学校代码: 10225 学 号: 2018010106

学位论文

# 预防 IHN 和 IPN 的二联弱毒疫苗研究

# 赵景壮

指导教师姓名: 申请学位级别: 论文提交日期: 授予学位单位:

滕春波 教授	东北林业大学	
尃 士	学科专业:	发育生物学
2023年4月	论文答辩日期:	2023年5月
东北林业大学	授予学位日期:	2023年6月

答辩委员会主席: 论 文 评 阅 人:

東北林業大學

University Code: 10225 Register Code : 2018010106

# Dissertation for the Degree of Doctor

# Research on the prevention of IHN and IPN with a bivalent attenuated vaccine

Candidate:	Zhao Jing-Zhuang
Supervisor:	Prof. Teng Chun-Bo
Associate Supervisor:	
Academic Degree Applied	Doctor
for:	Doctor
Speciality:	Development Biology
Date of Oral Examination:	June 2023
University:	Northeast Forestry University

# 摘要

传染性造血器官坏死病(Infectious hematopoietic necrosis,IHN)和传染性胰脏坏死 病(Infectious pancreatic necrosis, IPN)是严重威胁鲑鳟鱼健康养殖的急性、高度接触性 的全身性疾病,目前在世界范围内频繁暴发,给鲑鳟鱼养殖业造成了巨大的经济损失。 其中 IHN 的病原是传染性造血器官坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV),属于弹状病毒科、诺拉弹状病毒属、鲑科诺拉弹状病毒种中的一员,病毒基因 组为不分节段的负链 ssRNA。IPN 的病原是传染性胰脏坏死病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV),属于双 RNA 病毒科、水生双 RNA 病毒属的一员,病毒基因组为 双段的 dsRNA。针对 IHN 和 IPN,虽然国际上已分别有上市的 DNA 疫苗和灭活疫苗, 但是由于进口受限以及生物安全等问题,目前我国仍然没有商业化的疫苗,更没有同时 针对上述两种疾病的二联疫苗。因此,本研究将针对上述两种病毒开展二联疫苗的研究。 反向遗传操作系统的建立为病毒的基因功能研究、致病机理研究以及新型病毒载体疫苗 研究提供了技术平台。为了研究针对我国 IHN 和 IPN 的弱毒疫苗,本研究将通过病毒系 统进化分析、转录组分析,确定我国 IHNV 流行毒株,通过建立 IHNV 反向遗传操作系 统,对重组 IHNV 病毒作为载体表达外源蛋白的最佳位点进行确定,最终构建出能够成 功表达 IPNV 病毒 VP2 蛋白的重组病毒,并以该重组病毒为疫苗,保护虹鳟抵抗 IHNV 和 IPNV 的感染。

本研究的主要研究方法及结果:

1. 通过系统进化分析发现,目前我国流行的 IHNV 均属于 J 基因型,在虹鳟上属于 高致死毒株;通过对 U 基因型和 J 基因型 IHNV 感染后宿主转录组分析发现,U 基因型 和 J 基因型毒株感染后宿主免疫反应存在显著性差异。

2. 利用原核表达系统分别表达并纯化了 IHNV 的 G 蛋白,以及 IPNV 的 VP2 蛋白,利用这两种蛋白分别制备了抗 IHNV 和 IPNV 的多克隆抗体,并应用于本研究二联弱毒疫苗的评价中。

3. 成功构建表达 IHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 的质粒 pIHNV-Sn1203,以及表达病 毒 N 蛋白、P 蛋白、Nv 蛋白和 L 蛋白的辅助质粒;通过共转染 BHK-21-T7 细胞的方法, 拯救出具有感染性的重组病毒 rIHNV-Sn1203;对重组病毒多项生物学特性鉴定显示,该 重组病毒与野生型病毒保持着极其相近的生物学特性,说明 IHNV 反向遗传操作系统建 立成功。

4. 为了确定 IHNV 病毒作为载体表达外源基因的最佳位置,本研究以 GFP 作为外源 基因,分别将其插入到 IHNV 病毒载体的不同位置;通过测定 GFP 蛋白荧光强度发现, GFP 蛋白表达量由高到低依次为 rIHNV-GFP-P/M > rIHNV-GFP-N/P > rIHNV-GFP-M/G > rIHNV-GFP-G/Nv > rIHNV-GFP-Nv/L;以上结果表明,P/M 基因之间是 IHNV 作为载体 表达外源基因的最佳位置。 5. 为了构建预防 IHN 和 IPN 的二联弱毒疫苗,本研究以在虹鳟上低毒力的 IHNV 毒株 Blk94 为载体,将 IPNV 病毒的 VP2 基因插入到 P/M 基因之间,构建表达 VP2 蛋白的 重组病毒 rBlk94-VP2; 对该弱毒疫苗的免疫保护效果研究发现,其免疫后的虹鳟在感染 IHNV 病毒时的相对存活率为 86%,并且组织中 IPNV 病毒载量显著降低,宿主免疫相关 因子表达水平显著上调;同时该弱毒疫苗免疫后,虹鳟对 IHNV 和 IPNV 均产生了较高 水平的中和抗体。

结论: 我国目前流行的 IHNV 均为 J 基因型; 成功制备了针对 IHNV 病毒 G 蛋白的 多克隆抗体和针对 IPNV 病毒 VP2 蛋白的多克隆抗体; 成功建立了 IHNV 反向遗传操作 系统,并确定了 P/M 基因之间是 IHNV 作为载体表达外源基因的最佳位置; 成功构建了 预防 IHN 和 IPN 的二联弱毒疫苗,为开发虹鳟活载体弱毒疫苗奠定了坚实的基础。

关键词 传染性造血器官坏死病毒;传染性胰脏坏死病毒;反向遗传操作系统;重 组病毒载体;弱毒疫苗

# Abstract

Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and infectious pancreatic necrosis (IPN) are acute, highly contagious systemic diseases that pose a serious threat to salmon and trout aquaculture. The outbreak of these two diseases caused huge economic losses to worldwide salmon and trout industry. The pathogen for IHN is the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), which belongs to the Rhabdoviridae family, Novirhabdovirus genus, and the Salmonid novirhabdovirus species. The virus genome is an unsegmented negative-sense single-stranded RNA. The pathogen for IPN is the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), which belongs to the Birnaviridae family and Aquabirnavirus genus. The virus genome is a two segmented double-stranded RNA. For IHN and IPN, although there are currently commercially available DNA vaccines and inactivated vaccines respectively, due to import restrictions and biosafety issues, there is still no commercial vaccine in China, let alone a dual vaccine against the above two diseases. Therefore, this study will carry out the research on the dual vaccine against IHNV and IPNV. The establishment of reverse genetic system provides a technical platform for the study of virus gene function, pathogenic mechanism, and novel virus vector vaccines. In order to study the attenuated vaccine for IHN and IPN, this study will determine the endemic strains of IHNV through viral phylogenetic analysis and transcriptome analysis, and establish the reverse genetic operating system of IHNV to determine the optimal site for recombinant IHNV virus to express exogenous proteins as the carrier. Finally, the recombinant virus that can successfully express IPNV VP2 protein was constructed, and the recombinant virus was used as a vaccine to protect rainbow trout against IHNV and IPNV infection.

The following is the main content of this research:

1. Through evolutionary analysis of the system, it has been found that the currently prevalent IHNV strains in China belong to the J genotype, which is highly pathogenic in rainbow trout. Transcriptome analysis of host responses to IHNV infection with U and J genotypes revealed significant differences in host immune responses between the two strains.

2. The G protein of IHNV and the VP2 protein of IPNV were expressed and purified using prokaryotic expression systems. Polyclonal antibodies against IHNV and IPNV were prepared using these two proteins, respectively, and were applied in the evaluation of a bivalent attenuated vaccine in this study.

3. In this study, a plasmid pIHNV-Sn1203 was successfully constructed, which expressed the full-length cDNA of the virus, as well as auxiliary plasmids expressing the N, P, Nv, and L proteins of the virus. After co-transfection with BHK-21 cells expressing T7 polymerase, a viable recombinant virus rIHNV-Sn1203 was successfully rescued. Multiple biological characteristic identification assays were performed on the recombinant virus, which showed that the recombinant virus maintained similar biological characteristics to the wild-type virus, indicating the successful establishment of the IHNV reverse genetic system.

4. To determine the optimal expression site of exogenous genes in IHNV as a vector, this study inserted the GFP gene as an exogenous gene between different IHNV viral genes. By measuring the fluorescence intensity of GFP protein, it was found that the highest expression level of GFP protein was in rIHNV-GFP-P/M, followed by rIHNV-GFP-N/P, rIHNV-GFP-M/G, rIHNV-GFP-G/Nv, and rIHNV-GFP-Nv/L. These results indicate that the P/M gene region is the optimal expression site for exogenous genes in IHNV as a vector.

5. In order to develop a bivalent vaccine against both IHN and IPN, the attenuated IHNV strain Blk94 (for rainbow trout) was used as a vector and VP2 gene of IPNV virus was inserted into P/M gene region. The protective effect of this attenuated vaccine found that the relative survival rate of rainbow trout after infection with IHNV was 86%, and the viral load of IPNV in the tissues was significantly reduced. The immune-related genes were significantly upregulated. At the same time, after immunization with this attenuated vaccine, rainbow trout produced high levels of neutralizing antibodies against both IHNV and IPNV.

Conclusion: The currently prevalent IHNV strains in China belong to the J genotype. Polyclonal antibodies against the IHNV G protein and the IPNV VP2 protein have been successfully prepared. An IHNV reverse genetic system has been established, and the optimal location for expressing exogenous genes as IHNV carriers between the P/M genes has been determined. A bivalent attenuated vaccine has been successfully developed for the prevention of IHN and IPN, which lays a solid foundation for the development of a live attenuated vaccine for rainbow trout.

**Keywords** Infectious hematopoietic necrosis virus; Infectious pancreatic necrosis virus; reverse genetic system; Recombinant virus vector; Attenuated virus vaccine

目 录

1 绪论	1
1.1 传染性造血器官坏死病毒研究进展	1
1.1.1 IHN 流行病学特征	1
1.1.2 IHNV 病原学研究	3
1.1.3 IHNV 分子生物学特性	4
1.1.4 IHN 疫苗研究进展	6
1.2 负链 RNA 病毒反向遗传操作系统	7
1.2.1 反向遗传学的概念	7
1.2.2 反向遗传操作系统的原理及方法	8
1.2.3 负链 RNA 病毒反向遗传系统的建立	8
1.2.4 IHNV 反向遗传系统的建立	9
1.2.5 IHNV 反向遗传学的应用	9
1.3 传染性胰脏坏死病毒研究进展	10
1.3.1 IPN 流行病学特征	10
1.3.2 IPNV 病原学研究	.12
1.3.3 IPNV 分子生物学特性	.13
1.3.4 IPN 疫苗研究进展	.14
2 IHNV 系统进化、转录组分析及抗体制备	16
2.1 研究材料	16
2.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物	16
2.1.2 试剂和细胞培养材料	16
2.1.3 主要仪器设备	16
2.2 研究方法	.17
2.2.1 细胞培养和病毒增殖	.17
2.2.2 病毒 RNA 的提取	.17
2.2.3 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列克隆	.17
2.2.4 IHNV-Sn1203 全基因组序列及系统进化分析	.18
2.2.5 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分	·析
	18
2.2.6 IHNV 多克隆抗体的制备	.20
2.3 研究结果	.23
2.3.1 IHNV-Sn1203 毒株同源性和系统发育分析	.23
2.3.2 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列分析	.27
2.3.3 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分	·析

	29
2.3.4 IHNV 多克隆抗体的制备	35
2.4 讨论	40
2.4.1 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列及系统进化分析	40
2.4.2 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分	分析
	41
2.4.3 IHNV 多克隆抗体的制备	41
2.5 本章小结	42
3 IPNV 多克隆抗体的制备	43
3.1 研究材料	43
3.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物	43
3.1.2 试剂和细胞培养材料	43
3.1.3 主要仪器设备	43
3.2 研究方法	43
3.2.1 细胞培养和病毒增殖	43
3.2.2 病毒 RNA 的提取	43
3.2.3 IPNV 病毒多克隆抗体的制备	43
3.3 研究结果	45
3.3.1 VP2 蛋白抗原性及疏水性分析	45
3.3.2 VP2 蛋白的表达及纯化	45
3.3.3 IPNV 多克隆抗体效价的测定	48
3.3.4 IPNV 多克隆抗体的间接免疫荧光检测	48
3.4 讨论	49
3.5 本章小结	50
4 IHNV 反向遗传操作系统的建立	51
4.1 研究材料	51
4.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物	51
4.1.2 试剂和细胞培养材料	51
4.1.3 主要仪器设备	51
4.1.4 引物设计及合成	51
4.2 研究方法	51
4.2.1 细胞培养和病毒增殖	51
4.2.2 病毒 RNA 的提取	51
4.2.3 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的构建	52
4.2.4 rIHNV-Sn1203 毒株辅助质粒的构建	
4.2.5 重组病毒 rIHNV-Sn1203 的拯救及鉴定	
4.3 研究结果	61
4.3.1 rIHNV-Sn1203 毒株全长 c DNA 质粒的构建	61

4.3.2 rIHNV-Sn1203 毒株辅助质粒的构建	63
4.3.3 rIHNV-Sn1203 病毒的拯救	63
4.3.4 rIHNV-Sn1203 病毒的生物学鉴定	65
4.4 讨论	70
4.5 本章小结	71
5 IHNV 外源基因最佳表达位置的确定	72
5.1 研究材料	72
5.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物	72
5.1.2 试剂和细胞培养材料	72
5.1.3 主要仪器设备	72
5.1.4 引物设计及合成	72
5.2 研究方法	72
5.2.1 细胞培养和病毒增殖	72
5.2.2 病毒 RNA 的提取	72
5.2.3 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-N/P 病毒的拯救	72
5.2.4 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-P/M 病毒的拯救	74
5.2.5 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-M/G 病毒的拯救	75
5.2.6 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-G/Nv 病毒的拯救	75
5.2.7 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒的拯救	76
5.2.8 表达 GFP 蛋白的重组病毒的鉴定	77
5.3 研究结果	78
5.3.1 重组病毒全长 c DNA 质粒的构建	78
5.3.2 表达 GFP 蛋白的重组病毒的拯救及鉴定	79
5.3.3 拯救病毒的生长特性鉴定	81
5.3.4 拯救病毒 GFP 表达水平检测	83
5.4 讨论	85
5.5 本章小结	86
6 预防 IHN 和 IPN 二联弱毒疫苗的构建及其应用	87
6.1 研究材料	87
6.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物	87
6.1.2 试剂和细胞培养材料	87
6.1.3 主要仪器设备	87
6.1.4 引物设计及合成	87
6.2 研究方法	87
6.2.1 细胞培养和病毒增殖	87
6.2.2 病毒 RNA 的提取	87
6.2.3 重组病毒全长 cDNA 质粒的构建	87
6.2.4 重组病毒辅助质粒的构建	91

6.2.5 重组病毒的拯救及鉴定	92
6.2.6 重组病毒免疫保护效果的检测	93
6.3 研究结果	95
6.3.1 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒的构建	95
6.3.2 rIHNV-Blk94 毒株辅助质粒的构建	97
6.3.3 rIHNV-Blk94 病毒的拯救及鉴定	
6.3.4 rBlk94-VP2 病毒免疫保护效果鉴定	102
6.4 讨论	106
6.5 本章小结	108
结论	109
参考文献	110

# 1 绪论

# 1.1 传染性造血器官坏死病毒研究进展

传染性造血器官坏死病(Infectious hematopoietic necrosis, IHN)是由传染性造血器 官坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)引起的严重威胁鲑鳟鱼健康 养殖的急性、全身性疾病<sup>[1]</sup>。20世纪 50年代,该病首次发生于北美西部的红鲑 (*Oncorhynchus nerka*)孵化场中,随着水产品的流通迅速传播到亚洲和欧洲的一些国家, 目前在世界范围内频繁暴发,给世界鱼类养殖造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。目前世界动物 卫生组织将该病列入水生动物疫病名录,我国农业农村部将其列为二类动物疫病。

#### 1.1.1 IHN 流行病学特征

#### 1.1.1.1 IHN 流行特征

IHN 首次暴发于北美的红鲑孵化场中,并在 1971 年从北美经被感染的红鲑(Kokanee salmon)进入日本的北海道<sup>[3]</sup>。随着水产品贸易的发展,IHN 于 1987 年进入意大利<sup>[4]</sup>和法国<sup>[5]</sup>,1991 年进入韩国<sup>[6]</sup>,1992 年进入德国<sup>[7]</sup>。目前该病在世界范围内的许多国家都有暴发,如奥地利<sup>[8]</sup>、加拿大<sup>[9]</sup>、伊朗<sup>[10]</sup>、荷兰<sup>[11]</sup>、俄罗斯<sup>[12]</sup>、斯洛文尼亚<sup>[13]</sup>和西班牙<sup>[14]</sup>。我国首例 IHN 报道于 1985 年辽宁省某虹鳟养殖场,造成的虹鳟死亡率达 100%<sup>[15]</sup>。1994 年我国台湾省也暴发了 IHN,感染虹鳟死亡率达 95%以上<sup>[16]</sup>。自从九十年代初以来,在我国鲑鳟鱼主要养殖区均有不同程度的 IHN 发生(图 1-1),使一些鲑鳟鱼养殖场遭到毁灭性的打击<sup>[2, 17]</sup>,据不完全统计显示,IHN 的大规模暴发造成的虹鳟大鱼死亡率约为 10%~25%,小鱼死亡率可达 100%<sup>[18]</sup>。

IHNV 的传播方式主要为垂直传播和水平传播两种。垂直传播是指卵子在卵巢发育过程中或被污染或感染的精子渗透时受到 IHNV 感染,进而使得 IHNV 经受精卵从父母转移到子代。已有研究表明,IHNV 能够粘附在精子上或者存在于卵巢液中<sup>[19-20]</sup>。水平传播是指 IHNV 随着患病鱼的粘液、性液或粪便等代谢产物排入水中,感染其他健康鱼。已有研究发现,虹鳟鱼经水感染 IHNV 24 h 后能够在粘液中检测到病毒的存在,并在 48 h 增长至 10<sup>4</sup> pfu/mL<sup>[21]</sup>。

水温是影响 IHNV 感染与潜伏的主要因素之一,在 4~13℃是该病自然感染的发病温度,其中 8~10℃是最适的易感发病温度<sup>[22]</sup>;而当温度达到 15℃以上时,发病率较低甚至停止发病。目前的研究发现,当水温高于 15℃或者低于 10℃时死亡率显著降低<sup>[23]</sup>。实验室研究发现,在 3~21℃条件下,将虹鳟幼鱼(0.2~0.3 g)浸泡在 10<sup>5</sup> pfu/mL 的 IHNV 中时能够造成鱼体死亡<sup>[24]</sup>;将虹鳟和红鲑在感染前保持在 15.5℃ 以上,或在感染后 24 h内将鱼移至低于 18℃,在该温度下保持 4~6 d,可以防止或降低死亡率<sup>[25-26]</sup>。

1



图 1-1 IHN 在我国的分布(Xu L et al. 2019) Fig. 1-1 Distribution of IHN in China (Xu L et al. 2019)

## 1.1.1.2 IHN 临床症状

IHNV 能够感染多种鲑鳟科鱼类,在感染后的 7~14 d,被感染的鲑鳟鱼就会表现出临床症状。主要表现为精神萎靡、离群游动、昏睡、鱼体发黑、眼球凸起、厌食、腹部膨大、鱼鳍基部有出血等症状,有时患病鱼的肛门处常常会有一条白色的管装粪便。在疾病暴发的初期,患病鱼会出现痉挛或狂游不止的症状。解剖后可见鱼鳃发白,肝脏、脾脏和肾脏出现贫血,同时胃内容物减少并呈现乳白色,鱼腹腔出现棕红色粘稠样液体,肠道出现黄色液体<sup>[27]</sup>。实验室研究发现,在病毒感染后的 1~2 d 后,在鳃上皮细胞、皮肤、口腔区域、咽、食管、胃和幽门盲囊中能够检测到病毒;在感染后 3~4 d,在肾脏、脾脏、胸腺、肝脏、肌肉和软骨中能够检测到病毒;在感染后第 5 天,能够在心脏、胰腺和大脑中检测到病毒<sup>[28]</sup>。

#### 1.1.1.3 IHN 感染宿主

易感物种是指那些从其中分离或检测到病毒的物种,但它们不一定表现出 IHN 的发病症状。水生动物物种是否容易受到特定病原体的感染,决定了该物种是否有可能通过活体动物或产品的贸易形式传播相关病原体。因此,了解易感物种范围对于遏制疾病传播和防止其传入无病区至关重要。了解易感物种范围也有助于在监测方案中确定合适的物种,例如,证明不受感染;或者在某一病原体传入以前无病地区的情况下,确定其地理传播。在北美,IHN 疾病通常发生在红鲑、王鲑、虹鳟和大西洋鲑中<sup>[29]</sup>;在亚洲,IHN 的易感品种主要为虹鳟、马苏大麻哈和山女鳟等<sup>[30]</sup>;在俄罗斯,IHN 只在太平洋沿岸的红鲑中有记录<sup>[12]</sup>;在欧洲,IHN 疾病仅发生在虹鳟上<sup>[31]</sup>,但在无任何症状的鱼种也分离到了 IHNV,如欧洲鳗鱼<sup>[32]</sup>、北方梭子鱼<sup>[33]</sup>和褐鳟<sup>[34]</sup>。

# 1.1.2 IHNV 病原学研究

# 1.1.2.1 病毒分类及形态学特征

在分类学上 IHNV 属于单负病毒目(Mononegavirales)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)、 诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)、鲑科诺拉弹状病毒种(*Salmonid novirhabdovirus*) 中的一员,是一种线型、负链 RNA 病毒<sup>[35]</sup>。该病毒呈现出典型的弹状病毒形态,核衣壳 结构为二十面立体对称,病毒粒子大小为(70~90)×(160~180) nm,病毒粒子的轴孔 直径为 20 nm,核心直径为 60 nm(图 1-2)。IHNV 含有囊膜结构,病毒表面有刺突,囊 膜的脂蛋白包膜厚度约为 15 nm<sup>[36]</sup>。病毒的核衣壳蛋白、磷蛋白和聚合酶蛋白一起与病 毒的基因组 RNA 组成了核衣壳复合物(Ribonucleoprotein, RNP)<sup>[35, 37]</sup>。病毒粒子表面 覆盖着由糖蛋白组成的刺突,这些刺突与宿主细胞表面的受体相互作用,使得病毒能够 进入宿主细胞内部进行复制<sup>[38]</sup>。



Fig. 1-2 Viral structure of IHNV (From ViralZone)

# 1.1.2.2 理化特性

IHNV 在蔗糖中的浮力密度为 1.16 g/mL,氯化铯中为 1.2 g/mL,而在硫酸铯中为 1.59 g/mL, IHNV 在 5%~25%蔗糖溶液中的沉降系数为 38~40 S<sup>[39]</sup>。其碱基组成中腺嘌呤(A) 占 22.5%,尿嘧啶(U) 占 27.2%,胞嘧啶(C) 占 25.4%,鸟嘌呤(G) 占 24.2%<sup>[40]</sup>。IHNV 不耐热,并且对外部环境变化比较敏感。有研究表明,在 31℃条件下放置 15 min 就可使 IHNV 感染力降低 80%;在 45℃条件下放置 15 min 可使 IHNV 感染力降低 98%~99%;在 60℃条件下放置 1 min 可使 IHNV 完全失活;而在 4℃条件下,至少要放置 140 d 才能 够使其失活。当环境 pH 为 6~8 时是 IHNV 感染的最适 pH,随着 pH 的改变,IHNV 的感染能力受到很大的影响;当 pH 为 3 时,IHNV 的感染力仅为 0.1%;而当 pH 为 7.5 时,IHNV 的感染力为 100%。在有血清存在时,IHNV 能够在-20℃以下保存数年,并且冻存 及解冻对病毒危害很小。含有 IHNV 的组织匀浆能够在 4℃条件下短期保存,其病毒的感染活性可以维持数周<sup>[41-42]</sup>。

#### 1.1.2.3 病毒增殖

体外培养时, IHNV 病毒能够在多种细胞系上生长,如鲤鱼上皮瘤细胞系(EPC)、 大鳞大麻哈鱼胚胎细胞系(CHSE-214)、虹鳟性腺细胞系(RTG-2)、蓝腮太阳鱼细胞系 (BF-2)以及胖头鱥肌肉细胞系(FHM),但 IHNV 病毒只有在 EPC 和 CHSE-214 细胞 系上繁殖最快<sup>[43-47]</sup>。当细胞被 IHNV 病毒感染后会出现明显的细胞病变效应(CPE),主 要为细胞核明显变大,核膜变厚,细胞核内染色质边缘化,同时细胞边缘脱落的部分连 接在一起,形成类似葡萄串状细胞聚集,最终完全崩解<sup>[48]</sup>。IHNV 病毒在细胞上的生长 温度范围为 4~20℃,其中最适的生长温度为 15℃<sup>[42]</sup>。病毒在感染细胞后的 4 h 即可产生 新的子代病毒,并在感染后 16 h 进入指数生长期<sup>[49]</sup>。

#### 1.1.2.4 病毒致病性

IHNV 能够感染多种鲑鳟科鱼类,系统发育分析结果显示,目前世界范围内的 IHNV 已经进化为 5 个基因型,分别为 U 型、M 型、L 型、E 型和 J 型<sup>[2]</sup>。对不同基因型 IHNV 的毒力研究表明,不同基因型的 IHNV 在不同宿主中的致病性存在较大的差异。如对红 鲑致病性的研究发现,U基因型的致死率为 69%~100%,而 M 基因型的致死率只有 0~4%; 相反 M 基因型对虹鳟的毒性最强,其致死率能达到 25%~85%,而 U 基因型的 IHNV 对 虹鳟的致死率仅为 5%~41%; L 基因型的 IHNV 在红鲑和虹鳟上都只有中等的毒力,其 致死率为 13%~53%; J 基因型的 IHNV 在虹鳟上的死亡率最高,目前研究发现最高可达 到 95%<sup>[2, 50]</sup>。这些数据表明,不同基因型病毒的毒力与 IHNV 病毒株的地理来源有关。 因此,有人假设一个 U 基因型的 IHNV 毒株(或多个毒株)从红鲑跳到虹鳟,进化成 M 基因型,对新宿主具有更大的毒力,而对原始宿主失去毒力<sup>[51-52]</sup>。

# 1.1.3 IHNV 分子生物学特性

#### 1.1.3.1 IHNV 基因组特征及其编码产物

IHNV 是不分节段的单股负链 RNA 病毒,其病毒基因组全长约为 11129~11133 nt<sup>[17, 37, 53]</sup>。IHNV 病毒基因组从 3' 端到 5' 端共编码 5 个结构蛋白和 1 个非结构蛋白,其编码顺 序为核蛋白 (Nucleocapsid protein, N)、磷蛋白 (Phosphorprotein, P)、基质蛋白 (Matrix protein, M)、糖蛋白 (Glycoprotein, G)、非结构蛋白 (Non-virion protein, Nv) 和聚合 酶蛋白 (Polymerase protein, L)<sup>[54]</sup>。在基因组的 3' 端和 5' 端各有一段非编码区,其中 3' 端非编码区的长度约为 60 nts,称为先导序列 (Leader sequence); 5' 端非编码区的长 度为约 98~102 nt,称为尾随序列 (Trailer sequence),这两段序列在病毒 RNA 的复制和 转录过程中发挥关键作用<sup>[17, 37, 53]</sup>。IHNV 基因组上的所有基因都被称为基因连接区的非 翻译序列分开,这段非翻译序列中存在着能够终止上一个基因 mRNA 转录的序列,以及 能够起始下一个基因转录的序列<sup>[37]</sup>。

#### 1.1.3.2 N蛋白结构与功能

IHNV 病毒的 N 基因全长为 1176 bp, 共编码 391 个氨基酸, 蛋白分子量约为 42 kDa, 是病毒 RNP 的重要组成成分,同时也是 IHNV 病毒中相对保守的一个蛋白<sup>[17, 37]</sup>。电镜观

察发现,N蛋白呈圆环状,由 9~11 个单体蛋白构成<sup>[55-56]</sup>。N蛋白的功能主要有:(1)N 蛋白与病毒基因组 RNA 结合将其包裹形成复合体,在病毒的复制过程中起到保护病毒基 因组 RNA 免受核酸酶降解的作用,同时为病毒的复制和转录提供完整的模板<sup>[57-58]</sup>;(2) 在 P蛋白的帮助下,病毒的 N蛋白以可溶蛋白的形式存在,并且能够特异性的与 3'端 Leader 区的衣壳化识别信号结合,完成对病毒 RNA 的衣壳化<sup>[59-60]</sup>;(3)N蛋白能够调节 病毒基因的复制与转录<sup>[61]</sup>。虽然 N蛋白的末端序列相对保守,但是试验研究发现,当对 N蛋白末端的 45 个氨基酸(尤其是 C末端的 5 个氨基酸)进行敲除后,N蛋白丧失了衣 壳化病毒 RNA 的功能,说明其末端序列在 N蛋白衣壳化病毒 RNA 的过程中发挥关键作 用<sup>[59,62]</sup>。

## 1.1.3.3 P蛋白结构与功能

IHNV 病毒的 P 基因全长为 693 bp,共编码 230 个氨基酸,蛋白分子量约为 26 kDa<sup>[17]</sup>。 P 蛋白是一个具有多种功能的调控蛋白,能够介导病毒的复制与转录,同时又可以调控 蛋白质的翻译。多聚化后的 P 蛋白能够与 L 蛋白特异性的结合,形成 RNA 聚合酶复合 体,这一复合体的形成可以确保 L 蛋白免受蛋白酶的降解<sup>[63]</sup>。RNA 聚合酶复合体形成后 能够与 N-RNA 结合,启动基因组的复制和转录<sup>[55]</sup>。研究发现,P 蛋白能够以分子伴侣的 形式与 N 蛋白结合,确保 N 蛋白以可溶性的状态存在,防止 N 蛋白自身聚集<sup>[64]</sup>。此外, P 蛋白还具有调控开关的作用,能够使基因组从转录向复制状态进行转换,启动核衣壳 向新生 RNA 链的合成<sup>[65]</sup>。

#### 1.1.3.4 M蛋白结构与功能

IHNV病毒的M基因全长为588 bp,共编码195个氨基酸,蛋白分子量约为22 kDa<sup>[17]</sup>。 弹状病毒的M蛋白在病毒复制过程中有许多不同的功能,其中最主要的功能是通过在宿 主质膜和核衣壳核心之间形成桥梁来启动病毒粒子的组装,促进病毒的出芽<sup>[66]</sup>。M蛋白 能够通过抑制宿主三种 RNA聚合酶(RNAP)的转录,来有效抑制宿主基因的转录,同 时在M基因的5′或3′非编码区中可能存在着区分病毒编码基因和"其他"基因的调控元 件<sup>[67-68]</sup>。还有研究表明,M蛋白能够通过抑制 IFN 的表达来抑制宿主的抗病毒反应,并 且M蛋白是细胞病变效应的唯一原因,病变后的多边形细胞变圆也是由M蛋白所引起 的<sup>[69-71]</sup>。

# 1.1.3.5 G蛋白结构与功能

IHNV 病毒的 G 基因全长为 1527 bp, 共编码 508 个氨基酸,蛋白分子量约为 56 kDa<sup>[17]</sup>。G 蛋白是唯一一个在病毒表面的结构蛋白,在病毒表面以三聚体的形式存在<sup>[72]</sup>。 根据周围环境 pH 的不同,弹状病毒的 G 蛋白可呈现出三种不同的形态,即在 pH 值高于 7 的病毒表面检测到的天然状态(N),参与靶细胞膜融合过程的激活疏水状态(A),以 及非融合构象状态(I)。这些状态之间依靠 pH 的改变维持平衡,当周围环境为低 pH 时, G 蛋白结构向 I 态转变。在环境 pH 低于 6.7 时,病毒粒子立即表现出疏水性进入 A 状态, 并且能够以不同于中性 pH 时的方式与靶膜相互作用。这种与靶膜的疏水相互作用,由处 于 A 状态的 G 蛋白所介导,可能构成融合过程的第一步。然而,当环境 pH 值降低到 6.2 左右时发生膜融合,在低 pH 下长时间孵育会导致 G 蛋白的构象由 A 向 I 转变。在 I 状态下,G 蛋白不仅在构象上比 N 状态时长,而且抗原性也有所不同<sup>[73]</sup>。N 状态和 I 状态处于动态平衡的过程,在 pH 值较低时向 I 状态转变,在 pH 值 6.7 左右达到约 50%的 N 状态和 50%的 I 状态<sup>[72]</sup>。

G 蛋白除了与膜融合有关外,还是弹状病毒的主要抗原蛋白,能够诱导宿主产生中和抗体并激发宿主免疫反应<sup>[36]</sup>。IHNV 病毒的 G 蛋白主要含有四个区域,分别为 1~20 位 氨基酸组成的信号肽区,在病毒的转录过程中被特异性切除,21~459 位氨基酸组成的膜外区,460~482 位氨基酸组成的跨膜区和 483~508 位氨基酸组成的膜内区,其中 21~459 位的膜外区是影响病毒抗原特性的主要因素,其某些位点氨基酸的变化将会造成病毒毒力以及蛋白抗原特性的改变<sup>[74]</sup>。已有研究发现,G 蛋白第 78~81 位、218~232 位、272~276 位、301~325 位、419~444 位氨基酸区域为 IHNV 病毒的抗原表位区,并且除 218~232 位外,其余均含有中和抗原表位<sup>[75]</sup>。因此,目前关于 IHNV 的疫苗研究多选用 G 蛋白作为靶基因进行。

#### 1.1.3.6 Nv 蛋白结构与功能

IHNV 病毒的 Nv 基因全长为 336 bp, 共编码 111 个氨基酸,蛋白分子量约为 13 kDa<sup>[17]</sup>。Nv 蛋白是诺拉弹状病毒所特有的一种非结构蛋白,在病毒的复制过程中表达量 较低。目前关于 IHNV 和病毒性出血性败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)的研究发现,缺失 Nv 蛋白将会影响病毒的复制和致病性<sup>[76-77]</sup>;但是乌鳢弹状病 毒(Snakehead rhabdovirus, SHRV)的研究却表明, Nv 蛋白对于 SHRV 的复制并不是必 须的,而且 Nv 蛋白的缺失对于病毒的致病性并没有影响。已有研究发现, Nv 蛋白还能 够抑制 IFN 和 NF-κB 信号通路<sup>[78]</sup>。这些结果说明, Nv 蛋白的功能可能与病毒感染的宿 主以及生长环境有关。

#### 1.1.3.7 L蛋白结构与功能

IHNV 病毒的 L 基因全长为 5961 bp, 共编码 1986 个氨基酸, 蛋白分子量约为 225 kDa<sup>[17]</sup>。L 基因是弹状病毒基因组中最大的基因, 其长度占整个病毒基因的 50%以上, 但 是其蛋白含量却是结构蛋白中最低的, 并且需要与 P 蛋白同时存在才能发挥功能, 如指 导病毒 RNA 的复制和转录<sup>[79]</sup>。目前研究发现, L 蛋白具有以下功能活性: 甲基化和多聚 腺苷酸化 mRNA 5' 加帽活性、磷酸化 P 蛋白的蛋白激酶活性以及甲基转移酶活性<sup>[80-81]</sup>。

#### 1.1.4 IHN 疫苗研究进展

IHN 的暴发给世界范围内的鲑鳟鱼养殖带来了巨大的经济损失,疫苗免疫被认为是目前预防 IHN 最为有效的手段。目前针对 IHN 的疫苗研究主要集中在以下几个方面:减毒活疫苗、灭活疫苗和重组疫苗。

减毒活疫苗是指用毒力减弱的病毒株制成的能够引起宿主产生免疫反应抵抗外源病毒感染的疫苗。目前多个研究团队利用细胞连续传代培养的方法获得了 IHNV 弱毒株,利用该毒株免疫虹鳟后保护效果为 12%~65%<sup>[82-83]</sup>。Romero、Rouxel 等利用反向遗传学

构建了重组减毒 IHNV 病毒,免疫虹鳟后的相对保护效果为 40%~89%<sup>[84-86]</sup>。

灭活疫苗是指把通过细胞培养获得的病毒,经过化学或物理的方法灭活制备而成的 疫苗。Anderson 等利用高温加热的物理灭活方法制备了 IHNV 疫苗,结果发现虽然该灭 活疫苗能够诱导虹鳟产生免疫反应,但是其免疫保护效果较低<sup>[87]</sup>。目前针对 IHNV 的化 学灭活剂主要有 β-丙内酯、甲醛和二元乙烯亚胺等。甲醛在进行病毒灭活时,一方面可 以通过结合含有氨基的核苷酸来破坏病毒的核酸结构,另一方面还能与含有氨基的病毒 蛋白质结合使其变性失活<sup>[88]</sup>。但是利用甲醛进行 IHNV 的灭活时,灭活时间和灭活病毒 的免疫保护效果会随着灭活温度的改变而受到影响;随着温度的升高,灭活病毒所需要 的时间也会缩短,同时灭活病毒的免疫保护效果也会更加有效<sup>[89]</sup>。已有研究发现,利用 0.2%的甲醛在 4℃条件下灭活 IHNV 病毒 6 d 后,灭活病毒的保护率为 20%~30%<sup>[90]</sup>,而 在 37℃和 25℃条件下灭活 IHNV 病毒 24 h 后,保护率分别为 85%和 79.1%<sup>[91-92]</sup>。β-丙内 酯和二元乙烯亚胺主要通过影响病毒核酸碱基的方式灭活病毒,并不破坏病毒的蛋白质, 因此不会影响病毒的免疫原性<sup>[93]</sup>。已有研究发现,0.1%的β-丙内酯灭活病毒的相对保护 率为 68%,0.01%的β-丙内酯灭活病毒 24 h 后的相对保护率大于 90%,0.02%的二元乙烯 亚胺灭活病毒 48 h 后的相对保护率为 83.3%<sup>[91,94]</sup>。

虽然关于 IHNV 的疫苗研究取得了良好的效果,但是由于疫苗进口受限、疫苗安全 性等问题,我国目前仍然没有任何商业化的 IHN 疫苗。

# 1.2 负链 RNA 病毒反向遗传操作系统

#### 1.2.1 反向遗传学的概念

在病毒学中,反向遗传学指的是完全从其互补 DNA(cDNA)中产生一种有传染性的病毒<sup>[102]</sup>。与传统遗传学(或正向遗传学)不同,正向遗传学是从生物表型或特征到遗传基础的研究路线出发,研究遗传物质的本质和生命的发生、发展规律。而反向遗传学

则是通过分子生物学的手段,对生物的遗传物质进行缺失、突变或置换等操作,分析特定的遗传序列对生物性状、基因结构、生物功能的影响,用相反的方式阐释遗传物质与生命的发展规律<sup>[103-104]</sup>。

#### 1.2.2 反向遗传操作系统的原理及方法

反向遗传操作系统的主要内容就是具有感染性的 cDNA 分子克隆的构建。在感染性 克隆的构建过程中,首先获得含有病毒基因组全长序列的 cDNA,并将其依次连接到相 应的拯救载体中,同时在该载体中加入 RNA 聚合酶的启动子和终止子序列,最终构建出 含有病毒基因组全长 cDNA 的克隆。其次通过体外转录或转染敏感细胞的方式获得病毒 的 RNA,通过在细胞中的大量增殖,最终包装出与亲本病毒具有相同生物学特性的重组 病毒<sup>[105-106]</sup>。

根据 RNA 感染性转录产物获取方式的不同,目前的病毒拯救方式分为两种形式。第一种是体内转录,将含有病毒基因组全长 cDNA 的重组质粒,通过物理或化学的方法导入到宿主体内或细胞系中,借助宿主系统转录出病毒的基因组 RNA,并包装成新的感染性病毒<sup>[103,107]</sup>。第二种是体外转录,主要是利用噬菌体启动子(T3、T7或 SP6)和相应的转录组分,在体外的条件下以构建的含有基因组全长 cDNA 的质粒为模板合成病毒的基因组 RNA,最终将转录获得的 RNA 转染敏感细胞系拯救出病毒<sup>[108-109]</sup>。相较于体外转录,体内转录获得的病毒 RNA 更加稳定且产量高,同时其拯救过程操作简单,获得重组病毒的成本低廉,实验重复性好,因此目前的病毒反向遗传操作系统多采用体内转染的方式。

#### 1.2.3 负链 RNA 病毒反向遗传系统的建立

随着分子生物学的进步,反向遗传学在 20 世纪中期首次被用于实现对 T2 噬菌体的 拯救<sup>[110]</sup>。然后将其应用于 DNA 病毒,因为 DNA 可以直接引入细胞中以产生有传染性的 病毒<sup>[111]</sup>。在不同研究人员的努力下,反向遗传学在 20 年后进入了重要阶段,研究人员 成功地拯救了正义 RNA 病毒——噬菌体 Qbeta 和哺乳动物脊髓灰质炎病毒<sup>[112-113]</sup>。之后, Boyer 和 Haenni 发现在转染前进行 RNA 的体外转录更为高效,然后将其应用于几种 RNA 病毒的拯救中。尽管病毒拯救被视为理解基因功能、生成改造病毒以开发新疫苗和基于 病毒的教体的解决方案,但其应用最初仅限于 DNA 病毒和正义 RNA 病毒,因为其体外 合成的基因组 RNA 在转染到易感细胞时具有传染性<sup>[114]</sup>。

负链 RNA 病毒在建立反向遗传学方面很困难,因为仅有基因组 RNA 并不足以进行 复制、转录和翻译的生物学过程<sup>[115-116]</sup>。此外,负义 RNA 病毒的 RNA 基因组是无法感 染宿主细胞的,自然状态下也无法在细胞质中存在。负义 RNA 病毒的基因组最初被核蛋 白包装成核蛋白-RNA 复合物 (RNP),其中基因组被 RNP 包裹,并作为复制中间产物的 模板用于产生后代 RNA,随后与病毒基质蛋白和糖蛋白相互作用,形成一个新的病毒颗 粒<sup>[115]</sup>。为了解决这个问题,科学家们尝试使用不同的方法来重构病毒 RNP 复合物,但 这些方法仅适用于分段病毒。后来,研究人员开发出了一种新的方法,即通过将互补基 因组的 cDNA 转染到宿主细胞中来进行病毒的反向遗传操作,而不是直接转染病毒基因 组。这种方法革命性地改变了不分段的负义 RNA 病毒的反向遗传操作,并成功地拯救出 了狂犬病病毒,但是这种方法并不适用于分段病毒<sup>[117]</sup>。后来,科学家通过同时转染每个 基因组分段,首次成功拯救出了分段负义 RNA 病毒布尼亚病毒,并随后成功拯救了 A 型流感病毒<sup>[118-120]</sup>。然而,对于双链 RNA 病毒的拯救一直存在疑问,因为这些病毒中包 含在细胞中不存在的基因组结构。尽管如此,科学家们还是成功地合成了双链 RNA 病毒 的转录本,并证明其具有传染性<sup>[121]</sup>。

#### 1.2.4 IHNV 反向遗传系统的建立

IHNV 和狂犬病毒一样都属于不分节段的负链 RNA 病毒,其基因组 RNA 需要与 N 蛋白、P蛋白、L蛋白形成 RNP 后才具有感染性。第一个重组 IHNV 反向遗传操作系统 是 Biacchesi 等人于 2000 年建立的,由于 IHNV 病毒的基因组过长,Biacchesi 等人将其 分为四段分别克隆,然后利用核酸内切酶将所有克隆片段连接到目的载体中,并在病毒 全长 cDNA 的上游插入了 T7 启动子,下游插入了具有自剪切功能的核酶序列,以保证病 毒 RNA 5' 端具有精确的末端结构。他们利用牛痘病毒作为辅助病毒表达 T7 RNA 聚合 酶,辅助重组 IHNV 病毒的拯救<sup>[122]</sup>。但是,一项利用痘病毒作为辅助病毒拯救仙台病毒 的研究表明,拯救获得的重组仙台病毒去除了其 L 基因中的有害突变,这一发现证实了 痘病毒可能通过同源重组导致病毒基因组序列发生不确定突变<sup>[123-124]</sup>。2010 年 Ammayapan 等人建立了一种不依赖于痘病毒的 IHNV 反向遗传操作系统,在研究中他 们将表达病毒全长 cDNA 质粒中的 T7 启动子更改为 CMV 启动子,并在序列的上游和下 游分别加入了锤头状核酶和丁肝核酶确保基因组末端的完整性<sup>[125]</sup>。2016 年 Wang 等人, 用同样的方法进行了 IHNV 病毒的拯救,并成功用 GFP 基因替换掉 IHNV 病毒的 Nv 基 因获得了重组病毒<sup>[123]</sup>。目前利用 IHNV 反向遗传系统的研究越来越多,并将其逐渐应用 到了病毒的病原学研究和疫苗研究中<sup>[126-128]</sup>。

#### 1.2.5 IHNV 反向遗传学的应用

随着 IHNV 反向遗传操作系统的建立,利用其为基础进行的研究工作也越来越多。 在病毒的病原学研究方面,Chen 等利用反向遗传操作系统对 IHNV 病毒的 M 蛋白和 G 蛋白进行改造,发现这两种蛋白中的 L-domain 在病毒的出芽和致病性方面发挥重要作用 <sup>[127]</sup>;Jia 等人对 G 蛋白中的糖基化位点与病毒的致病性和免疫原性间的关系进行了研究, 通过对不同位点的突变发现,G 蛋白 401 和 438 位的糖基化对于病毒的高效复制有关键 作用,同时 438 位的糖基化在病毒的免疫逃逸中可能发挥重要作用<sup>[128]</sup>。Li 等通过对病毒 N 蛋白进行突变发现,N 蛋白第 85 位和 102 位的氨基酸在病毒毒力和免疫原性中发挥关 键作用<sup>[126]</sup>。在疫苗研究方面,研究人员利用 IHNV 作为载体表达外源抗原来预防其他病 毒性疾病,如 VHSV、鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus,SVCV)和流感 病毒<sup>[129-131]</sup>。研究表明,利用重组 IHNV 作为载体表达 SVCV 的抗原蛋白,免疫后的鲤 鱼在 SVCV 病毒感染时的相对存活率达 80%以上<sup>[129]</sup>。Rouxel 等利用重组 IHNV 作为载 体,表达流感病毒的 HA 蛋白,结果显示免疫 rIHNV-HA 后,引发了宿主抗流感病毒的 特异性免疫反应,流感病毒对小鼠的致死率显著降低<sup>[131]</sup>。同年 Rouxel 等对 IHNV 病毒 N 蛋白和 G 蛋白在基因组中的位置进行了重排,结果发现 N 基因的位置可能是与病毒毒力 水平相关的最关键因素之一<sup>[85]</sup>。

# 1.3 传染性胰脏坏死病毒研究进展

传染性胰脏坏死病(Infectious pancreatic necrosis, IPN)是由传染性胰脏坏死病毒 (Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)引起的严重威胁鲑鳟鱼健康养殖的急性、高 度接触性传染病,于 1941 年在加拿大鲑鱼中首次被发现<sup>[132]</sup>。最初由 M'gonigle 命名为急 性鼻粘膜肠炎(Acute catarrhal enteritis),但不久之后,Wood 等人根据对患有类似该感染 性疾病的美洲红点鲑(Salvelinus fontinalis)的组织病理学研究,将其更名为 IPN<sup>[133]</sup>。根 据感染毒株、饲养环境以及鱼龄的不同,该病一般对虹鳟可造成 10%~90%的死亡率,我 国农业农村部将其列为三类动物疫病<sup>[134]</sup>。

#### 1.3.1 IPN 流行病学特征

### 1.3.1.1 IPN 流行特征

IPN 首次报道于北美地区,但最初在加拿大地区被描述为急性鼻粘膜肠炎,1951 年 正式命名为 IPN<sup>[133]</sup>。IPNV于 1957 年首次从美国的美洲红点鲑中被分离出来,是第一个 从硬骨鱼中分离出来的病毒,被认为是世界上分布最广泛的水产养殖病原体之一,目前 几乎每个养殖鲑鱼的国家都发现了这种病毒<sup>[135]</sup>。欧洲已知的第一次 IPN 暴发发生在 1964 年的法国虹鳟鱼养殖场,在法国发生 IPN 之后,丹麦也发现了 IPNV<sup>[136]</sup>。挪威是世界上 最大的大西洋鲑鱼生产国,1975 年首次从虹鳟鱼中分离出 IPNV,并在 80 年代迅速传播 到挪威的大多数鲑鱼养殖场<sup>[137-138]</sup>。2000 年,墨西哥报告了第一次 IPN 爆发,主要来源 于从美国进口的虹鳟鱼卵<sup>[139]</sup>。目前,世界范围内的多个国家均报道了 IPN 的暴发,如智 利<sup>[140]</sup>、澳大利亚<sup>[141]</sup>、克罗地亚<sup>[142]</sup>、意大利<sup>[143]</sup>、乌克兰<sup>[144]</sup>、土耳其<sup>[145]</sup>、波兰<sup>[146]</sup>、苏 格兰<sup>[147]</sup>、爱尔兰<sup>[148]</sup>、西班牙<sup>[149]</sup>、芬兰<sup>[150]</sup>、希腊<sup>[151]</sup>、保加利亚<sup>[152]</sup>、科索沃<sup>[34]</sup>、捷克 共和国<sup>[153]</sup>、韩国<sup>[154]</sup>、中国<sup>[132]</sup>、日本<sup>[155]</sup>和伊朗<sup>[156]</sup>。20 世纪 80 年代 IPN 开始传入我国, 之后陆续在我国山西、辽宁、山东、云南、甘肃等地暴发(如图 1-3 所示),给我国鲑鳟 鱼养殖造成了巨大的经济损失<sup>[157-161]</sup>。



图 1-3 IPN 在我国的分布(Xu L et al. 2021)

Fig. 1-3 Distribution of IPN in China (Xu L et al. 2021)

为了抑制 IPNV 引起的疾病并减少该病毒在水产养殖环境中的传播,需要了解 IPNV 在鱼类宿主之间的传播方式。越来越多的证据表明,IPNV 是通过水平传播和垂直传播的 方式进行传播。水平传播是鱼苗之间的主要传播方式。在 IPNV 暴发时,水中的病毒浓 度可能高达 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL,足以感染鱼和鱼卵。一旦有鱼体感染 IPNV,水平传播就会 发生,这是由于吸入受污染的粪便、尿液、水或其他物质所造成的。在 IPNV 的垂直传 播中,已有研究发现卵巢液中存在高水平的 IPNV 病毒,并发现洗涤后的卵中仍存在病 毒,同时多位研究者也从性产物中分离出了 IPNV。对感染的鳟鱼产生的卵子进行外部消 毒时,仍无法阻止 IPNV 的感染,有研究者推测 IPNV 可能存在于发眼卵的内部<sup>[162-164]</sup>。

#### 1.3.1.2 IPN 临床症状

鲑鳟鱼在感染 IPN 后表现出明显的临床症状,行为特征变化表现为: 厌食、螺旋状游动;外部体征表现为:皮肤色素沉着、腹部肿胀、轻度或中度眼球突出、鳃苍白,同时伴有腹部和鳍出血。鱼体内部变化主要为:胃和肠道中没有食物并含有明显的乳白色粘稠液体,部分鱼体幽门盲肠和前脂肪组织出现出血点,体腔中含有腹水;脾脏、心脏、肝脏和肾脏异常肿大、苍白,整个内脏团可见点状出血<sup>[133,162,165]</sup>。

#### 1.3.1.3 IPN 感染宿主

自从 1957 年在美国首次分离出 IPNV 以来,在许多不同的鲑科鱼类中都发现了 IPNV。在整个 20 世纪 60 年代,仅在鲑科鱼类中检测到 IPNV<sup>[166]</sup>。然而,1972 年 Sonstegard 等人从加拿大健康的白亚口鱼(*Catostomus commersoni*)中分离出一种类似于 IPNV 的双 RNA 病毒<sup>[167]</sup>。1981 年 Sano 等人从日本鳗鱼(*Anquilla japonica*)中检测到双 RNA 病毒<sup>[168]</sup>。从上述的报道中可以看出,从淡水、海水和海洋环境中的鱼类,以及海洋软体动物 和甲壳动物中均分离出双 RNA 病毒和 IPNV 病毒<sup>[162]</sup>。1982 到 1999 年间,多位学者对水 生双 RNA 病毒的宿主范围进行了研究,水生双 RNA 病毒已知的宿主范围目前包括来自

30 多个科的鱼类、10 多种软体动物和几种甲壳动物<sup>[162, 165, 169-170]</sup>。此外, Lo 等人从鱼类 寄生的吸虫中分离出一种水生双 RNA 病毒<sup>[171]</sup>。最近的研究表明,一些重要养殖鱼类也 是 IPNV 的宿主,如塞内加尔鳎 (*Solea senegalensis*)、海鲷 (*Pagrus aurata*)<sup>[172]</sup>、许氏 平鲉(*Sebastes schlegeli*)<sup>[173]</sup>、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)<sup>[174]</sup>、日本鳗鱼(*Anquilla japonica*) <sup>[175]</sup>、野生绿背菱鲽 (*Rhombosolea tapirina*)、大眼角鲨 (*Squalus megalops*) 和鳕鱼 (*Genypterus blacodes*)<sup>[176]</sup>。

## 1.3.2 IPNV 病原学研究

#### 1.3.2.1 病毒分类及形态学特征

在分类学上 IPNV 属于双 RNA 病毒科(Birnaviridae),水生双 RNA 病毒属 (*Aquabirnavirus*)的一员,病毒粒子是无囊膜的单层二十面体对称结构,直径约 55~75 nm,基因组为双段的 dsRNA<sup>[177]</sup>。



图 1-4 IPNV 病毒结构(来源 ViralZone)

Fig. 1-4 Viral structure of IPNV (From ViralZone)

#### 1.3.2.2 理化特性

IPNV 病毒粒子的离心系数为 435 S,其在氯化铯中的浮力密度和空壳的密度分别为 1.33 g/ml 和 1.29 g/ml。该粒子的分子质量为 55×10<sup>6</sup> Da,外壳蛋白总质量约为 50.2×10<sup>6</sup> Da, 相差的 4.8×10<sup>6</sup> Da 是病毒的 RNA 组分,该组分构成了该粒子重量的 8.7%<sup>[162, 165]</sup>。

**IPNV** 具有耐酸、耐醚、耐氯仿和耐甘油的特性,并且相对耐热。**IPNV** 在 4℃条件 下能稳定储存 4 个月,但为了长期保存,应该在-20℃或更低的温度下保存。到目前为止, 它是在 0~40%盐度下最稳定的鱼类病毒,并且在存在脱脂奶粉、乳糖或乳清蛋白水解物 的情况下能够进行冷冻干燥<sup>[163]</sup>。**IPNV** 在 4℃下经过过滤处理的水中的感染力非常稳定, 并且至少可以持续 5~6 个月。在 10℃的自来水中,感染力也能持续 7 个月以上,但是在 未经处理的自来水中,在 10℃下 14 d 后即无法检测到病毒。在灭菌的河口水中,**IPNV** 感染力持续的时间是自然污染水中的 4 倍<sup>[162,178]</sup>。**IPNV** 在干燥条件下能稳定保存 4 周、 在 10<sup>6</sup> 的 γ 射线辐射下感染力只有 10%,在 254 nm 紫外线照射下稳定耐受 5 min。**IPNV** 的感染力会被多种消毒剂降低,如氯、碘、臭氧和福尔马林。在 pH 2.5 的条件下不能够 将 IPNV 完全灭活,但 pH 在 12.5 时能够完全灭活病毒。在 pH 3.0 到 9.0 的范围内,60℃ 的热灭活速率是双相的,在 pH 3.0 时前 30 min 的灭活速率最快。在生理范围内和 pH 9.0 时, IPNV 的感染力可持续数小时<sup>[162, 179]</sup>。

#### 1.3.2.3 病毒增殖

IPNV 和水生双 RNA 病毒通常能够在多种已建立的鱼类细胞系中进行复制,例如 BF-2、CHSE-214、EPC 和 RTG-2。该病毒在细胞质中复制一个周期需要 16~20 h,在易 感染的细胞中培养会产生特征性的 CPE,并且产生的病毒感染滴度为 10<sup>6</sup>~10<sup>9</sup> pfu/mL。 然而有研究表明,细胞系感染 IPNV 后也可以不出现 CPE,推测可能是由于在病毒滴度 较高的细胞培养中通常会出现缺陷干扰颗粒<sup>[165]</sup>。

#### 1.3.2.4 病毒致病性

对 IPNV 的 VP2 基因进行分析显示,目前世界范围内的 IPNV 已经进化为 7 个基因型,分别为 I-VII 型;血清学分析表明 IPNV 分为 10 个血清型,分别为 A1-A9 和 B1<sup>[132]</sup>。 实验室研究结果表明,鲑鳟鱼苗在感染 IPNV 病毒后约有 2 d 的潜伏期,但是在此期间可 以检测到水中的 IPNV 病毒。在感染病毒后的 2~4 d, 鲑鳟鱼苗出现明显的临床感染症状。 然而, IPNV 的致病性取决于几个因素,如宿主年龄、水温和鱼的种类。IPN 导致的死亡 率在年龄低于 6 个月的幼鱼中更高,成鱼在感染 IPNV 后通常没有明显的症状。在鲑鱼 养殖中,从开始进食的鱼苗、洄游过程中的稚鱼和在海水转移后的前几个月中均能造成 死亡,在海水转移后的前 3 个月中,死亡率最高可达 80%<sup>[165,180]</sup>。

#### 1.3.3 IPNV 分子生物学特性

#### 1.3.3.1 IPNV 基因组特征及其编码产物

IPNV 基因组占病毒总质量的 8.7%,由两个双链 RNA 组成,其中 A 段约为 2.5×10<sup>6</sup> Da, B 段约为 2.3×10<sup>6</sup> Da。病毒基因组中 G-C 含量为 54%,变性温度为 89℃<sup>[181]</sup>。病毒 RNA 与一个分子量为 10<sup>5</sup> kDa 的多肽 (VPg) 共价结合在一起。这个 VPg 多肽与 VP1 多肽 (分 子量为 94 kDa) 是相同的,在病毒颗粒中,VP1 多肽以自由形式和与基因组连接形式同 时存在。每个 RNA 链的 5' 端与 VPg 中的一个丝氨酸残基通过磷酸二酯键连接在一起<sup>[182]</sup>。 基因组 A 段包含一个大的开放阅读框 (ORF),大小约为 2962~3104 bp,编码一个 106 kDa 的多肽,它在翻译过程中被切割成三个多肽: pVP2 (主要衣壳蛋白 VP2 的前体)、VP3 和 VP4<sup>[183]</sup>。在病毒成熟期间,pVP2 蛋白进一步被切割成 VP2。基因组 A 还编码一个约 为 17 kDa 的富含精氨酸的 VP5 蛋白。基因组 B 段的 ORF 大小约为 2731~2784 bp,编码 内部多肽 VP1 蛋白,大小约为 94 kDa。这个蛋白质是病毒双链 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp)<sup>[184]</sup>。

#### 1.3.3.2 VP1 蛋白结构与功能

VP1 蛋白由病毒基因组的 B 段所编码,蛋白大小约为 94 kDa<sup>[184]</sup>。VP1 蛋白在病毒 粒子中以两种方式存在:一种是自由的多肽形式,另一种是和病毒基因组连接的形式, 即为病毒复制相关的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶<sup>[182]</sup>。VP1 蛋白在病毒的复制过程中发挥关 键作用,既作为病毒复制必要的聚合酶,又作为引物连接病毒 A 段到 B 段的转录[185]。

#### 1.3.3.3 VP2 蛋白结构与功能

VP2蛋白是病毒的主要结构蛋白,形成了病毒的外衣壳,由病毒的A段基因组所编码,蛋白大小约为54kDa,其蛋白含量约占病毒成熟粒子的62%。研究表明,在VP2蛋白中含有高度可变的基因区域以及主要的抗原决定簇和中和表位,同时决定着宿主和细胞的相互作用,介导着病毒进入细胞。已经证实,在VP2中有两个可变和一个保守的中和表位。因此,VP2成为了IPNV病毒检测和疫苗研发的主要靶点蛋白<sup>[99,186-187]</sup>。

#### 1.3.3.4 VP3 蛋白结构与功能

VP3 是病毒的第二个主要结构蛋白,形成了病毒的内衣壳,由病毒的 A 段基因组所 编码,蛋白大小约为 32 kDa,其蛋白含量约占病毒成熟粒子的 28%。已有研究发现,针 对 VP3 蛋白的单克隆抗体能够在病毒表面检测到 VP3 蛋白的存在。虽然目前针对 VP3 蛋白的研究较少,但已经发现 VP3 蛋白同样含有部分抗原表位,并且同样能够引发机体 的免疫反应。目前针对 VP3 蛋白作为研究靶点,同样开展了大量的疫苗研究,结果发现 VP3 蛋白与 VP2 蛋白同样具有良好的免疫原性<sup>[183,188-189]</sup>。

#### 1.3.3.5 VP4 蛋白结构与功能

VP4 是病毒的非结构蛋白,由病毒的 A 段基因组所编码,蛋白大小约为 21 kDa。在病毒的复制过程中能够催化其他结构蛋白的形成,具有相应的酶活性,同时促进 VP2 蛋白的成熟及其与病毒粒子上多肽的连接<sup>[190]</sup>。

#### 1.3.3.6 VP5 蛋白结构与功能

VP5 是病毒的非结构蛋白,由病毒的 A 段基因组所编码,蛋白大小约为 15 kDa。天然的 IPNV 病毒中并不存在 VP5 蛋白,该蛋白仅存在于被病毒感染的细胞中。已有研究发现,VP5 蛋白对病毒的复制至关重要,但在病毒粒子的成熟过程中该蛋白被直接剔除<sup>[191-192]</sup>。

#### 1.3.4 IPN 疫苗研究进展

IPN 的暴发给世界范围内的鲑鳟鱼养殖带来了巨大的经济损失,疫苗免疫被认为是目前预防 IPN 最为有效的手段。第一个获批生产的 IPN 疫苗是由挪威生产的多价灭活疫苗,之后他们研发的重组亚单位疫苗也获批了生产许可<sup>[193]</sup>。随着科技的发展,目前针对IPN 的疫苗研究主要集中在以下几个方面:灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗和 DNA疫苗等。最初的研究发现,将编码 IPNV 基因组 A 段的基因在大肠杆菌中进行表达后的细菌裂解液能够保护虹鳟抵抗 IPNV 的感染<sup>[194]</sup>。之后研究人员将 VP2 基因在酿酒酵母中进行表达,对虹鳟进行了注射和口服免疫,结果发现两种方法对虹鳟均起到了保护作用<sup>[195]</sup>。T Kuro 等则是将 VP2 蛋白与信号肽、转运蛋白以及受体结合蛋白进行融合表达,该融合蛋白能够穿透细胞膜并有效精准的定位到效应细胞,激发鱼体的抗病毒免疫反应。de Las 以及 Ballesteros 等则是利用不同的包裹技术,将表达 VP2 蛋白的质粒进行包裹后对虹鳟进行了口服免疫,结果显示对虹鳟的保护效果达 80%以上<sup>[196-197]</sup>。2012 年有学者

研究发现, IPNV 的未成熟病毒颗粒能够刺激宿主产生抗病毒免疫反应,并且将其作为减 毒疫苗来进行开发<sup>[198]</sup>。赵丽丽等人则是将病毒的 VP2 蛋白和 VP3 蛋白编码基因插入到 乳酸菌载体中,构建了重组干酪乳杆菌表达系统,对虹鳟进行灌胃研究发现,该系统诱 导机体产生了良好的免疫反应<sup>[199]</sup>。Xu 等则是研发了一种同时携带 IHNV G 基因和 IPNV VP2、VP3 基因的 DNA 疫苗,通过免疫发现该疫苗能够同时保护虹鳟抵抗 IHNV 和 IPNV 的感染<sup>[99]</sup>。

目前我国仍然没有针对 IPN 的商业化疫苗,虽然国际上批准了部分针对 IPN 的商业 化疫苗,但是由于进口受限以及生物安全等问题,目前我国仍然没有商业化的疫苗,更 没有同时针对 IHN 和 IPN 的二联疫苗。因此,本研究将针对上述两种病毒开展二联疫苗 的研究,以期解决严重威胁我国鲑鳟鱼养殖的病害问题。

# 2 IHNV 系统进化、转录组分析及抗体制备

#### 2.1 研究材料

#### 2.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物

IHNV 毒株 Sn1203(IHNV-Sn1203, GenBank no: KC660147.1)分离自中国东部某虹 鳟养殖场,经本实验室分离并保存。IHNV 毒株 Blk94(IHNV-Blk94, GenBank No: DQ164100)由美国地质调查局西部渔业研究中心的 Gael Kurath 教授和中国深圳出入境 检验检疫局刘荭研究员惠赠。鲤鱼上皮瘤细胞系(EPC,ATCC 保藏号为 CRL-2872)、虹 鳟性腺细胞系(RTG-2,ATCC 保藏号为 CCL-55)由中国水产科学研究院长江水产研究 所曾令兵研究员惠赠。新西兰大白兔购自黑龙江省医学实验动物供应基地。大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自宝日医生物技术有限公司,Rosetta 感受态细胞购自北京索莱宝科 技有限公司。表达载体 pET-27b 为本实验室保存。

#### 2.1.2 试剂和细胞培养材料

KOD-FX-Neo 高保真酶(货号 KFX-201)购自 TOYOBO 公司; PCR 纯化试剂盒 (D2000-02)购自 Omega 公司。SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi 试剂 盒(货号 12574030)、TRIzol LS 试剂(货号 10296028)购自英潍捷基(上海)贸易有限 公司。*Bam*H I 核酸内切酶(货号 R3136S)、*Nco* I 核酸内切酶(货号 R3193S)购自纽英 伦生物技术(北京)有限公司。DL15000 DNA Marker(货号 3582A)、DL2000 DNA Marker (货号 3427A)、Stellar 化学转化感受态细胞(货号 636763)、SMARTer RACE 5'/3' 试剂 盒(货号 634859)均购自宝日医生物技术有限公司。MEM 培养基(货号 C11095500BT)、青霉素-链霉素(双抗,货号 15070063)、胎牛血清(FBS,货号 10100147)购自 Gibco 公司。T75 细胞培养瓶(货号 430641)、T25 细胞培养瓶(货号 430639)、5 mL 一次性移 液管(货号 4487)、10 mL 一次性移液管(货号 4488)、6 孔细胞培养板(货号 3516)、96 孔细胞培养板(货号 3599)购自康宁公司。HRP标记山羊抗兔 IgG 抗体(货号 ab6721)、Cy3标记山羊抗兔 IgG 抗体(货号 ab6939)购自 Abcam 公司。单组分 TMB 显色液(货号 TMB-S-004)购自湖州英创生物科技有限公司。QuickAntibody-Rabbit8W(货号 KX0210045)购自博奥龙公司。

#### 2.1.3 主要仪器设备

低温冷冻离心机(3K15, Sigma 公司), PCR 扩增仪(SpeedCycler 2, analytikjena 公司), 倒置荧光显微镜(Dmi8, Lecia 公司), 超微量紫外分光光度仪(Scandrop, analytikjena 公司), 水浴锅(KHW-D-2, 北京市永光明医疗仪器有限公司), 生物安全柜(BSC-1360IIA2, 北京东联哈尔仪器制造有限公司), -80℃冰箱(DW-HL668, 中科美菱公司), 15℃ CO<sub>2</sub>培养箱(DH-160D, SANTN 公司)。

# 2.2 研究方法

## 2.2.1 细胞培养和病毒增殖

EPC 细胞采用含有 10% FBS 和 1% 双抗的 MEM 培养基,在 25℃、1% CO<sub>2</sub> 条件下进 行传代培养。RTG-2 细胞采用含有 10% FBS 和 1% 双抗的 MEM 培养基,在 18℃、1% CO<sub>2</sub> 条件下进行传代培养。在病毒增殖过程中,将测定滴度后的 IHNV 病毒进行稀释,以病 毒感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)为 10<sup>-4</sup>将 IHNV 病毒接种至 EPC 或 RTG-2 单层细胞中,待接种后的第 72 h 收集感染后的细胞,于-80℃反复冻融二次后保存。

# 2.2.2 病毒 RNA 的提取

将反复冻融二次后的 IHNV 病毒扩培液从-80℃中取出,置于冰上融化。按照 TRIzol LS 试剂提供的方法对病毒 RNA 进行提取,具体步骤如下:(1)将 750 µL TRIzol LS 试剂和 250 µL 病毒液加入到无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,充分混匀后室温裂解病毒 5 min; (2)向裂解后的病毒液中加入 200 µL 预冷的氯仿溶液,充分混匀 15 s;(3)室温放置 10 min 后,采用 12000 g 的转速,4℃离心裂解液 15 min;(4)将离心后的上清液转移至 另一个无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,同时加入 500 µL 预冷的异丙醇,充分混匀;(5)室温放置 15 min 后,采用 12000 g 的转速,4℃离心 10 min;(6)离心结束后弃掉上清液,加入 75%的无水乙醇洗涤 RNA 后,采用 12000 g 的转速,4℃离心 10 min;(7)离心结束后弃掉上清液,待离心管中乙醇挥发后,加入 60 µL 无 RNA 酶的水溶解 RNA。

# 2.2.3 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列克隆

# 2.2.3.1 全基因组序列克隆引物设计及合成

利用 Primer Premier 5 软件,在 IHNV-HLJ09 毒株(Accession number JX649101)全 基因组序列的基础上,设计覆盖全基因组序列的重叠引物,用于 IHNV-Sn1203 病毒株全 基因组序列克隆。所有引物均由吉林省库美生物科技有限公司合成,引物序列如表 2-1 所示。

# 2.2.3.2 全基因组序列克隆

在克隆 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列的过程中,将病毒全长序列分为 5 段进行克 隆,分别为 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4 和 IHN5。以 2.2.2 中提取的病毒 RNA 为模板,表 2-1 中的序列为引物,并按照 SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi 试剂盒 的方法,进行 IHNV 基因组 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4 和 IHN5 片段的克隆。PCR 反应 液组成为: 25 µL 的 2×Reaction Mix, 5 µL IHNV 病毒 RNA, 1 µL 的上游引物, 1 µL 的 下游引物, 1 µL 的 Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶, 17 µL 的去离子水。反应条件为: 50℃反转录 30 min, 94℃预变性 2 min, 94℃变性 15 s、53℃退火 30 s、72℃延伸 124 s、 25 个循环, 72℃终延伸 10 min。为了保证病毒基因组末端序列的准确性,研究中采用 SMARTer RACE 5'/3' 试剂盒对病毒基因组的 5' 和 3' 末端序列进行克隆。

#### 表 2-1 IHNV-Sn1203 基因组克隆引物

Table 2-1 Prin	her sequence used in	n IHNV-Sn1203	genomic sequence clo	one
			<i>i i i</i>	

	Nucleotide	Drimer sequence				
Primer name	position	rimer sequence				
	1.0	AAGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGGTATAA				
IHNI F EXI	1-8	AA				
IIINI1 E	1.02	CGACTCACTATAGGGGTATAAAAAAGTAACTTGA				
IHNI F	1-23	СТА				
IHN1 R	2019-2050	GGCGCCTTGGGATCCTGCGGTGTCTGGGGTGA				
IHN2 F	2030-2058	ACCGCAGGATCCCAAGAGGTGAAGAACAT				
IHN2 R	4011-4038	GGCGCCTAGACGTCATTTATTCCGGGAT				
IHN3 F	4018-4045	AATAAATGACGTCTACGCTATGCACAAA				
IHN3 R	7011-7039	GGCGCCATGACGCGTTCTACCCTAAGTAA				
IHN4 F	7015-7041	TTAGGGTAGAACGCGTCATGCAGAAAA				
IHN4 R	9132-9159	GGCGCCATTCCATGGGCATTGAGTAGAA				
IHN5 F	9135-9163	TACTCAATGCCCATGGAATCACAACGGCT				
IIINI5 D	11100 11121	TGGGACCATGCCGGCCGTATAAAAAAGTAACAGA				
ITING K	11108-11151	GAGAT				
IIINIS D E	11105 11121	GGCGCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCG				
INNO K EXI	11123-11131	TATAAA				

# 2.2.4 IHNV-Sn1203 全基因组序列及系统进化分析

将 2.2.3 中克隆所得的涵盖 IHNV-Sn1203 全基因序列的 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4 和 IHN5 片段进行测序,每个片段分别选择 3 个克隆送往吉林省库美生物科技有限公司 进行测序,测序结果利用 SeqBuilder 软件进行拼接。进行 IHNV-Sn1203 毒株的系统进化 分析时采用 Lasergene 和 MEGA 5.0 软件,通过 ClustalW 多重比对法以及邻位相连法,对 病毒的全基因组序列和系统发育进行分析,构建系统进化树。

#### 2.2.5 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分析

用 IHNV-Sn1203 毒株和 IHNV-Blk94 毒株分别感染 RTG-2 细胞(MOI=1.0),15℃孵育 1 h 后,用 PBS 清洗 3 次后更换为含 2% FBS 的新鲜培养基。在 15℃培养 24 h 后收集 细胞提取总 RNA,利用 DNase I 消化处理后,使用 Agilent 2100 生物分析仪测定 RNA 完整性。选择 28S/18S rRNA 比值大于 1.9 且 RNA 完整性≥8 的 RNA 样本进行文库构建。 从 1 µg 总 RNA 中分离并片段化 mRNA,然后合成双链 cDNA。对 3'端进行修复和腺苷 化后进行连接,最后进行反向 PCR 扩增。使用 Agilent 2100 生物分析仪分析最终测序文 库,并使用 Illumina 文库定量试剂盒进行 qPCR 定量,对文库的有效浓度进行准确定量,

质量合格的文库用 Illumina 平台进行测序。通过使用 SOAPnuke (v1.5.2) 去除接头序列 和低质量序列来过滤 Raw Reads,以获得高质量的 Clean Reads。然后使用 HISAT2 将 Clean Reads 与 Oncorhynchus mykiss 基因组序列(genoscope.cns.fr/trout/data/)进行比对。通过 StringTie 将比对到的结果进行组装和量化,其中高质量的数据进行下游数据分析。利用 NR、Swiss-Prot、COG、KOG、KEGG、GO、Pfam、eggNOG 和 TrEMBL 数据库对基因 进行注释。使用 DESeq2 软件进行显著差异表达基因(DEG)分析,筛选标准为: fold-change $\geq 2$ , false discovery rate (FDR) < 0.01.

为了验证 RNA-seq 分析的结果,以转录组测序用的 RNA 进行 RT-qPCR 验证。首先 使用带有 gDNA Eraser 的 PrimeScript RT Reagent Kit 将总 RNA 转录为 cDNA, 然后使用 TB Green Premix Ex Taq II Kit 进行 qPCR 检测。RT-qPCR 所用引物如表 2-2 所示, 内参基 因采用 β-actin,不同基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

Table 2-2 Primer sequences used for RT-qPCR						
Primer	Primer name	Primer sequence				
1	TRPM2 F	AGGGTCGGTTGCTTTAGTG				
2	TRPM2 R	GGGTTCATTGGGTTCACTT				
3	STING F	GCCTGGCTTGGTCTTTCC				
4	STING R	GAGCGATGTTGGCGTTGA				
5	ITGB7 F	GCTTCTACGATGGCACTAAAT				
6	ITGB7 R	TCCTCGGTGACAGCAAAG				
7	IRL F	ACCGTGGTCACAGACTTCC				
8	IRL R	CGATTCTCACCGCTCCTCT				
9	CACNB2 F	TCCTACACCAGCCGTCCAT				
10	CACNB2 R	CCGATTTCACAGCCTTCCTT				
11	BMP2L F	TTCTGGTGGTTACTACTCTGCC				
12	BMP2L R	TTCTGCTCCCGCTGTCTT				
13	MLF1 F	ATGCGGAGTTTATCAGAGCC				
14	MLF1 R	TCCTCACGCCGAACATCA				
15	mTOR F	ATGGTTTGCTCGCTGGTC				
16	mTOR R	GCTCCTGCTGGTGTTGCT				
17	RIPK2 F	CTGATGCAATGACAAGGGCTAC				
18	RIPK2 R	TGCTGGGACTGGTGGAAG				
19	IRF1 F	GGCTGGAGGATAAGATTGA				
20	IRF1 R	GTGTAGTCTCGCCTTGTATGA				
21	Gadd45α F	GATGACGAGGATGTAAAGGAC				

表 2-2 RT-qPCR 反应中所用引物

22	Gadd45α R	CAGGGAGGTTAATGATGGGT
23	PLK2 F	AGAGTTGTCACGGATTATTACGG
24	PLK2 R	TTCCCTTTGGTGCGGTTT
25	ARMC5 F	CCAGAAGTTTACGGAGGAGG
26	ARMC5 R	CACCAAGGAAGCCAATCAA
27	PIK3R1 F	ACCCACTGACATTCAACTCG
28	PIK3R1 R	GCCTCAATAGCCGTTCTC
29	c-Myc F	TGTATGTGGAGCGGGTTC
30	c-Myc R	AGTATCAGTTATTGGGTAGGGA

# 2.2.6 IHNV 多克隆抗体的制备

## 2.2.6.1 G基因克隆引物设计及合成

根据本研究获得的 IHNV-Sn1203 毒株 G 蛋白的基因序列,利用 DNAStar 6.0(Protean) 软件对病毒 G 蛋白的抗原性、疏水性及跨膜区进行分析;根据结果,利用 Primer Premier 5 软件针对病毒 G 基因设计引物进行目的基因片段的扩增,其中上游引物 G-F 带有 *Nco* I 酶切位点,下游引物 G-R 带有 *Bam*H I 酶切位点。所有引物均由吉林省库美生物科技有限公司合成,引物序列如表 2-3 所示。

表 2-3 G 基因克隆引物

Table 2-3 Primer sequence used in G gene clone					
Primer Primer name Primer sequence					
1	G-F	CCATGGGAATTGAATTCTGTGGG			
2	G-R	GGATCCCTAGGACCGGTTTGCCAGGT			

#### 2.2.6.2 G基因克隆及表达载体构建

(1) G 基因的克隆

以 2.2.2 中提取的 IHNV-Sn1203 病毒 RNA 为模板,表 2-3 中的 G-F 和 G-R 为引物,利用 RT-PCR 的方法对病毒 G 基因进行克隆,克隆后的产物命名为 G,反应条件为: 50℃ 反转录 30 min,94℃预变性 2 min,94℃变性 15 s、53℃退火 30 s、72℃延伸 66 s、25 个循环,72℃终延伸 10 min。将扩增后的产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析,确定克隆片段大小是否正确。

(2) pET-27b 载体的酶切

利用 Nco I 和 BamH I 对实验室保存的 pET-27b 载体进行双酶切,酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pET-27b 载体, 5 µL 的 Nco I, 5 µL 的 BamH I, 去离子水补齐至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。将扩增后的产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析,确定酶切载体大小是否正确。

(3) G 基因及 pET-27b 载体的回收

向(1)和(2)中的凝胶回收产物中分别加入等体积的 XP5 溶液,充分混匀后加入 到 HiBind DNA XS 收集柱中,10000 g 离心 1 min; 离心结束后,弃掉离心液,向收集柱 中加入 300 µL 的 XP5 溶液,10000 g 离心 1 min; 离心结束后,弃掉离心液,向收集柱中 加入 700 µL 的 SPW 溶液,10000 g 离心 1 min; 离心结束后,弃掉离心液,离心柱在 15000 g 条件下空离 2 min; 将空离后的离心柱放入一个新的 1.5 mL 离心管中,在离心柱的底部 滤膜中间加入 30 µL 预热的去离子水。回收后的 PCR 产物利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度后保存于-20℃备用。

(4) G 基因片段与 pET-27b 载体的连接

将(3)中回收的G基因片段与 pET-27b 载体进行连接,根据 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒说明书进行操作,具体步骤如下:①分别计算G基因片段和 pET-27b 载体的大小, 利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒官方网站提供的计算工具 (https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion -molar-ratio-calculator),确定G基因片段和 pET-27b 载体的加入量;②在 PCR 管中分别 加入58 ng的G基因片段和142 ng的 pET-27b 载体,同时加入2 μL的 In-Fusion 酶;③ 加入去离子水将反应体系补充至 10 μL 并充分混匀;④PCR 管放置于 50℃连接 15 min 后 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

(5)转化感受态细胞及鉴定

将(4)连接后的产物转化大肠杆菌感受态细胞,具体操作如下:①于-80℃冰箱中 取出大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,置于冰上融化 5 min;②待感受态细胞完全融化后,取 2 µL 连接产物加入到 DH5α 感受态细胞中,利用移液器混匀 3~5 次后,冰上放置 30 min; ③置于 42℃水浴锅中孵育 1 min;④冰上放置 2 min 后,加入 37℃预热的 LB 液体培养基 700 µL;⑤置于 37℃摇床中,120 rpm/min 培养 1 h;⑥将感受态细胞于 500 g 离心 2 min 后,弃掉 600 µL 上清液,利用剩余培养液将细胞吹打混匀后,涂布于含有卡那霉素的 LB 固体平板培养基上,37℃倒置培养 12 h。

利用 PCR 的方法,对转化后的菌落进行鉴定,具体操作如下:①利用 10 µL 无菌枪 头挑取 LB 固体平板上的单菌落,分别置于含有卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,于 37℃摇床中,120 rpm/min 振荡培养 12 h;②吸取培养后的菌液进行菌液 PCR 鉴定,PCR 反应体系为 12.5 µL 的 Premix Taq,2 µL 的菌液,1 µL 的 G-F,1 µL 的 G-R,8.5 µL 的去 离子水。③进行 PCR 反应,具体反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s、53℃ 退火 30 s、72℃延伸 124 s、35 个循环,72℃终延伸 10 min。④取 5 µL 扩增产物进行 1% 凝胶电泳,紫外条件下观察产物大小。⑤鉴定正确的菌液进行扩大培养后送往吉林省库 美生物科技有限公司进行测序,测序正确的质粒命名为 pET-27b-G。

# 2.2.6.3 G蛋白的表达及纯化

(1) G 蛋白的表达

将 2.2.6.2 中的 pET-27b-G 质粒转化大肠杆菌 Rosetta 感受态,具体转化步骤同 2.2.6.2

中(5)所示,转化后挑取单菌落,置于含有卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,于 37℃ 摇床中,120 rpm/min 振荡培养 12 h。将培养液以 1%的比例接种到含卡那霉素的 500 mL LB 液体培养基中进行培养,待菌液 OD600 吸光值达到 0.3~0.4 时,加入终浓度为 0.25 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 G 蛋白的表达。分别于加入 IPTG 后的 0 h~6 h 取菌液样品进行蛋白表达分析,确定蛋白表达量的变化情况。

(2) G 蛋白的纯化

将(1)中经 IPTG 诱导表达后的菌体进行离心,加入终浓度为1 mg/mL 的溶菌酶裂 解菌体 60 min 后,于冰上进行超声破碎 5 min,间隔 5 min 后继续超声破碎 5 min,如此 重复 2 次;破碎后的菌体于 10000 g 离心 5 min,弃掉上清液后加入含有 2 mol/L 尿素的 复性液洗涤沉淀 3 次;洗涤后加入含有 8 mol/L 尿素的变性液吹散并溶解沉淀,冰上变性 4 h 后,逐滴加入 20 倍体积的复性液,于 4℃条件下复性 12 h 后置于 pH 8.0 的 PBS 中进 行透析;透析 24 h 后,10000 g 离心 5 min,所得上清即为纯化后的 G 蛋白。

#### 2.2.6.4 G蛋白多克隆抗体的制备

将 2.2.6.3 中纯化获得的 G 蛋白用 PBS 进行稀释,终浓度为 0.5 mg/mL,将稀释后的 G 蛋白与 QuickAntibody-Rabbit8W 试剂等体积混合,其中 G 蛋白加入量为 100 µL(50 µg), QuickAntibody-Rabbit8W 试剂加入量为 100 µL;将二者快速混匀后,后腿小腿肌肉注射 免疫兔子,每只免疫剂量为 200 µL;于初次免疫后的第 21 天和 42 天,再次免疫兔子, 免疫方法和免疫剂量相同;与初次免疫后的第 56 天心脏取血,于 37℃条件下静置 1 h 后, 4℃静置过夜。待血清析出后分装于离心管中,于-80℃冰箱保存备用。

#### 2.2.6.5 G蛋白多克隆抗体效价的测定

用浓度为 50 mmol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲溶液稀释 2.2.6.3 中纯化获得的 G 蛋白, 利用稀释后的蛋白包被 ELISA 板,使每孔中的蛋白量为 100 ng,4℃条件下包被 12 h; 弃掉包被液后,加入 PBST 洗涤 ELISA 板 3 次,每次 5 min;加入终浓度为 5%的脱脂奶 粉于 37℃条件下封闭 ELISA 板 1 h 后,加入 PBST 洗涤 ELISA 板 3 次,每次 5 min;将 2.2.6.4 中制备的多克隆抗体进行稀释,稀释后的抗体加入到 ELISA 板中,每孔加入量为 100 µL,于 37℃条件下孵育 1 h 后,加入 PBST 洗涤 ELISA 板 3 次,每次 5 min;将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体按 1:10000 稀释后加入到 ELISA 板中,每孔加入量为 100 µL,于 37℃条件下孵育 1 h 后,加入 PBST 洗涤 ELISA 板 3 次,每次 5 min;将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体按 1:10000 稀释后加入到 ELISA 板中,每孔加入量为 100 µL,于 37℃条件下孵育 1 h 后,加入 PBST 洗涤 ELISA 板 3 次,每次 5 min;加入单组分 TMB 显色液,每孔加入量为 100 µL,显色 5 min;加入浓度为 2 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,每 孔加入量为 50 µL;利用酶标仪对 450 nm 波长下样品的吸光度(OD<sub>450</sub>)进行检测。当阳 性孔 OD<sub>450</sub>/阴性孔 OD<sub>450</sub>>2.1 时的最大稀释倍数即为抗体的效价。

#### 2.2.6.6 多克隆抗体的间接免疫荧光测定

具体操作步骤如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,25℃、1% CO2 条件下培养 12 h 后,接种 IHNV 病毒;(2)待 15℃、1% CO2 条件下感染 1 h 后,弃掉病毒液,更换为新鲜培养基;(3)培养 24 h 后,弃掉培养基,利用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,加入 4%的多聚甲醛室温固定细胞 30 min;(4)弃掉多聚甲醛,利用 PBS 溶液洗涤细胞 3

次,加入 0.5% (v/v) Triton X-100 室温处理 30 min; (5) 弃掉 Triton X-100,利用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,加入制备的抗体,37℃孵育 1 h; (6)利用 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,加入 Cy3 标记的羊抗兔二抗,37℃孵育 1 h; (7) PBS 溶液洗涤细胞 3 次,利用荧光显微镜对病毒感染后的细胞进行拍照分析。

## 2.3 研究结果

#### 2.3.1 IHNV-Sn1203 毒株同源性和系统发育分析

#### 2.3.1.1 全基因组进化分析

为了确定 IHNV-Sn1203 毒株的进化关系,首先利用其他鱼类弹状病毒的全基因组序 列对其进行了系统进化关系分析,结果发现牙鲆弹状病毒(Hirame rhabdovirus, HIRRV) 与 IHNV 进化关系最近,其次为乌鳢弹状病毒(Snakehead rhabdovirus, SHRV)、病毒性 出血性败血症病毒(Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)、鲤春病毒血症病毒(Spring viraemia of carp virus, SVCV)。所有 IHNV 毒株聚为一簇,其中 IHNV-Sn1203 毒株与中国 分离株 HLJ-09、BJSY、Ch20101008 亲缘关系更近,而美国分离株 220-90、WRAC 和欧 洲分离株 lambda ZAPII 亲缘关系更近(如图 2-1 所示)。对 IHNV-Sn1203 全基因组核苷 酸同源性进行分析发现,其与中国分离株 HLJ-09、BJSY、Ch20101008 核苷酸同源性分 别为 99.76%、99.52%和 99.67%;与美国分离株 WRAC 和 220-90 的核苷酸同源性分别为 95.41%和 94.89%,与欧洲分离株 lambda ZAPII 的核苷酸同源性分别为 95.88%(如表 2-4 所示)。



图 2-1 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列系统进化分析

Fig. 2-1 Phylogenetic analysis of complete genomic sequence of IHNV-Sn1203 strain

Strains	SVCV	HIRRV	Sn1203	HLJ-09	Ch2018- 101008	BJSY	220-90	WRAC	lambda ZAPII	SHRV	VHSV
SVCV	100	38.67	40.52	40.50	40.48	40.42	40.61	40.77	40.77	38.57	38.19
HIRRV	38.67	100	70.20	70.20	70.18	70.14	70.55	70.61	70.75	53.05	55.14
Sn1203	40.52	70.20	100	99.76	99.67	99.52	94.89	95.41	95.88	53.08	54.56
HLJ-09	40.50	70.20	99.76	100	99.84	99.68	94.99	95.50	95.98	53.12	54.61
Ch2018- 101008	40.48	70.18	99.67	99.84	100	99.84	95.00	95.50	95.97	53.10	54.57
BJSY	40.42	70.14	99.52	99.68	99.84	100	94.89	95.36	95.83	53.10	54.54
220-90	40.61	70.55	94.89	94.99	95.00	94.89	100	97.20	97.57	53.35	54.80
WRAC	40.77	70.61	95.41	95.50	95.50	95.36	97.20	100	98.33	53.09	54.60
lambda ZAPII	40.77	70.75	95.88	95.98	95.97	95.83	97.57	98.33	100	53.23	54.70
SHRV	38.57	53.05	53.08	53.12	53.10	53.10	53.35	53.09	53.23	100	58.23
VHSV	38.19	55.14	54.56	54.61	54.57	54.54	54.80	54.60	54.70	58.23	100

表 2-4 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列核苷酸同源性分析(%) Table 2-4 Nucleotide homology analysis of IHNV-Sn1203 genome sequence (%)

# 2.3.1.2 IHNV-Sn1203 毒株各基因进化分析

由于 G 蛋白是 IHNV 病毒表面的主要抗原蛋白,与病毒的毒力强弱直接相关,且该 基因序列的变异系数小,研究中首先对 IHNV-Sn1203 毒株 G 基因的进化关系进行了分析。 研究中我们对 100 株已公布的 IHNV 毒株的 G 基因进行了系统进化分析,结果显示,目 前报道的 IHNV 毒株分为 J、L、M、U 和 E 5 个基因型,其中 J 基因型又分为了 J Shizuoka 和 J Nagano 两个基因亚型。目前我国分离的 HLJ-09、GS2014、Ch20101008、CJ-13、LN-12、 GS-12、XJ-13、YN-13、SD-13 与 Sn1203 株聚为一簇,都属于 J Nagano 基因亚型,其中 CJ-13 株与 Sn1203 株亲缘关系更近(如图 2-2 所示)。

为了进一步了解 IHNV-Sn1203 毒株的系统进化关系,研究中同时利用其 N、P、M、Nv和L基因建立了系统进化树。对N基因的进化分析发现,Sn1203 分离株同 Ch20101008、 HLJ-09、zyx、CJ-13 和 LQN131107 分离株聚为一簇(如图 2-3A)。对 P 基因的进化分析 发现,Sn1203 分离株同 BJSY、Ch20101008、HLJ-09 和 CJ-43 分离株聚为一簇,其中 Sn1203 分离株的 P 基因同 HLJ-09 亲缘关系最近(如图 2-3B)。对 M 和 L 基因的进化分析发现, Sn1203 分离株同 BJSY、Ch20101008、HLJ-09 分离株聚为一簇,其中 Sn1203 分离株的 M 基因与 BJSY 分离株亲缘关系最近,而 Sn1203 分离株的 L 基因与 HLJ-09 分离株亲缘 关系最近(如图 2-3C 和 D)。对 Nv 基因的进化分析发现,Sn1203 分离株同 CJ-13、HLJ-09、 BJSY 和 Ch20101008 聚为一簇,并且 Sn1203 分离株的 Nv 基因与 HLJ-09 及 Ch20101008 亲缘关系最近(如图 2-3E)。以上结果表明 Sn1203 分离株与中国分离株 Ch20101008 和 HLJ-09 的亲缘关系最为密切。







图 2-3 IHNV-Sn1203 毒株 N、P、M、Nv 和 L 基因系统进化分析

A. 为N基因系统进化分析; B. 为P基因系统进化分析; C. 为L基因系统进化分析; D.为M基因系统进化分析; E. 为Nv基因系统进化分析

Fig. 2-3 Phylogenetic analysis of IHNV-Sn1203 N  $_{\rm N}$  P  $_{\rm N}$  M  $_{\rm N}$  Nv and L gene

A. Phylogenetic analysis of N gene; B. Phylogenetic analysis of P gene; C. Phylogenetic analysis of L gene;

D. Phylogenetic analysis of M gene; E. Phylogenetic analysis of Nv gene
#### 2.3.2 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列分析

为了获得 IHNV-Sn1203 毒株的全基因组序列,本研究中将病毒基因组分为了 5 段进行克隆,克隆后的产物测序后通过拼接的方式获得了 IHNV-Sn1203 全基因组序列。结果显示,IHNV-Sn1203 基因组全长为 11131 nts,依次编码了病毒的 N 蛋白、P 蛋白、M 蛋白、G 蛋白、Nv 蛋白和 L 蛋白,编码病毒蛋白的基因均被非翻译序列(UTR)分开,基因组结构与已经发表的鱼类弹状病毒相同(如图 2-4 所示)。



图 2-4 IHNV-Sn1203 病毒株的全基因组结构及克隆策略

Fig. 2-4 Genome distribution and cloning strategy of IHNV-Sn1203 strain

N 基因的 ORF 全长为 1176 nts, 位于病毒基因组的 175~1350 nt 之间; 其中 63~174 nt 区域为 N 基因 5' 端非翻译区, 长度为 112 nts, 63~66 nt 为 N 基因转录起始序列, 1351~1430 nt 区域为 N 基因 3' 端非翻译区, 长度为 80 nts, 1415~1430 nt 为 N 基因转录 终止序列; N 基因共编码 391 aa, 蛋白质大小约为 42 kDa (表 2-5 所示)。

P 基因的 ORF 全长为 693 nts,位于病毒基因组的 1466~2158 nt 之间;其中 1433~1465 nt 区域为 P 基因 5'端非翻译区,长度为 33 nts, 1433~1436 nt 为 P 基因转录起始序列, 2159~2199 区域为 P 基因 3'端非翻译区,长度为 41 nts, 2184~2199 nt 为 P 基因转录终止序列; P 基因共编码 230 aa,蛋白质大小约为 26 kDa (表 2-5 所示)。

M 基因的 ORF 全长为 588 nts, 位于病毒基因组的 2255~2842 nt 之间; 其中 2202~2254 nt 区域为 M 基因 5'端非翻译区,长度为 53 nts,2202~2205 nt 为 M 基因转录起始序列,2843~2945 区域为 M 基因 3'端非翻译区,长度为 103 nts,2930~2945 nt 为 M 基因转录终止序列; M 基因共编码 195 aa,蛋白质大小约为 22 kDa (表 2-5 所示)。

G基因的ORF全长为1527 nts,位于病毒基因组的2948~2998 nt之间;其中2948~2998 nt 区域为G基因5'端非翻译区,长度为51 nts,4552~4567 nt为G基因转录起始序列,4526~4567 区域为G基因3'端非翻译区,长度为42 nts,2930~2945 nt为G基因转录终止序列;G基因共编码508 aa,蛋白质大小约为56 kDa(表 2-5 所示)。

Nv 基因的 ORF 全长为 336 nts, 位于病毒基因组的 4596~4931 nt 之间; 其中 4570~4595 nt 区域为 Nv 基因 5'端非翻译区, 长度为 26 nts, 4570~4573 nt 为 Nv 基因转录起始序列, 4932~4938 区域为 Nv 基因 3'端非翻译区, 长度为 7 nts, 4923~4938 nt 为 Nv 基因转录终止序列, 与 NV 基因的开放阅读框有 9 nt(4923~4931)重叠; Nv 基因共编码 111 aa, 蛋白质大小约为 13 kDa (表 2-5 所示)。

L 基因的 ORF 全长为 5961 nts,位于病毒基因组的 5016~10976 nt 之间;其中 4941~5015 nt 区域为L基因 5'端非翻译区,长度为 75 nts, 4941~4944 nt 为L基因转录

起始序列,10977~11030 区域为 L 基因 3' 端非翻译区,长度为 54 nts,11015~11030 nt 为 L 基因转录终止序列; L 基因共编码 1986 aa,蛋白质大小约为 225 kDa (如表 2-5 所示)。

Gana Star		tar End	Total	5'I ITD	OPE		Protein	MW										
Gene	Stal	Ellu	length (nt)	JUIK	UKF	JUIK	Size (aa)	(kDa)										
Leader	1	60	60															
NT	(2)	1 4 9 9	1368	63-174	175-1350	1351-1430	391	42.36										
IN	63	1430		(112)	(1176)	(80)												
D	1 4 2 2	2100	7.7	1433-1465	1466-2158	2159-2199	230	25.99										
Р	1433	2199	99 767	(33)	(693)	(41)												
N	2202	2 2945		<b>a</b>	<b>2</b> 045	0045	2045	<b>2</b> 04 <b>7</b>	<b>2</b> 04 <b>7</b>	<b>2</b> 04 <b>7</b>			744	2202-2254	2255-2842	2843-2945	105	21.06
М	M 2202		/44	(53)	(588)	(103)	195	21.86										
G	C 2048 4	4567	4567	4567	4567	1 (20)	2948-2998	2999-4525	4526-4567	500	56.07							
G	2948					4567	4567	1620	(51)	(1527)	(42)	508	56.37					
	4570	4570 4938	2.60	4570-4595	4596-4931	4932-4938	111	10.00										
NV	4570		4938 369	(26)	(336)	(7)		13.30										
L 4	40.41	4941 11030	11020 6000	4941-5015	5016-10976	10977-11030	1007	224 72										
	4941		6090	(75)	(5961)	(54)	1986	224.73										
Trailer	11033	11131	99															

表 2-5 IHNV-Sn1203 毒株的基因组特征和蛋白预测 Table 2-5 Genomic characteristics and protein prediction of IHNV-Sn1203

与其他弹状病毒相同, IHNV-Sn1203 各基因之间都含有保守的 UTR 序列,包括基因 终止序列(Gene end, GE)、基因起始序列(Gene star, GS)和基因间序列(Intergenic regions, IG)。这些通常按照 GE-IG-GS 的顺序排列,其中 GE 序列通常由[UCUA/GUCU<sup>7</sup>]组成,并通过 U 序列重复复制的方式给 mRNA 加上 poly (A)尾巴。在[UCUA/GUCU<sup>7</sup>]序列后为 GC 或 AC 组成的非转录的基因间二核苷酸序列 (IG),以及 CGUG 组成的转录起始信号 (GS)(图 2-5A 所示)。通过对 IHNV-Sn1203 全基因组的基因间连接区分析发现,6 个 基因间连接区的长度均不相同,分别为 115 nts、96 nts、156 nts、70 nts 和 84 nts,其中 Nv 基因的终止密码子与其 GE 序列发生重叠,这种序列重叠方式并未在其他病毒中报道,并且其具体的作用机制也并未阐明。对 IHNV-Sn1203 基因组的末端序列分析发现,其 3'端的 Leader 序列长度为 60 nts, 5' Trailer 序列长度为 99 nts,二者 A/T 含量分别为 68.3% 和 56.6%,并且其基因组 3' 端的前 16 个核苷酸与 5' 端核苷酸互补(图 2-5B 所示),这种基因组末端的序列互补对弹状病毒复制至关重要。

28



В

16 nt 3' Leader 3'- GUAUAAAAAAAGUAACUUGACUAUGCUCAAAAGGACACAAGGACAGAAAAAAGAAAAAGG -5' 5'- CAUAUUUUUUUCAUUGUCUCUCUAAGAGUUUUUCCAUCAAUUUUUUCCAAAAACCACCGUC -3' 5' Trailer

图 2-5 IHNV-Sn1203 基因组 UTR 序列及基因组末端序列互补性分析

A. IHNV-Sn1203 基因组 UTR 序列分析; B. IHNV-Sn1203 基因组末端序列互补性分析

Fig. 2-5 Sequence analysis of IHNV-Sn1203 UTR regions and genome terminal sequences A. UTR sequence analysis of IHNV-Sn1203 genome B. Terminal sequence complementarity analysis of IHNV-Sn1203 genome

已有研究发现,Kozak 序列在真核生物基因的翻译起始中有重要作用,特别是起始 密码前-3 位的 A/G 碱基。本研究中对 IHNV-Sn1203 全基因组序列分析发现, 病毒 6 个蛋 白编码基因的起始密码子前面均含有 Kozak 序列,同时序列的-3 位碱基为 A (如图 2-6 所示)。



图 2-6 IHNV-Sn1203 全基因组中 Kozak 序列分析 Fig. 2-6 Kozak sequence analysis of IHNV-Sn1203 genome

# 2.3.3 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分析

已有研究发现 U 基因型的 IHNV 对虹鳟的致死率为 5%~41%, 而 J 基因型的 IHNV 感染虹鳟后的死亡率最高,可达到95%以上。为了初步研究 U 基因型和 J 基因型的 IHNV 感染后引起宿主的免疫反应差异,本研究对两种基因型的病毒感染后的细胞进行了转录 组分析。其中 Sn1203 毒株为 J 基因型 IHNV (J-IHNV), Blk94 毒株为 U 基因型 IHNV (U-IHNV)。

### 2.3.3.1 转录组测序质量分析

本研究分别利用 J-IHNV、U-IHNV 和 PBS(模拟处理组)处理后获得了 9 个 cDNA 文库。质控结果显示, 9 个 cDNA 文库共获得 63,513,756~66,846,372 个 Raw reads 和 60,573,286~63,305,380 个 Clean reads, Clean reads 比例为 93.12%~95.53%。所有文库的 Q20 和 Q30 值分别超过了 99.01%和 92.23%,表明 RNA 序列数据质量较高(如表 2-6 所 示)。原始序列数据已存入 NCBI 中,登录号为 PRJNA895736。将获得的 Clean reads 与 O. mykiss 基因组序列进行比对,比对率为 88.58%~93.71%,大多数 Clean reads 比对到 O. mykiss 基因组内的外显子区域。

			5 1 5	5	1		
Sample	Dow roads	Clean reads	Ratio of clean	%≥Q20	%≥Q30	Mapped	Mapped
name	Kaw leaus		reads (%)			Reads	Rate (%)
Mock01	63,513,756	60,573,286	95.37	99.18	92.77	53,658,025	88.58
Mock02	65,146,218	61,991,656	95.16	99.06	92.23	54,945,172	88.63
Mock03	66,133,174	63,045,716	95.33	99.17	93.46	56,146,882	89.06
J24h01	66,352,932	61,787,254	93.12	99.45	93.86	57,719,634	93.42
J24h02	66,846,372	62,891,688	94.08	99.30	93.76	58,844,980	93.57
J24h03	64,442,328	61,562,360	95.53	99.45	93.87	57,690,477	93.71
U24h01	66,821,192	63,305,380	94.74	99.28	93.62	56,760,424	89.66
U24h02	66,062,330	62,792,522	95.05	99.25	93.52	56,232,737	89.56
U24h03	66,244,510	61,773,066	93.25	99.01	93.28	55,215,857	89.39

表 2-6 RNA-seq 数据质量分析 Table 2-6 Summary of the quality analysis of RNA-seq data

# 2.3.3.2 U组与J组的DEG分析

DEG 分析显示 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组有 2238 个差异表达基因,其中上调基因 1227 个,下调基因 1011 个(如图 2-7 所示)。差异表达基因聚类分析显示,U-IHNV 和 J-IHNV 感染组的宿主基因表达水平发生了显著变化(如图 2-8 所示)。GO 富集分析显示,U-IHNV 和 J-IHNV 感染后共注释了 1549 个 DEGs,富集最多的 5 个类别分别为 bingding、 cellular process、biological regulation、cell、和 cell part (如图 2-9 所示)。KEGG 分析结果显示,共有 1525 个 DEGs 得到注释,涉及到 187 条通路,富集到差异基因最多的通路 包括: lysine degradation、herpes simplex virus 1 infection、relaxin signaling pathway、primary bile acid biosynthesis、platelet activation 和 TGF-β 信号通路 (如图 2-10 所示)。



图 2-8 差异基因聚类分析

Fig. 2-8 Hierarchical clustering analysis of DEGs





#### Fig. 2-10 KEGG enrichment analysis of DEGs

### 2.3.3.3 与免疫反应相关的 DEGs 分析

2.3.3.2 中的分析结果显示,U-IHNV 和 J-IHNV 感染组之间的 DEGs 富集到 187 条 KEGG 通路中,其中 15 条通路显著富集(P<0.05)。为了进一步了解 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组之间的差异,我们从 187 条 KEGG 通路中筛选出与免疫反应相关的前 30 个差异 基因。结果表明,与 U-IHNV 感染相比,J-IHNV 感染后 TRPM2、STING、ITGB7、SLITRK4、 ANTXR1 的表达水平均显著增加;而 ANTXR2、ARRDC2、RIPK2、TXNIP、IRF1 的表达水平显著降低(如图 2-11 所示)。



图 2-11 免疫反应相关的前 30 个差异基因 Fig. 2-11 Top 30 DEGs related to immune responses

### 2.3.3.4 与细胞信号转导相关的 DEGs 分析

为了进一步了解 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组之间在信号转导方面的差异,研究中筛 选了与信号转导相关的前 40 个差异基因。结果表明,与 U-IHNV 感染组相比,J-IHNV 感染后 CK1、IRL、CACNB2、BMP2L、RNF152 的表达量均显著增加;而 DUSP4、TCF7L1A、 GADD45 α、PLK2、CCN2 的表达水平显著降低(如图 2-12 所示)。

# 2.3.3.5 与病毒性疾病相关的 DEGs 分析

研究中筛选出与疾病相关的前 30 个差异基因进行了分析,结果显示,与 U-IHNV 感染组相比, J-IHNV 感染后 PLEKHA6、TNFRSF14L、MLF1、MYOM3L、mTOR 的表达 水平显著增加;而 CDC42EP4b、ARMC5、S100-A1、PIK3R1、c-Myc 的表水平显著降低 (如图 2-13 所示)。



图 2-12 信号转导相关的前 40 个差异基因





Fig. 2-13 Top 30 DEGs related to viral diseases

# 2.3.3.6 RT-qPCR DEG 验证

为验证 RNA-seq 分析结果,采用 RT-qPCR 分析了 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组之间与 免疫应答、信号转导和病毒性疾病相关的部分差异基因。结果表明,与 U-IHNV 感染组 相比, J-IHNV 感染组中免疫应答相关基因 trpm2、sting、itgb7,信号转导相关基因 irl、

cacnb2、bmp2l,疾病相关基因 mlf1、mtor 均上调;免疫应答相关基因 ripk2、irf1,信号 转导相关基因 gadd45α、plk2,疾病相关基因 armc5、J-IHNV 组 pik3r1 和 c-myc 均下调 (图 2-14)。RT-qPCR 检测到的 DEGs 折叠变化与 RNA-seq 分析得出的变化一致,证实 了 RNA-seq 数据的可靠性。



图 2-14 免疫应答、信号转导和病毒性疾病相关差异基因的验证

A. 免疫应答相关差异基因的表达水平; B. 信号转导相关差异基因的表达水平; C. 病毒性疾病相关 差异基因的表达水平

Fig. 2-14 Validation of selected DEGs related to immune responses, cellular signal transduction, and viral

diseases

A. DEG expression levels for genes related to immune responses; B. DEG expression levels for genes related to cellular signal transduction; C. DEG expression levels for genes related to viral diseases

# 2.3.4 IHNV 多克隆抗体的制备

### 2.3.4.1 G蛋白抗原性及疏水性分析

G 蛋白是 IHNV 病毒的主要结构蛋白,在G 蛋白中含有主要的抗原决定簇和中和表位。为了制备抗 IHNV 病毒 G 蛋白的多克隆抗体,我们首先需要对 G 基因进行克隆表达。本研究中首先利用 DNAStar 6.0 (Protean) 软件对 G 蛋白的抗原表位、疏水性及跨膜区进行预测分析,结果发现 G 蛋白 1~18 位和 464~488 位疏水性较强,蛋白的 1~20 位氨基酸为 G 蛋白信号肽,460~482 位氨基酸为跨膜区,483~508 位氨基酸为膜内区 (如图 2-15 所示)。已有研究发现 IHNV 病毒 G 蛋白第 78~81 位、218~232 位、272~276 位、301~325

位、419~444 位氨基酸区域为 IHNV 病毒的主要抗原表位区,因此本研究在进行 G 基因 克隆时去掉了信号肽区、跨膜区和膜内区,选取了富含抗原表位的 78~444 位氨基酸区段 基因进行克隆及表达,并将其命名为 G。



图 2-15 G 蛋白抗原表位、疏水性及跨膜区分析

A.G蛋白跨膜区分析; B.G蛋白抗原表位和疏水性分析

Fig. 2-15 The epitope, hydrophobicity and transmembrane region analysis of G protein A. Transmembrane analysis of G protein; B. Epitope and hydrophobicity analysis of G protein

# 2.3.4.2 G蛋白的表达及纯化

以提取的 IHNV-Sn1203 病毒 RNA 为模板,表 2-3 中的 G-F 和 G-R 为引物,利用 RT-PCR 的方法对病毒 G 基因进行克隆,克隆产物连接 pET-27b 载体,双酶切和测序正 确后获得重组质粒 pET-27b-G (如图 2-16 A 和 B 所示)。将 pET-27b-G 重组质粒转化大肠 杆菌 Rosetta 感受态细胞后,加入 IPTG 诱导 G 蛋白的表达。SDS-PAGE 结果发现,加入 IPTG 诱导后,在约 40 kDa 处有特异性蛋白条带表达,并且随着诱导时间的增加而增加,并在诱导 4 h 后达到最大值 (如图 2-17 A 所示);进一步对蛋白表达形式进行分析发现,G 蛋白主要在沉淀中以包涵体的形式表达 (如图 2-17 B 所示)。因此研究中利用包涵体变性、复性的方式对表达的 G 蛋白进行纯化。将纯化后的蛋白首先进行了 SDS-PAGE 分析,结果发现经包涵体变性、复性纯化后所得 G 蛋白为单一条带 (如图 2-17 C 所示),G 蛋白纯度在 90%以上,满足后期抗体制备的要求。



图 2-16 G 蛋白表达载体的鉴定

A. G 基因的 PCR 克隆, M 为 DL2000 marker, 泳道 1 为 PCR 鉴定的阴性对照, 泳道 2 为 pET-27b-G 的 PCR 鉴定; B. pET-27b-G 重组质粒的双酶切鉴定, M 为 DL2000 marker, 泳道 1 为 pET-27b-G 重组 质粒, 泳道 2 为 pET-27b-G 重组质粒双酶切结果

Fig. 2-16 Identification of G protein expression vector

A. PCR clone of G gene, M: DL2000 marker, Lane 1: Negative control of PCR identification, Lane 2: PCR result of pET-27b-G; B. Double enzyme digestion of pET-27b-G recombinant plasmid, M: DL2000 marker, Lane 1: pET-27b-G recombinant plasmid, Lane 2: Double enzyme digestion of pET-27b-G recombinant plasmid





图 2-17 G 蛋白的表达和纯化

A. 诱导不同时间后 G 蛋白表达量分析, 泳道 1 为未诱导菌体总蛋白, 泳道 2~6 为诱导 2~6 h 后菌体 总蛋白, M 为蛋白 marker; B. 表达 G 蛋白的可溶性分析, 泳道 1 为未诱导菌体总蛋白, 泳道 2 为未 诱导菌体破碎后上清, 泳道 3 为未诱导菌体破碎后沉淀, 泳道 4 为诱导菌体总蛋白, 泳道 5 为诱导菌 体破碎后上清, 泳道 6 为诱导菌体破碎后沉淀; C. 纯化后 G 蛋白的 SDS-PAGE 分析, 泳道 1 为纯化 后 G 蛋白

#### Fig. 2-17 Expression and purification of G protein

A. Analysis of G protein expression after different induction time, Lane 1: Total protein of uninduced bacterial cells, Lane 2~6: Total bacterial protein after induced for 2~6 h, M: Protein marker; B. Soluble analysis of G protein expression, Lane 1: Total protein of uninduced cells, Lane 2: Supernatant after lysis of uninduced cells, Lane 3: Pellet after lysis of uninduced cells, Lane 4: Total protein of induced cells, Lane 5: Supernatant after lysis of induced cells, Lane 6: Pellet after lysis of induced cells; C. SDS-PAGE analysis of purified G protein, Lane 1: Purified G protein

# 2.3.4.3 IHNV 多克隆抗体效价的测定

为了确定制备的 IHNV 多克隆抗体的效价,研究中分别利用纯化的 G 蛋白和 IHNV-Sn1203 细胞培养物包被 ELISA 板,对多克隆抗体的效价进行了检测。结果显示,包被纯化后 G 蛋白的抗体最大稀释倍数为 1:80000,包被 IHNV-Sn1203 细胞培养物的抗体最大稀释倍数为 1:20000 (如图 2-18 所示)。以上结果说明,本研究所得 IHNV G 蛋白 多克隆抗体不但能够识别表达的 G 蛋白,而且能够识别细胞培养物中的病毒粒子,表明 该多克隆抗体可以用于后期的研究。



注: \*P<0.05 vs 对照组

![](_page_48_Figure_3.jpeg)

Note: \*P<0.05 vs control

# 2.3.4.4 IHNV 多克隆抗体的间接免疫荧光检测

将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,分别接种 IHNV-Sn1203 毒株和 IHNV 参考毒株,培养 24 h 后加入本研究制备的多克隆抗体作为一抗,Cy3 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗进行间接免疫荧光观察。结果显示,IHNV-Sn1203 毒株和 IHNV 参考毒株感染的细胞在加入本研究制备的多克隆抗体后均呈现出特异性的红色荧光,而加入阴性血清的细胞中并未发现任何荧光(如图 2-19 所示)。说明本研究制备的多克隆抗体能够与IHNV-Sn1203 毒株和 IHNV 参考毒株发生特异性反应,识别病毒的 G 蛋白。

![](_page_48_Picture_7.jpeg)

图 2-19 IHNV 多克隆抗体的间接免疫荧光检测

A. IHNV 参考毒株感染后加入阴性血清作为一抗的检测结果; B. IHNV 参考毒株感染后加入制备的多

克隆抗体作为一抗的检测结果; C. IHNV-Sn1203 分离株感染后加入阴性血清作为一抗的检测结果; D. IHNV-Sn1203 分离株感染后加入制备的多克隆抗体作为一抗的检测结果; 物镜 40×

Fig. 2-19 Indirect immunofluorescence detection of IHNV polyclonal antibodies A. Cells were infeted with IHNV reference strain and used negative serum as primary antibody; B. Cells were infeted with IHNV reference strain and used polyclonal antibody as primary antibody; C. Cells were infeted with IHNV-Sn1203 isolate and used negative serum as primary antibody; D. Cells were infeted with IHNV-SN1203 isolate and used polyclonal antibody as primary antibody. Objective lens 40×

# 2.4 讨论

我国首例 IHN 报道于 1985 年辽宁省某虹鳟养殖场,造成的虹鳟死亡率达 100%<sup>[15]</sup>。 自从九十年代初以来,在我国鲑鳟鱼主要养殖区均有不同程度的 IHN 发生,使鲑鳟鱼养 殖场遭到毁灭性的打击<sup>[2,17]</sup>。目前我国仍然没有针对 IHN 的商业化疫苗,虽然加拿大批 准了针对 IHN 的商业化核酸疫苗<sup>[100]</sup>,但是由于疫苗进口受限、核酸疫苗存在生物安全风 险、IHNV 存在基因型差异等问题,我们需要研发适用于我国的 IHN 疫苗。因此,首先 需要对我国分离的 IHNV 病毒进行系统进化分析,确定我国目前现行的 IHNV 病毒基因 型,为适用于我国的 IHN 疫苗研发提供基础。

### 2.4.1 IHNV-Sn1203 毒株全基因组序列及系统进化分析

为了充分了解我国目前 IHNV 病毒的系统进化情况,本研究首先对临床分离到的 IHNV 毒株及网上公布的 IHNV 毒株进行了系统进化分析。对公布的 IHNV 毒株的全基因 组进化分析结果显示,中国分离株间的亲缘关系更近,并且HLJ-09、BJSY、Ch20101008 和 Sn1203 毒株聚为一簇, 而美国分离株 220-90、WRAC 和欧洲分离株 lambda ZAPII 亲 缘关系更近。由于 G 蛋白是 IHNV 病毒表面的主要抗原蛋白,与病毒的毒力强弱直接相 关,且该基因序列的变异系数小,研究中首先对已公布毒株的G基因进化关系进行了分 析。结果显示,目前报道的 IHNV 毒株主要分为 J、L、M、U 和 E 5 个基因型,其中 J 基因型分为了 J Shizuoka 和 J Nagano 两个基因亚型,目前我国分离的 IHNV 毒株均属于 J Nagano 基因亚型(如图 2-2 所示)。研究中同样对 IHNV 的 N、P、M、Nv 和 L 基因建 立了系统进化树,结果均发现 IHNV 中国分离株聚为一簇,亲缘关系上更为密切(如图 2-3 所示)。以上结果表明,虽然 IHNV 自从首次发现以来经过了数十年的进化,但是 IHNV 在我国的进化过程中非常保守,并未演化出新的基因型,目前在我国流行的 IHNV 均为 J 基因型病毒株,是在我国进行演化而来并非从外部引入。由于我国 IHNV 毒株全部归属 于 J Nagano 基因亚型,因此 IHNV 最初在我国的来源很可能与之前的报道一致,即我国 IHNV 是从日本进口的虹鳟鱼卵或鱼苗引入<sup>[53]</sup>。虽然在韩国也报道了 J Nagano 基因亚型 的 IHNV 毒株<sup>[200]</sup>, 但是我国首次暴发 IHN 是在 1985 年, 而韩国首次暴发 IHN 是在 1991 年,因此我国 IHNV 毒株并不是从韩国引入。

课题组于 2012 年在中国东部某虹鳟养殖场分离到了 Sn1203 毒株,该毒株造成了此

养殖场虹鳟 90%以上的死亡率。对 Sn1203 毒株的系统进化分析发现,其为我国目前流行的 IHNV 毒株,并且考虑到其高致病性的背景,研究中对其进行了更为深入的分析。为 了充分了解 IHNV 病毒基因组的结构及序列差异,研究中以 Sn1203 毒株作为对象对其全 基因组序列进行了分析。对 IHNV-Sn1203 基因组的末端序列分析发现,其 3'端的 Leader 序列长度为 60 nts,与报道的 Ch20101008 毒株以及 HIIRV 毒株的序列长度相同,但是比 SHRV(55 nts)和 VHSV(53 nts)的序列长;其 5' Trailer 序列长度为 99 nts,与已报道的 IHNV-Ch20101008 毒株(98 nts)及其他弹状病毒 HIRRV(73 nts)、SHRV(42 nts)、VHSV(116 nts)长度均不同。已有研究发现弹状病毒科的病毒基因组其 3'端的 Leader 序列长度基本相同(50~60 nt),而 5' Trailer 序列长度差异较大(19~116 nt),目前猜测其 长度可能与基因功能相关。IHNV-Sn1203 毒株各基因之间都含有保守的 UTR 序列,通常 按照 GE-IG-GS 的顺序排列,其中 GE 序列通常由[UCUA/GUCU<sup>7</sup>]组成,转录终止序列中的 7 个 U 能够在转录过程中发挥腺苷酸化信号的作用,给 mRNA 加上 poly (A)尾巴。对 IHNV-Sn1203 全基因组序列分析发现,病毒 6 个蛋白编码基因的起始密码子前面均含有 Kozak 序列,同时序列的-3 位碱基为 A。

### 2.4.2 IHNV 病毒 Sn1203 毒株和 Blk94 毒株的转录组差异分析

对 IHNV 的系统进化分析发现,该病毒最初在北美是地方性的,并分化成了三个主要的基因型,即U、M和L<sup>[51]</sup>。其中U基因型的最初宿主为红鲑,历史研究和遗传近乎分析证据表明,M基因型是由U基因型通过宿主跳跃到虹鳟进化而来的<sup>[23,52]</sup>。随后,M基因型适应了虹鳟宿主进化为高毒力病毒株,进化后的M基因型病毒在20世纪80年代被引入欧洲,随后形成了欧洲虹鳟养殖中的E基因型<sup>[7]</sup>。亚洲的IHN首次暴发于1971年的日本,主要从阿拉斯加进口的红鲑鱼卵引入<sup>[201]</sup>,后来的基因分型表明该病毒属于红鲑特异性的U基因组,但随着在日本水产养殖中进化,在20世纪80年代进化为在虹鳟上具有更高毒力的J基因型<sup>[3]</sup>。因此为了了解J基因型和U基因型在感染宿主时的差异,研究中对J基因型的Sn1203毒株(J-IHNV)和U基因型的Blk94毒株(U-IHNV)进行了转录组差异分析。

DEG 分析显示 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组有 2238 个差异表达基因,其中上调基因 1227 个,下调基因 1011 个。差异表达基因聚类分析显示,U-IHNV 和 J-IHNV 感染组的 宿主基因表达水平发生了显著变化,共涉及到 187 条通路信号通路。为了进一步了解 U-IHNV 和 J-IHNV 感染组之间的差异,我们从 187 条 KEGG 通路中筛选出与免疫反应、信号转导、疾病相关的差异基因,并进行了 RT-qPCR 验证。结果显示,与 U-IHNV 感染 组相比,J-IHNV 感染组中免疫应答相关基因 trpm2、sting、itgb7,信号转导相关基因 irl、cacnb2、bmp2l,疾病相关基因 mlf1、mtor 均上调;免疫应答相关基因 ripk2、irf1,信号 转导相关基因 gadd45α、plk2,疾病相关基因 armc5、J-IHNV 组 pik3r1 和 c-myc 均下调。

### 2.4.3 IHNV 多克隆抗体的制备

抗体在病毒检测、疾病治疗、病毒生物学研究等方面发挥重要作用。由于目前市场

上没有商品化的针对 IHNV 的抗体,因此本研究制备了 IHNV 多克隆抗体,为 IHNV 的 致病机理研究以及本研究中的二联弱毒疫苗研究提供基础材料。

G 蛋白是 IHNV 病毒的主要结构蛋白,在 G 蛋白中含有主要的抗原决定簇和中和表 位,在介导病毒进入细胞、刺激机体产生抗体和宿主抗病毒免疫的过程中发挥关键作用, 同时 G 基因是 IHN 检测及疫苗研发中的首选基因<sup>[36]</sup>。由于在进行抗体制备的过程中需要 利用蛋白对实验动物进行免疫,因此本研究利用能够高效表达异源蛋白的 pET 表达系统 对 G 蛋白进行表达。由于疏水区、跨膜区在包涵体的变性、复性过程中影响蛋白质的正 确折叠,同时己有研究发现 G 蛋白第 78~81 位、218~232 位、272~276 位、301~325 位、 419~444 位氨基酸区域为 IHNV 病毒的主要抗原表位区<sup>[75]</sup>。因此本研究在进行 G 基因克 隆时去掉了信号肽区、跨膜区和膜内区,选取了富含抗原表位的 78~444 位氨基酸区段基 因进行克隆及表达。通过对包涵体形式表达的 G 蛋白进行纯化后,注射新西兰大白兔制 备了多克隆抗体。ELISA 结果显示,多克隆抗体的效价达到了 1:20000。间接免疫荧光观 察显示,多克隆抗体能够与 IHNV-Sn1203 毒株发生特异性反应,识别病毒的 G 蛋白。以 上结果说明,本研究所得 IHNV G 蛋白多克隆抗体不但能够识别表达的 G 蛋白,而且能 够识别细胞培养物中的病毒粒子,表明该多克隆抗体可以用于后期的研究。

### 2.5 本章小结

综上所述,本研究通过系统进化分析发现目前我国流行的 IHNV 均为 J 基因型毒株, 课题组于 2012 年分离的 Sn1203 毒株可作为我国流行株代表进行研究; IHNV-Sn1203 毒 株基因组结构同其他弹状病毒相同,均含有保守的 UTR 序列及 3'端 Leader 序列,但不 同弹状病毒株 5' Trailer 序列长度差异较大;转录组分析发现,J-IHNV 和 U-IHNV 感染宿 主后免疫反应、信号转导、疾病相关的基因存在显著性差异;研究中成功制备了抗 IHNV 病毒 G 蛋白的多克隆抗体,所得抗体不但能够识别表达的 G 蛋白,而且能够识别细胞培 养物中的病毒粒子,表明该多克隆抗体可以用于后期的研究。

# 3 IPNV 多克隆抗体的制备

# 3.1 研究材料

### 3.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物

IPNV 毒株 ChRtm213(IPNV-ChRtm213, GenBank No: KX234591)分离自中国云南 省某虹鳟养殖场,经本实验室分离纯化并保存。大鳞大麻哈鱼胚胎细胞(CHSE-214, ATCC 保藏号为 CRL-1681)由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠。BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。其他细胞、质粒同 2.1.1 所示。

### 3.1.2 试剂和细胞培养材料

Hind III 核酸内切酶(货号 R3104S)购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;HRP标记兔抗小鼠 IgG 抗体(货号 ab6728)、FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体(货号 ab6785)购自 Abcam 公司;QuickAntibody-Mouse5W(货号 KX0210041)购自博奥龙公司。其他试剂和材料如 2.1.2 所示。

### 3.1.3 主要仪器设备

此部分所用设备如 2.1.3 所示。

### 3.2 研究方法

### 3.2.1 细胞培养和病毒增殖

CHSE-214 细胞采用含有 10% FBS 和 1%双抗的 MEM 培养基,在 18℃、1% CO<sub>2</sub>条件下进行传代培养。在进行 IPNV 病毒的增殖时,将测定滴度后的 IPNV 病毒进行稀释,以 MOI 为 10<sup>-4</sup>将 IPNV 病毒接种至 CHSE-214 单层细胞中,待接种后的第 72 h 收集感染后的细胞,于-80℃反复冻融二次后保存。

### 3.2.2 病毒 RNA 的提取

本研究中对 IPNV-ChRtm213 病毒的 RNA 进行提取,提取步骤参照 2.2.2 所示。

### 3.2.3 IPNV 病毒多克隆抗体的制备

#### 3.2.3.1 VP2 基因克隆引物设计及合成

根据实验室分离获得的 IPNV-ChRtm213 病毒株 VP2 蛋白的基因序列,利用 DNAStar 6.0 (Protean)软件对病毒 VP2 蛋白的抗原性、疏水性及跨膜区进行分析;根据结果,利用 Primer Premier 5 软件针对病毒 VP2 基因设计引物进行目的基因片段的扩增,其中上游引物 VP2-F1 带有 BamH I 酶切位点,下游引物 VP2-R1 带有 Hind III 酶切位点。所有引物均由吉林省库美生物科技有限公司合成,引物序列如表 3-1 所示。

#### 表 3-1 VP2 基因克隆引物

Table 3-1 Primer sequence used in VP2 gene clone

Primer	Primer name	Primer sequence
1	VP2-F1	GGATCCTGGTTCCAGAGTCGGTGCC
2	VP2-R1	AAGCTTTCATGCCTTTGAGGTTGGTAGGTCACTTGTGAAGT

### 3.2.3.2 VP2 基因克隆及表达载体构建

(1) VP2 基因的克隆

以 3.2.2 中提取的 IPNV-ChRtm213 病毒 RNA 为模板,表 3-1 中的 VP2-F1 和 VP2-R1 为引物,利用 RT-PCR 的方法对病毒 VP2 基因进行克隆,克隆后的产物命名为 VP2,反应条件为: 50℃反转录 30 min,94℃预变性 2 min,94℃变性 15 s、53℃退火 30 s、72℃ 延伸 69 s、25 个循环,72℃终延伸 10 min。将扩增后的产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析,确定克隆片段大小是否正确。

(2) pET-27b 载体的酶切

利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 对实验室保存的 pET-27b 载体进行双酶切,酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pET-27b 载体, 5 µL 的 *Hind* III, 5 µL 的 *Bam*H I, 去离子水补齐至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。将扩增后的产物进行 1%琼脂糖凝 胶电泳分析,确定酶切载体大小是否正确。

(3) VP2 基因及 pET-27b 载体的回收

在进行 VP2 基因及 pET-27b 载体的回收时,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) VP2 基因片段与 pET-27b 载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 VP2 基因片段加入量为 60 ng,pET-27b 载体的加入量为 140 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 VP2-F1 和 VP2-R1。其余步骤同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pET-27b-VP2。

### 3.2.3.3 VP2 蛋白的表达及纯化

将 3.2.3.2 中的 pET-27b-VP2 质粒转化大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞进行 VP2 蛋白的 表达,具体操作步骤同 2.2.6.3 所示。由于表达的 VP2 蛋白为包涵体,具体纯化步骤同 2.2.6.3 所示。

#### 3.2.3.4 VP2 蛋白多克隆抗体的制备

将 3.2.3.3 中纯化获得的 VP2 蛋白用 PBS 进行稀释,终浓度为 0.4 mg/mL,将稀释后 的 VP2 蛋白与 QuickAntibody-Mouse5W 试剂等体积混合,其中 VP2 蛋白加入量为 50 µL

(20 μg), QuickAntibody-Mouse5W 试剂加入量为 50 μL;将二者快速混匀后,后退小腿 肌肉注射免疫小鼠,每只免疫剂量为 100 μL;于初次免疫后的第 21 天再次免疫小鼠,免 疫方法和免疫剂量相同;于初次免疫后的第 35 天取血,于 37℃条件下静置 1 h 后,4℃ 静置过夜。待血清析出后分装于离心管中,于-80℃冰箱保存备用。

### 3.2.3.5 多克隆抗体效价的测定

在进行 VP2 蛋白多克隆抗体效价测定时,利用 3.2.3.3 中纯化获得的 VP2 蛋白,包 被 ELISA 板, 3.2.3.4 中制备的多克隆抗体稀释后作为一抗,HRP 标记兔抗小鼠 IgG 抗体 作为二抗,其余操作步骤同 2.2.6.5 所示。

### 3.2.3.6 多克隆抗体的间接免疫荧光测定

在进行 VP2 蛋白多克隆抗体效价测定时,利用 IPNV-ChRtm213 病毒感染 CHSE-214 细胞,加入 3.2.3.4 中制备的多克隆抗体作为一抗,FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗, 其余操作步骤同 2.2.6.6 所示。

### 3.3 研究结果

### 3.3.1 VP2 蛋白抗原性及疏水性分析

为了制备抗 IPNV 病毒 VP2 蛋白的多克隆抗体,我们首先需要对 VP2 基因进行克隆 表达。已有研究发现,在 VP2 蛋白的 153-330 位氨基酸中富含抗原表位,同时 217-221 位氨基酸与病毒毒力密切相关。本研究中首先利用 DNAStar 6.0 (Protean)软件对 VP2 蛋白的抗原表位、疏水性及跨膜区进行预测分析,最终对 VP2 蛋白第 68-451 位氨基酸区 域进行克隆和表达 (如图 3-1 所示)。

![](_page_54_Figure_9.jpeg)

图 3-1 VP2 蛋白的抗原表位、疏水性及跨膜区分析

A. VP2 蛋白跨膜区分析; B. VP2 蛋白抗原表位和疏水性分析

Fig. 3-1 The epitope, hydrophobicity and transmembrane region analysis of VP2 protein A. Transmembrane analysis of VP2 protein; B. Epitope and hydrophobicity analysis of VP2 protein

# 3.3.2 VP2 蛋白的表达及纯化

以提取的 IPNV-ChRtm213 病毒 RNA 为模板,表 3-1 中的 VP2-F1 和 VP2-R1 为引物,利用 RT-PCR 的方法对病毒 VP2 基因进行克隆,克隆产物连接 pET-27b 载体,双酶切和 测序正确后获得重组质粒 pET-27b-VP2 (如图 3-2 所示)。将 pET-27b-G 重组质粒转化大

肠杆菌 Rosetta 感受态细胞后,加入 IPTG 诱导 VP2 蛋白的表达。SDS-PAGE 结果发现,加入 IPTG 诱导后,在约 46 kDa 处有特异性蛋白条带表达,并且随着诱导时间的增加而增加,并在诱导 6 h 后达到最大值(如图 3-3A 所示);进一步对蛋白表达形式进行分析发现,VP2 蛋白主要在沉淀中以包涵体的形式表达(如图 3-3B 所示)。因此研究中利用包涵体变性、复性的方式对表达的 VP2 蛋白进行纯化。将纯化后的蛋白首先进行了SDS-PAGE 分析,结果发现经包涵体变性、复性纯化后所得 VP2 蛋白为单一条带,纯度在 90%以上,满足后期抗体制备的要求(如图 3-3C 所示)。

![](_page_55_Figure_2.jpeg)

#### 图 3-2 VP2 蛋白表达载体的鉴定

A. VP2 基因的 PCR 克隆, M 为 DL2000 marker, 泳道 1 为 PCR 阴性对照, 泳道 2~3 为 VP2 基因的 PCR 结果; B. pET-27b-VP2 重组质粒的 PCR 和双酶切鉴定, 泳道 1 为 BamH I 酶切后的质粒, 泳道 2 为 Hind III 酶切后的质粒, 泳道 3 为 BamH I 和 Hind III 酶切后的质粒, 泳道 4 为未酶切的质粒, 泳道 5 为 PCR 鉴定的阴性对照, 泳道 6 为重组质粒的 PCR 鉴定结果, M1 为 DL15000 marker

Fig. 3-2 Identification of VP2 protein expression vector

A. PCR clone of VP2 gene, M: DL2000 marker, Lane 1: Negative control of PCR clone, Lane 2~3: PCR result of VP2 gene; B. Double enzyme digestion of pET-27b-VP2 recombinant plasmid, Lane 1: *Bam*H I digestion of recombinant plasmid, Lane 2: *Hin*d III digestion of recombinant plasmid, Lane 3: *Bam*H I and *Hin*d III digestion of recombinant plasmid, Lane 4: Recombinant plasmid without enzyme digestion, Lane 5: Negative control of PCR identification, Lane 6: PCR identification of recombinant plasmid, M1: DL15000 marker

![](_page_56_Figure_1.jpeg)

图 3-3 VP2 蛋白的表达和纯化

A. 诱导不同时间后 VP2 蛋白表达量分析, M<sub>1</sub>和 M<sub>2</sub>为蛋白 marker, 泳道 1 为未诱导菌体总蛋白, 泳 道 2 为诱导 7 h 后菌体总蛋白, 泳道 3 为诱导 6 h 后菌体总蛋白, 泳道 4 为诱导 5 h 后菌体总蛋白, 泳道 5 为诱导 4 h 后菌体总蛋白, 泳道 6 为诱导 3 h 后菌体总蛋白, 泳道 7 为诱导 2 h 后菌体总蛋白; B. 表达 VP2 蛋白的可溶性分析, M1 和 M2 为蛋白 marker, 泳道 1 为未诱导菌体总蛋白, 泳道 2 为 未诱导菌体破碎后上清, 泳道 3 为未诱导菌体破碎后沉淀, 泳道 4 为诱导菌体总蛋白, 泳道 5 为诱导 菌体破碎后上清, 泳道 6 为诱导菌体破碎后沉淀; C. 纯化后 VP2 蛋白的 SDS-PAGE 分析, M 为蛋白 marker, 泳道 1 为纯化后 VP2 蛋白

#### Fig. 3-3 Expression and purification of VP2 protein

A. Analysis of VP2 protein expression after different induction time, M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>: Protein marker, Lane 1: Total protein of uninduced bacterial cells, Lane 2: Total bacterial protein after induced for 7 h, Lane 3: Total bacterial protein after induced for 6 h, Lane 4: Total bacterial protein after induced for 5 h, Lane 5: Total bacterial protein after induced for 4 h, Lane 6: Total bacterial protein after induced for 3 h, Lane 7: Total bacterial protein after induced for 2 h; B. Soluble analysis of VP2 protein expression, Lane 1: Total protein of uninduced cells, Lane 2: Supernatant after lysis of uninduced cells, Lane 3: Pellet after lysis of uninduced cells, Lane 4: Total protein of induced cells, Lane 5: Supernatant after lysis of induced cells, Lane 6: Pellet after lysis of induced cells; C. SDS-PAGE analysis of purified VP2 protein, M: Protein marker, Lane 1: Purified VP2 protein

# 3.3.3 IPNV 多克隆抗体效价的测定

为了确定制备的 IPNV 多克隆抗体的效价,研究中分别利用纯化的 VP2 蛋白和 IPNV-ChRtm213 细胞培养物包被 ELISA 板,对多克隆抗体的效价进行了检测。结果显示,包被纯化后 VP2 蛋白的抗体最大稀释倍数为 1:40000,包被 IPNV-ChRtm213 细胞培养物的抗体最大稀释倍数为 1:20000(如图 3-4 所示)。以上结果说明,本研究所得 IPNV VP2 蛋白多克隆抗体不但能够识别表达的 VP2 蛋白,而且能够识别细胞培养物中的病毒粒子,表明该多克隆抗体可以用于后期的研究。

![](_page_57_Figure_3.jpeg)

图 3-4 抗体效价检测

注: \*P<0.05 vs control

![](_page_57_Figure_6.jpeg)

Note: \*P<0.05 vs control

# 3.3.4 IPNV 多克隆抗体的间接免疫荧光检测

将 CHSE-214 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 接种 IPNV-ChRtm213 毒株培养 24 h 后 加入本研究制备的多克隆抗体作为一抗, FITC 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗进行间接免疫 荧光观察。结果显示, IPNV-ChRtm213 毒株感染的细胞在加入本研究制备的多克隆抗体 后均呈现出特异性的绿色荧光(如图 3-5 所示)。说明本研究制备的多克隆抗体能够与 IPNV-ChRtm213 毒株发生特异性反应, 识别病毒的 VP2 蛋白。

![](_page_58_Figure_1.jpeg)

图 3-5 VP2 多克隆抗体的间接免疫荧光检测

A. 无病毒感染对照细胞形态; B. 无病毒感染对照细胞免疫荧光检测结果; C. 细胞感染 IPNV 24 h 后细胞形态; D. 细胞感染 IPNV 24 h 后免疫荧光检测结果; E. 细胞感染 IPNV 48 h 后细胞形态; F. 细胞感染 IPNV 48 h 后免疫荧光检测结果; 物镜 40×

Fig. 3-5 Indirect immunofluorescence detection of VP2 polyclonal antibodies A. CHSE control cells without virus infection; B. The IFA result of CHSE control cells; C. CHSE cells infected with IPNV for 24 h; D. The IFA result of CHSE cells infected with IPNV for 24 h; E. CHSE cells infected with IPNV for 48 h; F. The IFA result of CHSE cells infected with IPNV for 48 h. Objective lens  $40\times$ 

# 3.4 讨论

为了后期评价预防 IHN 和 IPN 二联弱毒疫苗是否构建成功,需要获得针对 IPNV 的特异性抗体。由于 VP2 蛋白是病毒的主要结构蛋白,在 VP2 蛋白中含有主要的抗原决定 簇和中和表位,在介导病毒进入细胞的过程中发挥关键作用,同时 VP2 基因也是 IPN 检测及疫苗研发中的首选基因<sup>[99, 186-187]</sup>。因此本研究针对 IPNV 病毒的 VP2 蛋白制备了多 克隆抗体。已有研究发现,蛋白在进行跨物种表达时不能够有效表达,而 pET 表达载体能够高效表达多种异源蛋白,因此本研究构建 pET-27b-VP2 重组质粒对 VP2 蛋白进行表达。虽然 pET-27b 载体能够有效表达多种蛋白质,但其表达蛋白并非可溶蛋白而是包涵体。由于疏水区、跨膜区在包涵体的变性、复性过程中影响蛋白质的正确折叠,因此研究中对 VP2 蛋白的部分区段进行了表达。已有研究发现,在 VP2 蛋白的 153~330 位氨基

酸中富含抗原表位,183(243)~335 位氨基酸是 VP2 蛋白的高变区,同时 217~221 位氨基酸与病毒毒力密切相关。本研究在已有结果的基础上,综合考虑 VP2 蛋白的抗原表位、疏水性及跨膜区预测分析结果,最终对 VP2 蛋白第 68~451 位氨基酸区域进行克隆和表达。研究中通过对蛋白质包涵体进行变性、复性,最终成功获得了 VP2 蛋白。蛋白纯度检测结果表明,本研究所纯化的 VP2 蛋白要优于王健楠及连科讯<sup>[29]</sup>研究中所表达的 VP2 蛋白,我们猜测这可能是去除部分疏水区和跨膜区后对 VP2 蛋白进行表达的缘故。虽然在 2012 年王健楠等<sup>[30]</sup>制备了 VP2 蛋白的多克隆抗体,抗体效价为 1:12800,但是他们在研究中用的 IPNV 病毒株为 ATCC 购买的标准毒株。而本研究中制备的多克隆抗体 ELISA 检测效价达到了 1:20000,明显高于王健楠等制备的抗体,同时所用毒株 IPNV-ChRtm213 为我国西南地区的流行病毒株,能够为我国不同地区尤其是西南地区的 IPN 的监测提供技术支持。

# 3.5 本章小结

综上所述,本研究利用原核表达系统表达了 IPNV-ChRtm213 毒株的 VP2 蛋白,并成 功制备了针对 IPNV 病毒 VP2 蛋白的多克隆抗体,该抗体 ELISA 检测效价达到了 1:20000。 该多克隆抗体不但能够用于后期评价构建的预防 IHN 和 IPN 的二联弱毒疫苗,也能够为 我国不同地区尤其是西南地区的 IPN 的监测提供技术支持。

# 4 IHNV 反向遗传操作系统的建立

### 4.1 研究材料

### 4.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物

稳定表达 T7 RNA 聚合酶的乳仓鼠肾细胞系(BHK-21-T7)由东北农业大学生物制 药教研室李德山教授惠赠。构建拯救病毒用的 pBluescript SK 载体及辅助质粒载体 pHelp 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所张振宇副教授惠赠。无特定病原的虹鳟鱼购自本溪 艾格莫林实业有限公司。其余如 2.1.1 所示

### 4.1.2 试剂和细胞培养材料

PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep(货号 K210016)购自英潍捷基(上海)贸易有限公司; PolyJet 体外 DNA 转染试剂(货号 SL100688)购自 Signagen 公司; In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒(货号 638909)、One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR 试剂盒

(货号 RR096A)、*Nhe* I 核酸内切酶(货号 1241A)、*Xho* I 核酸内切酶(货号 1094A)、 *Dpn* I 核酸内切酶(货号 1235A)、*Not* I 核酸内切酶(货号 1166A)均购自宝日医生物技 术有限公司; *Aat* II 核酸内切酶(货号 R0117S)、*Mlu* I 核酸内切酶(货号 R3198S)、*Nar* I 核酸内切酶(货号 R0191S)购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; DMEM 高糖培养 基(货号 11965092)、Opti-MEM 减血清培养基(货号 31985070)购自 Gibco 公司。其他 试如 2.1.2 所示。

### 4.1.3 主要仪器设备

高分辨率活细胞成像系统(DeltaVision, Cytiva 公司), 37℃ CO<sub>2</sub>培养箱(MCO-20AIC, SANYO 公司),透射电镜(7650, Hitachi 公司),荧光定量 PCR 仪(7500, ABI 公司)。 其余设备如 2.1.3 所示。

### 4.1.4 引物设计及合成

利用 Primer Premier 5 软件,根据已公布的 IHNV 毒株序列设计引物序列用于 IHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的构建,所有引物均由吉林省库美生物科技有限公司 合成。

# 4.2 研究方法

### 4.2.1 细胞培养和病毒增殖

BHK-21-T7 细胞采用含有 10% FBS 和 1%双抗的 DMEM 高糖培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下进行传代培养。EPC 细胞培养及 IHNV 病毒增殖方法如 2.2.1 所示。

#### 4.2.2 病毒 RNA 的提取

本研究中对 IHNV-Sn1203 病毒的 RNA 进行提取,提取步骤参照 2.2.2 所示。

# 4.2.3 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的过程中,将 IHNV-Sn1203 毒株全长序 列分为5段进行克隆,分别为IHN1、IHN2、IHN3、IHN4和IHN5。采用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒提供的方法,按 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4和IHN5 的顺序依次连接入 pBluescript SK 载体中,其中插入IHN1片段后的中间载体命名为 pBlue-IHN1,插入IHN1 和 IHN2 后的中间载体命名为 pBlue-IHN2,插入IHN1、IHN2和IHN3后的载体命名为 pBlue-IHN3,插入IHN1、IHN2、IHN3和IHN4后的载体命名为 pBlue-IHN4,插入IHN1、 IHN2、IHN3、IHN4和IHN5后的载体命名为 pIHNV-Sn1203。

# 4.2.3.1 中间载体 pBlue-IHN1 的构建

(1) IHN1 插入片段的克隆

以提取的病毒 RNA 为模板,表 4-1 中的 IHN1-F 和 IHN1-R 为引物,并按照 SuperScript III One-Step RT-PCR Platinum Taq HiFi 试剂盒的方法,进行 IHNV 基因组 IHN1 片段的克隆。PCR 反应液组成为: 25 µL 的 2×Reaction Mix, 5 µL 的 IHNV 病毒 RNA, 1 µL 的 IHN1-F, 1 µL 的 IHN1-R, 1 µL 的 Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶, 17 µL 的去离子水。反应条件为: 50℃反转录 30 min, 94℃预变性 2 min, 94℃变性 15 s、53℃退火 30 s、72℃延伸 124 s、25 个循环, 72℃终延伸 10 min。

表 4-1 构建 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒所用引物

Table 4-1 Primer	sequences use	d for rIHNV-Sn1203	3 strain cDNA clone	construction
	1			

Primer	Primer name	Primer sequence
1	IHN1-F	CGACTCACTATAGGGGTATAAAAAAAGTAACTTGACTA
2	IHN1-R	GGCGCCTTGGGATCCTGCGGTGTCTGGGGTGA
3	IHN2-F	ACCGCAGGATCCCAAGAGGTGAAGAACAT
4	IHN2-R	GGCGCCTAGACGTCATTTATTCCGGGAT
5	IHN3-F	AATAAATGACGTCTACGCTATGCACAAA
6	IHN3-R	GGCGCCATGACGCGTTCTACCCTAAGTAA
7	IHN4-F	TTAGGGTAGAACGCGTCATGCAGAAAA
8	IHN4-R	GGCGCCATTCCATGGGCATTGAGTAGAA
9	IHN5-F	TACTCAATGCCCATGGAATCACAACGGCT
10	IHN5-R	TGGGACCATGCCGGCCGTATAAAAAAGTAACAGAGAGAGA
11	pBlue-F	GGATCCGACGTCACGCGTCCATGGGGCCCGGCATGGTCCCA
		GCCTCCTCGCT
12	pBlue-R	CCCTATAGTGAGTCGTATTAGCGGCCGCTTCCGAGCTT

(2) pBluescript SK 载体的克隆

以张振宇副教授惠赠的 pBluescript SK 载体为模板,用 PCR 的方法进行第一次载体 克隆,克隆的过程中在载体中依次引入 *Bam*H I、*Aat* II、*Mlu* I 和 *Nco* I 酶切位点,克隆 后的载体命名为 pBlue。反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pBluescript SK 载体,各 1.5 µL 的 pBlue-F 和 pBlue-R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保 真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃ 退火 30 s、68℃延伸 190 s、25 个循环,68℃终延伸 10 min。

(3) IHN1 插入片段及 pBlue 载体的回收

在进行 IHN1 插入片段及 pBlue 载体的回收时,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) IHN1 片段与 pBlue 载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 IHN1 基因片段加入量为 114 ng, pBlue 载体的加入量为 86 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN1-F 和 IHN1-R。其余步骤 同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pBlue-IHN1。

### 4.2.3.2 中间载体 pBlue-IHN2 的构建

(1) IHN2 插入片段的克隆

此步骤采用表 4-1 中的 IHN2-F 和 IHN2-R 为引物进行 PCR,同时反应退火温度更改 为 55℃,延伸时间改为 120 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pBlue-IHN1 载体的酶切

对 4.2.3.1 中构建成功的 pBlue-IHN1 载体进行酶切, 酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pBlue-IHN1 载体, 5 µL 的 BamH I, 5 µL 的 Aat II, 去离子水补 齐至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。

(3) IHN2 插入片段及 pBlue-IHN1 酶切载体的回收

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) IHN2 片段与 pBlue-IHN1 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 IHN2 基因片段加入量为 87 ng, pBlue-IHN1 载体的加入量为 113 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN2-F 和 IHN2-R,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 120 s,其余条件均与同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pBlue-IHN2。

### 4.2.3.3 中间载体 pBlue-IHN3 的构建

(1) IHN3 插入片段的克隆

此步骤采用表 4-1 中的 IHN3-F 和 IHN3-R 为引物进行 PCR,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 182 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pBlue-IHN2 载体的酶切

对 4.2.3.2 中构建成功的 pBlue-IHN2 载体进行酶切,酶切反应体系组成为: 10 μL 的 CutSmart Buffer, 2 μg 的 pBlue-IHN2 载体, 5 μL 的 *Mlu* I, 5 μL 的 *Aat* II,去离子水补齐

至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。

(3) IHN3 插入片段及 pBlue-IHN2 酶切载体的回收

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) IHN3 片段与 pBlue-IHN2 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 IHN3 基因片段加入量为 91 ng, pBlue-IHN2 载体的加入量为 109 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN3-F 和 IHN3-R,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 182 s,其余条件均与同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pBlue-IHN3。

### 4.2.3.4 中间载体 pBlue-IHN4 的构建

(1) IHN4 插入片段的克隆

此步骤采用表 4-1 中的 IHN4-F 和 IHN4-R 为引物进行 PCR,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 129 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pBlue-IHN3 载体的酶切

对 4.2.3.3 中构建成功的 pBlue-IHN3 载体进行酶切,酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pBlue-IHN3 载体, 5 µL 的 *Mlu* I, 5 µL 的 *Nco* I,去离子水补齐 至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。

(3) IHN4 插入片段及 pBlue-IHN3 酶切载体的回收

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) IHN4 片段与 pBlue-IHN3 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和插入片段的连接,其中 IHN4 基因片段加入量为 59 ng, pBlue-IHN3 载体的加入量为 141 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN4-F 和 IHN4-R,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 129 s,其余条件均与同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pBlue-IHN4。

#### 4.2.3.5 pIHNV-Sn1203 质粒的构建

(1) IHN5 插入片段的克隆

此步骤采用表 4-1 中的 IHN5-F 和 IHN5-R 为引物进行 PCR,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 120 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pBlue-IHN4 载体的酶切

对 4.2.3.4 中构建成功的 pBlue-IHN4 载体进行酶切,酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pBlue-IHN4 载体, 5 µL 的 *Nar* I, 5 µL 的 *Nco* I,去离子水补齐 至 100 µL。反应条件为: 37℃孵育 2 h。

(3) IHN5 插入片段及 pBlue-IHN4 酶切载体的回收

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) IHN5 片段与 pBlue-IHN4 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 IHN5 基因片段加入量为 49 ng, pBlue-IHN4 载体的加入量为 151 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN5-F 和 IHN5-R,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 129 s,其余条件均与同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pIHNV-Sn1203。

# 4.2.3.6 pIHNV-Sn1203 质粒大提

将 4.2.3.5 中经测序正确的菌液扩大培养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂盒提供的方法进行质粒大提,具体步骤如下: (1)向 HiPure Filter Maxi Column 收集柱中加入 30 mL 的 EQ1 溶液,进行收集柱的预平 衡;(2)取 200 mL 扩大培养的菌液,5000 g 离心 10 min 收集菌体;(3)弃掉上清液后, 加入 10 mL 含有 RNase A 的 R3 溶液重悬菌体;(4)加入 10 mL 的 L7 溶液,上下翻转离 心管 6-8 次,室温静置 5 min 使菌体充分裂解;(5)加入 10 mL 的 N3 溶液,上下翻转离 心管 6-8 次,将裂解液加入到 HiPure Filter Maxi Column 收集柱中,使裂解液由重力作用 流过收集管;(6)弃掉收集柱中的 Filtration Cartridge,加入 50 mL 的 W8 溶液,使溶液 由重力作用流过收集管;(7)将 HiPure Filter Maxi Column 收集柱置于一个新的 50 mL 离心管中,加入 15 mL 的 E4 溶液洗脱 DNA;(8)在洗脱液中加入 10.5 mL 的异丙醇, 充分混匀后于 4℃条件下,15000 g 离心 30 min;(9)弃掉上清液,加入 5 mL 的 70%无 水乙醇清洗 DNA 沉淀后,4℃条件下 15000 g 离心 10 min;(10)弃掉上清液,待离心管 中的乙醇挥发后,加入 500 µL 去离子水溶解 DNA;(11)利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,调整质粒浓度为 1 µg/µL,保存于-20℃备用。

# 4.2.4 rIHNV-Sn1203 毒株辅助质粒的构建

# 4.2.4.1 辅助质粒 pHelp-N 的构建

(1) N 基因的克隆

此步骤采用表 4-2 中的 IHN-F 和 IHN-R 为引物进行 PCR,同时反应退火温度更改为 55℃,延伸时间更改为 72 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pHelp 载体的酶切

对张振宇副教授惠赠的 pHelp 载体进行酶切, 酶切反应体系组成为: 10 µL 的 CutSmart Buffer, 2 µg 的 pHelp 载体, 5 µL 的 *Kpn* I, 5 µL 的 *Nhe* I, 去离子水补齐至 100 µL。反 应条件为: 37℃孵育 2 h。

(3) N 基因及载体的纯化

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) N 基因与 pHelp 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 N 基因片段加入量为 61 ng, pHelp 载体的加入量为 139 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHN-F 和 IHN-R,反应退火温

度更改为 55℃, 延伸时间改为 72 s, 其余条件同 2.2.6 所示, 鉴定正确的质粒命名为 pHelp-N。

(5) pHelp-N 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

表 4-2 构建辅助质粒所用引物

Table 4-2 Primer sequences used for help plasmids construction

Primer	Primer name	Primer sequence
1		GGTACCAAACACGATAATACCATGACAAGCGCACTCA
	IHN-F	GAGAGACGT
2		GCTAGCTCGGATCTTAGGTCATCAGTGGAATGAGTCG
2	IHN-K	GAGTCTTCTGGCT
2		GGTACCAAACACGATAATACCATGTCAGATGGAGAAG
3	IHP-F	GAGAAC
4		GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATTGACCCTGCTTCA
	IHP-K	TGCGCTTC
5	IHNv-F	GGTACCAAACACGATAATACCATGGACCACCGTGAAA
		TAAACACGT
6		GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATCTGGGATAAGCA
6	IHNV-K	AGAAATTCT
7		GGTACCAAACACGATAATACCATGGACTTCTTCGATCT
	IHL-F	CGACATAG
8		GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATTGTTCGCCTAGTG
	IHL-K	GAAAGAAG

# 4.2.4.2 辅助质粒 pHelp-P 的构建

(1) P 基因的克隆

此步骤采用表 4-2 中的 IHP-F 和 IHP-R 为引物进行 PCR,同时反应退火温度更改为 55℃,延伸时间更改为 44 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pHelp 载体的酶切

此步骤采用 4.2.4.1 中酶切的 pHelp 载体。

(3) P 基因及载体的纯化

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) P 基因与 pHelp 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 P 基因片段加入量为 42 ng, pHelp 载体

的加入量为 158 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHP-F 和 IHP-R,反应退火温度 更改为 55℃,延伸时间改为 44 s,其余条件同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pHelp-P。

(5) pHelp-P 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

### 4.2.4.3 辅助质粒 pHelp-Nv 的构建

(1) Nv 基因的克隆

此步骤采用表 4-2 中的 IHNv-F 和 IHNv-R 为引物进行 PCR,同时反应退火温度更改 为 55℃,延伸时间更改为 22 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pHelp 载体的酶切

此步骤采用 4.2.4.1 中酶切的 pHelp 载体。

(3) Nv 基因及载体的纯化

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) Nv 基因与 pHelp 酶切载体的连接及鉴定

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 Nv 基因片段加入量为 24 ng, pHelp 载体的加入量为 176 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHNv-F 和 IHNv-R,反应退火温度更改为 55℃,延伸时间改为 22 s,其余条件同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pHelp-Nv。

(5) pHelp-Nv 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

### 4.2.4.4 辅助质粒 pHelp-L 的构建

(1) L 基因的克隆

此步骤采用表 4-2 中的 IHL-F 和 IHL-R 为引物进行 PCR,同时反应退火温度更改为 55℃,延伸时间更改为 360 s,其余操作与 4.2.3.1 中相同。

(2) pHelp 载体的酶切

此步骤采用 4.2.4.1 中酶切的 pHelp 载体。

(3) L 基因及载体的纯化

此步骤除回收产物不同外,具体操作步骤同 2.2.6 所示。

(4) L 基因与 pHelp 酶切载体的连接

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载体和片段的连接,其中 L 基因片段加入量为 137 ng, pHelp 载体的加入量为 63 ng。在进行菌液鉴定时,将引物替换为 IHL-F 和 IHL-R,反应退火温度更改为55℃,延伸时间改为 360 s,其余条件同 2.2.6 所示,鉴定正确的质粒命名为 pHelp-L。

(5) pHelp-L 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

57

### 4.2.5 重组病毒 rIHNV-Sn1203 的拯救及鉴定

### 4.2.5.1 rIHNV-Sn1203 病毒的拯救

分别取 pIHNV-Sn1203 (1 µg)、pHelp-N (0.5 µg)、pHelp-P (0.5 µg)、pHelp-L (0.2 ug)和 pHelp-Nv(0.1 ug)质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,转染操作按照 Signagen 公司 PolyJet 体外 DNA 转染试剂建议方法进行,具体操作如下:(1)转染前 24 h 将 BHK-21-T7 细胞 接种于 6 孔细胞培养板中,接种后的培养板置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下进行培养,待细胞 密度达到 90% 汇合度时进行质粒转染; (2) 转染前 1 h 将 6 孔细胞培养板中的培养基弃 掉,更换为1 mL 37℃预热的新鲜培养基;(3)分别取 pIHNV-Sn1203 (1 µg)、pHelp-N (0.5 μg)、pHelp-P (0.5 μg)、pHelp-L (0.2 μg) 和 pHelp-Nv (0.1 μg) 于 1.5 mL 无菌离 心管中,加入125 μL的 DMEM 基础培养基进行稀释混匀;(4)取 6 μL的 PolyJet 体外 DNA 转染试剂于另一个 1.5 mL 无菌离心管中,加入 125 μL 的 DMEM 基础培养基进行 稀释混匀;(5)迅速将稀释后的 PolyJet 体外 DNA 转染试剂加入到稀释后的质粒中,并 将混合后的试剂充分混匀;(6)待室温静置 15 min 后,将试剂逐滴添加入 6 孔细胞培养 板中,轻轻混匀后置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养;(7)待培养 6h 后,将转染后的 6 孔 细胞培养板转移到 15℃、1% CO2条件下继续培养;(8)待细胞培养 6 d 后,取出 6 孔细 胞培养板,将细胞反复冻融3次后,4℃条件下12000g离心2min;(9)将离心后的上 清液接种于 EPC 单层细胞中,并于接种后 1 h 更换为新鲜培养基, 15℃、1% CO2条件下 继续培养;(10)当80%细胞出现病变时,取出6孔细胞培养板,将细胞反复冻融3次后, 4℃条件下 12000 g 离心 2 min, 收集上清即为拯救病毒。

#### 4.2.5.2 拯救病毒的酶切鉴定及全基因组测序

采用 2.2.2 的方法,对重组病毒 rIHNV-Sn1203 的基因组 RNA 进行提取。

对拯救病毒进行酶切鉴定的具体操作如下:(1)以提取的 rIHNV-Sn1203 基因组 RNA 为模板,表 4-3 中的 Fra1-F 和 Fra1-R 为引物,进行 rIHNV-Sn1203 基因组中 Fragment 1 片段的克隆;以 Fra2-F 和 Fra2-R 为引物,进行 rIHNV-Sn1203 基因组中 Fragment 2 片段 的克隆。PCR 反应液组成为: 25 µL 的 2×Reaction Mix, 5 µL 的 IHNV 病毒 RNA, 1 µL 的 Fra1-F/Fra2-F, 1 µL 的 Fra1-R/Fra2-R, 1 µL 的 Platinum Taq 高保真 DNA 聚合酶, 17 µL 的去离子水。反应条件为: 50℃反转录 30 min, 94℃预变性 2 min, 94℃变性 15 s、55℃ 退火 30 s、72℃延伸 80 s(Fra1-F 和 Fra1-R 为引物)/95 s(Fra2-F 和 Fra2-R 为引物)、 35 个循环, 72℃终延伸 10 min。(2)采用 2.2.6 中的方法对 PCR 产物进行回收,回收产 物 Fragment 1 片段采用 *Nhe* I 进行酶切鉴定,反应体系为: 2 µL 的 Fragment 1 片段, 2 µL 的 M Buffer, 1 µL 的 *Nhe* I, 5 µL 的去离子水,充分混匀离心后 37℃酶切 2 h;回收产物 Fragment 2 片段采用 *Xho* I 进行酶切鉴定,反应体系为: 2 µL 的 Fragment 2 片段, 2 µL 的 H Buffer, 1 µL 的 *Xho* I, 5 µL 的去离子水,充分混匀离心后 37℃酶切 2 h。(3)利用 1%琼脂糖凝胶电泳对酶切后的产物进行分析,确定 rIHNV-Sn1203 基因组与野生型 IHNV-Sn1203(wtIHNV-Sn1203)基因组的区别。

对拯救病毒进行全基因组测序的具体操作如下:以提取的rIHNV-Sn1203 基因组RNA

为模板,利用表 4-1 中的引物,对 rIHNV-Sn1203 的全基因组进行克隆,具体反应体系及 条件与 4.2.3 相同。克隆产物经回收后,送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序。 表 4-3 重组病毒基因组鉴定所用引物

Primer name	Primer sequence
Fra1-F	AGGGAACGAGAAGGGCATTGGGCCT
Fra1-R	TTCTTGTCGGGTCTCCTGGTGGGTTT
Fra2-F	AAAAACGGGGGAAGGAAAAATAGGGGT
Fra2-R	TCCAATTTCCTGATGGAGATCCCCGAT
•	Primer name Fra1-F Fra1-R Fra2-F Fra2-R

Table 4-3 Primer sequences used for recombinant virus genome sequence identification

#### 4.2.5.3 rlHNV-Sn1203 病毒间接免疫荧光鉴定

利用 EPC 细胞对 rIHNV-Sn1203 病毒进行间接免疫荧光鉴定,具体操作步骤如 2.2.6 所示。

### 4.2.5.4 rlHNV-Sn1203 病毒电镜鉴定

利用 EPC 细胞对 rIHNV-Sn1203 病毒进行电镜鉴定,具体操作步骤如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 25℃、1% CO2 条件下培养 12 h 后,分别接种 wtIHNV-Sn1203 病毒和 rIHNV-Sn1203 病毒; (2) 待 15℃、1% CO2条件下感染1h 后, 弃掉病毒液,更换为新鲜培养基;(3)培养24h后,弃掉培养基,利用PBS溶液悬浮细 胞后,4℃条件下100g离心5min;(4)加入浓度为2.5%的戊二醛固定液,4℃条件下固 定细胞 24 h 后, 4℃条件下 100 g 离心 5 min; (5) 加入 pH 7.2、浓度为 0.1 mol/L 的磷酸 盐缓冲溶液悬浮细胞,4℃条件下100g离心15min,重复此步骤三次;(6)加入浓度为 1%的锇酸固定液, 25℃条件下固定细胞 70 min; (7) 加入 pH 7.2、浓度为 0.1 mol/L 的 磷酸盐缓冲溶液悬浮细胞,4℃条件下 100g 离心 15 min, 重复此步骤三次;(8) 加入 50% 浓度的无水乙醇,4℃条件下处理细胞 8 min 后,100 g 离心 10 min;(9) 加入 70%浓度 的无水乙醇,4℃条件下处理细胞8min后,100g离心10min;(10)加入90%浓度的无 水乙醇,4℃条件下处理细胞 8 min 后,100 g 离心 10 min; (11) 加入 100%浓度的无水 乙醇,4℃条件下处理细胞 10 min 后,100 g 离心 10 min,重复此步骤二次;(12) 依次 加入 100%浓度的无水乙醇和 100%浓度的丙酮,4℃条件下处理细胞 10 min 后,100 g 离 心 10 min; (13)加入 100%浓度的丙酮, 室温条件下处理细胞 10 min 后, 100 g 离心 10 min; (14) 按 1: 1 (v/v) 的比例加入丙酮和包埋液, 室温孵育 30 min; (15) 按 1: 2 (v/v) 的比例加入丙酮和包埋液,室温孵育 1.5 h;(16) 按 1:3 (v/v) 的比例加入丙酮和包埋 液,室温孵育12h后,将样品放入含有包埋剂的包埋板中进行包埋;(17)将包埋后的样 品分别于 37℃和 45℃条件下聚合 12 h,再置于 60℃条件下聚合 24 h:(18)利用超薄切 片机对包埋好的样品进行修块以及切片,厚度约 50-60 nm; (19) 吸取醋酸铀染液对切片 室温染色 30 min,利用去离子水轻摇清洗切片 3 次,每次 5 min; (20) 吸取枸橼酸铅染 液对切片室温染色 8 min,利用去离子水轻摇清洗切片 3 次,每次 5 min; (21)将样品放置到铺有吸水纸的干净平皿中,自然晾干后进行电镜观察。

### 4.2.5.5 rlHNV-Sn1203 病毒生长特性鉴定

利用 EPC 细胞对 rIHNV-Sn1203 病毒的生长特性进行鉴定,其中病毒滴度测定的具 体操作步骤如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 25℃、1% CO<sub>2</sub>条件下培 养 12 h 后,分别接种 wtIHNV-Sn1203 病毒和 rIHNV-Sn1203 病毒;(2)待 15℃、1% CO2 条件下感染1h后,弃掉病毒液,更换为新鲜培养基;(3)分别于病毒感染后的12h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h 和 96 h 收集细胞培养上清液; (4) 将细胞培养上清液 10 倍梯度进行倍比稀释,稀释后的样品分别接种到已经铺满 EPC 细胞的 96 孔细胞培养 板中,每个稀释度设置8个复孔;(5)将96孔细胞培养板放置于15℃、1%CO2条件下 进行培养,1h后弃掉病毒液,PBS洗涤3遍后更换为新鲜培养基进行培养;(6)7天后 观察细胞病变情况,采用 Reed-Muench 法测定病毒半数组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)。细 胞内病毒 RNA 复制水平测定方法如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 25℃、 1% CO<sub>2</sub>条件下培养 12 h 后,分别接种 wtIHNV-Sn1203 病毒和 rIHNV-Sn1203 病毒;(2) 待 15℃、1% CO2条件下感染 1 h 后,弃掉病毒液,更换为新鲜培养基;(3)分别于病毒 感染后的 12 h、24 h、36 h 和 48 h 收集细胞; (4) 加入 TRIzol LS 试剂, 按照 2.2.2 中的 方法对病毒的 RNA 进行提取; (5) 按照 One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR 试 剂盒说明书的方法,利用 RT-qPCR 对病毒 RNA 表达水平进行检测;其中 RT-qPCR 反应 体系为: 10 µL 的 2×One Step SYBR RT-PCR Buffer 4、1.2 µL 的 TaKaRa Ex Taq HS Mix、 0.4 μL 的 PrimeScript PLUS RNase Mix、0.8 μL 的上游引物、0.8 μL 的下游引物、0.4 μL 的 ROX Reference Dye II、2 µL 的病毒 RNA、4.4 µL 的 RNase Free 去离子水,反应条件 为: 42℃反转录 5 min, 95℃反应 10 s, 95℃反应 5 s、60℃反应 34 s 共 40 个循环, 95℃ 反应 15 s, 60℃反应 60 s、95℃反应 15 s。RT-qPCR 反应中所用引物如表 4-4 所示, IHNV-N Forward 和 IHNV-N Reverse 用于检测 IHNV 病毒 N 基因的 mRNA 水平, IHNV-P Forward 和 IHNV-P Reverse 用于检测 IHNV 病毒 P 基因的 mRNA 水平, IHNV-M Forward 和 IHNV-M Reverse 用于检测 IHNV 病毒 M 基因的 mRNA 水平, IHNV-G Forward 和 IHNV-G Reverse 用于检测 IHNV 病毒 G 基因的 mRNA 水平, IHNV-Nv Forward 和 IHNV-Nv Reverse 用于检测 IHNV 病毒 Nv 基因的 mRNA 水平, IHNV-L Forward 和 IHNV-L Reverse 用于检 测 IHNV 病毒 L 基因的 mRNA 水平。

Primer	Primer name	Primer sequence
1	IHNV-N Forward	GCTCACCAAGGCTGTTTAT
2	IHNV-N Reverse	CATCAGTCTTACAATGCGTCTA
3	IHNV-P Forward	AAGGACTTCGGAGGTCTAAT
4	IHNV-P Reverse	TTTCTCGTGCTCTTGCTG
5	IHNV-M Forward	GATGGAGTTCGGAAGCAC
6	IHNV-M Reverse	AGGCTGGGTCTGAAGGTA
7	IHNV-G Forward	CATCAGTCTTACAATGCGTCTA
8	IHNV-G Reverse	TGGAGGCGGGATAAGAAA
9	IHNV-Nv Forward	ACGGAGACCTGGTATGGC
10	IHNV-Nv Reverse	CTCGTCCTTGGTGATGCT
11	IHNV-L Forward	TGGGAGCCATTGGTGATT
12	IHNV-L Reverse	GGTTGAGCGTCGGTTTGC
13	β-Actin RT/F	GCCGGCCGCGACCTCACAGACTAC
14	β-Actin RT/R	CGGCCGTGGTGGTGAAGCTGTAAC

### 表 4-4 RT-qPCR 反应中所用引物 Table 4-4 Primer sequences used for RT-qPCR

# 4.2.5.6 rlHNV-Sn1203 病毒致病性鉴定

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 6 组,每组 50 尾分别装在 15°C 的循环水箱 中。当分组暂养两周后,利用腹腔注射和浸泡攻毒的方法对病毒的致病性进行检验,每 种方法的分组为 wtIHNV-Sn1203 病毒组、rIHNV-Sn1203 病毒组和 PBS 对照组。在腹腔 注射检验时,虹鳟鱼腹腔注射病毒剂量为 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾,wtIHNV-Sn1203 病毒组和 rIHNV-Sn1203 病毒组相同,PBS 对照组采用同体积的 PBS 进行注射。在浸泡攻毒检验中, 病毒浸泡浓度为 1.0×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL,PBS 对照组采用同体积的 PBS 进行浸泡。在进行攻 毒后的 25 d 内每天观察并记录虹鳟死亡情况,利用 Graphpad Prism 软件绘制攻毒后的生 存曲线。

# 4.3 研究结果

# 4.3.1 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的构建

构建 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒 pIHNV-Sn1203 的过程中,将病毒全长基因 组序列分为 5 段进行克隆,分别为 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4 和 IHN5。采用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒提供的方法,按 IHN1、IHN2、IHN3、IHN4 和 IHN5 的顺序依次 连接入 pBluescript SK 载体中(如图 4-1 所示)。其中插入 IHN1 片段后的中间载体命名为 pBlue-IHN1,经 PCR 鉴定后,IHN1 片段成功插入到载体中,大小约为 2065 bp(如图 4-2 所示);其中插入 IHN2 片段后的中间载体命名为 pBlue-IHN2,经 PCR 鉴定后,IHN2 片段成功插入到载体中,大小约为 2008 bp(如图 4-2 所示);其中插入 IHN3 片段后的中间 载体命名为 pBlue-IHN3,经 PCR 鉴定后,IHN3 片段成功插入到载体中,大小约为 3021

bp (如图 4-2 所示); 其中插入 IHN4 片段后的中间载体命名为 pBlue-IHN4, 经 PCR 鉴定 后, IHN4 片段成功插入到载体中,大小约为 2144 bp (如图 4-2 所示); 其中插入 IHN5 片段后的中间载体命名为 pIHNV-Sn1203, 经 PCR 鉴定后, IHN5 片段成功插入到载体中,大小约为 1996 bp (如图 4-2 所示)。将 PCR 鉴定正确的重组质粒 pIHNV-Sn12034 进行测序,结果显示, IHNV-Sn1203 毒株全长基因组成功插入到目的载体中(数据未展示)。

![](_page_71_Figure_2.jpeg)

图 4-1 rIHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 质粒的构建策略

Fig. 4-1 Schematic diagram of cDNA construction of rIHNV-Sn1203

![](_page_71_Figure_5.jpeg)

图 4-2 构建重组质粒 pIHNV-Sn1203 的 PCR 鉴定

M 为 DL 15000 marker; 泳道 1 为 IHN1 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 2 为 IHN2 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 3 为 IHN3 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 4 为 IHN4 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 5 为 IHN5 片段的 PCR 鉴定结果

Fig. 4-2 PCR identification of recombinant plasmid pIHNV-Sn1203

M: DL 15000 marker; Lane 1: PCR result of IHN1 fragment; Lane 2: PCR result of IHN2 fragment; Lane 3: PCR result of IHN3 fragment; Lane 4: PCR result of IHN4 fragment; Lane 5: PCR result of IHN5 fragment
### 4.3.2 rlHNV-Sn1203 毒株辅助质粒的构建

在进行 rIHNV-Sn1203 毒株辅助质粒构建时,辅助质粒 pHelp-N、pHelp-P、pHelp-Nv 和 pHelp-L 的构建策略相同:均以提取的 IHNV-Sn1203 病毒 RNA 为模板,表 4-2 中的对 应引物进行 PCR,克隆出构建辅助质粒用的 N、P、Nv 和 L 基因;辅助质粒载体均采用 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切的方法获得,PCR 和双酶切产物经回收后连接,即获得相应辅助质 粒载体。对 pHelp-N 辅助质粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 1206 bp 的特异性条带,与预 期结果一致(如图 4-3 所示);对 pHelp-P 辅助质粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 723 bp 的特异性条带,与预期结果一致(如图 4-3 所示);对 pHelp-Nv 辅助质粒进行 PCR 鉴定, 结果出现约 366 bp 的特异性条带,与预期结果一致(如图 4-3 所示);对 pHelp-L 辅助质 粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 5991 bp 的特异性条带,与预期结果一致(如图 4-3 所示); 将上述重组质粒进行测序(数据未展示),结果显示 N、P、Nv 和 L 基因均已分别成功插 入到辅助质粒载体中,说明辅助质粒 pHelp-N、pHelp-P、pHelp-Nv 和 pHelp-L 构建成功。



图 4-3 rIHNV-Sn1203 毒株辅助质粒的 PCR 鉴定

M1 为 DL 15000 marker; 泳道 1 为 pHelp-N 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 2 为 pHelp-P 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 3 为 pHelp-Nv 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 4 为 pHelp-L 质粒的 PCR 鉴定结果; M<sub>2</sub> 为 DL 2000 marker

Fig. 4-3 PCR identification of helper plasmids of rIHNV-Sn1203

M<sub>1</sub>: DL 15000 marker; Lane 1: PCR result of pHelp-N plasmid; Lane 2: PCR result of pHelp-P plasmid; Lane 3: PCR result of pHelp-Nv plasmid; Lane 4: PCR result of pHelp-L plasmid; M<sub>2</sub>: DL 2000 marker

# 4.3.3 rIHNV-Sn1203 病毒的拯救

# 4.3.3.1 IHNV 反向遗传操作最佳细胞系的确定

为了确定用于 IHNV 反向遗传操作的最佳细胞系,研究中首先对鱼源、鼠源、人源 传代细胞系感染 IHNV 病毒后的病毒滴度进行了检测。结果发现,IHNV 病毒在鱼类细胞 (EPC、RTG、CHSE)中的生长效果最好,病毒毒力均达到了 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 以上;在 人源细胞(293T、A549、HepG2)中均不能够生长繁殖;在鼠源细胞 3T3-L1 和 CHO 细 胞中也不能够生长,但是在 BHK-21 细胞中能够繁殖,并且其前三代病毒毒力依次为 2.5×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL、2×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 和 2×10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL,三代病毒毒力均能够保持在 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 以上,结果如表 4-5 所示。

Table 4-5 IHNV proliferation in different cell lines 细胞系 Passage I Passage II Passage III 293T BHK-21  $2.5 \times 10^{6}$  $2.5 \times 10^{5}$  $2.5 \times 10^{4}$ 3T3-L1 EPC  $2 \times 10^{7}$  $2.8 \times 10^{7}$  $2.5 \times 10^{7}$ RTG  $1 \times 10^{7}$  $8 \times 10^{6}$  $1 \times 10^{7}$ CHSE  $2.5 \times 10^{6}$  $3 \times 10^{6}$  $1 \times 10^{6}$ CHO A549 HepG2

表 4-5 不同传代细胞系中 IHNV 病毒增殖情况

细胞转染效率的高低同样是决定病毒拯救能否成功的重要因素之一,因此研究中同 样对各细胞系外源质粒的转染效率进行了比较,转染后 48 h 发现各细胞系的转染效率有 明显的差异。其中 293T 转染效率最高达到了 90%以上,其次为 BHK-21 细胞达到了 65%, 而三种鱼源细胞的转染效率仅有 15%~20%,结果如表 4-6 所示。最终通过综合病毒增殖 效率及细胞转染效率数据,确定适用于 IHNV 反向遗传操作的最佳细胞系为 BHK-21。

	•
细胞系	转染效率(%)
293T	92
BHK-21	65
3T3-L1	35
EPC	20
RTG	15
CHSE	15
СНО	40
A549	15
HepG2	15

表 4-6 各细胞系的转染效率 Table 4-6 Transfection efficiency of different cell lines

# 4.3.3.2 rlHNV-Sn1203 拯救病毒的基因鉴定

利用 PolyJet 体外 DNA 转染试剂, 共转染 pIHNV-Sn1203、pHelp-N、pHelp-P、pHelp-L 和 pHelp-Nv 质粒于 BHK-21-T7 细胞, 5% CO2、37℃条件下培养 6 h 后, 转移到 15℃、 1% CO2条件下继续培养 6 d。反复冻融 3 次后, 接种于 EPC 单层细胞中 15℃、1% CO2条件下继续培养, 当 80%细胞出现病变时,将细胞反复冻融 3 次, 4℃离心收集上清即为 拯救病毒。对拯救的重组病毒 rIHNV-Sn1203 的基因组 RNA 进行提取,利用 PCR 的方法 对 rIHNV-Sn1203 基因组中 Fragment 1 和 Fragment 2 片段进行克隆及回收, 回收后的产

物分别用 Nhe I 和 Xho I 进行酶切鉴定。结果显示(图 4-4),以 rIHNV-Sn1203 基因组 RNA 为模板获得的 Fragment 1 和 Fragment 2 片段分别可以被 Nhe I 和 Xho I 所酶切,但以 wtHNV-Sn1203 基因组 RNA 为模板获得的 Fragment 1 和 Fragment 2 片段无法进行酶切。 为了进一步确定病毒拯救的成功,研究中扩增了涵盖病毒全基因组的片段,并对序列进行了测序。结果显示,与 wtHNV-Sn1203 病毒基因组相比,rIHNV-Sn1203 病毒基因组中 仅有两个碱基发生了突变,并且这两个碱基是在 cDNA 构建阶段人为引入的两个突变位 点。以上结果说明 rIHNV-Sn1203 病毒确实为 IHNV-Sn1203 毒株的人工拯救病毒,该拯救方法成功。



图 4-4 rIHNV-Sn1203 病毒基因组序列的酶切鉴定

M 为 DL 2000 Marker; 泳道 1 为 rIHNV-Sn1203 病毒的 PCR 片段 *Nhe* I 酶切结果; 泳道 2 为 wtIHNV-Sn1203 病毒的 PCR 片段 *Nhe* I 酶切结果; 泳道 3 为 rIHNV-Sn1203 病毒的 PCR 片段 *Xho* I 酶 切结果; 泳道 4 为 wtIHNV-Sn1203 病毒的 PCR 片段 *Xho* I 酶切结果

Fig. 4-4 Identification of rIHNV-Sn1203 genome sequence using enzyme digestion M: DL 2000 Marker; Lane 1: PCR fragment digestion by *Nhe* I of rIHNV-Sn1203; Lane 2: PCR fragment digestion by *Nhe* I of wtIHNV-Sn1203; Lane 3: PCR fragment digestion by *Xho* I of rIHNV-Sn1203; Lane 4: PCR fragment digestion by *Xho* I of wtIHNV-Sn1203

# 4.3.4 rlHNV-Sn1203 病毒的生物学鉴定

# 4.3.4.1 rlHNV-Sn1203 病毒间接免疫荧光鉴定

为了进一步确定拯救病毒 rIHNV-Sn1203 的生物学特性,研究中首先利用间接免疫荧光的方法对 rIHNV-Sn1203 病毒的抗原特性进行了检测。将 rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 病毒分别接种到 EPC 细胞中,培养 24 h 后进行了间接免疫荧光检测。结果显示(图 4-5),wtIHNV-Sn1203 病毒和 rIHNV-Sn1203 病毒感染的细胞均呈现出了特异性的红色荧光,而 PBS 模拟感染组没有任何荧光。上述结果说明 rIHNV-Sn1203 在细胞上与 wtIHNV-Sn1203 病毒表现出相同的抗原特性。



图 4-5 rIHNV-Sn1203 病毒的间接免疫荧光鉴定

注:物镜40×

Fig. 4-5 Identification of rIHNV-Sn1203 by indirect immunofluorescence assay

Note: Objective lens 40×.

# 4.3.4.2 rlHNV-Sn1203 病毒的电镜观察

为了进一步确定 rIHNV-Sn1203 的病毒粒子形态,本研究对拯救后的 rIHNV-Sn1203 病毒进行了电镜观察。结果显示(图 4-6),rIHNV-Sn1203 病毒粒子呈现出典型的子弹状外形,其病毒粒子大小在(70~90)×(160~180) nm 之间,与 wtIHNV-Sn1203 病毒在外观形态上并无差异。



图 4-6 rIHNV-Sn1203 病毒的电镜观察

A. wtIHNV-Sn1203 毒株电镜观察结果; B. rIHNV-Sn1203 毒株电镜观察结果; 白色箭头表示从细胞膜 出芽的未成熟的病毒粒子, 黑色箭头表示成熟病毒粒子; 物镜 40×

Fig. 4-6 Transmission electron microscopy observation of rIHNVSn1203

A. Transmission electron microscopy observation of wtIHNV-Sn1203; B. Transmission electron microscopy observation of rIHNV-Sn1203; White arrows indicate immature virions assembling and budding from the cell membrane, and black arrows indicate mature virus, Objective lens 40×

### 4.3.4.3 rlHNV-Sn1203 病毒的生长曲线

为了研究 rIHNV-Sn1203 病毒的生长动力学特性,本研究将 rIHNV-Sn1203 病毒和 wtIHNV-Sn1203 病毒接种于 EPC 细胞中,并于接种后的 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h 和 96 h 收获病毒,经反复冻融后进行 10 倍梯度倍比稀释,稀释后的样品分别 接种到已经铺满 EPC 细胞的 96 孔细胞培养板中,7 d 后观察细胞病变情况,采用 Reed-Muench 法测定病毒 TCID<sub>50</sub>,并绘制出 rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 的生长曲 线。结果显示(图 4-7),在病毒感染的前 36 h 内,rIHNV-Sn1203 的病毒滴度略低于 wtIHNV-Sn1203,但是二者的病毒滴度均呈现出了明显的上升趋势,同时二者的生长特性也相同。在病毒感染的 36~72 h,rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 均呈现出了快速的 生长状态,并且于 72 h 后进入平台期。虽然 rIHNV-Sn1203 病毒的增殖速度略低于 wtIHNV-Sn1203,但是二者的生长特性并无明显差异,说明 rIHNV-Sn1203 病毒具有着和 wtIHNV-Sn1203 病毒相似的生长动力学特性。

为了进一步确定 rIHNV-Sn1203 病毒的复制特性,研究中对细胞内病毒 N、P、M、G、Nv 和 L 基因的 mRNA 水平和细胞外病毒滴度进行了检测。结果显示(图 4-8),病毒感染后的 12~48 h 内,病毒 N、P、M、G、Nv 和 L 基因的 mRNA 水平均随着病毒感染时间的增加而升高;并且同一时间点时,rIHNV-Sn1203 病毒不同基因的 mRNA 水平 与 wtIHNV-Sn1203 病毒的 mRNA 水平并无显著性差异。细胞外病毒滴度结果显示(图 4-9),在病毒感染的 48 h 和 72 h 时,rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 的病毒滴度均达到了 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 和 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL,并且二者的病毒滴度在同一时间点并无显著性差异。







图 4-8 rIHNV-Sn1203 不同基因的 mRNA 水平

A. IHNV 病毒 N 基因 mRNA 表达水平; B. IHNV 病毒 P 基因 mRNA 表达水平; C. IHNV 病毒 M 基因 mRNA 表达水平; D. IHNV 病毒 G 基因 mRNA 表达水平; E. IHNV 病毒 Nv 基因 mRNA 表达水平; F. IHNV 病毒 L 基因 mRNA 表达水平; #P>0.05

Fig. 4-8 Intracellular mRNA abundance of rIHNV-Sn1203 viral genes

A. mRNA expression level of IHNV N gene; B. mRNA expression level of IHNV P gene; C. mRNA expression level of IHNV M gene; D. mRNA expression level of IHNV G gene; E. mRNA expression level of IHNV Nv gene; F. mRNA expression level of IHNV L gene; #P>0.05



图 4-9 rIHNV-Sn1203 病毒的滴度测定

注: #P>0.05



Note: #P>0.05

## 4.3.4.4 rlHNV-Sn1203 病毒的致病性

病毒的致病性是反应病毒生物学特性是否改变的关键因素之一,为了确定拯救的 rIHNV-Sn1203 病毒与 wtIHNV-Sn1203 病毒具有相同的生物学特性,本研究对 rIHNV-Sn1203 病毒的致病性进行了检测。研究中分别利用腹腔注射和水浴浸泡的方法, 对虹鳟进行攻毒实验,以评估 rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 的致病性。结果显示(图 4-10),在腹腔注射病毒 3 d 后,两组中的虹鳟均开始死亡,6~8 d 后死亡率最高;在感染 病毒 25 d 后,rIHNV-Sn1203 感染组的虹鳟累计死亡率为94%,wtIHNV-Sn1203 感染组的 虹鳟累计死亡率为96%;虽然在注射病毒 5~14 d 时,rIHNV-Sn1203 感染组的虹鳟死亡率 略低于 wtIHNV-Sn1203 感染组,但二者的累积死亡率却无显著性差异。在水浴浸泡攻毒 4 d 后,两组中的虹鳟均开始死亡,6~11 d 后死亡率达到高峰,rIHNV-Sn1203 感染组和 wtIHNV-Sn1203 感染组的虹鳟累积死亡率均为 94%。这些结果表明,rIHNV-Sn1203 与 wtIHNV-Sn1203 病毒的致病性无显著差异。





# 4.4 讨论

IHN 是由 IHNV 引起的严重威胁鲑鳟鱼健康养殖的急性传染病<sup>[1]</sup>,该病自发现以来, 在世界范围内已有多次暴发,是目前国内外鲑鳟鱼养殖中最主要的传染病之一。自 1985 年首次报道该病以来,在我国鲑鳟鱼主要养殖区均有不同程度的 IHN 发生,造成的鲑鳟 鱼死亡率高达 100%,使一些鲑鳟鱼养殖场遭到毁灭性的打击<sup>[15,17-18]</sup>。目前世界动物卫生 组织将该病列入水生动物疫病名录,我国农业农村部将其列为二类动物疫病,每年国家 水产技术推广总站均对全国范围内的 IHN 发病情况进行监测。目前针对 IHNV 的研究主 要集中在疫苗研发和病毒检测方向,针对 IHNV 病毒基因的研究较少。

反向遗传学技术是研究特定基因在病毒基因组序列中作用的强大平台,也可用于设 计病毒疫苗载体。第一个重组 IHNV 反向遗传操作系统是 Biacchesi 等人于 2000 年建立 的,他们利用痘病毒作为辅助病毒表达 T7 RNA 聚合酶,辅助重组病毒 rIHNV 的拯救<sup>[122]</sup>。 虽然使用痘病毒辅助系统可以成功拯救获得重组病毒 rIHNV, 但使用痘病毒可能存在一 定的生物安全风险。一项利用痘病毒作为辅助病毒拯救仙台病毒的研究表明,拯救获得 的重组仙台病毒去除了其 L 基因中的有害突变,这一发现证实了痘病毒可能通过同源重 组导致病毒基因组序列发生不确定突变<sup>[123-124]</sup>。已有研究表明,牛痘病毒感染和 T7 RNA 聚合酶表达并发挥功能的最佳温度为 37℃,但此温度对 IHNV 复制不是最佳温度 (IHNV 复制的最佳温度为 15℃)。因此,要使用该平台拯救 IHNV,需要将 EPC 细胞与痘病毒 在 37℃下孵育, 使 T7 RNA 聚合酶表达发挥活性, 然后将温度降至 15℃, 进行 IHNV 病 毒的复制。但研究发现,这种高温孵育对 EPC 细胞产生了有害影响,并可能影响重组病 毒 rIHNV 的拯救和拯救病毒的滴度水平<sup>[202]</sup>。为了规避与痘病毒相关的风险, Alonoso 等 人建立了稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 EPC 细胞系来拯救 SHRV 病毒<sup>[203]</sup>。Ammayappan 等人还建立了使用 CMV 启动子驱动的拯救质粒的无痘病毒的反向遗传系统,将该质粒 转染到 EPC 细胞中进行重组病毒的拯救<sup>[125]</sup>。虽然使用表达 T7 RNA 聚合酶的 EPC 细胞 或 CMV 启动子驱动的拯救质粒进行病毒拯救是可行的,但是在重组病毒 rIHNV 的拯救 过程中需要同时共转染 pIHNV-Sn1203、pHelp-N、pHelp-P、pHelp-L 和 pHelp-Nv 5 种质 粒。鱼类细胞系 EPC、RTG-2 和 CHSE-214 虽然是 IHNV 的敏感细胞系,但是其转染效 率较低,导致利用其拯救获得重组病毒 rIHNV 的效率较低,利用该系统拯救病毒可能需 要更多的时间和更高的费用才能获得用于商业用途的重组病毒。

为了克服这些问题,我们使用哺乳动物细胞系 BHK-21 进行了 rIHNV-Sn1203 病毒的 拯救。BHK-21 细胞是乳仓鼠肾细胞,由于它具有较高的转染效率和研究透彻的遗传背景, 被广泛用于病毒增殖和兽医疫苗的生产中。已有研究报道,BHK-21 细胞生长温度范围较 宽,三种鱼类弹状病毒 IHNV、VHSV 和 SVCV,均能够在其最佳复制温度下在 BHK-21 细胞中生长和复制<sup>[204]</sup>。这些结果表明 IHNV 能够利用 BHK-21 细胞产生病毒复制所需的 RNA 片段和功能性蛋白。因此,本研究在稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21-T7 细胞上, 通过共转染 pIHNV-Sn1203、pHelp-N、pHelp-P、pHelp-L 和 pHelp-Nv 5 种质粒来拯救重

70

组病毒 rIHNV。在质粒构建过程中,利用病毒基因组序列中存在的单一酶切位点将病毒 基因组连接到目的载体中,获得表达病毒全长 cDNA 的重组质粒 pIHNV-Sn1203。并且在 构建重组质粒 pIHNV-Sn1203 的过程中,在不改变氨基酸的前提下,人为引入了两个酶 切位点(*Nhe* I和 *Xho* I)作为区分 rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 病毒的分子标记。 研究中对拯救病毒进行了基因组鉴定后,又采用间接免疫荧光法和透射电镜进行了检测。 拯救获得的重组病毒 rIHNV-Sn1203 与 wtIHNV-Sn1203 具有相同的免疫原性和病毒形态。 病毒生长动力学分析显示,rIHNV-Sn1203 在感染后 72 h 达到生长平台期,rIHNV-Sn1203 与 wtIHNV-Sn1203 的细胞内病毒复制水平和细胞外病毒产量无显著性差异。 rIHNV-Sn1203 和 wtIHNV-Sn1203 感染虹鳟鱼造成的累计死亡率均达到 90%以上,这表明 重组病毒和野生型病毒的致病性相当。

# 4.5 本章小结

总之,本研究利用稳定表达 T7 RNA 聚合酶的 BHK-21-T7 细胞成功拯救了重组病毒 rIHNV-Sn1203,并且拯救获得的重组病毒 rIHNV-Sn1203 具有与野生病毒 wtIHNV-Sn1203 相同的生物学特性。鉴于 IHNV 是鱼类弹状病毒的一种,BHK-21 细胞也可能被用于拯救 其他鱼类弹状病毒,如 VHSV 和 SVCV。同时,该病毒拯救系统也可用于研究病毒毒力 相关基因和分子致病机制。

# 5 IHNV 外源基因最佳表达位置的确定

# 5.1 研究材料

# 5.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物

含有 GFP 基因的 pcDNA3.1-GFP 载体由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所张振宇副 教授惠赠。含有 IHNV-Sn1203 毒株全长 cDNA 的质粒 pIHNV-Sn1203, 拯救病毒的辅助 质粒 pHelp-N、pHelp-P、pHelp-L、pHelp-Nv 均为本研究 4.2 中所构建。wtIHNV-Sn1203 病毒在此部分中简写为 wtIHNV; 4.2 中构建的 rIHNV-Sn1203 病毒,在此部分中简写为 rIHNV。其余所用质粒和细胞如 4.1.1 所示。

### 5.1.2 试剂和细胞培养材料

所用试剂和细胞培养材料如 4.1.2 所示

## 5.1.3 主要仪器设备

多功能酶标仪(Spark, TECAN 公司),其余设备如 4.1.3 所示。

## 5.1.4 引物设计及合成

利用 Primer Premier 5 软件,根据 4.2 中的 IHNV-Sn1203 毒株序列设计引物序列,用 于不同 GFP 基因插入 IHNV-Sn1203 毒株基因组全长 cDNA 质粒的构建,所有引物均由吉 林省库美生物科技有限公司合成,引物序列如表 5-1 所示。

# 5.2 研究方法

### 5.2.1 细胞培养和病毒增殖

BHK-21-T7 细胞和 EPC 细胞培养方法,以及 wtIHNV 病毒和表达 GFP 基因的重组 病毒培养方法参照 4.2.1 所示。

#### 5.2.2 病毒 RNA 的提取

病毒 RNA 提取方法参照 4.2.2。

### 5.2.3 表达 GFP 蛋白的 rlHNV-GFP-N/P 病毒的拯救

### 5.2.3.1 rIHNV-GFP-N/P 病毒基因组全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-GFP-N/P 病毒基因组全长 cDNA 质粒的过程中,以 4.2.3 中构建的 pIHNV-Sn1203 重组质粒为模板,表 5-1 中的 N/P Vet F 和 N/P Vet R 为引物,进行载体克 隆;反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pIHNV-Sn1203 质粒,各 1.5 µL 的 N/P Vet F 和 N/P Vet R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃延伸 10 min、20 个循环,68℃终延伸 10 min。以张振宇副教授惠赠的 pcDNA3.1-GFP 重组 质粒为模板,表 5-1 中的 N/P insert F 和 N/P insert R 为引物,进行插入片段 GFP 的克隆。

反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pcDNA3.1-GFP 质粒, 各 1.5 µL 的 N/P insert F 和 N/P insert R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃ 延伸 53 s、25 个循环, 68℃终延伸 10 min。

表 5-1 重组质粒构建所用引物

Table 5-1 Primer sequences used in recombinant plasmid construction

Primer	Primer sequence
N/P insert F	TCACCCCACCTGACTCCCAGATAGAAAAAATGGCACT
N/P insert R	TTGAAAAGCACTATAGTGCCATTTTTTTCTGTCTTGGTAA
P/M insert F	TCCGGGCCCCCGGTTACCCAGATAGAAAAAATGGCACTA
P/M insert R	TGGAACGATACACTTGCGTGCCATTTTTTTCTGTCTTGGTAA
M/G insert F	TCCGCTCCTCACTCTGTCCCAGATAGAAAAAATGGCACTATA
M/G insert R	TCTCAAAGCACAAAAGTGCCATTTTTTTCTGTCTTGGTAA
G/Nv insert F	TCTTCACTTCCTCACCCCCAGATAGAAAAAATGGCACTATA
G/Nv insert R	TTTTACAGCACAAATGTGCCATTTTTTTTCTGTCTTGGTAA
Nv/L insert F	AGAATTTCTTGCTTATCCCAGATAGAAAAAATGGCACTATA
Nv/L insert F	AGTTTTTTGCACAAAAGTGCCATTTTTTTTCTGTCTTGGTAA
N/P Vet F	TATAGTGCTTTTCAACCCAAACCACAA
N/P Vet R	AGTCAGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
P/M Vet F	GCAAGTGTATCGTTCCAAACGAAGT
P/M Vet R	TAACCGGGGGCCCGGAGGAGGATGTCT
M/G Vet F	TTTTGTGCTTTGAGACCGAACGCAA
M/G Vet R	ACAGAGTGAGGAGCGGAGGGACTCT
G/Nv Vet F	ATTTGTGCTGTAAAAAGAGACAATGGA
G/Nv Vet R	GGTGAGGAAGTGAAGATTGAGGTCCTT
Nv/L Vet F	TTTTGTGCAAAAAACTCAAGCGCGACT
Nv/L Vet R	ATAAGCAAGAAATTCTTCAATCAGGAT
N/M F	ACACCAACAGTCCCCTCTCCTCT
N/M R	GCTCTCGTTTGAACTGACTCTTGGA
GFP Vet F	TGTTGTGGTTTGGGTTGAAAAGCACT
GFP Vet R	ACATCCTCCGGGGCCCCCGGTTA
GFP insert F	ACCCAAACCACAACAGCCACCATGGTGAGCAAGCAGAT
GFP insert R	CCCGGAGGAGGATGTTCACACCCACTCGTGCAGGCTGCCCA

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,回收后的片段命名为 N/P insert,回收后的载体命名为 N/P Vet。利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载 体和片段的连接,其中 GFP 插入片段加入量为 22 ng,目的载体的加入量为 178 ng,其余步骤同 2.2.6。按照 2.2.6 中的方法分别进行连接产物的转化、菌落 PCR 鉴定以及全基 因组测序,测序正确的重组质粒命名为 pIHNV-GFP-N/P。将测序正确的菌液扩大培养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂盒提 供的方法进行质粒大提,具体步骤如 4.2.3.6 所示。

### 5.2.3.2 rlHNV-GFP-N/P 病毒的拯救

分别取 pIHNV-GFP-N/P(1 μg)、pHelp-N(0.5 μg)、pHelp-P(0.5 μg)、pHelp-L(0.2 μg)和 pHelp-Nv(0.1 μg)质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,进行 rIHNV-GFP-N/P 病毒的拯救,具体病毒拯救步骤如 4.2.5 所示。

### 5.2.4 表达 GFP 蛋白的 rlHNV-GFP-P/M 病毒的拯救

### 5.2.4.1 rlHNV-GFP-P/M 病毒基因组全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-GFP-P/M 病毒基因组全长 cDNA 质粒的过程中,以 4.2.3 中构建的 pIHNV-Sn1203 重组质粒为模板,表 5-1 中的 P/M Vet F 和 P/M Vet R 为引物,进行载体克 隆;反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pIHNV-Sn1203 质粒,各 1.5 µL 的 P/M Vet F 和 P/M Vet R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃ 延伸 10 min、20 个循环,68℃终延伸 10 min。以张振宇副教授惠赠的 pcDNA3.1-GFP 重 组质粒为模板,表 5-1 中的 P/M insert F 和 P/M insert R 为引物,进行插入片段 GFP 的克 隆。反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pcDNA3.1-GFP 质粒,各 1.5 µL 的 P/M insert F 和 P/M insert R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合 酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃延伸 52 s、25 个循环,68℃终延伸 10 min。

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,回收后的片段命名为 P/M insert,回收后的载体命名为 P/M Vet。利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载 体和片段的连接,其中 GFP 插入片段加入量为 21 ng,目的载体的加入量为 179 ng,其余步骤同 2.2.6。按照 2.2.6 中的方法分别进行连接产物的转化、菌落 PCR 鉴定以及全基 因组测序,测序正确的重组质粒命名为 pIHNV-GFP-P/M。将测序正确的菌液扩大培养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂盒提 供的方法进行质粒大提,具体步骤如 4.2.3.6 所示。

### 5.2.4.2 rlHNV-GFP-P/M 病毒的拯救

分别取 pIHNV-GFP-P/M (1 μg)、pHelp-N (0.5 μg)、pHelp-P (0.5 μg)、pHelp-L (0.2 μg) 和 pHelp-Nv (0.1 μg) 质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,进行 rIHNV-GFP-P/M 病毒的拯救, 具体病毒拯救步骤如 4.2.5 所示。

### 5.2.5 表达 GFP 蛋白的 rIHNV-GFP-M/G 病毒的拯救

# 5.2.5.1 rlHNV-GFP-M/G 病毒基因组全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-GFP-M/G 病毒基因组全长 cDNA 质粒的过程中,以 4.2.3 中构建的 pIHNV-Sn1203 重组质粒为模板,表 5-1 中的 M/G Vet F 和 M/G Vet R 为引物,进行载体 克隆;反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pIHNV-Sn1203 质粒,各 1.5 µL 的 M/G Vet F 和 M/G Vet R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃ 延伸 10 min、20 个循环,68℃终延伸 10 min。以张振宇副教授惠赠的 pcDNA3.1-GFP 重 组质粒为模板,表 5-1 中的 M/G insert F 和 M/G insert R 为引物,进行插入片段 GFP 的克 隆。反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pcDNA3.1-GFP 质粒,各 1.5 µL 的 M/G insert F 和 M/G insert R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃延伸 55 s、25 个循环, 68℃终延伸 10 min。

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,回收后的片段命名为 M/G insert,回收后的载体命名为 M/G Vet。利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行载 体和片段的连接,其中 GFP 插入片段加入量为 23 ng,目的载体的加入量为 177 ng,其余步骤同 2.2.6。按照 2.2.6 中的方法分别进行连接产物的转化、菌落 PCR 鉴定以及全基 因组测序,测序正确的重组质粒命名为 pIHNV-GFP-M/G。将测序正确的菌液扩大培养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂盒提供 的方法进行质粒大提,具体步骤如 4.2.3.6 所示。

### 5.2.5.2 rlHNV-GFP-M/G 病毒的拯救

分别取 pIHNV-GFP-M/G (1 μg)、pHelp-N (0.5 μg)、pHelp-P (0.5 μg)、pHelp-L (0.2 μg) 和 pHelp-Nv (0.1 μg) 质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,进行 rIHNV-GFP-M/G 病毒的 拯救,具体病毒拯救步骤如 4.2.5 所示。

### 5.2.6 表达 GFP 蛋白的 rlHNV-GFP-G/Nv 病毒的拯救

### 5.2.6.1 rIHNV-GFP-G/Nv 病毒基因组全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-GFP-G/Nv 病毒基因组全长 cDNA 质粒的过程中,以 4.2.3 中构建的 pIHNV-Sn1203 重组质粒为模板,表 5-1 中的 G/Nv Vet F 和 G/Nv Vet R 为引物,进行载体 克隆;反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pIHNV-Sn1203 质粒,各 1.5 µL 的 G/Nv Vet F 和 G/Nv Vet R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃ 延伸 10 min、20 个循环,68℃终延伸 10 min。以张振宇副教授惠赠的 pcDNA3.1-GFP 重 组质粒为模板,表 5-1 中的 G/Nv insert F 和 G/Nv insert R 为引物,进行插入片段 GFP 的 克隆。反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pcDNA3.1-GFP 质粒,各 1.5 µL 的 G/Nv insert F 和 G/Nv insert R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚

合酶, 10 μL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃延伸 50 s、25 个循环, 68℃终延伸 10 min。

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,回收后的片段命名为 G/Nv insert,回收后的载体命名为 G/Nv Vet。利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行 载体和片段的连接,其中 GFP 插入片段加入量为 21 ng,目的载体的加入量为 179 ng, 其余步骤同 2.2.6。按照 2.2.6 中的方法分别进行连接产物的转化、菌落 PCR 鉴定以及全 基因组测序,测序正确的重组质粒命名为 pIHNV-GFP-G/Nv。将测序正确的菌液扩大培 养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂 盒提供的方法进行质粒大提,具体步骤如 4.2.3.6 所示。

### 5.2.6.2 rlHNV-GFP-G/Nv 病毒的拯救

分别取 pIHNV-GFP-G/Nv(1 μg)、pHelp-N(0.5 μg)、pHelp-P(0.5 μg)、pHelp-L(0.2 μg) 和 pHelp-Nv(0.1 μg) 质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,进行 rIHNV-GFP-G/Nv 病毒的 拯救,具体病毒拯救步骤如 4.2.5 所示。

### 5.2.7 表达 GFP 蛋白的 rlHNV-GFP-Nv/L 病毒的拯救

### 5.2.7.1 rlHNV-GFP-Nv/L 病毒基因组全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒基因组全长 cDNA 质粒的过程中,以 4.2.3 中构建的 pIHNV-Sn1203 重组质粒为模板,表 5-1 中的 Nv/L Vet F 和 Nv/L Vet R 为引物,进行载体 克隆;反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pIHNV-Sn1203 质粒,各 1.5 µL 的 Nv/L Vet F 和 Nv/L Vet R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃ 延伸 10 min、20 个循环,68℃终延伸 10 min。以张振宇副教授惠赠的 pcDNA3.1-GFP 重 组质粒为模板,表 5-1 中的 Nv/L insert F 和 Nv/L insert R 为引物,进行插入片段 GFP 的 克隆。反应液组成为: 25 µL 的 2×PCR Buffer, 10 µL 的 2mM dNTPs, 1 µL 的 pcDNA3.1-GFP 质粒,各 1.5 µL 的 Nv/L insert F 和 Nv/L insert R, 1 µL 的 KOD FX Neo 高保真 DNA 聚合酶, 10 µL 的去离子水。反应条件为: 94℃预变性 2 min, 98℃变性 10 s、55℃退火 30 s、68℃延伸 49 s、25 个循环,68℃终延伸 10 min。

按 2.2.6 中的方法分别对克隆后的载体和插入片段进行回收,回收后的片段命名为 Nv/L insert,回收后的载体命名为 Nv/L Vet。利用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒进行 载体和片段的连接,其中 GFP 插入片段加入量为 20 ng,目的载体的加入量为 180 ng, 其余步骤同 2.2.6。按照 2.2.6 中的方法分别进行连接产物的转化、菌落 PCR 鉴定以及全 基因组测序,测序正确的重组质粒命名为 pIHNV-GFP-Nv/L。将测序正确的菌液扩大培 养,并按照英潍捷基(上海)贸易有限公司 PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep 试剂 盒提供的方法进行质粒大提,具体步骤如 4.2.3.6 所示。

# 5.2.7.2 rlHNV-GFP-Nv/L 病毒的拯救

分别取 pIHNV-GFP-Nv/L (1 µg)、pHelp-N (0.5 µg)、pHelp-P (0.5 µg)、pHelp-L (0.2

μg)和 pHelp-Nv(0.1 μg)质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,进行 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒的 拯救,具体病毒拯救步骤如 4.2.52.2.6 所示。

### 5.2.8 表达 GFP 蛋白的重组病毒的鉴定

### 5.2.8.1 拯救病毒的全基因组测序

采用 4.2.2 的方法,对不同位点表达 GFP 蛋白的重组病毒的基因组 RNA 进行提取。 采用 4.2.5.2 的方法对拯救病毒的全基因组进行测序。

### 5.2.8.2 拯救病毒的间接免疫荧光鉴定

利用 EPC 细胞对拯救的重组病毒进行间接免疫荧光鉴定,具体操作步骤参照 4.2.5.3, 区别在于:接种的病毒分别为 rIHNV、rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、 rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv和rIHNV-GFP-Nv/L;细胞经兔抗 IHNV 抗体、Cy3 标记的羊抗兔二抗处理后,加入终浓度为1µg/mL 的 DAPI 室温孵育 5 min, PBS 溶液洗 涤细胞 3 次后,利用荧光显微镜对病毒感染后的细胞进行拍照分析。

#### 5.2.8.3 拯救病毒的生长特性鉴定

利用 EPC 细胞对拯救病毒的生长特性进行鉴定,具体操作步骤参照 4.2.5.5, 区别在于: 接种的病毒分别为 wtIHNV、rIHNV、rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L;分别于病毒感染后的 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 和 84 h 收集细胞培养上清液,进行拯救病毒的滴度测定;分别于病毒感染后的 12 h、24 h、36 h 和 48 h 收集细胞,提取 RNA 后进行细胞内病毒 mRNA 水平的测定, RT-qPCR 反应中所用引物如表 5-2 中所示, N Forward 和 N Reverse 用于检测 IHNV 病毒 N 基因的 mRNA 水平。

Table 5-2 Primer sequences used in RT-qPCR		
Primer	Primer names	Primer sequences
1	N Forward	GCTCACCAAGGCTGTTTAT
2	N Reverse	CATCAGTCTTACAATGCGTCTA
3	GFP RT-F	CGAGGTGGTGTACATGAACGA
4	GFP RT-R	GCTGTAGAACTTGCCGCTGTT
5	Actin RT-F	GCCGGCCGCGACCTCACAGACTAC
6	Actin RT-R	CGGCCGTGGTGGTGAAGCTGTAAC

表 5-2 RT-qPCR 反应中所用引物

# 5.2.8.4 拯救病毒的 GFP 表达水平检测

为了确定不同拯救病毒的 GFP 表达水平,本研究中分别对 GFP 的 mRNA 表达量和 蛋白表达量进行检测。

GFP 的 mRNA 表达水平测定方法如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 25℃、1% CO<sub>2</sub> 条件下培养 12 h 后,分别接种 wtIHNV、rIHNV、rIHNV-GFP-N/P、

rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒; (2) 待 15℃、1% CO<sub>2</sub>条件下感染 1 h 后,弃掉病毒液,更换为新鲜培养基; (3)分别于病毒感 染后的 24 h 和 48 h 收集细胞; (4)加入 TRIzol LS 试剂,按照 2.2.3 中的方法对病毒的 RNA 进行提取; (5)按照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书的方法,对基因组 DNA 进行去除,反应条件为: 2 µL 的 5×gDNA Eraser Buffer、1 µL 的 gDNA Eraser、1 µg 的病毒 RNA、RNase Free 去离子水补齐至 10 µL,42℃孵育 2 min; (6)进行反转录,反应条件为: 10 µL 的上一步的反应液、1 µL 的 PrimeScript RT Enzyme Mix、1 µL 的 RT Primer Mix、4 µL 的 5×PrimeScript Buffer 2、4 µL 的 RNase Free 去离子水, 37℃孵育 15 min 后 85℃孵育 5 s; (7)进行荧光定量检测,反应体系为: 10 µL 的 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)、0.8 µL 的 GFP RT-F、0.8 µL 的 GFP RT-R、0.4 µL 的 ROXReference Dye II、2 µL 的反转录反应液、6 µL 的 RNase Free 去离子水,反应程序为: 95℃反应 30 s, 95℃反应 5 s、60℃反应 34 s 共 40 个循环, 95℃反应 15 s,60℃反应 60 s, 95℃反应 15 s。

GFP 蛋白表达水平测定方法如下:(1)将 EPC 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,25℃、 1% CO<sub>2</sub>条件下培养 12 h 后,分别接种 wtIHNV、rIHNV、rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、 rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒;(2)待 15℃、1% CO<sub>2</sub>条 件下感染 1 h 后弃掉病毒液,PBS 清洗 2 遍后更换为新鲜培养基;(3)分别于病毒感染 后的 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 和 84 h 利用多功能酶标仪检测 GFP 蛋白的荧光 值,确定不同病毒在各时间点的 GFP 蛋白表达情况。

# 5.3 研究结果

# 5.3.1 重组病毒全长 cDNA 质粒的构建

构建 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv、 rIHNV-GFP-Nv/L 毒株全长 cDNA 质粒 pIHNV-GFP-N/P、 pIHNV-GFP-P/M、 pIHNV-GFP-M/G、pIHNV-GFP-G/Nv、pIHNV-GFP-Nv/L 的过程中,构建策略如图 5-1 所 示。对上述重组质粒进行 PCR 鉴定,结果显示各重组质粒 PCR 产物均出现特异性条带, 大小约为 860 bp,与预期结果相符(图 5-2)。同时将 PCR 鉴定正确的重组质粒 pIHNV-GFP-N/P、 pIHNV-GFP-P/M、 pIHNV-GFP-M/G、 pIHNV-GFP-G/Nv 和 pIHNV-GFP-Nv/L 进行测序,结果显示,GFP 基因分别成功插入到 IHNV 病毒基因组的 N/P 之间、P/M 之间、M/G 之间、G/Nv 之间和 Nv/L 之间(数据未展示),说明各重组质 粒构建成功。



图 5-1 重组病毒全长 cDNA 质粒的构建策略

Fig. 5-1 Schematic diagram of cDNA construction of recombinant virus



图 5-2 重组质粒的 PCR 鉴定

M<sub>1</sub>为 DL 2000 Marker; 泳道 1 为 pIHNV-GFP-N/P 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 2 为 pIHNV-GFP-P/M 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 3 为 pIHNV-GFP-M/G 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 4 为 pIHNV-GFP-G/Nv 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 5 为 pIHNV-GFP-Nv/L 质粒的 PCR 鉴定结果

Fig. 5-2 PCR identification of recombinant plasmids

M<sub>1</sub>: DL 2000 Marker; Lane 1: PCR result of pIHNV-GFP-N/P plasmid; Lane 2: PCR result of pIHNV-GFP-P/M plasmid; Lane 3: PCR result of pIHNV-GFP-M/G plasmid; Lane 4: PCR result of pIHNV-GFP-G/Nv plasmid; Lane 5: PCR result of pIHNV-GFP-Nv/L plasmid

# 5.3.2 表达 GFP 蛋白的重组病毒的拯救及鉴定

# 5.3.2.1 重组病毒的测序鉴定

在进行 IHNV 病毒基因组中不同插入位点表达 GFP 蛋白的重组病毒拯救时,利用

PolyJet 体外 DNA 转染试剂,分别共转染 pIHNV-GFP-N/P、pIHNV-GFP-P/M、 pIHNV-GFP-M/G、pIHNV-GFP-G/Nv或 pIHNV-GFP-Nv/L 与辅助质粒(pHelp-N、pHelp-P、 pHelp-L 和 pHelp-Nv)。对拯救的重组病毒的基因组 RNA 进行提取,利用 PCR 的方法扩 增了涵盖病毒全基因组的片段,并对序列进行了测序。结果显示,GFP 基因均正确的插 入到了 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 病毒基因组的相应位点中,为后期测定不同插入位点 GFP 蛋白表达量 奠定了基础。

# 5.3.2.2 重组病毒表达 GFP 蛋白鉴定

为进一步确定拯救的重组病毒均能够正常表达 GFP 蛋白,本研究利用拯救后的重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和rIHNV-GFP-N/L 感染 EPC 细胞 48 h 后,检测了 GFP 蛋白的表达。结果显示(图 5-3),在荧光显微镜下,接种重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 的 EPC 细胞均能够观察到绿色荧光,而接种 rIHNV 病毒的细胞没有绿色荧光出现,表明本研究不但成功拯救了重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L,而且各重组病毒均能够成功表达外源 GFP 蛋白。



图 5-3 重组病毒免疫荧光检测

注:物镜40×

Fig. 5-3 Immunofluorescence analysis of recombinant virus

Note: Objective lens 40×

### 5.3.3 拯救病毒的生长特性鉴定

# 5.3.3.1 拯救病毒的滴度测定

为了研究重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、 rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 的生长动力学特性,本研究首先对各病毒生长过程 中的病毒滴度进行了测定。将 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、 rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 重组病毒分别接种于 EPC 细胞中,并于接种后的 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 和 84 h 收获病毒,经反复冻融后,采用 Reed-Muench 法测定病毒 TCID<sub>50</sub>,并绘制出各重组病毒的生长曲线。结果显示(图 5-4),与 wtIHNV 相比, rIHNV 在病毒感染的 48 h 内生长略有延迟; 但在病毒感染的 60 h 后, rIHNV 与 wtIHNV 显示出相似的复制能力。而插入 GFP 基因的重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、 rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L, 整体上与 rIHNV 保持着相似的生长特性,各重组病毒的滴度在病毒感染的 12 h 到 72 h 均呈现出明 显上升趋势,并在 72 h 到 84 h 趋于稳定,进入平台期。但在对插入 GFP 基因的各重组 病毒进行对比的过程中发现,在 IHNV 基因组中插入 GFP 基因后,重组病毒的生长情况 明显受到影响。其中,在IHNV 基因组 N/P 之间插入 GFP 基因的重组病毒 rIHNV-GFP-N/P 的生长速度受到影响最为严重,在同一时间点上其病毒滴度约低于其他重组病毒 0.5 到1 个滴度。虽然重组病毒 rIHNV-GFP-P/M 在同一时间点上的病毒滴度略高于 rIHNV-GFP-N/P,但其滴度仍低于其他重组病毒。重组病毒 rIHNV-GFP-M/G、 rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 在同一时间点上的病毒滴度则略高于 rIHNV-GFP-N/P 和 rIHNV-GFP-P/M,并且与未插入 GFP 外源基因的 rIHNV 病毒滴度相 近,生长曲线也更加相似。



图 5-4 重组病毒的生长动力学特性



# 5.3.3.2 拯救病毒的 mRNA 表达水平检测

为了进一步确定外源基因 GFP 插入对病毒复制的影响,本研究将 rIHNV-GFP-N/P、

rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 重组病毒分别 接种于 EPC 细胞中,并于接种后的 12 h、24 h、36 h 和 48 h 收获细胞,提取 RNA 后对 各拯救病毒的 mRNA 表达水平进行了检测。结果显示(图 5-5),与 rIHNV 和 wtIHNV 相比,插入 GFP 基因的重组病毒的 mRNA 表达水平明显降低,并且病毒的 mRNA 表达 水平关系为 rIHNV-GFP-N/P < rIHNV-GFP-P/M < rIHNV-GFP-M/G < rIHNV-GFP-G/Nv < rIHNV-GFP-Nv/L。以上结果说明,外源基因 GFP 的插入位置对 IHNV 病毒的复制有较大 的影响,外源基因插入的位置距离病毒基因组的 3' 端越近,对病毒复制效率的影响就越 大。



图 5-5 重组病毒 N 基因的 mRNA 水平



#### 5.3.3.3 拯救病毒的间接免疫荧光检测

本研究利用间接免疫荧光检测的方法,在各重组病毒感染 60 h 后,检测了外源基因 GFP 的插入对病毒复制的影响。结果发现(图 5-6),各表达 GFP 的重组病毒的扩增效率 依次为 rIHNV-GFP-N/P < rIHNV-GFP-P/M < rIHNV-GFP-M/G < rIHNV-GFP-G/Nv < rIHNV-GFP-Nv/L,并且这一发现与各重组病毒的生长动力学结果一致。



В



图 5-6 重组病毒间接免疫荧光检测

A. 重组病毒表达 IHNV 蛋白的间接免疫荧光检测图; B. 荧光强度统计图; 物镜 40×

Fig. 5-6 Indirect immunofluorescence analysis of recombinant virus

A. Indirect immunofluorescence analysis of recombinant virus expressing IHNV protein; B. Statistical map of fluorescence intensity, Note: Objective lens 40×

# 5.3.4 拯救病毒 GFP 表达水平检测

# 5.3.4.1 拯救病毒 GFP 的 mRNA 表达水平检测

为了在转录水平确定重组病毒 rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、 rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-Nv/L 表达外源基因 GFP 的水平,同时验证 IHNV 病毒 的 mRNA 转录水平按照基因组 3' 向 5' 递减的原则,本研究采用 RT-qPCR 的方法,对各 重组病毒表达 GFP 基因的 mRNA 水平进行了检测,检测过程中以各重组病毒的 N 基因 作为内参。为了直观展示不同重组病毒中 GFP 基因 mRNA 表达量的差异,研究中以重组 病毒 GFP 基因 mRNA 表达量水平最高值作为 100%,绘制各重组病毒 GFP 基因 mRNA 表达量。结果显示(图 5-7),在各重组病毒中,rIHNV-GFP-N/P 对外源 GFP 基因的 mRNA 表达量最高,其次为重组病毒 rIHNV-GFP-P/M (其 24 h 的 GFP mRNA 表达量是 rIHNV-GFP-N/P 的 72%,48 h 为 rIHNV-GFP-N/P 的 65%),之后是 rIHNV-GFP-M/G 和 rIHNV-GFP-G/Nv,而重组病毒 rIHNV-GFP-Nv/L 对外源 GFP 基因的 mRNA 表达量最低。 综上,各重组病毒对外源 GFP 基因的 mRNA 表达量由高到低依次为 IHNV-GFP-N/P、 rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv、rIHNV-GFP-N/L。



图 5-7 重组病毒 GFP 基因的 mRNA 水平

Fig. 5-7 Intracellular GFP gene mRNA abundance of recombinant virus

5.3.4.2 拯救病毒 GFP 的蛋白表达水平检测

RT-qPCR 结果显示,外源基因的插入位点距离 IHNV 基因组的 3' 端越近,对应的 mRNA 的转录量也越多。而各重组病毒的生长动力学结果表明,外源基因的插入位点距 离 IHNV 基因组的 3' 端越近,外源基因的插入对于病毒复制效率的影响也就越大,最终 导致病毒滴度也会受到较大影响。为了进一步确定以 IHNV 病毒作为载体表达外源基因 的最佳插入位点,本研究中利用多功能酶标仪对不同时间点各重组病毒的 GFP 蛋白表达 量进行了检测。研究中以 GFP 表达量最高值为 100%,绘制了各重组病毒不同时间点 GFP 蛋白的相对表达量。结果显示(图 5-8),在感染 EPC 细胞 60 h 后,各重组病毒表达 GFP 蛋白的水平表现出明显的差异,重组病毒 rIHNV-GFP-P/M 的 GFP 蛋白表达水平最高,各重组病毒表达 GFP 蛋白水平由高到低依次为 rIHNV-GFP-P/M > IHNV-GFP-N/P > rIHNV-GFP-M/G > rIHNV-GFP-G/Nv > rIHNV-GFP-N/L。以上结果表明,在综合考虑外 源基因的插入对病毒复制的影响,以及 IHNV 病毒基因组 mRNA 转录特性的条件下,将 外源基因插入到 IHNV 病毒基因组的 P/M 基因之间时,外源基因的表达量最高;而当外

源基因插入到 IHNV 病毒基因组的 N/P 基因之间时,由于外源基因的插入位点距离病毒 基因组的 3'端过近,导致病毒的增殖效率受到了严重的影响,致使外源蛋白的表达量显 著下降。





# 5.4 讨论

近年来,研究人员报道了利用反向遗传操作技术开发重组减毒 IHNV 以预防 IHNV 感染<sup>[82,205]</sup>。由于重组减毒 IHNV 能够起到免疫保护作用,因此,研究人员利用 IHNV 作为载体表达外源抗原来预防其他病毒性疾病,如 VHSV、SVCV 和流感病毒<sup>[129-131]</sup>。研究 表明,利用重组 IHNV 作为载体表达 SVCV 的抗原蛋白,免疫后的鲤鱼在 SVCV 病毒感 染时的相对存活率达 80%以上<sup>[129]</sup>。Rouxel 等利用重组 IHNV 作为载体,表达流感病毒的 HA 蛋白,结果显示免疫 rIHNV-HA 后,引发了宿主抗流感病毒的特异性免疫反应,流感 病毒对小鼠的致死率显著降低<sup>[131]</sup>。这些结果表明,IHNV 不仅可以作为鱼类病原体的疫 苗载体,还可以作为其他哺乳动物病原体的疫苗载体。

自 IHNV 反向遗传系统建立以来,各种 IHNV 毒株被用作表达外源基因的疫苗载体。 外源抗原基因通常被构建成一个额外独立的转录单元(Independent transcription unit, ITU),并插入到病毒的不同基因组非编码连接区中<sup>[206]</sup>。ITU 由病毒基因开始序列(Gene star, GS)和结束序列(Gene end, GE)组成,外源基因通常插入到这两个序列之间进 行表达。该表达结构通常用来评估实验室和临床试验中的候选疫苗,确定其保护宿主免 受靶向病原体感染的能力<sup>[86, 129, 131, 207]</sup>。多项研究结果表明,IHNV 可作为表达外源抗原 的载体,用于预防其他病毒性疾病<sup>[129-131]</sup>。对于疫苗载体而言,影响疫苗接种反应的最重 要因素是外源基因的表达水平。然而,外源基因在 IHNV 载体中的最佳表达位点尚未确 定。人们普遍认为,在病毒 mRNA 转录和蛋白质表达的过程中,病毒基因组的表达存在 着 3'向 5' 递减的效应,并且主要通过在每个基因连接处的 GE 和 GS 起作用<sup>[208]</sup>。因此, 病毒基因组中邻近启动子的基因比距离启动子较远的基因能够更有效地表达。目前这一理论在新城疫病毒中已经得到了证实<sup>[208-209]</sup>,然而对于 IHNV,这一假设仍有待证实。

为了确定 IHNV 作为表达载体,外源基因的最佳插入位点,在本研究中,我们将一个编码 GFP 的额外 ITU 插入到病毒基因组的不同非编码基因连接区域,以确定外源基因 的最佳表达位置。研究中共构建了 5 种不同位置表达 GFP 蛋白的重组病毒: rIHNV-GFP-N/P 、 rIHNV-GFP-P/M 、 rIHNV-GFP-M/G 、 rIHNV-GFP-G/Nv 和 rIHNV-GFP-N/L。结果发现,GFP 基因的插入位点越靠近病毒基因组的 3'端,对病毒 生长动力学的影响越大。其次,GFP 基因的插入位点越靠近病毒基因组的 3'端,对病毒 生长动力学的影响越大。其次,GFP 基因的 mRNA 表达水平从 3' 端到 5'端依次降低。 通过 GFP 蛋白荧光强度测定发现,rIHNV-GFP-P/M 的 GFP 蛋白表达量最高,其次为 rIHNV-GFP-N/P > rIHNV-GFP-M/G > rIHNV-GFP-O/Nv > rIHNV-GFP-Nv/L。这证实了基 因离启动子越近,其表达水平越高(除了 N-P 基因连接)。关于水泡性口炎病毒(VSV) 的研究表明,N 蛋白和 P 蛋白的比例对 VSV 病毒的高效复制和衣壳化具有重要意义<sup>[210]</sup>。 因此我们认为,GFP 基因的插入改变了 IHNV 病毒 N 蛋白和 P 蛋白的比例,这种改变影 响了病毒的复制,导致 N-P 基因连接的 GFP 蛋白表达异常,这一结果也在新城疫病毒的 研究中得到了证实<sup>[208-209,211]</sup>。

这些报道的结果表明,要获得外源基因的最佳表达,必须在外源基因插入基因组的 位置、病毒的复制和外源基因表达的丰度之间保持微妙的平衡。考虑到病毒高效复制对 N蛋白和P蛋白的特殊需求,我们认为 N-P基因连接区不是 IHNV 表达外源基因的最佳 位点,P-M基因连接区可能是最佳位点。虽然 GFP基因插入 P-M基因连接区影响了下游 几个病毒基因的表达,但 rIHNV-GFP-P/M 病毒的滴度也达到 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL,与 wtIHNV 在同一数量级水平上,并不会显著影响病毒的复制及实际应用的效果。评价基因表达载 体的关键因素是外源基因表达水平的高低,因此我们认为 P-M 基因连接区是 IHNV 作为 载体表达外源基因的最佳插入位点。

### 5.5 本章小结

综上所述,我们成功构建了5种不同位置表达GFP蛋白的重组病毒:rIHNV-GFP-N/P、rIHNV-GFP-P/M、rIHNV-GFP-M/G、rIHNV-GFP-G/Nv和rIHNV-GFP-Nv/L。通过测定GFPmRNA表达水平,证实了病毒基因组中邻近启动子的基因比距离启动子较远的基因能够更有效地表达。同时GFP蛋白的荧光强度分析表明,P-M基因连接区是外源基因插入IHNV的最佳表达位点。通过在P-M基因连接区插入特定抗原基因,IHNV可作为疫苗载体用于预防其他疾病。

# 6 预防 IHN 和 IPN 二联弱毒疫苗的构建及其应用

### 6.1 研究材料

### 6.1.1 病毒、细胞、质粒和实验动物

IHNV 毒株 Blk94(IHNV-Blk94, GenBank No: DQ164100)由美国地质调查局西部 渔业研究中心的 Gael Kurath 教授和中国深圳出入境检验检疫局刘荭研究员惠赠。IPNV 毒株 ChRtm213(IPNV-ChRtm213, GenBank No: KX234591)分离自中国云南省某虹鳟 养殖场,经本实验室分离纯化并保存。大鳞大麻哈鱼胚胎细胞(CHSE-214, ATCC 保藏 号为 CRL-1681)由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵教授惠赠。无特定病原 (IHNV和IPNV)的虹鳟鱼购自本溪艾格莫林实业有限公司。其余所用质粒和细胞如4.1.1 所示。

### 6.1.2 试剂和细胞培养材料

鼠抗 IPNV VP2 蛋白抗体由本实验室制作并保存,FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体(货号 ab6785)、兔抗 β-tubulin 抗体(货号 ab179513)、HRP 标记兔抗小鼠 IgG 抗体(货号 ab6728)购自 Abcam 公司。NC 膜(货号 63301783)购自 PALL 公司;脱脂奶粉(货号 1053907)购自 BD 公司;其余所用试剂和细胞培养材料如 2.1.2 所示。

#### 6.1.3 主要仪器设备

化学发光成像系统(申花科技有限公司),其余设备如2.1.3所示。

### 6.1.4 引物设计及合成

利用 Primer Premier 5 软件,根据已公布的 IHNV-Blk94 毒株序列,设计引物序列用于 IHNV-Blk94 病毒全长 cDNA 质粒的构建;同时根据已公布的 IPNV-ChRtm213 毒株的 VP2 序列,设计引物序列用于插入 IHNV-Blk94 基因组的 VP2 基因的克隆,所有引物均 由吉林省库美生物科技有限公司合成。

# 6.2 研究方法

#### 6.2.1 细胞培养和病毒增殖

EPC 细胞培养方法及 IHNV 病毒增殖方法如 2.2.1 所示, CHSE-214 细胞培养方法及 IPNV 病毒增殖方法如 3.2.1 所示, BHK-21-T7 细胞培养方法如 4.2.1 所示。

### 6.2.2 病毒 RNA 的提取

本研究中分别对 IHNV-Blk94 病毒和 IPNV-ChRtm213 病毒的 RNA 进行提取,具体提取步骤参照 2.2.2 所示。

## 6.2.3 重组病毒全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒的过程中,首先进行 rBlk94 毒株全长基因

组序列的克隆与连接,待鉴定正确后进行 IPNV-ChRtm213 毒株 VP2 基因的插入。在构建 过程中 IHNV-Blk94 毒株全长序列分为5 段进行克隆,分别为H1、H2、H3、H4 和H5。 采用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒提供的方法,按H1、H2、H3、H4 和H5 的顺序依 次连接入 pBluescript SK 载体中,其中插入H1 片段后的中间载体命名为 pBlue-H1,插入 H1 和 H2 后的中间载体命名为 pBlue-H2,插入H1、H2 和 H3 后的载体命名为 pBlue-H3, 插入H1、H2、H3 和 H4 后的载体命名为 pBlue-H4,插入H1、H2、H3、H4 和 H5 后的 载体命名为 pIHNV-Blk94。鉴定正确后的 pIHNV-Blk94 质粒中插入 IPNV-ChRtm213 毒株 VP2 基因,最终的质粒命名为 pBlk94-VP2。

# 6.2.3.1 中间载体 pBlue-H1 的构建

(1) H1 插入片段的克隆

以提取的 IHNV-Blk94 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 H1-F 和 H1-R 为引物,进行 IHNV-Blk94 基因组 H1 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 H1-F 和 H1-R 外,其余反应条件如 4.2.3.1 所示。

Drimor	Primer	Primer sequence	
FIIIIei	name		
1	H1-F	CGACTCACTATAGGGGTATAAAAAAAGTAACTTGACTA	
2	H1-R	TTCTTCACCTCTTGGGATCCTGCGTTGTCT	
3	H2-F	AGGATCCCAAGAGGTGAAGAACATGGCCACT	
4	H2-R	AGCCTTTGTGCATAGCGTAGACGTCATTTATT	
5	H3-F	AAATGACGTCTACGCTATGCACAAAGGCTCCAT	
6	H3-R	TGAGCGCTGTTTTTGCATGACGCGTTCTA	
7	H4-F	AGAACGCGTCATGCAAAAAACAGCGCTCACCCA	
8	H4-R	TTGTGATTCCATGGGCATTGAGTAGAATTT	
9	H5-F	AATGCCCATGGAATCACAACGGCCCCTTCA	
10	H5-R	GGGACCATGCCGGCCGTATAAAAAAGTAACAGAAGGGTT	
11	VP2-F	AGTTCAAACGAGAGCATGAACACATCCAAGGCAACCGCAACT	
12	VP2-R	TCTTGAAAATAGACATGCTCTCGTTTGAACTGACTCTTGGA	
13	pBlk-F	ATGTCTATTTTCAAGAGAGCAAAGAGAACAGTTCTGATCCCT	
14	pBlk-R	GCTCTCGTTTGAACTGACTCTTGGATTTCGTTTGGAACGATA	

表 6-1 构建 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒所用引物

Table 6-1 Primer sequences used for rBlk94-VP2 strain cDNA clone construction

(2) pBluescript SK 载体的克隆

pBluescript SK 载体的克隆方法如 4.2.3.1 所示。

(3) H1 插入片段及 pBluescript SK 载体的回收

IHNV-Blk94 毒株 H1 片段及 pBluescript SK 载体的回收方法如 4.2.3.1 所示,回收后 的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) H1 片段与 pBluescript SK 载体的连接及鉴定

将(3)中经 PCR 纯化回收的 H1 与 pBluescript SK 载体进行连接,H1 插入片段加入 量为 114 ng,pBluescript SK 载体的加入量为 86 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更 改为 H1-F 和 H1-R。其余条件如 4.2.3.1 所示,测序正确的质粒命名为 pBlue-H1。

## 6.2.3.2 中间载体 pBlue-H2 的构建

(1) H2 插入片段的克隆

以提取的 IHNV-Blk94 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 H2-F 和 H2-R 为引物,进行 IHNV-Blk94 基因组 H2 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 H2-F 和 H2-R 外,其余反应条件如 4.2.3.2 所示。

(2) pBlue-H1 载体的酶切

pBlue-H1 载体的酶切方法如 4.2.3.2 所示。

(3) H2 插入片段及 pBlue-H1 载体的回收

IHNV-Blk94 毒株 H2 片段及 pBlue-H1 载体的回收方法如 4.2.3.2 所示,回收后的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) H2 片段与 pBlue-H1 载体的连接及鉴定

将(3)中经 PCR 纯化回收的 H2 与 pBlue-H1 载体进行连接,H2 插入片段加入量为 87 ng,pBlue-H1 载体的加入量为 113 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更改为 H2-F 和 H2-R。其余条件如 4.2.3.2 所示,测序正确的质粒命名为 pBlue-H2。

### 6.2.3.3 中间载体 pBlue-H3 的构建

(1) H3 插入片段的克隆

以提取的 IHNV-Blk94 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 H3-F 和 H3-R 为引物,进行 IHNV-Blk94 基因组 H3 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 H3-F 和 H3-R 外,其余反应条件如 4.2.3.3 所示。

(2) pBlue-H2 载体的酶切

pBlue-H2 载体的酶切方法如 4.2.3.3 所示。

(3) H3 插入片段及 pBlue-H2 载体的回收

IHNV-Blk94 毒株 H3 片段及 pBlue-H2 载体的回收方法如 4.2.3.3 所示,回收后的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) H3 片段与 pBlue-H2 载体的连接及鉴定

将(3)中经 PCR 纯化回收的 H3 与 pBlue-H2 载体进行连接,H3 插入片段加入量为 91 ng,pBlue-H2 载体的加入量为 109 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更改为 H3-F 和 H3-R。其余条件如 4.2.3.3 所示,测序正确的质粒命名为 pBlue-H3。

### 6.2.3.4 中间载体 pBlue-H4 的构建

(1) H4 插入片段的克隆

以提取的 IHNV-Blk94 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 H4-F 和 H4-R 为引物,进行 IHNV-Blk94 基因组 H4 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 H4-F 和 H4-R 外,其余反应条件如 4.2.3.4 所示。

(2) pBlue-H3 载体的酶切

pBlue-H3 载体的酶切方法如 4.2.3.4 所示。

(3) H4 插入片段及 pBlue-H3 载体的回收

IHNV-Blk94 毒株 H4 片段及 pBlue-H3 载体的回收方法如 4.2.3.4 所示,回收后的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) H4 片段与 pBlue-H3 载体的连接

将(3)中经 PCR 纯化回收的 H4 与 pBlue-H3 载体进行连接,H4 插入片段加入量为 59 ng,pBlue-H3 载体的加入量为 141 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更改为 H4-F 和 H4-R。其余条件如 4.2.3.4 所示,测序正确的质粒命名为 pBlue-H4。

### 6.2.3.5 plHNV-Blk94 质粒的构建

(1) H5 插入片段的克隆

以提取的 IHNV-Blk94 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 H5-F 和 H5-R 为引物,进行 IHNV-Blk94 基因组 H5 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 H5-F 和 H5-R 外,其余反应条件如 4.2.3.5 所示。

(2) pBlue-H4 载体的酶切

pBlue-H4 载体的酶切方法如 4.2.3.5 所示。

(3) H5 插入片段及 pBlue-H4 载体的回收

IHNV-Blk94 毒株 H5 片段及 pBlue-H4 载体的回收方法如 4.2.3.5 所示,回收后的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) H5 片段与 pBlue-H4 载体的连接

将(3)中经 PCR 纯化回收的 H5 与 pBlue-H4 载体进行连接,H5 插入片段加入量为 49 ng,pBlue-H4 载体的加入量为 151 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更改为 H5-F 和 H5-R。其余条件如 4.2.3.5 所示,测序正确的质粒命名为 pIHNV-Blk94。

(5) pIHNV-Blk94 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

#### 6.2.3.6 pBlk94-VP2 质粒的构建

(1) VP2 插入片段的克隆

以提取的 IPNV-ChRtm213 毒株的 RNA 为模板,表 6-1 中的 VP2-F 和 VP2-R 为引物,进行 IPNV-ChRtm213 毒株 VP2 基因的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 VP2-F 和 VP2-R,反应延伸时间更改为 86 s 外,其余反应条件如 4.2.3.1 中所示。

(2) pIHNV-Blk94 载体的克隆

以 pIHNV-Blk94 载体为模板,表 6-1 中的 pBlk-F 和 pBlk-R 为引物,进行 pIHNV-Blk94 载体的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 pBlk-F 和 pBlk-R,延伸时间更改为

856 s 外,其余反应条件如 4.2.3.1 所示。

(3) VP2 插入片段及 pIHNV-Blk94 载体的回收

**IPNV-ChRtm213** 毒株 VP2 基因片段及 pIHNV-Blk94 载体的回收方法如 4.2.3.1 所示, 回收后的产物均利用 ScanDrop 200 Spectrophotometer 测定浓度,并保存于-20℃备用。

(4) VP2 插入片段与 pIHNV-Blk94 载体的连接及鉴定

将(3)中经 PCR 纯化回收的 VP2 片段与 pIHNV-Blk94 载体进行连接,VP2 插入片段加入量为 34 ng,pIHNV-Blk94 载体的加入量为 166 ng。菌落 PCR 鉴定中,反应所用引物更改为 VP2-F 和 VP2-R,反应延伸时间更改为 86 s。其余条件如 4.2.3.1 所示,测序正确的质粒命名为 pBlk94-VP2。

(5) pBlk94-VP2 质粒大提

此步骤具体操作同 4.2.3.6。

### 6.2.4 重组病毒辅助质粒的构建

# 6.2.4.1 辅助质粒 pHelp-NBIk94 的构建

在进行 IHNV-Blk94 毒株辅助质粒 pHelp-N<sub>Blk94</sub> 的构建时, 克隆 IHNV-Blk94 毒株 N 基因所用引物更改为表 6-2 中的 HN-F 和 HN-R, 其余操作与 4.2.4.1 中相同。将鉴定正确 的菌液进行扩大培养后,送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序,测序正确的质粒 命名为 pHelp-N<sub>Blk94</sub>。

表 6-2 构建辅助质粒所用引物

Primer	Primer name	Primer sequence	
1 HN-F		GGTACCAAACACGATAATACCATGACAAGCGCACTCAGA	
	HN-F	GAGACGT	
2	HN-R	GCTAGCTCGGATCTTAGGTCATCAGCGGAATGAATCGGAG	
		TCTCCTGGCT	
3	HP-F	GGTACCAAACACGATAATACCATGTCAGATGGAGAAGGA	
		GAACA	
4	HP-R	GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATTGACCTTGCTTCATG	
		CGCTTCT	
5 H	HNv-F	GGTACCAAACACGATAATACCATGGACCACTGTGACACA	
		AACACGA	
6	HNv-R	GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATCTGGGATAAGCAAGA	
		AAGTCT	
7	HL-F	GGTACCAAACACGATAATACCATGGACTTCTTCGATCTTG	
		ACATAGA	
8	HL-R	GCTAGCTCGGATCTTAGGTCACTATTGTTCGCCTAGTGGA	

Table 6-2 Primer sequences used for help plasmids construction

AAGAA

### 6.2.4.2 辅助质粒 pHelp-Pык94 的构建

在进行 IHNV-Blk94 毒株辅助质粒 pHelp-P<sub>Blk94</sub> 的构建时, 克隆 IHNV-Blk94 毒株 P 基因所用引物更改为表 6-2 中的 HP-F 和 HP-R,其余操作与 4.2.4.2 中相同。将鉴定正确 的菌液进行扩大培养后,送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序,测序正确的质粒 命名为 pHelp-P<sub>Blk94</sub>。

# 6.2.4.3 辅助质粒 pHelp-NvBIk94 的构建

在进行 IHNV-Blk94 毒株辅助质粒 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub> 的构建时, 克隆 IHNV-Blk94 毒株 Nv 基因所用引物更改为表 6-2 中的 HNv-F 和 HNv-R, 其余操作与 4.2.4.3 中相同。将鉴 定正确的菌液进行扩大培养后,送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序,测序正确 的质粒命名为 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub>。

## 6.2.4.4 辅助质粒 pHelp-Lык94 的构建

在进行 IHNV-Blk94 毒株辅助质粒 pHelp-L<sub>Blk94</sub> 的构建时, 克隆 IHNV-Blk94 毒株 L 基因所用引物更改为表 6-2 中的 HL-F 和 HL-R,其余操作与 4.2.4.4 中相同。将鉴定正确的菌液进行扩大培养后,送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序,测序正确的质粒 命名为 pHelp-L<sub>Blk94</sub>。

## 6.2.5 重组病毒的拯救及鉴定

### 6.2.5.1 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒的拯救

在进行 rBlk94 病毒的拯救时,分别取 pIHNV-Blk94 (1 µg)、pHelp-N<sub>Blk94</sub> (0.5 µg)、 pHelp-P<sub>Blk94</sub>(0.5 µg)、pHelp-L<sub>Blk94</sub>(0.2 µg)和 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub>(0.1 µg)质粒共转染 BHK-21-T7 细胞;在进行 rBlk94-VP2 病毒的拯救时,分别取 pBlk94-VP2 (1 µg)、pHelp-N<sub>Blk94</sub> (0.5 µg)、pHelp-P<sub>Blk94</sub> (0.5 µg)、pHelp-L<sub>Blk94</sub> (0.2 µg)和 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub> (0.1 µg)质粒共转染 BHK-21-T7 细胞,其余操作如 4.2.5.1 所示。

### 6.2.5.2 拯救病毒的酶切鉴定及全基因组测序

采用 2.2.2 的方法,对重组病毒的基因组 RNA 进行提取。对拯救病毒进行酶切鉴定的具体操作如下:以提取的病毒基因组 RNA 为模板,表 6-3 中的 FraA-F 和 FraA-R 为引物,进行病毒基因组中 Fragment A 片段的克隆。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 FraA-F 和 FraA-R,反应延伸时间更改为 102 s 外,其余反应条件如 4.2.5.2 所示。在酶切反应中,对回收产物 Fragment A 片段采用 *Nhe* I 进行酶切鉴定,反应条件如 4.2.5.2 所示,酶切产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析。对拯救病毒中的 VP2 进行 PCR 鉴定具体操作如下:以提取的病毒基因组 RNA 为模板,表 6-1 中的 VP2-F 和 VP2-R 为引物,进行病毒基因组中 VP2 片段的鉴定。PCR 反应中,除反应所用引物更改为 VP2-F 和 VP2-R,反应延伸时间更改为 86 s 外,其余反应条件如 4.2.5.2 所示。

对重组病毒进行全基因组测序的具体操作如下:以提取的重组病毒基因组 RNA 为模板,利用表 6-1 中的引物,对重组病毒的全基因组进行克隆,克隆产物经回收后,送往

吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

表 6-3 重组病毒基因组鉴定所用引物

Table 6-3 Primer sequences used for recombinant virus genome sequence identification

Primer	Primer name	Primer sequence
1	FraA-F	AAGCGGGCGGTGAGTCACGTCGGAGGAGA
2	FraA-R	TCTCCTCCTCAACGTACTTTAGGATGAGTT

#### 6.2.5.3 重组病毒间接免疫荧光鉴定

利用 EPC 细胞对重组病毒进行间接免疫荧光鉴定,除接种病毒更改为 rBlk94 和 rBlk94-VP2 外,其余操作如 4.2.5.3 所示,最终利用荧光显微镜对病毒感染后的细胞进行 拍照分析。

## 6.2.5.4 重组病毒表达 VP2 蛋白的 Western Blot 分析

利用 EPC 细胞对重组病毒表达外源 VP2 蛋白的情况进行 Western Blot 分析,具体操 作步骤如下:(1)将 EPC 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,25℃、1% CO<sub>2</sub>条件下培养 12 h 后,分别接种 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒;(2)待 15℃、1% CO<sub>2</sub>条件下感染 1 h 后,弃 掉病毒液,更换为新鲜培养基;(3)培养 48 h 后,弃掉培养基,利用 PBS 溶液洗涤 3 遍;

(4)加入含有1 mM PMSF 的 RIPA 冰上裂解细胞5 min 后,4℃条件下 12000 g 离心5 min; (5)上清液中加入 SDS-PAGE 上样缓冲溶液后,进行蛋白凝胶电泳,电泳条件为 120 V、 90 min;(6)电泳结束后进行转膜,条件为 230 mA、120 min;(7)加入 5%的脱脂奶粉 对 NC 膜 37℃封闭1 h 后,分别加入鼠抗 IPNV VP2 抗体和兔抗β-tubulin 抗体 37℃孵育 1 h;(8) PBS 洗涤 3 遍后,分别加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体和 HRP 标记兔抗小鼠 IgG 抗体 37℃孵育1 h;(9) PBS 洗涤 3 遍后,加入 ECL 发光液,利用化学发光成像系 统进行成像分析。

### 6.2.5.5 重组病毒生长特性鉴定

利用 EPC 细胞对重组病毒的生长特性进行鉴定,除接种病毒更改为 wtBlk94、rBlk94 和 rBlk94-VP2 外,其余操作如 4.2.5.5 所示。

### 6.2.5.6 重组病毒致病性鉴定

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 5 组,每组 50 尾分别装在 15℃ 的循环水箱 中。当分组暂养两周后,虹鳟鱼分别腹腔注射 IHNV-Sn1203 病毒、wtBlk94 病毒、rBlk94 病毒和 rBlk94-VP2 病毒,注射病毒剂量为 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾,同时设置同体积 PBS 注射 作为对照组。在进行攻毒后的 25 d 内每天观察并记录虹鳟死亡情况,利用 Graphpad Prism 软件绘制攻毒后的生存曲线。

### 6.2.6 重组病毒免疫保护效果的检测

### 6.2.6.1 重组病毒对 IHNV 的免疫保护效果

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 4 组,每组 50 尾分别装在 15℃ 的循环水箱

中。当分组暂养两周后,虹鳟鱼分别腹腔注射 rBlk94 病毒和 rBlk94-VP2 病毒,注射病毒 剂量为 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾,同时设置同体积 PBS 注射作为对照组(2组)。在注射免疫后 的第 45 天进行 IHNV 攻毒实验,腹腔注射免疫 rBlk94 病毒、rBlk94-VP2 病毒和同体积 PBS 的 3 组,每组虹鳟鱼分别腹腔注射 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾的 IHNV-Sn1203 病毒,另外一 组 PBS 免疫组,注射同体积 PBS 注射作为攻毒对照。在进行攻毒后的 25 d 内每天观察 并记录虹鳟死亡情况,利用 Graphpad Prism 软件绘制攻毒后的生存曲线。

Gene name	Primer name	Primer sequence
VP1	VP1 RT/F	ATCCTGCCCGCTAATGAATC
	VP1 RT/R	CGGCCTGTGCGGTGGTAGAT
VP3	VP3 RT/F	GCCGTTCGCATCTCACTGGA
	VP3 RT/R	GGTCGGCTTTGTTATGGTCTGT
IFN-1	IFN-1 RT/F	AGAATGCCCCAGTCCTTTTCC
	IFN-1 RT/R	GACTTTGTCCTCAAACTCAGCATCA
IFN-γ	IFN-γ RT/F	GTTGAGGGCCATGGATGTG
	IFN-γ RT/R	TCCAGCCCATCAAGCAGAA
M. 1	Mx-1 RT/F	AGCGTCTGGCTGATCAGATT
IVIX-1	Mx-1 RT/R	AGCTGCTCGATGTTGTCCTT
IcM	IgM RT/F	CAAACCGGTGGAAGCTACAT
Igivi	IgM RT/R	AGACGGCTGCTGCAGATATT
IgT	IgT RT/F	AACATCACCTGGCACATCAA
	IgT RT/R	TTCAGGTTGCCCTTTGATTC
CD4	CD4 RT/F	CTGACCTCTGACCTGAAAGTG
	CD4 RT/R	TCCACAATTCACACCTCCAC
CD8	CD8 RT/F	GACTGCTGGCTGTGGCTTCC
	CD8 RT/R	CCCCGGAGCTGCCATTCT
B A atin	β-Actin RT/F	GCCGGCCGCGACCTCACAGACTAC
p-Acuit	β-Actin RT/R	CGGCCGTGGTGGTGAAGCTGTAAC

表 6-4 RT-qPCR 检测所用引物 Table 6-4 Primer sequences for RT-qPCR

# 6.2.6.2 重组病毒对 IPNV 的免疫保护效果

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 3 组,每组 50 尾分别装在 15℃ 的循环水箱 中。当分组暂养两周后,虹鳟鱼分别腹腔注射 rBlk94 病毒和 rBlk94-VP2 病毒,注射病毒 剂量为 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾,同时设置同体积 PBS 注射作为免疫对照组。在注射免疫后的 第 45 天进行 IPNV 攻毒实验,每组虹鳟鱼分别腹腔注射 1.0×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/尾的 IPNV-ChRtm213 病毒。在进行攻毒后的第 15 天,分别取各组虹鳟鱼的肝脏、头肾、脾脏进行组织中病毒含量的测定。具体测定方法为:按照 TRIzol LS 试剂说明书提供的方法提取组织 RNA,以此 RNA 为模板,表 6-4 中的 VP1 RT/F 和 VP1 RT/R 为引物对IPNV-ChRtm213 病毒 VP1 基因的水平进行检测,以 VP3 RT/F 和 VP3 RT/R 为引物对IPNV-ChRtm213 病毒 VP3 基因的水平进行检测。

### 6.2.6.3 重组病毒对免疫相关基因的影响

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 3 组,每组 50 尾分别装在 15℃ 的循环水箱 中。当分组暂养两周后,虹鳟鱼分别腹腔注射 rBlk94 病毒和 rBlk94-VP2 病毒,注射病毒 剂量为 2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾,同时设置同体积 PBS 注射作为免疫对照组。分别于不同时间 点,取各免疫后组织进行免疫相关基因的检测。具体测定方法为:在注射免疫后的第 1、 4、7、15 天,分别取各组虹鳟鱼的肝脏、头肾、脾脏,按照 TRIzol LS 试剂说明书提供 的方法提取组织 RNA,以此 RNA 为模板,表 6-4 中的 IFN-1 RT/F 和 IFN-1 RT/R 为引物 对 IFN-1 基因的水平进行检测,以 IFN-γ RT/F 和 IFN-7 RT/R 为引物对 IFN-γ 基因的水平 进行检测,以 Mx-1 RT/F 和 Mx-1 RT/R 为引物对 Mx-1 基因的水平进行检测;在注射免 疫后的第 15 和 21 天,分别取各组虹鳟鱼的肝脏、头肾、脾脏,按照 TRIzol LS 试剂说明 书提供的方法提取组织 RNA,以此 RNA 为模板,以 CD4 RT/F 和 CD4 RT/R 为引物对 CD4 基因的水平进行检测,以 CD8 RT/F 和 CD8 RT/R 为引物对 CD8 基因的水平进行检 测,以 IgM RT/F 和 IgM RT/R 为引物对 IgM 基因的水平进行检测,以 IgT RT/F 和 IgT RT/R 为引物对 IgT 基因的水平进行检测。

### 6.2.6.4 重组病毒免疫的中和抗体检测

将平均体重为 5±1 g 的虹鳟鱼随机分为 2 组,每组 20 尾分别装在 15℃ 的循环水箱 中。当分组暂养两周后,虹鳟鱼分别腹腔注射 rBlk94-VP2 病毒(2.0×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/尾)和 同体积的 PBS(对照组)。在免疫后的第 45 天,采用尾静脉取血的方式对免疫后的虹鳟 鱼进行采血,采集的血液于 4℃放置 12 h 后,500 g 离心 10 min,收获上清液用于血清中 和抗体的检测。将收获的血清进行 2 倍的倍比稀释,起始稀释度为 20 倍,稀释后的血清 与 IHNV 病毒于 15℃孵育 1 h 后,接种到铺有 EPC 细胞的 96 孔细胞培养板中,15℃、 1% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7 天后统计结果,能保护 50%细胞免于 IHNV 病毒和 IPNV 病毒感染 时的血清最高稀释度即为中和抗体效价。

### 6.3 研究结果

#### 6.3.1 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒的构建

在构建 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒的过程中,首先进行 IHNV-Blk94 毒株全长 基因组序列的克隆与连接,待鉴定正确后进行 IPNV-ChRtm213 毒株 VP2 基因的插入。

构建 IHNV-Blk94 毒株全长基因组 cDNA 质粒 pIHNV-Blk94 的过程中,将病毒全长 基因组序列分为 5 段进行克隆,分别为 H1、H2、H3、H4 和 H5。采用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒提供的方法,按 H1、H2、H3、H4 和 H5 的顺序依次连接入 pBluescript SK 载

体中(图 6-1)。其中插入 H1 片段后的中间载体命名为 pBlue-H1,经 PCR 鉴定后,H1 片段成功插入到载体中,大小约为 2065 bp(图 6-2);其中插入 H2 片段后的中间载体命 名为 pBlue-H2,经 PCR 鉴定后,H2 片段成功插入到载体中,大小约为 2008 bp(图 6-2); 其中插入 H3 片段后的中间载体命名为 pBlue-H3,经 PCR 鉴定后,H3 片段成功插入到 载体中,大小约为 3021 bp(图 6-2);其中插入 H4 片段后的中间载体命名为 pBlue-H4, 经 PCR 鉴定后,H4 片段成功插入到载体中,大小约为 2144 bp(图 6-2);其中插入 H5 片段后的中间载体命名为 pIHNV-Blk94,经 PCR 鉴定后,H5 片段成功插入到载体中, 大小约为 1996 bp(图 6-2)。将 PCR 鉴定正确的重组质粒 pIHNV-Blk94 进行测序,结果 显示,IHNV-Blk94 毒株全长基因组成功插入到目的载体中(数据未展示)。

构建rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒 pBlk94-VP2 时,采用 In-Fusion HD Cloning Plus 试剂盒提供的方法,将 VP2 基因插入 pBlk94-VP2 质粒中,最终的质粒命名为 pBlk94-VP2, 经 PCR 鉴定后, VP2 基因成功插入到载体中,大小约为 1456 bp(图 6-2)。将 PCR 鉴定 正确的重组质粒 pBlk94-VP2 进行测序,结果显示, VP2 基因成功插入到 IHNV-Blk94 毒 株基因组中(数据未展示)。



图 6-1 rBlk94-VP2 毒株全长 cDNA 质粒的构建策略

Fig. 6-1 Schematic diagram of cDNA construction of rBlk94-VP2



图 6-2 重组质粒的 PCR 鉴定

M<sub>1</sub>为 DL 2000 Marker; 泳道 1 为 H1 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 2 为 H2 片段的 PCR 鉴定结果; 泳 道 3 为 H3 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 4 为 H4 片段的 PCR 鉴定结果; 泳道 5 为 H5 片段的 PCR 鉴 定结果; 泳道 6 为 VP2 片段的 PCR 鉴定结果; M<sub>2</sub> 为 DL 15000 marker

#### Fig. 6-2 PCR identification of recombinant plasmids

M<sub>1</sub>: DL 2000 marker; Lane 1: PCR result of H1 fragment; Lane 2: PCR result of H2 fragment; Lane 3: PCR result of H3 fragment; Lane 4: PCR result of H4 fragment; Lane 5: PCR result of H5 fragment; Lane 6: PCR result of VP2 fragment; M<sub>2</sub>: DL 15000 marker

### 6.3.2 rlHNV-Blk94 毒株辅助质粒的构建

在进行 rIHNV-Blk94 毒株辅助质粒的构建时,辅助质粒 pHelp-N<sub>Blk94</sub>、pHelp-P<sub>Blk94</sub>、 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub>和 pHelp-L<sub>Blk94</sub>的构建策略相同:均以提取的 IHNV-Blk94 病毒 RNA 为模板, 表 6-2 中的对应引物进行 PCR,克隆出构建辅助质粒用的 N、P、Nv 和 L 基因;辅助质 粒载体均采用 *Kpn* I 和 *Nhe* I 双酶切的方法获得,PCR 和双酶切产物经回收后连接,即获 得相应辅助质粒载体。对 pHelp-N<sub>Blk94</sub> 辅助质粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 1206 bp 的特 异性条带,与预期结果一致(图 6-3);对 pHelp-P<sub>Blk94</sub> 辅助质粒进行 PCR 鉴定,结果出 现约 723 bp 的特异性条带,与预期结果一致(图 6-3);对 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub> 辅助质粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 366 bp 的特异性条带,与预期结果一致(图 6-3);对 pHelp-L<sub>Blk94</sub> 辅 助质粒进行 PCR 鉴定,结果出现约 5991 bp 的特异性条带,与预期结果一致(图 6-3)。 将上述重组质粒进行测序(数据未展示),结果显示 N、P、Nv 和 L 基因均已分别成功插 入到辅助质粒载体中,说明辅助质粒 pHelp-N<sub>Blk94</sub>、pHelp-Nv<sub>Blk94</sub>、pHelp-Nv<sub>Blk94</sub>和 pHelp-L<sub>Blk94</sub>构建成功。



图 6-3 rIHNV-Blk94 毒株辅助质粒的 PCR 鉴定

M<sub>1</sub>为 DL 2000 marker; 泳道 1 为 pHelp-NBlk94 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 2 为 pHelp-PBlk94 质粒 的 PCR 鉴定结果; 泳道 3 为 pHelp-NvBlk94 质粒的 PCR 鉴定结果; 泳道 4 为 pHelp-LBlk94 质粒的 PCR 鉴定结果; M<sub>2</sub>为 DL 15000 marker

Fig. 6-3 PCR identification of helper plasmids of rIHNV-Blk94

M<sub>1</sub>: DL 2000 marker; Lane 1: PCR result of pHelp-NBlk94 plasmid; Lane 2: PCR result of pHelp-PBlk94 plasmid; Lane 3: PCR result of pHelp-NvBlk94 plasmid; Lane 4: PCR result of pHelp-LBlk94 plasmid; M<sub>2</sub>: DL 15000 marker

### 6.3.3 rlHNV-Blk94 病毒的拯救及鉴定

### 6.3.3.1 拯救病毒的酶切鉴定及全基因组测序

在进行 rBlk94 病毒的拯救时,利用 PolyJet 体外 DNA 转染试剂,共转染 pIHNV-Blk94 (1 μg)、pHelp-N<sub>Blk94</sub>(0.5 μg)、pHelp-P<sub>Blk94</sub>(0.5 μg)、pHelp-L<sub>Blk94</sub>(0.2 μg)和 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub> (0.1 μg) 质粒于 BHK-21-T7 细胞。对拯救的 rBlk94 病毒的基因组 RNA 提取后,克隆 基因组中的 Fragment A 片段进行 *Nhe* I 酶切鉴定。结果显示(图 6-4),以 rBlk94 病毒基 因组 RNA 为模板的 Fragment A 片段能够被 *Nhe* I 所酶切,而以 wtBlk94 病毒基因组 RNA 为模板的 Fragment A 片段不能被 *Nhe* I 所酶切。以上结果说明, rBlk94 病毒确为人工拯救病毒。

在进行 rBlk94-VP2 病毒的拯救时,利用 PolyJet 体外 DNA 转染试剂,共转染 pBlk94-VP2 (1 µg)、pHelp-N<sub>Blk94</sub> (0.5 µg)、pHelp-P<sub>Blk94</sub> (0.5 µg)、pHelp-L<sub>Blk94</sub> (0.2 µg) 和 pHelp-Nv<sub>Blk94</sub> (0.1 µg) 质粒于 BHK-21-T7 细胞。采用同样的方法对拯救病毒基因组 中的 Fragment A 片段进行 *Nhe* I 酶切鉴定。结果显示(图 6-4),以 rBlk94-VP2 病毒基因 组 RNA 为模板的 Fragment A 片段也能够被 *Nhe* I 所酶切。以 rBlk94-VP2 病毒基因组 RNA 为模板,表 4-1 中的 VP2-F 和 VP2-R 为引物进行 PCR 的结果显示(图 6-4),从 rBlk94-VP2 病毒基因组 RNA 中成功克隆到了 VP2 基因。以上结果说明, rBlk94-VP2 病毒确为人工


拯救病毒,并且其基因组中成功插入了 IPNV-ChRtm213 毒株的 VP2 基因。

图 6-4 重组病毒基因组序列的酶切和 PCR 鉴定

A. 重组病毒基因组序列的酶切鉴定, M 为 DL 2000 marker; 泳道 1 为 wtBlk94 病毒的 PCR 片段酶切 结果; 泳道 2 为 rBlk94 病毒的 PCR 片段酶切结果; 泳道 3 为 rBlk94-VP2 病毒的 PCR 片段酶切结果。 B. 重组病毒基因组序列的 PCR 鉴定, M 为 DL 2000 marker; 泳道 1 为 rBlk94-VP2 病毒基因组的 PCR 结果; 泳道 2 为 wtBlk94 病毒基因组的 PCR 结果; 泳道 3 为 rBlk94 病毒基因组的 PCR 结果; 泳道 4 为阴性对照

Fig. 6-4 Identification of recombinant virus genome sequence using enzyme digestion and PCR. A. Enzyme digestion of recombinant virus genome sequence, M: DL 2000 marker; Lane 1: PCR fragment digestion of wtBlk94 virus; Lane 2: PCR fragment digestion of rBlk94 virus; Lane 3: PCR fragment digestion of rBlk94-VP2 virus. B. PCR identification of recombinant virus genome sequence, M: DL 2000 marker; Lane 1: PCR results of rBlk94-VP2 virus genome; Lane 2: PCR results of wtBlk94 virus genome; Lane 3: PCR results of rBlk94 virus genome; Lane 4: Negative control

## 6.3.3.2 重组病毒间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定

为了确定拯救病毒 rBlk94-VP2 的生物学特性,将 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒分别接种到 EPC 细胞中,培养 48 h 后进行了间接免疫荧光和 Western Blot 鉴定。间接免疫荧光 结果显示(图 6-5),rBlk94 病毒和 rBlk94-VP2 病毒感染的细胞均呈现出了特异性的红色 荧光,而 PBS 模拟感染组没有任何荧光,上述结果说明 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒在细胞上均能够正常复制,并表现出相同的抗原特性。而 rBlk94-VP2 病毒感染的细胞,除了 有红色荧光外,还同时呈现出了特异性的绿色荧光,说明 rBlk94-VP2 病毒感染的细胞中 特异性的表达了 IPNV 病毒的 VP2 蛋白。Western Blot 结果显示(图 6-5),rBlk94 成功表达了 IHNV 病毒蛋白,rBlk94-VP2 病毒在成功表达 IHNV 病毒蛋白的同时还表达了 IPNV 的 VP2 蛋白。以上结果说明,rBlk94-VP2 病毒在自身复制的同时,能够成功表达 IPNV 病毒的 VP2 蛋白。



图 6-5 重组病毒间接免疫荧光和 Western Blot 检测

A. 重组病毒表达 IHNV 蛋白和 VP2 蛋白的间接免疫荧光检测; B. 重组病毒表达 IHNV 蛋白和 VP2 蛋白的 Western Blot 检测;物镜 60×

Fig. 6-5 Indirect immunofluorescence and Western Blot analysis of recombinant virus
A. Indirect immunofluorescence analysis of recombinant virus expressing IHNV protein and VP2 protein; B.
Western Blot analysis of recombinant virus expressing IHNV protein and VP2 protein; Objective lens 60×

## 6.3.3.3 重组病毒的生长特性和致病性分析

本研究将 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒接种于 EPC 细胞中后,分别对其生长动力学特性进行了检测。结果显示(图 6-6),rBlk94 和 wtBlk94 病毒在不同时间点时均达到了相同的滴度,并在病毒感染的 72 h 进入生长的平台期,二者的生长曲线非常接近;而rBlk94-VP2 病毒,虽然在同一时间点上的病毒滴度略低于 rBlk94 和 wtBlk94,但三种病毒均表现出了相似的生长动力学,均在感染后的 72 h 趋于稳定,最终三种病毒间的病毒滴度并无显著性差异。



图 6-6 重组病毒的生长动力学特性

Fig. 6-6 Growth kinetics of recombinant virus

病毒的致病性是反应病毒生物学特性是否改变的关键因素之一,为了确定病毒的拯救过程并未改变其致病性,本研究中对 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒的致病性进行了检测,并以 IHNV-Sn1203 毒株作为阳性对照。结果显示(图 6-7),在 IHNV-Sn1203 攻毒后第 4 天虹鳟鱼开始死亡,在攻毒后第 6~11 天进入死亡高峰期;在病毒感染 25 d 后, IHNV-Sn1203 攻毒组的累积死亡率为 96%。相比之下,wtBlk94、rBlk94 和 rBlk94-vp2 攻毒组的累积死亡率仅为分别为 8%、6%和 4%。这表明病毒的拯救过程并未改变其致病性,重组病毒 rBlk94-VP2 和 rBlk94 与 wtBlk94 一样均具有较低的毒力。



图 6-7 感染重组病毒后虹鳟的生存曲线

Fig. 6-7 Survival curves of rainbow trout challenged with recombinant virus

#### 6.3.4 rBlk94-VP2 病毒免疫保护效果鉴定

#### 6.3.4.1 rBlk94-VP2 对 IHNV 的免疫保护效果

为了评价 rBlk94-VP2 病毒免疫保护虹鳟抵抗 IHNV 感染的效果,研究中在 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒免疫后的第 45 天进行 IHNV-Sn1203 攻毒实验,检测了免疫保护效果。结果显示(图 6-8),接种免疫 rBlk94 或 rBlk94-VP2 的虹鳟鱼存活率分别为 80%和 86%, 其存活率显著高于 PBS 免疫组(存活为 2%),但 rBlk94 和 rBlk94-VP2 免疫组之间并没 有显著差异。以上结果说明,rBlk94-VP2 能够保护虹鳟抵抗 IHNV 的感染。



图 6-8 免疫虹鳟 IHNV-Sn1203 攻毒存活率

Fig. 6-8 Survival rate of immunized rainbow trout after challenged with IHNV-Sn1203 strain

#### 6.3.4.2 重组病毒对 IPNV 的免疫保护效果

为了评价 rBlk94-VP2 病毒免疫保护虹鳟抵抗 IPNV 感染的效果,研究中在 rBlk94 和 rBlk94-VP2 病毒免疫后的第 45 天进行 IPNV-ChRtm213 攻毒实验,检测了免疫保护效果。在 IPNV-ChRtm213 攻毒后的第 15 天,对虹鳟肝脏、头肾和脾脏中 IPNV-ChRtm213 病毒的载量进行了检测。结果显示(图 6-9),PBS 免疫组和 rBlk94 免疫组中 IPNV 病毒载量显著高于 rBlk94-VP2 免疫组。PBS 免疫组 VP3 和 VP1 基因表达水平,在肝脏中是 rBlk94-VP2 免疫组的 36 倍和 28 倍,在头肾中是 rBlk94-VP2 免疫组的 42 倍和 21 倍,在脾脏中是 rBlk94-VP2 免疫组的 36 倍和 28 倍。rBlk94 免疫组 VP3 和 VP1 基因表达水平,在肝脏中是 rBlk94-VP2 免疫组的 36 倍和 28 倍。rBlk94 免疫组 VP3 和 VP1 基因表达水平, 在肝脏中是 rBlk94-VP2 免疫组的 36 倍和 27 倍,在头肾中是 rBlk94-VP2 免疫组的 37 倍和 19 倍,在脾脏中是 rBlk94-VP2 免疫组的 13 倍和 19 倍。以上结果表明,rBlk94-VP2 能够保护虹鳟抵抗 IPNV 的感染。



图 6-9 免疫虹鳟 IPNV-ChRtm213 攻毒后组织中 VP3 和 VP1 基因表达水平

#### 注: \*P<0.05

Fig. 6-9 Relative VP3 and VP1 gene expression levels in different tissues of immunized rainbow trout after challenged with IPNV-ChRtm213 strain

Note: \*P<0.05

#### 6.3.4.3 免疫相关基因表达水平检测

为进一步研究重组病毒免疫后对宿主免疫应答反应的影响,研究中分别在虹鳟肝脏、 头肾和脾脏中检测了免疫基因的相对表达量。在重组病毒免疫后第1、4、7和15天,检 测了 IFN-γ、IFN-1和 Mx-1基因的 mRNA 表达水平。结果显示(图 6-10),与 PBS 免疫 组相比,rBlk94和 rBlk94-VP2免疫组这三种基因均显著上调,其中 IFN-γ和 IFN-1基因 的 mRNA 表达水平在免疫后1 d 达到最大值,rBlk94-VP2免疫组肝脏中 IFN-γ和 IFN-1 基因的 mRNA 表达水平分别为 PBS 免疫组的 15 倍和 10 倍,头肾中为 PBS 免疫组的 28 倍和7倍,脾脏中为 PBS 免疫组的 12 倍和5倍;而 Mx-1基因的 mRNA 表达水平,在 免疫后7d 在肝脏中达到最大值,rBlk94-VP2免疫组为 PBS 免疫组的 45倍,在免疫后4 d 在头肾和脾脏中达到最大值,分别为 PBS 免疫组的 28 倍和 22 倍;通过对 rBlk94 免疫 组和 rBlk94-VP2 免疫组比较发现,两组中 IFN-γ、IFN-1 和 Mx-1 基因的 mRNA 表达水 平并没有显著性差异。在重组病毒免疫后第 15 和 21 天,检测了 CD4、CD8、IgM 和 IgT 基因的 mRNA 表达水平。结果显示(图 6-11),在 rBlk94-VP2 免疫 15 d 后,3 个组织中 CD4、CD8、IgM 和 IgT 基因的 mRNA 表达水平均显著上调,其中头肾和脾脏中 21 d 的 表达水平最高,而肝脏中 15 d 的表达水平最高(IgT 除外);通过对 rBlk94 免疫组和 rBlk94-VP2 免疫组比较发现,两组中 CD4、CD8、IgM 和 IgT 基因的 mRNA 表达水平并 没有显著性差异。这些结果表明,rBlk94-VP2 免疫可激活宿主先天性和适应性免疫反应, 但在 rBlk94 和 rBlk94-VP2 免疫组之间,这些免疫相关基因的表达并没有显著差异。



图 6-10 不同组织中 IFN-γ、IFN-1 和 Mx-1 基因的 mRNA 表达水平

#### 注: \*P<0.05

Fig. 6-10 Relative mRNA expression levels of IFN- $\gamma$ , IFN-1 and Mx-1 genes in different tissues Note: \*P $\leq$ 0.05



图 6-11 不同组织中 CD4、CD8、IgM 和 IgT 基因的 mRNA 表达水平

注: \*P<0.05

Fig. 6-11 Relative mRNA expression levels of CD4, CD8, IgM and IgT genes in different tissues Note:  $P \le 0.05$ 

#### 6.3.4.4 中和抗体水平检测

中和抗体是评价疫苗免疫效果的重要指标之一,为了更好的评估重组病毒 rBlk94-VP2 的免疫效果,研究中在免疫后的第45 天对中和抗体进行了检测。结果显示(表 6-5),rBlk94-VP2 免疫后的虹鳟鱼对 IHNV 和 IPNV 均具有较高的中和抗体效价,而 PBS 接种组中未发现特异性中和抗体。上述结果说明,重组病毒 rBlk94-VP2 免疫激活了宿主 特异性的抗病毒免疫反应。

Neutralizing antibody titers-IPNV				Neutralizing antibody titers-IHNV			
rBlk94-VP2		PBS vaccinated		rBlk94-VP2 vaccinated		PBS vaccinated	
vaccinated							
Fish	Titer	Fish	Titer	Fish	Titer	Fish	Titer
rB1	80	P1	10	rB1	160	P1	10
rB2	160	P2	10	rB2	160	P2	10
rB3	160	P3	10	rB3	80	P3	10
rB4	320	P4	10	rB4	320	P4	10
rB5	80	P5	5	rB5	160	P5	10
rB6	160	P6	10	rB6	320	P6	5
rB7	160	P7	5	rB7	160	P7	10
rB8	160	P8	5	rB8	80	P8	10
rB9	320	P9	10	rB9	160	P9	10
rB10	160	P10	10	rB10	320	P10	10

表 6-5 rBlk94-VP2 免疫后抗 IPNV 和 IHNV 中和抗体检测

Table 6-5 IPNV and IHNV neutralizing antibody titers induced by rBlk94-VP2 infection

#### 6.4 讨论

虹鳟是我国主要养殖的冷水鱼品种之一,自 1985 年和 1986 年分别在中国东北地区 暴发 IHN 和 IPN 以来,这两种疾病一直是影响虹鳟养殖产业发展的主要病毒性病害<sup>[22,12]</sup>。 目前 IHNV 毒株被分为五个主要的基因型: U、M、L、E 和 J,而中国 IHNV 毒株属于 J 基因型<sup>[213]</sup>。已有研究发现,J基因型 IHNV 对虹鳟的致死率超过 90%,而 U 基因型病毒 在虹鳟中的毒性明显较低<sup>[213-214]</sup>。尽管迄今为止报道的预防 IHN 和 IPN 最有效的疫苗是 DNA 疫苗,但由于其潜在风险(如染色体整合和对表达抗原的免疫耐受性),这种 DNA 疫苗的安全性仍然存在争议<sup>[189]</sup>。因此,仍需要开发其他疫苗来保护虹鳟免受 IHNV 和 IPNV 的感染。已有研究表明,反向遗传操作系统是制造多价重组病毒的强大工具,这些 病毒可以作为对抗两种或多病原体的活疫苗<sup>[129,215]</sup>。由于虹鳟是中国主要养殖的冷水鱼 品种,并且 U 基因型毒株 Blk94 对虹鳟的毒性相对较低,我们认为它可以通过表达来自 IPNV 的抗原蛋白作为活疫苗载体来保护虹鳟免受 IPNV 和 IHNV 的感染。IPNV 是双 RNA 病毒科水生双 RNA 病毒属家族中的一员,已有报道表明,水生双 RNA 病毒具有抗原变 异性。因此,针对 IPNV 研发疫苗时应该选取病毒中相对保守的中和表位<sup>[216]</sup>。水生双 RNA 病毒主要的特异性中和表位位于 VP2 蛋白中,该蛋白能够诱导机体产生中和抗体保护宿 主免受病毒感染<sup>[216-217]</sup>,因此我们构建了一种含有 VP2 基因的重组病毒。

在本研究中,我们使用 U 基因型 IHNV 毒株 Blk94 作为骨架载体构建了一种相对低 毒力的重组 IHNV 疫苗,并将 VP2 基因插入到病毒基因组中,以实现外源基因的成功表

达。我们的研究发现,在 IHNV 病毒的 N 和 P 基因之间插入外源基因会严重影响病毒生 长, 表明 N 和 P 基因之间不是最适合外源基因表达的位点。相反, 我们选择 P 和 M 基因 之间作为 VP2 基因的插入位点构建了重组病毒 rBlk94-VP2。结果显示, rBlk94-VP2 病毒 与 wtBlk94 病毒具有类似的生长动力学特性,同时在复制的过程中成功表达了 VP2 蛋白。 对该弱毒疫苗的免疫保护效果研究发现,其免疫后虹鳟在感染 IHNV 病毒后的相对存活 率为 86%, 而 PBS 模拟免疫组的存活率仅为 2%。虽然相对保护率是评估疫苗保护效力 最直接、有效的方法。然而,在已有报道和我们之前的研究中发现, IPNV 病毒的实验室 攻毒模型不能造成虹鳟死亡,因此建立了组织病毒载量测定的方法评估疫苗的保护效力 <sup>[99, 218-220]</sup>。结果显示,与 PBS 模拟免疫组相比,rBlk94-VP2 免疫组的 IPNV 载量显著降 低。本研究同时对免疫相关因子 IFN-γ、IFN-1、Mx-1、CD4、CD8、IgM 和 IgT 基因表 达水平进行了检测,发现在 rBlk94-VP2 免疫组中上述基因显著上调,表明 rBlk94-VP2 疫苗接种激活了先天和适应性免疫应答。2018 年 Guo 等人构建了一种表达 IPNV VP2 蛋 白的重组弱毒 IHNV, 接种这种重组病毒后对虹鳟的相对保护率为 65%<sup>[221]</sup>。而本研究中 构建的重组 rBlk94-VP2 病毒在接种后对虹鳟只造成了 2%~4% 的死亡率,接种 rBlk94-VP2 病毒后对虹鳟的相对保护率为86%。因此,本研究构建的重组疫苗比以前的研究更有效, 对于这一结果我们认为可能存在以下的原因: 首先, Guo 等人的研究中用 VP2 基因代替 Nv 基因,由于 Nv 基因在病毒的复制过程中发挥重要作用,所以这种替换严重影响了病 毒的生长,因此构建的疫苗复制水平相对较低,可能没有诱导虹鳟产生强烈的免疫反应 <sup>[76]</sup>。其次,本研究中将 VP2 基因插入到了 P 和 M 基因之间,与 Guo 等人将 VP2 插入 G 和 L 基因之间相比, P 和 M 基因之间离启动子更近, 可能会表达更多的 VP2 蛋白来刺激 宿主产生针对 IPNV 感染的强大免疫反应。

目前对 IHN 的研究报道中,疫苗免疫保护效果最好的是 DNA 疫苗,其对 IHNV 的 免疫保护率为 83%~98%<sup>[98, 222]</sup>。相比之下,灭活病毒疫苗对于 IHNV 的保护率为 50%~79%<sup>[87]</sup>。这两种疫苗形式据报道也能诱导出很好的 IPNV 感染保护免疫力<sup>[198,223-224]</sup>。 Guo 等人和本研究中构建的重组弱毒疫苗,在 IHNV 和 IPNV 感染过程中起到了良好的 免疫保护效果。虽然重组弱毒疫苗保护效果比 DNA 疫苗稍低,但仍然有希望进行生产应 用,因为 DNA 疫苗最有效的免疫递送方式是注射,在大规模养殖过程中需要消耗大量的 人力物力,而重组弱毒疫苗通过浸泡的方式即可进行免疫。虽然研究结果表明,重组弱 毒疫苗有望成为防控 IHN 和 IPN 的有效手段,但在其研发过程中仍有一些问题需要考虑。 首先,虽然重组弱毒疫苗的遗传特征相对稳定,但反复接种和传代过程中可能会出现弱 毒病毒返强现象。其次,虽然重组弱毒疫苗在某些被免疫动物中具有低病毒毒力,但对 高度易感动物可能具有危险性。第三,在接种重组弱毒疫苗期间,接受疫苗的鱼类如果 正在接受药物治疗,则免疫效力可能会受到负面影响。最后,活病毒疫苗不稳定,存储 和运输存在困难。考虑到这些问题,在重组弱毒疫苗能够作为临床使用的疫苗之前,还 需要进行更多的研究工作。

# 6.5 本章小结

综上所述,我们以在虹鳟上低毒力的 U 基因型 IHNV 毒株 Blk94 为载体,构建了能 够表达 IPNV 病毒 VP2 蛋白的重组弱毒疫苗 rBlk94-VP2。重组病毒与野生型病毒具有相 似的生物学特性,并能够保护虹鳟抵抗 IHNV 和 IPNV 的感染。以上结果表明,重组病 毒 rBlk94-VP2 可以作为预防 IHN 和 IPN 的疫苗,并且 IHNV 弱毒株可以作为载体用于 保护虹鳟免受两种或更多疾病的侵害,我们的方法为开发虹鳟活载体弱毒疫苗奠定了坚 实的基础。

# 结论

1. 明确了目前我国流行的 IHNV 病毒均为 J 基因型毒株,其病毒基因组结构同其他 弹状病毒相同;转录组分析证实, J-IHNV 和 U-IHNV 感染宿主后免疫反应、信号转导、 疾病相关的基因存在显著性差异。

2. 研究中成功制备了抗 IHNV 病毒 G 蛋白的多克隆抗体和抗 IPNV 病毒 VP2 蛋白的 多克隆抗体,这两种多克隆抗体不仅能够用于预防 IHN 和 IPN 二联弱毒疫苗的评价,也 能够为我国 IHNV、IPNV 的基础研究及疫病监测提供技术支持。

3. 建立了 IHNV 反向遗传操作系统,成功拯救出与野生病毒 wtIHNV-Sn1203 具有相同生物学特性的重组病毒 rIHNV-Sn1203,为 IHNV 病毒毒力关键基因和分子致病机制研究提供平台。

4. 成功拯救出了 5 种不同位置表达 GFP 蛋白的 IHNV 重组病毒。证实了病毒基因组 中邻近启动子的基因比距离启动子较远的基因能够更有效地表达,同时确定 P-M 基因连 接区是外源基因插入 IHNV 的最佳表达位点。该结果为以 IHNV 为载体的疫苗研究提供 技术指导。

5. 以在虹鳟上低毒力的 IHNV 毒株 Blk94 为载体,构建了能够表达 IPNV 病毒 VP2 蛋白的重组弱毒疫苗 rBlk94-VP2,利用该重组弱毒疫苗免疫后,能够保护虹鳟抵抗 IHNV 和 IPNV 的感染。以上结果表明,重组病毒 rBlk94-VP2 可以作为预防 IHN 和 IPN 的疫苗,并且 IHNV 弱毒株可以作为载体用于保护虹鳟免受两种或更多疾病的侵害,这一结果为 开发虹鳟活载体弱毒疫苗奠定了坚实的基础。

参考文献

- Breyta R, Jones A, Stewart B, et al. Emergence of Md Type Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Washington State Coastal Steelhead Trout[J]. Dis Aquat Organ, 2013, 104(3): 179-195.
- [2] Xu L, Zhao J, Liu M, et al. Phylogeography and Evolution of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in China[J]. Mol Phylogenet Evol, 2019, 131: 19-28.
- [3] Nishizawa T, Kinoshita S, Kim W S, et al. Nucleotide Diversity of Japanese Isolates of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Based on the Glycoprotein Gene[J]. Dis Aquat Organ, 2006, 71(3): 267-272.
- [4] Abbadi M, Gastaldelli M, Pascoli F, et al. Increased Virulence of Italian Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Associated with the Emergence of New Strains[J]. Virus Evol, 2021, 7(2): b56.
- [5] Bellec L, Louboutin L, Cabon J, et al. Molecular Evolution and Phylogeography of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus with a Focus on Its Presence in France Over the Last 30 Years[J]. J Gen Virol, 2017, 98(10): 2438-2446.
- [6] Kim W S, Oh M J, Nishizawa T, et al. Genotyping of Korean Isolates of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Based on the Glycoprotein Gene[J]. Arch Virol, 2007, 152(11): 2119-2124.
- [7] Enzmann P J, Kurath G, Fichtner D, et al. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus: Monophyletic Origin of European Isolates from North American Genogroup M[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 66(3): 187-195.
- [8] Bergmann S M, Ariel E, Skall H F, et al. Comparison of Methods for Detection of an Infection with Different Isolates of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV)[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2002, 115(9-10): 385-389.
- [9] Foreman M G, Guo M, Garver K A, et al. Modelling Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Dispersion from Marine Salmon Farms in the Discovery Islands, British Columbia, Canada[J]. Plos One, 2015, 10(6): e130951.
- [10] Ahmadivand S, Soltani M, Mardani K, et al. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Outbreak in Farmed Rainbow Trout in Iran: Viral Isolation, Pathological Findings, Molecular Confirmation, and Genetic Analysis[J]. Virus Res, 2017, 229: 17-23.
- [11] Haenen O L, Schuetze H, Cieslak M, et al. First Evidence of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in the Netherlands[J]. J Fish Dis, 2016, 39(8): 971-979.
- [12] Rudakova S L, Kurath G, Bochkova E V. Occurrence and Genetic Typing of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Kamchatka, Russia[J]. Dis Aquat Organ, 2007, 75(1): 1-11.
- [13] Hostnik P, Jencic V. Comparison of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Isolation on Monolayers and in Suspended Cells[J]. Dis Aquat Organ, 2000, 40(3): 225-228.
- [14] Cieslak M, Wahli T, Diserens N, et al. Phylogeny of the Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in European Aquaculture[J]. Plos One, 2017, 12(9): e184490.

- [15] 牛鲁祺,赵志壮.东北地区虹鳟IHN和IPN流行病学的初步研究[J].水产学报,1988,4:327-332.
- [16] 吴金炉, 曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗[J]. 海洋科学, 1999, 4: 37-42.
- [17] 赵景壮, 徐黎明, 任广明, 等. 传染性造血器官坏死病毒Sn1203株全基因组序列及系统进化分析[J].
   水产学杂志, 2020, 33(02): 1-9
- [18] Nichol S T, Rowe J E, Winton J R. Molecular Epizootiology and Evolution of the Glycoprotein and Non-Virion Protein Genes of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, a Fish Rhabdovirus[J]. Virus Res, 1995, 38(2-3): 159-173.
- [19] MULCAHY D, PASCHO R J, JENES C K. Titer Distribution Patterns of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus in Ovarian Fluids of Hatchery and Feral Salmon Populations[J]. Journal of Fish Diseases, 1983, 6(2): 183-188.
- [20] Mulcahy D, Pascho R J. Adsorption to Fish Sperm of Vertically Transmitted Fish Viruses[J]. Science, 1984, 225(4659): 333-335.
- [21] Lapatra S, Rohovec J, Fryer J. Detection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Fish Mucus[J]. Fish Pathol, 1989, 24(4): 197-202.
- [22] Dixon P, Paley R, Alegria-Moran R, et al. Epidemiological Characteristics of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV): A Review[J]. Vet Res, 2016, 47(1): 63.
- [23] Troyer R M, LaPatra S E, Kurath G. Genetic Analyses Reveal Unusually High Diversity of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout Aquaculture[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 12): 2823-2832.
- [24] Hetrick F, Fryer J, Knittel M, et al. Effect of Water Temperature on the Infection of Rainbow-Trout Salmo Gairdneri Richardson with Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. J Fish Dis, 1979, 2: 253-257.
- [25] Amend D. Control of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Disease by Elevating Water Temperature. J Fish Res Bd Canada[J]. J Fish Res Bd Canada, 1970, 27(2): 265-270.
- [26] Amend D. Prevention and Control of Viral Diseases of Salmonids. J Fish Res Bd Can, 1976, 33(4): 1059-1066.
- [27] 王光玉, 曲径, 徐仲, 等. 传染性造血组织坏死病病毒(IHNV)的危害、检疫及防治[J]. 中国动物检疫, 2006, 10: 34-35.
- [28] Brudeseth B E, Castric J, Evensen O. Studies on Pathogenesis Following Single and Double Infection with Viral Hemorrhagic Septicemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss)[J]. Vet Pathol, 2002, 39(2): 180-189.
- [29] Bootland L, Leong J. Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. In Woo Ptk, Bruno Dw (Eds) Fish Diseases and Disorders, Vol 3 Viral, Bacterial and Fungal Infections[M]. 1999.
- [30] Jeon C H, Kim S R, Kim W S, et al. Monitoring of Viruses in Chum Salmon (*Oncorhynchus Keta*) Migrating to Korea[J]. Arch Virol, 2011, 156(6): 1025-1030.
- [31] Enzmann P J, Castric J, Bovo G, et al. Evolution of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV), a Fish Rhabdovirus, in Europe over 20 Years: Implications for Control[J]. Dis Aquat Organ, 2010, 89(1):

9-15.

- [32] Bergmann S M, Fichtner D, Skall H F, et al. Age- and Weight-Dependent Susceptibility of Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss to Isolates of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) of Varying Virulence[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(3): 205-210.
- [33] Reschova S, Pokorova D, Hulova J, et al. Surveillance of Viral Fish Diseases in the Czech Republic over the Period January 1999-December 2006[J]. Vet Med Czech, 2008, 53(2): 86-92.
- [34] Rexhepi A, Berxholi K, Scheinert P, et al. Study of Viral Diseases in Some Freshwater Fish in the Republic of Kosovo[J]. Vet Arch, 2011, 81(3): 405-413.
- [35] Zhao J Z, Xu L M, Liu M, et al. Identification of the Optimal Insertion Site for Expression of a Foreign Gene in an Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vector[J]. Arch Virol, 2019, 164(10): 2505-2513.
- [36] 赵景壮,徐黎明,刘淼,等. 鱼类传染性造血器官坏死病病毒糖蛋白的截短表达及免疫原性检测[J].细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(12): 1238-1242.
- [37] Ammayappan A, LaPatra S E, Vakharia V N. Molecular Characterization of the Virulent Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Strain 220-90[J]. Virol J, 2010, 7: 10.
- [38] He M, Ding N Z, He C Q. Novirhabdoviruses Versus Fish Innate Immunity: A Review[J]. Virus Res, 2021, 304: 198525.
- [39] Hill B J. Physico-Chemical and Serological Characterization of Five Rhabdoviruses Infecting Fish[J]. J Gen Virol, 1975, 27(3): 369-378.
- [40] McAlliser P, Fryer J, Pilcher K. An Antigenic Comparison Between Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (OSV Strain) and the Virus of Haemorrhagic Septicaemia of Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*) (Denmark Strain) by Cross Neutralization[J]. J Wildl Dis, 1974, 10(2): 101-103.
- [41] Pietsch J, Amend D, Miller C. Survival of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Held under Various Environmental Conditions[J]. J Fisheries Res Board Canada, 1977, 34(9): 1360-1364.
- [42] 徐立蒲, 王小亮, 杨丽文, 等. 传染性造血器官坏死病诊断及防控的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(03): 209-215.
- [43] Cao Y, Xu L, LaPatra S E, et al. The Kinetics and Protection of the Antiviral State Induced by Recombinant IFN1a in Rainbow Trout Against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus[J]. Mol Immunol, 2016, 76: 55-61.
- [44] Saint-Jean S R, Perez-Prieto S I. Interferon Mediated Antiviral Activity against Salmonid Fish Viruses in BF-2 and other Cell Lines[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2006, 110(1-2): 1-10.
- [45] Ren G, Xu L, Zhao J, et al. Comparative Transcriptome Analysis of Long Non Coding RNA (lncRNA) in RTG-2 Cells Infected by Infectious Hematopoietic Necrosis Virus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 120: 314-324.
- [46] Ito T, Kamaishi T. Japanese Amberjack Seriola Quinqueradiata and Red Sea Bream Pagrus Major Susceptibility to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Isolate[J]. Dis Aquat Organ, 2021, 146: 1-8.

- [47] Zhao J Z, Xu L M, Ren G M, et al. Identification and Characterization of Dead-Box RNA Helicase Ddx3 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and its Relationship with Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Infection[J]. Dev Comp Immunol, 2022, 135: 104493.
- [48] 茆安婷, 尹玉伟, 代静, 等. 传染性造血器官坏死病毒研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(10): 79-82.
- [49] 胡潜,李强,张显昱. 传染性造血器官坏死病毒(IHNV)研究进展[J]. 现代农业科技, 2014, 7: 273-277.
- [50] Garver K A, Batts W N, Kurath G. Virulence Comparisons of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus U and M Genogroups in Sockeye Salmon and Rainbow Trout[J]. J Aquat Anim Health, 2006, 18(4): 232-243.
- [51] Kurath G, Garver K A, Troyer R M, et al. Phylogeography of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus in North America[J]. J Gen Virol, 2003, 84(Pt 4): 803-814.
- [52] Troyer R M, Kurath G. Molecular Epidemiology of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Reveals Complex Virus Traffic and Evolution within Southern Idaho Aquaculture[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55(3): 175-185.
- [53] Jia P, Zheng X C, Shi X J, et al. Determination of the Complete Genome Sequence of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Ch20101008 and Viral Molecular Evolution in China[J]. Infect Genet Evol, 2014, 27: 418-431.
- [54] 徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒-Sn1203株的基因型及糖蛋白的生物信息学 分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(01): 180-188.
- [55] Schoehn G, Iseni F, Mavrakis M, et al. Structure of Recombinant Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex and Identification of the Phosphoprotein Binding Site[J]. J Virol, 2001, 75(1): 490-498.
- [56] Albertini A A, Wernimont A K, Muziol T, et al. Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex[J]. Science, 2006, 313(5785): 360-363.
- [57] Assenberg R, Delmas O, Ren J, et al. Structure of the Nucleoprotein Binding Domain of Mokola Virus Phosphoprotein[J]. J Virol, 2010, 84(2): 1089-1096.
- [58] Thomas D, Newcomb W W, Brown J C, et al. Mass and Molecular Composition of Vesicular Stomatitis Virus: A Scanning Transmission Electron Microscopy Analysis[J]. J Virol, 1985, 54(2): 598-607.
- [59] Das T, Chakrabarti B K, Chattopadhyay D, et al. Carboxy-Terminal Five Amino Acids of the Nucleocapsid Protein of Vesicular Stomatitis Virus are Required for Encapsidation and Replication of Genome RNA[J]. Virology, 1999, 259(1): 219-227.
- [60] Giorgi C, Blumberg B, Kolakofsky D. Sequence Determination of the (+) Leader RNA Regions of the Vesicular Stomatitis Virus Chandipura, Cocal, and Piry Serotype Genomes[J]. J Virol, 1983, 46(1): 125-130.
- [61] Banerjee A K. The Transcription Complex of Vesicular Stomatitis Virus[J]. Cell, 1987, 48(3): 363-364.
- [62] Yang J, Hooper D C, Wunner W H, et al. The Specificity of Rabies Virus RNA Encapsidation by Nucleoprotein[J]. Virology, 1998, 242(1): 107-117.
- [63] Canter D M, Perrault J. Stabilization of Vesicular Stomatitis Virus L Polymerase Protein by P Protein

Binding: A Small Deletion in the C-Terminal Domain of L Abrogates Binding[J]. Virology, 1996, 219(2): 376-386.

- [64] Howard M, Wertz G. Vesicular Stomatitis Virus RNA Replication: A Role for the NS Protein[J]. J Gen Virol, 1989, 70 (Pt 10): 2683-2694.
- [65] Basak S, Raha T, Chattopadhyay D, et al. Leader RNA Binding Ability of Chandipura Virus P Protein is Regulated by its Phosphorylation Status: A Possible Role in Genome Transcription-Replication Switch[J]. Virology, 2003, 307(2): 372-385.
- [66] Chong L D, Rose J K. Interactions of Normal and Mutant Vesicular Stomatitis Virus Matrix Proteins with the Plasma Membrane and Nucleocapsids[J]. J Virol, 1994, 68(1): 441-447.
- [67] Ahmed M, Lyles D S. Effect of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein on Transcription Directed by Host RNA Polymerases I, II, and III[J]. J Virol, 1998, 72(10): 8413-8419.
- [68] Chiou P P, Kim C H, Ormonde P, et al. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Matrix Protein Inhibits Host-Directed Gene Expression and Induces Morphological Changes of Apoptosis in Cell Cultures[J]. J Virol, 2000, 74(16): 7619-7627.
- [69] Irie T, Liu Y, Drolet B S, et al. Cytopathogenesis of Vesicular Stomatitis Virus is Regulated by the PSAP Motif of M Protein in a Species-Dependent Manner[J]. Viruses, 2012, 4(9): 1605-1618.
- [70] Jayakar H R, Whitt M A. Identification of Two Additional Translation Products from the Matrix (M) Gene that Contribute to Vesicular Stomatitis Virus Cytopathology[J]. J Virol, 2002, 76(16): 8011-8018.
- [71] Ahmed M, McKenzie M O, Puckett S, et al. Ability of the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus to Suppress Beta Interferon Gene Expression is Genetically Correlated with the Inhibition of Host RNA and Protein Synthesis[J]. J Virol, 2003, 77(8): 4646-4657.
- [72] Gaudin Y, Tuffereau C, Durrer P, et al. Biological Function of the Low-pH, Fusion-Inactive Conformation of Rabies Virus Glycoprotein (G): G is Transported in a Fusion-Inactive State-Like Conformation[J]. J Virol, 1995, 69(9): 5528-5534.
- [73] Gaudin Y, Ruigrok R W, Knossow M, et al. Low-pH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and their Role in Membrane Fusion[J]. J Virol, 1993, 67(3): 1365-1372.
- [74] Purcell M K, Laing K J, Winton J R. Immunity to Fish Rhabdoviruses[J]. Viruses, 2012, 4(1): 140-166.
- [75] Roche S, Albertini A A, Lepault J, et al. Structures of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein: Membrane Fusion Revisited[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(11): 1716-1728.
- [76] Thoulouze M I, Bouguyon E, Carpentier C, et al. Essential Role of the Nv Protein of Novirhabdovirus for Pathogenicity in Rainbow Trout[J]. J Virol, 2004, 78(8): 4098-4107.
- [77] Ammayappan A, Kurath G, Thompson T M, et al. A Reverse Genetics System for the Great Lakes Strain of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus: The Nv Gene is Required for Pathogenicity[J]. Mar Biotechnol (Ny), 2011, 13(4): 672-683.
- [78] Wu Y, Wang L, Guo T, et al. Identification of Amino Acid Residues in Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Nv Protein Necessary for Viral Replication and Pathogenicity[J]. Fish Shellfish Immunol,

2018, 79: 294-302.

- [79] Grdzelishvili V Z, Smallwood S, Tower D, et al. A Single Amino Acid Change in the L-Polymerase Protein of Vesicular Stomatitis Virus Completely Abolishes Viral mRNA Cap Methylation[J]. J Virol, 2005, 79(12): 7327-7337.
- [80] Li J, Wang J T, Whelan S P. A Unique Strategy for mRNA Cap Methylation Used by Vesicular Stomatitis Virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(22): 8493-8498.
- [81] Li J, Rahmeh A, Morelli M, et al. A Conserved Motif in Region V of the Large Polymerase Proteins of Nonsegmented Negative-Sense RNA Viruses that is Essential for mRNA Capping[J]. J Virol, 2008, 82(2): 775-784.
- [82] Ristow S S, LaPatra S E, Dixon R, et al. Responses of Cloned Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss to an Attenuated Strain of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus[J]. Dis Aquat Organ, 2000, 42(3): 163-172.
- [83] Roberti K, Rohovec J, Winton J. Vaccination of Rainbow Trout Against Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) by Using Attenuated Mutants Selected by Neutralizing Monoclonal Antibodies[J]. J Aquat Anim Health, 1998, 10(4): 328-337.
- [84] Romero A, Dios S, Bremont M, et al. Interaction of the Attenuated Recombinant rIHNV-Gvhsv GFP Virus with Macrophages from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 140(1-2): 119-129.
- [85] Rouxel R N, Tafalla C, Merour E, et al. Attenuated Infectious Hematopoietic Necrosis Virus with Rearranged Gene Order as Potential Vaccine[J]. J Virol, 2016, 90(23): 10857-10866.
- [86] Romero A, Figueras A, Thoulouze M I, et al. Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Viruses Induce Protection for Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss[J]. Dis Aquat Organ, 2008, 80(2): 123-135.
- [87] Anderson E, Clouthier S, Shewmaker W, et al. Inactivated Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Vaccines[J]. J Fish Dis, 2008, 31(10): 729-745.
- [88] 王璐瑶,李宁求,张鹏,等. 渔用疫苗灭活剂研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(12): 1402-1408.
- [89] 陈桂花, 卢形岩, 赵景壮, 等. 传染性造血器官坏死病疫苗的研究进展[J]. 水产学杂志, 2021, 34(02): 1-7.
- [90] Nishimura T, Shima N, Sasaki H, et al. A Trial of Vaccination Against Rainbow Trout (*Salmo Gairdnerii*)
   Fry with Formalin Killed IHN Virus[J]. Fish Pathol, 1985, 20(2): 435-443.
- [91] Tang L, Kang H, Duan K, et al. Effects of Three Types of Inactivation Agents on the Antibody Response and Immune Protection of Inactivated IHNV Vaccine in Rainbow Trout[J]. Viral Immunol, 2016, 29(7): 430-435.
- [92] 高欣. 虹鳟鱼IHNV甘肃分离株全基因图谱的绘制及灭活苗的研制[D]. 甘肃农业大学, 2017.
- [93] Delrue I, Verzele D, Madder A, et al. Inactivated Virus Vaccines from Chemistry to Prophylaxis: Merits, Risks and Challenges[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(6): 695-719.
- [94] 魏文燕, 汪开毓, 李良玉, 等. 一种虹鳟传染性造血器官坏死病毒(IHNV)灭活疫苗的制备方法及其

应用[P]. 中国 2018-06-05.

- [95] 田园园, 叶星. 鱼用基因工程疫苗研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(05): 145-152.
- [96] Oberg L A, Wirkkula J, Mourich D, et al. Bacterially Expressed Nucleoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Augments Protective Immunity Induced by the Glycoprotein Vaccine in Fish[J]. J Virol, 1991, 65(8): 4486-4489.
- [97] Cain K D, LaPatra S E, Shewmaker B, et al. Immunogenicity of a Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Glycoprotein Produced in Insect Cells[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 36(1): 67-72.
- [98] Zhao J Z, Xu L M, Liu M, et al. Preliminary Study of an Oral Vaccine Against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus using Improved Yeast Surface Display Technology[J]. Mol Immunol, 2017, 85: 196-204.
- [99] Xu L, Zhao J, Liu M, et al. Bivalent DNA Vaccine Induces Significant Immune Responses against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Rainbow Trout[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5700.
- [100] Salonius K, Simard N, Harland R, et al. The Road to Licensure of a DNA Vaccine[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2007, 8(8): 635-641.
- [101] Noonan B, Enzmann P J, Trust T J. Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Glycoprotein Epitopes Expressed in Aeromonas Salmonicida Induce Protective Immunity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(10): 3586-3591.
- [102] Neumann G, Kawaoka Y. Reverse Genetics Systems for the Generation of Segmented Negative-Sense RNA Viruses Entirely from Cloned cDNA[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2004, 283: 43-60.
- [103] Hardy S, Legagneux V, Audic Y, et al. Reverse Genetics in Eukaryotes[J]. Biol Cell, 2010, 102(10): 561-580.
- [104] Taniguchi K, Komoto S. Genetics and Reverse Genetics of Rotavirus[J]. Curr Opin Virol, 2012, 2(4): 399-407.
- [105] 吴波平, 时洪艳, 陈建飞, 等. 反向遗传操作研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2008, 1:134-138.
- [106] 刘玉良, 刘秀梵. RNA病毒反向遗传操作技术研究进展[J]. 病毒学报, 2004, 1:90-94.
- [107] Kovacs G R, Parks C L, Vasilakis N, et al. Enhanced Genetic Rescue of Negative-Strand RNA Viruses: Use of an MVA-T7 RNA Polymerase Vector and DNA Replication Inhibitors[J]. J Virol Methods, 2003, 111(1): 29-36.
- [108] Almazan F, Gonzalez J M, Penzes Z, et al. Engineering the Largest RNA Virus Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(10): 5516-5521.
- [109] Lowen A C, Noonan C, McLees A, et al. Efficient Bunyavirus Rescue from Cloned cDNA[J]. Virology, 2004, 330(2): 493-500.
- [110] Fraser D, Mahler H R, Shug A L, et al. The Infection of Sub-Cellular *Escherichia Coli*, Strain B, with a DNA Preparation from T2 Bacteriophage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1957, 43(11): 939-947.
- [111] Pekosz A, He B, Lamb R A. Reverse Genetics of Negative-Strand RNA Viruses: Closing the Circle[J].

Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(16): 8804-8806.

- [112] Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. QB DNA-Containing Hybrid Plasmids Giving Rise to QB Phage Formation in the Bacterial Host[J]. Nature, 1978, 274(5668): 223-228.
- [113] Racaniello V R, Baltimore D. Cloned Poliovirus Complementary DNA is Infectious in Mammalian Cells[J]. Science, 1981, 214(4523): 916-919.
- [114] Boyer J C, Haenni A L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses[J]. Virology, 1994, 198(2): 415-426.
- [115] Bridgen A. Reverse Genetics of RNA Viruses Applications and Perspectives[M]//Chichester: Wiley, 2012.
- [116] Walpita P, Flick R. Reverse Genetics of Negative-Stranded RNA Viruses: A Global Perspective[J]. Fems Microbiol Lett, 2005, 244(1): 9-18.
- [117] Schnell M J, Mebatsion T, Conzelmann K K. Infectious Rabies Viruses from Cloned cDNA[J]. Embo J, 1994, 13(18): 4195-4203.
- [118] Fodor E, Devenish L, Engelhardt O G, et al. Rescue of Influenza A Virus from Recombinant DNA[J]. J Virol, 1999, 73(11): 9679-9682.
- [119] Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S. Rescue of Influenza C Virus from Recombinant DNA[J]. J Virol, 2007, 81(20): 11282-11289.
- [120] Bridgen A, Elliott R M. Rescue of a Segmented Negative-Strand RNA Virus Entirely from Cloned Complementary DNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26): 15400-15404.
- [121] Mundt E, Vakharia V N. Synthetic Transcripts of Double-Stranded Birnavirus Genome are Infectious[J].
   Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 11131-11136.
- [122] Biacchesi S, Thoulouze M I, Bearzotti M, et al. Recovery of Nv Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes[J]. J Virol, 2000, 74(23): 11247-11253.
- [123] Wang C, Lian G H, Zhao L L, et al. Virulence and Serological Studies of Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Rainbow Trout[J]. Virus Res, 2016, 220: 193-202.
- [124] Garcin D, Pelet T, Calain P, et al. A Highly Recombinogenic System for the Recovery of Infectious Sendai Paramyxovirus from cDNA: Generation of a Novel Copy-Back Nondefective Interfering Virus[J]. Embo J, 1995, 14(24): 6087-6094.
- [125] Ammayappan A, Lapatra S E, Vakharia V N. A Vaccinia-Virus-Free Reverse Genetics System for Infectious Hematopoietic Necrosis Virus[J]. J Virol Methods, 2010, 167(2): 132-139.
- [126] Li J, Xia D, Zhang M, et al. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Nucleoprotein Amino Acid Residues Affect Viral Virulence and Immunogenicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 130: 572-581.
- [127] Chen Y, Li J, Li D, et al. The L-Domains in M and G Proteins of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Affect Viral Budding and Pathogenicity[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 95: 171-179.
- [128] Jia S, Ding G, Wang C, et al. N-Linked Glycosylation Sites in G Protein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Affect its Virulence and Immunogenicity in Rainbow Trout[J]. Fish Shellfish

Immunol, 2019, 89: 537-547.

- [129] Emmenegger E J, Biacchesi S, Merour E, et al. Virulence of a Chimeric Recombinant Infectious Haematopoietic Necrosis Virus Expressing the Spring Viraemia of Carp Virus Glycoprotein in Salmonid and Cyprinid Fish[J]. J Fish Dis, 2018, 41(1): 67-78.
- [130] Romero A, Figueras A, Tafalla C, et al. Histological, Serological and Virulence Studies on Rainbow Trout Experimentally Infected with Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Viruses[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 68(1): 17-28.
- [131] Rouxel R N, Merour E, Biacchesi S, et al. Complete Protection Against Influenza Virus H1N1 Strain A/PR/8/34 Challenge in Mice Immunized with Non-Adjuvanted Novirhabdovirus Vaccines[J]. Plos One, 2016, 11(10): e164245.
- [132] Duan K, Zhao J, Ren G, et al. Molecular Evolution of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in China[J]. Viruses, 2021, 13(3): 488.
- [133] Wood E M, Snieszko S F, Yasutake W T. Infectious Pancreatic Necrosis in Brook Trout[J]. Ama Arch Pathol, 1955, 60(1): 26-28.
- [134] 赵景壮, 贺文斌, 徐黎明, 等. 虹鳟IPNV分离株VP2蛋白的表达及免疫原性检测[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(02): 179-185.
- [135] Wolf K, Dunbar C, Snieszko S. Infectious Pancreatic Necrosis of Trout A Tissue-Culture Study[J]. The Progressive Fish-Culturist, 1960, 22(2): 64-68.
- [136] Havarstein L S, Kalland K H, Christie K E, et al. Sequence of the Large Double-Stranded RNA Segment of the N1 Strain of Infectious Pancreatic Necrosis Virus: A Comparison with Other Birnaviridae[J]. J Gen Virol, 1990, 71 (Pt 2): 299-308.
- [137] Hastein T, Krogsrud J. Infectious Pancreatic Necrosis: First Isolation of Virus from Fish in Norway[J]. Acta Vet Scand, 1976, 17(1): 109-111.
- [138] Julin K, Mennen S, Sommer A I. Study of Virulence in Field Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Obtained from the Northern Part of Norway[J]. J Fish Dis, 2013, 36(2): 89-102.
- [139] Cesar O S, de Oca R M, Groman D, et al. Case Report: Viral Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Rainbow Trout from Mexico[J]. J Aquat Anim Health, 2006, 18(4): 305-310.
- [140] Escobar-Dodero J, Kinsley A, Perez A M, et al. Risk Factors for Infectious Pancreatic Necrosis in Farmed Chilean Atlantic Salmon (*Salmo Salar L.*) from 2010 to 2013[J]. Prev Vet Med, 2019, 167: 182-189.
- [141] Crane M S, Hardy-Smith P, Williams L M, et al. First Isolation of an Aquatic Birnavirus from Farmed and Wild Fish Species in Australia[J]. Dis Aquat Organ, 2000, 43(1): 1-14.
- [142] Lojkić I, Zrnčić S, Oraić D, et al. Phylogenetic Analysis of the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) from Croatian and Bosnian and Herzegovinian Farms[J]. B Eur Assoc Fish Pat, 2012, 32(4): 127-134.
- [143] Panzarin V, Holmes E C, Abbadi M, et al. Low Evolutionary Rate of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Italy is Associated with Reduced Virulence in Trout[J]. Virus Evol, 2018, 4(2): vey019.
- [144] Rud Y P, Maistrenko M I, Buchatskiy L P. Characterization of an Infectious Pancreatic Necrosis Virus

from Rainbow Trout Fry (Onhorhynchus Mykiss) in West Ukraine[J]. Virol Sin, 2015, 30(3): 231-233.

- [145] Tamer C, Isidan H, Kalayci G, et al. Determination of VP2 Sequence-Based Virulence Motifs and Phylogenetic Analysis of Domestic Turkish IPNV Isolates[J]. J Fish Dis, 2022, 45(2): 327-334.
- [146] Maj-Paluch J, Matras M, Borzym E, et al. Phylogenetic Characterization of Polish Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Salmonid Fish[J]. J Fish Dis, 2020, 43(11): 1443-1451.
- [147] Benkaroun J, Muir K F, Allshire R, et al. Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from a Fish Farm in Scotland[J]. Viruses, 2021, 13(3): 385.
- [148] Ruane N M, McCleary S J, McCarthy L J, et al. Phylogenetic Analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Ireland Reveals the Spread of a Virulent Genogroup 5 Subtype Previously Associated with Imports[J]. Arch Virol, 2015, 160(3): 817-824.
- [149] Cutrin J M, Olveira J G, Barja J L, et al. Diversity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Strains Isolated from Fish, Shellfish, and Other Reservoirs in Northwestern Spain[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(2): 839-843.
- [150] Holopainen R, Eriksson-Kallio A M, Gadd T. Molecular Characterisation of Infectious Pancreatic Necrosis Viruses Isolated from Farmed Fish in Finland[J]. Arch Virol, 2017, 162(11): 3459-3471.
- [151] Varvarigos P, Way K. First Isolation and Identification of the Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus from Rainbow Trout Onchorhynchus Mykiss Fingerlings Farmed in Greece[J]. Bull Eur. AssFish Pathol, 2002, 22(3): 195-200.
- [152] V C. Detection of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus in Rainbow Trouts in Bulgaria[J]. Bulg J Vet Med, 2004, 7(2): 129-136.
- [153] Reschova S, Pokorova D, Hulova J, et al. Surveillance of Viral Fish Diseases in the Czech Republic Over the Period January 1999 - December 2006[J]. Czech Academy of Agricultural Sciences, 2018, 53(2): 86.
- [154] Suebsing R, Kim J H, Kim S R, et al. Detection of Viruses in Farmed Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss) in Korea by RT-LAMP Assay[J]. J Microbiol, 2011, 49(5): 741-746.
- [155] Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M. An Approach for Genogrouping of Japanese Isolates of Aquabirnaviruses in a New Genogroup, VII, Based on the VP2/NS Junction Region[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 7): 1973-1978.
- [156] Ahmadivand S, Weidmann M, El-Matbouli M, et al. Low Pathogenic Strain of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Associated with Recent Outbreaks in Iranian Trout Farms[J]. Pathogens, 2020, 9(10): 782.
- [157] 江育林, 徐伯亥, 李伟, 等. 虹鳟传染性胰脏坏死病病毒(IPNV)的初步研究[J]. 水生生物学报, 1989, 4: 353-358.
- [158] 胡晓利,李伟,肇慧君,等. 虹鳟鱼传染性胰脏坏死病病毒的分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(03): 27-30.
- [159] Ji F, Zhao J Z, Liu M, et al. Complete Genomic Sequence of an Infectious Pancreatic Necrosis Virus Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) in China[J]. Virus Genes, 2017, 53(2): 215-225.

- [160] Zhu L, Wang X, Wang K, et al. Outbreak of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Farmed Rainbow Trout in China[J]. Acta Trop, 2017, 170: 63-69.
- [161] 刘淼, 徐黎明, 赵景壮, 等. 虹鳟传染性胰脏坏死病毒的分离鉴定及聚类分析[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(01): 56-61.
- [162] Rodriguez S S, Borrego J J, Perez-Prieto S I. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods[J]. Adv Virus Res, 2003, 62: 113-165.
- [163] Mortensen S H, Nilsen R K, Hjeltnes B. Stability of an Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Isolate Stored under Different Laboratory Conditions[J]. Dis Aquat Organ, 1998, 33(1): 67-71.
- [164] Rodriguez S, Alonso M, Perez-Prieto S. Detection of Infections Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) from Leukocytes of Carrier Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss[J]. Fish Pathol, 2010, 26(3): 139.
- [165] Kelly R, Wolf K. Infectious Pancreatic Necrosis.[M]//Fish Viruses and Fish Diseases. Ithaca, NY: Cornell Univ. Press, 1989: 115-157.
- [166] Wolf K, Quimby M C. Salmonid Viruses: Infectious Pancreatic Necrosis Virus. Morphology, Pathology and Serology of First European Isolations[J]. Arch Gesamte Virusforsch, 1971, 34(2): 144-156.
- [167] Sonstegard R A, McDermott L A, Sonstegard K S. Isolation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from White Suckers (*Catastomus Commersoni*)[J]. Nature, 1972, 236(5343): 174-175.
- [168] Sano T, Tanaka K, Fukuzaki S. Immune Response in Adult Trout Against Formalin Killed Concentrated IPNV[J]. Dev Biol Stand, 1981, 49: 63-70.
- [169] Ahne W. Virus Infections in Fishes: Etiology, Diagnosis and Control[J]. Zentralbl Veterinarmed B, 1985, 32(4): 237-264.
- [170] Reno P. Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses[M]//Fish Diseases and Disorders. Wallingford: CAB Publishing, 1999: 1-55.
- [171] Lo C, Chen S. The Study of *Clinostomum Complanatum* (Rud., 1914). V. The Influences of Metarcercaria of *C. Complanatum* on Fish. [M]//International Seminar on Fish Pathology. Tokyo: Japanese Society of Fish Pathologists, 1985: 39-40.
- [172] Rodger H, Muir F, Millar S. Isolation of an Aquatic Birnavirus from Sea Bream[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1997, 17(3): 134-136.
- [173] Joh S, Heo G. Genetic Analysis of the VP2-NS Junction Region on Segment a of Marine Birnavirus Isolated from Rockfish (*Sebastes Schlegeli*) Cultured in Korea[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1999, 19(5): 190-195.
- [174] Jung S J, Kitamura S, Kawai K, et al. Isolation of Different Types of Birnavirus from Ayu Plecoglossus Altivelis and Amago Salmon Oncorhynchus Rhodurus Cultured in the Same Geographic Area[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 38(2): 87-91.
- [175] Lee N S, Nomura Y, Miyazaki T. Gill Lamellar Pillar Cell Necrosis, a New Birnavirus Disease in Japanese Eels[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 37(1): 13-21.
- [176] Crane M S, Hardy-Smith P, Williams L M, et al. First Isolation of an Aquatic Birnavirus from Farmed and

Wild Fish Species in Australia[J]. Dis Aquat Organ, 2000, 43(1): 1-14.

- [177] Dopazo C P. The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known[J]. Pathogens, 2020, 9(2): 94.
- [178] Lemos M. Stability of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Untreated, Filtered and Autoclaved Estuarine Water[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1983, 3(4): 51-53.
- [179] Oye A K, Rimstad E. Inactivation of Infectious Salmon Anaemia Virus, Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Water Using UVC Irradiation[J]. Dis Aquat Organ, 2001, 48(1): 1-5.
- [180] Jarp J. Epidemiological Aspects of Viral Diseases in the Norwegian Farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar L.*)[J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1999, 19(6): 240-244.
- [181] Tapia D, Eissler Y, Reyes Lopez F E, et al. Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Salmonids: Molecular Epidemiology and Host Response to Infection[J]. Rev Aquac, 2022, 14(2): 751-769.
- [182] Barrera-Mejia M, Simon-Martinez J, Ulloa-Arvizu R, et al. Molecular Characterization of the VP1 Gene of a Mexican Isolate of Infectious Pancreatic Necrosis Virus[J]. Can J Vet Res, 2010, 74(3): 218-222.
- [183] Pedersen T, Skjesol A, Jorgensen J B. VP3, a Structural Protein of Infectious Pancreatic Necrosis Virus, Interacts with RNA-Dependent RNA Polymerase VP1 and with Double-Stranded RNA[J]. J Virol, 2007, 81(12): 6652-6663.
- [184] Bahar M W, Sarin L P, Graham S C, et al. Structure of a VP1-VP3 Complex Suggests How Birnaviruses Package the VP1 Polymerase[J]. J Virol, 2013, 87(6): 3229-3236.
- [185] Graham S C, Sarin L P, Bahar M W, et al. The N-Terminus of the RNA Polymerase from Infectious Pancreatic Necrosis Virus is the Determinant of Genome Attachment[J]. Plos Pathog, 2011, 7(6): e1002085.
- [186] Munang'Andu H M, Sandtro A, Mutoloki S, et al. Immunogenicity and Cross Protective Ability of the Central VP2 Amino Acids of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon (Salmo Salar L.)[J]. Plos One, 2013, 8(1): e54263.
- [187] Ballesteros N A, Rodriguez S S, Perez-Prieto S I. Immune Responses to Oral pcDNA-VP2 Vaccine in Relation to Infectious Pancreatic Necrosis Virus Carrier State in Rainbow Trout Oncorhynchus Mykiss[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2015, 165(3-4): 127-137.
- [188] Min L, Li-Li Z, Jun-Wei G, et al. Immunogenicity of Lactobacillus-Expressing VP2 and VP3 of the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Rainbow Trout[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(1): 196-203.
- [189] Dadar M, Memari H R, Vakharia V N, et al. Protective and Immunogenic Effects of *Escherichia Coli*-Expressed Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) VP2-VP3 Fusion Protein in Rainbow Trout[J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 47(1): 390-396.
- [190] Imajoh M, Goto T, Oshima S. Characterization of Cleavage Sites and Protease Activity in the Polyprotein Precursor of Japanese Marine Aquabirnavirus and Expression Analysis of Generated Proteins by a VP4

Protease Activity in Four Distinct Cell Lines[J]. Arch Virol, 2007, 152(6): 1103-1114.

- [191] Weber S, Fichtner D, Mettenleiter T C, et al. Expression of VP5 of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Strain VR299 is Initiated at the Second in-Frame Start Codon[J]. J Gen Virol, 2001, 82(Pt 4): 805-812.
- [192] Santi N, Song H, Vakharia V N, et al. Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP5 is Dispensable for Virulence and Persistence[J]. J Virol, 2005, 79(14): 9206-9216.
- [193] Biering E, Villoing S, Sommerset I, et al. Update on Viral Vaccines for Fish[J]. Dev Biol (Basel), 2005, 121: 97-113.
- [194] Manning D S, Leong J C. Expression in Escherichia Coli of the Large Genomic Segment of Infectious Pancreatic Necrosis Virus[J]. Virology, 1990, 179(1): 16-25.
- [195] Allnutt F C, Bowers R M, Rowe C G, et al. Antigenicity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP2 Subviral Particles Expressed in Yeast[J]. Vaccine, 2007, 25(26): 4880-4888.
- [196] Ballesteros N A, Rodriguez S S, Perez-Prieto S I. Food Pellets as an Effective Delivery Method for a DNA Vaccine Against Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 37(2): 220-228.
- [197] de Las H A, Rodriguez S S, Perez-Prieto S I. Immunogenic and Protective Effects of an Oral DNA Vaccine Against Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(4): 562-570.
- [198] Rivas-Aravena A, Cortez-San M M, Galaz J, et al. Evaluation of the Immune Response Against Immature Viral Particles of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV): A New Model to Develop an Attenuated Vaccine[J]. Vaccine, 2012, 30(34): 5110-5117.
- [199] Min L, Li-Li Z, Jun-Wei G, et al. Immunogenicity of Lactobacillus-Expressing VP2 and VP3 of the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Rainbow Trout[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(1): 196-203.
- [200] Yu Z, Deng M, Geng Y, et al. An Outbreak of Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Infection in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) in Southwest China[J]. Aquac Res, 2016: 2355-2362.
- [201] Yoshimizu M. Disease Problems of Salmonid Fish in Japan Caused by International Trade[J]. Rev Sci Tech, 1996, 15(2): 533-549.
- [202] Rocha A, Ruiz S, Coll J M. Improvement of Transfection Efficiency of Epithelioma *Papulosum Cyprini* Carp Cells by Modification of Cell Cycle and Use of an Optimal Promoter[J]. Mar Biotechnol (Ny), 2004, 6(5): 401-410.
- [203] Alonso M, Kim C H, Johnson M C, et al. The Nv Gene of Snakehead Rhabdovirus (SHRV) is Not Required for Pathogenesis, and a Heterologous Glycoprotein Can be Incorporated Into the SHRV Envelope[J]. J Virol, 2004, 78(11): 5875-5882.
- [204] Clark H F, Soriano E Z. Fish Rhabdovirus Replication in Non-Piscine Cell Culture: New System for the Study of Rhabdovirus-Cell Interaction in Which the Virus and Cell Have Different Temperature Optima[J]. Infect Immun, 1974, 10(1): 180-188.
- [205] Larragoite E T, Tacchi L, LaPatra S E, et al. An Attenuated Virus Vaccine Appears Safe to the Central

Nervous System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) After Intranasal Delivery[J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 49: 351-354.

- [206] Zhao W, Spatz S, Zhang Z, et al. Newcastle Disease Virus (NDV) Recombinants Expressing Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Glycoproteins gB and gD Protect Chickens Against ILTV and NDV Challenges[J]. J Virol, 2014, 88(15): 8397-8406.
- [207] Novoa B, Romero A, Mulero V, et al. Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model for the Study of Vaccination Against Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)[J]. Vaccine, 2006, 24(31-32): 5806-5816.
- [208] Zhang Z, Zhao W, Li D, et al. Development of a Newcastle Disease Virus Vector Expressing a Foreign Gene through an Internal Ribosomal Entry Site Provides Direct Proof for a Sequential Transcription Mechanism[J]. J Gen Virol, 2015, 96(8): 2028-2035.
- [209] Zhao W, Zhang Z, Zsak L, et al. P and M Gene Junction is the Optimal Insertion Site in Newcastle Disease Virus Vaccine Vector for Foreign Gene Expression[J]. J Gen Virol, 2015, 96(Pt 1): 40-45.
- [210] Wertz G W, Moudy R, Ball L A. Adding Genes to the RNA Genome of Vesicular Stomatitis Virus: Positional Effects on Stability of Expression[J]. J Virol, 2002, 76(15): 7642-7650.
- [211] Carnero E, Li W, Borderia A V, et al. Optimization of Human Immunodeficiency Virus Gag Expression by Newcastle Disease Virus Vectors for the Induction of Potent Immune Responses[J]. J Virol, 2009, 83(2): 584-597.
- [212] Zhu L, Wang X, Wang K, et al. Outbreak of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Farmed Rainbow Trout in China[J]. Acta Trop, 2017, 170: 63-69.
- [213] Xu L, Zhao J, Liu M, et al. A Effective DNA Vaccine Against Diverse Genotype J Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Strains Prevalent in China[J]. Vaccine, 2017, 35(18): 2420-2426.
- [214] Penaranda M M, Purcell M K, Kurath G. Differential Virulence Mechanisms of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Include Host Entry and Virus Replication Kinetics[J]. J Gen Virol, 2009, 90(Pt 9): 2172-2182.
- [215] Hu H, Roth J P, Yu Q. Generation of a Recombinant Newcastle Disease Virus Expressing Two Foreign Genes for Use as a Multivalent Vaccine and Gene Therapy Vector[J]. Vaccine, 2018, 36(32 Pt B): 4846-4850.
- [216] Frost P, Havarstein L S, Lygren B, et al. Mapping of Neutralization Epitopes on Infectious Pancreatic Necrosis Viruses[J]. J Gen Virol, 1995, 76 (Pt 5): 1165-1172.
- [217] Fridholm H, Eliasson L, Everitt E. Immunogenicity Properties of Authentic and Heterologously Synthesized Structural Protein VP2 of Infectious Pancreatic Necrosis Virus[J]. Viral Immunol, 2007, 20(4): 635-648.
- [218] de Las H A, Perez P S, Rodriguez S S. In Vitro and in Vivo Immune Responses Induced by a DNA Vaccine Encoding the VP2 Gene of the Infectious Pancreatic Necrosis Virus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27(2): 120-129.
- [219] Dhar A K, Bowers R M, Rowe C G, et al. Expression of a Foreign Epitope on Infectious Pancreatic

Necrosis Virus VP2 Capsid Protein Subviral Particle (SVP) and Immunogenicity in Rainbow Trout[J]. Antiviral Res, 2010, 85(3): 525-531.

- [220] Martinez-Alonso S, Vakharia V N, Saint-Jean S R, et al. Immune Responses Elicited in Rainbow Trout through the Administration of Infectious Pancreatic Necrosis Virus-Like Particles[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36(2): 378-384.
- [221] Guo M, Shi W, Wang Y, et al. Recombinant Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Infectious Pancreatic Necrosis Virus VP2 Protein Induces Immunity against both Pathogens[J]. Fish Shellfish Immunol, 2018, 78: 187-194.
- [222] Alonso M, Leong J A. Licensed DNA Vaccines against Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)[J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2013, 7(1): 62-65.
- [223] Ahmadivand S, Soltani M, Behdani M, et al. VP2 (PTA Motif) Encoding DNA Vaccine Confers Protection against Lethal Challenge with Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Trout[J]. Mol Immunol, 2018, 94: 61-67.
- [224] Cuesta A, Chaves-Pozo E, de Las H A, et al. An Active DNA Vaccine Against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) with a Different Mode of Action than Fish Rhabdovirus DNA Vaccines[J]. Vaccine, 2010, 28(19): 3291-3300.