

文章编号:1005-8737(2001)04-0087-04

·综述·

鱼类 DNA 疫苗的研究进展

Progress of studies on DNA vaccine for fish

伊光辉^{1,2}, 林天龙^{2*}, 熊邦喜¹

(1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 2. 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003)

YI Guang-hui^{1,2}, LIN Tian-long^{2*}, XIONG Bang-xi¹

(1. Fisheries College, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;

2. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

关键词: 鱼类; DNA 疫苗

Key words: fish; DNA vaccine

中图分类号: S942.5

文献标识码: A

DNA 疫苗也称核酸疫苗、基因疫苗,是将含有编码保护性抗原蛋白的基因序列和表达所必需调控元件的质粒 DNA 直接导入动物组织,使抗原蛋白经过内源性表达并递呈给免疫系统,诱发机体产生特异性体液免疫和细胞免疫应答,形成对相应病原的免疫保护作用,用于免疫的质粒 DNA 称为 DNA 疫苗。它不同于传统的弱毒疫苗、灭活疫苗及亚单位疫苗,是带有特异性抗原基因的真核表达质粒,是继病原体疫苗、亚单位疫苗之后的第 3 代疫苗^[1]。DNA 疫苗在人体和哺乳动物研究中已取得一定进展,部分疫苗已进入临床试验阶段^[2]。而鱼类 DNA 疫苗的研究则相对滞后,其推广和普及受到许多因素的制约^[3]。目前临床上用于水产养殖动物的疫苗为数不多,尤其是针对一些重要经济鱼类病毒性疾病的疫苗极少,抗寄生虫的疫苗仍为空白,渔用生物制品行业的发展空间十分广阔。许多鱼病学家已开始采用重组 DNA 技术进行疫苗的研究^[4,5],在利用基因工程制苗诸多方法中,DNA 疫苗被认为是有发展潜力的新型疫苗^[6],DNA 疫苗的诞生为鱼类疾病防治和疫苗开发提供了崭新的思路。

1 外源基因在鱼体内表达的研究

1990 年 Wolff 等^[7]将纯化的质粒 DNA 直接注射到小鼠骨骼肌细胞中,发现该基因能够在小鼠骨骼肌中表达,免疫

接种 60 d 后,由 DNA 质粒编码的酶仍有生物学活性,这为新型疫苗的设计提供了新的思路。1993 年 Ulmer 等^[8]将携带流感病毒核心蛋白编码基因的质粒注入小鼠肌肉中,使小鼠产生对多种流感病毒的免疫保护作用,由此开始了 DNA 疫苗的研究。许多学者对 DNA 疫苗在鱼病防治中应用的可能性进行了探讨。报告基因是一种编码可被检测的蛋白质或酶的基因,它是检测外源基因在鱼体内表达与否的一种简便、有效的方法,常用的报告基因有氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, cat)、 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)、荧光素酶(luciferase, luc)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)等^[9]。1991 年 Hansen 等^[10]首先报道了外源基因能够在鱼类肌肉组织中进行表达,他们把 SV40 早期区启动子、兔 β -心肌球蛋白(beta-cardiac myosin)重链启动子以及人 MxA 启动子分别构建到含 cat 或 β -gal 报告基因的质粒中,然后将含启动子和报告基因的质粒注射到鱼类的肌肉组织,结果发现大多数重组质粒能在鱼类细胞中表达;组织化学分析表明,在鱼类注射部位的肌纤维处 β -gal 基因表达效率最高。随后的实验^[11-14]证实,在金鱼(*Carassius auratus*)、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等鱼类体内,外源基因能够正常表达。这些研究结果表明,外源 DNA 在鱼体内不但能够高效、长时间地表达,而且能诱导宿主产生针对外源蛋白质的免疫应答^[12],这为构建鱼类 DNA 疫苗提供了依据。

2 鱼类 DNA 疫苗的构建

2.1 抗原基因的制备

DNA 疫苗是通过原位表达具有天然活性外源基因产物

收稿日期:2000-12-21

基金项目:福建省科技厅资助项目(2000Z077)

作者简介:伊光辉(1975-),男,硕士,从事鱼类免疫学研究。

E-mail: ygh75@163.net

* 通讯作者 Corresponding author, Tel: 0591-7817514, E-mail:

lmt@pub3.fz.fj.cn

来诱导宿主产生保护性免疫应答,因此筛选保护性抗原基因是构建 DNA 疫苗的前提。目前在鱼类病毒 DNA 疫苗研究中一般选择编码病毒表面糖蛋白(Glycoprotein)基因作为抗原基因构建 DNA 疫苗。Noonan 等^[15]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(*Aeromonas salmonicida*)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 Lorenzen 等^[16]和 Anderson 等^[17]的研究也得出了相似结果。分别把 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^[12,13],而用核衣壳蛋白基因构建的质粒 pCMV4-N 免疫虹鳟并不产生抗 IHNV 的中和抗体^[17]。因此以病毒表面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(*Ichthyophthirius multifiliis*)的研究较为系统、深入,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^[18],用小瓜虫的抑动抗原(immobilization antigen, i-Ag)作为抗原基因构建的 DNA 疫苗可以有效激发斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)的体液免疫应答,产生高水平的血清抗小瓜虫的抑动抗体。对于变异频繁的病源体,则可以选择各亚型共有的核心蛋白保守 DNA 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路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的病原体的 DNA 疫苗具有重要意义^[19,20]。

2.2 载体的选择

用于构建 DNA 疫苗的表达载体必需具备安全性和有效性两方面的要求。安全性即基因表达载体不会整合到宿主细胞的基因组中;有效性则指表达载体携带的抗原基因在动物细胞内获得适量表达并激发宿主产生免疫应答,包括诱导特异性抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的生成,这是产生保护性免疫的重要条件。构建鱼用 DNA 疫苗常用的质粒有:pUC19、pBR322、pcDNA3.1、pcDNA1 等。这些质粒载体一般都构建有真核基因的调控元件,适当的调控元件尤其是启动子对外源基因的表达非常重要,常用的启动子有细胞巨化病毒(CMV)启动子和猿猴病毒 40(SV40)启动子^[10,12,16]。已有实验表明,在 CMV 启动子调控下的外源基因表达进入高峰后还能维持一个高水平的平台期,而在 SV40 启动子调

控下外源基因表达在峰值过后迅速下降,维持低水平表达。虹鳟模型的动物实验发现,在细胞巨化病毒早期启动子(CMV-IEP)调控下荧光素酶基因的表达在 5~7 d 进入峰值,持续时间长达 115 d^[12]。因此,CMV 启动子被广泛运用于构建鱼类 DNA 疫苗^[17]。质粒载体中还可以加上一些增强子、终止子和免疫激活序列等调控元件。利用一些报告基因(如 luc 基因、cat 基因等)就可以系统地筛选和改进表达载体,以增强质粒的表达水平,提高 DNA 疫苗的免疫效果。

2.3 DNA 疫苗的接种方法

DNA 疫苗的接种有生物、化学和物理等方式。由于物理方法可有效地把不同质粒载体导入活体动物组织,因此常用于鱼类 DNA 疫苗的研究,主要有直接肌肉注射、基因枪(Gene gun)、浸泡、口服等几种方法。注射法是导入疫苗 DNA 简便有效的方法,一般用注射器直接将裸 DNA 盐溶液注入鱼类肌肉细胞,即可达到免疫效果。目前认为骨骼肌是较有效摄取外源基因并表达抗原蛋白的组织,因为骨骼肌细胞具有多核的特点,这一特定的内环境可能是导致骨骼肌细胞对所摄入的外源 DNA 具有更大的持久允许性,使表达更为持续稳定。注射法尽管简便有效,然而注射需要疫苗的剂量大,多数疫苗 DNA 不能到达靶细胞,在胞外可能被降解。基因枪是将金颗粒包被的质粒 DNA 导入靶器官、组织或细胞内,它可以将疫苗 DNA 导入动物体各个部位,包括皮下和粘膜。基因枪使用剂量小、作用明显,能够更加有效激发机体的免疫应答尤其是细胞免疫应答的能力,是目前用作基因免疫的最常用最有效的转移方法^[21]。罗得岛大学的 Gomez-Chiarri 等^[22]用基因枪将外包 DNA、粒径 1 μm 左右的金粒子通过氮气喷射鱼体,开发了将 DNA 导入鱼体细胞内乃至细胞核的方法,成功地向虹鳟导入外源基因。免疫化学分析表明,基因枪免疫的虹鳟外源基因在表皮、真皮和肌肉组织中均有表达,而采用注射接种则外源基因主要在注射处的肌肉中表达,不过基因枪免疫的虹鳟荧光素酶的表达水平却没有注射法的高。但不管是注射还是基因枪法都局限于中等偏大个体的鱼,对于小型鱼或鱼苗则需采用浸泡、口服等实用方法^[23]。Fernandez-Alonso 等^[24]把编码绿色荧光蛋白(GFP)的基因构建到质粒 pQBI₂₅ CMV 启动子的下游,再以质粒 DNA 浸泡免疫小鱼,2~3 d 后发现虹鳟尾鳍处有大量直径 10~20 μm 的荧光斑点,而且除尾鳍外,其他部位如腹鳍、背鳍都可检测到荧光,表明浸泡免疫接种的方法是可行的。

3 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 疫苗免疫机理研究的报道。实验表明,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 2 条主要途径产生针对病原体的保护性免疫^[25]。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,随后在 APC/MHC 分子作用下被降解成 8~12 个氨基酸的短肽,这些短肽上不同的抗原表位分别与 MHC-I 类和 MHC-II 类分子结合,形成复合物并被 APC 递呈到细胞表面。与 MHC-I 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-II 类结合的短肽则激活 CD_4^+ T 细胞(辅助细胞)^[26]。CTL 在 Th1 细胞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 Th2 细胞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^[25]。

4 增强 DNA 疫苗的免疫效果

DNA 疫苗在体内持续表达的微量抗原蛋白虽然可以激发机体的免疫应答,但其强度与弱毒疫苗相比仍较低,因此需要寻找合适的免疫佐剂或增强剂来增强 DNA 疫苗的免疫效果。已经证实一些非甲基化的 CpG 寡核苷酸序列(ODN)具有增强 DNA 疫苗的免疫效果,非甲基化的 CpG 经常出现于细菌 DNA 序列中,其碱基排列大多遵循以下规律:5'-PurPurCGPyPyr-3'。由于这种特征序列可激活多种免疫细胞,故又被称作免疫刺激 DNA 序列(Immunostimulatory DNA sequence, ISS)^[26]。CpG 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状细胞),而单核细胞分泌的细胞因子又能刺激 Th1 细胞产生干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)等细胞因子,间接地激活自然杀伤细胞(NK);单核细胞及 NK 细胞则可以促进 T 细胞因子的分泌,进而刺激 CTL 的免疫应答,激发机体的细胞免疫^[27]。而 CpG 激活的 B 细胞则在抗原蛋白的作用下转化为浆细胞,大量分泌特异性中和抗体^[28]。通过这一系列的反应,可以放大抗原的免疫效应并起到免疫激活作用。以小瓜虫 i-Ag 为抗原基因, CpG 作为免疫佐剂构建的质粒接种海鳗,结果发现抗原基因表达诱导鱼体产生的抗体水平及免疫保护率明显比没有使用佐剂组的高^[18]。

5 鱼类 DNA 疫苗的优势和存在的问题

5.1 DNA 疫苗的优势

DNA 疫苗与常规疫苗相比具有明显的优越性:①DNA 疫苗的抗原合成和提呈过程与病原的自然感染很相似,抗原蛋白在 APC 作用下通过 MHC-I 类和 II 类 2 条途径^[29],不仅可以诱导体液免疫,还可诱导细胞免疫,特别是特异性 CTL 的免疫反应,这对于一些主要依赖细胞免疫机制形成免疫保护的病原感染的防治很有意义^[29]。目前研制的绝大部分鱼类疫苗都是通过激发鱼体的体液免疫应答,产生针对病原体的中和抗体而达到免疫保护效果,而鱼体内抗体产生水平也是评价疫苗效果的一个重要指标。然而,有些研究已发现,鱼体内针对病原的凝集抗体与攻毒试验后的免疫保护率并不一定相关,虽然免疫鱼的凝集抗体水平要比未免疫鱼的高得多,但攻毒试验发现两者的死亡率并无明显差别^[31]。

这可能与检测抗体的方法不合适有关,还有可能与没能有效激发鱼体内细胞介导的免疫应答有关。Lorenzen 等^[16]发现,经 DNA 免疫的虹鳟尽管能获得良好的免疫保护力,但并非所有个体都可检测到抗 VHS 的中和抗体。②鱼类的病原菌如嗜水气单胞菌、小瓜虫等,变异频繁或血清型较多,进行多价弱毒疫苗的研制较为困难。而 DNA 免疫则极具潜力,克隆 1 个病原的免疫活性基因相对容易,而且 1 种构建的质粒载体可以同时容纳多个抗原基因,构建多价联苗,诱导机体产生针对不同病原菌的免疫保护力。Bourdinot 等^[32]把 VHS 和 IHN 2 种病毒的糖蛋白基因 pCDNA-gVHS 和 pCDNA-gIHN 构建到同一质粒载体 pCDNA1 中,结果发现质粒 DNA 能够诱导虹鳟产生针对 VHS 和 IHN 2 种病毒的双特异性保护免疫,而且还能够激发鱼体非特异性的抗病毒免疫应答。③DNA 疫苗的免疫原较单一,只有编码所需抗原的基因被导入细胞而得以表达,载体本身没有免疫原性或免疫原性极弱。持续表达的外源产物可以强化特异的免疫记忆细胞,从而使机体获得持久的保护性免疫。④DNA 疫苗使用的剂量较小,0.1 μ g 甚至 ng 水平的重组质粒都能产生有效的免疫保护作用^[33,34]。另外由于 DNA 疫苗无需提取纯化抗原蛋白,制造工艺相对安全简易,储存和运输相对方便,成本较低,免疫途径多样,因此鱼类 DNA 疫苗比常规疫苗具有更大的发展前景^[35]。

5.2 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清楚。②尽管目前的动物实验尚未发现有整合的证据,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。无论是注射法还是基因枪法,都会在操作上造成一定困难。而口服和浸泡则是很有前景的 2 种免疫接种方法。鳃、肠和皮肤粘膜是防止病原侵入的第 1 道屏障,是构成鱼类免疫系统的重要部分^[36]。许多鱼类(尤其是无鳞鱼)的皮肤表面都富含粘液,粘液中含有大量的免疫因子,采用口服和浸泡既不改变鱼类的生存环境,又可以激发局部粘膜免疫乃至全身性的免疫应答,且操作简便,对各种大小规格鱼类都可适用,是较为理想的免疫接种方法。

总之,由于鱼类是水生变温动物,鱼的大小、水温、抗原的性质、接种途径和剂量、应激及佐剂等都会影响其免疫应答,在研制鱼类疫苗及制订免疫程序时均要考虑,因此鱼类 DNA 疫苗的研究还需加强基础研究和实际应用探讨。

参考文献:

- [1] Donnelly I J, Ulmer J B, Shiver J W. DNA vaccines[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15:617-648.

- [2] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000.
- [3] Ellis A E. Fish vaccination[M]. London: Academic Press, 1988.
- [4] Leong J A C. Molecular and biotechnological approaches to fish vaccines[J]. Curr Opin Biotechnol, 1993, 4: 286 - 293.
- [5] Munn C B. The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines[J]. Fish Shellfish Immunol, 1994, 4: 459 - 473.
- [6] Tang D C, Devid M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response[J]. Nature, 1992, 356: 152 - 154.
- [7] Wolff I A, Malone R W, Williams P. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. Science, 1990, 247: 1 465 - 1 468.
- [8] 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.
- [9] 官明, 李旭. 报告基因[J]. 生命的化学, 2000, 20(3): 126 - 127.
- [10] Hansen E, Fernandes K, Goldspind G, et al. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle[J]. FEBS Lett, 1991, 23: 290(1/2): 73 - 79.
- [11] Heppell J, Heather L D. Expression of foreign genes in fish following direct DNA injection[A]. International Symposium on fish Vaccinology[C]. Oslo: cliché Grafisk, 1996.
- [12] 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.
- [13] Russell P H, Kanellos T, Sylvester I D, et al. Nucleic acid immunisation with a reporter gene results in goldfish (*Carassius auratus* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 18(2): 121 - 128.
- [14] Rahman A, Maclean N. Fish transgene expression by direct injection into fish muscle[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1992, 1: 286 - 289.
- [15] 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): 3 586 - 3 591.
- [16] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-jensen K, et al. Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 18(4): 261 - 270.
- [17] Anderson E D, Mourich D V. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Mol Mar Bio, 1996, 5(2): 114 - 122.
- [18] Dickerson H, Clark T, Lin T-L, et al. Diagnostic and protective antigen gene sequences of *Ichthyophthirius* [P]. USA M & R 235.00170201, 2000 - 02 - 16.
- [19] 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.
- [20] Johnson S A, Barry M A. Genetic to genomic vaccination[J]. Vaccine, 1997, 15(8): 808 - 809.
- [21] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, et al. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations[J]. Proc Natl Acad Sci (Immunology), 1993, 90: 11 478 - 11 482.
- [22] Gomez-Chiarri Marta, Sandra K, Livingston, 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.
- [23] Fernandez-Alonso M, Alvarez F, Estepa A, et al. Vacunas DNA en Acuicultura. Aqua TIC4 [JB/OL]. <http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA-vac.html>, 1998.
- [24] 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.
- [25] Ulmer J B, Sadoff J C. DNA vaccines[J]. Current Opinion in Immunology, 1996, B: 531 - 536.
- [26] Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization[J]. Science, 1996, 273(5): 352 - 354.
- [27] Arthur M K, Ae-Kyung Yi, Schorr J, et al. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines[J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(1): 23.
- [28] Krieg A M, Yi A-K, Waldschmi T J, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation[J]. Nature, 1995, 374: 546 - 549.
- [29] Vallejo A N, Miller N W, Clem L W. Antigen processing and presentation in teleost immune responses[J]. Annual Rev of Fish Diseases, 1992, 73 - 89.
- [30] Weiner D B, Kennedy R C. Genetic vaccines[J]. Scientific American, 1999, 281: 34 - 41.
- [31] Thuvander A, Wichardt U P, Jorun R L, et al. Humoral antibody response of brown trout *Salmo trutta* vaccinated against furunculosis[J]. Dis Aquat Org, 1993, 17: 17 - 23.
- [32] Bourdinot P, Blanco M, De Kinkelin P, et al. Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infections hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout[J]. Virology, 1998, 249: 297 - 306.
- [33] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, et al. Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype[J]. Virus Research, 1999, 63: 19 - 25.
- [34] Corbeil S, LaPatra S E, Anderson E D, et al. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Vaccine, 2000, 18: 2 817 - 2 824.
- [35] Ertl H C J, Xiang Z Q. Novel vaccine approaches[J]. J Immunol, 1996, 156(7): 3 579 - 3 582.
- [36] Manning M J. Fishes[A]. A Comparative Approach[M]. Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1994. 69 - 99.