



表达空肠弯曲菌CfrA蛋白重组乳酸乳球菌的构建及其免疫效果

王传文^{1,2}, 周宏专², 郭芳芳², 陈玉霞², 杨兵², 苏霞², 朱瑞良^{1*}, 徐福洲^{2*}

¹ 山东农业大学动物科技学院, 山东省动物生物技术与疫病防治重点实验室, 山东 泰安 271018

² 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 畜禽疫病防控技术北京市重点实验室, 北京 100097

摘要: 【目的】本试验将空肠弯曲菌肠菌素受体蛋白CfrA编码基因导入食品级乳酸乳球菌表达系统, 然后将重组乳酸乳球菌口服免疫鸡, 降低空肠弯曲菌在鸡肠道中的定殖。【方法】利用PCR分别扩增空肠弯曲菌*cfrA*全基因及其N端片段, 插入食品级表达载体pNZ8149多克隆位点并转化乳酸乳球菌NZ3900, 通过Western blot鉴定重组菌株CfrA蛋白表达情况, 同时通过筛选nisin浓度、温度、时间等诱导条件优化重组蛋白表达水平; 进而将重组乳酸乳球菌经口服免疫SPF鸡, 免疫后分别测定乳酸乳球菌自鸡体内的排出情况、以及诱导CfrA血清抗体和粘膜抗体水平, 最后将空肠弯曲菌口服攻毒免疫后的鸡, 通过测定鸡泄殖腔棉拭子中空肠弯曲菌的数目来判定口服免疫效果。【结果】Western blot检测显示CfrA全基因及其N端片段均可在重组乳酸乳球菌胞内可溶性表达, 不分泌, 筛选的最佳诱导表达条件为nisin浓度25 ng/mL、温度37 °C、时间1 h。口服乳酸乳球菌10 d内自鸡体完全排空; 鸡口服免疫后可产生CfrA蛋白特异性的血清IgG和肠粘膜sIgA抗体; 重组乳酸乳球菌口服免疫后空肠弯曲菌在鸡体内的增殖速度显著低于对照组。【结论】成功构建了重组CfrA蛋白的食品级乳酸乳球菌诱导表达系统; 表达CfrA蛋白的重组乳酸乳球菌口服免疫鸡对空肠弯曲菌在鸡肠道的定殖具有一定的抑制作用, 为研制重组乳酸菌口服家禽免疫制剂防治空肠弯曲菌奠定了基础。

关键词: 空肠弯曲菌, 肠菌素受体CfrA, 乳酸乳球菌, 表达, 口服免疫

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是弯曲菌属的一种微需氧的革兰氏阴性菌, 可在宿主肠道中定殖和感染引起多种疾病, 如感染人引起肠炎和腹泻, 是人最重要的食源性病原菌之一^[1-2], 在发

展中国家空肠弯曲菌更是儿童腹泻死亡的主要病原^[3-4], 而且该菌感染还与人的自身免疫性疾病如Guillain-Barre综合征密切相关^[5]。该菌感染家禽后不引起任何临床症状, 被认为是家禽肠道内的一

基金项目: 国家自然科学基金(31172344); 北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX20150703)

*通信作者。朱瑞良, Tel: +86-538-8242341, E-mail: zhurl@sdau.edu.cn; 徐福洲, Tel: +86-10-51503203, E-mail: fuzhouxu@163.com

收稿日期: 2015-11-10; 修回日期: 2016-01-14; 网络出版日期: 2016-03-08

种共生菌,但成为人感染的主要污染源,据统计人空肠弯曲菌感染病例中30%–40%直接来自于污染的禽肉^[6-7]。

控制家禽弯曲菌的污染是降低人感染该菌最直接有效的手段^[8]。定量风险评估结果显示,当禽肉中弯曲菌量降低100倍时,人感染该菌的几率将降低30倍^[9]。目前控制家禽弯曲菌的研究策略主要包括全菌灭活疫苗、亚单位疫苗、沙门菌减毒活载体疫苗等特异性免疫以及益生菌、细菌素、噬菌体、植物提取物等非特异性免疫^[6-8]。在特异性免疫中,空肠弯曲菌CfrA蛋白由于具有位于菌体表面、能为免疫系统识别、表达丰度较好、可在宿主体内表达、在不同血清型菌株中高度保守以及编码基因突变后在鸡肠道定殖能力显著降低等特点^[10-11],而成为亚单位疫苗研究中的1种重要的候选蛋白。在非特异性免疫中,乳酸菌等益生菌可在宿主肠道内竞争排斥空肠弯曲菌等病原细菌,在降低病原细菌感染方面同样发挥重要作用^[7],特别是基于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)开发的食品级表达系统具有生长迅速、安全性高、易于操作、使用方便等诸多优点,使其成为肠道活载体疫苗传递抗原的最佳选择之一^[12-14]。

本试验拟结合特异性免疫与非特异性免疫,选择食品级乳酸乳球菌表达系统,将空肠弯曲菌外膜上的肠菌素受体CfrA编码基因插入质粒表达

载体pNZ8149后转化乳酸乳球菌,构建表达CfrA蛋白的重组乳酸乳球菌口服免疫制剂,在表达条件优化的基础上口服免疫SPF鸡,鉴定重组口服免疫制剂对空肠弯曲菌在鸡肠道定殖的影响,为降低鸡肠道空肠弯曲菌的定殖水平提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及血清

空肠弯曲菌参考菌株NCTC 11168由中国疾病预防控制中心张茂俊博士惠赠,常规培养于Mueller-Hinton (MH)液体或固体培养基,培养条件为42 °C三气培养箱(85% N₂、5% O₂、10% CO₂);空肠弯曲菌CfrA蛋白免源高免血清由美国田纳西大学林军教授惠赠。乳酸乳球菌NZ3900及表达载体pNZ8149购自MoBiTec公司(NICE, NIZO Food Research),乳酸乳球菌常规培养于添加0.5%葡萄糖的M17培养基中。

1.2 基因扩增与克隆

根据空肠弯曲菌NCTC 11168菌株基因序列(AL111168)设计引物(表1),分别扩增*cfrA*基因除去信号肽后的全序列(*cfrA1*)及其N端部分区域(*cfrA2*),扩增片段大小及在基因上的位置如图1所示。以空肠弯曲菌NCTC 11168基因组DNA为模

表1. 本试验使用的主要引物
Table 1. Major primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Product size/bp	Target gene
PF	AAACTGCAGCGCAAAATGTAGAACTAGATAGC (<i>Pst</i> I)		
PR1	AAAGGTACCTTAAAAGTTACCATTGATAGAAAT (<i>Kpn</i> I)	2051	<i>cfrA1</i>
PR2	AAAGGTACCTTAATAAGCTCTTGGCGAAAC (<i>Kpn</i> I)	1247	<i>cfrA2</i>
CfrAF	GAGATGTTGCAGAGGCTATCG	527	Part of <i>cfrA</i>
CfrAR	TGCCTTTGTAGGACTTTGAGC		
pNZ8149F	CTTATGCTGGAGATGCTCGC		
pNZ8149R	TCCGTCGTTCCCTTCTCA	321	Part of pNZ8149

板, 引物对PF/PR1和PF/PR2分别扩增*cfrA1* (2031 bp) 和*cfrA2* (1224 bp) 片段。PCR产物经纯化后与pMD19-T simple载体(TaKaRa公司)连接, 连接产物转化大肠杆菌, 氨苄西林抗性筛选阳性克隆, 抽提的质粒经PCR扩增、限制酶酶切及测序鉴定; 经测序, 序列正确的质粒分别命名为pT*cfrA1*与pT*cfrA2*。

1.3 构建重组表达载体

参照Holo等^[15]方法制备乳酸乳球菌NZ3900感受态细胞。限制酶*Pst* I和*Kpn* I双酶切重组克隆载体pT*cfrA1*、pT*cfrA2*, 切胶回收的插入片段连接用同样限制酶双酶切的表达载体pNZ8149, 连接产物电转化NZ3900感受态细胞, 电击条件为2 kV、25 μ F、200 Ω , 利用Elliker选择培养基筛选黄色菌落。获得的黄色菌落利用菌落PCR和测序进行鉴定, 阳性克隆命名为pNZ8149-*cfrA1*/NZ3900与pNZ8149-*cfrA2*/NZ3900。

1.4 蛋白电泳及Western blot

将pNZ8149-*cfrA1*/NZ3900、pNZ8149-*cfrA2*/NZ3900与pNZ8149/NZ3900克隆菌株分别接种添加0.5%葡萄糖的M17培养基, 30 $^{\circ}$ C厌氧培养过夜后1:25转接新鲜培养基, 继续培养至菌液 $OD_{600} \approx 0.4$, 加入乳酸链球菌肽nisin (Sigma公司)至终浓度1 ng/mL进行诱导表达, 诱导3 h后离心收集菌体进行超声破碎, 条件为超声1 s、间歇

3 s、15 min, 将诱导后的培养基上清通过10 kDa截留分子量的超滤离心管进行浓缩, 然后分别取培养基上清浓缩液、细菌超声破碎后离心的上清液及沉淀样品进行SDS-PAGE, 电泳后转印至PVDF膜, 利用1:1000稀释的CfrA兔源高免血清作为一抗、1:4000稀释的HRP标记羊抗兔IgG作为二抗(Sigma公司)进行Western blot, 用DAB显色并拍照保存。

1.5 表达条件优化

在重组乳酸乳球菌表达*cfrA1*基因鉴定的基础上, 对诱导剂nisin浓度、诱导温度和时间分别进行筛选, 其中诱导剂nisin筛选终浓度为0.5、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 ng/mL, 诱导温度为25、30、37、42 $^{\circ}$ C, 诱导时间为1、2、3、4、5、6 h, 最后利用Western blot检测重组菌CfrA表达水平的差异, 以获得较好的表达条件。

1.6 口服免疫

将重组菌株pNZ8149-*cfrA1*/NZ3900、pNZ8149-*cfrA2*/NZ3900与空质粒对照菌pNZ8149/NZ3900分别进行诱导表达, 收集菌体, 以PBS洗涤2次后重悬菌液, 调整菌浓度为 5×10^{10} CFU/mL。取1日龄SPF鸡80只, 随机分为4组, 每组20只, 分别采取灌胃给药方式口服重组乳酸乳球菌pNZ8149-*cfrA1*/NZ3900和pNZ8149-*cfrA2*/NZ3900、空质粒对照菌pNZ8149/NZ3900以

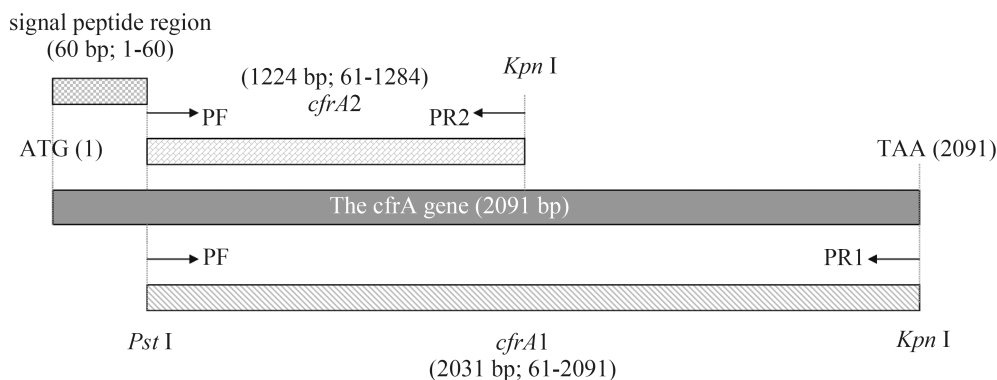


图 1. *cfrA1*和*cfrA2*基因片段在*cfrA*基因中的位置示意图

Figure 1. Position of *cfrA1* and *cfrA2* fragments in the whole *cfrA* gene.

及PBS空白对照。于5日龄和19日龄分别进行首免和二免, 免疫剂量为每只鸡0.2 mL, 每次免疫连续口服3 d, 每天1次。

1.7 乳酸乳球菌自鸡体内排出的测定

在首免后的第1、4、7、10 d, 每组随机选择10只鸡, 分别采集鸡泄殖腔棉拭子样品, 加入1 mL M17培养基中充分混匀, 离心后弃上清, 纯水重悬沉淀, 经煮沸裂解后作为DNA模板, 分别利用*cfrA*基因和pNZ8149载体特异性引物进行PCR扩增, 引物序列及扩增片段长度如表1所示, 根据PCR扩增结果判定乳酸乳球菌自鸡体内排出的动态变化。

1.8 血清IgG和肠粘膜sIgA的测定

于二免后2周攻毒前进行鸡心脏采血并分离血清, 采用间接ELISA测定抗CfrA的IgG抗体水平; 同时每组随机剖杀6只鸡, 剪取空回肠段小肠, 除去肠内容物, 利用小肠灌洗液(PBS, 包含0.05% Tween 20、0.05 mg/mL EDTA、0.35 mg/mL PMSF)冲洗肠粘膜, 冲洗液于4 °C振摇2 h, 4 °C、20000×g离心30 min, 收集上清液, 加入BSA至终浓度0.1%, 采用间接ELISA测定抗CfrA的sIgA抗体水平。间接ELISA方法简述为, 将在大肠杆菌中表达纯化的CfrA蛋白^[10]用抗原包被液稀释至1.4 µg/mL, 包被于96孔酶标板, 4 °C过夜, 血清或肠粘膜抽提液以1 : 10稀释作为一抗, 1 : 10000稀释的羊抗鸡IgG-HRP (Sigma公司)或羊抗鸡IgA-HRP (Abcam公司)作为二抗, 通过TMB底物显色测定OD₄₅₀值, 利用Student's *t*-test比较各组鸡特异性抗体水平的差异。

1.9 攻毒保护试验

二免2周后进行空肠弯曲菌灌胃攻毒试验, 攻毒菌株为空肠弯曲菌NCTC 11168, 参照文献[16]确定攻毒剂量为每只鸡 1.5×10^6 CFU。在攻毒后的第1、3、5、7天, 取每只鸡泄殖腔棉拭子样品, 加入1 mL MH液体培养基充分混匀, 稀释后涂布

于MH选择性培养平板(OXOID公司SR0204E, 2 mL加入500 mL MH培养基), 42 °C三气培养箱中培养2 d, 进行空肠弯曲菌菌落计数^[17]。通过比较各组测定结果, 获得重组乳酸乳球菌对空肠弯曲菌定殖的抑制效果。

2 结果和分析

2.1 重组乳酸乳球菌表达载体的构建和鉴定

空肠弯曲菌*cfrA1*与*cfrA2*基因片段经PCR扩增后获得2.0 kb和1.2 kb的特异性条带, 大小与预期相符(图2)。将PCR产物连入克隆载体pMD19-T, 经限制性内切酶*Pst* I+*Kpn* I双酶切鉴定正确(图2), 且测序结果与参考序列一致。进而将目的基因片段自T载体中切出插入乳酸乳球菌表达载体pNZ8149, 经*Pst* I+*Kpn* I双酶切鉴定同样正确(图2), 且测序结果表明*cfrA1*与*cfrA2*基因片段正确插入到表达载体中。

2.2 *cfrA*基因在重组乳酸乳球菌中的表达

将pNZ8149-*cfrA1*/3900、pNZ8149-*cfrA2*/3900重组菌与pNZ8149/3900空质粒对照菌的培养基上清、菌体超声破碎的上清和沉淀电泳后与特异性CfrA抗血清进行Western blot, 结果如图3所示。结果可见, 所有细菌培养基上清液中均未见CfrA条带, 提示不含信号肽的CfrA蛋白不能自乳酸乳球菌中分泌性表达; 重组细菌菌体超声破碎后的上清液和沉淀均可见75.5 kDa (CfrA1)与45 kDa (CfrA2) 2条特异性条带, 表达蛋白大小与预期相符, 且超声上清液中目标蛋白条带亮度高于超声沉淀, 提示*cfrA1*与*cfrA2*基因在重组菌体内主要以可溶性蛋白的形式表达。

2.3 重组乳酸乳球菌不同诱导表达条件的筛选

在30 °C诱导3 h鉴定不同nisin浓度对*cfrA1*基因表达的影响, 结果如图4-A所示, 在nisin终浓度为0.5–25.0 ng/mL时随着nisin浓度的升高*cfrA1*表达

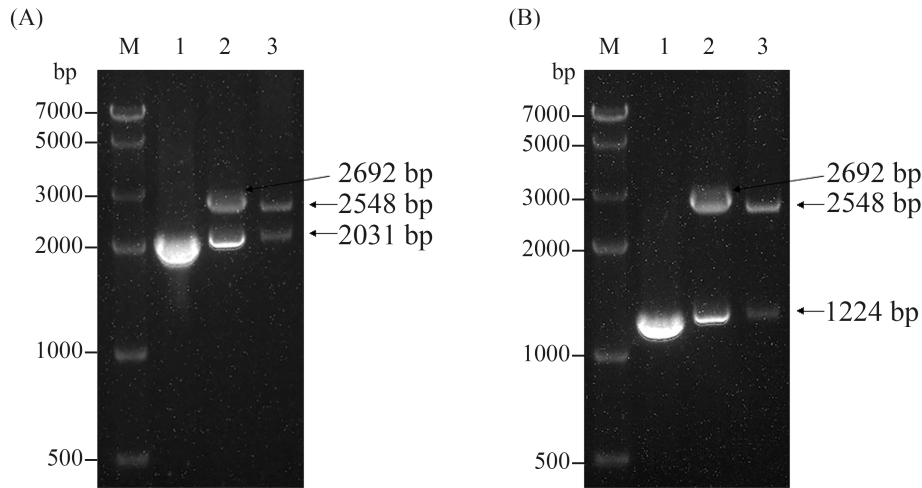


图 2. 基因PCR扩增及酶切鉴定结果

Figure 2. PCR products of *cfrA* and double enzymes digestion of its recombinant plasmids. A: *cfrA1*; B: *cfrA2*. M: DNA marker; 1: PCR products; 2: double digestion of inserts in pMD19-T; 3: double digestion of inserts in pNZ8149.

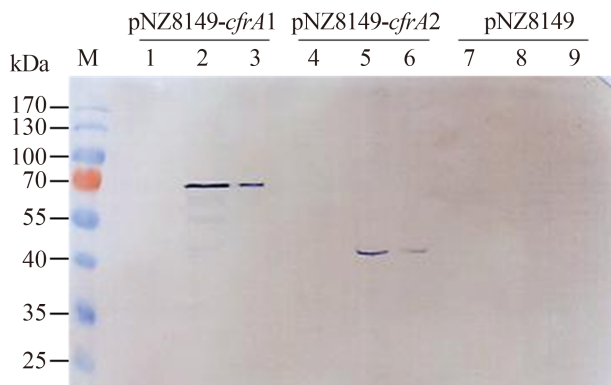


图 3. 基因在乳酸乳球菌中表达的Western blot测定结果

Figure 3. Western blot analysis on the expression of *cfrA* gene fragments in *L. lactis*. M: prestained protein marker; lane 1,4,7: culture supernatant of *L. lactis*; lane 2,5,8: bacterial lysate supernatant of *L. lactis*; lane 3,6,9: bacterial lysate precipitation of *L. lactis*.

量逐渐升高, 但浓度至50 ng/mL时表达量出现下降, 提示nisin添加浓度为25 ng/mL时获得最高的表达量。在30 °C且nisin添加浓度为25 ng/mL时鉴定不同诱导时间对*cfrA1*基因表达的影响, 结果如图4-B所示, 在所鉴定的6个时间段中, 随着诱导时间的延长目标蛋白的表达量逐渐下降, 诱导后1 h蛋白表达量最高。在nisin添加浓度为25 ng/mL且诱导时间为1 h时鉴定不同诱导温度对*cfrA1*基因

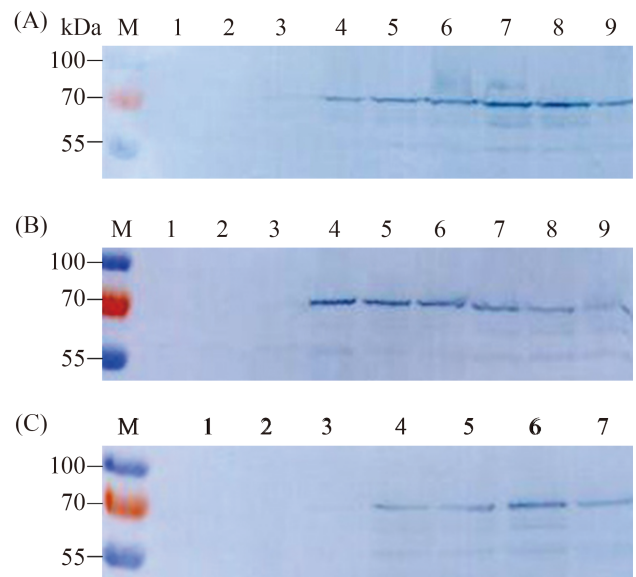


图 4. 不同诱导条件对*cfrA1*基因在乳酸乳球菌中表达的影响

Figure 4. Effect of different induction conditions on the *cfrA1* expression in *L. lactis*. A: nisin concentration; B: induction time; C: induction temperature. M, prestained protein marker; lane 1, pNZ8149 before nisin induction; lane 2, pNZ8149 after nisin induction; lane 3, pNZ8149-*cfrA1* before nisin induction; lane 4-9, nisin induced concentration of 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ng/mL, respectively; lane B4-9, induction time of 1, 2, 3, 4, 5, 6 h, respectively; lane C4-7, induction temperature of 25, 30, 37, 42 °C, respectively.

表达的影响, 结果如图4-C所示, 在4种培养温度中, 37 °C时目标蛋白表达量最高。最终, 优化的诱导条件为nisin终浓度25 ng/mL、诱导1 h、诱导温度37 °C。

2.4 重组乳酸乳球菌自鸡体内排出的测定结果

利用特异性引物自鸡泄殖腔棉拭子样品中分别扩增*cfrA*和表达载体基因片段, 从而判定重组乳酸乳球菌自鸡体内的排出情况, 测定结果如表2所示。结果显示, 给鸡口服后第1日, 除空白对照组外所有样品检测结果均为阳性, 随着日龄的增加各组检测阳性率逐渐降低, 至口服后第10日所有鸡检测结果均为阴性。检测结果提示乳酸乳球菌在鸡体内不能很好地定殖, 在口服10 d内即完全排出。

表2. 重组乳酸乳球菌自鸡体内持续排出的测定结果

Table 2. Duration of recombinant *L. lactis* in chickens

Group	Day post-inoculation			
	1	4	7	10
pNZ8149- <i>cfrA1</i> /3900	10/10*	10/10	7/10	0/10
pNZ8149- <i>cfrA2</i> /3900	10/10	9/10	5/10	0/10
pNZ8149/3900	10/10	6/10	4/10	0/10
PBS	0/10	0/10	0/10	0/10

* positive samples/total samples.

2.5 血清IgG和肠粘膜sIgA抗体水平的测定结果

在二免后2周即攻毒前, 分别测定各组鸡血清IgG和肠粘膜sIgA, 测定结果如图5所示, 结果显示CfrA1和CfrA2口服免疫组的IgG抗体水平均极显著高于空表达载体组和PBS空白对照组, 其中CfrA1免疫组IgG抗体水平高于空载体组和PBS组分别为51.8%和59.2%, CfrA2免疫组相应高出的百分比分别为20.5%和26.4%; CfrA1口服免疫组的sIgA抗体水平显著高于空表达载体组和PBS空白对照组(高出百分比分别为53.3%和78.6%), 而CfrA2口服免疫组与对照组相比未见显著差异, 提

示表达CfrA1蛋白的重组乳酸乳球菌口服免疫鸡后可刺激机体产生体液免疫和粘膜免疫。

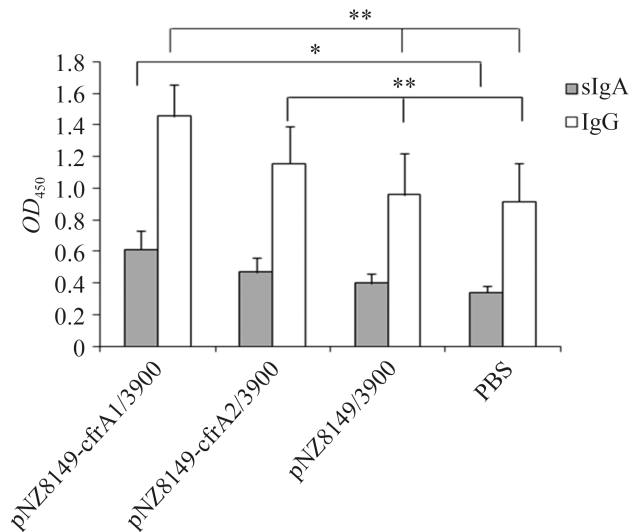


图5. 口服免疫后鸡血清IgG和肠粘膜sIgA抗体水平的测定结果

Figure 5. Antibody levels of sera IgG and intestinal mucosa sIgA in chicken by oral immunization. * and ** denote significant difference ($P < 0.05$) and highly significant difference ($P < 0.01$) using Student's *t*-test between the vaccinated group and the control group respectively.

2.6 空肠弯曲菌在鸡肠道内定殖的测定结果

通过测定鸡泄殖腔棉拭子中空肠弯曲菌的数量, 判定口服免疫重组乳酸乳球菌对空肠弯曲菌在鸡肠道内定殖的抑制作用, 测定结果如图6所示。结果显示, 攻毒后第1天和第7天, *cfrA1*和*cfrA2*免疫组空肠弯曲菌菌落数均显著低于空载体组和空白对照组($P < 0.05$), 且攻毒后第1天空载体组也显著低于空白对照组($P < 0.05$)。从总体趋势看, *cfrA1*和*cfrA2*免疫组空肠弯曲菌在鸡体内的增殖速度显著低于空载体组和空白对照组。提示重组乳酸乳球菌口服免疫后对空肠弯曲菌在鸡肠道的定殖具有一定的抑制作用。

3 讨论

由于空肠弯曲菌菌体表面抗原成分与人格林-

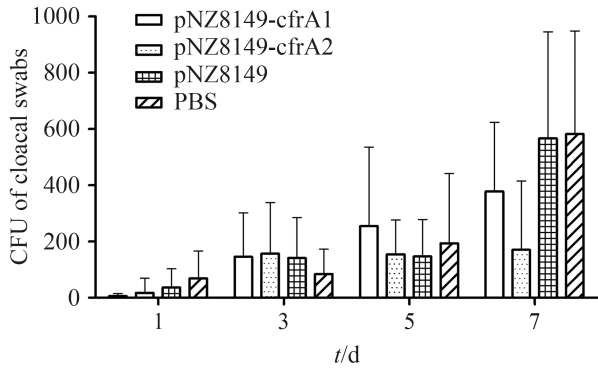


图 6. 重组乳酸乳球菌口服免疫对空肠弯曲菌在鸡体内定殖的影响

Figure 6. Effect of recombinant *L. lactis* on colonization of *C. jejuni* in chicken by oral immunization.

巴利综合征密切相关^[5], 因而研制空肠弯曲菌全菌体疫苗存在风险, 而研制亚单位疫苗或活载体疫苗具有潜在的应用价值。研究报道利用减毒沙门菌活疫苗作为载体表达空肠弯曲菌 *cjaA* 基因可显著降低鸡肠道内空肠弯曲菌的定殖水平^[18]。乳酸菌为非致病性微生物, 对人体免疫原性低, 不定殖于肠道, 非常适用于表达抗原, 因而乳酸菌表达系统近年来备受重视^[19-20]。在本试验中, 我们选用商品化的食品级乳酸乳球菌表达系统(NICE), 不但可直接口服免疫鸡高效表达外源基因, 而且乳酸乳球菌作为一种益生菌, 可同时发挥对鸡肠道病原细菌如空肠弯曲菌的竞争排斥作用, 降低肠道空肠弯曲菌的定殖水平^[7]。

高效表达是利用该蛋白表达系统首要考虑的因素。为提高目的蛋白的表达量, 本试验对诱导表达条件如诱导剂浓度、培养温度、诱导时间等进行筛选优化。试验发现, 培养基中添加的诱导剂 nisin 在一定浓度范围内与蛋白表达量呈正相关, 但随着 nisin 浓度的升高, 其抑制细菌生长的能力逐渐增强, 蛋白表达量相应降低, 因而 nisin 浓度的筛选对获得最大表达量具有重要意义。其次, 在筛选的不同培养温度下该系统均可诱导表达, 虽然乳酸乳球菌常规培养温度为 30 °C, 但本试验中 37 °C 时表达量最高, 而且在 42 °C 条件下细菌仍可增殖表达。还有, 诱导时间越短,

蛋白表达量越高, 这可能与诱导剂对细菌的生长抑制相关, 造成细菌逐渐死亡裂解而降低蛋白表达量, 另外还有可能随诱导时间的延长表达的蛋白形成不溶性沉淀, 造成裂解菌体上清中蛋白量降低。

除高效表达外, 蛋白分泌性表达对免疫效果也具有重要影响。在本试验中, Western blot 结果显示 CfrA 仅能在乳酸乳球菌胞内表达, 在培养上清液中未检测到目的蛋白, CfrA 表达蛋白未分泌至胞外, 且口服免疫鸡的重组菌为 nisin 诱导后的乳酸乳球菌, 只有当菌体裂解后表达蛋白才能释放出来, 从而刺激机体产生免疫反应, 这可能也是造成本试验中 CfrA 蛋白诱导血清 IgG 和肠粘膜 IgA 水平不高的主要原因。研究发现, 通过在目的蛋白 N 端加入分泌信号肽序列 *usp45*, 可实现目的蛋白的分泌性表达^[21], 因而我们拟在以后的试验中通过改造载体实现目的蛋白的分泌性表达。

本试验建立的间接 ELISA 方法, 使用的包被抗原为大肠杆菌表达纯化的空肠弯曲菌 CfrA 蛋白, 由于技术原因, 在表达纯化的蛋白包被液中, 除了含有 His 标签的 CfrA 重组蛋白, 还含有部分大肠杆菌裂解成分, 而这些大肠杆菌成分与鸡血清或粘膜中的相应抗体反应, 这可能是导致测定的抗体 OD 值偏高的主要原因。

在评价重组乳酸乳球菌的口服免疫效果时, 空肠弯曲菌的攻毒剂量也是一个重要的影响因素。根据文献报道^[16], 在评价空肠弯曲菌 CmeC 亚单位疫苗的口服免疫保护效果时, 攻毒剂量分别为 10^5 CFU 或 10^6 CFU (鸡只年龄不同), 本试验攻毒菌液经菌落计数后确定剂量为 1.5×10^6 CFU, 而且我们在评价空肠弯曲菌肠菌素受体 CfrB 对细菌定殖的影响中使用的攻毒剂量为 10^7 CFU^[17], 这些文献报道为本试验攻毒剂量的选择提供了重要依据。

空肠弯曲菌肠菌素受体 CfrA 是一种非常重要的铁调节蛋白受体, 在空肠弯曲菌利用铁方面发挥重要作用, 研究显示 CfrA 编码基因失活后空肠弯曲菌丧失了其在鸡体内的定殖能力^[11], 而且特异性血清 IgG 可抑制 CfrA 介导的铁吸收功能^[10], 因而

本试验选用*cfrA*基因作为乳酸乳球菌表达的目的蛋白。目前文献还报道了一些空肠弯曲菌亚单位疫苗候选蛋白如FlaA、FlaC、FspA、CjaA、CjaC、CjaD、Peb1等^[22]，我们将在以后的试验中选用不同的目的蛋白以进一步提高免疫效果。

参考文献

- [1] Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Mégraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 2005, 36(3): 351–382.
- [2] Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JSG. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41(4): 297–302.
- [3] Hegde MM, Ahluwalia NK. Rare presentation of a common illness. *Gut*, 2005, 54(6): 758.
- [4] O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2005, 16(2): 125–136.
- [5] Wakerley BR, Yuki N. Guillain-Barré syndrome. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2015, 15(8): 847–849.
- [6] Newell DG, Elvers KT, Dopfer D, Hansson I, Jones P, James S, Gittins J, Stern NJ, Davies R, Connerton I, Pearson D, Salvat G, Allen VM. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24): 8605–8614.
- [7] Hermans D, Van Deun K, Messens W, Martel A, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Rasschaert G, Heyndrickx M, Pasmans F. *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152(3/4): 219–228.
- [8] Lin J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(7): 755–765.
- [9] Rosenquist H, Nielsen NL, Sommer HM, Nørrung B, Christensen BB. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83(1): 87–103.
- [10] Zeng XM, Xu FZ, Lin J. Molecular, antigenic, and functional characteristics of ferric enterobactin receptor CfrA in *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 2009, 77(12): 5437–5448.
- [11] Palyada K, Threadgill D, Stintzi A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4714–4729.
- [12] Sáez D, Fernández P, Rivera A, Andrews E, Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity. *Vaccine*, 2012, 30(7): 1283–1290.
- [13] Hou J, Lu Y, Liu HY, Ma YJ, Xing Y, Zhang Y, Li TM, Cao RY, Jin L, Wu J, Zong L, Liu JJ. Oral administration of *Lactococcus lactis* delivered heat shock protein 65 attenuates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Vaccine*, 2011, 29(24): 4102–4109.
- [14] Zhang XJ, Duan GC, Zhang RG, Fan QT. Optimized expression of *Helicobacter pylori ureB* gene in the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression (NICE) system and experimental study of its immunoreactivity. *Current Microbiology*, 2009, 58(4): 308–314.
- [15] Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(12): 3119–3123.
- [16] Zeng XM, Xu FZ, Lin J. Development and evaluation of CmeC subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 2010, 1(3): 112.
- [17] Xu FZ, Zeng XM, Haigh RD, Ketley JM, Lin J. Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor, CfrB, in *Campylobacter*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(17): 4425–4435.
- [18] Wyszynska A, Raczko A, Lis M, Jagusztyn-Krynicka EK. Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, 2004, 22(11/12): 1379–1389.
- [19] Bahey-El-Din M. *Lactococcus lactis*-based vaccines from laboratory bench to human use: an overview. *Vaccine*, 2012, 30(4): 685–690.
- [20] Pontes DS, de Azevedo MSP, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expression and Purification*, 2011, 79(2): 165–175.
- [21] Sun QZ, Xiong YW, Ye CY, Xu JG. Construction of a food-grade secretion expression vector and use it for reporter protein expression in *Lactococcus lactis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 293–298. (in Chinese)
孙强正, 熊衍文, 叶长芸, 徐建国. 食品级分泌表达载体的构建及报告蛋白在乳酸乳球菌中的表达. *微生物学报*, 2008, 48(3): 293–298.
- [22] Jagusztyn-Krynicka EK, Łaniewski P, Wyszynska A. Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 8(5): 625–645.

Immunological modulation of chickens by recombinant *Lactococcus lactis* expressing ferric enterobactin receptor CfrA of *Campylobacter jejuni*

Chuanwen Wang^{1,2}, Hongzhuan Zhou², Fangfang Guo², Yuxia Chen², Bing Yang², Xia Su², Ruiliang Zhu^{1*}, Fuzhou Xu^{2*}

¹ Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

² Beijing Key Laboratory for Prevention and Control of Infectious Diseases in Livestock and Poultry, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to reduce the colonization level of *Campylobacter jejuni* in chicken intestine by oral immunization of recombinant *Lactococcus lactis* expressing the ferric enterobactin receptor CfrA of *C. jejuni*. [Methods] The whole *cfrA* gene and its N-terminal fragments were amplified by PCR, inserted into the expression vector pNZ8149 and transformed into *L. lactis* NZ3900. Based on the expression of CfrA in recombinant *L. lactis* by Western blot, the expression level was optimized by screening nisin concentration, induction temperature and time. Then the recombinant *L. lactis* strains were used to orally immunize specific-pathogen-free chickens. After oral immunization, the duration of recombinant *L. lactis* in chickens was determined by PCR, and the antibody levels of anti-CfrA serum IgG and intestinal mucosal sIgA were measured by ELISA. Finally, the immunized chickens were orally inoculated with *C. jejuni* to evaluate the inhibitory effect of recombinant *L. lactis* on colonization of *C. jejuni*. [Results] Western blot results determined that the whole *cfrA* gene and its N-terminal fragments were both expressed in recombinant *L. lactis* in soluble forms whereas no secreted CfrA protein was detected outside bacterial cells. The optimal conditions for inducing the expression were grown at 37 °C for 1 h with nisin concentration of 25 ng/mL. Detection of chicken cloacal swabs showed that the duration of oral *L. lactis* was less than 10 days in chicken. The immunized groups produced higher antibody titers of anti-CfrA specific serum IgG and mucosal sIgA than the control groups. Moreover, the colonization rate of *C. jejuni* in the immunized groups was significantly lower than that in the control groups. [Conclusion] Oral immunization of chickens with recombinant *L. lactis* expressing CfrA inhibited the colonization of *C. jejuni*. Our findings can be useful to develop oral vaccines with recombinant *Lactobacillus* for control of *C. jejuni* infection in chickens.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, ferric enterobactin receptor CfrA, *Lactococcus lactis*, expression, oral immunization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31172344) and by the Special Program on Science and Technology Innovation Capacity Building of BAAFS (KJCX20150703)

*Corresponding author. Ruiliang Zhu, Tel: +86-538-8242341, E-mail: zhurl@sdau.edu.cn; Fuzhou Xu, Tel: +86-10-51503203, E-mail: fuzhouxu@163.com

Received: 10 November 2015; Revised: 14 January 2016; Published online: 8 March 2016