

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0756 - 07

## 应用 dsRNA 测序技术检测草鱼呼肠孤病毒的混合感染

王 土, 许 丹, 吕利群

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 从草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 出血病疑似病料提取物感染的草鱼肾细胞 (CIK) 中提取病毒基因组 dsRNA, 电泳显示出水生呼肠孤病毒基因组的典型特征。应用简化的 FLAC (full-length amplification of cDNA) 技术扩增得到病毒的 4 个全长基因组片段进行测序分析。核酸序列 BLAST 分析表明: 其中 3 个基因组片段与 GCRV-873 第 5、9、10 片段高度同源, 另外 1 个基因组片段与 GCRV-HZ08 第 11 片段高度同源; 因此推测病料中同时存在两种不同的病毒核酸, 但也可能存在一种杂合病毒。根据已发表的 GCRV-HZ08 第 5、9、10 片段设计了 3 对引物对分离的病毒总 RNA 进行 RT-PCR 检测并测序, 结果显示这 3 个片段与 GCRV-HZ08 第 5、9、10 片段均具有 99% 同源性, 表明是由于混合感染而存在两株不同病毒的核酸 dsRNA, 两株病毒分别命名为 GCRV-JX01 和 GCRV-JX02。首次运用 dsRNA 测序法检测出了 GCRV 病毒的混合感染, 为草鱼呼肠孤病毒的流行病学和防控提供了一种新的技术选择。

**研究亮点:** 草鱼呼肠孤病毒是危害草鱼养殖最为严重的病原之一, 由于其基因组 dsRNA 组成的复杂性和不同毒株间的较大差异性, 全基因组序列的测序难度较大。应用简化的 FLAC 技术可以快速扩增出病料中 GCRV 病毒的部分基因组片段, 对扩增效率较高的基因组片段进行测序分析可以确定 GCRV 流行的株系特征。本研究运用此方法揭示了在江西地区收集到的病料中存在草鱼呼肠孤病毒两种毒株的混合感染, 为草鱼出血病的免疫学防控提供了科学参考。

**关键词:** dsRNA 测序; 检测; 草鱼呼肠孤病毒; 混合感染

**中图分类号:** S 917; S 941.41

**文献标志码:** A

我国草鱼养殖量约为淡水养殖总量的 23%, 每年因病害导致的损失占草鱼总养殖量 30% 以上。在草鱼所有病原中, 草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 危害最大, 其感染导致的草鱼出血病是一种高传染性、高致死性的病毒性疾 病, 成为我国淡水养殖中最为突出的问题之一。草鱼呼肠孤病毒是无囊膜的具有双层衣壳的正二十面体粒子, 核酸由 11 条分节段的双链 RNA 组成, 隶属于水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*, ARV), 是该属成员中毒力最强的病毒。现确定 GCRV 基因组共编码 7 个结构蛋白, 根据分子量由大到小依次定义为 VP1 ~ VP7; 其中 VP2 (病毒特异性 RNA 聚合酶) 和 VP4 (病毒特异性 NTP 酶

调节蛋白) 属基因组结合蛋白。构成病毒内外两层蛋白质外壳的 5 种蛋白中, VP5 和 VP7 组成病毒粒子的外层蛋白衣壳, VP3 和 VP6 构成病毒的内层蛋白衣壳, VP1 蛋白则横跨内外蛋白衣壳<sup>[1-2]</sup>。

草鱼呼肠孤病毒 3' 无 PolyA 尾结构, 各个毒株间序列差异较大, 同源性较低, 无法采用设计引物进行 RT-PCR 的方法扩增病毒全基因组, 研究其基因组结构和功能的进展缓慢。MAAN 等<sup>[3]</sup> 在 SPAT<sup>[4]</sup> 技术基础上改进的 FLAC (full-length amplification of cDNA) 技术, 可以对未知基因序列的 dsRNA 病毒基因组序列进行扩增, 但是研究表明其成功性受制于很多因素。在已知的

收稿日期: 2012-02-12 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 国家自然科学基金 (31072244); 上海市浦江人才计划 (10PJ1404800); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-46-12)

作者简介: 王 土 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产病原学。E-mail: tutumissy@163.com

通讯作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

草鱼呼肠孤病毒中,只有 GCRV-873 和 GCRV-GD108 完成了全基因组测序,难于测序的片段还需要借助传统方法破解。本研究发现部分基因组序列利用此方法容易快速测定,且重复性好。基于此发现,我们运用简化的 FLAC 技术揭示了在江西草鱼养殖区草鱼呼肠孤病毒不同毒株在同一批病料中的混合感染现象,可以为研究病毒性草鱼出血病病原变异和分型提供参考。本文进一步探讨了基于该技术在草鱼呼肠孤病毒流行性调查中进行应用的可能性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

草鱼肾细胞(CIK)由本实验室保存;草鱼呼肠孤病毒由发病草鱼分离得到;Medium 199 培养液购自杭州四季青公司;Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;引物均由上海生工生物工程有限公司合成;PrimerScript 逆转录酶购自 TaKaRa 公司; $T_4$  RNA 连接酶购自 NEB 公司;iProof High-Fidelity polymerase 购自 Bio-Rad 公司;RNeasy Kit 购自 Qiagen 公司;其余试剂(分析纯)均购自北京鼎国生物公司。

### 1.2 样品的采集与保存

发病的草鱼于 2011 年 8 月采自江西南昌地区疑似草鱼出血病发病池塘,症状突出表现为鳍基、鳃盖、眼眶明显充血,局部皮肤块状充血,带回实验室  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 病毒的分离与培养

综合柯丽华等<sup>[5]</sup>和毛树坚等<sup>[6]</sup>方法,研磨组织制成均匀的悬液。8 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,微孔滤膜过滤,将滤液(即为病毒液)于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。取病毒液感染 CIK 细胞,观察细胞至出现明显的细胞病变效应(CPE),收集上清,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 病毒基因组提取

病毒基因组 dsRNA 的提取参考 MAAN 等<sup>[3]</sup>,并且于 1% 琼脂糖凝胶电泳作快速分析。

### 1.5 FLAC 技术的应用与简化

根据 MAAN 等<sup>[3]</sup>的 FLAC 技术扩增出病毒基因组全长 cDNA。

#### 1.5.1 dsRNA 3' 加接头

500 ~ 1000 ng 纯化的 dsRNA 与 500 ng anchor-primer 在  $T_4$  RNA ligase (10U) 的作用下,

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应过夜。

#### 1.5.2 连接产物的纯化

连接产物的纯化方法按照 RNeasy kit 说明书步骤进行。

#### 1.5.3 cDNA 的合成

纯化得到的 dsRNA 逆转录过程参考 PrimerScript 逆转录酶说明书。

#### 1.5.4 单引物 PCR 扩增

PCR 体系参考 iproof HF Polymerase 说明书。反应条件为: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min,共 35 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.6 PCR 产物 T-A 克隆

PCR 产物纯化后进行 3' 加 dATP 反应,与载体 pMD19-T 连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,涂布于含有氨苄西林的 LB 固体培养基培养,进行蓝白斑筛选,阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.7 GCRV M6 片段的特异性 PCR 检测

特异性检测引物 Detection-F / R 的设计和 PCR 反应条件均参考 SENG 等<sup>[7]</sup>和郝贵杰等<sup>[8]</sup>。

### 1.8 验证存在两株 GCRV 病毒

根据 GenBank 上提交的 GCRV-HZ08 的第 5、9、10 节段序列,运用软件 Primer Premier 5.0 设计引物 HZ08-S5-F/R、HZ08-S9-F/R、HZ08-S10-F/R,目的扩增片段约为 500 bp。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环;最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.9 序列分析

将测序得到的序列用 SEQMAN 软件(Lasergene, DNASTar)拼接,分别将核苷酸序列进行 BLAST 搜索。并用 CLUSTAL-X 1.81 对 JX01 segment 9 和 JX02 segment 11 的氨基酸序列进行比对分析,用 MEGA 5 软件构建系统进化树。

表 1 扩增所用的引物序列

Tab.1 Primer sequences for amplification

名称	序列(5'-3')
anchor-primer	p-GACCTCTGAGGATTCTAAAC/isp9/ TCCAGTTTAGAATCC-OH
5-15-1	( <i>Bam</i> H I)GAGGGATCCAGTTTAGAAT CCTCAGAGGTC
Detection-F	ATCCCGTATATCTATGGCTT
Detection-R	TTGGAGACGAACATAGACGGC
HZ08-S5-F	TACCTAAGTCCGTTCTAACTGCTAC
HZ08-S5-R	CACGTCAGTCCGACTCGGAT
HZ08-S9-F	TTGGACATCTGATCCGGCTCAGCT
HZ08-S9-R	CAACTGGATCAGTCCAGGGGAG
HZ08-S10-F	AATGGTCCGTGGATTCCGATCTGCT
HZ08-S10-R	TAACCGGAGCAGAAAACGCATCAAG

## 2 结果

### 2.1 采集病毒样品感染草鱼肾细胞

将病鱼分离得到的病毒样品感染 CIK 细胞, 连续观察 2 d, 出现了明显的病毒性细胞病变

(CPE)。表现为部分细胞凋亡, 细胞空洞化且中央可见凋亡小体(图 1 中 2 所示)。同时还观察到感染细胞融合成一个大细胞(图 1 中 3 所示)。根据这些症状初步确认病料中含有 GCRV。

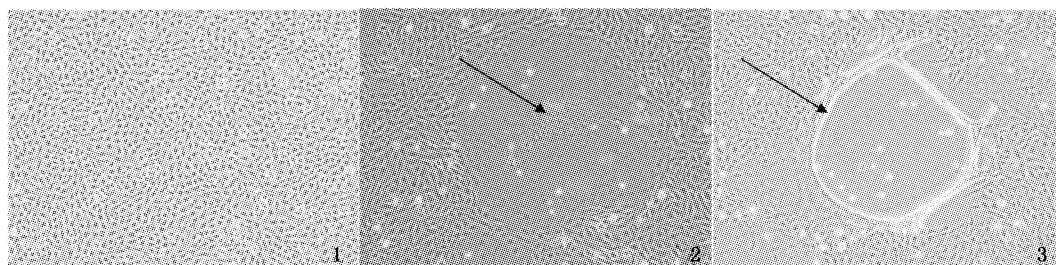


图 1 病毒感染 CIK 细胞后的细胞病变效应(×10)

Fig. 1 Cytopathic effect after virus infection in CIK (×10)

1. 正常细胞; 2-3. 分别为病毒感染细胞后出现凋亡和融合现象。

### 2.2 病毒基因组琼脂糖凝胶电泳分析

病毒基因组 dsRNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行快速鉴定, 结果显示: 分离到的病毒基因组显示出典型的水生呼肠孤病毒组基因特征, 由于每个部分中各节段的分子量接近, 难以分离, 因此按照电泳迁移率大小主要显出大(L)、中(M)、小(S)3 个部分的节段(图 2), 参考张超等这种节段共移现象在水生呼肠孤病毒中普遍存在<sup>[9]</sup>。

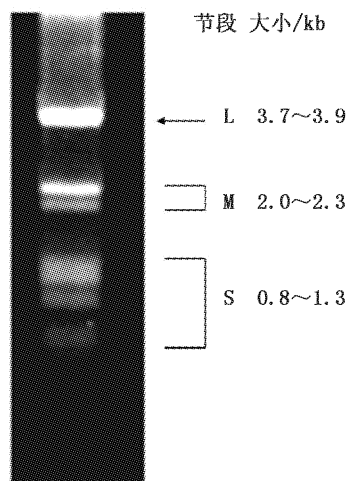


图 2 病毒基因组电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of the genomic dsRNAs of GCRV

### 2.3 GCRV M6 片段的 PCR 检测

分别从病鱼组织和采集病料感染的 CIK 细

胞中提取总 RNA, 用 GCRV M6 片段特异性检测引物(detection F/R)进行 RT-PCR 扩增, 均扩增出与目的片段一致的条带, 大小约为 500 bp(图 3), 确认江西南昌地区草鱼发病鱼感染了 GCRV。

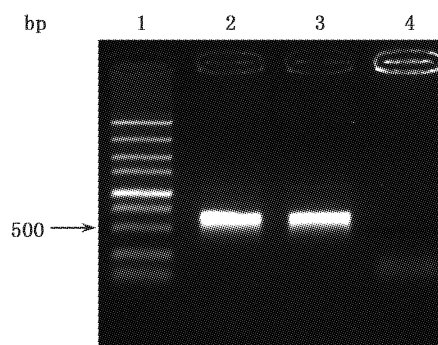


图 3 病毒基因组 M6 片段的 PCR 检测

Fig. 3 Detection of GCRV M6 by PCR

1. DL5000 分子量标准; 2-3. 分别为 RT-PCR 检测病鱼组织和病毒感染的细胞; 4. 阴性对照。

### 2.4 利用 FLAC 技术扩增病毒基因组的 cDNA

FLAC-PCR 结果显示, 使用 *Taq* 聚合酶扩增出较多非特异条带, 而未能得到目的基因组。采用 *iproof HF* 聚合酶成功扩增出病毒的基因组节段, 且非特异性扩增减少(图 4)。因此 *iproof HF* 聚合酶可作为有效的 FLAC-PCR 扩增酶。

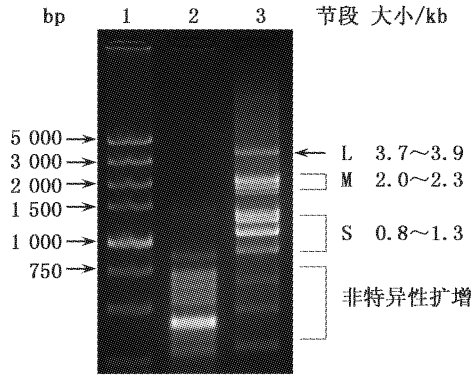


图 4 FLAC 技术扩增得到的病毒基因组电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis of the viral genome generated by FLAC

1. DL5000 分子量标准; 2-3. 分别为用 *Taq* 聚合酶和 iproof HF 聚合酶 PCR 扩增病毒基因组。

## 2.5 部分基因组全片段测序结果分析

FLAC 技术所得全基因组片段中,有 4 个基因片段的测序结果相对易得,且重复性高。对这 4 个片段测序的结果进行分析,发现其 5' 和 3' 具有草鱼呼肠孤病毒基因组的典型序列特征(表 2)。BLAST 结果表明,其中 3 个基因的核酸序列与 GCRV-873 的 S5、S9 和 S10 相应序列同源性高达 99%,1 个基因的核酸序列与 GCRV-HZ08 的 S11 序列同源性达到 99%,而 GCRV-873 与 GCRV-HZ08 的序列差异性比较大<sup>[8]</sup>,初步分析病料中同时存在 2 个毒株,也可能是这两种病毒的杂合病毒。将 FLAC 法测序得到的 4 个基因片段命名为 JX01-S5/S9/S10 和 JX02-S11。

表 2 序列分析

Tab. 2 sequences analysis

毒株	基因片段	长度/bp	序列		开放阅读框(ORF)	
			5'NCR	3'NCR	长度/bp	氨基酸残基数目
JX01	segment 5 (S5)	2 239	5'GUUAUUU...AUCAUC 3'		2 184	727
	segment 9 (S9)	1 130	5'GUUAUUU...AUCAUC 3'		1 056	352
	segment 10 (S10)	909	5'GUUAUUU...UUCAUC 3'		828	276
JX02	segment 11 (S11)	1 104	5'GUAUUU...UUCAUC 3'		930	310

## 2.6 用 PCR 测序技术分析采集病料中是否存在两株病毒

为了确认病料中是否存在 GCRV-873 和 GCRV-HZ08 两种病毒株,根据 GenBank 中 GCRV-HZ08 的第 5、9、10 节段序列,设计引物对采集病料样品进行 RT-PCR,结果均显示出与目的片段一致的条带,大小都约为 500 bp(图 5)。PCR 产物测序后经 BLAST 比对,显示这 3 个片段的序列与 FLAC 法测序所得的与 GCRV-873 高度同源的 S5、S9 和 S10 全长序列差异较大,却分别与 GCRV-HZ08 的第 5、9、10 节段的同源性均高达 99%。至此,我们确认采集病料总 dsRNA 中,包含了分别与 GCRV-873 和 GCRV-HZ08 基因组核酸高度同源的 2 套病毒基因组,并将这两株病毒分别命名为 GCRV-JX01 和 GCRV-JX02。

## 2.7 基于测序结果构建系统进化树

### 2.7.1 JX01 进化树分析

基于 JX01 第 9 基因组片段的序列构建的系统进化树分析结果表明,JX01 病毒株与 GCRV-873 自然聚类,亲缘关系最近,而与其他的草鱼呼肠孤病毒相差较远(图 6)。

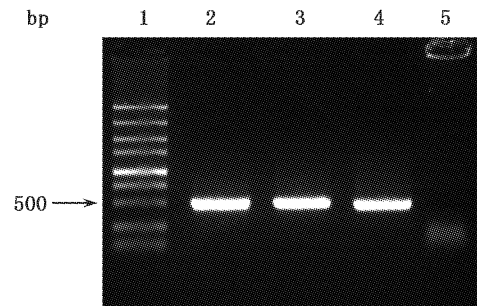


图 5 GCRV-HZ08 毒株的 5、9 和 10 片段的 PCR 检测

Fig. 5 Detection of 5, 9, 10 fragment of GCRV-HZ08 strain

1. DL5000 分子量标准; 2-4. 分别为引物 HZ08-S5-F/R、HZ08-S9-F/R、HZ08-S10-F/R PCR 扩增; 5. 阴性对照。

### 2.7.2 JX02 进化树分析

基于 JX02 的第 11 基因组片段序列构建的系统进化树分析结果表明,JX02 病毒株与 GCRV-HZ08 自然聚类,亲缘关系最近,而与其他的草鱼呼肠孤病毒相差较远(图 7)。

## 3 讨论

草鱼呼肠孤病毒是我国分离鉴定的第一株

鱼类病毒,可导致草鱼鱼种大批死亡,还能感染青鱼(*Piceus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)等<sup>[2]</sup>。目前我国缺乏病毒性草鱼出血病的治疗手段,各地正在推广疫苗的免疫防控技术。由于草鱼呼肠孤病毒不同株系间同源性低,免疫交叉保护性差,因此对不同地区流行株系的实时监控是采用疫苗控制草鱼出血病爆发的前提。本研究通过细胞学观察和特异性引物进行 RT-PCR 检测,证

实病鱼感染了草鱼呼肠孤病毒。在此基础上进一步利用 FLAC 技术得到病毒部分基因组片段的全序列,序列分析表明在该地区同时流行两种 GCRV 病毒,分别命名为 JX01 和 JX02。由于迄今未见草鱼呼肠孤病毒不同株系间存在重组杂合病毒的报道,本研究也未分离出杂合病毒,故确定在江西养殖区存在两株 GCRV 病毒混合感染。

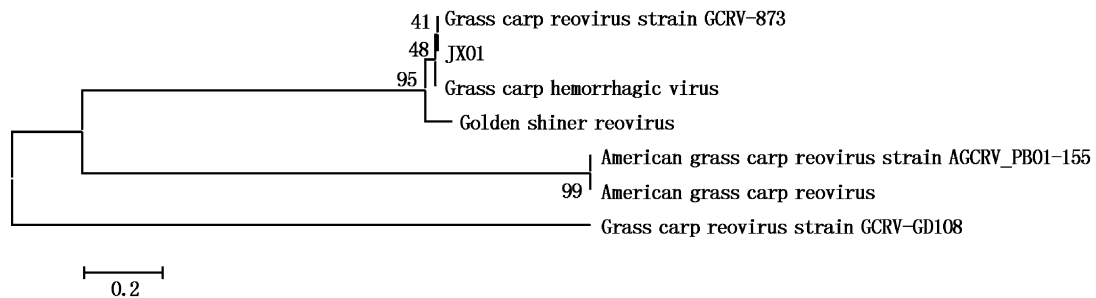


图 6 基于 JX01-S9 序列构建的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic trees based on the amino sequence of JX01 segment 9 with counterpart segments from other reoviruses

采用邻位相邻法,步长为 1 000。各病毒 GenBank 登录号如下:Grass carp reovirus strain GCRV-873; AF403395. 1; Grass carp hemorrhagic virus; AF284504. 1; Golden shiner reovirus; AF403406. 1; American grass carp reovirus strain AGCRV\_PB01-155; EF589106. 1; American grass carp reovirus; NC\_010592. 1; Grass carp reovirus strain GCRV-GD108; HQ231205. 1。

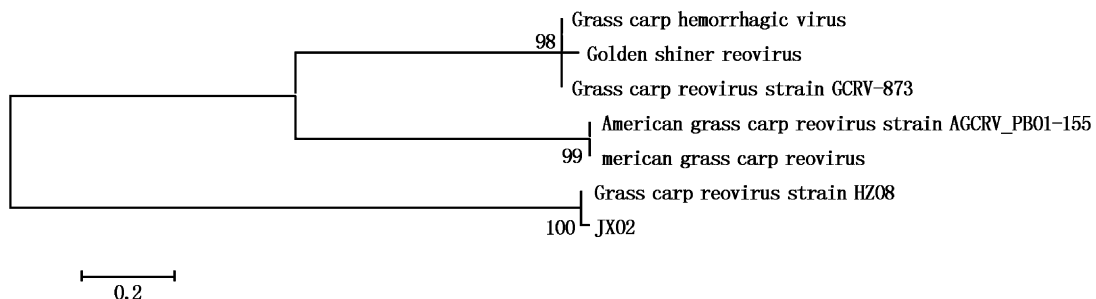


图 7 基于 JX02-S11 序列构建的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic trees based on the amino sequence of JX02 segment 11 with counterpart segments from other reoviruses

采用邻位相邻法,步长为 1 000。各病毒 GenBank 登录号如下:Grass carp reovirus GCRV-873; AF403397. 1; Grass carp hemorrhagic virus; AF234321. 1; Golden shiner reovirus; AF403408. 1; American grass carp reovirus strain AGCRV\_PB01-155; EF589108. 1; American grass carp reovirus; NC\_010594. 1; Grass carp reovirus strain HZ08; GU350748. 1。

SPAT (single primer amplification technique) 技术<sup>[4]</sup>对 dsRNA 病毒测序准确率和成功率都不高。FLAC 技术将一个可折叠的锚状引物连接在病毒 dsRNA 3' 两端,提高了逆转录的效率和准确率,从而能够扩增出基因组全长 cDNA。本研究采用高效的 RNA 纯化试剂盒,替代了传统 RNA 电泳回收的方法,有效减少了 RNA 降解和

损失,提高了对特异性基因组片段(5、9、10 和 11 片段)的检测效率和成功率。此方法虽然不能在短时间内扩增得到病毒全基因组序列,只能测出其中部分片段的全序列,但不失为一种检测草鱼呼肠孤病毒及其株型较为快速、高效的方法。

对 JX01 的 3 个基因组片段的核苷酸序列分析表明,S5、S9、S10 全长分别为 2 239 bp、2 184

bp、1 130 bp,都含有唯一的开放阅读框,分别编码 727、352、276 个氨基酸残基。经比对,3 个片段两端的保守序列均与 GCRV-873 相应片段一致。对 JX02-S11 核苷酸序列分析表明,S11 全长 1 104 bp,含有唯一开放阅读框,编码 310 个氨基酸残基,其两端的保守序列与 GCRV-HZ08 一致。研究表明水生呼肠孤病毒同属之间的末端保守序列相似,故两端保守序列的确定也可以作为鉴别呼肠孤病毒的重要依据<sup>[10-11]</sup>。

为了统一 PCR 扩增的反应条件和效率,在确定是否为 GCRV 混合感染时,针对 GCRV-HZ08 的 S5、S9、S10 引物设计中将其目标扩增序列的长度都确定为约 500 bp。扩增产物测序结果进一步表明,同一病料中也能够扩增出 GCRV-HZ08 的 5、9、10 相应目标片段,据此推测这批病料中同时存在这两株不同的病毒,属于混合感染。

本研究已用无限稀释法和 RT-PCR 鉴定技术纯化分离了这两株 GCRV 病毒,下一步将测定这两株病毒全基因组序列,研究它们的基因组结构和复制特性。我们的研究既能够为分析病毒变异、毒株分类和流行分布情况奠定基础,也能为该地区草鱼出血病的免疫学防控提供科学参考。

#### 参考文献:

- [1] 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[J].水生生物学报,1990,14(2):153-159.
- [2] 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):445-453.
- [3] MAAN S, RAO S J, ATTOUI H, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 143:132-139.
- [4] ATTOUI H, BILLOIR F, CANTALOUBI J F, et al. Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes [J]. Journal of Virological Methods, 2000, 89: 147-158.
- [5] 柯丽华,方勤,蔡宜权.草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养[J].病毒学杂志,1989,3(3):315-319.
- [6] 毛树坚,邵健忠,张念慈,等.草鱼出血病的病原研究[J].水产学报,1989,13(1):1-4.
- [7] SENG E K, FANG Q, LAM T J, et al. Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish *Aquareovirus* based on RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2004, 118:111-122.
- [8] 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[J].渔业科学进展,2011,32(1):47-52.
- [9] 张超,王庆,吴淑勤,等.草鱼呼肠孤病毒分离株 HZ08 基因组 L 节段的全长克隆与序列分析[J].江苏农业学报,2011,27(1):116-123.
- [10] ATTOUI H, FANG Q, JAAFAR F M, et al. Common evolutionary origin of aquareoviruses and orthoreovirus revealed by genome characterization of golden shiner reovirus, grass carp reovirus, striped bass reovirus and golden ide reovirus (*genus Aquareovirus*, family *Reoviridae*) [J]. Journal of General Virology, 2002, 83: 1941-1951.
- [11] JAAFAR F M, GOODWIN A E, BELHOUCHE M, et al. Complete characterization of the American grass carp reovirus genome (*genus Aquareovirus*: family *Reoviridae*) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus [J]. Virology, 2008, 373: 310-321.

## Detection of the co-infection of different grass carp reovirus strains using dsRNA sequencing technology

WANG Tu, XU Dan, LÜ Li-qun

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Viral genomic dsRNAs were extracted from *Ctenopharyngodon idellus* kidney (CIK) cells inoculated by diseased grass carp visceral organs with hemorrhagic symptom, and analyzed by agarose gel to show the typical genomic pattern of Aquareovirus. The purified viral pathogen caused typical cytopathic effects in CIK cells. A simplified dsRNA sequencing technology modified from FLAC (full-length amplification of cDNA) method was employed to sequencing the partial viral dsRNA genomic fragments. Four full-length dsRNA genomic fragments of the amplified cDNA fragments were successfully sequenced. Phylogenetic analysis was performed to identify two different viral strains in our sample, which indicated that there were two GCRV strains, named as JX01 and JX02 respectively, causing disease in grass carp in Jiangxi province. The data further suggested that we could monitor the pandemic viral strains using our simplified dsRNA sequencing technology. Our research thus provides a new technical method for the prevention, control and epidemiology of grass carp reovirus disease.

**Key words:** dsRNA sequence; detection; grass carp reovirus; co-infection

### 欢迎订阅 2013 年《中国水产科学》

《中国水产科学》为中国水产科学研究院主办的学术性期刊, 目前已成为中国水产科学研究领域的重要学术期刊。本刊在促进中国的水产科学研究、加强国际间学术交流、展示中国水产科学研究领域最新科研成果与研究进展等方面发挥了重要作用。期刊影响因子逐年递增, 2011 年中国科技期刊引证报告统计的影响因子值为 1.178, CNKI 期刊统计源复合影响因子为 1.709; 期刊多次获得“中国百种杰出学术期刊”奖。期刊主要报道水产生物学基础研究、水生生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及设施渔业等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 200 页, 单月出版, 国内外公开发行。

国内定价 60 元/期, 全年 360 元(含邮费)。

邮发代号: 18-250, 国内统一刊号: CN 11-3446/S,

国际标准刊号: ISSN 1005-8737, 国外代号 4639Q。

直接向编辑部订阅可享受 8 折优惠, 也可在当地邮政局办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号(中国水产科学研究院内)

邮政编码: 100141

联系电话: 010-68673921

传 真: 010-68673931

E-mail: zgsckx@cafs.ac.cn; jfishok@publica.bj.cninfo.net

投稿与查询网址: www.fishscichina.com