



罗非鱼湖病毒对吉富罗非鱼和E-11细胞的感染

李嘉波¹, 秦真东², 赵丽娟², 刘志刚³, 可小丽³,
吴灶和², 刘小玲¹, 卢迈新^{3*}, 林 鑫^{2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225;

3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带
水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 为研究罗非鱼湖病毒在吉富罗非鱼体内和敏感细胞E-11中的感染特性, 实验首先从人工感染罗非鱼湖病毒的吉富罗非鱼脾脏中获得罗非鱼湖病毒第4片段基因组, 其cDNA全长1 250 bp, 开放读码框长度为1 065 bp, 编码354个氨基酸。通过进化树分析, 该蛋白是罗非鱼湖病毒血凝素—酯酶融合蛋白(HEF)。随后通过在大肠杆菌大量表达和提纯GST融合HEF蛋白, 免疫新西兰大白兔, 制备了兔抗TiLV-HEF多克隆抗体。ELISA结果显示获得的抗血清效价高于1:51 200, 并且获得的抗体可以特异性识别病毒的TiLV-HEF蛋白。人工感染实验结果显示, TiLV的感染造成鱼体表面溃疡、全身性出血以及眼晶状体混浊等症状。H.E染色结果显示, 肝脏形成合胞体, 脾脏中含铁血黄素增加和部分细胞空泡变性。头肾出现淋巴细胞坏死, 体肾蛋白质沉淀和肾小球坏死等病理症状。Western blot和免疫组织化学结果显示该病毒在所有组织中均有分布, 其中脾脏、头肾和鳃中的病毒丰度高于肝脏、体肾和脑组织。通过细胞间接免疫荧光实验, 发现TiLV感染E-11细胞后, HEF蛋白在细胞质中。TiLV可以通过感染吉富罗非鱼幼鱼的肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃和脑等组织而引起疾病。

关键词: 吉富罗非鱼; E-11细胞; 罗非鱼湖病毒; HEF蛋白; 多克隆抗体; 免疫组化

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

罗非鱼是世界主要养殖鱼类, 2016年产量超过420万t^[1], 我国罗非鱼产量2017年达170多万t, 是全球罗非鱼的最大生产国^[2]。然而, 随着养殖规模的扩大、养殖密度的提高以及养殖环境的恶化, 暴发了多种疾病, 其中无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)和类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)等细菌性病原感染引起的病害给我国

罗非鱼养殖业带来了巨大的经济损失^[3-4]。值得注意的是, 近年来病毒性疾病在国外养殖罗非鱼中甚为流行, 如罗非鱼湖病毒(tilapia lake virus, TiLV)从2009年以来, 已经在以色列、厄瓜多尔、埃及、泰国和印度等多个国家和地区养殖的罗非鱼中流行和暴发, 对罗非鱼养殖业造成了严重威胁^[5-16]。TiLV被世界动物卫生组织(OIE)列为

收稿日期: 2019-01-30 修回日期: 2019-05-05

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 中国-东盟海上合作基金(CAMC-2018F); 国家自然科学基金(31872606, 31572657, U1701233); 广东省海洋与渔业局基金(GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); 广东省教育厅基金(KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

一种新生病毒^[5, 17-18], 该病毒已经对全球性罗非鱼养殖业构成了严重威胁, 必须加以防控。

TiLV是一种包膜病毒, 由10个单股负链RNA基因组片段组成, 总基因组大小为10.3 kb^[6]。电子显微镜显示, 病毒有包膜, 直径为55~75 nm^[9]。该病毒是一种正黏病毒科(Orthomyxoviridae)成员^[6]。此外, TiLV基因组片段1编码蛋白与C型流感病毒聚合酶1(PB1)中保守的氨基酸序列有弱序列同源性^[6, 13]。Eyngor等^[5]发现E-11细胞对TiLV敏感^[5]。TiLV最适温度25℃, 5—10月均可导致发病。有研究表明罗非鱼湖病毒感染鱼体后的临床症状会根据发病地的不同而有区别, 例如以色列的患病罗非鱼临床症状包括嗜睡、眼部病变、皮肤糜烂和体色发黑^[5]; 而厄瓜多尔的病例表现为眼球突出、体色变黑、腹胀, 鳞屑突出和鳃丝苍白^[8]; 泰国的患病鱼表现为食欲不振、嗜睡、眼球突出、腹部肿胀、皮肤充血和糜烂^[13, 18]。根据现有报道表明, 基于临床的症状对其进行诊断并不可靠。

目前对于TiLV的研究, 大多围绕流行病学诊断、致病性、敏感细胞株的建立、RT-PCR诊断和组织病理学^[14-15, 20-23]。而关于该病毒在我国广泛养殖的吉富罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)和敏感细胞中的感染特性还未见报道。因此本实验拟通过由德国弗里德里希洛弗勒研究所Sven Bergmann博士赠送的TiLV。制备TiLV第4基因组片段编码的HEF蛋白多克隆抗体, 采用苏木精—伊红染色、Western Blot、免疫组化和细胞免疫荧光等多种技术检测该病毒在患病组织和E-11细胞中的感染特性, 为TiLV的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

主要试剂 SDS-PAGE凝胶试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司; RNAiso Plus、限制性内切酶均购自TaKaRa公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; Trans5 α 感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金公司; HiScript II qRT SuperMix反转录试剂盒购自南京诺唯赞公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自Sigma公司; ECL显色液、考马斯亮蓝R-250购自北京索莱宝公司; IPTG、溴酚蓝、氨苄、硝酸纤维素膜购自Biosharp公

司; 分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。脱脂奶粉购自美国BD公司; 小鼠抗GST-tag一抗, HRP标记山羊抗小鼠二抗购自北京博奥森生物技术有限公司; TMB显色液、RIPA裂解液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天公司; 通用型组织固定液购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

主要仪器 微量分光光度计购自杭州奥盛仪器有限公司; 台式冷冻离心机购自Dynamica; 凝胶扫描成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司; 电动荧光显微系统M5000、细胞培养箱和酶标仪购自Thermo Scientific; 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验材料

吉富罗非鱼幼鱼购买于广东罗非鱼良种场, 购回后暂养于室内半径为0.4 m, 深0.6 m的封闭循环水系统, 温度维持在(25 \pm 1)℃。TiLV由德国弗里德里希洛弗勒研究所Sven Bergmann博士赠送, 由中国水产科学研究院珠江水产研究所保存。E-11细胞为条纹月鳢(*Channa asiatica*)全身细胞SSN-1细胞的克隆细胞。本实验用E-11细胞由扬州大学刘晓丹博士惠赠, E-11细胞使用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的L-15中置于25℃恒温培养箱中培养。

1.3 TiLV-HEF基因的生物信息学分析

使用下列软件和工具对TiLV-HEF基因进行分析: Clone Manager软件对获得的TiLV-HEF基因序列进行分析, 确定其开放阅读框(ORF); DNAMAN 7.0软件进行氨基酸序列分析, BLAST工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析, 在线软件(<http://www.expasy.org/>)分析蛋白质的特性, 采用MEGA 7.0软件中Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树。

1.4 TiLV-HEF多克隆抗体的制备及其特异性检测

TiLV-HEF重组质粒的构建、融合蛋白的表达及检测 编码TiLV-HEF基因的片段由病毒感染头肾组织提取的RNA进行扩增获得。随后将TiLV-HEF基因克隆到pGEX-4T-1质粒上, 内切酶分别为BamH I和Xho I。将重组质粒转化到*E. coli* BL21(DE3), 菌株37℃摇床培养3 h左右, 当菌液浓度OD_{600 nm}达到0.5~0.8时, 使用终浓度为1 mmol/L的IPTG在37℃条件下诱导6

h, 收集菌体后, PBS重悬, 用超声波细胞破碎仪破碎菌体, 在10 000 r/min 4 °C离心10 min, 分离上清液和沉淀, 随后进行12% SDS-PAGE电泳检测。根据崔振波等^[24]报道的方法, 对包涵体蛋白进行纯化与回收, 具体操作: 首先使用20 mL buffer A(50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA, pH 8.0)将包涵体沉淀充分悬起, 混匀。10 000 r/min 4 °C离心20 min, 去除上清液, 重复1次。然后, 20 mL buffer B(50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 脲, pH 8.0)将沉淀充分悬起, 混匀。10 000 r/min 4 °C离心20 min, 去除上清液, 重复1次。20 mL buffer C(0.1 mol/L Tris-HCl、10 mmol/L DTT, 8 mol/L 脲, pH 8.0)将沉淀充分悬起, 混匀。置于37 °C恒温摇床上以200 r/min振荡1 h。10 000 r/min 4 °C离心10 min, 保留上清液, 去除沉淀。最后将上清液装入透析袋中, 置于50倍上清液体积的透析液(0.1 mol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、5 mmol/L Cysteins, pH 8.0)中, 4 °C下透析16 h。换用新透析液4 °C下透析16 h, 10 000 r/min 4 °C离心10 min, 保留上清液, 去除沉淀。将上清液通过0.22 μm滤膜除菌后分装成1 mL冻存于-80 °C, 备用。将纯化后的蛋白, 用PBS按比例稀释, 加入5×loading buffer沸水煮沸15 min, 12% SDS-PAGE上样, 电泳结束后进行转膜, 封闭液(含有5%脱脂奶粉的TBST溶液)室温封闭3 h; 小鼠抗GST-tag一抗(1:1 000)室温孵育2 h; TBST洗涤5次, 每次5 min; HRP标记山羊抗小鼠二抗IgG(1:10 000)孵育45 min后, TBST洗涤5次, 每次5 min; ECL显色1 min, ChemiScope 6000获取照片。

TiLV-HEF多克隆抗体制备、效价检测及其特异性检测 将纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔(广东省医学实验动物中心), 免疫前, 抽取少量免疫前的血液, 为空白对照组。每次免疫剂量为0.5 mg, 一免为TiLV-HEF蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化, 二免、三免为TiLV-HEF蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。采用皮下多点注射法对大白兔注射免疫原。免疫后第43天终放血, ELISA检测抗血清效价达到要求, 颈动脉采全血。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测TiLV-HEF多克隆抗体的效价, 用包被缓冲溶液(0.035 mol/L碳酸氢钠、0.015 mol/L碳酸钠, pH 9.6)将重组蛋白抗原稀释到2 μg/mL, 并将抗原包被至96孔板中, 每孔100 μL, 4 °C包被过夜后, PBST(含0.05%

Tween 20的0.01 mol/L pH 7.4 PBS)洗涤5 min×3次, 加入封闭液(含1% BSA的PBS), 200 μL/孔, 37 °C封闭1 h, 弃去封闭液, PBST洗涤5 min×3次, 将血清从1:400倍比稀释至1:51 200, 分别加入96孔板, 100 μL/孔, 37 °C孵育1 h, 同时设置阴性血清做为对照, PBST洗涤5 min×3次; 每孔加入100 μL HRP标记的羊抗兔IgG(1:5 000稀释), 37 °C孵育1 h; PBST洗涤5 min×3次, 每孔加入200 μL TMB显色液, 37 °C避光显色10 min, 每孔加入50 μL终止液(2 mol/L H₂SO₄)终止反应后, 用酶标仪测定OD_{450 nm}波峰值。

采集感染TiLV患病吉富罗非鱼脾脏组织0.1 g, 加入1 mL RIPA裂解液(包括1 mmol/L PMSF、10 mmol/L氯化钠、1 mmol/L原砷酸钠), 冰上研磨, 直至充分裂解, 12 000 r/min 4 °C离心20 min, 取上清液。用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测定浓度, 上样量为30 μg, Western Blot检测多克隆抗体的特异性。

1.5 吉富罗非鱼感染实验

随机挑选健康的吉富罗非鱼幼鱼, 体质量(30±5) g, 分为2组, 每组10尾, 感染组每尾鱼腹腔注射200 μL TiLV(病毒浓度1×10⁶拷贝/mL), 对照组注射等量灭菌的PBS。每日观察实验吉富罗非鱼发病情况。感染实验在封闭循环水系统内进行, 对于实验用水进行二氧化氯严格消毒杀灭病毒后才对外排放。

1.6 PCR病毒检测鉴定

TiLV感染9 d后, 采集病鱼肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、脑等组织, 用TRizol法提取总RNA。按照HiScript II qRT SuperMix反转录试剂盒的说明书分别对RNA进行反转录获得cDNA。PCR引物参照Tattiyapong等^[25]的方法, Nested ext-2(5'-TTG-CTC-TGA-GCA-AGA-GTA-CC-3'); Nested ext-1(5'-TAT-GCA-GTA-CTT-TCC-CTG-CC-3'), 扩增TiLV-S3的片段(491 bp)。PCR反应为预变性95 °C 2 min, 循环条件为95 °C, 30 s, 56 °C 30 s; 72 °C, 30 s, 35个循环, 最后72 °C延伸7 min, 4 °C中10 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 TiLV在吉富罗非鱼各组织内的感染情况

TiLV感染吉富罗非鱼9 d后, 采集病鱼肝脏、脾脏、头肾、体肾、脑、鳃的组织, 用通用型

组织固定液将组织固定24 h, 送谷歌生物科技有限公司进行石蜡切片和苏木精—伊红(H.E)染色。

依次将获得的切片进行免疫组化分析, 根据王培等^[26]方法进行, 略作修改, 具体操作: 首先将切片放入二甲苯 I 20 min, 二甲苯 II 20 min, 无水乙醇 I 10 min, 无水乙醇 II 10 min, 95%酒精5 min, 90%酒精5 min, 80%酒精5 min, 70%酒精5 min, 蒸馏水清洗2次, 每次10 min; 随后将组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲溶液(pH 9.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火至沸后断电间隔10 min后中低火至沸。自然冷却后将玻片置于PBS(pH 7.4)中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5 min; 切片放入3%过氧化氢溶液中, 室温避光孵育20 min, 将玻片置于PBS(pH 7.4)中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5 min; 向切片滴加用5% NGS按一定比例稀释好的一抗(1:200)覆盖组织。切片平放于湿盒内4℃孵育过夜后, 置于TBST(pH 7.4)中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5 min; 切片稍甩干后滴加HRP偶联二抗(山羊抗兔)覆盖组织, 室温孵育50 min, 置于TBST(pH 7.4)中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5 min; 切片稍甩干后滴加新鲜配制的DAB显色液, 显微镜下控制显色时间, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色; Harris苏木素复染3 min左右, 自来水洗, 1%的盐酸酒精分化数秒, 自来水冲洗, 氨水返蓝, 流水冲洗; 将切片依次放入70%酒精5 min, 80%酒精5 min, 90%酒精5 min, 95%酒精5 min, 无水乙醇 I 5 min, 无水乙醇 II 5 min, 二甲苯 I 5 min, 二甲苯 II 5 min中脱水透明, 将切片从二甲苯中取出稍晾干, 中性树脂胶封片。

1.8 TiLV感染E-11细胞及间接免疫荧光检测

经传代后的细胞, 待其生长至整瓶的80%~90%, 弃细胞培养基, 使用L-15培养基润洗细胞3次, 将病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为1的TiLV加入细胞瓶内, 置于25℃孵育使病毒充分吸附细胞, 2 h后移除病毒液, 更换含有5%胎牛血清的L-15培养基继续培养, 每天显微观察细胞状况, 并拍照。

E-11细胞传代至预先放置处理过的盖玻片的6孔细胞板中, 待细胞密度达到80%~90%时, 用1MOI的TiLV孵育E-11细胞, 对照组细胞加入等量L-15。置于25℃培养箱中孵育2 h后, 移除

孵育液, 使用PBS润洗细胞2次后, 更换新鲜的含有5%胎牛血清的L-15培养基, 置于25℃培养箱中培养。根据李深伟等^[27]的方法进行间接免疫荧光操作, 略作修改, 具体操作: TiLV感染5 d后, 取出盖玻片, PBS洗涤2次, 使用预冷的丙酮—甲醇(1:1)固定液固定10 min, PBS洗涤3次, 每次5 min, 使用封闭液(10%山羊血清, PBST稀释)室温封闭1 h, TiLV-HEF一抗(1:200)室温孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次5 min, FITC标记山羊抗兔二抗1:500室温避光孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次5 min后, DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)染核10 min, PBS洗涤3次, 每次5 min封片, M5000荧光显微镜观察。

1.9 数据分析

SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析, Graphpad Prism 6.0软件作图。样本间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 TiLV-HEF基因的克隆和生物信息学分析

TiLV第4片段基因组cDNA全长1 250 bp, ORF为1 065 bp, 编码354个氨基酸, GenBank登录号为KU751817.1。ProtParam软件预测该蛋白分子量为38.30 ku, 等电点为8.98(图1)。Signal IP 4.1 Server程序预测该蛋白不含信号肽。TMpred预测第253~271个氨基酸是从膜内到膜外的跨膜结构域, 第281~306个氨基酸是从膜外到膜内的跨膜结构域。利用MEGA 7.0软件NJ法对该基因和其他7个正黏病毒科病毒的糖蛋白基因进行系统进化分析。结果表明该蛋白与丙型流感病毒、丁型流感病毒和传染性鲑鱼贫血病毒的HEF蛋白基因聚为一支(图2), 因此认定该蛋白为TiLV的HEF蛋白。

2.2 TiLV-HEF蛋白多克隆抗体制备及特异性检测

为了验证重组质粒是否构建成功, 通过双酶切验证, 电泳结果显示出明显的2条带, 并且大小与理论片段大小相一致(图3-a)。SDS-PAGE结果表明, 重组的HEF蛋白主要表达在包涵体中(图3-b)。通过GST-tag标签抗体检测表达的重组蛋白是否准确, 结果显示重组的GST-HEF蛋白在64.3 ku左右处有一明显条带, 而且大小和预测的

```

1 CCAAAGTTTACTCCTATTACCCAGAATAGCTAACTTAATAAACTGAAAATGGTGAGAACT
      M V R T
21  ACAAAGACTAGTATGGCAGCTGCCAGCACTGTTGCACCAGAGGTAGCAATGGATGAAAGT
21  T K T S M A A A S T V A P E V A M D E S
121 TCACCCAGCACTTCGCAGGTACAAGCTGAACTCCCAAGAAACCTTGAGGTTTTCAACGAA
41  S P S T S Q V Q A E L P R N L E V F N E
181 GCTTGTGGTCATGTGTTTGGAAAGTTCCTTTAACAGGGAGGACAACAGTGTGATATCTGAT
61  A C G H V F G S S F N R E D N S V I S D
241 GCTGCTGCATTTCTCTTTAAATGCACACTCACTCCCTCGATGGTCAGGAGGCTAAGGTT
81  A A A F L F K M H T H S L D G Q E A K V
301 CTGAGAGCCAGTGAAAAGAAGAGAGAGAGGGAGAACGCTAAGAAATCAAGGAAGGCACCA
101 L R A S E K K R E R E N A K K S R K A P
361 GAAGCAGGGATGAGGGTCGGAAGGAGCCTTATATTAACCAGCAGATGGACTGAATACTGC
121 E A G M R V G R S L I L T S R W T E Y C
421 GCAACCTGTGTGCCTGCACTGGGCTCAAAGATGAAGGTGATAAAAGCCTCAGGGGACGCA
141 A T C V P A L G S K M K V I K A S G D A
481 GCTATGATTCAGATGATGAAGGACCATAACTCTCTATTAAGAGTGTGTGTTGCGATTGAG
161 A M I Q M M K D H N S L L R V C V R I E
541 GTCTGGAAGGCTAGGTACGTACGTTGGTTGCTCTCGACGAGAGATTGAGACTTTGGAG
181 V W K A R Y V S L V A L D E R I Q T L E
601 GACGCCAATGGTCCCATATCTGAGTGGGGATTCTATCGTCTTGGCCAGGGCTGGTT
201 D A Q W F P Y L S G D S Y R A C P G L V
661 GGTGGCTACTTTGCAAAGAAAGCAGCAGCAGGAGAAAGAGAAAGAACTACAAAAAGTTG
221 G G Y F A K K A A A G E R G K N Y K K L
721 AATCAGACTGCTATAATCCCGCCTCCGAGATTTCTGATCATTGGCCACAGGCTGCAGATA
241 N Q T A I I P P P R F L I I G H R L Q I
781 GGCGACCAGGTACCCCTCAGGGAGCTGCTTGCCTCAATTGCTTGGGGCCTTTGCGACGGT
261 G D Q V T L R E L L A S I A W G L C D G
841 GTCCTTGCTGAGTGTGGAGCCCCTCGCAGGGGACGGGAGTATTGGTGTGTTGTTGGT
281 V L A E C W S P S Q G D G S I G V V V G
901 CTACCTCTGCAAGCTACAGGAAGCTGCTTCTGTTGGTAGCTAGCCACGGGCTCTCAGCA
301 L P L Q A T G S C F L V V A S H G L S A
961 ATTGCCGACTCTAGGATTGAGGGAACAGGGAACACGAATCTGCTGGAAGAATGCATTGCC
321 I A D S R I E G T G N T N L L E E C I A
1 021 ATTCAGAAACAGGACGGTGCATAAAAATGTAAGAGAAGTGGGAAGAGTCTGTATCACTGC
341 I Q K Q D G V I K C K R S G K S L Y H C
1 081 CTCAAGGAGACAGCAGGGGCTGTTGGGAGATAGGCAACGAAGTAGCCACCCATGCGCGG
361 L K E T A G A V G R *
1 141 AAAGCTGCACAGGCTGCCAAGGGCCCTCTTAGCCCAAGTTTTCTATATATTTCTTAACA
1 201 AGTCATCTAAAAGTGGTAAATCTTAGACGGTAATTGGAGAAAGATTTCG

```

图1 罗非鱼湖病毒HEF基因cDNA及其氨基酸序列

粗体ATG和TAG分别代表起始密码子和终止密码子，方框内M代表蛋白翻译起始，方框内*代表蛋白翻译结束

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of HEF from TiLV

The bold ATG and TAG is the start codon and the stop codon, respectively, M in box represents the start of the protein translation, the * in box represents the end of the protein translation

一致(图3-c)。对获得的多克隆抗体血清进行酶联免疫吸附测定法检测抗体效价(图4-a)，结果显示多克隆抗体的效价达1:51 200。为了进一步验证获得的多克隆抗体血清是否可以特异性识别目的HEF蛋白，因此实验通过蛋白免疫印迹检测感染TiLV病鱼脾脏中的HEF蛋白，结果显示可以清晰检测到一条38 ku左右的条带，大小和预测

<http://www.sexuebao.cn>

的TiLV-HEF较一致(图4-b)。

2.3 临床症状和组织病理学

在TiLV感染吉富罗非鱼5~10 d，鱼体外出现明显的病症，如患病鱼体色发黑，体表有溃烂和全身出血，肉眼晶状体混浊(图5-a中的B)。通过特异性引物检测TiLV是否感染吉富尼罗罗非鱼，RT-PCR检测结果显示TiLV感染组的脾脏样

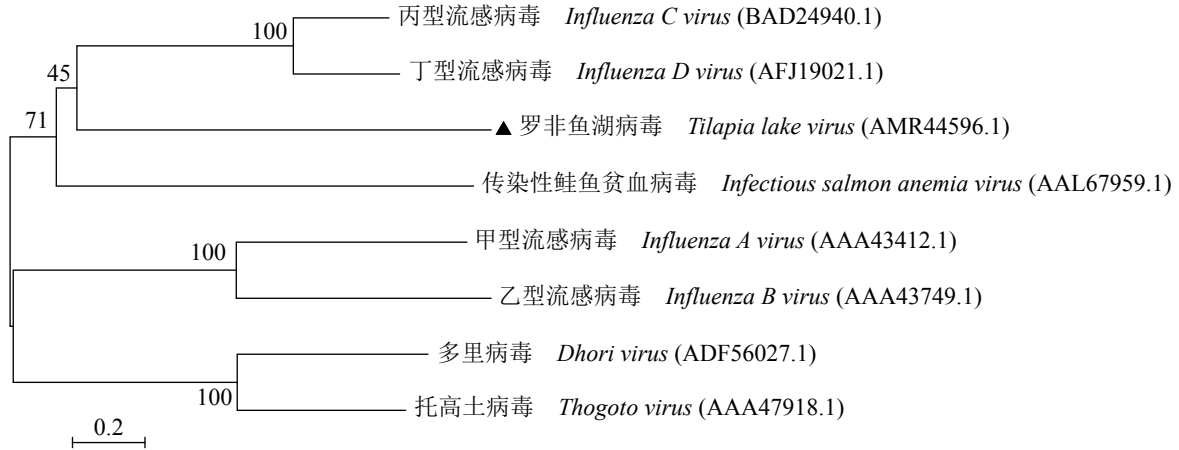


图 2 罗非鱼湖病毒HEF基因与其他正黏病毒糖蛋白基因的系统进化树
节点处的数字为1 000次引导值中该节点的自举置信水平, 黑色三角形标记为罗非鱼湖病毒HEF基因

Fig. 2 Phylogenetic tree of *TiLV-HEF* and glycoproteins from other orthomyxoviruses

Numbers at each branch indicates the percentage bootstrap values on 1 000 replicates. *TiLV-HEF* is marked with black triangle

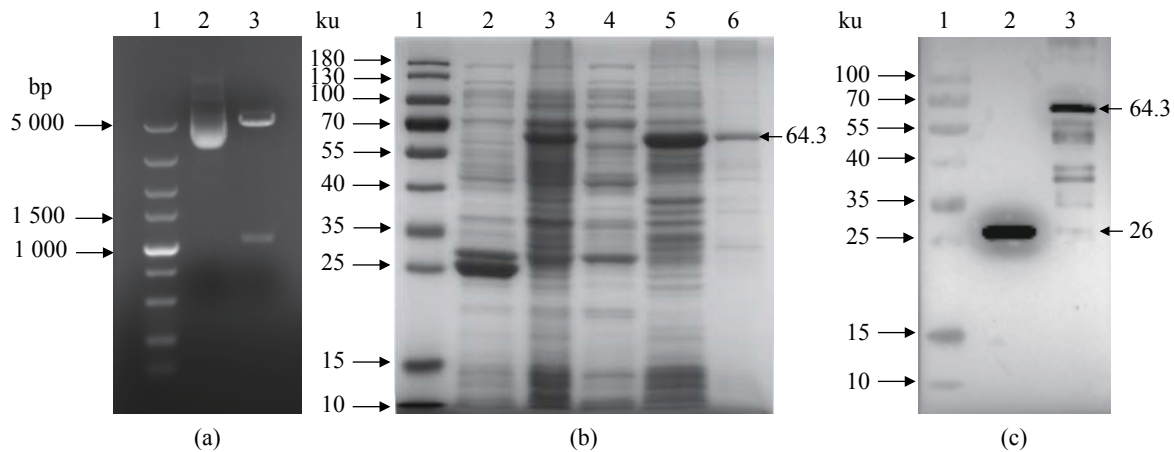


图 3 罗非鱼湖病毒HEF基因重组质粒酶切验证、表达纯化与Western blot检测

(a)重组质粒双酶切鉴定, 1. DNA Marker, 2.重组质粒, 3.双酶切产物; (b) TiLV-HEF 重组蛋白的表达及纯化, 1.蛋白Marker, 2. IPTG诱导的pGEX-4T-1空载, 3. TiLV-HEF重组蛋白表达全菌检测, 4. TiLV-HEF重组蛋白表达上清液, 5. TiLV-HEF重组蛋白表达沉淀, 6. TiLV-HEF重组蛋白纯化后检测; (c)GST标签抗体检测TiLV-HEF重组蛋白的表达, 1. 蛋白Marker, 2. 表达的pGEX-4T-1空载的总菌体样品, 3. TiLV-HEF重组蛋白的总菌体样品

Fig. 3 *TiLV-HEF* recombinant plasmid digestion, expression purification and Western blot

(a) recombinant plasmid digestion, 1. DNA Marker, 2. recombinant plasmid, 3. digestion product; (b) expression and purified recombinant *TiLV-HEF* protein, 1. protein Marker, 2. *E. coli* BL21 with pGEX-4T-1 vector with IPTG, 3. *TiLV-HEF* recombinant protein expression whole bacteria detection, 4. supernatant of *E. coli* with pGEX-4T-1-*TiLV-HEF*, 5. pellet of *E. coli* with pGEX-4T-1-*TiLV-HEF*, 6. purified recombinant *TiLV-HEF* protein.(c) verification of recombinant *TiLV-HEF* protein using GST-tag antibody, 1. protein Marker, 2. *E. coli* with pGEX-4T-1 vector, 3. *E. coli* with pGEX-4T-1-*TiLV-HEF*

品呈阳性, 而对照组吉富罗非鱼没有检测信号(图5-b)。H.E染色结果显示TiLV感染引起吉富罗非鱼组织不同程度的病变, 其中肝细胞空泡化, 部分细胞出现合胞体, 胰腺细胞坏死(图版 I -2); 脾脏中含铁血黄素增多, 部分细胞呈空泡变性, 淋巴细胞坏死(图版 I -4); 头肾中出现淋巴细胞坏死(图版 I -6); 体肾组织中出现蛋白质沉

淀和肾小球坏死(图版 I -8); 鳃小片黏连, 上皮细胞脱落, 泌氯细胞出现空泡化(图版 I -10); 大脑皮质中的神经胶质增生(图版 I -12)。

2.4 TiLV在吉富罗非鱼组织中的定位

为了确定TiLV在吉富罗非鱼组织中的分布情况, 通过Western blot和免疫组织化学的方法进行检测。TiLV感染9 d后, 提取吉富罗非鱼肝

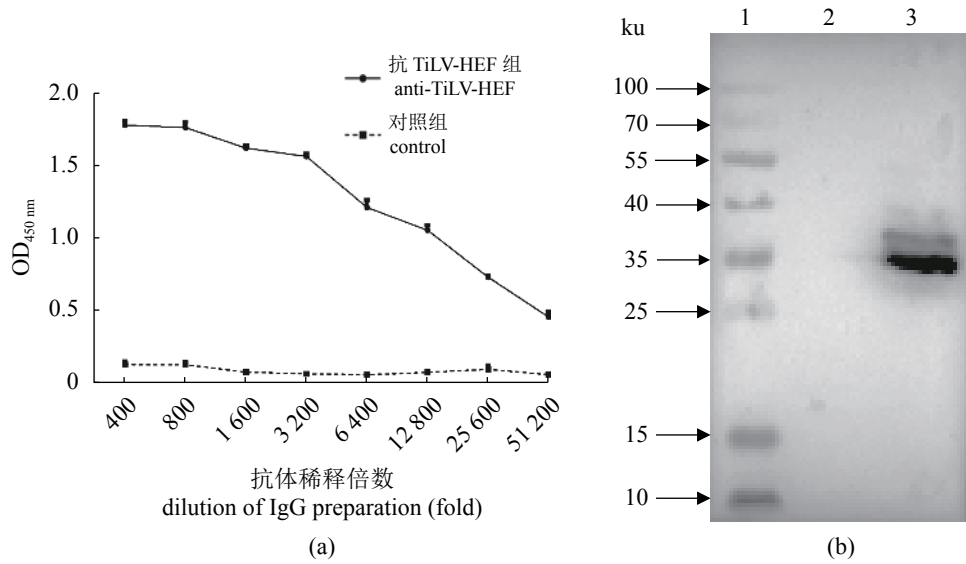


图 4 TiLV-HEF 多克隆抗体的效价及特异性检测

(a) ELISA法检测TiLV-HEF多克隆抗体的效价；(b) TiLV-HEF多克隆抗体的特异性检测，1.蛋白Marker，2.健康吉富罗非鱼脾脏组织蛋白，3.感染TiLV吉富罗非鱼脾脏组织蛋白

Fig. 4 Titer and specificity detection of anti-TiLV-HEF polyclonal antibody

(a) detection of titer of TiLV-HEF polyclonal antibody by ELISA; (b) specificity detection of TiLV-HEF polyclonal antibody, 1. protein Marker, 2. spleen tissue protein of healthy tilapia, 3. spleen tissue protein of TiLV infected tilapia

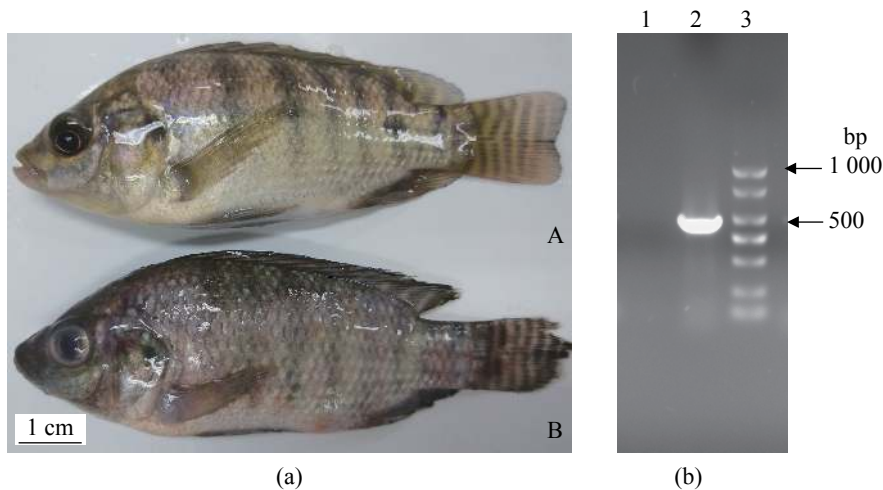


图 5 TiLV感染吉富罗非鱼临床症状和检测

(a)TiLV感染吉富罗非鱼的临床症状，A.未感染组吉富罗非鱼，B.感染组吉富罗非鱼。(b)RT-PCR检测TiLV感染吉富罗非鱼脾脏，1.未感染组吉富罗非鱼，2.感染组吉富罗非鱼，3. DNA Marker

Fig. 5 Clinical symptoms of GIFT *O. niloticus* infected by TiLV and its detection

(a) clinical symptoms of TiLV infected GIFT *O. niloticus*, A. uninfected GIFT *O. niloticus*, B. infected GIFT *O. niloticus*. (b) detection of TiLV in the spleen from GIFT *O. niloticus* by RT-PCR. 1. uninfected GIFT *O. niloticus*, 2. infected GIFT *O. niloticus*, 3. DNA Marker

脏、脾脏、头肾、体肾、鳃、脑组织蛋白，Western Blot结果显示，在脾脏、头肾和鳃中出现较明显的阳性信号，体肾、脑和肝脏中信号较弱(图6)。免疫组织化学结果显示，肝脏(图版 II -2)、脾脏(图版 II -4)、头肾(图版 II -6)、体肾(图版 II -8)、鳃(图版 II -10)及脑(图版 II -12)中分别检测到不同

程度的阳性信号。免疫组织化结果与Western blot结果基本一致。

2.5 TiLV对E-11细胞的感染

TiLV感染E-11细胞7~9 d，发生明显的细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)现象，并且病变

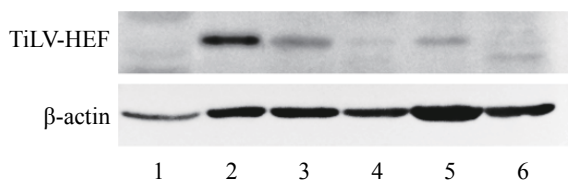


图6 TiLV感染吉富罗非鱼组织的Western Blot检测

1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 头肾, 4. 体肾, 5. 鳃, 6. 脑

Fig. 6 TiLV infecting GIFT *O. niloticus* by Western blot

1. liver, 2. spleen, 3. head kidney, 4. kidney, 5. gill, 6. brain

细胞逐渐聚集, 出现空斑(图版 III-4)。为了确定 TiLV 在细胞水平的感染特性, 运用间接免疫荧光的方法进行检测。TiLV 感染 5 d 后, 间接免疫荧光结果显示, TiLV 感染组孵育 HEF 抗体经显色后, 有部分细胞呈现绿色荧光(图版 IV-2), 主要分布在细胞质中。对照组孵育 HEF 抗体经显色后, 无相应的绿色荧光信号(图版 IV-5)。TiLV 感染组孵育阴性抗体后, 也无相应的绿色荧光信号(图版 IV-8)。

3 讨论

罗非鱼是世界范围内养殖的重要品种。养殖罗非鱼伴随着国际贸易在世界范围内流动, 增加了 TiLV 的传播风险^[28]。至今有关 TiLV 的生物学和流行病学特性还有许多未解之谜, 各国学者都在研究当中。Jaemwimol 等^[29]发现 TiLV 也可以感染丝足鲈(*Osphronemus goramy*)并引起临床病症。Amal 等^[14]发现 TiLV 可与其他病原体的协同感染加剧了对全球罗非鱼产业的威胁。最初, Eyngor 等^[5]用 RT-PCR 方法检测 TiLV 的区段 3。随后, Kembou 等^[9]发布了使用相同引物组的巢式 RT-PCR 分析, 能够检测低至 7 个拷贝的 TiLV, 比单个 RT-PCR 灵敏 10 000 倍。最近, Tattiyapong 等^[25]针对相同基因组区段 3 开发了一种新的基于 SYBR 的逆转录定量 PCR (RT-qPCR) 方法, 用于检测临床样品中的 TiLV, 报告灵敏度为 2 拷贝/ μL 。Swaminathan 等^[21]建立了罗非鱼的脑 (OnlB) 和肝脏 (OnlL) 的传代细胞系, 对于 TiLV 具有较高的敏感性。相对于另一种鱼类正黏病毒科成员传染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV), Christiansen 等^[30-31]已经鉴定了病毒的毒力和无毒毒株, 并且已经在野外观察到有 IASV 毒力和细胞向性的改变。这些变异是否存在于 TiLV 中仍有待确定。

本实验测定了 TiLV 第 4 片段基因组, 系统进化结果表明该基因组片段编码的蛋白为 HEF 蛋

白。进一步表达并纯化重组 TiLV-HEF 蛋白, 获得兔抗 TiLV-HEF 多克隆抗体, 可识别融合 TiLV-HEF 蛋白和感染的吉富罗非鱼脾脏组织中 TiLV-HEF 蛋白, 而且大小和预测一致。间接免疫荧光结果表明 TiLV 感染 E-11 细胞, HEF 蛋白主要存在于细胞质中。本实验通过 TiLV 感染 E-11 细胞, 在 7~9 d 出现了明显的 CPE 现象, 并且病变细胞逐渐聚集, 出现空斑。Eyngor 等^[5]用 TiLV 感染 E-11 细胞, 在 5~7 d 后观察到 CPE 现象, 与本实验结果基本一致。在人工感染鱼体中, 可观察到感染鱼体色发黑, 体表有溃烂和全身出血, 肉眼晶状体混浊。而在内脏组织中, 肝细胞空泡化, 部分细胞出现合胞体; 脾脏中含铁血黄素增多; 头肾淋巴细胞坏死; 体肾蛋白质沉淀和肾小球坏死; 鳃小片黏连, 上皮细胞脱落; 大脑皮质中的神经胶质增生。Eyngor 等^[5]在以色列患病鱼中观察到的病变包括内脏器官(肾脏和大脑)的充血, 大脑皮质中的神经胶质增生和血管周围箍带以及眼部病变(眼内炎和晶状体的白内障变化)。Fathi 等^[10]在埃及患病鱼中发现包括脑内胶质增生, 脑炎和轻度血管周围套囊, 多灶慢性肝炎和肾脏多灶性间质性出血。Surachetpong 等^[13]在泰国的患病鱼中的观察结果包括脑组织中淋巴细胞和血管周围套囊的聚集。TiLV 感染吉富罗非鱼的组织病理存在差异, 可能和采样时间点、毒株、鱼种质差异有关, 但大多数 TiLV 感染鱼的肝脏中观察到合胞体肝炎和泡沫状细胞质, 严重的胰腺坏死。根据目前的信息表明, 合胞体肝炎是 TiLV 暴发中最常见的组织病理学特征。通过 Western blot 和免疫组化检测 TiLV 患病幼鱼组织, 发现在肝脏、脾脏、头肾、体肾、鳃和脑中均存在 TiLV 阳性信号。预计病毒在脾脏和头肾中分布较多, 在鳃、体肾、脑和肝脏中分布较少。Bacharach 等^[6]采用地高辛原位杂交对罗非鱼苗进行组织分布检测, 研究表明, TiLV 复制和转录发生在肝脏和中枢神经系统。而 Dong 等^[18]在泰国采集的样本中, 原位杂交显示在肝脏、肾脏、脑、鳃、脾脏和肌肉结缔组织中有阳性信号, 而且肝脏、肾脏和鳃中信号较强。Senapin 等^[32]在幼鱼的肝脏、肾脏、脾脏、脑和心脏中发现了较低的 TiLV 病毒载量, 组织病理学观察到类似于合胞体肝炎的病理特征, 但原位杂交并未发现阳性信号。Mugimba 等^[16]在来自于维多利亚湖的样本中发现

脾脏中TiLV RNA分布最多,其次是头肾、心脏和肝脏。根据本实验的结果,脾脏和头肾为主的淋巴器官中检测到强的阳性信号,其机理还不清楚,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2018 - meeting the sustainable development goals[R]. Rome: FAO, 2018: 1-210.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴2018[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fisheries Bureau, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2018[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018 (in Chinese).
- [3] 卢迈新, 黎炯, 叶星, 等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 766-774.
Lu M X, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 766-774(in Chinese).
- [4] 刘志刚, 可小丽, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼致病性类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)的分离鉴定及其病理学观察[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 96-106.
Liu Z G, Ke X L, Lu M X, *et al.* Identification and pathological observation of a pathogenic *Plesiomonas shigelloides* strain isolated from cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(1): 96-106(in Chinese).
- [5] Eyngor M, Zamostiano R, Kembou Tsofack J E, *et al.* Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(12): 4137-4146.
- [6] Bacharach E, Mishra N, Briese T, *et al.* Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00431-16.
- [7] Del-Pozo J, Mishra N, Kabuusu R, *et al.* Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes[J]. *Veterinary Pathology*, 2017, 54(1): 164-170.
- [8] Ferguson H W, Kabuusu R, Beltran S, *et al.* Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(6): 583-589.
- [9] Kembou Tsofack J E, Zamostiano R, Watted S, *et al.* Detection of tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription-PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017, 55(3): 759-767.
- [10] Fathi M, Dickson C, Dickson M, *et al.* Identification of tilapia lake virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 430-432.
- [11] Nicholson P, Fathi M A, Fischer A, *et al.* Detection of tilapia lake virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2017, 40(12): 1925-1928.
- [12] Dong H T, Ataguba G A, Khunrae P, *et al.* Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 579-583.
- [13] Surachetpong W, Janetanakit T, Nonthabenjawan N, *et al.* Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015-2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(6): 1031-1033.
- [14] Amal M N A, Koh C B, Nurliyana M, *et al.* A case of natural co-infection of tilapia lake virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality[J]. *Aquaculture*, 2018, 485: 12-16.
- [15] Behera B K, Pradhan P K, Swaminathan T R, *et al.* Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 168-174.
- [16] Mugimba K K, Chengula A A, Wamala S, *et al.* Detection of tilapia lake virus (TiLV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(8): 1181-1189.
- [17] Jansen M D, Mohan C V. Tilapia lake virus (TiLV): Literature review[R]. Working Paper: FISH-2017-04. Penang, Malaysia: CGIAR Research Program on Fish Agri-Food Systems, 2017.

- [18] Dong H T, Siriroob S, Meemetta W, *et al.* Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection[J]. *Aquaculture*, 2017, 476: 111-118.
- [19] 郭建红, 蔡颖, 吴松浩. 罗湖病毒研究进展[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(8): 72-75.
Guo J H, Cai Y, Wu S H. Research progress in tilapia lake virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2017, 34(8): 72-75(in Chinese).
- [20] Waiyamitra P, Tattiyapong P, Sirikanchana K, *et al.* A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia[J]. *Aquaculture*, 2018, 497: 184-188.
- [21] Swaminathan Thangaraj R, Ravi C, Kumar R, *et al.* Derivation of two tilapia (*Oreochromis niloticus*) cell lines for efficient propagation of tilapia lake virus (TiLV)[J]. *Aquaculture*, 2018, 492: 206-214.
- [22] Wang Y Y, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Establishment and characterization of a cell line from tilapia brain for detection of tilapia lake virus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(12): 1803-1809.
- [23] Liamnimitr P, Thammatorn W, U-Thoornporn S, *et al.* Non-lethal sampling for tilapia lake virus detection by RT-qPCR and cell culture[J]. *Aquaculture*, 2018, 486: 75-80.
- [24] 崔振波, 刘莉莉. 简析包涵体纯化处理要点[J]. 现代农业科学, 2009, 16(5): 19-30.
Cui Z B, Liu L L. Analysis of purified inclusion bodies to deal with the main points[J]. *Modern Agricultural Sciences*, 2009, 16(5): 19-30(in Chinese).
- [25] Tattiyapong P, Dachavichitlead W, Surachetpong W. Experimental infection of tilapia lake virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 170-177.
- [26] 王培, 王蓓, 鲁义善, 等. 吉富罗非鱼*sIgM*基因多克隆抗体的制备及组织定位分析[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1211-1220.
Wang P, Wang B, Lu Y S, *et al.* Preparation of polyclonal antibody and tissue location analysis of *sIgM* gene in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1211-1220(in Chinese).
- [27] 李深伟, 杨柳, 李帅, 等. 拉沙病毒IgG抗体间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2018, 41(2): 81-83, 153.
Li S W, Yang L, Li S, *et al.* Development of indirect immunofluorescence assay for Lassa virus IgG detection[J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2018, 41(2): 81-83, 153(in Chinese).
- [28] Jansen M D, Dong H T, Mohan C V. Tilapia lake virus: a threat to the global tilapia industry?[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018: 1-15.
- [29] Jaemwimol P, Rawiwan P, Tattiyapong P, *et al.* Susceptibility of important warm water fish species to tilapia lake virus (TiLV) infection[J]. *Aquaculture*, 2018, 497: 462-468.
- [30] Christiansen D H, Østergaard P S, Snow M, *et al.* A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV-HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the Faroe Islands[J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92: 909-918.
- [31] Christiansen D H, McBeath A J A, Aamelfot M, *et al.* First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(4): 595-606.
- [32] Senapin S, Shyam K U, Meemetta W, *et al.* Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia[J]. *Aquaculture*, 2018, 487: 51-55.

Infection of tilapia lake virus in GIFT *Oreochromis niloticus* and E-11 cell

LI Jiabo¹, QIN Zhendong², ZHAO Lijuan², LIU Zhigang³, KE Xiaoli³,
WU Zaohe², LIU Xiaoling¹, LU Maixin^{3*}, LIN Li^{2*}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Science & Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

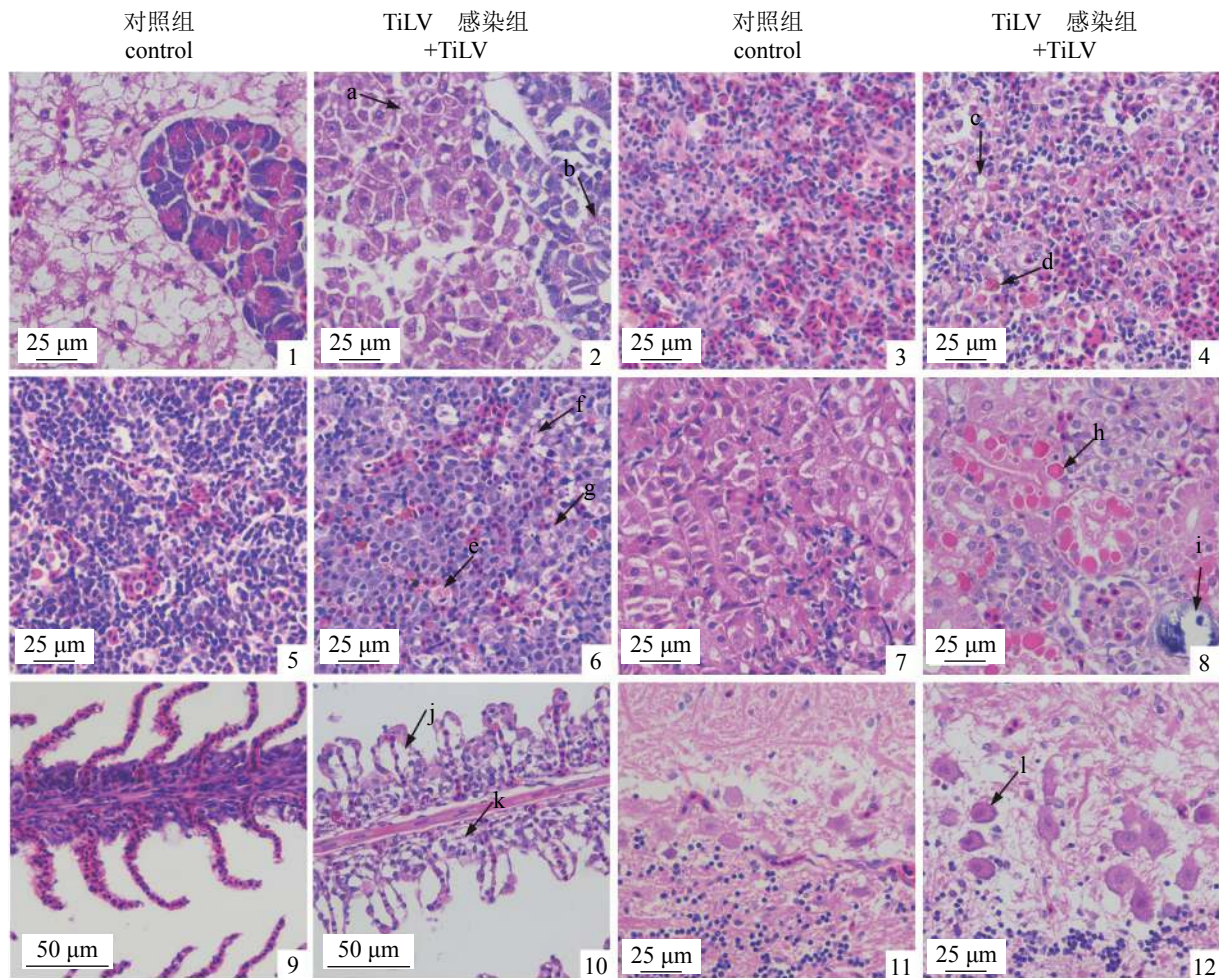
3. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to study the infection characteristics of TiLV in the cultured tilapia species and susceptible cells, GIFT *Oreochromis niloticus* and E-11 cells were chosen as models. For the present study, first of all, the whole nucleotide sequences of the fourth genome segment of TiLV from the experimental infected GIFT *O. niloticus* were determined. The length of the cDNA of the fourth genome segment was 1 250 bp containing an open reading frame of 1 065 bp, encoding a protein with 354 amino acids. The sequences and phylogenetic tree analysis showed that the fourth genome segment encoded TiLV Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein. Subsequently, GST fusion HEF was expressed in *Escherichia coli* and purified, and it was used to immunize New Zealand white rabbits according to the conventional method to prepare rabbit anti-HEF polyclonal antibody. The results showed that the antiserum titer obtained by ELISA was higher than 1 : 51 200, and the serum could specifically recognize the HEF protein from the spleen of TiLV infected GIFT *O. niloticus*. Through artificial infection experiments, it was found that TiLV infected juvenile GIFT *O. niloticus* severely and caused surface ulceration, systemic bleeding and ocular lens opacity. Furthermore, hematoxylin and eosin (HE) stain showed the syncytium in liver, hemosiderin and vacuolar degeneration in spleen, necrosis in head kidney lymphocytes, protein precipitation and glomerulus necrosis in trunk kidney. Western blot and immunohistochemistry results showed that the virus was distributed in all the tissues with the higher abundance in the spleen, head kidney and gill than that in the liver, trunk kidney and brain tissues. Through indirect immunohistochemistry assay, it was found that HEF protein was mainly distributed in the cytoplasm in E-11 cells infected with TiLV. Our results demonstrate that TiLV infection could cause disease by targeting liver, spleen, kidney, gill and brain tissues of GIFT *O. niloticus*.

Key words: GIFT *Oreochromis niloticus*; E-11 cell; TiLV; HEF protein; polyclonal antibody; immunohistochemistry

Corresponding authors: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com; LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund(CAMC-2018F); National Natural Science Foundation of China (31872606, 31572657, U1701233); Funds from the Administration of Ocean and Fisheries of Guangdong Province (GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); Department of Education of Guangdong Province (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); Guangdong Provincial Special Fund for Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams

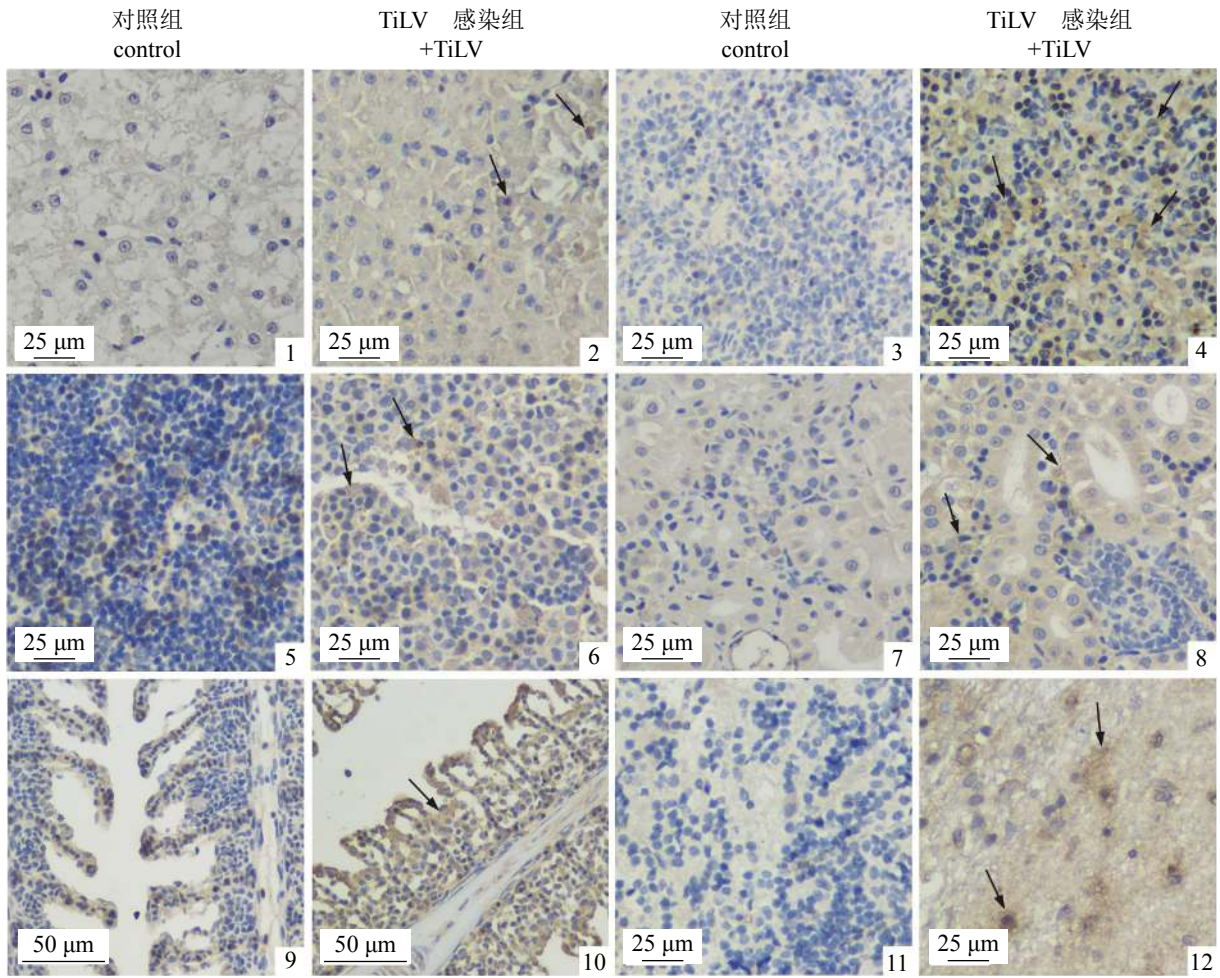


图版 I TiLV感染吉富罗非鱼组织病理观察

1, 2. 肝脏, a表示肝细胞, b表示胰腺细胞; 3, 4. 脾脏, c表示淋巴细胞, d表示含铁血黄素; 5, 6. 头肾, e、f和g表示淋巴细胞; 7, 8. 体肾, h表示蛋白质沉淀, i表示肾小球; 9, 10. 鳃, j表示上皮细胞, k表示泌氯细胞; 11, 12. 脑, l表示神经胶质增生, 下同

Plate I Histopathological observation of TiLV-infected tilapia

1, 2. liver, a. hepatocytes, b. pancreatic cells; 3, 4. spleen, c. lymphocytes, d. hemosiderin; 5, 6. head kidney, e, f and g. lymphocytes; 7, 8. trunk kidney, h. protein precipitation, i. glomeruli; 9, 10. gill, j. epithelial cells, k. chloride cells; 11, 12. brain, l. gliosis, the same below

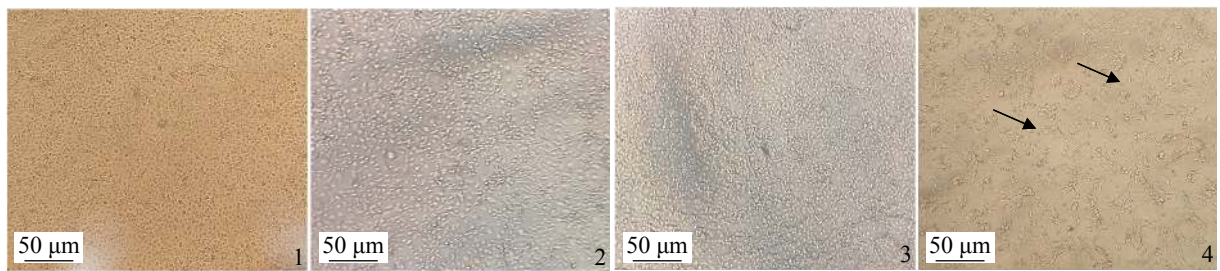


图版 II TiLV感染吉富罗非鱼组织的免疫组化检测

图中箭头表示阳性信号

Plate II Immunohistochemistry assay of the tissues from TiLV infected tilapia

The arrow in the figure indicates positive signal

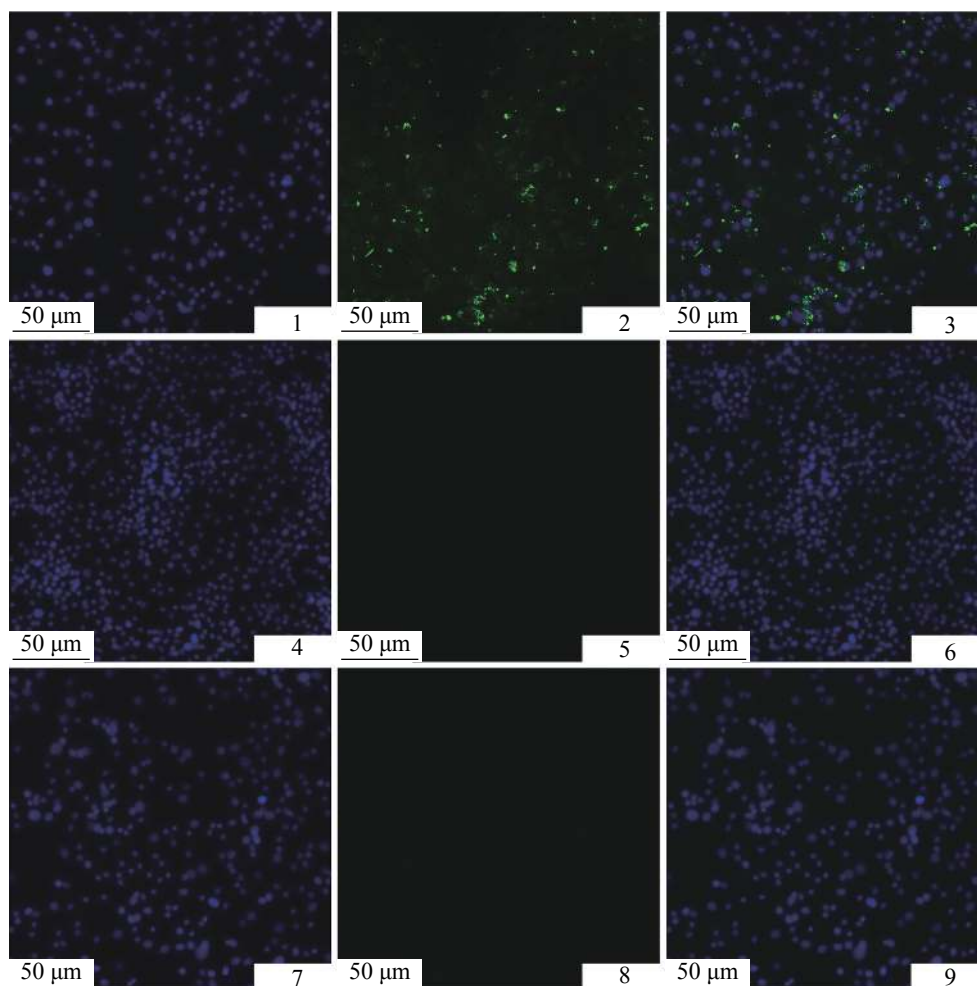


图版 III TiLV感染E-11细胞的显微观察

1.TiLV感染E-11细胞0 h, 2.TiLV感染E-11细胞48 h, 3.TiLV感染E-11细胞96 h, 4.TiLV感染E-11细胞192 h。图中箭头表示细胞病变

Plate III Microscopic observation of E-11 cells infected by TiLV

1. TiLV infection of E-11 cells 0 h; 2. TiLV infection of E-11 cells 48 h; 3. TiLV infection of E-11 cells 96 h; 4. TiLV infection of E-11 cells 192 h. The arrows in the figure indicate cytopathic changes



图版 IV TiLV感染E-11细胞间接免疫荧光检测

1. TiLV感染后孵育HEF抗体的DAPI显色, 2. TiLV感染后孵育HEF抗体的FITC显色, 3. 1与2的合并, 4. 对照组孵育HEF抗体的DAPI显色, 5. 表示对照组孵育HEF抗体的FITC显色, 6. 表示4与5的合并, 7. 表示TiLV感染后孵育阴性血清的DAPI显色, 8. 表示TiLV感染后孵育阴性血清的FITC显色, 9. 表示7与8的合并

Plate IV Indirect immunofluorescence assay of E-11 cells infected by TiLV

1. DAPI stain of TiLV infected cells incubated with anti-HEF antibody; 2. FITC stain of TiLV infected cells incubated with anti-HEF antibody; 3. merge of 1 and 2; 4. DAPI stain of non-infected cells incubated with anti-HEF antibody; 5. FITC stain of non-infected cells incubated with anti-HEF antibody; 6. merge of 4 and 5; 7. DAPI stain of TiLV infected cells incubated with negative serum; 8. FITC stain of TiLV infected cells incubated with negative serum; 9. merge of 7 and 8