

文章编号: 1000-0615(2017)04-0622-06

DOI: 10.11964/jfc.20160310301

鱼源植物乳杆菌表达IPNV VP2-VP3重组蛋白及其口服免疫程序

刘佳琪, 高帅, 段可馨, 郭梦婷, 杜航, 康海燕,
张英, 唐立杰, 李一经, 刘敏*

(东北农业大学动物科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为比较鱼源乳酸菌表达系统口服疫苗在不同免疫程序下诱导鱼免疫应答水平的差异, 确定鱼源乳酸菌表达系统口服免疫虹鳟幼鱼的免疫程序。本研究构建了重组表达IPNV VP2-VP3蛋白的鱼源植物乳杆菌L1212, 将重组菌pPG612-VP2-VP3/L1212包裹颗粒饲料, 口服免疫虹鳟幼鱼。免疫程序分为连续免疫组、免疫1 d后间隔1 d再免疫1 d组、连续免疫4 d后32 d加强免疫1次组和间隔免疫后32 d加强免疫1次组。免疫后进行尾动脉采血, 间接ELISA方法检测各组血清抗体效价, 免疫接种66 d后, 腹腔注射IPNV, 计算各组相对免疫保护率。确定颗粒饲料按照1 mL/g比例与108 CFU/mL重组菌pPG612-VP2-VP3/L1212和2.5%海藻酸钠混合, 于20 °C烘干制备口服疫苗。间隔免疫组血清抗体效价和攻毒保护率均显著高于其他组, 并且免疫2次的间隔免疫组的血清抗体效价和攻毒保护率均显著高于免疫1次间隔免疫组。采用重组菌包被颗粒饲料饲喂虹鳟幼鱼, 间隔免疫的免疫程序和免疫保护率优于连续免疫的免疫程序, 对IPNV的入侵起到保护作用。

关键词: 虹鳟; 植物乳杆菌; IPNV VP2-VP3; 口服疫苗; 免疫程序

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

胰腺坏死病毒(infectious pancreas necrosis virus, IPNV)是引起鲑鳟鱼类传染性胰腺坏死病(infectious pancreatic necrosis, IPN)的病原体, 主要危害鲑鳟鱼的幼鱼, 死亡率高达90%以上, 幸存的鱼终生带毒, 是潜在的感染源。该病流行范围广、发病率高、死亡率高, 每年给世界各地的渔业带来巨大的经济损失^[1-2]。为了在生产实践中方便快捷地达到免疫效果, 口服免疫成为最佳免疫方式^[3]。

VP2、VP3是IPNV的两种重要结构蛋白, VP2蛋白构成病毒的外衣壳, 占病毒总蛋白大小的62%。包含有1个高度可变区的VP2蛋白, 含有病毒主要的抗原表位, 既有血清型表位又有中和性表位^[4-5]。VP3蛋白构成病毒的内衣壳, 不仅

是IPNV的第二大主要结构蛋白, 也含有重要的中和抗体表位^[6-8]。

Zhao等^[9]将VP2、VP3基因串联, 连接到乳酸杆菌分泌型表达载体pPG612上, 转化至干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)L393中, 经Western-blotting检测, 表明重组菌能够有效表达。但重组菌的体内定植实验显示, 重组外源干酪乳杆菌在进入虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)体内后, 由于机体的消化代谢、环境压力等作用, 重组菌很快被排除至鱼体外^[10]。因此, 本实验室将在虹鳟肠道中分离到的植物乳杆菌(*L. plantarum*) L1212作为宿主细胞^[11], 表达IPNV VP2-VP3蛋白, 以口服免疫途径免疫虹鳟, 确定免疫程序, 为IPNV重组乳酸菌疫苗的应用奠定基础。

收稿日期: 2016-03-06 修回日期: 2016-10-13

资助项目: 国家自然科学基金(31372568, 31511130137); 国家科技支撑计划(2012BAD25B02); 东北农业大学博士启动基金(2012RCB66)

通信作者: 刘敏, E-mail: liumin-707@163.com

1 材料与方法

1.1 实验菌种

植物乳杆菌L1212由本实验室从虹鳟肠道中分离并保存; pPG612-VP2-VP3质粒由本实验室构建保存; IPNVSp株购自美国细胞菌种库(ATCC VR-1318); IPNVSp强毒株由江育林惠赠; 大麻哈鱼(*O. keta*)胚胎上皮细胞(CHSE-214)由深圳出入境检验检疫局惠赠。

1.2 实验对象

36周龄健康虹鳟幼鱼[平均体质量(30.58±4.52)g]购自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海试验站, 饲养在循环水族箱中, 实验前饲喂硬颗粒饲料1周, 水温16℃, 每天喂食1次。

1.3 主要试剂

兔抗IPNV全病毒血清由本实验室制备; HRP山羊抗兔IgG购自Sigma公司; 兔抗虹鳟IgM血清由本实验室制备保存。

1.4 重组IPNV VP2-VP3植物乳杆菌的构建及表达

将pPG612-VP2-VP3质粒电转化于植物乳杆菌L1212, 涂布MRS [含10 μg/mL Cm(氯霉素)抗性]琼脂平板, 37℃静置培养36 h。随机挑取平板上的单菌落, 接种于5 mL MRS (含10 μg/mL Cm)培养基中, 37℃静置培养过夜后提取质粒。对重组质粒pPG612-VP2-VP3进行BamHI和XhoI单、双酶切和PCR鉴定(引物P1: 5'AGAGCGACACATCTTAAACAAGAGAC 3'、P2: 5'TCGTCGTTTCATCTGTC 3')。经0.8%琼脂糖凝胶电泳后分析结果。

以1%乳糖诱导pPG612-VP2-VP3阳性重组质粒的重组植物乳杆菌, 37℃培养22~24 h。以1%乳糖诱导的含pPG612空载体的植物乳杆菌作为对照。以TCA(三氯乙酸沉淀)法处理蛋白样, 分别进行SDS-PAGE鉴定和Western blotting鉴定。

1.5 重组菌包被颗粒饲料

取诱导后的重组菌pPG612-VP2-VP3/L1212菌液, 离心收集菌体, 用灭菌PBS悬浮调节菌液浓度至OD₆₀₀=1.0, 约含细菌10⁸ CFU/mL, 使用一定浓度的海藻酸钠包被颗粒饲料, 在不同温度下烘干, 探索干燥温度对菌体存活数的影响;

最佳烘干温度下, 在菌悬液中分别添加不同浓度的海藻酸钠, 探索海藻酸钠浓度对菌体存活情况的影响; 以最佳温度、最适海藻酸钠浓度包被饵料, 分为4组: I组, 颗粒饲料+菌悬液; II组, 颗粒饲料+菌悬液+海藻酸钠; III组, 粉碎饲料+菌悬液; IV组, 粉碎饲料+菌悬液+海藻酸钠。其中III、IV两组将包被好的饲料用2 mL注射器挤压出, 干燥后切碎制成颗粒。各组分别按1 mL/g的比例添加处理好的菌液, 搅拌均匀。

1.6 重组菌免疫程序制定

将实验鱼分为7组, 每组20尾(免疫程序如表1), 每组饵料包被约10⁷ CFU/mL诱导后的重组菌液, 其中免疫2次者, 二免在一免之后32 d时进行。

表1 免疫程序

Tab. 1 Immunization program

组别 group	免疫程序 immunization program
A组	口服免疫pPG612-VP2-VP3/L1212, 免疫2次, 连续免疫4 d
B组	口服免疫pPG612-VP2-VP3/L1212, 免疫2次, 间隔1 d免疫1次
C组	口服免疫pPG612-VP2-VP3/L393, 免疫2次, 间隔1 d免疫1次
D组	口服L1212(对照), 免疫2次, 间隔1 d免疫1次
E组	口服PBS(对照), 免疫2次, 间隔1 d免疫1次
F组	口服免疫pPG612-VP2-VP3/L1212, 免疫1次, 连续免疫4 d
G组	口服免疫pPG612-VP2-VP3/L1212, 免疫1次, 间隔1 d免疫1次

1.7 虹鳟血清特异性抗体IgM的测定

分别于免疫后第0、31、50和63天, 每组随机取3尾鱼进行尾动脉采血, 分离血清。以兔抗虹鳟IgM为间接抗体, 用间接ELISA方法检测各组血清中IgM效价, IPNV细胞培养物作包被抗原(CHSE-214细胞培养物作为阴性抗原对照)包被96孔聚苯乙烯微量板, 再加入稀释完成的虹鳟血清孵育, 最后OPD法显色, 酶标仪检测结果。

1.8 攻毒保护性实验

用CHSE-214繁殖IPNVSp强毒株, 当病毒滴度达到10⁶ TCID₅₀/mL时进行攻毒保护性实验。各实验组于免疫接种后第66天, 每尾鱼腹腔注射300 μL IPNV病毒液, 逐日观察并记录攻毒后实验鱼的死亡情况。

2 结果

2.1 重组IPNV VP2-VP3植物乳杆菌诱导表达的结果

重组pPG612-VP2-VP3/L1212经Western blotting鉴定,经DAB显色后,在NC膜上呈现明显的目的条带(图1),第3道较空载体与未诱导重组菌有明显条带,表示诱导后的重组pPG612-VP2-VP3/L1212菌可分泌表达VP2-VP3蛋白。

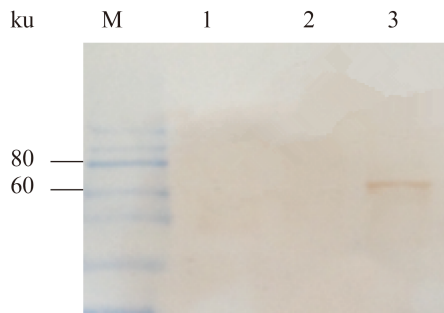


图1 目的蛋白Western blotting鉴定结果

M.蛋白预染Marker; 1.pPG612/L1212阴性对照; 2.pPG612-VP2-VP3/L1212未诱导上清液; 3.pPG612-VP2-VP3/L1212诱导后上清液

Fig. 1 The identification result of protein expressed by Western blotting

M. prestained protein Marker; 1.pPG612/L1212 negative control; 2.pPG612-VP2-VP3/L1212 uninduced supernatant; 3.pPG612-VP2-VP3/L1212 supernatant after induction

2.2 重组植物乳杆菌饲料包被结果

包被饵料烘干温度以20℃为最优(表2),能够保证重组菌的最大存活率。海藻酸钠浓度实验结果显示,最佳作用浓度为添加2.5%的海藻酸钠,使活菌的存活量达到最高(表3)。包被饲料方法实验结果显示,以第II种包被方式进行处理时效果最佳(图2)。

2.3 免疫后虹鳟血清特异性抗体IgM水平

免疫后31 d,免疫pPG612-VP2-VP3/L393组、

表2 干燥温度的确定

Tab. 2 Determination of the drying temperature

干燥温度/°C drying temperature	菌落数/(CFU/mL) no. of colonies
20	2.8×10^7
32	2.7×10^6
37	3.6×10^5

表3 海藻酸钠添加浓度的确定

Tab. 3 Determination of the sodium alginate concentration

海藻酸钠添加浓度/% sodium alginate concentration	菌落数/(CFU/mL) no. of colonies
1	3.4×10^5
2.5	2.6×10^6
5	2.8×10^5

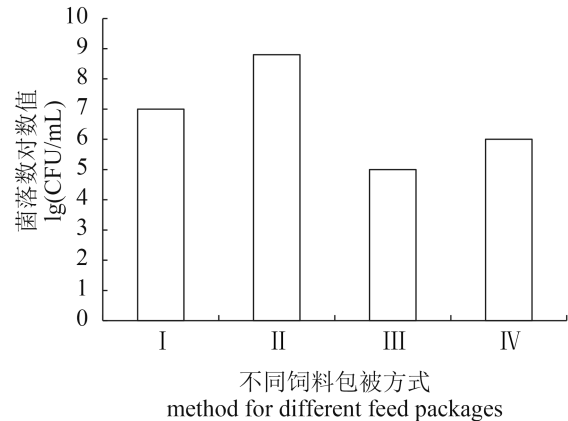


图2 重组菌包被饲料方法摸索结果

Fig. 2 The results of bait coating by recombinant bacteria

pPG612-VP2-VP3/L1212连续免疫组、pPG612-VP2-VP3/L1212间隔免疫组血清中均产生特异性抗体,与对照组L1212和PBS组相比,差异极显著($P < 0.01$);免疫1次的实验组,无论是间隔免疫还是连续免疫,在免疫后31 d血清特异性抗体水平升高,此后逐渐下降;用pPG612-VP2-VP3/L1212免疫2次的组,二免之后20 d(即一免后50 d),血清抗体IgM水平再次升高,到66 d时抗体水平最高,与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),与免疫1次的组相比,组内差异显著($P < 0.05$);无论是免疫1次还是2次,间隔免疫产生的抗体水平均较连续免疫组高,组间差异不显著($P > 0.05$)(图3)。

2.4 攻毒保护性实验结果

连续免疫2次的A和B组免疫保护率为100%,F和G组为95%,D和E组分别为10%和5%(表4)。

3 讨论

接种疫苗是预防鲑鳟暴发IPN的有效措施。目前,临床上常以注射接种全病毒灭活油佐剂疫苗为主,但是注射接种的免疫方式费时费力^[12],

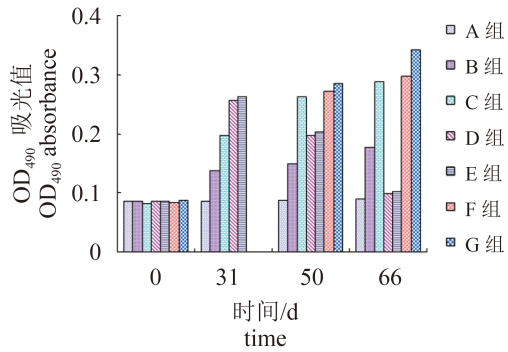


图3 免疫虹鳟血清中特异性抗VP2-VP3抗体IgM水平

Fig. 3 Anti-VP2-VP3 specific IgM level in the serum of *O. mykiss* after immunization

表4 攻毒保护性实验结果

Tab. 4 Result of attack protection experiment

组别 group	死亡数/尾 number of death	存活率/% survival rate
A组	0	100
B组	0	100
C组	8	60
D组	18	10
E组	19	5
F组	1	95
G组	1	95

对幼鱼的机械伤害较大且易使幼鱼感染其他疾病。浸泡免疫虽然能够实现鱼群体免疫,但是成本较高,免疫效果不理想^[13];采用群体口服免疫不仅操作便捷,而且安全系数高,更适宜对幼鱼免疫,是最理想的接种方式^[14]。口服免疫诱导免疫应答时需要克服免疫保护性抗原在胃和肠道中被降解或灭活的难题,而以乳酸菌作为表达免疫原的活载体系统,在传递完整无损的抗原成分时具有其他细菌载体无可比拟的优点。某些乳酸菌就是动物肠道的正常菌群,机体对乳酸菌载体系统本身不仅不产生强烈的抗体应答反应,同时还具有天然免疫佐剂的作用^[9-10],所以乳酸菌成为口服疫苗的最佳表达系统。

以虹鳟肠道中分离出的植物乳杆菌L1212作为宿主细胞^[11],表达IPNV主要抗原VP2-VP3蛋白,以口服免疫途径免疫虹鳟,可以增强抗原的免疫原性。本研究将表达的重组VP2-VP3蛋白鱼源植物乳杆菌L1212菌悬液分别与颗粒饲料和粉末饲料进行混合,同时参照Altun等^[15]的方法

用低价、无毒、无副作用的海藻酸钠进行包被,并摸索出了重组菌pPG612-VP2-VP3/L1212最佳包被虹鳟幼鱼颗粒饲料的条件,投喂虹鳟幼鱼后获得了较好的抗IPNV免疫保护效果。在免疫后31 d,所有免疫组均产生了特异性抗体,且与对照组相比差异极显著($P<0.01$);加强免疫后,抗体水平逐渐升高,到66 d抗体水平达到峰值,且与对照组相比差异极显著($P<0.01$),说明虹鳟产生了一定的免疫记忆。为了研究免疫间隔对免疫效果的影响,实验中设立了间隔免疫组和对照免疫组,通过血清抗体水平的检测,显示在免疫后的第31、50及66天,间隔免疫产生的抗体水平稍高于连续免疫组,组间差异不显著($P>0.05$),这表明间隔免疫的效果可能更优于连续免疫。分析形成这一结果的原因可能是间隔口服免疫更有利于菌体在虹鳟体内的定植、繁殖。同时,免疫1次的组,在免疫后31 d抗体水平升高,在随后的50和66 d过程中,抗体水平逐渐下降;二次加强免疫后,抗体水平持续升高,到检测时的66 d抗体水平达到最高,与免疫1次的组相比,组内差异显著($P<0.05$)。攻毒保护性实验显示,实验组起到了明显的保护作用。

表达的IPNV VP2-VP3重组虹鳟植物乳杆菌相比干酪乳杆菌L393表达系统,增强了抗原的免疫原性,引起更强烈的免疫应答,为鱼类口服疫苗的开发奠定了基础并提供了新的思路。但是,将抗原包被在饲料中进行免疫接种存在不能确定免疫剂量的问题,针对此问题有待进一步的探索。

参考文献:

- [1] 夏春. 水生动物疾病学[M].北京: 中国农业大学出版社, 2005.
Xia C. Aquatic Animal Diseases[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2005 (in Chinese).
- [2] 刘兴发. 鱼传染性胰腺坏死[J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(1): 51-53.
Liu X F. Infectious pancreatic necrosis of fish[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1998, 24(1): 51-53 (in Chinese).
- [3] Romalde J L, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, et al. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactoc-

- cocosis[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 119-129.
- [4] Shin S P, Gomez D K, Kim J H, *et al.* Detection and genetic analysis of aquabirnaviruses in subclinically infected aquarium fish[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(2): 325-329.
- [5] Munang'andu H M, Sandtrø A, Mutoloki S, *et al.* Immunogenicity and cross protective ability of the central VP2 amino acids of infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54263.
- [6] Park J W, Jeong G. Identification of VP3 as an important neutralising epitope from DRT strain, a Korean isolate of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6(3): 207-219.
- [7] Moon C H, Do J W, Cha S J, *et al.* Comparison of the immunogenicity of recombinant VP2 and VP3 of infectious pancreatic necrosis virus and marine birnavirus [J]. Archives of Virology, 2004, 149(10): 2059-2068.
- [8] Ballesteros N A, Saint-Jean S R, Perez-Prieto S I. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015, 165(3-4): 127-137.
- [9] Zhao L L, Liu M, Ge J W, *et al.* Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in *Lactobacillus casei* and immunogenicity in rainbow trouts[J]. Vaccine, 2012, 30(10): 1823-1829.
- [10] Liu M, Zhao L L, Ge J W, *et al.* Immunogenicity of *Lactobacillus*-expressing VP2 and VP3 of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1): 196-203.
- [11] 刘敏, 张英, 张琳琳, 等. 虹鳟肠道植物乳杆菌的分离及特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(12): 24-30. Liu M, Zhang Y, Zhang L L, *et al.* Isolation and characterization of indigenous *Lactobacillus plantarum* from rainbow trout intestine[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(12): 24-30 (in Chinese).
- [12] Dadar M, Memari H R, Vakharia V N, *et al.* Protective and immunogenic effects of *E.coli*-expressed infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in rainbow trout[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(1): 390-396.
- [13] 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.
- [14] Sinyakov M S, Dror M, Lublin-Tennenbaum T, *et al.* Nano-and microparticles as adjuvants in vaccine design: success and failure is related to host natural antibodies[J]. Vaccine, 2006, 24(42-43): 6534-6541.
- [15] Altun S, Kubilay A, Ekici S, *et al.* Oral vaccination against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier[J]. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2010, 16(2): 211-217.

Fish source *Lactobacillus plantarum* expressing IPNV VP2-VP3 recombinant protein and its oral immunization program

LIU Jiaqi, GAO Shuai, DUAN Kexin, GUO Mengting, DU Hang, KANG Haiyan, ZHANG Ying, TANG Lijie, LI Yijing, LIU Min*

(School of Animal Science And Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Comparison of the expression of fish-derived lactic acid bacteria expression system in oral vaccines was made under different immune process, to determine fish source *Lactobacillus* expression system immune program for immunization of juvenile rainbow trout. In this study, we constructed *L. plantarum* L1212 in recombinant protein expression IPNV VP2-VP3, then the recombinant strain pPG612-VP2-VP3 / L1212 was coated with pellet feed and immune *Oncorhynchus mykiss* juvenile fish. Immunization program was divided into continuous immunization group: the group that is immune for a single day after immunization for 1 day; the group that strengthens the immune 1 times after 4 days of continuous immunization 32 d and the group that strengthens the immune 1 times after interval immunization 32 d. After immunization, tail artery blood collection is carried out, and the serum antibody titers are measured by indirect ELISA. After immunization for 66 days, IPNV is injected abdominal cavity and the relative immune protection rates were calculated for each group. To determine the pellet feed in accordance with 1 mL/g ratio and 10⁸ CFU/mL recombinant bacteria pPG612-VP2-VP3 / L1212 and 2.5% sodium alginate mixed 20 °C drying preparation of oral vaccine; the titer and challenge protection rate of serum antibody in interval immunization group were significantly higher than those of other groups, and the serum antibody titer and challenge protection rate in the twice-immunization group were significantly higher than those of the group immunized once. The immunization program and the immunoprotection rate of the juvenile *O. mykiss* were collected by the recombinant bacteria. The immunization program was superior to the immunization program for continuous immunization and protected the invasion of IPNV.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; *Lactobacillus plantarum*; IPNV VP2-VP3; oral vaccine; immunization program

Corresponding author: LIU Min. E-mail: liumin-707@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31372568, 31511130137); National Science and Technology Support Program (2012BAD25B02); Northeast Agricultural University Doctoral Program (2012RCB66)