

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(1):72-77; 4 January 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

携带 TGEV DNA 疫苗减毒沙门氏菌的构建及安全性与免疫性分析

杨恒, 刘佳文, 曹三杰, 黄小波, 文心田*

(四川农业大学动物医学院, 动物传染病与基因芯片实验室, 四川省动物疫病与人类健康重点实验室, 雅安 625014)

摘要【目的】探讨以减毒沙门氏菌为载体, 进行 TGEV DNA 疫苗口服免疫可行性。【方法】通过 RT-PCR 扩增 TGEV 四川株(SC-H)S 基因 5' 端约 2.1 kb 的主要抗原位点片段, 将其插入真核表达载体 pVAX1, 构建重组质粒 pVAX-S, 体外转染 COS-7 细胞, 间接免疫荧光检测 S 基因表达。通过电转化将 pVAX-S 转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207, 构建 SL7207(pVAX-S) 重组菌, 并在体外感染小鼠腹腔巨噬细胞, 以 RT-PCR、间接免疫荧光检测细胞内 S 基因的转录与表达情况。将 SL7207(pVAX-S) 重组菌以 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 CFU 剂量口服接种 BALB/c 小鼠, 分析其安全性, 并以 1×10^9 CFU 剂量的重组菌 3 次免疫 BALB/c 小鼠, 通过间接 ELISA 检测免疫小鼠的血清 IgG 与肠道粘膜 IgA 抗体。【结果】成功构建重组质粒 pVAX-S, 且重组质粒能在 COS7 细胞中表达。重组菌 SL7207(pVAX-S) 感染巨噬细胞后检测到目的基因的转录、表达。小鼠口服接种不同剂量重组菌, 具有良好的安全性。免疫小鼠于二免后两周可检测到针对 TGEV S 蛋白的特异性血清 IgG 与肠道粘膜 IgA 抗体, 且三免后两周与 SL7207(pVAX1) 空载体免疫组间分别存在显著性差异 ($P < 0.05$) 和极显著性差异 ($P < 0.01$)。【结论】携带 TGEV DNA 疫苗的减毒沙门氏菌小鼠试验显示了良好的免疫原性与安全性。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因; 减毒沙门氏菌; DNA 疫苗; 安全性; 免疫原性
中图分类号: Q939.94 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0072-06

猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis of swine, TGE)是由冠状病毒科猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)引起的以仔猪呕吐、严重腹泻和高致死率为主要特征的消化道传染病, 该病是世界各养猪国家仔猪早期死亡的重要疫病之一^[1]。TGEV 的 S 蛋白含有宿主细胞氨肽酶(pAPN)的识别位点, 在病毒感染、发挥致病性和决定宿主细胞亲嗜性等方面起关键作用^[2-3], 而且 S 蛋白携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇, 是唯一能诱导产生中和抗体和提供免疫保护作用的结构蛋

白, 该蛋白的 N 端包含了 A、B、C、D 4 个主要的抗原决定位点, 是诱导机体产生 TGEV 中和抗体的主要区域^[4]。

针对 TGEV 肠道感染的特点, 通过口服疫苗免疫, 激发肠道粘膜免疫反应特别是 sIgA 的产生是预防该病较为理想的途径^[5]。目前在 TGEV 口服疫苗方面已进行了初步研究, 包括在转基因植物^[6]、减毒沙门氏菌^[7]以及乳酸杆菌中表达 S 蛋白^[8-9]。转基因植物表达的抗原蛋白通过胃部时易受胃酸降解失活, 而且蛋白表达量普遍较低^[10]; 在细菌中表达抗

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0555-9), 四川省教育厅资助科研项目

* 通信作者。Tel: +86-835-2886119; Fax: +86-835-2885302; E-Mail: csanjie@sicau.edu.cn

作者简介: 杨恒(1978-), 男, 四川人, 博士研究生, 主要从事动物传染病学与分子生物学研究。E-mail: 2008yanghengy@163.com

收稿日期: 2008-08-06; 修回日期: 2008-10-15

原蛋白则由于其表达的蛋白无法进行糖基化与翻译后修饰,而影响蛋白的免疫原性^[1]。因此,进一步研究简便有效的 TGEV 口服疫苗仍然十分必要。

近年来,以减毒细菌为载体携带 DNA 疫苗进行口服免疫被证实是激发粘膜免疫的一种理想途径。具有运送效率高,方法简单,免疫效果较好,能同时激发全身免疫和局部粘膜免疫等优点,有着良好的应用前景,其中对减毒沙门氏菌的研究最为引人注目^[11]。为探讨减毒沙门氏菌作为 TGEV 口服 DNA 疫苗载体的可行性,本研究构建出携带 TGEV S 基因 DNA 疫苗的重组减毒沙门氏菌,在小鼠腹腔巨噬细胞中进行了体外表达验证,并对其安全性、免疫原性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、毒株、细胞株 猪传染性胃肠炎四川分离株(SC-H 株)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、真核表达载体 pVAX1、ST 细胞、COS-7 细胞为本实验室保存;pMD19-T 载体购自日本 TaKaRa 公司;减毒沙门氏菌 SL7207[2337-65(WRAY)hisG46 Δ aroA407(TCS aroA544:Tnl0)]由德国 Helmholtz 感染研究中心 Kai Schulze 教授馈赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、去内毒素质粒提取试剂盒、BcaBEST RNA 反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、动物细胞 RNA 抽提试剂盒购自北京天根公司;小量病毒 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜公司;脂质体转染试剂(Lipofectamine 2000)购自美国 Invitrogen 公司;猪抗 TGEV 多克隆抗血清由哈尔滨兽医研究所冯力研究员馈赠;FITC 标记兔抗猪 IgG 抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 酶标二抗购自北京博奥森公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgA 酶标二抗购自美国 Sigma 公司。电子天平、5417R 台式高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司;移液器、PCR 仪、凝胶成像系统 Versadoc1000、酶标仪购自 Bio-Rad 公司;真空冷冻干燥系统购自 Thermo Savant 公司。

1.1.3 实验动物 6 周龄 BALB/c 小鼠(雌雄各半,清洁级)购自成都生物制品研究所。

1.2 TGEV S 基因的克隆与鉴定

培养 ST 细胞增殖病毒,以小量病毒 RNA/DNA 抽提取试剂盒提取病毒 RNA。参照 GenBank 中公布的 TGEV (Purdue 株)cDNA 序列,利用 Oligo 6.0 软件设计一对引物:上游引物(S1):5'-CGGAAGCTTAC

CATGGAAAACTATTTGTG-3'含 HindIII 酶切位点;下游引物(S2):5'-TCGGATCCTTAGCCACTAAGTAGCGTCCT-3'含 BamHI 酶切位点。上下游引物跨幅 2.1 kb,包含 S 基因的主要抗原位点,引物由上海英俊生物技术公司合成。采用 RT-PCR 试剂盒以两步法进行 TGEV S 基因的扩增,PCR 产物经电泳回收后与 pMD19-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,挑取菌落少量提取质粒,进行 PCR 与质粒酶切鉴定。阳性克隆送上海英俊生物技术有限工程公司测序验证。

1.3 真核表达质粒 pVAX-S 的构建与体外表达

对鉴定成功的 TGEV S 基因 T-A 克隆质粒以 HindIII 和 BamHI 进行双酶切,电泳回收纯化 S 基因片段,插入 pVAX1 载体相应的酶切位点,构建重组真核表达质粒 pVAX-S,并进行酶切鉴定。使用去内毒素质粒提取试剂盒分别提取 pVAX1 空载体质粒与构建的真核表达质粒,转染生长达 70%~80% 汇集的 COS-7 细胞,于转染 24~32 h 后,以猪抗 TGEV 多克隆抗血清为一抗,以 FITC 标记兔抗猪 IgG 抗体为二抗,通过间接免疫荧光检测 S 基因的表达。

1.4 携带 TGEV DNA 疫苗减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建

采用电穿孔法分别将 pVAX1 空载体质粒和真核表达质粒 pVAX-S 转入感受态减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207,电转化参数设定为:1.8 KV,200 Ω ,电击时间 3 ms。构建重组沙门氏菌 SL7207(pVAX)与 SL7207(pVAX-S)。

1.5 重组鼠伤寒沙门氏菌体外感染巨噬细胞试验

1.5.1 小鼠腹腔巨噬细胞的获取与沙门氏菌感染 将 12 周龄 BALB/c 小鼠处死后,向腹腔中注射 6 mL RPMI1640 培养液。按摩腹部 2 min,收集腹水,离心收集细胞,用 RPMI1640 培养液调整细胞密度为 2~5 $\times 10^6$ /mL 转入 24 孔板。37 $^{\circ}$ C 培养 3 h 后,用不含抗生素的 RPMI1640 培养液洗涤 1 次,除去未贴壁的细胞,随后加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 继续培养。培养 SL7207(pVAX)与 SL7207(pVAX-S)重组沙门氏菌,离心收集菌体后,以 PBS 重悬,将沙门氏菌与细胞按 50:1 的 MOI(感染复数)对细胞进行感染,37 $^{\circ}$ C 培养 30 min 后,换液,加入含 100 μ g/mL 庆大霉素、10% FBS 的 RPMI1640 培养液培养 2 h 后,加入 10 μ g/mL 的四环素继续培养 32~60 h。

1.5.2 表达检测 收集沙门氏菌感染的巨噬细胞,采用动物细胞 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,以引物 S1、S2 进行 RT-PCR,检测 S 基因的转录。同时,按照方法 1.3 对细胞进行免疫荧光染色,检测目

的蛋白的表达情况。

1.6 重组沙门氏菌对小鼠的安全性试验

将重组沙门氏菌 SL7207(pVAX-S) 分别以 5×10^8 CFU、 1×10^9 CFU、 2×10^9 CFU/只按文献 [13] 中的方法口服接种 6 周龄 BALB/c 小鼠, 每剂量组 8 只, 2 周后以相同的剂量进行第二次口服接种, 同时设立口服 PBS 对照组。每天观察小鼠有无异常反应与健康状况, 连续观察 30 d。同时, 在首次接种后每周每组分别扑杀小鼠 2 只, 无菌采集肝、脾, 以 2 mL 含 0.1% Triton 的 PBS 研磨后静置约 10 min。取 100 μ L 脏器悬液, 适当稀释, 分别涂布含 Kan 的 SS 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 菌落计数。计数至首次接种后 4 周, 分析重组菌在体内消长情况。

1.7 重组沙门氏菌对小鼠的免疫原性试验

1.7.1 疫苗准备: 取 SL7207(pVAX-S) 和 SL7207(pVAX1) 接种于含 100 μ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 100 r/min 振荡培养至菌体 OD 值约 0.7。离心收集菌体, 以灭菌的 PBS(含 5% NaHCO₃) 调整细菌浓度至 1×10^{10} CFU/mL, 备用。

1.7.2 免疫: 将 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 3 组, 每组 12 只, 分别为 SL7207(pVAX-S) 组、SL7207(pVAX1) 组与空白对照组。细菌以口服途径接种, 免疫剂量为 1×10^9 CFU/0.1 mL/只, 空白对照组以 PBS 代替。共免疫 3 次, 每次间隔两周。

1.7.3 样品采集: 各免疫组在首免后 2、4、6 周分别捕杀 3 只小鼠, 经由眼眶静脉采血, 分离血清; 同时采集小鼠完整的小肠, 去除胰腺和多余的脂肪, 于 5 mL PBS 中用剪刀充分剪碎, 置于 50 mL 离心管中剧烈振荡 5 min 以上, 4 $^{\circ}$ C 17949 \times g 离心 20 min, 将上清放置于冷冻干燥机上干燥后, 加入 0.5 mL PBS(含 100 μ g/mL PMSF) 溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.7.4 血清和粘膜抗体效价测定: 培养 TGEV 病毒, 以蔗糖密度梯度离心纯化病毒作为包被抗原, 分别加入待检血清样品(1:40 倍稀释)与小肠粘膜样品, 通过间接 ELISA 方法测定 TGEV 特异的血清和粘膜抗体效价, 所得数据用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 TGEV S 基因的克隆与鉴定

TGEV SC-H 株 S 基因 5' 端 RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得了与预期大小相符合约 2000 bp 的片段。进一步测序结果表明扩增的 TGEV S 基因 5' 端长度为 2124 bp, 编码 707 个氨基酸, 与 GenBank 上发表的常见毒株 TS、96-1933、HN2002、

Miller、NEB72-RT、Purdue、TH-98、TFI 及 TO14 株的核苷酸序列同源性为 98.1%、94.7%、98.3%、98.3%、99.8%、99.8%、99.5%、97.0% 和 98.4%; 推导的氨基酸同源性为 97.7%、94.1%、98.0%、97.9%、99.6%、99.7%、97.1%、99.0% 及 98.3%。

2.2 真核表达质粒的构建与体外表达

构建的重组真核表达质粒以 Hind III 和 BamH I 进行双酶切鉴定, 酶切产物电泳结果显示可切出约 2000 bp 的 S 基因片段与约 3000 bp 的 pVAX1 载体片段, 表明真核表达质粒 pVAX-S 构建成功。

质粒转染 COS-7 细胞后免疫荧光检测显示: 转染了质粒 pVAX-S 的细胞有明显的绿色荧光, 而转染空载体 pVAX1 对照细胞无特异性荧光, 说明 S 基因在转染细胞中获得表达(图 1)。

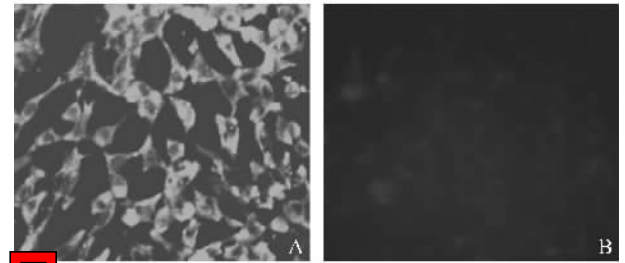


图 1 间接免疫荧光检测 pVAX-S 在 COS-7 细胞中的表达(200 \times)

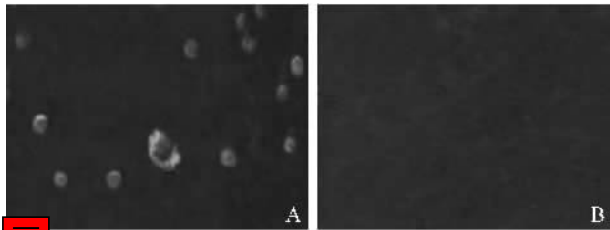
Fig. 1 Indirect immunofluorescence detection the expression of pVAX-S in COS7 cells(200 \times). A: Indirect immunofluorescence result of COS-7 cell transfected with pVAX-S; B: Indirect immunofluorescence result of COS-7 cell transfected with pVAX.

2.3 携带 TGEV DNA 疫苗减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建

通过电转化法将 pVAX-S 转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中, 挑取单个菌落, 在含 Kan 的液体培养基培养后, 少量提取质粒, 进行酶切与 PCR 鉴定。电泳结果显示, PCR 扩增可得到与 S 基因大小相符合约 2000 bp 的条带, 质粒双酶切可得到与约 3000 bp 的载体条带及与 S 基因大小相符合约 2000 bp 的插入片段条带, 表明重组质粒已被成功导入减毒沙门氏菌中。

2.4 重组鼠伤寒沙门氏菌体外感染巨噬细胞试验

SL7207(pVAX-S) 感染小鼠腹腔巨噬细胞后约 46 h, 提取细胞总 RNA, RT-PCR 特异性扩增出与 S 基因大小相符合的目的条带, 在约 51 h 通过间接免疫荧光观察到感染细胞呈现特异性绿色荧光。SL7207(pVAX) 感染的细胞 RT-PCR 结果为阴性, 也未见特异性荧光(图 2)。表明 SL7207(pVAX-S) 将真核表达质粒携带入细胞且质粒在细胞中进行了转录与表达。



2 重组减毒沙门氏菌体外感染小鼠腹腔巨噬细胞间接免疫荧光检测 S 基因表达 (200 ×)

Fig.2 Indirect immunofluorescence detection the expression of S gene after in vitro infection of mouse peritoneal macrophages with recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* (200 ×). A: Indirect immunofluorescence result of mouse peritoneal macrophages infected with SL7207(pVAX-S); B: Indirect immunofluorescence result of mouse peritoneal macrophages infected with SL7207(pVAX).

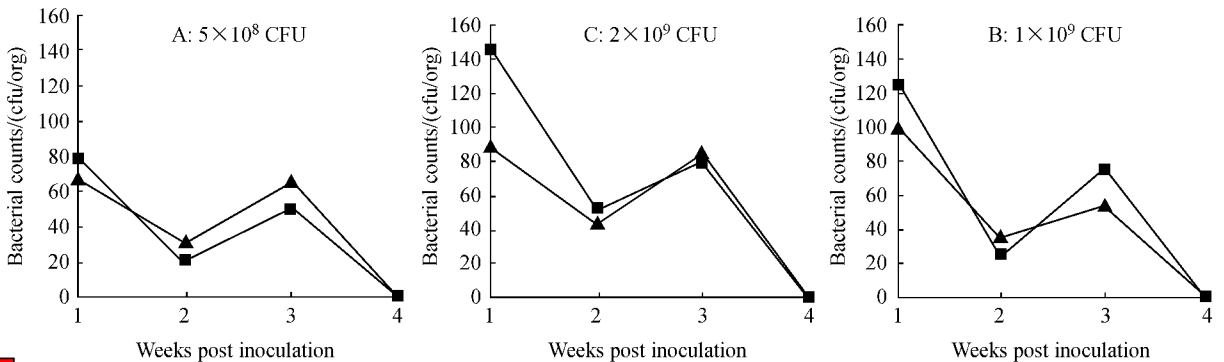


图 3 重组减毒沙门氏菌 SL7207(pVAX-S)口服接种后小鼠脾脏 (▲) 肝脏 (■) 中细菌动态消长

Fig.3 Persistence of the SL7207(pVAX-S) in spleen (▲) and liver (■) of mouse after oral immunization.

2.6 小鼠的免疫试验结果

免疫小鼠血清 IgG 抗体 ELISA 结果显示,在首免后两周,SL7207(pVAX-S)免疫组未能检测到特异性 TGEV 抗体,二免后出现特异性抗体,三免后两周抗体水平明显高于 SL7207(pVAX)空载体,且差异显著 ($P < 0.05$) (图 4-A)。在肠道黏膜抗体应答方面,SL7207(pVAX-S)免疫组在首免后两周可检测到抗

TGEV sIgA 抗体,二免后两周和三免后两周与 SL7207(pVAX)空载体免疫组小鼠之间分别存在差异性显著 ($P < 0.05$) 和极显著性差异 ($P < 0.01$) (图 4-B)。结果表明重组沙门氏菌 SL7207(pVAX-S)能诱导免疫小鼠产生针对 TGEV 的特异性体液与黏膜免疫应答。

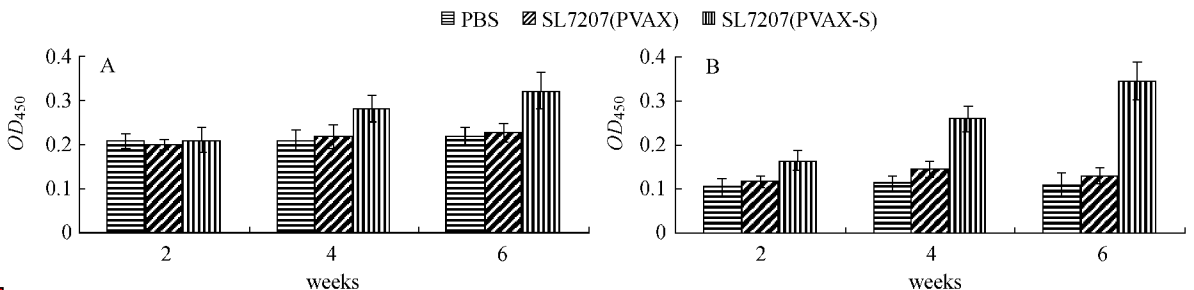


图 4 重组沙门氏菌 SL7207(pVAX-S)对小鼠的免疫原性试验结果

Fig.4 The results of immunogenicity assay of SL7207(pVAX-S) in mouse. A: serum IgG level; B: intestinal mucosal IgA level.

3 讨论

本研究采用 RT-PCR,成功扩增了 TGEV SC-H

株 S 基因 5' 端主要抗原位点片段,扩增长度为 2124 bp 编码 707 个氨基酸。与 GenBank 上发表的常见毒株的核苷酸序列同源性在 98.3% ~ 99.8% 之

间,氨基酸同源性在 94.1% ~ 99.7% 之间,表明 TGEV 不同毒株 S 基因 5' 端有较高保守性。因此, TGEV SC-H 株 S 基因 5' 端可以作为研制 TGE 基因工程疫苗的目的基因。构建的重组质粒 pVAX-S 转染 COS7 细胞后,间接免疫荧光试验表明转染细胞可以表达具有免疫反应性的 S 蛋白,为后续研究工作的开展奠定了基础。

与 DNA 疫苗直接肌肉注射相比较,减毒沙门氏菌作为 DNA 疫苗载体的优势之一在于细菌载体可以直接口服免疫,靶向将质粒直接传递给小肠内免疫诱导部位的巨噬细胞、树突细胞等抗原递呈细胞,借助于宿主细胞表达具有天然构象的目的抗原,从而激发较强的免疫应答^[12]。本研究将携带真核表达质粒的重组沙门氏菌 SL7207(pVAX-S)体外感染小鼠腹腔巨噬细胞后,采用 RT-PCR、与间接免疫荧光检测方法证实沙门氏菌 SL7207 将质粒携带入巨噬细胞,且 S 基因在细胞中进行了表达,表达蛋白具有良好的免疫反应性,为后续重组沙门氏菌免疫试验提供了理论依据。

细菌作为核酸疫苗载体应具有良好的安全性,本研究使用的减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 具有减毒且在动物机体中繁殖受限的双重特征^[13]。口服 5×10^8 CFU、 1×10^9 CFU、 2×10^9 CFU 重组细菌的小鼠试验结果表明,SL7207(pVAX-S)具有相对良好的安全性,沙门氏菌在完成质粒传递后,将被机体的免疫系统清除,同时,不同剂量重组沙门氏菌在第二次接种后一周脾脏、肝脏分离出的细菌数明显少于第一次接种后一周,提示免疫系统对细菌的清除能力随免疫次数增加也逐步加强。

本研究利用所构建的含有 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌 SL7207(pVAX-S)口服免疫 BALB/c 小鼠,二免、三免后均能检测到血清和小肠粘膜抗体应答,且三免后血清和小肠粘膜抗体水平与空载体和 PBS 空白组之间差异显著或极显著,这说明减毒沙门氏菌在体内能成功地释放所携带的 DNA 疫苗,既可以激发小鼠产生局部免疫应答,也可以激发小鼠产生全身性免疫应答,显示了较好的免疫原性。研究表明,通过对真核表达载体的改造以及引入细胞因子可有效提高与调整减毒沙门氏菌为载体诱导的免疫应答^[14-16]。因此下一步的工作中,我们将改造 pVAX1 载体为双启动子载体,并改造其复制子降低其在细菌中拷贝数,同时引入 IL-6、GM-CSF 等细胞因子以期进一步提高减毒沙门氏菌为载体诱导的免疫应答反应。

参考文献

- [1] Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, et al. 猪病学. 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [2] Delmas BJ, Gelfi RL, Haridon LK, et al. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 1992, 357: 417-420.
- [3] Kreml C, Schultze B, Laude H, et al. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Journal of Virology*, 1997, 71(4): 3285-3287.
- [4] Delmas B, Rasschaert D, Godet M, et al. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *Journal of General Virology*, 1990, 71(Pt 6): 1313-1323.
- [5] Saif LJ. Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1996, 54: 163-169.
- [6] Lamphear BJ, Jilka JM, Kesl L, et al. A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Vaccine* 2004, 22: 2420-2424.
- [7] Smerdou C, Urniza A, Curtis R III, et al. Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent S. typhimurium delta cya delta crp: persistence, stability and immune response in swine. *Veterinary Microbiology*, 1996, 48(1-2): 87-100.
- [8] Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intra-gastric administration of Lactobacillus casei expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine* 2005, 23(11): 1335-1342.
- [9] 唐丽杰, 欧笛, 葛俊伟等. 表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸球菌的构建及免疫原性分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 42(2): 340-344.
- [10] Nilesh PT, Michael PT. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell* 2004, 79: 125-145.
- [11] Schoen C, Stritzker J, Goebel W, et al. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Journal of Medical Microbiology* 2004, 294: 319-335.
- [12] Weiss S. Transfer of eukaryotic expression plasmid to mammalian host by attenuated *Salmonella* spp. *Journal of Medical Microbiology* 2003, 293: 95-106.

- [13] Stocker. Aromatic-dependent *Salmonella* as anti-bacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them. *Journal of Biotechnology* 2000 83 :45 - 50.
- [14] 唐丽华 潘志明 程宁宁等. 稳定携带 H5 亚型禽流感病毒候选 DNA 疫苗减毒沙门氏菌的构建及其免疫原性. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47 (4) :662 - 666.
- [15] Helen SG ,Richard WT ,Katherine AB ,et al. Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated *Microbial Pathogenesis* ,2003 ,34 : 115 - 119.
- [16] Basel K ,Ernest A ,Nada M ,et al. Cytokine expression by attenuated intracellular bacteria regulates the immune response to infection :the *Salmonella* model. *Molecular Immunology* 2001 38 :931 - 940.

Construction , safety and immunogenicity analysis of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring TGEV DNA vaccine

Heng Yang ,Jiawen Liu ,Sanjie Cao ,Xiaobo Huang ,Xintian Wen *

(Laboratory of Animal Infectious Disease and Gene Chip ; Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province ,College of Veterinary Medicine ,Sichuan Agricultural University ,Ya'an 625014 ,China)

Abstract [Objective] To study the feasibility of using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier for oral immunization of TGEV DNA vaccine. [Methods] The 2.1 Kb fragments of the TGVE SC-H strain S gene that encompasses all the four major antigenic domains were amplified by RT-PCR and cloned into eukaryotic expression vector pVAX1. The recombinant plasmid pVAX-S was transfected into COS7 cells and the expression of recombinant plasmids was identified by indirect immunofluorescence assay. Then pVAX-S was transformed by electroporation into attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207. The recombinant was screened and designated as SL7207(pVAX-S). Mouse peritoneal macrophages were infected with SL7207(pVAX-S), the transcription and expression of S gene were detected by RT-PCR and indirect immunofluorescence. BALB/c mouse were inoculated orally with SL7207(pVAX-S) at dosage of 5×10^8 , 1×10^9 and 2×10^9 CFU for safety analysis. In a vaccination test ,BALB/c mouse were immunized orally with recombinant bacterium at dosage of 1×10^9 CFU ,for 3 times and specific serum IgG and intestinal mucosal IgA antibody were detected by indirect ELISA. [Results] Recombinant plasmid pVAX-S was constructed correctly and expressed in COS7 cells. The transcription and expression of S gene were detected after mouse peritoneal macrophages were infected with SL7207(pVAX-S). The recombinant bacterium was safe to mouse at dosage of 2×10^9 CFU. Specific serum IgG and intestinal mucosal IgA antibody against TGEV S protein were detected in SL7207(pVAX-S) immunized group at 2 weeks post-boosting , and there were significant difference ($P < 0.05$) in serum IgG and most significant difference ($P < 0.01$) in intestinal mucosal IgA at 2 weeks after the third immunization , compared with SL7207(pVAX) control group. [Conclusion] The recombinant *Salmonella* carrying TGEV S gene DNA vaccines had good immunogenicity and safety in mouse.

Keywords : Transmissible gastroenteritis virus ; S gene ; attenuated *Salmonella* ; DNA vaccine ; safety ; immunogenicity

(本文责编 :王晋芳)