

## 猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽与猪细小病毒 VP2 蛋白在干酪乳杆菌中的共表达及免疫小鼠特异性抗体的测定

徐义刚<sup>1</sup> 崔丽春<sup>2</sup> 葛俊伟<sup>1</sup> 赵丽丽<sup>1</sup> 李一经<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030)

(<sup>2</sup> 东北林业大学 哈尔滨 150040)

**摘 要** 将分别编码猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽和猪细小病毒主要保护性抗原 VP2 蛋白的重组基因插入干酪乳杆菌分泌型表达载体 pPG 中, 构建了重组表达载体 pPG-VP2-E290, 将其电转化干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 393, 获得了猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽与猪细小病毒 VP2 蛋白的乳酸菌共表达系统, 经 2% 乳糖在 MRS 培养基中的诱导表达, 对诱导表达的菌体及培养上清液进行 SDS-PAGE 检测表明, 有约 70kDa 蛋白得到了表达, 表达蛋白的大小与理论值相符。Western blot 分析结果表明所表达的蛋白具有与天然病毒蛋白一样的抗原特异性。以诱导表达上清液作为抗原进行的间接 ELISA 实验也表明, 重组的目的蛋白获得了分泌表达。将该重组干酪乳杆菌经口服接种途径免疫 BALB/c 小鼠, 收集粪便样品检测小鼠产生抗 PPV 的特异性 sIgA 抗体, 采集血液样本检测血清中抗 PPV 及抗 E290 的特异性 IgG。结果表明分泌型的重组菌 pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 免疫小鼠能够产生明显的抗体水平, 为重组猪瘟与猪细小病毒乳酸菌口服活菌疫苗的研制奠定了重要的物质基础。

**关键词**: 猪瘟病毒; T 细胞表位; 猪细小病毒; VP2 蛋白; 干酪乳杆菌; 特异性抗体

中图分类号: Q78; Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0667-06

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起猪繁殖障碍的主要病原体。病毒经口、鼻等黏膜感染是其主要感染途径, 怀孕母猪感染后通过胎盘感染引起母猪流产、产死胎、木乃伊胎及新生仔猪死亡<sup>[1-3]</sup>。猪瘟是由猪瘟病毒(Classical Swine Fever virus, CSFV)引起的猪的一种急性、亚急性、慢性及典型、非典型的疾病过程<sup>[4,5]</sup>。因这两种病流行面广, 危害严重, 给养猪业带来重大经济损失。

免疫接种是预防这两种疾病的主要措施, 虽然常规灭活疫苗和弱毒疫苗在防治这两种疾病中起到了积极作用, 但常规疫苗固有的缺陷, 如灭活疫苗免疫原性差, 弱毒疫苗接种后的排散病毒、毒力返强等诸多缺陷限制了其应用<sup>[6]</sup>。因此开发安全无毒、便于接种, 且一次接种预防多种疾病的新型复合疫苗是今后疫苗制品的发展方向。

PPV 基因组编码 3 种结构蛋白, 分别是 VP1、VP2、VP3, 其中 VP2 是构成病毒粒子的主要衣壳蛋

白, 携带主要的抗原决定簇, 可诱导机体产生中和抗体, VP2 对病毒感染、发挥其致病性方面亦起关键作用<sup>[7]</sup>, 因此, PPV VP2 蛋白在 PPV 诊断和免疫防治等方面发挥重要作用。CSFV 的 E290 多肽能诱导  $\gamma$  干扰素的产生, 在细胞毒性实验中, CSFV 特异性 T 细胞能溶解含有该多肽的靶细胞, 该肽段含有 CSFV 特异的杀伤性 T 细胞表位和辅助性 T 细胞表位<sup>[8]</sup>, 是研制猪瘟表位疫苗的首选位点。

本研究利用干酪乳杆菌所具有的免疫佐剂、吸附黏膜、抗胆汁酸能力, 而本身又具有低免疫原性, 在动物肠道有一定定植能力等特点, 作为表达和传递外源抗原的载体, 设计将 CSFV T 细胞优势表位 E290 多肽基因与 PPV 主要免疫保护性蛋白 VP2 基因插入干酪乳杆菌分泌型表达载体 pPG, 构建共表达 CSFV T 细胞优势表位 E290 多肽与 PPV VP2 蛋白的干酪乳杆菌表达系统, 为研制重组 PPV 与 CSFV 乳酸菌口服疫苗奠定物质基础。

基金项目: 国家自然科学基金(30371074)

\* 通讯作者。Tel: 86-451-55190385 E-mail: yijingli@163.com

作者简介: 徐义刚(1978-), 男, 吉林人, 博士研究生, 研究方向为病原微生物与免疫学。E-mail: yigangxu-china@yahoo.com.cn

其它作者: 马广鹏<sup>1</sup>, 唐丽杰<sup>1</sup>

收稿日期: 2006-12-21 接受日期: 2007-02-26 修回日期: 2007-05-22

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株、病毒株及质粒** :pMelBacA-VP2-E290 重组质粒,含有猪细小病毒 VP2 基因,在该基因 5' 端上游插入有猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽基因,由本实验室构建;分泌型表达载体 pPG 含有 ssUSP 分泌信号肽基因序列、氯霉素(Cm)抗性基因,由荷兰 NIZO 研究所惠赠;L. casei 393 从 7 日龄健康乳猪的肠道中分离获得,经形态学、过氧化氢酶测定及碳水化合物发酵实验等方法鉴定,该菌氯霉素敏感实验为阴性,由本实验室保存;猪细小病毒强毒分离株(猪肾原代细胞培养),本实验室保存;感受态 JM109、pMD18-T simple 载体购自大连宝生物公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;BamH I、Xho I 等限制性内切酶购自 MBI 公司;T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;羊抗鼠 IgG/HRP、羊抗兔 IgG/HRP 购自北京中杉公司;鼠源抗 PPV 高免血清、兔抗猪瘟血清由本实验室制备保存;羊抗鼠 IgA/HRP、MRS 培养基购自 Sigma 公司;E290 多肽:KHKVRNEVMVHWFDD,由上海生物工程有限责任公司合成,纯度大于 95%。

**1.1.3 引物** :上游引物 P1 引入 BamH I 酶切位点,下游引物 P2 引入 Xho I 酶切位点。序列如下:P1 :5'-

CGATGGGATCCTATGAAACACAAAGTTCGTAACGA  
AGTTATGGTTCACTGGTTCG-ACGACCGCGAG-3'; P2 :5'-AGCTTCTCGAGCCATGCTACCTGATTAACCGAGTA  
ACTG-3'。

## 1.2 重组干酪乳杆菌的构建及鉴定

以 pMel<sub>BacA</sub>-VP2-E290 重组质粒为模版,P1 和 P2 为两侧引物,PCR 扩增目的基因 VP2-E290,反应体系采用 50 $\mu$ L,反应条件:95 $^{\circ}$ C,5min 94 $^{\circ}$ C,1min 58.3 $^{\circ}$ C,1min 20s,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。Gel Extract Mini 试剂盒回收 PCR 产物与 pMD18-T Simple 载体连接,转化感受态细胞 JM109,将转化子涂布于 SOC(含氯霉素 100 $\mu$ g/mL)琼脂培养基,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,筛选阳性克隆,并将重组阳性载体测序鉴定。

重组质粒 pMD18-T-VP2-E290 经 BamH I 和 Xho I 双酶切后回收目的基因片段 VP2-E290,与经同样双酶切的 pPG 载体连接,连接体系及反应条件:pPG 质粒 3 $\mu$ L、目的基因 9 $\mu$ L、T4 DNA 连接酶 1 $\mu$ L、Buffer 2 $\mu$ L、40% PEG8000 2 $\mu$ L、dH<sub>2</sub>O 3 $\mu$ L,16 $^{\circ}$ C 反应 20h。

取活化菌种 L. casei 393,按 1:50 的比例接种于 100mL MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8 4000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 15min,菌体分别先用 EPWB(6mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1mmol/L MgCl<sub>2</sub>,pH7.4)洗涤 3 次,再用 EPB(EPWB + 0.3mol/L Sucrose)洗涤 1 次,最后菌体悬浮于 1mL EPB 中,分装备用。

将 20 $\mu$ L 连接产物加入 100 $\mu$ L L. casei 393 感受态细胞中,混匀,冰浴 5min,将其转入 2mm 规格的预冷电转化杯(Bio-Rad 公司)中,迅速电击,电击参数为 2.5kv、100 $\Omega$ 、25 $\mu$ F,电击后迅速将感受态细胞移入 900 $\mu$ L 预冷的 GMRS(含 15%蔗糖的 MRS 培养基)恢复培养基中,冰浴 10min,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 2h。取适量菌液涂布于含有 10 $\mu$ g/mL Cm 的 MRS 琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36h。筛选阳性克隆,对重组质粒进行酶切鉴定、PCR 鉴定及序列测定分析,重组质粒命名为 pPG-VP2-E290。

## 1.3 氯霉素抗性基因在干酪乳杆菌中的稳定性

将构建的重组菌单菌落接种于无 Cm 抗性的 MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养至 OD<sub>600</sub> = 1.0,取适量再次接种于无 Cm 抗性的 MRS 培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养至 OD<sub>600</sub> = 1.0,依此连续传 70 代。取定量菌液作 10 倍递进稀释,分别涂布于含有 Cm 抗性和无 Cm 抗性的 MRS 平板中培养,并进行菌落计数,以检测含抗性基因重组子的稳定性。同时,随机挑取若干菌落进行培养,提取质粒,采用 PCR 方法对在没选择压力下连续传 70 代的重组菌中的目的基因进行鉴定。

## 1.4 目的蛋白的诱导表达

重组菌接种于 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养过夜活化,取过夜培养菌以 1:10 比例接种于 20mL 含 2%乳糖的 MRS 培养基中进行诱导。样品处理:诱导表达菌液以 12000r/min 离心 5min,将培养上清液用分子截留值为 8kDa 的透析袋透析浓缩,菌体沉淀用 500 $\mu$ L 10mg/mL 的溶菌酶 37 $^{\circ}$ C 水浴作用 40min,12000r/min 离心 5min,弃上清,透析浓缩物与菌体分别加入 SDS-PAGE 样品缓冲液(含 DTT),在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分析。

## 1.5 表达产物的鉴定

**1.5.1 免疫印迹(Western blot)** :SDS-PAGE 电泳结束后,将凝胶中蛋白转印到硝酸纤维素膜上,以鼠源抗 PPV 高免血清作为第一抗体,HRP 标记羊抗鼠 IgG 为第二抗体,4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 15min,观察结果。

**1.5.2 间接 ELISA 方法** :以诱导表达上清液作为抗原包被 ELISA 反应板,分别以鼠源抗 PPV 高免血

清、兔抗猪瘟血清为一抗,相应 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 为二抗,以抗体检测抗原的方法进行 ELISA 测定猪细小病毒 VP2 蛋白和猪瘟病毒 E290 多肽的表达情况。

### 1.6 实验动物分组及免疫

7 周龄 BALB/c 小鼠分成 3 组,每组 20 只:实验 I 组每只小鼠口服接种 100 $\mu$ L 浓度为 10<sup>10</sup> CFU/mL 的重组菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393;实验 II 组小鼠口服同等剂量的 pPG/*L. casei*393;实验 III 组小鼠口服 100 $\mu$ L PBS 溶液。共免疫 3 次,免疫时间间隔为 2w,每次连续免疫 3d。

### 1.7 免疫小鼠粪便中 PPV 特异性 sIgA 测定

分别于免疫前及初免后第 18d、38d 和 46d 收集免疫小鼠粪便,每 0.1g 粪便加入 0.5mL 提取液,置于振荡器上,振荡 30min,10000r/min 离心 5min,收集上清,以 PPV 全病毒作为抗原包被 ELISA 反应板,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,用含有 5% 脱脂乳的 PBS 液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,加入处理好的粪便上清,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,加 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5min,加终止液后,酶标测定仪在波长 490nm 处测定每孔的光吸收值。

### 1.8 免疫小鼠血清中抗 PPV 及 E290 特异性 IgG 测定

于口服免疫前、初免后第 18、38、46 等天采集免疫小鼠血液,4 $^{\circ}$ C 静止过夜,4000r/min 离心 5min,收集血清。分别以 PPV 全病毒及合成的 E290 多肽为抗原包被 96 孔 ELISA 反应板,4 $^{\circ}$ C 包被反应过夜,用含有 5% 脱脂乳的 PBS 液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,加入免疫小鼠血清,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,加 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物显色液,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5min,加终止液后,酶标测定仪在波

长 490nm 处测定每孔的光吸收值。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的遗传稳定性结果

重组菌在不含 Cm 抗性的 MRS 培养基中连续传 70 代后,分别取出 100 $\mu$ L 菌液进行 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> 稀释,分别涂布于含有 Cm 抗性和无 Cm 抗性的 MRS 平板,培养 36h 后,进行平板计数,结果显示在没有选择压力传代的条件下,带有选择标记的重组子几乎没有丢失(图 1-A)。同时,随机挑取若干菌落进行培养,提取质粒,采用 PCR 方法对在没有选择压力下连续传 70 代的重组菌中的目的基因进行鉴定,鉴定结果表明重组质粒中目的基因完好(图 1-B)。

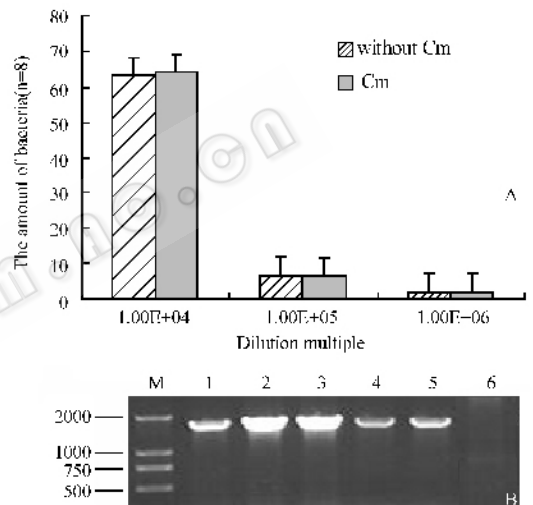


图 1 氯霉素抗性基因(A)和目的基因(B)在重组菌中的遗传稳定性结果

Fig.1 Segregational stability of Cm gene (A) and interest gene (B) in recombinant *L. casei* 393. Lanes M. DNA Marker DL2000; Lanes 1-5. Product of PCR; Lane 6. PCR negative control.

### 2.2 目的蛋白在干酪乳杆菌中的表达

重组菌经 2% 的乳糖诱导,菌体裂解物及培养

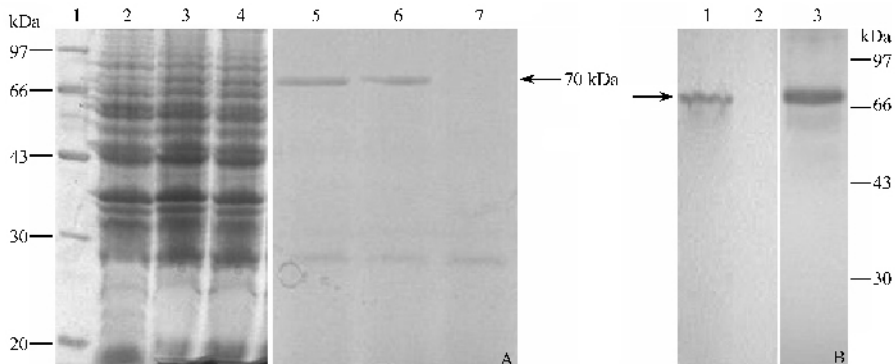


图 2 目的蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定结果

Fig.2 Identification of interest protein via SDS-PAGE and Western blot. A (SDS-PAGE): Lane 1. Protein Marker (97kDa-14kDa); Lane 2. The lysates of pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 noninduced by 2% lactose; Lanes 3, 4. The lysates of pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 induced by 2% lactose; Lanes 5, 6. The concentrated supernatants of pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 induced by 2% lactose; Lane 7. The concentrated supernatants of pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 noninduced by 2% lactose. B (Western blot): Lane 1. The expressed protein in pPG-VP2/*L. casei* 393 induced by 2% lactose appeared clear immune blot via Western-blot; Lane 2. *L. casei* 393 harboring pPG was induced by 2% lactose, the result of Western blot was negative; Lane 3. The result of Western blot of the expressed protein in the concentrated supernatants of pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 induced by 2% lactose.

上清液浓缩物经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,结果表明,菌体裂解物和培养上清浓缩液(图 2-A)均有约 70kDa 的蛋白泳带,其分子大小与理论值相符,培养上清液经 20 倍浓缩后的 SDS-PAGE 电泳结果目的蛋白带更为明显。诱导菌体及培养上清浓缩物经 SDS-PAGE 电泳后,转印硝酸纤维素膜,分别与鼠源抗 PPV 高免血清和羊抗鼠 IgG/HRP 作用,结果表明,菌体裂解物与培养上清浓缩物均在表达蛋白带的预期位置出现明显的反应,说明重组细小病毒 VP2 在乳酸菌中得到了有效表达,且所表达的蛋白既存在于菌体中,又可分泌到培养液中。表达的蛋白和天然的蛋白一样具有良好的抗原特异性(图 2-B)。

以诱导表达上清液为包被抗原,分别以鼠抗 PPV 高免血清、兔抗猪瘟血清为一抗,间接 ELISA 方法分别测定猪细小病毒 VP2 蛋白和 E290 分泌表达情况,结果表明,在重组菌培养的上清液中,均检测到了这两种蛋白的表达(结果略)。

### 2.3 重组干酪乳杆菌免疫小鼠抗 PPV 特异性 sIgA 测定结果

分别于免疫前及免疫后 18d、38d、48d 收集免疫鼠粪便检测 sIgA 水平。如图 3 所示:口服免疫重组菌后诱导小鼠产生了抗 PPV VP2 蛋白的分泌性 IgA 抗体。*L. casei393* 具有定植能力,定植于肠道中可不断的刺激肠黏膜,第 48d 时,在粪便中仍能测得较高的 IgA 抗体水平。免疫空载体菌 pPG/*L. casei393* 的小鼠和 PBS 对照组小鼠在免疫前后分泌性 IgA 抗体水平未出现明显差别。

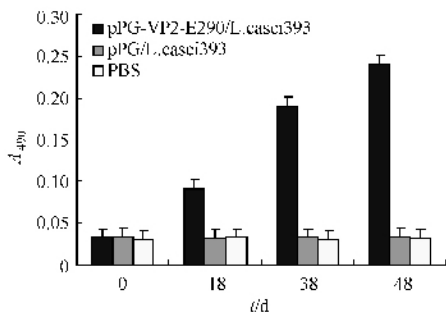


图 3 免疫小鼠粪便中抗 PPV VP2 蛋白特异性 sIgA 水平

Fig. 3 Anti-PPV-VP2 specific sIgA level in fecal of immunized mice.

### 2.4 重组干酪乳杆菌免疫小鼠血清中抗 PPV 及 E290 特异性 IgG 检测结果

分别于免疫前及初次免疫后 18d、38d、46d 采集免疫小鼠血液,制备血清,以 PPV 全病毒和合成的 E290 多肽作为 ELISA 反应抗原,检测免疫小鼠血清中产生抗 PPV 及 E290 的 IgG 抗体水平。如图 4 所

示,利用重组干酪乳杆菌连续 3 次免疫小鼠,诱导其机体产生了较高的抗 PPV VP2 蛋白及 E290 多肽的 IgG 抗体反应。

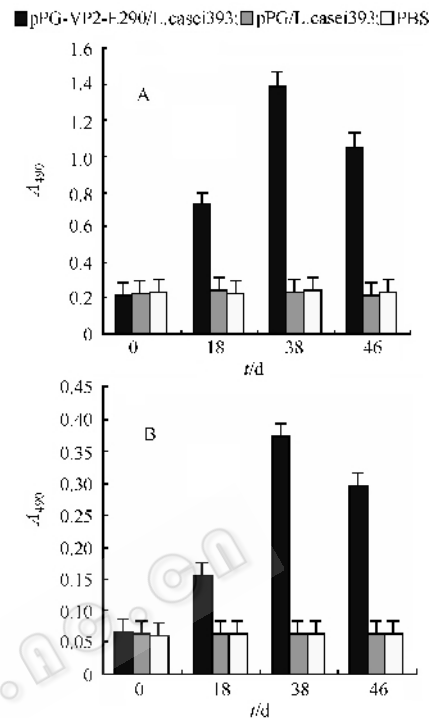


图 4 口服免疫重组干酪乳杆菌小鼠血清中特异性 IgG 水平

Fig. 4 Specific IgG level in the serum of mice orally immunized with recombinant *L. casei393*. A: Anti-PPV-VP2 specific IgG level; B: Anti-E290 specific IgG level.

## 3 讨论

VP2 蛋白是 PPV 的主要衣壳蛋白,在猪细小病毒感染过程中起着极为重要的作用,缺失 VP2 蛋白突变体的 PPV 丧失了对宿主细胞的感染性<sup>[9-11]</sup>。以 VP2 制备的类病毒粒子(Virus-Like Particles, VLPs)具有与完整病毒一样的血凝活性和免疫原性,用其免疫母猪能诱导产生免疫应答,血清抗体水平与完整的 PPV 病毒几乎没有差别<sup>[12]</sup>。因此,PPV VP2 在刺激机体产生特异性免疫保护作用中起着极为重要的作用。CSFV 的 E290 多肽是 CSFV 特异的杀伤性 T 细胞表位,亦是辅助性 T 细胞的优势表位,因此该多肽刺激机体可产生特异的细胞免疫和体液免疫,是研制猪瘟抗原表位疫苗时首选表位。

针对这两种疾病黏膜免疫特点,采用口服免疫是较为理想的预防途径。口服免疫突出的优点是有效地刺激黏膜免疫细胞产生分泌型 IgA 并引起全身免疫,但口服免疫需要克服免疫保护性抗原在到达肠道黏膜之前在胃和肠道中被降解或灭活的,可

能,满足这一要求的必须是活的载体系统来传递完整无损的抗原成分。以细菌、病毒为活载体均可达到这一目的,但作为安全无毒,能在肠道黏膜定居的活载体系统,乳酸菌是最合适的载体系统<sup>[13~20]</sup>。据此,本研究设计了以编码 PPV 起主要免疫保护作用的 VP2 衣壳蛋白及含有 CSFV 特异的杀伤性 T 细胞表位的 E290 多肽为目的基因,将其插入乳杆菌表达载体中,并转化干酪乳杆菌,构建了重组乳杆菌活菌载体表达系统,经鉴定该系统具有良好的遗传稳定性。诱导后,进行的 SDS-PAGE 结果显示,菌体裂解物和培养上清液均检测到约 70kDa 蛋白的表达,该蛋白大小与预期设计的分子量大小相一致。Western blot 结果进一步证实表达的蛋白具有与天然病毒蛋白一样的抗原特异性。

研究表明,活菌载体传递的疫苗抗原成份分泌到肠道中能更有效的刺激黏膜产生局部及全身免疫应答。本研究所使用的 pPG 表达载体,具有 ssUSP 分泌信号肽序列,属分泌表达型载体。重组菌诱导表达后的培养上清液经 20 倍浓缩后进行的 SDS-PAGE、Western-blot 试验证明其所表达的目的蛋白在培养液中,间接 ELISA 试验也表明,重组目的蛋白获得了分泌性表达。

为探讨共表达猪瘟 E290 多肽和猪细小病毒 VP2 蛋白的重组乳酸菌系统作为活菌疫苗潜在的应用价值,本实验以小鼠为试验动物,口服接种后不同时间分别测定了小鼠粪便中抗 PPV VP2 sIgA 及血清抗体等特异性局部和系统免疫应答。ELISA 检测结果表明,小鼠免疫后在其粪便中检测到了特异性 sIgA,同时在其血液中亦检测到了血清抗体,说明该重组菌既可诱导局部免疫应答,又可刺激机体产生系统的体液免疫应答。对抗 VP2 血清抗体的中和病毒活性分析表明,所获得的抗体能够有效的中和 PPV 对 ST 细胞的感染,同时,E290 多肽亦能产生明显的 CTL 反应。共表达猪瘟病毒 T 细胞优势表位 E290 多肽与 PPV VP2 蛋白的分泌型表达载体 pPG-VP2-E290 成功构建及重组蛋白在干酪乳杆菌中获得分泌性表达,为抗猪瘟与猪细小病毒重组乳酸菌疫苗的研制奠定了重要的物质基础。

## 参 考 文 献

[ 1 ] Carwright SF, Huck RA. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Vet Rec*, 1967, **81**: 196 - 197.

[ 2 ] Mengeling WL, Cutlip RC, Wilson RA, et al. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc*, 1975, **166**: 993 - 995.

[ 3 ] Mengeling WL, Lager KM, Zimmerman, et al. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 1991, **3**(1): 33 - 35.

[ 4 ] Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojic M, et al. Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets. *Vet Microbiol*, 2001, **81**(1): 1 - 8.

[ 5 ] Henneken M. Transmission of Classical Swine Fever Virus by Artificial insemination during the 1997 - 1998 epidemic in the Netherlands: A descriptive epidemiological study. *Vet Quart*, 2000, **22**: 228 - 233.

[ 6 ] Mengeling WL, Paul PS, Guntekunst DE, et al. Vaccination for reproductive failure caused by porcine parvovirus. *Proc Int Congr Pig Vet Soc*, 1980b, (6): 61.

[ 7 ] Molitor TW, Joo HS, Collett MS. Related Articles Porcine parvovirus parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol Feb*, 1983, **45**(2): 842 - 854.

[ 8 ] Armengol E, Wiesmuller KH, Wienhold D, et al. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol*, 2002, (83): 511 - 560.

[ 9 ] Brown CS, Van Lent JWM, Vlak JM, et al. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural protein. *Virology*, 1991, (65): 2702 - 2706.

[ 10 ] Maetinz C, Dalsgaard K, De Turiso JAL, et al. Production of porcine parvovirus empty capsid with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, (10): 684 - 690.

[ 11 ] Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ, et al. The minor capsid VP1 of the autonomous parvovirus minute of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *Virology*, 1993, (67): 131 - 141.

[ 12 ] Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, et al. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(14): 7503 - 7508.

[ 13 ] Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, et al. Enhanced Mucosal Delivery of Antigen with Cell Wall Mutants of Lactic Acid Bacteria. *Infect Immun*, 2004, **72**(5): 2731 - 2737.

[ 14 ] Peter H, Pouwel, Rob J, et al. The potential of Lactobacillus as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigen. *Biotechnology*, 1996, (44): 183 - 192.

[ 15 ] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, et al. Cell surface display system for Lactococcus lactis: a novel development for oral vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(1): 75 - 81.

[ 16 ] CBM Maassen, JD Laman, MJ Heijne, et al. Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine*, 1999, (17): 2117 - 2128.

[ 17 ] Lorenz Scheppler, Monique Vogel, Adrian Zuercher, et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery

- [ 18 ] Maria Leonor S Oliveria , Vicente Monedero , *et al.* Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens , PsaA and PspA by *Lactobacillus casei* . *FEMS Microbiol Lett* , 2003 ,( 227 ) : 25 – 31 .
- [ 19 ] Tomohiko Ogawa , Yasuyuki Asai , *et al.* Oral immunoadjuvant activity of a new symbiotic *Lactobacillus casei* subsp *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice . *Nutrition Research* , 2005 ,( 25 ) : 295 – 304 .
- [ 20 ] PS Ho , J Kwang , YK Lee . Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production . *Vaccine* , 2005 ,( 23 ) : 1335 – 1342 .

## Co-expression of CSFV T cell epitope E290 peptide and PPV VP2 protein in *Lactobacillus casei* and determination of specific antibodies in immunized mice

XU Yi-gang<sup>1</sup> , CUI Li-chun<sup>2</sup> , GE Jun-wei<sup>1</sup> , ZHAO Li-li<sup>1</sup> , LI Yi-jing<sup>1,\*</sup>

( <sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine , Northeast Agriculture University , Harbin 150030 , China )

( <sup>2</sup> Northeast Forestry University , Harbin 150030 , China )

**Abstract** : *Lactobacillus casei* strain 393 was selected as an antigen delivery vehicle for the development of oral vaccine to express recombinant classical swine fever virus ( CSFV ) T cell epitope E290 peptide and porcine parvovirus ( PPV ) VP2 protein . The recombinant genes encoding CSFV T cell epitope E290 peptide and PPV VP2 protein , respectively , were cloned into the secretion expression vector pPG , and then the pPG-VP2-E290 was electrotransformed into *L. casei* 393 giving rise to recombinant strain pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 . The recombinant *L. casei* 393 was induced by 2% lactose in MRS and about 70kDa protein was detected with SDS-PAGE in induced recombinant strain and culture supernatants . The result of Western blot indicated that the expressed protein possessed the antigenic specificity same as the native virus protein . The indirect ELISA test also indicated that the interest protein was expressed and secreted from the recombinant strain . Specific anti-PPV VP2 secret immunoglobulin A ( sIgA ) antibody was detected by indirect ELISA in the feces , anti-PPV VP2 and anti-CSFV E290 peptide immunoglobulin G ( IgG ) antibody was detected by indirect ELISA in the serum of immunized mice after intragastric administration . The results indicated that the mice immunized with recombinant strain pPG-VP2-E290/*L. casei* 393 could produce clear antibody level , which establish important material basement for the development of lactic acid bacteria oral vaccine of recombinant CSFV and PPV .

**Keywords** : CSFV ; T cell epitope ; PPV ; VP2 protein ; *Lactobacillus casei* 393 ; specific antibody