

文章编号: 1000-0615(2016)08-1258-07

DOI: 10.11964/jfc.20160110264

罗非鱼无乳链球菌微胶囊口服疫苗的研制及其免疫效果

吴斌^{1,2}, 樊海平^{1*}, 张新艳¹, 郑磊¹,
钟全福¹, 张国庆³, 翁祖桐²

(1. 福建省淡水水产研究所, 福建福州 350002;
2. 福建省水产技术推广总站, 福建福州 350002;
3. 福州博立医药科技有限公司, 福建福州 350002)

摘要: 为了建立罗非鱼无乳链球菌病免疫防控方法, 以原核表达SIP (surface immunogenic protein)蛋白为芯材, 天然多糖为壁材, 制备罗非鱼无乳链球菌聚丙烯酸树脂Ⅱ微胶囊口服疫苗, SIP口服疫苗微胶囊颗粒平均直径约826.5 μm, 包封率为72.02%, 载药量最高达6.11%。微胶囊包裹的SIP蛋白在5种缓冲液中释放效果: pH 6.80>pH 7.20>pH 9.18>pH 4.68>pH 2.00。体外实验证实微胶囊颗粒在模拟胃酸环境中蛋白释放量极小, 数值为395.5 μg; 而在模拟肠液中, 释放量最高达5426.0 μg, 其中240 min释放量为4911.1 μg, 释放度达90.51%, 说明微胶囊能避免胃酸的破坏且肠溶性好。SIP微胶囊口服疫苗以投喂的方式免疫“新吉富”罗非鱼, 分别以每克罗非鱼体质量免疫5和10 μg SIP蛋白的剂量分组测试, 4次免疫过程中, 5 μg免疫剂量组特异性血清效价为100⁻¹~400⁻¹, 10 μg免疫剂量组特异性血清效价为200⁻¹~1600⁻¹。4次免疫后, 攻毒实验表明, 5和10 μg的免疫剂量组的免疫保护率分别为44.45%和66.67%。研究表明, 微胶囊口服疫苗免疫为罗非鱼无乳链球菌病的免疫防治提供方便、安全、有效的途径。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; 表面免疫相关蛋白(SIP); 微胶囊口服疫苗

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

罗非鱼(*Oreochromis sp.*)链球菌病近年来在广东、广西、海南等罗非鱼养殖地区(省份)大规模暴发, 造成了重大的经济损失, 严重影响了罗非鱼产业的稳定发展^[1]。疫苗免疫是罗非鱼链球菌病重要的预防手段, 其中注射型疫苗在免疫过程中容易造成鱼体受伤, 且免疫操作不方便, 不利于罗非鱼养殖生产中大规模应用。因此, 研发安全、免疫保护率高、使用简便和低成本口服疫苗是罗非鱼疫苗的发展趋势。

国内外针对罗非鱼链球菌病口服疫苗的研究工作主要包括直接口服全菌灭活疫苗或弱毒苗、研制微胶囊包裹的灭活全菌疫苗或亚单位成份的疫苗、测试微胶囊包裹的DNA疫苗免疫

效果。徐增辉^[2]制备海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)灭活疫苗以口服方式免疫罗非鱼, 余晓丽等^[3]研制灭活海豚链球菌疫苗口服免疫奥尼罗非鱼(*O. niloticus*×*O. aureus*); 全琛宇等^[4]对罗非鱼口服免疫不同剂量无乳链球菌(*S. agalactiae*)弱毒苗, 并通过受免罗非鱼肠道组织学观察、攻毒实验验证了免疫效果; 高铭蔚等^[5]制备了聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)包裹灭活无乳链球菌的口服疫苗免疫尼罗罗非鱼, 获得较高的免疫保护率; Ramos等^[6]利用壳聚糖包裹表达β-半乳糖苷酶基因的DNA疫苗, 拌饲料口服免疫罗非鱼, 能够在受免鱼体的胃、脾、鳃中检测到疫苗成份, 表明口服效果好。

收稿日期: 2016-01-27 修回日期: 2016-05-15

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49); 福建省公益类科研院所专项(2014R1002-3); 福建省海洋与渔业厅重点项目(闽海渔合同[2010]2-12号)

通信作者: 樊海平, E-mail: fanhaiping16@163.com

Maione等^[7]利用基因组学方法筛选出无乳链球菌表面免疫相关蛋白(surface immunogenic protein, SIP),并检测了其具有较好的免疫原性;张新艳等^[8]原核表达了罗非鱼无乳链球菌重组蛋白SIP;黎炯^[9]在原核表达罗非鱼SIP蛋白的基础上开展免疫原性分析,结果显示重组蛋白SIP具有较强的免疫原性和保护作用;Zhang等^[10]原核表达罗非鱼无乳链球菌Trx-SIP蛋白,以PMMMA-PLGA为壁材,制备微胶囊口服疫苗。本研究致力于选择适合罗非鱼消化系统特征的壁材制备罗非鱼无乳链球菌SIP蛋白微胶囊口服疫苗,并开展了微胶囊疫苗特性测定、缓释效果分析和免疫效果测试。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

罗非鱼无乳链球菌SIP原核表达工程菌SIP-pET32a(+)由福建省淡水水产研究所水产动物病害防治研究室构建。

无乳链球菌070717LL菌株分离自罗非鱼肝脏组织,由福建省淡水水产研究所水产动物病害防治研究室分离鉴定。

无乳链球菌SIP兔多克隆抗体由福建省淡水水产研究所水产动物病害防治研究室制备。

“新吉富”罗非鱼由福建省淡水水产研究所榕桥中试基地提供。

1.2 微胶囊疫苗颗粒的制备

芯材的制备 将SIP-pET32a(+)菌株接种于LB液体培养基中,37℃振荡培养至OD₆₀₀为0.5~0.6,加入诱导剂IPTG,25℃诱导表达5~6h,5000 r/min,离心10 min,收集菌体,超声波破碎菌液,收集SIP蛋白并纯化备用。

微胶囊的制备 以SIP蛋白为芯材,天然多糖为壁材,丙烯酸树脂II为成膜物质,将SIP蛋白、多糖和丙烯酸树脂II溶液按一定比例混和制备出微胶囊,所得的微胶囊过滤,晾干即得微胶囊疫苗成品。

1.3 微胶囊疫苗颗粒特性测定

形态学特征及粒径显微观察 随机取制备的SIP微胶囊疫苗颗粒进行外观观察,并用显微摄影系统及其分析软件进行显微观察及粒径测量。

SIP微胶囊疫苗颗粒在5种pH缓冲液中溶解释

放效果测定 称取SIP微胶囊颗粒15份,每份0.1 g,分别置于含有磷酸盐缓冲液(pH 2.00)、柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液(pH 4.68)、磷酸缓冲液(pH 6.80)、磷酸缓冲液(pH 7.20)、四硼酸钠缓冲液(pH 9.18)的5个三角锥瓶中,每瓶含10.0 mL缓冲液,设置3个平行组,于恒温摇床中以28℃,200 r/min振荡处理720 min,并分别于30、60、120、180、240、300、360和720 min取样上清液,测定SIP蛋白浓度,分析微胶囊颗粒中芯材SIP蛋白在各缓冲液中溶解释放情况。

微胶囊颗粒在2种pH缓冲液中溶出度及包封率的测定 按“SIP微胶囊疫苗颗粒在5种pH缓冲液中溶解释放效果测定”步骤,检测微胶囊颗粒在磷酸缓冲液(pH 6.80)、磷酸缓冲液(pH 7.20)中的溶出度,于5、10、20、30、60、120、180、240、300、360和720 min取样上清液,测定SIP蛋白浓度,分析比较微胶囊颗粒芯材SIP蛋白在2种pH缓冲液中溶出的速率和程度,并计算微胶囊包封率:

微胶囊包封率(%)=(微胶囊中的SIP蛋白量/微胶囊化前的SIP蛋白量)×100

SIP微胶囊颗粒疫苗在模拟胃液、肠液中溶出度测定 模拟胃液的配制:24.4%稀盐酸16.4 mL,胃蛋白酶10.0 g,加水混匀,定容至1000 mL,pH 1.2。

模拟肠液的配制:磷酸二氢钾6.8 g,加水500 mL溶解,用0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至6.8;加入胰蛋白酶10 g,加水定容至1000 mL,pH 6.8。

模拟胃液和模拟肠液中的蛋白溶出度测定方法同“SIP微胶囊疫苗颗粒在5种pH缓冲液中溶解释放效果测定”。

1.4 SIP微胶囊口服疫苗饲料的制备

基础饲料为福州东坤饲料有限公司生产的淡水鱼配合饲料粉料,其粗蛋白质百分含量(%)≥32.0,SIP微胶囊疫苗颗粒与饲料粉料混合,利用小型螺杆制粒机制作成粒径5 mm的SIP微胶囊疫苗饲料,SIP蛋白含量分别为0、100和200 μg/g饲料,低温晾干,密封包装备用。

1.5 SIP微胶囊口服疫苗免疫效果测试

SIP微胶囊口服疫苗安全性评价 将SIP蛋白含量为200 μg/g微胶囊口服疫苗饲料按鱼体质

量5%的日投喂量免疫健康“新吉富”罗非鱼1次, 逐日观察记录鱼体死亡情况, 连续2周。

SIP微胶囊口服疫苗免疫罗非鱼特异性血清检测 取体质量约50 g的健康“新吉富”罗非鱼, 分3组, 每组70只, 暂养1周后, 实验组于1、21、56和91 d分4次投喂SIP微胶囊口服疫苗饲料, 第2组、第3组SIP蛋白质量分别按5和10 $\mu\text{g/g}$ 鱼体质量饲料投喂实验鱼, 第1组(阴性对照组)同步投喂未包封SIP蛋白的微胶囊颗粒(表1)。

表1 SIP微胶囊口服疫苗免疫方案

Tab. 1 Immune-procedure of protein SIP oral microencapsulated vaccine

组别 group	免疫方式 vaccination strategies	疫苗剂量 /($\mu\text{g/g}$) dose	免疫次数/次 immune times	鱼数量/尾 number of fish
1组	口服	0	0	70
2组	口服	5	4	70
3组	口服	10	4	70

于每次免疫后20 d, 随机取各组5尾“新吉富”罗非鱼的血清, 按捕获ELISA法进行检测, 分析效价。受免“新吉富”罗非鱼血清效价IgM捕获ELISA检测法: “新吉富”罗非鱼IgM单克隆抗体包被酶标板; 待测“新吉富”罗非鱼血清样本按 50^{-1} 、 100^{-1} 、 200^{-1} 、 400^{-1} 、 800^{-1} 、 1600^{-1} 、 3200^{-1} 、 6400^{-1} 、 $12\ 800^{-1}$ 倍比稀释加样检测, 每个样本设3个平行, 同时用正常的未免疫“新吉富”罗非鱼血清同倍稀释作阴性对照组; 加入SIP蛋白抗原; SIP蛋白兔多克隆抗体作一抗结合; HRP标记的羊抗兔作二抗结合; TMB显色液显色后终止; 酶标仪应用波长为450和630 nm的双波长读数; 分别比较各梯度稀释浓度下(实验组数值)/(阴性对照组数值), 若结果 ≥ 2.1 倍, 即判断为阳性结果, 若结果 ≤ 2.1 倍, 即判断为阴性结果。

1.6 SIP微胶囊口服疫苗免疫保护率测定

于4免后第10天, 各组取11尾“新吉富”罗非鱼进行攻毒实验, 攻毒菌株为BHI固体培养16 h的无乳链球菌070717LL(浓度为 9.0×10^7 cfu/mL), 腹腔注射攻毒, 每尾0.5 mL, 计算保护率, 未免疫的阴性对照组亦同。

免疫保护率(relative percent survival, RPS, %)= $[1-(\text{免疫组死亡率}/\text{对照组死亡率})] \times 100$

2 结果与分析

2.1 SIP微胶囊颗粒形态学特征

罗非鱼无乳链球菌SIP微胶囊颗粒外观呈白色粉末状, 大小均匀; 在显微镜(10 \times 10倍)下观察微胶囊颗粒为近似球状; 显微分析软件测量微胶囊颗粒直径为744.0~921.0 μm , 平均直径约826.5 μm , 标准差为65.5 μm 。

2.2 SIP微胶囊颗粒在5种pH缓冲液中的蛋白释放效果

在pH 6.80的缓冲液中, SIP蛋白释放量最大(图1), 第720 min时释放量为5104.2 μg , pH 2.00与4.68的缓冲液中, SIP蛋白释放量均较低, 第720 min时释放量分别为412.7和783.59 μg 。SIP蛋白释放效果比较: pH 6.80>pH 7.20>pH 9.18>pH 4.68>pH 2.00。

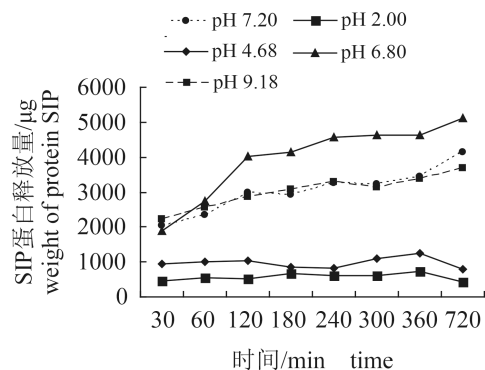


图1 SIP微胶囊颗粒在5种pH缓冲液中的蛋白释放曲线图

Fig. 1 Solubility curve of protein SIP oral microencapsulated vaccine in five pH conditions

2.3 SIP微胶囊颗粒在2种pH缓冲液中溶解曲线的测定及微胶囊包封率

在2种缓冲液中, 溶解0~240 min, SIP蛋白量随着溶解时间的延长而增加, 而在溶解240~1440 min阶段, 虽然溶解时间延长, 但SIP蛋白总体释放量变化不明显, SIP蛋白微胶囊蛋白主要在240 min内完成释放; SIP蛋白微胶囊在pH值为6.8的缓冲液中释放效果明显比pH值为7.2的缓冲液中好, 蛋白释放大(图2)。以微胶囊颗粒在pH 6.8的缓冲液中的释放量计算, 结合微胶囊制备过程中SIP蛋白投入量, SIP微胶囊颗粒包封率为72.02%, 载药量最高达6.11%。

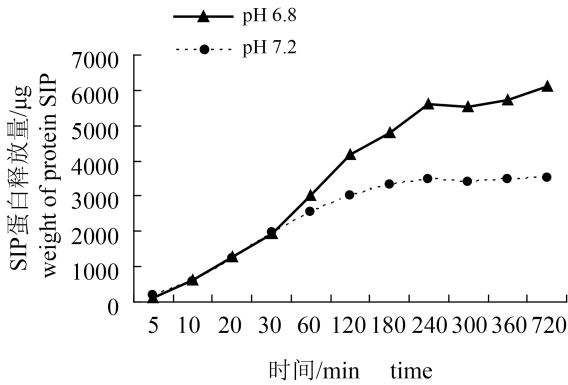


图 2 SIP微胶囊在2种pH缓冲液中的溶解曲线

Fig. 2 Solubility curve of protein SIP oral microencapsulated vaccine in two pH conditions

2.4 SIP微胶囊颗粒在模拟肠液、模拟胃液中的蛋白释放效果

微胶囊颗粒在模拟胃液环境中, SIP蛋白释放量极小, 最大量为395.5 μg (图3); 而在模拟肠液中, 微胶囊颗粒包封的SIP蛋白得到很好的释放, 释放量最高达5426.0 μg, 其中240 min释放量为4911.1 μg, 释放度达90.51%。

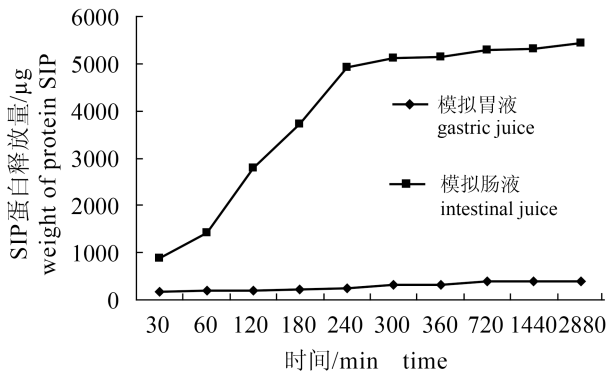


图 3 SIP微胶囊颗粒在模拟肠液、模拟胃液中蛋白释放效果

Fig. 3 Release conditions of protein SIP oral microencapsulated vaccine in simulated intestinal fluid and simulated gastric fluid

2.5 SIP微胶囊口服疫苗安全性评价

SIP微胶囊口服疫苗免疫“新吉富”罗非鱼后, 实验“新吉富”罗非鱼抢食积极, 游动活泼, 2周内未有任何异常, 表明疫苗安全性良好。

2.6 SIP微胶囊口服疫苗免疫“新吉富”罗非鱼特异性血清检测

于每次免疫后20 d检测各组“新吉富”罗非鱼血清特异性抗体效价, 结果显示, 第1组血清效

价均小于1:50 (稀释度); 第2组“新吉富”罗非鱼于首免后第20天检测出血清效价为1:100, 2免升高至1:200, 3免与4免后效价均达最大值1:400; 第3组于首免后第20天检测出血清效价为1:200, 2免和3免后升高至1:800, 4免后效价均达最大值1:1600 (表2)。

表 2 SIP微胶囊口服疫苗免疫“新吉富”罗非鱼血清抗体效价变化

Tab. 2 Change of antibody titers level in serum of tilapia immunized by protein SIP oral microencapsulated vaccine

组别	1免 first immunization	2免 second immunization	3免 third immunization	4免 fourth immunization
1组	≤50	≤50	≤50	≤50
2组	100	200	400	400
3组	200	800	800	1600

2.7 SIP微胶囊口服疫苗免疫保护率测定

剂量为10 μg/g组免疫效果好, 保护率达66.67%, 5 μg/g免疫组的保护效果为44.45% (图4, 表3), 说明SIP微胶囊口服疫苗对“新吉富”罗非鱼无乳链球菌病具有免疫保护力。

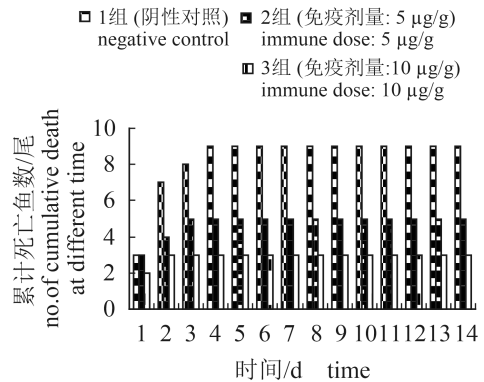


图 4 无乳链球菌攻毒后受免“新吉富”罗非鱼累计死亡数

Fig. 4 The cumulative death of immunized *O. niloticus* against challenge live with *S. agalactiae*

表 3 SIP微胶囊口服疫苗免疫保护率

Tab. 3 Relative protective rates of protein SIP oral microencapsulated vaccine

组别	免疫方式	剂量	鱼数量/尾	鱼死亡数/尾	免疫保护率/%
group	vaccination strategies	/(μg/g) dose	no. of fish	no. of mortality	RPS
1组	口服	0	11	9	—
2组	口服	5	11	5	44.45%
3组	口服	10	11	3	66.67%

3 讨论

水产口服疫苗研制中, 抗原的保护情况决定了免疫效果。微胶囊口服疫苗壁材的选择不仅要使其对酸(pH 1.0~5.0)稳定, 以保证疫苗不被胃酸破坏; 而且要具备肠溶性, 以使颗粒在鱼肠道(pH 6.5~7.5)中能顺利缓释出疫苗抗原蛋白, 最终被吸收进入鱼体, 产生免疫效果。目前鱼类口服疫苗壁材的选择主要包括天然生物可降解高分子材料, 如海藻酸钠、聚氨基酸和明胶等, 以及人工合成的可降解高分子聚合物, 如聚乳酸(PLA)、乙交酯—丙交酯共聚物及聚—DL—乳酸—聚乙二醇共聚物(PELA)等。高铭蔚等^[11]以乳酸—羟基乙酸共聚物为材料, 采用复乳溶剂挥发法制备无乳链球菌全菌及超声破碎后的上清液微球疫苗, 呈球形, 包封率分别为68.07%和63.49%, 且免疫保护率分别达到57.63%和34.40%; Ramos等^[6]利用壳聚糖包裹DNA疫苗, 拌饲料口服免疫罗非鱼, 可在体内检测到疫苗成份; 任燕等^[12]选择PELA包裹哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)重组外膜蛋白OmpK, 制备成微球疫苗, 结果表明PELA对抗原具有一定的保护作用, 可用作鱼类口服疫苗的投递载体; 肖鹏^[13]以白油为有机溶剂, 采用搅拌与匀浆方法制备鳗弧菌(*V. anguillarum*) M3和SMP1的油乳化二价疫苗, 用饵料包埋后以口服途径免疫养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus*); 另外, Irie等^[14]制备杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)脂质体口服疫苗免疫鲤(*Cyprinus carpio*)。这些研究中选择的壁材均能有效保护抗原成份, 对疫苗的免疫效果起了决定性的作用。

前期的研究表明罗非鱼体内胃液的pH值为1.0~3.0, 肠液的pH值为6.5~7.5。因此, 本研究选择对pH敏感的丙烯酸树脂Ⅱ为成膜材料, 制备对pH敏感的释放系统。微胶囊颗粒在模拟胃酸环境中, 蛋白释放量极小; 而在模拟肠液中, 微胶囊颗粒包埋的SIP蛋白得到很好的释放。可见制得的微胶囊具有较好的耐受性, 在模拟胃液中不易溶出, 能有效地保护SIP蛋白顺利通过罗非鱼胃部环境, 避免胃液的破坏; 而微胶囊在模拟肠液中SIP蛋白释放效果好, 证实了SIP微胶囊颗粒具有良好的肠溶性, 为SIP微胶囊口服疫苗的免疫效果提供了保障。

罗非鱼口服疫苗免疫抗原的剂量、免疫程序的设计也是决定疫苗免疫效果的重要因素。

罗非鱼链球菌病高发期为每年的7—9月, 持续时间达100多天。本研究进行的微胶囊口服疫苗免疫效果测试, 为疫苗的现场应用积累基础数据。针对原核表达的SIP蛋白免疫剂量和免疫保护期的预研究表明, 该蛋白于初免罗非鱼后, 受免罗非鱼在21~35 d仍能检测到特异性抗体, 但处于下降趋势。因此, 设置21~35 d作为加强免疫的间隔时间; 进行4次免疫, 可将免疫保护期延长至100 d左右, 且攻毒实验表明, 口服疫苗4免后对受免鱼体的免疫保护率达66.67%, 基本满足养殖的要求。本研究以每克鱼体质量分别免疫5和10 μg SIP蛋白的剂量分组免疫罗非鱼, 结果免疫剂量为10 μg的实验组受免罗非鱼获得了较高的免疫保护率。Zhang等^[10]制备的罗非鱼无乳链球菌SIP微胶囊口服疫苗, 以每克鱼体质量免疫20 μg Trx-SIP蛋白的剂量免疫罗非鱼, 每间隔7 d进行加强免疫, 经过3次免疫后, 受免罗非鱼免疫保护率达100%, 也取得了较好的免疫效果。口服疫苗抗原免疫剂量不一定越多越好, 其影响因素包括免疫程序、抗原蛋白特性、疫苗壁材种类、鱼体种类、水温和水质状况等, 甚至要考虑到免疫效果和节约疫苗成本之间的平衡。

参考文献:

- [1] 樊海平, 钟全福. 罗非鱼链球菌病的发病概况与防控建议[J]. 科学养鱼, 2012(9): 57.
Fan H P, Zhong Q F. The Prevalence and the prevention and control of tilapia streptococcal disease[J]. Scientific Fish Farming, 2012(9): 57 (in Chinese).
- [2] 徐增辉. 罗非鱼海豚链球菌疫苗的研制及免疫效果的初步研究[D]. 南宁: 广西大学, 2008.
Xu Z H. Preparation of *Streptococcus iniae* vaccine and its immunological efficacy on tilapia[D]. Nanning: Guangxi University, 2008 (in Chinese).
- [3] 余晓丽, 陈明, 李莉萍, 等. 罗非鱼海豚链球菌疫苗及其免疫效果的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 31-37.
Yu X L, Chen M, Li L P, et al. Studies on *Streptococcus iniae* vaccine and its immune effect in tilapia[J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(6): 31-37 (in Chinese).
- [4] 全琛宇, 杨磊, 王凯, 等. 口服无乳链球菌弱毒疫苗对罗非鱼肠道影响的组织学观察[J]. 动物医学进展, 2014, 35(10): 79-84.
Quan C Y, Yang L, Wang K, et al. Histological

- observation of effect of oral attenuated vaccine of streptococcus agalactiae on intestine of tilapia[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(10): 79-84 (in Chinese).
- [5] 高铭蔚, 田园园, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 PLGA 微球口服疫苗免疫效果的研究[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(2): 105-110.
- Gao M W, Tian Y Y, Lu M X, *et al.* The immune effect of PLGA microparticles containing GBS on Nile tilapia[J]. Immunological Journal, 2015, 31(2): 105-110 (in Chinese).
- [6] Ramos E A, Relucio J L V, Torres-Villanueva C A T. Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(2): 89-94.
- [7] Maione D, Margarit I, Rinaudo C D, *et al.* Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen[J]. Science, 2005, 309: 148-150.
- [8] 张新艳, 樊海平. 福建省水产学会病害防控专业委员会论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 2010: 31-36.
- Zhang X Y, Fan H P. The Paper Collect of Fujian Province Specialized Committee of Fish disease prevention and control[C]. Beijing: Ocean Press, 2010: 31-36 (in Chinese).
- [9] 黎炯. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及重组表面免疫原性蛋白 His-Sip 的免疫效果初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Li J. Isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from tilapia and immunogenicity of protein His-Sip recombinant protein[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [10] Zhang L, Zeng Z, Hu C, *et al.* Controlled and targeted release of antigens by intelligent shell for improving applicability of oral vaccines[J]. Biomaterials, 2016, 77: 307-319.
- [11] 高铭蔚, 黎宗强, 田园园, 等. 无乳链球菌乳酸—羟基乙酸共聚物微球的制备及其体外释放特点分析[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 65-72.
- Gao M W, Li Z Q, Tian Y Y, *et al.* Preparation of PLGA microparticles containing GBS and their release characteristics *in vitro* [J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(3): 65-72 (in Chinese).
- [12] 任燕, 张小江, 常藕琴, 等. PELA-OmpK 微球疫苗的部分特征及其对鲫鱼的口服免疫效果[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(11): 1306-1309.
- Ren Y, Zhang X J, Chang O Q, *et al.* Partial characteristics of PELA-OmpK microsphere vaccine and its immune effect in crucian carp inoculated by oral route[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2011, 24(11): 1306-1309 (in Chinese).
- [13] 肖鹏. 鱼类疫苗的研究: I: 海水鱼类病原菌乳白口服疫苗的研究; II: 迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌外膜蛋白疫苗的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008.
- Xiao P. Studies of fish vaccines: I: Immune response and efficacy of oral-oil-emulsified vaccines against marine fish bacterial pathogens; II: Immune response and efficacy of outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008 (in Chinese).
- [14] Irie T, Watarai S, Iwasaki T, *et al.* Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(3): 235-242.

Preparation of the oral microencapsulated vaccine of *Streptococcus agalaciate* from tilapia and its immunological effect

WU Bin^{1,2}, FAN Haiping^{1*}, ZHANG Xinyan¹, ZHENG Lei¹,
ZHONG Quanfu¹, ZHANG Guoqing³, WENG Zutong²

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian, Fuzhou 350002, China;
2. Fujian Provincial Fishery Technical Extension Center, Fuzhou 350002, China;
3. Fuzhou Borni Pharmaceutical SCI.&TECH.CO.,LTD., Fuzhou 350002, China)

Abstract: Desired for establishment of the prevention and control method of tilapia streptococcal disease, surface immunogenic protein (SIP) gene of *Streptococcus agalaciate* was prokaryotically expressed, and SIP fusion protein was used as core-material and natural polysaccharide II as shell material. The oral polyacrylic resin microencapsulated vaccine of *S. agalaciate* was prepared. The average diameter of microencapsulated vaccine particles was 826.5 μm , the package rate was 72.02% and the amount of medicine loaded was 6.11%. Solubility of protein SIP oral microencapsulated vaccine in five pH conditions was pH 6.80>pH 7.20>pH 9.18>pH 4.68>pH 2.00. The *in vitro* experiment showed that oral microencapsulated vaccine releases protein SIP 5426.0 μg in simulated intestinal fluid, however, only 395.5 μg in simulated gastric fluid, and accumulative release rate was 90.51% in simulated intestinal fluid of 240 min. The vaccine could avoid destroying gastric acid and had good characteristics of intestines dissolution. Tilapias (*Oreochromis niloticus*) were immunized by oral microencapsulated vaccine. The antigens (SIP proteins) were respectively used at 5 μg and 10 μg antigens per gram of tilapia each time of immunization. After every immunization, a high level of IgM specific to SIP was detected with the antisera from the tilapia, the titer of 5 μg group was $100^{-1}\sim 400^{-1}$, and the titer of 10 μg group was $200^{-1}\sim 1600^{-1}$. The results indicated the fish had produced high titer antibody against *S. agalaciate*. After four times of immunization, tilapias were challenged by artificial infection with *S. agalactiae* and relative percent survivals (RPS) were calculated. The RPS of 5 μg group and 10 μg group were 44.45% and 66.67% respectively. The results showed that the oral microencapsulated vaccine was a convenient, safe and effective method for immune control of *S. agalactiae* in tilapia.

Key words: *Oreochromis* sp.; *Streptococcus agalaciate*; surface immunogenic protein (SIP); oral microencapsulated vaccine

Corresponding author: FAN Haiping. E-mail: fanhaiping16@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-49); Special Funding Program of Fujian Public Research Institutes (2014R1002-3); Key Project Funding of Fujian Provincial Department of Ocean and Fisheries ([2010]2-12)