

# 中华鳖气单胞菌菌细胞苗和菌化学成份疫苗研制

叶巧真 何建国 翁少萍 邱德全

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

张邦杰 叶普仁 梁仁杰 潘 雷 王晓斌 李本旺 李春枝

(广东省东莞市水产研究所, 511700)

**摘 要** 利用分离自中华鳖的嗜水气单胞菌 Ah961004、Ah970516 与温和气单胞菌 As970510 菌体及其上清制备来活菌细胞苗和化学成份疫苗。肌肉注射中华鳖进行免疫, 加强免疫 15d 后, 用菌株 Ah961004 腹腔注射进行攻击, 观察 20d。结果表明, 温和气单胞菌 As970510 株的菌苗及其胞外分泌物(ECP) 苗组和嗜水气单胞菌 Ah961004 株的外膜成份组对嗜水气单胞菌的攻击的保护率最高, 分别为 87.5% 和 75%, 而其它疫苗组的保护率均在 50% 以下。

**关键词** 中华鳖, 嗜水气单胞菌, 温和气单胞菌, 疫苗

## Preparation of inactivated whole—cell and cell chemical components of *Aeromonas* from *Trinix sinensis*

Ye Qiaozhen, He Jianguo, Weng Shaoping, Qiu Dequan

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Zhang Bangjie, Ye Puren, Liang Renjie, Pan Lei, Wang Xiaobin, Li Benwang, Li chunzhi

(Dongguan Fisheries Research Institute of Guangdong Province, 511700)

**ABSTRACT** Inactivated whole—cell and cell chemical components were prepared with *Aeromonas hydrophila* Ah961004, Ah960916, Ah970516 and *A. sobria* As970510, Soft shell turtles, *Trinix sinensis*, were immunized via intramuscular route, after 15d booster doses, challenged with strain Ah961004 intraperitoneally and observed for 20d. The results showed that the group of *A. sobria* As970510 inactivated whole—cell with its extracellular products and the group of *A. hydrophila* Ah961004 outer membrane components had highly protection against strain Ah961004, with the protection rate 87.5% and 75% respectively, the other groups were lower than 50%.

**KEYWORDS** *Trinix sinensis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, vaccine

嗜温气单胞菌严重威胁鳖养殖业的发展。在我们所归纳的 25 种称谓的细菌和病毒所致鳖病中<sup>[1]</sup>, 气单胞菌引起的鳖病占了相当大的一部分, 达 15 种之多。鳖嗜水气单胞菌来活全菌苗已有不少报道<sup>[2~6]</sup>, 但由于气单胞菌血清型众多, 使这些疫苗的使用范围受到限制。我们从患红底板病和白底板病中华鳖中分离出毒性强弱不一的三株嗜水气单胞菌和一株温和气单胞菌, 以其菌体及上清液制备来活菌细胞苗和化学成份疫苗, 分组混合, 以最毒株进行攻毒, 以期寻找最佳的疫苗组合, 研制有效防治此两种病菌所引起的疾病的疫苗。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:嗜水气单胞菌 Ah961004、Ah960916、Ah970516 和温和气单胞菌 As970510 分离自患红底板和白底板病中华鳖,由中山大学生命科学学院生物水生经济动物繁殖、营养与病害控制国家专业实验室保存。

供试中华鳖:体重 100g 左右,由广东省东莞市水产研究所提供。

供试小白鼠:体重 20g 左右,由中山大学生命科学学院药理系提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株培养

菌株接种于合成培养基,28℃培养 24~36h。

#### 1.2.2 半致死量(LD<sub>50</sub>)测定

参照文献[7]LD<sub>50</sub>的点斜算法进行。

健康中华鳖 25 只,平均分成 5 组,4 组注射浓度为  $6.0 \times 10^8$  个/mL 菌的 Ah961004 菌液及其倍比稀释液 0.5mL,其余注射 PBS 作为对照,观察 10d,记录结果。

#### 1.2.3 全菌苗、化学成份疫苗制备

菌体灭活:10 000 r/min 离心 20min 收集菌体,PBS 洗下菌体制成  $10^{10}$  个/mL 菌悬液。加入终浓度为 1% 的甲醛溶液,32℃振摇 48h、4℃静置 20d 以完全灭活菌体。培养观察菌体灭活程度,进行安全性试验。

菌外膜成份制备及脱毒:10 000 r/min 离心 20min 收集菌体,PBS 洗下菌体制成  $10^{10}$  个/mL 菌悬液。超声波破碎 1h,间隔 1min。12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀用同体积 PBS 洗下。加入终浓度为 0.5% 的甲醛溶液,32℃振摇 24h、4℃静置 10d 脱毒。进行安全性试验。

菌外分泌物(ECP)制备及脱毒:10 000 r/min 离心 20min 取上清,测定 OD<sub>280</sub>,以估算外分泌蛋白含量。用硫酸铵沉淀法沉淀上清蛋白成分,12 000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀溶于 PBS 中,4℃透析 48h,再用 PEG8000 浓缩,测定 OD<sub>280</sub>。加入终浓度为 0.5% 的甲醛溶液,32℃振摇 24h、4℃静置 10d 脱毒。进行安全性试验。

菌细胞苗、化学成份疫苗的配制:把以上制备好了的灭活菌体、脱毒菌化学成份依表 1 分组混合,在表中各组成份中,再加入终浓度为 1/10 000 的硫柳汞、20% 的 Al(OH)<sub>3</sub>。在无菌条件下进行分装、封口,于 4℃保存备用。

#### 1.2.4 安全性试验

小白鼠安全试验:以一定量疫苗腹腔注射 20g 左右小白鼠,每组 5 只。观察两周。

中华鳖安全试验:根据小白鼠反应情况,酌量肌肉注射 100g 左右中华鳖,每组 8 只,观察两周。

#### 1.2.5 免疫保护试验

0.2mL 疫苗肌肉注射 100g 左右中华鳖,每组 8 只,对照组鳖注射 0.2mL PBS。初次免疫后 15d 同等剂量加强免疫,再 15d 后进行腹腔注射攻毒,观察 20d。

## 2 结果

### 2.1 LD<sub>50</sub>测定试验结果

按 LD<sub>50</sub>的点斜算法计算出菌株 Ah961004 的 LD<sub>50</sub>为  $8.0 \times 10^5$  个/g 菌,95%可信限为  $1.2 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^5$  个/g 菌。

## 2.2 全菌苗、菌化学成份疫苗

### 2.2.1 疫苗检定

各组疫苗菌体含量约为  $10^{10}$  个/mL 菌, 蛋白含量为 0.3~0.6mg/mL。接种营养琼脂平板未观察到有菌生长; 安全性试验组小白鼠和中华鳖全部存活。

### 2.2.2 免疫保护实验

加强免疫后 15d 进行攻毒, 腹腔注射 Ah961004 嗜水气单胞菌  $4 \times 10^9$  个/只菌 (50 倍  $LD_{50}$ )。各组免疫保护结果见表 2, 分组情况与表 1 相同。

表 1 灭活菌体和脱毒菌化学成份的分组混合 (mL)

	A	B	C	D	E	F	G
Ah961004 ECP 苗	10	5	5	5	5	5	
Ah961004 外膜成份			5				
Ah961004 菌细胞苗		5		2	5	2.5	
Ah960916 ECP 苗				2.5			
Ah960916 菌细胞苗				5			
As970510 ECP 苗						5	
As970510 菌细胞苗						5	
Ah970516 菌细胞苗							10 10

表 2 全菌苗、菌化学成份疫苗免疫保护试验

Tab.2 Protection of whole-cell and cell chemical component vaccine

	对照组	A	B	C	D	E	F	G
试验数(只)	8	8	8	8	8	8	8	8
存活数(只)	0	0	3	6	0	7	4	0
保护率(%)	0	0	37.5	75	0	87.5	50	0

从表 2 的结果可知: E 组(含 Ah961004 ECP 苗、菌苗; As970510 ECP 苗、菌苗)保护率最高, 达 87.5%; C 组(含 Ah961004 ECP 苗、外膜成份)次之, 达 75%; F 组(含 Ah961004 ECP 苗、菌苗和 Ah970516 菌苗)和 B 组(含 Ah961004 ECP 苗和菌苗)分别为 50% 和 37.5%; A 组(含 Ah961004 ECP 苗)、D 组(含 Ah961004 ECP 苗、菌苗少量; Ah960916 少量 ECP 苗、菌苗)和 G 组(含 Ah970516 菌苗)对 Ah961004 菌均无保护作用。表明嗜水气单胞菌 Ah961004 的 ECP 苗、嗜水气单胞菌 Ah960916 菌苗和 ECP 苗、嗜水气单胞菌 Ah970516 菌苗对嗜水气单胞菌 Ah961004 的攻击无保护作用, Ah961004 菌苗对自身菌的攻击保护效果甚微, 而温和气单胞菌 As970510 ECP 苗和菌苗则有较强的保护。

## 3 讨论

### 3.1 灭活菌苗

到目前为止, 商品化的鱼用疫苗大多为灭活菌苗, 主要是针对鲑科鱼的疖疮病、弧菌病及 ERM 等 3 种主要细菌病。对于嗜温气单胞菌的研究也多用此法, 且效果很好, 保护率均在 80% 以上, 有些甚至达 100%<sup>[2,4-6,8-11]</sup>。但是, 我们的研究结果并不令人满意, 菌细胞苗的免疫保护率只有 37.5%, 虽然选用了较为温和的方法以避免其抗原性的过多损失。菌苗的灭活条件是影响菌苗质量的一个重要因素, 通常采用 0.5%~1.0% 甲醛溶液, 63℃ 灭活细菌。较为温和的条件更有利于保持菌苗的抗原性<sup>[3,10,11]</sup>。据报道, 在菌浓度为  $10^8 \sim 10^{10}$  个/mL 菌, 0.2% 甲醛溶液时, 37℃ 灭活时间为 24~72h<sup>[2,3,5,11]</sup>, 而我们此株嗜水气单胞菌在菌浓度为  $10^{10}$  个/mL 菌、甲醛溶液浓度高达 1% 时, 37℃ 至少需 72h 才能灭活完全, 而 4℃ 则需 20d 左右。

虽然气单胞菌灭活菌苗具有安全性好、制造容易及有不少成功免疫的报道, 但是我们此株嗜水气单胞菌的灭活菌苗对鳖的免疫效果显然是不理想的, 而且由于随着不同的地理环境、不同的宿主, 嗜温气单胞菌的血清型有很大的变化, 限制了其有效的使用范围, 妨碍了此菌的商品化生产, 因此寻求嗜温气单胞菌的共同保护性抗原, 是此菌疫苗成为商品化的突破点。

### 3.2 化学成份疫苗

用化学方法提取菌体及其胞外分泌物(ECP)有效成份而制成, 对于胞外有毒成份则需灭活方可使

用。菌体保护性有效成份有脂多糖也称内毒素(LPS)、菌毛、S-层蛋白、外膜蛋白及多种胞外分泌物,对于致病菌株来说此类物质大多在菌体的致病过程中起着一定的作用,而主要的在不同的菌种中存在有共同的抗原成份。

在气单胞菌中,数杀鲑气单胞菌疫苗的研究最为深入:对LPS、S-层蛋白、外膜蛋白、ECP、胞外蛋白酶的免疫效果均有所研究<sup>[12-17]</sup>,其中对外膜蛋白的研究最令人鼓舞:杀鲑气单胞菌在双嗜噬存在下生长,可诱导产生分子量为82、77、72、70kD的铁调节外膜蛋白,这些蛋白作为疫苗具有很强的保护性;纯化外膜蛋白的浸泡免疫比全菌苗更为有效,这些研究表明外膜蛋白是很有希望的保护性抗原。

陈月英等试验比较了嗜水气单胞菌全菌苗、菌细胞苗和ECP苗对鲫的免疫效果<sup>[10]</sup>,以全菌苗最佳,全菌苗免疫腹腔注射和浸泡免疫保护率分别为80%和66.7%,ECP苗腹腔注射效果与菌细胞苗相近,而浸泡免疫效果则优于菌细胞苗,嗜水气单胞菌LPS苗腹腔注射免疫保护率最高,可达100%。

研究结果表明,A组单独注射菌株Ah961004 ECP苗没有保护作用,但ECP苗和外膜成份混和的C组免疫保护率达75%,进一步证实了嗜水气单胞菌外膜成份有一定的免疫保护效果;免疫保护率最高(87.5%)的E组(Ah961004菌苗及其ECP苗+As970510菌苗及其ECP苗)与保护率为37.5%的B组(Ah961004菌苗及其ECP苗)相比,增加了温和气单胞菌As970510的菌苗和ECP苗,说明As970510菌株的菌苗抑或ECP对嗜水气单胞菌Ah961004的攻击有交叉保护作用,而Ah961004的菌苗与ECP苗对自身的保护性则甚微。

邱德全<sup>[18]</sup>试验证明鳖嗜水气单胞菌分子量为100kD和24kD的外膜蛋白及分子量51.9kD和38kD的ECP是潜在的保护性抗原,其中51.9kD的ECP的一种外毒素。Merino等<sup>[19]</sup>研究发现,嗜温气单胞菌普遍存在的一种外膜蛋白(通道蛋白II)可激活补体经典途径,从而使补体能行使对异物的杀伤功能。

## 参 考 文 献

- 1 叶巧真. 中华鳖白底板病和红底板病原的研究. 广州: 中山大. 博士学位论文, 1999
- 2 孙玉华. 鳖嗜水气单胞菌疫苗的研制. 上海水产大学学报, 1998, 7(1): 75~78
- 3 杨先乐, 周建光, 艾晓辉等. 中华鳖嗜水气单胞菌灭活方法的研究. 华中农业大学学报, 1988, 17(4): 389~393
- 4 杨 臣. 甲鱼嗜水气单胞菌病灭活菌苗的研究. 水产科技情报, 1990, (4): 111~113
- 5 程天印, 鞠长增, 王小君等. 鳖用二联苗的研制初报. 信阳师范学院学报, 1994, 7(4): 414~416
- 6 虞蕴如, 徐福南, 凌天慧等. 中华鳖出血性败血症病原体的分离鉴定与防治. 中国兽医科技, 1992, 22(10): 25~26
- 7 孙瑞元. 定量药理学. 北京: 人民卫生出版社. 1987, 184~197
- 8 安利国, 傅榕恕, 邢维贤等. 鲁鲤鳞病病原及其疫苗的研究. 水产学报, 1998, 22(2): 136~142
- 9 孙建和, 陆承平. 嗜水气单胞菌疫苗的研制. 畜牧与兽医, 1995, 27(5): 202~205
- 10 陈月英, 钱 冬, 沈智华等. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术. 水产学报, 1996, 20(2): 125~131
- 11 廖伏初, 黄向荣, 汤江山等. 爆发鱼病菌苗的灭活条件及免疫效果的研究. 内陆水产, 1996, (6): 4~6
- 12 Ellis A E, Burrows A S, Hastings T S et al. Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular proteases as a protective antigen against furunculosis by passive immunization. *Aquac*, 1988, 70(3): 207~218
- 13 Hastings T S, Ellis A E. The humoral immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. *J Fish Dis*, 1988, 11(2): 147~160
- 14 Hirst I D, Ellis A E. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, 4(1): 29~45
- 15 Lund V, Jørgensen J, Holm K O, Eggset G. Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*. *J Fish Dis*, 1991, 14(4): 443~452
- 16 Lutwyche P, Exner P W, Hancock R E W, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infect Immun*, 1995, 63(8): 3137~3142
- 17 Rodgers C J. Immersion vaccination for control of fish furunculosis. *Dis Aquat Org*, 1990, 8(1): 69~72
- 18 邱德全. 嗜水性气单胞菌的致病性研究. 广州中山大学. 博士学位论文, 1997
- 19 Merino S, Nogueras M M, Aguilar A, et al. Activation of the complement classical pathway (C1q binding) by mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein. *Immun*, 1998, 66(8): 3825~3831