

## 嗜水气单胞菌菌蜕的制备及其对银鲫的口服免疫

储卫华<sup>1</sup>, 庄禧懿<sup>1</sup>, 陆承平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

(<sup>2</sup>南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

**摘要:** 菌蜕系统是一个自身具有佐剂性质的新型疫苗体系, 不含细胞质内容物但具有细菌的完整表面抗原结构, 可诱导机体的体液、细胞免疫应答及增强黏膜免疫反应。本研究通过将带有裂解基因 E 的质粒 pElysis 转化至嗜水气单胞菌 J-1 株中, 对 Ah J-1(pElysis) 进行温度诱导, 温度从 28℃ 升至 42℃, 每隔 15min 检测菌液的  $OD_{600}$  值, 测定其溶菌动力学, 并做无菌检验, 用扫描电镜观察裂解后的细菌形态, 研究其作为口服疫苗对银鲫的效果。结果显示, 通过温度诱导, 嗜水气单胞菌 J-1(pElysis)  $OD$  值在诱导 30min 后开始持续下降, 75min 时开始趋于平稳, 到 120min 溶菌效率达 99.99%, 诱导 16h 后进行无菌检验, 证实其无活菌。扫描电镜观察绝大部分菌体经诱导后形成菌蜕, 细胞两端有溶菌通道。动物试验表明, 用菌蜕口服免疫的银鲫, 在第 5 周产生较高的凝集抗体, 达到  $2^7$ , 并能维持 2 周; 而甲醛灭活苗组为  $2^6$ , 维持时间仅一周; 生理盐水对照组效价仅 2。攻击试验表明, 菌蜕疫苗组和甲醛灭活疫苗组对嗜水气单胞菌强毒株 J-1 的攻击均有保护作用, 其相对保护率分别为 16/20(78.95%) 和 12/20(57.9%), 显示菌蜕疫苗比普通灭活疫苗能更有效地激活机体的免疫保护。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 菌蜕; 疫苗

中图分类号: Q939.91 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0202-05

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)能够引致淡水鱼等的败血症和人的腹泻等<sup>[1]</sup>。治疗和预防细菌性鱼病主要依赖抗生素, 这不仅会引起鱼类生理上的障碍及药物残留、环境污染、水中有益菌群失调等一系列问题发生, 而且会导致细菌的抗药性并会潜在影响人类细菌性传染病的防治。由于鱼类已经具有专门的免疫器官和初步的特异性免疫防御机制, 接种疫苗可诱导鱼体免疫应答, 从而达到防治鱼类细菌性病害的目的。鱼类疫苗免疫主要采用浸泡免疫和肌肉注射免疫两种方法, 二者各有优缺点: 浸泡免疫方便, 但效果差; 而肌肉注射免疫效果虽然较好, 但因其既耗费时间, 又耗费人力而很难推广应用。鉴于鱼类疫苗免疫方面存在的问题, 选择一种能口服, 并能有效刺激机体产生免疫应答的疫苗成为研究

热点。

菌蜕(Bacterial ghosts, BGs)是一种具有佐剂性质并能携带外源抗原的新型疫苗递送体系, 它是革兰氏阴性菌被噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 裂解后形成的完整细菌空壳, 虽不含有胞浆成分, 但仍保持细菌细胞形态、黏附性、细菌表面抗原性等特性。由于它具有完整的细菌表面抗原结构, 所以它能直接作为疫苗使用, 利用基因工程手段, 可以非常便利地将外源抗原蛋白插入菌蜕的内膜、外膜或周质等多个部位, 构建重组菌蜕多价疫苗。菌蜕疫苗具有制备方法简便、安全性好、不需冷藏, 并可以用来制备多价联合疫苗等优点。因此, 菌蜕技术已成为一项研究开发新型基因工程疫苗的平台技术<sup>[2~7]</sup>。本试验以常用的鲤科鱼银鲫为试验动物, 以淡水鱼常见的病原菌嗜水

\*通讯作者。E-mail: [lucp@njau.edu.cn](mailto:lucp@njau.edu.cn)

作者简介: 储卫华(1971-), 男, 江苏东台人, 博士, 副教授, 主要从事微生物学与免疫学、生物工程等方面的研究。Tel: +86-25-83271323; E-mail: [chuweihua2002@yahoo.com.cn](mailto:chuweihua2002@yahoo.com.cn)

收稿日期: 2007-10-18; 修回日期: 2007-11-19

气单胞菌为对象, 将裂解基因 E 质粒转化进入, 经热诱导方法高效制备具有完整外膜的菌蜕, 研究其裂解效率、制备条件、形态以及作为口服疫苗对鲫的免疫效果, 为进一步研发有效的菌蜕疫苗和佐剂形式奠定了良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒:** 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)J-1 株系陈怀青等从患细菌性败血症的病鱼中分离而得, 由南京农业大学动物医学院微生物实验室保存, AhJ-1 对鲫的半数致死量为  $5 \times 10^3$  CFU<sup>[8]</sup>。将 AhJ-1 甘油菌种划线接种于 LB 琼脂平板, 28℃ 培养过夜, 再挑取适量菌体接种于 LB 培养基中 (pH7.2), 28℃ 震荡培养, 培养 24 h 后进行细菌计数。

裂解质粒 pElysis, 带有裂解基因 E, 由本室构建, 其结构见图 1; *E.coli* DH<sub>5a</sub>(pElysis)由本室保存。

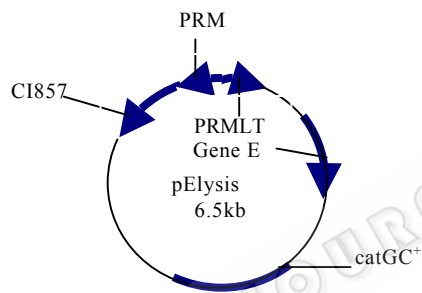


图 1 含裂解基因 E 质粒 pElysis 示意图

Fig.1 Partial restriction map of pElysis consisting of the lysis gene E.

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 主要仪器有: PCR 仪 (170-6701, 美国伯乐), 水平电泳仪 (DYCP-31D, 北京六一仪器厂), 凝胶成像仪 (Gel Doc XR 170-8170, 美国伯乐), 扫描电子显微镜 (Hitachi S-2150, 日本)。胰蛋白胨、酵母浸提取物、氯霉素 (catGC<sup>+</sup>), TaqDNA 聚合酶, dNTP, DNA 分子量 Marker, 质粒提取试剂盒, 琼脂糖等试剂均购自上海生工生物工程公司, 其它试剂位国产分析纯。

### 1.2 嗜水气单胞菌菌蜕的制备

**1.2.1 质粒 pElysis 转化嗜水气单胞菌:** 参照文献[9]方法进行, 从 *E.coli* DH<sub>5a</sub>(pElysis)提取质粒, 并用氯化钙法将质粒 pElysis 转化入嗜水气单胞菌 J-1 株, 28℃, 在氯霉素(30mg/L)抗性的 LB 平板上进行筛选, 挑取单菌落于 LB 液体培养基(catGC<sup>+</sup>)中培养, 进行 E 基因 PCR 鉴定, P<sub>1</sub>: 5'-ATGGTACGCTGGACTT-

TGTG-3', P<sub>2</sub>: 5'-ACATTACATCACTCCTTCCG-3'。

**1.2.2 Ah J-1 菌蜕的制备:** 从 -70℃ 冰箱中取出冻存的 Ah J-1(pElysis)接种于 LB 平板上, 28℃ 恒温箱培养过夜; 挑单菌落接种于 5mL 氯霉素(30mg/L)抗性的 LB 液体培养基中, 28℃ 200r/min 摇床过夜培养; 次日, 转接种于 50ml 氯霉素抗性的 LB 液体中, 28℃ 200r/min 摇床培养至 600nm 处 OD 值为 0.4~0.5 时, 开始把温度迅速升至 42℃, 进行诱导 14~16h 即得。

### 1.3 Ah J-1(pElysis)溶菌动力学试验

在 5mL 含 30mg/L 氯霉素的 LB 中接种 Ah J-1 (pElysis), 28℃ 200r/min 过夜培养, 然后转接 1~2mL 于 50ml 含 30mg/L 氯霉素的 LB 中, 28℃ 200r/min 摇床培养至 600nm 处 OD 值为 0.4~0.5 时, 将培养物分为两瓶(各 25mL), 一瓶继续 28℃ 培养, 一瓶 42℃ 培养, 诱导 E 基因表达。然后每 15min 取样, 测 OD<sub>600</sub> 的吸光度值, 直到 42℃ 培养物的 OD<sub>600</sub> 趋于平稳为止。

### 1.4 电镜观察

将诱导 4h 的菌液 4 000g 离心 10min, 用 0.01 mmol/L PBS 洗涤 3 次, 离心, 以 2.5% 戊二醛固定 60min, 经多步乙醇脱水, 丙酮脱水等步骤处理后用扫描电镜进行观察。

### 1.5 菌蜕疫苗动物试验

**1.5.1 疫苗的制备:** 菌蜕按 1.2.2 制备, 通过平板计数进行无菌检测, 确认无菌, 显示溶菌结束。溶菌结束后离心, 用 PBS 洗涤 3 次定容到原体积即为菌蜕疫苗。置 4℃ 冰箱备用。

### 1.6 动物免疫试验

银鲫(*Carassius auratus gibelio*, 以下简称鲫)60 尾购自南京市某养殖场, 每尾约 100~150g, 在水温为 (27±1)℃ 的水族箱内充氧饲养, 水体积为 30L。观察 7d, 证实无病后, 用于试验。

将 AhJ-1 和 Ah J-1(pElysis)按 1.1.1 和 1.2.2 方法培养, 并记数, 加入甲醛或升温灭活制备疫苗, 在每天观察鱼的采食量的基础上, 将疫苗或生理盐水按 4mL 疫苗/1000g 饲料, 添加粘合剂, 均匀喷洒在自制的鱼用普通粉状饲料中并制成颗粒饲料, 热空气烘干, 连续投喂 7d。

**1.6.1 全菌凝集试验:** 将 60 尾健康鲫随机分成 3 组, 各组每天通过饲料摄入一定量的疫苗或生理盐水, 各组剂量分别为: 试验组每尾口服含菌蜕疫苗, 对照组口服含甲醛灭活疫苗和生理盐水的饲料, 每隔一周尾静脉采血, 分离血清, 参照 Roberson 等的方法<sup>[10]</sup>进行微量板凝集试验, 检测鲫对 AhJ-1 的全菌凝集抗体。

1.6.2 攻击试验：在鲫口服菌蛻疫苗后第 6 周，用  $1.5 \times 10^7$  CFU 的 J-1 攻击，观察 7d，记录死亡数，并根据公式计算免疫保护率(RPS)， $RPS = (1 - \text{免疫组死亡数} / \text{对照组死亡数}) \times 100\%$  [11]。同时设对照组。

## 2 结果

### 2.1 转化菌 E 基因的 PCR 鉴定

将转化子进行 E 基因 PCR 扩增，经 1%琼脂糖电泳，出现 276bp 的条带，其结果跟预期的一致，说明质粒 pElysis 已经成功转化进入嗜水气单胞菌 J-1 中。

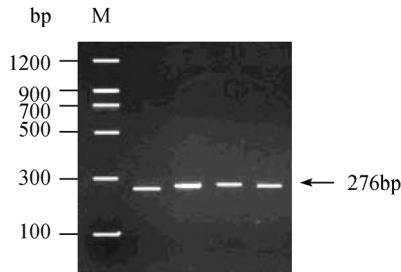


图 2 嗜水气单胞菌转化子 E 基因 PCR 产物电泳图  
Fig.2 Results of PCR products of *A.h* J-1 transformants consisting the E gene.

### 2.2 Ah J-1(pElysis)溶菌动力学

将嗜水气单胞菌 Ah J-1(pElysis)菌株在 28℃ 200 r/min 培养至对数生长期中期，然后 42℃ 诱导 E 基因表达。结果显示，溶菌在诱导表达后 30min 后就开始， $OD_{600}$  不断下降，75min 开始趋于平稳(图 3)。溶菌至

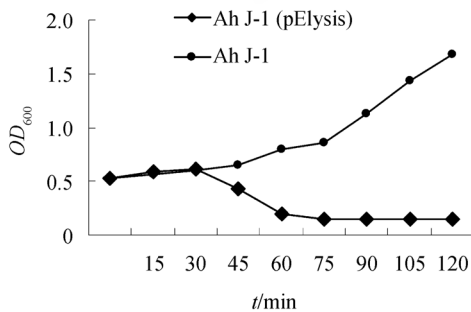


图 3 温度诱导 E 基因表达的嗜水气单胞菌溶菌过程  
Fig.3 Growth and lysis curves of *A. hydrophila* J-1(Elysis) by temperature induction of gene E expression. At time zero, the cultures were shifted from 28℃ to 42℃.

120min 时，培养物活菌数从  $7.5 \times 10^8$  CFU/mL 下降到  $3.0 \times 10^3$  CFU/mL，溶菌效率达 99.99%。

### 2.3 电镜观察

绝大部分细菌经诱导后形成菌蛻，呈空泡状的结构，而未裂解的细菌很少，呈实体(见粗箭头所示)。菌蛻细胞保持了完整的一层细菌外膜，但由于胞内的物质已经被溶解，细菌表面形态发生明显的皱缩，并能看到菌蛻细胞上的溶菌孔道，溶菌孔道位于细胞两极(图 4)。

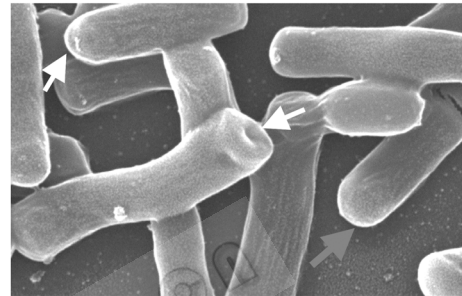


图 4 嗜水气单胞菌 J-1 菌蛻电镜照片(2000×)  
Fig.4 Scanning electron micrograph of *A. hydrophila* J-1 lysed by the induction of the lysis E gene(2000×). Arrows indicate trans-membrane tunnels.

### 2.4 动物免疫试验

口服含菌蛻疫苗的鲫在第 5 周时，发现其全菌凝集效价最高，达  $1:2^7$ (图 5)。第 6 周时用  $1.5 \times 10^7$  CFU 的 J-1 进行攻击，用菌蛻疫苗免疫组的相对存活率为 80%，免疫保护率(RPS)为 78.95%(表 1)，高于甲醛灭活组(57.9%)。

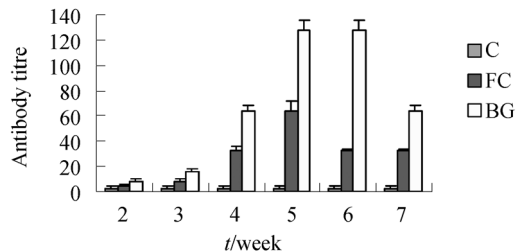


图 5 鲫口服菌蛻疫苗后抗体效价  
Fig.5 Serum antibody responses evoked in *Carassius auratus gibelio* following immunization with AhJ-1 ghost.

表 1 菌蛻免疫组与对照组的相对存活率

Table 1 The relative percent survival (RPS) of vaccinated with Ah J-1 ghost vaccine and control fish after challenged with *Aeromonas hydrophila* J-1

Group	Number of experiment fish	Number of survival	Ratio of survival	RPS/%	Statistical significance
Bacterial ghost vaccine	20	16	80.0	78.95	$P < 0.05$
Formalin killed vaccine	20	12	60.0	57.9	$P < 0.05$
Saline	20	1	5.0		

### 3 讨论

细菌菌膜的优势在于保留了与活菌一样的细胞膜结构和相关抗原蛋白,并可在壳内携带外来基因。由于其保留的细菌膜含有完整的膜蛋白,菌毛及其它免疫刺激成分如脂多糖,肽聚糖等,这些成分可被树突状细胞和巨噬细胞的相关膜受体识别,有效的吞噬进而激发相关免疫效应<sup>[5, 13, 14]</sup>,同时能诱导细胞因子的产生<sup>[15]</sup>。细菌菌膜本身同时又是很好的免疫佐剂,这也是细胞菌膜作为基因疫苗的运送系统的最大特点。细菌菌膜特别适合作为黏膜免疫的疫苗运送系统,通过口服途径也可激发体液和细胞免疫应答<sup>[16]</sup>。

鱼类的口服疫苗是较为方便的免疫途径,但口服方式及免疫效果均有待进一步改善。李凤玲等为提高活嗜水气单胞菌口服疫苗的效果,试用草鱼  $\alpha_2$  巨球蛋白作为保护剂及免疫增强剂<sup>[17]</sup>。菌膜口服疫苗与之相比,无疑有较大优势,免疫原性好,菌膜口服免疫鲫能有效地刺激鲫抗体的产生,其抗体效价和免疫保护率都高于常规的甲醛灭活组,说明菌膜疫苗本身具有佐剂的作用<sup>[17,18]</sup>。添加保护剂后是否可进一步增强免疫效果,有待进一步研究。

转化有噬菌体 PhiX174 的裂解基因 E 的质粒的方法有多种,本研究采用通过氯化钙转化法获得理想结果,此法可重复性好,易于掌握,与其他研究者的研究结果相类似<sup>[19,20]</sup>。采用热诱导法当温度由 28℃ 升高到 42℃ 后,75min 裂菌效果已趋于稳定,14h 时就达到完全裂解,比甲醛灭活细菌极大地节省了时间,并且没有甲醛对机体的不良刺激。

### 参 考 文 献

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报 (*Journal of Fisheries of China*), 1992,16(3): 282-288.
- [2] Jalava K, Henselb A, Szostaka M, *et al*. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *Journal of Control Release*, 2002, 85: 17-25.
- [3] Szostak MP, Hensel A, Eko FO, *et al*. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines. *Journal of Biotechnology*, 1996, 44(1-3): L161-170.
- [4] Eko FO, Witte A, Huter V, *et al*. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system. *Vaccine*, 1999, 17(13-14): 1643-1649.
- [5] Tabrizi CA, Walcher P, Mayr UB, *et al*. Bacterial ghosts - biological particles as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15(6): 530-537.
- [6] Ebensen T, Paukner S, Link C, *et al*. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines. *J Immunol*, 2004, 172(11): 6858-6865.
- [7] Kudela P, Paukner S, Mayr UB, *et al*. Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunother*, 2005, 28(2): 136-143.
- [8] 陈怀青, 陆承平. 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究, 南京农业大学学报(*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1991, 14(4): 87-9.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [10] Roberson BS. Bacterial agglutination, In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, eds, *Techniques in Fish Immunology*, Fair Haven NJ: SOS Publications, 1990, 81-86.
- [11] Eills AE. *General principles of fish vaccination*. Academic Press, 1988: 1-19
- [12] Jalava K, Hensel A, Smstak MP, *et al*. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *J Control Release*, 2002, 85(1-3): 17-25.
- [13] Mayr U. B., Walcher P., Azimpour C., *et al*. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, (57): 1381-1391.
- [14] Mader HJ, Szostak MP, Hensel A., *et al*. Endotoxicity does not limit the use of bacterial ghosts as candidate vaccine, *Vaccine* 1997, 15: 195-202.
- [15] Mayr UB, Haller C, Haidinger W, *et al*. Bacterial Ghosts as an Oral Vaccine: a Single Dose of *Escherichia coli* O157: H7 Bacterial Ghosts Protects Mice against Lethal Challenge *Infection and Immunity*, 2005, 73(8): 4810-4817
- [16] 李凤玲, 陆承平. 口服  $\alpha_2$  巨球蛋白对剑尾鱼的免疫保护作用. 南京农业大学学报(*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2005, 28(2): 144-146.
- [17] Kwon SR, Nam YK, Kim SK, *et al*. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, (20): 621-626.
- [18] Eko FO, Mayr UB, Attridge SR, *et al*. Characterization and immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts expressing toxin-coregulated pili. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83: 115-123.
- [19] Kwona SR, Namb YK, Kim SK, *et al*. Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene E, *Aquaculture* 2005, (250): 16-21.
- [20] Panthel K, Jechlinger W, Matis A, *et al*. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by phix Protein E-Mediated Inactivation and Their Evaluation as Vaccine Candidates, *Infection & Immunity*, 2003, 71(1): 109-116.

## Generation of *Aeromonas hydrophila* ghosts and their evaluation as oral vaccine candidates in *Carassius auratus gibelio*

Weihua Chu<sup>1</sup>, Xiyi Zhuang<sup>1</sup>, Chengping Lu<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

(<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The bacterial ghost (BG) system is a novel vaccine delivery system endowed with intrinsic adjuvant properties. Bacterial ghosts are nonliving Gram-negative bacterial cell envelopes devoid of cytoplasmic contents while maintaining their cellular morphology and native surface antigenic structures. They are produced by PhiX174 protein E-mediated lysis of Gram-negative bacteria, and can induce humoral and cellular immune response, including mucosal immune responses. Plasmid pElysis consisting E gene was transformed into AhJ-1. Through shifting the culture temperature from 28°C to 42°C, *A. hydrophila* J-1 (pElysis) was induced to lyse and the  $OD_{600}$  value of culture media was measured every 15 minutes during the induction. The lysed bacteria were observed by scanning electron microscopy (SEM). The *A. hydrophila* ghosts (AHG) used as oral vaccine were also investigated. The  $OD_{600}$  value of *A. hydrophila* J-1(pElysis) began to decline after 30min of induction, and after 75min of induction, the  $OD_{600}$  value decline speed become slowly. The efficiency of ghost induction in non-lyophilized *A. hydrophila* was 99.99%, 16 hours post induced, no live bacteria can be detected in culture. Scanning electron microscopy observation proved that most lysed bacteria were emptied. Fish vaccination experiments shows that the antibody evoked highest degree after 5 weeks by oral administration of bacterial ghost vaccine and the agglutination antibody titer reached  $2^7$  and continued two weeks, while the agglutination antibody titer of formalin killed vaccine only reached  $2^6$  and only maintained one week. After challenged with the parent strain J-1, the survival rate of bacterial ghost vaccinated fish was higher than the control group and formalin killed vaccine group, the relative percent survival (RPS) was 78.95% (16/20), but the RPS of formalin killed vaccine group was 57.9% (12/20). This suggests that the bacterial ghost vaccine has higher potential to induce protective adaptive immunity than normal vaccine.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*; bacterial ghost; vaccine

\*Corresponding author. E-mail: lucp@njau.edu.cn

Received: 18 October 2007/Revised: 19 November 2007

### 答 作 者 问

问：我的文章现已审查完毕，并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询，如果文章修改后，再次投递，是否还需要交稿件受理费？是否仍然用原论文编号提交？

答：这要分2种情况，(1)如果你的文章已经被通知“退稿”了，那么文章修改之后再投来的将按“新稿件”处理，从程序上来讲和新投稿件是一样的，仍需要缴纳稿件受理费，只是为便于稿件受理进程，请作者在投稿时注明“原稿件号+修后再投”字样。(2)如果是编辑部在审稿意见中要求您改后再投来“复审”，则不作为新稿处置，请直接注明“原稿件号+修后再审”字样，不再另交稿件受理费。