

牙鲆淋巴囊肿病与 基因工程疫苗

孙修勤 主编



科学出版社

牙鲆淋巴囊肿病 与基因工程疫苗

孙修勤 主编

国家海洋局第一海洋研究所出版基金资助
海洋公益性行业科研专项（201005015）支持

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书简要介绍了世界鱼类病毒病的发生与危害状况,重点报告了编者团队以我国首例大面积流行的淋巴囊肿病为研究对象所完成的病毒学和基因工程疫苗研究成果。该研究建立了淋巴囊肿病早期诊断技术、研制出早期诊断试剂盒;在病毒基因组分析的基础上,利用分子克隆和生物信息学两种研究方法,在世界上率先研制出淋巴囊肿病核酸疫苗,提出具有我国独立知识产权的淋巴囊肿病毒核酸疫苗规模化生产工艺和质量检验标准,证实该疫苗具有良好的免疫效果和安全性,为海水鱼病毒病及其疫苗防治提供了新产品和新技术。

本书以实验学方式编写,便于相关专业的研究者和研究生等参考。

图书在版编目(CIP)数据

牙鲆淋巴囊肿病与基因工程疫苗/孙修勤主编. —北京:科学出版社, 2011

ISBN 978-7-03-032694-2

I. ①牙… II. ①孙… III. ①牙鲆属-鱼病:淋巴疾病:囊肿-基因工程疫苗 IV. ①S943.399.41

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 226886 号

责任编辑:夏 梁 贺密青/责任校对:郑金红
责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年1月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年1月第一次印刷 印张:25 插页:2

字数:593 000

定价:118.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

主编简介

孙修勤，女，博士，1944 年出生，山东省青岛市人，研究员，博士生导师。1967 年毕业于山东海洋学院生物系，任职于国家海洋局第一海洋研究所。曾任国家“863”计划海洋生物主题（819）第一、二届专家组专家，国家科技兴海专家组专家，国家科学技术奖评审专家，中国海洋学会海洋生物专业委员会主任委员，中国水产学会养殖分会常务理事，山东省水产原良种评审委员会副主任等学术职务。

孙修勤博士长期从事水产养殖生物免疫学与疾病控制研究，先后获得国家科技进步二等奖 2 项，省部级科技进步一等奖 2 项、二等奖 3 项、三等奖 3 项等。20 世纪 80 年代，她对中国对虾细小病毒病进行了系统研究，提出了生态防治等综合技术措施，大大减少了对虾浮头死亡，在万亩养殖面积上创造了重大经济效益；90 年代以来，面对我国海水鱼养殖病害，特别是病毒病的发生与流行，她带领科研团队开展海水鱼病毒病与基因工程疫苗的研究，研制出具有我国独立知识产权的海水鱼淋巴囊肿病毒注射与口服型核酸疫苗，完成了疫苗安全性和免疫效果评价分析，建立了核酸疫苗质量检验标准和中试生产工艺，为海水鱼类病毒病的疫苗防治提供了新技术和有效产品。

《牙鲆淋巴囊肿病与基因工程疫苗》

编者名单

主 编 孙修勤 研究员 (国家海洋局第一海洋研究所)

编写人员(以编写章次为顺序)

孙修勤	博士	研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
王新成	学士	研究员	(中国科学院海洋研究所)
郑凤荣	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
吴兴安	博士	教授	(第四军医大学)
曲凌云	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
洪旭光	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
刘允坤	硕士		
王 亮	硕士	高工	(北京万方数据)
李继业	博士	高工	(国家海洋局北海分局)
咎金东	在读博士	博士生	(美国马里兰大学)
张进兴	学士	研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
刘云国	博士	高工	(山东省出入境检验检疫局)
闫秀英	博士	讲师	(广东省海洋大学)
郑明刚	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
邢明清	博士	副主任医师	(青岛市市立医院)
郑法新	博士	副教授	(日照市职业技术学院)
张之文	博士	副研究员	(上海市水产研究所)
刘洪展	在读博士	讲师	(山东大学威海分校海洋学院)
房保海	博士	高工	(山东省出入境检验检疫局)
衣 丹	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
沈志强	学士	高工	(山东省农科院滨州分院)
吴谡琦	博士	研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)
张元兴	博士	教授	(华东理工大学)

编 审	周祥山	博士	教授	(华东理工大学)
	周国栋	学士	高工	(北京渔阳康农佳纬生物公司)
	田继远	博士	副教授	(青岛农业大学)
	洪旭光	博士	副研究员	(国家海洋局第一海洋研究所)

序 一

我国的海水养殖始于 20 世纪 50 年代。60 多年来，紧跟科技进步和社会需求，走过了由藻类—甲壳类—贝类—鱼类养殖的发展历程。进入 21 世纪，鱼类养殖在第四次海水养殖产业化浪潮的推动下得到蓬勃发展，鱼、虾、贝、藻产业化共同繁荣的局面已经形成。然而，随着养殖品种的增多和规模的不断扩大，诸如环境、病害、质量安全等方面的问题也接踵而至，其中尤以病害对养殖业的危害最为严重。据报道，除流行性细菌性疾病外，当前尚有 80 多种病毒性疾病流行于世，在我国很早就有了淋巴囊肿、神经坏死、真鲷细胞肿大等多种病毒性疾病的报道。鉴于人类对病毒性疾病的特殊性尚缺乏足够认识，所以对其的防治方法至今仍然是水产界的一大难题。

淋巴囊肿病是 1874 年首先发现于欧洲河鲮的一种鱼类病毒病，而牙鲆淋巴囊肿病于 1976 年在日本首次发现。1989 年我国广东省养殖的云纹石斑鱼暴发此病，随后在山东、河北等省养殖的牙鲆、真鲷和鲈鱼中也发生了该种病毒病的感染。

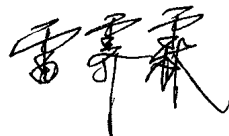
在海水鱼类疾病防治方面，我国养殖企业主要依赖抗生素、杀菌药或消毒剂的使用，诊断试剂盒和鱼病疫苗虽已开展了初期的研发工作，有了一定的技术储备，但远未达到普及实用的程度。总体而言，我国对海水养殖鱼类的病害防治，尤其针对病毒性疾病的防控体系、药物开发，以及在疫苗生产和免疫应用技术等方面，都还远远落后于先进养殖国家。当前，业界迫切期待安全高效的疫苗和防治方法问世，国内有关学者对此也高度重视。为了早日解除防治病毒性疾病的严峻局面，国家连续多年投入大量人力和物力，与企业界人士紧密合作、联合攻关，共同探讨海水鱼类疾病的防治机理与生产技术问题。

基因工程疫苗，又称核酸疫苗或分子疫苗，世界上称之为第三代疫苗，被公认为是当代治疗病毒病的最佳选择。孙修勤教授等学者瞄准了这一课题，在国家“863”项目的支持下，连续 13 年锲而不舍地致力于牙鲆淋巴囊肿病核酸疫苗研究，取得了可喜成果，填补了国内空白。

该书详细报告了作者对牙鲆淋巴囊肿病毒学和基因工程疫苗学的研究，为淋巴囊肿病早期诊断技术的建立、诊断试剂盒的研制提供了系统方法；在病毒基因组分析的基础上，利用分子克隆和生物信息学两种方法，率先制备出淋巴囊肿病核酸疫苗，并提出了具有独立知识产权的牙鲆淋巴囊肿病核酸疫苗规模化生产工艺和质量检验标准。实践证明，该疫苗具有良好的免疫效果和安全性，可为海水鱼类病毒及其疫苗防治提供新产品

和新技术。该书的写作风格为理论联系实际，可操作性强，在多方面都具有创新性，是目前研究鱼类病毒性疫苗不可多得的优秀参考书，特此将其推荐给水产大专院校的师生、专业研究人员以及广大产业部门的技术人员参考。

中国工程院院士



2011年3月1日

序 二

捧读孙修勤研究员的书稿，读懂得更多的是一个研究者对自己专业的追求与执著。作者用自己的心血记录和总结了他们多年的科研实践、发现和收获，并结册付梓与读者分享，这无论对作者还是读者都是件幸事。

与古老的种植业和畜牧业相比，海水鱼类养殖业是现代技术的衍生产业。几乎与繁育同等重要的是养殖鱼类的病害防治技术，而病害中又属对病毒病防治为困难之最。该书作者十几年来潜心于病毒致因的鱼类病害的流行病学、分子病毒学及免疫学方面的研究，特别以在基因疫苗领域开拓性研究的成果填补了我国海水病毒病核酸疫苗的空白。

基因工程疫苗也称核酸疫苗、分子疫苗，是国际公认的第三代疫苗，是治疗病毒病害的最佳选择。作者建立了淋巴囊肿病早期诊断技术并研制出诊断试剂盒；在病毒基因组分析的基础上，利用分子克隆和生物信息学方法，在世界上首例制备出淋巴囊肿病核酸疫苗，制订了具有我国独立知识产权的淋巴囊肿病毒核酸疫苗规模化生产工艺和质量检验标准。田间使用证明该疫苗具有良好的免疫效果和安全性，为海水鱼病毒防治提供了新技术，为疫苗法应用提供了新产品。

该研究开创了我国海水养殖鱼类病毒核酸疫苗领域的新天地，不仅为淋巴囊肿病的预防、诊断和治疗提供了新途径和新视角，也为鱼类其他病毒病的疫苗防治提供了科学支撑和技术支撑。该书主要以实验方法学为主线编写，但也兼顾了该领域的理论系统性。适于鱼类学、鱼类养殖学等相关专业实验人员与研究人员阅读参考。

国家海洋局第一海洋研究所所长 马德毅

2011年3月11日

前 言

20 世纪 50 年代以来,我国的海水养殖走过了藻类、甲壳类、贝类和鱼类养殖的发展历程,海水养殖已成为我国渔业生产的重要组成部分。然而,随着养殖规模的扩大,病害对养殖业的影响越来越严重,其防控技术已成为海水养殖必须解决的首要问题。

淋巴囊肿病 (lymphocystis disease, LCD) 是 1874 年首先发现于欧洲河鲈 (*Pleuronectes flesus*) 的一种鱼类病毒病。据统计,至今已被该病毒感染的鱼类有 9 科、42 属、130 余种。牙鲆淋巴囊肿病 1976 年在日本首次发现,1989 年在我国广东省养殖的云纹石斑鱼中开始暴发,随后山东、河北等省也报道了养殖的真鲷、鲈鱼等被淋巴囊肿病毒感染。鉴于世界上已报道了 80 余种鱼类病毒病,且因病毒的特殊性使防治十分困难,所以为防止其在我国流行,在国家“863”计划项目的支持下,作者连续 13 年对养殖牙鲆的淋巴囊肿病及其控制技术进行了研究。本文报道的内容涉及淋巴囊肿病毒纯化、病原体确认、流行病学与分子病毒学特征、早期诊断方法、虹彩病毒科不同毒株的系统进化关系与基因型分析、淋巴囊肿病的自愈机制、淋巴囊肿病毒力基因的 RNA 干扰效果、淋巴囊肿病核酸疫苗的制备方法、疫苗免疫效果和安全性及疫苗中试生产工艺与质量检验标准等。

基因工程疫苗又称核酸疫苗、分子疫苗,是世界公认的第三代疫苗,也是治疗病毒病的最好选择。由于鱼类免疫学研究相对滞后,基因疫苗的研究也相对较少,而我国海水鱼病毒病核酸疫苗的研究更是处于空白状态。

本研究开启了我国海水养殖生物病毒病核酸疫苗研制的大门,不仅为淋巴囊肿病的预防和治疗提供了新途径、新产品,而且为其他鱼类病毒病的同类疫苗研制提供了支撑技术。本研究通过基因克隆、生物信息学方法和改良的双乳化技术,研制出一种注射型核酸疫苗和三种口服型微囊核酸疫苗,完成了免疫效果和安全性检验,提出了淋巴囊肿病核酸疫苗的中试生产工艺和质量检验标准。

本研究成果,是在国家科技部、国家海洋局和国家海洋局第一海洋研究所的大力支持下取得的。具体工作得到了中国海洋大学,中国科学院海洋研究所,中国水产科学院黄海水产研究所,中山大学生命科学学院,中国水产科学院珠江水产研究所,第四军医大学,山东大学海洋学院,日照职业技术学院,山东寻山海洋科技有限公司,山东华新海大海洋生物股份有限公司,威海昌源水产有限公司等单位及海洋局一所科技处王宗灵处长,生态室王保栋主任,李瑞香、张学雷研究员等的大力协助,在此表示诚挚的谢意!

本研究工作历时 10 多年,鉴于分子生物学技术发展的日新月异,某些试验方法可能显得陈旧,但作者的目的是提供关于鱼类病毒学和核酸疫苗研制与评价的系统研究内容,所以请读者给予理解。由于作者水平所限,文中可能有不当甚至错误之处,敬请各位读者批评指正。

孙修勤

2011 年 3 月 1 日

目 录

序一
序二
前言

第一篇 鱼类养殖疾病与疫苗沿革

第一章 养殖海水鱼类的疾病	3
第一节 养殖海水鱼病毒病	3
一、弹状病毒病	3
二、淋巴囊肿病	4
三、双 RNA 病毒病	4
四、病毒性神经坏死病	4
五、病毒性红细胞坏死病	5
六、虹彩病毒感染症	5
七、疱疹病毒病	5
八、传染性胰脏坏死病毒病	5
九、传染性造血器官坏死病毒病	6
十、口白症	6
十一、传染性脾肾坏死病毒病	6
十二、水生呼肠孤病毒病	7
十三、病毒性腹水病	7
十四、病毒性畸形病	7
十五、红细胞包涵体综合征	7
十六、细胞肿大病毒病	8
第二节 养殖鱼类细菌病和其他疾病	9
一、细菌性疾病	9
二、低等藻类所致疾病	11
三、原虫病	12
四、蠕虫病	14
五、甲壳动物病	14
六、其他疾病	15
第三节 我国牙鲆养殖状况与主要疾病	15
一、牙鲆养殖状况	15
二、牙鲆常见疾病	16
第四节 淋巴囊肿病及其研究现状	19
一、淋巴囊肿病病毒的纯化和体外培养	19

二、病理学研究	19
三、病毒结构和基因组研究	21
四、病毒结构蛋白与抗原性研究	22
五、LCDV 的致病机制	23
六、患淋巴囊肿病牙鲆的抗体检测	24
七、诊断与防治研究	24
八、病毒多样性与基因组学研究现状	26
第五节 水产动物疾病早期诊断技术	27
一、免疫学诊断技术	27
二、分子生物学诊断技术	31
参考文献	32
第二章 鱼类疫苗研究史与病毒核酸疫苗	37
第一节 鱼类疫苗研究史	37
一、抗细菌疫苗	37
二、抗病毒疫苗	38
三、鱼类疫苗接种研究	39
第二节 核酸疫苗	40
一、核酸疫苗简介	40
二、核酸疫苗的优点	41
三、核酸疫苗的构成	42
四、核酸疫苗的免疫机制	42
五、提高核酸疫苗免疫效果的优化策略	43
六、“自杀性”疫苗及其研究进展	44
七、菌蛻疫苗研究进展	46
第三节 鱼用核酸疫苗研究概况与研制技术	47
一、研究概况	47
二、研制技术	51
第四节 影响核酸疫苗诱导水平和免疫效果的因素	52
一、核酸疫苗诱导的体液免疫	52
二、核酸疫苗诱导的细胞免疫	52
三、核酸疫苗的免疫机制	53
四、影响核酸疫苗免疫效果的因素	54
第五节 核酸疫苗的安全性及相关问题	55
一、基因整合	56
二、生殖毒性	57
三、免疫耐受	57
四、自身免疫疾病	58
五、疫苗生产菌株所带来的安全问题	59
六、对环境和消费者的安全问题	60
七、结语	60
第六节 核酸疫苗佐剂的研究进展	61

一、脂质体核酸疫苗佐剂的研究进展	61
二、细胞因子、CpG ODN 等佐剂的研究进展	64
第七节 核酸疫苗接种途径的研究	69
一、制备胶囊疫苗技术	70
二、微胶囊疫苗的释放	71
三、微胶囊的主要优点和作用机制	72
第八节 核酸疫苗中试产品的质量控制	72
一、原材料的质量控制	73
二、培养过程的质量控制	74
三、纯化过程中的质量控制	74
四、最终产品的质量控制	75
第九节 鱼用核酸疫苗研究展望	76
参考文献	77

第二篇 淋巴囊肿病特征、早期诊断与基因组分析

第三章 牙鲆淋巴囊肿病流行病学与病毒分子特征	87
第一节 牙鲆淋巴囊肿病流行病学特点	87
第二节 淋巴囊肿病的病理学特征	89
一、材料与方法	89
二、结果	89
第三节 淋巴囊肿病病毒的纯化	94
一、剥除肿瘤外膜-超速蔗糖密度梯度离心	95
二、胶原酶法分离淋巴囊肿病病毒	96
第四节 淋巴囊肿病病毒的体外细胞培养	102
一、材料与方法	102
二、结果	103
三、讨论	103
第五节 淋巴囊肿病的病原学研究	105
一、材料与方法	105
二、结果与讨论	106
第六节 患淋巴囊肿病牙鲆血清的免疫球蛋白分析	107
一、材料与方法	107
二、结果与讨论	109
第七节 淋巴囊肿病病毒单克隆抗体制备	112
一、材料与方法	112
二、结果与讨论	115
本章小结	116
参考文献	117
第四章 淋巴囊肿病早期诊断技术	120
第一节 淋巴囊肿病病毒的 PCR 诊断方法	120

一、试验材料	120
二、试验方法	120
三、结果与分析	122
第二节 LCDV-cn 的定量 PCR 检测	124
一、材料与方法	124
二、结果	126
三、讨论	129
第三节 淋巴囊肿病核酸探针-原位杂交诊断技术	129
一、试验材料	129
二、试验方法	130
三、结果与讨论	131
第四节 LCDV-cn 核酸探针-点杂交检测试剂盒研制与效果	135
一、材料与方法	135
二、结果	139
三、讨论	141
参考文献	141
第五章 不同虹彩病毒株系统进化关系与基因型分析	145
第一节 军曹鱼淋巴囊肿病病毒 <i>mcp</i> 基因与序列分析	145
一、材料与方法	145
二、结果与讨论	146
第二节 淋巴囊肿病病毒的遗传多样性和基因型分析	147
一、试剂、仪器和材料	148
二、实验方法	149
三、结果	150
四、讨论	152
参考文献	154
第六章 LCDV-cn 基因组信息分析	156
第一节 LCDV-cn 和淋巴囊肿病病毒特有功能基因研究	156
一、试剂与材料	156
二、试验方法	156
三、结果	158
四、讨论和结论	171
第二节 LCDV-cn 锌指蛋白基因的原核表达、序列同源性及编码蛋白结构分析	173
一、材料	174
二、方法	174
三、结果	176
四、讨论	179
参考文献	180
第七章 牙鲈淋巴囊肿病自愈过程和机制研究	182
第一节 患淋巴囊肿病牙鲈与自愈牙鲈的病理学特征比较	182

一、材料	183
二、实验操作	183
三、结果	184
四、讨论	185
第二节 细胞因子在牙鲆淋巴囊肿病自愈过程中的表达	187
一、材料和方法	188
二、结果与分析	190
三、讨论	194
第三节 水温对牙鲆体内 MHC 及 TCR 表达的影响	196
一、材料和方法	197
二、实验结果	197
三、讨论	199
第四节 牙鲆淋巴囊肿病血清蛋白质组研究	201
一、材料	201
二、实验方法	201
三、结果与分析	203
四、讨论	206
参考文献	208
第八章 牙鲆 p53 肿瘤抑制基因与淋巴囊肿病的关系研究	211
第一节 牙鲆 p53 基因 cDNA 克隆与组织表达	211
一、材料和方法	212
二、结果	216
三、讨论	220
第二节 牙鲆 p53 基因组结构分析	221
一、材料	222
二、方法	222
三、结果	223
四、讨论	229
第三节 牙鲆 p53 基因多态性及与淋巴囊肿病感染的关系	229
一、材料	230
二、方法	230
三、结果	233
四、讨论	237
参考文献	238
第九章 RNA 干扰技术在淋巴囊肿病防治中的初步应用	241
第一节 RNAi 技术及其在海洋生物研究中的应用	241
一、RNAi 技术在海洋生物基因功能研究中的应用	241
二、RNAi 技术在海洋生物抗病毒研究中的应用	242
三、RNAi 技术的应用前景	243
第二节 RNAi 对 LCDV-cn 在牙鲆体内复制的影响	244

一、材料和方法	244
二、结果	247
三、讨论	248
参考文献	249
 第三篇 淋巴囊肿病核酸疫苗的研发	
第十章 淋巴囊肿病核酸疫苗的基因克隆制备技术	253
第一节 LCDV-cn 保护性抗原基因筛选及含 MCP0.6kb 重组质粒的构建与鉴定	253
一、材料	254
二、方法	254
三、结果	257
四、讨论	259
第二节 LCDV-cn 真核载体的构建、鉴定与表达	260
一、材料与方法	260
二、结果	261
三、讨论	264
参考文献	265
第十一章 注射型核酸疫苗重组质粒的免疫效果研究	266
第一节 重组质粒在牙鲈体内的存留与表达	266
一、材料和方法	267
二、结果	270
三、讨论	273
第二节 重组质粒的免疫效果评价	274
一、接种淋巴囊肿病病毒核酸疫苗前后牙鲈体内 LCDV-cn 的检验	274
二、淋巴囊肿病病毒核酸疫苗不同接种途径和剂量的免疫效果比较	276
第三节 淋巴囊肿病病毒核酸疫苗的大量制备和田间试验	281
一、材料与方法	281
二、结果	283
三、讨论	285
第四节 牙鲈接种疫苗后免疫相关基因的表达	286
一、材料与方法	287
二、结果	290
三、讨论	292
参考文献	294
第十二章 核酸疫苗佐剂筛选	297
第一节 脂质体对核酸疫苗免疫活性的影响	297
一、材料和方法	297
二、结果	299
三、讨论	301

第二节 CpG ODN 对牙鲆淋巴囊肿病病毒核酸疫苗免疫活性的影响	302
一、材料与方法	302
二、结果	304
三、讨论	305
参考文献	307
第十三章 核酸疫苗的安全性研究	308
第一节 实验室安全性研究	308
一、菌株 DH5 α LCDV-cn 的质粒遗传稳定性研究	308
二、DH5 α LCDV-cn 中目的基因 MCP0.6kb 表达稳定性	310
三、制品对动物的安全性研究	313
第二节 中间试验阶段安全性研究	322
一、核酸疫苗质粒 DNA 在牙鲆注射部位存留和体内相关组织中的分布	322
二、核酸疫苗质粒 DNA 在牙鲆血液中的存在及持续时间	324
三、重组质粒核酸疫苗与牙鲆染色体的整合性研究	325
四、动物用转基因细菌的存活力研究	327
五、转基因微生物制品对动物的安全性	329
六、讨论	330
参考文献	331
第十四章 核酸疫苗的生产工艺与质量检验	332
第一节 中间试制生产	332
一、中间试制生产	332
二、工艺流程	334
三、试制产品生产检验	334
四、试制过程中的不足及改进建议	339
五、试制结论	339
第二节 核酸疫苗制备的质量检验规程	340
一、菌种、毒种	340
二、疫苗制造及过程控制	341
三、成品检验	343
四、作用与用途	343
五、用法与用量	343
六、注意事项	343
七、储藏	344
八、规格	344
第三节 牙鲆淋巴囊肿病核酸疫苗质量标准	344
参考文献	344
附录	345
第十五章 口服型淋巴囊肿病核酸疫苗研制技术与免疫效果	349
第一节 LCD 聚丙交酯乙二醇酸口服微囊核酸疫苗研制与免疫效果研究	350
一、材料和方法	350