

文章编号: 1000-0615(2018)01-0112-08

DOI: 10.11964/jfc.20161210655

# 一种佐剂新材料在嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫 异育银鲫中的应用效果

任 燕<sup>1</sup>, 时云朵<sup>1,2,3</sup>, 石存斌<sup>1\*</sup>, 吴淑勤<sup>1</sup>

(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,

农业部渔用药物创制重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 四川省水产学校, 四川 成都 611730)

**摘要:** 为研究蓖麻油聚乙二醇单酯葡萄糖苷(CPMG)在细菌灭活疫苗浸泡免疫中的佐剂作用, 将CPMG和嗜水气单胞菌灭活疫苗联合施用, 二次浸泡免疫异育银鲫后饲养在室内玻璃缸中, 用实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测加强免疫后2、4、7、11、14和21 d脾脏中IgM、IL-1 $\beta$ 、C3、C-凝集素和溶菌酶的mRNA表达量, 首次免疫30 d后用同源菌株活菌攻击实验鱼; 同时, 用含CPMG、山萘苕碱复合佐剂的灭活疫苗浸泡免疫异育银鲫一次后饲养在池塘网箱中, 定期抽取血液检测血清抗体效价并用同源菌株人工感染实验鱼。结果显示, CPMG佐剂组和无佐剂组的5个免疫相关基因的相对表达量显著高于对照组, CPMG组IgM基因较无佐剂组更早表达, 补体C3、C-凝集素以及溶菌酶的基因表达量更高或表达持续时间更长。血清抗体效价在免疫后2周达到160, 6周达到峰值640, 12周降低为40。室内玻璃缸中二次免疫30 d后, CPMG组的平均相对保护率达到70.6%, 复合佐剂组达到88.2%, 均显著高于无佐剂组的56.0%。池塘网箱中一次浸泡免疫30、60和120 d后, 平均相对保护率分别为54.6%、44.0%和12.5%。研究表明, CPMG与嗜水气单胞菌灭活疫苗共同浸泡免疫异育银鲫, 增强了脾脏中IgM、IL-1 $\beta$ 、C3、C-凝集素以及溶菌酶基因表达, 提高了异育银鲫抗嗜水气单胞菌感染的能力。

**关键词:** 异育银鲫; 蓖麻油聚乙二醇单酯葡萄糖苷; 山萘苕碱; 灭活疫苗; 浸泡免疫  
**中图分类号:** S 942 **文献标志码:** A

渔用疫苗, 尤其是细菌灭活疫苗的浸泡免疫操作方便, 适用于无鳞鱼、鱼苗等免疫。利用免疫佐剂、细胞渗透剂等材料, 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, 这是浸泡免疫的发展方向 and 趋势<sup>[1]</sup>。因此, 开发应用高效、安全、使用方便、绿色环保的浸泡材料提高疫苗浸泡免疫效果, 可大大推动渔用疫苗的应用, 进而推动水产养殖业的健康发展。蓖麻油聚乙

二醇单酯葡萄糖苷(castor oil polyethylene glycol monoester glucoside, CPMG)是由蓖麻油依次经酸化、酯化和糖苷化而合成的一种非离子表面活性剂, 可被生物降解, 无毒, 界面张力低, 水溶性好, 具有分散、乳化等作用, 能使油类或颗粒性物质在水溶液中分散更均匀和稳定。本文评价CPMG在嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)中的应用效果, 旨在寻找适合在渔业生产中应用的佐剂材料。

收稿日期: 2016-12-22 修回日期: 2017-04-10

资助项目: 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501C12); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46); 国家科技支撑计划(2012BAD25B02)

通信作者: 石存斌, E-mail: shicunbin2006@163.com

## 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场,体质量(8±1)g,体长(7.5±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。实验期间池塘水温(26±3)℃,室内玻璃缸水温(26±1)℃。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)菌株YYK090901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人工感染菌株。

### 1.2 主要试剂和仪器

CPMG由广州市瑞洋表面活性剂有限公司合成,胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基购自广东环凯微生物科技有限公司,山萘砒碱为河南普瑞制药有限公司产品,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,鼠抗鲤科鱼IgM单抗为Aquatic Diagnostic Ltd.产品,HRP标记的羊抗鼠IgG为美国Jackson公司产品,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,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,酶标仪infinite M200 PRO为瑞士Tecan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培养基中28℃摇床活化18h,再转接至500mL TSB培养基中28℃扩大培养18h,然后用3%福尔马林溶液28℃灭活72h。无菌检验合格后,即为嗜水气单胞菌灭活疫苗。

### 1.4 二次浸泡免疫试验(室内玻璃缸养殖)

将异育银鲫分为4组,每组80尾。各免疫组在1.5%盐水中充气浸泡5min后,分别在含10μg/mL CPMG的疫苗溶液、复合佐剂(10μg/mL CPMG+15μg/mL山萘砒碱)的疫苗溶液及无佐剂的疫苗溶液中充气浸泡15min。首次免疫7d后同法进行加强免疫,对照组仅在1.5%盐水中浸泡5min。免疫后每组鱼随机分成2个平行组,放置在室内

玻璃缸中充气饲养。每组浸泡体积为5L,浸泡疫苗溶液中细菌抗原浓度为 $5.2\times 10^8$ CFU/mL。

### 1.5 RT-PCR样品制备及检测

按照时云朵等<sup>[2]</sup>方法进行RT-PCR样品制备及检测:加强免疫后2、4、7、11、14和21d分6次取各组异育银鲫脾脏组织,每组每次分别随机取3尾。提取脾脏组织RNA并反转录为cDNA。构建标准曲线,以18S rRNA为内参,实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测异育银鲫IgM、IL-1β、补体C3、C-凝集素和溶菌酶5个基因的表达量。

### 1.6 一次浸泡免疫试验(池塘网箱养殖)

将异育银鲫分为2组,每组200尾,免疫组在含有复合佐剂(10μg/mL CPMG和15μg/mL山萘砒碱)的疫苗溶液中充氧浸泡15min,对照组在1.5%盐水浸泡5min。浸泡体积为30L,且浸泡疫苗混合溶液中细菌终浓度不小于 $3.0\times 10^8$ CFU/mL。

### 1.7 血清采集及抗体效价测定

池塘网箱中的实验鱼免疫后每2周采一次血,持续8周后每隔4周采血一次,直到16周。每次随机采集3~5尾,血液样本室温放置2h,4℃静置过夜,8500r/min离心10min,提取血清4℃保存备用。待测血清预先稀释10倍,以棋盘法确定细菌抗原的最佳包被浓度和二抗(鼠抗鲤科鱼IgM单抗)最佳使用浓度,间接ELISA测定血清抗体效价。以S/N(实验组OD值-空白组OD值)/(阴性对照组OD值-空白组OD值)≥2.1(S表示样品OD值,N表示阴性对照的OD值)判为阳性。

### 1.8 活菌人工感染试验

室内玻璃缸实验鱼在首次免疫30d,用半数致死量LD<sub>50</sub>( $8.7\times 10^6$ CFU/mL,0.1mL)的嗜水气单胞菌菌株YYK090901腹腔注射各实验组。池塘网箱实验鱼在免疫30、60和120d后,分别用嗜水气单胞菌YYK090901菌株( $8.7\times 10^6$ CFU/mL,0.1mL; $1.5\times 10^7$ CFU/mL,0.1mL; $4.0\times 10^7$ CFU/mL,0.2mL)腹腔注射各实验组。每天观察记录死亡数,连续观察14d。计算相对免疫保护率(RPS): $RPS=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)\times 100\%$ 。

### 1.9 数据分析

实验数据以平均值±标准差(mean±SD)表示,用SPSS17.0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

### 2.1 IgM、C3、IL-1 $\beta$ 、C-凝集素和溶菌酶基因的表达式变化

免疫组IgM表达量明显高于对照组( $P<0.05$ ),且免疫组都出现上升、下降再回升现象,其中CPMG组在4 d达到第一个高峰(34.7倍,  $P<0.05$ ),而后下降,在14 d又上升达到最高值(115.2倍,  $P<0.05$ );无佐剂组11 d出现最高值(56.1倍,  $P<0.05$ ),然后14 d呈现下降趋势(27.8倍,  $P<0.05$ ),在21 d时又出现上升(48.0倍,  $P<0.05$ ) (图1-a)。免疫组的IL-1 $\beta$ 的表达量变化与IgM相似(图1-b)。CPMG组C3在7 d达到最高值(432.9倍,  $P<0.05$ );无佐剂组中C3在4 d时迅速上升至最高值(135.2倍,  $P<0.05$ ),7 d呈现下降趋势(80.4倍,

$P<0.05$ ),免疫组的C3表达量都显著高于对照组( $P<0.05$ )(图1-c)。CPMG组的C-凝集素基因表达量同C3的变化趋势相似,2、4 d与对照组相比,无显著差异,在7 d达到最高值(20.7倍,  $P<0.05$ );无佐剂组在2 d就达到最高值(16.4倍,  $P<0.05$ ),然后呈现下降趋势(图1-d)。CPMG组的溶菌酶基因在7 d时出现上升(4.6倍,  $P<0.05$ ),14 d达到最高值(6.6倍,  $P<0.05$ );无佐剂组中溶菌酶2 d出现急剧上升现象,并达到最高值(12.9倍,  $P<0.05$ ),第4天与对照组无显著差异( $P>0.05$ )(图1-e)。实验结果显示,免疫组5个免疫相关基因的相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ );其中CPMG组IgM在免疫后快速表达,且C3、C-凝集素以及溶菌酶等免疫相关基因的表达量更高或表达持续时间更长。

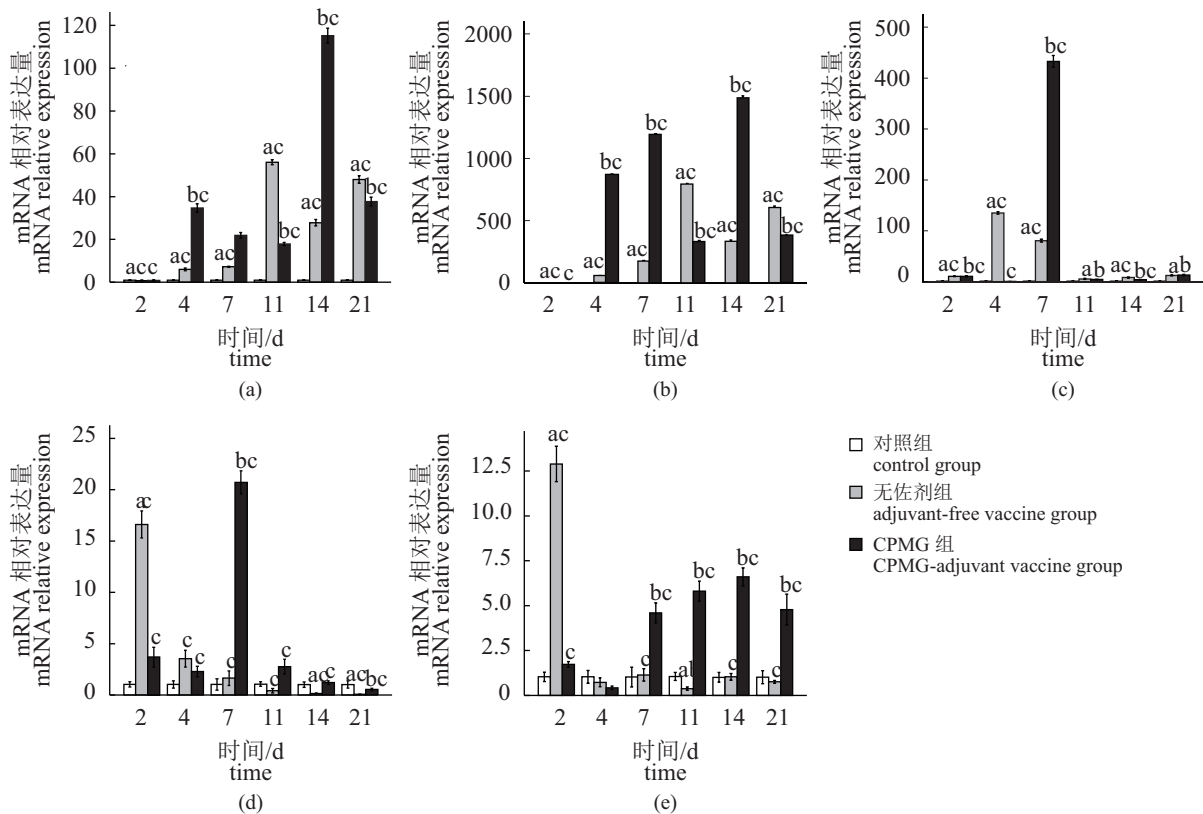


图1 不同实验组银鲫脾脏中各免疫相关基因的相对表达量

(a) IgM相对表达量, (b) IL-1 $\beta$ 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. 1 The relative expression level of genes in the *Carassius auratus gibelio* spleen in different experimental groups

(a) the relative expression level of IgM, (b) the relative expression level of IL-1 $\beta$ , (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 ( $P<0.05$ )

## 2.2 血清抗体效价

ELISA测定血清抗体效价结果发现, 复合佐剂和灭活疫苗联用一次浸泡免疫异育银鲫, 2周血清抗体效价达到160, 6周达到峰值640, 8周为320, 12周降低为40。结果显示, 复合佐剂免疫组免疫时间越长, 血清抗体效价也越高, 在6周达到最高值, 且复合佐剂浸泡免疫组一次浸泡免疫8周(约2个月)均有较高的血清抗体效价(图2)。

## 2.3 加强免疫组的人工感染结果(室内玻璃缸)

人工感染加强免疫的异育银鲫显示, 各组集中死亡时间在活菌攻击后12~48 h, 2 d后无死亡现象发生。CPMG组、复合佐剂组、无佐剂组和对照组的累计死亡率分别为25.00%、10.00%、36.67%、83.33%(表1)。CPMG组的相对免疫保护率RPS为70.6%, 复合佐剂组的相对免疫保护率可高达88.2%, 均显著高于无佐剂疫苗组的56.0%( $P<0.05$ )。

## 2.4 一次免疫组的人工感染结果(池塘网箱)

池塘网箱中一次浸泡免疫的异育银鲫感染结果显示, 每次(免疫30、60、120 d)人工感染后, 各组实验鱼集中死亡时间在12~72 h, 4 d后无死亡现象。免疫30 d的平均相对保护率为54.6%, 60 d为44.0%, 120 d下降为12.5%(表2)。

## 3 讨论

本研究将CPMG与嗜水气单胞菌灭活疫苗联用, 浸泡免疫异育银鲫, 并通过RT-PCR测定先天性免疫因子IL-1 $\beta$ 、补体C3、C-凝集素以及溶

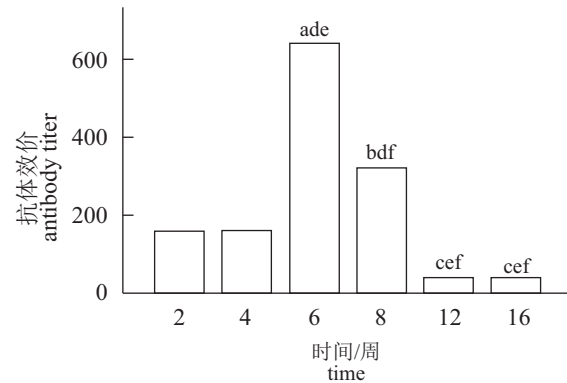


图2 血清抗体效价

2周和4周的抗体效价相同, 无显著差异; 12周和16周的抗体效价相同, 无显著差异; “a”表示6周与2、4周的抗体效价具有显著差异( $P<0.05$ ), “b”表示8周与2、4周具有显著差异( $P<0.05$ ), “c”表示12、16周与2、4周具有显著差异( $P<0.05$ ), “d”表示6周与8周具有显著差异( $P<0.05$ ), “e”表示6周与12、16周具有显著差异( $P<0.05$ ), “f”表示8周与12、16周具有显著差异( $P<0.05$ )

Fig. 2 Serum antibody titer

The antibody titer is not significantly different between 2 and 4 weeks; and it is also not significantly different between 12 and 16 weeks; “a” indicates that the antibody titer is significantly different between 6 weeks and 2, 4 weeks ( $P<0.05$ ), “b” indicates that it is significantly different between 8 weeks and 2, 4 weeks ( $P<0.05$ ), “c” indicates that it is significantly different between 12, 16 weeks and 2, 4 weeks ( $P<0.05$ ), “d” indicates that it is significantly different between 6 and 8 weeks ( $P<0.05$ ), “e” indicates that it is significantly different between 6 weeks and 12, 16 weeks ( $P<0.05$ ), “f” indicates that it is significantly different between 8 weeks and 12, 16 weeks ( $P<0.05$ )

菌酶基因和获得性免疫因子IgM基因表达情况。结果显示, CPMG组和无佐剂组中5种免疫相关因子的表达量都显著高于对照组( $P<0.05$ )。CPMG组补体C3和C-凝集素基因的相对表达量均显

表1 各实验组的相对保护率

Tab. 1 The relative percent survival in the different experimental groups

组别 groups	人工感染数/尾 challenged fish number	死亡数/尾 death number	死亡率% mortality	平均死亡率% average mortality	RPS%
CPMG组	30	7	23.33	25.00	70.6
CPMG-adjuvant vaccine	30	8	26.67		
复合佐剂组	30	3	10.00	10.00	88.2
CPMG and anisodamine- adjuvant vaccine	30	3	10.00		
无佐剂组	30	10	33.33	36.67	56.0
adjuvant-free vaccine	30	12	40.00		
对照组	30	26	86.66	83.33	/
control group	30	24	80.00		

表 2 各实验组的相对保护率

Tab. 2 The relative percent survival in the different experimental groups

组别 groups	人工感染时间 challenging time	感染数/尾 challenged fish number	死亡数/尾 death number	死亡率% mortality	平均死亡率% average mortality	RPS%
复合佐剂组 CPMG and anisodamine- adjuvant vaccine	30 d	20	7	35	37.5	54.6
		20	8	40		
		20	16	80		
对照组 saline control		20	17	85		/
		20	17	85		
复合佐剂组 CPMG and anisodamine- adjuvant vaccine	60 d	20	7	35	35.0	44.0
		20	7	35		
		20	12	60		
对照组 saline control		20	13	65		/
		20	13	65		
复合佐剂组 CPMG and anisodamine- adjuvant vaccine	120 d	20	17	85	87.5	12.5
		20	18	90		
		20	20	100		
对照组 control group		20	20	100		/
		20	20	100		

著高于无佐剂疫苗组( $P < 0.05$ )和对照组( $P < 0.05$ ),且溶菌酶基因表达持续时间更长。

目前对功能基因表达量与其编码蛋白的表达量的关系尚无定论,但随着RT-PCR技术的兴起,国内外许多学者评价佐剂在渔用疫苗中的功效时,将先天性和获得性免疫相关因子的基因表达情况作为一项评价指标。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)红体病虹彩病毒(Reddish body iridovirus)的壳聚糖核酸纳米粒疫苗(pDNA-CS-NPs)口服免疫大菱鲂,能诱导产生强烈的先天性和特异性免疫应答,*MHC-I $\alpha$* 、*MHC-II $\alpha$* 、*IFN-1*、*IFN- $\gamma$* 、*IL-8*和*Mx*表达量显著上调,免疫90 d仍可检测到抗体<sup>[3]</sup>。鞭毛蛋白(flagellin)能刺激大西洋鲑(*Salmo salar*)*TNF $\alpha$* 、*IL-6*、*IL-8*和*IL-1 $\beta$* 表达量显著上调,但不能诱导机体产生显著的抗体<sup>[4]</sup>。迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)的重组主要菌毛亚单位蛋白(rFimA)作为佐剂与哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)重组亚单位疫苗rVhhP2同时注射免疫大菱鲂,免疫1 d脾脏中IgM相对表达量比对照组显著提高<sup>[5]</sup>。Diao等<sup>[6]</sup>将 $\beta$ -葡聚糖、脂多糖(LPS)分别与迟缓爱德华菌的3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)重组蛋白注射免疫牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), IgM、*IFN- $\gamma$* 、*IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*TCR $\alpha$* 、*MHC-II $\alpha$* 和溶菌酶基因表达量均上调,且脂多糖、 $\beta$ -葡

聚糖组显著高于无佐剂组。本研究中CPMG组与无佐剂组的IgM和*IL-1 $\beta$* 表达量都呈现上升、下降再回升的表现,这与用山萘萘碱佐剂与疫苗共浸泡免疫鲫的IgM和*IL-1 $\beta$* 表达量变化相似<sup>[2]</sup>,也与LPS作为佐剂免疫牙鲆IgM表达量变化相似<sup>[6]</sup>。Paulsen等<sup>[7]</sup>将 $\beta$ -葡聚糖和脂多糖腹腔注射大西洋鲑7、14、21 d,结果发现,头肾、脾脏和肠的溶菌酶mRNA表达量均显著上调,且21 d仍有较高表达量。但Selvaraj等<sup>[8]</sup>将 $\beta$ -葡聚糖和脂多糖混合物注射、浸泡和口服鲤(*Cyprinus carpio*),发现3种途径免疫24、48 h的*IL-1 $\beta$* 基因相对表达量均与对照组无显著差异。Jiao等<sup>[9]</sup>用迟缓爱德华菌灭活疫苗免疫牙鲆,弗氏不完全佐剂(FIA)能增强IgM、C3、*MHC-I*、*MHC-II*、*CD8 $\alpha$* 、*CD40*、*Mx*、*IFN- $\gamma$* 、*TNF- $\alpha$* 及*IL-6*基因表达量,而无佐剂疫苗组仅能引起IgM、*MHC-I*、*MHC-II*、*Mx*基因表达。

浸泡免疫途径实用性强,国外已有杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)、鲁氏耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeni*)等浸泡型商品化疫苗<sup>[10]</sup>。超声波、高渗溶液可以增强抗原的递呈和抗体产生:Navot等<sup>[11]</sup>发现超声波能提高金鱼(*Carassius auratus*)皮肤对牛血清白蛋白(BSA)的抗原转运能力和鱼体抗体的产生。Zhou等<sup>[12]</sup>用脉冲式超声波处理石斑鱼(*Epinephelus sp.*)可以显著提高溶藻弧菌(*V. al-*

*ginolyticus*)全菌灭活疫苗浸泡免疫效果, 保护率与注射免疫的相当(95%)。Huising等<sup>[13]</sup>研究发现高渗透泡比直接浸泡能激起鲤更强的先天性免疫应答和特异性黏膜免疫应答。另外, 通过添加适量佐剂和载体也可提高各类灭活疫苗、亚单位疫苗的浸泡免疫效果。Kai等<sup>[14]</sup>将甲醛灭活的乙型野田村病毒(*Betanodavirus*)制备成纳米粒, 浸泡免疫斜带石斑鱼鱼种, 相对保护率可以从39%~43%提高到85%, 有效降低病毒性神经坏死(viral nervous necrosis, VNN)造成的死亡率。王秀华等<sup>[15]</sup>研究发现皂角苷(saponin)提高牙鲆鳗弧菌(*V. anguillarum*)灭活疫苗浸泡免疫效果, 皂角苷组的相对保护率为72%, 且以皂角苷为主的多组合佐剂组可以达到83%, 而无佐剂组仅有27%; 皂角苷提高罗非鱼(*Oreochromis*)点状气单胞菌(*A. punctata*)灭活疫苗浸泡免疫效果, 相对保护率分别为78.5%, 而无佐剂组的分别为54.1%。吴宗福等<sup>[16]</sup>用嗜水气单胞菌 $\beta$ -hemA-ISCs疫苗浸泡免疫鳗鲡(*Anguilla* sp.), 淋巴细胞转化率和抗体效价均显著高于IMS 1312佐剂组与无佐剂组。Fan等<sup>[17]</sup>应用含氢氧化铝胶的虹彩病毒(iridovirus)灭活疫苗两次浸泡免疫大菱鲆, 相对保护率达到90.5%。张吉红等将<sup>[18]</sup>IMS 1312与嗜水气单胞菌灭活疫苗合用浸泡免疫银鲫, 相对保护率RPS可达67%, 而无佐剂疫苗组的为56%。山萘碱能使平滑肌松弛并解除血管痉挛, 具有稳定细胞膜和扩张微血管作用<sup>[19]</sup>, 已有研究表明, 其作为浸泡佐剂能显著提高疫苗免疫效果<sup>[2, 20]</sup>。本研究中, 加强免疫后CPMG组的相对保护率达到70.6%, 且CPMG和山萘碱复合佐剂组的达到88.0%, 均显著高于无佐剂组的56.0%。可见, CPMG和山萘碱联合使用的效果更好, 这可能由于两者的协同作用有利用颗粒性抗原进入鱼体激发更强的免疫应答。

#### 参考文献:

- [1] 吴淑勤, 陶家发, 巩华, 等. 华南海水养殖鱼类疫苗研发策略探讨[C]//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.  
Wu S Q, Tao J F, Gong H, *et al.* Status and future strategy of vaccines for marine fish in south china[C]//Chinese Academy of Fishery Sciences, Division of Agriculture China Academy of Engineering. 2013 Forum Fishery Science and Technology. Guangzhou: [s.n.], 2013 (in Chinese).
- [2] 时云朵, 任燕, 张德锋, 等. 山萘碱提高嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫鲫的效果[J]. 水产学报, 2015, 39(5): 720-727.  
Shi Y D, Ren Y, Zhang D F, *et al.* Anisodamine increases efficacy of *Aeromonas hydrophila* inactivated vaccine in Gibel carp *Carassius auratus gibelio* by immersion immunization[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 720-727(in Chinese).
- [3] Zheng F R, Liu H Z, Sun X Q, *et al.* Development of oral DNA vaccine based on chitosan nanoparticles for the immunization against reddish body iridovirus in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 263-271.
- [4] Hynes N A, Furnes C, Fredriksen B N, *et al.* Immune response of Atlantic salmon to recombinant flagellin[J]. *Vaccine*, 2011, 29(44): 7678-7687.
- [5] 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.
- [6] Diao J, Ye H B, Yu X Q, *et al.* Adjuvant and immunostimulatory effects of LPS and  $\beta$ -glucan on immune response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 156(3-4): 167-175.
- [7] Paulsen S M, Lunde H, Engstad R E, *et al.* *In vivo* effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14(1): 39-54.
- [8] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of  $\beta$ -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.
- [9] 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.
- [10] Tafalla C, Bogwald J, Dalmo R A. Adjuvants and im-

- munostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1740-1750.
- [11] Navot N, Kimmel E, Avtalion R R. Enhancement of antigen uptake and antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) following bath immunization and ultrasound treatment[J]. *Vaccine*, 2004, 22(20): 2660-2666.
- [12] Zhou Y C, Huang H, Wang J, *et al.* Vaccination of the grouper, *Epinephelus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique[J]. *Aquaculture*, 2002, 203(3-4): 229-238.
- [13] Huisling 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.
- [14] 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.
- [15] 王秀华, 黄健, 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, CN200910255825.7[P]. 2012-12-12. Wang X H, Huang J, Zhao W W, *et al.* Fish soaking vaccine specific immunity intensifier and application and using method thereof: China, CN200910255825.7[P]. 2012-12-12 (in Chinese).
- [16] 吴宗福, 龚晖, 陈红燕, 等. 嗜水气单胞菌重组 $\beta$ -hemA-ISCOMs对鳗鲡的浸泡免疫效果[J]. *水产学报*, 2007, 31(3): 374-378.
- Wu Z F, Gong H, Chen H Y, *et al.* Immune effects of the eel after immersed with ISCOMs containing recombinant  $\beta$ -hemA of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(3): 374-378(in Chinese).
- [17] 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.
- [18] 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[J]. *中国兽药杂志*, 2003, 37(4): 26-27.
- Zhang J H, Lu C P. Effects of the adjuvant on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2003, 37(4): 26-27(in Chinese).
- [19] 何新. 山莨菪碱的药理作用及其作用机制[J]. *数理医药学杂志*, 1998, 11(3): 250-251.
- He X. The pharmacological effect and mechanism of action of anisodamine[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 1998, 11(3): 250-251(in Chinese).
- [20] 罗霞, 潘厚军, 巩华, 等. 鳗浸泡嗜水气单胞菌全菌疫苗后皮肤黏液抗体的变化[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 823-828.
- Luo X, Pan H J, Gong H, *et al.* Changes of skin mucus antibody in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) after immersion vaccination against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(5): 823-828(in Chinese).

## Efficacy of inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine with a new biodegradable material adjuvant in *Carassius auratus gibelio* by immersion immunization

REN Yan<sup>1</sup>, SHI Yunduo<sup>1,2,3</sup>, SHI Cunbin<sup>1\*</sup>, WU Shuqin<sup>1</sup>

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

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

3. Sichuan Fisheries School, Chengdu 611730, China)

**Abstract:** Castor oil polyethylene glycol monoester glucoside (CPMG) is a kind of biodegradable and artificial material. Formalin-inactivated *Aeromonas hydrophila* bacteria with or without CPMG, CPMG + anisodamine mixture were administered on days 1 and 7 to *Carassius auratus gibelio* through immersion. Spleens were sampled on days 2, 4, 7, 11, 14 and 21 post-second vaccination, and the expression quantities of IgM, IL-1 $\beta$ , C3, C-lectin and lysozyme mRNAs in spleen were detected through the real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). Formalin-inactivated *A. hydrophila* vaccine with CPMG + anisodamine mixture was immersion administered just once, then, specific antibodies were detected and the fish were challenged intraperitoneally with lethal *A. hydrophila* at different time post-vaccination. The results of vaccination twice showed that fish immunized with inactivated *A. hydrophila* vaccine and CPMG exhibited enhanced expression of genes that are involved in both innate and adaptive immune responses (IgM, IL-1 $\beta$ , C3, C-lectin and lysozyme) compared to no adjuvant control or saline control. The relative percent survival (RPS) was found to be 70.6% on day 30 post-vaccination, while immunization with the antigen alone followed by an experimental challenge gave an RPS of 56.0%, moreover, the CPMG + anisodamine coupled vaccine showed an RPS of 88.2%. The results of vaccination just once showed that the CPMG + anisodamine coupled vaccine could augment the production of specific serum antibodies, which reached the highest level 6 weeks post-vaccination. The resulting RPS calculated was 54.6%, 44.0% and 12.5% on days 30, 60, 120 post-vaccination, respectively. These results indicate that formalin-inactivated *A. hydrophila* vaccine with CPMG immersion administered to gibel carps can significantly promote the gene expression of IgM, IL-1 $\beta$ , C3, C-lectin and lysozyme in spleen and enhance specific immune responses against *A. hydrophila* infection.

**Key words:** *Carassius auratus gibelio*; castor oil polyethylene glycol monoester glucoside (CPMG); anisodamine; formalin-inactivated vaccine; immersion immunization

**Corresponding author:** SHI Cunbin. E-mail: shicunbin2006@163.com

**Funding projects:** Special Project of Marine Fishery Technology and Industrial Development of Guangdong Province (A201501C12); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-46); National key Technologies R & D Program of China (2012BAD25B02)