

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16321

黑龙江地区鲤春病毒血症病毒的分离与基因型分析

纪锋^{1,2}, 赵景壮¹, 刘淼¹, 贺文斌^{1,2}, 尹家胜¹, 卢彤岩¹, 任广明¹, 徐黎明¹

1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 对 2015—2016 年黑龙江不同地区的 40 个养殖场送检的鲤(*Cyprinus carpio*)进行鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)的细胞培养分离、PCR 鉴定、病毒滴度测定、病毒表面糖蛋白(glycoprotein, G)氨基酸序列聚类分析及基因分型研究。细胞培养结果显示, 来自 4 个不同养殖场的鲤组织样本能够感染鲤上皮细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC)产生典型细胞病变(cytopathic effect, CPE), 收集病毒悬液分别称为 Shlj1~Shlj4。PCR 鉴定结果表明, 该 4 株病毒均为 SVCV。病毒滴度实验测算出 SVCV Shlj 1~Shlj 4 的滴度分别为 $10^{6.28}$ 、 $10^{6.88}$ 、 $10^{7.57}$ 和 $10^{6.38}$ TCID₅₀/mL。Shlj 的糖蛋白基因核苷酸序列的聚类分析和遗传进化分析结果显示, Shlj 1~Shlj 4 与 GenBank 收录的中国参考株 A2、BJ0505-2 和美国参考株 USA、212364 聚为一簇, 同源性为 98.4%~99.8%; Shlj 1~Shlj 4 毒株之间的糖蛋白核苷酸序列相似性在 98.6%~99.8%, 其中 Shlj 3 与美国 SCVC 毒株 USA、212364 具有最高的核苷酸相似性(99.8%), Shlj 2 与英国参考毒株 880163 具有最低的相似性(88.0%)。糖蛋白氨基酸序列比对结果显示, Shlj 4 中氨基酸突变最多, 与另 3 个毒株差异较大。基因型分析结果显示, Shlj 1~Shlj 4 均为基因 Ia 型。本研究结果表明, 黑龙江地区 2015—2016 年间的 SVCV 检出率约为 10%, 并且来源于不同养殖场的病毒分离株的核酸序列呈现不同程度的差异, 该结果进一步证明 SVCV 毒株在中国不同的鲤养殖环境中正在不断地进化。

关键词: 鲤春病毒血症病毒; 糖蛋白; 进化分析; 基因型

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1141-08

鲤春病毒血症(spring viremia of carp, SVC)是鲤科鱼类的一种具有高度传染性的急性流行性疾病, 该病病原为鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV), 属水泡病毒属(*Vesiculovirus*), 是一种弹状病毒^[1]。该病毒最先由 Fijian^[2]于 20 世纪 70 年代分离出来, 它可以引起鲤(*Cyprinus carpio*)等鲤科鱼类大规模暴发 SVC, 具有高度的传染性, 感染 SVCV 的仔鱼死亡率最高可达 90%^[3]。据报道在自然条件下 SVCV 也会感染其他鲤科的鱼, 包括金鱼(*Carassius auratus*)、锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鲫(*Carassius carassius*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、丁鲷(*Tinca tinca*)

和圆腹雅罗鱼(*Leuciscus idus*)^[1, 4-5]。该病主要在欧洲的鲤养殖中广泛传播, 并造成了巨大的经济损失。中国自 2001 年开展全国范围的 SVCV 监测工作以来, 陆续出现了多篇关于 SVCV 分离鉴定的研究报道^[6-7]。

近年来, 国外很多学者致力于快速、高效的 SVCV 检测方法的研究^[8], 并逐渐开始对 SVCV 进行基因分型研究^[9-10]。目前中国广泛应用的检测方法有套式 RT-PCR、Real-time PCR、LAMP(loop-mediated isothermal amplification)等。目前利用糖蛋白基因序列可将世界范围内的 SVCV 基因型分为 Ia、Ib、Ic 和 Id。而前期结果研究表明中国 SVCV 分离株的基因型为 Ia^[11-12]。本研究对

收稿日期: 2016-10-27; 修订日期: 2016-12-01.

基金项目: 黑龙江省应用技术研究开发与计划项目(GA13B401).

作者简介: 纪锋(1990-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类病毒学研究. E-mail: fengjii@foxmail.com

通信作者: 徐黎明, 副研究员, 从事鱼类病毒学研究. E-mail: lmxu0917@163.com

2015—2016 年中国黑龙江地区送检的鲤进行常规的 SVCV 病原监测与分离,并且对分离到的新病原进行了病毒滴度的测定、遗传进化分析及其基因型分类等研究,旨在明确该地区 SVCV 与其他地区毒株之间的进化关系,掌握 SVCV 分离株的遗传背景及分布区域,为我国 SVC 的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

一步法基因扩增试剂盒和 DNA 聚合酶 rTaq premix(大连宝生物公司);鲤上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC)由中国水产科学研究院长江水产研究所鱼类病害教研室曾令兵教授惠赠;MEM(minimum essential medium)细胞培养基、胰酶购自 Hyclone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco;RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation system 为 Promega 生物公司产品;DNA Marker 及 PCR 纯化试剂盒为 TaKaRa Bio Inc. 产品。用于 SVCV 检测的引物参照国标^[13]设计并由哈尔滨博莱仕合生物公司合成,引物序列 R2: 5'-AGATGGTATGGACCCCAATACAT-HACNCAAY-3', R4: 5'-CTGGGGTTTCCNCCTCAAAGYTG-3', F1: 5'-TCTTGAGCCAAATAGCTCARRTC-3';用于 SVCV G 蛋白基因序列克隆的引物: Gf: 5'-GAAAAAACTAACAGACATCATGTCTAT-3', Gr: 5'-CTCAAACGAAGGACCGCATTCGTG-3'。

1.2 病毒的细胞培养

取病鱼肝、脾、肾等组织加磷酸盐缓冲液研磨,离心除去沉淀,将所得到的组织悬液用 0.22 μm 滤器过滤后置于-80℃冰箱保存。吸除细胞培养板中培养液,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 EPC 细胞单层 2~3 次。利用细胞维持液(含有 2%胎牛血清的 MEM 培养液)将组织滤液稀释 100 倍后接种于 EPC 致密单层细胞,在 20℃低温二氧化碳细胞培养箱中孵育 1.5 h,吸去孵育液,加入新的细胞培养液(含有 10%胎牛血清的 MEM 培养液)继续培养。每日定时观察记录细胞的病变情况并拍照。约 80%的细胞出现细胞病变后无菌收集病毒悬液,

分装保存于-80℃冰箱中。

1.3 SVCV 分离株的 PCR 鉴定

取 1.2 中出现细胞病变的病毒悬液,利用 SV Total RNA Isolation system 试剂盒提取病毒总 RNA。以提取的 RNA 为模板,进行一步法 RT-PCR 扩增^[14], F1/R2 为引物扩增 G 蛋白基因中的 714 bp 片段,引物 F1/R4 再从该片段中扩增 606 bp 的片段,同时设无病变的 EPC 细胞提取的 RNA 为阴性对照组。

1.4 病毒滴度的测定

将 EPC 接种到 96 孔细胞培养板上长成单层细胞后,每孔分别接种 10 倍梯度稀释的病毒悬液 100 μL ,共设 11 个梯度,每个浓度梯度接种 8 个孔,将只加培养液的细胞孔设为阴性对照孔,置于 20℃低温二氧化碳细胞培养箱中恒温培养,连续观察 10 d,记录出现及未出现 CPE 的孔数,用 Reed-Muench 公式^[15]计算病毒的滴度 TCID₅₀。

1.5 G 蛋白的序列分析

以提取的 RNA 为模板, Gf/Gr 为引物扩增 G 蛋白基因序列,胶回收后送上海生工生物公司进行测序。利用 BLAST 检索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)其他 SVCV 分离株的糖蛋白核苷酸序列(表 1),利用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离结果

对送检的 40 家养殖场的鲤进行 SVCV 检测,其中 4 家检测出并各分离出 1 株 SVC 病毒,检出率为 10%。在倒置显微镜下观察 4 株 SVCV 在 EPC 上的增殖结果: 20℃ CO₂ 培养箱中培养 96 h 后细胞收缩变圆,单层破坏,细胞大面积脱落,培养液变浑浊(图 1)。

2.2 PCR 鉴定

以病变后的细胞培养物提取的 RNA 为模板, F1/R2 为引物进行 RT-PCR 一步法基因扩增,并以 RT-PCR 产物为模板、F1/R4 为引物进行“半套式”PCR 扩增。凝胶电泳结果显示,在 750 bp 和 500 bp 之间出现与目的条带大小一致的特异性条带,分别为 714 bp 和 606 bp(图 2)。

表 1 本研究所用的鲤春病毒血症病毒株
Tab. 1 Spring viremia of carp virus strains used in this study

毒株 isolate	序列号 accession no.	宿主 host	国家或地区 country or area	基因型 genotype
Shlj 1	KX911973	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	黑龙江 Heilongjiang	—
Shlj 2	KX911974	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	黑龙江 Heilongjiang	—
Shlj 3	KX911975	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	黑龙江 Heilongjiang	—
Shlj 4	KX911976	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	黑龙江 Heilongjiang	—
M2-78	AJ538063.1	鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	摩尔多瓦 Moldova	Id3
880163	EU003618.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	英国 United Kingdom	Id3
970395	AJ538076.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	英国 United Kingdom	Id1
940626	EU003617.1	丁鲷 <i>Tinca tinca</i>	英国 United Kingdom	Id2
2/90	AJ538060.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	摩尔多瓦 Moldova	Ib
RHV	AJ538075.1	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	乌克兰 Ukraine	Ib
P4	AJ538074.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	美国 USA	Ic
N1-5	AJ538064.1	鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	乌克兰 Ukraine	Ic
Fijan	EF593133.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	南斯拉夫 Yugoslavia	Ic
978	AY842488.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	上海 Shanghai	Ia
BJ0505-2	EU177782.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	北京 Beijing	Ia
A2	DQ491000.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	武汉 Wuhan	Ia
USA	AY527273.1	锦鲤 <i>Cyprinus carpio koi</i>	美国北卡罗来纳州 USA: North Carolina	Ia
212364	DQ227501.1	锦鲤 <i>Cyprinus carpio koi</i>	美国北卡罗来纳州 USA: North Carolina	Ia
P4-9	EF593137.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	美国 USA	Ic
SVCV5	EF593149.1	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	美国 USA	Id

注: 表中 “—” 表示无基因型信息。
Note: “—” denotes no genotype.

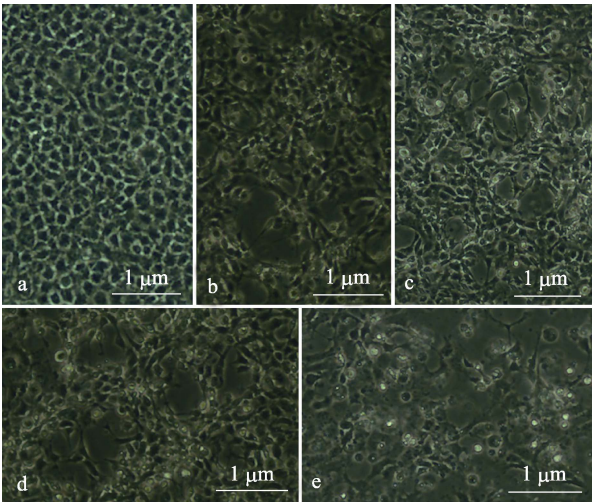


图 1 病毒悬液致细胞病变的显微图片(20×)
a. 对照 EPC; b~e. 分别是接种 Shlj 1~Shlj 4 病毒株的 EPC 细胞。
Fig. 1 Micrograph of EPC with pathological changes caused by virus suspension (20×)
a. Negative control; b~e. EPC cells inoculated with SVCV strain Shlj 1~Shlj 4.

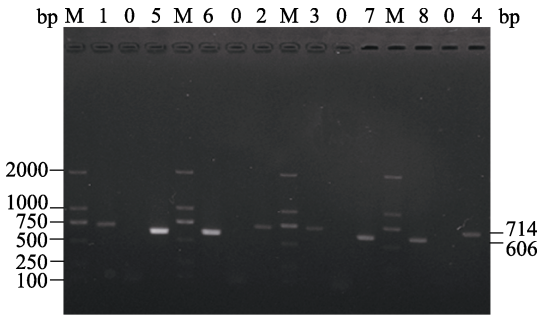


图 2 鲤春病毒血症病毒的半套式 PCR 鉴定
1~4: 一步法 RT-PCR 检测; 5~8: “半套式”PCR 检测; 0: 阴性对照; M: DL2000 DNA marker.
Fig. 2 Semi-nest PCR identification of spring viremia of carp virus
1~4: one step RT-PCR product; 5~8: nested PCR product; 0: negative control; M: DL2000 DNA marker.

2.3 病毒滴度的测定

根据病毒在已长成致密单层的 EPC 细胞的 96 孔细胞培养板中产生病变的记录, 按照 Reed-

Muench 公式, 测算出 SVCV Shlj 1~Shlj 4 病毒的滴度分别为 $10^{6.28}$ 、 $10^{6.88}$ 、 $10^{7.57}$ 和 $10^{6.38}$ TCID₅₀/mL。

2.4 G 蛋白的核酸序列比对分析

采用 Neighbor-joining 法, 步长为 1000, bootstrap 值>60%, 对本研究所分离的 4 株 SVCV 和其他国家的 SVCV 毒株的糖蛋白基因核苷酸序列, 构建系统进化树(图 3)。利用 MegAlign 软件进行基于糖蛋白基因核苷酸序列的遗传距离分析结果见表 2。进化分析结果显示, Shlj1~Shlj4 与中国参考株 A2、BJ0505-2、978 和美国参考株 USA、212364 聚为一簇, 核苷酸相似性为 98.4%~99.8%, Shlj1~Shlj3 之间具有更高的相似性(99.5%~99.8%), 与 Shlj4 的相似性相对较低(98.6%~98.9%), 与其他

毒株糖蛋白核酸序列相似性分别为 88.3%~99.3%, 88.0%~99.2%和 98.3%~99.5%。Shlj1~Shlj4 毒株中 Shlj3 与美国参考毒株 USA 和 212364 具有最高的氨基酸相似性(99.8%); Shlj2 与英国参考毒株 880163 具有最低的相似性(88.0%)。目前根据 Basic 等^[9], Miller 等^[16], Sheppard 等^[17]对 SVCV 基因分型的研究可将 SVCV 分为 Ia, Ib, Ic, Id 4 个基因型。通过糖蛋白的核酸序列系统发育分析显示, 本研究的 Shlj 1~Shlj 4 毒株与 SVCV 北京参考株 BJ0505-2、上海参考株 978 和武汉参考株 A2 均属于 Ia 基因型(图 3)。该结果表明, 中国不同来源地的 SVCV 毒株虽然具有基因差异性, 但是仍然具有相同的基因型。

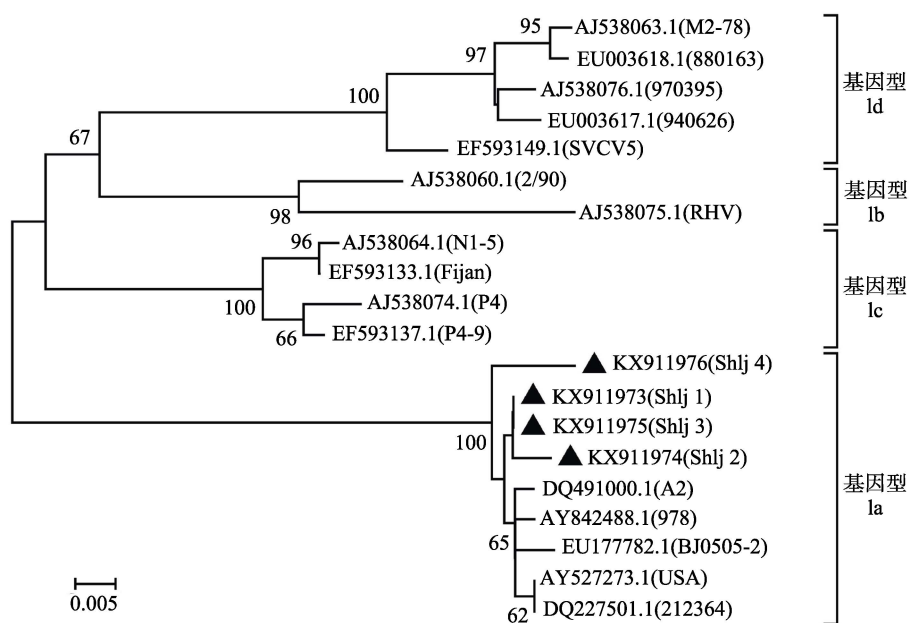


图 3 基于鲤春病毒血症病毒糖蛋白基因序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the glycoprotein gene sequences of spring viremia of carp virus

2.5 Shlj 毒株糖蛋白氨基酸序列比对分析

分离到的 Shlj 4 个不同毒株糖蛋白氨基酸序列比对结果(图 4)显示, 每个毒株都相应地发生了氨基酸的改变, 改变的氨基酸多集中在序列的中后区域。其中 Shlj 4 中氨基酸突变最多, 有 8 个氨基酸与另 3 个毒株糖蛋白序列相应位置氨基酸不同, 这也预示着 Shlj 4 的致病性、进化方向等特性与其他三株可能存在较大差异, 该结果与病毒滴度测定以及系统进化树分析结果均相符。

3 讨论

1971 年在南斯拉夫首次发现 SVCV^[18], 随后在美洲^[16, 19]和亚洲^[20]也分离到 SVCV。从 2015—2016 年到 2016 年, 本课题组利用细胞培养的方法对黑龙江省多家鲤养殖场送来的鲤监测样品进行病原检测, 从 40 家养殖场超过 12000 尾鱼中共检出 4 个 SVCV 阳性样本。

SVCV 感染症状通常是非特异性的, 如突眼、腹胀和局部水肿。病鱼经常表现为身体发黑, 鳃

Shlj 1 MSIIISYIAFL LLIDSTLGIP IFVPSGQNIS WQPVIQPFDY QCPIHGSLPN TMGLSATKLT IKSPSVFSTD KVSGWICHAA EWKTTCDYRW
Shlj 2
Shlj 3
Shlj 4
Shlj 1 YGPQYITHSI HPISPTIDEC KRIISRIASG TDEDLGFPQP SCGWASVTV SNTNYKVVPV SVHLEPYGGH WIDHEFNNGE CREKVCCEMKG
Shlj 2
Shlj 3
Shlj 4
Shlj 1 NHSIWITDET VQHECEKHIE EVEGIMYGNA PRGDAIYINN FIIDKHHRVY RFGGSCRMKF CNKDGIFKTR GDWVEKTAGT LTNIYANIPE
Shlj 2S.....
Shlj 3
Shlj 4A..D.....
Shlj 1 CADGTLVSGH RPLDLIDTV FNLENVVEYT LCEGTRKIN NQELTSVDL SYLAPRVGGF GSVFRVRNGT LERGSTTYIK IEVEGPIVDS
Shlj 2A.....I.....
Shlj 3I.....
Shlj 4I.....G.....
Shlj 1 LNGTDPRTNA SRVFWDDWEL DGNVYQGFNG VYKGDGKIHL IPLNMIESGI IDDELQHAFQ ADIIPHPHYD DDEIREDDIF FDNTGGENPN
Shlj 2
Shlj 3
Shlj 4 .S.....E.....
Shlj 1 VDAVVEWVSG WGTSLKFFGT TLVALILIFL LIRCCVACTY LMKKSKRPAT ESHMERSFV*
Shlj 2
Shlj 3
Shlj 4M.....A.....

图 4 鲤春病毒血症病毒 Shlj 系列分离株糖蛋白氨基酸序列比较
Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of glycoprotein of spring viremia of carp virus Shlj strains

表 2 基于鲤春病毒血症病毒糖蛋白基因核苷酸序列的遗传距离分析
Tab. 2 Genetic distance analysis based on glycoprotein gene nucleotide sequences of spring viremia of carp virus %

毒株 strain	Shlj 1	Shlj 2	Shlj 3	Shlj 4	M2-78	880163	970395	940626	2/90	RHV	P4	N1-5	Fijan	978	BJ0505-2	A2	USA	212364	P4-9	SVCV5
Shlj 1	***	99.5	99.8	98.7	89.5	88.3	88.9	88.7	90.7	88.9	90.5	90.4	90.9	99.2	99.3	99.3	99.6	99.6	91.2	92.3
Shlj 2	0.5	***	99.7	98.6	89.3	88.0	88.7	88.5	90.5	88.7	90.4	90.2	90.9	99.2	99.2	99.2	99.5	99.5	91.3	92.4
Shlj 3	0.2	0.3	***	98.9	89.6	88.3	89.1	88.7	90.9	89.1	90.7	90.5	91.1	99.4	99.5	99.5	99.8	99.8	91.4	92.5
Shlj 4	1.3	1.4	1.1	***	89.3	88.3	88.7	88.3	89.8	88.4	90.5	90.0	90.4	98.4	98.6	98.7	98.8	98.8	90.8	92.0
M2-78	11.6	11.9	11.4	11.8	***	99.3	98.0	98.4	92.4	91.5	92.2	92.0	92.4	89.3	89.1	89.3	89.3	89.3	92.0	97.5
880163	12.9	13.2	12.9	12.8	0.5	***	97.4	98.1	90.1	89.4	90.8	90.1	90.6	87.8	87.6	87.8	87.8	87.8	90.1	96.7
970395	11.5	11.7	11.3	11.7	1.3	1.4	***	97.9	91.8	90.9	91.5	91.3	91.6	88.7	88.5	88.7	88.7	88.7	91.3	97.3
940626	12.5	12.8	12.5	13.1	1.7	1.7	1.2	***	91.1	89.9	90.4	90.1	90.6	88.3	88.0	88.3	88.3	88.3	90.1	97.2
2/90	10.1	10.3	9.8	11.1	8.2	10.6	8.0	9.7	***	95.8	93.1	92.9	93.3	90.5	90.4	90.5	90.5	90.5	93.6	93.5
RHV	12.3	12.5	12.0	12.9	9.2	11.4	9.1	11.1	4.3	***	91.8	91.6	92.0	88.7	88.5	88.7	88.7	88.7	92.0	92.9
P4	10.3	10.5	10.1	10.3	8.4	9.7	8.5	10.5	7.3	8.8	***	98.7	99.8	90.5	90.4	90.5	90.5	90.5	98.4	92.9
N1-5	10.5	10.7	10.3	10.9	8.6	10.5	8.7	10.8	7.5	9.0	1.3	***	98.9	90.4	90.2	90.4	90.4	90.4	99.3	92.7
Fijan	10.0	9.9	9.7	10.5	8.2	10.0	8.2	10.2	7.1	8.6	0.2	1.1	***	91.2	90.7	90.2	90.5	90.5	98.7	92.1
978	0.8	0.9	0.6	1.6	11.9	13.5	11.7	13.1	10.3	12.5	10.3	10.5	9.5	***	99.3	99.0	99.3	99.3	91.6	92.6
BJ0505-2	0.7	0.8	0.5	1.4	12.1	13.8	12.0	13.4	10.5	12.7	10.5	10.7	10.1	0.7	***	99.2	99.4	99.4	91.0	92.1
A2	0.7	0.8	0.5	1.3	11.8	13.4	11.7	13.1	10.3	12.5	10.3	10.5	10.7	1.0	0.8	***	99.4	99.4	90.5	90.4
USA	0.4	0.5	0.2	1.2	11.9	13.5	11.7	13.1	10.3	12.5	10.3	10.5	10.4	0.7	0.6	0.6	***	99.9	90.9	90.9
212364	0.4	0.5	0.2	1.2	11.9	13.5	11.7	13.1	10.3	12.5	10.3	10.5	10.4	0.7	0.6	0.6	0.0	***	90.9	90.9
P4-9	9.5	9.5	9.2	10.0	8.6	10.5	8.7	10.8	6.7	8.5	1.7	0.7	1.3	9.1	9.7	10.4	9.9	9.9	***	92.3
SVCV5	8.3	8.2	8	8.6	2.6	3.1	2.1	2.9	7	7.6	7.6	7.8	8.5	7.9	8.5	10.3	9.8	9.8	8.2	***

注: 对角线以上为相似性百分比, 对角线以下为散度百分比。
Note: Figures above the diagonal show percentage similarity; figures below the diagonal show divergence percentage.

苍白,皮肤、腮、眼睛出血。解剖病鱼会发现内部器官,尤其是鱼鳃上出血严重^[21]。病毒的分离结果显示,接种组织悬液后的敏感细胞 EPC 开始收缩变圆,出现葡萄串状的细胞病变;随后细胞大面积脱落,培养液变浑浊;最后细胞单层几乎被完全破坏,呈网状。病毒滴度测定结果显示,研究中分离到的 4 株病毒毒力存在一定差异,这也与相关文献报道的某一氨基酸改变会引起多肽链空间折叠结构的变化,甚至会改变病毒的毒力^[22-23]的结论一致。SVCV 基因组为连续的线性单股负链 RNA,长 11019 个核苷酸,主要由 5 个基因组成,分别编码核蛋白 N(nucleoprotein)、磷蛋白 P(phosphoprotein)、基质蛋白 M(matrix)、糖蛋白 G(glycoprotein)和 RNA 聚合酶 L(RNA-dependent RNA polymerase)。其中,糖蛋白包含 509 个氨基酸,具有信号肽序列及跨膜结构域,是典型的跨膜糖蛋白^[1, 8, 24],在病毒检测、核酸疫苗开发上具有广阔的应用前景。由于糖蛋白是 SVCV 的主要抗原蛋白,决定了 SVCV 的血清学特征,因此对其基因结构和免疫原性开展研究,可为 SVCV 的免疫学诊断技术研究以及基因工程疫苗研制奠定基础^[25]。中国学者早在 2002 年便开始通过 ELISA 和 Real-Time PCR 检测糖蛋白来识别和分离 SVCV^[11]。2013 年, Xiao 等^[12]利用磷蛋白 P 对上海地区 SVCV 进行了基因分型,结果表明该毒株基因型为 Ia。本研究利用糖蛋白核酸序列对 SVCV Shlj 进行聚类分析,从数据可以推断出, Shlj 1~Shlj 4 与中国参考株 A2、978 和美国参考株 USA、212364 是由同一分支进化而来的,均属于 Ia 基因型。而美国参考株进化分枝节点在中国参考株之后,很有可能是由中国毒株进化而来,该结果与目前有关美国 SVCV 由亚洲传入的结论一致^[16, 26]。本研究利用 SVCV 糖蛋白基因对其进行基因分型,系统发育分析显示, SVCV 分为 4 个不同基因型 (Ia、Ib、Ic、Id),并且 SVCV 中国参考株 BJ0505-2、A2、978 以及本研究分离到的 Shlj 1~Shlj 4 和部分美国参考株都属于 Ia 基因型,该结果与磷蛋白基因分析结果一致。鉴于糖蛋白在该病毒中起主要免疫原作用,本研究结果对 SVCV 的深入研究具有一定的指导意义。

综上所述,本研究开展了黑龙江地区 SVCV 毒株的细胞培养分离,PCR 鉴定,病毒滴度测定,病毒表面糖蛋白氨基酸序列聚类分析及基因分型研究。结果证实 SVCV 存在于黑龙江地区鲤养殖场中,具有较高的检出率(10%),是黑龙江地区暴发的鲤疾病病原之一,并且这些来自不同养殖场的 SVCV 分离株具有不同核酸序列及氨基酸序列。SVCV Shlj 1~Shlj 4 毒株的生物特性及遗传进化分析为该地区 SVC 疫病的监测及防控提供了重要参考。

参考文献:

- [1] Ahne W, Bjorklund H V, Essbauer S, et al. Spring viremia of carp (SVC)[J]. Dis Aquat Organ, 2002, 52(3): 261-272.
- [2] Fijan N. Spring viraemia of carp and other viral diseases and agents of warm-water fish: fish diseases and disorders[C]// Fish Diseases and Disorders. Oxon: CAB International, 1999, (3): 177-244.
- [3] Baudouy A M, Danton M, Merle G. SVCV infection of Carp[J]. Ann Rech Vet, 1980, 11(3): 245-249.
- [4] Fijan N. Vaccination of fish in European pond culture: Prospects and constraints[J]. Symposia Biologica Hungarica, 1984, 23: 233-241.
- [5] Shchelkunov I S, Shchelkunova T I. Rhabdovirus Carpio in Herpivorous Fishes: Isolation, Pathology, and Comparative Susceptibility of Fishes: Viruses of Lower Vertebrates[M]. Berlin: Springer, 1989: 333-348.
- [6] Liu H, Fu F, Huang J, et al. Amino acid sequence of a Chinese isolate of spring viraemia virus of carp and preliminary analysis of the glycoprotein gene[J]. Virologica Sinica, 2005, 20(6): 647-651. [刘荭, 付峰, 黄健, 等. 鲤春血症病毒中国分离株糖蛋白基因和氨基酸序列的初步解析[J]. 中国病毒学, 2005, 20(6): 647-651.]
- [7] Liu H, Gao L, Shi X, et al. Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured Koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio carpio*) in P R China[J]. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 2004, 24(4): 194-202.
- [8] Zhang J, Li Q, Ye S G, et al. Prokaryotic expression of glycoprotein and preparation of monoclonal antibody in spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 454-458. [张家林, 李强, 叶仕根, 等. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(5): 454-458.]
- [9] Basic A, Schachner O, Bilic I, et al. Phylogenetic analysis of

- spring viraemia of carp virus isolates from Austria indicates the existence of at least two subgroups within genogroup Id[J]. *Dis Aquat Organ*, 2009, 85(1): 31–40.
- [10] Stone D M, Ahne W, Denham K L, et al. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups[J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(3): 203–210.
- [11] Zhang N Z, Zhang L F, Jiang Y N, et al. Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in china: a fatal aquatic viral disease that might spread in east asian[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6337.
- [12] Xiao Y, Ling S, Zhang C, et al. Genomic evidence of homologous recombination in spring viremia of carp virus: A negatively single stranded RNA virus[J]. *Virus Res*, 2014, 189: 271–279.
- [13] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 15805.5-2008, Quarantine Methods of Fish-Part 5: Spring Viraemia of Carp Virus (SVCV)[S]. Beijing: Standards Press of China, 1995. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 15805.5-2008, 鱼类检疫方法-第5部分: 鲤春病毒血症病毒(SVCV)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.]
- [14] Koutna M, Vesely T, Psikal I, et al. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR[J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 55(3): 229–235.
- [15] Yin Z, Liu J H. *Animal Virology*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997. [殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997.]
- [16] Miller O, Fuller F J, Gebreyes W A, et al. Phylogenetic analysis of spring viremia of carp virus reveals distinct subgroups with common origins for recent isolates in North America and the UK[J]. *Dis Aquat Organ*, 2007, 76(3): 193–204.
- [17] Sheppard A M, Le D R, Martin P D, et al. Genotyping spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation[J]. *Dis Aquat Organ*, 2007, 76(2): 163–168.
- [18] Fijan N N, Mawdesleythomas L E. Infectious dropsy in carp-a disease complex[J]. *Dis Fish*, 1972: 39–51.
- [19] Warg J V, Dikkeboom A L, Goodwin A E, et al. Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States[J]. *Virus Genes*, 2007, 35(1): 87–95.
- [20] Teng Y, Liu H, Lv J Q, et al. Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China[J]. *Arch Virol*, 2007, 152(8): 1457–1465.
- [21] Sanders G E, Batts W N, Winton J R. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus[J]. *Comp Med*, 2003, 53(5): 514–521.
- [22] Tang Y H, Wu P P, Sun Q, et al. Role of amino acid residues at positions 322 and 329 of hemagglutinin in virulence of H₅N₁ avian influenza virus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24(5): 340–344. [唐应华, 吴培培, 孙庆, 等. HA 基因 322 位和 329 位氨基酸对 H₅N₁ 亚型禽流感病毒毒力的影响[J]. 病毒学报, 2008, 24(5): 340–344.]
- [23] Shen Y Z, Zheng X Y. The influence of infectious bursal disease virus amino acid mutation on its virulence[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 22(5): 72–75. [沈咏舟, 郑新勇. 鸡传染性法氏囊病毒氨基酸变异对其毒力的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(5): 72–75.]
- [24] Zhang L, Ding Y L, Chen J M, et al. Subcloning, expression and purification of SVCV glycoprotein gene[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2011, 47(7): 10–12. [张琳, 丁雅苓, 陈建民, 等. 中国鲤春季病毒血症毒株糖蛋白基因的亚克隆表达与纯化[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(7): 10–12.]
- [25] Xu J, Zhou Y, Chen Q, et al. Expression and immunogenicity analysis of a truncated glycoprotein of spring viremia of carp virus (SVCV)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 352–358. [徐进, 周勇, 陈倩, 等. 鲤春病毒血症病毒糖蛋白的截短表达及其免疫原性分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(2): 352–358.]
- [26] Zhang N Z, Zhang L F, Jiang Y N, et al. Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: a fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6337.

Isolation and genotype analysis of spring viremia of carp virus strains from Heilongjiang Province in China

JI Feng^{1,2}, ZHAO Jingzhuang¹, LIU Miao¹, HE Wenbin^{1,2}, YIN Jiasheng¹, LU Tongyan¹, Ren Guangming¹, XU Liming¹

1. Heilongjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Spring viremia of carp virus (SVCV) was routinely isolated and identified from tissues of carp (*Cyprinus carpio*) from 40 carp farms in Heilongjiang Province by separation in cell culture and identification using polymerase chain reaction. SVCV isolates were subjected to virus titer determination, phylogenetic reconstruction based on their glycoprotein amino acid sequences and genotyping. Cell culture results showed that the isolates from four different farms infected *Cyprinus* carp epithelial cells and caused a cytopathic effect. The isolated SVCV strains were designated as Shlj1–Shlj4 and were confirmed as SVCVs by polymerase chain reaction. The titers of SVCV Shlj1–Shlj4 were $10^{6.28}$, $10^{6.88}$, $10^{7.57}$, and $10^{6.38}$ $\times$ the 50% tissue culture infectious dose/mL, respectively. The results of the Shlj glycoprotein gene cluster analysis showed that Shlj1–Shlj4 clustered with China strains A2 and BJ0505-2 as well as America strains USA and 212364. The nucleotide sequence similarities of Shlj1–Shlj4 with those previously reported SVCV strains were 98.4%–99.8%, and the similarities among Shlj1–Shlj4 were 98.6%–99.8%. The highest nucleotide sequence similarity (99.8%) was observed between Shlj3 and USA/212364, and Shlj2 had the lowest similarity (88.0%) with England reference strain 880163. The amino acid sequence alignment results showed that, among the four Shlj strains, the glycoproteins of Shlj4 contained the most mutations. Genotype analysis showed that Shlj1–Shlj4 all belonged to genotype Ia. The study showed that the SVCV detection rate was about 10% in Heilongjiang Province during 2015–2016, and the glycoprotein gene sequences of SVCV strains from different farms varied, indicating that SVCV strains are evolving in the Chinese fish farm environment.

Key words: spring viremia of carp virus; glycoprotein; phylogenetic analysis; genotype

Corresponding author: XU Liming. E-mail: lmxu0917@163.com