

DOI:10.13350/j.cjpb.230401

• 论著 •

乙肝病毒 DNA 疫苗 pHL-sec-LHBs 的构建及小鼠免疫效果检测*

石文刚¹, 徐瑞贤¹, 刘敏^{1,2}, 张桃苹¹, Faisal Mahmood¹, 宋玉竹¹, 韩芹芹¹, 夏雪山¹, 张金阳^{1**}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南省分子医学研究中心, 云南昆明 650500;

2. 昆明理工大学附属云南省第一人民医院感染性疾病及肝病科)

【摘要】 目的 构建针对乙肝病毒的 DNA 疫苗, 并检测该 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠的效果。方法 选择乙肝病毒表面蛋白中的 LHBs 蛋白基因作为抗原基因, 以 pHL-sec 真核外泌型质粒为载体构建 pHL-sec-LHBs 质粒。使用 pHL-sec-LHBs 质粒、pHL-sec-LHBs 质粒瞬时转染细胞上清和 pHL-sec 空载质粒在无佐剂或有佐剂条件下分别对 BALB/c 小鼠进行免疫, 共计免疫 5 次, 每次间隔 14 d。第 5 次免疫 7 d 后对小鼠进行 LHBs 蛋白特异性抗体检测。

结果 成功构建 pHL-sec-LHBs 重组质粒。使用该质粒瞬转 293T 细胞, Western blot 检测到细胞内 LHBs 蛋白的表达, 并有自切外泌信号肽迹象; ELISA 检测细胞上清中 LHBs 蛋白成功外泌。BALB/c 小鼠免疫试验显示, pHL-sec-LHBs 质粒成功诱发小鼠针对 LHBs 蛋白特异性抗体产生。**结论** 成功构建 pHL-sec-LHBs 重组质粒作为乙肝病毒 DNA 疫苗, 该疫苗对 BALB/c 小鼠中具有良好的免疫原性。

【关键词】 乙肝病毒; DNA 疫苗; 免疫原性

【中图分类号】 R373.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0373-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Apr;18(4):373-376,384.]

Construction of hepatitis B virus DNA vaccine pHL-sec-LHBs and its immune effect in mice

SHI Wen-gang¹, XU Rui-xian¹, LIU Min^{1,2}, ZHANG Tao-ping¹, FAISAL Mahmood¹, SONG Yu-zhu¹, HAN Qin-qin¹, XIA Xue-shan¹, ZHANG Jin-yang¹ (1. *Molecular Medicine Research Center of Yunnan Province, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China*; 2. *Department of Infectious Diseases and Liver Diseases, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming University of Science and Technology*)

【Abstract】 **Objective** To construct a DNA vaccine against hepatitis B virus (HBV) and evaluate its immune effect in BALB / c mice. **Methods** The LHBs gene of the hepatitis B virus was selected as the antigen gene, and the eukaryotic exosomal plasmid pHL-sec was used as the vector to construct the pHL-sec-LHBs plasmid. BALB / c mice were immunized with pHL-sec-LHBs plasmid, pHL-sec-LHBs plasmid transiently transfected cell supernatant and pHL-sec empty plasmid without or with adjuvant, respectively, for a total of 5 times with an interval of 14 days. Seven days after the fifth immunization, the mice were tested for LHBs protein-specific antibodies. **Results** The recombinant plasmid pHL-sec-LHBs was successfully constructed. The plasmid was transiently transfected into 293 T cells, and the expression of LHBs protein in the cells was detected by Western blot, and there was a sign of auto-excision of the signal peptide. ELISA detected the successful secretion of LHBs protein in cell supernatant. The immune test of BALB / c mice showed that the pHL-sec-LHBs plasmid successfully induced the production of specific antibodies against LHBs protein in mice.

Conclusion The pHL-sec-LHBs recombinant plasmid was successfully constructed as a hepatitis B virus DNA vaccine, which has good immunogenicity in BALB / c mice.

【Key words】 Hepatitis B virus; DNA vaccine; immunogenicity

***乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)是一种相对较小(3.2 kb)的 DNA 病毒, 可导致急性或慢性肝脏感染, 进而导致肝硬化或肝癌等疾病^[1]。据估计, 全球有超过 20 亿人感染该病毒, 3 亿人长期感染, 每年因乙型肝炎导致的肝硬化和肝细胞癌致使 60 多万人死亡。尽管乙型肝炎表面抗原(HBsAg)重组蛋白疫苗已经问世多年, 我国也自 1992 年开始将乙肝疫苗纳

* **【基金项目】** 昆明理工大学分析测试基金项目(No. 2021M20202118042); 云南省临床病毒学重点实验室开放课题(No. 2018DG010); 云南(昆明)张文宏专家工作站项目(No. YSZJGZZ-2020051)。

** **【通讯作者】** 张金阳, E-mail: jyzhang@kust.edu.cn

【作者简介】 石文刚(1995-), 男, 山东济宁人, 在读硕士研究生。研究方向: 分子病毒学。E-mail: 1373685243@qq.com

入计划免疫规划,但仍然存在5%~10%的人群在接种疫苗后存在低免疫应答或者无免疫应答的现象^[2-3]。而不同种类的疫苗在群体免疫中的效果不尽相同,在实际使用中常常优势互补,因此不断开发新型疫苗对HBV防治具有重要意义。

DNA疫苗是一项迅速发展的技术,被誉为第三代疫苗,为预防和治疗细菌或病毒引起的疾病提供了新的解决思路^[4-5],可产生针对多种病原体诱发机体保护性免疫^[6-7]。研究表明,DNA疫苗接种可诱导对HBV蛋白疫苗免疫无应答小鼠产生HBV特异性免疫应答^[8-9]。因此,DNA疫苗或许可以成为蛋白类疫苗之外的有效替代品。本研究基于构建的pHL-sec-LHBs质粒,在细胞内表达LHBs蛋白,并分泌到细胞外,诱导小鼠产生LHBs蛋白抗体,以达到机体免疫效果。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、质粒、细胞及实验动物 *E. coli* DH5 α 化学感受态菌株购于北京擎科生物科技有限公司昆明分公司;pHL-sec质粒、293T细胞及HepG2.2.15细胞株由本实验室保存。BALB/c小鼠,雌性,6周龄,购自昆明医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 Trizol和质粒大量提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;逆转录试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;无缝克隆试剂盒选购自TaKaRa Bio中国公司;乙肝表面抗体-HRP和乙肝表面抗原检测试剂盒购于上海科华生物工程有限公司;预染蛋白Marker购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;转染试剂脂质体2000/Lip2000购自北京索莱宝科技有限公司;DNA分子质量标准试剂由北京擎科生物科技有限公司昆明分公司提供。

2 方法

2.1 pHL-sec-LHBs重组质粒构建 使用Trizol试剂按说明书提取HepG2.2.15细胞总RNA,再用逆转录试剂盒将提取的RNA逆转录成cDNA。使用Primer5.0软件设计LHBs无缝克隆引物。LHBs-F:CGTAGCTGAAACCGGTATGGGGCAGAATCTTTCCAC;LHBs-R:TGATGGTGGTGCTTGGTACCAATGTATACCCAAAGACAAAAGAAA。引物由北京擎科生物科技有限公司昆明分公司合成。以HepG2.2.15细胞cDNA为模板PCR扩增LHBs基因。PCR体系:上下游引物各1 μ L,2 \times Taq DNA聚合酶Mix 10 μ L,cDNA模板1 μ L,ddH₂O补齐至20 μ L。PCR程序:94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸90s,共35个循环。pHL-sec质粒使用Age I和Kpn I双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳纯化后使用无缝克

隆试剂盒酶连接目的基因,连接产物转化*E. coli* DH5 α 化学感受态菌株,通过菌液PCR与DNA测序(由北京擎科生物科技有限公司昆明分公司完成)证实插入片段的核苷酸序列。

2.2 pHL-sec-LHBs重组质粒表达鉴定 纯化的无内毒素pHL-sec-LHBs质粒使用转染试剂瞬转293T细胞,转染48h后使用RIPA裂解细胞,收集上清进行Western blot。细胞裂解上清经SDS-PAGE 90V电泳30min后切换电压120V电泳1h至样品迁移至凝胶底部;将凝胶中蛋白转移到NC膜表面(160mA 2h),使用封闭液室温封闭2h;加入封闭液稀释的乙肝表面抗体-HRP 4 $^{\circ}$ C过夜孵育过夜,PBST洗膜3次(10min/次),膜面滴加显影液后使用显影仪观测。采用乙肝表面抗原检测试剂盒对离心后去除细胞碎片的细胞培养上清进行抗原检测,按说明书操作。

2.3 pHL-sec-LHBs重组质粒大量制备 取测序无误的pHL-sec-LHBs重组质粒菌液使用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒,冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱。

2.4 小鼠免疫 将15只BALB/c小鼠随机分为A、B、C3组,每组5只。A组为肌肉注射pHL-sec-LHBs质粒免疫组(50 μ g),B组为皮下注射含LHBs蛋白的293T细胞上清免疫组,C组为肌肉注射pHL-sec质粒免疫组(50 μ g)。3组注射体积均为200 μ L,每次免疫间隔2周,连续免疫5次。末次免疫后7d对小鼠尾静脉取血进行抗体检测。

2.5 小鼠多抗血清检测 (1)间接ELISA法:在酶标条上过夜包被瞬转获得的含LHBs蛋白的293T细胞培养上清;加入脱脂奶室温封闭2h;加入1:10稀释的小鼠多抗血清孵育2h,PBST洗板5次;加入1:10 000稀释山羊抗鼠IgG-HRP室温孵育1h,PBST洗板5次;加入可溶性TMB,显色15min后加入终止液终止显色。(2)竞争ELISA:同上过夜包被瞬转获得的含LHBs蛋白的293T细胞培养上清,脱脂奶封闭后同时加入1:10稀释的小鼠多抗血清和乙肝表面抗体-HRP结合物共同孵育1h,洗板后加入TMB显色。两种ELISA均使用酶标仪在450nm波长下检测吸光度A值。

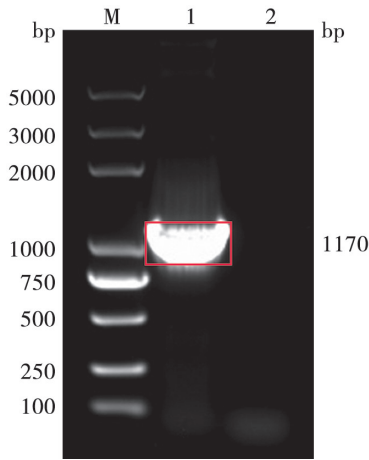
2.6 统计学分析 采用SPSS21.0统计学分析软件和Excel进行统计学分析。计量资料的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 pHL-sec-LHBs重组质粒的构建及鉴定

以HepG2.2.15细胞中获得cDNA为模板PCR扩增LHBs蛋白基因,扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,大小约1 000 bp,与目的基因LHBs(1 070

bp)大小基本一致(图1)。



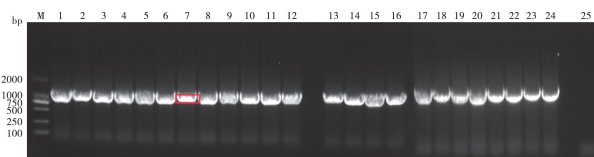
M DNA标志物(DL5000) 1 LHBs基因PCR扩增产物 2 阴性对照

图1 LHBs基因PCR扩增产物1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker (DL5000) 1 LHBs gene PCR amplification product 2 Negative control

Fig. 1 Analysis of PCR products of LHBs gene by 1% agarose gel electrophoresis

pHL-sec质粒内含EFNB2基因,首先对pHL-sec质粒使用限制性内切酶Age I和Kpn I进行双酶切,酶切产物同上进行核酸电泳纯化。目的基因和线性化载体纯化后经酶连、转化,对重组质粒单克隆菌落扩培的菌液进行菌液PCR鉴定,结果显示所有单克隆LHBs基因检测均为阳性(图2)。抽取7个单克隆菌液(单克隆2、4、5、6、7、8、9)进行测序,序列比对显示7号单克隆无突变,pHL-sec-LHBs重组质粒构建正确。



M DNA标志物(DL2000) 1~24 重组质粒单克隆菌液PCR产物 25 阴性对照

图2 重组质粒pHL-sec-LHBs菌液PCR鉴定

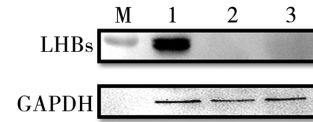
M DNA marker (DL2000) 1-24 Recombinant plasmid monoclonal bacteria PCR products 25 Negative control

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pHL-sec-LHBs by Bacteria PCR

2 LHBs蛋白真核表达鉴定

将重组质粒pHL-sec-LHBs转染至293T细胞培养48h,收集细胞蛋白样品,Western blot检测LHBs蛋白相对分子质量约为 43×10^3 ,与预期一致。转染pHL-sec空载组与293T细胞空白组未检出该蛋白(图3)。Western blot结果中可见LHBs蛋白以紧邻的两条反应条带存在,可能是因为在细胞内存在剪切掉膜信号肽的LHBs蛋白和未剪切掉膜信号肽的LHBs蛋白两种LHBs蛋白存在形式,且两者对乙肝

表面抗体亲和能力基本相同,蛋白大小差距很小,符合外泌信号肽在第28-29个氨基酸处自切的可能性。证明重组质粒pHL-sec-LHBs能在哺乳动物细胞表达LHBs蛋白,且存在外泌信号肽自切现象。



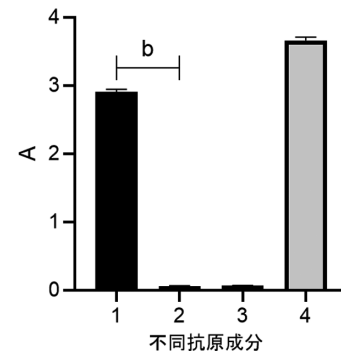
M 蛋白分子质量标准 1 转染pHL-sec-LHBs重组质粒的293T细胞裂解液与相应抗体反应条带 2 转染pHL-sec重组质粒的293T细胞裂解液对照 3 未转染质粒的293T细胞裂解液对照

图3 重组蛋白的Western blot检测

M Protein molecular quality standard 1 293T cell lysate transfected with pHL-sec-LHBs recombinant plasmid 2 Transfection pHL-sec/293T cell lysate of recombinant plasmid 3 Untransfected 293T cell lysate

Fig. 3 Western blot detection of recombinant protein

转染48h后收集的细胞上清离心去除细胞碎片,使用乙肝表面抗原检测试剂盒进行检测,结果呈现较强反应,证明LHBs蛋白成功外泌到细胞外(图4)。



1 转染pHL-sec-LHBs重组质粒的293T细胞上清 2 转染pHL-sec质粒的293T细胞上清 3 未转染质粒的293T细胞上清 4 乙肝表面抗原检测试剂盒中的阳性对照,即乙肝表面抗原(A: OD 450 nm;组间比较 $b P < 0.01$)

图4 转染pHL-sec-LHBs重组质粒后上清中乙肝表面抗原检测

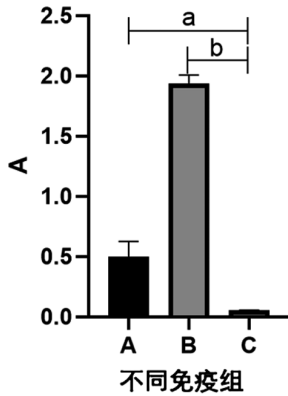
1 The supernatant of 293T cells transfected with pHL-sec-LHBs recombinant plasmid 2 supernatant of 293T cells transfected with pHL-sec plasmid 3 Untransfected 293T cell supernatant 4 Hepatitis B surface antigen detection kit in the positive control, namely hepatitis B surface antigen (A: OD 450 nm; group comparison $b P < 0.01$.)

Fig. 4 Detection of hepatitis B surface antigen in supernatant after transfection of pHL-sec-LHBs recombinant plasmid

3 免疫小鼠多抗血清检测

对免疫小鼠多抗血清进行检测,间接ELISA结果显示免疫pHL-sec-LHBs重组质粒的小鼠均产生了针对LHBs蛋白的特异性抗体(图5),但与免疫含LHBs蛋白293T细胞上清的小鼠相比具有较大的差距(3.88倍)。使用获得的小鼠多抗血清进行竞争ELISA检测,pHL-sec-LHBs重组质粒免疫小鼠多抗血清展现出良好的竞争性,对乙肝表面抗体-HRP抑制率为13.25%,含LHBs蛋白293T细胞上清免疫小

鼠多抗血清抑制率为 30.48%(图 6)。

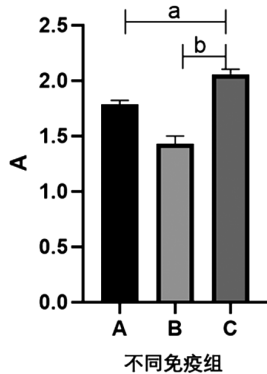


A 肌肉注射 pHL-sec-LHBs 质粒免疫组 B 皮下注射含 LHBs 蛋白的 293T 细胞上清免疫组 C 肌肉注射 pHL-sec 质粒免疫组(组间比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$)

图 5 间接 ELISA 检测重组质粒与含 LHBs 细胞上清免疫小鼠血清 LHBs 特异性抗体水平

A Intramuscular injection pHL-sec-LHBs plasmid immunization group B subcutaneous injection of 293 T cell supernatant containing LHBs protein immunized group C intramuscular injection pHL-sec plasmid immunization group(Group comparison ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$)

Fig. 5 Detection of LHBs specific antibody levels in serum of mice immunized with recombinant plasmid and supernatant containing LHBs cells by direct ELISA



A 肌肉注射 pHL-sec-LHBs 质粒免疫组 B 皮下注射含 LHBs 蛋白的 293T 细胞上清免疫组 C 肌肉注射 pHL-sec 质粒免疫组(组间比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$)

图 6 竞争 ELISA 检测重组质粒与含 LHBs 细胞上清免疫小鼠血清 LHBs 特异性抗体水平

A intramuscular injection pHL-sec-LHBs plasmid immunization group B subcutaneous injection of 293 T cell supernatant containing LHBs protein immunized group C intramuscular injection pHL-sec plasmid immunization group (Group comparison, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$)

Fig. 6 Detection of LHBs specific antibody in serum of mice immunized with recombinant plasmid and supernatant containing LHBs by competitive ELISA

讨论

HBV 属嗜肝 DNA 病毒科,是引起乙型肝炎的病原体,由不完全的环状双链 DNA 组成,长的为负链,短的为正链^[10]。HBV 基因组中的 4 个开放阅读框全部位于负链,分为 S 区、C 区、P 区、X 区^[11]。其中 S 区借助同一开放阅读框不同位点的起始密码子分别表达

LHBs、MHBs、SHBs 3 种病毒包膜蛋白(又称前 S1 蛋白、前 S2 蛋白及 S 蛋白)。HBV 的嗜肝性主要由 LHBs 和 MHBs 两种蛋白与肝细胞之间识别后介导的^[12-14]。进而导致这两种蛋白在 HBV 感染中具有很强的免疫原性。因此本研究在 DNA 疫苗构建过程中选择 LHBs 蛋白基因作为免疫原,探讨该 DNA 疫苗的可行性。

目前 DNA 疫苗仍然存在一些问题也不可忽视。例如 DNA 疫苗基因插入染色体引起基因突变的可能性^[15];免疫原性逊色于常规的灭活疫苗和重组蛋白疫苗;抑或存在明显的种属隔离,不同种属的 DNA 疫苗需要不同的启动子等问题^[16]。但与此同时 DNA 疫苗所具有的优势也是其他疫苗所无法比拟的。例如,常规以蛋白为手段的疫苗只能诱导机体产生体液免疫,但 DNA 疫苗却可在一定程度上诱导机体的细胞免疫^[17]。另外,DNA 疫苗具有保护周期长、制备简单、状态稳定、生产成本低廉等优点,使 DNA 疫苗成为疫苗家族中不可或缺的一份子。

据文献报道,外泌型质粒可有效提升 DNA 疫苗免疫原性^[18]。本研究选择以 pCAG. I-SceI 载体为骨架插入 EFNB2 基因的 pHL-sec 质粒作为 DNA 疫苗的载体,主要是因为该质粒在 Age I 和 Kpn I 两酶切位点处切开后插入的目的基因在表达时可以与 EFNB2 基因外泌信号肽蛋白形成融合蛋白,使目的蛋白借助外泌信号肽进行外泌,并在外泌时自行剪切掉该信号肽,进而提升疫苗的免疫原性。在细胞转染实验中,细胞内检测出的两种 LHBs 蛋白和转染后细胞上清中乙肝表面抗原强阳性的结果均表明该质粒具有表达目的蛋白并外泌的能力,推测可能是外泌的功能在一定程度上提升了该 DNA 疫苗的免疫原性,但具体提升幅度的高低还需要后续实验进一步优化。

本研究构建了 pHL-sec-LHBs 重组质粒,Western blot 和 ELISA 验证该质粒能在细胞中表达,小鼠免疫试验验证其具有免疫原性,证实了其作为 HBV 候选 DNA 疫苗的可行性,为新型 HBV 疫苗的研发提供了理论基础。

【参考文献】

[1] Chan SL, Wong VW, Qin S, et al. Infection and cancer: The case of hepatitis B[J]. J Clin Oncol, 2016, 34: 83-90.

[2] De Pooter D, Van Gulek E, Chen A, et al. A therapeutic hepatitis B virus DNA vaccine induces specific immune responses in mice and non-human primates[J]. Vaccines (Basel), 2021, 9(9): 969.

[3] 苏永健,陈梦丽,李嘉铃,等. YTHDF 基因 DNA 甲基化与乙肝疫苗低/无免疫应答[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(9): 1076-1080, 1085.

(下转 384 页)

and blocks S phase progression in mammalian cells[J]. *J Biol Chem*,2006,281(16):10669-10681.

[12] Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19[J]. *Clin Infect Dis*, 2020,71(8):1930-1934.

[13] Ni L, Ye F, Cheng ML, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals[J]. *Immunity*,2020,52(6):971-977.

[14] Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies [J]. *Viruses*,2020,12(3):254.

[15] Sairaj S, Madhavan N. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2[J]. *ArchMed Res*,2020, 51(6):482-491.

[16] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*,2020,181(2):271-280.

[17] Carlson CR, Asfaha JB, Ghent CM, et al. Phosphoregulation of phase separation by the SARS-CoV-2 N protein suggests a biophysical basis for its dual functions[J]. *Molecular Cell*, 2020,80(6):1092-1103.

【收稿日期】 2022-11-13 【修回日期】 2023-02-01

(上接 376 页)

[4] Lu S, Wang S, Grimes-Serrano JM, et al. Current progress of DNA vaccine studies in humans[J]. *Expert Rev Vaccines*,2008(7): 175-191.

[5] 黎强, 丁祎, 刘高文, 等. 狂犬病毒 M 蛋白多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *昆明理工大学学报(自然科学版)*,2022,47(4):90-96,117.

[6] Chavda VP, Pandya R, Apostolopoulos V. DNA vaccines for sars-cov-2: Toward third-generation vaccination era [J]. *Expert Rev Vaccines*,2021,20:1549-1560.

[7] Yu J, Tostanoski LH, Peter L, et al. DNA vaccine protection against sars-cov-2 in rhesus macaques[J]. *Science*,2020,369:806-811.

[8] Schirmbeck R, Bhm W, Ando K, et al. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic t lymphocytes in nonresponder mice[J]. *J Virol*, 1995, 69: 5929-5934.

[9] Fuller JT, Macklin M, Drape B, et al. Gene-gun-mediated DNA immunization with hbsag; Efficacy in small and large animals[J]. *Vaccines*,1997,157-162.

[10] Hu Z, Ban H, Zheng H, et al. Protein phosphatase 1 catalyzes hbv core protein dephosphorylation and is co-packaged with viral pregenomic rna into nucleocapsids[J]. *PLoS Pathog*,2020, 16: e1008669.

[11] Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, et al. Worldwide genetic diversity of hbv genotypes and risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*,2009,286:80-88.

[12] Shouval D, Roggendorf H, Roggendorf M. Enhanced immune response to hepatitis b vaccination through immunization with a pre-s1/pre-s2/s vaccine[J]. *Med Microbiol Immunol*.2015,204: 57-68.

[13] Barrera A, Guerra B, Notvall L, et al. Mapping of the hepatitis b virus pre-s1 domain involved in receptor recognition[J]. *J Virol*, 2005,79:9786-9798.

[14] 王炜晓, 赵丹莹, 常军亮, 等. 乙型肝炎病毒截短 L 蛋白的表达及其与 S 蛋白生物信息学对比分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022,17(4):373-379,387.

[15] Progress AA. challenges and opportunities in fish vaccine development[J]. *Fish Shellfish Immunol*,2019,90:210-214.

[16] Ruiz S, Tafalla C, Cuesta A, et al. In vitro search for alternative promoters to the human immediate early cytomegalovirus (ie-cmv) to express the g gene of viral haemorrhagic septicemia virus (vhsv) in fish epithelial cells[J]. *Vaccine*,2008,26:6620-6629.

[17] Roos AK, Moreno S, Leder C, et al. Enhancement of cellular immune response to a prostate cancer DNA vaccine by intradermal electroporation[J]. *Mol Ther*,2006,13:320-327.

[18] 涂亦娟, 张馨玉, 王宾, 等. 猪瘟病毒 E2 基因真核表达载体表达效率和免疫效果的比较[J]. *中国农业大学学报*,2005,10(6): 37-41.

【收稿日期】 2022-09-21 【修回日期】 2022-12-01