞绿色荧光密度明显高于接种GCRV-GD108ca株的细胞,这说明GD108株经冷适应培养后病毒复制效率明显要低于原始株,且冷适应株免疫原性未发生较大改变,与II型草鱼呼肠孤病毒多克隆抗体仍能够产生交叉反应。

[0073] (4) 无菌检验及支原体检验

[0074] 分别将GD108株在PSF细胞传代过程中P10、P20、P30代次按现行《中华人民共和国兽药典》第三部附录进行无菌检验和支原体检验。

[0075] PSF细胞传代过程中P10、P20、P30代次毒种经检验,均无细菌、霉菌、支原体污染。

[0076] (5) 外源病毒检验

[0077] 将GD108株在PSF细胞传代至P30代次进行外源病毒检测。

[0078] 取病毒样品 $1 \times 10^6$ 拷贝/ml,分别接种到已达80%长成单层的FHM(黑头软口鲮尾柄细胞)、EPC(鲤上皮瘤细胞)、CO(草鱼性腺细胞)、CIK(草鱼肾细胞)、KF(锦鲤鳍条细胞)、SSN-1(鳢鱼苗细胞)、CAB(鲫囊胚细胞)、CHSE(大马哈鱼胚胎细胞)、R<sub>1</sub>(虹鳟肝细胞)、PG(白斑狗鱼性腺细胞)、RTG-2(虹鳟性腺细胞)、BB(云斑鲮尾柄细胞)和BF-2(太阳鱼细胞)等13种鱼类细胞,培养24小时,每个细胞培养瓶(25cm<sup>2</sup>)接种病毒1ml,分别置15℃、20℃和25℃吸附1小时后,倒去病毒液,用不含血清的MEM维持液冲洗2次后,加入含2%血清的MEM维持液,分别置15℃、20℃和25℃恒温培养,并另外取对应敏感空白细胞,接种各种病毒GCRV genotype I(I型草鱼呼肠孤病毒)、IPNV(传染性胰脏坏死病毒)、IHN(传染性造血器官坏死病毒)、SVCV(鲤春病毒)、VHSV(病毒性出血性败血病病毒)、CCV(斑点叉尾鲮病毒)、EHN(流行性造血器官坏死病毒)、KHV(锦鲤疱疹病毒)、ISAV(鲑鱼传染性贫血病病毒)、VNNV(病毒性神经坏死病毒)和RSIV(真鲷虹彩病毒)于相应的细胞CIK、CHSE、FHM、EPC、RTG-2、BB、BF-2、CAB、R<sub>1</sub>、SSN-1、KF中作为阳性对照,逐日观察CPE情况,连续观察14日,各样品组再盲传一代,继续观察14天。

[0079] 草鱼出血病GCRV-GD108ca株第10代、第20代和第30代细胞培养弱病毒液分别接种FHM、EPC、CO、CK、KF、SSN-1、CAB、CHSE、R<sub>1</sub>、PG、RTG-2、BB和BF-2等13种鱼类细胞后,连续观察14日,并盲传一代,均没有出现细胞病变(CPE)的迹象。阳性对照组看见明显的CPE。因此PSF细胞传代过程中外源病毒检验P30代无I型草鱼呼肠孤病毒及其他鱼类外源病毒污染。

[0080] 另待检GCRV-GD108ca株P30样品按照国际兽疫局(OIE)《水生动物疾病诊断手册》中规定的方法做PCR、RT-PCR和nested-PCR,并设立阳性对照和阴性对照,结果阳性对照均扩增出特异性条带,阴性对照未扩增出特异性条带,样品亦未扩增出其他特异性条带。

[0081] 以上结果表明该批样品未发现外源性水生动物病毒污染。

[0082] (6) GD108株不同代次的致弱评价

[0083] 低温培养毒株每隔5代进行回归感染。将4月龄健康草鱼在水温为28~32℃的实验鱼缸内养殖7天,每天观察实验鱼健康状况,7天内如无意外情况,实验鱼分为8组,每组50尾,用PBS分别稀释不同代次低温培养的病毒及原始毒株,其中六组分别注射低温培养的5、10、15、20、25、30代次的病毒,注射剂量为0.2ml/尾( $\geq 1 \times 10^4$ 拷贝/ml),一组注射原始毒株GCRV GD108株,腹腔注射,注射剂量为0.2ml/尾(50个LD<sub>50</sub>/0.2ml),剩余一组作为对照组,注射生理盐水0.2ml/尾,免疫前停止饲喂24小时以上,免疫后每日定期饲喂,逐日观察鱼体健康及死亡状况,直至21日。不同代次冷适应株攻毒实验,每天死亡的鱼尾数,统计结果见表

2。

[0084] GD108株冷适应培养,每隔5代进行回归感染攻毒实验,腹腔注射,每尾攻毒剂量为50个LD<sub>50</sub>/0.2ml,结果表明,第0(原始毒株GCRV GD108株)、5代攻毒死亡率均80%以上,第十代死亡率为44%,第十五代以后死亡率均为0,且无草鱼出血病症状。12日之后稳定,不再出现死鱼状况。

[0085] 表2不同代次冷适应株攻毒实验

组别	4天	5天	6天	7天	8天	9天	10天	11天	12天
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0代	2	6	8	17	10	3	3	0	1
5代	0	4	9	15	11	3	2	1	0
[0086] 10代	0	0	5	8	6	0	2	0	1
15代	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20代	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25代	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30代	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0087] 实施例2冷适应表型的鉴定

[0088] 取6瓶长满单层的PSF细胞,各接种冷适应培养P30代的GCRV-GD108ca株、GD108株各三瓶,接种剂量均MOI0.1,接种后各取一瓶GCRV-GD108ca株、GCRV GD108株接毒细胞分别放置20℃、28℃、35℃生化培养箱培养7d,QPCR方法测定GCRV-GD108ca株、GCRV GD108分别在20℃、28℃、35℃培养的病毒含量,每个样品重复三次,实验数据取三次毒力实验的平均值±SD。冷适应性即cold adaptation(ca),指病毒株分别在28℃、20℃培养的病毒滴度比值小于100倍,表明毒株在20℃能够有效生长;温度敏感性即temperature sensitive(ts),指病毒株分别在28℃、35℃培养的滴度比值大于100,表明病毒对培养温度敏感,在高温时不利于病毒的生长。

[0089] 结果发现,20℃和28℃培养条件下,GCRV-GD108ca株及GD108株在PSF细胞中均生长良好,GCRV-GD108ca株20℃和28℃培养条件下病毒滴度分别达到 $1.2 \times 10^6$ 拷贝/ml、 $1.26 \times 10^6$ 拷贝/ml,GD108株在20℃和28℃培养条件下病毒滴度分别为 $6.8 \times 10^4$ 拷贝/ml,及 $1.05 \times 10^8$ 拷贝/ml,结果表明经过低温传30代后,GD108株获得了冷适应性。但病毒滴度与原始毒株相比出现较大下降。

[0090] 28℃和35℃培养条件下,GCRV-GD108ca株及GD108株在PSF细胞种均生长良好,GCRV-GD108ca株28℃和35℃培养条件下病毒滴度分别达到 $1.26 \times 10^{6.1}$ 拷贝/ml、 $6.9 \times 10^5$ 拷贝/ml,GD108株在28℃和35℃培养条件下病毒滴度分别为 $1.05 \times 10^8$ 拷贝/ml,及 $6.8 \times 10^7$ 拷贝/ml,结果表明,GD108及GCRV-GD108ca株未获得温度敏感性。

[0091] 实施例3免疫效力实验及保护效果

[0092] 取低温冷适应培养的30代病毒株GCRV-GD108ca株用0.65%的生理盐水进行100倍稀释,稀释后病毒含量为 $\geq 1 \times 10^4$ 拷贝/ml,将 $10 \pm 2$ cm体长的草鱼分为3组,每组50尾,28℃水温暂养一周,如无特殊情况发生,进行免疫实验,一组注射GCRV-GD108ca株病毒稀释液,剩余两组分别作为阳性及阴性对照组注射生理盐水,注射剂量为0.2ml/尾,注射前、注射后

分别禁食24h,免疫后逐日观察,记录实验鱼死亡及发病状况,21日后免疫组及阳性对照组进行攻毒,攻毒病毒株为GCRV GD108株,攻毒剂量为50个LD<sub>50</sub>/0.2ml,攻毒后继续逐日观察15日,记录实验鱼发病及死亡状况,结果见表3。

[0093] 表3 GCRV-GD108ca株效力检验结果

组别	发病率	死亡率	剖检病变检查
免疫组	0/50	0/50	无症状
[0094] 阳性对照组	50/50	45/50	鳍条出血、肠出血, 具有典型草鱼出血病症状
阴性对照组	0/50	0/50	无症状

[0095] 表3结果表明,用GD108强毒株(分离后接PSF细胞制备的出血病细胞强毒)攻毒经冷适应株免疫的实验鱼,每尾腹腔注射50个LD<sub>50</sub>/0.2ml,免疫组死亡0尾,阳性对照组死亡45尾(死亡率90%)以上,阴性对照组未发生死亡状况,免疫试验鱼相对保护率均为100%。

[0096] 实施例4安全性实验

[0097] (1) 不同鱼种大剂量注射安全性实验

[0098] GCRV-GD108ca第30代毒种原液稀释10倍(病毒含量 $\geq 1 \times 10^5$ 拷贝/ml,即10倍于免疫注射浓度),用4月龄易感草鱼20尾直接腹腔注射接种,每尾注射0.2ml;同时用该毒种对4月龄(10~12cm)鲢、鳙、鲤、鲮、罗非鱼、加州鲈和太阳鱼等七种非靶淡水鱼类各6~10尾直接腹腔注射接种试验。

[0099] GCRV-GD108ca株第30代细胞病毒液大剂量腹腔注射4月龄易感草鱼20尾和4月龄不同品种的其它非靶淡水鱼类各6~10尾在水族箱中饲养20日,实验鱼全部存活,体表观察及剖检结果未见异常(见表4)。

[0100] 表4 GCRV-GD108ca株毒种(细胞病毒液)对草鱼和其它品种的安全性

鱼种 品名	规格 (cm)	毒种浓度 (拷贝/ml)	注射剂量 (ml/尾)	存活尾数/ 总尾数(尾)	成活率 (%)	临床观 察	剖检
草鱼	10	$1.2 \times 10^5$	0.2	20/20	100	无异常	无异常
鲢	7~8	$1.2 \times 10^5$	0.2	10/10	100	无异常	无异常
[0101] 鳙	6~7	$1.2 \times 10^5$	0.2	10/10	100	无异常	无异常
鲤	5~6	$1.2 \times 10^5$	0.2	10/10	100	无异常	无异常
鲮	10~14	$1.2 \times 10^5$	0.2	6/6	100	无异常	无异常
罗非鱼	5~6	$1.2 \times 10^5$	0.2	6/6	100	无异常	无异常
加州鲈	9~10	$1.2 \times 10^5$	0.2	6/6	100	无异常	无异常
太阳鱼	5~6	$1.2 \times 10^5$	0.2	6/6	100	无异常	无异常

[0102] (2) 同居感染实验

[0103] GD108株第30代细胞病毒液( $1 \times 10^{6.84}$ 拷贝/ml)稀释100倍注射4月龄易感草鱼50尾,剂量为0.2ml,饲养在鱼塘的网箱中,同时放入没有注射病毒液的草鱼、鲮、罗非鱼、鳙和鲫各7~12尾与其同居,饲养20日,感染草鱼和其它同居的鱼全部存活,体表观察及剖检结果未见异常,每一种鱼的体重都有不同程度的增重(见表5),池塘中养殖的各种淡水鱼类也正常,没有发现死鱼。

[0104] 表5同居感染试验结果

	鱼种	试验前平均体重 (g)	注射剂量 (ml/尾)	存活尾数/总尾数 (尾)	成活率 (%)	临床观察	剖检	试验后平均体重 (g)	平均增重 (g)
[0105]	草鱼	8.2	0.2	50/50	100	无异常	无异常	10.2	2.0
	草鱼	15.7	/	10/10	100	无异常	无异常	19.5	3.8
	鲮	4.8/	/	9/9	100	无异常	无异常	8.6	3.8
	罗非鱼	20.2	/	12/12	100	无异常	无异常	32.0	11.8
	鳊	81.6	/	7/7	100	无异常	无异常	87.4	5.8
[0106]	鲫	29.4	/	7/7	100	无异常	无异常	36.1	6.7

[0107] 实施例5GCRV-GD108ca株毒力返强实验

[0108] (1) GCRV-GD108ca株在PSF细胞上连续传代毒力返强实验

[0109] 病毒培养采用吸附接种法,即PSF细胞长满单层后,用无血清M199培养基稀释GCRV-GD108ca株病毒液,1ml/瓶接种细胞瓶,接种完成后28℃恒温孵育1h,弃去孵育的病毒液,加入含2%血清的M199培养基细胞维持液,置28℃恒温生化培养箱培养,持续7天后放置-20℃冻融两次,作为下一代继代毒种;按上述方法持续继代20代。每隔5代进行鱼体攻毒实验,病毒液稀释至滴度 $\geq 1 \times 10^4$ 拷贝/ml,取体长为 $10 \pm 2$ cm的草鱼20尾,0.2ml/尾腹腔注射稀释后的病毒液,逐日观察实验鱼的临床反应、摄食、游泳、活动情况及注射伤口的变化情况,直至21日,并统计死亡及健活鱼数。结果见表6。

[0110] 表6 GCRV-GD108ca株在PSF细胞传20代,不同代次攻毒草鱼的观察情况

	病毒传代次数	接种物	接种剂量 (ml/尾)	接种途径	观察日数	存活尾数/总尾数 (尾)	存活率 (%)	临床观察	剖检
[0111]	P5	细胞病毒液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
	P10	细胞病毒液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
	P15	细胞病毒液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
	P20	细胞病毒液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常

[0112] 表6结果表明第5、10、15、20代细胞病毒液注射实验鱼后,21日内草鱼全部存活,临床观察及剖检结果未见异常。

[0113] (2) GCRV-GD108ca株在鱼体内连续传代毒力返强实验

[0114] 首次接种GCRV-GD108ca的细胞病毒液采用大剂量即 $\geq 1 \times 10^5$ 拷贝/0.2ml接种草鱼30尾,继代时接种10倍稀释的组织浆悬液,每尾0.2ml。接种后的草鱼,饲养10日后,收集草鱼取其肝、脾、肾组织,按1:10 (W/V) 加入无血清的细胞培养液,冰浴中匀浆后,经10000rpm/min离心20分钟,无菌操作收集上清液,加入1000IU/ml青霉素和1000 $\mu$ g/ml链霉素,置4℃冰箱过夜,经检验合格后作为第2代继代接种物。由第1代接种分离到的材料按照与第1次传代相同的途径接种继代草鱼。每一次继代后的病毒重新分离和鉴定方法与第1次传代相同。共在鱼体内继代5次,每一次继代后在21日内逐日观察草鱼是否出现由于疫苗株毒力返强所导致的临床症状。每一次继代接种草鱼30尾,接种后10日收集草鱼10尾用于分离病毒,其余20尾继续饲养至15~21日观察其安全性。

[0115] 对每一代分离物进行RT-PCR鉴定,按购买试剂盒说明书抽提分离组织RAN,反转录

后进行RT-PCR鉴定,设立阳性及阴性对照,RT-PCR鉴定方法同特异性检验。

[0116] 结果表明,GCRV-GD108ca株细胞病毒液在草鱼体内连续传5代,每代分离物均可检出II型草鱼呼肠孤病毒特异性条带,每代草鱼饲养21日,草鱼全部存活,临床观察及剖检结果未见异常(见表7)。

[0117] 表7 GCRV-GD108ca株毒种在草鱼体内传5代,每代草鱼的观察情况

病毒传代次数	接种物	接种剂量(ml/尾)	接种途径	观察日数	存活尾数/总尾数(尾)	存活率(%)	临床观察	剖检
1	细胞病毒液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
2	10倍稀释的组织浆悬液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
3	10倍稀释的组织浆悬液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
4	10倍稀释的组织浆悬液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常
5	10倍稀释的组织浆悬液	0.2	腹腔注射	21	20/20	100	无异常	无异常

[0119] 综上,GCRV-GD108ca株在细胞传20代、在动物体内继代5次均未发生毒力返强现象。

[0120] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

## 序列表

<110> 中国水产科学研究院珠江水产研究所

<120> II型草鱼呼肠孤病毒冷适应株GCRV-GD108ca及其应用

<160> 9

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 939

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

aaaaaccatt gacgtttttg gatctcacc gactcaatga ggcaatctgc tctcgggctc 60
tcttctttga taatgataac aactgctggt ctgtgtctcc aatcgcecca aggcaagcca 120
aattccatga ctgagttggt tgtattcgat gtggagcgcc cattgacaaa gtccatgcaa 180
tgtcaattcc accaccccct gtgcatggct gcattccgat gctggagcat agccaatggg 240
aagatctgta tgagttggct gatgatatgg gtcgctgtat ttggtgggct aaaaagcaac 300
tgatcatctg gatggaggga atagtgaatc tgaaggctgg taaggtgtat aacgataatg 360
tgagtaaccg cagcgagtgg ccagatgagg tgtgggatga aacatgcaaa atcttctgca 420
aatgggcaac gcaaaaatcgt gtggcgagcc gttggataca gtcaccatca cgtgtgtaca 480
agtttctttg tgaccaggaa agtaagatga acattgatgc tctggagcta tccaaccatc 540
agatttttca ggcaccaccg aaatggcccg agctagctat ggctgtcccc cattgggtccc 600
catccgtgca tgagatgcta aatggtcaca aaatgggtgat gattgtgccc cgcttgtcca 660
tgccagtcac atttgatccc gccaacgggt acgtcgcccc aatctacacc gcggccatga 720
tcagtctccc gtcccaatgg tgggtgtcac aatacgtaaa agttcatgga agccacatgg 780
tgccacgttt gtatgggtgat gacgtcccaa cttacgttc ccgctgcca aatgcttcta 840
ccacaacctc cactctcat acgcaactcc tgatgctgcc tgaagctcaa tcgaccttca 900
aacctgagat ccaggacag taatgactga ttccatacc 939

```

<210> 2

<211> 1269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

```

tggggcgat cccttacata tctgcacccc aggettcttc ggcgcaatg ttccgccttt 60
taaaacaata gacatacaac gatctacgac ggggtgtaat acgctttgga atgcgcgcgg 120
tcacgatgct ttcaggactt accctaaagt ggtatctcat gagaaggatt tccttcta 180
ttatacagag cagtttacat tcaacttget tattggcgcc ttctccagc aaccctact 240
gcagaactcg attgaccgac aatggagggg tatgatttgg acatctgatc ggcttagctc 300
gttgcgtata gcgccaccga attcacgtgc tgctgatctg cctcgcgat atcgtacgtt 360
ggaccttgcg aattaccac tatggggaac tgcacctgct gccctacaga cactatggat 420

```

ggacagttgt ctgatgacat tagagagttt atctgcgaga ggaccttttc tttacctccg 480  
gcatcctcaa gctcgaccag acgggaatgt tttacgagcc ttacagcagc atatttccaa 540  
gccaatggag gccatagtct cggaagccta ccaatcaata gctatgggac ctttgacatt 600  
gcaagacggg tattatcgcg ctctgtcagt gatcacctc atctatctag cctctctgac 660  
cggtcgtctg ggccctgacc gtacatatta tggtttctac gtccaattcc ctaagaaacg 720  
gaaatttgag gatctcggat actttgcgta caatgctgat ggacgtaacg tcgctgtcct 780  
gcaatccatt aacgcctaca tctactgtgc ttacctgac tggcagtaca gctgtgcct 840  
ctactacttg cacgtccttt ctgcctatc gctctctgg actgatccag ttggaatgat 900  
agatggtttc tcgtgtgtca atcaattcac ggacgttctt ggttggtctg ccacaaaccg 960  
tgctttgcac acgcatagct tcaactggtt caacctactg gaggacgcta ttgacacact 1020  
agttgcacgt agatactgga ccaatgccga gggacaggcc atacggcagg aatggacggc 1080  
ggcgcgagac aggtggcgag tgatcatgga cgcaaccct gatgaggatg acttggtggt 1140  
gttccgtacg ccagacgatt gtcgtagaag gcttaaact tatggggaca ataattggac 1200  
gcgtgcttac gatactgccg atgtggtgcg ggtgttggat cgcttatccc tagacctatc 1260  
ccagcccgg 1269

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

acgtgcgatt ggaagagctt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

agttctcaaa gctgagacag 20

<210> 5

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ccgatactc acca 14

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cgctgatgta attgatgcc 19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ggatcattta cgtcgtat 18

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ataggatcca tggcgggtgt gtctctcaac a 31

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gctaagcttc agcatctgcg caaatatacg tc 32



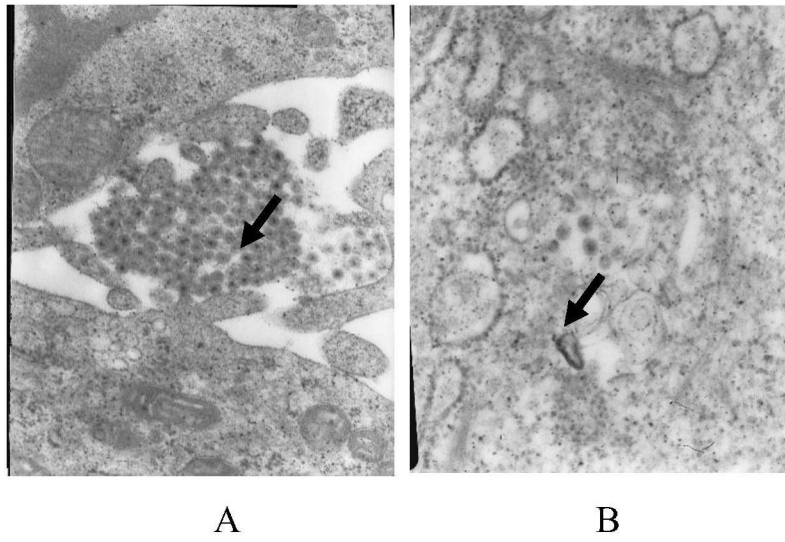


图1

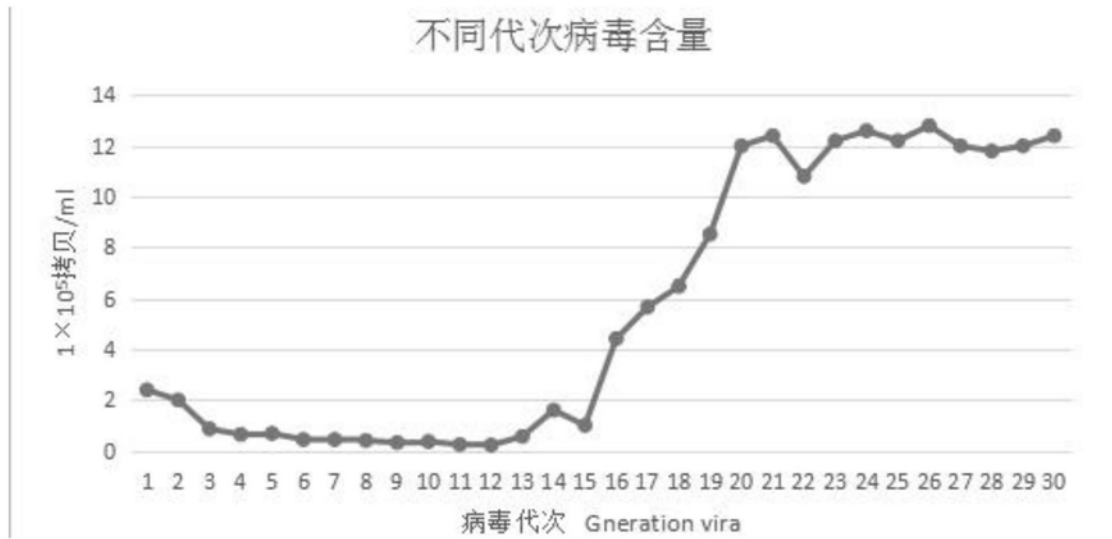


图2

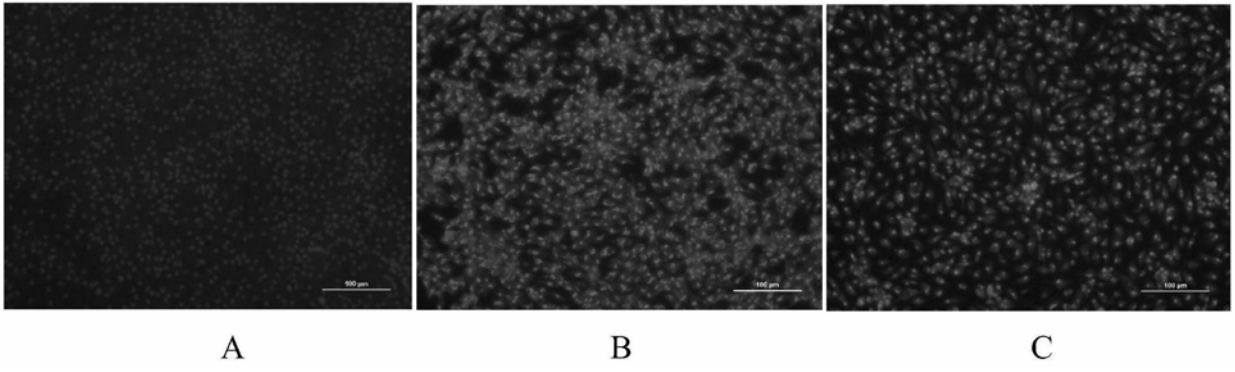


图3