

斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球疫苗的示踪及免疫效果

张小江^{1,2}, 任燕², 常藕琴², 石存斌², 李宁求², 吴淑勤²

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025; 2. 中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 采用可生物降解的合成高分子聚 DL- 乳酸 - 聚乙二醇共聚物 (DL-poly lactide-co-polyethylene glycol, PELA), 包裹哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*, *Vh*) 重组外膜蛋白 OmpK 后, 制备成 PELA-OmpK 微球。微球粒径小于 10 μm , 且 94% 粒径小于 5 μm , 平均粒径为 2.8 μm 。蛋白包裹率达 79.4%。斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 口服四甲基异硫氰酸罗达明 (TRITC) 荧光素标记的 OmpK-PELA 微球后, 第 1 天在其后肠观察到大量红色荧光微球, 第 3 天荧光微球数量明显减少, 第 7 天荧光微球基本消失。免疫组化研究结果表明, 口服 PELA-OmpK 组在斜带石斑鱼后肠组织黏膜层可见较强的棕黄色阳性着色。口服 PELA-OmpK 组血清抗体效价 (峰值 2^{10}) 显著高于口服 OmpK 蛋白溶液组 (峰值 2^4) 与对照组 ($P<0.05$), 低于注射组 (峰值 2^{12}) ($P<0.05$); 口服 PELA-OmpK 组的黏液抗体效价显著高于口服 OmpK 蛋白组 ($P<0.05$)。初次免疫 30 d 后用活菌攻击, 口服 PELA-OmpK 组的相对保护率 (62.5%) 显著高于口服 OmpK 蛋白组 (12.5%) ($P<0.05$); 低于注射组 (87.5%) ($P<0.05$)。结论为采用可生物降解材料 PELA 作为鱼类口服疫苗的投递载体是可行的。[中国水产科学, 2008, 15(5): 837-844]

关键词: PELA; 口服疫苗; 微球; 示踪; 免疫效果

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0837-08

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属于鲈形目 (Perciformes), 鲈科 (Serranidae), 石斑鱼亚科 (Epinephelinae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 俗称青斑, 其肉质鲜美, 营养丰富, 为海水名贵鱼类, 中国台湾、广东、海南、福建、浙江等沿海地区养殖较多。近年来由于大规模集约化养殖, 改变了鱼类的生活习性, 病害日益严重, 其中弧菌病尤为突出。利用疫苗防治弧菌病已有成功范例, 但大多数使用的是注射免疫接种方法^[1-4]。而口服免疫是一种更为理想的免疫接种方式, 其实施方便、安全易行、无应激, 且便于对鱼群再次免疫, 不受鱼体大小及时间的限制, 但其缺点是易被胃肠道蛋白酶消化^[5]。因此, 有必要探索一种有效的载体投递系统, 避免蛋白亚单位疫苗受胃肠道消化酶及酸性环境的影响。可生物降解载体材料包裹疫苗有保持抗原稳定性与防止蛋白在胃肠道降解的功能^[6], 为高效口服疫苗的制备提供了可能。本实验采用人工合成的可生物降解载体材料聚-DL-乳酸-聚乙二醇共聚物 (DL-poly lactide-co-polyethylene glycol, PELA)

包裹哈维氏弧菌重组外膜蛋白 OmpK 制备口服微球疫苗, 经口给药免疫斜带石斑鱼后, 运用荧光及免疫组化技术研究抗原在斜带石斑鱼后肠组织的分布情况, 并分析其血清和后肠黏液的抗体效价变化规律及免疫保护效果, 为进一步了解口服免疫机制, 研制出鱼用新型疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 聚-DL-乳酸-聚乙二醇共聚物 PELA [P (L-PEG2000 (90: 10)) Mv 20 000~23 000, 购自成都有机化学研究所; 明胶 (医用级) 由天津市化学试剂三厂生产; 聚乙烯醇 (PVA) 1750 $\pm$ 50 购自国药集团化学试剂有限公司; 二氯甲烷由天津大茂化学试剂厂生产; 四甲基异硫氰酸罗达明荧光素 (TRITC) 由 SIGMA 公司生产; 即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色剂由武汉博士德公司生产。

1.1.2 实验鱼 斜带石斑鱼购于广东省大亚湾水产试验中心, 健康无损伤, 初始体质量 (20.7 $\pm$ 3.8) g。

收稿日期: 2008 03 04; 修订日期: 2008 05 09.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA100308); 农业部农业结构调整重大技术研究专项 (05-06-02B).

作者简介: 张小江 (1980-), 男, 硕士, 从事水产动物免疫学及病害控制研究. E-mail: xiaojiangzhang008@163.com

通讯作者: 吴淑勤. E-mail: wushuqin001@21cn.com

用人工海水饲养在水泥池,增氧泵充氧,每天按1%鱼体质量投喂饲料,实验期间水温为28~32℃。

1.2 重组外膜蛋白OmpK的制备

重组外膜蛋白OmpK工程菌*Escherichia coli* DH5 α 由本实验室构建^[7]。将工程菌用少量LB培养液37℃活化过夜;1:10接种LB培养液于30℃培养至OD₆₀₀值为0.5~0.6,42℃热诱导5~6h。超声波破碎细菌,提取包涵体,溶解复性后冷冻干燥,20℃保存备用。

1.3 PELA-OmpK微球的制备

按复乳化-溶剂挥发法^[8]制备微球。用光学显微镜观测其形态,并随机测试至少500个微球粒径,计算平均粒径及粒径分布。称取一定量的干燥PELA-OmpK微球,加入2mL二氯甲烷,待微球溶解后加入4mL PBS(0.2mol/L, pH7.4)缓冲液,剧烈震荡过夜,5000r/min,4℃离心10min去除残渣,取上清液采用Bradford法测定蛋白含量。重复做3次,取平均值。计算公式:包裹率=(微球的蛋白含量/加入的蛋白量)×100%。

1.4 荧光示踪观察实验

1.4.1 TRITC标记OmpK 参照热娜-吐尔地等^[9]的方法进行。用碳酸盐缓冲液(0.25mol/L, pH9.0)配制一定浓度的OmpK溶液,加入TRITC(蛋白与荧光素的质量比为200:1),在冰浴和避光条件下搅拌12~14h。用缓冲液在低温(0~4℃)条件下充分透析,荧光显微镜检测直至除去游离荧光素,4℃保存备用。

1.4.2 TRITC标记的OmpK-PELA微球的制备

用TRITC荧光素标记的OmpK溶液替代OmpK溶液,制备方法同1.3。

1.4.3 分组与口灌 将斜带石斑鱼随机分成4组,每组10尾。分为TRITC荧光素标记的OmpK-PELA微球疫苗组;TRITC荧光素标记的OmpK蛋白溶液组;TRITC荧光素溶液组;生理盐水对照组。用自制的灌喂器将每组灌喂材料经口咽腔灌注到胃,每尾0.2mL。

1.4.4 荧光示踪观察 口灌后第1天、3天、7天,分别从各实验组随机捞取1尾斜带石斑鱼,取后肠组织制成冰冻切片,用荧光显微镜观察各组灌喂材料在斜带石斑鱼后肠组织的分布。

1.5 免疫组化实验

将斜带石斑鱼随机分成3组,每组10尾,第1组为PELA-OmpK微球疫苗组,第2组为OmpK蛋

白溶液组,第3组为生理盐水对照组。口灌方法同1.4.3。口灌后第1天、3天、7天,从各组随机捞取2尾斜带石斑鱼,取后肠组织用4%多聚甲醛固定24h,制备石蜡切片做免疫组化。制备好的切片加3%甲醇-H₂O₂孵育20min,封闭内源性过氧化物酶,PBS洗3次,每次5min;热修复抗原,PBS洗3次,每次5min;加入一定浓度的OmpK兔抗血清(由本实验室制备),室温孵育90min或4℃过夜,PBS洗3次,每次5min;滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,室温孵育10~30min,PBS洗3次,每次5min;DAB显色在显微镜下观察结果;自来水充分冲洗,苏木精复染,脱水,封片后显微镜下观察。

1.6 免疫效果实验

1.6.1 实验鱼分组与免疫 将斜带石斑鱼随机分成4个处理组,第1组为口服PELA-OmpK微球疫苗组,第2组为口服OmpK蛋白溶液组,第3组为弗氏不完全佐剂-OmpK注射组,第4组为口服生理盐水对照组。每组30尾,每个实验处理同时设2个平行组。口服免疫采用口灌,方法同1.4.3;注射免疫采取腹腔注射,每尾注射0.1mL。2周后加强免疫1次。

1.6.2 血清与肠黏膜的采集 首次免疫后第7天、14天、21天、28天、56天,每个平行组随机捞取3尾,尾静脉取血0.2mL,室温静置2h,4℃过夜,4000r/min离心10min收集血清,-20℃保存备用。同时,在各时间段从各平行组随机捞取3尾斜带石斑鱼,取后肠组织,剖开,清除粪便,用载玻片小心刮取后肠黏膜加500μL PBS匀浆,10000r/min,4℃离心10min取上清,20℃保存。

1.6.3 间接ELISA法测抗体效价 96孔ELISA板用含0.05%多聚赖氨酸100μL包被液室温处理1h,低盐洗液洗2次;用PBS调整抗原OmpK浓度,每孔加100μL OmpK,包板4℃过夜,低盐洗液洗3次;加350μL 5%脱脂奶粉,22℃包被2h,用低盐洗液洗3次;用2×PBS稀释样品(血清或黏膜上清),22℃包被2h或者4℃包被过夜,高盐洗液洗5次;加100μL鼠抗斜带石斑鱼IgM单抗(福建省农业技术科学研究所惠赠)室温孵育2h,高盐洗液洗5次;加100μL辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG室温孵育2h,高盐洗液洗5次;加OPD(邻苯二胺)显色10min;2mol/L硫酸终止反应。酶标仪于波长450nm读数。在加样品同时设PBS为阴性对照,结果为S/P≥2.1时判为阳性(S表示样品OD值,P表示阴性对照的OD值)。

1.6.4 免疫保护实验 免疫后第 30 天,从各组随机挑选 30 尾鱼,用浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的哈维氏弧菌 EcGS020802 菌株,以 0.1 mL/尾的剂量腹腔注射感染斜带石斑鱼。于水温 25 °C 的桶中饲养 15 d,记录感染鱼的发病和死亡情况。依照下式计算相对免疫保护率 (Relative percent survival, RPS):

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

1.7 数据分析

实验所得数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$),采用软件 OringinPro 6.0 进行数据处理,并利用 t 检验进行差异性分析,当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 PELA-OmpK 微球的特征

光学显微镜下,微球呈圆球状,粒径大小较为均匀 (图 1),粒径小于 10 μm 。小于 5 μm 的微球占 94% (图 2),平均粒径 2.8 μm 。按复乳化-溶剂挥发法制备的微球蛋白包裹率达 79.4%。

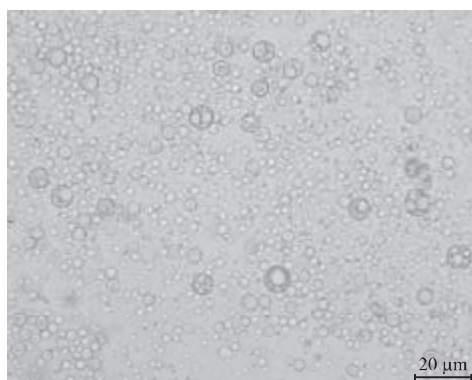


图 1 光学显微镜下的微球形态 ($\times 400$)

Fig. 1 Characteristics of microspheres under optical microscope

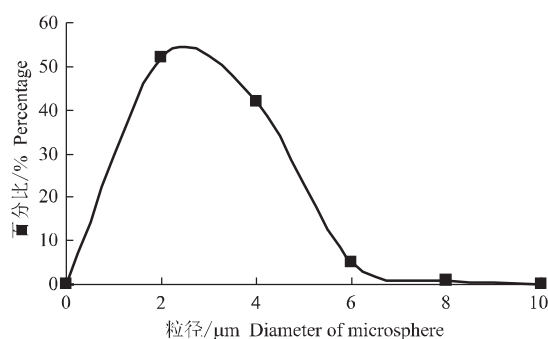


图 2 微球粒径分布图

Fig. 2 Size distribution of microspheres

2.2 荧光示踪观察

荧光显微镜观察各实验组后肠组织冰冻切片。斜带石斑鱼口灌荧光素标记的 Ompk-PELA 微球的第 1 天,在其后肠组织可观察到大量红色球状荧光颗粒 (图版 I-1),第 3 天荧光颗粒明显减少 (图版 I-2),第 7 天荧光颗粒基本消失 (图版 I-3);口灌荧光素标记的 Ompk 蛋白的第 1 天,在其后肠组织可见少量的红色荧光 (图版 I-4),第 3 天红色荧光基本消失 (图版 I-5),第 7 天未观察到红色荧光。荧光 Ompk-PELA 微球在斜带石斑鱼后肠组织的存在时间较荧光素 Ompk 蛋白的存在时间长。口灌荧光素溶液对照组后肠组织只可见红色荧光,未见荧光颗粒 (图版 I-6),至第 7 天还可观察到红色荧光。

2.3 免疫组化实验

斜带石斑鱼后肠组织免疫组化实验结果表明,口灌 PELA-OmpK 微球疫苗后第 1 天,在后肠黏膜层可见较强的棕黄色阳性着色 (图版 I-7),第 3 天棕黄色着色变浅 (图版 I-8),至第 7 天还可见少量棕黄色阳性着色 (图版 I-9);口灌 OmpK 蛋白溶液后第 1 天,在后肠黏膜层可见较弱的棕黄色阳性着色 (图版 I-10),第 3 天有微弱的棕黄色阳性着色 (图版 I-11),至第 7 天,无阳性着色;生理盐水对照组后肠黏膜层无阳性着色 (图版 I-12)。口服 PELA-Ompk 微球疫苗在斜带石斑鱼后肠黏膜层的阳性着色比口服 OmpK 蛋白溶液强,而且 PELA-OmpK 微球在后肠黏膜存在时间延长,说明 PELA 作为口服疫苗投递载体可携带蛋白抗原穿过后肠上皮屏障,主要分布在后肠的黏膜层,有利于后肠黏膜对抗原的吸收递呈。

2.4 免疫效果实验

2.4.1 免疫鱼血清抗体效价 斜带石斑鱼血清中抗体效价如图 3 所示。从图 3 可以看出,口服 PELA-Ompk 微球疫苗组血清抗体效价在第 28 天达到峰值 2^{10} ,而后持续下降,至第 56 天效价维持在 2^5 ;口服 OmpK 蛋白溶液组血清抗体效价变化不大 (峰值 2^4);注射弗氏不完全佐剂-OmpK 组血清抗体效价第 14 天达到第 1 个峰值 2^{11} ,加强免疫后第 28 天达到第 2 个峰值 2^{12} ,而后持续下降,第 56 天降至 2^8 。

统计分析表明,口服微球疫苗组的血清抗体效价除第 7 与 21 天外,其余时间点均显著高于对照组 ($P < 0.05$);口服 OmpK 蛋白溶液组和对照组的血清抗体效价无显著性差异 ($P > 0.05$);注射佐

剂-OmpK 组的血清抗体效价除第 7 天外,其余时间点均显著高于对照组 ($P<0.05$)。

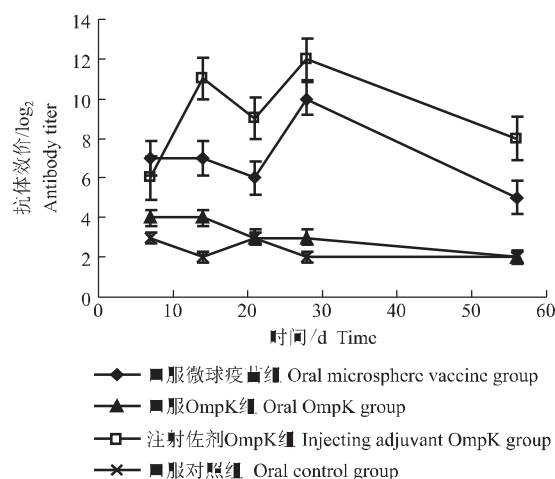


图 3 免疫鱼血清抗体效价

Fig.3 Antibody titer of *Epinephelus coioides* serum after vaccination

2.4.2 免疫鱼后肠黏液抗体效价 斜带石斑鱼后肠黏液中抗体效价如图 4 所示。从图 4 中可以看出,口服微球疫苗组后肠黏液抗体效价呈先上升后下降的趋势,免疫后第 21 天达到峰值;口服 OmpK 蛋白组加强免疫后其后肠黏液抗体效价略有升高。统计分析表明,口服微球疫苗组的后肠黏液抗体效价在各时间点均显著高于口服 OmpK 蛋白组与对照组 ($P<0.05$),口服 OmpK 蛋白溶液组与对照组

的后肠黏液抗体效价在各时间点均无显著性差异 ($P>0.05$)。

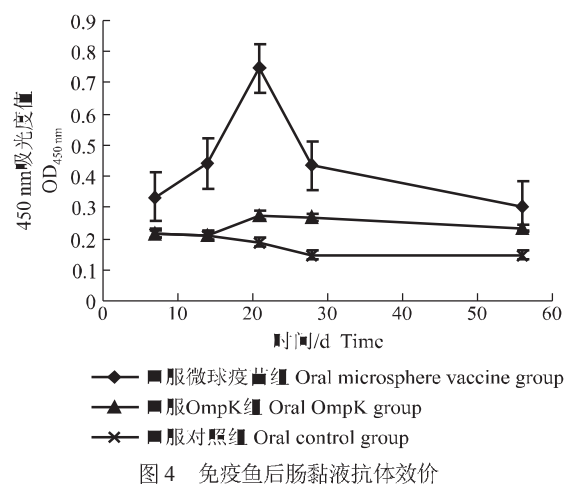


图 4 免疫鱼后肠黏液抗体效价

Fig. 4 Antibody titer of *Epinephelus coioides* mucus at the posterior intestine after vaccination

2.4.3 免疫保护实验 初次免疫后第 30 天用活菌 EcGS020802 菌株攻击,口服生理盐水对照组与口服 OmpK 蛋白溶液组的实验鱼第 2 天开始死亡;口服微球疫苗组的实验鱼第 4 天开始死亡,而且出现死亡时间较口服 OmpK 蛋白溶液组延长。死鱼症状明显,即体表局部褪色。口服微球疫苗组的相对免疫保护率 (62.5%) 高于口服 OmpK 蛋白溶液组 (12.5%),低于弗氏不完全佐剂-OmpK 注射组 (87.5%) (表 1)。

表 1 各组经 EcGS020802 菌株攻毒后的相对免疫保护率
Tab. 1 Relative percent survival of all groups challenged by EcGS020802 strains

组别 Groups	实验鱼数 / 尾 Number of experimental fish	存活数 / 尾 Number of survival fish	存活率 / % Survival rate	相对免疫保护率 / % RPS
口服生理盐水对照组 Control group	30	6	20.0	—
口服微球疫苗组 Oral microsphere vaccine group	30	21	70.0	62.5
口服 OmpK 蛋白组 Oral OmpK group	30	9	30.0	12.5
注射弗氏不完全佐剂-OmpK 组 Injecting adjuvant-OmpK group	30	27	90.0	87.5

3 讨论

用可生物降解、生物相容性好的载体材料包裹抗原制备微球疫苗,具有接种简单、保护抗原、靶向投递、佐剂活性等优点^[10]。载体材料在机体内缓慢降解,使包裹的蛋白抗原得到缓慢释放,可减少免疫次数、提高免疫效果。PELA 是人工合成的可降解高分子聚合物,既有亲水结构,又有疏水结构。亲水结构有利于结合水相中的蛋白抗原分子,从而提高抗原包裹率;疏水结构则更有利于保护其包裹的抗原^[11]。目前口服缓释制剂载体多广泛应用于临床包裹蛋白和多肽类药物,而将此载体用于鱼用蛋白亚单位疫苗制备,国内仅有少数报道^[12]。

有研究表明,哺乳动物的小肠可吸收粒径 10 μm 以下的微球,其中粒径小于 5 μm 的微球被小肠集合淋巴结上的微皱褶细胞(M 细胞)吸收,粒径大于 5 μm 的微球仍滞留在集合淋巴结的巨噬细胞内^[13]。本实验制备的 PELA-OmpK 微球粒径小于 10 μm ,其中 94% 的微球粒径小于 5 μm 。而且示踪结果表明,斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球后,第 1 天便可观察到其后肠组织有大量微球,以后逐渐减少。由此表明,小于 10 μm 的微球也可被鱼体肠道吸收。鱼类口服免疫后抗原递呈机制还不很清楚。有研究表明,鱼类后肠的肠道相关淋巴组织(Gut-associated lymphoid tissue, GALT)可能是抗原吸收的场所,主要由淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞等免疫细胞构成。颗粒性抗原经口服免疫后可能被巨噬细胞等抗原递呈细胞摄取、加工,从而活化 GALT 的淋巴细胞,引起肠黏膜免疫应答^[14]。

颗粒性抗原递呈机制在不同鱼类中可能不同。鲤(*Cyprinus carpio*)口服微球疫苗免疫后,疫苗被后肠空泡吸收,而后被吞噬细胞吞噬^[15];虹鳟(*Salmo gairdneri*)口服微球疫苗免疫后,疫苗被后肠空泡吸收却未发现吞噬细胞^[16];金头鲷(*Sparus aurata*)口服微球疫苗免疫后,疫苗被上皮细胞而不是被空泡吸收,且未发现吞噬细胞,这种抗原递呈途径被认为是吞噬细胞抗原递呈途径的补充^[15]。本研究中斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球后,微球分布在后肠黏膜层,与对银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[17]的研究结论相吻合。颗粒抗原经口服免疫鱼类后其抗原递呈机制还有待进一步研究。

鱼口服免疫既能产生全身的体液免疫又能诱导局部的黏膜免疫^[18]。肠黏膜是病原体首先接触

的区域,黏膜免疫产生的特异性抗体能在第一时间对侵入消化道的病原体进行中和清除,形成一道免疫屏障。而后抗原经后肠黏膜层的大量巨噬细胞和 EGC(嗜曙红颗粒细胞)等吞噬细胞^[19]的吞噬、递呈等过程到达靶器官,引起系统免疫应答。

斜带石斑鱼口服微球疫苗后,血清(抗体效价峰值 2¹⁰)与后肠黏液均检测到较高的抗体效价。因此,口服微球疫苗能有效引起鱼体产生体液免疫与局部黏膜免疫。口服免疫后,在血清抗体效价上微球疫苗组显著高于口服 OmpK 蛋白溶液组(抗体效价峰值 2⁴);在后肠黏液抗体效价上微球疫苗组也显著高于口服 OmpK 蛋白组,证实载体材料有较好的抗原保护性。微球疫苗有良好的缓释功能,本研究中口服微球疫苗组第 56 天血清抗体效价为 2⁵。对银鲫^[14]的研究结果也表明,微球疫苗组抗体效价能较长时间维持在较高水平。总之,载体材料包裹蛋白抗原制备的口服微球疫苗,既能保护抗原防止其被胃酸降解,又能缓慢释放抗原。

采用海藻酸盐、PLGA、PELA 等可生物降解高分子材料包裹鳃弧菌、温和气单胞菌、嗜水气单胞菌等全菌疫苗,口服免疫虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[16]、鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[20]、中华鳖(*Trionyx sinensis*)^[21]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[19,22]与银鲫^[17]等均获得良好的免疫保护。本研究采用 PELA 载体材料包裹哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 制备口服微球疫苗,口服免疫斜带石斑鱼后相对保护率为 62.5%,显示出微球疫苗有良好的免疫保护性,与鲫^[12,17]等作为实验对象得到的结论吻合。因此,采用可生物降解材料 PELA 作为鱼类口服疫苗的投递载体是可行的。

参考文献:

- [1] 高冬梅,李健,王群. 鳃弧菌灭活疫苗对牙鲆免疫效果的研究[J]. 海洋水产研究,2004,25(1): 34-40.
- [2] 秦启伟,潘金培. 创伤弧菌疫苗对青石斑鱼的免疫学效应和安全性[J]. 热带海洋,1996,15(2): 7-11.
- [3] 莫照兰,徐永立,张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学,2002,26(4): 63-66.
- [4] Newman S G. Bacterial vaccine for fish[J]. Annu Rev Fish Dis, 1993,3: 145-185.
- [5] 高小玲,蒋新国. 生物可降解聚酯和壳聚糖在疫苗制剂中的应用[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(1): 46-51.

- [6] 李荔, 刘志刚, 喻海琼, 等. 一种新型鱼病口服疫苗的研制和示踪研究 [J]. 热带医学杂志, 2006, 4: 382-385.
- [7] 李宁求, 白俊杰, 劳海华, 等. 斜带石斑鱼哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达 [C]// 吴常文. 第一届海洋生物高技术论坛论文集. 2003: 756-761.
- [8] 任建敏, 肖正华, 张梦军. PELA — BSA 微球体外释药特性与释药方程 [J]. 第三军医大学学报, 2004, (26)2: 173-175.
- [9] 热娜·吐尔地, 徐秉臣, 王信惠, 等. 异硫氢酸铵荧光素标记鼠疫 F1McAb 染色法快速检验鼠疫菌 [J]. 地方病通报, 2003, 18(2): 8.
- [10] 龚非. 可生物降解微球作为口服疫苗载体的研究进展 [J]. 国外医学 - 预防、诊断、治疗用生物制品分册, 2000, 23 (5): 211-215.
- [11] 李孝红, 邓先模, 黄志镗. 可生物降解聚合物用作制剂载体材料的疫苗微球研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(6): 364-367.
- [12] 任燕, 石存斌, 李宁求, 等. 鱼用哈维氏弧菌亚单位缓释微球口服疫苗的免疫效果初探 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(7): 48-52.
- [13] Mestecky J. Tartering and controlled release of antigens for the effective induction of secretory antibody responses [J]. Curr Opin Immunol, 1993, 3: 492-495.
- [14] Ainsworth A J, Rice C D, Xue L. Immune responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), after oral or intraperitoneal vaccination with particulate or soluble *Edwardsiella ictaluri* antigen [J]. J Fish Dis, 1995, 18: 397-409.
- [15] Joosten P H M, Aviles-Trigueros M, Sorgeloos P, et al. Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin [J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5: 289-299.
- [16] Joosten P H M, Tiemersma E, Threels A, et al. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles [J]. Fish Shellfish Immunol, 1997, 7: 471-485.
- [17] 李新华, 沈锦玉, 尹文林, 等. 银鲫口服嗜水气单胞菌疫苗的免疫和免疫组化研究 [J]. 水生生物学报, 2007, 1: 125-130.
- [18] 张吉红, 储卫华, 陆承平. 口服嗜水气单胞菌生物被膜的动物免疫试验 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(5): 404-407.
- [19] Mclean E, Rinsholdt B, Sten C. Gastrointestinal delivery of peptide and protein drugs to aquaculture teleosts [J]. Aquaculture, 1999, 177: 231-247.
- [20] 余俊红, 沈继红, 王祥红, 等. 鳊弧菌口服微胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 76-79.
- [21] 孙红祥, 潘杭君, 胡富强, 等. 中华鳖对温和气单胞菌口服微球缓释疫苗的免疫应答 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(2): 131-133.
- [22] 丁诗华, 王一丁, 彭远义, 等. 鱼用嗜水气单胞菌口服疫苗的免疫保护效应 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2005, 27(2): 888-891.

Trace and immune efficacy of oral PELA-OmpK microsphere vaccine in grouper, *Epinephelus coioides*

ZHANG Xiao-jiang^{1,2}, REN Yan², CHANG Ou-qin², SHI Cun-bin², LI Ning-qiu², WU Shu-qin²

(1. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Guangdong key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technique, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

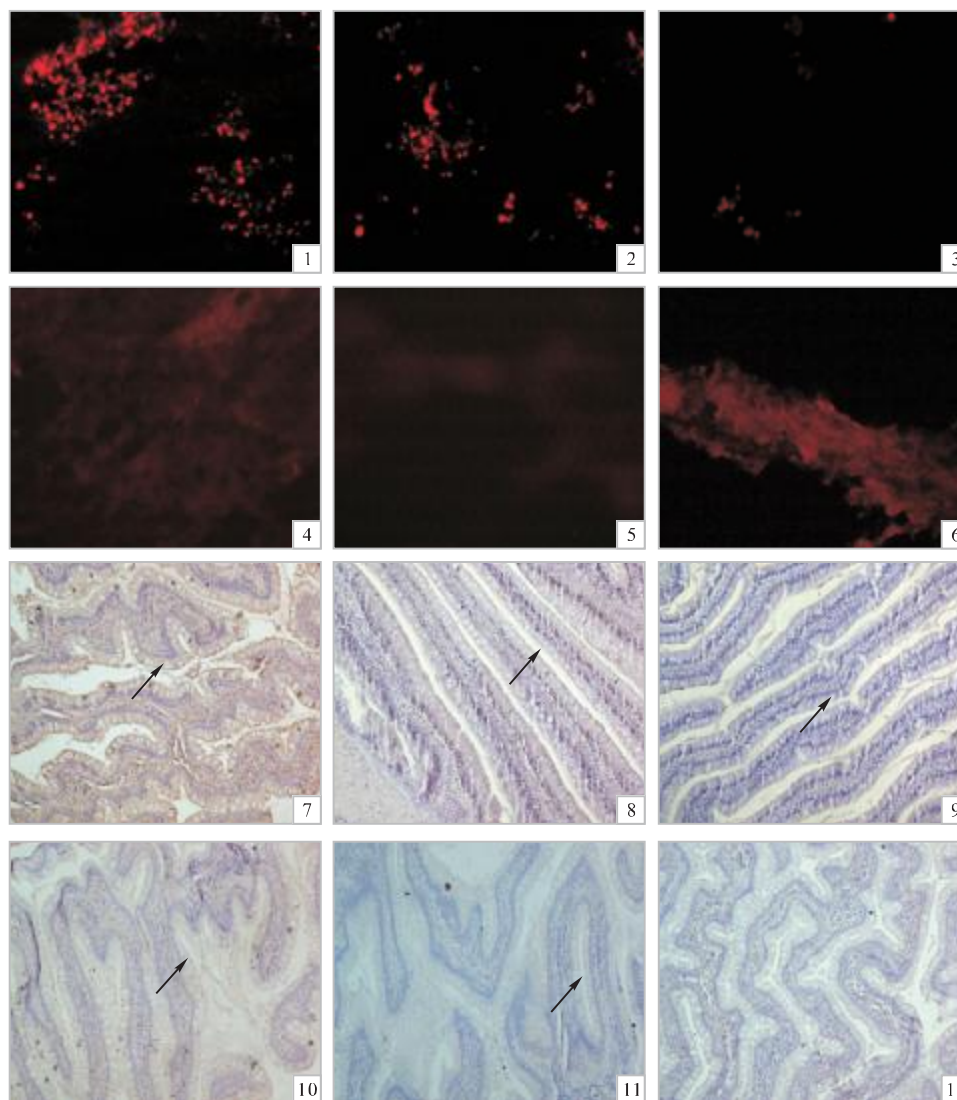
Abstract: To prepare oral biodegradable microsphere vaccine, the recombinant outer membrane protein (OmpK) as a common antigen of *Vibrio harveyi* was obtained from *Escherichia coli* DH5 α containing the recombinant plasmid pBV220-OmpK, and the OmpK was encapsulated in the biodegradable delivery system comprised of DL-poly lactide-co-polyethylene glycol (PELA) microspheres. The diameter of microsphere vaccine was smaller than 10 μm and 94% of them were smaller than 5 μm , with an average diameter of 2.8 μm . The encapsulation rate of the microsphere vaccine reached 79.4%. Marked with tetramethyl rhodamine isotheynate (TRITC), the PELA-OmpK microspheres were orally administrated to the grouper, *Epinephelus coioides* and a large amount of red microspheres were found in the hindgut tissue at the first day after oral administration, then the amount reduced at the third day, and almost could not be found at the 7th day. The hindgut tissue slice was studied by immunohistochemistry method, and the result showed that antigen could be found in the mucous membrane layer of hindgut in the oral PELA-OmpK vaccine treatment group. After being orally immunized with the microsphere vaccine, the maximal antibody titer in serum of oral PELA-OmpK vaccine treatment group (2^{10}) was obviously higher than that of oral OmpK treatment group (2^4) ($P < 0.05$), but lower than that of the injecting adjuvant OmpK treatment group (2^{12}) ($P < 0.05$). The antibody titer in hindgut mucus of the oral PELA-OmpK vaccine treatment group was also obviously higher than that of the oral OmpK treatment group ($P < 0.05$). The relative percent survival rate (PSR) of the oral PELA-OmpK vaccine treatment group (62.5%) was significantly higher than that of oral OmpK treatment group (12.5%) after 4 weeks ($P < 0.05$), lower than that of injection group (87.5%) ($P < 0.05$). These results show that the biodegradable microparticle can be a candidate as the vector system of oral microsphere vaccine in fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 837-844]

Key words: PELA; oral vaccine; microsphere; trace; immune efficacy

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com

张小江等:斜带石斑鱼口服 PELA-OmpK 微球疫苗的示踪及免疫效果

ZHANG Xiao-jiang et al: Trace and immune efficacy of oral PELA-OmpK microsphere vaccine in grouper, *Epinephelus coioides*



图版 I 微球疫苗在斜带石斑鱼后肠组织中的示踪及免疫组化研究结果

1: 口服 PELA-OmpK 微球组第 1 天 (大量红色荧光微球)×200; 2: 口服 PELA-OmpK 微球组第 3 天 (少量红色荧光微球)×200; 3: 口服 PELA-OmpK 微球组第 7 天 (荧光微球基本消失)×200; 4: 口服 OmpK 组第 1 天 (可见少量的红色荧光)×200; 5: 口服 OmpK 组第 3 天 (红色荧光基本消失)×200; 6: 口服荧光素组第 1 天 (可见红色荧光)×200; 7: 口服 PELA-OmpK 微球组第 1 天 (黏膜层有大量棕黄色阳性着色, 箭头所示)×100; 8: 口服 PELA-OmpK 微球组第 3 天 (黏膜层有较少棕黄色阳性着色, 箭头所示)×100; 9: 口服 PELA-OmpK 微球组第 7 天 (黏膜层有少量棕黄色阳性着色, 箭头所示)×100; 10: 口服 OmpK 组第 1 天 (黏膜层有较少棕黄色阳性着色, 箭头所示)×100; 11: 口服 OmpK 组第 3 天 (黏膜层有微弱棕黄色阳性着色, 箭头所示)×100; 12: 对照组 (黏膜层无阳性着色)×100.

Plate I Result of tracing and immunohistochemistry study of microsphere vaccine in hindgut of *E.coioides*

1: Oral PELA-OmpK group, the 1th day (lots of red microspheres); 2: oral PELA-OmpK group, the 3th day (a few red microspheres); 3: oral PELA-OmpK group, the 7th day (few microspheres); 4: oral OmpK group, the 1th day (a little red fluorescence); 5: oral OmpK group, the 3th day (little red fluorescence); 6: oral fluorescence group, the 1th day (red fluorescence); 7: oral PELA-OmpK group, the 1th day (lots of brown clumps in mucous membrane layer) ×100; 8: oral PELA-OmpK group, the 3th day (a little brown clumps in mucous membrane layer) ×100; 9: oral PELA-OmpK group, the 7th day (little brown clumps in mucous membrane layer) ×100; 10: oral OmpK group, the 1th day (a little brown clumps in mucous membrane layer) ×100; 11: oral OmpK group, the 3th day (little brown clumps in mucous membrane layer) ×100; 12: control (no brown clumps) ×100.