

鳗鲡疱疹病毒的分离与鉴定

葛均青*, 杨金先, 龚 晖, 林天龙

(福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要:为获知鳗鲡“脱粘败血病”与病毒的关系,实验用蔗糖密度梯度离心的方法从发病的欧洲鳗鲡内脏器官组织匀浆液中纯化了病毒粒子,负染后利用电镜观察;进一步用 EO 细胞对病毒进行了分离、培养,并对感染病毒的细胞进行超薄切片,电镜观察;然后,提取病毒 DNA,利用鳗鲡疱疹病毒的 PCR 检测方法对其进行了鉴定。结果显示,接种匀浆上清液的 EO 细胞出现细胞融合的病变效应;分离病毒的病毒粒子具囊膜,大小约为 200 nm;从感染病毒的细胞上清液 DNA 中扩增出特异性条带,序列测定与比对分析表明,该序列与鳗鲡疱疹病毒欧洲株 (AngHV-1) 的序列完全一致。研究表明,利用 EO 细胞分离了一株鳗鲡病毒,经形态观察和 DNA 分析,确认该病毒为鳗鲡疱疹病毒,命名为 AngHV-FJ。该研究为深入开展鳗鲡疱疹病毒的致病机制及鳗鲡“脱粘败血病”的防控研究奠定了重要基础。

关键词:欧洲鳗鲡;鳗鲡疱疹病毒;脱粘败血病;分离;鉴定

中图分类号:S 941.41

文献标志码:A

鳗鲡属硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鳗鲡目 (Anguilliformes), 是一种江海洄游性鱼类,在世界各地均有分布。自 20 世纪 70 年代末,我国引进鳗鲡养殖技术以来,已形成集养殖、饲料生产、产品加工与出口等较为成熟的产业链,其产值在我国农产品出口贸易中占有重要地位。但鳗鲡养殖过程中病害的频繁发生和流行给从业者造成了巨大损失,严重阻碍了产业的健康发展。当前,我国鳗鲡养殖的品种主要有欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)、日本鳗鲡 (*A. japonica*)、美洲鳗鲡 (*A. marmorata*) 等。鳗鲡疾病的病原学研究方面,细菌性疾病、寄生虫疾病的研究较多,且已经有一套比较成熟的预防和治疗方法。在欧洲、日本、中国台湾等地,对鳗鲡病毒性疾病病原的研究开展得较早,分离了疱疹病毒^[1]、弹状病毒^[2]、内皮细胞坏死病毒^[3]、小 RNA 病毒^[4]等多种病毒。而我国在鳗鲡病毒性疾病领域的研究较少,由于对病原不了解,使得一旦疾病暴发,常呈区域性传播,造成巨额的经济损失^[5]。

鳗鲡“脱粘败血病”常见于欧洲鳗鲡和美洲

鳗鲡,在我国福建省各养殖区水温为 24~32 ℃ 的季节广泛发生,传染性强,死亡率高。发病初期,鳗鲡体表粘液明显松弛、增生,继而脱落,体表出现粘液缺损斑块,随着病情的发展,病变至真皮层、发生溃疡;解剖可见烂鳃、肠道发炎,肝脏肿大等症状。已有研究表明,该病的病原为霍乱弧菌^[6]、豚鼠气单胞菌^[7]、嗜水气单胞菌^[8]等,但采用控制细菌性病原的方法不能有效控制疾病。流行病学分析表明,欧洲鳗鲡“脱粘、败血、红头”等症状都可能由鳗鲡疱疹病毒引起的^[9]。Zhou 等^[10]利用透射电镜在患败血症的欧洲鳗鲡的鳃、肝脏和肠等的组织细胞内观察到疱疹病毒。本实验利用从台湾引进的鳗鲡卵巢细胞 (EO) 从患“脱粘败血病”的欧洲鳗鲡中分离到一株病毒,经病毒纯化、电镜观察和 DNA 鉴定,确定该病毒为给多国鳗鲡养殖业造成巨大损失的鳗鲡疱疹病毒 (*Anguillid herpesvirus*, AngHV),这也是在我国大陆首次分离培养出该病毒,命名为 AngHV-FJ。这为深入研究 AngHV 的致病机制及开展鳗鲡“脱粘败血病”的防控研究奠定了重要基础。

收稿日期:2014-03-07 修回日期:2014-03-27

资助项目:国家自然科学基金(31101933);留学人员科技活动择优资助优秀类项目(2013 年);福建省公益类科研院所专项(2009R10035-6)

通信作者:葛均青, E-mail:jqge@163.com

1 材料与方法

1.1 接种细胞培养

EO 细胞由台湾大学施秀惠教授馈赠,EO 细胞在含 10% FBS 的 L-15 培养液中 27 ℃ 培养,胰酶消化传代,培养至铺满单层时使用。

1.2 病毒的细胞分离

2008 年 8 月,福建省某鳊鲃养殖场养殖的欧洲鳊鲃暴发“脱粘败血病”,取发病鳊鲃的肝、脾、肾等内脏器官,匀浆后取上清液,经 0.22 μm 的微孔过滤除菌,接种 EO 细胞,每天观察和记录细胞病变情况,待细胞产生病变效应 (cytopathic effect, CPE) 后,收集上清液,继续接种 EO 细胞进行传代,同时设正常 EO 细胞为对照。

1.3 病毒粒子的纯化

将发病鳊鲃的组织匀浆液在 -20 ℃ 冻融 2 次后,12 000 r/min 离心 10 min,弃细胞沉淀,收集上清液,用超速离心机 50 000 × g 离心 1 h,将沉淀用 1 mL Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液重悬,用蔗糖密度梯度 (20%, 40%, 60%) 35 000 × g 离心 2 h,取出病毒带,50 000 × g 离心 1 h 去除蔗糖,沉淀用 PBS 重悬,置于 -20 ℃ 备用。

1.4 病毒粒子的电镜观察

取纯化的病毒粒子悬液,滴在覆有 Formvar-碳膜的铜网上,晾干后,用 2% 磷钨酸负染,待铜网烘干后,在飞利浦 EM208 型透射电镜下观察,拍照。

将冻融后的病毒悬液接种 EO 细胞,待 50% 细胞产生 CPE 时,刮取细胞,12 000 r/min 离心 10 min,收集细胞,经常规超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5 min;在飞利浦 EM208 型透射电镜下观察、拍照。

1.5 病毒的 PCR 鉴定

分别取纯化的病毒粒子和感染 EO 细胞的病毒

悬液,用 Pure-Link™ DNA/RNA virus Mini Kit (Invitrogen) 试剂盒提取病毒 DNA。用特异性扩增 AngHV DNA 聚合酶基因的引物 HVApolF: 5'-GTGTCGGGCCTTTGTGGTGA-3' 及 HVApolR: 5'-CATGCCGGGAGTCTTTTGTGAT-3' 进行 PCR 扩增,PCR 产物用 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 纯化回收,纯化产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 连接,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布含 Amp 的 LB 平板,挑取单菌落,用上海生工质粒小提试剂盒抽提质粒,经 PCR 验证,阳性质粒送上海生工测序。获得的序列通过 blastn 进行比对分析。

2 结果

2.1 发病鳊鲃的临床症状

用于病毒分离的鳊鲃临床症状为鳃、部分鳍条及肛门充血、粘液分泌增多 (图 1); 表现为肝脏褪色,肾脏肿大及显著的肠炎;每天有数尾到数十尾死亡,持续几个月。

2.2 鳊鲃病毒的细胞分离

EO 细胞接种匀浆液后,继续培养至第 4 天,部分细胞收缩变圆,第 6 天,多数细胞变圆,融合和空胞化,而对照细胞没有明显变化 (图 2)。收集细胞上清,继续接种 EO 细胞,细胞出现相似的 CPE。



图 1 发病鳊鲃

Fig. 1 The diseased *A. anguilla*

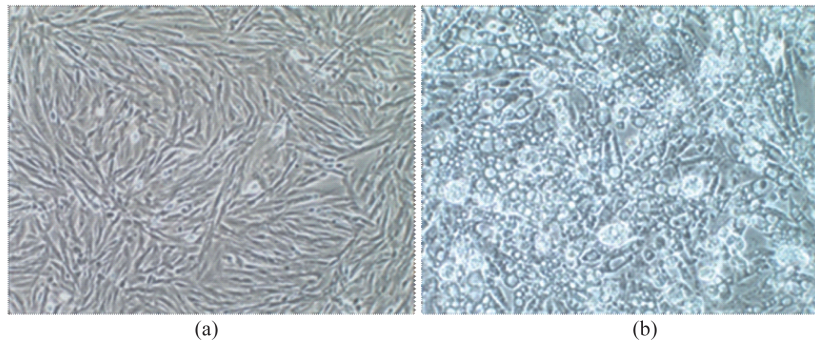


图 2 EO 细胞感染病毒后产生病变效应

(a) 对照 EO 细胞 (×100); (b) EO 细胞接种组织匀浆液 (×100)

Fig. 2 Cytopathogenic effects of the EO cells infected with the virus

(a) the control cells (×100); (b) the virus infected cells (×100)

2.3 病毒的电镜观察

分离纯化病毒粒子,负染后,在透射电镜下观察,发现病毒粒子形态基本一致,具囊膜,直径大约为 200 nm(图 3-a)。收集感染病毒的 EO 细胞,经固定、包埋、切片和染色,在电镜下观察,结果在细胞核与胞浆内均观察到病毒粒子,其形态特征与组织中纯化的病毒粒子一致(图 3-b)。

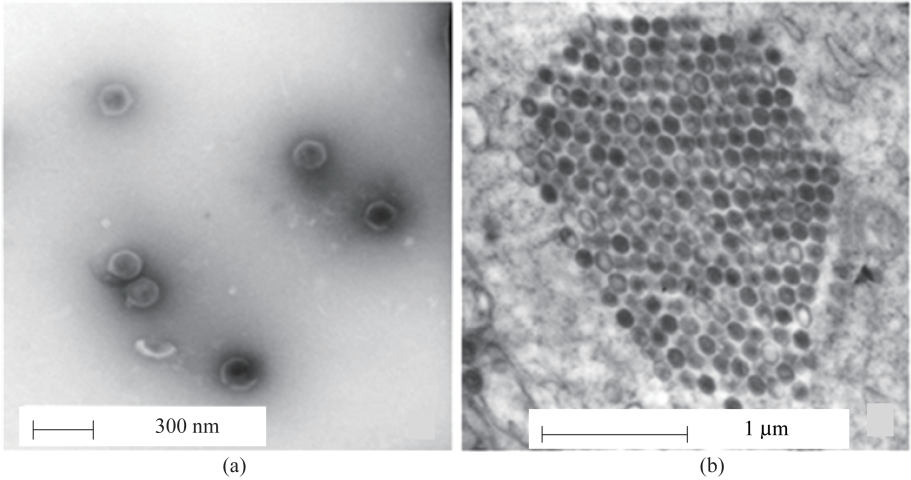


图 3 病毒的电镜观察
(a) 病毒粒子负染照片(16 000 ×); (b) 感染细胞的超薄切片照片(10 000 ×)
Fig. 3 Observation of the virions by electron microscope
(a) the negatively stained virions; (b) the ultrathin section of the virus infected cells

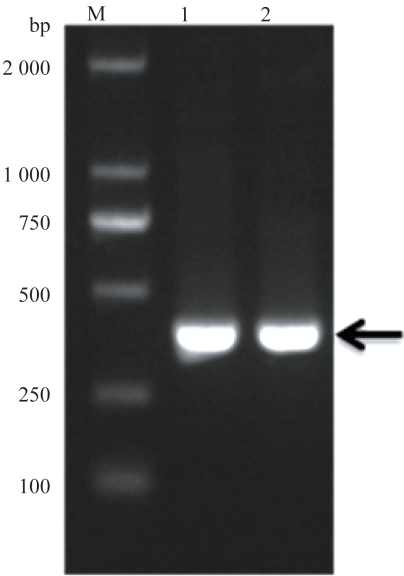


图 4 鳎疱疹病毒的 PCR 检测
M. DNA 标准; 1. 从组织匀浆液中纯化的病毒; 2. 感染 EO 细胞的病毒
Fig. 4 PCR identification of *A. herpesvirus*
M. DNA marker; 1. virus from homogenized tissue; 2. virus from infected EO cells

2.4 病毒的 PCR 鉴定

利用特异性扩增 AngHV DNA 聚合酶基因的引物对纯化的病毒粒子及感染细胞的病毒 DNA 进行 PCR 扩增,扩增出与预期大小一致的单一条带(图 4)。将该片段克隆后测序,获得 395 bp 的核苷酸序列,序列比对分析表明,其与 AngHV-1 DNA 聚合酶基因的序列完全一致,表明该病毒为一株 AngHV,命名为 AngHV-FJ。

3 讨论

疱疹病毒(*Herpesviruses*)是一组具囊膜的双链 DNA 病毒,具有高度的种别专一性。目前,已经在世界多地养殖的日本鳎和欧洲鳎体内分离到 AngHV^[1,11],已有的命名包括台湾鳎疱疹病毒(eel herpesvirus in Formosa)^[12],鳎鳃疱疹病毒(gill herpesvirus of eel)^[13]和欧洲鳎疱疹病毒(European eel herpesvirus)^[11]等。实验利用超速离心从欧洲鳎病料中纯化到病毒粒子,电镜观察发现其具囊膜,大小约 200 nm,推测其可能为 AngHV;进一步将病毒悬液接种 EO 细胞,细胞出现融合的 CPE,经感染病毒细胞的超薄切片电镜观察和病毒粒子的 DNA 鉴定,确认该病毒为 AngHV-FJ,这也是在我国大陆首次分离培养出该病毒。2010 年, van Beurden 等^[14]对 AngHV-1 的全基因组序列进行了测定;序列比对分析表明,扩增的 AngHV-FJ DNA 聚合酶基因序列与 AngHV-1 的序列完全一致,这进一步证实

AngHV-FJ 与欧洲、日本、中国台湾等地分离的 AngHV 为同一病毒株^[1,9,14-15]。AngHV-FJ 的细胞分离培养,为深入开展 AngHV 的致病机理及防控研究奠定了重要基础。

疱疹病毒在自然界中广泛存在,可引起人和多种动物的感染,多数只是在体表形成增生或肿瘤,并不能引起严重疾病。但是,多数从鱼和两栖动物中分离的疱疹病毒或类疱疹病毒可引起其寄主发病或致死,如 CyHV-3 就是草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 的高传染性和致死率病原^[16]。AngHV 是鳗鲡重要的致病病原,曾给鳗鲡养殖业造成巨大损失^[17],且可能与 20 世纪 80 年代以来野生鳗鲡的数量降低有关^[18]。研究表明,AngHV 病暴发时鳗鲡的临床症状有很大的不同,如引起鱼粘液分泌增多,病鱼眼突和腹胀,肝脏褪色,肾脏肿大、胆囊膨大、肠炎,表皮溃烂、穿孔并露出内脏,明显增高的死亡率等^[9,12]。潜伏感染也是 AngHV 的一个重要特征,在欧洲多地无发病症状的野生鳗鲡体内都可检测到该病毒,且阳性检出率达到了 48%^[17]。本实验分离的 AngHV-FJ 来自于患“脱粘败血症”的欧洲鳗鲡,具粘液分泌增多、败血、肾脏肿大等相似的临床症状;实验组之前也曾从患“红头病”、“烂鳃病”的鳗鲡病料中检测到 AngHV,表明这些疾病都可能由 AngHV 引起的^[9]。由于鱼类疱疹病毒的致病性与环境,尤其是与水温密切相关,其临床症状也有明显不同。下一步研究将进行 AngHV-FJ 的不同剂量、不同养殖环境条件下的攻毒实验,以明确其毒力、致病性、病理学特征等病原特性,为 AngHV 病的临床诊断提供依据。

参考文献:

- [1] Chang P H, Pan Y H, Wu C M, *et al.* Isolation and molecular characterization of herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in Taiwan [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 50 (2): 111 - 118.
- [2] 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.
- [3] Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, *et al.* Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. *Virology*, 2011, 412 (1): 179 - 187.
- [4] Fichtner D, Philipps A, Groth M, *et al.* Characterization of a novel picornavirus isolate from a diseased European eel (*Anguilla anguilla*) [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87 (19): 10895 - 10899.
- [5] Zhang Q Y, Gui J F. *Aquatic virology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007. [张奇亚, 桂建芳. 水生病毒学. 北京: 高等教育出版社, 2007.]
- [6] Fan H P, Huang X, Xu J E. Research on the mucous sloughing disease of cultured eel, *Anguilla anguilla* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1998, 5 (2): 68 - 72. [樊海平, 黄晓, 徐娟儿. 养殖欧洲鳗鲡脱粘病的研究. 中国水产科学, 1998, 5 (2): 68 - 72.]
- [7] Fan H P, Zeng Z S, Xu P J, *et al.* The septicemia of *Anguilla anguilla* infected by *Aeromonas caviae* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1999, 23 (3): 313 - 318. [樊海平, 曾占壮, 余培建, 等. 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症. 水产学报, 1999, 23 (3): 313 - 318.]
- [8] Lin T L, Chen R S, Dong C F, *et al.* Isolation and identification of the *Aeromonas hydrophila* pathogenic strains from *Anguilla anguilla* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 16 (4): 35 - 40. [林天龙, 陈日升, 董传甫, 等. 欧鳗嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析. 福建农业学报, 2001, 16 (4): 35 - 40.]
- [9] Ge J Q, Yang J X, Li Y J, *et al.* Polymerase Chain Reaction for the detection of *herpesvirus anguillae* in eel viral disease samples [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 961 - 964. [葛均青, 杨金先, 李友娟, 等. 鳗鲡病毒性疾病病料中鳗鲡疱疹病毒的 PCR 检测. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 961 - 964.]
- [10] Zhuo Y C, Fan H P, Lin Y. Detection of herpesvirus from cultured European eel (*Anguilla anguilla*) with septicemia [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2008, 27 (1): 73 - 76. [卓玉琛, 樊海平, 林煜. 从患败血症欧洲鳗鲡检出疱疹病毒. 电子显微学报, 2008, 27 (1): 73 - 76.]
- [11] van Nieuwstadt A P, Dijkstra S G, Haenen O L. Persistence of herpesvirus of eel *Herpesvirus anguillae* in farmed European eel *Anguilla anguilla* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 45 (2): 103 - 107.
- [12] Shi X H, Lu X Q, Chen X N. Eel herpesvirus in Forosa [C]. Taipei: COA Fisheries Series, Reports on

- Fish Disease Research,1993. [施秀惠,卢秀琴,陈秀男. 分离自日本鳎的疱疹病毒. 台北:台湾农委会渔业特刊、鱼病研究专集,1993.]
- [13] Lee N S, Kobayashi J, Miyazaki T. Gill filament necrosis in farmed Japanese eels, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), infected with *Herpesvirus anguillae* [J]. Journal of Fish Diseases, 2001, 22(6): 457 – 463.
- [14] van Beurden S J, Bossers A, Voorbergen-Laarman M H, et al. Complete genome sequence and taxonomic position of *Anguillid herpesvirus 1* [J]. Journal of General Virology, 2010, 91: 880 – 887.
- [15] Li Y J, Ge J Q, Song T Y, et al. Prokaryotic expression of *Anguillae herpesvirus* ORF95 protein [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(8): 787 – 791. [李友娟,葛均青,宋铁英,等. 鳎疱疹病毒 ORF95 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 福建农业学报, 2012, 27(8): 787 – 791.]
- [16] Michel B, Fournier G, Loeffrig F, et al. *Cyprinid herpesvirus 3* [J]. Emerging Infectious Diseases, 2010, 16(12): 1835 – 1843.
- [17] Jakob E, Neuhaus H, Steinhagen D, et al. Monitoring of *Herpesvirus anguillae* (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany [J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(6): 557 – 561.
- [18] van Beurden S J, Engelsma M Y, Roozenburg I, et al. Viral diseases of wild and farmed European eel *Anguilla anguilla* with particular reference to the Netherlands [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2012, 101(1): 69 – 86.

Isolation and identification of a herpesvirus from cultured European eels *Anguilla anguilla* in China

GE Junqing*, YANG Jinxian, GONG Hui, LIN Tianlong

(Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: To clarify whether the “mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease” of cultured European eels, *Anguilla anguilla*, is related with virus, the internal organs of the diseased European eel were extracted and homogenized, and virions were purified by sucrose density gradient centrifugation; then EO cells were incubated with the supernatant of the tissue homogenate, and the cytopathic effects of cell fusion appeared. In addition, the virus infected cells were thin sectioned, also the negatively stained purified virions were observed by electron microscope to photograph the virus morphology. It showed that the virus was enveloped with size in about 200 nm. Furthermore, DNA were extracted from the supernatant of the infected cells, and used for *Anguillid herpesvirus* (AngHV) PCR detection, and then the amplified fragment was sequenced and alignment analyzed. The results showed that it was exactly the same sequence with the AngHV European strain, AngHV-1. Therefore, the observation by electron microscope and DNA polymerase gene sequencing confirmed that the isolated virus is an AngHV strain, named AngHV-FJ, which is the first cell isolation in China mainland. The research has laid an important foundation for the study of the pathogenic mechanism of AngHV-FJ and the prevention and control of eels “mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease”.

Key words: *Anguilla anguilla*; *Anguillid herpesvirus*; mucus sloughing and hemorrhagic septicemia disease; isolation; identification

Corresponding author: GE Junqing. E-mail: jqge@163.com