

鸡新城疫口服 DNA 疫苗的安全性、稳定性与免疫效力

梁雪芽 方维焕* 江玲丽

(浙江大学动物预防医学研究所 杭州 310029)

摘 要 将含新城疫病毒(NDV) $F_{48}E_9$ 株融合蛋白(F)基因的真核表达质粒 pcDNA3-F 的减毒鼠伤寒沙门氏菌 ZJ111 株(ZJ111/pcDNA3-F)口服接种小鼠和雏鸡。结果表明:利用该减毒株作为载体传递 DNA 疫苗具有相对安全性。用酶切和 PCR 鉴定法证实,在体内外无抗生素存在的条件下重组质粒在受体菌 ZJ111 菌株内比较稳定。ZJ111/pcDNA3-F 以每羽 10^8 cfu 免疫雏鸡,2 周后二免,二免后 4 周攻击致死剂量的强毒株 $F_{48}E_9$,观察其免疫效力。结果表明:重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株不仅能诱导雏鸡产生抗 NDV 抗体,而且能诱导法氏囊 B 淋巴细胞和胸腺 T 淋巴细胞的增殖反应,对强毒株攻击的保护率为 66.7%,高于 pcDNA3-F 裸质粒 DNA 疫苗注射免疫组(50%)。上述结果初步提示减毒沙门氏菌为载体传递 DNA 疫苗具有良好的安全性、稳定性和免疫原性,为研制低成本、实用化的口服禽类 DNA 疫苗奠定了基础。

关键词 新城疫病毒,融合蛋白,减毒沙门氏菌,DNA 疫苗载体,免疫效力

中图分类号 Q78;S858.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0024-06

利用侵袭性胞内细菌作为 DNA 疫苗的细菌载体是目前基因免疫研究的热点之一。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)是一种可产生局部或全身感染的胞内病原体,能够通过粘附和侵袭等机制定居在肠相关淋巴组织,并转而到达肝脏和脾脏,有效地刺激机体产生保护性免疫应答反应。研究表明,以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体携带含有其它细菌、病毒或寄生虫等保护性抗原基因的重组质粒作为 DNA 疫苗进入机体后,能够激发机体产生针对沙门氏菌载体和外源抗原的体液免疫、细胞免疫和粘膜免疫^[1-2]。国外学者以减毒沙门氏菌为载体在真核细胞中成功地表达了一些外源基因,结果证实利用这类细菌作为载体传递 DNA 疫苗具有良好的免疫原性^[3-5]。

新城疫(Newcastle Disease, ND)是一种危害养禽业的烈性病毒性传染病,其病原为新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)属副粘病毒科、腮腺炎病毒属,为有囊膜的单股负链 RNA 病毒。位于 NDV 囊膜上的两种糖蛋白——融合蛋白(F)和血凝素-神经氨酸酶(HN)与病毒的致病性和免疫原性密切相关^[6]。其中 F 蛋白具有融合功能,主要参与病

毒脂蛋白囊膜与宿主细胞膜的融合,是决定 NDV 病毒毒力的主要因子和主要宿主保护性抗原之一^[7-8]。因此,以 F 基因为目的基因研制口服 DNA 疫苗是进行 ND 免疫学防治的基本策略之一。本研究旨在探讨以沙门氏菌 dam 和 phoP 基因双突变株为载体传递新城疫病毒 F 基因疫苗的安全性、稳定性和免疫效力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、NIH 小鼠、非免疫来航鸡和鸡胚:NDV 中国标准强毒 $F_{48}E_9$ 株购自中国兽药监察所;NIH 小鼠由浙江大学医学院实验动物中心提供;非免疫来航鸡及鸡胚由浙江省农科院提供,试验前经检测无 NDV 抗体。

1.1.2 菌株:减毒沙门氏菌 ZJ111 菌株 dam-和 phoP-双突变株,系本室与西班牙 Sevilla 大学生物学院遗传系 J. Casadesus 教授合作构建而成。携带真核表达质粒 pcDNA3-F 及空白质粒 pcDNA3 的减毒沙门氏菌 ZJ111 菌株和 *E. coli* DH5 α 由本室保存,见文献[9]。

1.1.3 主要试剂 :HRP 标记的兔抗鸡 IgG 购自 Pro-mega 公司。RPMI 1640、Hank's 液购自 Gibco 公司。MTT、ConA、PMA、BSA 等购自 Sigma 公司。限制酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌液制备和活菌计数 :重组菌 37℃ 培养 18 ~ 24 h 后离心,用 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 重悬,调节 OD_{600nm} 至 0.85 约相当于 3×10^9 cfu/mL,并以倍比稀释法测定菌液中的活菌数。

1.2.2 重组菌的安全性试验

小鼠安全性试验 :将 22 ~ 24g NIH 雌性小鼠随机分成 9 组,每组 20 只,其中重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株 4 组,每组分别口服 10^6 cfu、 10^7 cfu、 10^8 cfu 和 10^9 cfu (0.3mL/只);同时设 4 个 ZJ111/pcDNA3 对照组,剂量同上;另设正常对照组口服 PBS,连续观察 1 个月,记录小鼠病死情况。

雏鸡安全性试验 :将重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株分别以 10^6 cfu、 10^7 cfu 和 10^8 cfu 口服接种 3 日龄非免疫来航鸡,每个剂量组 30 只,2 周后以相同的细菌量进行第二次接种,同时设立口服 PBS 对照组 30 只。每天观察鸡的反应,并在接种重组菌后每周分别人工剖杀,无菌采集肝脏、脾脏和粪便,用适量灭菌 0.01 mol/L PBS 稀释、匀浆后接种于含氨苄青霉素 (Amp) 的胆硫乳琼脂平板,采用倾注平板法进行菌落计数,共计数至第 7 周。另外,为观察疫苗口服后对鸡增重的影响,ZJ111/pcDNA3-F 菌株分别以上述同样的剂量口服接种 3 日龄非免疫来航鸡(每组 30 只),2 周后二免,并设 PBS 对照,二免后第 4 周称取体重。

1.2.3 重组菌的稳定性试验

体外稳定性试验 :重组菌 ZJ111/pcDNA3-F 菌株分别接种于含和不含 Amp 的 LB 平板上,各连续传 10 代(每代 37℃ 培养 18 ~ 24 h),观察在平板上是否生长,分别随机挑取单菌落用碱裂解法抽提质粒,并转化 *E. coli* DH5 α ,重新抽提质粒后进行限制酶分析和 F 基因的 PCR 鉴定,PCR 扩增 F 基因方法见文献 [9]。

体内稳定性试验 :重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株二次免疫非免疫来航鸡,1 月后进行人工剖杀,用含 Amp 的胆硫乳琼脂平板分离肝脏、脾脏和粪便的细菌,抽提质粒进行鉴定。

1.2.4 免疫效力试验

试验分组、免疫及采样 :试验共分为 7 组,即口服重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株 10^8 cfu 组、口服 ZJ111/

pcDNA3 菌株 10^8 cfu 对照组、肌肉注射(im)pcDNA3-F 裸质粒组[pcDNA3-F-im 200 μ g/只]、pcDNA3 裸质粒肌肉注射对照组[pcDNA3-im]、NDV II 系疫苗组(浙江万马药业有限公司,批号 200101)、攻毒对照组和空白对照组,每组 30 只鸡。NDV II 系疫苗免疫组按厂家说明书免疫,攻毒和空白对照组口服 PBS 溶液,所有免疫组在 3 日龄首免,2 周后每组均以相同的剂量和途径进行二免。免疫后每隔一周分别经由翅静脉无菌采血(每组 5 只),分离血清,-20℃ 保存用于抗体检测。

真核表达质粒的制备及纯化 :用作肌肉注射免疫的 DNA 疫苗(pcDNA3-F 和 pcDNA3)按文献报道的方法进行^[10]。

抗体检测 以蔗糖密度梯度离心法纯化 NDV 用作 ELISA 包被抗原,采用间接 ELISA 法检测 NDV 抗体。

淋巴细胞增殖试验 :MTT 法测定各试验组鸡的胸腺 T 淋巴细胞及法氏囊 B 淋巴细胞的增殖反应,采用文献报道的方法进行^[11]。

攻毒保护试验 :试验组于二免后第 4 周攻击新城疫标准强毒株 F₄₈E₉,攻毒剂量为 10^5 EID₅₀,攻毒后每天观察鸡的反应,连续观察 14 d,统计各组存活数,计算免疫保护率。

1.2.5 统计学分析 :用方差分析法对免疫后各组的相关数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 对小鼠和雏鸡的安全性

口服重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株及 ZJ111/pcDNA3 菌株 10^6 cfu、 10^7 cfu 和 10^8 cfu 组所有小鼠都存活,活动正常,而 10^9 cfu 剂量组部分小鼠口服后第 1 ~ 3 天精神萎靡,行动迟缓,粪便较软。口服 10^9 cfu 的重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株组于第 5 天死亡 1 只,而口服 10^9 cfu 的 ZJ111/pcDNA3 对照组于第 3 天死亡 1 只,其它试验小鼠一个月后均存活。

重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株分别以 10^6 cfu、 10^7 cfu 和 10^8 cfu 的浓度口服接种非免疫来航鸡后,无任何不良反应。在第二次接种后 4 周称取鸡体重分别为 0.35 ± 0.008 kg、 0.36 ± 0.009 kg、 0.35 ± 0.006 kg,正常对照组为 0.35 ± 0.009 kg,各组间比较无统计学差异($P > 0.05$),说明不影响鸡的增重。对肝脏、脾脏和粪便进行菌落计数结果表明,在第二次接种后 3 周,雏鸡的肝脏、脾脏中已没有细菌(图 1),第二次接种后 4 周,粪便中也仅有少量的细菌,提示口服的沙门氏菌在完成抗原基因呈递后将被鸡体的免疫系

统清除。初步表明以减毒沙门氏菌 *dam* 和 *phoP* 双突变株作为传递 DNA 疫苗的载体具有相对安全性。

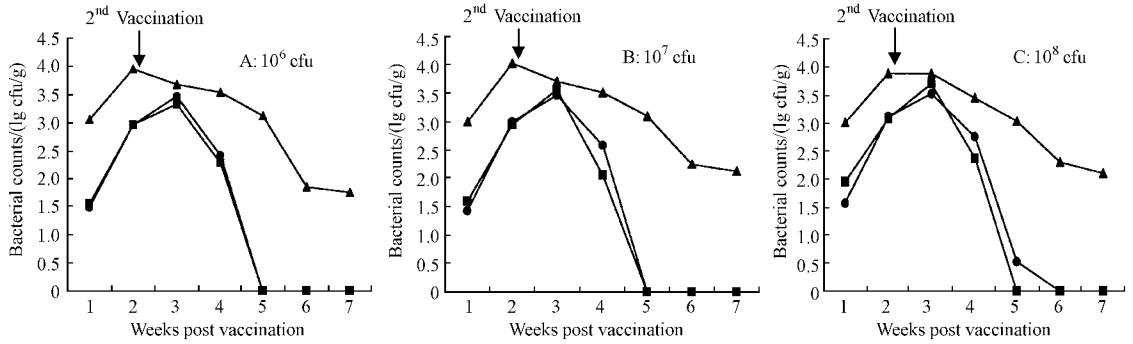


图 1 重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株口服接种后鸡体粪便(▲)、肝脏(●)和脾脏(■)中的细菌消长动态
 Fig.1 Persistence of the recombinant *S. typhimurium* ZJ111/pcDNA3-F in feces(▲), liver(●) and spleen(■) of chickens after oral immunization

2.2 重组菌在体内外的稳定性

重组菌 ZJ111/pcDNA3-F 于 Amp⁻ 和 Amp⁺ 平板上分别连续传 10 代, 抽提质粒后进行限制性酶切分析和 PCR 鉴定, 重组质粒并没有丢失(图略), 表明该重组菌在体外是稳定的。ZJ111/pcDNA3-F 菌株免疫 1 个月 后从鸡肝脏和粪便分离到的沙门氏菌和质粒转化大肠杆菌后进行酶切鉴定以及 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳均可见有 1.7kb 大小的 F 基因(图 2-3) 表明该重组细菌在体内也很稳定。

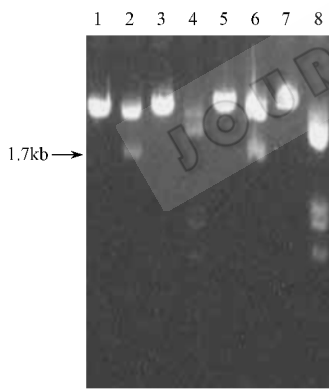


图 2 体内分离菌中重组质粒的酶切鉴定
 Fig.2 Identification of recombinant plasmids from *S. typhimurium* isolates of liver (lanes 1~4) and fecal (lanes 5~8) origin by restriction enzymes

1 5. *EcoR* I; 2 6. *EcoR* I + *Xho* I; 3 7. *Xho* I; 4 8. *EcoR* I + *Acc* I

2.3 免疫效力

2.3.1 免疫鸡抗体动态变化: 图 4 表明, ZJ111/pcDNA3-F 菌株首免后 1~2 周及二免后 1 周均未检测到特异性 NDV 抗体, 至二免后 2 周开始出现抗体, 随后开始上升, 至二免后第 4 周达到较高水平; pcDNA3-F 注射组抗体趋势与重组菌相似。NDV II 系疫苗组于免疫后第 1 周便出现抗体, 第 3 周抗体

达到最高, 随后维持在较高水平。而 ZJ111/pcDNA3 菌株对照组、pcDNA3 质粒对照组和正常对照组均没有检出特异性抗体。

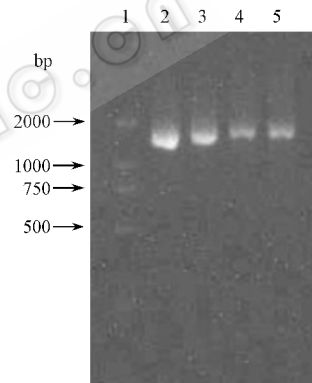


图 3 肝脏和粪便分离菌的重组质粒中 F 基因的 PCR 鉴定
 Fig.3 PCR identification of the target gene F from recombinant plasmids of *S. typhimurium* isolates of liver and fecal origin
 1. DNA Marker DL2000; 2. ZJ111/pcDNA3-F from liver; 3. ZJ111/pcDNA3-F from feces; 4. *E. coli*/pcDNA3-F transformed from "2"; 5. *E. coli*/pcDNA3-F transformed from "3"

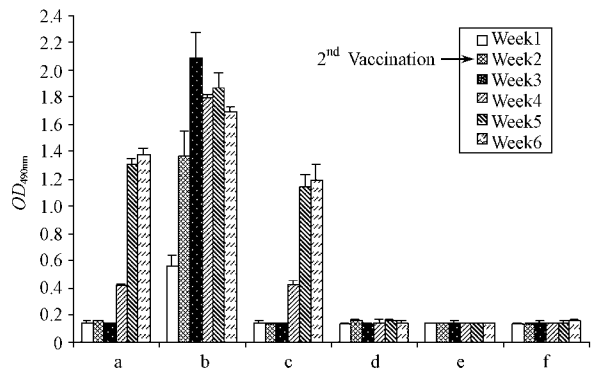


图 4 不同疫苗免疫后 NDV 抗体的动态变化
 Fig.4 NDV antibody levels of chickens immunized with different types of vaccines
 a. ZJ111/pcDNA3-F b. NDV vaccine; c. pcDNA3-f-im; d. pcDNA3-im; e. ZJ111/pcDNA3 f. PBS

2.3.2 淋巴细胞增殖反应:图 5 表明,口服免疫 ZJ111/ pcDNA3-F 和 ZJ111/ pcDNA3 的鸡胸腺 T 淋巴细胞对 ConA 刺激的增殖反应在试验的第 6 周(即二免后第 4 周)显著高于 PBS 对照组,而 NDV II 系苗和 pcDNA3-F 肌肉注射免疫后 T 淋巴细胞的增殖反应虽有所增强,但不如口服 DNA 疫苗组显著(图 5-A)。鸡法氏囊 B 淋巴细胞对 PMA 刺激的增殖反应也与上述结果类似,即口服免疫 ZJ111/ pcDNA3-F 和 ZJ111/ pcDNA3 的促进作用显著高于 PBS 对照组和其它疫苗组,而且在试验的第 4 周(即二免后第 2 周)就可见有显著作用(图 5-B)。

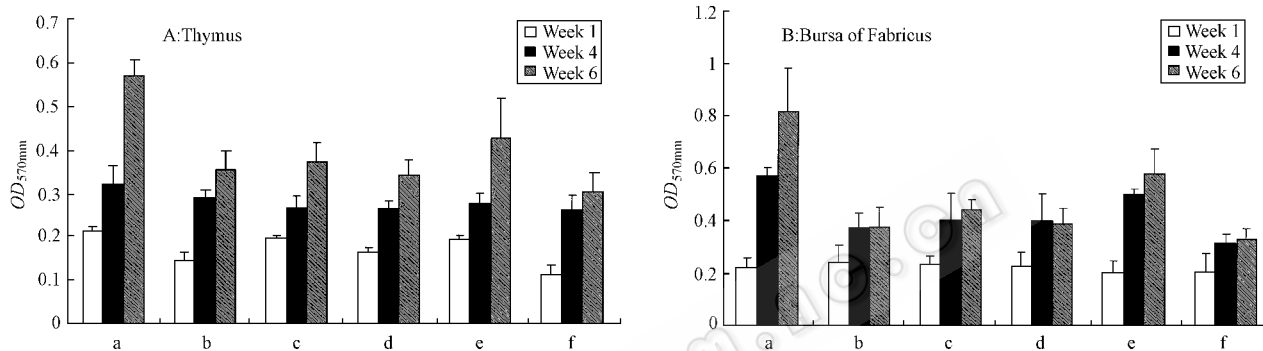


图 5 不同疫苗免疫后胸腺(A)和法氏囊(B)淋巴细胞增殖反应

Fig.5 Proliferation of lymphocytes from thymus(A) and bursa of Fabricius(B) of chickens immunized with different types of vaccines
a. ZJ111/pcDNA3-F b. DNV vaccine; c. pcDNA3-F-im; d. pcDNA3-im e. ZJ111/pcDNA3 f. PBS

表 1 不同疫苗免疫后对强毒攻击的保护效果

Table 1 Protective efficacy of immunized chickens against virulent NDV challenge

Groups	No. of chicken	Vaccination dose	Challenge dos(EID ₅₀ /chicken)	Survivors	Protection/ %
ZJ111/pcDNA3-F	30	10 ⁸ cfu	10 ⁵	20	66.7
pcDNA3-F-im	30	200μg	10 ⁵	15	50.0
NDV vaccine	30	recommended dose	10 ⁵	28	93.3
ZJ111/pcDNA3	30	10 ⁸ cfu	10 ⁵	0	0.0
pcDNA3-im	30	200μg	10 ⁵	0	0.0
Challenge control	30	—	10 ⁵	0	0.0
Normal control	30	—	—	30	—

3 讨论

利用减毒鼠伤寒沙门氏菌作为口服 DNA 疫苗载体已成为新型疫苗研制的重要途径之一。我们的前期研究结果表明:以减毒鼠伤寒沙门氏菌作为载体可以在体外将 F 基因递呈给 Vero 细胞进行转录和表达,表达的产物具有免疫原性^[9],为研制 NDV 的口服 DNA 疫苗提供了可靠的基础。

DNA 腺嘌呤甲基化酶(dam)基因和转录激活因

2.3.3 不同疫苗免疫后对强毒攻击的保护率:重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株免疫组和肌肉注射 pcDNA3-F 组在攻毒后第 3 天有部分鸡只发病,攻毒后第 14 天各组免疫鸡和对照组鸡的存活情况见表 1。由表可见,口服 DNA 疫苗具有 66.7% 的保护率,高于 DNA 注射免疫(50%);而 ZJ111/pcDNA3、pcDNA3 和攻毒对照组的雏鸡在攻击强毒株 F₄₈E₉ 后,陆续表现出新城疫的典型症状,攻毒后第 2 天开始便有鸡只死亡,攻毒后 1 周全部死亡;NDV II 系苗的保护率为 93.3%。

子(phoP)基因是控制沙门氏菌毒力的主要因子,本试验中的 *S. typhimurium* ZJ111 在这两个基因突变后的毒力显著下降(其 LD₅₀为 5.5 × 10⁹,而其相应野生型菌株的 LD₅₀为 2.5 × 10⁴)。本试验结果表明,ZJ111/pcDNA3-F 菌株只有在 10⁹ cfu 高剂量口服后引起个别小鼠的死亡,其它各口服剂量组菌没有出现死亡,因此,该减毒株仍然是安全的。而以高达 10⁸ cfu 的重组菌数免疫雏鸡后未见任何不良反应,也不影响鸡只的增重,脾脏、肝脏等主要器官的沙门

氏菌在二免后 2 周已被鸡体的免疫系统清除,至二免后 5 周粪便中也只检出极少数的菌落。这些结果均显示,利用 *dam* 和 *phoP* 基因双突变株作为载体传递 DNA 疫苗具有相对安全性。

对于口服 DNA 疫苗,外源抗原基因的稳定表达对于持续有效地激发机体的免疫应答十分重要。载体-宿主平衡致死系统构建的减毒鼠伤寒沙门氏菌可以使外源抗原在没有抗生素的条件下稳定表达,从而使其作为活疫苗载体成为可能^[12]。我们发现携带重组质粒 pcDNA3-F 的 ZJ111 菌株在无抗生素存在的条件下在受体菌内也是稳定的,酶切和 PCR 鉴定均见有约为 1.7kb 的 F 基因。减毒株 ZJ111 中重组质粒 pcDNA3-F 的稳定存在为其作为载体递呈外源基因、激发机体的免疫应答提供了前提。

以沙门氏菌为载体传递 NDV DNA 疫苗可诱导特异的保护性免疫应答反应,具体表现在三个方面。其一,诱导了对 NDV 强毒的攻击保护力,重组 ZJ111/pcDNA3-F 菌株可提供 66.7% 的免疫保护,效果优于 pcDNA3-F 肌肉注射组(保护率为 50%);其二,诱导了特异性的 NDV 抗体,在二免后 4 周可达到较高水平;其三,诱导了法氏囊 B 淋巴细胞和胸腺 T 淋巴细胞的增殖反应,其强度高于 ZJ111/pcDNA3 对照组。以上结果证实减毒沙门氏菌为载体传递鸡新城疫病毒 DNA 疫苗是可行的。

沙门氏菌为载体传递 DNA 疫苗具有很多潜在的优势。它可直接将质粒 DNA 运载至免疫相关器官的 APC 细胞,特别是巨噬细胞对沙门氏菌有特殊的亲和性,能更有效地将抗原呈递给树突状细胞,比 DNA 疫苗传统免疫途径的抗原呈递更为有效。同时减毒沙门氏菌还具有天然的佐剂作用、激发粘膜免疫等特点^[13-14]。因此,重组 ZJ111/pcDNA3-F 免疫鸡体后诱导产生的保护率比 pcDNA3-F 裸质粒 DNA 疫苗免疫组高。从图 5 同样可以看出:沙门氏菌介导(ZJ111/pcDNA3-F 和 ZJ111/pcDNA3)的淋巴细胞增殖反应要优于 NDV II 系弱毒苗,说明传统弱毒苗以抗体反应为主,而口服 DNA 疫苗可以同时激发体液和细胞免疫。然而,NDV II 系苗的免疫保护效果达 93%,优于本试验的 ZJ111/pcDNA3-F 口服基因免疫组。因此,如何进一步提高口服 DNA 疫苗的免疫效果将是我们今后继续研究的课题。在大型集约化养鸡场,以减毒沙门氏菌为载体进行口服免疫,既省时又方便,而且价廉、易于规模化推广^[15],有望代替肌肉注射或基因枪等 DNA 疫苗的免疫方式,是研制低成本、实用化的口服禽类 DNA 疫苗的一条新途径。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hone D M, Harris A M, Chatfield S *et al.* Construction of genetically defined double *aro* mutant of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, 1991, **9**(11): 810 - 816
- [2] Attridge S R, Davies R, Labrooy J T. Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine*, 1997, **15**(2): 155 - 162
- [3] Paglia P, Medina E, Arioli I *et al.* Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood*, 1998, **92**(9): 3172 - 3176
- [4] Shata M T, Reitz M S Jr, DeVico A L *et al.* Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8⁺ T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine vector. *Vaccine*, 2001, **20**(3-4): 623 - 629
- [5] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S *et al.* Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Biotechnol*, 2000, **83**(1): 19 - 26
- [6] Peeters B P, de Leeuw O S, Koch G. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol*, 1999, **73**(6): 5001 - 5009
- [7] Lin C, Jeffrey J G, Jenny M B. The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure*, 2001, **9**(3): 255 - 266
- [8] Peeters B P, de Leeuw O S, Versteegen I *et al.* Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, 2001, **19**(13): 1616 - 1627
- [9] FANG W H (方维焕), LIANG X Y (梁雪芽). Expression of the Newcastle disease virus fusion glycoprotein in Vero cells using attenuated *Salmonella typhimurium* as transgenic carrier. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学和生物物理学报), 2002, **34**(4): 488 - 493
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Adair B M, McNeilly F, McConnell D G *et al.* Effects of chicken anemia agent on lymphokine production lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, 1991, **35**(4): 783 - 792
- [12] Curtiss R 3rd, Nakayama K, Kelly S M. Recombinant avirulent *Salmonella* vaccine strains with stable maintenance and high level expression of cloned genes *in vivo*. *Immunol Invest*, 1989, **18**(1-4): 583 - 96
- [13] Darji A, Guzman C A, Gerstel B *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, 1997, **91**(6): 765

- [14] Darji A , zur Lage S , Garbe A I *et al.* . Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol.* , 2000 , **27**(4) : 341 – 349
- [15] Jain V , Mekalanos J J. Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae*-and *Salmonella enterica* serovar typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. *Infect Immun.* , 2000 , **68**(2) : 986 – 989

Safety , Stability and Immunogenicity of an Oral DNA Vaccine Against Newcastle Disease

LIANG Xue-Ya FANG Wei-Huan* JIANG Ling-Li

(*Institute of Preventive Veterinary Medicine , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China*)

Abstract Mice and 3-day-old chickens were orally inoculated with the recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* strain ZJ111 carrying pcDNA3-F expression plasmid encoding the fusion protein of Newcastle disease virus (NDV). The results showed that ZJ111/pcDNA3-F was relatively safe. The recombinant plasmid pcDNA3-F was stable within the host strain ZJ111 *in vitro* and *in vivo* as shown by restriction enzyme analysis and PCR identification of the F gene. In an experimental vaccination study , 3-day-old chickens were orally immunized with ZJ111/pcDNA3-F with a dose of 10^8 cfu per chicken and boosted two weeks later. At week 4 post boosting , all chickens were challenged with a lethal dose of a virulent NDV strain F₄₈E₉ . The results showed that oral vaccination with ZJ111/pcDNA3-F induced stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular immunization with naked pcDNA3-F plasmid. It also exhibited higher protection rate than the latter (66.7% vs 50%). This study indicates that the DNA vaccine using attenuated *Salmonella typhimurium* as delivery carrier had good safety , stability and immunogenicity and exhibited good potential of low cost and convenience for poultry disease control.

Key words Newcastle disease virus , fusion glycoprotein , attenuated *Salmonella typhimurium* , DNA vaccine vector , immunogenicity

Received : 08-03-2002

This work was supported by a grant from the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Key Project No. ZA0105).

* Corresponding author. Tel : 86-571-86971242 ; Fax 86-571-86971242 ; E-mail : whfang@zju.edu.cn