

文章编号: 1674-5566(2015)03-0334-07

海豚链球菌重组 C5a 肽酶对斑点叉尾鲟的免疫保护性研究

郑宗林^{1,2}, 汪开毓^{1,3}, 肖孟玮^{1,3}, 王均^{1,3}, 李岚敏^{1,3}, 贺扬^{1,3}, 陈德芳^{1,3}, 黄凌远^{1,3}

(1. 四川农业大学 鱼病研究中心, 四川 雅安 625014; 2. 西南大学荣昌校区 水产系, 重庆 402460; 3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

摘要: 采用饱和硫酸铵法对斑点叉尾鲟 IgM 进行粗提, 用亲疏树脂对 IgM 进行纯化, 将纯化的 IgM 免疫家兔, 并用 ELISA 检测兔抗斑点叉尾鲟 IgM 抗体效价; 制备重组 C5a 肽酶 (pSCPI), 分别用 1、2 和 3 $\mu\text{g/g}$ 的抗原免疫斑点叉尾鲟, 以 PBS 作为对照; 测定了第 21、28、35、42 和 49 天斑点叉尾鲟产生的特异性抗体的水平, 并于免疫后第 4 周用海豚链球菌 DGX07 株进行攻毒。结果显示: 通过亲疏树脂亲和层析后得到了较纯的 IgM 重链和轻链, 分别约 70 ku 和 27 ku, 浓度达到 6.4 mg/mL, 免疫家兔后的兔抗斑点叉尾鲟 IgM 抗体效价达 1:51200; 重组蛋白 pSCPI 免疫斑点叉尾鲟后第 3 周抗体水平开始增加, 第 4 周达到峰值, 第 5 周后开始下降, 且 3 $\mu\text{g/g}$ 浓度组第 4 周抗体水平最高, 但与 2 $\mu\text{g/g}$ 浓度组第 4 周抗体水平差异不显著; 攻毒实验显示, 3 个组 14 d 平均累计死亡率分别为 47.5%、45% 和 47.5%, 平均相对保护率分别为 40.63%、43.75% 和 40.63%, 且死亡鱼体内分离到唯一海豚链球菌。以上结果表明重组 pSCPI 蛋白具有较好的免疫保护作用, 能够作为海豚链球菌亚单位疫苗的候选之一。

研究亮点: 海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 为 β -溶血型链球菌。该菌是一种重要的鱼类致病菌。海豚链球菌的致病性是由多个毒力因子共同发挥作用的结果, C5a 肽酶是 GAS 和 GBS 上公认的重要毒力因子, 能够结合并分解补体 C5a, 抑制多核巨细胞靠近菌体, 延缓免疫系统对链球菌的杀灭。本研究依据前期的研究结果, 制备亚单位疫苗, 以斑点叉尾鲟作为实验动物进行免疫实验, 以期对斑点叉尾鲟海豚链球菌病的疫苗研制奠定基础。

关键词: 海豚链球菌; 斑点叉尾鲟; IgM; 免疫保护率
中图分类号: S 917
文献标志码: A

斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*) 亦称沟鲶 (channel catfish), 属于鲶形目 (Siluriformes)、鲶科 (Ictaluridae) 鱼类, 是美国主要的淡水养殖品种之一, 1987 年我国人工繁殖成功后, 目前已经在全国多个省份进行推广养殖。斑点叉尾鲟养殖中, 疾病是影响其健康养殖的重要因素, 每年由细菌性病害造成的损失超过年度养殖损失的 10%^[1]。2006—2007 年, 广西网箱养殖的斑点叉尾鲟连续暴发疾病, 死亡率高达 90%, 给当地的斑点叉尾鲟养殖带来严重的经济损失^[2-3]。经本实验室鉴定, 导致该养殖地区斑点叉尾鲟大规模

死亡的病原为海豚链球菌, 菌株命名为 DGX07^[4]。

近年来关于海豚链球菌病的防治报道逐渐增多, 其中免疫防治主要采用传统的全菌灭活疫苗, 集中使用于虹鳟^[5]、罗非鱼^[6]和大菱鲆^[7]等的海豚链球菌病防治中, 并取得了较好的效果, 而全菌灭活苗往往特异性比较强, 对于新型血清型的病原不具有保护作用, 使用范围受到较大限制。海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 为 β -溶血型链球菌, 但不属于兰氏分型中的任何类型。该菌是一种重要的鱼类致病菌, 能够感染虹鳟、罗非

收稿日期: 2014-12-02 修回日期: 2015-03-21

基金项目: 教育部创新团队项目 (IRT0848)

作者简介: 郑宗林 (1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为水产动物营养学与疾病控制。E-mail: zhengzonglin@126.com

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang@sicau.edu.cn。

鱼、鲑鱼、澳洲肺鱼、黄狮鱼、比目鱼、斑点叉尾鲷等多种鱼类,每年在全球水产行业中带来的经济损失近 1 亿美元。随着分子生物学的发展,关于海豚链球菌基因工程疫苗的研究也陆续展开,但是研究还处于起步阶段,距离生产应用可能还具较长时间。本文以海豚链球菌 C5a 肽酶作为研究抗原,以克隆和表达的主要功能活性区域免疫健康斑点叉尾鲷,通过抗体水平测定和免疫保护率评价该亚单位疫苗的免疫效果,以期对斑点叉尾鲷海豚链球菌病的免疫防治提供候选疫苗。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株和实验动物

斑点叉尾鲷源海豚链球菌分离株 DGX07 由四川农业大学鱼病研究中心分离鉴定并保存。斑点叉尾鲷(60 g ± 5 g)购于四川蒲江某养殖场,实验前在四川农业大学水产系水泥养殖池(1.5 m × 1.0 m × 1.5 m)中暂养 2 周,并进行细菌性和寄生虫疾病检测。

1.2 抗原制备

将重组蛋白 pSCPI 复性后用核酸蛋白仪测定蛋白浓度,并用 PBS 将 pSCPI 稀释成 1.2 mg/mL。

1.3 兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清制备

1.3.1 斑点叉尾鲷 IgM 的提取和纯化

健康斑点叉尾鲷用 MS-222 麻醉至死,尾静脉采血获得血液,血液在室温静置 2 h,然后转入 4 °C 冰箱过夜,4 000 r/min,4 °C 离心 30 min 后收

集上清,重复一次,获得血清放 -80 °C 保存备用。

硫酸铵粗提^[8]:吸取 10 mL 血清于小烧杯中缓慢加入 pH 7.0 的饱和硫酸铵溶液,使其终浓度达 33%,4 °C 过夜,10 000 r/min,20 min 离心后将上清加入终浓度为 33% 的饱和硫酸铵,4 °C 过夜,离心取沉淀。沉淀溶于相同体积 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 中,然后用相同的 PBS 透析 48 h,期间更换透析液,聚乙二醇(PEG-20000)浓缩,获抗体粗提物,-80 °C 保存。

亲疏树脂(Thiophilic Resin)亲和层析提纯斑点叉尾鲷 IgM:样品用 0.45 μL 滤器过滤,防止堵塞填料;用 4 倍柱床体积的平衡 buffer 平衡,弃掉流出的液体;上样 3 ~ 9 mL 的样品至柱子,让其流下,然后收集流下的液体,监控未结合的蛋白;用 5 ~ 10 倍柱床体积的平衡 buffer 洗涤。在 280 nm 测定流出的液体,测定所有未结合的蛋白已经从填料上洗脱完;用 12 倍柱床体积的洗脱 buffer 洗涤结合的免疫球蛋白,收集样品,并在 280 nm 下进行检测;收集样品经 SDS-PAGE 鉴定后用 PEG-20000 浓缩,1 mL 分管收集,用核酸蛋白仪测定浓度后放 -70 °C 冻存备用。

1.3.2 兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清制备

雄性新西兰大白兔暂养 1 周后用斑点叉尾鲷 IgM 进行免疫,免疫程序如表 1 所示。第 3 次免疫后耳缘静脉采血,收集血清通过琼扩检测抗体效价,效价达到 1:32 时用抗原进行加强免疫,免疫后 3 d 通过颈动脉放血,收集血清。将所制备的血清过滤除菌后分装,-80 °C 保存。

表 1 家兔接种免疫程序
Tab.1 Immunization procedure of rabbit

免疫次数 immune times	注射时间/d injection time	注射剂量/mL injection dose	注射浓度/(mg/只) injection concentration	抗原 antigen	注射部位 injection position
1	1	2.0	1	抗原 + 弗氏完全佐剂	背部皮下多点注射
2	7	2.0	1	抗原 + 弗氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
3	14	2.0	1	抗原 + 弗氏不完全佐剂	背部皮下多点注射
4	21	2.0	0.5	抗原 + PBS	耳缘静脉注射

1.3.3 兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清的纯化、效价测定

纯化兔抗斑点叉尾鲷 IgM。按照丁炜东等^[8]的方法,采用间接 ELISA 法检测抗体效价。具体步骤:用包被液(pH 9.6,0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)将斑点叉尾鲷 IgM 稀释至 20 μg/mL,每孔加入 100 μL,4 °C 冰箱过夜包被。然后用 5% 的牛

血清白蛋白于 37 °C 封闭 1 h,封闭结束后用含 0.05% Tween 20 的 0.01 mol/mL PBST(pH 7.4)洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min。各孔依次加入 2 倍梯度稀释的兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清 100 μL,阴性对照孔加 PBS,37 °C 温浴 1 h,同上洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 羊抗兔 IgG-HRP,37 °C 温浴 1 h。每孔加入 100 μL 新鲜配制的 TMB-H₂O₂ 底物溶

液,于避光处反应 30 min,然后每孔加入 100 mL 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,于 450 nm 下检测每孔 OD 值。

1.4 免疫

免疫前随机选取 5 尾鱼进行尾静脉采血,通过凝集实验测定实验鱼血清能否与海豚链球菌 DGX07 株进行反应。同时,分别接种 5 尾鱼的肝脏、肾脏和脾脏组织于 BHI 平板,观察有无细菌感染。

将 240 尾健康斑点叉尾鲷(60 g ± 5 g)随机分成 8 组,每组 30 尾。其中 6 个组为免疫组,2 个组为对照组。免疫剂量分别为 1 μg/g、2 μg/g 和 3 μg/g,每组设置 1 个平行,每尾鱼注射 0.2 mL 配比好的抗原,对照组注射等量的 PBS。2 周后用等量的抗原加强免疫 1 次。实验在 1.5 m × 1.0 m × 1.5 m 水泥池中进行,养殖水体为曝气自来水,实验水温 25 °C ± 3 °C,实验期间每天换水 1 次,每次 1/3。

1.5 采血

分别于实验第 21、28、35、42 和 49 天进行尾静脉采血,采血前每个组随机选取 5 尾鱼用 MS-222 进行麻醉。采集的血液室温静置 2 h 后转入 4 °C 冰箱,放置过夜,然后 4 000 r/min 离心 30 min,收集血清,放 -80 °C 备用。

1.6 间接 ELISA 检测抗体效价

按照张崇文的方法,用间接 ELISA 检测免疫鱼产生的特异性抗体效价^[9],抗体效价根据 P/N 值来确定:P/N = (待检血清 OD₄₅₀ - 空白对照的 OD₄₅₀) / (阴性血清的 OD₄₅₀ - 空白对照的 OD₄₅₀)。当 P/N 大于 2.1 时抗血清的最高稀释倍数为其最终抗体效价。数据以“平均值 ± 标准误差”表示,并用单因素方差分析进行显著性检验。

1.7 攻毒

将海豚链球菌 DGX07 株在健康斑点叉尾鲷体内复壮 3 次,然后接种于 BHI 肉汤,于 28 °C 过夜培养。以 10 倍 100% 的致死剂量(6 × 10⁸ cfu/mL)为攻毒浓度^[10],每尾腹腔注射 0.2 mL,每组选取 20 尾鱼。攻毒实验鱼在 90 cm × 60 cm × 60 cm 的水族箱中暂养 1 周,水温用加热棒控制在 28 °C ± 1 °C,养殖用水为曝气自来水,每天换水 1/3。攻毒后连续观察 14 d,观察死亡情况,记录

死亡数量,并分别接种肝脏、肾脏和脾脏组织于 BHI 平板鉴定攻毒细菌。以相对保护率表示免疫效果:相对保护率(R_{PS})计算公式为

$$R_{PS}(\%) = [1 - (D_{IM} / D_{CON})] \times 100\% \quad (1)$$

式中: R_{PS} 为相对保护率; D_{IM} 为免疫组死亡率; D_{CON} 为对照组死亡率。

2 结果

2.1 斑点叉尾鲷 IgM 血清提取和纯化

将健康斑点叉尾鲷血清采用饱和硫酸铵法进行粗提,经 SDS-PAGE 检测后斑点叉尾鲷 IgM 的重链约 70 ku 左右,轻链约 27 ku 左右。采用亲疏树脂(Thiophilic Resin)亲和层析进行纯化,得到了较纯的斑点叉尾鲷重链和轻链(图 1)。经核酸蛋白仪检测纯化的斑点叉尾鲷 IgM 含量达 6.4 mg/mL。

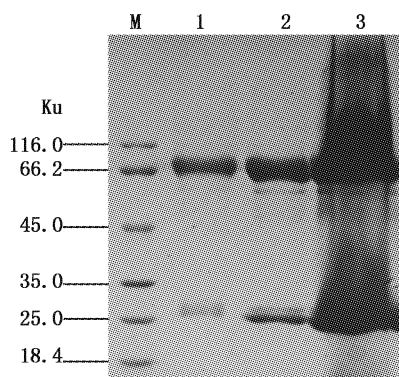


图 1 斑点叉尾鲷 IgM SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Analysis of channel catfish serum IgM by SDS-PAGE

M. 蛋白质 marker; 1. 亲疏树脂提取 IgM; 2. 饱和硫酸铵提取 IgM; 3. 斑点叉尾鲷血清。

M. protein marker; 1. IgM was purified by Thiophilic Resin; 2. IgM was purified by Saturated ammonium sulfate; 3. Channel catfish serum.

2.2 兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清制备

将纯化的斑点叉尾鲷 IgM 与弗氏佐剂混合免疫家兔,3 免后通过琼脂糖扩散实验检测兔血清抗体效价为 1:32,4 免后收集血清并进行纯化。采用间接 ELISA 的方法测定了兔抗斑点叉尾鲷 IgM 血清的抗体效价,结果表明,本实验制备的兔抗斑点叉尾鲷抗体效价达 1:51200(表 2),可以满足后续免疫检测的要求。

表 2 兔抗斑点叉尾鲷 IgM 抗体效价
Tab.2 Titer of rabbit polyclonal sera anti-IgM of channel catfish.

血清稀释倍数 serum dilution	OD ₄₅₀	+/-
400	2.161	+
800	2.123	+
1 600	2.093	+
3 200	2.117	+
6 400	2.067	+
12 800	1.861	+
25 600	1.734	+
51 200	1.576	+
102 400	1.106	-
204 800	0.854	-
阴性血清	0.634	
空白对照	0.048	

注: +/- 分别表示抗体效价的强和弱。

Note: +/- means the strong or weak of the antibody titer.

2.3 斑点叉尾鲷抗 pSCPI 抗体效价检测

采用间接 ELISA 的方法测定斑点叉尾鲷抗 pSCPI 抗体效价,结果表明,免疫后第 3 周开始实验组各组均出现特异性抗体,免疫后第 4 周出现最高抗体水平,第 5 周后开始下降,且各组抗体水平均与对照组差异极显著($P < 0.01$)。第 3 周 3 组间差异显著($P < 0.05$),第 4 周 2 $\mu\text{g/g}$ 剂量组与 3 $\mu\text{g/g}$ 剂量组差异不显著($P > 0.05$),第 5 周和第 6 周 1 $\mu\text{g/g}$ 剂量组与 2 $\mu\text{g/g}$ 剂量组差异不显著($P > 0.05$),第 7 周 3 $\mu\text{g/g}$ 剂量组与 1 $\mu\text{g/g}$ 剂量组和 2 $\mu\text{g/g}$ 剂量组差异不显著($P > 0.05$),见图 2。

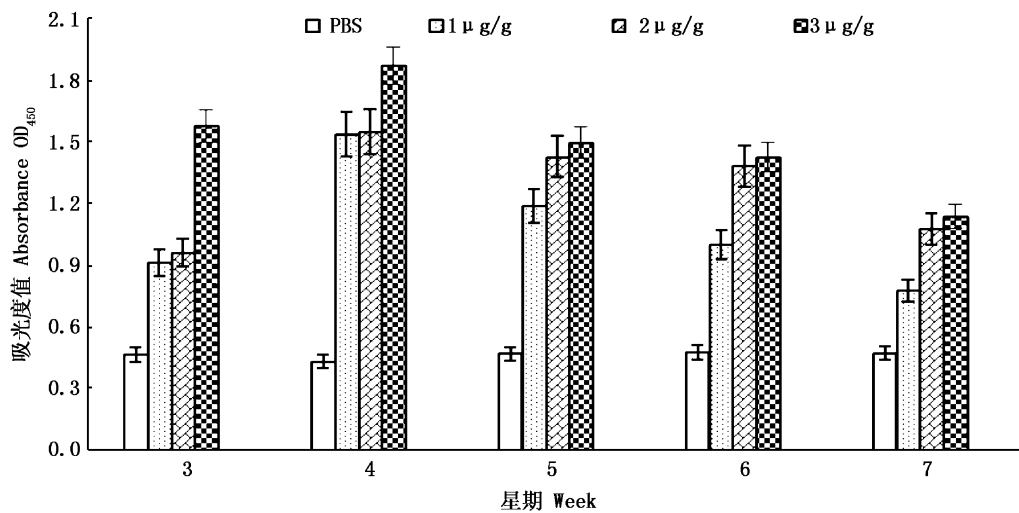


图 2 间接 ELISA 检测斑点叉尾鲷特异性抗体水平

Fig.2 Specific antibody titers of channel catfish by ELISA

2.4 免疫保护率

不同剂量抗原免疫 4 周后用海豚链球菌强毒株 DGX07 进行攻毒,攻毒后第 3 天开始出现死亡,14 d 各组平均累计死亡率分别为:1 $\mu\text{g/g}$ 剂量组死亡率 47.5%,2 $\mu\text{g/g}$ 剂量组死亡率 45%,3 $\mu\text{g/g}$ 剂量组死亡率 47.5%。平均相对保护率分别为 40.63%、43.75% 和 40.63% (表 3)。死亡鱼出现体表和内脏器官出血症状,接种死亡鱼肝脏、肾脏和脾脏组织于 BHI 平板,长出单一形态细菌,经鉴定为海豚链球菌。根据以上结果表明,重组蛋白 pSCPI 可以作为防控斑点叉尾鲷海豚链球菌病的疫苗候选。

3 讨论

3.1 斑点叉尾鲷 IgM 的分离和纯化

分步盐析法是蛋白质技术中最为经典的分离浓缩方法^[11],其原理为:高浓度的盐离子在蛋白质溶液中可与蛋白质竞争水分子,从而破坏蛋白质表面的水化膜,降低其溶解度,使之从溶液中沉淀出来。各种蛋白质的溶解度不同,因而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀不同的蛋白质。硫酸铵因其溶解度大,温度系数小和不易使蛋白质变性,广泛应用于免疫球蛋白的粗提。本实验依次采用 50% 和 33% 的饱和硫酸铵对斑点叉尾鲷的 IgM 进行粗提,经 SDS-PAGE 分析发现仍然含有较多的杂带,所以还需要对粗提的 IgM 进行

进一步纯化。目前纯化免疫球蛋白的方法除了常规的饱和硫酸铵(SAS)盐析外,还有柱层析、离子交换层析、疏水层析及亲和层析等方法,其中亲和层析是依靠生物高分子所特有的生物活性进行分离提纯的特异性吸附层析,具有高效、快速、纯化效果好的优点,是提取 IgM 的最佳方法^[12]。鱼类血清 IgM 的纯化常采用 Protein A 进行亲和层析。国内已有学者应用 rProtein A Sepharose 亲和层析法成功分离纯化了黄鳍棘鲷、大黄鱼、紫红笛鲷、青石斑鱼、尖吻鲈和牙鲆的血清 IgM^[13-16]。黄婷等采用 rProtein A Sepharose 亲和层析一步法纯化斑点叉尾鲷血清免疫球蛋白(IgM),结果表明,rProtein A Sepharose 亲和层析法可以分离获得高纯度的斑点叉尾鲷血清 IgM,但通过 SDS-PAGE 电泳检测发现只分离到

了斑点叉尾鲷血清 IgM 重链,分子量约 101.0 ku,而未见轻链,据分析可能是不同的沉淀方法导致 IgM 发生变性或重链和轻链未裂解导致^[17]。亲疏树脂(Thiophilic Resin)亲和层析是 PORATH 等 1984 年建立的,是一种特殊的盐依赖纯化技术,能够明显地结合免疫球蛋白和 α -巨球蛋白,其作用原理为:一些免疫球蛋白能够在高盐的环境下结合到固相的载体上,包括接近于硫醚基的磺基,而在低盐的环境中能够将结合蛋白洗脱,广泛应用于 IgG、IgY 和 IgM 的纯化。本实验采用亲疏树脂法对饱和硫酸铵粗提的 IgM 进一步进行纯化,经 SDS-PAGE 分析,得到了较纯的斑点叉尾鲷 IgM 重链和轻链,分子量分别约为 70 ku 和 27 ku。因此,该方法能够应用于斑点叉尾鲷血清 IgM 的分离纯化,且具有较好的纯化效果。

表 3 免疫后实验动物保护率

Tab. 3 The RPS of experimental animal immunized by vaccine

组别 group	免疫攻毒数/尾 number of challenge	死亡率/尾 death	平均死亡率/% average death rate	相对保护率/% RPS
1 μ g/g fish A	20	10	47.5	40.63
1 μ g/g fish B	20	9		
2 μ g/g fish A	20	10	45	43.75
2 μ g/g fish B	20	8		
3 μ g/g fish B	20	10	47.5	40.63
2 μ g/g fish B	20	8		
PBS A	20	17	80	--
PBS B	20	15		

3.2 重组蛋白 pSCPI 对斑点叉尾鲷的免疫保护效果

C5a 肽酶在 A 族链球菌和 B 族链球菌中不仅是重要的毒力因子,而且是良好的保护性抗原^[18-19]。研究显示 A 族链球菌的 C5a 肽酶(streptococcal C5a peptidase of A group, SCPA)能够通过鼻内免疫保护抵抗 M49 或 M1 型 GAS(B group streptococcal)对小鼠的感染^[20],而 B 族链球菌的 C5a 肽酶(streptococcal C5a peptidase of B group, SCPB)能够抵抗 1a、II 和 V 型 GBS 对小鼠的感染^[21]。而且,无论用 SCPA 还是用 SCPB 蛋白免疫小鼠,都可预防 GAS 或 GBS 感染导致的急性肺炎^[20, 22]。然而关于 C5a 肽酶在水产动物上的免疫效果还未见报道。本研究以斑点叉尾鲷作为免疫受试动物,以不同剂量的重组 pSCPI 蛋白作为抗原进行腹腔注射免疫,采集不同时间点的血清进行抗体效价测定,结果表明 pSCPI 免

疫的斑点叉尾鲷能产生较高的抗体效价,且在免疫后第 4 周出现最高值,第 5 周后开始下降,第 7 周仍然具有抗体效价,推测 pSCPI 蛋白对斑点叉尾鲷海豚链球菌病具有较长的保护时间。攻毒后第 3 天试验鱼陆续开始死亡,攻毒后 14 d 累计死亡率分别为 47.5% (1 μ g/g 剂量组)、45% (2 μ g/g 剂量组)、47.5% (3 μ g/g 剂量组)和 80% (PBS 组),平均相对保护率分别为 40.63%、43.75% 和 40.63%,根据保护率和抗体水平推测 2 μ g/g 为 pSCPI 免疫斑点叉尾鲷的最佳剂量。以上结果表明重组 pSCPI 蛋白具有较好的免疫保护作用,能够作为海豚链球菌亚单位疫苗的候选之一。

参考文献:

- [1] WAGNER B A, WISE D J, KHOO L H, et al. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish[J]. Journal

- of Aquatic Animal Health, 2002, 14(4): 263-272.
- [2] 汪开毓, 陈德芳, 耿毅, 等. 斑点叉尾鲷链球菌病的发生与诊治[J]. 科学养鱼, 2008, (3): 50-51.
WANG K Y, CHEN D F, GENG Y, et al. The occurrence and treatment of *Streptococcus iniae* Isolated from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Scientific Fish Farming, 2008, (3): 50-51.
- [3] 余晓丽, 陈明, 李超, 等. 斑点叉尾鲷暴发性海豚链球菌病的研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(3): 185-191.
YU X L, CHEN M, LI C, et al. Channel catfish *Ictalurus punctatus* outbreak infected by bacterium *Streptococcus iniae* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(3): 185-191.
- [4] 陈德芳. 斑点叉尾鲷海豚链球菌病原学、病理学和诊断方法研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
CHEN D F. Channel Catfish *Streptococcus iniae* disease etiology, pathology and diagnosis method [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2011.
- [5] BERCOVIER H, GHITTINO C, ELDAR A. Immunization with bacterial antigens; infections with streptococci and related organisms [J]. Developments in Biological Standardization, 1997, 90: 153-160.
- [6] 张旭丽. 罗非鱼海豚链球菌疫苗研制及胞外产物特性分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
ZHANG X L. Research of Tilapia *Streptococcus iniae* vaccine and cellular characterization extracellular products [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010.
- [7] 程爽. 一株海豚链球菌的分离鉴定及其亚单位疫苗研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010.
CHENG S. Identification and characterization of a *Streptococcus iniae* strain SF1 and its subunit vaccine[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010.
- [8] 丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明. 草鱼血清 IgM 蛋白的纯化及抗血清的制备[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 164-169.
DING W D, CAO L P, CAO Z M. Purification of serum IgM from garss carp (*Ctenopharyngodon idella*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 164-169.
- [9] 张崇文. 哈维氏弧菌外膜蛋白 (OmpK 和 GAPDH) 免疫原性研究及主要海水病原弧菌外膜蛋白交叉保护性抗原筛选[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
ZHANG C W. Immunogenicity of *Vibrio harveyi* outer membrane protein (OmpK and GAPDH) and main sea pathogen *Vibrio* cross-protective outer membrane protein antigen screening [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
- [10] CHEN D F, WANG K Y, GENG Y, et al. *Streptococcus iniae* Isolated from Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) in China[J]. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2011, 63(3): 105-115.
- [11] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
ZHAO Y F. Biochemical technology principles and applications[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1994.
- [12] 陈垚, 王石泉, 韩晓冬, 等. 鲫鱼血清和皮肤粘液 IgM 的分离纯化及部分性质的鉴定[J]. 动物学研究, 2003, 24(2): 111-115.
CHEN Y, WANG S Q, HAN X D, et al. Purification and partial characterization of Immunoglobulin M from *Carassius auratus* serum and skin mucus [J]. Zoological Research, 2003, 24(2): 111-115.
- [13] 刘振兴, 张殿昌, 苏天凤, 等. 黄鳍棘鲷血清 IgM 的纯化及兔抗血清的制备[J]. 中国水产科学, 2008, 15(1): 129-135.
LIU Z X, ZHANG D C, SU T F, et al. Purification of serum IgM in *Acanthopagrus latus* and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(1): 129-135.
- [14] 鄢庆彬, 韩一凡, 高天翔, 等. 大黄鱼血清 IgM 纯化及其兔抗血清的制备[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 475-479.
YAN Q P, HAN Y F, GAO T X, et al. Purification of serum IgM from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and preparation of rabbit sera anti-IgM [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 475-479.
- [15] 刘云, 孙峰, 姜国良. 牙鲆血清免疫球蛋白的分离纯化及部分特性分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 547-553.
LIU Y, SUN F, JIANG G L. Purification and partial characterization of serum immunoglobulins from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(4): 547-553.
- [16] 冯娟, 胡超群. 四种海水养殖鱼类血清免疫球蛋白的分离纯化及分子量测定[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 8-13.
FENG J, HU C Q. Purification and characteristics of serum immunoglobulins of four major cultured marine fishes in China [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2002, 21(4): 8-13.
- [17] 黄婷, 张彬, 陈明, 等. 罗非鱼和斑点叉尾鲷血清 IgM 的纯化及兔抗血清的制备[J]. 广西农业科学, 2010, 41(12): 1339-1342.
HUANG T, ZHANG B, CHEN M, et al. Purification of serum immunoglobulin (IgM) from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and preparation of their anti-IgM sera in rabbit [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(12): 1339-1342.
- [18] CLEARY P P, PRAHBU U, DALE J, et al. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(12): 5219-5223.
- [19] CHENG Q, CARLSON B, PILLAI S, et al. Antibody against

- surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(4): 2302–2308.
- [20] CLEARY P P, MATSUKA Y V, HUYNH T, et al. Immunization with C5a peptidase from either group A or B streptococci enhances clearance of group A streptococci from intranasally infected mice[J]. *Vaccine*, 2004, 22(31/32): 4332–4341.
- [21] SANTILLAN D A, RAI K K, SANTILLAN M K, et al. Efficacy of polymeric encapsulated C5a peptidase-based group B streptococcus vaccines in a murine model[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2011, 205(3): 249.e1–249.e8.
- [22] CHENG Q, DEBOL S, LAM H, et al. Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B streptococci from lungs of infected mice[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(11): 6409–6415.

The immunoprotectivity study of the pSCPI of *Streptococcus iniae* against channel catfish, *Ictalurus punctatus*

ZHENG Zonglin^{1,2}, WANG Kaiyu^{1,3}, XIAO Mengwei^{1,3}, WANG Jun^{1,3}, LI Lanmin^{1,3}, HE Yang^{1,3}, CHEN Defang^{1,3}, HUANG Lingyuan^{1,3}

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China; 2. Fisheries Department of Southwest University Rongchang Campus, Chongqing 402460, China; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: The saturated ammonium sulfate method was used to crude-extract the IgM of channel catfish, then purifying the IgM using sulfur resin affinity chromatography, followed by immunizing the rabbit using the purified IgM and detecting the antibody titer of the rabbit anti-IgM serum using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We prepared the recombinant protein pSCPI based on the method used in Chapter 2, vaccinating the healthy catfish with the concentration of the antigen protein 1 $\mu\text{g/g}$ fish, 2 $\mu\text{g/g}$ and 3 $\mu\text{g/g}$ fish, respectively and with PBS as a control. We detected the antibody level of the specific antibody produced by the vaccinated catfish at 21, 28, 35, 42 and 49 days post-vaccination, and challenged with the *S. iniae* DGX07 at 4 weeks post-vaccination. The results showed that: the purified IgM heavy chain and light chain by using sulfur resin affinity chromatography were about 70 ku and 27 ku, separately. And the concentration of the IgM was up to 6.4 mg/mL, the antibody titer of the rabbit anti-IgM serum was 1:51 200. Also we observed that the antibody level began to increase at 3 weeks post-vaccination and with the highest antibody level occurring at 4-week p. v., but it began to decline at 5-week p. v.. The antibody level of the antigen concentration with 3 $\mu\text{g/g}$ fish-vaccinated fish was highest at each examined time point, which had no significant difference compared with the 2 $\mu\text{g/g}$ fish-vaccinated fish. In 1 $\mu\text{g/g}$, 2 $\mu\text{g/g}$ and 3 $\mu\text{g/g}$ fish-vaccinated fish, *S. iniae* DGX07 challenge caused accumulated mortality rates of 47.5%, 45% and 47.5% respectively, which corresponded to RPS rates of 40.63%, 43.75% and 40.63% respectively with PBS as a control. For all vaccination trials, examination of moribund fish indicated that *S. iniae* was the only type of bacterial strains isolated from *S. iniae*-challenged fish, suggesting that mortalities were caused by the challenging bacteria. All these results indicated that the recombinant protein pSCPI was effective and had a better immunoprotectivity, which could be used as a candidate subunit vaccine against *S. iniae*.

Key words: *Streptococcus iniae*; *Ictalurus punctatus*; IgM; immunoprotectivity