

分类号：

密级：

U D C：

学号：405600210068

南 昌 大 学 硕 士 研 究 生

学 位 论 文

草鱼出血病口服重组干酪乳杆菌疫苗的研制和应用

Preparation and Application of Oral Recombinant *Lactobacillus casei* Vaccine Against GCRV Infection

张岩松

培养单位(院、系)：生命科学学院

指导教师姓名、职称：胡成钰 教授

申请学位的学科门类：理 学

学 科 专 业 名 称：细胞生物学

论 文 答 辩 日 期：2024 年 5 月 26 日

答辩委员会主席：_____

评阅人：_____

2024 年 5 月 26 日

摘 要

由草鱼呼肠孤病毒（Grass Carp Reovirus, GCRV）引起的草鱼出血病导致了水产养殖业的损失大量经济资源，疫苗已被广泛认为是一种有效预防疾病的手段。口服干酪乳杆菌进行免疫具有良好的安全性和高效性，口服的免疫方式体现出了其易于给药、免注射等优势，是一种非常具有潜力的免疫途径。在本研究中，以 GCRV 的外衣壳蛋白 VP5 作为免疫原，基于乳酸杆菌分泌表达载体 pVE5523，构建了重组干酪乳杆菌 LC-pVE5523-VP5。通过真空冷冻干燥技术将菌液制备成冻干菌粉，再将冻干菌粉与饲料进行混合压制、制备成颗粒饲料。在口服干酪乳杆菌菌粉饲料免疫期间，LC- pVE5523-VP5 能显著上调草鱼免疫相关基因（*IFN I*、*IgM*）的表达。随着口服免疫天数的增加，血清中 *IgM* 水平也有所上升。面对 GCRV 的感染，口服 LC- pVE5523-VP5 疫苗组的草鱼存活率为 74 %，明显高于对照组 35 %。通过荧光定量检测病毒的复制量，结果显示 LC- pVE5523-VP5 组病毒在组织中的含量明显少于未免疫组。停止口服疫苗后 15 天，依然能在草鱼肠道检测到 LC- pVE5523-VP5 菌体的存在。这些结果表明，本研究开发了一种能够有效预防 GCRV 感染的口服干酪乳杆菌疫苗 LC-pVE5523-VP5，具有易于制备，低成本，效果良好等特点。同时也为鱼用口服疫苗的相关研究提供了一定的参考价值。

关键词：草鱼；干酪乳杆菌；口服疫苗；*IFN I*；*IgM*

ABSTRACT

Grass carp hemorrhagic disease caused by Grass Carp Reovirus (GCRV) has caused serious economic losses to the aquaculture industry. Vaccine have been widely recognized as an effective mean for preventing the disease. Oral immunization with *Lactobacillus casei* is safe and highly effective. The oral immunization method reflects its advantages of easy administration and injection-free, so it is a very potential immunization approach. In this study, the recombinant *LC*-pVE5523-VP5 was constructed by using the outer capsid protein VP5 of GCRV as the immunogen and pVE5523 as secretory expression vector. The bacterial liquid was prepared into freeze-dried bacterial powder through vacuum freeze-drying technology, and then the freeze-dried bacterial powder was mixed with feed and pressed to pellet. During oral immunization with the recombinant *L. casei* powder feed, the expression of the immune-related genes (*IFN I*, *IgM* et al.) of grass carp were up-regulated significantly. With the increase of oral immunization days, grass carp serum IgM level was also increased. In the face of GCRV infection, the survival rate of grass carp fed with *LC*-pVE5523-VP5 vaccine was 74 %, which was significantly higher than the control group (35%). The amount of virus replication was also quantitatively detected by fluorescence. The results showed that the virus content in fish tissue was significantly less than that of the non-immunized group. Fifteen days after stopping the oral vaccine, the presence of *LC*-pVE5523-VP5 bacteria was still detected in the intestines of the fish. These results showed that the oral *LC*-pVE5523-VP5 can effectively prevent GCRV infection.

Key words: Grass carp; *Lactobacillus casei*; Oral vaccine; *IFN I*; *IgM*

目 录

第一章 引言.....	1
1.1 草鱼出血病.....	1
1.2 鱼用疫苗研究现状.....	1
1.3 口服疫苗与干酪乳杆菌.....	3
1.4 课题意义.....	4
第二章 实验材料与试剂	5
2.1 实验动物、细胞系、菌株、质粒	5
2.2 实验设备.....	5
2.3 实验试剂与耗材.....	6
2.4 实验的主要试剂盒.....	7
2.5 引物表.....	7
第三章 实验方法	9
3.1 实验动物、干酪乳杆菌及病毒的培养	9
3.1.1 实验动物.....	9
3.1.2 干酪乳杆菌的培养与干酪乳杆菌感受态的制备	9
3.1.3 细胞与病毒的培养.....	10
3.2 草鱼组织 RNA 的提取	10
3.3 相关表达载体的构建.....	10
3.3.1 构建 pVE5523-VP5 乳酸杆菌分泌表达载体.....	11
3.3.2 构建 pET-32a-IgM 原核表达载体.....	12
3.4 电转化 pVE5523-VP5 实验以及疫苗饲料的制备	12
3.4.1 LC-pVE5523-VP5 的制备	12
3.4.2 冻干菌粉以及疫苗饲料的制备.....	12
3.5 诱导纯化蛋白以及制备草鱼 IgM 多克隆兔抗	13
3.6 草鱼口服免疫及攻毒实验	13
3.6.1 荧光定量 PCR 检测组织相关基因表达量	14
3.6.2 草鱼各组织病毒载量的检测.....	14
3.7 Western blot 检测草鱼血清中 IgM 含量变化以及酶联免疫吸附法 测试浓度(ELISA)	14
3.8 疫苗摄入以及肠道定植检测	15
3.9 数据分析.....	15
第四章 结果与分析	16
4.1 干酪乳杆菌的最佳生长条件	16
4.2 构建 LC-pVE5523-VP5 以及蛋白表达验证	16

4.3 疫苗饲料的高温稳定性测试	19
4.4 草鱼 IgM 蛋白多克隆兔抗的制备	21
4.5 口服 LC-pVE5523-VP5 能促进多种关键免疫相关基因的表达	22
4.5.1 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫上调草鱼 IgM mRNA 的表达	23
4.5.2 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫上调草鱼 IFN mRNA 的表达	25
4.5.3 攻毒后草鱼 IFN 和 IgM mRNA 在组织中的相对表达量	26
4.5.4 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫对草鱼肠道等组织没有损害 ..	27
4.5.5 口服 LC-pVE5523-VP5 能有效降低攻毒后草鱼各组织病毒 载量	29
4.6 LC-pVE5523-VP5 重组干酪乳杆菌在肠道能够持续存在	30
第五章 讨论	34
第六章 结论与展望	37
6.1 主要结论	37
6.2 创新点	37
6.3 展望	37
参考文献	38

第一章 引言

1.1 草鱼出血病

在亚洲，草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是一种重要的水产资源，在近几十年的水产养殖产量中占比最大^[1]，在中国被广泛养殖^[2]。由于高密度养殖和环境因素等的影响，导致鱼类免疫力下降，非常容易引起大面积的疾病暴发^[3]。常见的鱼类疾病有草鱼出血病、鲤春病毒血症以及锦鲤疱疹病毒病等^[4,5]。鱼病在流行时容易造成水域内鱼类大范围死亡，既损失了大量水产资源，又对水产养殖业的经济产生消极影响。

草鱼是中国四大家鱼之一，论及与其相关的疾病，其中危害最大、影响最广的疾病为草鱼出血病。由草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)引起的出血性疾病严重影响了草鱼养殖业^[6]，该病具有发病时间短、范围广的特点，病症为全身性出血主要表现为各器官组织有不同程度的充血、出血^[7]。GCRV 主要结构为核酸以及蛋白质，属 dsRNA 病毒。结构呈现二十面体对称，具有两层衣壳，其蛋白组分为 VP1~VP7，其中 VP5 和 VP7 是其重要组成部分。GCRV 基因组由 S1-S11 构成，拥有 097、873、HZ08 等多种分离株^[8-13]。

抗生素曾经是治疗鱼类疾病的主要选择，然而，这无疑增加了抗生素对环境产生耐药性的风险^[14]。由于疫苗的高效性和对环境安全的特点，疫苗最近被认为是水产养殖业中的一种优良替代品^[15]。相关实验证明研制相关的鱼用疫苗是解决病毒性疾病的优选方法^[16]。目前，已有相关的草鱼灭活、减毒等疫苗的研发，并取得较好的免疫保护效果^[17,18]。目前针对鱼类的免疫方式还是以传统疫苗注射方式为主，该方式一方面消耗过大的人力、物力以及时间，另外也会对鱼体造成机械损伤和应激反应，容易造成鱼死亡^[19]。而鱼用口服疫苗因其易于给药、能触发粘膜免疫等特点，体现出极大的优势和广泛的应用前景^[20]。

1.2 鱼用疫苗研究现状

面对草鱼出血病，人们对鱼类的免疫机制以及相关鱼用疫苗的研究从未停止。人类第一次将疫苗应用到鱼类可以追溯到 1942 年，Duff 将杀鲑产气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)进行灭活后免疫硬头鳟并取得成功^[21]。在此之后，人们陆续开始关注鱼用疫苗的研制，

目前疫苗的主流分类分为灭活疫苗、减毒疫苗、核酸疫苗、以及蛋白质疫苗等^[22]。

灭活疫苗是在确保不破坏其免疫原性的前提下，将病原体进行杀灭，使其保留能触发免疫应答，但丧失感染复制的能力。早在 1973 年，中国水产科学院培养的灭活苗免疫保护率可达到 80%^[23]。1998 年，我国针对制备灭活苗，开发了转瓶细胞培养技术^[24]，优化了灭活苗的制备工艺。灭活疫苗也可通过直接对病鱼内脏组织进行碾碎、加入双抗以及福尔马林处理后制得，陈等^[25]通过该方式验证草鱼存活率达到 80%以上。

减毒疫苗保留了病毒微弱的活力，进入宿主体内后会启动一次轻微感染。与灭活苗相比，低剂量即可造成一次相对更持久的免疫。许等^[26]针对草鱼出血病研制的弱毒疫苗取得了一定的成果。周等^[27]运用 GCRV 减毒疫苗与黄芪多糖结合免疫草鱼，相关免疫基因和免疫因子出现不同程度的上调。另外，同时运用灭活苗和减毒苗免疫草鱼也能激发免疫应答，取得不错的效果^[28]。有研究表明灭活苗和减毒苗存在活疫苗毒力逆转的可能性^[29]。

核酸疫苗分为 DNA 和 RNA 疫苗两大类，具备针对不同类型的病毒的编码不同种类的蛋白的能力，灵活性较强^[30]。宋等^[31]构建的 pVAX1-S6 核酸疫苗在免疫草鱼后能使其产生抗体并维持在较高的水平。陶等^[32]针对拟态弧菌研发的三种 DNA 疫苗免疫草鱼后均能提高其肠道巨噬细胞活性。由此可见，核酸疫苗具有广泛的应用前景和市场空间。

重组蛋白疫苗/亚单位疫苗是通过细菌或者其他合适的载体，通过诱导其产生出目的抗原蛋白发挥作用的疫苗。目前研究最常用的为大肠杆菌表达系统^[33]。有研究通过使用 *trpE* 表达载体 *Parh2*，在大肠杆菌中合成了大量被编码的蛋白质，过程中产生了一种细菌裂解物，在诱导虹鳟鱼苗的保护性免疫方面效果显著^[34]。同样是大肠杆菌表达系统，相关研究^[35]表达了含有 *pelB* 定位信号和 His 标签的重组蛋白(*rFrpA*)，该蛋白能够诱导宿主产生特异性抗体，并能够保护宿主以及抵抗细菌的侵染。

近年来，鱼用疫苗的研究还在不断的深入，通过信息检索、筛选以及可视化处理，得到鱼用疫苗相关的研究年度发文趋势^[22]。检索条件如下：

通过在知网 (CNKI) 进行高级检索后，筛选时间区间为 2000 年 1 月至 2024 年 1 月，输出发文趋势图 (图 1.2A)。【检索条件：(主题：鱼用疫苗) OR (主题：鱼类 疫苗) OR (主题：鱼 疫苗)；检索范围：总库)】

通过在 Web of Science (WoS) 进行高级检索后，导出时间区间为 2000 年 1 月至 2023 年 12 月数据。使用软件 CiteSpace 6.2.R6 对数据进行可视化分析，并绘制发文趋势图 (图 1.2B)。【检索条件：Topic: 以 “Fish vaccine” 为检索词，

Search in: Web of Science Core Collection】

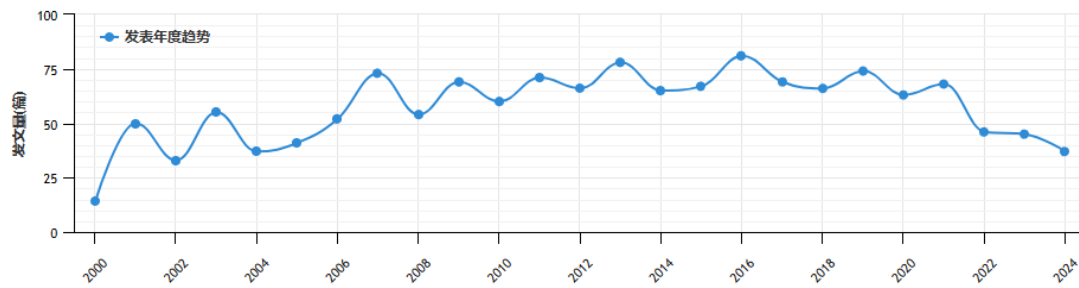


图 1.2 A 年度发文趋势（知网）

Figure 1.2 A Annual publication trend (CNKI)



图 1.2 B 年度发文趋势（Web of Science）

Figure 1.2 B Annual publication trend (WoS)

1.3 口服疫苗与干酪乳杆菌

随着鱼用疫苗的研究越来越深入，相应的免疫方式也变得多样化，常见的有注射法浸泡法和口服法三大类。不可否认的是注射法仍然是目前主流的免疫方式，其运用广泛且效果优良，但其缺点也很明显，不可避免的对鱼体造成机械损伤以及应激反应，导致死亡的情况不在少数。浸泡法是将鱼体浸入制备好的疫苗悬液中，其中的抗原在鱼和水体进行交换时进入并发挥作用，基本不会造成任何损伤。浸泡法主要分为三种^[36]：分别为直接浸泡、高渗透溶液浸泡和喷雾免疫。

口服法相对于肠道外用药具有众多优势，其特点是成本低，具有粘膜免疫原性，不会诱发注射引起的应激反应^[37]。粘膜表面被认为是第一道防线，粘膜免疫也引起了极大的关注^[38]。口服免疫重点在于需要通过口服疫苗来激发粘膜免疫和全身性免疫^[22]。口服疫苗在早期一直存在一个难以克服的问题：由于肠胃环境的复杂性，口服呈递的抗原会受到各种酶类的水解从而被破坏，当其到达发挥作用的区域时无法产生效应^[39]。为了应对这一难题，人们在口服疫苗的研究领域开发出了基于壳聚糖、铝佐剂、海藻酸盐、二氧化硅纳米颗粒、酵母菌等包被材料，用以包装抗原^[40-45]，均取得了一定的成果。

乳酸杆菌是一种革兰氏阳性菌，作为一类重要的益生菌，被广泛运用于食品加工和保藏等领域^[46]。乳酸杆菌一般具备耐酸、耐胆盐等特性，受这些特性影响，使其能够在肠胃中以及一些比较复杂恶劣的环境中生存^[47-49]。由此可见，乳酸杆菌非常适合作为口服疫苗载体。将目的基因和乳酸杆菌分泌表达质粒进行构建。该模式在哺乳动物领域已有成功案例，如付等^[50]构建了 3 型猪圆环病毒 (PCV3)Cap 蛋白重组至植物乳杆菌。周等^[51]构建了表达猪轮状病毒的 VP7 和 NSP4 基因的重组乳杆菌。

1.4 课题意义

草鱼作为一类重要的水产资源，常常因疾病暴发而造成大量经济损失。为避免这一情况，开发出一种能够有效预防疾病的疫苗成为了关键。相比于传统注射方式，口服给药更简单，安全性更高，免疫反应更广泛和持久^[52]。VP5 作为 GCRV 的外衣壳蛋白，与病毒启动感染复制息息相关。有研究报道大肠杆菌中表达的抗 GCRV 外衣壳蛋白 VP5 和 VP7 的抗体可以中和病毒的感染性^[53]。因此，VP5 是一种构建疫苗的良好抗原。本研究将 VP5 的全长基因构建至乳杆菌分泌表达载体，以干酪乳杆菌为抗原呈递载体，根据实验室现有条件推断可行性，并开发出一条成熟的技术路线，为后续研究鱼用口服疫苗打下了基础。

本研究采用与食品相关的工艺，建立了将 LC-pVE5523-VP5 疫苗工程菌经真空冷冻干燥技术与草鱼饲料结合的制备方法。探究了疫苗的免疫效果以及在肠道驻留的能力以及评估了其在病毒侵染下的保护效果。同时，本研究为预防草鱼乃至鱼类病毒性疾病提供了一种可行的方案，促进了以冻干菌粉结合饲料形式的鱼用疫苗在水产养殖防控中的应用，具备商业化的潜力。

第二章 实验材料与试剂

2.1 实验动物、细胞系、菌株、质粒

表 2.1 实验中使用的材料

Table 2.1 The primary materials used in the experiment

材料	类别	用途
实验动物	草鱼	口服免疫以及攻毒实验
	新西兰兔	制备多克隆兔抗
细胞系	草鱼肾细胞(CiK)	用于培养 GCRV 病毒
原核菌株	大肠杆菌 DH5 α , BL21	原核表达、基因克隆转化
	干酪乳杆菌 ATCC	用于 pVE5523 系列质粒电转化
相关载体(质粒)	pET32a	载体构建、蛋白纯化、抗体制备
	pVE5523	疫苗制备

2.2 实验设备

表 2.2 实验中使用的主要设备

Table 2.2 The primary equipment used in the experiment

仪器及设备	生产商(公司)
PCR 仪	美国 Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad
Gene Pulser Xcell (电穿孔仪)	美国 Bio-Rad
真空冷冻干燥机	北京四环冻干
电泳仪	北京六一
研磨仪	武汉赛维尔
酶标仪	美国 Thermo
超声波破碎仪	美国 Sonics & Materials
凝胶成像仪	美国 Bio-Rad
化学发光成像系统	上海勤翔
水平摇床	海门市其林贝尔

第二章 实验材料与试剂

仪器及设备	生产商(公司)
金属浴	海门市其林贝尔
冷冻离心机	德国 Eppendorf
高速离心机	德国 Eppendorf
超净工作台	苏州精华设备
恒温培养箱	上海一恒
立式压力蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
图像拍摄设备	小米 13 Ultra

2.3 实验试剂与耗材

表 2.3 实验中使用的主要试剂与耗材

Table 2.3 The primary reagents and consumables used in the experiment

产品名称	产品厂家
胎牛血清、M199 培养基	北京索莱宝
胰蛋白酶、青链霉素混合液、红霉素、溶菌酶	
TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)	
限制性内切酶	日本 Takara
弗氏完全佐剂	博奥龙
弗氏不完全佐剂	
Ni-NTA His•Bind Resin	Novagen
透析袋	Biotopped
脱脂乳粉	上海碧云天
1.1 x T3 Super PCR Mix	北京擎科
pET32a、pVE5523 质粒	丰晖生物
MRS 肉汤培养基	海博生物
MRS 肉汤培养基	
十二烷基硫酸钠(SDS)、二甲基亚砜(DMSO)、过硫酸铵(APS)、TEMED、丙烯酰胺, β -巯基乙醇、EDTA 等	上海生工
真空采血管普通管	江西精宇

第二章 实验材料与试剂

产品名称	产品厂家
一次性静脉采血针	江西瑞邦
一次性无菌注射器	江西三鑫
手动饲料颗粒机	湛江缪记乌之家

2.4 实验的主要试剂盒

表 2.4 实验中主要使用的试剂盒

Table 2.4 The primary kits used in the experiment

试剂盒名称	产品厂家
Total RNA extraction Kit	天根生化科技
Bradford 蛋白质定量试剂盒	
PrimeScript RT reagent Kit with Gdna Eraser	日本 TaKaRa
HiScript Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)	Vazyme
ClonExpress II One Step Cloning Kit	Vazyme
DiaSpin DNA Gel Extraction Kit	上海生工
Endo-Free Plasmid Mini Kit II D6950	美国 Omega Bio-Tek
鱼免疫球蛋白 M (IgM) 酶联免疫分析试剂盒	江苏酶免

2.5 引物表

本课题利用同源重组法进行相应基因载体的构建 (T-小写字母为同源臂序列)以及根据基因序列设计的荧光定量引物序列 (RT-)。

表 2.5 相关引物序列表

Table 2.5 The correlation primer sequence table.

ID	Primers	Primer sequence(5'to3')
1	873VP5-F	TAGCCAAGGATGATCACC
2	873VP5-R	GACCTGCTCAAACCCC
3	<i>IgM</i> -F	ATGAAAGGAACCAAAGTC
4	<i>IgM</i> -R	TAACGATCTAGTCCTTGC
5	pVE- <i>Sal</i> -F	TATTGCTAAACAAGATGCGGTC
6	pVE- <i>Sal</i> -R	TTTGTAGGATGCTTTGTTTCAGG
7	pVE5523-F	CCCCGTTGTCAGGTGTTT
8	pVE5523-R	TTCACCGACAAACAACAG

第二章 实验材料与试剂

ID	Primers	Primer sequence(5'to3')
9	T-pVE-VP5-F	gctaaacaagatgcggtcgacTAGCCAAGGATGATCACC
10	T-pVE-VP5-R	caatctagaactagcgatcGACCTGCTCAAACCCC
11	T-32a-IgM-F	gacagcccagatctgggtaccATGAAAGGAACCAAAGTCACCG
12	T-32a-IgM-R	acggagctcgaattcggatccCTAGTCCTTGCAGGATGCAGGG
13	β -actin-F	CACTGTGCCCATCTACGA
14	β -actin-R	CCATCTCCTGCTCGAAGTC
15	RT-IgM-F	AGTCAATCTTCGCCCTGTC
16	RT-IgM-R	CTCCCAAACGCTGGATACT
17	RT-IFN-F	CATTGCCAACAGACGATA
18	RT-IFN-R	ATTAGCTTGCTTGATCAGATT
19	RT-IL1 β -F	AAGCAGCGGATCTCCTCGTC
20	RT-IL1 β -R	CTACTTGGCACCTGGCACA
21	RT-IL8-F	GTTGCTGTGGCATGTCTGA
22	RT-IL8-R	TCTCCTGCTTGGTTTCCTT
23	RT-TNF α -F	CCGCTGCTGTCTGCTTCAC
24	RT-TNF α -R	GCATAACTGCGTGGCTCAT
25	RT-873VP5-F	ATCGCTTCGCTGTTTATGC
26	RT-873VP5-R	AAGGATGCTTGGACGCTAC

第三章 实验方法

3.1 实验动物、干酪乳杆菌及病毒的培养

3.1.1 实验动物

实验所用草鱼（30~60 g）购自江西省南昌市进贤县神农渔业有限公司，在 300 L 缸中充氧静养 2 周直至稳定，每日投喂饲料 2 次，及时使用虹吸管清理草鱼排泄废物、食物残渣以及清理死鱼，养殖环境温度保持 24 °C。制备抗体所用的新西兰兔，购自长沙天衡生物技术有限公司，于南昌大学动物实验中心进行人工饲养。

3.1.2 干酪乳杆菌的培养与干酪乳杆菌感受态的制备

干酪乳杆菌 ATCC 菌液（*Lactobacillus casei*）购自北纳生物（BeNa Culture Collection, China），菌种编号为 BNCC134415。

将购买的干酪乳杆菌菌液进行梯度稀释后，涂板于 MRS 固体平板进行菌落筛选。挑取单一菌落后使用无抗性 MRS 液体培养基按照 5 %进行活化，获得 *L. casei*。将活化后的 *L. casei* 菌液进行扩大培养，温度设置为 37 °C，静置培养后分别在 1, 2, 3, 6, 9, 21, 24, 48 小时，使用分光光度计测试 OD_{600nm} 处的吸光值，并绘制生长曲线。

将 *L. casei* 菌液用 MRS 液体培养基稀释 10⁶ 倍，涂板无抗性 MRS 固体平板并挑取单一菌落，培养至 OD_{600nm} 为 0.6~0.8，用于制备干酪乳杆菌感受态，根据^[54]等的方法进行改良制备，在超低温冰箱储存（-80 °C）。

具体步骤：

- (1) 将上述干酪乳杆菌菌液转移至 50 mL 离心管，冰浴 30 分钟。
- (2) 4 °C，4000 rpm 离心 15 分钟。
- (3) 弃去上清，使用 10 mL 预冷的缓冲液 A 进行重悬。
- (4) 重复步骤(2)、(3)。
- (5) 4 °C，4000 rpm 离心 15 分钟。
- (6) 弃去上清后，加入 4 mL 预冷的缓冲液 A 进行重悬。
- (7) 轻轻吹打混匀后，分装至 1.5 mL 离心管，100 μL/管（可加入甘油），保存至超低温冰箱备用（-80 °C）。

注：缓冲液 A：5 mM KH₂PO₄，0.15 mM MgCl₂ · H₂O，pH7.4，每 100 mL 缓

冲液 A 添加蔗糖 10.26 g。

3.1.3 细胞与病毒的培养

草鱼肾细胞 (*CiK*) 生长至完全贴壁后进行传代培养。使用移液枪将培养瓶中的培养基弃去, 加入 2 mL 无菌 PBS 进行清洗。弃去 PBS, 加入 2 mL 胰酶消化 3~5 分钟后, 加入培养基 (10 %胎牛血清以及 1 %青、链霉素双抗) 终止消化, 并缓慢吹打至细胞脱落。转移至 15 mL 离心管, 在条件为 1000 rcf 下, 离心 3 分 30 秒。将上清弃去后, 加入 4 mL 培养基缓慢吹打重悬, 再按实验需求将细胞悬液打入培养瓶中。

GCRV-I型菌株 GCRV 873 在实验室中保存。*CiK* 培养至贴壁后, 使用移液枪将培养皿中的培养基弃去, 然后加入无菌 PBS 缓慢清洗 2 次。清洗完成后加入不含青、链霉素的培养基, 加入 GCRV 处理 2 小时后, 将培养基弃去, 加入培养基。待细胞全部死亡飘起后, 对其进行反复冻融以及过滤, 最后保存在 -80 °C。

3.2 草鱼组织 RNA 的提取

将草鱼解剖后分别取出各组织, 放置于培养皿中, 使用生理盐水浸泡, 组织取完后尽可能清洗掉血水, 最后剪碎加入含 DEPC 水的 1.5 mL 离心管中备用。

参照天根 RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA 提取。在 260、280 nm 处吸光度测定 RNA 的浓度。配合材料所述的反转录试剂, 根据说明书将所提 RNA 反转成为 cDNA。

3.3 相关表达载体的构建

本研究构建表达载体共使用 2 种质粒, 分别是乳酸杆菌分泌表达载体 pVE5523 质粒和原核表达载体 pET32a。分别选择合适的酶切位点, 进行双酶切获得线性化载体。

VP5 已构建至 T 载体的质粒于实验室保存。在 NCBI 上搜索选取草鱼 *IgM* 部分序列 (GenBank: HM452135.1) 的编码序列, 在前端手动添加起始密码子, 使用 Oligo 7 对其设计引物。以提取的 RNA 逆转录得到的 cDNA 稀释 10 倍为 PCR 模板进行扩增。

将获得的目的片段进行纯化, 将目标条带进行切胶, 放入 1.5 mL 离心管中。参照 DNA 凝胶回收试剂盒进行操作回收。使用回收产物按照 T 载体说明操作,

连接至 T 载体。再转化至感受态细菌 DH5α，进行抗性筛选后送测序。提取相应质粒备用。实验所涉及的体系和程序见下表：

表 3.1 PCR 扩增体系和程序

Table 3.1 PCR amplification system and procedure

名称	PCR 体系(50 μL)	反应程序	循环数
ddH ₂ O	36.5 μL	95 °C 3 min	35 cycles
引物 F/R	1 μL	95 °C 30 s	
dNTPs (2.5 mmol/L)	4 μL	55 °C 30 s	
LA Taq DNA Polymerase	0.5 μL	72 °C (按需设定)	
cDNA template	2 μL	72 °C 10 min	
10×LA Taq Buffer	5 μL		

表 3.2 同源重组反应体系

Table 3.2 Homologous recombination reaction system

组分	反应体系
线性化载体	$\frac{0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}}{\text{酶切载体回收浓度}} \mu\text{L}$
插入片段	$\frac{0.04 \times \text{插入片段碱基对数}}{\text{插入片段回收浓度}} \mu\text{L}$
5*CE II buffer	4 μL
Exnase II	2 μL
ddH ₂ O	To 20 μL

3.3.1 构建 pVE5523-VP5 乳酸杆菌分泌表达载体

使用特异性引物进行聚合酶链式反应（PCR）扩增，得到 VP5 全长基因序列，并连接至 T 载体后。根据 pVE5523 质粒序列选择的酶切位点：*EcoR* V和 *Sal* I设计同源重组引物，通过同源重组法将 VP5 序列附带上同源臂。使用对应酶切位点的限制性内切酶对 pVE5523 质粒进行双酶切，然后对上述两种产物使用 DNA 胶回收试剂盒进行产物回收。将两种回收产物按照说明书进行酶连反应，利用连接酶将 VP5 序列连接至 pVE5523 质粒上。经转化验证后，提取 pVE5523-VP5 重组质粒，送测序验证确保无误。

3.3.2 构建 pET-32a-IgM 原核表达载体

将 PCR 扩增并得到 IgM 序列并连接至 T 载体后。根据 pET-32a 质粒序列选择的酶切位点：*Kpn I*和 *BamHI*设计同源重组引物，通过同源重组法将 IgM 序列附上同源臂，使用对应酶切位点的限制性内切酶对 pET-32a 质粒进行双酶切，对上述两种产物使用 DNA 胶回收试剂盒进行产物回收。二者按照体系进行酶连反应，利用连接酶 IgM 序列连接至 pET-32a 质粒上，经转化验证后，提取 pET-32a-IgM 重组质粒。

3.4 电转化 pVE5523-VP5 实验以及疫苗饲料的制备

3.4.1 LC-pVE5523-VP5 的制备

分别将 500 ng 的空载质粒 pVE5523 和目的质粒 pVE5523-VP5 分别加入半融化状态的干酪乳杆菌感受态进行混合，冰浴 10 min 后，转入预冷的 1 mm 无菌电击杯中，参考文中描述的方法^[55,56]进行梯度电击，使用 Bio-Rad 电穿孔仪器设定电压 0.8~2.0 kV 进行梯度电击。电击完成后迅速转移至冰上 3 min，轻轻加入 1 mL 含 0.3 M 蔗糖的 MRS 液体培养基，润洗电击杯将菌体全部转移至无菌的 1.5 mL 离心管中。37 °C 静置培养 4~6 h 后将菌液涂布与含有 10 µg/mL EM 的 MRS 固体培养基生长 36~48 h 进行抗性筛选。

待菌落生长至合适大小后进行单一菌落的挑取，接种至含 EM 的 MRS 液体培养基中。之后进行菌液 PCR 验证目的菌落。（注：短片段可以直接菌液 PCR，长片段如若菌液 PCR 无条带可尝试提质粒进行 PCR）。体系如下：

菌液 PCR 体系如下：菌液模板 1.5 µl，上下游引物各 1 µl，1.1 x T3 Super PCR Mix 22.5 µl。

质粒 PCR 体系如下：质粒模板 1 µl，上下游引物各 1 µl，1.1 x T3 Super PCR Mix 23 µl。

PCR 程序设置与 3.3 中一致。

3.4.2 冻干菌粉以及疫苗饲料的制备

将 30 % 的脱脂乳（105 °C 灭菌 45 min）和菌液按照 1 : 1 混合装入 50 mL 离心管。先在 -20 °C 预冷冻，期间每隔 10 min 上下颠倒数次直至结冰，然后放入 -80 °C 进行超低温冷冻。冷冻完成后使用无菌的锡箔纸将离心管束口并使用牙签

扎孔。置入已经预冷的真空冷冻干燥机，连续冻干 3~5 天，可根据样本量增加或缩短时间。

无菌操作将离心管内冻干菌粉捣碎并封装备用。使用破碎机将实验室购买的草鱼饲料研磨成粉状，加入冻干菌粉（添加量为饲料重量的 10%）。混合均匀后加入适量的无菌水（100 g 饲料加入约 60 mL 无菌水。视具体情况而定），进行混合后使用饲料颗粒机将其重新压制成 2 mm 左右的颗粒，放入培养箱 37 °C 风干。

3.5 诱导纯化蛋白以及制备草鱼 IgM 多克隆兔抗

将 pET-32a-IgM 重组质粒转化至 BL21 表达感受态中，进行抗性筛选，挑取单一菌落 PCR 验证后，按照 1 % 接种扩大培养，加入 1 % 菌液体积的 IPTG（24 mg/mL）进行低温诱导，条件为 24 °C，165 rpm。诱导后的菌液根据^[57]所述方法进行纯化，具体步骤为：

- (1) 菌液经 24 °C 过夜诱导后，4100 rcf 离心 5 min。
- (2) 使用适量 Binding 对菌液吹打重悬，进行超声破碎，程序设置为：Amp: 30 %，工作 3 s 停歇 7 s。
- (3) 将破碎后的菌液分装至 1.5 mL 离心管，12000 rpm 离心 30 min。
- (4) 将上清收集后，转入镍离子亲和柱，在低温环境下进行层析纯化，经透析浓缩后得到蛋白样品，储存于 -80 °C。

从上清中纯化得到的蛋白用于免疫新西兰兔，免疫注射的第一针使用弗氏完全佐剂与抗原蛋白 1:1 或 1:2 混合，乳化后在兔子皮下和肌肉进行多点注射。第二针为加强针，间隔 3~4 周后二次注射，采用弗氏不完全佐剂与抗原蛋白 1:1 或 1:2 混合，乳化后进行注射，整个周期中共注射 4 针，在第三针之后一周对兔子耳缘静脉抽血进行抗体检测。第 4 针后 1 周对兔子进行放血，提取抗体。存放至 -80 °C 备用，抗体用于检测草鱼血清中 IgM 水平。

3.6 草鱼口服免疫及攻毒实验

实验设置 4 组草鱼，每组 100 尾，分别是普通饲料组 M，干酪乳杆菌菌粉组 LC，空载质粒菌粉组 LC-pVE5523 以及构建质粒菌粉组 LC-pVE5523-VP5。各组饲料按照 2 % 鱼体重进行投喂，每天早晚投喂两次，口服免疫期间总共投喂 15 天，第 16 天进行攻毒处理且全部投喂普通饲料。

攻毒采用腹腔注射的方式,注射病毒为 GCRV 873 (4.68×10^5 TCID₅₀/mL)。攻毒后每天记录存活情况,每日正常投喂普通饲料。

3.6.1 荧光定量 PCR 检测组织相关基因表达量

分别在本实验周期中的第 3 天、7 天、11 天、15 天、19 天、23 天、27 天和 31 天对各组草鱼的肠道、肝脏、脾脏、肾脏的组织进行取样,并使用 RNA 提取试剂盒,按照说明书进行 RNA 的提取。在 260、280 nm 处吸光度测定 RNA 的浓度。使用反转录试剂反转成为 cDNA (1 μ g),将所得 cDNA 模板稀释 5 倍后进行荧光定量 PCR (Q-PCR) 检测。

每个样本均重复三次,以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。荧光定量 PCR 扩增体系和程序根据文献所述^[58]进行。

3.6.2 草鱼各组织病毒载量的检测

为检测攻毒后草鱼各组织的病毒载量情况,对第 19 天、23 天、27 天和 31 天取样的草鱼 cDNA 模板进行荧光定量 PCR,检测 GCRV 在组织中的含量。实验数据处理方法同上。

3.7 Western blot 检测草鱼血清中 IgM 含量变化以及酶联免疫吸附法测试浓度 (ELISA)

在口服免疫期间的第 3、7、11、15 天对各组的草鱼血样进行采集,样品于 4 °C 条件下自然凝结后进行离心 (3500 rpm/min) 分离提取血清,取部分血清稀释 10 倍,加入 25 μ L 5 $\times$ SDS Loading Buffer, 100 °C 处理 10 min。结合自制草鱼 IgM 多克隆兔抗,用于 Western blot 实验检测草鱼 IgM 抗体水平。剩下的血清样品保存至超低温冰箱 -80 °C,用于测定浓度。

另外,在 Western blot 验证的前提下,对上述的血清样品进一步检测。对口服免疫期间各组的第 3、7、11、15 天草鱼血清样本使用 ELISA 试剂盒进行 IgM 浓度测定。

3.8 疫苗摄入以及肠道定植检测

在口服干酪乳杆菌免疫期间的第 3 天以及停止投喂菌粉后的第 15 天对各组草鱼的不同肠段进行随机取样，加入无菌的 PBS 和氧化锆研磨珠，对样品进行研磨。将其稀释后涂布于带有 EM 抗性的 MRS 固体平板，进行抗性筛选。后续通过使用鉴定引物 pVE-*Sal*-F/R 以及 pVE5523-F/R 对筛选出的菌落进行相应 PCR，产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳后进行显影。

3.9 数据分析

所有数据处理分析均在 GraphPad Prism 9 中进行，数据以 mean±SD (n = 3) 表示。关于显著性的标识：当 $P < 0.12$ 时，用 ns 标注；当 $P < 0.03$ 时，用*标注；当 $P < 0.0021$ 时，用**标注；当 $P < 0.0002$ 时，用***标注；当 $P < 0.0001$ 时，用****标注。

第四章 结果与分析

4.1 干酪乳杆菌的最佳生长条件

根据在上述方法中提到的时间梯度以及 37 °C 静置厌氧条件下的培养情况，绘制了干酪乳杆菌的生长曲线（图 4.1），在实际培养时按照 2% 的菌液接种量，经过 48 小时达到平台期，这确定了后续大量制备疫苗冻干粉样品的最佳条件。

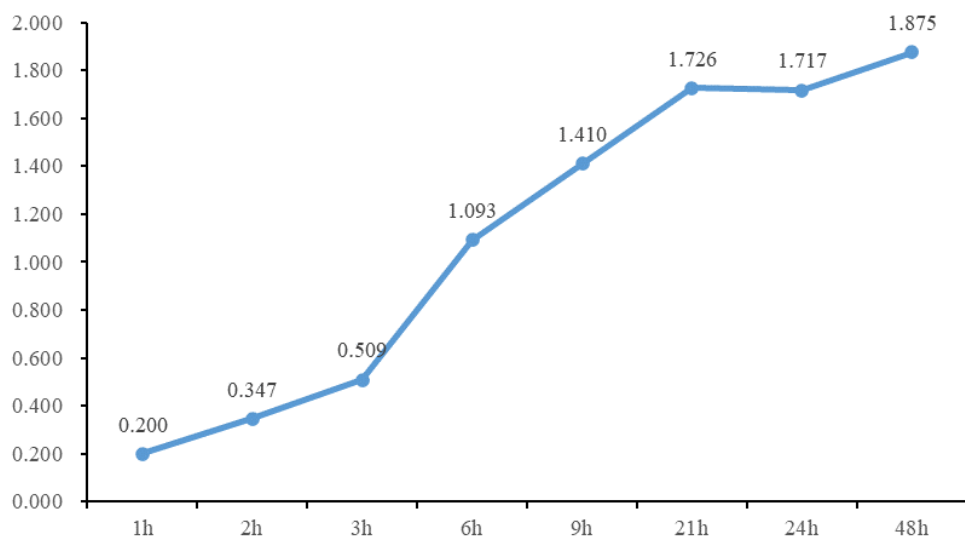


图 4.1 干酪乳杆菌生长曲线（在 37 °C 厌氧环境下培养 48 h）

Figure 4.1 Growth curve of *L. casei* (cultivated in an anaerobic environment at 37 °C for 48 hours)

4.2 构建 LC-pVE5523-VP5 以及蛋白表达验证

经构建得到 pVE5523-VP5 重组质粒（图 4.2.1）。将质粒与干酪乳杆菌感受态混合冰浴，电转化至干酪乳杆菌中，得到 LC-pVE5523-VP5，再经抗性筛选后得到目标菌落（图 4.2.2 A~B）。验证结果显示，LC-pVE5523 空载组（使用 pVE-Sal-F/R 和 pVE5523-F/R 两种引物验证：1~6 孔），长度分别为 170 bp 和 612 bp，均正确。LC-pVE5523-VP5 组（使用 pVE5523-F/R 验证：7~9 孔），VP5 全长为 2187 bp，验证正确。（图 4.2.2 C）

对各组的正常生长至平台期的干酪乳杆菌菌液进行 12000 rpm 离心 3 min 后，弃去培养基，加入 100 μ L 1 $\times$ SDS Loading Buffer，100 °C 处理 10 min

后进行 8 % SDS-PAGE，经考马斯亮蓝染色以及脱色后照胶，结果显示 *LC*-pVE5523-VP5 组具有明显的目的条带，且在超声破碎后出现 81 kDa 条带(图 4.2.3)，这与 VP5 的蛋白大小一致，说明经重组之后的 *LC*-pVE5523-VP5 具有正常表达 VP5 蛋白的能力。

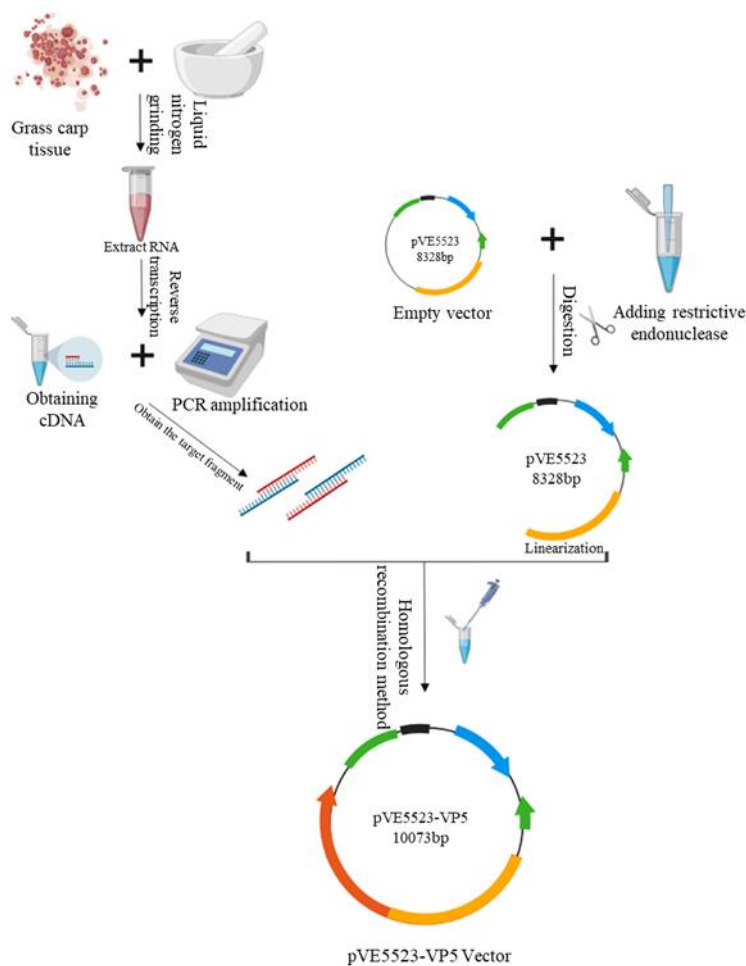


图 4.2.1 质粒构建流程图

Figure 4.2.1 Plasmid construction process

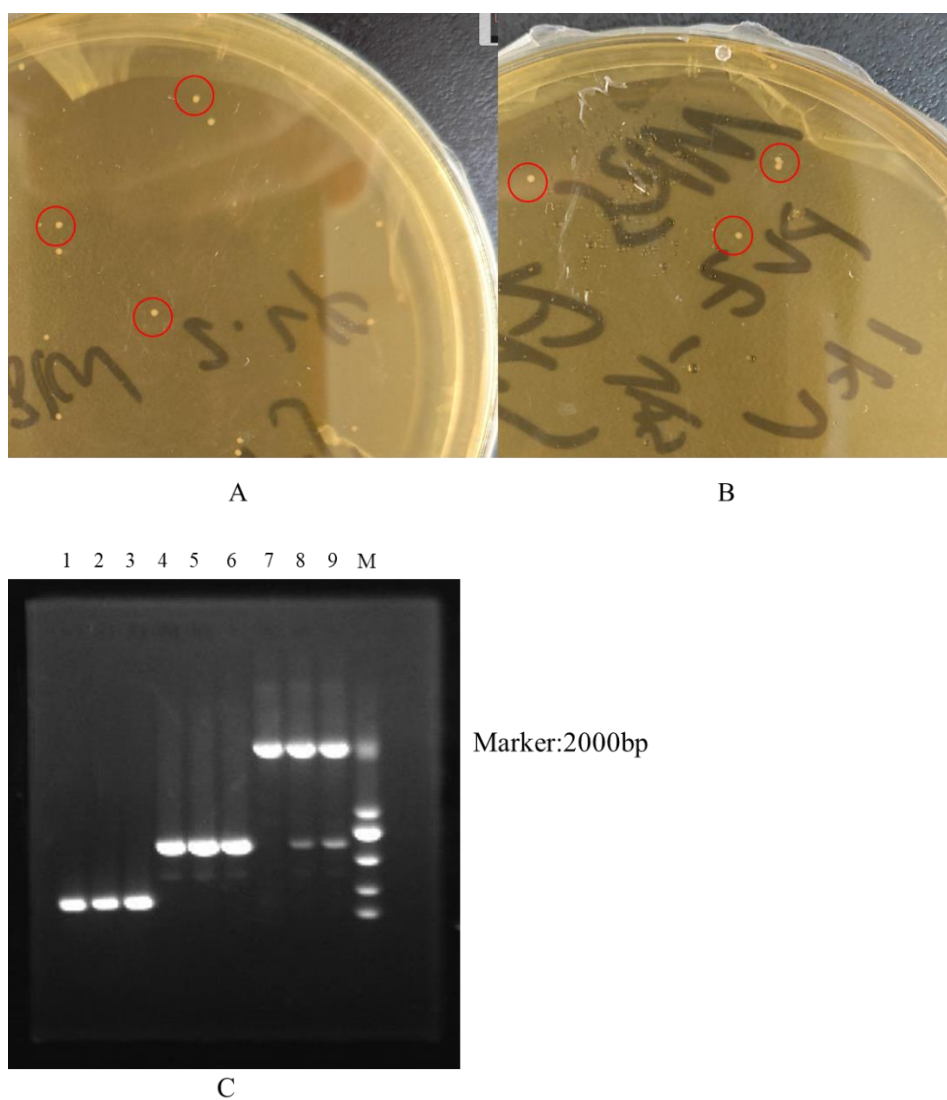


图 4.2.2 电转化后抗性筛选以及 PCR 验证

Figure 4.2.2 Resistance screening after electroconversion and PCR validation

A 为电转化 pVE5523 空载后菌落示意图；B 为电转化 pVE5523-VP5 组后菌落示意图；C 中 1 ~ 6 为 pVE5523 空载组（使用 pVE-Sal-F/R 和 pVE5523-F/R 两种引物验证），7~9 为 pVE5523-VP5 组（提取质粒后 PCR，使用 pVE5523-F/R 引物验证）

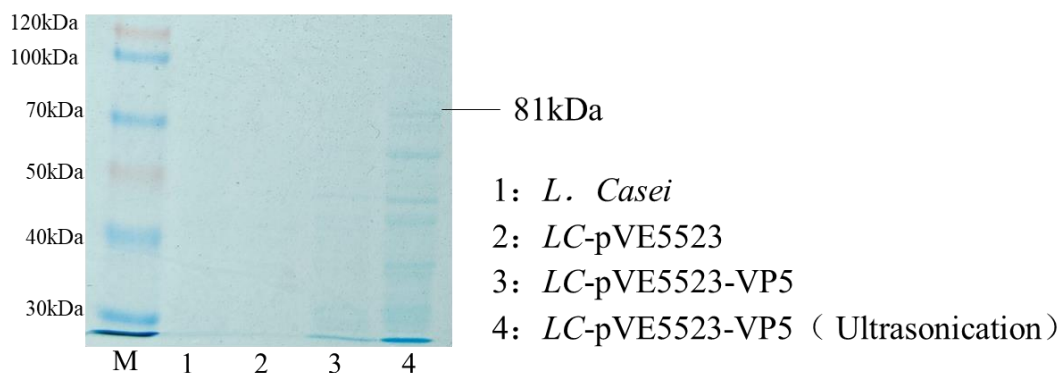


图 4.2.3 各组干酪乳杆菌蛋白表达验证图

Figure 4.2.3 Verification chart of *L. casei* protein expression in each group

分别为 1: 空白干酪乳杆菌组 (*L. Casei*)、2: 空载干酪乳杆菌组 (*LC-pVE5523*)、3 和 4: 重组 VP5 干酪乳杆菌组 (*LC-pVE5523-VP5*)。

4.3 疫苗饲料的高温稳定性测试

将干酪乳杆菌菌液培养至平台期，将其与 30 %脱脂乳粉 1:1 混合均匀，按照上述方法制备疫苗（图 4.3.1）以及疫苗饲料成品实拍图（图 4.3.2）。

考虑到饲料工艺中可能存在高温压制的情况，在本研究中探究了冻干菌粉在高温条件下的耐受表现。在温度分别为 55 °C、75 °C、85 °C、95 °C 和 100 °C 条件下对冻干菌粉进行高温耐受 2 min. 再将各组分别加入含 10 µg/mL EM 的 MRS 液体培养基进行复活试验。耐热梯度试验结果证明冻干菌粉在 100 °C 之内，经过持续高温加热，基本不会造成菌体的全部死亡。菌体依然能够活化，且在 48 h 左右达到基本一致的菌量（图 4.3.3），这说明了在面临高温加工时干酪乳杆菌疫苗的活性不会被破坏。

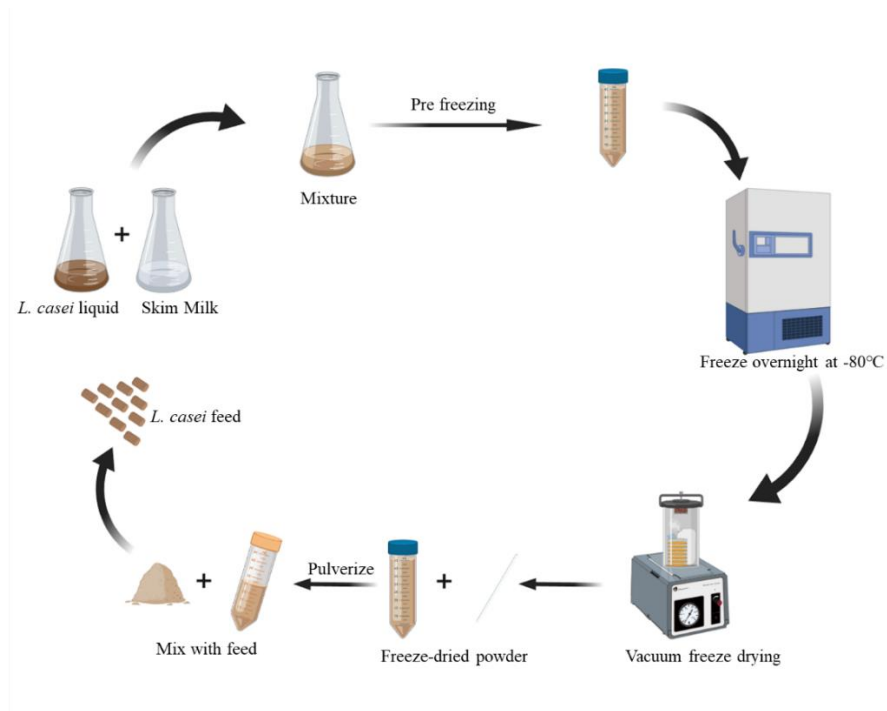


图 4.3.1 干酪乳杆菌疫苗饲料制备流程示意图

Figure 4.3.1 Schematic diagram of the preparation process of *L. casei* vaccine feed



图 4.3.2 疫苗饲料成品示意图

Figure 4.3.2 Schematic diagram of finished vaccine feed

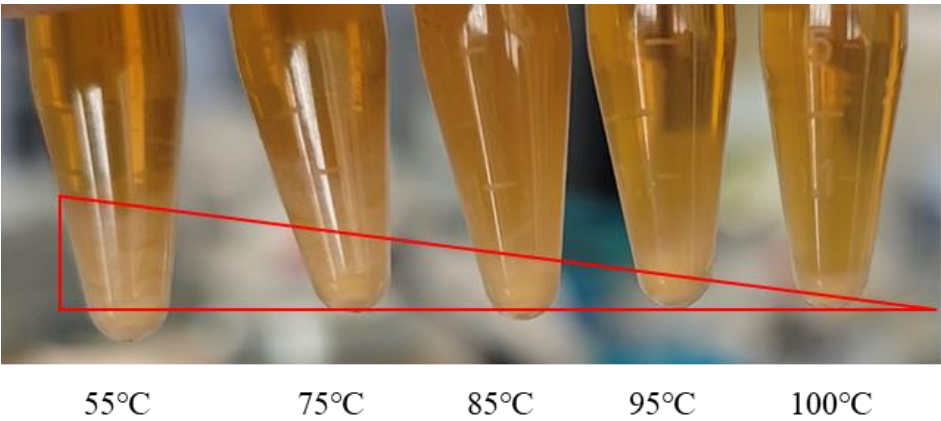


图 4.3.3 干酪乳杆菌疫苗菌粉的耐高温试验及再活化验证

Figure 4.3.3 High temperature resistance test and reactivation verification of *L. casei* vaccine powder

4.4 草鱼 IgM 蛋白多克隆兔抗的制备

将破碎后得到的上清液转入镍离子亲和柱时，每当破碎后上清液、Binding、Washing、Elution 流过 1 mL 时接取 2 ~ 3 滴相应液体，另外在 PEG2000 处理下浓缩至 1 mL 蛋白时，取 100 μ L，加入 25 μ L 5 $\times$ SDS Loading Buffer。100 $^{\circ}$ C下对样品处理 10 min 后，进行 8 % SDS-PAGE。胶体通过考马斯亮蓝染色以及脱色，最后照胶，结果显示 IgM 蛋白已经被纯化浓缩（图 4.4.1）。

使用该蛋白免疫新西兰兔后，经抽血后分离血清，抗体按照 1 : 1000 的稀释倍数进行 Western blot 试验验证，纯化的本源蛋白（图 4.4.2 A）以及草鱼血清中的 IgM（图 4.4.2 B）。

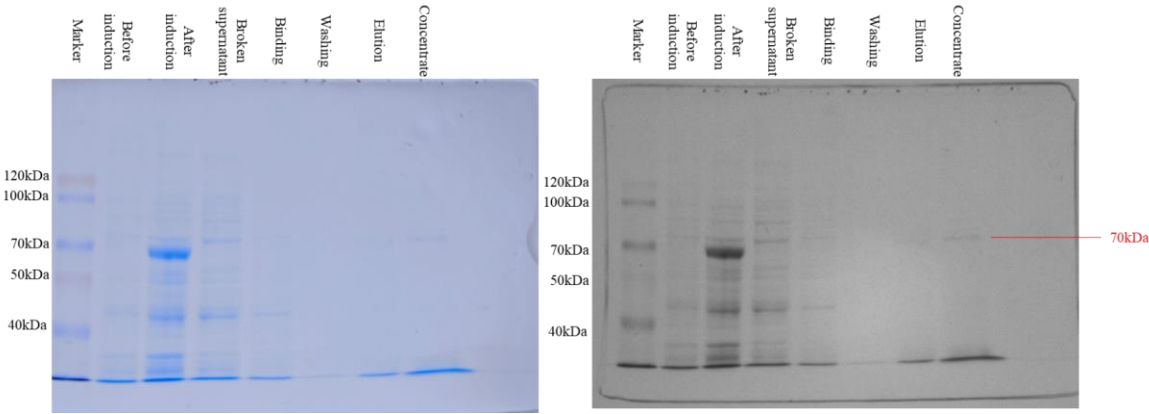


图 4.4.1 诱导纯化草鱼 IgM 蛋白图

Figure 4.4.1 Diagram of induced and purified grass carp IgM protein

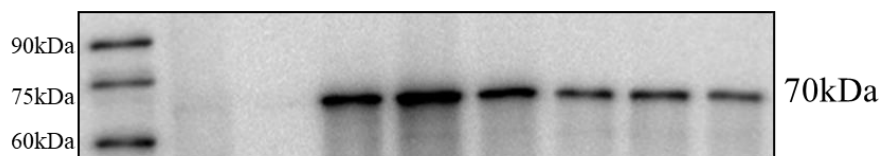
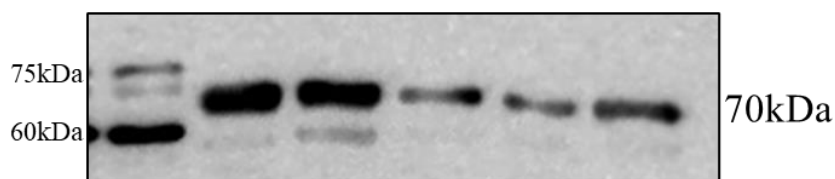


图 4.4.2 A 使用纯化的 IgM 蛋白进行验证

Figure 4.4.2 A Validation using purified IgM protein



IB: IgM

图 4.4.2 B 使用普通草鱼的血清进行验证

Figure 4.4.2 B Verification using serum of common grass carp

4.5 口服 LC-pVE5523-VP5 能促进多种关键免疫相关基因的表达

经过长达 15 天的口服免疫以及攻毒实验（图 4.5），为了检测在免疫后疫苗能否激活草鱼免疫相关基因的应答，在实验中分别对 3 d、7 d、11 d、15 d 的草鱼肠、肝、脾、肾等组织进行采集，使用 Q-PCR 检测了 *IFN*、*IgM*、*IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 等免疫相关基因的表达，探究草鱼口服免疫后其不同组织内的不同基因的表达情况。同时也对攻毒后(19 ~ 31 d)草鱼各组织的病毒载量进行了检测。

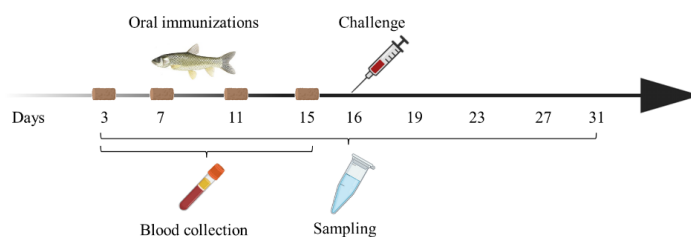


图 4.5 口服免疫试验周期及免疫后攻毒以及样本采集时间

Figure 4.5 Oral immunity test cycle and post-immunization challenge and sample collection time

各组(n=100)分别于前 15 天饲喂普通饲料或混合了相同比例(10%)LC、LC-pVE5523、LC-pVE5523-VP5 的饲料,在第 15 天之后全部投喂普通饲料。

4.5.1 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫上调草鱼 *IgM* mRNA 的表达

为了进一步研究口服 LC-pVE5523-VP5 后草鱼的免疫应答,采用 Q-PCR 检测草鱼部分组织中 *IgM* 基因的 mRNA 表达情况。结果显示,在肠道中 LC-pVE5523-VP5 组的 *IgM* mRNA 表达量在 15 d 内持续上调,且明显高于其他各组(图 4.5.1.1 A),在肝脏中也呈现逐渐上升的趋势,在第 15 d 时 LC-pVE5523-VP5 组的 *IgM* mRNA 表达量远高于其他各组(图 4.5.1.1 B)。在脾脏中 7 d 和 15 d 时 LC-pVE5523-VP5 组的 *IgM* mRNA 表达均高于其他各组(图 4.5.1.1 C)。上述结果表明,LC-pVE5523-VP5 对草鱼具有良好的免疫刺激作用,口服免疫可激活草鱼的免疫反应,促进免疫增强。

为了进一步确定在口服免疫后草鱼血清中的 *IgM* 含量变化,分别对 3 d、7 d、11 d 和 15 d 的草鱼进行血液采集。取 10 μ L 样品进行 8 % SDS PAGE,并使用草鱼 *IgM* 多克隆兔抗进行 Western blot 检测。结果显示,在 3 d 时各组无明显差异,而在 7 d、11 d、15 d 时,各组显示出差异性,且 LC-pVE5523-VP5 组的 *IgM* 水平都高于其他各组(图 4.5.1.2)

针对 Western blot 结果中显示的差异,本实验进一步使用鱼免疫球蛋白 M (*IgM*) 酶联免疫分析试剂盒,按照说明书操作,对上述样品进行了检测。在 OD_{450nm} 处测试吸光值,结果显示,在口服 LC-pVE5523-VP5 免疫之后草鱼血清中 *IgM* 的含量逐渐上升,并且在 11 d 和 15 d 时血清中 *IgM* 浓度远高于其他各组(图 4.5.1.3)。

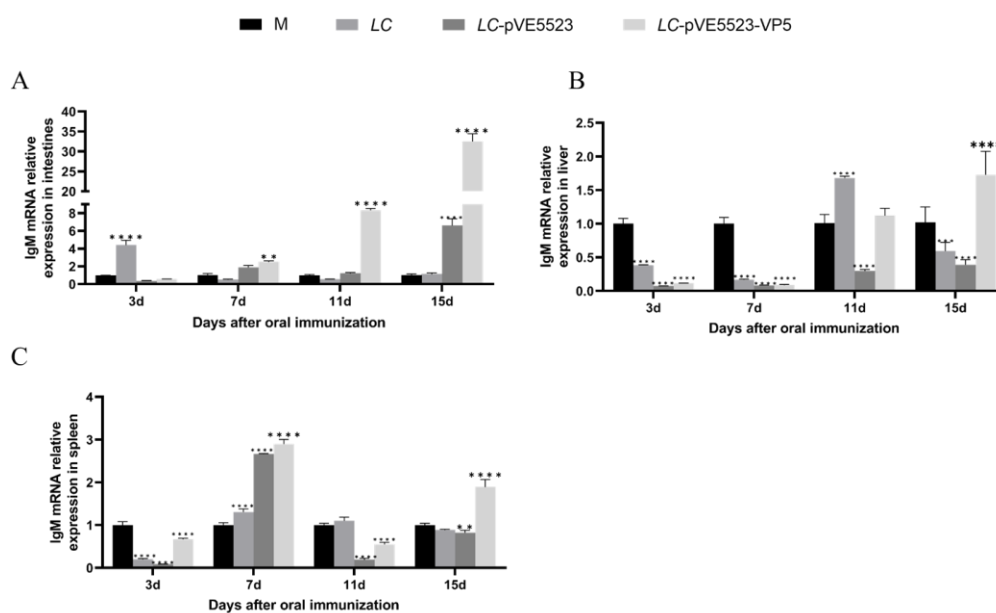
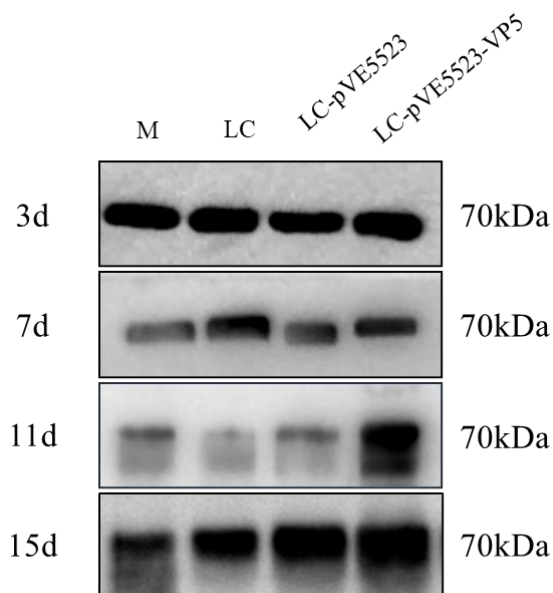


图 4.5.1.1 口服免疫后在 IgM mRNA 在草鱼肠道 (A)、肝脏 (B)、脾脏 (C) 的相对表达量

Figure 4.5.1.1 The relative expression of IgM mRNA in grass carp intestine (A), liver (B) and spleen (C) after oral immunization

分别于口服免疫的第 3 d、7 d、11 d、15 d 采集不同组别的草鱼组织，并以 β -actin 作为对照基因，做 Q-PCR，单一模板重复 3 次。



IB: IgM

图 4.5.1.2 Western blot 检测草鱼血清中 IgM 水平变化

Figure 4.5.1.2 Western blot detected changes in IgM levels in grass carp serum

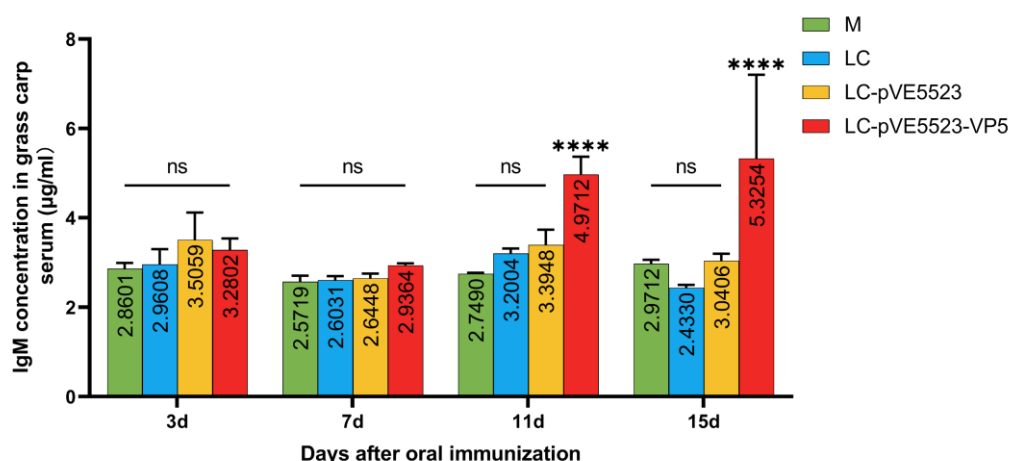


图 4.5.1.3 鱼免疫球蛋白 M (IgM) 酶联免疫分析试剂盒 (ELISA) 测定各组草鱼血清中 IgM 浓度

Figure 4.5.1.3 Fish immunoglobulin M (IgM) enzyme-linked immunoassay kit (ELISA) was used to determine the IgM concentration in grass carp serum in each group

4.5.2 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫上调草鱼 *IFN* mRNA 的表达

Q-PCR 检测草鱼部分组织中 *IFN* 基因的 mRNA 表达情况。结果显示，在肠道中 LC-pVE5523-VP5 组的 *IFN* mRNA 表达量在 15d 内呈现先上调再下降的趋势，前 7d 各组基本持平，在 11d 和 15d 时 LC-pVE5523-VP5 组表达量高于其他各组(图 4.5.2 A)。在脾脏中 LC-pVE5523-VP5 组呈现相同的趋势，在 11d 时其表达量远高于其他各组(图 4.5.2 B)。上述结果表明，口服 LC-pVE5523-VP5 后可以激发免疫刺激，促进草鱼的 *IFN* 的表达。

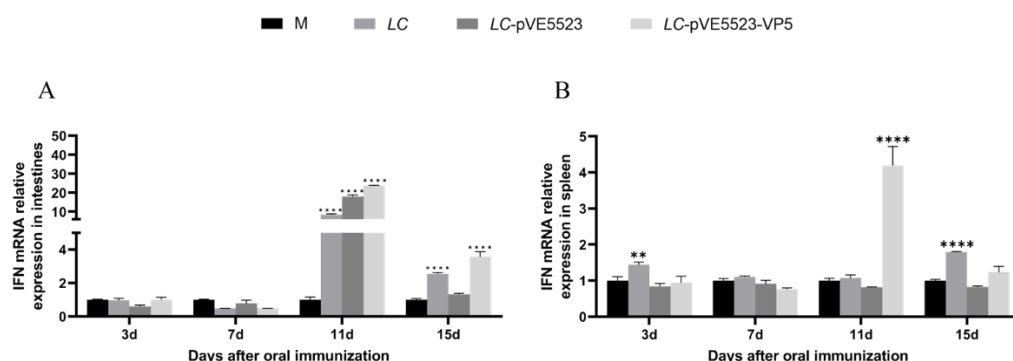


图 4.5.2 口服免疫后 *IFN* mRNA 在草鱼肠道 (A)、脾脏 (B) 的相对表达量

Figure 4.5.2 The relative expression of *IFN* mRNA in grass carp intestine (A) and spleen (B) after oral immunization

分别于口服免疫的第 3d、7d、11d、15d 采集不同组别的草鱼组织，并以 β -actin 作为

对照基因，做 Q-PCR，单一模板重复 3 次。

4.5.3 攻毒后草鱼 *IFN* 和 *IgM* mRNA 在组织中的相对表达量

为了进一步研究经过口服 LC-pVE5523-VP5 后免疫后的草鱼，在经过攻毒之后的相关免疫应答情况。采用 Q-PCR 检测草鱼部分组织中 *IFN*、*IgM* 基因的 mRNA 表达情况。

IFN mRNA 相对表达量结果显示，在肠道中 LC-pVE5523-VP5 组的 *IFN* mRNA 表达量在攻毒后内呈现先上调再趋于稳定的趋势，并在稳定后远高于其他各组(图 4.5.3 A)。在脾脏中 LC-pVE5523-VP5 组呈现先上调再下降的趋势，在 27 d 时其表达量最高且在 31 d 时下降后也远高于其他各组(图 4.5.3 B)。在肾脏中 LC-pVE5523-VP5 组表达量的趋势和脾脏相似，也并且在 27 d 和 31 d 时远高于其他各组(图 4.5.3 C)。

IgM mRNA 相对表达量结果显示，在攻毒之后，肠道中 LC-pVE5523-VP5 组的表达量依然遥遥领先其他各组，在 27 d 和 31 d 时趋于平衡(图 4.5.3 D)。

上述结果表明，经过口服 LC-pVE5523-VP5 后免疫后，即使停止口服疫苗饲料，再进行攻毒处理，依然可以持续激发草鱼的免疫应答，促进草鱼的 *IFN* 和 *IgM* 基因的表达，增加草鱼抵御病毒的能力。

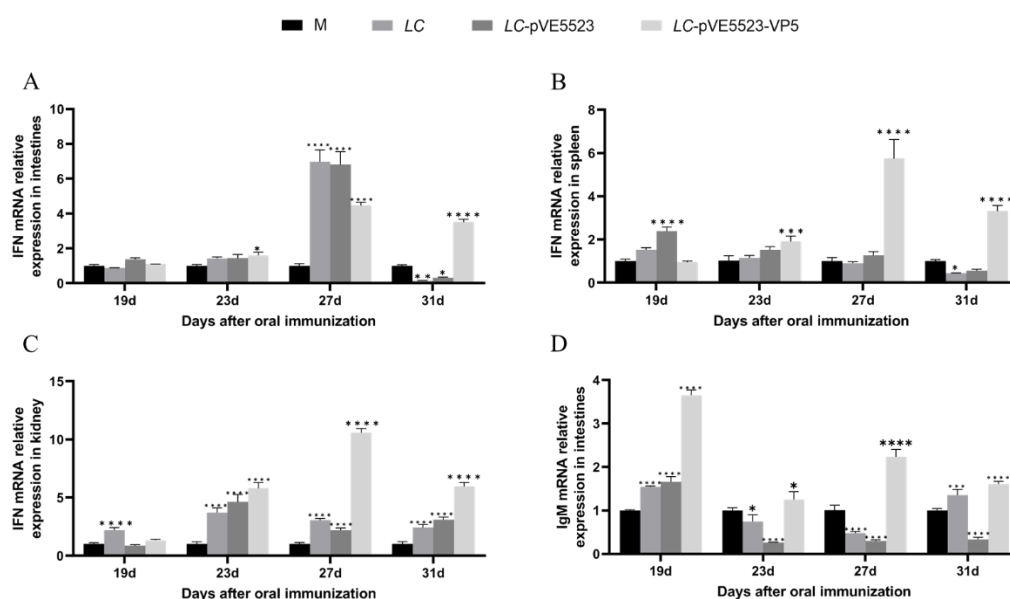


图 4.5.3 攻毒后 *IFN* mRNA 在草鱼肠道 (A)、脾脏 (B)、肾脏 (C) 以及 *IgM* mRNA 在草鱼肠道 (D) 中的相对表达量

Figure 4.5.3 After challenge, relative expression of *IFN* mRNA in grass carp intestine (A), spleen (B), kidney (C). And the *IgM* mRNA relative expression in grass carp intestine (D)

分别于攻毒后的第 3 d、7 d、11 d、15 d 分别对应图中 19 d、23 d、27 d、31 d 时，采集不同组别的草鱼组织，并以 β -actin 作为对照基因，做 Q-PCR，单一模板重复 3 次。

4.5.4 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫对草鱼肠道等组织没有损害

为了探究口服 LC-pVE5523-VP5 干酪乳杆菌是否会对草鱼肠道造成损害,在口服免疫期间对草鱼的肠道进行了抽样解剖观察。并未发现有出血、溃烂等情况(图 4.5.4.1)。结合定量数据来看,各组织在口服免疫期间(前 15 d) *IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 大部分处于较低的表达量,而在攻毒之后(15d 之后)显示出不同程度的波动。

在肠道中 *IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 三者的 mRNA 水平相比较于第 3 d 的初始水平而言,前 15 d 虽有显著上升的趋势,但表达量并不高。*IL1 β* 和 *IL8* 的表达量,而 *TNF α* 在经过攻毒之后从 19 d 到 31 d 呈现先上升后下降稳定至低水平的趋势(图 4.5.4.2 A)。

在肝脏中 *IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 三者的 mRNA 水平在口服免疫期间也处于低水平状态。*IL1 β* 和 *TNF α* 的水平在口服免疫期间的 15 d 均处于无显著变化的区间,在攻毒后开始呈现先上升后下降的趋势,而 *IL8* 则是在免疫的第 15 d 达到一个小高峰,经过停止口服以及攻毒之后在 19 d 有所下降,但是又 23 d 时在达到了一个较高的水平,随后逐步回降(图 4.5.4.2 B)。

在脾脏中 *IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 三者的 mRNA 水平在前 15 d 口服免疫期间有小幅先上升后下降的情况,*TNF α* 则无明显变化。三者攻毒之后的表达量显现出迅速上调再下降的趋势(图 4.5.4.2 C)。

在肾脏中 *IL1 β* 、*IL8*、*TNF α* 三者的 mRNA 水平在前 15 d 口服免疫期间均处于低水平状态且无显著变化。在进行攻毒之后三者的 mRNA 表达量有不同程度的上调。并且都在第 23 d 时表达量达到最高,随后开始下降然后趋于平衡(图 4.5.4.2 D)。

上述结果表明,口服 LC-pVE5523-VP5 干酪乳杆菌基本不会对以草鱼肠道为主等各部分组织造成炎症等损害。从数据上来看,相关 mRNA 的表达量普遍在攻毒之后呈现出显著上升再下降的共同规律,说明口服 LC-pVE5523-VP5 可以对病毒的侵染起到抵抗作用。



图 4.5.4.1 草鱼口服疫苗饲料后肠道解剖图

Figure 4.5.4.1 Intestinal anatomy of grass carp after immunization with oral vaccine feed

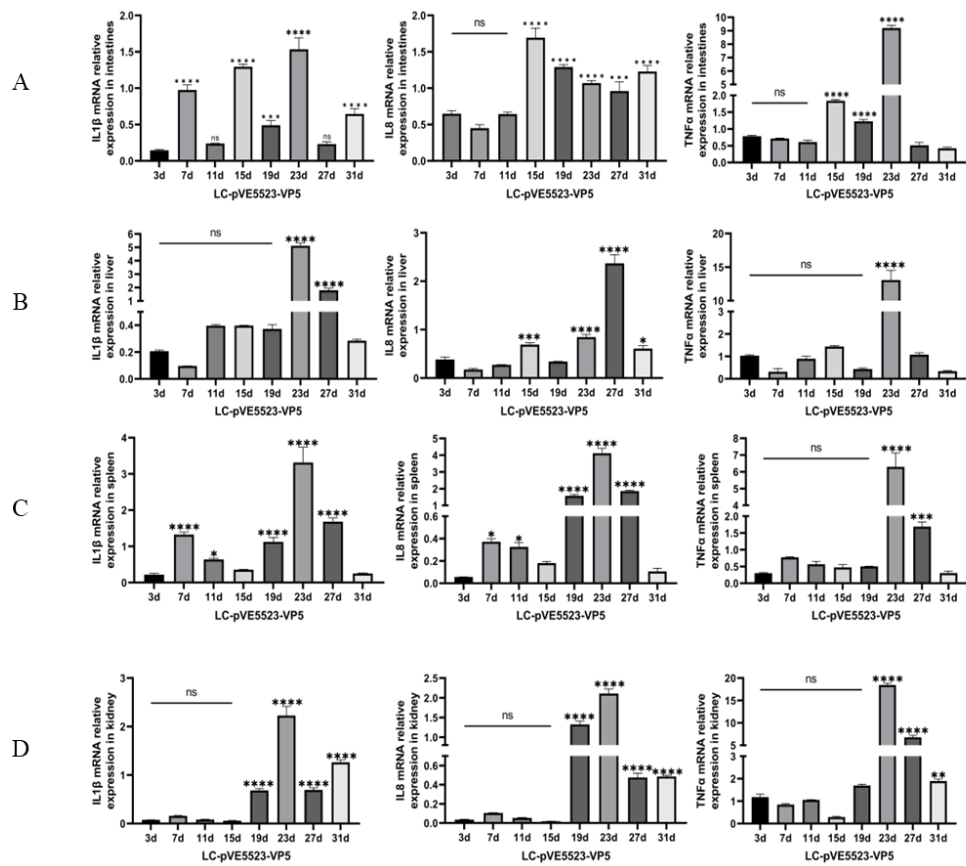
图 4.5.4.2 口服 LC-pVE5523-VP5 免疫以及攻毒后 $IL1\beta$ 、 $IL8$ 、 $TNF\alpha$ 分别在肠道 (A)、肝脏 (B)、脾脏 (C) 和肾脏 (D) 中的 mRNA 相对表达量

Figure 4.5.4.2 Relative mRNA expression of *IL1 β* , *IL8*, and *TNF α* in the intestine (A), liver (B), spleen (C) and kidney (D) after oral *LC*-pVE5523-VP5 immunization and challenge

分别于整个试验周期中的第 3 d、7 d、11 d、15 d、19 d、23 d、27 d、31 d 时采集不同组别的草鱼组织，并以 β -actin 作为对照基因，做 Q-PCR，单一模板重复 3 次。

4.5.5 口服 *LC*-pVE5523-VP5 能有效降低攻毒后草鱼各组织病毒载量

由于口服 *LC*-pVE5523-VP5 能够激活草鱼免疫应答，因此本实验又通过分析使用 GCRV 感染之后，病毒在草鱼各组织中的载量变化以及草鱼的存活率来评价其保护能力。

为探究口服免疫后，疫苗对组织的保护作用。对感染 GCRV 的草鱼的肠道、肝脏、脾脏、肾脏进行取样，通过 Q-PCR 对其病毒载量进行检测。结果显示，在病毒感染后，与对照组 M 相比，*LC* 和 *LC*-pVE5523 组在上述各组织中的病毒载量均处于较高水平，而 *LC*-pVE5523-VP5 组在肠道、肝脏、脾脏、肾脏组织病毒载量在感染初期（19 d）均低于其他各组，之后便处于一个较低的水平(图 4.5.5 A~D)，说明口服 *LC*-pVE5523-VP5 可有效抵御 GCRV 的侵染。在进行 GCRV 攻毒之后，经过 15 天的统计，*LC*-pVE5523-VP5 组的存活率(74 %)明显高于对照组(35 %)，*LC* 组 (20 %)和 *LC*-pVE5523 组(27 %) (图 4.5.5 E)。

上述结果表明，在面对 GCRV 的侵染时，草鱼口服 *LC*-pVE5523-VP5 后能够起到有效的预防作用。*LC*-pVE5523-VP5 组死亡率 26 %相对于对照组 M 死亡率 65 %，计算出 *LC*-pVE5523-VP5 组的免疫保护率为 60 %，说明其具有较好的免疫保护效果。

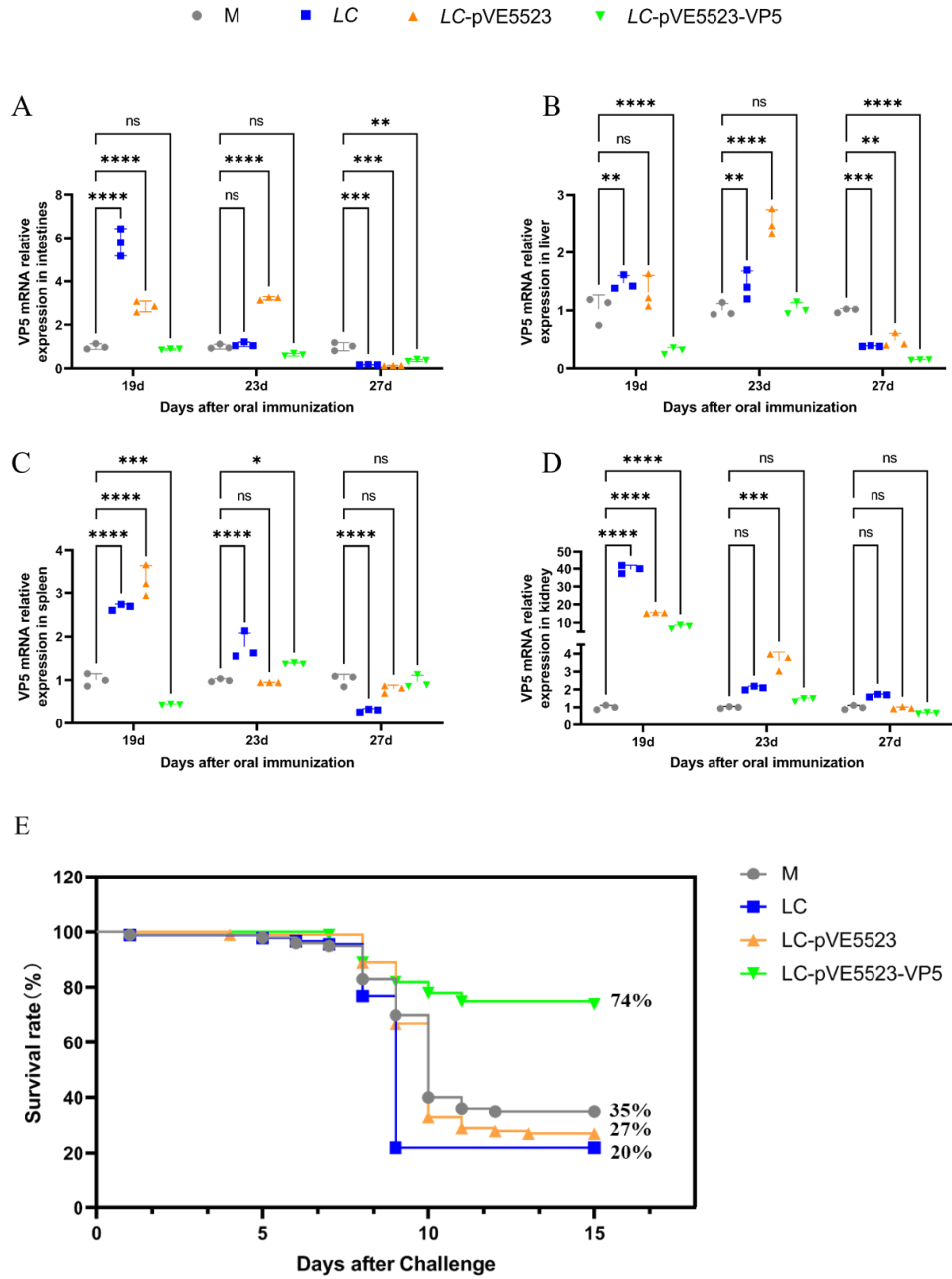


图 4.5.5 GCRV 感染后的组织病毒载量以及存活率曲线

Figure 4.5.5 Tissue viral load and survival rate curve after GCRV infection

以 β -actin 作为对照基因，Q-PCR 检测攻毒后 GCRV 873-VP5 分别在肠道 (A)、肝脏 (B)、脾脏 (C) 和肾脏 (D) 中的 mRNA 相对表达量。各组草鱼(n=100)感染后的存活率 (E)。注：攻毒后 3 d 到 15 d 对应实验总周期中的 19 d 到 31 d。

4.6 LC-pVE5523-VP5 重组干酪乳杆菌在肠道能够持续存在

为了检测在口服免疫期间疫苗饲料是否被草鱼有效摄入，在投喂第 3 天

对各组草鱼进行肠道随机取样, 再进行 EM 抗性筛选 (图 4.6.1 A)。经过 EM 抗性筛选后对单一菌落进行挑取培养, PCR 鉴定片段长度符合 (图 4.6.1 B), 即代表疫苗被草鱼成功摄入。

在经过 15 天口服免疫之后停止投喂菌粉饲料, 改换成普通草鱼饲料进行投喂, 饲养的量和频次不变。在饲喂 15 天后对各组肠道进行随机取样检测 (图 4.6.2 A)。经过 EM 抗性筛选后对单一菌落进行挑取培养, 经 PCR 鉴定结果显示片段长度符合 (图 4.6.2 B), 表明重组干酪乳杆菌在停止投喂之后能在草鱼复杂的肠道环境至少存活 15 天。

上述结果表明, 使用冻干菌粉结合饲料的方式进行投喂, 不影响草鱼的摄食。并且在停止口服菌粉后, 菌体能够在复杂的草鱼肠道存活较长的一段时间。

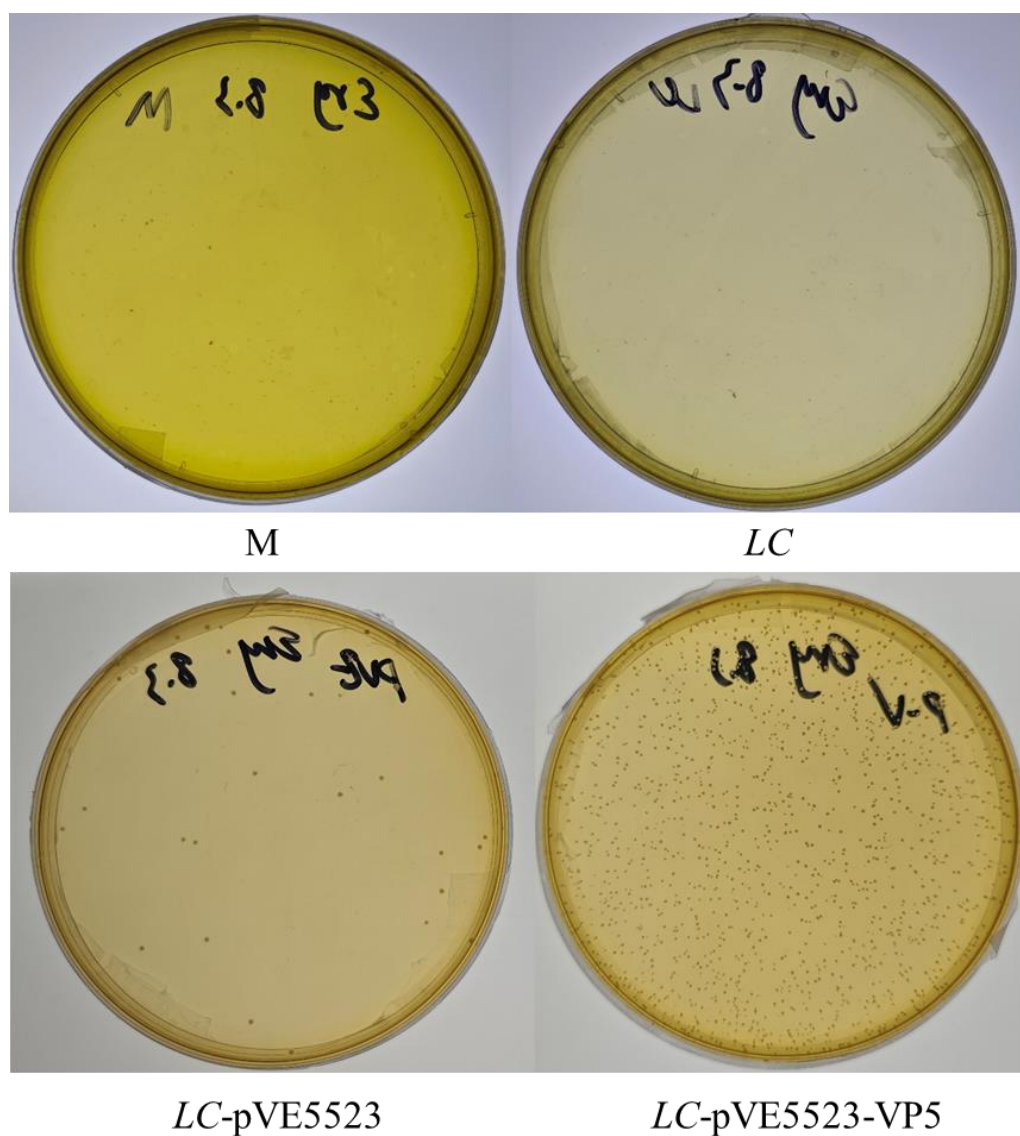


图 4.6.1 A 口服 3 d 后, 对各组肠道菌落进行红霉素耐药筛选

Figure 4.6.1 A After feeding for 3 d, the intestinal colonies of each group were screened for erythromycin resistance

在各组口服相应饲料 3 d 时，分别取不同肠段进行菌落鉴定（红霉素抗性筛选），检测疫苗是否被草鱼摄入。

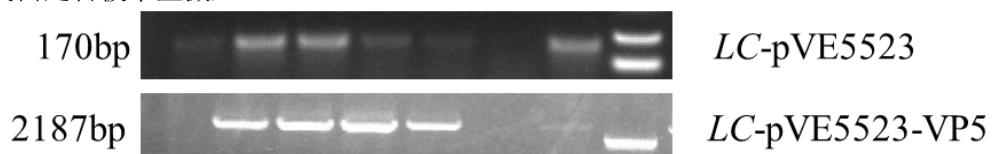


图 4.6.1B 肠道菌落定植鉴定结果

Figure 4.6.1 B Results of identification of intestinal colony colonization

对菌落进行 PCR，产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳后显影。注：LC-pVE5523 鉴定引物为 pVE-Sal-F/R，LC-pVE5523-VP5 鉴定引物为 pVE5523-F/R

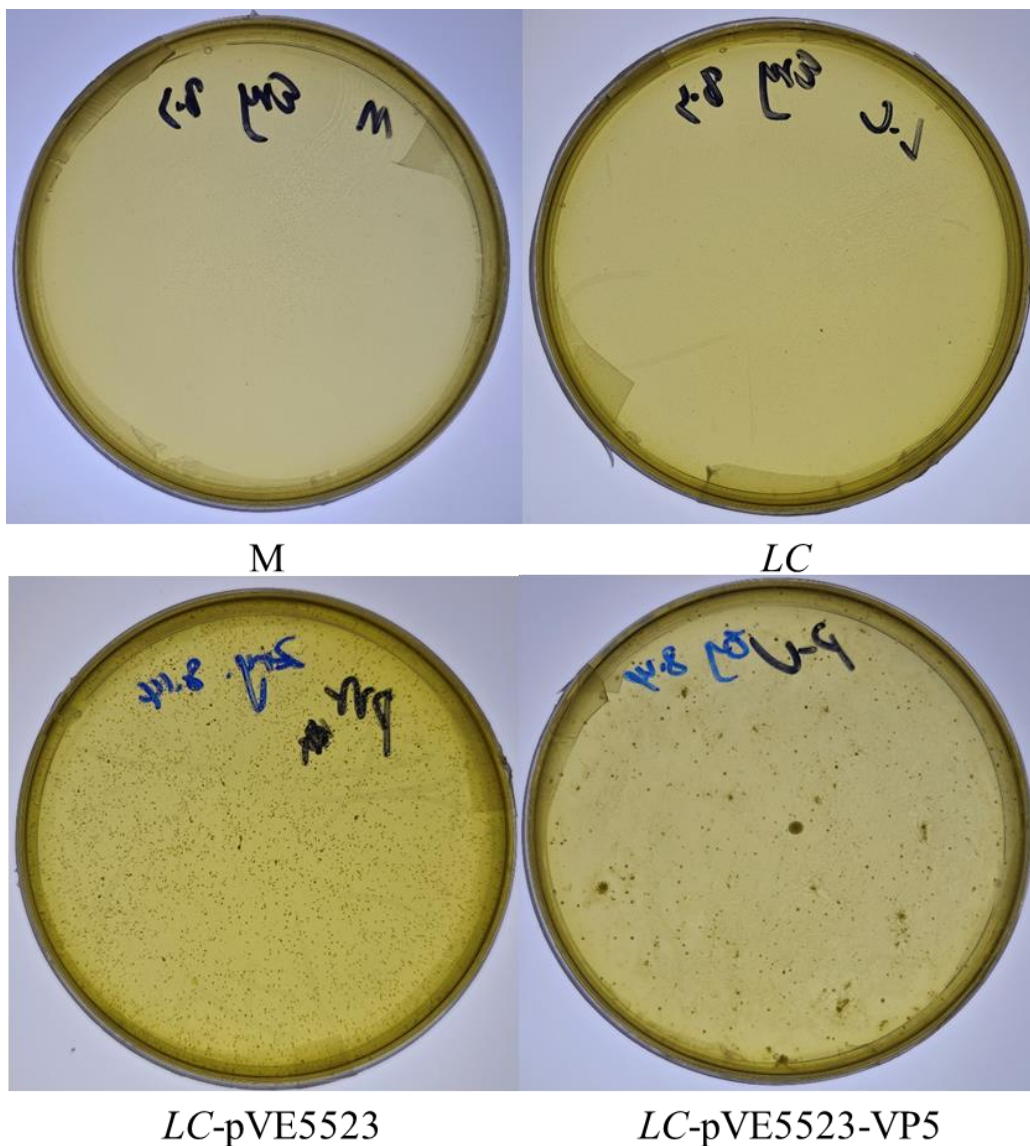


图 4.6.2 A LC-pVE5523-VP5 疫苗的定植能力

Figure 4.6.2 A The colonization ability of *LC-pVE5523-VP5* vaccines by colony count

各组在停止口服 15 d 后。分别取不同肠段进行菌落鉴定（红霉素抗性筛选）

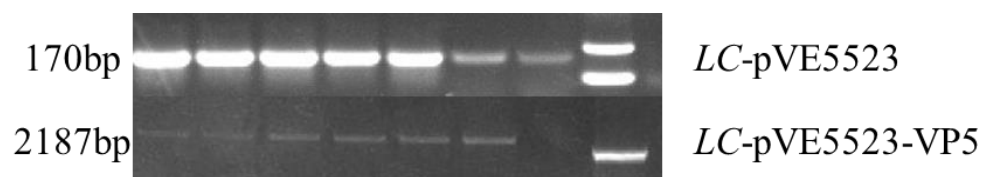


图 4.6.2 B 肠道菌落定植鉴定结果

Figure 4.6.2 B Results of identification of intestinal colony colonization

对菌落进行 PCR，产物进行 1 %琼脂糖凝胶电泳后显影。鉴定引物同上述一致。

第五章 讨论

时至今日，鱼用疫苗在鱼类抗病研究领域内仍然是一个研究热点。其中也不乏相关免疫制剂的研究^[59-61]。正是鱼用疫苗能带给鱼类免疫保护并起到一定的预防作用，进而给鱼类养殖业带来福泽。因此疫苗的研究开发工作也都在迅速发展，深度也在不断增加，并且在安全性和环保方面也越来越受到重视。新的鱼用疫苗的研发能够有效减少化学药物的滥用，保证对环境友好，其次优化的免疫方式，能够减少人力物力的消耗。在目前运用的免疫方式中，浸泡和腹腔内注射是用于鱼类疫苗接种的两种最常用的方法^[62]，而口服免疫途径也正在不断被人们探索，有望成为一种优良的免疫方式^[22]。

口服免疫是诱导粘膜免疫的一个有效途径。B 细胞在哺乳动物获得性体液免疫中起着至关重要的作用^[63]，同样在硬骨鱼中鱼类 B 细胞已被证明对免疫刺激有反应并分化为抗体分泌细胞^[64]，IgM 抗体可以在粘膜内局部产生，以响应抗原^[65,66]。IgM 是鱼类主要的免疫球蛋白同型，是一项硬骨鱼特异性免疫反应的重要指标^[67]。而本研究中口服 LC-pVE5523-VP5 免疫后，草鱼部分组织的 IgM mRNA 相对表达量显著增加（图 4.5.1.1）。在免疫后，评价疫苗的重要指标之一是鱼的血清抗体水平^[68]，在本研究中的 Western blot 检测以及 ELISA 试剂盒检测中草鱼血清中的 IgM 含量都有相应的提升（图 4.5.1.2、4.5.1.3）。IFN 是一种被广泛研究的参与抗病毒过程的细胞因子^[69,70]。IFN 主要以平衡的方式调节先天免疫反应^[71]。先天免疫是细胞抵御微生物感染的早期防线^[72,73]。且 IFN 的表达有利于抵御 GCRV 侵染^[74]，在口服 LC-pVE5523-VP5 免疫以及攻毒后，草鱼肠道以及脾脏的 IFN mRNA 的相对表达量有显著提升（图 4.5.2），攻毒后在脾脏和肾脏的表达量也都有显著的上调（图 4.5.3）。IL1 β 可以修复受损组织并抵抗外来抗原的压力，在先天和获得性免疫反应中都发挥着重要的作用^[75]。IL8 作为调节炎症的介质，在免疫过程中有重要的调节作用^[76]。TNF α 可以参与机体炎性反应和免疫应答的调节。因此免疫因子的定量检测的结果具有一定的参考性，而本实验在攻毒后，LC-pVE5523-VP5 组的 IL1 β 、IL8、TNF α 的表达量显著上调，在后期逐渐恢复至正常水平（图 4.5.4.2），说明口服免疫后对宿主抗病毒起到了相应的作用。

口服疫苗要发挥作用，关键点之一在于必须在将其呈递到发挥作用的位置之前不被破坏，这也是口服疫苗在递送过程中必须面临的一个问题：如何保证疫苗被稳定的摄入？目前基本上都通过各种封装技术将免疫原保护起来免受复杂肠道环境的影响。加工口服疫苗离不开合适的封装技术，将包括

食物成分、细胞或者其他物质在内的材料装入胶囊^[77]。在当下的研究中关于口服疫苗的包装方式层出不穷,常见的通过海藻酸盐、纳米材料、益生菌以及卤素生物等^[78]。海藻酸钠被用于制作微囊化疫苗应对 GCRV 对草鱼的感染,并取得了一定的效果^[79]。纳米技术近年来在食品健康、分子免疫等^[80-82]领域都有着不错的发展,在鱼类免疫中也有所应用,如壳聚糖纳米颗粒、聚乳酸-乙醇酸、纳米聚合物和病毒样颗粒(VLP)等有机材料已被用于纳米疫苗开发,用来对抗鱼类疾病^[83]。

而以益生菌作为疫苗载体的主要就是乳杆菌,因其具备诸多优势^[84],已经成为一个研究热点。目前也已经出现了基于干酪乳杆菌和海藻酸-壳聚糖微胶囊口服苗的相关研究^[85],通过封装将益生菌细胞包裹起来,为抵御环境压力提供了物理屏障^[86]。从而减少了益生菌细胞在加工、储存和消化过程中不可避免的活力损失^[87]。

在本实验采用脱脂乳粉作为冻干混合剂保证了干燥后菌体的质量。之后再按照一定比例与草鱼饲料(原料/粉末)混合,经压制、制粒、烘干成型。真空冷冻干燥是物料在低温进行升华脱水的一种干燥技术。在冷冻过程中形成的冰晶可能会对细胞膜造成物理破坏^[88],为了保证益生菌在这一过程中的活力,一般会添加各种保护剂。而碳水化合物在冻干过程中对益生菌具有保护作用。Buitink 等^[89]发现蛋白质的玻璃化转变温度(Tg)高于糖,表明蛋白质在玻璃形成中起重要作用。因此,包括脱脂牛奶、乳清蛋白、血清或血清白蛋白和蛋白胨在内的蛋白质是有效的干燥保护剂^[90,91]。在 chen 等^[92]的实验中也证明了脱脂乳粉的加入确实能够起到保护菌体的作用。

本研究选择干酪乳杆菌作为疫苗载体正是注重其安全性以及可操作性。在借鉴前人的经验下,结合乳杆菌脱水可以复性的特点,萌生出将其制备成为冻干粉的想法。由于脱水程度非常高,包装后的冻干粉可在室温下长时间贮存。物料经过冻干后,其内部多孔海绵状,复水化性能优异,且样品的干燥过程是在极低的温度下完成的,能够充分保留了原料中的营养成分和活性物质^[93]。乳杆菌通常菌以液体、喷雾干燥以及冷冻干燥等形式进行保存。在这些方式中,冻干或冻干细菌已经在微生物学中使用了几十年,这些方法已被证明是保存细菌最方便和成功的方法^[94]。这为本实验采用真空冷冻干燥去制备大量疫苗菌粉的可行性提供了依据。在介绍中已经提到使用包括但不限于脱脂牛奶的蛋白质可以作为有效保护乳杆菌的活性,因此,乳杆菌疫苗的活性也得以保留,以上便为本研究的下一步进行提供了可行性。

值得一提的是关于本实验的电转化和鉴定,根据方法中提到的操作,在本实验中设置了多个电压梯度,发现电压大于 2 kV 会产生爆炸声,易造成

转化失败。另外在鉴定时通过反复验证时发现, *LC-pVE5523* 组可以直接通过菌液 PCR 的方式成功鉴定, 而 *LC-pVE5523-VP5* 组菌液 PCR 鉴定成功率非常低, 因此需要配合溶菌酶进行质粒提取再经 PCR 验证, 这为后续研究者使用 *pVE5523* 乳杆菌分泌表达载体提供了部分经验。

本实验显示, 口服 *LC-pVE5523-VP5* 干酪乳杆菌能激活草鱼的免疫应答, 促进相关免疫基因的表达, 并且在攻毒后各组织病毒载量低(图 4.5.5 A~D)。存活率是评价疫苗免疫效果的重要指标^[95], 而本实验中的攻毒后存活率也有良好的表现(图 4.5.5 E)。与此同时, 经过免疫后也能够提高草鱼血清中 IgM 的含量(图 4.5.1.2、4.5.1.3)。并且能在草鱼肠道定植较长时间(图 4.6.2 A~B)。另外, 在口服免疫时接种益生菌疫苗的有效剂量也很重要^[96]。加之所有的免疫保护处理组都可能受到实验条件、对象和方法等各种因素的影响^[97]。因此, 本实验还存在优化的空间。通过探究疫苗的最佳剂量, 以及更加严格的控制变量, 可以使免疫保护率更高。

言而总之, 在本研究中提供了一种以 GCRV 外衣壳蛋白 VP5 为免疫原、干酪乳杆菌为疫苗载体, 基于真空冷冻干燥的工艺的口服疫苗制备方法。具有低成本、易制备、高效率等特点。在鱼用口服疫苗上赋予经济、高效、便捷的特点使其具备商业化的潜力, 这为鱼类口服疫苗的研制以及商品化提供了一定的参考价值。

第六章 结论与展望

6.1 主要结论

- (1) 口服 *LC-pVE5523-VP5* 能够促进草鱼免疫相关基因的上调；
- (2) 口服 *LC-pVE5523-VP5* 能够提升草鱼血清中 IgM 的水平；
- (3) 口服 *LC-pVE5523-VP5* 不会损伤草鱼肠道等组织，且在攻毒后各组织炎症相关基因的表达量呈现先上调后下降的趋势；
- (4) 停止口服 *LC-pVE5523-VP5* 后，干酪乳杆菌仍然能在草鱼复杂的肠道环境定植很长一段时间。

6.2 创新点

通过将 GCRV 的外衣壳蛋白 VP5 构建至乳杆菌分泌表达载体 pVE5523，以干酪乳杆菌作为口服抗原呈递载体，通过发酵菌液与脱脂乳混合，使用真空冷冻干燥技术获得冻干菌粉，最后将冻干菌粉结合至草鱼饲料。整个过程较为系统且操作便捷，成本低廉，成品产出率高。能保证草鱼稳定摄入疫苗。本研究的选题以及与相关工艺的结合理念都较为新颖且具有实用性，具备商业化的潜力。

6.3 展望

- (1) 研究 *LC-pVE5523-VP5* 口服疫苗冻干菌粉的最佳添加比例；
- (2) 优化 *LC-pVE5523-VP5* 疫苗饲料的制备工艺；
- (3) 研究 *LC-pVE5523-VP5* 最佳口服预防时间；
- (4) 基于 *LC-pVE5523-VP5* 现有的技术路线，开发新的口服疫苗；
- (5) 在大型养殖基地尝试应用并评估效果。

参考文献

- [1] Rao Y, Su J. Insights into the Antiviral Immunity against Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Reovirus (GCRV) in Grass Carp[J]. Journal of Immunology Research, 2015.
- [2] Dong Z, Zhang J, Ji X, et. al. Molecular cloning, characterization and expression of cathepsin D from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1207-1214.
- [3] 刘世旭, 王庆, 常藕琴, 等. 基因I型草鱼呼肠孤病毒 VP7 蛋白合成肽抗体的制备及应用[J]. 南方农业学报, 2018, 49(9): 1849-1857.
- [4] 黄献虹. 淡水养殖鱼类常见疾病及其防治[J]. 农家参谋, 2022(8): 90-92.
- [5] 刘智宏. 淡水养殖鱼类常见疾病及防制对策[J]. 今日畜牧兽医, 2021, 37(12): 41-42.
- [6] Dai Z, Li J, Hu C, et. al. Transcriptome data analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) infected by reovirus provides insights into two immune-related genes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 64: 68-77.
- [7] Gao T, Gao C, Wu S, et. al. Recombinant baculovirus-produced grass carp reovirus virus-like particles as vaccine candidate that provides protective immunity against GCRV genotype II infection in grass carp[J]. Vaccines, 2021, 9(1): 53.
- [8] 陈延, 王炜, 柯丽华, 等. 草鱼出血病病毒的糖蛋白和结构多肽的抗原性[J]. 病毒学报, 1992(1): 57-61.
- [9] 邱涛, 张菁, 陆仁后, 等. 草鱼出血病病毒 873 株基因组外发现缺损性干扰颗粒的亚基因组成份[J]. 病毒学报, 2001(2): 140-143.
- [10] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 790-795.
- [11] 方勤, 丁清泉. 呼肠孤病毒内源性转录的结构基础[J]. 中国病毒学, 2004(5): 107-111.
- [12] Fan Y, Rao S, Zeng L, et. al. Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. The Journal of General Virology, 2013, 94(Pt 10): 2266-2277.
- [13] Benavente J, Martínez-Costas J. Avian reovirus: structure and biology[J]. Virus Research, 2007, 123(2): 105-119.
- [14] Dhayanithi N B, Kumar T T A, Arockiaraj J, et. al. Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract on immune protection and disease resistance in *Amphiprion sebae* against *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(1): 52-58.
- [15] Ebanks R O, Dacanay A, Goguen M, et. al. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and in vivo growth conditions[J]. Proteomics, 2004, 4(4): 1074-1085.
- [16] Dhar A K, Manna S K, Thomas Allnutt F C. Viral vaccines for farmed finfish[J]. Virusdisease, 2014, 25(1): 1-17.
- [17] Zeng W, Wang Q, Wang Y, et. al. Immunogenicity of a cell culture-derived inactivated vaccine against a common virulent isolate of grass carp reovirus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 473-480.
- [18] Collins C, Lorenzen N, Collet B. DNA vaccination for finfish aquaculture[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 85: 106-125.

- [19] Plant K P, LaPatra S E. Advances in fish vaccine delivery[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2011, 35(12): 1256-1262.
- [20] Su H, Su J. Cyprinid viral diseases and vaccine development[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 83: 84-95.
- [21] Duff D C P. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida* [J]. The Journal of Immunology, 1942, 44(1): 87-94.
- [22] 胡成钰, 张岩松, 徐小文. 鱼用疫苗研究进展[J]. 南昌大学学报(理科版), 2024, 48(1): 77-86+94.
- [23] 杨先乐, 夏春, 左文功, 等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究——生产性免疫试验[J]. 水产科技情报, 1992(01): 10-14.
- [24] 曾令兵, 杨先乐, 贺路, 等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗旋转瓶法大规模生产工艺[J]. 中国水产科学, 1998(2): 63-68.
- [25] 陈道印, 欧阳敏. 草鱼出血病简易灭活疫苗本地化制作与应用效果观察报告[J]. 江西农业学报, 2009, 21(10): 143-144.
- [26] 许淑英, 李焕林, 邓国成, 等. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果[J]. 水产学报, 1994(2): 110+112-117.
- [27] 周智愚. GCRV 弱毒疫苗与黄芪多糖免疫草鱼母本的免疫因子代间传递与表达特性[D]. 湖南农业大学, 2017.
- [28] 陈佳明. II型草鱼呼肠孤病毒稀有鮎鲫感染模型和疫苗评价模型的建立[D]. 上海海洋大学, 2021.
- [29] Vaz Farias T H, Arijo S, Medina A, et. al. Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 101: 186-191.
- [30] 汪梦竹, 蒲飞洋, 赵泽阳, 等. 新型疫苗的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(9): 141-147.
- [31] 宋新建. 草鱼呼肠孤病毒II型 S6 基因 DNA 疫苗的构建及免疫效果评价[D]. 华南农业大学, 2018.
- [32] 陶会竹. 拟态弧菌靶向 DNA 疫苗对肠巨噬细胞活性及抗原递呈相关基因转录的影响[D]. 安徽农业大学, 2018.
- [33] 江水清, 李婷, 张一楠, 等. 鱼用基因工程疫苗的研究概况[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 160-170.
- [34] Manning D, Leong J. Expression in *Escherichia-coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus[J]. Virology, 1990, 179(1): 16-25.
- [35] Valderrama K, Balado M, Rey-Varela D, et. al. Outer membrane protein FrpA, the siderophore piscibactin receptor of *Photobacterium damsela* subsp. piscicida, as a subunit vaccine against photobacteriosis in sole (*Solea senegalensis*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 94: 723-729.
- [36] 蔺玉珍, 王伟伟, 黄孔阳, 等. 鱼用疫苗免疫途径的研究概况(下)[J]. 科学养鱼, 2022(3): 50-52.
- [37] Z Z, H W, D Z, et al. Oral vaccination with recombinant *Lactobacillus casei* expressing *Aeromonas hydrophila* Aha1 against *A. hydrophila* infections in common carps[J]. Virulence, 2022, 13(1).
- [38] Doherty T M, Olsen A W, van Pinxteren L, et. al. Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(6): 3111-3121.

- [39] Jin P, Sun F, Liu Q, et. al. An oral vaccine based on chitosan/aluminum adjuvant induces both local and systemic immune responses in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Vaccine*, 2021, 39(51): 7477-7484.
- [41] Zhang W, Zhu C, Xiao F, et. al. pH-controlled release of antigens using mesoporous silica nanoparticles delivery system for developing a fish oral vaccine[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 644396.
- [42] Han B, Xu K, Liu Z, et. al. Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 948-954.
- [43] Thirumalaikumar E, Lelin C, Sathishkumar R, et. al. Oral delivery of pVAX-OMP and pVAX-hly DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (Cs-TTP) nanoparticles in Rohu, (*Labeo rohita*) for protection against *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 115: 189-197.
- [44] Halimi M, Alishahi M, Abbaspour M R, et. al. Valuable method for production of oral vaccine by using alginate and chitosan against *Lactococcus garvieae*/*Streptococcus iniae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 431-439.
- [45] Huang X, Ma Y, Wang Y, 等. Oral Probiotic Vaccine Expressing Koi Herpesvirus (KHV) ORF81 Protein Delivered by Chitosan-Alginate Capsules Is a Promising Strategy for Mass Oral Vaccination of Carps against KHV Infection[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(12): e00415-21.
- [46] Abdo Z, LeCureux J, LaVoy A, et al. Impact of oral probiotic *Lactobacillus acidophilus* vaccine strains on the immune response and gut microbiome of mice[J]. *Plos One*, 2019, 14(12): e0225842..
- [47] Ruiz L, Margolles A, Sanchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 396.
- [48] Kajikawa A, Nordone S K, Zhang L, et. al. Dissimilar properties of two recombinant *Lactobacillus acidophilus* strains displaying *Salmonella* FliC with different anchoring motifs[J]. *applied and environmental microbiology*, 2011, 77(18): 6587-6596.
- [49] Wells J M, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(5): 349-362.
- [50] 付婷婷, 李昌, 王茂鹏, 等. 重组 PCV3 Cap 蛋白植物乳杆菌的构建与表达验证[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(6): 1052-1057.
- [51] 周晗. 表达猪轮状病毒 VP7 与 NSP4-VP7 基因重组干酪乳杆菌的构建及免疫学评价[D]. 东北农业大学, 2013.
- [52] Kiyono H, Azegami T. The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development[J]. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2015, 91(8): 423-439.
- [53] Shao L, Sun X, Fang Q. Antibodies against outer-capsid proteins of grass carp reovirus expressed in *E. coli* are capable of neutralizing viral infectivity[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 347.
- [54] 郭思杰. 猪流行性腹泻基因工程疫苗的研制与应用[D]. 湖南农业大学, 2022.
- [55] 格日勒图, 王艳霞, 包秋华, 等. 电转化方法将外源性质粒导入干酪乳杆菌的研究[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(2): 9-13.
- [56] 任婧, 李楠, 陈臣, 等. 干酪乳杆菌 LC2W 最优电转化条件的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(4): 1028-1032.
- [57] 陈华蓉. 草鱼II型细胞因子受体基因 CRFB1 和 CRFB5 的克隆、鉴定[D]. 南昌大学, 2015.
- [58] Liu Y, Du H, Wang S, et. al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) TNK1 modulates JAK-

- STAT signaling through phosphorylating STAT1[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 116: 103951.
- [59] 吴初新, 李东明, 余新建, 等. 重组干扰素、趋化因子合剂对草鱼免疫保护作用[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2014, 38(1): 91-95.
- [60] 余新建, 李东明, 马梅生, 等. 重组干扰素上调草鱼干扰素系统基因的表达[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(6): 1184-1188.
- [61] 汤雅男, 杨攀, 胡成钰. Z-DNA 及其生物学功能[J]. *生命科学*, 2009, 21(1): 72-75.
- [62] Bøgvold J, Dalmo R A. Protection of teleost fish against infectious diseases through oral administration of vaccines: Update 2021[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 10932.
- [63] Cui Z-W, Zhang X-Y, Wu C-S, et. al. Membrane IgM⁺ plasma cells in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Insights into the conserved evolution of IgM⁺ plasma cells in vertebrates[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 106: 103613.
- [64] Ye J, Kaattari I M, Ma C, et. al. The teleost humoral immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1719-1728.
- [65] Findly R C, Zhao X, Noe J, et. al. B cell memory following infection and challenge of channel catfish with *Ichthyophthirius multifiliis*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 39(3): 302-311.
- [66] Zhao X, Findly R C, Dickerson H W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 500-508.
- [67] Lorenzen N, Lapatra S E. Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 345-360.
- [68] Gao Y, Pei C, Sun X, et. al. Plasmid pcDNA3.1-s11 constructed based on the S11 segment of grass carp reovirus as DNA vaccine provides immune protection[J]. *Vaccine*, 2018, 36(25): 3613-3621.
- [69] Zhang Y-B, Gui J-F. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 193-202.
- [70] Sun C, Liu Y, Hu Y, et. al. Gig1 and Gig2 homologs (CiGig1 and CiGig2) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) display good antiviral activities in an IFN-independent pathway[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 477-483.
- [71] Su J. The discovery of type IV interferon system revolutionizes interferon family and opens up a new frontier in jawed vertebrate immune defense[J]. *Science China-Life Sciences*, 2022, 65(11): 2335-2337.
- [72] Li M, Hu J, Mao H, et. al. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) KAT8 inhibits IFN 1 response through acetylating IRF3/IRF7[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 808159.
- [73] Xu X, Li M, Deng Z, et. al. cGASa and cGASb from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) play opposite roles in mediating type I interferon response[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 125: 104233.
- [74] Xu X, Li M, Deng Z, et. al. Grass carp Mre11A activates IFN 1 response by targeting STING to defend against GCRV infection[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 116: 103909.
- [75] 杨潇. 草鱼白细胞介素 1 β 诱导表达的负调控机制及其在炎症反应中的意义[D]. 电子科技大学, 2016: 101.
- [76] 赵杰. 草鱼 IL-8 基因在炎症反应中的功能研究[D/OL]. 苏州大学, 2014: 86[2024-02-29].

- [77] Gibbs B, Kermasha S, Alli I, et. al. Encapsulation in the food industry: a review[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 1999, 50(3): 213-224.
- [78] Mutoloki S, Munang'andu H M, Evensen Ø. Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction[J]. Frontiers in Immunology, 2015, 6.
- [79] Xu C, Qiao M, Huo X, et. al. An oral microencapsulated vaccine loaded by sodium alginate effectively enhances protection against GCRV infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 848958.
- [80] Neethirajan S, Jayas D S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries[J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(1): 39-47
- [81] Dacoba T G, Olivera A, Torres D, et. al. Modulating the immune system through nanotechnology[J]. Seminars in Immunology, 2017, 34(C): 78-102.
- [82] Li X, Omonova Tuychi Qizi C, Mohamed Khamis A, et. al. Nanotechnology for enhanced cytoplasmic and organelle delivery of bioactive molecules to immune cells[J]. Pharmaceutical Research, 2022, 39(6): 1065-1083.
- [83] Angulo C, Tello-Olea M, Reyes-Becerril M, et. al. Developing oral nanovaccines for fish: a modern trend to fight infectious diseases[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(3): 1172-1192.
- [84] Galdeano C, Perdigón G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2006, 13(2): 219-226.
- [85] Chang J, Zhu W, Huo X, et al. Oral *Lactobacillus casei* expressing VP56310–500 and adjuvant flagellin C delivered by alginate-chitosan microcapsules remarkably enhances the immune protection against GCRV infection in grass carp[J]. Aquaculture, 2023, 567: 739301.
- [86] Burgain J, Gaiani C, Linder M, et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 104(4): 467-483.
- [87] Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(4): 291-311.
- [88] Fonseca F, Béal C, Corrieu G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage[J]. The Journal of Dairy Research, 2000, 67(1): 83-90.
- [89] Buitink J, van den Dries I J, Hoekstra F A, et. al. High critical temperature above T(g) may contribute to the stability of biological systems[J]. Biophysical Journal, 2000, 79(2): 1119-1128.
- [90] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205-229.
- [91] Abadias M, Teixidó N, Usall J, et. al. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(6): 856-861.
- [92] Chen H, Chen S, Li C, et. al. Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2015, 45(5): 463-475.
- [93] Liu Y, Zhang Z, Hu L. High efficient freeze-drying technology in food industry[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(12): 3370-3388.
- [94] Berny J-F, Hennebert G L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates[J]. Mycologia, 1991, 83(6): 805-815.
- [95] Zhu W, Zhang Y, Zhang J, et. al. Astragalus polysaccharides, chitosan and poly(I:C) obviously

enhance inactivated *Edwardsiella ictaluri* vaccine potency in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 379-385.

[96] Song H, Yu W, Liu X, et. al. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate-chitosan microencapsulated low density cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 108: 10-16.

[97] Yan Y, Huo X, Ai T, et. al. β -glucan and anisodamine can enhance the immersion immune efficacy of inactivated cyprinid herpesvirus 2 vaccine in *Carassius auratus gibelio*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 285-295.