

猪细小病毒 VP2 与大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位在干酪乳杆菌表面共表达

王相清 欧 笛 任安琦 葛俊伟 乔薪瑗 唐丽杰 李一经*

(东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 将分别编码猪细小病毒(PPV)主要免疫保护性抗原 VP2 蛋白与大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)基因插入乳酸杆菌细胞表面表达载体 pPG 中, 成功构建了重组表达载体 pPG-VP2-LTB, 将其电转化干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393, 获得了表达猪细小病毒 VP2-LTB 融合蛋白的重组乳酸菌表达系统, 经 2%乳糖诱导, SDS-PAGE 和 Western-blot 检测表明, 有大小约 78 kD 的蛋白得到了表达, 具有与天然病毒蛋白一样的抗原特异性, 全细胞 ELISA 结果表明, LTB 同时获得了表达; 间接免疫荧光实验及免疫胶体金定位试验结果表明, 所表达的蛋白定位于干酪乳杆菌的菌体表面。本研究成果为猪细小病毒重组乳酸菌活菌口服疫苗的研制和 LTB 作为粘膜免疫佐剂作用的研究奠定了重要的物质基础。

关键词: 猪细小病毒, VP2 蛋白, LTB, 干酪乳杆菌, 共表达

Co-expression of PPV VP2 and LTB on the Surface of *Lactobacillus casei*

WANG Xiang-Qing OU Di REN An-Qi GE Jun-Wei QIAO Xin-Yuan
TANG Li-Jie LI Yi-Jing*

(Department of Veterinary Medicine, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: *Lactobacillus casei* was selected as an antigen delivery vehicle for the development of oral vaccine to express recombinant LTB and porcine parvovirus (PPV) VP2 protein. The fusion protein gene encoding PPV VP2 protein and LTB, was cloned into the surface expression vector pPG, and then the recombinant expression vector pPG-VP2-LTB was electrotransformed into *Lactobacillus casei* 393, generating recombinant strain pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393. After induced by 2% Lactose in MRS broth, an about 78 kD protein was detected in the recombinant *Lactobacillus casei* by SDS-PAGE. The result of Western blot indicated that the protein possessed the antigenic specificity same as the native virus protein. The result of the whole bacteria cell ELISA indicated that the LTB protein was expressed at the same time. The results of indirect immunofluorescence test and immuno-gold electron microscopy showed that the interest protein was expressed on the surface of *L. casei* 393. The results provide potential for the development of lactic acid bacteria oral vaccine of PPV, which used LTB as mucosal adjuvant.

Keywords: PPV, VP2 protein, LTB, *Lactobacillus casei*, Co-expression

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30371074)

* 通讯作者: Tel: 86-451-55190301; ✉: yijingli@163.com

收稿日期: 2009-03-02; 接受日期: 2009-05-04

猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)是引起母猪繁殖障碍的重要病原之一。病毒经消化道、呼吸道及泌尿生殖道等多种黏膜途径感染,导致怀孕母猪,特别是初产母猪发生流产、死胎、木乃伊胎及新生仔猪死亡^[1]。因该病流行面广、危害严重,给养猪业带来重大经济损失^[2]。

PPV 属无囊膜病毒,衣壳蛋白是病毒的表面结构蛋白,其中 VP2 蛋白在病毒感染发生,致病性发挥以及诱导机体产生免疫保护等方面起关键作用^[3,4]。针对猪细小病毒黏膜感染特点和猪细小病毒 VP2 蛋白在疾病防治中所起的重要作用,设计以 VP2 为免疫原有效刺激黏膜免疫系统,以阻断病原入侵的第一道防线,对科学防治本病具有重要意义。

在疾病防治中,利用乳酸菌表达和传递外源抗原进行黏膜免疫被认为是安全有效的活菌疫苗^[5,6],但乳酸菌外源抗原表达量低、免疫原性差,多数乳酸菌表达后表达产物存在细胞内不能被免疫细胞识别和提呈是影响乳酸菌载体携带外源抗原免疫效果的重要因素,因此如何提高乳酸菌外源抗原对黏膜免疫系统的刺激以及增加抗原与免疫细胞接触,是提高乳酸菌黏膜免疫应答的重要技术环节。

本实验利用乳酸杆菌在肠道的黏附特性、耐胆汁酸盐、耐胰酶和在肠道的定殖和对机体的益生作用^[7],构建表达猪细小病毒 VP2 蛋白重组乳酸菌系统,为促进外源抗原对黏膜刺激的稳定性和持久性,在表达系统中插入了具有黏膜免疫佐剂的大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB),实现了 VP2 蛋白与 LTB 在乳酸菌表面的共表达,从而为研制 PPV 的口服活菌疫苗奠定了物质基础。

1 标题材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒: pMD18-T-VP2 和 pMD18-T-LTB 重组质粒,分别含有猪细小病毒 VP2 基因与 LTB 基因,在 VP2 基因两端含有 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点,LTB 基因两端含有 *Sal* I、*Xho* I 酶切位点,由本实验室构建;表面表达型载体 pPG 含有 *ssUSP* 分泌信号肽基因序列、氯霉素(Cm)抗性基因,锚定结构序列(Anchor)和 *Lactobacillus casei* 393 受体菌均由荷兰 NIZO 研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂: HRP 标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司,猪细小病毒 VP2

蛋白单克隆抗体由本实验室制备保存。鼠抗 LTB 阳性血清本实验室制备保存。T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。氯霉素(Cm)、溶菌酶、乳糖、伊文思兰等购自北京索莱宝生物有限公司;MRS 培养基、氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸钠等试剂购自 Sigma 公司。感受态 JM109、pMD18-T Simple 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 引物: 上游引物 P1 含 *Bam*H I 酶切位点,下游引物 P2 含 *Xho* I 酶切位点,用于扩增 VP2 基因。上游引物 LT1 含 *Sal* I 酶切位点,下游引物 LT2 含 *Xho* I 酶切位点,用于扩增 LTB 基因。引物 CX1、CX2 用于鉴定 VP2 与 LTB 连接部位,扩增目的片段约 750 bp,引物序列如下:

P1: 5'-ACGGGATCCATGAAACACAAAG-3' (*Bam*H I);
P2: 5'-CGGCTCGAGGTATAATTTCTTGG-3' (*Xho* I)
LT1: 5'-GGGGTTCGACGGCGGTGGCAGCATGAATAAAGTAAAATGTTAT-3' (*Sal* I)
LT2: 5'-GGGGCTCGAGCTAGTTTTCCATACTGATTGCCGCA-3' (*Xho* I)
CX1: 5'-GGGGTCGACTGGGATAAAGAAGCTTGATAC-3'
CX2: 5'-GGGGCTCGAGGTAGTTTTCCATACTGATTGCCGC-3'

1.2 方法

1.2.1 重组干酪乳杆菌的构建及鉴定: 以质粒 pMD18-T-VP2 和 pMD18-T-LTB 为模板,利用各自引物 PCR 扩增分别获得 VP2 基因和 LTB 基因。VP2 基因经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切胶回收,LTB 基因经 *Sal* I 和 *Xho* I 双酶切胶回收,VP2 与 LTB 经 T4 DNA 连接酶连接,以连接产物为模板,P1 和 LT2 为上下游引物,扩增获得 VP2-LTB 基因,胶回收 VP2-LTB 基因,连接 pMD18-T simple 载体,转化 JM109 感受态,获得阳性重组质粒 pMD18-T-VP2-LTB。重组质粒 pMD18-T-VP2-LTB 和 pPG 载体经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后回收目的基因片,连接过夜,连接产物电转化感受态细胞干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393。取适量菌液涂布于含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm 的 MRS 琼脂培养基上,37°C 厌氧培养 36 h。挑取单个菌落,接种于含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm 的 MRS 液体培养基中,37°C 厌氧培养过夜,提取质粒。对重组质粒进行酶切鉴定、以引物 CX1、CX2 进行 PCR 鉴定,并对疑似阳性重组质粒进行序列测定,获得的阳性重组质粒乳酸杆菌命名为 pPG-VP2-LTB/*L. c393*。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

1.2.2 目的蛋白的诱导表达: pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 阳性重组菌落接种于 MRS 液体培养基中, 37°C 厌氧培养过夜活化, 取过夜培养菌以 1:20 比例接种于含 2% 乳糖的 MRS 培养基中进行诱导, 诱导 22 h。诱导结束后取 1 mL 诱导菌液测 OD_{600} 值, 样品处理: 诱导表达菌液以 12000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用 500 μ L 10 mg/mL 的溶菌酶 37°C 水浴作用 60 min, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 菌体加入 SDS-PAGE 样品缓冲液(含 DTT), 混匀, 沸水浴 10 min, 12000 r/min 离心 5 min。同时设 pPG/*L. casei* 393 为阴性对照。经 10% SDS-PAGE 分析。

1.2.3 表达产物的鉴定: 1) Western-blot 鉴定: SDS-PAGE 结束后, 将凝胶中蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 以猪细小病毒 VP2 蛋白单克隆抗体作为第一抗体, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为第二抗体, 4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 15 min, 观察结果。

2) 全细胞 ELISA 鉴定表达的 LTB 蛋白: 首先用 0.01% 多聚赖氨酸(100 μ L/孔)包被 96 孔板, 室温 1 h; 然后用 0.05 mol/L PBS 浸没洗板, 轻微摇动板, 控干; 用 0.05 mol/L PBS 稀释诱导后的菌液至 OD_{600} 为 0.2, 每孔加入 100 μ L 乳酸菌细胞, 4°C 过夜孵育; 每孔加 0.25% 戊二醛 50 μ L, 室温孵育 15 min; 用 PBS 浸泡洗板 3 次, 每孔加 100 mmol/L 含 0.1% BSA 的甘氨酸缓冲液 100 μ L 以拮抗残留的戊二醛。室温孵育 1 h; 用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗板 5 次, 然后加入含 3% BSA 的 PBS-吐温(200 μ L/孔)封闭, 37°C 孵育 2 h; 每孔加 1:1000 稀释的 100 μ L 鼠抗 LTB 阳性血清或阴性血清, 室温孵育 90 min; 洗板后, 加入 1:2000 稀释的 100 μ L HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37°C 孵育 2 h; 用含 0.05% 吐温-20 PBS 浸泡洗板 3 次, 3 min/次, 拍干。准备 OPD 底物, 每孔加底物 100 μ L, 室温孵育 20 min。用 490 nm 波长测定光吸收值。

3) 间接免疫荧光法分析: 分别取 0.5 mL 经诱导的重组干酪乳杆菌、含空质粒的干酪乳杆菌, 5000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤 3 次, 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 猪细小病毒 VP2 蛋白单克隆抗体细胞培养上清液作为第一抗体, 混和均匀, 37°C 水浴作用 60 min, 5000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤 3 次, 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 PBS 稀释的含 1% 伊文思兰的 FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗, 悬浮混合后 37°C 作用

60 min, 5000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用无菌 PBS 洗涤 3 次, 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 菌体沉淀悬浮于适量的 PBS 中, 取适量涂片, 自然干燥后, 预冷丙酮固定 30 min, 荧光显微镜观察。

4) 免疫胶体金电镜分析: 制备胶体金颗粒, 并进行胶体金颗粒标记 VP2 蛋白单克隆抗体^[8]。分别取 0.4 mL 经诱导的重组干酪乳杆菌、含空质粒的干酪乳杆菌, 4000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用无菌 PB 缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)洗涤 3 次, 4000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入已制备的免疫胶体金溶液, 悬浮混匀 4°C 吸附作用过夜, 用无菌 PB 缓冲液洗涤 3 次, 4000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PB 缓冲液悬起。铜网蘸取混合液, 干燥, 电镜观察。

2 结果

2.1 重组乳酸菌表达质粒 pPG-VP2-LTB 的鉴定

以 P1、LT2 为引物, pMD18-T-VP2-LTB 为模板, 经 PCR 扩增获得约 2.1 kb 目的基因片段 VP2-LTB, 电转化 *Lactobacillus casei* 393 后, 经 MRS Cm 抗性平板选择培养, 挑取单个菌落扩大培养, 提取质粒, 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单、双酶切和 PCR 鉴定均表明与预期大小的核酸片段相一致(见图 1 和图 2)。测序结果也表明外源基因 VP2-LTB 正确插入 pPG 中。

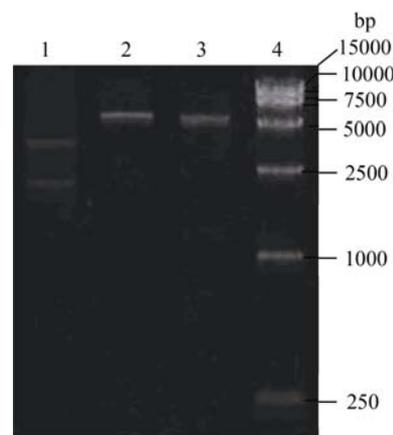


图 1 pPG-VP2-LTB 酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of pPG-VP2-LTB by enzyme digested
注: 1: pPG-VP2-LTB 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 分别切出大小约为 3600 bp 和 2200 bp; 2, 3: pPG-VP2-LTB 分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 单酶切后, 分别切出大小约为 5800 bp 目的片段; 4: DNA marker DL15000.

Note: 1: pPG-VP2-LTB digested by *Bam*H I and *Xho* I, interest fragments were about 3600 bp and 2200 bp, respectively; 2, 3: pPG-VP2-LTB digested by *Bam*H I, *Xho* I respectively, interest fragment was about 5800 bp; 4: DNA marker DL15000.

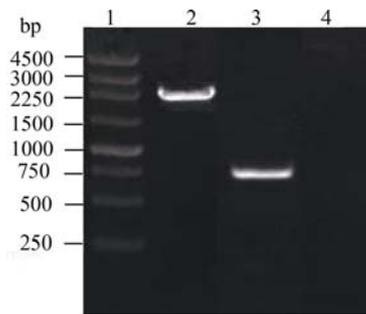


图 2 pPG-VP2-LTB PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of pPG-VP2-LTB by PCR

注: 1: DNA marker DL4500; 2: pPG-VP2-LTB 为模板, 引物 P1、P2 PCR 扩增出约 2200 bp 的基因片段; 3: pPG-VP2-LTB 为模板, 引物 CX1、CX2 PCR 扩增出约 750 bp VP2 与 LTB 连接部位的基因; 4: PCR 阴性对照。

Note: 1: DNA marker DL4500; 2: About 2200 bp gene fragment was amplified by PCR from pPG-VP2-LTB; 3: About 750 bp gene fragment of linked with VP2 and LTB was amplified by PCR from pPG-VP2-LTB; 4: PCR negative control.

2.2 目的蛋白在干酪乳杆菌中的表达

重组 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 菌株经 2% 的乳糖诱导, 菌体裂解物经 10% SDS-PAGE 鉴定, 表明菌体裂解物有约 78 kD 的蛋白泳带(见图 3), 其分子大小与预期理论值相符。

2.3 表达产物的鉴定

2.3.1 Western blot 鉴定: 诱导菌体表达裂解物经 SDS-PAGE 电泳后, 转印 NC 膜, 与猪细小病毒 VP2

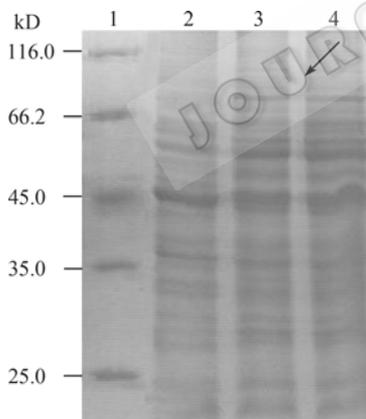


图 3 重组乳杆菌 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 表达蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 3 The identification of protein expression in pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 by SDS-PAGE

注: 1: 标准蛋白分子量(116.0 kD~25.0 kD); 2: 经 2%乳糖诱导的 pPG/*L. casei* 393; 3, 4: 经 2%乳糖诱导的 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393, 箭头所示有约 78 kD 蛋白泳带。

Note: 1: Protein marker (116.0 kD~25.0 kD); 2: pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 noninduced by 2% lactose; 3, 4: pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 induced by 2% lactose, as arrow showing.

蛋白单克隆抗体和羊抗鼠 IgG/HRP 作用后显示, 在表达蛋白带的预期位置出现明显的反应带, 说明重组蛋白 VP2-LTB 在乳酸菌中得到了有效表达(图 4 箭头所示)。

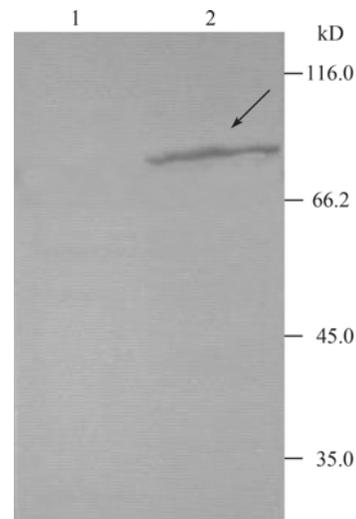


图 4 重组乳酸菌 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 表达蛋白 Western-blot 鉴定结果

Fig. 4 The identification of expressed protein in the pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 by Western-blot

注: 1: 2%乳糖诱导含 pPG 质粒的乳酸菌, Western-blot 结果阴性; 2: 2%乳糖诱导表达的重组乳酸菌 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 经 SDS-PAGE 电泳, 转印至 NC 膜后, 分别与鼠源抗 PPV 高免疫血清、羊抗鼠 IgG/HRP 作用后, 表达蛋白出现明显的反应带。

Note: 1: *L. casei* 393 harboring pPG was induced by 2% lactose, the result of Western-blot was negative; 2: The expressed protein in pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 induced by 2% lactose was transformed onto NC membrane, then reacted with Mouse anti PPV serum and sheep anti mouse IgG/HRP, result showed that the expressed protein appeared clear immune blot.

2.3.2 全细胞 ELISA 结果: 分别以诱导后的重组菌、空载体对照菌包被 ELISA 反应板, 分别以鼠抗 LTB 蛋白血清, 鼠阴性血清作为一抗, 相应的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 检测 LTB 蛋白表达情况。从图 5 可以看出 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 和阳性血清反应的 OD 值高于对照菌 pPG/*L. casei* 393 和阳性血清反应的 OD 值 2 倍以上, 且差异极显著。而 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 和阴性血清反应的 OD 值、对照菌 pPG/*L. casei* 393 和阴性血清反应的 OD 值基本相近。表明重组菌 pPG-VP2-LTB/*L. casei* 393 表达了 LTB 蛋白。

2.3.3 间接免疫荧光鉴定结果: 取经诱导的重组干酪乳杆菌和含空质粒的干酪乳杆菌进行的间接免疫荧光染色, 结果表明, 重组菌呈现蓝绿色荧光, 而

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

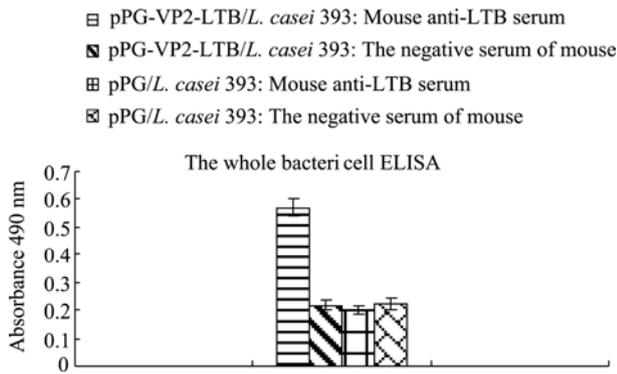


图 5 全细胞 ELISA 鉴定 LTB 蛋白表达检测结果
Fig. 5 The identification of LTB protein expressed by pPG-VP2-LTB/L. casei 393 via the whole bacteria cell ELISA

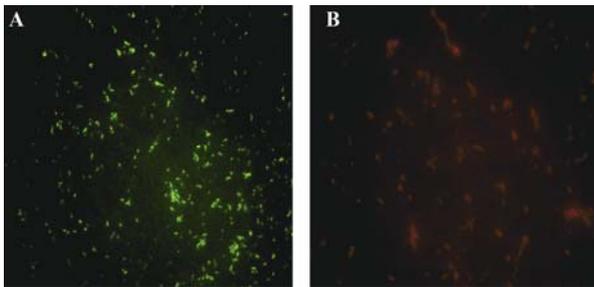


图 6 免疫荧光鉴定目的蛋白表达定位结果(40×)
Fig. 6 The identification of induced interest protein via immunofluorescence (40×)
注: A: pPG-VP2-LTB/L. casei 393 菌诱导表达后经间接免疫荧光染色, 荧光显微镜检测菌体呈绿色荧光; B: pPG/L. casei 393 免疫荧光结果, 荧光显微镜检测未出现荧光反应, 菌体被伊文思蓝染成红色。

Note: A: The pPG-VP2-LTB/L. casei 393 was induced by lactose, there were green-yellow fluorescence reaction on the surface of the bacteria; B: The result of immunofluorescence of pPG/L. casei 393 was negative and the bacteria were red dyed by Evans blue.

含空质粒的乳酸杆菌未见蓝绿色荧光, 被伊文思蓝染成红色(图 6), 说明目的蛋白在重组菌体获得了表达。

2.3.4 免疫胶体金电镜定位结果: 取经诱导的重组干酪乳杆菌和含空质粒的干酪乳杆菌分别用胶体金颗粒标记的 VP2 蛋白单克隆抗体作用, 电镜观察结果表明, 免疫胶体金颗粒有规律的吸附到重组菌表面(箭头指示), 而含空质粒乳酸杆菌未见有金颗粒的规律吸附, 进一步说明了目的蛋白是表达定位于重组菌的表面(图 7)。

3 讨论

本试验利用具有锚定结构的乳酸杆菌表达载体,

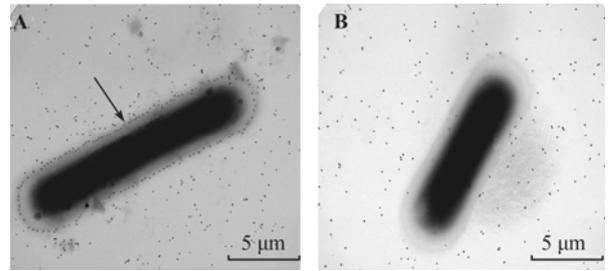


图 7 免疫胶体金电镜定位检测结果
Fig. 7 Detection of the interest protein by immuno-gold electron microscopy

注: A: pPG-VP2-LTB/L. casei 393 菌诱导表达后经免疫胶体金电镜观察, 电镜检测菌体表面有免疫胶体金颗粒吸附(箭头指示); B: pPG/L. casei 393 菌诱导后免疫胶体金电镜观察, 电镜检测菌体表面未出现免疫胶体金颗粒吸附。

Note: A: Immunogold labelling on the surface of pPG-VP2-LTB/L. casei 393(as arrow show); B: No immunogold labelling on the surface of pPG/L. casei 393.

构建了共表达猪细小病毒 VP2 蛋白与 LTB 的重组干酪乳杆菌表达系统, SDS-PAGE、Western-blot 分析, 全细胞 ELISA 检测以及间接免疫荧光检测均表明, 该蛋白获得了正确表达; 免疫胶体金电镜观察, 进一步确定了所表达的蛋白定位于乳酸杆菌细胞壁的表面。实现了 VP2 蛋白在乳酸杆菌的表面表达, 为提高该蛋白与免疫系统有效接触, 增强其免疫原性奠定了物质基础。

大肠杆菌不耐热肠毒素是由 A、B 两个亚单位组成的外毒素, 其 B(LTB)亚单位本身无毒性, 但在协助 A 亚单位进行粘附和发挥毒性过程中起重要作用^[9]。近年来 B 亚单位作为黏膜佐剂受到了关注。研究表明, LTB 是很好的免疫佐剂, 能传递黏膜抗原信息, 增加抗原特异性 T 细胞克隆的增殖和分化^[10]。LTB 可激活 Th1 途径, 不易引起变态反应, 同时能增大抗原分子量, 提高外源抗原的免疫原性, 亦能提高 CD8⁺T 细胞对病毒感染细胞的杀伤力^[11]。先前的实验表明, 已构建的表达猪细小病毒 VP2 蛋白乳酸菌表达系统, 免疫动物可有效刺激机体产生良好的体液免疫、细胞免疫和免疫保护作用^[12]。本实验在此基础上, 将 LTB 插入到表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组乳酸菌系统, 实现了 LTB 和猪细小病毒 VP2 蛋白在乳酸菌表面的融合表达。该系统在动物免疫中, 能否有效刺激机体免疫应答, LTB 对 VP2 是否具有免疫增强作用, 尚需进一步进行动物免疫加以验证。

参 考 文 献

- [1] Leman AD, Straw B, Galock RD. Diseases of swine. Sixth Edition. Iowa State University Press, 1986, pp.411-424.
- [2] Mengeling WL, Lager KM, Zimmerman, *et al.* A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 1991, **3**(1): 33-35.
- [3] Molitor TW, Joo HS, Collett MS. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol*, 1983, **45**: 842-854.
- [4] Maetinz C, Dalsgaard K, De Turiso JAL, *et al.* Production of porcine parvovirus empty capsid with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, **10**: 684-690.
- [5] Seegers J. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnology*, 2002, **20**(12): 508-515.
- [6] Pouwel PH, Rob J, Boersma WJ. The potential of Lactobacillus as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigen. *Biotechnology*, 1996, **44**: 183-192.
- [7] 徐义刚, 崔丽春, 赵丽丽, 等. 重组干酪乳杆菌在模拟消化环境中生存性能的研究. *中国微生物学杂志*, 2006, **18**(6): 424-426.
- [8] 孙秀兰, 赵晓联, 汤 坚. 单分散性胶体金的制备工艺优化. *免疫学杂志*, 2004, **20**(2): 151-153.
- [9] Yamamoto M, Mcghee JR, Hagiwara Y, *et al.* Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*, 2001, **53**(3): 211-217.
- [10] Apostolaki, Maria W, Neil A. Nasal delivery of antigen with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin augments antigen-specific T-cell clonal expansion and differentiation. *Infection and Immunity*, 2004, **72**(7): 4072-4080.
- [11] Ong KW, Wilson A, Douglas H, *et al.* The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin enhances CD8+ cytotoxic-T-lymphocyte killing of epstein-barr virus-infected cell lines. *J Virol*, 2003, **77**(7): 4298-4305.
- [12] Xu YG, Li YJ. Induction of immune responses in mice after intragastric administration of *Lactobacillus casei* producing porcine parvovirus VP2 protein. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(21): 7041-7047.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
10	全国酶工程会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	待定	待定	待定	金城 010-64807425
11	2009 年生物过程模型化与控制学术会议	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	9 月	100	上海	袁景淇 021-34204055
12	重要人兽共患病研究新进展学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	10 月 14-18 日	200	湖南 衡阳	万康林 010-61739466
13	第七届全国微生物毒素学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月	180	重庆	梁华平 023-68757404
14	第三届全国资源生物技术与糖工程学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	10 月	150	山东 济南	李越中 0531-88564288
15	首届全国生物固氮学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	湖北 武汉	李友国, 张忠明 027 - 87281685 , 027 - 87281687
16	2009 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 月	400	待定	王旭 010-64807200
17	第十二次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	250	湖北 武汉	蒋建东 025-84396348
18	植物线虫的微生物防治研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	60	昆明	张克勤 0871-5033790

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>