综 述

鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定

张义兵 张奇亚 桂建芳
'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$武汉发育生物学研究中心+武汉 *! ,)

INTEFERON SYSTEM AND IDENTIFICATION OF INTEFERON SYSTEM GENES IN FISH

BC(DE F6G6A:+BC(DE H6F5 5AI EJK L65A-M5A:
*(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan Center for Developmental Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan *! ,)*

关键词 鱼类$干扰素系统$抗病毒免疫相关基因$基因克隆$抗病毒机制
Key words: M6N=$KA0PQ9PQRA NSN0P4$(A06T6Q57-5AI 64 4;AP-QP7PT5A0 :PAP$EPAP @7RA6A:$(A06T6Q57 4P@=5A6N4
中图分类号 ."*# 文献标识码 (文章编号 # -! ,' *) !- !#,- &

干扰素'KA0PQ9PQRA+KMD)是最早发现的一种细胞因子。虽然有些组织和细胞能检测到KMD的组成型表达+但在正常情况下+生物机体一般只在受到病毒和细菌感染+或用UR7S K /、促细胞分裂素等诱导剂人工诱导时分泌KMD[#]。KMD系统是脊椎动物抵抗病毒入侵的第一道屏障+能在病毒感染后几小时内就迅速起作用+而特异性免疫抗体必须在几天或几周之后才由淋巴细胞产生[#+]。除了抗病毒作用外+KMD还能调节机体细胞的其他生理过程+如细胞的生长和分化、细胞凋亡、以及机体和细胞的免疫反应等[!—2]。因此+KMD系统是连接机体非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。然而在相当长的时间内+除了哺乳类和鸟类+在低等的脊椎动物+只发现受到病毒感染后的细胞能产生与哺乳类KMD类似的抗病毒活性物质+却一直没有成功克隆KMD基因或纯化KMD蛋白。近两年来+作者实验室在证实紫外线灭活的草鱼出血病病毒'EQ5NN /5QX CP4RQQ=5:P Y6Q;N+E/CY)诱导/(G细胞产生了KMD抗病毒活性物质的基础上+应用抑制差减杂交等基因克隆技术+建立了研究鱼类抗病毒相关基因和免疫相关基因的细胞模型+突破了研究系统及其相关技术瓶颈+并从该细胞系统中鉴定了许多重要的KMD基因+取得了一系列新的进展[&—##]。

1 IFN的发现与IFN系统

世纪! 年代+有学者发现生物机体在感染某一种病毒后+会对另一种抗原性毫无关系的病毒产生干扰现象+因此探索病毒干扰机制引起了病毒学家的极大兴趣。但直到#"2,年+KNN5@N和Z6AIPA4 5AA在利用鸡胚绒毛尿囊膜研究流感病毒的干扰现象时才发现感染病毒的细胞能分泌一种抗病毒蛋白+这种抗病毒蛋白能激活邻近细胞抗病毒状态的产生、抑制多种同源和异源病毒的感染。他们把这种抗病毒蛋白命名为KMD。#"2%年+D5:5AR和-R8645再次印证了KNN5@N和Z6AIPA45AA关于病毒干扰实质的发现+从此开始了对脊椎动物KMD系统近半个世纪的探索+KMD也逐渐从实验室的基础研究走向了临床应用[#!—2]。

那么+到底什么是KMD系统呢[目前一般认为+KMD系统包括分泌合成KMD的细胞系统以及受KMD作用的细胞系统+即指所有经病毒感染等外部刺激后能激活KMD合成的细胞、以及对KMD的作用发生反应并建立抗病毒状态的细胞[2]。

2 鱼类IFN活性物质的发现与鉴定

#"&2年+EQ5TP77等[#]首次发现传染性胰腺坏死病毒'KU-DY)在 !℃能诱导黑头软头鲦的鳍传代细胞MC\分泌一种

收稿日期 - '-##$修订日期 -#- %
基金项目 %&!计划项目' ((&&#)、国家自然科学基金资助项目'!#! *+! ,)、中国科学院知识创新方向项目'-./0-.1-!!)及武汉青年科技晨光计划' #2 2 22)资助
作者简介 张义兵'#"&"—)+男+湖北省仙桃市人$博士$主要从事鱼类分子免疫学和细胞遗传学的研究
通讯作者 桂建芳+研究员。3-4567 89:;6< 6=>?5@?@A

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

类似哺乳类 KMD 的抗病毒活性物质。此后又在多种病毒感染的鱼类和鱼类培养细胞中得到证实+ 诱导特性、生物学特性和理化特性的研究认定就是鱼类 KMD+ 并发现鱼类 KMD 不止一种[#]。

国内对鱼类 KMD 的研究最早见于江育林等的工作+ 是针对引起草鱼鱼种大量死亡的 E/CY 的研究[#!]。此后+ 邵建忠等用病毒和 UC(等诱导剂诱导的草鱼和草鱼细胞 KMD 活性物 质进行了特性研究+ 与哺乳类 KMD 的性质比较+ 认为前者可能为Ⅰ 型 KMD[#*]+ 而后者则为Ⅱ型 KMD' KMDY) [#2]。同时对鱼类 KMD 的免疫调节功能进行了初步探索[#&+#,]。尽管如此+ 近* 年来的研究认为鱼类存在 KMD 系统的证据主要来自于对病毒诱导的培养细胞上清液进行检测时发现的具有类似哺乳类 KMD 的抗病毒活性物质[#+&+,]+ 并且直到今天+ 也没有成功纯化出任何一种鱼类 KMD 蛋白[&+#6]。

3 鱼类 IFN 系统早期的分子研究

鱼类 KMD 系统的分子研究报道不多但开始的也较早。#"%! 年+ 1 67NRA 等[#"]报道用人 *HuIFN*β@^D(探针与鸟类和几种鱼类+ 如雅罗鱼' *Leuciscus leuciscus*)、条鳅' *Noemacheilus barbatulus*)、河鲈' *Perca fluviatilis*) 等的基因组 ^D(杂交时+ 就发现能检测到很弱的杂交信号。但是取得真正的进展始于鱼类 *Mx* 基因的鉴定工作。在哺乳类+ \a 作为机体细胞产生 KMD 的主要标记和抗病毒蛋白得到了广泛而深入研究。同样使用分子杂交的方法+ .05P=P76 等[ ]以小鼠 *Mx*# @^D(为探针+ 从限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ 消化的河鲈基因组 ^D(中克隆出 一个 . !2b> 的 ^D(片段+ 基因结构与小鼠 *Mx*# 相应片段比较极其保守并有很高的同源性+ 证实是鱼类 *Mx* 基因。后来从虹鳟' *Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑' *Salmo salar* Z?)、牙鲆 ' *Paralichthys olivaceus*)、河 ' *Takifugu rubripes*) 等也相继克隆出 *Mx* 基因[+ #]。由于鱼类与哺乳类 *Mx* 基因的同源性很高+ 蛋白结构具有很高的保守性+ 因此+ 虽然还没有完全证明鱼类 \a 蛋白具有类似哺乳类的抗病毒功能+ 但是作为鱼类 KMD 系统第一个直接的分子证据+ 鱼类 *Mx* 基因的成功鉴定暗示鱼类 KMD 系统的抗病毒免疫机制也非常保守。

但是在此后的十年+ 当哺乳类 KMD 系统的分子研究取得重大进展时+ 鱼类 KMD 系统的分子研究却一直没有大的突破+ 而且整个鱼类免疫系统的分子研究与哺乳类相比也相当落后[ ]。

4 鱼类 IFN 系统分子研究落后的主要原因

目前+ 已经在几种探索免疫反应机制的模型鱼如牙鲆、斑 鱼、虹鳟、大西洋鲑等开展了大量分子免疫学的研究+ 然而鉴定的鱼类免疫系统基因还是非常有限[+ !]。其中的原因是复杂的+ 有研究经费短缺、研究力度不够等的限制+ 但是一直没能找到好的技术方法是其中一个很重要的原因[#&+%]。

鱼类 *Mx* 的成功鉴定依靠的是以不同物种同源基因之间具有较高保守性为基础的 U/_ 技术和分子杂交技术[+]。但是后来的研究发现+ 由于鱼类免疫机制的多样性和复杂性+ 以及鱼类低等的进化地位+ 鱼类免疫相关基因与哺乳类相比可能有较大程度的变异。因此+ 如果借鉴已有的哺乳类免疫相关基因信息+ 仅用传统的 U/_ 和杂交方法来鉴定鱼类同源基因比较困难[%+]。采用 3.] 测序大量分析免疫细胞的基因转录信息+ 理论上可以获得重要的鱼类免疫相关基因+ 但是工作量太大。对鱼类脾、肝、头肾、皮肤等免疫因子合成旺盛的组织、以及对人工感染病毒的牙鲆白细胞进行的 3.] 分析效果也不明显[!]。事实上+ 由于免疫系统基因受到细胞和机体的严格调控+ 一般只在受到病原体刺激后、在一定时间内才大量、有规律表达+ 因此对于那些转录时间特定、表达量欠丰富的基因通过 3.] 分析成功筛选的机率是很小的。抑制性差减杂交技术' .;XXQPNN6TP N;>QQ5@6TP =S>Q6I6c506RA+ ..C) 是最近发展起来的分离差异表达基因的有效方法+ 能指数富集稀有表达基因+ 因此可以有效解决 3.] 序列分析遇到的难题+ 而且也已经运用到鱼类感染病毒后免疫器官和细胞的差异表达基因的鉴定和克隆[+ *]+ 但遗憾的是+ 已经取得的结果也极为有限。作为非特异性免疫系统的重要组成部分+ 鱼类 KMD 系统基因的研究进展更为缓慢+ 长期以来成功克隆的 K.E 基因只有鲑科鱼类的 *Mx* 基因[ ]+ 金鱼 *ISG*#2 可能是鱼类成功鉴定的第二个 K.E 基因[2]。

除了技术方面的原因+ 鱼类没有自身特色的研究模型系统可能也是主要原因之一。虽然国外有学者已经意识到建立研究鱼类免疫反应的体外培养细胞系统的迫切性和重要性[!]+ 然而所见报道还是多利用鱼类主要的免疫细胞——从感染鱼体分离的白细胞或人工感染短期培养的白细胞作为研究材料[+ *+ &]。体外培养细胞系经过体外长期传代培养后+ 虽然大多数细胞已发生不同程度的变异+ 但仍反映了起源组织和机体的特性+ 因此作为一种有用的材料在科学研究舞台上一直发挥重要作用。体外培养细胞用于研究细胞的抗病毒免疫反应不仅取材方便、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' 如病毒感染等) 产生强烈的免疫反应[, — "]。在哺乳类的免疫研究中+ 许多重要的 *ISG* 基因功能就是通过在细胞系统上的研究得到最终阐明的[! + #]。更为重要的是+ 培养细胞系由于在体外长期传代以及生长环境的变化+ 正常表达的基因相对减少+ 而且不受机体调控途径如激素、内分泌以及外界其他因素的影响+ 因此细胞受病毒感染后+ 导致的基因表达改变可能与细胞的抗病毒免疫更为直接相关[&+%]。这样在筛选抗病毒免疫基因时可以最大限度地减少其他基因的干扰。与以上的分析结果相呼应的是+ 在用 ..C 技术筛选病毒诱导鱼类机体后白细胞的基因表达谱时+ 发现筛选到因子多数为补体、抗体、趋化因子、受体蛋白以及急性反应蛋白等+ 而缺少代表 KMD 系统基因的重要的免疫因子[ ]。最近+ 较为成功的是 `' M5QQP77 等[&]的工作+ 他们将虹鳟白细胞分离出来后用病毒处理+ 获得了近 # 个被证明是鱼类 KMD 刺激的基因+ 但是仍然没有分离到在哺乳类已经证实的其他重要的 KMD 系统基因。

综合考虑以上因素+ 张义兵等在发现紫外线灭活草鱼出血病病毒 'E/CY) 能够诱导 /(G 细胞上产生 KMD 的基础

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上[,一"]+结合 ..C 等基因克隆技术+建立了病毒诱导的 /(G 细胞和未诱导细胞间差异表达基因的差减 @^D(文库[,]+由此成功建立了一个研究鱼类抗病毒免疫相关基因的细胞模型系统[%]+在该细胞系统中+同时鉴定克隆了十多个在哺乳类 KMD 系统已经认知功能的鱼类同源基因、以及一批受病毒和 KMD 诱导表达的新基因[&+%—##]。

5 鱼类 IFN 系统存在的分子证据

最近鱼类 KMD 系统基因的鉴定和克隆取得了重大进展+不仅有 KMD 基因[&#%]+而且还包括参与 KMD 信号通路、KMD 的表达调控、KMD 诱导的具有抗病毒功能的 K.E[&%]。从分子水平上有力证明了鱼类 KMD 系统的存在。

5.1 鱼类 IFN 基因

首先宣称发现鱼类 KMD 基因的是日本学者]5456 等[!]。#""!年+他们报道通过共转染人癌基因 @C5-Q5N 和 @-9RN 的表达质粒获得#株牙鲆永久白细胞系+由此用病毒诱导并纯化了牙鲆白细胞 KMD 蛋白、并克隆了牙鲆 *IFN* @^D(。将牙鲆 *IFN* @^D(连接表达载体+转染 GC-- #细胞表达获得成功+证明重组 KMD 蛋白与从细胞中诱导的牙鲆 KMD 大小一致。他们鉴定的牙鲆 KMD 蛋白有#!%个氨基酸+有一个糖基化位点和! 个氨基酸编码的信号肽+分子量为#&b^5[!]。但是与哺乳类 KMD 比较+分子量偏小、同源性很低+GZ(.] 搜寻蛋白数据库发现组成该蛋白的三分之二序列与丝状噬菌体有高于& d 的同源性[!+!!]。鉴于这些原因+牙鲆 KMD 基因始终没有得到众多科研工作者的认同。

!年　月+(7045AA 等[#%]率先从公共数据库中鉴定了一个与鸡 KMD 基因同源性很高的斑马鱼 3.]+从而克隆出 KMD 基因 *DrIFN*'(F#!2,#&+#%255)+体外表达证明其能诱导激活抗病毒基因 *Mx* 的启动子+并能诱导细胞的抗病毒状态+利用 *DrIFN* 序列从河　全基因组中也鉴定出河　*IFN* 基因。虽然 (7045AA 等[#%]只报道了一个斑马鱼 *DrIFN* 基因+但是搜索EPAG5Ab 发现至少有两种类型的斑马鱼 *IFN* 基因 *DrIFNA*'(L2**% #+#%!55)和 *DrIFNB*'(L2**% #+#%255)+另外还有一个斑马鱼 KMD 基因的基因组 ^D('(L2**%　+#,"55)。后三个 *IFN* 基因由另外一个实验室报道+其中(L2**%　与 (F#!2,#& 只有一个氨基酸不同+很可能代表一个基因+出现的差异有可能是测序的误差+这些结果表明鱼类的]SXP K KMD 肯定不止一个类型。同样+鲫鱼 *IFN* 基因的全长 @^D(序列也从建立的细胞模型系统中成功克隆+推导的氨基酸序列与斑马鱼 KMD 的同源性达 , d +序列分析发现 D 端前　个氨基酸为信号肽[&]。然而与大多数哺乳类 KMD 蛋白相比+鲫鱼和斑马鱼 KMD 不可能是糖蛋白+因为没有找到一个合适的 D-糖基化位点[#%]。鲫鱼和斑马鱼 KMD 与已经鉴定的牙鲆 KMD 的核苷酸和氨基酸序列也几乎没有同源性[&+#%]。最近+斑　鱼'*Ictalurus Punctatus*)KMD @^D(也得到了鉴定[!*]。

5.2 鱼类 IFN 的信号通路基因

除了细胞膜上的 KMD 受体+KMD 的信号传导主要由两类蛋白参与+即 L5A;N 激酶家族和 .](] 家族成员。鱼类 L5A;N 激酶家族的四个成员 *JAK#*、*JAK*　、*JAK!*、*Tyr*　基因早就在河　得到了鉴定[!2]。最早鉴定的鱼类 .](] 的基因是斑马鱼的 *STAT#* 和 *STAT!*+并发现 *STAT#* 能够拯救人 *STAT#* 基因缺陷细胞株的 KMD 信号放大功能[!&]。最近+河　*STAT2* 基因的 ^D(结构也得到了细致分析[!,]。鱼类与哺乳类 L5A;N 激酶家族和 .](] 家族成员的结构具有很高的保守性+暗示它们在信号通路中也具有相同的功能。

从病毒诱导能产生 KMD 的 /(G 细胞系统中+鲫鱼 *CaSTAT#* 和 *CaJAK#* 基因也得到了鉴定+并进行了较系统的信号功能分析[#]。实验表明+E/CY、紫外线灭活 E/CY、UR7SK /、/(G KMD 都能激活 /(G 细胞 *CaSTAT#* 基因的表达。根据哺乳类 *STAT#* 基因的表达特点+诱导分析证实鲫鱼 *CaSTAT#* 的诱导表达机制可能是 首先+病毒诱导细胞产生 /(G KMD+新分泌的 /(G KMD 然后激活细胞 *CaSTAT#* 基因的表达。由于细胞 KMD 是通过 L(-- .](] 信号途径介导细胞抗病毒基因的表达+比较 *CaSTAT#* 和 *CaMx#* 受 KMD 诱导表达时的启动时间发现+*CaMx#* 的表达晚于 *CaSTAT#*+因此更进一步预测了 *CaSTAT#* 的信号功能[#]。

最近的研究又增加了新的证据。基因组结构研究发现鱼类 K.E+包括河　*Mx*[!%]和 *ISG#2*[2]+在它们的启动子调控区域也具有哺乳类 K.E 的特征序列 K._3。在 L(-- .](] 信号通路中+形成的 K.EM! 复合物结合在 K.E 启动子的 K._3 上然后调控 K.E 的表达。另外+同源性分析表明+推导的鲫鱼 /5.](]# 蛋白与大鼠 .](]# 有最高同源性达 2" d +具有哺乳类 .](]# 功能蛋白的所有保守结构域 如 ^D(协同结合域+卷曲螺旋域+^D(结合域+.C　域等。然而+鲫鱼 /5.](]# 蛋白 / 末端的转录激活域较短+而且没有保守的 U\.U 序列+这个特点与人 .](] #β 完全一致[#]。早期的研究结果表明+人 .](] #β 是 .](] #α 的一个自然剪接体+与 .](] #α 相比仅缺少了 / 末端的最后!%氨基酸+然而并不影响]SXP K KMD 的信号传导功能[!"]。从这个结构特点可以证明紫外线灭活的 E/CY 诱导的 /(G KMD 就是一种Ⅰ型 KMD+从而也可以推论在鲫鱼还有一个非剪接的 .](] # 蛋白存在[#]。以上的这些结果可以充分证明鱼类 KMD 的信号放大也依赖 L(-- .](] 信号途径。

5.3 调控鱼类 IFN 表达的基因

哺乳类 K_M 家族目前有#　个成员得到了鉴定["]+它们的功能各不相同+但是从病毒也编码与宿主 K_M 结构相似的病毒 K_M 可以看出细胞 K_M 蛋白在抗病毒免疫反应中的重要性。牙鲆 *IRF* 是鱼类最先克隆的 KMD 系统基因之一+编码蛋白具有保守的由五个色氨酸组成的特征性 D 端 ^D(结合区[*]。此外在河　[*#]和虹鳟[*]也分别鉴定出 *IRF* 基因+分子进化树分析证实它们都应该属于 *IRF#* 亚家族["]。*IRF#* 家族由 *IRF#* 和 *IRF*　组成+它们在调节 KMD 的表达发挥重要作用。虹鳟 *IRF*　是第一个鉴定的鱼类 *IRF*　基因[*]。

最近在哺乳类的研究表明+三个 K_M 家族成员 *IRF!*、*IRF2*、*IRF,* 与病毒对细胞的感染直接相关+其中 *IRF!* 和 *IRF,* 的作用尤为重要[*!]。*IRF!* 和 *IRF,* 在正常细胞中一般有少量的组成型表达+一旦细胞受到病毒感染+立即被磷酸

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

化激活并参与KMD和K.E的调控表达+ *IRF*,主要参与晚期KMD种类和K.E的调控表达。同时+ 由于病毒感染导致细胞产生KMD+新分泌的KMD又能反过来促进细胞*IRF*,的表达+ 因此*IRF*,的功能作用是一种正反馈调控机制[""+*!]。*IRF*,的作用可以合理解释病毒诱导细胞KMD时的启动现象+ 即在病毒诱导细胞KMD前加入少量KMD能促进细胞KMD的表达[#]+这是因为加入的KMD能使细胞中如*IRF*,等转录因子的大量表达[*]。

由于*IRF*,与哺乳类直向基因的同源性很低+ 而且与哺乳类*IRF*,同源性最高的鸡*chIRF*!虽然早就得到鉴定+ 但一直无法把它进行合理分类+ 以致有学者认为在鱼类可能不存在*IRF*,基因。因此+ 鲫鱼*CaIRF*,基因的成功鉴定具有很重要的意义。*CaIRF*,不仅是鱼类而且是整个低等脊椎动物鉴定的第一个*IRF*,基因+组织特异性表达和诱导表达分析发现*CaIRF*,与哺乳类具有相同的特性[#"]+这表明鱼类KMD的诱导表达以及K.E的表达调控机制可能与哺乳类具有相同的机制+同时也同样能够解释诱导鱼类培养细胞KMD时的启动现象[,]+而且也意味着在鱼类也存在*IRF*!的直向同源基因。

5.4 鱼类IFN系统潜在的抗病毒基因

病毒诱导的鱼类KMD的生物学特性研究表明+鱼类KMD的抗病毒机制也与哺乳类一致+即自身无杀灭或中和病毒的作用+必须通过受体介导的KMD信号通路激活抗病毒基因的表达+诱导细胞的抗病毒状态[#]。随着鱼类KMD基因、KMD信号通路基因的揭示+鱼类KMD系统的抗病毒基因也相继被成功鉴定。

*Mx*基因是最先得到鉴定的鱼类KMD系统基因。年+(7RANR和ZPRA:报道用..C技术筛选到代表虹鳟*IFI*2*、*IFI*2&、*IFI*2%、*ISG*#2等基因的3.]+但是没有克隆它们的全长@^D(序列进行最后的分析鉴定。另外+在药物诱导的金鱼肾损伤系统中鉴定了*ISG*#2基因[2]+通过基因组结构分析+也鉴定了斑马鱼和河 的*ADAR*基因[**]。以上的这些结果都是一些零星的报道+而且大多没有研究它们与KMD或病毒诱导的直接关系。但是+在紫外线灭活的E/CY诱导的/(G细胞系统中+不仅成功克隆了鲫鱼KMD基因+KMD信号传导基因+KMD表达的调控基因+同样也鉴定和克隆了在哺乳类KMD系统中已经被证明发挥抗病毒作用的重要基因+包括*Mx*#、*Mx*!、*PKR*、*Viperin*+ *IFI*2&、*IFI*2%、*ISG*#2等。由于这些基因是在病毒诱导的、能够产生KMD的/(G细胞中被同时鉴定+因此可以推测这些基因的表达与病毒感染和细胞KMD的表达直接关系。事实上+进一步的研究也表明这些基因不仅受病毒诱导表达+而且用/(G KMD诱导也能够快速表达+证实了它们就是鱼类KMD诱导的基因[&]。虽然还没有最终在体外证实这些基因表达产物的抗病毒功能+但是这些基因都在病毒感染后的细胞中增量表达+而且根据哺乳类的研究进展+表明它们可能的功能包括识别病毒信号、启动KMD合成、传递放大KMD信号到最终激活宿主细胞抗病毒状态形成等等。因此+可以合理推测鱼类KMD系统也利用与哺乳类相似的抗病毒蛋白来抑制病毒的复制、维持细胞的正常生理功能。

6 鱼类IFN系统和鱼类病毒病

包括鱼类病毒在内的几乎所有病毒都发展了一套免疫逃避机制。KMD系统是所有脊椎动物抵抗病毒入侵的第一道防线+因此寄生的病毒也相应发展了适应宿主KMD系统的各种策略。病毒性疾病不仅在鱼类而且在人类也是一个至今无法有效控制的世界性难题。长期以来+对鱼类病毒病的防治主要是使用病毒疫苗。近年来+第四代的核酸疫苗虽开辟了疫苗学的一个崭新领域+但是由于免疫效果不稳定+以及免疫机制、安全性问题在理论上还没有解决+因此大大限制了核酸疫苗的推广应用。抗病育种可能是解决鱼类病毒性疾病的最彻底的策略。然而通过种群内、间的抗病遗传力的差异性杂交的常规育种、主要基于细胞核移植技术的细胞工程育种都没有取得良好的效果。利用抗病毒基因进行抗病毒育种可能是又一种有效的尝试途径+然而由于缺乏可用的抗病基因+因此还很少有相关报道[*2]。

由于KMD具有广谱的抗病毒活性+不只对一种或几种病毒有作用+因此+早在 世纪& 年代就有利用鱼类粗制KMD和诱导剂'如UR7S K /)延滞或抑制病毒在鱼体内的复制、防治鱼类病毒病的报道[#]。邵建忠等[#"]和贾方钧等[*&]也证明草鱼和鲫鱼粗制干扰素能有效抑制E/CY在草鱼苗种中的繁殖和草鱼出血病的发生。另外+国内还有运用人KMDα蛋白防治草鱼出血病的报告+发现在培养细胞和鱼体对E/CY都有一定的抑制作用[*,]。同时还制备了相应的转人KMDα基因草鱼+并证明KMDα在鱼体内的表达随着发育时期的不同而有所变化[*2]。

以前的研究表明利用KMD基因或其他抗病毒基因制备抗病毒药物应用在鱼类病毒性疾病的防治应该说是有效的。从长远来看+利用广谱的抗病基因进行基因工程育种可能最有发展前途[ ]。因为一个病原体不可能是一成不变的+也处在进化之中+而且当今日益严重的环境恶化问题也可能改变病原体和宿主之间的"生态平衡"关系而加速变异。早期的转基因动物研究表明+转KMD基因的小鼠能增强抗病毒感染能力+但是体内分泌的过量KMD的长期作用也对小鼠产生了副作用+主要导致转基因动物的免疫系统疾病和不育[*%]。虽然如此+但也有少量较为成功的报道[*"]。鉴于KMD有种属特异性+因此应用KMD基因进行鱼类基因工程育种+就必须选用鱼类自身的KMD基因+而且还必须进行深入的论证研究。因为KMD是一种细胞因子+能诱导机体很复杂的免疫反应。在正常情况下+KMD的产生仅是在病毒感染等异常情况下的短时间表达+而转基因育种产生的转KMD基因鱼可长时间过量表达KMD+有可能导致鱼体自身免疫系统的紊乱或类似于转KMD小鼠不育等缺陷。

目前的研究表明+ KMD系统的某些抗病毒蛋白能特异性抵抗某种病毒的感染+如\a蛋白主要抗粘病毒的感染+而且有时不需要其他抗病毒蛋白的参与就能建立起细胞和机体对某些病毒的抗病毒状态[2]。因此+以草鱼出血病为例+如果能鉴定某种很有效的抗E/CY感染的免疫基因+然后进行基因工程育种可能比用KMD基因更为理想。但是+不管使用什么策略来探索鱼类的抗病研究+阐明鱼类机体和病毒感染互作机制是解决这一系列问题的基础和关键。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7　结语

综上所述+ 近来的关于鱼类 KMD 系统分子研究的重要进展不仅证明了鱼类 KMD 系统的存在+ 而且也表明鱼类细胞的抗病毒免疫反应和机制与哺乳类一致。同时+ 鱼类抗病毒免疫相关基因细胞模型的建立也为今后相关研究提供了一个可借鉴的方法。然而也应该看到+ 目前鱼类 KMD 系统的分子研究仅仅是在鉴定和克隆相关基因、信号调控网络以及功能推测方面取得突破[&] + 还需要更多的证据。虽然目前分离的基因可以根据哺乳类的研究成果进行的合理推论+ 描绘出一个完整的鱼类 KMD 抗病毒的信号传导和作用图谱+ 但这也仅仅是概括出了一个很粗的轮廓+ 中间的细节还需要进一步的研究补充证实。但是也应该相信+ 目前所分离的这些在哺乳类已经证实功能的鱼类待选抗病毒基因+ 其表达产物大多数应该是具有抗病毒功能的。如果能对它们的表达调控做比较深入的研究+ 对今后鱼类抗病毒药物的研制开发、以及利用基因工程技术进行抗病转基因鱼的育种研究将有重要的理论指导意义。

同时+ 相关研究也表明+ 在病毒感染后的鱼类细胞中+ 还发现许多新的病毒诱导表达的 KMD 刺激基因+ 这些基因在哺乳类也未见报道。这可能意味着鱼类 KMD 系统的抗病毒途径既与哺乳类有相似之处+ 也有自己的一些特点。事实上+ 哺乳类也在不断发现和证实新的抗病毒基因、以及更复杂的 KMD 系统的信号调控网络和功能[2#]。因此+ 对哺乳类 KMD 系统的抗病毒机制而言+ 依然还有许多未知的问题没有得到深入阐明+ 而对于鱼类 KMD 系统的分子研究来说+ 这还仅仅是迈出了第一步。

参考文献

V # W　B=5A: F G? F; 0 \? UQR:QPNNPN 6A N0;I6PN 6A 96N= 6A0PQ9PQRA V LW? *J Fish Sci China*, +7' !) ", —# #? V 张义兵+ 俞小牧? 鱼类 KMD 的研究进展? 中国水产科学+ +, ' !) ", —# #W

V W　B=5A: F G+ E;6 L M? .0;I6PN RA 6A0PQ9PQRA 6AI;@6>7P \a XQR0P6A RA 96N= V LW? *Virologica Sinica*+ + **16**' *) "#— "%? V 张义兵+ 桂建芳? KMD 诱导的鱼类 \a 蛋白? 中国病毒学+ #+ **16**' *) "#— "%W

V ! W　.05Qb E _+ -PQQ K \+ 1 677654 N G _+ *et al*? CRe @P77N QPNXRAI 0R 6A0PQ9PQRAN V LW? *Ann Biochem*? #""%+ **67** , — &*

V * W　.PA E / ? Y6Q; NPN 5AI 6A0PQ9PQRAN V LW? *Annu Rev Microbiol*+ # **55** 22— %#

V 2 W　.54;P7 / 3? (A06T6Q57 5@06RA R9 6A0PQ9PQRAN V LW? *Clin Microbiol Rev*+ #+ **14** , %— % "

V & W　B=5A: F G? /7RA6A: + 6IPA0696@506RA 5AI @=5Q5@0PQ6c506RA R9 @Q;@65A @5QX 6A0PQ9PQRA NSN0P4 :PAPN 6A @Q;@65A @5QX ' *Carassius auratus* Z?) V ^W? U=? ^? 0=PN6N R9 0=P / =6APNP 5@5IP4S R9 N@6PA@PN+ !? V 张义兵? 鲫鱼干扰素系统基因的克隆鉴定及其特征分析? 中国科学院理学博士学位论文+ !W

V , W　B=5A: F G+ .=6 F C+ E;6 L M? /RANOQ;@06RA R9 5A06T6Q57 N;>0Q5@06TP@ ^D(76>Q5QS R9 @;70;QPI 96N= @P77N V LW? *Acta Hydrobiologica Sinica*+ !+ **27**') ##! —##%? V 张义兵+ 石耀华+ 桂建芳? 鱼类培养细胞抗病毒基因差减 @^D(文库的构建? 水生生物学报+ !+ **27**') ##! —##%W

V %W　B=5A: F G+ B=5A: H F + 0; ^ H+ *et al*? KIPA0696@506RA R9 5A06T6Q57+ QP7P-T5A0 :PAPN 6A 0=P @;70;QPI 96N= @P77N 6AI;@PI >S 6A5@06T50PI T6Q;N V LW? *Chin Sci Bull*, !+ **48**' &) 2%#—2%%? V 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? 科学通报+ !+ **48**' 2) *2, —*&!W

V " W　B=5A: F G+C; / F+ B=5A: L+ *et al*? \R7P@;75Q @7RA6A: 5AI @=5Q5@0PQ6c506RA R9 @Q;@65A @5QX' *Carassius auratus* Z?) 6A0PQ9PQRA QP: ;750RQS 95@0RQ ,V LW? *Fish Shellfish Immunol*+ !+ **15** *2! —*&&

V# W　B=5A: F G+ E;6 L M? \R7P@;75Q @=5Q5@0PQ6c506RA 5AI KMD N6:A57 X50=-e5S 5A57SN6N R9 *Carassius auratus* /5.] ( ]# 6IPA0696PI 9QR4 0=P @;7-0;QPI @P77N 6A QPNXRAN0 0R T6Q;N 6A9P@06RA V LW? *Dev Comp Immunol*+ *+ **28** ##— ,

V ##W　B=5A: F G+ E;6 L M? KIPA0696@506RA 5AI PaXQPNN6RA 5A57SN6N R9 0e R KMD-6AI;@6>7P :PAPN 6A @Q;@65A @5QX' *Carassius auratus* Z?) V LW? *Gene*+ *+ **325** *! —2#

V# W　EQ5TP77 \+ \ 5Q7N>PA:PQ _ E? (XPQ45APA0 @P77 76AP 9QR4 0=P 950=P5I 46AARe' *Pimephales promelas*) V LW? *Ann NY Academy Sci*+ #"&2+ **126** 222—2&2

V# !W　L65A: F Z+ Z6 B H? .0;I6PN RA 6A0PQ9PQRA-76bP N;>N05A@P XQRI;@PI 6A T6Q;N-6A9P@0PI :Q5NN @5QX @P77 76APN V LW? *Chin J Virol*+ #""#+ **7**' #) ! —!2? V 江育林+ 李正秋? 病毒感染的草鱼细胞产生类干扰素物质的研究? 病毒学报+ #""#+ **7**' #) ! —!2W

V# *W　.=5R L B+ 065A: Z 0+ Z6 F Z+ *et al*? .0;I6PN RA 5A 5A06-=P4RQQ=5:6@ T6Q;N XQR0P6A 6NR750PI 9QR4 @;70;QP @P77 R9 :Q5NN @5QX V LW? *Chin J Virol*+ #""!+ **9**' *) !2 —!& ? V 邵建忠+ 项黎新+ 李亚南? 从草鱼细胞分离到一种抗出血病病毒蛋白因子的研究? 病毒学报+ #""!+ **9**' *) !2 —!& W

V#2W　.=5R L B+ 065A: Z 0? KA T6Q0R 6AI;@06RA R9 6A0PQ9PQRA RA :544 5Q 9QR4 *Ctenopharyngodon idelluss* 7P;@R@S0PN >S X=S0R5::7;06A6A V LW? *Oceanologia et Limnologiasinica*+ #+ **32** ##, —# *? V 邵健忠+ 项黎新? UC(体外诱导草鱼白细胞产生 γ 干扰素的研究? 海洋与湖沼+ #+ **32** ##, —# *W

V#&W　.=5R L B+ 065A: Z 0? K44;AR4RI;750RQS 9;A@06RA R9 :Q5NN @5QX ' *Ctenopharyngodon idellus*) 6A0PQ9PQRA V LW? *Acata Zoologica Sinica*+ #+ **47**' *) * *—*##? V 邵健忠+ 项黎新? 草鱼干扰素的免疫调节功能? 动物学报+ #+ **47**' *) * *—*##W

V#,W　C5ANPA L ^ 5AI U50Q5 . Z? KA;@06RA R9 0=P Q56A>Re 0QR;0 \C / @75NN K X50=-e5S I;Q6A: 5@;0P KCDY 6A9P@06RA V LW? *Immunogenetics*+ + **54** &2*—&&#

V#%W　(7045AA . \+ \ P77RA \ ]+ ^6N0P7 ^ Z+ *et al*? \R7P@;75Q 5AI 9;A@06RA57 5A57SN6N R9 5A 6A0PQ9PQRA :PAP 9QR4 0=P cP>Q596N= *Danio rerio* V LW? *J Virol*+ !+ **77** #"" —

V#"W　1 67NRA Y+L P99QPS N (L+ G5QQ6P U? (@R4X5Q6NRA R9 TPQ0P>Q50P 6A0PQ9PQ-RA :PAP 954 676PN IP0P@0PI >S =S>Q6I6c506RA e60= =;45A 6A0PQ9PQRA ^D(V LW? *J Mol Biol*+ #"%!+ **166** *2, —*, 2

V W　.05P=P76 U F; F-.+ EQR> _+ *et al*? (IR;>7P-NQ5AIPI _D(-6AI;@6>7P 96N= :PAP =R4R7R:R;N 0R 0=P 4;Q6AP 6A97;PAc5 T6Q;N QPN6N05A@P :PAP \a V LW? *Mol Cell Biol*+ #"%"+ **9** !##, —!# #

V #W　F5X 1 C+]5S (+ GQPAAPQ .+ YPAb50PN= G? \R7P@;75Q @7RA6A: R9 0=P X;99PQ96N= ' *Takifugu rubripes*) \a :PAP 5AI 9;A@06RA57 @=5Q5@0PQ6c506RA R9 60N XQR4R0PQ V LW? *Immunogenetics*+ !+ **53** , 2—,#!

V W　Z6; Z+ M; 8b6 -+ ^6aRA G+ *et al*? / 7RA6A: R9 5 ARTP7 Q56A>Re 0QR;0' *On-*

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

corhynchus mykiss) / / @=P4Rb6AP e60= 5 9Q5@057b6AP-7bP N057b 5AI 5]D] IP@RS QP@PXORQ ;N6A: @^D(9Q5:4PA0N @RA056A6A: (J-Q6@= P7P-4PA0NVLW? *Cytokine*+ +**17**') ,#—%#

V !W .=646c; D+ (Rb6] C6QRARK+]5b5N=645 M? (f;506@:PAR46@N N0PXN0R-e5QI 5 :QP50 9;0;QPV\W?]RbSR .XQ6A:PQ-TPQ75:+

V *W (7RANR \? ZPRA: L (? .;XXQPNN6TP N;>0Q5@06RA 76>Q5Q6PN 0R 6IPA06QS 6A-0PQ9PQRA-6AI;@6>7P :PAPN 6A 96N=VLW? *Mar Biotechnol*+ +**4**'#) ,*—%

V 2W Z6; \? _P64N@=;PNNP7 _+C5NNP7 G (? \R7P@;75Q @7RA6A: R9 0=P 96N= 6A0PQ9PQRA N064;750PI :PAP+#2 b^5'K.E#2) RQ0=R7R:;P 5 ;>6f;606A-7bP :PAP 6AI;@PI >S APX=QR0Ra6@ I545:PVLW? *Gene*+ +**298** # "—#!"

V &W `' M5QP77 /+Y5:=P96 D+/5A0RAAP0 \+*et al*? .;QTPS R9 0Q5AN@Q6X0 Pa-XQPNN6RA 6A _56A>Re 0QR;0 7P;bR@S0PN QPTP57N 5 458RQ @RA0Q6>;06RA R9 KMD-QPNXRAN6TP :PAPN 6A 0=P P5Q7S QPNXRANP 0R 5 _=5>IRT6Q;N 6A9P@06RA VLW? *J Virol*+ +**76** % * —% *"

V ,W 15A:] C+B=5A: F G+Z6 E H+*et al*? KA0PQ9PQRA 6AI;@06RA 6A @;70;QPI 96N= @P77NVLW? *Chin J Virol*+#""$ **15**'#) *!—*"? V王铁辉+张义兵+李戈强+等?鱼类培养细胞 KMD 的诱导?病毒学报+#""+ **15**'#) *!—*"W

V %W B=5A: F G+15A:] C+Z6 E H+*et al*? KAI;@6RA 5AI X5Q0657 @=5Q5@0PQ-6c506RA R9 /(G@P77'G75N0;75P 34>Q6RA6@ /P77 Z6AP R9 /Q;@65A /5QX) 6A0PQ9PQRAVLW? *Virologica Sinica*+ +**15**') #&!—#&"? V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的研究?中国病毒学+ +**15**') #&!—#&"W

V "W B=5A: F G+ 15A:] C? .0;I6PN RA 0=P NPAN606T60S R9 NPTPQ57 96N= @P77 6APN 0R T5Q6R;N 6A0PQ9PQRANVLW? *Transactions of Oceanology and Limnology*, +'!) #—2? V张义兵+王铁辉?几种鱼类培养细胞对不同干扰素敏感性的研究?海洋湖沼通报+ +'!) #—2W

V ! W /=6A --/+ /QPNNeP77 U? Y6XPQ6A'@6:2)+5A KMD-6AI;@6>7P 5A06T6Q57 XQR0P6A I6@P@7S 6AI;@PI >S =;45A @SOR4P:57RT6Q;NVLW? *Proc Natl Acad Sci USA*+ #+**98**' &) #2# 2—#2#!

V !#W 3NXPQQ Z+^P:R7N E+ERA:RQ5 /+*et al*? K.E +5 APe 6A0PQ9PQRA-6AI;@PI _D5NP NXP@696@ 9RQ N6A:7P-N0Q5AIPI _D(+ IP96APN 5A 570PQA506TP 5A06T6Q57 X50=e5S 5:56AN0 _D(EPAR46@ Y6Q;NPNVLW? *J Biol Chem*+ !+**278** #&#2#—#&#2%

V ! W]5456]+.=Q5=505 .+DR:;@=6]+*et al*+/7RA6A: 5AI PaXQPNN6RA R9 9750-96N='*Paralichthys olivaceus*) 6A0PQ9PQRA @^D(VLW? *Biochim Biophys Acta*+#""!+**1174**') #%—#%&

V !!W \5:RQ GE 5AI \5:RQ -3? 3TR7;06RA R9 P99P@0RQN 5AI QP@PX0RQN R9 6AA50P 644;A60SVLW? *Dev Comp Immunol*+ #+**25** &2#—&%

V !*W ZRA: .+1 67NRA \+GPA:0PA 3+*et al*? KIPA0696@506RA R9 5 @^D(PA@RI6A: @=5AAP7 @5096N= 6A0PQ9PQRAVLW? *Dev Conmp Immunol*+ *+**28** ",—###

V !2W ZP;L C+F5=.L+ZPP] M+/=R; / \+*et al*? /R4X7P0P :PAR46@ RQ:5A6-c506RA 5AI XQR4R0PQ 5A57SN6N R9 0=P QR;AF.XR00PI X;99PQ96N= L(-#+ L(- +L(-!+5AI]F- :PAPNVLW? *DNA Cell Biol*+ +**19** *!#—**&

V !&W `50PN (/+1R77>PQ: U+U5Q00 .L+*et al*? BP>Q596N= N050! 6N PaXQPNNPI 6A QPN0Q6@0PI 06NN;PN I;Q6A: P4>QSR:PAPN6N 5AI N050# QPN@;PN @S0Rb6AP N6:-A576A: 6A 5 .](]# IP96@6PA0 =;45A @P77 76APVLW? *Dev Dynam*+#""+ **215** !2 —!,

V !,W .;A: . /+M5A] L+/=R; / \+*et al*?EPAR46@ NOQ;@0;QP+PaXQPNN6RA 5AI @=5Q5@0PQ6c506RA R9 5 .](]2 =R4R7R:;P 9QR4 X;99PQ96N='*Tetraodon fluviatilis*) VLW? *Eur J Biochem*+ !+**270** !"—2

V !%W F5X 1 C+]5S (+GQPAAPQ .+YPAb50PN= G? \R7P@;75Q @7RA6A: R9 0=P X;99PQ96N='*Takifugu rubripes*) \a :PAP 5AI 9;A@06RA57 @=5Q5@0PQ6c506RA R9 60N XQR4R0PQ? *Immunogenetics*, !+**53** , 2—,#!

V !"W .@=6AI7PQ /+M; 0 F+K4XQR05]+*et al*? UQR0P6AN R9 0Q5AN@Q6X06RA 95@0RQ K.EM-! RAP :PAP PA@RIPN 0=P "#5AI %*-b^5 K.EM-! XQR0P6AN 0=50 5QP 5@06T50PI >S 6A0PQ9PQRA αVLW? *Proc Natl Acad Sci USA*+#"" +**89** ,%!&—,%!"

V* W F5>;]+C6QRNP C+C6QRAR K? *et al*? \R7P@;75Q @7RA6A: R9 5 ARTP7 6A0PQ-9PQRA QP:;750RQS 95@0RQ 6A L5X5APNP 97R;AIPQ+ *Paralichthys olivaceus* VLW? *Mol Mar Biol Biotechnol*+#""% **7** #!%—#**

V*#W _6@=5QINRA \ U+]5S G C+ER=G F+*et al*? \R7P@;75Q @7RA6A: 5AI :P-AR46@ NOQ;@0;QP R9 5A 6A0PQ9PQRA QP:;750RQS 95@0RQ PA@RI6A: :PAP 6A 0=P X;99PQ96N='*Fugu rubripes*) VLW? *Mar Biotechnol*+ #**3** #*2—#2#

V* W /R77P0 G+CRTPAN E / L+\5ccRA6 ^+*et al*? /7RA6A: 5AI PaXQPNN6RA 5A57SN6N R9 Q56A>Re 0QR;0 *Oncorhynchus mykiss* 6A0PQ9PQRA QP:;750RQS 95@0RQ #5AI 'K_M-#5AI K_M-)VLW? *Dev Comp Immunol*+ !+**27** ###—# &

V*!W G5QAPN G+Z;Q>SRT5 G+U60=5 U \? `A0=P QR7P R9 K_M 6A =RN0 IP9PANP VLW? *J Interferon Cytokine Res*+ +**22** 2"—,#

V**W .75TRT ^+/QAR:RQ5@ L;Q@PT6@] /750b \+*et al*? /R4X5Q506TP 5A57SN6N R9 0=P ^_(^((-0R-K _D(PI606A: :PAP 9QR4 454457N+X;99PQ96N= 5AI cP>Q596N=VLW *Gene*, +**250** 2!—&

V*2W /=PA Z 0+B=5A: 0 1+065R F F+*et al*? 3aXQPNN6RA R9 C;-KMD-α EPAP 6A]Q5AN:PA6@ EQ5NN /5QXVLW? *Journal of Hunan Agricultural University*'D50;Q57 .@6PA@PN)+ #**27**'!) #,,—#,%? V陈立祥+张学文+肖调义+等?人α-干扰素基因在转基因草鱼中的表达?湖南农业大学学报'自然科学版)+ #+**27**'!) #,,—#,%W

V*&W L65 M L+15A:] C+B=5A: F G+*et al*? UQP7646A5QS N0;IS RA XQPTPA06RA 5AI 0QP504PA0 0R :Q5NN @5QX =P4RQQ=5:65 e60= 6A0PQ9PQRAVLW? *Fisheries Sciences*+ +**19**'*) #—*? V贾方钧+王铁辉+张义兵+等?干扰素防治草鱼出血病的效果初探?水产科学+ +**19**'*) #—*W

V*,W M;.C+@=PA]+15A: ^ E+*et al*?]=P N0;IS R9 =;45A KMD α 6AI;@6A: 96N= b6IAPS @P77N QPN6N05A@P 0R =P4RQQ=5:6@ T6Q;N R9 :Q5NN @5QXVLW? *Acata Hydrobiologica Sinica*+#"""+**23**'#) " — "? V符少辉+陈韬+汪冬庚+等?人 KMD-α 诱导草鱼肾细胞对草鱼出血病毒抗性作用的研究VLW?水生生物学报+#"""+**23**'#) " — " W

V*%W Ke5b;Q5 F+(N5AR \+-5e5IP F? \57P 0Q5AN:PA6@ 4 6@P @5QQS6A: Pa0Q5 6A0PQ9PQRA :PAP 5QP ;A5>7P 0R 0Q5AN460 0=P PaR:PAR;N :PAP 0R 0=P6Q R99-NXQ6A:? *J Interferon Res*+#"%,+**7** , !

V*"W /=PA+0 B+F;A L .+15:APQ]3? 3A=5A@PI T6Q57 QPN6N05A@P 6A 0Q5AN:PA6@ 46@P PaXQPNN6A: 0=P =;45A >P05 # 6A0PQ9PQRA VLW? *J Virol*+#"%%+**62** !%%!—!%%,

V2 W C577PQ `+MQPNP \+-R@=N E? \a XQR0P6AN 4PI650RQN R9 6AA50P QPN6N-05A@P 0R _D(T6Q;NPNVLW? *Rev Sci Technol Off Int Epizootol*+#""% **17** —!

V2#W 16P75AI .M+YP:5 _ E+\ü77PQ Y _+*et al*? .P5Q@=6A: 9RQ 6A0PQ9PQRA-6AI;@PI :PAPN 0=50 6A=6>60 =PX50606N G T6Q;N QPX76@506RA 6A 0Q5AN:PA6@ 4R;NP =PX50R@S0PNVLW? *J Virol*+ !+**77** # ,—# !&

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net