



嗜水气单胞菌 *ompA*、*flaA* 基因重组干酪乳杆菌对 鲤生长及免疫效果分析

赵林辉^{1,2,3,4}, 田佳鑫^{2,3,4}, 孔祎颀^{2,3,4}, 彭思博^{1,2,3,4}, 单晓枫⁴, 王桂芹^{2,3,4*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118;

2. 吉林农业大学, 现代农业技术教育部国际合作联合实验室, 吉林 长春 130118;

3. 吉林农业大学, 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118;

4. 吉林农业大学, 吉林省动物营养与饲料科学重点实验室, 吉林 长春 130118)

摘要: 为构建嗜水气单胞菌 *ompA* 和 *flaA* 基因重组干酪乳杆菌并分别检测其表达产物对鲤生长及免疫效果的影响, 实验将目的基因克隆至乳酸菌穿梭表达质粒 pPG612 中, 并电转至干酪乳杆菌中, 经诱导后包被饲料对鲤进行饲养 56 d, 称重并采集血清及组织, 分析生长指标及免疫指标变化。在 56 d 饲养免疫结束后结果显示, 生长指标显示重组干酪乳杆菌组与对照组无显著差异, 表明重组干酪乳杆菌对生长无影响; 免疫效果分析显示, 血清中 IgM 表达水平显著上升。血清中 AKP、LZM、SOD、CAT、C3 和 C4 也均显著升高。荧光定量 PCR 检测发现, 免疫后肝脏、脾脏、头肾及肠组织中的细胞免疫因子基因 *IL-1 β* 、*IL-8*、*TNF- α* 、*NF- κ B*、*TLR5* 及 *MYD88* 的表达水平有不同程度的显著提升; 其中 *TLR5* 及 *MYD88* 表达量在 Lc-mcs-*flaA* 组高于 Lc-mcs-*ompA* 组。攻毒后 Lc-mcs-*ompA* 与 Lc-mcs-*flaA* 组免疫保护率分别为 59% 与 54%, 显著高于对照组。研究表明, 本实验构建的重组干酪乳杆菌 Lc-mcs-*ompA* 与 Lc-mcs-*flaA* 免疫鲤能刺激机体产生免疫应答反应, 进而提高自身存活率, 为预防鱼类嗜水气单胞菌感染的口服免疫制剂的研发奠定基础并提供科学理论依据。

关键词: 鲤; 嗜水气单胞菌; *flaA*; *ompA*; 重组干酪乳杆菌; 生长及免疫

中图分类号: Q 784; S 942.5

文献标志码: A

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是一种人-兽-水生生物共患病原菌, 其致病性较强, 对多种不良环境均具有耐受能力, 广泛存在于淡水、淤泥以及土壤中^[1-2], 可引起不同种类水生生物如乌鳢 (*Channa argus*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)、中华鳖 (*Trionyx sinensis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*) 和虾等发病。除此之外, 嗜水气单胞菌可通过侵染伤口及水感染的方式进行传播, 引起人

类各种疾病, 例如腹泻、肠胃炎、脑膜炎和细菌性败血症等^[3-6]。近年来, 国内外关于分离自不同类型食物和腹泻患者体内的嗜水气单胞菌的报道越来越多, 对从事相关行业人员的健康造成了不小的威胁^[7-10]。同时, 养殖人员在疾病防治中滥用抗菌药物, 导致产生多重耐药性菌株, 给鱼类疾病的预防和控制带来新的挑战^[11-13]。目前, 关于嗜水气单胞菌的治疗机制尚未阐明, 因此, 对其致病机制及疾病防控研究不仅对水产养殖业有巨

收稿日期: 2020-02-21 修回日期: 2021-04-11

资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46); 国家自然科学基金 (31372540)

第一作者: 赵林辉 (照片), 从事水生生物学研究, E-mail: zlh18943928665@163.com

通信作者: 王桂芹, 从事水生生物营养研究, E-mail: wqjlau2019@sina.com



大的经济价值,而且对公共卫生健康的发展也有重大意义。部分研究表明,嗜水气单胞菌的致病力与其毒力因子的数量及其毒力因子之间的交互作用相关,如肠毒素、黏附素、溶血素和气溶素等可能存在交叉作用或协同作用^[14-17]。外膜蛋白 A (OmpA) 和鞭毛蛋白 A (FlaA) 是嗜水气单胞菌重要的黏附因子,在细菌入侵机体过程中增强其黏附性和致病性,且具有良好的免疫原性^[18-20],能有效激发机体的体液免疫和细胞免疫,以及补体介导的免疫系统,因此,在鱼类基因工程疫苗的研究中可作为良好的候选因子^[21]。由于养殖中各方面的特殊性,渔用疫苗的接种方式受到很大限制。乳酸菌是鱼类肠道中固有菌群,能够在肠道中定殖,机体应激反应小,近年来被广大研究者青睐,同时乳酸菌表达系统可将外源蛋白表达于菌体细胞内,有利于促进局部或全身黏膜免疫反应,可作为活菌的疫苗抗原载体,且表现出较高的安全性^[22]。

本实验选用干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 做口服疫苗的递承载体,分别构建锚定表达型嗜水气单胞菌 *ompA*、*flaA* 基因重组干酪乳杆菌,通过口服包被饲料对健康鲤进行免疫,并对其生长及免疫原性进行评价,从而为防治嗜水气单胞菌的新型口服疫苗免疫制剂的研发及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

嗜水气单胞菌 W12、干酪乳杆菌 ATCC393、pPG612质粒和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 穿梭表达载体 pET-32a 均由吉林农业大学预防兽医实验室保存,大肠杆菌 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 主要试剂

氯霉素和氨苄青霉素购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;MRS 琼脂培养基和肉汤培养基购于广东环凯微生物科技有限公司;蛋白胨、酵母提取物、氯化钠和琼脂粉购于北京缘生化科技有限公司;Es Taq Mix、Master Taq Mix、质粒小提试剂盒、His 标签纯化试剂盒均购于康为世纪生物技术有限公司;DNA 标准分子量、蛋白预染 Marker、ECL 发光液、蛋白预染 Marker、限制性内切酶 (*Xho* I、*Bam*HI、*Eco*R V、*Sma* I) 均为 TaKaRa 公司产品;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、Prefect

Real Time 和 Tli RNaseH Plus、反转录试剂盒均购于 TransGen Biotech 生物公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 Sigma 公司、RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 快速配制试剂盒、ECL 发光液、磷酸盐缓冲液 (PBS)、乳糖均购于北京索莱宝科技有限公司;免疫球蛋白 M (IgM)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LZM)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、补体 3 (C3) 和补体 4 (C4) ELISA 试剂盒均购于江苏晶美生物科技有限公司。

1.3 实验动物

300 尾实验用健康鲤体质量约 (20.00 \pm 0.33) g,均购自长春市青怡坊,置于 27 °C 水箱暂养 2 周。

1.4 目的基因克隆及纯化

将冻干保存的嗜水气单胞菌 W12 接种于 10 mL LB 液体培养基,过夜培养后提取基因组 DNA,并以其为模板进行 PCR 扩增 (表 1)。参照胶回收试剂盒说明书进行胶回收,获得纯化的目的基因 *flaA* 和 *ompA*,并送生物公司测序。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物 primers	序列 sequences	长度/bp length
<i>flaA</i> -F	CGACTAGTATGGGCCTTTTATCAACACT	912
<i>flaA</i> -R	CCGATATCTTAGCCTTGCAGCAGCTGAAG	
<i>ompA</i> -F	CCACTAGTATGATGAAAATGGCTCCTT	1023
<i>ompA</i> -R	CGGATATCTTATTGCTGAACCTTCTTGATC	
IL-1 β -F	TCCGATGACACTGAAGAAT	172
IL-1 β -R	GATGTAAGTACGACCAAGG	
IL-8-F	CTTCTCGGCTGTATCTGTG	160
IL-8-R	TTCCTCTGCGACTCTC	
TNF- α -F	ACAATACCACCCAGGTCCCA	182
TNF- α -R	ACGCAGCATCCTCTCATCCAT	
NF- κ B-F	CAGCCAAAACCAAGAGGGAT	168
NF- κ B-R	TCGGCTTCGTAGTAGCCATG	
Myd88-F	AAAGTTGACTTGTGGACGAT	177
Myd88-R	ATTGACAGCAACTTCCCAC	
TLR5-F	GATTATGATGGTGGTAGGG	192
TLR5-R	CACTGGCTTAGGTTGGTC	
β -actin-F	CACTGTGCCATCTACGAG	198
β -actin-R	CCATCTCCTGCTCGAAGTC	

1.5 原核表达载体的构建

将纯化后检测正确的目的基因按照反应条件 (94 °C 5 min; 94 °C 1 min、52 °C 1 min、72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min) 进行 PCR 扩增并回收基因 *flaA* 和 *ompA*。反应体系: Primer-STAR Max 12.5 μ L; dd H₂O 8.5 μ L; 引物 P1、P2 各 1 μ L; 基因组 DNA 2 μ L。将目的基因与克隆载体 pMD18-T 连接, 构建重组克隆质粒, 并通过普通热激法转化入大肠杆菌感受态 DH5 α , 培养后提取重组质粒并测序鉴定; 将成功构建的 pMD18-T-*flaA*、pMD18-T-*ompA* 分别用 *Spe* I 和 *EcoR* V 双酶切并回收目的片段, 同时分别用 *Spe* I 和 *EcoR* V 双酶切表达载体 pPG-612 回收目的片段, 其酶切反应体系: 质粒 20 μ L, 上下游限制性内切酶各 3 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, ddH₂O 19 μ L。将目的片段与载体片段通过 T4 连接酶 16 °C 金属浴过夜连接, 连接体系: 载体片段 1 μ L, 目的基因纯化产物 4 μ L, 后将连接产物转化至 MC1061 感受态细胞中, 培养 2.5 h 后, 离心并取 150 μ L MRS 肉汤培养基重悬并涂布于抗性平板中培养过夜 (氯霉素: 10 μ g/mL), 挑取疑似阳性克隆于氯霉素抗性的 Luria-Bertani 培养基过夜培养, 提取质粒测序鉴定。将鉴定正确的重组锚定表达型质粒命名为 *mcs-ompA* 和 *mcs-flaA*。

1.6 重组干酪乳杆菌的构建及鉴定

将干酪乳杆菌 ATCC393 冻干菌用 MRS 肉汤培养基厌氧活化传代培养后, 取 1 mL 菌液接种于 100 mL MRS 培养基中, 37 °C 厌氧条件下培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6。冰浴 30 min 后, 4 °C 下 5000 r/min 离心 10 min 弃上清液。预冷 CaCl₂ (0.06 mol/L) 缓冲液重悬菌体, 洗涤 3 次, 离心并收集菌体沉淀, 用冷藏的 CaCl₂ (0.06 mol/L, 含有 15 % 甘油) 10 mL 溶液洗涤 1 次, 并离心收集菌体。最后用 2 mL 的 CaCl₂ (0.06 mol/L, 含有 15 % 甘油) 重悬, 以 150 μ L 分装 1.5 mL EP 管后置于 -80 °C 保存。

通过电转化方法将重组锚定表达型质粒 *mcs-ompA* 和 *mcs-flaA* 电转至干酪乳杆菌 ATCC 393 感受态细胞。电转化方法: 干酪乳杆菌感受态冰上复苏 30 min, 取 20 μ L 质粒混入感受态细胞, 并冰浴 5 min, 转入间距为 2 mm 的预冷电击杯; 电转仪电击 (参数: 2.3 kV, 3 ms) 后, 迅速加入 1 mL 含有蔗糖的 MRS 恢复性培养基 (蔗糖 15 %), 冰浴 10 min 后 37 °C 恒温厌氧培养 3 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 取 150 μ L 灭菌后的 MRS 肉汤培养

基重悬, 均匀涂布于 MRS 抗性琼脂平板上 (氯霉素: 10 μ g/mL), 倒置于 37 °C 恒温箱中厌氧过夜培养。对疑似阳性菌落进行培养, 按照质粒提取试剂盒说明书操作规程提取干酪乳杆菌的质粒, 进行 PCR 鉴定。将测序正确的重组乳杆菌命名为 *Lc-mcs-ompA* 与 *Lc-mcs-flaA*。

1.7 重组干酪乳杆菌的表达与鉴定

将构建的重组干酪乳杆菌 *Lc-mcs-ompA* 与 *Lc-mcs-flaA* 接种于 5 mL MRS (含 10 g/mL 红霉素) 的液体培养基中, 30 °C 厌氧培养过夜。取 1 mL 接种于 50 mL MRS 液体培养基中, 30 °C 厌氧静置培养至 OD₆₀₀ 为 0.3 时, 加入木糖诱导 12 h, 以上述方法诱导含空载体 pPG 的干酪乳杆菌 (*Lc-mcs*) 作为对照, 将诱导后菌液在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 取 10 mL PBS 洗涤 3 次收集菌体沉淀, 溶菌酶作用 1 h 后, 离心并收集菌体沉淀, 取 1 mL PBS 重悬, 按照 1 : 50 的比例加入 4 \times SDS-PAGE Buffer 混合均匀, 煮沸 10 min, 4 °C 离心 5 min, 取上清液, 进行 SDS-PAGE 检测。

1.8 鲤饲养免疫

将诱导后的 *Lc-mcs-ompA*、*Lc-mcs-flaA*、*Lc-mcs* 重组菌株、干酪乳杆菌 (ATCC 393) 及 PBS 分别均匀地包被饲料, 烘干后的包被基础鱼粮平均包含 1 \times 10⁸ CFU/g 重组菌株。将实验鲤随机分为 5 组, 每组 40 尾, 分别为 *Lc-mcs-ompA* 免疫组、*Lc-mcs-flaA* 免疫组、空质粒组 (*Lc-mcs*)、干酪乳杆菌组 (ATCC 393) 和 PBS 空白组, 免疫途径为口服免疫。饲养 56 d 后随机取 5 尾鲤进行尾静脉采血, 采集血液后, 37 °C 促凝 1 h, 4 °C 静置过夜, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集血清并采集肝脏、脾脏、头肾及肠等组织样品, 立即置于液氮中冷冻, 并在 -80 °C 下储存。测定增重率 (WGR)、平均增重率 (AWGR)、生长率 (SGR) 和饲料转化率比率 (FCR), 以及肝体比 (VSI) 和脏体比 (HSI)。

1.9 血清指标检测

采用间接 ELISA 法检测鲤 IgM 水平。并按照酶活性测定试剂盒操作说明书检测每组血清中 LZM、AKP、SOD、CAT、C3 和 C4 含量。

1.10 细胞免疫因子基因表达量的测定

饲养免疫 56 d 后, 随机取出免疫组及对照组鲤采集肝脏、脾脏、头肾和肠道等组织样本, 提取总 RNA 后反转录成 cDNA, 荧光定量 PCR

(qPCR) 检测鲤细胞免疫因子基因 *IL-1 β* 、*IL-8*、*TNF- α* 、*NF- κ B*、*TLR5* 及 *MYD88* 的表达量情况。

1.11 免疫保护效果检测

免疫 56 d 后停食 2 d, 对鲤进行攻毒实验, 攻毒组 (Lc-mcs-*ompA* 组、Lc-mcs-*flaA* 组、Lc-mcs 组、干酪乳杆菌组和 PBS 组) 每尾腹腔注射 0.2 mL 嗜水气单胞菌 (1×10^8 mL/CFU), 未攻毒组 (negative) 作为阴性对照组, 观察其临床症状并记录攻毒后各组鲤的死亡情况, 初步检测重组干酪乳杆菌 Lc-mcs-*ompA* 和 Lc-mcs-*flaA* 的免疫效果。

1.12 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对鲤生长、抗氧化及免疫指标进行单因素方差分析, 若方差分析显著, 进一步进行 Duncan 氏多重比较, 分析组间差异显著性, 显著水平设定为 $P < 0.05$, 实验数据采用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 目的基因克隆、纯化及原核表达载体的构建

实验成功克隆了 *flaA* 及 *ompA* (图 1), 并成功构建了原核表达载体 mcs-*flaA* 和 mcs-*ompA* (图 2)。

2.2 重组干酪乳杆菌的构建及表达

SDS-PAGE 检测结果显示, 成功将重组表达载体电转至干酪乳杆菌, 且获得的重组干酪乳杆菌 Lc-mcs-*flaA* 与 Lc-mcs-*ompA* 表达出对应大小的

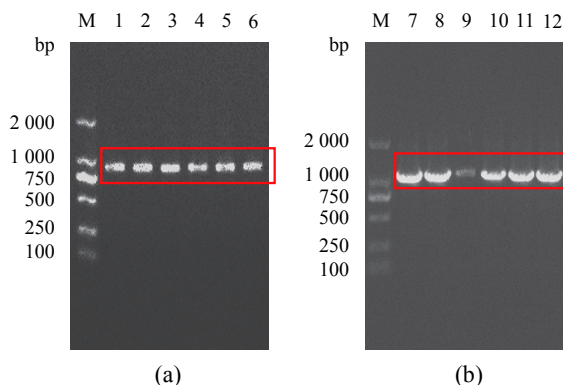


图 1 目的基因克隆检测 *flaA* (a) 和 *ompA* (b)

M. 标准物质 2 000; 1~6. *flaA* PCR 产物; 7~12. *ompA* PCR 产物; 下同

Fig. 1 Cloning and detection of target gene *flaA* (a) and *ompA* (b)

M. marker 2 000; 1-6. *flaA* PCR product; 7-12. *ompA* PCR product; the same below

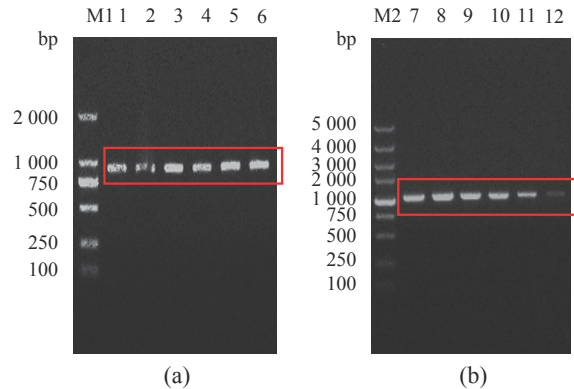


图 2 原核表达载体检测 *flaA* (a) 和 *ompA* (b)

M1. 标准物质 2 000; M2. 标准物质 5 000

Fig. 2 Prokaryotic expression vector detection of *flaA* (a) and *ompA* (b)

M1. marker 2 000; M2. marker 5 000

蛋白条带 (图 3)。

2.3 生长指标检测

生长指标检测结果显示, 饲料中添加重组干酪乳杆菌与对照组之间各项指标无显著差异 ($P > 0.05$)。添加重组干酪乳杆菌组较对照组相比, 显著提高鲤的 AWGR 和 SGR ($P < 0.05$), 但 HSI、VSI 与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。Lc-mcs 组与对照组各项指标无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.4 血清指标检测

5 组鲤饲养免疫 56 d 后停食 1 d, 每组随机挑选 5 尾称重后进行尾静脉采血, 测定血清中的 IgM 抗体水平。结果显示, 干酪乳杆菌组、Lc-mcs-*ompA* 组和 Lc-mcs-*flaA* 组 IgM 抗体水平均显著高于 PBS 组 ($P < 0.05$), 同时 Lc-mcs-*ompA*、Lc-mcs-*flaA* 组 IgM 抗体水平显著高于干酪乳杆菌组 ($P < 0.05$), 且 Lc-mcs-*ompA* 组抗体水平高于 Lc-mcs-*flaA* 组。Lc-mcs-*ompA* 组免疫效果相对最好 (图 4)。LZM、AKP、SOD、CAT、C3 和 C4 与 IgM 的结果趋势相似 (图 5), Lc-mcs-*ompA*、Lc-mcs-*flaA* 和干酪乳杆菌相较于对照组均显著提高 ($P < 0.05$), Lc-mcs-*ompA* 组和 Lc-mcs-*flaA* 组显著高于干酪乳杆菌组 ($P < 0.05$), Lc-mcs-*ompA* 组和 Lc-mcs-*flaA* 组二者之间的差异不显著 ($P > 0.05$), 但 Lc-mcs-*ompA* 组相对优于 Lc-mcs-*flaA* 组的免疫效果, Lc-mcs 与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.5 细胞免疫因子基因 qPCR 检测

以 β -actin 为内参基因, qPCR 检测重组干酪

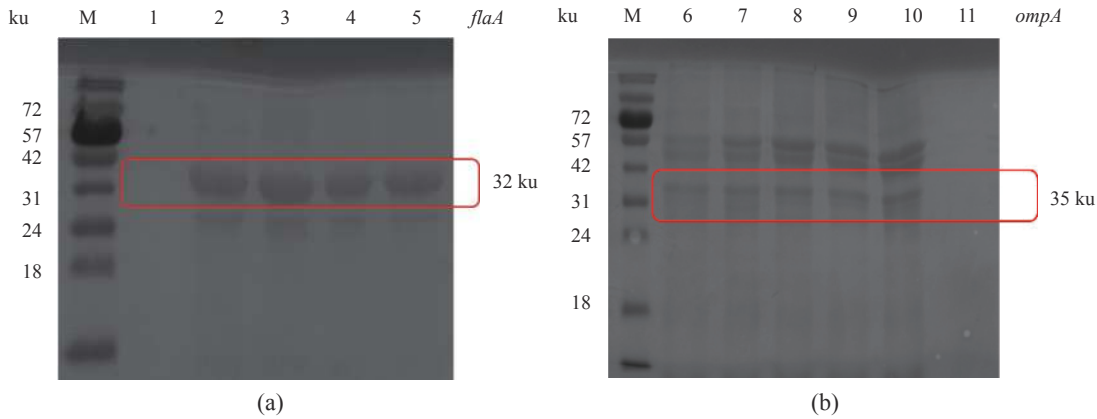


图 3 重组干酪乳杆菌 Lc-mcs-*flaA*(a) 和 Lc-mcs-*ompA*(b) 的蛋白表达结果

M. 蛋白标准物质 8~125, 1、11. 阴性, 2~5. *flaA* 产物, 6~10. *ompA* 产物

Fig. 3 Protein expression results of recombinant *L. casei* Lc-mcs-*flaA*(a) and Lc-mcs-*ompA*(b)

M. protein marker 8-125; 1,11. negative; 2-5. *flaA* protein product, 6-10. *ompA* protein product

表 2 生长指标检测结果

Tab. 2 Test results of growth indexes

项目 project	组别 groups	组别 groups				
		PBS	Lc-mcs	Lc-mcs- <i>flaA</i>	Lc-mcs- <i>ompA</i>	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>
初始体质量/g IBM		15.000±0.030	15.000±0.030	15.000±0.030	15.000±0.030	15.000±0.030
终末体质量/g FBM		48.070±0.020 ^a	50.250±0.001 ^a	50.080±0.031 ^a	50.040±0.038 ^a	56.170±0.002 ^b
平均增重率/% AWGR		215.220±0.040 ^a	235.800±0.140 ^a	231.040±0.040 ^a	228.160±0.110 ^a	270.750±0.002 ^b
特定增长率/(%/d) SGR		2.050±0.010 ^a	2.160±0.050 ^a	2.130±0.010 ^a	2.120±0.030 ^a	2.330±0.050 ^b
脏体比/% VSI		14.210±0.070	14.180±0.060	14.230±0.080	14.190±0.210	14.420±0.130
肝体比/% HSI		3.250±0.020	3.370±0.020	3.350±0.010	3.370±0.050	3.390±0.030

注: 表格同行肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: in the same row, values with different lowercases letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

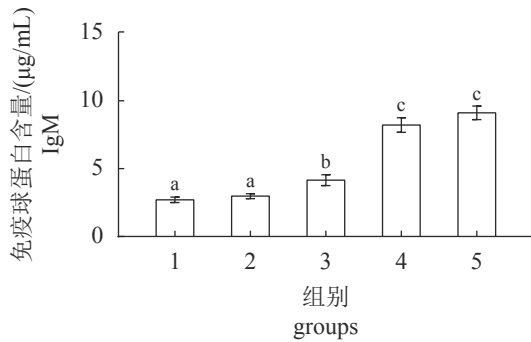


图 4 血清免疫球蛋白 IgM 检测

1. PBS, 2. Lc-mcs, 3. *L. casei* ATCC 393, 4. Lc-mcs-*flaA*, 5. Lc-mcs-*ompA*, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 图 5 同

Fig. 4 IgM detection of serum

1. PBS; 2. Lc-mcs; 3. *L. casei* ATCC 393; 4. Lc-mcs-*flaA*; 5. Lc-mcs-*ompA*, values with different lowercases letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same as Fig.5

乳杆菌免疫后鲤的各个组织 *IL-1β*、*IL-8*、*TNF-α*、*NF-κB*、*TLR5* 和 *MYD88* 的相对表达量。*IL-1β*、*IL-8*、*TNF-α* 和 *NF-κB* 表达量结果显示, Lc-mcs-

ompA、Lc-mcs-*flaA* 和干酪乳杆菌组显著高于对照组 ($P < 0.05$), Lc-mcs-*ompA* 和 Lc-mcs-*flaA*组显著高于干酪乳杆菌组 ($P < 0.05$), Lc-mcs-*ompA*组相对优于 Lc-mcs-*flaA* 组, 但不显著 ($P > 0.05$)。而组织中 *MYD88*、*TLR5* 的表达量 Lc-mcs-*flaA* 组显著高于其他 4 组 ($P < 0.05$), 而此 4 组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。各组中组织间免疫相关基因表达量不同, 头肾组织中表达量相对优于其他组织, 但其相较于各组织之间不显著 ($P > 0.05$), 其次是肠道和肝脏 (图 6)。

2.6 免疫保护效果检测

饲养免疫 56 d 后停食 2 d, 采用嗜水气单胞菌攻毒 8 d, 结果显示, PBS 组全部死亡, Lc-mcs 组和干酪乳杆菌组分别在 9 和 13 d 后全部死亡, Lc-mcs-*ompA* 与 Lc-mcs-*flaA* 存活率分别为 59% 与 54%(图 7)。

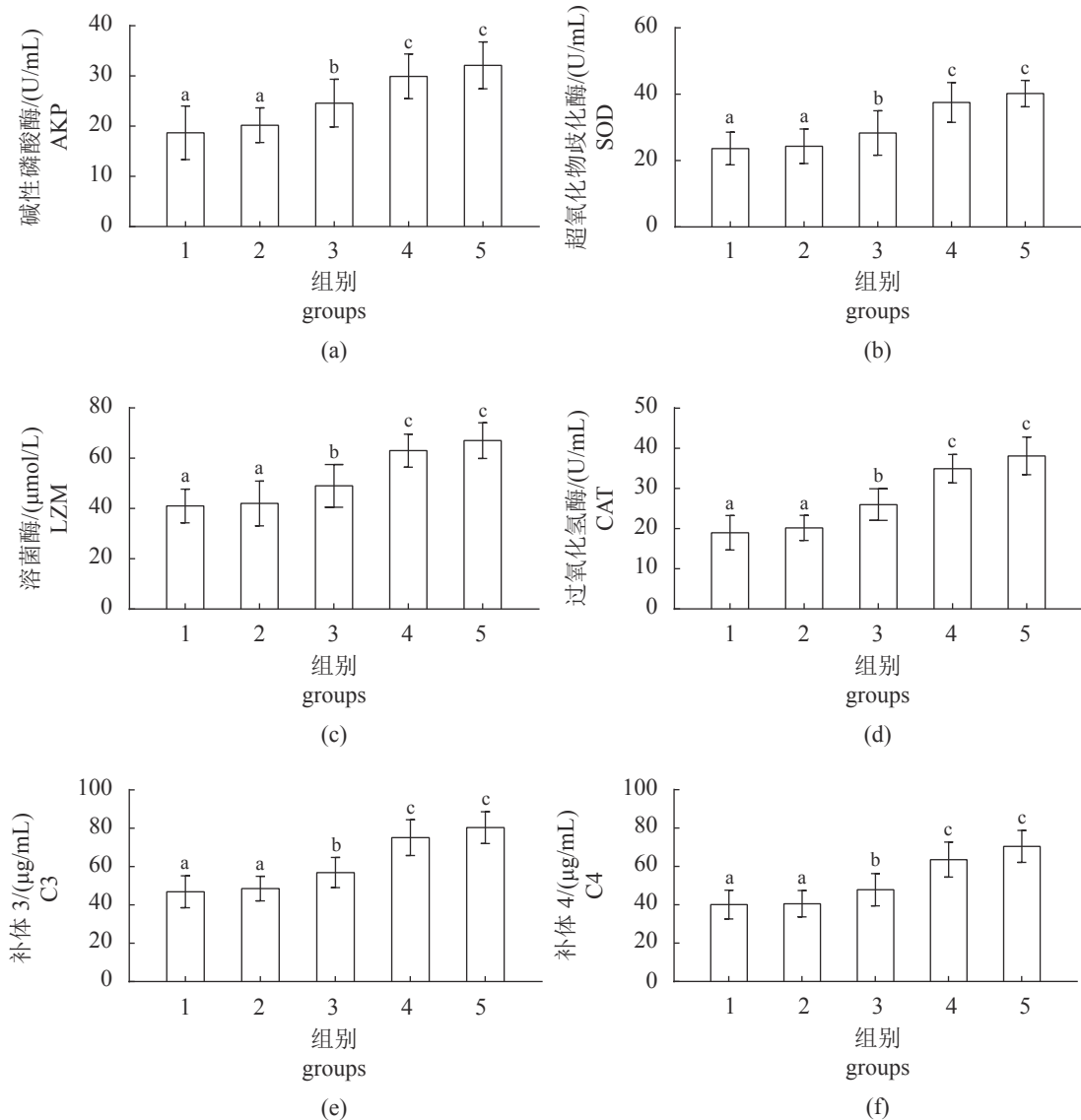


图 5 血清相关免疫指标检测

Fig. 5 Serum related immune index detection

3 讨论

嗜水气单胞广泛存在于淡水、土壤、河流和海水中,对环境具有较强的适应能力,是目前水产养殖中一种常见的致病菌,感染多种水生生物^[23],引起暴发性、传染性疾病,对水产养殖业的发展造成巨大的经济损失。研究发现,其感染的对象不同,临床症状亦不同,如异育银鲫 (*C. auratus gibelio*)、鲇 (*Silurus asotus*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 和西伯利亚鲟 (*A. baerii*) 感染后表现为体表及脏器不同程度地出血和充血等^[24-25];花鲈感染后腹部出现红斑,肛门红肿等;鲇属 (*Silurus*)、鳕属 (*Gadus*) 和虾虎鱼科 (*Gobiidae*) 鱼

类感染后,鱼体表鳞片脱落,出现溃疡,严重者出现溃烂^[26-27]。研究表明其致病性与其携带的多种毒力因子密切相关,主要包括外毒素、胞外蛋白质酶、结构蛋白和信号相关蛋白等。为有效控制嗜水气单胞菌的感染,研制具有针对性、高效性的基因工程类疫苗成为当下研究的热点。

随着基因工程疫苗的深入研究,相关报道表明, OmpA 和 FlaA 具有良好的免疫原性,其在受到刺激时可以引起机体的体液和细胞免疫,对病原体的识别、信号传导及催化具有重要作用^[28-29]。Fang 等^[30] 研究发现,嗜水气单胞菌外膜蛋白可阻断菌株对 EPC 细胞的黏附,表明该蛋白是嗜水气单胞菌共同抗原成分之一。荣娜等^[31] 研究同样表明外膜蛋白具有良好的免疫原性,是构成菌体抗

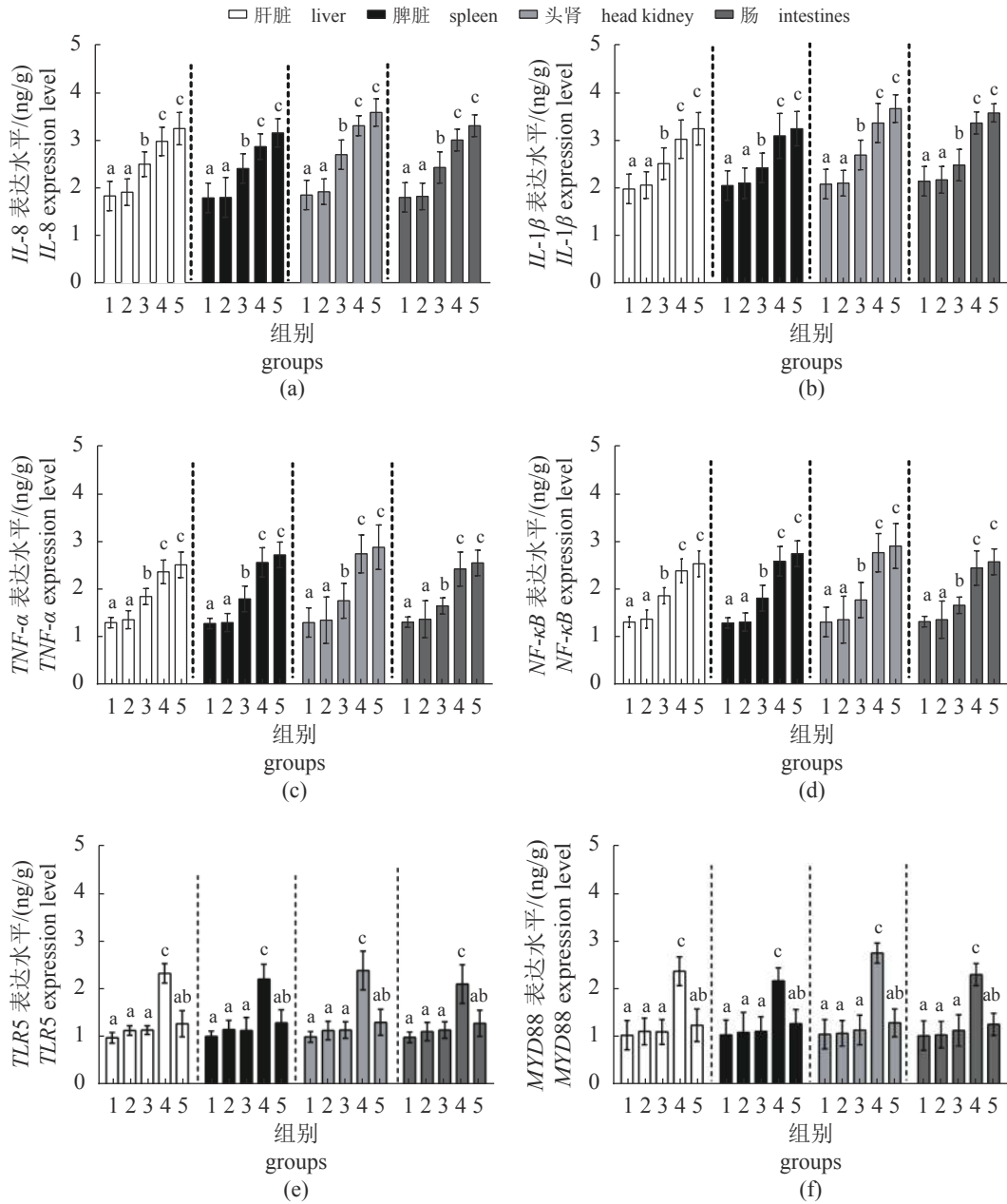


图 6 各组织中细胞免疫因子基因表达量检测

不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 Detection of cytokine genes expression in various tissues

Values with different lowercases letters indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$)

原的重要免疫原。Zhang 等^[32]通过对维氏气单胞菌 (*A. veronii*) *OmpA* I 进行重组乳酸菌的构建及免疫原性分析, 结果显示重组菌可明显提高细胞免疫因子的表达水平, 提高免疫保护率, 说明 *OmpA* I 具有免疫原性。Rabaan 等^[33]研究发现, 气单胞菌缺失鞭毛之后, 体外黏附能力较野生株有明显的衰减, 说明鞭毛蛋白对抵御细菌入侵起重要作用。Huleatt 等^[34]以鞭毛蛋白作为佐剂免疫小鼠 (*Mus musculus*) 后, 产生的抗体水平高于对

对照组, 表明鞭毛蛋白作为外源抗原能够提高机体的免疫应答水平。综上所述, 外膜蛋白和鞭毛蛋白是一种良好的免疫保护性抗原, 在水产基因工程疫苗的研发上有良好的发展前景。

本实验克隆了嗜水气单胞菌的 *ompA* 和 *flaA*, 构建了锚定型重组干酪乳杆菌 Lc-mcs-*ompA* 与 Lc-mcs-*flaA*, 包被基础饲料进行了为期 56 d 的养殖实验, 其生长指标结果显示, 重组干酪乳杆菌组与对照组比较无显著差异, 不影响鲤的生长, 表

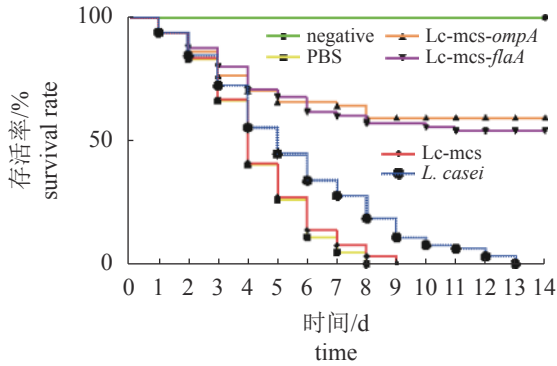


图7 攻毒后免疫保护率

Fig. 7 Immune protection rate after challenge

明重组干酪乳杆菌对鱼类生长无副作用，而干酪乳杆菌组与对照组相比显著提高了鲤的生长性能。Zokaeifar 等^[35]研究表明，2株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的增重率和特定生长率有显著提高，与本结果中干酪乳杆菌组结果相一致。同样蔡怡山等^[36]研究表明，枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 按 2:3:1 或 3:2:1 配比混合使用可以提高直立海马 (*Hippocampus erectus*) 幼苗的生长性能。刘建华等^[37]研究发现，复合益生菌发酵液对仔猪日增重提高 28.6%，仔猪断奶体质量增加 19.3% 等。以上研究结果均与本实验结果一致，但与重组干酪乳杆菌的结果有所出入，推测可能与免疫功能消耗机体的能量有关。

血清中存在多种免疫相关因子，其表达水平与鲤抵抗病原菌入侵的能力呈正相关，因此本研究在饲养免疫结束后检测了鲤血清中相关免疫指标，其中 IgM 为鱼类重要的免疫球蛋白，参与机体多项非特异性免疫，结果显示，重组干酪乳杆菌能显著提高 IgM 的含量，说明其能激活宿主体液免疫，与 Tian 等^[38] 及 Zhang 等^[32] 研究结果相一致。同样 C3、C4 在细菌入侵机体时起到至关重要的清除作用，与白细胞吞噬能力相似；溶菌酶如 SOD、CAT 和 AKP 等通过裂解细菌保护宿主。本研究结果显示，Lc-mcs-ompA、Lc-mcs-flaA 激活 C3、C4、LZM、SOD、CAT 和 AKP 表达的能力显著优于对照组，结果与胡蕾等^[39] 研究中气单胞菌弱毒疫苗能诱导杂交鳢肝脏中 C3 表达量上调相一致。Zhang 等^[32] 将 ompA I 的重组干酪乳杆菌口服免疫鲤，结果显示 AKP、LZM 和 SOD 表达量明显增高。刘小玲等^[40] 研究发现嗜酸乳杆菌能提高吉富罗非鱼 (*O. niloticus* GIFT) 血清中 SOD、

AKP 活性。张晓辉^[41] 研究表明，芽孢杆菌可明显提高凡纳滨对虾免疫因子的表达量。刘淑兰等^[42] 研究表明投喂复合益生菌后大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的消化酶和非特异性免疫指标显著升高，与本研究中干酪乳杆菌能够提高相关免疫因子表达量的结果一致。

为进一步评价重组干酪乳杆菌的免疫效果，实验又对各组织中相关免疫因子进行了荧光定量 PCR 检测。TNF- α 在病原入侵机体时能通过提高体温杀灭病原菌，本研究中 Lc-mcs-flaA 组与 Lc-mcs-ompA 组相较于对照组显著提高了各组织中的 TNF- α 表达量，与 Tian 等^[38] 和 Zhang 等^[32] 研究结果相一致。IL-1 β 是重要炎症因子之一，能够独立杀菌或诱导细胞凋亡，进而达到清除病原的功能，本研究中 Lc-mcs-ompA 与 Lc-mcs-flaA 均能诱导机体产生高水平的 IL-1 β ，并显著高于其他三组，与张东星等^[43] 关于维氏气单胞菌 ompA I 基因重组植物乳杆菌的构建及其表达产物的免疫原性分析结果相似。同样与 Kong 等^[44] 表达维氏气单胞菌 flaB 基因重组干酪乳杆菌的构建及其表达产物的免疫原性分析中免疫指标检测结果相似。实验结果显示，Lc-mcs-ompA 能够诱导 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 和 NF- κ B 更高水平的表达，其原因可能是 OmpA 作为细菌膜上主要蛋白，在机体内有特异性识别受体，能够激活相关免疫通路上调 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 和 NF- κ B。而在各组织中 TLR5 和 MYD 88 的表达量，Lc-mcs-flaA 组显著高于其他组，主要由于 TLR5 是鞭毛蛋白的特异性受体，而鞭毛蛋白激活 TLR5 受体之后促进相关免疫反应，进而分泌 MYD 88。攻毒后 Lc-mcs-ompA 和 Lc-mcs-flaA 相对保护率分别为 59% 和 54%，显著高于对照组和空质粒组，与测定的指标结果相符，同时也表明 2 种重组干酪乳杆菌均有一定保护作用。与 Tian 等^[38]、Zhang 等^[32] 和 Kong 等^[44] 的研究结果相一致，即重组基因工程菌能够提高免疫后鱼体的存活率。尽管 TLR5 是 FlaA 蛋白的特异性受体，其信号传导通路在抗病过程中具有重要作用，但是信号传导的持续会导致各种炎症因子的高表达，导致机体自身免疫紊乱并引发 TLR 相关的免疫疾病^[45]，因此其可能是 Lc-mcs-flaA 较 Lc-mcs-ompA 免疫原性弱的原因之一。

4 结论

本研究通过构建基因工程重组干酪乳杆菌 Lc-

mcs-ompA 和 *Lc-mcs-flaA*, 对鲤进行饲养免疫实验, 在生长指标无显著变化情况下, 其相关免疫指标均呈显著变化, 表明其重组菌能够诱导机体产生较高水平的免疫能力, 提高抵抗细菌入侵的能力, 起到一定的免疫保护作用。本研究结果为水产养殖业疾病防治提供可行的探索方向, 为水产基因工程口服疫苗的研究奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Abbott S L, Cheung W K W, Janda J M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41(6): 2348-2357.
- [2] 田佳鑫, 张冬星, 康元环, 等. 团头鲂致病嗜水气单胞菌的分离鉴定与毒力基因的检测及耐药分析[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(1): 100-108.
- Tian J X, Zhang D X, Kang Y H, et al. Isolation and identification, virulence factor detection and susceptibility test of pathogen *Aeromonas hydrophila* isolated from *Megalobrama amblycephala*[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(1): 100-108 (in Chinese).
- [3] 康元环, 张冬星, 杨滨僮, 等. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(5): 452-459,465.
- Kang Y H, Zhang D X, Yang B T, et al. Latest research progress on *Aeromonas veronii*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(5): 452-459,465 (in Chinese).
- [4] 王安琪, 陶丽竹, 周丰林, 等. 草鱼 miR-462 通过靶向 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 调控嗜水气单胞菌感染诱导的免疫应答[J]. *水产学报*, 2020, 44(9): 1467-1476.
- Wang A Q, Tao L Z, Zhou F L, et al. miR-462 modulates cellular immune response by targeting *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* in CIK cells infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(9): 1467-1476 (in Chinese).
- [5] Guo W, He Q, Wang Z Y, et al. Influence of antimicrobial consumption on gram-negative bacteria in inpatients receiving antimicrobial resistance therapy from 2008–2013 at a tertiary hospital in Shanghai, China[J]. *American Journal of Infection Control*, 2015, 43(4): 358-364.
- [6] Sinclair H A, Heney C, Sidjabat H E, et al. Genotypic and phenotypic identification of *Aeromonas* species and CphA-mediated carbapenem resistance in Queensland, Australia[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016, 85(1): 98-101.
- [7] 赫童, 杨双双, 邓铃俊, 等. 2010—2016年重庆一医院肠道外气单胞菌耐药性分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(6): 653-657.
- He T, Yang S S, Deng L J, et al. Antimicrobial resistance profile of the *Aeromonas* strains isolated from extra-intestinal specimens in a hospital in Chongqing[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2017, 17(6): 653-657 (in Chinese).
- [8] 陈苏芳, 王凤平, 赵静. 嗜水气单胞菌内源性感染菌株的分离与药敏分析[J]. *抗感染药学*, 2012, 9(2): 137-139.
- Chen S F, Wang F P, Zhao J. Analysis of separation and drug susceptibility strains of *Aeromonas hydrophila* endogenous infection[J]. *Anti-Infection Pharmacy*, 2012, 9(2): 137-139 (in Chinese).
- [9] 游忠岚, 陈嵩, 王宇明. 慢性重型肝炎并发嗜水气单胞菌败血症1例[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(3): 206.
- You Z L, Chen S, Wang Y M. A case of chronic severe hepatitis complicated with sepsis of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2008, 30(3): 206 (in Chinese).
- [10] 朱红, 牛红喜, 何春涂. 嗜水气单胞菌性面部蜂窝织炎死亡1例[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2006, 22(8): 703-704.
- Zhu H, Niu H X, He C D. A death case of facial cellulitis caused by *Aeromonas hydrophila*[J]. *China Journal of Leprosy and Skin Diseases*, 2006, 22(8): 703-704 (in Chinese).
- [11] Santos L, Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 52(2): 135-143.
- [12] Collignon P, Beggs J J, Walsh T R, et al. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis[J]. *The Lancet Planetary Health*, 2018, 2(9): e398-e405.
- [13] 任亚林, 李耘, 韩刚, 等. 水产品中嗜水气单胞菌耐药性研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(5): 759-765.
- Ren Y L, Li Y, Han G, et al. Research advances in drug resistance of *Aeromonas hydrophila* in fishery[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(5): 759-765

- (in Chinese).
- [14] 蒋启欢, 叶应旺, 胡王, 等. 嗜水气单胞菌毒力因子及病害控制技术研究进展[J]. *现代农业科技*, 2012(6): 324-327.
- Jiang Q H, Ye Y W, Hu W, *et al.* Research progresses of virulence factors and control technologies in *Aeromonas hydrophila*[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2012(6): 324-327 (in Chinese).
- [15] 葛慕湘, 张文香, 丁咚. 鱼类嗜水气单胞菌致病性与毒力因子相关性研究进展[J]. *科学养鱼*, 2017(10): 59-61.
- Ge M X, Zhang W X, Ding D. Research progress on the correlation between pathogenicity and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish[J]. *Scientific Fish Farming*, 2017(10): 59-61 (in Chinese).
- [16] 李绍戊, 卢彤岩. 嗜水气单胞菌毒力因子研究进展[J]. *水产学杂志*, 2013, 26(5): 61-64.
- Li S W, Lu T Y. Research advances of virulence factors in bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2013, 26(5): 61-64 (in Chinese).
- [17] Chopra A K, Houston C W, Peterson J W, *et al.* Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1993, 39(5): 513-523.
- [18] Qin Y X, Lin G F, Chen W B, *et al.* Flagellar motility is necessary for *Aeromonas hydrophila* adhesion[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 98: 160-166.
- [19] 李雪, 胡秀彩, 兰云, 等. 嗜水气单胞菌粘附素和外膜蛋白A基因克隆与结构预测[J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(1): 29-35.
- Li X, Hu X C, Lan Y, *et al.* Cloning and structure prediction of adhesion gene and outer membrane protein a gene from *Aeromonas hydrophila*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(1): 29-35 (in Chinese).
- [20] Kong Y D, Kang Y H, Tian J X, *et al.* Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flaB confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 627-637.
- [21] Fang H M, Ling K C, Ge R, *et al.* Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesin[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23(2): 137-145.
- [22] 刘晶, 杨桂连, 王春风, 等. 乳酸菌作为DNA疫苗载体的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(7): 67-69.
- Liu J, Yang G L, Wang C F, *et al.* Research progress of lactic acid bacteria as DNA vaccine carriers[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(7): 67-69 (in Chinese).
- [23] 周宇, 周秋白. 嗜水气单胞菌防控技术研究进展[J]. *生物灾害科学*, 2012, 35(2): 126-133, 141.
- Zhou Y, Zhou Q B. A review of the method in prevent and control the harm of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Biological Disaster Science*, 2012, 35(2): 126-133, 141 (in Chinese).
- [24] Yu J H, Han J J, Kim H J, *et al.* First report of *Aeromonas veronii* infection in farmed Israeli carp *Cyprinus carpio* in Korea[J]. *Journal of Fish Pathology*, 2010, 23(2): 165-176.
- [25] Goldschmidt - Clermont E, Wahli T, Frey J, *et al.* Identification of bacteria from the normal flora of perch, *Perca fluviatilis* L., and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(5): 353-359.
- [26] Guzman-Murillo M A, Ascencio F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 30(6): 473-478.
- [27] Kamilya D, Baruah A. Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish: history and current status of understanding[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2014, 24(1): 369-380.
- [28] Jang M J, Kim J E, Chung Y H, *et al.* Dendritic cells stimulated with outer membrane protein A (OmpA) of *Salmonella typhimurium* generate effective anti-tumor immunity[J]. *Vaccine*, 2011, 29(13): 2400-2410.
- [29] Qin Y X, Lin G f, Chen W B, *et al.* Flagellar motility contributes to the invasion and survival of *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla japonica* macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 273-279.
- [30] Fang H M, Ge R W, Sin Y M. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(5): 645-658.
- [31] 荣娜, 简思杰, 孙薇, 等. 鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白ToIC的原核表达及抗原性分析[J]. *河南农业科学*, 2021, 50(3): 157-164.
- Rong N, Jian S J, Sun W, *et al.* Prokaryotic expression and antigenicity analysis of outer membrane protein

- ToIC of fish pathogenic *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(3): 157-164 (in Chinese).
- [32] Zhang D X, Kang Y H, Chen L, *et al.* Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing *OmpAI* confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 552-563.
- [33] Rabaan A A, Gryllos I, Tomás J M, *et al.* Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(7): 4257-4267.
- [34] Huleatt J W, Nakaar V, Desai P, *et al.* Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin[J]. Vaccine, 2008, 26(2): 201-214.
- [35] Zokaiefar H, Balcázar J L, Saad C R, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 683-689.
- [36] 蔡怡山, 张东, 刘鑫, 等. 不同配比复合益生菌对灰海马幼苗存活、生长及免疫的影响[J]. 海洋渔业, 2020, 42(3): 365-374.
- Cai Y S, Zhang D, Liu X, *et al.* Effects of three probiotics in different proportions on survival, growth and immune response of *Hippocampus erectus* juveniles[J]. Marine Fisheries, 2020, 42(3): 365-374 (in Chinese).
- [37] 刘建华, 徐磊, 梁正. 饲喂复合益生菌发酵液对哺乳母猪生产性能的影响[J]. 当代畜禽养殖业, 2019(2): 5.
- Liu J H, Xu L, Liang Z. The effect of feeding compound probiotic fermentation broth on the production performance of lactating sows[J]. Modern Livestock and Poultry Breeding Industry, 2019(2): 5 (in Chinese).
- [38] Tian J X, Kang Y H, Chu G S, *et al.* Oral administration of *Lactobacillus casei* expressing flagellin a protein confers effective protection against *Aeromonas veronii* in common carp, *Cyprinus carpio*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 21(1): 33.
- [39] 胡蕾, 刘礼辉, 杨圆圆, 等. 杂交鳢舒伯特气单胞菌弱毒疫苗候选株筛选及其免疫效果评价[J]. 淡水渔业, 2019, 49(5): 74-79.
- Hu L, Liu L H, Yang Y Y, *et al.* Screening and immune efficacy evaluation of attenuated vaccine candidate strains of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(5): 74-79 (in Chinese).
- [40] 刘小玲, 曹俊明, 邝哲师, 等. 嗜酸乳杆菌对吉富罗非鱼生长、非特异性免疫酶活性和肠道菌群的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(1): 123-126.
- Liu X L, Cao J M, Kuang Z S, *et al.* Effect of dietary *Lactobacillus* on growth performance, non-specific immune enzymes activities and intestinal microflora of *Oreochromis niloticus* GIFT[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(1): 123-126 (in Chinese).
- [41] 张晓辉. 益生菌对凡纳滨对虾免疫力影响[J]. 海洋与渔业, 2020(5): 71-72.
- Zhang X H. The effect of probiotics on the immunity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Ocean and Fishery, 2020(5): 71-72 (in Chinese).
- [42] 刘淑兰, 陈娟, 李杰, 等. 复合益生菌制剂对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 生长、消化酶和非特异性免疫指标的影响[J]. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 100-106.
- Liu S L, Chen J, Li J, *et al.* Effects of complex-probiotic-preparation on the growth, digestive enzymes and the nonspecific immune indices of atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(5): 100-106 (in Chinese).
- [43] 张冬星, 康元环, 田佳鑫, 等. 维氏气单胞菌 *OmpA* I 基因重组植物乳杆菌的构建及其表达产物的免疫原性分析[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(2): 227-234.
- Zhang D X, Kang Y H, Tian J X, *et al.* Construction and immunogenicity analysis of recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing *OmpA* I gene of *Aeromonas veronii*[J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(2): 227-234 (in Chinese).
- [44] Kong Y D, Li M, Tian J X, *et al.* Effects of recombinant *Lactobacillus casei* on growth performance, immune response and disease resistance in crucian carp, *Carassius auratus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 99: 73-85.
- [45] 范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展[J]. 水生生物学报, 2015, 39(1): 173-184.
- Fan Z J, Zou P F, Yao C L. Toll-like receptors (TLR) and its signaling pathway in teleost[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 173-184 (in Chinese).

Effects of recombinant *Lactobacillus casei* from *Aeromonas hydrophila* *ompA* and *flaA* genes on the growth and immunity in common carp (*Cyprinus carpio*)

ZHAO Linhui^{1,2,3,4}, TIAN Jiabin^{2,3,4}, KONG Yidi^{2,3,4}, PENG Sibao^{1,2,3,4},
SHAN Xiaofeng⁴, WANG Guiqin^{2,3,4*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Joint Laboratory of Modern Agricultural Technology International Cooperation, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Ministry of Education Laboratory of Animal Production and Quality Security, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

4. Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To construct recombinant *Lactobacillus casei* with *ompA* and *flaA* of *Aeromonas hydrophila* and to detect the growth and immunogenicity of their expression products to common carp, *Cyprinus carpio*, the target genes were cloned into *Lactobacillus* Shuttle expression plasmid pPG612, and electric-transferred into *L. casei*. Fish were fed with dietary mixed with different recombinant *L. casei* for 56 days, and we weighed and collected serum and tissues, and analyzed the growth and related immune index changes; feeding at 56 days after the immunization, the growth index results showed that the recombinant *L. casei* had no significant difference compared with the control group, which showed that it had no effect on growth, immune indexes. Results showed that level of IgM in serum was significantly increased, alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LZM), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Complement 3 (C3) and Complement 4 (C4) were also significantly increased, qRT-PCR detection found that the expression levels of Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), Toll-like receptor 5 (TLR) and myeloid differentiation factor 88 (MYD88) in liver, spleen, kidney and intestinal tissues after immunization increased significantly to varying degrees; the expression of TLR5 in the *Lc-mcs-flaA* group was higher than that in *Lc-mcs-ompA* groups; after challenge, the immune protection rates of *Lc-mcs-ompA* and *Lc-mcs-flaA* were 59% and 54%, respectively, and the survival rate was significantly higher than control group. The constructed recombinant *L. casei* *Lc-mcs-ompA* and *Lc-mcs-flaA* immuned carp could stimulate the body to activate immune response, thereby increasing its survival rate. It is an oral solution for preventing fish *Aeromonas hydrophila* infection. The research and development of immune preparations laid the foundation and provided scientific theoretical basis.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Aeromonas hydrophila*; *flaA*; *ompA*; recombinant *Lactobacillus casei*; growth and immunity

Corresponding author: WANG Guiqin. E-mail: wgqjlau2019@sina.com

Funding project: China Agriculture Research System(CARS-46); National Natural Science Foundation of China (31372540)