

表达猪肺炎支原体免疫原性基因的重组猪霍乱沙门氏菌对小鼠的免疫原性

马丰英, 邹浩勇, 何启盖*

农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要:【目的】构建表达猪肺炎支原体免疫原性基因的重组猪霍乱沙门氏菌, 对重组菌株的生物学特性以及对小鼠的免疫原性进行研究。【方法】分别将猪肺炎支原体的免疫原性基因 p36、p46、p65 和 p97R1-Nrdf 克隆到 pYA3493, 得到重组质粒 pYA-36、pYA-46、pYA-65 和 pYA-97R1-Nrdf。重组质粒和空质粒 pYA3493 分别电转 asd 基因缺失株 C500⁻, 获得重组菌株 C36(pYA-36)、C46(pYA-46)、C65(pYA-65)、C97R1-Nrdf(pYA-97R1-Nrdf) 和空质粒菌株 CpYA(pYA3493)。研究重组菌株的生物学特性, 并以小鼠为动物模型评价重组菌株在口服、肌注两种不同免疫途径下的免疫原性。【结果】成功构建表达猪肺炎支原体免疫原性基因的重组猪霍乱沙门氏菌, 重组菌株能表达外源蛋白, 生化和生长特性未发生改变, 插入的外源基因亦稳定存在。小鼠的免疫原性结果显示: 口服 C36 + C46 + C65 + C97R1-Nrdf 组的猪肺炎支原体抗体极显著高于口服 C36 + C46 + C65 组和肌注商品疫苗组 ($P < 0.01$), 但与肌注 C36 + C46 + C65 组无显著性差异 ($P > 0.05$); IFN- γ 为肌注 C36 + C46 + C65 组显著高于肌注商品疫苗组 ($P < 0.05$), 而与口服 C36 + C46 + C65 或 C36 + C46 + C65 + C97R1-Nrdf 组差异均不显著 ($P > 0.05$); IL-4 水平为口服 C36 + C46 + C65 组 > 口服 C36 + C46 + C65 + C97R1-Nrdf 组 > 肌注商品疫苗组 > 肌注 C36 + C46 + C65 组, 但各组之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。对照组的猪肺炎支原体抗体、IFN- γ 以及 IL-4 均与试验组差异极显著 ($P < 0.01$)。【结论】构建的表达猪肺炎支原体免疫原性基因的重组猪霍乱沙门氏菌, 采用肌注免疫时具有较好的免疫原性, 有望发展为猪肺炎支原体的基因工程疫苗。

关键词: 猪肺炎支原体, 重组猪霍乱沙门氏菌, 免疫原性, 抗体, IFN- γ , IL-4

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1270-08

猪支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* of swine) 又称猪喘气病、猪地方流行性肺炎, 被认为是最常发生、最广流行、最难净化的原发性疾病之一。目前, 用于预防猪支原体肺炎 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 的疫苗主要是弱毒苗和灭活苗, 但存在成本较高、副反应大、免疫途径不便、免疫效果不

佳等缺陷。近年来, 对以猪霍乱沙门氏菌作载体表达外源基因的基因工程疫苗的研究突显其应用在猪用疫苗上的优越性。

Strasser 等^[1]报道, 猪肺炎支原体 p36 基因在进化过程中是高度保守而特异的, 是一种免疫优势蛋白, 该蛋白或其抗体与絮状或猪鼻支原体的蛋白无

基金项目: 现代农业产业技术体系项目 (nycytx-009)

* 通信作者。Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87282608; E-mail: heqigai@yahoo.com

作者简介: 马丰英 (1984-), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 研究方向为动物传染病。E-mail: mafengying229@163.com

收稿日期: 2011-03-22; 修回日期: 2011-05-15

免疫学交叉反应。自然或实验感染过程中, p36 蛋白是个早期强的免疫原因素^[2]。Wise 等^[3]发现 p46 蛋白是猪肺炎支原体的种特异性表面抗原, 感染早期即可检测到抗 p46 的抗体, 且引起抗体反应的持续时间最长。Kim 等^[4]研究发现, P65 蛋白是猪肺炎支原体的重要免疫原, 碳端是其主要的抗原区。P65 蛋白可能损害肺组织中的表面活性剂^[3], 可触发性或首次感染猪肺炎支原体的断奶仔猪和生长猪的早期免疫应答。之所以选择 p97 的 R1 区以及核苷酸还原酶(NrdF), 是因为 p97 是猪肺炎支原体的重要黏附因子, 其外膜蛋白的抗原能造成上皮细胞和纤毛损伤, 致使猪肺炎支原体附殖并发挥致病性; 而 NrdF 基因 R2 亚基 C 末端具良好地免疫原性, 其抗血清抑制猪肺炎支原体的生长。Yong 等^[5]报道, p97 蛋白诱导产生的 IgA 和 IgM 比其他抗原的抗体早 35 - 60d 出现。此外, Hsu 等^[6]报道, p97 的 R1 区能直接参与黏附, 是主要的抗原决定簇之一。Peter K Fagan 等^[7]发现, 用猪肺炎支原体野毒株进行攻毒试验中, 免疫与 NrdF 的 R2 亚基 C 末端同源杂合蛋白制备疫苗的猪, 其肺组织损伤比对照明显减轻。

本研究通过基因克隆方法, 构建分别表达 p36、p46 和 p65 蛋白的重组猪霍乱沙门氏菌 C36(pYA-36)、C46(pYA-46) 和 C65(pYA-65), 并以小鼠为模型检测 3 个重组菌株的免疫原性。为进一步提高重组菌株的免疫原性, 本试验还将串联表达猪肺炎支原体 p97 的 R1 区和 NrdF 的 R2 亚基 C 末端的重组菌株 C97R1-NrdF(pYA-97R1-NrdF) 与 C36、C46 和 C65 组合在一起, 以期获得更好的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:质粒 pYA3493 和 asd 缺失株大肠杆菌 X7213 由美国华盛顿大学 Dr. Roy Curtiss III 教授惠赠; asd 基因缺失株猪霍乱沙门氏菌 C500⁻、重组菌株 C36(pYA-36) 和 C97R1-NrdF(pYA-97R1-NrdF) 及重组质粒 pGEX-KG-46 和 pGEX-KG-65 由本实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂:DAP 购自上海 Sigma 公司; 各种内切酶、T4 DNA 连接酶以及 Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司; 小量质粒提取和胶回收试剂盒

购自美国 BioFlux 公司; 生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司; 猪肺炎支原体抗体(MP Ab)和小鼠 γ 干扰素(IFN- γ)及小鼠白细胞介素-4(IL-4)酶联免疫分析试剂盒均购自上海越研生物科技有限公司。

1.1.3 引物:引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name of primers	Primer sequence(5'→3')	Size of amplified products/bp
p46(<i>Sal</i> I)	AAAGTCGACCATGAAAAAATG	1260
p46(<i>Hind</i> III)	AATAAGCTTTTAGGCATCAGGAT	
p65(<i>Sal</i> I)	AAAGTCGACCATGGCAAAAGAA	1803
p65(<i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTAATCTGCTTGA	

1.2 培养条件

asd 缺失株 X7213 和 C500⁻在 TSB/TSA 培养基中, 37℃ 振摇/静止培养时, 需加入 DAP(2,6-二氨基庚二酸), 终浓度为 50 μ g/mL。

1.3 重组质粒 pYA-46 和 pYA-65 的构建与鉴定

以定点突变后能原核表达猪肺炎支原体 p46 基因的重组质粒 pGEX-KG-46 做为模板, 用引物 p46(*Sal* I)/p46(*Hind* III) 进行 PCR 扩增并回收, 回收产物和质粒 pYA3493 分别进行 *Sal* I 和 *Hind* III 双酶切, 再次回收并连接, 连接产物电转化缺失 asd 基因的大肠杆菌 X7213, 挑菌并提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定, 从而获得重组质粒 pYA-46。同理进行重组质粒 pYA-65 的构建与鉴定。

1.4 重组菌株 C46(pYA-46) 和 C65(pYA-65) 的构建与鉴定

将鉴定正确的重组质粒 pYA-46 电转化 asd 基因缺失株 C500⁻感受态, 于 DAP 阴性 TSA 平板上挑取单菌落培养, 并用引物 p46(*Sal* I)/p46(*Hind* III) 进行 PCR 鉴定, 筛选的阳性重组菌株命名为 C46(pYA-46), 同样方法构建重组菌株 C65(pYA-65) 并进行鉴定。

1.5 重组菌株 C46(pYA-46) 和 C65(pYA-65) 中外源蛋白的分泌表达鉴定

挑取重组菌株 C46(pYA-46) 和 C65(pYA-65) 的单个菌落于 TSB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 培养 12 h, 4℃ 放置 12 h, 按 1:100 体积比转接 TSB 培养基再培养 6 h, 8000 \times g 离心 10 min, 上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤, 加等体积预冷 20% 三氯乙酸冰浴 20 min, 13400 \times g 离心 20 min, 沉淀用 1 mL 无水

乙醇洗涤,13400 xg 离心 5 min,重复洗涤 1 次。所得蛋白用猪的抗猪肺炎支原体血清作一抗进行 Westernblot 鉴定。

1.6 重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65) 的生化特性研究

分别将重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65)、亲本菌株 C500 及空质粒菌株 CpYA (pYA3493)划线接种 TSA 平板后,分别转接阿拉伯糖、半乳糖醇、甘露糖、麦芽糖、木糖、尿素、葡萄糖、乳糖、鼠李糖、蔗糖及硫化氢,37℃ 温箱培养。观察这些菌株能否利用以上碳源和硫化氢,判断生化特性是否变化。

1.7 重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65) 的生长特性研究

分别将重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65)接种 TSB 培养基,37℃ 培养过夜,以 1:100 体积比转接 TSB 培养基,37℃、200 r/min 培养,每隔 1 h 取样测 OD_{600} 。同样方法绘制亲本菌株 C500 和 asd 基因缺失株 C500⁻及空质粒菌株 C501 (pYA3493) 的生长曲线,比较生长特性及快慢是否一致。

1.8 重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65) 的遗传稳定性

分别将重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65)在 TSA 培养基平板上划线培养,挑取单菌落于 TSB 培养基中,37℃、200 r/min 培养,按 1:100 的体积比转接 TSB 液体培养基中培养 12 h,再次按 1:100的比例转接到 TSB 培养基中,连续进行 50 次转接。分别进行 PCR 鉴定,观察重组菌株的遗传情况是否稳定。

1.9 重组菌株对小鼠的免疫试验

将 80 只 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 8 组,每隔 2 周免疫 1 次,免疫 2 次,免疫剂量均为 200 μ L,重组菌株总量为 6×10^8 CFU,其中每种重组菌株含量相等。从首免前开始,每周对小鼠断尾取血。2 免后 4 周每组随机挑选 2 只取肺脏,并无菌制备脾淋巴细胞。口服免疫组小鼠在免疫前 4 h 禁水禁食,免疫前口服 30 μ L 10% NaHCO_3 ,5 min 后采用灌胃针口服,30 min 后恢复饮水和饲料。具体试验设计如表 2。

表 2 小鼠的免疫试验设计

Table 2 the design of immunogenicity in mice

Groups	Number	Immunogen	Immune way	Number of experimental animals
the treatment groups	I	C36 + C46 + C65	i. m	10
	II	C36 + C46 + C65	p. o	10
	III	C36 + C46 + C65 + C97R1-Nrdf	p. o	10
	IV	M + PAC	i. m	10
the control groups	V	CpYA (pYA3493)	i. m	10
	VI	CpYA (pYA3493)	p. o	10
	VII	TSB	i. m	10
	VIII	TSB	p. o	10

1.10 脾淋巴细胞的免疫检测

无菌条件下制备脾细胞悬液,调整细胞浓度为 4×10^6 个/mL,加入 24 孔细胞培养板,每孔 2 mL,每个样本 3 个重复。试验 I 组和 II 组每孔加入 p36 + p46 + p65 蛋白作刺激原,试验 III 组和 IV 组采用 p36 + p46 + p65 + p97R1-Nrdf 蛋白作为刺激原,确保每种蛋白的最终浓度均为 5 μ g/mL,其余各组不进行蛋白刺激。将细胞培养板置于 37℃、5% CO_2 温箱中培养 24 h,收集细胞上清进行检测。

1.11 血清、肺脏和脾淋巴细胞的检测

小鼠的血清、肺脏以及经蛋白刺激的脾淋巴细胞的猪肺炎支原体抗体、IFN- γ 和 IL-4 的含量采用

猪肺炎支原体抗体 (MP Ab)、小鼠 γ 干扰素 (IFN- γ) 以及小鼠白细胞介素-4 (IL-4)酶联免疫分析试剂盒进行检测,同时测出每个试剂盒的标准曲线,以便将检测结果的 OD 值按比例换算成含量。

1.12 统计分析

对实验前后平均数的差异是否显著采用 t 检验进行统计分析。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 重组质粒 pYA-46 的构建与鉴定:PCR 结果

显示扩增的 p46 基因片段大小约为 1200 bp, 与预期大小相符; 重组质粒经酶切后有相同大小的基因片段。这说明构建的重组质粒 pYA-46 完全正确。

2.1.2 重组质粒 pYA-65 的构建与鉴定: 电泳结果显示扩增出约为 1800 bp 的 p65 基因片段, 大小与预期片段的相符; 酶切重组质粒后在 1800 bp 左右存在目的片段; 表明成功构建重组质粒 pYA-65。

2.2 重组菌株的构建与鉴定

由 PCR 电泳结果可见扩增出的 p46 全基因大小约为 1200 bp, p65 片段大小在 1800 bp 左右, 均与预期基因的大小相吻合, 这表明重组菌株 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65) 已构建成功。

2.3 重组菌株外源蛋白的分泌表达鉴定

图 1 Western blot 结果显示, A 中重组菌株 C46 (pYA-46) 以及 B 中 C65 (pYA-65) 分别分泌表达 p46 和 p65 蛋白, 这两种蛋白均能够与猪的抗猪肺炎支原体阳性血清发生特异性反应。

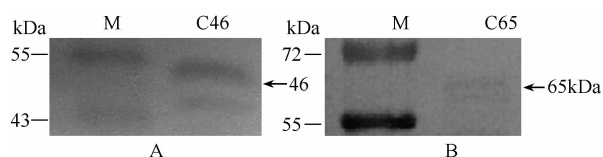


图 1 Western blot 鉴定蛋白表达

Fig. 1 Identification of proteins by Western-blot.

2.4 重组菌株的生化特性分析

生化特性结果表明, 重组菌株 C46 (pYA-46)、C65 (pYA-65) 和空质粒菌株 CpYA (pYA3493) 与亲本菌株 C500 均能利用甘露糖、麦芽糖、木糖、葡萄糖和鼠李糖, 但不能利用阿拉伯糖、半乳糖醇、尿素、乳糖和蔗糖等碳源, 其生化特性相一致, 符合猪霍乱沙门氏菌的典型特征。

2.5 重组菌株的生长特性分析

从图 2 重组菌株的生长曲线可见, 重组菌株 C46 (pYA-46)、C65 (pYA-65)、CpYA (pYA3493) 和亲本菌株 C500 的生长趋势一致, 但 C46 和 C65 的生长速度较 CpYA 和 C500 稍慢, C500⁻可能由于缺失 asd 基因增殖速度最慢。

2.6 重组菌株的遗传稳定性

分别取含有相同 CFU 的第 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 代的培养物为模板, 用引物 p46 (SalI)/p46 (HindIII) 或 p65 (SalI)/p65 (HindIII) 进行 PCR, 检测重组质粒在 C500⁻中的遗传稳定性。

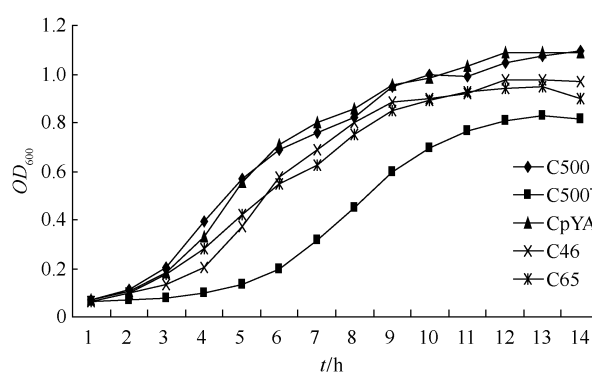


图 2 重组菌株的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of recombinant *S. choeraesuis* strains.

图 3 中 A 和 B 分别为 C46 (pYA-46) 和 C65 (pYA-65) 的遗传稳定性 PCR 鉴定, 其中 1-11 为第 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45 和 50 代的扩增结果, - 为 C500 (pYA3493) 对照。其结果显示每隔 5 代均能扩出目的条带, 表明重组质粒在重组菌株中稳定遗传。

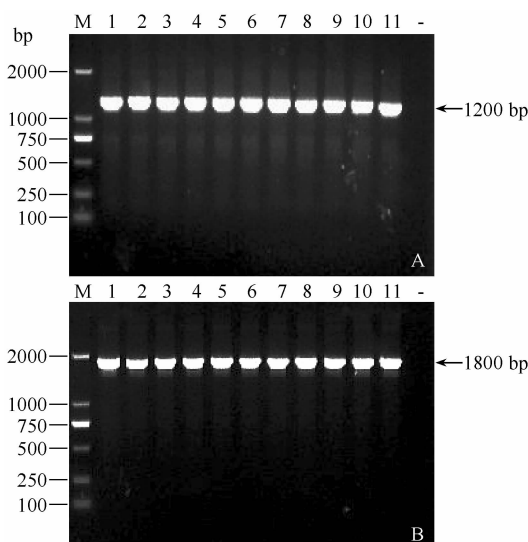


图 3 重组菌株的遗传稳定性 PCR 鉴定

Fig. 3 Genetic stability of recombinant *S. choeraesuis* strains by PCR.

2.7 血清 MP Ab、IFN- γ 和 IL-4 的检测结果

2.7.1 猪肺炎支原体抗体 (MP Ab) 检测结果: 从图 4 中各组猪肺炎支原体抗体的动态变化可见: 试验 III 组的抗体水平极显著高于试验 II 组和试验 IV 组 ($P < 0.01$), 试验 I 组与 II、III、IV 组以及试验 II 组与 IV 组无显著差异 ($P > 0.05$), 但免疫组均极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。其中, 试验 III 组 1 免 2 周高达 176.6 ng/L, 却低于试验 I 组 2 免 3 周时的最

高值 197.59 ng/L; 试验 II 组和 IV 组同样在 2 免 2 周时达到最高, 前者低, 为 126.84 ng/L, 后者稍高, 为

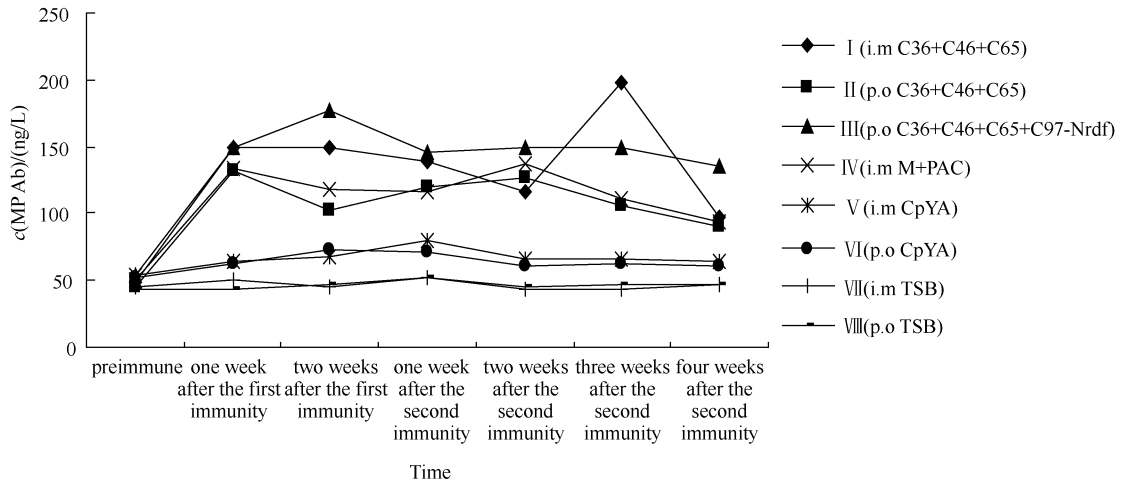


图 4 各组猪肺炎支原体抗体 (MP Ab) 动态变化

Fig. 4 The dynamic changes of antibody level of per group.

2.7.2 小鼠 γ 干扰素 (IFN- γ) 检测结果: 从图 5 各组 IFN- γ 水平来看: 试验 I、II、III 组均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 试验 IV 组极显著高于试验 VI、VII、VIII 组 ($P < 0.01$), 但显著高于试验 V 组 ($P < 0.05$)。试验 I 组显著高于试验 IV 组 ($P < 0.05$), 而试验 I 组与 II、III 组, 试验 II 组与 III、IV 组以及试验

III 组与 IV 组差异均不显著 ($P > 0.05$)。其中, 试验 I 组在 2 免 3 周高达 732.71 ng/L; 试验 II 组和 IV 组 2 免 2 周达到最高, 分别为 671.4 和 677.53 ng/L; 而试验 III 组在 1 免 2 周时达到最高值 800.16 ng/L。每组 IFN- γ 与猪肺炎支原体抗体达到最高值在时间点上呈现完全一致性。

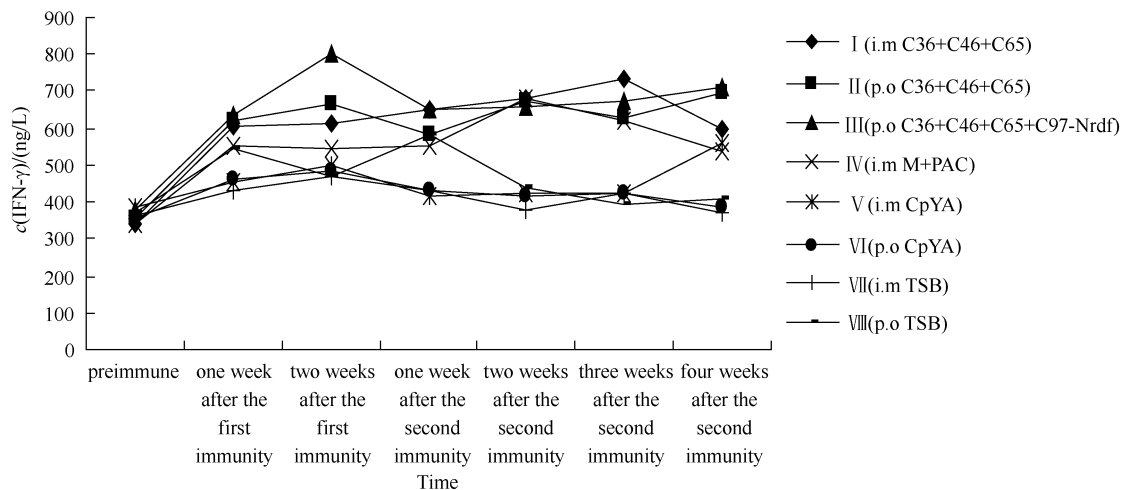


图 5 各组 γ 干扰素 (IFN- γ) 动态变化

Fig. 5 The dynamic changes of IFN- γ production of per group.

2.7.3 小鼠白细胞介素-4 (IL-4) 检测结果: 通过图 6 中各组 IL-4 的变化可以发现: 试验 II 组 > 试验 III 组 > 试验 IV 组 > 试验 I 组, 各免疫组之间差异均不显著 ($P > 0.05$), 但均极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。其中, 试验 I 组在 2 免 1 周高达 142.18 pg/mL;

试验 II 组在 1 免 1 周达到最高值, 为 165.33 pg/mL; 而试验 III 组于 2 免 4 周达 128.37 pg/mL; 试验 IV 组达到最高 143.8 pg/mL 是在 1 免后 2 周。

2.8 肺 MP Ab、IFN- γ 和 IL-4 的检测结果

图 7 中肺的检测结果可见, 猪肺炎支原体抗体

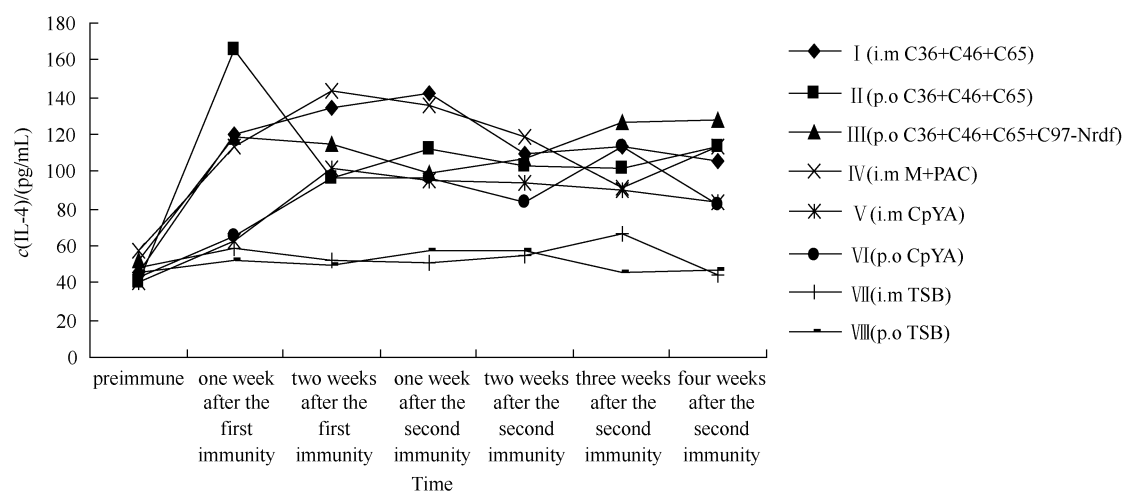
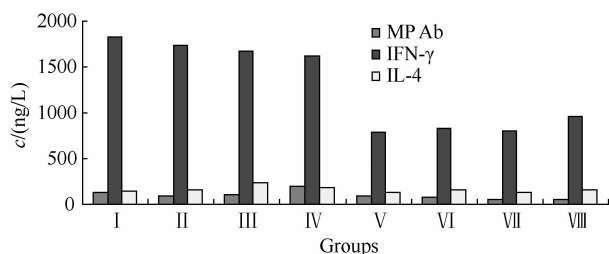


图6 各组白细胞介素-4(IL-4)动态变化

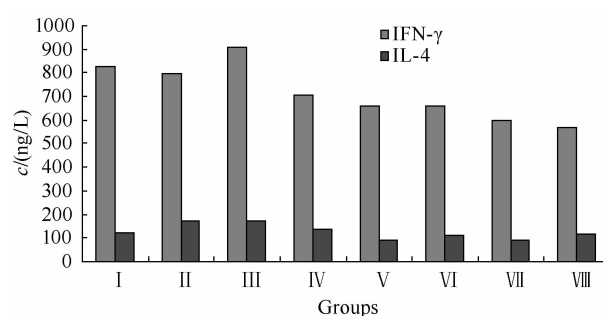
Fig. 6 The dynamic changes of IL-4 production of per group.

水平为试验IV组 > 试验I组 > 试验III组 > 试验II组 > 试验V组 > 试验VI组 > 试验VII组 > 试验VIII组; IFN- γ 水平表现为试验I组 > 试验II组 > 试验III组 > 试验IV组 > 试验VIII组 > 试验VI组 > 试验VII组 > 试验V组; 而 IL-4 水平为试验III组 > 试验IV组 > 试验VIII组 > 试验II组 > 试验VI组 > 试验I组 > 试验VII组 > 试验V组。由此可见,免疫组肺组织的猪肺炎支原体抗体和 IFN- γ 水平均高于对照组。

图7 肺 MP Ab、IFN- γ 和 IL-4 的检测结果Fig. 7 The result of MP Ab, IFN- γ and IL-4 in lung.

2.9 脾淋巴细胞的检测结果

图8脾的检测结果显示,IFN- γ 水平为试验III组 > 试验I组 > 试验II组 > 试验IV组 > 试验V组 > 试验VI组 > 试验VII组 > 试验VIII组; IL-4 水平表现为试验III组 > 试验II组 > 试验IV组 > 试验I组 > 试验VIII组 > 试验VI组 > 试验VII组 > 试验V组。上述结果表明,免疫组脾的 IFN- γ 和 IL-4 水平均高于各对照组。

图8 脾淋巴细胞 IFN- γ 和 IL-4 检测结果Fig. 8 The result of IFN- γ and IL-4 in the splenic lymphocytes.

3 讨论

减毒沙门氏菌保留侵袭力,可穿过粘膜组织,侵入粘膜局部相关淋巴结和脾、肝、肾等处的淋巴组织,并表达外源抗原,因此在局部粘膜产生 SIgA 的同时,激发全身性的体液和细胞免疫。与其它活疫苗载体相比,减毒沙门氏菌具有培养简便、繁殖迅速、免疫原性强、制备和使用方便、经济等优点。重组沙门氏菌可经黏膜途径(口服或滴鼻)免疫,操作方便,对接种对象刺激小,副作用低。同时,沙门氏菌本身具免疫佐剂的作用,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。此外,减毒沙门氏菌在侵入宿主后一段时间内可进行有限增殖,因此其免疫具有持续性,可省去反复多次的加强免疫。

猪霍乱沙门氏菌 C500 株具有较好的免疫原性,能激活全身、局部和远端粘膜的免疫系统且副作用

低,安全性好^[8]。其中应用最多,效果也最稳定的是沙门氏菌的 *asd* 平衡致死系统^[9-10]。该系统可显著提高携带外源基因的质粒在沙门氏菌中的存在及稳定表达,并且不降低自身针对沙门氏菌感染的免疫效力^[11]。Peter K Fagan 等 (1997)^[7] 利用沙门杆菌 SL3261 株作载体表达猪肺炎支原体 *NrdF* 的 R2 亚基并口服免疫小鼠,证实其诱导肺部粘膜免疫作用。

黏膜表面是机体抵抗病原微生物入侵的第一道防线,并且消化道、呼吸道等黏膜系统是绝大部分机体感染的主要途径,因而黏膜免疫在抵抗感染方面有着极其重要的作用。目前使用黏膜免疫的疫苗中,选用滴鼻途径的疫苗半清除时间仅 15 min,导致疫苗不能更多进入机体而有效的激发黏膜免疫^[12]。1990 年翁仲男研究表明,经肠道免疫猪支原体肺炎疫苗后受抗原刺激所产生的抗体可经循环系统移至呼吸道,证实了消化道与呼吸道之间的黏膜免疫机制是相通的。在单独重组菌株以小鼠为模型的免疫原性试验中,肌注效果最好,口服次之,滴鼻再稍次,因此研究多个重组菌株的免疫原性,我们只采用了肌注和口服两种免疫方式。

实验结果证明,小鼠免疫重组菌株 C36 + C46 + C65 或 C36 + C46 + C65 + C97R1-*NrdF* 后,均产生了针对猪肺炎支原体的抗体,且抗体水平较高,说明这些重组菌株能够表达外源蛋白,具有免疫原性。其中,口服 C36 + C46 + C65 + C97R1-*NrdF* 的小鼠产生的猪肺炎支原体的抗体极显著高于口服 C36 + C46 + C65 和肌注商品疫苗组 ($P < 0.01$)。为更加全面了解本研究中重组菌株的免疫机制,笔者特进行了体液和细胞免疫两个方面的监测。试验结果亦显示,肌注和口服重组菌株 C36 + C46 + C65 以及口服重组菌株 C36 + C46 + C65 + C97R1-*NrdF* 的小鼠均产生极显著高于对照组的 IFN- γ ($P < 0.01$)。对细胞免疫指标的进一步监测可发现,注射或口服重组菌株的小鼠诱导的 IL-4 极显著高于对照组 ($P < 0.01$),这说明重组菌株在激活体液免疫的同时也激活了细胞免疫。此外通过三组肌注与口服两种免疫方式的对比,可推测出:若采用肌肉注射 C36 + C46 + C65 + C97R1-*NrdF*,小鼠产生的猪肺炎支原体抗体和 IFN- γ 理论上应该更好。

本研究构建的分别表达猪肺炎支原体保护性抗原 p46 和 p65 的重组猪霍乱沙门氏菌与疫苗菌株 C500 具相似生物学特性,并能分泌表达外源抗原。虽然小鼠不感染猪肺炎支原体,无法进行免疫保护试

验,但能通过对小鼠的免疫原性检测来证实重组菌株能够诱导小鼠产生针对猪肺炎支原体的抗体,具有免疫原性,并且能诱导小鼠产生较高水平的体液免疫及一定水平的细胞免疫,说明重组菌株具有较好的应用前景,为进一步研究猪用疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Strasser M, Frey J, Bestetti G, Kobisch M, Nicolet J. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 1991, 59(4): 1217-1222.
- [2] Stipkovits L, Nicolet J, Haldimann A, Frey J. Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *molecular and cellular probes*, 1991, 5(6): 451-457.
- [3] Wise KS, Kim MF. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5546-5555.
- [4] Kim MF, Heidari MB, Stull SJ, McIntosh MA, Wise KS. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infection and Immunity*, 1990, 58(8): 2637-2643.
- [5] Young TF, Chiang YW, Ross RF. Evaluation of local and systemic humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proceedings of the 11th Congress of the international Pig vet Society*, 2000, 97-101.
- [6] Hsu T, Minion FC. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene*, 1998, 214(1-2): 13-23.
- [7] Fagan PK, Djordjevic SP, Chin J, Eamens GJ, Walker MJ. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* aroA expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (*NrdF*). *Infection and Immunity*, 1997, 65(6): 2502-2507.
- [8] 房晓文. 仔猪副伤寒弱毒疫苗研究. 研究报告汇编 (*Study Repertoire*), 1978, 4: 1-11.
- [9] Galán JE, Nakayama K, Curtiss R 3rd. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*; use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 1990, 94(1): 29-35.

- [10] 徐引弟. 猪霍乱沙门氏菌 C500 株 *crp*-/*asd*-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.
- [11] Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R 3rd Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70(4): 1739-1749.
- [12] Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, 2002, 14(5): 666-672.

Immunogenicity of attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing immunogenic genes of *Mycoplasma hyopneumoniae* in mice

Fengying Ma, Haoyong Zou, Qigai He*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: [Objective] The study was carried out to construct and characterize *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing immunogenic genes of *Mycoplasma hyopneumoniae* and to test its immunogenicity in mice. [Method] We made p36, p46, p65 and p97R1-Nrdf, the main immunogenic genes of *Mycoplasma hyopneumoniae*, to insert into the prokaryotic expression plasmid pYA3493. Then these recombinant plasmids and pYA3493 were electroporated into C500 *asd*-mutant, resulting in the recombinant *Salmonella choleraesuis* vaccine strains C36(pYA-36), C46(pYA-46), C65(pYA-65), C97R1-Nrdf(pYA-97R1-Nrdf) and CpYA(pYA3493). We characterized these recombinant *Salmonella choleraesuis* vaccine strains and tested the immunogenicity in mice by intramuscular injection or orally immunized. [Result] The results of the immunogenicity in mice indicated that the group orally immunized with C36, C46, C65, C97R1-Nrdf showed significantly higher *Mycoplasma pneumoniae* antibody than both the group orally immunized with C36, C46, C65 and the group intramuscular injected with the *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin (M + PAC) ($P < 0.01$). The group intramuscular injected with C36, C46, C65 showed higher IFN- γ production than the group injected with the *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin (M + PAC) ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the group orally immunized with C36, C46, C65 and the group orally immunized with C36, C46, C65, C97R1-Nrdf ($P > 0.05$). The highest level of IL-4 was found in the group orally immunized with C36, C46, C65; higher levels of IL-4 was observed in the group orally immunized with C36, C46, C65, C97R1-Nrdf than the group injected with the *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin (M + PAC); and the lowest IL-4 level was found in the group injected with C36, C46, C65. There were no significant differences among them ($P > 0.05$). The *Mycoplasma pneumoniae* antibody, IFN- γ or IL-4 production of the each group was obviously higher than the control group ($P < 0.01$). [Conclusion] The attenuated *Salmonella choleraesuis* vaccine strain expressing immunogenic genes of *Mycoplasma hyopneumoniae* which has immunogenicity in mice especially by intramuscular injection could probably serve as a vaccine against *mycoplasmal pneumonia* of swine.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, attenuated *Salmonella choleraesuis*, Immunogenicity, Antibody, IFN- γ , IL-4

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the China Agricultural Research System (nyzctx-009)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87282608; E-mail: heqigai@yahoo.com

Received: 22 March 2011/Revised: 15 May 2011