

三种创伤弧菌免疫原的制备及其对黄姑鱼的免疫保护效果

闫茂仓, 单乐州, 陈少波*, 谢起浪

(浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325006)

摘要: 从创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中提取菌体脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)并制备福尔马林灭活全菌苗(FKC), 腹腔注射接种黄姑鱼。分别在注射第 0、7、14、21 和 28 天后测定了受免鱼血清中凝集抗体效价、血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性, 以及免疫 28 d 后的相对免疫保护率。结果表明, 3 种抗原对黄姑鱼均有较强的免疫原性。免疫后, 免疫组血清凝集抗体效价逐渐增高, 第 28 天时最高; 溶菌酶活性(LMZ)、白细胞吞噬活性(PP)和吞噬指数(PI)显著升高($P<0.01$), 第 21 天达到峰值, 随后逐渐下降。各组之间比较表明, 受免后 7、14、21 和 28 d, 免疫组黄姑鱼凝集抗体效价、PP、PI 和 LMZ 显著高于对照组($P<0.05$), LPS 和 OMP 组凝集抗体效价低于 FKC 组, LPS 和 OMP 组的相对免疫保护率高于 FKC 组, 各组间免疫保护率大小顺序为 LPS 组>OMP 组>FKC 组>对照组。

关键词: 黄姑鱼; 创伤弧菌; 保护性抗原; 免疫机能

中图分类号: Q959.483; S942

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2012)05-0503-07

Effects of three antigens extracted from *Vibrio vulnificus* on the immunological protection of *Nibea albiflora*

YAN Mao-Cang, SHAN Le-Zhou, CHEN Shao-Bo*, XIE Qi-Lang

(Zhejiang Mariculture Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China)

Abstract: *Nibea albiflora* was immunized by intraperitoneal injection with either Lipopolysaccharide (LPS) or outer membrane protein (OMP) extracted from *Vibrio vulnificus* or formalin killed *Vibrio vulnificus* (FKC). The influence of the three antigens on the immunological function of *Nibea albiflora* was determined at different time points following the injection by testing the agglutinating antibody titers of the serum, lysozyme activity of the serum, phagocytic activity of the blood and the relative survival percentage. The results showed that the three antigens have higher immunogenicity and antigenicity than the control group (injection with sterile saline). The agglutinating antibody titers of the immune challenged groups increased quickly, and were highest on the day 28. The lysozyme activity and phagocytic activity were raised significantly ($P<0.01$), reaching their top value on day 21, and then the index gradually reduced. The immunological indexes of three immune groups were higher than the control group ($P<0.05$). The agglutinating antibody titers of the LPS group or the OMP group were lower than the control group, but the relative survival percentage was adverse when challenged with a *Vibrio vulnificus* infection. The order of relative survival percentage was group LPS>OMP>FKC>Control.

Key words: *Nibea albiflora*; *Vibrio vulnificus*; protective antigens; immunological function

黄姑鱼(*Nibea albiflora*)属石首鱼科(Sciaenidae)黄姑鱼属(*Nibea*), 为近海暖温性中下层经济鱼类, 分布于中国、朝鲜半岛和日本南部沿海, 是我国重要的经济鱼类。随着养殖密度的增大和养殖生态环境的恶化, 黄姑鱼的病害日趋严重, 主要发生在鱼

苗鱼种阶段(Ma et al, 2008)。创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)作为一种重要的致病性弧菌, 广泛分布在沿海地区, 感染黄姑鱼(Ma et al, 2008)、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)(Zhao et al, 2007)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)(Yu et al, 2008)、石鲈(*Kareius*

收稿日期: 2012-03-05; 接受日期: 2012-08-27

基金项目: 浙江省科技计划项目(2006R20001); 温州市科技计划项目(S20070051); 浙江省科技计划项目(2007F10009); 温州市重点科技创新团队建设(C20120004); 浙江省科技计划项目(2009C12081); 浙江省科技厅创新团队建设与人培养项目(2011F20032)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenshaobo@hotmail.com

第一作者简介: 闫茂仓, 男, 助理研究员, 研究方向为水产免疫学; E-mail: yanmaocang@126.com

bicoloratus)(Shen et al, 2001)、鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)(Xu et al, 2005)和军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)(Jian et al, 2003)等鱼类。

目前,国内外学者大量报道了弧菌等致病菌灭活疫苗对水产养殖动物免疫应答方面的研究(Kawai & Kusuda, 1995; Ma et al, 2010)。然而,灭活疫苗中包含诸多无效抗原,所产生的抗体并不是全部具有保护性。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)都是病原菌的菌体成分,是主要保护性抗原(Yan, 2005)。许多研究表明,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)皆具有较强的免疫原性,可以提高机体的非特异性免疫功能(Dalmo et al, 2000; Huang & Lu, 2002; Bader et al, 2004; Yan, 2005); LPS 能刺激 B 淋巴细胞产生特异性抗体,引起机体的免疫反应; OMP 可激发机体的体液免疫和细胞免疫,并且可通过遗传工程大量表达(Bøgwald et al, 1992; Solem et al, 1995; Rahman & Kawai, 2000; Mo et al, 2002)。近年来,研究工作者对弧菌全菌灭活疫苗免疫原性做了大量的研究工作,但是关于弧菌菌体成分亚单位疫苗(OMP 和 LPS 等)提升海水养殖鱼类免疫机能的报道却比较少。本研究通过测定血清中凝集抗体效价、血清溶菌酶活性、血液白细胞吞噬活性以及相对免疫保护率来探讨创伤弧菌 LPS 和 OMP 对黄姑鱼免疫机能的影响,旨在掌握 LPS 和 OMP 的免疫学特性,为丰富海水鱼类弧菌疾病的免疫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试鱼 浙江省海洋水产养殖研究所自繁养殖黄姑鱼, 120 日龄, 体重(50±10) g; 选择规格一致、外观健壮、游动活泼、无外伤的鱼作为试验鱼。试验鱼暂养于 3.3 m×3.3 m×1.0 m 的室内水泥池中, 充气, 以配合饵料(福州海马饲料有限公司)每日早、晚各投饵 1 次, 每天上午换水, 流水 1 h, 水温控制在 27.8~31.2 °C。暂养 1 周后, 进行免疫接种。

1.1.2 试验菌株 供试菌株为从乐清湾养殖黄姑鱼分离的创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)强毒株(Ma et al, 2008; Yan et al, 2010)。

1.2 免疫原的制备

1.2.1 全菌苗 FKC 的制备 将菌株接种于

ZOBELL 2216E 斜面, 28 °C 培养 24 h 后, 以无菌生理盐水下洗, 调节成 1.0×10^9 cells/mL 的浓度, 加入终浓度为 0.5% 的福尔马林, 28 °C 灭活 24 h 后, 以平板培养法检查灭活效果, 确认彻底灭活后, 保存在 4 °C 冰箱中备用。

1.2.2 创伤弧菌 LPS 的制备 按 Westphal & Jann(1969)酚水法进行, 取 20 mL 蒸馏水与 20 mL 浓度为 1.0×10^9 cells/mL 的创伤弧菌配制成菌悬液, 于 65 °C 下加入等量的 90% 苯酚振荡 10 min, 冷却至 15 °C 后, 10 000 r/min 离心 30 min, 取出上清液装入透析袋, 4 °C 蒸馏水透析 3 d, 30 000 r/min, 10 °C 条件下离心 5 h, 取上清液冷冻干燥得到 LPS 粉末, 置 4 °C 冰箱备用。临用前, 加入 10 mL 无菌水, 蒽酮法测定多糖含量为 0.428 mg/mL, 65 °C 水浴中作用 30 min 去除毒性, 用无菌生理盐水调浓度至 0.2 mg/mL。

1.2.3 创伤弧菌 OMP 的制备 参照 Sarkosyl 法(Lutwyche et al, 1995)提取 OMP 的方法, 取 50 mL 浓度为 1.0×10^9 cells/mL 的创伤弧菌菌悬液, 离心收集菌体, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次; 置冰浴下超声波破碎 10 min; 4 °C, 6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液; 4 °C, 50 000 r/min 离心 1 h; 弃上清, 沉淀溶解于 0.5% 十二烷基肌氨酸(Sarkosyl)的 Tris-HCl 缓冲液中, 28 °C 作用 30 min; 4 °C, 50 000 r/min 离心 1 h; 弃上清液, 用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤沉淀; 沉淀溶解于 10 mL 无菌重蒸水, Lowry 法测定蛋白含量为 0.494 mg/mL, -20 °C 保存。临用时以无菌生理盐水稀释至 0.1 mg/mL 备用。

1.3 吞噬原的制备

将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)菌株接种在液体培养内, 在 37 °C 条件下培养 24 h 后, 离心集菌, 制备菌悬液。然后在 *S. aureus* 悬液中加入终浓度为 0.5% 的福尔马林, 在 37 °C 条件下灭活 24 h。经过平皿法证实此菌已被彻底灭活后, 用无菌生理盐水清洗 3 次, 并将其浓度调节至 1.0×10^8 cells/mL, 即为福尔马林灭活的 *S. aureus* 菌体(formalin killed *S. aureus*, F-SA), 作为检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。置 4 °C 冰箱中保存备用。

1.4 免疫与采血

试验在 2.0 m×1.0 m×1.0 m 玻璃缸中进行, 试验共设 OMP、LPS 和 FKC 三个注射免疫处理组和无菌生理盐水注射对照组。以腹腔注射法进行, 每

尾鱼接种 0.1 mL 上述各种抗原, 即 LPS 的接种量为每尾鱼 0.02 mg, OMP 接种量为 0.01 mg, FKC 接种量为每尾鱼 1.0×10^8 个细胞, 对照组注射相同剂量的灭菌生理盐水, 每组鱼注射 50 尾。实验前和免疫注射第 7 d、14 d、21 d 和 28 d 后, 分别从每组中随机捞取 5 尾鱼尾静脉采血, 每尾鱼的血液分为 2 份, 1 份以常法收集后, 制备血清, 供检测血清凝集抗体效价和溶菌酶活性用; 另 1 份用肝素处理的离心管收集, 制备抗凝血, 供测定血液白细胞吞噬活性用。

1.5 凝集抗体效价的测定

采用血凝板法进行, 反应抗原为培养 24 h 后收集的菌液并经终浓度 0.5% 福尔马林灭活的创伤弧菌 (1.0×10^8 cells/mL)。

1.6 溶菌酶活性的测定

参照 Zhao(2005) 的方法, 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 冻干粉为底物, 用 1/15 mol/L, pH 6.4 磷酸缓冲液配成一定浓度的悬浊液 ($OD_{570} \approx 0.3$)。取鱼血清 0.1 mL, 置 28 °C 水浴锅中预热 5 min, 然后加入 1.8 mL 已预热的菌液, 立即计时, 至 2 min 时加入 1 滴 5 mol/L KOH 溶液以终止反应, 立即于 640 nm 波长测其透光率 T1%。取鱼血清 0.1 mL, 加入 1 滴 5 mol/L KOH 溶液摇匀, 28 °C 水浴锅中预热 5 min 后加入 1.8 mL 已预热的菌液, 在同样温度下至 2 min 时同法测定其透光率 T0%, $\Delta T = (T1\% - T0\%)$ 为透光率的差值, 即溶菌酶透光率的变化。

准确称取溶菌酶标准品 (Amresco 公司产品, 活性为 20 000 U/mg), 用 pH 6.4, 1/15 mol/L PBS 配置成 1 000 μ g/mL, 置冰箱保存。临用时再用 PBS 稀释成 500 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL、25 μ g/mL、10 μ g/mL 标准液。用 0.1 mL 各种浓度的溶菌酶标准液代替血清样品, 操作方法与以上血清的相同。通过测得的不同浓度标准液透光率的变化值进行回归分析, 得到回归方程: $U = a + b\Delta T$ 。按上式计

算血清样品溶菌酶的活性, 其中 U 表示溶菌酶活性 (单位: U/mL)。

1.7 白细胞吞噬活性的测定

白细胞吞噬活性的测定参照 Luo et al(2001) 的方法。取 100 μ L 抗凝血, 加入 100 μ L 的金黄色葡萄球菌菌液, 摇匀, 25 °C 水浴 60 min, 水浴期间每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取混合液涂片 (每个血样涂 5 片), 用甲醇固定 10 min, Giemsa 染色 1~1.5 h, 水洗风干后油镜观察。按下式计算吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 和吞噬指数 (phagocytic index, PI)。吞噬百分比 (PP) = 参与吞噬的白细胞数 / 计数的白细胞总数 $\times 100\%$, 吞噬指数 (PI) = 吞噬细胞内的细菌总数 / 参与吞噬的细胞数。

1.8 攻毒试验

采用 Reed & Muench(1938) 的方法测定创伤弧菌对黄姑鱼的 LD_{50} 为 5.5×10^5 CFU/鱼。于免疫接种后的第 28 d, 从免疫组和对照组各取 30 尾黄姑鱼, 每组各设 3 个平行组, 每个平行组 10 尾鱼, 每尾鱼腹腔注射 0.1 mL 浓度为 5.5×10^6 CFU/mL 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 活菌液, 置于二级沙滤水饲养, 连续观察 14 d, 记录死亡状况, 并进行解剖和病原的再分离以确定是否死于攻毒活菌引起的感染。实验结束后计算相对免疫保护率 (Relative percentage of survival, RPS)。RPS (%) = $1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

1.9 数据处理

采用 STATISTICA 7.0 统计软件作单因素方差分析处理, 组间差异采用 Duncan's 多重比较, 显著水平为 0.05, 极显著水平为 0.01。

2 结果

2.1 三种免疫原对黄姑鱼凝集抗体效价的影响

受免和对照组黄姑鱼血清凝集抗体效价的测定结果如表 1 所示。可以看出, 三种抗原注射黄姑

表 1 黄姑鱼接种不同创伤弧菌抗原后的血清凝集抗体效价
Tab. 1 Serum antibody titers in *Nibea albiflora* inoculated with different *Vibrio vulnificus* antigens

| 免疫原 Immunogen | 免疫后时间及其凝集效价 Days after immunization and titers/d | | | | |
|---------------|--------------------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| LPS | 1:2~8 (1:4.2) | 1:4~16 (1:10.4) | 1:1~32 (1:21.1) | 1:16~128 (1:48.4) | 1:128~1024 (1:128) |
| OMP | 1:2~4 (1:2.6) | 1:4~16 (1:10.4) | 1:8~32 (1:16) | 1:8~64 (1:36.8) | 1:32~512 (1:111.6) |
| FKC | 1:2~8 (1:3.4) | 1:8~256 (1:32) | 1:8~512 (1:48.5) | 1:32~1024 (1:168) | 1:128~1024 (1:388) |
| Control | 1:2~8 (1:3.8) | 1:2~8 (1:3.4) | 1:4~8 (1:4.6) | 1:2~8 (1:3.2) | 1:2~16 (1:4.8) |

血清凝集效价以黄姑鱼血清的稀释倍数表示。括号内为几何平均数。

Serum antibody titers showed as dilution ratio of serum. Figures in parenthesis indicate geometric average value.

鱼 7 d 后, 血清凝集抗体效价均迅速上升。而对照组的血清凝集抗体效价一直都很低。免疫组血清凝集抗体效价高于对照组水平。接种 14 d、21 d 和 28 d 后各免疫组之间血清凝集抗体效价也有差异, FKC 组血清凝集抗体效价高于 LPS 和 OMP 组水平。

2.2 三种免疫原对黄姑鱼溶菌酶活性的影响

三种免疫原接种黄姑鱼后的溶菌酶变化见图 1。28 d 的实验期内, 对照组血清溶菌酶的活性为 578.4~612.8 U/mL, 无显著差异($P>0.05$); 接种 7 d、14 d、21 d 和 28 d 后, 免疫鱼血清溶菌酶活性均显著地高于对照组($P<0.05$), 第 21 d 时, 溶菌酶活性达到峰值, LPS 组最高(1 824.6 U/mL), 随后逐渐下降。LPS 组在所有免疫组中最高, OMP 组次之, 两者显著高于 FKC 组。

2.3 三种免疫原对黄姑鱼对吞噬活性的影响

受免和对照黄姑鱼血液中吞噬细胞对 F-SA 的吞噬活性的测定结果见表 2 所示。抗原 LPS、OMP 和 FKC 接种黄姑鱼后, 受免鱼血液中吞噬细胞的吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)逐渐上升($P<0.05$),

并在接种 21 d 左右达到峰值, 随后逐渐下降。在 14 d、21 d 和 28 d 时, 各免疫组的 PP 和 PI 值均极显著地高于对照组($P<0.01$)。保护性抗原 LPS 和 OMP 没有显著的差异, 两者略高于 FKC 免疫组。

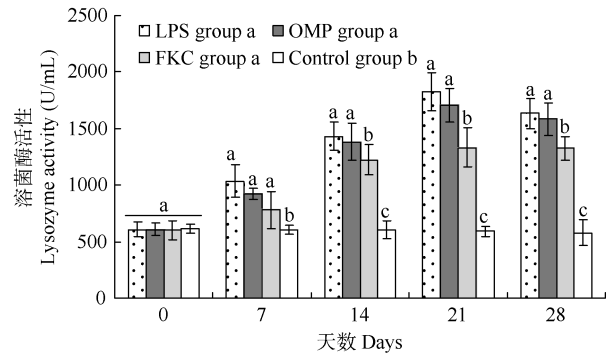


图 1 三种创伤弧菌抗原对黄姑鱼血清中溶菌酶活性的影响
Fig. 1 The effects of three *Vibrio vulnificus* antigens on serum lysozyme activity in *Nibea albiflora*

同一采样时间, 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 相同字母表示组间差异不显著($P>0.05$)。

Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), same letters indicate no significant differences ($P>0.05$) in the same observed period.

表 2 黄姑鱼接种不同创伤弧菌抗原后血液中白细胞吞噬活性的变化(平均值±标准差)

Tab. 2 The change of phagocytic activity in *Nibea albiflora* blood after inoculation with different *Vibrio vulnificus* antigens of (mean ±SD)

| 项目 Items | 免疫组别 Immunized group | 免疫后时间及其吞噬活性 Days after immunization and phagocytic activity (d) | | | | |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| PP(%) | LPS ^a | 27.8±4.35 | 31.8±4.31 ^a | 36.4±7.45 ^a | 38.8±6.31 ^a | 34.6±5.85 ^a |
| | OMP ^a | 28.4±3.61 | 31.4±3.77 ^a | 36.8±6.55 ^a | 37.0±4.56 ^a | 35.4±5.54 ^a |
| | FKC ^a | 27.2±3.97 | 29.6±3.98 ^b | 33.8±3.760 ^a | 35.0±3.52 ^a | 35.2±3.54 ^a |
| | Control ^b | 27.8±4.12 | 27.8±4.31 ^b | 28.0±4.90 ^b | 28.2±5.08 ^b | 28.8±3.66 ^b |
| PI(ind./cell) | LPS ^a | 2.56±0.34 | 3.56±0.37 ^a | 4.62±0.57 ^a | 5.53±0.51 ^a | 5.19±0.65 ^a |
| | OMP ^a | 2.69±0.68 | 3.65±0.41 ^a | 4.65±0.45 ^a | 5.47±0.73 ^a | 5.16±0.39 ^a |
| | FKC ^a | 2.38±0.43 | 3.28±0.43 ^a | 4.59±0.48 ^a | 4.95±0.43 ^a | 4.75±0.52 ^a |
| | Control ^b | 2.48±0.43 | 2.31±0.40 ^b | 2.28±0.39 ^b | 2.27±0.58 ^b | 2.39±0.27 ^b |

PP: 吞噬百分比, 即吞噬细菌的白细胞占计数细胞的百分比; PI: 吞噬指数, 即每个吞噬细胞吞噬的细菌个数。同一采样时间, 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$), 相同字母表示组间差异不显著($P>0.05$)。

PP: Percentage of phagocytes; PI: Phagocytic index. Different letters indicate significant differences ($P<0.05$), same letters indicate no significant differences ($P>0.05$) in the same observed period.

2.4 相对免疫保护率的测定

LPS、OMP 和 FKC 对黄姑鱼的免疫保护效果见表 4, 结果表明, 菌体 LPS 和 OMP 免疫组对黄姑鱼有较高的免疫保护作用, 免疫保护率分别达到 77.8%和 66.7%, 全菌苗组低于 LPS 和 OMP 两组, 免疫保护率只有 44.4%。

3 讨论

OMP 和 LPS 作为革兰氏阴性菌的主要保护性抗原, 具有良好的免疫原性, 国外内学者对其免疫原性以及亚单位疫苗的开发也做了大量的研究工作(Kawai et al, 2004; Ye et al, 2004; Maji et al, 2006;

表 3 三种创伤弧菌抗原对黄姑鱼的免疫保护效果

Tab. 3 The protective effect of the three antigens against a challenge with *Vibrio vulnificus*

| 组别 Group | 攻毒鱼尾数 Number of challenged fish | 死亡鱼尾数 Number of dead fish | 死亡率/% Mortality/% | 相对免疫保护率/% Relative percent survival/ % |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------------------|
| LPS ^a | 30 | 6 | 20 | 77.8 ^a |
| OMP ^{ab} | 30 | 9 | 30 | 66.7 ^{ab} |
| FKC ^b | 30 | 15 | 50 | 44.4 ^b |
| Control ^c | 30 | 27 | 90 | — ^c |

不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), same letters indicate no significant differences ($P > 0.05$).

Mao et al, 2007b; Zhang et al, 2011)。Ingilæ et al(2000)证实了杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)LPS 和 OMP 对鱼类大西洋庸鲽(*Hippoglossus hipoglossus* L.)和花狼鱼(*Anarhichas minor* L.)有较强的免疫原性, 能够刺激鱼体产生相应的抗体, 对杀鲑气单胞菌具有很好的免疫保护效果。Zhou et al (2002)的研究结果表明, 接种一定浓度的嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)LPS 可以提高卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)对嗜麦芽假单胞菌的抗病力, 能显著提高接种鱼白细胞吞噬能力, 增强接种鱼类的非特异性免疫功能。Huang & Lu (2002)对迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)全菌苗及外膜蛋白的免疫力进行了比较研究, 得出结论, 全菌和 OMP 均能提供良好的免疫保护, 在有佐剂 LPS 存在下, OMP 的效果更好。Mao et al (2007a)报道两种铁调外膜蛋白具有良好的免疫原性, 可作为高效疫苗的候选成分。本研究首次研究并比较了创伤弧菌 LPS、OMP 和 FKC 对黄姑鱼免疫保护效果, 结果表明, LPS 和 OMP 都能显著地提高黄姑鱼血清抗体凝集效价、溶菌酶活性以及血液中白细胞吞噬活性, 进而提高受免鱼的免疫保护力, 具有很好的免疫原性, 与上述研究结果相似。目前关于创伤弧菌保护性抗原的研究比较少, Jung et al (2005)报道创伤弧菌主要外膜蛋白(MOMP)可诱导哺乳动物模型产生保护性抗体, 免疫接种创伤弧菌 MOMP 14 d 后, 小鼠 IgG 水平显著升高, 其中以 IgG2b 的水平最高。本研究的结果证实创伤弧菌 OMP 也可诱导鱼类产生免疫保护性抗体。

抗体是体液中由浆细胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白, 抗体效价反映了鱼类特异性体液免疫水平(Yang et al, 1998; Zhang & Nie, 2000)。LPS、OMP 与 FKC 一样, 也能提高受免鱼的抗体水平。Jian et al (2004)研究发现溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)LPS 免疫接种石

斑鱼(*Epinephelus Skaara*)28 d 凝集抗体效价达到最高, 接种 8 mg/mL LPS 的石斑鱼免疫保护率达到 80%。Bader et al (2004)采用 N-lauroylsarcosine 法提取鮟爱德华菌(*Edwardsiella ictaluri*)OMP, 免疫接种斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*), 发现免疫 21 d 后, 免疫组抗体水平显著高于对照组水平, 同时研究还发现 LPS 和 OMP 联合疫苗刺激机体产生抗体的能力显著高于 OMP 免疫组和对照组。本研究结果表明, 黄姑鱼经 3 种免疫原免疫后, 血清凝集抗体效价缓慢升高, 随后迅速升高, 显著高于对照组水平, 3 个免疫组之间其抗体效价水平由高到低顺序是 FKC 组、OMP 组和 LPS 组。许多研究结果表明, 受免鱼的抗体凝集水平与免疫保护率往往并不一致。Chen et al (1996)用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) F-AH 及其菌体 LPS 作免疫原, 分别接种翘嘴鲈(*Siniperca chuatsi*)28 d 后, 血清中的凝集抗体效价分别为 1:1 228.8 和 1:275.2, 相对免疫保护率分别为 80.7%和 92.7%。Meng et al (2009)报道斑点叉尾鲷接种后 3 种嗜水气单胞菌免疫原后, 其全菌苗血清抗体效价高于 OMP 和 LPS 组, 而相对免疫保护率则低于 OMP 和 LPS 组; Zhang et al (2012)用嗜水气单胞菌 FKC、OMP 和 LPS 为免疫原, 分别免疫青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)28 d 后, FKC 组、OMP 组和 LPS 组的抗体效价分别为 1:426.67, 1:341.33 和 1:213.33, 免疫 28 d 后活菌攻毒的结果表明, OMP 组的免疫保护率为 75%, LPS 组为 67.8%, 均优于 FKC 组(50%)。本研究也发现, 相对于 FKC 全菌苗, LPS 和 OMP 免疫接种刺激黄姑鱼产生的血清凝集抗体效价稍低, 但能够提供更有效的免疫保护, 分别达到 77.8%和 66.7%, 高于 FKC 组水平, 与 Chen et al (1996)、Meng et al (2009)和 Zhang et al (2012)的结果相似。这可能是由于受免鱼对全菌苗等抗原产生的免疫应答中, 所产生的抗体并不是全部具有保护性, 虽然 FKC 能诱导受免黄姑鱼产生

比较高的抗体水平,但这些抗体中可能存在一些无效抗体而产生不了保护效果,而提取的 OMP 和 LPS 因为去除了菌体上的部分无效抗原,所以在刺激受免黄姑鱼产生的抗体中,有效抗体所占的比例相对较高,产生高的相对免疫保护力。

本研究中,血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性在 28 d 内的变化趋势不同于血清凝集抗体效价的变化,各免疫组血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性在免疫后显著升高,免疫 7 d 后显著高于对照组水平($P<0.05$),而血清凝集抗体效价在免疫接种后逐步增加,在 14 d 后开始迅速升高。在血清溶菌酶活性和血液白细胞吞噬活性开始下降的时候,血清凝集抗体效价却在上升。证实非特异性免疫的启动早于抗体水平的升高。这表明在免疫早期抗体尚未大量形成时,黄姑鱼主要是依靠吞噬细胞数量和吞噬活性的增加来吞噬病原菌以保护机体,吞噬细胞和溶菌酶等体液因子首先发挥重要的非特异性细胞免疫作用,随后是抗体水平升高来抵抗病原菌攻击,特异性体液免疫起主要作用。

参考文献:

- Bader JA, Shoemaker CA, Klesius PH. 2004. Immune response induced by *N-lauroylsarcosine* extracted outer-membrane proteins of an isolate of *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(3): 415-428.
- Bøgvold J, Stensvag K, Hoffman J, Holm KO, Jørgensen TØ. 1992. Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *vibrio anguillarum* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2(4): 251-256.
- Chen CF, Li J, Zhou WH, Zhao GZ. 1996. Studies on the immunoprophylaxis against bacterial septicemia in Mandarin fish [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 15(5): 475-479. [陈昌福, 李静, 周文豪, 赵桂珍. 1996. 翘嘴鲌细菌性败血症的免疫预防研究. 华中农业大学学报, 15(5): 475-479.]
- Dalmo RA, Kjerstad AA, Arnesen SM, Tobias PS, Bøgvold J. 2000. Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 10(2): 107-128.
- Ingilæ M, Arnesen J A, Lund V, Eggset G. 2000. Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida* [J]. *Aquaculture*, 183(1-2): 31-44.
- Huang XX, Lu CP. 2002. Comparative evaluation of the immune protection of *Edwardsiella tarda* whole cell bacteria and its OMPs [J]. *Immunol J*, 18(3): 187-189. [黄新新, 陆承平. 2002. 迟缓爱德华氏全菌及外膜蛋白的免疫力比较. 免疫学杂志, 18(3): 187-189.]
- Jian JC, Wu ZH, Chen G, Zeng ML. 2003. Isolation and characteristics of pathogen of *Vibriosis* in cobia (*Rachycentron canadum*) Maricultured in cage [J]. *Chn J Vet Sci*, 23(4): 329-330. [简纪常, 吴灶和, 陈刚, 曾敏玲. 2003. 海水网箱养殖军曹鱼弧菌病原的分离及其特性 [J]. 中国兽医学报, 23(4): 329-330.]
- Jian JC, Ye JM, Wu ZH. 2004. Influence of lipopolysaccharide from *Vibrio alginolyticus* on immunological function of *Epinephelus Skaara* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 28(1): 103-105. [简纪常, 叶剑敏, 吴灶和. 2004. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响 [J]. 水生生物学报, 28(1): 103-105.]
- Jung CR, Park MJ, Heo MS. 2005. Immunization with major outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* elicits protective antibodies in a murine model [J]. *J Microbiol*, 43(5): 437-442.
- Kawai K, Kusuda R. 1995. *Listonella anguillarum* infection in ayu, *Plecoglossus altivelis*, and its prevent ion by vaccination [J]. *Israeli J Aquacul*, 47(3-4): 173-177.
- Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, Oshima S. 2004. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate [J]. *Vaccine*, 22(25-26): 3411-3418.
- Luo L, Chen XX, Cai XF. 2001. Influence of Creat (*Andrographis Paniculata*) on the phagocytic activity of phagocytes in Grass Carp [J]. *J Southwest Agric Univ*, 2001, 23(1): 33-34, 38. [罗琳, 陈孝焯, 曹雪峰. 2001. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 西南农业大学学报, 23(1): 33-34, 38.]
- Lutwyche P, Exner MM, Hancock REW, Trust TJ. 1995. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. *Infect Immunol*, 63(8): 3137-3142.
- Ma AM, Yan MC, Chang WS, Chen SB, Shan LZ, Xie QL. 2008. Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* from diseased *Nibeia albiflora* [J]. *Chn J Zoon*, 24(10): 960-964. [马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 陈少波, 单乐州, 谢起浪. 2008. 黄姑鱼创伤弧菌的分离和鉴定 [J]. 中国人兽共患病学报, 24(10): 960-964.]
- Ma AM, Yan MC, Hu LH, Xie QL, Chen SB, Dan LZ. 2010. Study on immune efficacy induced by killed *Vibrio splendidus* vaccine on

- Sciaenops ocellatus* [J]. *J Hydroecol*, **3**(3): 137-141. [马爱敏, 闫茂仓, 胡利华, 谢起浪, 陈少波, 单乐州. 2010. 灿烂弧菌灭活疫苗对美国红鱼免疫效果的研究. *水生态学杂志*, **3**(3): 137-141.]
- Maji S, Mali P, Joardar SN. 2006. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **20**(4): 462-473.
- Mao ZJ, You ZQ, Wei YW, Yu L. 2007a. Cloning, expression and immunogenicity analysis of two iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* ZJ2003 [J]. *J Fish Sci Chn*, **14**(4): 563-569. [毛芝娟, 由振强, 魏永伟, 于涟. 2007a. 副溶血弧菌 ZJ2003 株两种铁调外膜蛋白的克隆、表达和免疫原性. *中国水产科学*, **14**(4): 563-569.]
- Mao ZJ, Yu L, You ZQ, Wei YW, Liu Y. 2007b. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **23**(3): 567-575.
- Meng XL, Chen CF, Wu ZX, Luo YL. 2009. Comparative study on immunogenicity of three vaccines of *Aeromonas hydrophila* to channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Freshwat Fish*, **39**(4): 49-53. [孟小亮, 陈昌福, 吴志新, 罗宇良. 2009. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗对斑点叉尾鲷免疫原性比较研究. *淡水渔业*, **39**(4): 49-53.]
- Mo ZL, Xu YL, Zhang PJ. 2002. Vaccination Against *Vibrio Anguillarum* on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Sci*, **26**(4): 62-66. [莫照兰, 徐永立, 张培军. 2002. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究. *海洋科学*, **26**(4): 62-66.]
- Rahman MH, Kawai K. 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **10**(4): 379-382.
- Reed L J, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points [J]. *Am J Epidemiol*, **27**(3): 493-497.
- Shen ZQ, Liu JS, Li F, Xu KL, Wang ZJ, Lu CP, Chu WH. 2001. Isolation and identification of pathogen in stone flounder with *Vibrio vulnificus* infection as well as treatment and prevention for the disease [J]. *Chn J Vet Sci Technol*, **31**(10): 22-23. [沈志强, 刘吉山, 李锋, 徐可利, 王忠军, 陆承平, 储卫华. 2001. 石鲈鱼创伤弧菌病的病原分离鉴定与防治. *中国兽医科技*, **31**(10): 22-23.]
- Solem ST, Jørgensen JB, Roberrtsen B. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **5**(7): 475-491.
- Westphal O, Jann K. 1969. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure [J]. *Meth in Carbohydr Chem*, **5**: 83-96.
- Xu BF, Lin TL, Dong CF, Yi GH. 2005. Molecular identification of *Vibrio vulnificus* isolated from the diseased *European eels* in mainland China [J]. *Chn J Zoon*, **21**(11): 995-997, 980. [许斌福, 林天龙, 董传甫, 伊光辉. 2005. 鳗鲡创伤弧菌的分子鉴定. *中国人兽共患病杂志*, **21**(11): 995-997, 980.]
- Yan MC. 2005. Study on Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides of *Vibrio Harveyi* [D]. Master thesis, Huazhong Agricultural University, 32-40. [闫茂仓. 2005. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究[D]. 硕士学位论文, 华中农业大学, 32-40.]
- Yan MC, Chen SB, Shan LZ, Wang XP, Ma AM, Xie QL. 2010. Comparison of different preservation methods for *Vibrio splendidus* and *Vibrio vulnificus* [J]. *J Hydroecol*, **3**(5): 136-140. [闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 王雪鹏, 马爱敏, 谢起浪. 2010. 灿烂弧菌和创伤弧菌的不同保存方法比较. *水生态学杂志*, **3**(5): 136-140.]
- Yang GW, An LG, Wang CF, Wen WJ. 1998. Comparative studies on the immunoglobulin in skin mucus nad serum of carp [J]. *Zool Res*, **19**(6): 489-492. [杨桂文, 安利国, 王长法, 温武军. 1998. 鲤鱼皮肤粘液与血清中免疫球蛋白的比较研究. *动物学研究*, **19**(6): 489-492.]
- Ye JM, Jian JC, Wu HB, Wu ZH. 2004. Chemical composition of lipopolysaccharides (LPS) from *Vibrio alginolyticus* and toxicity of LPS on *Epinephelus akaara* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **28**(5): 574-576. [叶剑敏, 简纪常, 吴后波, 吴灶和. 2004. 溶藻弧菌脂多糖的化学成分分析及其对石斑鱼的毒性. *水生生物学报*, **28**(5): 574-576.]
- Yu LP, Wang B, Li Y, Hu L, Zhao FM. 2008. Isolation and identification of haemorrhagic septicaemia pathogen from cultivated turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *J Dalian Fish Univ*, **23**(5): 335-339. [于兰萍, 王斌, 李艳, 胡亮, 赵凤梅. 2008. 大菱鲆出血性败血症病原菌的分离与鉴定. *大连水产学院学报*, **23**(5): 335-339.]
- Zhang B, Zeng LB, Luo XS, Gao ZY, Zhou Y, An W. 2012. Responses of immune parameters in periphery blood of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) immunized with three vaccines of *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Huazhong Agric Univ*, **31**(1): 100-105. [张波, 曾令兵, 罗晓松, 高正勇, 周勇, 安伟. 2012. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗免疫的青鱼外周血免疫指标的变化. *华中农业大学学报*, **31**(1): 100-105.]
- Zhang YA, Nie P. 2009. Humoral immune factors of fish: a review [J]. *J Fish Chn*, **24**(4): 376-381. [张永安, 聂品. 2009. 鱼类体液免疫因子研究进展. *水产学报*, **24**(4): 376-381.]
- Zhang YN, Li XY, Geng XN, Zhao BH. 2011. Cloning and expression of a outer membrane protein gene (OMP2) of *Edwardsiella tarda* HB01 and its immunogenicity [J]. *Chn J Cell Mol Immunol*, **27**(10): 1075-1079. [张亚宁, 李晓玥, 耿晓娜, 赵宝华. 2011. 迟缓爱德华菌 HB01 外膜蛋白 Omp2 基因的克隆表达及其免疫原性研究. *细胞与分子免疫学杂志*, **27**(10): 1075-1079.]
- Zhao DH, Liu LB, Sun JJ, Wang HF, Liang LQ, Zhao HH, Liu L, Li G F. 2007. Histopathology of ovate pompano *Trachinotus ovatus* infected with *Vibrio damsela* and *Vibrio vulnificus* [J]. *J Dalian Fish Univ*, **22**(6): 455-459. [赵典惠, 刘丽波, 孙际佳, 王海芳, 梁兰清, 赵会宏, 刘丽, 李桂峰. 2007. 用美人鱼弧菌与创伤弧菌人工感染卵形鲳鲹的组织病理学研究. *大连水产学院学报*, **22**(6): 455-459.]
- Zhao F. 2005. Effects of Rapeseed Meal on the Immune Function of *Carassius Auratus* Gibelio [D]. Master thesis, Huazhong Agric Univ, 18-19. [赵飞. 2005. 菜籽粕对异育银鲫免疫功能的影响[D]. 硕士学位论文, 华中农业大学, 18-19.]
- Zhou YC, Zhang B, Chen XF, Qian JY. 2002. Preparation of *Pseudomonas maltophilia* lipopolysaccharidae and immunological analysis of the lipopolysaccharide against *Trachinotus ovatus* [J]. *J Fish Chn*, **26**(2): 143-148. [周永灿, 张本, 陈雪芬, 钱家英. 2002. 嗜麦芽假单胞菌脂多糖的制备及其在卵形鲳鲹中的免疫反应. *水产学报*, **26**(2): 143-148.]

2012 年昆明秀丽线虫研讨会顺利召开

昆明秀丽线虫学术研讨会于 2012 年 8 月 3 日至 8 月 5 日在中国科学院昆明动物研究所顺利召开。本次会议由中国科学院昆明动物研究所、中国科学院昆明植物研究所和云南大学联合组织，昆明动物研究所主办。来自北京生命科学研究所、中国科学院上海神经科学研究所、中国科学院生物物理研究所、中国科学院遗传和发育研究所、中国科学技术大学、首都师范大学、云南大学、云南农业大学、同济大学、中南大学、华中科技大学、浙江大学、上海交通大学、中国科学院昆明植物研究所和中国科学院昆明动物研究所的 20 多位专家学者参加了会议。

8 月 4 日，与会专家在中国科学院昆明动物所学术报告厅，与昆明动物所、昆明植物所和云南大学的师生相聚一堂，向大家分享他们研究秀丽线虫的重要成果和心得。会议由中国科学院昆明动物研究所梁斌研究员主持。首先，来自北京生命科学研究所的张宏研究员发表了简短的致辞：他总结了目前国内秀丽线虫研究的良好发展态势，并就秀丽线虫研究材料、方法和技术等资源共享平台的建设，扩大相互间的合作和交流，推动国内秀丽线虫研究工作，和与会专家深入地交换意见，获得了广泛共识。

接着，各位专家就各自研究领域分别为大家做了精彩的学术报告。机械性介导的压力感受器对于触觉，机械力引起的痛觉、听觉、平衡感的形成至关重要，但是其具体的作用机制不太清楚。浙江大学基础医学院的康利军研究员介绍了利用全细胞膜片钳技术记录活体线虫神经元电生理活动，揭示 TRP-4 通道在感受机械性压力中的重要作用，及其介导触觉生成过程中的分子机制。钾离子通道在几乎所有生物体中存在，并在生命的各个过程中有重要参与，如在衰老过程中，钾离子通道氧化引起感觉功能丧失。来自中科院上海神经科学研究所的蔡时青研究员利用反向遗传学的方法，筛选秀丽线虫中影响钾离子通道功能的相关基因，进一步阐述秀丽线虫中钾离子通道的功能和调控机理。RNA 剪接是调控真核基因表达的主要机制之一，RNA 剪接和许多疾病相关。中南大学医学遗传学国家重点实验室的马龙教授研究组通过遗传筛选，在秀丽线虫中发现 *tos-1* 基因可以作为 RNA 剪接的标志物，其剪切受到 *uaf-1* 和 *saf-1* 基因的影响；并且他们还发现 *mfap-1* 基因能抑制 *unc-93* 突变株的表型，能改变 *tos-1* 基因的剪接，从而证实 *mfap-1* 也是一个 RNA 剪接关键因子，这一研究对了解 RNA 剪切及其相关的人类疾病开拓了新的视野。中国科技大学的单革教授也介绍了大肠杆菌的内源非编码 RNA 与秀丽线虫基因表达及生理表现之间的密切联系，发现 OxySRNA 和 DsrARNA 是不同条件处理的大肠杆菌表达的非编码 RNA，影响秀丽线虫的进食和生理表现，并对其机理进行了深入的研究。

随后，中科院生物物理所刘平生研究员详细介绍了他们对于脂滴在代谢性疾病、生物能源和进化三大方面的研究，展示了他们在脂滴膜蛋白共性、脂滴形成及动态变化、脂滴起源等三个重大科学问题上取得的最新成果。他们最近完成了秀丽线虫脂滴的分离和纯化，脂滴蛋白组学研究发现了两个在脂滴表面表达的基因 *mdt-28* 和 *dhs-3*，能够作为秀丽线虫脂滴的特异标志物，追踪脂滴形成的变化、检查秀丽线虫脂肪含量及其调控机制。他们同时发现脂滴的积累可能与心衰有关，特别是脂肪水解酶 ATGL 功能失常是导致心脏脂肪积累、心衰的主要原因。另外，他课题组发现并分离了一种高效富集油脂的细菌，并试图将之与光合蓝细菌相重组，对于推动生物柴油的开发有着重大意义。

最后，华中科技大学生命科学与技术学院吴政星教授带领的课题组利用秀丽线虫，用可以显著提高或降低秀丽线虫摄食速率的化学物质加以处理，筛选可以恢复秀丽线虫正常摄食速率的基因，从而阐明线虫在选择喜欢的食物和逃避不喜欢食物时的两条摄食调节路径的分子机制，以及 5-HT、tyramine/octopamine 和它们的受体在促进和抑制秀丽线虫摄食过程中的相互作用关系。吴政星研究员的报告使大家对秀丽线虫的摄食行为及其调节有了更深的了解。

研讨会学术气氛热烈，与会专家和听众进行了广泛的讨论，提出了很多宝贵的意见和建议，现场师生相互受益匪浅。本次会议的顺利召开，对于活跃学术氛围，促进国内秀丽线虫研究人员间的合作交流起到了非常重要的推动作用，并对促进国内秀丽线虫研究的发展，提高秀丽线虫的研究水平具有重要意义！

丁毅弘，梁斌

(中国科学院和云南省动物模型与疾病机理重点实验室，昆明动物研究所，昆明，教场北路 32 号，650223)