

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00924

重组多子小瓜虫抑动抗原 ISCOMs 制备

柯翎¹, 陈如敬², 刘晓东¹, 杨金先¹, 龚晖¹

1. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003;
2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013

摘要: 提取表达于四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)细胞膜表面的多子小瓜虫抑动抗原。通过 Western Blotting 证实重组多子小瓜虫抑动抗原约为 35.7 kD, 其免疫原性与多子小瓜虫抑动抗原相似。以 Quil-A 作为佐剂, 采用离心、超声波和透析等方法制备小瓜虫抑动抗原免疫刺激复合物(Iag-ISCOMs)。电镜观察可见 Iag-ISCOMs 经磷钨酸负染后呈直径 30~40 nm 的笼格状结构。免疫和攻毒试验证实 Iag-ISCOMs 对鳗鲡具有一定保护能力, 攻毒后存活率达 71.4%, 对照组存活率为 43.9%, 结果表明, 本实验成功制备了具有一定免疫原性的 Iag-ISCOMs。

关键词: 小瓜虫; 抑动抗原; 免疫复合刺激物

中图分类号: S942

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0924-05

多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)是寄生在淡水鱼类体表的纤毛原生动动物, 是鱼类养殖业的重要病害。目前治疗多子小瓜虫的有效药物主要是对鱼体、人体和环境不利的化学药物, 这些药物大多数仅对自由生活阶段的多子小瓜虫有杀灭作用, 对已寄生于鱼体的多子小瓜虫疗效甚微。采用免疫方法防治, 诱导鱼体自身产生免疫能力是防治多子小瓜虫病更为有效、安全的方法。

在多子小瓜虫的免疫学研究中, 科学家发现感染过小瓜虫而存活下来的鱼体, 其血清能在鱼体外凝集多子小瓜虫的感染期幼虫^[1]。林天龙等^[2]在多子小瓜虫虫体的细胞外膜分离到一种高度糖基化的蛋白, 这种蛋白与凝集现象相关, 小瓜虫免疫鱼血清抗体能特异性地与这种蛋白发生交联反应, 最终使虫体凝集在一起, 从而抑制小瓜虫的体外游动能力, 因而将其命名为抑动抗原(immobilization antigen, Iag)。Clark 等^[3]分离并纯化了抑动抗原, 并证实抑动抗原能够诱导鱼体产生免疫应答反应并对鱼体产生免疫保护作用。

虽然抑动抗原具有较好的免疫原性, 如何选择合适的免疫佐剂应用于鱼类养殖业, 仍是难点之一。常用的兽用佐剂具有一定效果, 但在鱼类养殖上的使用受到较大的限制, 例如油基质佐剂会使注射位点黑化(melanism), 从而影响商品鱼的品质; 而矿物质乳胶佐剂对鱼类的毒性较大^[4]。免疫复合物(immunostimulating complexes, ISCOMs)是一种新型的免疫制剂, 能诱导机体产生抗原特异的体液和细胞免疫应答^[5]。且 ISCOMs 可通过浸浴和口服的方式给药, 因此 ISCOMs 更适用于鱼类疫苗尤其是基因重组及亚单位疫苗的研发。

本实验室已克隆多子小瓜虫抑动抗原序列^[6], 并与美国康奈尔大学联合构建了四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)表达体系用于表达多子小瓜虫抑动抗原。该重组四膜虫含有重金属启动子, 能在氯化镉诱导下在虫体膜表面大量表达小瓜虫抑动抗原。本实验从重组四膜虫膜表面分离并纯化了多子小瓜虫的重组抑动抗原, 并用 Quil-A 等佐

收稿日期: 2010-12-08; 修订日期: 2011-03-11.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2010J01096); 福建省科技厅平台项目(2007N2003); 福建省科技厅公益项目(2009R10035-5).

作者简介: 柯翎(1979-), 男, 助理研究员, 从事水产动物疾病防治研究. E-mail: keling_online@163.com

通信作者: 龚晖(1971-), 副研究员, 主要从事动物免疫学和分子生物学研究. E-mail: ghxfjm@163.com

剂将其制备成为具有免疫原性的抑动抗原 ISCOMs (Iag-ISCOMs), 为多子小瓜虫疫苗的开发奠定试验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

Quil-A 由美国康奈尔大学 Ted Clark 教授惠赠; Mega-10 购自华美生物工程公司; Proteose Peptone 购自 DIFCO 公司。CdCl₂、FeCl₃、葡萄糖、胆固醇和卵磷脂等均为分析纯试剂。

1.2 虫株、单抗、实验鱼、培养基和攻毒用的多子小瓜虫

虫株是以四膜虫为表达体系构建的含抑动抗原的重组四膜虫, 重组四膜虫虫株编号为 G1。

单抗为本实验制备的单抗 10H3, 能使重组四膜虫虫株 G1 和血清型为 A 的多子小瓜虫(现保存于美国)这两株虫体在体外产生凝集现象^[2]。

培养基为 SPP。SPP 配制时先将 Proteose Peptone 10 g、Yeast Extract 1 g、葡萄糖 2 g 溶解在 1000 mL 的 H₂O 中, 121℃ 蒸汽灭菌 15 min, 冷却到室温后添加 1 mL 浓度为 33 mmol/L 经无菌处理的 FeCl₃。

膜蛋白提取试剂盒为上海生工公司的膜蛋白提取试剂盒(货号 BSP049), 用于抽提虫体膜蛋白。

实验鱼为欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*), 鱼体质量约 20 g, 养殖水体平均温度为 22℃。

多子小瓜虫来源于福建永泰某鳗鲡养殖场。用于攻毒。收集病鱼的多子小瓜虫包囊, 在 24℃ 下孵化约 48 h 后产生感染期幼虫, 计数后备用。

1.3 重组四膜虫培养、诱导与虫体凝集检测

将 100 μL 重组四膜虫从液氮中复苏后, 加入 10 mL SPP 培养基, 在 30℃ 摇床上培养 48 h。随后, 在培养基中加入 CdCl₂ 使其终浓度为 2 μg·mL⁻¹, 诱导过夜, 促使抑动抗原大量表达。

用单抗 10H3 对虫体进行凝集试验。在 ELISA 板条上, 第一孔用 Tris-HCl 缓冲液将单抗 10H3 以 1:100 稀释, 并倍比稀释到第 11 孔, 第 12 孔作为对照孔, 每孔体积为 50 μL。在第 1 到 12 孔中加入 50 μL 诱导后的虫体培养液。5 min 后在显

微镜下观察凝集情况。

1.4 重组抑动抗原的提取

将诱导后的虫体培养液分装到离心管中, 1000 g 4℃ 离心 15 min, 去除上清。再将每管样品用 1 mL Tris-HCl 缓冲液重悬。加入等量预冷的 2% Triton X-114 抽提液混匀, 冰浴 10 min。在 4℃ 下, 16 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清, 上清在 37℃ 下温浴 10 min。将温浴后的上清在蔗糖垫上 300 g 离心 5 min。可见液体分层, 吸出下部云雾状的有机溶液, 其中含有所需的目的蛋白(具体过程参考试剂盒说明书)。

1.5 变性非还原凝胶电泳和 Western Blotting 分析

变性非还原凝胶电泳: 分别配制 4% 浓缩胶和 10% 分离胶进行不连续垂直凝胶电泳。蛋白样品用变性非还原缓冲液稀释后直接上样, 开始电泳, 电泳后进行电转印。

Western Blotting: 电转印到硝酸纤维素薄膜后, 一抗为亲和层析 10H3 单抗(1:1000), 二抗为 AP 标记的羊抗鼠血清 IgG(1:2000); 抗体反应结束后用 BCIP-NBT(Sigma)显色。

1.6 Iag-ISCOMs 的制备

在蛋白抽提液中加入 Mega-10 使其最终质量分数为 2%, 并在室温下作用 2~4 h。再将此重悬液 10000 r/min 4℃ 离心 30 min, 去除沉淀, 此上清中含有抑动抗原蛋白。将蛋白质浓度稀释到约 2 mg·mL⁻¹, 加入 Quil-A 使其在蛋白抽提液中的终浓度为 0.1%, 再加入预先用氯仿融解胆固醇和卵磷脂使其在蛋白抽提液中的终浓度为 125 μg·mL⁻¹。将此液超声波处理 10 s, 间歇 10 s, 一共 30 次, 功率约为 200 W。用 PBS 透析 3 d 后, 透析后的 ISCOMs 在 -20℃ 下保存。将 ISCOMs 溶液稀释 20 倍, 用钨酸负染后在电镜下观察。

1.7 注射免疫 Iag-ISCOMs

免疫组: 用 PBS 缓冲液将 Iag-ISCOMs 稀释至 100 μg·mL⁻¹, 用 MS-222 将 7 尾欧洲鳗鲡麻醉后, 每尾鱼腹腔注射 0.2 mL 稀释后的 Iag-ISCOMs, 即每尾注射 20 μg Iag-ISCOMs。

对照组: 用 MS-222 将 7 尾欧洲鳗鲡麻醉后, 每尾鱼腹腔注射 0.2 mL pH 为 7.2 的 10 mmol/L

磷酸盐缓冲液。

攻毒: 注射 30 d 后, 以每尾 10000 个感染期幼虫的剂量进行浸泡攻毒试验, 攻毒期间观察鱼体表变化, 攻毒 30 d 后结束攻毒。

2 结果与分析

2.1 抑制抗原的凝集作用

单抗 10H3 对诱导后的四膜虫有凝集作用。单抗在 1:12800 出仍然可以使虫体凝集(图 1), 而对照孔没有凝集现象。说明重组四膜虫经过诱导后, 能在虫体膜表面表达抑制抗原蛋白。

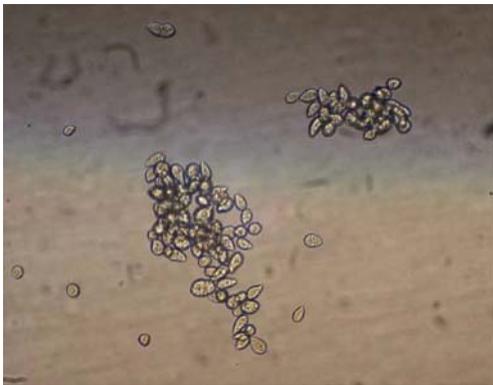


图 1 Iag 单抗与诱导后的四膜虫工程株的凝集反应
Fig.1 Aggregation reaction of Iag-mab and recombinant *Tetrahymena thermophila*

2.2 Western Blotting 结果

Western Blotting 结果显示: 纯化样品中的重组抑制抗原能与 10H3 单抗发生免疫反应, 其分子量大小约为 35.7 kD(图 2)。这说明制备的 Iag 具有与多子小瓜虫抑制抗原相似的免疫原性。

2.3 ISCOMs 结构

经磷钨酸负染后电镜观察本实验所制备的 ISCOMs 颗粒呈直径 30~40 nm 的笼格状结构(图 3), 其结构与相关报道中的 ISCOMs 的结构相似^[7]。

2.4 攻毒结果

攻毒期间, 免疫组的鳃部体表不出现白点, 且死亡鱼的鳃部仅有少量虫体。对照组鳃部出现大量白点。攻毒结束后免疫组存活 5 尾欧洲鳊, 存活率为 71.4%; 对照组存活 3 尾, 存活率为 43.9%。免疫组存活率高于对照组, 两组的生存数

量变化见图 4。

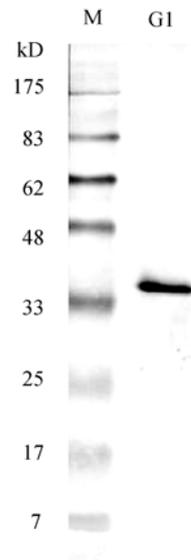


图 2 从 G1 四膜虫提取的重组小瓜虫抑制抗原与单抗 (10H3)反应的 Western Blotting 图谱

Fig.2 Western blotting profile of the reactions between Iag of G1 recombination *T. multifiliis* and monoclonal antibodies(10H3)

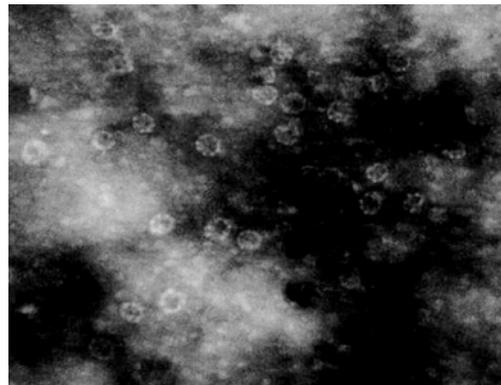


图 3 IAG-ISCOMs 的电镜照片

Fig.3 Transmission electron microscope photo of Iag-ISCOMs

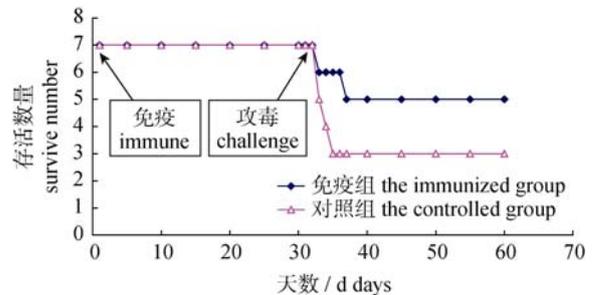


图 4 免疫组与对照的存活曲线图

Fig.4 Survive curves of the immunized group and the controlled group

3 讨论

研究表明, 抑动抗原是多子小瓜虫病潜在的主要保护性抗原, 然而多子小瓜虫还无法大规模在体外进行培养, 因此难以获得足量的抑动抗原应用于疫苗制备。本实验培养并诱导重组四膜虫虫株, 该虫株能在细胞膜外高效表达多子小瓜虫抑动抗原蛋白。采用离心等方法成功提取四膜虫膜蛋白制备了 ISCOMs 颗粒。在电镜下观察, 膜蛋白分布在 ISCOMs 颗粒表面, 形成直径 30~40 nm 的笼格状的典型结构, 证实成功制备了 Iag-ISCOMs。

He 等^[8]采用大肠杆菌表达系统表达了抑动抗原融合蛋白, 虽然免疫组的保护率大于对照组, 但在攻毒后期免疫组也可以观察到鱼体被多子小瓜虫感染的现象。而本实验的免疫组在攻毒后 30 d 内没有观察到体表有白点出现。由于大肠杆菌的表达产物缺少糖基化修饰, 其天然构象与抑动抗原差异较大。Wang 等^[9]分离纯化了多子小瓜虫的抑动抗原, 采用福氏佐剂注射免疫鱼体并攻毒后, 免疫保护率约为 70%。本实验中经过电泳和电转印后单抗与目的蛋白能发生反应可以说明, 四膜虫表达系统的重组抑动抗原蛋白的明显优势在于, 它与多子小瓜虫天然的抑动抗原具相似的免疫原性。接种该蛋白后可诱导鱼体具有免疫保护性, 这也表明四膜虫表达系统相对于大肠杆菌表达系统更适合小瓜虫抗原的表达。

由于鱼类对病原产生免疫保护力是多因子共同作用的结果, 血清抗体效价往往不能与免疫保护力正相关, 而攻毒后的免疫保护率是疫苗效果的直接反映, 因此, 本研究仅采用攻毒对 Iag-ISCOMs 的效果进行评价。本实验仅 1 次免疫, 即可诱导鳊对多子小瓜虫产生一定的免疫保护力, 证实了制备的 Iag-ISCOMs 的效果。

ISCOMs 是近年来发展起来的一种亚单位疫苗。它能有效地激活免疫系统的 3 种途径, 即体液免疫、细胞免疫和细胞毒性 T 细胞应答。ISCOMs 诱导机体产生强烈而持久的免疫应答, 相对其他佐剂更优越的免疫学价值^[10]。

本实验中 Iag-ISCOMs 不能产生完全保护作用的原因分析如下: 首先, 由于不同来源小瓜虫可能存在一定差异, 重组四膜虫的抑动抗原基因来自美国的多子小瓜虫, 而攻毒所使用的虫株来自福建本地, 两者的抑动抗原结构存在差异^[11]; 其次, 多子小瓜虫存在免疫逃避机制, 在免疫应答过程中, 虫体的抑动抗原基因可能发生变异^[12]。另外, 由于多子小瓜虫在体外培养难度较大, 从发生病害的养殖场获得的攻毒用虫株具有较大的不确定性, 因此本实验所设置的实验组及对照组的实验鱼个体偏少(仅 7 尾), 非实验因素的误差对实验结果有一定的影响。今后拟通过多次免疫等方法来增强 Iag-ISCOMs 的效果。

ISCOMs 作为新型佐剂虽已被广泛应用于兽用疫苗研究中^[13], 但在水产动物寄生虫方面, 成熟 ISCOMs 商品化的疫苗还未有报道。Iag-ISCOMs 在多子小瓜虫的免疫防治中的具有前景广阔, 它有高效诱导能力, 而且通过多种免疫途径(如: 注射、浸泡、口服等)都可能有效诱导鱼类的免疫应答, 这将使得防治多子小瓜虫更加方便, 成本更加低廉。这还需要进一步研究其血清及黏膜的免疫应答规律、生物学等特性。

参考文献:

- [1] Hines R S, Spira D T. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio*(L.) V. acquired immunity[J]. J Fish Biol, 1974, 6: 373-378.
- [2] Lin T L, Dickerson H W. Purification and partial characterization of immobilization antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. J Protozool, 1992, 39(4): 457-463.
- [3] Clark T G, Lin T L, Dickerson H W. Surface immobilization antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*: Their role in protective immunity[J]. Annu Rev Fish Dis, 1995, 5: 113-131.
- [4] Anderson D P. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish[J]. Dev Biol Stand, 1997, 90: 257-265.
- [5] 赵秩先. 免疫刺激复合物(ISCOM)[J]. 中国兽药杂志, 1991, 25(4): 44-46.
- [6] 杨金先, 陈强, 刘晓东, 等. 简并 PCR 扩增小瓜虫抑动抗原基因的 ORF[J]. 中国水产科学, 2004, 11(2): 135-138.
- [7] Morein B, Hu K F, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine [J]. Adv Drug

- Deliv Rev, 2004, 56(10): 1367–1382.
- [8] He J, Yin Z, Xu G, et al. Protection of goldfish against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with a recombinant vaccine[J]. Aquaculture, 1997, 158: 1–10.
- [9] Wang X, Dickerson H W. Surface immobilization antigen of the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* elicits protective immunity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(1): 176–181.
- [10] Moore D P, Echaide I, Verna A E, et al. Immune response to Neospora caninum native antigens formulated with immune stimulating complexes in calves.[J]. Vet Parasitol, 2011, 175(3–4): 245–51.
- [11] Lin Y, Lin T L, Wang C C, et al. Variation in primary sequence and tandem repeat copy number among i-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 120(1): 93–106.
- [12] Clark T G, Lin T L, Dickerson H W. Surface antigen cross-linking triggers forced exit of a protozoan parasite from its host[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(13): 6825–6829.
- [13] Merza M, Tibor S, Kucsera L, et al. ISCOM of BHV-1 envelope glycoproteins protected calves against both disease and infection.[J]. Zentralbl Veterinarmed B, 1991, 38(4): 306–314.

Preparation of recombinant immobilization antigen of *Ichthyophthirius multifiliis*

KE Ling¹, CHEN Rujing², LIU Xiaodong¹, YANG Jinxian¹, GONG Hui¹

1. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou 350013, China

Abstract: The recombinant immobilization antigen (Iag) of *Ichthyophthirius multifiliis* was extracted from membrane protein of *Tetrahymena thermophila*. The molecular weight of the recombinant immobilization antigen is 35.7 kD. In addition, western blotting corroborated that the recombinant Iag had similar immunogenic features to the Iag of *I. multifiliis*. Iag-ISCOMs were prepared by centrifugation, ultrasonic, dialysis and by using Quil-A as the adjuvant. Results from negative contrast electron microscopy observations indicate that Iag-ISCOM is a cage-like structure with a diameter of 30–40 nm. The Iag-ISCOMs provide protection to the eels based on the trials of immunization and challenge. Thus, survival rates of the Iag-ISCOMs and control groups were 71.4% and 43.9%, respectively. Results show that the Iag-ISCOMs with immunogenicity were successfully prepared.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*; immobilization antigen; immunostimulating complex

Corresponding author: GONG Hui. E-mail: ghxfjm@163.com