

文章编号:1000-0615(2009)02-0303-08

## 嗜水气单胞菌气溶素的免疫刺激复合物的制备 及其对欧洲鳗的免疫效果

龚晖<sup>1,2</sup>, 林天龙<sup>2</sup>, 张晓佩<sup>2</sup>, 罗士炎<sup>3</sup>, 吴宗福<sup>2</sup>, 宋铁英<sup>2</sup>, 杨先乐<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306;

2. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350001;

3. 福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350001)

**摘要:**将嗜水气单胞菌气溶素(AerA)基因定向连接到pET32a(+)表达载体,转化大肠杆菌BL21(DE3),SDS-PAGE分析表明,硫氧还蛋白-气溶素融合蛋白(Trx-AerA)表达量占重组菌总蛋白量的65.5%。将上述融合蛋白与商品化的QuilA混合,分别添加Mega-10、卵磷脂、胆固醇获得Trx-AerA ISCOMs。其中同时添加Mega-10、卵磷脂、胆固醇组蛋白回收率最高为10.46%,仅添加QuilA组蛋白回收率为1.82%,两者差异显著( $P < 0.05$ )。分别采用Trx-AerA、Trx-AerA ISCOMs、Trx ISCOMs经腹腔注射免疫欧洲鳗,免疫30 d后,每个实验组取5尾实验鱼采集血清,按1:200稀释通过ELISA法检测抗体水平,同时采用菌数为 $2.0 \times 10^6$  CFU的嗜水气单胞菌ZNI株进行攻击,测定免疫效力。结果显示:Trx-AerA免疫组相对保护率为0%(3/15),Trx-AerA ISCOMs免疫组为83.3%(13/15),Trx ISCOMs免疫组为50%(9/15);3个免疫组针对气溶素的特异性抗体水平 $OD_{450}$ 值分别为0.19,0.52,0.36,Trx-AerA ISCOMs免疫组、Trx-AerA免疫组显著高于Trx ISCOMs免疫组( $P < 0.05$ )。结果表明影响嗜水气单胞菌免疫效果的除了气溶素的抗体水平外,ISCOMs等也能够增强非特异性免疫保护应答。

**关键词:**欧洲鳗;嗜水气单胞菌;重组气溶素;免疫刺激复合物;免疫

**中图分类号:**Q 579.1; S 917

**文献标识码:**A

病原微生物亚单位成分的免疫功效,并不仅仅取决于抗原自身的特性,还与抗原的结构,呈递途径,以及使用的佐剂等密切相关。以抗原和皂甙QuilA等试剂制备出的免疫刺激复合物(immune stimulating complexes, ISCOMs)能够诱导宿主对病原产生较强的免疫应答<sup>[1-4]</sup>。不同性质的抗原其ISCOMs的制备方法不同<sup>[5-8]</sup>,为了得到稳定的ISCOMs,降低成本,我们试图通过改变制备ISCOMs过程中壬酰基-N-甲基葡糖胺(Mega-10)、卵磷脂、胆固醇等成份的配比,为更经济、有效地制备ISCOMs提供了有价值的参考。

气溶素是嗜水气单胞菌的一种主要溶血性毒素,它具有细胞毒性、肠毒性和溶血性,是嗜水气

单胞菌的主要致病因子之一<sup>[9-10]</sup>。气溶素为可溶性抗原,由于不溶性抗原和可溶性抗原激发的免疫效应有较大差异<sup>[11]</sup>,气溶素与佐剂结合后可形成不同的抗原形式,因此它是研究不同形式抗原免疫功能和免疫应答机制的理想模式抗原。我们在前期研究中曾采用真核表达载体pCDNA3.0实现了气溶素的分泌表达<sup>[12]</sup>,但表达量较低,大批量纯化存在难度,采用含有气溶素的胞外产物进行免疫试验,虽然初步证实了胞外产物能够诱导免疫鱼产生有效的免疫保护作用<sup>[13]</sup>。然而,胞外产物是一种混合物,很难排除胞外产物中其它菌体成分对免疫效果的影响。本实验采用pET32a(+)质粒作为表达载体,实现了鳗源嗜水

收稿日期:2008-03-17 修回日期:2008-05-20

资助项目:国家自然科学基金项目(30471336);福建省自然科学基金项目(2007J0057);福建省科技项目(2006i0008)

通讯作者:杨先乐, Tel:021-61900451, E-mail:xyang@shou.edu.cn

气单胞菌 ZN1 株气溶素的高效表达,为从单因子水平探讨抗原对宿主的免疫效应提供了可能。

本研究在获得 Trx-AerA 高效表达的情况下,制备了高纯度的 Trx-AerA ISCOMs,分别用 Trx-AerA、Trx-AerA ISCOMs、Trx-ISCOMs 免疫欧洲鳗,通过免疫效果的比较,了解了 AerA、ISCOMs 的免疫作用,为规模化生产 ISCOMs 疫苗提供了技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

表达质粒 *pET32a(+)*、工程菌大肠杆菌 BL21(DE3)福建省农业科学院生物技术研究所保存。dNTP、*ExTaq* 酶、100 bp DNA Ladder、限制性内切酶 *Bam*HI、*Hand* III、T4 DNA 连接酶购自宝生物大连工程有限公司, *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder、IPTG、甲丙烯酰胺、N,N'-2-亚甲双丙烯酰胺、TEMED、氨苄青霉素购自上海生物工程有限公司,DNA 胶回收试剂盒、Ni-NTA Agrose 购自 QIAGEN 公司,低分子量蛋白标准购自上海生物化学研究所,预染广谱蛋白标准购自 NEB 公司,预染蛋白标准 III 购自 TIAGEN 公司。酵母提取物、胰蛋白酶购自 OXOID 公司,羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶标记物、OPD、BCIP/NBT、SDS、超纯尿素购自 Sigma 公司。QuilA 购自美国 Accurate Chemical&Scientific Corporation 公司; Mega-10 购自华美生物工程公司。

嗜水气单胞菌 ZN1 株系福建省农业科学院生物技术研究所福建周宁从表现出败血症状的欧洲鳗肝脏内分离、并根据柯赫法则检验、鉴定。鼠抗欧洲鳗 IgM 单抗和鼠抗 AerA 单抗为福建省农业科学院生物技术研究所制备。供试欧洲鳗购自福建省长乐欧洲鳗场,规格为 15 g 左右,实验鱼置 40 L 水族箱暂养,水温 22~24 ℃,每日换水 1/3。

Tris-Cl 缓冲液浓度 20 mmol/L、pH 7.4。PBS 缓冲液浓度 0.01 mmol/L、pH 7.4。

### 1.2 Trx-AerA 融合蛋白的制备

参照陆承平等<sup>[14]</sup>方法,提取嗜水气单胞菌 ZN1 基因组 DNA 作为 PCR 反应模板,根据 GeneBank 已发表的嗜水气单胞菌溶血素基因序列(No. AB021152)设计引物,上游引物:5'-AGAGGATCCGCAGAACCCGTCTATCCAGA-3'

下游引物:5'-GCCAAGCTTCCACAACACGCAGTCGTTAT-3';PCR 扩增,PCR 产物经 *Hand* III 和 *Bam*HI 酶切后,定向连接到 *pET32a(+)*,构建重组质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3),将 AerA 基因重组菌命名为 BL21(Trx-AerA),经 1 mmol/L IPTG 诱导表达的融合蛋白命名为 Trx-AerA,携带空质粒 *pET32a(+)* 的工程菌命名为 BL21(Trx),表达的硫氧还蛋白命名为 Trx。Trx-AerA 经 Ni-NTA Agrose 亲和层析柱纯化(按产品说明书操作)。用含不同浓度尿素(4、2、0 mol/L)的 Tris-Cl 缓冲液对 Trx-AerA 进行分步透析,每个浓度梯度透析 24 h。透析后的蛋白存于 -20 ℃ 备用。各取 3 μg 纯化前后产物经 SDS-PAGE,用 Quantity One 4.62 软件进行纯度分析。将蛋白浓度为 50 μg/mL 的 Trx-AerA 融合蛋白用 PBS 倍比稀释,各稀释度取 50 μL 分别与 1% 兔全血红细胞混匀,37 ℃ 温浴 1 h,4 ℃ 静置 16 h 观察,实验设平行两组,以 Trx 蛋白为对照,检测溶血性。

### 1.3 Trx-AerAISCOMs 的制备

透析过的 Trx-AerA,于 40 000 ×g,4 ℃,离心 4 h,取上清用于 ISCOMs 的制备。分别采用下列 5 种组合制备 ISCOMs。

组 1:取浓度为 1.6 mg/mL Trx-AerA,加入 Mega-10 至终浓度为 2%,37 ℃ 水浴 4 h,分别加入 QuilA、卵磷脂、胆固醇,QuilA 终浓度为 0.1%,卵磷脂、胆固醇终浓度为 250 μg/mL。200 V 超声 50 次,每次 10 s,间隔 10 s。4 ℃,Tris-Cl 缓冲液透析 48 h。

组 2:不加卵磷脂、胆固醇,其余操作步骤与 1 组相同。

组 3:不加 Mega-10,其余操作步骤与 1 组相同。

组 4:不加 Mega-10、卵磷脂、胆固醇,其余操作步骤与 1 组相同。

组 5:对照,不加 QuilA、Mega-10、卵磷脂、胆固醇等抗原微团化试剂。

参照 Nicola Boulter 等<sup>[15]</sup>方法分析产物,每组样品各取 3 mg 稀释到 8 mL,经 38 000 ×g,4 ℃,离心 20 h,收集沉淀,重悬于 200 μL Tris-Cl 缓冲液中。各组取 5 个样,每个样重复 5 次,测定蛋白浓度,计算回收率,同时每组各取 3 μL 样品,进行 SDS-PAGE 分析。

#### 1.4 Trx-AerA ISCOMs 抗原性分析

将制成的 Trx-AerA ISCOMs 用 1% 福尔马林 20 °C 脱毒 48 h, 采用 SDS-PAGE 和 Western-blotting 检测 Trx-AerA ISCOMs 的抗原性, SDS-PAGE 上样量为 3 μg, Western-blotting 一抗为鼠抗 AerA 单抗(3C12B11), 工作浓度为 1:1 000, 二抗为羊抗鼠 HRP 酶标抗体, 工作浓度为 1:15 000, 底物为 DAB。

#### 1.5 Trx-AerA ISCOMs 的免疫试验

供试欧洲鳗分四组, 每组 20 尾, Trx-AerA ISCOMs、Trx ISCOMs、Trx-AerA 三种不同抗原各免疫 1 组, 每尾鱼接种剂量均为 20 μg 抗原/200 μL, 腹腔注射。另 1 组为对照, 每尾鱼腹腔注射 200 μL Tris-Cl 缓冲液。

在免疫后第 30 天, 每组取 5 尾欧洲鳗, 尾静脉采血, 制备血清。每份血清设 3 个平行重复试验, 采用 ELISA 测定血清中针对气溶素血清抗体水平。方法如下: 以浓度为 2.5 μg/mL 的 Trx-AerA 为抗原包被 96 孔酶标板, 每孔 50 μL, 4 °C 过夜, PBS 为空白对照。一抗为稀释度 1:200 的待测鱼血清, 二抗为鼠抗欧洲鳗 Ig 单抗(8H1), 工作浓度 1:1 000。酶标抗体为工作浓度 1:20 000 的羊抗鼠 HRP 酶标抗体, 底物为 OPD。检测气溶素的抗体水平时, 每 1 μL 欧洲鳗血清用 10 μL 浓度为 1 mg/mL 的 Trx 蛋白, 37 °C 吸附 1 h 后, 2 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 以 PBS 稀释至工作浓度, 以去除血清中针对 Trx 蛋白的抗体。

在免疫后第 30 天, 每组取 15 尾欧洲鳗尾腹腔注射 0.2 mL 浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU/mL 嗜水气单胞菌 ZN1, 连续观察 10 d, 计算相对免疫保护力 (relative percent survival, RPS),  $RPS(\%) = [1 - (\text{受免鱼死亡率}/\text{对照鱼死亡率})] \times 100$ 。

#### 1.6 数据分析

ISCOMs 获得率以及免疫血清抗体水平以平均数 ± 标准差表示 ( $\bar{X} \pm SD$ ), 通过软件 SPSS13.0 进行方差齐性分析, 再用 LSD 法或 Games-Howell 法进行单因素方差分析比较差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 Trx-AerA 表达与纯化

SDS-PAGE 分析表明, BL21(Trx-AerA) 经诱导培养后其裂解沉淀样品在 66 ku 附近出现高丰度蛋白条带, 与预期的 Trx-AerA 融合蛋白分子量

相符(图 1, Lane 8), 诱导前的 BL21(Trx-AerA) 菌体裂解上清在相同位置可见微弱的蛋白条带(图 1, Lane 3, 4), 诱导后的 BL21(Trx-AerA) 菌体裂解沉淀可见明显的蛋白条带(图 1, Lane 7), 其它对照样品均未见到相应的表达条带。以上结果表明 BL21(Trx-AerA) 未经 IPTG 诱导就能表达适量的 Trx-AerA, 经 IPTG 诱导后获得高效表达, 经 Quantity One 4.62 软件分析, 表达量占菌体总蛋白量的 65.5%, 产物主要以包涵体形式分布于菌体裂解沉淀中。产物经 Ni-NTA Agrose 亲和层析柱纯化, 获的高纯度的 Trx-AerA(图 2, Lane 2)。表达的 Trx-AerA 蛋白具有溶血性, 对兔红细胞的溶血效价为  $2.05 \times 10^5$  HU/mg。

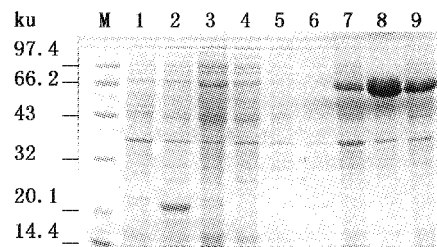


图 1 SDS-PAGE 分析重组菌 Trx-AerA 的表达情况

M: 低分子量蛋白标准; 1, 2 为诱导前后的: BL21(Trx) 菌体裂解上清; 3, 4: 为诱导前后的 BL21(Trx-AerA) 菌体裂解上清; 5, 6 为诱导前后的 BL21(Trx) 菌体裂解沉淀; 7, 8: 诱导前后的 BL21(Trx-AerA) 菌体裂解沉淀; 9: 诱导后 BL21(Trx-AerA) 菌体裂解液

Fig. 1 SDS-PAGE analyzing the expression of Trx-AerA in recombinant bacterium

M: Low range protein marker; 1: lysate supernatant of BL21(Trx); 2: lysate supernatant of BL21(Trx) induced with IPTG; 3: lysate supernatant of BL21(Trx-AerA); 4: lysate supernatant of BL21(Trx-AerA) induced with IPTG; 5: lysate precipitate of BL21(Trx); 6: lysate precipitate of BL21(Trx) induced with IPTG; 7: lysate precipitate of BL21(Trx-AerA); 8: lysate precipitate of BL21(Trx-AerA) induced with IPTG; 9: lysate of BL21(Trx-AerA) induced with IPTG

### 2.2 Trx-AerA ISCOMs 的制备

按 1.3 介绍的方法制备 Trx-AerA ISCOMs, 经高速离心后, 其中组 1~4 四种不同方法制备的样品, 均可在管底见到棕色沉淀, 而组 5(Trx-AerA 对照) 未见棕色沉淀。蛋白回收试验显示, 添加 Mega-10(组 1, 2) 回收率最高, 添加卵磷脂和胆固醇(组 3) 次之, 仅含 QuilA(组 4) 最低, 各组蛋白回收率差异显著 ( $P < 0.05$ , 表 1)。组 1~4 样

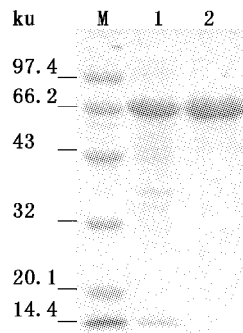


图2 SDS-PAGE 分析纯化的 Trx-AerA 蛋白

M: 低分子量蛋白标准; 1: 未纯化的 Trx-AerA 蛋白; 2: 纯化后的 Trx-AerA 蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analyzing purified Trx-AerA fusion protein

M: low range protein marker; 1: un-purified Trx-AerA fusion protein; 2: purified Trx-AerA fusion protein

品在电镜下可观察到颗粒状结构, 其中组 1 和组 3 样品的“梅花状”笼格结构最为典型的, 大小约

为 40 nm 的 ISCOMs (图 3)。SDS-PAGE 结果进一步证实, 组 1 ~ 2 Trx-AerA 蛋白含量高, 组 3 ~ 4 Trx-AerA 蛋白含量含量较低, 而组 5 (Trx-AerA 对照), 未见明显蛋白带 (图 4)。

### 2.3 Trx-AerA ISCOMs 抗原性分析

SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析结果表明, Trx-AerA ISCOMs 经福尔马林灭活脱毒后, ISCOMs 中 Trx-AerA 蛋白能被鼠抗气溶素单抗所识别, 有效位点抗原性不变 (图 5 和图 6)。

### 2.4 Trx-AerA ISCOMs 的免疫试验

欧洲鳎接种 Trx-AerA ISCOMs 30 d 后, 血清抗体检测和攻毒试验结果显示, Trx-AerA ISCOMs 和 Trx-AerA 组免疫鱼血清中针对气溶素的抗体水平与对照组、Trx ISCOMs 免疫组差异显著 ( $P < 0.05$ )。Trx-AerA ISCOMs 免疫组的保护率最高, Trx ISCOMs 免疫组次之, Trx-AerA 免疫组和对照组存活数相同 (表 2 和图 7)。

表 1 不同方法制备的 ISCOMs 中蛋白回收率的测定

Tab. 1 Measurement of the protein recovery rates in different ISCOMs preparation

	第 1 组 group 1	第 2 组 group 2	第 3 组 group 3	第 4 组 group 4	第 5 组 group 5
获得率 (%) yield	10.46 ± 0.79 <sup>a</sup>	7.23 ± 0.52 <sup>b</sup>	3.17 ± 0.32 <sup>c</sup>	1.82 ± 0.36 <sup>d</sup>	0.53 ± 0.12 <sup>e</sup>

注: 肩标字母不同代表差异显著 ( $P < 0.05$ ), 字母相同代表差异不显著 ( $P > 0.05$ )

Notes: Treatments means with the different letter in the same line are significantly different from each other ( $P < 0.05$ )

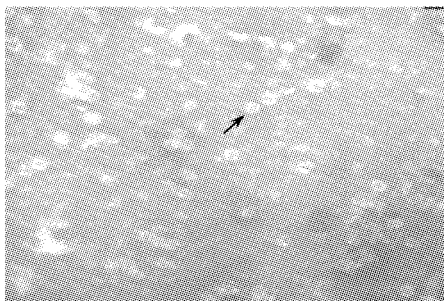


图 3 电镜观察 Trx-AerA ISCOMs 的结构

Fig. 3 The morphology of Trx-AerA ISCOMs under the electron microscope

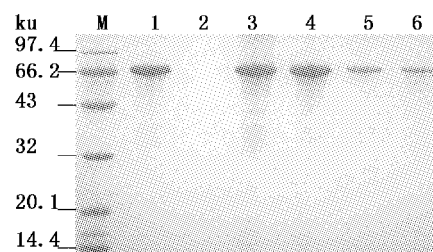


图 4 SDS-PAGE 分析不同方法制备的 ISCOMs 样品中 Trx-AerA 含量

M: 低分子量蛋白标准; 1: 纯化的 Trx-AerA; 2: 组 5 样品; 3: 组 1 样品; 4: 组 2 样品; 5: 组 3 样品; 6: 组 4 样品

Fig. 4 SDS-PAGE analyzing the amount of Trx-AerA in different ISCOMs preparation

M: low range protein marker; 1: purified Trx-AerA; 2: sample from group 5; 3: sample from group 1; 4: sample from group 2; 5: sample from group 3; 6: sample from group 4

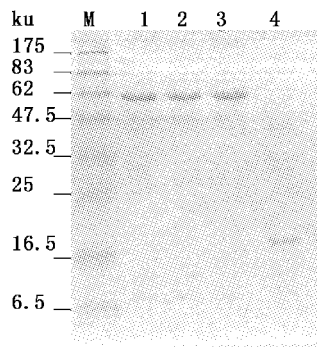


图5 SDS-PAGE 分析 Trx-AerA ISCOMs 样品

## Trx-AerA 蛋白的稳定性

M: 预染蛋白标准;1: Trx-AerA;2: Trx-AerA ISCOMs;3: 福尔马林灭活后的 Trx-AerA ISCOMs;4: 福尔马林灭活后的 Trx ISCOMs

Fig. 5 The SDS-PAGE analyzing the structure of the Trx-AerA protein in the ISCOMs form

M: prestained protein marker; 1: Trx-AerA; 2: Trx-AerA ISCOMs;3: Trx-AerA ISCOMs inactivated with formalin. 4: Trx ISCOMs inactivated with formalin

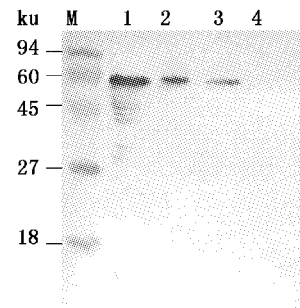


图6 Western-blotting 分析 Trx-AerA ISCOMs 中

## Trx-AerA 蛋白的抗原性

M: 预染蛋白标准;1: Trx-AerA;2: Trx-AerA ISCOMs;3: 福尔马林灭活后的 Trx-AerA ISCOMs;4: 福尔马林灭活后的 Trx ISCOMs

Fig. 6 The Western-blot analyzing the antigenicity of the Trx-AerA protein in the ISCOMs forms

M: prestained protein marker; 1: Trx-AerA; 2: Trx-AerA ISCOMs;3: Trx-AerA ISCOMs inactivated with formalin 4: Trx ISCOMs inactivated with formalin

表2 免疫欧洲鳗血清抗体水平与相对免疫保护率测定

Tab. 2 The detection of the antibody and relative survival rates of the immunized eel

组别 groups	抗气溶素抗体水平(OD <sub>490</sub> ) value of sera antibody to aerolysin(OD <sub>490</sub> )	攻击尾数(尾) challenged	存活尾数(尾) survival	相对保护率(%) RSP
Trx-AerA ISCOMs 免疫组 immunized with Trx-AerA ISCOMs	0.52 ± 0.12 <sup>a</sup>	15	13	83.3
Trx ISCOMs 免疫组 immunized with Trx ISCOMs	0.19 ± 0.02 <sup>c</sup>	15	9	50
Trx-AerA 免疫组 immunized with Trx-AerA	0.36 ± 0.07 <sup>b</sup>	15	3	0
Tris-Cl 对照组 control group	0.17 ± 0.05 <sup>c</sup>	15	3	0

注:肩标字母不同代表差异显著( $P < 0.05$ ),字母相同代表差异不显著( $P > 0.05$ )

Notes: Treatment means with different letters in the same line are significantly different from each other( $P < 0.05$ )

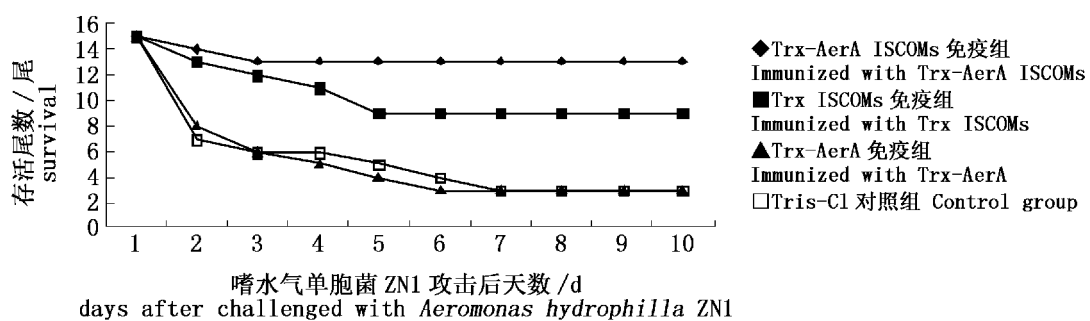


图7 嗜水气单胞菌 ZN1 攻击后欧洲鳗死亡日线图

Fig. 7 The deaths at different time after being challenged with *Aeromonas hydrophilla* ZN1

### 3 讨论

ISCOMs 能有效地提高亚单位疫苗的免疫效力。ISCOMs 疫苗有多种不同的制备方法,不同性质的抗原其 ISCOMs 的制备工艺不尽相同,ISCOMs 的制得率和疫苗中 ISCOMs 的含量将影响疫苗的免疫效果和成本。本实验首次用不同的方法来制备 Trx-AerA ISCOMs,从实验结果来看,卵磷脂、胆固醇对 ISCOMs 笼格结构的形成有直接的影响,MEGA-10 的添加可显著提高蛋白的回收率,并发现仅用 QuilA 与 Trx-AerA 蛋白混合,即可使可溶性抗原转变成颗粒性抗原。重组气溶素制成 ISCOMs 并经福尔马林处理后仍保持着原有的抗原性。这些实验结果对 ISCOMs 制备工艺的优化具有指导意义。由于气溶素为可溶性抗原,本次实验蛋白回收率相对偏低,还需进一步改变 ISCOMs 采集时的离心速率以及各组分比例的调整来获得更高的蛋白回收率。

在免疫实验中,Trx-AerA 免疫组针对气溶素的血清抗体水平显著高于 Trx ISCOMs 免疫组( $P < 0.05$ ),但对嗜水气单胞菌的相对免疫保护率为 0%,表明气溶素诱导的血清抗体不能有效保护欧洲鳗承受嗜水气单胞菌 ZN1 的攻击,免疫保护力的产生应是各种免疫效应综合作用的结果,这一结论与 Michel<sup>[16]</sup>、莫照兰等<sup>[17]</sup>、曹宏梅等<sup>[18]</sup> 的实验结论相吻合。

ISCOMs 的主要成份 QuilA 能非特异性地促进哺乳动物 IL-2、IL-4、IL-10、r-IFN 等细胞因子的分泌,介导非特异性免疫<sup>[19]</sup>。在本实验中,Trx ISCOMs 免疫组对嗜水气单胞菌 ZN1 的相对保护率为 50%,高于 Trx-AerA 免疫组,提示 ISCOMs 确能促进欧洲鳗产生非特异免疫应答,并介导一定水平的非特异性免疫保护。

Trx-AerA ISCOMs 组的免疫保护率高于 Trx ISCOMs 免疫组,提示气溶素在介导特异性免疫保护方面还是发挥着一定作用。Trx-AerA 免疫组在嗜水气单胞菌 ZN1 攻击后,其存活率与对照组无明显差别。但在制成 ISCOMs 免疫欧洲鳗后,免疫鳗针对气溶素的血清抗体水平有所提高,同时相对免疫保护率达 83.3%,说明 ISCOMs 具有免疫增强作用。ISCOMs 对 Trx-AerA 免疫效力的增强作用可能有两个原因:(1)抗原类型发生了改变,颗粒性抗原比可溶性抗原更易被抗原提

呈细胞(antigen presenting cell, APC)所提呈。同时高密度的抗原更易介导细胞免疫<sup>[11]</sup>。(2) ISCOMs 中 QuilA 等成份非特异的免疫激活作用,有可能帮助可溶性抗原气溶素诱导出较强的特异性免疫应答。这也暗示了非特异性免疫与特异性免疫之间存在密切的关系,有必要加强鱼类这方面的研究工作。

由于 ISCOMs 的主要成份 QuilA 具有疏松胞间连接,促进胞饮的作用,它能提高大分子抗原的穿透性,促进抗原的吸收;其次由嵌入剂 Quil A、胆固醇、卵磷脂与抗原作用形成的 ISCOMs,可耐受胃、肠蛋白酶的降解,减少目标抗原的损失<sup>[20]</sup>,因此 ISCOMs 可运用于口服型和浸泡型疫苗的研发。在前期的研究中,我们初步证实了 ISCOMs 运用于口服和浸泡免疫的可行性,但浸浴免疫和一次口服免疫的免疫保护率与注射免疫相比还有一定差距<sup>[21-22]</sup>,通过本实验,我们了解了各组分对 ISCOMs 结构的影响,制备了较纯的气溶素 ISCOMs,证实了它的免疫效果,为进一步示踪 ISCOMs 经不同免疫途径的吸收过程,以及研究鱼类对 ISCOMs 的免疫效应提供了条件。

#### 参考文献:

- [1] Morein B, Sundquist B, Hoglund S, *et al.* Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses [J]. *Nature*, 1984, 308: 457-460.
- [2] Sjolander A, Vant Land B, Lovgren B K. ISCOMs containing purified *Qnillaja saponins* upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses [J]. *Cell Immunol*, 1997, 177: 69-76.
- [3] Mowat A M, Maloy K J, Donachie A M. Immune-stimulating complexes as adjuvant for inducing focal and systemic immunity after roal immunization with protein antigen [J]. *Immunology*, 1993, 80: 527.
- [4] 林锋强, 胡松华, 胡奇林, 等. 皂甙 QuilA 及其单体成分的免疫佐剂作用 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25 (4): 43-45.
- [5] 吴隼, 郭立君, 金立杰, 等. ISCOMS 重组乙型肝炎疫苗的研究 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2004, 17 (5): 303-306.
- [6] 黄文查, 刘志红, 周锡鹏, 等. 人巨细胞病毒 ISCOMs 的研制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 1998, 11 (1): 5-8.
- [7] 陈少莺, 胡奇林, 俞伏松, 等. 猪伪狂犬病毒囊膜

- 蛋白免疫刺激复合物的制备[J]. 动物医学进展, 2002,23(3):64-65.
- [8] Sunan P, Mikaela F, Maria W, et al. Immunogenicity and protective effect against murine cerebral neosporosis of recombinant NcSRS2 in different iscom formulations[J]. Vaccine, 2007, 25: 3658 - 3668.
- [9] 储卫华. 嗜水气单胞菌临床分离株胞外毒力因子的检测[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(1): 49 - 50.
- [10] Thomas Buchley J, Peter Howerd S. The cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is Aerolysin [J]. Infect and Immun, 1999, 67(1): 466 - 467.
- [11] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2000.
- [12] 龚 晖, 林天龙, 俞伏松, 等. 鳗源嗜水气单胞菌  $\beta$ -溶血素基因的克隆与表达[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 122 - 130.
- [13] 方勤美, 林天龙, 龚 晖, 等. 嗜水气单胞菌 p-hemA 重组菌表达产物 ISCOMs 的研制[J]. 福建农业学报, 2004, 19(4): 238 - 242.
- [14] 陆承平, 陈怀青. 用 PCR 检测嗜水气单胞菌毒素基因[J]. 中国动物检疫, 1995, 12: 5 - 7.
- [15] Nicola B, Duncan B, Gwen W, et al. Evaluation of recombinant sporozoite antigen SPAG-1 as a vaccine candidate against *Theileria annulata* by the use of different delivery systems [J]. J Gen Virol, 1988, 69: 549 - 559.
- [16] Michel C. Furunculosis of salmonids: vaccination attempts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by formalin-killed germs [J]. Ann Rech Vet, 1979, 10(1): 33 - 40.
- [17] 莫照兰, 徐永立, 张培军, 等. 养殖牙鲆鳗弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 63 - 66.
- [18] 曹宏梅, 李 健, 战文斌. 鳗弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 397 - 402.
- [19] Tadokoro C E, Macedo M S, Ubrahamsohn I A, et al. Saponin adjuvant primes for a dominant interleukin-10 production to ovalbumin and to *Trypanosoma cruzi* antigen [J]. Immunology, 1996, 89(3): 368 - 374.
- [20] Jenkins P G, Harris J. Enhanced enteric uptake of human gamma globulin by Quil-A saponin in *Oreochromis mossambicus* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1991, 1: 279 - 295.
- [21] 龚 晖, 林天龙, 吴宗福, 等.  $\beta$ -hemA-ISCOMs 疫苗对鳗鲡的口服免疫效果[J]. 福建农业学报, 2006, 21(4): 325 - 329.
- [22] 吴宗福, 龚 晖, 陈红燕, 等. 嗜水气单胞菌重组  $\beta$ -hemA-ISCOMs 对鳗鲡的浸泡免疫效果[J]. 水产学报, 2007, 31(3): 374 - 378.

## The preparation of ISCOMs with aerolysin from *Aeromonas hydrophilla* and the immune efficiency in *Anguilla anguilla*

GONG Hui<sup>1,2</sup>, LIN Tian-long<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-pei<sup>2</sup>, LUO Tu-yan<sup>3</sup>,  
WU Zong-fu<sup>2</sup>, SONG Tie-ying<sup>2</sup>, YANG Xian-le<sup>1</sup>

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350001, China;

3. Central Laboratory of Agricultural Sciences, Fuzhou 350001, China)

**Abstract:** In order to optimize the processes for the collection of ISCOMs, and find the immunity of aerolysin and aerolysin ISCOMs. The aerolysin gene of *Aeromonas hydrophilla* ZN1 was orientationally inserted into the prokaryotic expression Vector *pET32a(+)*. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3). After being induced with 1mmol/L IPTG for 4h, the Trx-Aerolysin(Trx-AerA) fusion protein was expressed with inclusion bodies from and up to 65.5% in total recombined bacterial proteins. After being centrifuged at 40 000 × g for 4 h, Trx-Aerolysin was divided into 5 groups for making ISCOMs: Group 1 was mixed with QuilA, Mega-10, lecithin, cholesterol, Group 2 was mixed with QuilA, Mega-10, Group 3 was mixed with QuilA, lecithin, cholesterol, Group 4 was mixed with QuilA, Group 5 only contained Trx-Aerolysin. All groups were centrifuged at 38 000 × g for 20 h, centrifugal sedimentation was collected for analysis. After being analysed for protein concentration, SDS-PAGE and ultrastructure, the results showed that the protein yield rate of the five groups was 10.46%, 7.23%, 3.17%, 1.82%, and 0.53% respectively. The protein yield rate of the five groups had significant difference ( $P < 0.05$ ), Mega-10, lecithin, cholesterol improved the yield rate of ISCOMs. Next, eels were divided into 4 groups for immunization. Group 1 was injected with Trx-AerA fusion protein ISCOMs, Group 2 was injected with Trx-AerA fusion proteins, Group 3 was injected with Trx ISCOMs, and Group 4 was injected with Tris-Cl. After 30d, the immune effects were evaluated, five eels were selected from each group for the detection of the value of sera antibody while the others were challenged with *Aeromonas hydrophilla* ZN1. The results showed that the RPS of the eels immunized with Trx-AerA ISCOMs, Trx ISCOMs, Trx-AerA was 83.3% (13/15), 50% (9/15), and 0 (3/15) after being injected with  $2.0 \times 10^6$  CFU *Aeromonas hydrophilla* ZN1. The values of sera antibody to aerolysin during the group immunized with Trx-AerA ISCOMs and the group immunized with AerA were significantly higher than that of the group immunized with Trx ISCOMs ( $P < 0.05$ ). These results suggested that the non-specific immune response might contribute greatly to eel immunity except in the case of sera antibody.

**Key words:** *Anguilla anguilla*; *Aeromonas hydrophilla*; recombined aerolysin (Trx-AerA); ISCOMs; immunity