

表面展示新城疫病毒部分 F 蛋白的重组干酪乳杆菌的构建及其免疫原性

刘欢欢¹, 李树东¹, 杨雨晴¹, 孙晓莹¹, 李岩¹, 刘昕旻², 陈小燕², 张连妹², 白永飞², 侯喜林¹, 余丽芸²

1 黑龙江八一农垦大学 动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319

2 黑龙江八一农垦大学 生命科技学院, 黑龙江 大庆 163319

刘欢欢, 李树东, 杨雨晴, 等. 表面展示新城疫病毒部分 F 蛋白的重组干酪乳杆菌的构建及其免疫原性. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1453–1462.

Liu HH, Li SD, Yang YQ, et al. Immunogenicity of the truncated NDV F protein surface-displayed on *Lactobacillus casei*. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1453–1462.

摘 要: 本研究旨在构建重组干酪乳杆菌 pLA-Newcastle disease virus (NDV)-F/*Lactobacillus casei*, 获得表达产物, 并探讨其免疫效果。利用 PCR 扩增携带部分主要抗原表位的 NDV F 基因, 与穿梭质粒 pLA 连接转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 筛选阳性重组质粒, 将其电转化至干酪乳杆菌中, 构建重组干酪乳杆菌 pLA-NDV-F/*L. casei*, 应用 PCR 鉴定阳性菌株, Western blotting 鉴定重组菌反应原性, 间接免疫荧光、流式细胞术和激光共聚焦检测蛋白表达情况。试验选用 14 日龄雏鸡, 各组免疫方式为口服+滴鼻。设立 pLA-NDV-F/*L. casei* 两次免疫组和三次免疫组、弱毒疫苗组、pLA/*L. casei*、未攻毒 PBS 组和攻毒 PBS 组。间接 ELISA 方法检测雏鸡血清 IgG、肠道、鼻腔、肺脏中 sIgA 抗体效价, 评价试验组雏鸡攻毒保护率。结果表明, 有 94.10% 的重组菌表达了 F 蛋白, 且高效表达在干酪乳杆菌细胞表面, 蛋白大小为 62 kDa, 并能与抗 NDV 阳性血清特异性结合。各免疫组 anti-F IgG 和 sIgA 抗体水平显著高于对照组, pLA-NDV-F/*L. casei* 三次免疫组抗体持续时间比两次免疫组延长 28 d, 抗体峰值没有显著差异。免疫 pLA-NDV-F/*L. casei* 三次、两次、弱毒疫苗、pLA/*L. casei* 和 PBS 的攻击保护率分别为 80%、80%、90%、0% 和 0%。因此, 利用干酪乳杆菌表达体系成功表达了携带部分抗原表位的 NDV F 基因, 具备良好的反应原性和免疫原性, 可诱导机体产生保护性免疫应答。

关键词: 新城疫病毒, 免疫原性, 干酪乳杆菌, 黏膜免疫, 保护率

Received: March 22, 2019; **Accepted:** May 20, 2019

Supported by: Heilongjiang Bayi Agricultural University Postgraduates' Innovation Project (No. YJSCX2017-Y40), Provincial Early Stage Industrialization Cultivation Project (No. 1253CGZH14), Heilongjiang Provincial Land Reclamation Bureau Science and Technology Research Project (No. HNK135-04-06).

Corresponding authors: Liyun Yu. Tel/Fax: +86-459-6819292; E-mail: yuliyun1227@126.com

Xilin Hou. E-mail: xly_hou@163.com

黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 (No. YJSCX2017-Y40), 省高校产业化前期培育项目 (No. 1253CGZH14), 黑龙江省农垦总局科技攻关项目 (No. HNK135-04-06) 资助。

网络出版时间: 2019-06-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190617.1050.002.html>

Immunogenicity of the truncated NDV F protein surface-displayed on *Lactobacillus casei*

Huanhuan Liu¹, Shudong Li¹, Yuqing Yang¹, Xiaoying Sun¹, Yan Li¹, Xinyang Liu², Xiaoyan Chen², Lianmei Zhang², Yongfei Bai², Xilin Hou¹, and Liyun Yu²

¹ College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

² College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: To evaluate immune efficacy of the recombinant *Lactobacillus casei*, we constructed pLA-Newcastle disease virus (NDV)-F/*L. casei* and obtained the expression products. PCR amplified the NDV F gene carrying part of the major epitopes. The target gene was inserted to the shuttle plasmid pLA, and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) in order to screen positive recombinant plasmid. The positive recombinant plasmid was transformed into *L. casei* by electroporation to construct pLA-NDV-F/*L. casei*. The positive strains were identified by PCR. The reactivity of the recombinant bacteria was identified by Western blotting and the protein expression was detected by indirect immunofluorescence, flow cytometry and laser confocal microscopy. The 14-day-old chickens in each group were vaccinated by oral plus nose drops. The pLA-NDV-F/*L. casei* twice immunization group and three times immunization group, the commercial vaccine group, the pLA/*L. casei* group, the unchallenge PBS and the challenge PBS group were established. IgG in serum and sIgA in the lavage fluid of intestinal, nasal and lung were detected by ELISA. The protection rate of chickens was evaluated. The results showed that 94.10% of the recombinant bacteria expressed the F protein. The recombinant protein was highly expressed on the surface of *L. casei* with a protein size of 62 kDa, which specifically bound to anti-NDV serum. The levels of anti-F IgG and sIgA antibodies in each test group were significantly higher than those in the control groups. The duration of antibody in the pLA-NDV-F/*L. casei* three-time immunization group lasted 28 days longer than that in the twice immunized group, and there was no significant difference between antibody peak values. The attack protection rates in each group of immunized pLA-NDV-F/*L. casei* three times, twice, attenuated vaccine, pLA/*L. casei* and PBS were 80%, 80%, 90%, 0% and 0%, respectively. Therefore, the antigenic protein of NDV F was successfully expressed by *L. casei* expression system, which has of reactogenicity and immunogenicity, and could induce protective immune responses in chickens.

Keywords: Newcastle disease virus, immunogenicity, *Lactobacillus casei*, mucosal immunity, protection rate

新城疫 (Newcastle disease, ND) 由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引发, 是危害禽类最严重的疫病之一, 被世界动物卫生组织认定为必须报告的 A 类动物疫病。NDV 在常温下具备高度稳定性^[1], 并可通过粪口途径和眼结膜及鼻黏膜等呼吸道黏膜侵入机体, 使得该病防控困难较大^[2]。

由于野生鸟类和家禽的相互传播致使 NDV 变异株大量出现^[3], 迄今为止全世界已分离出 18 种不同的基因型^[4], 常规疫苗常无法提供足够的保护。抗原表位是机体产生免疫应答的基础, 截取主要抗原表位进行基因工程疫苗研制针对性更强, 更有利于 ND 的防控。NDV F 蛋白存在多处

抗原位点可诱导产生中和抗体, 在调控病毒与受体细胞膜融合、病毒侵入机体等方面具有关键性作用^[5]。NDV F 蛋白裂解位点 (Fcs) 位于 NDV 前体蛋白 F0 的第 112–117 氨基酸处^[6], 研究表明, 此处碱基的轻微改变即可影响 NDV 毒力和融合活性, 是决定 ND 毒力强弱的关键因素^[7–8]。因此, 截取涵盖 Fcs 的抗原区段制备基因工程疫苗更具应用价值。

干酪乳杆菌是肠道益生菌, 可抑制胃肠道病原体生长, 调节肠道微生物菌群的平衡, 能够诱发黏膜和全身免疫起到类似佐剂的作用^[9–11], 以其作为黏膜疫苗递送载体可以表达同源和异源蛋白^[12–13], 构建的重组菌株表达的酶无需经过纯化

即可应用于饲料添加剂等食品级用途^[14]。ND 主要通过黏膜途径侵入机体,因此,以干酪乳杆菌作为抗原递送载体研发黏膜疫苗对该病的防控具有十分重要的意义。本研究截取包括 Fcs 在内的 NDV F 蛋白的两处主要抗原表位基因片段,选用干酪乳杆菌表面展示表达载体 pLA 与目的片段连接,构建重组干酪乳杆菌 pLA-NDV-F/*L. casei*,通过激光共聚焦、流式细胞术检测目的蛋白的表达情况,将表达的重组菌免疫雏鸡对其免疫原性进行分析,为制备新城疫基因工程乳酸菌疫苗的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒、细菌株、质粒、试验动物

新城疫活疫苗 (LaSota 株) 购自哈药集团生物疫苗有限公司; F48E8 株由黑龙江八一农垦大学预防兽医实验室保存; 大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞、干酪乳杆菌表面展示表达载体 pLA、纯化的重组 NDV F 蛋白均由本实验室构建保存; 干酪乳杆菌购自中国工程微生物保藏中心; 试验用鸡为 14 日龄商品蛋鸡。

1.2 主要试剂和仪器

TRIzol、Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒、pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购自 AXYGEn 公司; 胶回收试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自 Solarbio 公司; 羊抗鸡 IgG-HRP、FITC 标记的羊抗鸡荧光二抗购自北京博奥森; 山羊抗鸡 IgA-HRP 购自 Abcam 公司; DAB 显色试剂盒购自中杉金桥公司; DH5 α 感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞、抗 NDV 阳性血清由本实验室保存, 抗 NDV 阳性血清抗体效价经血清中和试验 (SNT) 测得为 1 : 256。凝胶成像系统和半干转膜仪, 美国 Bio-Rad 公司; 超净工作台, 哈尔滨东联电子技术开发公司; 共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司。

1.3 目的基因的获取

根据 NDV F 基因序列 (GenBank 登录号: AF077761.1) 设计一对特异性引物, 上下游引物分别插入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点, 上游引物序列: P1 5'-GGATCCATCATAGTTAAGCTCCTCCC-3' (下划线部分为 *Bam*H I), 下游引物序列: P2 5'-GTCGACGTAATCCATATTTCCACCAG-3' (下划线部分为 *Sal* I)。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min, PCR 产物用 0.9% 琼脂糖凝胶分析。

1.4 pLA-NDV-F/*E. coli* 的构建与鉴定

采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 1.3 中 PCR 产物进行回收并将其连接至 pMD18-T 上, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄抗性的 LB 固体培养基中, 37 °C 培养, 次日挑取单菌落, 进行 PCR 初步鉴定、双酶切鉴定阳性重组菌, 送往深圳华大基因科技有限公司测序。将测序正确的目的片段与 pLA 穿梭质粒连接转化至 BL21 感受态细胞中, 命名为 pLA-NDV-F/*E. coli*, 经 PCR、双酶切鉴定筛选阳性重组质粒 pLA-NDV-F。

1.5 pLA-NDV-F/*L. casei* 的构建

将 1.4 获得的阳性重组质粒 pLA-NDV-F 电转化至干酪乳杆菌感受态细胞中, 涂布于氯霉素抗性 MRS 固体培养基中 (含氯霉素 34 μ g/mL), 次日挑取单菌落 37 °C 静置培养 12 h, 提取重组质粒进行 PCR 鉴定, 筛选阳性重组干酪乳杆菌, 并将其命名为 pLA-NDV-F/*L. casei*。同时构建干酪乳杆菌对照菌, 命名为 pLA/*L. casei* 用于动物试验, 干酪乳杆菌感受态细胞制备参照温丽娟等^[15]发表的方法。

1.6 pLA-NDV-F/*L. casei* 表达目的蛋白的鉴定

1.6.1 pLA-NDV-F/*L. casei* 的表达

取 pLA-NDV-F/*L. casei* 和 pLA/*L. casei* 各 2% 接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 静置培养 10 h 后, 获得重组蛋白。

1.6.2 Western blotting 分析

获得的重组蛋白经溶菌酶处理后,1%上样缓冲液重悬,SDS-PAGE 后,半干转膜仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂乳封闭、抗 NDV 阳性血清 (1:50) 孵育 2 h、羊抗鸡 IgG-HRP (1:5 000) 孵育 2 h, DAB 显色液显色。

1.6.3 间接免疫荧光试验

取表达 10 h 的 pLA-NDV-F/L. *casei*, 均匀涂布于载玻片上,放入预冷的无水乙醇中固定菌体,5%脱脂乳溶液封闭过夜,抗 NDV 阳性血清 (1:50) 37 °C 孵育 2 h、FITC 标记的羊抗鸡荧光二抗 (1:100) 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤菌体后于荧光显微镜下观察结果。

1.6.4 流式细胞术

取表达 10 h 的 pLA-NDV-F/L. *casei*, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL, 收集菌体用 5%牛血清白蛋白 4 °C 封闭过夜,依次经抗 NDV 阳性血清 (1:50)、FITC 标记的羊抗鸡荧光二抗 (1:100) 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 重悬菌体,流式细胞仪检测。

1.6.5 激光共聚焦

取流式细胞术处理后的表达菌涂布于载玻片上,封片剂封片,激光共聚焦显微镜观察。

1.7 重组菌 pLA-NDV-F/L. *casei* 免疫攻毒保护性试验

1.7.1 动物免疫

经平板计数后,将菌液浓度为 10^{11} CFU/mL

的 pLA-NDV-F/L. *casei* 和 pLA/L. *casei*, 通过口服和滴鼻结合的方法用于动物免疫,免疫剂量为 0.2 mL/只 (口服 0.15 mL, 滴鼻 0.05 mL)。选用 14 日龄雏鸡,随机分为 5 组,每组 30 只, A1 和 A2 组免疫重组菌 pLA-NDV-F/L. *casei*, B 组免疫弱毒疫苗 (5 羽份/mL), C 组免疫 pLA/L. *casei*, D1 和 D2 组免疫 PBS。A1 组为两次免疫组, A2 组为三次免疫组, D1 组为攻毒 PBS 组, D2 组为未攻毒 PBS 组,比较不同组别间免疫效果。具体分组情况见表 2。

B 组免疫按弱毒疫苗免疫程序,其余各组连续免疫菌体 5 d 为一次免疫,一免、二免、三免各间隔 10 d,免疫开始每隔 7 d 每组剖杀 2 只鸡采集血清,检测特异性 IgG 抗体水平,取肺脏、肠道、鼻腔冲洗液检测特异性 sIgA 抗体水平。

1.7.2 血清中 IgG 抗体检测

将浓度为 1 μ g/mL 的纯化重组 NDV F 蛋白包被酶标板,4 °C 包被过夜,5%脱脂乳 37 °C 封闭 1 h,加入待检样品 (1:10),37 °C 孵育 1 h,加入羊抗鸡 IgG-HRP (1:5 000) 37 °C 孵育 1 h,底物 (TMB-H₂O₂) 显色,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶标仪检测,读取 OD₄₅₀ 吸光值。待检血清 OD₄₅₀/阴性血清 ≥ 2.1 即为阳性结果,反之为阴性结果。

1.7.3 肠道、鼻腔、肺脏冲洗液中 sIgA 抗体检测

检测 sIgA 抗体,二抗选用山羊抗鸡 IgA-HRP (1:10 000),具体步骤参照 1.7.2。

表 1 免疫试验

Table 1 Immunological test

Groups	Immune components	Immune dose (mL)	Number of immune	Immune mode
A1	pLA-NDV-F/L. <i>casei</i>	0.2	2	Oral + Intraocular-nasal
A2	pLA-NDV-F/L. <i>casei</i>	0.2	3	Oral + Intraocular-nasal
B	Commercial vaccine	0.2	3	Oral + Intraocular-nasal
C	pLA/L. <i>casei</i>	0.2	3	Oral + Intraocular-nasal
D1	Challenge PBS control	0.2	3	Oral + Intraocular-nasal
D2	Unchallenge PBS control	0.2	3	Oral + Intraocular-nasal

1.7.4 检测结果显示性分析

采用 Graphpad Prism 6 软件的方差分析法对检测结果进行显著性分析。*: $0.01 < P < 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$; ***: $0.000\ 1 < P < 0.001$; ****: $0.000\ 01 < P < 0.000\ 1$ 。

1.7.5 pLA-NDV-F/L. casei 攻毒保护试验

将 F48E8 毒株以肌肉注射的方式,对 A1 组二免后 7 d, A2、B、C、D1 组三免后 7 d 的试验鸡进行攻毒,攻毒剂量为 10^5 EID₅₀,攻毒后 7 d 观察试验鸡临床症状及死亡情况,计算免疫保护率。

免疫保护率(%)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。D2 组为未攻毒 PBS 组。

2 结果与分析

2.1 pLA-NDV-F/L. casei 构建与鉴定

2.1.1 PCR 鉴定

以 pLA-NDV-F/L. casei 提取的重组质粒为模板进行 PCR 扩增,结果显示有大小约为 564 bp 的片段,与预期结果一致(图 1)。

2.1.2 Western blotting 鉴定

对表达 10 h 的 pLA-NDV-F/L. casei 和 pLA/L. casei 用溶菌酶处理后,进行 Western blotting 鉴定,结果显示, pLA-NDV-F/L. casei 表达的蛋白被抗 NDV 阳性血清识别,在 62 kDa 处出现明显印记(图 2),对照组未出现特异性条带,与预期结果相符。

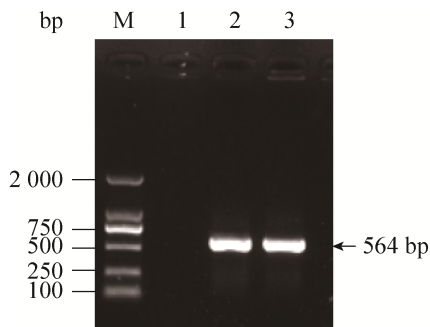


图 1 pLA-NDV-F/L. casei PCR 扩增结果

Fig. 1 pLA-NDV-F/L. casei recombinant plasmid PCR results. M: DL2 000 marker; 1: negative control; 2: positive control; 3: PCR product of NDV F.

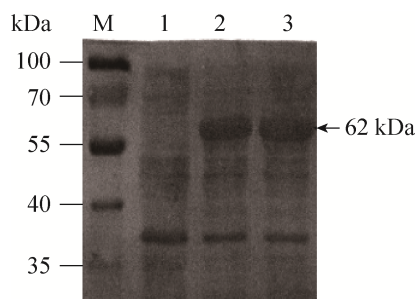


图 2 pLA-NDV-F/L. casei Western blotting 鉴定结果

Fig. 2 Western blotting result of pLA-NDV-F/L. casei. M: low molecular weight protein marker; 1: pLA/L. casei; 2, 3: pLA-NDV-F/L. casei.

2.1.3 间接免疫荧光试验鉴定

对 pLA-NDV-F/L. casei 和 pLA/L. casei 进行间接免疫荧光鉴定,结果表明, pLA-NDV-F/L. casei 在明视野下可观察到菌体形态(图 3A),荧光显微镜下亦可观察到明显的绿色荧光反应(图 3B),且荧光为菌体发出(A,B 重叠图 3C),pLA/L. casei 在明视野下可见到菌体形态(未列结果),荧光显微镜下未见到绿色荧光(图 3D),证明 pLA-NDV-F/L. casei 成功表达外源蛋白。

2.1.4 流式细胞术鉴定

取表达 10 h 的 pLA-NDV-F/L. casei 和 pLA/L. casei 进行流式细胞术检测,结果显示, pLA-NDV-F/L. casei 荧光强度明显高于 pLA/L. casei,筛选的 10 000 个重组乳酸菌可表达此蛋白的菌体高达 94.10%(图 4),表明 pLA-NDV-F/L. casei 已成功表达外源蛋白,且表达量较高。

2.1.5 激光共聚焦鉴定

利用激光共聚焦技术检测重组菌蛋白表达情况,观察到绿色荧光主要集中于菌体表面(图 5C),而 pLA/L. casei 无此现象(图 5D),与预期结果相符(图 5)。

2.2 血清 IgG 抗体效价测定

间接 ELISA 方法检测血清中 IgG 抗体水平,结果显示, pLA-NDV-F/L. casei 两次免疫组、三次免疫组和弱毒疫苗组雏鸡首免后 7 d 即可检测

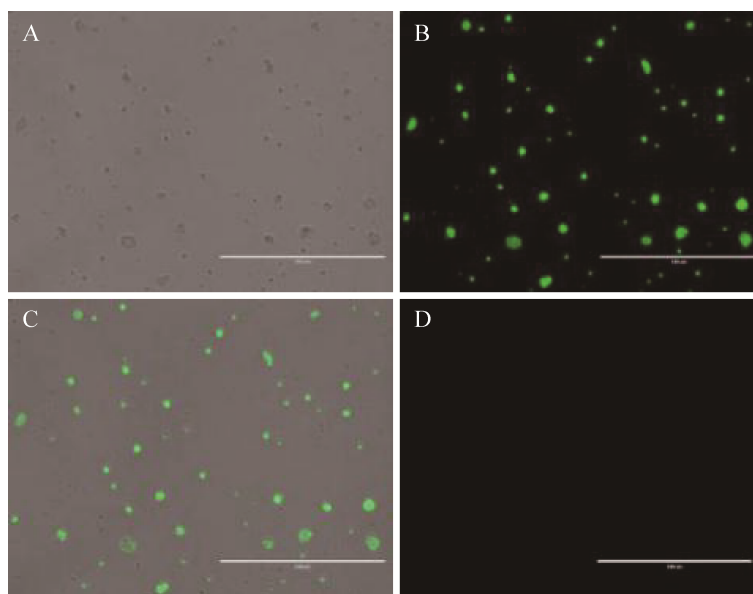


图3 pLA-NDV-F/L. casei 荧光检测结果

Fig. 3 Fluorescence analysis of pLA-NDV-F/L. casei. (A) Bright field photograph 400× of pLA-NDV-F/L. casei. Bar=100 μm. (B) Fluorescence photo 400× of pLA-NDV-F/L. casei. Bar=100 μm. (C) Merger 400× of pLA-NDV-F/L. casei. Bar=100 μm. (D) Fluorescence photo 400× of pLA/L. casei. Bar=100 μm.

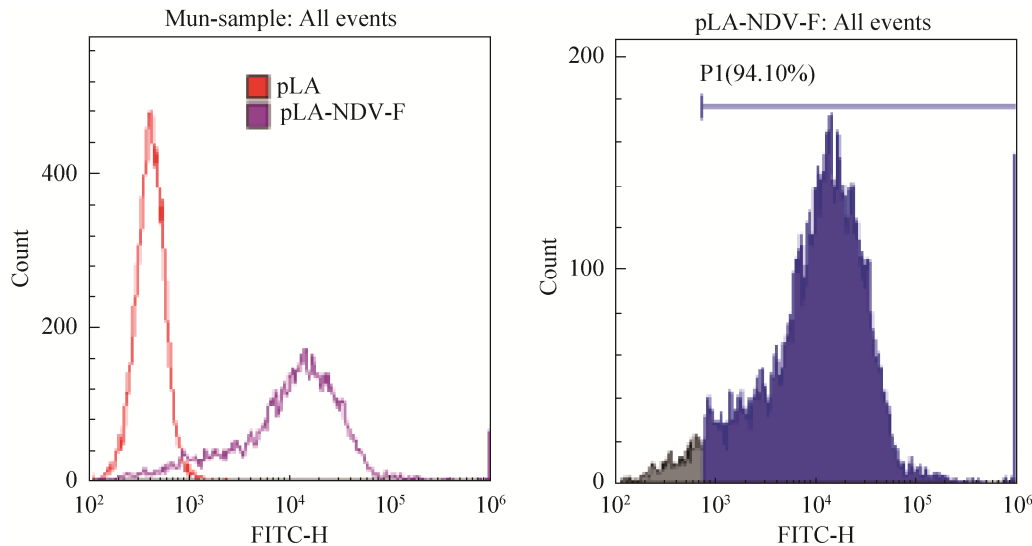


图4 pLA-NDV-F/L. casei 流式细胞术检测结果

Fig. 4 Fluorescence-activated cell sorter analysis of pLA-NDV-F/L. casei. The red curve is the fluorescence intensity of the pLA/L. casei control; the purple curve is the fluorescence intensity of experimental group pLA-NDV-F/L. casei.

到相应抗体,三次免疫组与两次免疫组 ($P=0.098$) 和弱毒疫苗组 ($P=0.382$) 相比抗体峰值没有显著差异 ($P>0.05$), 三次免疫组与两次免疫组抗体

水平于 42 d 后出现显著性差异 ($P<0.05$), 7 d 后各试验组抗体水平均显著高于 pLA/L. casei 组和 PBS 组 ($0.0001<P<0.001$) (图 6A)。

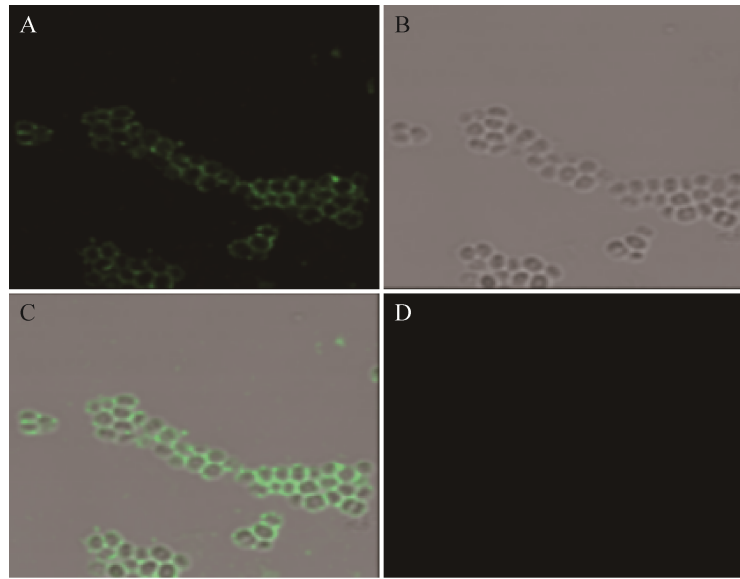


图 5 pLA-NDV-F/L. casei 激光共聚焦显微镜检测结果

Fig. 5 Laser confocal microscopy detection of pLA-NDV-F/L. casei. (A) Fluorescent photo 630x of pLA-NDV-F/L. casei. (B) Bright field photo 630x of pLA-NDV-F/L. casei. (C) Merger 630x of pLA-NDV-F/L. casei. (D) Fluorescent photo 630x of pLA/L. casei.

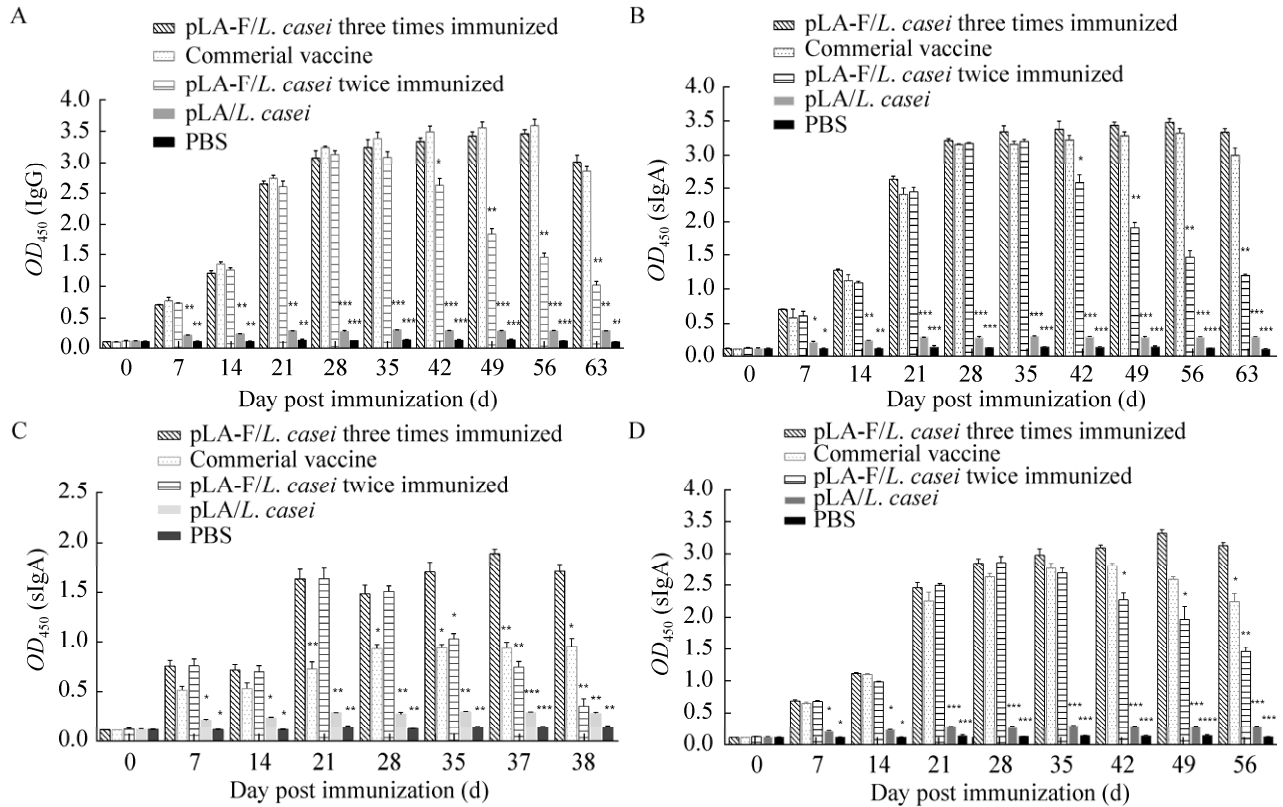


图 6 重组菌免疫雏鸡血清 (A) 特异性 IgG 抗体水平及雏鸡肠道 (B)、鼻腔 (C)、肺脏 (D) 冲洗液特异性 sIgA 抗体水平

Fig. 6 Specific IgG antibody response in sera (A) and specific sIgA antibody response in intestinal (B), nasal (C) and lung (D) following immunization with recombinant strains.

2.3 肠道、鼻腔、肺脏冲洗液 sIgA 抗体效价测定

对采集的雏鸡肠道、肺脏、鼻腔冲洗液进行间接 ELISA 方法检测,肠道冲洗液检测结果显示,免疫 pLA-NDV-F/L. *casei* 的两组抗体水平显著高于对照组 ($0.000\ 01 < P < 0.000\ 1$), 分别于免疫后 56 d、28 d 达到抗体峰值且抗体水平没有显著性差异 ($P > 0.05$), 三次免疫组抗体水平于 42 d 后显著高于两次免疫组。弱毒疫苗组在免疫后 49 d 抗体出现下降趋势, 各试验组抗体水平均显著高于 pLA/L. *casei* 组 ($0.000\ 1 < P < 0.001$) 和 PBS 组 ($0.000\ 1 < P < 0.001$) (图 6B)。

鼻腔冲洗液检测结果表明, pLA-NDV-F/L. *casei* 三次免疫组和两次免疫组抗体水平分别于免疫后 37 d、21 d 达到抗体峰值且抗体水平没有显著性差异 ($P > 0.05$), pLA-NDV-F/L. *casei* 三次免疫组的抗体水平于 35 d 后显著高于两次免疫组 ($0.01 < P < 0.05$), 于 21 d 后显著高于弱毒疫苗组 ($0.05 < P < 0.01$), 并显著高于 pLA/L. *casei* 组 ($0.000\ 1 < P < 0.001$) 和 PBS 组 ($0.000\ 1 < P < 0.001$), 对照组抗体无明显增长 (图 6C)。

肺脏冲洗液检测结果表明, pLA-NDV-F/L. *casei* 免疫三次组和免疫两次组在免疫后 21 d 抗体出现明显增长并趋于稳定, 分别于 49 d 和 28 d 达到峰值, 于 42 d 后出现显著性差异 ($0.01 < P < 0.05$), 三次免疫组与弱毒疫苗组抗体水平没有显著性差异 ($P > 0.05$), 各试验组抗体水平极显著高于 pLA/L. *casei* 组 ($0.000\ 1 < P < 0.001$) 和 PBS 组 ($0.000\ 01 < P < 0.000\ 1$) (图 6D)。

2.4 pLA-NDV-F/L. *casei* 攻毒保护试验结果

分别于两次免疫和三次免疫 7 d 后以 NDV 强毒株 F48E8 对试验鸡进行攻毒, 攻毒对照组 72 h 内全部死亡; 未攻毒 PBS 组 (D2) 试验鸡全部存活, 健康状态良好。其中, 免疫重组干酪乳杆菌 pLA-NDV-F/L. *casei* 的两组于 36 h 开始出现死亡

表 2 免疫重组干酪乳杆菌保护率

Table 2 Protectiveratio of recombinant *Lactobacillus casei*

Group	Negative ratio	Average protection rate (%)
A1	8/10	80
A2	8/10	80
B	9/10	90
C	0/10	0
D1	0/10	0
D2	10/10	100

现象, 两次免疫组弱毒疫苗组于 48 h 开始出现死亡现象, 未死亡个体健康状态均良好, A1、A2、B、C、D1 和 D2 各组保护率分别为 80%、80%、90%、0%、0%和 100% (表 3)。

3 讨论

本文报道了以干酪乳杆菌作为抗原递送载体研发一种黏膜疫苗用于鸡新城疫的防控。具体为截取包括 Fcs 在内的 NDV F 蛋白的两处主要的抗原基因片段, 与 pLA 穿梭质粒相连, 构建重组干酪乳杆菌 pLA-NDV-F/L. *casei*, 经检测发现重组菌阳性率高达 94.10%, 且展示在细胞表面, 确定了该重组菌的应用价值。

黏膜免疫存在归巢效应, 诱导特定部位致敏的免疫细胞, 约 80% 免疫细胞返回抗原致敏部位发挥免疫功能, 表现为局部免疫, 其余 20% 免疫细胞则转移至其他黏膜部位发挥功能, 致使不同黏膜部位发生相互关联^[16]。通过对鼻黏膜冲洗液中 sIgA 抗体的检测可以发现, 相对于其他组织, 重组菌在此处诱导的抗体持续时间相对较短, 与相关文章中关于乳杆菌鼻黏膜的定殖仅为 3 d 左右的报道基本一致^[17]。可于肺脏冲洗液中检测到 sIgA 抗体, 且抗体水平和抗体持续时间均优于鼻腔冲洗液, 分析原因可能为: 1) 滴鼻免疫途径使部分重组菌抗原进入肺脏诱发局部黏膜免疫; 2) 进入鼻腔和肠道的菌刺激产生的免疫细胞部分转移

至肺脏黏膜免疫组织,引起黏膜相关淋巴组织 (Mucosal associated lymphoid tissues, MALT) 免疫应答^[16]; 3) 口服 pLA-NDV-F/L. *casei* 可长时间、大量存留于肠道,由此处刺激产生的免疫细胞可转移刺激肺脏黏膜免疫组织产生免疫应答,却不能刺激鼻相关淋巴组织 (Nasal associated lymphoid tissues, NALT) 免疫反应^[18],可能是造成肺脏抗体持续时间长于鼻腔的原因,另外,是否因为自身免疫器官产生的局部免疫应答和其他免疫细胞通过转移诱导的 MALT 免疫应答共同作用,从而导致此处抗体水平较高,有待验证。

免疫次数增多的同时免疫成本也随之增加,因此,确定免疫次数与抗体效价、抗体持续时间的关系对于该重组菌的实际应用具有重要意义,可以发现免疫两次组和免疫三次组在诱导体液免疫和黏膜免疫方面产生的抗体峰值无显著性差异,可能是试验时均以相同剂量抗原用于雏鸡免疫,以至于试验鸡体内针对此剂量抗原产生的抗体已到达阈值,无法实现显著增长。研究表明,在适当增加抗原施用剂量时可诱发更高水平的抗体滴度^[2,19]。因此,随着免疫次数的增加,适当增加免疫剂量或许更有利于抗体峰值的增长。攻毒试验结果显示 A1、A2 组保护率一致,表明两次免疫和三次免疫都能抵抗病毒感染,只是三次免疫能获得更长的免疫保护时间。免疫保护性试验结果显示,重组菌组免疫效果略低于弱毒疫苗组,可能因为重组菌表达的仅为部分抗原表位区,而弱毒疫苗具备天然病毒完整的抗原表位,因此能刺激机体产生更高的免疫应答,但是仍需要田间免疫效果的进一步分析。

本研究利用干酪乳杆菌表达体系成功表达了 NDV F 部分主要抗原表位蛋白,雏鸡免疫及攻毒保护性试验表明,重组干酪乳杆菌 pLA-NDV-F/L. *casei* 具有良好的免疫原性和反应原性,可诱导机体产生保护性免疫应答。

REFERENCES

- [1] Ge JY, Wang XJ, Tian MJ, et al. Recombinant Newcastle disease viral vector expressing hemagglutinin or fusion of canine distemper virus is safe and immunogenic in minks. *Vaccine*, 2015, 33(21): 2457–2462.
- [2] Dimitrov KM, Afonso CL, Yu QZ, et al. Newcastle disease vaccines-A solved problem or a continuous challenge? *Vet Microbiol*, 2017, 206: 126–136.
- [3] Ayala AJ, Dimitrov KM, Becker CR, et al. Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): e0162484.
- [4] Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, et al. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in west and central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2250–2260.
- [5] Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, et al. Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J Virol*, 1988, 62(11): 4427–4430.
- [6] Samal S, Khattar SK, Paldurai A, et al. Mutations in the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein confer hyperfusogenic phenotypes modulating viral replication and pathogenicity. *J Virol*, 2013, 87(18): 10083–10093.
- [7] Xiao S, Nayak B, Samuel A, et al. Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52751.
- [8] Samal S, Kumar S, Khattar SK, et al. A single amino acid change, Q114R, in the cleavage-site sequence of Newcastle disease virus fusion protein attenuates viral replication and pathogenicity. *J Gen Virol*, 2011, 92: 2333–2338.
- [9] Aktas B, de Wolfe TJ, Tandee K, et al. The effect of

- Lactobacillus casei* 32G on the mouse cecum microbiota and innate immune response is dose and time dependent. PLoS ONE, 2015, 10(12): e0145784.
- [10] Compare D, Rocco A, Coccoli P, et al. *Lactobacillus casei* DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: an *ex-vivo* organ culture model of post-infectious irritable bowel syndrome. BMC Gastroenterol, 2017, 17: 53.
- [11] Van Beek AA, Sovran B, Hugenholtz F, et al. Supplementation with *Lactobacillus plantarum* WCFS1 prevents decline of mucus barrier in colon of accelerated aging *Ercc1^{-Δ7}* mice. Front Immunol, 2016, 7: 408.
- [12] Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, et al. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. Infect Immun, 2004, 72(5): 2731–2737.
- [13] Qiu ZB, Chen J, Chen JJ, et al. Effect of recombinant *Lactobacillus casei* expressing interleukin-10 in dextran sulfate sodium-induced colitis mice. J Dig Dis, 2013, 14(2): 76–83.
- [14] Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. Biotechnol J, 2011, 6(9): 1147–1161.
- [15] Wen LJ, Hou XL, Wang GH, et al. Immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains producing K99, K88 fimbrial protein protects mice against enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vaccine, 2012, 30(22): 3339–3349.
- [16] Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. Immunol Today, 1999, 20(6): 267–277.
- [17] Wyszynska A, Kobierecka P, Bardowski J, et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(7): 2967–2977.
- [18] Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. Am J Pathol, 1997, 151(1): 97–110.
- [19] Dimitrov KM, Ramey AM, Qiu XT, et al. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). Infect Genet Evol, 2016, 39: 22–34.

(本文责编 郝丽芳)