



杀鲑气单胞菌灭活疫苗的制备及其在大菱鲆体内的免疫效果

郭慧敏, 丁圆媛, 王昊, 郑旭佳, 修云吉, 周顺*

(青岛农业大学海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266200)

摘要: 为了预防大菱鲆疥疮病, 本研究将杀鲑气单胞菌菌株 HHSM1905 经甲醛灭活制备成灭活疫苗, 通过腹腔注射途径免疫健康大菱鲆; 对免疫后大菱鲆血清抗体效价、血清溶菌酶 (LZM) 活性、酸性磷酸酶 (ACP) 活性及疫苗保护率进行测定; 以 β -actin 为内参, 对免疫相关基因 (*IL-1 β* 、*TLR-5*、*MHC I*、*MHC II- α* 、*CD4*) 表达情况进行定量 PCR 分析。结果显示, 在免疫后 2 周时, 疫苗组血清抗体效价显著高于对照组并达到最大值; 疫苗组 LZM 活性在免疫 2 周时达到峰值, 4 周时仍与对照组保持显著差异; 疫苗组 ACP 活性在免疫后的 2 周达到峰值, 与对照组差异显著; 灭活疫苗相对保护率 (RPS) 为 72.72%。免疫组与对照组相比, *IL-1 β* 、*TLR-5*、*MHC I*、*MHC II- α* 、*CD4* 的表达量均呈上调趋势, 与对照组差异显著。本研究成功制备了大菱鲆用杀鲑气单胞菌灭活疫苗, 其对大菱鲆疥疮病能够起到一定的预防作用, 可为大菱鲆养殖过程中疾病预防提供新方法。

关键词: 大菱鲆; 杀鲑气单胞菌; 疥疮病; 灭活疫苗

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 原产于大西洋东北沿岸, 在中国称为“多宝鱼”, 是一种极具经济价值的冷水性鱼类^[1-2], 于 1992 年从英国引进。其在国内的养殖区域首先从山东开始, 迅速扩大至河北、辽宁、天津、江苏和福建等省份, 养殖规模不断扩大, 成为我国北方沿海的重要养殖品种。随着大菱鲆养殖集约化程度不断提高、养殖密度日益加大, 大菱鲆病害频发, 各种病毒性、细菌性和寄生虫病的报道日渐增多, 其中疥疮病病害尤为严重^[3]。1992 年杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 首次从西班牙某养殖场的患病大菱鲆体内分离到, 随后类似病例相继在丹麦^[4]、挪威^[5] 和中国^[6] 等地被报道, 杀鲑气单胞菌病的暴发给大菱鲆养殖业造成了重大经济损失。

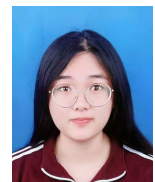
杀鲑气单胞菌属于气单胞菌属 (*Aeromonas*), 革兰氏阴性短杆菌, 为已知最古老的鱼类病原体之一^[7-8]。杀鲑气单胞菌主要分为 5 个亚种, 分别为典型亚种: 杀鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*); 非典型杀鲑气单胞菌: 溶果胶亚种 (*A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*)、杀日本鲑亚种 (*A. salmonicida* subsp. *masoucida*)、无色亚种 (*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*) 以及史氏亚种 (*A. salmonicida* subsp. *smithia*)^[9]。目前杀鲑气单胞菌几乎在世界各地的淡水和海洋水域流行, 在池塘水质恶化、养殖对象体质下降时极易诱发疾病, 给水产养殖带来重大损失^[10-11]。杀鲑气单胞菌主要会导致鱼类感染处皮肤严重溃烂, 即疥疮病, 甚至还会出现口腔出血, 鳍部边缘溃烂等症状。国内鱼类大部分细菌病的治疗以抗生

收稿日期: 2021-06-30 修回日期: 2021-08-16

资助项目: 山东省现代农业产业技术体系鱼类产业创新团队 (SDAIT-12-06); 山东省 2018 年度农业重大应用技术创新项目

第一作者: 郭慧敏 (照片), 从事海水鱼类疾病防控研究, E-mail: 2411345806@qq.com

通信作者: 周顺, E-mail: zhoushun@qau.edu.cn



素为主^[12], 但抗生素等化学药物的使用会引起抗药菌株的产生, 并导致药物残留以及水环境污染。实践表明, 疫苗接种在水产病害防控中发挥了无可替代的作用^[13], 其中灭活疫苗制备简单、安全性高, 具备开发优势。

针对大菱鲆养殖中疔疮病常发且危害严重的现状, 本实验利用从患病大菱鲆体内分离到的杀鲑气单胞菌制备了杀鲑气单胞菌灭活疫苗, 通过对大菱鲆的免疫与攻毒实验进行免疫效果评价, 以期进一步为杀鲑气单胞菌灭活疫苗的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杀鲑气单胞菌无色亚种(编号: HHSM1905), 保存于本实验室。大菱鲆购自烟台海阳市某养殖场, 选择体质量为(30±5)g、体长为(8±2)cm的大菱鲆, 实验前暂养7d, 确认健康。

甲醛、三氯甲烷、异丙醇为国产分析纯, 酸性磷酸酶(ACP)检测试剂盒与溶菌酶(LZM)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 人工感染实验

将接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB培养基)内的菌株划线分离单菌落, 挑取单菌落接种于新的TSB液体培养基, 放入摇床, 200 r/min, 28℃下恒温培养18h。感染实验分为空白组与注射组, 注射组分别设立5个浓度梯度(1.14×10⁵、1.14×10⁶、1.14×10⁷、1.14×10⁸和1.14×10⁹CFU/mL)。将培养的菌液离心并使用无菌磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬3次, 最后1次重悬至指定浓度, 以腹腔注射的方式感染大菱鲆。注射组每个浓度梯度设置12尾鱼, 每尾鱼注射100 μL菌悬液; 空白组设置12尾鱼, 每尾鱼注射100 μL无菌PBS。每天正常投喂、换水, 随时观察记录发病及死亡情况。对濒死的大菱鲆进行病原菌分离与鉴定, 并计算出菌株HHSM1905对大菱鲆的半致死浓度(LD₅₀)。

1.3 灭活疫苗的制备

将接种于TSB液体培养基的HHSM1905菌株28℃下振荡培养24h(200 r/min), 5 000×g离心15 min, 弃上清液, 无菌PBS清洗沉淀3次并重悬, 使菌体浓度约为1×10⁹ CFU/mL, 加入

0.5% 甲醛(V/V, 体积分数)4℃处理24h, 取小部分进行平板涂布培养检测无活菌后, 用无菌PBS离心清洗3次去除甲醛, 平板涂布检验无污染后即杀鲑气单胞菌灭活疫苗, 将灭活疫苗与Montanide™ ISA 763 A VG佐剂按比例3:7(体积比)混合均匀, 储存于4℃冰箱备用。

1.4 灭活疫苗安全性检测

取10尾健康无病大菱鲆饲养1周后, 每尾鱼接种100 μL杀鲑气单胞菌灭活疫苗, 同时设置注射同等剂量的无菌PBS的10尾大菱鲆为对照, 保持供氧并每天换水, 正常投喂饲料, 1周后观察是否有死亡情况。

1.5 灭活疫苗免疫大菱鲆

实验用大菱鲆养殖于山东海阳某养殖场中, 随机抽取5尾大菱鲆解剖检查, 对肝脏、肾脏等组织进行平板划线, 检验其是否受到病菌感染。大菱鲆连续充气暂养1周后用于实验。将健康的大菱鲆随机分为免疫组与对照组, 每组各150尾鱼。实验采用的免疫方式为腹腔注射, 免疫组每尾鱼分别注射0.1 mL的灭活疫苗; 对照组注射0.1 mL的无菌PBS。

1.6 溶菌酶与酸性磷酸酶的活性测定

在免疫大菱鲆后的第0、1、2、3、4周, 每周分别从免疫组和对照组随机取9尾鱼(每个时间点3个生物学重复, 每个重复3尾鱼)进行血液采样。将血液在室温下静置2h后, 4℃, 3 000×g离心15 min, 取上清液-80℃保存。按照试剂盒(南京建成生物工程研究所)的相应步骤, 测定血清中溶菌酶与酸性磷酸酶的活性。

1.7 抗体效价的检测

血清抗体水平由凝集法检测, 使用倍比稀释法将0.1 mL待检血清样本用无菌PBS稀释至第12管, 每管0.5 mL, 并在所有管中分别加入用无菌PBS洗涤稀释的HHSM1905菌液(1×10⁸ CFU/mL)0.5 mL。吹打混匀后将试管置于37℃恒温培养箱孵育2h后显微镜下观察凝集反应。每组均设置阴性对照, 且重复3次, 效价值以log₂N(N为最大稀释倍数)表示。

1.8 大菱鲆免疫基因表达变化测定

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检

测免疫基因在对照组与免疫组不同时间点的表达变化。于免疫后 0、1、2、3、4 周分别从免疫组与对照组取大菱鲆肝脏、脾脏和肾脏组织, 每组每次分别随机取 3 个生物学重复, 每个重复 3 尾鱼。参考 TransZol up(TransGen) 说明书提取组织的 RNA, 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 完整性, 并使用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度和 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比率。检测结果较好的 RNA 反转录为 cDNA, 以其为模板进行 qRT-PCR 扩增, 每个样品设 3 个平行。使用 NCBI Primer 针对不同的 6 对基因进行 qRT-PCR 引物设计, 分别为 β -actin、白细胞介素-1 β 基因 (interleukin-1 β 、*IL-1 β*)、Toll-like 受体 5 基因 (Toll-like receptor 5、*TLR-5*)、主要组织相容性复合体 I 基因 (major histocompatibility complex I、*MHC I*)、主要组织相容性复合体 II- α 基因 (major histocompatibility complex II- α 、*MHC II- α*)、白细胞分化抗原 4 基因 (cluster of differentiation 4、*CD4*) (表 1), 引物由青岛派森诺生物有限公司合成。以 β -actin 为内参基因, 计算在 5 个时间点 (0~4 周) 免疫组与对照组的免疫相关基因表达量。

1.9 免疫保护率测定

免疫第 29 天进行攻毒实验。HHSM1905 菌液经过离心后用无菌 PBS 重悬至半致死浓度, 免疫组和对照组分别取 20 尾大菱鲆, 每尾大菱

表 1 基因克隆和表达所用引物

Tab. 1 Primers for gene cloning and expression	
引物 primer	引物序列 (5'~3') sequence (5'~3')
<i>IL-1β-F</i>	CGCTTCCCCAACTGGTACAT
<i>IL-1β-R</i>	ACCTTCCACTTTGGGTCGTC
<i>TLR-5-F</i>	CGGCCTCAGTATAAGCTCCA
<i>TLR-5-R</i>	GGGGAGGCTAGGAAGTTGTT
<i>MHC I-F</i>	TGCTGAGAAAGCTCGACTCAC
<i>MHC I-R</i>	CTCGCCCCAAAGTTCACGTA
<i>MHC II-α-F</i>	ACTGGACTTCACCCACAGT
<i>MHC II-α-R</i>	CATCAACCAATCAGCTGCACTC
<i>CD4-F</i>	ACATACCAATCCGTGGCGAG
<i>CD4-R</i>	GAAATCGCGTCGGACGATCA
β -actin-F	AATGAGCTGAGAGTTGCCCC
β -actin-R	AGCTTGGATGGCAACGTACA

鲆注射 0.1 mL 菌液。观察 2 组大菱鲆发病情况与症状, 统计累计死亡率, 并计算灭活组疫苗相对保护率 (RPS, %)。

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

1.10 数据分析

实验结果用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示, 数据采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 半致死浓度测定

人工感染实验中患病鱼主要表现为进食减少、部分病鱼鳍部、吻部出血, 解剖后肠内有白便。发病的鱼体中分离到的菌株分子鉴定结果与感染用菌株一致, 说明杀鲑气单胞菌 HHSM1905 为实验的致病菌株。

到 14 d 死亡数目稳定时, 注射浓度 10 倍梯度稀释后的死亡率分别为 100%、91.7%、66.7%、8.3% 和 0, 而空白组大菱鲆无一例死亡 (表 2)。由此计算出 HHSM1905 菌株对大菱鲆的半致死剂量 LD_{50} 为 2.63×10^6 CFU/mL。

表 2 人工感染健康大菱鲆结果

Tab. 2 Artificially infected healthy <i>S. maximus</i> results		
组别 groups	死亡数目/尾 number of deaths	死亡率/% mortality
1.16×10^9 CFU/mL	12	100.0
1.16×10^8 CFU/mL	11	91.7
1.16×10^7 CFU/mL	8	66.7
1.16×10^6 CFU/mL	1	8.3
1.16×10^5 CFU/mL	0	0
空白组 blank group	0	0

2.2 疫苗安全性检测

1 周内, 观察疫苗接种后大菱鲆的情况, 结果发现进食活动正常, 未出现死亡或腹水、疥疮等症状, 与 PBS 对照组大菱鲆无差异, 表明杀鲑气单胞菌灭活疫苗对于大菱鲆无危险, 可以应用于大菱鲆免疫保护实验。

2.3 溶菌酶与酸性磷酸酶的活性

溶菌酶活性测定 根据公式, 计算出免疫组与对照组溶菌酶 LZM 数值, 得出了各组

LZM 活性变化趋势 (图 1)。大菱鲂进行免疫后, 免疫组血清中 LZM 活性在 1 周时迅速上升, 在免疫后 2 周活性达到最高 (66.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$), 显著高于对照组, 直至 4 周时仍然显著高于对照组 LZM 水平; 而对照组血清中 LZM 无显著上调, 变化不显著。

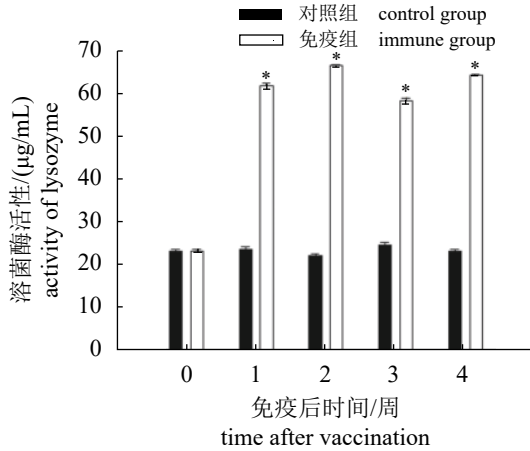


图 1 疫苗免疫后大菱鲂血清溶菌酶活性随时间变化趋势

*表示对照组 0 周和疫苗组 0 周与其他组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Lysozyme activity in serum of *S. maximus* after vaccination

* indicates significant difference between the control group (0 week), the vaccine group (0 week) and other groups ($P < 0.05$), the same below

酸性磷酸酶测定 对大菱鲂进行疫苗注射后, 免疫组血清 ACP 活性开始逐渐上调 ($P < 0.05$), 在免疫后 2 周达到最高水平 8.58 (U/100 mL)。伴随着免疫时间延长, 免疫组血清 ACP 活性仍然显著高于对照组; 对照组血清中 ACP 活性无明显变化, 且一直处于较低的水平(图 2)。

2.4 大菱鲂血清抗体效价的测定

大菱鲂免疫疫苗或 PBS 后, 在第 0~4 周血液抗体效价水平如图 3 所示。对照组的抗体效价在 4 个时间点无显著变化, 而免疫组中抗体效价呈现升高的趋势, 其中在第 2 周呈现最高的抗体效价 1 : 2¹¹ ($P < 0.05$)。之后抗体水平略有降低, 至第 4 周时仍能检测到特异性抗体效价为 1 : 2¹⁰。

2.5 大菱鲂免疫相关基因 mRNA 表达水平的检测结果

IL-1 β 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达 在免疫后, 免疫组 IL-1 β 在肝脏、脾脏、肾脏组织

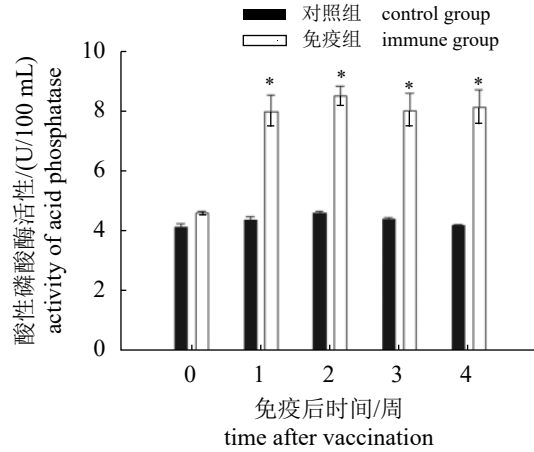


图 2 疫苗免疫后大菱鲂血清酸性磷酸酶活性随时间变化趋势

Fig. 2 Change trend of serum acid phosphatase (ACP) content with time after immunization in *S. maximus*

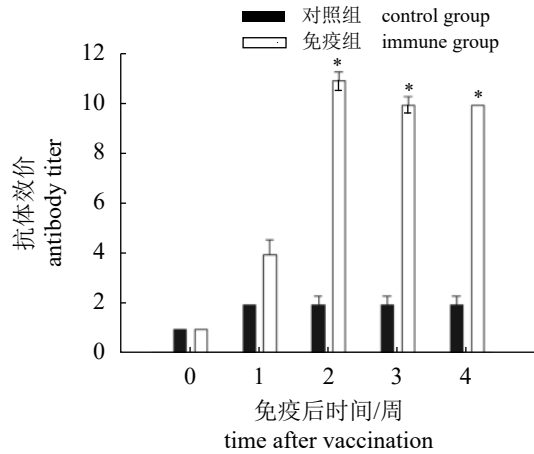


图 3 疫苗免疫后大菱鲂血清抗体效价随时间变化趋势

Fig. 3 Change trend of serum complement C3 concentration with time after immunization in *S. maximus*

中的表达量均有上调趋势(图 4)。肝脏中, 免疫组 IL-1 β 的表达量在 1 周时显著高于对照组并达到最大值, 是对照组的 4.04 倍 ($P < 0.05$), 到第 4 周时免疫组表达量仍高于对照组; 脾脏中, 免疫组 IL-1 β 的表达量在第 4 周达到最大值, 是对照组的 3.59 倍; 肾脏中, 免疫组 IL-1 β 的表达量在第 2 周达到最大值, 是对照组的 19.31 倍, 到第 3 周时免疫组与对照组无显著差异。

TLR-5 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达 免疫组 TLR-5 在肝脏、脾脏、肾脏组织中的表达量均有上调(图 5)。肝脏中, 免疫组 TLR-5 的表达量高于对照组并在第 3 周达到最大值, 是对照组的 3.87 倍, 之后到第 4 周时免疫组表达量仍显

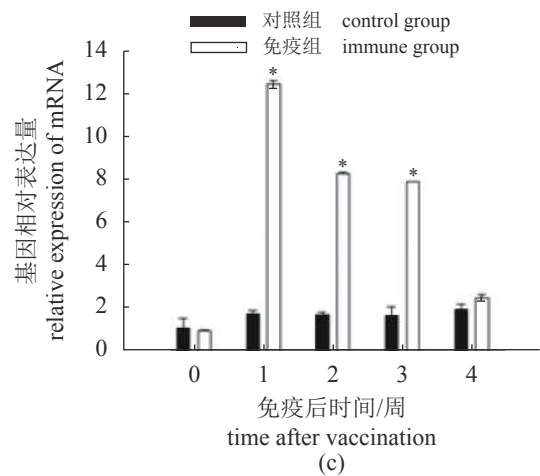
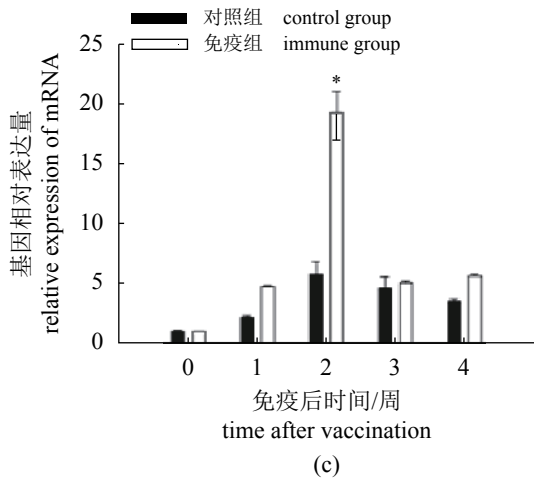
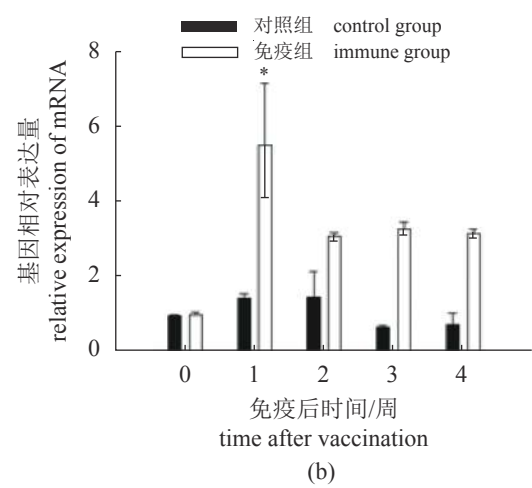
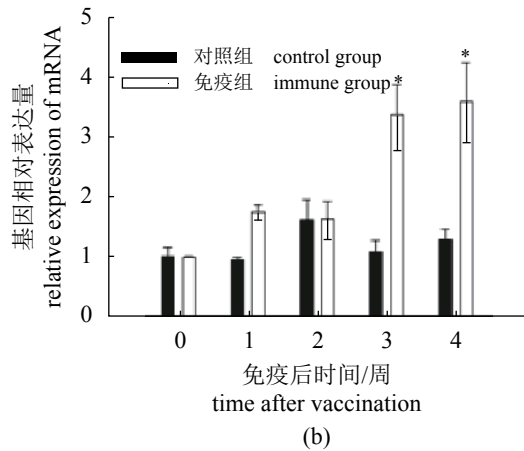
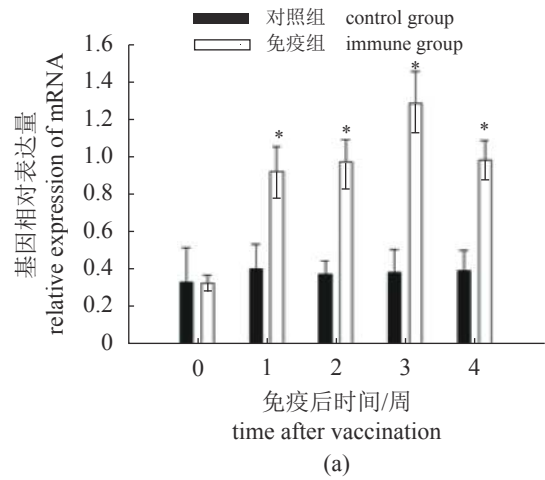
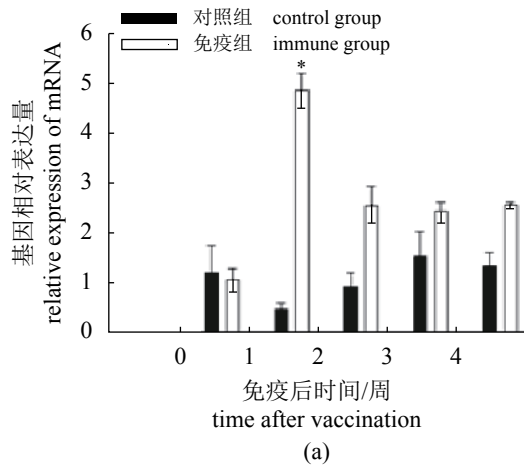


图 4 疫苗免疫后 5 个时间点对照组和疫苗组的 *IL-1β* 表达情况

(a) 肝脏、(b) 脾脏、(c) 肾脏；下同

Fig. 4 Expression of *IL-1β* at 5 time points after vaccination

(a) liver, (b) spleen, (c) kidney; the same below

显著高于对照组；脾脏中，免疫组 *TLR-5* 的表达量在第 1 周时显著高于对照组，是对照组的 5.53 倍；肾脏中，免疫组 *TLR-5* 的表达量在第 1

图 5 疫苗免疫后 5 个时间点对照组和疫苗组的 *TLR-5* 基因表达情况

Fig. 5 Expression of *TLR-5* at 5 time points after vaccination

周时显著高于对照组，是对照组表达量的 10.90 倍 ($P < 0.05$)。

MHC I 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达 在第 1 周时，免疫组 *MHC I* 在肝脏、脾脏和肾脏

组织中的表达量同时达到最高值 ($P<0.05$), 肝脏中表达量是对照组的 169.04 倍, 脾脏中表达量是对照组的 126.68 倍, 肾脏中表达量是对照组的 4.04 倍。到第 4 周时, 免疫组 *MHC I* 表达量仍显著高于对照组 (图 6)($P<0.05$)。

MHC II-α 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达

肝脏中, 免疫组 *MHC II-α* 的表达量在第 1 周时显著高于对照组, 并在第 4 周达到最大值, 是对照组的 4.61 倍 (图 7); 脾脏中, 免疫组 *MHC II-α* 的表达量在第 2 周时高于对照组并达到最大值, 是对照组的 2.23 倍 ($P<0.05$), 在第 3 周时表达量下降, 与对照组无显著差异; 肾脏中, 免疫组 *MHC II-α* 的表达量在第 2 周时达到最大值, 是对照组的 2.31 倍 ($P<0.05$)。

CD4 在肝脏、脾脏和肾脏中的表达

肝脏中, 免疫组 *CD4* 的表达量在第 1 周达到最大值, 是对照组的 3.71 倍 ($P<0.05$); 脾脏中, 免疫组 *CD4* 的表达量在第 2 周达到最大值, 是对照组的 4.19 倍 ($P<0.05$), 之后表达量下降, 第 3 周时与对照组无显著差异; 肾脏中, 免疫组 *CD4* 的表达量自 2 周后高于对照组并达到最大值, 是对照组的 4.37 倍, 在第 4 周时仍显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 8)。

2.6 免疫保护率

免疫后的第 29 天, 用杀鲑气单胞菌 HHSM1905 的半致死浓度进行大菱鲆攻毒感染实验, 对照组在第 4 天开始出现死亡, 免疫组在第 5 天出现死亡。在攻毒后 14 d 内, 免疫组存活 17 尾, 对照组存活 9 尾 (图 9)。结果表明, 接种杀鲑气单胞菌灭活疫苗的免疫组获得的抗杀鲑气单胞菌相对免疫保护率为 72.72 %。

3 讨论

本研究利用一株从患疥疮病的大菱鲆体内分离得到的杀鲑气单胞菌无色亚种 HHSM1905, 通过人工感染实验获得 HHSM1905 的半致死浓度为 2.63×10^6 CFU/mL, 以此为基础制备灭活疫苗免疫健康大菱鲆, 检测血清中非特异性免疫指标、抗体效价、相对免疫保护率及部分免疫基因表达变化, 以此评价疫苗保护效果。

鱼类抵御病原体的首道防线由非特异性免疫系统构建, 溶菌酶活性是该系统的一个重要

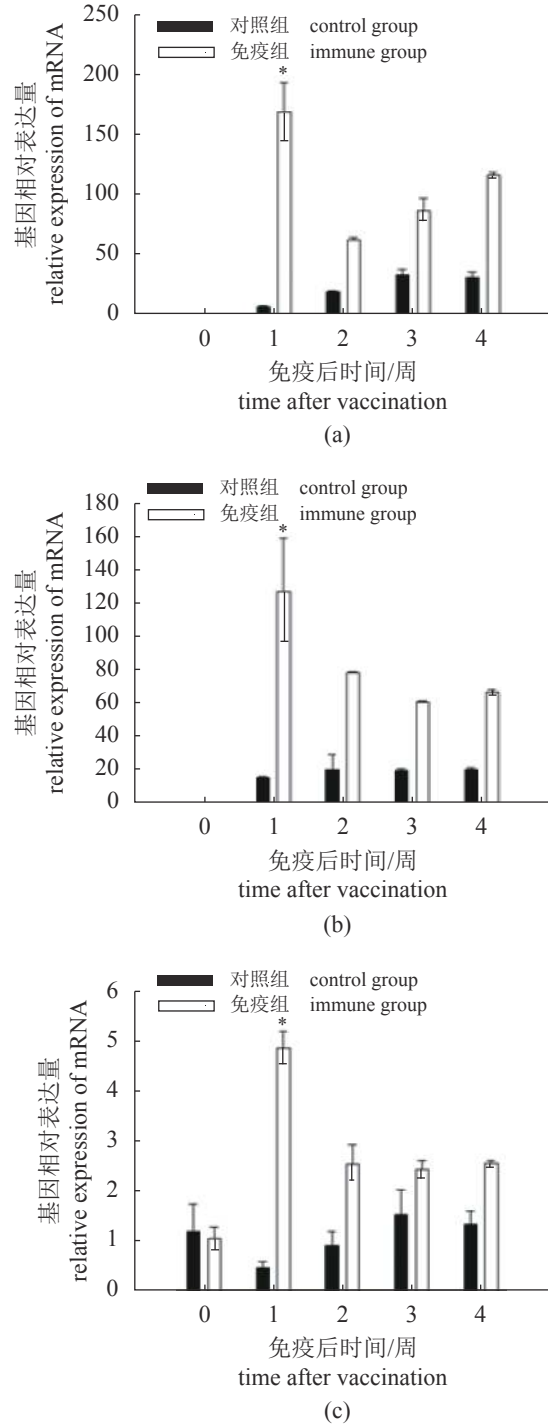


图 6 疫苗免疫后 5 个时间点对照组和疫苗组的 *MHC I* 表达情况

Fig. 6 Expression of *MHC I* at 5 time points after vaccination

体液成分。溶菌酶在病原菌感染或其他外来抗原物质胁迫时含量会明显增加, 对检测鱼类免疫状态有重要意义。因此, 溶菌酶活性是量化水产动物免疫反应强弱的指标之一。本实验中,

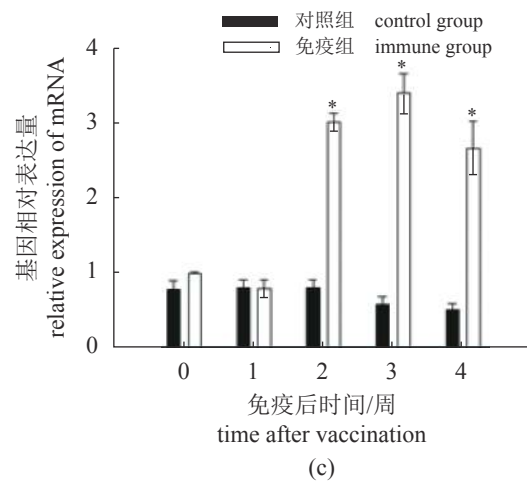
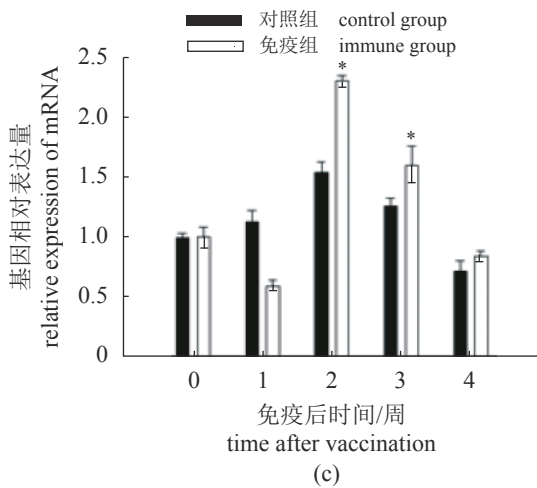
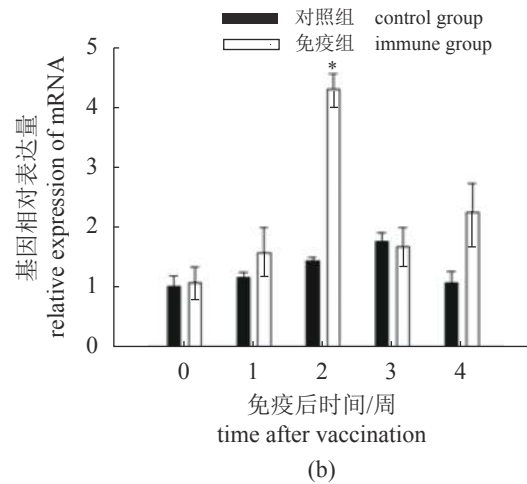
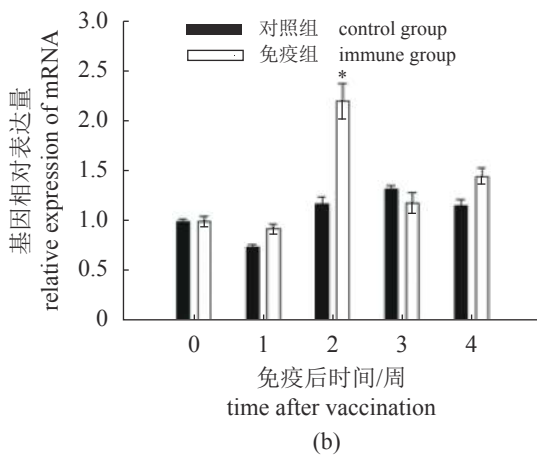
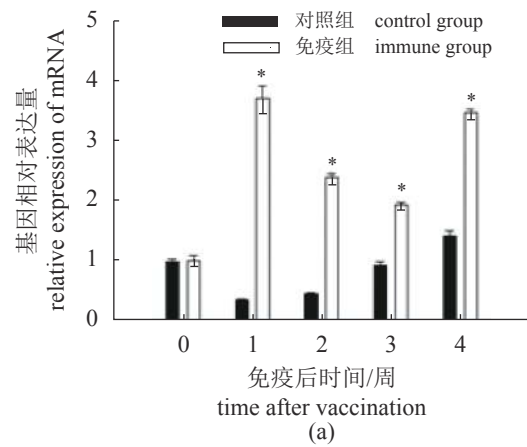
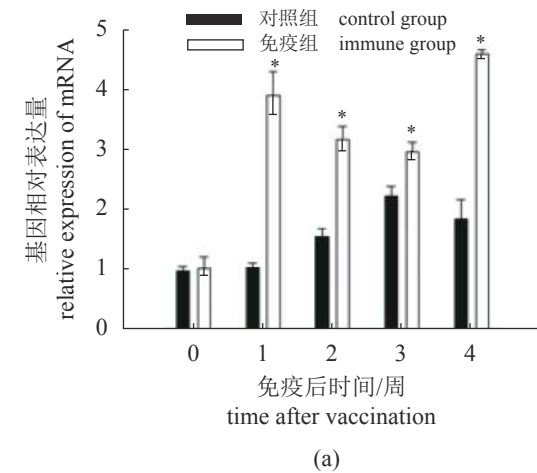


图7 疫苗免疫后5个时间点对照组和免疫组的 *MHC II-α* 表达情况

Fig. 7 Expression of *MHC II-α* at 5 time points after vaccination

免疫后大菱鲆血清溶菌酶活性显著升高，至第4周时仍显著高于对照组。酸性磷酸酶是一种在酸性条件下催化水解磷酸单酯的水解酶，是巨噬细胞溶酶体的标志酶^[14]，能够广泛参与机体免

图8 疫苗免疫后5个时间点对照组和免疫组的 *CD4* 表达情况

Fig. 8 Expression of *CD4* at 5 time points after vaccination

疫反应。周勇等^[15]使用嗜水气单胞菌灭活疫苗腹腔注射射史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*)，在免疫后14 d 酸性磷酸酶活性达到峰值，与对照组呈现显

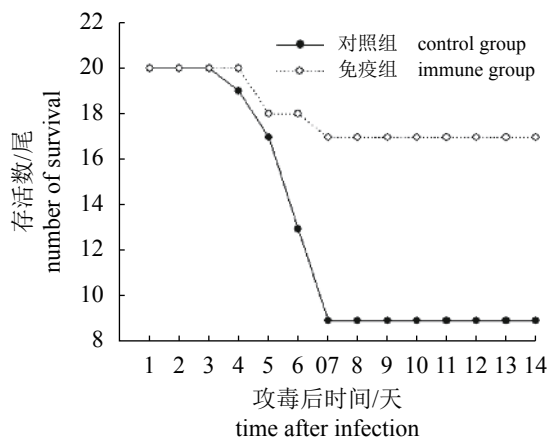


图9 感染后大菱鲆存活数目曲线图

Fig. 9 Survival curve of *S. maximus* after infection

著差异。与周勇的实验结果相似, 本研究发
现经疫苗免疫后的大菱鲆酸性磷酸酶活性在
第2周达到峰值, 且与对照组差异显著。本
研究表明, 杀鲑气单胞菌灭活疫苗对大菱
鲆的非特异性免疫有增强作用, 从而提高
免疫效果。

血清抗体检测结果可用于评价鱼类免疫
功能指标, 实验结果表明, 杀鲑气单胞菌
灭活疫苗抗体效价在第2周时达到峰值, 并
显著高于对照组。免疫鱼的抗体效价和保
护水平的正相关关系^[16]也表明, 在整个
实验中非特异性免疫和特异性免疫的共同
作用, 为大菱鲆提供了更长时间的免疫保
护。在攻毒实验中, 接种杀鲑气单胞菌
灭活疫苗的大菱鲆获得的抗杀鲑气单胞
菌相对免疫保护率为72.72%。这远高于
李联泰等^[17]将杀鲑气单胞菌灭活注射型
疫苗免疫泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)
的免疫保护率(60%)。

通过qRT-PCR方法研究灭活疫苗对大
菱鲆免疫相关基因表达的影响。*IL-1 β* 是
一种典型的促炎症细胞因子, 由巨噬细胞
等多种细胞产生^[18], 它能促进免疫细胞
的生长和增殖, 是抵御抗原入侵的第一介
质。*IL-1 β* 不仅能够通过提高自身表达量
来增强免疫作用, 还可诱导其他细胞因子
的合成^[19]。在本实验中, 免疫组*IL-1 β*
的表达量高于对照组, 说明灭活疫苗使
免疫鱼对病原入侵进行更快速和有效的反
应, 对于抵御病原入侵有重要的作用。TLR
是检测微生物入侵的关键模式识别受体。
这些受体能够识别多种微生物病原相关
分子模式, 以激活信号通路来诱导先天
免疫反应, 因此在抵御病原入侵方面发
挥重要作用^[20]。其中TLR-5参与识别
细菌鞭毛蛋白^[21]。

实验中TLR-5在大菱鲆肝脏、脾脏和肾
脏中的表达在疫苗免疫后显著增加。MHC
群可编码主要组织相容性系统, 其编码产
物广泛参与免疫反应, 其中MHC II类基
因产物的主要功能是结合外源性抗原并呈
递给CD4⁺T细胞^[22-23]。本实验检测了
MHC I、MHC II- α 和CD4的表达变化,
结果与先前的研究一致, MHC I通路在
疫苗接种后被触发; 而MHC II- α 和CD4
的表达量在各组中的趋势相近, 在攻毒
后1周时, 2种基因的表达量均有上调,
也说明疫苗免疫后可以帮助鱼体抵抗病
原入侵, 增强机体免疫力。

研究表明, 杀鲑气单胞菌灭活疫苗能
够显著提高大菱鲆机体的非特异性免疫与
特异性免疫, 且该灭活疫苗对大菱鲆杀
鲑气单胞菌感染具有较高的保护性, 可引
起受免疫鱼体内的免疫反应。本实验为
进一步开发和应用杀鲑气单胞菌疫苗奠
定了基础, 对水产养殖的健康可持续发展
具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] 刘龙腾, 朱雪梅, 赵明军. 中国大菱鲆产业发展演进与趋势分析[J]. *农业展望*, 2018, 14(9): 51-59, 64.
Liu L T, Zhu X M, Zhao M J. Development course and trends of turbot industry in China[J]. *Agricultural Outlook*, 2018, 14(9): 51-59, 64(in Chinese).
- [2] 吴杨镝, 贾素文, 陈宏博, 等. 辽宁大菱鲆养殖产业发展形势分析[J]. *中国水产*, 2019(3): 50-52.
Wu Y D, Jia S W, Chen H B, et al. Analysis on development situation of turbot breeding industry in liaoning[J]. *China Fisheries*, 2019(3): 50-52(in Chinese).
- [3] Ronza P, Álvarez-Dios J A, Robledo D, et al. Blood transcriptomics of turbot *Scophthalmus maximus*: a tool for health monitoring and disease studies[J]. *Animals*, 2021, 11(5): 1296.
- [4] Toranzo A E, Barja J L. First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest Spain[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1992, 12(5): 147-149.
- [5] Pedersen K, Larsen J L. First report on outbreak of furunculosis in turbot *Scophthalmus maximus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Denmark[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1996, 16(4): 129-133.

- [6] Larsen J L, Pedersen K. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1996, 37(2): 139-146.
- [7] 刘帅, 王荻, 卢彤岩, 等. 实时荧光定量PCR扩增特异性 *vapA* 基因检测杀鲑气单胞菌[J]. 水产学报, 2017, 41(12): 1928-1935.
- Liu S, Wang D, Lu T Y, et al. Real-time PCR detection of *Aeromonas salmonicida* by amplification of specific *vapA* gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1928-1935(in Chinese).
- [8] Ling X D, Dong W T, Zhang Y, et al. A recombinant adenovirus targeting typical *Aeromonas salmonicida* induces an antibody-mediated adaptive immune response after immunization of rainbow trout[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 133: 103559.
- [9] 何亚鹏, 时晓, 李博, 等. 杀鲑气单胞菌灭活疫苗的制备及免疫效果评价[J]. 水产养殖, 2020, 41(4): 47-48.
- He Y P, Shi X, Li B, et al. Preparation of *Aeromonas salmonicida* inactivated vaccine and test of its immunological efficacy[J]. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(4): 47-48(in Chinese).
- [10] Aguilera-Arreola M G, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, et al. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 242(2): 231-240.
- [11] Park S Y, Han J E, Kwon H, et al. Recent insights into *Aeromonas salmonicida* and its bacteriophages in aquaculture: a comprehensive review[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(10): 1443-1457.
- [12] 单晓枫, 康元环, 吴同垒, 等. 细鳞鱼杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(10): 91-93, 97.
- Shan X F, Kang Y H, Wu T L, et al. Isolation and identification of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* from *Brachymystax lenok*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(10): 91-93, 97(in Chinese).
- [13] Vasquez I, Cao T, Hossain A, et al. *Aeromonas salmonicida* infection kinetics and protective immune response to vaccination in sablefish (*Anoplopoma fimbria*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 557-566.
- [14] Liu C S, Sun Y, Hu Y H, et al. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity[J]. *Vaccine*, 2010, 28(25): 4153-4161.
- [15] 周勇, 史玉恒, 赵建青, 等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫施氏鲟后的免疫应答反应与保护效果[J]. 中国水产科学, 2018, 25(1): 195-203.
- Zhou Y, Shi Y H, Zhao J Q, et al. Immune responses and protective efficacy in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) after immunization with formalin-killed *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(1): 195-203(in Chinese).
- [16] Romstad A B, Reitan L J, Midtlyng P, et al. Comparison of a serological potency assay for furunculosis vaccines (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) to intraperitoneal challenge in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Biologicals*, 2014, 42(2): 86-90.
- [17] 李联泰, 卫明亮, 刘煜恒, 等. 杀鲑气单胞菌疫苗的研制[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2020, 29(2): 1-5.
- Li L T, Wei M L, Liu Y H, et al. Development of *Aeromonas salmonicida* vaccine[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020, 29(2): 1-5(in Chinese).
- [18] Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 326-340.
- [19] Pleguezuelos O, Zou J, Cunningham C, et al. Cloning, sequencing, and analysis of expression of a second *IL-1 β* gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Immunogenetics*, 2000, 51(12): 1002-1011.
- [20] Wei Y C, Pan T S, Chang M X, et al. Cloning and expression of Toll-like receptors 1 and 2 from a teleost fish, the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 141(3-4): 173-182.
- [21] Basu M, Swain B, Maiti N K, et al. Inductive expression of toll-like receptor 5 (TLR5) and associated downstream signaling molecules following ligand exposure and bacterial infection in the Indian major carp, mrigal (*Cirrhinus mrigala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 121-131.
- [22] Zhou X J, Xing J, Tang X Q, et al. Evaluation of

- bivalent vaccines candidates among VAA, OmpK and OmpR from *Vibrio anguillarum* in flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 85: 1-9.
- [23] Rozas-Serri M, Peña A, Maldonado L. Gene expression associated with immune response in Atlantic salmon head-kidney vaccinated with inactivated whole-cell bacterin of *Piscirickettsia salmonis* and pathogenic isolates[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 789-795.

Preparation of *Aeromonas salmonicida* inactivated vaccine and test of its immunological efficacy in *Scophthalmus maximus*

GUO Huimin, DING Yuanyuan, WANG Hao, ZHENG Xujia, XIU Yunji, ZHOU Shun*
(School of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266200, China)

Abstract: *Scophthalmus maximus* is one of the important species of mariculture in China, and occupies an important position in China's mariculture industry. At present, *S. maximus* farming industry shows a rapid growth trend, but as *S. maximus* farming intensification and scale continue to increase, bacterial diseases continue to occur. As pathogens of scabies, *Aeromonas salmonicida* has caused great economic losses to aquaculture. In order to prepare the inactivated vaccine of *A. salmonicida* and evaluate its immune effect on *S. maximus*, HHSM1905 strains were killed by formalin to prepare the inactivated vaccine. The experimental animals were randomly divided into two groups, i.e. immune group and control group. *S. maximus* was immunized by intraperitoneal injection. The indexes such as serum antibody titer, serum lysozyme activity, acid phosphatase activity and vaccine protection rate were determined. The expression of related immune genes (*IL-1 β* , *TLR-5*, *MHC I*, *MHC II- α* and *CD4*) was studied with *β -actin* gene as internal reference. The results showed that 2 weeks after vaccination, the antibody titer of immune group was significantly higher than that of control group and reaching the peak value. The lysozyme activity of the immune group reached the peak value 2 weeks after immunization, and remained significantly different from that of the control group at 4 weeks; the acid phosphatase activity of the immune group reached the peak value at 2 weeks after immunization; the relative percentage survival of the combined vaccine was 72.72%. Compared with the control group, *IL-1 β* , *TLR-5*, *MHC I*, *MHC II- α* and *CD4* immune genes in the immune group had an upward trend, and most of them reached the maximum value at 1-2 weeks, which had significant difference with the control group. In conclusion, the inactivated vaccines of *A. salmonicida* for *S. maximus* were successfully prepared in this study. The *A. salmonicida* inactivated vaccine was effective for preventing *A. salmonicida* disease, and may provide a novel method for disease prevention in *S. maximus* culture.

Key words: *Scophthalmus maximus*; *Aeromonas salmonicida*; furunculosis; inactivated vaccine

Corresponding author: ZHOU Shun. E-mail: zhoushun@qau.edu.cn

Funding projects: Shandong Province Modern Agricultural Industry Technology System Fish Industry Innovation Team (SDAIT-12-06); 2018 Agricultural Major Applied Technology Innovation Project of Shandong Province