

# 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白抗血清的制备及应用

朱旭<sup>1,2,3</sup> 兰文升<sup>2,3\*</sup> 刘荭<sup>2,3</sup> 高隆英<sup>2,3</sup> 杜鹃<sup>1,2,3</sup> 陈孝煊<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

(<sup>2</sup>深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心, 518045)

(<sup>3</sup>深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室, 518045)

**摘要** 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从传染性造血器官坏死病毒(Infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)感染的细胞悬液克隆病毒的糖蛋白基因, 将其亚克隆至原核表达载体 pCWori, 转化到大肠杆菌 DH 5 $\alpha$ , 通过发酵大肠杆菌制备病毒糖蛋白。经 SDS-PAGE 分析, 诱导表达的重组蛋白主要以包涵体的形式存在, 使用 Ni-NTA 亲和层析柱在变性条件下进行纯化并透析复性, 最终得到了较高纯度的可溶性糖蛋白, 分子量约为 57 kDa。Western-blot 分析结果显示, 所表达的蛋白能够被 IHNV 病毒制备的兔抗 IHNV 血清识别。用复性后的蛋白免疫小鼠制备抗血清, ELISA 显示抗体效价可达 1:64 000。经制备的抗血清可以作为一抗建立 ELISA 检测方法, 用于检测细胞悬液的病毒粒子, 将抗血清稀释到 1:16 000 仍能与 IHNV 全病毒发生反应。本研究利用重组的 IHNV 糖蛋白成功制备了高效价的抗血清, 并能够与 IHNV 全病毒发生特异性结合, 为 IHNV 免疫学检测方法建立奠定了基础。

**关键词** 传染性造血器官坏死病毒 糖蛋白 原核表达 抗血清

**中图分类号** S941.41 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0112-06

## Antiserum preparation for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) glycoprotein and its application in IHNV detection

ZHU Xu<sup>1,2,3</sup> LAN Wen-sheng<sup>2,3\*</sup> LIU Hong<sup>2,3</sup>  
GAO Long-ying<sup>2,3</sup> DU Juan<sup>1,2,3</sup> CHEN Xiao-xuan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Fisheries, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

(<sup>2</sup> Animal & plant Inspection and Quarantine Technology Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 518045)

(<sup>3</sup> Shenzhen Key Laboratory of Exotic Pests, 518045)

**ABSTRACT** The 1527bp IHNV glycoprotein gene was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from cell culture, and was subcloned into pCWori plasmid. Then the recombinant pCWori-G was transformed into DH 5 $\alpha$ . The recombinant protein was obtained through fermentation. The 57kDa target protein was expressed successfully by 1 mmol/L IPTG induction for 5 h. SDS-PAGE analysis showed that it was mainly in the form of inclusion body. The soluble glycoprotein was obtained after purification and renaturation processing. Western-blot analysis showed that the recombinant protein was identified specifically by the goat anti-IHNV serum. The recombinant protein was used to immunize mice to produce

国家质检公益性行业科研专项项目(201010020)资助

\* 通讯作者。E-mail:lanwshao@yahoo.com.cn, E-mail:chenxx@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2012-02-25;接受日期:2012-04-06

作者简介:朱旭(1987-),男,硕士研究生,主要从事水产动物疾病研究。E-mail:zhuxu\_224@163.com

glycoprotein antiserum. The prepared antiserum reacted specifically with IHNV by indirect ELISA test. In this study, the IHNV glycoprotein was expressed by prokaryotic expression system and polyclonal antiserum was obtained by immunized mice.

**KEY WORDS** Infectious hematopoietic necrosis virus Glycoprotein  
Prokaryotic expression Antiserum

传染性造血器官坏死病症是由 IHNV(Infectious hematopoietic necrosis virus)引起鲑科鱼类的一种常见的急性病毒性传染病,常造成鱼苗或幼鱼高达 70%~100%的死亡率(St-Hilaire *et al.* 2002; Hoffmann *et al.* 2005),世界动物卫生组织(OIE)早已将其列入水生动物疫病名录,我国也将其列为二类动物疫病。早在 20 世纪 40、50 年代, Watson 等人报道了在美国北部太平洋西北鲑鱼幼鱼中一种严重的流行性疾病,该病原即为 IHNV,随后, IHNV 对冷水鱼类造成的危害为人们所关注。1968 年, IHNV 随红大麻哈鱼鱼卵从阿拉斯加传入日本北海道(Sanot *et al.* 1977),1969 年 Amend 等人在北美地区首次分离出了该病毒。1990 年在辽宁省本溪市某虹鳟养殖场报道了我国第一例 IHNV(赵志壮等 1994)。目前该病毒在北美、亚洲太平洋沿岸,乃至欧洲等一些地区都有分布,对水产养殖业造成了巨大经济损失,因此,研发 IHNV 检测方法迫在眉睫。

传染性造血器官坏死病毒属弹状病毒科的粒外弹状病毒属,为单股单链反义 RNA 病毒(Wolf *et al.* 1989),其线性基因组编码 6 个蛋白,依次为核衣壳蛋白(N)、磷酸蛋白(P)、基质蛋白(M)、表面糖蛋白(G)、非病毒结构蛋白(NV)和病毒聚合酶蛋白(L)(Ammayappan *et al.* 2010; Gomez-Casado *et al.* 2011),其中糖蛋白为病毒外壳突起囊膜重要组成部分,也称之为囊膜蛋白,该蛋白还具有丰富的抗原表位和较强的免疫原性,能诱导产生中和抗体,并刺激细胞免疫,同时还参与病毒和细胞的识别、结合等过程,直接决定病毒毒力(Morzunov *et al.* 1995; Verjan *et al.* 2008)。因此,糖蛋白能够一定程度上代替全病毒作为抗原制备多克隆抗体,用于 IHNV 诊断和免疫防治等方面的研究。目前,用于检测 IHNV 的主要方法是聚合酶链式反应(PCR)方法,该方法简单易行,但是实践过程中常常出现假阳性结果,因此,需要检测病毒蛋白的方法做进一步确证,以提高检测结果的准确性。抗体是检测病毒蛋白必须的材料,抗体的获得可以用全病毒制备,也可以通过病毒的重组囊膜糖蛋白制备,通过构建原核表达系统,能够低成本高效率地生产出用于制备抗体的目的蛋白(韩俊英等 2011),克服了全病毒难以培养获得的问题,重组蛋白相对于病毒来说更容易纯化和批量生产,根本上保证了检测试剂盒中抗体原料的获得。本研究拟通过大肠杆菌发酵生产 IHNV 糖蛋白,用纯化的重组蛋白制备抗血清,建立快速有效的 IHNV 免疫学检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 毒株、细胞、菌株与质粒

IHNV 毒株、*E. coli* DH 5 $\alpha$ 菌株、pCWori 载体和鲤鱼上皮瘤细胞(Epithelioma papulosum of carp, EPC)等由本实验室所保存, pMD18-T 载体购自大连宝生物公司。

#### 1.1.2 工具酶及主要试剂

T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、小量胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司,病毒 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, DAB 显色试剂盒、TMB 显色液购自英创生物科技有限公司, Ni-NTA 亲和层析柱购自默克公司,兔抗 IHNV 血清由本实验所制备, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 都购自 Sigma 公司。

### 1.2 引物设计及 IHNV 糖蛋白基因扩增

根据 GenBank 发表的 IHNV 全基因组序列(NCBI 登录号: HM461966.1),利用 Oligo 6.0 设计针对糖蛋白(G 蛋白)基因的特异性序列设计引物:上游引物 P1 (5'-CATATGCAAACCGTCAAACCCGAC-3')含有

*Nde*I 酶切位点和下游引物 P2 (5'-AAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCAG-CACGCGGCAACAGC-3')含有 *Hind*Ⅲ酶切位点,由大连宝生物公司合成,预计扩增的基因片段长 1 527 bp。用试剂盒抽提 IHNV 病毒的核酸 RNA 为模板,按照反应条件为 94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,再 72 °C 10 min,P1 和 P2 作为引物,进行 RT-PCR 扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用胶回收试剂盒回收目的片段。

### 1.3 重组大肠杆菌的构建及蛋白表达

将 IHNV-G 基因克隆至 pMD18-T,得到重组质粒 pMD18-T-G,用 *Hind*Ⅲ和 *Nde*I 双酶切 pMD18-T-G 和载体 pCWori,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的片段,然后用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶按说明书设计合适的反应体系,构建重组质粒 pCWori-G,并转化到大肠杆菌 DH 5 $\alpha$ 。挑取阳性重组菌 pCWori-G/DH 5 $\alpha$ 单菌落接种到 1 ml 含 100  $\mu$ g/ml 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 条件下,转速为 220 r/min 摇床振荡培养 3 h。将培养菌液按 1 : 20 的比例接种到 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,25 °C 诱导 6 h,每隔 1 h 收集菌液,诱导后菌液 4 °C,6 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 PBS 洗涤两次,再用 PBS 重悬后经超声波破碎,进行 SDS-PAGE 分析,观察表达量的变化。另外,将诱导后的菌液进行超声波破碎,4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 后将上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.4 表达蛋白的亲纯化及复性

1 L LB 培养基中按 1 : 100 加入菌液,37 °C、220 r/min 振荡至 OD<sub>600</sub> = 0.5 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,25 °C 条件下诱导 5 h,收集菌体,反复冻融 3 次后,加入终浓度为 1 mg/ml 的溶菌酶,低温振荡 1 h,然后冰浴超声波破碎,再 4 °C、14 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,沉淀再用 PBS 重悬沉淀,如此反复几次,得到的沉淀用含 8 mol/L 尿素进行溶解,4 °C、14 000 r/min 离心 15 min,上清液即为可溶性重组蛋白。以 Ni-NTA 亲和层析的方法进行纯化,步骤按说明书进行。纯化后蛋白装入透析袋内在 PBS(pH 9.0)中透析 12 h。将透析后获得的产物 4 °C、14 000 r/min 离心 15 min,取上清液。

### 1.5 表达蛋白免疫原性分析

将诱导表达的糖蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,再用 2% BSA 封闭,4 °C 过夜。次日用 PBST 洗膜。将实验室保存的兔抗 IHNV 全病毒血清作为一抗,1 : 20 000 稀释,37 °C 作用 1 h,将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗,1 : 2 000 稀释,37 °C 作用 1 h,最后用 DAB 显色试剂盒进行显色。

### 1.6 IHNV 糖蛋白抗血清的制备及其效价测定

采用腹腔皮下多点注射免疫 SPF 级雌性小鼠(28~35d 龄)方法制备抗血清,每只小鼠每次免疫抗原剂量约为 50  $\mu$ g,每隔 7 d 免疫 1 次,共免疫 4 次。首次免疫注射的抗原为纯化后的可溶性 IHNV 糖蛋白与弗氏完全佐剂混匀制备,阴性对照为 PBS 与弗氏完全佐剂混匀制备,之后 3 次注射的抗原和阴性对照分别采用目的蛋白、PBS 与弗氏不完全佐剂混匀制备。末次加强免疫 7d 后眼球取血,采集血样置于无菌的不含抗凝剂的离心管中,4 °C 过夜,使之析出淡黄色抗血清,将抗血清吸至另一离心管中,剩下血块离心后取上清液,超低温冰箱中 -80 °C 保存,ELISA 检测血清效价。

### 1.7 糖蛋白抗血清对 IHNV 病毒的检测

采用酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测抗体与全病毒反应,具体步骤:将感染 IHNV 细胞培养物与包被缓冲液(0.1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,pH 9.6)等比例混合,包被 ELISA 板,空白对照包被 PBS,每孔 100  $\mu$ l,4 °C 过夜后,用 1 $\times$ PBST(含有 0.05% Tween 20)洗板 5 次,每次 3 min。2% BSA 封闭,每孔 200  $\mu$ l,37 °C 湿润作用 1 h,洗涤同上。鼠抗 IHNV-G 蛋白血清和阴性血清为一抗,1 : 500 开始倍比稀释,每孔 100  $\mu$ l,37 °C 湿润作用 1 h,洗涤同上。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,1 : 2 000 稀释,每孔 100  $\mu$ l,

37 °C 湿润作用 1 h, 洗涤同上。TMB 显色液室温显色 10 min。2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 每孔 50 μl 终止反应后立刻在酶标仪上读 OD<sub>450</sub> 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖蛋白基因的扩增及重组质粒的鉴定

以感染 IHNV 细胞培养物提取的总 RNA 作为反转录模板, 经 RT-PCR 对目的基因进行了扩增, 并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果表明, 扩增到了大小为 1 527 bp 的目的片段(图 1)。经测序后发现该片段序列与全基因组测序报道的 IHNV 糖蛋白序列一致。

### 2.2 重组表达质粒 pCWori-G 的鉴定

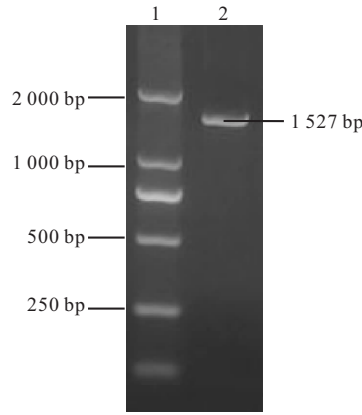
将获得的重组表达质粒 *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切, 酶切结果可见有大小约为 1 527 bp 的目的片段和 3 951 bp 的载体片段(图 2), 表明目的片段已经正确插入了表达载体, 成功地构建了表达质粒 pCWori-G。

### 2.3 糖蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 分析可知, pCWori-G/DH 5α 重组菌经 1 mol/L IPTG 诱导 1~6 h 后均表达出了相对分子质量约 57 kDa 的目的蛋白, 与 DNA Star 软件预测的理论值 57 kDa 相符, 且在一定范围内随着时间的延长表达量逐渐增多, 在诱导 5 h 左右时表达量达到最大(图 3)。超声波处理诱导后菌体, 经 SDS-PAGE 分析表明, 重组蛋白主要在沉淀中, 以不溶性的包涵体形式存在(图 4)。

### 2.4 表达蛋白的复性与纯化

将诱导表达包涵体经过洗涤、溶解、Ni-NTA 亲和层析纯化以及复性后得到了可溶性的重组糖蛋白。SDS-PAGE 分析, 纯化后的蛋白为单一条带, 分子量约为 57 kDa(图 5)。

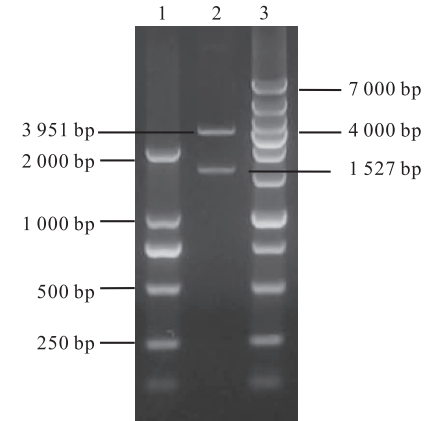


1. DNA 分子量标准 DL2000;  
2. RT-PCR 产物

1. DNA marker DL2000;  
2. RT-PCR product

图 1 IHNV-G 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

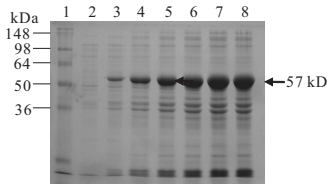
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR



1. DNA 分子量标准 DL2000;  
2. 重组质粒经 *Hind* III 和 *Nde* I 酶切的产物;  
3. DNA 分子量标准 DL7000

1. DNA marker DL2000;  
2. *Hind* III/*Nde* I; 3. DNA marker DL7000

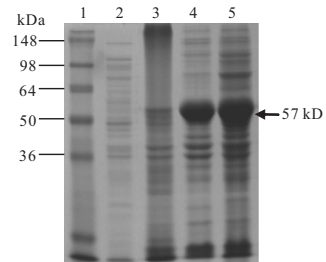
图 2 重组质粒 pCWori-G 酶切鉴定电泳  
Fig. 2 pCWori-G plasmid digested by restriction enzymes



1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导菌体蛋白;  
3~8. 诱导 1~6 h 收集菌体蛋白  
1. Protein marker; 2. Uninduced bacteria;  
3~8. Total protein induced for 1~6 h

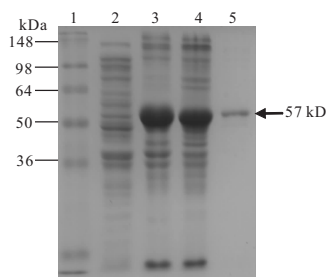
图 3 重组菌 pCWori-G/BL21(DE3) 表达蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed protein



1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导菌体蛋白;  
3. 菌体破碎上清液; 4. IPTG 诱导后菌体总蛋白; 5. 菌体破碎后沉淀  
Note: 1. Protein marker; 2. Uninduced bacteria; 3. Supernatant after supersonic  
4. Induced products; 5. Precipitation after supersonic

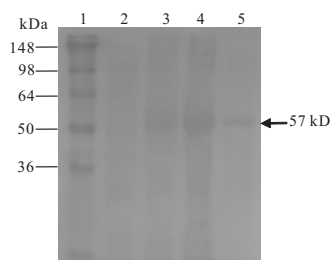
图 4 重组菌诱导表达后超声上清和沉淀 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed protein



1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导菌体总蛋白;  
3. 包涵体; 4. 尿素溶解后糖蛋白; 5. 纯化并复性后的糖蛋白
1. Protein marker; 2. Uninduced bacteria;  
3. Inclusion body of G protein 4. Dissolved G protein;  
5. Purified G protein

图5 纯化复性后的糖蛋白的 SDS-PAGE 的鉴定

Fig. 5 The identification of G protein purified by SDS-PAGE



- 注: 1. 蛋白分子量标准; 2. 未诱导菌体总蛋白;  
3. 包涵体; 4. 尿素溶解后糖蛋白; 5. 纯化和复性后糖蛋白
- Note: 1. Protein marker; 2. Uninduced bacteria;  
3. Inclusion body products; 4. Dissolved G protein;  
5. Purified G protein

图6 表达目的蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 6 The identification of expressed protein by Western-blot

## 2.5 表达蛋白抗原性的检测

重组蛋白经 SDS-PAGE 转印到 PVDF 膜上, IHN 兔抗全病毒血清 1:20 000 稀释后作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 1:2 000 稀释作为二抗。Western-blot 结果显示, 经诱导后的菌体蛋白、尿素溶解过后的包涵体以及镍柱纯化和复性后的糖蛋白都可以与 IHN 兔抗血清反应, 在 PVDF 膜上出现了一条明显的特异性条带, 分子量大小处于 57 kD 左右, 与 SDS-PAGE 出现的目的蛋白相符, 而作为对照的未经诱导的菌体蛋白无条带产生(图 6)。结果说明, 表达的糖蛋白能够被 IHN 兔抗血清识别, 具有良好的抗原性。

## 2.6 IHN 糖蛋白抗血清效价测定

用纯化的糖蛋白包被 ELSIA 板, 设立阴性对照和空白对照, 将本试验制备的糖蛋白鼠抗血清作为阳性血清, 按 1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000、1:128 000、1:256 000 稀释阳性血清和阴性血清, 进行间接 ELSIA 试验。结果表明, 获得的多抗与包被蛋白发生了较强的反应性, 血清最大稀释度为 1:64 000, 仍满足  $(\text{阳性血清 OD}_{450\text{nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{nm}}) / (\text{阴性血清 OD}_{450\text{nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{nm}}) > 2$  (图 7)。

## 2.7 IHN 糖蛋白抗血清与全病毒反应

用感染 IHN 的细胞培养物包被 ELSIA 板, 空白对照包被 PBS, 将本研究制备的糖蛋白多抗和阴性血清, 按 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000、1:64 000 二倍比例稀释, 进行 ELSIA 试验, 结果见图 8。从图 8 可知, 多抗最大稀释到 1:16 000 时, 仍满足  $(\text{阳性血清 OD}_{450\text{nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{nm}}) / (\text{阴性血清 OD}_{450\text{nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{nm}}) > 2$ 。

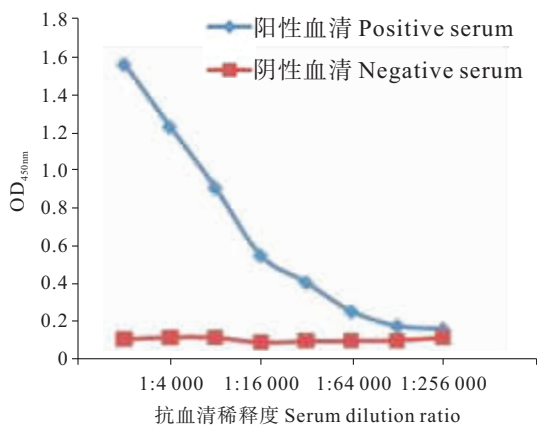


图7 间接 ELISA 检测糖蛋白多抗效价结果

Fig. 7 The result of G protein infected rabbit serum

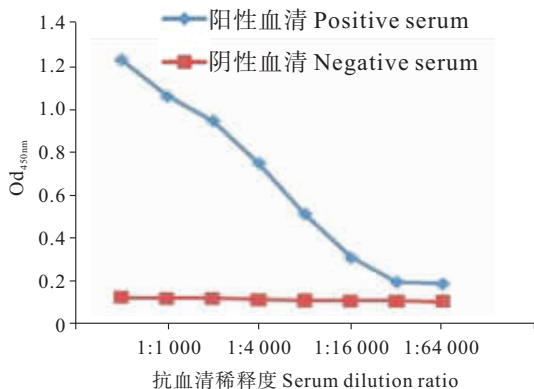


图8 间接 ELISA 检测糖蛋白多抗与全病毒反应结果

Fig. 8 The result of purified IHN infected rabbit serum

$OD_{450\text{ nm}}\text{-空白孔 } OD_{450\text{ nm}}) > 2$ , 说明本研究制备的 IHNV 糖蛋白多抗在一定的浓度范围内能够特异性识别全病毒。试验结果显示, 制备的 IHNV 糖蛋白多抗在一定的浓度范围内能够与全病毒发生较强的特异性反应, 当抗体浓度稀释度加大时, 则反应较弱, 这可能与制备抗血清所用的抗原活性蛋白含量低有关。

### 3 讨论

由于 IHNV 传染病在国内养殖业的危害性, 国内很多专家对 IHNV 的免疫学检测方法给予极高的关注, 也先后有研究者用原核系统表达了 IHNV 糖蛋白和核衣壳蛋白并做了初步研究(郭露玲等 2009; 赵永欣等 2011), 但是, 对使用重组蛋白建立免疫学检测方法鲜有报道。本研究选用专门用于在原核表达系统中表达膜蛋白的 pCWori 载体尝试表达 IHNV 囊膜糖蛋白, 这种载体质粒在大肠杆菌表达重组蛋白过程中, 具有更严谨的表达调控、更低的渗漏表达、提供更多的融合标签选择、为后续目的蛋白亲和纯化提供方便等优点, 结果成功表达出了具有良好免疫原性的重组蛋白。但是, 本研究中发现膜蛋白产物却是以包涵体形式存在, 分析可能是由于重组蛋白在表达过程中缺乏某些蛋白折叠的辅助因子或者是重组菌增殖太快导致目的蛋白无法正确形成次级键等原因造成的。本研究对得到的包涵体形式的糖蛋白做了复性研究, 通过采用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 多次洗涤, 除去可溶性蛋白及其他杂质, 8 mol/L 尿素溶解后, 使用 Ni-NTA 亲和层析柱在变性条件下进行纯化, 最终通过膜透析获得纯度较高的可溶性糖蛋白。通过 Western-blot 和间接 ELISA 试验对得到的目的蛋白进行抗原性验证, 发现目的蛋白能够被兔抗 IHNV 全病毒血清识别, 而且反应条带单一, 说明本研究对包涵体的复性是成功的, 得到的目的蛋白具有良好的抗原性。

总体来说, 目前我国对 IHNV 的研究相对落后, 研究方向主要集中在病毒的成分及理化性质方面(岳志芹等 2008), 所采用的检测方法只是单纯检测病毒核酸的 PCR 方法, 还没有成熟的检测病毒蛋白的免疫学方法, 其限制性因素是抗 IHNV 抗体的生产, 本研究通过原核表达的抗原生产免疫学检测方法所用的抗血清, 解决了检测 IHNV 的 ELISA 方法的原料问题。本研究意义在于利用重组 IHNV 糖蛋白制备出的抗血清, 除了在建立 IHNV 病原的免疫学检测方法中应用之外, 还将在研究 IHNV 的致病机理以及 IHNV 在鱼机体和细胞的定位等方面发挥重要作用。

### 参 考 文 献

- 岳志芹, 刘 荻, 梁成珠, 高宏伟, 徐 彪, 邓明俊, 江育林. 2008. 实时定量 RT-PCR 检测鱼类传染性造血器官坏死病毒方法的建立与应用. 水生生物学报, 32(1): 91~95
- 赵志壮, 牛鲁祺. 1994. 中国本溪虹鳟一株弹状病毒的分离及初步研究. 水生生物学报, 18(4): 348~353
- 赵永欣, 赵丽丽, 刘巍巍, 王建楠, 李一经, 乔新媛, 葛俊伟, 刘 敏. 2011. 传染性造血组织坏死病毒核衣壳蛋白的原核表达及抗原性分析. 淡水渔业, 41(5): 40~44
- 郭露玲, 刘海滨, 石 剑, 李 谷, 肖庚富. 2009. 传染性造血组织坏死病毒囊膜蛋白在原核细胞中的表达. 华中农业大学学报, 28(2): 210~213
- 韩俊英, 李 健, 李吉涛, 陈 萍, 李 华. 2011. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定. 渔业科学进展, 32(5): 45~50
- Ammayappan, A., Lapatra, S. E., and Vakharia, V. N. 2010. Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220-90. Virology Journal, 7: 10~20
- Gomez-Casado, E., Estepa, A., and Coll, J. M. 2011. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. Vaccine, 29(21): 2 657~2 671
- Hoffmann, B., Beer, M., Schütze, H., and Mettenleiter, T. 2005. Fish rhabdoviruses; Molecular epidemiology and evolution. Current Topics in Microbiology and Immunology, 292: 81~117
- Morzunov, S. P., Winton, J. R., and Nichol, S. T. 1995. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. Virus Research, 38(2-3): 175~192
- Sanot, T., Nishimura, T., and Okamoto, N. 1977. Studies on viral disease of Japanese fishes. VI. Infectious hematopoietic necrosis(IHN) of salmonids in the mainland of Japan. Journal of the Tokyo University of Fisheries, 63: 81~85
- St-Hilaire, S., Ribble, C. S., Stephen, C., Anderson, E., Kurath, G., and Kent, M. L. 2002. Epidemiological investigation of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water net-pen reared Atlantic salmon in British Columbia, Canada. Aquaculture, 212(1-4): 49~67
- Verjan, N., Ooi, E. L., Nochi, T., Kondo, H., Hirono, L., Aoki, T., Kiyono, H., and Yuki, Y. 2008. A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol, 25(1-2): 170~180
- Wolf, K. 1989. Fish Viruses and Fish Viral Disease. Cornell University Press, : 476~493