

# 鱼用生物工程疫苗研究进展

## Progress of studies on bioengineering vaccines for fish

李 涛, 吴后波

(中国科学院 南海海洋研究所 LED 实验室, 广东 广州 510301)

中图分类号: S942.5 文献标识码: A 文章编号: 1009-3096(2006)08-0078-05

鱼用疫苗的研究可上溯到 20 世纪 40 年代, 1942 年加拿大者 Duff<sup>[1]</sup> 应用灭活的杀鲑产气单胞菌免疫硬头鲈获得成功, 开创了鱼类疫苗研究的先河。随后数十年间, 各国学者对鱼用疫苗进行了大量研究, 这些疫苗大致可分为两类: 减毒疫苗、灭活疫苗。前者是通过改变培养条件, 或在异种动物体内传代, 使病原体毒性减弱; 后者则是通过物理(紫外照射、声波震荡等)、化学(福尔马林、氯仿、苯酚等)方法杀死病原体, 制备疫苗。这两类疫苗具有良好的免疫保护作用, 但前者可能发生回复突变, 或失去免疫原性; 后者虽然安全, 但免疫原性较差, 且保护时间短。同时, 这些传统疫苗多为细菌菌苗, 对于病毒性鱼病无能为力<sup>[2]</sup>。但是随着水产养殖业集约化的发展, 由于水体环境恶化等因素, 世界各地鱼类病毒病频频发生, 病毒性鱼病已成为制约水产养殖业发展的重要因素之一<sup>[3]</sup>。因此, 发展新型疫苗尤其是病毒性疫苗, 迫在眉睫。生物工程技术的迅猛发展, 给鱼类疫苗的研究提供了新思路, 新方法, 也打开了制备病毒性鱼病疫苗的大门。目前利用生物工程技术研制的疫苗主要包括: 基因工程疫苗, DNA 疫苗。

### 1 基因工程疫苗

基因工程疫苗又称亚单位疫苗(subunit vaccines), 是指采用基因工程技术, 利用表达载体表达病原体一种或几种抗原蛋白而制成的疫苗。感染原的表面蛋白, 如病毒的被膜蛋白是可以被宿主免疫系统识别的抗原, 能诱发宿主的免疫反应, 产生中和抗体, 阻止感染症状的出现<sup>[4]</sup>。基因工程疫苗的制作方法有两种: 一是分离病原性的多肽进行重组, 二是改进致病基因, 保持抗原基因<sup>[5]</sup>。Gilmore 等<sup>[6]</sup> 1988 年将 IHNV 糖蛋白编码基因片段与大肠杆菌表达载体 TrpE 基因重组, 构成重组质粒。1993 年 Leong 和 Fryer<sup>[7]</sup> 用该重组质粒的表达产物(未提纯)口服或注射免疫虹鳟(Rainbow trout)和其他鲑类, 其免疫保护率可达 81%~100%。针对 IPNV 病毒, Manning 等<sup>[8]</sup> 利用大肠杆菌合成由基因片段 A 编码的蛋

白(VP2, NS, VP3), 其细菌裂解物对虹鳟有良好的免疫效果。

此外, 对于细菌性鱼病利用基因重组技术, 发展了新的减毒活疫苗构建方法。Vaughan 等<sup>[9]</sup> 将卡那霉素抗性基因插入杀鲑产气单胞菌 *aroA* 基因编码区, 利用自杀质粒将重组 DNA 导入野生毒株, 经过等位基因交换后, 得到减毒株。另外, 也有研究者直接删除毒力因子编码基因, 构建减毒株<sup>[10, 11]</sup>。

#### 1.1 外源基因的表达

鱼类基因工程疫苗中重组的外源基因, 通常是在大肠杆菌中以融合蛋白形式表达的, 其表达部位有细胞质和细胞周质两种。这两种表达部位各有其不同的优缺点: 细胞质表达的融合蛋白通常形成不溶的包涵体(inclusion body), 易于分离, 可以受到保护, 免受胞内蛋白酶的分解, 其表达产量通常也很高<sup>[4]</sup>, 但得到的融合蛋白往往由于缺乏肽链的正确折叠, 而缺乏活性<sup>[2]</sup>。周质(periplasm)是指革兰氏阴性细菌中, 位于内膜和外膜之间的结构部分。周质中表达的蛋白质, 分离纯化简单, 而且周质中的氧化环境有利于蛋白质的正确折叠, 但其融合蛋白产量很低<sup>[4]</sup>。同时, 为了获得免疫保护作用, 融合蛋白的糖基化也不可缺少<sup>[13]</sup>, 而大肠杆菌这类原核生物表达体系对某些蛋白无法进行糖基化。因此, 也有研究者尝试使用真核生物表达体系: 酵母、昆虫病毒等, 表达融合基因。Lecoq x honneux 等<sup>[12]</sup> 利用 *autographa californica* 克隆了 VHS 病毒糖蛋白的 cDNA, 随后用 *Spodoptera frugiperda*

收稿日期: 2003-09-22; 修回日期: 2003-11-15

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2001AA622050); 国家自然科学基金资助项目(30371106); 中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-1-04)

作者简介: 李涛(1979), 男, 江苏连云港人, 在读硕士, 研究方向: 水生生物病害; 吴后波, 通讯作者, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋生物病害, 电话: 020-89023162, E-mail: hb.w@netease.com; wuhoubu@scsio.ac.cn



昆虫细胞增殖重组病毒,经免疫荧光检测,细胞表面糖蛋白表达量占全部融合蛋白的1%,用表达融合蛋白的昆虫细胞(叠氮化钠灭活)免疫注射平均体质量为2g的虹鳟,6周后,检测到中和抗体,其RPS为47%,但采用口服和浸泡接种时,免疫失败,说明适当的免疫接种方式,对鱼类免疫也很重要。

### 1.2 基因工程疫苗优点和缺陷

基因工程疫苗制备简单、安全性好,在构建疫苗时,可将多种不同的抗原表位串联在一起,构成含有多种成分的抗原刺激成分,从而能够在一次注射中同时产生抵抗多种病原体的抗体。已有大规模基因工程疫苗实地实验:用IHN疫苗免疫防治100 000条平均体质量为1g的鳟鱼,其鱼群死亡率可从27%降到4%<sup>[14]</sup>。但目前,基因工程疫苗的大规模使用,仍存在理论和实际的困难:(1)鱼类免疫学基础研究薄弱,疫苗免疫机制不清,有报道基因工程疫苗可对0.25g的鱼苗产生保护作用,而这一阶段的鱼苗通常被认为不具有免疫补体<sup>[15]</sup>,因此,疫苗的免疫机制及相关免疫作用因子,有待进一步研究。(2)缺乏实际可行的接种方式,鱼类基因疫苗通常采用注射法接种,虽然效果好,但此法在大规模生产实践中显然行不通。(3)缺乏适当的表达载体,为了提高融合蛋白产量,人们通常采用高效质粒表达载体如pUEx2等,但此类载体表达的融合蛋白一般是不溶的包涵体,不具有生物活性<sup>[4,16]</sup>。而采用酵母或昆虫病毒等真核表达载体,融合蛋白产量又很低<sup>[12]</sup>。

## 2 DNA疫苗

传统疫苗和基因工程疫苗的研制,使鱼病防治取得了很大成功,但对于某些鱼类病毒病,如IPNV, IHN等,这两类疫苗的使用效果并不令人满意<sup>[17,18]</sup>。为此,人们一直在寻找新的疫苗设计思路。1990年Wolf等<sup>[9]</sup>发现纯化的质粒DNA,能够在小鼠骨骼肌细胞中表达,Ulmer等<sup>[20]</sup>将由RSV或CMV启动子控制的甲型流感病毒核蛋白(NP)DNA导入小鼠骨骼肌,数周后检测到针对NP蛋白的抗体反应和细胞毒T细胞反应(CTL反应),表明直接基因接种能够诱发机体产生保护性免疫。由此,人们构建了第三代疫苗——DNA疫苗。

DNA疫苗又称核酸疫苗,基因疫苗,是指将编码某种抗原蛋白的基因(细菌的外膜蛋白<sup>[21]</sup>,病毒的膜外蛋白<sup>[4]</sup>等),在体外与载体DNA连接形成重组DNA,将其直接导入动物体内,使抗原基因在体内表达,其表达产物在抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)作用下,通过MHG-I和MHG-II两条途

径,诱发宿主特异和非特异免疫系统<sup>[22,23]</sup>。

### 2.1 鱼用DNA疫苗的组成

DNA疫苗一般由两部分组成:编码抗原蛋白基因(外源基因)和表达载体。获得合适的抗原蛋白基因,是制备DNA疫苗的关键。应选择病原体的主要保护性抗原基因,也可将具有协同功能的基因共同组装入质粒载体<sup>[24]</sup>,而对于变异频繁的病原体,则可选择各亚型共有的抗原蛋白保守序列,既可避免免疫逃避现象,又可产生交叉保护作用<sup>[25]</sup>。保护性抗原基因及其所编码的抗原蛋白结构对DNA疫苗的免疫应答水平可产生一定的影响,如信号肽序列的有无,密码子的使用情况,表达的抗原蛋白是否稳定,抗原蛋白是膜结合型还是分泌型等。糖蛋白抗原其糖基化必须在信号肽的引导下进入内质网和高尔基体后才能完成。因此不带信号肽的糖蛋白不能形成正确的空间结构,从而失去一些抗原表位,因而不能诱导高质量的免疫应答<sup>[24]</sup>。DNA疫苗常用质粒做表达载体,如pBR322, pUC19等,其主要包括如下元件:复制起点,常用具有高拷贝数的大肠杆菌ColE1复制起点;强启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子,鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子,猴空泡病毒(SV40)启动子等<sup>[25,26]</sup>。含有CMV病毒启动子的质粒重组DNA,表达高效持久,有实验表明,其持续时间可长达115 d<sup>[27]</sup>。SV40的启动子功能很低,但可以诱导抗原基因长期持续表达;增强子,终止子和CpG序列。另外,为了检测外源基因在鱼体内是否表达,可在表达载体内加入报告基因,常用的报告基因有荧光素酶(luciferase),绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)等。

目前,鱼类DNA疫苗主要是针对出血性败血病毒(VHSV),传染性造血组织坏死病毒(IHNV)。这两类病原体表面糖蛋白,由大约500多个氨基酸组成<sup>[28]</sup>,具有6个链间二硫键,构成复杂的环状结构<sup>[29]</sup>。Traxler等<sup>[30]</sup>将IHNV病毒的糖蛋白编码基因与巨细胞病毒(PCMV)启动子相连,构成重组质粒,免疫注射大洋州大麻哈鱼,8周后,用IHNV病毒攻击,保护率可达40%~100%。Lorenzen等<sup>[31]</sup>用含有VHSV病毒糖蛋白基因的质粒肌注平均体质量0.5g的虹鳟,分别在第9和第71天用致死剂量攻击,结果显示,DNA疫苗仍具有较高的免疫保护性。对于鱼类寄生虫病,如车轮虫病、小瓜虫病、贝尼登虫病等,由于其有机体极难或无法无菌培养,因此,很难用传统方法制得疫苗,但采用现代生物工程技术可制备DNA疫苗,国外已对小瓜虫的抑动抗原(immobi-

lization antigen, F Ag), 进行了初步研究<sup>[32, 33]</sup>, 有望以此作为抗原基因, 构建 DNA 疫苗。

## 2.2 抗原性基因筛选方法

常用的筛选抗原基因的方法有表达文库免疫技术(expression library immunization, ELI)和噬菌体表面展示技术(Phage Display Techniques, PDT)。ELI是指利用反转录酶, 由病原体的 mRNA 合成 cDNA, 制备病原体的基因文库, 利用基因免疫的方法从病原体基因文库中, 筛选具有免疫保护作用的基因片段。此技术常用于筛选基因组较大的病原抗性基因<sup>[34]</sup>。噬菌体表面展示技术则以改构的噬菌体为载体, 将待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白基因区, 使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面, 进而通过亲和富集法筛选表达有特异肽或蛋白质的噬菌体。它实现了基因型和表型的转换, 被用于建立噬菌体抗体库和噬菌体肽文库, 并能对靶蛋白抗原表位进行定位, 以及不经过免疫即可获得高亲和力的抗体<sup>[35]</sup>。

## 2.3 DNA 疫苗的接种方式

鱼类 DNA 疫苗的接种方式主要有: 注射法, 基因枪法, 浸泡, 口服等。注射法是鱼类疫苗最常用接种方法, 按注射部位可分肌肉注射(im), 腹腔注射(ip), 皮下注射等。注射法简便有效, 但劳动量大, 对实验者技术要求高。基因枪法则是先将外源 DNA 溶液与钨、金等金属微粒共同保温, 使 DNA 吸附于金属颗粒表面, 然后加速金属颗粒, 利用被加速的金属颗粒对细胞击孔, 使外源 DNA 直接射入细胞<sup>[36]</sup>, 其优点是免疫用量少, 能有效激发机体细胞免疫, 用注射器直接注射一般要求 DNA 量为 10~200  $\mu\text{g}$ , 用基因枪注射所需要的 DNA 量则可少至亚纳克级<sup>[37]</sup>。但基因枪法缺点是制备包被 DNA 疫苗的金属颗粒过程较为复杂, 而且每次转运的 DNA 量很少(2.5  $\mu\text{g}$  以下), 超过这个剂量, 质粒 DNA 集聚在一起形成“大颗粒”, 可能会引起靶细胞的损伤反应<sup>[38]</sup>。虽然浸泡和口服是鱼用疫苗最适宜的接种方式, Fernandez Alonso 等<sup>[39]</sup>将 GFP 基因连接到质粒 PBQ<sub>125</sub> 中 CMV 启动子的下游序列, 浸泡虹鳟鱼苗, 2~3 d 后可在尾鳍、腹鳍、背鳍处, 检测到荧光, 其直径可达 10~20  $\mu\text{m}$ , 说明外源基因可以通过浸泡的形式, 渗入鱼体进行表达。但遗憾的是, 有实验<sup>[40]</sup>证明, 浸泡、口服接种鱼类 DNA 疫苗, 并不能有效地诱发对鱼体的免疫保护作用, 其具体原因尚不清楚。

## 2.4 DNA 疫苗的免疫机制

对于鱼用 DNA 疫苗的免疫机制, 目前尚无定

论, 但普遍认为: 鱼类 DNA 疫苗通过两条途径诱发免疫应答: (1) DNA 疫苗被 APC 摄取后, 在细胞内进行抗原的生物合成, 其表达产物抗原蛋白在 APC 和主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC) 分子作用下被降解为 8~10 个氨基酸多肽, 多肽与 MHC-I 类分子结合, 从而激活 MHC-I 限制的抗原特异性的 CTL, 产生细胞免疫。(2) 胞内表达的蛋白质通过分泌或细胞裂解释放入血, 被专职 APC 内吞, 在内体中被降解为 12~18 个氨基酸的多肽, 与此同时, 胞浆内质网合成的 MHC-II 类分子也被运至内体, 与抗原肽结合成抗原肽 MHC-II 类分子复合物而递呈于 APC 表面, 成为 T 辅助细胞(CD4+ Th 细胞)免疫监视的靶位, Th 细胞分泌淋巴因子, 刺激 B 细胞转化为浆细胞, 产生抗体, 诱导抗原特异性的体液免疫应答<sup>[4, 41]</sup>。

## 2.5 CpG 序列的免疫佐剂作用

DNA 疫苗具有很高的免疫原性, 纳克级表达的抗原蛋白即可诱发机体有效的免疫应答<sup>[42]</sup>, 而若用同样数量的蛋白质直接免疫动物, 则根本不可能诱发任何免疫应答<sup>[4]</sup>, 其原因在于表达载体质粒 DNA 上含有特定非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)模体。CpG 模体普遍存在于细菌 DNA 中, 脊椎动物基因组中 CpG 含量只有细菌的四分之一。CpG DNA 不仅能引起 B 细胞分化, 还可激活单核细胞、巨噬细胞和树突细胞, 引起这些细胞分泌 TH1 样为主的细胞因子, 而且能协同刺激抗原特异性 B 细胞和 T 细胞分化, 在 TH1 样细胞因子的作用下, 显著增强获得性细胞免疫<sup>[43]</sup>。因此, 加强对 CPG 免疫刺激原理的研究, 寻找最佳刺激序列, 对增强 DNA 疫苗的免疫效果很有必要。

## 2.6 DNA 疫苗的优点

与基因工程疫苗以及常规疫苗相比, DNA 疫苗更具有优势<sup>[44]</sup>: (1) 可在体内持续表达, 可诱发长期免疫。(2) 疫苗免疫时产生的抗原多肽的递呈过程和自然感染时相似, 以其天然构象被递呈给免疫识别系统, 对构象型抗原表位引发的保护性免疫尤为重要, 而基因工程疫苗常常造成构象型抗原表位的改变或丢失。(3) 疫苗可以免去生产和纯化蛋白质的费用, 制备成本低于基因工程疫苗。(4) 构建 DNA 疫苗载体相对容易。

DNA 疫苗尽管有许多优点, 但也有许多不足<sup>[45, 46]</sup>: (1) 质粒导入细胞的效率不高, 诱发的免疫效果也相对较低。(2) 转入体内的外源 DNA 有可能

整合到宿主细胞基因组上,使宿主细胞抑癌基因失活或癌基因活化,使宿主细胞转化成癌细胞。(3)质粒接种后表达少量蛋白,并持续较长时间,这种外源抗原的持续表达在理论上会对机体产生不良后果,包括免疫耐受,自身免疫病,过敏反应,超敏反应或自身攻击等。

目前,鱼类 DNA 疫苗主要应用于病毒性鱼病研究,包括出血性败血病毒(VHSV),传染性造血组织坏死病毒(IHNV)以及鳃鱼病毒(EVA, EVEX),草鱼呼肠孤病毒(FRV)等,而在细菌性鱼病和寄生虫鱼病研究较少<sup>[32,33]</sup>,主要是因为:(1)获得合适的抗原蛋白基因,是制备 DNA 疫苗的关键,而这只有通过病原体的病原学,生物化学及分子生物学等各方面研究,最后才能确定致病因子及其相关基因,而细菌和寄生虫由于基因组比病毒大许多而且往往具有多种抗原成分,因此很难获得合适的抗原蛋白基因,而病毒由于基因组小,结构单一,获得抗原蛋白基因相对容易。(2)许多细菌和寄生虫抗原都是复合抗原,在其蛋白质结构上还连接着一些糖基化基团,而这些糖分子又是维持该分子抗原性的必须成分<sup>[47]</sup>,这种糖蛋白分子往往在目前使用的质粒表达体系无法正确或高效表达。

### 3 生物工程疫苗的应用前景及安全性

我国人口众多,土地可耕面积少,水产养殖业在满足人们对动物蛋白需求方面有重要作用。据统计,2000 年全国渔业总产量达  $4\ 278.99 \times 10^4$  t, 养殖业产量  $2\ 578.21 \times 10^4$  t, 占总产量的 60%, 渔业总产值  $2\ 694.1 \times 10^8$  元, 占农林牧渔业总产值的 10.9%<sup>[48]</sup>。但是,由于中国养殖业技术落后,养殖场多以粗放型为主,加之水体环境不断恶化,造成我国养殖业病害频繁发生,给国民经济带来巨大损失。鱼用疫苗是防治各种鱼类病害极其有效的方法之一,但传统疫苗制备复杂,成本高,对病毒性疾病,作用不大。而运用生物工程技术研制的生物工程疫苗,制备简单,可利用工程菌大规模生产,且免疫残留物可分解,对环境和生态群落几乎没有影响。但在我国,有关鱼类病原抗原基因的研究工作还不多,国内除对草鱼呼肠孤病毒、鲤春病毒有一定的研究外,我国鱼类主要病原表面抗原的分子生物学基础研究还很欠缺<sup>[49]</sup>,鱼类生物工程疫苗研究亟待加强。可以预见,随着生物工程技术的不断发展,生物工程疫苗在渔业生产中的应用必将越来越广泛。

但是,我们也要清醒地认识到:生物工程疫苗给

养殖业的病害防治提供“利器”的同时,也可能给人类带来灾难:外源基因的重组,有可能产生自然界中新的物种,而人们无法预料此新物种对生态环境的影响是好是坏,尤其是 DNA 疫苗通过体细胞转导方式进行免疫,存在外源基因整合到宿主细胞染色体的可能性,而且,水产品最终为人消费,这样的免疫方式对人有无影响,尚无相关实验论证。因此,有待加强生物工程疫苗生物安全性的研究。

#### 参考文献:

- [1] Duff D C B. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida* [J]. **Journal of immunology**, 1942, 44: 87-94.
- [2] 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.
- [3] 吴金炉,曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗[J]. 海洋科学, 1999, 4: 37-38.
- [4] 吴乃虎. 基因工程原理(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 135-139.
- [5] 杨先乐,陈远新. 鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J]. 水产学报, 1996, 20(2): 58-64.
- [6] Gilmore R D Jr, Engelking H M, Manning D S, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge [J]. **Bio/Technology**, 1988, 6: 295-300.
- [7] Leong J C, Fryer J L. Viral vaccines for aquaculture [J]. **Annual Review of Fish Diseases**, 1993, 3: 225-240.
- [8] Manning D S, Leong J. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein [J]. **Virology**, 1990, 179: 9-15.
- [9] Vaughan L M, Smith P R, Foster T J. An aromatic dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, is attenuated and is effective as a live vaccine against the salmonid diseases, furunculosis [J]. **Infection and Immunity**, 1993, 61: 2172-2181.
- [10] Marsden M J, Vaughan L M, Foster T J, *et al.* A live (delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T cell responses relative to B cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. **Infect Immun**, 1996, 64(9): 3863-3869.
- [11] Vanderheijden N, Alard P, Lecomte C, *et al.* The

- attenuated V60 strain of channel catfish virus possesses a deletion in ORF50 coding for a potentially secreted glycoprotein [J]. **Virology**, 1996, **218**(2): 422-426.
- [12] Lecoq Xhonneux F, Thiry M, Dheur I, *et al.* A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout [J]. **Journal of General Virology**, 1994, **75**: 1579-1587.
- [13] Lorenzen N, Olesen N J, Vestergaard J P E, *et al.* Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein [J]. **Journal of General Virology**, 1993, **74**: 623-630.
- [14] Leong J C, Anderson E B, Chen L, *et al.* Biotechnological approaches to the development of salmonid fish vaccines [A]. Kimura T. Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases [C]. Sapporo: Hokkaido University press, 1992. 250-255.
- [15] Johnson K A, Flynn J K, Amend D F. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins [J]. **Journal of Fish Diseases**, 1982, **5**: 197-205.
- [16] Bressan G M, Stanley K K. PUEX, a bacterial expression vector related to PEX with universal host specificity [J]. **Nucleic Acids Research**, 1987, **15**: 10056.
- [17] Lorenzen N, Olesen N J. Immunization with viral haemorrhagic septicaemia antigens [A]. Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng P J, *et al.* Fish Vaccinology, Developments in Biological Standardization (90) [C]. Basel: KARGER, 1997. 201-209.
- [18] Winton J R. Immunization with viral antigens: infectious haematopoietic necrosis [A]. Gudding R, Lillehaug A, Midtlyng P J, *et al.* Fish Vaccinology, Developments in Biological Standardization (90) [C]. Basel: KARGER, 1997. 211-220.
- [19] Woff J A, Malone R W, William P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. **Science**, 1990, **247**: 1465-1468.
- [20] 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, **259**: 1745-1749.
- [21] 鱼艳荣, 刘希成, 张彦明, 等. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展 [J]. **动物医学进展**, 2000, **21**(2): 35-39.
- [22] 许雪梅, 宋国兴, 司静懿. DNA 疫苗机制研究进展 [J]. **微生物学免疫学进展**, 2002, **30**(1): 65-70.
- [23] Vallejo A N, Miller N W, Clem L W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses [J]. **Annual Rev of Fish Diseases**, 1992, **2**: 73-89.
- [24] 廖国阳, 姜述德. 基因疫苗生物学特征及影响其免疫应答的因素 [J]. **国外医学·生理、病理科学与临床分册**, 2002, **22**(4): 422.
- [25] 石军, 陈安国, 洪奇华. DNA 疫苗在鱼类中的应用研究进展 [J]. **中国兽药杂志**, 2002, **36**(5): 44-45.
- [26] 苏小凤, 邵庆均. DNA 疫苗及其在水产养殖业中的应用 [J]. **齐鲁渔业**, 2002, **19**(8): 10-13.
- [27] Anderson E D, Mourich D V, Leong A C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA [J]. **MOL Mar Bio**, 1996, **5**(2): 105-113.
- [28] Coll J M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. Brief review [J]. **Archives of Virology**, 1995, **140**: 827-851.
- [29] Einer Jensen K, Krogh T N, Roepstorff P, *et al.* Characterization of intramolecular disulphide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus [J]. **Journal of Virology**, 1998, **72**: 10189-10196.
- [30] Traxler G S, Anderson E, Lapatra S E, *et al.* Naked DNA vaccination of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) against IHNV [J]. **Dis Aquat Organ**, 1999, **38**(3): 183-190.
- [31] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer Jensen K. Immunity to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life stage [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2001, **11**(7): 585-591.
- [32] Lin T-L, Dickerson H W. Purification and partial characterization of immobilization antigens for *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. **Journal of Protozoology**, 1992, **39**: 457-463.
- [33] Xuting Wang, Theodore G, Clark J N, *et al.* Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* immobilisation antigens elicits serotype specific protection [J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2002, **13**(5): 337-350.
- [34] Barry M A, Lai C L, Johnston S A, *et al.* Protection against mycoplasma infection using expression library immunization [J]. **Science**, 1996, **377**: 632-635.
- [35] 王长军. 噬菌体表面展示技术进展 [J]. **国外医学免疫学分册**, 2001, **24**(4): 215-218.

(下转第 97 页)

(上接第 82 页)

- [36] 朱玉贤,李毅.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2000.449.
- [37] 刘建文,乐国伟,施用晖. DNA 疫苗研究进展[J].动物科学与动物医学,2002,19(1):15-18.
- [38] 李华,杨汉春. DNA 疫苗研究新进展[J].农业生物技术学报,1999,7(1):81.
- [39] Fernandez Alonso M, Alvarez F, Estepa A, *et al.* A model to study fish DNA immersion vaccination by using green fluorescent protein[J]. **Journal of Fish Diseases**, 1999, 22: 237-241.
- [40] Corbeil S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunization[J]. **Fish and Shellfish Immunology**, 2000, 10: 711-723.
- [41] 孙树汉. 核酸疫苗及其在疾病免疫防治中的应用[J].第二军医大学学报,2000,21(6):519.
- [42] Corbeil S, Lapatra S E, Anderson E D, *et al.* Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous virus strains of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. **Vaccine**, 2000, 18: 2817-2824.
- [43] 朱建中,朱鸿飞,卢春,等.免疫佐剂 CpG 的研究进展[J].生命的化学,2002,22(2):155.
- [44] 于善谦,王洪海,朱乃硕,等.免疫学导论[M].北京:高等教育出版社,1999.38-39.
- [45] 周世力. DNA 疫苗的研究进展[J].江汉大学学报(自然科学版)2002,19(2):82.
- [46] 靳彦文. DNA 疫苗接种的安全性[J].生物技术通讯,2001,12(1):56.
- [47] 李德昌,陈启军. 寄生虫虫苗的研究概况[J]. 中国兽医寄生虫病,2000,8(1):51.
- [48] 洪惠馨,林利民. 我国渔业问题与对策[J]. 集美大学学报(自然科学版),2002,7(1):5.
- [49] 白俊杰,叶星. DNA 疫苗及其在水产养殖中的应用研究进展[J].上海水产大学学报,2001,10(1):72.

(本文编辑:刘珊珊)