

分 类 号: S855.3

单位代码: 10193

密 级: 公开

学 号: 20210389



吉林农业大学

硕士学位论文

表达ASFV候选抗原重组*L. lactis*和BLP的构建及免疫原性评价
**Construction recombinant *Lactococcus lactis* and Bacterium-like
particles expressing protective candidate antigen of African swine fever
virus and evaluation of the immunogenicity**

作者姓名: 黄京山

学位类别: 农学硕士

专业名称: 预防兽医学

研究方向: 动物疫苗及分子免疫学

指导教师: 孙元研究员

所在学院: 动物科学技术学院/动物医学院

2024年5月

摘 要

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染家猪和野猪引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病。2018 年 8 月我国发生首起 ASF 疫情, 并迅速蔓延至全国, 给我国养猪业带来了巨大的经济损失。由于目前我国暂无商品化 ASF 疫苗可用, 主要依靠早期诊断和严苛的生物安全措施防控 ASF, 这严重威胁我国养猪业及相关产业的健康发展, 研制疫苗用于防控 ASF 的流行是迫切且必要的。ASFV 主要通过气溶胶及接触传播, 突破猪只黏膜屏障进而引发疾病, 所以设计可通过黏膜途径进行免疫的疫苗对于阻止 ASFV 的早期传播及帮助建立 ASF 立体防控或有其独特价值。乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 可以表达和展示异源抗原, 具有典型的抗感染作用, 以 LAB 为载体构建的疫苗可以通过灌胃或鼻喷等方式进行免疫, 诱导机体产生黏膜免疫应答。因此, 设计以 LAB 为载体构建可通过黏膜进行免疫的载体疫苗, 既可诱导机体产生黏膜免疫应答又可诱导全身免疫应答的产生, 不失为一种有潜力的 ASF 疫苗研发策略。

本研究首先利用乳链菌肽基因控制表达系统 (nisin-controlled expression system, NICE), 以食品级乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, *L. lactis*) NZ3900 为宿主菌, 无抗性质粒 pNZ8149 为表达质粒, 分别构建了 9 株表达本团队早期筛选出的 ASFV 保护性候选抗原的重组 *L. lactis*, 包括 r*L. lactis*-F317L、r*L. lactis*-H171R、r*L. lactis*-CP530R、r*L. lactis*-D117L、r*L. lactis*-E120R、r*L. lactis*-CD2v、r*L. lactis*-B602L、r*L. lactis*-p54 和 r*L. lactis*-p72。Western blotting 结果表明, 9 株 r*L. lactis* 均能可溶性表达相应的 ASFV 蛋白, 以 r*L. lactis*-F317L 为模式菌株, 对 r*L. lactis* 的生长特性进行鉴定, 结果表明, r*L. lactis* 的生长曲线与 *L. lactis* NZ3900 无显著差异。随后在小鼠体内, 将 9 株 r*L. lactis* 混合后通过灌胃及肌注两种方式对 r*L. lactis* 的免疫效力进行了评价, 免疫剂量为每株 r*L. lactis* 免疫 10^9 CFU, 每只小鼠共免疫 9×10^9 CFU。结果表明, r*L. lactis* 肌注组小鼠在首免后 7 d 血清特异性 IgG 抗体较对照组有显著升高, 且随时间推移抗体水平得到进一步升高, 同时干扰素 (interferon, IFN)- γ 和白细胞介素 (interleukin, IL)-10 水平较对照组有显著升高; r*L. lactis* 灌胃组小鼠在首免后 7 d 粪便中分泌型 IgA (secretory immunoglobulin A, sIgA) 抗体水平较对照组有显著升高, 不过在后续时间点的样品中, sIgA 抗体水平降低至与对照组无显著差异; 对免疫后小鼠的脾脏淋巴细胞增殖能力进行评价, 结果表明, r*L. lactis* 肌注组及 r*L. lactis* 灌胃组小鼠, 淋巴细胞增殖水平与对照组小鼠均无显著差异。

为提高以 *L. lactis* 为载体的 ASF 候选疫苗的免疫效力, 本研究以热和酸灭活处理 *L. lactis* NZ3900 得到的细菌样颗粒 (Bacterium-like particles, BLP) 为载体, 构建了表面锚定展示 ASFV 保护性候选抗原的 BLP。*L. lactis* NZ3900 用热和酸处理后可得到仅含肽聚糖的 BLP, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE) 及透射电镜观察, 处理后的 BLP 无杂蛋白存在, 菌体内容物流出且具备菌体基本形态。以 pGEX-6P-1 为表达质粒, 分别构建了 9 种 ASFV 抗原蛋白与锚钩蛋白 (Protein anchor, PA) 融合表达的重组质粒, 并将重组质粒转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) Rosetta, 进而构建了 9 种表达 ASFV 抗原蛋白的重组 *E.coli*。Western blotting 结果表明, 9 种 ASFV 重组蛋白均能可溶性表达。将 9 种重组 *E.coli* 诱导表达后的裂解液分别与 BLP 共孵育制备了 BLP-F317L、BLP-H171R、BLP-CP530R、BLP-D117L、BLP-E120R、BLP-CD2v、BLP-B602L、BLP-p54 和 BLP-p72。SDS-PAGE 凝胶电泳及间接免疫荧光试验证明 9 种 ASFV 抗原蛋白均可表面锚定展示于 BLP, 以不同浓度的 BSA 作为标准蛋白进行考马斯亮蓝染色, 结果表明, 1 U 的 BLP 最大可负载的抗原蛋白量为 F317L (72 μg)、H171R (350 μg)、CP530R (36 μg)、D117L (82 μg)、E120R (320 μg)、CD2v (93 μg)、B602L (152 μg)、p54 (61 μg) 和 p72 (55 μg)。以 BLP-p54 为模式抗原, 在小鼠体内对 BLP-p54 通过灌胃及肌注免疫产生的免疫原性进行评价。结果表明, 在二免后 7 d, BLP-p54 肌注组小鼠即产生了高水平的血清特异性 IgG 抗体, BLP-p54 灌胃组有 2/5 的小鼠血清中 p54 特异性 IgG 抗体转阳, 二免后 14 d, BLP-p54 肌注组及 BLP-p54 灌胃组抗体转阳的小鼠血清抗体水平均得到进一步提高, 但 BLP-p54 灌胃组小鼠未有新的小鼠抗体转阳。最后在猪体上通过肌注及鼻喷免疫的方式对 9 种表面锚定展示 ASFV 抗原蛋白的 BLP 的免疫原性进行评价, 以 5 U/株的剂量将 9 株锚定展示 ASFV 抗原蛋白的 BLP 混合后通过肌注及鼻喷的方式免疫猪只。结果表明, BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只首免后 28 d 即可产生高水平的血清特异性 IgG 抗体, 但 BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只未能诱导血清特异性 IgG 抗体产生; 采集二免后 28 d 免疫猪只的外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 进行 ELISpot 及流式细胞术分析, 结果表明, BLP-ASFV-Mix 肌注组及 BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数均显著高于对照组; 流式细胞术结果表明, BLP-ASFV-Mix 肌注组与 BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只二免后 28 d 外周血 PBMCs 中 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞与对照组无显著差异, 但 BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只的 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞有升高的趋势, BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只 CD8⁺ T 细胞有升高的趋势。

关键词: 非洲猪瘟、乳酸乳球菌、细菌样颗粒、载体疫苗

Abstract

African swine fever (ASF), caused by African swine fever virus (ASFV), is an acute, severe, and highly contagious disease, which infects domestic pigs and wild boars. In August 2018, the first ASF epidemic occurred in China and quickly spread throughout the whole country, resulting in significant economic losses for the pig industry in China. Since there is no commercial ASF vaccine available in China, it mainly relies on strict biosafety measures for prevention and control of ASF, which seriously threatens the healthy development of the pig industry and related industries in China. It is urgent and necessary to develop vaccines to prevent and control the epidemic of ASF. ASFV is mainly transmitted through aerosols and contact, breaking through the mucosal barrier of pigs and causing disease. Therefore, designing a vaccine that can be immunized through the mucosal route may have its unique value for preventing the early transmission and dimensional prevention and control of ASF. Lactic acid bacteria (LAB) can express and display heterologous antigens and have typical anti-infective effects. Vaccines constructed with LAB as carriers can be immunized by gavage or nasal spray to induce mucosal immune responses. Therefore, the design of LAB as a carrier to construct a carrier vaccine that can be immunized through the mucosa can not only induce the body to produce mucosal immune response but also induce systemic immune response, which is a potential ASF vaccine development strategy.

In this study, the nisin-controlled expression system (NICE) was used to construct nine recombinant *Lactococcus lactis* (*L.lactis*) strains expressing the ASFV protective candidate antigens (F317L, H171R, CP530R, D117L, E120R, EP402R, B602L, E183L and B646L) screened by our team in the early stage, using food-grade *L.lactis* NZ3900 as the host strain and the non-resistant plasmid pNZ8149 as the expression plasmid. Including *rL.lactis*-F317L, *rL.lactis*-H171R, *rL.lactis*-CP530R, *rL.lactis*-D117L, *rL.lactis*-E120R, *rL.lactis*-CD2v, *rL.lactis*-B602L, *rL.lactis*-p54 and *rL.lactis*-p72. The results of Western blotting showed that all 9 *rL.lactis* could express the corresponding ASFV protein in a soluble form. The growth characteristics of *rL.lactis*-F317L were identified by using *rL.lactis*-F317L as the model strain. The results showed that there was no significant difference in the growth curve between *rL.lactis* and *L.lactis* NZ3900. Subsequently, the immune efficacy of *rL.lactis* was evaluated in mice by gastric gavage and intramuscular injection after mixing 9 strains of *rL.lactis*. The immune dose was 10^9 CFU per strain of *rL.lactis* and 9×10^9 CFU per mouse. The results showed that the sera specific-IgG antibodies of mice in the *rL.lactis* intramuscular injection group were significantly higher than that in the control group on the 7 d after the first immunization, and the antibodies

level were further increased over time. At the same time, the levels of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-10 were significantly higher than those in the control group. The level of secretory immunoglobulin A (sIgA) antibodies in feces of mice in the *rL.lactis* gastric gavage group were significantly higher than that in the control group at 7 d after the first immunization, but the level of sIgA antibodies decreased to no significant difference from that in the control group at subsequent time points. The spleen lymphocytes proliferation ability of immunized mice were evaluated. The results showed that there was no significant difference in lymphocytes proliferation between the *rL.lactis* intramuscular injection group and the *rL.lactis* gastric gavage group and the control group.

To improve the immune efficacy of ASF candidate vaccine with *L.lactis* as the carrier, Bacterium-like particles (BLP) obtained by heat and acid inactivation of *L.lactis* NZ3900 were used as the carrier to construct BLP with surface anchoring display of ASFV protective candidate antigen. *L.lactis* NZ3900 was treated with heat and acid to obtain BLP containing only peptidoglycan. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transmission electron microscopy showed that there was no impurity protein in the treated BLP, and the content of the bacteria flowed out and had the basic morphology of the bacteria. Nine recombinant plasmids expressing ASFV antigen proteins and protein anchor (PA) were constructed using pGEX-6P-1 as the expression plasmid, and the recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* (*E.coli*) Rosetta, and then 9 recombinant *E.coli* expressing ASFV antigen proteins were constructed. Western blotting results showed that all the 9 ASFV recombinant proteins could be expressed in soluble form. BLP-F317L, BLP-H171R, BLP-CP530R, BLP-D117L, BLP-E120R, BLP-CD2v, BLP-B602L, BLP-p54 and BLP-p72 were prepared by co-incubation of 9 recombinant *E.coli* lysates with BLP, respectively. SDS-PAGE and indirect immunofluorescence assay showed that the 9 ASFV antigen proteins could be anchored on the surface of BLP. Coomassie brilliant blue staining was performed with different concentrations of BSA as a standard protein. The maximum amount of antigen protein loaded by 1 U BLP was F317L (72 μ g), H171R (350 μ g), CP530R (36 μ g), D117L (82 μ g), E120R (320 μ g), CD2v (93 μ g), B602L (152 μ g), p54 (61 μ g) and p72 (55 μ g). The immunogenicity of BLP-p54 produced by gastric gavage and intramuscular injection was evaluated in mice using BLP-p54 as a model antigen. The results showed that the mice in the BLP-p54 intramuscular injection group produced a high level of serum-specific IgG antibodies 7 d after the second immunization, and 2/5 of the mice in the BLP-p54 gastric gavage group had p54-specific IgG antibodies positive. 14 d after the second immunization, the serum antibodies levels of the mice in the BLP-p54 intramuscular injection group and the BLP-p54 gastric gavage

group were further improved, but there were no new mouse antibodies positive in the BLP-p54 gastric gavage group. Finally, the immunogenicity of 9 BLPs anchored to display ASFV antigen protein was evaluated by intramuscular injection and nasal spray immunization in pigs. The 9 strains of BLPs anchored to display ASFV antigen protein were mixed at a dose of 5 U/strain and immunized by intramuscular injection and nasal spray. The results showed that the pigs in the BLP-ASFV-Mix intramuscular injection group could produce high levels of serum-specific IgG antibodies at 28 d after the first immunization, but the pigs in the BLP-ASFV-Mix nasal spray group failed to induce serum-specific IgG antibodies. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the immunized pigs were collected 28 d after the second immunization for ELISpot and flow cytometry analysis. The results showed that the number of IFN- γ -producing cells per million PBMCs in the BLP-ASFV-Mix intramuscular injection group and the BLP-ASFV-Mix nasal spray group was significantly higher than that in the control group. The results of flow cytometry showed that there was no significant difference in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in PBMCs between the BLP-ASFV-Mix intramuscular injection group and the BLP-ASFV-Mix nasal spray group and the control group at 28 d after the second immunization. However, the CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the BLP-ASFV-Mix intramuscular injection group tended to increase, and the CD8⁺ T cells in the BLP-ASFV-Mix nasal spray group tended to increase.

Keywords: African Swine Fever, *Lactococcus lactis*, Bacterium-like particles, Vector vaccines

目 录

前言	1
第一篇 文献综述	3
第一章 非洲猪瘟研究概况	3
1.1 非洲猪瘟概述	3
1.2 非洲猪瘟病毒概述	3
1.3 非洲猪瘟疫苗研究现状	4
第二章 乳酸乳球菌表达系统及其作为活载体的应用	6
2.1 乳链菌肽控制基因表达系统的概述	6
2.2 乳酸乳球菌活载体疫苗的研究进展	6
2.3 乳酸乳球菌活载体疫苗的优势及挑战	7
第三章 细菌样颗粒疫苗研究概况	8
3.1 细菌样颗粒及其表面展示系统的简介	8
3.2 细菌样颗粒疫苗的研究进展	8
3.3 细菌样颗粒疫苗的优势及挑战	9
第二篇 研究内容	10
第一章 表达 ASFV 候选抗原 rL. lactis 的构建及其免疫原性评价	10
1.1 材料和方法	10
1.2 结果	16
1.3 讨论	23
1.4 小结	25
第二章 表面展示 ASFV 候选抗原 BLP 的构建及其免疫原性评价	26
2.1 材料和方法	26
2.2 结果	31
2.3 讨论	40
2.4 小结	41
结论	42
参考文献	43

前 言

非洲猪瘟（African swine fever, ASF）是由非洲猪瘟病毒（African swine fever virus, ASFV）感染猪只引起的一种急性、出血性的烈性传染病，急性病死率高达 100%，世界动物卫生组织（World Organisation for Animal Health, WOAH）将其列为法定报告动物疫病，我国将其列为一类动物疫病。1921 年，ASF 首次发现于非洲肯尼亚，2018 年 8 月我国发生首起 ASF 疫情，并迅速蔓延至全国，给我国养猪业带来巨大的经济损失。ASF 是对养猪业危害最为严重的疫病之一，而我国目前暂无安全有效的 ASF 疫苗和防治药物，仅能依靠做好生物安全措施进行防控，这严重危害了我国养猪业及相关产业的健康发展。研究人员尝试了包括灭活疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗、病毒活载体疫苗、减毒活疫苗和基因缺失活疫苗在内的各种类型的 ASF 疫苗研发策略，但不同策略的疫苗均有其缺陷存在。ASFV 主要是通过气溶胶及接触进行传播，突破猪只黏膜屏障进而引发疾病，而通过黏膜途径免疫可以诱导产生以分泌型免疫球蛋白 A（secretory immunoglobulin A, sIgA）为主的黏膜免疫应答，同时也可以诱导全身性免疫应答。因此，设计可通过黏膜途径进行免疫的疫苗不失为一种有效的 ASF 疫苗研发策略。

乳酸菌（Lactic acid bacteria, LAB）可以表达、展示异源抗原；且具有调节机体免疫应答的能力，可以抑制 Th0 向 Th2 的分化，上调 Th1/Th2 的比率，具有典型的抗感染作用；LAB 还可以耐受胃酸、胆汁及肠道的消化作用，因此，以 LAB 为载体构建的疫苗可以通过灌胃或滴鼻的方式进行免疫，进而诱导机体产生黏膜免疫应答；LAB 自身还具有佐剂效应，能够增强外源抗原的免疫原性。在生物工程领域中，已广泛应用 LAB 作为抗原递呈系统来递送细菌和病毒抗原，用于黏膜疫苗的研制，其中以乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*, *L. lactis*）和乳酸乳杆菌最为常见。

细菌样颗粒（Bacterium-like particles, BLP）是指用热和酸灭活处理 *L. lactis* 得到的具备菌体形态的中空肽聚糖颗粒。BLP 由食品级 *L. lactis* 制备，不含任何核酸物质，安全性高；经热和酸处理后，细菌细胞壁中脂磷壁酸和壁蛋白等物质流失，仅剩肽聚糖，故而 BLP 负载外源蛋白的能力远高于活菌的负载能力，抗原展示密度大；BLP 主要成分肽聚糖可通过与病原相关分子模式（Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs）的相互作用，激活固有免疫反应，增强天然免疫系统对病原微生物的清除和杀伤能力及诱导宿主树突状细胞（Dendritic cells, DCs）成熟，具备自佐剂效应；BLP 大小约 1 μm ，是黏膜表面 M 细胞摄入外源抗原的理想大小，可被位于鼻咽上皮组织和肠道的 M 细胞有效摄入并转运至抗原递呈细胞，黏膜递送的效率高。因此，BLP 在疫苗的研发应用上有极大的潜力，尤其是应用于黏膜疫苗的研发。

为了防控 ASF 在我国进一步蔓延及暴发，本研究以食品级 *L. lactis* NZ3900 为宿主菌株，以无抗表达的 pNZ8149 为表达质粒，结合本团队前期筛选的 9 种 ASFV 潜在的保护性候选抗原，构建了 9 种表达 ASFV 抗原的重组 *L. lactis*，后续又进一步以食品级 *L. lactis* NZ3900 处理后得到的 BLP 为载体，构建了 9 种表面锚定展示 ASFV 抗原的 BLP，并分别在小鼠和猪只上评价了其免疫原性。以期 ASF 微生态活载体疫苗的研发提供依据和基础。

第一篇 文献综述

第一章 非洲猪瘟研究概况

1.1 非洲猪瘟概述

ASF 是由 ASFV 感染猪引起的一种急性、烈性及高度接触性传染病^[1]。家猪感染 ASFV 后的临床症状从最急性、急性、亚急性到慢性不等，高毒力 ASFV 毒株会引起猪只最急性型和急性型的临床症状，死亡率高达 100%；中、低毒力 ASFV 毒株在感染猪只后，虽然可能不会导致猪只全部死亡，但仍可持续排毒一段时间^[2,3]。1921 年，ASF 首次发现于非洲肯尼亚，在 1957 年首次跨州传播至葡萄牙，并从葡萄牙传播到欧洲、加勒比和巴西等地区，于 2007 年传入高加索地区，随后传播至俄罗斯，并于 2014 年传播到欧盟、波罗的海国家和波兰，到 2018 年，ASFV 传播到比利时、匈牙利、捷克共和国、罗马尼亚、塞尔维亚和中国^[4]。于 2018 年 8 月我国辽宁发生首起 ASF 疫情^[5]，并在短短数月时间内，就传播至全国各个地区，由于我国暂无商品化 ASF 疫苗可用，仅能依靠早期诊断及严苛的生物安全措施进行防控，这严重威胁到我国养猪业及相关行业的健康发展。

1.2 非洲猪瘟病毒概述

ASFV 属非洲猪瘟相关病毒科 (*Asfarviridae*) 成员，是一种双链 DNA 病毒，也是目前唯一已知的虫媒 DNA 病毒^[6]。ASFV 病毒粒子具有对称的 20 面体结构，由囊膜、衣壳、内膜、内核壳和基因组五部分组成，由外向内排列，直径在 200~300 nm 之间^[7]。ASFV 基因组在 170~193 kb，包含 151~167 个开放阅读框架 (Open reading frames, ORFs)，ASFV 基因数量和基因组长度的差异主要是由于多基因家族 ORF 的获得或丢失，基因组末端由不完全碱基配对的发夹共价闭合，类似于痘病毒的基因组末端^[8,9]。ASFV 编码多种结构蛋白与非结构蛋白，这些蛋白不仅参与病毒的组装，还参与病毒基因组的复制、修复以及基因的表达^[10-12]。尽管部分 ASFV 蛋白的功能尚未完全解析，但已有多种潜在的具有免疫原性的保护性抗原蛋白被报道^[13-15]。为了鉴定 ASFV 免疫原性和潜在的保护性抗原，Linda 等在单个质粒中克隆了具有不同功能的 47 个病毒蛋白基因，用于核酸疫苗和重组痘苗病毒载体疫苗的构建，通过 DNA 疫苗初免和重组痘苗病毒载体疫苗进行加免，并用酶联免疫吸附斑点试验 (Enzyme-linked immunospot assay, ELISpot) 及酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测免疫猪外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 对单个重组蛋白和 ASFV 的反应，以确定持续诱导最高反应的

抗原亚群^[16]。结果表明, KP177R、KP177R、B438L、D117L、O61R 和 E120R 等蛋白可能对诱导保护性抗体反应或用作感染的血清学标志具有重要意义, 而 F317L、CP530R、B602L、p72、p54 和 CD2v 等蛋白均能有效刺激免疫猪体内的淋巴细胞, 诱导机体产生较强的细胞免疫应答。

1.3 非洲猪瘟疫苗研究现状

古语有言“猪粮安天下”, 养猪业对我国居民营养乃至经济发展均有至关重要的影响, ASF 的暴发严重制约了我国养猪业的健康发展, 面对我国养猪业复杂的国情, 开发安全有效的 ASF 疫苗是迫切且至关重要的。但目前对 ASFV 感染引起的保护性免疫应答以及免疫保护机制认识尚不完全清楚, 这严重制约了 ASF 疫苗的研究^[17]。在 20 世纪 60 年代, 研究者首先开展了 ASF 灭活疫苗研究, 结果表明, 灭活疫苗虽能诱导体液反应, 但是绝大部分无保护作用^[18]。有研究者认为 ASF 灭活疫苗是不可行的, 因为 ASFV 特异性抗体无中和作用^[19-21]。之后研究人员陆续探索了减毒活疫苗、亚单位疫苗、核酸疫苗和活载体疫苗等 ASF 疫苗研发策略, 其中天然致弱毒株 OURT88/3 对同源毒株表现出保护作用, 但不同免疫途径和剂量都会影响其免疫保护效果, 且其对异源毒株保护率并不令人满意^[22-23], 且天然弱毒株减毒活疫苗存在较大的安全性风险, 包括对猪的副作用、毒力返强和重组等, 这限制了它们在现地中的应用。目前, ASF 减毒活疫苗的设计主要集中在通过从不同分离株中缺失定向基因来开发改良的减毒活疫苗。Gallardo 等人通过缺失 A238L、A224L、A276R 和 EPI53R 等基因构建了重组 NH/P68 减毒株, 结果表明, 候选株对 ASFV/L60 的同源攻击具备完全的保护效果, 但对基因 II 型 ASFV/Arm07 无保护作用^[24]。有研究证明, ASFV-G-ΔI177L 是一个理想的基因缺失减毒活疫苗株, 使用 ASFV-G-ΔI177L 接种 6~8 周龄的猪, 攻毒后猪只不会产生 ASF 一般症状, 只显示出零星的、短暂的临床症状, 如轻微咳嗽和软便等^[25, 26], 到目前为止, 越南批准的应用的减毒活疫苗(ASFV-G-ΔI177L)也是世界上第一个商业化的 ASF 疫苗^[27]。以 ASFV HLJ/18 为骨架, 构建的缺失 7 基因 (MGF505-1R、MGF505-2R、MGF505-3R、MGF360-121、MGF360-13L、MGF360-14L 和 CD2v) 的 HLJ/18-7GD 株, 其安全性和保护性评价结果表明, 免疫 HLJ/18-7GD 的猪能在 ASFV HLJ/18 株的攻击中完全存活^[28]。尽管基因缺失减毒活疫苗表现出较好的保护效果, 但其在现地应用中仍然存在毒力返强及重组的风险。ASF 亚单位疫苗可以在特定的基因和蛋白表达后有效地产生体液和细胞免疫, 如前所述, 部分 ASFV 抗原已被证明可以诱导体液或细胞免疫应答, 但即使如此, ASF 亚单位疫苗依旧无法提供完全的免疫保护作用^[29-31]。例如, Gómez-putas 等人利用杆状病毒表达系统构建了表达 p30、p54 和 p72 蛋白的 ASF 亚单位疫苗, 在将疫苗注射到实验动物体内后, 只在部分动物中观察到了有效的免疫保护^[32]。DNA 疫苗与亚单位疫苗类似, 虽然其可以在宿主体内诱导高水平的特异性 T 细胞反应, 但仍然无法提供完全的免疫保护^[33, 34]。活载体疫苗是指以某种病毒或细菌为载体,

表达一个或多个目标病毒的抗原基因，载体既可以提升抗原的免疫原性，其自身免疫原也可以用于区分感染动物和接种疫苗的动物。有研究人员评估以腺病毒（Adenovirus, AdV）为载体表达多个 ASFV 抗原的活载体疫苗的安全性和免疫原性，证明 Ad-ASFV 多抗原可用于诱导 ASFV 抗特异性细胞毒 T 淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes, CTLs）反应^[35]。此外，作者还评价了 7 种抗原腺病毒载体（A104R、A151R、B602L、B438L、B119L、EP402RΔPrR 和 K205R）的免疫原性，描述了通过用佐剂配制的重组腺病毒鸡尾酒在猪体内诱导局部和系统免疫的另一种策略^[36]。

尽管 ASF 疫苗研发面临许多问题，但开发安全有效的 ASF 疫苗或是我国预防和控制 ASF 流行的最佳策略。尽管 ASF 基因缺失疫苗从保护效果上来看是目前最具应用前景的疫苗，但从长期生物安全的角度来看，基因缺失疫苗因安全性问题使其在现地应用中仍需更谨慎的评估。因此，研制安全、有效、不基于活病毒、可规模化生产的新型 ASF 疫苗是目前我国 ASF 防控紧迫的产业需求和重大科学问题。

第二章 乳酸乳球菌表达系统及其作为活载体的应用

2.1 乳链菌肽控制基因表达系统的概述

LAB 是指一类革兰氏染色呈阳性，发酵碳水化合物以乳酸为主要代谢终产物的兼性厌氧细菌的总称，共包含有乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、片球菌属、明串珠菌属和肠球菌属等 43 个属，这些属又可划分为 373 个种和亚种^[37]。LAB 广泛存在于自然界和各类发酵食品中，是人和动物肠道微生物的重要组成部分，在工业、医药、农业等和生活密切相关的领域均具有相当高的应用价值^[38-41]。LAB 可以促进肠道消化和维持肠道内环境稳态，此外，对调节机体自身免疫系统和抵御病原微生物的感染也具有非常重要的作用^[42]。随着对 LAB 的认识不断深入，以 LAB 作为递送载体开发可诱导黏膜免疫的微生态活载体疫苗越来越受到重视，且其中以 *L. lactis* 和乳酸乳杆菌为载体最为常见^[43-46]。

L. lactis 是公认的食品级安全微生物，其背景清楚，*L. lactis* 的功能特征已被广泛研究，包括碳代谢、胞外和胞内蛋白分解系统、抗生素物质的产生以及它们与噬菌体的相互作用和耐药性等^[47-49]。这使得 *L. lactis* 得到了广泛的应用，包括作为黏膜疫苗的载体来递呈细菌和病毒抗原^[50]。乳链菌肽控制基因表达系统（Nisin-controlled gene expression system, NICE）是目前最常用的以 *L. lactis* 表达异源蛋白的系统，也是乳酸菌中唯一的商业表达系统^[51-53]。NICE 系统包括 3 个基本要素：能表达组氨酸蛋白激酶和反应调节蛋白的宿主菌；包含一个 *nisA* 或 *nisF* 启动子区，允许乳链菌肽（nisin）诱导表达的质粒和由 11 个基因编码合成的抗微生物 nisin 诱导剂^[54]。NICE 系统所用的 *L. lactis* 菌株均为乳制品发酵菌 NCDO712 无质粒后代—*L. lactis* subsp. *Cremoris* MG1363 的衍生物，其中 *L. lactis* NZ3900 是为 NICE 系统的食品级应用而开发的，它来自 *L. lactis* NZ3000^[55]。NICE 系统配套的质粒可分为胞内表达和分泌表达两种，胞内表达的质粒包括 pNZ8148、pNZ8149、pNZ8150、pNZ8151 等，其中 pNZ8149 质粒是以 *lacF* 基因作为食品级选择标记；分泌表达的质粒包括 pNZ8120、pNZ8121 和 pNZ8123 等^[56, 57]。

2.2 乳酸乳球菌活载体疫苗的研究进展

以 *L. lactis* 作为宿主菌，构建表达载体用来表达细菌和病毒抗原，逐渐成为了活载体疫苗研究的热点，多项实验结果表明通过 NICE 系统构建的微生态活载体疫苗，能够起到免疫保护的作用^[58]。对于病毒性疾病，表达 A 型口蹄疫病毒多表位抗原蛋白的 *rL. lactis* 可以有效地诱导黏膜组织中 sIgA 和 IgG 的产生，同时还可以诱导强烈的细胞免疫应答^[59]；采用 *L. lactis* 作为口服疫苗递送载体表达草鱼呼肠孤病毒 II 型 VP6 蛋白，与对照组相比，

口服组存活率和保护率分别提高了 46.7%和 42.9%，且 *L. lactis* 通过表达鱼类的免疫相关基因大大增强了非特异性免疫反应，此外，口服免疫后可诱导机体产生系统免疫和黏膜免疫，并可诱导机体产生炎症反应和细胞免疫，增强免疫保护效果^[60]；融合表达禽流感 H9N2 毒株保守型抗原 M1 和 HA2 蛋白的 r*L. lactis* 可以诱导保护性黏膜和全身免疫，降低鸡群的病理损伤^[61]。对于细菌性疾病，使用 NICE 系统构建的分泌表达布鲁氏菌 LS 蛋白（*Brucella* lumazine synthase, BLS）的 *L. lactis*-pNZ8148-BLS-Usp45 灌胃后可以诱导 IgG 抗体的产生及高水平的干扰素（interferon, IFN）- γ 、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）- α 、白细胞介素（interleukin, IL）-4 和 IL-10 等细胞因子，可以减轻小鼠组织脏器损伤^[62]；融合表达产肠毒素大肠杆菌三价肠毒素蛋白 STa-LTB-STb、菌毛抗原 F5 与耶尔森氏菌外膜蛋白 H 的 *L. lactis*-SLS-F5-OmpH 在灌胃免疫小鼠后可提供完全免疫保护效果^[63]。对于寄生虫类疾病，灌胃免疫表达恶性疟原虫裂殖子的表面蛋白 1 的 r*L. lactis* 可以对小鼠提供免疫保护作用^[64]；有研究者构建了胞质表达、分泌表达及锚定表达三种类型表达鸡球虫病保护性抗原盲肠型球虫免疫标记蛋白-1（*Eimeria tenella* immune mapped protein-1, EtIMP1）的 r*L. lactis*，动物试验结果表明，与携带空载体的 *L. lactis* 相比，三种表达 EtIMP1 的活 *L. lactis* 均显著减少了卵囊脱落，减轻了盲肠的病理损伤并改善了体重增加^[65]。综上所述，*L. lactis* 具备可诱导黏膜免疫应答及安全性上独特的优势，使其在黏膜疫苗的研发中具备极高的潜力。

2.3 乳酸乳球菌活载体疫苗的优势及挑战

以 LAB 为载体构建新型载体疫苗有其独特的优势。相较于肌注免疫，LAB 活载体疫苗可以通过灌胃或鼻喷的方式进行免疫，从而诱导机体产生以 sIgA 为主的黏膜免疫应答，可阻止病毒的早期感染和传播^[66-68]；且 LAB 的细胞壁含有肽聚糖，可以诱导机体产生 Toll 样受体（Toll-like receptors, TLR）2 型反应，使得其本身便具有良好的佐剂效应^[69]；除此之外，LAB 自身还可调节肠道菌群组成，维持肠道稳态，提高免疫力，在预防疾病的同时还能起到保健的作用^[70, 71]。而基于 *L. lactis* 为载体的 NICE 系统构建的活载体疫苗除了上述优势外，其还具备以下独特的优势：1）操作方法简便、技术成熟、成本低且重复性高；2）安全性高、不产生内毒素，可直接口服所表达的蛋白，且菌株自身分泌的蛋白质少，免去了目的蛋白的体外提纯等后续加工处理工序；3）宿主菌没有胞外蛋白酶也不分泌蛋白酶，降低了外源蛋白被降解的风险，有利于外源蛋白的完整性以及功能的正常发挥；4）与其他的 LAB 宿主菌相比，蛋白表达量高，经诱导后能表达 60%的胞内总蛋白；5）拥有可以调控的子系统，能够表达毒素蛋白^[72]。

除了上述优势，我们也必须认识到 *L. lactis* 活载体疫苗仍然有部分问题有待解决，首先就是口服免疫后，如何更好的克服肠道内复杂的恶劣环境，虽然 LAB 本身具有一定的

耐酸及耐胆盐作用，但如果是锚定或分泌型表达的重组菌株，部分抗原蛋白被破坏是难以避免的。其次，对于黏膜免疫的具体作用机制还需要更深入地认识，以及 *L. lactis* 活载体疫苗如何克服个体及物种间肠道微环境的差异也是一个值得挑战的课题。

第三章 细菌样颗粒疫苗研究概况

3.1 细菌样颗粒及其表面展示系统的简介

LAB 递送外源蛋白的方式主要有三种，包括胞内表达，分泌型表达以及将外源蛋白表达后锚定到菌体表面这几种作用方式。其中胞内表达可以很好地保证抗原蛋白的免疫活性，表达量较高，但不利于抗原递呈细胞（Antigen-presenting cells, APC）对抗原的识别^[73]；分泌性表达有利于 APC 识别抗原蛋白，但不利于保证抗原的活性^[74]；表面锚定展示外源蛋白是指将抗原蛋白通过非共价键或者共价键结合到细菌细胞壁表面，将抗原蛋白展示到细胞壁表面既可利用菌体本身的佐剂效应，还有利于 APC 识别抗原蛋白，促使机体的免疫应答的产生，但锚定表达的蛋白数量较胞内及分泌表达低^[75]。

Bosma 等人在 2006 年首次提出基于革兰氏阳性增强基质（Gram-positive enhancer matrix, GEM）的表面展示系统，GEM 是指用热和酸灭活处理 *L. lactis* 得到的具备菌体形态的中空肽聚糖颗粒，又称为细菌样颗粒（Bacterium-like particles, BLP），基于 BLP 的表面展示系统主要由两部分组成，包括 BLP 和肽聚糖锚钩蛋白（protein anchor, PA）^[76]。*L. lactis* 经过热和酸处理后，会破坏包括核酸在内的细胞内成份，也能去除细胞壁中除肽聚糖外的其他成份，得到具备菌体形态的中空肽聚糖颗粒，所以相较于活菌，细菌样颗粒具备更高的蛋白负载量；且 *L. lactis* 细胞壁中的肽聚糖，它由短肽和肽间桥交联的聚糖链组成，可被 TLR2 识别，进而诱导促炎症细胞因子、趋化因子和 I 型 IFN 的产生^[77]，以及激活 DCs，促进 DCs 成熟，增强抗原的递呈效率^[78]，具有良好的佐剂效应。PA 蛋白来源于乳酸乳球菌主要自溶素蛋白（N-Acetylmuraminidase, AcmA），AcmA 是一种肽聚糖水解酶，由 437 个氨基酸组成，主要包括 N-端水解酶活性中心和 C-端细胞壁结合活性中心两个结构域^[79]。C-端细胞壁结合活性结构域即为 PA，包含 3 个重复的溶解素基序（lysin motif, LysM），这些基序是由高度同源的 45 个氨基酸组成的，PA 与 BLP 通过非共价键特异性结合，其结合能力非常强，只能通过十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate, SDS）或氯化锂处理才能将其解离^[80]。

3.2 细菌样颗粒疫苗的研究进展

BLP 由于其强大的负载外源蛋白的能力及可通过黏膜进行免疫的方式，近几年越来越

受到关注。Kees Leenhouts 团队以此开发了多款具备应用潜力的疫苗,包括表面锚定展示志氏贺菌侵袭性质粒抗原(*Shigella* invasion plasmid antigen, Ipa)B 和 IpaD 的 BLP-IpaB/D, 免疫小鼠后可诱导血清中高水平的特异性 IgG 和粪便中 sIgA 的产生,可提供良好的免疫保护效果^[81];以 BLP 作为伯氏疟原虫环孢子蛋白多表位递送平台经肌注免疫后可诱导小鼠对疟疾的完全保护作用^[82];其开发的表达合胞体病毒 F 蛋白的 BLP 疫苗 SynGEM,可诱导机体产生持久的抗体反应^[83],开发的用于防控流感病毒 BLP 疫苗 FluGEM,可以诱导小鼠产生高水平黏膜免疫应答及全身免疫应答,同时诱导 Th1 型细胞因子的产生^[77],且 SynGEM 和 FluGEM 均已进入临床试验阶段。在国内,有研究者构建了表面展示寨卡病毒(Zika virus, ZIKV) prM-E 蛋白的 BLP,联合 ISA 201 VG 和 Poly(I:C)佐剂肌注免疫 BALB/c 小鼠可诱导持久的 ZIKV 特异性 IgG 和保护性中和抗体产生,免疫后还能刺激 B 细胞和 DCs 的激活,显著刺激脾细胞增殖、多种细胞因子分泌、T/B 细胞活化和中枢记忆 T 细胞反应^[84];表达中东呼吸综合征冠状病毒受体结合域的 BLP 疫苗,用含 GEL01 佐剂的 RLP3-BLP 滴鼻免疫小鼠,结果表明,RLP3-BLP 可增强小鼠的体液免疫、细胞免疫和局部黏膜免疫应答,尤其是肠道免疫应答^[85]。

3.3 细菌样颗粒疫苗的优势及挑战

LAB 的锚定表达系统主要可分为脂蛋白锚定模型、LPxTG 锚定模型、利用 Lysm 重复序列的锚定模型及表面蛋白的锚定模型等。BLP 是通过 Lysm 重复序列对外源蛋白进行表面锚定。相较于活菌的表面展示,BLP 作为抗原展示平台主要有以下几点优势:1)安全性高,由于菌株经过热和酸处理,去除了菌体杂质蛋白及遗传物质,仅保留了肽聚糖,所以 BLP 属于非活性、非遗传修饰生物体,减少了重组核酸向环境和其他生物传播的风险^[86];2)融合表达 PA 蛋白的抗原蛋白可体外使用真核或原核表达系统进行表达,表达的重组蛋白无需纯化即可特异的结合在肽聚糖上,操作简单,适应性广^[87];3)单个细菌表面能同时展示多个蛋白,且 Lysm 重复基序之间也可以锚定展示不同的抗原,有利于多价疫苗的制备^[88];4)BLP 具有佐剂效应,其主要成分肽聚糖为 TLR2 的配体之一,通过激活 TLR2 信号通路,可以诱导宿主 DCs 成熟,刺激 IFN- γ 、IL-2 等炎性细胞因子表达,激发更高效的免疫应答^[89];5)外源蛋白负载量高,由于去除了细胞壁中其他杂质蛋白的干扰,使得 BLP 负载外源蛋白的效率比活菌高 100~1000 倍左右^[76];6)更利于被黏膜表面 M 细胞捕获,BLP 大小约 1 μm ,是黏膜表面 M 细胞摄入外源抗原的理想大小,可被位于鼻咽上皮组织和肠道的 M 细胞有效摄入并转运至抗原递呈细胞^[90]。但是作为后续商业化应用,细菌样颗粒的稳定性和均一性,包括负载蛋白的定量等问题还值得进一步探索。

第二篇 研究内容

第一章 表达 ASFV 候选抗原 *rL. lactis* 的构建及其免疫原性评价

ASF 自 2018 年传入我国以来, 给我国养猪业带来了沉重的打击。目前正在尝试几种 ASF 疫苗研发策略, 基因工程减毒活疫苗表现出较好的临床保护效果, 但可能存在安全性问题, 接种后可能会导致关节炎、皮肤坏死和慢性感染等副反应, 并且具有毒力返强以及野生毒株发生重组的风险, 亚单位疫苗及核酸疫苗的保护效果还有待进一步提升^[91, 92]。ASFV 主要是通过气溶胶及接触传播, 突破猪只黏膜屏障进而引发疾病, 可诱导黏膜免疫应答的疫苗对于防控 ASF 的早期传播或许有其独特价值。因此, 开发可诱导黏膜免疫应答和全身性免疫应答的黏膜疫苗, 不失为一种有效的疫苗研发策略。*L. lactis* 是一种良好的黏膜疫苗载体, 具备良好的耐酸、耐胆盐能力, 可通过口服途径免疫, 其本身也是一种良好的免疫增强剂。本研究选取乳酸乳球菌 NICE 表达系统构建 ASF 黏膜疫苗, 以 *L. lactis* NZ3900 菌株为宿主菌, 以食品级质粒 pNZ8149 为表达质粒, 将本团队前期筛选的 ASFV 潜在保护性抗原进行序列优化, 构建了 9 株可稳定表达 ASFV 抗原的 *rL. lactis*。进一步以构建的 9 株 *rL. lactis* 通过灌胃及肌注两种方式免疫小鼠, 并从黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫及固有免疫反应四方面对其免疫原性进行评估, 为研制可诱导黏膜免疫应答的 ASF 黏膜疫苗奠定基础。

1.1 材料和方法

1.1.1 材料

1.1.1.1 质粒、菌株及试验动物

本研究使用的 pNZ8149 无抗质粒和 *L. lactis* NZ3900 菌株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所崔红玉副研究员惠赠; 20 只 5-6 周龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雌性 BALB/c 小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司。

1.1.1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、Prime STAR® HS 聚合酶、DL2 000 和 DL15 000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司; 同源重组试剂盒购自 Vazyme 公司; nisin 诱导剂购自 Sigma-Aldrich 公司; 十二烷基硫酸钠、Tris-盐酸缓冲液、过硫酸铵、氯化镁、十二水合磷酸氢二钠、甘氨酸和磷酸氢二钾等化学试剂购自 Amresco 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Tiangen 公司; 氯化钠、蛋白胨、酵母提取物、乳糖、抗坏血酸、无水乙酸钠、乙二胺四乙酸和蔗糖等购自 Amresco 公司; β -巯基乙醇购自上海联硕生物科技有限公司; M17 肉汤购自青岛海博生物

科技有限公司；30%丙烯酰胺购自 Beyotime 公司；鼠源抗 Sterp 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Sigma-Aldrich 公司；小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒（LTS1092PK）购自天津灏洋生物制品科技有限公司；胎牛血清及青/链霉素双抗购自 Gibco 公司；RPMI 1640 培养基购自 Sigma 公司；兔抗小鼠 IgG H&L (HRP) ab6728 和山羊抗小鼠 IgA (HRP) ab97235 购自 Abcam； 本实验所用到的所有 PCR 引物由黑龙江睿博生物科技有限公司合成。

1.1.1.3 主要仪器设备

Herasafe 2030i 生物安全柜（Thermo Fisher Scientific 公司）、水平摇床（北京市六一仪器厂）、电热恒温水浴锅（上海一恒）、PCR 仪（TaKaRa 公司）、小型离心机（Eppendorf 公司）、DYY-8C 型琼脂糖凝胶电泳仪（北京六一仪器厂）、凝胶成像系统（Bio-Rad 公司）、蛋白凝胶电泳仪与 Western blotting 半干转膜仪（Bio-Rad 公司）、Odyssey 型红外荧光扫描成像系统（Li-COR 公司）、超微量紫外分光光度计（德国 Implen 公司）、超声细胞破碎仪（S-250D）及电转仪（Bio-Rad 公司）等。

1.1.1.4 主要溶液的配制

EM 液体培养基：酵母提取物 5.0 g，蛋白胨 20.0 g，氯化钠 4.0 g，无水乙酸钠 1.5 g，抗坏血酸 0.5 g，使用蒸馏水定容至 1 L，分装后 115℃高压蒸汽灭菌 15 min。

SGM17 培养基：M17 肉汤 21.2 g，蔗糖 85.5 g，甘氨酸 12.5 g，加入蒸馏水定容至 500 mL，分装后 115℃高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 液体培养基：酵母提取物 5.0 g，蛋白胨 10.0 g，氯化钠 10.0 g，加入蒸馏水定容至 1 L，分装后 121℃高压蒸汽灭菌 30 min。

各种对应的固体培养基在其液体培养基中加入 1.5%的琼脂。

L. lactis 感受态细胞制备溶液：蔗糖 171.0 g，甘油 100 mL，加入蒸馏水定容至 1 L，115℃高压蒸汽灭菌 20 min。

L. lactis 感受态细胞制备溶液II：蔗糖 85.5 g，乙二胺四乙酸 9.3 g，甘油 50 mL，加入蒸馏水定容至 500 mL，115℃高压蒸汽灭菌 20 min。

电转复苏液的配制：氯化镁 0.38 g，氯化钙 0.04 g，M17 肉汤 8.46 g，加入蒸馏水定容至 200 mL，115℃高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.2 方法

1.1.2.1 目的片段的扩增

从 NCBI 数据库中检索 ASFV HLJ/18 株（登录号：MK333180.1）的基因序列，根据 *L. lactis* MG1363 的全基因组序列对目的基因进行优化并在序列 C 端引入 Strep 及 His 标签，优化后的 ASFV 基因序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。依据 pNZ8149 载体序列、及优化后的 ASFV 蛋白基因序列设计引物，用于载体 pNZ8149 的线性化和目的片段的扩增，具体引物序列见表 1-1。

表 1-1 引物序列

Table 1-1. Sequences of primers

引物	序列（5'-3'）
F317L-F	GCACTCACCATGGTTGAAACACAAATGGAT
H171R-F	GCACTCACCATGGTTGTTTATGATCTTCTT
CP530R-F	GCACTCACCATGCCATCAAATATGAAACAA
D117L-F	GCACTCACCATGGATACAGAACTTCACCT
E120R-F	GCACTCACCATGGCTGATTTTAATTCACCA
EP402R-F	GCACTCACCATGATTATTCTTATTTTCTT
B602L-F	GCACTCACCATGGCTGAATTTAATATT
E183L-F	GCACTCACCATGGATTTCAGAATTT
B646L-F	GCACTCACCATGGCTTCAGGTGGA
Common-R	AAGCTTGAGCTCTCACTTCTCGAACTGGGG
pNZ8149-F	GGTACCACTAGTTCTAGAGAGCTC
pNZ8149-R	GCATGCCTGCAGTACCCATGGTGA

注：Common-R 代表所有目的基因使用的同一反向引物。

分别以 pNZ8149、pUC57-ASFV-X（X 为 9 中 ASFV 基因中的一种）为模板，对载体和目的片段进行扩增，并在两者之间引入同源臂，具体的 PCR 反应体系如下：1）扩增 pNZ8149 的反应体系：Prime STAR® HS 聚合酶 1 μ L，5 $\times$ buffer 10 μ L，dNTP 4 μ L，pNZ8149-F 1 μ L，pNZ8149-R 1 μ L，pNZ8149 1 μ L，加 ddH₂O 补齐至 50 μ L；2）扩增 pUC57-ASFV-Mix 的反应体系：Prime STAR® HS 聚合酶 1 μ L，5 $\times$ buffer 10 μ L，dNTP 4 μ L，ASFV-Mix-F 1 μ L，ASFV-Mix-R 1 μ L，pUC57-ASFV-Mix 1 μ L，加 ddH₂O 补齐至 50 μ L。PCR 反应程序按以下步骤进行：1）95℃预变性 5 min；2）95℃变性 30 s；3）57℃退火 30 s；4）72℃延伸 1 kb/min，共 35 个循环；72℃延伸 10 min。将 PCR 产物进行核酸电泳，鉴定正确的产物胶回收后送公司测序进一步验证序列是否正确。

1.1.2.2 重组质粒的构建

按照同源重组试剂盒的说明书将 pNZ8149 载体分别与目的片段进行同源重组, 构建重组质粒, 具体反应体系如下: pNZ8149 线性化片段 2 μL , 目的片段添加量为基因序列长度 $\times 0.02$ /回收浓度, 同源重组酶 2 μL , 5 $\times$ buffer 4 μL , 加 ddH₂O 补齐至 20 μL 。将上述反应物分别加入离心管中, 混匀, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 30 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存用于后续的电转化试验。

1.1.2.3 重组乳酸乳球菌的构建

将制备好的 *L. lactis* 感受态细胞置于冰上 5 min, 待其完全融化后, 加入 10 μL 的同源重组产物并混匀, 继续在冰上静置 2 min, 将 *L. lactis* 感受态细胞转移至 0.2 cm 已预冷的电转杯中, 设置电转程序为 2 000 V, 25 μF , 200 Ω 并进行电转, 结束后加入 700 μL 的预冷复苏液, 继续在冰上放置 5 min, 放置 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中活化 1 h, 将活化后的样品 6 000 $\times g$ 离心 2 min, 预留 50 μL 上清重悬菌体, 涂布含乳糖的 EM 固体培养基, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置培养 24~48 h, 挑取单菌落, 将单菌落 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置培养 24 h 后进行菌液 PCR 鉴定并提取质粒送公司测序, 鉴定正确的重组 *rL. lactis* 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.1.2.4 重组蛋白表达的鉴定

将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的 *rL. lactis* 活化 2 代, 活化后的菌液按照 1:100 的比例接种于 10 mL EM 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置培养菌液至 OD_{600nm} 为 0.4 时, 加入终浓度为 10 ng/mL 的 nisin 诱导剂, 并继续置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中静置培养 5 h, 诱导结束后 6 000 $\times g$ 离心 5 min 收获菌体, 并用 PBS 洗涤 2 次, 沉淀用 1 mL PBS 重悬, 使用细胞超声破碎机破碎菌体, 程序为: 功率 39%, 超声 5 s, 间隔 5 s, 共 6 min, 将超声后的样品 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 分离上清和沉淀 (用 200 μL PBS 重悬), 加入 5 $\times$ Loading buffer 混匀, 沸水浴 10 min, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

按照说明书配制合适浓度的蛋白胶, 将样品取出, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$ 离心 3 min, 吸取蛋白 marker 10 μL 和待测蛋白样品 20 μL 加入蛋白胶样品孔中, 先调节电压为 80 V, 待样品跑出浓缩胶, 调整电压为 140 V, 继续进行直至样品移动至凝胶底部, 将凝胶取出, 并切除多余凝胶, 选择大小合适的硝酸纤维素膜和滤纸, 按照下层滤纸、硝酸纤维素膜、凝胶、上层滤纸的顺序依次放在转膜仪中央, 调节转膜仪电压至 15 V, 运行 1 h。转膜结束后取出有蛋白印记的硝酸纤维素膜, 用 5% 脱脂乳室温封闭 2 h, 然后用 PBS 洗去脱脂乳, 加入鼠源抗 Strep 抗体, 在摇床上孵育 2 h, 结束后分别用 PBST 洗涤 4 次, 每次 5 min, 再加入山羊抗鼠 IgG 抗体, 于摇床上孵育 45 min, 同样使用 PBST 洗涤 4 次, 每次 5 min, 清洗完成后使用 Odyssey 扫描成像系统进行扫膜。

1.1.2.5 重组乳酸乳球菌的生长特性鉴定

将 500 μL 过夜培养的 *rL. lactis*-F317L 及 *L. lactis*-pNZ8149 及 *L. lactis* NZ3900 接种于

10 mL EM 液体培养基中，并设立加诱导剂及不加诱导剂组，测定菌液的 OD_{600nm} 值，此后，每隔 1 h 测定一次菌液的 OD_{600nm} 值并记录，检测至细菌稳定期，根据数据绘制 *rL. lactis*-F317L、*L. lactis*-pNZ8149 及 *L. lactis* NZ3900 的生长曲线并进行分析，根据绘制的菌液生长曲线，将稳定期菌液稀释成不同的 OD_{600nm} 值（包括 OD_{600nm} 为 0.4 时及诱导 5 h 后的 OD_{600nm} 值），用平板涂布法计算菌落数，具体方法如下：将菌液用 PBS 十倍稀释成不同梯度（100 μ L + 900 μ L），选取三个合适稀释度的菌液，分别取 0.2 mL 加到已制备好的 Em 固态平板上，然后用无菌涂布棒将菌液涂布至整个平板表面，30°C 温箱培养 48 h，计算菌落数（菌落数量以 50 到 300 之间为宜），按以下公式计算原菌液的含菌数：每毫升原菌液活菌数=同一稀释度 3 个重复培养皿菌落平均数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 5。

1.1.2.6 重组乳酸乳球菌的遗传稳定性鉴定

为了评估重组菌株的遗传稳定性，将 *rL. lactis* 每日进行传代培养，将重组菌连续传 22 代，在第 5、10、15 和 22 代时，诱导 *rL. lactis* 表达蛋白，超声破碎后收集上清，进行 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的表达情况。

1.1.2.7 小鼠免疫试验

将 20 只 5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为 4 组，每组 5 只，包括 *rL. lactis* 灌胃免疫组、*rL. lactis* 肌注免疫组、*L. lactis* 空载对照组及 PBS 空白对照组，*rL. lactis* 免疫组免疫剂量为 9×10^9 CFU/只，共 9 株菌混合后进行免疫，每株菌的免疫剂量为 10^9 CFU，用 200 μ L 的 PBS 重悬、*L. lactis* 空载对照组免疫剂量为 9×10^9 CFU 的 *L. lactis*-pNZ8149，其中 *rL. lactis* 肌注免疫组将菌株破碎后进行肌注，其余组菌株均通过灌胃的方式进行免疫，具体分组及免疫方案见表 1-2。

表 1-2 *rL. lactis* 小鼠免疫的剂量及途径

Table 1-2. The immunization dose and route of *rL. lactis* in mice

组别	数量（只）	免疫原	免疫剂量	免疫途径
A	5	<i>rL. lactis</i>	10^9 CFU/株，共 9 株	灌胃
B	5	<i>L. lactis</i> -pNZ8149	9×10^9 CFU/株	灌胃
C	5	PBS	100 μ L	灌胃
D	5	<i>rL. lactis</i>	10^9 CFU/株，共 9 株	肌注

小鼠免疫程序为首免时，灌胃免疫为隔天免疫，连续灌胃 14 d，间隔两周后，连续免疫 3 d 进行加强免疫，再次间隔两周后，连续免疫 3 d 进行第二次加强免疫，肌注免疫每次仅免疫一次。于第 0 d、21 d（首免后 7 d）、37 d（二免后 7 d）、44 d（二免后 14 d）

及 54 d（三免后 7 d）对小鼠进行断尾采血及收集粪便，第 54 d 将小鼠吸入 CO₂ 麻醉，颈椎脱臼处死小鼠，收集小鼠脾脏用于后续淋巴细胞增殖试验检测，若动物出现濒死则此时作为试验的终点对小鼠进行安乐死。安乐死方式为 CO₂ 吸入麻醉颈椎脱臼处死小鼠。具体免疫程序见图 1-1。

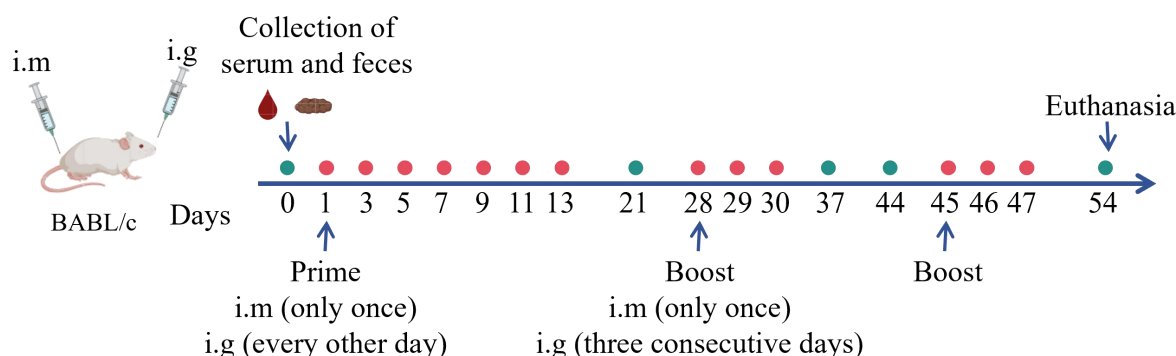


图 1-1 小鼠试验的免疫程序

Fig. 1-1 Mouse immunization schedule

1.1.2.8 ELISA

1) 用碳酸盐溶液将纯化的 ASFV 目的蛋白稀释至合适的浓度，并分别包被 96 孔 ELISA 微量反应板，4℃冰箱过夜；

2) 每孔加入 200 μL PBST 洗涤 3 次，弃掉 PBST 后，加入 100 μL 5% 的脱脂乳作为封闭液，37℃条件下封闭 2 h；

3) 弃去封闭液后将 96 孔板拍干，加入稀释后（1:100）的样品 100 μL，37℃温箱孵育 1 h；

4) PBST 洗板 5 次，每孔 200 μL，每次 3 min，拍干后每孔加入稀释后的兔抗小鼠 IgG（羊抗小鼠 IgA）抗体 100 μL/孔，37℃温箱孵育 45 min；

5) 洗板 5 次，每次 3 min，最后一次置于厚吸水纸上拍干，加入 TMB 显色液 100 μL/孔，室温避光孵育 15 min；

6) 加入 2 M H₂SO₄ 终止液 50 μL/孔，混匀后立即测量 OD_{450nm} 值。

1.1.2.9 小鼠脾脏淋巴细胞增殖试验

1) 将小鼠脱颈处死，于 75% 酒精中浸泡消毒后，无菌条件下解剖小鼠并取其脾脏；

2) 将脾脏放在 70 μm 细胞筛网上（筛网置于 50 mL 离心管上），并用 2 mL PBS 润洗滤网，减少细胞黏附于干燥的滤网上，用 5 mL 注射器塞以温和画圆的方式反复研磨，

边研磨边加入匀浆冲洗液，使细胞全部通过筛网滴到离心管中；

3) 弃去筛网，组织研磨液以 $400 \times g$ ，离心 10 min，弃上清；

4) 用 1 mL 样本稀释液重悬细胞，备用；

5) 取 15 mL 离心管，加入 4 mL 分离液；

6) 小心吸取脾脏组织单细胞悬液缓慢加于分离液液面上， $400 \times g$ ，离心 20 min；

7) 离心后，此时离心管中由上至下分为四层，第一层为稀释层，第二层为环状乳白色淋巴层，第三层为透明分离液层，第四层为红细胞层；

8) 小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层到另一个 15 mL 离心管中，向离心管加入 5 mL 洗涤液，混匀细胞；

9) $400 \times g$ ，离心 10 min，弃上清，以 5 mL 清洗液重悬所得细胞， $250 \times g$ ，离心 10 min；

10) 将上述细胞悬液以 10^5 个细胞 100 μ L/每孔接种 96 孔板；

11) 设置 3 个实验组，每组 2 个重复，阴性对照组，每孔仅加入 100 μ L 的 RPMI-1640，阳性对照组，每孔加入 100 μ L 的 Con A 溶液（用 RPMI-1640 稀释至终浓度为 10 μ g/mL），ASFV 刺激组每孔加入 100 μ L 的 1×10^5 TCID₅₀ 的 ASFV-WT。

12) 置于 37°C、5% CO₂ 细胞恒温培养箱培养 72 h 后，每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂，37°C 避光孵育 3 h，在酶标仪上读取 OD_{450nm} 处的吸光度值并计算刺激指数，刺激指数（stimulation indices, SI）=（刺激值-空白值）/（对照值-空白值）。

1.1.2.10 统计分析

利用统计学软件 GraphPad Prism 9.0.0 进行统计学分析，实验数据使用 One-way ANOVA 进行分析，用平均值与标准偏差（mean $\pm$ SD）表示，其中 ns 代表 $p > 0.05$ ，无显著差异，*代表 $p \leq 0.05$ ，**代表 $p \leq 0.01$ ，***代表 $p \leq 0.001$ ，****代表 $p \leq 0.0001$ 。

1.2 结果

1.2.1 重组 *rL. lactis* 的构建及鉴定

分别以含 9 种优化后的 ASFV 基因序列的质粒 pUC57-B646L、pUC57-E183L、pUC57-ER402R、pUC57-F317L、pUC57-H171R、pUC57-CP530R、pUC57-D117L、pUC57-B602L 和 pUC57-E120R 为模板，扩增优化后的 ASFV F317L（1008 bp）、H171R（567 bp）、CP530R（1647 bp）、D117L（408 bp）、E120R（423bp）、EP402R（1137 bp）、B602L（1731 bp）、E183L（609 bp）和 B646L（1995 bp）片段，并使用同源重组试剂盒

将 pNZ8149 载体分别与目的片段进行同源重组, 构建重组质粒, 并将构建好的质粒电转化至 *L. lactis* NZ3900 中, 挑取电转后的单个菌落于 EM 液体培养基中, 30℃条件下静置培养 8 h, 并进行菌液 PCR 鉴定, 结果如图 1-2 所示。

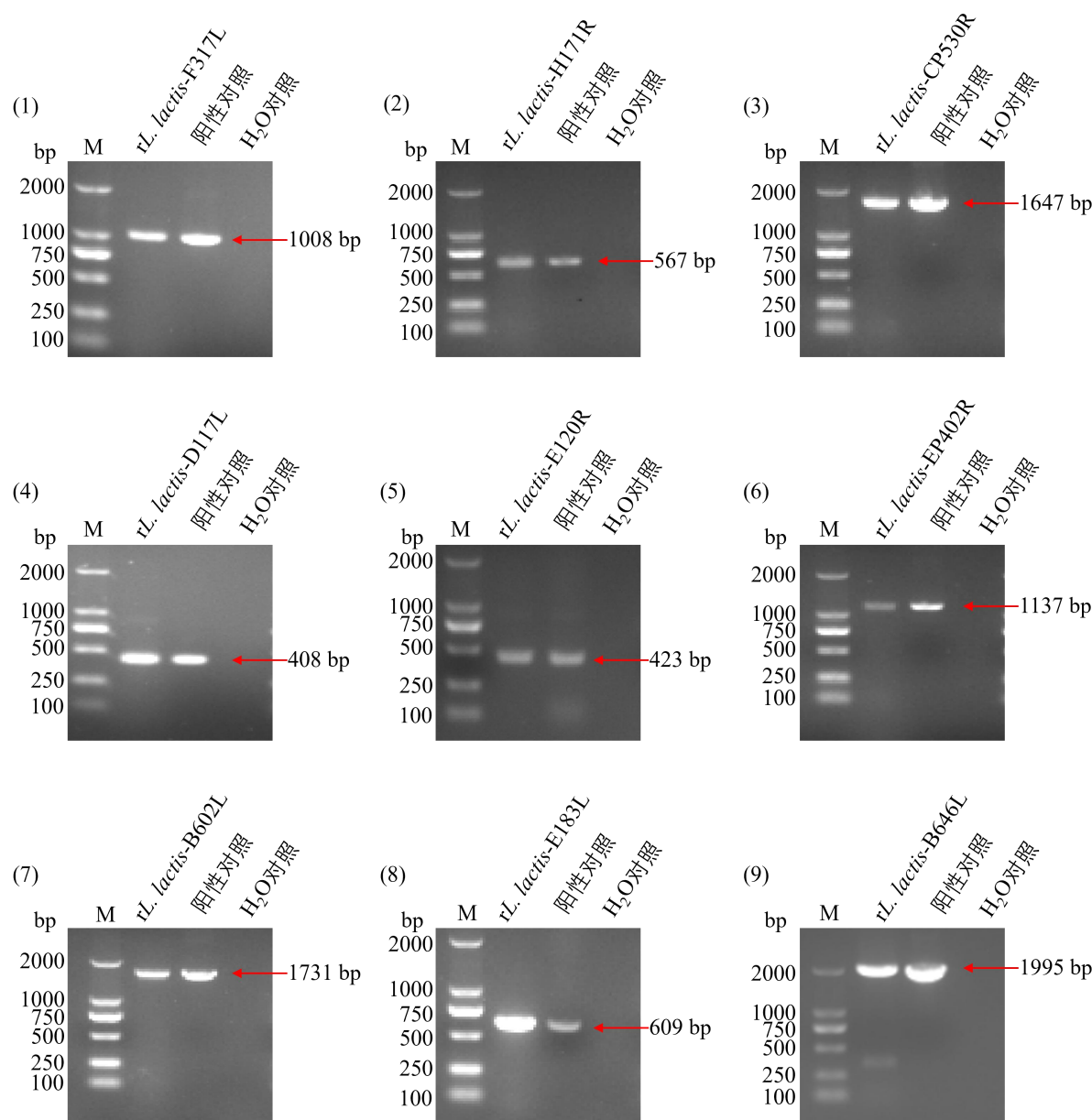


图 1-2 重组乳酸乳球菌的 PCR 鉴定

Fig. 1-2 PCR identification of recombinant *Lactococcus lactis*

1.2.2 目的蛋白在重组乳酸乳球菌中的表达

使用诱导剂 nisin 诱导 *rL. lactis* 表达相应的 ASFV 抗原蛋白, 将诱导表达后的 *rL. lactis* 超声破碎, 离心后收取上清液进行 Western blotting 鉴定, 使用鼠源抗 Strep 单克隆抗体 (mAb) 为一抗, 检测到特异性目的条带, 分别与 ASFV F317L (40 kDa)、H171R (24 kDa)、

CP530R (63 kDa)、D117L (16 kDa)、E120R (20 kDa)、CD2v (*EP402R* 基因编码蛋白, 43 kDa)、B602L (71 kDa)、p54 (*E183L* 基因编码蛋白, 22 kDa) 和 p72 (*B646L* 基因编码蛋白, 75 kDa) 的预期蛋白大小相符 (图 1-3), 这表明 9 种 *rL. lactis* 均可可溶性地表达相应的 ASFV 抗原蛋白。

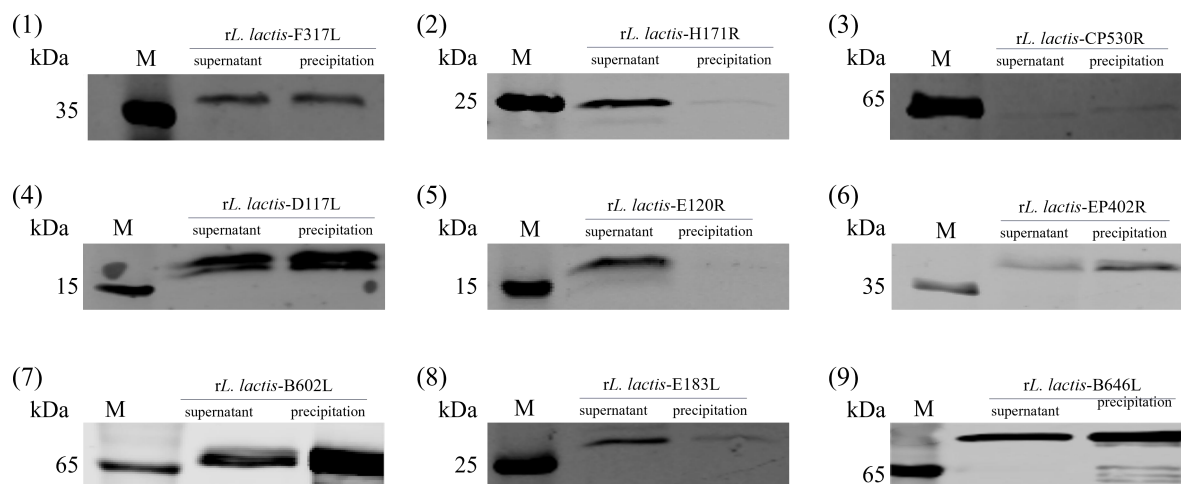


图 1-3 Western blotting 检测目的蛋白的表达

Fig. 1-3 The expression of target protein was detected by Western blotting.

1.2.3 重组乳酸乳球菌生长特性的鉴定

为了了解含有重组质粒的菌株是否影响 *L. lactis* 的生长及不同 OD_{600nm} 时含有的细菌数, 我们以 *rL. lactis*-F317L 为 9 株重组菌中的模式菌, 并设立加诱导剂及不加诱导剂组, 每隔 1 h 测定一次 *rL. lactis*-F317L、*L. lactis*-pNZ8149 及 *L. lactis* NZ3900 的 OD_{600nm} 值并记录, 检测至细菌稳定期, 根据数据绘制生长曲线 (图 1-4), 结果表明, 引入外源抗原不影响 *L. lactis* 的生长。将稳定期菌液稀释成不同的 OD_{600nm} 值, 用平板涂布法计算不同的 OD_{600nm} 值时含有的菌落数, 经计算, 在 OD_{600nm} 为 0.4 时加入诱导剂, 诱导 5 h 后的重组菌刚好处于菌株稳定期, 此时菌株数约为 5×10^8 CFU/mL。

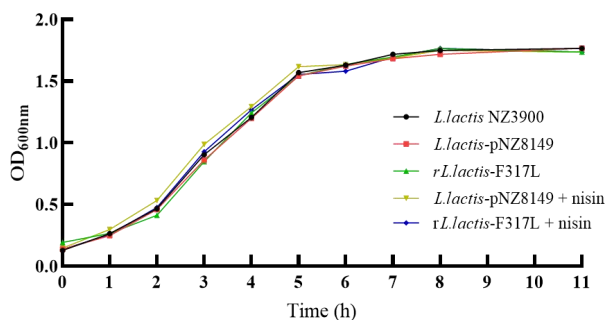


图 1-4 *rL. lactis* 的生长曲线

Fig. 1-4 Growth curve of the *rL. lactis* strains

1.2.4 重组乳酸乳球菌的遗传稳定性鉴定

为了验证 *rL. lactis* 的遗传稳定性, 连续传代 *rL. lactis*, 并在第 5、10、15 和 22 代时, 诱导 *rL. lactis* 表达相应的 ASFV 抗原蛋白, 超声破碎菌株后取上清进行 Western blotting, 以分析不同代次的 *rL. lactis* 表达 ASFV 抗原蛋白的水平, 结果表明, 在第 22 代时, 9 株 *rL. lactis* 均可稳定表达相应的 ASFV 抗原蛋白, 这也表明构建的 9 株 *rL. lactis* 均有良好的遗传稳定性 (图 1-5)。

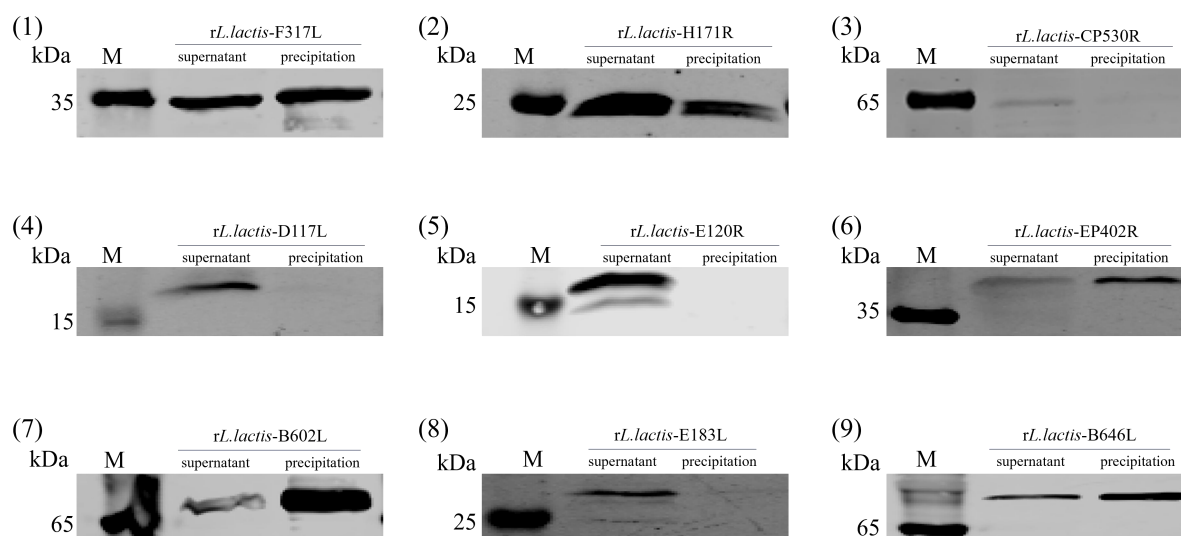


图 1-5 Western blotting 检测第 22 代 *rL. lactis* 菌株的蛋白表达

Fig. 1-5 The protein expression of the 22nd generation *rL. lactis* strains detected by western blotting

1.2.5 免疫小鼠血清中特异性 IgG 抗体水平

本研究利用大肠杆菌表达系统表达并纯化了相应的 ASFV 抗原蛋白, 并建立间接 ELISA 检测方法, 利用该方法检测免疫后的小鼠血清中特异性 IgG 抗体水平。小鼠灌胃免疫首免时为隔天免疫, 连续灌胃 14 d, 后续每隔两周, 连续免疫 3 d 进行加强免疫, 肌注免疫每次仅免疫一次, 于每次免疫后 7 d 及 14 d 收集小鼠血清并分离血清。ELISA 结果表明, 首免后 7 d, 仅 *rL. lactis* 肌注组小鼠血清中可检测到血清特异性 IgG 抗体, 较其他组小鼠血清抗体水平有显著升高, 且随着时间推移, *rL. lactis* 肌注组小鼠血清抗体水平逐步升高; *rL. lactis* 灌胃组小鼠血清 E183L、F317L 及 D117L 等蛋白在二免后 7 d 及 14 d 较对照组小鼠血清特异性 IgG 抗体略有升高的趋势, 但与对照组无显著差异 (图 1-6)。

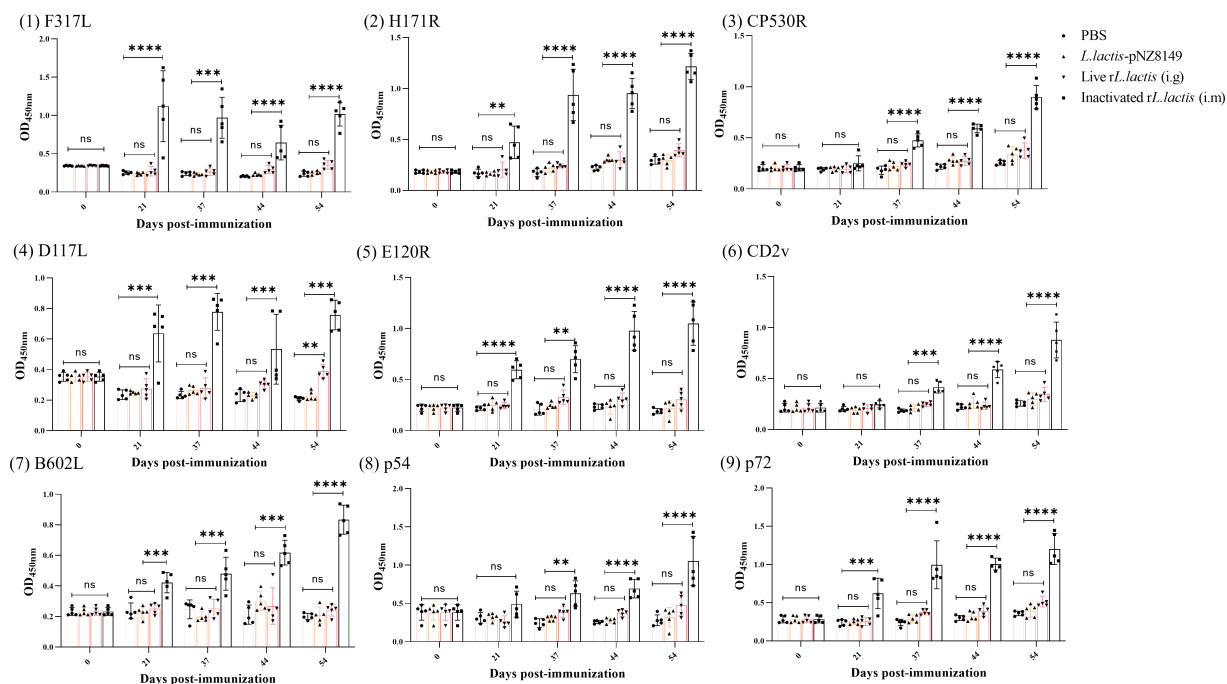


图 1-6 免疫后小鼠血清中 IgG 抗体水平

Fig. 1-6 Sera IgG antibodies in the mice immunized

1.2.6 免疫小鼠粪便中 sIgA 抗体水平

为了评价 *rL. lactis* 免疫小鼠后诱导的黏膜免疫应答水平,采集了不同时间点的免疫小鼠粪便,对粪便中 sIgA 抗体水平进行了 ELISA 检测。结果表明,首免后 7 d, *rL. lactis* 灌胃组小鼠粪便中 sIgA 抗体水平显著高于其他各组,但在二免后 7 d,其粪便中 sIgA 抗体水平下降至较其他组无显著差异,这提示灌胃免疫可能仅在免疫早期能诱导 sIgA 的产生; *rL. lactis* 肌注组小鼠粪便中 sIgA 抗体水平较其他组小鼠无显著差异(图 1-7)。

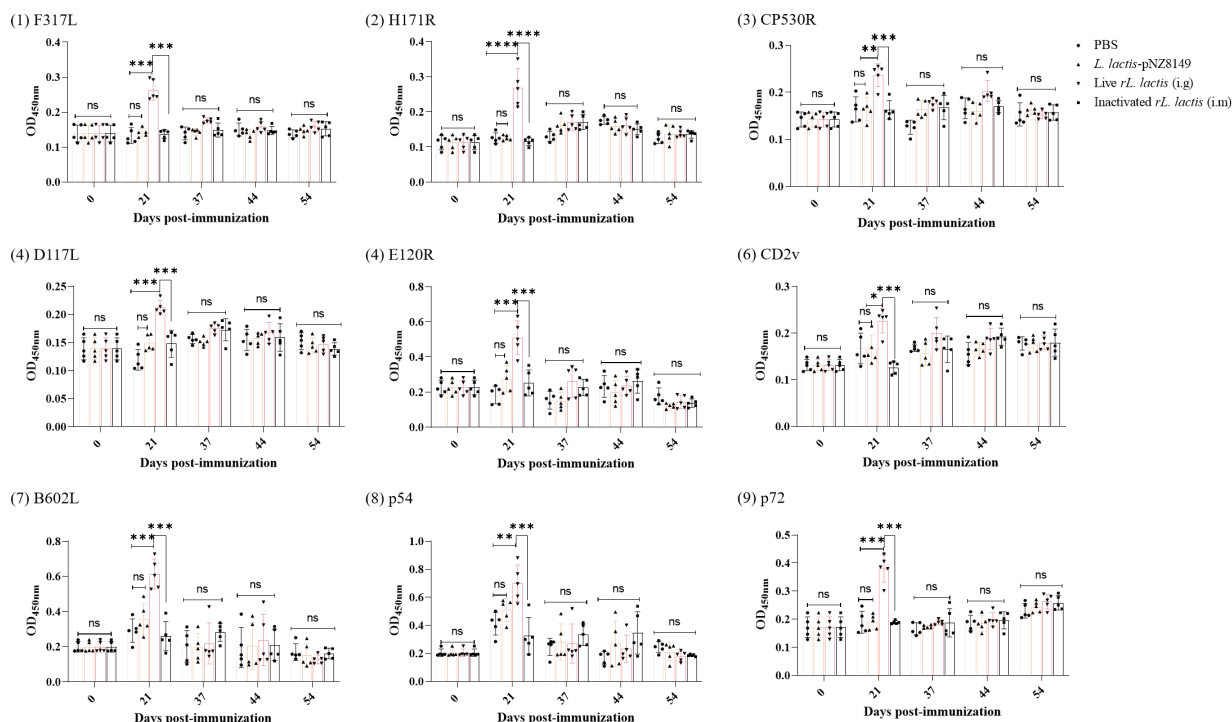


图 1-7 免疫后小鼠粪便中 sIgA 抗体水平

Fig. 1-7 sIgA Antibodies in the feces of the mice immunized

1.2.7 免疫小鼠肠黏膜中 sIgA 抗体水平

考虑到小鼠肠黏膜 sIgA 抗体水平可能比粪便样本能更准确反映免疫后小鼠肠道 sIgA 抗体水平, 为了进一步评价小鼠肠道 sIgA 抗体水平, 我们收集了免疫 54 d 处死后小鼠的肠黏膜样本, 并检测其 sIgA 含量。结果表明, 与对照组相比, 灌胃组小鼠肠黏膜 sIgA 水平呈上升趋势, 然而, 这些差异没有达到统计学意义 (图 1-8)。

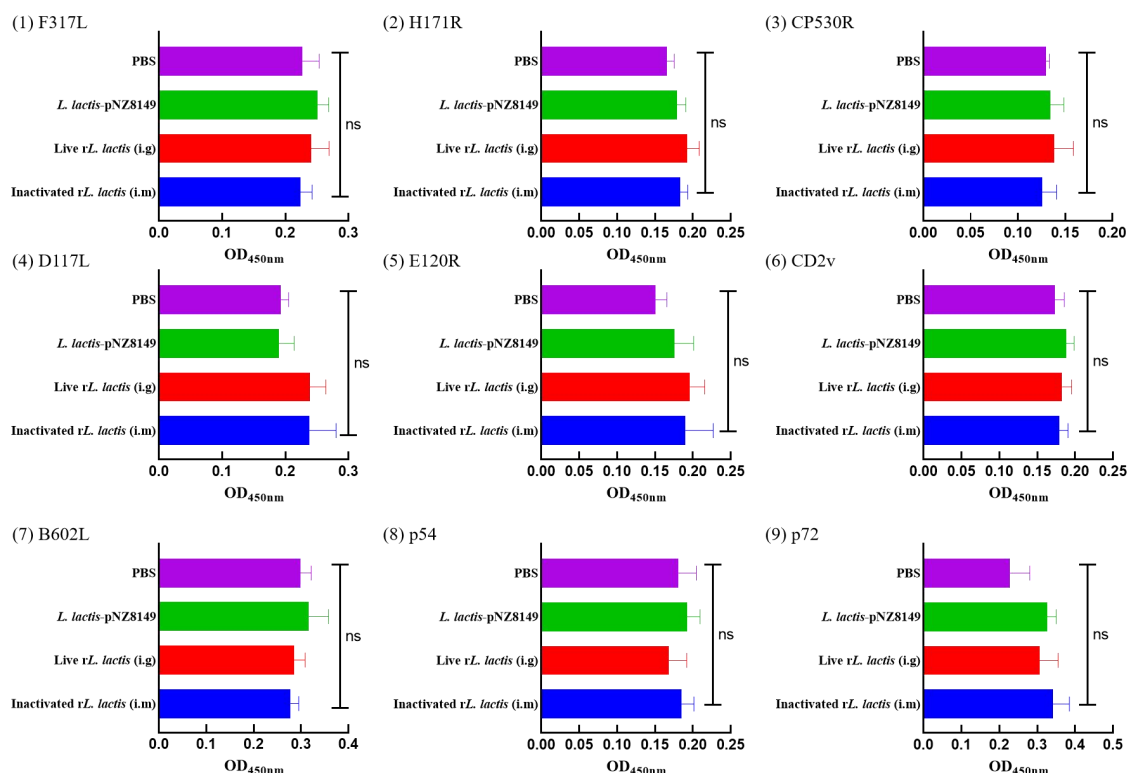


图 1-8 免疫后小鼠肠黏膜中 sIgA 抗体水平

Fig. 1-8 sIgA antibodies in the intestinal mucosa of the mice immunized

1.2.8 免疫小鼠脾脏淋巴细胞增殖水平

为了评价 *rL. lactis* 免疫小鼠后诱导的细胞免疫应答水平，我们对小鼠脾脏淋巴细胞增殖水平进行了验证，淋巴细胞增殖反映了淋巴细胞响应相关刺激的活性和功能状态。小鼠脾脏淋巴细胞增殖试验结果表明，以 10^5 TCID₅₀ 的 ASFV 对小鼠脾脏淋巴细胞进行刺激，*rL. lactis* 灌胃及肌注免疫均未能诱导小鼠脾脏淋巴细胞刺激指数的增高（图 1-9）。

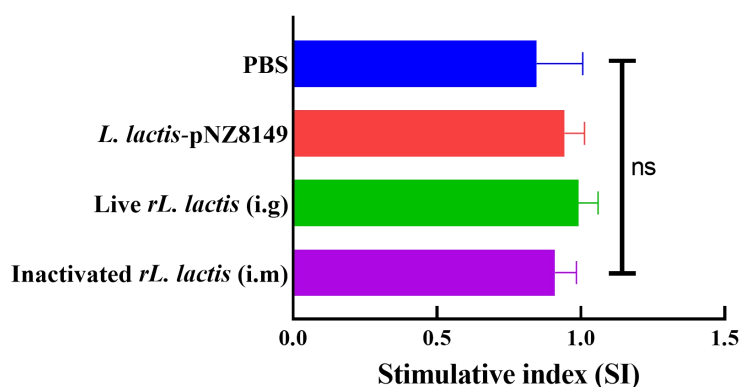


图 1-9 免疫后小鼠淋巴细胞增殖水平

Fig. 1-9 Lymphocyte proliferation of the mice immunized

1.2.9 免疫小鼠血清中细胞因子水平

为了评估 *rL. lactis* 免疫对小鼠先天性免疫的影响, 我们评估了小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 等细胞因子的水平。IFN- γ 和 IL-2 是 Th1 细胞产生的细胞因子, 可促进 CTL、巨噬细胞和 NK 细胞的活化和增殖, 增强 CD8⁺ T 细胞和固有免疫应答。IL-4 和 IL-10 属于 Th2 型细胞因子, 可促进 B 细胞增殖并分化为浆细胞, 从而启动抗体分泌, 促进体液免疫应答, 抑制炎症的发生。结果显示, 仅 *rL. lactis* 肌肉组小鼠血清中 IFN- γ 和 IL-10 水平显著高于其他组 (图 1-10)。

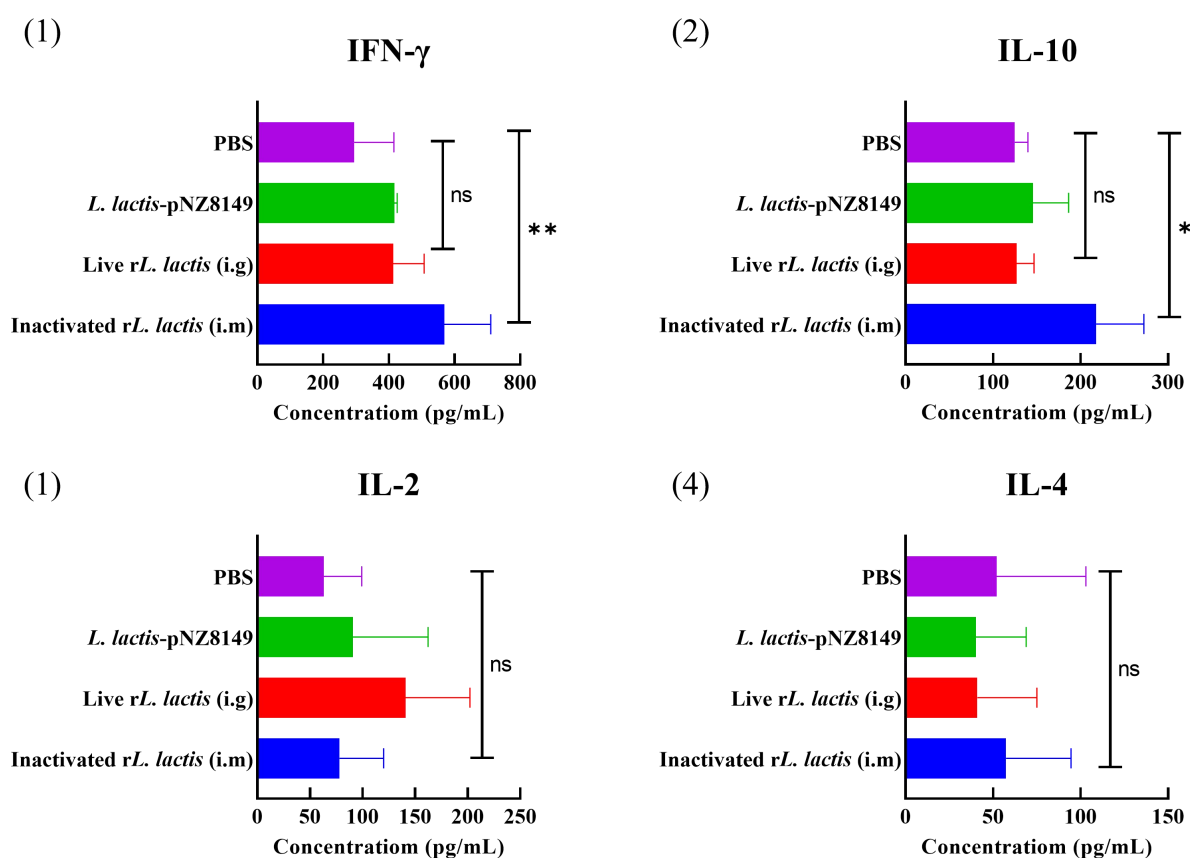


图 1-10 免疫后小鼠血清中细胞因子水平

Fig. 1-10 Cytokine levels in the serum of the mice immunized

1.3 讨论

黏膜是机体抵抗病原入侵的第一道防线, ASFV 等大多数病原微生物主要通过黏膜入侵机体。因此, 诱导黏膜免疫应答对疾病的预防和治疗具有重要意义。而目前正在研制的 ASF 疫苗主要设计为肌肉注射的方式进行免疫接种, 该方式通常无法诱导有效的黏膜免疫应答。因此, 开发 ASF 黏膜疫苗能在病毒入侵的起始位点建立有效的黏膜免疫屏障, 从而更有效地阻止 ASFV 直接入侵。

在生物工程领域,利用 *L. lactis* 作为黏膜免疫活载体递呈病毒抗原研制口服疫苗得到了广泛的应用。*L. lactis* 是公认的食品级安全微生物,背景清楚,以其为基础开发的 NICE 系统操作方法简便、技术成熟、成本低且外源蛋白表达量高,是良好的黏膜疫苗载体,也是最常见的 LAB 载体,已应用于多种病毒的载体疫苗研发^[93]。而发现具有保护作用的免疫原对于亚单位及载体疫苗的设计至关重要,ASFV 基因组长,编码的蛋白多,对其保护性抗原的认识依然不充分,但已有部分抗原被认为可能具有良好的保护性作用,其中 ASFV p72 及 p54 是 ASF 最常用的保护性抗原靶标,ASFV p72 蛋白由 *B646L* 基因编码,是 ASFV 的衣壳蛋白,也是 ASFV 的主要结构蛋白,约占病毒粒子总重的 33%,具有良好的免疫原性^[94]; p54 蛋白由 *E183L* 基因编码,参与 ASFV 颗粒的组装,在病毒的生存和膜前体向组装位点的招募起着重要作用,其动力蛋白结合域与抗体介导的病毒中和有关,用重组蛋白 p54 免疫猪只可以诱导中和抗体^[95]。除上述两种蛋白外,CD2v 蛋白由 *EP402R* 基因编码在 ASFV 复制晚期表达,参与 ASFV 感染的多个阶段,具有良好的免疫原性,可刺激产生 ASFV 特异性抗体并诱导细胞免疫^[96]; ASFV F317L、H171R、CP530R、D117L、B602L 及 E120R 蛋白也均有文献报道可诱导猪只产生良好的体液免疫或细胞免疫,是 ASF 良好的保护性抗原靶标^[16]。

在本研究中,应用 NICE 表达系统,以食品级 *L. lactis* NZ3900 为宿主菌,无抗性质粒 pNZ8149 为表达质粒,构建了 9 株表达 ASFV 保护性候选抗原的 *rL. lactis*,包括 *rL. lactis*-B646L、*rL. lactis*-E183L、*rL. lactis*-CD2v、*rL. lactis*-F317L、*rL. lactis*-H171R、*rL. lactis*-CP530R、*rL. lactis*-D117L、*rL. lactis*-B602L 及 *rL. lactis*-E120R。通过 Western blotting 验证,9 株 *rL. lactis* 的抗原蛋白均为可溶性表达,且可稳定传代。将 9 株 *rL. lactis* 混合后在小鼠体内通过肌注及灌胃两种方式进行免疫以评价其免疫原性。结果表明,*rL. lactis* 肌注免疫可诱导小鼠血清中产生较高水平的 IgG 抗体,而 *rL. lactis* 灌胃组小鼠不能诱导血清中特异性 IgG 抗体的产生。我们认为主要原因可能是重组蛋白的表达定位于细胞内,这可能导致肠道黏膜上皮无法高效地识别和捕获疫苗抗原,从而未能诱导有效的免疫反应,而肌注组的 *rL. lactis* 菌体被超声破碎,蛋白更容易被血液中的免疫细胞捕获,从而产生免疫刺激。此前,有研究者构建了共表达传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBV) 主要抗原 VP2 和肠道沙门菌株 RCK 蛋白的 *rL. lactis*-OptiVP2-RCK,通过肌注及口服免疫,未在血清中检测到特异性 IgG 抗体的产生,但可以检测到中和抗体的产生,且中和抗体提供了对鸡只的保护,作者认为可能是蛋白结构的差异及黏膜免疫和系统免疫的差异导致这一结果^[97]。

sIgA 是黏膜分泌物中的主要抗体类型,对病原体的粘附及穿透肠道屏障具有保护作用。本研究中,在首免后第 7 d,我们可以在灌胃免疫 *rL. lactis* 的小鼠粪便中检测到较高水平的 sIgA 抗体,但遗憾的是在加强免疫后,*rL. lactis* 灌胃组小鼠粪便中 sIgA 水平降低,

且与其他组无显著差异,小鼠肠黏膜 sIgA 抗体水平也进一步证明免疫后期 *rL. lactis* 灌胃组小鼠肠道 sIgA 抗体水平较对照组无显著差异,这与 Jiang 的研究的结果相似,说明 sIgA 可能只在免疫早期分泌阶段发挥作用^[98],与系统性免疫不同,黏膜免疫系统不仅要对抗病原微生物,还要耐受食物中的大量抗原和正常菌群^[99]。抗原的量、性质以及免疫次数对于产生免疫耐受非常重要^[100]。如果通过口服免疫途径应用小剂量可溶性抗原可能导致宿主细胞免疫的多次减弱及免疫耐受的形^[101,102]。由 *rL. lactis* 表达的 ASFV 抗原蛋白量低,加之初次免疫后的长期免疫刺激,可能导致小鼠肠道内出现免疫耐受,这可能是后期免疫阶段小鼠粪便中 sIgA 抗体水平降低至与对照组无显著差异,且未诱导淋巴细胞增殖增加的原因。

总而言之,本试验为构建以 *L. lactis* 为载体的 ASF 黏膜疫苗提供了参考。*rL. lactis* 灌胃免疫可以诱导 sIgA 的产生,这可能为猪只提供早期保护,但是 *rL. lactis* 肌注免疫可以更好的诱导血清特异性 IgG 抗体的产生。我们认为通过表面锚定展示 ASFV 保护性抗原可能更有利于疫苗的免疫效果,因为它有利于增加抗原被 APC 捕获的概率,下一步我们将把 ASFV 抗原蛋白表面锚定展示于 *L. lactis* 表面,以验证其免疫效果。

1.4 小结

1、成功构建了 9 株可溶性表达 ASFV 保护性候选抗原的 *rL. lactis*, 且 *rL. lactis* 具有良好的遗传稳定性;

2、灌胃免疫 *rL. lactis* 初免后 7 d 可诱导小鼠 sIgA 抗体水平显著升高,肌注免疫 *rL. lactis* 可诱导小鼠血清 IgG 抗体水平、IFN- γ 和 IL-10 水平显著升高。

第二章 表面展示 ASFV 候选抗原 BLP 的构建及其免疫原性评价

为了进一步提高以 *L. lactis* 为载体的疫苗免疫效果, 我们计划将 ASFV 保护性抗原蛋白锚定展示于 *L. lactis* 表面。以 *L. lactis* 为载体表面锚定展示外源抗原的方式有多种, 其中 Bosma 等人在 2006 年首次提出了 BLP 表面展示系统, BLP 表面展示系统主要由经酸和热处理后得到的仅含肽聚糖的 BLP 颗粒及融合表达锚钩蛋白的外源蛋白表达系统两部分构成。相较于活菌的表面展示, BLP 表面展示系统具备安全性高、外源蛋白负载量高和更利于保存运输等特点, 且 BLP 本身具备良好的免疫佐剂效应。

本研究构建了 9 种表面展示 ASFV 候选保护性抗原蛋白的 BLP (BLP-F317L、BLP-H171R、BLP-E120R、BLP-p54、BLP-p72、BLP-B602L、BLP-D117L、BLP-CP530R 和 BLP-CD2v)。为了评价这 9 种 BLP 的免疫原性, 我们首先以 BLP-p54 为模式抗原, 在小鼠上进行免疫, 评价其免疫原性。之后, 进一步将 9 种 BLP 混合后在猪体通过鼻喷及肌注两种免疫方式对其免疫原性进行了进一步的评价, 为 ASF 载体疫苗研究奠定了相应的基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 质粒、菌株及实验动物

质粒 pGEX-6P-1-PA 由本实验室保藏; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 20 只 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司, 16 头 4 周龄的 ASFV 阴性商品猪购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物实验基地。

2.1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 购自赛默飞世尔科技公司; 胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 同源重组酶购自诺唯赞生物科技有限公司; IPTG、氨苄青霉素钠及 Anti-His Tag 单克隆抗体购自索莱宝科技有限公司; FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Sigma-Aldrich 公司; QuickBlue 快速染胶液购自博奥龙科技有限公司, 其余同 1.1.1.2。

2.1.1.3 主要仪器设备

同 1.1.1.3。

2.1.2 方法

2.1.2.1 目的片段的扩增

以提取的 ASFV HLJ/18 基因组为模板, 设计含有 pGEX-6P-1-PA 质粒同源臂的 ASFV 候选抗原基因的特异性引物用于扩增目的片段, 具体引物序列见表 2-1, 所有引物均由黑龙江睿博生物科技有限公司合成。

表 2-1 融合表达 PA 蛋白的 ASFV 基因引物序列

Table 2-1. Primer sequence of ASFV genes fused with PA protein gene

引物	序列 (5'-3')
F317L-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGTTCAATGGTTGAGACACAAATGGA
F317L-PA-R	CTATTGGATCCTCCGCCGCCTGTTGTGGACGATGCCTTTG
H171R-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGGTAGTTTATGACTTGCT
H171R-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCGTTTTTTATAGAAAACATGT
CP530R-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGCCCTCTAATATGAAACA
CP530R-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCTTCTTGAAGTAACTTTAGTA
D117L-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGGACACTGAAACGTCTCC
D117L-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCTGAATGCGCAAGTTCAGCTA
E120R-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGGCAGATTTTAATTCTCC
E120R-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCCTTCGATTTATGCGAGCTTA
CD2v-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCGACTACTGGGTGTCTTTCAA
CD2v-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCCAGGTATGTGCAGTTAATGA
B602L-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGGCAGAATTTAATATTGA
B602L-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCCAATTCTGCTTTTGTATATA
E183L-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGATCCATGGATTCTGAATTTTTTCA
E183L-PA-R	AATTCTGAACCTCCGCCGCCCAAGGAGTTTTCTAGGTCTT
B646L-PA-F	CACCAGGCGGCGGAGGTTCAATGGCATCAGGAGGAGCTTT
B646L-PA-R	CTATTGGATCCTCCGCCGCCGGTACTGTAACGCAGCACAG

2.1.2.2 重组质粒的构建

使用限制性内切酶 *EcoRI* 及 *BamHI* 对质粒 pGEX-6P-1-PA 进行双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收。回收产物测定浓度后, 按照同源重组试剂盒说明书的步

骤将线性化的 pGEX-6P-1-PA 载体与 ASFV 目的基因片段进行同源重组，构建重组质粒。取 10 μ L 重组产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，涂布于含有氨苄抗性的 LB 固体平板中，37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养后挑取单菌落进行菌液 PCR 并提质粒送黑龙江睿博生物科技有限公司进行测序，鉴定正确的质粒即为构建成功的重组质粒。

2.1.2.3 重组蛋白可溶性表达的验证

将鉴定正确的重组质粒转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞，将重组菌加入 10 mL 含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中诱导表达，当重组菌液 OD_{600nm} 值达 0.3~0.4 时，将菌液置于 15 $^{\circ}$ C 摇床继续培养 30 min 后加入 1 mmol/L 的 IPTG，于诱导 24 h 后收集菌体，并超声破碎，分离上清和沉淀。取 40 μ L 破碎后的菌体上清液，加入 10 μ L 的 5 $\times$ SDS-PAGE Loading buffer 混匀，沸水浴 10 min。10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白胶转至硝酸纤维素膜，用鼠抗 His 标签抗体（1:1000 稀释）作为一抗，以山羊抗鼠 IgG 抗体（1:10 000）作为二抗，经近红外扫描仪检测融合蛋白可溶性表达情况。

2.1.2.4 细菌样颗粒的构建

将-80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存的 *L. lactis* NZ3900 菌株于 GM17 固体平板划线，挑取单菌落在 GM17 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 过夜培养，第 2 天以 5% 的比例接种于 100 mL GM17 液体培养基中，30 $^{\circ}$ C 温箱培养 12 h，10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。以无菌的 PBS 洗涤 3 次去除培养基，然后以 0.2 倍体积的 10% 三氯乙酸重悬菌体，沸水浴 30 min，10 000 r/min 离心 10 min 去除酸液，并用无菌 PBS 洗涤 5 次，以彻底去除酸液及菌体的杂质蛋白和核酸。使用红细胞计数板对菌体进行计数，以 2.5×10^9 为 1 U，将菌体浓度调整为 10 U/mL，-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.1.2.5 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白表面锚定展示于 BLP

取 10 mL 表达 ASFV 抗原融合蛋白的重组菌液活化并经 IPTG 诱导表达，24 h 后离心收集菌体，用 1 mL 无菌 PBS 重悬菌体，超声破碎后收集上清，加入 1 U 的 BLP，室温旋转孵育 1 h，离心收集沉淀和上清。收集的沉淀用无菌的 PBS，10 000 r/min 离心 10 min 洗涤 3 次后即表面展示 ASFV 抗原蛋白的 BLP。为验证其结合效率，将表面展示 ASFV 抗原蛋白的 BLP 与适量的 5 $\times$ SDS-PAGE Loading buffer 混匀，沸水浴 10 min。10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白胶置于 QuickBlue 快速染胶液中室温振荡 0.5~1 h，然后使用 Odyssey 扫描成像系统进行扫描。

2.1.2.6 IFA 鉴定重组蛋白表面锚定展示于 BLP

取 1 U 表面展示 ASFV 抗原蛋白的 BLP，用 PBS 洗涤 2 次，10 000 r/min 离心 5 min，洗涤后的沉淀用 1 mL 4% 的多聚甲醛固定液重悬，于室温下旋转 0.5 h。随后用 PBS 洗涤 3

次, 10 000 r/min 离心 5 min, 用 1 mL 1% 的 BSA 重悬固定后的菌体沉淀, 室温封闭 0.5 h。用 PBS 洗涤 3 次, 10 000 r/min 离心 5 min, 以 1 mL ASFV 参考阳性血清 (1:200 稀释) 作为一抗, 置于 4°C 冰箱旋转孵育过夜。用 PBS 洗涤 5 次, 10 000 r/min 离心 5 min, 加入 1 mL FITC 标记的抗猪荧光二抗 (1:200 稀释), 37°C 孵育 45 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 10 000 r/min 离心 5 min, 并用 200 μ L 的 PBS 重悬沉淀, 取 10 μ L 细菌悬液滴于载玻片, 盖上盖玻片, 排除气泡后, 自然干燥, 并用倒置荧光显微镜观察荧光。

2.1.2.7 透射电镜观察负载重组蛋白的 BLP

为了观察 ASFV 融合蛋白在 BLP 上的展示情况, 以 BLP-p54 为模式菌株, 我们进行了透射电子显微镜观察。具体步骤如下, 将未处理的 *L. lactis* NZ3900、处理后的 BLP 和 ASFV p54 融合蛋白结合后的 BLP-p54 样品 10 000 r/min, 离心 5 min, 沉淀用 2% 戊二醛固定 24 h 后, 进行超薄切片投射电子显微镜观察。

2.1.2.8 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白与 BLP 锚定结合量的测定

为了确定 1 U 的 BLP 与 ASFV 抗原蛋白的最大结合量, 诱导表达 200 mL 的重组菌液, 收集菌体沉淀并用 20 mL 无菌 PBS 重悬菌体, 随后对重悬后的菌液进行超声破碎, 分离超声破碎后上清及沉淀。分别取 2、3、4 和 5 mL 超声破碎后的上清与 1 U 的 BLP 室温旋转结合 1 h, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 000 r/min 离心 5 min, 用 1 mL 的 PBS 重悬沉淀, 制成样品后利用 SDS-PAGE 鉴定 1 U 的 BLP 的最大菌液结合量。取 1 U 的 BLP 能结合的最大菌液量, 以不同浓度的 BSA (0、0.05、0.10、0.15、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL) 作为标准蛋白, 以等体积上样量进行 SDS-PAGE 分析, 并制作准曲线, 得到 1 U 的 BLP 与 ASFV 抗原蛋白的最大结合量。

2.1.2.9 小鼠免疫试验

将 20 只 6 周龄的 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 包括 BLP-p54 灌胃组、BLP-p54 肌注组、BLP 空载对照组及 PBS 对照组, 除 BLP-p54 肌注组采用肌肉注射外, 其余组小鼠均采用灌胃途径进行免疫。灌胃组每次免疫需连续灌胃 3 d, 肌注组每次仅免疫 1 次, 所有组小鼠在首免后 14 d 加强免疫 1 次, 并在免疫后 0、7、14、21 及 28 d 时采集血液及粪便样品, 免疫程序见表 2-2。

表 2-2 小鼠免疫剂量和途径

Table 2-2 Immunization doses and routes in mice

组别	数量(只)	免疫菌株	免疫剂量	免疫方式
1	5	BLP-p54	1 U/50 μ L	肌注
2	5	BLP-p54	1 U/200 μ L	灌胃
3	5	BLP	1 U/200 μ L	灌胃
4	5	PBS	200 μ L	灌胃

2.1.2.10 猪只免疫试验

将 16 只 4 周龄的 ASFV 阴性商品猪随机分为 4 组，包括 BLP-ASFV-Mix 鼻喷组（4 头）、BLP-ASFV-Mix 肌注组（4 头）、BLP 鼻喷空载对照组（3 头）、BLP 肌注空载对照组（3 头）及 PBS 对照组（2 头）。首免后 4 周加强免疫 1 次，并在每次免疫后 2 和 4 周时采集血液及鼻拭子样品，具体免疫程序见表 2-3。

表 2-3 猪只免疫剂量和途径

Table 2-3 Immunization doses and routes in pig

组别	数量(只)	免疫菌株	免疫剂量	免疫方式
1	4	BLP-ASFV-Mix	5 U/2 mL	肌注
2	4	BLP-ASFV-Mix	5 U/2 mL	鼻喷
3	3	BLP	5 U/2 mL	肌注
4	3	BLP	5 U/2 mL	鼻喷
5	2	PBS	2 mL	肌注

2.1.2.11 ELISA

同 1.1.2.8

2.1.2.12 酶联免疫斑点吸附试验

1) 按照猪外周血淋巴细胞试剂盒分离猪只外周血淋巴细胞，具体步骤与 2.1.2.4 中分离小鼠脾脏淋巴细胞相似；

2) 每个样品需要 6 个孔，其中待检样品、阴性和阳性对照各 2 孔，计算所需孔数，用 PBS（200 μ L/孔）清洗 5 次，洗时轻轻摇晃，然后弃液；

2) 加入含 5%的青、链霉素、10%胎牛血清的 RPMI 1640（200 μ L/孔），孵育 0.5 h；

- 3) 弃去培养基, 以 5×10^5 个细胞 $100 \mu\text{L}$ /每孔接种 ELISpot 96 孔板;
- 4) 待检样品用 $100 \mu\text{L}$ 10^6 TCID₅₀ 的 ASFV-WT 进行刺激, 同时使用 $100 \mu\text{L}$ RPMI 1640 和 $100 \mu\text{L}$ PHA (1:1000 稀释) 分别作为阴性和阳性对照刺激物, 将刺激物加入到 96 孔板中;
- 5) 加入刺激物后, 将 96 孔板置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 48 h;
- 6) 弃去培养液, 使用 PBS ($200 \mu\text{L}$ /孔) 清洗 5 次;
- 7) 以 $100 \mu\text{L}$ /孔的量加入用 PBS 稀释的含 0.5% FBS 的 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 检测抗体 (P2C11-BIOTIN, 0.5 mg/mL), 室温孵育 2 h;
- 8) 弃去一抗, 使用 PBS ($200 \mu\text{L}$ /孔) 清洗 5 次;
- 9) 加入用 PBS 稀释的含 0.5% FBS 的 HRP 标记抗体 ($100 \mu\text{L}$ /孔, 1000 倍稀释), 室温孵育 1 h;
- 10) 弃去二抗, 使用 PBS ($200 \mu\text{L}$ /孔), 清洗 5 次, 洗时轻轻摇晃, 然后弃液;
- 11) 加入 TMB 显色液 ($100 \mu\text{L}$ /孔), 避光孵育 30 min, 直至出现明显的斑点;
- 12) 用水冲洗阻止继续变色; 晾干后, 使用 AID iSpot FluoroSpot Reader System 读取结果并计算每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数。

2.1.2.7 流式细胞术

- 1) 1.5 mL EP 管中加入 10^6 个分离好的猪外周血淋巴细胞;
- 2) 设置对照管, 一个 CD3 ϵ -SPRD 单染对照 ($2 \mu\text{L}$ CD3 ϵ 单抗, 混匀), 一个 CD4-FITC 单染对照 ($2 \mu\text{L}$ CD4 单抗, 混匀), 一个 CD8 α -PE 单染对照 ($2 \mu\text{L}$ CD8 α 单抗, 混匀);
- 3) 样品管每管分别加入 $2 \mu\text{L}$ CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 单抗, 混匀后于冰上避光孵育 30 min;
- 4) 室温 $500 \times g$, 离心 3 min;
- 5) 弃上清, 加 1 mL PBS 缓冲液悬浮, 室温 $500 \times g$, 离心 3 min;
- 6) 重复步骤 5;
- 7) 每管加入 $500 \mu\text{L}$ PBS 缓冲液, 悬浮, 使用流式细胞仪检测处理样品的 CD8 $^+$ T 细胞及 CD4 $^+$ T 细胞数量, 并进行数据分析。

2.2 结果

2.2.1 目的基因的扩增

以提取的 ASFV HLJ/18 基因组为模板, 扩增 ASFV *F317L* (951 bp)、*H171R* (513 bp)、*CP530R* (1590 bp)、*D117L* (282 bp)、*E120R* (366 bp)、*EP402R* (528 bp)、*B602L* (1590 bp)、*E183L* (483 bp) 和 *B646L* (1938 bp) 等目的片段, 获得与预期大小相当的

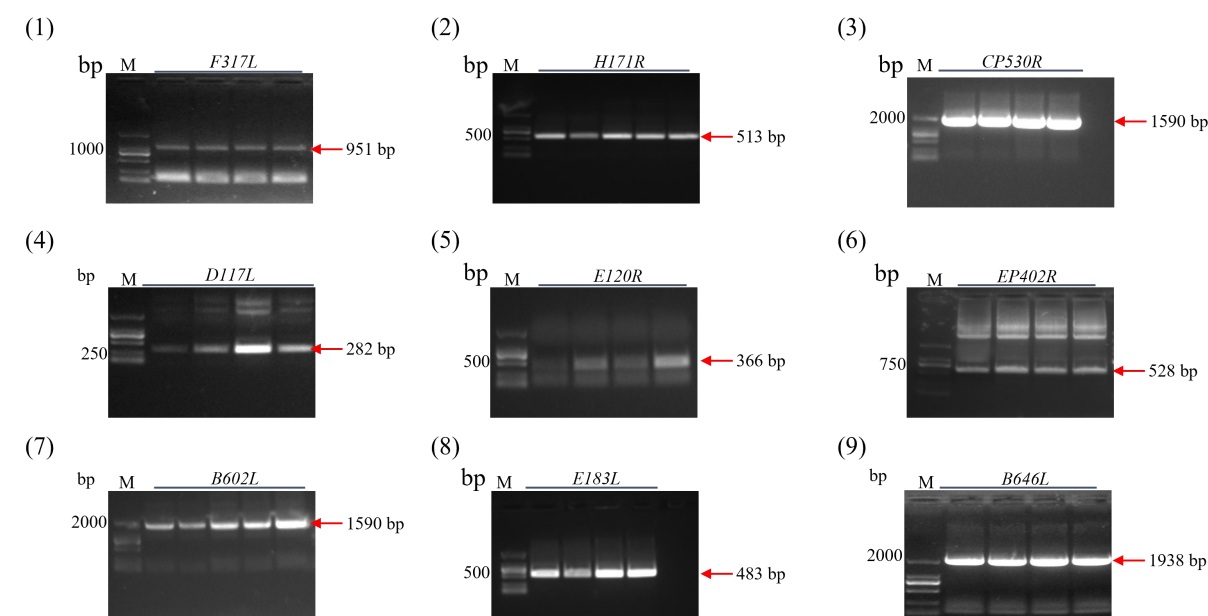


图 2-1 目的基因的扩增

Fig. 2-1 Amplification of target gene

2.2.2 表达 ASFV 抗原蛋白的重组菌的 PCR 鉴定

挑取转化后的单菌落于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中, 在 37°C 条件下 180 rpm 培养 12 h, 经菌液 PCR 鉴定初步筛选出表达 ASFV 抗原蛋白的阳性单克隆菌株 (图 2-2), 进一步送公司测序验证后, 将完全正确的菌株保存于 -80°C 冰箱备用。

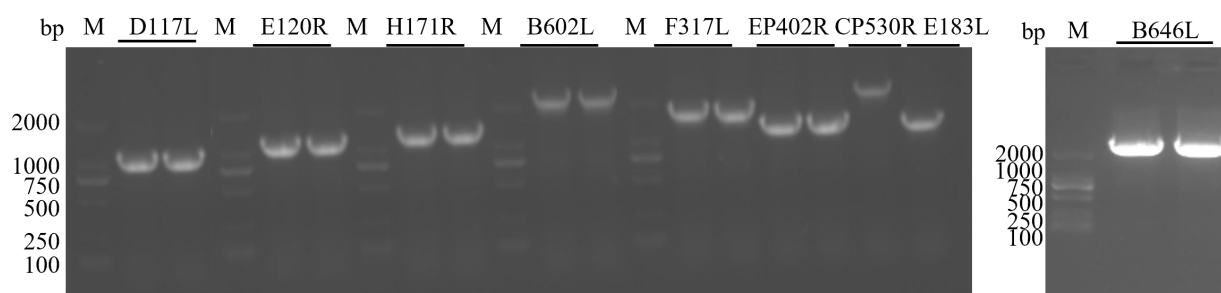


图 2-2 表达 ASFV 抗原蛋白的重组菌的 PCR 鉴定

Fig. 2-2 PCR identification of recombinant bacteria expressing ASFV antigen protein

2.2.3 ASFV 融合蛋白的可溶性检测

取 10 mL 重组菌 pGEX-6P-1-ASFV-PA/Rosetta 与 *E. coli* Rosetta 空载对照菌, 用 IPTG

对菌液进行诱导表达, 以小鼠抗 His 标签抗体为一抗, 经 Western blotting 验证。结果表明, 重组菌株上清液在 F317L-GST-PA (85 kDa)、H171R-GST-PA (69 kDa)、CP530R-TF-PA (135 kDa)、D117L-GST-PA (60 kDa)、E120R-GST-PA (63 kDa)、CD2v-GST-PA (69 kDa)、B602L-GST-PA (110 kDa)、p54-GST-PA (66 kDa) 和 B646L-TF-PA (148 kDa) 处有清晰的条带, 与预期蛋白大小相差不大, 空载对照组在 26 kDa 处有条带, 与伴侣蛋白 GST 蛋白大小相符 (图 2-3)。

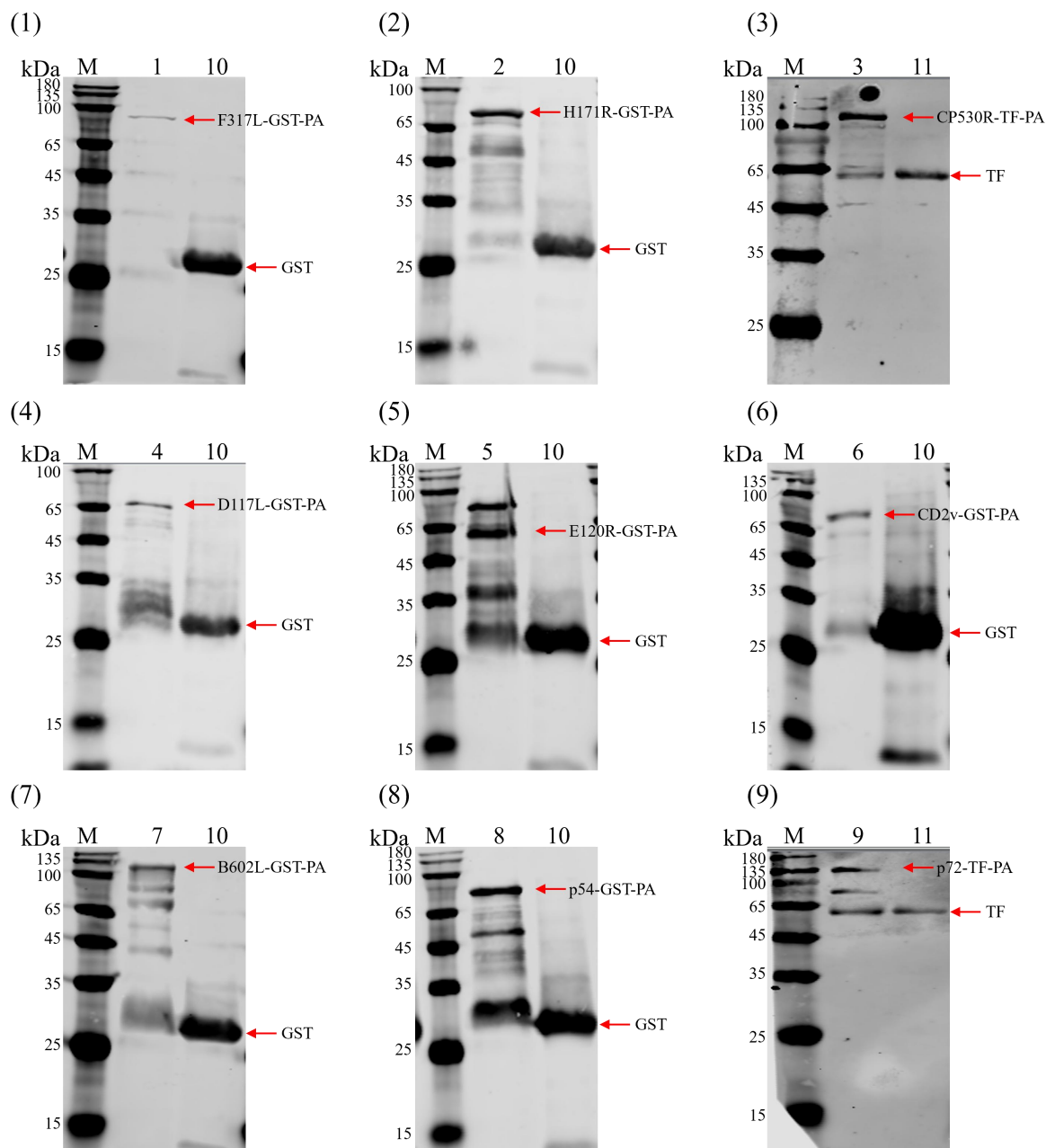


图 2-3 ASFV 融合蛋白的可溶性检测

Fig. 2-3 Detection of ASFV fusion protein in soluble

注: 1~9 分别表示 F317L-GST-PA、H171R-GST-PA、CP530R-TF-PA、D117L-GST-PA、E120R-GST-PA、CD2V-GST-PA、B602L-GST-PA、p54-GST-PA、B646L-TF-PA 蛋白; 10 代表 GST 蛋白; 11 代表 TF 蛋白。

2.2.4 IFA 鉴定 ASFV 抗原蛋白与 BLP 的结合

取 9 种表面展示 ASFV 抗原的 BLP 与 BLP 进行 IFA 观察，结果表明，BLP 与 ASFV 融合蛋白结合后，进行共聚焦显微镜观察，绿色荧光视野下可以观察到特异性荧光，而 BLP 对照组在共聚焦显微镜绿色荧光视野下则无法观察到特异性荧光（图 2-4）。本结果证明，ASFV 融合蛋白可以锚定表达于 BLP 表面，且融合蛋白可以和 ASFV 阳性血清发生特异性反应。

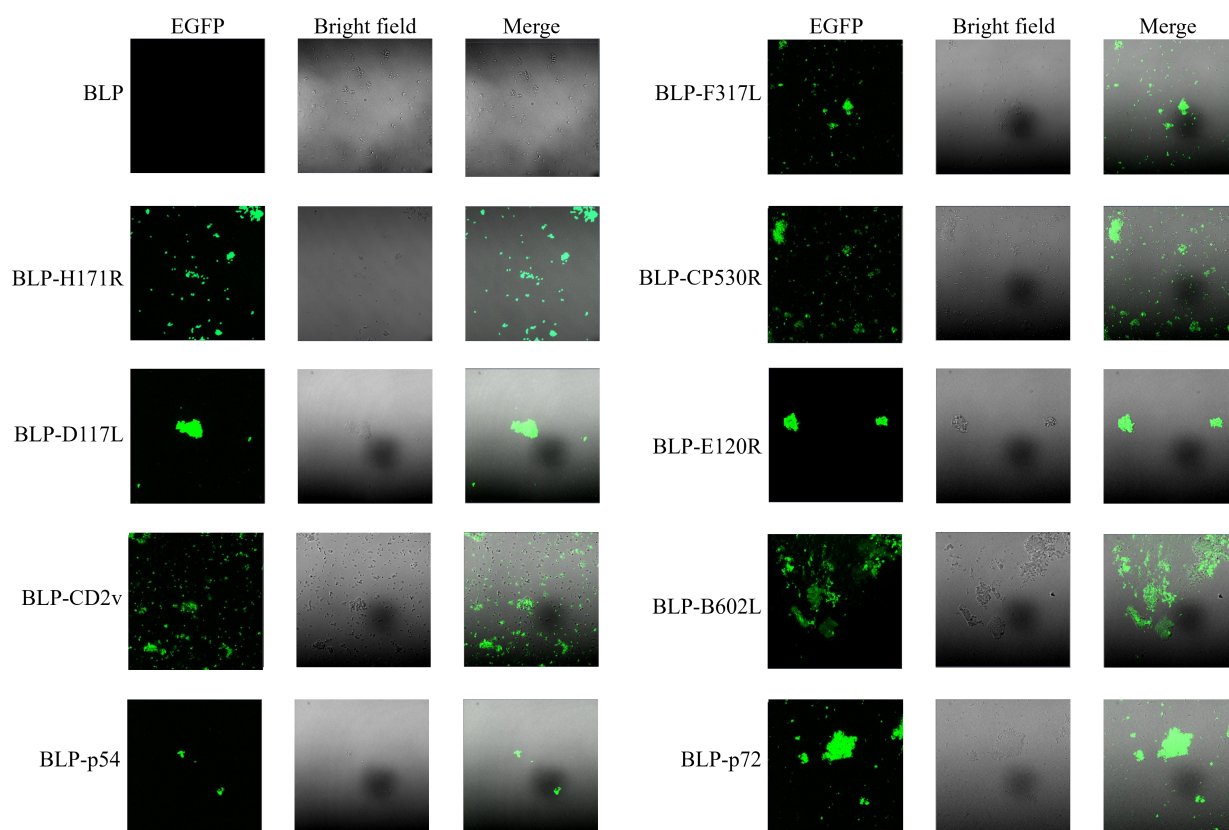


图 2-4 ASFV 融合蛋白与 BLP 结合的 IFA

Fig. 2-4 IFA of the ASFV fusion protein binding to BLP

2.2.5 SDS-PAGE 鉴定 p54 融合蛋白与 BLP 的结合

为了进一步确定 1 U 的 BLP 与 ASFV 融合蛋白的最大结合量，首先将 1 U 的 BLP 分别与 2、3、4 和 5 mL 不同梯度的超声破碎后的重组菌上清液结合，离心后取沉淀与 BLP 进行 SDS-PAGE 分析。结果表明，9 种表面展示 ASFV 抗原的 BLP 在蛋白大小相应的位置有条带，而 BLP 无任何条带，这表明经热和酸处理后的 BLP 不含有杂蛋白，且 BLP 可以和 ASFV-PA 融合蛋白结合，1 U 的 BLP 通常最多和 4 mL 的 10 倍浓缩后超声破碎的重组菌上清液结合，1 U 的 BLP 虽然与部分重组菌 5 mL 的裂解上清液结合后结合量有所提高，但也更容易导致非特异性的结合（图 2-5）。

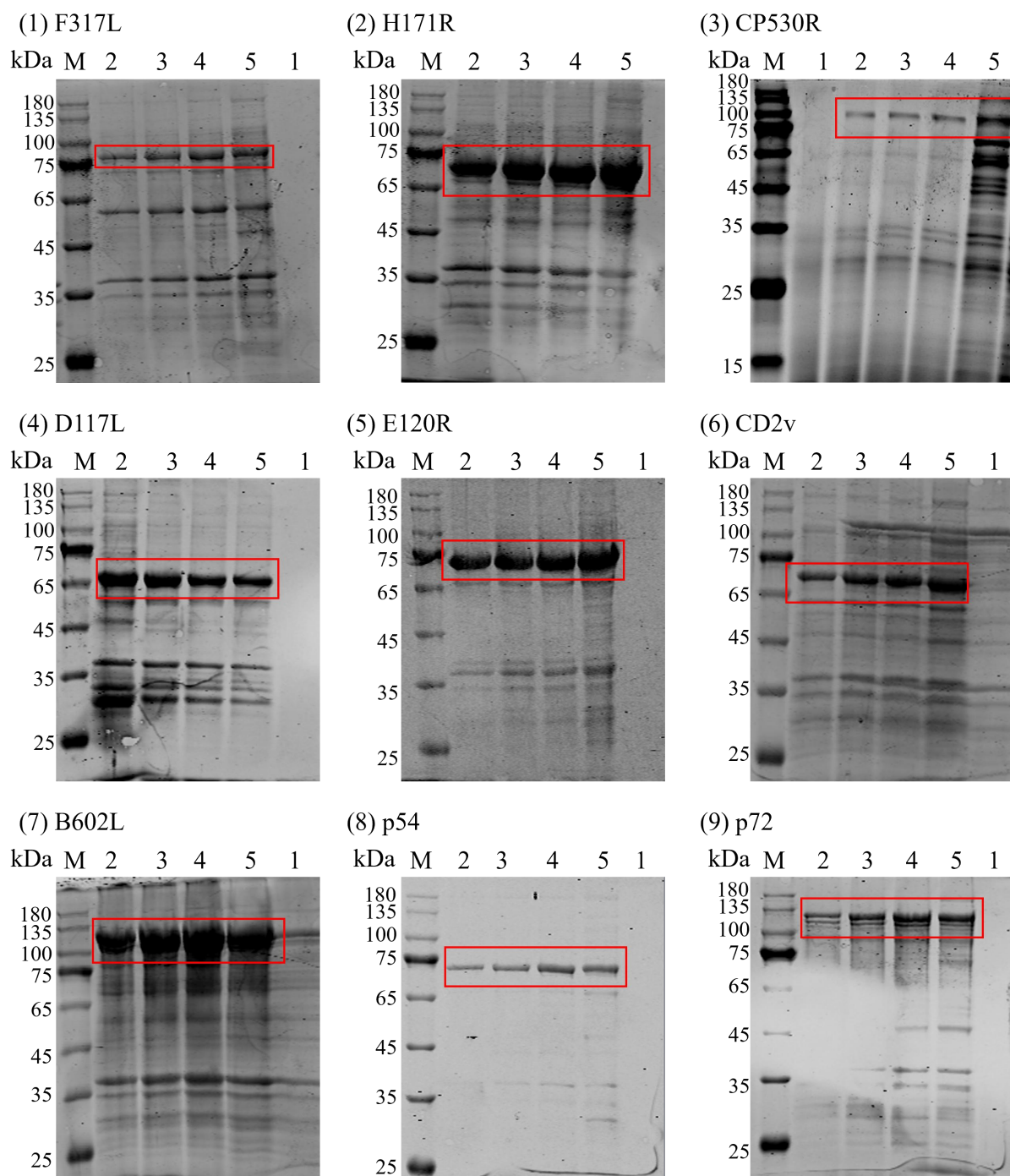


图 2-5 1 U 的 BLP 与重组菌株破碎上清最大结合量的确定

Fig. 2-5 The maximum binding amount of 1 U BLP to lysis supernatant of recombinant strain

注：1 表示 BLP、2~5 分别代表 1 U 的 BLP 分别与 2、3、4 和 5 mL 不同梯度的超声破碎后的重组菌上清液结合。

2.2.6 透射电镜观察 BLP

以 BLP-p54 为模式抗原，对未处理的 *L. lactis* NZ3900、BLP 和 BLP-p54 样品进行透

射电镜观察，可以看出 *L. lactis* NZ3900 菌体结构正常，细胞质颜色较深，内容物较多；而经热和酸处理后的 BLP 则菌体电子密度较低，内容物流出，但保留了细菌的骨架和形态大小；BLP-p54 样品细胞壁不再光滑，周边似有絮状或点状沉淀（图 2-6），由此表明，p54 融合蛋白能与 BLP 充分结合，且展示在 BLP 表面。

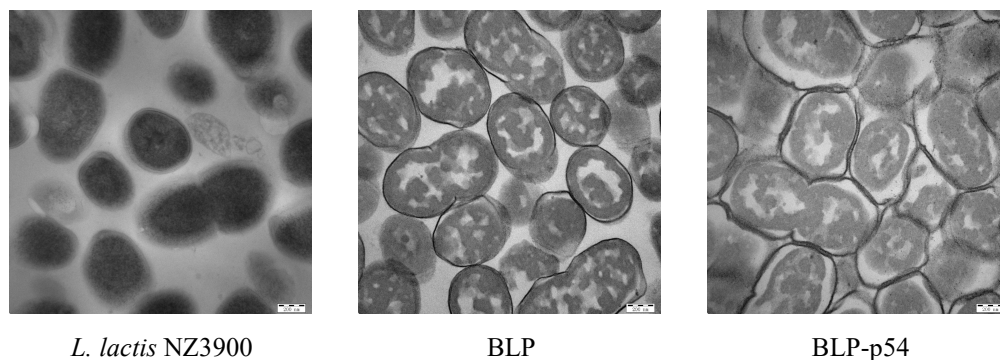


图 2-6 表面展示 p54 蛋白的 BLP 的 TEM 图像

Fig. 2-6 TEM images of BLP displaying the p54 protein

2.2.7 ASFV 融合蛋白与 BLP 结合量的确定

为了进一步确定 1 U 的 BLP 分别对 9 种 ASFV 抗原蛋白的最大负载量，本研究以商品化 BCA 蛋白浓度试剂盒中 BSA 蛋白为标准品，设置 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL 等不同的梯度。取 1 U 的 BLP 分别与 4 mL 的表达 ASFV 融合蛋白的重组菌上清液进行结合，然后与不同浓度的 BSA 标准蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，通过 Image J 软件进行灰度值分析，制作标准曲线，以确定 1 U 的 BLP 分别对 9 种 ASFV 抗原蛋白的最大负载量。结果表明，1 U BLPs 与 ASFV 融合蛋白的最大结合量分别为 F317L (72 μg)、H171R (350 μg)、CP530R (36 μg)、D117L (82 μg)、E120R (320 μg)、CD2v (93 μg)、B602L (152 μg)、p54 (61 μg) 和 p72 (55 μg)（图 2-7）。

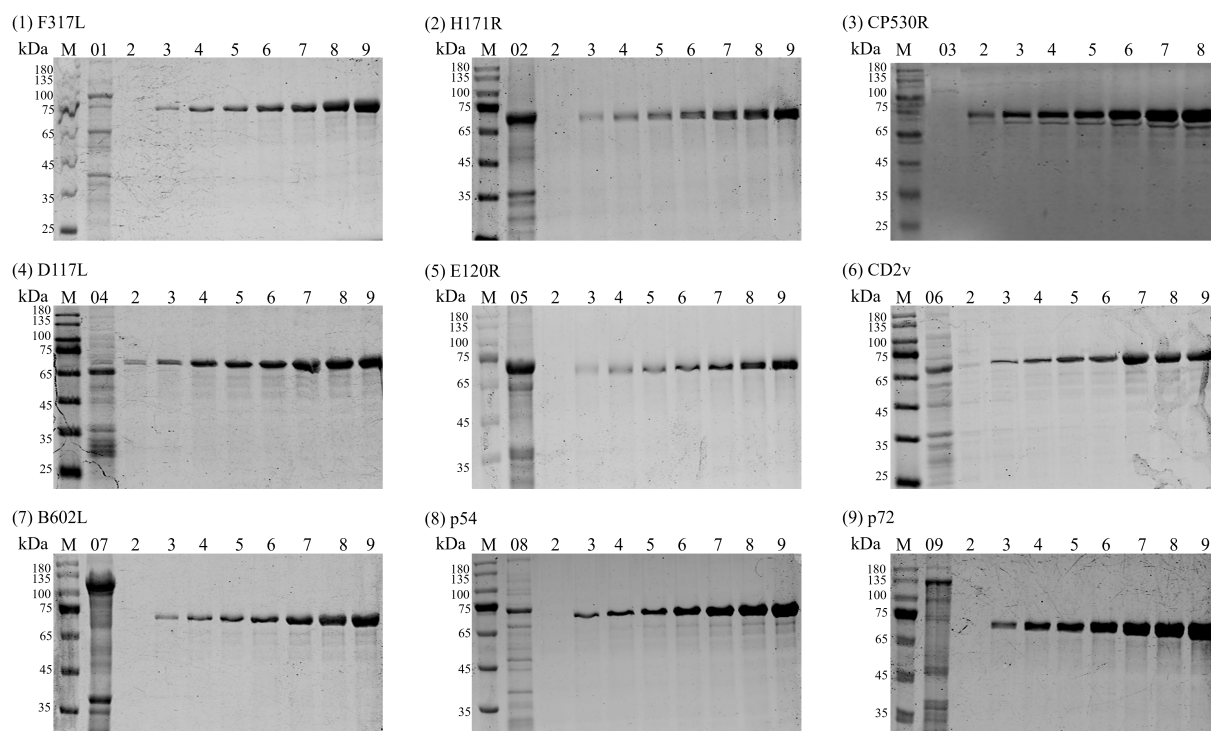


图 2-7 1U BLP 最大可负载的 ASFV 抗原蛋白量

Fig. 2-7 The maximum binding of the ASFV antigen protein to 1U BLP

注: M: 蛋白分子量标准; 01~09: BLP-F317L、BLP-H171R、BLP-CP530R、BLP-D117L、BLP-E120R、BLP-CD2v、BLP-B602L、BLP-p54、和 BLP-p72; 2~9: 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL 的 BSA 标准蛋白。

2.2.8 免疫小鼠血清中 p54 特异性 IgG 抗体水平

将 BLP-p54 以灌胃及肌注途径免疫小鼠后, 于不同时间点分离小鼠血清, 采用间接 ELISA 检测各组小鼠血清中 p54 特异性 IgG 抗体水平。结果显示, 首免后 7 d, BLP-p54 肌注组及 BLP-p54 灌胃组均有 1 只小鼠的血清抗体转阳, 二免后 7 d, BLP-p54 肌注组所有小鼠血清中 IgG 抗体转阳, 且与其他组小鼠差异显著, BLP-p54 灌胃组仅有 2 只小鼠血清中 IgG 水平升高, 其余小鼠较对照组无显著差异, 二免后 14 d, BLP-p54 肌注组及 BLP-p54 灌胃组中 2 只血清 IgG 抗体转阳的小鼠血清 IgG 抗体水平均得到进一步升高, 但 BLP-p54 灌胃组小鼠未有新的小鼠抗体转阳 (图 2-8)。这表明, 相较于灌胃途径, 肌注免疫 BLP-p54 可更快产生更高水平的血清抗体, 可能由于个体差异, 灌胃免疫 BLP-p54 产生的 IgG 抗体水平在不同小鼠之间差异较大。

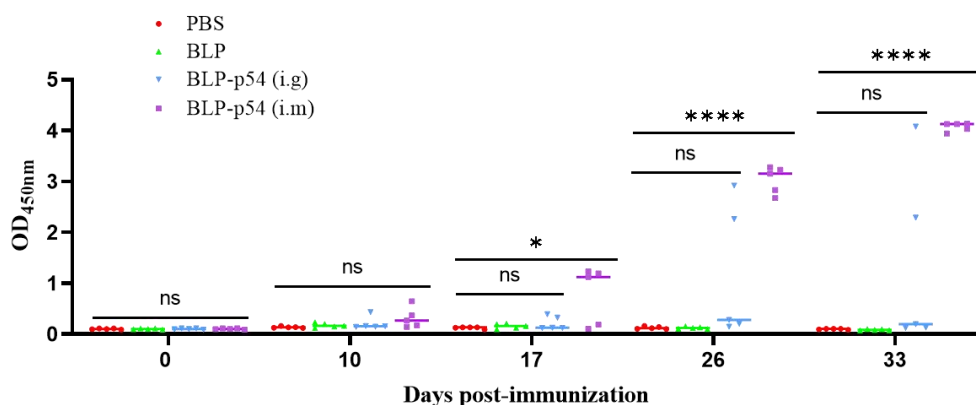


图 2-8 免疫小鼠血清中 p54 特异性 IgG 抗体水平检测结果

Fig. 2-8 The levels of serum p54-specific IgG antibodies in the immunized mice

2.2.9 免疫小鼠粪便中 sIgA 抗体水平

将 BLP-p54 以灌胃及肌注途径免疫小鼠后，于不同的时间采集小鼠粪便，用 PBS 重悬后分离上清液，采用间接 ELISA 检测各组小鼠粪便中 p54 特异性 sIgA 抗体水平。结果表明，所有免疫组小鼠粪便中均未检测出 p54 特异性 sIgA 抗体的存在（图 2-9）。

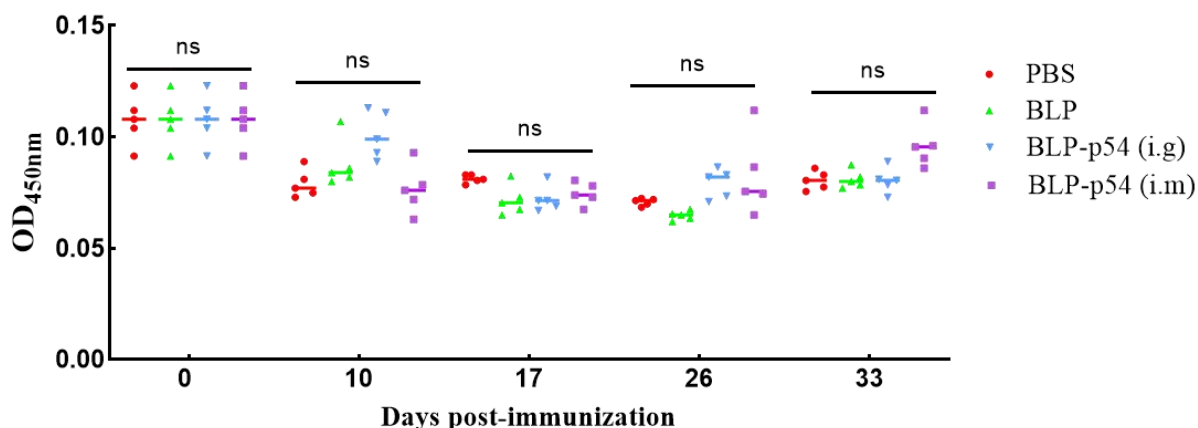


图 2-9 免疫小鼠粪便中 p54 特异性 sIgA 抗体水平

Fig. 2-9 The p54-specific sIgA antibodies in the feces of the immunized mice

2.2.10 免疫猪只血清中特异性 IgG 抗体水平

将 9 种表面展示 ASFV 抗原的 BLP 以鼻喷及肌注途径免疫猪只后，于不同时间点分离猪只血清，采用间接 ELISA 及阻断 ELISA (p72) 检测各组猪只血清中 ASFV 抗原特异性 IgG 抗体水平。结果表明，BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只在首免后 14 d，成功诱导血清特异性 IgG 抗体产生，但其中 E120R、CD2v 及 p54 蛋白仅一只猪只血清特异性 IgG 抗体升高，p72 抗体在二免后 14 d 开始升高，其中一头转阳，两头接近 Cut off 值，在二免后 28 天，两头猪只血清中 p72 抗体已经转阳，一头接近阳性 Cut off 线（图 2-10）。

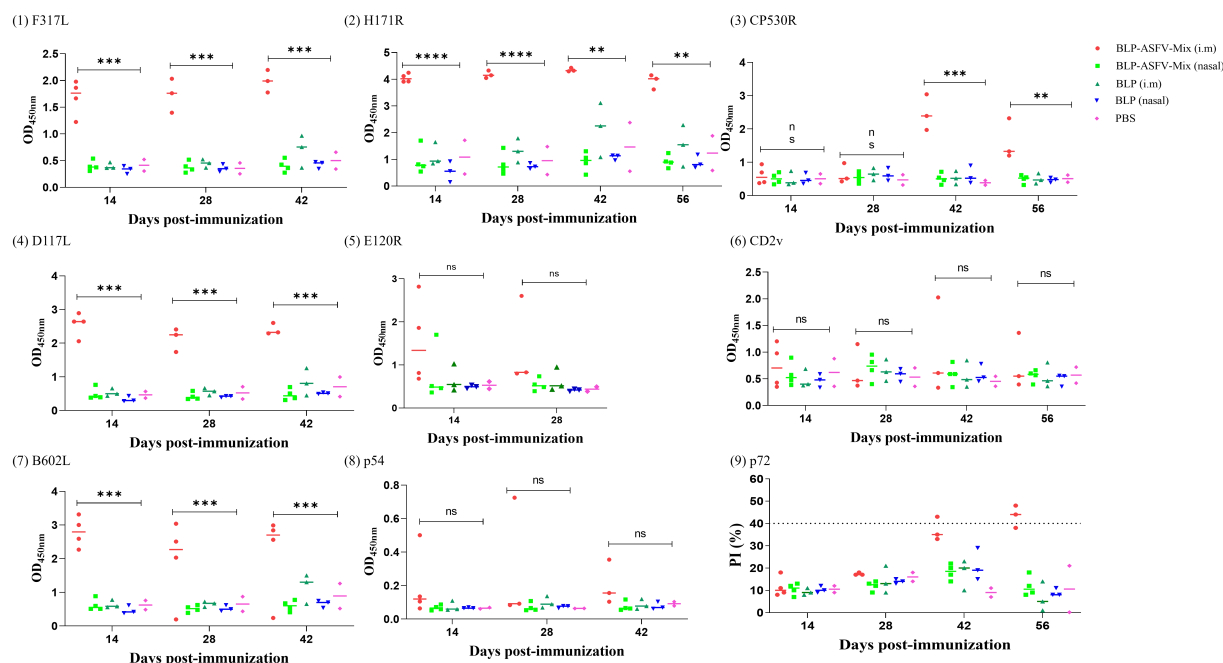
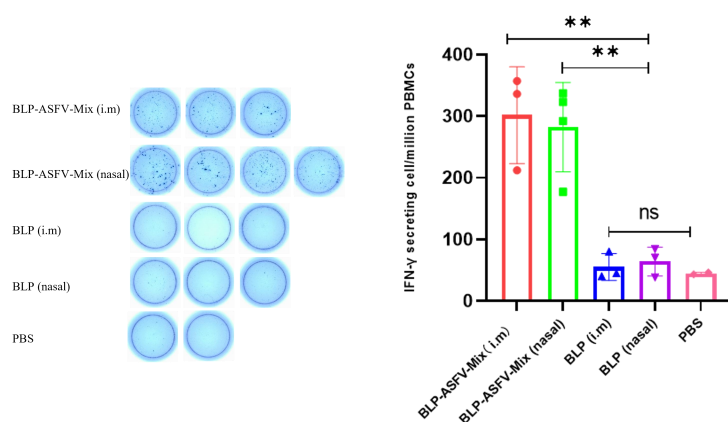


图 2-10 免疫猪只血清中特异性 IgG 抗体水平

Fig. 2-10 The specific IgG antibodies in the serum of the immunized pig

2.2.11 猪外周血淋巴细胞中产生 IFN- γ 的细胞数

为了评价 BLP-ASFV-Mix 免疫后诱导猪只细胞免疫应答的能力, 使用 ELISpot 检测了二免后 28 d, 每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数。结果表明, 与对照组相比, 在二免后 28 d, BLP-ASFV-Mix 肌注组及 BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只均诱导了一定水平的细胞免疫, 每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数最高为 357, 而 PBS 组猪只, 每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数最高为 46 (图 2-11)。以上结果表明, BLP-ASFV-Mix 肌注及鼻喷免疫猪只均可诱导一定程度的细胞免疫应答。

图 2-11 二免后 28 d 每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数Fig. 2-11 The number of IFN- γ -producing cells per million PBMCs at 28 days after second immunization

2.2.12 免疫猪只 CD4⁺及 CD8⁺阳性 T 细胞数

二免后 28 d, 分离猪只 PBMCs, 利用流式细胞仪分析猪只 PBMCs 中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚群数量。结果显示, 与 PBS 对照组相比, BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只有产生更高水平的 CD4⁺及 CD8⁺ T 细胞的趋势, 但与对照组无显著差异; BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只有产生更高水平的 CD8⁺ T 细胞的趋势, 但与对照组也无显著差异 (图 2-12), 以上结果表明 BLP-ASFV-Mix 肌注可能可以增强 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的活化, 刺激机体的抗病毒能力。

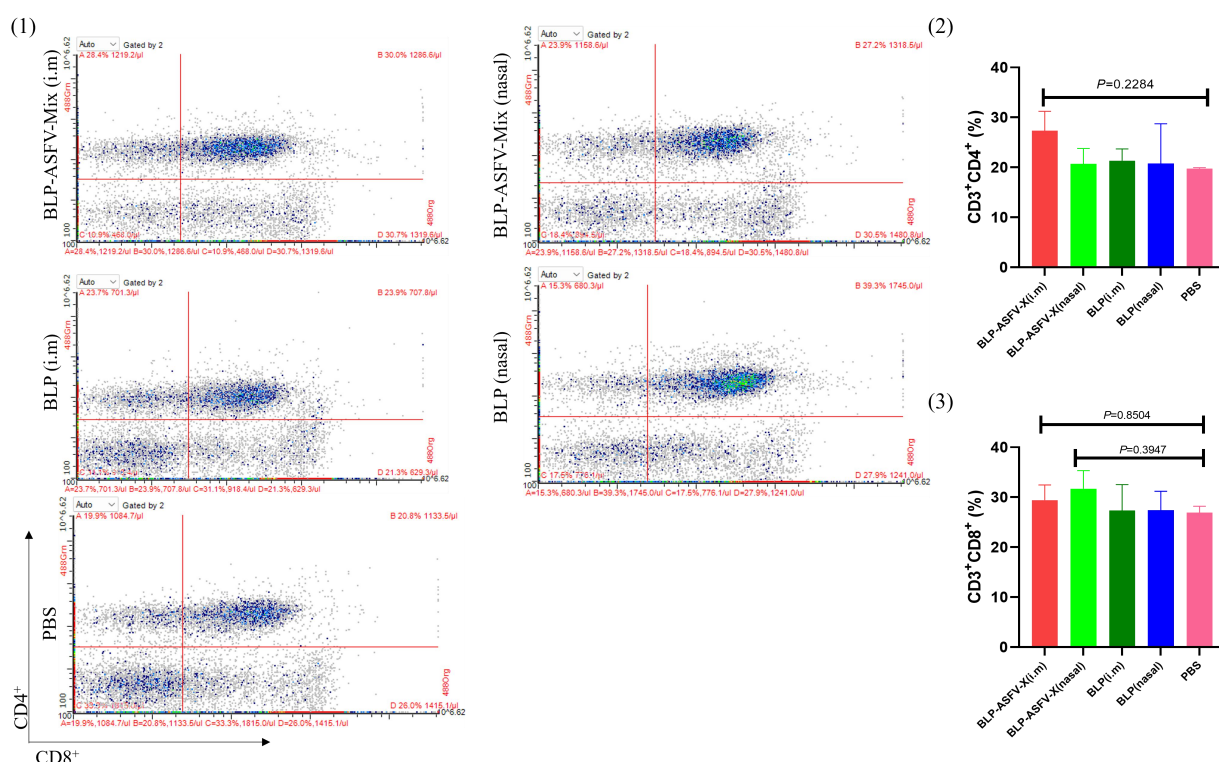


图 2-12 免疫猪外周血淋巴细胞 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞数

Fig. 2-12 Number of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in peripheral blood of immunized pigs

2.3 讨论

以 LAB 作为疫苗的递送载体是一种良好的策略, 但以活菌作为载体存在表达量低, 及一定的生物安全风险。BLP 是由热和酸灭活处理 *L. lactis* 得到的具备菌体形态的中空肽聚糖颗粒, 由于不含重组 DNA, 因此被认为是非转基因微生物, 安全性高; 而且由于处理后的菌株细胞壁仅含肽聚糖, BLP 与 PA 在表面结合更牢固, 目的蛋白表面结合的效率更高, 为活菌结合的 100~1000 倍; 负载的 BLP 在 PBS 中或作为冻干粉在室温、4℃和-80℃条件下可以稳定储存; BLP 粒径约 1 μm 更容易被 M 细胞所捕获, 黏膜给药可以同时诱导黏膜免疫应答和全身免疫应答, 所以 BLP 是良好的疫苗载体, 且国外已有相关流感疫苗产品进入临床试验^[77,86]。通过大肠杆菌表达系统表达外源蛋白具备易操作、成本低、蛋白

表达周期短、产量高等优势。外源蛋白与 BLP 结合后可以通过一步离心的方法进行纯化, 这样不仅易于操作, 而且还大大的降低了纯化成本。因此, BLP 表面锚定系统可能是一种有潜力的载体疫苗构建的方法。

本研究将 9 种 ASFV 保护性候选蛋白与肽聚糖锚定蛋白 PA 融合表达, 并在体外将其锚定于由食品级 *L. lactis* 制备的 BLP 上。SDS-PAGE 及 IFA 结果表明, 其能够高效率的锚定在 BLP 表面, 且 ASFV 融合蛋白能与 ASFV 阳性参考血清反应, 1 U 的 BLP 最多与 4 mL 的重组菌超声裂解上清液结合, 与 ASFV 融合蛋白的最大结合量为 36 ~ 350 μg 。由于 p54 蛋白是 ASFV 表达的早期膜蛋白, 是目前公认的 ASFV 良好的保护性抗原, 可诱导保护性抗体产生, 且该蛋白大小适中^[103]。故而我们选择其为 9 中 ASFV 抗原中的模式抗原, 在小鼠上对 BLP 的免疫原性进行评价, 以 BLP-p54 为模式菌通过灌胃及肌注两种方式免疫小鼠, 结果表明肌注免疫方式最快地产生了高水平的血清特异性 IgG 抗体, 灌胃组中 2/5 的小鼠血清抗体水平升高, 这可能是由于肠道复杂的微环境及个体差异导致灌胃免疫的效果差异较大。但令人遗憾的是, 各组免疫小鼠粪便中均未检测到特异性 sIgA 抗体, 我们推测, 这可能是由于灌胃免疫对部分小鼠未产生作用或只诱导了极微弱的黏膜免疫应答, 导致差异不明显。也有相关研究表明, 相较于灌胃免疫, 滴鼻免疫的方式可以诱导 BLP 疫苗产生更高和更持久的黏膜免疫应答^[104]。所以后续我们将 9 种表面展示 ASFV 抗原的 BLP 混合后通过鼻喷及肌注的方式免疫猪只, 结果显示, BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只诱导了血清特异性 IgG 抗体的产生, BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只未能诱导血清特异性 IgG 抗体的产生, 但在二免后 28 d, ELISpot 数据显示, BLP-ASFV-Mix 肌注组及鼻喷组猪只均诱导了一定程度的细胞免疫, 每百万 PBMCs 中产生 IFN- γ 的细胞数较对照组升高, 流式细胞术结果表明, BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只 CD4⁺及 CD8⁺细胞数均有所提高, 但与对照组猪只无显著差异, BLP-ASFV-Mix 鼻喷组猪只 CD8⁺细胞数较对照组猪只有所提高。

2.4 小结

1、利用大肠杆菌原核表达系统成功构建了 9 种与 PA 锚定蛋白融合表达的 ASFV 保护性候选蛋白;

2、ASFV 抗原融合蛋白可成功锚定展示于 BLP 颗粒表面, 且 1 U 的 BLP 与 ASFV 抗原融合蛋白的最大结合量为 36 ~ 350 μg 。

3、BLP-p54 通过肌注免疫小鼠可诱导高水平的血清 IgG 抗体产生。

4、BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只可产生高水平的血清 IgG 抗体, BLP-ASFV-Mix 鼻喷组及 BLP-ASFV-Mix 肌注组猪只均可诱导一定水平的细胞免疫应答。

结 论

1、成功构建了 9 株表达 ASFV 保护性候选抗原的 rL. lactis, 且 rL. lactis 遗传稳定性良好;灌胃免疫 rL. lactis 初免后 7 d 可诱导小鼠 sIgA 抗体水平显著升高,肌注免疫 rL. lactis 可诱导小鼠血清 IgG 抗体水平、IFN- γ 和 IL-10 水平显著升高。

2、成功构建了 9 种可锚定展示 ASFV 保护性候选抗原的 BLP。BLP-p54 肌注免疫小鼠可诱导高水平的血清抗体产生,灌胃免疫可诱导部分小鼠产生血清抗体,但二者均未诱导明显的黏膜免疫应答;9 种 BLP-ASFV-Mix 通过肌注及鼻喷等方式免疫猪只,仅肌注组猪只产生高水平的血清特异性 IgG 抗体,但二种免疫方式均可诱导一定程度的细胞免疫应答。

参考文献

- [1] Zhao D, Sun E, Huang L, et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs[J]. *Nat Commun.* 2023, 14(1): 3096.
- [2] Dixon L K, Sun H, Roberts H. African swine fever[J]. *Antiviral Res.* 2019, 165: 34-41.
- [3] Petrov A, Forth J H, Zani L, et al. No evidence for long-term carrier status of pigs after African swine fever virus infection[J]. *Transbound Emerg Dis.* 2018, 65(5): 1318-1328.
- [4] Dixon L K, Stahl K, Jori F, et al. African swine fever epidemiology and control[J]. *Annu Rev Anim Biosci.* 2020, 8: 221-246.
- [5] Zhou X, Li N, Luo Y, et al. Emergence of African swine fever in china, 2018[J]. *Transbound Emerg Dis.* 2018, 65(6): 1482-1484.
- [6] Iyer L M, Balaji S, Koonin E V, et al. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses[J]. *Virus Res.* 2006, 117(1): 156-184.
- [7] Liu S, Luo Y, Wang Y, et al. Cryo-EM structure of the African swine fever virus[J]. *Cell Host & Microbe.* 2019, 26(6): 836-843.
- [8] Dixon L K, Chapman D A, Netherton C L, et al. African swine fever virus replication and genomics[J]. *Virus Res.* 2013, 173(1): 3-14.
- [9] Xian Y, Xiao C. The structure of ASFV advances the fight against the disease[J]. *Trends Biochem Sci.* 2020, 45(4): 276-278.
- [10] Wang G, Xie M, Wu W, et al. Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses.* 2021, 13(11).
- [11] Li H, Liu Q, Shao L, et al. Structural insights into the assembly of the African swine fever virus inner capsid[J]. *J Virol.* 2023, 97(6): e26823.
- [12] Wang N, Zhao D, Wang J, et al. Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly[J]. *Science.* 2019, 366(6465): 640-644.
- [13] Alejo A, Matamoros T, Guerra M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *J Virol.* 2018, 92(23).
- [14] Yang J, Jing M, Niu Q, et al. Identification and characterization of nanobodies specifically against African swine fever virus major capsid protein p72[J]. *Front Microbiol.* 2022, 13: 1017792.
- [15] 孙茂文, 王涛, 孙元, 等. 非洲猪瘟病毒的免疫逃逸策略[J]. *微生物学报.* 2021, 61(02): 249-262.
- [16] Jancovich J K, Chapman D, Hansen D T, et al. Immunization of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins[J]. *J Virol.* 2018, 92(8).
- [17] 安一娜, 杨静静, 高敏, 等. 非洲猪瘟病毒编码蛋白功能及疫苗研究进展[J]. *养殖与饲料.* 2021, 20(10): 107-114.
- [18] Stone S S, Hess W R. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs[J]. *Am J Vet Res.* 1967, 28(123): 475-481.
- [19] Blome S, Gabriel C, Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation[J]. *Vaccine.* 2014, 32(31): 3879-3882.
- [20] Rock D L. Challenges for African swine fever vaccine development "perhaps the end of the beginning"[J]. *Vet Microbiol.* 2017, 206: 52-58.

- [21] Cadenas-Fernandez E, Sanchez-Vizcaino J M, van den Born E, et al. High doses of inactivated African swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge[J]. *Vaccines (Basel)*. 2021, 9(3).
- [22] Sanchez-Cordon P J, Chapman D, Jabbar T, et al. Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3[J]. *Antiviral Res.* 2017, 138: 1-8.
- [23] Sanchez-Cordon P J, Jabbar T, Chapman D, et al. Absence of long-term protection in domestic pigs immunized with attenuated African swine fever virus isolate ourt88/3 or benindeltamgf correlates with increased levels of regulatory t cells and interleukin-10[J]. *J Virol.* 2020, 94(14).
- [24] Gallardo C, Sanchez E G, Perez-Nunez D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses[J]. *Vaccine.* 2018, 36(19): 2694-2704.
- [25] Borca M V, Rai A, Ramirez-Medina E, et al. A cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain[J]. *J Virol.* 2021, 95(14): e12321.
- [26] Tran X H, Phuong L, Huy N Q, et al. Evaluation of the safety profile of the ASFV vaccine candidate ASFV-G-DeltaI177L[J]. *Viruses.* 2022, 14(5).
- [27] Tran X H, Le TTP, Nguyen Q H, et al. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-DeltaI177L efficiently protects european and native pig breeds against circulating vietnamese field strain[J]. *Transbound Emerg Dis.* 2022, 69(4): e497-e504.
- [28] Chen W, Zhao D, He X, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs[J]. *Sci China Life Sci.* 2020, 63(5): 623-634.
- [29] Zajac M D, Trujillo J D, Yao J, et al. Immunization of pigs with replication-incompetent adenovirus-vectored African swine fever virus multi-antigens induced humoral immune responses but no protection following contact challenge[J]. *Front Vet Sci.* 2023, 10: 1208275.
- [30] Zhang X, Guan X, Wang Q, et al. Identification of the p34 protein of African swine fever virus as a novel viral antigen with protection potential[J]. *Viruses.* 2023, 16(1).
- [31] Zhang G, Liu W, Yang S, et al. Evaluation of humoral and cellular immune responses induced by a cocktail of recombinant African swine fever virus antigens fused with OprI in domestic pigs[J]. *Virol J.* 2023, 20(1): 104.
- [32] Gomez-Puertas P, Rodriguez F, Oviedo J M, et al. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization[J]. *J Virol.* 1996, 70(8): 5689-5694.
- [33] Argilaguet J M, Perez-Martin E, Nofrarias M, et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies[J]. *PLoS One.* 2012, 7(9): e40942.
- [34] Bosch-Camos L, Lopez E, Rodriguez F. African swine fever vaccines: a promising work still in progress[J]. *Porcine Health Manag.* 2020, 6: 17.
- [35] Lokhandwala S, Waghela S D, Bray J, et al. Induction of robust immune responses in swine by using a cocktail of adenovirus-vectored African swine fever virus antigens[J]. *Clin Vaccine Immunol.* 2016, 23(11): 888-900.
- [36] Lokhandwala S, Waghela S D, Bray J, et al. Adenovirus-vectored novel African swine fever virus antigens elicit robust immune responses in swine[J]. *PLoS One.* 2017, 12(5): e177007.
- [37] 宋宇琴, 孙志宏, 张和平. 乳酸菌微进化的研究进展[J]. *微生物学报.* 2015, 55(11): 1371-1377.
- [38] Tan E W, Tan K Y, Phang L V, et al. Enhanced gastrointestinal survivability of recombinant *Lactococcus lactis* using a double coated mucoadhesive film approach[J]. *PLoS One.* 2019, 14(7): e219912.
- [39] Landete J M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application[J]. *Crit Rev Biotechnol.* 2017, 37(3): 296-308.

- [40] Raman J, Kim J S, Choi K R, et al. Application of lactic acid bacteria (LAB) in sustainable agriculture: advantages and limitations[J]. Int J Mol Sci. 2022, 23(14).
- [41] Lubeck M, Lubeck P S. Application of lactic acid bacteria in green biorefineries[J]. FEMS Microbiol Lett. 2019, 366(3).
- [42] Garbacz K. Anticancer activity of lactic acid bacteria[J]. Semin Cancer Biol. 2022, 86(Pt 3): 356-366.
- [43] 刘琳琳. 表达传染性法氏囊病病毒 VP2 重组乳酸菌主动递送活载体的构建及免疫效果评价[D]. 中国农业科学院, 2017.
- [44] Kazemi D, Doosti A, Shakhshi-Niaei M. Immunization of BALB/c mice with BAB1-0278: An initial investigation of a novel potential vaccine for brucellosis based on *Lactococcus lactis* vector[J]. Microb Pathog. 2023, 185: 106417.
- [45] Pontes D S, de Azevedo M S, Chatel J M, et al. *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems[J]. Protein Expr Purif. 2011, 79(2): 165-175.
- [46] Xue Y, Yang K D, Quan Y, et al. Oral vaccination with invasive *Lactobacillus plantarum* delivered nucleic acid vaccine co-expressing SS1 and murine interleukin-4 elicits protective immunity against *Trichinella spiralis* in BALB/c mice[J]. Int Immunopharmacol. 2021, 101: 108184.
- [47] Poorinmohammad N, Hamed J, Masoudi-Nejad A. Genome-scale exploration of transcriptional regulation in the nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1[J]. Sci Rep. 2020, 10(1): 3787.
- [48] Fallico V, Ross R P, Fitzgerald G F, et al. Genetic response to bacteriophage infection in *Lactococcus lactis* reveals a four-strand approach involving induction of membrane stress proteins, D-alanylation of the cell wall, maintenance of proton motive force, and energy conservation[J]. Journal of Virology. 2011, 85(22): 12032-12042.
- [49] Lee J, Heo S, Choi J, et al. Selection of *Lactococcus lactis* HY7803 for glutamic acid production based on comparative genomic analysis[J]. J Microbiol Biotechnol. 2021, 31(2): 298-303.
- [50] Jounai K, Sugimura T, Ohshio K, et al. Oral administration of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 enhances lung immune response resulting in protection from murine parainfluenza virus infection[J]. PLoS One. 2015, 10(3): e119055.
- [51] Xiong Z Q, Wei Y Y, Kong L H, et al. Short communication: An inducible CRISPR/dCas9 gene repression system in *Lactococcus lactis*[J]. J Dairy Sci. 2020, 103(1): 161-165.
- [52] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*[J]. Appl Microbiol Biotechnol. 2005, 68(6): 705-717.
- [53] Olejnik-Schmidt A, Gronowalska A, Schmidt M. The NICE system as a tool for protein expression in *Lactococcus lactis*[J]. Postepy Biochem. 2013, 59(3): 322-326.
- [54] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, de Ruyter P G, et al. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction[J]. J Biol Chem. 1995, 270(45): 27299-27304.
- [55] de Ruyter P G, Kuipers O P, Meijer W C, et al. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening[J]. Nat Biotechnol. 1997, 15(10): 976-979.
- [56] 张晶晶, 李泰明, 谭树华. 乳酸菌食品级 nisin 控制的基因表达系统 NICE[J]. 中国生物工程杂志, 2006, (03): 68-72.
- [57] Mierau I, Leij P, van Swam I, et al. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin[J]. Microb Cell Fact. 2005, 4: 15.
- [58] Zhou X X, Li W F, Ma G X, et al. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements[J]. Biotechnol Adv. 2006, 24(3): 285-295.
- [59] Zhang F, Zhang Z, Li X, et al. Immune responses to orally administered recombinant *Lactococcus lactis*

- expressing multi-epitope proteins targeting m cells of foot-and-mouth disease virus[J]. *Viruses*. 2021, 13(10).
- [60] Wang N, Li J, Wang Y, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing grass carp reovirus VP6 induces mucosal immunity against grass carp reovirus infection[J]. *Front Immunol*. 2022, 13: 914010.
- [61] Sha Z, Shang H, Miao Y, et al. Recombinant *Lactococcus Lactis* expressing M1-HA2 fusion protein provides protective mucosal immunity against H9N2 avian influenza virus in chickens[J]. *Front Vet Sci*. 2020, 7: 153.
- [62] Fatehi Z, Doosti A, Jami M S. Oral vaccination with novel *Lactococcus lactis* mucosal live vector-secreting *Brucella* lumazine synthase (BLS) protein induces humoral and cellular immune protection against *Brucella abortus*[J]. *Arch Microbiol*. 2023, 205(4): 122.
- [63] Song J, Zhao L, Song M. A *Lactococcus lactis*-vectored oral vaccine induces protective immunity of mice against enterotoxigenic *Escherichia coli* lethal challenge[J]. *Immunol Lett*. 2020, 225: 57-63.
- [64] Zhang Z H, Jiang P H, Li N J, et al. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1[J]. *World J Gastroenterol*. 2005, 11(44): 6975-6980.
- [65] Ma C, Li G, Chen W, et al. *Eimeria tenella*: IMP1 protein delivered by *Lactococcus lactis* induces immune responses against homologous challenge in chickens[J]. *Vet Parasitol*. 2021, 289: 109320.
- [66] Kitagawa K, Tatsumi M, Kato M, et al. An oral cancer vaccine using a *Bifidobacterium* vector suppresses tumor growth in a syngeneic mouse bladder cancer model[J]. *Mol Ther Oncolytics*. 2021, 22: 592-603.
- [67] Dotiwala F, Upadhyay A K. Next generation mucosal vaccine strategy for respiratory pathogens[J]. *Vaccines (Basel)*. 2023, 11(10).
- [68] Moradi-Kalbolandi S, Majidzadeh-A K, Abdolvahab M H, et al. The role of mucosal immunity and recombinant probiotics in SARS-Cov2 vaccine development[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021, 13(5): 1239-1253.
- [69] Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler L M. The role of TLR2 in infection and immunity[J]. *Front Immunol*. 2012, 3: 79.
- [70] Ganesh B P, Versalovic J. Luminal Conversion and immunoregulation by probiotics[J]. *Front Pharmacol*. 2015, 6: 269.
- [71] Illikoud N, Do C F, Daniel N, et al. Development of innovative fermented products by exploiting the diversity of immunomodulatory properties and fermentative activity of lactic and propionic acid bacteria[J]. *Food Res Int*. 2023, 166: 112557.
- [72] 高莹, 李淼, 孙元, 等. 乳酸乳球菌表达系统的发展现状与前景展望[J]. *微生物学报*. 2022, 62(03): 895-905.
- [73] Wells J M, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*. 2008, 6(5): 349-362.
- [74] Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick S J, et al. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106(11): 4331-4336.
- [75] Mao R, Wu D, Wang Y. Surface display on lactic acid bacteria without genetic modification: strategies and applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016, 100(22): 9407-9421.
- [76] Bosma T, Kanninga R, Neef J, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2006, 72(1): 880-889.
- [77] Van Braeckel-Budimir N, Haijema B J, Leenhouts K. Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications[J]. *Front Immunol*. 2013, 4: 282.
- [78] Liu W, Tan Z, Liu H, et al. Nongenetically modified *Lactococcus lactis*-adjuvanted vaccination enhanced

- innate immunity against *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*. 2017, 22(5).
- [79] 张震. 食品级乳酸乳球菌表面展示系统的构建与性能分析[D]. 华中农业大学, 2009.
- [80] 任红坤. 新型细菌样颗粒表面展示平台的构建及其在展示多表位抗原中的应用[D]. 东北农业大学, 2023.
- [81] Heine S J, Franco-Mahecha O L, Chen X, et al. Shigella IpaB and IpaD displayed on *L. lactis* bacterium-like particles induce protective immunity in adult and infant mice[J]. *Immunol Cell Biol*. 2015, 93(7): 641-652.
- [82] Nganou-Makamdop K, van Roosmalen M L, Audouy S A, et al. Bacterium-like particles as multi-epitope delivery platform for *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein induce complete protection against malaria in mice[J]. *Malar J*. 2012, 11: 50.
- [83] Ascough S, Vlachantoni I, Kalyan M, et al. Local and systemic immunity against respiratory syncytial virus induced by a novel intranasal vaccine. a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019, 200(4): 481-492.
- [84] Jin H, Bai Y, Wang J, et al. A bacterium-like particle vaccine displaying Zika virus prM-E induces systemic immune responses in mice[J]. *Transbound Emerg Dis*. 2022, 69(5): e2516-e2529.
- [85] Li E, Chi H, Huang P, et al. A novel bacterium-like particle vaccine displaying the MERS-CoV receptor-binding domain induces specific mucosal and systemic immune responses in mice[J]. *Viruses*. 2019, 11(9).
- [86] 王建忠, 赵建伟, 王春风. 细菌样颗粒——新型乳酸菌表面展示技术及其应用[J]. *微生物学报*. 2019, 59(03): 411-419.
- [87] Zhou X, Gao M, De X, et al. Bacterium-like particles derived from probiotics: progress, challenges and prospects[J]. *Front Immunol*. 2023, 14: 1263586.
- [88] Audouy S A, van Selm S, van Roosmalen M L, et al. Development of *lactococcal* GEM-based pneumococcal vaccines[J]. *Vaccine*. 2007, 25(13): 2497-2506.
- [89] Li A L, Sun Y Q, Du P, et al. The effect of *Lactobacillus actobacillus* peptidoglycan on bovine beta-lactoglobulin-sensitized mice via TLR2/NF-kappaB pathway[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2017, 16(2): 147-158.
- [90] Lu J, Hou H, Wang D, et al. Systemic and mucosal immune responses elicited by intranasal immunization with a pneumococcal bacterium-like particle-based vaccine displaying pneumolysin mutant Plym2[J]. *Immunol Lett*. 2017, 187: 41-46.
- [91] Borca M V, Ramirez-Medina E, Silva E, et al. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic eurasia strain[J]. *J Virol*. 2020, 94(7).
- [92] Argilaguet J M, Perez-Martin E, Lopez S, et al. BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus[J]. *Antiviral Res*. 2013, 98(1): 61-65.
- [93] Azizpour M, Hosseini S D, Jafari P, et al. *Lactococcus lactis*: A New Strategy for Vaccination[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2017, 9(4): 163-168.
- [94] 黄布敏, 张人俊, 陈红, 等. 非洲猪瘟病毒衣壳蛋白 p72 结构与功能的研究进展[J]. *畜牧与兽医*. 2022, 54(12): 146-152.
- [95] 李子萱, 张永红, 童津津, 等. 非洲猪瘟病毒结构蛋白 p54 的功能研究进展[J]. *动物医学进展*. 2023, 44(08): 72-75.
- [96] 王曼, 沈宇清. 非洲猪瘟病毒结构蛋白 CD2v 的功能研究进展[J]. *中国免疫学杂志*. 2021, 37(22): 2734-2737.
- [97] Wang W, Song Y, Liu L, et al. Neutralizing-antibody-mediated protection of chickens against infectious

- bursal disease via one-time vaccination with inactivated recombinant *Lactococcus lactis* expressing a fusion protein constructed from the RCK protein of *Salmonella enterica* and VP2 of infectious bursal disease virus[J]. Microb Cell Fact. 2019, 18(1): 21.
- [98] Jiang H Q, Bos N A, Cebra J J. Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups[J]. Infect Immun. 2001, 69(6): 3611-3617.
- [99] Pietrzak B, Tomela K, Olejnik-Schmidt A, et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells[J]. Int J Mol Sci. 2020, 21, 9254.
- [100] Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1994, 91, 6688-92.
- [101] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis[J]. Science 1994, 265, 1237-40.
- [102] Nagler-Anderson C, Bhan AK, Podolsky DK, et al. Control freaks: immune regulatory cells[J]. Nat Immunol. 2004, 5, 119-22.
- [103] Rodriguez F, Alcaraz C, Eiras A, et al. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54[J]. J Virol. 1994, 68, 7244-7252.
- [104] Sudo H, Tokunoh N, Tsujii A, et al. The adjuvant effect of bacterium-like particles depends on the route of administration[J]. Front Immunol. 2023, 14: 1082273.
- .