

研究简报

## 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究

张奇亚 李正秋 江育林 梁绍昌 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所,武汉 430072)

### PRELIMINARY STUDIES ON VIRUS ISOLATION AND CELL INFECTION FROM DISEASED FROG *RANA GRYLIO*

Zhang Qiya, Li Zhengqiu, Jiang Yulin, Liang Shaochang and Gui Jianfang

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

**关键词** 沼泽绿牛蛙(美国青蛙)、病毒、细胞感染

**Key words** Pig-Frog, *Rana grylio*, Virus, Cell Infection

沼泽绿牛蛙(*Rana grylio* stejneger)又称美国青蛙,是近年由国外引进。沼泽绿牛蛙养殖业发展很快,但遗憾的是沼泽绿牛蛙的病害也随之增加。目前沼泽绿牛蛙常见的病害有:红腿病、水霉病、气泡病、脱皮病、肿腿病、烂皮病等。由于病原研究严重滞后的现状,使得沼泽绿牛蛙的病害难以防治,造成了严重的经济损失。关于两栖类病毒病原的研究虽早在50年前就开始了<sup>[1]</sup>,但直到60年代末期才有了一些进展,而研究主要集中在豹蛙肾腺癌(Lucke tumor)致病病毒的基础研究方面<sup>[2]</sup>。为了研究名、特、优水产养殖动物在高密度等集约化养殖条件下,疾病流行与病毒病原的关系,我们在分离到造成对虾暴发性致死的杆状病毒<sup>[3-4]</sup>、鳗鲡开口病毒<sup>[5]</sup>,并开始从患病中华鳖中分离鉴定病毒<sup>[6]</sup>的基础上,对患致死性综合症的沼泽绿牛蛙进行了病毒分离试验,结果从病蛙组织中分离到病毒。并就此病毒对细胞的感染性进行了研究。本文报道了这一研究的初步结果。

### 1 材料与方法

**1.1 病蛙来源** 材料蛙取自本所关桥实验场,体重约为20g左右患病的沼泽绿牛蛙。

**1.2 病毒粗提液的制备** 无菌操作,取出病蛙的肝、肾、脾组织,剪碎,加PBS匀浆后,再加双抗,冰冻过夜,离心取上清液,过滤,所得过滤液即为病毒粗提液。

**1.3 细胞感染和病毒效价测定** 取病毒粗提液,10倍系列稀释( $10^{-1}$ — $10^{-8}$ ),接到24孔板中已长成单层的细胞上,199培养液代替病毒悬液接种作对照组,每孔0.5ml,25℃吸附1h,去吸附液,每孔加入1ml 199培养液,置25℃培养。被感染的细胞有:CO(草鱼卵巢细胞)、EG(鳗鲡性腺细胞)、EPC(鲤上

本研究得到“淡水生态和生物技术”国家重点实验室、中国科学院院长基金及中科院武汉分院大型仪器测试基金的资助;文中的电镜照片是由中科院武汉病毒研究所邓红、袁爱华拍摄,特此致谢。

1996年1月18日收到,1996年6月12日修回。

皮乳状瘤细胞)和 GCF(草鱼鳞细胞)<sup>[7-8]</sup>。

病毒效价 TCID<sub>50</sub> 的测定在 96 孔板上进行, 分别加入 CO、EG 和 GCF 细胞, 培养长成单层后, 加入作 10 倍系列稀释到 10<sup>-8</sup> 的病毒粗提液, 感染后分别置于 20℃、25℃ 和 30℃ 条件下培养, 记录各稀释度阴性和阳性孔数, 并按 Reed and Muench 方法<sup>[9]</sup>计算病毒液的 TCID<sub>50</sub>。

**1.4 病变细胞超薄切片的电镜观察** 收集病变细胞, 按常规电镜超薄切片技术固定, 切片, 在 HITACHI H-7000 电镜下观察和照像。

## 2 结果与讨论

### 2.1 病蛙的症状及发病特点

疾病流行于变态不久的幼蛙群中。发病前, 主要表现为精神不振, 行动迟缓, 食欲减退。发病初期, 蛙的体表有出血点; 幼蛙头背部皮肤开始仅局部脱落腐烂, 很快烂斑扩大, 病势不断加重。其头背部皮肤失去光泽, 出现白色花纹, 表皮脱落、腐烂并露出背肌; 腹部皮肤有出血点, 四肢发红、溃烂。有的指及趾部充血、出血或溃烂。病重的蛙体形非常消瘦, 解剖发现肠壁严重充血, 肠内无食物, 有的肝或胆囊肿大。此病病程短, 蔓延极快, 死亡率可高达 90% 以上。

### 2.2 细胞的敏感性和病毒的复制

用粗提的病毒悬液直接接种到长成单层的细胞上, 约一周可引起 CO、EG、GCF、EPC 细胞产生病变(Cytopathic effect 简称 CPE)(图 1)。在不同温度下细胞产生 CPE 所需的时间以及病毒的 TCID<sub>50</sub> 见表 1。由表 1 可见温度不同时, 病毒复制的速度不同, 病毒的滴度随培养温度升高而增加。比较而言, 30℃ 是病毒最适合的增殖温度; 当温度相同时, 不同的细胞对病毒的敏感性不同, 相对来说 GCF 细胞比 CO 细胞对病毒更敏感(图 2)。

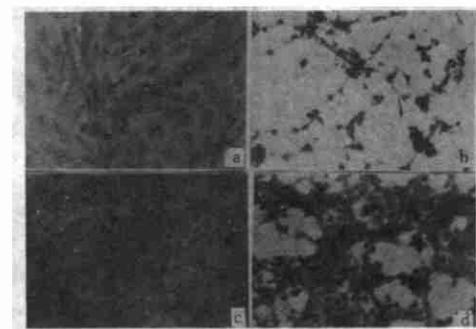


图 1 (a)正常对照的 EG 细胞;(b)RGV 感染的 EG 细胞,有明显的 CPE;(c)正常对照的 EPC 细胞;(d)RGV 感染的 EPC 细胞,有明显的 CPE。

Fig.1 (a) Normal control EG cells; (b) EG cells infected with RGV, showing apparent CPE; (c) Normal control EPC cells; (d) EPC cells infected with RGV, showing apparent CPE;

表 1 温度对细胞感染病毒敏感性的影响

Tab.1 Temperature effect on the sensitivity of cell infection by RGV isolate

细胞 Cells	接 RGV 后细胞出现 CPE 的时间 Time of CPE appearance after infection by RGV	不同培养温度下的 TCID <sub>50</sub> TCID <sub>50</sub> in different culture temperature		
		20℃	25℃	30℃
CO	20℃ 6d	3d	10 <sup>3-2</sup>	10 <sup>4-5</sup>
EG	20℃ 6d	3d	—	—
GCF	20℃ 8d	4d	10 <sup>4-5</sup>	10 <sup>5-2</sup>
EPC	20℃ 8d	4d	10 <sup>4-5</sup>	10 <sup>5-8</sup>
				10 <sup>6-2</sup>

### 2.3 病毒的大小和形态

病变细胞经切片电镜观察表明, 该病毒颗粒呈球形, 有囊膜, 大小约为 150nm(图 3a); 并见很多病毒颗粒在细胞中呈晶格状排列(图 3b)。

国外对两栖类病毒病原研究得较深入的是从豹蛙肾腺癌中分离到的虹彩病毒蛙病毒3型(forgvirus 3, FV3),其内容涉及FV3 DNA的复制、转录和翻译的调节等<sup>[2]</sup>。除此,对牛蛙水肿病毒(TEV)、蛙红细胞病毒(FEV)、蛙白细胞病毒(LCV)、蛙病毒4型(FV4)、蛙腺病毒(FAV-1)等,也进行了报道和研究<sup>[10]</sup>。从沼泽绿牛蛙蛙中分离到的RGV与FV3有何异同?还有待于进一步的研究。另外,RGV尚未进行回接感染试验,有关生物学、免疫学以及分子生物学的性质正在研究之中。

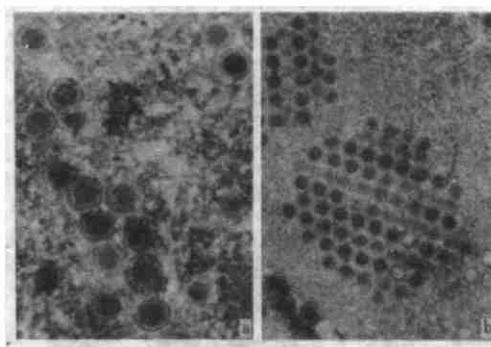


图2 病变的EPC细胞中分散的(a,  $\times 50000$ )和呈晶状排列的(b,  $\times 35000$ )病毒颗粒的电镜照片。

Fig.2 Electron micrographs of the scattered virus particles (a,  $\times 50000$ ) and the virus particles with typical paracrystalline (b,  $\times 35000$ ) in infected EPC cells showing CPE.

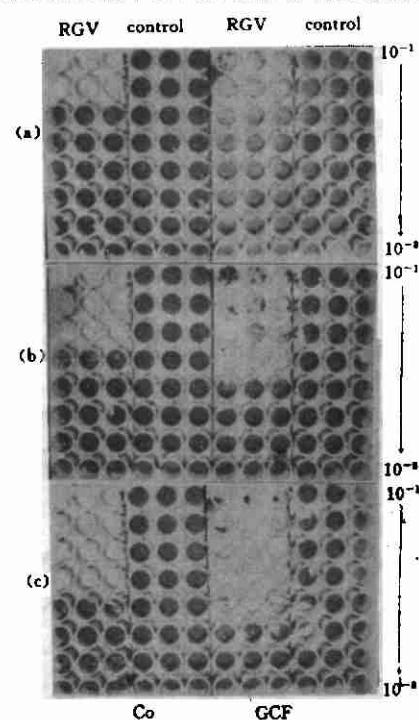


图3 不同稀释度的RGV粗提液接种到CO细胞和GCF细胞后,在3种不同培养温度(a,20℃;b,25℃;c,30℃)下出现CPE的结果比较。  
Fig.3 Comparative results of CPE occurring from CO cells and GCF cells infected with various diluted RGV isolates under 3 different culture temperatures (a,20℃; b,25℃; c,30℃).

## 参 考 文 献

- [1] Lucke B. Carcinoma in the leopard frog. Its probable causation by a virus. *J. Exp. Med.* 1938 **68**: 457—468.
- [2] Granoff A. Viruses of amphibia: an historical perspective. Ahne, W., Kurstak, E., (Eds.) *Viruses of lower vertebrates*. Berlin Heidelberg 1989, 3—13.
- [3] 江育林等,我国对虾暴发性流行病病因初探. 水生生物学报, 1995, **19**(2): 186—187.
- [4] Zhang Qiya, et al. Isolation characterization of nucleocapsids and enveloped virions of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV). *Annual Report of FEBL*, 1996 (in press).
- [5] 陈燕新等,我国发生一种鳗鲡病毒性流行病. 科学通报, 1992, **23**: 2190—2192.
- [6] Zhang Qiya, et al. Isolation of the virus from diseased soft-shelled turtle *Trionyx sinensis*. *Annual Report of FEBL*, 1996 (in press).
- [7] 陈燕新等,鳗鲡性腺细胞株的建立及其生物学特性. 鱼病学研究论文集, 北京: 海洋出版社, 1995, (第二辑): 9—14.
- [8] Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases. Ithaca, New York: Cornell University, 1988, p459—472.
- [9] Reed L J, Muench H A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, 1938, **27**: 493—497.
- [10] Carlson D L, et al. Fate of herpesvirus DNA in embryos and tadpoles coined from Lucke renal carcinoma nuclei. *Journal of Comparative Pathology* 1994 **111**(2): 197—204.