

## 表达 T<sup>+</sup> Pm 保护性抗原的重组猪霍乱沙门氏菌 C500 株的构建及其生物学特性

赵战勤<sup>1,2</sup>, 王臣<sup>1\*</sup>, 丁轲<sup>1</sup>, 李晓峰<sup>3</sup>, 吴斌<sup>2</sup>, 卢顺<sup>2</sup>, 张春杰<sup>1</sup>, 程相朝<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 河南科技大学动物科技学院, 动物病原微生物学实验室, 洛阳 471003)

(<sup>2</sup> 华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

(<sup>3</sup> 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

**摘要:**【目的】本研究利用 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统构建表达巴氏杆菌毒素 (*Pasteurella multocida* toxin, PMT) 的重组猪霍乱沙门氏菌株, 并对重组菌株的生物学特性进行比较研究。【方法和结果】通过基因克隆的方法构建表达 PMT 的重组质粒 pYA-PmtC, 再将其电转化减毒猪霍乱沙门氏菌 C500 的 *asd* 基因缺失株 C501, 构建口服活疫苗菌株 C501 (pYA-PmtC)。研究结果表明重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的生化特性、血清型和生长速度与亲本菌株 C500 一致; 在没有选择压力的条件下, C501 (pYA-PmtC) 能够稳定遗传重组质粒及其外源基因片段, 并能稳定、高效、分泌性表达 30.5 kDa 的外源保护性抗原 rPmtC。C501 (pYA-PmtC) 腹腔感染 BALB/c 小鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $8.5 \times 10^6$  CFU, 毒力稍低于 C500 (LD<sub>50</sub> 为  $4.4 \times 10^6$  CFU); 口服接种 C501 (pYA-PmtC) 和 C500 的所有仔猪未见任何发病症状, 两者没有显著差别。【结论】本研究利用 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统的原理构建表达 T<sup>+</sup> Pm 保护性抗原重组猪霍乱沙门氏菌弱毒菌株 C501 (pYA-PmtC), 为进一步开发猪萎缩性鼻炎-副伤寒的双价基因工程疫苗奠定基础。

**关键词:** 猪霍乱沙门氏菌 C500 株; 产毒巴氏杆菌; Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统; 重组疫苗

**中图分类号:** S852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0091-07

粘膜免疫与多价疫苗是未来免疫预防传染病的重要方向, 以细菌为载体的重组活疫苗是其最有发展前景的研究领域之一<sup>[1-2]</sup>。近年来, 以减毒沙门氏菌作为活疫苗表达载体的研究受到广泛关注<sup>[1]</sup>。沙门氏菌为胞内寄生菌, 疫苗株能有效呈递抗原, 在激发抗沙门氏菌免疫反应的同时诱导产生针对外源抗原的特异性体液和细胞免疫, 以减毒沙门氏菌作为粘膜免疫用基因工程活疫苗载体具有无可比拟的优越性<sup>[3]</sup>。以前, 人们普遍采用携带抗性基因的表达质粒作为重组菌在体内生长的主要

遗传选择标记。近年来, 出于生物安全性的考虑, 抗生素等抗性质粒选择系统已不被人们所接受。目前, 已经研制出多种策略替代抗生素等抗性标记来控制外源基因的稳定表达<sup>[2-4]</sup>。Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统由沙门氏菌的 *asd* 基因缺失株与能表达二氨基庚二酸 (D L- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -Diaminopimelic acid, DAP) 的 Asd<sup>+</sup> 质粒构成。沙门氏菌 *asd* 基因编码天冬氨酸  $\beta$ -半乳糖脱氢酶, 该酶是 DAP 生物合成途径中的必需酶。只有含 Asd<sup>+</sup> 质粒的沙门氏菌 *asd* 缺失株才能在无 DAP 存在的条件下存活, 并在体内或体外稳定表达

基金项目: 河南科技大学博士基金项目 (090001337); 国家“863 计划” (2006AA10A206)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-379-66893191; E-mail: wangchen2001@126.com

作者简介: 赵战勤 (1980-), 男, 河南兰考人, 讲师, 博士, 主要从事细菌分子生物学及其基因工程疫苗研究。E-mail: zhaozhanqin@

126.com

收稿日期: 2009-07-03; 修回日期: 2009-09-09

外源抗原。由于  $Asd^+$  平衡致死系统中 *asd* 基因代替了抗生素抗性标记,也更加安全<sup>[4]</sup>。

猪进行性萎缩性鼻炎 (progressive atrophic rhinitis, PAR) 是危害世界养猪业的五大传染病之一,被国际兽疫局(OIE)定为 B 类动物传染病。该病的直接致病因子是产毒多杀性巴氏杆菌 (toxigenic *Pasteurella multocida*,  $T^+Pm$ ) 分泌的一种大小为 146 kDa 的巴氏杆菌毒素 (*Pasteurella multocida* toxin, PMT)。PMT 是一种有丝分裂原,它与哺乳动物细胞上的受体结合后,可以启动细胞 DNA 的合成并引起细胞生长分裂,使造骨细胞出现异常生长及形态变化,导致破骨细胞对骨细胞的裂解,最终表现为猪的鼻甲骨萎缩和鼻梁变形。在猪的感染试验中,不产生 PMT 的  $Pm$  菌株不能导致猪发生进行性萎缩性鼻炎,且猪群的保护率与 PMT 的抗体水平呈线性关系,被认为是  $T^+Pm$  最主要的毒力因子和保护性抗原<sup>[5]</sup>。PMT 的 N 端区域包含 2 个细胞结合位点和一个跨膜区,介导 PMT 吸附到宿主细胞;C 端区域包含酶活性催化位点并被证实具有较强的免疫原性<sup>[5-6]</sup>。

猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis) 弱毒株 C500 是我国用于预防仔猪副伤寒的标准疫苗株<sup>[7]</sup>。徐引弟等以 C500 为亲本菌株构建了 *asd* 基因缺失株  $\Delta asdC500$ <sup>[8]</sup>,为开发以猪霍乱沙门氏菌 C500 为载体的基因工程重组疫苗奠定研究平台。本研究以猪霍乱沙门氏菌  $\Delta asdC500$  为活疫苗载体,利用  $Asd^+$  平衡致死系统的原理构建

表达  $T^+Pm$  主要保护性抗原 PMT C 端蛋白的重组疫苗菌株,为进一步开发猪进行性萎缩性鼻炎-副伤寒的双价基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**猪霍乱沙门氏菌弱毒疫苗株 C500 购自中国兽医药品监察所国家兽医微生物保藏中心。C500 的 *asd*<sup>-</sup> 单基因缺失株  $\Delta asdC500$  (本文命名 C501) 及携带空载体质粒的菌株 C501 (pYA3493) 由徐引弟等构建<sup>[8]</sup>。pET-28a 质粒、猪源产毒多杀性巴氏杆菌 HN-13 株、天然 PMT 的猪抗血清由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室提供。无抗性、 $Asd^+$  原核表达质粒 pYA3493<sup>[9]</sup> 及其宿主菌大肠杆菌  $\chi 6097$ <sup>[10]</sup> 由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**生化鉴定管、麦康凯琼脂培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司;LB 培养基购自美国 BD 公司;DAP 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;DNA Marker、Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 和限制性内切酶等购自大连 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒购自上海 Sangon 公司。

**1.1.3 试验动物:**5-6 w 龄、SPF 级、雌性 BALB/c 小鼠购自河南省实验动物中心。22-25 日龄、6.0-7.0 kg、沙门氏菌阴性、长大系断奶仔猪由河南科技大学养殖场提供。

**1.1.4 引物:**引物由上海 Sangon 公司合成(表 1)。

表 1 实验中所用引物及说明

Table 1 The primer sets for PCR in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site
pt1	TTAGGATCCTGAAGAAGACTAGATCGAGA	775	<i>Bam</i> H I
pt2	TTTGTGACTAGTGCTCTTGTTAAGCG		<i>Sal</i> I
pa6	TCCTATCTGCGTCGCTAC	3717 (WT)	
pa7	TTGGACAATGTTACCGATAA	2229 ( $\Delta asd$ )	
pya	GTTGACAATTAATCATCCGG	990	
p12	TTTGTGACTAGTGCTCTTGTTAAGCG		<i>Sal</i> I

Note: WT, wild type.

### 1.2 表达 $T^+Pm$ *toxA* 基因片段的重组菌株的构建

提取  $T^+Pm$  HN-13 株的基因组为模板,用引物 pt1/pt2 进行 PCR,扩增 *toxA* 基因中编码 PMT C 端免疫原性区域的 DNA 片段(命名为 PmtC),将其克隆到 pYA3493 质粒的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点构建重组质粒 pYA-PmtC;将连接产物电转化缺失 *asd* 基因的大肠杆菌  $\chi 6097$ ,筛选阳性克隆,提取 pYA-PmtC

质粒进行酶切鉴定和序列测定后将其电转化 C501 感受态细胞,在不含 DAP 的 LB 平板上筛选阳性克隆,分别用 3 对引物 pt1/pt2、pya/pt2 和 pa6/pa7<sup>[8]</sup> 进行 PCR 鉴定,重组菌株命名为 C501 (pYA-PmtC)。

### 1.3 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的表型鉴定

按厂家说明书使用生化鉴定管和沙门氏菌属标准血清因子(兰州生物制品所)对重组菌株 C501

(pYA-PmtC)、空载体菌株 C501 (pYA3493) 与亲本菌株 C500 进行生化试验和 O、H 抗原鉴定。

#### 1.4 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的生长特性

将 C501 (pYA-PmtC) 和亲本菌株 C500 在 LB 液体培养基中培养 12 h 后, 以平板表面涂布法进行活菌计数 (CFU/mL), 然后转接 LB 液体培养基使终浓度约为  $10^6$  CFU/mL, 37°C 200 r/min 培养, 每 1 h 取样进行活菌计数, 绘生长曲线<sup>[11]</sup>。

#### 1.5 外源抗原在重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 中的表达

挑取重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 单菌落到 LB 液体培养基中, 37°C、200 r/min 摇床培养 12 h, 4°C 放置 12 h, 按 1: 100 的比例转接 10 mL LB 培养基再培养 6 h, 7155 × g 离心 10 min 收集菌体。上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 加等体积冰冷 20% 三氯乙酸冰浴 20 min, 16992 × g 离心 20 min, 沉淀用 1 mL 无水乙醇洗涤, 16992 × g 离心 5 min, 重复洗涤 1 次。将两者进行 SDS-PAGE<sup>[12]</sup>, 并使用天然 PMT 蛋白的猪抗血清进行 Western-blot 分析<sup>[12]</sup>。同时设 C501 (pYA3493) 为对照。进一步使用 Bio-Rad Quantity One 软件 (美国 Bio-Rad Laboratories) 对融合蛋白的表达量进行分析。

#### 1.6 外源基因重在重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 中的遗传稳定性

将 C501 (pYA-PmtC) 在 LB 液体培养基中连续传 50 代, 分别取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30 和 50 代的培养物为模板, 用引物 pt1/pt2 进行 PCR 检测重组质粒 pYA-PmtC 在 C501 中的遗传稳定性; 分别取不同代次的含有相同 CFU 的培养物进行 SDS-PAGE, 检测融合蛋白表达量的变化。

#### 1.7 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的对小鼠的毒力

将 85 只 BALB/c 小鼠均分为 17 组 (5 只/组)。第 1 - 4 组小鼠以腹腔注射途径分别接种含有  $2.7 \times 10^5$  CFU、 $2.7 \times 10^6$  CFU、 $2.7 \times 10^7$  CFU 和  $2.7 \times 10^8$  CFU C501 (pYA-PmtC) 的 LB 培养物 (0.2 mL); 5 - 8 组小鼠进行口服途径接种, 免疫前 4 h, 小鼠禁水禁食, 免疫前 5 min 口服 30 μL 10% NaHCO<sub>3</sub> 中和胃酸, 然后用 12 号灌胃针口服接种含有  $2.7 \times 10^7$  CFU、 $2.7 \times 10^8$  CFU、 $2.7 \times 10^9$  CFU 和  $2.7 \times 10^{10}$  CFU C501 (pYA-PmtC) 的 LB 培养物 (0.2 mL), 30 min 后恢复饮水和饲料<sup>[13]</sup>。第 9 - 16 组以同样的方法接种亲本菌株 C500。第 17 组小鼠不做任何处理为空白对照。观察、记录发病及死亡情况 30 d, 死亡者立即剖检, 取其内脏和脑组织进行

细菌分离鉴定, 并根据 Reed-Muench 法<sup>[23]</sup> 计算小鼠半数致死剂量 (50% lethal dose, LD<sub>50</sub>)。

#### 1.8 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的对猪的安全性

以亲本菌株 C500 的免疫剂量 (口服或颈部肌肉注射均为  $3.0 \times 10^9$  CFU/头) 为参考数据<sup>[7]</sup>, 分别通过肌肉注射和口服 2 种途径将重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 接种 22 - 25 日龄断奶仔猪, 测定对猪的安全性。将 30 头仔猪均分为 5 组 (6 头/组)。第 1 组仔猪每头口服接种 4 mL 含有  $3.4 \times 10^9$  CFU C501 (pYA-PmtC) 的 PBS; 第 2 组仔猪每头浅层肌肉注射 2 mL 含有  $3.4 \times 10^9$  CFU C501 (pYA-PmtC) 的 10% 铝胶生理盐水; 第 3、4 组以同样的方法接种亲本菌株 C500。第 5 组不做任何处理。另设一组仔猪 (3 头) 口服接种  $1.0 \times 10^9$  CFU 强毒株 C78-1 为对照。接种后观察发病及死亡情况 30 d, 并测定接种后 1 - 3 d 的直肠平均温度和 3 - 6 d 的平均日增重 (Average daily gain, ADG)。对相关数据采用 Fisher's exact test 进行检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

#### 2.1 表达 T<sup>+</sup>Pm *toxA* 基因片段的重组菌株的构建

PCR 结果显示所扩增的 *toxA* 基因片段大小约为 775 bp, 与预期大小相符。将其克隆到 pYA3493, 得到的重组质粒酶切后有相同大小的融合基因。进一步的序列测定结果表明构建的重组质粒完全正确。将重组质粒 pYA-PmtC 电转化 C500 的 *asd* 缺失株 C501, 在无 DAP 的 LB 平板上筛选获得阳性重组子 C501 (pYA-PmtC)。用引物 pa7/pa6 进行 PCR 鉴定, C501 (pYA-PmtC) 可以扩增出  $\Delta asd$  缺失型 2229 bp 的片段, 亲本菌株 C500 则扩增出

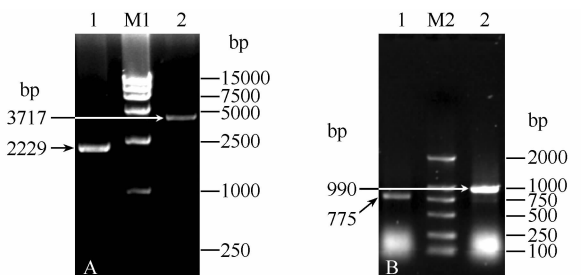


图 1 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的 PCR 鉴定结果

Fig. 1 Identification of recombinant *S. enterica* Serovar Choleraesuis strain C501 (pYA-PmtC) by PCR. A: panel,  $\Delta asd$  identification. M1, DNA marker (DL 15000); 1, C501 (pYA-PmtC); 2, C500. B: panel, *toxA* gene identification. M2, DNA marker (DL 2000); 1, pt1/pt2; 2, pYA/pT2.

3717 bp的 *asd* 全基因片段(图 1-A),而不加模板的参照管则不能扩增出这任何片段;引物 pt1/pt2 可扩增出 *tox A* 基因上 775 bp 的 *pmtC* 片段,引物 *pya*/pt2 可扩增出重组质粒上 990 bp 的 DNA 片段(图 1-B),而亲本菌株 C500 则不能扩增出这两种片段。

## 2.2 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的表型鉴定结果

C500 的 *asd* 基因突变株 C501 只能在含有 DAP 的培养基上生长。将含有 *asd* 基因的表达质粒 pYA-PmtC 电转化 C501 构建的重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 恢复了在不含 DAP 的培养基上生长的能力,这说明 pYA-PmtC 质粒在 C501 菌株内能够表达 DAP 并与缺失 *asd* 基因的 C500 菌株形成互补。

表 2 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 与 C500 的代谢特征比较<sup>a</sup>

Table 2 Metabolic characterization of C501 (pYA-PmtC) and C500<sup>a</sup>

Strains	Maltose	Glucose	Lactose	Sucrose	Rhamnose	Mannose	Arabinose	Dulcitol	Xyl	Urea	H <sub>2</sub> S
C500	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C501 (pYA-PmtC)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C501 (pYA3493)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-

<sup>a</sup> Fermentation was conducted on either MacConkey base agar medium plus 1% of the carbon sources or commercial biochemistry tubes as indicated.

## 2.3 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的生长特性

在 LB 固体培养基上 37℃ 培养 24 h 后, C501 (pYA-PmtC)、C501 (pYA3493) 与亲本菌株 C500 的平均菌落直径分别为 1.9 mm、1.9 mm、1.0 mm 和 2 mm。在 LB 液体培养基上培养时, C501 (pYA-PmtC)、C501 (pYA3493) 与亲本菌株 C500 的世代间隔 (mean generation time, MGT) 分别为 29.4 min、28.1 min 和 27.9 min。C501 (pYA-PmtC) 的世代间与亲本菌株 C500 没有明显差别。从生长曲线也可以看出, C501 (pYA-PmtC) 的生长速度与亲本菌株 C500 相似(图 2)。

## 2.4 抗原 PMT 在重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的分泌表达

SDS-PAGE 结果显示, 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 在约 30.5 kDa 处有明显的表达带, 而空载体

生化鉴定结果表明, 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 与载体菌株 C501 (pYA3493) 不能利用乳糖、蔗糖、阿拉伯糖、半乳糖醇和尿素作为唯一碳源, 但能利用一些其他糖类作为唯一碳源, 这些生化指标与亲本菌株 C500 相同(表 2)。血清因子鉴定结果表明 C501 (pYA-PmtC) 和 C501 (pYA3493) 的血清型为 6, 7: C: 1, 5, 与 C500 一致。另外, C501 (pYA-PmtC) 和 C501 (pYA3493) 在麦康凯培养基上生长均呈无色, 而在加有 1% 麦芽糖时则呈红色菌落, 与 C500 相同。这些试验结果表明重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的碳源利用特征、血清型等生物表型均与亲本菌株 C500 一致, 符合猪霍乱沙门氏菌的典型特征。

菌株 C501 (pYA3493) 则没有对应的表达带(图 3)。Western blot 结果表明, 该重组蛋白(命名为 rPmtC) 能够与天然 PMT 毒素的猪抗血清发生特异性反应, 而空载体菌株 C501 (pYA3493) 则不能(图 3)。通过生物学软件 Bio-Rad Quantity One 对 SDS-PAGE 结果进行分析, 发现重组蛋白 rPmtC 的总表达量约占菌体总蛋白的 3.3%。其中, 在菌体中的表达量约占总表达量的 69.6%, 分泌到上清液中的表达量(分泌性表达)占 30.4%(图 3)。

## 2.5 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的遗传稳定性

取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30、40、50 代的

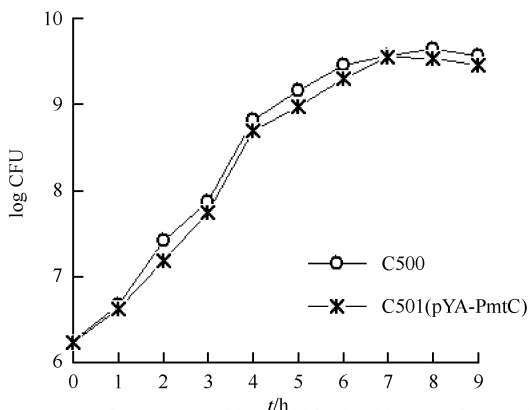


图 2 菌株 C501 (pYA-PmtC) 与亲本菌株 C500 的生长曲线

Fig. 2 The growth curves of C501 (pYA-PmtC) and C500.

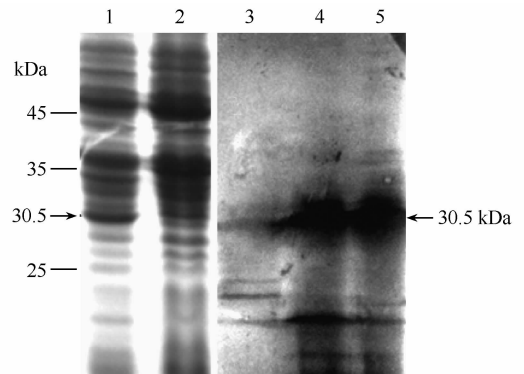


图 3 rPmtC 在  $\Delta asd$  突变株 C501 中的表达

Fig. 3 Expression of rPmtC in *S. enterica* Serovar Choleraesuis  $\Delta asd$  mutant C501. 1 - 2: SDS-PAGE analysis of control vector strain C501 (pYA3493) and recombinant C501 (pYA-PmtC) vaccine strain. 4 - 6: Western blot analysis for total-cell extracts of control vector strain C501 (pYA3493) and C501 (pYA-PmtC), and concentrated supernatant of C501 (pYA-PmtC), respectively.

C501 (pYA-PmtC) 培养物为模板, 用引物 pt1/pt2 进行 PCR 均能扩增到预期 775 bp 的 DNA 片段, 其亮度没有明显差别; 将第 50 代培养物涂平板, 分别挑取 50 个单菌落为模板进行 PCR, 也均能扩增到预期 775 bp 的 DNA 片段。这两个试验结果表明重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 能够稳定遗传重组质粒及其外源基因片段。分别取含有相同 CFU 的第 1、10、20、30、40 和 50 代的培养物进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析, 发现 C501 (pYA-PmtC) 能够稳定表达约 30.5 kDa 的 T<sup>+</sup>Pm PMT 的 C 端保护性抗原蛋白 (图略)。

## 2.6 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 对小鼠的毒性

C501 (pYA-PmtC) 和亲本菌株 C500 的高剂量腹腔感染组小鼠均出现了死亡, 根据 Reed-Muench 法计算<sup>[14]</sup>, C501 (pYA-PmtC) 腹腔感染小鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $8.5 \times 10^6$  CFU, 毒力较亲本菌株 C500 (LD<sub>50</sub> 为  $4.4 \times 10^6$  CFU) 稍低。当口服感染时, 所有小鼠均没有发生死亡; 甚至当口服高达  $2.7 \times 10^{10}$  CFU C501 (pYA-PmtC) 时, 所有小鼠也没有出现任何发病症状。在观察 30 d 后进行剖检, 发现口服感染的小鼠与空白对照组小鼠相比没有明显的病理变化。口服和腹腔注射接种 C501 (pYA-PmtC) 对小鼠的毒性具

有明显的差别, 这可能是因为消化道对沙门氏菌具有更大的耐受力, 而腹腔注射更易于导致系统感染的结果。

## 2.7 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的对猪的安全性

口服接种猪霍乱沙门氏菌野生型强毒株 C78-1 的 3 头仔猪出现高热, 精神沉郁, 腹泻, 食欲减退或废绝, 四肢末端及腹部发绀等临床症状 (表 3)。接种后 5 d 和 9 d 分别死亡 1 头, 剖检后发现均具有急性仔猪副伤寒的病理变化。另一头猪在 30 d 的观察期内存活, 但是被毛粗糙, 极度消瘦, 30 d 观察期后对其剖检发现也具有仔猪副伤寒的病理变化。口服接种 C501 (pYA-PmtC) 和 C500 的所有仔猪精神食欲均正常, 未见任何发病症状。肌肉注射 C501 (pYA-PmtC) 的所有仔猪精神食欲也均正常, 虽然接种后 24 h 体温出现体温暂时升高的现象, 但与亲本菌 C500 组没有显著差异 ( $P > 0.05$ ), 且未见其它发病症状 (表 3)。口服或肌肉注射接种 C501 (pYA-PmtC) 组仔猪的平均日增重与 C500 组和空白对照组没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。这说明 C501 (pYA-PmtC) 以亲本菌株 C500 的免疫剂量接种断奶仔猪是安全的。

表 3 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 对猪的安全性试验结果

Table 3 Inoculation safety on pigs following vaccination with C501 (pYA-PmtC) strain

Strains or groups	Inoculation route	Dose (CFU)	Mortality/%	Diarrhea/%	ADG/g	Mean temperature $\pm$ SD ( $^{\circ}$ C)	
						Pre	Post
C500	oral	$6.0 \times 10^9$	0	0	$137.3 \pm 5.3$	$39.6 \pm 0.12$	$39.8 \pm 0.14$
C500	s. c.	$6.0 \times 10^9$	0	0	$153.2 \pm 11.4$	$39.7 \pm 0.10$	$40.2 \pm 0.12$
C501 (pYA-PmtC)	oral	$8.3 \times 10^9$	0	0	$154.3 \pm 9.4$	$39.6 \pm 0.13$	$39.9 \pm 0.14$
C501 (pYA-PmtC)	s. c.	$8.3 \times 10^9$	0	0	$134.6 \pm 7.3$	$39.5 \pm 0.11$	$39.8 \pm 0.13$
C78-1	oral	$1.0 \times 10^9$	66.7	100	NT	$39.6 \pm 0.12$	$41.7 \pm 0.37^*$
Nonvaccinated	-	-	0	0	$147.9 \pm 14.1$	$39.5 \pm 0.13$	$39.6 \pm 0.15$

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). "Pre" and "Post" values are the mean temperatures for the 3 days pre- or post-inocubation. NT: not tested. \*: The values in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

沙门氏菌为胞内寄生菌, 活疫苗菌株能有效呈递抗原, 在激发抗沙门氏菌免疫反应的同时能诱导产生针对外源抗原的特异性体液和细胞免疫反应。而且, 口服、滴鼻等免疫途径具有操作方便、对动物损伤小、能同时诱导广泛的粘膜免疫与全身免疫等优势。另外, 沙门氏菌载体本身具有免疫佐剂作用, 其 LPS 作为一种内在佐剂可以刺激宿主细胞释放各种细胞因子。鉴于此, 以减毒沙门氏菌作为粘膜免疫用基因工程活疫苗表达载体具有无可比拟的优越性, 因此成为开发新型重组疫苗的研究热

点<sup>[1-3]</sup>。其中, 效果最稳定, 应用最多的是沙门氏菌 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统<sup>[4, 8]</sup>。用 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统代替抗生素抗性标记, 因而更加安全。目前, 利用 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统构建高效基因工程二价疫苗在鼠伤寒沙门氏菌中已有较多报道<sup>[1-3]</sup>。猪霍乱沙门氏菌 C500 株是化学方法致弱的用于预防仔猪副伤寒的弱毒疫苗菌株, 毒力较弱且免疫原性好。C500 在国内已经使用超过 40 年, 在我国仔猪副伤寒的控制中发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。鉴于猪霍乱沙门氏菌 C500 的良好免疫原性, 我们在前期的研究中构建了 *asd* 基因的缺失株 C501, 以期利用 Asd<sup>+</sup> 平衡致死系统的原理将其开发为重组多价疫苗的活载体。

PMT 是 T<sup>+</sup>Pm 最重要的毒力因子和保护性抗原<sup>[5]</sup>。Liao 等(2007)将 *tox*A 全基因分成三段,在体外实现了表达,其中 N-端和 C-端重组衍生物免疫动物后,均获得有效的免疫保护性<sup>[6]</sup>。我们的前期研究也证明,PMT 蛋白 N 端和 C 端原核表达产物均能提供免疫小鼠较高的保护效力<sup>[15-16]</sup>。这些研究表明应用分子生物学的方法对毒素 *tox*A 基因进行操作,构建含有 PMT 主要免疫原性基因片段的无毒重组衍生物来预防 PAR,可能具有良好的保护效果。但是,原核或者真核表达产物存在表达量较低、纯化难度大、易于降解等一系列的困难,一直是实现规模化生产的瓶颈<sup>[17]</sup>。利用细菌活疫苗载体实现病原主要免疫保护性抗原在其中的表达并进行黏膜免疫给这个问题提供了一个良好的解决模式。因此,利用我们已构建的猪霍乱沙门氏菌弱毒疫苗菌株 C500 的 Asd<sup>+</sup>平衡致死系统,本研究构建了表达 T<sup>+</sup>Pm 主要保护性抗原的重组菌株 C501 (pYA-PmtC),并对其一系列的生物学特性进行比较研究,目的是评价其作为猪萎缩性鼻炎-副伤寒的重组疫苗的可行性。

本研究结果证实,携带平衡致死质粒 pYA-PmtC 的 C501 重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 具有和亲本菌株 C500 一致的碳源利用特征和血清型,生长速度(世代时间分别为 29.4 min 和 27.9 min)接近。小鼠的毒性试验发现重组菌株较亲本菌株的毒力稍有降低。另外,C501 (pYA-PmtC) 菌株高剂量(8.3 × 10<sup>9</sup> CFU)接种仔猪无任何不良反应,保留了弱毒疫苗菌株 C500 对猪的安全性。由于重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 和亲本菌株 C500 具有一系列相似的生物学特征,因此推测该突变菌株具有和亲本菌株 C500 大致相当的针对沙门氏菌攻击的免疫保护力。SDS-PAGE 和 Western blotting 分析结果表明:在没有选择压力的情况下,外源抗原基因的融合片段 *PmtC* 能在重组菌株 C501 (pYA-PmtC) 的细胞质和培养基上清中高效表达重组蛋白 rPmtC。这说明外源抗原能通过 Asd<sup>+</sup>平衡致死系统在 C501 缺失株中分泌性表达,并具有良好抗原活性。外源蛋白在机体内的分泌表达对于辅助抗原提呈,刺激免疫反应,提高免疫效力具有重要意义<sup>[9]</sup>。

总之,本研究利用 Asd<sup>+</sup>平衡致死系统构建表达 T<sup>+</sup>Pm 主要保护性抗原的重组猪霍乱沙门氏菌菌株 C501 (pYA-PmtC),该重组菌株与疫苗菌株 C500 具有相似的生物学特性和生物安全性,并能通过 Asd<sup>+</sup>平衡致死系统的原理分泌表达外源抗原,为进一步

开发猪萎缩性鼻炎-副伤寒的双价基因工程疫苗奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods*, 2006, 38(5): 133-143.
- [2] Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 2001, 19(13-14): 1573-1580.
- [3] Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunological reviews*, 1999, 171(2): 5-26.
- [4] Galan JE, Nakayama K, R Curtiss III. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*; use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 1990, 94(5): 29-35.
- [5] Dominick MA, Rimler RB. Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. *American journal of veterinary research*, 1986, 47(7): 1582-1536.
- [6] Pullinger GD, Sowdhamini R, Lax AJ. Localization of functional domains of the mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 2001, 69(12): 7839-7850.
- [7] 康凯. 仔猪副伤寒活疫苗. 中国兽药杂志 (*Chinese Journal of Veterinary Drug*), 2003, 37(2): 49.
- [8] 徐引弟. 猪霍乱沙门氏菌 C500 株 *crp*<sup>-</sup>/*asd*<sup>-</sup> 缺失株平衡致死系统的构建及应用. 华中农业大学博士学位论文, 2006.
- [9] Kang HY, Srinivasan J, R Curtiss III. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70(2): 1739-1749.
- [10] Nakayama K, Kelly SM, R Curtiss III. Construction of an Asd<sup>+</sup> expression-cloning vector; stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio/Technology*, 1988, 6(1): 693-697.
- [11] 廖延雄. 兽医微生物实验诊断手册. 北京: 中国农业大学出版社, 1995.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Kang HY, Srinivasan J, R Curtiss III. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70(2): 1739-1749.

- [14] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American journal of hygiene*, 1938, 27(3): 493-497.
- [15] Liao CM, Huang C, Hsuan SL, et al. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine*. 2006, 24(1):27-35.
- [16] 汤细彪, 吴斌, 赵战勤, 等. 重组产毒多杀性巴氏杆菌毒素 PMT 的 N-端和 C-端蛋白的生物学活性及免疫原性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(2):213-219.
- [17] Foged NT, Nielsen JP, Jorsal S. Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. *The Veterinary Record*, 1989, 125(1):7-11.

## Construction and characterization of recombinant *Salmonella enterica* serovar choleraesuis vaccine strain expressing heterologous antigen of *Pasteurella multocida* toxin

Zhanqin Zhao<sup>1,2</sup>, Chen Wang<sup>1\*</sup>, Ke Ding<sup>1</sup>, Xiaofeng Li<sup>3</sup>, Bin Wu<sup>2</sup>, Shun Lu<sup>2</sup>, Chunjie Zhang<sup>1</sup>, Xiangchao Cheng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

(<sup>2</sup>The State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

(<sup>3</sup>College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** [Objective] This study was aimed to construct and characterize *Salmonella* vaccine strain C500 expressing the recombinant *Pasteurella multocida* toxin (PMT) antigen by the Asd<sup>+</sup> balanced-lethal host-vector system. [Methods and results] The DNA fragment encoding C terminal of PMT was cloned downstream from the beta-lactamase signal sequence in the multicopy Asd<sup>+</sup> pYA3493 vector to create pYA-PmtC. Fermentation patterns, serotype, and mean generation time of the vaccine strain C500 harboring pYA-PmtC (named with C501(pYA-PmtC)) were identical to those of the parent strain C500. The recombinant pYA-PmtC plasmid was very stable in C501(pYA-F1P2), which expressed secretorily a large amount of the recombinant PMT antigen (named with rPmtC). The virulence of C501(pYA-PmtC) with LD<sub>50</sub> of 8.5 × 10<sup>6</sup>CFU was a little lower than C500 with LD<sub>50</sub> of 4.4 × 10<sup>6</sup>CFU based on the method of Reed and Muench. All piglets inoculated with C501(pYA-PmtC) or C500 survived, and had no signs of disease during the entire experimental period. No significant differences were found between these two groups. [Conclusion] The recombinant vaccine strain C501(pYA-PmtC) had a series of biological characteristics similar to the parent vaccine strain C500. It is likely that C501(pYA-PmtC) could be adapted to develop multivalent recombinant *Salmonella* vaccine against both infections with *S. enterica* serovar Choleraesuis and toxigenic *P. multocida*.

**Keywords:** *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis C500 strain; toxigenic *Pasteurella multocida*; Asd<sup>+</sup> balanced-lethal host-vector system; recombinant vaccine

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (090001337) and the National High-tech Research and Development Programs of China (2006AA10A206)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-66893191; E-mail: wangchen2001@126.com

Received: 3 July 2009/ Accepted: 9 September 2009

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>