

文章编号:1005-8737(2001)01-0086-03

·综述·

新型鱼用疫苗的研究进展

Advances in the study on new types of fish vaccines

夏永娟, 黄威权

(第四军医大学 组织学与胚胎学教研室, 陕西 西安 710032)

XIA Yong-juan, HUANG Wei-quan

(Department of Histology and Embryology, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China)

关键词: 鱼类; 疫苗; DNA; 合成肽; 减毒

Key words: fish; vaccine; DNA; synthetic peptide; attenuation

中图分类号: S942.5

文献标识码: A

养殖业的发展与疾病的防治密切相关, 传统鱼病的防治多使用抗生素及减毒、灭活疫苗。近年来, 随着分子免疫学与基因工程技术的迅猛发展, 新一代鱼用疫苗的研究从90年代开始起步, 目前国外研究进展较快, 主要包括: DNA疫苗, 合成肽疫苗及减毒活疫苗^[1]。与采用传统方法生产的疫苗相比, 新型疫苗具有安全、高效、价廉及可大量生产等优点。本文试对这3种疫苗的研究现状进行综述, 以探索、开发用于养殖业的新型疫苗, 同时为深入了解鱼类的免疫防御机制提供依据。

1 DNA疫苗

DNA疫苗是指含有编码抗原基因的真核表达质粒DNA, 经直接接种体内后, 可被宿主细胞摄取, 并转录、翻译、表达出相应的抗原, 然后通过不同途径刺激机体产生针对此种抗原的免疫应答。

自Wolff等^[2]于1990年首次提出核酸疫苗的设想后, 核酸疫苗的发展出人意外的迅速^[3,4]。早期DNA疫苗的研究主要是以哺乳动物为模型。近年来, 越来越多的研究发现, 鱼类的细胞同样能够有效的表达由真核表达载体所携带的外源蛋白基因, 也就是说, DNA疫苗同样适用于鱼类^[5]。Kanellos等^[6]将含有巨细胞病毒启动子(CMV)及LacZ基因的质粒(PCMV-LacZ)通过肌肉接种到金鱼体内, 14 d后, 在金鱼的肌纤维及肾脏中检测到了大肠杆菌 β -半乳糖苷酶(Beta-gal)。他们同时还发现, 质粒DNA所表达的抗原蛋白诱发了金鱼的细胞免疫及体液免疫, 但是并不引起自身

免疫, 目的基因也没有整合入金鱼的染色体中。进一步实验证明, 用质粒DNA进行肌肉接种免疫与用beta-gal加佐剂进行腹腔免疫所产生的抗体滴度几乎相同^[7]。这些实验说明, 外源基因完全可通过质粒DNA在鱼体内得到表达并且充当很好的免疫原。

目前, 鱼用DNA疫苗主要针对的是病毒性鱼病, 研究较多的是出血性败血病毒(VHSV)和传染性造血组织坏死病毒(IHN)疫苗。已知这两种病毒的G蛋白均包含有中和性表位(Neutralizing epitopes), Boudinot等^[8]根据它们的G蛋白基因, 分别构建了pcDNAgVHS质粒和pcDNAgIHN质粒(包含CMV启动子)。将这两种质粒分别通过肌肉接种到成年虹鳟体内, 不久即发现鱼的肌肉组织中有质粒DNA、G蛋白的mRNA及G蛋白存在, 这3种物质均能诱导机体产生具有中和活性的抗体。Lorenzen^[9]针对VHSV病毒G蛋白构建的DNA疫苗能够诱导70%的虹鳟产生较高水平的免疫保护性。同时, 他们还通过免疫组织化学技术在虹鳟的肌肉组织中检测到了G蛋白。以上DNA疫苗的构建基本都是选择质粒载体和巨细胞病毒启动子。也有学者尝试用其它方法构建DNA疫苗。如Gomez等^[10]人发现以一种鲤鱼的 β -肌动蛋白启动子构建的DNA疫苗能够在鱼体内表达荧光素酶基因。另外, Traxler等人^[11]以编码IHN病毒G蛋白(PCMV4-G)的裸DNA免疫大洋州大麻哈鱼, 8周后, 用IHN病毒攻击, 保护率可达40%~100%。

与常规基因重组疫苗相比, DNA疫苗有以下优点: ①易于构建、易于制备和稳定性高。②具有高效性。DNA疫苗以每尾鱼10~100 μ g的剂量免疫即可得到良好的免疫效果^[12]。另外, 由于质粒本身具有佐剂的功效, 因此使用DNA疫苗免疫接种时不用加佐剂^[13]。但是, DNA疫苗也存在缺陷, 目前为止, DNA疫苗的接种多采用肌肉注射, 这种

收稿日期: 2000-07-12

作者简介: 夏永娟(1970-), 女, 第四军医大学讲师, 博士, 从事免疫学研究。

方法耗时费力,在实际生产中具有一定的局限性。因此,探索新的免疫接种方法是 DNA 疫苗研究需要解决的问题。

2 合成肽疫苗(表位疫苗)

合成肽疫苗是指通过人工合成或利用表达载体产生与病原体保护性抗原决定簇(抗原表位)的氨基酸序列相同的肽段。这种肽段经制备成免疫原后接种机体,可以使机体产生保护性抗体。

确定病原体的抗原决定簇中使机体产生中和性抗体等保护性应答成分的氨基酸序列是设计、合成合成肽疫苗的前提。在鱼类杆状病毒中的 G 蛋白是一种重要的中和性表位,由 500 多个氨基酸组成,在杆状病毒的致病性中发挥着重要作用^[14]。针对传染性胰脏坏死病毒(IPNV),Christie 等^[15]利用其中和性单克隆抗体测定的表位图显示:可变区 VP₂ 区内部(aa200-350)折叠成了一种免疫显性结构,这种结构包括血清型特异的和中和性保守的表位,大肠杆菌表达的重组 VP₂(rVP₂)可自发形成这种折叠结构。以部分纯化的大肠杆菌表达产物 VP₂ 加完全佐剂免疫大洋州大麻哈鱼,可明显提高鱼体对 IPNV 的免疫力。Manning 等^[16]发现,借助 trpE 表达载体 pATH₂,大肠杆菌可以合成大量由基因片段 A(aa86-210)编码的蛋白 VP₂、NS 和 VP₃,其细菌裂解产物对虹鳟具有良好的保护效果。另外,Thiry 等人^[17]也通过大肠杆菌表达了 VHSV 的 G 蛋白。针对 IHNV 病毒,Winton^[18]发现,将编码 G 蛋白的部分基因克隆入大肠杆菌或杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的减毒株中表达,通过浸浴法免疫可产生保护作用。与此同时,也有实验发现,由大肠杆菌表达的纯化的 IHNV 核蛋白基因的产物或体外根据氨基酸序列合成的 G 蛋白不能在鱼体内诱导保护性免疫反应,而以包含 IHNV 的 G 蛋白细菌裂解产物免疫时却可以明显提高鱼体对此病毒的免疫力^[19,20]。以上结果说明鱼用合成肽疫苗的免疫机制需要进一步深入探讨。

合成肽疫苗具有制备容易、可大量生产、稳定、易保存、副反应少及使用安全等优点,近几年已得到发展。但还存在不少理论和实际上的障碍:①免疫原性弱,使用时必需配用佐剂或必需直接用表达菌的裂解产物;②不同肽免疫活性亦不同。研究表明,合成肽的抗原性不但与分子大小有关,还与空间构型、亲水性、肽类所带电荷有关。因此在设计、合成具有免疫活性的合成肽疫苗时,应充分考虑肽的空间结构、所带电荷与天然抗原决定簇的差异;③部分肽只含激发 B 细胞的表位,缺乏激发 T_H 细胞的表位,当一外来抗原进入机体后,要使机体的免疫系统开始启动,绝大部分的抗原需要同时具有 B 细胞和 T_H 细胞决定簇。所以,在考虑应用合成肽作为疫苗时,应尽量选择既含 B 细胞决定簇又含激发 T_H 细胞决定簇的肽段。目前为止,鱼用合成肽疫苗的研究基本处于实验阶段,具体的作用机制,免疫途径以及免疫效果等都有待进一步研究。

3 减毒活疫苗

主要指利用基因工程技术,定向控制变异,或将保护性病原体蛋白编码基因插入活载体中制备的、能够在机体内增殖并且能够诱发免疫应答的疫苗。包括遗传重组疫苗、基因缺失活疫苗和活载体疫苗 3 种。

3.1 遗传重组疫苗

主要是通过基因重组将野毒株的表面抗原基因与其它基因重新组合而获取减毒活疫苗。Vaughan 等^[21]针对一种使大麻哈鱼和虹鳟发生严重疝病的杀鲑气单胞菌,在其 aroA 基因(编码由 440 个氨基酸组成的一种蛋白)的编码区插入一段卡那霉素抗性基因抑制其活性,重组后的基因通过一种自杀质粒重新导入菌体后,重组基因可置换出其相应的等位基因,从而使菌体达到减毒目的。实验证明,将此减毒株以 10(7)CFU 腹腔接种虹鳟后可使半数致死剂量(LD₅₀)比未减毒菌株提高 253 倍而它的免疫原性未变。Hernanz 等^[22]在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的 aroA 基因区插入了一个卡那霉素抑制性决定位的 DNA 片段,使 aroA 基因失活而构建了减毒疫苗。Singer 等^[23]将鳃弧菌 775 株的 recA 基因中插入一个卡那霉素抑制基因而使其成为减毒株作为疫苗使用。Ardelli 等^[24]针对斑点叉尾鲟爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*),在其 PurA 基因中删除一个 598 bp 的基因片段,并且插入一个卡那霉素抑制基因使其失活,以此构成的减毒活疫苗无论是通过浸浴、注射还是口服均会对鲑鱼产生免疫保护作用。基因重组法可大大缩短制备减毒活疫苗所需时间。

3.2 基因缺失活疫苗

利用 DNA 重组技术,定向缺失病原体基因的某一区段,使病原体丧失毒力而保留增殖能力和免疫原性。如 Marsden 等^[25]将杀鲑单胞菌的 aroA 基因删除构建了减毒活疫苗。进一步实验发现,这种减毒活疫苗主要通过刺激鱼体的 T 细胞增殖而引起细胞免疫,减毒活疫苗对鱼体的保护率明显高于灭活疫苗。又如,Vanderheijden 等^[26]将斑点叉尾鲟病毒(channel catfish virus)的 ORF50 基因中删除一段 1 200 bp 的序列成功构建了减毒株 V60。这种在核酸水平上缺失毒力相关基因的方法,因具有遗传背景清楚、疫苗株不易返祖而重新获得毒力的优点成为发展活疫苗的理想途径。

3.3 活载体疫苗

利用重组 DNA 技术,将编码某一特定病原体蛋白的外源基因插入无毒力的病毒或细菌疫苗株的基因组的某一部位,使其高效表达却不影响该疫苗株的生长与繁殖。用这种重组体作为活疫苗进行预防接种时,病毒或细菌在其繁殖的细胞中产生外源蛋白,诱发机体产生特异性免疫应答。如针对病毒 IHNV、VHSV 和 IPNV,Noonan 等^[27]将它们的抗原表位基因-G 蛋白基因转入杀鲑气单胞菌的无毒菌株 A440 中,通过活菌苗 A440 感染大麻哈鱼可产生针对这几种杆状病毒的保护性免疫。

减毒活疫苗接种后可在鱼体内繁殖,由于其接种过程与自然的感染过程相似,可刺激机体产生长期的中和抗体以及诱导良好的细胞介导应答,一次接种后即可产生较好的免疫,具有一定的应用价值。但是减毒活疫苗可能仍保留部分毒性,是否会对周围环境中的其它鱼类造成危害是我们在使用过程中应该慎重考虑的问题。

参考文献:

- [1] Leong J C, Anderson E, Bootland L M, et al. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies[J]. Dev Biol Stand, 1997, 90:267-277.
- [2] Wolff J A, Malone R W, William P, et al. Direct gene transfer into muscle in vivo[J]. Science, 1990, 247:1 456.
- [3] Koide Y, Nagata T, Yoshida A. DAN vaccine[J]. Jpa J Pharmacol, 2000, 83(3):167-174.
- [4] Donnelly J J, Ulmer J M. DNA vaccine for viral disease[J]. Braz J Mea Biol Res, 1999, 32(2):215-222.
- [5] Heppell J, Davis H L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 43(1):29-43.
- [6] Kanellos T, Sylvester I D, Ambali A G, et al. The safety and longevity of DNA vaccines for fish[J]. Immunology, 1999, 96(2):307.
- [7] Kanellos T, Sylvester I D, Howard C R, et al. DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish[J]. Vaccine, 1999, 17(7-8):965-972.
- [8] Boudinot P, Blanco M, de Kinkelin P, 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, 30(2):297-306.
- [9] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer J 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 Res, 1999, 63(1-2):19-25.
- [10] Gomez-Chiarri M, Chiaverini L A. Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccine for aquaculture[J]. Genet Anal, 1999, 15(3-5):121-124.
- [11] Traxler G S, Anderson E, Lapetra S E, et al. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV[J]. Dis Aquat Organ, 1999, 38(3):183-190.
- [12] Corbeil S, La Patra S E, Anderson E D, et al. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Vaccine, 2000, 18(25):2 817-2 824.
- [13] Babiuk L A, van-Drunen-Little-van-den-Hurks-s, Babiuk L. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 72(1/2):189-201.
- [14] Coll M. The glycoprotein G of rhabdoviruses[J]. Arch Virol, 1995, 140(5):827-851.
- [15] Christie K E. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis[J]. Dev Biol Stand, 1997, 90:191-199.
- [16] Manning, Leong J C. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Virology, 1990, 179(1):16-25.
- [17] Thiry M, Lecocq-Xhonnex F, Dhenr I. Molecular cloning of the mRNA coding for the G protein of the viral haemorrhagic septicaemia(VHS) of Salmonids[J]. Vet Microbiol, 1990, 23(1-4):221-226.
- [18] Winton J R. Immunization with viral antigens: infectious haematopoietic necrosis[J]. Dev Biol Stand, 1997, 90:211-220.
- [19] Emmenegger E, Huang C, Landolt M, et al. Immune response to synthetic peptides representing antigenic sites on the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Vet Res, 1995, 26(5-6):374-378.
- [20] Oberg L A, Wirkkula J, Mourich D, et al. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish[J]. J Virol, 1991, 65(8):4 486-4 489.
- [21] Vaughan L M, Smith P R, Foster T J. An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis[J]. Infect Immun, 1993, 61(5): 2 172-2 181.
- [22] Hernanz M C, Flano del Castillo E, Lopez F P, et al. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* *aroA* gene and potential use of an autotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine[J]. Infect Immun, 1998, 66(5):1 813-1 821.
- [23] Singer J T, Ma C, Boettcher K J, et al. Overcoming a defect in generalized recombination in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775: construction of a *recA* mutant by marker exchange[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(10):3 727-3 771.
- [24] Lawrence M L, Cooper R K, Thune R L. Attenuation, persistence, and vaccine potential of an *Edwardsiella ictaluri* *purA* mutant[J]. Infect Immun 1997, 65(11):4 642-4 651.
- [25] Marsden M J, Vaughan L M, Foster T J, et al. A live (Δ 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): 3 863-3 869.
- [26] 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.
- [27] Noonan B, Enzmann P J, Trust T J. 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.