



单壁碳纳米管载嗜水气单胞菌外膜蛋白亚单位疫苗的研制及免疫效果评价

姜倩雯^{1,2}, 张丽珊^{1,2}, 李小艳^{1,2}, 武瑶^{1,2},
赵怡扬^{1,2}, 徐慧铭^{1,2}, 林向民^{1,2*}

(1. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002;

2. 福建农林大学, 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 为了筛选细菌的疫苗候选蛋白, 本实验根据课题组前期的研究, 挑选了2个嗜水气单胞菌外膜蛋白(A0KLQ6和A0KH89), 以A0KHR9(OmpAII)为对照, 通过比较外膜蛋白与碳纳米管载外膜蛋白通过腹腔注射与浸泡免疫模式, 比较和评价斑马鱼的免疫反应与免疫保护效果。结果显示, 腹腔注射组和浸泡组与普通蛋白组对比, 碳纳米管载蛋白能够显著提高斑马鱼免疫相关基因表达量。腹腔注射组在5 μ g剂量下免疫A0KHR9、A0KLQ6和A0KH89蛋白分别获得61.60%、65.39%和84.96%相对免疫保护率(relative immune protection rate, RPS), 在5 μ g剂量下免疫碳纳米管载蛋白SWCNTs-A0KHR9、SWCNTs-A0KLQ6和SWCNTs-A0KH89分别获得68.10%、77.50%和90.43%的RPSs。浸泡组在40mg/L剂量下免疫A0KHR9、A0KLQ6和A0KH89蛋白分别获得30.80%、25.85%和37.80%的RPSs, 在40mg/L最高剂量下免疫碳纳米管载蛋白疫苗SWCNTs-A0KHR9、SWCNTs-A0KLQ6和SWCNTs-A0KH89分别获得63.60%、73.74%和68.49%的RPSs。研究表明, 铁离子限制下嗜水气单胞菌外膜蛋白A0KLQ6和A0KH89等能够作为抗嗜水气单胞菌的亚单位疫苗候选蛋白, 而单壁碳纳米管载蛋白通过注射免疫与浸泡免疫均能显著提升免疫疗效, 是一种疫苗的适宜纳米载体。以上研究为寻找高效的嗜水气单胞菌亚单位疫苗候选蛋白及佐剂提供了理论依据。

关键词: 嗜水气单胞菌; 外膜蛋白; 碳纳米管; 注射免疫; 浸泡免疫

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

当前, 中国水产养殖业规模已经达到世界水产养殖业的70%, 且比重呈现逐年递增的趋势^[1]。与此同时, 病原菌的传播给水产养殖业造成的损失也越来越严重^[2]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)作为一种常见的条件致病菌, 能够使鱼类患败血症, 引发出血性败血症、眼眶蜂窝织炎和眼球破裂等症状, 最终导致鱼类死亡^[3-5]。此外, 此菌还是人—畜—鱼共患致病菌, 严重时甚至可能危害到人类的生命健康^[6]。疫苗免疫

被认为是抑制嗜水气单胞菌感染最有效的途径之一, 但是疫苗存在佐剂选择、运送及免疫方式等问题, 使其规模化生产与使用受到限制。因此, 当前迫切需要筛选有效的免疫保护性候选蛋白以及一种良好的疫苗递送佐剂以控制该疾病的传播。

暴露在革兰氏阴性细菌表面的外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)是外膜的主要成分, 因其暴露的表位很容易被宿主免疫系统所

收稿日期: 2019-04-20 修回日期: 2019-06-27

资助项目: 国家自然科学基金(31670129)

通信作者: 林向民, E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

识别, 具有很强的免疫原性, 因此是一种非常具有开发潜力的抗原, 可作为疫苗的候选蛋白。前期研究发现, 在缺铁环境下高表达的嗜水气单胞菌外膜蛋白能够显著增强斑马鱼 (*Danio rerio*) 的免疫能力, 提示铁离子相关外膜蛋白可能作为细菌的疫苗候选蛋白, 但是这些候选蛋白的免疫效果可能因为佐剂以及免疫宿主方式等问题受到限制^[7]。因此, 寻找一种更持续、稳定和高效的佐剂是当前渔用疫苗开发研究的热点。近年来, 纳米材料中的单壁碳纳米管 (single-walled carbon nanotube, SWCNTs) 通过功能化修饰后可以与蛋白共价结合, 具有载药率高和极易穿透组织屏障实现药物高效转运、低毒或无毒等优点, 在生物医学领域得到较好的发展, 并在水产养殖疫苗中得到初步的应用^[8-11]。通过佐剂的添加提高药物在受体体内的药效与作用时间, 同时利用纳米材料的细胞膜穿透效应, 制备高效疫苗是当前渔用疫苗开发的新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蓝色斑马鱼 [体长 (3±1) cm, 体质量 (0.3±0.1) g], 购买于福州市花鸟市场; 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 与嗜水气单胞菌强毒株 LP-2 由本实验室-80 °C 保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 购自北京全氏金生物技术有限公司; 原核表达载体 pET-32a(+) 保存于本实验室; 胰蛋白酶、酵母粉、氯化钠购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 实验所用限制性内切酶与连接酶由 TaKaRa 公司提供。

1.2 实验方法

克隆与表达 利用 UNIPROT 和 NCBI 数据库, 并通过 Primer Premier 5.0 软件对相关蛋白基因进行引物设计 (表 1)。并对这些基因进行 PCR 扩增。分别对 PET-32a 和扩增片段进行酶切, 所得酶切产物通过 T₄ 连接酶连接, 并转化至大肠杆菌 BL21 中, 筛选阳性克隆菌并验证。重组菌转接培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 加入 IPTG 诱导剂, 18 °C 低温诱导 6~8 h; 将 200 mL 诱导菌液收集于离心管中, 于 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀重悬于 10 mL 1×磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 重复 3 次; 然后向收集好的菌体中加入 10 mL 5 mmol/L 咪唑溶液, 超声破碎 30 min; 置于 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min 收集破碎后

的菌体上清液。然后将用 0.45 μm 滤膜过滤后的样品加入到 Ni²⁺柱中, 4 °C, 10 r/min 结合 6~8 h; 最后用不同浓度的咪唑梯度洗脱, 所得蛋白通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测结果。

表 1 基因克隆引物

基因 genes	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	酶切位点 restriction site
AHA_1279	F: CGCGGATCCATGAACATAAGA	BamH I
	GTAAAACCTGTTT	
	R: ATTAAGCTTTTACTGCTCGGCC	Hind III
AHA_2699	F: GCAGAATTCATGAAGAAGACG	EcoR I
	ATTGTTGCC	
	R: TAGCTCGAGTTACTGTTTAGCT	Xho I
AHA_1098	F: CCGGAATTCATGAAAAAAGTTGC	EcoR I
	ACTTTCAGTTC	
	R: CCCAAGCTTTTAGAAGCTGTACT	Hind III
	TCACACCCAGG	

单壁碳纳米管载蛋白候选疫苗制备与检测 通过缩合酰化过程制备候选碳纳米管载蛋白疫苗。200 mg 羰基修饰后的单壁碳纳米管 (o-SWCNTs) 加入到 100 mL 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸缓冲液 (MES) 中充分混匀 30 min; 1 g 乙基二甲胺丙基碳化二亚胺 (EDC) 和 1.4 g N-羰基琥珀酸亚胺 (NHS) 加入上述缓冲液中, 超声处理 2 h, 然后用 0.1 mol/L MES 缓冲液洗涤 2 次, 之后 7 000 r/min 离心 10 min 收集样品; 目的蛋白和上述收集样品于 PBS (pH=7.4) 中充分混匀, 并超声处理 2 h, 置于 4 °C 搅拌 2 d; 上述所得搅拌样品放入 100 ku 透析袋中透析 3 d, 之后 3 000 r/min, 10 min, 离心收集样品, 获得单壁碳纳米管载蛋白^[8]。样品选用 Perkin Elmer 公司傅立叶变换红外光谱仪进行检测。将 1 mg 的蛋白样品和碳纳米管载蛋白样品分别与 100 mg 溴化钾一起于研钵中研磨压制成均匀的薄片, 然后使用 FTIR 光谱仪从 4 000 至 500 cm⁻¹ 的吸光度模式扫描薄片, 记录所得数据。

斑马鱼注射与蛋白浸泡免疫 斑马鱼随机分成 4 组, 每组 30 尾, 将蛋白与弗氏佐剂 1 : 1 (V : V) 比例混合, 乳化至滴到冰水上不扩散为止。分别选用蛋白+弗氏佐剂、碳纳米管载蛋白疫苗 (酸化单壁碳纳米管 : 抗原蛋白的质量比 = 1 : 1~1 : 3) 对斑马鱼进行注射免疫, 剂量分别为 1、2、3 和 5 μg; 免疫 14 d 后, 对各组进行再次加强免疫, 注射量和第 1 次相同, 共免疫 28 d;

利用上述样品对斑马鱼进行浸泡免疫, 具体为将样品完全分散于水体中, 终浓度分别为 10、20、30 和 40 mg/L 下浸泡免疫处理 6 h 后, 更换新鲜水体饲养, 免疫时间为 28 d。

荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测免疫相关基因表达 分别选取上述处理中斑马鱼内脏, 利用 Trizol 法提取 RNA。将斑马鱼内脏取出, 置于加入液氮的研钵中研碎, 加入 1 mL Trizol 到各样品中, 静置 5 min; 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡后静置 2~3 min, 2~8 °C, 12 000 × g, 15 min, 离心吸取上清液, 加入 0.5 mL 异丙醇, 静置 10 min, 2~8 °C, 12 000 × g, 10 min, 离心去上清液; 最后加入 1 mL 75% 乙醇, 振荡混匀, 2~8 °C, 7 500 × g, 5 min 离心去上清液, 于 -20 °C 保存测浓度后的干燥沉淀。并对其免疫相关基因引物表达的检测(表 2)。

表 2 PCR 定量免疫相关基因表达的引物

Tab. 2 Primers used for the PCR quantification of immune-related gene expression

基因 genes	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: ATGGATGAGGAAATCGCTGCC R: CTCCTGATGCTGGGTCGTC
<i>Lyz</i>	F: GATTGAGGGATTCTCCATTGG R: CCGTAGTCCTTCCCGTATCA
<i>Il1b</i>	F: TGGACTTCGCAGCACAAAATG R: GTTCACTTCACGCTCTTGATG
<i>MHC I</i>	F: GGAGTTCACCTTGCTTATGC R: CCCTCTGACCCATTCTTGT
<i>MHC II</i>	F: TGACTCAACTGTCCGTGATA R: CCATTAGCCATCTCCATAGTG
<i>IL-8</i>	F: GTCGCTGCATTGAAACAGAA R: CTTAACCCTATGGAGCAGAGG
<i>IL-10</i>	F: TCACGTCATGAACGAGATCC R: CCTCTGCAATTCACCATATCC
<i>IL-15</i>	F: ACAGAGGAAGAAGCCTACAG R: GCGATGAAGACGAGAAAAGAG

斑马鱼攻毒实验 将嗜水气单胞菌 LP-2 于 37 °C、200 r/min 下活化 16~18 h, 次日转接至 5 mL 试管中, 同样条件下培养至 OD₆₀₀=1.0, 1×PBS 稀释菌液至 1×10⁵ CFU/mL, 此浓度为斑马鱼半数致死量的 25 倍, 每尾鱼注射 20 μL 进行攻毒实验, 每组鱼为 30 尾, 进行 3 次重复。

2 结果

2.1 铁离子相关外膜蛋白的克隆与表达

实验室前期研究证明铁离子相关蛋白在嗜水气单胞菌的铁稳态中起到重要作用, 特别是外膜蛋白可能成为潜在的候选疫苗。本实验

根据前期定量蛋白质组学的分析结果, 选取了 2 个与铁稳态相关且差异表达的外膜蛋白(A0KLQ6、A0KH89)和外膜蛋白 OmpA II, 将这些基因分别克隆、表达和纯化, 并研究其对斑马鱼的免疫反应及免疫保护作用。

基因 PCR 扩增与双酶切验证 以嗜水气单胞菌 ATCC 7966 总 DNA 为模板, 对上述外膜蛋白(A0KHR9、A0KLQ6 和 A0KH89)基因进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳结果显示, 图中条带单一且明亮, 大小与目的基因相符, 表明基因扩增成功(图 1-a)。通过割胶回收目的基因, 将目的基因与 PET-32a 载体连接, 获得阳性克隆, 通过双酶切后经琼脂糖凝胶电泳检测出 2 个条带, 分别为 pET-32a(质粒大小 5 900 bp), 以及各自目的基因, 大小与目的序列大小一致(图 1-b)。

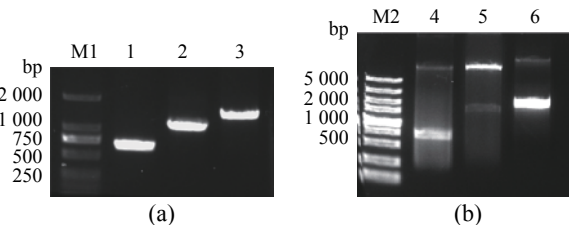


图 1 PCR 扩增与重组质粒双酶切验证

(a) PCR 扩增图, (b) 双酶切验证; M1. 2 000 bp DNA marker, M2. 5 000 bp DNA marker, 1. *AHA*_1098 (627 bp), 2. *AHA*_1279 (1 053 bp), 3. *AHA*_2699 (1 326 bp), 4. pET-32a-*AHA*_1098 (627 bp), 5. pET-32a-*AHA*_1279(1 053 bp), 6. pET-32a-*AHA*_2699 (1 326 bp)

Fig. 1 PCR amplification of target genes and results of recombinant plasmid digestion verification

(a) PCR amplification map, (b) double enzyme digestion verification; M1. 2 000 bp DNA marker, M2. 5 000 bp DNA marker, 1. *AHA*_1098 (627 bp), 2. *AHA*_1279 (1 053 bp), 3. *AHA*_2699 (1 326 bp), 4. pET-32a-*AHA*_1098 (627 bp), 5. pET-32a-*AHA*_1279(1 053 bp), 6. pET-32a-*AHA*_2699 (1 326 bp)

重组菌诱导表达 对构建成功的重组菌进行 IPTG 诱导表达, 表达后经 SDS-PAGE 检测, 结果发现, 各目的蛋白在重组菌中都表达, 且加上 pET-32a 融合蛋白大小, 各蛋白表达位置大小一致(图 2-a)。经 Ni²⁺柱纯化所得蛋白经 SDS-PAGE 检测, 目的蛋白条带都较清晰且相对单一, 目的条带位置与对应蛋白大小一致(图 2-b), 表明蛋白纯化效果好, 无明显杂带, 可用于下一步研究。

2.2 单壁碳纳米管载候选重组蛋白疫苗及其 FTIR 检测结果

为了验证重组蛋白是否已经结合在单壁碳

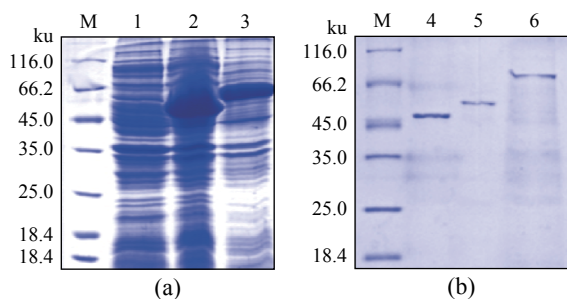


图2 重组蛋白诱导表达与纯化

(a) 重组蛋白诱导表达图, (b) 重组蛋白纯化图; M: 蛋白 marker, 1、4. A0KH89; 2、5. A0KHR9; 3、6. A0KLQ6

Fig. 2 Expression and purification of recombinants induced by IPTG

(a) recombinant protein induced expression, (b) recombinant protein purification map; M: protein marker, 1, 4. A0KH89; 2, 5. A0KHR9; 3, 6. A0KLQ6

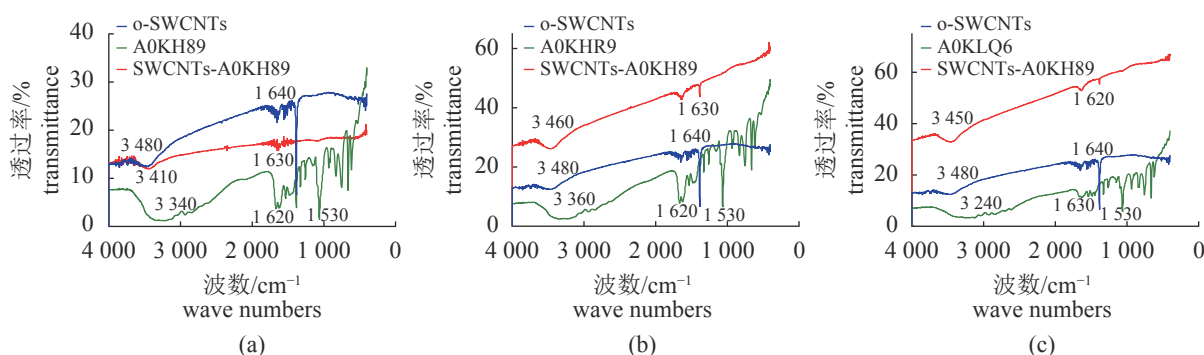


图3 o-SWCNTs、重组蛋白和 SWCNTs-重组蛋白的红外光谱图

以 o-SWCNTs 为阴性对照下 A0KH89(a), A0KHR9(b) 和 A0KLQ6(c) 的 FTIR 光谱, 及其对应的 SWCNTs-重组蛋白

Fig. 3 FTIR spectra of o-SWCNTs, candidate proteins, and SWCNT-encapsulated proteins

The FTIR spectra of A0KH89 (a), A0KHR9 (b) and A0KLQ6 (c) respectively, as well as their SWCNTs-recombinant protein; o-SWCNTs were used as negative controls

2.3 斑马鱼对免疫重组蛋白和 SWCNTs-重组蛋白的免疫反应

本实验中选取 2 个铁离子限制下差异表达的外膜蛋白为潜在疫苗对象, 并且以已知具有免疫保护作用 OmpA II 蛋白为对照, 探究这些差异外膜蛋白的潜在疫苗表达能力。首先研究目的蛋白对斑马鱼的免疫应答效果, 利用所选重组蛋白和 SWCNTs 载重组蛋白以注射免疫和浸泡免疫模式免疫斑马鱼, 然后用 qRT-PCR 技术分别对斑马鱼体内 7 种免疫相关基因的转录水平进行检测。

在腹腔注射免疫模式下, 与对照组比, 大部分免疫相关基因发生明显上调表达(倍数变化

纳米管上, 选用傅立叶红外光谱仪分别对重组蛋白、o-SWCNT 和 SWCNTs-重组蛋白进行检测(图 3)。A0KH89 蛋白以及其与碳纳米管结合产物的图谱见图 3-a, 其中, A0KH89 蛋白的酰胺 I、酰胺 II 和游离氨基特征吸收峰分别在 1 620、1 530 和 3 340 cm^{-1} 处。在与碳纳米管结合后, SWCNTs-A0KH89 的酰胺 I 和游离氨基特征吸收峰分别在 1 630 和 3 410 cm^{-1} 处发生偏移, 并且在 SWCNTs-A0KH89 中酰胺 II 基团的特征吸收峰消失; 图 3-b 和图 3-c 中具有与图 3-a 相似的结果, 和原蛋白相比, 与碳纳米管结合后的蛋白, 酰胺 I 和游离氨基特征吸收峰都发生偏移。结合后的蛋白与未结合的蛋白图谱存在很大差异, 且结合后的图谱与单壁碳纳米管的更相似, 表明这些蛋白能够较好地结合在 SWCNTs 上。

大于 2, 图 4)。分别通过腹腔注射 5 μg A0KHR9、A0KH89 和 A0KLQ6, 可使 *IL-8* 的转录相对于对照组分别增加至 4.7、11.1 和 7.18 倍。与候选蛋白免疫相比, SWCNTs 负载蛋白在腹腔注射后显著增加了斑马鱼的免疫反应。例如斑马鱼在腹腔注射 SWCNTs-A0KLQ6 后 *MHC II* 的表达增加了 483.1 倍, 而注射 SWCNTs-A0KH89 后 *MHC I* 的表达则增加了 189.3 倍。以上表明, 在碳纳米管的负载下, 重组蛋白在斑马鱼体内的抗体应答反应发生增强作用, 揭示碳纳米管是一种能够增强药效的药物纳米载体。

与对照相比, 蛋白浸泡免疫模式对斑马鱼很多免疫相关基因的表达水平影响较小(图 5)。然而在碳纳米管负载蛋白免疫后, 显著促进了

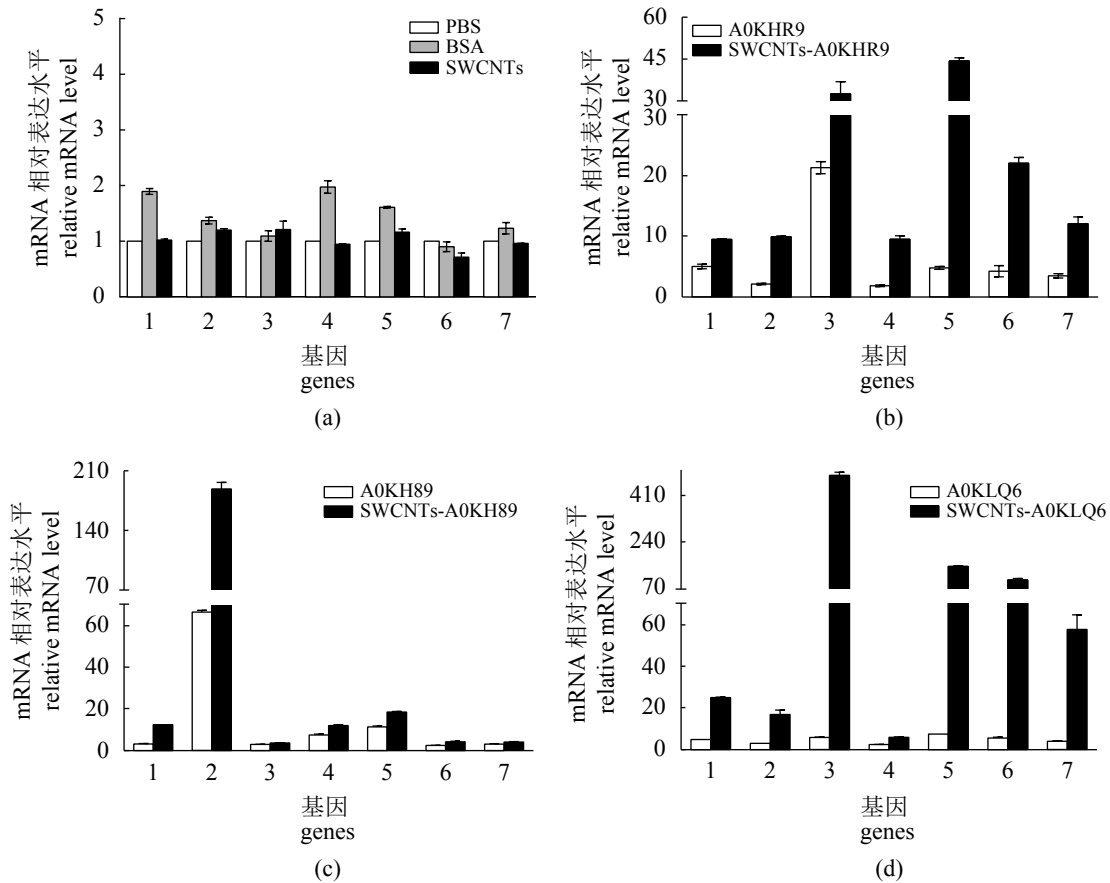


图 4 腹腔注射免疫下斑马鱼免疫应答

(a) PBS、BSA 和 SWCNTs 注射免疫斑马鱼后免疫相关基因的 RNA 表达水平；5 μ g A0KHR9(b)、A0KH89(c) 和 A0KLQ6(d) 蛋白及其对应的 SWCNTs-蛋白注射免疫斑马鱼后免疫相关基因的 RNA 表达水平；1. *Lyz*, 2. *MHC1*, 3. *MHC2*, 4. *IL-1 β* , 5. *IL-8*, 6. *IL-10*, 7. *IL-15*；下同

Fig. 4 Immune response of *D. rerio* after intraperitoneal injection

(a) the RNA expression levels of immune-related genes in *D. rerio* by PBS, BSA and SWCNTs; (b) the RNA expression levels of immune-related genes in *D. rerio* after injection with 5 μ g candidate protein A0KHR9(b), A0KH89(c) and A0KLQ6(d), and 5 μ g SWCNTs-encapsulated candidate protein; 1. *Lyz*, 2. *MHC1*, 3. *MHC2*, 4. *IL-1 β* , 5. *IL-8*, 6. *IL-10*, 7. *IL-15*; the same below

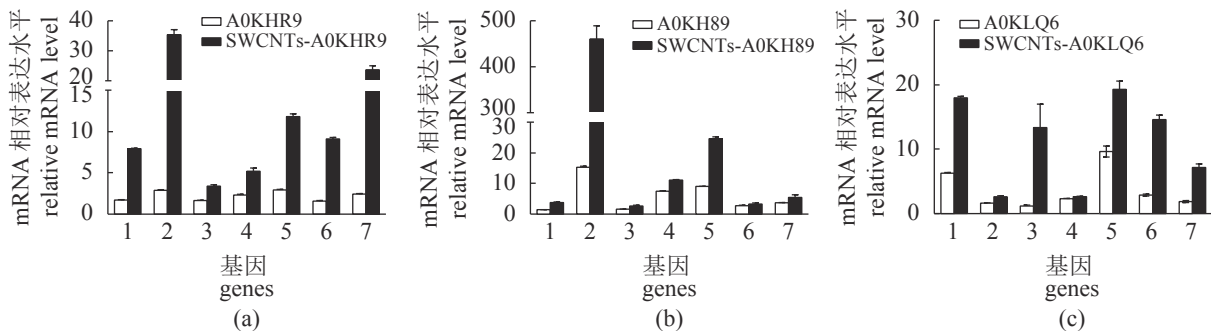


图 5 浸泡免疫模式下斑马鱼免疫应答

40 mg/L 的 A0KHR9(a)、A0KH89(b) 和 A0KLQ6(c) 蛋白及其对应的 SWCNTs-蛋白浸泡免疫斑马鱼后免疫相关基因的 RNA 表达水平

Fig. 5 Immune response of *D. rerio* after immersion immunization

(a) the RNA expression levels of immune-related genes in *D. rerio* after immersion immunization with 40 mg/L candidate protein A0KHR9(a), A0KH89(b) and A0KLQ6(c), and 40 mg/L SWCNTs-candidate protein

斑马鱼的免疫反应。例如在浸泡免疫 SWCNTs-A0KLQ6 后，*IL-10* 的表达增加了 14 倍；在浸泡

免疫 SWCNTs-A0KHR9 后则增加了 460.8 倍，表明碳纳米管负载蛋白能够在浸泡模式下显著提

升机体内的免疫应答。

2.4 重组蛋白和 SWCNTs-重组蛋白免疫保护评价

本实验中选取常见的免疫保护效果较好的 OmpA II 蛋白 (A0KHR9) 作为阳性对照组进行观察, 分别在腹腔注射与浸泡免疫模式下, 对纯化蛋白以及其碳纳米管负载蛋白免疫斑马鱼, 并分别选取牛血清白蛋白 (BSA)、SWCNTs 为阴性对照组进行观察。28 d 后, 选取嗜水气单胞菌同源强毒株 LP-2 进行攻毒实验, 攻毒观察 2 周, 每天记录各组别死亡情况, 绘制累计生存率曲线 (图 6, 图 7)。

根据存活率结果分析发现, 在注射模式下, 外膜蛋白 OmpA II (A0KHR9) 在 1、2、3 和 5 μg 剂量下对斑马鱼的 RPSs 分别为 42.30%、48.80%、61.60% 和 61.60%; SWCNTs-A0KHR9 在 1、2、3 和 5 μg 剂量下对斑马鱼的 RPSs 分别为 42.30%、53.90%、56.70% 和 68.10% (图 6-a)。说明碳纳米管负载蛋白相较于单独注射蛋白, 可以提高其相对免疫保护率; 此外, A0KH89 和 A0KLQ6 碳纳米管负载蛋白都比单独注射蛋白组的 RPSs 高 (图 6-b, 6-c)。在注射免疫模式最高剂量 5 μg 下, 与 A0KHR9 (61.60%) 和 A0KLQ6 (65.39%) 相比, A0KH89 (84.96%) 具有最高的相对免疫保护率; 同时在 SWCNTs-重组蛋白中, 与 SWCNTs-A0KHR9 (68.10%) 和 SWCNTs-A0KLQ6 (77.50%) 相比, SWCNTs-A0KH89 (90.43%) 具有最高的相对免疫保护率。以上结果表明, 本实验所选取的外膜蛋白都具备较好的免疫保护作用, 而碳纳米管作为疫苗载体能够显著增强外膜蛋白的免疫保护作用。说明这些蛋白可以作为潜在的候选疫苗, 并且碳纳米管是一种较佳的药物递送载体。

在浸泡免疫模式中, 除 A0KH89 候选蛋白在最高剂量 40 mg/L 下具有 37.80% 的 RPSs 以外, 其他蛋白的 RPSs 都低于 31%。然而在以碳纳米管为载体后, 所有 SWCNTs-重组蛋白候选疫苗都表现出更明显的 RPSs, 其中以 SWCNTs-A0KLQ6 (73.74%) 为最高, 其他候选疫苗的 RPSs 分别为 SWCNTs-A0KHR9 (63.60%) 和 SWCNTs-A0KH89 (68.49%)。这些结果表明, 在浸泡免疫模式下, 碳纳米管作为载体显著提高了候选蛋白在斑马鱼中对抗嗜水气单胞菌的免疫保护作用, 表明碳纳米管对浸泡免疫的蛋白递送进入受体体内

具有良好的效果, 是一种合适的纳米药物载体。

3 讨论

通常细菌必须从宿主或复杂的自然环境中捕获有限的铁资源^[12]。当细菌在富含营养的实验培养基中生长时, 许多潜在功能蛋白表达水平较低, 从而易被研究者所忽略。本实验室的前期研究表明, 在铁离子限制下的嗜水气单胞菌 ATCC 7966 中至少存在 20 个表达上调的外膜蛋白, 但是这些蛋白是否可以作为候选疫苗制备目前还不清楚。本研究从这些上调的蛋白中, 选择了 2 个与铁离子相关的外膜蛋白, 分别为 A0KH89 和 A0KLQ6, 并且选取常见外膜主要蛋白 OmpA II 为对照, 共同评估了这些蛋白质在斑马鱼中的免疫保护作用。此外, 除了具有免疫保护性的亚单位蛋白的选择以外, 渔用疫苗还需考虑其免疫接种效率的问题。注射免疫是水产动物常用的疫苗免疫方式之一, 然而这样复杂的操作方式很难应用于商业化模式; 浸泡模式虽然操作简便且适合规模化产业, 但由于皮肤屏障等, 限制了其在渔业疫苗中的使用, 口服免疫方法也具有类似问题。最近研究表明, 用 SWCNTs 等纳米材料作为载体对蛋白质进行负载, 可以通过浸泡免疫增强免疫蛋白在鱼类中的免疫保护功效^[13]。利用碳纳米管表面可被修饰的特点, 特异性结合生物大分子或者药物, 借助碳纳米管的穿膜优势进入细胞或组织。Oh 等^[9]通过合成的单壁碳纳米管负载多柔比星 (SWNTs-DOX) 复合物, 发现 SWNTs-DOX 能够表现出缓慢的 DOX 释放。虽然纳米材料还有一些问题需要解决, 如成本较高、技术限制以及部分无机纳米材料难降解等^[14], 但随着科技的发展, 其仍是开发新疫苗及提高疫苗效率的优良选择。本实验使用 SWCNT 为纳米载体结合外膜蛋白, 并对其在注射和浸泡免疫 2 种疫苗接种模式下的免疫保护作用进行评价, 筛选能够在浸泡及注射免疫方法中均达到较好的免疫效果、且易于操作的候选疫苗。

在本实验筛选的 3 个外膜蛋白中, A0KHR9 (OmpA II) 是嗜水气单胞菌外膜的主要组成部分之一, 具有较好的免疫原性^[15]。张志强等^[16]研究表明, 迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 的重组 OmpA 对免疫组小鼠 (*Mus musculus*) 具有保护力, 为亚单位疫苗的研制奠定基础。本研究

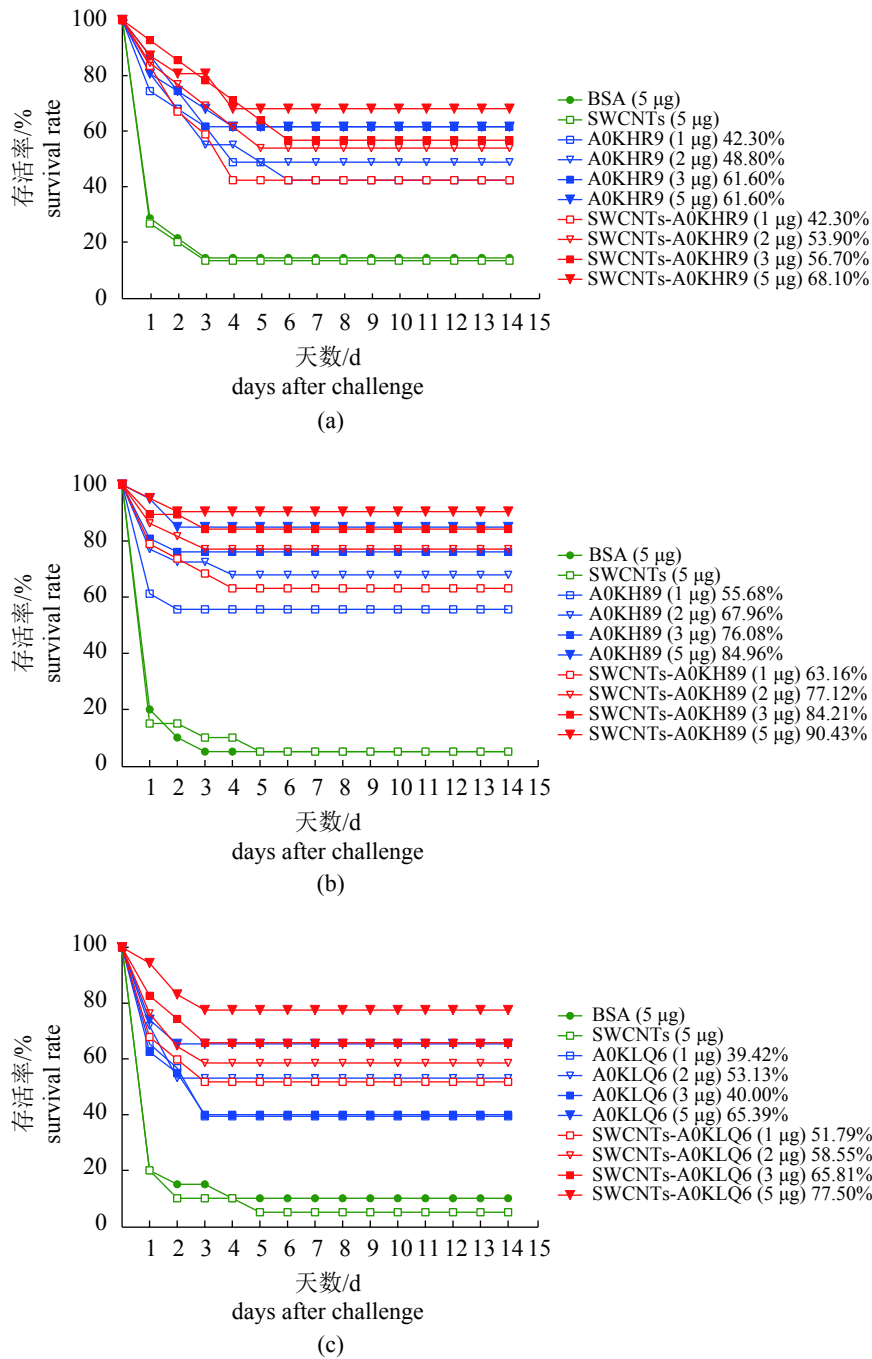


图 6 攻毒后注射模式下接种的斑马鱼的累积存活率

注射 A0KHR9(a)、A0KH89(b) 和 A0KLQ6(c) 蛋白及其对应 SWCNTs-重组蛋白后免疫斑马鱼，经嗜水气单胞菌 LP-2 攻毒观察 14 d 所得相对免疫保护率曲线

Fig. 6 Cumulative survival rates of *D. rerio*, vaccinated via injection after being challenged

Cumulative survival rates of *D. rerio* vaccinated with A0KHR9(a), A0KH89(b) and A0KLQ6(c) protein and their recombinant with SWCNT via injection immunization, and then challenged with *A. hydrophilia* LP-2 for 14 days

采用嗜水气单胞菌外膜蛋白 OmpA II 为潜在候选疫苗免疫斑马鱼，分别在腹腔注射和浸泡免疫模式下对 A0KHR9 与 SWCNTs-A0KHR9 的免疫反应及保护效果进行评价，发现浸泡 A0KHR9 蛋白免疫斑马鱼效果较差，40 mg/L 最高剂量下

的免疫保护率为 30.8%，而 A0KHR9 和 SWCNTs-A0KHR9 注射斑马鱼以及 SWCNTs-A0KHR9 浸泡免疫斑马鱼在诱导免疫反应以及免疫保护作用中起到显著的作用，且在最高剂量下其免疫保护效果范围为 61.60%~68.10%，验证了外膜蛋白

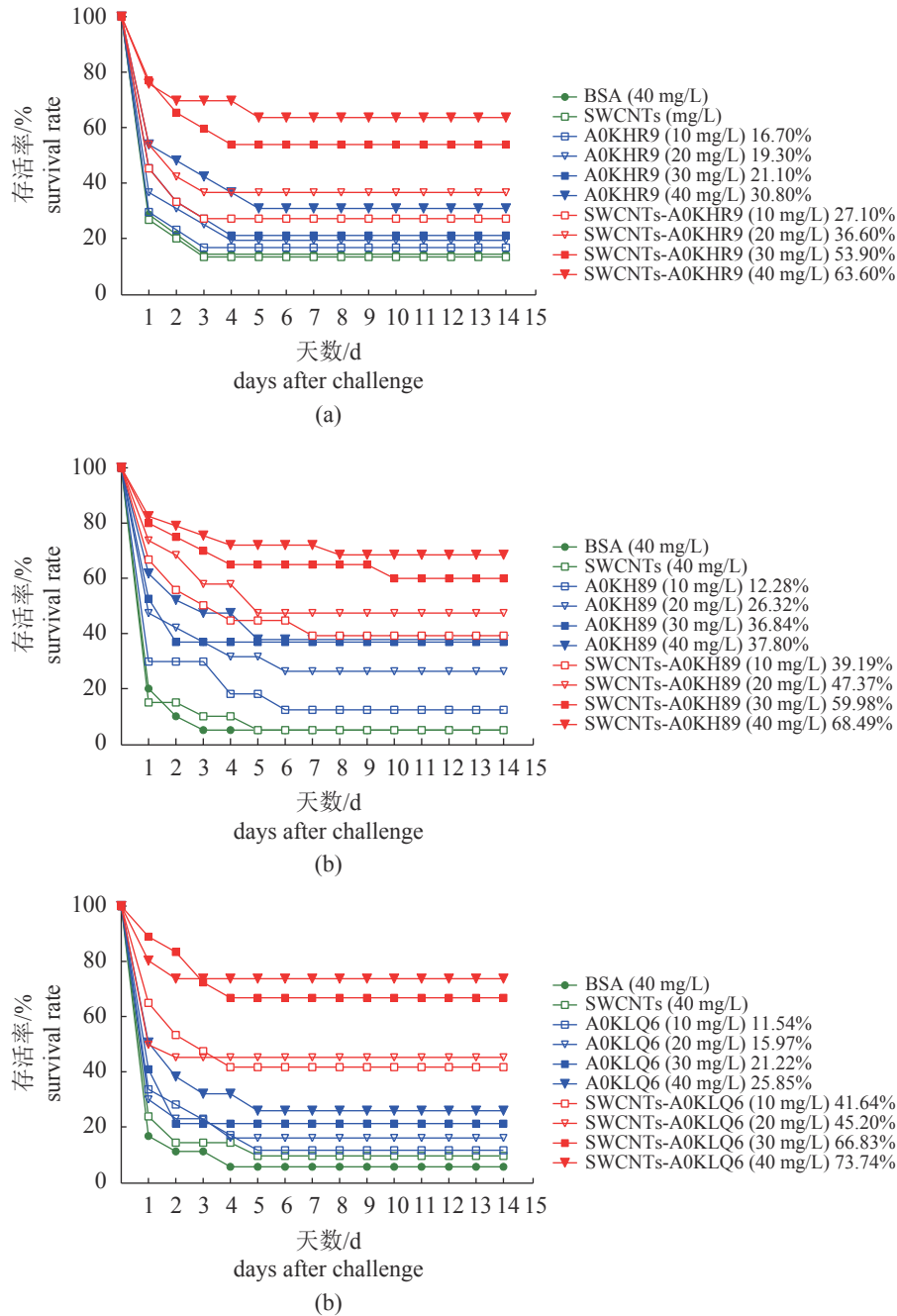


图 7 攻毒后浸泡模式下接种的斑马鱼的累积存活率

分别浸泡于 A0KHR9(a)、A0KH89(b) 和 A0KLQ6(c) 蛋白及其对应 SWCNT 重组后免疫斑马鱼, 经嗜水气单胞菌 LP-2 攻毒观察 14 d 所得相对免疫保护率曲线

Fig. 7 Cumulative survival rates of *D. rerio*, vaccinated via immersion after being challenged

Cumulative survival rates of *D. rerio* vaccinated with A0KHR9(a), A0KH89(b) and A0KLQ6(c), and their recombination with SWCNT via bath immunization, and then challenged with *A. hydrophilia* LP-2 for 14 days

OmpA II 确实在候选疫苗中具有较佳的效果。

A0KHR9 是一个未知蛋白, 当前文献报道较多的都是已知功能的蛋白, 而忽视一些定位于外膜上的未知蛋白。本研究中发现 A0KHR9 和 SWCNTs-A0KHR9 在腹腔注射和浸泡免疫中都增强了斑马鱼的免疫应答反应, 单独浸泡蛋白免

疫不能够明显增强免疫应答。在最高剂量下, 各组实验中斑马鱼的相对免疫保护率的范围为 68.49% 和 90.43%。该蛋白免疫斑马鱼的相对免疫保护率最高达 90.43%, 说明其适宜作为抗嗜水气单胞菌的候选疫苗。

A0KLQ6 是一种凝集蛋白, 是能够识别糖

蛋白与糖脂和细胞膜中的碳水化合物结构的一类蛋白质,与凝集素与细胞之间的黏着、细菌感染宿主、机体天然免疫防御等生理现象相关^[17-18]。有研究通过检测细菌攻击后半乳糖凝集素在各组织中的表达情况发现,半乳糖凝集素是一种具有急性反应的基本诱导蛋白,可在非特异性免疫中起重要作用^[19]。在本实验中发现,A0KLQ6和SWCNTs-A0KLQ6在腹腔注射和浸泡免疫中都增强了斑马鱼的免疫应答反应,单独浸泡40 mg/L的A0KLQ6蛋白免疫效果欠佳,相对免疫保护率为25.85%,在最高剂量下,其他组实验中斑马鱼的相对免疫保护率的范围为65.39%~77.50%。因此,A0KLQ6蛋白是一种具有较好疗效的潜在疫苗。

综上所述,在接种疫苗时,SWCNT负载靶蛋白提高了斑马鱼的存活率,特别是当疫苗通过浸泡免疫方式时。当用嗜水气单胞菌攻毒接种疫苗的斑马鱼时,这2种铁相关外膜蛋白都具有高度免疫保护作用,具有疫苗开发的潜力。以上研究为寻找高效的嗜水气单胞菌亚单位疫苗候选蛋白及佐剂提供了理论依据。

参考文献 (References):

- [1] 李振,张建城,曹振辉,等.噬菌体控制主要水产养殖类致病菌的研究进展[J].畜牧与兽医,2015,47(8):138-143.
Li Z, Zhang J C, Cao Z H, et al. Research progress on bacteriophages controlling major aquaculture pathogens[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015, 47(8): 138-143.
- [2] 姚国成,关歆.世界水产养殖30年发展分析(下)[J].科学养鱼,2013(2):1-3.
Yao G C, Guan X. Analysis of the development of aquaculture in the world in the past 30 years (Part 2)[J]. Scientific Fish Farming, 2013(2): 1-3.
- [3] 陈翠珍.我国嗜水气单胞菌感染研究概况[J].河北科技师范学院学报,2012,26(4):61-64.
Chen C Z. Research survey on infection of *Aeromonas hydrophila* in China[J]. Journal of Hebei Normal University Science & Technology, 2012, 26(4): 61-64(in Chinese).
- [4] Hossain M J, Sun D W, McGarey D J, et al. An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish[J]. mBio, 2014, 5(3): e00848-14.
- [5] Noonin C, Jiravanichpaisal P, Söderhäll I, et al. Melanization and pathogenicity in the insect, *Tenebrio molitor*, and the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, by *Aeromonas hydrophila* AH-3[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15728.
- [6] Xiong X M, Chen Y L, Liu L F, et al. Estimation of genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Aquaculture, 2017, 479: 768-773.
- [7] Wang Y Q, Chen H R, Guo Z, et al. Quantitative proteomic analysis of iron-regulated outer membrane proteins in *Aeromonas hydrophila* as potential vaccine candidates[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 68: 1-9.
- [8] Gong Y X, Zhu B, Liu G L, et al. Single-walled carbon nanotubes as delivery vehicles enhance the immunoprotective effects of a recombinant vaccine against *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 42(1): 213-220.
- [9] Oh Y, Jin J O, Oh J. Photothermal-triggered control of sub-cellular drug accumulation using doxorubicin-loaded single-walled carbon nanotubes for the effective killing of human breast cancer cells[J]. Nanotechnology, 2017, 28(12): 125101.
- [10] Meng J, Meng J, Duan J H, et al. Carbon nanotubes conjugated to tumor lysate protein enhance the efficacy of an antitumor immunotherapy[J]. Small, 2008, 4(9): 1364-1370.
- [11] Wang Y, Liu G L, Li D L, et al. The protective immunity against grass carp reovirus in grass carp induced by a DNA vaccination using single-walled carbon nanotubes as delivery vehicles[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(2): 732-742.
- [12] Andrews S C, Robinson A K, Rodríguez-Quiriones F. Bacterial iron homeostasis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2-3): 215-237.
- [13] Liu L, Gong Y X, Zhu B, et al. Effect of a new recombinant *Aeromonas hydrophila* vaccine on the grass carp intestinal microbiota and correlations with immunological responses[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(1): 175-183.
- [14] 郑力榕,罗云波,许文涛.光及光热纳米材料在生物传感、药物靶向运输和生物成像中的应用[J].生物技术通报,2018,34(9):79-89.

- Zheng L R, Luo Y B, Xu W T. Applications of optical and photothermal nanomaterials in biosensing, drug-targeted delivery and bioimaging[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(9): 79-89.
- [15] 王亚磊, 王权, 白雪瑞, 等. 副溶血弧菌SH112株OmpA蛋白的高效表达及免疫学特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1937-1947.
- Wang Y L, Wang Q, Bai X R, *et al.* Expression and immunological characterization of the OmpA protein from *Vibrio parahaemolyticus* strain SH112[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(10): 1937-1947(in Chinese).
- [16] 张志强, 杨楠, 李永慧, 等. 迟缓爱德华菌外膜蛋白OmpA原核表达及其免疫原性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(6): 534-537.
- Zhang Z Q, Yang N, Li Y H, *et al.* Prokaryotic expression and immunological protection analysis for OmpA protein of *Edwardsiella tarda*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(6): 534-537(in Chinese).
- [17] 陈政强, 黄捷, 战文斌, 等. 贝类凝集素的特性与功能[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2007, 12(4): 314-321.
- Chen Z Q, Huang J, Zhan W B, *et al.* Characterization and roles of agglutinin in mollusk[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science Edition)*, 2007, 12(4): 314-321(in Chinese).
- [18] Wei J F, Liu B S, Fan S G, *et al.* Serum immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* to xenografts and allografts[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 303-310.
- [19] Arason G J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6(4): 277-289.

Development of single-walled carbon nanotubes carrying *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein subunit vaccine and evaluation of immune effect

JIANG Qianwen^{1,2}, ZHANG Lishan^{1,2}, LI Xiaoyan^{1,2}, WU Yao^{1,2},
ZHAO Yiyang^{1,2}, XU Huiming^{1,2}, LIN Xiangmin^{1,2*}

(1. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring,
Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To investigate the immune response of zebrafish to iron-related proteins and SWCNT-encapsulated proteins, we overexpressed and purified two iron-related recombinant proteins (A0KLQ6 and A0KH89) from *Aeromonas hydrophila*. We then vaccinated *Danio rerio* with these proteins and their SWCNT-encapsulated counterparts via both intraperitoneal injection and immersion immunization, and found they evoked a strong immune response in *D. rerio*. When challenged with virulent *A. hydrophila*, *D. rerio* administered 5 μ g intraperitoneal injections of A0KHR9, A0KLQ6, A0KH89, SWCNTs-A0KHR9, SWCNTs-A0KLQ6 and SWCNTs-A0KH89 obtained high relative percent survivals (RPSs) (61.60%, 65.39%, 84.96%, 68.10%, 77.50% and 90.43%, respectively). Meanwhile, the *D. rerio* administered 40 mg/L immersion immunizations of aboved samples had 30.80%, 25.85%, 37.80%, 63.60%, 73.74% and 68.49% RPSs, respectively. These results indicate that the outer membrane proteins A0KLQ6 and A0KH89 can be used as potential subunit vaccine candidates against *A. hydrophila* infection, and the SWCNTs-encapsulated counterparts can significantly improve the immune effect in both immunization ways. Our studies may provide a theoretical basis for the development of vaccines and adjuvants candidates

Key words: *Aeromonas hydrophila*; outer membrane protein; carbon nanotubes; injection immunization; immersion immunization

Corresponding author: LIN Xiangmin. E-mail: xiangmin@fafu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31670129)