

表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组干酪乳杆菌 诱导小鼠产生特异性抗体

徐义刚^{1,2}, 崔丽春², 葛俊伟¹, 唐丽杰¹, 赵丽丽¹, 李一经¹

(¹东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; ²东北林业大学研究生处, 哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】研究以干酪乳杆菌作为传递抗原活载体表达猪细小病毒主要免疫保护性抗原 VP2 蛋白的免疫特性。【方法】将构建的重组猪细小病毒 (PPV) VP2 基因的细胞表面表达型载体 pPG-VP2 电转化干酪乳杆菌 *L. casei* 393, 获得阳性重组菌 pPG-VP2/*L. casei* 393。重组菌以 2%乳糖为诱导物, 在 MRS 培养基中进行诱导, 经 SDS-PAGE、Western blot 及间接免疫荧光分析, 目的蛋白获得表达。将重组菌及空质粒菌株分别口服接种 BALB/c 小鼠, 收集粪便及肠黏液样品测定小鼠产生抗 VP2 的特异性 sIgA, 采集血液样品测定小鼠产生抗 VP2 的特异性 IgG, 并对获得的抗体进行 PPV 中和活性的测定。【结果】重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*393 免疫小鼠能够产生明显的抗 PPV 的 sIgA 和 IgG 抗体水平, 其对 PPV 的中和效价分别为 1 : 24 和 1 : 128。【结论】为 PPV 重组乳酸菌口服疫苗的研制提供了重要的物质基础。

关键词: 猪细小病毒; VP2 蛋白; 干酪乳杆菌; 黏膜免疫

The Immune Response Induced in Mice Orally Immunized with *Lactobacillus casei* Expressing Porcine Parvovirus VP2 Protein

XU Yi-gang^{1,2}, CUI Li-chun², GE Jun-wei¹, TANG Li-jie¹, ZHAO Li-li¹, LI Yi-jing¹

(¹Department of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

²Graduate School of Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract: 【Objective】*Lactobacillus casei* 393 was selected as oral vaccine carrier for the expression of porcine parvovirus (PPV) major immune protective antigen VP2 protein and immune character was analyzed. 【Method】The constructed plasmid pPG-VP2 of cell-surface expression was electroporated into *L. casei* 393 generating recombinant pPG-VP2/*L. casei*393. The interest protein was detected by SDS-PAGE, Western blot and indirect immunofluorescence after induced by 2% lactose in MRS broth. Oral immunization of BALB/c mice was received with recombinant strain harboring pPG-VP2 and *L. casei* 393 harboring pPG. Specific anti-PPV VP2 secret immunoglobulin A (sIgA) antibody was detected by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the feces and intestines mucus of mice after orogastric immunization, and anti-PPV VP2 immunoglobulin G (IgG) antibody was detected by indirect ELISA in the serum of immunized mice. In order to confirm the efficacy of the induced antibodies collected from mice immunized with pPG-VP2/*L. casei*393 in inhibiting the virus, the neutralization ability of antibodies to PPV was tested. 【Result】Mice immunized with pPG-VP2/*L. casei*393 could produce remarkable anti-PPV antibody level. The result of neutralization ability test showed that the neutralization ability of serum antibody was 1 : 128 and the neutralization ability of intestinal lavages antibody was 1 : 24. 【Conclusion】The experiment has established an important material bases for the development of PPV oral vaccine.

Key words: Porcine parvovirus; VP2 protein; *Lactobacillus casei* 393; Oral immunization

收稿日期: 2006-12-29; 接受日期: 2007-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371074)

作者简介: 徐义刚 (1978-), 男, 吉林汪清人, 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; 通讯作者李一经 (1962-) 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 研究方向为分子病毒学。Tel: 0451-55190385; E-mail: yijingli@163.com

0 引言

【研究意义】依据猪细小病毒经黏膜感染的特点, 选择安全无毒, 能够在肠道中存活并能表达和传递抗原物质的乳酸菌载体系统, 进行猪细小病毒重组乳酸菌口服疫苗的研制, 为获得抗猪细小病毒的口服活菌疫苗提供物质基础。【前人研究进展】猪细小病毒病是由细小病毒科猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 引起的以怀孕母猪流产、产死胎、木乃伊胎及新生仔猪死亡为主要特征的病毒性传染病^[1,2]。该病流行面广、危害严重给养猪业带来重大经济损失^[3]。疫苗免疫接种是预防本病的主要措施, 常规疫苗主要有弱毒疫苗和灭活疫苗两种。但常规疫苗的广泛使用, 不仅对猪群是否感染细小病毒的诊断带来干扰, 同时灭活疫苗效果不稳定, 弱毒活疫苗接种机体后存在排散病毒、病毒毒力返强等诸多安全隐患。因此, 安全、有效、实用的新型疫苗仍是猪细小病毒病免疫预防研究的主要方向。【本研究切入点】猪细小病毒主要经消化道黏膜感染而引起猪体发病^[4], 针对其感染途径和黏膜免疫的重要性, 研制能有效刺激黏膜免疫系统所产生的黏膜免疫应答, 进而诱导产生系统免疫应答的疫苗对本病的防治具有重要意义。PPV 基因组编码 VP1、VP2 和 VP3 这 3 种结构蛋白, 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^[5-9]。因此, 本研究选择 VP2 蛋白作为免疫原进行相关研究。【拟解决的关键问题】目前普遍认为, 在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的理想方式^[10,11]。本研究以食品级微生物干酪乳杆菌作为递呈疫苗抗原的活菌载体, 选择含有分泌信号肽基因序列 (ssUSP) 和锚定结构序列 (anchor) 的细胞表面表达型质粒 pPG 进行猪细小病毒重组乳酸菌口服活菌疫苗的研制。将构建的表达猪细小病毒 VP2 蛋白的重组干酪乳杆菌口服免疫小鼠, 测定其诱导黏膜和系统免疫反答应产生的抗体水平, 评价该重组乳酸菌表达系统作为 PPV 的口服疫苗的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 重组菌株、病毒株及主要试剂

重组干酪乳杆菌细胞表面表达系统 pPG-VP2/*L.casei*393, 含有编码猪细小病毒主要衣壳蛋白 VP2 基因, 由本实验室构建保存; 猪细小病毒强毒

分离株 (猪肾原代细胞培养), 本室保存。鼠源抗 PPV 高免血清由本实验室制备保存; HRP 标记的羊抗鼠 IgA 购自 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉公司。

1.2 试验动物

免疫用 Balb/c 小鼠为清洁级, 购自哈尔滨医科大学第二临床医院实验动物中心。

1.3 目的蛋白在干酪乳杆菌中的诱导表达及鉴定

将重组菌 pPG-VP2/*L.casei*393 接种于 MRS 液体培养基中, 37℃ 培养活化, 取活化菌按 1 : 5 比例接种于 10 ml 含 2% 乳糖的 MRS 培养基中进行诱导表达。诱导表达菌液以 12 000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀用 10 mg·ml⁻¹ 的溶菌酶 37℃ 水浴作用 40 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 SDS-PAGE 样品缓冲液 (含 DTT), 混匀, 沸水浴 10 min, 在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分析, 同时利用 Western blot 与间接免疫荧光检测目的蛋白的表达。

1.4 试验动物分组及免疫

7 周龄 Balb/c 小鼠分成 3 组, 每组 30 只, 雌雄各半: 试验组 I 每只小鼠口服接种 100 μl 10¹⁰CFU·ml⁻¹ 重组菌 pPG-VP2/*L.casei* 393; 试验组 II 口服免疫同等剂量的 pPG/*L.casei* 393; 试验组 III 口服 100 μl PBS 溶液。免疫程序: 免疫分 3 次, 每次免疫时间间隔为 2 周, 每次连续口服接种 3 d, 1 d 免疫 1 次, 并于连续免疫的第 2 天, 每只小鼠补饲 2% 的乳糖 200 μl。

1.5 免疫小鼠肠黏液及粪便中特异性 sIgA 测定

采用间接 ELISA 方法进行: 分别于免疫前、初免后第 4、18、32、38、46、58 天收集免疫鼠粪便, 每 0.1 g 粪便加入 0.5 ml 提取液, 置于振荡器上振荡 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清 (以上操作 4℃ 环境中进行); 引颈处死小鼠, 取其肠段, 纵向切开, 除去肠内食物及粪便残渣, 刮取肠黏液, 加入 0.5 ml PBS, 置于振荡器上振荡 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液 (4℃ 环境中进行)。以 PPV 全病毒抗原包被 ELISA 反应板, 4℃ 包被过夜, PBST 液洗板 3 次; 用含有 5% 脱脂乳的 PBS 液 37℃ 封闭 2 h, PBST 液洗板 3 次; 分别加入处理好的粪便上清和肠黏液, 37℃ 反应 1 h, PBST 液洗板 3 次; 加入 1 : 2 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA, 37℃ 反应 1 h, PBST 液洗板 3 次; 加 OPD-H₂O₂ 底物显色液, 37℃ 避光显色 10 min, 加终止液后, 酶标测定仪在波长 490 nm 处测定每孔的光吸收 (OD₄₉₀) 值。

1.6 免疫小鼠血清中特异性 IgG 测定

间接 ELISA 方法进行检测：分别于口服免疫前、初免后第 4、18、32、38、46 天采集小鼠血液，4℃ 静止过夜，4 000 r/min 离心 10 min，收集血清。以 PPV 全病毒抗原包被 96 孔聚苯乙烯微量板 4℃ 反应过夜；用含有 5% 脱脂乳的 PBS 液 37℃ 封闭 2 h；加入免疫小鼠血清，37℃ 反应 1 h；加入 1 : 2 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG，37℃ 反应 1 h；加 OPD-H₂O₂ 底物显色液，37℃ 避光显色 10 min，加终止液，酶标仪在波长 490 nm 处测定每孔光吸收 (OD₄₉₀) 值。

1.7 抗体中和活性的测定

1.7.1 PPV 病毒毒价的测定 取置-70℃ 保存的 PPV 病毒，将病毒在 96 孔培养板上作 10 倍递进稀释，即 10⁻¹、10⁻²、10⁻³……10⁻¹¹，每孔病毒悬液量为 100 μl，每个稀释度作 8 孔，每孔加入 100 μl ST 细胞悬液，培养板的最后一行设为细胞对照（细胞悬液的浓度以使细胞在 24 h 内长满单层为度），将其置于 5% CO₂ 温箱 37℃ 培养，逐日观察细胞病变，记录结果，按 Reed 和 Muench 两氏法计算 TCID₅₀：IgTCID₅₀ = 病毒最低稀释度的对数 + 组距（稀释系数）

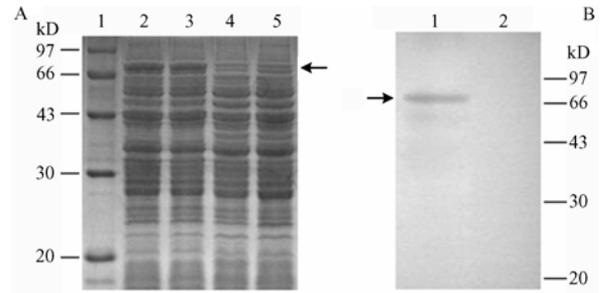
1.7.2 中和试验 将口服重组菌免疫获得的血清抗体及肠黏膜抗体过虑除菌，60℃ 灭活 20~30 min。取已灭活处理的抗体，在 96 孔微量细胞培养板上，用稀释液作一系列 2 倍递进稀释，每孔含量为 100 μl，每个稀释度作 4 孔（同时设立阳性和阴性抗体对照），加入按 200TCID₅₀ 稀释的 PPV 液，每孔 100 μl，置于 37℃ 温箱中和 1 h，然后每孔加入 100 μl ST 细胞悬液，将培养板置于 37℃、5% CO₂ 温箱培养，逐日观察。

1.7.3 结果判定 被检血清孔出现 100% CPE 判为阴性，50% 以上细胞出现保护者为阳性，固定病毒稀释血清中和试验的结果是计算出能保护 50% 细胞孔不产生细胞病变的血清稀释度，该稀释度即为该份血清的中和抗体效价。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白在干酪乳杆菌中的诱导表达及鉴定

重组菌 pPG-VP2/*L.casei*393 经 2% 乳糖进行诱导，诱导菌体裂解物经 10% SDS-PAGE 鉴定，结果表明有约 74 kD 的蛋白泳带，初步证明目的蛋白获得了表达。表达的蛋白转印 NC 膜，分别与鼠源抗 PPV 高免血清和羊抗鼠 IgG/HRP 作用。结果显示，pPG-VP2/*L.casei*393 经诱导后，Western blot 检测在表达蛋白带的预期位置出现明显的免疫印迹，说明表达的蛋白和天然蛋白一样具有良好的抗原特异性（图 1）。



A: 1. 标准蛋白分子量 (97-14 kD); 2、3. 经诱导的 pPG-VP2/*L.casei*393, 箭头所示有约 74 kD 蛋白泳带; 4、5. 未经乳糖诱导的 pPG-VP2/*L.casei*393 SDS-PAGE 结果。B: 将蛋白转印 NC 膜, 先后与鼠抗 PPV 血清和 HRP 标记羊抗鼠 IgG 作用, 显色后观察结果。1. 经诱导的 pPG-VP2/*L.casei*393, Western blot 鉴定出现预期大小的免疫反应带; 2. 未经诱导的 pPG-VP2/*L.casei*393, Western blot 结果未出现预期的反应带 A: 1. Protein Marker (97-14 kD); 2, 3. pPG-VP2/*L.casei*393 induced by lactose, the interest protein as arrow showing; 4, 5. pPG-VP2/*L.casei*393 noninduced by lactose. B: 1. The expressed protein in pPG-VP2/*L.casei*393 induced by lactose was transformed onto NC membrane, then reacted with mouse anti-PPV serum and sheep anti-mouse IgG/HRP, Western blot analysis showed that the expressed protein appeared clear immune blot; 2. pPG-VP2/*L.casei*393 noninduced by lactose, the result of Western blot was negative

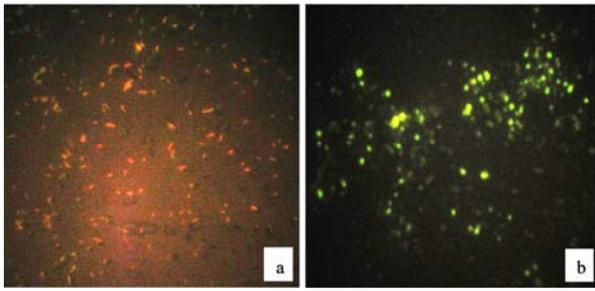
图 1 重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/*L. casei*/393 表达 VP2 蛋白 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定结果

Fig. 1 Identification of VP2 protein expressed in *L. casei* 393 by SDS-PAGE and Western blot

取经诱导和未诱导的重组菌各 0.5 ml 离心去上清后，分别用 PBS 洗菌体 3 次；加入鼠源抗 PPV 高免血清，混匀，37℃ 作用 60 min，4 000 r/min 离心 5 min 去上清，PBS 洗菌体 3 次；加入稀释的含有 0.1% 伊文思蓝的 FITC 荧光标记羊抗鼠 IgG 二抗，悬浮混合后 37℃ 作用 60 min，4 000 r/min 离心 5 min 去上清，PBS 洗菌体 3 次；菌体沉淀物悬浮于 200 μl PBS 中，取适量涂片，自然干燥，预冷丙酮固定 30 min 后，荧光显微镜观察，结果显示经诱导的重组菌菌体表面出现黄绿色荧光（图 2-b），未经诱导的重组菌菌体被伊文思蓝染成红色（图 2-a）^[12]。

2.2 重组干酪乳杆菌免疫小鼠抗 PPV 特异性 sIgA 测定

分别于免疫前及初免后第 4、18、32、38、46 和 58 天采集鼠粪及肠黏液样品检测 sIgA 水平。肠液中 sIgA 测定结果如图 3 所示，粪便中 sIgA 测定结果如图 4 所示：连续 3 次口服免疫重组菌 pPG-VP2/*L.casei*393 后诱导小鼠产生了抗 VP2 蛋白的分泌性 IgA 抗体反应。初免后第 38 至 58 天，产生抗体水平较免疫前差异显著 ($P < 0.05$)。免疫空载体菌 pPG/*L.casei*393 的小鼠和阴性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。



a: 未经诱导的 pPG-VP2/L.casei393 菌体表面未出现荧光反应，菌体被伊文思蓝染色成红色；b: pPG-VP2/L.casei393 经诱导表达后，间接免疫荧光检测菌体表面出现黄绿色荧光
a: the recombinant strain pPG-VP2/L.casei393 was not induced by lactose, the result of immunofluorescence was negative and the bacteria were red dyed by Evans blue; b: Recombinant strain pPG-VP2/L.casei393 was induced by lactose, there were green-yellow fluorescence reaction on the surface of the bacteria

图 2 重组菌表达 VP2 蛋白免疫荧光鉴定结果

Fig. 2 Immunofluorescence of VP2 protein displayed on cell-surface of pPG-VP2/L.casei 393

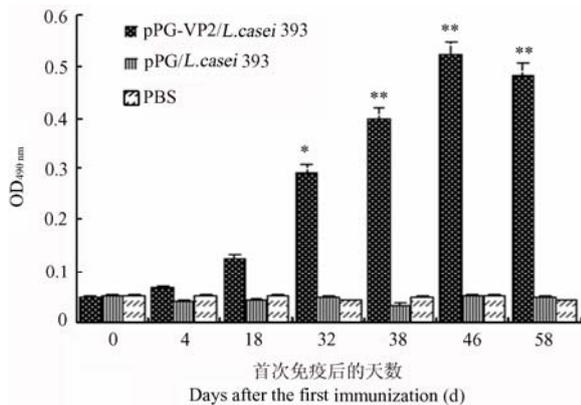


图 3 免疫小鼠肠黏液中特异性抗 PPV VP2 蛋白 sIgA 水平

Fig. 3 Anti-PPV VP2 specific IgA level in intestine mucus of mice immunized with recombinant strain

2.3 重组干酪乳杆菌免疫鼠血清中抗 PPV 特异性 IgG 测定结果

于免疫前及初次免疫后第 4、18、32、38、46 天采集小鼠血液，制备血清，以 PPV 全病毒作为包被抗原检测抗 PPV IgG 水平。如图 5 所示，重组干酪乳杆菌 pPG-VP2/L.casei393 在连续 3 次免疫后诱导小鼠产生了较高的抗 PPV IgG 抗体反应。

2.4 抗体中和活性的测定结果

采用固定病毒稀释抗体的方法进行重组干酪乳杆菌免疫鼠所得血清及肠黏液抗体中和猪细小病毒中和

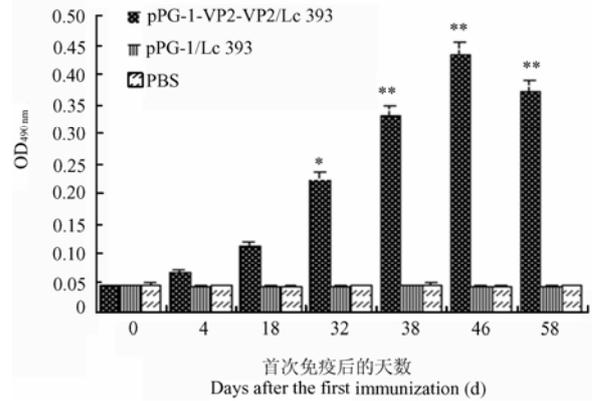


图 4 免疫小鼠粪便中特异性抗 PPV VP2 蛋白 sIgA 水平

Fig. 4 Anti-PPV VP2 specific IgA level in fecal material of immunized mice

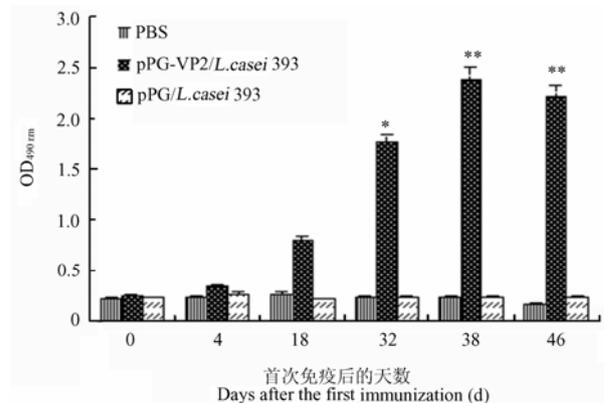


图 5 免疫小鼠血清中特异性抗 PPV VP2 蛋白 IgG 水平

Fig. 5 Anti-PPV VP2 specific IgG level in the serum of immunized mice

效价的测定。病毒浓度为 100 TCID₅₀，血清抗体及肠黏液抗体以 2 倍递进稀释，即 1 : 2，1 : 4，1 : 8，1 : 16，1 : 32，1 : 64.....，病毒与稀释后的抗体充分混匀后，37℃条件下孵育 1h，然后接入 ST 细胞(浓度以 24 h 长成单层为度)，将培养板置于 5% CO₂ 37℃恒温培养箱培养 3 d，逐日观察细胞病变并记录结果，进行统计分析。所得结果如下：重组干酪乳杆菌免疫鼠血清抗体中和猪细小病毒效价为 1 : 128，肠黏液中 IgA 抗体中和效价为 1 : 24。

3 讨论

猪细小病毒主要经消化道和呼吸道黏膜感染而引

起猪体发病,因此黏膜免疫是阻止病毒侵入机体的第一道防线,研制有效的刺激黏膜免疫系统产生局部免疫应答,进而引起全身性系统免疫反应的新型疫苗,对疾病的防治具有重要意义。

口服疫苗开发了由 sIgA 介导的第一道防线,即能引起黏膜免疫反应,也能引起系统免疫反应,是较为理想的选择。细菌、病毒或生物微球均可作为口服疫苗抗原载体,从生物安全性及疫苗免疫效果角度出发,发展了以乳酸菌为代表的非致病性口服疫苗载体。干酪乳杆菌作为重要的益生性乳酸菌种类,具有免疫佐剂^[13]、吸附黏膜^[14,15]、抗胆汁酸能力及菌体本身低免疫原性,应用该系统携带外源基因表达产物,使抗原物质对黏膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径,产生更为理想的黏膜免疫保护效应^[11]。用破伤风毒素 C 片段(TTFC)作模型抗原已获得许多乳酸菌用于免疫接种的知识,结合人们对免疫系统认识的不断提高及近来克隆和表达技术的发展,开辟了乳酸菌作为活疫苗载体的真实前景^[16-21]。本研究针对猪细小病毒经黏膜感染的特点及黏膜免疫的重要性,以干酪乳杆菌 *L.casei* 393 作为递送疫苗抗原的活菌载体,构建了细胞表面表达猪细小病毒主要免疫保护性抗原 VP2 蛋白的重组干酪乳杆菌系统,以期利用该系统作为猪细小病毒口服疫苗,达到预防的目的。

对构建的重组干酪乳杆菌表达系统诱导后,可见约 74 kD 的融合蛋白得到表达,表达的蛋白经 Western blot 免疫学检测表明,外源重组蛋白能够与 PPV 全病毒制备的抗血清发生反应,说明所构建的重组干酪乳杆菌表达系统能够有效的表达外源目的蛋白,重组蛋白与天然抗原一样具有相同的免疫原性。目前普遍认为,在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式,本研究所使用的 pPG 表达载体,具有 ssUSP 分泌信号肽,同时具有锚定结构,属于细胞表面表达型载体。诱导表达后的活菌体经间接免疫荧光试验检测结果表明,所表达的蛋白能够分泌于菌体的表面。存在菌体表面的目的蛋白,为抗原物质有效刺激免疫系统,提高机体的免疫水平奠定了基础。

本试验以鼠为动物模型进行口服免疫接种试验,探讨该重组干酪乳杆菌系统作为活菌疫苗潜在的应用价值。口服免疫程序分 3 次进行,时间间隔 2 周,每次连续接种 3 d^[22]。口服接种后不同时间分别测定了小鼠肠黏液及粪便中抗 PPV 分泌型 IgA 及小鼠血清抗体 IgG 等特异性黏膜和系统免疫应答。检测结果表明,

在免疫后小鼠的粪便和肠黏液中均检测到了特异性 sIgA,由于干酪乳杆菌具有较强的肠道定植能力,定植于肠道中可不断地刺激肠黏膜产生分泌性 IgA,初免后第 58 天,在免疫小鼠肠黏液及粪便中仍能测得较高的 IgA 抗体水平。同时小鼠口服重组菌后,其血液中亦检测到了血清抗体。中和试验结果表明,以猪细小病毒 VP2 蛋白为免疫原的重组干酪乳杆菌免疫小鼠获得的黏膜抗体 IgA 和血清抗体 IgG 具有良好的中和病毒的能力,其中血清抗体稀释度为 1:2~32 和黏膜抗体稀释度为 1:2~4 时对 PPV 具有 100% 的中和能力。具有中和活性 sIgA 和 IgG 抗体的产生,为抑制病毒经肠道黏膜感染进而入侵机体提供了保障。

4 结 论

本研究构建的重组干酪乳杆菌表达系统既可诱导局部黏膜免疫应答,又可刺激机体产生系统的体液免疫应答,为 PPV 重组乳酸菌口服疫苗的进一步研发和应用奠定了重要的物质基础。

References

- [1] Carwright S F, Huck R A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Veterinary Record*, 1967, 81: 196-197.
- [2] Mengeling W L, Cutlip R C, Wilson R A, Parks J B, Marshall R F. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1975, 166: 993-995.
- [3] Mengeling W L, Lager K M, Zimmerman R. 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] Bican J, Svoboda M, Drabek J. Porcine parvovirus infection in boars in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 2002, 71: 45-49.
- [5] Molitor T W, Joo H S, Collett M S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *Journal of Virology*, 1983, 45(2): 842-54.
- [6] Bergeron J, Hebert B, Tijssen P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *Journal of Virology*, 1996, 70(4): 2508-2515.
- [7] Maetinz C, Dalsgaard K, De Turiso J A, Cortes E, Vela C, Casal J I. Production of porcine parvovirus empty capsid with high immunogenic activity. *Vaccine*, 1992, (10): 684-690.
- [8] Tullis G E, Burger L R, Pintel D J. 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. *Journal of Virology*, 1993, (67): 131-141.
- [9] Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(14): 7503-7508.
- [10] Underdown B J, Mestecky J. Mucosal immunoglobulin. In: Ogra P, Mestecky J, Lamm M E, Strober W, McGhee J R, Bienestock J. *Handbook of Mucosal Immunology*. Boston: Academic Press, 1994: 79-98.
- [11] Brandtzaeg P. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells. In: *Handbook of Immunology*. Boston: Academic Press, 1994: 251-279.
- [12] Xu Y G, Cui L C, Ma G P, Ge J W, Tang L J, Xia C L, Qiao X Y, Zhao L L, Li Y J. The surface display of porcine parvovirus VP2 protein in *Lactobacillus casei*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 23(2): 101-104.
- [13] Tomohiko Ogawa, Yasuyuki Asai, Kenji Yasuda, Hiromi Sakamoto. 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.
- [14] Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65: 351-354.
- [15] Lee Y K, Ho P S, Low C S, Arvilommi H, Salminen S. Permanent colonization by *lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70: 670-674.
- [16] Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M, Mercenier A. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infection Immunity*, 2004, 72(5): 2731-2737.
- [17] Pouwel P H, Rob R J, Boersma W J. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigen. *Journal of Biotechnology*, 1996, (44), 183-192.
- [18] Maassen C B M, Laman J D, Heijne den Bak-Glashouwer M J, Tielens F J, van Holten-Neelen J C P A, Hoogteijling L. 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.
- [19] Seegers J F. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnology*, 2002, 20(12): 508-515.
- [20] Oliveria M L S, Monedero V, Miyaji E N, Leite L C C, Ho P L, Perez-Martinez G. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA and PspA by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 227: 25-31.
- [21] Ho P S, Wang J K, Lee Y K. Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine*, 2005, 23: 1335-1342.
- [22] Challacombe S J. Salivary antibodies and systemic tolerance in mice after oral immunization with bacterial antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1983, 409:177-193.

(责任编辑 林鉴非)