

# 鳗鲡冠状病毒样病毒的细胞分离与培养

岳玉环 黎诚耀 杨盛华 卢 强 陶增思  
王文东 邹啸环 杨振国 王振英 殷 震  
(解放军农牧大学水产动物疾病研究中心, 长春 130062)

**摘 要** 实验选用 4 种鱼类传代细胞, 对首次发现的鳗鲡“狂游病”的病原——鳗鲡冠状病毒样病毒进行了细胞分离与培养。本研究在鲤上皮乳头状瘤细胞(EPC)中复制了鳗鲡冠状病毒样病毒粒子, 并经病毒细胞培养物的电镜负染和超薄切片法检查得到了证实。

**关键词** 欧洲鳗鲡, 冠状病毒样病毒, 细胞培养

前期研究中, 我们在国内外首次发现并证实了鳗鲡冠状病毒样病毒是我国福建省等地人工养殖的欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla* L.) (以下简称鳗鲡) 中呈暴发性流行的“狂游病”的病原[陶增思等 1997]。在此基础上, 本研究对鳗鲡冠状病毒样病毒进行了细胞分离与培养, 获得了成功。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

鳗鲡冠状病毒样病毒, 从福建省诏安县养鳗场患“狂游病”病鳗鲡的脏器中提取(约含病毒粒子  $1.2 \times 10^6$  个/mL)[陶增思等 1997]。

### 1.2 传代培养细胞系

鲤上皮乳头状瘤细胞(EPC)、虹鳟肝细胞(R<sub>1</sub>)、草鱼肾细胞(GCK)和草鱼卵巢细胞(CO)等鱼类传代细胞, 由中国科学院水生生物研究所鱼病室提供。

### 1.3 营养液与细胞培养

营养液为含 10% 小牛血清、1% 青、链霉素的 M199 培养液(GIBCO)、pH 值 7.4。EPC、GCK 和 CO 细胞培养条件为 5% CO<sub>2</sub>、26℃ 静止培养, R<sub>1</sub> 细胞为 22℃ 静止培养。细胞每 5~7 天传代培养一次。

### 1.4 病毒细胞分离与培养

**方法 I** 用提纯的病毒液 0.1 mL 稀释至 1 mL, 加入形成单层的 EPC、R<sub>1</sub>、GCK 和 CO 细胞中, 22℃ 条件下吸附 1h 后补加营养液至全量, 置培养箱中继续培养。7d 后将接毒的培养细胞冻融一次, 吸取该细胞冻融液 1 mL 盲传于另一瓶正常细胞中。依此类推, 每隔 7d 病毒盲传培养一代。

方法 II 在细胞传代的同时加入 0.1 mL 病毒液进行同步培养。此后, 该细胞每次传代培养时均加入 0.1 mL 病毒液进行强化攻毒, 强攻 4~7 代后按方法 I 进行病毒盲传培养。

## 1.5 电镜观察

用电镜负染检查法检测细胞培养物中是否含有增殖的病毒粒子。采用细胞超薄切片法确认病毒在细胞内的复制与定位。

## 1.6 细胞培养病毒人工感染鳎试验

由厦门购进欧洲鳎(每尾 400~800 g 左右), 经一周观察后, 选择健康鳎 8 尾, 分成二组, 实验组 6 尾, 对照组 2 尾。实验组在每尾鳎背鳍前部旁侧肌肉注射 0.2 mL EPC 培养的第 7 代病毒液, 对照组注射正常的 EPC 冻融液。

## 2 结果

### 2.1 病毒接种细胞的病理变化

病毒强攻和盲传 4 代以后的 EPC 细胞有病理变化, 呈现细胞圆缩、细胞融合形成空斑、以及脱落悬浮细胞增多等变化(图 1)。细胞病变主要集中在接毒的第 3~6 天, 并且随着盲传代数的增加, 病变出现的时间逐渐提前。实验观察到病毒强攻 4 代的 EPC, 第 3 天开始有的细胞变圆, 第 4 天细胞单层出现空斑, 第 6 天还有一些空斑存在。病毒盲传 7 代的 EPC, 第 3 天出现空斑, 第 6 天时空斑已减少, 大部分空斑处又被新生细胞覆盖。病毒盲传 8 代的 EPC, 第 2 天开始出现空斑, 第 5 天出现新生细胞覆盖现象。另外几种细胞如 GCK、CO 和 R<sub>1</sub> 等接种病毒后都没有明显的细胞病理变化。

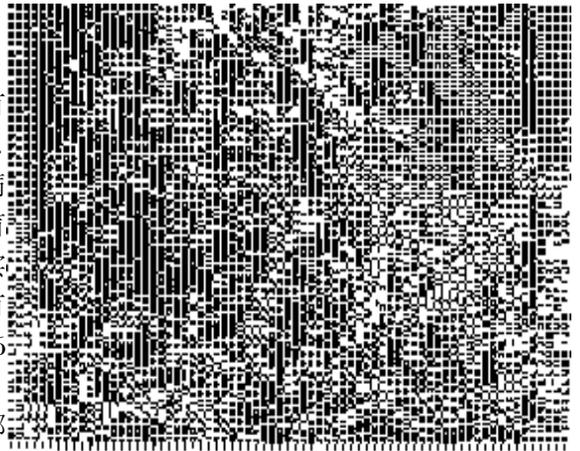


图 1 接种病毒 5 天后的 EPC 病变状况

Fig. 1 Cytopathic effect of EPC inoculated virus after 5 days

### 2.2 细胞培养病毒电镜负染检查

分别对病毒强攻 3 代、强攻 8 代和盲传 2 代的 EPC 细胞、病毒盲传 4 代的 GCK 细胞、病毒盲传 6 代和 8 代的 R<sub>1</sub> 细胞冻融液进行电镜负染观察, 结果没有发现病毒粒子。在病毒强攻 3 代又盲传 4 代以后的 EPC 细胞冻融液里发现了复制的鳎冠状病毒样病毒, 特别是病毒盲传 6 代以后的 EPC 冻融液内的病毒粒子含量显著增加。在病毒盲传第 10 代的细胞培养物裂解液内, 一个电镜视野里可见几个病毒粒子, 形态典型(图 2)。

### 2.3 病毒复制细胞的超薄切片电镜检查

对病毒盲传第 7 代的 EPC 进行固定, 制作超薄切片, 在电镜下检查, 发现细胞的空泡及其

粗面内质网内有大量典型的鳎冠状病毒样病毒粒子(图3)。



图2 EPC培养的第10代鳎冠状病毒样病毒粒子  
Fig. 2 Eel coronavirus-like virus of the tenth passage cultured by EPC  
(电镜负染法,  $\times 80\ 000$ )

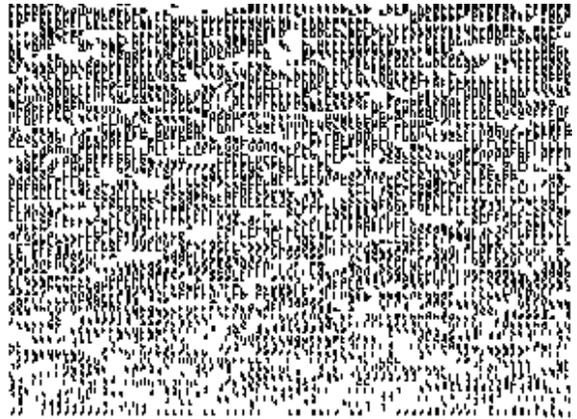


图3 EPC胞浆内的鳎冠状病毒样病毒粒子,  $\times 80\ 000$

Fig. 3 Eel coronavirus-like virus in vacuole of cytoplasm of EPC,  $\times 80\ 000$

## 2.4 细胞培养病鳎毒人工感染鳎

实验组鳎从接种第3天开始死亡,至第7天共死亡5尾,对其肝、肾等脏器裂解液进行电镜负染检查,结果是第3天死亡的鳎体内未发现病毒,4天以后死亡的鳎脏器官裂解液内均观察到大量病毒,对照组鳎生长正常,没有死亡。

## 3 讨论

目前,有关鳎病毒的细胞分离培养的研究报道还比较少见[黄琪琰 1993]。据资料检索证实,本研究在EPC细胞内复制扩增鳎冠状病毒样病毒成功尚属首次报道。实验还初步证实, $R_1$ 、GCK和CO细胞对鳎冠状病毒样病毒不敏感。

通常认为冠状病毒的细胞分离与培养难度较大。对于较难进行细胞分离培养的病毒,可采用病毒强攻和盲传的方法,经过几代的病毒盲传驯化,慢慢的适应了细胞,病毒粒子数量也逐渐扩增。另外,我们还发现如果把二种方法结合起来先用病毒强攻细胞几代后,再进行病毒盲传数代,这样能够增加病毒感染细胞的机会。用这种方法,我们进行了对虾副粘病毒样病毒的细胞培养[岳玉环等 1997],也取得了成功。

鳎冠状病毒样病毒的细胞培养成功,为进一步研究鳎“狂游病”的细胞培养疫苗和免疫预防等奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 岳玉环,黎诚耀,杨盛华等. 1997. 对虾副粘病毒样病毒的细胞分离与培养. 中国兽医学报, 17(3): 306~307.  
黄琪琰. 1993. 水产动物疾病学. 上海: 上海科技出版社. 85~86.  
陶增思,黎诚耀,杨盛华等. 1997. 鳎“狂游病”病原学研究. 中国兽医学报, 17(1): 30~32.

## CELL ISOLATION AND CULTURE OF *ANGUILLA ANGUILLA* CORONAVIRUS-LIKE VIRUS

YUE Yu-Huan, LI Cheng-Yao, YANG Sheng-Hua, LU Qiang, TAO Zeng-Si

WANG Wen-Dong, ZOU Xiao-Huan, YANG Zhen-Guo, WANG Zhen-Ying, YIN Zhen

(Research Center of Aquatic Animal Disease, University of Agriculture and Animal Science, Changchun 130062)

**ABSTRACT** In this experiment, 4 of the fish cell lines were selected to isolate and culture Eel Coronavirus-like Virus that was a pathogen of eel (*Anguilla anguilla*) "mad-swim-disease". The results showed that the Eel Coronavirus-like Virus could be replicated in epithelioma papillosum cyprini (EPC). The growth of the virus in EPC was confirmed by electron microscopy method both in negative-staining and ultrathin section specimens from observation of the viral cell cultures. And it was also verified tentatively that rainbow trout liver cells (R<sub>1</sub>), grass carp kidney cells (GCK) and grass carp oavry cells (CO) were not sensitive to this virus.

**KEYWORDS** *Anguilla anguilla*, Coronavirus-like virus, Cell culture