

# 紫外线诱变建立草鱼抗出血病 病原病毒的 AHZC88 细胞株\*

李亚南 毛树坚

(杭州大学生物研究所)

**提要** 通过 UV 对草鱼出血病病原病毒敏感的草鱼 ZC 7901 细胞株反覆诱变, 获得了对出血病病原病毒具有抗性的 AHZC 88 细胞株。经生物学特性测定, AHZC 88 细胞的染色体  $2n = 48$ , 温度适应范围  $4^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ , 最适生长温度  $27^{\circ}\text{C}$ , 分裂指数在 36 小时时达最高值。经病原病毒的人工侵染等试验表明, AHZC 88 细胞不受草鱼出血病病毒感染。在电镜切片观察中, 细胞内不见病毒颗粒。LDH 同工酶分析, 比敏感细胞少 1 条酶带。

**关键词** 草鱼出血病, 抗病细胞株, 呼肠孤病毒, 小 RNA 病毒

陈燕桑等曾从草鱼 (*Otenopharyngodon idellus* C. et V.) 患出血病病鱼中分离到一种呼肠孤病毒 (Reovirus)<sup>[10]</sup>, 作者等又在病理细胞中发现并分离到一种属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 的病毒。该两种病毒的感染, 都能使草鱼复制出典型的出血病<sup>[1,2]</sup>。为进一步探索抗病原病毒的因子和培育抗病草鱼新品种, 有必要建立抗病的草鱼细胞株。本文利用对两种病原病毒敏感的草鱼 ZC 7901 细胞株, 经过紫外线 (UV) 诱变筛选, 获得了突变株 AHZC 88 细胞。经生物学特性鉴定及感染试验等表明, AHZC 88 细胞是 ZC 7901 细胞的突变株, 对草鱼出血病的病原病毒具有抗性。

## 材 料 和 方 法

### 1. 细胞培养与病毒感染

**细胞** 草鱼吻端组织 ZC 7901 细胞株, 继代培养 60 次。该细胞株已经证实对草鱼出血病病原病毒极敏感。在培养瓶或 96 孔微量培养板中常规培养<sup>[5,21]</sup>。

**病毒液** 从典型出血病病鱼组织分离得混合病毒及纯化后的呼肠孤病毒 (RV)、小 RNA 病毒 (PV)<sup>[22]</sup>, 用维持液稀释成  $10^{-1}$  悬液。

**病毒感染** 用病毒液感染细胞 60 分钟后, 洗去病毒液, 加维持液  $27^{\circ}\text{C}$  培养。以不加病毒液的细胞作对照。

**TCID<sub>50</sub> 测定** 用 96 孔微量培养板 (Caster 或 Facolb) 测定 TCID<sub>50</sub> 值<sup>[11]</sup>, 即为病毒滴度。以滴度高低作判断细胞敏感性强弱的依据。

### 2. 抗性细胞的筛选

**病毒筛选** 用混合病毒或个别的两种病毒感染传代后培养 3 天左右, 长成单层的 ZC 7901 细胞。培

\* 本文是 863-101-08-32 课题的部份工作。

收稿年月: 1989 年 7 月; 同年 12 月修改。

养8天后,选出无CPE的培养瓶(孔)中细胞进行继代扩增。重复3次。

UV诱变筛选 取 $1 \times 10^6$ 细胞/毫升的细胞悬液3毫升置50毫米培养皿中,紫外线照射5分钟<sup>[13]</sup>,换培养瓶培养。当有10~20%的存活细胞贴壁后,换新鲜培养液,使细胞长成单层。然后病毒筛选,重复3次。

筛选的全过程是,①病毒筛选 I(混合病毒感染3次)→②UV诱变筛选 I(混合病毒感染3次)→③UV诱变筛选 II(混合病毒感染3次)→④病毒筛选 II(RV感染3次)→⑤UV诱变筛选 III(RV感染3次)→⑥UV诱变筛选 IV(RV感染3次)→⑦病毒筛选 III(PV感染3次)→⑧UV诱变筛选 V(PV感染3次)→⑨病毒筛选 IV(混合病毒感染3次)→⑩获得抗性突变株 AHZC 88 细胞。

### 3. 细胞溶解物感染试验

将受混合病毒感染的 ZC 7901 细胞及 AHZC 88 细胞分别经过 8、48 小时培养,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融后用维持液稀释 10 倍,即成两种细胞溶解物。

### 4. 抗性测定

ZC7901 细胞与 AHZC 88 细胞分别培养于 96 孔微量培养板,俟孔中细胞长满后加入病毒液作感染处理。以不加病毒液的细胞作对照。在对照细胞开始老化时,统计培养板中出现 CPE 的孔数,计算抗性程度。抗性程度(%) = 未出现 CPE 的孔数/受试细胞的总孔数  $\times$  %。又取前述两种细胞溶解物分别对 ZC 7901 细胞与 AHZC 88 细胞作抗性测定。

### 5. 电镜样品制备

取经 PV 感染后 5 天的 ZC 7901 细胞、AHZC 88 细胞按常规方法作电镜切片观察<sup>[9]</sup>。

### 6. 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶分析

取生长良好的 ZC 7901 细胞与 AHZC 88 细胞,经  $-20^{\circ}\text{C}$  冻融匀浆,制成电泳样品,采用高 pH 不连续系统聚丙烯酰胺管状电泳<sup>[12,14]</sup>。

7. 生物学特性鉴定,均按有关常规方法进行<sup>[6,7]</sup>。

## 结 果

1. ZC 7901 细胞对 RV 与 PV 都极敏感,结果见表 1。表中各第 1 次试验的病毒,是来自病鱼组织分离所得,第 2~5 次试验的病毒,是在细胞中经过逐次传代后的细胞病毒。

表 1 ZC 7901 细胞受病毒感染后的敏感性

Tab. 1 The sensitivity of the ZC 7901 cells infected by viruses

病 毒	混 合 病 毒					RV				PV				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	I	II	III	IV	V
受试细胞总孔数	5	6	4	5	5	5	6	4	4	6	10	7	5	6
出现 CPE 孔数	4	5	4	5	5	8	4	4	4	4	8	6	5	6
感染率(%)	80	83	100	100	100	60	67	100	100	67	80	85	100	100
对照 CPE/细胞孔数	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

TCID<sub>50</sub> 测定结果,混合病毒为  $10^{-5}$ ,RV 为  $10^{-2.06}$ ,PV 为  $10^{-2.25}$ 。

2. 抗性细胞的筛选 经过病毒筛选和 UV 诱变筛选后,获得的突变株 AHZC 88 细胞,对两种病毒的抗性程度达到 100%,结果见表 2。

3. 细胞溶解物感染试验(结果见表 3)

表2 筛选过程中抗性程度递增的变化

Tab. 2 Progression of resistance in the selective mutation of ZC 7901 cells

筛选过程		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
抗性程度 (%)	筛选细胞	7.5	37.5	81.25	87.5	75.2	89.63	85	87	98	100
	对照细胞	6.8	4.2	6.8	4.2	4.2	4.2	6.8	4.2	2.1	4.2

表3 细胞溶解物对 ZC 7901 细胞、AHZC 88 细胞的感染结果

Tab. 3 Result of the ZC 7901 and AHZC 88 cells infected by the cellular lysate

细胞溶解物 ↓ 受感染细胞	抗性程度		存活细胞培养后果
	培养8小时	培养48小时	
ZC 7901 细胞溶解物 ↓ ZC 7901 细胞	25%	17%	(1) 将发生 CPE 孔中的幸存细胞挑出培养, 2次传代后出现 CPE, 最后死亡。 (2) 从不出现 CPE 的孔中挑出细胞培养, 2次传代后部份细胞出现 CPE。
ZC 7901 细胞溶解物 ↓ AHZC 88 细胞	98%	97%	(1) 将发生 CPE 孔中的幸存细胞挑出培养, 2次传代后细胞生长良好, 可以长成单层。 (2) 从不出现 CPE 的孔中挑出细胞培养, 2次传代后细胞生长正常。
AHZC 88 细胞溶解物 ↓ ZC 7901 细胞	100%	100%	
AHZC 88 细胞溶解物 ↓ AHZC 88 细胞	100%	98%	

4. 电镜观察 电镜下分别检查受 PV 感染过的 ZC 7901 细胞与 AHZC 88 细胞各 30 个, 在 ZC 7901 细胞中发现细胞结构受损及含有 PV 的囊泡, 也看到 PV 增殖时形成的颗粒(图版, 4), AHZC 88 细胞则结构正常, 不见病毒颗粒。

5. LDH 同工酶分析 ZC 7901 细胞的 LDH 同工酶出现 6 条酶带, 而 AHZC 88 细胞只有 5 条酶带(图版, 5)

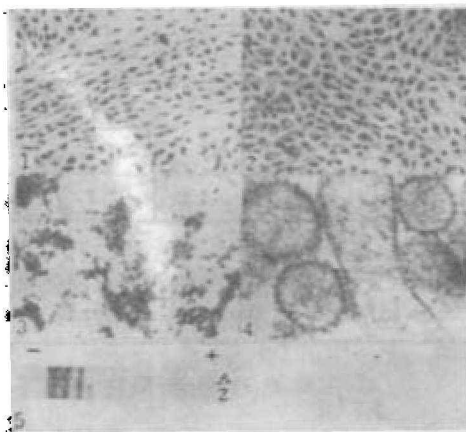
6. 细胞生物学特性测定

(1) 细胞形态见照片(图版, 1—3)。

(2) 在 4°C、10°C、16°C、20°C、27°C、32°C、37°C、38°C 各温度下培养, AHZC 88 细胞的最适温度为 27°C, 与 ZC 7901 细胞基本相同。AHZC 88 细胞在 32°C 时生长虽然加快, 但仍然良好, 未见老化; 37°C 时细胞仍能保持缓慢生长; 38°C 以上时仍有少数细胞存活。说明 AHZC 88 细胞对温度的适应范围较广, 在高温区也更耐热。

(3) AHZC 88 细胞在 27°C 接种 4~5 天时, 细胞数目达最高峰, 不久即见生长停顿并逐渐老化。

(4) 据 1000 以上细胞的统计, AHZC 88 细胞的分裂指数在 36 小时时为最高, 达 42.7%。



图版说明 草鱼 ZC 7901 细胞株与 AHZC 88 细胞株的比较

Expansion of Plate The Comparison between the cell Strains AHZC 88 and ZC 7901 of grass carp

1. ZC 7901 细胞, Giemsa 染色,  $\times 300$ 。2. AHZC 88 细胞, Giemsa 染色,  $\times 300$ 。3. ZC 7901 细胞经 Reovirus 与 Picornavirus 接毒后发生 CPE, 细胞变圆、脱落, 解体, Giemsa 染色,  $\times 300$ 。4. Picornavirus 在 ZC 7901 细胞中增殖, 病毒颗粒在囊泡膜上形成。 $\times 30K$ , H-300 电镜。5. 电泳图谱: A 为 AHZC 88 细胞株 LDH 同工酶 (5 条酶带); Z 为 ZC 7901 细胞株 LDH 同工酶 (6 条酶带)。

(5) 据 190 个分裂相的统计, AHZC 88 细胞株的染色体众数  $2n = 48$ , 占分裂相总数的 67.4%,  $2n \neq 48$  的占 32.6%。染色体数目的分布见表 4。

表 4 AHZC 88 细胞株染色体数目的分布

Tab. 4 Range of chromosome number of cell strain AHZC 88

染色体数	16	21	22	24	26	31	32	34	37	41	42	45	48	50	55	58	61	82	90	96
分裂相数	1	1	2	2	2	4	5	3	6	9	3	4	128	3	1	3	1	2	1	1

## 讨 论

1. ZC 7901 细胞早已证实对草鱼出血病病原病毒极为敏感<sup>[9]</sup>。本文进一步证实, 无论是直接来自病鱼组织的混合病毒, 还是分离纯化的 RV 和 PV, 当病毒在细胞内经过 3~4 代细胞的适应性感染传代后, 对 ZC 7901 细胞的感染率都达到 100%, 与邓初夏等的结果基本一致<sup>[9]</sup>。TCID<sub>50</sub> 测定表明, 混合病毒、RV、PV 的病毒滴度分别为  $10^{-5}$ 、 $10^{-2.06}$ 、 $10^{-2.25}$ 。在本文所有的感染试验中, 病毒的浓度都是  $10^{-1}$ , 毒力完全在 TCID<sub>50</sub> 以上, 足以引起细胞发生 CPE, 因此所进行的抗性试验是可靠的。

2. ZC 7901 细胞虽然对两种病毒极为敏感, 但在受病毒感染时, 仍有少数细胞幸存下来。这提示少数 ZC 7901 细胞中可能存在有可以抵制病毒侵染的抗性因子。从表 1、2 看, 存活率少的是 2.1%, 多的达 40%, 因而推测相关抗性因子必然是复杂而多态性的, 在不同的条件下存活率有所不同。表 1 显示, 病毒的来源对存活率有关系, 直接来自病鱼组织的病毒, 毒力较小, 随着宿主细胞的增殖传代, 病毒的毒力增加。本文所使用的病毒筛选, 是使敏感细胞在病毒的压力下淘汰, 而抗性细胞被保留扩增; 同时在 UV 诱变筛选下使向抗性方向突变的细胞增多而又被保留。在筛选过程中曾有二次抗性程度下降, 这可能是由于 UV 照射而有细胞向更敏感方向突变<sup>[15]</sup>, 但在病毒的压力下, 最后终于使抗性程度达到 100%。

3. 细胞溶解物试验表明, ZC 7901 细胞在经受病毒感染后携带病原病毒, 因而使用其溶解物再侵染敏感细胞时, 就能使敏感细胞出现 CPE。AHZC 88 细胞具有抗性, 虽经

病毒感染,但其溶解物不含病原病毒,不使敏感细胞发生 CPE。AHZC88 细胞在遭受 ZC 7901 细胞溶解物侵染时,不发生 CPE 或只发生极少数的 CPE。如将极少数 CPE 培养孔中幸存细胞挑出培养,细胞生长正常。因而证明, AHZC 88 细胞确实具有抗病毒能力,极少数 CPE 现象并非是病毒感染所致,可能是溶解物中含有细胞破碎后的毒物(如水解酶)所引起<sup>[5]</sup>,可以排除细胞有潜伏病毒的可能性。

4. 鱼类的 LDH 同工酶国内外有过若干报道<sup>[4,18,16]</sup>。吴力钊等<sup>[4]</sup>报道草鱼的 LDH 至少有 3 个基因座位(Ldh-A、Ldh-B、Ldh-C),但在一般组织中可检测出由 LDH-A、LDH-B 亚基组成的 5 种 LDH 同工酶和 1 条遗传基础和亚基组成尚不清楚的 LDH-X 酶带<sup>[4]</sup>。ZC 7901 细胞具有 6 条酶带,与一般组织的 LDH 酶带一致。但 AHZC 88 细胞在阳极方向少 1 条相当于 LDH-B 的酶带。这可能是 UV 的照射而导致 Ldh-B 基因表达的变化。抗性细胞 Ldh-B 基因表达的变化既是区别于敏感细胞与突变株细胞的重要标志,又可以用以分析抗性因子相关的遗传结构。

5. ZC 7901 细胞是成纤维细胞型与上皮细胞型混合的细胞,经诱变筛选后的 AHZC 88 细胞仍是混合型的细胞株,但上皮细胞型的细胞增多;染色体数仍为 48,但分布频率有扩散的趋势。AHZC 88 细胞的生长速度也类似于 ZC 7901 细胞,但在高温区的适应性比 ZC 7901 细胞略强。这表明 AHZC 88 细胞在生物学特性与遗传结构上与 ZC 7901 细胞株无很大的差异。在连续 6 个月的每月一次抗性程度检测中,抗性程度一直保持 100%,没有出现回复突变,说明 AHZC 88 细胞株是稳定的。

### 参 考 文 献

- [1] 毛树坚等,1988. 草鱼出血病两种病原病毒的细胞病理观察. 海洋与湖沼,19:435—438.
- [2] ———,1989. 草鱼出血病的病原研究. 水产学报,13:1—4.
- [3] 邓初夏,1985. 几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤病毒敏感性的研究. 水生生物学报,9:351—357.
- [4] 吴力钊等,1987. 草鱼同工酶发育遗传学研究, I. 不同组织器官的同工酶分析. 遗传学报,14:278—286.
- [5] 吴克复,1982. 动物组织培养技术,246 页. 科学出版社(京).
- [6] 李国珍,1985. 染色体及其研究方法,127—145. 出版社同上.
- [7] 周焕庚等,1974. 人体微量血液体外培养制备染色体标本简易方法. 中华医学杂志,54:368—370.
- [8] 张念慈等,1981. 草鱼吻端组织细胞株 ZC 7901 及其亚株 ZC 7901s<sub>1</sub> 的建立. 实验生物学报,14:101—105.
- [9] 张景强等,1987. 生物电子显微镜技术,40—59. 中山大学出版社.
- [10] 陈燕桑等,1983. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究. 科学通报,28:1133—1140.
- [11] 郑志明,1986. 医学病毒学,535—542. 上海科学技术出版社.
- [12] Loening, U. E., 1967. Fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by poly-acrylamide-gel electro-phoresis. *Biochem. J.*, 102: 251—257.
- [13] Lush, I. E. et al., 1969. The lactate dehydrogenase isozymes of twelve species of flatfish (*Heterosomata*). *J. Exp. Zool.*, 171: 105—117.
- [14] Siciliano, M. J. et al., 1976. Zone electrophoresis. in: "Chromatographic and electrophoretic techniques" 2: 185—209, I. Smith Ed., Academic Press, New York and London.
- [15] Thompson, L. H., 1979. Mutant isolation. in: "Enzymology: Cell Culture" 58: 308—322, W. B. Jakobby et al., Ed. Academic Press, New York and London.
- [16] Wilson, F. R. et al., 1973. Lactate dehydrogenase and melate dehydrogenase isozyme patterns in tissue of temperature-acclimated goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 46:105—116
- [17] Wolf, K., 1982. Fish cell culture. in: "Advances in cell culture" 2: 322—329, K. Maramotosch Ed., Academic Press, New York and London.

**ESTABLISHMENT OF CELL STRAIN AHZC 88 RESISTANT TO  
PATHOGENIC VIRUSES OF GRASS CARP HEMORRHAGE  
BY ULTRAVIOLET (UV) INDUCEMENT**

Li Yanan and Mao Shujian

*(Biological Research Institute, Hanzhou University)*

**ABSTRACT** The cell strain AHZC 88 of anti-hemorrhage of grass carp has been obtained by repeatedly UV inducement on strain ZC 7901 from the snout tissue cell sensitive to hemorrhage of grass carp. Identification of its biological characteristic showed that its chromosome number was  $2n = 48$ , the range of its suitable temperature was between 4–38°C, the optimal growth was 27°C, and mitotic index reached to maximum in 36 hours. The infective test with the pathogenic virus of hemorrhage proved that the cell strain AHZC 88 was not infected with the hemorrhage virus. The observation under electron microscope showed that there was no virosome in the cell of strain. The analysis of LDH isoenzyme displayed five zones which were different from the sensitive cell strain.

**KEYWORDS** hemorrhage of grass carp, anti-disease cell strain, reovirus, picornavirus