

文章编号: 1674 - 5566(2013)02 - 0212 - 07

草鱼出血病细胞疫苗微囊制备与体外释放研究

李瑞伟¹, 曾令兵^{1,2}, 张辉², 肖艺², 周勇², 范玉顶², 刘秋凤¹,
孙建滨³

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
3. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 以海藻酸钠、壳聚糖以及草鱼出血病细胞灭活疫苗为原材料, 采用复凝聚法制备草鱼出血病口服微囊疫苗。通过单因素试验和正交试验, 研究了海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度以及加入疫苗体积对微囊疫苗包封率的影响, 确定了其最佳制备工艺。结果显示, 各因素对草鱼出血病微囊疫苗包封率的影响程度由大到小依次为: 海藻酸钠浓度 > 疫苗加入量 > 壳聚糖浓度 > 氯化钙浓度; 制备草鱼出血病微囊疫苗的最佳工艺为: 海藻酸钠浓度为 1.5%, 壳聚糖浓度为 1%, 氯化钙浓度为 4%, 加入疫苗体积为 2 mL。该微囊疫苗平均粒径为 $(7.02 \pm 3.95) \mu\text{m}$, 平均包封率为 60.53%, 平均载蛋白量为 8.12 mg/g, 在 pH 7.4 的 PBS 溶液、生理盐水溶液中具有较好的释放性能。

研究亮点: 首次以草鱼出血病细胞灭活疫苗为芯材, 以海藻酸钠、壳聚糖为壁材, 制备草鱼出血病口服微囊疫苗。通过单因素实验和正交试验, 确定了微囊疫苗的最佳制备工艺。并进行了微囊粒径、包封率、载蛋白量以及微囊体外释放性能的研究。
关键词: 草鱼出血病; 细胞疫苗; 海藻酸钠; 壳聚糖; 微囊制备工艺
中图分类号: S 941.41⁺1
文献标志码: A

草鱼出血病是我国养殖草鱼最为严重的病毒性疾病, 其病原为草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV)。草鱼出血病流行范围广, 持续时间长, 死亡率高, 严重威胁我国草鱼养殖业的健康发展。采用疫苗免疫的方法对草鱼出血病进行免疫预防被证实是最为有效的方法^[1]。传统草鱼出血病疫苗的免疫途径主要是注射或浸泡, 因其操作繁琐且对鱼体造成一定程度损伤或应激, 推广使用仍受到局限。口服免疫途径是鱼类疾病预防最为自然的免疫接种途径, 对鱼体造成伤害小, 且实施方便, 不受时间、鱼体的大小等限制, 正日益受到人们的重视。

疫苗通过口服途径直接免疫时, 因其抗原物质易受鱼体内消化系统酶的破坏, 其免疫效果无法保障。但是, 随着微囊化技术的发展与应用, 口服免疫疫苗成为水产疫苗研究的热点。JOOSTEN 等^[2]制备的微囊弧菌疫苗, 通过对草鱼

和鳙鱼的口服免疫试验, 证实了微囊疫苗确实可以提高鱼体对抗原的吸收。2001年, 余俊红等^[3]首次报道了鳃弧菌口服微囊疫苗, 研究发现: 该微囊化的疫苗免疫效果优于普通的全细胞疫苗, 保护率最高达 73.7%。ROMALDE 等^[4]研究结果表明: 微囊化的口服疫苗对虹鳟乳球菌病的免疫保护较显著。张守庆等^[5]通过重组抗菌肽海藻酸钠微囊制备与体外释放特征研究, 表明微囊具有良好的肠溶性可以抵抗胃液的破坏, 为抗菌肽在水产病害防治过程的口服给药提供了实验基础。

本研究采用具有良好的生物相容性、天然可降解的材料——海藻酸钠、壳聚糖, 以传统方法灭活的 GCRV104 细胞疫苗为抗原蛋白, 初步探索微囊疫苗的最佳制备条件及其体外释放特性, 旨在为草鱼出血病微囊疫苗的制备、应用及口服免疫效果研究奠定基础。

收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-11-08

基金项目: 国家大宗淡水鱼类产业技术体系专项资金 (CARS-46-11)

作者简介: 李瑞伟 (1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物病害防治。E-mail: sdtzlrw888@126.com

通信作者: 曾令兵, E-mail: zenglingbing@gmail.com

1 材料与试剂

草鱼肾脏组织细胞系(CIK)、草鱼呼肠孤病毒 104 毒株(GCRV104)由本实验室保存。海藻酸钠购于天津红岩试剂厂;壳聚糖(脱乙酰纯度 >90%)购于上海如吉生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 草鱼出血病细胞灭活疫苗制备

将 CIK 细胞传代培养,24 h 后细胞生长成汇合单层。将培养液吸出,向培养瓶中加入 1 mL GCRV 细胞培养病毒液和 10 μ L Polybrene(浓度为 10 μ g/mL)。对照瓶中加入等量无血清 MEM 培养基模拟感染。将细胞培养瓶置 28 $^{\circ}$ C 培养箱中吸附 1 h,期间每 20 min 轻摇培养瓶一次,使细胞与病毒液充分接触促进病毒吸附。1 h 后吸弃未吸附病毒液,添加 4 mL 含 2% 新鲜牛血清的 MEM 培养基,置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。细胞出现 90% 病变时,收获病毒材料。置 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱、室温中冻融 3 次使细胞裂解,4 000 r/min 离心 30 min,吸取上清即为 GCRV 病毒液,并测得 TCID₅₀/mL = 10^{8.5}。加入终浓度为 0.2% 的甲醛溶液,37 $^{\circ}$ C 灭活一周。5 000 r/min 离心 30 min,取上清,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 微囊制备方法

参考朱敏莉^[6]、李朝霞和朱建良^[7]、刘博等^[8]、何东保等^[9]、赵亚南等^[10]方法,取适量的疫苗加入到海藻酸钠液中,充分混匀。用医用 9 号针头注射器将其以恒定的速度滴入到氯化钙溶液、壳聚糖乙酸的混合液中。恒速搅拌使其成膜反应充分,室温静置,去除多余的氯化钙液体,即得海藻酸钙-壳聚糖微囊疫苗的混悬液。过滤并用蒸馏水反复清洗。将其于 -80 $^{\circ}$ C 预冷 1 h,真空冷冻干燥,即获得微囊疫苗。

2.3 单因素实验

分别考察影响微囊疫苗的主要成囊因素:海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度及所加疫苗体积。选取各个因素的不同水平,以疫苗的包封率为指标,考察各因素对微囊疫苗包封率/载蛋白量的影响。

2.3.1 不同海藻酸钠浓度对微囊包封率的影响

海藻酸钠浓度分别设为 0.5%、1.0%、

1.5%、2.0%、2.5%,在壳聚糖浓度为 1.0%,氯化钙浓度为 4.0%,加入疫苗体积为 1 mL 的条件下制备微囊疫苗,考察各个浓度对微囊疫苗包封率的影响。

2.3.2 不同壳聚糖浓度对微囊包封率的影响

壳聚糖浓度分别设为 0.25%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%,在海藻酸钠浓度为 1.5%,氯化钙浓度为 4.0%,加入疫苗体积为 1 mL 的条件下制备微囊疫苗,考察各个浓度对微囊疫苗包封率的影响。

2.3.3 不同氯化钙浓度对微囊包封率的影响

氯化钙浓度分别设为 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%,在海藻酸钠浓度为 1.5%,壳聚糖浓度为 1.0%,加入疫苗体积为 1 mL 的条件下制备微囊疫苗,考察各个浓度对微囊疫苗包封率的影响。

2.3.4 不同疫苗加入量对微囊包封率的影响

加入疫苗体积分别为 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL,在海藻酸钠浓度为 1.5%,氯化钙浓度为 4.0%,壳聚糖浓度为 1.0% 的条件下制备微囊疫苗,考察各个浓度对微囊疫苗包封率的影响。

2.4 正交试验设计

以单因素实验为基础,选取海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度、疫苗体积 4 个因素,根据 L₉(3⁴) 正交试验设计,进行 4 因素 3 水平试验,以包封率为评价指标,探索 GCRV 细胞疫苗微囊的最佳制备条件。正交试验因素水平表见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Tab.1 Factors and levels in orthogonal experiments

水平	海藻酸钠浓度	氯化钙浓度	壳聚糖浓度	疫苗体积
	/%	/%	/%	/mL
	A	B	C	D
1	0.5	2	0.5	1
2	1.5	3	1.0	2
3	2.5	4	1.5	4

2.5 微囊粒径测量

将待用疫苗用考马斯亮蓝 G-250 染色后制备微囊。用玻璃棒蘸取少量微囊,涂于载玻片上,用 50% 甘油分散后在光学显微镜下随机选取 30 个微囊颗粒,用显微镜测微尺测量微囊粒径大小。

2.6 微囊疫苗包封率、载蛋白量测定

取 6 支 15 mL 离心管并依次编号,各管依次加入不同浓度的牛血清蛋白溶液、考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂,摇匀,放置 2 min,然后在 595 nm 波长下测定并记录 A_{595} 。以各管对应的标准蛋白含量(μg)为横坐标, A_{595} 为纵坐标,绘制标准曲线。所得曲线回归方程为 $y = 6.08x + 0.0114$, $R^2 = 0.9998$ 。

取 100 mg 冻干微囊于 50 mL 离心管中,加入 0.06 mol/L 的柠檬酸三钠溶液 10 mL,室温静置 5~10 min,冰浴,超声破碎,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液(若上清液中有悬浮物,过滤去除)1 mL,采用考马斯亮蓝法测定上清液中的总蛋白含量。根据公式计算微囊的包封率(B)和载蛋白量(Z):

$$B = W/J \times 100\% \quad (1)$$

$$Z = W/M \quad (2)$$

式中: W 为微囊内的蛋白含量; J 为加入的总蛋白量; M 为微囊总质量。

2.7 微囊疫苗的体外释放实验

参考张守庆等^[5]方法,称取 100 mg 干燥的载蛋白微囊,分别加入 10 mL pH 7.4 的 PBS 溶液、生理盐水溶液中,置于 37 °C,转速 100 r/min 的恒温振荡器中。分别于 1 h、3 h、7 h、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 测定释放液中的蛋白含量,制作释放曲线。

3 结果与分析

3.1 海藻酸钠浓度对微囊包封率的影响

不同海藻酸钠浓度对微囊包封率的影响见图 1。由图可知,在其它制备条件不变的情况下,当海藻酸钠浓度增高时,微囊包封率先是逐渐增高然后逐渐下降;当海藻酸钠浓度为 1.5% 时,微囊包封率最高。分析其原因可能为:当海藻酸钠浓度较低时,其不能与氯化钙、壳聚糖充分反应,导致其所形成的微囊膜较薄,易破损,微囊包封率较低;当海藻酸钠浓度较高时,海藻酸钠溶液的粘度增加,不利于其与疫苗液的充分混合;同时,所形成的微囊膜较厚,不易破碎,微囊包封率较低。因此,最适海藻酸钠的浓度在 1.5% 左右。

3.2 壳聚糖浓度对微囊包封率的影响

不同壳聚糖浓度对微囊包封率的影响见图 2。在其它微囊制备条件不变时,微囊包封率随

壳聚糖浓度的增加先是逐渐增高然后逐渐下降,当壳聚糖浓度为 1% 时,微囊包封率最高。由于壳聚糖浓度与微囊机械强度有关^[11],当壳聚糖浓度较低时,微囊机械强度较低,易破损,包封率较低;当壳聚糖浓度较高时,微囊机械强度较高,不易破碎,微囊包封率较低。因此,最适壳聚糖浓度在 1% 左右。

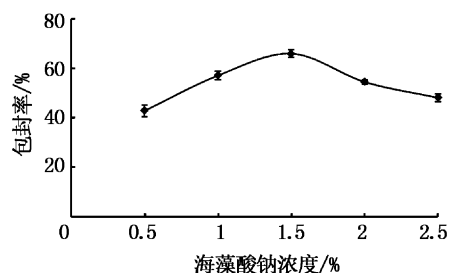


图 1 海藻酸钠浓度对微囊包封率的影响

Fig.1 Effect of concentration of sodium alginate on encapsulation rate of microcapsules

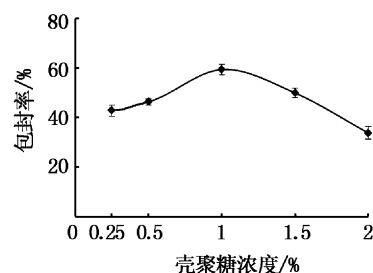


图 2 壳聚糖浓度对微囊包封率的影响

Fig.2 Effect of concentration of chitosan on encapsulation rate of microcapsules

3.3 氯化钙浓度对微囊包封率的影响

图 3 显示不同氯化钙浓度对微囊包封率的影响。在其它微囊制备条件不变时,随着氯化钙浓度增加,微囊包封率增加,当氯化钙浓度达到 4% 时,微囊包封率最高;当氯化钙浓度大于 4% 时,微囊包封率呈下降趋势。原因可能是,氯化钙和海藻酸钠是以络合物的形式参与微囊的形成,而且氯化钙和壳聚糖是以竞争的方式与海藻酸钠反应,故当氯化钙浓度较低时,海藻酸钠与壳聚糖形成的微囊壁较厚,不易破碎,微囊包封率较低;当氯化钙浓度较高时,微囊壁较薄,易破损,微囊包封率较低。因此,最适氯化钙浓度在 4% 左右。

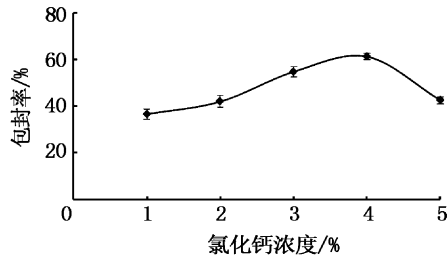


图3 氯化钙浓度对微囊包封率的影响

Fig.3 Effect of concentration of calcium chloride on encapsulation rate of microcapsules

3.4 疫苗加入量对微囊包封率的影响

图4表明不同疫苗加入量对微囊包封率的影响。由图可知,当加入疫苗的体积增加时,微囊包封率逐渐降低。但是,在分析该微囊的载蛋白量时(图5),随着加入疫苗的体积增加,微囊载蛋白量基本保持不变(平均载蛋白量8.1 mg/g, RSD=0.27%)。因此,在确保微囊疫苗最大包封率的条件下,制备过程中疫苗加入量宜保持在2 mL左右,以保证微囊包封率的稳定。

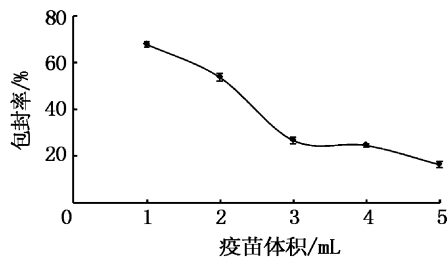


图4 疫苗加入量对微囊包封率的影响

Fig.4 Effect of dosage of vaccine on encapsulation rate of microcapsules

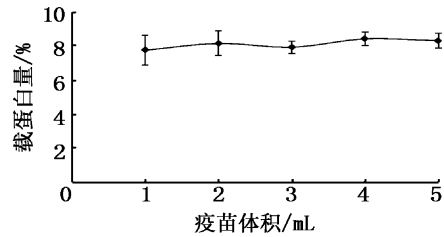


图5 疫苗加入量对微囊载蛋白量的影响

Fig.5 Effect of dosage of vaccine on loading dose of microcapsules

3.5 正交试验结果

根据单因素实验结果,取海藻酸钠浓度、壳聚糖浓度、氯化钙浓度和疫苗加入量为试验因素,选取 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以微囊包封率为试验指标确定GCRV微囊疫苗制备的最佳工艺。正交试验结果见表2。

由表2可知,各因素对微囊包封率的影响程度由大到小依次为:海藻酸钠浓度(A) > 疫苗加入量(D) > 壳聚糖浓度(C) > 氯化钙浓度(B),确定最佳制备方案为: $A_2B_3C_2D_2$,即海藻酸钠浓度为1.5%,氯化钙浓度为4%,壳聚糖浓度为1.0%,疫苗加入量为2 mL。该结果与单因素实验结果一致。

3.6 微囊疫苗的粒径、包封率、载蛋白量

根据正交试验所得最佳制备方案,重新制备3批微囊疫苗,测得微囊粒径为 $(7.02 \pm 3.95) \mu\text{m}$,光镜下可见淡蓝或深蓝色微囊,呈圆形或类圆形。该微囊疫苗平均包封率为60.53% (RSD=1.31%),平均载蛋白量为8.12 mg/g (RSD=0.33%)。

表2 正交试验结果

Tab.2 Results of orthogonal experiments

序号	海藻酸钠浓度/% A	氯化钙浓度/% B	壳聚糖浓度/% C	疫苗体积/mL D	包封率/%
1	1	1	1	1	19.76
2	1	2	2	2	43.28
3	1	3	3	3	36.93
4	2	1	2	3	50.67
5	2	2	3	1	47.21
6	2	3	1	2	56.39
7	3	1	3	2	42.68
8	3	2	1	3	22.16
9	3	3	2	1	36.32
K_1	99.97	113.11	98.31	103.29	
K_2	154.27	112.65	130.27	142.35	
K_3	101.16	129.64	126.82	109.76	
k_1	33.32	37.70	32.77	34.43	T=355.4
k_2	51.42	37.55	43.42	47.45	
k_3	33.72	43.21	42.27	36.59	
R	18.10	5.66	10.65	13.02	

注:K表示单一因素在单一水平上的结果总和;k表示单一水平上总和的均值。

3.7 体外释放实验结果

微囊疫苗在 pH 7.4 的 PBS 溶液、0.75% 的生理盐水溶液中的释放曲线见图 6、7。由图可知,微囊疫苗在 3 h 内的累积释放率均在 30% 左右,并在 14 d 内基本释放完全,表明该微囊疫苗在 pH 7.4 的 PBS 溶液、0.75% 的生理盐水溶液中具有较好的释放性能。然而,当将该微囊置于 pH 2.3 的盐酸溶液中,在第 3 小时,微囊疫苗的累积释放率仅为 15.57% (图 8),表明该微囊疫苗具有一定的耐酸性。

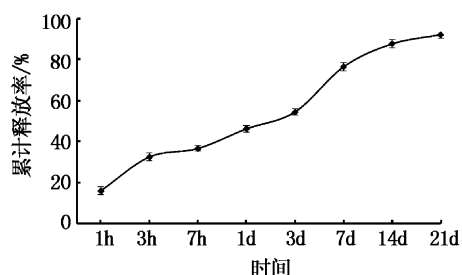


图 6 微囊疫苗在 PBS 溶液 (pH 7.4) 中的释放曲线

Fig. 6 Release curve of microencapsulated vaccine in PBS solution (pH 7.4)

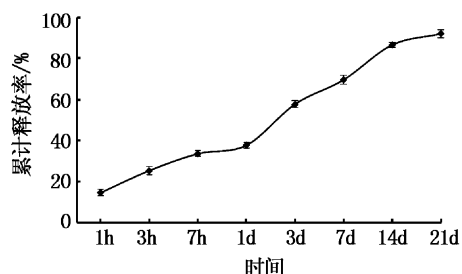


图 7 微囊疫苗在生理盐水溶液 (0.75%) 中的释放曲线

Fig. 7 Release curve of microencapsulated vaccine in physiological saline solution (0.75%)

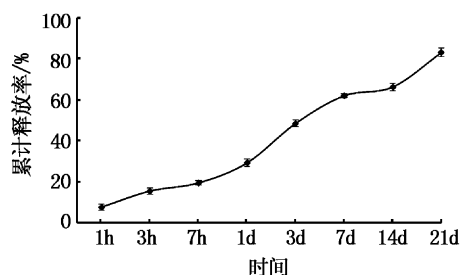


图 8 微囊疫苗在盐酸溶液 (pH 2.3) 中的释放曲线

Fig. 8 Release curve of microencapsulated vaccine in hydrochloric acid solution (pH 2.3)

4 讨论

海藻酸钠和壳聚糖均为天然多糖,具有良好的生物相容性、生物降解性和生物粘附性,且无毒性^[12-13]。此外,壳聚糖还具有抗菌、消炎及免疫调节等作用^[14]。海藻酸钠和壳聚糖分子链上分别存在大量的羧基和伯氨基,因此,二者可以通过正、负电荷吸引形成聚电解质膜。当海藻酸钠与氯化钙络合成凝胶珠后,海藻酸钠分子上未参与络合的羧基可与壳聚糖分子上的伯氨基反应,形成聚电解质膜,即海藻酸钠-壳聚糖微囊。该微囊制备过程温和,制备过程中芯材的生物活性较少损失^[15]。据国内外报道,目前,该微囊多应用于药物控释载体、细胞培养微反应器、生物医学工程等领域^[16-18]。

吴华伟^[19]以灭活的小反刍兽疫 (PPRV) 抗原为微囊芯材,制备 PPRV 缓释微囊疫苗,结果所得微囊平均包封率为 75.1%;微囊体外释放实验表明,微囊疫苗在 1 h 内累积释放率在 30% 左右,在 12 d 时释放率达到 90% 以上。唐文等^[20]以壳聚糖-海藻酸钠为囊材,制备猪脾脏转移因子壳聚糖-海藻酸钠微囊,结果显示,微囊平均包封率为 60.8%,平均载药量为 11.60 mg/g;微囊体外释放实验表明,24 h 内微囊在磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中累计释药 89.4%,在稀盐酸 (pH 1.2) 中 24 h 内累计释药 63.9%。RODRIGUES 等^[21]鱼类嗜水气单胞菌海藻酸钠微胶囊口服疫苗的制备研究显示,嗜水气单胞菌的包裹效率接近 100%。李义等^[22]以嗜水气单胞菌灭活疫苗为芯材、海藻酸钠为壁材,制备嗜水气单胞菌微胶囊口服疫苗,所得微囊疫苗包封率为 73.66%。

与吴华伟等微囊制备工艺不同,本研究所得微囊包封率相对较低。但是,微囊体外释放实验结果与本次试验所得结果基本一致。分析其原因可能与吴华伟等添加的乳化剂、植物油等有机物,以及包封率计算方法有关。因此,有必要开展 GCRV 细胞毒疫苗微囊的不同制备工艺研究,在确保疫苗抗原活性的条件下,提高微囊疫苗包封率。

本次研究采用草鱼呼肠孤病毒 (GCRV104) 细胞疫苗为芯材,以海藻酸钠、壳聚糖为壁材,研究微囊疫苗的制备工艺。最终确定最佳制备工艺为:海藻酸钠浓度 1.5%,壳聚糖浓度 1%,氯化

钙浓度 4%,加入疫苗体积 2 mL。该制备工艺条件下,GCRV 微囊疫苗平均粒径为 (7.02 ± 3.95) μm ,平均包封率为 60.53%,平均载蛋白量为 8.12 mg/g,在 pH 7.4 的 PBS 溶液、生理盐水溶液中具有较好的体外释放性能,并具有一定耐酸性,但微囊的体内缓释效果还有待进一步验证。本研究的制备工艺成本较低、操作简单,所得微囊粒径较小,体外释放性能良好,为微囊疫苗的大规模制备以及免疫效果研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 杨先乐,杜森英,曾令兵,等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告[J]. 淡水渔业,1986(3): 1-5.
- [2] JOOSTEN P H M, TIEMERSMA E, THREELS A, et al. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles [J]. Fish and Shellfish Immunology, 1997, 7(7): 471-485.
- [3] 余俊红,纪伟尚,徐怀恕. 鲈鱼口服生物胶囊疫苗的研究[J]. 高技术通讯,2001(3): 15-18.
- [4] ROMALDE J L, ASTERIA L A, RAVELO C, et al. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis [J]. Aquaculture, 2004, 236: 119-129.
- [5] 张守庆,王宝杰,姜珊,等. 重组抗菌肽海藻酸钠微囊制备与体外释放特征研究[J]. 海洋科学,2012, 36(4): 1-6.
- [6] 朱敏莉. 海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠(ACA)液芯微胶囊制备工艺优化及性能研究[D]. 西安:西北大学,2010.
- [7] 李朝霞,朱建良. 制备海藻酸钠-壳聚糖生物微胶囊的技术研究[J]. 盐城工学院学报:自然科学版,2005, 18(2): 58-62.
- [8] 刘博,张宏亮,薛伟明,等. 载脂肪酶壳聚糖/海藻酸钙微胶囊的制备[J]. 化工进展,2010, 29(8): 1541-1546.
- [9] 何东保,石毅,梁红波,等. 壳聚糖-海藻酸钠协同相互作用及其凝胶化的研究[J]. 武汉大学学报,2002, 48(2): 193-196.
- [10] 赵亚南,张卫明,钱骅,等. 海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠微胶囊二步法固定化 β -葡萄糖苷酶的制备[J]. 食品工业科技,2012, 33(6): 253-257.
- [11] 张志辰,王英,董明盛,等. 壳聚糖-海藻酸钠液芯微胶囊机械强度优化研究[J]. 江苏农业科学,2010(1): 268-269,302.
- [12] 徐连敏,陈改清. 壳聚糖纳米粒的研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2002, 29(6): 329-332.
- [13] 付颖丽,雄鹰,于炜婷,等. 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊生物相容性的研究[J]. 自然科学进展,2002, 2(8): 845-847.
- [14] ROIER S, COVILL N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(2): 202-209.
- [15] 王勇,解玉冰,马小军. 壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展[J]. 生物工程进展,1999, 19(2): 13-16.
- [16] GOOSEN M F A, KING G A, MCKNIGHT C A, et al. Animal cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular weight cut-off [J]. Journal of Membrane Science, 1989, 41: 323-343.
- [17] HARI P R, THOMAS C, CHANDRA P S. Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin [J]. Journal of Applied Polymer Science, 1996, 59: 1795-1801.
- [18] 单晓枫,钱爱东,高云航,等. 微囊技术在水产养殖中的应用[J]. 中国饲料,2005(12): 28-30.
- [19] 吴华伟. 小反刍兽疫缓释微囊疫苗制备技术研究[D]. 北京:中国兽医药品监察所,2010.
- [20] 唐文,周凤,姜彪,等. 猪脾脏转移因子壳聚糖-海藻酸钠微囊的制备及其性能[J]. 过程工程学报,2011, 11(4): 660-665.
- [21] RODRIGUES A P, HIRSCH D, FIGUEIREDO H C P, et al. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 638-643.
- [22] 李义,刘永贵,俞泉宇,等. 中华绒螯蟹嗜水气单胞菌微胶囊口服疫苗制备工艺及特性研究[J]. 淡水渔业,2011, 41(3): 77-82.

Preparation and *in vitro* release of microencapsulated killed vaccine against grass carp hemorrhage

LI Rui-wei¹, ZENG Ling-bing^{1,2}, ZHANG Hui², XIAO Yi², ZHOU Yong², FAN Yu-ding², LIU Qiu-feng¹, SUN Jian-bin³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yangtze River Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, Hubei, China; 3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract: A complex co-acervation method was applied to microencapsulate killed vaccine against grass carp hemorrhage by using sodium alginate and chitosan as the wall materials. The single factor test and the orthogonal experiments were conducted to optimize the conditions of preparing the microcapsules. The optimal conditions were as follows: 1.5% sodium alginate, 1% chitosan, 4% calcium chloride and 2mL inactivated vaccine. The influence of factors that affect encapsulation efficiency was sodium alginate concentration > vaccine dosage > chitosan concentration > calcium chloride concentration. The microcapsules have an average diameter of $(7.02 \pm 3.95) \mu\text{m}$, the average encapsulation rate is 60.53% and the average drug-loading rate is 8.12 mg/g. The microcapsules have good release properties in PBS (pH 7.4) and saline solution.

Key words: grass carp hemorrhage; killed vaccine; sodium alginate; chitosan; microcapsule preparation