

文章编号:1000-0615(2007)03-0374-05

嗜水气单胞菌重组 β -hemA-ISCOMs 对鳗鲡的浸泡免疫效果

吴宗福¹, 龚 晖^{1,2}, 陈红燕¹, 杨金先¹, 刘晓东¹, 林天龙¹

(1.福建省农业科学院生物技术研究所,福建 福州 350003;

2.上海水产大学农业部渔业动植物病原库,上海 200090)

摘要:应用嗜水气单胞菌 β -hemA 重组菌表达产物作为抗原,制备成免疫刺激复合物(β -hemA-ISCOMs),通过浸泡途径免疫鳗鲡,测定免疫鱼细胞和抗体应答水平和免疫效力。试验结果表明:(1) β -hemA-ISCOMs 在电镜下呈笼格状颗粒,直径约 40 nm;(2)一免后第 44 天, β -hemA-ISCOMs 免疫组淋巴细胞转化率显著高于非 β -hemA-ISCOMs 免疫组($P < 0.05$);(3)免疫浓度在 30 ~ 120 mg·L⁻¹时, β -hemA-ISCOMs 免疫组血清抗体效价与浓度正相关,且显著高于 ISM1312 佐剂组与无佐剂组($P < 0.05$);(4)免疫浓度在 30 ~ 120 mg·L⁻¹时, β -hemA-ISCOMs 免疫组存活率与免疫接种剂量正相关,在同等剂量下, β -hemA-ISCOMs 免疫组的存活率高于其它组。因此 β -hemA-ISCOMs 浸泡免疫可诱导宿主产生细胞与抗体介导的免疫应答,产生保护性免疫,ISCOMs 技术适用于制备浸泡型渔用疫苗。

关键词:鳗鲡;嗜水气单胞菌;溶血素;免疫刺激复合物;浸泡免疫;淋巴细胞;抗体

中图分类号:S 942.5 **文献标识码:**A

Immune effects of the eel after immersed with ISCOMs containing recombinant β -hemA of *Aeromonas hydrophila*

WU Zong-fu¹, GONG Hui^{1,2}, CHEN Hong-yan¹, YANG Jin-xian¹, LIU Xiao-dong¹, LIN Tian-long¹

(1. Bio-technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Aquatic Pathogen Collection Center of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The main objective of this work was to study the effect of β -hemA-ISCOMs in eliciting eel immunity. After immersed the eels with the different dose of vaccine, the results showed that: (1) β -hemA-ISCOMs appeared as a typical cage-like structure with the size about 40 nm in diameter; (2) The T lymphocyte proliferation of the fishes immunized with β -hemA-ISCOMs was significantly higher than the groups without ISCOMs as adjuvant($P < 0.05$); (3) The value of serum antibody during β -hemA-ISCOMs groups is positively correlated with the dose of the vaccine at the range from 30 mg·L⁻¹ to 120 mg·L⁻¹. Furthermore, the serum antibody titer of β -hemA-ISCOMs group was significantly higher than ISM1312 adjuvant group and adjuvant free group; (4) The survival rates of β -hemA-ISCOMs groups was correlated with the dose of the vaccine at the range from 30 mg·L⁻¹ to 120 mg·L⁻¹; at the same dose, the survival rates of β -hemA-ISCOMs groups was significantly higher than

收稿日期:2006-07-24

资助项目:福建省自然科学基金项目(B0410025);福建省科技重大专项专题(2004NZ03-2);国家自然科学基金项目(30471336)

作者简介:吴宗福(1981-),男,福建古田人,硕士研究生,主要从事水产病原微生物学与免疫学研究,E-mail:wuzongfu@163.com

通讯作者:龚 晖,E-mail:ghxf@sina.com

ISM1312 adjuvant group and adjuvant free group. The conclusions: β -hemA-ISCOMs was able to elicit eel to mount immunity when administered by immersion; the ISCOMs technology is suitable for developing immersion vaccine.

Key words: ell; *Aeromonas hydrophila*; hemalysin; ISCOMs; immersion immunization; lymphocyte; antibody

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是引起鱼类暴发性流行病的重要病原菌^[1-2]。免疫接种是预防嗜水气单胞菌病的重要手段,国内外许多学者在嗜水气单胞菌疫苗研制方面做了大量的工作。由于气单胞菌血清型众多,按菌体 O 抗原划分,其血清型已经超过 100 种,而且不同血清型致病菌株可能同时混合感染同一鱼种^[3]。利用不同血清型菌株之间具有介导交叉免疫保护的共同保护性抗原,研发新型广谱嗜水气单胞菌疫苗是解决这一问题的主要途径。

β -溶血素是嗜水气单胞菌的主要致病因子和保护性抗原,能够激发鱼类产生保护性免疫应答^[4-5],是制备亚单位疫苗的重要目的抗原之一。本实验室在前期实验中构建了能高效表达天然 β -溶血素的重组菌,将重组表达的粗提胞外产物(β -hemA)制成免疫刺激复合物 (immune-stimulating complexes, β -hemA-ISCOMs),通过注射免疫能诱导免疫鱼产生良好的免疫保护^[6]。

鱼类疫苗的免疫途径主要有注射、浸泡和口服三种方式,注射免疫可以得到很好的免疫效果,但是这种免疫方式在水产养殖中大面积推广使用有一定难度。可行且便于操作的免疫方式是浸泡和口服免疫。浸泡免疫与口服免疫相比,又具有抗原不受鱼类胃肠道消化酶破坏等因素影响的优点,同时鱼类大面积的表皮粘膜也是摄取外来抗原的重要组织,对稚鱼和幼鱼,浸泡免疫法尤为适用^[7]。

ISCOMs 能通过粘膜提呈抗原,适用于浸泡免疫。为了证实浸泡免疫的效果,探讨浸泡免疫可能面临的问题,我们应用 β -hemA-ISCOMs 作为模式疫苗通过浸泡途径免疫鳢,并测定了免疫鱼细胞和抗体应答水平和免疫效力,为研究鱼用疫苗的实用化免疫接种技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂 QuilA 购自美国 Accurate Chemical&Scientific Corporation 公司 (NO.

AP04991); Cell proliferation ELISA, Brdu (罗氏公司); ConA (Sigma); ISM1312 (Seppic); Mega-10 购自华美生物工程公司;嗜水气单胞菌 TPS30 由浙江省淡水所钱冬先生惠赠; β -溶血素基因 AHTPS30HEM 由中国农业大学夏春先生惠赠; pCDNA 3.0 购自 Invitrogen 公司;含嗜水气单胞菌 β -溶血素基因的重组菌由本室将 β -溶血素基因 AHTPS30HEM 插入 pCDNA 3.0 质粒,并转入工程菌 *E. coli* DH5 α 构建而成,命名为 PCB;含 5% 绵羊红细胞的血平板购自福建省疾控中心;培养基为 TSB 培养液;鼠抗鳢 Ig 的单克隆抗体 7E2 与 8H1 腹水抗体本实验室制备,供试鳢购自福建省长乐鳢场,规格为每尾 30 g。

1.2 方法

细菌培养 将 PCB 菌种接种于 LB 培养基平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,挑取单菌落,接种于 10 mL TSB 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,当 OD₅₉₀ 值为 1.0 时,取 5 mL 接种于 500 mL TSB 培养基中培养,转速 180 r \cdot min⁻¹,20 h,37 $^{\circ}\text{C}$ 收获。

胞外产物提取 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min,取上清,加入硫酸铵至 60% 饱和度,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min,收集沉淀,用 PBS (0.01 mol \cdot L⁻¹ pH 7.2) 重悬,透析,每隔 4 h 换液 1 次,换液 5~6 次,收获毒素后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用(溶血素存在于胞外产物 ECPs 中)^[6]。

蛋白含量的测定 用 DU Series 7000 分光光度计 (Beckman) 按照 Bradford 法测定,在波长 595 nm 处测得 A 值,参照标准曲线得出蛋白浓度。

β -hemA-ISCOMs 的制备 参照方勤美等^[4] 方法用 β -hemA 制备 ISCOMs。命名为 β -hemA-ISCOMs,同时将携带有 pCDNA 3.0 空质粒的工程菌 *E. coli* DH5 α 胞外产物制成 ISCOMs,命名为 PC-ISCOMs。

电镜观察 β -hemA-ISCOMs 取待测样品 10 μL 滴铜网,用 2% 醋酸铀染色,在 JEM-1200EX 电镜上观察。

β -hemA-ISCOMs 免疫试验 供试鳢规格

为 30 g 左右,实验鱼置 40 L 水族箱,温度 22~24 ℃,每日换水 1/3。免疫实验方案如表 1 所示,采用二次免疫,分 8 组进行,每组 15 尾,15 d 后第二

次免疫,每次浸泡 60 min,注射为腹腔注射。空白对照组用 0.01 mol·L⁻¹ pH 7.2 的 PBS 免疫。

表 1 The β -hemA-ISCOMs 免疫方案

Tab.1 The scheme of β -hemA-ISCOMs immunotrial

组别 group	免疫方式 immunization routes	样品 samples	浓度 concentration
1	浸泡 immersion	β -hemA-ISCOMs	120 mg·L ⁻¹
2	浸泡 immersion	β -hemA-ISCOMs	60 mg·L ⁻¹
3	浸泡 immersion	β -hemA-ISCOMs	30 mg·L ⁻¹
4	浸泡 immersion	PC-ISCOMs	120 mg·L ⁻¹
5	浸泡 immersion	β -hemA ISM1312	120 mg·L ⁻¹
6	注射 injection	β -hemA ISCOMs	60 μ g·ind ⁻¹
7	浸泡 immersion	β -hemA	120 mg·L ⁻¹
8	空白对照 control	PBS	

鳗鲡淋巴细胞转化试验 攻毒前(一免后 44 d)第 1、4、5、7、8 组每组各取 4 尾鳗鲡,进行淋巴细胞转化试验,试验采用 Brdu-ELISA 法,按照试剂盒说明书进行。具体方法如下:无菌条件下,取鳗鲡脾脏细胞,采用淋巴细胞分层液分离淋巴细胞,1 640 培养液重悬,细胞定量为 3×10^6 mL⁻¹,加入 ConA 终浓度为 5μ g·mL⁻¹,滴入 96 孔微量细胞板,每孔 100 μ L,每份样品做 6 个平行孔,另设置只含培养基的空白。余下检测过程利用 Roche 公司的淋转试剂盒并依照说明书进行操作。显色后每孔用 1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 25 μ L 终止反应。用酶联仪 Microplate Reader(BioRad Mode 1550)读取 OD₄₅₀ 值。

酶联免疫吸附试验检测鳗鲡血清抗体 攻毒前(一免后 44 d),对上述免疫试验组 8 组每组随机取 4 尾鳗鲡,经尾静脉采血,分离血清于 -20 ℃ 冰箱冻存备用。血清抗体检测按常规酶联免疫吸附试验法操作,包被抗原为 TPS30 胞外产物(TPS30 ECPs)按 12μ g·mL⁻¹ 的蛋白浓度包被,空白对照用 PBS 包被,每孔 50 μ L,4 ℃ 过夜。一抗为待检鳗鲡血清(1:100 稀释),每孔 50 μ L。二抗为本室制备的鼠抗鳗鲡 Ig 的单克隆抗体(1:1 000 稀释),每孔 50 μ L。酶标抗体为羊抗鼠 HRP 标记的 IgG(1:5 000 稀释),每孔 50 μ L,底物 OPD,2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应。用酶联仪 Microplate Reader(BioRad Mode 1550)读取 OD_{495nm} 值。

攻毒保护实验 一免后 45 d 进行攻毒,用 TPS30 腹腔注射攻毒,攻毒剂量为 5×10^7 mL⁻¹ ($5 \times$ LD₅₀)。连续观察 1 周。

2 结果

2.1 重组菌 PCB 胞外产物的蛋白含量

用 DU Series7000 分光光度计(Beckman)按照 Bradford 法测定重组菌 PCB 胞外产物的蛋白含量为 20 mg·mL⁻¹。

2.2 β -hemA-ISCOMs 电镜图

待测样品经 2% 醋酸铀染色后在电镜下观察到 ISCOMs 呈现典型笼络状网格结构(图 1),直径约为 40 nm 左右。

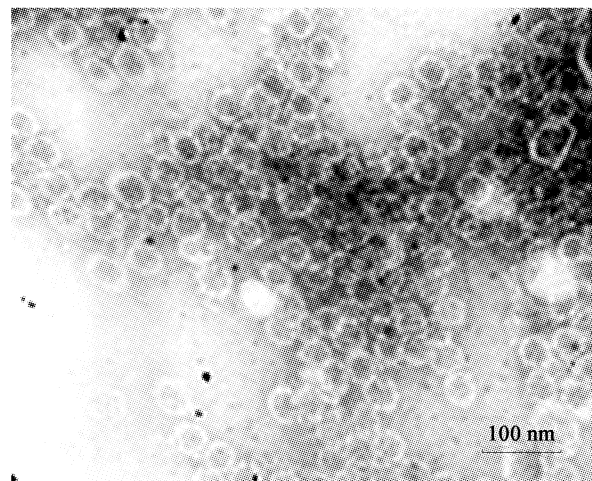


图 1 β -hemA-ISCOMs 电镜图

Fig.1 The picture of β -hemA-ISCOMs under electron microscope

2.3 鳗鲡淋巴细胞转化试验结果

攻毒前 1、4、5、7、8 组鳗鲡淋巴细胞转化试验结果如表 2、图 2 所示,经方差分析,1 和 4 组淋转显著高于 5、7 和 8 组($P < 0.05$),其中 1 与 4 组之

间及 5、7、8 组之间无显著差异。

2.4 鳗鲡血清抗体效价测定

攻毒前(免疫后 44 d)八组鳗鲡血清抗体效价如表 3、图 3 所示,经方差分析,1 组血清抗体效价(OD_{495} 值)显著高于 2 组与 3 组($P < 0.05$),2 组血清抗体 OD_{495} 值显著高于 3 组($P < 0.05$),1 组血清抗体 OD 值显著高于 5 组与 7 组($P < 0.05$)。

表 2 淋巴细胞转化试验结果

组别 group	1	4	5	7	8
淋转 OD_{450} 值 proliferation of lymphocyte (OD_{450} value)	1.09 ± 0.09^a	1.18 ± 0.05^a	0.84 ± 0.08^b	0.87 ± 0.07^b	0.81 ± 0.07^b

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Notes: the different letters indicate significant differences($P < 0.05$)

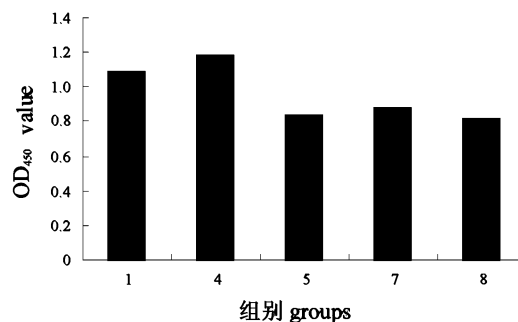


图 2 淋巴细胞转化试验结果

Fig.2 The results of the lymphocyte proliferation

2.5 免疫保护试验结果

经浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的 TPS30 腹腔注射攻毒后,实验鳗鲡 48 h 内达到死亡高峰,在攻毒 1 周后不再有死亡现象出现,攻毒结果如表 4 所示。

表 3 免疫鳗鲡血清抗体效价

组别 group	1	2	3	4	5	6	7	8
血清 OD_{495} 值 OD_{495} value of serum	0.90 ± 0.16^a	0.63 ± 0.2^b	0.37 ± 0.2^c	0.31 ± 0.08	0.2 ± 0.08^d	0.94 ± 0.39	0.41 ± 0.17^d	0.12 ± 0.04

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Notes: the different letters indicate significant differences($P < 0.05$)

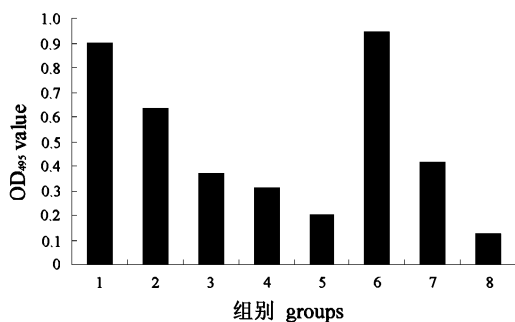


图 3 免疫鳗鲡血清抗体效价

Fig.3 The serum antibody titers of immunized eels

表 4 以 TPS30 strain 攻毒后鳗鲡的存活率

组号 group	攻毒尾数 no. challenged	存活尾数 no. survival	存活率(%) survival rate
1	6	2	33.3
2	6	1	16.7
3	7	0	0
4	10	0	0
5	9	0	0
6	6	4	66.7
7	6	1	16.7
8	6	0	0

3 讨论

浸浴免疫具有操作简便、应激反应小,能同时对大批量养殖鱼类进行免疫接种等优点。自从 Amend 等^[8]用牛血清白蛋白(BSA)浸泡虹鳟证实了 BSA 能进入鱼体并能诱导宿主产生免疫应答以来,浸泡法已被广泛应用于鱼类免疫接种研究。Antipa 等^[9]用鳗弧菌和杀鲑气单胞菌苗浸泡免疫大麻哈鱼获得成功。Crop 等^[10]利用高渗液法接种弧菌疫苗预防红大麻哈鱼的弧菌病,也得到了良好的实验结果。有多种因素能够影响浸泡免疫过程中抗原的吸收,比如抗原的浓度、浸泡时间的长短、鱼类规格、抗原的状态、佐剂的使用等等,这些因素中抗原的选择与佐剂的使用最为关键^[11]。

溶血素是嗜水气单胞菌主要的致病因子之一,同时也是不同血清型菌株之间具有介导交叉免疫保护的共同保护性抗原^[4-5]。从免疫保护试验结果还看出, β -hemA-ISCOMs 浸泡免疫可诱导一定的免疫保护,在 $30 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度内,免疫保护水平与疫苗的使用浓度正相关,与 Nakanishi 等^[11]的报道相符。本研究证实了 β -溶血素通过

浸泡免疫能诱导鱼类产生保护性免疫力,这对于开发实用的鱼类疫苗具有十分积极的意义。本试验所获得的免疫保护率较低,与异位接种(注射)攻毒有关,浸泡免疫诱导鱼类产生的免疫应答可能是以粘膜免疫为主,循环抗体水平较低,异位接种攻毒试验不一定能体现真实的保护率;此外免疫保护率低还与所获 β -溶血素纯度、含量有关,如果能与其它保护性抗原共同作用,有望获得更高的免疫保护。ISCOMs 技术为多抗原联合作用提供了可能。

Quil A 是一种优良的佐剂,它能与抗原、胆固醇、卵磷脂结合形成直径为 30 ~ 40 nm、呈笼格状结构的免疫刺激复合物 (ISCOMs)^[12], ISCOMs 可以嵌入多种不同的亚单位抗原以达到制备多价疫苗的目的。它能将可溶性抗原包装成类似天然病原的颗粒状物质,使其具备天然活体疫苗的免疫原性^[13]。ISCOMs 还可通过粘膜途径提呈抗原,并能同时激发体液免疫应答和细胞介导的免疫反应,载有各种抗原的 ISCOMs 所诱导的抗体,其效价比单用抗原或蛋白胶粒高 10 倍以上,而所用抗原剂量减少 10 倍^[13]。

综上所述,ISCOMs 通过浸泡免疫不仅可提高鳗鲡抗体效价和 T 淋巴细胞的增殖转化能力,且能诱导免疫保护,证实了采用 ISCOMs 技术制备浸泡型渔用疫苗的可行性。进一步深入研究 ISCOMs 的制备工艺,探讨浸泡免疫的方法和措施,了解鱼类粘膜摄取 ISCOMs 和产生免疫应答的机理,科学合理地选择免疫原,可望使 ISCOMs 疫苗日趋完善,使之成为制备渔用疫苗的一种新工艺。

参考文献:

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述

[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282 - 288.

- [2] Griffithe E. Enviromental regulation of bacterial virulence-implication for baccine design and production [J]. Trends in Biotechnology, 1991, 9(9): 305 - 315.
- [3] 沈智华, 钱冬, 曹铮, 等. 嗜水气单胞菌 HEC 毒素苗对鲫鱼的免疫效果的初步研究 [J]. 浙江海洋学院学报, 1999, 18(2): 124 - 128.
- [4] 陈怀青. 嗜水气单胞菌外毒素研究进展 [J]. 国外医学(微生物分册), 1992, 15: 256 - 259.
- [5] 孙建和, 严亚贤. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(3): 20 - 23.
- [6] 方勤美, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌 β -hema 重组菌表达产物 ISCOMs 的研制 [J]. 福建农业学报, 2004, 19(4): 238 - 242.
- [7] 陈怀青. 鱼类免疫接种的理论与实践 [J]. 国外水产, 1995, 2: 6 - 9.
- [8] Amend D F, Fender D C. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hypersmotic solutions: a model for vaccinating fish [J]. Science, 1976, 192 (4241): 793 - 794.
- [9] Antipa R, Amend D F. Immunization of pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibro anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins [J]. Fish Res Board Can, 1997, 34: 203 - 208.
- [10] Crop T P, Amend D F. Immunization of sockeyes salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique [J]. Aquaculture, 1977, 12: 317 - 325.
- [11] Nakanishi T, Ototake M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination [J]. Dev Biol Stand, 1997, 90: 59 - 68.
- [12] Morein B. Immunostimulating complex [J]. Vet Mic, 1990, 23(1 - 4): 79 - 84.
- [13] 黄银君, 周育彪. 免疫刺激复合物疫苗研究进展 [J]. 中国兽医科技, 1994, 24(5): 17 - 18.