

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)脊髓组织 细胞系的建立及对 CyHV-2 的敏感性*

魏钰娟¹ 潘晓艺² 蔺凌云² 姚嘉赞² 郝贵杰² 曹 铮²
夏焱春² 尹文林² 刘忆瀚² 沈锦玉^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201200; 2. 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要 鲫造血器官坏死病是近些年来危害养殖鲫鱼最为严重的传染性疾病,其病原为鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)。本研究以异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)脊髓组织为材料,进行组织细胞体外培养,构建对鲤疱疹病毒 II 型敏感的异育银鲫脊髓细胞系(*Spinal cord tissue cell lines of Carassius auratus gibelio*, CSC)。采用组织块移植法,进行异育银鲫脊髓细胞的原代培养,并进行传代,已传代至第 128 代次,获得稳定传代的细胞系后,采用低渗法进行细胞染色体核型分析,并进行鲤疱疹病毒 II 型的敏感性测试与传代。结果表明,以含 10%胎牛血清的 L-15 培养基,在 24°C 恒温条件下,可稳定传代培养异育银鲫脊髓细胞,传代细胞呈成纤维样或纺锤状;核型分析显示,染色体数为 156±2 条,该细胞为三倍体细胞。通过对 CyHV-2 敏感性的测试,CSC 细胞感染 CyHV-2 后产生典型的细胞病变,感染第 7 天的病变细胞液的 TCID₅₀ 达到 10^{9.33}/mL, CyHV-2 病毒可在 CSC 细胞上稳定传代;通过对病变细胞的电镜观察,可见大量直径为 128—134nm 大小的疱疹样病毒颗粒。以上研究结果表明,本研究构建的异育银鲫脊髓细胞系对 CyHV-2 敏感,并在细胞上能进行稳定传代,传代病毒具有较高病毒滴度,这为鲤疱疹病毒 II 型的深入研究及疫苗开发奠定了重要的基础。

关键词 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*); 脊髓组织细胞系; 鲤疱疹病毒 II 型

中图分类号 S943 doi: 10.11693/hyhz20200300071

鲤疱疹病毒 II 型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)又被称为疱疹病毒性造血器官坏死病病毒(Herpesviral haematopoietic necrosis virus, HVHNV)(徐进等, 2013)或金鱼造血器官坏死病毒(Goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)(Jeffery *et al*, 2007)与鲤科鱼类的其他两种疱疹病毒 CyHV-1(Carp pox)和 CyHV-3(Koi herpesvirus, KHV)同属于异疱疹病毒科(Alloherpesviridae)鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)。CyHV-2 于 1992—1993 年间给日本西部养殖的金鱼造成了巨大的经济损失,患病金鱼死亡率高达 100% (Jung *et al*, 1995)。随后其他国家和地区也相继有了该

病暴发的报道,1997 年春季在美国西海岸一循环水养殖场的金鱼幼鱼出现大量死亡,死亡率高达 80% 以上,后经证实其发病是由 CyHV-2 感染引起的。观赏鱼的国际贸易很大程度上促进了该病的跨区域传播,随后中国台湾、澳大利亚、英国养殖的金鱼相继暴发该病(Stephens *et al*, 2004; Jeffery *et al*, 2007; Hanson *et al*, 2011)。2011 年匈牙利报道了养殖的银鲫也发现了 CyHV-2 感染。而中国大面积暴发该病始于 2009 年,主要发生在江苏省鲫鱼养殖区射阳、大丰、宝应、高邮、东台等地,发病总面积在 6600ha 以上,发病严重的塘口死亡率高达 90%,造成的经济损失达数亿

* 浙江省重点研发计划, 2019C02058 号; 浙江省省属科研院所扶持专项, 2020YSZX001 号。魏钰娟, 硕士研究生, E-mail: 745722539@qq.com

通信作者: 沈锦玉, 研究员, E-mail: sjinyu@126.com; 潘晓艺, 副研究员, E-mail: panxiayi@163.com

收稿日期: 2020-03-12, 收修改稿日期: 2020-04-15

元(桂建芳, 2009; Xu *et al.*, 2013)。与此同时, 在湖北、湖南、江西、浙江等省份, 也相继在患病鲫鱼体内检测出 CyHV-2。

细胞培养分离技术是病毒病诊断的经典方法, 也常被世界动物卫生组织(OIE)所推荐。CyHV-2 敏感细胞系的建立对 CyHV-2 的分离、特征分析和细胞灭活疫苗研究都具有重要作用。但已有研究发现 CyHV-2 很难在鱼类病毒分离常用的细胞系中进行连续的传代(马杰等, 2016), 比如胖头鲤细胞(fathead minnow cells, FHM) (Jung *et al.*, 1995)、鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprini, EPC)、草鱼卵巢细胞(grass carp ovary, CO)、草鱼肾细胞(grass carp kidney, CIK)均对 CyHV-2 不敏感, 仅锦鲤鳍细胞(koi fin, KF-1)能产生细胞病变效应(CPE), 但病毒在 KF-1 细胞上传至第 3—5 代后, CPE 消失且检测不到病毒核酸(Jung *et al.*, 1995)。虽然已有学者建立了异育银鲫脑组织细胞系(Ma *et al.*, 2015)和鳍条细胞系(Lu *et al.*, 2018), 且对 CyHV-2 敏感, 但由于不对外供应, 还是缺乏 CyHV-2 敏感的细胞系, 限制了对 CyHV-2 的研究, 因此建立对 CyHV-2 敏感的细胞系并研究该细胞系的生物学特性, 对 CyHV-2 进行连续传代扩大培养从而深入研究病毒的特性, 具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

患鲫造血器官坏死病异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)采集自江苏盐城某鲫鱼养殖场。健康异育银鲫来自于浙江省淡水水产研究所综合试验基地, 平均体重 120 ± 20 g/尾, 实验前于室内养殖水池暂养。L-15 细胞培养基、青霉素/链霉素、磷酸缓冲液(PBS)、胰蛋白酶-EDTA、秋水仙素均购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自 GIBICO 公司, DNA 核酸提取试剂为天根产品; PCR 用 rTaq 预混液购为 TaKaRa 公司。细胞培养瓶、移液管、细胞冻存管均购自 Corning 公司。

1.2 鲫鱼脊髓细胞系的建立

1.2.1 原代培养 健康异育银鲫以 75%酒精进行体表消毒 3—4 次, 无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织, 置于含 200U/mL 青霉素和 200 μ g/mL 链霉素的 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)中(图 1), 清洗三次。然后将洗净的组织移至盛有 L-15 培养液的培养皿中进行平衡。根据 Freshney(2010)和薛庆善(2001)原代培养法, 采用组织块移植法进行原代细胞培养。将上述的脊髓组织剪成约 0.1mm³ 的组织块, 然后移植到

25cm² 的细胞培养瓶中, 均匀平铺于培养瓶底面, 倒置平放, 24 $^{\circ}$ C 恒温培养, 放组织块的一面朝上, 培养瓶中添加 3mL 含 20% V/V 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 L-15 培养液, 过夜, 慢慢将培养瓶正置过来进行培养, 每 2—3 天更换培养液一次, 倒置生物显微镜观察细胞生长情况。



图 1 培养皿中异育银鲫脊髓组织

Fig.1 Spinal cord tissue of *C. auratus gibelio* in culture dish

1.2.2 传代培养 参照肖艺等(2012)的方法进行细胞传代培养。当细胞从组织块中迁出单层达培养瓶底面积 90%时, 采用胰蛋白酶消化法按 1 瓶传 2 瓶的方式进行传代, 24 $^{\circ}$ C 培养, 待细胞再次形成单层后, 再同法进行传代培养, 直至获得稳定传代的异育银鲫脊髓组织细胞系 CSC。并对稳定传代的细胞系添加细胞冻存液后进行液氮保存。

1.2.3 细胞染色体核型分析 对处于对数生长期的 CSC 细胞, 加入终浓度为 0.4 μ g/mL 的秋水仙素, 25 $^{\circ}$ C 孵育 4h 后胰酶消化收集细胞, 用 0.075mol/L 的 KCl 溶液低渗处理 25min 后加入预冷的卡诺固定液, 1000r/min 离心 5min 去上清后再用预冷的卡诺固定液固定 3 次, 每次 15min。冷滴片法滴片, 干燥后用 5% Giemsa 染色 25min, 流水冲洗, 干燥后显微镜观察。100 倍油镜下随机选取 100 个细胞, 统计其染色体数目。

1.3 CSC 细胞对 CyHV-2 的敏感性

1.3.1 对 CyHV-2 的敏感性 将鲤疱疹病毒型阳性的病鱼肾脏、脾脏、脑、脊髓组织剪碎, 并加等体积 PBS 进行匀浆, 匀浆液 5000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15min 后, 上清经 0.45 μ m 和 0.22 μ m 滤膜过滤, 制备成无菌组织匀浆滤液。将病毒滤液按 1 : 10 和 1 : 20 的稀释度感染培养至单层的 CSC 细胞, 24 $^{\circ}$ C 吸附 1h

后, 弃去病毒稀释液, 换成血清浓度为 2% 的 L-15 维持液继续 24°C 培养, 逐日观察细胞病变情况(Wang *et al.*, 2016)。

1.3.2 病毒的 TCID₅₀ 测定 在 96 孔细胞培养板中将 CSC 细胞培养至单层细胞, 用维持液将 CyHV-2 感染 CSC 细胞 7d 后的病毒裂解液作连续 10 倍稀释, 即 10⁻¹、10⁻²……10⁻¹⁰, 每个稀释度取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度作 8 个重复, 并设空白细胞培养对照。置 24°C 培养箱中。逐日观察细胞病变, 并记录细胞病变孔数。按 Reed-Muench 法计算病毒滴度 TCID₅₀ 值。

1.3.3 CSC 对 CyHV-2 传代的稳定性 采用 CSC 细胞对 1.3.1 分离的病毒进行传代, 传代至第 7 代次, 保存每代次的病变细胞用于 CyHV-2 的检测。病变细胞的总 DNA 采用 DNAzol 进行提取, CyHV-2 检测引物为: CyHV-2-366F: 5'-GGACTTGCGAAGAGTTTGATTTC TAC-3'; CyHV-2-366R: 5'-CCATAGT CACCATCG TCTCATC-3' (Waltzek *et al.*, 2009)。

1.3.4 CSC 病变细胞的电镜观察 将感染第 7 代 CyHV-2 的 CSC 病变细胞经 2% 戊二醛固定液(pH 7.2, 0.1 mol/L PBS 缓冲液配制)预固定, 1% 四氧化锇固定液后固定, 再经脱水包埋后进行超薄切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后, 透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 原代细胞特征

采用含 20% 胎牛血清的 L-15 培养液, 对处理成小块的异育银鲫脊髓组织, 黏附细胞瓶后, 于 24°C 进行恒温静止培养, 3—4d 后有些细胞从组织

块周围迁出, 细胞形态呈成纤维样(图 2)。待单层细胞长至充满瓶底面积 80%—90% 时, 按 1 传 2 的方式进行传代。

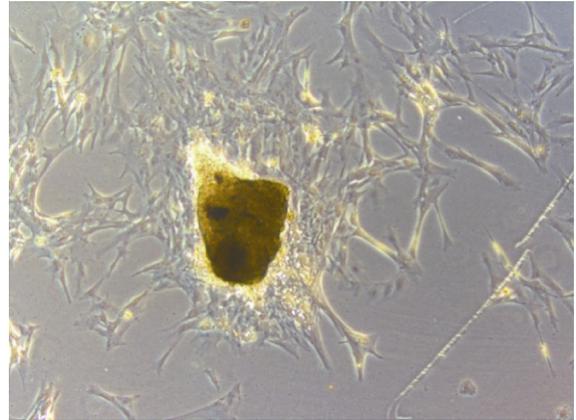


图 2 原代异育银鲫脊髓组织细胞

Fig.2 The spinal cord tissue cells of *C. auratus gibelio* in the primary culture

2.2 传代细胞特征

CSC 细胞首次传代, 约 30min 可完成贴壁, 群体倍增时间为 48h。连续传代 8 次后, 传代细胞贴壁生长速度更趋稳定, 3d 后可形成单层细胞。在传代至第 10 代后, 逐渐减少血清含量至 10%, 通过连续传代, 采用 10% 胎牛血清的 L-15 培养液, 24°C 培养, 可对 CSC 细胞进行稳定培养, 至今 CSC 细胞已传至 128 代。获得稳定传代的第 10、第 50 和第 100 代次 CSC 细胞形态见图 3, 并对 CSC 细胞进行了保藏, 保藏号为 CCTCC NO: C2018211。采用添加细胞冻存液, 将传代的细胞系于液氮中进行冷冻保存。

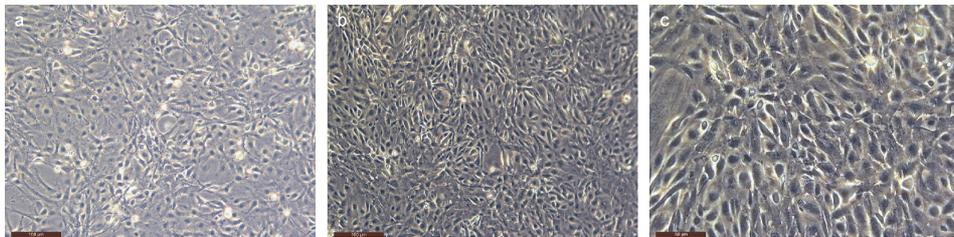


图 3 异育银鲫脊髓组织细胞系

Fig.3 Morphology of CSC cells
注: a: 10 代, b: 50 代, c: 100 代

2.3 传代细胞染色体分析

采用秋水仙素使分裂的细胞停止于分裂中期, 再通过低渗法进行染色体观察。通过对 100 个分裂相细胞的观察, 第 26 代异育银鲫脊髓组织来源细胞的染色体数分布在 152—160 之间(图 4a), 41% 的细胞都含

有 156 条染色体(图 4b), 表明该细胞的宿主为三倍体异育银鲫。

2.4 CSC 细胞对 CyHV-2 的敏感性

CyHV-2 阳性样品组织匀浆液感染 CSC 细胞单层(图 5a), 并以含 2% 血清的 L-15 维持液培养, 逐日观

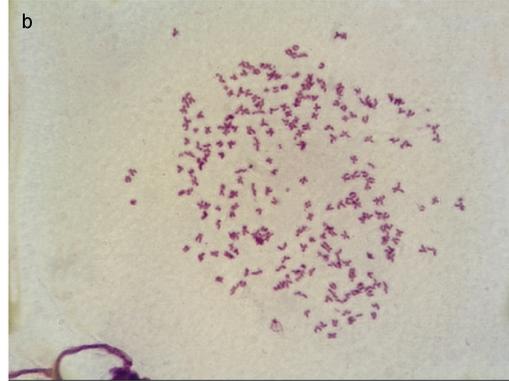
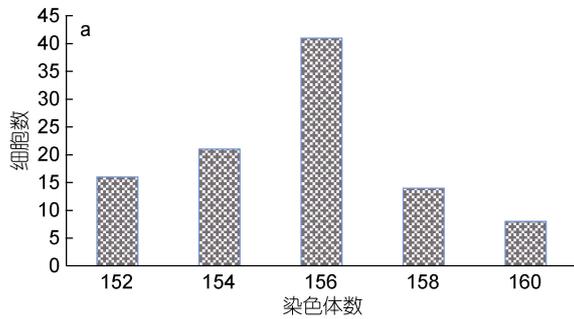


图4 第26代异育银鲫脊髓组织细胞系的染色体
Fig.4 Chromosomes of CSC cells at passage 26

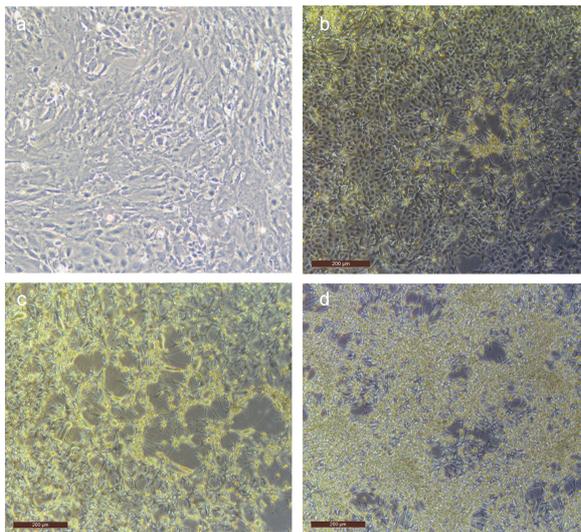


图5 CSC细胞感染CyHV-2后的病变特征

Fig.5 CPE features of CyHV-2 infected CSC cells

注: a. 感染前正常细胞; b. 感染第3天细胞病变; c. 感染第5天空斑区域扩大; d. 感染第7天细胞病变

察细胞病变(CPE), 感染后第3天细胞聚合后溶解出现空斑(图5b), 感染后第5天空斑区域扩大(图5c), 感染后第7天细胞出现大片聚合病变(图5d)。

2.5 传代病毒的TCID₅₀测定

不同稀释浓度的病毒裂解液接种96孔的CSC细胞单层后, 连续观察9d, 记录每个稀释度的细胞病变孔数, 结果见表1所示, 按Reed-Muench法计算, 换算成1mL所含的TCID₅₀为10^{9.33}/mL。

表1 TCID₅₀检测

Tab.1 Detection of TCID₅₀ in different virus dilutions

稀释度	10 ⁻¹	10 ⁻² —10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
病变孔数	8	8	8	5	2	0
未病变数	0	0	0	3	6	8

2.6 CSC细胞对病毒传代的稳定性

对收集的第2—7代次的CyHV-2细胞培养物进行DNA提取, 并进行CyHV-2的检测, 发现第2代次至第7代次培养物的总DNA, 都可扩增得到366bp的目的片段(图6), 表明CyHV-2在CSC细胞中可以稳定传代7代以上。

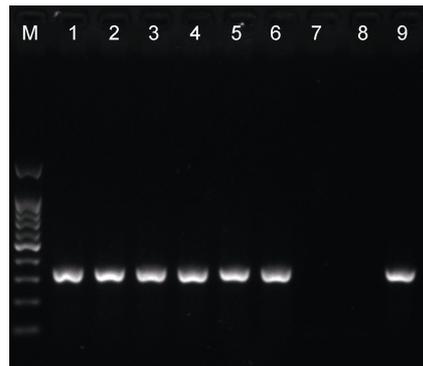


图6 不同培养代次CyHV-2的PCR检测结果示意图

Fig.6 Schematic results of PCR detection of CyHV-2 in different culture passages

注: M. 100bp Marker; 1—6. 第2—7代CSC细胞培养CyHV-2细胞毒; 7. CSC细胞对照; 8. 阴性对照; 9. CyHV-2阳性对照

2.7 鲤疱疹病毒型感染CSC的电镜观察

通过透射电镜观察感染CyHV-2后的CSC病变细胞, 可观察到大量直径在128—134nm的疱疹样病毒粒子, 呈球形颗粒状。说明CyHV-2在CSC细胞中能繁殖、扩增(图7a, 图7b)。

3 讨论

鱼类细胞培养的研究始于20世纪60年代, Wolf等(1962)建立了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系RTG-2。此后, 鱼类细胞系的建立及其相关研

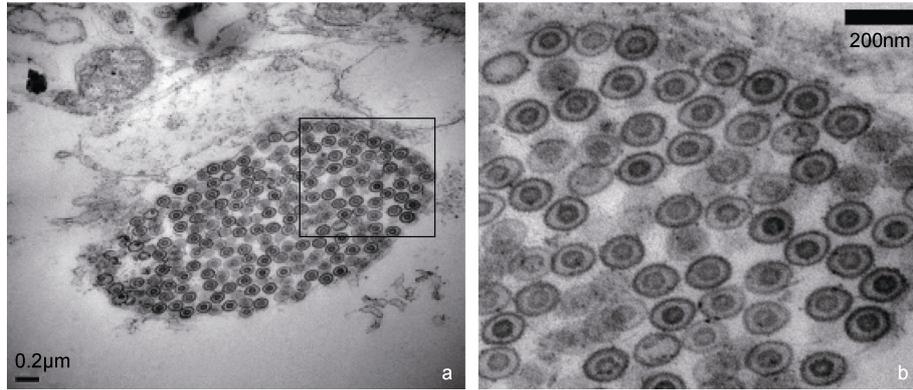


图7 第7代 CyHV-2 病毒感染 CSC 的细胞电镜超薄切片示意图

Fig.7 Schematic view of ultrathin section of the 7th generation CyHV-2-infected CSC cells
注: a. 图中标尺=0.2μm; b. 为 a 图的放大部分, 图中标尺=200nm

究进展迅速, 迄今为止, 已有 300 株左右来自不同品种鱼类的不同组织的细胞系已被建立, 鱼类细胞培养已成为一项重要的技术, 在病毒学、免疫学、鱼类资源保护与遗传育种、病理学、环境毒理学、鱼类生理学、内分泌学和转基因等方面的理论及应用研究中发挥作用(Lakra *et al*, 2011)。而鲫鱼组织源的细胞系也被多位学者建立, 包括鳍条细胞系 CFS、鲫鱼异倍体囊胚细胞系 CAB-800、鲫鱼腮盖膜细胞系 HCC-87、银鲫鱼背鳍细胞系 SCC-DF、鲫鱼脑细胞系 GiCB、鲫鱼尾鳍细胞系 GiCF 等(陈敏容等, 1985; 李亚男等, 1992; Hasegawa *et al*, 1997; Ma *et al*, 2015; Lu *et al*, 2018)。

原代细胞培养主要有组织块贴壁法、胰蛋白酶消化法、机械分散法、络合剂分散法等(于森等, 2003)。常用的是组织块贴壁法和胰蛋白酶消化法, 比较这两种原代细胞培养法的优缺点, 组织块贴壁法更适用于不易消化的组织。根据前期对 CyHV-2 在鲫鱼内脏组织分布的研究发现, 脑和肾脏的病毒含量最高(袁雪梅等, 2019), 此外, 疱疹病毒容易在神经细胞中进行潜伏感染(Grinde, 2013), 因此, 本研究选择与脑连接的脊髓组织作为原代细胞培养的组织源。脊髓组织质地松软, 含有较多不易被消化的组织, 所以选择组织块贴壁法对鲫鱼脊髓组织进行原代细胞培养。采用胰蛋白酶消化法对鲫鱼脊髓原代细胞进行传代培养, 以 1:2 的比例顺利获得传代。细胞是否可以长期冻存和成功复苏, 对于建立稳定的细胞系至关重要。本实验中, 采用液氮保存法, 选取了细胞冷冻保护液, 有效避免了因细胞在降温过程中形成冰晶而造成的细胞损坏(陈爱平等, 2011)。

细胞系是分离病毒性病原的重要材料。而鲫鱼来

源的对 CyHV-2 敏感的细胞系较缺乏, 制约了有关鲫鱼疱疹病毒病的研究进展。本研究以鲤疱疹病毒型感染 CSC 细胞系后, 细胞出现了明显病变效应, 在感染第 7 天病毒滴度达到了 $10^{9.33}$ TCID₅₀/mL。而已报道的对 CyHV-2 最敏感的细胞系, 分离的病毒最高滴度只有 $10^{4.9}$ TCID₅₀/mL (GiCF) (Lu *et al*, 2018) 和 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL (GiCB) (Ma *et al*, 2015)。这表明 CSC 细胞系扩增 CyHV-2 的能力更强, 并且分离的 CyHV-2 病毒可在 CSC 细胞中稳定传代, 传代病毒各代次病毒滴度稳定。通过对固定的病变细胞进行电镜观察, 在细胞中观察到大量的疱疹样病毒颗粒, 直径大小为 128—134nm, 病毒粒子的形状和大小与 CyHV-2 病毒一致(李茂等, 2015)。根据电镜观察到的病毒量, 也间接证明了病毒 CyHV-2 可以在 CSC 细胞中进行高效的复制。这为制备鲫造血器官坏死病细胞培养灭活疫苗提供了可靠的病毒复制载体。

4 结论

综上, 本研究建立的 CSC 细胞系对 CyHV-2 敏感, 且病毒在该细胞系中能进行稳定高滴度地传代, 因此 CSC 细胞系成为研究 CyHV-2 复制与发病机制的有效工具, 还可用于 CyHV-2 细胞培养灭活疫苗的制备。以此为基础研究获得的 CyHV-2 细胞灭活疫苗将有助于我国鲫造血器官坏死病的预防和控制。

参 考 文 献

- 于 森, 管华诗, 郭华荣等, 2003. 鱼类细胞培养及其应用. 海洋科学, 27(3): 4—8
马 杰, 周 勇, 范玉顶等, 2016. 鲤疱疹病毒型的理化及生物学特性和超微形态发生. 水产学报, 40(3): 475—483
李 茂, 肖 丹, 刘天强等, 2015. 鲤科疱疹病毒型射阳株

- 的分离与鉴定. 淡水渔业, 45(3): 93—96
- 李亚男, 张义, 毛树坚, 1992. 两株鱼类细胞系-草鱼尾鳍组织细胞系(HGC-87)及鲫鱼腮盖膜细胞系(HCC-87)的建立. 见: 毛树坚. 生命科学论文集. 杭州: 杭州大学出版社, 112—119
- 肖艺, 曾令兵, 徐进等, 2012. 锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性. 中国细胞生物学学报, 34(8): 767—774
- 陈爱平, 江育林, 钱冬等, 2011. 水生动物疫病病种介绍: 传染性造血器官坏死. 中国水产, (2): 56—57
- 陈敏容, 陈宏溪, 易詠兰, 1985. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性. 水产学报, 9(2): 121—130
- 袁雪梅, 潘晓艺, 郝贵杰等, 2019. 一例异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)暴发性出血病病原分析. 海洋与湖沼, 50(4): 913—920
- 桂建芳, 2009. 异育银鲫养殖新品种——“中科3号”简介. 科学养鱼, (5): 21
- 徐进, 曾令兵, 杨德国等, 2013. 鲤疱疹病毒2型武汉株的分离与鉴定. 中国水产科学, 20(6): 1303—1309
- 薛庆善, 2001. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 87—101
- Freshney R I, 2010. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc
- Grinde B, 2013. Herpesviruses: latency and reactivation-viral strategies and host response. Journal of Oral Microbiology, 5(1): 22766
- Hanson L, Dishon A, Kotler M, 2011. Herpesviruses that infect fish. Viruses, 3(11): 2160—2191
- Hasegawa S, Nakayasu C, Okamoto N *et al*, 1997. Fin cell line from isogenic gibelina crucian carp. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 33(4): 232—233
- Jeffery K R, Bateman K, Bayley A *et al*, 2007. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK. Journal of Fish Diseases, 30(11): 649—656
- Jung S J, Miyazaki T, 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Diseases, 18(3): 211—220
- Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P, 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review. Fish Physiology and Biochemistry, 37(1): 1—20
- Lu J F, Xu D, Lu L Q, 2018. A novel cell line established from caudal fin tissue of *Carassius auratus gibelio* is susceptible to cyprinid herpesvirus 2 infection with the induction of apoptosis. Virus Research, 258: 19—27
- Ma J, Jiang N, LaPatra S E *et al*, 2015. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). Veterinary Microbiology, 177(3—4): 315—325
- Stephens F J, Raidal S R, Jones B, 2004. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. Australian Veterinary Journal, 82(3): 167—169
- Waltzek T B, Kurobe T, Goodwin A E *et al*, 2009. Development of a polymerase chain reaction assay to detect cyprinid herpesvirus 2 in goldfish. Journal of Aquatic Animal Health, 21(1): 60—67
- Wang H, Xu L J, Lu L Q, 2016. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in peripheral blood cells of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), suggests its potential in viral diagnosis. Journal of Fish Diseases, 39(2): 155—162
- Wolf K, Quimby M C, 1962. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. Science, 135(3508): 1065—1066
- Xu J, Zeng L B, Zhang H *et al*, 2013. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio* in China. Veterinary Microbiology, 166(1—2): 138—144

ESTABLISHMENT OF SPINAL CORD CELL LINE OF *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* AND ITS SENSITIVITY TO CYHV-2

WEI Yu-Juan¹, PAN Xiao-Yi², LIN Ling-Yun², YAO Jia-Yun², HAO Gui-Jie², CAO Zheng²,
XIA Yan-Chun², YIN Wen-Lin², LIU Yi-Han², SEHN Jin-Yu^{1,2}

(1. School of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201200, China; 2. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract Hemopoietic organ necrosis of Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) is the most serious disease causing economic loss of Crucian carp. In this study, the spinal cord tissue cell line of *C. auratus gibelio*, named CSC was established *in vitro*. The spinal cord cells of crucian carp were cultured in primary culture by tissue block transplantation, and passed on. After obtaining stable cell lines, the cell chromosome karyotype was analyzed by hypotonic method, and the sensitivity test and passage of carp herpesvirus type II were carried out. The results show that the CSC could be stably subcultured in L-15 medium containing 10% fetal bovine serum at 24°C, and the subculture cells are mainly composed of fibroblast-like and spindle-like cells. Karyotype analysis showed that the number of chromosomes was 156±2, and the cells were triploid. Through the test of CyHV-2 sensitivity, CSC cells infected with CyHV-2 produced typical cytopathic effects. On the 7th day of infection, TCID₅₀ of the cells infected with CyHV-2 reached 10^{9.33}/mL, and CyHV-2 virus could be continuously and stably passaged. A large number of herpes-like virus particles with a diameter of 128—134nm in the cells infected with CyHV-2 were observed with electron microscope. Results show that the spinal cord cell line of *C. auratus gibelio* constructed in this study was sensitive to CyHV-2 and could be stably subcultured. The subculture virus showed a high virus titer, which lays an important foundation for the further research and vaccine development against Cyprinid herpesvirus 2.

Key words *Carassius auratus gibelio*; spinal cord tissue cell line; CyHV-2