

网络出版时间:2018-01-26 10:32

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.05.006

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180126.0953.012.html>

传染性造血器官坏死症重组腺病毒载体的构建

李守湖^{1,2}, 范玉锋³, 高欣^{1,2}, 李宝玉², 吴鹏程³, 胡永浩¹, 柳纪省²

(1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2 兰州威特森生物科技有限公司, 甘肃 兰州 730050;

3 兰州市渔业技术推广中心, 甘肃 兰州 730020)

[摘要] **【目的】**克隆传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)G 基因, 构建其重组腺病毒载体, 为 IHN 预防及疫苗的研制提供参考。**【方法】**通过 RT-PCR 和 PCR 技术扩增 IHNV G 基因, 将 G 基因插入到腺病毒穿梭载体中, 再用带有目的基因的腺病毒载体与骨架载体在大肠杆菌 BJ5183 中同源重组, 构建重组腺病毒质粒, 通过 PCR 扩增及 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 经 *Pac* I 酶切后转染 HEK-293 细胞进行包装, 获得带有目的基因的重组腺病毒, 通过观察绿色荧光蛋白表达情况来监控重组腺病毒, 用 Western-blot 法检测糖蛋白的表达, 并测定重组腺病毒的 TCID₅₀。**【结果】**成功克隆出 IHNV G 基因, 其长度为 1 533 bp。成功构建了 IHNV G 蛋白重组腺病毒载体。GFP 监测显示, 重组腺病毒转染成功。重组腺病毒能在 HEK-293 细胞中表达出分子质量约 58 ku 的产物, 与预期相符, 其 TCID₅₀ 达到 $1.0 \times 10^{10.4}$ mL⁻¹。**【结论】**成功构建了带有 IHNV G 基因的重组腺病毒载体, 重组腺病毒能高效表达, 滴度较高。

[关键词] 传染性造血器官坏死症; G 基因; 腺病毒载体

[中图分类号] S852.65⁺9.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2018)05-0037-06

Construction of recombinant adenovirus vector of infectious hematopoietic necrosis

LI Shouhu^{1,2}, FAN Yufeng³, GAO Xin^{1,2}, LI Baoyu²,

WU Pengcheng³, HU Yonghao¹, LIU Jixing²

(1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2 Lanzhou Watson Biological Technology Co., Ltd, Lanzhou, Gansu 730050, China;

3 Lanzhou Center of Fisheries Technology Promotion, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: **【Objective】**This study cloned G gene of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and constructed its recombinant adenovirus vector to provide reference for IHN prevention and vaccine development. **【Method】**The G gene of IHNV was amplified and inserted into the adenovirus shuttle vector by RT-PCR and PCR. The adenovirus vector with the target gene was recombined with the backbone vector in *Escherichia coli* BJ5183 to construct the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transfected into HEK-293 cells after digestion with *Pac* I. The recombinant adenovirus was identified by PCR amplification and digestion with *Sal* I and *Xho* I. The recombinant adenovirus was monitored by the expression of green fluorescence protein and its glycoprotein expression was detected by Western-blot. Its TCID₅₀ was also determined. **【Result】**The G gene of IHNV was cloned successfully with the length of 1 533 bp. The recombinant adenovirus vector with IHNV G protein was also successfully constructed. GFP monitoring

[收稿日期] 2017-02-10

[基金项目] 甘肃省兰州市科技发展规划项目(2014-RC-69)

[作者简介] 李守湖(1990—), 男, 甘肃白银人, 在读硕士, 主要从事动物传染病学与分子生物学研究。

E-mail: 15117236506@163.com

[通信作者] 胡永浩(1962—), 男, 甘肃古浪人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病学与分子生物学研究。

E-mail: yhh0817@126.com

showed that the recombinant adenovirus was transfected successfully. The recombinant adenovirus could express with molecular weight of 58 ku in HEK-293 cells, which was consistent with anticipation. Its $TCID_{50}$ reached $1.0 \times 10^{10.4} \text{ mL}^{-1}$. 【Conclusion】 The recombinant adenovirus vector with IHNV G gene was constructed successfully and it expressed efficiently with high titers.

Key words: infectious hematopoietic necrosis; G gene; adenovirus vector

传染性造血器官坏死症(infectious hematopoietic necrosis, IHN)是一种以引起鲑鳟鱼类肾脏和脾脏造血组织坏死为主要特征的高度接触性传染病^[1-4]。IHN 主要危害鱼苗和种鱼,发病鱼死亡率通常在 90%以上,是鱼类口岸第一类检疫对象,被我国列为二类动物疫病^[5]。IHN 给北美、欧洲和亚洲等各国鲑鳟鱼养殖业造成了毁灭性的打击,严重阻碍了各国水产养殖业的发展^[6-10]。我国于 1990 年在辽宁暴发 IHN,死亡率近 100%^[5]。近年来,我国养鳟业发展迅速,因此深入研究 IHN 病原对于更好地防控此病具有重要的现实意义。其病原为传染性造血器官坏死症病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV),是一种负链 RNA 病毒,隶属弹状病毒科诺拉弹状病毒属。IHNV 长度约为 11 kb,共编码 5 种结构蛋白和 1 种非结构蛋白,分别是核衣壳蛋白、磷酸化蛋白、基质蛋白、表面糖蛋白、聚合酶蛋白和非结构蛋白,其中表面糖蛋白(G)可诱导中和抗体的产生,通常用于 IHNV DNA 疫苗的研究^[11-14]。

重组腺病毒载体作为一种宿主广泛、易于培养、转导效率高以及繁殖滴度高的理想基因转移系统,常被用于基因工程疫苗的接种、基因的转移等。在动物机体内外,可以通过构建重组腺病毒将特异性的外源靶基因转移到哺乳动物细胞系^[15-16],进而获得高效目标蛋白^[17],刺激机体产生强烈的体液和细胞免疫反应,是转导目的基因的理想工具之一^[18]。本试验克隆了 IHNV G 基因,以腺病毒作为目的基因转移载体,构建表达 IHNV G 蛋白的重组腺病毒载体,旨在为 IHN 的预防及疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞系 IHN 阳性病料(肾脏、脾脏),采集自甘肃省永登县某虹鳟鱼养殖场;HEK-293 细胞系,由中国农业科学院兰州兽医研究所草食动物病毒病团队提供。

1.1.2 质粒与感受态细胞 Pad-Track-CMV 穿梭

载体、pAd-easy-1 骨架载体、DH5 α 感受态细胞、DH10B 感受态细胞和 BJ5183 感受态细胞,均购自武汉金开瑞生物科技有限公司。

1.1.3 试剂 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、Quick-Fusion 快速克隆试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 聚合酶和限制性内切酶,均购自美国纽英伦生物技术(NEB);RNA 反转录试剂盒,购自德国罗氏公司(Roche);脂质体 2000,购自美国英杰生命技术有限公司(Invitrogen)。其他化学试剂均购自美国 SIGMA 生物科技有限公司。

1.2 IHNV G 基因的扩增与 RT-PCR

根据 GenBank 上发表的 IHNV G 基因序列(GenBank 登录号:U50401.1),应用 DNA Star 设计 G 基因特异性引物,上游引物增加了同源序列和 *Sal* I 酶切位点:5'-ATCTCTAGACCATGGGTCGACGCCACCATGTACACCATG-3',下游引物增加了同源序列和 *Xho* I 酶切位点:5'-TAGATCTTCGAATCCCTCGAGTTAGGACCGGTTT-GCCAG-3',序列中下划线部分为相应的酶切位点。引物由苏州金唯智生物科技有限公司完成,预期扩增序列长度为 1 533 bp。

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 IHN 病料总 RNA,以提取的 RNA 为模板,采用 RNA 反转录试剂盒进行反转录反应,合成 cDNA,反转录反应体系 20 μL :1 μg 总 RNA,2.5 $\mu\text{mol/L}$ anchored-oligo(dT)₁₈ 引物,10 U 反转录酶,1 $\times$ 反转录酶 buffer,20 U 蛋白酶抑制剂,1 mmol/L 脱氧核苷酸混合物,加 ddH₂O 至总体积为 20 μL ;反应条件:65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

以反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:cDNA 模板 2 μL ,GXL DNA 聚合酶(1.25 U/ μL)1 μL ,5 $\times$ GXL DNA buffer 10 μL ,dNTP Mixture(200 $\mu\text{mol/L}$)4 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.5 μL ,加 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 31 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,同时设置空体系对照。PCR 产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 G 基因的快速克隆和腺病毒载体的构建

将 PCR 产物电泳鉴定后切下目的片段,按照 DNA 胶回收试剂盒说明书回收和纯化目的片段,用 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切腺病毒载体 Pad-Track-CMV 使之线性化。按照快速克隆试剂盒说明书,G 基因的快速克隆体系为:PCR 产物 40 ng,Pad-Track-CMV 载体 20 ng,1.0 μ L 快速克隆酶,10 $\times$ 快速克隆酶 2.0 μ L,加 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 30 min。反应结束后立即将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。挑取白色菌落培养后进行 PCR 鉴定,同时设空载体对照。对阳性培养物提取质粒,用 *Sal* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,鉴定为阳性的质粒立即送往苏州金唯智生物科技有限公司测序。将测序结果在 NCBI 上进行同源性比对。

1.4 Pad-Track-CMV 载体与 pAd-easy-1 骨架载体的同源重组

将 pAd-easy-1 骨架载体转化到 BJ5183 感受态细胞中,之后将带有 pAd-easy-1 骨架载体的 BJ5183 大肠杆菌细胞做成电转化感受态细胞,置于一80 $^{\circ}$ C 保存备用。

将 1.3 中鉴定合适的带有目的基因的腺病毒载体 Pad-Track-CMV 用 *Pme* I 酶切线性化后,按照胶回收试剂盒说明书回收产物,再将 10 μ L 线性化的重组腺病毒载体(1 μ g)与 40 μ L 含有 pAd-easy-1 骨架载体的 BJ5183 电转化感受态细胞置于直径为 2.0 mm 的电转杯中进行电击。电击条件为:电压 2 500 V,电阻 200 Ω ,电容 25 μ F,电击时间 5 ms。将电击后的腺病毒重组质粒按照 100,200,300,400 μ L 分别涂布于含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 16~20 h。挑取培养平板上培养的较小菌落,提取质粒并进行 PCR 扩增,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定,对疑似阳性的质粒再用 *Pac* I 酶切鉴定,酶切体系为:1 μ L 限制性内切酶 *Pac* I、5 μ L 10 $\times$ buffer、1 μ g 重组质粒,加 ddH₂O 至 50 μ L;37 $^{\circ}$ C 作用 4 h 并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

通过与上述中相同的电击条件,将阳性重组腺病毒质粒转化到感受态细胞 DH10B 中,以获得高表达的重组质粒,并用限制性内切酶 *Pac* I 酶切鉴定。然后从大肠杆菌 DH10B 中大量提取重组腺病毒质粒,用 *Pac* I 消化以切除 ori 和卡那霉素抗性原件。

1.5 重组质粒转染 HEK-293 细胞

转染前 24 h 将 HEK-293 细胞以 1.0×10^6 mL⁻¹ 的密度分散于 25 cm² 细胞培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。将 4 μ g 线性化重组质粒 DNA 加入 460 μ L F12-DMEM 中制成悬浮液 A,将 20 μ L 脂质体 2000 加入到 480 μ L F12-DMEM 中混匀制成悬浮液 B,再将悬浮液 A 与悬浮液 B 混匀加入到培养好(汇合度达 50%~70%)的 HEK-293 细胞中,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 h,补加细胞培养液后置于培养箱中继续培养。转染 8 d 后,通过监测绿色荧光蛋白(GFP)来确定转染的结果,待细胞出现绿色荧光时,弃去上层 5 mL 细胞培养液并收集下层培养液 5 mL,收集的病毒液反复冻融 2 次后,在 HEK-293 细胞中复制,复制 5 代后对重组病毒中的糖蛋白进行 Western-blot 检测。

1.6 重组腺病毒糖蛋白表达的 Western-blot 检测

收集上述重组病毒液样品,同时取空白 HEK-293 细胞,加入 RIPA 蛋白裂解液于冰上裂解 5 min,收集到 EP 管后进行超声破碎(40 W 3 s,间隔 3 s,重复 20 次),然后于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,加入蛋白上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 作用 10 min,制备样品。将蛋白样品加入 SDS-PAGE 孔中进行电泳,电泳条件:先在 60 V 电压下反应 60 min,再将电压调到 120 V 直至结束。参考蛋白分子质量标准将电泳结束后的凝胶切下,以 β -actin 为内参,用 PVDF 膜进行 200 mA 120 min 的转膜操作。转膜结束后用 50 g/L 的牛血清白蛋白封闭 1 h,用 PBST 洗 3 次,每次 10 min;于封闭好的膜上加入 1:2 000 倍稀释好的兔抗 IgG 孵育 1 h,用 PBST 洗 3 次,每次 10 min;小心取出膜置于稀释好的羊抗兔二抗中孵育 2 h,用 PBST 洗 3 次,每次 10 min,之后加入配好的显色液进行化学发光反应。

1.7 重组腺病毒半数组织细胞感染量(TCID₅₀)的测定

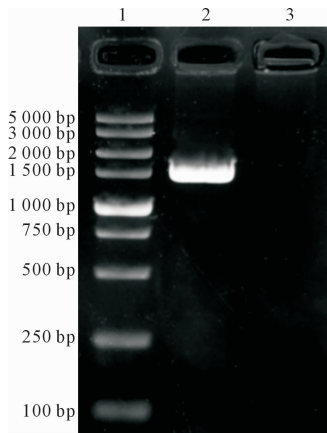
将复制 10 代后收集的病毒按照 $10^{-1} \sim 10^{-12}$ 连续稀释成 12 个梯度,然后将稀释的病毒接种在培养好 HEK-293 细胞的 96 孔板中,每个稀释度重复 8 孔,每孔接种 100 μ L。每天观察细胞病变情况并记录结果,按照 Reed-Muench 法^[19] 计算病毒 TCID₅₀。

2 结果与分析

2.1 IHNV G 基因的 PCR 扩增

将 IHNV G 基因的 PCR 产物加入 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,获得了长 1 533 bp 的片段(图

1),与预期片段长度相符。



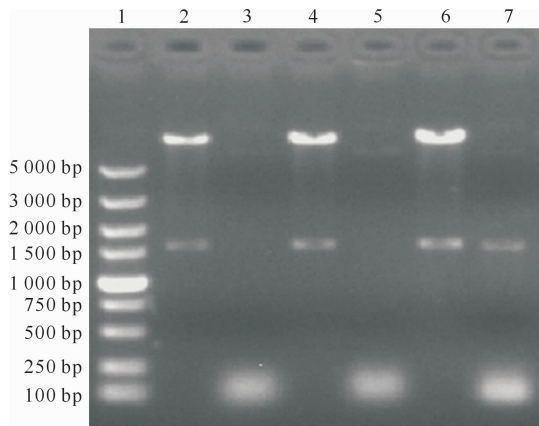
1. 5 000 bp DNA Marker;2. G 基因;3. 空白对照
1. 5 000 bp DNA Marker;2. G gene;3. Blank control

图 1 IHN V G 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification product of IHN V with G gene

2.2 IHN V G 基因重组载体 Pad-Track-CMV 的鉴定

IHN V G 基因的重组腺病毒载体经 PCR 鉴定获得了 1 533 bp 的片段,经 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定获得了 1 533 bp 和 9 200 bp 的片段(图 2),均与预期结果一致。测序分析结果显示,本试验中 G 基因的开放阅读框(ORF)与 IHN V ChYU78、ChAb76、KoMo71、RtNaq82 和 HV7601 株的同源性为 99%。结果表明,重组腺病毒载体 Pad-Track-CMV 构建成功。



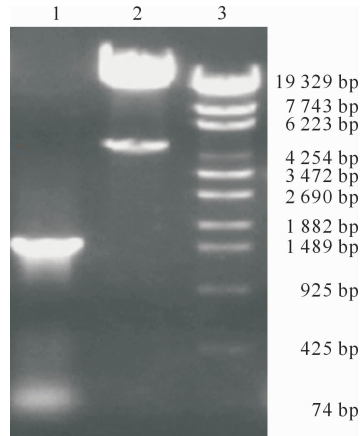
1. 5 000 bp DNA Marker;2,4,6. *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切产物;
3,5. 空载体 PCR 扩增产物;7. 重组腺病毒载体 PCR 扩增产物
1. 5 000 bp DNA Marker;2,4,6. Products of recombinant plasmids
by *Sal* I and *Xho* I ;3,5. PCR amplification product of
empty vector;7. PCR amplification products of recombinant plasmid

图 2 IHN V G 基因重组载体 Pad-Track-CMV 的
PCR 和 *Sal* I /*Xho* I 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant Pad-Track-CMV vector
by PCR and double digestion plasmids with *Sal* I /*Xho* I

2.3 IHN V G 基因重组腺病毒质粒的鉴定

重组腺病毒质粒的 PCR 扩增和 *Pac* I 限制性内切酶的消化结果(图 3)表明,PCR 扩增获得了 1 533 bp 的片段,符合预期;*Pac* I 内切酶消化获得了长约 33 和 4.5 kb 的 2 条清晰条带,与试验预期结果相符。由此得知重组腺病毒质粒构建成功。



1. G 基因 PCR 扩增;2. 内切酶 *Pac* I 消化结果;
3. 5 000 bp DNA Marker

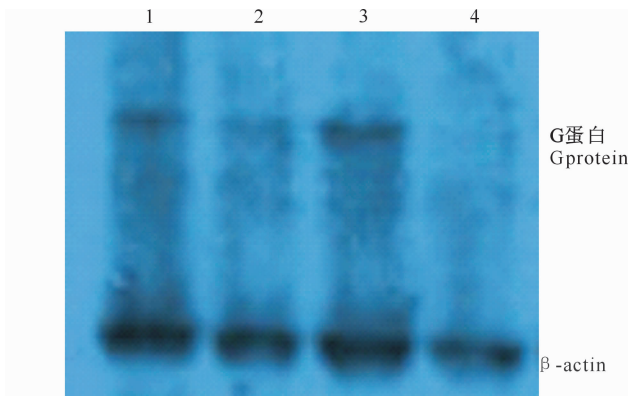
1. PCR amplification of G gene;2. Recombinant plasmids by
Pac I ;3. 5 000 bp DNA Marker

图 3 IHN V G 基因重组腺病毒质粒的鉴定

Fig. 3 Screening of recombinant adenovirus vector
of IHN V with G gene

2.4 重组腺病毒糖蛋白表达的 Western-blot

转染的重组腺病毒经 HEK-293 细胞复制 5 代后,以 β -actin 为内参,通过 Western-blot 分析糖蛋白表达情况,结果(图 4)显示,相比空白 HEK-293 细胞,重组腺病毒在分子质量约 58 ku 处有蛋白条带,表明转染的重组腺病毒中糖蛋白能够表达。



1,2,3. 重组腺病毒糖蛋白;4. 空白 HEK-293 细胞
1,2,3. Expression of glycoprotein of the recombinant adenovirus;
4. HEK-293 cells

图 4 重组腺病毒糖蛋白表达的 Western-blot 分析
Fig. 4 Western-blot analysis on expression of
glycoprotein of the recombinant adenovirus

2.5 重组腺病毒的 TCID₅₀

转染重组腺病毒的 HEK-293 细胞第 5 天出现绿色荧光蛋白,第 8 天时有 80% 的细胞可以清楚观察到绿色荧光蛋白(图 5)。根据 Reed-Muench 方法计算得知,重组腺病毒的 TCID₅₀ 为 $1.0 \times 10^{10.4}$ mL⁻¹。

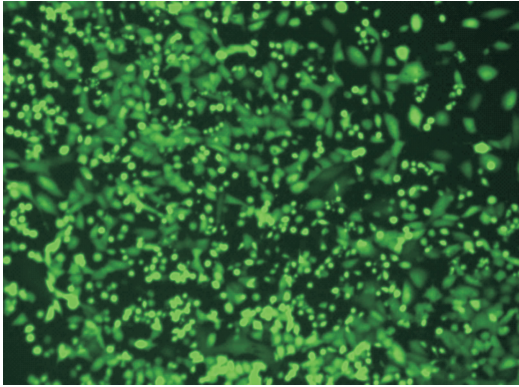


图 5 重组腺病毒转染 HEK-293 细胞第 8 天后 GFP 的表达
Fig. 5 Expression GFP of the recombinant adenovirus
8 days after transfecting

3 讨论

传染性造血器官坏死症(IHN)是一种主要危害鲑鳟鱼的病毒性疫病,其引发的极高死亡率给国内外冷水鱼养殖业造成了严重的经济损失^[20-21]。我国自 1990 年辽宁发现 IHN 以来,该病的传播范围不断扩大。另外,我国对于 IHN 的研究相对落后,该病爆发基本无法控制,因此给鲑鳟鱼养殖业造成了严重的影响。疫苗免疫是目前防控该病的主要措施^[22],因此研制 IHN 疫苗成为我国防控该病的重中之重。表面糖蛋白能够诱导中和抗体产生并刺激细胞免疫,在免疫保护机制中起着重要作用^[23]。Kurath 等^[22]构建了 IHNV pIHNV-G DNA 疫苗,用其免疫虹鳟鱼苗 3 个月后可以检出中和抗体。本试验利用糖蛋白构建了重组腺病毒载体,通过测序分析得知,IHNV 的 G 基因仍保留着关键抗原位点,未发生关键内氨基酸的突变。

重组腺病毒具有较高的转染效率,且不会整合到宿主基因组中,是用于动物体内和体外转染疫病靶基因的有效病毒载体之一。重组腺病毒在 E3 和 E4 中的突变,使得其与靶基因组可以通过包装病毒在 HEK-293 细胞中转染,由于转染高效、宿主广泛和病毒滴度较高,因此重组腺病毒载体被广泛应用于疫苗的研发^[24-25]。与传统疫苗的研发相比,重组腺病毒良好的免疫原性及安全性,促使其广泛地成

为建立疫苗平台的理想基因转移载体^[26-27]。本研究首先运用快速克隆方法将 IHNV G 基因快速插入到 Pad-Track-CMV 载体中,代替了传统依靠 T 载体连接目的基因的复杂操作,提高了载体的构建效率。此外,同源重组在大肠杆菌内进行,比传统的细胞内重组效率更高,使得阳性质粒的筛选更为简便^[28]。本研究首先用化学方法将 pAd-easy-1 骨架载体转入大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞中,再将带有目的基因的腺病毒载体电转入感受态 pAd easy-BJ5183 中进行同源重组,相比于双质粒同时电转化至大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞更为简便,显著提高了重组效率。另外,利用 Pad-Track-CMV 载体携带的 GFP 可直接观察到目的蛋白在细胞内的表达情况,使得观察转染成功与否更为简便。

综上所述,本研究利用重组腺病毒系统,通过在大肠杆菌中同源重组,成功构建了带有 IHNV G 基因的重组腺病毒,转染 HEK-293 细胞后,重组腺病毒能高效表达,且病毒滴度较高。糖蛋白在细胞中的高效表达,增加了鱼类免疫应答和体内抗体的产生可能,为研制 IHN 的针对性疫苗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kim K I, Cha S J, Lee C, et al. Genetic relatedness of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from cultured salmonids in Korea [J]. Archives of Virology, 2016, 161(8): 2305-2310.
- [2] Jonstrup S P, Schuetze H, Kurath G, et al. An isolate and sequence database of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) [J]. Journal of Fish Disease, 2010, 33(6): 469-471.
- [3] Dixon P, Paley R, Alegria-Moran R, et al. Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) [J]. Veterinary Research, 2016, 47(1): 63.
- [4] Hattenberger A M, Danton M, Merle G, et al. Epidemiology of infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonid fish in France: study of the course of natural infection by combined use of viral and seroneutralization test and eradication attempts [J]. Veterinary Research, 1995, 26(4): 256-275.
- [5] Anderson E, Clouthier S, Shewmaker W, et al. Inactivated infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines [J]. Journal of Fish Disease, 2008, 31(10): 729-745.
- [6] 吉尚雷, 张培军, 卢玉婷, 等. 传染性造血器官坏死病毒 CJ-13 株糖蛋白的原核表达及免疫原性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(7): 1-6.
Ji S L, Zhang P J, Lu Y T, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity of glycoprotein gene of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) CJ-13 strain [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2015, 43(7): 1-6.
- [7] Food and Agriculture Organisation. The state of world fisheries and aquaculture [M]. Rome: Springer Netherlands, 2012: 261-

294.

[8] Kurath G, Garver K A, Troyer R M, et al. Phylogeography of infectious hematopoietic necrosis virus in North America [J]. The Journal of General Virology, 2003, 84(4): 803-814.

[9] 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]. Diseases of Aquat Organ, 2010, 89(1): 9-15.

[10] Adel M, Amiri A B, Dadar M, and et al. Phylogenetic relationships of Iranian infectious hematopoietic necrosis virus of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) based on the glycoprotein gene [J]. Archives of Virology, 2016, 161(3): 657-663.

[11] 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.

[12] Morzunov S P, Winton J R, Nichol S T. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Virus Res, 1995, 38(2): 175-192.

[13] Jeon C H, Kim S R, Kim W S, et al. Monitoring of viruses in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) migrating to Korea [J]. Archives of Virology, 2011, 156(6): 1025-1030.

[14] Kim W S, Nishizawa M J, Park J W, et al. Genotyping of Korean isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene [J]. Archives of Virology, 2007, 152(11): 2119-2124.

[15] Kozarsky K F, Wilson J M. Gene therapy: adenovirus vectors [J]. Curr Opin Genet Dev, 1993, 3: 499-503.

[16] Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery [J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10: 440-447.

[17] Zou X, Xiao R, Guo X, et al. Preparation of recombinant human adenoviruses labeled with miniSOG [J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(1): 32-38.

[18] Cao Y, Xu L, LaPatra S E, et al. The kinetics and protection of the antiviral state induced by recombinant IFN1 α in rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Molecular Immunology, 2016, 24: 55-61.

[19] 杨海玉, 马智龙. 应用 TCID₅₀ 法比较 4 种细胞对呼吸道腺病毒的敏感性 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(23): 4345-4347.

Yang H Y, Ma Z L. Comparison on sensitivity of four cells to adenovirus in respiratory tract with TCID₅₀ [J]. Modern Preventive Medicine, 2014, 41(23): 4345-4347.

[20] McKenney D G, Kurath G, Wargo A R. Characterization of infectious dose and lethal dose of two strains of infectious hematopoietic necrosis virus [J]. Virus Research, 2016, 214: 80-89.

[21] Kurath G, Garver K A, Corbeil S, et al. Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout [J]. Vaccine, 2006, 24: 345-354.

[22] Robison C S, Whitt M A. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly [J]. Journal of Virology, 2000, 74(5): 2239-2246.

[23] Lasaro M O, Ertl H C. New insights on adenovirus as vaccine vectors [J]. Mol Ther, 2009, 17(8): 1333-1339.

[24] 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.

[25] Lorenza N, LaPatra S E. DNA vaccines for aquacultured fish [J]. Rev Sci Tech, 2005, 24(1): 201-213.

[26] 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 Research, 2016, 220: 193-202.

[27] 陈邦党, 马依彤, 马翔, 等. 人 EPO 基因重组腺病毒载体的构建及表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(3): 223-226.

Chen B D, Ma Y T, Ma X, et al. Construction and expression of recombinant adenovirus vector of human EPO gene [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2010, 26(3): 223-226.