

中国对虾复合疫苗的初步研究*

丁 燊 王 雷 李光友[†]

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

提要 于1996年11月—1997年5月,运用差异离心、蔗糖梯度离心、柱层析等方法从发病中国对虾分离出杆状病毒并纯化;分别用冷乙酸处理法、十二烷基硫酸钠-苯酚法提取纯化该病毒的结构蛋白与核酸、 λ DNA;分别用十二烷基硫酸钠煮沸法、三氯乙酸法纯化弧菌的肽葡聚糖和鸡卵粘蛋白;配制出小牛血清白蛋白、蜗牛凝集素两溶液。然后从超氧化物歧化酶(SOD)活力和溶菌活力两种免疫指标分析灭活病毒和以上提取、纯化的7种大分子物质对中国对虾的免疫效果,根据其结果筛选几种物质制成复合疫苗,测定复合疫苗对对虾的免疫作用。结果表明,病毒免疫后的SOD活力、溶菌活力均有提高。7种大分子物质免疫后,除小牛血清白蛋白外,其余6种物质的两种酶活性均有提高。以6种物质组成的复合疫苗免疫实验表明,两种酶活力提高明显(SOD活力最高峰达224.10units,溶菌活力最高峰为0.122units)。说明复合疫苗具有提高SOD和溶菌活力的作用,可以增强中国对虾的防御能力。

关键词 中国对虾 病毒 弧菌 糖蛋白 免疫激活剂 复合疫苗

学科分类号 S945.1

对虾疫苗的研究除对虾弧菌疫苗外(Song *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1991),几乎没有其它成功的疫苗,弧菌疫苗口服后可使白对虾产量提高8%—10%,死亡率减少。免疫激活剂的研究是对虾病害防治的另一方面,如 β -1, 3葡聚糖可以提高斑节对虾对弧菌的抵抗力(Sung *et al.*, 1994; I Chiu Liao *et al.*, 1996),王雷等(1995)研制的免疫多糖可以提高中国对虾的生长速度与抗病力,已在海洋水产上得以广泛应用,现又开始应用于淡水鱼类,取得较好的效果。以上研究主要集中在弧菌疫苗与多糖类免疫激活剂,而未涉及到病毒疫苗和糖蛋白免疫激活剂,并且是将疫苗与激活剂分别研究。本文将从抗原(病毒和弧菌的抗原)免疫及免疫激活剂入手,在以病原抗原为免疫原的前提下,再筛选出几种糖蛋白类免疫激活剂制成复合疫苗进行免疫实验,以期为提高中国对虾综合抗病能力提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

于1997年4月从市场购得中国对虾(*Penaeus chinensis*)。亲虾长约10—12cm,于室温

* 国家攀登计划B资助项目,PDB6-6-3号;国家“九五”科技攻关项目,055970311号。丁燊,男,出生于1971年9月,硕士,现在湛江海洋大学水产学院养殖系,邮编:524025, Fax: 0086-0759-2383001

收稿日期:1997-08-12,收修改稿日期:1998-10-30

27℃、pH = 7.8、盐度为 5 的条件下暂养 6 天后进行实验。溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 由中国科学院海洋研究所丁美丽研究员提供。中国对虾杆状病毒, 直接从病虾中提取, 病虾于 1996 年 6 月采集于青岛市上马镇养虾场。大肠杆菌噬菌体 λ 由武汉大学病毒系 1997 年 2 月提供。小牛血清白蛋白、蜗牛凝集素购自 Sigma 公司。

1.2 各种免疫物质的提纯及制备

1.2.1 病毒及其成分的分离提纯和鉴定 病毒的初提参照 Misao 等 (1995) 的方法。首先经差异离心得到病毒初提液, 然后将初提液蔗糖梯度离心, 收集各梯度, 负染制片作电镜观察, 以鉴定病毒组分。确认病毒组分后将其用 Sephadex G-150 柱层析进一步纯化, 于 280nm 测吸光值, 收集第 1 峰即为病毒峰, 干燥浓缩。

病毒的结构蛋白分离用冷乙酸处理法 (Laemmli, 1970), 离心收集所需蛋白, 再将提纯蛋白用 Sephadex G-100 柱层析进一步提纯。最后采用十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶 (10%) 电泳测分子量 (张龙翔等, 1981)。病毒的核酸分离采用 SDS-苯酚法 (Maniatis *et al.*, 1989), 最后将 DNA 沉淀溶于 Tris-HCl-EDTA (TE) 缓冲液, 并用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 大肠杆菌噬菌体 λ DNA 的提取 方法同病毒的核酸提取, 最后改用冷乙酸沉淀 DNA, 得 λ DNA, 溶于 TE 缓冲液。

1.2.3 弧菌肽葡聚糖的分离 用 SDS 煮沸法。弧菌液 (9×10^9 cell/ml) 与 8% SDS 等量混匀后煮沸 30min, 冷却至室温过夜, 再以 64 000r/min 转速离心 60min, 水洗悬浮沉淀 3—4 次。然后将沉淀悬浮于 5ml 10mmol/L Tris-HCl (pH = 7.0), 加咪唑至终浓度为 0.32mol/L; 加淀粉酶至终浓度为 100 μ g/ml; 37℃ 保温 2h, 再加胰蛋白酶至 300 μ g/ml, 于 60℃ 处理 1.5h, 再加等体积的 8% SDS, 煮沸 15min, 洗 SDS 3—4 次, 最后将沉淀悬浮于蒸馏水。

1.2.4 鸡卵粘蛋白的分离纯化 采用三氯乙酸法。取 30ml 蛋清, 加入等体积 10% 三氯乙酸 (pH = 1.15), 于 25℃ 恒温 4h 以上, 以 4 500r/min 转速离心 20min。上清液过滤, 待冷却至 0℃ 后加 3 倍 4℃ 的丙酮于冰箱 (4℃) 过夜。次日小心倒出清液, 离心收集沉淀, 将沉淀干燥后溶于 12ml 蒸馏水中, 装入透析袋对流水透析 2—3d, 4℃ 保存待用。

1.2.5 小牛血清白蛋白、蜗牛凝集素溶液的制备 分别取商品化的小牛血清白蛋白、蜗牛凝集素 0.1mg 用 0.1mol/L, pH = 7.6 的磷酸缓冲液 (PBS) 配制成 0.1mg/ml 的溶液。

1.3 灭活病毒疫苗实验

设实验组与对照组, 每组用 20 尾中国对虾亲虾。实验组每尾注射 20 μ l 灭活病毒生理盐水溶液 (30 μ g/ml, 将提纯的病毒用生理盐水溶液溶解煮沸 2h 即得灭活病毒); 对照组每尾注射 20 μ l 无菌生理盐水。实验前取一次血, 实验后每 4d 用 2 只中国对虾分别取血, 于 4℃ 过夜, 离心取上清液作测定免疫指标用。实验后第 12d 作第 2 次免疫, 每只中国对虾注射 10 μ l, 同样取血清。免疫指标包括超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和溶菌活力。SOD 活力测定参照邓碧玉等 (1991), 溶菌活力测定按 Hultmark (1980) 改进的方法。

1.4 7 种大分子物质的单独免疫

用 1.2 提取的病毒结构蛋白 (100 μ g/ml)、病毒核酸 (150 μ g/ml)、 λ DNA (150 μ g/ml)、肽葡聚糖 (100 μ g/ml)、鸡卵粘蛋白 (100 μ g/ml)、小牛血清白蛋白 (100 μ g/ml)、蜗牛凝集素

(100 μ g/ml)等7种大分子物质分别免疫中国对虾, 实验组, 在虾体第4至5腹节间注射, 每尾注射30 μ l; 设对照组, 每组用10尾亲虾, 温度27 $^{\circ}$ C, pH = 7.8, 过滤海水喂养, 注射前及注射后每天取血1次, 共取血5次, 同1.3测定SOD活力和溶菌活力。

1.5 复合疫苗的免疫

将有促进免疫作用的物质按等量(每种物质0.5ml)配成复合疫苗液, 免疫中国对虾; 同时设对照组, 每组10尾亲虾, 喂养、取血、测定两种活力同1.4。

2 结果

2.1 病毒的分离纯化结果

初提的病毒经蔗糖梯度离心, 呈现5条带, 经电镜检测, 第2条带具有典型的杆状病毒(图1a), 大小为(505—525) \times (150—175)nm。将第2条带成分经柱层析去蔗糖和蛋白杂质, 收集第1峰, 即为较纯的病毒, 病毒的结构蛋白经Sephdex G-100柱层析, 具有6个峰, 第2和第3峰的分子量测定见电泳图(图1b), 分子量在30kD左右, 选取第2峰的病毒结构蛋白作免疫用, 病毒核酸分离后, 电泳呈单一带(图1c)。

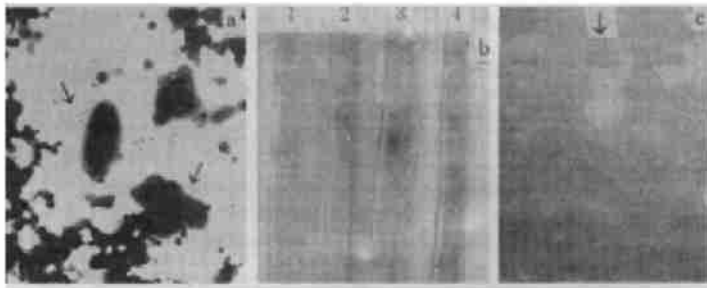


图1 中国对虾杆状病毒电镜照片及病毒结构蛋白和DNA的电泳照片

Fig.1 The photographs of rod-shape viruses of *P. chinensis* under electronic microscope and electrophoresis of their capsid proteins and DNA

- a. 梯度离心后第2条带的病毒负染电镜照片, $\times 20\,000$ 。b. 病毒结构蛋白组分分子量的测定: 1和3为层析后的第3峰蛋白; 2. 为层析后的第2峰蛋白; 4为标准分子量蛋白(分子量分别为66 000, 45 000, 34 700, 24 000, 18 400, 14 300)。c. 病毒核酸电泳照片

2.2 灭活病毒的免疫效果

结果见表1。对照组的SOD活力没有较大的波动(位于370—395units之间)。实验组, 注射前SOD活力仅为375.2units, 4天内上升很快, 至第8天达到最高点(557.9units), 然后开始下降。第12天进行第2次注射后, SOD活力又迅速回升, 达第2峰值557.9units。

表1 注射灭活病毒后中国对虾血清SOD和溶菌活力(units)

Tab.1 The SOD and bacteriolytic activities in the serum of *P. chinensis* after injecting inactivated viruses

取样时间(d)		0	4	8	12	16	20	24
SOD活力	实验组	375.2	535.9	557.9	392.9	557.9	495.9	
	对照组	371.3	369.3	391.3	390.3	383.2	395.4	
溶菌活力	实验组	0.0776	0.0801	0.1955	0.1967	0.0189	0.2080	0.1450
	对照组	0.1185	0.1209	0.1204	0.1198	0.1210	0.1213	0.1015

对照组溶菌活力同样较稳定(在 0.101 5—0.121 3units之间)。但实验组溶菌活力发生了明显变化,注射病毒后,虽前 4 天上升缓慢,但第 4—8 天间上升最快,第 8 天达 0.195 5units,一直延续至第 12 天,第 12—16 天又下降。第 12 天再次免疫后,16—20 天间回升很快。实验表明,两种酶活力的结果趋势基本相同,只是溶菌活力对病毒的反应要慢一点。

2.3 7 种大分子物质的免疫结果

结果见表 2。可以看出,SOD 活力在对照组和小牛血清白蛋白实验组没有明显变化,其余 6 种大分子物质实验组的(90.55—224.10units)均显著高于对照组的(58.25—72.21units)。病毒结构蛋白组第 2 天升至最高(167.5units),以后较稳定;病毒核酸组和 λ DNA 组,SOD 活力一直呈上升趋势,第 4 天均为最高;肽葡聚糖组注射后第 1 天升至最高点(224.10units),后略有下降,但仍比对照组的高出很多;鸡卵粘蛋白组一直上升,第 4 天达 159.60units;蜗牛凝集素组也保持较高状态,第 1 天达 195.30units。

表2 注射7种大分子物质后中国对虾血清SOD和溶菌活力(units)

Tab.2 SOD and bacteriolytic activities in the serum of *P. chinensis* after injecting seven kinds of macromolecular compounds

组别	溶 菌 活 力*					SOD 活 力*					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
对照组	65.39	69.37	65.48	58.25	72.21	0.024	0.023	0.028	0.019	0.021	
实 验 组	病毒结构蛋白	65.81	128.80	167.50	165.40	158.90	0.029	0.043	0.087	0.056	0.124
	病毒核酸	73.25	110.10	141.40	144.40	178.70	0.032	0.040	0.095	0.130	0.040
	λ DNA	71.38	95.57	142.70	132.90	224.10	0.026	0.085	0.109	0.051	0.083
	肽葡聚糖	72.55	205.70	138.40	178.70	148.70	0.034	0.053	0.121	0.066	0.083
	鸡卵粘蛋白	66.47	90.55	127.40	136.20	159.60	0.018	0.031	0.075	0.110	0.050
	血清白蛋白	67.32	71.44	75.35	69.91	80.25	0.025	0.029	0.032	0.028	0.030
	蜗牛凝集素	71.23	195.30	141.10	164.50	155.80	0.024	0.046	0.132	0.071	0.085

* 活力两栏中的0—4数据,均表示采样天数(d)

可以看出,溶菌活力在对照组和小牛血清白蛋白组的同样波动很小,对照组溶菌活力在 0.019—0.028units 之间,小牛血清白蛋白组的在 0.025—0.032units 之间。其它各组免疫后溶菌活力均有明显变化,且均高于对照组的,其中病毒结构蛋白组的溶菌活力除第 3 天稍有下降外,一直呈上升状态,第 4 天达最高(0.124units);病毒核酸组第 3 天升至最高点(0.130units),然后下降; λ DNA 组和肽葡聚糖组第 2 天为最高峰,再稍有回落,但仍高于对照组的;鸡卵粘蛋白组从 0.031 升至 0.110units,第 4 天下降;蜗牛凝集素组第 2 天为最高峰(0.132units),第 3 天、第 4 天也居较高状态。

2.4 复合疫苗的免疫效果

以除小牛血清白蛋白外的其它 6 种具有免疫作用的大分子物质组成的复合疫苗,对中国对虾进行免疫后,其 SOD 和溶菌活力见表 3。可以看出,对照组的 SOD 活力和溶菌活力均很稳定且处于较低状态,实验组的两种酶活力均高于对照组的。SOD 活力第 1 天开始上升,至第 2 天达最高(222.90units),以后持较平稳状态;溶菌活力除第 3 天有所下降,

基本趋势是上升的,第 4 天达高峰(0.122units)。

表3 注射复合疫苗后中国对虾血清SOD和溶菌活力(units)

Tab.3 SOD and bacteriolytic activities in the serum of *P. chinensis* after injecting complex vaccine (except buffalo serum albumen)

取样时间(d)		0	1	2	3	4
SOD活力	对照组	78.43	87.86	82.71	78.43	85.71
	实验组	81.29	148.70	222.90	222.90	219.90
溶菌活力	对照组	0.025	0.034	0.041	0.032	0.038
	实验组	0.021	0.023	0.096	0.061	0.122

3 讨论与结语

3.1 病毒及其结构蛋白的免疫

灭活病毒免疫表明,注射病毒后 SOD 活力和溶菌活力明显上升,下降时作第 2 次免疫,可使酶活再次提高。溶菌活力对疫苗的反应较滞后,比 SOD 活力持久性稍长,但持久性也是有限的,这就要不断地给以疫苗刺激,以及提前进行疫苗处理。蛋白类和某些短肽可以用来提高机体的抗菌能力(Coleman, 1993),本实验用病毒结构蛋白免疫中国对虾后,SOD 活力和溶菌活力均高于对照组的,说明具有免疫激活作用。但用小牛血清白蛋白无免疫效果,其机制不甚明了,可能与蛋白大小和结构有关。

3.2 核酸免疫

核酸疫苗的研究是疫苗史上的又一次革新(丁焯等,1997),关于对虾核酸疫苗的研究尚未见报道。本实验用提取的病毒核酸、 λ DNA 接种中国对虾,两者同样激活了中国对虾的免疫能力,说明应用在对虾上也是可能的,但核酸作用于中国对虾的机理有待阐明。

3.3 弧菌及其亚单位的免疫

弧菌疫苗起主要作用的是细胞壁中粘多糖的糖苷键,本文提取到弧菌细胞壁的肽葡聚糖,接种中国对虾具有较好的免疫效果,说明弧菌亚单位疫苗是可行的,提供了从另一途径分离具免疫能力的生物大分子,这与通常的福尔马林灭活菌苗和葡聚糖免疫斑节对虾时具有同样的效果(Itami *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1991)。

3.4 糖蛋白类的免疫

多糖类免疫激活剂已得到公认(I Chiu Liao *et al.*, 1996),本实验用弧菌肽葡聚糖、鸡卵粘蛋白、蜗牛凝集素等糖蛋白免疫中国对虾,都有一定程度的免疫激活作用。糖蛋白的复杂结构可能是免疫功能的基础。糖蛋白广泛分布于自然界,是一种很有潜力的免疫激活剂。

3.5 复合疫苗的作用

以病毒的结构蛋白、病毒核酸、 λ DNA、弧菌肽葡聚糖,以及糖蛋白(鸡卵粘蛋白和蜗牛凝集素)组成的复合疫苗免疫中国对虾,SOD 活力和溶菌活力均明显提高,且 SOD 活力的提高优于各单一成分的免疫,说明复合疫苗的效果比较好。复合疫苗中各成分各自的作用,达到相互弥补的作用,使免疫效果更显著。当然复合疫苗的配比等方面需进一步摸索。

可见,通过筛选出的 6 种高分子物质组成的复合疫苗具有刺激免疫功能的作用,可以

增强中国对虾的防御系统, 如果对其作用机理、使用方法等作深入研究, 这种疫苗可能在对虾中得以应用。

参 考 文 献

- 丁 婧, 王 雷, 1997. 核酸免疫及其在水产病害防治中的应用前景. 湛江海洋大学学报, 17(2):80—82
- 王 雷, 李光友, 毛远兴, 1995. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖沼, 25(5):486—491
- 邓碧玉, 袁 勤, 李文杰, 1991. 改良后的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学与生物物理进展, 18(2):163—165
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 1981. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量. 生物化学实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 112—118
- Coleman G, 1993. A 70 kD *Aeromonas salmonicida* serine protease-beta-galactosidase hybrid protein as an antigen and its protective effect on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against a virulent *A. salmonicida* challenge. Trans Biochem Soc, 21(1):49—53
- Hultmark D, 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 106:7—16
- I Chiu Liao, Mao-Sen Su, Cheng-Fang Chang, 1996. Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1, 3 glucan. J Fish Soc Taiwan, 23(2):109—116
- Itami T, Takahashi Y, Tsuchihira E, 1993. Enhancement of Disease Resistance of Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* and Increase in Phagocytic Activity of Prawn Hemocytes After Oral Administration of β -1, 3 Glucan. The Third Asian Fisheries Forum. Manila, Philippine: Asian Fisheries Society, 375—378
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680—685
- Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E F, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Lab, 1—34
- Misao A, Tetsuo Y, Younosuke M, 1995. Characterization and partial cloning of the genomic DNA of a baculovirus from *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 132:213—220
- Song Y L, Sung H H, 1990. Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacterin prepared from *Vibrio vulnificus*. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 10:98—99
- Sung H H, Song Y L, Kou G H, 1991. Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. Fish Shellfish Immunol, 1:311—312
- Sung H H, Kou G H, Song Y L, 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology, 29(1):11—17

PRIMARY STUDIES ON COMPLEX VACCINE OF *PENAEUS CHINENSIS*

DING Yu, WANG Lei, LI Guang-you[†]

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

[†](First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266003)

Abstract From November 1996 to May 1997 rod shape viruses of *P. chinensis* were separated and purified from disease prawns *P. chinensis* through differential centrifugation, sucrose gradient centrifugation and column chromatograph. Their capsid protein was purified using ice-acetic acid method, an SDS-phenol method was applied to extract their DNA as well as λ DNA. Peptidoglycan of *Vibrio alginolyticus* (by SDS-boiling method), and chicken ovomucin were also extracted by chloroacetic acid method. At last bufflo serum albumen and snail agglutinin solution were prepared with a phosphate buffer. The effects of all above materials including inactivated viruses and seven kinds of macromolecular compounds on the immuno potency of *P. chinensis* after injected into prawns were determined by SOD and bacteriolytic activities. According to the above results several compounds were selected to form complex vaccine, whose immuno potency was then evaluated. The results show that SOD and bacteriolytic activities of the test group were much more intensive than the control group after the viruses were injected. Six of the seven compounds except bufflo serum albumen can activate two enzymes activities; the SOD activity of the test group can reach 224.10 units. but that of the control group was only between 58.25—72.21 units. The bacteriolytic activity of the test group would reach 0.132 units, but that of the control group was only between 0.019 and 0.028 units. Further, the two enzymes activities of the test group were much higher than the control after the complex vaccine containing six types of materials were inoculated. In the test group maximum of SOD activity could reach 222.90 units, and that of bacteriolytic activity was 0.122 units. However, in the control group the SOD activity was changing from 78.43 to 87.86 units and the bacteriolytic activity was from 0.025 to 0.041 units. It is suggested that this complex vaccine can strengthen SOD and bacteriolytic activities and can increase immuno potency of *P. chinensis*.

Key words *Penaeus chinensis* Virus *Vibrio* Glycoprotein Immuno stimulant
Complex vaccine

Subject classification number S945.1