

文章编号:1000-0615(2002)04-0363-05

虎纹蛙病毒体外培养及其理化特性

王晓红, 翁少萍, 何建国

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 从发病濒死的虎纹蛙 (*Rana tigrina rugulosa*) 蝌蚪中分离到一种病毒。在 25℃ 条件下, 该病毒能在鲤鱼表皮瘤细胞系 (EPC), 胖头鲢肌肉细胞系 (FHM) 和草鱼性腺细胞系 (CO) 三种鱼类细胞上产生空斑状的细胞病理变化 (CPE)。该病毒对氯仿, 热 (56℃, 30min) 和酸 (pH3) 敏感。其体外培养的适合增殖温度范围为 20 ~ 30℃。电镜下观察, 病毒为对称的二十面体, 切面正六边形, 对角直径 125nm 左右。

关键词: 虎纹蛙; 虹彩病毒; 体外培养; 理化特性

中图分类号: S945.1 文献标识码: A

In vitro culture and physico-chemical properties of a virus isolated from diseased *Rana tigrina rugulosa*

WANG Xiao-hong, WENG Shao-ping, HE Jian-guo

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *In vitro* culture and physico-chemical properties of a virus isolated from moribund *Rana tigrina rugulosa* were investigated. The results showed that the virus multiplied on EPC (epithelioma papillosum cyprini), CO (ovary cells of grass carp) and FHM (muscle cells of fathead minnow) cell lines, and caused similar round lytic plaque cytopathic effect (CPE) at the temperature of 25℃; The optimal temperatures for the virus propagation *in vitro* ranged between 20 and 30℃; When incubated at 56℃ for 30 min, or in chloroform and pH3, the virus lost infectivity. Under transmission electron microscope, the virus particles in infected EPC exhibited icosahedral symmetry with hexagonal cross-sections and 125nm in diameter.

Key words: *Rana tigrina rugulosa*; iridovirus; *in vitro* culture; physico-chemical properties

2000 年 5-6 月间, 广东省南海市一养殖场饲养的虎纹蛙 (*Rana tigrina rugulosa*) 蝌蚪出现不明病因的大批死亡, 死亡的蝌蚪体表无明显病症。为查明病因, 我们利用鱼类细胞系从虎纹蛙蝌蚪中分离到一种病毒, 通过对这种病毒的理化特性、生物学特性和形态学特性的研究, 认为该病毒是虹彩病毒 (Iridovirus), 现将该病毒的体外培养及其理化特性的研究结果作一报道。

1 材料和方法

1.1 病蛙来源

濒死的虎纹蛙蝌蚪来自于广东省南海市一养殖场。

收稿日期: 2001-10-16

作者简介: 王晓红 (1969-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工程师, 理学学士, 主要从事细胞培养及鱼类病害研究。Tel: 020-84113793

通讯作者: 何建国 (1962-), 男, 广东佛山人, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞培养及鱼类病害研究。Tel: 020-84110976

1.2 病毒粗提液的制备

将整只濒死蝌蚪称重后用清水冲净,再用双蒸水冲洗2次,移入超净工作台中干净的小烧杯中,用70%酒精浸泡10min,用无菌双蒸水冲洗2~3次后剪碎,按照1:10的比例加入磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)冰浴匀浆,匀浆液中加入双抗($1000\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素 + $1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素), $3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C 离心20min,取上清液经孔径 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,所得滤液即病毒粗提液。

1.3 病毒分离

取病毒粗提液用细胞培养液M199进行10倍系列梯度稀释(浓度为 $10^{-1}\sim 10^{-4}$),将病毒粗提液及其梯度稀释液分别接种于已长成致密单层细胞的96孔板中,对照组用M199代替病毒粗提液。每孔接种0.05mL, 25°C 吸附1h,每孔再加M199培养液至0.2mL,置于 25°C , CO_2 浓度为2.5%的 CO_2 培养箱培养。逐日镜检观察细胞病理变化(CPE),取出现CPE的孔中的培养悬液再接种细胞,方法如上。如此连续传3代。用于病毒分离的细胞有鲤鱼表皮瘤细胞系(EPC),胖头肌肉细胞系(FHM)和草鱼性腺细胞系(CO)。

本研究中病毒的 TCID_{50} 值(半数细胞病变剂量)测定,均在96孔板上进行,所用细胞为EPC。病毒液做10倍系列稀释至 10^{-12} ,记录各稀释度产生CPE的孔数,按照Reed和Muench^[1]的方法计算病毒的 TCID_{50} 值。

1.4 病毒的体外培养

将病毒粗提液稀释10倍,取0.1mL接种于已长满致密单层EPC细胞的细胞培养瓶(25cm^2)中,吸附1h,加入5mL M199细胞维持液(含2%小牛血清),置于 25°C , 2.5%的 CO_2 培养箱培养。当细胞单层出现CPE达80%以上时,即可收获病毒,方法是将培养物置于 -20°C 冰箱,冻融2次, $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4°C ,离心20min,上清液即为体外培养的病毒悬液。

1.5 病毒理化特性测定

1.5.1 脂溶剂敏感性

按照Feldman和Wang^[2]的方法,在1mL体外培养的病毒悬液中加入0.5mL氯仿,对照组加入0.5mL磷酸缓冲液(PBS),室温下振荡10min后低速离心,分离氯仿,吸取上层水相,同时与对照组分别作 TCID_{50} 值测定。

1.5.2 pH稳定性试验

用1N HCl或1N NaOH调病毒悬液(约1mL)pH分别为3、4、5、10、11、12、13、14,在 20°C 保持1h,再分别用1N HCl或NaOH调回pH值至7.2。对照组病毒悬液pH7.2,同时作 TCID_{50} 值测定。

1.5.3 热稳定性试验

病毒悬液置于 56°C 水浴分别处理15、30、60、90min。对照组置于 20°C ,后分别作 TCID_{50} 值测定。

1.6 病毒形态学观察

感染病毒的EPC细胞,当出现CPE达到80%以上且大部分脱落时,加入与培养液等量的4%戊二醛电镜固定液,固定15min, $2000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低速离心10min,弃掉上清液,沉淀细胞再用4%戊二醛固定,经PBS冲洗再用锇酸固定,然后按常规方法包埋,切片,染色,电镜观察。

1.7 病毒的生物学特性

1.7.1 细胞宿主范围

将鲤鱼表皮瘤细胞系(EPC, epithelioma papillosum cyprini)、胖头鲢肌肉细胞系(FHM, muscle cells

of fathead minnow)、草鱼性腺细胞系(CO, ovary cells of grass carp)、鲤鱼白细胞系(CLC, leucocytes of common carp)、草鱼肾组织细胞系(CIK, kidney cells of grass carp)、虹鳟性腺细胞系(RTG-2, gonad cells of rainbow trout)、梭鱼性腺细胞系(PG, gonad cells of pike)、大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系(CHSE-214, embryo cells of chinook salmon)8种细胞分别接种于25cm²细胞培养瓶中,待长成致密单层后,每瓶接种体外培养的病毒悬液0.1mL,吸附1h,加M199培养基5mL,于25℃,2.5%的CO₂培养箱中培养,逐日观察CPE。

1.7.2 生长温度

在7个已长满EPC细胞的25cm²的细胞培养瓶内,各接种0.1mL病毒悬液,吸附1h,加M199培养基5mL分别置于4、10、15、20、25、30、35℃条件下培养,逐日观察CPE。7d后冻融1次,4 000r·min⁻¹,4℃离心20min,收集上清液,分别作TCID₅₀值测定。

2 结果

2.1 病毒分离及体外培养

稀释10倍的病毒粗提液本身对细胞有一定的毒性,使细胞不能正常生长,接种第二天,细胞就大部分死亡。接种了稀释梯度为10⁻²~10⁻⁴病毒粗提液3~4d后,在EPC、CO和FHM三种细胞中均出现不同程度的CPE:细胞先是变暗,轮廓明显,胞质颗粒增加,继而细胞坏死,出现小空洞,空洞周围细胞均收缩变圆坏死(图版-1),然后,空洞变大增多,形成破鱼网状,最后,细胞全部缩成球状,脱离瓶壁,呈片状悬浮。这一变化过程十分迅速只需1~2d。而且随着病毒液稀释度的增加,细胞出现CPE的时间及病变速度越慢,即稀释度与细胞病理变化呈负相关。取出现CPE的孔中的培养悬液继续接种细胞,在25℃如此连续传3代,相同的CPE仍反复出现,且出现时间逐渐提前,从开始(自然感染宿主来源的病毒粗提液)的3~4d到第二代的2d到第三代的24h即可出现CPE。以上结果可以初步认定病毒的存在。

实验发现,EPC细胞出现CPE的时间最早,且变化最快,说明病毒在EPC上增殖效果最好,故选用EPC细胞进行该病毒的体外培养。体外培养的病毒悬液接种EPC细胞后出现CPE的时间最终稳定在24~36h,一般接种病毒后3d即可收获病毒。

2.2 电镜观察

感染病毒的EPC细胞经超薄切片,电镜下观察,未成熟病毒粒子均呈晶格状整齐地排列于细胞质中(图版-3),病毒粒子为二十面体(图版-4),横切面为正六边形,成熟的病毒粒子均由三部分组成,由中心向外依次为核壳、电子非致密区和衣壳。病毒直径均在125nm左右。

2.3 病毒的理化特性

病毒经氯仿处理后,对EPC细胞失去感染力,表明该病毒对脂溶剂氯仿敏感。病毒在56℃处理30min即失去感染力,说明病毒对热敏感。病毒在pH3处理1h无感染能力说明病毒对酸敏感,但在pH14处理1h后仍有微弱感染力,说明病毒对强碱有一定抗性(表1)。

表1 病毒对氯仿、热处理和pH的敏感性及其在不同温度下的增殖

Tab.1 The virus sensitivity to chloroform, heat and pH treatments in relation to the replication at different temperatures

	氯仿 chloroform	热(56℃)处理时间(min) time of heat(56℃) treatment				pH						温度(℃) temperature						
		15	30	60	90	3	4	5	10	11	12	13	14	10	15	20	25	30
试验组 test	0*	3.3	0	0	0	0	3.6	3.0	11.3	7.3	5.6	3.0	0.3	4.5	5.7	7.0	12.5	15
对照组 control	11	6.3				7.0												

* log TCID₅₀·0.05mL⁻¹

2.4 病毒的生物学特性

2.4.1 细胞宿主范围

病毒接种到 CIK、PG、CLC、CHSE - 214 和 RTG - 2 细胞系后,均无 CPE 出现,而接种到 EPC、CO 和 FHM 细胞上以后,均有 CPE 出现。病毒出现 CPE 的时间在感染后 24 ~ 72h 内,3 ~ 5d CPE 可达 80% 以上。实验显示,病毒对 EPC 和 CO 细胞的感染力比 FHM 强(表 2)。

2.4.2 增殖温度范围

病毒接种于 EPC 细胞后,在 20 ~ 30℃ 培养条件下均能大量增殖并产生 CPE,最适增殖温度应为 30℃。而在此温度范围以外,TCID₅₀ 值均较低,在 10℃ 和 15℃ 条件下,CPE 出现得十分缓慢且 TCID₅₀ 值较低(表 1)。在 4℃ 和 35℃ 时,由于此温度不适于 EPC 细胞生长,细胞在此温度下很快变圆脱落死亡,故无法观察 CPE。

3 讨论

本研究结果表明,从濒死的泰国虎纹蛙蝌蚪中分离到的病毒,在透射电镜下观察为正六边形,在细胞质中成熟的病毒粒子呈晶格状排列,其直径大小在 125nm 左右。在酸(pH3)和热(56℃,30min)条件下不稳定。这些特性与虹彩病毒(Iridoviridae)相似^[3],最近,本实验室完成了该病毒株基因组全 DNA 序列的测定,结果表明这种病毒是虹彩病毒科蛙病毒属的病毒。虹彩病毒是一种二十面体胞浆型 DNA 病毒,只感染昆虫和冷血脊椎动物^[3]。近十几年来虹彩病毒成为危害鱼类养殖业的主要病害之一,到目前为止,已报道近一百种鱼类有虹彩病毒的感染^[4]。虹彩病毒与两栖类的疾病有密切关系。其中 FV3 是虹彩病毒科蛙病毒属(*Ranavirus*)的代表种,也是研究最为全面的虹彩病毒之一^[5]。它是从豹蛙(*Rana pipiens*)中分离到的,且对成熟豹蛙无致病性,但对豹蛙蝌蚪有致病性。在我国张奇亚等^[6]报道了从患致死性综合症的美洲青蛙(*Rana grylio Stejneger*)中分离到了一种虹彩病毒(RGV),成熟的病毒粒子大小为 150nm,Kanchanakhon 等^[7]报道了从养殖的患病的泰国虎纹蛙中分离到一种虹彩病毒,该病表现为背部和腿部的皮肤溃烂,他们用 EPC 细胞从患病蛙中分离到的虹彩病毒(TFIV)直径为 128nm。我们分离到的这种病毒与 FV3、RGV、TFIV 之间的关系,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Reed I J, Muench H. A simple methods of estimating fifty percent endpoints[J]. American Journal of Hygiene, 1938, 270: 493 - 497.
- [2] Feldman H, Wang S. Sensitivity of various viruses to chloroform [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1961, 106: 736 - 738.
- [3] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus taxonomy [J]. Archives of Virology, 1995 (suppl.):1.
- [4] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of Iridovirus a suitable target for the study of virus evolution? [J]. Virus Genes, 1998, 18(1): 59 - 66.
- [5] Yin Z, Liu Z H. Animal Virology[M]. Beijing: Science Press, 1997. 1 101 - 1 102. [殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 1 101 - 1 102.]
- [6] Zhang Q Y, Li Z Q, Jiang Y L, et al. Preliminary studies on virus isolation and cell infection from diseased frog *Rana grylio* [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1996, 20(4): 390 - 392. [张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究[J]. 水生生物学报. 1996, 20(4): 390 - 392.]
- [7] Kanchanakhon S, Saduakdee U K, Chinabut S, et al. Isolation and characterization of a new virus fish ulcerative diseases. tiger frog (*Rana tigrina*) Cantor [C]. Proceedings of the 37 Th Kasetsart University Annual Conference, 1999, 133 - 140.

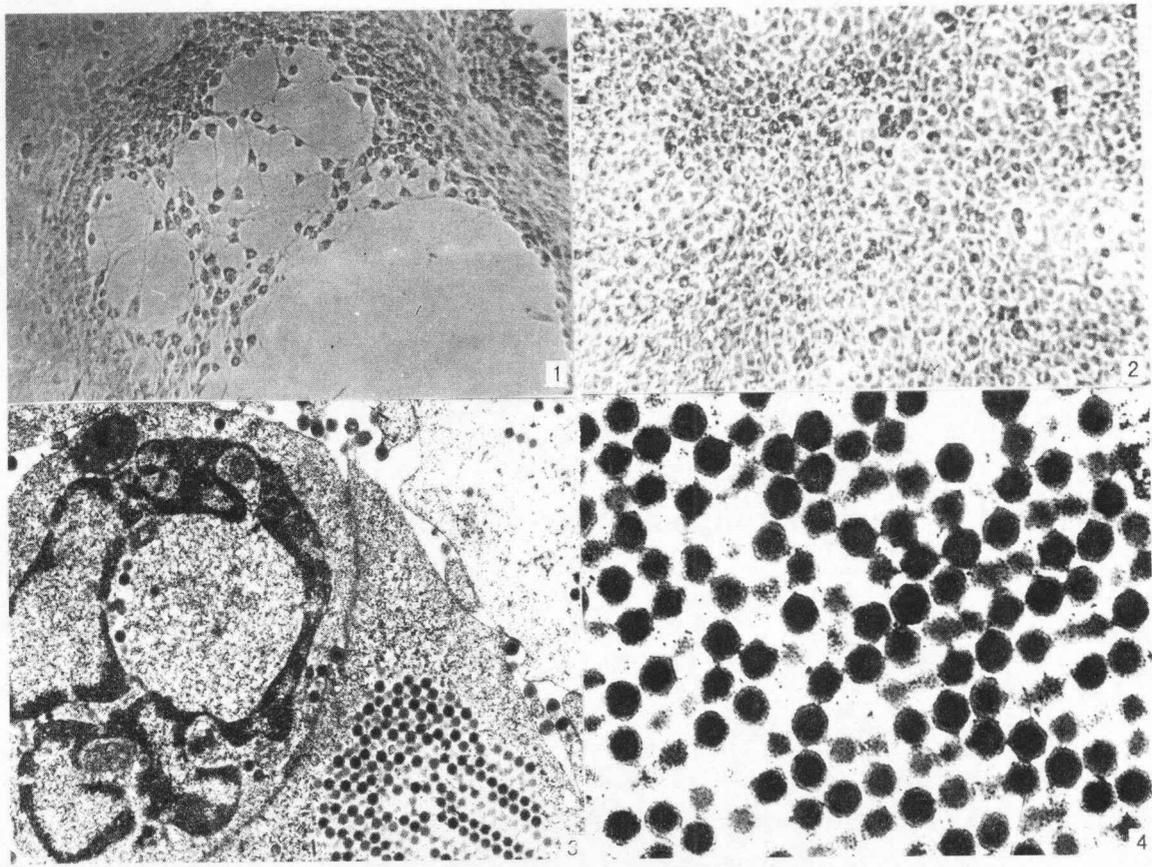
表 2 病毒对 8 种鱼类细胞系的敏感性

Tab.2 The sensitivity of eight fish cell lines to the virus

细胞系 Cell lines	出现 CPE 的时间(h) CPE time	达到 CPE80% 以上的时间 80% CPE days
EPC	24 - 36	3
CO	36 - 48	4
FHM	48 - 72	5
CLC	-	-
PG	-	-
RTG - 2	-	-
CHSE - 214	-	-
CIK	-	-

注:“-”表示不产生 CPE

Notes:“-”showing no sytopathie effect(CPE)



图版说明 Explanation of Plate

1. 接种虎纹蛙病毒后出现 CPE 的 EPC 细胞。细胞轮廓明显,胞质颗粒增加,出现空洞,空洞周围细胞均收缩变圆坏死(倒置相差显微镜,×100);2. 正常的已长成致密单层的 EPC 细胞(倒置相差显微镜,×100);3. 虎纹蛙病毒粒子。EPC 细胞质中的未成熟病毒粒子呈晶格排列(电镜,×10 000);4. 虎纹蛙病毒粒子。病毒粒子为二十面体,横切面为正六边形,成熟的病毒粒子均由三部分组成,由中心向外依次为核心、电子非致密区和衣壳。病毒直径均在 125nm 左右(电镜,×40 000)。

1. Cytopathic effect (CPE) in EPC cells after inoculation of *Rana tigrina virus*. Infected cells first showed obviously contour and granules increasing in cytoplasm, then plaques appeared in the monolayer of cultured cells, and the cells at plaque margins were retracting, rounding and necrosis (Invert microscope, ×100); 2. Normal abundant monolayer of EPC cells (Invert microscope, ×100); 3. *Rana tigrina virus* particles. Immature virus particles showed crystalline arrays in cytoplasm of infected EPC cells (electron microscope, ×10 000); 4. *Rana tigrina virus* particles. Virus particle exhibited icosahedral symmetry with hexagonal cross-sections, the mature virion consists of a central electron-dense core, a electron translucent zone and a capsomer, and measures 125nm in diameter (electron microscope, ×40 000).