

# 携带新城疫病毒 DNA 疫苗的鼠伤寒沙门氏菌 及其安全性与免疫效力

潘志明<sup>1</sup> 焦新安<sup>1,2\*</sup> 黄金林<sup>1</sup> 殷月兰<sup>1</sup> 唐丽华<sup>1</sup>

(扬州大学<sup>1</sup> 生物科学与技术学院<sup>2</sup> 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

**摘 要** 根据 GenBank 中发表的新城疫病毒(NDV)融合蛋白(F)基因序列,设计一对引物,通过 RT-PCR 扩增出鹅源新城疫病毒分离株 JS5 F 基因,测序确认后,将其克隆入真核表达载体 pVAX1,获得重组真核表达质粒 pVAX1-F。将 pVAX1-F 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207,构建成携带 DNA 疫苗的重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-F)。重组菌以不同剂量口服免疫 1 日龄雏鸡,结果表明,细菌对雏鸡具有良好的安全性,且不影响鸡的增重。将 SL7207(pVAX1-F)分别以  $10^8$  CFU 和  $10^9$  CFU 的剂量 3 次口服免疫 1 日龄商品代伊莎褐蛋鸡,抗体检测结果显示,在三免后 1 周,SL7207(pVAX1-F) $10^9$  CFU 剂量组的血清抗体效价与空载体组之间存在显著性差异( $p < 0.05$ )。重组菌两个剂量组在首免后 2 周开始出现粘膜抗体,并于二免后 2 周和 3 周达到较高水平。免疫保护试验结果显示,SL7207(pVAX1-F) $10^9$  CFU 剂量组的保护率为 77.27%,与空载体组之间存在显著性差异( $p < 0.05$ )。

**关键词** 减毒沙门氏菌, DNA 疫苗, 新城疫病毒, 安全性, 免疫效力

中图分类号 S852.6 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)06-0937-05

新城疫(Newcastle disease, ND)是危害养禽业的主要传染病之一,被国际兽疫局列为 A 类烈性传染病。目前,在新城疫的免疫预防中使用的常规疫苗主要有各种不同毒力的弱毒疫苗和油乳剂灭活疫苗。有些弱毒疫苗保留了部分毒性,对雏鸡仍有一定的致死率<sup>[1]</sup>,而且弱毒苗还能引起鸡呼吸道的温和病变,增强了对其它病原的易感性。灭活疫苗虽然能产生高水平的循环抗体,但是不能刺激机体产生细胞免疫和粘膜免疫。另外,常规疫苗接种还会受到母源抗体的干扰<sup>[1]</sup>。因此,寻求一种新型的、更为安全有效的疫苗,对于新城疫的综合防治具有重要的现实意义<sup>[2~4]</sup>。

国内外研究证实,许多病原细菌、病毒和寄生虫的 DNA 疫苗可诱导产生保护性的免疫应答。然而,传统 DNA 的免疫主要通过肌肉注射、皮下注射和基因枪免疫等方式,DNA 摄取效率低,需要较大剂量,所以免疫效果不稳定且生产成本相对较高,难以适于兽医的临床应用<sup>[5]</sup>。近年来,减毒细菌载体被证实是传递 DNA 疫苗的理想工具。细菌载体可以通过自然感染途径运送 DNA 疫苗至免疫诱导部位,乃至特定的免疫细胞(如 APC 等),借助于宿主细胞表达目的抗原,因而免疫方法简便,免疫效果较好,能

同时激发全身免疫和局部粘膜免疫,有着良好的应用前景。在这类细菌载体中已经报道的有减毒沙门氏菌(*Salmonella*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、产单核细胞李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)和侵袭性大肠杆菌(*Escherichia coli*)等,其中对减毒沙门氏菌的研究最为引人注目<sup>[4,6,7]</sup>。

本研究采用 RT-PCR 方法获得了鹅源新城疫病毒 JS5 株的 F 基因,并对其进行了克隆和序列测定,在此基础上,构建了含有 JS5 株 F 基因 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌,并对其安全性和免疫效力作了评价,为研制新城疫新型基因工程粘膜疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株、细胞、细菌和疫苗** 鹅源新城疫病毒毒株 JS/5/01/GQ(简称 JS5)由农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离保存。减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207[2337-65(WRAY)hisG46  $\Delta$ aroA407(TC<sup>S</sup>aroA544:Tn10)]由美国斯坦福大学 Stocker 博士惠赠。COS-7 细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。鸡新城疫油乳剂灭活疫苗为中牧实业股份有限公司南京药械厂产品。

基金项目:国家“863 计划”(2002AA245051)、国家自然科学基金(30425031,30170700)、江苏省自然科学基金(BK2003043)

\* 通讯作者。Tel 86-514-7979091; Fax 86-514-7311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介:潘志明(1972-),男,江苏靖江人,副教授,博士,从事畜禽新型基因工程疫苗研究。E-mail: zmpan@yzu.edu.cn

其他作者:张 辉<sup>1</sup>, 张晓明<sup>1</sup>, 张小荣<sup>2</sup>, 刘秀梵<sup>2</sup>

收稿日期:2005-04-04, 修回日期:2005-08-29

**1.1.2 质粒和抗体:**真核表达质粒 pVAX1 购自 Invitrogen 公司, pGEM<sup>®</sup> T easy vector 购自 Promega 公司。FITC 标记兔抗鸡 IgG 荧光二抗及 HRP 标记的兔抗鸡 IgG、IgM 和羊抗鸡 IgA 酶标二抗购自 Sigma 公司。

**1.1.3 主要试剂:**限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 购自上海华美生物工程公司, T4 DNA 连接酶、Expand High Fidelity PCR System 购自 Roche 公司, QIAfilter plasmid midi kit 购自 Qiagen 公司, AMV 反转录酶和 RNase 抑制剂 RNasin 购自 Promega 公司。

**1.1.4 试验动物:**1 日龄商品代伊莎褐蛋鸡购自江苏省无锡市养鸡场集团公司。

## 1.2 NDV F 基因的扩增

参照 GenBank 中已发表的新城疫病毒 F 基因全序列(登录号 AF456442), 设计合成一对引物  $P_1$ : 5'-TGAATTCCAATATGGGCTCCAGACCT-3' 和  $P_2$ : 5'-CAAG CTTCACCTCTTATCTGCATTTCATGC-3', 在引物两端分别引入了 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点。引物由大连宝生物工程有限公司合成。以酚-SDS 法提取病毒基因组 RNA, 按 Promega 公司 AMV 反转录酶说明书反转录后进行 PCR。

## 1.3 重组真核表达质粒 pVAX1-F 的构建和鉴定

将 PCR 产物克隆到 pGEM<sup>®</sup> T easy vector 中, 酶切鉴定为阳性的克隆命名为 pGEM-F, 并送至上海生物工程技术有限公司进行序列测定。从 pGEM-F 中用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切获得 F 片段, 克隆入真核表达载体 pVAX1, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pVAX1-F。以 Lipofectin 为转染试剂, 将 pVAX1-F 转染 COS-7 细胞, 转染后 48h 通过间接免疫荧光试验检测 F 基因的表达。

## 1.4 携带新城疫病毒 DNA 疫苗减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建

用电穿孔法<sup>[8]</sup>将 pVAX1 质粒空载体或重组表达质粒 pVAX1-F 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207。所获得阳性转化子命名为 SL7207(pVAX1) 和 SL7207(pVAX1-F)。

## 1.5 重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-F) 对商品鸡的安全性试验

SL7207(pVAX1-F) 分别以  $10^8$  CFU、 $10^9$  CFU、 $10^{10}$  CFU 灌喂接种 1 日龄商品代伊莎褐蛋鸡, 每剂量组 10 只。连续观察 2 周后, 扑杀试验鸡, 检查是否出现眼观病变。

## 1.6 重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-F) 对商品鸡的免疫效力试验

### 1.6.1 试验分组及免疫接种:

蛋鸡共分为 5 组, 分别为重组菌 SL7207(pVAX1-F) 高剂量免疫组( $10^9$  CFU/羽, 30 羽), SL7207(pVAX1-F) 低剂量免疫组( $10^8$  CFU/羽, 30 羽), SL7207(pVAX1) 免疫组( $10^8$  CFU/羽, 25 羽), 油苗免疫组(25 羽), 攻毒对照组(25 羽)。细菌免疫以灌喂方式进行 3 次, 分别于 1 日龄、2 周龄、4 周龄进行, 油苗于 1 日龄颈部皮下接种 0.2 mL/羽。

**1.6.2 称重及样品采集处理:**分别于第 1 天和第 35 天称量各试验组所有鸡只的体重, 观察其增重情况。各免疫组在首免后第 14、28 和 35 天分别经翅静脉采血, 10 只/组, 分离血清。同时, 每组剖杀两只试验鸡, 按文献<sup>[9]</sup>的方法制备肠道粘膜样品。

**1.6.3 F 蛋白特异性血清和小肠粘膜抗体效价的测定:**通过间接 ELISA 方法测定 F 蛋白特异的血清和粘膜抗体效价。

**1.6.4 攻毒:**于三免后 10d 用新城疫标准强毒株 F48E8 以滴鼻途径对鸡群进行攻毒, 攻毒剂量为  $8 \times 10^4$  EID<sub>50</sub>, 攻毒后连续观察 14d, 计算免疫保护率。

## 2 结果

### 2.1 重组表达质粒的构建和鉴定

双酶切产物电泳后, 得到一大一小两个片段, 其中小片段与目的基因片段大小一致(1.7 kb), 表明重组质粒构建成功。pVAX1-F 转染细胞出现黄绿色荧光(图 1), 而对照组(pVAX1)未见有特异性荧光, 说明 F 基因在转染细胞中获得表达。

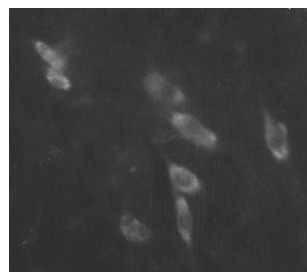


图 1 pVAX1-F 转染 COS-7 细胞的间接免疫荧光试验结果

Fig.1 The result of indirect immunofluorescent assay for COS-7 cells transfected with pVAX1-F

### 2.2 重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-F) 的构建

将 pVAX1-F 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207, 挑取单个菌落抽提质粒, 并进行酶切鉴定。电泳结果表明, 所有抽提质粒的酶切电泳图谱均与预期相符, 表明重组质粒已被成功地导入减毒沙门氏菌中。

### 2.3 重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-F) 安全性试验

在观察期内, 所有接种鸡均无任何不良反应。2 周后扑杀, 剖检没有发现在肝脏、脾脏等实质脏器上

有眼观病变。从增重试验结果来看,在第 5 周时,重组菌 SL7207( pVAX1-F )的两个试验组鸡的体重之间没有统计学差异(  $p > 0.05$  ),而且与其它试验组之间也未见显著差异(  $p > 0.05$  )结果见表 1。

表 1 重组细菌疫苗免疫对雏鸡增重的影响		
Table 1 Effect of oral immunization with SL7207( pVAX1-F ) on chicken 's body weight		
Group	Number of chicken	Mean body weight at 5-week-old/kg
SL7207( pVAX1-F ) $10^8$ CFU	23	0.428 $\pm$ 0.054
SL7207( pVAX1-F ) $10^9$ CFU	22	0.413 $\pm$ 0.047
Control	16	0.438 $\pm$ 0.041
SL7207( pVAX1 )	17	0.427 $\pm$ 0.044
Oil-emulsified vaccine	18	0.403 $\pm$ 0.055

表 2 以鼠伤寒沙门氏菌运送的 DNA 疫苗对商品代伊莎褐蛋鸡的免疫原性试验结果				
Table 2 The results of immunogenicity assay of DNA vaccines delivered by <i>Salmonella typhimurium</i> in commercial ISA brown chickens				
Group	GM antibody titers as determined by ELISA			
	Samples of serum		Samples of small intestinal mucosa	
	2Week post-priming	1Week post-three immunization	2Week post-priming	1Week post-three immunization
SL7207( pVAX1-F ) $10^9$ CFU	320.00 $\pm$ 195.95	576.00 $\pm$ 143.10*	128.00	192.00 $\pm$ 90.51
SL7207( pVAX1-F ) $10^8$ CFU	128.00 $\pm$ 43.81	104.00 $\pm$ 53.66	96.00	128.00
SL7207( pVAX1 )	96.00 $\pm$ 35.77	40.00	32.00	32.00
Oil-emulsified vaccine	1024.00 $\pm$ 350.54	896.00 $\pm$ 350.54	48.00 $\pm$ 22.63	48.00 $\pm$ 22.63
Control	96.00 $\pm$ 35.77	36.00 $\pm$ 35.77	32.00	32.00

\* : $p < 0.05$  SL7207( pVAX1-F )  $10^9$  CFU group versus SL7207( pVAX1 ) group.

表 3 重组鼠伤寒沙门氏菌对商品代伊莎褐蛋鸡的免疫保护结果				
Table 3 The results of protective efficacy of DNA vaccines delivered by <i>Salmonella typhimurium</i> for commercial ISA brown chickens				
Group	Number of chickens	Number of survivor	Number of dead	Protective rate / %
SL7207( pVAX1-F ) $10^9$ CFU	22	17	5	77.27
SL7207( pVAX1-F ) $10^8$ CFU	23	12	11	52.10
SL7207( pVAX1 )	17	5	12	29.42
Oil-emulsified vaccine	18	15	3	83.22
Control	16	2	14	12.50

### 3 讨论

自 1997 年以来,在我国部分地区流行鹅源的新城疫,该病具有高度的发病率和死亡率,对养禽业造成了巨大的经济损失。目前,对于鹅源新城疫主要采用油苗免疫的预防措施,而应用 DNA 疫苗防治鹅

2.4 SL7207( pVAX1-F )的免疫效力试验

2.4.1 F 蛋白特异的血清和粘膜抗体检测 :在首免后 2 周,所有试验组的血清抗体效价均较高,但到二免后 2 周,所有试验组的抗体水平下降;在三免后 1 周,SL7207( pVAX1-F ) $10^9$  CFU 剂量组的抗体水平回升,且与空载体组和空白对照组之间存在显著性差异(  $p < 0.05$  ),但与油苗免疫组之间不存在显著性差异(  $p > 0.05$  )。小肠粘膜抗体的测定结果显示,重组菌 SL7207( pVAX1-F )的两个剂量组在首免后 2 周开始出现粘膜抗体,并于二免后 2 周和 3 周达到较高水平(表 2)。

2.4.2 免疫攻毒试验 :如表 3 所示,SL7207( pVAX1-F ) $10^9$  CFU 免疫组具有良好的保护率(达 77.27%),与空白对照组和空载体组之间存在显著性差异(  $p < 0.05$  ),而 SL7207( pVAX1-F ) $10^8$  CFU 免疫组提供的保护率较低,仅为 52.10%。

源 ND 的研究还未见报道,值得探讨,同时亦可为其它水禽传染性疾病的控制提供新的思路 and 手段<sup>[10]</sup>。

本研究应用 RT-PCR 扩增并克隆了鹅源新城疫病毒分离株 JS5 的 F 基因,序列测定结果表明,所测 1679 个核苷酸包含 F 基因的完整阅读框架( ORF ),编码 553 个氨基酸组成的前体蛋白 F<sub>0</sub>,其裂解区域

的氨基酸为 RRQKR↓F,说明该毒株是一株典型的 NDV 强毒株。通过比较 JS5 株与其它 NDV 毒株 F 蛋白氨基酸序列发现,JS5 株与国际标准强毒株、鸡源 NDV 强毒分离株和其它鹅源 NDV 强毒分离株的 F 蛋白高度保守<sup>[11]</sup>。所以,JS5 株的 F 基因可以作为研制 ND 基因工程疫苗的目的基因,本研究则以该病毒 F 基因构建了 NDV 的 DNA 疫苗。作为研究 DNA 疫苗的基本程序,在进行动物试验之前,一般要将其转染动物细胞,观察是否有目的蛋白的表达以及表达的蛋白是否有免疫反应性。本试验结果证实,重组质粒 pVAX1-F 转染 COS-7 细胞后可以表达具有免疫反应性的 F 蛋白,这为后续研究工作的开展奠定了基础。

鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 是 *aroA* 缺陷型细菌,属减毒菌株,以 SL7207 静脉注射小鼠,其对小鼠致死剂量较同源野生型菌株提高了  $10^6$  倍<sup>[12]</sup>。可见,SL7207 虽已减毒,但仍具有一定的毒力。本试验研究表明,以  $10^8$  CFU、 $10^9$  CFU 和  $10^{10}$  CFU 剂量的重组细菌口服接种雏鸡,没有引起鸡的不良反应,且  $10^8$  CFU 和  $10^9$  CFU 剂量组的鸡只增重正常,说明 SL7207(pVAX1-F)具有良好的安全性。

研究发现,基于 F 基因为目的基因的 DNA 疫苗肌肉注射 SPF 试验鸡后,试验鸡产生了高水平针对 F 蛋白的抗体,并具有部分保护强毒攻击的能力,但不能激发明显的粘膜免疫应答<sup>[3]</sup>。而 NDV 感染的主要门户是消化道和呼吸道,因此在局部建立有效的粘膜应答对于 NDV 的控制有着重要的意义<sup>[11]</sup>。本研究免疫效力试验结果显示,二免后 14d,  $10^9$  CFU 剂量组的血清抗体水平高于空载体免疫组,三免后 7d 两组间血清抗体水平存在显著性差异( $p < 0.05$ )。同时测定试验鸡的 HI 抗体效价表明,免疫前试验鸡群具有相当高的新城疫病毒母源抗体,HI 效价在  $2^7 \sim 2^8$  之间。在二免后 14d 和 21d,细菌免疫组的 HI 抗体效价分别在  $2^0 \sim 2^2$  之间,说明此时细菌免疫组的母源抗体已消失。因而可以推断,本试验中的细菌免疫组在后期产生的特异性抗体是重组细菌激发机体产生的,而不是母源抗体在鸡体内的残留。另外,细菌免疫组的粘膜抗体水平在二免后 14d 和 21d 均高于空载体组,而油苗免疫组一直未能检测出粘膜抗体。攻毒试验结果显示,重组细菌  $10^9$  CFU 剂量组的免疫保护率为 77.27%,与空载体组存在显著性差异( $p < 0.05$ ),但  $10^8$  CFU 剂量组的保护水平稍低,仅为 52.10%。这提示除在肠道局部产生保护性抗体外,还需要机体产生较高水平

的循环抗体,这样才能较好地提供对强毒的攻击。试验中油苗免疫组的保护率也仅为 83.22%,与细菌  $10^9$  CFU 剂量组相当,说明油苗免疫除受到母源抗体干扰外,还存在不能诱导产生局部粘膜免疫应答的缺陷。因此,我们认为,如果将本研究的重组细菌疫苗与油苗联合使用,则可以相互取长补短,从而提高免疫效果。在试验中我们还发现鸡体产生了高滴度的抗沙门氏菌抗体,而且延续时间长,因此重组细菌的早期免疫还可同时预防沙门氏菌的感染。

本研究初步显示了以减毒沙门氏菌运送新城疫病毒 DNA 疫苗的免疫保护作用,在对运送载体优化、最佳免疫剂量、免疫程序和免疫机制作进一步研究后,我们相信,这一疫苗技术对于家禽新城疫的控制将有良好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京:科学出版社, 1997.
- [2] 倪振亚,焦新安,吴艳涛,等. 表达新城疫病毒融合蛋白 F 基因的重组减毒沙门氏菌的构建和鉴定. 江苏农业研究, 1999, 20(3):32.
- [3] Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, et al. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. *Vaccine*, 1996, 14:747-752.
- [4] 潘志明,焦新安,张小荣,等. 运送鹅源新城疫病毒 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌及其免疫原性. 农业生物技术学报, 2004, 12(4):412-415.
- [5] Krishnan B R. Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Adv Drug Delivery Rev* 2000, 43:3-11.
- [6] Dietrich G, Spreng S, Favre D, et al. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2003, 5(1):11-19.
- [7] Weiss S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella* spp.. *Int J Med Microbiol* 2003, 293(1):95-106.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第二版. 北京:科学出版社, 1992.
- [9] 于长青,邹全明,王缚绳,等. 口服幽门螺杆菌疫苗后小鼠粘膜免疫应答研究. 上海免疫学杂志, 2001, 21(4):240-245.
- [10] 陈立功,万洪全,宋红芹,等. 不同基因型新城疫病毒株对鹅的致病性. 中国兽医学报, 2005, 25(2):131-134.
- [11] Baker K A, Dutch R E, Lamb R A, et al. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 2002, 3:309-319.
- [12] Stocker B A. Aromatic-dependent *Salmonella* as anti-bacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them. *J Biotech* 2000, 83:25-50.

## Safety and efficacy of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring DNA vaccine against Newcastle disease virus

PAN Zhi-ming<sup>1,2</sup> JIAO Xin-an<sup>1,2\*</sup> HUANG Jin-lin<sup>1</sup> YIN Yue-lan<sup>1</sup> TANG Li-hua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Bioscience and Biotechnology, <sup>2</sup> Animal Infectious Diseases Laboratory of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** A pair of primers were designed and synthesized according to the previously published sequence of fusion protein (F) gene of Newcastle disease virus (NDV) and used to amplify F gene by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from the genomic RNA of a NDV strain JS5 isolated from goose. The PCR product was identified by sequencing. Then recombinant eukaryotic expression vector pVAX1-F was constructed through inserting F gene into MCS of pVAX1. The recombinant plasmid pVAX1-F was transfected in COS-7 cells, and identified for the transient expression of F gene by indirect immunofluorescent assay. Finally, the recombinant plasmid was transformed into attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207, and the recombinant was screened and designated as SL7207 (pVAX1-F). It was verified that SL7207 (pVAX1-F) as the oral NDV DNA vaccine was safe for chickens after oral immunization at dosage of  $10^{10}$  CFU or below. 1-day-old commercial ISA brown chickens were immunized orally with SL7207 (pVAX1-F) at two different dosages ( $10^9$  CFU and  $10^8$  CFU) on day 1, 14 and 28. On day 7 after the last immunization, no significant difference was observed in the body weight between these two groups ( $p > 0.05$ ), and also no significant difference between those two groups and negative control group ( $p > 0.05$ ). Since there were maternal antibodies, high ELISA titers of serum antibodies against NDV were detected in the chickens of all groups on day 14. However, the levels of serum antibodies were decreased in the chickens of all groups on day 28, but the anti-NDV antibody response detected in the sera of chickens immunized with SL7207 (pVAX1-F) at the dosage of  $10^9$  CFU were increased and significantly higher than the response induced by immunization with SL7207 (pVAX1) on day 35 ( $p < 0.05$ ). Intestinal mucosal immune response was observed in chickens immunized with SL7207 (pVAX1-F) at the dosage of  $10^9$  CFU or  $10^8$  CFU. The high ELISA titers of antibodies against NDV in small intestinal mucosal samples from immunized chickens were on day 28 and 35. After challenged intranasally with virulent NDV strain F48E8, the chickens immunized with SL7207 (pVAX1-F) at the dosage of  $10^9$  CFU could be protected with the protective rate of 77.27%, significantly higher than those with SL7207 (pVAX1) ( $p < 0.05$ ). In summary, the DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* was safe and has good immunogenicity for chickens. A novel mucosal DNA vaccine was developed and could be useful for controlling the infection and epidemic of ND in the poultry.

**Key words:** Attenuated *Salmonella*, DNA vaccine, Newcastle disease virus, Safety, Efficacy

Foundation item: High Technology Research and Development Program of China (2002AA245051); National Sciences Foundation of China (30425031, 30170700); Natural Sciences Foundation of Jiangsu Province (BK2003043)

\* Corresponding author. Tel 86-514-7979091; Fax 86-514-7311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Other authors: ZHANG Hui<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-ming<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-rong<sup>2</sup>, LIU Xiu-fan<sup>2</sup>

Received date: 04-04-2005

### 《微生物学报》加入“万方数据”等数字化期刊群的声明

为适应信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,《微生物学报》除发行印刷版外,还加入了《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,进入因特网提供信息服务。

通常在期刊的出版过程中,不可能将其中的一篇撤掉。因此,本刊建议:凡不同意转让专有出版权和网络传播权等所有版权的作者,敬请提前声明,并改投其他刊物。另外,本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。为此,本刊致以诚挚的谢意!

读者可上网查询浏览本刊内容,网址为: <http://www.im.ac.cn/journals> 或 <http://wsxb.periodicals.com.cn>