

# 鸭疫里默氏菌 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 蛋白的免疫原性

钟璐嘉<sup>1</sup>, 蒋文灿<sup>\*1,2</sup>, 蒋鑫<sup>1</sup>, 霞雨<sup>1</sup>, 曾晓慧<sup>1</sup>, 李鑫<sup>1</sup>

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

钟璐嘉, 蒋文灿, 蒋鑫, 霞雨, 曾晓慧, 李鑫. 鸭疫里默氏菌 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 蛋白的免疫原性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1705-1718

Zhong Lujia, Jiang Wencan, Jiang Xin, Xia Yu, Zeng Xiaohui, Li Xin. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* DnaK, OmpA and OmpA-DnaK proteins[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1705-1718

**摘要:**【背景】鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)可引起鸭等多种禽类败血症和浆膜炎, 给禽养殖业造成严重经济损失。蛋白疫苗是预防 RA 感染的重要策略之一。目前, 有关 RA 重组蛋白免疫原性报道较少, 且其应用也受到单一蛋白抗原诱导的特异性免疫反应不足的限制。【目的】探究分子伴侣 DnaK、外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA) 和 OmpA-DnaK 蛋白疫苗在鸭体内诱导的免疫应答, 评估其免疫原性, 为 RA 疫苗抗原研发提供依据。【方法】克隆 *DnaK* 和 *OmpA* 基因并分别与 pET-32a(+) 载体相连, 利用限制性酶切位点 *Nco* I 和 *Bam*HI 将 *OmpA* 连接至 *DnaK* 基因上游, 经原核表达和纯化制得重组蛋白 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK。3 种重组蛋白分别皮下免疫雏鸭 2 次, 检测其血清抗体滴度、淋巴细胞增殖和细胞因子(IL-2 和 IL-4)水平; 以 RA-GH5 肌肉注射攻毒, 检查其组织病理学变化及免疫保护率。【结果】成功表达了 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 重组蛋白, 分子量分别约为 90、60 和 130 kDa。3 种蛋白疫苗均能诱导宿主产生体液和细胞免疫应答, 并且诱导的免疫保护反应减轻了 RA 引起的组织病理学损伤。与单独 DnaK 或 OmpA 免疫相比, OmpA-DnaK 显著提高了血清抗体滴度、淋巴细胞增殖指数, 以及 IL-2 和 IL-4 细胞因子水平。OmpA-DnaK 对鸭的免疫保护率为 50%, DnaK 和 OmpA 均为 30%。【结论】RA 重组 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 蛋白疫苗均能诱导鸭免疫反应, 并且 DnaK 与 OmpA 融合表达可引起更强的体液免疫和细胞免疫应答。

**关键词:** 鸭疫里默氏菌; 分子伴侣 DnaK; 外膜蛋白 A; 融合表达; 免疫原性

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0848)

Supported by: Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of Ministry of Education of China (IRT0848)

\*Corresponding author: E-mail: jiangwc1234@163.com

Received: 2021-05-08; Accepted: 2022-01-25; Published online: 2022-03-24

# Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* DnaK, OmpA and OmpA-DnaK proteins

ZHONG Lujia<sup>1</sup>, JIANG Wencan<sup>\*1,2</sup>, JIANG Xin<sup>1</sup>, XIA Yu<sup>1</sup>, ZENG Xiaohui<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>

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

2 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** **[Background]** *Riemerella anatipestifer* (RA) causes septicemia and infectious serositis in a variety of birds such as duck, leading to serious economic losses in the poultry industry. Protein vaccination is considered to be one of the most important strategies for preventing RA infection in ducklings. At present, there are few studies on the immunogenicity of RA recombinant proteins, and their application is also limited by the insufficient specific immune response induced by the single protein antigen. **[Objective]** The study aims to explore the immune response induced by the molecular chaperone DnaK, outer membrane protein A (OmpA) and OmpA-DnaK vaccines in ducklings, and to evaluate whether the recombinant fusion protein OmpA-DnaK has enhanced immunogenicity, which is conducive to the further development of RA vaccines. **[Methods]** We amplified the *DnaK* and *OmpA* genes and linked them to the pET-32a(+) vector, respectively. *OmpA* gene was ligated to the upstream region of *DnaK* gene through the restriction sites of *Nco* I and *Bam*H I. DnaK, OmpA and OmpA-DnaK proteins were prepared by prokaryotic expression and purification. The DnaK, OmpA and OmpA-DnaK vaccines were respectively used to immunize ducklings twice via subcutaneous injection, and then the serum antibody titers, lymphocyte proliferation and cytokine (IL-2 and IL-4) levels were determined. The ducklings were then challenged by RA-GH5 strain through intramuscular injection, and the histopathological changes and immune protection rate were examined. **[Results]** The recombinant DnaK, OmpA and OmpA-DnaK proteins were expressed, with molecular weights of approximately 90, 60 and 130 kDa, respectively. The three recombinant protein vaccines induced the humoral and cellular immune responses of ducklings, and mitigated the histopathological damage caused by RA. Compared with DnaK or OmpA alone, OmpA-DnaK significantly increased serum antibody titer, lymphocyte proliferation index, and IL-2 and IL-4 levels after vaccination. The immune protection rate of OmpA-DnaK to ducklings was 50%, and those of both DnaK and OmpA were 30%. **[Conclusion]** The recombinant OmpA, DnaK and OmpA-DnaK protein vaccines all induced immune responses in ducklings. Moreover, the fusion of DnaK and OmpA caused stronger humoral and cellular immune responses.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer*; molecular chaperone DnaK; outer membrane protein A; fusion expression; immunogenicity

鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)属于拟杆菌门黄杆菌科里氏菌属,具有多种血清型,是造成水禽养殖重大经济损失的主要致病菌之一。感染鸭以败血症和纤维性渗出为典型特

征,通常伴有神经症状,死亡率可高达75%<sup>[1-2]</sup>。RA对多种抗菌药耐药<sup>[3-4]</sup>,疫苗免疫是预防RA感染的有效措施。蛋白作为疫苗抗原具有优良的安全性和提供交叉保护作用的潜力。目前有关

RA 蛋白免疫原性研究的报道较少, 已知具有免疫原性的 RA 蛋白包括外膜蛋白<sup>[5]</sup>、TonB 依赖性受体<sup>[6]</sup>、分子伴侣 GroEL<sup>[7]</sup>、新型蛋白 Rican\_1750 和 Rican\_1752<sup>[8]</sup>等。其中, 外膜蛋白 A (outer membrane protein A, OmpA)存在于所有 RA 血清型参考菌株中, 具有交叉反应原性, 是有潜力的疫苗抗原<sup>[9]</sup>。然而, 同大多数蛋白疫苗一样, 其应用也受到抗原特异性免疫反应不足的限制。

分子伴侣 DnaK 是高度保守的热休克蛋白 70 (heat shock proteins 70, HSP70)家族成员<sup>[10-12]</sup>, 在先天和适应性免疫应答中起着重要作用, 可诱导抗原呈递细胞的活化引发针对特定病原体的适应性免疫应答<sup>[13-15]</sup>, 具有开发为疫苗抗原的潜力<sup>[16-18]</sup>。此外, HSP70 可作为抗原载体, 通过与抗原呈递细胞上的受体相互作用, 促进伴侣肽的抗原呈递, 进一步刺激针对共价连接融合蛋白的免疫反应<sup>[19-23]</sup>。RA DnaK 是 HSP70 同源蛋白, 未见其作为蛋白抗原和免疫增强剂的相关研究报道。

为研究 RA DnaK 蛋白的免疫原性, 以及其作为抗原载体与 OmpA 融合表达后是否具有增强鸭免疫应答的能力。我们通过大肠杆菌原核表达系统制备了 RA DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 蛋白, 在鸭体内评估 3 种重组蛋白诱导的免疫应答, 以期为 RA 蛋白抗原研究提供科学参考数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒和血清

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和大肠杆菌 BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司; 原核表达质粒 pET-32a(+), 鸭疫里默氏菌 GH5 (RA-GH5, 血清 2 型)、RA-GH5 阳性鸭血清为四川农业大学微生物与免疫研究室保存。

### 1.2 实验动物

1 日龄健康北京鸭购自成都克里莫育种有

限公司。

### 1.3 主要试剂和仪器及培养基

PrimeSTAR Max DNA Polymerase、Nco I、BamH I、Hind III, TaKaRa 公司; 增强型二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)辣根过氧化物酶显色试剂盒, 上海碧云天生物技术公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂, Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司; HRP 山羊抗鸭 IgG(H+L), KPL 公司; 鸭 PBMC 分离试剂盒、MTT 细胞增殖检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; IL-2 和 IL-4 ELISA 试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

蛋白层析系统、湿式转印槽、酶标仪, Bio-Rad 公司; 大容量冷冻离心机、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 赛默飞世尔科技公司。

胰蛋白胍肉汤培养基、LB 肉汤培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.4 pET-32a(+)-DnaK 和 pET-32a(+)-OmpA 载体的构建

参考 RA ATCC 11845 的基因序列(GenBank 登录号 NC\_017045.1), 设计 DnaK 和 OmpA 基因引物(表 1)。PCR 扩增获得 RA-GH5 DnaK 和 OmpA 基因。利用限制性酶切位点 BamH I 和 Hind III 将 DnaK 基因与 pET-32a(+)载体连接, 将 OmpA 基因通过 Nco I 和 BamH I 与载体相连。

表 1 DnaK 和 OmpA 基因克隆引物

Table 1 Gene cloning primers for RA DnaK and OmpA

引物	序列
Primer	Sequence (5'→3')
DnaK-F	CGGGATCCATGAGTAAATTATAGGAATTGACT
DnaK-R	CCCAAGCTTTTATTTTACTTCTTCGAAATTGCA
OmpA-F	CGCGCCATGGGTAAAGAATTTATGTTG
OmpA-R	CGGGATCCCTTTTCTTTTCTTTTACTACTT

注: 下划线的碱基编码 BamH I (GGATCC)、Hind III (AAGCTT)和 Nco I (CCATGG)限制位点

Note: The underlined bases encode BamH I (GGATCC), Hind III (AAGCTT) and Nco I (CCATGG) restriction sites.

将连接混合物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经 Amp-LB 琼脂(Amp 100  $\mu$ g/mL)筛选, 利用限制性酶切和测序验证克隆序列的正确性。

### 1.5 pET-32a(+)-OmpA-DnaK 载体的构建

pET-32a(+)-DnaK 和 pET-32a(+)-OmpA 经 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 回收 *OmpA* 片段和 pET-32a(+)-*DnaK* 酶切产物。通过限制性酶切位点 *Bam*H I 将 *OmpA* 连接至 *DnaK* 基因上游, 如图 1 所示。经 PCR、限制性酶切(*Nco* I、*Hind* III)和测序鉴定, 构建 pET-32a(+)-OmpA-DnaK。

### 1.6 重组蛋白的表达与纯化

含重组质粒 *E. coli* BL21(DE3)在 LB 肉汤中培养至  $OD_{600}$  为 0.5, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 于 20  $^{\circ}$ C 继续培养 12 h, 4  $^{\circ}$ C、7 000 $\times$ g 离心 10 min, 细菌沉淀悬浮于 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0)。经超声破碎(400 W, 工作 3 s, 间隔 5 s)后, 离心获得上清为可溶性蛋白。沉淀重悬于 8 mol/L 尿素 PBS 溶液, 离心获得上清为不溶蛋白。采用 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达。从可溶级分中回收 DnaK 和 OmpA-DnaK, 从不溶级分中回收 OmpA, 再由 Bio-Rad Ni<sup>2+</sup>螯合柱纯化。

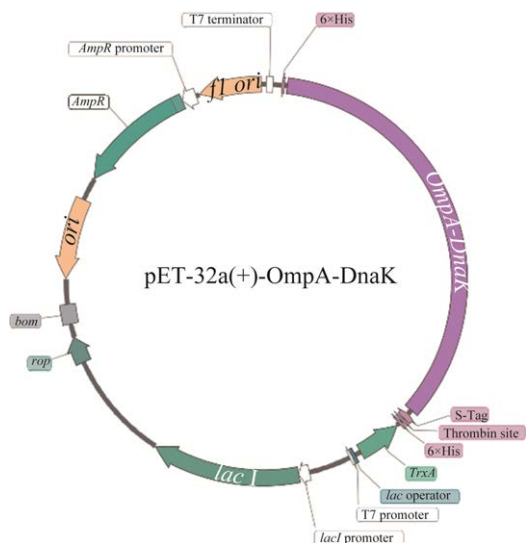


图 1 pET-32a(+)-OmpA-DnaK 质粒示意图

Figure 1 pET-32a(+)-OmpA-DnaK plasmid schematic.

### 1.7 Western blotting 鉴定重组蛋白

纯化的 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 蛋白进行 SDS-PAGE 后, 转印至 NC 膜上, 5%脱脂牛奶 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h。鸭抗 RA-GH5 血清(1:200 稀释于 5%脱脂牛奶)为一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。HRP 山羊抗鸭 IgG(H+L)抗体(1:5 000)为二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。DAB 显色后, 观察结果。

### 1.8 动物免疫保护试验

#### 1.8.1 动物免疫

将 1 日龄北京鸭饲养至 4 日龄, 并随机分为 5 组(每组 10 只小鸭): 对照组、OmpA 组、DnaK 组、OmpA-DnaK 组和空白组。于 4 日龄首次免疫(0 d), 疫苗组小鸭分别皮下注射相应重组蛋白 100  $\mu$ g, 而且每种重组蛋白分别在相同体积的完全弗氏佐剂(Freud's complete adjuvant, FCA)中乳化。首免 10 d 后, 相同剂量的抗原辅以不完全弗氏佐剂(Freud's incomplete adjuvant, FIA)用于加强免疫。对照组和空白组的动物仅注射无菌 PBS 0.5 mL。为了研究免疫反应, 在免疫前(0 d)和免疫后第 10、17 和 24 天收集血液。

#### 1.8.2 血清抗体水平检测

间接 ELISA 检测血清抗体水平。重组 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 蛋白分别以浓度 4.0、2.5 和 5.0  $\mu$ g/mL 于 4.0  $^{\circ}$ C 包被过夜。依次经 5%脱脂牛奶封闭, 待检血清孵育和 HRP 山羊抗鸭 IgG (1:3 000)作用后, 避光加入 TMB 底物溶液。15 min 后加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, ELISA 读数器检测  $OD_{450}$ 。参考 Liu 等<sup>[24]</sup>建立的 ELISA 方法, 检测雏鸭免疫前(0 d)血清, RA 抗体呈阴性, 将其作为阴性血清。当待测血清  $OD_{450}$  (P)与阴性血清  $OD_{450}$  (N)之比, 即  $P/N \geq 2.1$ , 判定为阳性<sup>[24]</sup>。

#### 1.8.3 淋巴细胞增殖检测

通过鸭外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离试剂盒收集 PBMC 级分, 将其重悬于含 10%胎牛血清的

RPMI-1640 培养基中。细胞培养液将各蛋白抗原稀释成 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。刀豆蛋白 A (ConA, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激为阳性对照, 细胞培养基刺激为阴性对照, 不含细胞的细胞培养液为空白对照。MTT 法测定淋巴细胞增殖, 于 490 nm 处读数。刺激指数 (stimulation index) = (处理组的  $OD_{490}$  - 空白对照的  $OD_{490}$ ) / (阴性对照的  $OD_{490}$  - 空白对照的  $OD_{490}$ )<sup>[25-26]</sup>。

#### 1.8.4 血清细胞因子检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-2 和 IL-4 水平<sup>[27]</sup>。根据测得的标准曲线计算各组鸭血清中 IL-2 和 IL-4 含量。

#### 1.8.5 攻毒试验

加强免疫 2 周后, 对疫苗组和对照组雏鸭肌肉注射致死剂量 5 $LD_{50}$  RA-GH5 ( $5 \times 10^6$  CFU), 空白组注射等剂量的 PBS。观察并记录 8 d 内小鸭出现的临床症状和死亡情况。

#### 1.8.6 组织病理学检查

采集各试验组鸭肝脏、心脏和脑组织样品,

于 4% 多聚甲醛 (pH 7.4) 固定, 通过石蜡包埋, 制成 4-5  $\mu\text{m}$  的切片<sup>[28]</sup>。利用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 镜检分析组织病理学变化。

#### 1.9 统计分析

采用 SPSS 27.0 进行统计学分析, 利用独立样本  $t$  检验 (student's two-tailed unpaired  $t$  test) 和单因素方差分析 (one-way ANOVA) 分别比较两组及多组之间的统计学差异,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET-32a(+)-DnaK 和 pET-32a(+)-OmpA 载体构建结果

PCR 扩增得到 *DnaK* 和 *OmpA* 基因片段 (图 2), 长度分别约为 1 908 bp 和 1 161 bp, 与预期大小一致。pET-32a(+)-DnaK 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 显示 2 条与预期相符的线性条带分别约在 1 900 bp 和 5 900 bp。*Nco* I 和 *Bam*H I 对 pET-32a(+)-OmpA 进行酶切, 约在 1 100 bp

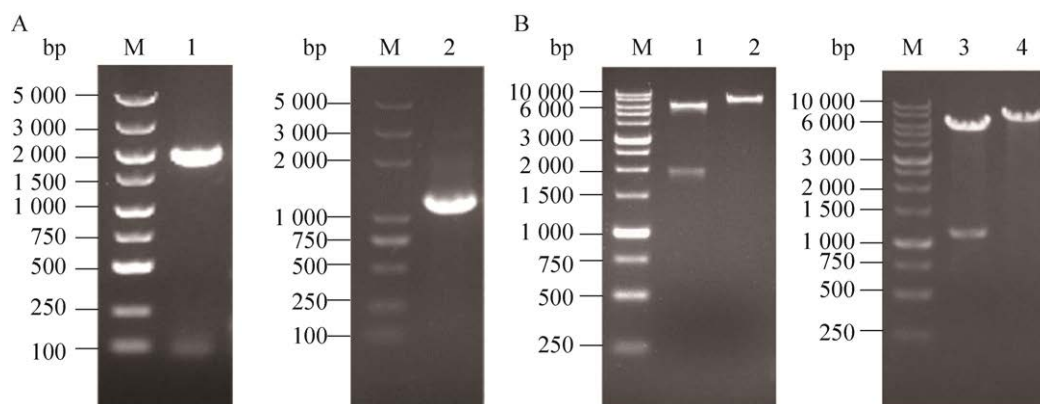


图 2 目的基因扩增和酶切鉴定 A: M: DNA 分子量标准 Marker (100-5 000 bp); 1: *DnaK* 基因; 2: *OmpA* 基因。B: M: DNA 分子量标准 Marker (250-10 000 bp); 1: pET-32a(+)-DnaK *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切; 2: pET-32a(+)-DnaK *Bam*H I 单酶切; 3: pET-32a(+)-OmpA *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切; 4: pET-32a(+)-OmpA *Bam*H I 单酶切

Figure 2 Amplification and restriction enzyme digestion of the target fragments. A: M: DNA Marker (100-5 000 bp); 1: *DnaK* gene; 2: *OmpA* gene. B: M: DNA Marker (250-10 000 bp); 1: pET-32a(+)-DnaK identification with *Bam*H I and *Hind* III enzyme digestion; 2: pET-32a(+)-DnaK identification with *Bam*H I; 3: pET-32a(+)-OmpA identification with *Nco* I and *Bam*H I; 4: pET-32a(+)-OmpA identification with *Bam*H I.

和 5 900 bp 处呈现线性条带,符合预期。RA-GH5 DnaK 和 OmpA 基因的核苷酸序列提交至 NCBI GenBank,登录号分别为 MW849861 和 MW849862。

## 2.2 pET-32a(+)-OmpA-DnaK 载体构建结果

经 PCR 鉴定,在约 3 075 bp 处出现预期目的条带(图 3A)。经 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切,约 3 000 bp 和 5 900 bp 处显现 2 条预期条带(图 3B)。核苷酸测序证实了克隆基因 OmpA-DnaK 连接的正确性,成功构建了 pET-32a(+)-OmpA-DnaK。

## 2.3 重组蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 分析重组蛋白 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 的表达谱(图 4A、4B、4C)。结果显示,0.4 mmol/L IPTG 于 20 °C 诱导 12 h, DnaK 和 OmpA-DnaK 重组蛋白主要以可溶形式存在于上清,而 OmpA 主要以不溶形式表达为包涵体蛋白。经纯化获得带有 His 标签的重组 OmpA、

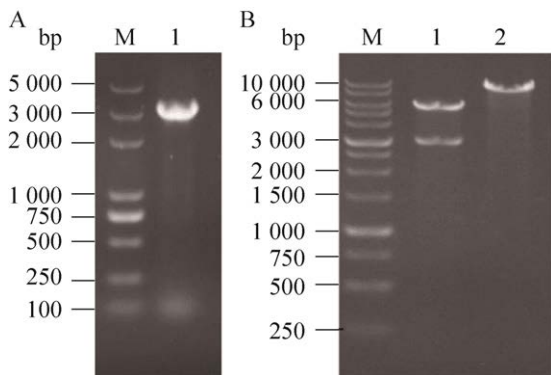


图 3 pET-32a(+)-OmpA-DnaK 的 PCR 和酶切鉴定 A: M: DL5000 DNA Marker; 1: *OmpA-DnaK* 基因片段。B: M: DNA 分子量标准 Marker (250–10 000 bp); 1: pET-32a(+)-OmpA-DnaK *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切; 2: pET-32a(+)-OmpA-DnaK *Hind* III 单酶切

Figure 3 Identification of PCR and restriction enzyme of pET-32a(+)-OmpA-DnaK. A: M: DL5000 DNA Marker; 1: *OmpA-DnaK* gene. B: M: DNA Marker (250–10 000 bp); 1: pET-32a(+)-OmpA-DnaK identification with *Nco* I and *Hind* III enzyme digestion; 2: pET-32a(+)-OmpA-DnaK identification with *Hind* III.

DnaK 和 OmpA-DnaK 蛋白,分子量分别约为 60、90 和 130 kDa (图 4D), 在预期的大小范围内。

## 2.4 Western blotting 鉴定

Western blotting 检测结果显示,重组蛋白 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 均可与 RA-GH5 阳性血清发生特异性反应,具有免疫原性(图 5)。

## 2.5 动物免疫保护实验

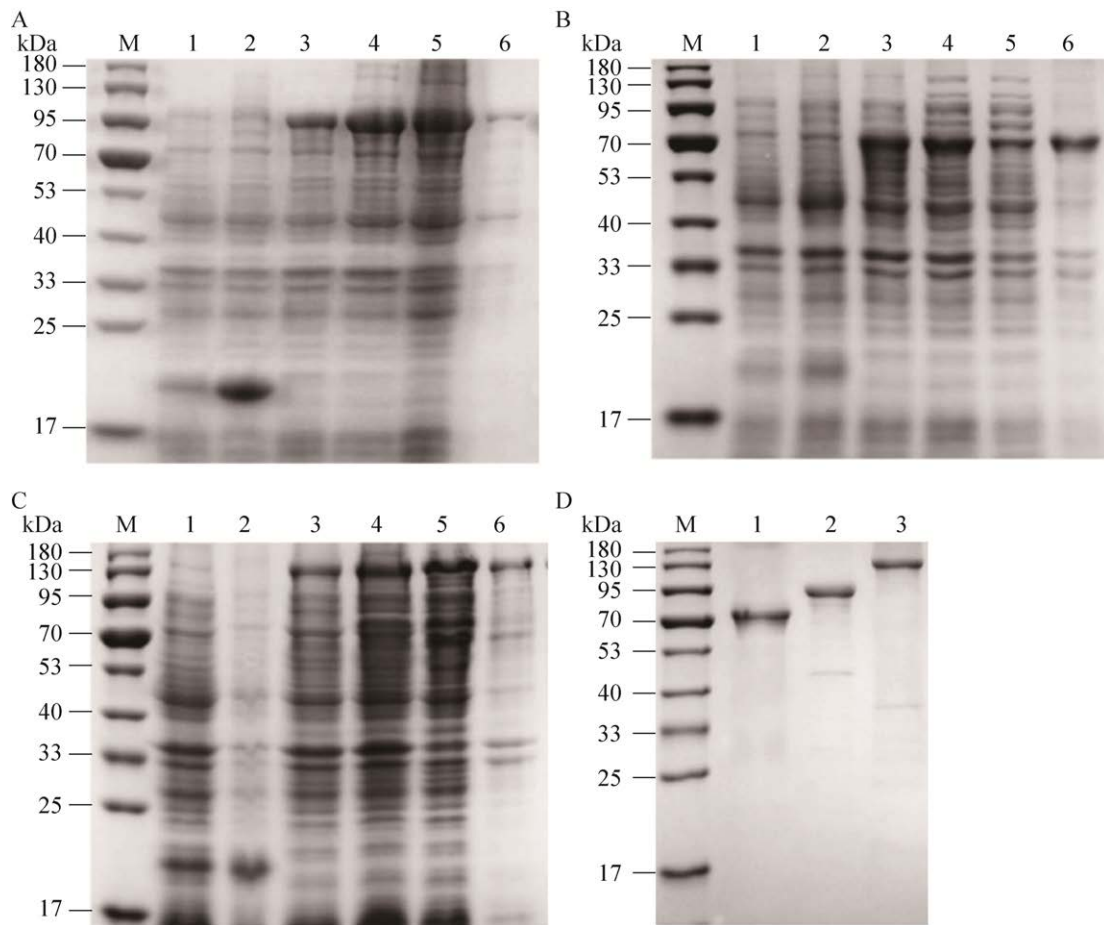
### 2.5.1 血清抗体水平检测

通过包被相应的疫苗蛋白测定了疫苗组和对照组鸭血清的特异性抗体滴度(图 6A)。结果显示,用于免疫雏鸭的重组蛋白诱导了可检测的 IgG 反应,而注射 PBS 的对照组小鸭未见特异性抗体产生。在首免后第 10、17 和 24 天,与单独的 DnaK 或 OmpA 免疫相比,融合表达的 OmpA-DnaK 免疫后在血清中刺激的 IgG 滴度更高且差异性显著( $P < 0.05$ )。在免疫后第 24 天, DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 抗体滴度分别可达 1:1 200、1:12 000 和 1:20 000。

通过包被融合蛋白 OmpA-DnaK 探测了 OmpA 和 DnaK 免疫诱导的抗体水平(图 6B)。ELISA 结果显示,重组融合蛋白能够与 OmpA 和 DnaK 的抗血清发生反应,测得的 OmpA 组和 DnaK 组抗体滴度变化与用其相应的疫苗蛋白包被测得的趋势类似。与单独重组蛋白 DnaK 和 OmpA 相比, OmpA-DnaK 抗体水平显著升高( $P < 0.01$ )。在首免后第 24 天, DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 抗体滴度分别可达 1:800、1:6 000 和 1:20 000。

### 2.5.2 淋巴细胞增殖检测

如图 7 所示,与对照组相比,3 组蛋白疫苗免疫的动物表现出显著的抗原特异性增殖细胞反应( $P < 0.001$ )。ConA 作为阳性对照,所有组淋巴细胞对 ConA 刺激产生非特异性反应。与单独的 OmpA 或 DnaK 相比,融合蛋白 OmpA-DnaK 免疫动物后,淋巴细胞增殖表现出增强作用( $P < 0.001$ )。



**图 4 重组蛋白 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 的表达和纯化** A (DnaK)/B (OmpA)/C (OmpA-DnaK): M: 蛋白质标准; 1: 未诱导 BL21(DE3)/pET-32a(+); 2: IPTG 诱导 BL21(DE3)/pET-32a(+); 3: 未诱导 BL21(DE3)/重组载体培养物; 4: IPTG 诱导 BL21(DE3)/重组载体培养物; 5: IPTG 诱导 BL21(DE3)/重组载体表达的上清; 6: IPTG 诱导 BL21(DE3)/重组载体表达的包涵体. D: M: 蛋白质标准; 1: OmpA; 2: DnaK; 3: OmpA-DnaK.

### 2.5.3 细胞因子水平

如图 8 所示, 与对照组相比, 所有蛋白免疫组血清中细胞因子 IL-2 和 IL-4 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), 而且 OmpA-DnaK 组免疫产生的 IL-2 和 IL-4 显著高于 OmpA 组和 DnaK 组 ( $P < 0.001$ )。

### 2.5.4 攻毒试验

攻毒试验结果如图 9 所示, OmpA-DnaK 免

疫组存活率为 50%, 而 OmpA 组和 DnaK 组的存活率均为 30%。攻毒对照组中所有鸭均表现出病症, 如饮食减退、嗜睡、无法站立、眼分泌物增多和腹泻等, 最终全部死亡。在 8 d 的观察期内, 空白组和疫苗组的鸭均未发现临床病症。

### 2.5.5 组织病理学分析

HE 结果表明, 对照组的鸭经 RA-GH5 感染

后出现严重病理变化(图 10)。肝细胞广泛变性坏死,肝索结构紊乱,血管壁和窦状隙扩张充血,血管周围水肿(图 10B-b)。心脏心肌纤维断裂坏死(图 10B-g)。脑部嗜碱性细胞增多,神经细胞

肿大变性,血管扩张充血,血管周围间隙水肿(图 10B-l)。疫苗免疫组鸭在 RA-GH5 感染后出现肝细胞水肿,部分心肌纤维扭曲,虽然显示局部病理病变,但损伤明显减轻。

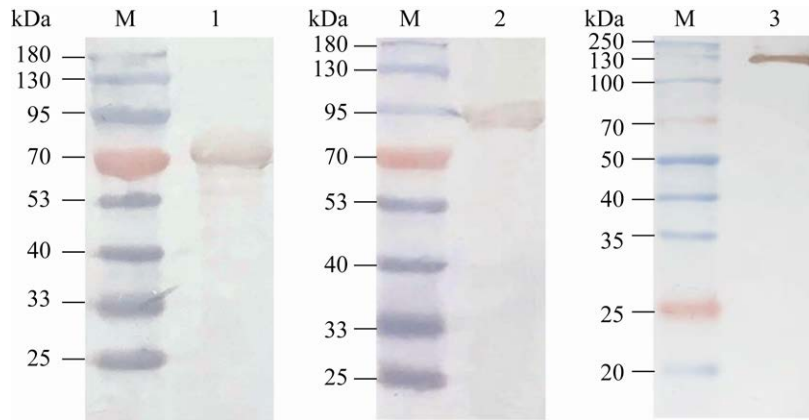


图 5 Western blotting 鉴定重组蛋白 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK M: 蛋白预染 Marker。1: OmpA; 2: DnaK; 3: OmpA-DnaK

Figure 5 Identification of recombinant proteins OmpA, DnaK and OmpA-DnaK by Western blotting. M: Protein molecular mass standard. 1: OmpA; 2: DnaK; 3: OmpA-DnaK.

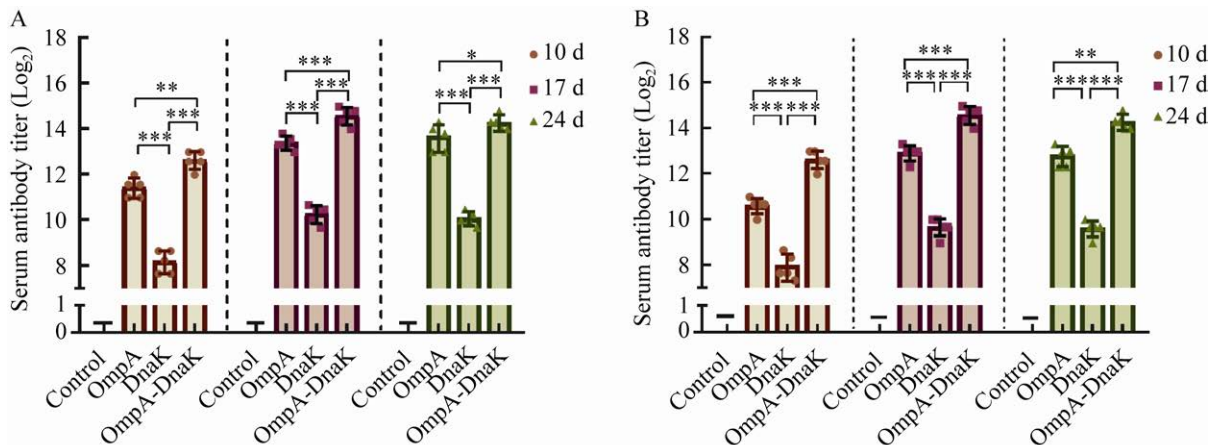


图 6 免疫鸭血清抗体滴度的测定 A: 相应的免疫蛋白用作包被抗原检测的抗体水平; B: OmpA-DnaK 用作包被抗原检测的抗体水平. 水平短线表示  $P/N < 2.1$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

Figure 6 Determination of serum antibody titers in immunized ducklings. A: The ELISA plates were coated by the same antigens, which were used as immunizing antigens; B: The ELISA plates were coated by OmpA-DnaK. Short horizontal lines indicate  $P/N < 2.1$ . \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .



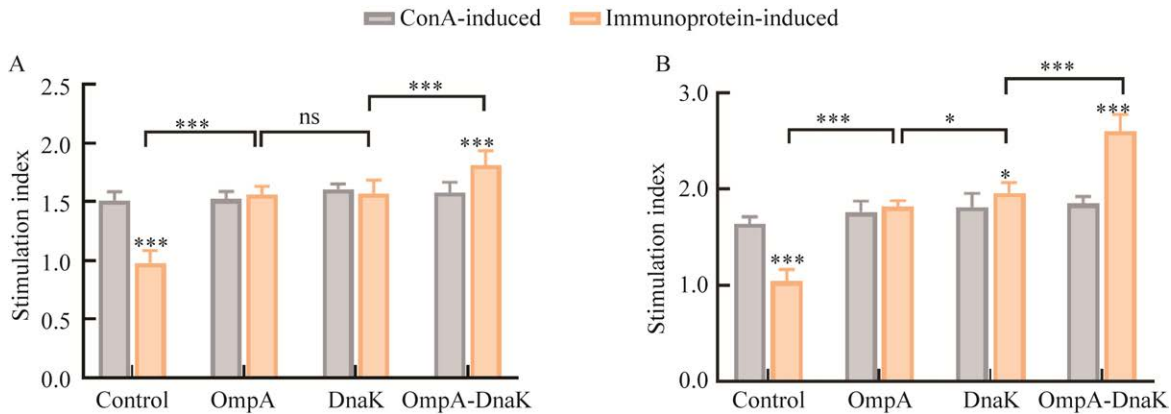


图 7 淋巴细胞增殖测定 A: 免疫第 10 天淋巴细胞增殖水平; B: 免疫第 24 天淋巴细胞增殖水平. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns:  $P > 0.05$

Figure 7 Lymphocyte proliferation assay. A: Lymphocyte proliferation level on the 10th day of immunization; B: Lymphocyte proliferation level on the 24th day of immunization. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns:  $P > 0.05$ .

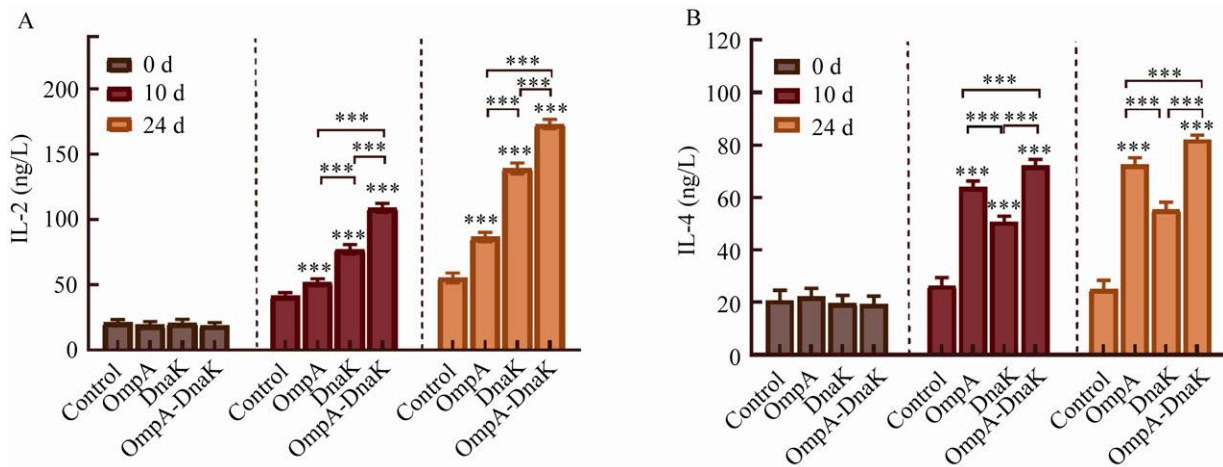


图 8 细胞因子水平

Figure 8 Detection of the cytokine level in the serum of ducks. A: IL-2; B: IL-4. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

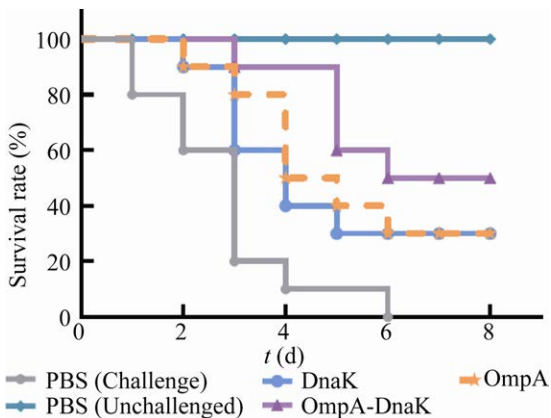


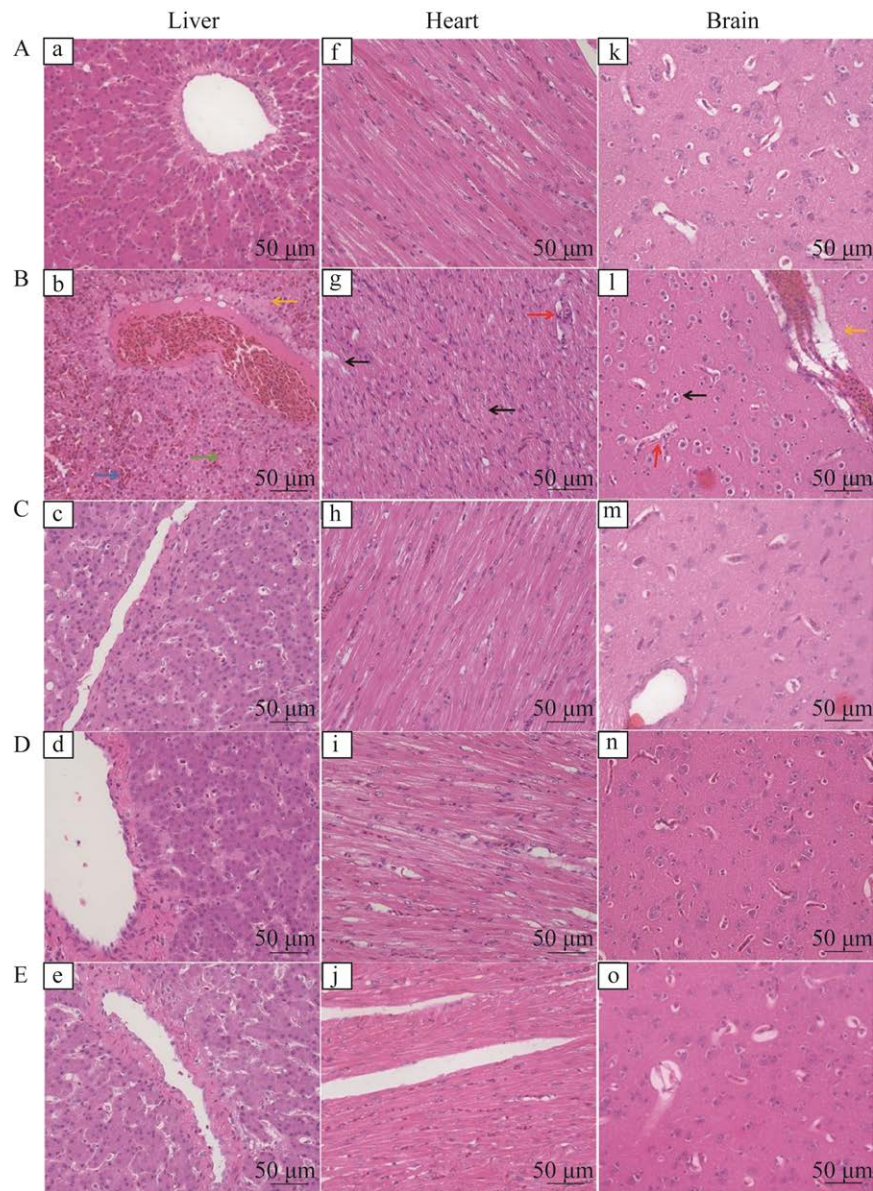
图 9 RA-GH5 攻击各组鸭的存活率

Figure 9 The survival rate of ducks challenged with RA-GH5.

### 3 讨论

传染性浆膜炎呈世界性流行, 给养鸭业造成巨大的经济损失<sup>[29-31]</sup>。本文通过原核表达系统获得了 RA 重组 DnaK、OmpA 和 OmpA-DnaK 蛋白, 首次探究了 DnaK 蛋白疫苗在鸭体内诱导的免疫反应, 证实了重组融合蛋白 OmpA-DnaK 较单独重组蛋白 OmpA 或 DnaK 具有更强的免疫原性, 以期为 RA 亚单位疫苗的进一步优化提供参考。

DnaK 作为分子伴侣可以与各种类型的蛋白



**图 10 组织病理学分析** A: 空白组。B: 攻毒对照组: b: 肝细胞核溶解(绿色箭头), 肝窦状隙扩张充血(蓝色箭头), 血管扩张充血(黄色箭头); g: 心肌纤维溶解(黑色箭头), 淋巴细胞浸润(红色箭头); l: 嗜碱性细胞增多(黑色箭头), 神经细胞肿大变性(红色箭头), 血管扩张充血(黄色箭头)。C: OmpA-DnaK 组。D: DnaK 组。E: OmpA 组

Figure 10 Histopathologic analysis of ducks. A: The blank group. B: The challenge control group: b: Hepatocyte nuclear lysis (green arrow), sinusoidal space dilation and hyperemia (blue arrow), vasodilation and congestion (yellow arrow); g: Myocardial fibrinolysis (black arrow), lymphocyte infiltration (red arrow); l: Strongly basophilic chief cells (black arrow), enlargement and degeneration of nerve cells (red arrow), vasodilation and hyperemia (yellow arrow). C: The OmpA-DnaK group. D: The DnaK group. E: The OmpA group.

质底物相互作用,以协助广泛的折叠过程,在避免形成错误的蛋白质构型方面起着重要作用<sup>[32-35]</sup>。在本研究中,RA OmpA 在大肠杆菌表达系统中为不溶性包涵体,这与已知报道 RA OmpA 在大肠杆菌系统异源表达结果一致<sup>[36-37]</sup>。DnaK 和 OmpA-DnaK 在原核表达系统中主要为可溶性表达,表明 DnaK 与不溶性 OmpA 共表达增加了 OmpA 溶解性,该结果符合有关 DnaK 具有分子伴侣活性的报道。

本研究结果显示,重组蛋白 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 均诱导了体液免疫和细胞免疫反应。OmpA 是 RA 已知的具有交叉反应原性的抗原,已报道其可诱导抗体反应和淋巴细胞增殖<sup>[6,26]</sup>。DnaK 作为 HSP70 同源蛋白,在微生物入侵宿主过程中,由于外界环境压力表达上调,使其易成为宿主免疫细胞的靶标<sup>[38-39]</sup>。我们的研究表明,RA DnaK 重组蛋白在鸭体内不仅能诱导产生特异性抗体,还可以刺激淋巴细胞增殖。此外,DnaK 还是先天性和抗原特异性免疫的有效诱导剂,可激活自然杀伤细胞,增加抗原对效应细胞的呈递,并增强针对其相关抗原的体液和细胞免疫反应<sup>[40-42]</sup>。我们将 OmpA 与 DnaK 融合表达,发现含有 DnaK 成分的融合蛋白在改善 OmpA 诱导的免疫反应方面是有效的,这与前人报道<sup>[43]</sup>DnaK 融合表达表面蛋白诱导免疫反应增强结果相似。

细胞因子 IL-2 刺激 Th1 反应,可以激活自然杀伤细胞,并刺激单核细胞的生长<sup>[44-45]</sup>。IL-4 是具有标志性的 Th2 细胞因子,可介导体液免疫反应,并参与抑制促炎性细胞因子的表达<sup>[46]</sup>,从而减轻 RA 的感染<sup>[47-48]</sup>。IL-2 和 IL-4 均是具有代表性的细胞因子。Yang 等报道<sup>[49]</sup>,OmpA-Fc 融合蛋白可显著增加血清 IL-2 和 IL-4 的水平。在本研究中观察到了类似的现象,3 种重组蛋白疫苗免疫鸭,血清 IL-2 和 IL-4 含量均显著增加,但较 OmpA 或 DnaK 免疫而言,OmpA-DnaK 重

组蛋白可诱导更高的 IL-2 和 IL-4 的水平。

体内免疫保护结果显示,重组 OmpA-DnaK、OmpA 和 DnaK 蛋白分别能提供 50%、30%和 30%的保护率。Gupta 等<sup>[50]</sup>报道 LcrV-HSP 和 LcrV 可分别提供鼠疫 100%和 70%的保护,表明通过蛋白融合提高保护力是可行的。我们的结果也显示 OmpA-DnaK 较单个蛋白具有更高的保护率。本试验首次研究了 RA DnaK 蛋白疫苗对鸭的免疫保护作用,DnaK 蛋白具有良好免疫原性,但只提供局限保护。这或许与不同菌种 DnaK 氨基酸序列存在差异以及宿主种属不同有关<sup>[51-53]</sup>。在本试验中,100  $\mu\text{g}$  OmpA 免疫 2 次小鸭存活率为 30%,攻毒对照组全部死亡。Xu 等<sup>[37]</sup>将 100  $\mu\text{g}$  OmpA 免疫小鸭一次,攻毒后 OmpA 存活率在 44.4%,攻毒对照组存活率为 21.1%,与我们的研究报道大致相符,这表明重组 OmpA 蛋白只能提供有限的保护效果。虽然我们没有做交叉保护实验,但我们克隆表达的 OmpA 序列与已知具有一定交叉保护作用 RAf153 OmpA 序列<sup>[36]</sup>具有 98.5%的核苷酸序列相似性,RA DnaK 序列又高度保守,可以合理推测重组 OmpA-DnaK 也可能具有一定的交叉保护,但还有待进一步验证。

利用融合表达在提高蛋白疫苗免疫保护效果上是可行的<sup>[22,49]</sup>。尽管在本研究中重组 OmpA-DnaK 蛋白未显示出优良的保护效果,但我们不能否认 OmpA 与 DnaK 融合表达具有诱导鸭免疫反应增强的作用。

## 4 结论

RA 重组 OmpA、DnaK 和 OmpA-DnaK 蛋白疫苗均能在鸭体内诱导宿主免疫应答。与 OmpA 或 DnaK 单独免疫效果相比,RA OmpA 与 DnaK 融合表达的重组蛋白可诱导鸭体液免疫和细胞免疫反应增强。融合表达可用于增强蛋白抗原的免疫原性,为 RA 亚单位疫苗研究提供了新的视角。

## REFERENCES

- [1] Fulton RM, Rimler RB. Epidemiologic investigation of *Riemerella anatipestifer* in a commercial duck company by serotyping and DNA fingerprinting[J]. Avian Diseases, 2010, 54(2): 969-972
- [2] Li SD, Gong XW, Chen QW, Zheng FY, Ji G, Liu YS. Threshold level of *Riemerella anatipestifer* crossing blood-brain barrier and expression profiles of immune-related proteins in blood and brain tissue from infected ducks[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2018, 200: 26-31
- [3] Luo HY, Liu MF, Wang MS, Zhao XX, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, et al. A novel resistance gene, *lnu(H)*, conferring resistance to lincosamides in *Riemerella anatipestifer* CH-2[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2018, 51(1): 136-139
- [4] Sun JK, Zhu DK, Xu JG, Jia RY, Chen S, Liu MF, Zhao XX, Yang Q, Wu Y, Zhang SQ, et al. Rifampin resistance and its fitness cost in *Riemerella anatipestifer*[J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 107
- [5] Subramaniam S, Huang B, Loh H, Kwang J, Tan HM, Chua KL, Frey J. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, 7(2): 168-174
- [6] Hu QH, Ding C, Tu J, Wang XL, Han XG, Duan YB, Yu SQ. Immunoproteomics analysis of whole cell bacterial proteins of *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(3/4): 428-438
- [7] Han X, Hu Q, Ding S, Chen W, Ding C, He L, Wang X, Ding J, Yu S. Identification and immunological characteristics of chaperonin GroEL in *Riemerella anatipestifer*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(3): 1197-205
- [8] Yang Y, Gu C, Liao Y, Luo Q, Hu X, Zhang W, Shao H, Cheng G. Protein expressions and their immunogenicity from *Riemerella anatipestifer* cultured in iron restriction medium[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65901
- [9] Phonvisay M, Lee JW, Liou JJ, Wang HY, Chu CY. Evaluation of long-term antibody response and cross-serotype reaction in ducks immunised with recombinant *Riemerella anatipestifer* outer membrane protein A and CpG ODN[J]. Journal of Veterinary Research, 2019, 63(4): 543-548
- [10] Henderson B, Allan E, Coates ARM. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(7): 3693-3706
- [11] Nillegoda NB, Wentink AS, Bukau B. Protein disaggregation in multicellular organisms[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2018, 43(4): 285-300
- [12] Grindle MP, Carter B, Alao JP, Connors K, Tehver R, Kravats AN. Structural communication between the *E. coli* chaperones DnaK and Hsp90[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 2200
- [13] Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer[J]. Drug Discovery Today, 2006, 11(11/12): 534-540
- [14] Colaco CA, Bailey CR, Walker KB, Keeble J. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 461230
- [15] Ghazaei C. Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens[J]. Journal of Medical Microbiology, 2017, 66(3): 259-265
- [16] Bolhassani A, Rafati S. Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development[J]. Expert Review of Vaccines, 2008, 7(8): 1185-1199
- [17] Fourie KR, Wilson HL. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases[J]. Vaccines, 2020, 8(4): 773
- [18] Verma S, Sugadev R, Kumar A, Chandna S, Ganju L, Bansal A. Multi-epitope DnaK peptide vaccine against *S. Typhi*: an *in silico* approach[J]. Vaccine, 2018, 36(28): 4014-4022
- [19] Lussow AR, Barrios C, Van Embden J, Van Der Zee R, Verdini AS, Pessi A, Louis JA, Lambert PH, Del Giudice G. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules[J]. European Journal of Immunology, 1991, 21(10): 2297-2302
- [20] Floto RA, MacAry PA, Boname JM, Mien TS, Kampmann B, Hair JR, Huey OS, Houben ENG, Pieters J, Day C, et al. Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5[J]. Science, 2006, 314(5798): 454-458
- [21] Bolhassani A, Rafati S. Mini-chaperones: potential immuno-stimulators in vaccine design[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013, 9(1): 153-161
- [22] Golotin V, Sanina N, Davydova L, Chopenko N, Mazeika A, Roig M, Shnyrov V, Uversky VN, Kostetsky E. Recombinant fusion protein joining E protein domain III of tick-borne encephalitis virus and HSP70 of *Yersinia pseudotuberculosis* as an antigen for the TI-complexes[J]. Biomolecules, 2018, 8(3): 82

- [23] Attaran H, Nili H, Tebianian M. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant M2e.Hsp70c (Hsp70\_359–610) fusion protein against influenza virus infection in mice[J]. *Virologica Sinica*, 2014, 29(4): 218-227
- [24] Liu MF, Huang M, Shui Y, Biville F, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Zhao XX, et al. Roles of B739\_1343 in iron acquisition and pathogenesis in *Riemerella anatipestifer* CH-1 and evaluation of the RA-CH-1ΔB739\_1343 mutant as an attenuated vaccine[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197310
- [25] Zhang YW, Chen HL, Zeng XF, Wang P, Li JX, Wu WX. Levamisole enhances immunity in ducklings vaccinated against *Riemerella anatipestifer*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2014, 58(8): 456-462
- [26] Chu CY, Liu CH, Liou JJ, Lee JW, Cheng LT. Development of a subunit vaccine containing recombinant *Riemerella anatipestifer* outer membrane protein A and CpG ODN adjuvant[J]. *Vaccine*, 2015, 33(1): 92-99
- [27] Liu HW, Wang XL, Ding C, Han XG, Cheng AC, Wang SH, Yu SQ. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer*-inactivated vaccine[J]. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 2013, 20(5): 691-697
- [28] Kang M, Seo HS, Soh SH, Jang HK. Immunogenicity and safety of a live *Riemerella anatipestifer* vaccine and the contribution of IgA to protective efficacy in Pekin ducks[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 222: 132-138
- [29] Pathanasophon P, Phuektes P, Tanticharoenyos T, Narongsak W, Sawada T. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. *Avian Pathology*, 2002, 31(3): 267-270
- [30] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 朱德康, 黄城, 刘菲, 周毅, 郭宇飞, 刘兆宇, 方鹏飞. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(4): 320-323
- Cheng AC, Wang MS, Chen XY, Zhu DK, Huang C, Liu F, Zhou Y, Guo YF, Liu ZY, Fang PF. Epidemiology and new serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in China and studies on their pathogenic characteristics[J]. *Chinese Journal of Veterinary*, 2003, 23(4): 320-323 (in Chinese)
- [31] Omaleki L, Blackall PJ, Bisgaard M, Turni C. Molecular and serological characterization of *Riemerella isolates* associated with poultry in Australia[J]. *Avian Pathology*, 2021, 50(1): 31-40
- [32] Mamipour M, Yousefi M, Hasanzadeh M. An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 367-375
- [33] Fatima K, Naqvi F, Younas H. A review: molecular chaperone-mediated folding, unfolding and disaggregation of expressed recombinant proteins[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2021, 79(2): 153-174
- [34] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis[J]. *Nature*, 2011, 475(7356): 324-332
- [35] Doyle SM, Shastry S, Kravats AN, Shih YH, Miot M, Hoskins JR, Stan G, Wickner S. Interplay between *E. coli* DnaK, ClpB and GrpE during protein disaggregation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(2): 312-327
- [36] Zhai ZP, Li XX, Xiao X, Yu J, Chen MM, Yu YF, Wu GY, Li YZ, Ye LL, Yao HC, et al. Immunoproteomics selection of cross-protective vaccine candidates from *Riemerella anatipestifer* serotypes 1 and 2[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/3/4): 850-857
- [37] Xu XX, Xu YH, Miao S, Jiang P, Cui JS, Gong YS, Tan PP, Du XL, Islam N, Hu QH. Evaluation of the protective immunity of *Riemerella anatipestifer* OmpA[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 1273-1281
- [38] Lange MD, Abernathy J, Farmer BD. Evaluation of a recombinant *Flavobacterium columnare* DnaK protein vaccine as a means of protection against columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1175
- [39] Lange MD, Beck BH, Brown JD, Farmer BD, Barnett LM, Webster CD. Missing the target: DnaK is a dominant epitope in the humoral immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Flavobacterium columnare*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 170-179
- [40] Tobian AAR, Canaday DH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4<sup>+</sup> T cells[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(8): 5130-5137
- [41] Tobian AAR, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8<sup>+</sup> T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages[J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 172(9): 5277-5286
- [42] Binder RJ. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system[J]. *Journal of*

- Immunology: Baltimore, Md: 1950, 2014, 193(12): 5765-5771
- [43] Atzingen MV, Rodriguez D, Siqueira GH, Leite LCC, Nascimento ALTO. Induction of boosted immune response in mice by leptospiral surface proteins expressed in fusion with DnaK[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 564285
- [44] Habijanac J, Berovic M, Boh B, Plankl M, Wraber B. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(1): 85-95
- [45] Boyman O, Kolios AGA, Raeber ME. Modulation of T cell responses by IL-2 and IL-2 complexes[J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2015, 33(4 Suppl 92): S54-S57
- [46] Fernandez CP, Afrin F, Flores RA, Kim WH, Jeong J, Kim S, Lillehoj HS, Min W. Identification of duck IL-4 and its inhibitory effect on IL-17A expression in *R. anatipestifer*-stimulated splenic lymphocytes[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 95: 20-29
- [47] Fernandez CP, Afrin F, Flores RA, Kim WH, Jeong J, Kim S, Chang HH, Lillehoj HS, Min W. Downregulation of inflammatory cytokines by berberine attenuates *Riemerella anatipestifer* infection in ducks[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 77: 121-127
- [48] Fernandez-Colorado CP, Cammayo PLT, Flores RA, Nguyen BT, Kim WH, Kim S, Lillehoj HS, Min W. Anti-inflammatory activity of diindolylmethane alleviates *Riemerella anatipestifer* infection in ducks[J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0242198
- [49] Yang SF, Dong WW, Li GM, Zhao ZC, Song MX, Huang ZL, Fu J, Jia FJ, Lin SQ. A recombinant vaccine of *Riemerella anatipestifer* OmpA fused with duck IgY Fc and *Schisandra chinensis* polysaccharide adjuvant enhance protective immune response[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 136: 103707
- [50] Gupta A, Narayan B, Kumar S, Verma SK. Vaccine potential of a recombinant bivalent fusion protein LcrV-HSP70 against plague and yersiniosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 988
- [51] Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2007, 25(37/38): 6721-6729
- [52] Paliwal PK, Bansal A, Sagi SSK, Sairam M. Intraperitoneal immunization of recombinant HSP70 (DnaK) of *Salmonella* Typhi induces a predominant Th2 response and protective immunity in mice against lethal *Salmonella* infection[J]. *Vaccine*, 2011, 29(38): 6532-6539
- [53] Kim WS, Kim JS, Kim HM, Kwon KW, Eum SY, Shin SJ. Comparison of immunogenicity and vaccine efficacy between heat-shock proteins, HSP70 and GrpE, in the DnaK operon of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 14411