



# 一种高效浓缩水环境中鲤疱疹病毒 II 型的铁絮凝法

翟玉菲<sup>1</sup>, 沈飞<sup>1</sup>, 王浩<sup>2</sup>, 吕利群<sup>1, 2\*</sup>

1 上海海洋大学国家水生动物病原库 上海 201306

2 上海海洋大学农业农村部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306

**摘要:** 本研究利用  $Fe^{3+}$  结合病毒形成絮凝物的特性, 探索高效浓缩回收水环境中 CyHV-2 的方法, 对不同浓度梯度的 CyHV-2 进行浓缩回收; qPCR 法检测浓缩回收前后的病毒基因拷贝数; 鲫 GiCF 细胞系培养浓缩后 CyHV-2 粒子。研究发现, 添加病毒拷贝数为  $10^{3.0}$ 、 $10^{4.0}$ 、 $10^{4.8}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{6.0}$ 、 $10^{7.0}$  copies/ml 时, 浓缩回收后平均拷贝数分别为  $10^{3.16}$ 、 $10^{4.17}$ 、 $10^{4.76}$ 、 $10^{5.51}$ 、 $10^{5.93}$ 、 $10^{6.58}$  copies/ml, 建立添加与回收病毒拷贝数的拟合曲线,  $R^2=0.994$ , 显示出较好的线性关系。浓缩回收后所有浓度梯度的病毒均可在 GiCF 细胞中产生细胞病变效应。

**Abstract:** This study used the characteristics of  $Fe^{3+}$  combined with virus to form flocs, explored the method of efficient concentration and recovery of CyHV-2 in water environment, and concentrated and recovered CyHV-2 with different concentration gradients; The copy number of virus gene before and after concentration and recovery was detected by qPCR; CyHV-2 particles were cultured and concentrated in GiCF cell line. It was found that when the added virus copy numbers were  $10^{3.0}$ 、 $10^{4.0}$ 、 $10^{4.8}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{6.0}$ 、 $10^{7.0}$  copies/ml, the average copy numbers after concentration and recovery were  $10^{3.16}$ 、 $10^{4.17}$ 、 $10^{4.76}$ 、 $10^{5.51}$ 、 $10^{5.93}$  and  $10^{6.58}$  copies / ml respectively. The fitting curve between the added and recovered virus copy numbers was established,  $R^2 = 0.994$ . After concentration and recovery, viruses with all concentration gradients can produce cytopathic effects in GiCF cells.

## 研究思路

- 利用 CyHV-2-ORF121 质粒构建 qPCR 标准曲线;
- 将 2ml 不同浓度梯度的 CyHV-2 病毒悬液添加入 1L 水体, 利用铁絮凝法进行浓缩回收, qPCR 法测定浓缩前后的 CyHV-2 病毒浓度;
- 建立添加病毒与回收病毒基因拷贝数的拟合曲线;
- 浓缩后的 CyHV-2 接种至 GiCF 细胞系观察细胞病变效应;
- 透射电镜观察铁絮凝法浓缩后的病毒结构。

## 结果

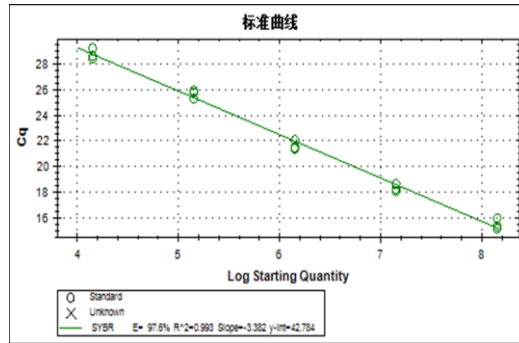


图 1 CyHV-2-ORF121 质粒荧光定量扩增标准曲线

添加病毒 Log <sub>10</sub> (病毒基因拷贝数) (copies/ml)	回收病毒 Log <sub>10</sub> (病毒基因拷贝数) (copies/ml)	接种 细胞 病变 结果
10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>6.67</sup>	+
10 <sup>6.0</sup>	10 <sup>5.96</sup>	+
10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>5.54</sup>	+
10 <sup>4.8</sup>	10 <sup>4.75</sup>	+
10 <sup>4.0</sup>	10 <sup>4.11</sup>	+
10 <sup>3.0</sup>	10 <sup>3.0</sup>	+

表 1 添加 CyHV-2 与浓缩回收 CyHV-2 荧光定量结果

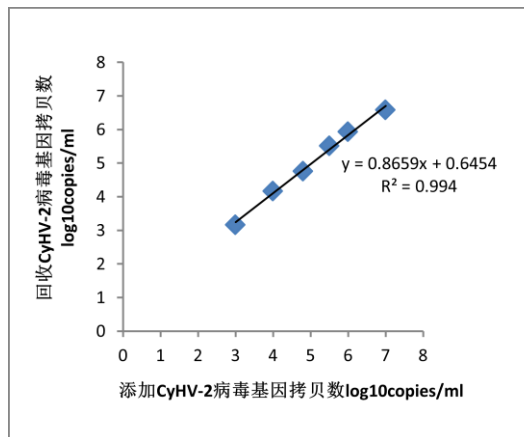


图 2 添加病毒与回收病毒定量结果拟合曲线

## 结果

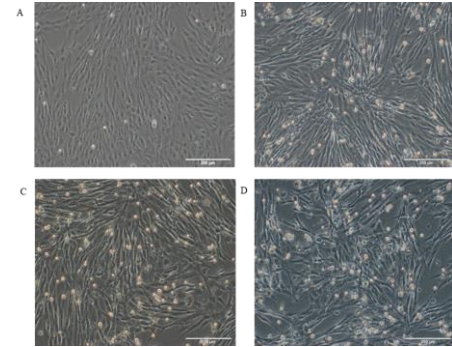


图 3 GiCF 细胞接种 CyHV-2 培养实验结果注: A: 健康 GiCF 细胞; B: GiCF 细胞接种实验室 CyHV-2 毒株接种生长 3 天; C: GiCF 细胞接种铁絮凝法回收 CyHV-2 病毒 3 天; D: GiCF 细胞接种铁絮凝法回收 CyHV-2 病毒 4 天。

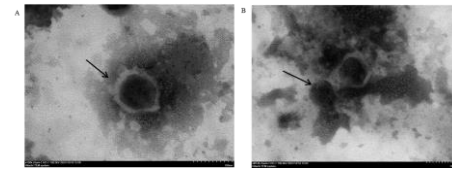


图 4 透射电镜下浓缩回收 CyHV-2 颗粒注: A: 囊膜完整的 CyHV-2 病毒颗粒; B: 囊膜破损的 CyHV-2 病毒颗粒。比例尺: 100nm

## 参考文献:

- [1]余琳,吕利群,王浩. II型鲤疱疹病毒 ORF121 蛋白的多克隆抗体制备及鉴定[J]. 水产学报, 2019, 43(06):1463-1471.
- [2]Bonnie L. Hurwitz et al. Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5) : 1428-1440.
- [3]Nishi Shinnosuke et al. Cell Culture Isolation of Piscine Nodavirus (Betanodavirus) in Fish-Rearing Seawater.[J]. Applied and environmental microbiology, 2016, 82(8) : 2537-2544.
- [4]Bintuan Zhu, Dennis A. Clifford, Shankar Chellam, Virus removal by iron coagulation-microfiltration, Water Research, Volume 39, Issue 20, 2005, Pages 5153-5161, ISSN 0043-1354, https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.035.

项目支持: 国家现代农业产业技术体系资助

## 结论

- ◆ 建立的 CyHV-2 qPCR 检测方法特异性强、灵敏度高;
- ◆ 铁絮凝法可用于水环境中 CyHV-2 的高效浓缩回收;
- ◆ 铁絮凝法浓缩回收后的 CyHV-2 病毒粒子仍具有感染性;
- ◆ 为进一步研究 CyHV-2 在水环境中水平传播效率奠定基础;
- ◆ 为其他水生生物病毒的浓缩回收提供了方法参考。