

## 一株鳢科鱼源弹状病毒的分离及鉴定

曾伟伟, 王庆, 王英英, 刘春, 谭爱萍, 石存斌, 吴淑勤\*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部鱼药创制重点实验室,  
广东省免疫技术重点实验室,广东广州 510380)

**摘要:**为研究近来鳢科鱼类疫病频发的病因,实验对采集的患病杂交鳢病料分别从细菌学和病毒学两方面进行病原分离和鉴定。排除细菌感染的可能后,通过细胞培养技术、回归感染实验、电镜技术、分子生物学技术等进行病毒学分析,最终分离到一株弹状病毒,命名为 HSHRV-C1207 (Hybrid Snakehead Rhabdovirus -C1207)。实验结果显示,该病毒在 EPC、FHM、GSB、SFC、CIK 等 8 种细胞中都能复制,并对其中 6 种细胞产生明显的细胞病变效应(CPE)。用分离的病毒进行回归感染实验,可使感染的杂交鳢复制出自然发病鱼的相同症状,且死亡率达 90%。感染病料组织液的 EPC 细胞固定后经电镜观察,发现细胞质内有大量子弹状病毒聚集,直径约 60 nm,长度约为 160 nm,形态和排列方式与已报道的鱼类弹状病毒相似。参考 OIE 中传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、鲤春病毒血症病毒(SVCV)的检测引物及根据乌鳢弹状病毒(SHRV)、鳊鱼弹状病毒(SCRV)、比目鱼弹状病毒(HIRRV)的 G 蛋白基因设计特异性引物,分别对自然发病病料组织、接种病料组织的细胞进行 RT-PCR 扩增,仅针对 SCRV 的引物能扩增出大小约 350 bp 的片段。对 HSHRV-C1207 株的 G 基因进行序列测定和分析,结果表明其核苷酸序列同 SCRV 和 SHRV 的同源性分别为 93.8% 和 20.4%,推导的氨基酸序列同源性分别是 93.7% 和 18.3%。用 G 基因推导氨基酸序列与其它弹状病毒的 G 蛋白进行系统进化树分析,表明该毒株与水泡性病毒属聚为一支,其中与 SCRV 的亲缘关系最近,而与属于诺拉弹状病毒属的 SHRV 相距甚远,可能为 SCRV 的变异株或一个新的毒株。

**关键词:**杂交鳢;弹状病毒;分离;鉴定

**中图分类号:**Q 939.4; S 943

**文献标志码:**A

乌鳢 (*Channa argus*) 和斑鳢 (*Channa maculata*) 为我国重要的土著鱼类养殖品种,因其适应性特别强,而被俗称为生鱼,它们同属鲈形目 (Perciformes), 攀鲈亚目 (Anabantoidei), 鳢科 (Channidae)、鳢属 (*Channa*)。二者均为食用性的淡水鱼类,对环境有很强的适应性、耐低氧、抗病力强。因此,在国内分布广泛,以南方地区为主,斑鳢主要分布于珠江水系及海南各水系,乌鳢主要分布于长江及长江以北的水系。近年来,各地也形成了较大规模的人工养殖<sup>[1]</sup>。因它们具

有肉味鲜美,蛋白含量高、骨刺少等特点,在食用鱼类中享有盛誉<sup>[2]</sup>。还因其具有生肌补血、滋补调养等功效,在传统的中医学中被证明具有较好的药用价值<sup>[3]</sup>。使得鳢科鱼类已成为我国一种重要的淡水养殖品种和外贸出口水产品。杂交鳢 (*Channa argus*) 是乌鳢和斑鳢通过鱼类远缘杂交的种间杂交后代,综合了二者的优点,并且在实际的养殖生产过程中体现出本身的杂种优势,具有生长速度快、抗逆性强、成活率高、耐运输、易驯食膨化颗粒饲料等方面的优点<sup>[4-8]</sup>。近年来,杂交

收稿日期:2013-02-24 修回日期:2013-03-30  
资助项目:国家科技支撑计划(2012BAD25B02)  
通信作者:吴淑勤,E-mail:wushuqin001@21cn.com

鳢的养殖势头迅猛发展,已逐步替代乌鳢、斑鳢等的鳢科鱼类的经典养殖品种,而成为鳢科鱼类中主要的养殖品种,其养殖规模和养殖范围在逐步推广<sup>[9]</sup>。

由于鳢科鱼类抗病能力较强,在中国对鳢科鱼类的病害及其防治方面的研究相对较少<sup>[10]</sup>。随着鳢科鱼类养殖的集约化程度不断提高、养殖规模和养殖密度的逐步扩大,致使鳢科鱼类发生传染病的情况日趋增多,各种病害频繁发生,制约了鳢科鱼类养殖业的发展和更快的推广<sup>[10-11]</sup>。鱼类弹状病毒是一类能使多种鱼出现高致死率的病毒病原体,其感染宿主谱广、普遍存在、严重危害各种淡水和海水鱼。迄今报道感染鱼类的弹状病毒已有 20 多种,包括导致鲤科鱼类大规模爆发鲤春病毒血症的鲤春病毒血症病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV)<sup>[12-13]</sup>、引起虹鳟、鲑等患出血性疾病的病毒性出血性败血症病毒 (viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV)<sup>[14]</sup>、引起鳟鱼和太平洋大马哈鱼为主的急性、全身性的严重传染病的传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)<sup>[15]</sup>、以及牙鲆弹状病毒 (hirame rhabdovirus, HRV)<sup>[16]</sup>、乌鳢弹状病毒 (snakehead rhabdovirus, SHRV)<sup>[17]</sup>、鳊鱼弹状病毒 (siniperca chuatsi rhabdovirus, SCRv)<sup>[18]</sup>、胭脂鱼弹状病毒 (Chinese sucker rhabdovirus, CSRV)<sup>[19]</sup>、石鲮鱼弹状病毒 (kareius bicoloratus rhabdovirus, KBRV)<sup>[20]</sup>、欧洲鳗鲡弹状病毒 (eel virus european X, EVEX)<sup>[21]</sup> 等。其中 IHNV、VHSV、HRV、SHRV 等属于诺拉弹状病毒属,而 SVCV、PFRV、SCRv 等属于水泡性病毒属<sup>[22-23]</sup>。鳢科鱼类因感染弹状病毒而爆发疫病在 20 世纪 80 年代和 90 年代就有报道研究<sup>[17,24-25]</sup>,而国内至今尚未见鳢科鱼类感染弹状病毒报道。2012 年的 7 月份—10 月期间,广东省的广州、佛山、珠海、清远等多个地方的鳢科鱼养殖场大规模的爆发流行性疫病并大批量死亡,病因不明,使得该地区鳢科鱼养殖遭受巨大的经济损失。患病鳢科鱼主要症状表现为肝脏、脾脏肿大、表明有大小不等的出血点,鱼鳃血管严重肿胀,整个鱼鳃都被出血斑块覆盖。为了弄清导致该流行性疫病爆发的病因,本实验对来自佛山地区患病杂交鳢分别从细菌学和病毒学两方面进行了分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验试剂与样品

M199 培养基、犊牛血清、胰酶为 Gibco 公司产品;AMV 反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司;T<sub>4</sub> RNA ligase 购自 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯。患病杂交鳢采自广东省佛山市某杂交鳢养殖户池塘中,其外表没有明显的异常症状,解剖后发现病鱼肝脏和脾脏肿大,并有少量出血点,肠道充血,鱼鳃严重充血,整个鱼鳃表面都被肿胀、出血的斑块覆盖。

### 1.2 细胞和实验鱼

草鱼肾细胞系 (CIK)、肥头鲤细胞系 (FHM)、鲤上皮细胞系 (EPC) 购自武汉大学细胞典藏中心、草鱼脑细胞 (CIB)、草鱼鳃细胞 (GSB)、锦鲤吻端细胞系 (KPC)、剑尾鱼胚胎细胞系 (SFC)、鳊脑细胞系 (SCC) 由本实验室建立并保存。体质量为 180 ~ 200 g 的杂交鳢购自佛山市三水区一杂交鳢养殖户,并对购进的实验鱼杂交鳢进行了已知常见病原的检测,证明没有感染常见的鳢科鱼类易感病原。

### 1.3 细菌的分离与鉴定

采集自然发病的鱼在无菌环境下解剖后,按参考文献[26]介绍的方法以无菌操作从肝脏、脾脏、肾脏、鱼鳃取样进行 BHI 琼脂平板、血平板和 RS 培养基平板划线分离,28 °C 培养 24 ~ 48 h,待菌落形成后进行菌落纯化和鉴定。

### 1.4 病毒分离与细胞培养特性测定

无菌采取病鱼的鳃、肝、肾、脾,加入含双抗的灭菌的 PBS 中制成 1:1 的匀浆液,在 -20 °C 冻融 3 次后,组织匀浆液依次经 2 000、5 000 和 10 000 r/min,每次离心 10 min,去沉淀,上清液经滤膜孔径为 0.22 μm 的微孔滤器过滤除菌分别接种密度为 80% ~ 90% 的单层 FHM、EPC、CIK、GIB、GSB、KPC、SFC 和 SCC 细胞,室温下吸附 1 h,吸弃病毒液,加入与培养液等量的维持液 (含 3% FBS 的 M199),28 °C 恒温培养,每日观察细胞形态。病毒传代时,将病毒细胞培养物反复冻融 2 ~ 3 次,再按上述接种方法做传代培养。

### 1.5 回归感染实验

60 尾健康的杂交鳢放入水族箱中暂养 1 周,分成两组 (各 30 尾) 进行感染实验。用无菌注射器

吸取已配制好的病毒液,进行腹腔注射,每尾注射 0.3 mL,对照组每尾注射 0.3 mL 灭菌 PBS,每天观察各组实验鱼的发病和死亡情况。同时在实验过程中,对攻毒后死亡或濒临死亡的鱼以及攻毒 3 周后未死亡或者发病的鱼进行解剖,观察各组织器官的病理变化,并分别采取肝、脾、肾和鳃,于 -70 °C 保存备用,用于后续病原的检测和分析。

### 1.6 电镜观察

收集病毒感染后出现细胞病变的细胞,用戊二醛和四氧化锇双固定,酒精系列脱水,苯二甲酸二丙酯包埋,制备超薄切片,经染色后在透射电

镜下观察和拍片。

### 1.7 RT-PCR 检测

按照 Trizol Reagent 说明书的步骤进行病料组织和病毒感染细胞总 RNA 的提取,然后按照 TaKaRa AMV 试剂盒说明书进行反转录获得总 cDNA,再以 cDNA 为 PCR 扩增模板,分别参考 OIE 中 IHNV、VHSV、SVCV 的 RT-PCR 扩增引物,及分别根据 SHRV、SCRV 和比目鱼弹状病毒 (hirame rhabdovirus, HIRRV) 的 G 蛋白基因设计特异性引物,进行 PCR 扩增,引物信息如表 1 所示:

表 1 检测弹状病毒的 PCR 扩增引物  
Tab. 1 The PCR amplification primers for the detection of rhabdovirus

病毒 virus	引物 primers	扩增片段大小/bp fragment length
IHNV	F:5'-GGGCGAACCAGAATCACTTA-3' R:5'-ATCCGGAGGAATCTGATGTG-3'	392
SVCV	F:5'-TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC-3' R:5'-AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCA-3'	715
VHSV	F:5'-ATGGAAGGAGGAATTCGTGAAGCG-3' R:5'-GCGGTGAAGTGCTGCAGTTCCC-3'	453
SHRV	F:5'-TACAAA GTCGCCGTGGTAAG-3' R:5'-CTCTCCAGTGCCCGATAGCC-3'	354
SCRV	F:5'-GGGCTGGATGATAGACGATTG-3' R:5'-TGGCGGAGGTGCTTGATATGG-3'	349
HIRRV	F:5'-ATGGCACGTTAGTGTACTGTT-3' R:5'-TCCGGGACCCAAAGTTGACCT-3'	335

反应体系为 25  $\mu$ L: cDNA 1  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 1  $\mu$ L, P1 和 P2 (25  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 灭菌超纯水 19  $\mu$ L。扩增反应热循环参数为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 53.5 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物和 DNA Marker (DL1000) 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳观察结果。

### 1.8 G 基因全长测定及系统进化分析

根据 SCR/V 糖蛋白基因 (G 基因) 序列 (GenBank: DQ399789.1) 采用软件 Oligo7.37 设计以下两对引物进行扩增, 两对引物扩增的片段有一部分重叠, 两对引物分别是 SCR/V-G-1-F: 5' ATT AAT CAA TGG TGT TGG TGG 3', SCR/V-G-1-R: 5' CCA CCA ACA CCA TTG ATT AAT 3' 和 SCR/V-G-2-F: 5' CAT ATC CGA ATT GCG AAG AGC 3', SCR/V-G-2-R: 5' TTC TTG AGA ATA ATC CAT GAT 3'。将 PCR 扩增的目的片段回收, 克隆到载体 pMD18-T, 转化 *E. coli* 菌株 DH5a, 通

过 PCR 方法检测阳性克隆, 将阳性克隆菌液送上海博亚公司测序。应用 DNA star 软件将测得的 HSHRV G 基因及推导的氨基酸序列与 GenBank 中 SCR/V 和 SHR/V G 基因及相应蛋白序列进行同源性比对。最后根据 G 基因推导的氨基酸序列, 用 MegAlign 软件采用邻位相连法 (Neighbor-Joining) 绘制 HSHRV 与 SHR/V (GenBank: NC\_000903.1)、SCR/V (GenBank: DQ399789.1)、VHSV (GenBank: NC\_000855.1)、SVCV (GenBank: NC\_002803.1)、HIRRV (GenBank: NC\_005093.1)、EVEX (GenBank: JN639009.1)、梭子鱼苗弹状病毒 (pike fry rhabdovirus F4, PFRV; GenBank: FJ872827.1)、鲈鱼弹状病毒 (*Perch rhabdovirus*, PRV; GenBank: JX679246.1)、大菱鲆弹状病毒 (*Scophthalmus maximus* Rhabdovirus, SMRV; GenBank: HQ003891.1)、海鳟弹状病毒 (sea trout rhabdovirus, STRV; GenBank: AF434992.1)、狂犬病毒 (Rabies virus QS-05, RABV; GenBank:

JN786877.1)、牛流行热病毒(bovine ephemeral fever virus JT02L, BEFV; GenBank: JX564639.1)、水泡性口炎病毒突变体(mutant vesicular stomatitis viruses, MVSV; GenBank: HV819427.1)的系统进化树,并采用自引分析法((Bootstrap  $n = 1\ 000$ ))进行检验。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离情况

从发病杂交鳢的肝脏、脾脏、肾脏和鱼鳃均未

分离到细菌。

### 2.2 病毒分离情况

病料组织悬液接种 CIK, CIB、FHM、EPC、SFC 和 GSB 后,盲传至第 2 或 3 代,接毒 2 d 后就开始出现不同程度的细胞病变,主要表现为细胞收缩、变圆,6 d 后接种 CIB 和 EPC 的细胞大部分凋亡并脱落,未接毒的细胞对照生长状态良好(图 1)。而接种 SCC 和 KPC 细胞则没有明显变化,但通过 RT-PCR 对其进行扩增,可以检测到病毒的存在。

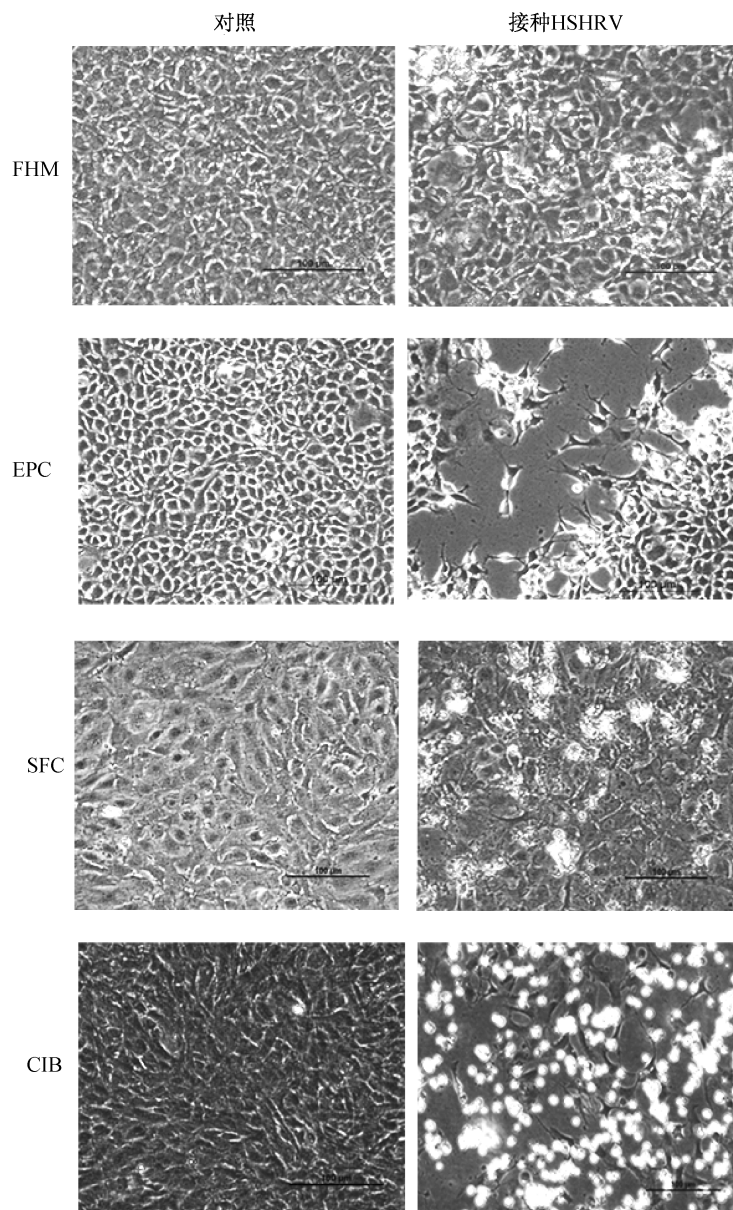


图 1 病料组织悬液分别接种 FHM、EPC、SFC 和 CIB 细胞 5 d 后产生 CPE 的结果(200 ×)

Fig. 1 The results of induced CPE in FHM, EPC, SFC and CIB cells 5 d after tissue suspension inoculation(200 ×)

### 2.3 动物回归感染实验

利用接种 EPC 细胞分离的病毒液腹腔注射接种 180 ~ 20 g 的杂交鳢, 接种病毒的杂交鳢从第 12 天开始死亡, 16 d 左右达到死亡高峰(表 2)。感染病毒的杂交鳢能复制出自然发病鱼的相同临床症状, 对接毒后死亡的杂交鳢进行解剖观察, 可发现自然发病鱼的典型症状, 即肝(图 2, 箭头 3 所示)、脾(图 2, 箭头 2 所示)、肾肿大、表

面有出血点, 鳃严重出血, 整个表面都覆盖了肿胀的血管和出血块(图 2, 箭头 1 所示)。攻毒 13 d 后病毒注射组死亡 1 尾实试验鱼, 后续的 14 ~ 19 d 内, 病毒注射组每天都有鱼死亡, 死亡高峰期为第 16 天和第 17 天, 最后总共死亡 27 尾鱼, 死亡率为 90%, 而注射 PBS 的对照组仅在 18 d 后死亡 1 尾, 对其进行解剖观察, 没有发现明显的组织器官病变, 最后对照组死亡率为 3.3%。

表 2 病毒对杂交鳢的回归感染实验结果  
Tab. 2 The results of virus on hybrid snakehead regression test

组别 groups	数量 quantity	注射后天数/死亡数 days of after challenge/no. of deaths										死亡率/% mortality
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
病毒注射组 virus	30	0	1	3	2	10	8	2	1	0	0	90
对照组 control	30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3.3

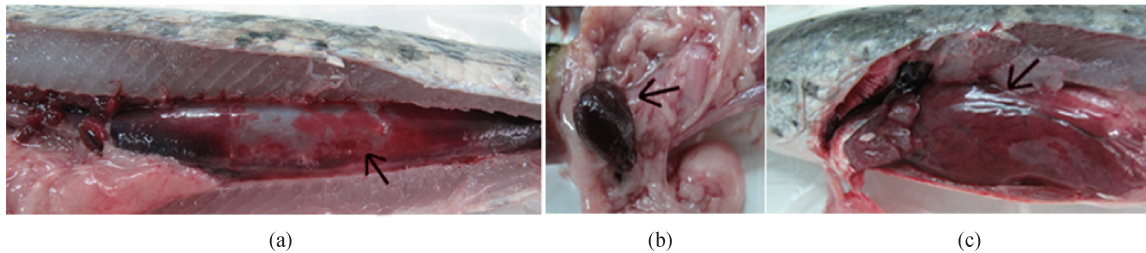


图 2 回归感染实验中发病杂交鳢内脏病理变化

(a) 鱼鳔; (b) 脾脏; (c) 肝脏。

Fig. 2 The visceral histopathology of diseased hybrid snakehead in regression tests

(a) swimming bladder; (b) spleen; (c) liver.

### 2.4 病毒超微形态观察

对感染病毒的细胞切片进行电镜观察, 在细胞质中可见有大量病毒的颗粒, 病毒呈典型的弹状, 直径约 60 nm, 长度为 160 nm(图 3)。因为切片方向性的问题, 一些病毒被斜切或纵切而表现为近椭圆形或圆形。分离的毒株被命名为 HSHRV-C1207。

### 2.5 RT-PCR 检测

自然发病和人工感染病料组织、感染病料发生病变的 EPC 细胞上清液分别采用针对 IHNV、SVCV、VHSV、SHRV、SCRV 和 HIRRV 的检测引物, 对其病原进行 RT-PCR 扩增检测, 结果显示, 针对 SCRV 的检测引物在病料和感染细胞中均能扩增出特异性目的条带, 大小约为 350 bp, 而其它扩增引物和阴性对照均未能扩增出目的条带(图 4)。

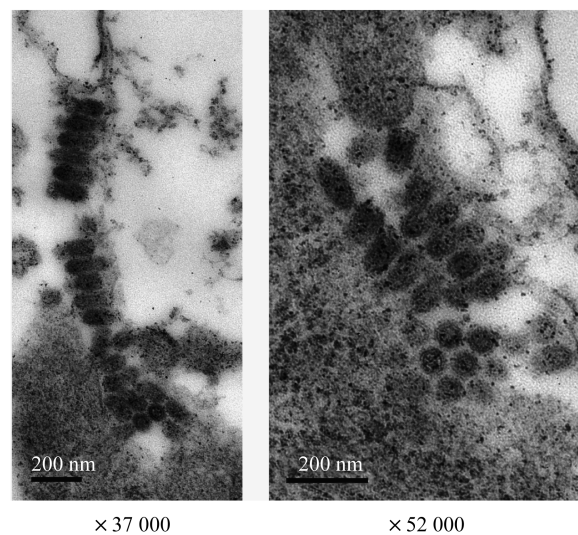


图 3 细胞质内呈规则排列的病毒离子

Fig. 3 Regular array of viral particles in cytoplasm

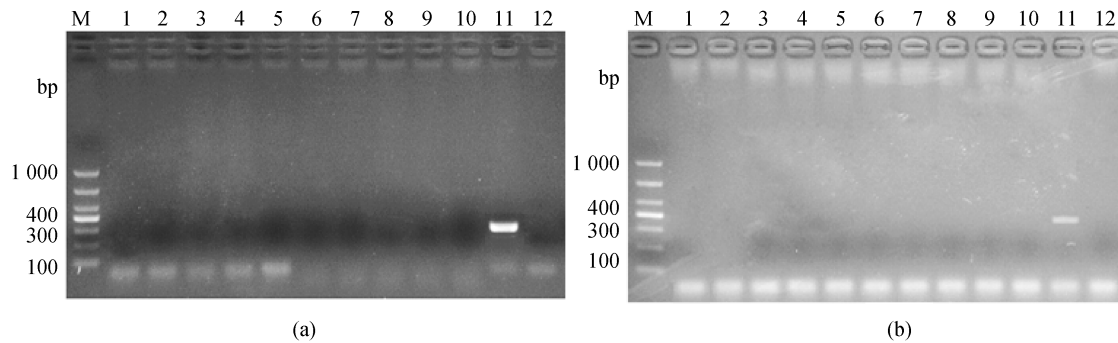


图4 采用不同引物对组织和细胞样品的 RT-PCR 检测结果

(a) 细胞样品; (b) 组织样品, 其中 1, 3, 5, 7, 9, 11 分别是以 IHNV、SVCV、VHSV、SHRV、HIRRV 和 SCRV 为检测引物的样品检测结果, 2, 4, 6, 8, 10, 12 分别是以 IHNV、SVCV、VHSV、SHRV、SCRV 和 HIRRV 为检测引物的阴性对照; M 为 DL 1 000 marker。

Fig. 4 Detection results of samples using different primers based on RT-PCR

(a) cell sample; (b) tissue sample; 1, 3, 5, 7, 9, 11. the amplification results using the primers based on IHNV, SVCV, VHSV, SHRV, HIRRV and SCRV respectively; 2, 4, 6, 8, 10, 12: negative control; M. DL 1 000 marker.

## 2.6 G 基因序列测定与系统进化树分析

根据 SCRV G 蛋白基因的序列信息设计引物, 对新分离 HSHRV-C1207 株病毒的 G 基因进行序列测序表明, G 基因最大的 ORF 推导出的氨基酸为 509 aa, 其分子量大小为 56.5 ku。通过与其它弹状病毒的 G 基因序列和 G 蛋白氨基酸序列同源性比对分析表明, 与 HSHRV-C1207 毒株核苷酸序列和氨基酸序列同源性最高的是 SCRV, 分别为 93.9% 和 93.7%。而与已报道的乌鳢弹状病毒 SHRV G 基因核苷酸序列和氨基

酸序列的同源性仅分别为 20.4% 和 18.2%。根据 HSHRV-C1207 病毒 G 基因推导的氨基酸序列与 GenBank 中 SCRV、SHRV、VHSV、SVCV、EVEX、HIRRV、PFRV、PRV、SMRV、STRV、RABV、BEFV、MVSU、IHNV 的 G 蛋白进行系统进化树分析, 结果该毒株与水泡性病毒属的病毒聚为一类, 其中与 SCRV 的关系最近, 而与属于诺拉弹状病毒属的 SHRV 相距甚远, 与同为弹状病毒的狂犬病毒相距更远(图 5)。

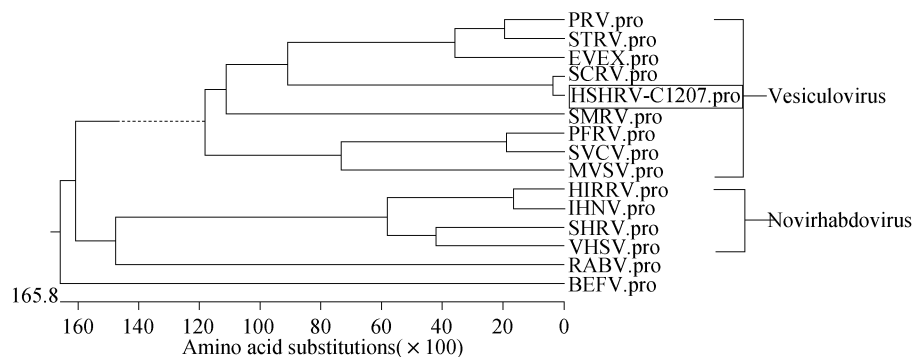


图5 HSHRV 与其他弹状病毒在 G 蛋白基因氨基酸序列基础上的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic trees based on amino acid sequence of G gene with counterpart segment from other rhabdoviruses

## 3 讨论

弹状病毒在自然界有广泛的感染宿主, 包括各种脊椎动物、无脊椎动物和多种植物<sup>[27]</sup>。目前弹状病毒科总体上分为 6 个属<sup>[28]</sup>, 分别是水泡性病毒属 (*Vesiculovirus*), 狂犬病毒属 (*Lyssavirus*),

短暂热病毒属 (*Ephemerovirus*), 诺拉弹状病毒属 (*Novirhabdovirus*), 质型弹状病毒属 (*Cytorhabdovirus*) 和细胞核弹状病毒属 (*Nucleorhabdovirus*)。分类地位已确定的鱼类弹状病毒都属于水泡性病毒属或诺拉弹状病毒属。鱼类弹状病毒是影响淡水和海水养殖业非常重要

的一种病原,该病毒因感染宿主广、毒株种类多、毒力强,一旦感染往往造成巨大的经济损失,目前已从鲟蝶、鲤科、鳢科、鳅、虹鳟、鳗鲡等多种鱼类分离到近 20 株弹状病毒。

早在 20 世纪 80 年代国外就已从属于鳢科鱼类的乌鳢上分离到弹状病毒,Frerichs 等<sup>[29]</sup>从泰国患流行性溃疡综合症的乌鳢中分离到弹状病毒,之后在整个东南亚的野生和养殖的鱼类中均有发现,并先后完成了其病原学特性研究和基因组序列分析<sup>[13,17,25]</sup>。在中国大陆,对于鳢科鱼类的病原学研究较少<sup>[10]</sup>,主要集中在细菌学方面,截至目前为止还未见鳢科鱼类感染弹状病毒的报道。实验对采集的患病杂交鳢病料分别从细菌学和病毒学两方面进行病原鉴定。常规的细菌分离鉴定技术,未从发病杂交鳢的病变组织中未分离的病原菌,因此,可以排除细菌疾病导致国内目前杂交鳢大量爆发流行性疫病死亡的原因。应用细胞培养技术、动物回归感染实验、电镜技术、分子生物学技术、生物信息学技术等进行了病毒学分析,从患病杂交鳢的内脏中分离到病毒,经鉴定为弹状病毒。病料组织悬液接种 CIK, CIB、FHM、EPC、SFC、GSB、SCC 和 KPC,检测到病毒均可在细胞中增殖,对前 6 种细胞可产生明显的 CPE。该病毒可在挑选的 3 个科 8 种鱼类细胞中均能复制,并可使其其中 6 种细胞产生明显的 CPE,显示了其对鱼类细胞的强感染性,这与鱼类弹状病毒有广泛的感染宿主有较大的关系。通过细胞分离的病毒液感染健康的杂交鳢,可复制出与自然感染病例相同的病变,主要症状都与出血和肿胀有关,这是感染弹状病毒后宿主表现出的一个典型特征。通过人工感染病毒的杂交鳢,最终的致死率为 90%,而对照组仅死亡 1 尾,对照组死亡的鱼无典型病变,PCR 扩增也未能扩增出目的条带,可能为非特异性死亡,细胞感染实验和动物实验结果表明该毒株为一个毒力较强的病毒。电镜下观察病毒粒子的形态大小,可见病毒呈典型的子弹状,直径约 60 nm,长度为 160 nm,比其它已报道的 SVCV(70 nm,180 nm)<sup>[30]</sup>(Wolf K,1988)、SHRV(60~70 nm,180~200)<sup>[24]</sup>、IHN(65~75 nm,150~190 nm)<sup>[31]</sup>、SCRV(100 nm,200 nm)<sup>[23,32]</sup>等要小一些。RT-PCR 检测结果显示,针对 SCRV 的引物能扩展出特异性的目的条带,初步判断该毒株的基因组序列与 SCRV 的基因组

序列应该比较相似;进一步对其 G 基因核苷酸序列和氨基酸序列分析表明,与 SCRV 的同源性最高<sup>[24]</sup>,分别为 93.9% 和 93.7%,而与从其亲本鱼乌鳢上分离到的弹状病毒 SHRV G 基因核苷酸序列和氨基酸序列的同源性仅分别为 20.4% 和 18.2%。这表明该毒株与 SCRV 的亲缘关系应该比较近,而与 SHRV 可能相距较远。根据 HSHRV-C1207 病毒 G 基因推导的氨基酸序列与 GenBank 中其它相关弹状病毒的 G 蛋白进行系统进化树分析表明,该毒株与水疱性病毒属弹状病毒聚为一类,其中与 SCRV 的关系最近,而与属于诺拉弹状病毒属的 SHRV 相距甚远,与弹状病毒的典型代表狂犬病毒关系更远。虽然 G 蛋白序列同源性和系统遗传进化树结果显示 HSHRV C1207 毒株与 SCRV 的亲缘关系比较近,但二者在病毒大小、基因和氨基酸序列等方面存在一些差异,且感染 SCC 也未能引起细胞病变。因此,实验可以初步判定 HSHRV C1207 应为水疱性病毒属的成员,但是否为 SCRV 的变异株,还是一株新的鱼类弹状病毒,还有待进一步深入研究验证。

#### 参考文献:

- [1] Courtenay W R, Williams J D. Snakeheads (Pisces, Channidae): A biological synopsis and risk assessment[M]. Minnesota: U. S. Department of the Interior, U. S. Geological Survey, 2004: 1251.
- [2] 聂国兴,傅艳茹,张浩,等. 乌鳢肌肉营养成分分析[J]. 淡水渔业, 2002, 32(2): 46-47.
- [3] Liu J, Cui Y, Liu J. Resting metabolism and heat increment of feeding in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and Chinese snakehead (*Channa argus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and integrative Physiology, 2000, 127(2): 131-138.
- [4] 刘苏,朱新平,陈昆慈,等. 杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)及其自交后代细胞核型初步分析[J]. 动物学杂志, 2011, 46(1): 100-105.
- [5] 刘文奎,樊启学,杜海明,等. 养殖密度对杂交鳢仔鱼生长与存活的影响[J]. 淡水渔业, 2007, 37(4): 45-48.
- [6] 杨菁. 惠农 1 号杂交鳢与斑鳢养殖效益的比较[J]. 海洋与渔业, 2009, (5): 42-42.
- [7] 杨小强. 闽香鳢[乌鳢(♂)×斑鳢(♀)]遗传生物学研究 I. 子代和亲本形态比较[J]. 福建水产, 2004, 10(3): 41-44.
- [8] 冯晓宇. 杂交鳢“杭鳢 1 号”[J]. 杭州农业与科技,

- 2010(2):47-48.
- [9] 张新铨,陈昆慈,朱新平. 乌鳢、斑鳢及杂交种养殖研究现状[J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 132-134.
- [10] 吴同垒,单晓枫,王桂芹,等. 乌鳢主要病害的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医科技版, 2011(9): 29-30.
- [11] 朱林,李应森,冯晓宇,等. 乌鳢主要病害的诊断和防治[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(10): 2074-2077.
- [12] Padhi A, Verghese B. Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 156(1-2): 54-63.
- [13] Johnson M C, Maxwell J M, Loh P C, *et al.* Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Virus Research*, 1999, 64(2): 95-106.
- [14] Mortensen H F, Heuer O E, Lorenzen N, *et al.* Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild marine fish species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea [J]. *Virus Research*, 1999, 63(1-2): 95-106.
- [15] Nichol S T, Rowe J E, Winton J R. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus [J]. *Virus Research*, 1995, 38(2-3): 159-173.
- [16] 桂朗,李正秋,张奇亚. 牙鲆一株弹状病毒病原的分离与鉴定[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 345-353.
- [17] Ksaornchandra J, Lannan C N, Rohovec J S, *et al.* Characterization of a rhabdovirus isolated from the snakehead fish (*Ophicephalus striatus*) [M]. Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. Oregon: Oregon State University Press, 1991: 1775-1782.
- [18] Tao J J, Gui J F, Zhang Q Y, *et al.* Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish [J]. *Aquaculture*, 2007, 262(1): 1-9.
- [19] 张奇亚,李正秋. 胭脂鱼弹状病毒包涵体在培养细胞中的形成[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 38-41.
- [20] 孙颖杰,江育林,刘荃,等. 石鲮鱼鱼苗中一种弹状病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 277-282.
- [21] Galinier R, van Beurden S, Amilhat E, *et al.* Complete genomic sequence and taxonomic position of eel virus European X (EVEX), a rhabdovirus of European eel [J]. *Virus Research*, 2012, 166(1-2): 1-12.
- [22] Walker P J, Benmansour A, Calisher C H, *et al.* Family Rhabdoviridae [M] // van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al.*, Eds. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. New York: Academic Press, 2000: 563-583.
- [23] 陶建军. 鳊鱼弹状病毒的分离、鉴定及基因组测序分析[D]. 北京:中国科学院研究生院, 2006.
- [24] Wattanavijarn W, Wattanodorn S, Hunnak P, *et al.* Viruses of ulcerative diseased fish [J]. *Electron Microsc Soc Thailand Newsl*, 1986, 3: 20-23.
- [25] Kasornchandra J, Engelking H M, Lannan C N, *et al.* Characteristics of three rhabdoviruses from snakehead fish (*Ophicephalus striatus*) [J]. *Disease of Aquatic Organisms*, 1992, 13: 89-94.
- [26] Holt J G, Krige N R, Senath P H A, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. (9th edition). London: Williams & Wilkin Press, 1994: 527-558.
- [27] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社, 1997.
- [28] Hogenhout S A, Redinbaugh M G, El-Desouky A. Plant and animal rhabdovirus host range; a bug's view [J]. *Trends in Microbiol*, 2003, 11(6): 264-271.
- [29] Frerichs G N, Millar S D, Roberts R J. Ulcerative rhabdovirus in fish in South-East Asia [J]. *Nature*, 1986, 322(6076): 216.
- [30] Johnson M C, Maxwell J M, Loh P C. Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS): spring viremia of carp virus (SVCV) [J]. *Virus Research*, 1999, 64(2): 95-106.
- [31] Wolf K. *Fish viruses and fish viral disease* [M]. Ithaca: Cornell University Press, 1988, 83: 114.
- [32] 张奇亚,李正秋. 在患病鳊鱼组织中观察到3种病毒[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 192-195.



## Isolation and characterization of a rhabdovirus from snakehead fish (*Ophicephalus striatus*)

ZENG Weiwei, WANG Qing, WANG Yingying, LIU Chun, TAN Aiping, SHI Cunbin, WU Shuqin\*

(*Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,*

*Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture,*

*Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China*)

**Abstract:** The diseased hybrid snakehead (*Channa maculate* ♀ × *Channa argus* ♂) were collected for analysis of the pathogen both in bacteriology and virology to make the pathologic agent clear. None of pathogenic bacteria was obtained using routine bacteria separation method. One rhabdovirus was isolated using cell culture technique, regression tests, electron microscopy, molecular biology techniques and others, which assigned hybrid snakehead rhabdovirus – C1207 (HSHRV-C1207). HSHRV-C1207 could replicate and proliferate in EPC, FHM, GSB, SFC, CIK cells, and cause the significant cytopathic effect (CPE). The regression tests in which separated viruses were injected in the abdominal cavity were all presented with symptoms similar to the natural incidence, and the final mortality was 90%. Electron microscopy observation of ultra-thin section samples of specimen-infected EPC cells revealed that the bullet-shaped virus replicated in cytoplasm with regular arrangement like other fish rhabdovirus, and had a non-enveloped structure with a diameter and length of approximately 60 nm and 145 nm respectively. The OIE recommended primers for Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV), spring viraemia of carp virus (SVCV), viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and three pairs of specific primers were designed by G gene conserved sequences of snakehead rhabdovirus (SHRV), siniperca chuatsi rhabdovirus (SCRV) and hiram rhabdovirus (HIRRV) respectively, were applied to the RT-PCR amplification for detecting the possible rhabdovirus in diseased fish and virus-infected cells. A specific ladder product about 350 bp only was amplified with primers of SCR. Sequencing analysis of the G gene of HSHRV-C1207 showed that this gene shares the sequence identities 93.8% and 20.4% with the respective genes of SCR and SHRV respectively, and the corresponding deduced amino acid sequence identity 93.7% and 18.3% respectively. Phylogenetic relationship with other rhabdoviruses using the corresponding amino acid sequences of G protein indicates that HSHRV C1207 is most closely related to the vesiculovirus genus and shares the highest identity with SCR, but was far from the snakehead rhabdovirus (SHRV) and the other rhabdovirus. The above results indicated that the causes of hybrid snakehead diseases ceaseless breaking out was the rhabdovirus, and this new isolates HSHRV-C1207 belongs to vesiculovirus genus. It may be a novel variant SCR isolate or a new member.

**Key words:** *Channa argus*; rhabdovirus; isolation; characterization

**Corresponding author:** WU Shuqin. E-mail: wushuqin001@21cn.com