

鲷爱德华菌口服疫苗对斑点鲷的免疫效果

吴学婧¹, 汪开毓^{1*}, 阳磊^{1,2}, 周燕¹, 王二龙¹,
贺扬¹, 陈德芳¹, 耿毅¹

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川成都 611130;

2. 广元市农业局, 四川广元 628017)

摘要: 为评价鲷爱德华菌口服微球疫苗对斑点鲷的免疫效果, 实验以天然高分子聚合物海藻酸钠和鲷爱德华菌灭活疫苗为材料, 制备鲷爱德华菌口服微球疫苗。将实验动物随机分为鲷爱德华菌微球疫苗组、鲷爱德华菌灭活疫苗组、空微球组和对照组, 以拌料口服方式进行免疫, 通过检测血清中溶菌酶活力、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力、补体替代途径(ACH₅₀)活性等非特异性免疫指标, 抗体效价以及相对免疫保护率评价疫苗免疫效果, 采用荧光定量PCR检测口服疫苗对斑点鲷免疫相关基因表达量的影响。结果显示, 鲷爱德华菌口服微球疫苗能够较长时间增强斑点鲷非特异性免疫功能; 血清凝集效价于第5周达到峰值, 为1:16, 免疫后第7周仍可检测到特异性抗体; 口服鲷爱德华菌微球疫苗的斑点鲷获得的抗鲷爱德华菌相对免疫保护率为60.7%, 远高于灭活疫苗组(14.3%)及空微球组(10.7%); 荧光定量分析结果显示, 攻毒后48 h相比攻毒前各免疫基因表达量均有上调, 鲷爱德华菌微球疫苗对受免鱼肾脏、脾脏中免疫基因的表达影响尤为明显。结果表明, 鲷爱德华菌口服微球疫苗能增强斑点鲷非特异性免疫功能, 对鲷爱德华菌病起到一定的预防作用。

关键词: 鲷爱德华菌; 斑点鲷; 口服疫苗; 海藻酸钠; 非特异性免疫功能; 免疫保护

中图分类号: S 941

文献标志码: A

斑点鲷(*Ictalurus punctatus*)亦称沟鲶(channel catfish), 属鲇形目(Siluriformes)、鲷科(Ictaluridae)鱼类, 是世界公认的最适合加工的优良淡水养殖品种。目前, 我国已将斑点鲷推广到20多个省市进行养殖, 并在湖北、江西、湖南、安徽和四川等省逐步形成了产业化发展趋势^[1]。然而随着集约化养殖技术的发展和养殖良种的种质退化, 各种细菌性疾病成为危害斑点鲷健康养殖的首要问题^[2]。其中, 鲷爱德华菌因其发病急、发病率和死亡率高等特点, 备受养殖者和研究者重视。

鲷爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 爱德华菌属(*Edwardsiella*),

革兰氏阴性短杆菌, 是一种重要的鱼类病原菌, 主要感染鲇形目的一些种类, 斑点鲷是最易感鱼类^[3]。该病的控制以抗生素和化学药物为主, 但长期的使用易带来如细菌耐药性、食品安全、药物残留等问题, 因此使用疫苗来替代抗生素和化学药物控制鲷爱德华菌病势在必行。口服免疫作为鱼类最理想的免疫接种方式, 不仅对鱼类应激小, 免疫成本低, 而且可以方便地实现对各生长阶段鱼类的免疫, 但是鱼类胃肠道环境对疫苗的破坏制约着口服疫苗的发展。

鱼类是低等脊椎动物, 其特异性免疫机制尚不健全, 非特异性免疫对于鱼类免疫防御有着十分重要的作用。鱼类的非特异防御机制可分

收稿日期: 2015-07-14 修回日期: 2015-11-01

资助项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队专项(IRT0848); 四川省科技厅产业链(2014NZ003); 四川省科技厅应用基础专项(2014JY0143)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywangsicau@126.com

为细胞防御和体液防御2种,而这2种防御机制均为先天形成,作用于所有外来病原微生物,无特异性。其中,总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase activity, T-SOD)活力、溶菌酶活力、补体替代途径(alternative pathway complement activity, ACH₅₀)活性等是评价鱼类非特异性免疫防御的重要指标^[4-6]。目前,越来越多的研究开始从基因水平探究疫苗的免疫效果,鱼类白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等是诱导免疫调节,刺激淋巴细胞增殖的关键因子^[7]; MHC-II β 、CD4L-2等基因在病原入侵鱼体后,在抗原递呈、识别及免疫应答的各阶段均有关键性作用,以上各免疫因子为维护机体健康,帮助机体清除病原体发挥了重要的作用。本研究以天然高分子聚合物海藻酸钠为疫苗载体,采用乳化离子交联法制备鲷爱德华菌口服疫苗,免疫健康斑点鲷,通过对多种非特异性免疫指标、抗体效价的检测和相对免疫保护率的测定,评价疫苗免疫保护效果,为鱼类口服疫苗研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

致病性鲷爱德华菌(KC112992)由四川农业大学鱼病研究中心分离保存。健康斑点鲷购自雅安一斑点鲷养殖基地,体质量(50 \pm 5) g。

1.2 鲷爱德华菌灭活疫苗制备

将复壮后的鲷爱德华菌接种于BHI液体培养基中,28℃振荡培养24 h,革兰氏染色镜检纯。生理盐水调整菌液浓度为 3×10^9 cfu/mL,用锥形瓶分装适量菌液并加入终浓度为0.3%的甲醛,摇床120 r/min,28℃灭活24 h后,用无菌生理盐水洗涤3次,置于4℃冰箱备用。

1.3 鲷爱德华菌口服疫苗制备

参照阳磊等^[8]方法,采用响应面法优化后的制备工艺,制备鲷爱德华菌口服疫苗以及海藻酸钠空微球。

1.4 疫苗饲料制备

将鲷爱德华菌微球疫苗、鲷爱德华菌灭活疫苗以及海藻酸钠空微球分别按所需免疫剂量与粉碎后的饲料混合再成型、干燥制成口服疫苗饲料,按照体质量的2%进行投喂。

1.5 免疫程序及样品采集与处理

将实验用斑点鲷240尾随机分为4组(表1),各组均连续投喂疫苗饲料7 d^[9-10]。免疫接种后第1~8周分别从各组随机取9尾鱼,用MS222溶液(1 mg/L)麻醉,尾静脉采血,每尾0.2 mL。采集血液室温下静置1 h,然后在4℃冰箱中保存4 h,于4℃条件下4000 r/min离心10 min,收集上层血清,-80℃保存备用。

斑点鲷攻毒处理0和48 h,每组随机挑选6尾实验鱼,取其头肾、脾脏样品,液氮速冻、研磨,-80℃暂存备用。分别提取各组实验鱼脾脏及头肾组织中的总RNA。每次实验做3个平行,以EF-1 α 为内参基因进行对照,测定疫苗对斑点鲷IL-1 β ₁、TNF- α 、MHC-II β 、CD4L-2基因表达的影响。

1.6 血清T-SOD活力检测

利用T-SOD试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)测定受免鱼血清T-SOD活力。按下列公式计算T-SOD活力:

$$\text{T-SOD活力(U/mL)} = (\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}) / (\text{对照管OD值}) / 50\% \times \text{反应体系的稀释倍数} \times \text{样本测试前的稀释倍数}$$

表1 免疫程序

Tab. 1 Immunization program

分组 groups	疫苗成分 vaccine composition	免疫途径 immunization route	免疫剂量 immunization dose	数量/尾 quantity/tail	免疫时间/d immunization time
I	鲷爱德华菌微球疫苗	拌料口服	1×10^9 cfu/尾	60	7
II	鲷爱德华菌灭活疫苗	拌料口服	1×10^9 cfu/尾	60	7
III	海藻酸钠空微球	拌料口服	M mg/尾	60	7
IV	正常饲料	拌料口服	PBS	60	7

注:海藻酸钠空微球组免疫剂量M等于I组中微球疫苗质量;实验水温(22 \pm 2)℃

Notes: immune dose M of sodium alginate empty microspheres group is equal to the microsphere vaccine quality in group I; the experimental temperature, (22 \pm 2)℃

1.7 血清溶菌酶活力检测

利用冻干的微球菌粉通过浊度分析法进行测定^[4,11]。

1.8 血清ACH₅₀活性检测

参照Sitja等^[12]的方法测定血清ACH₅₀活性。

1.9 总RNA提取及cDNA的合成

参照Wang等^[13]的方法提取组织总RNA, 并反转录得到相应的cDNA。

1.10 引物设计与合成

根据GenBank中斑点鲷*IL-1β₁*、*TNF-α*、*MHC-IIβ*和*CD4L-2*基因及内参基因*EF-1α*的cDNA序列, 用Primer Express 3.0软件设计引物, 通过NCBI检测引物特异性。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表2)。

1.11 实时荧光定量PCR分析

参照ABI公司SYBR@ Green PCR Supermix染料说明书配置PCR反应体系, 总反应体积为

表2 实时荧光定量PCR反应的引物

Tab. 2 Primer sequences used in real-time PCR experiment

引物名称 primer	基因登录号 Genbank accession	引物序列(5'~3') sequence of the primers (5'~3')
<i>EF-1αF</i>	DQ353797.1	CTGGAGATGCTGCCATTGTG
<i>EF-1αR</i>		ACAGCAACGGTCTGCCTCAT
<i>IL-1β₁F</i>	DQ160229.1	GCCATGTTGCTAATGTTGTAATCG
<i>IL-1β₁R</i>		TGTCTGCAGGCTGTAACCTCTG
<i>TNF-αF</i>	AJ417565.2	CGCACAAACAAACCAGACGAGAC
<i>TNF-αR</i>		ACCACTGCATAGATACGCTCGAA
<i>MHC II βF</i>	U77598.1	CGGGAAGGAGATTAAGGAGGT
<i>MHC II βR</i>		GTTTGGTGAAGCTGGCGTGT
<i>CD4L-2F</i>	DQ435304.1	GCAGGGCACGGATAGATGGA
<i>CD4L-2R</i>		TGGGTTTCGAGAGGCTGATAC

10 μL, 含cDNA 1.0 μL, SYBR Green Real-time PCR Master Mix 5 μL, 上下游引物各0.5 μL, ddH₂O 3.0 μL。按照以下条件进行PCR反应, 94 °C预变性2 min, 94 °C变性20 s, 56 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环, 72 °C延伸30 s。每个循环退火末期采集荧光信号。扩增反应结束后继续从65 °C缓慢升温至95 °C(0.5 °C/10 s), 进行PCR产物溶解曲线分析, 鉴定扩增产物是否特异性单一。

1.12 相对定量方法及数据分析

每个实验组均进行平行检测(n = 3), 取其循环阈值(Ct)的平均值, 计算斑点鲷目的基因的相对表达量为2^{-ΔΔCt}:

$$\Delta Ct = \text{目的基因平均Ct值} - \text{内参基因平均Ct值}$$

$$\Delta \Delta Ct = \text{实验组} \Delta Ct - \text{对照组} \Delta Ct$$

用SPSS17.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏多重比较, 以检验不同处理

间目标基因的表达差异。

1.13 微量凝集实验检测血清抗体水平

参照Huang等^[14]方法, 向96孔板1~12孔中加入50 μL PBS, 再向第1孔中加入50 μL待测血清, 吹打8~10次, 取50 μL加入第2孔, 依次倍比稀释, 至第10孔, 弃去50 μL, 末尾2孔不加血清作为抗原对照, 然后每孔中加入一定浓度的抗原50 μL, 同时设阳性、阴性对照, 混匀后反应, 过夜, 观察记录结果。

1.14 攻毒实验及相对免疫保护效果测定

以寇氏法计算鲷爱德华菌对斑点鲷半数致死量(LD₅₀)。于免疫后第29天进行攻毒实验, 以50 × LD₅₀浓度的鲷爱德华菌攻毒, 腹腔注射0.2 mL/尾。记录攻毒后14 d内各组鱼的发病及死亡情况, 另取濒死鱼体的肝、肾进行接菌培养, 确定病原菌种类。并计算相对免疫保护率

(relative percent survival, RPS), 按下列公式计算:

$$RPS(\%) = [(对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率] \times 100\%$$

2 结果

2.1 血清T-SOD活力检测结果

免疫后, 各实验组血清T-SOD活力均极显著上升($P < 0.01$), 鲷爱德华菌微球疫苗组和灭活疫苗组血清T-SOD活力至第6周时与对照组差异不显著($P > 0.05$), 空微球组在实验1~3周, 引起T-SOD活力的快速上升, 但至第4周时即与对照组差异不显著($P > 0.05$)(图1)。

2.2 血清溶菌酶活力检测结果

免疫后第1~6周, 鲷爱德华菌微球疫苗组和灭活疫苗组血清溶菌酶活力均极显著高于对照组($P < 0.01$), 第7周时, 差异不显著($P > 0.05$); 空微球组溶菌酶活力在整个实验期间均低于其他实验组, 高水平的酶活力持续时间也较短, 第5周时与对照组差异不显著($P > 0.05$, 图2)。

2.3 ACH₅₀活性检测结果

免疫后第1、2周, 各实验组ACH₅₀活性均极

显著高于对照组($P < 0.01$), 疫苗组在第2周达到峰值, 鲷爱德华菌微球疫苗组ACH₅₀活性至第7周仍显著高于对照组($P < 0.05$), 而灭活疫苗至第5周时与对照组差异不显著($P > 0.05$); 空微球组仅在实验第1、2周极显著高于对照组($P < 0.01$), 之后差异不显著($P > 0.05$, 图3)。

2.4 疫苗对斑点鲷肾脏免疫相关基因表达的影响

通过real-time PCR方法检测攻毒前斑点鲷各免疫相关基因在肾脏中的表达量, 鲷爱德华菌微球疫苗组各免疫基因的表达均高于其余各组。鲷爱德华菌微球疫苗组IL-1β₁的表达显著高于灭活疫苗组($P < 0.05$), 极显著高于对照组($P < 0.01$), 鲷爱德华菌灭活疫苗组与空微球组、对照组差异不显著($P > 0.05$); 各实验组肾脏中TNF-α的表达量高于对照组, 但微球疫苗、灭活疫苗及空微球组间差异不显著($P > 0.05$); 鲷爱德华菌微球疫苗组和鲷爱德华菌灭活疫苗组MHC-IIβ的表达均极显著高于空微球组和对照组($P < 0.01$); 鲷爱德华菌微球疫苗组CD4L-2的表达显著高于灭活疫苗组和对照组($P < 0.05$, 图4)。

攻毒48 h后检测各实验组斑点鲷免疫基因表

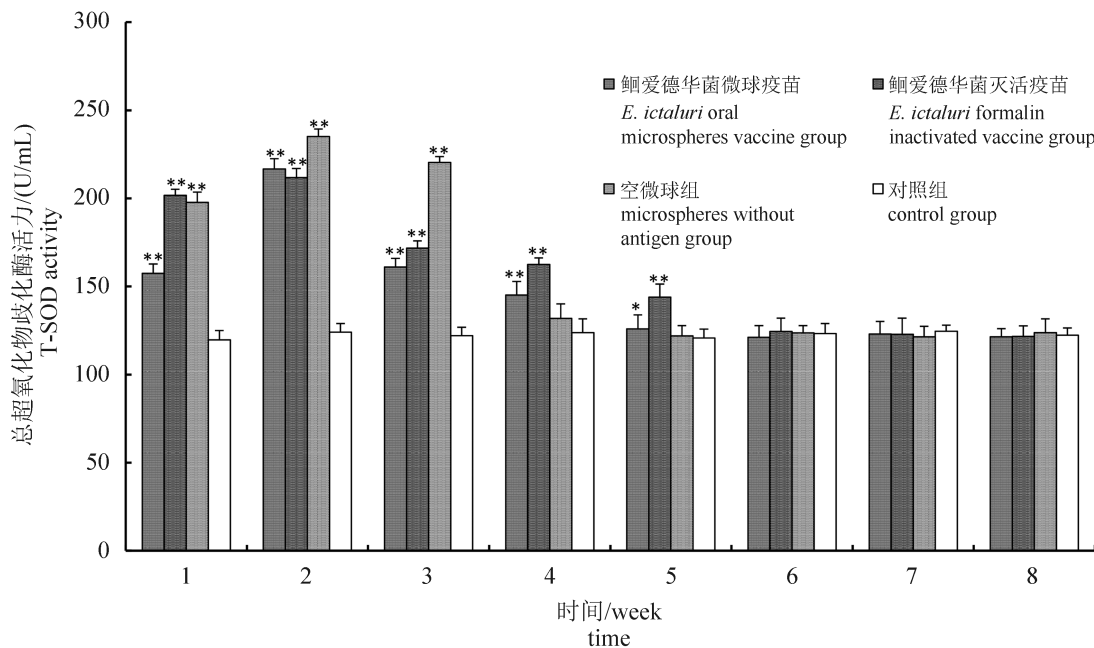


图1 斑点鲷血清总超氧化物歧化酶活力变化

将各实验组与对照组T-SOD活力进行差异显著性分析; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Differences of T-SOD activity in serum of *L. punctatus*

Differences of T-SOD activity between control group and other groups in each week were analyzed statistically; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; the same below

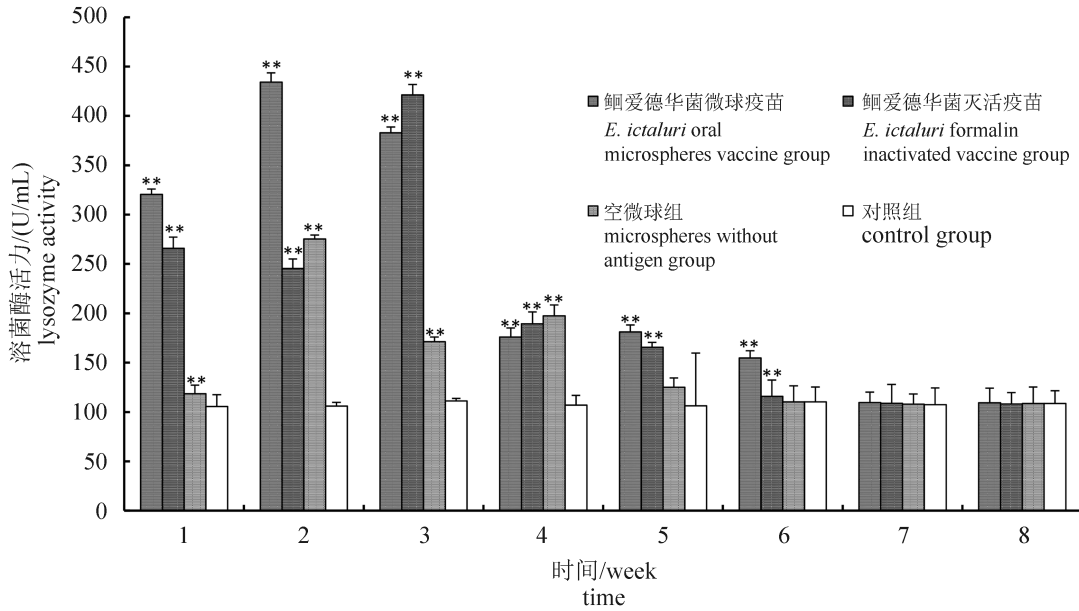


图 2 斑点鲷血清溶菌酶活力变化

Fig. 2 Differences of lysozyme activity in serum of *I. punctatus*

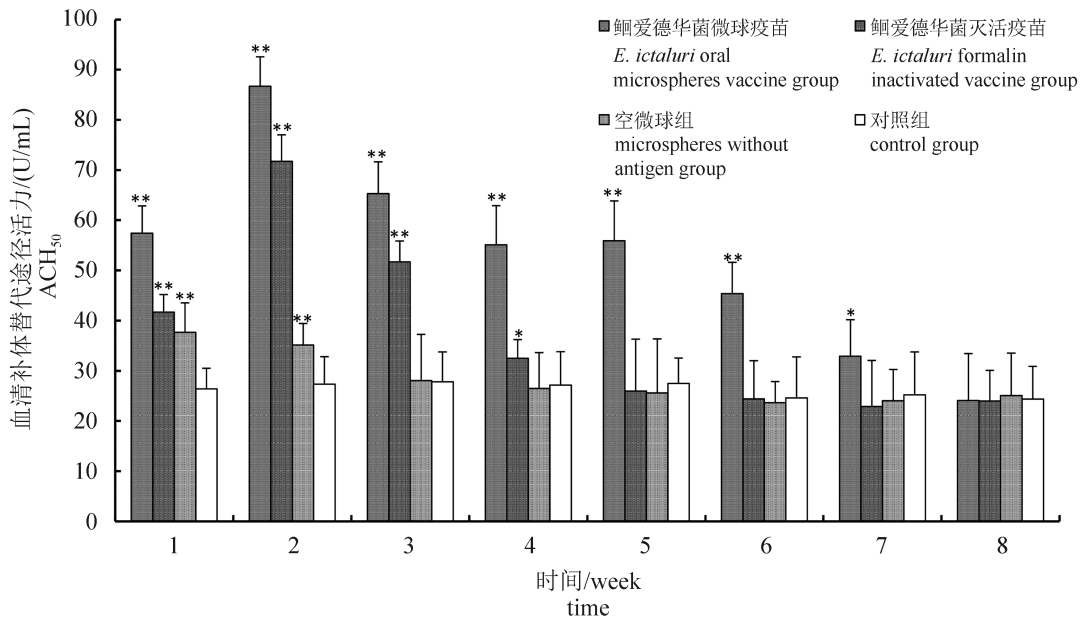


图 3 斑点鲷血清补体替代途径活力变化

Fig. 3 Differences of ACH₅₀ activity in serum of *I. punctatus*

达发现, *IL-1β*₁、*TNF-α*、*MHC-IIβ*和*CD4L-2*在肾脏中的表达量均有一定程度的上调。鲷爱德华菌微球疫苗组各基因的表达量均极显著高于对照组($P < 0.01$), 分别为对照组的7.7、6.9、10.9和3.8倍。*TNF-α*和*MHC-IIβ*基因表达量极显著高于灭活疫苗组和空微球组($P < 0.01$, 图5)。

2.5 疫苗对斑点鲷脾脏免疫相关基因表达的影响

检测各免疫相关基因在受免斑点鲷脾脏中的

表达量, 鲷爱德华菌微球疫苗组*IL-1β*₁、*TNF-α*和*MHC-IIβ* 3种免疫基因的表达均极显著高于对照组($P < 0.01$); *IL-1β*₁和*CD4L-2*的表达量显著高于灭活疫苗组($P < 0.05$); 灭活疫苗组*IL-1β*₁和*CD4L-2*的表达量与对照组差异不显著($P > 0.05$, 图6)。

攻毒后48 h检测发现, 鲷爱德华菌微球疫苗组*IL-1β*₁和*MHC-IIβ*表达量较攻毒前有较大的上调, 分别为对照组的8.5倍和7.4倍, 极显著高于灭活疫苗组、空微球组和对照组($P < 0.01$); 鲷爱

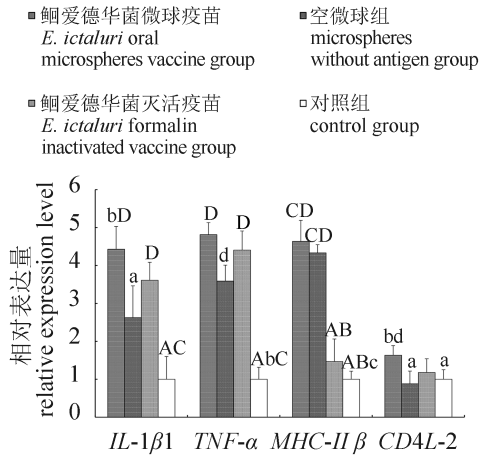


图 4 攻毒前斑点鲷肾脏中免疫相关基因相对表达量数据为平均数±标准差(mean±SD)。A、B、C、D分别表示与鲷爱德华菌微球疫苗组、鲷爱德华菌灭活疫苗组、空微球组、对照组差异极显著($P < 0.01$)。a、b、c、d分别表示与鲷爱德华菌微球疫苗组、鲷爱德华菌灭活疫苗组、空微球组、对照组差异显著($P < 0.05$)。下同

Fig. 4 Relative expression level of immune genes in kidney of vaccinated *I. punctatus* before challenge

Data are presented with the means ± standard deviation. Letter A, B, C and D represent the significant difference ($P < 0.01$) between any one of the groups and *E. ictaluri* oral microspheres vaccine group, formalin inactivated vaccine group, microspheres without antigen group and control group, respectively. Letter a, b, c and d represent difference ($P < 0.05$) between any one of the groups and *E. ictaluri* oral microspheres vaccine group, formalin inactivated vaccine group, microspheres without antigen group and control group, respectively. The same below

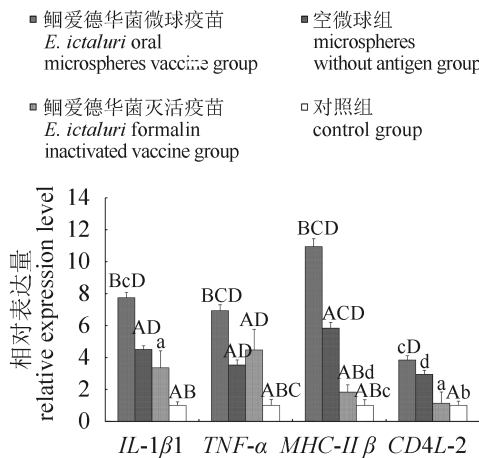


图 5 鲷爱德华菌攻毒后 48 h 斑点鲷肾脏中免疫相关基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of immune genes in kidney of vaccinated *I. punctatus* at 48 h post-challenge by *E. ictaluri*

爱德华菌微球疫苗组 *TNF-α* 和 *CD4L-2* 的表达量均高于其余各实验组, 极显著高于空微球组和对照

组($P < 0.01$, 图 7)。

2.6 微量凝集实验检测血清抗体

通过微量凝集实验检测, 鲷爱德华菌微球疫苗组在第 2 周时检测到特异性抗体, 效价 1 : 2, 第 5 周时达到峰值 1 : 16, 之后抗体水平开始降低, 至第 7 周时仍能检测到低水平的特异性抗体, 效价 1 : 2。鲷爱德华菌灭活疫苗组仅在第 3、4 周时检测到特异性抗体, 效价 1 : 2。空微球组和对照组在整个实验中均无特异性抗体检出。

2.7 相对免疫保护率

攻毒前, 斑点鲷均未出现死亡等异常情况。

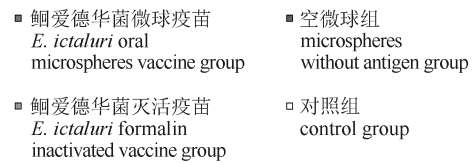


图 6 攻毒前斑点鲷脾脏中免疫相关基因相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of immune genes in spleen of vaccinated *I. punctatus* before challenge

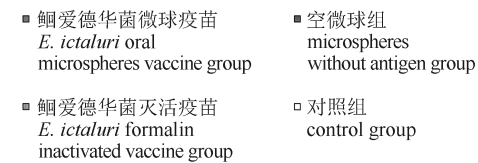


图 7 鲷爱德华菌攻毒后 48 h 斑点鲷脾脏中免疫相关基因相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of immune genes in spleen of vaccinated *I. punctatus* at 48 h post-challenge by *E. ictaluri*

各实验组按体质量2%口服免疫饲料1个免疫周期(7 d),于免疫后第29天进行攻毒。采用寇氏法计算鲷爱德华菌LD₅₀为2.1×10⁶ cfu/mL,以50 LD₅₀攻毒。结果表明,接种鲷爱德华菌微球疫苗和灭活疫苗组分别获得的抗鲷爱德华菌相对免疫保护率为60.7%和14.3%;空微球组相对免疫保护率为10.7%,正常饲料对照组在攻毒后14 d内,死亡率为93.3%(表3)。

3 讨论

本研究以天然高分子聚合物海藻酸钠为口服疫苗载体,制备鲷爱德华菌口服微球疫苗,通过免疫健康斑点鲷,检测血清非特异性免疫指标、抗体效价和相对免疫保护率,评价疫苗保护效果。

超氧化物歧化酶是鱼类清除机体自由基的重要物质,当SOD活力下降时,机体清除自由基的

表3 攻毒后斑点鲷死亡率和相对免疫保护率

Tab. 3 Mortality and relative percent survival of *L. punctatus* after challenge with *E. ictaluri*

分组 groups	实验动物数量/尾 the quantity of experimental animals	死亡数量/尾 the quantity of death	死亡率/% mortality	相对免疫保护率/% RPS
鲷爱德华菌微球疫苗组	30	11	36.7	60.7
鲷爱德华菌灭活疫苗组	30	24	80.0	14.3
空微球组	30	25	83.3	10.7
对照组	30	28	93.3	0.0

能力减弱,从而引起免疫力下降,本实验中,免疫后各免疫组血清总超氧化物歧化酶活力均升高,鲷爱德华菌口服疫苗组血清T-SOD活力在免疫后第5周仍显著高于对照组($P < 0.05$),高水平的SOD活性与生物体的免疫水平密切相关,对增强巨噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要作用^[15],有较多学者也对免疫后鱼体内的SOD活力变化进行了研究,高冬梅等^[16]通过鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)疫苗对鲈(*Lateolabrax japonicus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的血清SOD活力进行研究;兰萍等^[17]、董少杰等^[18]分别对免疫后的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、鲤(*Cyprinus carpio*)血清中SOD活力水平进行研究,发现免疫后鱼体SOD活力均显著升高,与本实验结果相似,这主要是因为体液免疫因子中的非特异性免疫参与宿主的抗病原体感染过程,病原体往往会产生一些代谢产物,SOD能有效清除这些有害物质,所以SOD水平的高低可以间接反映机体抗病能力的大小。溶菌酶是一种碱性蛋白,能水解细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解释放,从而消除侵入机体的异物,实现机体防御功能,作为鱼类非特异性免疫的重要组成,其广泛分布于血清、黏液及部分淋巴组织中,鱼体内溶菌酶的活力和水平,直接关系到鱼类的免疫能力和健康状况^[19-20]。本实验中,免疫口服微球疫苗的斑点鲷血清溶菌酶活力极显著升高($P < 0.01$),至第6周时仍显著高于对

照组,对于长期保护机体消除入侵的病原体有积极的作用。鱼类补体直接参与机体防御,其生物学活性影响机体抵抗微生物的能力、免疫复合物的形成和持续时间等,而ACH₅₀是衡量鱼类非特异性免疫力的一项重要指标^[21],免疫鲷爱德华菌口服疫苗的斑点鲷血清中ACH₅₀活性相比灭活疫苗及空微球组更高,且持续时间长,说明鲷爱德华菌口服疫苗能有效地激活鱼类补体系统。

通过real-time PCR方法研究口服疫苗对斑点鲷免疫相关基因表达的影响,相比于对照组,免疫组的IL-1β₁和TNF-α 2种基因迅速大量表达,这与其作为单核吞噬细胞分泌的前炎性细胞因子,是抵抗病原入侵的第一介质有关^[22]。其功能是调节趋化因子产生,诱导中性粒细胞和巨噬细胞迁移到感染部位发挥免疫功能^[23]。因此在本实验中,鲷爱德华菌微球疫苗组IL-1β₁和TNF-α基因的表达式高于其他实验组,说明免疫口服微球疫苗使受免鱼对病原入侵进行更快速和有效的反应,对于抵御病原入侵有重要的作用。MHC是一组能够编码主要组织相容性系统的基因群,其编码产物广泛参与免疫反应。鱼类MHC I类基因产物主要作用是将内源性抗原递呈给CD8T细胞,而MHC-II基因类产物的主要作用是结合外源性抗原并递呈给CD4T细胞。本实验通过检测MHC-IIβ和CD4L-2基因的表达,发现2种基因的表达量在各组中的趋势相近,在攻毒后48 h 2种基因的表达量均有上调,鲷爱德华菌

微球疫苗组尤为明显, 也说明免疫鲷爱德华菌微球疫苗的受免鱼能有更多的MHC-II β 和CD4L-2基因表达, 以帮助鱼体抵抗病原入侵, 增强机体免疫力。这与王庆等^[24]用灭活疫苗免疫斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)后MHC-II基因的表达变化相似, Yu等^[25]和Jiao等^[26]也在实验中得到了类似的结果。

通过微量凝集实验检测特异性抗体, 鲷爱德华菌微球疫苗组抗体效价在第5周时达到峰值, 为1:16, 至免疫后的第7周仍能检测到特异性抗体, 因此, 在整个实验中非特异性免疫和特异性免疫的共同作用, 为鱼体提供了更长时间的免疫保护。在攻毒实验中, 接种鲷爱德华菌口服微球疫苗的斑点鲷获得的抗鲷爱德华菌相对免疫保护率为60.7%, 远高于灭活疫苗组(14.3%)及空微球组(10.7%)。这与李新华等^[27]制备的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)免疫银鲫(*Carassius auratus gibelio*)获得的相对免疫保护率(61.1%)相当, 远高于丁诗华等^[28]的研究结果(32.1%)和曲向阳^[29]的研究结果(50.0%), 这与口服疫苗的制备工艺与疫苗载体不同有关。本研究中, 鲷爱德华菌微球疫苗对斑点鲷非特异性免疫力的促进作用强于灭活疫苗及空微球, 同时也可发现, 本实验选用的口服疫苗载体海藻酸钠对于斑点鲷非特异性免疫力也具有一定的积极作用, 其也能使斑点鲷获得10.7%的相对免疫保护率。总之, 本实验证明鲷爱德华菌口服疫苗是一种可用的斑点鲷疫苗, 且海藻酸钠是一种有效的渔用口服疫苗载体。

参考文献:

- [1] 严朝晖, 肖友红, 李林. 世界鲇鱼产业现状及对我国斑点叉尾鲷产业市场定位的重新认识[J]. 中国水产, 2013(6): 36-40.
Yan C H, Xiao Y H, Li L. The situation of channel catfish in the world and new understanding to market positioning in China [J]. China Fisheries, 2013(6): 36-40 (in Chinese).
- [2] Dunham R A, Warr G W, Nichols A, et al. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish *Ictalurus punctatus* possessing cecropin genes [J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(3): 338-344.
- [3] 耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 鲷爱德华氏菌与鲷爱德华氏菌病[J]. 水产科技情报, 2009, 36(5): 236-240.
Geng Y, Wang K Y, Chen D F, et al. *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella ictaluri* infection *Edwardsiella ictaluri* and enteric septicemia of catfish [J]. Fisheries Science Technology Information, 2009, 36(5): 236-240 (in Chinese).
- [4] Behera T, Swain P. Alginate-chitosan-PLGA composite microspheres induce both innate and adaptive immune response through parenteral immunization in fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(3): 785-791.
- [5] 庞丽姣. 低聚木糖对草鱼非特异性免疫功能及免疫相关基因表达的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
Pang L J. Effects of xylooligosaccharide on the non-specific immunity function and the expression of immune related genes on *Ctenopharyngodon idellus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [6] 王庆奎, 赵海运, 吕志敏, 等. 口服当归多糖对点带石斑鱼非特异性免疫力的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 39(22): 13857-13860.
Wang Q K, Zhao H Y, Lv Z M, et al. Effects of dietary angelica sinensis Polysaccharide on nonspecific immunity of *Epinephelus malabaricus* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 39(22): 13857-13860 (in Chinese).
- [7] McBeath A J A, Snow M, Secombes C J, et al. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(3): 230-241.
- [8] 阳磊, 汪开毓, 潘延乐, 等. 响应面法优化鲷爱德华菌口服微球疫苗制备工艺及其特性分析[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 430-438.
Yang L, Wang K Y, Pan Y L, et al. Optimization of preparation conditions by response surface methodology and characterization of oral microsphere vaccine of *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 430-438 (in Chinese).
- [9] Leal C A G, Carvalho C G A, Sacchetti P S C, et al. Oral and parenteral vaccines against *Flavobacterium columnare*: evaluation of humoral immune response by ELISA and *in vivo* efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture International, 2010, 18(4): 657-666.
- [10] Romalde J L, Luzardo A A, Ravelo C, et al. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis [J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 119-129.

- [11] Swain P, Dash S, Sahoo P K, *et al.* Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(1-2): 38-43.
- [12] Sitjà B A, Mingarro M, Pujalte M J, *et al.* Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 707-724.
- [13] Wang E, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 9998-10015.
- [14] Huang H Y, Chen Y C, Wang P C, *et al.* Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization [J]. *Vaccine*, 2014, 32(51): 7014-7020.
- [15] 艾春香, 陈立桥, 高露姣, 等. Vc对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. *台湾海峡*, 2002, 21(4): 431-438.
- Ai C X, Chen L Q, Gao L J, *et al.* Effect of vitamin C on SOD, ALP and ACP activities of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002, 21(4): 431-438 (in Chinese).
- [16] 高冬梅. 鳗弧菌疫苗对牙鲆和鲈鱼免疫效果研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- Gao D M. Immunological efficacy induced by *V. anguillarum* vaccines on flounder (*Paralichthys olivaceus*) and perch (*Lateolabrax janopicus*) [D]. Qingdao: China Ocean University, 2003 (in Chinese).
- [17] 兰萍, 宋晓玲, 张辉, 等. 美人鱼发光杆菌对凡纳滨对虾非特异性免疫功能及抗病力的影响[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(1): 65-73.
- Lan P, Song X L, Zhang H, *et al.* Effect of *Photobacterium damsela* on the non-specific immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(1): 65-73 (in Chinese).
- [18] 董少杰, 梁拥军, 孙向军, 等. 口服免疫灭活菌苗对锦鲤幼鱼非特异性免疫功能的影响[J]. *华北农学报*, 2010, 25(5): 223-227.
- Dong S J, Liang Y J, Sun X J, *et al.* Effect of oral immune with inactivated bacteria on non-specific immunological function of Juvenile koi [J]. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*, 2010, 25(5): 223-227 (in Chinese).
- [19] 汪成竹, 姚鹏, 吴凡, 等. 免疫多糖(酵母细胞壁)对中华鳖非特异性免疫功能的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(4): 421-425.
- Wang C Z, Yao J, Wu F, *et al.* Effect of oral immunopolysaccharide (yeast cell wall) on non-specific immune function in juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) by oral administration [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, 25(4): 421-425 (in Chinese).
- [20] Zhou J, Song X L, Huang J, *et al.* Effects of dietary supplementation of A3 α -peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 251(2-4): 172-181.
- [21] 王志平, 张士瑾, 王光锋. 鱼类补体系统成分及补体特异性和功能的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(5): 760-769.
- Wang Z P, Zhang S C, Wang G F. Advances on the complement components, characteristic and function of complement system in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(5): 760-769 (in Chinese).
- [22] Park K C, Osborne J A, Tsoi S C M, *et al.* Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(5): 393-415.
- [23] Wei Y C, Pan T S, Chang M X, *et al.* Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(3-4): 173-182.
- [24] 王庆, 吴光辉, 巩华, 等. 斜带石斑鱼浸泡免疫哈维氏弧菌灭活疫苗后MHC-II类分子的表达变化[J]. *广东农业科学*, 2010, 37(12): 136-139.
- Wang Q, Wu G H, Gong H, *et al.* Expression of MHC class II molecules of *Epinephelus coioides* vaccinated with killed *Vibrio harveyi* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2010, 37(12): 136-139 (in Chinese).
- [25] Yu S H, Ao J Q, Chen X H. Molecular characterization and expression analysis of MHC class II α and β genes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(3): 1295-1307.
- [26] Jiao X D, Cheng S, Hu Y H, *et al.* Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's

- incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen [J]. *Vaccine*, 2010, 28(7): 1832–1837.
- [27] 李新华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 125–130.
- Li X H, Shen J Y, Yin W L, *et al.* Immunity and immunohistochemistry by oral vaccination of *Carassius auratus gibelio* using *Aeromonas hydrophila* vaccine [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 125–130 (in Chinese).
- [28] 丁诗华, 王一丁, 彭远义, 等. 鱼用嗜水气单胞菌口服疫苗的免疫保护效应[J]. *西南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(6): 888–891, 917.
- Ding S H, Wang Y D, Peng Y Y, *et al.* Immunogenicity and protective effects of an oral vaccine microparticle against *Aeromonas hydrophila* in grass CARP (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science)*, 2005, 27(6): 888–891, 917 (in Chinese).
- [29] 曲向阳. 嗜水气单胞菌微囊口服疫苗的制备及其免疫效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- Qu X Y. Study on preparation and immune efficacy of chitosan-coated alginate microspheres incorporating *Aeromonas hydrophila* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.

The immune effect of an oral microspheres vaccine against *Edwardsiella ictaluri* on channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

WU Xuejing¹, WANG Kaiyu^{1*}, YANG Lei^{1,2}, ZHOU Yan¹, WANG Erlong¹,
HE Yang¹, CHEN Defang¹, GENG Yi¹

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. Guangyuan Municipal Agriculture Bureau, Guangyuan 628017, China)

Abstract: To evaluate the immune effect of an oral vaccine of *Edwardsiella ictaluri* on channel catfish, *E. ictaluri* were killed by formalin and sodium alginate was used to prepare the oral microsphere vaccine. The experimental animals were randomly divided into four groups, including *E. ictaluri* oral microspheres vaccine group, formalin inactivated vaccine group, microspheres without antigen group and control group. After oral immunization, the effect of the vaccine was evaluated by serum non-specific immune parameters, antibody titers and relative percent survival detection. Results showed the serum lysozyme activity, total superoxide dismutase (T-SOD) activity and alternative pathway complement (ACH₅₀) activity significantly increased in vaccinated channel catfish, showing the influence of the relativity gene transcription of the *Ictucurus punctatus* induced by these oral vaccines respectively by real-time PCR. The results showed that the *I. punctatus* fed the *E. ictaluri* oral microsphere vaccine can acquire longer time of nonspecific immunity. The serum agglutination titers peaked to 1 : 16 at 5th week. The specific antibodies could still be detected at 7th week. The relative percent survival of channel catfish was 60.7%, far higher than formalin inactivated vaccine group (14.3%) and microspheres without antigen group (10.7%). From the results of real-time PCR, it is found that in the *E. ictaluri* oral microspheres vaccine group, the expression of immunity genes increased more notably than other groups during the 48 hours after injection, especially in the kidney and spleen. In conclusion, the oral microspheres vaccine of *E. ictaluri* was able to enhance the non-specific immune function and effective for preventing *E. ictaluri* disease.

Key words: *Edwardsiella ictaluri*; *Ictalurus punctatus*; oral vaccine; sodium alginate; non-specific immunity function; relative percent survival

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywangsicau@126.com

Funding projects: Changjiang Scholars and Innovative Research Teams in the University (IRT0848); Sichuan Science and Technology Agency Project (2014NZ0003); Sichuan Science and Technology Agency Application Foundation Project (2014JY0143)