|  |  |
| --- | --- |
| 学 校 代 码： | 10264 |
| 研究生学号： | M100104194 |

**上 海 海 洋 大 学**

**硕 士 学 位 论 文**

|  |  |
| --- | --- |
| **题** **目：** | **草鱼出血病细胞培养灭活疫苗微囊**  **制备与口服免疫效果研究** |
| **英文题目：** | **Preparation and Oral Immunization**  **of Microencapsulated Killed Vaccine against Grass Carp Hemorrhage** |
| **专** **业：** | 临床兽医 |
| **研究方向：** | 水产动物疾病防治 |
| **姓** **名：** | 李瑞伟 |
| **指导教师：** | 曾令兵 研究员 |

**二 O 一三年四月**

**上海海洋大学学位论文原创性声明**

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

**上海海洋大学学位论文版权使用授权书**

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

保密 □ ，在 年解密后适用本版权书。 不保密□

学位论文作者签名： 指导教师签名：

日期： 年 月 日 日期： 年 月 日

**上海海洋大学 博/硕士学位论文**

**答辩委员会成员名单**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 工作单位 | 职称 | 备注 |
| 叶林柏 | 武汉大学生命科学学院 | 教授 | 主席 |
| 张奇亚 | 中国科学院水生生物所 | 研究员 | 委员 |
| 陈孝煊 | 华中农业大学水产学院 | 教授 | 委员 |
| 李爱华 | 中国科学院水生生物所 | 研究员 | 委员 |
| 吕利群 | 上海海洋大学水产与生命学院 | 教授 | 委员 |
| 曹小娟 | 华中农业大学水产学院 | 讲师 | 秘书 |
| 答辩地点 | 湖北 武汉 | 答辩日期 | 2013 年5 月 |

草鱼出血病细胞培养灭活疫苗微囊制备与口服免疫效果研究

摘要

草鱼出血病是我国养殖草鱼最为严重的病毒性疾病，其病原为草鱼呼肠孤病毒（grass carp reovirus, GCRV）。草鱼出血病流行范围广，持续时间长，死亡率高，对草鱼养殖业造成了巨大的经济损失，严重威胁我国草鱼养殖业的健康发展。因此，研究草鱼出血病的有效防治措施对草鱼养殖业具有重要意义。疫苗免疫是预防草鱼出血病最为有效的方法，目前，草鱼主要以注射免疫或浸泡免疫为主。口服疫苗免疫接种方便，不受鱼体大小、养殖规模等条件限制，越来越受到研究人员关注。但是，口服疫苗因疫苗抗原蛋白易受消化系统酶的破坏，而导致其研究与应用受到限制。疫苗微囊化技术的发展与应用，降低了疫苗抗原的损失，提高了疫苗的免疫效果，因此，微囊疫苗的研究逐渐受到重视。

本研究以海藻酸钠、壳聚糖为微囊壁材，以草鱼出血病细胞培养灭活疫苗为微囊芯材，采用复凝聚法研究了海藻酸钠-壳聚糖（SA-CS）微囊疫苗的制备工艺。首先，通过单因素试验，研究了海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度、壳聚糖溶液pH以及加入疫苗体积五个因素对微囊疫苗包封率的影响。然后，在单因素试验的基础上，通过正交试验筛选，优化了草鱼出血病口服微囊疫苗的制备工艺，并确定其最佳制备工艺；最后，通过微囊疫苗的外观观察和体外释放试验，研究了微囊疫苗的外观形态、释放性能以及耐酸碱性能。单因素试验结果显示，在制备SA-CS微囊疫苗时，海藻酸钠浓度宜保持在1.5%左右，壳聚糖浓度宜保持在1%左右，壳聚糖溶液pH宜保持在4- 5之间，氯化钙浓度宜保持在4%左右，最适加入疫苗体积为2mL；正交试验筛选结果显示，各因素对草鱼出血病微囊疫苗包封率的影响程度由大到小依次为：海藻酸钠浓度＞疫苗加入量＞壳聚糖浓度＞氯化钙浓度，制备草鱼出血病微囊疫苗的最佳工艺为：海藻酸钠浓度1.5%，壳聚糖浓度1%，氯化钙浓度4%，加入疫苗体积2mL；微囊疫苗体外性能研究显示，光镜下观察微囊呈类圆形，平均粒径为（7.02±3.95）μm，平均包封率为60.53%，平均载蛋白量为8.12mg/g，在pH7.4的PBS溶液、生理盐水溶液中具有良好的释放性能。

将保存不同时间的SA-CS微囊疫苗分别口服免疫草鱼，通过检测血清中和抗体效价，研究该微囊疫苗的稳定性；经过鱼体免疫，以间接荧光免疫技术证实该疫苗能够被草鱼肠道摄取；免疫草鱼后，在不同时间点分别取草鱼的血液和内脏组织（肝、脾、肾），通过检测血清中和抗体效价，比较微囊免疫组、细胞疫苗口服组和对照组血清抗体效价水平的差异，并采用实时荧光相对定量法检测草鱼免疫相关基因IgM、Mx的表达量差异，从而确定该微囊疫苗的免疫效果；通过草鱼呼肠孤病毒GCRV104攻毒试验，确定该微囊疫苗的免疫保护力。SA-CS微囊疫苗稳定性研究结果表明，保存1个月、3个月、6个月的SA-CS微囊疫苗在免疫草鱼后，3个组的血清中和抗体效价检测无显著性差异（*P*＞0.05），说明微囊疫苗可在4℃条件下保存6个月；免疫草鱼后，血清抗体效价检测结果显示，在第7d，免疫组抗体水平显著上升，细胞疫苗口服组的抗体水平（83.61±11.02）显著高于SA-CS微囊疫苗组（69.72±2.37）（*P*＜0.05）；在第14d，免疫组均维持在较高的水平，差异不显著（*P*＞0.05）；第21d时，SA-CS微囊疫苗组（101. 56±4.28）显著高于细胞疫苗组（79.89±9.04）（*P*＜0.05）。免疫相关基因表达检测结果显示，免疫组IgM在免疫7d后，显著高于对照组（*P*＜0.05），而在第14d后，差异极显著（*P*＜0.01）；而Mx表达量在免疫3d后显著高于对照组（*P*＜0.05），第7d

后，差异极显著（*P*＜0.01）。攻毒试验研究结果显示，SA-CS微囊疫苗免疫组的草鱼死亡率低于对照组，该微囊疫苗的相对免疫保护力（RPS）为62.5%。

关键词：草鱼出血病； SA-CS 微囊； 制备工艺； 体外释放； 免疫效果

**Preparation and Oral Immunization of Microencapsulated Killed Vaccine against Grass Carp Hemorrhage**

Abstract

Grass carp hemorrhage is the most serious disease of grass carp cultured in China, the causative pathogen is the grass carp reovirus (GCRV). Grass carp hemorrhage has been spreading in a wide range of areas in China with long duration and high mortality, and caused huge economic losses. Grass carp hemorrhage has become a great threat to the healthy development of the industry of grass carp culture. Therefore, it is of importance to explore the effective measures for preventing and controlling grass carp hemorrhage. At present, immunization with vaccine against grass carp hemorrhage is reported the most effective method through intraperitoneal injection and immersion routines. Because of easy delivery, non-limited of fish size and farming scale, more attentions has been paid on the oral vaccine development for fish. However, due to the antigenic protein might be destructed easily by digestive enzyme *in vivo*, the development and application of oral vaccine for fish is limited currently. The development microencapsulated technology and the application of microencapsulated vaccine reduced the loss of vaccine antigenicity, and enhanced the immune effect, therefore, study of the microcapsule vaccine has been given more and more attention.

A complex co-acervation method was applied to microencapsulate killed vaccine against grass carp hemorrhage by using Sodium alginate and Chitosan as the wall materials, and the killed vaccine of grass carp hemorrhage as microcapsule core material. Firstly, by single factor experiment, five factors which affect microencapsulated vaccine entrapment efficiency were studied, including the concentration of sodium alginate, chitosan concentration, calcium chloride concentration, pH of chitosan solution and adding vaccine volume. Through orthogonal test, the optimal preparation technology of oral SA-CS microencapsulated

Vaccine was determined. Finally, morphology observation and releasing test of microencapsulated vaccine *in vitro*, and the properties of resistance to acid and base were studied. The results of single factor test showed that, in the preparation of SA-CS microencapsulated vaccine, sodium alginate concentration should be maintained at around 1.5%, chitosan concentration should be maintained at about 1%, and pH of chitosan solution should be maintained at 4-5, calcium chloride concentration should be maintained at 4%, and the optimal dose of vaccine is 2mL; the affecting degree of the factors for the microencapsulated vaccine entrapment rate from large to small is: sodium alginate concentration> vaccine dosage> chitosan

Concentration＞calcium chloride concentration. The optimum preparation of

Microencapsulated vaccine is: sodium alginate concentration 1.5%, chitosan concentration 1%, chloride calcium concentration 4%, vaccines volume 2mL. The results of performance *in vitro* of the microencapsulated vaccine showed that, the microencapsulated vaccine presented in homogeneous round under light microscope, withan average particle size of (7.02±3.95)μm. The average encapsulation rate was 60.53%, the average carrier protein was 8.12mg/g, and the microencapsulated vaccine had a good releasing performance in PBS solution (pH7.4) and physiological saline solution.

The grass carp were immunized with SA-CS microencapsulated vaccine stored with different time. By the serum neutralizing antibody titer detection, the stability of the microencapsulated vaccine was studied. After immunizing the grass carp, it was confirmed that the vaccine was uptook in grass carp intestinal by indirect immunofluorescence technique. The blood and splanchnic tissues (liver, spleen and kidney) of grass carp were taken to compare the differences between microcapsules immune group, cell vaccine oral group and control group. By real-time fluorescent quantitative PCR method, the expression of the immune gene IgM and Mx of grass carp were analyzed to determine the immune effect of microcapsule vaccine. Through the GCRV104 challenge test, the immune protection of the microencapsulated vaccine was determined. Results of the stability study of SA-CS microencapsulated vaccine showed that, grass carp immunized with SA-CS microencapsulated vaccine stored at

4℃for 1 month, 3 months, 6 months of were no significant difference between the 3

Groups after detection of serum antibody titer(*P*＞0.05), which illustrated the microcapsule vaccine can be stored at 4℃at least 6 months; After immunization, results of serum antibody titers detection showed that, at 7d, the antibody level of cell

Vaccine oral group was significantly higher than that of SA-CS microencapsulated vaccine group (*P* <0.05); at 14d, the immunized groups were maintained at a high level, the difference was not significant (*P*> 0.05); at 21d, SA-CS microencapsulated vaccine group was significantly higher than that of cell vaccine group (*P* <0.05). Results of immune gene expression detection showed that, at 7d, IgM of the immunized group was significantly higher than that of the control group (*P* <0.05), and at 14d, was significant difference (*P* <0.01); the expression level of Mx in the immunized group is significantly higher than that in control group at 3d (*P* <0.05), the difference is significant (*P* <0.01) at 7d. Results of challenge test showed that, the mortality rate of SA-CS microencapsulated vaccine group was lower than that of control group, and relative percent survival (RPS) of the microencapsulated vaccine was 62.5%.

KEY WORDS: grass c*: grasscarphemorrhage; sa-csmicrocapsule; preparationtechnology; releasein vitro*; Immune efficacy

目 录

[摘要](#_Toc686458762) 3

[Abstract](#_Toc686458763) 4

[第一章 文献综述](#_Toc686458764) 6

[1 草鱼出血病研究背景](#_Toc686458765) 7

[1.1 草鱼出血病研究历史](#_Toc686458766) 7

[1.2 草鱼出血病流行概况](#_Toc686458767) 7

[1.3 草鱼出血病防治技术研究进展](#_Toc686458768) 7

[1.3.1 疫苗研究](#_Toc686458769) 7

[1.3.2 药物防治研究](#_Toc686458770) 7

[1.3.3 免疫增强剂防治研究](#_Toc686458771) 7

[1.3.4 生态防治研究](#_Toc686458772) 7

[1.3.5 其他防治方法研究](#_Toc686458773) 8

[2 微囊及微囊技术简介](#_Toc686458774) 8

[2.1 微囊壁材的选择及微囊释放原理](#_Toc686458775) 8

[2.1.1 壁材选择](#_Toc686458776) 8

[2.1.2 芯材释放原理](#_Toc686458777) 8

[2.2 微囊制备方法](#_Toc686458778) 8

[2.2.1 化学成囊法](#_Toc686458779) 9

[2.2.2 物理成囊法](#_Toc686458780) 9

[2.2.3 物理化学制备法](#_Toc686458781) 9

[2.2.4 其他新型制备方法](#_Toc686458782) 9

[3 海藻酸钠-壳聚糖（SA-CS）微囊](#_Toc686458783) 9

[3.1 海藻酸钠](#_Toc686458784) 9

[3.2 壳聚糖](#_Toc686458785) 10

[3.3 海藻酸钠-壳聚糖微囊成膜机理](#_Toc686458786) 10

[3.4 海藻酸钠-壳聚糖微囊制备方法](#_Toc686458787) 10

[4 微囊技术在水产养殖应用中的研究进展](#_Toc686458788) 10

[4.1 在水产动物疫苗方面的应用](#_Toc686458789) 10

[4.2 在水产饵料及饲料添加剂方面的应用](#_Toc686458790) 10

[4.3 其他方面的应用](#_Toc686458791) 11

[5 研究目的及意义](#_Toc686458792) 11

[第二章 草鱼出血病细胞疫苗微囊制备及体外释放研究](#_Toc686458793) 11

[1 材料](#_Toc686458794) 11

[1.1 实验设备与仪器](#_Toc686458795) 11

[1.2 实验材料](#_Toc686458796) 13

[1.3 实验试剂与器皿](#_Toc686458797) 13

[1.4 试剂配制](#_Toc686458798) 13

[2 实验方法](#_Toc686458799) 13

[2.1 CIK细胞传代培养](#_Toc686458800) 13

[2.2 GCRV104 增殖及其细胞灭活疫苗制备](#_Toc686458801) 13

[2.3 蛋白质含量测定标准曲线的建立](#_Toc686458802) 14

[2.4 SA-CS微囊制备方法的确立](#_Toc686458803) 14

[2.5 单因素试验](#_Toc686458804) 15

[2.5.1 不同海藻酸钠浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458805) 15

[2.5.2 不同壳聚糖浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458806) 15

[2.5.3 不同氯化钙浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458807) 15

[2.5.4 不同疫苗加入量对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458808) 15

[2.5.5 壳聚糖溶液不同pH对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458809) 15

[2.6 正交试验设计](#_Toc686458810) 15

[2.7 SA-CS微囊形态观察及粒径测量](#_Toc686458811) 16

[2.8 微囊疫苗包封率、载蛋白量测定](#_Toc686458812) 16

[2.9 微囊疫苗的体外释放实验](#_Toc686458813) 16

[3 结果与分析](#_Toc686458814) 16

[3.1 蛋白含量测定标准曲线](#_Toc686458815) 16

[3.2 SA-CS微囊制备方法比较结果](#_Toc686458816) 16

[3.3 单因素试验结果](#_Toc686458817) 17

[3.3.1 海藻酸钠浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458818) 17

[3.3.2 壳聚糖浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458819) 17

[3.3.3 氯化钙浓度对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458820) 17

[3.3.4 疫苗加入量对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458821) 17

[3.3.5 壳聚糖溶液pH对SA-CS微囊包封率的影响](#_Toc686458822) 17

[3.4 正交试验结果](#_Toc686458823) 18

[3.5 SA-CS微囊外观、粒径、包封率、载蛋白量](#_Toc686458824) 20

[3.6 体外释放实验结果](#_Toc686458825) 20

[4 讨论](#_Toc686458826) 21

[小 结](#_Toc686458827) 21

[第三章 草鱼出血病细胞SA-CS微囊疫苗免疫效果研究](#_Toc686458828) 21

[1 材料](#_Toc686458829) 21

[1.1 实验仪器](#_Toc686458830) 21

[1.2 实验材料](#_Toc686458831) 23

[1.3 引物设计](#_Toc686458832) 23

[1.4 实验试剂](#_Toc686458833) 25

[1.5 试剂配制](#_Toc686458834) 25

[7.6 左右，蒸馏水定容至1000 mL。](#_Toc686458835) 25

[2 实验方法](#_Toc686458836) 25

[2.1 GCRV104多克隆抗体的制备及特异性检测](#_Toc686458837) 25

[2.2 草鱼肠道冷冻切片制备与间接荧光免疫检测](#_Toc686458838) 25

[2.3 血清中和抗体效价检测](#_Toc686458839) 25

[2.3.1 免疫、采血及血清处理](#_Toc686458840) 25

[2.3.2 GCRV104毒价滴定](#_Toc686458841) 25

[2.3.3 血清中和试验](#_Toc686458842) 26

[2.3.4 GCRV104回归试验](#_Toc686458843) 26

[2.3.5 血清毒性试验](#_Toc686458844) 26

[2.4 免疫基因表达检测](#_Toc686458845) 26

[2.4.1 草鱼内脏组织总RNA提取及逆转录](#_Toc686458846) 26

[2.4.2 半定量检测免疫基因的表达](#_Toc686458847) 26

[2.4.3 实时荧光定量检测免疫基因](#_Toc686458848) 26

[2.5 SA-CS微囊疫苗稳定检测](#_Toc686458849) 26

[2.6 SA-CS微囊疫苗免疫保护率检测](#_Toc686458850) 26

[3 结果](#_Toc686458851) 27

[3.1 GCRV104多克隆抗体特异性检测](#_Toc686458852) 27

[3.2 草鱼肠道切片间接荧光免疫检测](#_Toc686458853) 27

[3.3 血清中和抗体效价检测](#_Toc686458854) 27

[3.4 免疫基因检测](#_Toc686458855) 28

[3.5 SA-CS微囊疫苗稳定性检测](#_Toc686458856) 29

[3.6 SA-CS微囊疫苗免疫保护力检测](#_Toc686458857) 29

[4 讨论](#_Toc686458858) 29

[小 结](#_Toc686458859) 30

[参考文献](#_Toc686458860) 30

[附录一](#_Toc686458861) 34

[附录二](#_Toc686458862) 36

# 第一章 文献综述

草鱼出血病是我国养殖草鱼最为严重的病毒性疾病，其发生范围广、流行时间长，死亡率高，造成重大的经济损失，严重威胁我国草鱼养殖业的发展。草鱼出血病病原为草鱼呼肠孤病毒。开展草鱼出血病的防控技术研究，不仅具有重要的理论研究意义，而且有广泛的应用前景。

## 1 草鱼出血病研究背景

### 1.1 草鱼出血病研究历史

草鱼出血病研究最早开始于20世纪50年代，1970年湖北黄陂滠口渔场养

殖工人根据患病草鱼肌肉出血症状，将其称为“红肌病”。到70年代末正式开始病原分离研究。湖北省水生生物研究所[1]通过细菌分离、人工感染实验，没有得到感染鱼发生出血病并死亡的结果，排除了细菌病原感染的可能性。此后，中国科学院水生生物研究所三室病毒组[2]和湖北省水生生物研究所[3]通过将病鱼组织匀浆过滤液感染健康草鱼，成功复制出与自然发病相同的症状；并通过电镜观察病鱼组织材料，发现病毒颗粒并分离，经人工感染实验研究，证实为草鱼出血病病原，并命名为“草鱼疱疹病毒”（Herpesvirus of Grass Carp, HVGC）。陈燕燊等[4]通过病毒形态结构以及理化特性研究，进一步证实该病毒为RNA病毒，属于水生呼肠孤病毒属，并定名为草鱼呼肠孤病毒（Grass Carp Reovirus, GCRV）。中国科学院武汉病毒所、中国水产科学研究院长江水产研究所草鱼出血病研究协作组[5-7]从患出血病的草鱼体内分离出一株病毒，通过对该病毒的精细结构与核酸理化特性的系统研究，确认为该病病原，并将其定名为鱼呼肠孤病毒（Fish

Reovirus，FRV）。草鱼吻端组织细胞株[8]及草鱼肾脏组织细胞系[9]的成功建立，为草鱼出血病病毒的分离鉴定与防控技术研究奠定了重要基础。柯丽华等[10-11]从患出血病的草鱼体内分离到一株新的病毒，经病毒形态及核酸理化特性分析，表明该病毒可能为呼肠孤病毒科的新成员（GCRV873），并进行了不同病毒株的免疫原性比较。1995年，草鱼出血病病毒被国际病毒分类命名委员会正式命名为草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV)。随后，相继有草鱼出血病病

原分离鉴定的相关报道[12-17]。

### 1.2 草鱼出血病流行概况

草鱼出血病主要危害草鱼鱼种，其发病症状为鱼体发黑，眼眶周围充血、眼球突出，鳃和鳍条基部出血，口腔、上下颌、头顶等表皮组织以及肌肉组织呈现点或块状充血；解剖后发现肠内无食、肠壁充血，肠系膜、鱼鳔、肝脏局部以及胆囊有出血点，脾、肾充血。草鱼出血病主要发生在6月下旬至9月底，8月份为高发期，通常水温在25-30℃时最易发病。该病发病时间长，死亡率高，可引起草鱼鱼种的大批死亡。草鱼呼肠孤病毒通常通过鱼卵进行垂直传播并以水媒等进行水平传播，其不仅感染草鱼，还能引起青鱼、麦穗鱼及稀有鮈鲫等发生出血病，并能在鲢鱼等鱼体内繁殖[18]。草鱼出血病主要流行于长江中下游地区、两广等省、市主要淡水养殖区，华北地区也有发生[19]。

目前已报道的来源于全国草鱼主要养殖区域的GCRV毒株超过10余株，它们是：GCRV-841, GCRV-854，GCRV-861，GCRV-873，GCRV-875, GCRV-876，GCRV-892, GCRV-991，GCRV-104，GCRV-HZ08，GCRV-GD108, GCRV-JX-0902等。

### 1.3 草鱼出血病防治技术研究进展

草鱼（Grass carp）在我国的淡水养殖中占有重要地位。草鱼呼肠孤病毒是我国从患病草鱼体内分离到的第一株鱼类病毒，具有高传染性、高致病性，严重威胁草鱼养殖业的发展。其主要危害1~2龄草鱼鱼种，感染此病的草鱼死亡率达到90%。因此，探索草鱼出血病有效防治措施以降低经济损失对草鱼养殖业具有重要意义。

#### 1.3.1 疫苗研究

草鱼出血病疫苗的研究最早是从组织浆灭活疫苗开始，经历了组织浆疫苗、细胞培养灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗以及基因工程疫苗等阶段。20世纪60年代，浙江省淡水水产研究所和中国科学院水生生物研究所成功制备了草鱼出血病组织浆灭活疫苗[20]。经实践证实，该疫苗可较为有效地预防草鱼出血病的发生，提高草鱼鱼种的成活率[21-22]。杨先乐等[23]利用细胞培养法制备了草鱼出血病细胞灭活疫苗，并在生产实践中取得了显著效果[24-25]。曾令兵等[26-27]建立了旋转瓶大规模生产工艺制备草鱼出血病细胞疫苗的方法，进一步推动了草鱼出血病疫苗的研究应用进程。许淑英等[28-29]制备了草鱼出血病减毒疫苗，经免

疫研究，获得较好的免疫效果，并成为国内外首个获得兽药证书的草鱼出血病活疫苗，标志着草鱼出血病疫苗研究的发展在中国已经进入了实质性阶段[30]。

亚单位疫苗最主要的优点就是疫苗中只含有病原体中具有抗原性的某个特定成分，除去了病原体具有感染性的核酸成分，相对安全性高。该类疫苗具有确定的化学性质以及化学结构，可以通过特殊手段对其进行改造，使其具有稳定性较高的免疫原性，最大限度的激发机体免疫系统的免疫反应，达到较好的免疫效果。但是该类疫苗在使用过程中需要添加免疫佐剂，或偶联特定的载体，制备成本较高，不适合大范围的推广使用。基因工程疫苗是指将病原体中编码某个具有抗原性蛋白的基因克隆到原核或真核表达系统中，并使其稳定表达从而制备出疫苗。该类疫苗主要包括核酸疫苗、基因重组疫苗、基因缺失疫苗以及活载体疫苗等。随着基因工程技术以及分子生物学技术的研究发展，操作方便、成本经济、免疫效果好的新技术疫苗逐渐受到重视[31]。章怀云等[32]将鲤鱼的抗GCHV基因导入草鱼受精卵，研究处理后的草鱼对草鱼出血病的抵抗力，结果显示，处理组的草鱼抗病力比普通组提高了3.89～5.89倍。方勤等[33]研究构建了GCRV外壳蛋白VP5、VP6、VP7的重组病毒表达载体并获得了发明专利，该载体成功在昆虫Sf9细胞中获得表达，奠定了草鱼出血病基因工程疫苗开发研究基础。周勇等[34]构建了GCRV VP6融合表达植物载体（pCAMBIA1302-LTB-VP6），为草鱼出血病的免疫防控技术研究提供了新思路，并奠定了草鱼出血病转基因植物疫苗的基础。徐诗英等[35]利用其制备的GCRV VP7基因核酸疫苗免疫草鱼，结果表明该基因疫苗能有效的提高草鱼对GCRV感染的抵抗力。刘林等[36]将其制备的GCRV VP6 基因核酸疫苗免疫草鱼，研究发现该核酸疫苗能够显著增加草鱼的免疫抵抗能力，降低了GCRV感染机率。

#### 1.3.2 药物防治研究

草鱼呼肠孤病毒进入鱼体后，在肾脏中进行繁殖[37]，成熟后直接作用于肾脏和肠道，从而引起循环和代谢障碍[38]。我国学者陆续开展了一系列抗草鱼出血病病毒的药物筛选研究，也证实了某些药物的抗病毒能力[39]。安伟等[40]在体外研究并建立了抗GCRV的药物筛选细胞模型，该模型的建立为在筛选草鱼出血病抗病毒药物的研究上提供了研究方法。此外，使用氯化铜、氟苯尼考、硫酸亚铁、聚维酮碘等抗病毒化学类药物可以有效地预防和治疗草鱼出血病也有报道

[41-42]。

中草药作为预防及治疗草鱼出血病的药物，其毒副作用小、天然、低成本、广谱高效等优点，在生产实践中被广泛应用。袁良萃等[43]利用虎杖、当归、赤

芍等十几种中草药配伍，研制出“景珠牌止血散”方剂，结果表明，该方剂对于防治草鱼出血病具有较高的治愈率。黄柏、大黄、板蓝根、金银花、苦木、大青叶、黄芩、大蒜、黄连等单味或复方中草药均能激活草鱼免疫系统，通过增强草鱼细胞免疫以及体液免疫，达到预防和治疗草鱼出血病的效果[44-47]。

#### 1.3.3 免疫增强剂防治研究

免疫增强剂是指能够刺激鱼体产生特异或非特异性免疫应激反应，并能够协助机体有效的抵抗病毒、细菌、寄生虫等异物的物质。李军等[48]提出，免疫增强剂可一方面显著提高鱼体抗病能力，另一方面营造病毒不适合繁殖的宿主内环境，从而达到预防草鱼出血病的目的。有研究显示[49-51]，通过在草鱼饲料中添加具有天然活性、不同剂量的免疫多糖，可有效激活草鱼免疫系统，显著增加了草鱼对GCRV的抵抗能力，提高成活率。许明等[52]在草鱼饲料中添加了黄芪多糖、板蓝根、维生素C等免疫增强剂，实验结果显示，三者均可有效提高草鱼抗病毒能力，而且草鱼出血病的治疗效果也显著。

#### 1.3.4 生态防治研究

草鱼出血病的生态防治研究主要包括水温、池塘放养密度、水体pH、水质等环境因素研究、放养模式以及饲养管理等。杨先乐等[53]通过在不同水温下用草鱼出血病疫苗免疫草鱼，探索受免鱼免疫应答与水温的关系，研究结果指出疫苗诱导期的水温决定了草鱼的免疫应答是否发生以及免疫应答的强弱。王文博等

[54]对实验室条件下的草鱼进行了拥挤胁迫试验，结果显示，高密度放养会导致

胁迫，降低了草鱼对GCRV的免疫抵抗力。董天红等[55]水体pH值对草鱼血液中白细胞吞噬活性影响的研究表明，偏碱性的养殖水体可以使草鱼免疫系统功能较大程度的发挥，从而降低了GCRV感染机率。相对于其他常规鱼类，草鱼对于不良水质的耐受力较低，而且水中的氨氮、亚硝酸盐等有害物质极易诱发草鱼出血病的发生，因此，维持良好的水体环境并及时改善水质、尽量维持适宜的水温、保持合理适度的放养密度等对预防草鱼出血病的发生有重要意义。

在饲养管理上，定期清除池塘里的过多淤泥并灌注清水，并通过泼洒微生态制剂改善水质；根据草鱼的食性、天气情况以及水质情况适量的投喂优质饵料，饲料投喂应遵循一定的原则和规律，同时添加适量的维生素等；在高温时，要定期的清除水体残余饵料。选择鱼种或亲鱼时要严格执行检疫制度，在鱼种投放前要对池塘进行清淤、曝晒或消毒，并对水源进行消毒处理。可利用微生物或者植物等的生物吸收、代谢以及净化功能对水质进行改良，保持水体的充足溶氧、池

水透明度，适时改变放养模式。及时清除或隔离已患病的鱼，并对患病死亡的鱼体作无害化处理[56]。

#### 1.3.5 其他防治方法研究

有研究表明[57-59]，干扰素能够有效刺激草鱼巨噬细胞并激活相应的免疫信号传导，通过促进细胞免疫以及调控抗病毒基因表达等提高鱼体的抗病毒能力，是草鱼体内重要的抗病毒途径。但是，干扰素制备成本高，而且使用干扰素时只能采取注射免疫方式，在实际生产实践中使用过程复杂，因此，没有得到推广使用。此外，Hermann等[60]进行了霉酚酸抑制呼肠孤病毒的作用是否与病毒M1基因组片段具有相关性的研究，结果表明，霉酚酸能有效的抑制呼肠孤病毒的繁殖。

Lupini等[61]研究了板栗和白坚木提取物在体外的抗病毒活性，研究表明，该提取物对呼肠孤病毒的抑制作用具有特异性。马杰等[62]采用RNA干扰技术合成

siRNA，进行了草鱼细胞抗GCRV的研究，结果显示，siRNA能够有效的抑制

GCRV感染草鱼细胞，奠定了定向培育抗GCRV草鱼品种的基础。

## 2 微囊及微囊技术简介

微囊是指利用天然的或合成的高分子成膜材料，通过物理或化学等方法将固体颗粒、气体或者是液体包裹从而形成的微小封闭容器，其中包裹在微囊内部的物质称为芯材或囊芯物质，外部的囊壁称为壁材或囊壁。微囊的粒径一般在1～

1000μm，囊壁厚度一般在0.2～10μm。微囊的外形一般取决于囊壁材料的凝聚方式以及囊芯的物质特性，主要呈球状或实体膜壳、折叠的不规则结构、平滑的葡萄球形、多核微囊、微囊簇等形态（图1-1）。

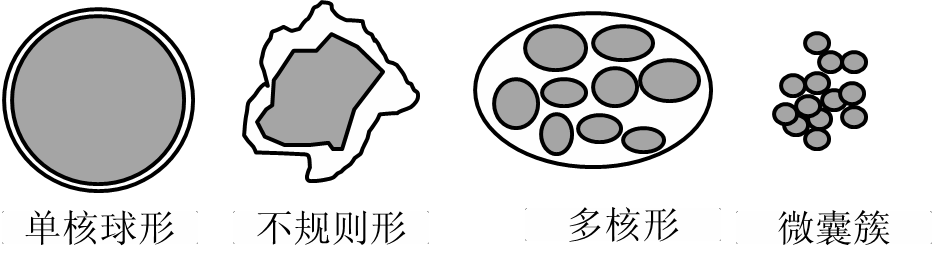


图1-1 微囊的外观形态

Fig. 1-1 Appearance of microcapsules

微囊制备技术的研究开始于20世纪30年代，由美国的大西洋海岸渔业公司首先提出用来制备鱼肝油微囊。美国National Cash Register公司的Green在1954年成功应用该技术生产无碳复写纸，开启了微囊技术新纪元[63]。1957年Chang

等[64]首次报道了载生物活性物质微囊的研究，其以蛋白质、激素、酶等生物活性物质为芯材制备微囊，并将所得微囊产品称为“生物微胶囊”。随后，微囊技术在各领域的研究逐渐开展，并迅速发展。目前，微囊技术已广泛应用于食品工业、生物制品及医药业、化妆品工业、饲料加工与生产、纺织工业等领域，特别是在生物制品及医药领域，应用该技术制备的药物剂型具有非常高的优越性。微囊技术的应用主要有以下特点[65-66]：1）提高应用产品的稳定性及耐储藏性；2）用于弥补传统工艺的缺陷，解决传统工艺面临的技术难题，节省成本；3）应用于物质与物质或物质与周围介质之间的绝缘性；4）应用于工业、药物、生物制品的缓慢释放，达到微囊缓释或控释的目的；5）降低某些液体的挥发性，改变其分散状态，解决其与周围介质材料之间的不兼容性。

### 2.1 微囊壁材的选择及微囊释放原理

#### 2.1.1 壁材选择

微囊壁材的选择是微囊制备过程中的重要环节，同时，用于制备微囊的材料是影响微囊性能的重要因素，不同条件下对于微囊材料的要求是不同的。理想的微囊壁材具有以下特点：1）壁材与芯材之间不发生反应，具有良好的流动性、可溶解性、稳定性；2）成膜材料带有电荷或者能通过改变pH而获得电荷，以便与带有相反电荷的成膜物质凝聚形成囊膜；3）应用于食品以及医药等领域的成膜材料必须具有良好的生物相容性和天然可降解性；4）材料来源广、易得，成本较低。

通常将用于制备微囊的材料分为三类：天然高分子材料、合成高分子材料以及半合成高分子材料。天然高分子材料来源范围广，是应用最为广泛的，其具有天然无毒或毒性小、成膜性好、物理化学性质稳定、水溶性大等优点，这类材料主要有壳聚糖、海藻酸盐、乳糖、琼脂粉、淀粉、糊精、纤维素、低聚糖、植物胶、阿拉伯胶、卡拉胶等糖类及碳水化合物物质，纤维蛋白、白蛋白、大豆蛋白、明胶、乳清蛋白等蛋白类物质，石蜡、蜂蜡、硬脂酸、卵磷脂等蜡和脂类物质，该类材料主要以复凝聚法聚合成膜，其中多糖类和蛋白质类因其免疫原性低、无毒性等优点，多被用于生物微囊制备。合成高分子材料和半合成高分子材料统称为人工合成材料，主要有羧甲基纤维素钠、聚乳酸、乳酸-乙醇酸共聚物、醋酸纤维素、聚氨基酸、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯、多聚磷酸酯等，该类材料具有化学性能好、良好的稳定性、黏度大，具有良好的耐酸或碱或高温或高压等优点。目前，用于微囊制备最理想的成膜材料是带电荷的天然多糖如壳

聚糖以及聚氨基酸等聚电解质。

#### 2.1.2 芯材释放原理

微囊芯材的释放方式可分为扩散、囊壁破裂、壁材降解三种方式。扩散是芯材随液体流动，通过壁材的可渗透性、微囊囊膜层的空隙等向外扩散，维持微囊内外的渗透压或浓度平衡；囊壁破裂是由于外界的挤压、摩擦等作用力的影响，或电磁及辐射，或温度变化等因素造成囊壁破裂而达到芯材释放的目的；壁材降解是指通过热作用、酶消化、溶剂以及微生物等作用于囊壁而使其破损，从而释放微囊囊芯。因此，可以通过有目的性的选择微囊的包裹方法及制备微囊的壁材，使微囊芯材具有靶向性的选择释放。

根据释放动力学可将微囊囊芯的释放分为两种：瞬间释放和缓慢释放。瞬间释放主要是微囊受外界各种形式力的影响，以及热动力学作用、水解酶等的攻击、超声波或者电磁的方法等而使囊壁破裂。缓慢释放则是通过扩散、壁材缓慢降解等方式而使芯材释放。有报道显示，影响微囊囊芯释放的因素主要有囊壁厚度、壁材与芯材结构和性质、微囊尺寸、囊壁添加剂以及囊膜孔洞等因素。微囊囊芯的释放一般均遵循零级释放动力方程或一级释放动力方程，释放速率方程式[67]如下：

-d(qm,∞- qm, t) / dt = kqnm, mc (1-1)

（1-1）式中，qm，∞ ：微囊囊芯的总量；

qm, t ：时间为t时，为囊囊性释放的量；

k：特定温度下的释放速率常数。

当n等于0时，即为零级释放方程；当n等于1时，即为一级释放方程。

### 2.2 微囊制备方法

近年来，随着微囊技术的迅猛发展，微囊的制备方法研究一直是微囊研究领域的重点，据统计，目前的微囊制备方法已达200多种[68]。根据微囊制备条件、微囊性质以及微囊形成机理，可将微囊制备方法分为：化学成囊法（聚合反应法）、物理成囊法和物理化学制备法（相分离法）。根据不同制备工艺及芯材、壁材的性质，每类方法又可分为若干不同的制备方法。但是，其基本制备过程可概述为：首先将芯材均匀分散到适当的介质中，或进行乳化，使其能够形成微液滴；然后在混合液中加入成膜材料，经特殊的设备、条件等将作为囊壁的聚合材料沉积在芯材微滴上，形成具有保护性外壳的微液滴；最后经过化学，或物理，或物理化学共同作用的处理，使所形成的微粒达到一定的机械强度，经固化剂固化后即可

获得稳定的微囊。

#### 2.2.1 化学成囊法

化学成囊法是一种利用高分子材料在介质中通过聚合反应或交联缩合反应制备微囊的方法，主要包括界面聚合法、锐孔法、悬浮交联法、乳化聚合法、原位聚合法等。该方法具有有效地包覆非亲水性物质或大单体、原料多样性、制备微囊多样化等优点。

Micheal等[69]采用界面聚合法制备胰岛素微胶囊，结果显示该微囊粒径为200～220 nm，胰岛素的包封率为54.9 %。彭应旭[70]利用乳化聚合法，在添加表面修饰剂Poloxamer 407条件下，研究柔红霉素微囊的制备，得到平均粒径70nm，包封率为97 %的微囊。江定心等[71]研究了植物源农药印楝素微囊的制备，研究结果表明界面聚合法制备的微囊呈球形，表面光滑，包封率达（83.16±1.22 %），

而且所得产品具有较好的杀菌效果。刘书庆等[72]以癸二酰氯和1, 6-己二胺为材料，采用界面聚合法制备了维生素C微囊。戚栋明等[73]利用原位聚合法制备了平均粒径为3.5μm的有机颜料酞箐蓝微囊。

#### 2.2.2 物理成囊法

物理成囊法是指借助特有的设备，通过机械搅拌、热动力等方式均匀混合芯材和壁材并细化造粒，在借助外力的作用下使壁材在芯材微滴表面凝聚固化，从而制备微囊的方法。根据所选用的仪器设备，制备微囊的方法可分为：喷雾干燥法、溶剂蒸发法、挤压法、静电沉积法、空气悬浮法、真空蒸汽沉积法、流化床喷雾法、分子包埋法、超临界流体快速膨胀法等。

Donald等[74]将桔油和低右旋值的玉米糖浆充分混合，利用挤压法并借助于氮气，得到了具有良好流动性的粉末状微囊。冯怡等[75]利用喷雾干燥法对陈皮微囊制备的各影响因素进行了工艺优化，所得优化工艺制备的微囊表面光滑，包封率为84.50%，载药量达28.32%。李宁[76]利用喷雾干燥法和挤压法分别制备了双歧杆菌微囊，并研究了该微囊的耐酸性、耐贮藏性以及耐胆盐性，结果表明，挤压法制备的微囊粒径为1～2mm，而喷雾干燥法制备的微囊粒径为5～10μm，但两种方法所得微囊均具有较好的耐酸性、耐储藏性和耐胆盐性，都有利于双歧杆菌在肠道中定殖。陈梅香等[77]利用分子包埋法研究了抗氧化剂BHT微囊的制备，所得微囊取得较好的效果。赵艳花等[78]以麦芽糊精和阿拉伯胶为原料包裹莪术油，并对制备工艺进行优化，结果表明微囊平均粒径为5.2μm，包封率为

94.2%，微囊具有良好的稳定性。黄嘉驷等[79]利用改良的喷雾-界面配位法对大

肠杆菌口服微囊疫苗进行制备研究，获得了平均粒径为10μm，包封率为65%的微囊，经过免疫实验研究表明，该微囊疫苗能有效的刺激体液免疫、细胞免疫以及粘膜免疫的发生，并能产生IgA和IgG。胡国勤等[80]采用超临界CO 2快速膨胀法研究并制备出灰黄霉素超细微囊颗粒，通过扫描电镜以及X射线衍射等对所得微囊产品进行表征，结果证实该微囊颗粒的粒径均匀且在1μm左右。

#### 2.2.3 物理化学制备法

物理化学制备法，又被称为相分离法。其主要是通过调节温度、pH值，或加入电解质的方式将溶解于适当介质中的成膜材料（聚合物）发生凝聚，在芯材颗粒表面进行沉积并将其包裹形成微囊。该方法主要有单凝聚法、油相分离法、复相乳液法（干燥浴法）、复凝聚法、冷凝法、熔化分散法、溶剂-非溶剂法等。

Maria等[81]利用复相乳液法，经超声乳化后成功制备了载L-天门冬酰胺酶的微囊，研究结果表明所得微囊粒径在200nm左右，L-天门冬酰胺酶的包封率为40%. Li等[82]用W/O/W型复相乳液法研究制备了载乙肝抗原的聚乙醇酸/聚乳酸嵌段共聚物微囊，通过皮下注射免疫研究表明，该乙肝微囊疫苗具有良好的缓释效果，且在免疫24周后，微囊疫苗引发的抗体水平高于未包囊疫苗。杜静玲等

[83]采用单凝聚法制备载VA棕榈酸酯的聚天冬氨酸/明胶微囊的研究，结果显示，该微囊的VA棕榈酸酯初始含量可达84.3%，且效果良好；经高温实验证实该微囊产品具有较好的稳定性。冯岩等[84]以转谷氨酰胺酶为交联剂，将复凝聚法成功应用于食品卫生领域，其以阿拉伯胶和明胶为壁材制备的VE微囊，取得良好效果，且微囊包封率为（92.78±0.65）%. Dai等[85]通过复凝聚法制备载具有电泳性质液体的明胶/羧甲基纤维素/二辛基磺化琥珀酸钠微囊的研究，并利用光学显微镜、扫描电镜、热重分析仪等仪器设备分析微囊表面特征，研究结果表明，微囊表面光滑，具有良好热稳定性和保护性；该微囊通过了低电压试验，表明该微囊产品在电泳领域的应用前景广阔。

#### 2.2.4 其他新型制备方法

微生物微囊制备法，利用微生物本身的细胞壁作为壁材制备微囊的方法。该方法无毒、微囊粒径均一、可生物降解、资源丰富、成本低，而且能够最大化的保持芯材原有的特性。李川等[86]以酵母菌细胞壁为壁材，研究了姜油微囊的制备工艺，研究结果表明，该微囊姜油的包封率为96.17%，并能够达到姜油缓慢释放的目的。

类脂质体薄膜分散法，该方法是将类脂质体溶于适量的有机溶剂中，在减压

旋转下使类脂质体在仪器壁上形成薄膜，然后添加药物缓冲液并振摇，使其形成大小均一的载药类脂质体微囊。鲁卫东等[87]以流感疫苗、司盘和胆固醇为原材料制备流感疫苗的类脂质体微囊，研究结果显示：载流感疫苗的类脂质体微囊包封率高于65%，微囊颗粒大小均匀、呈球形或椭圆形形态，重现性较好，微囊在

（25±2）℃可稳定保存7d。

## 3 海藻酸钠-壳聚糖（SA-CS）微囊

目前，海藻酸钠-壳聚糖微囊已被广泛应用于药物缓释和控释、器官移植研究、微生物的发酵培养以及细胞培养和固化等研究领域，并已成为蛋白类药物及食品缓释剂等研究方向的热点，应用前景广阔[88-89]。主要优点：1）良好的生物相容性、缓释作用以及可降解性，且免疫原性低、安全无毒；2）机械强度适中，稳定性高；3）制备工艺简单、条件温和；4）材料资源丰富，成本低。

### 3.1 海藻酸钠

海藻酸钠（Sodium Alginate, SA）来源于海洋褐藻类生物以及细菌，属于天然聚阴离子直链多糖，是一种线性嵌段共聚物，主要结构单元是α-L-古罗糖醛酸和β-D-甘露糖醛酸（图1-2）。1883年首次发现于海带中，直到1929海藻酸钠开始在工业生产中应用。1944年海藻酸钠被应用于食品工业，其在食品中被作为天然纤维素添加，具有排除机体有害金属等功能，在国外普遍被应用于食品行业，其在日本被称为长寿食品。1983年美国食品与药品管理局（FDA）批准其应用于医药工业。

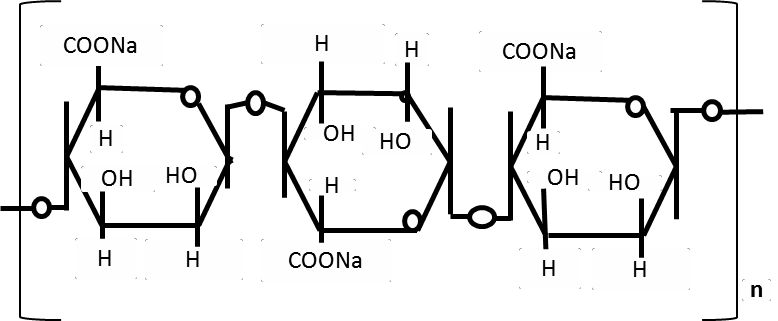


图1-2 海藻酸钠分子结构示意图

Fig. 1-2 Schematic diagram of the molecular structure of Sodium Alginate

海藻酸钠因其本身特有的物理化学性质和生物活性，而且其凝胶反应温和，广泛被食品工业和制药业等作为增稠剂、螯合剂、絮凝剂以及稳定剂等应用。海藻酸钠具有止血，调节机体免疫力，调节血液中血脂、血糖浓度，防止皮肤氧化

以及抗衰老，有利减肥等功效[90]，被应用于仿肉食品、缓释药物、细胞微反应器以及介质分离等食品加工与高端医学工程领域。利用海藻酸钠制备的可食性涂膜，具有良好的隔热隔油性能，高耐热度以及机械强度，被广泛应用于保鲜膜的制备。此外，海藻酸钠在治理重金属污染、细胞以及酶等固定化、生物海绵的开发等方面也具有广阔的应用前景。

### 3.2 壳聚糖

壳聚糖（Chitosan, CS）亦称聚氨葡萄糖，是自然界中唯一的直链碱性多糖，它是由几丁质在碱性条件下经过脱乙酰化反应，将分子中50%以上的乙酰基水解而制备形成的一种聚氨基多糖。壳聚糖的结构单元为N-乙酰-D-氨基葡萄糖（图1-3），白色粉末状或片状固体，溶于稀盐酸、乙酸等无机酸，不直接溶于水和碱性溶液中。壳聚糖分子含有大量的羟基和氨基活性基团，尤其是其分子侧链上的伯氨基，可在水溶液中与聚阴离子电解质发生反应，形成聚电解质膜。



图1-3 壳聚糖分子结构示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the molecular structure of Chitosan

目前，壳聚糖已被广泛应用于化工、医药、生物医学工程以及食品等诸多领域，尤其是在生物医药领域倍受青睐[91]。壳聚糖因其具有良好的絮凝、离子聚合等作用，用于蜂蜜、果汁、酒等液体产品以及半成品的除杂剂，保健产品的填充剂以及食品保鲜剂、保湿剂、防腐剂等。在医学上，壳聚糖良好的抗凝作用、增强机体免疫保护力、抑制细菌生长、止血并促进伤口愈合、调节机体血液中血脂、血糖以及胆固醇浓度等功能[92-93]，其本身的海绵状结构使其具有良好的溶胶性能，广泛应用于人造皮肤、药物缓释控释系统、生物敷料、手术线等。此外，壳聚糖可以作为饲料添加剂、动物免疫增强剂、土壤改良剂等，还可作为化妆品中的保湿剂以及膏霜中的添加剂，在污水处理、金属富集以及回收中也应用广泛，甚至已达工业化状态。

### 3.3 海藻酸钠-壳聚糖微囊成膜机理

海藻酸钠分子是由甘露糖醛酸和古罗糖醛酸两个单元随机排列组成，薛伟明等[94]认为海藻酸钠与Ca2+产生凝胶的反应机理为：海藻酸钠分子中每两个古罗糖醛酸上的羧基和羟基通过形成4个配位键与Ca2+形成有“蛋壳”结构的三维网状结构（图1-4）。海藻酸钠属于聚阴离子电解质，而壳聚糖属于天然聚阳离子电解质，壳聚糖分子上的伯氨基在水溶液中带有一个正电荷，其可在静电力的作用下，迅速与海藻酸钠分子上带有负电荷的羧基发生静电聚合反应（图1-5），从而在海藻酸钠与钙离子形成的“蛋壳”结构表面形成一层聚电解质膜，因此，海藻酸钠-壳聚糖微囊可以对被包裹物进行有效的包裹，并能够对包裹物原有的物理化学特性进行有效的保护。



图1-4 海藻酸钙凝胶的“蛋壳”结构示意图

Fig. 1-4 Schematic diagram of the" eggshell" structure of Calcium Alginate gel



图1-5 壳聚糖与海藻酸钠静电聚合反应方程式

Fig. 1-5 Equation ofthe electrostatic polymerization reaction of Chitosan and Sodium Alginate

### 3.4 海藻酸钠-壳聚糖微囊制备方法

海藻酸钠-壳聚糖微囊是由海藻酸钠、壳聚糖两种聚电解质，经过复杂的络合反应而成。根据络合反应原理，可将海藻酸钠-壳聚糖微囊的制备方法分为一步法、两步法、复合法。

根据微囊制备过程中，各实验材料加入的顺序不同，又将一步法分为两种方式：一种是首先将壳聚糖与氯化钙混合于容器中，然后将海藻酸钠溶液滴入恒速搅拌的混合液中，经过充分反应而形成微囊。付加雷等[95]利用此种方式对干扰素-tau微囊的制备工艺进行了优化筛选，最终确定了微囊的最佳制备工艺：海藻酸钠浓度为2.0%、壳聚糖浓度为0.4%、氯化钙浓度为1.0%、干扰素-tau浓度为

0.3%，所得微囊性质稳定。另一种方式是第一种的反向操作，先将壳聚糖和氯化钙混匀，将混合液滴入到恒速搅拌的海藻酸钠溶液中，充分反应形成微囊。两种方式在成膜材料的添加顺序上不同，但，两种方式所得微囊均具有三层架构：居于内部的为液态囊芯，中部的海藻酸钙凝胶层以及海藻酸钠-壳聚糖聚电解质络合层，最外部的是壳聚糖沉积层。此方法制备过程简单，用时较少而且被包裹物不易损失，但用该方法制备的微囊形状不均匀，不易形成单个的微囊。

两步法的基本过程为：首先将氯化钙滴入到恒速搅拌的海藻酸钠溶液中，或者是将海藻酸钠滴入到恒速搅拌的氯化钙溶液中，从而制备出海藻酸钙微球珠，然后将海藻酸钙微球珠从液体中分离出来，将其与壳聚糖溶液混合，充分反应而成微囊。刘利萍等[96]利用两步法，优化姜油树脂海藻酸钠-壳聚糖微囊的制备工艺研究，结果显示，微囊平均粒径842μm，包封率（69.82±1.05）%，工艺重现性好，载药量稳定。赵亚南等[97]也是采用此法制备了β-葡萄糖苷酶固定化的海藻酸钠-壳聚糖微囊。该方法所得海藻酸钠-壳聚糖微囊相对于一步法外观较好，粒度相对均匀。但是，微囊制备过程相对较复杂，被包裹物相对损失较多。对用于细胞固定及培养等的微囊多用此法制备。

复合法是指在一步法和两步法的基础上，利用戊二醛、四甲酸苯等双功能团修饰剂，经过交联反应，对所得微囊的表面加以修饰。相对于一步法、两步法该方法所得微囊的表明光滑，粒度更加均匀，而且微囊的机械强度高。但是，用该方法制备微囊的过程非常繁琐，所加修饰剂对被包裹物有一定的损害，不适于生物体微囊、食品加工用微囊以及环境敏感型微生物微囊的制备。王津等[98]利用戊二醛作为交联剂，制备了壳聚糖-海藻酸钠布洛芬缓释微囊，并对其制备工艺和性能进行了研究，结果显示，在温度30℃、搅拌速度为600r/min、调整pH4.5的条件下，4.0mg/mL壳聚糖、1.5mL戊二醛为最佳制备工艺，所得微囊粒径（31.6

±1.7）μm，测的包封率为（64.6±2.2）%，微囊表面光滑，性质稳定，且缓释效果好。

## 4 微囊技术在水产养殖应用中的研究进展

### 4.1 在水产动物疫苗方面的应用

Morris等在1994年最早提出了疫苗的微囊化。随后，近十几年来，微囊化技术以及免疫理论的研究飞速发展，疫苗的包被技术也日渐成熟。然而，微囊技术在水产动物疫苗上的应用研究起步较晚，还处于探索发展阶段。鱼类疫苗在进行接种免疫时，主要通过注射免疫、口服免疫以及浸泡免疫。1997年Murno 等

[99]首次报道了HGG（human gamma globulin）微囊疫苗口服免疫虹鳟，研究结果表明，微囊能够降低疫苗在胃部的损失，在肠部能够被吸收并产生抗体。Joosten等[100]通过自制的弧菌微囊疫苗口服免疫草鱼和鳟鱼，免疫效果研究结果证实，该微囊疫苗明显降低了消化酶对抗原的降解。

将微囊技术应用于疫苗的研究，国内外起步较晚，但研究成果显著。作为疫苗的传递、运载系统，微囊不仅具有良好的生物相容性、天然可降解性、免疫佐剂效应以及相对较低的免疫原性，还兼具有缓释控释的特性。这使得被包裹的疫苗抗原能够在生物体内缓慢释放，而不是脉冲式的突释，从而在呈递疫苗抗原物质时，在相当长的时间里以加强免疫的方式，持续提供疫苗抗原，从而达到较好免疫效果以及节省成本的目的。随着水产养殖业的不断集约化，养殖规模不断扩大，这种新型微囊口服疫苗的优点日益突出，微囊口服疫苗成为越来越多水产学者的研究热点。

余俊红等[101]报道了鳗弧菌口服微囊疫苗的制备研究，经免疫后，显示，该微囊疫苗的免疫效果显著优于普通的全细胞疫苗，且其免疫保护率达73.7%，显著提高了抗原在鱼体消化道中的吸收，该报道在国内尚属首次。Romalde等[102]成功制备了虹鳟格氏乳球菌口服微囊疫苗，并对该微囊口服疫苗以及非微囊口服疫苗进行了免疫评价，结果显示，微囊化的口服疫苗对鱼体的免疫保护力高于非微囊化的，证实了该微囊口服疫苗的有效性。Irie等[103]利用脂质体研究制备了非典型鲑气单胞菌口服疫苗，经免疫研究发现：在受免鱼的血清、肠膜及胆汁中均检测到特异性抗体的存在；攻毒试验表明，免疫组的存活率达到83.5%，且受免鱼的皮肤溃烂症状明显受到抑制。Ramos等[104]以壳聚糖为原材料，研究DNA疫苗微囊的制备，并口服免疫罗非鱼，结果表明，在受免罗非鱼的鳃、胃和脾中均能检测到基因的表达产物。李新华等[105]用自制的嗜水气单胞菌海藻酸钠口服微囊疫苗免疫银鲫，结果表明，该微囊疫苗能够明显的激发鱼体细胞、体液免疫以及局部的黏膜免疫，证实该微囊疫苗是有效的。张小江等[106]以可生物降解的

聚乳酸与聚乙二醇的共聚物（DL-polylactide-co-polyethylene glycol, PELA）为壁材，以重组外膜蛋白OmpK为芯材，成功制备了平均粒径为2.8μm 的

PELA-OmpK口服微囊疫苗，免疫结果表明微囊组的相对免疫保护率显著高于蛋白口服组。李义等[107]研究了中华绒螯蟹的嗜水气单胞菌微囊口服疫苗的制备，结果显示，所得最佳制备工艺为海藻酸钠浓度为2%，乳化时间为15 min，菌胶比例为1: 6，搅拌速度为1000 r /min；该工艺制备的微囊疫苗包封率为73.66%，平均粒径为（56.8±1.6）μm，且微囊的耐酸性以及肠溶性良好。

微囊疫苗对疫苗抗原具有良好的保护性，对生物机体具有良好的生物相容性，而且无毒副作用或毒性小。在医药领域作为药物缓释控释系统，一方面在保护疫苗抗原、降低药物副作用的同时也提高了生物机体对药物的利用率；另一方面通过缓释给药，疫苗抗原可以缓慢释放，增加了免疫效果，有效减少了能诱导机体免疫应答的疫苗抗原量，降低了消化酶类对口服疫苗抗原的破坏。因此，微囊口服疫苗作为极具潜力的新型口服疫苗剂型，其研究虽然还处于基础的试验阶段，已经吸引了人们的广泛兴趣并越来越受重视。

### 4.2 在水产饵料及饲料添加剂方面的应用

微囊技术在水产饵料上的研究应用开始于70年代，最早的是应用于虾类幼体的开口饵料以及配合饲料的制备研究。Jones等[108]制备了对虾幼体的微囊饵料，实践证明，该微囊饵料对提高对虾幼体成活率有明显效果，而且在提高虾幼体成活率方面，与活饵具有相当的效果。饵料微囊化后，可以降低水环境中有害物质对饵料的污染，有效减少了饵料中营养物质的损失，同时，该技术制备的微囊饵料也为寻找活饵的代替物提供了新的视野[109]。Ottagali[110]在进行对虾育苗试验时，对比研究了投喂微囊饵料和微藻对对虾幼体生长以及存活的差异，结果证实，两者之间并无明显差异。然而，有实验研究表明[111-113]，对鱼类幼体单独使用微囊饵料甚至会导致其死亡，而与活饵共同使用，其对提高鱼类幼体成活率的效果显著高于单独使用活饵的效果。

近几年，随着水产动物营养学和免疫学的研究发展，养殖人员逐步意识到水产动物对饲料蛋白以及自身生长的营养物存在适宜需要量，因此，在水产饲料中添加水生动物生长所必要的营养物质以及增强免疫抵抗力的生物活性物质成为水产营养学研究热点，而微囊技术以其独有的缓释优点倍受研究人员的关注。

Cowey等[114]在虹鳟对摄食蛋白态氨基酸和晶体氨基酸的吸收差异比较研究中，结果发现，虹鳟不能对饲料中晶体氨基酸和蛋白态氨基酸的进行同步吸收，导致鱼体体质较差，对于外来抗原抵抗力降低。同时，有报道指出[115-116]，饲料中添

加的微囊氨基酸可促进鱼体对饲料中蛋白态氨基酸的吸收并能有效利用微囊氨基酸。冷向军等[117]对添加微囊氨基酸的低鱼粉饲料是否影响鲤鱼的生长性能进行了研究，结果表明，补充微囊氨基酸的低鱼粉饲料可显著提高鲤鱼的增重率。牛化欣[118]研究了晶体氨基酸（Crystalline amino acids, CAA）微囊（MAA）的制备，并分析比较了不同加工工艺条件分别对MAA、CAA稳定性的影响差异，结果表明MAA在加工过程中的损失显著低于CAA；通过投喂凡纳滨对虾证实，用添加微囊氨基酸的血球蛋白粉替代60%的鱼粉，对虾的生长以及对虾对饲料的利用率没有明显变化；通过对虾的免疫指标分析表明，MAA明显提高了对虾的免疫抵抗力。张守庆等[119]利用凝聚法，按照海藻酸钠浓度为2%以及CaCl2浓度

1.5%的制备工艺，成功制备了重组抗菌肽对虾素3-2海藻酸钙微囊，微囊体外表

征分析及释放研究表明，经冷冻干燥后的微囊粒径约为1.1mm，微囊包封率为83.87%，证实了该微囊具有缓释作用、耐酸性以及肠溶性。

### 4.3 其他方面的应用

微囊技术在水产养殖中其他方面主要应用于微生态制剂、渔用口服药物、激素，以及维持机体生理机能正常运转的生物活性物质等。Moriyama等[120]虹鳟口服重组鲑生长激素微囊研究，结果表明，微囊组的虹鳟血液中的生长激素水平远高于未包被组。龚露旸等[121]采用离子交联法制备了恩诺沙星壳聚糖微囊，经表征及释药性能分析，结果显示，所得微囊平均包封率为（51.2±2.9）%，具有良好的缓释性能。王文辉等[122]研究结果显示，维生素C微囊明显提高了黄颡鱼的生长速度，显著提高了黄颡鱼体内溶菌酶、蛋白酶以及淀粉酶活性，血清中总蛋白含量明显提高。

## 5 研究目的及意义

草鱼是我国重要的淡水养殖品种，在我国淡水养殖中占有重要地位。草鱼出血病是养殖草鱼最为严重的病毒性疾病，其流行范围广，发病时间长，死亡率高，给草鱼养殖业造成重大经济损失，严重威胁草鱼养殖业的健康发展。免疫是预防草鱼出血病最为有效的方法，但目前主要依赖注射或浸泡方式进行免疫。口服免疫是最自然的免疫接种方式，不造成鱼体伤害，且使用方便，省时省力，不受免疫鱼规格大小的限制。但是，口服疫苗在进入鱼体后，极易受到消化系统酶的破坏，使免疫效果受到严重影响，极大的阻碍了口服疫苗研究与应用。

随着微囊技术的不断研究与应用，使微囊疫苗成为可能。口服疫苗经包裹后，

可有效的降低或抵抗消化酶的破坏，提高了免疫效果；微囊疫苗还具有缓释控释的作用，微囊内的抗原物质可缓慢持久的释放，降低了疫苗免疫次数，节省了疫苗使用量；冷冻干燥后的微囊疫苗便于运输和储藏。此外，用于制备微囊的材料如脂质体、壳聚糖等具有免疫增强剂的作用，可以调节机体免疫系统以及黏膜的局部免疫。因此，开展草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的微囊化技术研究以及微囊疫苗免疫效果研究，对于有效防控草鱼出血病具有重要的理论意义与应用前景。

本研究以海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙、草鱼出血病细胞培养灭活疫苗为原材料，制备草鱼出血病细胞灭活疫苗SA-CS微囊并正交优化制备工艺，确立了海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙的最佳制备浓度；光镜下，观察该微囊疫苗的表面特征，并研究其在0.75%生理盐水、pH7.4的磷酸盐缓冲液、pH2.3的盐酸溶液中的体外释放特性；通过口服免疫草鱼，测定受免草鱼免疫基因表达差异、草鱼血清中和抗体效价以及相对免疫保护率。本研究旨在建立草鱼出血病微囊口服疫苗制备工艺，查明微囊口服疫苗的免疫效果，为草鱼口服疫苗新剂型的研制奠定基础。

# 第二章 草鱼出血病细胞疫苗微囊制备及体外释放研究

草鱼出血病是我国养殖草鱼最为严重的病毒性疾病，其病原为草鱼呼肠孤病毒（grass carp reovirus, GCRV）。草鱼出血病的流行范围广，持续时间长，死亡率高，严重威胁我国草鱼养殖业的健康发展。口服免疫途径是鱼类疾病预防最为自然的免疫接种途径，不对鱼体造成伤害，且实施方便，不受时间、鱼体的大小等限制，正日益受到人们的重视。疫苗通过口服途径直接免疫时，因其抗原物质易受鱼体内消化系统酶的破坏，其免疫效果无法保障。但是，随着微囊化技术的发展与应用，口服免疫疫苗成为水产疫苗研究的热点。Joosten等[100]制备的微囊弧菌疫苗，通过对草鱼和鳟鱼的口服免疫试验，证实了微囊疫苗确实可以提高鱼体对抗原的吸收。2001年，我国余俊红等[101]首次报道了鳗弧菌口服微囊疫苗，研究发现：该微囊化的疫苗其免疫效果显著优于普通的全细胞疫苗，保护率最高达73.7%. Romalde等[102]研究结果表明：微囊化的口服疫苗在对虹鳟乳球菌病的免疫保护较显著。张守庆等[119]通过重组抗菌肽海藻酸钠微囊制备与体外释放特征研究，表明微囊具有良好的肠溶性并可以抵抗胃液的破坏，为抗菌肽在水产病害防治过程的口服给药提供实验基础。

本研究采用具有良好的生物相容性、天然可降解的材料—海藻酸钠、壳聚糖，以传统方法灭活的GCRV104细胞疫苗为抗原蛋白，初步探索微囊疫苗的最佳制备条件及其体外释放特性，旨在为草鱼出血病微囊疫苗的制备、应用及口服免疫效果研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 实验设备与仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 型号 | 生产厂家 |
| 倒置显微镜 | Diphot | 日本 Nikon 公司 |
| 高压灭菌锅 | HVE-50 | 日本 HIRAYAMA 公司 |
| 恒温磁力搅拌器 | 85-2B | 金坛市医疗器械厂 |
| 电热恒温干燥箱 | DHG-9143BS-Ⅲ | 上海新苗医疗器械有限公司 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 恒温水浴锅 | HH-4 | 苏州威尔实验用品有限公司 |
| 超纯水系统 | Cascada LS MK2 | 美国 PALL 公司 |
| 恒温培养振荡器 | ZHWY-100B | 上海智城分析仪器制造有限公司 |
| 冰箱 | BCD-212 | 德国 SIMENS 公司 |
| 超低温冰箱 | DW-86W150 | 青岛 AUOMA 公司 |
| 真空冷冻干燥机 | LGJ-10 | 北京松源华兴科技发展有限公司 |
| 生化培养箱 | MIR-154 | 日本 SANYO 公司 |
| 台式冷冻离心机 | 3K-15 | 德国 Sigma 公司 |
| 生物安全柜 | ClassⅡBSC | 新加坡 ESCO 公司 |
| 电子分析天平 | A120S | 德国 Sartorius 公司 |
| 分光光度计 | RS-232C | 德国 Eppendorf 公司 |

### 1.2 实验材料

草鱼肾脏组织细胞系（CIK）由本实验室建立，传代培养并保存；草鱼呼肠孤病毒104毒株（GCRV104）由本实验室分离保存。

### 1.3 实验试剂与器皿

新生牛血清，购自杭州四季青生物工程材料有限公司；海藻酸钠、无水氯化钙，购于天津红岩试剂厂；壳聚糖（脱乙酰度＞90%），购于上海如吉生物科技公司；胰蛋白酶（0458），购自AmRESCO公司；MEM培养基、PBS缓冲液、牛血清白蛋白（BSA），购自Sigma 公司；考马斯亮蓝G-250，由合肥博美生物科技有限责任公司进口分装；其他试剂均为国产分析纯。

T25、T75细胞培养瓶，96孔微量培养板，购自Corning公司；1 mL、2 mL、5 mL、10 mL移液管，15 mL、50 mL离心管，购自Greiner bio-one公司；医用

9号针头注射器，购自武汉市王冠医疗器械有限责任公司；移液管电动助力器，购自HTL公司。

### 1.4 试剂配制

1）Versene 溶液：依次称取NaCl 8 g, KH2PO4 0.2 g, KCl 0.2 g, Na2HPO4 1.15

g，EDTA-Na•2H2O 0.2 g，酚红0.02 g，用去离子水溶解，定容至500 mL，121℃

高压灭菌，4℃冰箱保存备用。

2）1.0 % Trypsin母液：精确称取1 g胰蛋白酶（Trypsin），用去离子水溶解，定容至100 mL，4℃过夜，0.22μm微孔滤膜过滤除菌，分装，-20℃冰箱保存备用。

3）0.5 mol/L HEPES：取4-羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES）1.15 g，用去离子水溶解，定容至100 mL，0.22μm微孔滤膜过滤除菌，分装，4℃冰箱保存备用。

4）细胞培养液：新生牛血清50 mL, MEM培养基450 mL，用0.5 mol/L HEPES

调pH值，分装，4℃冰箱保存备用。

5）0.25 % Trypsin-DETA: 取1.0 % Trypsin 25 mL，用Versene溶液稀释并定容至100 mL，分装，4℃冰箱保存备用。

6）蛋白质标准溶液：准确称取经凯氏定氮法测定的牛血清白蛋白（BSA）

10mg，加入100mL蒸馏水，充分溶解，即得100μg/mL的标准蛋白质溶液，4℃冰箱保存备用。

7）考马斯亮蓝G-250溶液：将10mg考马斯亮蓝G-250溶于5mL的95%乙醇中，加入质量分数为85%的磷酸10mL，蒸馏水定容至100mL，4℃冰箱保存备用。

8）壳聚糖乙酸溶液：按照试验不同浓度和pH的要求称取适量的壳聚糖，加入1%的乙酸溶液，充分溶解后，使用稀盐酸和氢氧化钠溶液调节pH，4℃冰箱保存备用。

9）海藻酸钠溶液：称取适量的海藻酸钠，将其加入到60℃左右的蒸馏水中，快速搅拌使其充分溶解，4℃冰箱保存备用。

10）50%甘油溶液：量取10mL的甘油，加入等量的蒸馏油，121℃高压蒸汽灭菌，分装，4℃冰箱保存备用。

## 2 实验方法

### 2.1 CIK细胞传代培养

倒置显微镜下观察CIK细胞，当其长满单层时，在生物安全柜中用移液管吸出细胞培养瓶（以T25瓶为例）内的细胞培养液，3000 r/min离心5 min；同时，加入1 mL 0.25%的胰蛋白酶于T25瓶中，并将其放置在28℃生化培养箱中孵育5 min。当在显微镜下观察到细胞间隙增大并变圆发亮后，将细胞培养瓶内消化好的细胞轻轻拍打下来，立即将4mL离心后的细胞培养液的上清液加入到

T25瓶中，中和T25瓶中的胰蛋白酶，借助移液管电动助力器稍微吹打细胞，并将其转移至15mL离心管中，1000 r/min离心5 min，吸弃细胞上清液并向细胞沉淀中加入5mL细胞培养液并反复吹打，使其分散均匀。然后，分装细胞悬液于两个T25瓶中并将细胞培养液添加至5mL, Hepers调节细胞培养液pH（细胞培养液呈橘黄色为宜），于28℃生化培养箱中，培养4-5 d，待观察到细胞长满单层时再进行传代。

### 2.2 GCRV104 增殖及其细胞灭活疫苗制备

将CIK细胞传代培养，24 h后观察细胞。当生长成汇合单层时将细胞培养液吸出，向培养瓶（T25瓶为例）中加入1 mL的GCRV104细胞培养病毒稀释液（病毒原液100倍稀释，即10-2），再加入10μL浓度为10μg/mL的Polybrene以促进病毒的吸附。对照瓶中加入等量无血清的MEM培养基进行模拟感染。将

T25瓶放置于28℃生化培养箱中1 h，期间每20 min轻轻摇晃培养瓶一次，使细胞与病毒液充分接触促进病毒吸附。1 h后吸弃未吸附的病毒稀释液，添加5 mL含2%新生牛血清的MEM细胞培养基，置于28℃培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞，当90%的细胞出现CPE时，收获病毒材料并标记病毒的代数。将收获的病毒材料放置于-80℃超低温冰箱、室温中反复冻融3次以使细胞充分裂解，4000 r/min离心30 min，吸取上清即为GCRV病毒液，并测得TCID50/mL=108.5。加入终浓度为0.2%的福尔马林溶液，37℃灭活一周。5000 r/min离心30min，取上清，4℃冰箱保存备用。

### 2.3 蛋白质含量测定标准曲线的建立

取6支15mL离心管并依次编号，各管依次加入不同浓度的牛血清蛋白溶液、考马斯亮蓝G-250蛋白试剂（表2-1），摇匀，放置2min，然后在595nm波长下测定并记录A595。以0号管作为空白对照，其余各管对应的标准蛋白含量（μg）为横坐标，A595为纵坐标，绘制标准曲线。

表2-1 标准曲线配加表

Tab. 2-1 Table of solvent with addition of the standard curve

|  | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蒸馏水/mL | 1.0 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| 100μg/ml 牛血清白蛋白溶液/mL | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 考马斯亮蓝 G-250 溶液/mL | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |

### 2.4 SA-CS微囊制备方法的确立

一步法制备：取适量的疫苗加入到海藻酸钠液中，充分混匀。用医用9号针

头注射器将其以恒定的速度（约60-90滴/min）滴入到氯化钙、壳聚糖乙酸的混合液中。以300r/min恒速搅拌使其成膜反应充分，室温静置30min，即得海藻酸钙-壳聚糖微囊的混悬液。过滤分离并用蒸馏水反复清洗。将其于-80℃预冷1h，真空冷冻干燥。

两步法制备：将适量的疫苗加入到海藻酸钠溶液中，充分混匀。用医用 9

号针头注射器将其以恒定的速度（约60-90滴/min）滴入到氯化钙溶液中，以

300r/min恒速搅拌使其充分完成成膜反应，室温静置10min，将海藻酸钙凝胶珠从混悬液中过滤分离，并用蒸馏水清洗。然后，将海藻酸钙凝胶珠加入到壳聚糖乙酸溶液中，300r/min恒速搅拌，充分反应后，过滤分离，蒸馏水清洗，即得SA-CS微囊。将其于-80℃预冷1h，真空冷冻干燥。

每种方法做6组平行，即每种方法制备6批SA-CS微囊疫苗。分别测定两种方法获得的SA-CS微囊疫苗的包封率，统计所得数据，进行显著性比较分析。

### 2.5 单因素试验

分别考察影响SA-CS微囊疫苗的成囊因素：海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度、壳聚糖溶液pH及所加疫苗体积等。选取各个因素的不同水平，以疫苗的包封率为指标，考察各因素对SA-CS微囊疫苗包封率、载蛋白量的影响。

#### 2.5.1 不同海藻酸钠浓度对SA-CS微囊包封率的影响

海藻酸钠浓度分别设为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%，在壳聚糖浓度为1.0%，氯化钙浓度为4.0%，加入疫苗体积为1mL的条件下制备SA-CS微囊疫苗，考察海藻酸钠溶液各个浓度对SA-CS微囊疫苗包封率的影响。

#### 2.5.2 不同壳聚糖浓度对SA-CS微囊包封率的影响

壳聚糖浓度分别设为0.25%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%，在海藻酸钠浓度为1.5%，氯化钙浓度为4.0%，加入疫苗体积为1mL的条件下制备SA-CS微囊疫苗，考察壳聚糖溶液各个浓度对SA-CS微囊疫苗包封率的影响。

#### 2.5.3 不同氯化钙浓度对SA-CS微囊包封率的影响

氯化钙浓度分别设为1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%，在海藻酸钠浓度为1.5%，壳聚糖浓度为1.0%，加入疫苗体积为1mL的条件下制备SA-CS微囊疫苗，考察氯化钙溶液各个浓度对SA-CS微囊疫苗包封率的影响。

#### 2.5.4 不同疫苗加入量对SA-CS微囊包封率的影响

加入疫苗体积分别为1mL、2mL、3mL、4mL、5mL，在海藻酸钠浓度为1.5%，氯化钙浓度为4.0%，壳聚糖浓度为1.0%的条件下制备SA-CS微囊疫苗，考察不同疫苗加入量对SA-CS微囊疫苗包封率的影响。

#### 2.5.5 壳聚糖溶液不同pH对SA-CS微囊包封率的影响

将壳聚糖溶液的pH分别设为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0，在海藻酸钠浓度为1.5%，氯化钙浓度为4.0%，壳聚糖浓度为1.0%，加入疫苗体积为1mL的条件下制备SA-CS微囊疫苗，考察壳聚糖溶液不同pH对SA-CS微囊疫苗包封率的影响。

### 2.6 正交试验设计

以单因素实验为基础，选取海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度、疫苗体积4个主要影响因素，根据L9（34）正交试验设计，进行4因素3水平试验，以包封率为评价指标，探索GCRV细胞疫苗SA-CS微囊的最佳制备条件。正交试验因素水平表见表2-2。

表2-2 正交试验因素水平表

Tab. 2-2 Factors and levels in orthogonal experiments

| 水平 | 海藻酸纳浓度/%  A | 氯化钙浓度/%  B | 壳聚糖浓度/%  C | 疫苗体积/mL  D |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0.5 | 2 | 0.5 | 1 |
| 2 | 1.5 | 3 | 1.0 | 2 |
| 3 | 2.5 | 4 | 1.5 | 4 |

### 2.7 SA-CS微囊形态观察及粒径测量

将待用疫苗用考马斯亮蓝G-250染色后按照正交试验筛选的最佳制备工艺

制备SA-CS微囊疫苗。用玻璃棒蘸取少量微囊，涂于载玻片上，用50%甘油分散后在光学显微镜下寻找分散的单个微囊，观察SA-CS微囊疫苗的外部形态；然后，在同一个视野下随机选取30个微囊颗粒，用显微镜测微尺测量微囊粒径大小。

### 2.8 微囊疫苗包封率、载蛋白量测定

取100mg冻干微囊于50mL离心管中，加入0.06mol/L的柠檬酸三钠溶液10mL，室温静置5～10min，冰浴，超声破碎，4000 r/min离心30min，取上清液（若上清液中有悬浮物，过滤去除）1mL，采用考马斯亮蓝法测定上清液中的总蛋白含量。根据公式计算微囊的包封率（B）和载蛋白量（Z）：

B=W/J×100% (2-1)

Z=W/M (2-2)

其中，（2-1）、（2-2）式中：W为微囊内的蛋白含量；J为加入的总蛋白量；M为微囊总质量

### 2.9 微囊疫苗的体外释放实验

称取100mg干燥的载蛋白SA-CS微囊于3个50mL离心管中，分别依次加入10mL pH7.4的PBS溶液、0.75%生理盐水溶液、pH2.3的盐酸溶液，将其放置于恒温振荡器中，37℃，转速100 r/min。分别于1 h、3h、7h、1d、3d、7d、

14d、21d测定释放液中的蛋白含量，统计数据并绘制释放曲线。

## 3 结果与分析

### 3.1 蛋白含量测定标准曲线

以溶液中蛋白质（BSA）含量为横坐标，以各溶液的吸光值A595为纵坐标，建立蛋白质含量测定的标准曲线。图2-1显示，BSA含量与吸光值A595的线性关系，所得曲线回归方程为y=6.08x + 0.0114，R2=0.9998。



图2-1 蛋白质含量测定标准曲线

Fig. 2-1 Standard curve of determination of protein content

### 3.2 SA-CS微囊制备方法比较结果

将两种方法分别制备的SA- CS微囊破碎，并测定每一批微囊疫苗的包封率，统计数据并输入到IBM SPASS Statistics 19.0软件，采用单因素方差分析

（one-way ANOVA），结果表明，一步法和两步法所得SA-CS微囊的包封率显著性差异不明显（P＞0.05），但是，两种方法所得数据的变异系数：RSD一步法=0.89%

＜RSD两步法=1.52%，即由一步法制备的SA- CS微囊疫苗包封率相对稳定，故选择一步法。

### 3.3 单因素试验结果

#### 3.3.1 海藻酸钠浓度对SA-CS微囊包封率的影响

不同海藻酸钠浓度对SA-CS微囊包封率的影响见图2-2。由图可知，在其它制备条件不变的情况下，当海藻酸钠浓度增高时，微囊包封率先是逐渐增高然后逐渐下降；当海藻酸钠浓度为1.5%时，微囊包封率最高。分析其原因可能为：当海藻酸钠浓度较低时，其不能与氯化钙、壳聚糖充分反应，导致其所形成的微囊膜较薄，易破损，微囊包封率较低；当海藻酸钠浓度较高时，海藻酸钠溶液的粘度增加，不利于其与疫苗液的充分混合；同时，所形成的微囊膜较厚，不易破碎，微囊包封率较低。因此，最适海藻酸钠的浓度在1.5%左右。



图2-2 海藻酸钠浓度对微囊包封率的影响

Fig. 2-2 Effect of concentration of Sodium alginate on encapsulation rate of microcapsules

#### 3.3.2 壳聚糖浓度对SA-CS微囊包封率的影响

不同壳聚糖浓度对SA-CS微囊包封率的影响见图2-3。在其它微囊制备条件不变时，微囊包封率随壳聚糖浓度的增加先是逐渐增高然后逐渐下降，当壳聚糖浓度为1%时，微囊包封率最高。由于壳聚糖浓度与微囊机械强度有关[123]，当壳聚糖浓度较低时，微囊机械强度较低，易破损，包封率较低；当壳聚糖浓度较高时，微囊机械强度较高，不易破碎，微囊包封率较低。因此，最适壳聚糖浓度在1%左右。



图2-3 壳聚糖浓度对微囊包封率的影响

Fig. 2-3 Effect of concentration of Chitosan on encapsulation rate of microcapsules

#### 3.3.3 氯化钙浓度对SA-CS微囊包封率的影响

图2-4显示不同氯化钙浓度对SA-CS微囊包封率的影响。在其它微囊制备条件不变时，随着氯化钙浓度增加，微囊包封率增加，当氯化钙浓度达到4%时，微囊包封率最高；当氯化钙浓度大于4%时，微囊包封率呈下降趋势。原因可能是，氯化钙和海藻酸钠是以络合物的形式参与微囊的形成，而且氯化钙和壳聚糖是以竞争的方式与海藻酸钠反应，故当氯化钙浓度较低时，海藻酸钠与壳聚糖形成的微囊壁较厚，不易破碎，微囊包封率较低；当氯化钙浓度较高时，微囊壁较薄，易破损，微囊包封率较低。因此，最适氯化钙浓度在4%左右。



图2-4 氯化钙浓度对微囊包封率的影响

Fig. 2-4 Effect of concentration of Calcium chloride on encapsulation rate of microcapsules

#### 3.3.4 疫苗加入量对SA-CS微囊包封率的影响

图2-5表明不同疫苗加入量对SA-CS微囊包封率的影响。由图可知，当加入疫苗的体积增加时，微囊包封率逐渐降低。但是，在分析该微囊的载蛋白量时

（图2-6），随着加入疫苗的体积增加时，微囊载蛋白量基本保持不变（平均载蛋白量8.1mg/g，RSD=0.27%）。因此，在确保微囊疫苗最大包封率的条件下，制备过程中疫苗加入量宜保持在2mL左右，以保证微囊包封率的稳定。



图2-5 疫苗加入量对微囊包封率的影响

Fig. 2-5 Effect of dosage of vaccine on encapsulation rate of microcapsules



图2-6 疫苗加入量对微囊载蛋白量的影响

Fig. 2-6 Effect of dosage of vaccine on loading dose of microcapsules

#### 3.3.5 壳聚糖溶液pH对SA-CS微囊包封率的影响

图2-7显示壳聚糖溶液不同pH对SA-CS微囊包封率的影响。当壳聚糖溶液pH值为1.0时，SA-CS微囊的包封率仅有20%左右，当壳聚糖溶液酸性逐渐降低时，SA-CS微囊的包封率随着酸性降低而升高；当壳聚糖溶液pH在4.0-5.0时，SA-CS微囊包封率达到最高，此后随着壳聚糖溶液pH升高而降低。分析其原因可能是由于，壳聚糖的pKa值为6.3，而海藻酸钠两个结构单元的pKa分别为3.38和3.65[124]。当壳聚糖溶液的pH发生变化是，直接影响到反应体系中海藻酸盐以及壳聚糖本身的电荷密度变化和电解离度变化，最终对SA-CS微囊囊膜的厚度和机械强度产生影响，继而导致微囊包封率的高低变化。



图2-7 壳聚糖溶液pH对微囊包封率的影响

Fig. 2-7 Effect of pH of Chitosan solution on encapsulation rate of microcapsules

### 3.4 正交试验结果

根据单因素实验结果，取海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度和疫苗加入量为试验因素，选取L9（34）正交表进行试验，以微囊包封率为试验指标确定

GCRV微囊疫苗制备的最佳工艺。正交试验结果见表2-3。

表2-3 正交试验结果

Tab. 2-3 Results of orthogonal experiments

| 序  号 | 海藻酸钠浓度/%  A | 氯化钙浓度/%  B | 壳聚糖浓度/%  C | 疫苗体积/mL  D | 包封率  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 19.76 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 43.28 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 36.93 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 50.67 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 47.21 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 56.39 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 42.68 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 22.16 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 36.32 |
| K1 | 99.97 | 113.11 | 98.31 | 103.29 |  |
| K2 | 154.27 | 112.65 | 130.27 | 142.35 |  |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| K3 | 101.16 | 129.64 | 126.82 | 109.76 | T=355.4 |
| k1 | 33.32 | 37.70 | 32.77 | 34.43 |  |
| k2 | 51.42 | 37.55 | 43.42 | 47.45 |  |
| k3 | 33.72 | 43.21 | 42.27 | 36.59 |  |
| R | 18.10 | 5.66 | 10.65 | 13.02 |  |

由表2-3可知，各因素对微囊包封率的影响程度由大到小依次为：海藻酸钠浓度（A）＞疫苗加入量（D）＞壳聚糖浓度（C）＞氯化钙浓度（B），确定最佳制备方案为：A2B3C2D2，即海藻酸钠浓度为1.5%，氯化钙浓度为4%，壳聚糖浓度为1.0%，疫苗加入体积为2mL。该结果与单因素实验结果一致。

### 3.5 SA-CS微囊外观、粒径、包封率、载蛋白量

根据正交试验所得最佳制备方案，重新制备3批微囊疫苗，测得微囊粒径为

（7.02±3.95）μm；光学显微镜下观察，可见经考马斯亮蓝染色成淡蓝或深蓝色的微囊，呈圆形或类圆形（图2-8），微囊粒度不均匀。该微囊疫苗平均包封率为60.53%（RSD=1.31%），平均载蛋白量为8.12mg/g（RSD=0.33%）。



图2-8 SA-CS微囊外观示意图

Fig. 2-8 Appearance of SA-CS microcapsules

### 3.6 体外释放实验结果

微囊疫苗在pH7.4的PBS溶液、0.75%的生理盐水溶液中的释放曲线见图2-9和图2-10。由图可知，微囊疫苗在3h内的累积释放率均在30%左右，并在14天内基本释放完全，表明该微囊疫苗在pH7.4的PBS溶液、0.75%的生理盐水溶液中具有良好的释放性能。然而，当将该微囊置于pH2.3的盐酸溶液中，在第

3h时，微囊疫苗的累积释放率仅为15.57% (图2-11)，表明该微囊疫苗具有一定

的耐酸性。



图2-9 微囊疫苗在PBS溶液（pH7.4）中的释放曲线

Fig. 2-9 Release curve of microencapsulated vaccine in PBS solution(pH7.4)



图 2-10 微囊疫苗在生理盐水溶液）中的释放曲线

Fig. 2-10 Release curve of microencapsulated vaccine in physiological saline solution(0.75%)



图2-11 微囊疫苗在盐酸溶液（pH2.3）中的释放曲线

Fig. 2-11 Release curve of microencapsulated vaccine in hydrochloric acid solution(pH2.3)

## 4 讨论

海藻酸钠和壳聚糖均为天然多糖，具有良好的生物相容性、生物降解性和生物粘附性，且无毒性[125-126]。此外，壳聚糖还具有抗菌、消炎及免疫调节等作用

[127]. 海藻酸钠和壳聚糖分子链上分别存在大量的羧基和伯氨基，因此，二者可

以通过正、负电荷吸引形成聚电解质膜。当海藻酸钠与氯化钙络合成凝胶珠后，海藻酸钠分子上未参与络合的羧基可与壳聚糖分子上的伯氨基反应，形成聚电解质膜，即海藻酸钠-壳聚糖微囊。该微囊制备过程温和，制备过程中芯材的生物活性较少损失[128]。据国内外报道，目前，该微囊多应用于药物控释载体、细胞培养微反应器、生物医学工程等领域[129-130]。

吴华伟和支海兵[131]以灭活的小反刍兽疫（PPRV）抗原为微囊芯材，制备

PPRV缓释微囊疫苗，结果所得微囊平均包封率为75.1%；微囊体外释放实验表明，微囊疫苗在1h内累积释放率在30%左右，在12d时释放率达到90%以上。唐文等[132]以壳聚糖-海藻酸钠为囊材，制备猪脾脏转移因子壳聚糖−海藻酸钠微囊，结果显示，微囊平均包封率60.8%，平均载药量11.60 mg/g；微囊体外释放实验表明，24 h内微囊在磷酸盐缓冲液(pH7.4)中累计释药89.4%，在稀盐酸(pH1.2)中24 h内累计释药63.9%. Rorigues等[133]鱼类嗜水气单胞菌海藻酸钠微胶囊口服疫苗的制备研究显示，嗜水气单胞菌的包裹效率接近100%。李义等

[107]以嗜水气单胞菌灭活疫苗为芯材、海藻酸钠为壁材，制备嗜水气单胞菌微胶

囊口服疫苗，所得微囊疫苗包封率为73. 66%。

与吴华伟等的微囊制备工艺不同，本研究所得微囊包封率相对较低。但是，微囊体外释放实验结果与本次试验所得结果基本一致。分析其原因可能与吴华伟等添加的乳化剂、植物油等有机物，以及包封率计算方法有关。因此，有必要开展GCRV细胞毒疫苗微囊的不同制备工艺研究，在确保疫苗抗原活性的条件下，提高微囊疫苗包封率。

## 小 结

本研究采用草鱼呼肠孤病毒（GCRV104）细胞疫苗为芯材，以海藻酸钠、壳聚糖为壁材，研究了微囊疫苗的制备工艺。经过显著性比较和方差分析，确定了SA-CS微囊的制备方法；单因素分析显示，最适海藻酸钠的浓度在1.5%左右、最适壳聚糖浓度在1%左右、最适氯化钙浓度在4%左右、制备微囊时疫苗加入量宜保持在2mL左右。经过正交试验研究，结果显示，最佳制备工艺为：海藻酸钠浓度1.5%，壳聚糖浓度1%，氯化钙浓度4%，加入疫苗体积2mL。该制备工艺条件下，GCRV微囊疫苗平均粒径为（7.02±3.95）μm，平均包封率为60.53%，平均载蛋白量为8.12mg/g。体外释放实验研究表明，在pH7.4的PBS溶液、生理盐水溶液中具有良好的体外释放性能，并具有一定耐酸性，但微囊的体内缓释效果还有待进一步验证。本研究的制备工艺成本较低、操作简单，所得微囊粒径较小，体外释放性能良好。

# 第三章 草鱼出血病细胞SA-CS微囊疫苗免疫效果研究

微囊技术在水产疫苗领域的研究应用起步较晚，但是，随着水产疫苗的研究应用以及微囊技术的飞速发展，水产微囊疫苗也取得了一些显著成果。1988年，Hart等[134]研究了真骨鱼后肠吞噬细胞的胞饮作用，提出如果用具备生物相容性的囊膜保护疫苗，可以减少鱼体消化酶对疫苗的破坏，以获得相对较好的免疫效果。1997年，Joosten等[100]成功制备了弧菌微囊疫苗，通过对草鱼和鳟鱼的口服免疫试验研究，结果证实了微囊疫苗能够显著提高鱼体对抗原的吸收。2000年，史秋梅[135]用嗜水气单胞菌制成的饵料吸附型口服免疫罗非鱼时发现：疫苗的相对免疫保护率达87.1%。至此，具有良好的缓释效果和生物相容性的微囊技术，在水产养殖研究领域越来越受重视。

本次研究是在上一章的基础上，采用正交试验法筛选的最佳制备工艺制备草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗，研究该微囊疫苗的稳定性；通过免疫草鱼，研究草鱼体内免疫基因的表达、血清中和抗体效价以及相对免疫保护率，确定该微囊疫苗的有效性。同时，为微囊疫苗进一步的深入研究积累科学资料。

## 1 材料

### 1.1 实验仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 型号 | 生产公司 |
| 倒置荧光显微镜 | DFC420C | 德国 LEICA 公司 |
| 倒置显微镜 | Vanox | 日本 Olympus 公司 |
| 超速离心机 | OptimaTM L-80XP | 美国 BECKMAN COULTER 公司 |
| 冰冻切片机 | CM1950 | 德国 LEICA 公司 |
| 生物安全柜 | ClassⅡBSC | 新加坡 ESCO 公司 |
| PCR 仪 | T-professional | 德国 Biometra 公司 |
| 台式冷冻离心机 | 3K-15 | 德国 Sigma 公司 |
| 超纯水系统 | Cascada LS MK2 | 美国 PALL 公司 |
| 生化培养箱 | MIR-154 | 日本 SANYO 公司 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 制冰机 | IMS-40 | 江苏格林电器有限公司 |
| 涡旋混合器 | HQ-60-Ⅱ | 北方同正仪器厂 |
| 实时荧光定量 PCR 仪 | Rotor-Gene 6000 | 德国 Qiagen 公司 |
| 凝胶成像系统 | Tans-Blot SD | 美国 Bio-Rad 公司 |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | DHG-9143BS-Ⅲ | 上海新苗医疗器械有限公司 |
| 高压灭菌锅 | HVE-50 | 日本 HIRAYAMA 公司 |

### 1.2 实验材料

草鱼呼肠孤病毒104毒株（GCRV104），由本实验室分离并保存；草鱼肾脏细胞系（CIK），由本实验室建立，传代培养；GCRV104细胞培养灭活疫苗，由本实验室研究制备；草鱼出血病细胞SA-CS微囊疫苗，由本实验室研究制备。草鱼，长江水产研究所窑湾试验基地提供，规格：体重（87.6±7.4）g，体

长（10.2±1.9）cm。

### 1.3 引物设计

根据Genbank中已公布的基因序列：β-Actin、IgM、Mx。使用引物设计软件

Primer premier 5.0进行引物设计（表3-1），由武汉擎科生物技术有限公司合成。

表3-1 引物信息表

Tab. 3-1 Information table on primers

| 基因  名称 | Genbank 登录号 | 引物名称 | 引物序列（5’-3'） | PCR 退  火温度 | 扩增片  段长度 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | β-Actin-F | CCAAAGCCAACAGGGAAAAGAT | 60℃ |  |
| β-Actin | M25013 |  |  |  | 135 bp |
|  |  | β-Actin-R | CAGAGGCATACAGGGACAGCAC | 60℃ |  |
|  |  | IgM-F | AACCATCTCCGCCGAAGTCAA | 60℃ |  |
| IgM | GQ201430 |  |  |  | 177 bp |
|  |  | IgM-R | CACTCCCAAACGCTGGATACTG | 60℃ |  |
|  |  | Mx-F | ACGCTGTCCTCTGGTATTGA | 60℃ |  |
| Mx | AY395698 |  |  |  | 178 bp |
|  |  | Mx-R | CATGACTGATCCCTTCTCCC | 60℃ |  |

### 1.4 实验试剂

免疫荧光染色试剂盒（抗兔Cy3），购自碧云天生物技术研究所；ReverTra Ace qPCR RT Kit（逆转录cDNA合成试剂盒），2×SYBR Green Realtime PCR Master Mix（2×SYBR荧光定量试剂盒），购自东洋坊（上海）生物科技有限公司。

### 1.5 试剂配制

1）间接荧光免疫试剂：

固定液：称取2 g多聚甲醛溶解在50 mL PBS中，恒温磁力搅拌器加热搅拌，温度不要超过60℃，充分溶解后，调pH7.4左右。

洗涤液：

TBS：精确称取2.42 g Tris碱，8 g NaCl，溶解于蒸馏水中，用盐酸调节pH

### 7.6 左右，蒸馏水定容至1000 mL。

TBSTx: 精确量取500μL的Triton X-100，加入到500mL的TBS中，使其终浓度为0.1 %，充分混匀。

封闭液：称取5 g牛血清白蛋白（BSA）溶解在100 mL的TBSTx中。

2）5×Tris-硼酸（TBE）缓冲液：将54 g Tris碱、27.5 g硼酸、20 mL 0.5 mol/L

EDTA加入到蒸馏水中，混匀并定容到1 L。

3）6×Loading Buffer: 0.25 g二甲苯青FF、0.25 g溴酚蓝、30 mL甘油溶解于蒸馏水中并定容至100 mL，EP管分装。

4）10 mg/mL溴化乙锭（EB）：称取溴化乙锭0.1 g，溶解于10 mL蒸馏水中，

EP管分装避光贮存。

5）DEPC水：将100μL的DEPC加入到100 mL蒸馏水中，得到体积分数为

0.1％的DEPC；37℃水浴处理12 h，121℃高压灭菌20 min。

## 2 实验方法

### 2.1 GCRV104多克隆抗体的制备及特异性检测

收集大量的细胞培养病毒材料，经过-80℃和室温反复冻融三次后，8000r/min离心30min，取病毒上清液，25000r/min离心2h，吸弃上清液取其沉淀，少量的

PBS缓冲液重悬。经蔗糖梯度离心纯化，测得病毒浓度为0.9mg/mL。送上海英基生物科技有限公司制备GCRV104多抗。GCRV104多克隆抗体制备后，以细胞间接荧光免疫法检测该多克隆抗体的特异性。

### 2.2 草鱼肠道冷冻切片制备与间接荧光免疫检测

草鱼免疫7小时后，分别取对照组和SA-CS微囊疫苗免疫组草鱼的前、中、后肠，利用冷冻切片机切取肠道组织于2.4cm×2.4cm的盖玻片上，得草鱼肠道组织切片。将制备好的草鱼肠道冷冻切片放置于固定液中固定10min或4℃过夜；

吸弃固定液，用洗涤液清洗3次，每次5min；加入封闭液，封闭60min，可在摇床上轻轻摇晃；吸弃封闭液，加入稀释好的GCRV104多抗（一抗），作用60min，为增强与一抗的作用，可4℃过夜；去除一抗，洗涤液清洗3～5次，每次5min；加入稀释好的荧光标记二抗1mL,避光孵育60min，回收二抗并用洗涤液清洗3～

5次，每次5min，整个操作过程注意避光；清洗完成后，加入适量的抗荧光淬灭剂，使其正好覆盖切片上的组织为宜，倒置显微镜下观察是否有荧光，以证明SA-CS微囊疫苗能被草鱼肠道吸收。

### 2.3 血清中和抗体效价检测

#### 2.3.1 免疫、采血及血清处理

将健康草鱼分为3组：SA-CS微囊疫苗组（免疫1组：按0.1g/尾SA-CS微囊疫苗拌入草鱼饲料）、细胞疫苗组（免疫2组：按0.1mL/尾细胞疫苗拌入草鱼饲料）和对照组（按0.1mL/尾无菌PBS拌入饲料），通过灌喂的方式口服免疫草鱼。免疫草鱼后，分别在第1d、3d、7d、14d、21d取免疫组和对照组草鱼，每次每组取3尾。在生物安全柜中，断尾或心脏周围采取草鱼血液，收集于1.5mL离心管中，每次所取得的草鱼血液不混合，室温下放置1 h，置4℃冰箱过夜，待血细胞沉淀后，离心，取上层血清，过滤除菌；56℃水浴中灭活20min（血清量少时，可用无菌生理盐水适当稀释）；暂保存于4℃冰箱。

#### 2.3.2 GCRV104毒价滴定

用不含血清的MEM培养基将GCRV104病毒液依次作10倍梯度稀释，分别加入96孔微量培养板的各孔中，每孔100μL，每个稀释度设8个重复孔；用含

5%血清的MEM培养基重悬CIK细胞，每孔滴入100μL细胞悬液。CIK细胞对照组用100μL不含血清的MEM培养基代替病毒液作模拟感染。调节pH，封口膜封口，放置于28℃生化培养箱中培养，连续5d观察细胞生长情况并记录结果，按照Reed-Muench两氏法计算GCRV104毒价（TCID50/100μL）。

#### 2.3.3 血清中和试验

将处理好的血清用无菌生理盐水作2倍稀释：1: 2、1: 4、1: 8、1: 16、1：

32、1: 64、1: 128。滴入96孔微量培养板中，每孔50μL，每个稀释度作6个平行。每孔滴加50μL稀释好的病毒液（200TCID50），封口膜封好并置于28℃生化培养箱中，感作1h。然后，将细胞悬液滴入微量孔中，每孔100μL。细胞对

照孔滴加100μL细胞悬液和100μL无菌生理盐水；病毒对照孔滴加100μL细胞悬液、50μL无菌生理盐水和50μL病毒液。调节pH，封口膜封好后置于28℃生化培养箱中培养。48h后，倒置显微镜下连续5d观察细胞生长情况，并记录细胞产生CPE的孔数。

#### 2.3.4 GCRV104回归试验

将GCRV104分别作0.1TCID50、1 TCID50、10 TCID50、100 TCID50、1000

TCID50稀释；各个稀释度的病毒液滴入96孔微量培养板中，每孔50μL；将细胞悬液滴入到各个孔中，每孔100μL；调节细胞培养液pH至橙黄色，置28℃生化培养箱培养。连续5d观察细胞生长情况，并记录发生CPE的孔数。

#### 2.3.5 血清毒性试验

将50μL用于血清中和试验的最低稀释倍数血清滴入96孔微量培养板中，每孔滴加细胞悬液100μL，调节细胞培养液pH，封口膜封好，置28℃生化培养箱中培养，连续5d观察细胞生长状况。

### 2.4 免疫基因表达检测

#### 2.4.1 草鱼内脏组织总RNA提取及逆转录

在生物安全柜中，分别取SA-CS微囊疫苗免疫组和对照组的草鱼内脏肝、脾、肾组织0.1g，置于离心管中，加入1mL的TRIzol LS Reagen试剂，匀浆，室温静置10min；4℃下12000g离心10min，吸取匀浆上清液置于1.5mLEP管中；加入200μL的氯仿并剧烈摇晃15s，室温静置15min，4℃下12000g离心15min；将上层透明液相（不要吸取白色中间层）转入EP管中，加入异丙醇500μL，混匀后放置于-20℃静置10min；4℃下12000g离心15min，吸弃上清液，加入用

DEPC水配制的75%乙醇，涡旋混匀以清洗管底的RNA；4℃下10000g离心10min，吸弃上清液，于生物安全柜中室温干燥5-10 min（RNA样品不要过于干燥，否则很难溶解）。适量的DEPC水溶解RNA，2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性；暂放于-80℃冰箱保存备用。

逆转录：首先，取适量的RNA，65℃热处理5min，立即放于冰上冷却；PCR反应管中依次加入2μL 5×RT Buffer，0.5μL RT Enzyme Mix，0.5μL Primer Mix，7μL RNA模板；混匀后置PCR仪进行逆转，反应程序：37℃逆转录反应15min；

98℃酶失活反应5min。逆转产物暂放于-20℃冰箱保存备用。

#### 2.4.2 半定量检测免疫基因的表达

利用荧光定量内参基因引物β-Actin-F/R和免疫基因引物Mx-F/R、IgM-F/R来检测免疫基因Mx、IgM在草鱼内脏组织中的不同时间段的表达情况。将逆转录产物进行PCR扩增，反应体系为25μL：10×Buffer 2.5μL，MgCl2 1.5μL，dNTPs

0.25μL，引物各0.25μL，Taq酶0.25μL，cDNA模板1μL，ddH2O 19μL. 混匀，置PCR仪中进行PCR扩增，反应程序为95℃预变性5 min；95℃变性30 s，60℃退火40 s，72℃延伸30 s，25个循环；72℃延伸10 min. 取10μL PCR反应产物，

2%琼脂糖凝胶电泳，观察扩增产物电泳条带，拍照保存。

#### 2.4.3 实时荧光定量检测免疫基因

利用荧光定量内参基因引物β-actin-F/R和免疫基因引物Mx-F/R、IgM-F/R来检测免疫基因Mx、IgM在草鱼内脏组织中的不同时间段的表达差异。采用荧光染料法（SYBR）进行实时荧光定量PCR，其反应体系为20μL：2×SYBR Mix 10μL，引物各0.25μL，cDNA模板1μL，ddH2O 8.5μL。实时荧光定量PCR扩增反应程序：95°c 预变性10 min；95℃变性30 s，60℃退火40 s，72℃延伸30 s，

40个循环。每个检测样品均做3个重复。

### 2.5 SA-CS微囊疫苗稳定检测

制备SA-CS微囊疫苗，并保存于4℃冰箱中，保存时间分别为：1、3、6月。将草鱼分为4组，3个免疫组和对照组，每组3尾。分别用不同保存时间的SA-CS微囊疫苗免疫草鱼。免疫21天后，分别采集各组草鱼血液，每组草鱼血液不混合。室温下静置1 h，放置于4℃冰箱过夜，待血液细胞沉淀后，离心取上层的血清，过滤除菌；56℃水浴中灭活20min。利用血清中和法测定各组血清中的抗体效价，并记录结果。

### 2.6 SA-CS微囊疫苗免疫保护率检测

将草鱼分为2组：微囊疫苗口服组和对照组。免疫组通过灌喂的方式进行口服免疫，对照组以无菌PBS作为对照。待免疫草鱼后第21天，从试验组和对照组中分别取30尾鱼。通过肌肉注射的方式，每尾注射0. 2 mL GCRV104, TCID50/100μL =106.0。观察14 d，记录感染发病和死亡情况，计算相对免疫保护力( Relative Percent Survival, RPS)。

RPS=[1- (免疫组死亡率/对照组死亡率)]×100% (3-1)

## 3 结果

### 3.1 GCRV104多克隆抗体特异性检测

经过ELISA检测，GCRV104多抗的抗体效价为1: 32000。将制备的GCRV104多抗稀释500倍用于细胞间接荧光免疫试验。倒置荧光显微镜下可观察到，感染了GCRV104三天的CIK细胞在绿光的激发下发出鲜艳的红色荧光；没有被

GCRV104感染的CIK细胞则没有红色荧光出现（图3-1）。结果表明制备的

GCRV104多抗能够特异性检测GCRV104.



图3-1 CIK细胞中GCRV104的免疫荧光检测(3d)

A列：白光下的CIK细胞；B列：绿光下的CIK细胞；

Fig. 3-1 Immunofluorescent detection of the GCRV104 in CIK cells (3d) Column A: CIK cells under the white light; Column B: CIK cells under the green light;

### 3.2 草鱼肠道切片间接荧光免疫检测

图3-2所示，草鱼肠道切片的间接荧光免疫结果。由图可知，免疫草鱼7h后，能在草鱼的肠道肠绒毛中看到有红色荧光；而对照组则没有荧光。另外，在草鱼后肠食物残渣中也观察到荧光（图3-3）。说明SA-CS微囊中的GCRV104灭活疫苗能够被草鱼肠道摄取。

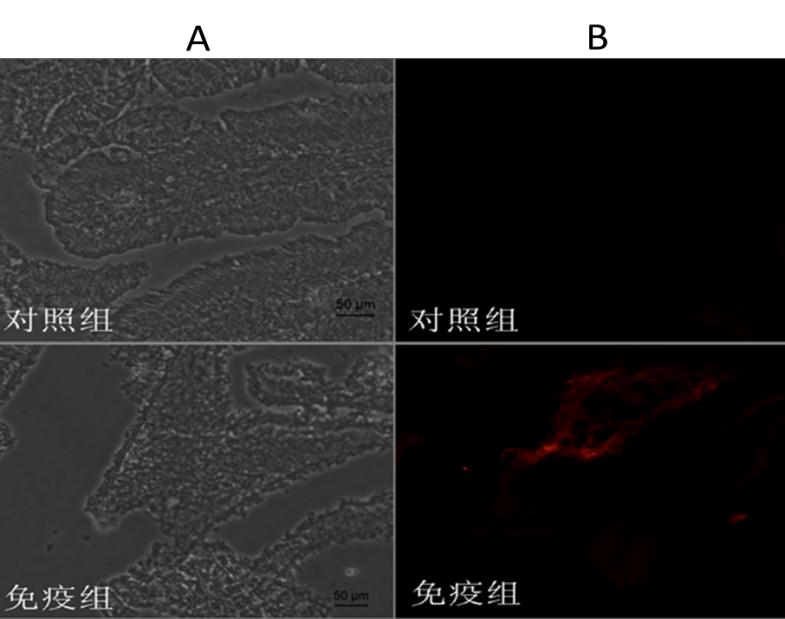


图3-2 草鱼肠道切片的间接荧光免疫结果(7h)

A列：白光下的肠道组织切片；B列：绿光下的肠道组织切片



Fig. 3-2 Results of indirect immunofluorescence in intestinal tissue slice of grass carp Column A: intestinal tissue sliceunder the white light; Column B: intestinal tissue sliceunder the green light

图3-3 荧光下的草鱼肠道食物残渣

Fig. 3-3 Food residues in grass carp intestinal under the fluorescence

### 3.3 血清中和抗体效价检测

经Reed-Muench两氏法计算GCRV104毒价TCID50/100μL =106.0. 表3-2为病毒回归实验结果，GCRV104在稀释成0.1TCID50、1 TCID50时，基本不能引起

CIK细胞产生CPE；稀释度为100 TCID50、1000 TCID50则完全能引起CIK细胞

产生CPE。而且血清毒性试验结果显示，最低稀释倍数的血清基本不能引起CIK细胞产生CPE。结果表明，此次的血清中和试验是成立的。表3-3所示为血清中和试验结果，草鱼口服免疫3d后，免疫组的抗体水平与对照组的抗体水平差异极显著（*P*＜0.01）；在第7d，免疫组抗体水平剧增，细胞疫苗口服组的抗体水平显著高于SA-CS微囊疫苗组（*P*＜0.05）；在第14d，免疫组均维持在较高的水平，差异不显著（*P*＞0.05）；第21d时，SA-CS微囊疫苗组显著高于细胞疫苗组

（*P*＜0.05）。

表3-2 病毒回归实验结果

Tab. 3-2 Results of virus regression test

|  | Ctrl | 0.1TCID50 | 1TCID50 | 10TCID50 | 100TCID50 | 1000TCID50 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| CPE 孔数 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 5/8 | 8/8 | 8/8 |

表3-3 血清中和试验结果

Tab. 3-3 Results of serum neutralization test

|  | 1d | 3d | 7d | 14d | 21d |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 对照组 | 9.65±1.77 | 9.78±0.64 | 10.47±2.09 | 9.82±1.28 | 11.01±1.93 |
| 免疫 1 组 | 16.13±2.31 | 20.88±1.16 | 69.72±2.37 | 92.94±0.93 | 101. 56±4.28 |
| 免疫 2 组 | 15.77±1. 45 | 47.19±3.06 | 83.61±11.02 | 89.77±2.49 | 79.89±9.04 |

### 3.4 免疫基因检测

图3-4所示RNA电泳图，由图可见很清晰的两条带，说明所提取的RNA基本完整。以β-Actin作为内参基因，对不同免疫时间的草鱼内脏组织中IgM和Mx基因进行半定量分析，结果显示（图3-5），能在草鱼内脏组织中检测到β-Actin、IgM和Mx基因的表达，而且可以观察到在不同免疫时间里，IgM和Mx基因的表达量也不同。同时，以β-Actin作为内参基因，采用2-△△Ct法，对不同免疫时间的草鱼内脏组织中IgM和Mx基因进行相对荧光定量分析（图3-6），结果显示，免疫草鱼14d后，IgM和Mx的表达量均达到相对较高的水平；经过单因素方差显著性比较，在免疫1d、3d，免疫组IgM表达量与对照组差异性不显著（*P*

＞0.05），在第7d后，显著高于对照组（*P*＜0.05），而在第14d后，差异极显著

（*P*＜0.01）；免疫组Mx表达量在免疫3d后显著高于对照组（*P*＜0.05），第7d

后，差异极显著（*P*＜0.01）。



图3-4 草鱼内脏组织总RNA电泳图

Fig. 3-4 Electrophoresis of the total RNA in Grass carp viscera tissue



图3-5 免疫基因半定量电泳图

Fig. 3-5 Semi-quantitative electrophoresis of the immune gene.

M: DL500 DNATM Marker; 1d、3d、7d、14d、21d means the immune gene amplified bands on Each time



图3-6 IgM、Mx的相对表达量示意图

\*差异显著；\*\*差异极显著

Fig. 3-6 Schematic diagram of the relative expression of IgM and Mx

\* means significant difference; \*\* means extremely significant difference

### 3.5 SA-CS微囊疫苗稳定性检测

同一批次的SA-CS微囊疫苗在4℃冰箱中分别保存1个月、3个月和6个月后，分组免疫草鱼。免疫21d后，通过血清中和试验测定抗体效价。结果显示（表3-4），微囊疫苗在4℃条件下保存3个月免疫草鱼后，抗体水平相对于对照组依然较高，而保存6个月后，抗体水平有所下降。但是，经过单因素方差显著相比较分析，3个保存时间的微囊疫苗所引起的抗体水平差异不显著（*P*＞0.05）。

表3-4 疫苗稳定性检测结果

Tab. 3-4 Detection results of the microencapsulated vaccine stability

|  | 1 个月 | 3 个月 | 6 个月 | 对照组 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 血清抗体效价 | 102.73±8.47 | 104.92±13.51 | 99.84±10.49 | 13.26±5.18 |

### 3.6 SA-CS微囊疫苗免疫保护力检测

表3-5所示攻毒实验结果，GCRV104攻毒14d后，免疫组死亡率小于对照组死亡率。经（3-1）公式计算，草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗的相对免疫保护力为62.5%。

## 4 讨论

表3-5 GCRV104攻毒实验结果

Tab. 3-5 Results of challenge experiment with GCRV104

| 草鱼总数/尾 | | 死亡数/尾 | 死亡率/% | RPS/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 免疫组 | 30 | 9 | 30 | 62.5% |
| 对照组 | 30 | 24 | 80 |  |

海藻酸钠-壳聚糖微囊不仅具有缓释效果，而且对于疫苗免疫具有辅助效果，其良好的生物相容性和较低的免疫原性使得SA-CS微囊在缓释疫苗载体系统的研究上具有广泛的应用前景。微囊口服疫苗在水产养殖的实际生产应用上，不仅不受鱼体、时间地点的限制，不会对鱼体的机体造成损害；而且更适合于大规模的养殖水体及养殖鱼群的免疫。试验研究结果显示，草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗能够保护细胞疫苗的免疫原性，降低或不受消化酶的破坏，达到较好的免疫效果，使得草鱼血清抗体水平维持在较高的水平。SA-CS微囊的缓释作用可以使鱼体在相当长的时间内获得持续的抗原供应，并在相当长的时间里使血清中和抗体效价维持在较高的水平，在一定程度上减少了免疫次数。同时，微囊疫苗还具有耐贮存性以及良好的稳定性，降低了疫苗在运输及贮存过程中的成本，使得其在水产养殖上的应用研究得到广泛关注。

Murno等[99]通过HGG（human gamma globulin）微囊口服免疫虹鳟鱼，指出具有缓释作用的微囊在鱼体肠部被吸收并产生抗体。Joosten等[100]利用弧菌微囊疫苗口服免疫草鱼和鳟鱼，结果证实微囊疫苗确实可以提高鱼体对抗原的吸收。Challacombe等[136]用Ovalbumin (OVA)微囊通过灌喂的方式免疫小鼠，结果显示，微囊免疫组诱导产生的IgA和IgG抗体水平显著高于对照组，且6周内均维持在较高的水平。余俊红等[101]鳗弧菌微囊口服疫苗免疫效果研究表明，微囊疫苗对鲈鱼的免疫保护力高于全细胞疫苗。耿晓修[137]在鱼类肠型点状气单胞菌微囊疫苗对草鱼的免疫保护效应研究中证实，具有缓释作用的微囊口服疫苗能够诱导草鱼免疫系统产生免疫应答，并使其获得相应的抗体，而且在较长时间内维持草鱼血清抗体在较高的水平，对草鱼具有一定的保护力。田继远[138]研究了淋巴囊肿病毒核酸微囊口服疫苗，结果显示微囊对核酸疫苗具有保护作用，而且核酸微囊疫苗相应的基因在鱼体内得到高效表达，并指出微囊为核酸疫苗的理想载体。吴华伟和支海兵[131]对小反刍兽疫SA-CS微囊疫苗免疫效果进行了研究，结果显

示，微囊疫苗使绵羊获得了较高的抗体水平，并能维持6个月，证实了微囊疫苗良好的免疫原性和缓释性能。徐怀英等[139]以鸡新城疫病毒液为微囊芯材，壳聚糖为微囊壁材，通过戊二醛交联作用，研究制备出平均粒径为5.83μm、具有良好分散性和均匀度的鸡新城疫壳聚糖微囊疫苗；通过SPF鸡免疫研究，结果表明该微囊疫苗能够有效的刺激免疫系统，使其产生较强的特异性免疫和非特异性免疫，进一步证实了微囊疫苗具有良好的免疫保护效果。符华林等[140]对载TF的海藻酸钠-壳聚糖微囊中TF的活性进行了检测，结果显示，该微囊化的TF对于小鼠巨噬细胞吞噬能力的提高具有显著效果。

本试验研究结果与上述研究结果相对一致。研究结果显示，草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗能够被草鱼肠道摄取，客观上对草鱼出血病细胞培养灭活疫苗具有保护作用，其抗原物质能刺激草鱼免疫系统产生抵抗草鱼出血病细胞疫苗的抗体；在免疫21d后，血清中和抗体效价维持在较高的水平，显著高于细胞疫苗组。免疫基因表达检测结果显示，SA-CS微囊疫苗能够诱导草鱼免疫基因IgM和Mx的表达，且免疫组的免疫基因相对表达量显著高于对照组。攻毒实验结果表明，该微囊疫苗对草鱼具有一定的保护作用，免疫保护力为62.5%，降低了免疫组草鱼的死亡率。本次试验研究只是对于草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗的免疫效果的初步研究，由于实验条件的影响，免疫研究数据具有一定的误差，有待开展更具体细致的研究。

## 小 结

本试验研究采用间接荧光免疫法，证实了草鱼出血病细胞培养灭活SA-CS微囊疫苗能够被草鱼肠道摄取并吸收；血清中和抗体效价检测结果说明该微囊疫苗能诱导草鱼免疫系统的免疫应答，并产生了较高水平的血清中和抗体，同时客

观说明了该微囊疫苗具有一定的缓释效果。微囊疫苗抗原物质被草鱼肠道摄取后，能够诱导草鱼免疫基因IgM和Mx的表达，并增加了草鱼对GCRV104的抵抗力，降低了草鱼死亡率。

参考文献

[1]湖北省水生生物研究所鱼病研究室草鱼出血病研究小组. 草鱼出血病的研究简报[J]. 淡水渔业, 1977, 6: 25- 27.

[2]中国科学院水生生物研究所三室病毒组. 草鱼出血病病原的研究[J]. 水生生物学集刊, 1978, 6(3)：321- 330.

[3]湖北省水生生物研究所鱼病研究室草鱼出血病研究小组. 草鱼出血病病原的研究II电镜观察[J]. 水生生物学集刊, 1980, 7(1)：75-84.

[4]陈燕燊，江育林. 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究[J]. 科学通报, 1983, 18: 1138- 1140.

[5]中国科学院武汉病毒研究所，中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病协作组. 草鱼出血病病毒的电子显微镜观察初报[J].淡水渔业, 1983, 3: 39- 40.

[6]中国科学院武汉病毒所，中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组. 草鱼呼肠孤病毒精细结构[J]. 淡水渔业, 1984, 2: 21-22.

[7]中国科学院武汉病毒所，中国水产科学院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组. 草鱼出血病病原-鱼呼肠孤病毒（FRV）核酸特性的研究[J]. 淡水渔业,1984, 4: 7-9.

[8]张念慈，杨广智. 草鱼吻端组织细胞株ZC-7901及其亚株ZC-7901S1的建立和特性观察[J]. 水产学报, 1981, 5(2): 111- 119.

[9]左文功，钱华金，许映芳，等. 草鱼肾组织细胞系CIK的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1)：11- 17.

[10]柯丽华，方勤，蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 1990, 14(2)：153- 159.

[11]柯丽华，余兰芬，方勤，等. 三株草鱼出血病病毒免疫原性的比较[J]. 中国病毒学, 1991, 6(3)：248- 252.

[12]方勤，肖调义，李旅，等. 四株草鱼呼肠孤病毒毒株的细胞感染特性比较研究[J]. 中国病毒学, 2002, 17(2)：182- 184.

[13]方勤, Sanket Shah, Yuyao Liang, 等. 草鱼呼肠孤病毒的三维重构与衣壳蛋白特性[J]. 中国科学C辑: 生命科学, 2005, 35(3): 231- 237.

[14]郝贵杰， 沈锦玉，潘晓艺， 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定[J].

渔业科学进展, 2011, 32(1): 47- 52.

[15]曾伟伟，王庆，刘永奎，等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5)：790- 795.

[16]刘永奎，王庆，曾伟伟，等. 草鱼呼肠孤病毒JX-0902株的分离和鉴定[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1077- 1083.

[17]张超，王庆，石存斌，等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株的分离与鉴定[J].中国水产科学, 2010, 17(6):1257- 1263.

[18]丁清泉，余兰芬，柯丽华，等. 草鱼出血病病毒对其它鱼的感染性研究[J]. 中国病毒学, 1991, 6(4)：371- 373.

[19]陈艳.草鱼出血病的流行病学分析[J]. 中国水产, 2004, 4: 49- 51.

[20]倪达书. 我国鱼病学研究现状及其发展前景[J]. 现代渔业信息, 1994, 9(3)：1- 4.

[21]刘栭， 冯祖强. 注射土法免疫组织浆防治草鱼鱼种出血病[J]. 淡水渔业，

1977(12): 10- 13.

[22]李秀瑜，王斯清. 自制草鱼出血病灭活疫苗应用效果报告[J].福建水产, 1986(3)：46- 50.

[23]杨先乐，杜森英，曾令兵，等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告

[J]. 淡水渔业, 1986, 3: 1- 5.

[24]郑斌. 草鱼出血病灭活疫苗注射治疗草鱼出血病试验[J]. 福建水产, 1996(2)：33- 36.

[25]杨先乐，夏春，左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究——生产性免

疫试验[J]. 1992, 19(1): 10-14.

[26]曾令兵，高梦雪，蒋勇华. 草鱼细胞和病毒的大培养研究[J]. 淡水渔业, 1995, 25(6)：6- 9.

[27]曾令兵，杨先乐，贺路，等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗旋转瓶法大规模

生产工艺[J].中国水产科学, 1998, 6(2): 62- 67.

[28]许淑英，李焕林，邓国成，等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果[J]. 水产学报, 1994, 18(2)：111- 118.

[29]许淑英，李焕林，邓国成，等. 草鱼出血病病毒减毒的研究[J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(3)：211- 216.

[30]胡光安. 草鱼出血病活疫苗问世. 中国渔业报，2011-2-14（004）.

[31]肖波. 草鱼呼肠孤病毒及其免疫预防研究进展[J]. 鲁东大学学报（自然科学版）：2010, 26(1)：48-53.

[32]章怀云，萧克宇，陈韬，等. 外源DNA处理的草鱼对草鱼出血病毒的抗性观察[J]. 湖南农业大学学报, 1997, 23(2)：154- 157.

[33]方勤，丁清泉. 表达草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白的重组杆状病毒及其构建. 中国专利, 101205545A. 2008-6-25.

[34]周勇，曾令兵，范玉顶，等. 草鱼呼肠孤病毒VP6蛋白与大肠杆菌LTB亚基植物融合表达载体的构建[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1)：1- 7.

[35]徐诗英，李婧慧，邹勇，等. 草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白VP7重组疫苗的构建及其免疫效力评价[J]. 湖南农业大学学报（自然科学版）, 2011, 37(6)：659- 664.

[36]刘林，徐诗英，李婧慧，等. 鱼出血病病毒vp6核酸疫苗的免疫效果评估[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5): 841- 847.

[37]丁清泉，余兰芬，王学兰，等. 草鱼出血病鱼主要器官组织的超薄切片观察及感染力的比较[J]. 水产学报, 1990, 14( 1)：66- 69.

[38]肖雪. 草鱼呼肠孤病毒人工感草鱼的条件筛选和病理学研究[D]. 四川农业大学硕士学位论文, 2007。

[39]朱心玲，李爱华，射巧雄.克列奥鱼服康抗草鱼出血病病毒的实验研究.鱼病学研究论文集，北京： 海洋出版社, 1993, 20-25.

[40]安伟. 抗草鱼呼肠孤病毒药物筛选细胞模型及分子检测方法的建立[D]. 华中农业大学硕士学位论文, 2011。

[41]刘堂水，艾桃ft, 喻运珍. 草鱼出血病类型及防治方法[J]. 河北渔业, 2008(2): 30- 31.

[42]王春清，王海玉. 草鱼出血病的防治措施[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(14)：62-

63.

[43]袁良萃. 中草药防治草鱼出血病新技术[J]. 中国水产, 2000, 11: 78。

[44]付亚成，肖克宇. 中草药在水产动物病害防治中的研究进展[J]. 北京水产, 2008，(4)：64- 67.

[45]王志谦，项仁农. 草鱼出血病的中药疗法[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(4): 42.

[46]简纪常，吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响[J]. 大连水产学报, 2002, 17(2)：114- 119.

[47]姜德ft，李丙文. 中草药治疗草鱼出血病[J]. 中国兽医学杂志, 2003, 1: 22-

23.

[48]李军，王铁辉，陆仁后，等. 草鱼出血病的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(4): 445- 453.

[49]曹振杰， 曲世科，丛日祥， 等. 免疫多糖对草鱼免疫功能的影响[ J]. 齐鲁渔

业, 1999, 16( 3): 43-44

[50]刘毅， 谢海侠， 昌鸣先， 等. 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼的免疫促进作用[ J].

水产学报, 2006, 30( 5): 683- 689.

[51]肖克宇. 水产动物免疫与应用[M ]. 北京：科学出版社, 2007: 343- 370.

[52]许明，马贵华. 黄芪多糖防治草鱼出血病的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30):13202, 13230

[53]杨先乐， 左文功. 水温与草鱼免疫应答关系的研究[J]. 动物学报, 1997，

43(L): 42- 48.

[54]王文博，李爱华，汪建国，等. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(2)：139- 144.

[55]董天红，史增奎，赵润朝. pH值对草鱼白细胞吞噬力影响的研究田[J]. 河北渔业, 2005, 3: 3- 5.

[56]郭慧玲. 草鱼出血病防治探讨. 渔业致富指南, 2011, 12: 55- 56.

[57]邵健忠，项黎新，李亚南，等. 从草鱼细胞分离到一种抗出血病病毒蛋白因子的研究[J]. 病毒学报, 1993, 9(4)：352- 360.

[58]邵建忠，钱凯先，项黎新，等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究. 病毒学报, 1998, 14 (4)：348- 351.

[59]贾方钧，王铁辉. 干扰素防治草鱼出血病的效果初探[J]. 水产科学,2000, 19(4)：1- 4.

[60] Hermann L L, Coombs K M. Inhibition of Reovirus by Mycophenolic Acid Is Associated with the M1 Genome Segment [J]. Journal ofVirology, 2004, 78(12): 6171-6179.

[61] Lupini C, Cecchinato M, Scagliarini A, et al. In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus [J]. Research in Veterinary Science, 2009, 87(3): 482-487.

[62] Ma J, Wei M, Zeng L B, et al. Inhibition of the replication of grass carp reovirus in CIK cells with plasmid-transcribed shRNAs [J]. Journal of virological methods, 2011, 175, (2): 182-187.

[63]宋健， 陈磊， 李效军， 等. 微胶囊化技术及应用[M]. 北京： 化学工业出版社，

2004.

[64]汪洋，张成伟. 微囊化技术在药剂学中的应用[J]. 中国实用医药, 200, 3(12): 183- 185.

[65]刘学贤， 龚建森. 微胶囊技术在兽医生物制品中的应用状况和前景[J]. 中国

禽业导刊,2005, 22(13): 16- 17.

[66]蔡涛，王丹，宋志祥，等. 微胶囊的制备技术及其国内应用进展[J]. 化学推进剂与高分子材料, 2010, 8(2)：20- 26.

[67]陆宁，宛晓春. 微胶囊囊心释放过程研究进展[J].粮油食品科技, 2001, 9(4)：22- 24.

[68]朱建康， 姬巧玲，陈燚涛. 微胶囊技术及其在纺织领域中的应用进展[J].天

津工业大学学报, 2012, 31(4): 44- 49.

[69] Micheal C, Aprahamian M, Defontaine L, et al. The effect ofsite administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1991, 43(1): 1-5.

[70]彭应旭. 骨髓靶向柔红霉素毫微粒的研究[J ]. 中国医药工业杂志, 2000，

31(2):57.

[71]江定心，徐汉虹，杨晓云. 植物源农药印楝素微胶囊化工艺及防虫效果[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2)：205- 208.

[72]刘书庆，李树英，时念秋，等. 界面缩聚法维生素C微囊的研究[J]. ft东轻工业学院学报, 2008, 22(2): 46- 47, 83.

[73]戚栋明，张睿，许玲玉，等. 有机颜料酞菁蓝微胶囊的原位微悬浮法制备及其表征[J]. 高分子学报, 2011(2)：145- 150.

[74] Donald C C, David E P. Improved encapsulated citrus oil [J]. Food Technol, 1978, (1): 36-39．

[75]冯怡，张瑛，杨胤，等. 影响陈皮挥发油微囊成囊因素的考察[J]. 中成药, 2007, 29 (2): 202- 208.

[76]李宁. 双歧杆菌微胶囊制备工艺及功能特性的研究[D]. 河北农业大学，

2007.

[77]陈梅香，张雅稚. 用分子包埋法对BHT进行微胶囊化研究及应用[J]. 肉类研究, 2007 (3)：22- 27．

[78]赵艳花，傅红兴，蔺胜照等. 喷雾干燥法制备莪术油微囊[J]. 医药导报, 2008, 27(5): 581- 584.

[79]黄嘉驷，苏艳，周军，等. 致病性大肠杆菌微胶囊口服疫苗的制备及对其免

疫功能的评价[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(1): 31- 34.

[80]胡国勤，陈琪，邓修. 超临界溶液快速膨胀制备灰黄霉素超细微粒的表征与溶解性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(9)：671- 674.

[81] Maria M G, Blanco D, Cruze M, et al. Formulation of l-asparaginase-loaded

Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme

Loading, activity and in vitro release [J ]. Journal of Controlled Release, 1998, 52(1): 53- 62.

[82] Li X H. Poly- DL- lactide- poly (ethylene glycol) microspheres as oral and parenteral delivery systems for Hepatitis B surface antigen [J]. Journal of Applied Polymer Science,2002, 83(4):850- 856.

[83]杜静玲， 谭天伟. VA棕榈酸酯微胶囊的制备及性能研究[J]. 食品与发酵工业，

2007, 33(1): 48- 50．

[84]冯岩，张晓鸣，路宏波，等. 复合凝聚法制备VE微胶囊工艺的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 39- 44．

[85] Dai R Y, Wu G, Li W G, et al. Gelatin /carboxymethylcellulose /dioctyl sulfosuccinate sodium microcapsule by complex coacervation and its application for electrophoretic display[J]. Colloids and Surfaces( A): Physicochemical and

Engineering Aspects, 2010, 362(5): 84- 89．

[86]李川，李兆华，蒋和体，等. 微生物细胞壁微囊化姜油及其缓释效应研究[J]. 中国高新技术企业, 2009, 14: 8- 9.

[87]鲁卫东，马波，倪俊学. 流感疫苗类脂质体制备及稳定性研究[J]. 扬州大学学报（农业与生命科学版），2010, 31(4)：57- 61.

[88]何荣军，杨爽，孙培龙，等. 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的制备及其应用研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(2)：166- 169.

[89]张国栋. 壳聚糖-海藻酸钠微胶囊对布洛芬的缓释作用[J]. 生物技术世界, 2012, 2: 32- 37.

[90]张运铎. 海藻酸钠功能特性应用研究进展[J]. 河南科技, 2011(17)：56- 57.

[91]王富花，刘中阳，张占军. 壳聚糖的研究进展及其在食品医药工业中的应用

[J]. 广州化工, 2010, 38(10): 46- 48.

[92]朱海燕，李卫芬. 壳聚糖对水产动物免疫性能的影响研究进展[J]. 饲料广角, 2012, 21: 43- 44.

[93] Sugamori T, Iwase H, Maeda M, et al. Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(2): 225- 232.

[94]薛伟明，于炜婷，刘袖洞，等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊

方法研究[J].高等学校化学学报, 2004, 25(7): 342- 1346

[95]付加雷，宋长征，张更林. 干扰素-tau微囊的制备工艺优化[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(6): 378- 381.

[96]刘利萍，毛威，贾玉梅，等. 乳化外凝聚法制备姜油树脂海藻酸钠一壳聚糖微囊的工艺优化研究[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(3)：229- 232.

[97]赵亚南，张卫明，钱骅，等. 海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠微胶囊二步法固定化β-葡萄糖苷酶的制备[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6)：253- 257.

[98]王津，李柱来，陈莉敏，等，壳聚糖-海藻酸钠布洛芬缓释微球的制备工艺及性能[J].福建医科大学学报, 2008, 42(1)：56- 59.

[99]梁安莉，吴健敏. 微囊技术在动物医学领域的应用研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息（专论与综述）, 2008, 5: 5- 7.

[100] Joosten P H M, Tiemersma E, Threels A, et al. Oral vaccination of fish against Vibrio anguillarum using alginate microparticles [J]. Fish and Shellfish Immunology, 1997, 7(7): 471- 485.

[101]余俊红， 纪伟尚，徐怀恕. 鲈鱼口服生物胶囊疫苗的研究[J]. 高技术通讯，

2001(3): 15- 18.

[102] RomaldeJL, AsteriaLA, RaveloC, et al. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactoccocosis [J]. Aquaculture, 2004, 236: 119- 129.

[103] IrieT, WataraiS, IwasakiT, et al. Protection against eaperimentai Aeromonas salmonicida infection in carp by oral immunization with bacterial antigen entrapped liposomes [J]. FishShellfish Immunol, 2005, 18: 235- 242.

[104] RamosEA, RelucioJL, Torres VillanuevaCA. Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7: 89- 94.

[105]李新华，沈锦玉，尹文林，等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫

组化研究[J]. 水生生物学报, 2007(1): 125- 130.

[106]张小江，任燕，常藕琴，等. 斜带石斑鱼口服PELA-OmpK微球疫苗的示踪及免疫效果[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 837- 843.

[107]李义，刘永贵，俞泉宇，等. 中华绒螯蟹嗜水气单胞菌微胶囊口服疫苗制备工艺及特性研究[J]. 淡水渔业, 2011, 41(3)：77- 82.

[108] Jones D A, Kurmaly K, Arshard A. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets[J]. Aquaculture,1987,64:133- 146

[109]单晓枫， 钱爱东， 高云航， 等. 微囊技术在水产养殖中的应用[J]. 中国饲料，

2005, 12: 28- 30.

[110] Ottagali L. Total subsititution of microparticules for algae for Penaeus stylirostris larval rearing in New Caledoria[J]. Journalof the world Aquaculture

Society,1991,22:46.

[111] Fernandz-Diaz C, Yufera M. Detecting growth in gilthead seabream(Sparus aurata L), larvae fed microcapsules[J]. Aquaculture, 1997,153:93- 102.

[112] Yufera M, Fernandez-Diaz C, Pascual E. Feeding rates of gilthead seabream (Sparus aurate L), larvae on microcapsules[J]. Acquaculture, 1995, 134: 257- 268.

[113]邓岳松. 鳗鲡仔鱼微型胶囊饵料的初步研究[J]. 水产科学, 2001, 20(5)：8-

10.

[114] Cowey C B, Walton M J. Studies on the uptake of (14C) amino acids derived from both dietary (14C) protein and dietary (14C) amino acids by rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson[ J]. Journal of Fish Biology, 1988, 33: 293- 305.

[115]刘永坚，田丽霞，刘栋辉，等. 实用饲料补充结晶或包膜氨基酸对草鱼生

长、血清游离氨基酸和肌肉蛋白质合成率的影响[ J]. 水产学报, 2002, 26(3)：252-

258.

[116]陈丙爱，冷向军，李小勤，等. 晶体或包膜氨基酸对鲤鱼的作用效果研究

[J]. 水生生物学报, 2008, 32(5): 774- 778.

[117]冷向军，罗运仙，李小勤，等. 饲料中添加晶体或微囊氨基酸对鲤生长性能的影响[J].动物营养学报, 2010, 22(6)：1599- 1606.

[118]牛化欣. 微胶囊氨基酸制备及其在饲料加工和虾养殖中的效果研究[D]. 江南大学博士学位论文, 2011。

[119]张守庆，王宝杰，姜珊，等. 重组抗菌肽海藻酸钠微囊制备与体外释放特征研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(4)：1- 6.

[120] Moriyama S, Yamamoto H, Sugimoto S, et al. Oral administration of recombinant salmon growth hormone to rainbow trout(Oncorhynchus mykiss)[J]. Aquaculture,1993,112:99- 106.

[121]龚露旸，胡鲲，杨先乐. 恩诺沙星壳聚糖纳米粒的制备及其体外释药特性

研究[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 321- 326.

[122]王文辉，王吉桥，程鑫，等. 不同剂型维生素C对黄颡鱼生长和几种免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6)：951- 958.

[123]张志辰，王英，董明盛，等. 壳聚糖-海藻酸钠液芯微胶囊机械强度优化研究[J]. 江苏农业科学，2010(1)：268 - 269, 302.

[124]于炜婷，刘袖洞，李晓霞，等. 壳聚糖溶液pH对载细胞海藻酸钠-壳聚糖微胶囊性能的影响[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(1)：182- 186.

[125]徐连敏，陈改清. 壳聚糖纳米粒的研究进展[J]. 国外医学：药学分册, 2002, 29(6): 329- 332.

[126]付颖丽，雄鹰，于炜婷，等. 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊生物相容性的研究[J]. 自然科学进展, 2002, 2(8)：845- 847.

[127] Roiier S, Covill N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads[J]. Journal of food protection, 2000, 63(2): 202-209.

[128]王勇， 解玉冰， 马小军. 壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展[J]. 生物

工程进展, 1999, 19(2): 13- 16.

[129] Goosen M F A, King G A, Mcknight C A, et al. Animal cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular weight cut- off [J]. Journal of Membrane Science, 1989, 41: 323- 343.

[130] Hari P R, Thomas C, Chandra P S. Chitosan/calcium- alginate beads for oral delivery of insulin[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1996, 59: 1795- 1801.

[131]吴华伟， 支海兵. 小反刍兽疫缓释微囊灭活疫苗的制备及其免疫效果[J].

中国兽医科学, 2010, 40(12): 1248- 1254.

[132]唐文，周凤，姜彪，等. 猪脾脏转移因子壳聚糖-海藻酸钠微囊的制备及其性能[J]. 过程工程学报, 2011, 11(4)：660- 665.

[133] Rodrigues A P, Daniela H, Figueiredo H C P, et al. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating Aeromonas hydrophila designed forﬁsh oral vaccination [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 638- 643.

[134] Hart, S, Wrathmell, A B, Harris, J E, et al. Gut immunology in fish: A review[J]. Dev. Comp. Immunol., 1988, 12: 453- 480.

[135]史秋梅. 罗非鱼出血病病原鉴定及疫苗的研究[J]. 中国兽医科技2000，

30(9): 3- 5.

[136] Challacombe S J, Rahman D, Jeffery H, et al. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oralimmunization with biodegradable microparticles containing antigen[J]. Immunology, 1992, 76: 164- 168.

[137]耿晓修. 鱼类肠型点状气单胞菌口服疫苗微粒的制备及免疫保护效应研究

[D].西南大学硕士学位论文, 2007。

[138]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]. 中国海洋大学硕士学位论文, 2008。

[139]徐怀英，秦卓明，王友令，等. 鸡新城疫壳聚糖微球疫苗的制备及免疫效果研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2)：576- 580.

[140]符华林，唐文，黄平全，等. 猪脾转移因子微囊的制备及其活性检测[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(1)：83- 87.

附录一

缩略语表（按字母顺序排列）

Abbreviationlist (in alphabetical order)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| CIK | Grass carp kidney tissue cell lines | 草鱼肾细胞细胞系 |
| cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid | 互补 DNA |
| CPE | Cytopathic effect | 细胞病变效应 |
| CS | Chitosan | 壳聚糖 |
| DEPC | Diethy pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| dNTP | Deoxyrinediamine triphoshate | 脱氧核糖核苷三磷酸 |
| EB | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| GCRV104 | Grass carp reovirus104 | 草鱼呼肠孤病毒 104 毒株 |
| IgM | Immunoglobulin M | 免疫球蛋白 M |
| Mx | Myxovirus resistant | Mx 抗病毒蛋白 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链式反应 |
| pH | Hydrogen ion concentration | 氢离子浓度指数 |
| RNA | Ribonucleic acid | 核糖核酸 |
| RT-PCR | Reverse Reverse transcription-polymerase  chain reaction | 反转录聚合酶链反应 |
| SA | Sodium alginate | 海藻酸钠 |
| TCID50 | Median tissue culture infective dose | 半数组织培养感染剂量 |
| Tris | Tris (hydroxymethyl) aminomethane | 三（羟甲基）氨基甲烷 |
| β-Actin | β-Actin | β-肌动蛋白 |

附录二

硕士在读期间发表的学术论文

[1] 李瑞伟, 曾令兵, 张辉, 等. 草鱼出血病细胞疫苗微囊制备与体外释放研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(2): 212- 218.

[2] 李瑞伟, 曾令兵, 张辉, 等. 患病大鲵体内摩氏摩根菌的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 已录用.

[3] 周勇, 曾令兵, 李瑞伟, 等. 患病黄额闭壳龟中产酸克雷伯菌的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2012, 42(3): 20 - 25.

致谢

时光荏苒，光阴如梭，三年的研究生生活转眼即逝。回首过往的点点滴滴，有过失败，也有过成功，每一次的经验总结都是我人生中的宝贵财富。首先感谢我的导师曾令兵研究员，从培养方案的制定到论文选题、实验研究以及写作定稿都倾注了老师您的心血与厚爱；在生活上您无微不至的关怀，时常让我感激不已、令我终生难忘！谨在论文完成之际，由衷的感谢老师您对我的辛勤栽培、谆谆教诲与帮助，并致以崇高的敬意！

感谢上海海洋大学水产与生命学院和中国科学研究院长江水产研究所的领导和老师为我提供了先进的实验条件和良好的科研环境。

感谢长江水产研究所鱼病室的罗晓松副研究员、梁勇老师、张辉博士、范玉顶博士、徐进师兄、周勇师兄、肖艺师姐、陈可珍女士等在我生活上以及科研上的无私关怀与支持。

感谢华中农业大学高正勇师兄、李雷师兄、张金凤师姐、苏岚师姐在我学习和生活上的帮助和指导，上海海洋大学叶欢师兄、刘涛师兄对我学业生活上的关心，在此衷心感谢他们的无私帮助，我将铭记在心。

感谢来自上海海洋大学、华中农业大学的同门孙建滨、刘秋风，曹磊、王晓阳等长江所同学，刘文枝、李俊超、杨星、王荣华等师弟师妹在学习和生活中的鼓励、帮助与支持，他们积极的心态以及真诚的品格使我难以忘怀。

感谢在我人生成长道路上所有给与我关心和帮助的老师、同学以及好友。感谢论文评审和答辩委员会的各位专家、教授，感谢您们能在百忙中精心审

阅论文并提出宝贵意见。

感谢我的家人对我学业的支持以及生活上的关心。

李瑞伟

2013年4月武汉