

大口黑鲈蛙虹彩病毒传代致弱株免疫效果评价

高铭悦 楚馨 刘思玉 姚嘉赞 蔺凌云 沈锦玉 潘晓艺

EVALUATION OF IMMUNE EFFECT ON ATTENUATED STRAIN OF LARGEMOUTH BASS RANAVIRUS

GAO Ming-Yue, CHU Xin, LIU Si-Yu, YAO Jia-Yun, LIN Ling-Yun, SHEN Jin-Yu, PAN Xiao-Yi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0447>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大口黑鲈鱼诺卡氏菌传代弱毒株特性及免疫效果评价

CHARACTERISTICS AND IMMUNOPROTECTIVE EFFECTS OF ATTENUATED *NOCARDIA SERIOLAE* FROM LARGEMOUTH BASS INDUCED BY CONTINUOUS PASSAGING

水生生物学报. 2024, 48(7): 1120–1129 <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0399>

抗大口黑鲈弹状病毒发酵中草药的筛选及其效果评价

SCREENING AND EVALUATION OF ANTI- *MICROPTERUS SALMOIDES* RHABDOVIRUS FERMENTED CHINESE HERBS MEDICINE

水生生物学报. 2024, 48(3): 479–487 <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0174>

发酵豆粕替代鱼粉对大口黑鲈幼鱼生长、脂质代谢、血清非特异性免疫及肠道菌群的影响

FERMENTED SOYBEAN MEAL INSTEAD OF FISH MEAL ON GROWTH, LIPID METABOLISM, SERUM NON-SPECIFIC IMMUNITY AND INTESTINAL FLORA OF JUVENILE LARGEMOUTH BASS

水生生物学报. 2022, 46(4): 466–477 <https://doi.org/10.7541/2021.2021.095>

饲料中单独或联合添加乳酸菌对大口黑鲈生长及免疫性能的影响

SINGLE OR CONJOINT ADMINISTRATION OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE GROWTH AND IMMUNE RESPONSE OF *MICROPTERUS SALMOIDES*

水生生物学报. 2024, 48(9): 1494–1501 <https://doi.org/10.7541/2024.2024.0022>

饲料中添加酵母培养物对大口黑鲈生长、肠道健康和免疫力的影响

DIETARY YEAST CULTURE ON GROWTH, INTESTINAL HEALTH AND IMMUNITY OF *MICROPTERUS SALMOIDES*

水生生物学报. 2024, 48(1): 23–33 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0080>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0447

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0447

大口黑鲈蛙虹彩病毒传代致弱株免疫效果评价

高铭悦^{1,2} 楚馨^{2,3} 刘思玉^{2,4} 姚嘉赞^{2,3} 蔺凌云² 沈锦玉^{1,2,3,4*} 潘晓艺^{2,4*}

(1. 湖州师范学院生命科学院, 湖州 313000; 2. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州市渔业环境与水产品质量安全重点实验室, 湖州 313001; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 4. 浙江海洋大学水产学院, 舟山 316022)

摘要: 为研究大口黑鲈蛙虹彩病毒(Largemouth Bass Ranavirus, LMBV)传代致弱毒株LMBV-ZJDSS-F110的特性, 研究开展了该病毒的复制效率、毒力、体内病毒载量变化、比较基因组、免疫保护率、免疫后免疫相关基因表达和毒力返强等试验。结果显示: 采用FHM培养, F110代次毒滴度可达 $10^{9.1}$ TCID₅₀/mL, 以剂量 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL×0.1 mL注射大口黑鲈, 未见死亡。不同代次毒株体内组织病毒载量测试, 结果显示: 传代毒F5、F45和F110在7d时脾脏和鳃的病毒载量要高于3d, 而F90在两时间点的病毒载量变化不显著, 表明传代毒F90相较于F45, F110相较于F90都出现了特性改变。不同代次毒株F5与F110比较基因组学分析显示: LMBV-ZJDSS-F110出现了10处变异, 其中有7处可能引起编码区的变化。将传代弱毒F110通过注射和浸泡免疫大口黑鲈, 结果显示 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL浓度组都获得了对强毒F5株70%免疫保护率, 而头肾中免疫因子(*TNF-α*、*CD8b*、*IgM*、*IgT*、*IFN-γ*)基因表达量在免疫后14d达到峰值, 且注射组显著高于浸泡免疫组, 其中*IFN-γ*表达量接近对照组的50倍。活体传代毒力返强测试结果显示, F110活体盲传5代未引起死亡。以上研究表明, LMBV-ZJDSS-F110是一株安全有效的弱毒疫苗株, 为大口黑鲈蛙虹彩病毒病的免疫预防提供了路径。

关键词: 弱毒疫苗; 免疫因子; 传代致弱; 大口黑鲈蛙虹彩病毒; 免疫途径

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)06-062503-11



大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是我国重要的淡水养殖品种之一^[1]。自20世纪80年代引入中国以后, 养殖规模逐渐扩大, 现已成为我国第7大淡水养殖鱼类^[2]。然而, 在养殖过程中, 大口黑鲈出现的致病性病原被相继报道, 包括大口黑鲈蛙虹彩病毒(Largemouth bass ranavirus, LMBV)^[3]、传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)^[4]、大口黑鲈弹状病毒(*Micropterus salmoides* Rhabdovirus, MSRV)^[5]、鲈鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)^[6]等。其中LMBV对大口黑鲈全养殖期都具有致病性, 是造成大口黑鲈损失最大的病原之一。LMBV属于虹彩病毒科蛙病毒属, 由于其高传

染率和致死率而引起越来越多的关注^[7]。LMBV最早于美国1996年被分离和鉴定^[8], 而国内于2009年在大口黑鲈溃疡综合征中被首次报道^[9]。2006年以来, 溃疡综合征在广东省多个大口黑鲈养殖场频繁发生, 死亡率高达60%以上^[10], 造成重大经济损失。患病的大口黑鲈一般表现为嗜睡, 食欲不振, 在水里缓慢游动, 体表可见多处溃烂及出血点, 鳍条基部、尾柄处红肿出血; 解剖发现其脾脏肿大, 颜色暗红发黑, 肝脏发白并有出血点等症状^[11,12], 此外, 也有出现无特征性临床症状的发病鱼^[13]。

由于没有针对LMBV的特效药物, 疫苗接种是现今预防病毒性疾病感染的有效手段。Yi等^[14]以

收稿日期: 2024-11-14; 修订日期: 2025-01-17

基金项目: 浙江省科研院所专项(2025YSZX02); 浙江省“尖兵领雁+X”研发攻关计划(2024C02005); 国家重点研发计划“海洋农业与淡水渔业科技创新”重点项目(2023YFD2400702)资助 [Supported by the Zhejiang Provincial Institute Special Project (2025YSZX02); the “Vanguard Geese+X” Research and Development Breakthrough Plan in Zhejiang Province (2024C02005); National Key Research and Development Program “Innovations in Marine Agriculture and Freshwater Fisheries Technology” (2023YFD2400702)]

作者简介: 高铭悦, 女, 硕士研究生; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: 17710273872@163.com

通信作者: 沈锦玉, 研究员; E-mail: sjinyu@126.com 潘晓艺, 研究员; E-mail: panxiaoyi@163.com *共同通信作者

主要衣壳蛋白基因为抗原构建真核表达质粒pCDNA3.1-MCP-Flag进行鱼体注射免疫,获得了63%的相对免疫保护率(RPS); Fu等^[15]通过浸泡免疫实验,从天然LMBV毒株库中筛选出一株具有良好免疫原性的减毒LMBV毒株,命名为LMBV-2007136,当大口黑鲈以最低浓度 $10^{2.0}$ TCID₅₀/mL浸泡接种时,所有鱼类在毒力LMBV攻击后均存活,RPS为100%。Hu等^[16]开发了三种类型的LMBV疫苗:全病毒灭活疫苗、由主要病毒衣壳蛋白MCP组成的亚单位疫苗及MCP DNA疫苗。通过不同的免疫和加强策略,研究发现所有疫苗组均能诱导体液和细胞免疫反应,并在不同程度上保护大口黑鲈免受致命的LMBV攻击,其中MCP DNA疫苗(DD)产生了最佳的总体效果。具体而言,DD组的相对存活率达到了89.5%,显著高于其他组别。Luo等^[17]成功开发了一种含有纳米铝佐剂的LMBV灭活疫苗,可有效保护大口黑鲈免受LMBV感染。研究结果表明,纳米铝佐剂疫苗免疫鱼脾脏中*TNF- α* 、*IFN*、*IL-8*等免疫相关基因的表达水平显著上调,且中和抗体丰度较高,持续时间较长。此外,纳米铝佐剂疫苗组大口黑鲈头肾淋巴细胞经ConA刺激后在体外表现出更强的增殖活性。该研究结果表明,含有纳米铝佐剂的灭活LMBV疫苗可以为大口黑鲈提供有效的保护,使其免受LMBV感染。活疫苗保留了更好的免疫原性,且能够在宿主体内一定限度内繁殖,所以减毒活疫苗能有效激起细胞免疫且免疫持续期较长,呈现较为优良的相对免疫保护率。减毒活疫苗可引发机体免疫反应,刺激机体产生特异性的记忆B细胞,获得长期或终生保护的作用。目前,水产活疫苗中应用较多的减毒疫苗是用致病性已大为减弱的病毒减毒株或变异的弱毒株制备的疫苗^[18,19]。

病毒在培养细胞中经过多次传代,常导致病毒基因中一个或多个突变的积累,从而使病毒毒力减弱^[20]。根据王丛旭等^[21]研究结果表明,在连续传代的过程中,增加了病毒对细胞的适应性,导致细胞病变的速度变快,并且随着病毒代次的增高,病毒毒力下降,致病性降低,病毒载量在组织内达到峰值的时间变慢。为开发LMBV减毒活疫苗,本研究对本实验室LMBV分离株(LMBV-ZJDSS)在已传代至LMBV-ZJDSS-F65^[21]的基础上,继续传代致弱至F110代,并对F110传代毒株的复制效率、毒力、体内病毒载量变化等多个方面进行了全面评估,这种全方位的评价体系为减毒活疫苗的开发提供了科学依据。通过比较基因组学,了解到减毒株与原始毒株之间的基因差异,这有助于理解减毒机制,并

为未来的疫苗设计提供了分子层面的信息。免疫后宿主免疫相关基因的表达变化,有助于了解疫苗如何激活宿主的免疫反应。而测试F110传代毒株的毒力返强能力是评估疫苗安全性的重要方面。通过这一系列的研究,以期筛选出有应用价值的疫苗减毒株,增强对LMBV疾病的防控能力,为LMBV减毒活疫苗的开发提供了有应用价值的疫苗减毒候选株。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼、细胞系及毒株 健康大口黑鲈,规格分别为 (13.0 ± 2.0) 和 (3.5 ± 0.5) g购自浙江省湖州市某规模化养殖场,经检测无病原后^[22],于循环水养殖桶中暂养2周后备用。养殖水体为 $55 \text{ cm} \times 90 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$,水温保持在 $(26.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$,保持溶解氧 $>6 \text{ mg/L}$,日投饲2次(8:00—9:00和17:00—18:00),表观饱食投喂的条件下进行饲养管理。

大口黑鲈蛙虹彩病毒强毒LMBV LY20709^[25](LMBV-ZJDSS-F5)及其传代株F45和F65^[21],胖头鲮肌肉细胞系(Fathead minnow cell line, FHM; ATCC CCL-42)^[23]均由本实验室保存。

实验试剂 M199培养基、0.25%Trypsin-EDTA (1 $\times$)购自美国Gibco公司;新生牛血清购自内蒙古金源康生物工程有限公司;青链霉素混合液(P1400)和PBS购自北京索莱宝科技有限公司;2 $\times$ Super Real PreMix (Probe)试剂盒、FastQuant RT Kit (With gDNase)、RNA simple Total RNA Kit试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸提取试剂盒(磁珠法)购自洛阳爱森生物科技有限公司。

1.2 方法

LMBV-ZJDSS的传代 FHM细胞采用含10%血清和1%青链霉素混合液的M199培养基于 28°C 培养箱中培养。待细胞铺满单层后,弃培养液,接入LMBV-ZJDSS-F65^[21]病毒液1 mL, 24°C 培养箱孵育50 min后,吸出病毒液,加入细胞维持液(含2%血清和1%青链霉素混合液的M199培养基),于 24°C 培养,每日观察细胞病变效应(Cytopathic Effect, CPE)情况,待CPE达到80%时,收集病毒液,于 -80°C 中保存,获得F90和F110代次毒株。

不同代次毒株病毒滴度及毒力测定 根据LaBarre等^[24]方法测定传代毒F5、F45、F90、F110的病毒滴度。并采用病毒滴度分别为 $10^{8.0}$ 、 $10^{7.0}$ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL的病毒稀释液进行毒力测定。大口黑鲈 (13.0 ± 2.0) g, 10尾/组, 0.1 mL/尾,对照组注射等量生理盐水,养殖条件同上,观察14 d,统计存活率。

不同代次毒株在大口黑鲈体内的消减特征

比较 LMBV-ZJDSS 不同代次毒株 F5、F45、F90、F110 在大口黑鲈体内的复制规律。将 20 尾大口黑鲈 (13.0 ± 2.0) g, 以 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 的浓度分别注射 0.1 mL/尾, 对照组注射等量生理盐水。在注射后 3d 和 7d 进行取样, 每组取 3 尾, 取脾脏、后肠和鳃进行 LMBV 定量检测^[25]。

比较不同天数 14d、21d、90d, LMBV-ZJDSS-F110 在大口黑鲈体内的复制规律。将 20 尾大口黑鲈 (13.0 ± 2.0) g, 以 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 的浓度分别注射 0.1 mL/尾, 对照组注射等量生理盐水。在注射后 14d、21d、90d 进行取样, 每组取 3 尾, 取脾脏、后肠和鳃进行 LMBV 定量检测^[25]。

将 LMBV-ZJDSS-F110 代毒株进行扩大培养, 收集病毒液 100 mL, 冻融 3 次, 12000 r/min, 离心 30min, 收取上清液, 铺于 5 mL 30% 的蔗糖溶液上, 50000 r/min, 4℃, 离心 3h。收集沉淀进行病毒 DNA 的提取^[26]。病毒 DNA 送美吉生物公司进行二代测序, 测序数据采用 CLC Genomics Workbench 软件的重测序分析流程与 LMBV-ZJDSS-F5 毒株的基因组序列, 进行变异、缺失与插入的分析。

LMBV-ZJDSS-F110 毒株免疫保护率的测定

取 600 尾健康大口黑鲈, 鱼体质量为 (13.0 ± 2.0) g, 分为 4 组, 其中 3 个试验组, 1 个对照组, 每组 150 尾, 分为 3 个平行, 每个平行 50 尾。3 个试验组包括 F110 代次毒株的 3 种免疫浓度, 分别为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL, $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL, 免疫腹腔注射剂量为 0.1 mL/尾, 对照组注射等量生理盐水。免疫后每日早晚观察, 共观察 28d, 记录死亡率; 免疫后 1d、7d、14d 和 28d 进行取样, 每桶随机取 3 尾鱼, 混合头肾作为 1 个样品, 待获得免疫保护率结果后, 取最高组别用于免疫基因测定; 在 28d 每组各取 30 尾鱼用强毒 LMBV LY20709 (LMBV-ZJDSS-F5) 进行攻毒, 攻毒浓度为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL, 注射 0.1 mL/尾, 观察记录 14d, 计算其免疫保护率。按下列公式进行计算: 免疫保护率(%)=[(对照组死亡率-免疫组死亡率)/对照组死亡率]×100。

取 750 尾健康大口黑鲈, 鱼体质量为 (3.5 ± 0.5) g 分为 5 组, 其中 4 个试验组, 1 个对照组, 每组 150 尾, 分为 3 个平行, 每个平行 50 尾。4 个试验组包括 F110 代次毒株的 4 种免疫浓度, 分别为 $10^{8.0}$ 、 $10^{7.0}$ 、 $10^{6.0}$ 和 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL, 每组均浸泡 30min。免疫后每日早晚观察, 共观察 28d, 记录死亡率; 免疫后 1d、7d、14d 和 28d 进行取样, 每桶随机取 3 尾鱼, 混合头肾作为一个样品, 待获得免疫保护率结果后, 取最高组别用于免疫基因测定; 在 28d 每组各取 30 尾鱼

用强毒 LMBV LY20709 (LMBV-ZJDSS-F5) 进行攻毒, 攻毒浓度为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL, 注射剂量为 25 μ L/尾, 并计算其免疫保护率。

经上述实验中测得免疫保护率最高的浓度为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 注射组和浓度为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 的 30min 浸泡组的大口黑鲈头肾混合样品, 参照 RNA simple Total RNA Kit 试剂盒(天根生化科技有限公司)说明书提取组织 RNA, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 参照 Livak 等^[27]报道的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法测定大口黑鲈肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素-8 (Interleukin-8, *IL-8*)、*CD8b* 分子(*CD8b*)、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, *IgM*)、免疫球蛋白 T (Immunoglobulin T, *IgT*) 和干扰素- γ (Interferon- γ , *IFN- γ*) 表达水平(表 1 引物序列), qPCR 反应体系为: 2×*Taq* Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6.8 μ L; 反应程序为 95℃ 60s; 95℃ 5s, 60℃ 30s, 40 个循环; 所有 qPCR 反应均进行 3 次重复, 每个样品的数据和与之对应的对照组样品的数据相对于 β -*actin* 基因的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[27]表示, 其中纵坐标表示为注射组与浸泡组与其各自对照组相对于 β -*actin* 基因的表达水平的比值(注射组/注射对照组、浸泡组/浸泡对照组)。

LMBV-ZJDSS-F110 体内盲传实验 使用 LMBV-ZJDSS-F110, $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL 对实验鱼体进行接种, 接种剂量 0.1 mL/尾, 每次接种 10 尾。其中 7 尾用于观察感染情况并计算死亡率; 3 尾在接种后 3d 取注射后鱼体的肾脏和脾脏用于混合研磨; 约每

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer Sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	来源 Source
<i>TNF-αF</i>	AGAAGCGCAATCTGTTCCTCA	[14]
<i>TNF-αR</i>	GTGGCTTGAGTTCTCTCGTGA	
<i>IL-8 F</i>	AAACCACTTCTCTCTGGCTGC	[28]
<i>IL-8 R</i>	ACTCAGCTCGGCATAGGTTG	
<i>CD8b F</i>	ATGGCTGCGGCTACTTGATT	[29]
<i>CD8b R</i>	TTTGGAAGTCGGCTGAAGT	
<i>IgM F</i>	ACAATGCGAAGGTCAAGTGG	[30]
<i>IgM R</i>	CGACAGATGGCTTGTTTGCC	
<i>IgT F</i>	CTGTTGGGCAGGTGTTGATGG	[30]
<i>IgT R</i>	AGCAATCCTCTCCAGTCCTTTT	
<i>IFN-γF</i>	TGAGGAGCTGAAACAACCCC	[31]
<i>IFN-γR</i>	AGGATGCTGGAGAAGATGCG	
β - <i>actin F</i>	TCCTCGGTATGGAGTCTTG	[32]
β - <i>actin R</i>	GTCAGCGATTCCAGGGTA	

0.1 g组织匀浆加入1 mL M199培养基, 4℃下4000 r/min离心5min, 吸取上清后, 用0.22 μm 滤膜过滤; 将该组织匀浆上清液注射到新一组的健康大口黑鲈体内^[33]。每次取样时, 组织匀浆测其病毒载量; 由前次接种鱼体分离到的组织匀浆, 按照与第1次传代相同的途径接种鱼体; 鱼体连续传代次数5代(即首次接种后要进行4次继代); 将重新分离的蛙虹彩病毒株接种最后一次传代的大口黑鲈后, 逐日观察至少21d; 将注射LMBV-ZJDSS-F110的大口黑鲈记为P1, 其余依次为P2、P3、P4和P5。

2 结果

2.1 不同代次毒株病毒滴度及毒力测定

病毒LMBV-ZJDSS在FHM细胞系中连续传代, 获得F66至F110代次, 选取F5、F45、F90和F110进行实验。不同代次病毒感染滴度如图1所示: 病毒感染滴度从F5至F110逐渐升高; F110的病毒滴度最高, 为 $10^{9.1}$ TCID₅₀/mL。

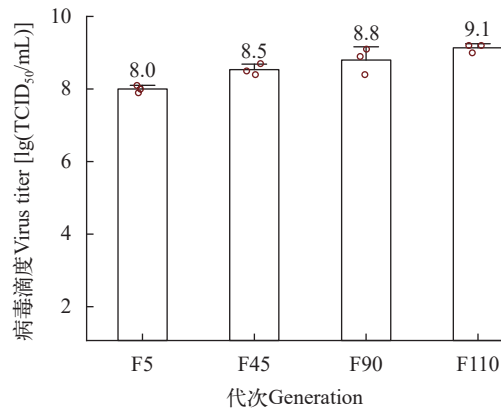


图1 LMBV-ZJDSS 不同代次感染病毒滴度

Fig. 1 Virus titers of different generations of LMBV-ZJDSS

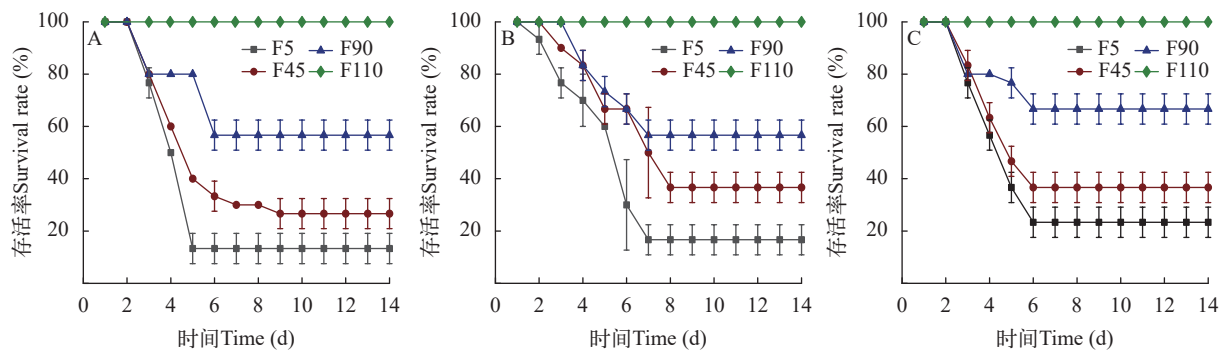


图2 LMBV-ZJDSS 不同代次存活率

Fig. 2 Survival rate of different generations of LMBV-ZJDSS

A. 病毒滴度为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL时不同代次存活率; B. 病毒滴度为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL时不同代次存活率; C. 病毒滴度为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL时不同代次存活率

A. The survival rate of different generations when the virus titer is $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL; B. The survival of rate different generations when the virus titer is $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL; C. The survival rate of different generations when the virus titer is $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL

将F5、F45、F90和F110不同代次病毒注射大口黑鲈后, 连续观察14d。如图2所示: 当病毒滴度为 $10^{8.0}$ 、 $10^{7.0}$ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL时, F110注射接种的鱼均未出现死亡和异常, 存活率均为100%; 当病毒滴度为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL时, F5、F45和F90的存活率分别为13.3%、26.7%和56.7% (图2A); 当病毒滴度为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL时, F5、F45和F90的存活率分别为16.7%、36.7%和56.7% (图2B); 当病毒滴度为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL时, F5、F45和F90的存活率分别为23.3%、36.7%和63.3% (图2C);

2.2 不同代次的毒株在大口黑鲈体内的消减特征

LMBV-ZJDSS各代次在不同组织中的病毒载量

不同代次LMBV-ZJDSS接种后的3d和7d, 取样检测各组脏器中的病毒载量(图3)。接种后3d, F110的脾脏组织拷贝数达到 1.5×10^5 copies/mg, 相比之下, F5、F45和F90组的脾脏组织拷贝数较低, 为 1.5×10^4 — 1.7×10^4 copies/mg; 各组别后肠组织拷贝数为 8.6×10^3 — 2.8×10^4 copies/mg。接种7d后, F110组鱼体后肠组织拷贝数升至 3.3×10^5 copies/mg, 相比之下, F5和F45组的后肠组织拷贝数分别升至 10^6 和 10^5 copies/mg; F110组鱼体脾脏组织拷贝数降至 4.2×10^4 copies/mg, F45组鱼体脾脏组织拷贝数升至 1.3×10^6 copies/mg; 各组别鳃组织拷贝数在接种后7d达到 10^4 — 2.5×10^4 copies/mg。

LMBV-ZJDSS-F110在不同组织中的病毒载量变化情况

LMBV-ZJDSS-F110接种后的14d、21d和90d, 取样检测各组脏器中的病毒载量(图4)。接种后的14d, F110的脾脏组织拷贝数为 9.69×10^2 copies/mg, 相比之下, 后肠组织拷贝数达到 3.27×10^4 copies/mg, 而鳃的组织拷贝数为 5.40×10^2 copies/mg; 接种21d后, F110组鱼体脾脏组织拷

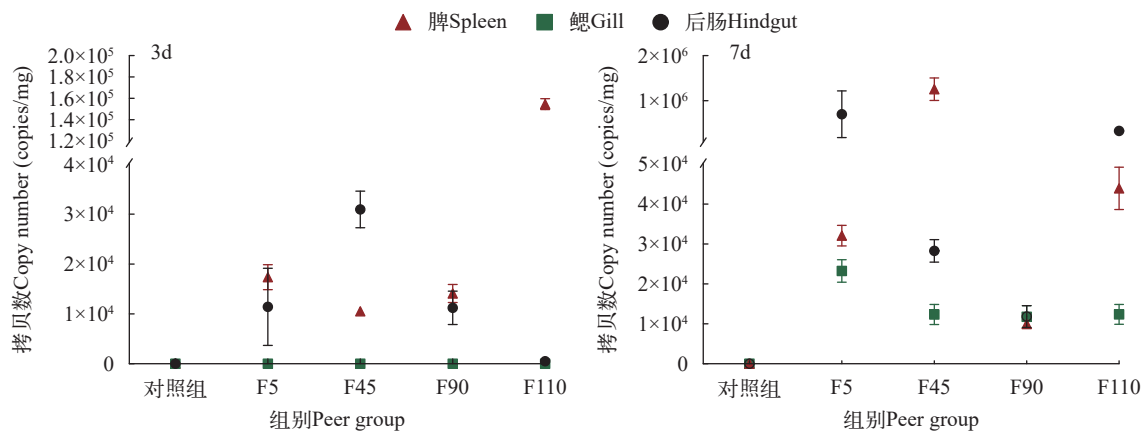


图3 LMBV-ZJDSS各代次不同组织中的病毒载量

Fig. 3 Viral load in different tissues of each generation of LMBV-ZJDSS

贝数降至 5.21×10^1 copies/mg, 后肠和鳃组织拷贝数分别降至 1.87×10^2 copies/mg和0; 接种90d后, F110组鱼体脾脏、后肠和鳃组织病毒载量检测为阴性。

2.3 LMBV-ZJDSS-F110基因组序列测定与分析

采用二代测序技术进行病毒基因组序列测定, 采用重测序分析方法, 以LMBV-ZJDSS-F5基因组序列为参考基因组进行基因组变异、插入和缺失的分析。结果如表2所示: 与LMBV-ZJDSS-F5代相比, LMBV-ZJDSS-F110变异点有10处, 其中有7处可以引起编码区的变化, 其中在ORF5区域, 氨基酸由苯丙氨酸变为苏氨酸, 其编码的蛋白为未知功能蛋白; 在ORF34区域, 氨基酸由亮氨酸变为苯丙氨酸, 其编码的蛋白为未知功能蛋白; 在ORF78区域, 氨基酸未发生变化, 为苏氨酸(编码区密码子由ACA变为ACG), 其编码的蛋白为putative DNA-dependent RNA polymerase subunit; 在ORF81区域有两处碱基位置发生变化, 氨基酸由谷氨酰胺变为脯氨酸、甘氨酸(编码区密码子由GGA变为GGC), 其编码的蛋白为RNA编辑蛋白家族(其编码的蛋白与PPK12323蛋白家族同源); 在ORF83区域同样有两处碱基位置发生变化, 氨基酸由谷氨酰胺变为丙氨酸、脯氨酸(编码区密码子由CCG变为CCC), 其编码的蛋白为神经丝三联体H1样蛋白(Neurofilament triplet H1-like protein)和神经丝三联体H2样蛋白(Neurofilament triplet H2-like protein)。

2.4 LMBV-ZJDSS-F110毒株致死率及免疫保护率

LMBV-ZJDSS-F110不同免疫组, 免疫保护率见图5。对照组的大口黑鲈强毒攻毒14d以后, 鱼的死亡率达100%; $10^{8.0}$, $10^{7.0}$ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL对大口黑鲈注射免疫时免疫保护率分别为70.0%、56.7%、36.7%; 通过qPCR检测确认为LMBV致死。实验结果显示免疫后的大口黑鲈死亡率低于对照组, 说明在腹腔注射免疫的情况下, LMBV-ZJDSS-F110存

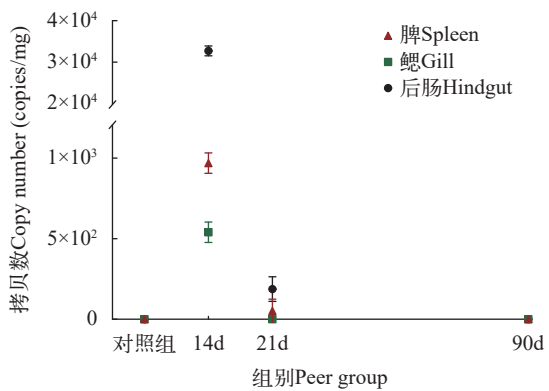


图4 LMBV-ZJDSS-F110在不同组织中的病毒载量变化情况

Fig. 4 The changes of viral load of LMBV-ZJDSS-F110 in different tissues

表2 LMBV-ZJDSS-F110与F5基因组差异分析

Tab. 2 Genome difference analysis of LMBV-ZJDSS-F5 and F110

碱基位置 Base position	核苷酸变化 Amino acid change F5→F110	氨基酸变化 Amino acid change F5→F110	ORF编码蛋白 ORF encodes protein
1999	C→A	/	/
5061	A→G	Phe→Thr	ORF5, 未知功能蛋白
28633	C→A	Let→Phe	ORF34, 未知功能蛋白
33837	A→G	/	/
54414	T→C	/	/
68395	A→G	Thr (ACA→ACG)	ORF78, Putative DNA-dependent RNA polymerase subunit
73253	A→T	Gln→Pro	ORF81, RNA编辑蛋白家族
73255	CT→GG	Gly (GGA→GGC)	ORF81, RNA编辑蛋白家族
74382	A→G	Gln→Ala	ORF83, 神经丝三联体h1样蛋白
74403	C→G	Pro (CCG→CCC)	ORF83, 神经丝三联体h2样蛋白

在对大口黑鲈的免疫保护。

LMBV-ZJDSS-F110不同免疫组, 免疫保护率见图6: 浸泡相同时间30min, $10^{8.0}$ 、 $10^{7.0}$ 、 $10^{6.0}$ 和 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL毒株浸泡免疫保护率分别为70.0%、50.0%、33.3%和11.0%, 经qPCR检测确认为LMBV致死。结果显示免疫后的大口黑鲈死亡率低于对照组, 且浓度越高, 免疫保护率越高, 说明在浸泡免疫的情况下, LMBV-ZJDSS-F110存在对大口黑鲈的免疫保护。

2.5 免疫基因的测定

注射和浸泡免疫后大口黑鲈头肾组织中的细胞因子*TNF-α*、*IL-8*、*CD8b*、*IgM*、*IgT*、*IFN-γ*的表达量测定发现, 注射免疫组对细胞因子的影响程度更为显著, 其中*TNF-α*、*CD8b*和*IFN-γ*在免疫24h后都出现了下调。到7d时浸泡免疫组*TNF-α*、*IL-8*

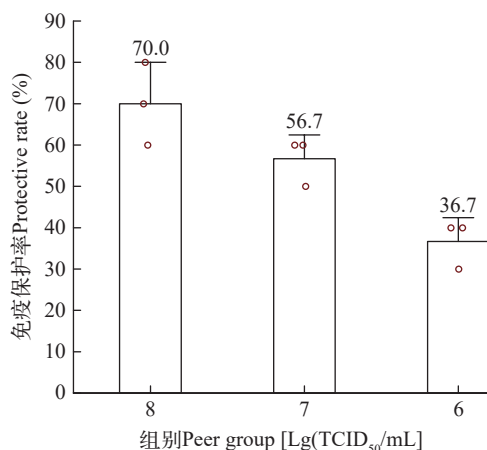


图5 LMBV-ZJDSS-F110对大口黑鲈的免疫保护率

Fig. 5 Immunization protection rate of LMBV-ZJDSS-F110 against largemouth bass

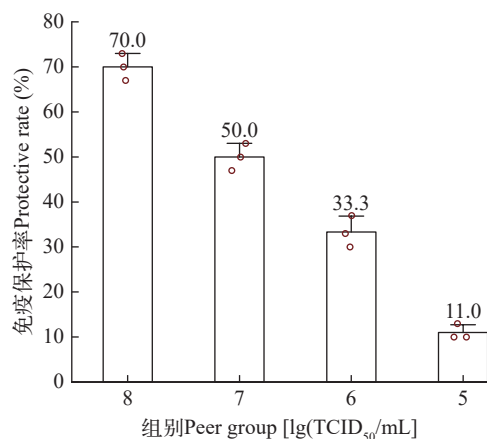


图6 LMBV-ZJDSS-F110对大口黑鲈浸泡30min免疫的免疫保护率

Fig. 6 The immune protection rate of LMBV-ZJDSS-F110 against largemouth bass soaked for 30min

和*IFN-γ*仍处于被下调状态, 此后开始被上调, 而其他免疫因子在7d、14d和28d都处于上调状态(图7)。并且除*IL-8*外, 都在14d达到了表达峰值, 各免疫基因表达量在14d时, 注射免疫组显著高于浸泡免疫组(除*CD8b*; $P < 0.05$), 其中*IFN-γ*表达量接近对照组的50倍。

2.6 LMBV-ZJDSS-F110体内盲传实验

用注射了LMBV-ZJDSS-F110制备的头肾混合匀浆在大口黑鲈中传代5次, 以确定组织中的病毒载量并观察死亡率, 通过观察死亡率, 发现连续传代后大口黑鲈均没有出现病毒引起的死亡。qPCR结果显示(图8): 第一代大口黑鲈的肾脏和脾脏中病毒拷贝数最高, 为 6.1×10^5 — 7.5×10^5 copies/mg。在第二代中, 大口黑鲈组织中的病毒拷贝数开始减少到 8.6×10^4 — 1.2×10^5 copies/mg。在第三至第五代中, 病毒DNA拷贝数为 1.7×10^1 — 1.2×10^3 copies/mg。结果表明, 随着次数增加病毒的拷贝数越来越低, 第五代后病毒DNA拷贝数只有 1.7×10^1 copies/mg, LMBV-ZJDSS-F110在体内传代没有毒力返强。

3 讨论

3.1 弱毒株在大口黑鲈体内的消减特征

不同代次毒株(LMBV-ZJDSS-F5、F45、F90和F110)接种大口黑鲈后, 各脏器中的病毒扩增模式存在显著差异。病毒接种后3d, F110组脾脏的病毒拷贝数显著高于其他组, 而7d时, 各组的鳃和后肠组织中病毒载量处于较高水平。这些结果表明, 不同代次LMBV感染大口黑鲈后, 宿主对病毒的扩散和清除可能具有不同的应答模式, 特别是在脾脏和后肠的病毒载量变化上反映出较明显的代次差异。刘丹等^[34]对强毒大鲵蛙病毒(Chinese Giant Salamander *Ranavirus*, CGSRV)在体内组织分布的研究中, 发现各脏器中病毒载量随感染进程而升高, 其中肠和脾脏也是高病毒载量的靶器官。王丛旭等^[21]对人工感染LMBV后的大口黑鲈检测发现, 肠道病毒载量最高, 强毒株在第48h各脏器病毒载量达到峰值, 弱毒的峰值延后。这些数据表明, 不同蛙病毒毒株, 在不同宿主中的组织嗜性存在差异, 并且感染后期, 在外排相关组织肠道和鳃中的病毒载量显著升高。这些结果可以进一步用于理解大口黑鲈不同代次间对LMBV的免疫应答机制。

3.2 LMBV-ZJDSS-F110全基因组测序

本研究在LMBV-ZJDSS-F110基因组测序分析发现, 与低代次强毒LMBV-ZJDSS-F5相比, ORF81和ORF83出现了碱基位点的突变, 其中ORF81有一处突变导致谷氨酰胺被改变为脯氨酸; ORF83区域

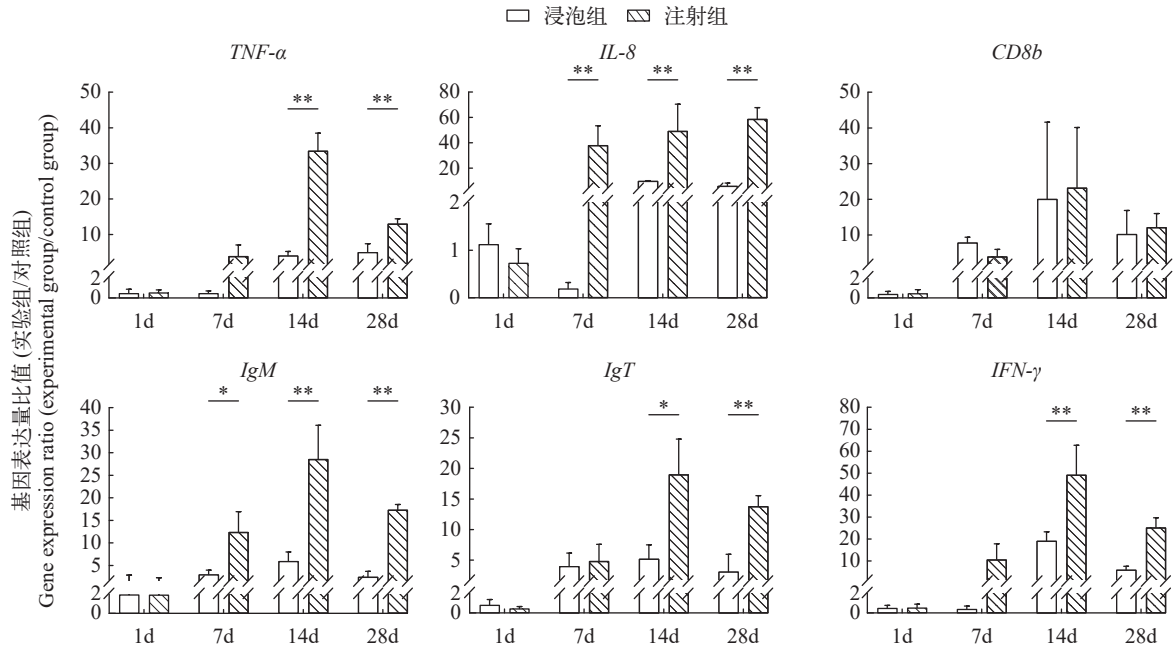


图7 大口黑鲈免疫后免疫基因的表达情况

Fig. 7 Expression of immune genes in largemouth bass after immunization

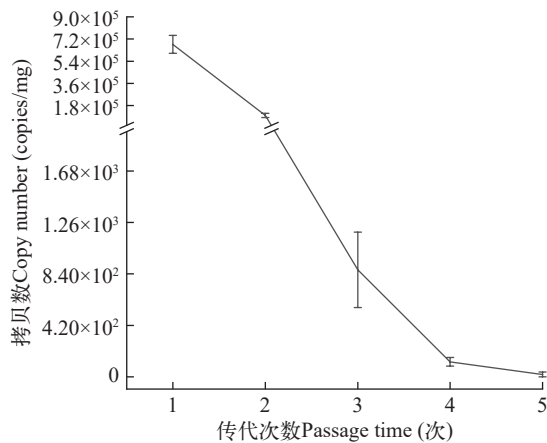
* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 

图8 LMBV-ZJDSS-F110体内盲传实验

Fig. 8 LMBV-ZJDSS-F110 in vivo blind transmission experiment

同样有两处碱基位置发生变化, 其中一处导致氨基酸由谷氨酰胺变为丙氨酸。根据蛋白预测, ORF81和ORF83编码蛋白可能分别与RNA编辑和神经丝蛋白的合成密切相关。RNA编辑在病毒感染中的作用尚未完全明了, 但已有研究表明, 一些病毒, 如人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)和乙型肝炎病毒(Hepatitis B, HBV), 在其生命周期中利用RNA编辑调节自身的致病性和免疫逃逸机制^[35]。在本研究中, 弱毒LMBV-ZJDSS-F110的RNA编辑蛋白家族基因ORF81的突变可能为其适应宿主免疫系统提供了某些优势。神经丝三联体h1样蛋白基因是蛙病毒属中较为保守的基因, 常

被用于蛙病毒的基因分型^[36], 但在病毒感染或毒力方面还未有报告, 该基因与毒力相关功能值得进一步进行研究。

3.3 免疫基因对免疫效果的影响

脾脏和肾脏是硬骨鱼的主要免疫器官, 头肾与体液免疫有关^[37]。病原感染诱导后鱼体产生的大量细胞因子, 可以抵御病原入侵。本研究对大口黑鲈蛙虹彩病毒减毒株免疫的大口黑鲈头肾组织开展了细胞因子白细胞介素(IL-8)、细胞免疫(CD8b)、体液免疫(IgM)、黏膜免疫(IgT)、干扰素(IFN-γ)和TNF-α检测。大口黑鲈注射免疫后IFN-γ和TNF-α在24h即出现下调, 表明注射免疫可能启动了负反馈机制以防止过度炎症, 免疫基因的表达下调可能是病毒为了自身可以在细胞中复制存活而进化出的一种逃逸宿主免疫的机制。如肠道病毒71型(EV71)的3C蛋白切割IFNβ的TIR结构域衔接蛋白, 扰乱IFN-I产生, 最终使EV71可以逃逸IFN-I介导的抗病毒免疫反应^[38]。随后在第7至第28天都为上调, 有助于形成保护性免疫。有研究表明, 传染性造血器官坏死病毒(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)的DNA疫苗免疫虹鳟后在4—15d上调了IFN-γ的表达, 1d时也未出现上调^[39], 而在另一个关于口服IHNV的DNA疫苗研究中, IFN-γ在第3、第7和第15天时也都被上调^[40]。这些结果表明IFN-γ不论在注射弱毒活疫苗、DNA疫苗或口服DNA疫苗, 3d以后都会被显著上调。意外的是, 本研究中

浸泡免疫后7d, *IFN- γ* 仍然处于负调控, 这可能是由于, 浸泡免疫时, 进入机体的弱毒数量少, 并且短期内产生的病毒不足以刺激机体产生*IFN- γ* 的高表达。*IL-8*也出现了类似的情况, 7d注射组上调, 而浸泡组出现了显著性的下调。*IL-8*作为促炎性细胞因子, 虽然在病毒感染过程中促进炎症和招募免疫细胞, 进一步增强宿主的抗病毒和清除病原体的能力。然而, 过度或持续性的上调可能会导致病理性炎症, 损伤宿主组织。因此, *IL-8*的表达通常受到严格调控, 以平衡抗感染能力和防止过度炎症的风险。

鱼类生活在水生环境, 其黏液性免疫非常发达, *IgT*就是鱼类黏膜组织中发挥着重要的特异性免疫防御作用的免疫球蛋白类型。李琦等^[41]利用重组蛋白Sip及 α -enolase对尼罗罗非鱼进行初次及二次免疫, 发现外周血清总*IgM*于初次免疫后12—15d开始迅速上升, 至免疫后30—45d达峰值而后缓慢下降。在本研究中, *IgT*和*IgM*的表达量均在14d达到峰值, 且注射组的*IgT*和*IgM*表达量高于浸泡组, 表明弱毒抗原要比原核表达蛋白抗原的免疫刺激机体产生免疫反应更为迅速, 并且注射的免疫效果较浸泡免疫更具免疫调节作用。*CD8b*存在于大多数细胞毒性T淋巴细胞上, 可介导免疫系统内的有效细胞间相互作用。已有研究表明, 在哺乳动物体内, 多种胞外抗原可通过MHC I型通路激活*CD8⁺* T细胞^[43]。*CD8⁺* T淋巴细胞(CTL)是机体抵御多种病毒感染的重要方式^[44]。Vallejos-Vidal等^[46]研究表明在病毒感染过程中*CD8a*、*CD8b*的高表达对CTL介导的免疫反应具有正向调节作用。本研究减毒活疫苗株LMBV-ZJDSS-F110免疫后, 2种免疫途径都可以正向调节大口黑鲈*CD8b*的表达, 表明弱毒LMBV-ZJDSS-F110可刺激机体产生细胞免疫, 这为宿主抵抗胞内病原体的保护中起重要作用。因此, 本研究认为LMBV-ZJDSS-F110对大口黑鲈的免疫保护作用可能归因于体液免疫和细胞免疫的共同作用。

3.4 对弱毒疫苗体内盲传的研究

本研究针对传代弱毒株F110进行鱼体传代体内盲传试验, 在大口黑鲈体内连续传代5次, 均未引起大口黑鲈的死亡和异常。这表明, 弱毒株F110感染大口黑鲈后, 在体内复制产生的病毒粒子还基本保持着原先的特性, 毒力未出现返强, 表明该弱毒株F110在有限代次内遗传稳定。孙雨雨^[33]将制备的鲫造血器官坏死症弱毒疫苗通过注射感染异育银鲫, 连续体内传代6次, 也未出现鱼体异常现象, 仅病毒载量逐渐降低。通常情况下, 在传代或环境压力下, 弱毒病毒可能在宿主体内发生毒力返强, 从而恢复部分或全部致病性。在传代过程中积累

的突变可能增强病毒的复制适应性^[47], 此外, 某些突变可能导致重要的毒力基因被重新激活, 使病毒株的毒力水平提高^[48]。此外, 免疫系统的压力也可导致病毒毒力基因的适应性突变, 进而提升其感染力和免疫逃逸能力, 如SARS-CoV疫苗病毒株在免疫压力下可能发生毒力回升^[49]。由于弱毒的安全性, 目前水产疫苗中, 仅有少数几种弱毒活疫苗获准上市, 包括以色列的锦鲤疱疹病毒病(*Koi herpesvirus*, KHV)疫苗和中国的草鱼出血病疫苗^[50]。

4 结论

本研究通过连续体外传代获得了一株可用于弱毒疫苗研发的安全有效的大口黑鲈虹彩病毒LMBV-ZJDSS-F110。该毒株对大口黑鲈致病力弱, 可同时诱导鱼体产生细胞免疫和体液免疫应答反应, 通过注射和浸泡两种递送途径免疫保护率均达到70%。该研究结果为大口黑鲈虹彩病毒病的防治提供了新思路, 为日后研究大口黑鲈虹彩病毒弱毒疫苗提供了有效的疫苗毒株。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Li J T, Yang K Y, Qiu X T, et al. Comparison of growth and morphological characteristics of inbred and hybrid families of *Micropterus salmoides* from Foshan and Taiwan populations [J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(5): 1-9. [李江涛, 杨凯宇, 邱晓桐, 等. 大口黑鲈佛山和台湾群体自交与杂交子代的生长和形态差异分析 [J]. *南方水产科学*, 2021, 17(5): 1-9.]
- [2] Coyle S D, Tidwell J H, Webster C D. Response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to dietary supplementation of lysine, methionine, and highly unsaturated fatty acids [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2000, 31(1): 89-95.
- [3] 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.]
- [4] Wei X F, Yong L, Yuting F, et al. The inactivated ISKNV- I vaccine confers highly effective cross-protection against epidemic RSIV- I and RSIV- II from cultured spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e0449522.
- [5] Zhang W Y, Zhang Y J, Li C, et al. Isolation and identification of *Micropterus salmoides* rhabdovirus [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2022, 41(6): 230-236. [章文言, 张玉军, 李陈, 等. 大口黑鲈弹状病毒的分离与鉴定 [J]. *华中农业大学学报*, 2022, 41(6): 230-236.]

- [6] Wang D, Zhang B, Chen M, *et al.* Comparison and evaluation of DNA vaccines against *Nocardia seriolae* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2025(596): 741772.
- [7] Deng G, Li S, 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.
- [8] Plumb J A, Grizzle J M, Young H E, *et al.* An iridovirus isolated from wild largemouth bass [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1996, **8**(4): 265-270.
- [9] 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病原的分离和鉴定 [J]. 水产学报, 2009, **33**(5): 871-877.]
- [10] Dong H X, Zeng W W. Research progress on largemouth bass ranavirus disease [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, **38**(3): 746-756. [董寒旭, 曾伟伟. 大口黑鲈蛙虹彩病毒病研究进展 [J]. 病毒学报, 2022, **38**(3): 746-756.]
- [11] 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.]
- [12] Zhao R, Geng Y, Qin Z, *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] Grizzle J M, Altinok I, Noyes A D. PCR method for detection of largemouth bass virus [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, **54**(1): 29-33.
- [14] Yi W, Zhang X, Zeng K, *et al.* Construction of a DNA vaccine and its protective effect on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) challenged with largemouth bass virus (LMBV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(106): 103-109.
- [15] Fu X Z, Li W X, Liu C, *et al.* A naturally attenuated largemouth bass ranavirus strain provided protection for *Micropterus salmoides* by immersion immunization [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(153): 109871.
- [16] Hu T, Wang Y, Wang Y, *et al.* Production and evaluation of three kinds of vaccines against largemouth bass virus, and DNA vaccines show great application prospects [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(153): 109841.
- [17] Luo X, Wang R, Ma B, *et al.* Inactivated LMBV vaccine with nano-aluminum adjuvant provided immune protection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2025(595): 741634.
- [18] Liu Z L, Chen R, Zhu D Z, *et al.* Preparation of VHS reference material used for nucleic acid detection [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2018, **54**(3): 15-19. [刘志玲, 陈茹, 朱道中, 等. 病毒性出血性败血症病毒 RNA 标准物质的研制 [J]. 中国兽医杂志, 2018, **54**(3): 15-19.]
- [19] Chen G H, Xu L M, Zhao J Z, *et al.* Preparation and immune protective efficacy analysis of an inactivated vaccine against infectious hematopoietic necrosis (IHN) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(11): 1909-1920. [陈桂花, 徐黎明, 赵景壮, 等. 传染性造血器官坏死病灭活疫苗的制备及免疫保护效果 [J]. 水产学报, 2021, **45**(11): 1909-1920.]
- [20] Liu F, Wu X, Li L, *et al.* Evolutionary characteristics of morbilliviruses during serial passages in vitro: Gradual attenuation of virus virulence [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2016(47): 7-18.
- [21] Wang C X, Pan X Y, Zhou K X, *et al.* Effect of in vitro passage on virulence of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ranavirus [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2023, **38**(4): 623-629. [王丛旭, 潘晓艺, 周可欣, 等. 体外传代对大口黑鲈蛙虹彩病毒毒株毒力的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2023, **38**(4): 623-629.]
- [22] Yang Z Z, Lin Q, Fu X Z, *et al.* Molecular epidemiology and histopathological analysis of largemouth bass ranavirus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(6): 1063-1073. [杨展展, 林强, 付小哲, 等. 大口黑鲈蛙病毒分子流行病学及组织病理分析 [J]. 水产学报, 2022, **46**(6): 1063-1073.]
- [23] Zheng N, Wang Q J, Ma Y, *et al.* Regulation of L-carnitine on antioxidant function in *Pimephales promelas* muscle cell line and grass carp *Ctenopharyngodon idellus* ovary cell line [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, **33**(6): 736-742. [郑男, 王秋举, 马悦, 等. L-肉碱对胖头鲢肌肉细胞和草鱼性腺细胞抗氧化功能的调节作用 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, **33**(6): 736-742.]
- [24] LaBarre D D, Lowy R J. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays [J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, **96**(2): 107-126.
- [25] Gong J P, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Establishment and application of TaqMan qPCR method for largemouth bass ranavirus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, **44**(5): 508-513. [巩金鹏, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 大口黑鲈虹彩病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, **44**(5): 508-513.]
- [26] Zhang X L, Zhou X Y, Zhang H. Isolation, purification and major capsid protein gene sequence analysis of Iridovirus isolated from Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2014, **42**(12): 23-28. [张星朗, 周小愿, 张辉. 大鲵虹彩病毒的分离纯化及其 MCP 基因序列分析 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2014, **42**(12): 23-28.]
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the

- 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.
- [28] Gayle R B 3rd, Sleath P R, Srinivason S, *et al.* Importance of the amino terminus of the interleukin-8 receptor in ligand interactions [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**(10): 7283-7289.
- [29] Kayesh M E H, Hashem M A, Maetani F, *et al.* CD4, CD8b, and cytokines expression profiles in peripheral blood mononuclear cells infected with different subtypes of KoRV from koalas (*Phascolarctos cinereus*) in a Japanese zoo [J]. *Viruses*, 2020, **12**(12): 1415.
- [30] Uchuwittayakul A, Thangsunan P, Thangsunan P, *et al.* Molecular structure and functional responses of IgM, IgT and IgD to *Flavobacterium covaie* and *Streptococcus iniae* infection in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch, 1790) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(153): 109823.
- [31] Gasperini S, Marchi M, Calzetti F, *et al.* Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils [J]. *Journal of Immunology*, 1999, **162**(8): 4928-4937.
- [32] Byadgi O, Chen C W, Wang P C, *et al.* Transcriptome analysis of differential functional gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) after challenge with *Nocardia seriolae* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(53): 124.
- [33] Sun Y Y. Evaluation of the effect of a attenuated strain of carp herpesvirus type II as a candidate strain of live vaccine [D]. Yancheng: Yancheng Institute of Technology, 2023: 26-28. [孙雨雨. 一株鲤疱疹病毒 II 型弱毒株作为活疫苗候选株效果评价研究 [D]. 盐城: 盐城工学院, 2023: 26-28.]
- [34] Liu D, Geng Y, Wang K Y. *et al.* 2017, Dynamic pathological lesions and tissue distribution of Chinese giant salamanders infected with CGSRV [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, **24**(1): 146-155. [刘丹, 耿毅, 汪开毓, 等. 大鲵蛙病毒感染大鲵的动态病理损伤及病原的组织分布 [J]. 中国水产科学, 2017, **24**(1): 146-155.]
- [35] Hu S B, Li J B. RNA editing and immune control: from mechanism to therapy [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2024(86): 102195.
- [36] Holopainen R, Ohlemeyer S, Schütze H, *et al.* Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, **85**(2): 81-91.
- [37] Li Y N, Chen Q Z, Shao J Z, *et al.* Advances in research of fish immunology [J]. *Zoological Research*, 1995, **16**(1): 83-94. [李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展 [J]. 动物学研究, 1995, **16**(1): 83-94.]
- [38] Song J, Hu Y J, Liu L D. Research progress on viral evasion mechanisms of host immune responses [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2016, **28**(1): 118-123. [宋杰, 胡雅洁, 刘龙丁. 病毒逃逸宿主免疫反应机制的研究进展 [J]. 生命科学, 2016, **28**(1): 118-123.]
- [39] Xu L, Zhao J, Liu M, *et al.* Bivalent DNA vaccine induces significant immune responses against infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 5700.
- [40] Ballesteros N A, Alonso M, Saint-Jean S R, *et al.* An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, **45**(2): 877-888.
- [41] Li Q. Analysis of lymphocyte characterization during humoral immune response of nile tilapia [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2022: 13-21. [李琦. 尼罗罗非鱼体液免疫应答过程中淋巴细胞表征解析 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2022: 13-21.]
- [42] Abdelkhalek N K, Komiya A, Kato-Unoki Y, *et al.* Molecular evidence for the existence of two distinct IL-8 lineages of teleost CXC-chemokines [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(6): 763-767.
- [43] Vyas J M, Van der Veen A G, Ploegh H L. The known unknowns of antigen processing and presentation [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**(8): 607-618.
- [44] Uribe C, Folch H, Enriquez R, *et al.* Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review [J]. *Veterinární Medicina*, 2011, **56**(10): 486-503.
- [45] Somamoto T, Yoshiura Y, Nakanishi T, *et al.* Molecular cloning and characterization of two types of CD8alpha from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, **29**(8): 693-702.
- [46] Vallejos-Vidal E, Reyes-López F E, Sandino A M, *et al.* Sleeping with the enemy? The current knowledge of piscine orthoreovirus (PRV) immune response elicited to counteract infection [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 768621.
- [47] Hanley K A. The double-edged sword: how evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine [J]. *Evolution*, 2011, **4**(4): 635-643.
- [48] Lee E, Lobigs M. Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus [J]. *Journal of Virology*, 2002, **76**(10): 4901-4911.
- [49] Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, *et al.* Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development [J]. *Advances in Virus Research*, 2016(96): 245-286.
- [50] Wang Q Y. Fish vaccine technology development and application in China: a review [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, **37**(1): 1-9. [王启要. 中国鱼类疫苗技术研发及应用研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2022, **37**(1): 1-9.]

EVALUATION OF IMMUNE EFFECT ON ATTENUATED STRAIN OF LARGEMOUTH BASS RANAVIRUS

GAO Ming-Yue^{1,2}, CHU Xin^{2,3}, LIU Si-Yu^{2,4}, YAO Jia-Yun^{2,3}, LIN Ling-Yun²,
SHEN Jin-Yu^{1,2,3,4} and PAN Xiao-Yi^{2,4}

(1. School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China; 2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Key Laboratory of Fishery Environment and Aquatic Product Quality and Safety of Huzhou City, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: In order to investigate the characteristics of LMBV-ZJDSS-F110, an attenuated transmissible strain of Largemouth bass virus (LMBV), this study examined various factors, including replication efficiency, virulence, in vivo viral load changes, comparative genomes, immune protection rate, expression of immune-related genes after immunization, and virulence regression of the virus. The results showed that, when cultured in FHM, the viral titer of F110 strain reached $10^{9.1}$ TCID₅₀/mL, and no mortality was observed in largemouth bass when injected at a dose of $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL×0.1 mL. Tissue viral load tests on different generations of strains showed that the viral loads in spleen and gills of passaged strains F5, F45, and F110 were higher in the 7d than that of the 3d, whereas the viral loads of F90 did not change significantly at the two time points, which indicated that the characteristics of the transmission strain F90 had changed compared with those of F45 and F110. Comparative genomic analyses of the F5 and F110 strains showed that LMBV-ZJDSS-F110 exhibited 10 mutations, of which 7 could cause changes in the coding region. Immunization trials using both injection and immersion showed that the $10^{8.0}$ TCID₅₀/mL concentration group obtained 70% immune protection rate against the strong F5 strain. Gene expression of immune factors (*TNF-α*, *CD8b*, *IgM*, *IgT*, *IFN-γ*) in the head and kidney reached a peak on the 14d after immunization and was significantly higher in the injected group than that of the immersion group, with the expression of *IFN-γ* was significantly higher. Specifically, the expression of *IFN-γ* was nearly 50 times that of the control group. The results of in vivo virulence reversion test showed that F110 did not cause any mortality in 5 generations of blind in vivo transmission. The above studies indicate that LMBV-ZJDSS-F110 is a safe and effective attenuated vaccine strain, which provides a pathway for the immunization of largemouth bass virus.

Key words: Attenuated vaccine strain; Immunity factor; Transmission weakening; Largemouth bass virus; Immunity pathway