

综述

## 鱼类 DNA 疫苗研究的新进展

陈振海<sup>1,2</sup> 林天龙<sup>1</sup> 夏春<sup>2</sup>

(1. 福建省农科院畜牧兽医研究所, 福州 350003; 2 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

### CURRENT DEVELOPMENT IN THE STUDIES OF FISH DNA VACCINES

CHEN Zhenhai<sup>1,2</sup>, LIN Tianlong<sup>1</sup>, XIA Chun<sup>2</sup>

(1. Institute of Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Fuzhou 350003,

2. College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing 100094)

关键词: 鱼; DNA 疫苗

Key words: Fish; DNA vaccine

中图分类号: S942.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)06-0648-05

疫苗及其预防接种是控制动物病原疾病、保障养殖业持续发展的重要手段。半个世纪以来, 学者们也努力进行着各种鱼类病原体疫苗的研究。鱼类疫苗可分为灭活苗、减毒活疫苗、重组活疫苗、基因工程疫苗以及 DNA 疫苗五大类<sup>[1]</sup>; 十年前已有一些细菌苗商品化<sup>[2]</sup>, 但病毒苗还很少, 而寄生虫疫苗几乎没有<sup>[3]</sup>。因为鱼类疫苗存在免疫保护力、生产成本和安全性等问题, 大部分疫苗停留在实验室使用阶段, 还未商品化生产<sup>[4,5]</sup>。

1993 年以来, DNA 疫苗以其高免疫保护率受到了广泛关注。DNA 疫苗是指直接把带有目的抗原基因的重组质粒转染或注射到动物体内, 使之表达出天然抗原物质。与传统疫苗相比, DNA 疫苗的制作相对简单, 成本低廉, 运输保存容易, 不存在毒力返强的现象。并且, 必要时可对 DNA 疫苗加以改进, 在同一质粒 DNA 中表达成多价疫苗, 以进一步减少费用。同时, DNA 疫苗可通过免疫激活 NDA 序列 (ISS) 触发非特异性免疫应答, 以及通过表达抗原、有效地刺激特异性体液和细胞免疫应答。DNA 疫苗的作用机理如同活疫苗, 却没有活疫苗返强导致感染的危险。与灭活苗和亚单位疫苗相比, DNA 疫苗的效果更好。1996 年, Anderson 等首次将鱼传染性造血器官坏死症病毒 (IPNV) 的 G 糖蛋白基因插入真核表达质粒制成 DNA 疫苗, 并免疫虹鳟鱼, 发现能够诱导其产生强烈的保护性免疫应答, 抵抗 IPNV 病毒的攻击<sup>[6,7]</sup>。迄今为止, 大量学者进一步进行了鱼类 DNA 疫苗的研究, 并取得了新的进展。鱼类生活在水中, 与陆上动物相比在对病原疾病的预防接种方法上存在较大差异。为了促进鱼类 DNA 疫苗在我国的研究与应用, 本文对鱼类 DNA 疫苗的研究技

术及其最新进展予以综述。

#### 1 表达质粒的设计与改进

##### 1.1 表达质粒的设计

鱼用 DNA 疫苗表达质粒的设计前提是目的基因的密码子必须适用于在鱼类细胞中表达。表 1 中总结了在鱼类 DNA 疫苗研究中所使用过的目的基因。主要包括数种鱼类重要病原的宿主保护性抗原基因以及几种报告基因。就目的基因所用的密码子而言, 表达一些细菌和寄生虫基因时存在密码子的使用问题; 而表达病毒基因时则不存在此类问题, 因为病毒的基因本来就能在鱼类细胞中利用细胞器进行表达。例如在“白点病”病原多子小瓜虫的抑动抗原基因序列中, UAA 和 UAG 均编码谷氨酰胺, 而在许多动物和鱼类中该密码子则作为终止密码子使用<sup>[9]</sup>。因此, 要在鱼类细胞中表达多子小瓜虫的抑动抗原基因, 就必须将 UAA 或 UAG 突变成 CAA 或 CAG。另外, 在表达质粒的设计时还必须确认目的基因中是否还含有多余的内含子, 并且此内含子在鱼类细胞内是否影响外显子转录成 mRNA 后的剪接。目前已有报道表明鱼类细胞并不能正确加工所有哺乳动物的内含子<sup>[10]</sup>。

表达外源基因的质粒载体通常含有真核表达载体的组件。在鱼类 DNA 疫苗的研究中, 已经测试了许多启动子的使用效果(表 1)。结果显示不同的启动子差异很大。相对而言, 巨细胞病毒早期启动子 (CMV-IEP) 在鱼类 DNA 疫苗中的使用效果最好。并且, CMV-IEP 序列中已经包括了 CMV 的增强子序列。此外, 特定的 DNA 疫苗载体在不同的动物体内也呈现出一定差异。Hepell 等报道 pcDNA3 真核表达质粒在

鱼体的表达效果高于在鼠中的表达<sup>[11]</sup>。

## 1.2 表达质粒的改进

改进表达质粒的方法包括加载T细胞表位、共线性表达细胞因子基因、加载共刺激分子序列以及CpG免疫刺激基元序列等。这些措施可促进鱼类的免疫应答和减少DNA疫苗的使用剂量。

表达质粒中如含有免疫激活作用的非甲基化六碱基DNA序列即CpG基元(Motif)时能够刺激B细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞的活性<sup>[40]</sup>。Kanellos等<sup>[12]</sup>研究结果显示适用于哺乳动物如老鼠的CpG基元序列并不一定适用于鱼类,CpG基元具有种属特异性。目前应用于鱼类DNA疫苗研究的质粒载体都含有一定数量的CpG基元。因此,寻找新的鱼类CpG基元以及确定其最佳数量将有助于改进鱼类DNA疫苗。

细胞因子如干扰素、白介素等是机体免疫系统的调节因子,在DNA疫苗的研究中常作为免疫佐剂基因加载于真核表达质粒。2000年,Yin等<sup>[13]</sup>将重组鲤鱼白介素IL-1 $\beta$ 作为免疫佐剂与嗜水气单胞菌灭活苗共同免疫,取得了良好的效果。这表明细胞因子可以作为鱼类疫苗的免疫佐剂。此外,将抗原基因与细胞因子基因共线性表达或分别表达、联合使用可增进鱼类DNA疫苗的免疫效果<sup>[14]</sup>。此外,Kanellos等<sup>[12]</sup>的研究结果显示鼠的细胞因子GM-CSF也能作为鱼类DNA疫苗的免疫佐剂,即将其与含抗原编码基因的表达质粒共同注入金鱼体内可增强细胞免疫应答。

## 2 目的基因的表达

### 2.1 表达的时间与效果

目的基因的表达可从表达的时间、效果以及表达位点两方面分析。迄今为止,还难以确定抗原基因在DNA表达质粒中表达后到底需要多长时间能诱导鱼类产生最强的免疫应答。因为持续性表达抗原蛋白也许将导致组织坏死或者免疫耐受。重组质粒DNA的持续表达可能对人类食品构成不安全因素。所以有必要首先确定重组质粒DNA及其编码的抗原蛋白在鱼类细胞中的存在时间。Anderson等<sup>[7]</sup>用10 $\mu$ g和25 $\mu$ g的pCMV-Luc(荧光酶)分别注射1g和50g的鱼,7d后均测到了最大的荧光酶活性。其中,1g鱼在115d后荧光酶活性下降到了10%;50g鱼的荧光酶活性在28d时仍有50%,至63d时仍有十倍于本底水平的荧光酶活性。因此,在转染重组质粒DNA的鱼类肌肉细胞中,抗原有可能长期表达。而在上述实验过程中,并没有观察到组织异常,也没有出现免疫耐受等现象。有报道证实将含lacZ报告基因的纯质粒DNA注射入虹鳟肌肉后并不引起永久性的组织损伤,可是在注射部位出现了炎症细胞,但没有坏死症状<sup>[16]</sup>。另外,DNA疫苗在使用中还未观察到如油佐剂疫苗引起的内脏粘连、生长延滞等副作用<sup>[17]</sup>。尽管这些结果显示DNA疫苗对鱼并没有多少负面影响,但是从生物安全的角度考虑,尽量要限制DNA疫苗在机体组织中留存的时间。

### 2.2 表达的位点

重组质粒DNA注射入肌肉后,根据鱼体大小,外源基因表达的组织与器官明显不同。对于较大的鱼,报告基因的表达位点似乎仅限于注射部位,包括肌肉细胞和渗透在肌肉组织、毛细血管附近的上皮细胞<sup>[21]</sup>。重组质粒DNA转染非肌肉组织,尤其是抗原提呈细胞,将有助于增强免疫应答。对小鱼来说,肌肉注射后重组质粒DNA可在不同的器官(鳃、脾、肾)中表达,尤其在肌肉中表达量最大<sup>[31]</sup>。

Anderson等<sup>[7]</sup>用25 $\mu$ g/200 $\mu$ L的pCMV $\beta$ Gal注射50g的鱼后,在接种位点附近的肌肉组织中能检测到报告蛋白活性;而用10 $\mu$ g/200 $\mu$ L的pCMV $\beta$ Gal注射1g的鱼后,在沿着注射针径周围5mm以内的肌肉组织中可检测到活性,并且不同的组织中检测到的报告蛋白的量和活性是不同的,最高的活性还是在沿着接种途径的肌肉细胞中,鱼类的两种主要的淋巴器官(头肾和脾)中也能检测到报告蛋白活性。因此,用DNA疫苗免疫小鱼时有必要确定究竟哪种细胞被转染。另外,在肌肉注射后重组质粒DNA转染的肌细胞中,重组质粒DNA呈不能复制的超螺旋状态,也没有发现质粒DNA整合进宿主基因组中的现象。

## 3 鱼类DNA疫苗的接种方式

鱼类疫苗的免疫接种方法主要包括注射、浸泡、口服和基因枪接种四种方式。注射免疫尽管存在动物的应激和人工劳动强度大等问题,但却能使鱼类免疫接种取得较好效果<sup>[32]</sup>。目前,大部分的鱼类DNA疫苗均采用的是注射免疫(表1)。即将纯化的重组质粒DNA溶液从鱼的背鳍附近的侧面以肌肉注射的方式进行接种。另外还有一些其他的注射部位。但是从鳃部注射难以检测到报告基因产物,而从腹腔注射得到的结果差异较大<sup>[21]</sup>。

基因枪接种是注射接种的替代方法,在鱼类DNA疫苗研究中常有报道<sup>[23,26,27]</sup>。即将重组质粒DNA与金颗粒、亚精胺混合,使DNA包被于这些微颗粒的表面,再经过离心、乙醇洗涤、超声波处理等步骤制成附有重组质粒DNA微颗粒载体,通过基因枪发射将DNA微颗粒导入鱼的表皮内。从已有报道的结果分析,基因枪接种免疫后,报告基因的表达水平和效果都不如注射接种。基因枪接种也因成本高和操作繁琐,不能广泛应用于养殖场。

浸泡免疫是将动物放于一定有效浓度的疫苗液中或用疫苗溶液以喷雾的方式接种动物。虽然浸泡免疫效果不如注射接种,然而因其工作量小、且适用于很小的鱼,是将来鱼类疫苗接种免疫的发展方向之一<sup>[1]</sup>。Alonso等<sup>[22]</sup>将携带绿色荧光蛋白基因(GFP)和含病毒出血性败血症病毒G糖蛋白基因(VHSV-G)的质粒DNA分别与超声波、脂质体、微载体联用浸泡免疫接种虹鳟鱼。结果显示,在虹鳟鱼的鳍细胞中能检测到荧光酶活性。荧光酶表达的时间越长,相应的用含VHSV-G质粒DNA免疫鱼的效果就越好。DNA疫苗与低强度短脉冲的超声波联用是获得高水平抗体免疫应答和免疫保护率的有效方法。有关超声波诱导重组质粒DNA转染虹

表 1 主要的鱼类 DNA 疫苗实验

Tab. 1 List of fish DNA vaccine experiments

实验动物	基因 <sup>a</sup>	启动子 <sup>b</sup>	接种部位 <sup>c</sup>	接种方法 <sup>d</sup>	参考文献
金鱼	$\beta$ -Gal <sup>1</sup>	CMV- IEP <sup>10</sup>	肌肉	注射	[ 18]
	$\beta$ -Gal±GM-CSF	CMV- IEP	皮内、肌肉、腹腔	注射	[ 12]
虹鳟	IHNV G 糖蛋白 <sup>2</sup>	CMV- IEP	肌肉	注射	[ 19]
	SHRV G 糖蛋白 <sup>3</sup>				
SVCV G 糖蛋白 <sup>4</sup>					
	IHNV 核衣壳 N 蛋白	CMV- IEP	肌肉	注射	[ 20]
P 磷蛋白					
	M 基质蛋白				
NV 非毒粒蛋白					
	VHSV G 糖蛋白 <sup>5</sup>	CMV- IEP	肌肉	注射	[ 21]
GFP <sup>6</sup>			皮肤	浸泡	[ 22]
	CAT <sup>7</sup>	CMV- IEP	皮肤	浸泡	[ 22]
CAT <sup>7</sup>			肌肉	基因枪	[ 23]
	SV40 EP <sup>11</sup>				
Luc <sup>8</sup>		CMV- IEP	肌肉	注射	[ 7]
	鲤鱼 $\beta$ 肌动蛋白				
鼠瘤病毒糖皮质激素应答启动子					
IHNV G 糖蛋白		CMV- IEP	肌肉、腹腔、皮肤	注射、基因枪、浸泡	[ 24]
	Luc				
ScAbs(VHSV) <sup>9</sup>		CMV- IEP	肌肉	注射	[ 25]
	Luc	CMV- IEP	皮内	基因枪	[ 26]
CAT、 $\beta$ -Gal		SV40 EP	肌肉	注射	[ 27]
	CAT	兔 $\beta$ 心肌球蛋白重链	肌肉	注射	
大西洋鲑鱼		人 MxA			
	Luc	鲤鱼 $\beta$ 肌动蛋白	肌肉	注射	[ 28]
比目鱼		鱼乳酸脱氢酶			
	CAT	SV40 EP	皮内	基因枪	[ 29]
玻璃鯙鱼		CMV- IEP			
	Luc	CMV- IEP	肌肉	注射	[ 30]

注: 1.  $\beta$ -Gal $\beta$  半乳糖苷酶; 2. IHNV 传染性造血器官坏死症病毒; 3. SHRV 乌鳢弹状病毒; 4. SVCV 鲤鱼春季病毒血症病毒; 5. VHSV 病毒出血性败血症病毒; 6. GFP 绿色荧光蛋白; 7. CAT 氯霉素乙酰转移酶; 8. Luc 荧光酶; 9. ScAbs 单链噬菌体抗体; 10. CMV- IEP 巨细胞病毒早期启动子; 11. SV40 EP 猴病毒 40 早期启动子。

鳟鱼皮肤细胞的机制目前还不清楚, 然而已有研究证明超声波能使得鱼体胞间空隙增大、破坏连接于表皮细胞间的桥粒<sup>[33]</sup>。还有些其他的机制可能用来解释超声波在鱼类 DNA 疫苗中起作用的机理<sup>[34,35]</sup>, 这些都还有待进一步证实。另外, 目前还没有鱼类 DNA 疫苗口服免疫接种的报道。

#### 4 DNA 疫苗的免疫应答

##### 4.1 体液免疫应答

鱼类体液免疫应答包括 B 细胞识别和吸附可溶性抗原、产生和分泌特异性抗体等过程。实验结果显示 DNA 疫苗能诱导鱼类产生特异性的免疫球蛋白。用含 $\beta$ -半乳糖苷酶(*lacZ*)基因的质粒 DNA 注射免疫金鱼, 7d 后在金鱼血清中能

检测到抗 $\beta$  半乳糖苷酶的抗体<sup>[36]</sup>。用含 VHSV-G 基因的质粒 DNA 注射虹鳟鱼, 23d 后能检测到抗 G 蛋白的抗体, 血清抗体浓度在 3—8 周间达到峰值, 抗体形成的浓度维持高水平可达数周之久<sup>[31]</sup>。Russell 等<sup>[37]</sup>证实肌肉注射含编码 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的质粒 DNA 后, 金鱼比老鼠更易产生特异性抗体。与高等哺乳动物相比, 鱼类不发达的肌肉组织存在区室化, 这使得鱼类肌纤维更有利 DNA 质粒的转移, 增加了传播到其他组织的可能性。如同哺乳动物, 鱼类的体液免疫应答也具有抗原剂量依赖性。当用低剂量的 DNA 注射时, 血清抗体的产生是不完全的<sup>[18]</sup>。在首次免疫后第三周进行 DNA 疫苗的加强免疫并不产生更强烈的或更快的体液免疫应答<sup>[6]</sup>。Lorenzen 等<sup>[38]</sup>研究结果显示, 用含 VHSV-G 基因的质粒 DNA

免疫接种虹鳟鱼,血清中和抗体的滴度在攻毒前和攻毒后并没有明显的不同。一些结果也证实鱼类最强的体液免疫应答是由单剂量的DNA疫苗诱导的。然而,目前还没有关于在DNA疫苗的免疫保护期内去评估加强免疫效果的报道。

#### 4.2 细胞免疫应答

细胞介导的免疫应答包括CD4和CD8T细胞分别识别由MHCⅡ和MHCⅠ分子呈递的抗原多肽激活细胞毒性T淋巴细胞和ADCC T淋巴细胞等过程。鱼类的种类多、免疫系统的差别较大,所以难以对鱼类的细胞免疫应答进行标准评估。DNA疫苗免疫后,在不同的时间分离鱼肾脏淋巴细胞进行转化实验,结果显示用含特异抗原的重组质粒再次接种后可呈现出T细胞增殖<sup>[36]</sup>。另外还有报道证实,用编码抗原基因的质粒DNA肌肉注射后,鱼肌肉中Mx基因被激活<sup>[31]</sup>。这表明可能产生了干扰素。

此外,用DNA疫苗免疫鱼后,也有增强MHCⅡ分子表达的报道<sup>[31]</sup>,这表明DNA疫苗激活了与MHCⅡ分子表达有关的B细胞、巨噬细胞和T细胞。用含非抗原性的荧光酶报告基因和含VHSV病毒的G糖蛋白基因的质粒联合注射鱼,接种后28d荧光酶活性大大降低<sup>[31]</sup>,这一结果表明VHSV-G诱发了鱼类特异的CTL反应。此外,用含有VHSV病毒核衣壳N基因的DNA疫苗免疫鱼后,虽然不能在血清中检测到中和抗体,但鱼类却能抵抗病毒的攻击<sup>[38]</sup>。这也进一步表明细胞免疫应答提供了一定程度的免疫保护作用。

#### 4.3 免疫效果评估

DNA疫苗在小规模攻毒实验中提供给鱼很好的免疫保护力。用含传染性造血器官坏死症病毒G糖蛋白基因的DNA疫苗免疫虹鳟鱼,攻毒实验显示存活率达到75%<sup>[6]</sup>。用含VHSV病毒G糖蛋白基因的DNA疫苗免疫接种虹鳟鱼,用同源和异源病毒分别攻毒后,虹鳟鱼存活率分别达到97%和78%<sup>[31,38]</sup>。此外,用含IHNV或VHSV G糖蛋白基因的DNA疫苗免疫成鱼后收集抗血清,将其被动免疫接种虹鳟幼鱼,攻毒后的存活率是100%<sup>[21]</sup>。

#### 5 DNA疫苗的有效剂量和体积

从生物安全和疫苗成本的角度考虑,确定DNA疫苗的有效剂量十分重要。DNA疫苗有效剂量取决于是否能够诱导鱼类的有效免疫应答,该剂量也间接决定了DNA疫苗的转染效率和抗原提呈的效率。因此不同DNA疫苗的免疫接种剂量各不相同,即使是同种DNA疫苗也可因接种鱼的种类、途径和方法的不同而导致较大差异。在实际操作中,鱼类DNA疫苗的免疫接种是批量进行的,因此小剂量使操作更方便,费用也更低廉。一般来说适用鱼类的DNA剂量为1—50 $\mu$ g、体积为10—50 $\mu$ L。也有报道显示较低剂量的DNA疫苗对鱼类也有效。Hepell等<sup>[15]</sup>研究结果显示用0.1 $\mu$ g/5 $\mu$ L质粒DNA溶液注射平均重量1g的虹鳟鱼能够产生免疫保护。

注射越大剂量的DNA并不一定增加目的基因的表达水平,因为DNA可能仅被有限数量的细胞摄取。迄今为止没有研究显示在不同尺寸和种类的鱼之间取得的结果有很大差

异,但年龄可能是一个重要因素,如年龄较小、生长快的草鱼比年龄较大的草鱼能够表现更高水平的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告基因活性<sup>[27]</sup>。最适剂量的DNA并不与免疫接种的动物个体大小成正比,为了测试DNA疫苗的免疫应答,最初使用剂量一般在25—50 $\mu$ gDNA之间就足够了。

注射每尾鱼的DNA溶液体积应尽量小。然而Hepell等<sup>[41]</sup>研究显示增加质粒DNA溶液的体积能使得检测到的个体鱼间报告基因表达水平差异减小。Anderson等测试了100 $\mu$ L和200 $\mu$ L含相同剂量的质粒DNA溶液,也得到了相同的结论。DNA溶液的体积越小,测到的个体间的结果差异越大,这是因为接种DNA疫苗的器具精确度不高或接种操作时DNA的损失造成的。当用小量体积DNA溶液注射鱼类肌肉时,尤其要防止DNA溶液的流失。

#### 6 生物安全

质粒DNA注入鱼类后,对鱼类消费者构成了潜在的威胁;同时还存在DNA质粒整合到人类基因组等问题。但是,迄今为止,还没有此类相关的报道,也没有表达质粒从鱼类性腺或卵子中垂直传递的报道。表达质粒从肌肉注射进入鱼体后,质粒DNA存在的时间与在哺乳动物不同。注射到鱼体内的质粒DNA更稳定,Southern blot检测结果显示仅有少量降解,而将质粒DNA注入小鼠几小时后就开始降解<sup>[39]</sup>。注射的质粒DNA最长的存在时间为63d<sup>[7]</sup>。PCR技术可在注射后的70d内,从注入的肌肉中检测到质粒DNA,其他组织检测不到<sup>[36]</sup>。

#### 7 展望

虽然鱼类DNA疫苗的研靠仍处于初期阶段,但已有不少实验结果证实DNA疫苗能诱发鱼类产生特异性的体液免疫和细胞免疫应答,尤其是可对目前尚没有常规疫苗的病毒病进行免疫预防。此外,最近Lorenzen等<sup>[25]</sup>将编码抗病毒出血性败血症病毒(VHSV)单链噬菌体抗体基因插入质粒载体后注射虹鳟鱼后,表达了抗VHSV的中和抗体,并在攻毒试验中也取得了较好的结果。这类抗体基因工程结合DNA疫苗的新尝试也许会拓宽鱼类疫病防治的新领域。如果在水产养殖中大规模使用DNA疫苗,有些重更问题还尚待解决,如肌肉注射DNA疫苗固然有效,然而这种方法并不适用于鱼苗,需要寻找其他替代方法。对于鱼苗,使用口服或浸泡免疫的方法更为适用。

随着我国水产养殖业的快速发展,将会促进有关部门对疫病防治的投入。DNA疫苗将以其独有的优势出现在鱼类疫病的研究领域和实际应用中。目前在国内,作者已分别将嗜水气单胞菌溶血素基因和多子小瓜虫抑制抗原基因插入pcDNA3中,采用肌肉注射的方式将重组质粒免疫接种鳗鱼和鲴鱼,结果证实两种鱼均能产生针对溶血素和小瓜虫抑制抗原的特异性抗体,然而实验表明鱼并不能抵抗嗜水气单胞菌的攻击,但是免疫抑制抗原的鱼体内特异性抗体能够抑制小瓜虫的运动,表明有一定的免疫保护效果。据作者所知,这是目

前在国内首次同时进行的两项鱼类核酸疫苗实验,为我国在鱼类核酸疫苗的研究方面做一些有益的尝试。

### 参考文献:

- [ 1 ] Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. Recent developments in fish vaccinology [J]. *Veterinary Immunol Immunopathol*, 1999, **72**: 203—212
- [ 2 ] Newman S G. Bacterial vaccines for fish [J]. *Ann. Rev. Fish Dis*, 1993, **3**: 145—185
- [ 3 ] Midtlyng P J. Novel vaccines & new vaccination strategies for fish. [J]. *Bull. Eur. Fish Pathol*, 1997, **17**: 239—244
- [ 4 ] Leong J C, Fryer J L. Viral vaccines for aquaculture [J]. *Rev Fish Dis*, 1993, **3**: 225—240
- [ 5 ] Munn C B. The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines [J]. *Fish Shellofish Immunol*, 1994, **4**: 459—473
- [ 6 ] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S C, et al. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, **5**: 114—112
- [ 7 ] Anderson E D, Mourich D V, Lenong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, **5**: 105—113
- [ 8 ] Anderson E D, Leong J C. Development of DNA vaccines for Salmonid fish [M]. Totowa: Humana Press Inc., 2000, 105—106
- [ 9 ] Budmann K, Sigh J, Nielsen C V, et al. Host response against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Vet parasitol*, 2001, **100**: 105—116
- [ 10 ] Bearzotti B M, Perrot E, Vanhee C M, et al. Gene expression following transfection of fish cells [J]. *J Biotechnol*, 1992, **26**: 315—325
- [ 11 ] Heppell J, Davis H L. Expression of foreign genes in fish following direct DNA injection [R]. Internal Symp. on Fish Vaccinology, Oslo, Norway, 1996
- [ 12 ] Kanellos T S, Sylvester I D, Butler V L, et al. 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
- [ 13 ] Yin Z, Kwang J. Carp interleukin-1 $\beta$  in the role of an immunor adjuvant [J]. *Fish Shellofish Immunol*, 2000, **10**: 375—378
- [ 14 ] Kwang J. Fishing for vaccines [J]. *Nature biotech*, 2000, **18**: 1145—1146
- [ 15 ] Heppell J, Lorenzen N, Lorenzen E, et al. DNA vaccines for fish: protection against viral hemorrhagic septicemia virus in trout [R]. Abstrat in First International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference. Madison, WI, July 1997, 27—31
- [ 16 ] Chiari M G, Livingston S K, Cacho C M, et al. Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment [J]. *Dis Aquat Org*, 1996, **27**: 5—12
- [ 17 ] Poppe T T, Breck O. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil adjuvanted vaccine [J]. *Dis Aquat Org*, 1997, **29**: 219—226
- [ 18 ] Kanellos T S, Sylvester I D, Howard C R, et al. DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish [J]. *Vaccine*, 1999, **17**: 965—972
- [ 19 ] Kim C H, Johnson M C, Drennan J D, et al. DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish [J]. *J. Virol*, 2000, **74**(15): 7048—7054
- [ 20 ] Corbeil S, Lapatra S E, Anderson E D, et al. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines [J]. *Dis Aquat Org*, 1999, **39**: 29—36
- [ 21 ] Boudinot P, Bianco M, Kinkelin P D, et al. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout [J]. *Virology*, 1998, **249**: 297—306
- [ 22 ] Alonso M F, Rocha A, Coll J M. DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicæmia virus [J]. *Vaccine*, 2001, **19**: 3067—3075
- [ 23 ] Lee J Y, Hirono I, Aoki T. Stable expression of a foreign gene, delivered by gene gun, in the muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Mar Biotechnol*, 2000, **2**: 254—258
- [ 24 ] Corbeil S, Kurath G, Lapatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation [J]. *Fish shelfish Immunol*, 2000, **10**: 711—723
- [ 25 ] Lorenzen N, Cupit P M, Jenson K E, et al. Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes [J]. *Nature Biotechnol*, 2000, **18**: 1177—1180
- [ 26 ] Torgersen J, Collas P, Alestrom P. Gene gun mediated transfer of reporter genes to somatic zebrafish (*Danio rerio*) tissues [J]. *Mar Biotechnol*, 2000, **2**: 293—300
- [ 27 ] Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, et al. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle [J]. *FEBS letters*, 1991, **290**(1, 2): 73—76
- [ 28 ] Chiari M G, Chiaverini L A. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture [J]. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1999, **15**: 121—124
- [ 29 ] Tucker C, Endo M, Hirono I, 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
- [ 30 ] Dijkstra J M, Okamoto H, Ootake M, et al. Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhosus*) [J]. *Fish Shellofish Immunol*, 2001, **11**: 199—202
- [ 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 septicæmia virus genes as model [J]. *Fish Shellofish Immunol*, 1998, **8**: 271—286
- [ 32 ] Press C M, Lillehaug A. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects [J]. *Br Vet J*, 1995, **151**: 45—69
- [ 33 ] Frenkel V, Kimmel E. Ultrasound induced intercellular space widening in fish epidermis [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, **26**: 473—480
- [ 34 ] Frenkel V, Kimmel E, Iger Y. Ultrasound induced cavitation damage to external epithelia of fish skin [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1999, **25**: 295—303
- [ 35 ] Martin C J, Pratt B M, Watmough D J. Observation of ultrasound induced effects in the fish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Ultrasound Med*

*Biol*, 1983, **9**: 177—183

- [36] Kanellos T, Sylvester L D, Ambali A G, et al. The safety and longevity of DNA vaccines for fish [J]. *Immunology*, 1999, **96**: 307—313
- [37] Russell P H, Kanellos T, Sylvester I D, et al. Nucleic acid immunization with a reporter gene results in antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, **8**: 121—128
- [38] Lorenzen N, Lorenzen E, Jensen K E, et al. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following DNA vaccination [J]. *Fish shelffish Immunol*, 1999, **8**: 261—270
- [39] Wolff J a, Williams P, Ascadi G, et al. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo [J]. *Bio Techniques*, 1991, **4**: 474—485
- [40] Krieg A M, Yi A K, Chorr S J, et al. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines [J]. *Trends Microbiol*, 1998, **6**: 23—26
- [41] Hepell, J. Davis, H. L. Expression of foreign genes in fish following direct DNA injection [J]. *Devlop. Biol. Stand*, 1997, **90**: 464

## 第十届国际轮虫学术研讨会概况

### A Survey of X<sup>th</sup> International Rotifer Symposium

由国际轮虫学科学委员会发起的第十届国际轮虫学术研讨会于2003年6月7日至13日在奥地利伊梅滋(Illmitz)召开。来自三十多个国家和地区的113名专家和学者出席了这次大会。会议围绕着轮虫遗传学、系统发育和进化、轮虫分子生态学、生物地理学和发育生物学、轮虫的滞育、低湿生活(anhydrobiosis)和休眠卵、轮虫形态学、超微结构和行为、轮虫的摄食、轮虫种群生态学、轮虫的培养、轮虫生理学和生态毒理学等方面内容进行了广泛而深入的研讨。60余名代表作了大会报告,另有40余名代表以墙报形式展示了自己的部分研究成果。

从本次大会所研讨的内容来看,当前国际轮虫学研究发展迅猛。这主要表现在:一、轮虫学研究涉及的范围有了进一步拓展。如轮虫的无性生殖与物种形成和自然选择研究、蛭态类轮虫卵的发育研究以及臂尾轮虫雄体的形态、休眠卵的发育等的研究均给轮虫进化和发育以及繁殖生物学的研究增加了新的内容。二、轮虫学许多领域的研究深度得到进一步增加,如有关轮虫种群分化和物种形成的研究使得轮虫分子生态学研究的深度进一步增加,而轮虫老化(aging)的研究则由老化的过程研究发展到老化的分子机制研究等。

(安徽师范大学生命科学学院 席贻龙)