

郭芸芸, 张雪寒, 刘茂军, 等. 猪肺炎支原体纤毛黏附因子 P97 和 F7-CTB 对 O 型口蹄疫灭活疫苗的免疫增强作用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(11): 204-210.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.046

猪肺炎支原体纤毛黏附因子 P97 和 F7-CTB 对 O 型口蹄疫灭活疫苗的免疫增强作用

郭芸芸^{1,2}, 张雪寒², 刘茂军², 王 警^{1,2}, 牛家强¹, 何孔旺²

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏林芝 860000; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014)

摘要:旨在研究猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, 简称 Mhp) 纤毛黏附因子 P97 以及 F7 鞭毛蛋白 (flagellin, 简称 F) - 霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B subunit, 简称 CTB) 2 种重组蛋白对口蹄疫 (foot and mouth disease, 简称 FMD) 灭活疫苗的免疫增强作用。通过体外表达获得 pCold-F7-CTB、pET32a-P97-R1 2 种重组蛋白, 用间接酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, 简称 ELISA) 方法检测 pCold-F7-CTB 蛋白的生物学活性, 将重组蛋白分别与口蹄疫病毒 (foot and mouth disease virus, 简称 FMDV) 灭活抗原、口蹄疫灭活疫苗混合制备, 皮下或腹腔接种 Balb/c 小鼠, 共免疫 2 次, 间隔 3 周。分别于免疫前、免疫后 21、35、49 d 采血, 49 d 后无菌摘取脾脏。采用阻断 ELISA 的方法检测小鼠血清口蹄疫 O 型病毒免疫球蛋白 (IgG) 抗体滴度, 用流式细胞术检测脾淋巴细胞亚型比例, 以评估免疫效力。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western Blot) 分析结果表明, 2 种重组蛋白成功表达。用 GMI (神经节苷脂)-ELISA 方法验证 pCold-F7-CTB 的生物学活性, 发现融合蛋白 F7-CTB 保留了与 GMI 的结合能力。小鼠免疫试验结果表明, 经皮下注射接种后, 单独口蹄疫病毒灭活抗原组没有产生明显的抗体水平, 而 F7-CTB 免疫增强剂组比单独口蹄疫病毒灭活抗原组的 IgG 滴度更高。在试验中发现, 当重组蛋白与口蹄疫灭活疫苗联合使用时, 血清中的 IgG 滴度明显增高, CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞比值上升; P97 和 F7-CTB 混合使用对口蹄疫灭活疫苗的免疫增强效果最佳。可以初步得出, 免疫增强剂 P97 和 F7-CTB 具有协同作用, 皮下注射可显著提高 FMD 的特异性 IgG 水平, CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞比值升高, 显示其具有良好的应用前景。

关键词:口蹄疫; P97; F7-CTB; 免疫增强剂

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0204-06

口蹄疫 (foot and mouth disease, 简称 FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot and mouth disease virus, 简称 FMDV) 引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必须报告的传染病之一^[1]。疫苗接种是预防和控制口蹄疫最可靠和有效的手段^[2]。目前灭活口蹄疫疫苗的使用仍最为广泛^[3-4]。现有的口蹄疫疫苗存在免疫后抗体产生慢、抗体水平低和持续期短的缺点^[5], 因此, 本研究以增强免疫效力为目的, 尝试研制一种新型免疫增强剂。

结合猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*, 简称 Mhp) 的免疫学特点, R1 区作为 Mhp 纤毛黏附因子 p97 黏附纤毛的主要决定区, 主要引起黏膜免疫和细胞免疫^[6]。同时也是少数被证明具备免疫保护能力的抗原之一^[7-8]。鞭毛蛋

白作为 TLR-5 受体激动剂, 能诱导强烈、广泛的免疫反应^[9]。

鞭毛蛋白 (flagellin, 简称 F) 佐剂的效果在流感病毒^[10-11]、结核分枝杆菌^[12]和鼠疫菌^[13]的研究中已经被多次确认, 鞭毛蛋白是较好的载体及佐剂。Albert 等在研制亚单位疫苗时, 将结肠弯曲菌的鞭毛蛋白的 FlaA 片段与麦芽糖结合蛋白 (maltose-binding protein, 简称 MBP) 进行融合表达, 得到了 MBP-FlaA 重组蛋白, 通过口服途径免疫, 结果显示, 对照组小鼠肠道的细菌完全定植, MBP-FlaA 免疫组有 71.4% 的小鼠有细菌定植, 显示该重组蛋白在一定程度上抵御了结肠弯曲菌的感染^[14]。Delaney 等用 flagellin-LIR (FR) 重组蛋白 (将牛痘病毒 LIR 抗原序列连到细菌鞭毛蛋白 N 端) 免疫小鼠, 结果能产生与天然 LIR 相互作用的抗体, FR 重组蛋白更能促进抗原特异免疫球蛋白 (IgG) 的产生, 加强免疫后可产生有效的保护性免疫应答, 对小鼠能提供 100% 的保护^[15]。大肠杆菌霍乱毒素 (CT) 具有黏膜免疫佐剂活性, 是细菌类毒素, 研究发现, CT 的 B 亚单位单独作用, 表现为无毒性, 但仍可保持较强的佐剂活性, 能刺激机体产生强烈的黏膜系统免疫应答, 调节 Th1、Th2 型细胞反应的细胞因子的表达^[16]。Hou 等将霍乱毒素 B 亚基 (cholera toxin B subunit, 简称 CTB) 作为黏膜佐剂, 与 HIV-1DNA (人免疫缺

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划 (编号: 2015BAD12B04); 国家自然科学基金 (编号: 31572503)。

作者简介: 郭芸芸 (1994—), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 主要从事黏膜佐剂的研究。E-mail: 1692373770@qq.com。

通信作者: 牛家强, 副教授, 硕士生导师, 主要从事高原动物传染病防控方面的研究工作, E-mail: lznjq@163.com; 何孔旺, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事人兽共患病的相关研究, E-mail: 1692373770@qq.com。

陷病毒-1 的 DNA)疫苗联合后免疫小鼠,可诱导其产生高水平的 Th1 和 Th2 型细胞因子、炎症细胞因子和趋化因子,同时提高血清中 Env 蛋白的 IgG 抗体水平^[17]。Miyata 等将 CTB 与蛋白 MSP1-19 耦合,可以提高血清和支气管肺泡灌洗液中的 IgG 抗体水平^[18]。由以上结果可以看出,CTB 无论是作为黏膜免疫佐剂还是抗原递送载体,都有良好的免疫增强作用。本研究将 F7 和 CTB 基因进行连接后重组表达,并与 P97 重组蛋白联合或分别单独作用,从体液免疫及细胞免疫角度来评估其免疫应答,以期改善传统疫苗的缺点。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

pCold I-F7、pUC57-CTB 质粒均由农业部兽用生物制品工程技术重点实验室保存;pET32a-P97-R1 由江苏省农业科学院兽医研究所猪病研究室惠赠;大肠杆菌感受态细胞 Trans5 α 和 BL21(DE3),购自 TransGen 公司。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Sal* I、*Xba* I 和 T₄ DNA 连接酶,购自 TaKaRa 公司;蛋白纯化试剂盒,购自 GE 公司;辣根过氧化物酶(HRP)-小鼠抗组氨酸(histidine,简称 His)标签、HRP-羊抗鼠-IgG 和 HRP-羊抗兔-IgG,购自博士德生物工程有限公司;CTB 蛋白、兔源抗大肠杆菌不耐热性肠毒素(Heat-labile enterotoxin B subunit,简称 LTB)抗体、神经节苷脂 1(Ganglioside,简称 GM1)和胎牛血清,购自 Sigma 公司;PE-CyTM7 Hamster Anti-Mouse CD3e、PE Rat Anti-Mouse CD4 和 FITC Rat Anti-Mouse CD8a,购自美国 BD 公司;单组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetra-methylbenzidine,简称 TMB)显色液 I、无血清培养基 RPM 1640、Triton x-114,购自南京助研生物技术有限公司;MONTANIDE ISA 206 VG,购自赛彼科(上海)特殊化学品有限公司;内毒素检测试剂盒,购自 Thermo 公司;口蹄疫 O 型液相阻断酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,简称 ELISA)抗体检测试剂盒,购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.3 试验动物

6 周龄 Balb/c 小鼠,购于扬州大学医学院。

1.4 pCold I-F7-CTB 重组质粒的构建

将笔者所在实验室保存的克隆质粒 pUC57-CTB 用限制性内切酶 *Sal* I、*Xba* I 酶切,获得目的基因 CTB,将其插入到表达载体 pCold I-F7 相应的酶切位点中,构建重组质粒 pCold I-F7-CTB。

1.5 重组菌的构建

将重组质粒 pCold-F7-CTB、pET32a-P97-R1 转化大肠杆菌 BL21(DE3),涂布于 LB 平板(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)上。过夜培养,挑取单菌落,酶切鉴定,获得重组菌株 pCold I-F7-CTB/BL21(DE3) 和 pET32a-P97-R1/BL21(DE3)。

1.6 重组蛋白的表达

1.6.1 重组菌的诱导表达 将上述重组菌于 37 $^{\circ}$ C 继续快速培养至 $D_{600\text{ nm}}$ = 0.4~0.6,加异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside,简称 IPTG)至终浓度为 1 mmol/L(同

时设空载体对照组);将 pCold I-F7-CTB/BL21 菌株于 16 $^{\circ}$ C、18~24 h 诱导表达,并将 pET32a-P97-R1/BL21 菌株于 37 $^{\circ}$ C、5 h 诱导表达,收集细菌。

1.6.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,简称 SDS-PAGE)鉴定重组蛋白质的表达 各取 3 mL 上述诱导培养物,于 12 000 r/min 离心 1 min,收集菌体,用 1/10 体积的 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(简称 PBS,pH 值为 7.4)重悬菌体,在冰水浴中超声裂解至菌体全部破碎,取部分超声裂解菌体作为全菌蛋白质,将剩余部分离心分离菌体上清液和沉淀。通过 SDS-PAGE 分别检测全菌、上清液和沉淀,分析重组蛋白的表达形式。

1.7 重组蛋白的纯化和蛋白质印迹法(Western Blot)分析

对于 2 种诱导重组菌 pCold I-F7-CTB/BL21(DE3) 和 pET32a-P97-R1/BL21(DE3),参照 GE 公司的 His TrapTM HP 说明书,对上清液进行纯化。用 SDS-PAGE 分析纯化效果,同时用纯化后的蛋白进行 Western Blot 分析,通过 RC DC Protein Assay 检测纯化蛋白的浓度,并用 Triton X-114 法去内毒素,用显色法检测内毒素含量,具体操作参照使用说明书。

1.8 GM1-酶联免疫吸附

用 100 μ L pH 值为 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(含 2 μ g 神经节苷脂 GM1)包被 96 孔酶联板,于 4 $^{\circ}$ C 过夜;用 200 μ L/孔的 2% 牛血清白蛋白(BSA)于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;每孔加入 12.5 ng pCold-F7-CTB 蛋白,同时设阴、阳性对照,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;加入以 1:1 000 体积比稀释的兔源抗 LTB,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;加入以 1:1 000 体积比稀释的 HRP-羊抗兔-IgG,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色;加入终止液,测定 $D_{450\text{ nm}}$ 。

1.9 小鼠免疫接种

1.9.1 免疫试验 1 将 6 周龄的 Balb/c 小鼠随机分成 4 组,5 只/组,皮下注射配制的液体试剂,每只注射 0.1 mL。配制方法:按照 5 μ g/只的蛋白量与口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus,简称 FMDV)灭活抗原混合制备,具体分组和免疫剂量见表 1。共免疫 2 次,间隔 3 周。分别于免疫前与免疫后 21、35、49 d 在小鼠眼眶静脉丛采血,测定抗体水平。

1.9.2 免疫试验 2 将 6 周龄的 Balb/c 小鼠随机分成 8 组,5 只/组,按照 5 μ g/只的蛋白量与 FMDV 灭活抗原混合后,再按 1:1 的比例添加 MONTANIDE ISA 206 VG 制备口蹄疫灭活疫苗。比较 P97、F7-CTB 2 种重组蛋白单独添加以及混合添加对口蹄疫灭活疫苗的免疫增强作用,同时比较皮下、腹腔 2 种免疫途径的差异。具体分组和免疫剂量见表 2。共免疫 2 次,间隔 3 周。分别于免疫前、免疫后 21、35、49 d 在小鼠眼眶静脉丛采血,测定抗体水平。

1.10 血清中口蹄疫 O 型病毒抗体 IgG 的检测

用口蹄疫 O 型液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测,分别于免疫前与免疫后 21、35、49 d 采集血液,分离血清,检测方法参照具体说明书。

1.11 流式细胞术检测脾淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 亚型比例

于首免 49 d 时,取 1×10^6 /mL 小鼠脾脏淋巴细胞加入

表 1 免疫试验 1 的免疫剂量

组别	疫苗	P97 蛋白剂量 (μg/只)	F7 - CTB 蛋白剂量 (μg/只)	抗原剂量 (μg/只)
G ₁ (阴性对照)	PBS	—	—	—
G ₂ (对照)	口蹄疫灭活疫苗	—	—	0.2
G ₃	P97 + 口蹄疫灭活疫苗	5	—	0.2
G ₄	F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗	—	5	0.2

表 2 免疫试验 2 的免疫剂量

组别	疫苗	P97 蛋白剂量 (μg/只)	F7 - CTB 蛋白剂量 (μg/只)	ISA 206 VG 剂量 (μL/只)	抗原剂量 (μg/只)	总剂量 (μL/只)	免疫途径
G ₁	PBS	—	—	—	—	100	皮下
G ₂	口蹄疫灭活疫苗	—	—	50	0.2	100	皮下
G ₃	P97 + 口蹄疫灭活疫苗	5	—	50	0.2	100	皮下
G ₄	P97 + 口蹄疫灭活疫苗	5	—	50	0.2	100	腹腔
G ₅	F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗	—	5	50	0.2	100	皮下
G ₆	F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗	—	5	50	0.2	100	腹腔
G ₇	P97 + F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗	5	5	50	0.2	100	皮下
G ₈	P97 + F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗	5	5	50	0.2	100	腹腔

1.5 mL 无菌离心管中,用 1 mL 0.01 mol/L PBS,于 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清,用溶有 PE - CyTM7 Hamster Anti - Mouse CD3e、PE Rat Anti - Mouse CD4 和 FITC Rat Anti - Mouse CD8a 荧光抗体的 300 μL 荧光洗液 [100 mL, 0.01 mol/L PBS,pH 值为 7.4,用 2% *N* - 溴代琥珀酰亚胺 (NBS)]重悬细胞,充分混匀后于 4 ℃ 避光孵育 30 min,用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次,每次 1 mL,于 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,将管底细胞用 500 μL 荧光保存液 (100 mL, 0.01 mol/L PBS,pH 值为 7.4,2% 葡萄糖,0.1% NaN₃)重悬,利用流式细胞仪 (BD AccuriTM C6 Plus)检测 10 000 个细胞中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 阳性细胞数。

2 结果与分析

2.1 重组菌的构建、蛋白表达和纯化

经双酶切鉴定,均获得正确大小的目的片段,为阳性重组质粒 (图 1)。SDS - PAGE 结果显示,重组蛋白主要以可溶形式存在于细菌裂解上清中,P97 - R1、F7 - CTB 蛋白的预期大

小分别为 26.50、74.65 ku (图 2)。经 His TrapTM HP 纯化后,得到 2 种高纯度的重组蛋白,检测结果表明,内毒素的含量均小于 0.5 EU/mL (EU 为内毒素单位) (图 3)。

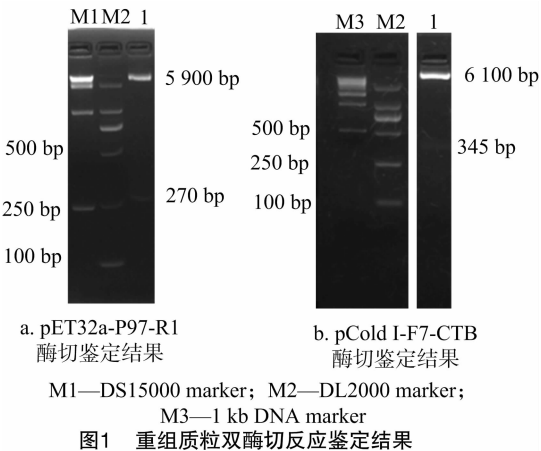


图 1 重组质粒双酶切反应鉴定结果

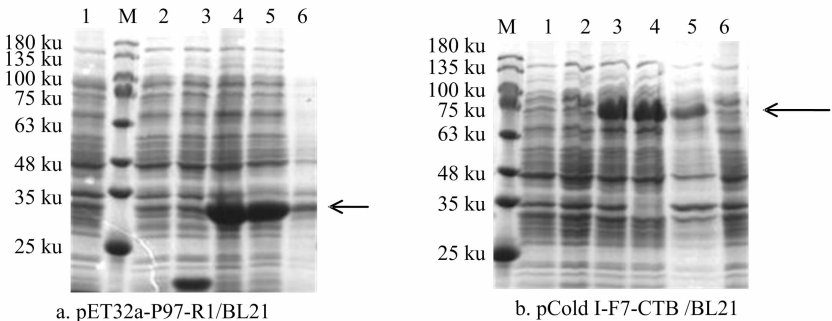


图 a: M—蛋白质分子量标准; 1—pET32a-P97-R1/BL21 诱导前; 2—pET32a/BL21 诱导后; 3—pET32a/BL21 诱导后; 4—重组菌 pET32a-P97-R1/BL21 超声破碎全菌蛋白质; 5—重组菌 pET32a-P97-R1/BL21 超声破碎上清液; 6—重组菌 pET32a-P97-R1/BL21 超声破碎沉淀。箭头所示为预期大小的目的蛋白条带

图 b: M—蛋白质分子量标准; 1—重组菌 pCold I-F7-CTB/BL21 诱导前; 2—pCold I/BL21 诱导前; 3—pCold I/BL21 诱导后; 4—重组菌 pCold I-F7-CTB/BL21 超声破碎全菌蛋白质; 5—重组菌 pCold I-F7-CTB/BL21 超声破碎上清液; 6—重组菌 pCold I-F7-CTB/BL21 超声破碎沉淀。箭头所示为预期大小的目的蛋白条带

图 2 SDS-PAGE 鉴定重组菌 pET32a-P97-R1/BL21 和 pCold I-F7-CTB/BL21 的表达和可溶性分析

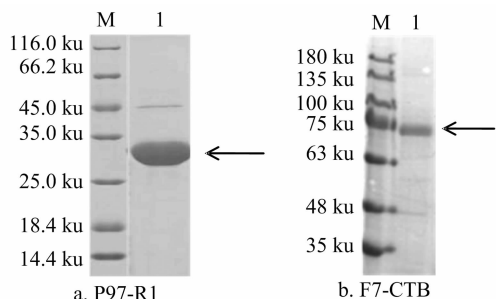


图 3 纯化产物的 SDS-PAGE 分析结果
图 a: M—蛋白质分子量标准; 1—P97-R1 蛋白纯化产物。
图 b: M—蛋白质分子量标准; 1—F7-CTB 蛋白纯化结果

图 3 纯化产物的 SDS-PAGE 分析结果

2.2 Western Blot 分析

将纯化的蛋白经 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素膜上,以抗 His 标签的鼠单克隆抗体为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗,显色后出现清晰且特异的目的条带(图 4)。

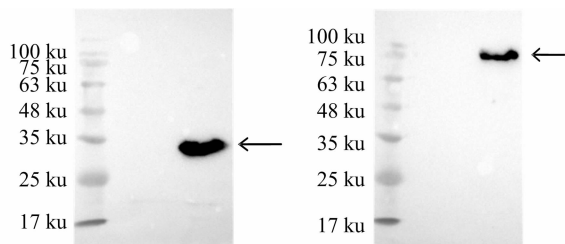


图 4 表达产物的 Western Blot 分析结果
a. P97-R1 的 Western Blot 结果 b. F7-CTB 的 Western Blot 结果

图 4 表达产物的 Western Blot 分析结果

2.3 GM1-ELISA 检测

阳性对照(CTB 蛋白)、F7-CTB、F7 的 $D_{450\text{ nm}}$ 分别是 1.029、0.781 和 0.241,其间差异明显(图 5)。CTB 的免疫增强作用在于其形成的五聚体有与 GM1 结合的能力,热变性后,五聚体解聚,丧失与 GM1 结合的能力。因此,为了验证 F7-CTB 是否能形成五聚体,保留与 GM1 的结合能力是很有必要的。GM1-ELISA 分析表明,重组蛋白 F7-CTB 具有与 GM1 结合的能力。

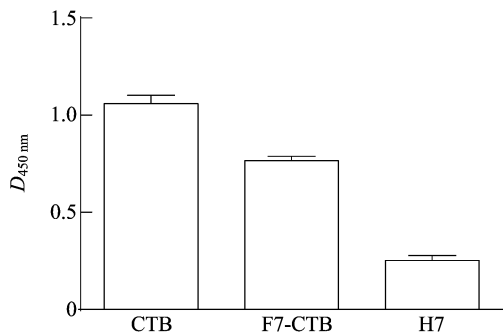


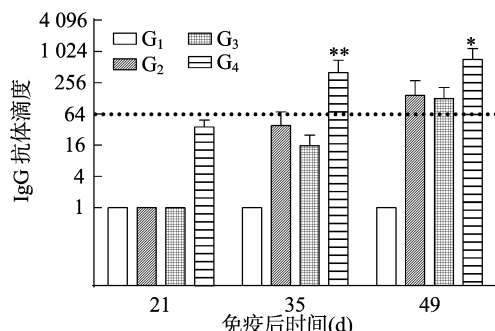
图 5 融合蛋白 F7-CTB 的生物学活性检测结果

2.4 Balb/C 小鼠的免疫效果

2.4.1 免疫小鼠血清中特异性 IgG 的测定

2.4.1.1 免疫试验 1 分别于小鼠免疫后 21、35、49 d 采集血液,收集血清,以检测 IgG 水平。由图 6 可见,经 2 次免疫,在免疫后 35 d, G_1 组(PBS)无特异性 IgG 抗体产生,剩余组别产生了较高的抗体水平,且 G_4 组(F7-CTB + 灭活口蹄疫病毒)产生的抗体水平最高,大约为 1 : 396 ($2^{8.6}$),与 G_2 组(灭活口蹄疫病毒)相比差异极显著($P < 0.01$)。在免疫后 49 d,

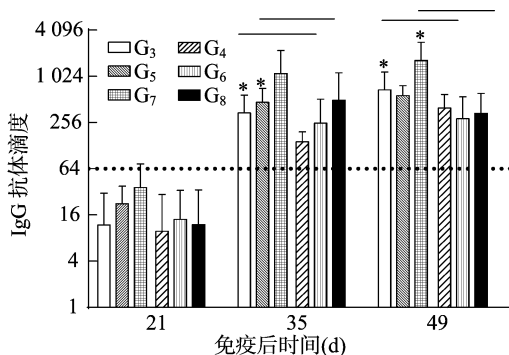
与 G_2 组(灭活口蹄疫病毒)相比, G_3 组(P97 + 灭活口蹄疫病毒)产生抗体的差异不明显; G_4 组(F7-CTB + 灭活口蹄疫病毒)的抗体产生水平最佳,约为 1 : 720 ($2^{9.5}$),与 G_2 组(灭活口蹄疫病毒)相比差异显著($P < 0.05$)。



*、**分别表示与对照(G_2 组)相比差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)

图 6 免疫小鼠血清中的 IgG 水平

2.4.1.2 免疫试验 2 分别于小鼠免疫后 21、35、49 d 采集血液,收集血清,检测其 IgG 水平。经 2 次免疫后, G_1 组(PBS)无特异性 IgG 抗体产生,在免疫后 35 d,其余组别小鼠产生了较高的抗体水平,均高于 1 : 64 (2^6)。在免疫后 49 d, IgG 水平持续升高,且皮下免疫组 IgG 水平明显高于相应组别的腹腔免疫。 G_3 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗-皮下)与 G_4 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗-腹腔)相比,差异显著($P < 0.05$); G_7 组(P97 + F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗-皮下)与 G_8 组(P97 + F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗-腹腔)相比,差异显著($P < 0.05$); G_5 组(F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗-皮下)的抗体水平高于 G_6 组(F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗-腹腔)(图 7)。因此,着重探讨皮下免疫的组别。在皮下免疫组别(G_2 、 G_3 、 G_5 、 G_7)中,与 G_2 组(口蹄疫灭活疫苗)相比, G_7 组[P97-R1 + F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗,抗体水平约为 1 : 1656 ($2^{10.7}$)]和 G_3 组[P97-R1 + 口蹄疫灭活疫苗,抗体水平约为 1 : 684 ($2^{9.4}$)]产生的抗体差异不明显, G_5 组(F7-CTB + 口蹄疫灭活疫苗)的抗体产生水平在 49 d 时差异显著($P < 0.05$),约为 1 : 576 ($2^{9.2}$),详见图 8。



横线两端所对应的 2 组有显著差异($P < 0.05$)。图 8 同

图 7 免疫小鼠血清中的 IgG 水平

2.4.2 免疫小鼠 $CD3^+CD4^+$ 和 $CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞的变化

2.4.2.1 免疫试验 1 相对于 G_1 组(PBS), G_2 组(灭活口蹄疫病毒)、 G_3 组(P97 + 灭活口蹄疫病毒)和 G_4 组(F7-CTB + 灭活口蹄疫病毒)的 $CD3^+/CD4^+$ T 淋巴细胞比例均略

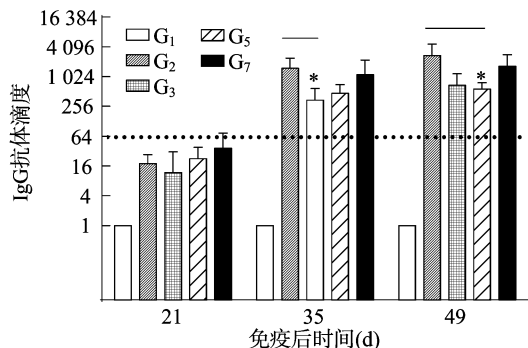
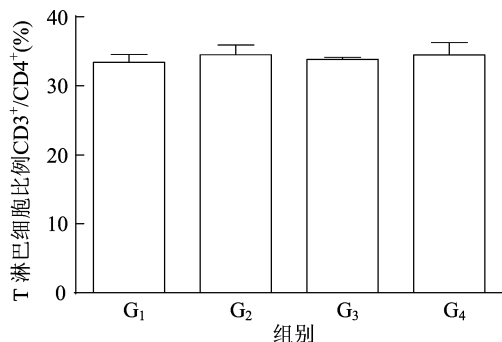
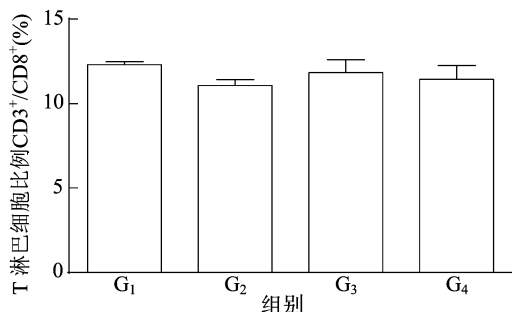
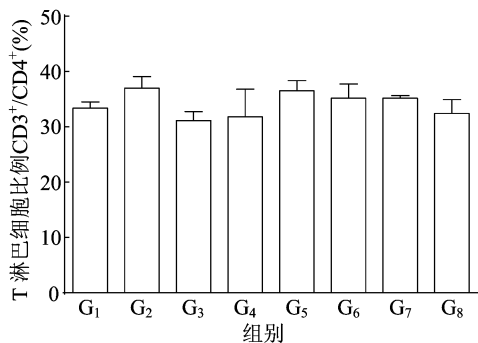
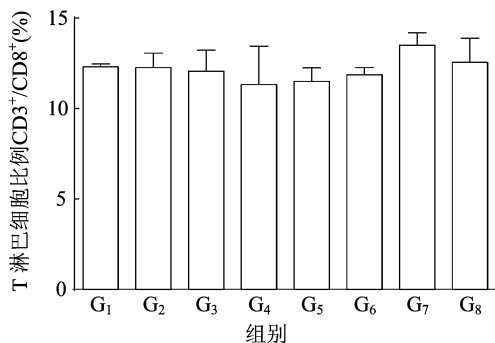


图8 免疫小鼠血清中的 IgG 水平

有上升,但差异不明显(图 9)。相对于 G_1 组(PBS), G_2 组(灭活口蹄疫病毒)、 G_3 组(P97 + 灭活口蹄疫病毒)和 G_4 组(F7 - CTB + 灭活口蹄疫病毒)的 $CD3^+ / CD8^+$ T 淋巴细胞比例均存在不同程度的下降,但差异不明显(图 10)。

图9 试验 1 免疫小鼠脾脏淋巴细胞 $CD3^+ / CD4^+$ 的比例分析图10 试验 1 免疫小鼠脾脏淋巴细胞 $CD3^+ / CD8^+$ 的比例分析

2.4.2.2 免疫试验 2 除 G_3 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗 - 皮下)、 G_4 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗 - 腹腔)与 G_1 组(PBS)的 $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞比例几乎持平外,其余各组的 $CD3^+ CD4^+$ T 淋巴细胞比例均略有上升,但各组之间差异均不明显,并且皮下免疫组别比相对应的腹腔免疫组略有升高(图 11)。由图 12 可以看出, G_3 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗 - 皮下)、 G_4 组(P97 + 口蹄疫灭活疫苗 - 腹腔)、 G_5 组(F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗 - 皮下)和 G_6 组(F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗 - 腹腔)的 $CD3^+ CD8^+$ T 淋巴细胞比例比 G_1 组(PBS - 皮下)低; G_2 组(口蹄疫灭活疫苗 - 皮下)与 G_1 组(PBS - 皮下)的 $CD3^+ CD8^+$ T 淋巴细胞比例持平; G_7 组(P97 + F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗 - 皮下)和 G_8 组(P97 + F7 - CTB + 口蹄疫灭活疫苗 - 腹腔)的 $CD3^+ CD8^+$ T 淋巴细胞比例均高于 G_1 组(PBS - 皮下)。

图11 试验 2 免疫小鼠脾脏淋巴细胞 $CD3^+ / CD4^+$ 的比例分析图12 试验 2 免疫小鼠脾脏淋巴细胞 $CD3^+ / CD8^+$ 的比例分析

3 讨论

FMD 是由 FMDV 引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度传染病,其发病率高、传播速度快^[19]。目前疫苗接种是预防口蹄疫的有效手段。制备安全有效的疫苗是成功预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件^[20]。部分灭活疫苗免疫原性较低,不能产生有效的攻毒保护率。因此,需要一种佐剂,既能引起良好的体液免疫水平,又能够产生细胞免疫,从而提高灭活苗的免疫效果。

Barate 等将融合蛋白 rLTB R1 加入 IMS 1113 佐剂制成疫苗后免疫,结果表明,重组蛋白能诱导小鼠机体产生针对 R1 的特异性体液免疫,并能诱导 Th1 细胞和 Th2 细胞反应^[21]。陈超等将构建成功的含 P97 C 末端基因的重组腺病毒质粒转染,获得重组腺病毒,进行动物试验,结果表明,该重组质粒无论是肌肉注射或者是滴鼻免疫均能刺激小鼠机体产生针对 P97 C 末端蛋白的体液免疫,同时滴鼻途径还可诱发黏膜免疫,但未产生细胞免疫应答,说明 P97 蛋白具有良好的免疫原性^[22]。在本研究中,笔者将 P97 蛋白作为免疫增强剂应用于口蹄疫疫苗,发现 P97 蛋白对机体的体液免疫无显著增强作用。韦艳娜等将含有 P97 - R1 的免疫刺激复合物 (ISCOM - P97R1) 作为 Mhp 活疫苗的佐剂,肌肉注射免疫小鼠,免疫后 7 d 即可在小鼠血清中检测到高水平的特异性 P97 - R1 抗体,并且其针对 Mhp 全菌蛋白的抗体也显著高于无佐剂的活疫苗对照组,从而印证了 P97 - R1 对 Mhp 有一定程度的免疫增强作用^[23]。这可能与免疫途径、免疫增强剂的成分及抗原不同有关。笔者在前者的基础上加入了广泛使用的 ISA206VG,分皮下、腹腔 2 种途径免疫,发现显著差异,表明皮下途径具有更显著的体液免疫增强作用。检测脾脏淋巴细胞亚型比例发现,P97 蛋白没有显示出良好的细胞免疫应答。

鞭毛蛋白可以通过 TLR5 通路诱导炎症反应发生,并促使树突状细胞成熟,该蛋白无论是与抗原混合还是融合表达,均表现出良好的免疫效果^[24-25]。CTB 能够与大多数哺乳动物细胞表面的 GM1 特异性结合,可使其连接的抗原蛋白更易与黏膜作用,进而引起免疫机体一系列生化反应,使其产生更强的免疫效果^[26]。

将基因 F7 和 CTB 进行连接后重组表达,获得重组蛋白 F7-CTB。用 F7-CTB 蛋白与灭活口蹄疫病毒混合免疫小鼠,IgG 抗体水平相比于对照组显著升高($P < 0.05$),表明 F7-CTB 对灭活口蹄疫病毒免疫刺激能力有显著的增强作用。孙小涵单独用 F7 鞭毛蛋白作为灭活口蹄疫病毒的佐剂,皮下注射,发现初次免疫后的 F7+灭活口蹄疫病毒(1:78)的 IgG 抗体水平大约是灭活口蹄疫病毒(1:50)的 1.56 倍^[27]。在本试验中,F7-CTB+灭活口蹄疫病毒 IgG 抗体滴度(IgG 抗体水平为 1:35.8)约是灭活口蹄疫病毒的 35.8 倍。孙小涵虽然使用的 F7 蛋白量为 3 μg ,较本研究用量(5 μg)偏少,从差异倍数来看,F7-CTB 的免疫增强效果明显高于 F7 蛋白。加入 ISA 206 VG 后,分为 2 种免疫途径:皮下及腹腔,且皮下免疫组别的 IgG 抗体水平明显高于腹腔免疫组别^[27]。在细胞免疫水平上,在未添加 ISA206 VG 和添加 ISA206VG 后,均不存在良好的细胞免疫应答。

当 P97-R1 及 F7-CTB 联合应用后,皮下免疫组别的 IgG 抗体水平明显高于腹腔免疫组别。在皮下免疫组别中,蛋白联合应用后的 IgG 抗体水平显著高于单个蛋白的组别,从而验证两者有协同作用。在细胞免疫水平上,蛋白联合应用组别的 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞比例低于灭活口蹄疫病毒组别,但其 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞比例却相对于单个蛋白佐剂的组别有小幅上升,说明联合应用不仅可以增强体液免疫,也有较低程度的细胞免疫增强作用。

另外,本研究中 206+灭活口蹄疫病毒组别的 IgG 抗体水平及细胞免疫均存在比添加 P97-R1、F7-CTB 或两者均添加后都较高的现象,其原因正在分析。遗憾的是,本研究并未设置未添加 ISA206VG 的联合应用组别。此外,2 种蛋白都是公认的具有良好黏膜免疫性的佐剂,这点后续会进一步研究。

总之,本试验初步证实了 P97-R1 及 F7-CTB 这 2 种蛋白作为灭活口蹄疫病毒的佐剂或者是免疫增强剂在体液免疫水平上有较高的协同作用。两者皆是极具发展前景的新型疫苗佐剂,本研究可以为口蹄疫的防治及疫苗的研发提供新的思路。

参考文献:

- [1] Strohmaier K, Franze R, Adam K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunization protein[J]. Journal of General Virology, 1982, 59(2): 295-306.
- [2] Cao Y M, Lu Z J, Liu Z X. Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems[J]. Expert Review of Vaccines, 2016, 15(6): 783-789.
- [3] Doel T R. FMD vaccines[J]. Virus Research, 2003, 91(1): 81-99.
- [4] Rodriguez L. Foot-and-mouth disease virus vaccines[J]. Vaccine, 2011, 27(S4): D90-D94.
- [5] 孙小涵, 张碧成, 张强, 等. 非致病性大肠杆菌鞭毛蛋白对 O 型

- 口蹄疫病毒的佐剂效果[J]. 中国农业科学, 2017, 50(9): 1714-1722.
- [6] Sheldrake R F, Romalis L F, Saunders M M. Serum and mucosal antibody responses against *Mycoplasma hyopneumoniae* following intraperitoneal vaccination and challenge of pigs with *M. hyopneumoniae*[J]. Research in Veterinary Science, 1993, 55(3): 371-376.
- [7] Okamba F R, Arella M, Music N, et al. Potential use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin protein as a vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine[J]. Vaccine, 2010, 28(30): 4802-4809.
- [8] Lee S H, Lee S W, Chae C, et al. A recombinant chimera comprising the R₁ and R₂ repeat regions of *M. hyopneumoniae* P₉₇ and the N-terminal region of *A. pleuropneumoniae* Apx III elicits immune responses[J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10: 43.
- [9] Smith K D, Andersen-Nissen E, Hayashi F, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility[J]. Nature Immunology, 2004, 5(4): 451.
- [10] Hong S H, Byun Y H, Nguyen C T, et al. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection[J]. Vaccine, 2012, 30(2): 466-474.
- [11] Skountzou I, Martin M D, Wang B Z, et al. *Salmonella* flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine[J]. Vaccine, 2010, 28(24): 4103-4112.
- [12] Le Moigne V, Robreau G, Mahana W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response; study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(9): 2499-2507.
- [13] Honko A N, Sriranganathan N, Lees C J, et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(2): 1113-1120.
- [14] Albert M J, Mustafa A S, Islam A, et al. Oral immunization with cholera toxin provides protection against *Campylobacter jejuni* in an adult mouse intestinal colonization model[J]. MBio, 2013, 4(3): e00213-e00246.
- [15] Delaney K N, Phipps J P, Johnson J B, et al. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice[J]. Viral Immunology, 2010, 23(2): 201-210.
- [16] Petrovsky N, Aguilar J C. Vaccine adjuvants: current state and future trends[J]. Immunology and Cell Biology, 2004, 82(5): 488-496.
- [17] Hou J E, Liu Y, Hsi J, et al. Cholera toxin B subunit acts as a potent systemic adjuvant for HIV-1 DNA vaccination intramuscularly in mice[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2014, 10(5): 1274-1283.
- [18] Miyata T, Harakuni T, Taira T, et al. Merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* fused via an oligosaccharide moiety of cholera toxin B subunit glycoprotein expressed in yeast induced protective immunity against lethal malaria infection in mice[J]. Vaccine, 2012, 30(5): 948-958.
- [19] 陈里新, 靳玉珠, 扈荣良. 口蹄疫疫苗的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(3): 301-304.

徐磊,孙博悻,盛鹏程,等. 湖州地区典型水产养殖池塘中抗菌药物的污染特征[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):210-214.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.047

湖州地区典型水产养殖池塘中抗菌药物的污染特征

徐磊,孙博悻,盛鹏程,施沁璇,罗毅志

(农业部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省鱼类健康与营养重点实验室/浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:在水产养殖业中,抗菌药物作为防治细菌性疾病的药物和生长促进剂被大量的应用,不可避免地造成了抗菌药物在水环境中的残留,引发一系列环境问题。利用固相萃取和超高效液相串联质谱技术调查 6 种磺胺类、4 种四环素类和 6 种喹诺酮类抗菌药物在湖州地区典型水产养殖池塘中的含量水平,揭示其在湖州地区典型水产养殖环境中的污染现状与分布特征。在养殖水、底泥中分别检测到 9、13 种抗菌药物,平均浓度在 0.1 ~ 428.8、10.0 ~ 3 681.6 ng/kg 之间,其中养殖水中以磺胺类为主,底泥中以四环素类和喹诺酮类为主。抗菌药物在底泥和水中的分布可采用底泥-水分配系数(K_d)来解释分析。在不同养殖模式下,抗菌药物的污染程度存在巨大差异。

关键词:抗菌药物;水;底泥;水产养殖区;湖州地区;分配系数;污染特征

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)11-0210-05

随着我国水产养殖业的快速发展,抗菌药物在促生长、预防和治疗感染性疾病方面被广泛使用,为动物的快速、健康生长作出了重要贡献^[1]。然而,抗菌药物在水产养殖中的大量使用,不可避免地造成了抗菌药物在水环境中的残留,研究表明养殖塘中有 70% ~ 80% 的抗菌药物最终进入环境^[2]。梁惜梅等在珠江口水产养殖区的水和沉积物中分别检测出 2 类 3 种(诺氟沙星、氧氟沙星和四环素)和 3 类 5 种(诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、四环素和脱水红霉素)抗菌药物残留,平均质量浓度分别在 7.63 ~ 59.00、0.97 ~ 85.25 ng/g 之间^[3]。大量的抗菌药物进入到水环境中可能会引发多种危害,其中一个危害就是诱导细菌产生对抗菌药物的抗性基因。杨颖发现,含有四环素类和磺胺类抗性基因的细菌在珠江流域的北江水体中普遍存在,抗性基因在环境中的存在与传播

将可能导致人类本体携带上抗性基因,并最终危害人类健康^[4]。

湖州地区是全国著名的淡水渔业基地,各类养殖水域达到 426.67 km²。近年,年生产各类水产品 15 万 t,产值约 20 亿元。然而,对于湖州地区养殖水域中抗菌药物污染的研究较为鲜见,缺乏足够的研究基础。本研究将以湖州 3 县 2 区 9 个养殖品种、18 个养殖塘为研究对象,调查了 6 种磺胺类、4 种四环素类和 6 种喹诺酮类在养殖水和底泥中的含量水平,分析其中抗菌药物的组成及分布特征,以了解湖州地区养殖塘中抗菌药物的残留状况,以期为我国水产养殖区中抗菌药物使用和残留的环境风险评价提供更多的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和材料

超高效液相色谱串联质谱仪(TQ MS/I-CLASS 系列美国 Waters 公司),旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司),氮吹仪(美国 Orgnomation 公司),冷冻干燥机(美国 Labconco 公司),固相萃取装置(美国 SUPELCO 公司)。

磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲基嘧啶(SMR)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺多辛(SDX)、磺胺异噁唑(SFZ)、磺胺甲异噁

收稿日期:2018-02-06

基金项目:浙江省湖州市科技计划(编号:2015GY02)。

作者简介:徐磊(1988—),男,浙江江山人,硕士,工程师,研究方向为水产品质量安全。E-mail:Lei_1130@126.com。

通信作者:罗毅志,副研究员,研究方向为鱼类病害防治。E-mail:13587242279@139.com。

[20] Gibbens J C, Sharpe C E, Wilesmith J W, et al. Descriptive epidemiology of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in Great Britain: the first five months[J]. Veterinary Record, 2001, 149(24): 729-743.

[21] Barate A K, Cho Y, Truong Q L, et al. Immunogenicity of IMS 1113 plus soluble subunit and chimeric proteins containing *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 C-terminal repeat regions[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 352(2): 213-220.

[22] 陈超,李媛,郭丹,等. 猪肺炎支原体 p97 C 末端基因重组腺病毒的构建及其免疫效果[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 465-470.

[23] 韦艳娜,熊琪琰,董璐,等. 猪肺炎支原体 P97R1 抗原免疫刺激复合物的制备及对活疫苗免疫刺激能力的增强作用研究

[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(12): 1016-1019.

[24] Batah J, Denève-Larrazet C, Jolivet P A, et al. *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF- κ B pathway in epithelial cells[J]. Anaerobe, 2016, 38: 116-124.

[25] Tahoun A, Jensen K, Corripio-Miyar Y, et al. Functional analysis of bovine TLR₅ and association with IgA responses of cattle following systemic immunisation with H₇ flagella[J]. Veterinary Research, 2015, 46: 9.

[26] Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant-an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity[J]. Vaccines, 2015, 3(3): 579-596.

[27] 孙小涵. 非致病性大肠杆菌鞭毛蛋白增强 FMDV 免疫原性的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2017.