

# 双链 RNA 病毒诱导的牙鲆胚胎细胞差减 cDNA 文库的构建\*

陈玉栋<sup>1,2</sup>, 张义兵<sup>1</sup>, 朱 蓉<sup>1</sup>, 蒋 琚<sup>1</sup>, 张奇亚<sup>1</sup>, 桂建芳<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

## Construction of a Subtractive cDNA Library from the *Paralichthys olivaceus* Embryonic Cells Induced by a Double-Stranded RNA Virus

CHEN Yu-dong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yi-bing<sup>1</sup>, ZHU Rong<sup>1</sup>, JIANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Qi-ya<sup>1</sup>, GUI Jian-fang<sup>1\*\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Using suppression subtractive hybridization (SSH) technique, a subtractive cDNA library was constructed from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryonic cells (FEC) induced by UV-inactivated dsRNA virus GCHV (Grass carp hemorrhage virus). A housekeeping gene,  $\alpha$ -tubulin, was used to estimate the efficiency of subtractive cDNA. In this library,  $\alpha$ -tubulin was subtracted at about  $2^{10}$  folds, indicating that some differentially expressed genes were also enriched at about the same folds. The length of the subtractive cDNA fragments cloned into pGEM-T vector ranged from 250bp to 2000bp. The results showed that the subtractive cDNA library is successful, which will be very useful for the understanding of antiviral immune response to dsRNA virus and essential for rapid isolation of differentially expressed genes induced by dsRNA virus.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; Grass carp hemorrhage virus; dsRNA virus; Suppression subtractive hybridization (SSH); cDNA library

**摘要:**以紫外线灭活的 dsRNA 病毒草鱼出血病病毒(GCHV)诱导和模拟诱导的牙鲆胚胎细胞为材料,利用抑制性差减杂交(SSH)技术,成功构建了双链 RNA 病毒诱导的牙鲆胚胎细胞(FEC)差减 cDNA 文库。以管家基因  $\alpha$ -tubulin 作为差减指标,经检测,该文库差减效率达  $2^{10}$  倍,表明经病毒诱导后某些差异表达基因也得到了相应倍数的富集。将获得的 cDNA 片段连接到 pGEM-T 载体,PCR 检测显示差减片段在 250bp ~ 2 000bp 之间。该差减 cDNA 文库的构建为从分子水平研究牙鲆培养细胞对 dsRNA 病毒的免疫反应、以及进一步鉴定和克隆差异表达基因打下了坚实基础。

**关键词:** 牙鲆;草鱼出血病病毒;双链 RNA 病毒;抑制性差减杂交;cDNA 文库

中图分类号:S 941 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)02-0168-05

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是我国已经形成规模经济效益的几种重要海水养殖鱼类之一。随着养殖集约化程度的提高,近年来频繁遭受病毒性疾病的侵袭并导致巨大经济损失<sup>[1]</sup>。由于长期以来对鱼类病毒性疾病没有特别适用、有效的防治方法,因此,深入研究牙鲆免疫系统的分子机制,特别是研究

牙鲆与病毒的相互作用将有助于牙鲆病毒病的预防和今后的抗病毒病分子育种研究。

目前,表达序列标签(expressed sequence tags, EST)分析和基因组序列分析极大促进了鱼类免疫系统的分子研究,对牙鲆免疫组织、甚至病毒诱导的牙鲆淋巴细胞的 EST 分析也取得了许多成果<sup>[2]</sup>。

收稿日期:2004-09-07,修回日期:2004-10-18

\* 基金项目:863 计划项目(2002AA626010,2004AA621030);国家自然科学基金资助项目(30200207,30471333);中国科学院知识创新方向项目(KSCX2-SW-303)

作者简介:陈玉栋(1971-),男,河南省淮滨县籍,博士生;研究方向为鱼类免疫遗传学。

\*\* 通讯作者。Corresponding Author. Tel:027-68780707, E-mail:jfgui@ihb.ac.cn.

然而,鉴于病毒与鱼体之间相互作用的复杂性,取得的研究结果有时只能说明特定病毒和鱼体之间的关系,因此有一定局限性。例如,已经成功鉴定、在抵抗病毒入侵中发挥重要作用的牙鲆干扰素系统基因就很少<sup>[2]</sup>。

dsRNA 能有效诱导鱼类机体和细胞的抗病毒免疫反应<sup>[3,4]</sup>,但在牙鲆中还没有见到系统研究 dsRNA 病毒感染牙鲆后基因表达变化的报道。本研究选用具有 dsRNA 基因组的草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhage virus, GCHV)感染的牙鲆胚胎细胞(*Paralichthys olivaceus embryonic cells*, POE)作为实验系统,运用抑制性差减杂交技术<sup>[5]</sup>,构建了 dsRNA 病毒诱导的牙鲆胚胎细胞基因差异表达的差减 cDNA 文库。该差减 cDNA 文库的构建对研究牙鲆细胞在分子水平上对 dsRNA 病毒的免疫反应和进一步鉴定免疫和抗病毒相关基因具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞与病毒

牙鲆胚胎细胞 FEC<sup>[6]</sup>由中国水产科学研究院黄海水产研究所陈松林研究员惠赠的原代胚胎细胞经传代培养而来。鲫鱼囊胚细胞系(*Carassius auratus blastulae embryonic cells*, CAB)由本实验室建立<sup>[6]</sup>,草鱼肾细胞系(*Ctenopharyngodon idellus kidney cells*, CIK)由中国水产科学院长江水产研究所建立<sup>[7]</sup>,GCHV-873 株<sup>[8]</sup>为本实验室保存,大鳞鲆弹状病毒(*Scophthalmus maximus Rhabdovirus*, SMRV)由本实验室分离。CAB、CIK 细胞的培养、GCHV 的增殖、纯化以及紫外线灭活见文献<sup>[9]</sup>。POE 细胞用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基在 25℃ 下培养。

### 1.2 牙鲆胚胎细胞的 GCHV 诱导及抗病毒活性检测

FEC 细胞常规传代培养 7d,每 25cm<sup>2</sup> 培养瓶加入 0.5mL 紫外线灭活的 GCHV 诱导 2h,诱导后用无血清的 DMEM 培养基置 25℃ 培养。对照 FEC 细胞用 0.5mL 无血清 DMEM 培养基代替灭活病毒进行模拟诱导。48h 后收集细胞,采用 CsTFA 超速离心法提取总 RNA (Pharmacia RNA Extraction Kit),Poly A<sup>+</sup> RNA 用生物素标记的寡聚(dT)探针和链亲合素包裹的磁珠纯化(PolyA Tract mRNA Isolation system(Promega)),详尽步骤参照试剂盒说明书。病毒诱导和模拟诱导的 FEC 细胞培养上清液按本实验室方法<sup>[11,12]</sup>进行抗病毒活性

检测。

### 1.3 抑制性差减杂交和抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建

差减 cDNA 文库的构建采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech),具体方法参照按本实验室已经报道的文献<sup>[10,13~15]</sup>。首先,分别制备 FEC 细胞的 Driver cDNA 和 Tester cDNA。Driver cDNA 的制备是将模拟诱导的 FEC 细胞的 mRNA 逆转录成 ds cDNA,然后用 *Rsa* I 充分酶切 3h 后完成。Tester cDNA 的制备是将合成的灭活病毒诱导的 FEC 细胞 ds cDNA 用 *Rsa* I 酶切后,分成两份,分别与 adaptor 1 和 adaptor-R 连接后即制成 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA。然后,以制备好的 FEC 细胞 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别进行抑制性消减杂交。抑制性消减杂交过程:首先将 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA 分别与 Driver cDNA 进行第一次杂交,混合两种杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA 进行第二次杂交。杂交产物然后以引物 primer 1(试剂盒提供)进行第一次 PCR 扩增,第一次 PCR 产物再用引物 Nested primer 1 和 2R(试剂盒提供)进行第二次 PCR 扩增,使差异表达基因得到指数扩增。进行差减杂交的同时,也制备未差减 cDNA 以检测差减文库的差减效率。未差减的 cDNA 的制备是:在连接两种接头制备 Tester cDNA 时,将刚加好样还没有进行连接反应的 Tester-1 和 Tester-2 cDNA 各取 2μL 混合,然后进行连接反应。

### 1.4 接头连接效率和差减效率的检测

接头连接效率的检测以鲫鱼管家基因  $\beta$ -actin 为指标。以鲫鱼  $\beta$ -actin 的特异上游引物和下游引物为一个组合、以及试剂盒提供的接头引物 PCR primer 1 (5'-CTAA TACGACTCACTA TA GGGC-3')和  $\beta$ -actin 的下游引物为一个组合进行 PCR 扩增,比较不同引物组合扩增产物的大小及产量,鉴定连接效率的优劣。PCR 反应条件为:75℃ 5min,94℃ 5min,然后 94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 1min 扩增 30 个循环。检测差减 cDNA 文库的差减效率以管家基因  $\beta$ -tubulin 为指标。PCR 反应条件除 75℃ 5min 外,其余皆与上同。鲫鱼  $\beta$ -tubulin 的特异上游引物和下游引物分别为:5'-GTGCACTGGTCT-TCA GGGGTT-3' 和 5'-GGGAA GTGGA TCGGT-GGGTA T-3';  $\beta$ -actin 基因的上游引物和下游引物序列分别为:5'-CACTGTGCCCA TCTACGA G-3' 和 5'-CCA TCTCCTGCTCGAA GTC-3'。

### 1.5 差减文库 cDNA 片段大小检测

参考本实验室的方法<sup>[9,12~14]</sup>,将制备的差减

cDNA 直接连接到 p GEM-T 载体 (Promega), 即得到差减 cDNA 质粒文库。转化大肠杆菌 DH5, 涂布在含氨苄青霉素琼脂平板上。随机挑选菌落, 37 培养 4h。取 0.5 $\mu$ L 菌液, 以差减试剂盒提供的引物 Nested 1 和 Nested 2R 在 20 $\mu$ L 体系 PCR 检测插入片段大小。PCR 扩增参数为: 94 15s, 65 30s, 72 2min 共 30 个循环。

## 2 结果

### 2.1 紫外灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞抗病毒活性检测

紫外灭活 GCHV 诱导和模拟诱导 FEC 细胞 48h 后, 收集细胞, 用 CsTFA 密度梯度超速离心法提取细胞总 RNA 后, 经紫外分光光度计测定 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值均在 1.8 以上。电泳显示 28S、18S 条带清晰(图 1), 表明制备的 RNA 质量达到了建库要求。

为了检测紫外灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞是否发生了基因表达的改变, 将收集细胞时保留的培养上清液进行抗病毒活性检测。培养上清液先加到用于检测的 FEC 细胞保护 24h, 然后用 1 000 TCID<sub>50</sub>/mL SMRV 攻击。结果如图 2, 灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞培养上清液可以保护 FEC 细胞免受 SMRV 的攻击, 而加入模拟诱导 FEC 细胞上清的则对细胞没有保护作用。说明紫外灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞产生了抗病毒活性物质, 同时也表明用灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞提取的 RNA 中包含有正常细胞不表达的免疫或抗病毒相关基因的 mRNA。

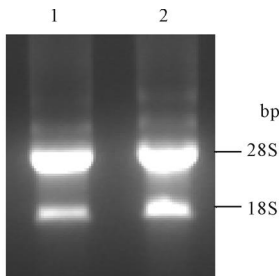


图 1 FEC 细胞总 RNA 的提取

Fig. 1 Total RNAs extracted from FEC cells

1, Total RNAs from UV-inactivated GCHV-infected FEC cells; 2, Total RNAs from mock-induced FEC cells.

### 2.2 Tester cDNA 的接头连接效率的检测

以鲫鱼  $\beta$ -actin 的特异上游引物和下游引物为一个组合、以及试剂盒提供的接头引物 PCR primer 1 和  $\beta$ -actin 的下游引物为一个组合, 以 *Rsa* I 酶切后再与接头连接的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,

结果证明 Tester cDNA 制备成功, 可用于下一步的两轮 PCR 扩增(图 3)。

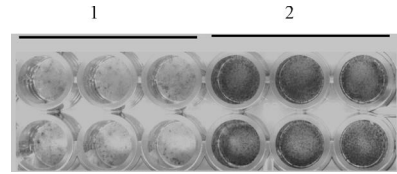


图 2 紫外灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞抗病毒活性的检测  
Fig. 2 Detection of antiviral activity of UV-inactivated GCHV induced FEC cells

1, FEC cells incubated with supernatant from mock-induced cells; 2, FEC cells incubated with supernatant from UV-inactivated GCHV induced FEC cells.

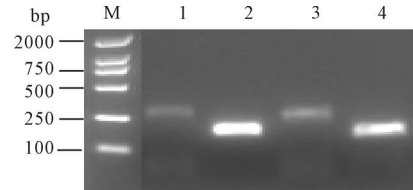


图 3 Tester cDNA 接头的连接效率检测

Fig. 3 Detection of the adaptor ligation efficiency of tester cDNA

M, 1kb DNA marker; 1/3, PCR products amplified by adaptor primer PCR primer 1 and  $\beta$ -actin downstream primer; 2/4, PCR products amplified by  $\beta$ -actin upstream and downstream primers.

### 2.3 cDNA 文库差减效率检测

文库的差减效率是对文库构建质量的评价, 通过检测管家基因  $\beta$ -tubulin 在差减和未差减 cDNA 的第二次抑制性 PCR 产物中量的差异来进行鉴定。结果显示, 当以未差减的 cDNA 为模板时,  $\beta$ -tubulin 基因在 23 个 PCR 循环就开始检出扩增产物, 而差减后的 cDNA 则在 33 个循环才有带出现(图 4), 说明所构建文库的差减效率高达近  $2^{10}$  倍。

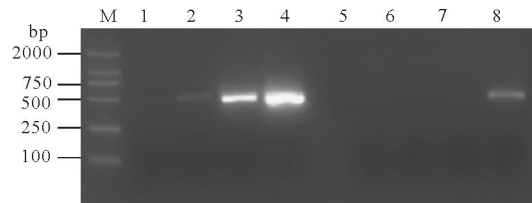


图 4 以  $\beta$ -tubulin 为指标检测差减文库的差减效率

Fig. 4 Subtraction efficiency of subtracted cDNA library by detection of  $\beta$ -tubulin gene

M, 1kb DNA marker; 1-4, PCR products of unsubtracted cDNA in 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively; 5-8: PCP products of subtracted cDNA in 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively.

### 2.4 差减文库 cDNA 片段大小的鉴定

将差减 cDNA 片段接入 p GEM-T 载体, 经转化 *E. coli*. DH5, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 随机挑取一定数量的克隆进行 PCR 检测, 结果显示克隆片段大小在 250 ~ 2 000bp 之间, 图 5 为随机挑

取的 24 个克隆的 PCR 结果。

### 3 讨论

抑制性差减杂交技术已经成为克隆差异表达基因的一项非常有效的技术。在构建差减文库的过程中,总 RNA 的提取、mRNA 的分离纯化、接头连接效率和差减效率等是决定差减 cDNA 文库质量的关键。从本文实验结果看,该文库的构建是成功的。试剂盒所提供的检测接头连接效率和差减效率的是人的管家基因甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH),该基因与鱼类的同源性不高,因此我们选择本实验室通用的与牙鲆具有很高的序列同源性鲫鱼管家基因  $\alpha$ -actin 和  $\beta$ -tubulin 作为检测指标<sup>[10]</sup>。



图 5 差减 cDNA 质粒文库中插入 cDNA 片段大小的鉴定

Fig. 5 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA library

M, 1 kb DNA marker; 1-24, 24 colonies randomly selected from the subtractive cDNA library.

鱼类的多样性决定了免疫机制的多样性和复杂性。虽然哺乳类免疫系统的研究进展可以借鉴于鱼类免疫系统的分子研究,然而由于鱼类的进化地位较低,其免疫相关基因与哺乳动物相比同源性较差,因此采用传统的同源克隆方法分离与哺乳动物同源的鱼类相关基因很难奏效。目前,进行大量 EST 分析已经广泛应用于鱼类的免疫组织和细胞来鉴定免疫相关基因。如利用构建 cDNA 文库和差减 cDNA 文库的方法,从牙鲆肝、脾、皮肤、弹状病毒感染的白细胞和免疫球蛋白阳性细胞以及 ConA/PMA 或 LPS 处理的白细胞中鉴定了一些与免疫相关的基因,这些基因包括细胞因子、细胞因子受体、转录因子、信号通路分子、胞浆蛋白(plasma protein)、细胞表面分子、凋亡相关分子等<sup>[16]</sup>。

虽然使用从感染鱼体分离的免疫组织和免疫细胞作为研究材料取得了重大进展,但是实验中也发现:由于鱼类机体细胞的基因表达要受到其他调控途径如激素、内分泌以及外界因素的影响,因此在某种程度上干扰了直接与感染病毒相关基因的分离和鉴定,也增加了克隆拷贝数低、表达欠丰富基因的困难<sup>[2]</sup>。而使用体外培养的细胞系就可能有效解决这

些问题。因为细胞系不仅取材方便、可以很方便大量扩增病毒,而且也同机体细胞一样,能对外界刺激产生强烈的免疫反应<sup>[17]</sup>。如本实验室从灭活的草鱼出血病病毒诱导的 CAB 细胞中,鉴定了 69 个抗病毒相关和免疫相关基因的 EST,并成功克隆十多个重要的鱼类干扰素系统基因的全长 cDNA,如 TLR3、IFN、STAT1、IRF7、Mx1、Mx2、Viperin、IFI56、IFI58、PKR-like、USP18、ISG15-1、ISG15-2、IL8、SCA19 以及如 G $\alpha$ 1 和 G $\alpha$ 2 等多个干扰素刺激表达的新基因<sup>[10,18~24]</sup>。因此,找到并建立一个适用于研究牙鲆免疫系统的细胞系统非常必要<sup>[25]</sup>。

通常认为病毒在细胞中复制产生的 dsRNA 是诱导细胞免疫应答的一个重要因子<sup>[3,4]</sup>。本实验所选材料为具有 dsRNA 基因组的 GCHV<sup>[26]</sup>,实验证明 GCHV 不需要在细胞中的复制就能有效诱导鱼类细胞的抗病毒免疫反应<sup>[11,12,18]</sup>。事实上利用紫外线灭活的 GCHV 能够诱导 FEC 细胞产生抗病毒活性物质(图 1),表明经灭活 GCHV 诱导的 FEC 细胞已经产生了免疫或抗病毒相关的基因表达改变。因此,利用 FEC 细胞系经灭活 GCHV 诱导后构建的差减 cDNA 文库中也应大量富集了牙鲆免疫或抗病毒相关的基因。该文库的构建将有助于克隆牙鲆抗病毒和免疫相关的基因和从分子水平探索牙鲆对 dsRNA 病毒感染产生的免疫应答,也对进一步研究鱼类细胞与病毒相互关系具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Zhang Q Y, Xiao F, Xie J, *et al.* Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China[J]. *J Virol*, 2004, 78: 6982-6994.
- [2] Aoki T, Tucker C, Hirono I. Expressed sequence tag analyses of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. In: Shimizu N, Aoki T, Hirono I, Takashima F, eds. *Aquatic genomics: steps toward a great future* [M]. Tokyo: Springer-Verlag, 2003, 102-114.
- [3] Robertsen B, Trobridge G, Leong J A. Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21: 397-412.
- [4] Jensen I, Larsen R, Robertsen B. An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly (I:C) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 13, 367-378.
- [5] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.
- [6] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, *et al.* Establishment of a cortinur

- ous embryonic cell line from Japanese flound *Paralichthys olivaceus* for virus isolation[J]. *Dis Aquatory*, 2004, 60:241-246
- [7] 陈敏容,陈宏溪,易咏兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. *水产学报*, 1985, 9:121-130.
- [8] 左文功,钱华鑫,许映芳,等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立[J]. *淡水渔业*, 1984, 2:38-39.
- [9] 柯丽华,方勤,蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J]. *水生生物学报*, 1990, 14:153-159.
- [10] 张义兵,石耀华,桂建芳. 鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建[J]. *水生生物学报*, 2003, 27:113-118.
- [11] 王铁辉,张义兵,李戈强,等. 鱼类培养细胞干扰素的诱导. *病毒学报*[J], 1999, 15:43-49.
- [12] 张义兵,王铁辉,李戈强,等. 鲫鱼囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性. *中国病毒学*[J], 2000, 15:163-169.
- [13] Xie J, Wen J J, Chen B, *et al.* Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, 2001, 271: 109-116.
- [14] Shi Y H, Liu J, Xia J H, *et al.* Screen for stage specific expression genes between tail bud stage and heartbeat beginning stage in embryogenesis of gynogenetic silver crucian carp [J]. *Cell Res*, 2002, 12: 133-142.
- [15] Fan L C, Yang S T, Gui J F. Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp [J]. *Cell Res*, 2001, 11:17-27.
- [16] Hirono I, Aoki T. Immune-related genes of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. In: Shimizu N, Aoki T, Hirono I, Takashima F, eds. *Aquatic genomics: steps toward a great future* [M]. Tokyo: Springer-Verlag, 2003, 286-300.
- [17] 张义兵,张奇亚,桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定[J]. *水生生物学报*, 2004, 28:317-322.
- [18] 张义兵,张奇亚,徐德全,等. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因[J]. *科学通报*, 2003, 48:457-463.
- [19] Zhang Y B, Hu C Y, Zhang J, *et al.* Molecular cloning and characterization of crucian carp (*Carassius auratus* L.) interferon regulator factor 7 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 453-466.
- [20] Zhang Y B, Gui J F. Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28:211-227.
- [21] Zhang Y B, Gui J F. Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Gene*, 2004, 325:43-51.
- [22] Zhang Y B, Li Q, Gui J F. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon [J]. *Immunogenetics*, 2004, 56:68-75.
- [23] Zhang Y B, Gui J F. Identification of two novel IFN-stimulated genes from cultured CAB cells induced by UV-inactivated grass carp hemorrhage virus [J]. *Dis Aquat Org*, 2004, 60: 1-9.
- [24] Hu C Y, Zhang Y B, Huang G P, *et al.* Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from the cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17:353-366.
- [25] Miller N, Wilson M, Bengten E, *et al.* Functional and Molecular characterization of teleost leukocytes [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166:187-197.
- [26] 张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(1):93-101.