

吴唯维, 李盼, 柯翎, 等. 斑马鱼在鱼类病原免疫学研究中的应用 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (6): 602-607.

WU W-W, LI P, KE L, et al. Application of Zebrafish in the Fish Pathogen Immune Study [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (6): 602-607.

斑马鱼在鱼类病原免疫学研究中的应用

吴唯维^{1,2}, 李 盼^{2,3}, 柯 翎², 李素一², 陈 华², 陈 叙², 林天龙^{2*}, 林晨韬^{2*}

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108; 2. 福建省农业科学院生物技术研究所,
福建 福州 350003; 3. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 斑马鱼全基因组测序已经完成, 建立了多个专门的在线数据库, 作为模式生物在遗传学、发育生物学等领域已得到了广泛的应用。本文介绍了斑马鱼用于鱼类病原免疫学研究的优点, 包括个体发育过程透明、免疫系统较成熟, 具有先天性和获得性 2 种免疫系统; 多种鱼类来源的细菌和病毒在成年斑马鱼和胚胎中都能感染和复制, 使其成为研究鱼类病原的入侵机制和宿主免疫应答的模式生物。同时, 对目前已建立的鱼类细菌和病毒病原斑马鱼感染模型以及在疫苗方面的研究现状作简要概述。

关键词: 斑马鱼; 病原; 免疫; 模式生物

中图分类号: S 942

文献标识码: A

Application of Zebrafish in the Fish Pathogen Immune Study

WU Wei-wei^{1,2}, LI Pan^{2,3}, KE Ling², LI Su-yi², CHEN Hua², CHEN Xu², LIN Tian-long^{2*},
LIN Chen-tao^{2*}

(1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China;
2. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China;
3. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The zebrafish genome sequencing has been completed, and a number of specialized online databases have been established. As a model organism, zebrafish has been widely used in genetics, developmental biology and other fields. The advantages of zebrafish in fish etiology and immunology researches, such as transparent ontogenesis, mature immune system which contained both innate and adaptive immune system, and the supportive capacity for infection and replication of many fish-derived bacteria and viruses in the adults and the embryos; have made it the most popular model organism for studying infectious pathogenesis and immune response of the fish. The established zebrafish infection models and their application on vaccinology of a variety of fish pathogenic bacteria and virus have been overviewed briefly in this report.

Key words: zebrafish; pathogen; immune; model organism

近海养殖业是我国海洋经济的主要组成部分, 近年来发展迅速, 福建省的优势品种鳗鱼和大黄鱼, 在全国的年产值都在一百亿元左右。但随着养殖规模的不断扩大, 养殖密度的不断提高, 病害也日渐增多^[1-2]。当前我国鱼类病害防治仍以化学药物防治为主, 化学药物的频繁使用易引发病原耐药

和药物残留问题, 危害消费者健康。免疫预防是替代化学治疗的有效手段, 但我国的水产养殖品种众多, 养殖条件复杂, 对于养殖鱼类和病原相互作用的免疫学研究才刚刚起步。目前存在的问题主要有养殖的经济鱼类一般体积较大, 成本高, 实验室条件下饲养的数目有限, 另外多数养殖鱼类的基因组

收稿日期: 2014-02-16 初稿; 2014-03-24 修改稿

作者简介: 吴唯维 (1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫学、发育生物学研究

* 通讯作者: 林晨韬 (1979-), 男, 博士, 研究员, 主要从事分子生物学、免疫学研究 (E-mail: linchentao@hotmail.com);

林天龙 (1955-2014), 男, 研究员, 主要从事动物免疫学及水产动物保护学研究

基金项目: 福建省农业科学院引进海外人才项目 (HWRC2011-02); 国家自然科学基金项目 (31300766)

信息不全,无法满足进入到分子生物的免疫学研究的需要。可见实验性动物已经成为制约鱼类病原免疫学发展的瓶颈。

斑马鱼 *Danio rerio* 是一种热带硬骨鱼,鲤科,是被广泛应用的模式生物之一。一百多年前,斑马鱼就已用于胚胎发育的研究,如今已成为发育生物学、遗传学研究的模式生物。斑马鱼在进化上属于脊椎动物,与果蝇和线虫等低等模式生物相比更接近哺乳动物,被用于人类疾病^[3]和造血系统的研究^[4]。斑马鱼全基因组测序已经完成,作为研究得最彻底的硬骨鱼类,具有丰富的遗传和基因组信息,建立了多个专门在线数据库,被视为鳍鱼类病原体研究的典范。国内外一些实验室已建立了鱼类来源的细菌和病毒感染斑马鱼的模型,进行相关免疫学研究^[5]。在模式动物上深入研究病原与鱼类的相互作用,有助于达到防治鱼类病害的目的。

1 斑马鱼用于鱼类病原免疫学研究的优点

第一,斑马鱼具有繁殖能力强、性成熟周期短、个体小、易养殖、体外受精和发育、便于开展大规模研究等诸多特点,与传统的免疫学模式生物——小鼠相比,斑马鱼更易感染鱼类病原,用于鱼类病原免疫研究更具优势。

第二,斑马鱼作为脊椎动物,有较成熟的免疫系统,具有先天性和获得性2种免疫系统^[6]。作为目前科学研究涉及的为数不多的几个鱼类模型,斑马鱼可作为更高等的脊椎动物模型如小鼠和大鼠的补充,且操作更容易。斑马鱼具有和哺乳动物相似的免疫系统,包括各种白细胞种群、炎症介质和信号分子^[7]。斑马鱼有B细胞、T细胞、单核细胞和巨噬细胞,以及至少2种粒细胞^[8]。哺乳动物获得性免疫系统有5种免疫球蛋白包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,斑马鱼已经发现三类已知的免疫球蛋白,分别为IgD、IgM和IgZ,2010年我国邵建忠教授的团队发现一个IgZ样免疫球蛋白,命名为IgZ-2^[9]。

在斑马鱼中已经发现24个toll样受体(TLR),哺乳动物中已发现的9种toll样受体TLR1-9在斑马鱼中都可以找到类似物。在toll样受体信号传导途径中起重要作用的接头蛋白,也已在斑马鱼中得到确定,其中包括TIRAP、MyD88、SARM、TICAM等^[10]。2005年Phelan等用蛇头棒状病毒SHRV(snake head rhabdovirus)感染斑马鱼ZFL细胞,通过real-time PCR检测到

TLR3和下游信号分子TRAF6的表达上调,证明了toll样受体信号传递系统在斑马鱼的先天免疫系统中的重要作用^[11]。

第三,斑马鱼产卵数量众多,且胚胎发育早期是透明的,也为免疫学研究提供了便利。鱼卵受精后,在最初的1~4 d,斑马鱼获得性免疫尚未发育,以先天性免疫为主,幼鱼只依赖先天免疫反应生存;4 d后,T细胞和B细胞才开始发育,而获得性免疫系统在受精4~6周后功能才发育成熟^[12]。斑马鱼免疫系统在发育时间上分离,也为在体内研究脊椎动物先天免疫应答提供了一个合适的系统,而不受获得性免疫系统的干扰^[13],可见斑马鱼也是用于先天性和获得性免疫研究的极好模式生物。同时,透明的胚胎也使得斑马鱼可以用于病原感染的实时分析。

最后,多种鱼类来源的细菌和病毒在成年斑马鱼和胚胎中都能感染和复制,有利于进行各种鱼类病原的免疫研究^[5,13]。用鱼类病原建立斑马鱼的感染模型,还可用于一些毒力突变株的鉴定。目前已建立了部分鱼类病原感染斑马鱼的模型,这些感染模型的使用,使人们能够洞察鱼类免疫系统的作用和发育,以及病原体和宿主之间的反应^[5],为相应的病原疫苗研究和疾病防御打下基础。

2 斑马鱼在病原学研究中的应用

近年来,国内外科学家已经开始利用斑马鱼为模式生物来研究鱼类病原体的感染机制以及宿主机体的免疫反应。目前已建立了多种鱼类病原的斑马鱼感染模型,包括细菌感染模型和病毒感染模型。

2.1 细菌性病原对斑马鱼的感染模型

多种对鱼类致病的细菌已被用来感染斑马鱼。运用经过荧光蛋白标记的细菌来构建的斑马鱼感染模型可更好地观测感染进程,认识感染的首发部位,进一步了解细菌感染宿主的路径。鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)可以感染许多鱼类,并引起弧菌病,是造成严重的出血性败血病的主要病因。Ronan T等用绿色荧光蛋白GFP标记的鳗弧菌,分别用高浓度 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 及低浓度的 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的鳗弧菌浸泡,均可感染斑马鱼幼体,并用共聚焦显微镜进行感染的实时监测,发现感染症状的首发部位为斑马鱼的胃肠道和皮肤^[14]。2011年王雪鹏等构建了GFP标记的迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*),采用腹腔注射和浸泡感染斑马鱼,证明了肠道、鳃和皮肤可能是迟缓爱德华菌感染斑马鱼的主要途径^[15]。

细菌感染斑马鱼模型还用于研究宿主的炎症反应, 检测免疫相关基因的表达, 在细胞和分子水平上对宿主的免疫防御系统进行更深入的分析和研究, 可以为疫苗的研发奠定基础。2005 年 Pressley ME 等^[16]在斑马鱼上进行了迟缓爱德华菌感染试验发现, 胚胎对于浸泡更加敏感, 而成鱼对于腹腔注射更易感, 斑马鱼被感染后炎性细胞因子反应显示白细胞介素-1b (IL-1b) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 的 mRNA 的表达水平有所提高。海豚链球菌是鱼类一种重要的病原, Neely M N 等^[17]在 2002 年建立了其斑马鱼感染模型, 以半致死量 10^3 CFU 注射到背部肌肉, 斑马鱼就会出现致死性的感染, 其特点是入侵的病原体由初始坏死病变, 迅速进入所有主要器官系统, 包括大脑。2007 年 Lin B 等^[18]研究了斑马鱼对杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida* 的免疫应答, 经过创伤浸泡 12 h 后, 斑马鱼出现明显不适症状, 包括无规律游泳或游泳异常与呼吸率增加, 24~30 h 后死亡。通过 real-time PCR 检测发现, 细菌感染后可诱导 IL-1、纤维蛋白原、触珠蛋白、补体成分和铁调素等基因表达, 都和急性期蛋白 (APPS) 密切相关, 他们还发现了一种新的急性期蛋白 LECT2 在感染后上调了 1 000 倍, 提示其在抗杀鲑气单胞菌感染中的重要作用。

建立的细菌感染斑马鱼模型还有用于鉴定不同细菌种属间在毒力上的差别, 如 Moyer T R 等^[19]建立 2 种黄杆菌 *Flavobacterium columnare* 和 *Flavobacterium johnsoniae* 对斑马鱼的感染模型, 发现 *F. johnsoniae* 对斑马鱼并不是有效的病原, 注射感染时 LD₅₀ 为 3×10^{10} CFU, 而 *F. columnare* 则是有效的病原体, 其 LD₅₀ 为 3.2×10^6 CFU, 二者的差别高达 10 000 倍。柱状黄杆菌对大多数的鱼种都是严重病原, 而 *F. johnsoniae* 只是某些鱼类的条件致病菌, 该研究指出他们种属间的毒力差异可能是主要原因。斑马鱼模型也被应用到病原菌的减毒疫苗的研究上。

2.2 病毒性病原对斑马鱼的感染模型

斑马鱼作为模式动物也被用于鱼类病毒性病原的研究。迄今为止, 大多数感染养殖鱼类的病毒都在斑马鱼模型上进行过相关研究^[13]。建立斑马鱼鱼类病毒感染模型, 分析病毒的易感细胞、入侵损伤的组织, 在体内系统地了解病毒疾病发展的进程。2000 年 LaPatra 等用传染性造血组织坏死病毒 (rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 和传染性胰腺坏死病毒

(birnavirus infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 感染斑马鱼的造血前体细胞^[20], 用病毒上清液感染全鱼, 2 种病毒都可以在斑马鱼中复制, 表明病毒的宿主范围包括斑马鱼。在养殖鱼类中, IHNV 和 IPNV 病毒感染往往导致头肾 (造血的主要部位) 的组织坏死, 造成严重死亡, 但斑马鱼中的症状较轻, 可在感染 6 d 后痊愈。斑马鱼也易受另一种鱼类弹状病毒——鲤春病毒 (spring viremia of carp virus, SVCV) 的感染, Sanders 等^[21]的研究表明, 在较低温度时死亡率可超过 50%, 病鱼表现出表皮点状出血后死亡, 病理组织学研究表明在鳃、肝脏和肾脏有巨噬细胞的增殖。

建立的鱼类病毒感染斑马鱼模型, 可以模拟病毒在养殖鱼类的发病症状, 也被广泛应用于病毒感染前后免疫相关基因的差异表达分析、免疫细胞功能研究, 为鱼类病毒病的防治提供理论基础。研究人员对水产上常见的病毒性出血败血症病毒 (viral haemorrhagic septicemia virus, VHSV) 建立了斑马鱼浸泡感染模型, 模拟天然感染状态, 并通过双向电泳、定量 PCR 以及基因芯片技术分析了感染相关的免疫基因, 发现补体成分 (C3B, C8 和 C9), I 类组织相容性抗原 (MHC 1) 如分泌型免疫球蛋白结构域 (SID4), 巨噬细胞刺激因子 (MST1) 和簇分化抗原 (CD36) 等表达上调^[22]。

当前在斑马鱼中的鱼类病毒感染模型, 表明先天免疫系统似乎在抵抗病毒感染中起到更关键的作用。比如 Toll 样受体在蛇头棒状病毒 SHRV 感染斑马鱼中的作用, 是通过 TLR3 识别病毒双链 RNA, 起到免疫防御的功能^[11]。而更多的研究关注的是干扰素在斑马鱼抵抗病毒感染中起到的重要作用。López-Muñoz 等发现, 斑马鱼幼鱼缺乏对鲤春病毒 (SVCV) 保护性的抗病毒反应^[23], 斑马鱼幼鱼虽然具有可诱导表达的 I 型和 II 型干扰素的 cDNA, 但在成鱼中可以起到抗病毒作用的干扰素系统在幼鱼中似乎还不太成熟。神经坏死病毒 (Nervous necrosis virus, NNV) 是一个小分子 RNA 病毒, 对全球海水养殖影响较大, Lu 等^[24]建立的感染模型表明干扰素反应参与了神经坏死病毒的急性和持续感染。RT-PCR 和免疫印迹检测显示, 在幼鱼中的急性感染主要是由于无效的干扰素反应, 而成鱼中持续性感染过程和激活先天免疫反应有关。不同病毒对于斑马鱼的干扰素系统的激活能力不同。蛇头棒状病毒 (Snakehead rhabdovirus, SHRV) 感染斑马鱼的临床表现包括点状出血、腹部红肿和不稳定的游泳行为。研究表

明, 胚胎浸泡 SHRV 的半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀/mL) 为 10^6 , 呈现出的累积死亡率 (CPM) 为 55%; 成年斑马鱼腹腔注射 SHRV 的 TCID₅₀/mL 为 10^5 , CPM 为 70%。采用 Real-time PCR 对免疫相关分子检测表明, 病毒感染后干扰素和抗病毒蛋白 Mx 增加最为明显, 表达量增加 10 倍以上^[25]。

3 斑马鱼在鱼类疫苗研究中的应用

我国水产养殖的品种众多, 养殖条件相对简陋, 面临来自细菌、病毒以及寄生虫等众多病原的威胁。针对我国特有的经济鱼类的全基因组测序工作, 目前只在少数鱼种中开展, 对众多的基因功能的解读还需时日, 很大程度上限制了鱼类疫苗的应用。随着斑马鱼在鱼类病原感染模型的建立, 已经为一些重要的经济鱼类的疫苗及预防措施的发展提供了重要线索^[5]。人们对鱼类病原和宿主间相互作用的研究逐步深入, 越来越多的免疫相关基因的功能被揭示, 斑马鱼免疫系统在抵抗病原入侵中发挥的作用也逐步明朗, 鱼类疫苗在斑马鱼上的试验也逐步展开。由于斑马鱼体积小, 繁殖迅速, 在实验室条件下饲养简便, 成本低, 将其作为鱼类疫苗的实验动物, 采集的数据更加准确可靠, 可以更好地解释鱼类疫苗的作用机理。

2006 年 Novoa B^[26] 等证明斑马鱼接种了病毒性出血败血症病毒 VHSV 减毒活疫苗后出现了有效的抗病毒免疫反应, 使用疫苗后的存活率为 20%~60%, 首次证明了斑马鱼可以作为病毒疫苗的接种模型。

斑马鱼在鱼类细菌疫苗上的应用以减毒活疫苗为主。海鱼分支杆菌 *Mycobacterium marinum* 可

以感染多种淡海水鱼类, 2010 年 Z Cui 等^[27] 用无法在巨噬细胞中复制的海鱼分支杆菌突变株 L1D 作为减毒活疫苗, 以斑马鱼为动物模型来研究疫苗的效果, 发现对照组 PBS、分枝杆菌胞外培养滤液蛋白组以及热灭活分枝杆菌组在 60 d 的生存试验中存活率只有 0%~20%, 而海鱼分支杆菌突变株 L1D 作为减毒活疫苗组的存活率高达 70%。2011 年华东理工大学的 Xiao J 等^[28] 在斑马鱼上进行了迟缓爱德华菌减毒活疫苗试验, 斑马鱼模型被用于肌肉注射法检测突变体的致病力, 发现 14 个缺失突变体能够显著降低死亡率, 其中一个多位点的突变体表现出低毒性, 其对斑马鱼模型最高的免疫保护率 RPS 为 81%。当斑马鱼通过注射接种迟缓爱德华菌减毒活疫苗, 免疫相关基因包括 IgM 和 MHC II 类分子的表达上调。Zheng Y 等^[29] 在鳗弧菌中表达来自迟缓爱德华氏菌的保护性抗原 GAPDH, 建立了鳗弧菌减毒活疫苗, 该多价载体疫苗在斑马鱼中对鳗弧菌的免疫保护率为 85%, 而对爱德华氏菌免疫保护率为 70%。

斑马鱼还是鱼类 DNA 疫苗研究的模式动物。2009 年台湾学者 Shih-Bin Lin 等^[30] 将含有抗菌肽 epinecidin-1 的 DNA 质粒电转到斑马鱼肌肉, 可以引起斑马鱼的免疫反应, 抑制创伤弧菌的生长, 为创伤弧菌 DNA 疫苗的研究提供了参考。笔者所在实验室开展了嗜水气单胞菌 DNA 疫苗在斑马鱼模型中的相关研究, 构建了嗜水气单胞菌溶血素 PCB、外膜蛋白 MOMP^[31]、粘附素 ZAPB, pcDNA3 的真核表达载体, 将 DNA 疫苗的肌肉注射免疫斑马鱼, 对嗜水气单胞菌攻毒有一定的免疫保护力。

表 1 已报道的斑马鱼在鱼类疫苗研究中的应用

Table 1 Reported fish vaccine researches in zebrafish

病原	疫苗种类	报道时间	参考文献
病毒性出血败血症病毒 VHSV	减毒活疫苗	2006 年	[26]
海鱼分支杆菌 <i>Mycobacterium marinum</i>	减毒活疫苗	2010 年	[27]
迟缓爱德华菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	减毒活疫苗	2011 年	[28]
鳗弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	减毒活疫苗	2012 年	[29]
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	DNA 疫苗	2009 年	[30]

4 展望

虽然斑马鱼免疫系统的研究还没有小鼠等哺乳

动物深入, 但是来自养殖鱼类的病原对斑马鱼的适应度要比小鼠等陆生动物高得多, 目前大部分对养殖鱼类造成严重损失的细菌和病毒都可以感染斑马

鱼。斑马鱼对养殖条件要求不高,繁殖能力强,每对斑马鱼一周可产上百颗卵,生长周期短,相比体型较大的经济养殖鱼类,在鱼类病原疫苗的研究上可以节约成本,可用于细菌突变株的大规模筛选,在筛选鱼类病原的减毒活疫苗方面已经有所应用。同时,斑马鱼的鱼卵及幼鱼发育期是透明的,可进行鱼类病原感染的实时观测,有助于认识病原的入侵途径。斑马鱼作为模式动物已经有数十年的历史,其遗传背景清楚,最先进的分子生物学技术在斑马鱼上都有大量的应用,包括基因芯片、新一代的测序技术、转基因及基因沉默技术等等,可为阐述相关免疫基因在抵抗病原入侵方面的功能提供便利,是用于鱼类病原免疫学研究的合适模式生物。

尽管已经建立了多种鱼类病原-斑马鱼感染模型,主要以研究细菌和病毒的感染途径和免疫相关的基因表达为主,但多数模型还不够成熟,在鱼类疾病的防治、疫苗的开发上还需深入研究。斑马鱼的全基因组测序已经完成,有多个专门的遗传学、基因组和发育学信息的在线数据库,随着人们对斑马鱼认识的日趋深入,以其为模式生物进行鱼类病原学的研究必将为探索鱼类的免疫机制、疫苗的开发提供便利。

参考文献:

- [1] 刘家富,韩坤煌.我国大黄鱼产业的发展现状与对策[J].福建水产,2011,33(5):4-8.
- [2] 李书民,谭洪新,孙生智.中国鳗鱼产业发展困局及纾困对策[J].中国渔业经济,2012,31(1):24-28.
- [3] PENBERTHY W T, SHAFIZADEH E, LIN S. The zebrafish as a model for human disease [J]. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 2002, 7: 1439-1453.
- [4] 程烽,陈竺.斑马鱼:一种造血系统的遗传学研究模型动物[J].国外医学:输血及血液学分册,2004,27(3):200-202.
- [5] SULLIVAN C, KIM C H. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25 (4): 341-350.
- [6] NIKOLAUS S T, DAVID M L, DAVID T, et al. The Use of Zebrafish to Understand Immunity [J]. *Immunity*, 2004, 20 (4): 367-379.
- [7] CRIM M J, RILEY L K. Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown [J]. *ILAR J*, 2012, 53 (2): 135-143.
- [8] PHELPS H A, NEELY M N. Evolution of the zebrafish model: from development to immunity and infectious disease [J]. *Zebrafish*, 2005, 2 (2): 87-103.
- [9] HU Y L, XIANG L X, SHAO J Z. Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47 (4): 738-746.
- [10] MEIJER A H, GABBY K S, MEDINA R, et al. Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish [J]. *Mol Immunol*, 2004, 40 (11): 773-783.
- [11] PHELAN P E, MELLON M T, KIM C H. Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42 (9): 1057-1071.
- [12] DANIOVA N, HOHMAN V S, SACHER F, et al. T cells and the thymus in developing zebrafish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28 (7-8): 755-767.
- [13] NOVOA B, FIGUERAS A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946: 253-275.
- [14] O'TOOLE R, VON H J, ROSQVIST R, et al. Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum* [J]. *Microb Pathog*, 2004, 37 (1): 41-46.
- [15] 王雪鹏,丁雷,邹兰柱,等.应用绿色荧光蛋白标记迟缓爱德华菌感染斑马鱼[J].中国实验动物学报,2011,19(5):433-436.
- [16] PRESSLEY M E, PHELAN P E, WITTEN P E, et al. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2005, 29 (6): 501-513.
- [17] NEELY M N, PFEIFER J D, CAPARON M. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis [J]. *Infect Immun*, 2002, 70 (7): 3904-3914.
- [18] BIN L, SHANGWU C, ZHEN C, et al. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44 (4): 295-301.
- [19] MOYER T R, HUNNICKUTT D W. Susceptibility of zebrafish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 76: 39-44.
- [20] LAPATRA S E, BARONE L, JONES G R, et al. Effects of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus infection on hematopoietic precursors of the zebrafish [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2000, 26 (5): 445-452.
- [21] SANDERS G E, BATTES W N, WINTON J R. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus [J]. *Comp Med*, 2003, 53 (5): 514-521.
- [22] ENCINAS P, RODRIGUEZ-MILLA M A, NOVOA B, et al. Zebrafish fin immune responses during high mortality infections with viral hemorrhagic septicemia rhabdovirus. A proteomic and transcriptomic approach [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 518.
- [23] LOPEZ-MUNOZ A, ROCA F J, SEPULCRE M P, et al. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus [J]. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34 (5): 546-552.

- [24] MING-WEI L, YUNG-MEI C, TZ-CHUN G, et al. The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45 (4): 1146–1152.
- [25] PHELAN P E, PRESSLEY M E, WITTEN P E, et al. Characterization of snakehead rhabdovirus infection in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of virology*, 2005, 79 (3): 1842–1852.
- [26] NOVOA B, ROMERO A, MULERO V, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) [J]. *Vaccine*, 2006, (24): 5806–5816.
- [27] CUI Z, SAMUEL-SAKER D, WATRAL V, et al. Attenuated *Mycobacterium marinum* protects zebrafish against mycobacteriosis [J]. *J Fish Dis*, 2010, 33 (4): 371–375.
- [28] XIAO J, CHEN T, WANG Q, et al. Search for live attenuated vaccine candidate against edwardsiellosis by mutating virulence-related genes of fish pathogen *Edwardsiella tarda* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53 (4): 430–437.
- [29] ZHENG Y, XIAO Y, WU H, et al. Different approaches to expressing *Edwardsiella tarda* antigen GAPDH in attenuated *Vibrio anguillarum* for multivalent fish vaccines [J]. *J Fish Dis*, 2012, 35 (8): 569–577.
- [30] LIN S B, FAN T W, WU J L, et al. Immune response and inhibition of bacterial growth by electrotransfer of plasmid DNA containing the antimicrobial peptide, epinecidin-1, into zebrafish muscle [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26 (3): 451–458.
- [31] 李盼, 李素一, 吴唯维, 等. 嗜水气单胞菌外膜蛋白基因DNA疫苗载体的构建及分析 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (9): 844–848.

(责任编辑: 张 梅)