

溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaC* 基因 DNA 疫苗对红笛鲷的免疫保护

梁海鹰¹, 陈永新¹, 简纪常^{1,2*}, 吴灶和^{2,3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东海洋大学广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088;

3. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510206)

摘要: 为研究溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaC* 基因 DNA 疫苗对红笛鲷的免疫保护作用, 实验构建了重组真核表达质粒 pcDNA-*flaC* 并将该质粒肌肉注射红笛鲷, 采用 PCR、RT-PCR、ELISA 和攻毒试验等方法检测了该真核表达质粒在红笛鲷组织内的分布、表达和对红笛鲷的免疫保护。PCR 结果显示, 免疫接种 7 和 28 d, 注射点周围肌肉、鳃、肾脏、肝脏和脾脏都存在质粒分布; RT-PCR 结果显示, 免疫接种后第 7 天、14 天和 28 天, 红笛鲷不同组织内均有目的基因表达。ELISA 结果表明, 鱼血清内产生了抗 FlaC 蛋白的抗体, 表明 DNA 疫苗免疫后鱼体表达了目的蛋白, 并诱导产生了相应抗体。攻毒实验表明, 免疫后的红笛鲷能较好地抵抗致病性溶藻弧菌的感染。结果表明, 质粒 pcDNA-*flaC* 可能是抵抗溶藻弧菌感染的有效的疫苗候选物。

关键词: 红笛鲷; 溶藻弧菌; DNA 疫苗; 免疫保护率

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

弧菌病是由弧菌属细菌引起的一类细菌性疾病, 其中尤以溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌等引起的疾病危害严重, 其爆发流行给海水鱼类、贝类及甲壳类等经济动物的养殖业造成巨大的经济损失, 严重影响了水产养殖业的发展^[1-3]。有效控制这些疾病已成为水产养殖业持续增长的迫切要求。目前, 水产养殖中主要采用抗生素等化学药物防治鱼类细菌性病害, 但是抗生素等化学药物的长期使用, 会使病原菌产生抗药性, 且对养殖水域的生态环境造成严重的污染和破坏, 药物残留还会对人类构成潜在的威胁^[4-5]。因此, 开发预防水产病害的相关疫苗, 对于水产养殖业的健康发展具有十分重要的意义。

近年来, 鱼用疫苗已从病原体疫苗、亚单位疫苗发展到 DNA 疫苗的研制阶段^[6]。DNA 疫苗也称核酸疫苗、基因疫苗, 是将含有编码保护性抗原蛋白的基因序列和表达所必需调控元件的质粒 DNA 直接导入动物组织, 使抗原蛋白经过内源性表达并递呈给免疫系统, 诱发机体产生特异性体

液免疫和细胞免疫应答, 形成对相应病原的免疫保护作用^[7]。DNA 疫苗在人类和哺乳动物研究中已取得一定进展, 部分疫苗已进入临床试验阶段, 而鱼类 DNA 疫苗的研究则相对滞后^[8]。

弧菌通常具有 3 类抗原: 鞭毛抗原 (H 抗原)、菌体抗原 (O 抗原)、表面抗原 (K 抗原)。鞭毛抗原与细菌的免疫保护性密切相关, 因此, 鞭毛抗原既是病原细菌疫苗的重要材料, 又是制备免疫保护特异性强的疫苗的先决因素^[9]。本实验以溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaC* 基因的重组真核表达质粒 pcDNA-*flaC*^[10] 为抗原免疫红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*), 研究该质粒在红笛鲷组织中的分布和 *flaC* 基因的表达, 在免疫后第 28 天以活菌攻击, 分析 DNA 疫苗对红笛鲷的免疫保护效果, 探索防治弧菌病的鱼用 DNA 疫苗的可行性。

1 材料与方 法

1.1 菌株、实验鱼和质粒

溶藻弧菌强毒株 HY9901, 自广东省湛江海

收稿日期:2012-05-18 修回日期:2012-09-18

资助项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD29B03);广东省自然科学基金项目(9151064201000063);广东海洋大学自然科学研究项目(1012381);广东省大学生创新实验基金(2010);广东海洋大学大学生创新实验基金(2010)

通信作者:简纪常, E-mail:jianjichang@21cn.com;吴灶和, E-mail:wuzh@gdou.edu.cn

域患病红笛鲷鱼体中分离获得,并保存在广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨广东省水产经济动物病害控制重点实验室; *Escherichia coli* DH5 α 菌株由本实验室提供[基因型:F-endAl hsd1T(r-,m+) supE44 thi-1recAL λ -A96 relAL Δ (argF-LacZya) U16g Φ 80d LacZ Δ M15]。

表达质粒 pcDNA3.1(+) 由夏立群博士惠赠。重组质粒 pcDNA-flaC 由梁海鹰等^[10]构建。

实验用红笛鲷购自广东省湛江市特呈岛,饲养于湛江港麻斜鱼排,投喂小杂鱼饲养。为平均体质量(20 \pm 5)g的1龄鱼,鱼体体格健壮,游动活泼,无外伤。

1.2 工具酶和试剂

Prime STARTM HS DNA 聚合酶, *EcoR* I、*Xho* I 等限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司;提取无内毒素质粒试剂盒(PureLinkTM HiPure Plasmid Filter Purification Kits)购自英韦创津公司;动物组织基因组提取试剂盒购自 TaKaRa 公司;cDNA 第一链合成试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 真核重组质粒 pcDNA-flaC 抽提和纯化

将空质粒 pcDNA 3.1 和重组质粒 pcDNA-flaC 的阳性克隆分别接种于 5 mL LB 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。次日按 1:100 的比例扩大培养,参照试剂盒说明书提取质粒,并保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.4 实验鱼免疫

实验鱼随机分为 3 组,每组 45 尾,采用肌肉注射法对实验鱼进行免疫,注射部位为鱼背鳍基部肌肉。实验组:每尾鱼注射 10 μ g(溶于 50 μ L 无菌生理盐水)真核重组质粒 pcDNA-flaC;对照组 I:每尾鱼注射 10 μ g(溶于 50 μ L 无菌生理盐水)空质粒 pcDNA 3.1;对照组 II:每尾鱼注射 50 μ L 无菌生理盐水。

1.5 真核重组质粒在鱼组织中的分布检测

取免疫接种后第 7 天、28 天的红笛鲷,每组取 3 条,无菌操作取注射点周边肌肉、鳃、脾脏、头肾和肝组织,采用动物组织基因组提取试剂盒提取各组织的 DNA。以上述各组织 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。

上游引物 PC3:5'-CCGGAATTCATGGCTGT-AACAGTTAGTACT-3'(*EcoR* I)

下游引物 PC4:5'-CCGCTCGAGTTACTGCA-ATAGTGACATTGC-3'(*Xho* I)

阳性对照为重组质粒,阴性对照为注射空质粒和 PBS 的红笛鲷各组织。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳、鉴定。

1.6 flaC 基因的表达检测

免疫接种后第 7 天、14 天和 28 天,取上述红笛鲷各组织约 50 mg 用 TRIzol 试剂提取总 RNA,再用 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA。用引物 PC3、PC4,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。以鱼的 β -actin 基因作为阳性对照。参照不同鱼的 β -actin 基因进行比对设计引物。

β S1:5'-GCAGATGTGGATCAGCAAGCAG-GA-3'

β A1:5'-CGCCTGAGTGTGTATGAGAAATG-3'

反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,34 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;flaC:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,59 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.7 ELISA 检测血清中抗体滴度

免疫后第 7 天,14 天,21 天和 28 天的红笛鲷,尾静脉取血,4 $^{\circ}$ C 静置过夜,分离血清运用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗体效价。用纯化的重组蛋白 FlaC 为抗原包被 96 孔板,根据预实验确定最适抗原浓度为每孔 8 μ g/100 μ L。待测鱼抗 FlaC 血清为一抗,倍比稀释,二抗为 1:800 稀释的兔抗红鱼 IgM,三抗为 1:4 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。四甲基联苯胺(TMB)溶液显色后,加入 2.0 mol/L H₂SO₄ 终止反应,在酶标仪上读出波长 450 nm 的吸光值,抗体效价根据 P/N 值来确定。P/N = 待检血清的 OD₄₅₀/阴性血清的 OD₄₅₀。当 P/N > 2.0 时抗血清的最高稀释倍数为其最终抗体效价。用 Student's t-test 统计显著性差异。

1.8 攻毒保护试验

在免疫后 28 d,将上述 3 组实验鱼从湛江港麻斜鱼排取回实验室。暂养一周后,每组随机取 25 尾,每尾腹腔注射 0.1 mL 1.0 \times 10⁸ cfu/mL 的活菌悬液;观察 14 d,记录实验鱼的发病与死亡情况,对濒死鱼进行病理解剖和病原的再分离以确定是否死于攻毒活菌引起的感染,存活下来的鱼饲养于实验室继续观察。实验结束后计算免疫保

护率(RPS)。计算公式为 $RPS(\%) = (1 - \text{免疫组死亡率}/\text{对照组死亡率}) \times 100^{[11]}$ 。

2 结果

2.1 质粒的浓度和纯度检测

提取的重组质粒 pcDNA-*flaC* 经电泳检测(图1),第2泳道为所提质粒。经分光光度计测定,pcDNA-*flaC* 浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{OD}_{260/280} > 1.8$,说明质粒的纯度较高。

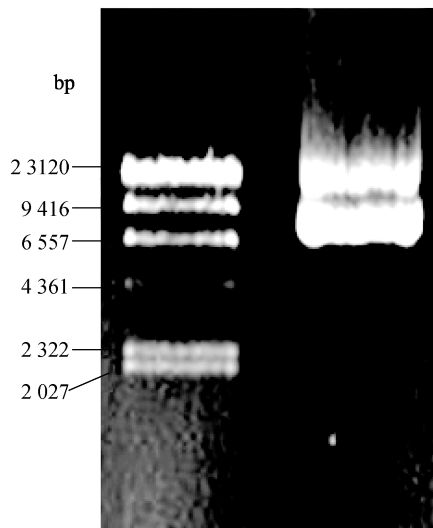


图1 重组质粒 pcDNA-*flaC* 提取结果

1. λ -*Hind* III digest DNA 分子量标准; 2. pcDNA-*flaC* 质粒。

Fig.1 Extraction result of pcDNA-*flaC*

1. λ -*Hind* III digest DNA marker; 2. pcDNA-*flaC* plasmid.

2.2 PCR 检测重组质粒的分布

在注射部位肌肉、头肾、鳃、肝和脾脏等的 DNA 中均扩增出了 1 155 bp 的片段;阴性对照红笛鲷各组织均未扩增出目的片段(图2,图3)。

2.3 RT-PCR 检测 *flaC* 基因的表达

RT-PCR 检测结果显示:注射重组质粒后第7天,各组织中 *flaC* 基因均有不同程度的表达;28 d 后各组织仍有表达(图4)。

2.4 抗体效价检测

免疫后的红笛鲷,分别在第7天,14天,21天和28天采血和收集血清,用间接 ELISA 法测定抗体效价。结果表明,红笛鲷在免疫后都发生特异免疫应答,免疫组与 PBS 阴性对照组存在显著差异($P < 0.01$),在免疫后第4周抗血清效价达最高值为 1:8 192,第1周效价最低为 1:1 536,第2和3周效价都是 1:3 072,对照组抗体效价没多大变化,为 1:2 ~ 1:8,为方便比较,效价以 Log_2

值表示(图5)。

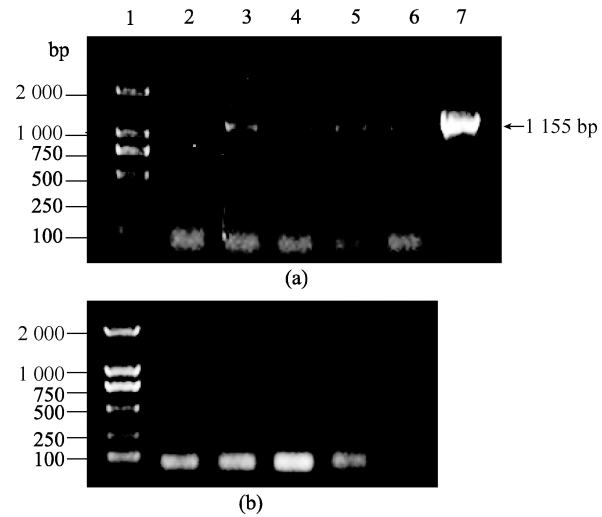


图2 红笛鲷接种 7 d 后重组质粒在各组织中的分布(a)及阴性对照 PBS(b)

1. DL 2000 DNA 分子量标准; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 头肾; 5. 鳃; 6. 注射部位肌肉; 7. 阳性对照。

Fig.2 Distribution of vaccine DNA in fish tissues sampled on 7 days(a) and (b) PBS negative control

1. DL 2000 DNA marker; 2. liver; 3. spleen; 4. head kidney; 5. gill; 6. injected muscle; 7. positive control.

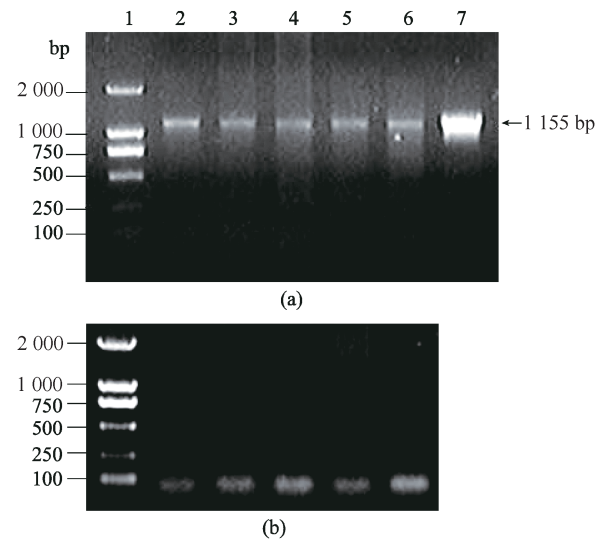


图3 红笛鲷接种 28 d 后重组质粒在各组织中的分布(a)及阴性对照 pcDNA3.1(b)

1. DL 2000 DNA 分子量标准; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 头肾; 5. 鳃; 6. 注射部位肌肉; 7. 阳性对照。

Fig.3 Distribution of vaccine DNA in fish tissues sampled on 28 days(a) and (b) pcDNA3.1 negative control

1. DL 2000 DNA marker; 2. liver; 3. spleen; 4. head kidney; 5. gill; 6. injected muscle; 7. positive control.

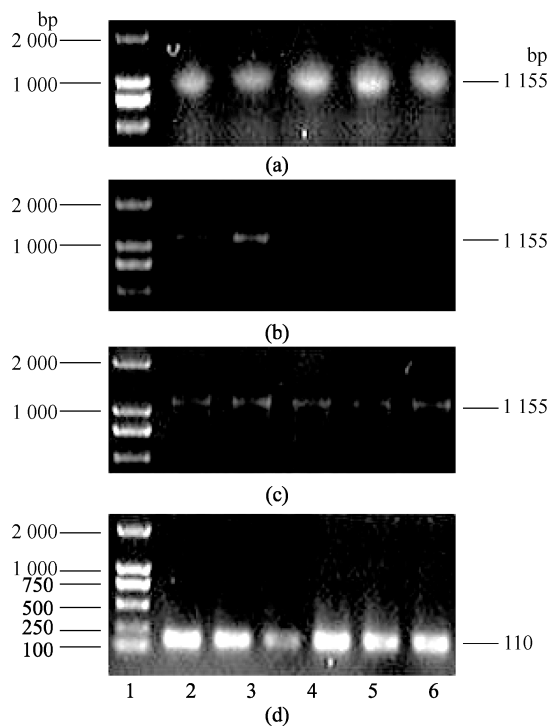


图4 接种后7 d,14 d和28 d后目的基因在红笛鲷各组织中表达的RT-PCR检测结果

(a)接种7 d;(b)接种14 d;(c)接种28 d;(d)对照 β -actin基因。

1. DL 2000 DNA 分子量标准; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 头肾; 5. 鳃; 6. 注射部位肌肉。

Fig. 4 Expression of aimed gene in tissues of fish on 7,14 and 28 days by RT-PCR

(a)7 days post injection; (b)14 days post injection; (c)28 days post injection; (d)control β -actin.

1. DL 2000 DNA marker; 2. liver; 3. spleen; 4. head kidney; 5. gill; 6. injected muscle.

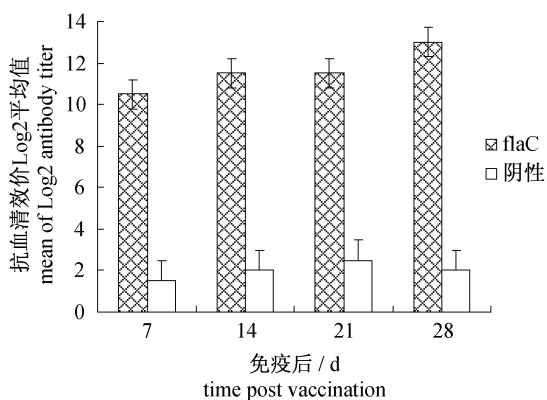


图5 间接ELISA法测定的免疫鱼抗体效价

Fig. 5 Antibody titers of vaccinated fish detected by ELISA

2.5 免疫保护率

试验鱼在活菌攻毒后14 d内出现了程度不

等的死亡率,死亡时间集中在攻毒后4~9 d,以后趋于稳定,未免疫的对照组全部死亡(图6)。部分发病鱼出现体表充血发红的症状,从濒死鱼肝、肾中重新分离到了溶藻弧菌,确认死于攻毒引起的感染。注射真核重组质粒pcDNA-flaC的实验组获得了92%的免疫保护率;注射空质粒pcDNA3.1的对照组I免疫保护率28%,注射生理盐水的对照组II全部死亡。

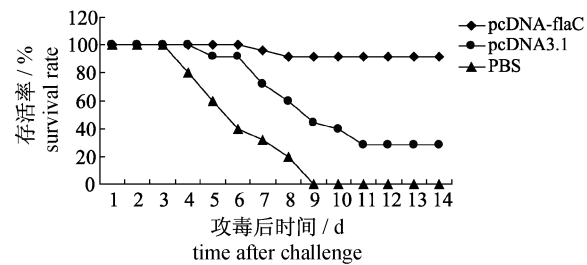


图6 重组真核质粒免疫后的红笛鲷用溶藻弧菌HY9901攻毒后的存活率

Fig. 6 Survival rate of *L. sanguineus* after challenged with *V. alginolyticus* HY9901

3 讨论

鱼类疫苗的免疫接种方法主要包括注射、浸泡、口服和基因枪接种4种方式。注射免疫尽管存在动物的应激和人工劳动强度大等问题,但却能使鱼类免疫接种取得较好效果^[12]。目前,大部分的鱼类DNA疫苗均采用的是注射免疫。注射部位一般选择在肌肉,腹腔,静脉和皮下。其中以肌肉注射最常见,肌肉注射能诱导疫苗基因的强而持久的表达^[13]。一般来说,适用鱼类的DNA疫苗注射剂量范围是1~50 μ g,体积范围在10~50 μ L,注射剂量往往因实验鱼的种类和个体大小而有所变化,但并不是越高的注射剂量越能引起更高的免疫应答^[6]。Heppell等^[14]研究结果显示,用0.02 μ g/ μ L质粒DNA溶液注射平均重量10 g的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)能够产生免疫保护。本研究我们选择的注射剂量为10 μ g,注射方式为肌肉注射,注射体积为50 μ L,产生了较强的免疫反应。

DNA疫苗注射入鱼体后可避免在注射部位被降解并到达其他的组织器官^[15-16],Anderson等^[17]用荧光素酶作报告基因,肌肉注射不同大小的虹鳟,发现小鱼的不同组织如鳃、脾脏、肾脏等,可检测到荧光素酶活性,但肌肉中的酶活性并不

最高;而在大鱼中,荧光素酶的表达则局限在注射部位。这两者的区别可能是因为疫苗在小鱼体内可迅速分布到不同组织,也可能与试验方法及敏感度有关^[6]。本研究 PCR 结果显示:免疫接种 7 d 后,注射点周围肌肉、鳃、头肾、肝脏、脾脏等部位存在质粒分布,1 个月后,各组织还能检测到质粒的存在;RT-PCR 检测结果显示:免疫接种后第 7、14 和 28 天,红笛鲷不同组织内均有目的基因表达。上述结果表明,接种重组质粒 pcDNA-*flaC* 后,该重组质粒可分布于接种红笛鲷的多种组织内,并在一定时间内持续表达,这种表达可不断提供抗原并刺激机体产生特异性的免疫应答。类似的结果在 DNA 疫苗对石斑鱼 (*Epinephelus awoara*)^[18] 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[19] 的免疫研究中也存在。

本研究显示,pcDNA-*flaC* 注射入鱼体后第 7 天就可检测到抗 FlaC 的抗体,抗体效应至少存在 28 天。Kanellos 等^[20] 用含 β -半乳糖苷酶 (*lacZ*) 基因的质粒 DNA 注射免疫金鱼,7 d 后在金鱼血清中能检测到抗 β -半乳糖苷酶的抗体。Heppell 等^[21] 用含 VHSV-G 基因的质粒 DNA 注射虹鳟,23 d 后能检测到抗 G 蛋白的抗体,血清抗体浓度在 3~8 周间达到峰值,抗体形成的浓度维持高水平达数周之久。

尽管鱼类 DNA 疫苗的免疫机制还不是很清楚,但很多研究表明 DNA 疫苗可以提供较好的保护效果。例如研究最多的虹鳟 DNA 疫苗的攻毒实验中,Lorenzen 等^[22-24] 构建了带有 IHNV 病毒 G 蛋白基因的 DNA 疫苗能够诱导 75% 的虹鳟产生较高水平的免疫保护。而抗 VHSV 的 DNA 疫苗,根据注射量不同,可以达到 78% 到 98% 的保护率。笔者在之前的研究中构建了溶藻弧菌鞭毛蛋白 *flaC* 基因的基因工程亚单位疫苗,并研究了该疫苗的免疫保护作用,发现它对红笛鲷的免疫保护率为 84%^[25]。本研究中攻毒实验发现免疫组的死亡率远远低于阴性对照组与空白对照组,免疫保护率可达 92%,且鱼发生死亡的情况相对于其它两组出现时间晚。结果证实,实验构建的 DNA 疫苗对预防由溶藻弧菌引起的疾病可能起到积极作用,将有望运用于生产实践中。

参考文献:

- [1] Liu P C, Lin J Y, Hsiao P T, *et al.* Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2004, 44 (1): 23-28.
- [2] Jayaprakash N S, Pai S S, Philip R, *et al.* Isolation of a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus* from necrotic larvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, 29 (3): 187-191.
- [3] 鄢庆彬,陈强,邹文政,等.不同环境条件对溶藻弧菌粘附大黄鱼肠粘液的影响[J].*水产学报*,2006,30(2):254-259.
- [4] Alcaide E, Blasco M D, Esteve C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (6): 3348-3350.
- [5] Press C M, Lillehaug A. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects [J]. *British Veterinary Journal*, 1995, 151 (1): 45-69.
- [6] Heppell J, Davis H L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 43 (1): 29-43.
- [7] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, *et al.* DNA vaccines: a novel approach to immunization [J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 1995, 17 (2): 79-83.
- [8] 伊光辉,林天龙,熊邦喜.鱼类 DNA 疫苗的研究进展[J].*中国水产科学*,2001,8(4):87-90.
- [9] 梁海鹰,夏立群,吴灶和,等.溶藻弧菌 HY9901 鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆及原核表达[J].*水产学报*,2010,34(1):155-162.
- [10] 梁海鹰,夏立群,吴灶和,等.溶藻弧菌 HY9901 鞭毛蛋白 *flaC* 基因的克隆和序列分析及真核表达质粒的构建[J].*吉首大学学报*,2010,31(3):95-100.
- [11] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [J]. *Developments in Biological Standardization*, 1981, 49: 447-454.
- [12] Press C M, Lillehaug A. Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects [J]. *British Veterinary Journal*, 1995, 151 (1): 45-69.
- [13] Gomez-Chiarri M, Livingston S K, Muro-Cacho C, *et al.* Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1996, 27 (1): 5-12.
- [14] Heppell J, Lorenzen N, Lorenzen E, *et al.* DNA

- vaccines for fish: protection against viral hemorrhagic septicemia virus in trout [R]. Abstract in First International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, 1997: 27 - 31.
- [15] Tonheim T C, Dalmo R A, Bøgvold J, *et al.* Specific uptake of plasmid DNA without reporter gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney after intramuscular administration [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 90 - 101.
- [16] Seternes T, Tonheim T C, Løvoll M, *et al.* Specific endocytosis and degradation of naked DNA in the endocardial cells of cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(12): 2091 - 2103.
- [17] Anderson E D, Mourich D V, Lenong J C. Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1996, 5(2): 105 - 113.
- [18] Qin Y X, Su Y Q, Wang S F, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of *Vibrio harveyi* pcFlaA DNA vaccine in *Epinephelus awoara* [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(4): 769 - 774.
- [19] Zheng F R, Sun X Q, Liu H Z, *et al.* Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1128 - 1134.
- [20] Kanellos T, Sylvester L D, Ambali A G, *et al.* The safety and longevity of DNA vaccines for fish [J]. *Immunology*, 1999, 96(2): 307 - 313.
- [21] Heppell J, Lorenzen N, Armstrong N K, *et al.* Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(4): 271 - 286.
- [22] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, *et al.* DNA vaccines as a tool for analyzing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 439 - 453.
- [23] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, *et al.* Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26(2): 173 - 179.
- [24] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K. Immunity to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life-stage [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(7): 585 - 591.
- [25] Liang H Y, Xia L Q, Wu Z H, *et al.* Expression, characterization and immunogenicity of flagellin FlaC from *Vibrio alginolyticus* strain HY9901 [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2): 343 - 348.

Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine containing flagellin *flaC* gene against *Vibrio alginolyticus* in red snapper (*Lutjanus sanguineus*)

LIANG Haiying¹, CHENG Yongxin¹, JIAN Jichang^{1,2*}, WU Zaohe^{2,3*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China;

3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510206, China)

Abstract: In order to study the immunogenic and protective effects of DNA vaccine, plasmid DNA encoding flagellin *flaC* gene (designated as pcDNA-*flaC*) was used as a DNA vaccine to immunize red snapper (*Lutjanus sanguineus*). The distribution, expression and immunoprotection of the DNA vaccine were analyzed in tissues of the red snapper by PCR, RT-PCR and challenge test. PCR results indicated that pcDNA-*flaC* was distributed in liver, spleen, kidney, gill and injection site muscle at 7 – 28 days after vaccination. RT-PCR results indicated that the *flaC* gene was expressed in all above tissues of vaccinated fish at 7 – 28 days after vaccination. These results demonstrated that the DNA vaccine was distributed and *flaC* gene was expressed in various tissues of vaccinated fish. Red snapper immunized with DNA vaccine showed higher serum antibody levels at 7 – 28 days after vaccination, compared to fish vaccinated with the control eukaryotic expression vector pcDNA3.1 and PBS. In addition, fish immunized with DNA vaccine developed a protective response to live *V. alginolyticus* challenge 28 days post-inoculation, as demonstrated by increased survival of vaccinated fish over the control fish. This study indicates that pcDNA-*flaC* is an effective vaccine candidate against *V. alginolyticus* infection.

Key words: *Lutjanus sanguineus*; *Vibrio alginolyticus*; DNA vaccine; relative percent survival

Corresponding author: JIAN Jichang. E-mail: jianjichang@21cn.com;

WU Zaohe. E-mail: wuzh@gdou.edu.cn