·综述·

# 草鱼病毒性出血病研究进展

王方华，李安兴
（中山大学生命科学学院，广东 广州 510275）

**摘要**：草鱼出血病是严重困扰着草鱼养殖业发展的一大疾病。根据近几十年来对于该病研究的进展，就草鱼出血病病原的生物学特性、不同发现株之间的比较、分子生物学研究以及疾病的防治等方面进行综合评述，总结了草鱼出血病的研究现状及研究中亟待解决的问题，并提出了该领域以后的重点研究方向。为进一步深入开展对该病的防治研究提供参考，以提高草鱼养殖的生产率。

**关键词**：草鱼出血病；呼肠孤病毒；分子生物学；病害防治

**中图分类号**：S941.41+1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-2227-（2006）03-0066-06

# Advances in research of hemorrhage of grass carp

WANG Fanghua, LI Anxing
( *The School of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou* 510275, *China*)

**Abstract**: Grass carp hemorrhagic disease is a severe disease that affect the grass carp breeding. In the past several decades, progress has been made in the research of grass carp hemorrhagic disease in China. The most important advances about GCRV including the biochemical and ultra-structural characteristics of GCRV, the molecular biology research advance, the current strategies on diagnosis and control of GCRV. Here we review these progress and put forward the questions we should resolve in the future, hoping to enhance the productivity of grass carp breeding.

**Key words**: hemorrhage of grass carp; Aquareovirus; molecular biology; disease prevention

草鱼（*Ctenopharyngodon 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，而其中以草鱼出血病最甚，给养殖业带来巨大的损失[1]，因此草鱼出血病是我国水产研究中的一个重要课题。近十年来，随着现代分子生物学技术在鱼类病毒研究领域的广泛应用，中国的科技工作者对草鱼出血病病毒的研究和认识也愈来愈深入，取得了很多突破性的进展，进一步加深了人们对于该病的认识。本文对此进行综合评述，以期为进一步深入开展对于该病的防治研究提供参考。

## 1 草鱼出血病的流行病学和病原研究

草鱼出血病流行于湖北、广东、广西、江西、江苏、浙江、福建、上海、河南、河北、四川等省、市、自治区的主要养鱼地区。病鱼的主要症状是口腔、上下颌、头顶部、眼眶周围、鳃盖、鳃及鳍条基部充血，有时眼球突出；剥除鱼的皮肤，可见肌肉呈点状或块状充血、出血，严重时全身肌肉呈鲜红色；肠壁充血，但仍有韧性，肠内无食物；肠系膜、周围脂肪、鳔、胆囊、肝、脾、肾也有出血点或血丝，故以症状定名为草鱼出血症。根据出血部位的不同可将该病的症状分为3种类型：红肌肉型、红鳍红鳃

收稿日期：2006-01-04；修回日期：2006-01-10
作者简介：王方华（1982-），男，硕士研究生，从事水生经济动物病原分子生物学研究。E-mail：sdzbwfh@163.com
通讯作者：李安兴，E-mail：ls58@zsu.edu.cn

盖型和肠炎型。

草鱼出血病的发病季节长，每年 6 月下旬至 9 月底是主要流行季节，高峰在 8 月，在水温 25 ~ 30℃最为流行，死亡率高，高密度饲养的鱼种池危害更甚，常发生养殖的草鱼全军覆没。人工感染健康草鱼，从感染到发病死亡约需 4 ~ 15 d，一般 7 ~ 10 d，其病程有潜伏期、前趋期和发展期 3 个阶段。

早在 1953 年，倪达书等[2]就注意到具有出血症状的草鱼病鱼。1954 年秋开始怀疑它可能是一种病毒性疾病。陈燕燊等用分离病毒的方法从病鱼组织得到的滤液感染草鱼，获得典型的出血症状并能在单层细胞中传代繁殖，才正式确定草鱼出血病是由病毒引起。其根据病毒的形态和理化特性，将其定名为草鱼呼肠孤病毒（Reovirus of grass carp GCRV），该病毒隶属水生呼肠孤病毒属（*Aquareoviridae*），是中国分离的第一种鱼类病毒[3]。GCRV 除能感染草鱼外，还能感染青鱼、麦穗鱼、布氏餐条和鲢等，并能使这几种鱼发生出血病症状而死亡，尤其是稀有鮈鲫死亡率高达 100%。电镜观察患病鱼的组织切片发现，在其肝脏、心脏、肌肉、肾脏、脾、鳃和肠道内都发现有病毒粒子的存在。另外，毛树坚等[1]曾报道了从出血病病鱼组织的电镜研究中发现了 2 种病毒颗粒，一种是呼肠孤病毒，另一种是 20 ~ 30 nm 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，并且用这 2 种病毒分别感染健康草鱼，可导致不同的发病症状：呼肠孤病毒主要导致“肠出血型症状”，另一种病毒（经初步鉴定属于小 RNA 病毒科）主要导致“肌肉出血型”出血病。此结果同时也初步解释了出现不同症状出血病的原因。但关于草鱼小 RNA 病毒导致草鱼出血病的病理机制以及病原和病症的关系，未见有进一步的报道。

## 2　呼肠孤病毒的生物学特性研究进展

### 2.1　病毒结构研究

近年来，随着低温电镜技术和计算机三维重构方法的逐步应用，对于病毒的三维结构更精细的研究工作正逐步展开，最近方勤等[4]对该病毒分辨率达到 17 埃的三维重构与衣壳蛋白特性研究。结果表明：GCRV 颗粒呈多层排列，包括 RNA 核心与内壳层、中间层与外壳层。由 200 个按 T = 13 对称排列的三聚体构成外衣壳。其典型特征是在 5 次轴上出现三聚体缺失凹陷区，暴露出中间层三聚体亚单位，内壳层由 120 个单体构成，按 T = 1 排列。结构特点与呼肠孤病毒科成员内衣壳特征相一致。通过对纯化的 GCRV 完整颗粒进行电泳分析，揭示成熟的病毒含有 7 种衣壳蛋白组分（VP1 ~ VP7）。分子量在 34 ~ 138 kDa 之间。

### 2.2　GCRV 的理化特性研究

GCRV 主要由蛋白质和核酸组成，还含有少量的糖类，以糖蛋白的形式存在，不含脂类[5]。GCRV 对温度（56℃）有一定的稳定性，但反复冻融会对病毒感染力有较大影响，病毒对氯仿、乙醚等有机溶剂有一定的抗性，对酸（pH = 3）、碱（pH = 10）处理不敏感，完整病毒在氯化铯中的浮力密度约 1.36 $g \cdot mL^{-1}$。在蔗糖中浮力密度为 1.305 $g \cdot m^{-3}$，另外，用胰蛋白酶或精氨酸处理 GCRV，病毒滴度都略有上升[6]。

### 2.3　细胞培养和感染特性

GCRV 能感染培养细胞并增殖和传代，产生合胞体状细胞病变效应（CPE）。现已建立起多株对 GCRV 敏感的细胞系[7]。病毒复制部位在胞浆，能形成晶格状排列，在体外细胞培养中最佳增殖温度为 28℃，一般感染 12 h 后即开始增殖，24 ~ 72 h 大量增殖，使细胞产生典型的病理变化（CPE），形成直径约为 2 mm 的空斑[8]。5 d 左右达到最大增殖，此时病毒的滴度最高，以后逐渐平缓。关于病毒的致病机理、宿主范围及病毒的检测曾有系统的综述[9-11]。

## 3　不同地区分离株的比较研究

目前已经报道了许多对于该病的分离株，并对各分离株的特性分别进行了研究报道[12-13]，但对于各分离株之间的差异比较尚未见有系统的报道。而就相关的分离株进行比较研究，有助于认识该病毒的遗传差异与进化、病毒的区系分布等，为进一步构建该病毒的系统进化树提供参考。同时通过比较各分离株免疫原性的差异，找出不同分离株抗原蛋白或基因之间的差别，可为下一步亚单位疫苗和基因疫苗的制作提供一些依据，从而能制备出保护率更高的并能对所有 GCRV 病毒分离株进行免疫保护的疫苗，解决目前一种疫苗不能保护鱼抵抗所有分离毒株的难题。因此对不同地区分离株的比较有较大的实际意义，应加大对这方面的研究力度，弥补在该病毒研究中的空缺。

### 3.1　不同毒株之间核酸分子量的比较

各毒株之间核酸分子量比较见表 1。从表中可以看出，GCRV 不同分离株其基因组都由 11 个 dsRNA 片段组成，不同的毒株之间，病毒基因组的总分子量差异不大，而各片段分子量有所差异[14,17]。这一点从它们的基因组 PAGE 图谱中也可反映出来[18]。而对于这些不同毒株间基因组序列比对的研究可作为描述水生呼肠孤病毒属不同成员多样性的一个标准。另外进一步探讨这些不同基因片段所编码的蛋白之间的差异，可以为进一步弄清组成该病毒结构的不同蛋白及其所执行的功能差异奠定基础。

### 3.2　不同病毒株细胞感染特性和致病性的比较

现已建立起多株对 GCRV 敏感的细胞株（系），但不同分离株对细胞株的感染性方面存在一定的差别。李军等[15]比较了 GCRV861 和 GCRV873 2 毒株的组织培养特性，

表1 GCRV 不同地区分离株病毒基因片段分子量大小比较

Tab. 1 Comparison of the molecular weight of GCRV

| 病毒株 isolate | 基因组片段/kb fragment of genome | | | | | | | | | | | 总分子量 MV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L1 | L2 | L3 | M1 | M2 | M3 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | |
| MGCRV-875(武汉南湖株)[14] | 2.75 | 2.47 | 2.26 | 1.52 | 1.40 | 1.38 | 1.06 | 0.91 | 0.89 | 0.60 | 0.55 | 15.06 |
| GCRV-861(武汉东西湖株)[15] | 2.85 | 2.70 | 2.65 | 1.30 | 1.25 | 1.20 | 1.04 | 0.95 | 0.89 | 0.75 | 0.70 | 16.28 |
| GCRV-873 (湖南邵阳株)[5] | 3.10 | 2.70 | 2.33 | 1.34 | 1.25 | 1.21 | 0.87 | 0.82 | 0.71 | 0.57 | 0.55 | 15.46 |
| GCRV-991 (湖南长沙株)[16] | 2.61 | 2.55 | 2.28 | 1.39 | 1.34 | 1.27 | 0.89 | 0.81 | 0.71 | 0.58 | 0.55 | 14.48 |
| GCRV-854 (湖北仙桃株)[17] | 2.45 | 2.28 | 2.24 | 1.50 | 1.42 | 1.30 | 1.00 | 0.80 | 0.55 | 0.54 | 0.30 | 14.06 |
| GCRV-D2 (未知株)[15] | 2.48 | 2.47 | 2.26 | 1.52 | 1.40 | 1.38 | 1.30 | 1.06 | 0.91 | 0.89 | 0.60 | 15.52 |

发现 GCRV873 株感染草鱼肾脏组织 CIK 和 GCK 细胞，28℃培养 3～4 d 后，培养细胞大部分裂解，出现典型的细胞病变效应（CPE），而 GCRV861 株感染 CIK 和 GCK 细胞，连续传至 10 代也未见明显的 CPE。另外，在研究中还发现，GCRV 感染细胞的能力与其感染鱼体的毒力并不都是一致的，GCRV873 对培养细胞感染力强，但对鱼体的毒力却较弱。而 GCRV861 株则恰相反[16,19-20]。方勤等[21]对低温保存的 3 株草鱼呼肠孤病毒 GCRV873、GCRV875、GCRV876 与新分离的 GCRV991 毒株进行了细胞培养与病毒感染特性的研究。结果发现，低温保存的前 3 株病毒株在长时间保存后其滴度有所降低，但仍有一定感染性。经传代培养后，毒力逐渐升高并趋于稳定，并有结果表明不同地区分离株病毒的细胞感染特性是有所不同的，其中湖南地区分离的 873、991 毒株感染特性最强。这一结果与湖南地区高的发病死亡率也是相吻合的。

## 4 病毒的分子生物学研究进展

### 4.1 病毒基因克隆与文库构建研究

自 1983 年首次分离 GCRV 以来，迄今已有十多年的历史。由于 GCRV 含 11 条双链分段 RNA 基因组以及其 3′端不含 poly(A)尾的特性，使得其基因组文库的构建具有一定的难度及复杂性。虽然目前最为普遍的 cDNA 文库构建多采用 RT-PCR 合成 cDNA，但该方法均需借助计算机数据库进行相关种属序列的同源性及保守区域的分析，以获得 RT-PCR 的引物序列，从而构建同类病毒新毒株的 cDNA 文库。由于 GCRV 为呼肠孤病毒科新属新种，在无法进行同源序列比较的情况下，采用随机引物法引导 cDNA 合成不失为一种简单、可行的策略。LI 等[22]用此方法，通过 PCR 扩增得到了 GCRV861 株第 6、9 节段部分序列。方勤等[23]在原有随机引物法的基础上，通过进行一系列条件比较，采用微克级模板，成功地构建了 GCRV-RNA L1、L2、L3、M6、S7、S9、S10、S11 的 cDNA 文库。并用所构建的文库进行了 GCRV 各基因片段的序列分析。该成果将为 GCRV 以后的同源性比较、进化研究及各基因片段所编码的蛋白质结构与功能研究奠定良好的基础。

### 4.2 GCRV 体内与体外转录和翻译研究

GCRV 基因组的转录和翻译过程都是在宿主细胞质中完成的，病毒核酸可穿过核心上的中空钉状物释放到宿主细胞的细胞质中。近年来的研究表明：GCRV 核心内含有 RNA 转录酶，可催化 dsRNA 中的一条链转录合成 mRNA，该酶的最适酶活温度是 28℃，且能保持较长的反应时间[24]。在体外转录条件下，双链 RNA 各节段是全长转录，各节段长度成反比，并且 RNA 聚合酶需要低离子浓度活化，GCRV 转录酶的上述特征，有别于呼肠孤病毒科的其它成员，这是由于它们各自所适应不同的宿主结构的缘故。张保焰和柯丽华[25]研究还发现，GCRV 基因组的体内转录分为早晚 2 期，早期转录是在病毒感染细胞后 4 h 开始的，8 h 后开始晚期转录，转录产物 mRNA 的大小和数目大体上与病毒基因组的一致。早期转录是 RNA 转录酶以初始感染的病毒 dsRNA 为模板进行的转录；晚期转录则是以子代病毒基因组为模板进行的转录，二者没有本质上的差别，只是转录模板的来源不同。

方勤等[26]进行了该病毒 RNA 聚合酶基因保守区重组子（GCRV-RdRp）功能区序列在原核细胞中的表达研究，并得到高效表达的融合蛋白，最近又在此基础上继续对该聚合酶基因含保守区的 5′与 3′末端序列进行了体外表达与纯化研究，由此构建了含保守区 GCRV RNA 聚合酶的 N 端与 C 端部分基因的重组表达质粒，以确定该基因在原核细胞的表达水平及表达产物的生物学特性。根据对该酶的功能研究发现，在 RNA 病毒复制周期的转录调节与翻译中，5′与 3′末端序列对于双链 RNA 解旋与单链 RNA 模板的结合才是至关重要的[27]。上述研究结果为 GCRV RNA 聚合酶特性分析提供了依据，并为进一步酶特性测定与特性分析奠定了基础。

目前，尚未见到关于 GCRV 体内翻译的报道。但是对

于 GCRV 在体外翻译的研究结果表明：草鱼出血病病毒 dsRNA 的一条链具有 mRNA 的性质，可在体外进行翻译，其翻译产物为 11 条多肽链，与病毒的结构多肽是一致的，只是片段 S2、S3、S5 编码的多肽与病毒衣壳中的结构多肽在分子量上有所差异[28]。推测这些体外翻译产物可能为结构多肽的非成熟中间产物，在宿主细胞内装配过程中还需要进一步的修饰加工。

### 4.3　病毒基因组结构研究

草鱼呼肠孤病毒（Grass carp reovirus GCRV）基因组由 11 个 dsRNA 片段组成[11,29]，不同的毒株间病毒基因组的总分子量差异不大（约 $15\times10^6$Da），而各片段分子量有所差异，按分子量大小，11 个片段可分为 3 组，即较大片段（L1、L2、L3）、中等片段（M1、M2、M3）和较小片段（S1、S2、S3、S4、S5）。邱涛等[30]通过对 GCRV873 基因组研究，首次发现该病毒基因组外存在缺损性干扰颗粒的病毒亚基因组分，并从中筛选出 2 条缺损性干扰颗粒 cDNA 进行了序列分析，确定了其性质，因为其基因组只是亚基因片段，为原基因组核酸片段经剪切、重排并被错误包裹入病毒衣壳而形成，其自身属性决定其亚基因组中携带了众多正常病毒颗粒所没有的信息，使之成为研究该病毒复制、装配过程以及调控信息的有利工具。

### 4.4　病毒蛋白功能研究

方勤等[31]对病毒基因所编码的蛋白功能进行了详细的描述：（1）病毒核衣壳组分 VP3 和 VP6，分别由基因片段 L3 和 S2 编码，为核心衣壳的主要成分，它们在病毒的转录与复制及病毒核衣壳形成中起着重要的作用。VP3 蛋白序列具有核苷酸结合位点，另外还具有解旋酶和 RNA 三磷酸酶/ATP 酶活性，其主要参与病毒转录过程中基因组负链的解旋与帽化的能量供应，但 VP3 功能的发挥离不开 VP6 的帮助，其在病毒 VP3 核壳构象形成中具有十分重要的功能。另外研究还发现 VP6 有弱的 dsRNA 结合能力。（2）病毒钉状物突起 VP1，VP1 蛋白五聚体蛋白为呼肠孤病毒 L2 基因片段编码，已证实 VP1 蛋白与外衣壳蛋白 VP7 和 VP5 以及内衣壳 VP3 和 VP2 有很强的亲合作用与相互联系。序列及结构分析表明：VP1 蛋白具有鸟苷酸转移酶和 2 种甲基化酶活性，与 mRNA 5′末端的甲基化有关。（3）微量核心组分 VP2 和 VP4，分别由基因片段 L1 和 M1 节段所编码。VP2 为 RNA 聚合酶，该蛋白位于内壳层 5 次对称轴通道孔洞处，参与新生 mRNA 的起始合成。VP4 蛋白的作用可能为病毒复制中的一种调节蛋白，在病毒转录与复制过程中协同 VP3 共同决定 NTP 酶活性。（4）病毒外衣壳结构蛋白，M1、S4 编码的病毒蛋白 VP5 和 VP7 构成病毒外衣壳组分，VP5 和 VP7 蛋白具有介导病毒粒子进入寄主细胞质的功能，此外 VP5 还可进行构象的改变，其作用是保证膜穿透。病毒粒子 VP7 具有协同 VP5 蛋白通过构象变化行使膜穿透功能。

## 5　草鱼出血病的防治研究进展

### 5.1　草鱼出血病的疫苗防治研究

草鱼出血病是一种病毒性鱼病，危害很大，感染此病后，当年草鱼死亡率一般为 30% ~50%，最高可达 60% ~80%。而免疫预防是该病最有效的防治方法之一。因此疫苗研制对该病的防治意义重大。对于草鱼出血病毒疫苗的研制大致经历了组织灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗等阶段，但都存在一定的缺陷[32]。组织灭活疫苗须含足够的病毒才能引起免疫应答，而大剂量（常是必须的）又可引起局部或全身的反应。该疫苗不能进入 MHCI 类抗原呈递途径，因此不能有效的诱导 CTL 反应，并且所获得的免疫性一般是短暂的，须激发注射。而减毒活疫苗由于存在致病性、刺激性过强和回复致病性的潜在危险，而且活疫苗生产还可能造成污染，含有生产过程带来的潜在有毒物质，因此在成本和生产技术上要求比较高。另外，上述 2 种疫苗的主要缺点是需要冷冻保存，这样既增加成本又影响有效寿命，尤其是影响其在发展中国家的推广使用。亚单位疫苗由于制备过程复杂，成本高，要求技术含量高，因此也没有得到推广应用。而众所周知，理想的疫苗应具备的特征有：安全、廉价、热稳定性好、含有多种具有保护作用的免疫原，最好是一次口服即可生效。目前常规疫苗没有一个能完全满足上述标准。因此基因疫苗应运而生。基因疫苗与传统疫苗相比有一些明显优点，主要表现在以下几个方面：（1）基因疫苗接种后，抗原蛋白在宿主细胞内表达，加工处理过程与病原的自然感染类似，抗原呈递过程也相同，因而可以诱导机体产生细胞和体液免疫；（2）抗原基因在体内存在时间比较长，不断表达抗原蛋白，持续给免疫系统提供刺激，因而能够刺激机体产生较强和较持久的免疫应答；（3）可以将包含不同抗原基因的质粒混合进行联合免疫；（4）质粒载体没有免疫原性，可以反复使用。总之，基因疫苗以其抗原性强、保护时间长、改造方便、制备和运输方便而越来越受到人们的重视。成为一种全新的免疫方式[33]。

就草鱼出血病的致病呼肠孤病毒来说，现在我们已经得到了其病毒的全部基因片段，并建立了相应的基因文库及基因表达多肽的图谱。王炜等[34]曾对 GCRV 单个多肽进行了免疫原性研究，并筛选出 VP6 为免疫原性强的多肽片段，这说明单个多肽作为抗原能刺激机体中和抗体的产生。而我们已经知道了编码这个多肽的基因序列，因此完全可以通过将这段序列与载体结合制成基因疫苗来免疫草鱼。另外，还可将不同地区发现的毒株中免疫原性强的多肽片段制成联合免疫疫苗，以提高草鱼对不同毒株的抗性。相信这将是非常有意义并且实用价值的研究内容。可为疫苗

的研究方面开拓一条新的思路。但由于基因疫苗的发展刚处于起始阶段，对于基因疫苗在鱼体内的作用和代谢机制还不完全清楚，其便捷实用的使用方法和适宜剂量也需要实验的深入研究。另外，对于基因疫苗中所用的抗原基因的分离技术还很不成熟，抗原表达控制元件的优选也有待于进一步的探索。但可以肯定，未来更多的高效安全、使用方便的基因疫苗的制备和大规模生产，必将能够促进我国草鱼养殖业的发展。

### 5.2 草鱼出血病的中草药防治

中草药具有天然、高效、毒副作用小、抗药性不显著、资源丰富以及性能多样化等优点，在防治鱼病中，除了兼有药性和营养性外，还具有提高水产动物生产性能和饲料利用率的功效。因此应用中草药防治鱼病越来越受到人们的关注，并总结筛选出许多在生产应用中行之有效的单方、验方[35-36]。在治疗及预防草鱼出血病中应用的最多的中草药有：大黄、黄柏、黄芩、大蒜等。袁良萃[37]在总结前人治疗草鱼出血病经验的基础上，经过反复实践，利用当归、大黄、板兰根、赤芍、虎仗等十几种中草药剂制成方剂“景珠牌止血散”，用于防治草鱼出血病，调查结果表明，有效率在95%以上，治愈率占90%以上。是中草药在防治草鱼出血病中很好的应用例子。

中草药虽然在防治鱼病方面有一定的功效，但在实际应用中也存在许多问题，集中表现在以下几个方面：（1）药材质量不稳定，由于季节、产地、炮制方法等不同，同一种中草药，其有效成分含量差异很大，有时同样的配方却疗效不同。（2）加工工艺原始，目前中草药的加工大多以原药粉碎或切碎煎熬，其配方多为粗制型产品，剂量使用偏大，适口性也差，不利于规模化生产、应用。应采取先进的生产工艺，对中草药进行提取、精制，使其向微量化、系列化、专用型方向发展。（4）对渔用中草药的药效、药理方面研究不足，对其有效成分难以确认，使用的剂量没有严格的标准。因此应加强在这方面的研究，加强对中草药进行提纯和治疗机理方面的研究，充分合理开发我国的中草药资源，以弥补在中草药研究上的空缺。使中草药在防治鱼病方面发挥其应有的作用。

### 5.3 草鱼出血病的其它防治方法研究

章怀云等[38]采用外源DNA处理方法，将鲤鱼精液、肝脏的总DNA以精子作载体处理草鱼受精卵，获得了数批经外源DNA处理的草鱼群体，并证明该群体在自然养殖条件下显示出一定的抗草鱼出血病的症状。当人工感染时，其抗病力比普通鱼强3.98～5.89倍。潜伏期长1～2 d，死鱼持续时间短1～2 d。其具体机制尚待进一步研究。

干扰素是至今发现的最为理想的一种抗病毒生物活性物质，是一种主要细胞调节因子，具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等功能[39]。目前研究较为活跃，邵建忠等[40]采用细胞病变抑制法测定了病毒诱导前后草鱼外周血中干扰素的活性变化，结果表明经病毒诱导的草鱼血清中出现明显的干扰素抗病毒活性，并对干扰素活性因子进行了理化性质的研究。GCRV激活寄主抗病毒防御机制是通过诱导合成和分泌干扰素来实现的，对鱼类干扰素研究不仅为干扰素的分子进化和比较免疫学等基础研究提供资料，具有重要的理论意义，而且在鱼病防治中有广阔的应用前景[14]。特别是通过草鱼干扰素研究有可能为我国水产养殖中的草鱼出血病防治开辟新的途径。

近年来，国外学者采用化学合成法或基因工程法构建随机肽库，研究蛋白质之间的分子识别、酶与底物的结合、抗原与抗体的相互作用，并使之成为一门新的快速有效、潜力巨大的技术，广泛应用于与分子识别有关的领域，如：抗生素筛选、酶抑制剂筛选、小分子药物设计、重组疫苗设计及病毒高亲和力的抗体、肿瘤治疗及免疫治疗，由于肽库技术具有如此重要的理论价值和应用前景，作为一项具有极大潜力的抗病毒新策略，越来越受到重视。王冰等[41]报道了从随机肽库中筛选出与草鱼出血病病毒颗粒特异性结合的短肽分子，并能有效的中和病毒、阻止病毒感染。这一新的途径提示了应用肽库技术在体外筛选抗病毒制剂的可能性，并为高效抗病毒短肽制剂的及小分子抗病毒药物的设计打下基础。

**参考文献：**

[1] 毛树坚，邵建忠，杭绮，等. 草鱼出血病的病原研究［J］. 水产学报，1989，13（1）：1-4.

[2] 倪达书. 我国鱼病学研究现状及其发展前景［J］. 现代渔业信息，1994，9（3）：1-4.

[3] 中国科学院水生生物研究所三室病毒组. 草鱼出血病病原的研究［J］. 水生生物学集刊，1978，6（3）：321-329.

[4] 方勤. 草鱼呼肠孤病毒的三维结构与衣壳蛋白特性［J］. 中国科学，2005，35（3）：231-237.

[5] 陈延，王炜，柯丽华，等. 草鱼出血病病毒的糖蛋白和结构多肽的抗原性［J］. 病毒学报，1992，3（1）：57-61.

[6] 曾令兵，袁明雄. 草鱼出血病病毒高滴度培养方法的研究［J］. 淡水渔业，2000，30（4）：40-41.

[7] 张义兵，石耀华，桂建芳. 鱼类培养细胞抗病毒基因差减cDNA文库的构建［J］. 水生生物学报，2003，27（2）：113-118.

[8] 丁清泉，余兰芬，王学兰，等. 草鱼出血病病鱼主要器官的超薄切片观察及感染力的比较［J］. 水产学报，1990，14（1）：66-69.

[9] 邵建忠，项黎新，李亚南，等. 应用Dot-ELISA技术检测草鱼出血病病毒的研究［J］. 水产学报，1996，20（1）：6-11.

[10] 李军，王铁辉，周立冉，等. 应用逆转录聚合酶链反应直接检测草鱼出血病病鱼组织的研究［J］. 水产学报，1997，21（2）：175-179.

[11] 李军，王铁辉，陆仁后，等. 草鱼出血病病毒的研究进展 [J]. 海洋与湖沼，1999，30（4）：445－452.

[12] 李亚南，毛树坚. 紫外线诱变建立草鱼抗出血病病原病毒的 AHZC88 细胞株 [J]. 水产学报，1990，14（2）：89－93.

[13] 郑德崇，黄琪琰，赵立勤，等. 草鱼出血病的电镜观察 [J]. 水产学报，1991，15（4）：317－320.

[14] 方勤，朱作言. 呼肠弧病毒结构与功能研究进展 [J]. 病毒学报，2003，9（4）：381－384.

[15] 李军，王铁辉，周立冉，等. 两种草鱼出血病病毒的比较 [J]. 中国水产科学，1998，5（3）：115－118.

[16] 方勤，肖调义，清泉，等. 草鱼呼肠孤病毒新分离株（GCRV991）的病毒学特性分析 [J]. 中国病毒学，2002，17（2）：178－181.

[17] 曾令兵，贺路，左文功. 草鱼出血病病毒 854 株的理化、生物学特性及基因组结构 [J]. 水产学报，1998，22（3）：279－282.

[18] 王炜，蔡宜权，方勤，等. 草鱼出血病病毒多肽的基因定位 [J]. 中国病毒学，1994，9（4）：356－361.

[19] 方勤，丁清泉，汪亚平，等. 两株水生呼肠孤病毒部分特性的比较 [J]. 中国病毒学，2003，18（5）：464－467.

[20] ZHANG Q, RUAN H, LI Z, et al. Detection of grass carp hemorrhage virus (GCHV) from Vietnam and comparison with GCHV strain from China [J]. High Tech Let, 2003, 9 (2): 7－13.

[21] 方勤，肖调义，李旅，等. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究 [J]. 中国病毒学，2002，17（2）：182－184.

[22] LI J, WANG T, LIU H, et al. A detection method of haemorrhagic virus of grass carp (GCHV) based on the reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Dis Aquat Org, 1997, 29 (1): 7－12.

[23] 方勤，田静. 草鱼呼肠孤病毒（GCRV）部分基因片段 cDNA 文库的构建 [J]. 中国病毒学，2000，5（1）：78－82.

[24] 方勤，丁清泉. 呼肠孤病毒内源性转录的结构基础 [J]. 中国病毒学，2004，19（5）：535－539.

[25] 张保焰，柯丽华. 草鱼出血病病毒基因组体内转录的研究 [J]. 中国病毒学，1993，8（2）：185－188.

[26] 方勤，朱作言. 草鱼呼肠孤病毒 RNA 聚合酶基因功能区在原核细胞中的表达 [J]. 病毒学报，2002，18（1）：86－88.

[27] 方勤，丁清泉，汪亚平，等. 草鱼呼肠孤病毒 RNA 聚合酶基因的表达与产物纯化 [J]. 中国病毒学，2003，18（2）：169－173.

[28] QIU T, LU R H, ZHANG J, et al. The molecular characterization of RNA segment S9 of grass carp hemorrhage virus (GCHV) [J]. Aquac, 2001, 203 (1/2) 1－7.

[29] 田静，邹桂平，方勤. 草鱼出血病病毒基因组的 cDNA 合成、克隆及部分序列分析 [J]. 中国病毒学，1999，4（1）：87－92.

[30] 邱涛. 草鱼出血病病毒 873 株基因组外发现缺损性干扰颗粒的亚基因组成份 [J]. 病毒学报，2001，17（2）：140－143.

[31] 方勤，朱作言. 水生呼肠孤病毒研究进展 [J]. 中国病毒学，2003，18（1）：82－86.

[32] 许淑英，李焕林，郑国成，等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果 [J]. 水产学报，1994，18（2）：110－115.

[33] 姜勋平. 基因免疫的原理和方法 [M]. 北京：科学出版社，2004：1－6.

[34] 王炜，陈延，柯丽华，等. 草鱼出血病病毒武汉南湖株的精细结构与基因组及多肽的研究 [J]. 病毒学报，1990，6：44－49

[35] 江河，戚少燕，陈宇，等. 特异化饵料免疫预防草鱼出血病的效果 [J]. 安徽农业科学，2001，29（5）：676－677.

[36] 汪长友. 中草药在鱼病防治中的应用 [J]. 水产养殖，2003，24（1）：44－46.

[37] 袁良萃. 中草药防治草鱼出血病新技术 [J]. 中国水产，2000（11）：78.

[38] 章怀云，萧克宇，陈韬，等. 外源 DNA 处理的草鱼对草鱼出血病毒的抗性观察 [J]. 湖南农业大学学报，1997，23（2）：154－157.

[39] 贾方钧，王铁辉，张义兵，等. 干扰素防治草鱼出血病的效果初探 [J]. 水产科学，2000，19（4）：1－4.

[40] 邵建忠，钱凯先，项黎新，等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究 [J]. 病毒学报，1998，14（4）：346－351.

[41] 王冰，柯丽华，江红，等. 从随机噬菌体肽库中筛选抗草鱼出血病毒多肽的研究 [J]. 中国病毒学，1998，3（4）：351－356.