

DOI: 10.12264/JFSC2021-0481

## 一株湖北源大口黑鲈蛙病毒的分离鉴定

罗晓雯<sup>1</sup>, 沈锦玉<sup>2</sup>, 阳涛<sup>3</sup>, 曾令兵<sup>1</sup>, 周勇<sup>1</sup>, 范玉顶<sup>1</sup>, 刘文枝<sup>1</sup>, 李逸群<sup>1</sup>, 薛明洋<sup>1</sup>, 孟彦<sup>1</sup>, 江南<sup>1</sup>

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001;
3. 通威股份动物保健研究所, 四川 成都 610041

**摘要:** 采用电子显微镜观察和细胞培养等技术, 从湖北黄陂某养殖场患病大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)体内发现并分离到一株蛙病毒。患病大口黑鲈的临床症状主要表现为体表出血、溃疡, 肝脏发白。将病鱼内脏组织匀浆超微滤液接种鳊脑细胞系(mandarin fish brain, MFB)细胞能产生典型细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 病毒滴度达到  $10^{8.36 \pm 0.15}$  TCID<sub>50</sub>/mL。细胞培养病毒的超薄切片电镜观察结果显示, 细胞质中存在大量直径约为 150 nm 左右的正六边形病毒粒子, 呈晶格排列。细胞培养病毒的人工感染大口黑鲈试验结果显示, 7 d 内试验鱼死亡率高达 100%, 其临床症状与自然发病鱼相似。采用大口黑鲈病毒(largemouth bass virus, LMBV)的特异性 PCR 检测方法对患病组织样品和细胞培养病毒样品进行检测, 均能扩增出 241 bp 的单一目的条带。进一步根据 GenBank 中 LMBV 主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因序列设计特异性引物, 均能从上述样品中扩增出 1392 bp 的 MCP 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)全长。将 MCP 氨基酸全序列进行比对, 结果显示其与 Santee-Cooper 蛙病毒、孔雀鱼病毒 6 型及大口黑鲈溃疡综合征病毒的 MCP 氨基酸序列同源性高达 100%。系统进化结果显示, 与感染鱼类的虹彩病毒科蛙病毒属病毒, 如鳊鱼蛙病毒、Santee-Cooper 蛙病毒、孔雀鱼病毒 6 型和大口黑鲈溃疡综合征病毒等聚成一支。这些结果证明, 该分离株为虹彩病毒科蛙病毒属的成员, 暂命名为大口黑鲈蛙病毒(largemouth bass ranavirus, LMBRaV)湖北株 LMBRaV-HB001。病毒敏感细胞系筛选试验结果表明, 病毒 LMBRaV-HB001 感染鲤上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)、草鱼性腺细胞(grass carp ovary, GCO)、大鲵肌肉细胞(giant salamander muscle, GSM)和鲫脑组织细胞(gibel carp brain, GiCB)均能产生典型 CPE, 病毒滴度可达  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL 以上。本研究首次在湖北省养殖大口黑鲈体内分离与鉴定了 LMBRaV 病毒, 建立了病毒的细胞培养方法, 为进一步研究该病毒的传播、诊断和防控技术提供了重要参考。

**关键词:** 大口黑鲈; 蛙病毒; 细胞培养; 病毒分离鉴定

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)03-0494-09

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)又称加州鲈, 隶属于鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Ceetrachidae), 黑鲈属。其适温范围广、生长迅速、耐低氧、抗病能力强, 且肉质鲜美, 是一种名贵的肉食性鱼类。大口黑鲈原产于美国加利福尼亚州的密西西比河流域, 于 1983 年引进我国广东佛山, 在 1985

年人工繁殖成功后被广泛养殖, 取得较好的经济效益。2019 年全国大口黑鲈养殖总产量高达 47.8 万 t<sup>[1-2]</sup>。但随着我国大口黑鲈养殖越来越普遍, 产量越来越高, 其病害也越来越严重, 造成了重大的经济损失。目前报道的导致大口黑鲈病害的主要病原包括: 诺卡氏菌(*Nocardia*)、柱状黄杆菌

收稿日期: 2021-10-12; 修订日期: 2021-12-30.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900102); 浙江省淡水水产研究所开放课题项目(ZJK202113).

作者简介: 罗晓雯(1992-), 硕士, 研究方向为水产动物医学. E-mail: m18790069727@163.com

通信作者: 江南, 副研究员, 研究方向为水生生物病害防控, E-mail: jn851027@yfi.ac.cn; 沈锦玉, 研究员, 研究方向为水生动物病害防治研究, E-mail: sjinyu@126.com

(*Flavobacterium columnare*) 等细菌病原, 虹彩病毒(Iridoviridae)和弹状病毒(Rhabdoviridae)等病毒病原, 车轮虫(*Trichodina*)、杯体虫(*Apiosoma blanchard*)和小瓜虫(*Ichthyophthirius*)等寄生虫病原<sup>[3]</sup>。

大口黑鲈病毒(largemouth bass virus, LMBV), 属于虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*)。虹彩病毒科包括 5 个属: 蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)、细胞肿大病毒属(*Megalocytivirus*)、虹彩病毒属(*Iridovirus*)、绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*)。蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属和细胞肿大病毒属病毒感染脊椎动物, 虹彩病毒属和绿虹彩病毒属感染无脊椎动物<sup>[4]</sup>。1991 年首次在美国佛罗里达州 Lake Weir 患病大口黑鲈体内发现 LMBV 病毒, 随后几年在美国 20 多个州相继发现, 并传播到欧洲<sup>[4]</sup>。大口黑鲈蛙病毒 2008 年首次在我国广东发现, 命名为大口黑鲈溃疡综合征病毒(largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV); 2018 年浙江省也发生严重流行, 许峰等分离鉴定到 LMBV 病毒宁波株。患病大口黑鲈表现出体表溃烂、肝脏肿大发白等临床症状<sup>[5-6]</sup>。目前对蛙病毒属病毒已建立多种检测方法。马冬梅等<sup>[7-8]</sup>建立了病毒 PCR 快速检测方法和 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法, 同时对病毒主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)基因重组蛋白的免疫效果进行初步分析。王庆等<sup>[9]</sup>建立了大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法, 可同时检测两种感染大口黑鲈的虹彩病毒科病毒: 蛙病毒属虹彩病毒和肿大细胞病毒属虹彩病毒。

本研究从湖北黄陂某鲈鱼养殖场采集患病的大口黑鲈样本, 采用细胞培养、透射电子显微镜观察、分子生物学检测及生物信息学分析等方法, 分离得到一株新的大口黑鲈蛙病毒, 经鉴定其为虹彩病毒科蛙病毒属成员, 命名为大口黑鲈蛙病毒湖北分离株(LMBRaV-HB001), 为进一步研究加州鲈疾病的防控技术奠定了前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞和实验鱼

患病加州鲈采集自湖北黄陂某养殖场。鳃脑

组织细胞系(mandarin fish brain, MFB)和异育银鲫脑组织细胞系(gibel carp brain, GiCB)由本实验室建立; 鲤上皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)、草鱼卵巢组织细胞系(grass carp ovary, GCO)细胞由本实验室保存; 大鲵肌肉细胞系(giant salamander muscle, GSM)由中国科学院水生生物研究所张奇亚教授惠赠。感染试验用健康大口黑鲈购自湖北省洪湖市某鲈鱼养殖场, 体长约 10 cm, 感染试验用鱼在实验室暂养 14 d, 按参考文献[7]中的 PCR 检测方法进行检测, 结果为 LMBV 阴性。

### 1.2 试剂

细胞培养基 L-15、M199 购自 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 0.25%胰酶溶液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司; 磷酸缓冲液(PBS)购自 Hyclone 公司; 病毒 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; DNA 标准 DL 2000 Marker、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 购自宝日医生物技术(北京)有限公司(TaKaRa, 中国)。

### 1.3 寄生虫检查与细菌分离

取患病鲈体表黏液和鳃丝在光学显微镜下观察, 检查寄生虫。无菌条件下取患病鲈鱼肝脏、肾脏等组织划线接种于 BHI 固体培养基, 28 °C 恒温培养, 观察细菌生长情况。

### 1.4 病毒的分离与培养

无菌条件下取患病鲈鱼肝脏、脾脏和肾脏等组织, 研磨后, 用磷酸缓冲液(PBS)制成 1 : 10 ( $V_{\text{组织}} : V_{\text{PBS}}$ )的组织匀浆液, 反复冻融 3 次后, 4 °C 4000 r/min 离心 30 min, 用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 上清即为组织毒悬液。取 500  $\mu\text{L}$  组织毒悬液接种于 MFB 细胞, 28 °C 培养中孵育 1 h 后, 加入 2% FBS 的 L-15 培养基, 置于 28 °C 培养箱中培养, 逐日观察细胞形态, 同时设未接组织毒悬液的细胞作为对照组。至发现实验组细胞出现 80% 细胞病变后, 将细胞培养物收于 -80 °C 冰箱反复冻融 3 次, 4 °C 4000 r/min 离心 30 min 收集细胞毒悬液。将收集的细胞毒悬液按上述方法接种 MFB 细胞连续传代培养 7 代, 同时收集第 7 代(P7)病毒悬液进行 PCR 检测。同时将 P7 病毒悬液接种 EPC、GCO、GSM 和 GiCB 细胞, 观察细胞状态。

### 1.5 电镜样品制备

收集病鱼脾肾组织和上述 P7 细胞毒悬液感染后病变的 MFB 细胞, 加入 2.5%戊二醛固定, 4 °C 固定过夜。经 1%锇酸固定和 50%~100%乙醇梯度脱水后使用环氧树脂包埋样品。使用超薄切片机将样品切成 50~80 nm 超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅染色后晾干, 将样品置于透射电子显微镜(日立 H7650)下观察、拍照。

### 1.6 病毒分子检测

按照 Omega 病毒 DNA 提取试剂盒说明书提取患病鱼肝脏、脾脏、肾脏病毒 DNA 和细胞培养病毒 DNA。按照已报道的 LMBV 检测方法<sup>[7]</sup>合成 PCR 检测引物, TF: 5'-TCTGT TACGGGTTCTGG CATC-3'; TR: CCAGCCAAGAGTTGAGCACAT。以提取的患病鱼组织病毒和细胞培养病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增的反应总体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 2.5  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, rTaq DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.25  $\mu$ L。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s; 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 min, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 7 min。PCR 产物使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因。阴性对照为健康大口黑鲈脾脏 DNA。

### 1.7 MCP 基因开放阅读框区全长扩增和氨基酸序列比对

参考 GenBank 中已发表的 LMBV 病毒 MCP 基因序列设计特异引物扩增 MCP 基因 ORF 区全长<sup>[10]</sup>, 引物序列如下: LMBV-F, 5'-CTGGATCC AGCAACACACTTC-3'; LMBV-R, 5'-CATATCGC AGTTTGCGATATGG-3'。以提取的患病鱼组织病毒和细胞培养病毒 DNA 为模板, PCR 扩增 MCP 基因的 ORF 区及上下游部分序列, 扩增的反应总体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 2.5  $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, rTaq DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.25  $\mu$ L。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 S; 58 °C 退火 30 S, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因, 并将 PCR 产物送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测

序, 通过 NCBI 数据库的 BLAST 检索系统进行同源性分析, 然后选取与获得序列相似的参考毒株的氨基酸序列, 使用 Clustal Omega 在线软件对分离株 LMBRaV-HB001 的 MCP 氨基酸序列与其他蛙病毒的 MCP 氨基酸序列进行多重序列比对, 最后使用 MEGA7.0 采用邻接法(neighbour-joining)构建系统发育树。

### 1.8 人工感染试验

将在 MFB 细胞中传代至第 9 代的细胞毒悬液稀释到 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 后进行人工回归感染试验。试验设置试验组和对照组, 每组 30 尾健康大口黑鲈。试验组每尾大口黑鲈腹腔注射 200  $\mu$ L 病毒液, 对照组大口黑鲈每尾注射 200  $\mu$ L 杜氏磷酸缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS), 实验期间水温控制在 28 °C, 逐日观察试验鱼的发病情况并统计死亡率。

### 1.9 病毒滴度测定

采用微孔板法测定病毒滴度, 使用胰酶将细胞消化后, 接种于 96 孔板中(Corning, USA), 将细胞数调整到约 1 $\times$ 10<sup>5</sup>~2 $\times$ 10<sup>5</sup>个/mL, 每孔加 100  $\mu$ L。待细胞长至单层后, 将病毒液 10 倍稀释后分别加到 96 孔板中, 每孔加 100  $\mu$ L, 每个稀释度接 8 孔。同时设置正常细胞对照, 28 °C 培养, 逐日观察细胞病变情况, 7 d 后记录病变孔数, 使用 Reed-Muench 法计算病毒的半致死感染剂量(TCID<sub>50</sub>)<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床症状

自然发病水温为 26~29 °C, 患病大口黑鲈临床症状主要表现为腹部和下颌点状出血, 肛门红肿, 肝脏发白, 脾脏肿大(图 1), 部分病鱼有体表溃烂和螺旋游动症状。取病鱼肝脏、肾脏等组织, 在 BHI 固体培养基上进行细菌培养, 未培养出细菌。黏液和鳃丝中也未检出寄生虫。

### 2.2 细胞培养与病毒分离

超微过滤后的病鱼组织匀浆液接种 MFB 细胞 24 h 后, 细胞开始变圆、脱落, 出现典型细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 继续培养 12 h 后可观察到因细胞死亡脱落形成的空洞(图 2)。被感染的 MFB 细胞在 48 h 内全部收缩呈球状, 脱离细胞培瓶壁。病毒在 MFB 细胞中连续传代 10 次,

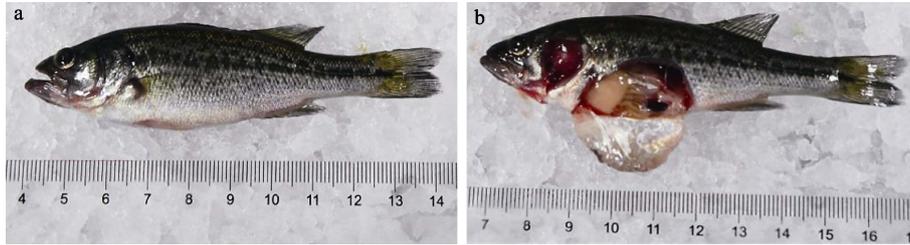


图 1 自然发病大口黑鲈症状

a. 发病鲈体表外观; b. 发病鲈解剖图.

Fig. 1 Clinic symptom of naturally infected *Micropterus salmoides*  
a. Surface appearance of diseased *M. salmoides*; b. Anatomy of diseased *M. salmoides*.

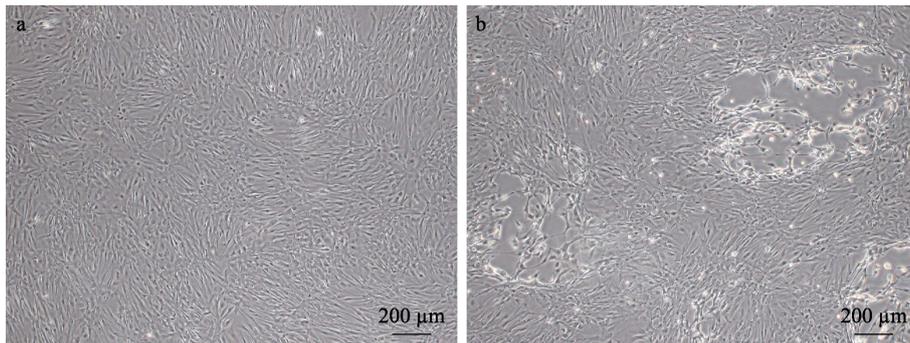


图 2 病鱼组织匀浆液接种鳊脑细胞系(MFB)细胞引起的细胞病变效应(CPE)

a. 正常细胞; b. 接毒 12 h 的细胞.

Fig. 2 Cytopathic effect (CPE) of mandarin fish brain (MFB) cells infected with tissue homogenate filtrate of diseased *Micropterus salmoides*  
a. Normal MFB cells; b. CPE of MFB cells 12 hours post-infection.

滴度达到  $10^{8.36 \pm 0.15}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

### 2.3 病毒接种细胞电镜观察结果

对病毒感染的 MFB 细胞进行超薄切片和透射电镜观察, 发现细胞质中存在大量正六边形,

直径 150 nm 左右的病毒颗粒, 病毒颗粒呈晶格状排列, 并且可见具有衣壳和核心的成熟病毒颗粒 (黑色箭头) 和正在装配仅有衣壳的未成熟病毒颗粒 (白色箭头)。细胞核出现核物质边缘化 (图 3)。

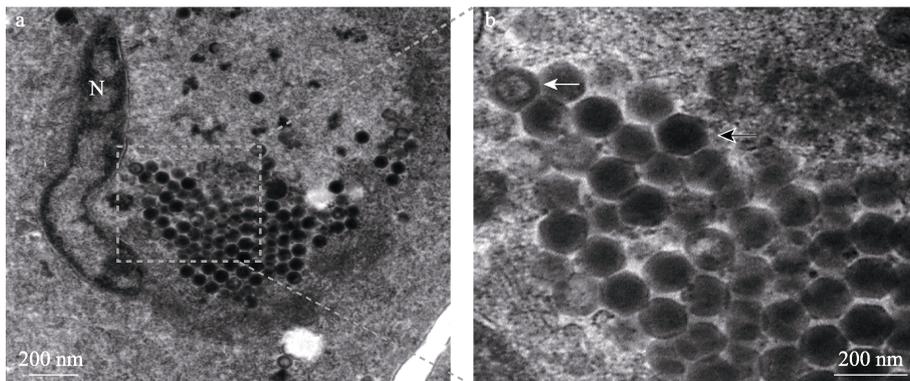


图 3 大口黑鲈蛙病毒(LMBRaV)湖北株 LMBRaV-HB001

病毒感染鳊脑组织细胞的透射电镜观察

a. 细胞质中晶格状排列的病毒颗粒; b. a 中白色方框区域放大; 黑色箭头: 成熟病毒颗粒; 白色箭头: 未成熟病毒颗粒; N: 细胞核.

Fig. 3 Transmission electron micrographs of *Micropterus salmoides* brain cells infected with LMBRaV-HB001  
a. Pseudocrystalline array of virus particles in the cytoplasm; b. Higher magnification of white box in figure a. Black arrow indicates mature virus particle. White arrow indicates immature virus particle. N: nucleus.

## 2.4 人工感染试验

将细胞培养病毒进行人工回归感染健康大口黑鲈, 攻毒后的鱼与自然发病鱼表现相似症状, 出现下颌点状出血、肛门红肿、肝脏发白等症状, 少量出现螺旋游动症状。在攻毒后的第 2 天开始死亡, 第 3 天开始大量死亡, 7 d 死亡率达到 100% (图 4)。对照组鲈表现正常, 无死亡。

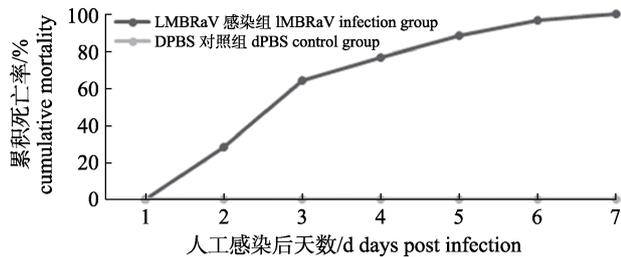


图 4 人工感染大口黑鲈累计死亡率

Fig. 4 Cumulative mortality of experimentally infected *Micropterus salmoides*

## 2.5 病毒核酸分子检测

按照已报道的 LMBV 检测方法对自然患病鲈肝脏、脾脏和肾脏以及病毒感染的 MFB 细胞样品 (第 7 代感染细胞样品) 进行 PCR 检测, 结果显示 3 种组织样品以及细胞感染样品均能扩增出 241 bp 的单一阳性条带, 阴性对照无特异性条带扩增 (图 5)。

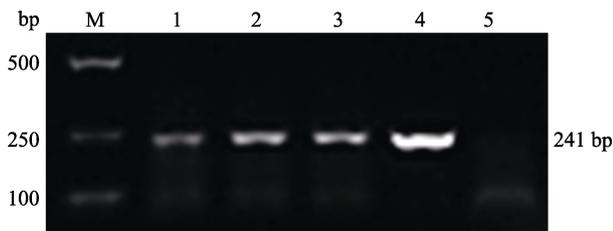


图 5 自然患病鲈组织样品和病毒感染细胞样品的 LMBRaV-HB001 PCR 检测

M: DL2000 DNA marker; 1-3: 自然患病鲈肝脏、脾脏和肾脏样品; 4: 病毒感染细胞样品; 5: 阴性对照。  
Fig. 5 PCR detection of LMBRaV-HB001 from naturally infected largemouth bass tissues and virus infected cell  
M: DL2000 DNA marker; 1-3: liver, spleen and kidney of naturally infected largemouth bass; 4: virus infected cell; 5: negative control.

## 2.6 MCP 基因 ORF 区扩增及序列比对分析

根据 GenBank 中已发表的 LMBV 病毒 MCP

基因序列设计特异引物 LMBV-F/R, 对病毒 DNA 进行扩增, 获得 1392 bp 的 MCP 基因 ORF 区全长序列 (图 6)。分离株 LMBRaV-HB001 的 MCP 氨基酸序列与其他感染鱼类的蛙病毒 MCP 氨基酸序列比对结果显示, 与鳊蛙病毒 (mandarin fish ranavirus, MFRV)、Santee-Cooper 蛙病毒 (santee-cooper ranavirus, SCRv)、孔雀鱼病毒 6 型 (guppy virus, GV-6) 及大口黑鲈溃疡综合征病毒 (largemouth bass ulcerative syndrome virus, LBUSV) 的 MCP 氨基酸同源性最高, 一致性均达 100% (表 1)。系统进化结果表明, 本研究分离得到的病毒与感染鱼类的蛙病毒聚为一支, 进一步证明该分离株属于虹彩病毒科, 蛙病毒属 (图 7)。

## 2.7 病毒敏感细胞系筛选

P7 代细胞毒接种 EPC、GCO、GSM 和 GiCB 细胞, 接种后 12 h 均能产生典型的 CPE, 细胞变圆, 脱落, 形成空洞 (图 8)。接毒后第 3 天收集上清和细胞进行病毒滴度分析, 上述细胞中的病毒滴度分别达到  $10^{11.73 \pm 0.9}$ 、 $10^{11.68 \pm 0.32}$ 、 $10^{11.15 \pm 1.2}$ 、 $10^{8.27 \pm 0.11}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

## 3 讨论

虹彩病毒科蛙病毒属病毒主要感染两栖类和爬行类动物, 近年来发现也感染鱼类, 如流行性造血器官坏死病毒 (epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNv)、石斑鱼虹彩病毒 (singapore grouper iridovirus, SGIV) 和 Santee-Cooper 蛙病毒 (SCRv)<sup>[12]</sup>。SCRv 病毒包括 3 种: 大口黑鲈病毒 (LMBV)、医生鱼病毒 (DFV) 和孔雀鱼病毒 6 型 (GV-6)<sup>[13]</sup>。LMBV 是引起大口黑鲈大规模死亡的重要病原。LMBV 病毒于 1991 年首次在美国佛罗里达州 Lake Weir 患病野生大口黑鲈体内发现, 随后几年在美国 20 多个州相继发现并传播到欧洲<sup>[5]</sup>。2008 年我国广东佛山首次发现大口黑鲈溃疡病暴发, 病鱼体内发现大量病毒颗粒, 经鉴定为蛙病毒, 命名为大口黑鲈溃疡综合征病毒 (LBUSV), 其 MCP 氨基酸序列与国外报道的 DFV 和 LMBV 病毒 MCP 氨基酸序列同源性分别为 100% 和 98%<sup>[14]</sup>。2020 年许峰等<sup>[5]</sup>从江苏患病大口黑鲈中分离一株 LMBV



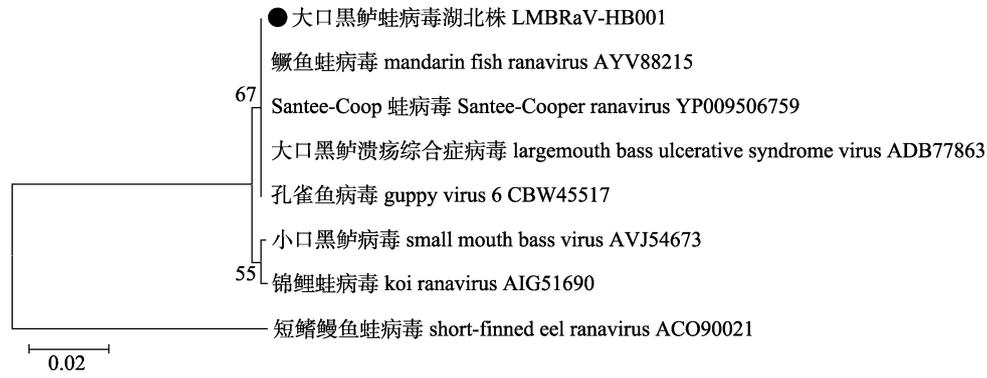


图 7 LMBRaV-HB001 株与其他鱼类蛙病毒分离株基于 MCP 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic relationship of LMBRaV-HB001 strain with other fish ranavirus based on MCP amino acid sequence

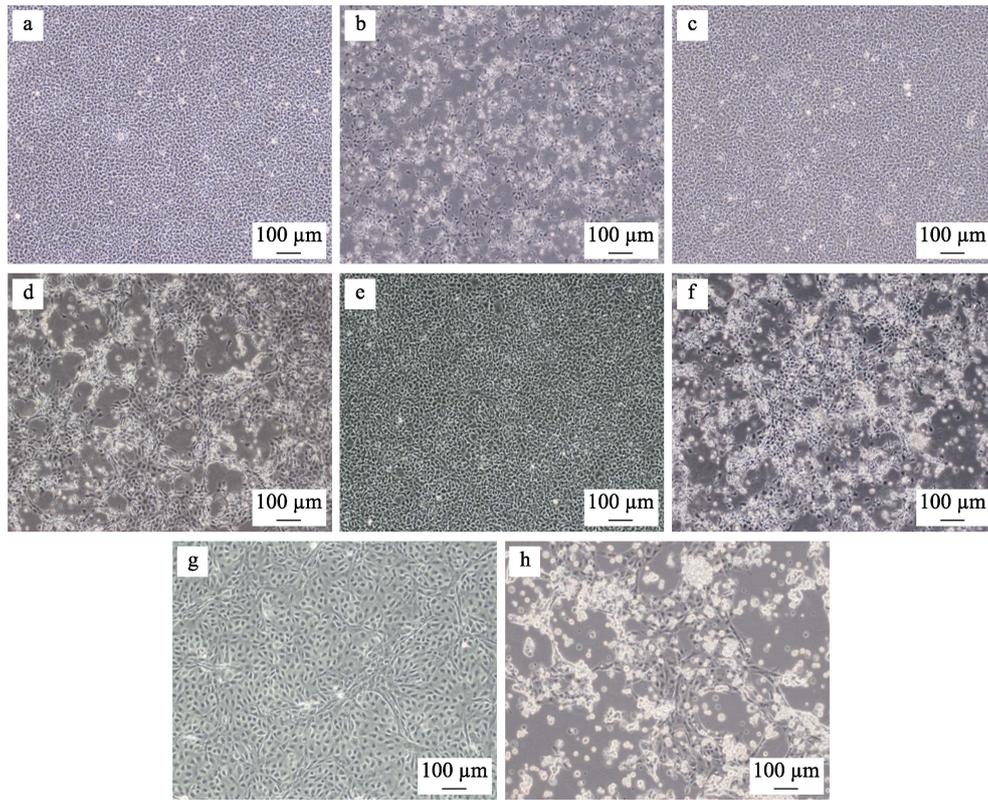


图 8 细胞培养病毒接种 EPC、GCO、GSM 和 GiCB 细胞引起的细胞病变效应(CPE)

a. 正常 EPC 细胞; b. 接毒 12 h 的 EPC 细胞; c. 正常 GCO 细胞; d. 接毒 12 h 的 GCO 细胞; e. 正常 GSM 细胞; f. 接毒 12 h 的 GSM 细胞; g. 正常 GiCB 细胞; h. 接毒 12 h 的 GiCB 细胞.

Fig. 8 Cytopathic effect (CPE) of EPC, GCO, GSM and GiCB cells infected with cell cultured virus  
a. Normal EPC cells; b. EPC cells at 12 hours post-infection; c. Normal GCO cells; d. GCO cells at 12 hours post-infection; e. Normal GSM cells; f. GSM cells at 12 hours post-infection; g. Normal GiCB cells; h. GiCB cells at 12 hours post-infection.

本研究中患病鲈的临床症状和先前报道的 LMBV 病毒感染大口黑鲈的症状非常相似, 呈现体表出血、溃疡, 肝脾肿大等特征<sup>[4,12]</sup>, 而且电镜观察到的病毒粒子大小、形态等特征也和蛙病毒类似, 病毒粒子直径 150 nm 左右, 形状为正六边

形, 在细胞质中呈现晶格排列<sup>[15]</sup>。为确定病毒的分类地位, 作者进一步进行了病毒保守基因的序列分析。*MCP* 基因既具有病毒分类所需要的保守区域, 又具有区分不同种病毒的可变区, 仅用 *MCP* 基因的序列来区分虹彩病毒不同分离株之

间的亲缘关系, 虽然依据还不够充分, 但其仍适合作为研究病毒进化的靶基因<sup>[16]</sup>。通过氨基酸序列比对发现 LMBRaV-HB001 的 MCP 氨基酸序列与 SCRv、GV-6 及 LBUSV 病毒 MCP 氨基酸序列的同源性达到 100%, 并且进化树分析结果显示本 LMBRaV-HB001 毒株与感染鱼类的蛙病毒聚为一支, 证明造成湖北省大口黑鲈大规模死亡的毒株为虹彩病毒科蛙病毒属成员。由于病毒的全基因组序列尚不清楚, 无法确定此次发现的大口黑鲈蛙病毒和之前广东发现的 LBUSV 是否为同一个病毒, 因此暂命名为大口黑鲈蛙病毒湖北分离株 LMBRaV-HB001 以示区别。此前, LMBV 病毒引起的大口黑鲈死亡主要在南方地区(如广东省)暴发, 近年来陆续发现在中部省份(江苏省和湖北省)暴发, 说明该病毒在我国的传播越来越广, 应当尽快进行大规模流行病学调查, 开展有关病毒致病机理和防控措施的研究。

虽然 LMBV 病毒已发现 20 年, 但目前大口黑鲈的细胞系还较少。2014 年 Getchell 等<sup>[17]</sup>建立了大口黑鲈性腺细胞系(largemouth bass gonad, LMBG), 接种 LMBV 后病毒滴度能达到  $10^{8.45}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 比 Deng 等<sup>[6]</sup>接种 EPC 细胞的滴度( $10^{10.82}$  TCID<sub>50</sub>/mL)低很多。因此, 建立及筛选 LMBV 敏感的细胞系是一个亟待解决的问题。本研究中 LMBRaV-HB001 接种 EPC、GCO、GSM 和 GiCB 细胞系均能产生典型 CPE, 病毒滴度能达到  $10^{11.73\pm 0.9}$ 、 $10^{11.68\pm 0.32}$ 、 $10^{11.15\pm 1.2}$ 、 $10^{8.27\pm 0.11}$  TCID<sub>50</sub>/mL。说明 4 种细胞均对 LMBRaV 病毒高度敏感。

本研究首次从湖北省患病大口黑鲈体内分离到一株病毒, 病毒形态为直径 150 nm 左右的正六边形, 分类地位属于虹彩病毒科蛙病毒属, 命名为大口黑鲈蛙病毒湖北分离株(LMBRaV-HB001)。并且查明 EPC、GCO 和 GSM 等多种细胞对该病毒敏感。

#### 参考文献:

[1] Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs PRC, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2020. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产

学会. 中国渔业统计年鉴 2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.]

[2] Deng G C, Bai J J, Li C J, et al. Common diseases in pond culture of largemouth bass and their control[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(18): 102-103. [邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈池塘养殖常见病害及其防治[J]. 广东农业科学, 2011, 38(18): 102-103.]

[3] Xia Y C, Cao Z, Lin L Y, et al. Research progress on main diseases of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. China Animal Health Inspection, 2018, 35(9): 72-76. [夏焱春, 曹铮, 蔺凌云, 等. 大口黑鲈主要病害研究进展[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(9): 72-76.]

[4] Wang Q, Li K B, Zeng W W, et al. Progress on viral disease caused by largemouth bass ranavirus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(2): 73-76. [王庆, 李凯彬, 曾伟伟, 等. 大口黑鲈虹彩病毒病研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 73-76.]

[5] Xu F, Lu J F, Wei Y W, et al. Characterization of an iridovirus isolate from largemouth bass *Micropterus salmoides*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(1): 156-162. [许峰, 鲁建飞, 魏永伟, 等. 一株大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)虹彩病毒(Iridoviridae)的分离及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(1): 156-162.]

[6] Deng G C, Li S J, Xie J, et al. Characterization of a ranavirus isolated from cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China[J]. Aquaculture, 2011, 312(1-4): 198-204.

[7] Ma D M, Bai J J, Deng G C, et al. Sequence analysis of MCP gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus and rapid detection by PCR assay[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1149-1156. [马冬梅, 白俊杰, 邓国成, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 MCP 基因序列分析及 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1149-1156.]

[8] Ma D M, Deng G C, Bai J J, et al. Prokaryotic expression of MCP gene from largemouth bass ulcerative syndrome virus and the immune effect analysis of recombinant protein[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 139-144. [马冬梅, 邓国成, 白俊杰, 等. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 MCP 基因的原核表达及重组蛋白的免疫效果初步分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 139-144.]

[9] Wang Q, Zeng W W, Liu C, et al. A duplex PCR for detection of iridescent virus from largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(4): 106-110. [王庆, 曾伟伟, 刘春, 等. 大口黑鲈虹彩病毒双重 PCR 检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(4): 106-110.]

[10] Ohlemeyer S, Holopainen R, Tapiovaara H, et al. Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2011, 96(3): 195-207.

[11] Ma J, Zhou Y, Fan Y D, et al. The physical-chemical and biological characteristics of Cyprinid herpesvirus 2 and its ultrastructural morphogenesis *in vitro*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 475-483. [马杰, 周勇, 范玉顶, 等.

- 鲤疱疹病毒 II 型的理化及生物学特性和超微形态发生[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 475-483.]
- [12] Zhao R X, Geng Y, Qin Z Y, et al. A new Ranavirus of the Santee-Cooper group invades largemouth bass (*Micropterus salmoides*) culture in southwest China[J]. Aquaculture, 2020, 526: 735363.
- [13] Jancovich J K, Steckler N K, Waltzek T B. Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates[M]. New York: Springer, 2015: 59-70.
- [14] Deng G C, Xie J, Li S J, et al. Isolation and preliminary identification of the pathogen from largemouth bass ulcerative syndrome[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 871-877. [邓国成, 谢骏, 李胜杰, 等. 大口黑鲈病毒性溃疡病原的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 871-877.]
- [15] Williams T. The iridoviruses[J]. Advances in Virus Research, 1996, 46: 345-412.
- [16] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution?[J]. Virus Genes, 1998, 16(1): 59-66.
- [17] Getchell R G, Grocock G H, Cornwell E R, et al. Development and characterization of a largemouth bass cell line[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2014, 26(3): 194-201.

## Isolation and identification of largemouth bass ranavirus from Hubei Province

LUO Xiaowen<sup>1</sup>, SHEN Jinyu<sup>2</sup>, YANG Tao<sup>3</sup>, ZENG Lingbing<sup>1</sup>, ZHOU Yong<sup>1</sup>, FAN Yuding<sup>1</sup>, LIU Wenzhi<sup>1</sup>, LI Yiqun<sup>1</sup>, XUE Mingyang<sup>1</sup>, MENG Yan<sup>1</sup>, JIANG Nan<sup>1</sup>

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;
3. Animal Health Research Institute, Tongwei Co., Ltd., Chengdu 610041, China

**Abstract:** A ranavirus that caused high mortality of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in Huangpi, Hubei was isolated and identified by using cell culture and transmission electron microscopy (TEM). The clinical symptom of diseased fish showed hemorrhages and ulcers on the skin and a pale liver. The typical cytopathic effect (CPE) was observed in the cells of the mandarin fish brain (MFB) that were infected with the filtrate of diseased fish tissue homogenate, and the viral titer was approximately  $10^{8.36 \pm 0.15}$  TCID<sub>50</sub>/mL. A large number of hexagonal virus particles with a diameter of approximately 150 nm aggregated in a pseudocrystalline array in infected MFB cells. The mortality of artificial infection reached 100% within 7 days post infection, and the clinical symptoms were similar to those of naturally diseased fish. A 241 bp specific positive fragment was obtained by a largemouth bass virus (LMBV) PCR assay of both naturally diseased fish and infected cells. According to the sequence of major capsid protein (MCP) gene of LMBV in GenBank, the specific primers were designed and a 1392 bp full length sequence of open reading frame (ORF) was obtained from the above samples. The amino acid sequence shared 100% identity with that of Santee Cooper frog virus, guppy virus type 6 and largemouth bass ulcer syndrome virus. Phylogenetic analysis showed that the virus had the highest homology with ranavirus which infects fish, such as mandarin fish ranavirus, Santee-Cooper ranavirus, largemouth bass ulcerative syndrome virus, guppy virus et al. MCP amino acid sequence analysis indicated that the virus belonged to genus *Ranavirus* of the family *Iridoviridae*, and the virus was designated as largemouth bass ranavirus LMBRaV-HB001. The typical CPE could also be observed in epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cells, grass carp ovary (GCO) cells, giant salamander muscle (GSM) cells, and gibel carp brain (GiCB) cells infected with cell cultured virus, and the viral titer reached over  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL. In this study, LMBRaV was first isolated and identified in cultured largemouth bass in Hubei province, and the sensitive cell lines of the virus were also screened. These results will provide critical foundation for the transmission, diagnosis, prevention and control of ranavirus.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; largemouth bass virus; cell culture; isolation and identification of virus

**Corresponding author:** JIANG Nan, E-mail: jn851027@yfi.ac.cn; SHEN Jinyu, E-mail: sjinyu@126.com