

鱼类 DNA 疫苗的研究进展

Approaches to fish DNA vaccine study

韩一凡^{1,2}, 鄢庆枇^{2,3}, 高天翔², 庄峙厦³, 王小如³

(1.中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛, 266003; 2.集美大学 水产学院, 福建 厦门, 361021; 3.厦门大学 化学化工学院, 福建, 厦门 361005)

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)03-0064-06

DNA 疫苗是编码免疫原或与免疫原相关的真核表达质粒 DNA(或 RNA), 它可经一定途径进入动物体内, 被动物宿主细胞摄取后能转录和翻译表达出抗原蛋白, 此抗原蛋白能够刺激机体产生非特异性和特异性两种免疫应答反应, 从而起到免疫保护作用。1990 年, Wolff 等^[1]给小鼠骨骼肌肉直接注射纯化的质粒 DNA, 可使载体上的基因在小鼠骨骼肌中表达, 这种表达可持续数月, 甚至持续终生, 且没有检测出注射的外源 DNA 与宿主染色体整合。1993 年 Ulmer 等^[2]证实小鼠肌肉注射含有编码甲型流感病毒蛋白(NP)的重组质粒后, 可使小鼠产生对多种流感病毒的免疫保护作用。此后, 许多学者纷纷进行了 DNA 疫苗的研究使之成为减毒疫苗, 灭活疫苗, 亚单位疫苗和重组多肽疫苗之后又一新型疫苗, 被成为第三代疫苗。DNA 疫苗具有许多优点: (1) DNA 接种载体(如质粒)的结构简单, 提纯质粒 DNA 的工艺简便, 因而生产成本较低, 且适于大批量生产; (2) DNA 分子克隆比较容易, 使得 DNA 疫苗能根据需要随时进行更新; (3) DNA 分子很稳定, 可制成冻干疫苗, 使用时在盐溶液中可恢复原有活性, 因而便于运输和保存; (4) 比传统疫苗安全, 虽然 DNA 疫苗具有与弱毒疫苗相当的免疫原性, 能激活细胞毒性 T 淋巴细胞而诱导细胞免疫, 但由于 DNA 序列编码的仅是单一的一段病毒基因, 基本没有毒性逆转的可能, 因此不存在减毒疫苗毒力回升的危险, 而且由于机体免疫系统中 DNA 疫苗的抗原相关表位比较稳定, 因此 DNA 疫苗也不象弱毒疫苗或亚单位疫苗那样, 会出现表位丢失; (5) 质粒本身可作为佐剂, 因此使用 DNA 疫苗不用加佐剂, 既降低成本又方便使用;

(6) 将多种质粒 DNA 简单地混合, 就可将生化特性类似的抗原(如来源于相同病原菌的不同菌株)或一种病原体的多种不同抗原结合在一起, 组成多价疫苗, 从而使一种 DNA 疫苗能够诱导产生针对多个抗原表位的免疫保护作用, 使 DNA 疫苗生产的灵活性大大增加^[3]。

鱼类 DNA 疫苗的研究工作起步较晚, 但是非常必要的。据统计, 每年大约有 10% 的养殖鱼类死于传染性疾病, 而大规模的爆发性疾病会引起更严重的损失^[3]。1991 年, Hansen 等^[4]首先报道了外源基因能够在鲤鱼肌肉组织中表达。1996 年, Anderson 等^[5]第一次报告了带有 IHNV 糖蛋白基因的质粒能够在虹鳟中表达, 并且能够保护 IHNV 病毒对受免疫鱼的感染。随后的一些实验也证明, 在多种鱼体内, 外源基因不仅能够高效, 持久地表达, 而且能够引起宿主鱼类对外源蛋白的免疫应答。这些为构建鱼类 DNA 疫苗提供了基础。

1 质粒的构建

随着近年来鱼类 DNA 疫苗研究的深入, 鱼类 DNA 疫苗的载体的构建和优化也取得了很大的成果。如启动子的选择从最初的 CMV, SV40 逐渐转向利用鱼类自身的启动子如虹鳟干扰素调节因子启动

收稿日期: 2004-12-20; 修回日期: 2005-01-10
基金项目: 福建省自然科学基金(B0410022); 福建省青年创新基金(2002J037)
作者简介: 韩一凡(1979-), 男, 天津市人, 硕士研究生, 电话: 13328766621, E-mail: tjhyf@hotmail.com; 鄢庆枇, 通讯作者, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

子和 Mx1 蛋白启动子, 鲤鱼 β 肌动蛋白启动子等^[5,6]。而在质粒 DNA 中添加各种免疫刺激序列也极大地改善了 DNA 疫苗的免疫效果^[7~9]。

1.1 启动子的选择

早期的工作所采用的外源基因的载体绝大部分以哺乳动物表达载体为骨架。对于经济型鱼类来说, 由于在理论上质粒 DNA 仍有较低概率整合的可能

性, 并造成插入突变, 这种以哺乳动物启动子构建的 DNA 疫苗存在一定的安全隐患。近期研究表明, 以鱼类特有启动子构建的 DNA 疫苗在体内和体外实验中已经取得了比较理想的效果^[5,6], 这种以非哺乳类动物启动子构建的 DNA 疫苗在生产实践中对于哺乳动物、人类消费者和环境来说是非常安全的。

表 1 在鱼类 DNA 疫苗研究中应用的启动子

Tab.1 Promoters used in the study of fish DNA vaccine

启动子	实验鱼	参考文献
CMV	虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	[31,32,34~36]
	真鲷(<i>Sparus aurata</i>)	[29]
	日本大比目鱼(<i>Paralichthy olivaceus</i>)	[24,27]
	斑马鱼(<i>Brachydanio rerio</i>)	[31]
	金鱼(<i>Carassius auratus L.</i>)	[13,33]
	大菱鲆(<i>Scophthalmus maximus</i>)	[28]
	日本大比目鱼	[11]
SV40 early	鲤鱼 (<i>Cyprinus carpio</i>)	[4]
IRF1A(虹鳟)	虹鳟	[6]
Mx1(虹鳟)	虹鳟	[6]
carp β -actin	虹鳟	[35]

许多实验证明, CMV 启动子是非常高效的, 而且在外源基因表达峰值过后仍能持续高水平表达一段时间, SV40 启动子在峰值过后很快下降, 为持续低水平表达。但这 2 种启动子均存在一定的安全隐患, 目前仅仅在实验室阶段, 没有转入生产实践当中。而 IRF1A, Mx1, β -actin, LDH, 这些均来源于鱼类本身, 对于哺乳动物来说, 安全可靠, 其表达效果以 Mx1 启动子最差, 而其他三者相差不多, 但是都不如 CMV 的表达效果好^[6]。

1.2 抗原基因

理论上, 任何编码病原体蛋白的基因都可以引起宿主的免疫应答从而用作 DNA 疫苗。Noonan 等^[10]首先报道了某些病毒的糖蛋白基因能够在载体中表达, 他们把编码病毒性出血败血症病毒(VHSV)和传染性造血组织坏死病毒(IHNV)的糖蛋白基因克隆到杀鲑气单胞菌表达载体中, 用糖蛋白特异性的单克隆抗体通过免疫印迹试验, 发现糖蛋白基因能够以融合蛋白的形式获得表达。攻毒试验表明, 受免虹鳟能产生针对病毒的保护性免疫。随后 Anderson^[5]

和 Lozenren^[11~14]的研究也得出了相似结果。分别把带有 VHSV 和 IHNV 糖蛋白基因的质粒注射到虹鳟体内, 攻毒试验表明, 病毒糖蛋白基因能够分别诱导鱼体产生针对 VHSV 和 IHNV 的保护性免疫。以病毒糖蛋白基因作为抗原基因构建病毒 DNA 疫苗的方法是可行的。而鱼类寄生虫疫苗的研究则以多子小瓜虫的研究较为系统和深入^[15], 目前已经完成对小瓜虫的保护性抗原基因的定位和序列分析, 用小瓜虫的抑动抗原作为抗原基因构建的 DNA 疫苗可以有效激发斑点叉尾鲷的体液免疫应答, 产生高水平的血清抗小瓜虫的抑动抗体。对于变异频繁的病原体, 则可以选择各种亚型共有的核心蛋白保守序列构建疫苗, 产生跨株的免疫保护反应, 从而克服因病原体变异产生的免疫逃避问题。但是上述方法是建立在了解病原体基因组的基础上, 对于基因组复杂或不太清楚的病原体则还需借鉴其他方法。而表达文库免疫接种(expression-library immunization, ELI) 技术是一种在各种已知或未知病原体基因组中获得保护性抗原基因的有效方法, 该技术是先构建病原体

的基因表达文库,再利用基因免疫的方法筛选病原体基因中具有免疫保护功能的基因片段。目前ELI技术是发现保护性抗原基因比较有效的方法,对于构建基因组较大病原体的DNA疫苗具有重要意义^[16,17]。而在鱼类细菌DNA疫苗的研究方面,由于可作为保护性抗原基因太多,可能需要几个基因产物才能起到免疫保护作用,要寻找其最佳保护性抗原,需要克隆和构建若干个细菌抗原基因的真核表达载体,然后单独或组合这些基因的真核表达载体免疫鱼类才能确定。周化民^[18]等首先采用化学方法合成和克隆了副溶血弧菌极鞭毛蛋白*Fla I*基因,用于构建*Fla I*基因真核表达载体。覃映雪^[19]等将编码副溶血弧菌极鞭毛丝蛋白的*FlaA, FlaB, FlaC, FlaD, FlaE, FlaF* 6个基因中的*FlaB*基因成功重组到pIRESneo载体上。目前真正进行鱼类病原细菌DNA疫苗研究的工作还很少。

1.3 免疫刺激分子

目前研究和应用于鱼类的免疫刺激分子主要为核酸,油佐剂和细胞因子。

1.3.1 寡聚脱氧核苷酸

Jorgensen^[20,21]等发现细菌DNA和寡聚脱氧核苷酸(ODN)能够刺激大西洋鲑和虹鳟产生干扰素I和II。Yi^[22]发现鲶鱼对CpG DNA产生非特异性细胞毒细胞。zheng meng^[8]等在对草鱼的体外实验中发现CpG DNA能够激活草鱼的巨噬细胞。CpG反应机理为在体内能够直接激活B细胞和单核细胞(包括巨噬细胞和树突细胞),激发机体的细胞免疫和体液免疫,放大抗原的免疫效应并起到免疫激活作用。含有这种基因序列的质粒DNA,会增强鱼类的免疫应答,而且也可能可以减少DNA的使用量。

1.3.2 油佐剂

Kanellos^[23]等发现,鲫鱼腹腔注射质粒DNA时,血清内抗体的几何平均滴定为93,而混合质粒DNA和油性佐剂给腹腔注射时,几何平均滴定是355,对提高免疫应答起到了一定的作用。但是油佐剂会在疫苗注射部位产生严重的组织反应,即使随着工艺的改进,现在应用的是和水乳化后的混合物,但仍不能消除注射部位的损伤,因此不推荐在鱼类DNA疫苗中使用。

1.3.3 细胞因子

与CpG基因相类似,在质粒中加入细胞因子基因同样可以调节鱼类的免疫应答。有研究表明,将小鼠的粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因重组到DNA疫苗中,可以调节金鱼的细胞免疫应

答^[9]。

2 鱼类DNA疫苗的接种方法

鱼类DNA疫苗目前比较常用的有注射、浸泡和口服三种方式。

2.1 注射

尽管会给动物造成胁迫,但是就免疫效果来说,注射途径^[3]仍然是免疫鱼类的最佳途径。

2.1.1 注射部位

注射部位一般选择在肌肉,腹腔,静脉和皮下。

2.1.2 注射的剂量

关于注射的剂量对外源基因表达的影响已经做了很多工作。一般来说,根据不同的种,体长体质量不同,DNA的注射量在1~50 μ g,注射体积一般在11~50 μ L。并不是越高的注射剂量越能引起更高的免疫应答^[4]。

2.1.3 其他注射方法

用基因枪DNA将包被的粒子轰击导入鱼体内是注射的另外一种方法,Carl^[24]等以绿色荧光蛋白为报告基因,用包被DNA质粒的金粒子对日本比目鱼进行轰击,分别用1.03MPa和2.07MPa两种压力。并进行组织病理学检验。结果表明,在免疫60d后2.07MPa仍然可以使DNA疫苗持续稳定的表达,但是会对鱼体的上皮和真皮组织造成明显伤害,这种伤害在免疫后28d即可痊愈;而1.03MPa虽然不会对鱼体造成明显伤害,但效果很差,研究表明,当压力超过1.38MPa后,就会给鱼体产生明显的伤害。用基因枪将包被DNA的粒子轰击导入鱼体内的方法虽然高效,但是其较高的费用和需要经验的操作导致了这种方法不可能大规模应用到生产实践。

2.2 口服和浸泡

对于生产者来说,口服疫苗是最理想的免疫途径,因为它操作简单,而且不会对鱼类造成惊扰。口服途径可以引起鱼类黏膜系统产生非特异性免疫,这是鱼类抵抗病原体的第一道防线。然而至今未见有关口服DNA疫苗实验的报道。主要原因是无法确定每只动物摄入疫苗的量。

Kristine^[25]等用脂质体包被的带有报告基因荧光素酶的质粒对虹鳟鱼进行浸泡实验,在鱼体中没有检测到报告基因的表达。浸泡途径需要DNA疫苗的量很大,而效果还不如直接注射。关于这方面的工作还有待深入研究。

最近,一种将质粒DNA导入鱼体的新方法在体外实验中取得了一定的进展。Benjamin^[26]等用弱毒性

的大肠杆菌二氨基庚二酸盐营养缺陷型 K12 菌株, 将含有耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 侵袭素基因的低拷贝质粒 pGB2 Ω inv, 含有单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) listeriolysin 蛋白基因低拷贝质粒 pGB2 Ω inv-hly 和含有绿色荧光蛋白报告基因的质粒 pEGFP-c 分别在 HeLa, COS-7 和 CHO 细胞系中进行表达。结果显示, 报告基因(GFP)在 CHSE-214 细胞中的表达率为 0.01% 到 0.02%, 在前肾巨噬细胞中和腮培养物中的表达率也很低。而当加入脂质体转染试剂后, 最终获得了 1% 到 5% 的表达率。使用弱毒细菌导入 DNA 疫苗还需要进一步的研究工作, 如使用更有效的转染试剂, 选择更有效的启动子, 增加剂量等等。

3 外源基因在鱼体内的表达的检测

鱼类 DNA 疫苗进入鱼体内后, 首先要检测是否能够表达及其表达效果。针对不同的报告基因和抗原基因, 有不同的检测方法。目前常用的报告基因有荧光素酶, β 半乳糖苷酶和绿色荧光蛋白。荧光素酶使用荧光素酶检测试剂进行检测; 而对 β 半乳糖苷酶可采用 ELISA, 酶活测定, PCR 和组化等手段进行检测; 绿色荧光蛋白也有专门的仪器进行检测, 如果不定量的话, 其表达是肉眼可见的。对于抗原

基因的检测手段也是多种多样的, 一般遵循定性、定量和定位 3 个原则。

Tomokazu^[27]等用带有杆状病毒糖蛋白基因的 pCMV-HRVg 对日本比目鱼进行了免疫, 然后通过 RT-PCR 对免疫相关基因 MHC I α , II α , II β , TCR- α , β 1, β 2 等进行了定量分析来确定免疫 1~7d 后的免疫应答效果。Ingunn^[28]等用含 VHSV-G 的 pcDNA3 质粒免疫大菱鲆, 然后通过 RT-PCR 和组织学, 组织化学检测手段来分析 VHSV-G 基因的表达情况。Marta^[6]等将含有报告基因荧光素酶的质粒对虹鳟鱼进行肌肉注射, 注射后 4~7d, 将鱼杀死, 提取肌肉匀浆, 离心后取上清加入荧光素酶检验试剂, 在酶标板上用照度计来测量每秒发光次数。Tiziano^[29]等 β -gal 为报告基因, 通过组织化学, 酶活测定, ELISA, PCR 对其在金头鲷体内的表达情况进行了检测。Carl^[24]等分别以 CAT 和 GFP 为报告基因, 用荧光显微镜对 GFP 基因表达情况的检测; 用相应的检测试剂对 CAT 的表达进行检测。Maureen^[30]等用 RT-PCR 对带有 IHNV 基因的 DNA 疫苗在虹鳟内的表达效果进行了分析。鄢庆枇^[38]等用 pIRESneo 为载体将 GFP 基因导入大黄鱼体内, 用荧光显微镜对其表达进行检测。

表 2 外源基因在鱼体内的表达时间

Tab.2 Duration of exogenous genes expressing in fish

外源基因	实验鱼	持续表达时间 (d)	参考文献
Luciferase (荧光素酶)	虹鳟	>7	[6]
		>84	[31]
		>115	[35]
VHSV-G (病毒性出血败血症病毒糖蛋白)	斑马鱼	>112	[31]
	大菱鲆	>27	[28]
IHNV-G(传染性造血组织坏死病毒糖蛋白)	虹鳟	>56	[32]
	虹鳟	>30	[11]
β -gal (β -半乳糖苷酶)	海鲷(<i>Sparus aurata</i>)	>90	[29]
GFP(绿色荧光蛋白)	日本大比目鱼	>28	[24]
CAT(氯霉素乙酰基转移酶)	日本大比目鱼	>60	[24]
HIRRV-G (hirame杆状病毒糖蛋白)	日本大比目鱼	>7	[27]
GFP	大黄鱼(<i>Pseudosciaena crocea</i>)	>28	[37]

4 DNA 疫苗可能的免疫机制

DNA 免疫机制研究涉及 DNA 疫苗如何转染体内的靶细胞、如何在靶细胞内表达、表达的抗原蛋白

如何被呈递给免疫效应细胞等问题。目前尚无鱼类 DNA 疫苗免疫机理的研究报道。DNA 疫苗可以通过激发体液免疫和细胞免疫、尤其是细胞免疫这条

主要途径产生针对病原体的保护性免疫。当质粒DNA导入细胞后,在抗原递呈细胞(APC)的作用下,抗原编码基因开始表达抗原蛋白,随后经细胞浆内蛋白酶降解成8到12个氨基酸的短肽,这些短肽上不同的抗原表位分别与MHC-1类和MHC-2类分子结合,形成复合物并被APC呈递到细胞表面。与MHC-1类分子结合的短肽能够激活细胞毒性T淋巴细胞(CTL),而与MHC-2类结合的短肽则激活CD4⁺T细胞。CTL在辅助性T细胞1(Th1)的作用下可以有效刺激鱼体细胞免疫应答,而分泌到细胞外的抗原则被带有相应膜抗体的B淋巴细胞所捕捉,并在辅助性T细胞2(Th2)及其分泌的细胞因子的刺激下转化为浆细胞,分泌大量抗体。

5 DNA疫苗的免疫效果

尽管鱼类DNA疫苗的免疫机制还不是很清楚,但是在少量的攻毒实验中证明,DNA疫苗可以提供较好的保护效果。例如研究最多的虹鳟鱼DNA疫苗的攻毒实验中,Lorenzen^[11-14]等构建了带有IHNV病毒G蛋白基因的DNA疫苗能够诱导75%的虹鳟产生较高水平的免疫保护。而抗VHSV的DNA疫苗,根据注射量不同,可以达到98%到78%的保护率。Maureen^[30]等用带有IHNV-G基因的DNA疫苗对虹鳟进行免疫,在攻毒实验中,鱼群从第七天开始出现死亡现象,到第28天,总死亡率达到17.65%,并对Mx基因的表达进行了PCR分析,发现在免疫后的7,14,21和28d,Mx基因的表达出现增长。Mx基因是在抗病毒早期起重要作用的一类基因。Ingunn^[28]等在用带有VHSV-G的DNA疫苗免疫虹鳟,在免疫8天之后的攻毒实验中,注射了疫苗的鱼全部存活,而对照组死亡率达到54%;在免疫35d之后的攻毒试验中,免疫组有10%的死亡率,对照组有27%的死亡率;而用带有VHSV糖蛋白基因的DNA疫苗对大菱鲆进行了免疫,在用Noda病毒进行的攻毒实验中,发现在免疫8d后,免疫组死亡率为0,而对照组到达54%;在免疫35d后,免疫组死亡率为10%,对照组为27%。Tomokazu^[27]在对用带有杆状病毒糖蛋白基因的质粒DNA免疫后的日本比目鱼的攻毒实验中发现,在攻毒14d后,注射DNA含量为1μg的组死亡率达到28.8%,而10μg的组死亡率为8.8%,对照组则全部死亡。通过以往的实验证明,对于水产业鱼类的养殖周期和养殖业主来说,DNA疫苗可以产生足够的保护时间和保护率,而且DNA疫苗的众多优点使其具有很好的应

用前景。

6 鱼类DNA疫苗存在的问题

尽管鱼类DNA疫苗具备诸多优点,但距实际应用仍有一定距离。主要原因为:(1)鱼类DNA疫苗基础性研究相对薄弱,免疫应答的产生及机理尚不十分清楚。(2)尽管目前的动物实验尚未发现有整合到宿主基因组的证据,但在理论上质粒DNA仍有较低概率整合的可能性,并造成自体免疫疾病和插入突变;而且DNA疫苗刺激机体产生免疫应答的能力通常比自然感染病原体引起的免疫反应弱,长期表达低水平的外源抗原,有可能引起免疫耐受。(3)鱼类生活在水环境中,个体小、种群数量大,免疫接种途径是一个重要问题。注射法和基因枪法都能够使DNA疫苗得到高效的表达和理想的保护时间,然而这两者都会在上操作造成一定困难,如注射技巧、剂量、效率等等。目前挪威已经采用机械化设备对鱼进行注射,基本解决了操作的问题,但和基因枪法一样,其较高的成本并不适用于一些小型生产者,同时也消除不了对鱼的胁迫作用。而口服和浸泡则是很有前景的2种免疫接种方法。口服是比较理想的方法,但是仍未见相关的技术报道。浸泡法的研究工作仍在初期阶段,其需要解决的几个方面的问题是:减少浸泡所需的DNA疫苗的量,提高DNA疫苗进入鱼体内的效率,包被剂的合理使用以及对鱼类粘膜系统的深入研究等等。

7 总结

鱼类DNA疫苗的研究仍然处于初期阶段,其取得的成果是令人鼓舞的。但是距离真正实现普遍,大规模的生产应用还有很长的一段路要走。快速增长的水产业需要更多的,更有效的新型疫苗。DNA疫苗与传统疫苗相比,有着很多优势,但其能否成为“最有用”的疫苗,取决于它的免疫效果,安全性和生产成本。这三个因素里面,前两者是最关键的,也是以后工作的重点。而第三点主要针对在低经济价值鱼类中的应用而言。

参考文献:

- [1] Wolff I A, Malone R W, Williams P. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. *Nature*, 1992, 356: 152-154.
- [2] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. *Science*, 1993, 59: 1 745-1 749.
- [3] Joel H, Heather L D. Application of DNA vaccine

- technology to aquaculture[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2000, 43:29-43.
- [4] Hansen E, Fernandes K, Goldspind G, *et al.* Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle[J]. **FEBS Lett**, 1991, 23(1/2): 73-79.
- [5] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S C, *et al.* Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 2000, 5:114-122.
- [6] Marta A, Marc J, Ben S, *et al.* A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A(IRF1A) promoter for genetic immunization of fish[J]. **Vaccine**, 2003, 21:1591-1600.
- [7] Michael J M, Heather L D. CpG DNA as mucosal adjuvant[J]. **Vaccine**, 2000, 18:231-237.
- [8] Zhen M, Jianzhong S, Lixin X. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngo don idellus*) macrophages[J]. **Developmental and Comparative Immunology**, 2003, 27:313-321.
- [9] Kanellos T S, Sylvester I D. Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish[J]. **Immunology**, 1999, 96:507-510.
- [10] Noonan B, Enzmann P J, Trust T J, *et al.* Recombinant infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein epitopes expressed in *Aeromonas salmonicida* induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61(10): 3586-3591.
- [11] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, *et al.* DNA vaccines as a tool for analyzing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2002, 12:439-453.
- [12] Lorenzen N, Lorenzen E, Katja E-J, *et al.* Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens[J]. **Developmental and comparative Immunology**, 2002, 26:173-179.
- [13] Lorenzen N, Niels J O, Claus K. Immunity to VHS virus in rainbow trout[J]. **Aquaculture**, 1999, 172: 41-61.
- [14] Lorenzen N, Lorenzen E, Katja E-J. Immunity to viral hemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life-stage [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2001, 11:585-591.
- [15] Dickerson H, Clark T, Lin T-L, *et al.* Diagnostic and protective antigen gene sequences of *Ichthyophirius multifiliis* [P]. USA: M & R 235,00170201, 2000-02-16.
- [16] Barry M A, Lai C L, Johnston S A, *et al.* Protection against myxoplasmal infection using expression-library immunization[J]. **Science**, 1996, 377:632-635.
- [17] Johnson S A, Barry M A. genetic to genomic vaccination[J]. **Vaccine**, 1997, 15(8): 808-809.
- [18] 周化民, 王军, 苏永全. 溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) Fla I 基因真核表达重组质粒的构建[J]. 厦门大学学报 (自然科学版) 2002, 42(40):21-27.
- [19] 覃映雪, 苏永全, 周化民. 溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 极鞭毛蛋白 FlaB 基因的克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报 2003, 11(6): 656-657.
- [20] Jorgensen J B, Johansen A, Stenersen B, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity[J]. **Dev Comp Immunol**, 2001, 25:313-21.
- [21] Jorgensen J B, Zhou J, Johansen A, *et al.* Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides simulate expression of IL-1 β and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism[J]. **Fish & Shellfish Immunol**, 2001, 11:673-82.
- [22] Yi A K, Tuetken R, Redford T, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA activate oxygen species [J]. **Immunol**, 1998, 160:4755-4761.
- [23] 伊光辉, 林天龙, 熊邦喜. 鱼类 DNA 疫苗的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 87-90.
- [24] Carl T, Makoto E, Ikuo H, *et al.* Assessment of DNA vaccine potential for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, through the introduction of reporter genes by particle bombardment and histopathology[J]. **Vaccine**, 2001, 19:801-809.
- [25] Kristine R, Beate J T, Oystein E. Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 16:251-264.

- [26] Benjamin E S, Jo-Ann C I. Gene Transfer to Fish Cells by Attenuated Invasive *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol**, 2002, 4: 303-309.
- [27] Tomokazu T, Akiko I, Ikuo H, *et al.* Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 17: 367-374.
- [28] Ingunn S, Lorenzen E, Lorenzen N, *et al.* A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus in turbot [J]. **Vaccine**, 2003, 21: 4661-4667.
- [29] Tiziano V, Laura I, Rita C, *et al.* Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene[J]. **Fish & Shellfish immunology**, 2003, 15: 283-295.
- [30] Maureen K P, Gael K, Kyle A G, *et al.* Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) Infection or DNA vaccination [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 17: 447-462.
- [31] Heppell J, Lorenzen N, Armstrong N K, *et al.* Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1998, 8: 271-286.
- [32] Mclauchlan P. E, Collet B, Ingerslev E, *et al.* DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2003, 15: 39-50.
- [33] Theophanis K, Ian D S, Colin R H, *et al.* DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish[J]. **Vaccine**, 1999, 17: 965-972.
- [34] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, *et al.* Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following DNA vaccination [J]. **Fish & Shellfish Immunol**, 1998, 8: 261-270.
- [35] Anderson E D, Mourich D V, Leong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA[J]. **Mol Mar Biol Biotechnol**, 1996, 5: 105-113.
- [36] Boudinot P, Blanco M, Kinkelin P de, *et al.* Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of hemorrhagic septicemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout[J]. **Virology**, 1998, 249: 297-306.
- [37] 鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 绿色荧光蛋白基因在大黄鱼体内的表达[J]. 厦门大学学报 (自然科学版) 2002, 41 (2): 265-268.

(本文编辑: 刘珊珊)