

石斑鱼神经坏死病毒 RNA 干扰的 转染条件优化与效果分析

黄桂菊^{1,2}, 喻达辉¹, 柳明¹, 潘俐玲¹, 王晓宁¹, 曾令兵², 龙华²

(1 农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室, 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;
2 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室,
中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要:克隆了石斑鱼神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)的衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因序列并构建了绿色荧光蛋白(EGFP)基因与MCP基因的融合真核表达载体pEGFP-MCP, 设计了3对针对MCP基因序列的小片段干扰性RNA(Small interfering RNA, siRNA)序列(NNV-001、NNV-002、NNV-003), 开展了转染方法、转染剂量与转染效果的研究, 用脂质体转染法将pEGFP-MCP和不同剂量的siRNA共转染导入黑头呆鱼肌肉(FHM)细胞。结果表明, 用无血清培养基转染、4~6 h后换液的转染方法, 比不换液、只将转染混合物代替同体积培养基的转染方法效率高; 当质粒的转染量为50、70、100和150 ng时, 100 ng的转染量为最合适; 在pEGFP-MCP与siRNA共转染组, 3对siRNA序列都有干扰效果, 均能干扰绿色荧光蛋白的表达, 其中NNV-002效果最好。当siRNA终浓度为200 nmol/L时, 显示出了较好的沉默效果。

关键词:石斑鱼; 神经坏死病毒; 衣壳蛋白基因; RNA干扰

中图分类号:S917.4

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)02-0093-06

Preliminary Study on RNA Interference Against Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus-Optimization of Transfection Condition and Comparison of Interference Effect Based on FHM Cell

HUANG Gui-ju^{1,2}, YU Da-hui¹, LIU Ming¹, PAN Li-ling¹,
WANG Xiao-ning¹, ZENG Ling-bing², LONG Hua²

(1 The Key Lab of Mariculture, Ecology and Quality Control, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2 The Key Lab of Freshwater Fish Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture, The Key Lab of Freshwater Ecology and Healthy Aquaculture, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Grouper is one of the most valuable commercial marine fish and viral nervous necrosis (VNN) is the most harmful disease of this fish. Capsid protein (major capsid protein, MCP) of NNV is a major pathogenic factor and currently there is no effective drug available for its treatment. This paper is intended to provide a preliminary study of the RNAi control technology for NNV. The grouper nervous necrosis virus MCP gene was cloned and eukaryotic expression vector pEGFP-MCP was constructed with a green fluorescent protein (EGFP) fusion gene and the MCP gene. Three pairs of siRNA (NNV-001, NNV-002, NNV-003) a-

收稿日期:2010-05-25

作者简介:黄桂菊(1978—),女,助理研究员,硕士,E-mail:xaxhgi@126.com;通信作者:喻达辉(1963—),男,研究员,博士,E-mail:pearlydh@163.com

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2007TS02);农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题(LFB20070610);中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题(2007FEA0214)

against the gene sequence designed, were transfected into FHM cells (muscle cells of fathead minnow) with Lipofectamine2000 in order to detect EGFP expression and comparison of transfection method, dose and efficiency. The results showed that the transfection efficiency with serum-free medium after 4–6 h is higher than the rate of transfection with mixture medium. 100 ng was found to be the most appropriate amount when the plasmid was transfected with 50, 70, 100 and 150 ng respectively. In the cotransfection of siRNA and pEGFP, all of the three pairs of siRNA sequences had interference effects on EGFP expression and pair 002 was found to be the best. Better interference effects were obtained at the siRNA concentration 200 nmol/L.

Key words: grouper; the fish viral nervous necrosis; major capsid protein gene; RNA interference

鱼类病毒性神经坏死病 (Viral nervous necrosis, VNN) 是由 β 型诺达病毒 (Betanodavirus) 引起的传染性疾病, 仔、稚鱼易受感染, 成鱼也可受害, 其死亡率达到 90% 以上, 甚至 100%^[1-2]. 诺达病毒是一类细小的 RNA 病毒, 病毒粒子呈二十面体结构, 大小为 25 ~ 30 nm, 核酸的 3' 端无多聚腺嘌呤 (Poly A) 结构. 病毒由衣壳和核心 2 部分组成, 无囊膜. 衣壳由 180 个衣壳亚单位组成, 核心由 2 条正义 RNA 单链 (RNA1 和 RNA2) 组成, 基因组大小为 4.5 kb 左右. RNA1 的大小约为 3.0 ~ 3.2 kb, 主要编码非结构 A 蛋白, 是一种依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependant RNA polymerase, RdRp), RNA2 大小约为 1.3 ~ 1.4 kb, 编码病毒主要衣壳蛋白 (Major capsid protein, MCP) 的前体蛋白^[3-5]. 到目前为止, 该病毒已在除非洲以外的其他各大洲的 30 多种重要经济鱼类中发现^[6-7]. 然而鱼类病毒病目前还没有什么特效药, 而 RNA 干扰技术也许是其克星. RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 介导同源 mRNA 降解的现象^[8]. 外源或内源的双链 RNA 进入细胞后, 被 RNase III 家族核酸酶 (Dicer, DCR) 以 ATP 依赖的方式切割成长约 21 ~ 24 个核苷酸的小片段, 即小片段干扰 RNA 分子 (siRNA)^[9]. siRNA 与某些作用因子结合形成无活性的 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC). RISC 与靶 mRNA 结合并在核酸内切酶 Ago-2 的作用下在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA, 将其降解, 完成 siRNA 介导的 RNAi 过程^[10]. 由于 RNAi 具有高度的序列专一性, 可以特异地使特定基因沉默, 使其功能丧失或降低, 因此设计针对抑制某个已知基因的 siRNA, 导入细胞或机体, 观察该基因的表达水平是否下降或完全抑制, 从而抑制该基因的功能^[11]. 因此 RNAi 可以作为基因治疗的一种工具, 并已经在某些重大病毒性传染疾病上取得了一定成效, 如甲肝病毒^[12]、乙肝病毒^[13]、登革热病

毒^[14]、SARS 病毒^[15] 等. 本试验对石斑鱼神经坏死病毒病的 RNAi 防治技术进行了初步研究, 为该病毒病防治的新途径奠定技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

FHM 细胞 (Muscle cell of fathead minnow) 由农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室保存, 培养于 28 °C; 脂质体 Lipofectamine™ 2000 和培养基 Opti-MEM I 用于细胞转染, 为 Invitrogen 公司产品; 增强型绿色荧光蛋白质粒 pEGFP-N3 和大肠杆菌 DH5 α 由农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室保存; 无内毒素质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品; 限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、pMD18-T 和 *Taq* DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品. 其他药品和试剂均为国产分析纯.

1.2 MCP 基因的克隆及真核表达载体 pEGFP-MCP 的构建

以赤点石斑鱼病脑组织 cDNA (中国水产科学研究院南海水产研究所鱼病室保存) 为材料, 根据 GenBank 中的 NNV-MCP (AF534998、AY744705、NC_004136、AF245004) 相对保守区设计特异引物, 从编码病毒 MCP 基因 ORF 的起始位点 AUG 至终止位点 UAA 设计了 1 对引物 (不包括终止位点), 引物序列如下:

NNVF 5'-CGCAAGCTTGGATGCTACGCAAAGGT-GAG-3';

NNVR 5'-CAGAATTCGAGTTTCCGAGTCAAC-CCTGGT-3'.

引物间距约 1 014 bp, 其中 NNVF 和 NNVR 的 5' 端的 CGC 和 CA 均为加入的保护性碱基, 并分别加入了 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切识别序列 (下划线部分), 为保证读码框正确在酶切位点后添加了 2 个碱基

(阴影部分). 引物由上海英骏生物技术公司合成. PCR 扩增产物 NNV-MCP 与 T 载体连接后, 转化至感受态细胞 DH5 α , 筛选阳性克隆并送上海英骏生物技术公司进行序列测定.

回收 NNV-MCP 的 PCR 产物和质粒 pEGFP-N3, 分别进行 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切, 再用琼脂糖凝胶分别进行回收. 回收的 PCR 酶切产物和 pEGFP-N3 进行连接反应, 得到 pEGFP-MCP 重组质粒. 重组质粒带有 EGFP 绿色荧光蛋白报告基因, 可以方便在荧光显微镜下观察转染效果.

1.3 siRNA 序列设计

根据 MCP 基因序列, 利用 Ambion 公司 (<http://www.ambion.com>) 提供的在线工具进行 siRNA 序列设计. 共设计 3 对 siRNA 序列 (NNV-001、NNV-002、NNV-003), 通过网上 BLAST 确保所选序列与其他相关基因没有相似性. 同时设阴性对照和阳性对照 (si-EGFP, 针对 EGFP 基因的 siRNA). 所有序列由锐博生物科技有限公司进行化学合成.

1.4 质粒转染剂量的筛选

将生长状态良好的 FHM 细胞消化计数后, 按照每孔 5×10^5 个细胞接种于 96 孔板中. 待细胞生长状态稳定, 融合率在 90% 左右时, 进行转染试验, 每个剂量都是重复 3 个孔. 为避免内毒素对细胞的损害, 转染用的质粒均要用无内毒素质粒提取试剂盒提取. 转染剂 Lipofectamine 2000 脂质体用量均为 0.25 μ L, 质粒的转染量为 50、70、100、150 ng; 同时转染 pEGFP-N3 空载体作为对照组; 以细胞中出现明显绿色荧光时的最低剂量, 作为后续试验的质粒转染量.

1.5 2 种转染方式的比较

按照 LipofectamineTM 2000 说明书, 转染可以不用换液, 只要将推荐体积的转染混合物替代同体积的培养基即可. 在试验中我们对比了 2 种转染方式. 一种是先吸掉孔里的培养基, 用无血清培养基转染 (Opti-MEM I), 4~6 h 后换成细胞生长液 (含 10% FBS), 另一种是不换液, 只将转染混合物代替同体积的培养基.

1.6 siRNA 的干扰试验

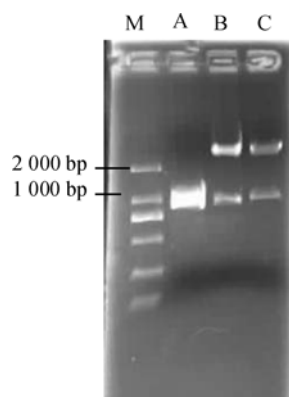
为了验证所合成 siRNA 的特异性和有效性, 将 pEGFP-MCP 和针对 MCP 基因设计的 siRNA 共转染. 转染使用 96 孔板, 每个孔所用的质粒量为 100 ng, lipofectamine2000 的用量为 0.25 μ L, 而特异性的 siRNA 则采用了终浓度为 50、100、200 nmol/L 的 3 种剂量, 每个剂量都是重复 3 个孔. 同时, 还设置了 pEG-

FP-N3 载体与无效 siRNA 共转染作为阴性对照, 单转染 pEGFP-MCP 作为阳性对照.

2 结果

2.1 石斑鱼神经坏死病毒 MCP 基因的克隆及真核表达载体 pEGFP-MCP 的构建

测序结果显示 NNV-MCP 全长 1 014 bp, 与预期结果一致. BLAST 显示核苷酸序列与赤点石斑鱼 (AY744705) 相似性达到 100%, 属于 RGNNV 血清型, 与其他血清型的相似性也在 83% 以上. *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切重组质粒, 得到大小约为 1.0 和 3.0 kb 的 2 个片段, PCR 鉴定结果也得到与目的片段大小相符的产物, 证明 MCP 定向克隆到质粒 pEGFP-N3 中, 成功构建了真核表达载体 pEGFP-MCP (见图 1).



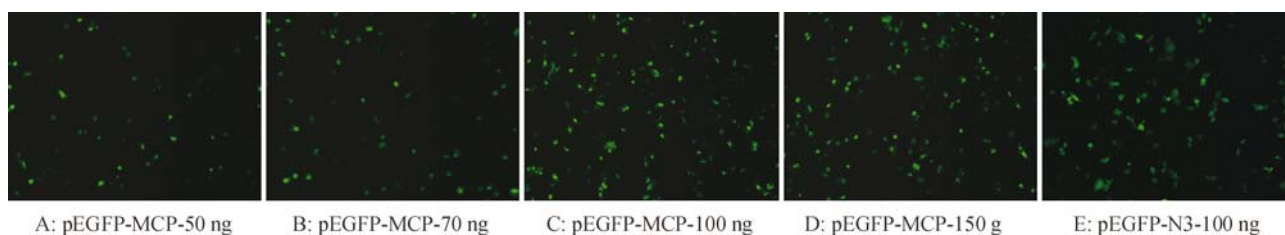
M: DL2000 DNA ladder; A: PCR 产物; B、C: 双酶切产物

图1 质粒 pEGFP-NNV 双酶切 (*Hind* III/*Eco* R I) 鉴定及 PCR 鉴定

Fig. 1 Verification of recombinant plasmid pEGFP-NNV based on PCR amplification and double enzymes digestion

2.2 质粒转染剂量的筛选

荧光倒置显微镜 (Nikon TE300) 的放大倍数是 100 倍 (10 物镜 $\times$ 10 目镜), 按照每孔 5×10^5 个细胞接种于 96 孔板中, 在 10 倍物镜下每孔观察了 6~8 个视场 (由于数量太多, 只罗列其中 1 个, 但每个视场效果基本一致). 当质粒的转染量为 50、70 和 100 ng 时, 观察到的绿色荧光点随着转染量的增加而明显增多 (图 2A~2D). 由于 pEGFP-N3 的绿色荧光蛋白在多克隆位点之后, 只有片段插入无误才能正确表达, 荧光倒置显微镜下可见到构建好的质粒 pEGFP-MCP 在转染 24 h 后, 细胞中有明显的绿色荧光. pEGFP-N3 空载体在 FHM 中也观察到了明显的绿色荧光 (图 2E), 说明转染成功. 150 ng 转染量比 100 ng 时的绿色荧光点稍多、但不明显, 筛选后的质粒转染量确定为 100 ng/孔.



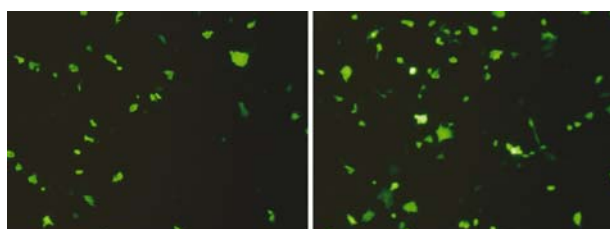
A: pEGFP-MCP-50 ng B: pEGFP-MCP-70 ng C: pEGFP-MCP-100 ng D: pEGFP-MCP-150 ng E: pEGFP-N3-100 ng

图2 不同转染量 pEGFP-MCP 转染 FHM 细胞的效果(×100)

Fig. 2 Effect of transfecting FHM cells by pEGFP-MCP with different dilution(×100)

2.3 转染方式的比较

同 2.2 观察,经比对有血清和无血清培养基,发现先使用无血清培养基转染,4~6 h 后换液,转染率更佳(图 3)。



A: 不换液

B: 4-6 h 后换液

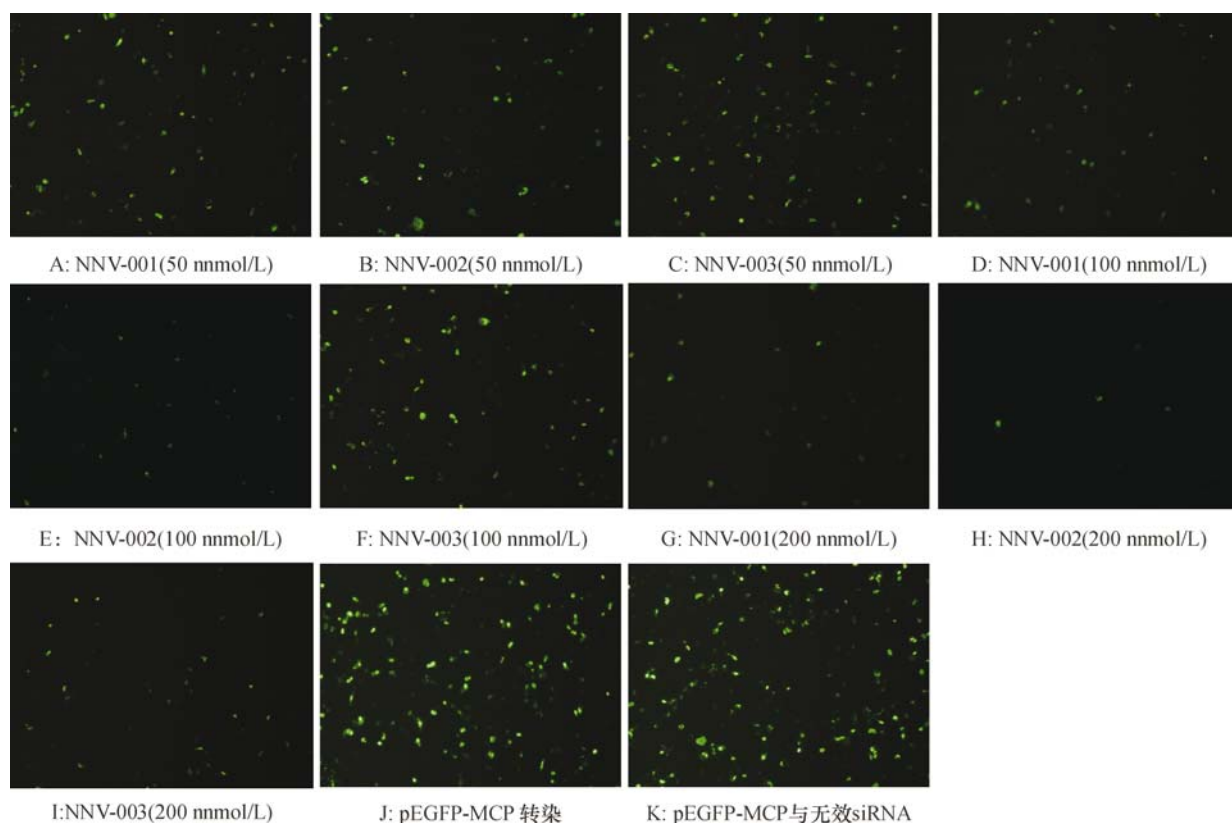
图3 2 种方式转染 FHM 细胞的效果比较(×200)

Fig. 3 Effect of two transfection ways on FHM cells with pEGFP-N3(×200)

2.4 siRNA 的干扰效果

同 2.2 观察,在共转染 12 h 后就观察到了绿色

荧光。在 pEGFP-MCP 与 siRNA 共转染组,当 NNV-001、NNV-002 和 NNV-003 终浓度为 50 nmol/L 时,可以观察到较多的绿色荧光细胞(图 4A~4C),但与单转 pEGFP-MCP 的阳性对照(图 4J)相比,发绿色荧光的细胞数目有所减少。当 NNV-001、NNV-002 和 NNV-003 终浓度为 100 nmol/L 时(图 4D~4F),绿色荧光细胞数明显减少,当终浓度调整到 200 nmol/L 时,NNV-002 组的绿色荧光细胞数已很少(图 4H),而 NNV-001 和 NNV-003 组的绿色荧光细胞数比 NNV-002 稍多(图 4G、4I)。从共转染的效果来看,NNV-002 的干扰效果要好于其他 2 个。同时,pEGFP-MCP 与无效的 siRNA 共转染可观察到很多的绿色荧光细胞(图 4K),与单转 pEGFP-MCP 的阳性对照基本一样,结果表明,200 nmol/L 的 siRNA 与 100 ng 的 pEGFP-MCP 共转染,已经显示出较理想的沉默效果。



I: NNV-003(200 nmol/L) J: pEGFP-MCP 转染 K: pEGFP-MCP 与无效 siRNA

图4 不同浓度的 siRNA 和 pEGFP-MCP 转染 FHM 细胞(×100)

Fig. 4 Interference effects of Co-transfection of different diluted siRNA and pEGFP-MCP into FHM cells(×100)

3 讨论

在水产生物病毒研究方面,利用 RNA 干扰技术作为病毒性疾病的治疗手段的探索刚刚起步^[16].许多实验室已经在对虾上进行 RNA 干扰技术的研究,将根据某种病毒的关键基因设计的双链 RNA 导入动物体内,利用 RNA 干扰机制来抑制病毒复制,以期实现对病毒的预防和治疗^[17]. Robalino 等^[18]将体外转录获得的 dsRNA 导入养殖南美白对虾 *Litopenaeus vannamei* 体内,成功抑制了对虾内源 hemocyanin 基因和 CDP 基因的表达. Xie 等^[19]针对蛙虹彩病毒(TFV)主要外壳蛋白基因(mcp)设计 siRNA,这些 siRNA 在 FHM 细胞中有效抑制了病毒的复制.选择合适的靶基因是能否成功抑制病毒的关键因素之一,最适合的靶基因应该是病毒侵染过程中的关键基因^[17].神经坏死病毒由 2 条正义 RNA 单链(RNA1 和 RNA2)组成.其中 RNA2 编码的 MCP 是主要的致病因子^[5,20]. Tanaka 等^[21]证实 MCP 在病毒侵染宿主细胞过程中起重要作用,也是病毒的主要抗原,能引起动物产生保护性抗体. Nishizawa 等^[22]根据神经坏死病毒 MCP 基因核苷酸序列部分片段的相似性将其分为 4 种基因型,并且发现这 4 种基因型的 NNV 具有大量相同的抗原表位,表明 NNV 的 MCP 在病毒感染动物过程中以及诱导机体产生保护性抗体时起重要作用.因此,针对 RNA2 序列的 siRNA 有可能使该病毒失活.本研究针对 MCP 基因序列所设计的 3 对 siRNA 序列均能抑制绿色荧光蛋白基因的表达,表明这些 siRNA 对 MCP 基因具有一定的沉默效果,但能否使病毒失活还有待进一步的检验.

RNAi 的效果与注射剂量有很大关系,过高的剂量有时会引起非特异基因表达的抑制. Wargelius 等^[23]用 T7 RNA 聚合酶合成的长 dsRNA 显微注射到斑马鱼 1-2 细胞期受精卵中,观察胚胎发育中的 RNAi 现象,结果发现由 dsRNA 产生的缺陷表型与已知的相应突变体表型很相似,并且抑制程度与 dsRNA 的量有很大的关系,但高注射量(60 pg RNA/胚胎)也容易引起非特异基因表达抑制(可高达 30%). 本试验过程中也发现,siRNA 的剂量并不是越大越好,3 个 siRNA 转染浓度(50、100、200 nmol/L)下, RNAi 效果随着 siRNA 剂量的增加而增强,200 nmol/L 的 siRNA 与 100 ng 的 pEGFP-MCP 共转染时,即显示出了较理想的沉默效果,而 300、

400 nmol/L 的 siRNA 与其沉默效果相当. 但 pEGFP-MCP 与无效的 siRNA 共转染也能观察到很多绿色荧光细胞,与单转 pEGFP-MCP 的阳性对照基本一样,证明无效的 siRNA 即使浓度达到 200 nmol/L 也不会产生脱靶效应,本研究针对 MCP 基因序列所设计的 3 对 siRNA 序列均能抑制绿色荧光蛋白基因的表达,表明这些 siRNA 对 MCP 基因具有一定的沉默效果. Boonanuntanasarn 等^[24]的试验也证明了这一点,他们针对外源基因 eGFP 和内源基因 TyrA 不同的位点合成 siGFP,同时以错配 4 个碱基的 siGFP-M 作为对照,在虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 胚胎中观察到了很好的抑制效果且未产生非特异性抑制.

转染方式也会影响转染效果. 在试验中我们对比了 2 种转染方式. 一种是先吸掉孔里的培养基,用无血清培养基转染(Opti-MEM I),4~6 h 后换成细胞生长液(含 10% FBS),另一种是不换液,只将转染混合物代替同体积的培养基. 4~6 h 后换液,发现转染率更佳,估计原因是细胞在饥饿状态下,更容易摄入外源基因. 因此在本试验中确定了 6 h 后换液的转染方式.

本试验克隆的赤点石斑鱼神经坏死病毒 MCP 基因与赤点石斑鱼的 MCP 基因(AY744705)相似性达到 100%,属于 RGNNV 血清型,与其他血清型的相似性也在 83% 以上,因此选用该基因作为 RNAi 的靶基因具有广谱性. 本试验所用的真核表达载体 pEGFP-N3 含有卡那霉素抗性基因,为靶基因在细胞中的长期基因沉默研究提供了前提条件. 由于含有 GFP 绿色荧光蛋白报告基因,所以可在荧光显微镜下方便地观察转染效果,是开展 RNAi 研究的良好平台.

参考文献:

- [1] ASPEHAUG V, DEVOLD M, NYLUND A. The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. B Eur Assoc Fish Pat, 1999, 19: 196-202.
- [2] FUKUDA Y, NGUYEN H D, FURUHASHI M, et al. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis [J]. Fish Pathol, 1996, 31: 165-170.
- [3] BALL L A, JOHNSON K L. Reverse genetics of nodaviruses [J]. Adv Virus Res, 1999, 53: 229-224.
- [4] BALL L A, LI Yue. Cis-acting requirement for the replication of flock house virus RNA 2 [J]. J Virol, 1993, 67 (6): 3544-3551.

- [5] NISHIZAWA T, TAKANO R, MUROGA K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 3023-3027.
- [6] LIN Li, HE Jian-guo, MORI K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatcheryreared groupers in the People's Republic of China [J]. Fish Pathol, 2001, 36(3): 186-188.
- [7] HEGDE A, CHEN C L, QIN Q W, et al. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauwina*, in Singapore [J]. Aquac, 2002, 213: 55-72.
- [8] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-810.
- [9] ZAMORE P D, TUSCHL T, SHARP P A, et al. RNAi: double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cell, 2000, 101: 25-33.
- [10] FINNEGAN E J, MARGIS R, WATERHOUSE P M, et al. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of dicer-1 from *Drosophila* [J]. J Curr Biol, 2003, 13(3): 236-240.
- [11] 黄桂菊, 王庆, 喻达辉, 等. RNA 干扰机制及其在水产生物中的应用 [J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(12): 41-45.
- [12] KANDA T, KUSOV Y, YOKOSUKA O, et al. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318: 341-345.
- [13] MCCAFFREY A P, NAKAI H, PANDEY K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 639-644.
- [14] ZHANG Wei-dong, SINGAM R, HELLERMANN G, et al. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery [J]. Genet Vaccines Ther, 2004, 2: 8.
- [15] WANG Zhi, REN Li-li, ZHAO Xin-gang, et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells [J]. J Virol, 2004, 78(14): 7523-7527.
- [16] 韩林强, 李胜杰, 于凌云, 等. RNA 干扰技术在鱼类中的研究进展 [J]. 南方水产, 2009, 5(3): 67-73.
- [17] 陈芸, 朱作言. RNA 干扰在抗病毒研究中的应用 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 356-359.
- [18] ROBALINO J, BARTLETT T, SHEPARD E, et al. Double-stranded RNA induces sequence specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: Convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? [J]. J Virol, 2005, 79(21): 13561-13571.
- [19] XIE Jun-feng, LU Ling, DENG Min, et al. Inhibition of reporter gene and iridovirus-tiger frog virus in fish cell by RNA interference [J]. Virology, 2005, 338: 43-52.
- [20] NAGAI T, NISHIZAWA T. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 3019-3022.
- [21] TANAKA S, MORI K, ARIMOTO M, et al. Protective immunity of seven band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis [J]. J Fish Dis, 2001, 24: 15-22.
- [22] NISHIZAWA T, FURUHASHI M, NAGAI T, et al. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1633-1636.
- [23] WARGELIUS A, ELLINGSEN S, FJOSE A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263: 156-161.
- [24] BOONANUNTANASARN S, GORO Y, TOSHIO T. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310: 1089-1095.

【责任编辑 柴 焰】