

网络出版时间:2014-11-04 10:51
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.12.004.html>

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.12.004

大鲵虹彩病毒的分离纯化及其 MCP 基因序列分析

张星朗^a,周小愿^a,张 辉^b

(中国水产科学院 a 黄河水产研究所,陕西 西安 710086,b 长江水产研究所,湖北 武汉 430223)

【摘 要】 【目的】确定陕西省略阳县某大鲵养殖场高致死性疾病的病原,分析其主要衣壳蛋白(MCP)的基因特征。**【方法】**采集患病大鲵,观察其临床症状,取其脏器组织,处理后分别分离细菌和接种鲤鱼上皮瘤(EPC)细胞,观察细胞病变,分离病毒;对病原进行增殖,采用蔗糖密度梯度(20%,30%,40%,50%,60%)离心法进行纯化,电镜观察纯化样品。克隆分离病毒的 MCP 基因,测定其序列并进行系统进化树分析。**【结果】**患病大鲵背部有溃疡、头部肿大且有出血点,尾部有轻微的溃烂。取病鲵内脏组织样品分离病原,未分离到细菌;处理的内脏组织感染 EPC 细胞,出现细胞病变。电镜观察证实,在蔗糖密度梯度为 50%~60%的样品中,病毒粒子的纯度最高,且结构较为完整;病毒粒子的直径约 150 nm,与虹彩病毒相似。MCP PCR 扩增得到了预期长度(1 392 bp)的特异性产物。NCBI BLAST 结果显示,扩增的 MCP 序列与蛙病毒属的感染性造血器官坏死病毒(EHNV)、食用蛙病毒(RSV)、普通产婆蟾病毒(CMTV)以及梭鲈虹彩病毒(PPIV)的 MCP 全长的同源性最高,达到 99%;与中华鳖虹彩病毒(STIV)、蛙病毒 3 型(FV3)、虎纹蛙虹彩病毒(RTV)等 MCP 全长的同源性为 98%。系统发育分析结果显示,导致该例大鲵发病的病毒为蛙病毒属的虹彩病毒。**【结论】**造成陕西省略阳县某大鲵养殖场大鲵大量死亡的病原为蛙病毒属的虹彩病毒,将该株病毒命名为大鲵虹彩病毒略阳分离株(CGSIV-LY1112)。

【关键词】 大鲵;虹彩病毒;纯化;MCP;系统进化树
【中图分类号】 S947.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2014)12-0023-06

Isolation, purification and major capsid protein gene sequence analysis of *Iridovirus* isolated from Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*

ZHANG Xing-lang^a, ZHOU Xiao-yuan^a, ZHANG Hui^b

(a Yellow River Fisheries Institute, CAFS, Xi'an, Shaanxi 710086, China,
b Yangtze River Fisheries Research Institute, CAFS, Wuhan, Hubei 430223, China)

Abstract: 【Objective】 The study aimed to determine the causative pathogen of diseased Chinese giant salamander *Andrias davidianus* with highly mortality and examine its major capsid protein (MCP) genetic characteristics. **【Method】** After observation of clinical symptoms of the diseased Chinese giant salamander, the tissues infected were disposed to isolate bacterium and inoculate with EPC cells, separately. Then the doubtful virus was cultured with EPC, and sampled to purify by sucrose density gradient centrifugation (20%, 30%, 40%, 50%, and 60%). Electron microscope was used to observe the purified viral particles. MCP clone plasmid of the purified virus was detected by PCR, and phylogenetic tree was constructed based

〔收稿日期〕 2013-08-19
〔基金项目〕 陕西省科学技术计划项目(2012K01-18)
〔作者简介〕 张星朗(1964—),男,陕西西安人,副研究员,主要从事水产养殖与水产动物疾病研究。
〔通信作者〕 周小愿(1972—),男,陕西礼泉人,副研究员,硕士,主要从事水产动物疾病研究。E-mail:zhouxy_2005@163.com

on nucleotide sequences of MCP. 【Result】 The gross lesions with ulcer in the back and swelling of head with petechial hemorrhages were observed. No pathogenic bacterium was isolated from organs including liver, spleen and kidney. After treatment, the visceral tissue suspension was infected with EPC, and cytopathic effect was observed. Electron microscopy showed that the most abundant and intact virus particles occurred in the 50%—60% sucrose density fraction, the average diameter was 150 nm, and the shape was highly similar to that of iridovirus. With the primers designed according to the sequences of major capsid protein (MCP) from the GenBank, specific products with predicted size of 1 392 bp were obtained from the cloned plasmid. Comparative analysis of nucleotide sequences was performed with the GenBank using BLAST database network service. The results indicated that the putative gene products from sick giant salamander shared high identities with homologous of 99% with epizootic hematopoietic necrosis virus (EHNV), *Rana esculenta virus* (RSV), common midwife toad virus (CMTV), pike-perch *Iridovirus* (PIIV), and with homologous of 98% with soft-shelled turtle *Iridovirus* (STIV) and FV3 and *Rana tigrina virus* (RTV). Phylogenetic tree indicated that the pathogen in present study was a species within the genus *Ranavirus*. 【Conclusion】 The pathogen was a virus belonging to the genus of *Ranavirus* and it was named tentatively Lueyang isolates of Chinese giant salamander *Iridovirus* (CGSIV-LY201112).

Key words: *Andrias davidianus*; *Iridovirus*; purification; MCP; phylogenetic tree

中国大鲵(*Andrias davidianus*)是我国特有的珍贵物种,属于国家二类野生保护动物,已被列入CITES公约附录I中。近年来,大鲵的人工繁育与养殖在陕西、浙江、湖南、湖北、贵州等省份发展迅速,逐渐成为具有重要经济价值的产业。然而随着养殖规模的不断扩大,大鲵病害问题日益突出,尤其是近年来在多地发生的大鲵病毒性疾病,给大鲵养殖业造成了很大的经济损失^[1-2]。2011-12,陕西省略阳县某大鲵养殖场大鲵发生大量死亡,死亡率达到90%以上。本研究从该养殖场采集一例患病大鲵,剖检后从其内脏组织分离到病原,通过感染鲤鱼上皮瘤(Epithelioma papiloma eyprin, EPC)细胞,待疑似病毒病原大量增殖后,进行蔗糖密度梯度离心纯化,电镜观察证实得到大量高纯度的病毒粒子,并抽提病毒核酸,在此基础上进行了该病毒主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因的分子生物学鉴定,进一步明确了其分类地位,为后续该病毒性疾病基因工程疫苗的研制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

患病大鲵于2011-12在陕西省略阳县某大鲵养殖场采集,病鲵体表背部、尾部有溃疡,头部肿大且有点状出血,将其运回实验室进行病原的分离与鉴定。

脑心浸液培养基(BHI)、RS培养基和质量分数5%绵羊血琼脂,购自北京陆桥生物制品有限公司;

EPC细胞,由中国水产科学院长江水产研究所鱼类病害研究室惠赠;MEM培养基,HyClone公司;胰蛋白酶,AmRESCO,0458;高保真Ex Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNA Marker、感受态细胞DH5 α ,购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒、DNA提取试剂盒,购自OMEGA公司;pMD18-T simple载体,购自Promega公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 病原的分离与鉴定

将病鲵解剖后,无菌操作从肝脏、脾脏、肾脏取样,分成2份,其中一份按文献[3]介绍的方法进行细菌分离:在BHI平板、血平板和RS培养基平板上划线分离,28℃培养24~48 h,若有菌落形成进行纯化和鉴定。

另一份组织样品按质量分数加入10%除菌PBS(pH 7.2),同时加入适量1 000 U/mL青霉素和1 000 μ g/mL链霉素溶液,冰浴条件下研磨匀浆,然后将匀浆液于-80℃/室温冻融2~3次后,5 000 r/min离心30 min,取上清液,经0.22 μ m滤膜无菌过滤后,取0.1 mL滤液接种EPC细胞,25℃培养,盲传3代,期间逐日观察细胞病变(CPE)情况。确信EPC细胞单层70%~80%的细胞出现CPE时收获细胞培养物,-80℃/室温冻融2次,然后于4℃条件下4 000 r/min离心20 min,收集上清液,备用。

1.3 病毒粒子的纯化

将收集的上清液于-80℃/室温冻融2次后,

8 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀,上清液经 25 000 r/min 离心 2 h,取沉淀重悬于少量 PBS (pH 7. 2) 中。采用蔗糖密度梯度离心法对病毒进行纯化,蔗糖密度梯度为 20%,30%,40%,50%和 60%,离心条件为 25 000 r/min 2 h。用 PBS 重悬蔗糖密度梯度离心所获得的各折光带样品,进行电镜观察。

1.4 病毒粒子的电镜观察

将提取的病毒悬液用无菌的 PBS 10 倍稀释,用悬滴法进行负染后,在透射电子显微镜(日立 H-7560)下观察。

1.5 病毒 MCP 基因的扩增与序列测定

按照 DNA 提取试剂盒的说明书提取纯化病毒的核酸。

根据 GenBank 已发表的蛙病毒属的代表种 FV3 MCP 基因高度保守区序列(GenBank 登录号:AY548484)设计引物,用于 MCP 全长扩增,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列如下:CGS-C-F: 5'-ATGTCTTCTGTAAGTGGTTC-3'; CGS-C-R:5'-TTACAAGATTGGGAATCCCA-3'。

以提取的病毒 DNA 为模板,PCR 扩增 MCP 基因,反应体系总体积为 25 μ L: 5 U/ μ L TaKaRa Ex Taq 0. 25 μ L,10 $\times$ Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Plus) 2. 5 μ L,0. 25 nmol/L dNTPs 1. 0 μ L,50 pmol/L 引物 CGS-C-F 和 CGS-C-R 各 0. 5 μ L,DNA 模板 3 μ L,ddH₂O 补足 25 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1. 5 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min。取 PCR 产物,进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

用胶回收试剂盒回收 PCR 反应获得的目的基因,与 pMD 18-T simple 载体连接,连接反应体系为:纯化 PCR 反应产物 4 μ L,pMD 18-T simple 载体 1 μ L,连接缓冲溶液 5 μ L;反应条件:16 $^{\circ}$ C 连接 2

h。取连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,涂布含 100 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h 后,挑取 5~6 个白色菌落抽提质粒,进行 PCR 鉴定。挑选阳性克隆,委托武汉擎科创新生物科技有限公司测序。

1.6 序列分析

将测序得到的病毒 MCP 核苷酸序列进行 BLAST 检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),并用 MEGA 5. 10 软件构建系统进化树。比对采用的毒株及其序列登录号为:传染性脾肾坏死病毒(Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), AF370008)、条石鲷虹彩病毒(Rock seabream iridovirus (RBIV), HQ105005)、蛙病毒 3 型(Frog virus 3 (FV3), FJ459783)、虎纹蛙病毒(*Rana tigrina* virus (RTV), AY033630)、中华鳖病毒(Soft-shelled turtle iridovirus (STIV), DQ335253)、淋巴囊肿病病毒 1 型(Lymphocystis disease virus 1(LCDV-1), EF103188)、无脊椎虹彩病毒 3 型(Invertebrate iridescent virus 3(IIV3), NC_008187)、无脊椎虹彩病毒 6 型(Invertebrate iridescent virus 6 (IIV6), AF303741)。

2 结果与分析

2.1 患病大鲵的外部病症及细菌的分离

患病大鲵体表可见头部肿大且有点状出血,背部有明显溃疡,尾部有局部轻微溃烂及出血点。

从病鲵的肝脏、脾脏和肾脏均未分离到细菌

2.2 患病大鲵分离病毒对 EPC 细胞的感染

病毒液感染 EPC 细胞 24 h 后就出现 CPE,可见排列紧密的细胞出现空洞,空洞周围的细胞收缩变圆、坏死,空洞逐渐变大、变多,形成破鱼网状,最后细胞全部缩成球状,脱离瓶壁(图 1)。

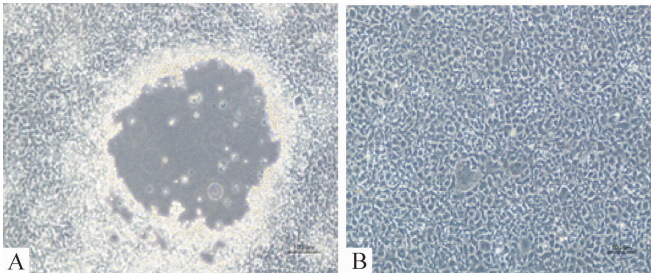


图 1 患病大鲵分离病毒液感染 EPC 细胞形成的病变(100 $\times$)
A. 病毒液感染 EPC 细胞 48 h 后出现的 CPE;B. 正常 EPC 细胞
Fig. 1 CPE of virus liquid on EPC cells under a microscope (100 $\times$)
A. EPC cells inoculated by virus liquid;B. Normal EPC cells

2.3 患病大鲵分离病毒的纯化及电镜观察

从病毒样品的蔗糖密度梯度离心结果可看到 4 条清晰的折光带,从上到下依次命名为:D1(在 20%~30%蔗糖密度梯度之间)、D2(在 30%~40%蔗糖密度梯度之间)、D3(在 40%~50%蔗糖密度梯度之间)、D4(在 50%~60%蔗糖密度梯度之间),同时将底层沉淀物命名为 D5。

从病毒悬液负染后的电镜结果可以看出,D1、D2 带区只有细胞碎片、膜物质、无定形结构,没有观察到病毒粒子;D3 带区能观察到个别病毒粒子,但

杂质占多数;D4 带区可清楚地观察到病毒粒子,呈现分开的状态,杂质含量很少(图 2),表明靠近蔗糖密度梯度 50%的折光带为病毒主要区带;D5 带区细胞碎片最多,可观察到少量病毒粒子,且病毒粒子同其他膜物质、无定形结构粘连。

负染观察到的病毒粒子主要呈球状,还有一些病毒粒子呈近似完整的六面体状,外周的衣壳由中央的致密核心体和其间的非电子致密层构成,核衣壳的直径约 150 nm,电镜下可观察到单个病毒粒子的衣壳由外层和内层构成(图 3)。

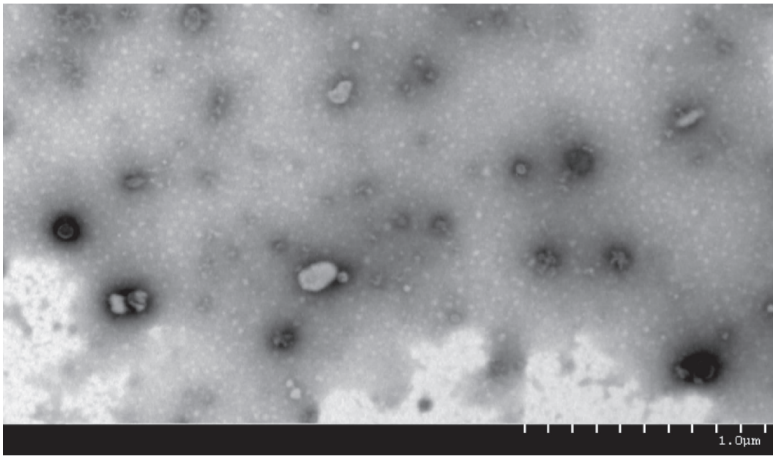


图 2 50%~60%蔗糖密度梯度离心纯化的患病大鲵病毒粒子电镜负染结果(×4 000)
Fig. 2 Transmission electron micrograph of negatively stained and purified viral particles obtained by gradient centrifugation with 50%–60% sucrose density (×4 000)

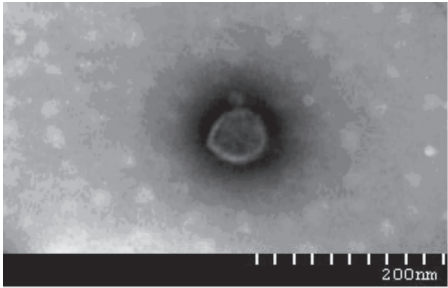


图 3 患病大鲵分离单个病毒粒子的电镜负染结果(×12 000)
Fig. 3 Negatively stained viral particle isolated from sick Chinese giant salamander (×12 000)

2.4 患病大鲵分离病毒 MCP 基因的序列分析

提取的病毒核酸采用引物 CGS-C-F 和 CGS-C-R 进行 PCR 扩增,扩增产物经胶回收、连接转化 DH5α 感受态细胞,挑取连接产物 5 个菌落,增菌后提取质粒,进行 PCR 鉴定,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,菌落 2、3、4 和 5 的 PCR 扩增产物在预期的 1 392 bp 处有明显条带。

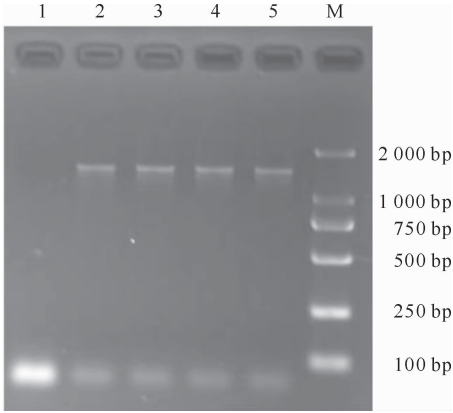


图 4 患病大鲵分离病毒 MCP 克隆质粒的 PCR 鉴定结果
M. DNA Marker DL2000;1~5. 克隆质粒样品

Fig. 4 PCR identification of the MCP cloned plasmid of virus

M. DNA Marker DL2000;1–5. The cloned plasmid

挑取菌落 2 和 3 进行测序,将测序结果输入 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析,结果显示,扩增序列与食用蛙病毒(*Rana esculenta virus*, RSV)、普通产婆蟾病毒(Common midwife toad virus,

CMTV)、流行性造血器官坏死病病毒 (Epizootic haematopoietic necrosis, EHNV) 以及梭鲈虹彩病毒 (Pike-perch *Iridovirus*, PPIV) 等的 MCP 基因全长的同源性最高,均达到 99%;与中华鳖虹彩病毒 (STIV)、蛙虹彩病毒 3 型 (FV3)、虎纹蛙虹彩病毒 (RTV) 等 MCP 基因全长的同源性为 98%,而与传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV) MCP 基因全长的同源性仅为 79%。从 GenBank 上查找虹彩病毒 MCP 基因相关序列,包括肿大细胞虹彩病毒属 (*Megalo-*

cytivirus)、蛙病毒属 (*Ranavirus*)、淋巴囊肿病毒属 (*Lymphocystivirus*)、绿虹彩病毒属 (*Chloriridovirus*) 和虹彩病毒属 (*Iridovirus*) 的代表株,并以核苷酸序列构建系统进化树。结果 (图 5) 显示,本试验分离到的病毒与蛙病毒属虹彩病毒聚为一簇,应为蛙病毒属虹彩病毒,将其命名为大鲵虹彩病毒略阳分离株 (Chinese giant salamander iridovirus, CGSIV-LY201112),其 MCP 序列在 GenBank 上的登录号为 KF023635。

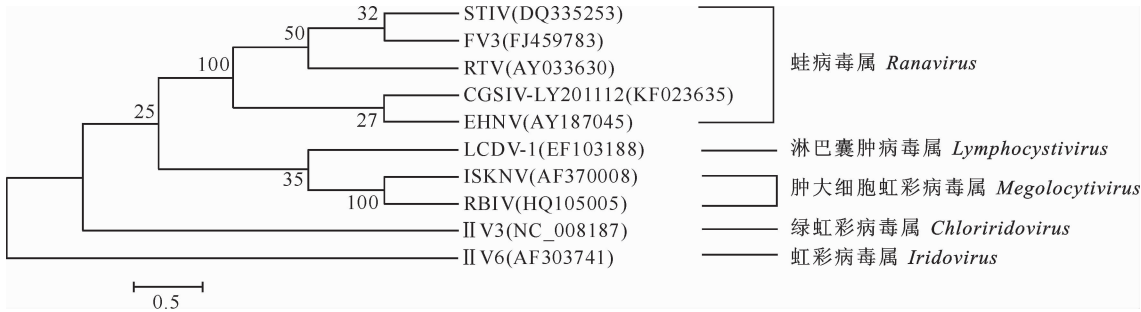


图 5 基于 MCP 基因序列构建的患病大鲵分离病毒与其他虹彩病毒的系统发育树
括号中的数据为毒株 MCP 序列在 GenBank 中的登录号

Fig. 5 Phylogenetic tree of virus isolated from sick Chinese giant salamander based on the nucleotide sequences of MCP with counterpart segments from other iridovirus
GenBank accession numbers of MCP of the viruses are given in the parentheses

3 讨 论

近年来,在许多野生和养殖的鱼类、两栖爬行类动物中,陆续发生由虹彩病毒引起的疾病^[4-5]。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 第 9 次报告^[6],虹彩病毒科被分为 5 个属:虹彩病毒属、绿虹彩病毒属、蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属和肿大细胞虹彩病毒属。其中蛙病毒属、淋巴囊肿病毒属和肿大细胞虹彩病毒属成员能够感染变温脊椎动物^[7]。目前已经确认,蛙属病毒可致蛙类、龟鳖等两栖爬行类以及众多的海、淡水鱼类染病,并引发大量死亡,因而愈来愈受到关注^[8-10]。最近几年,有关大鲵感染蛙属病毒致病的报道有逐渐增多的趋势^[1-2,11]。从现有的报道看,大鲵感染蛙属病毒的临床症状一般常会出现皮肤溃疡、头部肿大、远端肢体坏死以及下颌、腹部充血、出血等症状^[2,12-13],这与本例患病大鲵所表现的症状极为相似。这些症状也与该病毒感染其他两栖类动物所出现的症状非常相似。当然,仅从以上外部临床症状无法确诊该病为病毒性疾病,需要在病毒分离纯化后做进一步的电镜观察和分子生物学检验才能确诊。

病毒的纯化是病毒分类及其分子生物学和免疫

学等研究的基础。目前,常用的病毒纯化方法有沉淀法、离心法、透析法等。密度梯度离心法是一种有效的病毒纯化方法,不仅可以获得高纯度的病毒粒子,而且所获病毒的结构较为完整。根据本研究结果,采用蔗糖密度梯度离心法纯化大鲵虹彩病毒时,病毒带主要集中在 50%~60% 蔗糖密度梯度之间。在以后的研究中可以采用这个蔗糖密度梯度区间大量纯化大鲵虹彩病毒。

分子生物学检验方法是另一种揭示病毒性病原属性常用的可靠方法。为此,笔者选择保守基因进行序列扩增和分析。虹彩病毒 MCP 是其病毒粒子中表达丰度最高的蛋白,占整个病毒粒子多肽的 40%~45%^[14],并且在虹彩病毒科中高度保守,因此可以利用 MCP 基因的同源性差异进行虹彩病毒分子进化方面的研究^[15]。从 MCP 基因的扩增结果来看,分离纯化后的病毒样品以及病毒 MCP 基因序列 T 克隆质粒都可以特异性扩增出预期大小的片段。MCP 全长序列的 BLAST 搜索结果显示,该病原应为虹彩病毒,与蛙病毒属的 EHNV、FV3、RTV 以及 STV 等具有较高的同源性。从基于 MCP 核苷酸序列构建的系统发育树可以明确看出,分离病毒株与蛙病毒属成员聚为一类,应为蛙病毒

属成员。

大鲵虹彩病毒是近年来新发现的一种传染性强、致死率较高的新病毒。本试验结果不仅确定了分离病毒的分类地位,也为今后更好地了解该病毒的免疫原性、侵染和复制机理及其基因工程疫苗的研制奠定了基础。

志 谢:农业部长江流域水生动物疫病重点实验室的周勇、徐进、江南以及范玉顶等同志在病毒样品电镜观察及分子进化树分析方面给予本研究许多帮助,谨致谢意。

[参考文献]

- [1] 耿 毅,汪开毓,李成伟,等. 蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测 [J]. 中国兽医学,2010,40(8):817-821.
Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. PCR detection and electron microscopic observation of bred Chinese giant salamander infected with *Ranavirus* associated with mass mortality [J]. Veterinary Science in China, 2010, 40(8): 817-821. (in Chinese)
- [2] 江育林,张 旻,景宏丽,等. 患病中国大鲵分离到一株虹彩病毒及其特性研究 [J]. 病毒学报,2011,27(3):274-282.
Jiang Y L, Zhang M, Jing H L, et al. Isolation and characterization of an *Iridovirus* from sick giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(3): 274-282. (in Chinese)
- [3] Holt J G, Krige N R, Senath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th edition. London: Williams & Wilkin Press, 1994: 527-558.
- [4] Chinchar V G. *Ranaviruses* (family iridoviridae): emerging cold-blooded killers [J]. Arch Virol, 2002, 147: 447-470.
- [5] Ariel E. Viruses in reptiles [J]. Vet Res, 2011, 42: 100.
- [6] Jancovich J K, Chinchar V G, Hyatt A, et al. Family *Iridoviridae* virus taxonomy [C]//King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, et al. 9th report of the ICTV. San Diego: Elsevier, 2011: 193-210.
- [7] 萧 枫,张奇亚. 水生动物虹彩病毒的分子生物学 [J]. 水生生物学报, 2004, 28(2): 202-206.
Xiao F, Zhang Q Y. Molecular biology of *Iridoviruses* from aquatic animals [J]. Acta Hydrobiological Sinica, 2004, 28(2): 202-206. (in Chinese)

- [8] Reddacliff L A, Whittington R J. Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L) [J]. Journal of Comparative Pathology, 1996, 115(2): 103-115.
- [9] Chen Z X, Zheng J C, Jiang Y L. A new *Iridovirus* isolated from soft-shelled turtle [J]. Virus Research, 1999, 63(1/2): 147-151.
- [10] 苗素英,何建国,张利红,等. 虎纹蛙病毒主要衣壳蛋白克隆及其基因序列分析 [J]. 水产学报, 2001, 25(6): 559-563.
Miao S Y, He J G, Zhang L H, et al. Cloning, sequence analysis of the major capsid protein gene of newly isolated *Iridovirus* from *Rana tigrina* [J]. Journal of Fisheries of China, 2001, 25(6): 559-563. (in Chinese)
- [11] 周 勇,曾令兵,孟彦,等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan real-time PCR 检测方法的建立 [J]. 水产学报, 2012, 36(5): 732-778.
Zhou Y, Zeng L B, Meng Y, et al. Establishment of a Taq Man real-time PCR assay for detecting the giant salamander *Iridovirus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(5): 732-778. (in Chinese)
- [12] 耿 毅,汪开毓,李成伟,等. 养殖大鲵蛙病毒自然感染的病理形态学观察 [J]. 中国兽医报, 2011, 31(11): 1640-1644.
Geng Y, Wang K Y, Li C W, et al. Pathological changes of cultured Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) naturally infected with *Ranavirus* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(11): 1640-1644. (in Chinese)
- [13] 高正勇,曾令兵,肖汉兵,等. 大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究 [J]. 淡水渔业, 2012, 42(5): 17-21.
Gao Z Y, Zeng L B, Xiao H B, et al. Studies on the physical, chemical and biological characteristics of giant salamander *Iridovirus* [J]. Freshwater Fisheries, 2012, 42(5): 17-21. (in Chinese)
- [14] Nandhagopal N, Simpson A A, Gurnon J R, et al. The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(23): 14758-14763.
- [15] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of *Iridoviruses* a suitable target for the study of viral evolution? [J]. Virus Genes, 1998, 16(1): 59-66.

(上接第 17 页)

- [17] 陈小武,祝善乐,殷树仪,等. 雌性大鼠心内神经节中雌激素受体及其 mRNA 的表达 [J]. 解剖学报, 2003, 34(4): 372-374.
Chen X W, Zhu S L, Yan S Y, et al. Expression of estrogen receptor protein and mRNA in intracardiac ganglia in female rats [J]. Acta Anatomica Sinica, 2003, 34(4): 372-374. (in Chinese)
- [18] Patrone C, Andersson S, Korhonen L, et al. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(19): 10905-10910.
- [19] Gurjinder K, James J, Lori G I, et al. Estrogen regulation of

neurotrophin expression in sympathetic neurons and vascular targets [J]. Brain Research, 2007, 1139(30): 6-14.

- [20] 刘晓柳,李光千. 雌激素对大鼠心内神经节 IL-6 和 NGF 表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2009, 25(8): 718-720.
Liu X L, Li G Q. The influence of estrogen on expression of interleukin-6 and nerve growth factor in cardiac ganglia in female rats [J]. Chinese Journal of Immunology, 2009, 25(8): 718-720. (in Chinese)
- [21] Benten W P, Stephan C, Lieberherr M, et al. Estradiol signaling via sequestrable surface receptors [J]. Endocrinology, 2001, 142(4): 1669-1677.