

山莨菪碱提高嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫鲫鱼的效果

时云朵^{1,2}, 任 燕¹, 张德锋¹, 付小哲¹,
林 强¹, 李宁求¹, 石存斌¹, 吴淑勤^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室,
农业部渔药创制重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为研究山莨菪碱作为佐剂在细菌灭活疫苗浸泡免疫中的作用, 将山莨菪碱和嗜水气单胞菌全菌灭活疫苗联合浸泡免疫异育银鲫, 首次浸泡免疫 7 d 后加强免疫 1 次。通过实时荧光定量 PCR 检测第 2、4、7、11、14 和 21 天脾脏中 IgM、IL-1 β 、C3、C-凝集素以及溶菌酶的 mRNA 表达量, 并在第 21 天进行同源菌株活菌攻击实验。结果显示, 山莨菪碱组第 4 天 IgM 和 IL-1 β 的表达量达到最高值, 分别为 28.3 和 332.7; 而无佐剂疫苗组第 11 天 IgM 和 IL-1 β 达到最高值, 分别为 56.1 和 791.8。山莨菪碱组的补体 C3、C-凝集素以及溶菌酶的表达量都显著高于无佐剂组和对照组, 且表达持续时间长。活菌攻击实验表明山莨菪碱组的相对免疫保护率可达 80.0%, 显著高于无佐剂组的 56.0%。结果表明, 山莨菪碱与嗜水气单胞菌灭活疫苗共同浸泡免疫银鲫, 可以增强脾脏中 IgM、IL-1 β 、C3、C-凝集素以及溶菌酶基因表达, 提高银鲫相对免疫保护率。

关键词: 异育银鲫; 山莨菪碱; 灭活疫苗; 浸泡免疫; 免疫效果

中图分类号: Q 939.9; S 965

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是一种条件致病菌, 广泛分布于自然界各种水体中, 可导致严重的出血性败血症^[1-3]。目前, 渔业生产中已应用疫苗来预防该菌引起的疾病。渔用疫苗注射投递的免疫效果好, 但对鱼体应激大、劳动强度高, 不适合大规模应用, 发展新型、高效的浸泡/口服免疫技术是鱼类疫苗投递的主要发展趋势。浸泡投递操作方便, 适用于小规格鱼种。如何提高鳃和皮肤对抗原的摄入量, 是建立浸泡投递技术的首要问题^[4]。利用免疫佐剂、细胞渗透剂、活载体等材料, 结合高渗浸泡、超声波处理等透皮方法, 增强鱼体对抗原的摄入量, 从而提高免疫效果是浸泡免疫的发展方向 and 趋势。

山莨菪碱(anisodamine)是我国首次从茄科植物唐古特山莨菪(*Anisodus tanguticus*)中提取出来的一种生物碱, 是一种阻断 M 胆碱受体, 可

以使平滑肌松弛^[5], 解除血管痉挛的抗胆碱药, 具有稳定细胞膜和扩张微血管作用^[6], 可以作为一种细胞松弛剂, 能够恢复并增强黏膜的生理功能, 提高免疫力。在渔业生产中山莨菪碱能促进鱼体生长, 增强疫苗免疫效果^[7-8]。

本研究将山莨菪碱和嗜水气单胞菌灭活疫苗联合浸泡免疫异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*, gibel carp), 通过实时荧光定量 PCR 检测 IgM、IL-1 β 、补体 C3、C-凝集素以及溶菌酶的基因表达量并进行活菌攻击实验, 研究山莨菪碱在灭活疫苗浸泡免疫中对银鲫先天性免疫和获得性免疫的影响及免疫保护效果。

1 材料与amp;方法

1.1 实验鱼和菌株

异育银鲫购于广东省佛山市三水区某养殖

收稿日期:2014-10-17 修回日期:2014-12-03

资助项目:“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD25B02);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

通信作者:吴淑勤, E-mail:gzwshuqin@163.com

场,体质量(5 ± 1)g,体长(6.5 ± 0.5)cm。实验前暂养 2 周,观察摄食活动状态,确认健康后用于实验。实验期间水温(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。嗜水气单胞菌 YYK090901 菌株为本研究室自行分离、鉴定并保藏的细菌,为本次实验的疫苗制备株和活菌攻击菌株。

1.2 主要试剂和仪器

TSB 培养基购自广东环凯微生物科技有限公司、山萘苕碱为河南普瑞制药有限公司产品(含量 5 mg/片)、PrimeScript RT Reagent Kit 和 SYBR Premix Ex Taq II 购自大连宝生物工程有 限公司、Trizol Reagent 购自英潍捷基公司,其余试剂为进口或国产分析纯。

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品、台式冷冻离心机为美国

Sigma 公司产品、核酸蛋白测定仪为美国 BECKMAN COULTER 公司产品、温控摇床 SPH-2112F 为中国 SHIPING 公司产品,生化培养箱 MIR-153 为日本 SANYO 公司产品。

1.3 嗜水气单胞菌灭活疫苗的制备

将 YYK090901 菌株接种到 TSB 液体培养基中, 28°C 摇床活化 18 h,再转接到 500 mL TSB 培养基中 28°C 扩大培养 18 h,然后用 3% 福尔马林溶液 28°C 灭活 72 h。无菌检验合格后,即为嗜水气单胞菌灭活疫苗。

1.4 浸泡免疫与样品采集

将银鲫分为 3 组,每组 50 尾,分别为山萘苕碱组、无佐剂组 and 对照组。首次免疫 7 d 后同法进行加强免疫(表 1)。加强免疫后第 2、4、7、11、14 和 21 天分别采集脾脏,每组每次分别采集 3 尾鱼。

表 1 实验分组及浸泡免疫
Tab.1 The summary of immersion immunization

组别 groups	尾数/尾 fish number	浸泡免疫程序 programs of immersion immunization
山萘苕碱组 anisodamine-adjuvant vaccine group	50	1.5% 盐水浸泡 5 min 后,在 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 山萘苕碱和 5.2×10^8 cfu/mL 疫苗 ^[9] 溶液中浸泡 30 min,首次免疫 7 d 后同法进行加强免疫
无佐剂组 adjuvant-free vaccine group	50	1.5% 盐水浸泡 5 min 后,在 5.2×10^8 cfu/mL 疫苗溶液中浸泡 30 min,首次免疫 7 d 后同法进行加强免疫
对照组 control group	50	1.5% 盐水浸泡 5 min,首次免疫 7 d 后同法进行加强免疫

注:山萘苕碱的浓度为 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$,由预实验所得,浓度过高对鱼体损伤较大,甚至造成银鲫死亡

Notes:the concentration of anisodamine is $15 \mu\text{g}/\text{mL}$,high concentration could cause big damage,and even death from the pre-test

1.5 总 RNA 的提取和反转录

用 Trizol 法提取银鲫脾脏的 RNA,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 的完整性,并使用核酸蛋白测定仪测得 RNA 的浓度和 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 比率。检测结果较好的 RNA 进行 cDNA 的合成。

1.6 实时荧光定量 PCR 引物设计与合成

在 GenBank 中查找银鲫 18S rRNA、IgM、IL-1 β 、补体 C3、C-凝集素和溶菌酶的核苷酸序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,并由吉格生物科技有限公司合成。引物序列如表 2 所示。

表 2 18S rRNA、IgM、补体 C3、IL-1 β 、C-凝集素和溶菌酶基因引物
Tab.2 The quantitative PCR primers of gibel carp genes of 18S rRNA, IgM, C3, IL-1 β , C-lectin and lysozyme

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	引物长度/bp primer length
18S rRNA	Forward 5'-GGACACGGAAAGGATTGACAG-3'	99
	Reverse 5'-CGGAGTCTCGTTTCGTTATCGG-3'	
IgM	Forward 5'-GTCAATCTTCGGCTTGCTCA-3'	179
	Reverse 5'-GGGTATAATCTCCATCGGGTC-3'	
C3	Forward 5'-GTGTAAGGGAGACCTGTGCCA-3'	166
	Reverse 5'-ATAGATGTCCGAGTCCTGTTT-3'	
IL-1 β	Forward 5'-ACCAATGCGACATACAAGAGG-3'	228
	Reverse 5'-ATCAAACCACAGAAGCCAGT-3'	
C-凝集素 C-lectin	Forward 5'-CTCCCGCCTTGTCTGAATA-3'	214
	Reverse 5'-AAGTGC GTGATGTTGTTGGTG-3'	
溶菌酶 lysozyme	Forward 5'-GGATTCTCACTTGCCAATAT-3'	249
	Reverse 5'-TGATTTCAGTCCTTCGGTTTT-3'	

1.7 实时荧光定量 PCR 标准曲线的构建

以正常银鲫脾脏的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,对目的条带进行回收、与载体连接、转化并筛选阳性克隆,送上海生物工程技术有限公司测序。提取阳性克隆质粒,检测质粒的浓度和 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值,以 10 倍梯度稀释的重组质粒为模板,进行荧光定量 PCR,分别构建内参基因和目的基因的标准曲线。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 IgM、C3、IL-1 β 、C-凝集素、溶菌酶的表达量

将反转录的 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR,每个样品做 3 个平行。反应程序:95 $^{\circ}C$, 30 s;95 $^{\circ}C$, 5 s;60 $^{\circ}C$, 34 s,40 个循环;95 $^{\circ}C$, 15 s;60 $^{\circ}C$, 60 s;95 $^{\circ}C$, 15 s(表 3)。

1.9 活菌攻击实验

加强免疫 21 d 后,用预实验测得的半数致死量 LD_{50} (8.7×10^6 cfu/mL,0.1 mL)的 YYK090901 菌株腹腔注射攻击各组实验鱼。每天观察记录死亡数,连续观察 14 d。计算相对免疫保护率 (RPS/%):

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

表 3 实时荧光定量 PCR 扩增体系

Tab.3 The amplification system of quantitative PCR

试剂 reagent	体积/ μ L volume
SYBR premix Ex Taq II(Tli RNaseH plus) (2 \times)	5
ROX reference dye II(50 \times)	0.2
PCR forward primer(10 μ mol/L)	0.2
PCR reverse primer(10 μ mol/L)	0.2
ddH ₂ O	3.4
cDNA	1
总体积 total volume	10

1.10 数据分析

实验数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA),以 LSD 方法进行多重检验。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的构建

用 10 倍梯度稀释后的质粒模板作为标准品,构建各基因的标准曲线,初始模板量的对数值对每个稀释样品的 C_t 值作图,得到一条呈线性关系的标准曲线(图 1)。

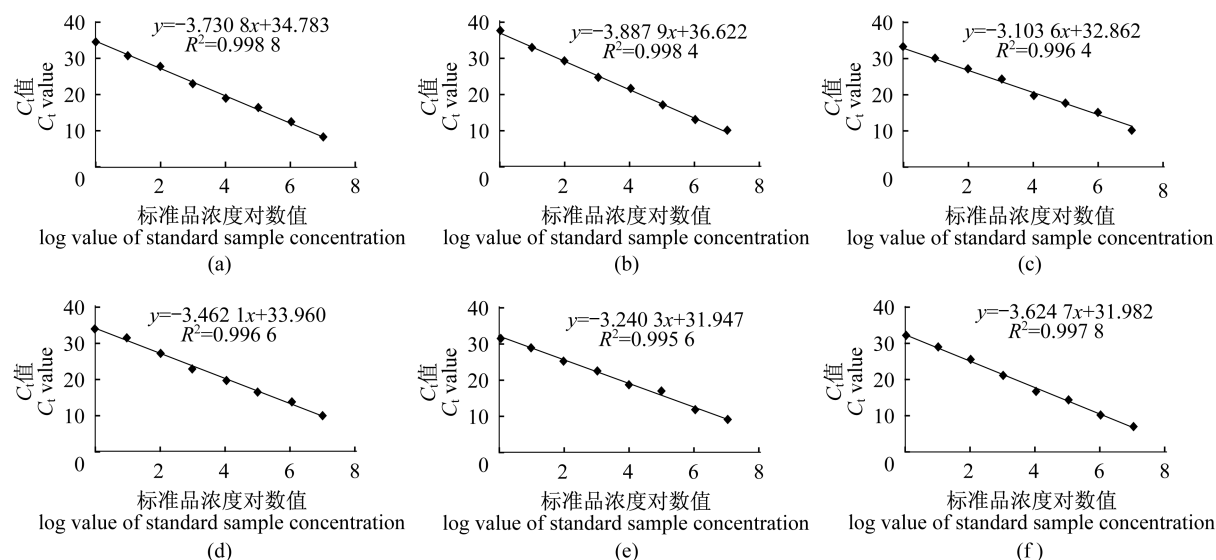


图 1 18S rRNA、IgM、C3、IL-1 β 、C-凝集素和溶菌酶基因实时荧光定量 PCR 标准曲线

(a) 18S rRNA 标准曲线; (b) IgM 标准曲线; (c) C3 标准曲线; (d) IL-1 β 标准曲线; (e) C-凝集素标准曲线; (f) 溶菌酶标准曲线

Fig.1 Standard curves of quantitative PCR of 18S rRNA, IgM, C3, IL-1 β , C-lectin and lysozyme

(a) standard curve of 18S rRNA; (b) standard curve of IgM; (c) standard curve of C3; (d) standard curve of IL-1 β ; (e) standard curve of C-lectin; (f) standard curve of lysozyme

2.2 IgM、C3、IL-1 β 、C-凝集素和溶菌酶基因的表达式变化

两组免疫组 IgM 的相对表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中山莨菪碱组在第 4 天时达到了最高值(28.3 倍, $P < 0.05$), 第 7 天下降到对照水平 ($P > 0.05$), 在第 11 天又出现回升(5.3

倍, $P < 0.05$); 无佐剂组第 11 天出现最高值(56.1 倍, $P < 0.05$), 然后第 14 天呈现下降趋势(27.8 倍, $P < 0.05$), 在第 21 天时又出现上升(48.0 倍, $P < 0.05$) (图 2-a)。两组免疫组的 IL-1 β 的表达量变化与 IgM 相似(图 2-b)。两组免疫组中补体 C3 在第 4 天时迅速上升, 在第 7 天时

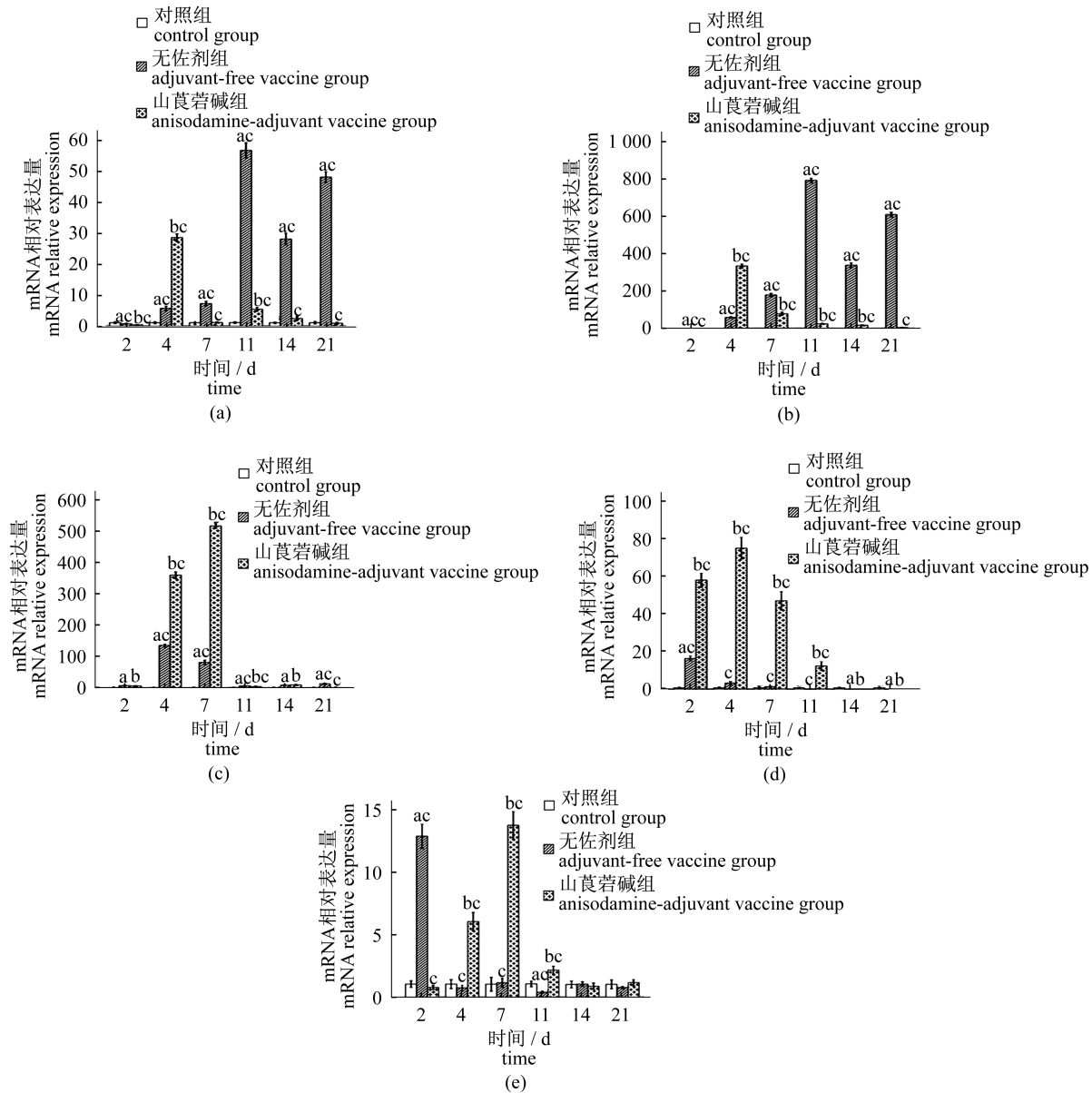


图 2 不同实验组银鲫脾脏中各免疫基因的相对表达量

(a) IgM 相对表达量; (b) IL-1 β 相对表达量; (c) C3 相对表达量; (d) C-凝集素相对表达量; (e) 溶菌酶相对表达量。“a”表示对照组与无佐剂组的相对表达量具有显著差异 ($P < 0.05$), “b”表示对照组与山莨菪碱组具有显著差异 ($P < 0.05$), “c”表示无佐剂组与山莨菪碱组具有显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 2 The relative expression level of genes in the gibel carp spleen in different experimental groups

(a) the relative expression level of IgM; (b) the relative expression level of IL-1 β ; (c) the relative expression level of C3; (d) the relative expression level of C-lectin; (e) the relative expression level of lysozyme. “a” indicates that the relative expression level is significantly different between control group and adjuvant-free vaccine group ($P < 0.05$), “b” indicates that it is significantly different between control group and anisodamine-adjuvant vaccine group ($P < 0.05$), “c” indicates that it is significantly different between adjuvant-free vaccine group and anisodamine-adjuvant vaccine group ($P < 0.05$)

山萘蓉碱组达到最高值(516.6倍, $P < 0.05$), 而无佐剂组在第7天呈现下降趋势(80.4倍, $P < 0.05$), 两组免疫组的C3相对表达量都显著高于对照组($P < 0.05$)(图2-c)。山萘蓉碱组的C-凝集素在第2天急剧上升(58.1倍, $P < 0.05$), 第4天达到最高值(75.0倍, $P < 0.05$), 并且在第11天时与无佐剂组相比仍保持较高的表达水平(12.6倍, $P < 0.05$); 无佐剂组的C-凝集素在第2天就达到最高值(16.4倍, $P < 0.05$), 然后呈现下降趋势(图2-d)。山萘蓉碱组的溶菌酶第4天开始上升(6.0倍, $P < 0.05$), 第7天时达到最高值(13.8倍, $P < 0.05$), 在第11天时(2.2倍)与对照组相比, 还存在显著性差异, 第14天下降到对照水平($P > 0.05$); 无佐剂组中溶菌酶第2天出现急剧上升现象, 并达到了最高值(12.9倍, $P <$

0.05), 第4天就恢复到对照水平($P > 0.05$)(图2-e)。实验结果表明, 免疫组各免疫基因的相对表达量显著高于对照组($P < 0.05$), 并且山萘蓉碱 + Ah 疫苗组可以使 IgM 在免疫后快速表达, 一些免疫因子补体 C3、C-凝集素以及溶菌酶可以在长时间内持续保持表达状态。

2.3 活菌攻击实验结果

YYK090901 菌株攻毒各组实验鱼, 连续观察 14 d 结果显示, 各组集中死亡时间在活菌攻毒后 12 ~ 48 h, 2 d 后无死亡情况发生。对照组、无佐剂组、山萘蓉碱组累计死亡率分别为 83.33%、36.67% 和 16.67%。山萘蓉碱组相对免疫保护率为 80.0%, 显著高于无佐剂组的 56.0% ($P < 0.05$)(表4)。

表4 各实验组的相对免疫保护率

Tab.4 The relative percent survival in the different experimental groups

组别 groups	攻毒尾数/尾 challenged fish number	死亡尾数/尾 dead fish number	死亡率/% mortality	相对免疫保护率/% RPS
山萘蓉碱组 anisodamine-adjuvant vaccine group	30	5	16.67	80.0
无佐剂组 adjuvant-free vaccine group	30	11	36.67	56.0
对照组 control group	30	25	83.33	

3 讨论

本研究将山萘蓉碱与嗜水气单胞菌灭活疫苗联用, 浸泡免疫异育银鲫, 并通过实时荧光定量 PCR 测定了特异性免疫因子 IgM 和先天性免疫因子白细胞介素 IL-1 β 、补体 C3、C-凝集素以及溶菌酶基因表达的变化。结果显示, 山萘蓉碱组和无佐剂组中 5 种免疫因子的表达量都显著高于对照组($P < 0.05$)。

目前对基因表达量与蛋白表达的关系还没有明确的解释, 但是国内外许多学者对渔用疫苗与佐剂进行评价时, 采用了检测基因表达量方法, 使其作为一个参考标准, Diao 等^[10]在评价脂多糖和 β -葡聚糖作为佐剂对牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 的作用时, 对免疫相关基因 IgM、IL-1 β 、IL-6、TFN- α 、溶菌酶等进行了检测, Huising 等^[11]使用杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 灭活疫苗浸泡免疫鲤 (*Cyprinus carpio*), 检测了鲤的 IL-1 β 和 TFN- α 的基因表达情况。本研究中检测了银鲫的 IgM、IL-1 β 、C3、C-凝集素和溶菌酶的基因表达量变化。结果显示, 山萘蓉碱组的补体 C3、

C-凝集素和溶菌酶的基因相对表达量均显著高于无佐剂疫苗组 ($P < 0.05$) 和对照组 ($P < 0.05$), 并且表达持续时间长, 这表明山萘蓉碱和嗜水气单胞菌灭活疫苗同时浸泡免疫银鲫, 可以显著提高银鲫先天性免疫因子表达。

IL-1 β 的相对表达量变化同 IgM 的表达量变化趋势很相似, 在第 2 天时山萘蓉碱组与对照组相比, 未出现显著差异, Selvaraj 等^[12]使用 β -葡聚糖和脂多糖作为佐剂与重组 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 联用免疫鲤, 3 次免疫后检测 24 和 48 h 的 IL-1 β 的相对表达量, 结果发现与对照组相比并未有差异。IL-1 β 可以使前体 B 细胞克隆增强因子 (pre-B-cell colony enhancing factor, PBEF) 表达量增多, 促使前体 B 细胞向 B 细胞转化^[13]。IL-1 β 还可以提高 CD₄₀ 的表达, 在 B 细胞表面存在 CD₄₀ 的受体, 推测可能会促进 B 细胞产生抗体^[14], B 细胞表面也可产生 IL-1 的受体^[15] 等, 都表明 IL-1 β 可能与 IgM 的表达有相关性。无佐剂组的 IgM 呈现上升下降再回升的趋势, 这与脂多糖疫苗组和无佐剂疫苗组注射免疫牙鲈后 IgM 表达

量变化趋势相似^[10]。使用迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 的重组 FimA (主要菌毛亚单位蛋白) 作为佐剂与重组哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 亚单位疫苗联用注射免疫比目鱼, 免疫 1 d 后测得脾脏中 IgM 的相对表达量与对照组相比就产生了极显著的提高 ($P < 0.01$)^[16]。本研究中, 山萘砒碱组与无佐剂组的 IgM 表达量都显著高于对照组, 山萘砒碱组在第 4 天时就已达到最高值 (28.3 倍, $P < 0.05$), 推测可能是由于山萘砒碱提前了抗体的产生。

研究表明高渗浸泡、添加适量佐剂和载体、延长浸泡时间、增加浸泡免疫次数等方式均能提高浸泡免疫效果: 皂角苷 (saponin) 能提高牙鲆鳃弧菌灭活疫苗 (*V. anguillarum* inactivated vaccine)、罗非鱼点状气单胞菌灭活疫苗 (*A. punctata* inactivated vaccine) 浸泡免疫效果, 相对免疫保护率分别为 72% 和 78.5%, 而无佐剂组的分别为 27% 和 54.1%^[17]。将甲醛灭活的病毒性神经坏死病毒 (viral nervous necrosis virus, VNNV) 制备成纳米粒, 浸泡免疫斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 幼鱼, 相对免疫保护率可以从 58.6% 提高到 85%^[18]。嗜水气单胞菌 β -hemA-ISCs 疫苗浸泡免疫鳊鲈, 淋巴细胞转化率和抗体效价均显著高于 IMS1312 佐剂组与无佐剂组^[19]。含氢氧化铝胶的虹彩病毒 (iridovirus) 灭活疫苗 2 次浸泡免疫大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*), 相对免疫保护率可以达到 90.5%^[20]。IMS1312 与嗜水气单胞菌灭活疫苗合用浸泡免疫银鲫, 佐剂组相对免疫保护率达 67%, 而无佐剂疫苗组的为 56%^[9]。山萘砒碱与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 出血病疫苗 (vaccine against haemorrhagic disease in grass carp) 浸泡免疫草鱼, 成活率高达 85%, 远远高于对照组 30%~50%^[21]。山萘砒碱与气单胞菌三联疫苗联用浸泡免疫斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 鱼种, 成活率为 92%, 而未免疫组成活率仅有 37.5%^[22]。本研究中山萘砒碱组的相对免疫保护率达 80.0%, 无佐剂组的达到 56.0%, 可见山萘砒碱能显著提高嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫银鲫的效果, 是一种高效的细菌疫苗浸泡免疫佐剂, 具有很好的应用价值。

参考文献:

- [1] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(3): 282 - 288. [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3): 282 - 288.]
- [2] Xu B H, Yin Z, Wu Y S, et al. Studies on the taxonomy of pathogenic bacteria of the bacterial hemorrhagic septicemia in cultured fishes in freshwater[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1993, 17(3): 259 - 266. [徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究. 水生生物学报, 1993, 17(3): 259 - 266.]
- [3] Dong C F, Lin T L, Chen R S, et al. Studies on pathogenicities and biochemical characteristics of pathogens which caused *Anguilla japonica* bacterial septicaemia and ascites[J]. Fisheries Science, 2002, 21(1): 5 - 8. [董传甫, 林天龙, 陈日升, 等. 日本鳊鲈败血腹水病病原研究. 水产科学, 2002, 21(1): 5 - 8.]
- [4] Chinese Academy of Fishery Sciences, Division of Agriculture China Academy of Engineering, 2013 Forum Fishery Science and Technology [C]. Guangzhou: (publisher unknown), 2013. [中国水产科学研究院, 中国工程院农业学部. 2013 水产科技论坛论文集. 广州: (出版者不详), 2013.]
- [5] Xu G N, Yang K, Xu Z P, et al. Protective effects of anisodamine on cigarette smoke extract-induced airway smooth muscle cell proliferation and tracheal contractility [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 262(1): 70 - 79.
- [6] He X. The pharmacological effect and mechanism of action of anisodamine [J]. Journal of Mathematical Medicine, 1998, 11(3): 250 - 251. [何新. 山萘砒碱的药理作用及其作用机制. 数理医药学杂志, 1998, 11(3): 250 - 251.]
- [7] Cong N. Introduction to scopolia drugs in aquaculture [J]. Scientific Fish Farming, 1992(1): 20. [丛宁. 简介萘砒类药物在水产养殖中的作用. 科学养鱼, 1992(1): 20.]
- [8] Chen Y Y, Ye J Y. Effect of henbane and tissue vaccine supplement on the growth-promoting and disease-resistance of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, 1994, 13(2): 104 - 109. [陈月英, 叶金云. 添加萘砒和疫苗对一龄草鱼促长防病饲养效果的研究. 浙江水产学院学报, 1994, 13(2): 104 - 109.]
- [9] Zhang J H, Lu C P. Effects of the adjuvant on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* Vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, <http://www.sexuebao.cn>

- 2003,37(4):26-27. [张吉红,陆承平.佐剂对嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫效果的作用.中国兽药杂志,2003,37(4):26-27.]
- [10] Diao J, Ye H B, Yu X Q, *et al.* Adjuvant and immunostimulatory effects of LPS and β -glucan on immune response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 156(3-4):167-175.
- [11] Huising M O, Guichelaar T, Hoek C, *et al.* Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment[J]. *Vaccine*, 2003, 21(27-30):4178-4193.
- [12] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 114(1-2):15-24.
- [13] Liu P. Modulation of IL-1 β mediated pulmonary endothelial and epithelial cell inflammation and permeability by Pre-B-cell colony enhancing factor [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2008. [刘鹏.前B细胞增强因子对IL-1 β 介导的肺上皮和内皮细胞的炎症和通透性的调节.大连:大连医科大学,2008.]
- [14] Fan H Y, Zhao G F, Liu F, *et al.* IL-1 β synergistically strengthen the LPS-induced dysfunction of B cells from SLE mice by up-regulation of TLR4 expression[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2012, 28(10):867-871. [樊竑治,赵光锋,刘飞,等.IL-1 β 通过诱导TLR4表达增强协同LPS刺激引起的狼疮小鼠B细胞的功能异常.中国免疫学杂志,2012,28(10):867-871.]
- [15] Bi A H, Gong F L, Wang L R, *et al.* Medical immunology [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1995. [毕爱华,龚非力,王立人,等.医学免疫学.北京:人民军医出版社,1995.]
- [16] Wang C, Hu Y H, Chi H, *et al.* The major fimbrial subunit protein of *Edwardsiella tarda*: Vaccine potential, adjuvant effect, and involvement in host infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3):858-865.
- [17] Wang X H, Huang J, Zhao W W, *et al.* Application of specific immunostimulants for fish immersion immunization; China, ZL200910255825.7[P]. 2012-12-12. [王秀华,黄捷,赵伟伟,等.鱼类浸泡疫苗特异免疫增强剂及其应用和使用方法:中国, ZL200910255825.7.2012-12-12.]
- [18] Kai Y H, Chi S C. Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization [J]. *Vaccine*, 2008, 26(11):1450-1457.
- [19] Wu Z F, Gong H, Chen H Y, *et al.* Immune effects of the eel after immersed with ISCOMs containing recombinant β -hemA of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(3):374-378. [吴宗福,龚晖,陈红燕,等.嗜水气单胞菌重组 β -hemA-ISCOMs对鳗鲡的浸泡免疫效果.水产学报,2007,31(3):374-378.]
- [20] Fan T J, Hu X Z, Wang L Y, *et al.* Development of an inactivated *Iridovirus* vaccine against turbot viral reddish body syndrome [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2012, 11(1):65-69.
- [21] Xu J H. Efficacies of vaccine with anisodamine against haemorrhagic disease in grass carp by immersion immunization [J]. *Scientific Fish Farming*, 1998(12):27. [许金花.山萘砒碱混合疫苗浸泡鱼种防治出血病试验.科学养鱼,1998(12):27.]
- [22] Pei J T, Qi C X, Zhang Y, *et al.* Efficacies of triple vaccine in channel catfish larvae by immersion immunization[J]. *Fishery Guide to be Rich*, 2004(14):60-61. [裴家田,齐彩霞,张扬,等.三联疫苗对斑点叉尾鮰苗种浸泡免疫.渔业致富指南,2004(14):60-61.]

Anisodamine increases efficacy of *Aeromonas hydrophila* inactivated vaccine in gibel carp *Carassius auratus gibelio* by immersion immunization

SHI Yunduo^{1,2}, REN Yan¹, ZHANG Defeng¹, FU Xiaozhe¹,
LIN Qiang¹, LI Ningqiu¹, SHI Cunbin¹, WU Shuqin^{1*}

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Lab of Aquatic Animal Immune Technology of Guangdong Province, Key Lab of Fishery Drug Development of Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to study the role of anisodamine as an adjuvant in the immersion administration together with inactivated whole cell vaccines, gibel carps were administrated by immersion with inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine (inactivated Ah vaccine) with anisodamine on days 1 and 7. Spleens were sampled on days 2, 4, 7, 11, 14 and 21 after the second immersion immunization, and the expression levels of IgM, IL-1 β , C3, C-lectin and lysozyme mRNAs in spleen were detected through the real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). The gibel carps from the control and immunization groups were challenged intraperitoneally with *A. hydrophila* YYK090901 at the dose of LD₅₀ concentration on day 21 and then mortality was determined and relative percent survival (RPS) was calculated. The results showed that the expression levels of IgM and IL-1 β mRNAs of anisodamine-adjuvant vaccine group reached the peak on day 4, i. e. 28.3 and 332.7 respectively, but the adjuvant-free vaccine group reached the peak on day 11. The expression levels of C3, C-lectin and lysozyme mRNAs of the anisodamine-adjuvant vaccine group were significantly higher than those of the adjuvant-free group and the control, and those of the anisodamine-adjuvant group had longer expression duration than the others. The efficacy of inactivated Ah vaccine could be significantly improved by anisodamine through immersion administration, and RPS rate was 80.0%. The results showed that anisodamine immersion administrated gibel carps together with inactivated whole cell vaccines can significantly promote the expression of IgM, IL-1 β , C3, C-lectin and lysozyme mRNAs in spleen, and protect gibel carps better against *A. hydrophila* infection.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; anisodamine; inactivated vaccine; immersion immunization; immune efficacy

Corresponding author: WU Shuqin. E-mail: gzwshuqin@163.com