



大黄鱼肿大细胞病毒不同毒株的细胞培养及主要衣壳蛋白基因比较

杨西西^{1,2}, 池洪树¹, 郑在予¹, 刘晓东¹, 罗潘潘³,
许斌福¹, 陈秀霞¹, 龚晖^{1*}

(1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;

2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002;

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 为建立大黄鱼肿大细胞病毒的培养方法, 明确其分类地位, 用肿大细胞病毒检测呈阳性的大黄鱼幼鱼病料 (FD201807 和 SA201808) 肾组织匀浆液感染鳊仔鱼细胞系 (mandarin fish fry cell line-1, MFF-1) 并连续传代, 从病料组织匀浆液和细胞冻融液中提取病毒 DNA, 克隆病毒主要衣壳蛋白基因 (*mcp*), 测序后与 NCBI GenBank 中的虹彩病毒科肿大细胞病毒属病毒 *mcp* 以及 2018—2020 年所检出的 15 株大黄鱼肿大细胞病毒 *mcp* 进行比对分析。结果显示, 病毒传至第 4 代才可引起 MFF-1 细胞病变, 细胞病变的主要特征为细胞脱壁、变圆、折光度增强; 感染时间越长脱壁细胞越多, 同时培养液中的颗粒增加; 透射电镜下可见感染细胞的细胞质散在大小为 130~150 nm 的六边形病毒粒子和空壳。感染细胞的病变周期随传代代次的增加而缩短, 第 15 代次的 FD201807 株感染细胞 80% 细胞病变的时间为 3 d, 第 15 代次的 SA201808 株感染细胞 80% 细胞病变的时间为 7~8 d。 *mcp* 序列比对和聚类分析发现, SA201808 株与 FD201807 株的 *mcp* 序列存在 21 个碱基差异, 二者的 *mcp* 序列分别与大黄鱼虹彩病毒 (large yellow croaker iridovirus, LYCIV) LYCIV-Zhoushan (GenBank: MW139932.1) 和花鲈虹彩病毒 (*Lateolabrax maculatus* iridovirus, LMIV) (GenBank: MH577517.1) 相近。15 株从大黄鱼病料检出的肿大细胞病毒中, 12 株的 *mcp* 序列与 SA201808 株聚类; 3 株与 FD201807 聚类。本研究利用 MFF-1 细胞系分离培养了大黄鱼肿大细胞病毒, 揭示了大黄鱼肿大细胞病毒存在差异, 为更好地了解大黄鱼肿大细胞病毒提供了数据参考。

关键词: 大黄鱼; 肿大细胞病毒; 细胞培养; 主要衣壳蛋白

中图分类号: Q 785; S 942.2

文献标志码: A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是中国养殖产量最高的海水鱼类^[1], 随着养殖规模的扩大, 大黄鱼病害问题日益突出, 已成为制约大黄鱼产业健

康发展的主要因素^[2]。何爱华等^[3]通过电镜从夏季发病的大黄鱼幼鱼中发现了虹彩病毒 (*Iridovirus*), Chen 等^[4]证实 1999—2001 年夏季福建省宁德、

收稿日期: 2021-08-18 修回日期: 2021-10-26

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900102); 福建省重大专项专题 (2020NZ08003); 福建省公益类科研院所基本科研专项 (2020R1027006, 2020R1027002, 2020R1027004)

第一作者: 杨西西 (照片), 从事水产动物病害防控研究, E-mail: 18437958210@163.com;

池洪树, 从事水产动物病害防控研究, E-mail: chs321@qq.com

通信作者: 龚晖, 从事水产动物病害防控研究, E-mail: ghxfjm@163.com



罗源等地养殖大黄鱼幼鱼暴发性死亡由虹彩病毒感染所致, 根据组织病理学、形态学和分子生物学特征分析, 确认该病毒属于肿大细胞病毒属 (*Megalocytivirus*), 并将其命名为大黄鱼虹彩病毒 (Large yellow croaker iridovirus, LYCIV)。近年来, 养殖大黄鱼中常有肿大细胞病毒检出^[5-6], 但受限于无敏感细胞系, 研究无法深入开展, 开展的研究主要集中于病毒检测方法的建立和部分功能基因的分析^[7-10]。已有团队建立了对 ISKNV 型和 RSIV 型肿大细胞病毒高度敏感的鳊 (*Siniperca chuatsi*) 仔鱼细胞系 (mandarin fish fry cell line-1, MFF-1), 基于 MFF-1 细胞系可实现 ISKNV 型和 RSIV 型肿大细胞病毒持续、稳定地传代^[11-15]。本研究利用 MFF-1 细胞系分离培养大黄鱼肿大细胞病毒, 对病毒的主要衣壳蛋白基因 (major capsid protein, *mcp*) 进行比较分析, 以期为大黄鱼肿大细胞病毒病的研究和防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

病料 2018—2020 年间所采集, 用国家标准 GB/T 36191—2018^[16] 中的 1F/R 引物 PCR 检测

呈阳性的大黄鱼肝脏、脾脏、肾脏等内脏组织, 存于-80 °C。(表 1)

细胞系 鳊仔鱼细胞系 MFF-1。

引物 根据 NCBI 上的登录的 LYCIV 的 *mcp* (GenBank: AY779031.1), 利用 Primer premier 5.0 软件设计扩增全长 *mcp* 的引物, 上游引物 *mcp* F: ATGTCTGCGATCTCAGGTGC, 下游引物 *mcp* R: TTACAGGATAGGGAAGCCTGC, 预期扩增片段大小为 1 362 bp。

实验试剂 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、含 EDTA 和酚红的胰酶、青霉素和链霉素双抗 (Gibco), 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]。病毒基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek)、2×*Taq* Master Mix (Dye Plus)、琼脂糖粉末、50×TAE 琼脂糖电泳缓冲液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。DL2000 DNA Marker、pMD-19T 载体克隆试剂盒、TB Green® Premix Ex *Taq*TM II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 日本)。Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 美国)。组织固定液: 2.5% 戊二醛 (Sigma-Aldrich, 美国), 取 25% 戊二醛 10 mL, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 50 mL,

表 1 实验所用的大黄鱼病料

Tab. 1 Pathological specimens of *L. crocea* used in the experiment

| 样品名称 samples name | 采集日期 collection date | 病鱼来源 origin | 组织 tissue | 备注 note |
|----------------------|-------------------------|----------------|--------------|---------------|
| FD201807 | 2018-07-17 | 宁德福鼎沙埕海区 | 肾脏 | 幼鱼(15~20 g) |
| SA201808 | 2018-08-23 | 宁德蕉城沙澳海区 | 肾脏 | 鱼苗(8~10 g) |
| YW201904 | 2019-04-03 | 宁德蕉城斗姆海区 | 肾脏 | 鱼苗(5~8 g) |
| DW201904 | 2019-04-17 | 宁德蕉城大湾海区 | 脾脏 | 幼鱼(150~200 g) |
| QX201904 | 2019-04-17 | 宁德蕉城七星海区 | 肾脏 | 成鱼(300 g) |
| JS201904 | 2019-04-17 | 宁德蕉城白基湾海区 | 肾脏 | 幼鱼(200 g) |
| CZ201904 | 2019-04-17 | 宁德霞浦东安海区 | 肝脏 | 鱼苗(5~8 g) |
| YWY201904 | 2019-04-17 | 宁德蕉城斗姆海区 | 肾脏 | 幼鱼(200 g) |
| DW201905 | 2019-05-06 | 宁德蕉城大湾海区 | 肝脾肾混合 | 幼鱼(150~200 g) |
| DM201907 | 2019-07-31 | 宁德蕉城斗姆海区 | 肝脏 | 鱼苗(15~20 g) |
| DW201908 | 2019-08-05 | 宁德蕉城大湾海区 | 肝脾肾混合 | 鱼苗(15~20 g) |
| CZ201908 | 2019-08-22 | 宁德霞浦东安海区 | 肾脏 | 成鱼(500~600 g) |
| DWA 202003 | 2020-03-12 | 宁德蕉城大湾海区 | 脾脏 | 成鱼(500~600 g) |
| DW202003 | 2020-03-12 | 宁德蕉城大湾海区 | 肝脏 | 幼鱼(100 g) |
| FF202003 | 2020-03-20 | 宁德蕉城育苗场 | 内脏团 | 鱼苗(1~2 g) |
| FFP 202003 | 2020-03-20 | 宁德蕉城育苗场 | 脾脏 | 亲鱼(700~800 g) |
| DW202008 | 2020-08-10 | 宁德蕉城大湾海区 | 肾脏 | 幼鱼(15~20 g) |

ddH₂O 定容至 100 mL, 4 °C 保存。

1.2 细胞培养

MFF-1 细胞用 DMEM 培养基 (含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素) 于 25 cm² 细胞瓶中培养, 培养条件为 5% CO₂, 27 °C, 饱和湿度。0.25% 胰酶消化、传代。

1.3 病毒分离、接种与传代

分别将冻存于 -80 °C, 采自福鼎和宁德沙澳的大黄鱼幼鱼病料 (FD201807 和 SA201808) 肾脏组织装入 1.5 mL 离心管中, 加入适量的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4), 在冰浴条件下研磨成浆。4 °C, 4 602 × g 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 取 500 μL 滤过液加入已弃去培养液的单层 MFF-1 细胞中, 静置 1 h, 加入 5 mL 维持液 (含 2% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液) 继续培养, 每 12 小时观察 1 次, 若 7 d 内无病变, 细胞与培养液一并收集, 冻融 3 次后, 冻融液于 4 °C, 2 348 × g 离心 10 min, 收集上清液, 与维持液以 1 : 10 的比例感染单层 MFF-1 细胞继续传代, 每 7 天盲传 1 次, 直至出现细胞病变 (cytopathic effects, CPE), 80% 细胞出现 CPE 时将细胞与培养液一并收集, 按以上方法继续传代。

1.4 电镜观察

收集病毒感染细胞, 弃培养液, 0.25% 胰酶消化, 吹洗一下细胞, 2 348 × g 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL 组织固定液重悬沉淀, 再次 2 348 × g 离心 5 min, 弃上清液, 补充 1 mL 组织固定液, 4 °C 保存 2 d 后, 委托中山大学生命科学学院电镜室按董传甫^[12] 的方法进行漂洗、脱水、包埋、超薄切片、醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 最后通过 JEM-1400 透射电镜观察。

1.5 病毒全长 *mcp* 的克隆、测序与分析

按病毒基因组 DNA 提取试剂盒产品说明书分别提取 FD201807 和 SA201808 组织匀浆液、15 代次的病毒感染细胞冻融液, 以及其他 15 个大黄鱼病样组织匀浆液总 DNA 作为模板。以全长 *mcp* 引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 2 × Taq Master Mix (Dye Plus) 25 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板 2 μL, 补充 ddH₂O 至

50 μL。PCR 反应程序: 95 °C 变性 5 s; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 s, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

凝胶电泳后, 按照胶回收试剂盒说明书回收目的基因, 连接 pMD19-T 载体, 转化感受态细胞, 用含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆, 随机挑取 3 个阳性克隆至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 通过 NCBI-BLAST 将 FD201807 株和 SA201808 株 *mcp* 与 GenBank 数据库中肿大细胞病毒 *mcp* 进行比对分析, 用 MEGA 4 软件分别对上述 2 株病毒的 *mcp* 与 GenBank 数据库中肿大细胞病毒以及 15 个大黄鱼病料中检出的肿大细胞病毒 *mcp* 进行系统发育分析。

2 结果

2.1 病毒对细胞的感染

FD201807 和 SA201808 的病料组织匀浆液感染 MFF-1, 盲传 3 代均未出现明显的细胞病变, 第 4 代感染细胞开始出现病变, 病变的主要表现为细胞脱壁、变圆, 折光率增强, 随着培养时间的延长, 脱壁细胞逐渐增多, 同时培养液中的颗粒增加, 第 4 代 FD201807 株感染细胞 10 d 的细胞病变率达 80%, 第 4 代 SA201808 株感染细胞病变率达到 80% 的时间为 12 d。随着代次的增加, 病毒感染细胞病变周期逐渐缩短, 第 15 代 FD201807 株感染细胞 48 h 时病变率达 50% 以上, 72 h 时细胞病变率达 80% 以上。第 15 代 SA201808 株感染细胞 72 h 时部分细胞出现病变, 168 h 时细胞病变率近 80%。(图版 I)

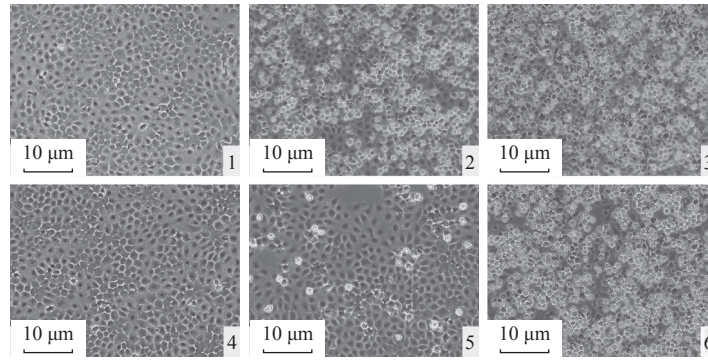
2.2 病毒结构特征

电镜观察病毒感染细胞, 可见细胞质内存在大量散在的六边形病毒粒子和空壳, 直径 130~150 nm (图版 II)。

2.3 病毒全长 *mcp* 基因的克隆、测序结果

用所设计的肿大细胞病毒全长 *mcp* 引物对 FD201807 和 SA201808 的组织匀浆液和 15 代病毒的细胞冻融液进行 PCR 扩增, 均得到了大小约 1 300 bp 的单一目的条带 (图 1)。

分别对上述目的条带进行胶回收和克隆测序。结果显示 FD201807、SA201808 的组织匀浆液和 15 代病毒细胞冻融液 PCR 扩增产物均为 1 362 bp。

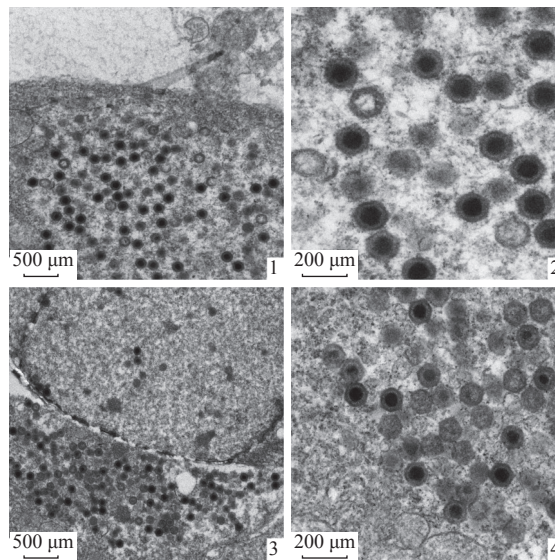


图版 I 15 代次 FD201807 和 SA201808 感染 MFF-1 细胞的病变过程

1-3. FD201807 株接种后 0、48 和 72 h; 4-6. SA201808 株接种后 0、72 和 168 h。

Plate I Cytopathic effects of MFF-1 infected FD201807 and SA201808 at passage15

1-3. 0, 48 and 72 h after FD201807 inoculation, respectively; 4-6. 0, 72 and 168 h after SA201808 inoculation, respectively.



图版 II 病毒感染的 MFF-1 细胞电镜照片

1. 14 代次 FD201807 株感染 MFF-1 细胞 72 h 后的电镜照片(6 000×); 2. 第一帧图片的局部放大(15 000×); 3. 14 代次 SA201808 株感染 MFF-1 细胞 144 h 后的电镜照片(5 000×); 4. 第 3 帧图片的局部放大(15 000×)。

Plate II Electron micrograph of virus-infected MFF-1 cells

1. MFF-1 cell infected with FD201807, passage 14, 72 h post inoculation (6 000×); 2. local zoom of frame 1 (15000×); 3. MFF-1 cell infected with SA201808, passage 14, 144 h post inoculation (6 000×); 4. local zoom of frame 3 (15 000×).

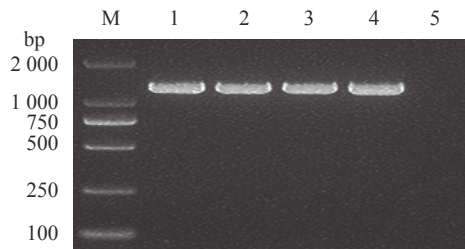


图 1 FD201807 株和 SA201808 株全长 *mcp* 扩增结果

M. DL2000 DNA Marker; 1. FD201807 组织匀浆液; 2. SA201808 组织匀浆液; 3. 第 15 代 FD201807 株感染的 MFF-1 细胞冻融液; 4. 第 15 代 SA201808 株感染的 MFF-1 细胞冻融液; 5. MFF-1 细胞冻融液。

Fig. 1 Complete *mcp* sequences amplification from isolate FD201807 and SA201808

M. DL2000 DNA Marker; 1. FD201807 tissue homogenate; 2. SA201808 tissue homogenate; 3. freeze-thawed MFF-1 cells infected with FD201807, passage 15; 4. freeze-thawed MFF-1 cells infected with SA201808, passage 15; 5. freeze-thawed MFF-1 cells.

FD201807 株、SA201808 株与其他相关的肿大细胞病毒分离株比较分析表明, FD201807 株和 SA201808 株属于虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 肿大细胞病毒属 (*Megalocytivirus*) 的不同病毒分离株。SA201808 株与 LYCIV-Zhoushan (GenBank: MW139932.1) 的 *mcp* 核酸序列仅有 1 个碱基差异, 与 LYCIV (GenBank: AY779031.1) *mcp* 有 5 个碱基差异。FD201807 株与 SA201808 的 *mcp* 有 21 个碱基差异, 与花鲈虹彩病毒 (*Lateolabrax macu-*

latus iridovirus, LMIV) (GenBank: MH577517.1) *mcp* 存在 1 个碱基差异 (图 2)。

与已知的肿大细胞病毒 *mcp* 聚类分析结果显示, SA201808 株、FD201807 株归属肿大细胞病毒 RSIV 基因型, SA201808 株与 FD201807 株有一定的遗传距离 (图 3)。

FD201807 株、SA201808 株与其他 15 株大黄鱼肿大细胞病毒 *mcp* 的聚类分析结果表明, 12 株大黄鱼肿大细胞病毒的 *mcp* 序列与 SA201808 聚

| | | |
|----------------|---|------|
| LYCIV-Zhoushan | ATGTCCTGCAATCTCAGGTGGGAACGTAAACCAGTGGGTCATCGACATCTCCGGGTTTGATGGGATGGAGACCACCTTGTATGGGGCC | 87 |
| LYCIV | ATGTCCTGCAATCTCAGGTGGGAACGTAAACCAGTGGGTCATCGACATCTCCGGGTTTGATGGGATGGAGACCACCTTGTATGGGGCC | 87 |
| FD201807 | ATGTCCTGCAATCTCAGGTGGGAACGTAAACCAGTGGGTCATCGACATCTCCGGGTTTGATGGGATGGAGACCACCTTGTATGGGGCC | 87 |
| LMIV-1706 | ATGTCCTGCAATCTCAGGTGGGAACGTAAACCAGTGGGTCATCGACATCTCCGGGTTTGATGGGATGGAGACCACCTTGTATGGGGCC | 87 |
| SA201808 | GACAATGCGCGTGACCTACTTTGGCCGGTGAACCGTGGCTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCCACCTATCAAAAACAGACTGGC | 174 |
| LYCIV-Zhoushan | GACAATGCGCGTGACCTACTTTGGCCGGTGAACCGTGGCTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCCACCTATCAAAAACAGACTGGC | 174 |
| LYCIV | GACAATGCGCGTGACCTACTTTGGCCGGTGAACCGTGGCTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCCACCTATCAAAAACAGACTGGC | 174 |
| FD201807 | GACAATGCGCGTGACCTACTTTGGCCGGTGAACCGTGGCTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCCACCTATCAAAAACAGACTGGC | 174 |
| LMIV-1706 | GACAATGCGCGTGACCTACTTTGGCCGGTGAACCGTGGCTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCCACCTATCAAAAACAGACTGGC | 174 |
| SA201808 | CATGCTAAATTTGGCCAGGAGTTTACTGTGACCTGGCTAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGGCTGGGTTAAGATTCUCC | 261 |
| LYCIV-Zhoushan | CATGCTAAATTTGGCCAGGAGTTTACTGTGACCTGGCTAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGGCTGGGTTAAGATTCUCC | 261 |
| LYCIV | CATGCTAAATTTGGCCAGGAGTTTACTGTGACCTGGCTAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGGCTGGGTTAAGATTCUCC | 261 |
| FD201807 | CATGCTAAATTTGGCCAGGAGTTTACTGTGACCTGGCTAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGGCTGGGTTAAGATTCUCC | 261 |
| LMIV-1706 | CATGCTAAATTTGGCCAGGAGTTTACTGTGACCTGGCTAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGGCTGGGTTAAGATTCUCC | 261 |
| SA201808 | TCCATCACCTCCAGCAAGGAACAGCTACATTCCTGGTGGTGAACAATCTGATGCACAATCTGGTGGAGGAGGTTGGGTTGTCATTT | 348 |
| LYCIV-Zhoushan | TCCATCACCTCCAGCAAGGAACAGCTACATTCCTGGTGGTGAACAATCTGATGCACAATCTGGTGGAGGAGGTTGGGTTGTCATTT | 348 |
| LYCIV | TCCATCACCTCCAGCAAGGAACAGCTACATTCCTGGTGGTGAACAATCTGATGCACAATCTGGTGGAGGAGGTTGGGTTGTCATTT | 348 |
| FD201807 | TCCATCACCTCCAGCAAGGAACAGCTACATTCCTGGTGGTGAACAATCTGATGCACAATCTGGTGGAGGAGGTTGGGTTGTCATTT | 348 |
| LMIV-1706 | TCCATCACCTCCAGCAAGGAACAGCTACATTCCTGGTGGTGAACAATCTGATGCACAATCTGGTGGAGGAGGTTGGGTTGTCATTT | 348 |
| SA201808 | AACGACCTGGTGGCAGACACCTGACCAAGCGAGTTCCCTGACTTTTGGAAAGCTTGCATGATGCCGGCAGCAAACTCTGGCTAT | 435 |
| LYCIV-Zhoushan | AACGACCTGGTGGCAGACACCTGACCAAGCGAGTTCCCTGACTTTTGGAAAGCTTGCATGATGCCGGCAGCAAACTCTGGCTAT | 435 |
| LYCIV | AACGACCTGGTGGCAGACACCTGACCAAGCGAGTTCCCTGACTTTTGGAAAGCTTGCATGATGCCGGCAGCAAACTCTGGCTAT | 435 |
| FD201807 | AACGACCTGGTGGCAGACACCTGACCAAGCGAGTTCCCTGACTTTTGGAAAGCTTGCATGATGCCGGCAGCAAACTCTGGCTAT | 435 |
| LMIV-1706 | AACGACCTGGTGGCAGACACCTGACCAAGCGAGTTCCCTGACTTTTGGAAAGCTTGCATGATGCCGGCAGCAAACTCTGGCTAT | 435 |
| SA201808 | AACAGGATGATTCGCAATGGCAGCGACCTGGTGGTGGTATCACCAGCGTACAGACTATGCCCGCCCTACCTTAATTTGGCCATT | 522 |
| LYCIV-Zhoushan | AACAGGATGATTCGCAATGGCAGCGACCTGGTGGTGGTATCACCAGCGTACAGACTATGCCCGCCCTACCTTAATTTGGCCATT | 522 |
| LYCIV | AACAGGATGATTCGCAATGGCAGCGACCTGGTGGTGGTATCACCAGCGTACAGACTATGCCCGCCCTACCTTAATTTGGCCATT | 522 |
| FD201807 | AACAGGATGATTCGCAATGGCAGCGACCTGGTGGTGGTATCACCAGCGTACAGACTATGCCCGCCCTACCTTAATTTGGCCATT | 522 |
| LMIV-1706 | AACAGGATGATTCGCAATGGCAGCGACCTGGTGGTGGTATCACCAGCGTACAGACTATGCCCGCCCTACCTTAATTTGGCCATT | 522 |
| SA201808 | CCCTGTTCTTTACCGGTGACACAGCCCTTGCATTCCTACAGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGGCCTCCACTTCAAGCTGGCG | 609 |
| LYCIV-Zhoushan | CCCTGTTCTTTACCGGTGACACAGCCCTTGCATTCCTACAGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGGCCTCCACTTCAAGCTGGCG | 609 |
| LYCIV | CCCTGTTCTTTACCGGTGACACAGCCCTTGCATTCCTACAGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGGCCTCCACTTCAAGCTGGCG | 609 |
| FD201807 | CCCTGTTCTTTACCGGTGACACAGCCCTTGCATTCCTACAGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGGCCTCCACTTCAAGCTGGCG | 609 |
| LMIV-1706 | CCCTGTTCTTTACCGGTGACACAGCCCTTGCATTCCTACAGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGGCCTCCACTTCAAGCTGGCG | 609 |
| SA201808 | CCCTGGAGGACTGCTCATCAGCCAGGACCTGACCTGACATGGCCATATCGACTGTACCGTGGCTAACATTCGCAATTCGCAAT | 696 |
| LYCIV-Zhoushan | CCCTGGAGGACTGCTCATCAGCCAGGACCTGACCTGACATGGCCATATCGACTGTACCGTGGCTAACATTCGCAATTCGCAAT | 696 |
| LYCIV | CCCTGGAGGACTGCTCATCAGCCAGGACCTGACCTGACATGGCCATATCGACTGTACCGTGGCTAACATTCGCAATTCGCAAT | 696 |
| FD201807 | CCCTGGAGGACTGCTCATCAGCCAGGACCTGACCTGACATGGCCATATCGACTGTACCGTGGCTAACATTCGCAATTCGCAAT | 696 |
| LMIV-1706 | CCCTGGAGGACTGCTCATCAGCCAGGACCTGACCTGACATGGCCATATCGACTGTACCGTGGCTAACATTCGCAATTCGCAAT | 696 |
| SA201808 | CCCGCACTGACCAACGTTGTCCTGATGGCAGCTACCGCGTACTGACAAGTGGAGGCGGTGAGGTGCTGGCCAGTCTAGCCGTTAGC | 783 |
| LYCIV-Zhoushan | CCCGCACTGACCAACGTTGTCCTGATGGCAGCTACCGCGTACTGACAAGTGGAGGCGGTGAGGTGCTGGCCAGTCTAGCCGTTAGC | 783 |
| LYCIV | CCCGCACTGACCAACGTTGTCCTGATGGCAGCTACCGCGTACTGACAAGTGGAGGCGGTGAGGTGCTGGCCAGTCTAGCCGTTAGC | 783 |
| FD201807 | CCCGCACTGACCAACGTTGTCCTGATGGCAGCTACCGCGTACTGACAAGTGGAGGCGGTGAGGTGCTGGCCAGTCTAGCCGTTAGC | 783 |
| LMIV-1706 | CCCGCACTGACCAACGTTGTCCTGATGGCAGCTACCGCGTACTGACAAGTGGAGGCGGTGAGGTGCTGGCCAGTCTAGCCGTTAGC | 783 |
| SA201808 | ATGCTCATTGAACAGTGGCAGGTGGGCGCTGGTGGTGGTGCACACCGGAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGT | 870 |
| LYCIV-Zhoushan | ATGCTCATTGAACAGTGGCAGGTGGGCGCTGGTGGTGGTGCACACCGGAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGT | 870 |
| LYCIV | ATGCTCATTGAACAGTGGCAGGTGGGCGCTGGTGGTGGTGCACACCGGAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGT | 870 |
| FD201807 | ATGCTCATTGAACAGTGGCAGGTGGGCGCTGGTGGTGGTGCACACCGGAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGT | 870 |
| LMIV-1706 | ATGCTCATTGAACAGTGGCAGGTGGGCGCTGGTGGTGGTGCACACCGGAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTGAGT | 870 |
| SA201808 | CACCTGTGGAAGGCTTGTCTTTCGAGTCAAGAAATGTCACCCAGCCGCAAGTGGCAAGCAATTAACACTGGCCAGTCCCGTGTAT | 957 |
| LYCIV-Zhoushan | CACCTGTGGAAGGCTTGTCTTTCGAGTCAAGAAATGTCACCCAGCCGCAAGTGGCAAGCAATTAACACTGGCCAGTCCCGTGTAT | 957 |
| LYCIV | CACCTGTGGAAGGCTTGTCTTTCGAGTCAAGAAATGTCACCCAGCCGCAAGTGGCAAGCAATTAACACTGGCCAGTCCCGTGTAT | 957 |
| FD201807 | CACCTGTGGAAGGCTTGTCTTTCGAGTCAAGAAATGTCACCCAGCCGCAAGTGGCAAGCAATTAACACTGGCCAGTCCCGTGTAT | 957 |
| LMIV-1706 | CACCTGTGGAAGGCTTGTCTTTCGAGTCAAGAAATGTCACCCAGCCGCAAGTGGCAAGCAATTAACACTGGCCAGTCCCGTGTAT | 957 |
| SA201808 | GTCACAAACAGGTGAATCTGCTTTTGGTGGCCACCAATCCCTGCTGAGGTGTCACTCATTTACGAGAACACCCCTAGGCTTCAC | 1044 |
| LYCIV-Zhoushan | GTCACAAACAGGTGAATCTGCTTTTGGTGGCCACCAATCCCTGCTGAGGTGTCACTCATTTACGAGAACACCCCTAGGCTTCAC | 1044 |
| LYCIV | GTCACAAACAGGTGAATCTGCTTTTGGTGGCCACCAATCCCTGCTGAGGTGTCACTCATTTACGAGAACACCCCTAGGCTTCAC | 1044 |
| FD201807 | GTCACAAACAGGTGAATCTGCTTTTGGTGGCCACCAATCCCTGCTGAGGTGTCACTCATTTACGAGAACACCCCTAGGCTTCAC | 1044 |
| LMIV-1706 | GTCACAAACAGGTGAATCTGCTTTTGGTGGCCACCAATCCCTGCTGAGGTGTCACTCATTTACGAGAACACCCCTAGGCTTCAC | 1044 |
| SA201808 | CAGATGGGAGTAGACTACTTTACATCTGTGGACCCCTACTACTTTGGCCCGAGCATGCTGAGATGGATGGTGTCAATGACCTACTGC | 1131 |
| LYCIV-Zhoushan | CAGATGGGAGTAGACTACTTTACATCTGTGGACCCCTACTACTTTGGCCCGAGCATGCTGAGATGGATGGTGTCAATGACCTACTGC | 1131 |
| LYCIV | CAGATGGGAGTAGACTACTTTACATCTGTGGACCCCTACTACTTTGGCCCGAGCATGCTGAGATGGATGGTGTCAATGACCTACTGC | 1131 |
| FD201807 | CAGATGGGAGTAGACTACTTTACATCTGTGGACCCCTACTACTTTGGCCCGAGCATGCTGAGATGGATGGTGTCAATGACCTACTGC | 1131 |
| LMIV-1706 | CAGATGGGAGTAGACTACTTTACATCTGTGGACCCCTACTACTTTGGCCCGAGCATGCTGAGATGGATGGTGTCAATGACCTACTGC | 1131 |

(图 2 Fig. 2)

| | | |
|----------------|--|-------|
| SA201808 | TATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCCTATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCTGTCCAACGTCACCCCTGTCATGTAAGGTGTCG | 1 218 |
| LYCIV-Zhoushan | TATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCCTATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCTGTCCAACGTCACCCCTGTCATGTAAGGTGTCG | 1 218 |
| LYCIV | TATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCCTATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCTGTCCAACGTCACCCCTGTCATGTAAGGTGTCG | 1 218 |
| FD201807 | TATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCCTATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCTGTCCAACGTCACCCCTGTCATGTAAGGTGTCG | 1 218 |
| LMIV-1706 | TATACGCTGGACATGGGCAATATCAACCCCTATGGGCTCAACCAACTACGGCCGCTGTCCAACGTCACCCCTGTCATGTAAGGTGTCG | 1 218 |
| SA201808 | GACAATGCCAAGACAACCTGCGGCGGGCGGGAGGCCAACGGCACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCA | 1 305 |
| LYCIV-Zhoushan | GACAATGCCAAGACAACCTGCGGCGGGCGGGAGGCCAACGGCACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCA | 1 305 |
| LYCIV | GACAATGCCAAGACAACCTGCGGCGGGCGGGAGGCCAACGGCACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCA | 1 305 |
| FD201807 | GACAATGCCAAGACAACCTGCGGCGGGCGGGAGGCCAACGGCACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCA | 1 305 |
| LMIV-1706 | GACAATGCCAAGACAACCTGCGGCGGGCGGGAGGCCAACGGCACCGGCTACACGGTCGCCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCA | 1 305 |
| SA201808 | GTCACCCACAACATAATGAAGATTGCTGACGGTCTGACGGCTTCCTATCCTGTGA | 1 362 |
| LYCIV-Zhoushan | GTCACCCACAACATAATGAAGATTGCTGACGGTCTGACGGCTTCCTATCCTGTGA | 1 362 |
| LYCIV | GTCACCCACAACATAATGAAGATTGCTGACGGTCTGACGGCTTCCTATCCTGTGA | 1 362 |
| FD201807 | GTCACCCACAACATAATGAAGATTGCTGACGGTCTGACGGCTTCCTATCCTGTGA | 1 362 |
| LMIV-1706 | GTCACCCACAACATAATGAAGATTGCTGACGGTCTGACGGCTTCCTATCCTGTGA | 1 362 |

图 2 FD201807 株、SA201808 株、LYCIV、LYCIV-Zhoushan 与 LMIV-1706 的 *mcp* 序列比对

灰色区域为 5 个序列中相似度为 60% 的碱基，黑色区域为 5 个序列中相似度为 80% 的碱基。

Fig. 2 *mcp* sequences alignment of FD201807, SA201808, LYCIV, LYCIV-Zhoushan and LMIV-1706

Grey area. the bases with 60% similarity among the 5 sequences; black area. the bases with 80% similarity among the 5 sequences.

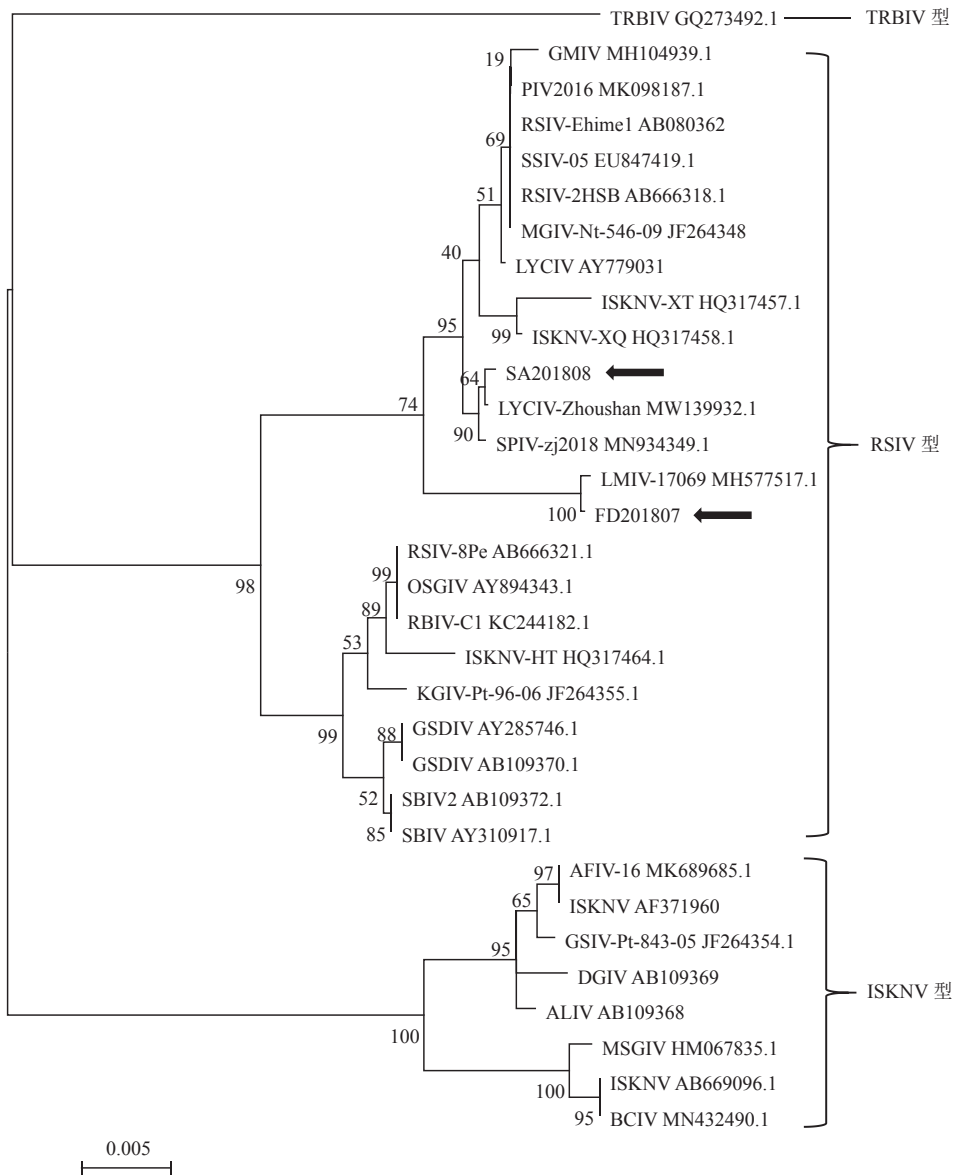


图 3 肿大细胞病毒 *mcp* 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *mcp* of *Megalocytivirus*

类; 另 3 株大黄鱼肿大细胞病毒 *mcp* 与 FD201807 以及 LMIV(MH577517.1) 聚类 (图 4)。

3 讨论

虹彩病毒科可分为 α 虹彩病毒亚科 (*Alphairidovirinae*) 和 β 虹彩病毒亚科 (*Betairidovirinae*)， α 虹彩病毒亚科病毒主要感染硬骨鱼类、两栖类和爬行类等冷血脊椎动物，分为淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*)、肿大细胞病毒属和蛙病毒属 (*Ranavirus*) 3 个属^[17]。肿大细胞病毒属病毒仅感染硬骨鱼类，是鱼类的主要病原^[18]，Inouye 等^[19]于 1990 年在养殖真鲷 (*Pagrus major*) 上首次发现真鲷虹彩病毒 (red sea bream virus, RSIV)。吴淑勤等^[20]于 1997 年从鳊上发现一种直径约为 150 nm 的病毒，He 等^[21]对该病毒开展了研究，将该病毒命名为脾肾坏死病毒 (infection spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)，到目前为止已发现了 20 余种肿大细胞病毒，感染对象包括鲈形目 (*Perciformes*)、鲷形目 (*Pleuronectiformes*)、鳉形目 (*Gadiformes*) 和鲉形目 (*Tetraodontiformes*) 等近百

种类^[22-24]。适合肿大细胞病毒培养的细胞系较少，在病毒培养过程中常遇到细胞病变缓慢、病毒滴度低或难以稳定传代的问题^[23]。Ao 等^[25]研究发现，大黄鱼肿大细胞病毒可在 BF-2 细胞系上增殖，但未见大黄鱼肿大细胞病毒引起细胞病变的报道，本研究利用 MFF-1 细胞对大黄鱼肿大细胞病毒进行了分离培养，经过 3 代盲传后，大黄鱼肿大细胞病毒感染的细胞表现出典型的肿大细胞病毒细胞病变特征，经过 15 个代次的传代，病毒的感染力并未减弱，CPE 的周期缩短，说明 MFF-1 细胞适用于大黄鱼肿大细胞病毒的培养。此外从本研究结果来看，不同来源的大黄鱼肿大细胞病毒对 MFF-1 细胞的易感性存在差异，这种差异产生的原因还有待进一步研究。

虹彩病毒的 *mcp* 相对保守，因此常被用于虹彩病毒的系统发育分析^[26-29]，根据 *mcp* 或 *ATPase* 可将肿大细胞病毒分成 RSIV、ISKNV 和 TRBIV 三个基因型^[18]。本研究结果表明，SA201808 株和 FD201807 株的 *mcp* 与 RSIV 基因型病毒的 *mcp* 聚类，SA201808 株的 *mcp* 与已报道的大黄鱼肿大细

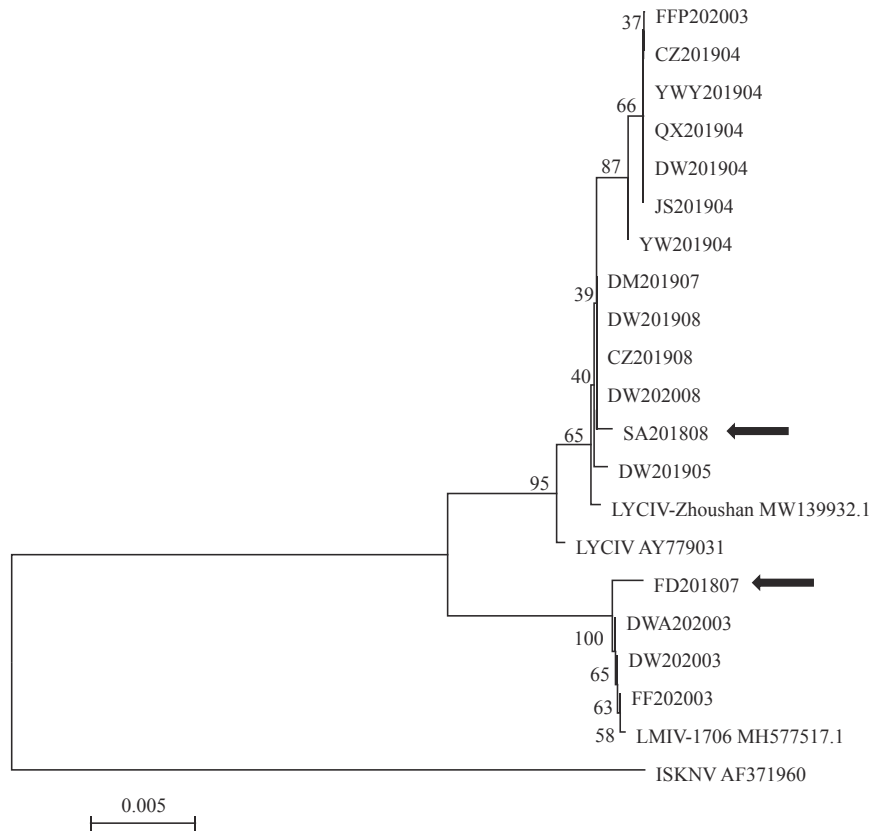


图 4 大黄鱼肿大细胞病毒分离株 *mcp* 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on *mcp* gene of the *Megalocytivirus* isolated from *L. crocea*

胞病毒同源性高, 而 FD201807 与花鲈虹彩病毒的 *mcp* (GenBank: MH577517.1) 高度一致, 同时从 17 株大黄鱼肿大细胞病毒 *mcp* 的聚类分析来看, 不同的大黄鱼肿大细胞病毒分布与年份、养殖区域和鱼体大小无直接相关性, 同一时间同一养殖区域内可同时存在 2 种大黄鱼肿大细胞病毒, 推测大黄鱼肿大细胞病毒可能有不同来源且可跨物种感染。大黄鱼肿大细胞病毒的传播途径和进化关系如何, 还需做更大范围的调查分析。

本研究实现了大黄鱼肿大细胞病毒的稳定传代培养, 为该病毒的致病性研究和疫苗研发提供了条件, 通过对大黄鱼肿大细胞病毒的 *mcp* 比较分析, 为大黄鱼肿大细胞病毒病的流行病学研究和防控提供了参考。

感谢中山大学生命科学学院董传甫课题组为本研究提供细胞系。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 22.
Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 22 (in Chinese).
- [2] 王凡, 廖碧钗, 孙敏秋, 等. 福建大黄鱼产业发展形势分析[J]. 中国水产, 2019(3): 45-49.
Wang F, Liao B C, Sun M Q, *et al.* Development situation analysis on large yellow croaker industry of Fujian Province[J]. *China Fisheries*, 2019(3): 45-49 (in Chinese).
- [3] 何爱华, 林奕坚, 郭永建, 等. 大黄鱼幼鱼虹彩病毒感染的电镜研究[J]. 福建水产, 1999(3): 56-59.
He A H, Lin Y J, Guo Y J, *et al.* Electron microscopy on iridovirus infection in *Pseudosciaen crocea* larva[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 1999(3): 56-59 (in Chinese).
- [4] Chen X H, Lin K B, Wang X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(10): 615-619.
- [5] 杨小强. 罗源湾养殖大黄鱼虹彩病毒的PCR检测[J]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(2): 5-8.
Yang X Q. PCR detection of cage cultured large yellow croaker Iridovirus in the Luoyuan bay, Fujian Province[J]. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 35(2): 5-8 (in Chinese).
- [6] 林雪玲, 张志灯. 福建部分沿海地区真鲷虹彩病毒病初步调查及基因进化分析[J]. 福建农业学报, 2013, 28(12): 1208-1212.
Lin X L, Zhang Z D. Preliminary investigation and phylogenetic analysis of red sea bream iridovirus disease (RSIVD) in some coastal areas of Fujian Province[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28(12): 1208-1212 (in Chinese).
- [7] 陈新华, 郭睿, 何天良. 一种大黄鱼虹彩病毒的双重 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒及制备方法: 中国, CN202010900766.0[P]. 2020-11-24.
Chen X H, Guo R, He T L. Dual TaqMan probe method fluorescent quantitative PCR detection kit for large yellow croaker iridovirus and preparation method of dual TaqMan probe method fluorescent quantitative PCR detection kit: CN, CN202010900766.0[P]. 2020-11-24 (in Chinese).
- [8] 郑晓聪, 钱冬, 程奇, 等. 大黄鱼虹彩病毒 (LYCIV) 的 RAA 恒温荧光检测方法及其试剂: 中国, CN201810609321. X[P]. 2019-12-20.
Zheng X C, Qian D, Cheng Q, *et al.* Large yellow croaker iridovirus (LYCIV) RAA (recombinase-aid amplification) thermostatic fluorescence detection method and reagent: CN, CN201810609321. X[P]. 2019-12-20 (in Chinese).
- [9] 王小文, 陈新华. 大黄鱼虹彩病毒腺苷三磷酸酶 (ATPase) 基因的克隆与表达[J]. 病毒学报, 2004, 20(1): 81-85.
Wang X W, Chen X H. Cloning and expression of the large yellow croaker iridovirus ATPase gene[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(1): 81-85 (in Chinese).
- [10] Yang Z, Liu Q, Wang Q Y, *et al.* Gene cloning and expression of major capsid protein of large yellow croaker iridovirus and its secretion based on α -hemolysin transport system[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2008, 39(6): 774-780.
- [11] Dong C F, Weng S P, Shi X J, *et al.* Development of a 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- mandarin fish *Siniperca chuatsi* fry cell line suitable for the study of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. *Virus Research*, 2008, 135(2): 273-281.
- [12] 董传甫. 肿大细胞病毒敏感细胞系建立及病毒蛋白组 and 疫苗研究 [D]. 广州: 中山大学, 2008.
- Dong C F. Establishment of a high susceptible cell line to *Megalocytivirus* and its application for the viral proteome and vaccine[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2008 (in Chinese).
- [13] Dong C F, Weng S P, Luo Y W, *et al.* A new marine *Megalocytivirus* from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. *Virus Research*, 2010, 147(1): 98-106.
- [14] Dong C F, Xiong X P, Shuang F, *et al.* Global landscape of structural proteins of infectious spleen and kidney necrosis virus[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2869-2877.
- [15] Shuang F, Luo Y W, Xiong X P, *et al.* Virions proteins of an RSIV-type *Megalocytivirus* from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* (SKIV-ZJ07)[J]. *Virology*, 2013, 437(2): 89-99.
- [16] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 36191—2018 真鲷虹彩病毒病诊断规程 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- State Administration of Market Supervision and Administration of the People's Republic of China, Standardization Administration. GB/T 36191-2018 Protocol of diagnostic methods for red sea bream iridovirus disease (RSIVD)[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [17] Chinchar V G, Hick P, Ince I A, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Iridoviridae*[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(5): 890-891.
- [18] Kurita J, Nakajima K. *Megalocytiviruses*[J]. *Viruses*, 2012, 4(4): 521-538.
- [19] Inouye K, Yamano K, Maeno Y, *et al.* Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Fish Pathology*, 1992, 27(1): 19-27.
- [20] 吴淑勤, 李新辉, 潘厚军, 等. 鳊暴发性传染病病原研究[J]. 水产学报, 1997(S1): 56-60.
- Wu S Q, Li X H, Pan H J, *et al.* Research on the pathogen of the outbreak-infective disease of *Siniperca chuatsi*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997(S1): 56-60 (in Chinese).
- [21] He J G, Deng M, Weng S P, *et al.* Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus[J]. *Virology*, 2001, 291(1): 126-139.
- [22] Kawakami H, Nakajima K. Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000[J]. *Fish Pathology*, 2002, 37(1): 45-47.
- [23] Nakajima K, Sorimachi M. Biological and physicochemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Fish Pathology*, 1994, 29(1): 29-33.
- [24] 吴成龙, 孔晓瑜, 史成银. 鱼类细胞肿大虹彩病毒病研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(3): 70-74.
- Wu C L, Kong X Y, Shi C Y. Progress on *Megalocytivirus* iridoviral disease of fish[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(3): 70-74 (in Chinese).
- [25] Ao J Q, Chen X H. Identification and characterization of a novel gene encoding an RGD-containing protein in large yellow croaker iridovirus[J]. *Virology*, 2006, 355(2): 213-222.
- [26] Gray M J, Chinchar V G. *Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates*[M]. Cham: Springer, 2015, 59-70..
- [27] Do J W, Cha S J, Kim J S. Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses[J]. *Archives of Virology*, 2005, 150(2): 351-359.
- [28] Huang S M, Tu C, Tseng C H, *et al.* Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(9): 1505-1515.
- [29] Fu X Z, Li N Q, Liu L H, *et al.* Genotype and host range analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)[J]. *Virus Genes*, 2011, 42(1): 97-109.

Cell culture and major capsid protein (*mcp*) gene analysis of *Megalocytivirus* isolates from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

YANG Xixi^{1,2}, CHI Hongshu¹, ZHENG Zaiyu¹, LIU Xiaodong¹, LUO Panpan³,
XU Binfu¹, CHEN Xiuxia¹, GONG Hui^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In the last decades, the marine cage-cultured large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in Fujian province suffered from *Megalocytivirus* frequently. The *Megalocytivirus* isolated from *L. crocea* have not found any sensitive cell-culture model yet. The missing of culture methods has set back the studies on *Megalocytivirus* from *L. crocea*. The *Siniperca chuatsi* cell line mandarin fish fry cell line-1 (MFF-1) derived from *S. chuatsi* fry, which has been proved to be highly sensitive to multiple ISKNV-like and RSIV-like *Megalocytivirus* members, may also be a promising culture system for *L. crocea* *Megalocytivirus*. To establish methods for cell culture and classification of *Megalocytivirus* strains from *L. crocea*, and to make a comparison of their major capsid protein (*mcp*) genes, which will benefit for the studies of invasion and prevention of these unclassified *Megalocytivirus*, kidney tissue homogenates of *Megalocytivirus*-positive *L. crocea* juveniles (FD201807 and SA201808) were inoculated to the MFF-1 cell line and subcultured continuously. From the tissue homogenates and freeze-thawed infected cells, the virus genome was extracted. The virus *mcp* was then cloned and sequenced, and compared with the NCBI GenBank records of *Megalocytivirus*, and a 2018–2020 Fujian collection of 15 *Megalocytivirus* isolates from *L. crocea* as well. The results showed both two *Megalocytivirus* isolates caused typical cytopathic effects (CPE) on MFF-1 cells after 3 passages, of which the key features included cell rounding and shrinking, increased cell dipter, continuous cell detachment and particulates secretion with time. Hexagonal viral particles and empty capsids with a size of 130-150 nm were observed in the cytoplasm of infected MFF-1 cells under a transmission electron microscope (TEM). With the processing of virus subculture, the CPE interval of FD201807 shortened from 10 d to 3-5 d, while which of SA201808 remained 7-8 d. *mcp* gene revealed a 21-bases difference between SA201808 and FD201807. Phylogenetic and clustering analysis indicated that the *mcp* gene of SA201808 was highly homologous to LYCIV-Zhoushan (GenBank: MW139932. 1), while the homological identity of *mcp* gene between FD201807 and lateolabrax maculatus iridovirus (LMIV, GenBank: MH577517. 1) was up to 99.93%. 12 of the total 15 Fujian *L. crocea* *Megalocytivirus* isolates were found clustered with SA201808, and the other 3 were clustered with FD201807. In this study, *L. crocea* *Megalocytivirus* were isolated through MFF-1 cell culture, indicating the differences among *L. crocea* *Megalocytivirus* strains, which could benefit for better understanding of this virus group.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Megalocytivirus*; virus culture; major capsid protein

Corresponding author: GONG Hui. E-mail: ghxfjm@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900102); Major Special Projects in Fujian Province (2020NZ08003); Basic Scientific Research Projects of Public Welfare Research Institutes in Fujian Province (2020R1027006, 2020R1027002, 2020R1027004)