

无乳链球菌 Sip-GAPDH 嵌合核酸疫苗的 制备及免疫效果评价

王 蓓^{1,2,3}, 李桂欢^{1,2,3}, 鲁义善^{1,2,3},
汤菊芬^{1,2,3}, 吴灶和^{2,3,4}, 简纪常^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 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. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524088;

4. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘要: 为了研究无乳链球菌 Sip-GAPDH 嵌合核酸疫苗对罗非鱼链球菌病的免疫保护作用, 本研究通过 PCR 和重叠延伸拼接技术 (SOEing) 获得融合基因 *Sip-GAPDH*, 连接至真核表达载体 pcDNA3.1(+) 制备 DNA 疫苗, 通过背鳍肌肉注射方式免疫吉富罗非鱼, 免疫后第 7、28 天取样, 采用 PCR 及 RT-PCR 方法检测 pcDNA-Sip-GAPDH 在各个组织 (包括肌肉、脑、头肾、脾脏、鳃和肝脏) 中的表达情况。采用 ELISA、Real-time PCR 法和体外攻毒法分别分析各实验组不同时间血清抗体效价、免疫基因 (*IgM*、*IL-1 β* 和 *CD8*) 表达变化规律和相对保护率, 研究该嵌合性疫苗对吉富罗非鱼的保护效果。结果显示, 实验组在免疫接种第 7 和第 28 天时, 注射点周围的肌肉、脑、头肾、脾脏、鳃和肝脏均能检测到嵌合性质粒, 实验组罗非鱼血清抗体效价均高于对照组并于 21 d 时达到峰值 (1:4 096); qPCR 数据表明, 实验组鱼体胸腺、头肾和脾脏的 *IgM*、*IL-1 β* 和 *CD8* 基因的 mRNA 表达量均出现了上调, 并且在胸腺、头肾和脾脏中的表达量分别在免疫后第 12 和第 48 h 达到峰值; 免疫后 42 d 进行人工攻毒后计算免疫保护率为 93.3%。以上研究结果表明, 本研究构建的无乳链球菌 Sip-GAPDH 嵌合核酸疫苗在罗非鱼链球菌病防治中具有潜在的应用价值。

关键词: 无乳链球菌; 罗非鱼; Sip-GAPDH; 嵌合基因; 核酸疫苗; 免疫保护率

中图分类号: S 941

文献标志码: A

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 为革兰氏阳性菌, 可引起鱼类脑膜炎, 奶牛乳腺炎, 新生儿败血症等疾病, 是为数不多的几种人兽鱼共患的病原菌之一^[1-3]。近几年, 我国罗非鱼养殖区暴发了大规模的链球菌病, 罗非鱼一旦感染此病, 短期内将大量死亡, 目前缺乏有效的防治措施^[4]。Sip 是一种表面免疫相关蛋白 (surface immunogenic protein, SIP), 在 B 群链球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS) 多种血清型菌株中均有表达, 对细菌的粘附和定植以及逃避宿主免疫方面具有重要作用, 因而成为无乳链球菌候选疫苗靶

基因之一^[5]。在前期的工作中已证实构建的 Sip 核酸疫苗对罗非鱼抗链球菌病具有良好的保护作用^[6]。GAPDH 是糖酵解过程中一种非常关键的酶, 它不仅在细胞能量代谢过程中扮演重要角色, 而且还具有作为疫苗候选抗原的潜力, 近年来的研究表明, GAPDH 蛋白作为抗微生物和寄生虫感染的疫苗具有良好的免疫原性^[7]。

随着分子生物学的发展, 通过人工合成或重叠延伸等方法可将几个不同的基因片段相互拼接起来形成嵌合基因, 表达不同蛋白质的融合体, 同时展现不同来源蛋白质的活性和功能, 甚至可以

收稿日期: 2014-05-22 修回日期: 2014-10-04

资助项目: 国家自然科学基金青年基金 (31302226); 国家科技支撑计划 (2012BAD17B02, 2012BAD17B03); 广东省科技计划农业攻关项目 (2012B020308009); 广东省 2012 年鱼病防治专项资金 (2130108)

通信作者: 简纪常, E-mail: jianjc@gmail.com

获得协同效应^[8]。核酸疫苗因其具有传统灭活疫苗所不具备的稳定性、安全性、高效性及长时性,而成为近期开发的热点,此外核酸疫苗还可构建多价疫苗,使其发展前景较为广阔^[9]。

本研究以 pcDNA3.1 (+) 为载体,利用重叠延伸 PCR 技术将两个有效的疫苗靶位点嵌合,构建了 pcDNA-Sip-GAPDH 核酸疫苗,通过肌肉注射方式免疫吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), 分析各实验组鱼体血清抗体效价,免疫相关基因表达变化以及免疫保护率,研究该嵌合疫苗对罗非鱼的保护效果,为抗链球菌核酸制剂的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物及菌株 吉富罗非鱼(体质量为 100 g 左右)采自湛江东海岛养殖基地,健康、有活力。并参照黄锦炉等^[10]方法,随机取 10 尾实验鱼的脑、肝脏和肾脏组织,采用三重 PCR 法对其进行快速检测,实验结果均为阴性。pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5 α , 质粒 pcDNA3.1 (+)、无乳链球菌强毒株 ZQ0910^[11]、pMD18-Sip^[6] 和 pMD18-GAPDH^[12] 均为本实验室保存。

实验试剂 限制性内切酶 *Bam* H I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶和 Prime STARTM HS DNA polymerase 均购自 TaKaRa 公司(日本);qPCR 试剂为 ABI 公司产品;小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 和显色底物 DAB 均为武汉博士德产品(中国);细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品(中国),质粒小量提取试剂盒为

Thermo Scientific 公司产品(美国),Endo-Free Plasmid Maxi Kit 无内毒素大提质粒试剂盒为 OMEGA 公司产品,Trizol 为 Invitrogen 公司产品、cDNA 第一链合成试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),Anti-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) IgM monoclonal antibody 购自英国 Aquatic Diagnostics Ltd 公司。

1.2 实验方法

细菌基因组 DNA 提取及 Sip、GAPDH 基因扩增 按照天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取无乳链球菌基因组 DNA,根据 GenBank 上已登录的 *Sip*、*GAPDH* 基因序列(EIM 69670.1、EIM71266.1),应用 Primer5.0 软件,设计两对引物 P1/P2、P3/P4 分别用于扩增准备进行融合的基因,该引物中引入了柔韧性较好的 (Gly₄Ser)₃ 氨基酸多肽作为 linker 序列(表 1 斜体部分)链接 2 个基因,并在 P1/P4 引物中分别引入酶切位点 *Bam* H I 与 *Sal* I,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。以 pMD18-Sip 和 pMD18-GAPDH 质粒为模板,采用引物 P1/P2、P3/P4 分别扩增 *Sip* 和 *GAPDH* 基因。PCR 体系为,模板 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L,dNTP Mixture 4 μ L,Prime STARTM HS DNA polymerase 0.5 μ L,5 \times Prime STARTM Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L,ddH₂O 31.5 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C/57 $^{\circ}$ C (*Sip*/*GAPDH*) 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 34 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后切胶回收,然后克隆入 pMD18-T 载体,菌落 PCR 鉴定后将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 *Sip-GAPDH* 融合基因扩增引物
Tab.1 The amplification primers of *Sip-GAPDH*

| 引物名称 name of primers | 序列 sequence |
|-------------------------|--|
| <i>Sip</i> 基因上游引物 P1 | CGCGGATCCATGAAAATGAATAAAAAGGTACT |
| <i>Sip</i> 基因下游引物 P2 | <i>GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTCCACCGCCACCTTTGTTAAATGATACGTGAACG</i> |
| <i>GAPDH</i> 基因上游引物 P3 | <i>GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCATGGTAGTTAAAGTTGGTATTAAACG</i> |
| <i>GAPDH</i> 基因下游引物 P4 | ACGCGTCGACTTATTTTGCAATTTTGCAAA GTATT |

注:其中黑色加粗部分为互补的 linker 序列;下划线部分表示分别引入的 *Bam* H I 与 *Sal* I 酶切位点

Notes:the black-bordered indicates the sequence of complementary linker,and the underlined indicates restriction enzyme digestion of *Bam* H I and *Sal* I

Sip 与 *GAPDH* 基因融合 取 *Sip* 与 *GAPDH* 回收产物各 2 μ L 混合作为模板,PCR 体

系为,*Sip* + *GAPDH*(2 μ L + 2 μ L),10 \times LA Buffer 5 μ L,LA Taq 酶 1 μ L,dNTP Mixture 4 μ L,ddH₂O

33 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,10 个循环;然后向 PCR 管中补加引物 P1、P4 和 LA Taq 酶各 1 μL ,继续进行 PCR 循环 25 个,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。然后克隆入 pMD18-T 载体构建,菌落 PCR 鉴定后将阳性克隆质粒 pMD18-Sip-GAPDH 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

重组真核质粒构建及大量提取 按照质粒提取试剂盒说明书方法提取 pMD18-Sip-GAPDH 和 pcDNA3.1 (+) 质粒,采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后,用 T4 连接酶连接,后转入大肠杆菌 DH5 α 中,然后采用菌落 PCR 方法,从中挑选出阳性克隆菌扩大培养后,送往上海生工测序部测序鉴定。鉴定成功的阳性菌扩大培养后按照无内毒素质粒提取试剂盒说明书进行质粒 DNA 提取,电泳检测后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

免疫实验鱼及血清效价测定 将健康无病的罗非鱼随机分为 3 组,每组 180 尾(设 3 个重复,每个重复 60 尾鱼)以背鳍基部肌肉注射法对鱼体进行免疫。分组情况如下,实验组:肌肉注射质粒 pcDNA-Sip-GAPDH 组;对照组 1:肌肉注射空质粒 pcDNA3.1 组;对照组 2:肌肉注射生理盐

水组。其中对照组 2 注射 0.1 mL 生理盐水,其余各实验组鱼体按 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 鱼体质量注射各重组质粒及空质粒(溶于 0.1 mL 无菌生理盐水)。在免疫后第 7、14、21、28、35、42 天以尾静脉取血的方式,在各组免疫鱼中随机取 3 尾鱼的血清,室温放置 2 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日以 4 500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,采用间接 ELISA 法分别测定其抗体效价。

罗非鱼体内 Sip-GAPDH 的表达 分别在免疫后第 7、28 天,取对照组和实验组罗非鱼注射点周边肌肉、脑、头肾和脾脏组织,每组随机取 3 尾鱼。RNA 提取采用 Invitrogen Trizol 试剂说明书方法进行,总 RNA 完整性和纯度通过凝胶电泳进行检测,采用核酸微量分析仪进行 RNA 浓度分析,cDNA 一链采用反转录试剂盒合成,采用海洋动物基因组提取试剂盒提取各组织 DNA。以采用核酸微量定量仪将提取的鱼体组织 cDNA 一链和 DNA 统一调整为 50 ng/ μL ,作为 PCR 反应模板,采用 *Sip-GAPDH* 特异性引物 P1/P4(表 1)和 β -*actin* 引物(表 2)进行 PCR 扩增,反应体系与扩增 Sip 与 GAPDH 时相同,将使用两对 PCR 引物扩增的产物进行混合上样,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 *IgM*、*IL-1 β* 、*CD8* 及 β -*actin* 基因的扩增引物
Tab. 2 The amplification primers of *IgM*, *IL-1 β* , *CD8* and β -*actin*

| 引物名称 name of primers | 序列 sequence | 基因登录号 GenBank accession number |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>IgM</i> 1 | 5'-TATTTGTCAGCCTTACCAGT-3' | KF305823 |
| <i>IgM</i> 2 | 5'-AGCACTTGGAGTCTTGGTTGA-3' | |
| <i>IL-1β</i> 1 | 5'-AACACTGACAGAACAACCTGCGAACA-3' | XM_003460625 |
| <i>IL-1β</i> 2 | 5'-TCGCAGTTGTTCTGTCAGTGTGTT-3' | |
| <i>CD8</i> 1 | 5'-ATGGACCAAAAATGGCTTCTG-3' | ABN58893.1 |
| <i>CD8</i> 2 | 5'-GCTGAAAGATCCAATGAATTC-3' | |
| β - <i>actin</i> 1 | 5'-AACAAACCACACACCACACATTC-3' | ABN58893.1 |
| β - <i>actin</i> 2 | 5'-TGTCTCCTTCATCGTTCCAGTTT-3' | |

攻毒及免疫保护率计算 免疫 42 d 后,从各组实验鱼中随机取 90 尾(每个重复随机取 30 尾),采用加热棒将水温调整至 32 $^{\circ}\text{C}$,正常饲料喂养。将制备好的 5.6×10^8 cfu/mL 浓度的无乳链球菌活菌悬液,腹腔注射入实验鱼体内,每尾 0.2 mL。另取 30 尾未免疫的罗非鱼注射相同剂量的无菌 PBS 作为对照组 3。所有实验组均观察 14 d,同时记录各组鱼的发病与死亡情况。对濒临死亡的鱼进行解剖与

病原分离,确定其是否由活菌攻毒致死。

免疫保护率(relative percentage survival, RPS)的计算公式参照 Amend(1981)^[13],RPS = (1 - 免疫组死亡率/对照组死亡率) \times 100%。

qRT-PCR 分析罗非鱼免疫相关基因差异表达 分别取免疫后各组罗非鱼 6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、7 d、14 d、28 d、42 d 的胸腺、脾脏、头肾组织参照 Trizol 总 RNA 抽提试剂说明书提取总 RNA,按

照试剂盒方法反转录为 cDNA 一链,以得到的 cDNA 一链为模板,分别用 β -actin (内参)、*IgM*、*IL-1 β* 、*CD8* 作为引物(表 2),采用 ABI7900(美国)进行 Real-time PCR。2 \times SYBR Select Master Mix 12.5 μ L,正向引物 1.0 μ L,反向引物 1.0 μ L,cDNA 2 μ L,H₂O 8.5 μ L。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,每次延伸后采集荧光信号。应用 ABI 7900 自带软件,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行结果分析。采用 SPSS 17.0 软件对所得实验数据进行单因素方差分析。文中 * 表示与同期对照组相比差异显著($0.01 < P < 0.05$),** 表示与同期对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 pcDNA-Sip-GAPDH 重组质粒的构建

通过重叠延伸技术,利用特异性引物进行 PCR 体外扩增,得到一条长度为 2 358 bp 的特异性条带(图 1),与预期相符,并经过克隆测序证实其正确性。通过双酶切连接到 pcDNA3.1(+)载体后,对连接产物进行双酶切,分别得到 2 条大小约为 2.4 和 5.4 kb 的条带,结合测序结果说明 pcDNA-Sip-GAPDH 重组质粒已构建成功(图 2)。

2.2 安全性及抗体效价检测

各组抗原以背鳍肌肉注射的方式注入鱼体内,经观察,所有鱼都无异常现象出现,生命体征状况良好,表明各组抗原是安全的,可以进行后续实验。分别在第 7、14、21、28、35、42 天对免疫后的罗非鱼进行采血,收集各组的血清,采用间接

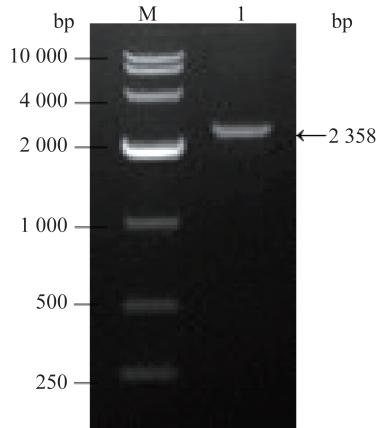


图 1 *Sip-GAPDH* 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
M. DL 10000 分子量; 1. *Sip-GAPDH* PCR 产物

Fig. 1 Agarose gel map of *Sip-GAPDH* by PCR

M. DL 10000 marker; 1. PCR product of *Sip-GAPDH*

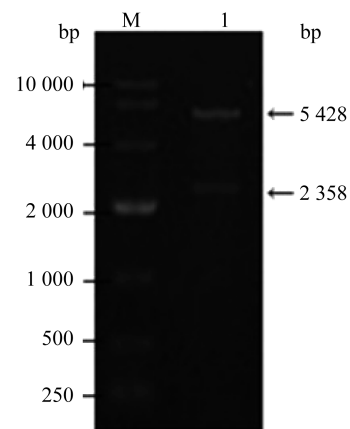


图 2 重组质粒 pcDNA-Sip-GAPDH 酶切鉴定

Fig. 2 The determination of the recombinant plasmid pcDNA-Sip-GAPDH by enzyme restriction

ELISA 的方法测定抗体效价。结果表明,罗非鱼在接种疫苗后,发生了特异性免疫反应,各免疫组与对照组均具有显著性差异($0.01 < P < 0.05$),在第 7 天即可检测到抗体的产生,在第 21 天抗体水平达到峰值(1:4 096)(图 3)。

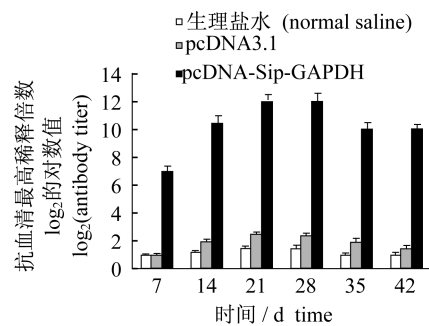


图 3 间接 ELISA 法测定的免疫鱼抗体效价

Fig. 3 Antibody titers of vaccinated fish detected by ELISA

2.3 免疫保护率计算

使用活菌攻毒后,实验组及对照组罗非鱼在 14 d 内出现了不同程度的死亡,其死亡时间集中在活菌攻毒后的 4~8 d,之后基本稳定;发病鱼出现了体表充血、眼球突出、角膜混浊,体色变深等症状,解剖发病鱼具有肝脏淤血,出血,脾脏肿大,肠腔积水等典型的链球菌病的发病症状,对病灶组织进行病原分离鉴定,证实了发病鱼是由注射的无乳链球菌而引发感染致死。实验结果显示:实验组 pcDNA-Sip-GAPDH 的免疫保护率为 93.3%,空质粒对照组 1pcDNA3.1 组只有 30% 的保护率;对照组 2 的实验鱼在 14 d 内则全部发

病死亡;而注射 PBS 的健康对照组 3 的罗非鱼在 14 d 内未出现死亡现象(图 4)。

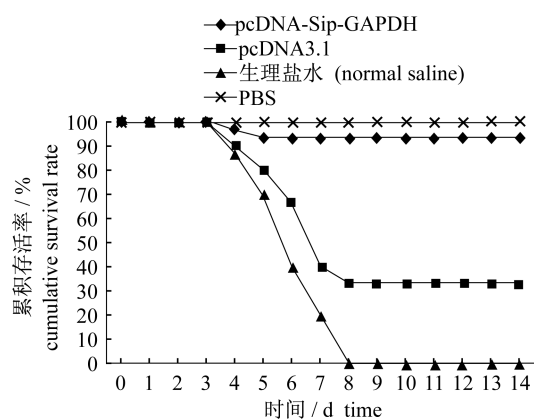


图 4 免疫后的罗非鱼用无乳链球菌攻毒后的存活率

Fig. 4 Survival rate of tilapia after being challenged with *S. agalactiae*

2.4 吉富罗非鱼体内 *Sip-GAPDH* 嵌合基因的表达情况

为确定所构建的重组质粒在罗非鱼组织中的表达,分别在注射免疫 7、28 d 取实验组和对照组肌肉、脑、头肾、脾脏、鳃和肝脏组织,经 PCR 和 RT-PCR 检验分析该嵌合基因的表达情况。无论是在 DNA 水平还是 RNA 水平上,实验组均能检

测到嵌合基因的表达,而对照组未检测到该基因的表达,并且各重组质粒均可检测到内参基因的存在,表明所构建的重组质粒 pcDNA-Sip-GAPDH 可在罗非鱼体内表达(图 5,6)。

表 3 嵌合疫苗免疫吉富罗非鱼后获得的累积存活率

Tab. 3 Effects of chimeric DNA vaccine on the survival rate of *O. niloticus*

| 注射无乳链球菌后天数/d days after injection with <i>S. agalactiae</i> | 累积存活率/% survival rate | | | |
|--|-----------------------|-------------|-------------|-------|
| | 实验组 | 对照组 1 | 对照组 2 | 对照组 3 |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 97 ± 3.36 | 90 ± 2.23 | 88 ± 0.65 | 100 |
| 6 | 93 ± 5.35 * | 80 ± 1.16 | 70 ± 6.31 * | 100 |
| 7 | 93 ± 2.21 | 68 ± 2.44 | 40 ± 5.54 * | 100 |
| 8 | 93 ± 3.35 * | 40 ± 1.03 | 20 ± 2.21 | 100 |
| 9 | 93 ± 2.88 * | 32 ± 0.22 | 0 | 100 |
| 10 | 93 ± 1.24 | 32 ± 3.23 | 0 | 100 |
| 11 | 93 ± 3.11 | 32 ± 1.66 | 0 | 100 |
| 12 | 93 ± 2.11 | 32 ± 4.56 * | 0 | 100 |
| 13 | 93 ± 0.21 | 32 ± 0.36 | 0 | 100 |
| 14 | 93 ± 1.11 | 32 ± 2.98 | 0 | 100 |

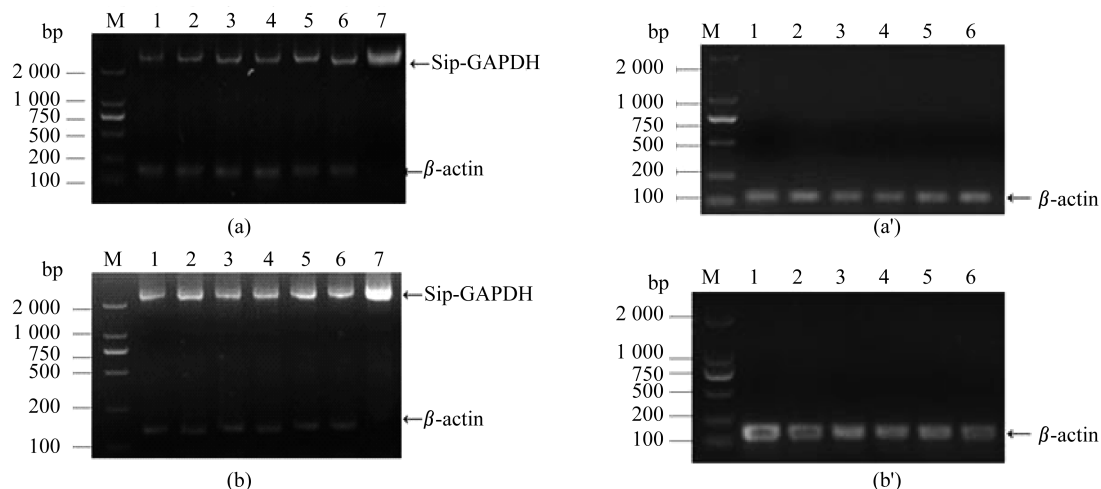


图 5 接种后 7、28 d 目的基因 *Sip-GAPDH* 在罗非鱼各组织中表达的 RT-PCR 检测结果

(a) 7 d 检测结果; (a') 阴性对照; (b) 28 d 检测结果; (b') 阴性对照

M. DL 2000 marker; 1. 肌肉; 2. 脑; 3. 头肾; 4. 脾脏; 5. 鳃; 6. 肝脏; 7. 阳性对照

Fig. 5 Expression of aimed gene in tissues of fish on 7, 28 days by RT-PCR

(a) detection result on 7 days; (a') negative control; (b) detection result on 28 d days; (b') negative control

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

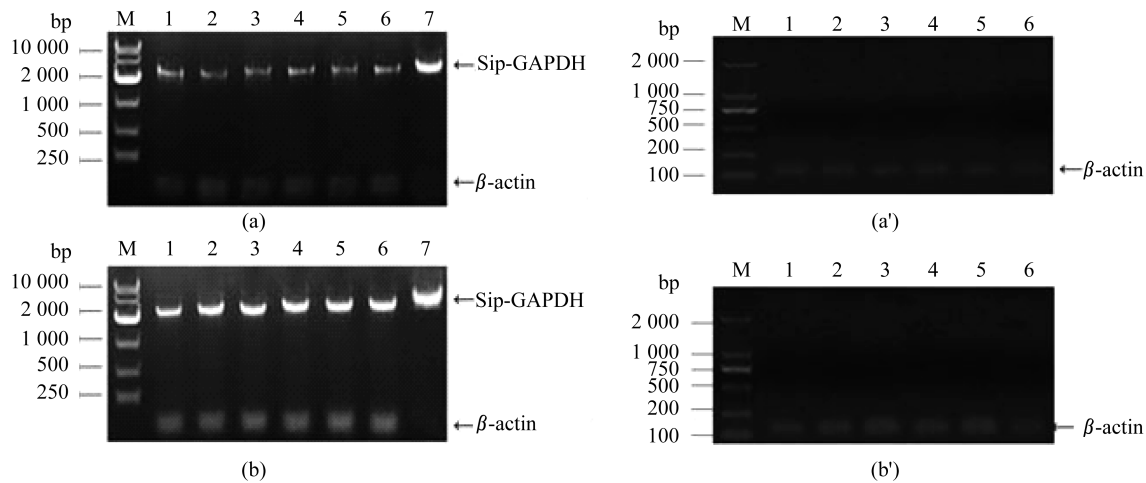


图 6 接种后 7、28 d 目的基因 *Sip-GAPDH* 在罗非鱼各组织中表达的 PCR 检测结果

(a) 7 d 检测结果; (a') 阴性对照; (b) 28 d 检测结果; (b') 阴性对照

M. DL 10000 marker; 1. 肌肉; 2. 脑; 3. 头肾; 4. 脾脏; 5. 鳃; 6. 肝脏; 7. 阳性对照

Fig. 6 Expression of aimed gene in tissues of fish on 7, 28 days by PCR

(a) detection result on 7 days; (a') negative control; (b) detection result on 28 d days; (b') negative control

M. DL 10000 marker; 1. muscle; 2. brain; 3. head kidney; 4. spleen; 5. gill; 6. liver; 7. positive control

2.5 罗非鱼免疫相关基因差异表达的结果分析

实验采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分别对 *IgM*、*IL-1 β* 和 *CD8* 基因在胸腺、脾脏和头肾组织中, 10 个时间点的表达情况进行了分析。结果显示, 注射嵌合型核酸疫苗以后, 罗非鱼体内 *IgM*、*IL-1 β* 和 *CD8* 基因的 mRNA 表达量均出现了上调 ($P < 0.01$)。其中, 免疫后 12 h, *IgM* 在胸腺和头肾中表达量达到峰值 ($P < 0.01$), 在免疫后 48 h, *IgM* 在脾脏中的表达量迅速上调至峰值 ($P < 0.01$), 随着时间的延长, 各组织中的 *IgM* 逐渐降低到一个平稳水平, 但仍高于对照组 (图 7); *IL-1 β* 在胸腺、头肾和脾脏中的表达量在 12 h 即可达到峰值 ($P < 0.01$) (图 8); 在胸腺、脾脏和头肾组织中 *CD8* 的表达量均在 2 d 后达到峰值, 随后有一定下降但仍高于对照组水平 ($P < 0.01$) (图 9)。

3 讨论

核酸疫苗又称 DNA 疫苗, 它是指将含有编码抗原基因的真核表达质粒, 通过注射或口服的方式接种到动物体内, 使得外源蛋白能够在动物体内表达, 刺激动物免疫应答^[12]。由于它能够表达出免疫系统天然的抗原, 诱导机体的细胞免疫和体液免疫应答, 并且生产便捷, 成本低廉, 因此

成为未来新型疫苗的发展方向之一, 在由病毒和细菌引起的疾病防治中有着良好的应用前景^[14-17]。由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病给我国南方罗非鱼养殖业带来了巨大的经济损失。而现阶段缺乏对罗非鱼源无乳链球菌有效的治疗药物, 采用疫苗免疫的策略防控鱼类链球菌病是最有效的途径, 寻找有效的疫苗靶蛋白是研制高效渔用疫苗的关键。近年来的研究表明, *GAPDH* 和 *Sip* 均可作为疫苗开发的重要靶蛋白, 具有良好的免疫保护性^[5, 18-20]。嵌合疫苗是在基因水平上改造病原体, 将病原体的两个或多个基因片段用基因工程的方法以不同形式连接或置换, 构建一个能表达两种或多种抗原物质的重组基因用于疫苗的制备^[21]。近年来此类疫苗的应用范围逐渐扩大, 大量的动物实验证明, 嵌合疫苗能够增强动物对外来抗原免疫应答反应, 具有乐观的应用前景。因此本研究在前期工作的基础上, 选取无乳链球菌 ZQ0910 株中保守的 *Sip* 与 *GAPDH* 基因, 成功通过重叠延伸拼接技术构建了 *Sip-GAPDH* 融合基因, 并结合核酸疫苗的制备方法成功构建了嵌合性核酸疫苗, 这为探索该融合性核酸疫苗的免疫原性提供有力的理论基础, 也丰富鱼类核酸疫苗的研究内容。

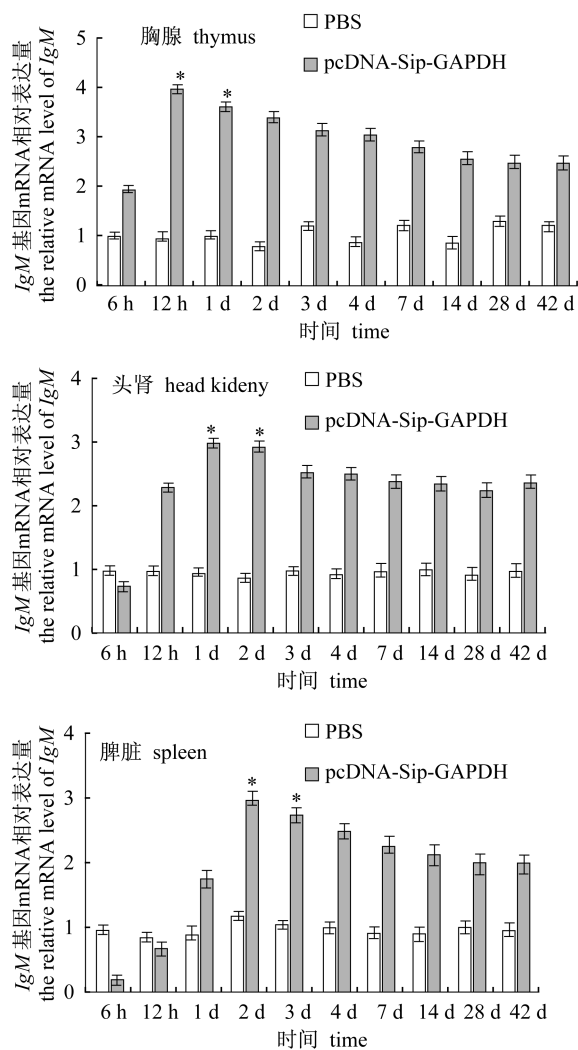


图7 qRT-PCR检测注射pcDNA-Sip-GAPDH后罗非鱼主要免疫器官组织中*IgM*基因mRNA时空表达情况

Fig.7 Temporal expression of *IgM* in major immune organs of *O. niloticus* after pcDNA-Sip-GAPDH challenge was measured by fluorescent real-time RT-PCR

本研究成功构建了嵌合性核酸疫苗,并采用能够诱导宿主抗原基因持久表达的肌肉注射法作为本实验的免疫方式^[22],对一定数量的吉富罗非鱼进行免疫,从研究结果来看,无论在DNA水平还是mRNA水平,罗非鱼肌肉、脑、头肾、脾脏和肝组织中均能检测到目的质粒。抗体效价7d时就明显高于对照组并于21d达峰值,表明该核酸疫苗能诱导罗非鱼产生较强的免疫应答,攻毒实

验发现各实验组的死亡率明显低于生理盐水和pcDNA3.1空质粒对照组,免疫保护率高达93.3%,高于曾经报道过的pcDNA-Sip核酸疫苗90%的免疫保护率^[6]。本研究结果佐证了嵌合疫苗能够提高单价疫苗的免疫保护效果,证实了构建的嵌合DNA疫苗对无乳链球菌病的暴发可起到一定的防治作用,也为DNA疫苗的实际应用提供了理论依据。

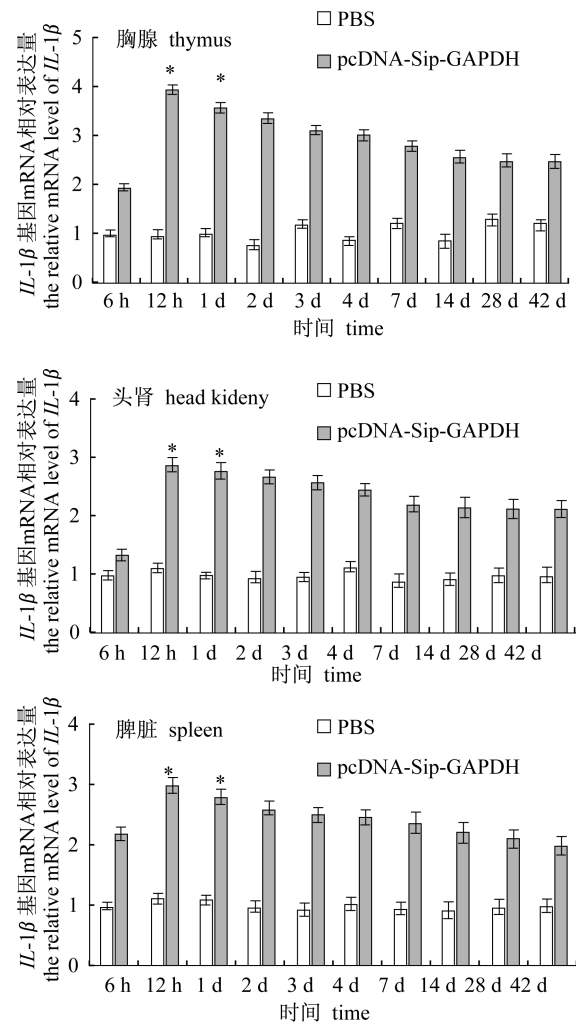


图8 qRT-PCR检测注射pcDNA-Sip-GAPDH后罗非鱼主要免疫器官组织中*IL-1β*基因mRNA时空表达情况

Fig.8 Temporal expression of *IL-1β* in major immune organs of *O. niloticus* after pcDNA-Sip-GAPDH challenge was measured by fluorescent real-time RT-PCR

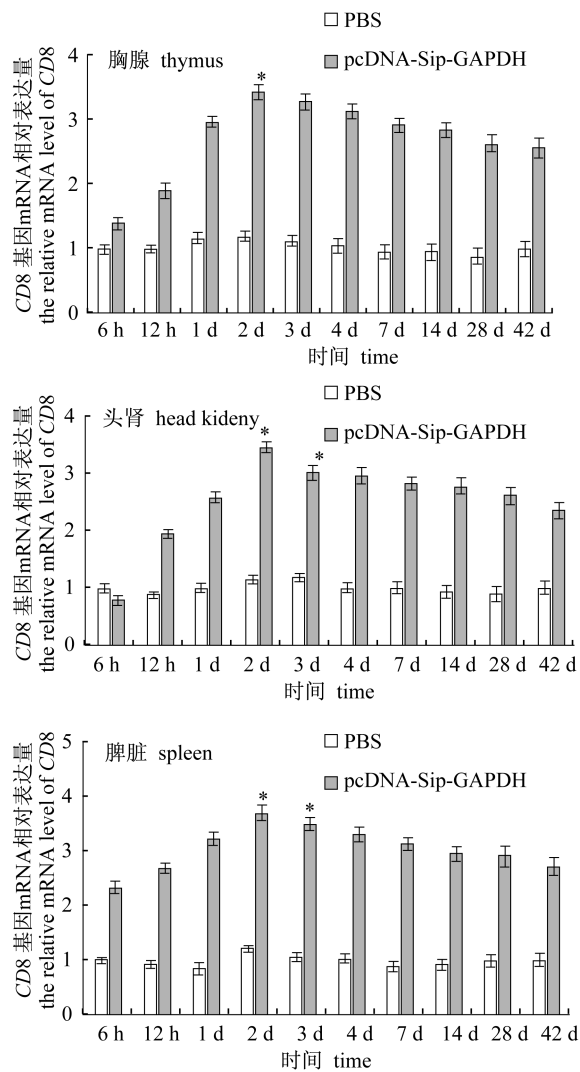


图9 qRT-PCR检测注射pcDNA-Sip-GAPDH后罗非鱼主要免疫器官组织中CD8基因mRNA时空表达情况

Fig. 9 Temporal expression of CD8 in major immune organs of *O. niloticus* after pcDNA-Sip-GAPDH challenge was measured by fluorescent real-time RT-PCR

IgM 是硬骨鱼类中最常见的免疫球蛋白分子,在体液免疫中发挥着重要的作用^[22],因此除了检测血清中的抗体效价之外,对 IgM mRNA 的时空表达形式也应做相应的探索。本研究选取了罗非鱼的主要免疫器官及链球菌病的靶器官组织进行相对定量分析,结果显示实验组罗非鱼 IgM 的 mRNA 表达量在免疫初期有轻微的下调趋势,12 h 后在上述各器官中均出现明显的上调现象,实验组鱼胸腺和头肾中的表达量在 24 h 即可达到峰值,达峰时间较快,而脾脏中的达峰时间相对

较长,需时 48 h。由于脾脏是鱼体 B 细胞成熟分化的场所,浆细胞的产生需要抗原的刺激^[24],而疫苗作为一种高效的胸腺依赖性抗原,能够在 T 细胞的辅助下有效的刺激 B 细胞转化为浆细胞并产生相应的抗体,因此实验组罗非鱼 IgM mRNA 表达量达到最高值的时间有所延长,之后有一定程度的下降但仍能维持在一个较高的水平。IL-1 β 又称淋巴细胞刺激因子,在较低浓度时就可以参与机体免疫调节,协同刺激抗原提呈细胞和 T 细胞活化,促进 B 细胞增殖和分泌抗体,并且有研究称它在鱼类粘膜免疫应答的起始阶段起到了重要作用^[25],因此探索疫苗是否能刺激机体细胞产生该种细胞因子及其变化规律是非常有必要的。本研究结果表明,实验组鱼体 3 个主要的免疫组织中的 IL-1 β mRNA 表达量在 6 h 时相对于对照组已经出现了上调并迅速升高,在 12 h 时达到最高,并在接下来的 42 d 内均维持在较高的表达水平,这说明疫苗注入到鱼体内能够促进细胞因子的表达从而发挥免疫调节作用,进一步促进机体对抗原的免疫应答反应,这一研究结果与 Lee 等^[25]采用 LPS 刺激尼罗罗非鱼 IL-1 β 的表达情况相同。机体的细胞免疫应答主要是在 T 细胞的介导下完成的,近年来,一些参与 T 细胞活化的关键分子,如 TCR、CD3、CD4、CD8 等在鱼类中相继被发现,说明鱼类可能具有类似于高等脊椎动物的 T 细胞应答过程。此外, Nithikulworawong 等^[26]还克隆到了尼罗罗非鱼 TCR β 的 cDNA 序列,并通过 qRT-PCR 发现 TCR β 在胸腺中的表达水平最高,并且无乳链球菌能诱导 TCR β 显著上调表达,这说明罗非鱼很可能具有与高等脊椎动物类似的、能为 T 细胞活化提供第一信号的受体。刘冬^[27]克隆了尼罗罗非鱼 T 细胞特异性分化抗原 CD3 γ/δ 、CD4 和 CD8 α ,发现三者都具有哺乳动物直系同源物的一些典型结构特征,并在主要的免疫器官中的表达量最高。作为 T 细胞活化的第一信号,以上分子在罗非鱼细胞免疫过程中扮演着重要的角色,本研究重点探讨了鱼体主要免疫器官中 CD8 分子在疫苗免疫过程中的表达变化,结果表明,3 个免疫器官中,CD8 分子 mRNA 表达量在 48 h 时达到最高,随后稍有下降但仍维持在较高的水平,这与刘冬等^[27]的研究结果相似,说明了该嵌合型疫苗能有效激发鱼体的细胞免疫,能够更高效地清

除病原从而达到防病抗病的作用。

4 结论

本研究成功构建了罗非鱼源无乳链球菌嵌合型核酸疫苗 pcDNA-Sip-GAPDH, 免疫吉富罗非鱼后, 在核酸和蛋白水平上均能检测到目的抗原蛋白的表达, 血清抗体效价可高达 1:4 096, 并获得了高达 93.3% 的免疫保护率。实验组鱼主要免疫组织中的 *IgM*, *IL-1 β* 和 *CD8* 基因的 mRNA 表达量较对照组均有显著的上调。以上数据说明了使用此种疫苗接种吉富罗非鱼后, 机体能产生较强的免疫应答反应, 该研究为鱼用核酸疫苗的发展以及产业化提供了理论数据, 并进一步丰富了鱼类核酸疫苗的研究内容。

参考文献:

- [1] Elliott J A, Facklam R R, Richter C B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(3):628-630.
- [2] Pereira U P, Mian G F, Oliveira I C M, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(1-2):186-192.
- [3] Wagner B, Wagner W, Kubin V. Immunoelectron microscopic study of the location of group-specific and protein type-specific antigens of group B streptococci [J]. *Journal of General Microbiology*, 1980, 118(1):95-105.
- [4] Wang B, Jian J C, Lu Y S, et al. Cloning and expression analysis of transcriptional regulator *rovS* gene of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910 isolated from tilapia [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(4):584-592. [王蓓, 简纪常, 鲁义善, 等. 罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 转录调控因子 *rovS* 基因的克隆及表达研究, 水产学报, 2013, 37(4):584-592.]
- [5] Brodeur B R, Boyer M, Charlebois I, et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(10):5610-5618.
- [6] Wang B, Jian J C, Cai S H, et al. Construction and evaluation of *Streptococcus agalactiae* DNA vaccine for tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science*, 2013, 43(12):30-35. [王蓓, 简纪常, 蔡双虎, 等. 罗非鱼无乳链球菌 DNA 疫苗的构建及免疫效果研究. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2013, 43(12):30-35.]
- [7] Xie D F, Fang Z, Hunag W Q, et al. Cloning, eukaryotic expression of the gene encoding glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase from periodic *Brugia malayi* [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2008, 27(6):609-612. [谢东方, 方政, 黄为群, 等. 周期型马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶编码基因的克隆与真核表达. 中国地方病学杂志, 2008, 27(6):609-612.]
- [8] Zhang H, Zhu Y C, Si J, et al. Development and identification of the multiple B cell epitope antigens of *Schistosoma japonicum* [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2007, 25(4):285-289. [章辉, 朱荫昌, 司进, 等. 日本血吸虫复合 B 细胞表位抗原的制备和鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4):285-289.]
- [9] Huang P J, Huang Y C, Jian J C, et al. Cloning expression and DNA vaccine analysis of *OmpW* of *Vibrio harveyi* ZJ0607 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12):1839-1847. [黄浦江, 黄郁葱, 简纪常, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 *OmpW* 基因克隆、表达及 DNA 疫苗的免疫效果. 水产学报, 2013, 37(12):1839-1847.]
- [10] Huang J L, Wang K Y, Xiao D, et al. The development and application of a triple PCR method for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2):254-261. [黄锦炉, 汪开毓, 肖丹, 等. 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 三重 PCR 快速检测方法的建立与应用. 海洋与湖沼, 2012, 43(2):254-261.]
- [11] Wang B, Jian J C, Lu Y S, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18):5132-5133.
- [12] Li G H, Wang B, Lu Y S, et al. Cloning and prokaryotic expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from *Streptococcus agalactiae* in tilapia [J]. *Fisheries Science*, 2014, 33(3):175-180. [李桂欢, 王蓓, 鲁义善, 等. 罗非鱼源无乳链球菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与原核表达. 水产科学, 2014, 33(3):175-180.]

- [13] Amend D F. Potency testing of fish vaccines [C] // International Symposium on Fish Biologics; Serodiagnostics and Vaccines. Leetown; Developments in biological standardization, 1981, 49:447 - 454.
- [14] Corbeil S, Kurath G, LaPatra S E. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus; efficacy of various routes of immunisation [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(8) :711 - 723.
- [15] Byon J Y, Ohira T, Hirono I, *et al.* Comparative immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* after vaccination with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) recombinant glycoprotein and DNA vaccine using a microarray analysis [J]. Vaccine, 2006, 24(7) :921 - 930.
- [16] Caipang C M, Takano T, Hirono I, *et al.* Genetic vaccines protect red seabream, *pagrus major*, upon challenge with the red seabream iridovirus (RSIV) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21 (2) : 130 - 138.
- [17] Sun Y, Hu Y H, Liu C S, *et al.* Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine [J]. Vaccine, 2010, 28(23) :3905 - 3912.
- [18] Yan Y T, Liu S X. The research progress of potential vaccine antigens of *Schistosoma japonicum* [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2000, 18(2) :115 - 119. [阎玉涛, 刘述先. 日本血吸虫疫苗候选抗原的研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18(2) :115 - 119.]
- [19] Wu D, Wu Z D, Hu X C, *et al.* Cloning, expression and sequence analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Clonorchis sinensis* [J]. Chinese Journal of Parasitic Disease Control, 2005, 18(1) :28 - 32. [吴德, 吴忠道, 胡旭初, 等. 华支睾吸虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆、表达和序列分析. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18 (1) : 28 - 32.]
- [20] Waive G J, Becker M, Yang W, *et al.* Cloning molecular characterization and function activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against *Schistosoma japonicum* [J]. Infection and Immunity, 1993, 61(1) :4716 - 4723.
- [21] Zhuang M, Li D. The research progress of chimeric virus vaccine [J]. Foreign Medical Sciences; Section of Immunology, 2004, 27(3) :137 - 141. [庄敏, 李迪. 病毒嵌合疫苗的研究进展. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(3) :137 - 141.]
- [22] Plant K P, LaPatra S E. Advances in fish vaccine delivery [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35(12) :1256 - 1262.
- [23] Wang P, Lu Y S, Wang B, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of secretory form of Immunoglobulin M (sIgM) heavy chain gene in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) induced by *Streptococcus agalactiae* [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(2) :116 - 123. [王培, 鲁义善, 王蓓, 等. 无乳链球菌诱导吉富罗非鱼分泌型免疫球蛋白 M (sIgM) 重链基因的克隆及原核表达 [J]. 生物技术通讯, 2014(2) :116 - 123.]
- [24] Mebius R E, Kraal G. Structure and function of the spleen [J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5 : 606 - 616.
- [25] Lee D S, Hong S H, Lee H J, *et al.* Molecular cDNA cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1 β gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 143(3) :307 - 314.
- [26] Nithikulworawong N, Yakupitiyage A, Rakshit S K, *et al.* Molecular characterization and increased expression of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), T-cell receptor beta chain in response to *Streptococcus agalactiae* infection [J]. Journal of Fish Disease, 2012, 35(5) :343 - 358.
- [27] Liu D. Cloning and expression of several marker genes of T lymphocytes in tilapia [D]. Chongqing: Southwest University, 2012. [刘冬. 罗非鱼 T 淋巴细胞几种标志基因的克隆及表达研究. 重庆: 西南大学, 2012]

Chimeric DNA vaccine development and protective immunity analysis of Sip-GAPDH of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WANG Bei^{1,2,3}, LI Guihuan^{1,2,3}, LU Yishan^{1,2,3}, TANG Jufen^{1,2,3}, WU Zaohe^{2,3,4}, JIAN Jichang^{1,2,3*}

(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. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China;

4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: In order to study the immunogenic and protective effects of Sip-GAPDH from *Streptococcus agalactiae* recombined chimeric DNA vaccine for *Oreochromis niloticus*, we cloned Sip and GAPDH gene by PCR, and then obtained the Sip-GAPDH fusion gene using the splicing overlap extension technology (SOEing). The Sip-GAPDH fusion gene was inserted into pcDNA3.1(+) vector and confirmed by restriction endonuclease digestion, PCR amplification and sequencing, and *O. niloticus* were immunized with the recombined plasmid (designated as pcDNA-Sip-GAPDH) by intramuscular injection. The pcDNA-Sip-GAPDH expression in tissues (including muscle, brain, head kidney, spleen, gill and liver) was analyzed by PCR and RT-PCR at 7 and 28 d after immunization. To reveal the serum antibody titer, expression of immunogenes (*IgM*, *IL-1 β* and *CD8*) and relative percentage survival (RPS), we used the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), real-time PCR and bacterial challenge in vitro to demonstrate the DNA vaccine is a potential candidate for vaccine development of *O. niloticus*. The results indicated that pcDNA-Sip expression could be found in all studied tissues and antibody titer rose to peak (1:4 096) at 21 d after immunization. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *IgM*, *IL-1 β* and *CD8* had relatively high expression levels in the head kidney, thymus, spleen. After *S. agalactiae* infection, transcripts of *IgM*, *IL-1 β* and *CD8* increased and reached its peak 12 h in thymus and head kidney, and 48 h in spleen, respectively. Additionally, the relative percentage survival (RPS) value was 93.3% according to the mortality by *S. agalactiae* challenge. All the results suggested that the chimeric DNA vaccine is an effective vaccine candidate against *S. agalactiae* infection.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; *Oreochromis niloticus*; Sip-GAPDH; chimeric gene; DNA vaccine; relative percentage survival

Corresponding author: JIAN Jichang. E-mail: jianjc@ gmail. com