

表达猪流行性腹泻病毒 S1 基因植物乳酸杆菌工程菌的免疫原性分析

聂民财^{1*}, 岳健国^{3*}, 邓益超¹, 杨姝⁴, 朱玲^{1,2}, 徐志文^{1,2}

1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川农业大学 动物医学院 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

3 成都市动物疾病预防控制中心, 四川 成都 610041

4 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610101

聂民财, 岳健国, 邓益超, 等. 表达猪流行性腹泻病毒 S1 基因植物乳酸杆菌工程菌的免疫原性分析. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2779-2785.

Nie MC, Yue JG, Deng YC, et al. Immunogenicity of engineered *Lactobacillus plantarum* expressing porcine epidemic diarrhea virus S1 gene. Chin J Biotech, 2021, 37(8): 2779-2785.

摘要: 为探究表达猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) S1 基因的植物乳酸杆菌工程菌是否对动物产生保护力, 利用构建的含重组质粒 pVE5523-S1 乳杆菌口服免疫豚鼠 3 次, 每次间隔 14 d, 每次 2×10^8 CFU/只。并以植物乳酸杆菌及含表达质粒 pVE5523 植物乳杆菌为阴性对照, 进行相同处理。用猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎二联活疫苗 (HB08 株+ZJ08 株) 肌肉注射接种豚鼠, 免疫 3 次, 每次间隔 14 d, 每次 0.2 mL/只, 作为阳性对照。分别在免疫后的 0 d、7 d、14 d、24 d、31 d、41 d 及 48 d 对 4 组试验豚鼠心脏采血并分离血清, 进行酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测抗体和中和试验分析, 同时无菌采豚鼠脾脏, 进行脾细胞增殖实验分析。结果显示, 工程菌能刺激机体产生分泌性抗体 sIgA、特异性中和抗体, 还可刺激机体 IL-4 和 IFN- γ 的增长以及脾细胞的增殖。说明该 PEDV S1 基因植物乳酸杆菌工程菌使豚鼠对 PEDV 产生了特异性免疫力, 为后续口服疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒 S1 基因, 植物乳杆菌, 黏膜免疫, 免疫原性

Received: September 12, 2020; **Accepted:** December 14, 2020

Supported by: Sichuan Science and Technology Department New Product Development, China (No. 2018NZDZX0006), Sichuan Provincial Department of Science and Technology "Thirteenth Five-Year" Breeding Project, China (No. 2016NYZ0052), Sichuan Science and Technology Department Key RESEARCH and Development Projects, China (No. 2018NZ0150), Sichuan Science and Technology Department Key Research and Development Projects, China (No. 2019YFN0015), Agricultural Industrial Technology System of Sichuan Department of Agriculture, China (No. CARS-SVDIP).

Corresponding author: Ling Zhu. Tel: +86-28-86291162; E-mail: abtcz172@126.com

*These authors contributed equally to this study.

四川省科技厅新产品开发 (No. 2018NZDZX0006), 四川省科技厅“十三五”育种攻关计划课题 (No. 2016NYZ0052), 四川省科技厅重点研发项目 (No. 2018NZ0150), 四川省科技厅重点研发项目 (No. 2019YFN0015), 四川省农业厅农业产业技术体系 (No. CARS-SVDIP) 资助。

网络出版时间: 2021-01-05

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210104.1328.001.html>

Immunogenicity of engineered *Lactobacillus plantarum* expressing porcine epidemic diarrhea virus *S1* gene

Mincai Nie^{1*}, Jianguo Yue^{3*}, Yichao Deng¹, Shu Yang⁴, Ling Zhu^{1,2}, and Zhiwen Xu^{1,2}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Sichuan Key Laboratory of Animal Epidemic Disease and Human Health, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Chengdu Animal Disease Prevention and Control Center, Chengdu 610041, Sichuan, China

4 College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan, China

Abstract: To investigate whether the engineered *Lactobacillus plantarum* expressing the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) *S1* gene can protect animals against PEDV, guinea pigs were fed with recombinant *L. plantarum* containing plasmid PVE5523-S1, with a dose of 2×10^8 CFU/piece, three times a day, at 14 days intervals. Guinea pigs fed with wild type *L. plantarum* and the engineered *L. plantarum* containing empty plasmid pVE5523 were used as negative controls. For positive control, another group of guinea pigs were injected with live vaccine for porcine epidemic diarrhea and porcine infectious gastroenteritis (HB08+ZJ08) by intramuscular injection, with a dose of 0.2 mL/piece, three times a day, at 14 days intervals. Blood samples were collected from the hearts of the four groups of guinea pigs at 0 d, 7 d, 14 d, 24 d, 31 d, 41 d and 48 d, respectively, and serum samples were isolated for antibody detection and neutralization test analysis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The spleens of guinea pigs were also aseptically collected to perform spleen cells proliferation assay. The results showed that the engineered bacteria could stimulate the production of secretory antibody sIgA and specific neutralizing antibody, and stimulate the increase of IL-4 and IFN- γ , as well as the proliferation of spleen cells. These results indicated that the engineered *L. plantarum* containing PEDV *S1* induced specific immunity toward PEDV in guinea pigs, which laid a foundation for subsequent oral vaccine development.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus *S1* gene, *Lactobacillus plantarum*, mucosal immunity, immunogenicity

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是一种以水样腹泻为特征的猪的急性、高度接触性肠道传染病^[1]。该病在全球广泛流行,严重影响养猪业的发展,造成了很大的经济损失。猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) *S1* 基因是 PEDV 主要的免疫原性基因,在诱导机体产生中和抗体的过程中发挥着重要作用^[2-5]。

乳酸杆菌是一类无芽孢并能将葡萄糖发酵为乳酸的细菌,其具有许多特性使它非常适合作为载体将目的基因递呈至黏膜而引起黏膜免疫。例如具有耐酸和耐胆盐的生物特性;能够定殖在机体特定的区域,在维持微生物菌群平衡方面发挥着重要的作用;细胞壁的主要成分脂磷壁酸 (Lipoteichoic acid, LTA) 能够刺激细胞因子的合成^[6-7]。并且已有研究成功构建了以乳酸杆菌为载体的活疫苗:付婷婷等^[8]构建了猪圆环病毒 3 型

Cap 蛋白重组乳杆菌,周晗^[9]构建了表达猪轮状病毒的 *VP7* 和 *NSP4* 基因的重组乳杆菌。

本实验将表达 PEDV *S1* 基因的工程乳酸杆菌口服免疫实验动物,并对血清中抗体水平、粪便中分泌抗体水平、脾细胞增殖情况等进行检测和分析,以期为 PEDV 活载体疫苗的研发与临床应用奠定实践基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和试验动物

PEDV EM-P 株、植物乳杆菌由四川农业大学动物生物技术中心保存;PEDV *S1* 基因植物乳杆菌工程菌、含有质粒 pVE5523 植物乳杆菌^[10]由四川农业大学动物生物技术中心构建保存;健康豚鼠购自达硕生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂

猪源 PEDV S 蛋白 IgA、IgG、sIgA ELISA 检测试剂盒、豚鼠源 IL-4、IFN- γ ELISA 检测试剂盒和辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗豚鼠二抗均购自上海酶联生物科技有限公司; 新生犊牛血清、DMEM、RPMI 1640 培养液均购自美国 GIBCO 公司; MTT 试剂盒购自 BBI Life Science; 猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎二联活疫苗 (HB08 株+ZJ08 株) (PED-TGE 二联活疫苗) 购自中牧实业股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备

分别用含红霉素的 MRS 培养基和 MRS 培养基培养 PEDV *SI* 基因乳杆菌工程菌与植物乳杆菌, 调整浓度为 10^9 CFU/mL。

1.2.2 试验动物分组及免疫

将 40 只 250–300 g 豚鼠随机分为 4 组, 其中 3 组分别口服免疫 PEDV *SI* 基因乳杆菌工程菌、含质粒 pVE5523 的植物乳杆菌 (空载组) 及含红霉素的 MRS 液体培养基 (空白组), 每组免疫 3 次, 每次间隔 14 d, 每次 2×10^8 CFU/只; 另设一组为商品疫苗免疫组 (PED-TGE 二联活疫苗), 肌注免疫 3 次, 每次间隔 14 d, 每次 0.2 mL/只。

1.2.3 sIgA 抗体检测

于免疫前 (0 d) 及初次免疫后 7 d、14 d、24 d、31 d、41 d、48 d 采集豚鼠的粪便样品。使用猪源 PEDV S 蛋白 sIgA ELISA 检测试剂盒进行测定, 二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗豚鼠抗体。应用间接 ELISA 方法测定, 商品试剂盒中包被了 sIgA 的一抗, 将样品 1:4 稀释之后加入反应孔进行孵育, 孵育后加入酶标二抗, 酶标仪测定 OD_{450} 。以标准物浓度和 OD_{450} 建立坐标系绘制曲线计算抗体水平。

1.2.4 血清中 IgG、IgA、IL-4、IFN- γ 检测

于免疫前 (0 d) 及初次免疫后 7 d、14 d、24 d、31 d、41 d、48 d 心脏采集豚鼠的血液, 分别用猪

源 PEDV S 蛋白 IgA、IgG ELISA 检测试剂盒和豚鼠源 IL-4、IFN- γ ELISA 检测试剂盒进行检测。IgG、IgA ELISA 检测时二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗豚鼠。实验操作同 1.2.3。

1.2.5 脾细胞增殖试验

每组选择一只豚鼠, 于免疫前 (0 d) 及初次免疫后 7 d、14 d、24 d、31 d、41 d、48 d 解剖豚鼠, 取脾脏并开一口, 用 PBS 液冲洗并用镊子按压, 收集液体, 离心后用 PBS 液重悬沉淀。向 96 孔板中加入 100 μ L 的 1640 培养液、50 μ L 的含有脾细胞和 10 μ L/mL 双抗的 PBS 溶液。按照 MTT 试剂盒说明书步骤检测豚鼠脾细胞增殖情况。

1.2.6 中和抗体检测

将 PEDV EM-P 株用含有 2% 新生犊牛血清的 DMEM 进行 10 倍梯度稀释, 稀释 9 个梯度, 接种于 Vero 细胞密集生长至 80% 的 96 孔板中, 每孔加 100 μ L, 设置 8 个重复, 其余孔为对照。培养 4–6 d 记录细胞病变。根据 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

将待检血清灭活并进行 2 倍梯度稀释 (1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64), 加入 96 孔板中, 每孔加 50 μ L, 设置 4 个重复。将病毒液用含 10% 新生犊牛血清的 DMEM 稀释为 200 TCID₅₀, 每孔加 50 μ L。充分混匀后作用 1 h。制备 Vero 细胞悬液, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L。混合后培养观察, 并设置正常细胞空白对照组。根据 CPE 用 Reed-Muench 法计算出 50% 血清中和终点。

2 结果与分析

2.1 粪便样品中 sIgA 的检测结果

空白组和空载组 sIgA 水平没有明显变化。PEDV *SI* 基因工程菌组在首免后第 7 天抗体水平明显增加 ($P < 0.05$), 二免后 sIgA 抗体迅速增长至 488.34 ng/L ($P < 0.05$), 三免后再次迅速增长 ($P < 0.01$), 最大增长至 600.61 ng/L。商品疫苗组在第 48 天达到最大值 360.8 ng/L ($P < 0.01$) (图 1)。

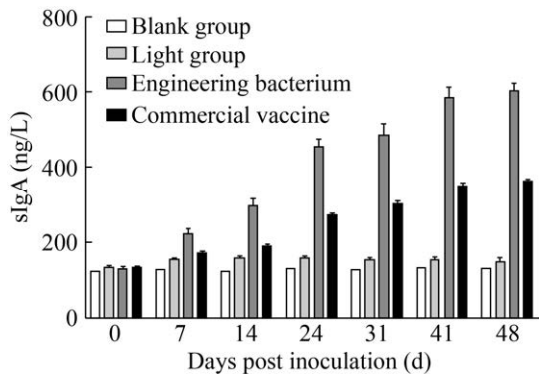


图1 粪便样品中 sIgA 检测结果

Fig. 1 sIgA levels in fecal samples.

2.2 血清中 IgG、IgA、IL-4、IFN- γ 的检测结果

2.2.1 血清中 IgG 抗体水平的检测结果

空白组和空载组 IgG 水平没有明显的变化。PEDV *S1* 基因工程菌组在首免后抗体水平开始增长 ($P < 0.01$), 三免后 IgG 水平增长到最大值 354.45 U/L ($P < 0.01$)。商品疫苗组在 48 d 抗体水平达到最大值 602.66 U/L ($P < 0.01$) (图 2)。

2.2.2 血清中 IgA 水平的检测结果

空白组和空载组 IgA 水平没有明显的增长。PEDV *S1* 基因工程菌组和商品疫苗组在首免后 IgA 水平开始增长, 且前者增长速度比后者快 ($P < 0.01$); 在 48 d PEDV *S1* 基因工程菌组和商品疫苗组 IgA 水平均达到最大值, 分别为 331.07 U/L、198.59 U/L ($P < 0.01$) (图 3)。

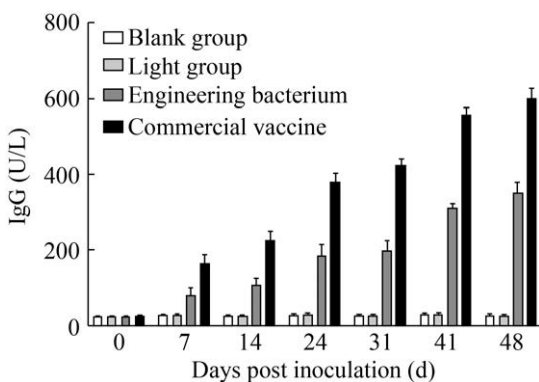


图2 血清中 IgG 抗体 ELISA 检测结果

Fig. 2 Serum IgG levels detected by ELISA.

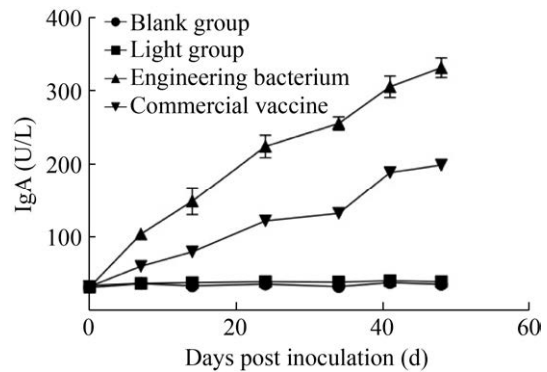


图3 血清中 IgA 抗体 ELISA 检测结果

Fig. 3 Serum IgA levels detected by ELISA.

2.2.3 血清中细胞因子 IL-4 水平的检测结果

空白组和空载组 IL-4 水平没有明显变化。PEDV *S1* 基因工程菌组和商品疫苗组在一免后 IL-4 水平开始增长, 二免后 IL-4 的水平迅速增长 ($P < 0.01$), 两组 IL-4 水平在 48 d 均达到最大值, 分别为 75.24 pg/mL 和 152.04 pg/mL ($P < 0.01$) (图 4)。

2.2.4 血清中 IFN- γ 水平的检测结果

空白组 IFN- γ 的水平没有明显变化, 空载组 IFN- γ 的水平有小幅度的增加。PEDV *S1* 基因工程菌组和商品疫苗组 IFN- γ 水平在首免后开始增长, 7-14 d 增长缓慢 ($P < 0.05$), 二免后, 两组 IFN- γ 水平均迅速增长 ($P < 0.01$), 在 48 d PEDV *S1* 基因工程菌组和商品疫苗组 IFN- γ 水平均达到最大值, 分别为 106.42 pg/mL 和 147.86 pg/mL ($P < 0.01$) (图 5)。

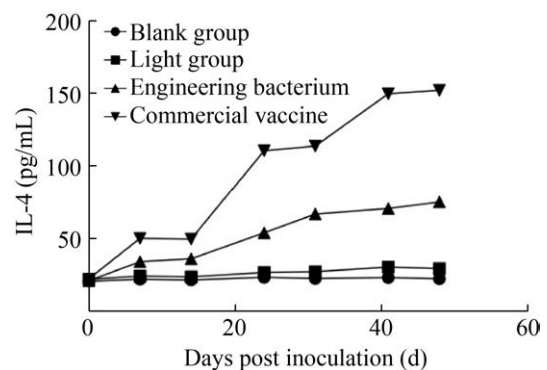


图4 血清中 IL-4 水平的 ELISA 检测结果

Fig. 4 Serum IL-4 levels detected by ELISA.

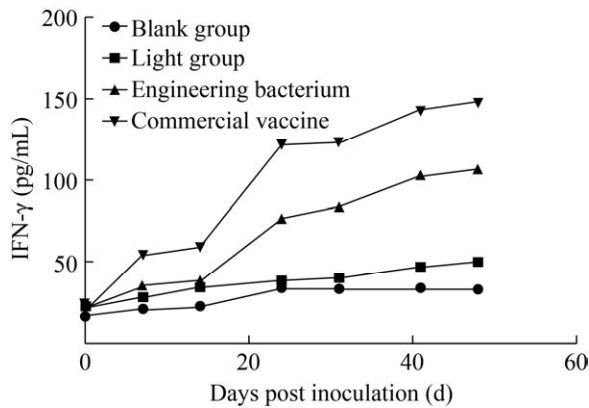


图 5 血清中 IFN- γ 水平的 ELISA 检测
Fig. 5 Serum IFN- γ levels detected by ELISA.

2.3 脾细胞增殖实验结果

空白组和空载组的脾细胞未出现明显的增殖，PEDV S1 基因工程菌组和商品疫苗组脾细胞有明显的增殖 ($P < 0.01$), 但 PEDV S1 基因工程菌组弱于商品疫苗组 (图 6)。

2.4 细胞中和试验结果

根据 Reed-Muench 法计算 PEDV 毒株 TCID₅₀ 为 $10^{-6.32}/0.1$ mL, PEDV S1 基因工程菌组和商品疫苗组都产生了中和抗体, PEDV S1 基因工程菌组中和抗体水平低于商品疫苗组, 空白组和空载组均未检出中和抗体 (图 7)。

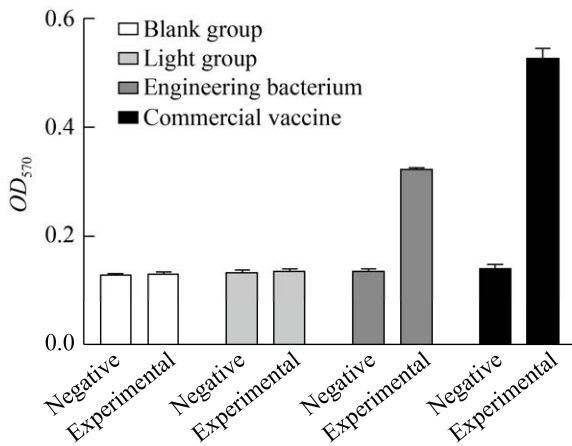


图 6 脾细胞增殖实验
Fig. 6 The splenocyte proliferation assay detected by MTT method.

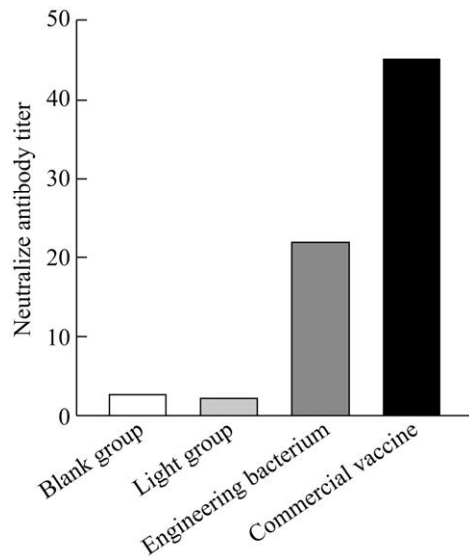


图 7 中和试验结果
Fig. 7 The results of neutralization test.

3 讨论

实验结果表明, 以乳酸杆菌为载体的疫苗不仅能诱导机体产生体液免疫、细胞免疫, 还能刺激机体产生黏膜免疫。用植物乳杆菌为活载体表达 PEDV S1 基因的细菌活载体疫苗免疫健康豚鼠后, 能在一定程度上刺激动物脾细胞的增殖, 还可以刺激动物机体产生特异性病毒中和抗体。

在成功构建了 PEDV S1 基因植物乳杆菌工程菌的基础上, 我们通过用 PEDV S1 基因工程菌口服免疫豚鼠来初步探究该活载体疫苗的免疫原性。特异性抗体结果显示, 相比于空白组和空载组, PEDV S1 基因工程菌组的 IgG 水平在 48 d 内有明显提高, 但低于商品疫苗组。该结果与苏君鸿等^[11]研究结果一致, 原因可能是商品化 ELISA 试剂盒包被板上是 PEDV S1 蛋白全蛋白, 含有本研究目的蛋白量较少。针对这种情况, 可以将目的蛋白纯化后作为包被板中的抗原物质, 这样可使准确性更高。但本研究结果与倪能能等^[12]研究结果不同, 倪能能构建了猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因重组植物乳杆菌并免疫小鼠, 以 PCV2 商品灭活

疫苗组作为对照组,均产生了较高的特异性的抗体,两者保护效果没有明显差别。原因可能是由于在对照组中选用的商品疫苗不同,本研究中采用的是 PED-TGE 二联活疫苗。从分泌性抗体 sIgA 测定结果显示,相比于空白组、空载体组、商品疫苗组, PEDV S1 基因乳杆菌工程菌中在 48 d 内有明显的增长。以上结果与张月^[13]表达的 PEDV S1 蛋白重组嗜酸乳杆菌口服免疫小鼠后得到的结果一致,说明植物乳杆菌和嗜酸乳杆菌均能作为载体递呈抗原物并刺激机体产生黏膜免疫应答。病毒中和抗体测定结果显示,在免疫结束 2 周后检测豚鼠血清中中和抗体效价,在 PEDV S1 基因工程组和商品疫苗组均测得病毒中和抗体,但 PEDV S1 基因工程菌组的中和抗体水平低于商品疫苗组。其原因在于 PEDV S1 基因工程菌免疫主要刺激机体产生分泌性抗体 sIgA,而通过肌注的商品疫苗组主要刺激机体产生特异性抗体 IgG。其次在于, PED-TGE 二联活疫苗含有完整的病毒成分,刺激动物机体产生的抗体更为全面,而乳酸杆菌活载体疫苗仅选用了 PEDV S 蛋白中的一部分,刺激机体产生的抗体比较单一,与 PED-TGE 二联活疫苗相比,产生的中和抗体水平相对较低。

工程菌口服疫苗与传统疫苗相比具有很多优势。与口服疫苗相比,口服疫苗在肠道易受到胃酸及肠道内容物的破坏,从而降低了免疫效果;而工程菌疫苗在肠道内能够免受胃酸的破坏,在肠道内定殖并表达 PEDV S1 蛋白达到更好的免疫效果。与注射疫苗相比,注射疫苗技术要求高,人工成本高;且注射易引起猪只产生应激;而工程菌疫苗可以通过饮水或饲料进行免疫,人工成本低,不易产生应激反应。

乳酸杆菌工程菌活载体疫苗有许多经济又实用的优点,这类疫苗较易生产、不需纯化;成本较低、价格非常便宜;易于口服使用,口服免疫不会损坏皮肤黏膜,有利于预防通过伤口接触感

染的疾病;易于保存和运输;可诱导产生黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫;安全性高于常规疫苗。综上所述,乳酸杆菌工程菌活载体口服疫苗的开发使用是过去几年也是未来口服疫苗研究的热点。全价、多型、多联乳酸杆菌工程菌活载体口服疫苗发展前景十分诱人。本实验对 PEDV 活载体口服疫苗的免疫原性进行了探究,为后续 PEDV 疫苗的研究提供参考。

REFERENCES

- [1] 汪淼. 表达猪流行性腹泻病毒中和抗原区重组乳酸乳球菌系统的构建[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
Wang M. Construction of recombinant *Lactococcus lactis* expressing neutralizing antigenic domain of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [2] Chang SH, Bae JL, Kang TJ, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells*, 2002, 14(2): 295-299.
- [3] Kang TJ, Seo JE, Kim DH, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Prot Expr Purif*, 2005, 41(2): 378-383.
- [4] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 137-144.
- [5] Bridgen A, Kocherhans R, Tobler K, et al. Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus//Enjuanes L, Siddell SG, Spaan W, Eds. *Coronaviruses and Arteriviruses*. Boston, MA: Springer, 1998, 440: 781.
- [6] Fredriksen L, Mathiesen G, Sioud M, et al. Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(21): 7359-7362.
- [7] Yilmaz H, Altan E, Ridpath J, et al. Genetic

- diversity and frequency of bovine viral diarrhea virus (BVDV) detected in cattle in Turkey. *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35(5): 411-416.
- [8] 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. *中国兽医学报*, 2019, 39(6): 1052-1057.
Fu TT, Li C, Wang MP, et al. Construction and expression verification of recombinant PCV3 Cap protein in *Lactobacillus plantarum*. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(6): 1052-1057 (in Chinese).
- [9] 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]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
Zhou H. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* expressing NSP4 and VP7 of porcine rotavirus and immunogenicity analysis[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [10] Deng YC, Jiang ZY, Fan Y, et al. Construction and expression of a recombinant plasmid containing the porcine epidemic diarrhea virus S1 gene delivered by *Lactobacillus*//BIBE 2019; The Third International Conference on Biological Information and Biomedical Engineering. Hangzhou, China, 2019: 288-292.
- [11] 苏君鸿, 李云岗, 陈树林, 等. 以乳酸杆菌为载体的猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 A、D 抗原位点 DNA 疫苗的构建. *动物医学进展*, 2009, 30(8): 19-23.
Su JH, Li YG, Chen SL, et al. Construction of DNA vaccine containing antigenic sites A and D of S gene of porcine transmissible gastroenteritis virus using *Lactobacillus* as carrier. *Progr Vet Med*, 2009, 30(8): 19-23 (in Chinese).
- [12] 倪能能, 王新珂, 赖强, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因重组植物乳杆菌的构建及其免疫原性分析. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(8): 2408-2416.
Ni NN, Wang XK, Lai Q, et al. Construction and immunogenicity analysis of recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2. *China Anim Husband Vet Med*, 2017, 44(8): 2408-2416 (in Chinese).
- [13] 张月. 猪流行性腹泻病毒 S 基因变异分析及嗜酸乳杆菌口服疫苗的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
Zhang Y. Genetic variation of S gene and *Lactobacillus* edible vaccine study of porcine epidemic diarrhea virus[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)