

## 锦鲤疱疹病毒 GZ1301 株的分离与鉴定

李莹莹, 王 庆, 曾伟伟, 潘厚军, 王英英,  
刘 春, 梁红茹, 石存斌, 吴淑勤\*

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

**摘要:** 2013 年 4 月,广东省一锦鲤养殖场暴发不明病因疾病,濒死锦鲤在塘边游动缓慢直至死亡,死亡率高达 100%。现场采样发现,发病锦鲤体长 25 cm,眼球凹陷,胸鳍及腹鳍出现出血斑点,解剖发现内脏器官包括肝、脾、肾肿大。细菌分离结果显示,内脏器官肝脏和肾脏中未分离到细菌。提取自然发病鱼的肝、脾、肾、鳃组织 DNA 作为模板,采用世界动物卫生组织(OIE)推荐的锦鲤疱疹病毒(KHV)检测引物进行 PCR 扩增,均能扩增出预期大小的特异性产物。NCBI 的 Blast 搜索结果显示,扩增序列与 KHV 胸苷激酶(thymidine kinase,TK)基因核苷酸序列同源性为 99%。病鱼内脏组织研磨过滤除菌后,腹腔注射 20 尾锦鲤,可复制出与自然发病相似的症状,并于 7 d 内全部死亡。取病鱼的鳃和肾脏研磨过滤除菌后进行细胞感染实验,结果显示,组织滤液感染 CCB 细胞后,盲传 5 代可以观察到典型的细胞病变效应(CPE)。将出现典型 CPE 的 CCB 细胞进行超薄切片制备和电镜观察,电镜下病毒呈对称 20 面体,直径约 100 nm。将出现典型 CPE 的细胞进行间接免疫荧光实验,可以观察到特异性荧光。根据 TK 基因全长序列建立系统进化树,证实该毒株为 KHV 亚洲型毒株,暂命名为 KHV-GZ1301 株。研究结果可为 KHV 起源进化、分类以及疾病防控提供重要材料。

**关键词:** 锦鲤; 锦鲤疱疹病毒; TK 基因; 病毒鉴定

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

锦鲤疱疹病毒病(Koi herpesvirus disease, KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus, KHV)引起的鲤(*Cyprinus carpio*)和锦鲤强传染性、高死亡率的病毒病。1996 年在英国首次发现锦鲤疱疹病毒病,1998 年 Hedrick 等<sup>[1-2]</sup>首次分离并鉴定病原为锦鲤疱疹病毒,该病曾在德国、比利时、法国和波兰等国家暴发流行。如今,KHVD 呈世界性分布和流行,给鲤养殖业和锦鲤观赏鱼行业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。目前的流行病学研究表明,KHV 传播迅速,可感染任何年龄的锦鲤与鲤,感染锦鲤疱疹病毒的病鱼典型临床症状是行动迟缓、食欲不振、平衡失

调、体表多黏液、在皮肤和鳍基部出现出血症状、眼球凹陷、鳃苍白或颜色不规则并伴有中度至严重的鳃坏死,感染后 7~10 d 开始出现死亡,2~3 周后死亡率可达 100%<sup>[3-5]</sup>。由于该病毒造成病鱼的死亡率极高,疫情难以控制,已引起各国的高度关注<sup>[6]</sup>。

2013 年 4 月,广东省广州地区一锦鲤养殖场发生大面积死亡,发病鱼体表黏液增多,眼球凹陷,胸鳍及腹鳍出现出血斑点,鳃部溃烂并颜色苍白。剖检后可见肝脏、脾脏、肾脏肿大,从内脏器官肝脏、脾脏和肾脏中未分离到细菌。根据病鱼的发病特征及病理学观察结果,初步

收稿日期:2014-03-04 修回日期:2014-05-30

资助项目:国家科技支撑计划(2013BAD12B02);广东省科技计划项目(2006B20301028);大宗淡水鱼产业技术体系(CARS-46)

通信作者:吴淑勤,E-mail:gzwushuqin@163.com

判定为 KHV 引起,为进一步验证导致锦鲤大量死亡的原因,将发病鱼内脏器官匀浆并进行人工感染和细胞分离实验,在此基础上进行分子生物学和免疫学实验鉴定,判定该次锦鲤发病是由锦鲤疱疹病毒引起。

刘荏等<sup>[7]</sup>首次报道我国进口的锦鲤有锦鲤疱疹病毒感染,但对于该病毒基于细胞水平的分离与培养却少有开展。本实验利用新鲜病料接种 CCB 细胞,成功分离与培养出 KHV 并已稳定传代 20 代,对于锦鲤疱疹病毒临床毒株的分离和鉴定具有一定的借鉴作用。此外,随着更多 KHV 毒株获得分离和鉴定,也可为 KHV 的起源进化、分类以及疫苗制备提供重要材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

发病锦鲤取自广东广州市一锦鲤养殖场,一共 20 尾濒死鱼,体长 20 ~ 30 cm。健康锦鲤来自珠江水产研究所观赏鱼养殖基地。CCB 细胞由德国动物健康研究院病原学研究所 (FLI) 馈赠。鼠抗 KHV 一抗 [Anti-Koi Herpesvirus (KHV) monoclonal antibody] 购自英国 AQUATIC Diagnostics Ltd。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。脑心浸液培养基 (BHI) 购自北京陆桥生物制品有限公司;5% 绵羊血琼脂购自广东环凯微生物科技有限公司;2.5% 戊二醛购自 Sigma 公司;Mix、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;胶回收、组织 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 细菌的分离与鉴定

濒死鱼解剖后,按 Holt<sup>[8]</sup>的方法以无菌操作从肝脏、脾脏、肾脏取样进行 BHI 平板、血平板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。

### 1.3 人工感染实验

取濒死鱼的鳃和肾脏组织,用含有双抗 (100 μg/mL 青霉素、100 μI/mL 链霉素) 的灭菌 PBS 缓冲液以 1:8 (重量体积比) 的比例在冰浴上匀浆;在 4 °C 下 3 000、6 000、9 000 r/min 依次离心 10 min;在无菌操作台上用注射器取上清,用 0.22 μm 的滤膜过滤到灭菌离心管中。健康锦鲤分成 2 组,每组 20 尾。一组每尾注射 0.3 mL 的组织

悬液,另外一组每尾注射 0.3 mL 无菌 PBS 缓冲液。实验期间水温控制在 20 ~ 25 °C。每日观察,连续 3 周。

### 1.4 病鱼组织感染 CCB 细胞

将过滤液用 PBS 进行梯度稀释 10 倍、100 倍,吸取 1 mL 加入到含单层 CCB 细胞的培养瓶中,孵育 1 h 后,吸弃组织过滤液,加入含 3% 血清的培养基,感染的 CCB 细胞放入 22 °C 生化培养箱中,每天观察细胞生长情况。每个代次连续观察 15 d,如无病变进行继续传代。

### 1.5 超薄切片的制备与观察

刮取出现典型细胞病变的 CCB 细胞,6 000 r/min 离心 1 min,倒掉上清,将细胞沉淀置于 2.5% 戊二醛中,经磷酸盐缓冲液冲洗后,以 1% 锇酸固定。梯度乙醇中脱水,苯二甲酸二丙酯包埋,制备超薄切片,在 JEM-100CX II 透射电镜下观察和拍片。

### 1.6 基因的扩增与序列测定

发病鱼、健康鱼与感染 CCB 细胞的 DNA 提取按照 OMEGA DNA 提取试剂盒的说明进行。根据世界动物卫生组织 (OIE) 上推荐的鉴定锦鲤疱疹病毒的引物 (TK) 用于检测锦鲤疱疹病毒病;按参考文献<sup>[9-10]</sup>介绍的方法合成引物 (Q-TK) 进行 TK 基因全序列的测定,根据序列全长对所获得毒株与从 GenBank 下载的 21 株 KHV 分离株进行聚类分析。引物由 Invitrogen 公司合成 (表 1),扩增体系为总体积 25 μL 的反应体系包括 12.5 μL Mix,2 μL DNA 模板,primer F 和 R (20 μmol/L) 各 1.5 μL,7.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s (Q-TK 引物的延伸时间为 1 min),共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

表 1 本实验所用引物对

Tab. 1 Primer sets used in this research

引物 primer	引物序列 primer sequence	片段 大小/bp size	用途 usage
TK	F:GGGTACCTGTACGAG R:CACCCAGTAGATTATGC	409	检测引物
Q-TK	F:AACGCGGGCCAGCTGAACAT R:TGTGTGTATCCAATAAACG	997 ~ 1 007	扩增 TK 基因全长

以 Q-TK 为引物扩增的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶回收后,与 pMD18-T 载体连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5α,涂布含 Amp 的

LB 平板,挑取白色菌落,并进行菌落 PCR 鉴定,挑选 3 个阳性克隆委托上海英骏公司测序。

### 1.7 间接免疫荧光实验

接种 CCB 细胞至 96 孔板中,待长至 90% 满时,每孔加入 30  $\mu$ L 病毒上清液,在 22  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育,直至出现典型 CPE;除去培养液,加入预冷的(-20  $^{\circ}$ C)甲醇在室温下固定 10 min,用 PBS 洗 3 次;加入 0.5% Triton 进行透化处理 10 min,用 PBS 洗 3 次;加 5% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min,用 PBS 洗 3 次;加入鼠抗 KHV 一抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次;加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记

的羊抗鼠二抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 PBS 洗 3 次;最后于倒置荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 细菌的分离

从发病鱼的肝脏、脾脏和肾脏未分离到细菌。

### 2.2 人工感染

人工感染锦鲤 72 h 后出现症状,主要表现为游动缓慢、眼球凹陷、鳞片 and 鳍条基部出血、鳃部坏死(图 1)。感染 7 d 后,实验组全部死亡,对照组无任何症状,全部存活。



图 1 感染 KHV 的锦鲤

(a) 自然发病鱼; (b) 人工感染鱼

Fig.1 The infected koi

(a) naturally diseased fish; (b) experimentally infected fish

### 2.3 CCB 细胞感染情况观察

组织滤液感染 CCB 细胞后,盲传 5 代可以稳定地观察到典型的细胞病变效应:细胞出现大量

空泡,细胞发生融合,而对照组细胞生长致密且无空泡出现(图 2)。

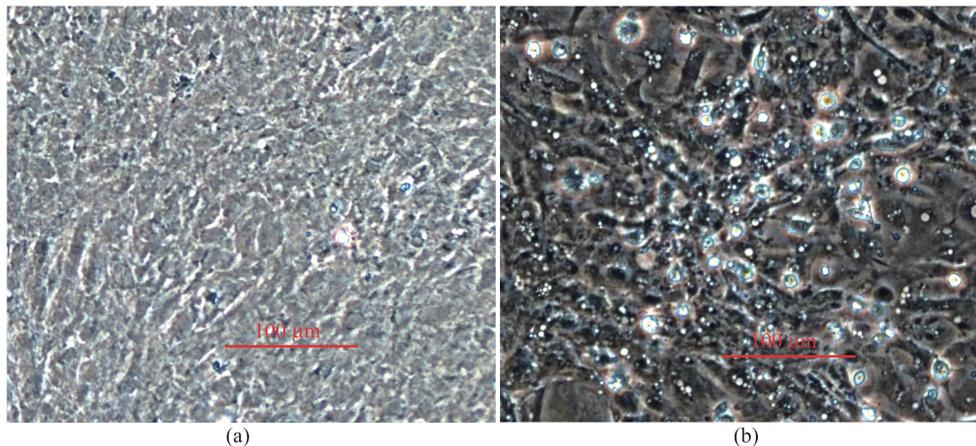


图 2 感染 KHV 的 CCB 细胞 CPE 观察

(a) 对照; (b) 感染细胞

Fig.2 CPE of CCB cell infected by KHV observed under microscope

(a) control; (b) infected cell

## 2.4 超薄切片观察

将出现典型 CPE 的 CCB 细胞进行超薄电镜切片观察,发现在细胞质中存在大量成熟和不成

熟的病毒粒子,电镜下病毒似对称 20 面体,直径约 100 nm(图 3)。

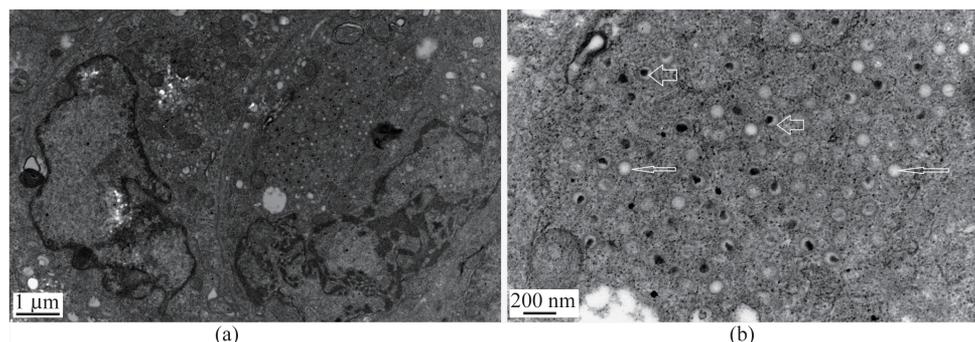


图 3 感染 KHV 的 CCB 细胞超薄切片观察

粗箭头标识成熟病毒粒子,细箭头标识未成熟病毒颗粒

(a)放大 9 700 倍; (b)放大 37 000 倍

Fig. 3 Ultra-thin section preparation of CCB cell infected by KHV observed under EM

Thick arrows indicate mature enveloped KHV virions, and thin arrows indicate immature enveloped KHV virions

(a) 9 700 × magnification; (b) 37 000 × magnification

## 2.5 基因扩增与序列分析

根据 OIE 上推荐的鉴定 KHV 引物检测自然发病鱼、人工感染鱼和感染细胞,均检测到预期大小的片段,健康鱼无扩增条带(图 4)。

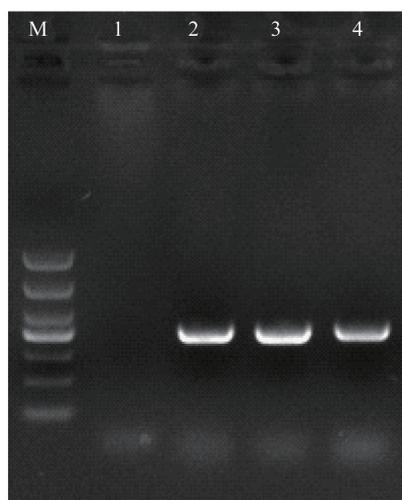


图 4 PCR 检测结果

M. Marker DL1000; 1. 健康鱼; 2. 自然发病鱼; 3. 人工感染鱼; 4. 感染细胞

Fig. 4 Detection results using PCR

M. DNA marker DL1000; 1. healthy fish; 2. naturally diseased fish; 3. experimentally infected fish; 4. infected cell

测定分离株的 TK 基因全长序列,分离株 TK 基因全长 997 bp,依据邻接法利用 MEGA 5.0 建

立进化树(图 5),证实本实验中所分离毒株为 KHV 亚洲型毒株,序列比对发现,与亚洲型(KHV-J)只有一个碱基的差异,同源率为 99.9%。

## 2.6 间接免疫荧光实验

将出现典型病变的 CCB 细胞利用甲醇固定,进行间接免疫荧光实验。结果表明,利用针对 KHV 的抗体作为一抗孵育细胞,用 FITC 标记的二抗可以检测到大量的绿色荧光,而对照组未发现特异性绿色荧光,进一步验证 GZ1301 株可以感染 CCB 细胞,并被 KHV 特异性抗体检测到(图 6)。

## 3 讨论

鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)也被称作锦鲤疱疹病毒(KHV),是基因组大小为 295 kb 的线型双链 DNA<sup>[11]</sup>。由 KHV 引起的锦鲤疱疹病毒病(Koi herpesvirus disease, KHVD)是 20 世纪末被确定的一种鱼类疾病,严重威胁鲤和锦鲤养殖业的安全。流行病学研究表明,锦鲤疱疹病毒传播迅速,常暴发于 22 ~ 27 °C,可感染任何年龄的锦鲤与鲤,成鱼比幼鱼更易感染且死亡率较高<sup>[3,12]</sup>。OIE 和欧洲联盟法律将锦鲤疱疹病毒病列为必须申报的疾病<sup>[13]</sup>,我国将其列为二类动物疫病。鲤和锦鲤是我国重要的养殖对象,2012 年我国的

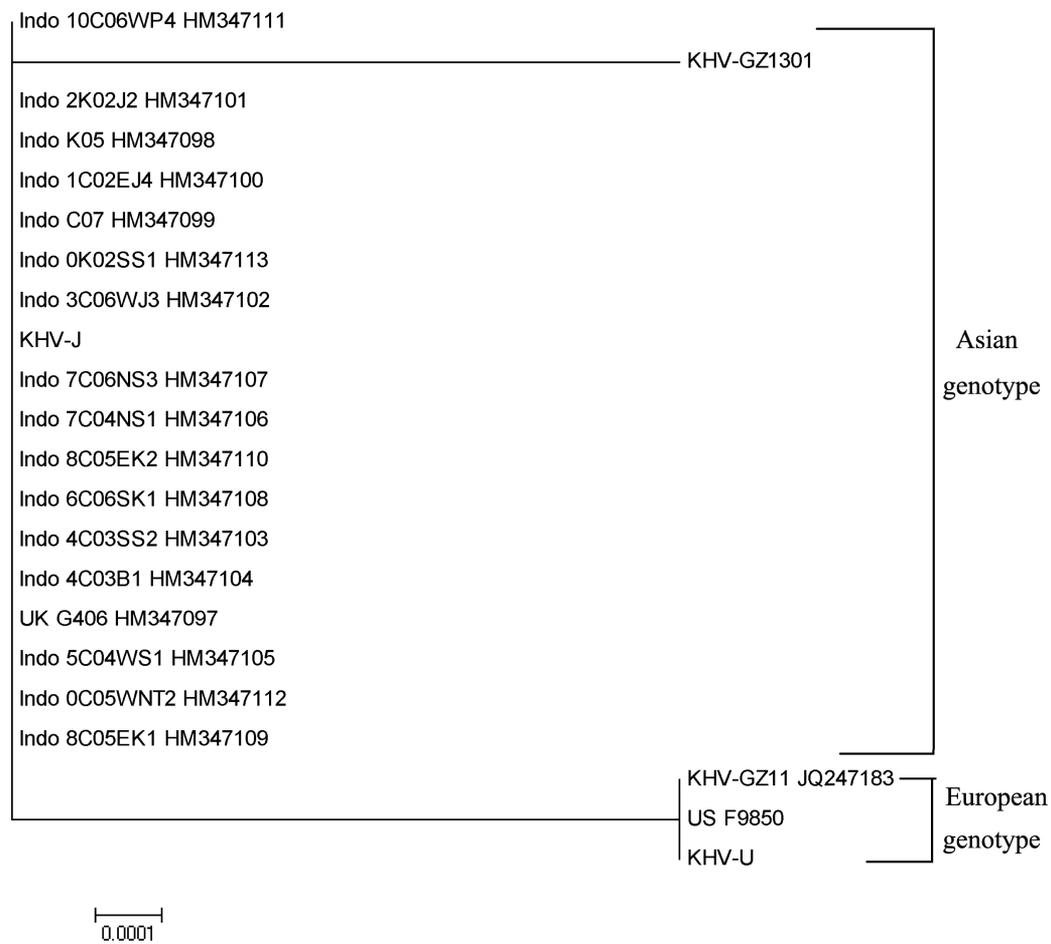


图 5 基于 *TK* 基因利用邻接法构建 KHV-GZ1301 进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of KHV-GZ1301 based on neighbor-joining analyses of the *TK* gene sequences

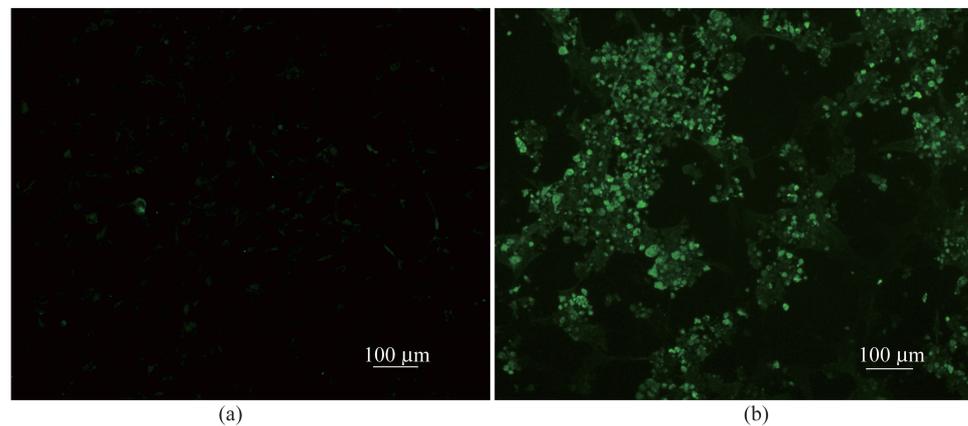


图 6 间接免疫荧光检测结果

(a) 对照; (b) 感染细胞

Fig. 6 Detection results using IFAT

(a) control; (b) infected cell

鲤养殖产量已占淡水养殖鱼类总产量的 12.4%<sup>[14]</sup>;锦鲤则是我国观赏鱼的主要品种,一

旦暴发锦鲤疱疹病毒病,高达 100% 的死亡率将给我国水产养殖和观赏鱼产业带来巨大的损

失<sup>[3]</sup>,因此,亟需开展锦鲤疱疹病毒的防控研究。

KHV 在细胞水平的分离与培养是研究锦鲤疱疹病毒病防控的基础,刘荭等<sup>[7]</sup>曾报道在进口到中国的锦鲤中检测到 KHV,但是至今仍很难用细胞系分离到 KHV。最近在韩国的养殖锦鲤中检测到 KHV,但是未能利用 KF-1 细胞系成功分离到病毒<sup>[15]</sup>;朱霞等<sup>[16]</sup>利用发病鲤肾脏组织与单层框镜鲤鳍原代细胞(KFC)共培养的方式分离到 KHV 毒株;Dong 等<sup>[9,17]</sup>建立了锦鲤鳍条细胞系 KCF-1 分离出欧洲型 KHV,但是至今尚未有利用 CCB 细胞系成功分离到 KHV 的报道。本实验中对于 KHV 基于细胞水平的成功分离和培养,对锦鲤疱疹病毒病临床毒株的分离和鉴定具有一定的借鉴价值。

利用 TK 基因保守序列检测 KHV 病毒是目前最常用的检测方法,该方法也被纳入到了 OIE 法规中,Bercovier 等<sup>[18]</sup>证明,以 TK 基因保守序列为目的基因的 PCR 检测与用 KF-1 细胞分离 KHV 病毒的 KHV 检测金标准方法具有相同的检测结果,说明以 TK 基因保守序列为目的基因的 PCR 检测可以代替花费时间长的病毒分离方法。在本实验中也证实,以 TK 基因保守序列为目的基因的 PCR 检测具有良好的特异性,并利用该方法成功地检测到 KHV 病毒。

不同地区 KHV 毒株的分离和鉴定将对 KHV 病毒的起源进化、分类及疫苗研制等提供重要的材料。在疫苗的研制上,以色列已经研制出锦鲤疱疹病毒疫苗,并成功上市,由于不同基因型毒株存在差异,疫苗是否适用于中国锦鲤疱疹病毒病的防治也不得而知,因此,中国锦鲤疱疹病毒毒株的鉴定对以后疫苗筛选和引进也具有重要的意义。目前,从以色列、美国和日本 3 个地方分离出的 KHV 毒株的全基因组序列已被公布,来自以色列和美国的隔离群统称为欧洲株,来自日本的 KHV 隔离群被命名为亚洲株,从基因组学比较分析和分子流行病学研究方面都证明来自亚洲和欧洲的隔离群有着明显的基因差异<sup>[10-11]</sup>,可通过对 TK 基因全长序列的测定将 KHV 毒株区分为欧洲型和亚洲型<sup>[9]</sup>。本实验通过测定分离出的毒株的 TK 基因全长序列,并进行核苷酸序列 Blast 比对,构建 TK 全基因系统进化树,证实分离出的 GZ1301 为 KHV 亚洲型毒株,与亚洲株(KHV-J)只有一个碱基的不同,具有高度同源性。

本实验利用 CCB 细胞系成功地分离到 KHV,通过电镜观察和间接免疫荧光实验证实了病毒的细胞感染,获取了 GZ1301 毒株的 TK 基因全长序列,并通过聚类分析表明 GZ1301 为亚洲型毒株。本研究的开展能为 KHV 的分离和鉴定提供技术支持,也为今后疫苗研制和疾病防控奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Haenen O L M, Way K, Bergmann S M, *et al.* The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture [J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2004, 24 (6): 293 - 307.
- [2] Hedrick R P, Gilad O, Yun S, *et al.* A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, 12(1): 44 - 57.
- [3] Ilouze M, Dishon A, Kotler M. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(1): 147 - 156.
- [4] Jha P, Barat S. The effect of stocking density on growth, survival rate, and number of marketable fish produced of koi carps, *Cyprinus carpio* vs. koi concrete tanks [J]. *Journal of Applied Aquaculture*, 2005, 17(3): 89 - 102.
- [5] Jha R, Barat S. Effect of water exchange on water quality and the production of ornamental carp (*Cyprinus carpio* var. *koi* L.) cultured in concrete tanks manured with poultry excreta [J]. *Archives of Polish Fisheries*, 2005, 13: 77 - 90.
- [6] El Matbouli M, Saleh M, Soliman H. Detection of *Cyprinid herpesvirus* type 3 in goldfish cohabiting with CyHV-3-infected koi carp (*Cyprinus carpio koi*) [J]. *Veterinary Record*, 2007, 161: 792 - 793.
- [7] Liu H, Shi X J, Gao L Y, *et al.* Study on the aetiology of Koi epizootic disease using the method of nested-polymerase chain reaction assay (nested-PCR) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(5): 414 - 418. [刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 NestPCR 鉴定. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 414 - 418.]
- [8] Holt J G, Krige N R, Senath P H A, *et al.* *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th edition) [M]. London: Williams & Wilkin Press, 1994: 527 - 558.

- [ 9 ] Dong C F, Li X Z, Weng S P, *et al.* Emergence of fatal European genotype CyHV-3/KHV in mainland China [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162 ( 1 ): 239 - 244.
- [ 10 ] Kurita J, Yuasa K, Ito T, *et al.* Molecular epidemiology of koi herpesvirus [ J ]. *Fish Pathology*, 2009, 44 : 59 - 66.
- [ 11 ] Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, *et al.* Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide [ J ]. *Journal of Virology*, 2007, 81 ( 10 ): 5058 - 5065.
- [ 12 ] Dishon A, Perelberg A, Bishara-Shieban J, *et al.* Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) in fish droppings [ J ]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 ( 11 ): 7285 - 7291.
- [ 13 ] Antychowicz J. Notifiable diseases in OIE manuals and European Union Legislations [ J ]. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006, 62 ( 9 ): 977 - 980
- [ 14 ] The Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. Chinese fishery statistical yearbook [ M ]. Beijing: China Agriculture Press, 2012. [ 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2012. ]
- [ 15 ] Gomez D K, Joh S J, Jang H, *et al.* Detection of koi herpesvirus ( KHV ) from koi ( *Cyprinus carpio koi* ) broodstock in South Korea [ J ]. *Aquaculture*, 2011, 311 ( 1 - 4 ): 42 - 47.
- [ 16 ] Zhu X, Li X W, Wang H, *et al.* Isolation and identification of Kio herpesvirus [ J ]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33 ( 5 ): 340 - 343. [ 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定. 中国预防兽医学报, 2011, 33 ( 5 ): 340 - 343. ]
- [ 17 ] Dong C F, Weng S P, Li W, *et al.* Characterization of a new cell line from caudal fin of koi, *Cyprinus carpio koi*, and first isolation of cyprinid herpesvirus 3 in China [ J ]. *Virus Research*, 2011, 161 ( 2 ): 140 - 149.
- [ 18 ] Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, *et al.* Cloning of the koi herpesvirus ( KHV ) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis [ J ]. *BMC Microbiology*, 2005, 5 : 13.

## Isolation and identification of koi herpesvirus( GZ1301 ) from diseased koi( *Cyprinus carpio* )

LI Yingying, WANG Qing, ZENG Weiwei, PAN Houjun, WANG Yingying,  
LIU Chun, LIANG Hongru, SHI Cunbin, WU Shuqin \*

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

**Abstract:** An unknown disease causing 100% mortality occurred in a koi (*Cyprinus carpio*) population cultured in Guangdong Province, in April 2013. The moribund koi showed lethargy and unusual swimming behavior such as floating on the pond surface until death. The diseased koi had a mean body length of 25 cm with typical clinical signs including enophthalmia (sunken eyes) and haemorrhages on the skin and base of the fins, and fin erosion. The postmortem examination revealed that liver, spleen, kidney were obviously swollen. No pathogenic bacterium was isolated from internal organs. Positive results were obtained from all detected koi according to a standard PCR diagnosis of CyHV-3 proposed by Office International des Epizooties (OIE). Comparative analysis of nucleotide sequences was performed with the GenBank databases using Blast database network service. The results showed that the putative gene products from infected koi shared 99% identity to that of reported KHV. After filtration treatment, the tissue suspension was injected intraperitoneally into 20 koi. Similar signs appeared and all koi died within 7 days post-infection (p. i.). After filtration treatment, the gills and kidney tissue suspension was inoculated to the CCB monolayer cells. The stable cytopathic effect (CPE) was formed after five blind passages in CCB cells, characterized by severe vacuolation in the infected CCB cells. Under electron microscope (EM), icosahedral viral particles were observed in the cell. The virus particles had an average diameter of 100 nm, and the shape was highly similar to that of KHV. After indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), specific fluorescence could be observed on the cell. Based on neighbor-joining analyses of the TK gene sequences, phylogenetic tree was constructed and the result indicated that the pathogen in our study was Asian genotype isolate which was named tentatively KHV-GZ1301. The present study provided important material for virus genesis, evolution, classification, and disease control.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; koi herpesvirus; TK gene; virus identification

**Corresponding author:** WU Shuqin. E-mail: gzwshuqin@163.com