

猪源 A 组轮状病毒重组质粒 pW425et-Vp7 在乳酸菌中的表达及免疫原性分析

胡静涛, 王春风*

(吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要: 【目的】在乳酸菌中表达猪源 A 组轮状病毒重组质粒 pW425et-Vp7, 并检测其抗原性, 为进一步制备猪轮状病毒乳酸菌疫苗奠定基础。【方法】摸索电转化条件, 将已构建的重组质粒 pW425et-Vp7 转化至 *thyA* 基因缺陷型的嗜酸乳杆菌中。筛选阳性克隆, 采用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测其表达情况。并将 BALB/c 小鼠口服免疫该重组菌, 间接 ELISA 检测其免疫原性。另外, 给免疫后小鼠攻以纯化的猪轮状病毒(蛋白含量 15 mg/mL), 初步检测该重组菌的免疫保护作用。

【结果】Vp7 基因在乳酸菌中获得表达, 大小约 40.77 kDa, 且该蛋白可与猪轮状病毒抗体反应, 具有反应原性。ELISA 检测小鼠肠黏膜样品结果显示免疫后小鼠能产生明显的抗轮状病毒 SIgA 抗体, 表明该重组菌具有较好的免疫原性。且攻毒后, 免疫组仅 23% 的小鼠发生腹泻, 初步证明该重组菌对猪轮状病毒的攻击具有较好的保护作用。【结论】在乳酸菌中成功地表达了猪轮状病毒 Vp7 基因, 制备了猪轮状病毒 Vp7 重组乳酸菌, 该重组菌具有较好的抗原性, 初步证明其作为疫苗的可行性。

关键词: 猪轮状病毒; 电转化; 乳酸菌; 表达; 免疫原性

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1514-06

乳酸菌作为动物肠道内正常存在的益生菌具有许多益生功效, 以其作为表达外源保护性抗原基因的受体菌株, 就可以将乳酸菌的生物学功能和外源功能抗原基因的特异性免疫相结合^[1]。鉴于猪轮状病毒 (Porcine Rotavirus, PRV) 对养猪业的严重危害, 采用基因工程和分子生物学手段研制基因工程乳酸菌, 在防治消化道疾病中的应用潜能是不可估量的。乳酸菌具有使动物肠道黏膜底层细胞增加, 使免疫细胞吞噬功能增强, 加强宿主肠黏膜免疫, 诱导 SIgA 分泌而增强肠道免疫屏障等作用^[2]。利用一些乳酸菌可在胃肠道、泌尿、生殖系统中黏附存活且抑制病原微生物等特点, 开展乳酸菌作为活菌口服疫苗载体的研究受到了广泛的重视。作为乳酸菌

成员之一的乳酸杆菌是保护性抗原基因或免疫调节因子良好的转化或表达系统, 以其作为载体表达内源或外源蛋白, 在功能食品、医疗保健等领域具有诱人的前景^[3]。

本研究对电穿孔条件进行摸索和优化后, 将已构建好的重组质粒 pW425et-Vp7 电转化到 *thyA* 基因缺陷型的嗜酸乳杆菌中, 经生长功能弥补筛选阳性克隆^[4, 5], 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析检测在乳酸菌中的表达情况。将获得表达的重组菌口服免疫 4~6 周龄 BALB/c 小鼠, 采用间接 ELISA 检测 SIgA 特异性抗体。并对免疫的小鼠攻以猪轮状病毒, 初步检测其免疫保护力, 为进一步研制绿色环保型猪轮状病毒基因工程乳酸菌疫苗奠定基础。

基金项目: 国家“863 计划” (2003AA24112002、2006AA10A205、2007AA10Z322); 国家自然科学基金 (0200199、30671573); 吉林省科技厅项目 (20020220)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-431-84533425; E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

作者简介: 胡静涛(1982-), 女, 吉林省长春人, 助教, 硕士, 研究方向为动物病毒学与微生物生态学。E-mail: hujingtao2004@126.com

收稿日期: 2008-04-10; 修回日期: 2008-08-17

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料、病毒和质粒：猪轮状病毒，重组质粒 pW425et-Vp7^[6]，猪源的 *thyA* 基因缺陷型的嗜酸乳杆菌以及兔抗猪轮状病毒多克隆抗体（一抗），均由吉林农业大学预防兽医学动物微生态研究室制备并保存；4~6 周龄 BALB/c 小鼠，购于吉林大学基础部实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器：电穿孔仪，购于美国 BIO-RAD 公司；HRP 标记的羊抗兔 IgG，购于宝生物(大连)技术有限公司；*Ex Taq* DNA 聚合酶、核酸分子量标准、*Sac*、*Kpn* 为 TaKaRa 公司产品；琼脂糖为 Spanish 公司产品；溶菌酶、dNTPs 为 Bebcos 公司产品；红霉素、胸腺嘧啶核苷、DL-苏氨酸、DTT、RNase A 为 Sigma 公司产品；酵母浸出粉、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品；低分子量蛋白质标准为上海生物化学研究所产品；PVDF 转移膜为 German 公司产品；其他均为市购常规药品及试剂。

1.2 红霉素最小抑制浓度的确定

将嗜酸乳杆菌接入含红霉素浓度分别为 50、75、100、200、300、400 $\mu\text{g/mL}$ 的 MRS 液体培养中（含胸腺嘧啶核苷 50 $\mu\text{g/mL}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 48 h 后，分别测定其 OD_{600} 值，并将含空载体 pW425et 质粒的嗜酸乳杆菌在上述 MRS 培养液中的生长情况作对照，确立红霉素对该实验菌株的最小抑制浓度。

1.3 电转化条件的摸索

将乳酸菌单个菌落以 2% 的接种量转移到含有 1% 甘氨酸的 MRS 培养液（含胸腺嘧啶核苷 50 $\mu\text{g/mL}$ ）中，摸索其 OD 值在 0.2~0.7 之间最高的转化效率^[7]。将生长到最佳时期的乳酸菌，8000 r/m 离心 5 min 收集菌体。分别采用 10% 甘油水溶液、蒸馏水、磷酸盐缓冲液(PEB)^[8] 作为电击转化缓冲液，比较不同缓冲液对转化效率的影响，并摸索最佳的脉冲时间及脉冲电压^[9~12]。转化后加入 800 μL 、37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 MRS（补加 0.5 mol/L 蔗糖）培养液，37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 2~4 h 后^[13]，取 100 μL 转化产物，涂在含红霉素（200 $\mu\text{g/mL}$ ）的 MRS 平板上，采用质粒的提取^[14]、酶切及 PCR 进行初步鉴定。

1.4 SDS-PAGE 分析

将待检重组菌接种于 5 mL 含有红霉素（200 $\mu\text{g/mL}$ ）的 MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 36~48 h 后，取 1 mL 转接于 50 mL MRS 液体培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧

培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8，在培养基中添加 40 mmol/L DL-苏氨酸。每隔 2 h 取一次菌液，取 7~8 次。以上述方法诱导含空质粒 pW425et 的乳酸菌，培养 5 h 后的样品作对照，进行 12% 凝胶 SDS-PAGE 分析^[15]。

1.5 Western blot 分析

将上述表达产物以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 转移膜上，经牛血清白蛋白（BSA）封闭后，依次加入轮状病毒兔抗猪多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG，最后在联苯胺（DAB）溶液中显色并观察结果。

1.6 重组阳性菌的稳定性检测

在含红霉素（200 $\mu\text{g/mL}$ ）的 MRS 平板上，将阳性重组菌传 100 代，分别挑取第 10、20、50、80、100 代的单菌落 100 个于含红霉素（200 $\mu\text{g/mL}$ ）的 MRS 平板上，进行菌落计数。取普通的 MRS 平板作对照，方法同上，计算传代时质粒的稳定性（如下公式）^[16]。并对不同代数的质粒进行酶切、PCR 鉴定，及采用 SDS-PAGE 检测其表达的稳定情况。

$$\text{质粒的稳定性}(\%) = \frac{\text{含红霉素MRS平板上的菌落数}}{\text{普通MRS平板上的菌落数}}$$

1.7 间接 ELISA 检测小鼠肠粘膜 SIgA

将购进的 4~6 周龄 BALB/c 鼠以每组 40 d 只随机分成 3 组，依次为 Vp7-pW425et 试验组（Vp7-pW425et 组）、空载体对照组（pW425et 组）、生理盐水空白对照组（空白组）。将 Vp7-pW425et 组和 pW425et 组的乳酸菌（ 2×10^{10} CFU/mL）离心后用灭菌生理盐水离心洗涤，并溶于 10% 灭菌脱脂牛奶中。每只小鼠以 20 mL/kg 体重进行口服接种，每隔 2 周免疫一次，每次连续免疫 3 天。共免疫 3 次后，空白组口服同样的生理盐水^[17]。

分别于免疫前及免疫后的 10、20、30、40 d 将小鼠处死，无菌采集肠粘膜及内容物（按照质量体积换算）加入等体积的 PBS 缓冲液（pH7.4）混匀，6000 r/m 离心 15 min，收集上清液。采用间接 ELISA，将 MA-104 细胞培养的轮状病毒液包被酶标板（160 $\mu\text{g/孔}$ ），1% BSA 封闭。将待检样品倍比稀释后，加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgA 用 PBS 稀释至工作浓度，37 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 h 后，3 \times 3 min 洗涤。加入现配置的 OPD-H₂O₂ 底物溶液避光显色 20~30 min 后，终止反应，自动酶标测定仪在波长 492 nm 处测定各孔的光吸收值（ OD_{492} 值）。

1.8 免疫保护性试验

按照上述免疫方法，将另设立的 Vp7-pW425et 组和空白组小鼠，分别以提纯后的猪轮状病毒（蛋白含量为 15 mg/mL）进行灌胃，观察其临床症状，并

记录攻毒后各组出现腹泻的情况,初步检测 Vp7 重组乳酸菌的免疫效果。

2 结果

2.1 红霉素的最小抑制浓度的测定

当培养基中添加红霉素含量达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,可

以抑制实验菌株的生长(表 1)。而含有载体 pW425et 质粒的嗜酸乳杆菌(因载体 pW425et 具有红霉素和胸腺嘧啶核苷两个选择标记)在含不同浓度的红霉素 MRS 培养液中均生长繁殖,且红霉素浓度在 200~400 $\mu\text{g/mL}$ 时对转化后细菌生长几乎没有影响。因此,选择红霉素浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时为最小抑制浓度。

表 1 嗜酸乳杆菌在不同红霉素浓度 MRS 培养液中的生长情况(OD_{600})

Table 1 Growth of *Lactobacillus* in MRS liquid medium with Erythromycin at different concentrations indicated

Strain	c(erythromycin)/($\mu\text{g/mL}$)					
	50	75	100	200	300	400
<i>Lactobacillus</i>	0.82	0.79	0.65	0.08	0.08	0.07
<i>Lactobacillus</i> with plasmid pW425et	0.79	0.80	0.75	0.70	0.68	0.65

2.2 电转化条件摸索的结果

2.2.1 不同生长时期的受体菌株对电转化效率的影响:当乳酸菌生长至 OD 值为 0.4 时转化效率最高(图 1),随后转化效率有所下降。

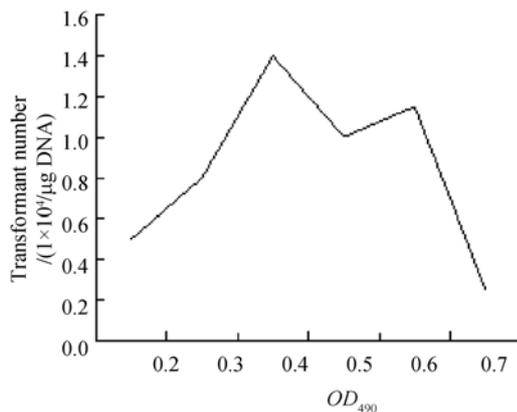


图 1 受体菌株生长时期的摸索

Fig. 1 The optimized growth cycle of *L.acidophilus* being electroporated.

2.2.2 脉冲电压及时间对电转化效率的影响:比较不同的脉冲时间和电压,当设置电穿孔仪脉冲电压为 2.5 KV,脉冲时间为 3.5 ms 时,转化效率相对较高(图 2)。

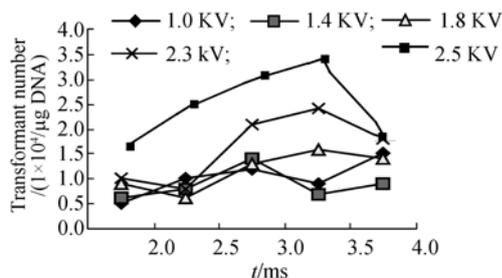


图 2 脉冲电压及时间与电转化效率的关系

Fig. 2 The relationship between the pulsed voltage, time and the efficiency of electroporation.

2.2.3 电击转化缓冲液对电转化效率的影响:当电压为 2.5 KV、脉冲时间为 3.5 ms 时,比较不同的电击缓冲液对电转化效率的影响,结果表明应用磷酸盐缓冲液(PEB)作为电击转化缓冲液,转化效率相对较高(表 2)。

表 2 电击转化缓冲液与转化效率的关系

Table 2 The relationship between electrotransformation efficiency and different buffer

Buffer	Glycerion solution (10%)	Distilled water	Phosphate buffer (PEB)
number of transformant ($1 \times 10^4 / \mu\text{g DNA}$)	0.8	0.04	2.0

The number in the table was the average of transformant after repeated electrotransformation.

2.3 重组阳性菌的鉴定

2.3.1 质粒的提取及酶切鉴定结果:对电转化后筛选的疑似菌落进行质粒提取,结果标记为 1、2、3 号菌的质粒均可能为阳性,经琼脂糖凝胶电泳进一步检测,其中 1 号菌落的重组质粒含有目的片段,但仍需要进一步鉴定。采用 *Sac* 和 *Kpn* 限制性内切酶对 1 号、2 号、3 号菌质粒分别进行双酶切,结果只有 1 号菌质粒得到了约 4800 bp 和 980 bp 大小的目的片段,分别与载体 pW425et 和外源片段 Vp7 大小相符。

2.3.2 PCR 鉴定结果:设立阳性对照和阴性对照,以 1 号菌质粒为模板,分别稀释 10、100、1000 倍进行 PCR 扩增,结果清晰地扩增出与阳性对照大小相符的条带,大小约为 981 bp(图 3),并将 1 号菌命名为 Vp7-pW425et。

2.4 SDS-PAGE 分析

对重组的 Vp7-pW425et 和 pW425et 空载体乳酸菌进行诱导表达,结果在约 40 kDa 处出现目的条带,而空载体并未出现,说明 Vp7 可能在乳酸菌中得到表达。从图

中诱导的情况看,在诱导后 0、2、4、6 h 表达量基本相同,而在诱导后 8、10 h 表达量稍有减少(图 4)。

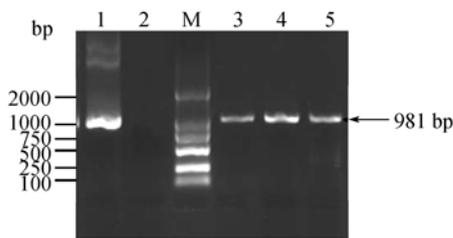


图 3 PCR 鉴定含 Vp7 基因的重组质粒

Fig.3 Identification Vp7 gene of recombinant by PCR. 1:PCR product with Vp7 gene as positive control; 2:PCR product with D.D.W as negative control; M:DL2000 marker; 3-5:PCR product with Strain 1 plasmid $10\times, 10^2\times, 10^3\times$ dilution as template respectively.

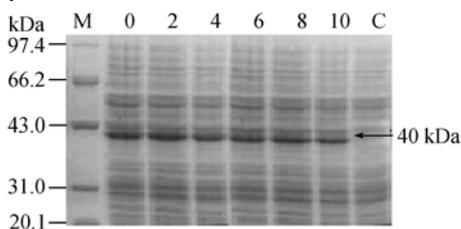


图 4 SDS-PAGE 电泳检测 Vp7 基因在乳酸菌中的表达情况

Fig. 4 Expression of the Vp7 in *L.acidophilus* by SDS-PAGE. M: Low molecular weight protein marker; C: expression product of pW425et in *L.acidophilus*; 0-10: expression product of pW425et-Vp7 in *L.acidophilus* at 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h respectively.

2.5 Western blot 分析

在约 40 kDa 处有一条清晰的蛋白印迹,而空载体并未出现任何蛋白印迹。说明该表达产物可与猪轮状病毒抗体反应,具有反应原性,进一步证明猪轮状病毒 Vp7 基因在乳酸菌中获得表达(图 5)。

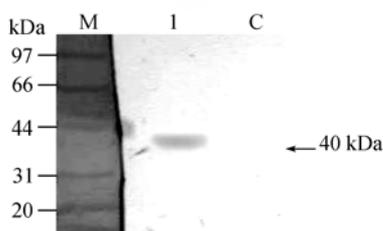


图 5 Western blot 分析

Fig. 5 Analysis of western blot. 1. Expression product of pW425et-Vp7 at 6h in *L.acidophilus*; C. negative control; M. Low molecular weight protein marker.

2.6 重组阳性菌的稳定性检测

重组阳性菌在红霉素选择压力下,在 MRS 平板上进行传代时,质粒在重组菌中较为稳定(表 3),传代 100 代次后重组质粒仍保持在 90% 以上的稳定性,同时其酶切、PCR 电泳图谱与原代没有差异,且传代后菌种的表达情况和表达水平与原代比也无明显差别。

表 3 重组阳性菌传代时的质粒稳定性

Table 3 The plasmid stability of recombinant positive strain during subculture

Positive strain	Generation of subculture					
	0	10	20	50	80	100
Plasmid stability/%	100	98	98	94	94	92

2.7 间接 ELISA 检测小鼠肠粘膜 SIgA

免疫 Vp7-pW425et 重组乳酸菌后,可以刺激小鼠产生抗猪轮状病毒的 SIgA 抗体,并且在免疫后第 20~30 d 抗体水平较高。而 pW425et 组(空载体对照组)及空白组在免疫前后并未检测到 SIgA 抗体,且与 Vp7-pW425et 组(Vp7-pW425et 试验组)相比较差异极显著(图 6)。检测结果表明,该重组阳性菌对小鼠具有较好的免疫原性,为今后该重组阳性菌的进一步应用奠定前期基础。

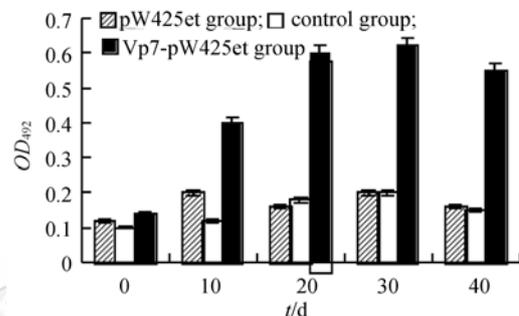


图 6 免疫小鼠特异性 SIgA 的检测

Fig. 6 Detection of Specific SIgA of mice immunized with recombinant strain.

2.8 免疫保护性试验结果

攻毒后,空白组小鼠 80% 出现腹泻症状,而口服免疫 Vp7-pW425et 重组菌的小鼠,发病率仅为 23.3%,差异显著。另外,对照组小鼠由于猪轮状病毒引起了腹泻,故平均体重较攻毒前有明显的下降趋势;而 Vp7-pW425et 组小鼠攻毒后平均体重下降不明显(表 4)。

3 讨论

目前利用益生的乳酸菌作为活菌口服疫苗的载体受到广泛的重视,如李文姝等研制的预防弓形虫病的乳酸乳球菌口服疫苗^[18],徐镛蕊等研制的转鸡柔嫩艾美耳球虫 SO7 基因功能乳酸菌,对试验感染的球虫具有一定的保护作用等^[19]。而对于猪轮状病毒主要保护性抗原基因的研究,主要集中于在大肠杆菌中表达或者与一些病毒重组来对抗该病毒的攻击^[20],利用益生的乳酸菌表达猪轮状病毒保护性抗原基因在国内外更是鲜有

表 4 攻毒后小鼠的发病率
Table 4 The incidence rate of BALB/c mouse after intragastrically administrating PRV

Group	Number of mice	Body weight before attracting PRV/g	Body weight after attracting PRV/g	Number of diarrhea mice	Incidence rate/%
Vp7-pW425et	30	18.5	17.9	7	23.3
Control	30	19.1	16.5	24	80

报道。由于乳酸菌在进入肠道之前能够更好的适应动物胃肠道的环境和小肠中高浓度胆盐的影响, 耐受消化道内的各种酶类, 在肠壁上的粘附能力较强, 能很好的在肠道内定植, 可迅速繁殖成为优势菌群, 同时对宿主的免疫系统有较强的免疫调节作用, 特别是能诱导 SIgA 的分泌, 增强宿主的粘膜免疫反应, 因此, 对于主要侵害消化道的猪轮状病毒来说, 利用乳酸菌表达其主要保护性抗原基因, 即可阻断该病原感染的第一道防线, 并可产生更为理想的粘膜免疫效果。

本研究是在王春风 (2001 年) 构建了可以在乳酸杆菌和大肠杆菌中穿梭表达的载体 pW425et 基础上^[21], 将猪源 A 组轮状病毒 Vp7 基因在乳酸菌中进行表达, 目的是制备可以预防猪轮状病毒病的基因工程乳酸菌。本试验通过将此重组阳性菌口服免疫小鼠, 检测肠黏膜 SIgA 抗体结果表明, 猪轮状病毒重组乳酸菌可刺激小鼠肠道免疫系统产生明显的特异性免疫应答, 具有较好的免疫原性。动物保护性试验结果也证实该重组菌对猪轮状病毒的攻击具有一定保护作用, 初步证明该重组菌可以用来研制口服疫苗的可行性。尽管猪轮状病毒主要感染的对象是出生仔猪, 但考虑到研究初始阶段直接应用仔猪作为实验动物进行初步检测操作繁琐、饲养管理不便利。因此, 本研究利用同样可被该病原感染的小鼠作为实验动物, 一方面操作和饲养管理更加便捷, 另一方面, 可以满足庞大的样本数量, 试验结果也表明可以初步检测到该重组乳酸菌的免疫效果, 为其下一步回归本试验动物奠定试验基础, 从而也为猪轮状病毒基因工程乳酸菌疫苗的研制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 王春风主编. 乳酸菌在畜牧业生产中的应用. 吉林科学技术出版社, 2005.
- [2] 阿木尔吉日嘎拉. 乳酸菌的免疫调节作用的研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2006, 5.
- [3] Seegers JF. *L.acidophilus* as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol, 2002, 20(12): 508-515.
- [4] 傅晓丽, 徐建国, 高守一. 嗜酸乳酸杆菌 DOMLa 菌株 *thyA* 基因突变株的筛选. 生物工程进展(*China Biotechnology*), 1998, 18(5): 16-19.
- [5] 余秀军, 阎世德, 徐建国. 福氏 2a 志贺氏菌以 *thyA* 基因为基础的质粒-染色体致死平衡系统的构建. 中华流行病学杂志 (*Chinese Journal of Epidemiology*), 1994, 15(6-A): 37-45.
- [6] 胡静涛, 宁军, 肖冲, 等. 猪源 A 组轮状病毒 Vp7 基因与双标记表达载体 pW425et 的重组及在大肠杆菌中的表达. 吉林农业大学学报 (*Journal of Jilin Agricultural University*), 2008, 30(1): 84-88.
- [7] 王荫榆, 陈丽珊, 贾士芳, 等. 乳酸菌受体菌株的筛选、鉴定及特性研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2005, 32(2): 60-64.
- [8] 贾士芳, 王荫榆, 郭兴华, 等. 乳杆菌电转化条件的研究. 生物工程报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 1998, 14(4): 429-434.
- [9] 包其郁, 孙永巧, 王慧峰, 等. 影响电转化效率的几个因素探讨. 温州医学院学报 (*Journal of Wenzhou Medical College*), 2003, 33(1): 9-11.
- [10] Kim YH, Han KS, Oh S, *et al.* Optimization conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. J Appl Microbiol, 2005, 99(1): 167-174.
- [11] 张建琼, 张雪萍, 谢维, 等. 高效电转化率条件的探索. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2000, 23(2): 72-75.
- [12] 孙磊, 孔文涛, 孔健. 乳酸乳球菌电转化条件的研究. 山东大学学报 (*Journal of Shandong University*), 2005, 40(3): 121-124.
- [13] 王荫榆. 有关乳酸菌质粒和表达体系的研究. 复旦大学博士学位论文. 2003, 6.
- [14] Daniel J, O'sullivan, Todd P, *et al.* Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *L.acidophilus* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993: 2730-2733.
- [15] Sambrook J, W Russell DW. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] 葛保胜, 任育红, 唐志红, 等. 表达重组别藻蓝蛋白质粒在工程菌株中的遗传稳定性研究. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2005, 32(4): 37-41.
- [17] 唐丽杰, 欧笛, 葛俊伟, 等. 表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸乳球菌的构建及免疫原性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(2): 340-344.
- [18] 李文妹. 弓形虫 P30 乳酸乳球菌口服疫苗免疫效果研究及弓形虫 ROP2-P30 基因工程复合抗原的构建. 苏州大学博士学位论文, 2004, 5.
- [19] 徐镛蕊, 王春风, 孙哲, 等. 转球虫 SO7 基因功能乳酸杆菌对

肉仔鸡感染球虫后盲肠病理学变化的影响. 畜牧兽医学报
(*Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*), 2005,
36(1): 74-76.

[20] 刘馨, 张光明, 李鸿钊, 等. 表达轮状病毒 Vp4 抗原的重组腺

病毒对新生小鼠的被动免疫保护作用. 中国生物制品学杂志
(*Chinese Journal of Biologicals*), 2007, 20(1): 33-36.

[21] 王春风, 共生乳酸杆菌非抗性表达载体的构建及柔嫩艾美耳
球虫 SO7 基因的表达. 中国农业大学博士学位论文, 2001, 6.

Expression and Immunogenicity Analysis of Recombinant Plasmid pW425et-Vp7 of Porcine Rotavirus A in *Lactobacillus*

Jingtao Hu, Chunfeng Wang*

(College of Animal Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: [Objective] We tested the antigenicity of porcine rotavirus Vp7 gene expressed in *Lactobacillus*. [Methods] We studied the condition of electroporation and transformed the plasmid pW425et-Vp7 into *thyA* gene-mutant *L. acidophilus*. Then the positive clone was selected and its expression was detected by SDS-PAGE and Western blot. In our test, the BALB/c mice were drenched by the above-mentioned recombinant strain and SIgA was detected by ELISA. In addition, we also tested the protection of the recombinant strain through attacking porcine rotavirus to the mice immunized (content of virus was 15 mg/mL). [Result] Vp7 gene expressed in *Lactobacillus* with approximate 40.77 kDa fusion protein was observed by SDS-PAGE. The protein had the reactionogenicity with the antibody of porcine rotavirus through Western blot. We also detected the specific SIgA from the mice immunized by ELISA. Moreover, we observed that only 23% mice had diarrhea after attacking porcine rotavirus, which was immunized by recombinant strain. [Conclusion] Vp7 gene was expressed in *Lactobacillus* successfully. It had good immunogenicity and protection against porcine rotavirus. Moreover, the test further proved that the recombinant strain could be applied in the study on porcine rotavirus vaccine in the future.

Keywords: porcine rotavirus; electroporation; *Lactobacillus*; expression; immunogenicity

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA24112002, 2006AA10A205) and the National Natural Science Foundation of China(0200199, 30671573)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-431-84533425; E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

Received: 10 April 2008/ Revised: 17 August 2008

科学出版社新书推介 (2008-08)

肠道微生态制剂与消化道疾病的防

熊德鑫 主编著

978-7-03-021830-8 ¥ 65.00 2008年8月30日出版

这是我国第一本系统地介绍微生态学理论与肠道微生态制剂临床应用 的专著。书中还较详细地介绍了微生态学 与消化内科形成交叉学科的基本 情况, 提出了有关消化道疾病产生机制, 尤其是防治方法及使用益生剂的生 物防治全新观念, 并将国内外尤其是欧美发达国家使用益生 剂防治腹泻、 IBS、 IBD、 HP 及相关疾病和消化道肿瘤的宝贵经验介绍给医学界同仁, 以 提高我们的诊治水平, 更好地为患者服务。

本书可作为从事医学微生态学、 微生物学、 免疫学、 病理学人员, 以及消化道内科基础和临床研究人员、 临床医师的参考书。

