

# 表面表达猪流行性腹泻病毒核蛋白蛋白的重组干酪乳杆菌诱导产生的免疫应答

葛俊伟, 姜艳平, 汪淼, 乔薪瑗, 刘敏, 唐丽杰, 李一经

东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 为探讨表达猪流行性腹泻病毒(PEDV) 核蛋白(N)基因的重组干酪乳杆菌口服免疫小鼠后诱导特异性免疫应答, 本研究制备表达流行性腹泻病毒核蛋白的重组干酪乳杆菌, 应用 Western blotting、间接免疫荧光和全细胞 ELISA 鉴定目的蛋白的表达。然后用该重组干酪乳杆菌口服免疫 BALB/c 小鼠, 分别测定了免疫后不同时间血清中特异性 IgG、粪便中特异性的 sIgA 水平以及血清的中和活性; 并测定免疫小鼠脾淋巴细胞增殖情况和细胞因子水平。结果显示, 目的蛋白表达在细胞表面, 可被阳性血清所识别。免疫小鼠后, 可分别在血清中和粪便中检测到较高水平特异性 IgG、sIgA( $P<0.01$ ), 但血清并没有中和活性; 淋巴细胞增殖试验和细胞因子测定结果显示, 免疫组可产生明显的细胞免疫应答。结果表明, 该重组干酪乳杆菌表达系统可诱导小鼠产生黏膜免疫应答和系统免疫应答, 具有作为口服疫苗潜在的应用价值。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒, N 蛋白, 干酪乳杆菌, 免疫反应

## Induction of immune response after oral inoculation of mice with *Lactobacillus casei* surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral N protein

Junwei Ge, Yanping Jiang, Miao Wang, Xinyuan Qiao, Min Liu, Lijie Tang, and Yijing Li

Veterinary Department, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** To evaluate the immune responses of recombinant *Lactobacillus casei* 393 expressing Porcine Epidemic Diarrhea Viral (PEDV) N protein as oral vaccine, n gene of PEDV was subcloned into the expression vector pPG-1, and then transformed into *L. casei* 393 by electroporation, resulting in recombinant strain pPG-1-n/*L. casei* 393. The recombinant strains were induced to express interest protein, which was detected by Western blotting, immunofluorescence microscopy and the whole bacteria ELISA. And then BALB/C mice were used as an animal model immunized with recombinant strains by oral administration, and the immune efficacy was analyzed. The recombinant PEDV N protein showed the antigenic specificity, and was located on the bacterial cell walls of pPG-1-n transformed *L. casei*. The results of ELISA showed that the mice immunized with recombinant strains could produce remarkable special sIgA level in the feces, and high level of anti-PEDV N protein IgG in the serum ( $P<0.01$ ), but the induced antibodies in serum did not demonstrated neutralizing effect. Statistical significant difference was observed among the spleen lymphocyte proliferation index (LPI) among the immunization groups of mice and control groups. And there was significant increase

**Received:** February 27, 2009; **Accepted:** April 22, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30671574).

**Corresponding author:** Yijing Li. Tel: +86-451-55190385; E-mail: yijingli@163.com

国家自然科学基金项目(No. 30671574) 资助。

of IFN- $\gamma$  and IL-4 contents in the supernatant of spleen cell culture in immunized group. In conclusion, the oral immunizations with recombinant *L. casei* 393 can induce significant specific mucosal PEDV N-specific IgA response as well as serum IgG responses, and can evoke both mucosal immune and system immune responses.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus, N protein, *Lactobacillus casei*, immune response

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是引起猪腹泻的重要病原,主要通过肠道感染猪,具有明显的肠道组织嗜性的特点。因该病在世界范围内广泛分布,危害严重,给养猪业带来较大经济损失<sup>[1,2]</sup>。

PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属成员,该病毒粒子有囊膜,呈现多形性,大小约 95~190 nm,囊膜表面有纤突蛋白呈放射状排列; PEDV 有 4 个主要结构蛋白,分别是 S 蛋白(Spike protein)、M 蛋白(Membrane protein)、E 蛋白(Small membrane protein)和 N 蛋白(Nucleoprotein)。研究表明,冠状病毒 N 蛋白与基因组 RNA 结合,形成螺旋状的核蛋白体,参与病毒基因组转录、RNA 的包装、病毒组装<sup>[3]</sup>; 在鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV)<sup>[4]</sup>、鸡传染性支气管炎病毒(Avian infectious bronchitis virus, IBV)<sup>[5]</sup>、猪传染性胃肠炎病毒(Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)<sup>[6]</sup>、SARS-COV<sup>[7]</sup>等冠状病毒的研究中发现, N 蛋白也是病毒主要的免疫原蛋白之一,高度保守的 N 蛋白分子结构中具有诱导特异性抗体的抗原表位和诱导产生细胞免疫的 T 细胞表位,可诱发机体产生有效的免疫应答,可以诱导辅助特异性体液免疫的 Th 细胞的增殖,抗 N 蛋白的细胞免疫可以使感染动物康复。这说明 N 蛋白是冠状病毒基因工程疫苗研究和开发的一个靶标。

目前,疫苗接种是预防猪流行性腹泻的主要措施,从应用的效果来看,在抗 PEDV 感染免疫过程中除体液免疫和细胞免疫外,局部肠黏膜免疫系统发挥着不可替代的作用。针对病毒经黏膜感染和 sIgA 在抵抗疾病中具有重要作用的特点,研制能有效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又安全无毒的新型疫苗,对防治猪流行性腹泻具有实际意义。

乳酸菌是人和大多数动物肠道内的常见细菌,在食品工业各个领域中的长期应用已证明其无致病性,被公认为安全级微生物<sup>[8]</sup>。分子生物学技术的不断进步为探索其新的应用潜力提供了基础,其中最

有前景的应用即是通过乳酸菌作为活载体,将治疗性蛋白或抗原传递至黏膜表面,继而同时诱导黏膜免疫和系统免疫的新型疫苗,具有广泛的应用前景。乳酸菌作为载体菌的优点还包括其本身具有佐剂效应、不会产生强的免疫反应、可以利用同一载体对动物进行多次免疫,是肠道正常菌群和益生菌之一。乳酸菌分泌的乳酸菌素、有机酸等多种代谢产物,本身就具有抗菌抑菌、抗腹泻的作用,这一特点尤其适合于预防引起胃肠道感染的细菌或病毒。

为了探讨 PEDV N 蛋白功能、乳酸菌表达的 N 蛋白的免疫原性以及其在口服疫苗研制中的可能价值,本研究将 *n* 基因插入乳酸菌表达载体中,构建了表达 PEDV *n* 基因片段的重组干酪乳杆菌表达系统,以此作为口服疫苗免疫动物,通过体液免疫和细胞免疫等免疫学指标的测定,评价所得到的重组乳酸菌菌株的免疫原性,为 PEDV 重组乳酸菌口服疫苗的研制提供物质基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒、菌种与质粒

pMD18-T simple 载体、大肠杆菌 JM109 感受态细胞购自大连宝生物公司。干酪乳杆菌表面表达型载体 pPG-1 含有分泌信号肽基因序列(ssUSP)、氯霉素(Cm)抗性基因和锚定结构序列(Anchor)及干酪乳杆菌 *L. casei* 393 由荷兰 NIZO 研究所惠赠; PEDV 病毒株 LJB/03 和 CV777、含 PEDV *n* 基因的质粒 pGEM-T-N、表达 PEDV *n* 基因的重组大肠杆菌 pPROHTa-n/BL21<sup>[9]</sup>由本实验构建、保存。

### 1.2 主要试剂

EX Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司; BamH、Xho 等限制性内切酶购自 MBI 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 小量质粒 DNA 提取试剂盒、小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; MRS 培养基购自 Sigma 公司。羊抗鼠 IgA 酶标抗体(辣根过氧化物酶 HRP 标记)购自 Us Biological 公司。酶标抗体羊抗猪 IgG/HRP、荧光抗

体羊抗猪 IgG/FITC 购自北京中杉公司; 猪抗 PEDV 高免疫血清由本实验室制备保存。

### 1.3 实验动物

BALB/c 小鼠为清洁级, 8 周龄, 雌性, (20 ± 2) g, 购自北京维通利华实验动物有限公司。

### 1.4 重组干酪乳杆菌表达载体的构建

以质粒 pGEM-T-N 为模板, 分别以上游引物 LNF: 5'-TACGGATCCAGATTTTATGGCTTC-3 (含有 *Bam*H 酶切位点) 和下游引物 LNL: 5'-CATCTCGA GATTTCTGTATC-3 (含有 *Xho* I 酶切位点) PCR 扩增基因目的片段 n。常规操作将获得的基因片段连接于 pMD18-T simple 载体, 经测序验证正确后, 命名为 pMD18-Ts-n。

将干酪乳杆菌表达载体和重组质粒 pMD18-Ts-n 进行 *Bam*H、*Xho* 双酶切, 然后分别回收载体片段和目的基因片段, 并进行连接。连接产物直接电转化乳酸菌 *L. casei* 393 感受态细胞。筛选抗氯霉素 (10 μg/mL Cm) 阳性克隆菌株, 并提取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-1-n。

### 1.5 目的基因在干酪乳杆菌中的诱导表达、鉴定

挑取重组干酪乳杆菌单菌落接种于含有 10 μg/mL Cm 的 MRS 液体培养基中, 37°C 培养过夜后; 将过夜培养物分别按 1:10 比例接种含有 10 μg/mL Cm 的 1% 乳糖 MRS 液体, 37°C 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右。以诱导的含空载体的干酪乳杆菌 pPG-1/*L. casei* 393 作为对照经 SDS-PAGE 分析后, 进行 Western blotting、间接免疫荧光方法和全细胞 ELISA 分析目的蛋白的表达。具体方法参照文献[10]和[11]进行。

### 1.6 动物免疫

8 周龄 BALB/c 雌性小鼠分为 3 组饲养用于免疫, 每组 15 只, 实验组每只小鼠口服接种  $10^9$  CFU 的重组菌 pPG-n/*L. casei* 393; 空载体对照组小鼠口服同等剂量的 pPG-1/*L. casei* 393; 空白对照组小鼠口服 100 μL PBS 溶液。免疫程序: 免疫 3 次, 每次免疫时间间隔为 2 周, 每次连续免疫 3 d, 每天 1 次。并于连续免疫的第 2 天, 每只小鼠补饲 2% 的乳糖 200 μL。

### 1.7 抗体检测

分别于 0 d、21 d、35 d、49 d 收集免疫小鼠新鲜粪便、血液样品。新鲜粪便 -70°C 冻存备用。采集免疫小鼠血液后, 37°C 促凝 2 h, 4°C 静止过夜,

4000 r/min 离心 5 min, 收集血清, -70°C 冻存备用, 检测时, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 作 1:100 稀释使用 (稀释液为 0.01 mol/L PBS, pH 7.4); 检测前, 将每 0.1 g 粪便加入 0.5 mL 提取液 (含 0.05 mol/L EDTA 的 0.01 mol/L PBS, pH 7.4), 置于振荡器上, 振荡 30 min, 4°C 放置过夜, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清用作检测样品<sup>[12]</sup>。

以纯化的重组 PEDV N 蛋白作为抗原包被 96 孔 ELISA 反应板<sup>[9]</sup>, 每孔 100 μL, 4°C 包被过夜; 洗涤后, 每孔用 250 μL PBS 液 (含 5% 脱脂乳), 37°C 封闭 2 h; 洗涤后, 分别加入处理好的样品 100 μL, 37°C 反应 1 h; 洗涤后, 每孔加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA 二抗或 HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗 100 μL, 37°C 反应 1 h; 加 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物显色液, 37°C 避光显色 15 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 ( $OD_{490}$ ) 值。

### 1.8 脾淋巴细胞增殖试验

各组在 3 免后 10 d (38 d) 取 4 只小鼠, 处死, 无菌取脾脏, 制备成单个脾细胞悬液, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 10 mL 8.3 mol/L Tris-NH<sub>4</sub>Cl, 37°C 水浴 5 min 使红细胞裂解后, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入适量 Hank's 缓冲液洗涤 3 次, 每次 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 进行细胞计数, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL, 每孔加入 100 μL。刺激时采用 2 个抗原浓度, 每个样本 8 个重复, 同时设阴性对照。阳性对照试验孔加入 ConA, 终浓度为 5 μg/mL。置 37°C、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h 后, 每个样本吸出 4 孔用于测定细胞因子, 其余各孔每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL, 继续培养 3 h。然后每孔加 100 μL 终止液 (含 0.04 mol/L HCl 的 10% SDS), 测定  $OD_{570}$  吸光值。计算刺激指数 (SI) = 试验孔  $OD_{570}$  吸光值 / 阴性对照孔  $OD_{570}$  吸光值。

### 1.9 细胞因子 IL-4、IFN-γ 测定

上述培养液中 IFN-γ、IL-4 水平采用 BioSource ELISA 试剂盒检测, 按说明书操作, 分别以标准品绘制标准曲线, 计算待检测样品中相应细胞因子的含量。

### 1.10 中和试验

将已灭活处理的免疫鼠血清, 作一系列 2 倍递进稀释, 即 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64; 然后与等体积病毒液 (含 100 TCID<sub>50</sub> 病毒) 混合, 置于 37°C 温箱孵育 1 h; 接种至 vero 细胞单层上。同时设阳性

血清对照、阴性血清对照、病毒对照、空白对照。置 5% CO<sub>2</sub>、37°C 温箱培养, 逐日观察并记录。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。

### 1.11 数据处理

应用统计软件 MINITAB14 进行分析, 所有数据用均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 重组表达载体的鉴定结果

所获得的重组表达载体, 经 *Bam*H 和 *Xho* 酶切、PCR 鉴定均为阳性, 序列测定结果进一步表明, *n* 基因正确克隆到表达载体 pPG-1 中。

### 2.2 重组干酪乳杆菌的诱导表达鉴定结果

#### 2.2.1 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定结果

诱导后的菌体培养物经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 结果表明在 SDS-PAGE 凝胶上未发现有明显的目的蛋白表达, 但是在转印 NC 膜上, 在预期位置 (49 kD) 出现明显的反应带 (如图箭头所示), 说明目的蛋白获得了表达, 并且表达的蛋白能被抗血清所识别。

pPG-1-*n/L. casei* 393 的 Western blotting 鉴定结果见图 1 所示。

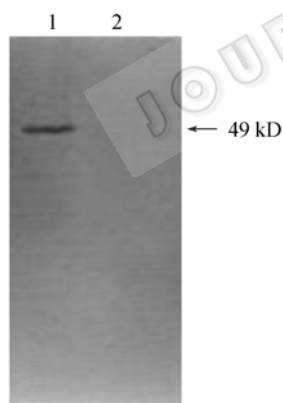


图1 重组菌 pPG-1-*n/L. casei* 393 诱导后表达的 PEDV N 蛋白的 Western blotting 鉴定结果

Fig.1 Western blotting identification of PEDV N protein produced by pPG-1-*n/L. casei* 393 after induction. 1: recombinant strain pPG-1-*n/L. casei* 393 induced by 2% lactose; 2: pPG-1/*L. casei* 393 induced by 2% lactose, as negative control.

#### 2.2.2 间接免疫荧光鉴定结果

经荧光显微镜检查可见诱导后的重组菌 pPG-1-*n/L. casei* 393 菌体表面出现明显的黄绿色荧光(图2A), 诱导的对照菌 pPG-1/*L. casei* 393 未发现绿色荧光(图

2B)。由此表明, 重组干酪乳杆菌表达了目的蛋白, 且表达的重组蛋白存在于菌体的表面。

### 2.2.3 全细胞 ELISA

全细胞 ELISA 检测目的蛋白的表达结果见图 3。从图 3 可知, pPG-1-*n/L. casei* 393 和阳性血清反应的 OD 值高于对照菌 pPG-1/*L. casei* 393 和阳性血清反应的 OD 值 2 倍以上, 且差异极显著; pPG-1-*n/L. casei* 393 和阴性血清反应的 OD 值、对照菌 pPG-1/*L. casei* 393 和阳性血清反应的 OD 值基本相近, 表明重组干酪乳杆菌表面表达了目的蛋白。

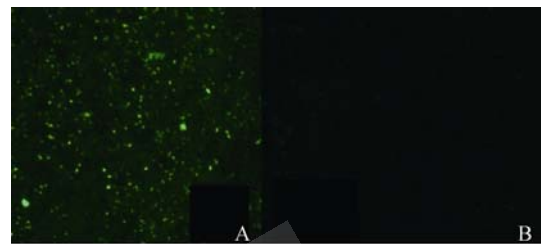


图2 免疫荧光鉴定目的蛋白 N 表达结果(400×)

Fig.2 Detection of N protein at the cell surface of *L. casei* by immunofluorescence(400×). (A) Recombinant *L. casei* expressing N. (B) *L. casei* harboring the control plasmid pPG-1. Bacterial samples were treated with specific anti-N antibodies and then fluorescence-stained with goat-anti-pig IgG conjugate FITC.

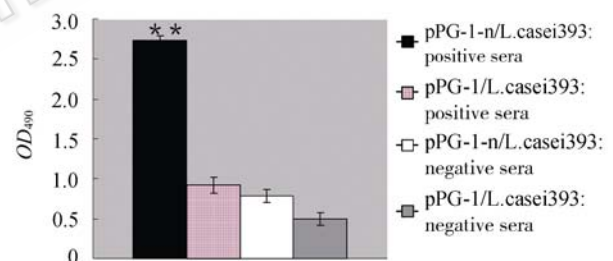


图3 pPG-1-*n/L.casei*393 全细胞 ELISA 检测结果

Fig.3 Identification of induced PEDV N protein by the whole bacterial cell ELISA.

### 2.3 抗体检测

pPG-1-*n/L. casei* 393 免疫组在首次免疫后 21 d 检测到的血清抗体 IgG 就明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 随后逐渐上升, 在 49 d、63 d 高于 pPG-1/*L. casei* 393 免疫组, 差异极显著。对照组 pPG-1/*L. casei* 393 组小鼠和 PBS 组小鼠在免疫前后血清 IgG 抗体水平未出现明显差别(图 4)。

各免疫组诱生的特异性 sIgA 分析结果显示(图 5), pPG-1-*n/L. casei* 393 免疫组所诱生的抗 PEDV N 蛋白的 sIgA 效价在免疫后 21 d 均明显高于对照组, 差异显著, 在 49 d、63 d 明显高于 pPG-1/*L. casei* 393 免疫

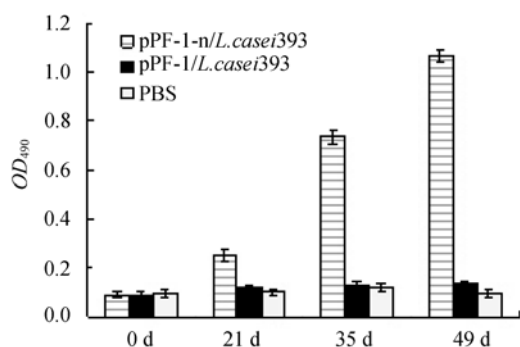


图 4 免疫小鼠血清中特异性抗 PEDV N 蛋白 IgG 水平变化

Fig. 4 Anti-PEDV N specific IgG levels in serum of mice immunized.

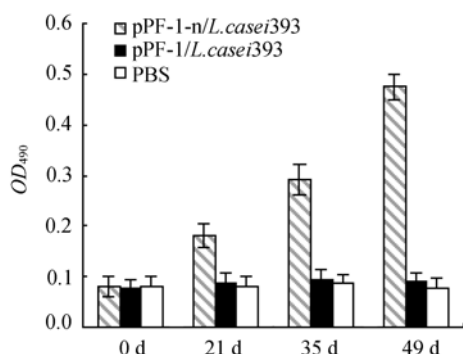


图 5 免疫小鼠粪便中特异性抗 PEDV N 蛋白 sIgA 水平

Fig. 5 Anti-N sIgA level in the fecal samples.

组极显著, 并且和血清抗体呈现一致的增长趋势。

#### 2.4 特异性淋巴细胞增殖实验

MTT 法测定淋巴细胞增殖结果显示, 重组乳酸菌 pPG-1-n/L. casei 393 免疫后, 在 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗原和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗原不同浓度刺激下, 小鼠淋巴细胞增殖刺激指数分别为  $1.930 \pm 0.656$ 、 $1.677 \pm 0.743$ , 显著高于 pPG-1/L. casei 393 免疫对照组的  $1.014 \pm 0.021$  ( $P < 0.05$ )、 $1.019 \pm 0.025$  ( $P < 0.05$ ), 提示重组菌可诱导特异性的细胞免疫应答。

#### 2.5 细胞因子 IL-4、IFN- $\gamma$ 测定

ELISA 检测细胞因子产生的结果显示, IL-4、IFN 数值分别为  $(2.3 \pm 0.046) \text{pg}/\text{mL}$ 、 $(1.86 \pm 0.043) \text{pg}/\text{mL}$ , 较同等条件下对照组的  $(0.372 \pm 0.008) \text{pg}/\text{mL}$ 、 $(0.372 \pm 0.008) \text{pg}/\text{mL}$  均有不同程度升高, 虽然数值较低但均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.6 中和试验结果

血清中和效价测定结果显示, 重组干酪乳杆菌免疫鼠血清抗体中和效价小于 1:2, 即并没有表现出中和活性, 和对照组相比差异不明显。

### 3 讨论

本研究将 PEDV *n* 基因插入乳酸菌表达载体中, 构建了表达 PEDV *n* 基因片段的重组干酪乳杆菌表达系统, 经鉴定目的蛋白获得了表达, 可被阳性血清所识别; 间接免疫荧光和全细胞 ELISA 的鉴定结果证实所表达的目的蛋白位于菌体表面。以该重组干酪乳杆菌表达系统作为口服疫苗免疫动物, 体液免疫和细胞免疫等免疫学指标的测定结果显示, 可诱导循环抗体 IgG 和黏膜抗体 sIgA 的产生, 在免疫后 21 d 检测到的抗体明显高于对照组, 但是血清抗体并没有表现出中和活性。淋巴细胞增殖试验和细胞因子测定结果显示, 免疫组淋巴细胞增殖刺激指数和细胞因子产生水平均比对照组显著提高, 表明重组干酪乳杆菌可诱导细胞免疫应答。

Hou 等<sup>[13]</sup>用乳酸菌表达的 PEDV N 蛋白免疫小鼠和豚鼠, 产生体液免疫应答, 产生的抗体也不具有中和活性, 但是未测定细胞免疫应答情况。这一结果与本研究中乳酸菌表达的 PEDV N 蛋白可以诱导小鼠体液免疫应答的情况一致。

利用 N 蛋白作为冠状病毒的疫苗的靶抗原, 其效果也得到了一些实验的证实。Inrs MA 等的研究表明, 重组的 TGEV S 蛋白配合 M 蛋白或 N 蛋白才可以诱导产生中和抗体, 并证实以 S 蛋白的聚合体和 N 蛋白联合免疫可取的最为理想的免疫反应<sup>[14]</sup>。以重组腺病毒表达的 MHV S 蛋白和 N 蛋白都可诱导产生保护性反应, 并能抵抗病毒(致死量)的攻击, 但是二者联合免疫的效果更为理想<sup>[15]</sup>。Liu 等以 TGEV *n* 基因构建了重组质粒(pcDNA/N), 免疫鼠后, 能诱导产生针对传染性胃肠炎病毒 N 蛋白的体液免疫反应和细胞介导的免疫反应, 抗体类型主要为 IgG2a 型, 这提示了重组质粒激活 Th1 细胞, 但所产生的抗体没有中和活性<sup>[16]</sup>。Kim 等<sup>[17]</sup>将 SARS 病毒 N 蛋白基因与 calreticulin 相连构建的 DNA 疫苗免疫 C57BL/6 小鼠, 诱导产生了有效的 N 蛋白特异性的体液和 T 细胞介导的免疫应答, 且这种免疫应答能明显降低表达 SARS-CoV N 蛋白的牛痘病毒的滴度。SARS-Cov 的 DNA 疫苗以及重组腺病毒载体疫苗研究发现, 含有 *n* 基因的疫苗可以刺激 BALB/c 产生抗体和刺激淋巴细胞增殖, 产生强烈的 DTH 反应 CD8<sup>+</sup> CTL 反应。本研究也证实, 干酪乳杆菌表达

的 PEDV N 蛋白可以诱导小鼠体液免疫应答和细胞免疫应答, 取得一致的结果。以上研究成果表明, 冠状病毒 N 蛋白是一种重要的免疫原, 可用于病毒感染的诊断和预防研究, 对 PEDV 基因工程疫苗的研制提供了有益的资料。

对不同类型淋巴细胞反应(Th1 和 Th2)的检测也可反映出在机体保护性免疫应答中起主导作用的免疫反应, 对于阐明免疫保护的作用机制和指导治疗具有重要意义。为此, 我们检测了免疫小鼠脾细胞在体外经抗原再次刺激下分泌 Th1 型(IFN- $\gamma$ )和 Th2 型(IL-4)细胞因子的水平。

试验鼠脾细胞在体外经抗原再次刺激下分泌细胞因子的结果表明, 重组乳酸菌免疫鼠脾细胞培养上清中 IL-4 和 IFN- $\gamma$ 分泌水平明显高于对照鼠 ( $P<0.01$ )。免疫组 IL-4 和 IFN- $\gamma$ 比值大于 1, 证实机体免疫应答中产生 Th1/Th2 的混合免疫反应, 并以 Th2 反应为主。

综上所述, 表达 PEDV N 蛋白的重组干酪乳杆菌具有良好的免疫原性, 可以刺激肠道产生局部免疫应答, 又可诱导产生系统特异性免疫应答, 经口免疫小鼠能激发出特异性的体液免疫和细胞免疫, 说明 N 蛋白可以作为基因工程疫苗的候选组分, 可以和其他的免疫原 S 蛋白、M 蛋白等联合使用以产生最为理想的免疫应答。

## REFERENCES

- [1] Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M, *et al.* Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod*, 2002, **10**(2): 81–85.
- [2] Pensaert M. Porcine epidemic diarrhea now enzootic in Asia. *Pig Progr Enteric Diseases Special* : 2005, 20–21.
- [3] Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*, 1997, **48**: 1–100.
- [4] Boots AHM, Van Lierop, Kusters JG, *et al.* MHC class II-restricted T-cell hybridomas recognising the nucleocapsid protein of avian coronavirus IBV. *Immunol*, 1991, **72**: 10–14.
- [5] Sneed LW, Butcher GD, Wang L, *et al.* Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by Western blot analysis. *Viral Immunol*, 1989, **12**(3): 221–227.
- [6] Anton IM, Sune C, Melen RH, *et al.* A transmissible gastroenteritis coronavirus nucleoprotein epitope elicits T-helper cells that collaborate in the *in vitro* antibody synthesis to the three major structure viral proteins. *Virology*, 1995, **212**: 746–751.
- [7] Zhu MS, Pan Y, Chen HQ, *et al.* Induction of SARS-nucleoprotein-specific immune response by use of DNA vaccine. *Immunol Lett*, 2004, **94**: 237–243.
- [8] Seegers J. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(12): 508–515.
- [9] Jiang YP, Ge JW, Wang M, *et al.* Preliminary application of the recombinant nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03 as detecting antigen in diagnostic assays. *Chin J Prev Vet Med*, 2008, **30**(8): 587–591.  
姜艳平, 葛俊伟, 汪森, 等. 猪流行性腹泻病毒重组核蛋白作为检测抗原的初步应用. *中国预防兽医学报*, 2008, **30**(8): 587–591.
- [10] Xu YG, Cui LC, Ma GP, *et al.* The surface display of porcine parvovirus vp2 protein in *Lactobacillus casei*. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(2): 315–318.  
徐义刚, 崔丽春, 马广鹏, 等. 猪细小病毒 VP2 蛋白在干酪乳杆菌表面的表达. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 315–318.
- [11] Andrew R, Michael JH, Martin PC. *Vaccine Protocols*. 2nd Ed. Totowa: Humana Press, 2003: 111–124.
- [12] Moorthy, Ramasamy R. Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. *Vaccine*, 2007, **25**: 3636–3645.
- [13] Hou XL, Yu LY, Liu JZ, *et al.* Surface-displayed porcine epidemic diarrhea viral (PEDV) antigens on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 2007, **26**: 24–31.
- [14] Inrs MA, Silvia G, Maria JB, *et al.* Cooperation between transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) structural proteins in the *in vitro* induction of virus-specific antibodies. *Virus Res*, 1996, **46**: 111–124.
- [15] Wesseling JG, Godeke GJ, Schijns VECJ, *et al.* Mouse hepatitis virus spike and nucleocapsid proteins expressed by adenovirus vector protect mice against a lethal infection. *J Gen Virol*, 1993, **74**: 2061–2069.
- [16] Liu C, Kokuho T, Onodera T, *et al.* DNA mediated immunization with encoding the nucleoprotein gene of porcine transmissible gastroenteritis virus. *Virus Res*, 2001, **80**(1/2): 75–82.
- [17] Kim TW, Lee JH, Hung CF, *et al.* Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol*, 2004, **8**: 4638–4645.