

李 双, 向 涛, 周海峰, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF72 基因克隆、蛋白原核表达和抗体制备[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(14): 62–65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.014

# 鲤疱疹病毒 II 型 ORF72 基因克隆、蛋白原核表达和抗体制备

李 双<sup>1</sup>, 向 涛<sup>1</sup>, 周海峰<sup>1</sup>, 吴 霆<sup>1,2</sup>, 顾 伟<sup>1</sup>, 王 文<sup>1</sup>, 孟庆国<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院/江苏省水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏南京 210023;

2. 江苏省宝应县水生动物疫病预防控制中心, 江苏宝应 225800)

**摘要:** 异育银鲫作为我国重要的淡水经济鱼类, 其鳃出血病为主要病害, 并造成重大经济损失, 该病病原为鲤疱疹病毒 II 型 (cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)。目前, 研究主要在该病的检测和病理方面, 对于免疫学检测方面研究较少。本研究根据 CyHV-2 ORF72 基因序列设计了 1 对特异性引物, 利用患病异育银鲫肾脏 DNA 作为模板, 通过 PCR 扩增得到 CyHV-2 ORF72 基因全长, 该基因序列全长为 1 113 bp, 可编码 370 个氨基酸的蛋白。该基因与 pET-28a 表达载体连接构建重组原核表达载体 pET-ORF72 转入大肠杆菌中, 经 IPTG 诱导表达得到了分子量约为 45 ku 的重组蛋白, 与预测的蛋白大小基本一致。将纯化的重组蛋白皮下多点注射免疫新西兰大白兔制备了 ORF72 的多克隆抗体, 经 Western Blotting 检测抗体能与病毒粗提液有良好反应, 特异性较好, 本结果可为下一步建立疫苗和免疫检测方法奠定基础。

**关键词:** 异育银鲫; 鲤疱疹病毒 II 型; ORF72; 多克隆抗体; Western Blotting

**中图分类号:** S941.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0062-04

鲫鱼是江苏省重要的大宗淡水养殖品种之一, 在淡水养殖业中具有重要地位<sup>[1-3]</sup>。在江苏省鲫鱼精养面积达 533.3 km<sup>2</sup> 以上, 2011 年产量达 54.80 万 t, 产值约 80 多亿

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 渔业重大技术集成与示范推广项目 (编号: D2015-13-5)。

作者简介: 李 双 (1990—), 女, 山东惠民人, 硕士, 研究方向为异育银鲫鳃出血病的预防和控制。E-mail: jsws19661314@163.com。

通信作者: 孟庆国, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事水生动物病害和免疫学研究。E-mail: mlzzcld@aliyun.com。

以南泥湾野生山丹丹的鳞茎进行组培快繁得出以下结论: 较佳启动培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.01 mg/L + AC 2 mg/L, 此时出芽率达到 84%; 较佳继代培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L, 增殖系数达到 7.3; 较佳生根培养基为 1/2MS + IBA 0.3 mg/L, 生根率为 84%。以上培养基均附加白砂糖 30 g/L、琼脂 5.5 g/L, pH 值均为 6.8。用继代培养的山丹丹组培苗炼苗移栽成活率能达到 100%。

## 参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 姚连芳, 刘荷芬. 野生观赏植物山丹丹及其引种栽培[J]. 中国野生植物资源, 2004(5): 63–64.
- [3] 李小英, 王文和, 赵剑颖, 等. 百合白天使与山丹远缘杂交胚胎发育的细胞学研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 256–262.
- [4] 刘冬云, 史宝胜, 李银华, 等. 不同碳源及 PP<sub>333</sub>、GA<sub>3</sub> 对山丹丹组

元, 居全国首位。随养殖集约化程度的增高、养殖密度的增大以及养殖水环境的恶化, 鲫鱼的病害问题也日益突出, 目前已成为威胁鲫鱼养殖业健康发展的主要因素。在这些病害中, 主要以近几年发生的鳃出血病最为严重。经检测确认, 引起这种疾病的病原是鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2), 该病毒的宿主范围较窄, 仅感染金鱼、鲫鱼和它们的变种<sup>[4-5,8]</sup>, 致死率可高达 90%~100%<sup>[4]</sup>, 给水产养殖业造成严重危害。

CyHV-2 首次发病是在日本养殖的金鱼中<sup>[9]</sup>, 目前该病在美国<sup>[4-5]</sup>、澳大利亚<sup>[5]</sup>、我国台湾省<sup>[8]</sup>、英国<sup>[10]</sup>等地均有发生, 其流行情况分布全球。2011—2012 年, CyHV-2 导致我国养殖的异育银鲫 (*Carassius gibelio*) 出现严重死亡, 也是我

- 苗鳞茎增大的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 2(2): 32–35.
- [5] 刘冬云, 孟庆瑞, 郭庭杰, 等. 山丹启动培养中生理生化特性的研究[J]. 中国农学通报, 2005(7): 204–206, 212.
- [6] 齐向英, 陈宗礼, 薛 皓, 等. 陕北野生山丹丹组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2011(22): 115–117.
- [7] 马永红. 野生山丹丹组培快繁的研究[J]. 园林科技, 2007(1): 11–14.
- [8] 刘冬云, 杜鸿云, 王进茂, 等. 野生山丹丹启动培养研究[J]. 河北林果研究, 2005(3): 289–290, 293.
- [9] 刘冬云, 梁海永, 史宝胜, 等. 野生山丹的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 641.
- [10] van Aartrijk J. Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb scale tissue *in vitro*, in relation to duration of bulb storage and cultivar[J]. Scientia Horticulturae, 1981, 14(3): 261–268.
- [11] 张俊秀. 百合组培苗生根培养基配方的筛选[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(12): 124–125.

国大陆异育银鲫发生该病的首次报道<sup>[11]</sup>。而 2013 年在江苏、北京、武汉、广州等地养殖的异育银鲫中也被检测出了 CyHV-2,说明 CyHV-2 在我国已有较为广泛的分布<sup>[12]</sup>。

CyHV-2 又称金鱼造血器官坏死病毒 (goldfish haematopoietic necrosis virus, GFHNV)<sup>[3,5,13-14]</sup>、疱疹病毒性造血器官坏死症病毒 (herpes viral haematopoietic necrosis virus, HVHNV)<sup>[5,9]</sup>。该病毒是第 2 个从鲤科鱼中分离出的病毒,因此,国际病毒系统分类与命名委员会命名其为鲤疱疹病毒 II 型 (cyprinid herpesvirus II, CyHV-2)<sup>[3,14]</sup>,与鲤痘疮病毒 (carp pox herpesvirus, cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) 统称为“鲤科鱼疱疹病毒目的 3 个型”。目前,对该病毒的研究还处于初级阶段,世界动物组织 (OIE) 还未将其纳入检疫目录<sup>[12]</sup>。CyHV-2 为一种线型的双链 DNA 病毒,包含 156 个开放阅读框 (ORF)<sup>[1]</sup>,成熟的病毒粒子外有一层包膜,呈圆形或椭圆形,直径可达 0.175~0.200  $\mu\text{m}$ <sup>[15]</sup>。目前,对该病毒的检测方法和病理学方面的研究较多,而对其病毒的研究仍较少。分子生物学诊断方法主要是普通 PCR、荧光定量 PCR、环介导等温扩增等,另外还有细胞培养,电镜观察检测法等。然而,该病毒的免疫学研究还很少,CyHV-2 抗原蛋白的表达和抗体制备处于萌芽阶段。抗原蛋白表达和抗体制备对于有效预防和治疗该病毒至关重要,可为以后该病毒相应疫苗的商业化生产打下坚定地基础。本研究对 ORF72 基

表 1 CyHV2-ORF72 原核表达所用引物序列

引物	序列(5'→3')	内切酶
CyHV-2-72F	CAAGAATTCATGTACGGCTTAAACAACGC	EcoR I + Xho I
CyHV-2-72R	ATGCTCGAGGTTGAATGAATGTATGATGCC	

#### 1.4 CyHV-2 ORF72 基因扩增

使用 DNA 提取试剂盒,根据说明书操作步骤提取患病异育银鲫肾脏总 DNA 作为扩增模板。25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系:灭菌双蒸水 9.5  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各自 1  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,Prime star Max Premix (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为:98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 5 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。将扩增完的 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.5 重组质粒的构建、转化及筛选

将扩增的目的片段和 pET-28a 运用 Xho I 和 EcoR I 限制性内切酶进行双酶切后,1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,使用胶回收试剂盒对 DNA 进行回收和纯化。之后 T<sub>4</sub> 连接酶将两者连接构成重组质粒 pET-ORF72。将重组质粒转化入感受态细胞 *E. coli* Trans1 T1 中,经 PCR、酶切鉴定和测序以确定读码框正确无误。

#### 1.6 重组质粒的原核表达及重组蛋白的纯化

将筛选出测序正确的阳性重组质粒 pET-ORF72 转化到表达感受态细胞 *E. coli* BL21 中,培养至  $D_{600\text{nm}}$  为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 诱导剂诱导培养 6 h,离心收集菌液,经超声波破碎裂解后离心出上清和沉淀,分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,最后采用 His-tag 亲和层析柱按照说明书步骤对目的蛋白进行纯化。

#### 1.7 Western blot 检测

将病毒粗提液先进行 SDS-PAGE 电泳;然后取出凝胶

因进行原核重组表达,并构建了重组表达载体 pET-ORF72,且在新西兰大耳兔中制备了该重组蛋白的多克隆抗体,为病毒的防治提供了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 载体、菌株及病毒来源

pET-28 原核表达载体,购自 Novagen 公司,于笔者所在实验室保存。大肠杆菌感受态细胞 Transetta (DE3),购自 Trangen 生物公司。CyHV-2 病毒从患有明显鳃出血病症的异育银鲫中分离纯化获得,且 CyHV-2 PCR 检测阳性。

### 1.2 试验试剂

DNA 纯化回收试剂盒 (DNA Gel Extraction Kit)、Prime star Max Premix (2 $\times$ )、DL2 000 DNA Marker、Taq DNA 聚合酶,均购自 Tiangen 生物公司。Xho I 和 EcoR I 限制性内切酶、T<sub>4</sub> 连接酶,均购自 TaKaRa 生物公司。2 种弗氏佐剂 (完全和不完全),购自 Sigma 公司,DNA 蛋白分子标准,购自 Fermentas 公司;胰蛋白胨,购自 Solarbio 公司;考马斯亮蓝,购自南京建成生物工程研究所;高纯质粒小量制备试剂盒,购自北京百泰克生物科技有限公司;LB 营养琼脂,购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

### 1.3 引物的设计与合成

根据 CyHV-2 ORF72 基因序列,利用 Oligo 6 软件设计的引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成 (表 1)。

置于缓冲液中平衡 10~15 min;剪出和胶同等大小的 PVDF 膜和滤纸,用甲醇浸润膜 20 s,再用无菌水浸洗 2 min,再与滤纸一起放转移平衡液中平衡 20 min;负极向正极转膜,按顺序放置好 3 层滤纸、凝胶、3 层 PVDF 膜,注意避免产生气泡;将组装好的槽装入转移装置后加入充足转移缓冲液,冰浴条件下 250~300 mA 转移 90~100 min;转膜结束后取出 PVDF 膜置于平皿中,用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h;用 TBST 每隔 10 min 洗 1 次,共洗 4 次后加入 ORF72 多克隆抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;再用 TBST 同上洗涤 4 次后加入 HRP 标记的羊抗兔抗体室温下孵育 1 h;洗涤 4 次后用显色剂显色后将膜放入双蒸水中终止反应,最后用凝胶成像仪进行曝光。

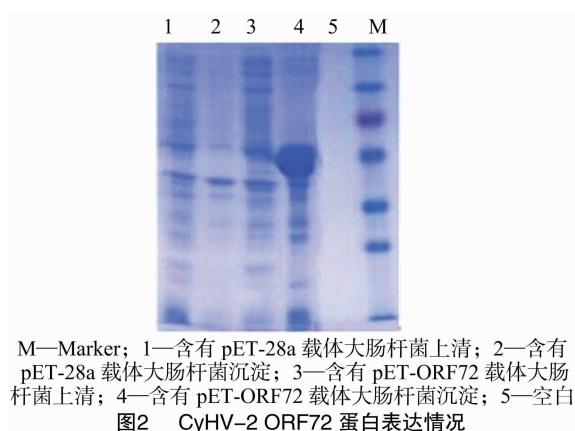
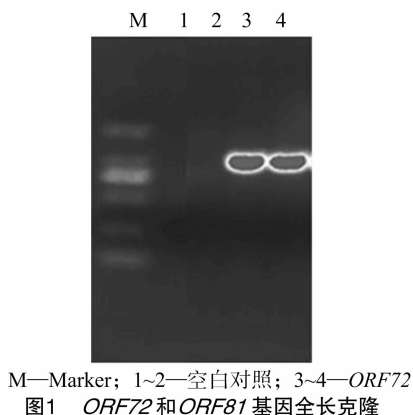
## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的 PCR 扩增

利用患病异育银鲫肾脏提取的 CyHV-2 DNA 作为扩增模板,使用设计的相应特异性引物 (表 1),通过 PCR 扩增得到 CyHV-2 ORF72 目的基因。CyHV-2 ORF72 基因序列全长为 1 113 bp,其长度和预期一致 (图 1)。

### 2.2 CyHV-2 ORF72 重组蛋白的表达

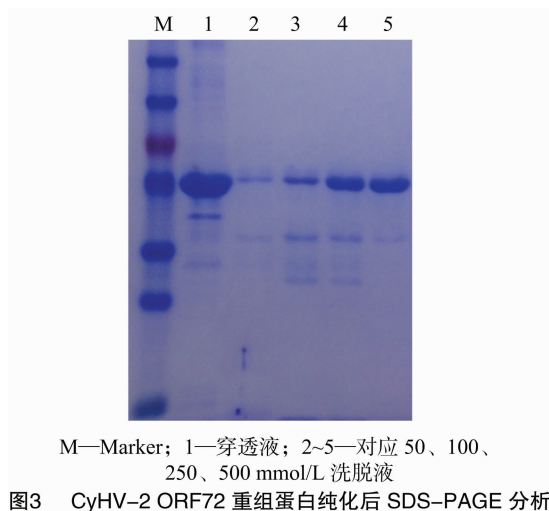
将构建好的重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞 BL21 中,诱导剂 IPTG 诱导后使其终浓度为 238.30 mg/L,继续培养细菌 6 h 后超声破碎离心出上清和沉淀后,进行 SDS-PAGE 凝胶分析。由图 2 可知,重组融合蛋白 ORF72 表达明显,可诱导出分子量约为 45 ku (1 u = 1 g/mol) 的重组蛋白,与



预测蛋白大小基本一致;在没有 IPTG 剂诱导时,目的蛋白不表达。

### 2.3 CyHV-2 ORF72 重组蛋白的纯化

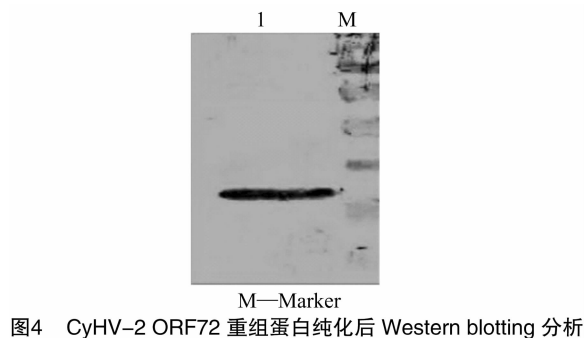
利用亲和层析法对重组表达的 CyHV-2 ORF72 蛋白进行纯化,将收集到的穿透液和洗脱液进行 SDS-PAGE 凝胶分析(图 3)。目的蛋白进行纯化后浓度较高,且分子量为 45 ku 处得到单一条带。



### 2.4 CyHV-2 ORF72 纯化蛋白多克隆抗体的 Western blot 验证

利用纯化的原核重组 ORF72 蛋白,与佐剂等量混合后分

4 次腹部皮下多点注射免疫新西兰大耳兔,每次间隔 1 周,以制备 ORF72 的多克隆抗体,并利用 Western blotting 方法检测纯化的 ORF72 的多克隆抗体效果,结果显示制备的多克隆抗体能与病毒粗提液有良好的反应。由图 4 可知,其特异性好,可见单一条带,为后续建立免疫检测方法奠定了一定基础。



## 3 讨论

异育银鲫具有生长快、食性杂、易饲养、肉质鲜美、蛋白质丰富等优点,受到广大消费者的青睐,成为主要淡水经济鱼类。随着养殖密度的加大和水环境的管理欠缺,病害发生越来越多,制约了异育银鲫的发展,影响了社会效益。异育银鲫的常见病害主要有细菌性疾病,如细菌性败血症<sup>[16]</sup>等;真菌性疾病,如水霉病<sup>[17]</sup>等;寄生虫病,如黏孢子虫病<sup>[18]</sup>等。近年来,异育银鲫出血病发病频繁,成为其主要病害。2011 年至今,鲫出血病以极快的速度蔓延,发病死亡面积已达到约 66.67 km<sup>2</sup>,造成的经济损失已达数亿元。2012 年<sup>[11]</sup>和 2013 年<sup>[2]</sup>经现场诊断调查与实验室病原分离与鉴定研究,获得人工感染试验、组织病理学、超薄切片电镜观察、分子诊断、病毒培养等关键性试验数据,确认近年在我国江苏大部分地区暴发的养殖鲫鱼出血病为疱疹病毒性造血器官坏死症,其病原为鲤疱疹病毒 II 型(CyHV-2)。

目前,病毒检测的主要手段为 PCR, CyHV-2 的 PCR 检测方法已有环介导等温扩增<sup>[20]</sup>、微滴式数字快速 PCR 检测方法<sup>[21]</sup>、双重快速 PCR<sup>[22]</sup>、Taqman 实时荧光 PCR<sup>[23-24]</sup>。另外,薛忠仪等运用 chelex 建立了一种快速检测该病毒的 PCR 方法<sup>[17]</sup>。除 PCR 检测法外,还有电镜观察、细胞培养的方法去检测病毒的存在。电镜观察法比较直观,能够直接看到患病鱼体组织内病毒的有无。Jung 等通过电镜技术首次观察到了患病金鱼脾、肾组织细胞中感染的 CyHV-2 粒子<sup>[9]</sup>;Groff 等采用电镜观察濒死金鱼幼鱼的鳃和肾组织的超薄切片,也证实了感染细胞内 CyHV-2 粒子的存在<sup>[10]</sup>;Chang 等通过电镜技术也在濒死的金鱼组织细胞内观察到 CyHV-2 粒子<sup>[8]</sup>。Wang 等通过电镜发现在肝和脾能观察到最明显的组织病理学变化<sup>[10]</sup>。Wu 等通过电镜也发现了患病鱼肾、脾、肝、鳃、肠道等组织的不同损伤和坏死<sup>[2]</sup>。细胞培养技术目前用到的不多,由于 CyHV-2 通过细胞培养繁殖几代后就失去其活性,所以很难在鱼类病毒分离常用的细胞系中进行增殖传代,一般传 3~4 代就会失去活性,马杰等建立了鲤疱疹病毒 II 型敏感的异育银鲫脑组织细胞系, CyHV-2 在 GiCB 细胞上连续传代到第 6 代仍可检测到病毒核酸且病变稳定<sup>[25]</sup>。

目前,对 CyHV-2 的免疫学检测相关的研究还较少,因此免疫学研究更有意义,可筛选出病毒相关蛋白制备出相应抗体,为病毒疫苗的商业化生产奠定基础,能够有效解决病毒的危害问题。彭俊杰等原核表达了 ORF25 蛋白及制备了其单克隆抗体<sup>[15]</sup>;周勇等原核表达了 ORF4 蛋白并制备了其多克隆抗体,并用 ELISA 和间接免疫荧光检测了抗体可以和该病毒良好地特异性结合<sup>[3]</sup>;廖红等成功克隆了 ORF5 截短基因并且成功原核表达出蛋白,通过攻毒实验证实了该融合蛋白具有一定的免疫原性<sup>[1]</sup>。本研究利用 CyHV-2-ORF72 基因设计出其特异性引物进行了基因的克隆、蛋白的表达和纯化试验,并且利用新西兰大白兔制备了多克隆抗体,并且经 Western blotting 分析可见其特异性良好。本试验的表达系统为原核表达载体 pET-28a 和大肠杆菌,该系统与其他系统相比具有很高的表达效率,能够良好地表达出目的蛋白,运用的大肠杆菌具有周期短、易培养、成本低廉等优点<sup>[26]</sup>。本试验成功表达出 ORF72 蛋白,并且利用该纯化的蛋白免疫新西兰大白兔获得了抗体,为下一步组装 ELISA 试剂盒和 CyHV-2 免疫胶体金试纸条奠定了基础,同时也为探讨重组表达的 ORF72 蛋白是否能作为疫苗使用奠定了基础,有利于对该病毒疫苗进行商业化大规模生产,可加快对 CyHV-2 病毒的免疫学检测办法实践于养殖异育银鲫的农业生产中,养殖户在养殖过程中可便利准确检测该病原,并且能高效地进行室内室外自身检测病原,这对于及时发现及治疗鳃出血病,减少异育银鲫养殖业及水产行业的损失,具有重大意义。

#### 参考文献:

- [1] 廖红,林华,郝中香,等. 鲤疱疹病毒 2 型 ORF5 截短基因的克隆表达及免疫原性研究[J]. 中国兽医科学,2016(11):1394-1400.
- [2] Wu T, Ding Z F, Ren M, et al. The histo- and ultra- pathological studies on a fatal disease of Prussian carp (*Carassius gibelio*) in mainland China associated with cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) [J]. Aquaculture, 2013, 412(6): 8-13.
- [3] 周勇,范玉顶,徐进,等. 鲤疱疹病毒 II 型 ORF4 基因的克隆、表达与免疫学检测方法[J]. 淡水渔业, 2017, 47(1): 61-65.
- [4] Goodwin A E, Khoo L, Lapatra S E, et al. Goldfish hematopoietic necrosis herpesvirus (cyprinid herpesvirus 2) in the USA: molecular confirmation of isolates from diseased fish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2006, 18(1): 11-18.
- [5] Stephens F J, Raidal S R, Jones B. Haematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus [J]. Australian Veterinary Journal, 2004, 82(3): 167-169.
- [6] Luo Y Z, Lin L, Liu Y, et al. Haematopoietic necrosis of cultured Silver prussian carp (*Carassius gibelio*) associated with cyprinid herpesvirus [J]. Journal of Fish Diseases, 2013, 36(12): 1035-1039.
- [7] Xu J, Zeng L, Zhang H, et al. Cyprinid herpesvirus 2 infection emerged in cultured gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, in China [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(1/2): 138-144.
- [8] Chang P H, Lee S H, Chiang H C, et al. Epizootic of herpes-like virus infection in goldfish, *Carassius auratus* in Taiwan [J]. Fish Pathology, 1999, 34(4): 209-210.
- [9] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(3): 211-220.
- [10] Jeffery K R, Bateman K, Bayley A, et al. Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus* (L.), in the UK [J]. Journal of Fish Diseases, 2007, 30(11): 649-656.
- [11] Wang L, He J, Liang L, et al. Mass mortality caused by cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in prussian carp (*Carassius gibelio*) in China [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2012, 32(5): 164-173.
- [12] 李莉娟, 罗杨志, 刘学芹, 等. 金鱼鲤疱疹病毒 II 型的分子诊断 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(1): 92-96.
- [13] Jung S J, Miyazaki T. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 18(3): 211-220.
- [14] 薛中仪, 朱春艳, 王瑶, 等. 一种鲤科疱疹病毒 II 型的 PCR 快速检测方法 [J]. 水产养殖, 2015, 36(7): 45-48.
- [15] 彭俊杰, 张琪, 贾路路, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 (CyHV-2) ORF25 蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 96-101.
- [16] 李振言. 鱼类细菌性败血症及其防治技术 [J]. 科学养鱼, 2004(1): 46-46.
- [17] 张书俊, 杨先乐, 李 聃, 等. 施氏鲟水霉病原的初步研究 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 89-96.
- [18] 徐海圣, 王淑霞, 吴惠仙, 等. 异育银鲫寄生黏孢子虫病的研究 [J]. 浙江大学学报(理学版), 1997(3): 259-264.
- [19] Ma J, Jiang N, Lapatra S E, et al. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 315-325.
- [20] Zhang H, Zeng L B, Fan Y D, et al. A Loop-Mediated isothermal amplification assay for rapid detection of cyprinid herpesvirus 2 in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. The Scientific World Journal, 2014(1): 1-6.
- [21] 郝中香, 林华, 余容, 等. 鲤疱疹病毒 2 型微滴式数字 PCR 快速检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学, 2016(2): 167-173.
- [22] 罗丹, 梁利国, 谢骏, 等. 2 型鲤疱疹病毒双重 PCR 快速检测方法的建立及应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(5): 379-382.
- [23] 于力, 王津津, 史秀杰, 等. 鲤科疱疹病毒 2 型 Taqman 实时荧光 PCR 方法的建立 [J]. 中国动物检疫, 2015(10): 80-84.
- [24] 周勇, 曾令兵, 张辉, 等. 鲤疱疹病毒 II 型 TaqMan real-time PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 水产学报, 2013, 37(4): 607-613.
- [25] Ma J, Jiang N, Lapatra S E, et al. Establishment of a novel and highly permissive cell line for the efficient replication of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) [J]. Veterinary Microbiology, 2015, 177(3/4): 315-325.
- [26] 乔宁, 李美芹, 刘永光, 等. 番茄黄化曲叶病毒 CP 基因的原核表达载体构建选择 [J]. 安徽农业科学, 2012(7): 3901-3902, 3905.
- [27] 王世会, 贾智英, 李池陶, 等. 锦鲤疱疹病毒 ORF72 基因克隆及结构功能分析 [J]. 水产学杂志, 2016, 29(3): 9-15.