

# 一株大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)虹彩病毒 (Iridoviridae)的分离及鉴定\*

许 峰<sup>1</sup> 鲁建飞<sup>1</sup> 魏永伟<sup>1</sup> 苗 亮<sup>1</sup> 陈 炯<sup>1,2</sup>

(1. 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室 宁波大学 宁波 315211;

2. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学海洋学院 宁波 315832)

**摘要** 2018 年 7 月,浙江省某大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)养殖场暴发疑似病毒引起的疾病。现场采样发现,病鱼体长约 15—20cm,鱼体于水面下暗游,反应迟钝,体表有出血点或溃疡症状。本研究通过采用鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)培养、超薄切片透射电镜观察、病毒主要衣壳蛋白(major capsid protein, MCP)克隆与测序分析等方法,从患病大口黑鲈中分离得到一株病毒,鉴定其属于虹彩病毒科蛙病毒属,命名为大口黑鲈虹彩病毒宁波分离株(LMBIV-NB001)。EPC 经患病鱼组织匀浆液接种后出现细胞圆缩、死亡、脱落等典型的细胞病变症状。将感染后的 EPC 细胞制作超薄切片,通过电镜观察发现, EPC 细胞质中存在大量直径约 120nm 具囊膜的正六边形成熟病毒粒子,形态与虹彩病毒相似。根据虹彩病毒 MCP 基因保守区域序列设计特异性引物对病鱼组织样本进行 PCR 扩增,获得了 1029bp 的目的基因片段。将该扩增片段连入 pMD19-T simple 质粒后测序,经 BLAST 比对分析显示,其与 GenBank 中已报道的鳊鱼蛙病毒 NH-1609、大口黑鲈溃疡综合征病毒 BG/TH/CU3、EPC060608-08 的 MCP 基因同源性最高,相似度均达到 99.13%。构建系统进化树分析表明,本研究分离的 LMBIV-NB001 株与 NC\_038508、GU256635、MG941005 等虹彩病毒科蛙病毒属毒株聚成一簇。本论文研究结果为不同地区蛙病毒属成员的起源和分化等相关研究等提供了基础材料。

**关键词** 大口黑鲈; 虹彩病毒科; MCP 基因; 鲤鱼上皮瘤细胞(EPC); 分离鉴定

中图分类号 S941.41

doi: 10.11693/hyhz20190800163

大口黑鲈(largemouth bass, *Micropterus salmoides*), 又名加州鲈, 属于广温、肉食性淡水鱼类。其原产于北美洲密西西比河流域, 自 1983 年引入我国广东地区后, 因其适应能力强、生长速度快、养殖周期短、且肉质鲜美等特点, 被广泛养殖(王广军等, 2008)。目前, 大口黑鲈已经成为我国重要的淡水养殖经济鱼类之一, 其年产量已超过 37.4 万吨(农业部渔业渔政管理局, 2017)。随着养殖密度的不断增加、水体环境恶化、以及病原微生物的传播, 大口黑鲈病害相关的报道也日趋增长(Fogelson *et al.*, 2016; Jiang *et al.*,

2019)。导致大口黑鲈病害的病原主要包括细菌(如柱状黄杆菌 *Flavobacterium columnare*, 诺卡氏菌 *Nocardia*)、病毒(如虹彩病毒 Iridoviridae, 弹状病毒 Rhabdoviridae)、寄生虫(如车轮虫 *Trichodina*, 杯体虫 *Apiosoma*)等(夏焱春等, 2018)。

由病毒感染引起的大口黑鲈疾病死亡率高, 且难以防治, 对世界范围内的大口黑鲈养殖业带来了较为严重的威胁。大口黑鲈病毒首次发现于 1991 年的美国佛罗里达州(Grizzle *et al.*, 2002), 我国最早发现于 2008 年广东省的佛山地区, 被其感染的大口黑

\* 国家自然科学基金项目, 31772876 号; 浙江省自然科学基金项目, LZ18C190001 号; 宁波市科技创新团队项目, 2015C110018 号。许 峰, 博士研究生, E-mail: xufengnbu@163.com

通信作者: 陈 炯, 博士生导师, 研究员, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2019-08-30, 收修改稿日期: 2019-10-09

鲈死亡率高达 60%以上(邓国成等, 2009)。大口黑鲈病毒性疾病主要有虹彩病毒导致的溃疡病、脾肾坏死病、弹状病毒导致的旋转病等(邓国成等, 2011)。大口黑鲈在被虹彩病毒感染后, 体表会有斑块状出血性溃疡, 尾柄红肿溃疡, 病鱼肝脏肿大、颜色发白或发黄, 也有的发病鱼体表虽完好但脾脏肿大(黄耀锋, 2017)。

本研究从浙江宁波某养殖场采集了患病的大口黑鲈样本, 通过其体表病患特征及内脏剖检推测为病毒引起的溃疡综合征。综合采用鲤鱼上皮瘤细胞(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)培养、透射电子显微镜超薄切片观察、分子生物学分析等方法, 分离得到一株病毒, 鉴定其为虹彩病毒科蛙病毒属病毒, 命名为大口黑鲈虹彩病毒宁波分离株(LMBIV-NB001)。本报道为后续针对该病毒的防控及免疫相关研究工作提供了基础参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2018年7月于浙江宁波某养殖场采集了10尾体表出血或溃疡症状的大口黑鲈, 病鱼体长约15—20cm, 鱼体于水面下暗游, 反应迟钝, 发病时鱼塘水温24°C, 水质正常。采集的样本分别使用封口袋单独保存, 并通过冰盒低温运送到实验室, 于-80°C超低温冰箱内冻存以备实验室分析。

### 1.2 细胞系、试剂与主要仪器

EPC系由本实验室保存, 其培养基为M199(Hyclone), 含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; Gibico), 培养温度25°C; LA Taq DNA聚合酶、pMD19T simple、dNTPs、DL2000 DNA Marker均购自大连TaKaRa公司; DNA提取、胶回收、质粒抽提试剂盒均购自美国Omega公司; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、细菌培养基等常用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)TG1由本实验室保存; CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自Thermo Fisher公司; 普通光学显微镜购自日本Nikon公司; 透射电子显微镜购自日本Hitachi公司; PCR核酸扩增仪购自Eppendorf公司; 引物合成及序列测定均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.3 病原分离

将患病大口黑鲈解剖后, 在无菌状态下取肝脏、脾脏、肾脏、肌肉等样品, 分别加入10倍体积(*V/V*)的无菌PBS, 冰浴条件下研磨匀浆, 将匀浆液分为两份, 其中一份分别在BHI平板、血平板和RS培养基

平板上进行划线, 28°C培养24h分离细菌; 另一份转移至50mL离心管中, 置于-70°C室温条件下反复冻融3次后, 5000g、4°C低温离心30min, 取上清液, 经0.22μm滤器(Millipore)过滤, -70°C冻存备用。

EPC细胞在T25细胞培养瓶(Corning)中传代培养, 细胞汇合度为80%—90%时, 弃去培养基, 实验组取200μL病鱼组织匀浆过滤液与800μL M199培养基混匀, 对照组为200μL无菌PBS与800μL M199培养基混匀, 分别接种于健康EPC细胞, 25°C吸附1h, 期间每隔15min轻轻晃动培养瓶以便均匀吸附。1h后, 均补加4mL含2% FBS的M199培养基, 置于25°C含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中继续培养, 每日于显微镜(Nikon)下观察细胞状态至发现实验组细胞单层80%出现细胞病变时收获培养物。收集的病毒液按上述步骤继续感染新的健康EPC细胞, 重复至收获第6代病毒液。

### 1.4 电镜样品制备

将上述经第6代病毒悬液感染后病变的EPC细胞培养物收集, 800g离心25min去除细胞培养液, 收集细胞沉淀。固定: 将细胞沉淀用2.5%戊二醛固定; 用0.1mol/L磷酸漂洗液漂洗三次, 每次15min; 1%锇酸固定液固定2h; 再用0.1mol/L磷酸漂洗液漂洗三次, 每次15min。脱水: 50%乙醇15min; 70%乙醇15min; 90%乙醇15min; 90%乙醇+90%丙酮(1:1)15min; 90%丙酮15min; 100%丙酮20min。包埋: 100%丙酮+包埋液(2:1)室温2h; 100%丙酮+包埋液(1:2)室温2h; 包埋液室温过夜。固化: 37°C烘箱12h; 60°C烘箱48h。切片: 超薄切片机切片。染色: 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色。最后将样品置于透射电子显微镜下观察、拍照。

### 1.5 分子克隆鉴定

病鱼肝脏、脾脏、肾脏、肌肉组织DNA的提取按照Omega的DNA提取试剂盒说明进行操作。参考GenBank中已发表的虹彩病毒MCP基因保守区序列设计引物, 序列如下: LMBV-F: 5'-TTTCGGGCAGCAGTTTTTCGGT-3'; LMBV-R: 5'-CCGTAGTTGGTGGAGCC-3'。以提取的病鱼组织DNA为模板, PCR扩增MCP部分保守序列, 扩增的反应体系为25μL, 其中包括: DNA模板1μL, 上下游引物各(10μmol/L)1.0μL, 10×LA buffer 2.5μL, dNTP (2.5mmol/L) 3.5μL, LA Taq DNA聚合酶0.5μL, ddH<sub>2</sub>O 15.5μL。反应条件为: 94°C预变性5min; 94°C变性30s, 56°C退火30s, 72°C延伸90s, 变性至延伸共32个循环; 72°C延伸10min。扩增产物经1% (*W/V*)琼脂糖凝胶电泳分离、

胶回收试剂盒回收纯化后,与 pMD19-T simple 载体 16°C 连接 3h, 连接的反应体系为: 切胶回收的 DNA 片段 4 $\mu$ L, pMD19-T Simple 1 $\mu$ L, Solution 5 $\mu$ L。将连接产物转化 TG1 感受态细胞后,涂布于含 100mg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 Luria Broth (LB)平板上,37°C 培养过夜,挑取 5 个菌落进行扩大培养,抽提质粒,PCR 鉴定,选取阳性克隆进行测序。

### 1.6 PCR 扩增产物序列分析

将测序得到的病毒 MCP 部分核苷酸序列用 BioEdit 软件和 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析,然后选取 GenBank 中与测得序列相似的参考毒株,采用 Mega 7.0 软件构建系统进化树(邻接法)。构建进化树使用的参考毒株及其序列登录号分别为: 鳊鱼蛙病毒(MG941005)、桑蒂库珀蛙病毒(NC\_038508)、大口黑鲈溃疡综合征病毒(GU256635)、孔雀鱼病毒(FR677325)、小口黑鲈病毒(KY825779)、锦鲤蛙病毒(KJ939444)、流行性造血器官坏死病病毒(AY187045)、虎纹蛙病毒(AY033630)、中华鳖病毒(DQ335253)、蛙病毒 3 型(FJ459783)、传染性脾肾坏死病毒(AF370008)、条石鲷虹彩病毒(HQ105005)和淋巴囊肿病病毒 I 型(EF103188)。

## 2 结果与分析

### 2.1 病鱼主要症状

患病大口黑鲈主要症状为体表出血。在其体表可见多处溃烂及出血点,鳍条基部、尾柄处红肿出血(图 1a);解剖发现其脾脏肿大,颜色暗红发黑,肝脏发白

并有出血点(图 1b)。病鱼具有因病毒感染引发的溃疡综合征的典型症状。

### 2.2 分离病毒引起 EPC 细胞病变

从病鱼肝脏、脾脏、肾脏、肌肉中均未分离得到细菌。

由于病鱼具有被虹彩病毒感染后的典型症状,而该病毒能引起 EPC 细胞病变(Halaly *et al*, 2019),所以采用 EPC 细胞进行感染实验。病鱼组织匀浆过滤液感染 EPC 细胞 36h 后,可见紧密生长的 EPC 细胞出现变圆、脱落的病变现象(cytopathic effect, CPE),继续培养 12h 后可见因细胞死亡脱落形成的空洞(图 2)。被感染的 EPC 细胞在 72h 内全部收缩呈球状,脱离瓶壁。



图 1 患病大口黑鲈体表及内脏病症

Fig.1 The external and visceral symptoms of diseased largemouth bass

注: a. 病鱼体表病变特征; b. 病鱼内脏病变特征

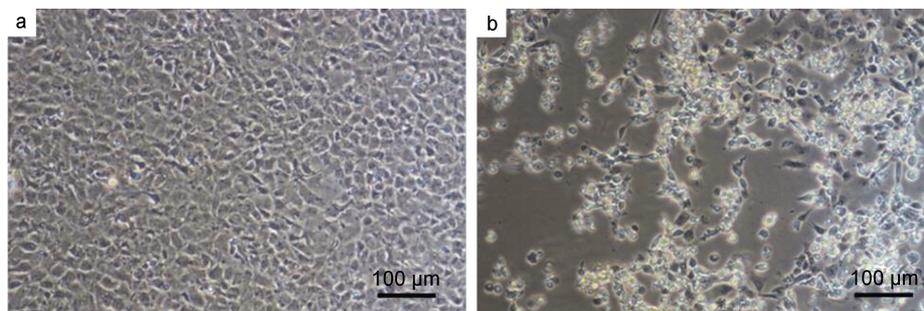


图 2 患病大口黑鲈分离病毒液感染 EPC 细胞形成的病变

Fig.2 Cytopathic effect of virus liquid on EPC cells under a microscope

注: a. 健康 EPC 细胞; b. 病毒液感染 48h 后 EPC 细胞出现细胞病变

### 2.3 电镜观察

通过电子显微镜技术可以直观地观察到病毒粒子形态特征。病鱼组织匀浆液感染 EPC 细胞后,经电镜超薄切片观察,可见细胞内存在大量直径约 120nm、具有

囊膜的正六边形病毒颗粒(图 3)。

### 2.4 MCP 基因鉴定及序列分析

提取的病鱼肝脏、脾脏、肾脏和肌肉组织 DNA 分别采用引物 LMBV-F 和 LMBV-R 进行 PCR 扩增,

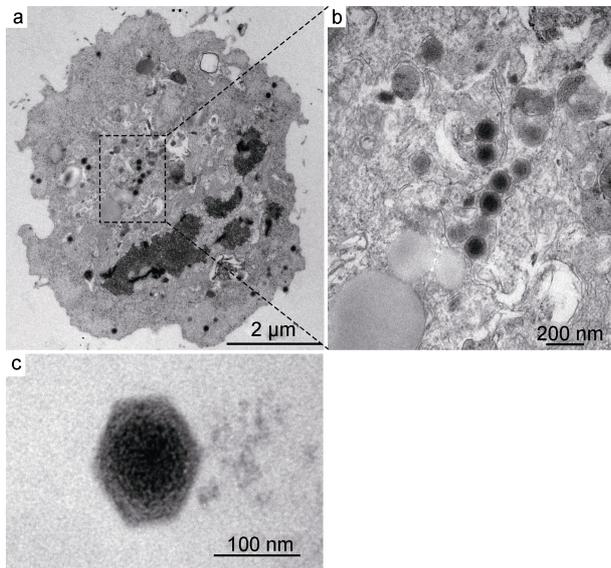


图3 病毒悬液感染 EPC 细胞的超薄切片透射电镜观察  
Fig.3 Ultra-thin section observation of virus liquid-infected EPC cells under TEM

均获得长度约 1kb 的目的条带(图 4a), 将其切胶回收、连接至 pMD19-T simple 克隆载体, 转化 TG1 感受态细胞, 涂平板培养后选取 6 个菌落, 扩大培养后抽提质粒, 进行 PCR 鉴定, 结果如图 4b 所示, 所选

菌落的 PCR 扩增产物在约 1kb 处有明显条带, 与预期结果相同。选取其中的 2 个阳性克隆菌落进行 PCR 扩增产物测序, 获得长度为 1029bp 的序列, 经 NCBI 数据库中 BLAST 比对, Bioedit 软件分析, 结果显示, 扩增得到的序列与鳊鱼蛙病毒 NH-1609、大口黑鲈溃疡综合征病毒 BG/TH/CU3、EPC060608-08 的 MCP 核苷酸同源性最高, 相似度均为 99.13%(表 1)。系统进化分析结果表明, 本研究分离得到的病毒与鳊鱼蛙病毒、大口黑鲈溃疡综合征病毒聚成一簇, 属于虹彩病毒科的蛙病毒属(图 5), 将其命名为大口黑鲈虹彩病毒宁波分离株(Largemouth bass iridovirus, LM BIV-NB001), 上传至 GenBank 后获得的登录号为 MN176304。

### 3 讨论

虹彩病毒科(Iridoviridae)包括蛙病毒属(*Ranavirus*)、肿大细胞虹彩病毒属(*Megalocytivirus*)、淋巴囊肿病毒属(*Lymphocystivirus*)、虹彩病毒属(*Iridovirus*)和绿虹彩病毒属(*Chloriridovirus*), 是一个大型二十面体病毒家族, 其双链 DNA 基因组的大小从 103kb 到 220kb 不等(Chinchar *et al*, 2017a, b)。不

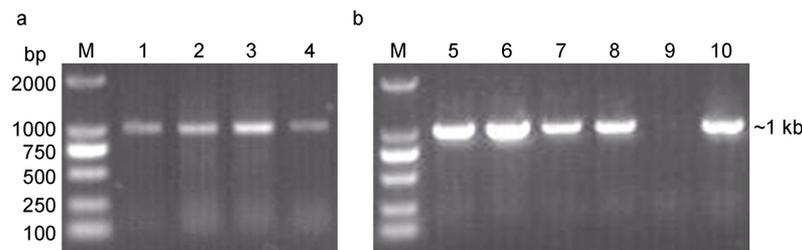


图4 患病大口黑鲈分离病毒 MCP 片段的 PCR 鉴定结果

Fig.4 PCR identification of the partial MCP of virus from diseased fish and the cloned plasmid

注: M: DL2000 DNA Marker; 1—4: 分别为病鱼肝脏、脾脏、肾脏和肌肉组织 DNA 为模板的 PCR 扩增; 5—10: 克隆质粒样品

表 1 LMBIV-NB001 株 MCP 基因部分序列与其他虹彩病毒的同源性比较

Tab.1 Comparison between LMBIV-NB001 strain and other iridovirus on the MCP gene partial sequence identity

病毒名称	中文名	分离株	登录号	同源性(%)
Mandarin fish ranavirus	鳊鱼蛙病毒	NH-1609	MG941005	99.13
Santee Cooper ranavirus	桑蒂库珀蛙病毒	BG/TH/CU3	NC_038508	99.13
Largemouth bass ulcerative syndrome virus	大口黑鲈溃疡综合症病毒	EPC060608-08	GU256635	99.13
Guppy virus	孔雀鱼病毒	F93-20#6	FR677325	98.25
Smallmouth bass virus	小口黑鲈病毒	12-342	KY825779	97.86
Koi ranavirus	锦鲤蛙病毒	In01	KJ939444	98.20
Short-finned eel ranavirus	短鳍鳗鱼蛙病毒	ANGA14001	KX353311	80.39
Pike perch iridovirus	梭鲈蛙病毒	SLU14001	KX574341	80.29
European catfish virus	欧洲鲶鱼病毒	14612/2012	KT989885	80.25

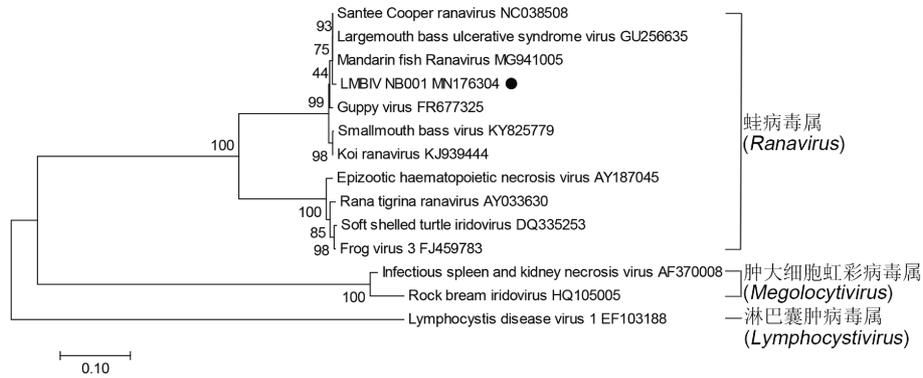


图5 采用邻接法基于 MCP 基因部分序列同源性的系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of LMBIV-NB001 strain with other iridovirus based on MCP gene partial sequence homologues using the neighbor-joining method

同属的病毒在感染同种或不同物种后的影响可能从没有明显的损伤或行为变化到严重的损伤甚至死亡 (Lesbarrères *et al.*, 2012)。近年来, 由虹彩病毒科蛙病毒属引发的疾病在世界范围内广泛流行 (Brenes *et al.*, 2014), 其在两栖动物、鱼类以及爬行动物中均有报道 (Price *et al.*, 2017; McKenzie *et al.*, 2019; Saucedo *et al.*, 2019)。大口黑鲈蛙病毒病高发于水温 25—30°C 的夏季, 主要危害成鱼, 且致死率高, 一旦暴发将会给我国水产养殖业带来巨大的经济损失 (邓国成等, 2011)。中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 在被蛙病毒属病毒感染后出现体表溃疡、头部肿大且有出血点、尾部溃烂等病理特征 (张星朗等, 2014); 大口黑鲈在被病毒感染后常出现皮肤溃疡、肝脾肾肿大、肌肉坏死以及鳍基、尾柄充血或出血等症状 (马冬梅等, 2016), 这与本研究中采集的病鱼所表现出的病症非常相似。蛙病毒属病毒可以感染中国大鲵胸腺细胞 (Chinese giant salamander thymus cells, GSTC) 和 EPC 细胞, 使细胞发生病变 (Ke *et al.*, 2019)。为了确定病原, 本研究首先进行了细菌分离, 在未分离得到病原菌的情况下, 通过制备病鱼组织匀浆液感染 EPC 细胞, 观察到 EPC 发生细胞死亡、脱落等病变现象, 其病变特征与关于蛙病毒属病毒感染 EPC 细胞的报道相似 (Deng *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2018)。进一步通过电子显微镜观察, 发现直径约 120nm 的正六边形有囊膜病毒粒子, 其形态特征与虹彩病毒为具有囊膜、直径在 120—300nm 的二十面体结构特征相似 (Williams, 1996), 推测其为一株虹彩病毒科病毒。

使用分子生物学方法是鉴定病毒性病原常用的可靠手段, 通过对病毒的保守基因序列进行扩增和分析能够明确病原的分类地位 (Grizzle *et al.*, 2003; 刘群等, 2018; Leis *et al.*, 2018)。MCP 是虹彩病毒最主要

的结构蛋白基因, 其基因序列在不同种病毒间既具有高度的保守性, 又有一定的差异性, 所以 MCP 序列的分析常用于虹彩病毒的分类和鉴定 (Webby *et al.*, 1998; Ohlemeyer *et al.*, 2011)。Sivasankar 等 (2017) 利用 MCP 基因序列分析, 从雀鲷 (*Pomacentrus similis*) 中鉴定了一株虹彩病毒科蛙病毒; 本实验根据已知虹彩病毒的 MCP 基因序列保守区设计了一对特异性引物, 采用 PCR 扩增、测序后获得 1029bp 的病毒核苷酸序列, 经 BLAST 搜索比对, 其与鳊鱼蛙病毒、大口黑鲈溃疡综合征病毒的 MCP 基因核苷酸同源性最高, 相似度均高达 99.13%, 表明该分离株属于虹彩病毒科。通过基于 MCP 核苷酸部分序列构建的系统发育树可以明确看出, 分离得到的 LMBIV-NB001 毒株与虹彩病毒科蛙病毒属参考毒株聚为一类, 应为蛙病毒属成员。不同地区蛙病毒属成员毒株的分离和鉴定将对其起源、进化、分类及免疫相关研究等提供重要的基础材料。

#### 4 结论

本研究报道了一株从患病大口黑鲈中分离的病毒, 通过 EPC 细胞分离培养、电镜观察、PCR 扩增特异性基因片段, 明确了其分类地位属于虹彩病毒科蛙病毒属, 将该株病毒命名为大口黑鲈虹彩病毒宁波分离株 (LMBIV-NB001)。为进一步研究该病毒的生物学特性、免疫原性、感染机制以及疫苗的制备奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- 马冬梅, 邓国成, 白俊杰等, 2016. 大口黑鲈溃疡综合征病毒 MCP 基因的原核表达及重组蛋白的免疫效果初步分析. 生物技术通报, 32(8): 139—144

- 王广军, 关胜军, 吴锐全等, 2008. 大口黑鲈肌肉营养成分分析及营养评价. 海洋渔业, 30(3): 239—244
- 邓国成, 白俊杰, 李胜杰等, 2011. 大口黑鲈池塘养殖常见病及其防治. 广东农业科学, 38(18): 102—103, 137
- 邓国成, 谢 骏, 李胜杰等, 2009. 大口黑鲈病毒性溃疡病原的分离和鉴定. 水产学报, 33(5): 871—877
- 刘 群, 韩进刚, 王 菁等, 2018. 天津地区养殖鲤鱼(*Cyprinus carpio*)鲤浮肿毒(CEV)PCR 检测与人工感染试验. 海洋与湖沼, 49(3): 638—645
- 农业部渔业渔政管理局, 2017. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社
- 张星朗, 周小愿, 张 辉, 2014. 大鲵虹彩病毒的分离纯化及其 MCP 基因序列分析. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 42(12): 23—28
- 夏焱春, 曹 铮, 蔺凌云等, 2018. 大口黑鲈主要病害研究进展. 中国动物检疫, 35(9): 72—76
- 黄耀锋, 2017. 加州鲈虹彩病毒病的主要症状及预防方法. 海洋与渔业·水产前沿, (9): 86—87
- Brenes R, Gray M J, Waltzek T B *et al*, 2014. Transmission of ranavirus between ectothermic vertebrate hosts. PLoS One, 9(3): e92476
- Chinchar V G, Hick P, Ince I A *et al*, 2017a. ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*. The Journal of General Virology, 98(5): 890—891
- Chinchar V G, Waltzek T B, Subramaniam K, 2017b. Ranaviruses and other members of the family *Iridoviridae*: Their place in the virosphere. Virology, 511: 259—271
- Deng G C, Li S J, Xie J *et al*, 2011. Characterization of a ranavirus isolated from cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in China. Aquaculture, 312(1—4): 198—204
- Fogelson S B, Petty B D, Reichley S R *et al*, 2016. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 28(3): 338—344
- Grizzle J M, Altinok I, Fraser W A *et al*, 2002. First isolation of largemouth bass virus. Diseases of Aquatic Organisms, 50(3): 233—235
- Grizzle J M, Altinok I, Noyes A D, 2003. PCR method for detection of largemouth bass virus. Diseases of Aquatic Organisms, 54(1): 29—33
- Halaly M A, Subramaniam K, Koda S A *et al*, 2019. Characterization of a novel megalocytivirus isolated from European chub (*Squalius cephalus*). Viruses, 11(5): 440
- Jiang B, Lu G L, Du J J *et al*, 2019. First report of trypanosomiasis in farmed largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from China: pathological evaluation and taxonomic status. Parasitology Research, 118(6): 1731—1739
- Ke F, Wang Z H, Ming C Y *et al*, 2019. Ranaviruses bind cells from different species through interaction with heparan sulfate. Viruses, 11(7): 593
- Leis E, McCann R, Standish I *et al*, 2018. Comparison of lethal and nonlethal sampling methods for the detection of largemouth bass virus (LMBV) from largemouth bass in the upper Mississippi river. Journal of Aquatic Animal Health, 30(3): 217—225
- Lesbarrères D, Balseiro A, Brunner J *et al*, 2012. Ranavirus: past, present and future. Biology Letters, 8(4): 481—483
- McKenzie C M, Piczak M L, Snyman H N *et al*, 2019. First report of ranavirus mortality in a common snapping turtle *Chelydra serpentina*. Diseases of Aquatic Organisms, 132(3): 221—227
- Mu W H, Geng Y, Yu Z H *et al*, 2018. FV3-like ranavirus infection outbreak in black-spotted pond frogs (*Rana nigromaculata*) in China. Microbial Pathogenesis, 123: 111—114
- Ohlemeyer S, Holopainen R, Tapiovaara H *et al*, 2011. Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV. Diseases of Aquatic Organisms, 96(3): 195—207
- Price S J, Ariel E, Maclaine A *et al*, 2017. From fish to frogs and beyond: Impact and host range of emergent ranaviruses. Virology, 511: 272—279
- Saucedo B, Serrano J M, Jacinto-Maldonado M *et al*, 2019. Pathogen risk analysis for wild amphibian populations following the first report of a ranavirus outbreak in farmed American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) from Northern Mexico. Viruses, 11(1): 26
- Sivasankar P, John K R, George M R *et al*, 2017. Characterization of a virulent ranavirus isolated from marine ornamental fish in India. Virus Disease, 28(4): 373—382
- Webby R, Kalmakoff J, 1998. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. Archives of Virology, 143(10): 1949—1966
- Williams T, 1996. The iridoviruses. Advance of Virus Research, 46: 345—412

## CHARACTERIZATION OF AN IRIDOVIRUS ISOLATE FROM LARGEMOUTH BASS *MICROPTERUS SALMOIDES*

XU Feng<sup>1</sup>, LU Jian-Fei<sup>1</sup>, WEI Yong-Wei<sup>1</sup>, MIAO Liang<sup>1</sup>, CHEN Jiong<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Meishan Campus, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

**Abstract** A suspected virus-induced disease broke out in July 2018 in a large-mouth bass farm in Zhejiang Province, South China. The diseased fish showed slow reaction and swam underneath the water surface. The body length of diseased fish samples were 15—20cm with typical clinical signs such as haemorrhages on the skin and ulcer symptoms. Epithelioma papulosum cyprinid (EPC) culture, ultrathin section of transmission electron microscope, and major capsid protein (MCP) cloning and sequencing were used, and a virus from diseased largemouth bass was isolated, identified, and named as Ningbo isolate of largemouth bass iridovirus-NB001 (LMBIV-NB001). The tissue homogenate of diseased fish could cause typical cytopathic effect such as cell shrinkage, death, and exfoliation in EPC cells. Electron microscopy observation showed that there were a large number of virus particles about 120 nm in diameter in infected EPC cells, which is similar to iridescent virus. The conserved region of major capsid protein (MCP) gene of iridovirus was amplified by PCR, and a 1029bp specific gene fragment was obtained. Sequence alignment analysis of the DNA fragment showed that LMBIV-NB001 shared high identity (up to 99.13%) with the published MCP gene sequence of iridovirus. Phylogenetic analysis showed that LMBIV-NB001 strain had the highest homology with Mandarin fish ranavirus strain NH-1609, Santee Cooper ranavirus strain BG/TH/CU3, and largemouth bass ulcerative syndrome virus strain EPC060608-08, belonging to the genus *Ranavirus* of the Family Iridoviridae.

**Key words** largemouth bass *Micropterus salmoides*; Iridoviridae; major capsid protein (MCP) gene; epithelioma papulosum cyprinid, EPC; isolation and identification