

黄芪多糖佐剂对大菱鲆五联疫苗免疫增效作用

邓楠楠^{1,2} 王印庚^{1*} 张 正¹ 曲江波³

廖梅杰¹ 张辰仓² 王忠华²

(¹青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(³烟台开发区天源水产有限公司, 264006)

摘 要 用福尔马林灭活哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻胶弧菌制备成五联灭活疫苗, 添加黄芪多糖作为佐剂。分别用添加黄芪多糖佐剂组和无佐剂组对大菱鲆进行腹腔注射, 在第 7、14、21、28、35、42、56 天采取血样并检测抗体效价、溶菌酶活力和 SOD 活力, 第 56 天进行人工攻毒实验, 测定免疫保护力。结果表明, 黄芪多糖佐剂组(免疫组 2)和无佐剂组(免疫组 1)两组的溶菌酶活力和 SOD 活力都在第 28 天达到最高值, 且黄芪多糖佐剂组显著高于无佐剂组($P < 0.05$)。两个免疫组抗体效价也都在第 28 天达到最大值, 但黄芪多糖佐剂组要显著高于无佐剂组($P < 0.05$), 其中免疫组 2 的哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻胶弧菌的抗体效价分别为 $2^{7.25}$ 、 $2^{6.75}$ 、 $2^{8.5}$ 、 $2^{8.75}$ 、 $2^{6.25}$, 免疫组 1 分别为 2^6 、 $2^{5.75}$ 、 $2^{6.75}$ 、 $2^{2.5}$ 、 2^5 。用上述 5 种细菌分别进行人工攻毒实验, 结果表明, 免疫组 2 的免疫保护力依次为 50.0%、50.0%、71.4%、62.5%、44.4%; 免疫组 1 的免疫保护力依次为 37.5%、30.0%、42.9%、50.0%、33.3%。实验结果证明, 五联疫苗对大菱鲆具有免疫作用, 而且添加黄芪多糖佐剂组的免疫效果显著好于无佐剂组。

关键词 大菱鲆 五联疫苗 黄芪多糖 免疫保护力 抗体效价

中图分类号 S941.4 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0035-08

Immune enhancement of astragalan-adjuvant to five-valent vaccine in turbot *Scophthalmus maximus*

DENG Nan-nan^{1,2} WANG Yin-geng^{1*} ZHANG Zheng¹ QU Jiang-bo³

LIAO Mei-jie¹ ZHANG Chen-cang² WANG Zhong-hua²

(¹Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(³Tianyuan Aquaculture Limited Company of Yantai Development Area, 264006)

ABSTRACT A five-valent vaccine was made of *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *Ewardsia latarda*, *V. scopthalmi* and *V. alginolyticus* which were firstly inactivated by formalin, and

国家科技支撑计划(2006BAD09A11)、国家鲆鲽类产业技术体系疾病防控岗位和公益性行业(农业)科研专项经费(nyhyzx07-046-鲆鲽)共同资助

* 通讯作者。E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85841732

收稿日期: 2011-02-24; 接受日期: 2011-05-06

作者简介: 邓楠楠(1985-), 女, 硕士, 主要从事水产养殖疾病控制及微生物方向的研究。E-mail: deguodexue@163.com, Tel: 15006482701

then mixed with astragalan-adjuvant. Turbot *Scophthalmus maximus* was subjected to vaccines *via* intraperitoneal injection, and the vaccines were respectively appended with (Group 2) or without astragalan-adjuvant (Group 1). Antibody titers, activities of lysozyme and superoxide dismutase were examined on the 7th, 14th, 21th, 28th, 35th, 42th, and 56th day after first vaccination. Finally, all the fish were challenged with the five kinds of bacteria (mentioned above) on 56d. The results showed that the activities of lysozyme and superoxide dismutase of both groups reached the peak value on 28d, in which Group 2 were significantly higher than those in Group 1 ($P < 0.05$). The antibody titers of both groups also reached the highest on 28d, but which were much higher in Group 2 than that in Group 1 ($P < 0.05$). In Group 2, the antibody titers of five kinds bacteria were $2^{7.25}$, $2^{6.75}$, $2^{8.5}$, $2^{8.75}$, $2^{6.25}$ respectively, and in Group 1 they were 2^6 , $2^{5.75}$, $2^{6.75}$, $2^{7.5}$, 2^5 . The RPS of Group 2 was 50.0%, 50.0%, 71.4%, 62.5%, 44.4% respectively, and 37.5%, 30.0%, 42.9%, 50.0%, 33.3% in Group 1. The results suggest that the five-valent vaccine can enhance the immunity in turbot *Scophthalmus maximus*. In addition, the immune enhancement was markedly improved in astragalan-adjuvant group, indicating that astragalan-adjuvant has a positive effect on immunity.

KEY WORDS *Scophthalmus maximus* Five-valent vaccine Astragalan
Relative percentage survival(RPS) Antibody titers

大菱鲆 *Scophthalmus maximus* 是一种原产于欧洲沿海的名贵肉食性海水鱼类,因其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富、生长迅速,目前已成为中国北方重要的经济养殖鱼类之一(雷霖霖等 2008)。但是随着养殖规模的不断扩大,大菱鲆病害频发,尤其以细菌性疾病危害最为严重,已成为制约我国大菱鲆养殖业持续健康发展的瓶颈(张正等 2004)。目前已报道的大菱鲆发病率和致死率均在 80% 以上甚至高达 90%。烂鳍病、白便病、腹水病、肠炎病以及细菌性红体病的病原菌主要有鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌等(杨少丽等 2005;董丽等 2009;王印庚等 2004)。

对于细菌性疾病,传统的治疗方法主要依赖于抗生素和化学药物,长期大量使用这些药物导致了菌株耐药性增强、药物残留、环境污染等一系列问题,影响了水产品的质量,对食品安全形成了潜在威胁。作为抗生素类药物的替代品,疫苗能够同时提高非特异性免疫和特异性免疫,在国外发达国家已经成为鱼类细菌性疾病防治的重要手段,不仅在游泳性鱼类上有报道(Mikkelsen *et al.* 2004),在鲆鲽类疾病防治上亦有很多研究(Santos *et al.* 1991;Castro *et al.* 2008)。多联疫苗同单菌苗相比,因为具有一剂多效的功能,逐渐成为水产疾病防控研究的一个热点。在国外多联疫苗如鳃弧菌、杀鲑气单胞菌的二联苗已经商品化,在我国也有草鱼的细菌性烂腮、肠炎、赤皮病的三联疫苗。

本研究为了更好地发挥疫苗在鲆鲽类多种重要细菌性疾病防治上的作用,研制了大菱鲆五联细菌疫苗。疫苗的免疫效果与佐剂密切相关,佐剂能非特异地改变或增强机体对抗原的特异性免疫应答,增强抗原的免疫原性或改变免疫反应类型,但目前国内关于多联佐剂疫苗的报道还较少。黄芪多糖作为黄芪的主要成分,具有无毒、安全、无刺激、增强机体特异性和非特异性免疫的功能,在家畜疾病防治上已经取得显著疗效(Kong *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2007;王旭贞等 2008)。但是黄芪多糖能否作为佐剂在水产疫苗上使用尚需评价。本研究将大菱鲆 5 种主要致病菌制备成福尔马林灭活疫苗,并添加黄芪多糖作为佐剂,验证黄芪多糖佐剂对大菱鲆五联疫苗的免疫增效作用。

1 材料与方 法

1.1 菌株

实验所用鳃弧菌、大菱鲆弧菌、迟钝爱德华氏菌、哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌均为中国水产科学研究院黄海

水产研究所鱼类室从患有白便病、腹水病、肠炎病、红体病、烂鳍病的大菱鲆病灶处分离纯化并经回接感染后鉴定保存的病原菌(董丽等 2009;张正 2004)。

1.2 实验用鱼

实验用大菱鲆平均体重 50 ± 5 g,体长 10~13 cm,由烟台开发区天源水产有限公司提供。在圆形玻璃钢桶(底面直径、高分别为 68 cm、55 cm)中暂养 10 d 后,将大菱鲆随机分为 3 个处理组,分别为五联无佐剂疫苗组(免疫组 1)、黄芪多糖佐剂五联疫苗组(免疫组 2)、生理盐水对照组,每个处理组两个平行实验桶,每个实验桶放置 60 尾鱼。

实验期间,养殖用水为过滤深井海水,全天充气,循环流水,水温稳定在 $13.8 \sim 14.5$ °C,盐度为 $24.1 \sim 25.0$,溶解氧为 $4.1 \sim 5.0$ mg/L,pH 为 $7.4 \sim 7.6$,以上水质变化用 YSI556MPS 水质测定仪测定。每日早、晚各投喂 1 次,投喂量为体重的 2%,定期吸底清污。

1.3 疫苗的制备

1.3.1 全菌灭活疫苗的制备

将鳗弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌、大菱鲆弧菌分别接种于 TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)固体培养基上,其中鳗弧菌、哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌 28 °C 培养 24 h,迟钝爱德华氏菌和大菱鲆弧菌 28 °C 培养 48 h 后,分别挑取适量菌体接种于 500 ml TSB 液体培养基, $110 \sim 120$ r/min 振荡培养 28 h 后, 4 °C $8\ 000$ r/min 离心 3 min,将离心后的沉积菌体用 PBS(pH 7.2)冲洗 3 遍后调制成 10^9 CFU/ml 的菌悬液。分别加入不同浓度的福尔马林(0.01%、0.03%、0.05%、0.10%、0.15%)(V/V), 28 °C 振荡灭活($110 \sim 120$ r/min)数小时;期间每隔一段时间,取 0.1 ml 的菌液涂布于 TSB 平板,每组两个平行,置于 28 °C 培养 7 d,观察平板上是否有菌落生长。若无菌落生长则证明菌株已被完全灭活,用 PBS 缓冲液(pH 7.2)洗脱 3 次去除福尔马林,将 5 种疫苗等体积混合(1:1:1:1:1)即为五联疫苗, 4 °C 保存供后期实验之用。

1.3.2 黄芪多糖佐剂的制备

黄芪多糖(APS)由山东圣旺药业股份有限公司提供,多糖含量为 78.2%,呈土黄色粉末状。将黄芪多糖用蒸馏水溶解,配成浓度为 25 mg/ml 的棕色液体, 115 °C 高压灭菌 10 min, 4 °C 备用。APS 与五联疫苗以 1:1 的比例制备黄芪多糖佐剂五联疫苗。

1.3.3 五联疫苗的安全性检测

用制备好的五联疫苗腹腔注射暂养的 20 尾大菱鲆,每尾注射 0.2 ml。注射后饲养 10 d,观察被注射大菱鲆的活动、摄食情况以及是否有体色异常症状或死亡现象。

1.4 大菱鲆的免疫接种

3 个处理组的暂养大菱鲆分别腹腔注射无佐剂五联疫苗、黄芪多糖佐剂五联疫苗和生理盐水,注射剂量为 0.2 ml/尾,首次免疫 7 d 后对免疫组 1 和免疫组 2 同法加强免疫 1 次,养殖条件同 1.2。

1.5 免疫指标的测定

1.5.1 免疫血清

免疫接种大菱鲆后,在第 7、14、21、28、35、42、56 天从各组各取 4 尾大菱鲆,尾静脉采血 0.3 ml,于离心管中 4 °C 静置 4 h,使血清充分析出后, $8\ 000$ r/min 离心 10 min,分离血清备用。

1.5.2 血清凝集抗体效价测定

采用 96 孔 U 型血凝板,微量凝集法进行抗体凝集效价测定(沈萍等 1999)。抗原分别采用哈维氏弧菌、鳗弧菌、迟钝爱德华氏菌、溶藻胶弧菌和大菱鲆弧菌的灭活菌悬液,浓度均为 10^9 CFU/ml。抗体效价以 \log_2 表示。

1.5.3 血清溶菌酶活力的测定

用溶菌酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定血清中溶菌酶的含量,以生理盐水对照组的大菱鲆血清作为对照。

1.5.4 血清 SOD 活力的测定

用 SOD 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定血清中 SOD 的含量,以生理盐水对照组的大菱鲆血清作为对照。定义每 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位(U)。

1.6 免疫保护力的测定

在首次免疫后 56d 从免疫组 1、免疫组 2 和对照组各取 50 尾大菱鲆,共计 150 尾。将每组 50 条大菱鲆再随机分为 5 个平行组,每组 10 尾,分别以 5 种细菌的 50 LD₅₀ 活菌悬液(哈维氏弧菌、鳗弧菌、迟钝爱德华氏菌、溶藻胶弧菌、大菱鲆弧菌活菌的 LD₅₀ 分别为 1.50×10^8 、 2.35×10^5 、 $1.29 \times 10^{9.33}$ 、 $5.00 \times 10^{5.75}$ 、 $9.50 \times 10^{4.33}$ CFU/ml)对受免疫大菱鲆进行腹腔注射(0.2 ml/尾)。同 1.2 环境养殖 10 d,仔细观察并记录各组死亡数,根据公式计算疫苗的免疫保护力(RPS),计算公式为:

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

1.7 数据统计

采用 SPSS 17.0 for Windows 对所得数据进行方差分析,若差异达显著,则进行 Tukey 多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 灭活疫苗的安全性检验结果

甲醛灭活结果见表 1。结果表明,哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌容易灭活,在 28℃ 条件下,0.3% (V/V) 浓度处理 48 h 即可完全灭活;而大菱鲆弧菌、鳗弧菌、迟钝爱德华氏菌则不易灭活,在 28℃ 条件下,1.5% (V/V) 浓度下,大菱鲆弧菌处理 12 h、鳗弧菌处理 28 h、迟钝爱德华氏菌处理 48 h 才可完全灭活。

根据本实验结果,并综合考虑疫苗的安全性、有效性及实践应用等各因素,最终确定哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌以 0.5% (V/V)、大菱鲆弧菌以 1.0% (V/V)、迟钝爱德华氏菌和鳗弧菌以 1.5% (V/V) 的终浓度处理 48h 为最佳灭活条件。

灭活的五联疫苗腹腔注射大菱鲆后,20 尾大菱鲆全部正常游动摄食,无一发生体色异常和死亡现象,说明此五联疫苗是安全可靠的。

2.2 大菱鲆的血清抗体效价测定结果

大菱鲆对哈维氏弧菌、鳗弧菌、迟钝爱德华氏菌、溶藻胶弧菌、大菱鲆弧菌的特异性抗体在初次免疫后第 7 天即可检测到,由图 1~图 5 可知,两个免疫组 5 种菌的抗体效价呈现先上升、后下降的趋势,同时在 28 d 达到最高值。免疫组 2 中,5 种菌的抗体效价显著高于免疫组 1 ($P < 0.05$),56 d 时免疫组 1 和免疫组 2 抗体效价仍然维持相当的水平,而对照组在整个实验期内都始终没有检测到抗体。两个免疫组中大菱鲆弧菌和迟钝爱德华氏菌抗体效价相对较高,而溶藻胶弧菌和哈维氏弧菌则相对较低。

2.3 大菱鲆血清溶菌酶活力测定结果

实验结果显示(表 2),在五联疫苗中添加黄芪多糖佐剂明显增加了大菱鲆血清中溶菌酶的活力。第 14~56 天,两个免疫组显著高于对照组 ($P < 0.05$);免疫组 2 显著高于免疫组 1 ($P < 0.05$)。第 28 天,两个免疫组同时达到最高值,分别为 1.312 ± 0.010 、 1.237 ± 0.010 U/ml。整个实验期内,相对于免疫组 1 和对照组,免疫组 2 上升最快,且溶菌酶活力较高而稳定。

表 1 甲醛的灭活效果

Table 1 Cell survival after formalin treatment

时间 Time (h)	浓度(V/V) Concentration(%)	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	大菱鲆弧菌 <i>V. scophtalmi</i>	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>
4	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+
	1.0	-(+)	+	+	+	+
	1.5	-	+	+	+	-
12	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+
	0.5	-	+	+	+	-(+)
	1.0	-	+	+	+	-
	1.5	-	-(+)	-(+)	-	-
24	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	-(+)	+	+	+	+
	0.5	-	+	+	+	-
	1.0	-	+	+	+	-
	1.5	-	-	-(+)	-	-
48	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	-	+	+	+	-
	0.5	-	+	+	-(+)	-
	1.0	-	-(+)	+	-	-
	1.5	-	-	-	-	-

注:(1)实验在 28℃ 条件下进行。(2)+表示 TSB 培养基上有菌落生长;-表示 TSB 培养基上无菌落生长;+(+)表示有两种实验结果

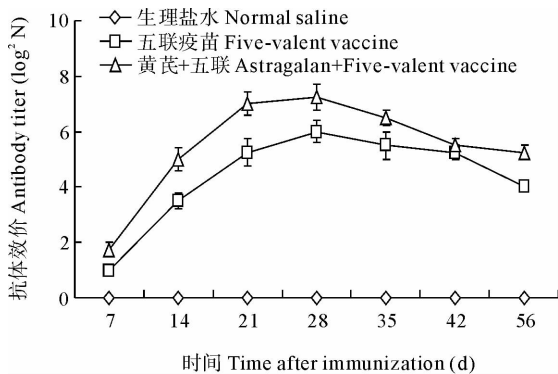


图 1 哈维氏弧菌抗体效价随时间的变化曲线
Fig. 1 Changes of antibody titer responses to *V. harveyi* versus time in serum of turbot

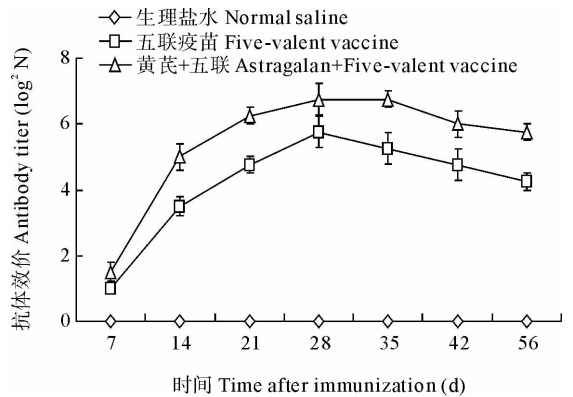


图 2 鳗弧菌抗体效价随时间的变化曲线
Fig. 2 Changes of antibody titer responses to *V. anguillarum* versus time in serum of turbot

2.4 大菱鲆血清 SOD 活力测定结果

实验结果显示(表 2),在五联疫苗中添加黄芪多糖佐剂有利于进一步提高大菱鲆血清中 SOD 活力。两个

免疫组比对照组都表现了更高的活力($P < 0.05$)。第28天,免疫组1和免疫组2的SOD活力同时达到最高值,且免疫组1显著高于免疫组2($P < 0.05$);第56天,免疫组1仍显著高于免疫组2($P < 0.05$),结果证实免疫组1的SOD活力相对于免疫组2更为稳定且持久。

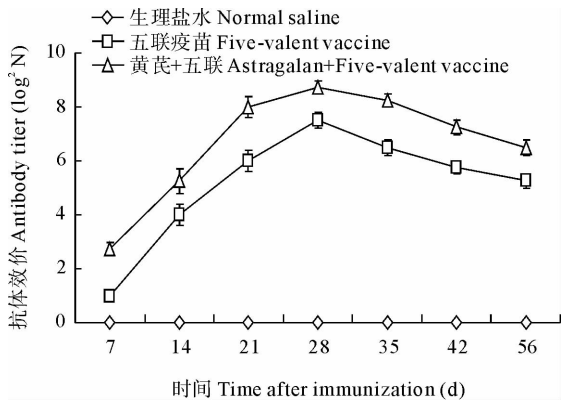


图3 迟钝爱德华氏菌抗体效价随时间的变化曲线
Fig. 3 Changes of antibody titer responses to *E. tarda* versus time in serum of turbot

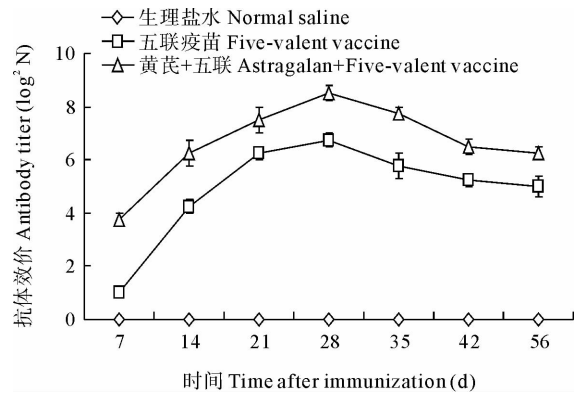


图4 大菱鲆弧菌抗体效价随时间的变化曲线
Fig. 4 Changes of antibody titer responses to *V. scophtalmi* versus time in serum of turbot

2.5 疫苗对人工感染大菱鲆的免疫保护力

黄芪多糖佐剂五联疫苗和无佐剂五联疫苗对大菱鲆腹腔注射免疫后,都能产生一定的免疫保护力,且黄芪多糖佐剂五联疫苗的免疫保护作用更强。由表3可知,免疫组2对哈维氏弧菌、鳃弧菌、迟钝爱德华氏菌、大菱鲆弧菌、溶藻胶弧菌5种菌的免疫保护力分别为50.0%、50.0%、71.4%、62.5%、44.4%;免疫组1的免疫保护力分别为37.5%、30.0%、42.9%、50.0%、33.3%。

3 讨论

目前,水产动物疾病的混合感染甚至3~4种疾病并发现象十分普遍,例如草鱼肠炎病、赤皮病、出血病、烂鳃病并发,中华鳖同时感染腐皮、疥疮、出血病等疾病,这种现象已经成为疫苗开发过程中的主要障碍(杨先乐等 2006)。面对多种疾病的混合感染,疫苗研制工作逐渐从单苗向多联疫苗转变,这样能使鱼体对多种致病菌同时产生抗体,对多种疾病可同时防控,具有实际生产的可操作性和实用性。自1997年至今,大菱鲆养殖连续开展了10余年,疾病种类繁多,特别是细菌性疾病也逐渐呈现出混合感染的态势(王印庚等 2004)。曹红梅等(2006)研制了大菱鲆的鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗,刘斌(2007)研制了大菱鲆的鳃弧菌、哈维氏弧菌、副溶血弧菌和迟缓爱德华氏菌四联疫苗。根据大菱鲆疾病流行病学特点,本研究以哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻胶弧菌5种抗原为基础,首次研制了五联疫苗(另文报道),以同期防控大菱鲆的多种主要细菌性疾病。

疫苗的免疫效果主要受抗原的免疫原性、接种疫苗的剂量、佐剂、疫苗的给予方式、机体的状况、生存环境等因素影响(杨先乐等 2006)。其中佐剂不容忽视,它是一种先于抗原或者与抗原混合后同时注射动物、能增强疫苗的免疫效果、发挥其辅佐作用的物质(单晓枫等 2005)。目前佐剂主要分为细菌性免疫佐剂、化学性免疫佐剂、动植物来源免疫佐剂、生化制剂类免疫佐剂和营养因子类免疫佐剂等5大类。使用佐剂能显著提高疫苗的免疫效果,疫苗与佐剂的联合使用已成为现代鱼用疫苗发展的必然方向。黄芪多糖作为天然中草药黄芪

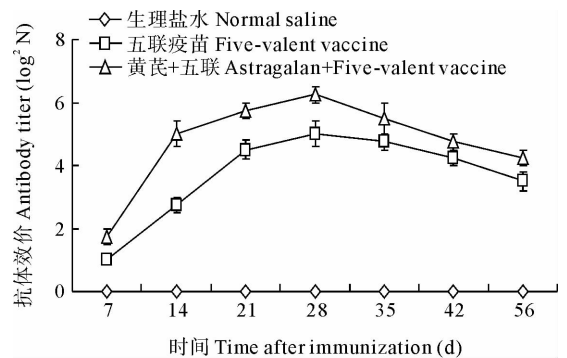


图5 溶藻胶弧菌抗体效价随时间的变化曲线
Fig. 5 Changes of antibody titer responses to *V. alginolyticus* versus time in serum of turbot

的提取物,因具有水溶性好、毒副作用小、高效、经济等优点,逐渐成为疫苗的新型佐剂。

表 2 免疫大菱鲆血清溶菌酶活力和 SOD 活力的比较

Table 2 Comparison of lysozyme and superoxide dismutase activity after immunization on turbot

组别 Group		7d	14d	21d	28d	35d	42d	56d	ANOVA	F 值	P 值
溶菌酶 Lysozyme (U/ml)	对照组 Control	1.095± 0.012 ^a _A	1.090± 0.007 ^a _A	1.113± 0.008 ^a _A	1.122± 0.008 ^a _A	1.115± 0.007 ^a _A	1.083± 0.011 ^a _A	1.095± 0.014 ^a _A		2.166	0.070
	免疫组 1 Group 1	1.117± 0.007 ^a _A	1.138± 0.010 ^b _A	1.152± 0.013 ^b _A	1.237± 0.010 ^b _A	1.173± 0.008 ^b _{AB}	1.145± 0.033 ^a _A	1.133± 0.011 ^b _A		6.389	0.000
	免疫组 2 Group 2	1.183± 0.013 ^b _A	1.197± 0.013 ^c _A	1.262± 0.009 ^c _B	1.312± 0.010 ^c _C	1.275± 0.007 ^c _{BC}	1.185± 0.008 ^b _A	1.177± 0.005 ^c _A		34.086	0.000
ANOVA	F 值	18.312	21.275	57.375	96.971	127.356	6.017	15.624			
	P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000			
SOD (U/ml)	对照组 Control	14.94± 0.16 ^a _A	14.90± 0.15 ^a _A	15.00± 0.17 ^a _A	15.24± 0.11 ^a _A	14.88± 0.19 ^a _A	15.22± 0.15 ^a _A	14.73± 0.10 ^a _A		1.516	0.221
	免疫组 1 Group 1	14.99± 0.14 ^a _A	16.67± 0.22 ^b _B	19.20± 0.33 ^c _C	21.60± 0.18 ^b _D	17.34± 0.23 ^b _B	16.66± 0.15 ^b _B	15.07± 0.06 ^b _A		134.32	0.000
	免疫组 2 Group 2	16.47± 0.24 ^b _B	17.70± 0.21 ^c _C	21.85± 0.24 ^c _D	24.35± 0.21 ^c _E	21.83± 0.34 ^c _D	18.64± 0.16 ^c _C	15.13± 0.09 ^b _A		218.642	0.000
ANOVA	F 值	21.901	52.923	178.852	726.404	181.308	126.328	6.780			
	P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016			

注:上标英文小写字母不同,代表同一列各数据差异显著;下标大写字母不同,代表同一行数据差异显著

表 3 免疫大菱鲆对 5 种病原菌人工感染的免疫保护力

Table 3 The relative percentage survival of the vaccinated turbot challenged with the five pathogens

组别 Group	菌种 Strain	实验鱼数(尾) Number of fish in experiment	死亡鱼数(尾) Number of deaths	免疫保护率(%) RPS
免疫组 1 Group 1	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	10	6	37.5
	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	10	7	30.0
	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	10	4	42.9
	大菱鲆弧菌 <i>V. scophtalmi</i>	10	4	50.0
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	10	5	33.3
免疫组 2 Group 2	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	10	5	50.0
	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	10	5	50.0
	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	10	2	71.4
	大菱鲆弧菌 <i>V. scophtalmi</i>	10	3	62.5
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	10	4	44.4
对照组 Control	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	10	8	—
	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	10	10	—
	迟钝爱德华氏菌 <i>E. tarda</i>	10	7	—
	大菱鲆弧菌 <i>V. scophtalmi</i>	10	8	—
	溶藻胶弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	10	9	—

黄芪多糖佐剂已较多应用在兽用疫苗上,并获得良好效果。金尔光等(2009)制备的 I 型鸭疫里氏杆菌黄芪多糖灭活苗的平均保护力高达 93%, 林树乾等(2006)研制的金黄色葡萄球菌的黄芪多糖灭活苗的免疫保护力为 83.3%, 罗燕等(2008)的黄芪多糖配合禽流感-新城疫重组二联疫苗产生的抗体效价显著高于无佐剂对照组。上述报道与本研究结果相一致, 具有良好免疫增效作用。本研究结果显示, 黄芪多糖佐剂五联疫苗免疫大菱鲆后, 产生的抗体效价远远高于无佐剂五联疫苗组, 并且在初次免疫 56d 后, 黄芪多糖佐剂五联疫苗组对哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻胶弧菌的免疫保护力比无佐剂五联疫苗组分别高出 12.5%、20.0%、28.5%、12.5%、11.1%, 其增效作用显著($P < 0.05$)。

另外, 本实验还针对大菱鲆非特异性免疫指标做出了分析。结果显示, 黄芪多糖佐剂五联疫苗组的溶菌酶活力和 SOD 活力从第 7 天开始, 一直到 56 d 实验结束, 都显著高于无佐剂五联疫苗组, 说明黄芪多糖佐剂具有提高非特异性免疫因子的作用。

本研究首次就黄芪多糖佐剂在鱼用疫苗上的免疫增效作用进行了有益尝试, 观察到黄芪多糖佐剂具有免疫增效作用, 56 d 时仍具有较高的免疫效果。然而, 大菱鲆等海水鱼类一般需要养殖 1 年后才能达到商品规格出售, 为此对其更长期的免疫效果仍需进一步跟踪评价, 优化其使用工艺和操作规范, 以期黄芪多糖佐剂在鱼用疫苗上的商品化开发提供理论依据。

参 考 文 献

- 王印庚, 张正, 秦蕾, 史成银, 陈洁君, 杨少丽, 马爱军. 2004. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 25(6): 61~68
- 王旭贞, 李宏全. 2008. 黄芪多糖对接种 ND IV 系疫苗雏鸡抗体效价的影响. 中兽医医药杂志, (4): 26~27
- 刘斌. 2007. 海水养殖鱼类主要细菌病多联疫苗的研制及应用. 见: 中国海洋大学硕士研究生学位论文
- 张正. 2004. 养殖大菱鲆流行病学调查及主要细菌性疾病的病原学研究. 见: 中国海洋大学硕士研究生学位论文
- 张正, 王印庚, 杨官品, 李秋芬. 2004. 大菱鲆细菌性疾病的研究现状. 海洋湖沼通报, (3): 83~87
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 1999. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 165~167
- 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 2005. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展. 海洋水产研究, 26(4): 75~83
- 金尔光, 陈洁, 钱运国, 陈橙, 曾新华, 公时玉, 华娟. 2009. 黄芪多糖佐剂对 I 型鸭疫里氏杆菌灭活疫苗的作用研究. 中国畜牧兽医, 36(3): 151~153
- 杨先乐, 曹海鹏. 2006. 我国渔用疫苗的研制. 水产学报, 30(2): 264~271
- 林树乾, 张燕, 杨少华, 马广强, 高运东, 李国升, 赵宏坤, 仲跻峰. 2006. 中药黄芪多糖的免疫佐剂作用. 中国畜牧兽医, 33(5): 58~60
- 单晓枫, 高宇航, 李影, 钱爱东. 2005. 鱼用疫苗研究进展. 中国兽药杂志, 39(11): 19~22
- 罗燕, 邵永斌, 谷新利, 李星艳. 2008. 黄芪多糖佐剂对鸡禽流感-新城疫重组二联苗免疫效果的影响. 中兽医医药杂志, (5): 13~15
- 曹宏梅, 李健, 战文斌. 2006. 鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果. 中国水产科学, 13(3): 397~402
- 董丽, 王印庚, 张正, 曲江波, 陈霞. 2009. 养殖大菱鲆细菌性红体病原菌的分离与鉴定. 海洋科学, 33(7): 57~63
- 雷霖霖, 梁萌青, 刘新富, 孟振. 2008. 大菱鲆营养成分与食用价值研究概述. 海洋水产研究, 29(4): 112~113
- Castro, N., Toranzo, A. E., Núñez, S., and Magariños, B. 2008. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish & Shellfish Immunology, 25(3): 208~212
- Kong, X., Hu, Y., Rui, R., Wang, D., and Li, X. 2004. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken. International Immunopharmacology, 4(7): 975~982
- Mikkelsen, H., Schroder, M. B., and Lund, V. 2004. Vibriosis and atypical furunculosis vaccines: efficacy, specificity and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture, 242(1-4): 81~91
- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccine for fish. Annual Review of Fish Diseases, 3: 145~185
- Qiu, Y., Hu, Y., L., Cui, B., Zhang, H., Kong, X., Wang, D., and Wang, Y. 2007. Immunopotentiating effects of four Chinese herbal polysaccharides administered at vaccination in chickens. Poultry Science, 86(12): 2 530~2 535
- Santos, Y., Bandin, I., Núñez, S., Gravning, K., and Toranzo, A. E. 1991. Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccine. Journal of Fish Diseases, 14(3): 407~411