

文章编号: 1004 - 7271(2001)01 - 0070 - 03

·综述·

DNA 疫苗及其在水产养殖中的应用研究进展

DNA vaccine and its progress of application studies in aquaculture

白俊杰, 叶 星

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380)

BAI Jun-jie, YE Xing

(Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China)

关键词: DNA 疫苗; 水产养殖

Key words: DNA vaccine; aquaculture

中图分类号: Q789 文献标识码: A

1990 年, Wolff 等^[1]发现将质粒 DNA(裸露的 DNA)注射给小鼠能引起外源基因的长期表达,接着 Ulmer 等^[2]进一步证实将病毒蛋白基因注射给动物能引起免疫反应,便诞生了 DNA 免疫技术。此后研究证明,编码病毒、细菌和寄生虫等不同种类抗原基因的质粒 DNA 能引起鸡、鼠、牲畜、灵长类和鱼等物种强烈而持久的免疫反应,它成为继减毒疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗和重组多肽疫苗之后又一新型疫苗。

1 DNA 疫苗

1.1 DNA 疫苗的作用机制

DNA 疫苗又称核酸疫苗和基因疫苗,它通过编码免疫原或与免疫原相关的 DNA(有时也可是 RNA)由宿主细胞表达抗原蛋白,达到免疫效果。与其它免疫方式相似,DNA 免疫可导致两种免疫类型,体液免疫和细胞介导免疫。前者由抗原激活 B 细胞产生特异抗体,后者则是诱导产生细胞毒素 T 淋巴细胞(CTLs)。抗体可中和病原体,而 CTLs 可杀死病原细胞或通过非细胞溶解方式控制感染,因此 CTLs 更为重要,它能有效防范特定的病原体,在抗病毒和抗胞内菌感染中,它是真正有效的免疫效应细胞。

1.2 DNA 疫苗的组成

DNA 疫苗最基本的成分是质粒 DNA。质粒绝大多数来源于细菌,是细胞质中的一类独立于染色体的能自主复制的遗传成份,由环型双链 DNA 组成。用于构建 DNA 疫苗的质粒通常由 5 个部分组成:①细菌的复制起点,用于复制大量的质粒 DNA;②抗性选择基因,如抗氨卞青霉素基因或抗卡那霉素基因,用作筛选的标记;③编码抗原蛋白或多肽的基因,这些保护性抗原编码基因可以是一组基因,也可以是单基因的 cDNA,还可以利用关键性抗原表位的一段碱基序列。一般选择病原体表面糖蛋白编码基因(如乙肝病毒基因疫苗)构建 DNA 疫苗。被表达的蛋白质可在宿主体内糖基化,诱导对病原体的免疫反应;有些易变异的病毒,如 A 型感冒病毒,则可以选择不同亚型之间共有的核心蛋白保守 DNA 序列作为疫苗基因,产生跨株系的免疫保护反应,以避免易变异病毒可能产生的免疫逃避问题。●转录调控因

子;如启动子、内含子和增强子等用于提高基因的表达量。常用的质粒载体启动子多为来源于病毒基因组的启动子,具有增强转录作用。⑤最后是一多聚腺嘌呤序列用作 mRNA 的转录终止信号。大多数质粒在大肠杆菌中复制后纯化而获得。最近有人报道^[3,4],用携带 DNA 表达质粒的减毒细菌作为载体感染宿主后将质粒带入体内,也能产生免疫效果。

1.3 DNA 疫苗的优点及存在的问题

自 1993 年 DNA 疫苗问世至今仅短短的 7 年时间,但发展异常迅速。有关 DNA 疫苗免疫的报道大量涌现,被称之为第三代疫苗。1996 年美国颁布了有关基因免疫技术的操作守则及使用意见,同年批准在健康人身上进行预防艾滋病的基因疫苗的 I 期临床试验。许多基因疫苗的临床试验随即也获准开始,其中一些已进入 II 期临床试验。与传统的蛋白质疫苗相比, DNA 疫苗具有以下优点:① DNA 疫苗制备方法简单,成本低,适合大批量生产。与蛋白质相比,质粒 DNA 非常稳定,易于贮存和运输。② DNA 疫苗的抗原基因能在体内长期表达,不断刺激机体的免疫系统达到免疫效果。③ 具有弱毒疫苗的免疫原性,能激发体液免疫和细胞介导的免疫反应,即能导致细胞毒性 T 淋巴细胞激活而诱导细胞免疫,但不存在减毒疫苗毒力回升的危险。④ 可组成多价疫苗,即一种基因疫苗能诱导产生针对多个抗原表位的免疫保护作用。作为一类新型的疫苗, DNA 疫苗还有一些不完善的地方,在实际应用中也存在一些问题有待解决。其中最引人关注的是安全问题,人们担心 DNA 疫苗可能会整合到宿主的染色体上造成插入突变。不过目前的动物实验尚未发现有插入突变的证据。

2 DNA 疫苗在水产养殖中的应用研究

鱼类 DNA 疫苗的研究工作起步较晚,且主要集中在鲑鳟鱼类的传染性造血器官坏死病毒(IHNV)和病毒性出血败血症病毒(VHSV)疫苗的研究上,但已取得了令人鼓舞的成就^[5]。已有实验室对鱼进行攻毒试验结果显示 DNA 疫苗比传统的灭活疫苗具有更有效的保护作用^[6]。

最早有关鱼类 DNA 疫苗的报道见于 1996 年。Anderson 等^[7]和 Comdz-Chiari 等^[8]的实验分别证明了向鱼体注射带病原基因的 DNA 疫苗能引起鱼体产生免疫反应。Anderson 等^[9]给虹鳟注射含有 IHNV 病毒糖蛋白基因的质粒 DNA,使虹鳟对 IHNV 产生抗性。

1998 年 Boudinot 等^[10]对鱼类 DNA 疫苗的作用机制作了较详细的研究。采用真核表达载体 pCDNA 以及巨细胞病毒(CMV)启动子分别构建了 VHSV 和 IHNV 糖蛋白基因的 DNA 疫苗,单独或联合给虹鳟成鱼进行肌肉注射,以研究 DNA 疫苗的免疫过程。研究发现注射 45 天后仍能在肌细胞里检测到质粒 DNA。同时在注射部位的肌细胞中检测到病毒糖蛋白。实验鱼体内有特异性中和抗体和保护抗体产生。实验还发现,当两种疫苗联合注射时,鱼体产生两种特异性的中和抗体反应与分别注射单一种疫苗时相似,说明鱼的免疫系统能同时产生多种抗体,这为鱼类多功能 DNA 疫苗的开发开辟了道路。他们在疫苗注射部位还检测到 Mx 蛋白和主要组织相容性抗原(MHC) II 类分子的 RNA。Mx 蛋白是一种干扰素诱导因子,其表达说明鱼体产生了抗病毒的非特异性免疫反应。MHC II 类分子只在巨噬细胞或树突状细胞等专门的抗原呈递细胞表面才有,说明 DNA 疫苗引发了鱼体特异性免疫反应。

最近, Kim 等^[6]用 IHNV、生鱼杆状病毒(SVCoV)和鲤春病毒(SHRV)等三种血清学上不相关的杆状病毒糖蛋白基因构建成三种 DNA 疫苗,免疫虹鳟后进行 IHNV 的攻毒实验。证明三种疫苗均能使虹鳟对 IHNV 产生免疫保护作用。免疫 30 天后攻毒,免疫任何一种 DNA 疫苗的三个实验组中仅有 5% 的实验鱼死亡,对照组却有 50% 以上的鱼死亡。免疫 70 天以后攻毒, IHNV 疫苗免疫的虹鳟仅有 12% 的鱼死亡, SHRV 疫苗和 SVCoV 疫苗免疫的鱼分别有 68% 和 76% 死亡。用任何一种疫苗免疫过的虹鳟体内都能检测到 Mx 蛋白。有趣的是所有用 IHNV 疫苗免疫 7 天后的虹鳟都已检测不到 Mx 蛋白的存在,而 SVCoV 和 SHRV 疫苗免疫的虹鳟仍能检测到 Mx 蛋白。这些实验结果再次证明, DNA 疫苗先是诱导鱼类产生干扰素类的非特异性抗病毒的保护作用后,才产生特异性的免疫反应。

在研究鱼类 DNA 疫苗的用量方面, Corbeil 等^[11]用 IHNV 糖蛋白 DNA 疫苗免疫虹鳟和鲑。结果表

明 1~10 ng 质粒 DNA 就能使虹鳟对水环境中的 IHNV 产生抗性。攻毒试验中,每尾鱼接种 100 ng 质粒 DNA 可产生理想的保护作用。且 DNA 疫苗对来自日本、法国等处的 IHNV 菌株都有保护作用。

鱼类 DNA 疫苗的免疫方式目前大多采用肌肉注射。该方法具用量少和免疫效果好的优点。但该方法仅局限于中等大小的鱼种,对鱼苗和经济价值较低的鱼类就不很适用。Fernandez-Alonso 等^[12]以表达萤光蛋白的报告基因构建质粒,采用浸泡方式研究 DNA 疫苗对鱼类的免疫作用。用 10mg·L⁻¹脂质体包埋的萤光 DNA 疫苗浸泡 0.2~0.5g 的虹鳟 15~30 min,2~3 天后能在尾鳍和鱼体其它部位检测到萤光蛋白,该蛋白在体内至少存在 10 天以上。说明通过浸泡能使编码抗原基因的 DNA 疫苗进入鱼体达到免疫作用。但该实验浸泡液中 DNA 疫苗的含量偏高,且需脂质体包埋,成本较高。鱼类 DNA 疫苗浸泡技术因成本较高,因而离生产还有一段距离,其方法和效率有待完善和提高。

近年来水产养殖业逐步向集约化、产业化发展,大规模高密度养殖和水环境的污染使水产养殖病害日趋严重,特别是病毒性传染病所造成的损失非常惊人,已成为水产养殖业发展的主要障碍。在鱼类细菌性传染病的防治中传统疫苗起着重要的作用。但仍有不少疾病特别是病毒性病害和寄生虫病害还没有有效的防治方法。与传统的抗原疫苗相比,DNA 疫苗在免疫功能以及生产、保存上有着许多优点,已受到行业内的关注。几年来,哺乳类、鸟类的 DNA 疫苗制作技术日趋成熟,应用效果令人鼓舞。但这些技术不全适合于鱼类。虽然,最近的研究表明,鱼类对注射质粒 DNA 既能产生体液免疫反应而生成抗体,也能产生细胞介导的免疫反应,但由于鱼类免疫系统的研究不够深入,鱼类 DNA 疫苗作用机制有待进一步的探索。再者,获得合适的抗原编码基因,是构建 DNA 疫苗的一项重要工作。有关鱼类病原抗原基因的研究工作还不多,在国内除对草鱼呼肠弧病毒、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,亟待加强。此外,优化 DNA 疫苗效率、降低疫苗生产成本、研究非注射方式接种疫苗,使之适合规模化生产应用等都是影响其应用前景的重要因素。

参考文献:

- [1] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. Science, 1990, 247: 1465 - 1468.
- [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, 259: 1745 - 1749.
- [3] Sizemore D, Branstrom A A, Sadoff J C. Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization[J]. Vaccine, 1997, 15: 804 - 810.
- [4] Barji A, Getstel B, Wacholz P. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*[J]. Cell, 1997, 91:617 - 623.
- [5] 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 septicemia virus genes as model[J]. Fish Shellfish Immunol, 1998, 8:271 - 287.
- [6] Kim C H, Johnson M C, Brennan 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.
- [7] Anderson E D, Mourich D V, Fahrenkrug S, et al. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus[J]. Mol Mar Biotech, 1996, 5:114 - 122.
- [8] Gomez-Chiari M, Livingston S K, Muro-Cacho C, et al. Introduction of foreign gene into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment[J]. Dis Aquat Organ, 1996, 27:5 - 12.
- [9] Anderson E D, Mourich D V, Leong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA[J]. Mol Mar Biotech, 1996, 5:105 - 113.
- [10] Boudnot 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, 249(2):297 - 306.
- [11] 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(25):2817 - 2824.
- [12] Fernandez-Alonso M, Alvarez F, Estepe A, et al. A model to study fish DNA immersion vaccination by using the green fluorescent protein[J]. J Fish Dis, 1999, 22:237 - 241.