

草鱼出血病病毒的生长特性及高滴价培养

方 勤 柯丽华 蔡宜权

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

草鱼出血病病毒感染鱼肾(CIk)单层细胞后, 产生明显的细胞病变, 其繁殖周期为2—3天。病毒增殖的上升期在感染后的12—48小时。28°C下, 当感染复数(Multiplicity of Infection 简称 MOI)为0.05PFU/cell时, 病毒滴价可达 1.78×10^{11} PFU/ml, 不同温度(25°C、28°C、30°C)下通气培养, 测定病毒滴价略有差异。感染病毒的细胞培养液经ELISA检测和电子显微镜观察均为阳性结果, 并且能感染健康草鱼。

关键词: 草鱼出血病病毒; 生长特性; 病毒效价

1983年我们首次从草鱼出血病病鱼组织中分离到一株病毒, 通过形态结构的研究、核酸分析等鉴定后, 定名为鱼呼肠孤病毒(FRV)^[1], 该病毒能够感染CIk细胞^[2]。近年来, 我们从湖南邵阳分离到另一毒株, 编号为GCHV-873。对其形态、基因组及理化特性等已进行了研究(另文报道), 同时成功地从组织培养中获得了高滴价病毒。这一研究结果, 对该病毒的深入研究及其应用等提供了物质基础和实验依据, 现将GCHV-873在CIk细胞培养中的某些生物学特性及高滴价培养的结果报告如下:

材 料 与 方 法

一、细胞及其培养 实验选用CIk细胞株^[3]。细胞培养液含10%小牛血清的Eagle's MEM, 并加入谷氨酰胺(按300μg/ml)。维持液含2%小牛血清。用7.5%的NaHCO₃调整pH至7.2左右, 培养温度为28°C。

二、原始病毒样品的制备 从湖南邵阳地区患草鱼出血病之草鱼中取其内脏, 用0.01mol/L PBS(pH7.2)漂洗三次, 加入少量10mmol/L的HEPES(pH7.0)缓冲液, 用组织匀浆器磨碎, 制成1:10的粗制悬液。悬液冻融三次, 用普通滤纸过滤, 滤液经8,000r/m(Hitachi, RPR-20-2转头, 下同)离心30分钟, 上清经ELISA^[4]测定为阳性后, 加入青霉素(100u/ml)和链霉素(100μg/ml), 过滤除菌, 置4°C冰箱备用。

三、病毒接种与传代 取4°C保存之病毒悬液, 用无血清的Eagle's MEM稀释成1:10接种细胞。28°C下吸附1小时, 倾去未吸附的悬液, 加入维持液置28°C培养。三天后, 取100μl上清作ELISA检测, 阳性结果的培养液作为继续传代的毒源。以后各代病毒的传代培养按上述方法

本文于1988年9月13日收到。

本所电镜室的同志拍摄本文电镜照片, 湖南邵阳地区水产科学研究所提供毒源及回接实验数据在此一并致谢。

进行。

四、病毒滴价测定 培养于 24 孔培养板 (Coster) 的细胞长成单层后, 用无血清的 Eagle's MEM 将待测病毒悬液作 10 倍稀释, 每孔接 0.1ml, 每一稀释度 3 个孔, 培养 2—3 天, 观察细胞病变, 按 Reed 和 Muech^[6] 法计算出 TCID₅₀/ml。同时采用空斑滴定法 (方法另文报道) 计算病毒悬液的 PFU。

五、病毒繁殖曲线的测定 细胞在直径为 60mm 的平皿 (Corning) 中培养 2—3 天, 每平皿加入 0.1ml 的病毒悬液 (感染复数分别为 0.05, 1, 20 PFU/cell)。接种方法同上, 不同时间取样测定病毒滴价。

六、细胞传代病毒的回接试验 用细胞传代第 16 代 GCHV-873 回接 3.5—4.2 寸草鱼, 每尾注射 0.3—0.5ml 的病毒培养液, 28°C—31°C 水温条件下观察发病情况。

七、病毒部分提纯及电镜观察 收集感染了病毒的细胞培养液, 8,000r/m 离心 30 分钟, 去细胞碎片, 然后再经 16,000r/m 离心 4 小时, 去上清, 沉淀用 1×ssc (0.15mol/L 氯化钠, 0.015mol/L 柠檬酸三钠, pH7.4) 缓冲液溶解。上述过程重复一次, 沉淀用少量双蒸水悬浮滴于铜网上, 晾干, 用 2% 磷钨酸 (pH6.9) 负染, 置 JEM-100C 型电子显微镜观察。

结果与讨论

一、病毒的复制与传代

从病鱼组织中分离、制备的病毒悬液感染细胞, 病变出现在 48 小时以后。病变伊始, 单层细胞局部出现边缘不整齐的空洞 (图 1), 未感染的细胞无此现象 (图 2)。随着 CPE 的发展, 整个单层细胞拉成网状, 最后大部分裂解的细胞离壁飘浮于液面。从感染到收集病毒这一过程约需 5 天时间。感染后第三天, 用 ELISA 法检测细胞培养液呈阳性反应, 未感染的细胞培养液则为阴性反应。随着传代次数的增加, 病毒的毒力和产量都有所提高, 繁殖周期相应缩短, 当病毒传至 3—4 代, 这些指标逐步趋于稳定, 结果见表 1。

表 1 病毒传代次数与滴价的关系
Table 1 Relationship between serial propagation and titer of GCHV-873

病毒传代次数	稀 释 度	收获时间 (天)	病毒滴价 (TCID ₅₀ /ml)	ELISA 检测
原 代*	1 : 10 ²	4—5	ND**	+
1	1 : 10 ²	3	1.78 × 10 ⁸	++
2	1 : 10 ³	2	2.68 × 10 ⁹	++
3	1 : 10 ³	2	6.5 × 10 ¹⁰	+++
4	1 : 10 ⁴	2	7.2 × 10 ¹¹	+++
5	1 : 10 ⁴	2	8.8 × 10 ¹¹	+++

*原代——从病鱼组织制备的病毒悬液

**ND——未测定

二、通气条件对病毒增殖的影响

接种于 24 孔培养板的病毒, 分别置 28°C 普通培养箱和 CO₂ 培养箱 (含 5% CO₂) 培养, 48 小时后检查培养液的 pH 和病毒滴价, 发现前者的 pH 为 7.8—8.0, 后者的 pH

为 6.0—6.5, 两者的病毒滴价较为接近, 如表 2 所示。此结果表明, 由于细胞代谢和空气所导致的培养液 pH 之轻度变化, 对病毒复制无大的影响。

表 2 通气条件对病毒增殖的影响
Table 2 Effect of atmosphere or partial pressures of CO₂ on GCHV-873 replication

培养条件	pH	病毒滴价 (TCID ₅₀ /ml)
对照*	7.0—7.2	8.6×10^{12}
空气	7.8—8.0	7.02×10^{12}
5% CO ₂	6.0—6.6	5.8×10^{12}

* 对照——为不通气培养

三、温度对病毒增殖的影响

比较了 25℃、28℃、30℃ 三种温度对病毒增殖的影响, 结果如表 3。

表 3 温度对病毒增殖的影响
Table 3 The effect of temperature on GCHV-873 replication

温度	25℃	28℃	30℃
滴价(TCID ₅₀ /ml)	7.0×10^{11}	5.6×10^{11}	3.2×10^{11}

这三种温度培养之病毒, 滴价略有差异, 25℃ 略高, 30℃ 偏低, 28℃ 介于二者之间。因 CIK 细胞在 28℃ 生长较快且比较稳定^[4], 故我们一般采用 28℃ 作为细胞生长和病毒增殖的温度。

四、不同感染复数对病毒产量的影响

同一条件下, 用不同感染复数的病毒感染细胞, 其病毒产量有显著差异, 结果见表 4。

表 4 不同感染复数和病毒产量的影响
Table 4 The effect of MOI on GCHV-873 yield

感染复数 (PFU/cells)	细胞数/ml	病毒滴价 (TCID ₅₀ /ml)	测定时间 (天)
0.05	7.2×10^5	1.78×10^{11}	3
1	7.0×10^5	5.2×10^{10}	3
20	7.2×10^5	7.89×10^8	3

在其他条件相同的情况下, 感染复数与病毒的收获量存在着一定的关系。当 MOI 为 20 时, 其病毒滴价为 7.89×10^8 PFU/ml, MOI 等于 1 时所获病毒滴价为 5.2×10^{10} PFU/ml, 而 MOI 减少到 0.05 时, 滴价则上升到 1.78×10^{11} PFU/ml。由此不难看出感染复数对病毒产量的影响, 可能当感染复数较高时, 细胞很快被破坏。感染复数较低时, 细胞可利用宿主细胞进行多次侵染, 故病毒滴价较前者高。

五、病毒繁殖曲线

接种病毒的细胞, 在 28℃ 下, 测定的病毒繁殖曲线如图^[3]所示。病毒增殖从 6 小时开始, 12—48 小时呈对数繁殖, 48 小时达到最高点, 随着时间的推移, 逐步趋向

平稳。

六、细胞传代病毒的回接试验

传代第 16 代 GCHV-873 回接鱼体，感染 6 天后，开始发病，第 9 天发病率高达 90%。实验结果表明，从组织培养中收获的病毒，不仅适应细胞培养，而且能够感染鱼体。

七、电子显微镜观察

60ml 感染病毒的细胞培养液，经部分提纯之样品在电子显微镜下可见到成片的病毒粒子（图 4）。

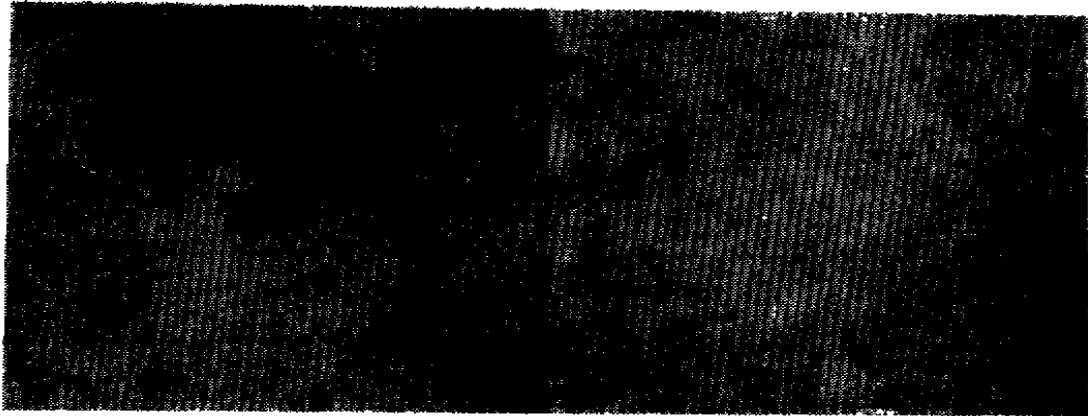


图 1 感染病毒的 CIK 细胞

Fig 1 Micrograph of infected CIK cells

图 2 未感染病毒的 CIK 细胞

Fig 2 Control CIK cells

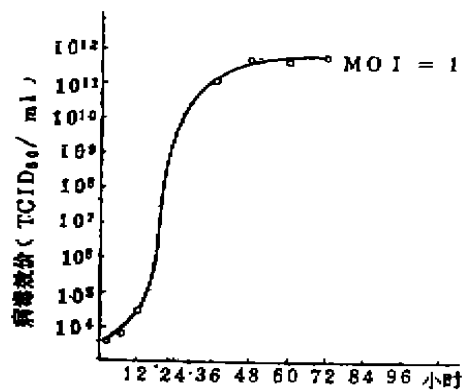


图 3 GCHV-873 的繁殖曲线

Fig 3 Representative growth curve of GCHV-873

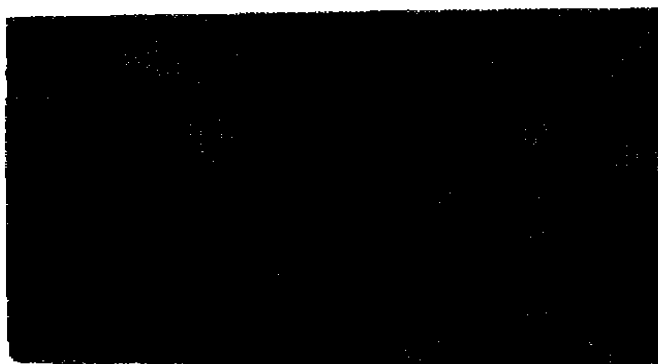


图4 电子显微镜下负染的病毒粒子

Fig 4 Electron micrograph of negatively stained GCHV-873

参 考 文 献

- [1] 洪世雯等, 1985年亚州淡水养殖学术讨论会论文集。
 [2] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学院长江水产所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1983, 淡水渔业, No.3, P39
 [3] 左文功等, 1984, 淡水渔业, No.3, P38
 [4] 闵淑琴等, 1986, 水产学报, 10:4, 383-389
 [5] 戴华生等, 1983, 新实验病毒学, P34

Growth Characteristics and High Titer Culture of Grass Carp Hemorrhage Virus (GCHV)-873 in Vitro

Fang Qin Ke Li-hua Cai yi-quan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Some biological properties of Grass Carp Hemorrhage Virus (GCHV)-873 have been studied in this report. This virus could make grass carp kidney cells (CIK) to produce a unique cytopathic effect. At 28°C its logarithmic growth phase occurred 12 to 48 hr after infection. The virus titer reached 1.78×10^{11} PFU/ml when the MOI was approximately 0.05 PFU/cell. There were slight differences in virus titer under incubation of 25°C, 28°C and 30°C respectively, and the similar results in 5% CO₂ or in normal atmosphere. The virus particles in culture fluid of infected cells were further confirmed by using ELISA and electron microscopy, and it could infect healthy grass carp as well.

Key words, Grass Carp Hemorrhage Virus, Growth characteristic, Virus titer