

文章编号: 1000-0615(2018)09-1481-08

DOI: 10.11964/jfc.20170610857

基于CPB细胞扩增体系的鳃弹状病毒增殖条件的优化

罗霞, 付小哲, 李宁求*, 林强, 黄志斌, 张悠

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室,
广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为获知鳃弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRV)QY株在体外培养细胞中最适增殖条件, 以鳃脑细胞系(Chinese perch brain cell line, CPB)为增殖体系, 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术所测病毒拷贝数为判断指标, 比较同步接毒和异步接毒2种接种方式以及病毒接种量、血清浓度等培养条件对病毒增殖的影响, 确定SCRV-QY株在CPB细胞中的最适增殖条件。结果显示, 单位体积病毒增殖量方面, 异步接毒法优于同步接毒法, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为10将病毒接种长满单层的CPB细胞中, 28 °C吸附1.5 h, 用含2%胎牛血清的L15培养液于28 °C培养时, 病毒增殖量最高, 为 5.59×10^{10} 拷贝/mL; 而从单位成本所获病毒量考虑, 同步接毒法筛选出的4种增殖条件单位成本所获的病毒产量优于异步接毒法, 其中当MOI=0.03、胎牛血清终浓度为6%时, 同步接种对数生长中期的CPB细胞, 28 °C恒温培养70 h后收获病毒液, 单位成本所获病毒量最高, 为 4.88×10^{13} 个拷贝/元。综上所述, 本研究以病毒增殖量和培养基成本作为考量, 优化SCRV-QY株的增殖条件, 可为SCRV疫苗低成本、规模化生产提供理论依据。

关键词: 鳃弹状病毒; 鳃脑细胞; 接毒方法; 增殖条件; 实时荧光定量PCR

中图分类号: S 941.4

文献标志码: A

鳃(*Siniperca chuatsi*)是我国重要淡水特色养殖品种之一, 近年来由鳃弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRV)引起的弹状病毒病给鳃的养殖产业带来严重的经济损失。张奇亚等^[1]首先在患病鳃中观察到弹状病毒, 发现其感染细胞时可引起线粒体肿胀、出现空泡等病理变化, 并推断可能是鳃暴发性传染病的一种病原。Tao等^[2-3]对该病毒株的生物学特性、基因组序列及表达分析等进行了研究。弹状病毒宿主广泛, 可感染脊椎动物、无脊椎动物及植物^[4], 鱼类弹状病毒大都属于水疱性口膜炎病毒属(*Vesiculoviruses*)和诺拉弹状病毒属(*Novirhabdoviruses*)^[5], 目前已报道的鱼类弹状病毒达10多种, 主要包括病毒性出血性败血症病毒(viral hemor-

rhagic septicemia virus, VHSV)、传染性造血器官坏死病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)、日本牙鲆弹状病毒(hirame rhabdovirus, HIRRV)、鳢弹状病毒(snakehead rhabdovirus, SHRV)、梭子鱼苗弹状病毒(pike fry rhabdovirus, PFRV)等^[6-11], 这些病毒在欧、美、亚洲等地引起海、淡水养殖的多种经济鱼类发生流行性病害, 死亡率可达90%~100%^[12], 给水产养殖业造成了巨大的经济损失。

针对弹状病毒所引发的鱼类疫病, 目前尚无有效的治疗药物, 主要通过免疫接种进行预防。国内外已有学者研发出一些针对此类病毒的疫苗, 具有一定的免疫保护效果^[13-14]。基于本实

收稿日期: 2017-06-05 修回日期: 2017-08-30

资助项目: 广东省渔港建设和渔业产业发展专项(粤财农〔2017〕17号); 广东省省级科技计划项目(2016B020234003); 广东省省级科技计划项目(2016A020210021)

通信作者: 李宁求, E-mail: liningq@126.com

实验室建立的SCRV敏感的鳊脑组织细胞系 (Chinese perch brain cell line, CPB)^[15], 现已成功研制出安全、有效、质量稳定的细胞灭活疫苗, 免疫保护率可达100%。而提高病毒产量、降低生产成本是实现该疫苗规模化应用的关键因素。因此, 本文以病毒增殖量为指标, 同时结合培养基成本对SCRV在CPB细胞中的最适增殖条件进行优化, 旨在探索SCRV抗原低成本、规模化制备工艺, 为鳊弹状病毒灭活疫苗的规模化制备提供参数。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CPB细胞由本实验室建立并保藏^[15]; 鳊弹状病毒(SCRV-QY株)由本实验室分离并保存。L15培养基、胎牛血清、胰酶购自Gibco公司; RNA提取试剂盒为QIAGEN公司产品; 反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; Premix Ex Taq™(Probe qPCR)试剂盒、dNTPs购于大连TaKaRa公司。

1.2 细胞感染试验

取SCRV-QY病毒液, 用无血清的L15培养基稀释至 10^{-4} , 接种至长满单层的CPB细胞中, 28℃条件下作用1 h后, 加入含2%胎牛血清的L15细胞维持液, 28℃恒温培养, 逐日观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况并拍照记录。具体参照本实验室已建立的方法^[16]。

约50%的CPB细胞出现典型病变后, 收集病变细胞, 8 000 r/min 4℃离心30 min, 弃上清液, 加入戊二醛溶液对沉积在管底部的细胞块进行固定, 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液漂洗, 依次用2%锇酸溶液固定、乙醇溶液梯度脱水、Spurr包埋、切片, 用醋酸铀柠檬酸铅双染色后经PHILIPS CM10透射电镜观察并拍片。

1.3 异步接毒

选取处于对数生长中期的CPB细胞, 胰酶消化后加入含有10%(V/V)胎牛血清的L15培养液, 按照1传3的比例进行分瓶, 28℃恒温培养1~2 d。将SCRV-QY原液稀释, 按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为10接种上述长满单层的CPB细胞中, 28℃吸附1.5 h后, 倒掉病毒液, 加入含2%(V/V)胎牛血清的L15培养液。

1.4 同步接毒

选取对数生长中期的CPB细胞, 在细胞传代的同时接种SCRV-QY, 具体接种量等接种参数如下:

SCRV-QY接毒量。根据预实验结果, 分别设置0.000 1~0.000 9、0.001~0.009和0.01~0.09共27个不同梯度MOI, 同步接种处于对数生长中期的CPB细胞。

SCRV-QY增殖血清浓度。参照预实验结果, 同步接种SCRV后培养液中胎牛血清的终浓度分别设置6%、8%和10% 3个浓度梯度。

上述每个样品同时设置3个重复, 接毒后置28℃培养箱中培养, 每日早、中、晚各观察一次。细胞病变达到80%即可收获病毒液, 置-80℃保存。

1.5 病毒含量测定

每个样品取500 μL病毒液, 按照QIAGEN公司的RNA提取试剂盒说明书提取病毒核酸后, 溶于50 μL无菌水, TransGen反转录试剂盒合成cDNA后, 利用荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(ABI 7500)测定病毒 C_T 值。

引物和探针的设计 根据鳊弹状病毒N蛋白基因序列, 应用Primer 5.0软件设计引物(SCRV FP、SCRV RP)和探针(SCRV probe)并委托上海生工生物技术有限公司合成。序列如下:

SCRV FP: 5'-GGCCGTCATGGTGGCG AATCTGAATCTCCAAGAATGGAAAACC-3'

SCRV RP: 5'-GGATAAGTGGCCTGAGC TTC-3'

SCRV probe: 5'-FAM-AGAAGTGCCT-TGACTTCGGCTCC-Eclipse-3'

病毒 C_T 值测定及拷贝数计算 qRT-PCR反应体系为: Premix Ex Taq™ (2×) 10 μL, SCRV FP、SCRV RP (10 μmol/L)各0.4 μL, SCRV probe (10 μmol/L)0.4 μL, ROX™ Reference Dye II (50×)0.4 μL, cDNA模板1 μL, 去离子水7.4 μL, 总体积20 μL。阴性对照组以去离子水代替待测样品。每个样品同时作3个复孔。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s、60℃ 34 s, 40个循环; 于60℃采集荧光信号。然后根据本实验室已建立的公式将所测 C_T 值换算为病毒拷贝数:

$C_T = -3.217 \lg x + 41.274$ (x表示病毒拷贝数, C_T 为每个反应管内荧光信号到达设定域值经历

的循环数)

1.6 数据处理

以培养基成本为参考因素,将“病毒含量测定”中所得病毒拷贝数(x)折算成培养基成本(Y)即每元人民币培养基所获病毒拷贝数(拷贝/元)对培养增殖条件进行评价。同步接毒法增殖病毒所产生的培养基成本具体换算方法参照已有文献^[17],计算公式为 $Y=10^6x/665$ (6%血清组), $Y=10^6x/865$ (8%血清组), $Y=10^6x/1\ 065$ (10%血清组);异步接毒法的计算公式为 $Y=10^6x/1\ 065+10^6x/265$ 。实验所得数据均表示为平均值±标准差(mean±SD),采用软件OringinPro 9.0进行数据处理,并利用 t 检验进行差异显著性分析,当 $P<0.05$ 时差异显著, $P<0.01$ 时差异极显著。

2 结果

2.1 细胞病变

SCRV-QY接种长满单层的CPB细胞(图1-a),

24 h即可出现CPE,至36 h出现不同程度的细胞病变,倒置显微镜下可见病变细胞收缩变圆(图1-b,图1-c),至48 h病变细胞呈网状脱落(图1-d),CPE可达80%。

2.2 电镜超薄切片

SCRV-QY感染CPB细胞后,透射电镜下观察可见大量呈子弹状的病毒颗粒(图2),说明SCRV-QY能够感染CPB细胞并进行增殖。

2.3 不同接毒条件下SCRV-QY增殖结果

异步接毒条件下,按照MOI=10接种至长满单层的CPB细胞,28 °C吸附1.5 h,加入含2%胎牛血清的L15培养液于28 °C培养,48 h左右病变可达80%,所收获病毒液中SCRV-QY拷贝数为 5.59×10^{10} 拷贝/mL(表1);同步接毒条件下,24 h细胞可长成致密单层,与对照组无差异,当病毒接种量MOI=0.002,培养液胎牛血清终浓度为8%时,28 °C培养70 h左右病变可达80%,所获病毒液病毒量最高,为 3.93×10^{10} 个拷贝/mL(表1)。

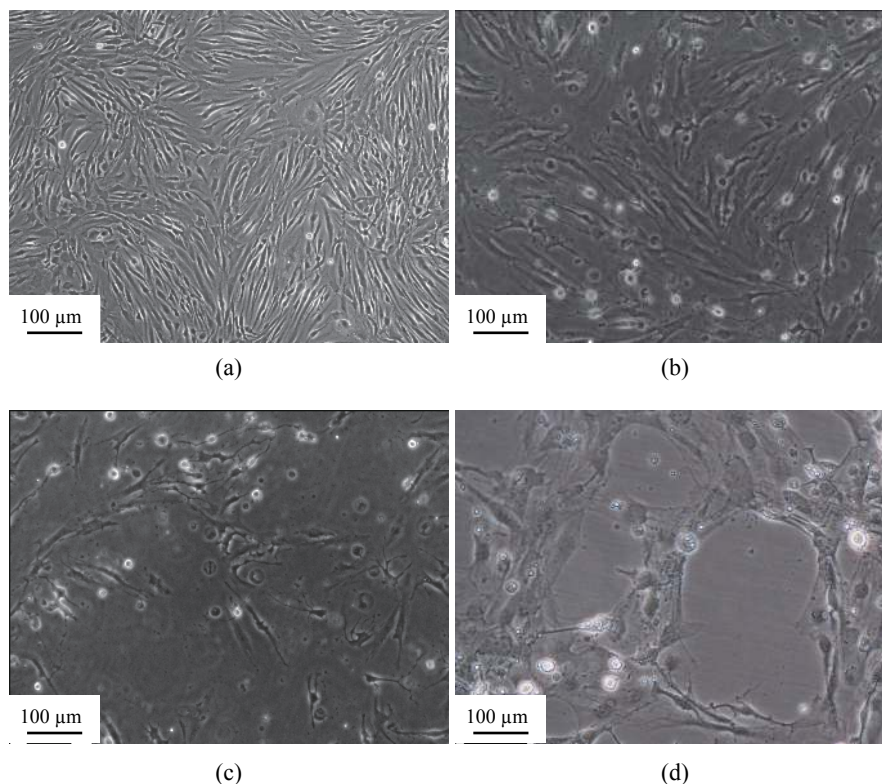


图1 SCR-V-QY感染CPB细胞后不同时期的病变情况

(a)对照CPB细胞;(b)感染24 h的CPB细胞;(c)感染36 h的CPB细胞;(d)感染48 h的CPB细胞

Fig. 1 Cytopathogenic effects in infected CPB in different periods

(a) control CPB cells; (b) CPB cells infected with SCR-V-QY for 24 h later; (c) CPB cells infected with SCR-V-QY 36 h later; (d) CPB cells infected with SCR-V-QY 48 h later

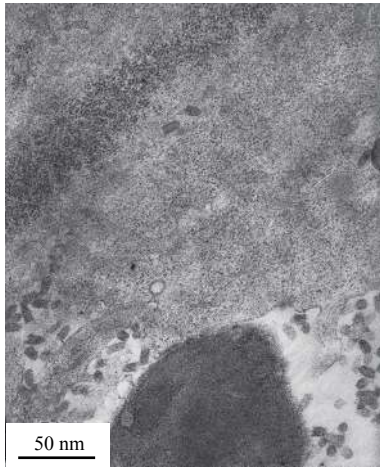


图2 电镜观察病变CPB细胞中的SCR-V-QY病毒粒子

Fig. 2 SCR-V-QY particles in infected CPB cells observed under EM

由此可见,从单位体积所获病毒拷贝数进行考量,异步接毒法极显著优于同步接毒法($P < 0.01$)。

2.4 SCR-V-QY增殖培养基成本的研究

从病毒的增殖成本考虑,将同步法和异步法所测得病毒拷贝数分别折算成培养基成本进行评价(表2),异步法的价格成本为 4.21×10^{13} 拷贝/元,同步法中有4种接毒条件下产生的价格成本优于此值,即 4.88×10^{13} 拷贝/元、 4.54×10^{13} 拷贝/元、 4.47×10^{13} 拷贝/元和 4.25×10^{13} 拷贝/元。由此可见,从价格成本考虑,同步法优于异步法。由于培养基成本主要涉及血清和培养液,就同步接毒法来讲,6%血清组所用血清成本最低,即折算成价格成本后其平均每元人民币所得病毒拷贝数为 3.03×10^{13} ,而8%和10%血清组分别为 2.35×10^{13} cell/元和 1.25×10^{13} cell/元,经检验可知,6%血清组培养基成本显著低于8%血清组($P < 0.05$),极显著低于10%血清组($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

CPB细胞是本实验室自行建立的传代细胞系,SCR-V-QY感染CPB细胞后可引起明显的细胞病变,并且通过透射电镜可以在病变细胞中清晰地看到病毒粒子的存在,验证了通过CPB细胞来增殖SCR-V-QY的可行性。鉴于qRT-PCR测定病毒拷贝数操作简便、结果准确稳定^[18-20],实验室建立了测定SCR-V-QY拷贝数的qRT-PCR方法,并通过反复实验证明该法与CPE方法检测的病毒滴度具有较好的相关性。基于CPB细胞作为扩增体

表1 不同接毒条件下的病毒拷贝数

Tab. 1 Viral copy numbers under different inoculation conditions /(10^{10} 拷贝/mL)

MOI ($\times 10^{-4}$)	血清浓度 serum concentration			
	2%	6%	8%	10%
100 000	5.59 ± 0.25^a	/	/	/
100	/	2.51 ± 0.04	2.99 ± 0.04	1.71 ± 0.10
200	/	2.71 ± 0.02	2.58 ± 0.04	1.22 ± 0.14
300	/	3.25 ± 0.04	2.22 ± 0.03	1.56 ± 0.56
400	/	2.39 ± 0.03	1.83 ± 0.04	1.13 ± 0.39
500	/	1.96 ± 0.05	1.69 ± 0.04	1.13 ± 0.16
600	/	1.64 ± 0.04	3.37 ± 0.05	1.09 ± 0.25
700	/	1.19 ± 0.09	1.68 ± 0.02	1.39 ± 0.09
800	/	1.51 ± 0.03	2.17 ± 0.04	1.41 ± 0.11
900	/	1.47 ± 0.05	2.08 ± 0.03	1.46 ± 0.04
10	/	1.98 ± 0.02	1.59 ± 0.42	1.68 ± 0.06
20	/	2.65 ± 0.04	3.93 ± 0.02^b	1.68 ± 0.05
30	/	2.83 ± 0.17	2.00 ± 0.01	1.78 ± 0.07
40	/	2.54 ± 0.04	2.05 ± 0.09	1.28 ± 0.07
50	/	2.64 ± 0.61	2.47 ± 0.09	0.78 ± 0.01
60	/	0.62 ± 0.3	2.43 ± 0.04	1.19 ± 0.03
70	/	2.78 ± 0.39	1.88 ± 0.02	0.96 ± 0.03
80	/	1.97 ± 0.49	1.84 ± 0.08	0.39 ± 0.01
90	/	1.98 ± 0.49	1.52 ± 0.02	0.71 ± 0.01
1	/	0.72 ± 0.07	1.76 ± 0.26	1.24 ± 0.09
2	/	2.97 ± 0.05	3.43 ± 0.10	1.86 ± 0.03
3	/	0.70 ± 0.01	1.62 ± 0.01	0.71 ± 0.28
4	/	2.64 ± 0.02	1.34 ± 0.18	1.90 ± 0.08
5	/	0.61 ± 0.04	2.51 ± 0.30	2.07 ± 0.28
6	/	2.14 ± 0.04	1.54 ± 0.09	1.07 ± 0.13
7	/	2.66 ± 0.02	0.78 ± 0.10	1.26 ± 0.13
8	/	1.88 ± 0.04	1.30 ± 0.09	1.80 ± 0.22
9	/	1.53 ± 0.01	0.34 ± 0.46	1.55 ± 0.08

注: a为异步接毒条件下的病毒拷贝数; b为同步接毒条件下的最高病毒拷贝数; “/”未设血清浓度或MOI; 下同

Notes: a represents virus copies with asynchronous inoculation; b represents the highest virus copies with synchronous inoculation; “/” the serum concentration or MOI was not contained; the same below

系,本文首次研究报道了同步接毒和异步接毒条件下SCR-V-QY的增殖情况。

表2 单位成本的病毒产量

Tab. 2 Unit cost of viral yield /(10^{13} 拷贝/元)

MOI ($\times 10^{-4}$)	血清浓度 serum concentration			
	2%	6%	8%	10%
100 000	4.21 \pm 0.56 ^a	/	/	/
100	/	3.78 \pm 0.04	3.45 \pm 0.04	1.60 \pm 0.10
200	/	4.07 \pm 0.02	2.99 \pm 0.04	1.15 \pm 0.14
300	/	4.88 \pm 0.03 ^b	2.57 \pm 0.03	1.47 \pm 0.56
400	/	3.45 \pm 0.03	2.11 \pm 0.04	1.06 \pm 0.39
500	/	2.95 \pm 0.05	1.96 \pm 0.04	1.06 \pm 0.16
600	/	2.47 \pm 0.03	3.90 \pm 0.05	1.02 \pm 0.25
700	/	1.79 \pm 0.09	1.95 \pm 0.02	1.30 \pm 0.09
800	/	2.26 \pm 0.03	2.50 \pm 0.04	1.32 \pm 0.11
900	/	2.21 \pm 0.05	2.41 \pm 0.03	1.37 \pm 0.04
10	/	2.97 \pm 0.02	1.84 \pm 0.42	1.58 \pm 0.06
20	/	3.99 \pm 0.04	4.54 \pm 0.02 ^c	1.57 \pm 0.05
30	/	4.25 \pm 0.17 ^c	2.31 \pm 0.01	1.67 \pm 0.07
40	/	3.82 \pm 0.04	2.37 \pm 0.08	1.21 \pm 0.07
50	/	3.97 \pm 0.60	2.85 \pm 0.08	0.73 \pm 0.01
60	/	0.93 \pm 0.28	2.81 \pm 0.04	1.12 \pm 0.03
70	/	4.18 \pm 0.39	2.17 \pm 0.01	0.90 \pm 0.03
80	/	2.96 \pm 0.48	2.13 \pm 0.08	0.36 \pm 0.01
90	/	2.98 \pm 0.48	1.76 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01
1	/	1.05 \pm 0.06	2.03 \pm 0.26	1.17 \pm 0.09
2	/	4.47 \pm 0.05 ^d	3.96 \pm 0.09	1.74 \pm 0.03
3	/	1.08 \pm 0.01	1.87 \pm 0.01	0.66 \pm 0.28
4	/	3.97 \pm 0.02	1.55 \pm 0.18	1.78 \pm 0.08
5	/	0.92 \pm 0.03	2.90 \pm 0.30	1.95 \pm 0.28
6	/	3.21 \pm 0.03	1.78 \pm 0.09	1.00 \pm 0.13
7	/	4.00 \pm 0.01	0.90 \pm 0.10	1.18 \pm 0.13
8	/	2.83 \pm 0.04	1.50 \pm 0.09	1.69 \pm 0.22
9	/	2.30 \pm 0.01	0.39 \pm 0.46	1.45 \pm 0.08
平均值	/	3.03 \pm 0.18 ^f	2.35 \pm 0.05 ^g	1.25 \pm 0.09 ^h

注: a为异步接毒条件下单位成本病毒拷贝数; b、c、d、e为同步接毒条件下单位成本病毒拷贝数优于a值的4组数据; f、g、h分别为同步接毒条件下6%、8%、10%血清组平均每元人民币所得病毒拷贝数

Notes: a represents virus copies of unit cost with asynchronous inoculation; b, c, d, e represent virus copies of unit cost which were higher than data a with synchronous inoculation; f, g, h represent average virus copies of unit cost with asynchronous inoculation in 6%, 8% and 10% serum groups, respectively

宿主细胞对弹状病毒较为敏感,其常用接毒方法为异步接毒即待细胞长满单层后再接种病毒^[16, 21],本文直接选取该接毒条件作为对照。相对于异步接毒法,同步接毒可以减少工作量,提高工作效率,降低污染几率,节省成本^[17],由于CPB细胞接种SCRV-QY后24 h即可产生病变,因此为了控制病变速度,结合预实验结果,我们设置了0.000 1~0.000 9、0.001~0.009和0.01~0.09共27个不同梯度的MOI,参照已有文献^[17]的结果,直接接种处于对数生长中期的CPB细胞,实现了该病毒的同步接毒。异步接毒细胞长满单层需要24 h,接毒后再经24 h左右开始出现病变,48 h左右病变可达80%,因此从细胞传代到收获病毒共需约72 h;同步接毒在细胞传代的同时接种病毒,病毒在细胞分裂增殖的同时进行复制,可能由于在本研究所选MOI范围内细胞复制的速度快于病毒复制的速度,传代细胞24 h可长满单层,与异步法无明显差别,由于细胞在分裂增殖的同时病毒感染,病毒不必再通过细胞间传递而几乎侵入到了全部细胞,后续感染过程只需36~46 h细胞病变即可达到80%,快于异步接毒法的48 h。但从单位体积病毒液中所获得病毒拷贝数来讲,同步接毒法中最高为 3.93×10^{10} 拷贝/mL,低于异步接毒法的 5.59×10^{10} 拷贝/mL。吴云飞等^[22]对猪细小病毒(porcine parvovirus infection, PPI)PK-15的研究中同样发现分步接毒的病毒含量高于同步接毒,与本结果相似。分析原因可能因为接种病毒时细胞尚未贴壁,而MOI值又非常低,加上培养液的存在导致了病毒与细胞之间的吸附机会相对减少,同时为了保证细胞的生长,胎牛血清的浓度也有不同程度的提高,这些都会对病毒的增殖产生一定影响^[23]。但同是CPB细胞,笔者在前期对鰕传染性脾脏坏死病毒(infectious spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)的研究中却发现同步接毒法的病毒含量高于异步法,推测可能同细胞对病毒的敏感程度有直接关系。

异步法接毒时需要更换培养液,因此所需血清等培养基成本较高,折算成价格成本为 4.21×10^{13} 拷贝/元。作为影响价格成本的重要因素——血清,可以促进细胞生长和贴壁,但血清中同时存在非特异性抑制因子,又会抑制病毒生长和增殖^[24]。同步法接种病毒,必须选取适宜的血清浓度,既要维持细胞的正常生长,又不能抑

制病毒的扩增, 同时又要降低生产成本。为了筛选出最低血清浓度, 我们在预实验中设置了3%、4%、5%和6%4个血清组, 结果显示, 血清浓度只有达到6%时CPB细胞才能正常生长, 其他3组由于血清浓度太低, CPB细胞无法长满单层, 接种SCRV-QY后病毒拷贝数均低于 10^6 拷贝/mL。因此, 综合上述各因素, 我们在本实验中设置了6%、8%和10% 3个血清组, 发现血清浓度为8%时每毫升病毒液可以扩增出的平均病毒量最多, 而血清浓度为6%时单位成本所得平均病毒拷贝数最多, 即成本最低。但在8%血清组中, MOI为0.002时单位价格成本为 4.54×10^{13} 拷贝/元, 仅次于6%血清组中的 4.88×10^{13} 拷贝/元, 由此可见, 血清能够影响价格成本, 但又不是唯一因素, 宿主细胞浓度及接毒量也都具有一定的影响, 并且三者之间相互制约, 只有配比合适, 才能获得较高的病毒产量, 这与樊卫平等^[25]关于HIV的研究结果一致。本文SCRV-QY同步接毒法中筛选出4种接毒条件, 其单位成本价格均优于异步接毒法, 从细胞传代到收获病毒所需时间成本为70 h, 与异步接毒的生产周期72 h相比时间成本相差不大。由此可见, 本研究所建立的同步接毒法能够降低SCRV-QY的生产成本, 节约种毒使用量, 操作简便, 完全可以替代现行的异步接毒法, 更具有产业化应用前景。

本文成功探讨了SCRV-QY在CPB细胞中的最适增殖条件, 即单纯提高单位体积的病毒产量可选择异步接毒, 若从降低生产成本考虑可选择同步接毒, 此研究为该病毒的规模化培养奠定了基础, 同时结合前期关于ISKNV增殖的研究结果^[17], 为低成本ISKNV和SCRV二联灭活疫苗的生产提供了理论依据, 对鳊的健康养殖及经济效益的提高都具有重要意义。

参考文献:

- [1] 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(5): 437-441.
Zhang Q Y, Li Z Q. Three different viruses observed from the tissues of diseased mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(5): 437-441(in Chinese).
- [2] Tao J J, Gui J F, Zhang Q Y. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(1): 1-9.
- [3] Tao J J, Zhou G Z, Gui J F, *et al.* Genomic sequence of mandarin fish rhabdovirus with an unusual small non-transcriptional ORF[J]. *Virus Research*, 2008, 132(1-2): 86-96.
- [4] Fauquet C M, Mayo M, Maniloff J, *et al.* Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. Pittsburgh, U. S. A: Academic Press, 2005: 623-644.
- [5] Walker P J, Benmansour A, Dietzgen R, *et al.* Family Rhabdoviridae[M]//Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al.* Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000: 563-583.
- [6] Jensen M H. Research on the virus of Egtved disease[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1965, 126(1): 422-426.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Kimura T, Yoshimizu M, Gorie S. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1986, 1(3): 209-217.
- [10] Phelan P E, Pressley M E, Witten P E, *et al.* Characterization of snakehead rhabdovirus infection in Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(3): 1842-1852.
- [11] De Kinkelin P, Galimard B, Bootsma R. Isolation and identification of the causative agent of "red disease" of pike (*Esox lucius* L. 1766)[J]. *Nature*, 1973, 241(5390): 465-467.
- [12] 阮红梅, 张奇亚. 鱼类弹状病毒分子生物学研究动态[J]. 中国水产科学, 2003, 10(6): 513-519.
Ruan H M, Zhang Q Y. Molecular biology of fish rhabdoviruses—Review[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 513-519(in Chinese).

- [13] Takano T, Iwahori A, Hirono I, *et al.* Development of a DNA vaccine against hiram rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(4): 367-374.
- [14] Byon J Y, Ohira T, Hirono I, *et al.* Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis[J]. *Vaccine*, 2006, 24(7): 921-930.
- [15] Fu X, Li N, Lai Y, *et al.* A novel fish cell line derived from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32-45.
- [16] 罗霞, 邓国成, 赵长臣, 等. 池塘养殖斑鳎弹状病毒的分离与初步鉴定[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 620-625.
- Luo X, Deng G C, Zhao C C, *et al.* Isolation and preliminary identification of rhabdovirus from *Channa maculata* cultured in pond[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 620-625(in Chinese).
- [17] 罗霞, 付小哲, 李宁求, 等. 同步接毒条件下鳎传染性脾肾坏死病毒在CPB细胞中的最适增殖条件[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1712-1720.
- Luo X, Fu X Z, Li N Q, *et al.* Study on optimal proliferation conditions of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi* in CPB cells with synchronous inoculation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1712-1720(in Chinese).
- [18] Atkinson E M, Debelak D J, Hart L A, *et al.* A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(11): 2821-2823.
- [19] 周勇, 曾令兵, 孟彦, 等. 大鲵虹彩病毒TaqMan实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. *水产学报*, 2012, 36(5): 772-778.
- Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, *et al.* Establishment of a TaqMan real-time PCR assay for detecting the giant salamander iridovirus[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 772-778(in Chinese).
- [20] Wang X W, Ao J Q, Li Q G, *et al.* Quantitative detection of a marine fish iridovirus isolated from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, using a molecular beacon[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 133(1): 76-81.
- [21] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 42(1): 1-9.
- [22] 吴云飞, 朱玲, 徐志文, 等. 猪细小病毒PK-15细胞适应株的培育及增殖特性[J]. *病毒学报*, 2013, 29(4): 357-363.
- Wu Y F, Zhu L, Xu Z W, *et al.* Proliferation characteristics of a PK-15 cell-adapted strain of porcine parvovirus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013, 29(4): 357-363(in Chinese).
- [23] 郭显坡. 猪细小病毒分离鉴定、SYBR Green I实时定量PCR检测方法的建立及临床初步应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- Guo X P. Isolation, identification and development of SYBR green I real-time PCR assay and clinical detection of porcine parvovirus[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [24] 樊廷俊, 王丽燕, 耿晓芬, 等. 大菱鲆红体病虹彩病毒体外增殖条件的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(5): 767-774.
- Fan T J, Wang L Y, Geng X F, *et al.* Studies of the propagation of turbot reddish body iridovirus *in vitro*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(5): 767-774(in Chinese).
- [25] 樊卫平, 李敬云, 王红霞, 等. 不同血清浓度培养基对HIV产量的影响[J]. *军事医学科学院院刊*, 2000, 24(1): 69-70.
- Fan W P, Li J Y, Wang H X, *et al.* Influence of culture medium with different concentration of serum for HIV production[J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2000, 24(1): 69-70(in Chinese).

Study on optimal proliferation condition of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus in CPB cells

LUO Xia, FU Xiaozhe, LI Ningqiu*, LIN Qiang, HUANG Zhibin, ZHANG You

(Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The optimal proliferation condition of *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV) in CPB cells was determined through detecting the viral copy numbers by Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR). Two inoculation methods including synchronous and asynchronous inoculation and different culture conditions such as the amount of inoculated virus, FBS concentration of the culture medium were investigated in this study. The virus was harvested when the CPE reached 80% and then RNA was extracted for qRT-PCR detection. Results showed that all the above factors had obvious influence on the SCRIV proliferation in vitro. When compared with the viral yields in unit volume, asynchronous inoculation method was superior to the synchronous inoculation. The highest amount of virus (5.59×10^{10} copies/mL) were obtained when cultured in L-15 medium containing 2% fetal bovine serum at 28 °C for 48 h with MOI=10 and inoculation for 1.5 h. While the viral yields with unit cost was compared, 4 proliferation conditions with synchronous inoculation method were singled out which were superior to asynchronous inoculation. The highest viral yields per unit cost (4.88×10^{13} copies/yuan) were obtained when SCRIV was inoculated to the CPB cells at the middle-log phase with a MOI=0.03 and cultured with L-15 medium containing 6% fetal bovine serum and harvested after culturing at 28 °C for 70 h. In conclusion, viral yield and the medium cost were studied as the assessment criteria for SCRIV proliferation in CPB cells in this paper, and it provided the theoretical basis for SCRIV vaccine production with low cost through the comprehensive viral yield analysis of the medium cost.

Key words: *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRIV); Chinese perch brain cell line, CPB cells; inoculation method; proliferation condition; quantitative real-time PCR

Corresponding author: LI Ningqiu. E-mail: liningq@126.com

Funding projects: Guangdong Special Projects on Construction of Fishing Port and Fishery Industry Development Science & Technology Project of Guangdong Provinces (2016B020234003); Science & Technology Project of Guangdong Provinces (2016A020210021)