

文章编号: 1000-0615(2016)08-1249-09

DOI: 10.11964/jfc.20160110256

草鱼呼肠孤病毒 II 型在不同鱼类细胞中的增殖情况

李 贤^{1,2}, 曾伟伟¹, 王 庆¹, 王英英¹, 李莹莹¹,
宋新建¹, 黄琦雯¹, 石存斌¹, 吴淑勤^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室,
广东省水生动物免疫重点实验室, 广东广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 草鱼呼肠孤病毒 II 型(GCRV II)是当前导致草鱼出血病流行和暴发的主要基因型, 本研究拟通过分析 GCRV II 代表株 HZ08 在不同鱼类细胞中的增殖情况来筛选 GCRV II 的敏感细胞系。首先以不同浓度的 HZ08 株接种草鱼吻端成纤维细胞(PSF)和草鱼鳃细胞(GSB), 以确定病毒接种的最佳浓度; 然后以最佳接种浓度同时感染 PSF、GSB、草鱼肝细胞(L8824)、草鱼卵巢细胞(CO)等 10 种鱼类细胞, 接毒后每天观察细胞状态, 用荧光定量 PCR(qPCR)方法定量分析 HZ08 在各种细胞系中的增殖量, 并在感染 5 d 后用间接免疫荧光定性分析病毒在各种细胞中的增殖情况。结果显示, HZ08 感染细胞的最佳接种浓度为 1.0×10^4 拷贝/ μL , 该毒株接种的 10 种鱼类细胞均无明显的细胞病变效应(CPE); qPCR 分析病毒感染 5~8 d 后的结果显示, HZ08 在 GSB、L8824、PSF、草鱼鳍条细胞(CF)、CO、草鱼脑细胞(CIB)、锦鲤吻端细胞(KS)7 种细胞中均能增殖, 其中在 GSB、L8824 和 PSF 细胞中的增殖量较大, 最大分别为 1.14×10^7 、 5.90×10^6 和 6.30×10^4 拷贝/ μL 。而在鲤上皮细胞(EPC)、锦鲤脑细胞(KB)、鲫脑细胞(CcB)中不增殖, 免疫荧光定性检测结果与荧光定量检测结果相吻合, 在 GSB、L8824 和 PSF 中的荧光信号较多、较强, 其他细胞中则较弱或没有荧光信号。研究表明, GSB、L8824 和 PSF 是 GCRV II 较为敏感的细胞系, 该研究结果对今后 II 型 GCRV 的研究和防控产品开发具有重要意义。

关键词: 草鱼; 呼肠孤病毒; 基因 II 型; 细胞系; 增殖情况

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)是目前已知毒力最强的呼肠孤病毒, 主要引起 1 龄和 2 龄草鱼发生出血病, 死亡率一般为 30%~50%, 最高可达 60%~90%, 而且还能感染青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)等^[1-2], 在中国、越南、缅甸等亚洲国家都有报道。该病毒流行广、危害大、死亡率高、发病季节长, 严重影响了广大养殖者的积极性

和我国淡水养殖业的健康发展。

关于草鱼呼肠孤病毒的基因分型研究, 多数学者都是根据核苷酸序列或推导的氨基酸序列进行同源性比对并构建系统发育进化树来进行分析。Pei 等^[3]、曾伟伟等^[4]、Wang 等^[5]基于各自研究将草鱼呼肠孤病毒分为 3 个基因型。当前, 全国各地分离到的流行株中, 3 个基因型病毒感染均有报道, 有的单独感染, 有的混合感染。其中, II 型 GCRV 病毒分离报道的研究最多^[6-12]。通过对近 5 年提交到 GenBank 中 GCRV 的基因序列进行分

收稿日期: 2016-01-21 修回日期: 2016-05-09

资助项目: “十二五”国家科技支撑计划(2013BAD12B02); 江西省科技计划项目(20152ACF60021)

通信作者: 吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

析和比较发现, 19个GCRV新分离株, 有16株为Ⅱ型, 占整个GCRV新分离株的84%, 曾伟伟等^[4]利用建立的三重PCR方法对2009—2011年从全国各地收集的草鱼出血病疑似病料进行检测和初步流行病学分析, 研究表明Ⅱ型毒株在阳性率中占的比重为78.6%。杨映^[13]的草鱼出血病流行病学数据也表明, 目前流行的GCRV主要为Ⅱ型。以上数据均表明, 目前主要流行的草鱼呼肠孤病毒为Ⅱ型。

细胞是病毒研究最为重要的基础材料和工具。方勤等^[14-15]和邓初夏等^[16]通过研究不同GCRV毒株对细胞的敏感性, 认为草鱼肾细胞(CIK)是呼肠孤病毒较好的增殖细胞。杨映^[13]统计了当前用于分离培养草鱼呼肠孤病毒的细胞系主要有CIK、草鱼胚胎细胞(CP-80)、草鱼鳍条细胞(CF)、草鱼囊胚细胞(GCB)、草鱼性腺细胞(CO)、草鱼吻端细胞(ZC-7901)和鲫(*Carassius auratus*)囊胚培养细胞(CAB)。以往学者在对GCRV的研究中都使用CIK^[17-20]。可见CIK是使用最为频繁的细胞。但在本实验室的研究过程中, 发现目前保存的CIK疑似有Ⅱ型GCRV病毒感染, 而且GCRVⅡ型感染常见的鱼类细胞均没有明显的CPE, 对多数鱼类细胞也不敏感, 为了更好地开展GCRV的基础研究及疫苗等防控产品的开发, 筛选对GCRVⅡ较为敏感的细胞系是当前研究的一项重要工作。

本研究用GCRVⅡ的代表株HZ08以特定浓度感染L8824、CO、CIB等10种鱼类细胞, 接毒后每天观察细胞状态并用实时荧光定量PCR分析HZ08在各种细胞系中的增殖情况, 感染5d后采用间接免疫荧光定性分析HZ08在各种细胞中的增殖情况, 确定各细胞系对HZ08的增殖效果, 以筛选适合于GCRVⅡ增殖的细胞系。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

L8824、鲤上皮细胞(EPC)购自武汉大学细胞典藏中心; CO由江苏水产技术推广站馈赠; 草鱼脑细胞(CIB)、草鱼吻端成纤维细胞(PSF)、CF、草鱼鳃细胞(GSB)、锦鲤吻端细胞(KS)、锦鲤脑细胞(KB)、鲫脑细胞(CcB)均由本实验室建立并保存; 草鱼呼肠孤病毒HZ08株(GCRV HZ08)由本实验室分离并保存; HZ08 VP4多克隆抗体由本实验室制备并保存。

1.2 主要试剂与仪器

Medium199(M199)培养基、0.25%-EDTA胰蛋白酶和胎牛血清(FBS)均为GIBCO公司产品; Premix Ex Taq (Probe qPCR), PrimeScript RT Reagent Kit(Perfect Real Time)均为TaKaRa公司产品; E.Z.N.A. Total RNA Kit I、E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I均为OMEGA公司产品; 细胞培养瓶和细胞培养板为CORNING公司产品; ABI7500荧光定量PCR仪为ABI公司产品; PICO 17型离心机、CO₂培养箱为Thermo公司产品; 数码倒置荧光显微镜(DV730)为Nikon公司产品。

1.3 接毒浓度的优化

从-80℃冰箱中取出保存的种毒HZ08, 通过qPCR测定其浓度之后, 用M199培养基对病毒液进行10倍比稀释, 分别接毒单层PSF和GSB细胞, 28℃孵育1h, 用灭菌的PBS润洗2次, 接毒5d后收集病毒液, 反复冻融2次后用qPCR方法检测各接毒浓度下病毒的增殖情况, 确定最佳感染浓度。qPCR方法参照刘宝芹^[21]的实验方法, 得到实验结果Ct值, 根据标准曲线公式换算成病毒的拷贝数浓度。

1.4 准备细胞

取生长良好的L8824、EPC、CO、PSF、GSB、CIB、CF、KS、KB、CcB10种鱼类细胞各1瓶, 用含0.25% EDTA的胰酶将细胞消化后, 加入含10% FBS的M199培养基将消化的细胞稀释至浓度约为 1.0×10^6 个/mL细胞悬液。吹打均匀后分装到4块96孔培养板中, 每种细胞共32个孔, 每孔100 μL, 放置于含5% CO₂的28℃细胞培养箱中培养。

1.5 接毒及取样

待孔内细胞长至80%~90%后, 弃掉旧培养基, 用灭菌的PBS润洗2次, 每孔加入100 μL稀释至最佳接毒浓度的HZ08病毒液, 28℃孵育1h, 弃去接毒液, 加入含5% FBS的M199培养基维持液100 μL/孔, 每种细胞设24个平行组和8个未接毒的对照组, 28℃培养箱培养, 每天观察细胞病变情况并拍照。接毒后, 每种细胞每天从3个接毒孔和1个对照孔中取培养液各80 μL, 进行病毒含量的测定, 连续取样8d。

1.6 测定病毒含量

将收集的细胞病毒液反复冻融2次, 每个样

品取200 μL 病毒液用OEMGA的Total RNA Kit I试剂盒提取总RNA, 用TaKaRa的Prime Script RT Reagent Kit试剂盒将RNA反转录成cDNA, 具体步骤均参照试剂盒的说明书进行。以反转录的cDNA为模板, 根据文献报道的qPCR方法测定各组样品的病毒含量^[21], 获得的Ct值再根据标准曲线公式换算成病毒的拷贝数浓度。

1.7 间接免疫荧光

间接免疫荧光实验参照曾伟伟等^[22]方法, 略有更改。在24孔培养板上进行细胞接毒, 5 d后, 弃去培养液, 甲醇 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定30 min; 弃去固定液, 室温放置10 min; PBS洗涤后加入1% Triton X-100透化处理30 min; PBS洗涤后加入3%牛血清白蛋白室温封闭30 min; 加入1:500稀释的HZ08 VP4多克隆抗体, 室温孵育60 min; PBS洗涤后加入1:2000稀释的FITC标记的羊抗兔二抗, 室温孵育60 min后PBS洗涤。每一种细胞均设阴性对照。倒置荧光显微镜下观察、拍照并记录。

1.8 数据处理

相关数据采用SPSS 19.0统计软件进行分析, 不同细胞和不同时间之间病毒的浓度差异通过*t*检验来分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 细胞接毒后的状态变化

10种鱼类细胞接毒HZ08后, 连续观察8 d, 发现多种细胞在感染病毒3 d后开始有少量细胞皱缩变圆、脱落并漂浮在细胞液中, 并随着接毒时间的推移脱落的细胞增多, 但细胞并未发生聚合, 没有形成合胞体及成片脱落形成空斑的现象; 未接毒的细胞对照组也有细胞单个脱落现象, 但发生时间较病毒感染细胞晚, 死亡漂浮的细胞数量也更少(图1)。

2.2 最佳接毒浓度

以10倍倍比稀释的HZ08病毒感染PSF和GSB细胞, 5 d后, 通过qPCR检测不同接毒浓度下的增殖情况, 结果显示, 在同样接毒100 μL 的情况下, 病毒的浓度越高, 其增殖量越大, 但两种细胞在接毒浓度为 $1.05\times 10^6\sim 1.05\times 10^4$ 拷贝/ μL

时, 其病毒的增殖量均没有显著差异(图2), 根据增殖浓度从大到小分别用“***”、“**”、“*”标记为3个梯度, 相互比较差异情况。综合考虑, 1.05×10^4 拷贝/ μL 的浓度应为该病毒的最佳接毒浓度, 后续实验接毒均选择此浓度。

2.3 病毒增殖量与感染时间的关系

用qPCR检测各细胞中病毒的增殖情况, 结果表明, HZ08毒株在GSB、CO、L8824、CIB和CFS中接毒第1天后开始增殖, 第5天达到最高峰, 然后第7天开始病毒量有所下降; 而在PSF细胞中第6天达到最高峰, 之后有所下降; 在EPC和CcB中检测不到病毒。各细胞系达到最大拷贝数的时间: CO、CF、CIB在第5天或第6天出现最大值, KS、KB在第7天出现最大值, 但浓度较低, 与其他细胞相比拷贝数较小; GSB和L8824在第7天出现最大值; PSF在第6天出现最大值(图3), 根据增殖浓度大小用“***”、“**”表示, “***”表示浓度较高, “**”表示浓度较低, 无标记的表示浓度很低。

2.4 各细胞的最大病毒增殖量比较

将10种细胞接毒HZ08, 分别在各细胞的病毒增殖高峰时取样, 用qPCR方法检测病毒的增殖量。结果显示, HZ08病毒在GSB细胞中的增殖量最大, 达到 1.14×10^7 拷贝/ μL , 其次是L8824细胞和PSF细胞, 分别为 5.90×10^6 和 6.30×10^5 拷贝/ μL , 该毒株在这3种细胞中的增殖量相互间存在显著差异($P<0.05$); 在其他细胞中增殖量较小, 在CcB和EPC中检测不到病毒(表1)。

2.5 免疫荧光

将完成间接免疫荧光实验的细胞培养板置于荧光显微镜下观察, 特异性的荧光细胞呈黄绿色, 胞浆中黄绿色颗粒或亮斑为草鱼呼肠孤病毒存在的阳性信号。结果显示, 免疫荧光定性检测结果与荧光定量检测结果相吻合, 在GSB和L8824细胞中的荧光信号最强、最多, 其次是PSF细胞, 在KB和CF细胞中的荧光信号较微弱, 在CcB和EPC细胞中没有观察到荧光信号(图4)。

3 讨论

HZ08毒株是本实验室2008年从浙江湖州发

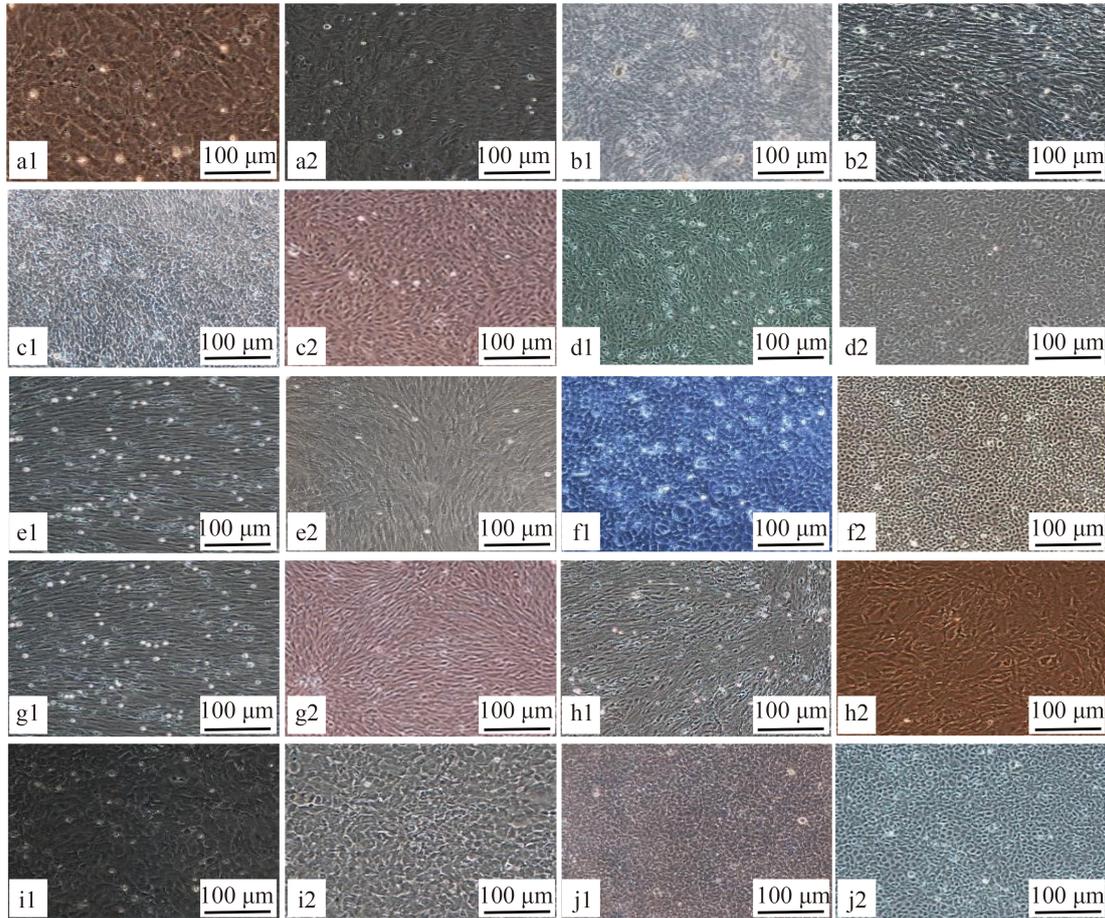


图 1 10种鱼类接种GCRV HZ08病毒5 d后的状态

a1、b1、c1、d1、e1、f1、g1、h1、i1和j1分别表示CcB、KB、L8824、CIB、GSB、CO、PSF、CF、KS和EPC细胞感染GCRV HZ08株的实验结果；a2、b2、c2、d2、e2、f2、g2、h2、i2和j2分别表示CcB、KB、L8824、CIB、GSB、CO、PSF、CF、KS和EPC细胞未感染病毒的阴性对照组结果

Fig. 1 The results of 10 cells after being infected by GCRV HZ08 for 5 days

a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1, i1 and j1 represent the results of CcB, KB, L8824, CIB, GSB, CO, PSF, CF, KS and EPC cell lines infected with GCRV HZ08 respectively; a2, b2, c2, d2, e2, f2, g2, h2, i2 and j2 represent CcB, KB, L8824, CIB, GSB, CO, PSF, CF, KS and EPC cell lines not infected with virus respectively

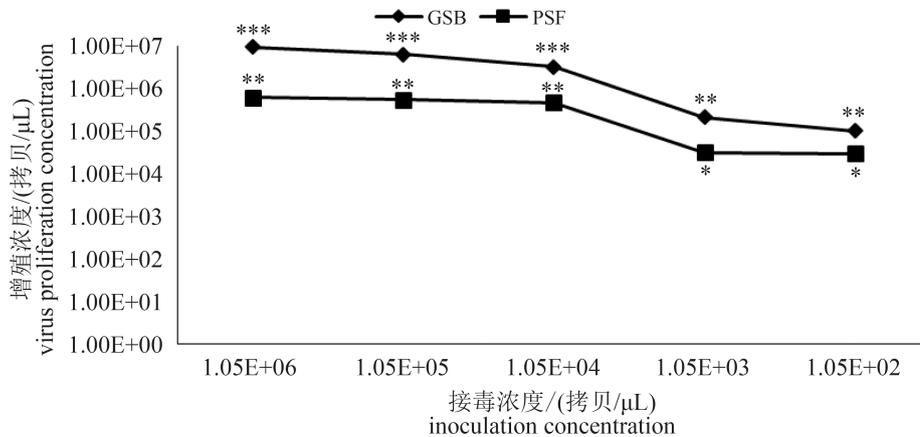


图 2 5 d后不同接毒浓度下的拷贝数

Fig. 2 The copies in different concentrations for 5 days

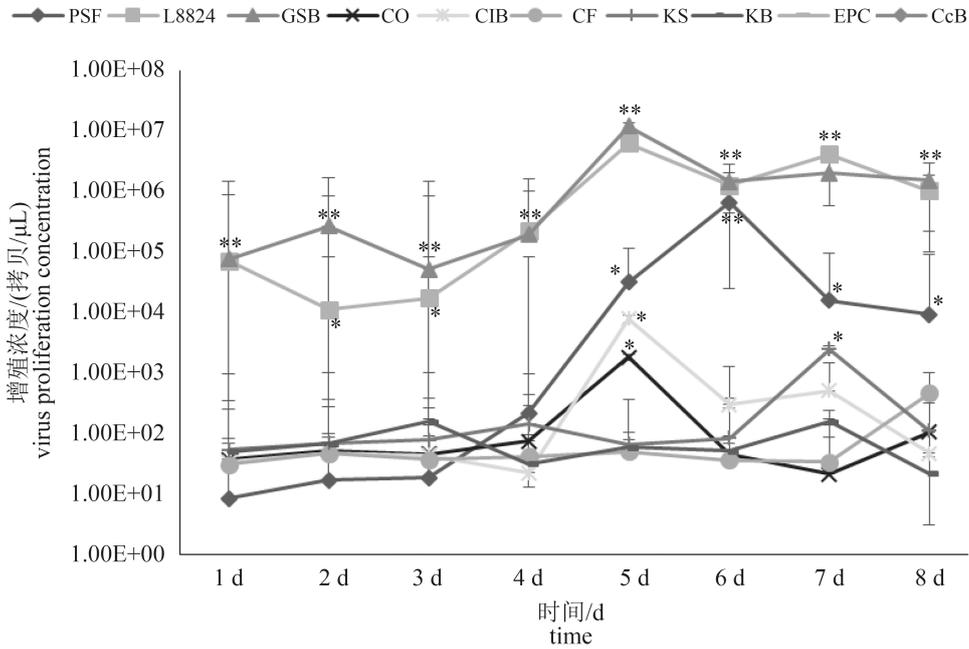


图 3 10种细胞8 d中的拷贝数变化

Fig. 3 The changes of viral copies in 10 kinds of cells for 8 days

表 1 HZ08病毒在不同细胞中的最大增殖量

Tab. 1 The maximum proliferation of HZ08 in different cells

细胞 cells	病毒拷贝数/(拷贝/μL) copies	细胞 cells	病毒拷贝数/(拷贝/μL) copies
GSB	1.14×10 ^{7a}	CF	4.87×10 ^e
PSF	6.30×10 ^{5c}	CcB	-
L8824	5.90×10 ^{6b}	KS	2.38×10 ^{3d}
CO	1.75×10 ^{3d}	KB	2.12×10 ^e
CIB	7.48×10 ^{3d}	EPC	-

注: 病毒拷贝数的右上角不同小写字母表示相互之间存在显著差异; “-”表示测定后无结果

Notes: the different letter indicates that there is significant difference between each other; “-” indicated that no results after determination

病草鱼中分离与鉴定的一株GCRV毒株, 该毒株与当时已知的GCRV其他分离株在毒力、细胞敏感性和致细胞病变效应、基因组带型、基因组序列和特征等方面都存在较大差异^[23]。HZ08对常见的鱼类细胞均不能产生明显的CPE, 但是对草鱼和稀有鲫的致病性比较强, 为一株强毒株^[5, 12, 23], 此后多数分离和研究报道的GCRV与HZ08均为 II 型草鱼呼肠孤病毒^[3, 6, 9]。

HZ08感染10种鱼类细胞均没有明显的CPE, 与张超^[23]用HZ08毒株感染CIK细胞的结果一致, II 型毒株如GD108、109接种常见的草鱼

细胞系均不能产生CPE^[3, 24], 可能和该基因型病毒的基因组缺少编码FAST蛋白的基因有关^[3], 而与接种的细胞没有关系。在用10倍倍比稀释的方法确定最适接毒浓度时, 接种同等体积下, 病毒的接种浓度越高, 其增殖量就越大, 但2种细胞在病毒接种浓度为1.05×10⁴~1.05×10⁶拷贝/μL时, 其病毒的增殖量均没有显著差异。从病毒的利用率和最大效益考虑, 最后确定的接种浓度为1.05×10⁴拷贝/μL, 这样能用较少的病毒接种量, 获得较多的病毒量。

方勤等^[14]、曾令兵等^[24]和张念慈^[25]等研究表明GCRV 873株细胞培养的最适增殖温度为28 °C, 一般感染12 h后即开始增殖, 24~72 h大量增殖, 培养细胞出现典型的CPE, 5 d左右达到最大增殖量, 此时病毒的滴度最高, 之后逐渐趋于平缓。与873毒株不同, HZ08毒株在接毒的10种细胞中, 只在其中8种细胞中可以增殖, 而且接毒3 d内增殖不明显, 第3天之后才开始大量增殖, 在CO、PSF、CF、CIB、GSB和L8824细胞中, 第5天或第6天出现增殖高峰, 之后趋于平缓或稍有下降。HZ08与873株的增殖规律基本一致, 但需要的时间更长, 这可能与病毒本身的特性有关, HZ08这一类病毒结合细胞受体的数量和能力可能不如873株这类病毒, 也有可能病毒进入细胞之后, 复制能力的差异导致增殖效果的不同。

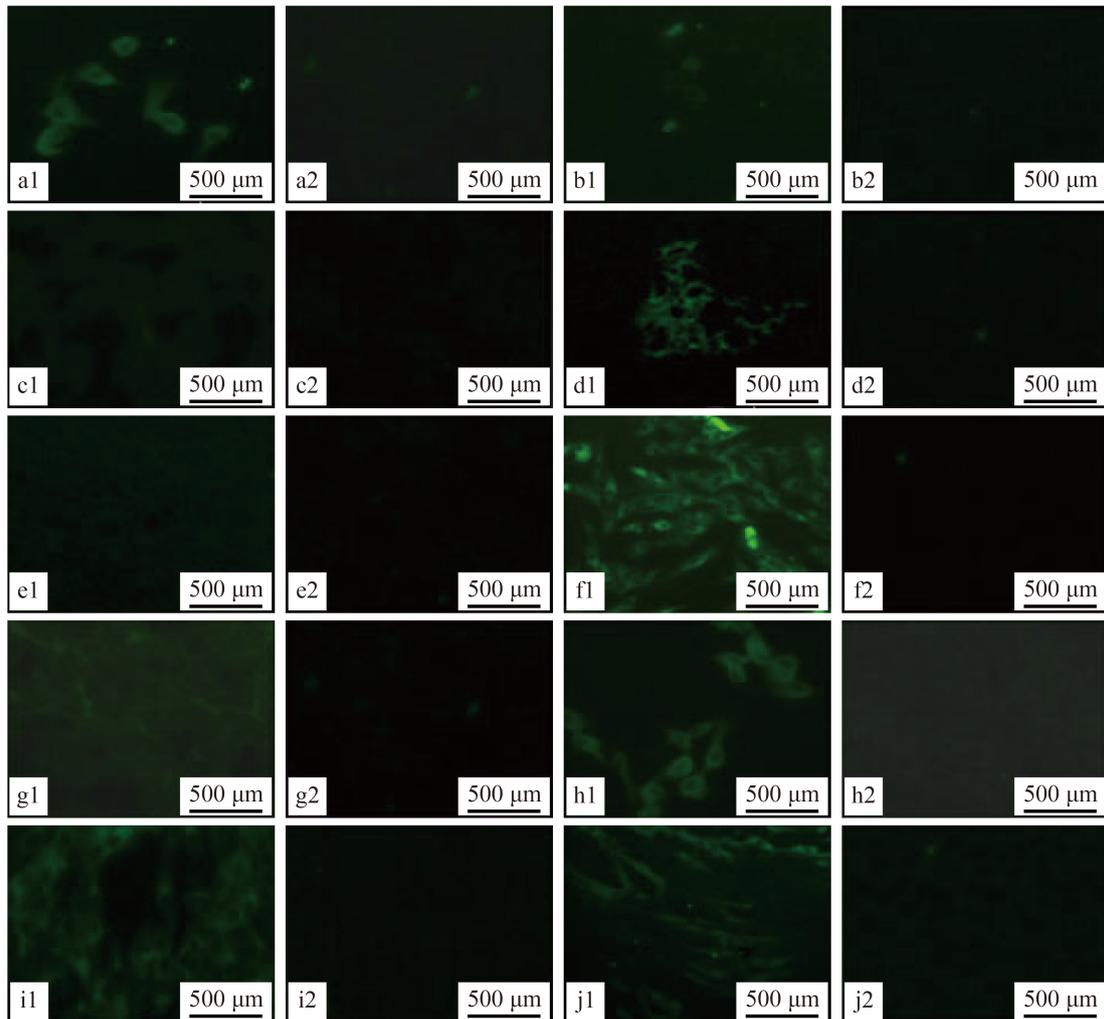


图4 HZ08接毒5 d后各细胞中的荧光信号情况

a1、b1、c1、d1、e1、f1、g1、h1、i1和j1分别表示CIB、CF、CcB、CO、EPC、GSB、KB、KS、L8824和PSF细胞感染GCRV HZ08株后的间接免疫荧光(IFA)实验结果；a2、b2、c2、d2、e2、f2、g2、h2、i2和j2分别表示CIB、CF、CcB、CO、EPC、GSB、KB、KS、L8824和PSF细胞未感染病毒的间接免疫荧光(IFA)实验结果

Fig. 4 The fluorescence signal in cells after being infected by GCRV HZ08 for 5 days

a1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1, i1 and j1 represent the IFA results of CIB, CF, CcB, CO, EPC, GSB, KB, KS, L8824 and PSF cell lines infected with GCRV HZ08 respectively; a2, b2, c2, d2, e2, f2, g2, h2, i2 and j2 represent IFA results of CIB, CF, CcB, CO, EPC, GSB, KB, KS, L8824 and PSF cell lines not infected with virus respectively

由于病毒毒价受多种因素的影响，与不同毒株、不同细胞系、细胞密度、培养温度等因素有关。本研究采用固定细胞密度、固定毒株和培养条件的方式，研究不同细胞对HZ08的增殖效果。荧光定量和免疫荧光结果均显示，对HZ08增殖效果最好的是GSB细胞，其增殖效果显著高于其他细胞，L8824和PSF细胞次之，然后是CO、CIB和KS细胞，而在另外4种细胞中增殖效果不好或者不增殖。可见，细胞对病毒的增殖起了至关重要的作用，在积累高浓度抗原时，需选择最合适的细胞增殖，这样既能提高

工作效率，也为顺利完成免疫动物制备阳性血清、单抗和疫苗的生产等提供更好的条件^[26]。

本研究以GCRV II的代表株HZ08为研究材料，比较分析了GCRV II在10种鱼类细胞中的增殖情况，确定了其最佳接毒浓度和接毒后的最佳收毒时间，并筛选了II型GCRV增殖效果较好的GSB、L8824和PSF 3种细胞系，为GCRV II的分离、鉴定，草鱼出血病的诊断和病原学研究以及草鱼出血病疫苗等防控产品的开发与应用提供了依据。

参考文献:

- [1] 王方华, 李安兴. 草鱼病毒性出血病研究进展[J]. 南方水产, 2006, 2(3): 66-71.
Wang F H, Li A X. Advances in research of hemorrhage of grass carp[J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(3): 66-71 (in Chinese).
- [2] 李军, 王铁辉, 陆仁后, 等. 草鱼出血病病毒的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 445-453.
Li J, Wang T H, Lu R H, *et al.* Advances in research of hemorrhagic virus of grass carp[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(4): 445-453 (in Chinese).
- [3] Pei C, Ke F, Chen Z Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109 (GCRV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution[J]. Archives of Virology, 2014, 159(9): 2435-2440.
- [4] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重PCR检测方法的建立及其应用[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 419-426.
Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 419-426 (in Chinese).
- [5] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(22): 12466.
- [6] Yan X Y, Wang Y, Xiong L F, *et al.* Phylogenetic analysis of newly isolated grass carp reovirus[J]. Springer Plus, 2014, 3(1): 190.
- [7] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 790-795.
Zeng W W, Wang Q, Liu Y K, *et al.* Isolation and identification of new GCRV strain and primary study on its immunogenicity[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 790-795 (in Chinese).
- [8] Fan Y D, Rao S J, Zeng L B, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(10): 2266-2277.
- [9] 刘永奎, 王庆, 曾伟伟, 等. 草鱼呼肠孤病毒JX-0902株的分离和鉴定[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1077-1083.
Liu Y K, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 1077-1083 (in Chinese).
- [10] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 47-52.
Hao G J, Shen J Y, Pan X Y, *et al.* Isolation and identification of a strain of grass carp reovirus in Huzhou[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(1): 47-52 (in Chinese).
- [11] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 44-49.
Xu Y, Hao G J, Shen J Y, *et al.* Isolation and identification of two grass carp reovirus strains in Jiangxi province[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(3): 44-49 (in Chinese).
- [12] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1257-1263.
Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRVHZ08[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1257-1263 (in Chinese).
- [13] 杨映. 南方草鱼呼肠孤病毒流行病学调查及双重荧光定量RT-PCR检测方法的建立[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
Yang Y. Epidemiologic survey of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus in south China and establishment of duplex real-time RT-PCR[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [14] 方勤, 肖调义, 丁清泉, 等. 草鱼呼肠孤病毒新分离株(GCRV₉₉₁)的病毒学特性分析[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2): 179-181.
Fang Q, Xiao D Y, Ding Q Q, *et al.* Virological properties of GCRV₉₉₁ strain[J]. Virologica Sinica, 2002, 17(2): 179-181 (in Chinese).
- [15] 方勤, 丁清泉, 汪亚平, 等. 两株水生呼肠孤病毒部分特性的比较[J]. 中国病毒学, 2003, 18(5): 464-467.
Fang Q, Ding Q Q, Wang Y P, *et al.* Partial characteristic comparison between two aquareovirus isolates[J]. Virologica Sinica, 2003, 18(5): 464-467 (in Chinese).
- [16] 邓初夏, 杨兴棋, 陈宏溪. 几种鱼类细胞对草鱼呼肠孤

- 病毒敏感性的研究[J]. 水生生物学报, 1985, 9(4): 351-358.
- Deng C X, Yang X Q, Chen H X. Susceptibility to grass carp reovirus(GCRV) of several fish cell lines[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1985, 9(4): 351-358 (in Chinese).
- [17] 刘晓晨. 草鱼呼肠孤病毒(GCRV)感染性及其单克隆抗体的研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2013.
- Liu X C. Study of infectivity and preparation of monoclonal antibody to grass carp reovirus[D]. Yantai: Ludong University, 2013 (in Chinese).
- [18] 郝贵杰, 盛鹏程, 林锋, 等. RT-PCR检测草鱼呼肠孤病毒的方法研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2013, 18(1): 8-13.
- Hao G J, Sheng P C, Lin F, *et al.* Development and application of RT-PCR technique for detecting grass carp reovirus (GCRV) infection[J]. Journal of Jimei University(Natural Science), 2013, 18(1): 8-13 (in Chinese).
- [19] 李瑞伟, 曾令兵, 张辉, 等. 草鱼出血病细胞疫苗微囊制备与体外释放研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(2): 212-218.
- Li R W, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Preparation and in vitro release of microencapsulated killed vaccine against grass carp hemorrhage[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(2): 212-218 (in Chinese).
- [20] 马杰. RNA基因干扰技术抑制草鱼呼肠孤病毒复制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- Ma J. Study on the inhibition of replication of grass carp reovirus by RNA interference[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [21] 刘宝芹. 两株草鱼呼肠孤病毒FQ-PCR方法的建立及其在病毒定量分析中的应用[D]. 大连: 大连海洋大学, 2012.
- Liu B Q. Development and application of fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique for detection and quantitative analysis two strains of Grass Carp Reovirus[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [22] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株VP4蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 水产学报, 2013, 37(3): 450-456.
- Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against VP4 protein of grass carp reovirus HZ08 strain[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 450-456 (in Chinese).
- [23] 张超. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株的分离鉴定与全基因组分子特征分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- Zhang C. Isolation, identification of grass carp reovirus HZ08 and molecular characteristics of its complete genome[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010 (in Chinese).
- [24] 曾令兵, 贺路. 草鱼出血病病毒854株的纯化及其理化特性[J]. 淡水渔业, 1992(2): 3-5.
- Zeng L B, He L. Studies on the purification and physical-chemical characteristics of the grass carp hemorrhage virus strain 854[J]. Freshwater Fisheries, 1992(2): 3-5 (in Chinese).
- [25] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株ZC-7901及其亚株ZC-7901S₁的建立[J]. 实验生物学报, 1981, 14(1): 103-111.
- Zhang N C, Yang G Z. The establishment of strain ZC-7901 and substrain ZC-7901S₁ of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) lip cell[J]. Acta Biologicae Experimentalis Sinica, 1981, 14(1): 103-111 (in Chinese).
- [26] 程晓霞, 陈少莺, 胡奇林, 等. 猪伪狂犬病病毒在几种细胞中增殖情况的比较[J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28(6): 37-38.
- Cheng X X, Chen S Y, Hu Q L, *et al.* Comparison of the proliferative effects of porcine pseudorabies virus in several cell lines[J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary, 2006, 28(6): 37-38 (in Chinese).

The study on the proliferation of GCRV II in different fish cell lines

LI Xian^{1,2}, ZENG Weiwei¹, WANG Qing¹, WANG Yingying¹, LI Yingying¹,
SONG Xinjian¹, HUANG Qiwen¹, SHI Cunbin¹, WU Shuqin^{1*}

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Currently, grass carp reovirus genotype II (GCRV II) are the leading cause of grass carp haemorrhage disease. To determine the optimum concentration of virus inoculation, various concentrations of HZ08 strain was inoculated with proboscis snout into fibers (PSF) cell of grass carp (PSF) and swim bladder cell of grass carp (GSB). Then we infected 10 kinds of fish cell lines with the optimum inoculation concentration, including liver cell of PSF, GSB, grass carp (L8824), ovary cell of grass carp (CO), etc. After inoculation, we observed the state of the cells with microscope daily, and real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to analyze the proliferation of HZ08 in various cell lines. We also used indirect immunofluorescence to further qualitatively analyze the proliferation of HZ08 in various cell lines five days after infection. The results showed that the optimum inoculation concentration of HZ08 infected cells was 1.0×10^4 copies/ μ L. There was no significant cytopathic effect (CPE) observed in 10 kinds of fish cells inoculated with the HZ08 strain. qPCR analysis showed that HZ08 strain can proliferate in GSB, L8824, PSF, CF, CO, CIB, KS, 7 kinds of cells, which proliferated better in GSB, L8824 and PSF cells. The titers can reach 1.14×10^7 , 5.90×10^6 and 6.30×10^4 copies/ μ L respectively. The result of immunofluorescence are coincided with the results of qPCR, there were strong fluorescence signals in GSB, L8824 and PSF cell lines and weak or even no fluorescence signals were observed in other cells. In conclusion, GSB, L8824 and PSF, these 3 kinds of cells are more sensitive cell lines for the proliferation of GCRV II. In conclusion, this research is of great significance to the research of GCRV II and the development of prevention and control product for GCRV II.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; reovirus; genotype II; cell lines; proliferation

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

Funding projects: National Key Technology Support Program (2013BAD12B02); Science and Technology Project of Jiangxi Province, China (20152ACF60021)