

编码草鱼呼肠孤病毒 VP5 与 NS38 B 细胞表位的 DNA 疫苗壳聚糖纳米口服制剂的研制与评价

唐庆权¹, 张子涵¹, 毛颖睿¹, 鲁子怡¹, 陶敏慧¹, 徐婷婷¹, 曾杭¹,
樊慧敏¹, 许晓牧¹, 彭开松^{1,2,3*}, 朱若林¹, 鲍传和^{1,2,3}

(1. 安徽农业大学动物科技学院水生健康与公共卫生实验室, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学新农村研究院江淮分水岭(定远)综合试验站, 定远 233200; 3. 安徽省现代农业产业技术体系(水产)健康养殖研究室, 合肥 230036)

摘要:以编码 II 型 GCRV VP5 和 NS38 的 B 细胞线性表位的 cDNA 串联构建 pcDNA3.1(+)-Bs5-10 (GenBank 登录号为 MH234474), 并包被成纳米级壳聚糖颗粒; 无 GCRV 草鱼 (11~12 cm、25~30 g) 随机分为空白对照组、空白对照-GCRV 攻毒组、裸空载体注射组、壳寡糖包被空载体口服组、裸 DNA 疫苗注射组 (每尾鱼注射 10 μg 载体, 1 d 和 29 d 各免疫 1 次)、壳寡糖包被 DNA 疫苗口服组 (每尾鱼大约投喂 50 μg 载体, 1~3 d、15~17 d 和 43~45 d 各口服免疫 1 次), 在 28℃ 水温下评价疫苗保护力和特异性抗体水平。结果显示, 裸 DNA 疫苗注射组和壳寡糖包被 DNA 疫苗口服组的相对保护率分别为 66.67% 和 50%; 两组血清抗 VP5 和抗 NS38 的 IgM 水平均随加强免疫而显著升高 ($P < 0.05$); 且在对应时间点 (22 d 或 50 d), 前组特异性 IgM 水平均显著高于后者 ($P < 0.05$)。结果表明, 壳聚糖包被的 DNA 疫苗口服免疫能在一定程度上抵抗 GCRV 攻击, 且体液免疫参与了该保护机制。

关键词: 草鱼呼肠孤病毒; 多基因 DNA 疫苗; 口服免疫; 注射免疫

中图分类号: S941.41; R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)03-0389-05

Preparation and evaluation of a DNA vaccine oral nanoparticle oral preparation for encoding grass carp reovirus VP5 and NS38 B cell epitopes

TANG Qingquan¹, ZHANG Zihan¹, MAO Yingrui¹, LU Ziyi¹, TAO Minhui¹, XU Tingting¹, ZENG HANG¹,
FAN Huimin¹, XU Xiaomu¹, PENG Kaisong^{1,2,3}, ZHU Ruolin¹, BAO Chuanhe^{1,2,3}

(1. Aquatic Health and Public Health Laboratory, School of Animal Science And Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036;

2. Jianghuai Watershed (Dingyuan) Comprehensive Experimental Station, Anhui Agriculture University New Rural Research Institute, Dingyuan 233200;

3. Anhui Modern Agriculture Industry Technology System (Aquaculture) Healthy Breeding Laboratory, Hefei 230036)

Abstract: In this study, pcDNA3.1 (+) -Bs5-10 (GenBank login number is MH234474) was constructed in series of B cell linear epitopes of II type GCRV VP5 and NS38, and was packaged into nanoscale chitosan particles. Grass carp (11-12 cm, 25-30 g) without GCRV were randomly divided into blank control group, blank control group-GCRV attack group, bare empty carrier injection group, Chitosan oligosaccharide coated empty carrier oral group, naked DNA vaccine group (at day 1 and 29, each tail fish was injected 10 μg pcDNA3.1 (+) -Bs5-10), and Chitosan oligosaccharide coated DNA vaccine oral group (each tail fish took orally 50 μg pcDNA3.1 (+) -Bs5-10 everyday, which had been carried between 1-3 days, 15-17 days and 43-45 days). Then the protective ability and specific antibody level of vaccine need to be evaluated at the temperature of 28 °C. The results showed that the relative percent survival of the naked DNA vaccine group and the Chitosan oligosaccharide coated DNA vaccine oral group were 66.67 % and 50 % respectively, and the level of serum anti VP5 and anti NS38 IgM in these two groups increased significantly with the enhanced immunization ($P < 0.05$). Furthermore, the specific IgM level in the former group was significantly higher than the latter ($P < 0.05$) at the corresponding time point (22 days

收稿日期: 2018-08-07

基金项目: 安徽省省级大学生创新创业训练计划项目 (201610364015), 安徽省重点研究与开发计划 (1704g07020123), 安徽省现代农业产业技术体系 (皖农科[2016]84 号) 和安徽农业大学大学生创新基金 (2017 年度) 共同资助。

作者简介: 唐庆权, 硕士研究生。E-mail: 1721990862@qq.com

* 通信作者: 彭开松, 博士, 副教授。E-mail: kaisongpeng@ahau.edu.cn

or 50 days). This study showed that oral immunization with chitosan-coated DNA vaccine could resist the attack from GCRV to some extent, and humoral immunity was involved in this protective mechanism.

Key words: grass carp reovirus; multi-gene vaccine; oral immunity; injection immunity

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是中国重要的淡水经济鱼类, 其养殖产量连续多年位列榜首, 2016 年总产量达 589.88 万 t, 占淡水养殖总产量的 18.55%^[1]。草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 引起的草鱼出血病是危害草鱼最为严重的疾病。草鱼出血病的防控措施有疫苗防控、药物防控和生态防控。草鱼出血病的疫苗防控虽然最为有效, 但因病毒变异、注射免疫劳动强度大等原因, 而未能大面积推广使用。草鱼出血病疫苗研发经历了组织匀浆灭活疫苗、细胞培养病毒灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗等传统疫苗阶段^[2]。DNA 疫苗是近年鱼类疫苗研制的热点^[3], 不仅容易实现多价, 而且在成本和保存条件等方面比传统疫苗有更多优势^[4]。

国内 GCRV 有 3 种基因型 (I、II、III 型), 以 II 型流行最广、检出率最高。GCRV 的 11 个核酸片段 (S1—S11) 共编码 12 种蛋白, 包括 5 种非结构蛋白 (NS80、NS38、NS31、NS26 和 NS16) 和 7 种结构蛋白 (VP1—VP7)。VP5、VP6 和 VP7 是 GCRV 疫苗研制中的主要靶标抗原蛋白^[5-6]。GCRV 的 S5 编码蛋白 VP5 是 GCRV 的外衣壳组分, 参与病毒侵入靶细胞过程; S10 编码的非结构蛋白 NS38 参与病毒包涵体形成^[7]。对病毒侵入靶细胞的阻断是疫苗研制中的重要靶点, 而干扰病毒包涵体形成也会影响病毒生命周期; 因此, 本研究以 S5 和 S10 为 DNA 疫苗研制的靶标基因。

口服免疫是理想的鱼类免疫方式^[8]。壳寡糖包被的疫苗纳米颗粒是有望实现临床应用的口服疫苗^[9-10], 而在 GCRV 疫苗上还鲜见报道。

本研究以 GCRV II 型的 VP5 和 NS38 的 B 细胞线性表位的编码核酸串联成双基因 DNA 疫苗; 为实现口服免疫, 制备了 DNA 疫苗的纳米级壳聚糖包被微粒, 并比较了注射和口服免疫的保护效果。本研究旨在为我国的 GCRV 疫苗研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 B 细胞表位编码 cDNA 串联核酸疫苗的设计和壳寡糖纳米颗粒包被

采用 B 细胞线性表位在线预测软件 (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 分别分析 GenBank 中现有 GCRV II 型毒株 (GCRV-918、GCRV-HuNan794、

GCRV-106、GCRV-HeNan988、GCRV-JX02、GCRV-HZ08、GCRV-GD108、GCRV-109、GCRV-AH528、GCRV-Huan1307) 的 S5 和 S10 编码的成熟肽 (VP5 和 NS38) 及其对应 cDNA。取 Bepipred Linear Epitope Prediction 预测评分大于 1 的 B 细胞表位的编码 cDNA, 并将其串联拼接, 分别命名为 Bs5 和 Bs10; 进一步串联拼接为 Bs5-10。通过 Lasergene 7.0 中的 MegAlign 验证上述串联表位所对应的 cDNA 的正确性。用 primer5.0 分析 Bs5-10 的酶切位点后, 由通用生物 (安徽) 合成 pcDNA3.1(+)-Bs5-10, 并将该 DNA 疫苗质粒提交 GenBank 注册。

参考田继远方法^[11]分别制备壳寡糖包被的 pcDNA3.1(+)-Bs5-10 和 pcDNA3.1(+) 纳米级颗粒, 分别命名为 nCh[pcDNA3.1(+)-Bs5-10] 和 nCh[pcDNA3.1(+)]。

1.2 试验草鱼

三重 RT-PCR 法检测^[12]草鱼养殖群, 筛选出无 GCRV 携带的草鱼 (8~9 月龄、11~12 cm、25~30 g), 用于疫苗保护力评价。试验草鱼养殖在 28 °C 控温水槽, 并有 2 周适应期, 试验期间水质符合渔业水质标准。

1.3 攻毒病毒株

用于评价疫苗保护力的 GCRV-HF1601 株为本实验室保存的 GCRV II 型毒株。引起攻毒草鱼 14 d 累积死亡率在 85%~95% 之间的感染剂量为疫苗保护力评价时的攻毒剂量^[13]。

1.4 试验鱼分组与处理

试验鱼随机分 6 组。空白对照组 (a 组, 80 尾) 用于养殖环境监控。空白对照-GCRV 攻毒组 (b 组, 80 尾) 用于观察未免鱼 GCRV 攻毒后的死亡情况。裸空载体注射组 (c 组, 80 尾) 用于测定注射空载体的效应。壳寡糖包被空载体口服组 (d 组, 80 尾) 用于测定口服壳寡糖包被空载体的效应。裸 DNA 疫苗注射组 (e 组, 80 尾) 用于评价注射裸 DNA 疫苗的效应。壳寡糖包被 DNA 疫苗口服组 (f 组, 80 尾) 用于评价口服壳寡糖包被 DNA 疫苗的效应。免疫注射剂量参照 Zhu 等^[14]方法, 口服免疫剂量考虑壳聚糖包被、消化道环境性等因素后, 根据预实验确定。

试验前 (0 d), 所有组取 10 尾鱼制备血清。第

1 天, c 组—f 组进行首次免疫。裸 DNA 疫苗注射组 (e 组), 在背鳍基部肌肉注射 10 μg 的 pcDNA3.1(+)-Bs5-10 质粒 1 次; 裸空载体注射组 (c 组) 注射同样剂量的 pcDNA3.1(+). 壳寡糖包被 DNA 疫苗口服组 (f 组) 的 nCh[pcDNA3.1(+)-Bs5-10] 与饲料混匀, 按 2% 投饵率连续喂 3 d, 每尾鱼每天摄入疫苗量约为 50 μg 载体; 壳寡糖包被空载体口服组 (d 组) 投喂等剂量的 nCh[pcDNA3.1(+)]. 第 15 天, 口服组 (d 组和 f 组) 进行第 1 次加强免疫。第 22 天, 所有组取 10 尾鱼制备血清。第 29 天, 注射组 (c 组和 e 组) 进行加强免疫。第 43 天, 口服组 (d 组和 f 组) 进行第 2 次加强免疫。第 50 天, 所有组取 10 尾鱼制备血清。第 57 天, b 组—f 组各取 30 尾进行攻毒, 连续 14 d 观察死亡情况, 死亡鱼以肌肉、肠道和内脏等出现不同程度的出血为特征, 细菌分离排出细菌感染致死, 参考方法^[12]检测并确认是 GCRV 感染致死。

以毕赤酵母重组表达的 GCRV 的 VP5 或 NS38 为抗原包被 ELISA 板, 以采集的草鱼血清为待测血清 (用 PBS-T 稀释 100 倍), 以小鼠抗草鱼 IgM 单抗 (以 PBS-T 稀释为 2 μg·mL⁻¹) 为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 为酶标二抗 (以 PBS-T 稀释 1 000 倍), 以 TMB 为显色系统, 在 450 nm 波长测定 OD 值 (Biotek, USA), 作为特异性抗体的相对浓度^[13]。同时, 采集免疫前未接触 GCRV 的阴性鱼血清作为为阴性对照 (0 d)。以 GCRV 攻

击后 14 d 的幸存者的血清为阳性血清 (阳性对照)。数据经统计学软件分析, 结果表示为平均值±标准误差。单因素差异性分析用 the ANOVA Procedure from SAS Software Release 8.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 软件分析。

2 结果与分析

2.1 疫苗制备

生物信息分析显示, GCRV II 型毒株的 s5 和 s10 编码蛋白的 B 细胞线性表位的氨基酸序列和对应核酸序列完全相同, 其串联表位 Bs5 和 Bs10 见表 1 和表 2。BamHI/XbaI 为串联拼接成的 Bs5-10 合适的酶切位点。构建的 pcDNA3.1(+)-Bs5-10 在 GenBank 中的登录号为 MH234474。壳寡糖包被 DNA 疫苗后形成的纳米颗粒大小约 40~80 nm (图 1)。

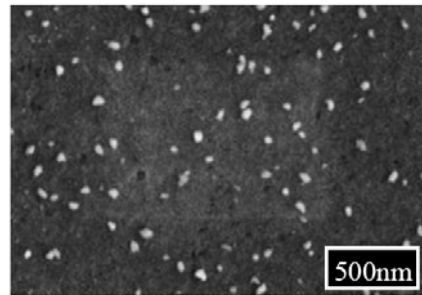


图 1 壳寡糖包被 pcDNA3.0(+)-Bs5-10 形成的纳米颗粒
Figure 1 Scanning electron microscopy of chitosan-coated [pcDNA3.0(+)-GCRV-S5-S10] nanoparticles

表 1 GCRV 的 S5 片段的 B 细胞线性表位分析
Table 1 Linear epitope analysis of B cells in S5 fragment of GCRV

氨基酸位置 Amino acid location	氨基酸序列 Amino acid sequence	核酸序列 Nucleic acid sequence
8~17	YD <u>G</u> ARDDDFL	tacgatggagcgcgcatgacgacttcctc
27~35	KIHSDPNVQ	aaaatccactccgaccaaactgacg
64~70	EIT <u>P</u> RHP	gaaatcacaccgacacccc
102~117	LTAT <u>A</u> NGERTEKKISD	ctaactgctacggccaatggtgaacgcacgagagaagaagattagcga
155~170	RKWCQDD <u>A</u> YSGAYARA	cgaaaatggtgtcaagacgacgctactctgggcttacgctcgtgcc
175~187	LHRPNWPVPPKVT	ttacacagaccgaattggcccgttccgcccgaagtaaca
209~217	AYWPPDVTH	gcttactggccacctgatgtgacgat
270~285	RDHAQS <u>V</u> TSGTATGTI	cgtgatcacgcgcaatcagtacgtctgtgtaccgccacggggaccatc
296~305	KNSNSPKVAA	aaaaattcaaatagcccgaagggtgctgca
352~361	LRISGGQAVC	ctacgtactagcggagccaggcagtggtg
379~394	HRSPDK <u>Y</u> KISPSYLS	catcgtagccccgataagataataatcgcctcatatctatccgac
430~444	AAFDSDDAGNTVSPT	gcagcttctgattcagatgacgcccgaacacggtatcaccacc
490~503	YASTVTP <u>V</u> SRDTIG	tatgcctcaaccgtcactccagtaagcagagacacaataggt

注: 下划线部分为预测位点分值大于 1 的残基。Note: the underscore is a residue with a prediction point greater than 1.

2.2 保护力测定

攻毒试验期间, 空白对照组 (a 组) 未见死亡。

攻毒后的第 5 天, 空白对照-GCRV 攻毒组 (b 组)、空载体注射组 (c 组)、壳聚糖包被空载体口服组 (d

组) 出现死亡; 而裸 DNA 疫苗注射组 (e 组) 和壳聚糖包被 DNA 疫苗口服组 (f 组) 在第 9 天才出现死亡 (图 2)。14 d 累积死亡率从高到低依次为: 空白对照-GCRV 攻毒组 (100%)、壳聚糖包被空载体口服组 (96.67%)、空载体注射组 (93.33%)、壳聚

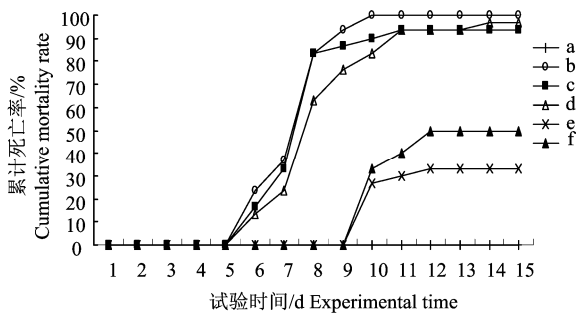
糖包被 DNA 疫苗口服组 (50%) 和裸 DNA 疫苗注射组 (33.33%)。DNA 疫苗注射免疫和 DNA 疫苗壳寡糖颗粒口服免疫后, 对 GCRV 攻毒均有保护效力, 两组相对保护率分别为 66.67% 和 50%。

表 2 GCRV 的 S10 片段的 B 细胞线性表位分析

Table 2 Linear epitope analysis of B cells in S10 fragment of GCRV

氨基酸位置 Amino acid location	氨基酸序列 Amino acid sequence	核酸序列 Nucleic acid sequence
32~44	RCEPGK <u>G</u> RELPKF	cggtgtgaaccgcgtaaggacgcgaattaccaaattt
68~81	WVPNSPSRK <u>P</u> SRQH	tggtcccaacagtcgaagtcgtaaacatccagacagcat
143~164	AGVEPMDL <u>S</u> RQTDASARMVSY	Gcaggcgtagaacggatggacttgattcagctcagacggacgccagtgcccgga tggtgagctac
173~196	SNEAGDR <u>I</u> EPWNVELDK <u>E</u> FGNPDL	Tctaagaggcaggagatagaattgagccgtggaatgtgagctcgacaaggagttg gaaatccagatctg
206~232	VQRYGDSKASTDTLTLAD <u>A</u> PERSKPAL	Gtgaacgatattggcgactccaaagccagcacagacactctgacctggctgatgcc cagagagtgccaagcctgctctg
262~269	DQYP <u>Q</u> YAN	gatcagtatcctggatagcgaat
305~319	ECWRNSRNSR <u>D</u> ATGC	gagtgctggaggaaactctgcaactctcgcatgcaacaggtgtg

注: 下划线部分为预测位点分值大于 1 的残基。Note: the underscore is a residue with a prediction point greater than 1.



a. 空白对照组; b. 空白-GCRV 组; c. 空载体注射组; d. 壳聚糖包被空载体口服组; e. 裸 DNA 疫苗注射组; f. 壳聚糖包被 DNA 疫苗口服组

a. blank control group; b. blank -GCRV group; c. unloaded body injection group; d. chitosan bag by empty body oral group; e. naked DNA vaccine injection group; f. chitosan bag by DNA vaccine oral group

图 2 试验鱼的死亡曲线

Figure 2 The test fish death curve

2.3 特异性抗体水平测定

免疫后第 22 天, 裸 DNA 疫苗注射组 (e 组) 和壳聚糖包被 DNA 疫苗口服组 (f 组) 均可检出抗 VP5 和抗 NS38 的 IgM; 随着免疫加强, 首免后第 50 天 2 组特异性 IgM 水平均相应升高 (表 3)。在对应时间点 (22 d 或 50 d), 裸 DNA 疫苗注射组 (e 组) 的特异性 IgM 水平均要显著高于壳聚糖包被 DNA 疫苗口服组 (f 组) ($P < 0.05$)。空白对照-GCRV 攻毒组 (b 组) 试验鱼在 GCRV 攻毒后在第 9 天的 24:00 前均全部死亡, 在第 14 天没有幸存者; 因此, 只能变通使用第 7~9 天濒临死亡鱼的血清 (共 5 尾) 的测定 Anti-VP5 IgM OD_{450nm} 或 Anti-NS38 IgM OD_{450nm} 作为阳性对照, 所有测定值在 0.310 2~0.538 6 之间, 其与阴性对照平均值的比值均大于 10 倍。

表 3 GCRV 攻毒前特异性抗体水平分析

Table 3 Statistical analysis of antibody protein titration results

组别 Groups	Anti-VP5 IgM OD_{450nm}			Anti-NS38 IgM OD_{450nm}		
	0 d	22 d	50 d	0 d	22 d	50 d
空白-GCRV 组(b)	0.002 3±0.002 7 ^a	0.001 5±0.001 2 ^c	0.001 8±0.001 7 ^c	0.001 8±0.001 0 ^a	0.001 5±0.001 2 ^c	0.001 9±0.001 6 ^c
裸空载体注射组(c)	0.001 9±0.001 5 ^a	0.002 4±0.001 2 ^c	0.001 5±0.001 1 ^c	0.001 8±0.001 5 ^a	0.002 4±0.001 2 ^c	0.001 6±0.001 0 ^c
壳寡糖包被空载体口服组(d)	0.001 5±0.000 9 ^a	0.001 4±0.000 5 ^c	0.001 7±0.001 5 ^c	0.001 5±0.000 8 ^a	0.001 4±0.000 5 ^c	0.002 2±0.001 2 ^c
裸 DNA 疫苗注射组(e)	0.002 8±0.001 9 ^a	0.7300±0.110 0 ^a	1.290 0±0.100 0 ^a	0.002 1±0.001 0 ^a	0.750 0±0.140 0 ^a	2.030 0±0.130 0 ^a
壳寡糖包被 DNA 疫苗口服组(f)	0.001 1±0.001 5 ^a	0.3974±0.020 8 ^b	0.834 1±0.066 2 ^b	0.001 4±0.001 0 ^a	0.429 6±0.031 8 ^b	1.451 7±0.321 6 ^b

注: 同一列标有不同小写字母的数据之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: there is a significant difference between the data in the same column with different lowercase letters ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究显示无论裸 DNA 疫苗注射免疫, 还是壳聚糖包被 DNA 疫苗纳米级颗粒口服免疫, 对 GCRV 攻毒都有一定的保护力, 且前者免疫保护力要高于后者。这 2 种疫苗形式和对应免疫方式, 均能诱导免疫草鱼产生相应特异性抗体, 且特异性抗体滴度与保护力呈正相关, 这提示体液免疫参与了这两种疫苗的保护机制。

Chen 等^[13]注射 pcDNA-NS38 免疫草鱼后, GCRV-HF 株攻毒获得相对保护率为 23.1%; Wang 等^[15]注射 pcEGFP-vp5 免疫草鱼后, GCRV 097 株攻毒获得到的相对保护率为 33.3%; Zhu 等^[14]注射 pcDNA-vp7 免疫草鱼后, GCRV 097 株攻毒获得到的相对保护率为 44.4%。本研究中包含双基因来源的串联 B 细胞表位疫苗 pcDNA3.1(+)-Bs5-10 注射免疫后的相对保护率达到 66.67%, 均不同程度地高于上述单基因核酸疫苗; 这与前人报道的多基因 DNA 疫苗的注射免疫保护力高于单独基因 DNA 疫苗的结论相一致^[16]。

口服免疫是理想的鱼类免疫方式^[17]。通过对口服疫苗中的 DNA 或抗原的载体包被是减少其被消化降解是重要途径^[3]。目前尚未见草鱼呼肠孤病毒纳米壳聚糖口服疫苗的报道, 但是与其他病毒的纳米壳聚糖口服疫苗相比, 本研究研制的纳米壳聚糖口服疫苗的相对保护率 (50%) 还比较低。Rivas-Aravena 等^[17]研制 alphavirus replicase DNA vaccine 的纳米壳聚糖口服免疫大西洋鲑后获得的相对保护率为 77%。Vimal 等^[18]研制的 NV RNA2 capsid protein gene in DNA plasmid 的纳米壳聚糖口服免疫亚洲鲈鱼后获得的相对保护率为 85%~90%。

将转载体包被裸 DNA 疫苗可提高 DNA 疫苗的免疫保护力, 这可能与转载体能更高效地将 DNA 疫苗传递到注射部位的细胞中有关^[14-15, 19]。例如, SWCNTs (单壁碳纳米管) -pEGFP-VP5 DNA 疫苗^[15]和 SWCNTs (单壁碳纳米管) -pcDNA-VP7 DNA 疫苗^[14]、以大肠杆菌做为载体和 vp7 基因序列构成的 DNA 疫苗^[19]可显著提高 DNA 疫苗注射免疫的保护率^[14-15]。含有转载体的 DNA 疫苗可以进一步被保护载体包被, 制备成口服疫苗, 从理论上预期可以进一步提高口服疫苗的保护效力。

参考文献:

[1] 农业部渔业局. 2017 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.

- [2] 杨先乐, 夏春, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究: 疫苗株的免疫原性及其有效免疫剂量的比较[J]. 水产学报, 1989, 13 (2): 138-144.
- [3] DALMO A. DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection[J]. J Fish Dis, 2018, 41(1): 1-9.
- [4] DHAR A K, MANNA S K, THOMAS ALLNUTT F C. Viral vaccines for farmed finfish[J]. Virus Dis, 2014, 25(1): 1-17.
- [5] 邹勇, 徐诗英, 李婧慧, 等. 草鱼出血病基因疫苗的免疫效果[J]. 水产养殖, 2011, 32(10): 1-4.
- [6] 李永刚, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(4): 97-103.
- [7] 高岩, 裴超, 张超, 等. 草鱼呼肠孤病毒疫苗的研发与应用[J]. 水产科学, 2017, 36(2): 237-242.
- [8] EMBREGTS C W E, FORLENZA M. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species[J]. Dev Comp Immunol, 2016, 64: 118-137.
- [9] LI D, FU D W, KANG H, et al. Advances and potential applications of chitosan nanoparticles as a delivery carrier for the mucosal immunity of vaccine[J]. CDD, 2017, 14(1): 27-35.
- [10] SINGH B, MAHARJAN S, CHO K H, et al. Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 110: 54-64.
- [11] 田继远. 淋巴囊肿病毒口服微囊核酸疫苗的研制与免疫效果研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [12] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 419-426.
- [13] CHEN D D, YAO Y Y, CUI Z W, et al. Comparative study of the immunoprotective effect of two DNA vaccines against grass carp reovirus[J]. Fish Shellfish Immun, 2018, 75: 66-73.
- [14] ZHU B, LIU G L, GONG Y X, et al. Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule[J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 42(2): 325-334.
- [15] WANG Y, LIU G L, LI D L, et al. The protective immunity against grass carp reovirus in grass carp induced by a DNA vaccination using single-walled carbon nanotubes as delivery vehicles[J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 47(2): 732-742.
- [16] LU L, XU H, HE Y, et al. Protection of grass carp, *Ctenopharyngon idellus* (Valenciennes), through oral administration of a subunit vaccine against reovirus[J]. Fish Dis, 2011, 34: 939-42.
- [17] RIVAS-ARAVENA A, FUENTES Y, CARTAGENA J, et al. Development of a nanoparticle-based oral vaccine for Atlantic salmon against ISAV using an alphavirus replicon as adjuvant[J]. Fish Shellfish Immun, 2015, 45(1): 157-166.
- [18] VIMAL S, ABDUL MAJEED S, NAMBI K S N, et al. Delivery of DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection[J]. Aquaculture, 2014, 420/421: 240-246.
- [19] HAO K, CHEN X H, QI X Z, et al. Protective immunity of grass carp induced by DNA vaccine encoding capsid protein gene (vp7) of grass carp reovirus using bacterial ghost as delivery vehicles[J]. Fish Shellfish Immun, 2017, 64: 414-425.