

# 携带 NDV HN 基因疫苗的重组减毒鸡白痢沙门菌口服免疫原性研究

丁 轲, 余祖华, 李 蒙, 郁 川, 尚 珂, 程相朝\*, 陈桂华,  
廖成水, 贾艳艳, 汪 洋, 张春杰

(河南科技大学动物疫病与公共卫生重点实验室, 洛阳 471003)

**摘 要:** 为研究携带新城疫病毒(NDV)血凝素-神经氨酸酶(HN)基因疫苗的重组减毒鸡白痢沙门菌的口服免疫原性, 将携带 NDV HN 基因的重组质粒 pcDNA3-HN 电转化减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13, 构建重组疫苗菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN)。将重组菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 以  $1 \times 10^9$  CFU  $\cdot$  只<sup>-1</sup> 口服免疫 7 日龄雏鸡, 同时设 PBS、 $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) 和 NDV IV 系疫苗免疫对照, 于免疫后 7、14、21、28、35 d 测定免疫雏鸡诱导的抗 NDV 的 HI 抗体、鸡白痢沙门菌 IgG 抗体和肠道黏膜 IgA 抗体动态水平, 同时测定免疫雏鸡的外周血淋巴细胞增殖水平并进行攻毒试验。结果表明, 成功获得携带 NDV HN 基因疫苗的重组菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN); 在免疫后 14~35 d, 可诱导产生抗 NDV 的 HI 抗体, 且在免疫后 21 d 时达到最高值; 可诱导产生抗鸡白痢沙门菌的 IgG 抗体, 且在免疫后 28 d 达到最高值;  $\Delta crp$ (C79-13 pcDNA3-HN) 组肠道黏膜 IgA 抗体含量最高值略高于  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) 组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在免疫 28 d 以后,  $\Delta crp$ (C79-13 pcDNA3-HN) 组外周血淋巴细胞刺激指数极显著高于 PBS 对照组 ( $P < 0.01$ ), 显著高于  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3) 组 ( $P < 0.05$ )。用  $10^3$  EID<sub>50</sub> NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 株攻毒, 保护率达 67% (10/15), 用  $10^6$  CFU 鸡白痢沙门菌 C79-13 攻毒, 保护率为 100%。本研究表明重组减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 具有良好的口服免疫原性。

**关键词:** 新城疫病毒; HN 基因; 减毒沙门菌; 口服免疫; 免疫原性

中图分类号: S852.52

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)10-2081-08

## Oral Immunogenicity of an Attenuated *Salmonella pullorum* Harboring HN Gene Vaccine of Newcastle Disease Virus

DING Ke, YU Zu-hua, LI Meng, YU Chuan, SHANG Ke, CHENG Xiang-chao\*, CHEN Gui-hua,  
LIAO Cheng-shui, JIA Yan-yan, WANG Yang, ZHANG Chun-jie

(Key Laboratory of Animal Disease and Public Health, Henan University  
of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** To study the oral immunogenicity of attenuated *Salmonella pullorum*, carried HN (haemagglutinin-neuraminidase) gene vaccine of Newcastle disease virus (NDV). In this study, the recombinant plasmid pcDNA3-HN was finally electro-transformed into attenuated *Salmonella pullorum*  $\Delta crp$ C79-13 to construct the recombinant strain  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN). Then the 7-day-old chickens were oral inoculated with  $1 \times 10^9$  CFU recombinant strain  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN), and the  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3), PBS, NDV IV vaccine were act as the control group. Then the dynamic level of HI antibody and intestinal mucosal IgA antibody against NDV

收稿日期: 2016-03-22

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(152102110078)

作者简介: 丁 轲(1977-), 男, 河南永城人, 副教授, 博士, 主要从事动物传染病与动物微生态学研究, Tel: 0379-64895698, E-mail: keding19@163.com

\* 通信作者: 程相朝, E-mail: chengxch@126.com

were determined at 7, 14, 21, 28, 35 days post vaccination. At the same time, the level of peripheral blood lymphocyte proliferation of immune chicken and the challenge protection efficiency were determined. The results showed that the recombinant vaccine strains  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) carrying NDV *HN* gene vaccine was constructed successfully, which could induce HI antibody against NDV at 14-35 d after immunization and reach the highest value at 21 d after immunization. The content of intestinal mucosal IgA antibody in  $\Delta crp$  (C79-13 pcDNA3-HN) group was slightly higher than that in  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) group, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). The peripheral blood lymphocyte stimulation index of  $\Delta crp$  (C79-13 pcDNA3-HN) group was significantly higher than that of the PBS control group ( $P < 0.01$ ), and was slightly higher than that of the  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) group ( $P < 0.05$ ) at 28 d after immunization. The immunity protection rate against strong virus was 67% (10/15) in experiment group with  $10^3$  EID<sub>50</sub> NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub>, the protection rate was 100% which challenged with  $10^8$  CFU *Salmonella pullorum* C79-13 strain. The results showed that the recombinant attenuated *Salmonella pullorum*  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) strains have good oral immunogenicity.

**Key words:** NDV; *HN* gene; attenuated *Salmonella bacteria*; oral immunization; immunogenicity

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种急性、高度接触性传染病,严重危害全球养禽业<sup>[1]</sup>。NDV 又称禽副黏病毒-1(avain paramyxovirus, PMV-1),为单股负链不分节有囊膜的 RNA 病毒,其基因组全长 1.5 kb,编码 6 种结构蛋白(L、HN、F、NP、P),其中血凝素-神经氨酸酶(haemagglutinin-neuraminidase, HN)位于囊膜外表面,具有血凝素及神经氨酸酶的活性<sup>[2]</sup>。HN 蛋白是 NDV 重要的宿主保护性抗原,具有良好的免疫原性,可在 NDV 侵染的过程中起到识别细胞受体、介导病毒吸附细胞膜的作用<sup>[3-4]</sup>。因此,HN 基因可作为 NDV 基因工程疫苗的重要抗原靶基因之一。目前,我国用于 ND 防制的疫苗主要有弱毒苗和灭活苗,但近年来常有弱毒疫苗和灭活疫苗免疫失败的报道。因此,研究新型疫苗来控制 NDV 是亟待解决的问题之一。

沙门菌是一种较为常见的侵袭性胞内菌,通过基因工程方法减毒后对宿主致病性显著降低,但仍保留良好的侵袭力,并且减毒沙门菌还可作为载体直接将真核表达质粒携带进入动物细胞内表达相应的蛋白而诱导特异性的免疫应答反应<sup>[5-6]</sup>。以减毒沙门菌为载体的 DNA 疫苗具有诸多优点<sup>[7-8]</sup>。首先,它不仅可以通过口服、鼻内感染途径进行免疫,既省时又方便,而且可以将抗原直接运载至内脏淋巴组织,产生有效的黏膜免疫。其次,以沙门菌为载体能够将质粒 DNA 运载至相关免疫器官的 APC

细胞,特别是巨噬细胞对沙门菌有特殊的亲和性,能更有效的将抗原递呈给树突细胞,比 DNA 疫苗的传统免疫途径的递呈更有效。最后,质粒表达的抗原与减毒沙门菌本身的抗原也起到了联合免疫的作用。因此,减毒沙门菌为载体携带外源 DNA 疫苗的策略为研究新型 NDV 疫苗提供了可能。近年来,关于 ND 基因工程疫苗的研究取得长足的进步。X. Yang 等<sup>[9]</sup>以传染性支气管炎病毒为载体构建了能够表达 HN 的重组病毒 R-H120-HN/5a,用该重组病毒免疫 SPF 雏鸡,可诱导机体产生较高的 NDV HI 抗体水平,用 NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 强毒株攻毒后的免疫保护率可达 80%。王善辉等<sup>[10]</sup>利用杆状病毒表达系统获得了 HN-Bacmid 重组病毒,用该病毒免疫 SPF 鸡,可诱导产生了高滴度的 NDV 特异性抗体,强毒攻击后免疫保护率可达 75%。目前已有利用减毒沙门菌携带 NDV DNA 疫苗的报道<sup>[11-12]</sup>,但以减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13 为载体携带 NDV DNA 疫苗的研究还鲜有报道。因此,本研究在构建携带 NDV *HN* 基因疫苗的减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN)基础上,对其口服免疫原性作了进一步研究,从而为研制新型鸡白痢一新城疫口服活载体疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、疫苗和毒株 大肠杆菌 JM109、减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13、pMD18-

HN、真核表达载体 pCDNA3,均由河南科技大学动物疫病与公共卫生重点实验室保存;NDV IV 系疫苗购自辽宁益康生物股份有限公司;S. pullorum 标准强毒株 C79-13、NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 株均购自中国兽医药品监督所。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、BamH I、Hind III 等限制性内切酶等购自宝生物工程(大连)有限公司;新生牛血清、RPMI 1640 培养基、青链霉素购自 Gibco (Life Technologies) 公司;鸡外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋华科生物技术有限公司;鸡 sIgA 酶联免疫吸附测定试剂盒购自武汉 Elabscience 生物科技有限公司;刀豆球蛋白 A(Con A)、MTT、PMSF、DMSO 购自 Sigma 公司;NDV 阳性血清购自中国兽医药品监察所;HRP 标记的兔抗鸡 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;TMB 显色液购自碧云天生物技术公司。

1.1.3 实验动物 1 日龄健康雏鸡购自洛阳公华禽业有限公司,按常规方法检测沙门菌抗体阴性。

## 1.2 方法

1.2.1 重组减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta r p C 7 9 - 1 3$  (pCDNA3-HN)的基因疫苗的制备 用设计的引物

Pa1: 5'-CCCAAGCTTACCATGGACCGCGCCGT-TAGC-3'(下划线为 Hind III 酶切位点), Pa2: 5'-CGGGATCCCTAGCCAGACCTGGCTTC-3'(下划线为 BamH I 酶切位点),以 pMD18-HN 为模板,PCR 扩增出 HN 基因片段。将扩增的 HN 产物通过 BamH I、Hind III 酶切后定向插入真核表达载体 pCDNA3 中,构建重组质粒 pCDNA3-HN。通过电转化的方法将重组质粒 pCDNA3-HN 和 pCDNA3 分别转入减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta c r p C 7 9 - 1 3$  中,挑取在 LB 固体培养基(100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Amp<sup>+</sup>)的上生长的阳性单菌落进行 PCR 和酶切鉴定,获得重组减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta c r p C 7 9 - 1 3$  (pCDNA3-HN)和  $\Delta c r p C 7 9 - 1 3$  (pCDNA3)。然后将重组减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta c r p C 7 9 - 1 3$  (pCDNA3-HN)和  $\Delta c r p C 7 9 - 1 3$  (pCDNA3)分别接种 LB 液体培养基(100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Amp<sup>+</sup>),37 °C 振荡培养过夜,用 PBS 洗涤 3 次后重悬菌液,并将菌液浓度调整为  $1 \times 10^9$  CFU  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 雏鸡的分组与免疫 随机选取 6 只雏鸡进行血清母源抗体检测,待母源抗体下降到 4 log<sub>2</sub> 以下后,挑选体重均匀的雏鸡 240 只,随机分为 4 组,每组 60 只。按表 1 免疫方式和剂量进行免疫。

表 1 雏鸡免疫试验分组

Table 1 The grouping of chicken

分组 Groups	免疫方式 Immune methods	免疫剂量 Immunizing dose	免疫次数 Immunity times	数量 Number
PBS	口服	200 $\mu\text{L}$	1	60
$\Delta c r p C 7 9 - 1 3$ (pCDNA3-HN)	口服	$1 \times 10^9$ CFU	1	60
$\Delta c r p C 7 9 - 1 3$ (pCDNA3)	口服	$1 \times 10^9$ CFU	1	60
IV 系	口服	2 头份	1	60

1.2.3 NDV HI 抗体水平检测 分别于免疫后 7、14、21、28、35 从各组随机取 6 只雏鸡,采血,分离血清,测定各组雏鸡 NDV HI 抗体水平。

1.2.4 鸡白痢沙门菌 IgG 抗体的检测 挑取鸡白痢沙门菌 C79-13 单菌落,活化过夜,以 1:100 比例转接培养 8 h,收集菌体并用 PBS 洗涤 2 次,以 1:100 倍浓缩重悬于 PBS,置于冰上超声破碎至菌液澄清,离心后收集上清,并将浓度调整至 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  包被 96 孔酶标反应板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置于 4 °C 过夜。弃去包被液,PBS 洗涤 3 次,每孔加入 0.5% 的脱脂奶粉 100  $\mu\text{L}$ ,37 °C 封闭 2 h;PBS 洗涤 3 次,将待检血清按 1:200 比例稀释后 100

$\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,37 °C 孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次;每孔加入 HRP 标记的兔抗鸡 IgG(稀释倍数为 1:3 000)100  $\mu\text{L}$ ,37 °C 孵育 2 h;经洗涤后每孔加入 50  $\mu\text{L}$  TMB 底物显色液,避光反应 10 min。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,用酶标仪测量其 OD<sub>492 nm</sub> 值。

1.2.5 免疫雏鸡肠道 sIgA 抗体水平的测定 分别于免疫后 7、14、21、28、35 d 从各组随机挑选 6 只雏鸡,扑杀鸡,采集小肠,用含 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  PMSF 的 PBS 缓冲液灌洗小肠。离心收集小肠液并制备免疫雏鸡及对照的小肠样本,采用鸡 sIgA ELISA 检测试剂盒测定免疫雏鸡肠道 sIgA 抗体水平。

1.2.6 免疫雏鸡淋巴细胞增殖检测 分别于免

疫后 7、14、21、28、35 d 从每组随机抽取 6 只雏鸡, 无菌心脏采血, 分离淋巴细胞, 将分离的淋巴细胞悬浮于 RPMI 1640 培养基中并调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。将淋巴细胞加入 96 孔细胞培养板 (100  $\mu$ L  $\cdot$  孔<sup>-1</sup>), 每个样品 3 个重复孔, 每孔加 100  $\mu$ L 含有 ConA (5  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 的 RPMI-1640 营养液。阴性对照组加 100  $\mu$ L 完全 RPMI-1640 培养基, 于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h; 最后加入 10  $\mu$ L MTT (终质量浓度为 5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 37  $^{\circ}$ C 培养 4 h, 1 500 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清, 并每孔加入 100  $\mu$ L DMSO, 室温振荡 10 min, 酶标仪测定 OD<sub>492 nm</sub> 值。以免疫组的 OD 值/对照组的 OD 值表示各组的刺激指数 (SI)。

1.2.7 免疫雏鸡的攻毒保护试验 在免疫 21 d 后, 每组选择 30 只鸡, 其中 15 只鸡用 NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 株进行滴鼻攻毒, 攻毒剂量  $10^3$  EID<sub>50</sub>, 另外 15 只鸡用 *S. pullorum* 菌野生株 C79-13 口服攻毒, 攻毒剂量为  $10^8$  CFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (100 倍 LD<sub>50</sub>)。各组鸡攻毒后连续观察 20 d, 记录鸡的精神状态、发病和死亡情况, 统计免疫保护率。

1.2.8 数据统计与分析 数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析 one-way ANOVA 进行差异性比较, 并用 GraphPad Prism 5.0 软件作图,  $P > 0.05$  表示差异不显著,  $P < 0.05$  表示差异显著, 用 \* 表示,  $P < 0.01$  表示差异极显著, 用 \*\* 表示。

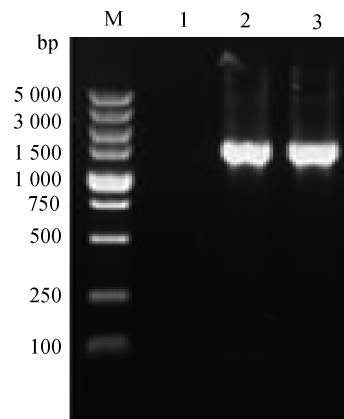
## 2 结果

### 2.1 重组菌株 $\Delta crpC79-13$ (pCDNA3-HN) 的鉴定

将构建成功的阳性重组质粒 pCDNA3-HN 电转化至减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crpC79-13$  后, 挑取含 Amp 的 LB 固体培养基上的单菌落, 用引物 Pa1/Pa2 进行 PCR 扩增, 获得一条大小约 1.7 kb 的条带 (图 1)。阳性菌落的质粒进行酶切后获得两条大小不同的片段, 大小分别为 5.4 kb 和 1.7 kb 左右 (图 2)。PCR 和酶切结果表明, 重组减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) 构建成功。

### 2.2 重组菌株对雏鸡 NDV HI 抗体水平的影响

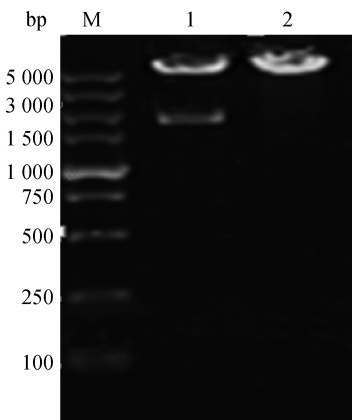
$\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) 重组菌株免疫雏鸡后, 在一定时期内可以有效刺激机体 NDV HI 抗体水平的增长, 且在免疫后 21 d 时抗体水平达到最高值, 之后两周开始缓慢降低。21~35 d,  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) 重组菌免疫组和 NDV IV 系疫苗免



M. DNA 相对分子质量标准 (DL5000); 1. 对照; 2、3. 重组菌  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) HN 基因 PCR 产物  
M. DNA Marker (DL5000); 1. Control; 2-3. PCR products of HN gene in  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN)

图 1 重组减毒菌的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant attenuated strain



M. DNA 相对分子质量标准 (DL5000); 1. BamH I + Hind III 酶切  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN); 2. BamH I + Hind III 酶切  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3)

M. DNA Marker (DL5000); 1. Restriction fragments of  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) with BamH I + Hind III; 2. Restriction fragments of pCDNA3 with BamH I + Hind III

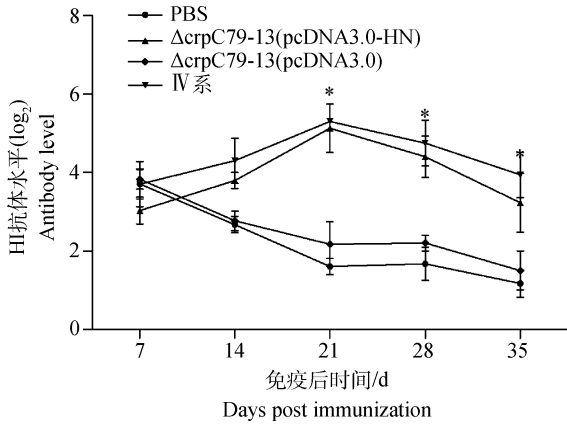
图 2 重组减毒菌的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of enzyme for recombinant attenuated strain

疫组显著高于  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3) 免疫组与 PBS 对照组 ( $P < 0.05$ ), 而  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3-HN) 重组菌免疫组和 NDV IV 系疫苗免疫组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),  $\Delta crpC79-13$  (pCDNA3) 免疫组和 PBS 对照之间差异也不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

### 2.3 重组菌株对雏鸡体内沙门菌血清 IgG 抗体水平的影响

以 *S. Pullorum* C79-13 菌体蛋白作为抗原, 运用间接 ELISA 方法检测各组雏鸡血清 IgG 抗体水

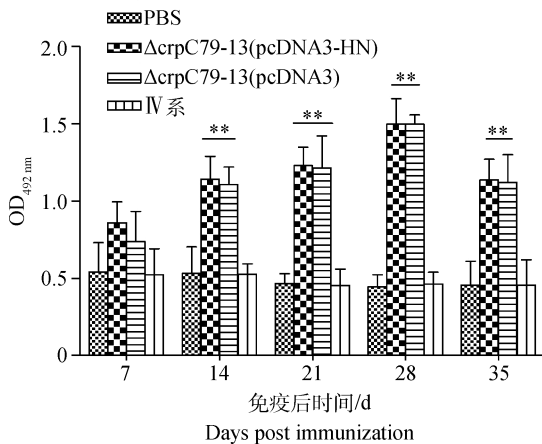


\* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$

图 3 NDV HI 抗体检测

Fig. 3 Assay of HI antibody of NDV

平。ELISA 结果表明,14~35 d 重组菌株  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组和  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组的血清 IgG 抗体极显著高于 PBS 对照组和 NDV IV 系疫苗免疫组 ( $P < 0.01$ )。免疫雏鸡的血清 IgG 抗体含量在 7~28 d 之间呈上升趋势,且在 28 d 时达到最高水平,在第 28 天之后又呈下降趋势(图 4)。



\* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$

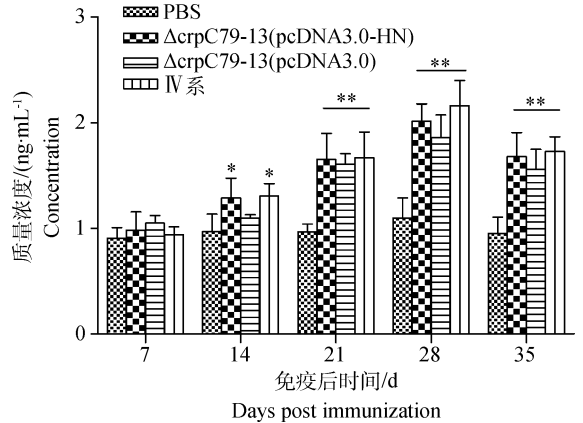
图 4 沙门菌 IgG 抗体检测

Fig. 4 Assay of IgG antibody to Salmonella

## 2.4 重组菌株对雏鸡肠道 sIgA 抗体水平的影响

运用 ELISA 方法检测各组雏鸡肠道 sIgA 抗体水平,结果显示  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组、 $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组和 NDV IV 系疫苗免疫组肠道 sIgA 抗体含量均高于 PBS 对照组,且在 28 d 时达到最高水平。免疫后 14 d 时  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组和 NDV IV 系疫苗免疫组肠道 sIgA 抗体含量显著高于  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)

免疫组和 PBS 对照组 ( $P < 0.05$ ),NDV IV 系疫苗免疫组肠道 sIgA 抗体含量略高于  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组,但差异不显著 ( $P > 0.05$ );免疫后 21~35 d, $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组、 $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组和 NDV IV 系疫苗免疫组均极显著高于 PBS 对照组 ( $P < 0.01$ ),但  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组与 NDV IV 系疫苗免疫组及  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。



\* .  $P < 0.05$ ; \* \* .  $P < 0.01$

图 5 肠道 sIgA 抗体检测

Fig. 5 Assay of secretion IgA antibody in intestinal

## 2.5 重组菌株对雏鸡淋巴细胞增殖的影响

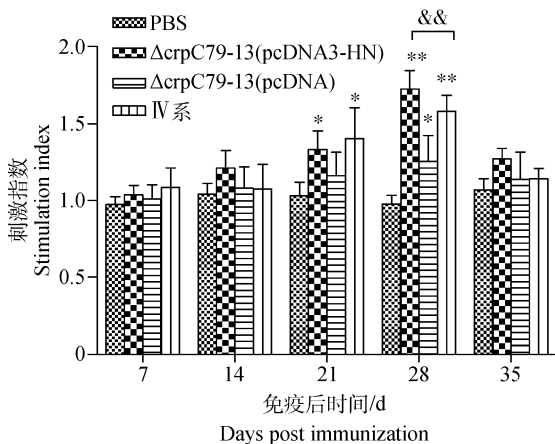
用 MTT 法检测各组雏鸡外周血淋巴细胞的增殖水平,计算刺激指数 (SI)。结果显示,重组菌株  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)免疫组的 SI 在免疫后 28 d 达到最大值,为 1.725 左右,重组菌  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组的 SI 为 1.371 左右,NDV IV 系疫苗免疫组的 SI 为 1.579 左右。方差的单因子变量分析显示,免疫后 21 d 时,重组菌株  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)和 NDV IV 系疫苗免疫组显著高于 PBS 对照组和  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组 ( $P < 0.05$ ),而  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组与 PBS 组之间差异不显著;免疫 28 d 时重组菌株  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3-HN)和 NDV IV 系疫苗免疫组均极显著高于 PBS 对照组 ( $P < 0.01$ ),显著高于  $\Delta crpC79-13$ (pcDNA3)免疫组 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

## 2.6 重组菌株对雏鸡的免疫保护效力检测

免疫后 21 d,以口服的方式进行攻毒鸡白痢沙门菌 C79-13,以滴鼻、点眼的方式进行攻毒 NDV F<sub>48</sub>E<sub>8</sub> 株,攻毒后连续观察 20 d,评价重组菌免疫雏鸡对 C79-13 的免疫保护作用(表 2)。免疫雏鸡对

表 2 重组菌免疫雏鸡抵抗沙门菌 C79-13 和 NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 攻毒的保护力Table 2 The immune protective efficiency of recombinant strain to *Salmonella pullorum* C79-13 and NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> in chickens

组别 Groups	C79-13		F <sub>48</sub> E <sub>9</sub>	
	死亡数/总数	存活率/%	死亡数/总数	存活率/%
	Death/Total	Survival rate	Death /Total	Survival rate
PBS	15/15	0	12/15	20
$\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN)	0/15	100	5/15	67
$\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3)	0/15	100	10/15	23
IV 系	15/15	100	4/15	73



\*.  $P < 0.05$ ; \*. \*.  $P < 0.01$

图 6 雏鸡免疫后各时间点的淋巴细胞刺激指数

Fig. 6 Stimulation index of lymphocytes in various time points after immunization

鸡白痢沙门菌保护效力结果显示, 重组菌株  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN) 和  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3) 免疫组能 100% 抵抗野生株的感染, 而 PBS 对照组和 NDV IV 系疫苗免疫组的免疫保护率为 0; 免疫雏鸡对 NDV 保护效力结果显示, NDV F<sub>48</sub>E<sub>9</sub> 攻毒后, PBS 组死亡率高达 80%, 重组菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) 死亡率为 77%, 而重组菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 死亡率为 33%, 保护率为 67%, NDV IV 系疫苗免疫组的存活率为 73%, 表明该重组菌株对 NDV 感染具有一定的免疫保护, 但其免疫保护效果略低于 NDV IV 系疫苗。

### 3 讨论

减毒沙门菌作为载体可以通过自然感染途径侵入宿主的派伊尔氏结、肠淋巴结、肝、脾等组织细胞, 将携带的 DNA 疫苗运送至免疫诱导部位, 乃至于特定的免疫细胞 (如 APCs 等), 借助于宿主细胞表

达目的抗原, 不仅激发出宿主针对沙门菌本身的免疫反应, 而且激发出针对其所携带抗原的各种免疫反应, 包括全身体液免疫、细胞免疫和局部黏膜反应<sup>[13-14]</sup>。

甘军纪等<sup>[15]</sup>用表达鸡 NDV HN 基因的重组鸡痘病毒活载体疫苗 rFPV-12LS HN 免疫 14 日龄的 SPF 鸡群, 7 d 后即可检测到鸡 NDV HI 抗体, rFPV-12LS HN 免疫后仅 2~3 周 NDV HI 抗体平均滴度  $> 4 \log_2$ , 免疫后 10~18 周, HI 抗体平均滴度均  $< 2 \log_2$ , 但依然能完全保护试验鸡抵抗 NDV 强毒的致死性攻击。孙景秀等<sup>[16]</sup>构建的重组干酪乳杆菌 (pLA-HN/*L. casei*) 免疫雏鸡, 将重组菌表达的产物 HN 蛋白作为抗原刺激机体产生免疫应答, 前 1 周其 IgG 抗体水平呈平稳上升, 二免、三免后试验组抗体水平迅速上升, 而对照组没有变化。以上研究表明 NDV HN 基因可诱导机体产生 HI 抗体, 且 HI 抗体具有较好的保护效力。本研究构建的重组减毒沙门菌  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫后一定时期内, 雏鸡体内 NDV HI 抗体水平持续增长, 且在免疫后 21 d 时抗体水平达到最高值, 表明减毒沙门菌  $\Delta crp$ C79-13 携带的 HN 基因疫苗能有效刺激机体产生 NDV 的 HI 抗体产生, 对雏鸡的新城疫有一定的免疫效果。程相朝等<sup>[17]</sup>将构建的减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$ C79-13 口服免疫 4 日龄雏鸡, 结果显示  $\Delta crp$ C79-13 不影响雏鸡生长, 且在第 14~21 天体内特异性细胞和体液免疫水平达到最高。本研究中, 在免疫后 7 d 即可检测到鸡白痢沙门菌的 IgG 抗体, 且在免疫后 28 d 时达到最高水平, 表明重组减毒沙门菌  $\Delta crp$ C79-13 (pcDNA3-HN) 在作为减毒活载体的同时还能有效刺激机体产生一定水平的抗沙门菌 IgG, 保持了亲本株良好的体液免疫原性。

禽类黏膜免疫是机体内抵御外界病原感染的首

道免疫屏障,对维护机体健康有着至关重要的作用。黏膜免疫的主要效应因子为 sIgA,它能够阻止病原菌黏附在黏膜表面,可以激活机体免疫机制,清除病原,在保护自身机体和抗感染等方面发挥重要作用<sup>[18]</sup>。在  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫组的鸡只体内检测到了肠黏液分泌型 IgA,且 21 d 后  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫组和  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3) 免疫组均极显著高于 PBS 对照组,表明  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 可定植肠道的相关淋巴结,并引起有效的黏膜免疫反应。血液中 T 淋巴细胞的转化水平可反映机体细胞免疫的状态。孙景秀等<sup>[16]</sup>构建的重组干酪乳杆菌 pLA-HN/*L. casei* 免疫鸡淋巴细胞增殖刺激指数显著高于 pLA/*L. casei* 免疫组,表明含 HN 的重组干酪乳杆菌可诱生细胞免疫应答。在本研究中,重组菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫组与 PBS 免疫组 SI 差异显著 ( $P < 0.05$ ),表明淋巴细胞在重组菌的刺激下,发生了分裂增殖,证实携带的 HN 基因疫苗的重组菌株  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 能够刺激机体产生一定的细胞免疫应答反应。

本研究的攻毒保护试验结果显示,重组菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫雏鸡用  $10^3$  EID<sub>50</sub> NDV F<sub>48</sub> E<sub>9</sub> 强毒株攻击后,雏鸡的存活率可达 67%,略低于 NDV IV 系疫苗。X. Yang 等<sup>[9]</sup>用重组菌 R-H120-HN/5a 免疫 SPF 雏鸡后,用 NDV F<sub>48</sub> E<sub>9</sub> 强毒株攻毒后的免疫保护率可达 80%。沙万里等<sup>[19]</sup>构建 pVAX I-HN、pVAX I-F-HN 两种 DNA 疫苗肌肉注射 2 周龄雏鸡,免疫 14 d 后用  $10^5$  EID<sub>50</sub> 的 NDV LaSota 株滴鼻攻毒免疫保护率分别为 46.7% 和 93.3%。重组菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 免疫雏鸡用鸡白痢沙门菌强毒株 C79-13 攻毒后,仍全部存活,表明携带新城疫病毒 HN 基因疫苗的减毒鸡白痢沙门菌  $\Delta crp$  C79-13 (pcDNA3-HN) 不仅能够诱导产生对新城疫病毒的保护性免疫应答,还能 100% 抵抗鸡白痢沙门菌 C79-13 的感染,但对雏鸡的免疫保护效果略低于 NDV IV 系疫苗。S. Kumar 等<sup>[20]</sup>研究表明雏鸡单独免疫表达 HN 蛋白的禽 3 型副黏病毒对 NDV 强毒的攻击可产生部分抵抗力,但同时免疫表达 HN 蛋白和 F 蛋白的禽 3 型副黏病毒对 NDV 强毒的攻击可提供完全保护,表明同时免疫表达 NDV F 蛋白和 HN 蛋白的基因工程疫苗具有更好的免疫效果,构建能够同时表达 HN 蛋白和 F 蛋白的重组减毒鸡白痢沙

门菌是否可诱导产生更高的免疫保护率还需进一步研究探索。

综上所述,本试验构建的携带 NDV HN 基因疫苗的重组减毒 *S. pullorum* C79-13 $\Delta crp$  (pcDNA3-HN) 不仅能够刺激机体产生鸡白痢沙门菌特异性应答反应,而且可以诱导机体产生针对 NDV 的免疫应答反应,具有良好的口服免疫效应,为进一步将其开发为鸡白痢-新城疫二联活疫苗奠定了基础。

## 参考文献 (References):

- [1] JIANG Y L, HU J T, GUO Y B, et al. Construction and immunological evaluation of recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing HN of Newcastle disease virus and DC-targeting peptide fusion protein [J]. *J Biotechnol*, 2015, 216: 82-89.
- [2] 杨 煦, 刘玉芬, 刘怀然. 新城疫疫苗的研究进展 [J]. 现代农业科技, 2012(2): 325-327.  
YANG X, LIU Y F, LIU H R. Research progresses of Newcastle disease vaccine [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2012(2): 325-327. (in Chinese)
- [3] MORRISON T G. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1614(1): 73-84.
- [4] 侯 巍. 新城疫病毒分子生物学及其疫苗的研究进展 [J]. 草业与畜牧, 2011(9): 7-10.  
HOU W. Study progress in application of molecular biology in Newcastle disease virus and vaccines [J]. *Prataculture & Animal Husbandry*, 2011(9): 7-10. (in Chinese)
- [5] GENTSCHEV I, DIETRICH G, SPRENG S, et al. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19 ( 17): 2621-2628.
- [6] CHIRULLO B, AMMENDOLA S, LEONARDI L, et al. Attenuated mutant strain of *Salmonella Typhimurium* lacking the ZnuABC transporter contrasts tumor growth promoting anti-cancer immune response [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19): 17648-17660.
- [7] HAN L, ZHEN Y H, LIANG A X, et al. Oral vaccination with inhibin DNA delivered using attenuated *Salmonella choleraesuis* for improving reproductive traits in mice [J]. *J Basic Microbiol*, 2014, 54(9): 962-968.
- [8] 张明亮, 张春杰, 程相朝. 沙门氏菌减毒及其作为疫苗

- 活载体的研究进展[J]. 生物学杂志, 2012(2):65-68.
- ZHANG M L, ZHANG C J, CHENG X C. Advances in attenuation for salmonella and attenuated salmonella as vaccine carrier[J]. *Journal of Biology*, 2012(2):65-68. (in Chinese)
- [9] YANG X, ZHOU Y S, LI J N, et al. Recombinant infectious bronchitis virus (IBV) H120 vaccine strain expressing the hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against IBV and NDV challenge[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(5):1209-1216.
- [10] 王善辉, 薛 忠, 汪鹏旭, 等. 昆虫细胞表达基因Ⅶ NDV HN 基因的免疫效力研究[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 43(1):1-5.
- WANG S H, XUE Z, WANG P X, et al. Expressions of protein HN of Newcastle disease virus in recombinant baculovirus and its antigenicity analysis [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2015, 43(1):1-5. (in Chinese)
- [11] 潘志明, 焦新安, 张小荣, 等. 运送鹅源新城疫病毒 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌及其免疫原性[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4):412-415.
- PANG Z M, JIAO X A, ZHANG X R, et al. DNA vaccine against Newcastle disease virus of goose origin delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and its immunogenicity for mice[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(4):412-415. (in Chinese)
- [12] 潘志明, 黄金林, 程宁宁, 等. 稳定携带新城疫病毒 DNA 疫苗减毒沙门氏菌的构建及其免疫原性[J]. 病毒学报, 2008, 24(1):41-46.
- PAN Z M, HUANG J L, CHENG N N, et al. Construction and immunogenicity of attenuated *Salmonella typhimurium* stably harbouring DNA vaccine against Newcastle disease virus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24(1):41-46. (in Chinese)
- [13] 张丽君, 罗开健. 减毒沙门菌在禽用疫苗应用中的研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(8):73-76.
- ZHANG L J, LUO K J. Study progress of attenuated *Salmonella* in the application of avian vaccines [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(8):73-76. (in Chinese)
- [14] HUANG L Y, WANG K Y, XIAO D, et al. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 38(1):34-41.
- [15] 甘军纪, 陶 鸽, 张胜文, 等. 鸡新城疫重组鸡痘病毒活疫苗的免疫持续期和加强免疫研究[J]. 中国兽医学报, 2011, 12(31):1681-1685.
- GAN J J, TAO G, ZHANG S W, et al. Duration of immunity and boost vaccination of a recombinant fowlpox virus expressing Newcastle disease virus HN gene [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 12(31):1681-1685. (in Chinese)
- [16] 孙景秀, 王桂华, 侯喜林, 等. 锚定 NDV HN 蛋白重组干酪乳杆菌诱导雏鸡黏膜免疫应答[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2012, 24(2):43-47.
- SUN J X, WANG G H, HOU X L, et al. The mucosal immune response induced in chicks immunized with *Lactobacillus casei* anchoring NDV HN Protein [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2012, 24(2):43-47. (in Chinese)
- [17] 程相朝, 郁 川, 廖成水, 等. 减毒鸡白痢沙门氏菌  $\Delta$ crpC79-13 株的构建及其对雏鸡的免疫活性[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(1):19-25.
- CHENG X C, YU C, LIAO C S, et al. Construction of an attenuated *Salmonella pullorum*  $\Delta$ crp C79-13 mutant and its immunogenicity in chicks [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(1):19-25. (in Chinese)
- [18] SUN Y, ZHANG Y, SHI C, et al. Newcastle disease virus vaccine encapsulated in biodegradable nanoparticles for mucosal delivery of a human vaccine [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(8):2503-2506.
- [19] 沙万里, 宋 泰, 尹柏双, 等. 新城疫病毒 F-HN 基因 DNA 疫苗的免疫效果评价[J]. 吉林农业科技职业学院学报, 2014, 23(1):7-9.
- SHA W L, SONG T, YIN B S, et al. Evaluation of immune efficacy with DNA vaccines based on F and HN gene of Newcastle disease virus [J]. *Journal of Jilin Agricultural Science and Technology University*, 2014, 23(1):7-9. (in Chinese)
- [20] KUMAR S, NAYAK B, COLLINS P L, et al. Evaluation of the Newcastle disease virus F and HN proteins in protective immunity by using a recombinant avian paramyxovirus type 3 vector in chickens [J]. *J Virol*, 2011, 85(13):6521-6534.