中国水产科学 2013 年 11 月, 20(6): 1303−1309
Journal of Fishery Sciences of China

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01303

鲤疱疹病毒 2 型武汉株的分离与鉴定

徐进, 曾令兵, 杨德国, 张辉, 马杰, 江南, 范玉顶

中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 采用细胞培养、超薄切片电镜观察、巢式 PCR 检测以及病毒 DNA 克隆与测序分析等技术, 从湖北武汉一循环水养殖系统中患出血病异育银鲫(*Carassius auratusgibelio*)体内分离鉴定了一株鲤疱疹病毒 2 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)病毒, 命名为鲤疱疹病毒 2 型武汉株(CyHV-2-WH)。患病鱼组织匀浆液接种锦鲤鳍条细胞系(Koi-Fin)可产生典型的细胞病变效应。用患病鱼组织匀浆液与细胞培养物分别人工感染异育银鲫, 均可重复出与自然发病相同的症状, 死亡率达 100%。患病鱼脾与肾脏组织超薄切片电镜观察结果显示, 病毒为具囊膜的球形病毒, 囊膜直径为 170~200 nm, 病毒衣壳直径为 110~120 nm, 病毒在细胞核内复制、组装。采用 CyHV-2 的特异引物对病鱼样本和感染细胞培养物样本进行巢式 PCR 检测, 均能扩增出 357 bp 的目的条带, 将该扩增产物进行测序与比对分析后发现, 其与 GenBank 中已报道的 CyHV-2 毒株的 DNA 解旋酶基因高度同源(99.44%以上), 与鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)也有较高的同源性(81.55%)。系统进化分析结果显示, CyHV-2-WH 株与 JS2012、H.Fukuda、YC110907 等 CyHV-2 病毒株属同一分支。

关键词: 鲤疱疹病毒 2 型; 异育银鲫; 病毒分离; 病毒鉴定; 潜伏感染
中图分类号: S941 文献标志码: A 文章编号: 1005−8737−(2013)06−1303−07

鲤疱疹病毒 2 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2), 又称疱疹病毒性造血器官坏死病病毒(Herpesviralhaematopoietic necrosis virus, HVHNV)[1]或金鱼造血器官坏死病毒(Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)[2], 与鲤科鱼类的其他两种疱疹病毒 CyHV-1(Carp pox)和 CyHV-3(Koi herpesvirus, KHV)同属 Alloherpesviridae 科[3−4]。Jung 等[1]于 1995 年首次报道了 CyHV-2, 该病毒引起的病害给日本金鱼养殖业造成了巨大的经济损失, 死亡率高达 100%, 根据其造成的病理学特征而被命名为疱疹病毒性造血器官坏死病病毒。随后美国[2, 5]、中国台湾[6]、澳大利亚[7]、英国[8]养殖的金鱼相继暴发该病。自 2011 年 CyHV-2 首次在匈牙利养殖的银鲫体内被检测到后[9], 近 2 年来 CyHV-2 感染异育银鲫(*Carassius auratusgibelio*)的报道逐渐增多, 捷克[10]、意大利[11]先后报道了 CyHV-2 感染异育银鲫并引起大量死亡的病例。在中国, Wang 等[12] 于 2012 年首次报道了 CyHV-2 感染异育银鲫的病例, 该病毒病给中国东部地区池塘养殖的异育银鲫造成了严重损失, 其死亡率极高, 部分池塘的死亡率高达 100%。随后在北京、武汉、广州等地观赏鱼市场销售的金鱼体内也检测到 CyHV-2[13], 表明该病已传入中国。

本课题组通过对湖北武汉一循环水养殖设施内出现大量死亡的异育银鲫样本进行超微病理学观察、细胞培养以及分子生物学分析, 分离到一株病毒, 经鉴定为鲤疱疹病毒 2 型, 命名为 CyHV-2-WH 株。本文对该研究过程进行报道, 旨在为鱼类疱疹病毒病的防控技术研究提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

患病异育银鲫于 2011 年 11 月购自武汉白沙洲

收稿日期: 2013−05−20; 修订日期: 2013−07−16.
基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-46-11); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2013A0606).
作者简介: 徐进(1982−), 男, 助理研究员, 从事水生动物疾病研究. E-mail: xujin@yfi.ac.cn
通信作者: 曾令兵, 研究员. E-mail: zlb@yfi.ac.cn

农贸市场，并一直在湖北武汉一循环水养殖设施内进行人工养殖，期间投喂配合饲料。2012 年 8 月发病，发病时鱼全长 23~28 cm，死亡率 85%，发病时水温 22℃，水质指标均正常。收集濒死新鲜病鱼样本以备实验室分析。

用于人工感染实验的健康异育银鲫来自长江水产研究的荆洲窑湾养殖基地。

1.2 细胞系

锦鲤鳍条细胞系(Koi-Fin)为本实验室建立和保藏[14]，其培养基为 MEM(Sigma)，血清浓度 10%(四季青，浙江天杭生物科技有限公司)，培养温度 25℃。

1.3 病毒分离与培养

收集病鱼的鳃、肝、脾、肾等内脏组织于无菌培养皿中，用无菌眼科剪剪碎，加入10 倍体积(*V*/*W*)的DPBS(Sigma)，转入玻璃匀浆器内，在冰浴中研磨成组织匀浆液。将组织匀浆液转移至50 mL离心管中，在–80℃至室温反复冻融3次，随后将匀浆液在4℃，4 000 r/ min离心30 min(Sigma, 3K15)。将上清液经 0.22 μm滤器(Nalgene)过滤除菌后立即用于鱼体人工感染试验，剩余滤液可分装于冻存管(Corning)中，–80℃保存备用。

Koi-Fin细胞在T25细胞培养瓶(Corning)中以上述培养基进行传代培养，待细胞单层铺满瓶壁时(24 h左右)，弃去培养基，每瓶加入上述组织浆过滤液 1 mL，加入终浓度为10 μg/mL聚凝胺(Polybrene, Sigma公司产品)，25℃吸附1 h，期间每隔15～20 min轻微晃动培养瓶一次以便均匀吸附。吸附1 h后，补加含2%FBS的MEM培养基4 mL，置于25℃培养箱中培养。在光学相差显微镜(Nikon)下逐日观察细胞病变效应(Cytopathic Effect, CPE)。向对照细胞中添加1 mL无血清的MEM培养基模拟感染，其他操作同感染实验组。

1.4 人工感染实验

人工感染实验在水族箱中进行，水体体积为40 L，连续充气，水温25℃，实验鱼在室内暂养1周后进行人工感染实验。人工感染实验分为3组，注射组织浆过滤液组、注射感染细胞培养液组以及模拟感染组，每组实验鱼30尾，感染方式为腹腔注射，注射剂量为0.2 mL/尾，其中感染细胞培养液组为第2代病毒培养液(10^6TCID$_{50}$/尾)。模拟感染组注射相同剂量的DPBS作为阴性对照。每天观察实验鱼的活动情况，记录实验鱼发病情况状并统计死亡率，随机挑选3尾实验组死亡鱼和对照组正常鱼取内脏样本进行病毒核酸检测。

1.5 病毒鉴定

1.5.1 病毒纯化 采用蔗糖梯度离心法纯化病毒。取上述制备的组织浆过滤液 30 mL，4℃、20 000 r/min 离心 2 h，弃上清，沉淀用 1 mL DPBS 悬浮，旋涡仪上充分震荡分散。用 DPBS 分别配制 20%、30%、40%、50%、60%(*W*/*V*)的蔗糖溶液，并依次加入离心管中制成蔗糖浓度梯度溶液，将上述 1 mL 病毒悬液小心加到最上层。4℃、25 000 r/min 离心 3 h 后，将蔗糖梯度中的白色病毒带吸出，加入 10 倍体积的 DPBS，混匀后于 4℃、20 000 r/min 离心 2 h，弃上清，沉淀用 0.2 mL DPBS 悬浮，–80℃保存备用。

1.5.2 超薄切片与电镜观察 选取濒死的患病鱼，迅速解剖，取肾、脾组织，剪成小块，加入适量的 2.5%戊二醛固定 2 h，将组织块切成 1~2 mm^3 小块后用 1%锇酸再次固定 2 h。组织块用纯水洗 3 遍后，经乙醇梯度脱水，环氧丙烷渗透，Epon812 包埋，制片，醋酸双氧铀和柠檬酸铅联合染色后，置于透射电镜观察[15]。取正常组织同步制片观察。

1.5.3 病毒巢式 PCR 检测 取 100 μL 上述纯化的病毒样品或 Koi-Fin 细胞培养物，用 DNAzol 试剂(Invitrogen)提取病毒核酸作为巢式 PCR(Nested-PCR)模板。Nested-PCR 检测引物设计(表 1)参照 GenBank 中已发布的 CyHV-2 的 DNA 解旋酶基因序列(GenBank 登录号：EU349287)，由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

Nested-PCR 分两步进行，先用外引物 P1 进行 PCR 扩增，然后以该 PCR 产物作为模板用内引物 P2 进行二次扩增。外引物 P1 的 PCR 扩增反应体系为：10×PCR Buffer(Mg^{2+})2 μL，dNTPs(10 mmol/L)2 μL，外引物 P1(20 μmol/L)0.5 μL，DNA 模板 2 μL，Taq 酶(5 U/μL, TaKaRa)0.2 μL，纯水补足至 20 μL。同时取纯水做阴性对照。PCR 反应条件为：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，30 个循环后 72℃ 5 min。内引物 P2 的 PCR 扩增：取 1 μL 外引物 P1 的扩增产物作为模板，以内引物 P2 为引物进行二次扩增，其他反应成分和反应条件同第一次扩增。用 1%~2%(*W*/*V*)琼脂糖凝胶电泳检测目的条带并成像分析。

表 1　CyHV-2 Nested-PCR 引物信息
Tab. 1　Primer sequences in CyHV-2 Nested-PCR assay

引物名称 primer	序列(5'–3') Sequence(5'–3')	扩增产物大小/bp amplicon size
P1-F	TGAAATGTCAAAAGTGGATGG	716
P1-R	TATTCCCAGACAGCCTTCAAA	
P2-F	GAACACCGCTGCTCATCATC	357
P2-R	ACTCTTCGCAAGTCCTCACC	

1.5.4　PCR 扩增产物序列分析　将上述 357bp PCR 产物切胶后用 DNA 回收试剂盒(Promega)回收和纯化, 然后连接 pMD19-T 载体(TaKaRa), 转化感受态大肠杆菌 DH5α 细胞, LB Amp^+抗性平板 37℃培养, 阳性克隆经 PCR 鉴定确认后进行测序。用 DNAStar 以及 NCBI BLAST 对测序结果进行核苷酸序列同源性分析。从 GenBank 中选取与阳性序列相似的参考毒株, 用 MEGA 4.0 软件构建进化树。

2　结果与分析

2.1　疾病症状

病鱼主要症状为典型体表出血。各鳍条及其基部充血、出血, 眼球突出, 眼眶、口、下颌、鳃盖、胸以及腹部出血, 鳞片松动, 鳃丝苍白, 体色变浅(图 1A)。解剖后可见脾膨大, 颜色发黑, 肝肿大、出血, 腹腔无腹水(图 2)。

图 1　患病异育银鲫体表症状
A: 自然感染的病鱼; B: 人工感染的病鱼.
Fig. 1　The exterior symptom of diseased gibel carp
A: naturally infected fish; B: artificially infected fish.

2.2　细胞培养与病毒分离

患病鱼组织浆首次接种 Koi-Fin 细胞系即能产生明显的 CPE。感染 5 d 后部分细胞开始收缩、变圆、折光度增加, 10 d 后胞间连丝清晰可见, 部分细胞开始脱落, 细胞单层开始破裂, 第 12 天后可见细胞出现大面积脱落, 细胞单层崩解(图 3)。

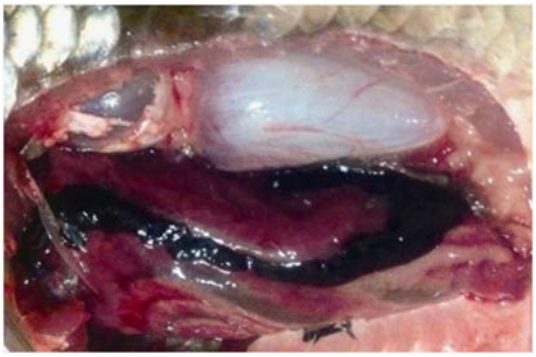

图 2　患病异育银鲫内部组织症状
Fig. 2　The interior symptom of diseased gibel carp

2.3　人工感染实验

人工感染实验可重复出与自然发病鱼相同的出血症状(图 1B)。注射组织浆过滤液的实验鱼从第 3 天开始发病, 第 4 天开始出现死亡, 第 6~8 天达到高峰, 第 9 天累计死亡率达 100%; 注射感染细胞培养液的实验鱼从第 4 天开始发病, 第 5 天开始出现死亡, 第 7~9 天达到高峰, 第 10 天累计死亡率达 100%。注射 DPBS 模拟感染的实验鱼未出现死亡(图 4)。随机选取的发病鱼取内脏组织进行 PCR 检测, 结果均为阳性, 而对照鱼均为阴性(图 7)。

2.4　电镜观察

对患病鱼脾和肾组织进行超薄切片并在电镜下观察, 可见大量球形病毒颗粒。脾组织中细胞形态相对完整, 可见细胞核与线粒体等细胞器, 细胞膜、核膜完整, 染色质边集化, 核内可见成熟的病毒粒子(黑色箭头)与正在装配中的未成熟病毒颗粒(白色箭头)(图 5A); 肾脏组织细胞结构基本溶解, 细胞膜、核膜不明显, 未见细胞器, 病毒颗粒散在分布(图 5B)。病毒为具囊膜的球形病毒, 囊膜直径为 170~200 nm, 病毒衣壳直径为 110~120 nm, 核心直径约为 60 nm。

2.5　病毒核酸分子检测

以 CyHV-2 的 DNA 解旋酶基因序列设计的 Nested-PCR 引物对采集的 3 个病鱼样本和 2 个感染细胞培养物样本(第 1、2 代感染细胞培养物)进行了 Nested-PCR 检测, 结果显示这 5 个样本均能扩增出 357 bp 的单一条带, 结果为阳性(图 6)。

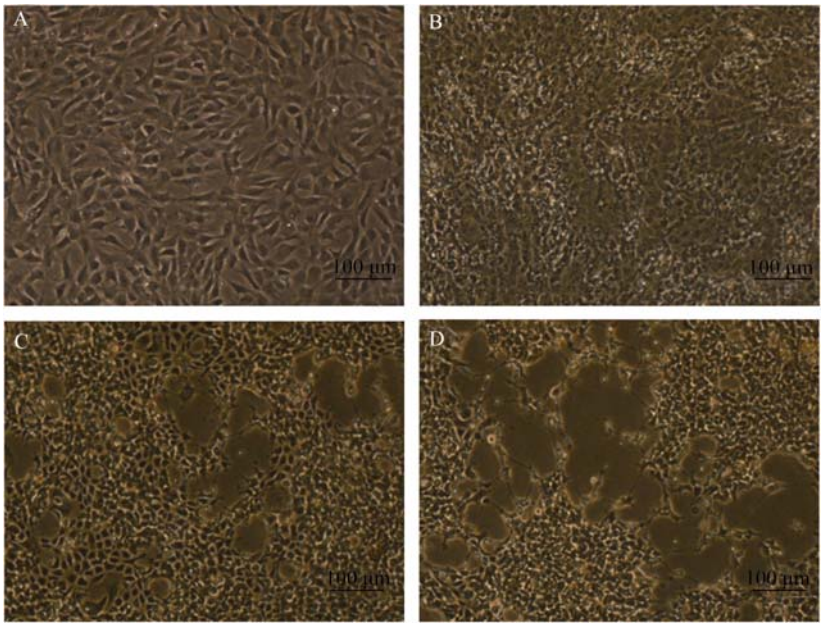

图 3 患病异育银鲫组织浆过滤液接种 Koi-Fin 细胞单层引起的细胞病变效应

A: Koi-Fin 正常细胞单层; B: 接种病毒 5 d 的细胞单层; C: 接种病毒 10 d 的细胞单层; D: 接种病毒 12 d 的细胞单层. 标尺=100 μm.

Fig. 3 Cytopathic effect of Koi-Fin cell monolayer inoculated with diseased fish tissue homogenate filtrate.

A: normal Koi-Fin cell monolayer; B: cytopathic effect of Koi-Fin cells 5 days post-infection; C: cytopathic effect of Koi-Fin cells 10 days post-infection; D: cytopathic effect of Koi-Fin cells 12 days post-infection. Bar=100 μm.

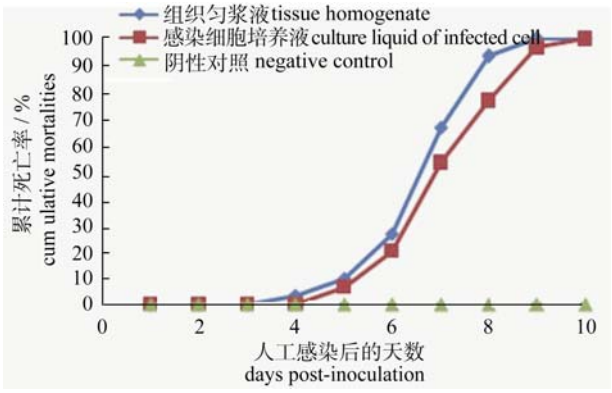

图 4 人工感染异育银鲫实验累计死亡率

Fig. 4 Cumulative mortalities of experimental infected fishes

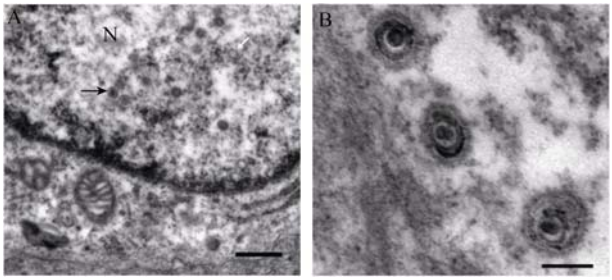

图 5 患病异育银鲫脾与肾组织超薄切片电镜观察

A: 脾脏细胞中的病毒粒子, 标尺=500 nm; B: 肾脏细胞中的病毒粒子, 标尺=200 nm.

Fig. 5 Transmission electron micrograph of spleen and kidneycells from a diseased gibel carp

A: virus particles in spleen cell, bar=500 nm; B: virus particles in kidney cell, bar=200 nm.

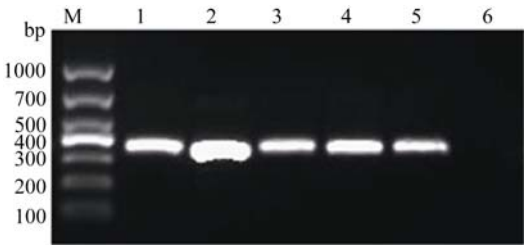

图 6 CyHV-2 的 Nested-PCR 检测

M: DL1000 DNA marker; 1~3: 病鱼组织样本; 4~5: 细胞培养物; 6: 阴性对照.

Fig. 6 Nested-PCR assayof CyHV-2 samples

M: DL1000 DNA marker; 1–3: diseased fish samples; 4–5: cell cultured virus; 6: negative control.

2.6 DNA 序列比对与分析

对上述 Nested-PCR 二次扩增的产物进行了测序, 测序结果显示基因片段为 357bp, 与预期长度一致。将该序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析发现, 其与 CyHV-2 其他毒株的相应基因序列高度同源(99%以上), 与鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)即锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV)也有较高的同源性(表 2)。

系统进化分析结果显示, CyHV-2 WH 株与 JS2012、H.Fukuda、YC110907 等 CyHV-2 病毒株聚为一支, 并且与 KHV TUMST1、KHV-U、KHV-I

等 CyHV-3 病毒株的亲缘关系较近, 而与 CyHV-1 的亲缘关系相对较远(图 8)。

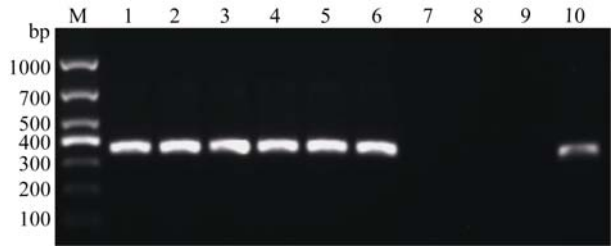

图 7　人工感染异育银鲫的 CyHV-2 巢式 PCR 检测结果

M: DL1000 DNA marker; 1~3: 注射组织浆过滤液的实验鱼; 4~6: 注射感染细胞培养物的实验鱼; 7~9: 阴性对照; 10: 阳性病毒 DNA.

Fig. 7　CyHV-2 Nested-PCR assay of fish samples in artificial infection experiment

M: DL1000 DNA Marker; 1–3: fishes challenged with tissue homogenate filtrate; 4–6: fishes challenged with cell cultured virus; 7–9: fishes from mock-infection group; 10: positive DNA.

3　讨论

CyHV-2 是引起金鱼大量死亡的金鱼造血器官坏死症的病原, 在 2011 年以前所有的研究资料显示该病毒只感染金鱼, 直到 2011 年有文献报道在匈牙利养殖的银鲫中检测到 CyHV-2[9], 以及随后多个 CyHV-2 感染异育银鲫的病例表明, 异育银鲫是 CyHV-2 的另一个天然宿主。金鱼和异育银鲫同属鲫(*Carassius auratus*)种, 其对病毒的易感性应该相同, 本研究结果也证实了这一点。鲫鱼是中国主要的淡水养殖鱼类之一, 特别是异育银鲫, 因其肉质鲜美、生长快、产量高等优点, 已在中国被广泛养殖, 在中国淡水养殖中占有举足轻重的地位。由 CyHV-2 感染引起的鲫鱼疱疹病毒病是目前发现的唯一感染异育银鲫的病毒性疾病, 由于其死亡率极高, 危害巨大, 传染性强, 目前又缺少有效的防治措施, 因此该病已成为我国鲫鱼养殖的主要威胁。

表 2　**CyHV-2 WH 株 DNA 解旋酶基因部分序列与其他鲤疱疹病毒的同源性比较**

Tab. 2　Comparison of CyHV-2 WH strain and other Cyprinid herpesviruses on the DNA helicase gene partial sequence identity

病毒名称 virus	分离株 strain	登录号 accession	同源性/% identity
CyHV-2	JS2012	KC245087.1	100
	ST-J1	JQ815364.1	99.44
	H．Fukuda	EU349287.1	99.44
	YC110907	JQ067603.1	99.71
CyHV-3	TUMST1	AP008984.1	81.55
	KHV-U	DQ657948.1	81.55
	KHV-I	DQ177346.1	81.55
CyHV-1	NG-J1	JQ815363.1	76.95

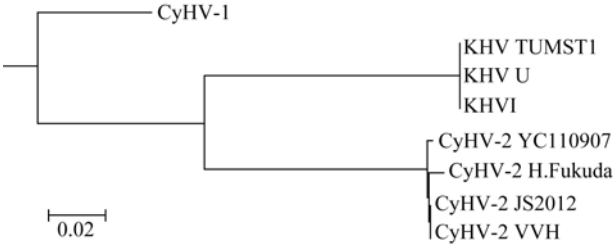

图 8　基于 CyHV-2 DNA 解旋酶基因部分序列同源性的系统进化分析

Fig. 8　Phylogenetic analysis of CyHV-2 WHstrain with other *Cyprinivirus*strains based on helicase gene partial sequence homologues.

从本病例中分离到的 CyHV-2 WH 株, 其病毒颗粒大小、形状等形态学特征与之前报道的 CyHV-2 分离株[12]一致。对其 DNA 解旋酶基因部分序列测序与同源性分析发现, 其与所有 CyHV-2 分离株同源性达 99.44%以上, 表明该基因在遗传上比较保守, 因此, 本研究针对该基因建立的巢式 PCR 检测方法, 可应用于该病毒的分子检测中。

在本研究中, 养殖设施为一循环水养殖系统, 养殖环境独立, 养殖用水为曝气并经过紫外线消毒的自来水, 水质指标都正常。这批鱼于 2011 年冬天购进, 在循环水系统中养到次年 8 月份才发病, 期间投喂商品配合饲料, 鱼活动正常。由于此养殖池只单养异育银鲫, 无其他传染源, 因此综合分析, 该病毒来源只可能来自鱼体自身。我们推测, 在养殖过程中, CyHV-2 曾经感染过这批异育银鲫, 并在鱼体内形成潜伏感染, 这些潜伏感染的病毒在温度不

适宜时长期潜伏于鱼体内, 当养殖水温升高到 22℃, 或其他因素导致机体抵抗力下降时, 潜伏感染被激活, 导致宿主开始发病并造成疾病传播, 引起鱼群大量死亡。

潜伏感染是疱疹病毒的主要特征之一[16], 如感染动物的猪伪狂犬病毒(Pseudorrabies virus, PRV)[17]、牛疱疹病毒-1(Bovine herpesvirus-1, BHV-1)[18]以及感染人的人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)[19]、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)[20]等。包括 KHV[21]以及斑点叉尾鮰病毒(Channel catfish virus, CCV)[22]等鱼类疱疹病毒也被证实能长期潜伏感染于鱼体内而不表现任何症状。这种携带病毒的潜伏感染鱼外表正常, 与无病毒携带的健康鱼无任何差异, 很难被识别区分, 因此给疾病的彻底消除带来了极大的困难, 也造成了疾病的广泛传播。目前针对鱼类疱疹病毒潜伏感染的研究不多, 更未见 CyHV-2 潜伏感染的相关研究, 因此需要针对 CyHV-2 的潜伏感染开展深入研究, 以揭示其潜伏感染建立、维持以及激活机制, 为该病的防控技术研究提供科学依据。

参考文献:

[1] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus*(L.)[J]. J Fish Dis, 1995, 18(3): 211–220.

[2] Groff J M, LaPatra S E, Munn R J, et al. A viral epizootic in cultured populations of juvenile goldfish due to a putative herpesvirus etiology [J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10(4): 375–378.

[3] Davison A J, Eberle R, Ehlers B, et al. The order *Herpesvirales* [J]. Arch Virol, 2009, 154(1): 171–177.

[4] Hanson L, Dishon A, Kotler M. Herpesviruses that infect fish [J]. Viruses, 2011, 3(11): 2160–2191.

[5] Goodwin A E, Khoo L, LaPatra S E, et al. Goldfish Hematopoietic Necrosis Herpesvirus (Cyprinid Herpesvirus 2)in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish [J]. J Aquatic Anim Health, 2006, 18(1): 11–18.

[6] Chang P H, Lee S H, Chang H C, et al. Epizootic of Herpes-like Virus Infection in Goldfish, *Carassius auratus*, in Taiwan [J]. Fish Pathol, 1999, 34(4): 209–210.

[7] Stephens F J, Raidal S R, Jones B. Haematopoietic necrosis in a goldfish(*Carassius auratus*)associated with an agent morphologically similar to herpesvirus [J]. Aust Vet J, 2004, 82(3): 167–169.

[8] Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus*(L.), in the UK [J]. J Fish Dis, 2007, 30(11): 649–656.

[9] Doszpoly A, Benko M, Csaba G, et al. Introduction of the family Alloherpesviridae: the first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary [J]. Magy Allatorvosok, 2011, 133(3): 174–181.

[10] Danek T, Kalous T, Vesely T, et al. Massive mortality of Prussian carp *Carassiusgibelio* in the upper Elbe basin associated with herpesviral hematopoietic necrosis(CyHV-2)[J]. Dis Aquat Organ, 2012, 102(2): 87–95.

[11] Fichi G, Cardeti G, Cocumelli C, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with an *Aeromonas sobria* infection of *Carassiuscarassius*(L.), in Italy [J]. J Fish Dis, 2013, 36(10): 823–830.

[12] Wang L, He J, Liang L, et al. Mass mortality caused by Cyprinid Herpesvirus 2(CyHV-2)in Prussian carp (*Carassius gibelio*)in China [J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 2013, 32(5): 164–173.

[13] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(1): 92–96.

[14] 肖艺, 曾令兵, 徐进, 等. 锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(8): 767–774.

[15] Kellenberger E, Ryter A, Sechaud J. Electron microscope study of DNA-containing plasma. II: Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states [J]. J Biophys Biochem Cytol, 1958(4): 671–676.

[16] 李祥敏, 金梅林, 陈焕春. 疱疹病毒潜伏感染与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, 22(4): 32–35.

[17] 刘俊磊. 伪狂犬病毒基因组在潜伏感染中的时空表达[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.

[18] Hossain A, Schang L, Jones C, et al. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus-1 [J]. J Virol, 1999, 69: 5345–5352.

[19] 陈贵海, 周江宁, 王明丽. 人巨细胞病毒潜伏感染机制研究新进展[J]. 病毒学报, 2004, 20(4): 382–384.

[20] Richard J W, David W K, Bernard R. Herpes simplex virus [J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(3): 541–555.

[21] Kathleen E E, Tim M M, Jerry R H, et al. Investigation of koi herpesvirus latency in koi [J]. J Virol, 2011, 85(10): 4954–4962.

[22] Gray W L, Williams R J, Jordan R L, et al. Detection of channel catfish virus DNA in latently infected catfish [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1817–1822.

Isolation and characterization of Cyprinid herpesvirus 2 WH strain

XU Jin, ZENG Lingbing, YANG Deguo, ZHANG Hui, MA Jie, JIANG Nan, FAN Yuding

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: By using cell culture and virus infection methods, a virus had been isolated from gibel carp (*Carassiusauratus gibelio*) suffering with severe hemorrhage, which were cultured in a circulation aquaculture system in Wuhan,and then identified as Cyprinid herpesvirus 2(CyHV-2), designated as CyHV-2 WH strain, by electron microscopy observation, nested-PCR and viral DNA sequencing and sequence alignment analysis. The tissue homogenate of diseased fish could cause typical cytopathic effect in Koi-Fin cells. In artificial infection test, the typical symptoms of hemorrhage could be reproduced as naturally infected fish by infecting both tissue homogenate and cell cultured virus, and the death rate reached 100%. Electron microscopy observation of ultra-thin section samples of spleen and kidney tissues revealed that the viral nucleocapsid was spherical in shape measuring 110–120 nm in diameter with a 170–200 nm envelope. The virions replicated and assembled in nucleus. A 357 bp DNA fragment obtained by the nested-PCR assay of both tissue homogenate and cell culture. Sequence alignment analysis of the DNA fragment showed that WH shared so high identity (>99.44%) with the published DNA helicase gene sequence of CyHV-2 stains in GenBank, meanwhile, it shared 81.55% identity with CyHV-3 stains. Phylogenetic analysis showed that WH strain formed an independent branch on the phylogenetic tree with other CyHV-2 strains such as JS2012, H.Fukuda and YC110907.

Key words: Cyprinid herpesvirus 2(CyHV-2); gibel carp; virus isolation; virus identification; latency

Corresponding author: ZENG Lingbing. E-mail: zlb@yfi.ac.cn