

鳗鲡开口病的病毒分离及特性研究*

陈燕燊 谢 军 李 伟

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 从患开口病鳗中分离到一种病毒于 30℃ 条件下, 病毒能在 EG 细胞上产生细胞病变及形成 1.2mm 大小的空斑。电镜下观察, 病毒呈圆形, 具囊膜。膜上有纤状突起。成熟颗粒直径为 70—85nm, 其核酸为单链单分子 RNA, 病毒对氯仿、热和 pH3 不稳定, 经多次冻融, 其滴度稍有下降, 病毒是在细胞浆内复制, 温度范围在 25—32℃ 之间, 最适复制温度为 30℃。

关键词 鳗鲡病毒分离, 特性, 披膜病毒

在中国福建省和广东省一些养鳗场发生一种死亡率高的日本鳗鲡 (*Anguilla japonica* Temminck et Schlegel) 流行病, 由于病鳗是以出血性开口病 (简称鳗开口病), 发病季节在 6—10 月间, 水温 25—32℃, 而以 7—8 月为发病高峰。罹病鱼都有出血现象, 最初可见口腔出血, 继而颅腔, 打开颅腔可见颅内被血液充满。而且血液浸入颅骨, 外表可透见病鱼头顶扩散性发红出血, 有些病鱼出现胸鳍及臀鳍出血, 腹部也有出血点。作者于 1992 年^[1]在病鳗的血细胞中, 电镜下, 观察到病毒颗粒存在。自后开展病毒分离研究。鳗鲡病毒病原的分离研究, 国外及台湾均有报道^[2-3]。在中国大陆是第一次分离到鳗鲡病毒。

1 材料和方法

1.1 细胞 主要用 EG 细胞^[4]分离病毒, 培养液为 L-15 含 10% Fes; 其它温水鱼细胞, 如 CIK, GCK, CAB, FHM 和 Epc 等也用作分离试验, 培养液为 199 含 10% Fes。维持液为 2% Fes。

1.2 材料 病鱼材料是 1993 年在广东省南海市的养鳗场收集, 将濒死病鳗, 空运回本试验室。健康鳗是在武汉市场买回, 经饲养观察无患病者, 供感染实验。

1.3 病毒分离 从濒死的病鳗中取脾肾和外周血细胞, 分别匀浆, 以 Earle's 作 1:20 稀释, 经离心和除菌过滤, 将滤液接种入生长在 24 孔板的上述 6 种细胞中, 吸附后加维持液, 分别置 25℃ 和 30℃ 培养。经 7d 观察, 连续盲传 3 代, 镜检有细胞病变 (cytopathic effect CPE) 出现的感染细胞, 继续繁殖供试验用。用 96 微孔板, 50% 感染性终点技术按文^[5]方法

* 国家自然科学基金资助课题

1998-12-08 修回

测定病毒滴度。

1.4 病毒提纯 感染的 EG 细胞出现 CPE 后, 经零下 20—20℃ 3 次冻化细胞裂解。悬液在 14℃, 8000r/min 离心 10min, 取上清, 于 28000r/min 超速离心 2.5h, 留沉淀, 加入 PBS 悬浮。悬液同上述法再差速离心 1 次, 沉淀悬浮于少量蒸馏水中。

1.5 电镜片的制作 病鱼血细胞的收集和制片方法按以前报道^[1]。感染病毒的细胞, 出现 CpE 后, 按常规法消化离心收集细胞, 加 2.5% 的戊二醛固定再用锇酸固定按常规包埋切片染色。负染片的制作用提纯的病毒悬液, 采用琼脂扩散法制备载网片。常规法负染, 电镜观察。

2 结果

2.1 病毒分离

以鳃组织除菌滤液, 感染 EG 细胞, 第 1—2 代时, 均看不出细胞病变。继续传至第 3 代于 30℃ 培养 3—4d 出现 CpE (图 1)。最初细胞饱满状, 而后胞质变暗, 颗粒增多, 细胞逐渐坏死, 单层破坏出现灶形病变。最后胞质融解而离壁脱落。将有 CpE 出现的细胞感染液再接入新的 EG 单层, CpE 能重复出现。测定其 $T_{cid_{50}}$ 为 9×10^{10} / ml。但在 25℃ 培养的 CpE 出现缓慢, 且滴度略低。经试验观察, 此病毒在细胞复制需时较长才出现 CpE, 通常需 3—5d。



图1 病毒感染EG细胞后4d, 出现的CpE
Fig.1 CpE of EG cell infected with viruses after 4d

2.2 空斑形成

细胞生长在 24 孔板, 24h 形成单层后, 按 Woll^[6] 进行试验, EG 细胞于 30℃ 培养 5d, 出现直径 0.5mm 的斑点 (图 2)。空斑逐渐向边缘发展, 空斑直径可增至 1.2mm (图 3)。染色后显微镜下观察, 可见到大多数为清晰的空斑, 有些斑的中央保留有残存的细胞核。本试验经过两次挑斑, 分离到一纯株, 命名为 Evs932。

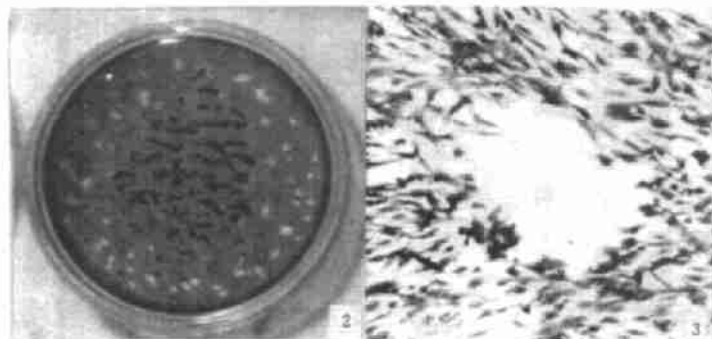


图2 病毒在EG细胞形成斑

Fig.2 Plaque formed in EG cell infected with virus

图3 一个空斑

Fig.3 A plaque

2.3 电镜观察

感染病毒后的 EG 细胞超薄切片, 均观察到与前文所述的两种颗粒。其大小和形态与之相似。电镜下, 可见大量无外膜的病毒颗粒分布于胞质中。病毒粒子是在胞质中复制。首先在胞质中形成条状的膜样物, 继而形成具有核膜和核心的颗粒, 它们大量分布于胞质中, 随后病毒核心移至空泡膜或内质网膜上装配而获得囊膜 (图版 I) 为成熟颗粒。成熟的和未成熟的病毒颗粒随细胞崩解而释放出来。胞质包涵体 (Inclusion) 可见, 位于靠近细胞核的外方。电镜下观察到的负染颗粒呈球形或略椭圆形, 大小不一, 具囊膜的成熟颗粒直径为 70—85nm。囊膜上披有 9—12nm 长的纤突。但纤突和外膜容易脱落, 可能因超离心影响之故, 囊膜内包裹的核衣壳和核心呈五边形或六边形, 直径为 35—48nm。

2.4 核酸提取和核酸分析

病毒核酸的提取和分析, 基本上按前人方法^[7]略有修改。核酸在 10%PAGE 电泳染色后, 仅出现单一条带 (图 4)。以 λ DNA 的 HindIII—EcoRI 酶解片断计算出鳃鲮病毒基因组的分子量为 1850bp, 经试验, 病毒核酸只能被 RNA_{se} 消化, 而不能为 DNA_{se} 降解, 表明该病毒属 RNA 型, 经吡啶橙染色后, 核酸呈红色, 属单链 RNA。故此, 该病毒为单链单分子 RNA。

2.5 几种理化因子的影响

病毒对脂溶剂的测定按方法文献 [8], 结果病毒对脂溶剂氯仿很敏感, 表明病毒具有脂溶剂囊膜, 并且对热 (56℃ 30min) 和 PH₃ 也不稳定 (表 1)。

表1 病毒对几种理化因子的敏感性

Tab.1 Sensitivity of virus to physico-chemical treatment

| 分 项 Titer | 氯仿 (纯) Pure chloroform | 56℃, 30min | PH ₃ |
|---------------|------------------------|------------|-----------------|
| 处理组 Treatment | 2.0 | 2.7 | 2.6 |
| 对照 Control | 5.4 | 5.5 | 5.3 |

注: Log₁₀ TCId₅₀/ml

冻融对病毒活性的影响 病毒在 -25—-20℃ 分别冻化 1, 3, 4 次后, 接种 EG 细胞均能出现 CpE, 而经 4 次冻化的出现 CpE 的时间较长, 且滴度略低, 试验提示, 该病毒经多次冻化对其活性是有影响的。

2.6 病毒的生物学特性

病毒体外复制, 病毒在 CIK, GCK, CAB, FHM, Epc 等细胞中, 均无 CpE 出现; 而在 EG 细胞培养 3—4d 后可出现 CpE。将上述 6 种感染病毒的细胞液在 EG 细胞中滴定效价, 结果见表 2。虽然 GCK, CIK 细胞可被测出低滴度效价, 但意义不大。表明此病毒的宿主细

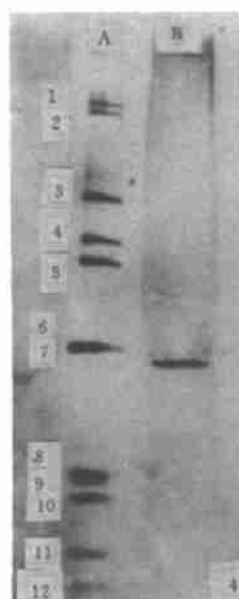


图4 病毒核酸基因组在 10%PAGE 分析。

Fig.4 10% PAGE analysis of eel virus genome.

A. 标准样品: λ DNA HindIII—EcoRI

Marker λ DNA HindIII—EcoRI

B. 鳃鲮病毒核酸基因组 Genome of eel virus.

表2 病毒在几种细胞中复制 (Log10 Tgid 50/ml)
Tab.2 Replication of virus in different cells

| 细胞系 Cell lines | EG | GCK | CAB | CIK | FHM | CpE |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 细胞病变 Cpe | + | +- | - | +- | - | - |
| 病毒滴度 Titer of Vires | 9.2 | 2.2 | - | 1.8 | - | - |

胞范围不广,仅在 EG 细胞分离此病毒最佳。

病毒在 EG 细胞培养在 15℃ 和 36℃ 于 3d 内细胞收缩脱落,看不出 CpE。可能是温度不适于细胞生长之故。在 20℃ 培养下,细胞正常生长,唯无 CpE 出现。在 25℃ 和 30℃ 培养的,可于 3—4d 出现 CpE,而以 30℃ 培养的出现 CpE 较明显。测定在 25℃ 和 30℃ 培养 5d 的滴价分别为 10^{7.5}和 10^{9.2}TCID 50/ml。可见病毒的复制温度范围在 25—30℃ 之间。最适温度为 30℃。

病毒注射感染鳊鲴后于 30℃ 恒温饲养,30—35d 出现开口并出血症状,与天然发病鳊相似,死亡率达 60%。

3. 讨论

迄今已分离到的鳊鲴病毒有虹彩病毒(Iridovirus)^[3],正粘病毒(Orthomyxovirus)^[9,10],枪弹形病毒(Rhabdovirus)^[11],Binavirus 群病毒^[12]和疱疹病毒(Herpessvirus)^[13]等。鳊鲴开口病病毒的形态虽较近似于正粘病毒,呈球形均具囊膜结构,但正粘病毒颗粒较大,更重要的是其病毒核衣壳是在细胞核内形成。据此特征,则明显有别于鳊开口病病毒的繁殖方式。

城彦等^[14],在日本德岛县养鳊鲴池发现过鳊鲴开口病,认为是鄂关节异常。猜疑过种种原因,但都不能成立。钱文华^[15],在浙、闽、粤等地养鳊池,也发现鳊开口病,判断此病是属于营养性疾病,是饵料中缺乏维生素 C 及 B₆而引起,诱发原也不排除铁锚虫叮咬。他在饵料中添加足量的维生素 C 和 B₆及消炎药等,认为病情有好转并据此否定了传染性病因。鱼类营养研究认为,饵料中添加足量的维生素,特别是维生素 C 其功效可以间接增强机体对不良环境的抵抗力及免疫功能。作者曾于 1994 年走访粤某养鳊公司,该公司根据此病是缺乏维生素 C 所致,于是在饵料中添加维生素 C,虽然短期内病情稍有好转,但是几天后疾病又暴发。因此,缺少维生素并非鱼体致病的直接原因。此病病态明显,病情凶猛,发病季节长达 4 个月之久。从病原研究结果,作者确认此病是一种由病毒引起的传染性疾病。

电镜下,可观察到病毒在 EG 细胞的复制过程是在胞浆中完成。这种繁殖方式与披膜病毒科的繁殖方式极为相似^[16]。

前文^[1]的讨论中提出,因在病鳊血细胞中电镜下观察到两种形态和大小不同的病毒颗粒,疑鳊开口病是否由两种病毒病原引起。经试验表明,是因病毒在繁殖过程中不同的发育阶段,其实该病是由一种病毒病原引起。

根据作者在鳊鲴中分离到的病毒形态大小,核酸类型,理化特性及繁殖方式等,是具有披膜病毒科的特征^[16]。因此,提议从鳊开口病分离到的病毒暂属于披膜病毒科中一新成员。披膜病毒科的终宿主,大多数为脊椎动物,而在鱼类病毒中尚属罕见。

参 考 文 献

- [1] 陈燕桑等. 我国发生一种鳗鲡病毒性流行病. 科学通报, 1992, 37(23): 2190—2192
- [2] Mcallister P E, Nagabayashi T, Wolf K. Viruses of eels with and without stomatopapillams. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1977, 298:233—244
- [3] Wolf. K. Fish Viruses and Fish Viral Disease, Comstock Publishing Associates Cornell University Press. 1988
- [4] 陈燕桑, 谢军. 鳗鲡性腺细胞系的建立及生物学特性. 鱼病学研究论文集(第二辑), 北京: 海洋出版社, 1995, 9—14
- [5] Reed I J, Muench. A simple methods of estimating fifty percent endpoints *Am. J. Hyg.*, 1938, 270: 493—497
- [6] Wolf K, Quimby M C. Fish viruses buffers and medthods for plaquing eight agents unter normal atmosphere. *Appl. Microbiol.* 1973, 25:659—664
- [7] 戴国珍等, 1979—1981年昆明地区人轮状病毒分子流行病学研究——用 PAGE 分析病毒 RNA 基因组及其多形性, 中华微生物和免疫学杂志, 1984, 4(6):355—357
- [8] Feldman H, Wang. S. Sensitivity of raxious viruses to chloroform. *Prce. Exptl. Med.*, 1961, 106: 736—738
- [9] Nagabayashi T, Wolf K. Characterization of EV2, a virus isolated from European eels (*A. anguilla*) with stomatopapilloma. *J. Viral.* 1979, 30:358—364
- [10] Neukirch M. Isolation of an orthomyxo—virus like agent from European eel. (*Anguilla anguilla*). *Bull. Eur. Assos. Fish Pathol.* 1985, 5:12—13
- [11] Sano Net al Studies on Viral diseases of Japanese fishes——VII. A rhabdovirus isolated from European eel (*Anguilla anguilla*). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1977, 43(5):491—495
- [12] Sano, T N, Okamoto, T. Nishimure. A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and schlegel. *J. Fish Dis.* 1981, 4:127—139
- [13] Ueno Y. et al. Charasterigation of a harpes—like rirus isotalaed from Cultured Japaneses eels in Taiwan. *Fish Pathol.* 1992, 27:7—17
- [14] 城彦, 室賀清邦, ううネあげの鄂關異常にツレジ魚病研究, 1974, 8(2):144—146
- [15] 钱文华. 鳗鱼的出血性开口病, 科学养鱼, 1996, (2): 34
- [16] Mathen's REF. Classification and nomenclature of viruses. Forth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Interviroogy* 1982, 17:1—119
- [17] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学技术出版社. 1985, 464—532
- [18] Reproduction of togaviruses; in Fraenkel—Conral, Wagaer, Comprehensive Virology, Vol. 2, 171—230 (penum New York 1974).

CHARACTERIZATION OF A TOGAVIRUS—LIKE AGENT, ISOLATED FROM EELS *ANGUILLA JAPONICA* IN CHINA

Chen Yanxin, Xie Jun and Li Wei

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract The present paper describes a new kind of epidemic which occurred in eels in South China in summer between temperatures ranging 25—32°C and resulted in mortality of more than 60% eels in some culture ponds. The diseased examination shows: Marked haemorrhage occurred in inter membrane of oral cavity and in cranial cavity and sometimes in the pectoral fin anal fin and abdomina surface.

A new virus was isolated from the diseased eels, The virus was spherical in shape, 40—80nm in diameter, with an envelope tightly around a nucleus about 35—40nm, sensitive to chloroform, labile to heat acid (PH3), freezing and thawing. The virus replicated successfully in eels gonads (EG) cell line at temperature 25—32°C with optimal temperature at 30°C. However, CIK GCK, CAB, FHM and Epc lines were refractory to multiplication of this virus. which replicated in plasma of cells. The results suggest the tentative placement of the virus in the Family Togaviridae.

Key words Isolation of eel virus, Characterization, Togavirus

图 版 说 明

图 版 I

1. 感染病毒的 EG 细胞超薄切片, n. 细胞核, VN. 病毒核衣壳 × 80000; 2. 免疫电镜负染, 脱落的病毒囊膜联结成团, × 90000; 3. 病毒在感染细胞的内质网膜进行包被外膜, × 11400; 4. 病毒在胞质的空泡膜上装配成囊膜, × 88000; 5. 病毒负染颗粒, × 13000; 6. 单个病毒负染颗粒, 具有外纤突, × 15000

1. Ultrathin section of EG cell infected with virus, × 80000; n nucleus of cell, VN viral nucleocapsid, 2. Immune electron micrograph of negative of viral envelope jointed closely together. × 90000; 3. Enveloped viral particles by endoplasmic reticulum to fit together, × 11400; 4. Virus in cytoplasmic vacuolate membrane to fit together. × 8800; 5. Electron micrograph of negative of viruses. × 13000; 6. Electron micrograph of A purified virus with surface projection × 15000