

297-301

15

S941.41

S943.18f

鳊鱼病毒病原及细胞感染特性的研究*

方勤^{1,2}, 艾桃山³, 邹桂平², 喻运珍³, 刘家欣², 汪亚平¹¹(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)²(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)³(武汉市水产科学研究所, 武汉 430006)

摘要:在患暴发流行性发病鳊鱼的脾、肾、肝、鳃组织细胞的超薄切片中观察到直径为120-150 nm的二十面体病毒粒子,其截面呈六角形,有囊膜。将病鱼内脏与10倍体积的PBS缓冲液制成组织匀浆液,过滤除菌后感染对数生长期的草鱼肾细胞。结果表明,该感染液在28℃条件下,培养36-48 h,生长旺盛的草鱼肾细胞开始出现CPE,5-7 d感染的单层细胞逐渐脱落死亡。该细胞病毒悬液具有感染性,可持续稳定地进行传代培养。感染细胞的病毒培养液,经差异离心纯化,负染制片,电镜下观察到大量的病毒粒子,对照培养物中未发现任何病毒颗粒。

关键词:鳊鱼; 病毒; 敏感细胞系

细胞感染特性

中图分类号:Q939.4, S965.117 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2000)03-0297-05

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)为我国名贵淡水养殖品种,其肉鲜味美,颇受消费者喜爱。由于鳊鱼养殖规模的扩大及养殖密度的提高,加之自然生态环境的污染,伴随而来的鳊鱼病害频频发生。除细菌性疾病外^[1],近年来暴发的一种大规模流行病,给鳊鱼的人工养殖造成了严重威胁。调查发现,经苗种和水传播病原是造成地区鳊鱼暴发流行病的主要途径。为防止该病继续蔓延及恶化,我们首先对具典型发病症状的鳊鱼进行了超薄组织切片电镜观察。结果发现患病鳊鱼内脏切片含大量的病毒粒子,同时将其病毒进行了细胞感染实验,进一步证实引起该病的病原为病毒^[2-4]。下面报道本研究的结果。

1 材料与方 法

1.1 病鱼材料来源、细胞培养及病毒感染

发病的鳊鱼材料于1998年7月取自广东珠江三角洲鳊鱼高产养殖鱼塘,发病鳊鱼体重175克。CIK细胞培养及病毒感染按文献[5]进行。

1.2 病鱼组织超薄切片电镜样品的制备

取典型症状的病鱼内脏(脾、肝、肾、心、鳃)切成直径约1~2 mm的小块,用2.5%的戊二醛固定,进行包埋、超薄切片,2%醋酸双氧铀染色后,在日立H-7000FA型透射电镜下观察。

1.3 粗制病毒悬液的制备

取经电镜超薄切片观察发现大量病毒粒子的病鱼内脏,用PBS工作液(pH7.2)漂洗三次后,加入一定体

收稿日期:1999-06-28,修回日期:2000-01-13

* 基金项目:“淡水生态与生物技术国家重点实验室”开放项目(2000FB07);湖北省自然科学基金资助项目(99J097)。

作者简介:方勤(1961年-),女,湖北省人,副研究员。主要从事水生动物病毒的分子生物学及基因工程研究。

积的 PBS,用组织匀浆器磨碎,最后制成 1:10 粗制病毒悬液。该悬液经 8 000 r/min 离心 30 min (Hitachi, RPR-20-2),除去细胞碎片及杂质,然后用孔径为 0.25 μm 微孔滤膜过滤除菌;滤液置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 病毒感染细胞实验及传代培养

选用 CIK 细胞株进行鳊鱼病毒的细胞感染实验。病毒感染及传代培养按以下方法进行:取 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存的粗制病毒悬液,用无血清的 MEM 培养基按 1:10 比例稀释后,接种处于对数生长期的细胞。粗制病毒悬液在 28 $^{\circ}\text{C}$ 吸附细胞 1 h 后,倾去未吸附的悬液,用 PBS 洗涤二次,加入含 2% 血清的细胞维持液,同时设置正常细胞对照。病毒的传代培养按实验室常规方法进行。

1.5 病毒细胞培养液的纯化及电子显微镜观察

收集感染病毒的细胞悬液,8 000 r/min,离心 20 min,除去细胞碎片;然后 15 000 r/min,离心 30 min,将初步纯化的病毒细胞悬液,用 2% 磷钨酸负染制样,在日立 H-7000FA 型透射电镜下观察结果。

2 结果

2.1 发病鳊鱼临床症状及组织超薄切片

典型的患病鳊鱼的临床解剖症状一般表现为头部鳃盖充血发红,鳞片色泽偏黄,体表腹腔两侧出血发红,鳃部失血变白或呈花斑鳃;肝脏失血变白,其血管粗大充血,肾、脾充血变紫,胃壁肌肉呈斑块状充血,胃肠粘膜以及幽门充血发红,胆囊萎缩或肿大,肠内充满黄色流晶样物质,腹腔充满血样状的腹水。在典型患病鳊鱼内脏的超薄组织切片中发现大量的病毒粒子(图 1、2、3)。从图中我们可以看到受病毒感染的脾、肾、肝组织细胞的形态结构严重破坏,同时观察到鳊鱼脾、肾、肝组织切片内含有大量的直径在 120~150 nm 的球状病毒颗粒。此外在鳃组织切片中亦发现散在病毒颗粒。该病毒形态及结构与吴淑勤等报道的极为相似^[2-3]。由此进一步证实鳊鱼暴发性流行病为病毒所致。

2.2 组织培养上的细胞病理变化

将原代粗制病毒悬液感染 CIK 细胞,36-48 h 开始出现 CPE,5-7 d 病变细胞逐渐裂解死亡。观察发现,病毒感染 36 h 内,细胞在维持液中仍能缓慢生长;光镜下细胞形态无任何变化。但 36-48 h 后,单层细胞局部开始出现小的空洞(图 4),随着感染时间的延长,病变区域逐步扩大,最后导致整个单层细胞裂解脱落。而未感染病毒的细胞在维持液中仍然保持良好的生长状况,形态良好(图 5)。

2.3 纯化病毒的电镜观察

病毒感染细胞悬液经初步纯化后,在电子显微镜下观察到大量散在及成堆的近似球形的病毒粒子(见图 6、7);而在正常细胞的负染对照样品中未发现任何病毒颗粒。

3 讨论

我们成功地从流行性发病鳊鱼样品的脾脏、肾脏、肝脏及鳃组织的超薄切片中观察到大量的病毒粒子。成熟的病毒粒子直径约在 120~150 nm,二十面体对称,截面呈六边形,外面有一层包膜。根据我们所观察到的病毒粒子的形态特征,证实与吴、何等^[2-4]的报道基本相同。在病鱼组织的超薄切片中,有些病毒颗粒大小不一,可能是该病毒在感染中处于病毒复制的不同阶段或没有包装上外层包膜^[6]。我们还发现病鱼的组织器官中病毒粒子的密度及分布均有不同,是否病毒在病鱼组织的分布有特异性,尚需进一步证实。在病鱼鳃组织的超薄切片中亦观察到了病毒粒子,是否鳊鱼的鳃为病毒感染的初始器官,尚需通过深入的组织病理研究来

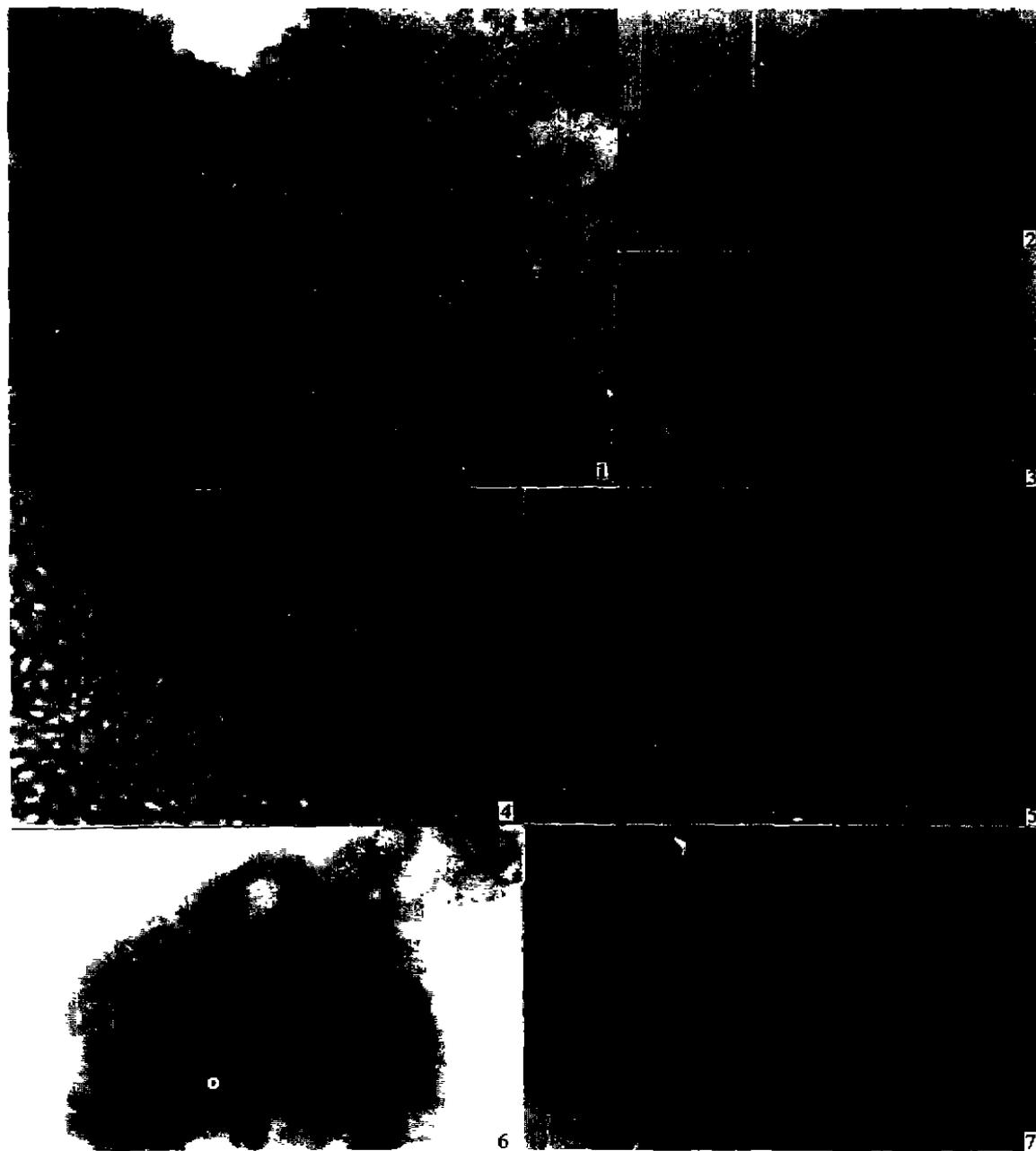


图 1 鳊鱼脾组织的超薄组织切片($\times 54\ 000$)

图 2 鳊鱼肾细胞的超薄组织切片,箭头所示为病毒的囊膜($\times 54\ 000$)

图 3 鳊鱼肝组织的超薄组织切片,箭头所示为病毒的囊膜($> 54\ 000$)

图 4 正常 CIK 细胞

图 5 感染鳊鱼病毒病原所出现的 CPE

图 6.7 病毒粒子的负染电镜照片 ($\times 54\ 000$)Fig.1 *Siniperca chuatsi* virus in the fish spleen cells under the electron microscope ($\times 54\ 000$)Fig.2 *Siniperca chuatsi* virus in the fish kidney cells under the electron microscope, arrow shows envelope ($\times 54\ 000$)Fig.3 *Siniperca chuatsi* virus in the fish liver cells under the electron microscope, arrow shows envelope ($\times 54\ 000$)

Fig.4 Normal CIK cells

Fig.5 Cytopathic Effect of the CIK cells after being infected by *Siniperca chuatsi* virusFig.6,7 Electron micrograph of negatively stained viral particles from infected tissue culture supernatants by *Siniperca chuatsi* virus ($\times 54\ 000$)

加以证实。该病毒的形态特征及感染特性与 Rodger 等^[7-10]的报道极为相似。此外,我们对病毒感染的细胞培养液进行了初步纯化,并按常规核酸提取法^[11]提取了病毒核酸,实验结果表明,该病毒核酸不为 RNase 所降解,其分子量大小与其他的报道^[2-4]相接近(结果未示),进一步的研究正在进行中。

为寻找感染鳊鱼病毒的敏感细胞系,我们用草鱼肾细胞系 CIK 细胞对患病毒病鳊鱼的组织研磨粗制病毒悬液作了感染性实验。结果证实,鳊鱼病毒病原能感染 CIK 单层细胞,出现明显的细胞病变,并且在经差异离心的病毒悬液负染样品中观察到了大量的病毒颗粒,该病毒悬液具有持续感染细胞的能力。目前我们正利用此方法增殖病毒,进一步研究其核酸、蛋白特性及确定其分类地位。

自 1994 年以来,鳊鱼暴发流行病给珠江三角洲的鳊鱼养殖业带来了严重的威胁,因此,建立一套快速而灵敏的检测方法及有效的防疫措施已成为当务之急,我们将在鳊鱼病毒病原感染草鱼 CIK 细胞的基础上,进行鳊鱼暴发流行病病原诊断试剂及其细胞灭活疫苗的研制,为鳊鱼病毒病的防治提供理论及实验依据。

致谢 本课题组田静在本文打印过程中给予了大力支持,电镜室邓红、袁爱华协助拍摄电镜照片,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈昌福,史维舟,赵桂珍,等. 鳊鱼烂腮病原菌的分离及初步鉴定[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(2): 263-266
- [2] 吴淑勤,李新辉,潘厚军,等. 鳊鱼暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 56-60
- [3] 何建国,翁少萍,黄志坚,等. 鳊鱼暴发性传染病病原性病原的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1998, 37(5): 77-77
- [4] 李新辉,吴淑勤,潘厚军,等. 一种检测鳊鱼病毒方法[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 112-114
- [5] 方勤,柯丽华,蔡宜权,等. 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: 315-319
- [6] 杨复华. 病毒学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1992. 453-482
- [7] Rodger H D, Knobs M, Macartney A, et al. Systemic iridovirus infection in freshwater angelfish, *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) [J]. Journal of Fish Disease, 1997, 20: 69-70
- [8] Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like virus pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. [J]. Journal of Fish Disease, 1986, 9: 263-268
- [9] McGrogan D G, Ostland V E, Byrne P J, et al. Systemic disease involving an iridovirus-like agent in cultured tilapia, *Oreochromis niloticus* L. - a case report [J]. Journal of Fish Diseases, 1998, 21: 149-152
- [10] Langdon J S, Humphrey J D, Williams L M. Outbreaks of an EHN-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia [J]. Journal of Fish Diseases, 1988, 11: 92-96
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. USA, NY: Cold Spring Harbor, 1989. 954-956

Study of the *Siniperca chuatsi* Viral Pathogen and its Infectious Characteristics in Fish Cells

FANG Qin^{1,2}, AI Tao-shan³, ZOU Gui-ping², YU Yun-zhen³, LIU Jia-xin², WANG Ya-ping¹

¹(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

²(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071, China)

³(Wuhan Institute of fishery, Wuhan 430006, China)

Abstract: An icosahedral virus was found in the ultra-thin section of spleen, kidney, liver, gill of the outbreak-infectious *Siniperca chuatsi* by electron microscope. The virions of section show hexagon, about 125-150 nm in diameter, and have envelope outside. Cell culture indicated that CIK cell was sensitive to the virus, which was isolated from the internal organs of *Siniperca chuatsi*. The CPE can be seen after being infected for 36-48 hours at 28°C. Cell cultured virus suspension is infectious and can be subcultured steadily in CIK cell line. Many virions isolated by different centrifugation from infected cell culture can be observed by negative stained electron microscope method, but no virions were detected in the control samples.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Virus; Sensitive cell line