

牙鲆一株弹状病毒病原的分离与鉴定

桂朗^{1,2,3} 李正秋¹ 张奇亚¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:从患病牙鲆中分离鉴定了一株弹状病毒 (*Paralichthys olivaceus rhabdovirus*, PoRV)。用过滤除菌后的患病牙鲆组织匀浆液, 接种不同的鱼类细胞, 其中有 7 种鱼类细胞出现明显的病变在对病毒进行挑斑分离后, 测定了 PoRV 的滴度, 显示 PoRV 在敏感鱼类细胞 (Grass Carp Ovary, GCO) 中的滴度达到 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL; 绘制了 PoRV 生长曲线; 经蔗糖密度梯度离心提纯 PoRV, 负染及宿主细胞超薄切片的电镜观察, 显示 PoRV 大小约为 60nm × 200nm。测定了 PoRV 的理化性质, 显示该病毒对有机溶剂和温度敏感, 但对 DNA 抑制剂阿糖胞苷 (Ara-c) 不敏感。经 SDS-PAGE 电泳, 对 PoRV 的蛋白图谱进行了分析, 表明该病毒有 5 种主要蛋白带, 其分子量大小分别约为: 250kD、67kD、44kD、30kD、23kD。

关键词: 鱼类; 牙鲆; 弹状病毒; 理化性质; 结构蛋白

中图分类号: Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)03-0345-09

牙鲆 (flounder, *Paralichthys olivaceus*) 属硬骨鱼纲, 鲽型目, 鲆科。在我国俗称牙片、偏口、比目鱼, 是名贵的海产鱼类。其裙边肥厚, 肉质味美, 是做生鱼片的上好材料, 深受消费者的喜爱, 经济价值很高。20 世纪 90 年代开始, 我国牙鲆养殖发展迅速, 尤其在黄、渤海地区, 牙鲆养殖业方兴未艾。但鱼病流行, 尤其是鱼类病毒病是限制这一产业发展的难题。

鱼类弹状病毒是一类普遍存在、严重危害各种淡水水鱼的病原体^[1-4]。为了有针对性地预防和控制鱼类病害的流行, 首先应对病毒病原进行分离鉴定。鱼类细胞培养技术不仅可用于病毒病原的分离, 还可用于研究病毒病原的感染性和复制、致病机理及疫苗研制。此外, 电镜技术及分子生物学技术也是鱼类病毒检测、分离和鉴定的有效途径^[5-7]。因此, 运用这些技术, 我们对患病牙鲆的病毒病原进行了分离和鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料来源和处理 取患病牙鲆的内脏组织, 分为两份, 其中一份用戊二醛固定, 制备超薄

切片, 用于电镜观察; 另一份用生理盐水洗数次后, 称重剪碎匀浆, 加入含双抗 (青霉素 100U/mL, 链霉素 100μg/mL) 的 TC 199 培养液, 置 4℃ 过夜。次日低速离心取上清, 并通过 0.25μm 滤膜过滤除菌, 制备病毒原液, 置于 -20℃ 保存。

1.2 鱼类细胞及其培养 实验用鱼类细胞系为鱼类草鱼性腺 (GCO)、鲤鱼上皮瘤 (EPC)、肥头鲤 (FHM)、鲤鱼淋巴 (CLC)、草鱼鳍条 (GCF)、棕斑 (BB)、草鱼肾 (CIK)、稀有鳊鲫卵巢 (GRO)、牙鲆胚胎 (FE)、白鲢囊胚 (HMB)、石斑鱼吻端细胞 (GP)、鲫鱼鳍 (CAR) 等 12 种。除 GP 与 BB 细胞用含 10% 新生牛血清 (Bovine Calf Sera, BCS) 的 DMEM 培养液外, 其他细胞用含 10% BCS 的 199 培养液, 在 25℃ 条件下培养。

1.3 细胞敏感性测定 室温放置, 使病毒原液解冻, 然后分别接种到已长成单层的上述 12 种鱼类细胞中, 置于 20℃ 培养, 同时正常细胞作对照, 逐日观察。

1.4 病毒的空斑分离及提纯 将病毒原液作 10 倍系列稀释至 10^{-7} , 取稀释度 10^{-3} — 10^{-7} 的病毒原液分别接种到已长成 GCO 细胞单层的 24 孔细胞板中, 每个稀释度接种 4 孔, 每孔 0.1mL, 置于

收稿日期: 2006-09-20; 修订日期: 2007-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (30671616); 湖北省创新群体项目 (2004A BC005) 资助

作者简介: 桂朗 (1984—), 女, 湖北武汉人; 在读研究生; 从事海洋生物病害及生物技术研究

通讯作者: 张奇亚, E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

25℃吸附1h后,弃去未吸附病毒,再用含10%BCS的TC199培养液配制、融化后置45℃温浴中保温的0.1%琼脂糖覆盖。待琼脂凝固后,每个孔再加入TC199培养液(含双抗、Hepes和5%BCS),置于20℃培养。同时以未接毒的正常细胞为对照。

接毒2d后,细胞板中有空斑形成。弃去上层培养液,挑取单一空斑,置1.5mL EP管中,再加入TC199培养液悬浮,取悬浮液重新接种到长成单层的GCO细胞瓶中,待细胞出现病变,收集细胞液,获得分离的PoRV病毒悬液。

另制备长有单层GCO细胞的24孔板,操作步骤同上,用不同稀释倍数的病毒悬液接毒,7d后,弃培养液,用甲醛固定3h,挑出琼脂,经结晶紫染色0.5h后,进行空斑计数和拍照,按下列公式计算出病毒株PoRV的空斑形成单位(plaque formation units, PFU)。

$$\text{PFU} = \frac{\text{空斑数} \times \text{病毒原液稀释倍数}}{\text{每孔接种的病毒量}}$$

1.5 病毒理化性质测定 理化因素对病毒的影响很大,当受到某些理化因素作用时,其毒力会减弱甚至失活。鉴定病毒的理化性质,可了解一些重要的理化因素对病毒失活程度的影响。

最适生长温度的测定 在4组5mL细胞瓶中培养GCO单层细胞,接种PoRV悬液后,分别在15℃、20℃、25℃和30℃温度条件下培养,逐日观察。3h后取出,置冰箱冻存,冻融3次,取出备用,分别做10倍稀释至稀释度为 10^{-7} ,接毒于已长成GCO细胞单层的96孔板中,20℃培养,同时以只加培养液正常细胞为对照,逐天观察病变现象并记录。在第7h,96孔板经甲醛固定,结晶紫染色后拍照,并计算半数细胞感染剂量TCID₅₀(50% tissue culture infections dose)。

脂溶剂敏感性测定 取PoRV悬液加入1/4体积氯仿,振荡混合后于4℃放置4h,然后再以2000r/min离心10min,吸取上清置4℃待用。

pH稳定性测试 取PoRV悬液分为5组,分别用1mol/L盐酸调至pH2、pH1,用1mol/L NaOH调至pH10、pH11、pH12。25℃放置1h后,分别用1mol/L NaOH和1mol/L盐酸调回pH7,置于4℃待用。

热稳定性测试 取PoRV悬液,分3组,分别在50℃水浴30min、56℃水浴30min、56℃水浴60min,然后均置于4℃待用。未经处理的对照组病毒一直置于4℃待用。

DNA抑制剂阿糖胞苷(Ara-c)敏感性测定

Ara-c为一种DNA合成抑制剂,但对RNA和蛋白质的合成无显著抑制作用。用Ara-c处理已长成单层GCO细胞的96孔板1h后接毒,测算病毒滴度。接种病毒除PoRV之外,还有已知DNA病毒:蛙虹彩病毒RGV^[8];RNA病毒:大菱鲆弹状病毒^[9]及草鱼呼肠孤病毒^[10]。设不用Ara-c处理的对照板,接毒步骤同上。

经上述处理过的PoRV悬液分别10倍稀释至 10^{-7} ,按稀释度从 10^{-1} — 10^{-7} 接毒于已长成致密单层GCO细胞的96孔板中,测定TCID₅₀。

1.6 生长曲线的测定 取PoRV悬液10倍稀释至 10^{-3} ,接毒0.5mL于已长成致密单层GCO细胞的25cm²培养瓶中,一组8瓶,置于20℃温箱中培养,每间隔12h收取1瓶,置冰箱冻存,直至84h后,单层GCO细胞完全脱落为止。

将接毒12h、24h、36h、48h、72h、84h 6个时段、并冻存的系列细胞培养瓶取出,反复冻融3次后,10倍稀释至 10^{-7} 。将不同时间段的病毒按相应稀释度接毒于长成GCO细胞单层的96孔板中,2h后甲醛固定、染色。测算出不同时段病毒的滴度,并作病毒生长曲线图。

1.7 超微观察

超薄切片的制备与电镜观察 取用戊二醛固定的患病牙鲆组织,或将PoRV感染的GCO细胞,20℃培养1h后,用5%胰酶消化下贴壁细胞,1000r/min(Sigma离心机,12124pp转头)离心5s,使细胞沉淀下来,弃上清,加入戊二醛固定,置4℃保存过夜。制备超薄切片,电镜(JEM-1230)观察。

负染样品的制备与电镜观察 取PoRV病毒悬液,4℃6000r/min离心30min,取上清;然后12000r/min(sigma离心机,12024H转头),离心30min,留沉淀。沉淀用PBS缓冲液悬浮,取约10μL悬浮液滴到封口膜上,把铜网的碳面朝下贴在液滴表面,室温放置20min。滤纸吸干铜网碳面液滴后,再碳面朝下贴在浓度为2%的磷钨酸液滴表面,染色约3min,用滤纸吸干,电镜(JEM-1230)观察。

1.8 病毒提纯及其蛋白电泳分析 利用SDS-PAGE分析,可从分子水平了解PoRV主要蛋白的条数和分子量大小,从而与其他弹状病毒进行比较,并且间接鉴定样品纯度。

病毒扩增 在GCO细胞中大量扩增病毒,收集接毒2h后的细胞培养液,反复冻融3次后得到

病毒悬液。

病毒提纯 病毒悬液于 4℃ 下经 6000r/min (HIMAC 离心机, 转头为 RPR20-2-2174) 粗离 30min 后, 取上清于 4℃ 下 32000r/min (Beckman 离心机, 型号为 SW41) 超速离心 1.5h。沉淀用 1.5mL PBS 缓冲液悬浮, 经蔗糖梯度 (50%、35% 和 25%), 4℃ 下 28000r/min (Beckman 离心机, 型号为 SW41) 高速离心 1h。取出离心后的病毒带再次超离。得到沉淀分别用 100μL PBS 缓冲液重悬, 置于 -20℃ 冰箱冻存。除了牙鲆弹状病毒 PoRV 之外, 通过以上步骤还分别制备了大菱鲆弹状病毒(*Scophthalmus maximus rhabdovirus*, SMRV) 和鲤春病毒血症病毒 (Spring viraemia of carp virus, SVCV) 2 种提纯的病毒样品。

SDS-PAGE 电泳 取上述 3 种病毒样品, 分别与 SDS 上样缓冲液混匀, 100℃ 沸水浴 5min 后, 取出后立即置于冰上, 使病毒蛋白变性, 冷藏备用。制备聚丙烯酰胺凝胶以及准备 Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 加样后, 110V 条件下电泳约 2h, 至

标记染料刚抵达分离胶底部, 停止电泳。取出凝胶置于大平皿中, 考马斯亮蓝染色 1h, 然后室温下脱色 12h 后用清水洗净。

2 结 果

2.1 PoRV 可引起 7 种鱼类细胞产生病变

在接种了 PoRV 悬液的 12 种培养细胞 (表 1) 中, 先后有 GCO、EPC、FHM、GCF、CLC、FE 和 BB 等 7 种细胞出现了程度不一的病变。与正常细胞相比, EPC 和 FHM 大量脱落, 并形成大片无细胞区域; GCO 和 GCF 细胞部分脱落, 并呈散在分布, 未脱落细胞稀疏似网状; 感染的 CLC、FE 和 BB 细胞出现肿胀、堆积现象, 细胞脱落较少 (图 1)。不同细胞病变的时间长短也有所不同: GCO、EPC、FHM 和 GCF 细胞接毒后第 2 天就出现了明显病变, 而 BB 细胞到了第 3 天才出现不太明显的病变。结果表明 GCO 细胞对 PoRV 较敏感, 且病变时间适中, 便于观察。故后续实验除有注明外, 都是采用 GCO 细胞对病毒进行扩增。

表 1 用于 PoRV 感染实验的 12 种细胞系
Tab. 1 The 12 kinds of cell lines used in experiment

细胞系 Cells	简写 Abbreviations	参考文献 References
草鱼性腺(<i>Ctenopharyngodon idellus</i> ovaries)	GCO	[11]
鲤鱼上皮瘤(<i>Epithelioma papulosum cyprini</i>)	EPC	[12]
草鱼鳍条(<i>ctenopharyngodon idellus</i> fins)	GCF	[13]
肥头鲤(<i>Pimphales promelas</i>)	FHM	[14]
鲤鱼淋巴细胞(<i>Cyprinus carpio leucocyte</i> cell)	CLC	[15]
棕鲇(<i>Brown bullhead, Ameiurus nebulosus</i>)	BB	[16]
牙鲆胚胎(flounder embryo)	FE	[17]
草鱼肾(<i>Ctenopharyngodon idellus</i> kidney)	CIK	[18]
稀有鳊鲫卵巢(<i>Gobiocypris rarus</i> ovary)	GRO	本实验室尚未发表
白鲢囊胚(<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> blastula)	HMB	本实验室尚未发表
石斑鱼吻端细胞(Grouper proboscis)	GP	本实验室尚未发表
金鱼鳍(Goldfish fin)	CAR	[19]

2.2 PoRV 空斑分离

将不同稀释度的 PoRV 悬液接种到已长成 GCO 细胞单层的 24 孔板中, 2d 后有空斑形成, 空斑大小约 0.5—2mm。病毒稀释度越低 (如 10^{-3}) 的孔中, 空斑出现越早, 且空斑数量越多。接毒 7d 后, 空斑形成情况基本稳定; 在病毒稀释度最高 (10^{-7}) 的每个孔中, 仅形成 1—5 个空斑, 适宜

计数或挑斑分离。

用枪头挑取病毒稀释度为 10^{-5} 孔中的单个空斑, 接毒于长成单层 GCO 细胞的培养瓶中, 置 20℃ 培养。3d 后观察到大量 GCO 细胞病变脱落; 空斑测定显示其大小均匀, 表明已分离出牙鲆弹状病毒单一病毒株。根据公式, 计算得到 PoRV 的滴度约为 6.5×10^7 PFU/mL。

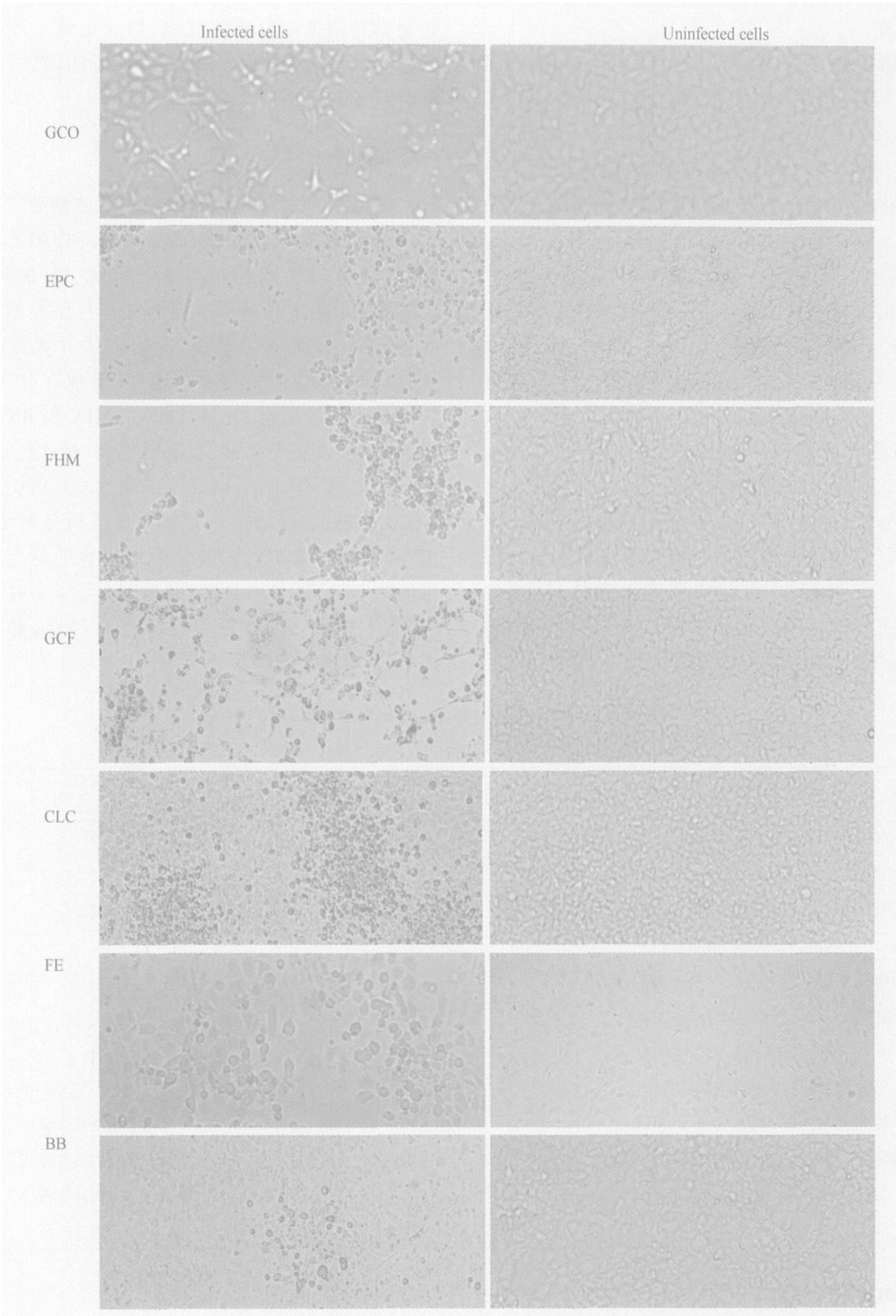


图 1 细胞病变的显微图片

Fig. 1 Micrograph of infected cells

左: 7 种细胞(GCO、EPC、FHM、GCF、CLC、FE 和 BB) 接毒后的病变情况; 右: 细胞对照(× 40)

Left: Cytopathogenic effects in the infected 7 cell lines (GCO, EPC, FHM, GCF, CLC, FE and BB) ; Right: uninfected cells (× 40)

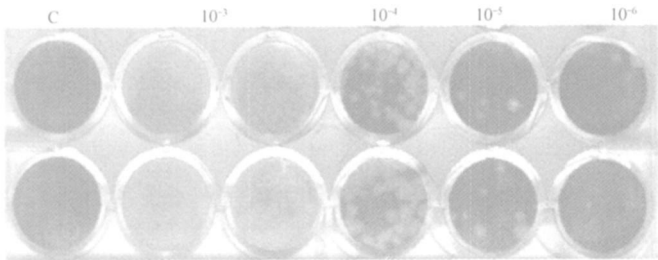


图 2 空斑图片

Fig. 2 The photograph of PoRV plaques

在接种了 PoRV 不同稀释度(10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})的 GCO 细胞板中形成的空斑, C: 正常细胞对照

Plaques of PoRV virus were produced in GCO cells plate with different dilutions

(10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), C: normal cells

2.3 PoRV 的理化性质

当 GCO 单层细胞接毒后, 分别置于 15、20、25 和 30℃ 4 种不同温度下培养, 结果测得病毒滴度依次为 $10^{5.3}$ 、 $10^{5.8}$ 、 $10^{2.5}$ 和 $10^{1.5}$ TCID₅₀。显示 20℃ 培养时, PoRV 滴度最高, 达到 $10^{5.8}$ TCID₅₀。可见 PoRV 的最适生长温度为 20℃。分别测定了经不同理化因

子作用后病毒的 TCID₅₀, 结果见表 2。经氯仿、56℃ 60min、pH2 60min, 以及 pH12 60min 处理后, 病毒完全失活, 表明 PoRV 对脂溶剂氯仿敏感, 但不耐热和酸。当用 DNA 抑制剂(Ara-c) 处理后, 病毒滴度几乎没有改变, 这是由于 PoRV 是弹状病毒, 其基因组是 RNA。

表 2 PoRV 对各种理化因子的敏感性

Tab. 2 PoRV titres after treatments with different physical chemistry factors

理化因子	对照	氯仿	50℃	56℃	56℃	pH2	pH11	pH12	Ara-c
Physical chemistry factors	Control	Chloroform	30min	30min	60min	60min	60min	60min	
TCID ₅₀	$10^{6.5}$	0	$10^{3.5}$	$10^{1.5}$	0	0	$10^{3.5}$	0	$10^{6.5}$

2.4 PoRV 的生长曲线

以感染病毒的细胞培养时间为横坐标, 以病毒滴度为纵坐标绘制 PoRV 生长曲线(图 3)。可见从 0—35h, 病毒滴度不断升高, 显示 PoRV 在这一时期处于复制活跃期; 36h 到达峰值。在感染后 37—48h, 病毒滴度达到最高并持平, 此时, 病毒复制与细胞病变处在一个平稳期。48h 之后, 由于宿主细胞病变并脱落, 病毒滴度逐渐减小, 直至 84h 时细胞完全脱落。

2.5 PoRV 形态及宿主细胞的超微病变

细胞超薄切片和病毒负染电镜观察, 表明 PoRV 颗粒是大小约为 60nm × 200nm 的典型子弹状颗粒(图 4)。通过高倍放大或负染电镜观察, 可见有的病毒颗粒呈现直径约 20nm 的浅染中心(图 4C)。成熟的病毒粒子可通过细胞膜出芽, 释放到胞膜外(图 4A); 也可从细胞内膜出芽, 进入胞质囊泡中(图 4B)。形成含成熟病毒粒子数目不等的囊泡。一个宿主细胞中可含多个这样大小不一的囊泡。多数 PoRV 感染的 GCO 细胞的超微结构遭到破坏, 核固缩, 核膜分离, 线粒体肿胀、脊消失, 胞质中出现大量空泡、甚至整个细胞裂解。

2.6 PoRV 的蛋白图谱

经 SDS-PAGE, 对牙鲆弹状病毒 PoRV 结构蛋白分析, 结果显示, PoRV 有 L、G、N、P 和 M 等 5 条主要结构蛋白带(图 5)。对 3 种病毒蛋白图谱进行比较(表 3), 可见其分子量存在明显差异。另外, 在总蛋白中 N 蛋白的含量, PoRV 要高于其他两种病毒。

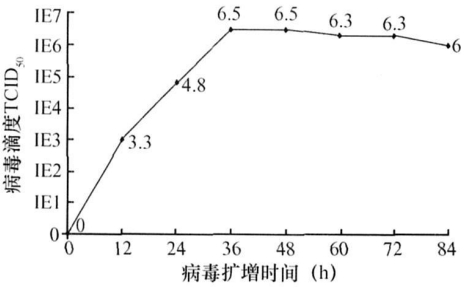


图 3 病毒生长曲线

Fig. 3 The growth curve of PORV replication

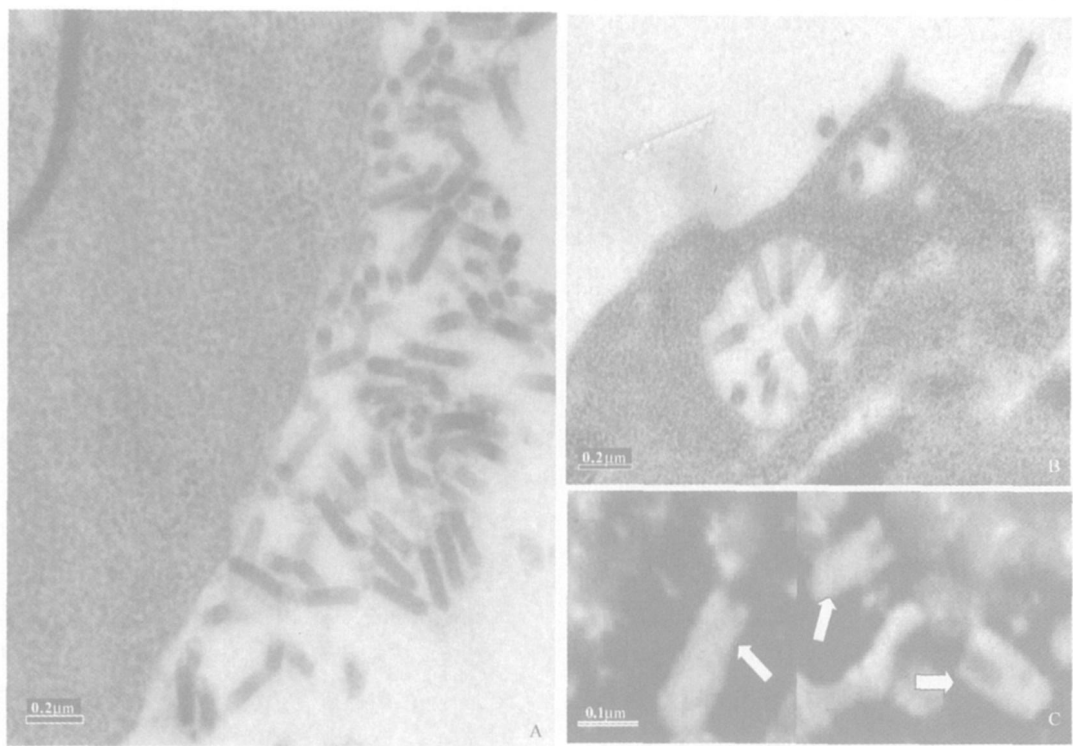


图 4 电镜图片

Fig. 4 Electron micrograph

A. B. 感染细胞的超薄切片(标尺 0.2 μm); C. 病毒负染图片(标尺 0.1 μm)

A. B The ultrathin section of PoRV host cells(bar 0.2 μm); C: The negatively stained viral particles(bar 0.1 μm)

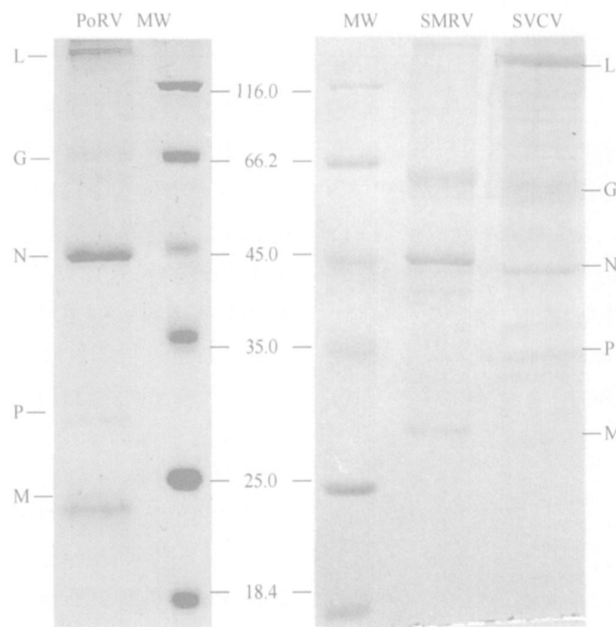


图 5 鱼类三种弹状病毒的蛋白图谱

Fig. 5 Structural proteins of three rhabdovirus

PoRV、SMRV、SVCV 分别是从小黄鱼、大菱鲆和鲤鱼中分离 MW 标准分子量; L: RNA 聚合酶; G: 糖蛋白; N: 核蛋白; P: 磷蛋白; M 基质蛋白

PoRV: flounder *Paralichthys olivaceus* rhabdovirus. SMRV: *Scophthalmus maximus* rhabdovirus. SVCV: Spring viraemia of carp virus. MW: standard molecular weight markers. The 5 structural protein bands are separately indicated on the left. L: Polymerase; G: Glycoprotein; N: Nucleoprotein; P: Phosphoprotein; M: Matrix protein

表3 鱼类 3 种弹状病毒的主要蛋白比较
Tab. 3 Comparison of structure proteins of fish rhabdoviruses

	L (kD)	G (kD)	N (kD)	P (kD)	M (kD)
PoRV	250	67	44	30	23
SMRV	250	58	47	42	28
SVCV	238	57	45	35	27

3 讨 论

利用电镜超微观察、鱼类细胞培养、空斑分离、理化性质测定、结构蛋白的分析等技术方法, 分离鉴定出一株鱼类弹状病毒(PoRV)。经超微观察, PoRV 从宿主细胞中成熟具有与其他弹状病毒类似的出芽方式^[20], 该病毒能引起多种鱼类细胞产生病变, 显示了其对鱼类细胞的强感染性。同时 PoRV 对有机溶剂氯仿的敏感性、对 DNA 抑制剂 Ara-c 的非敏感性等, 这些都是弹状病毒的特征。SDS-PAGE 分析, 也表明 PoRV 有 5 种主要蛋白, 分布情况也与已知弹状病毒的 5 种结构蛋白相对应。

但是, 从形态大小来看, PoRV 为 60nm×200nm, 其长短直径比值超过 3, 不仅比弹状病毒属的代表株狂犬病毒 Rabies Virus (75nm×180nm) 要大, 也比已知的其他几种鱼类弹状病毒, 如鲤春病毒血症病毒 SVCV (70nm×180nm)、病毒性出血败血症病毒 VHSV (70nm×200nm)、鳊鱼弹状病毒 SCR (100nm×200nm) 等^[21, 22]要大, 或者有所不同。PoRV 对酸敏感, 但对碱有耐性。通常当 pH 达到 10 后, 病毒 1h 内即可灭活, 但是使 PoRV 完全灭活的碱度达到 pH12, 其原因还有待进一步查明。

近些年, 国内虽在生产实践中已注意到牙鲆弹状病毒的危害, 并尝试采用一些防治措施, 但尚未对病毒病原进行鉴定和研究。另有报道, 在美国已分离鉴定了一株称为 SFRV (flounder rhabdovirus) 的牙鲆弹状病毒^[1], 但 SFRV 无论在大小 (50nm×100nm)、最适培养温度 (15℃), 还是 5 种主要结构蛋白的分子量 (L: 150—190kD; G: 57kD; N: 46kD; P: 36kD 和 M: 24kD) 都有差别。与大菱鲆弹状病毒 SMRV 和 SVCV 的结构蛋白分子量也有所不同。尽管 PoRV 在形态学、病原学以及蛋白图谱等方面与已知鱼类弹状病毒都存在差异, 但要确定 PoRV 是否是一株新的鱼类弹状病毒, 则还有待进一步提供分子生物学的证据。

参考文献:

[1] Mork C, Hershberger P, Kocan R, et al. Isolation and characterization

of a rhabdovirus from starry flounder (*Platichthys stellatus*) collected from the northern portion of Puget Sound, Washington, USA [J]. *J Gen Virol*, 2004, **85**(Pt 2): 495—505

[2] Dixon P F, Longshaw C B. Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus [J]. *Dis Aquat Organ*, 2005, **67**(1—2): 25—29

[3] Nishizawa T, Savas H, Isidan H, et al. Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(4): 2373—2378

[4] Zhang Q Y, Tao J J, Huang X H, et al. Coinfection of two *Siniperca chuatsi* virus and morphologic changes of the infected cells [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, 2005, **29**(5): 473—478 [张奇亚, 陶建军, 黄晓红, 等. 两种鳊病毒的共感染现象及引起感染细胞的超微变化. 水生生物学报, 2005, **29**(5): 473—478]

[5] Zhao Z, Lu Y. Establishment and characterization of two cell lines from bluefin trevally *Caranx melampygus* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2006, **68**(2): 91—100

[6] Chen Z Y, Liu H, Li Z Q, et al. Detection of viral pathogen from diseased common carp (*Cyprinus carpio*) by infectious tests [J]. *Journal of Fisher Sciences of China*, 2006, **13**(4): 617—623 [陈中元, 刘荭, 李正秋, 等. 鲤病毒病原的感染性测定. 中国水产科学, 2006, **13**(4): 617—623]

[7] Ruan H M, Li Z Q, Zhang Q Y. Formation process of inclusion bodies of the Chinese sucker rhabdovirus in an infected fish cell line [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, 2002, **26**(5): 555—559 [阮红梅, 李正秋, 张奇亚. 胭脂鱼弹状病毒对鲤科鱼类感染性的测定. 水生生物学报, 2002, **26**(5): 555—559]

[8] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* [J]. *Dis Aquat Org*, 2000, **42**: 1—9

[9] Du C S, Zhang Q Y, Li C L, et al. Induction of apoptosis in a carp leucocyte cell line infected with turbot (*Scophthalmus maximus*) rhabdovirus [J]. *Virus Research*, 2004, **101**: 119—126

[10] Fang Q, Attoui H, Biagini J F, et al. Sequence of genome segments 1, 2 and 3 of the grass carp reovirus (Genus aquareovirus, family reoviridae) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **274**: 762—766

[11] Zhang Q Y, Ruan H M, Li Z Q, et al. Infection and propagation of lymphocystis virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines [J]. *Dis Aquat Org*, 2003, **57**(1—2): 27—34

[12] Fijan N, Sulimanovic D, Berzotti M, et al. Some properties of the *Epithelium papulosum cuprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Ann Virol (Paris)*, 1983, **134E**: 207—220

[13] Lu Y A, Lannan C N, Rohovec J S, et al. Fish cell lines: establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, **26**(3): 275

[14] Gravel M, Malsberger R G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1965, **126**: 555—565

[15] Faisal M, Ahne W. A cell line (CLC) of adherent peripheral blood mononuclear leucocytes of normal common carp *Cyprinus carpio* [J].

- Dev Comp Immunol*, 1990, **14**(2): 255—260
- [16] Bowser P R, Plumb J A. Channel catfish virus: comparative replication and sensitivity of cell lines from Channel catfish ovary and the brown bullhead [J]. *J Wildl Dis*, 1980, **16**(3): 451—454
- [17] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, *et al.* Establishment of a continuous embryonic line from flounder (*Paralichthys olivaceus*) for virus isolation [J]. *Disease of Aquatic Organism*, 2004, **60**: 241—246
- [18] Zuo W G, Qian H X, Xue Y F, *et al.* Establishment of grass carp kidney cell line (CIK) [J]. *Fresh-water Fisheries* (in Chinese), 1986, **10**(1): 11—17 [左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性. 水产学报, 1986, **10**(1): 11—17]
- [19] Mitani H. Lethal and mutagenic effects of radiation and chemicals on cultured fish cells derived from the erythrophoroma of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Mutat Res*, 1983, **107**(2): 279—288
- [20] Granzow H, Weiland F, Fichtner D, *et al.* Identification and ultrastructural characterization of a novel virus from fish [J]. *Journal of General Virology*, 2001, **82**: 2857
- [21] Wolf K. Fish viruses and fish viral diseases [M]. Ithaca, NY: Cornell University Press 1988
- [22] Zhang Q Y, Li Z Q. Three different viruses observed from the tissues of diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44**(2): 192—195 [张奇亚, 李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到三种病毒. 科学通报, 1999, **44**(2): 192—195]

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A RHABDOVIRUS FROM DISEASED FLOUNDER *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

GUI Lang^{1,2,3}, LI Zheng-Qiu¹ and ZHANG Qi-Ya¹

(1. Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; 3. Graduate school of the Chinese Academy of sciences, Beijing 100039)

Abstract: The family *Rhabdoviridae* contains the genera *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, *Cytohhabdovirus* and *Nucleorhabdovirus*, belong to the order *Mononegavirales*. More than 175 rhabdoviruses have been reported from many different species of fish and other life forms. Rhabdoviruses constitute one of the largest groups of viruses isolated from teleost fish. The viruses are mostly associated with epizootics and heavy losses in piscine aquaculture. A rhabdovirus pathogenic virus isolated from diseased fish flounder *Paralichthys olivaceus* (PoRV). The tissues extracted from the diseased flounder, filtered through a filter membrane to get rid of bacteria, and 12 fish cell lines, *Ctenopharyngodon idellus* ovaries (GCO), *Epithelioma papulosum cuprini* (EPC), *Ctenopharyngodon idellus* fins (GCF), *Pinephales promelas* (FHM), *Cyprinus carpio leucocyte* cell (CLC), Brown Bullhead (BB), Flounder embryo (FE), *Ctenopharyngodon idellus* kidney (CIK), *Gobiocypris rarus* ovary (GRO), *Hypophthalmichthys molitrix* blastula (HMB), Grouper proboscis (GP) and Goldfish fin (CAR), etc. were challenged with the extracts. Observation of the cytopathogenic effect appeared in GCO, EPC, FHM, GCF, CLC, FE and BB 7 of these cell lines. It is supported that PoRV was the viral pathogen of the diseased flounder. The plaques of PoRV virus were produced in GCO cells plate with 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} series dilutions, and after plaque assays and isolation, PoRV titers of about $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL were obtained by infecting the grass carp ovary (GCO) cells. The growth curve of PoRV was determined, a growth curve for the virus obtained from persistently infected GCO cell layers. The growth curves of the virus showed an initial exponential rise and reached a maximal constant value from 0 to 36 hours. The viruses were purified by differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation from GCO cells infected. Electron microscopy observation showed that the viral particles of ultrathin sections from host cells and negatively stained from purified virus had typical bullet shape and was about 60nm × 200nm in size. The physical and chemical properties were detected. Monolayers of GCO cell cultures were infected with 10-fold dilutions of the tissues isolated after incubated 30 to 60min at 50 and 56 °C. PoRV isolate was mixed with 1/4 volume of chloroform, then the mixtures were shaken and centrifuged at 2000r/min for 10min to separate the chloroform from the aqueous phase of the treated sample. Stability at selected pH levels, from pH1 to 12, was tested by incubating PoRV isolate in medium adjusted to each pH by the 1mol/L HCl or 1mol/L NaOH, after 1h incubation at 25 °C, and the samples were adjusted to pH 7. PoRV isolation was treated with 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-c). Then all the treated samples of PoRV infectivity were titrated as compared to the control (no treatment, or treatment other viruses). The results were shown that PoRV was temperature and lipid solvent sensitivity, but insensitivity to pH and Ara-c. SDS-PAGE analysis of the purified PoRV particles indicated that the structural proteins of PoRV were mainly composed of L (Polymerase), G (Glycoprotein), N (Nucleoprotein), P (Phosphoprotein) and M

(Matrix protein) 5 polypeptide with the molecular weights about 250, 67, 44, 30 and 23 kD, respectively. The data shows that PoRV is a kind of fish rhabdovirus and very closely resembled *Scophthalmus maximus* rhabdovirus (SMRV) and Spring viraemia of carp virus (SVCV).

Key words: Fish; Flounder *Paralichthys olivaceus*; Rhabdovirus; Physical and chemical properties; Structural proteins