

分类号

密级:



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

博士学位论文

DOCTOR'S DEGREE DISSERTATION

重组乳酸菌活载体口服疫苗在防治 F4⁺产肠毒素大
肠杆菌感染中的应用

APPLICATION OF RECOMBINANT LACTIC ACID
BACTERI (LAB) LIVE VECTOR ORAL VACCINE IN
PREVENTION OF F4⁺ ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA*
COLI (ETEC) INFECTION

研究生: 于江旭
CANDIDATE: YU JIANGXU
学号: 2020302010145
STUDENT NO.:
学位类型: 兽医博士
DEGREE TYPE: DOCTOR OF PROFESSIONAL DEGREE
IN VETERINARY MEDICINE
导师: 陈焕春 教授
SUPERVISOR: PROFESSOR CHEN HUANCHUN
徐高原 高级兽医师
SENIOR VETERINARIAN XU GAOYUAN

中国 武汉
WUHAN, CHINA
二〇二四年六月
JUNE, 2024

华中农业大学博士学位论文

重组乳酸菌活载体口服疫苗在防治 F4⁺产肠毒素大肠杆菌感染中的应用

**Application of Recombinant Lactic Acid Bacteria (LAB)
Live Vector Oral Vaccine in Prevention of F4⁺
enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Infection**

博士研究生： 于江旭

学 号： 2020302010145

指导教师： 陈焕春 教授

金梅林 教授

王湘如 教授

谭 臣 教授

徐高原 高级兽医师

学位类型： 兽医博士

领 域：

华中农业大学动物医学院

中国武汉

**College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural
University, Wuhan, China**

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 研究问题的由来.....	1
1.2 产肠毒素大肠杆菌.....	2
1.3 菌毛黏附素.....	6
1.3.1 F4 菌毛.....	7
1.3.2 其他菌毛类型.....	9
1.4 肠毒素.....	12
1.4.1 不耐热肠毒素 LT	12
1.4.2 耐热肠毒素 ST	16
1.5 产肠毒素大肠杆菌疫苗研究进展	17
1.6 乳酸乳球菌载体疫苗.....	20
1.7 研究的目的是与意义.....	22
第二章 ETEC 的分离鉴定及毒力基因分析	23
2.1 前言.....	23
2.2 材料方法.....	23
2.2.1 材料.....	23
2.2.2 方法.....	26
2.3 试验结果.....	29
2.3.1 三批次样品的 ETEC 分离情况.....	29
2.3.2 三批次样品分离 ETEC 菌株对比分析	33
2.4 讨论与分析.....	40
2.4.1 三批次不同样品来源的 ETEC 菌株分离率情况分析	40
2.4.2 三批次不同样品来源的 ETEC 菌株毒素及菌毛基因检测情况 况分析	40
2.4.3 ETEC 分离结果对疫苗研发的提示.....	42
2.5 小结.....	43
第三章 重组乳酸乳球菌的构建及生物学特性研究	44
3.1 前言.....	44
3.2 材料方法.....	45
3.2.1 材料.....	45
3.2.2 方法.....	50
3.3 结果.....	62
3.3.1 重组乳酸菌的构建.....	62
3.3.2 三株重组乳酸菌的表达鉴定.....	68

3.3.3 重组乳酸乳球菌生长曲线.....	69
3.3.4 重组乳酸菌活菌数和时间的关系曲线	69
3.3.5 重组乳酸菌 pH 值和时间的关系曲线.....	70
3.3.6 重组乳酸菌抗逆性检测情况.....	71
3.3.7 重组乳酸乳球菌在不同保护剂下的保存期情况	71
3.3.8 重组乳酸乳球菌耐药情况检测.....	73
3.4 讨论.....	74
3.4.1 重组乳酸菌的构建.....	74
3.4.2 乳酸乳球菌生长情况的分析.....	75
3.4.3 乳酸乳球菌抗逆性结果分析.....	76
3.4.4 重组乳酸菌保存条件的初步探索.....	76
3.4.5 重组乳酸菌耐抗生素情况的检测.....	76
3.5 小结.....	77
第四章 重组乳酸菌活载体口服疫苗的应用研究	78
4.1 前言.....	78
4.2 材料方法.....	79
4.2.1 材料.....	79
4.2.2 方法.....	79
4.3 结果.....	87
4.3.1 小鼠 F4 ⁺ ETEC 的感染模型的构建.....	87
4.3.2 重组乳酸菌活载体疫苗口服免疫保护小鼠免受 F4 ⁺ ETEC 感染	88
4.3.3 仔猪 F4 ⁺ ETEC 的感染模型的构建.....	89
4.3.4 重组乳酸菌活载体口服疫苗保护无母源抗体仔猪断奶阶段免受 F4 ⁺ ETEC 感染.....	90
4.3.5 重组乳酸菌活载体口服疫苗免疫妊娠后期母猪使其产生较强免疫力并将母源抗体传递给仔猪	93
4.3.6 重组乳酸菌活载体口服疫苗免疫显著提高了妊娠晚期母猪肠道中乳酸杆菌的丰度	95
4.3.7 重组乳酸菌活载体口服疫苗四轮免疫提高了妊娠后期母猪肠道内菌群丰富度及均匀度	101
4.3.8 口服免疫母猪传递的母源抗体保护哺乳阶段(8 日龄)仔猪免受 F4 ⁺ ETEC 感染.....	102
4.3.9 重组乳酸菌活载体口服疫苗保护存在母源抗体仔猪断奶阶段免受 F4 ⁺ ETEC 感染.....	105
4.4 讨论.....	107
4.5 小结.....	110
全文总结.....	111

参考文献.....	112
附录一 补充材料	134

摘要

产肠毒素大肠杆菌（*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC）是一种能够导致多种幼龄动物腹泻的致病型大肠杆菌，尤其是以哺乳期间的仔猪黄白痢、断奶后仔猪腹泻（PWD）等疾病最为典型，在临床上对养猪业造成了巨大的经济损失。该菌主要以含有不耐热肠毒素（heat-labile enterotoxins, LT）、耐热肠毒素（heat-stable enterotoxins, STs）以及 F4（K88）、F5（K99）、F6（987P）、F18、F41 五种菌毛的菌株流行较高，其中又以 F4⁺ETEC 流行最广泛，在世界各地的研究中均有报道。目前，养殖行业针对本病的主要防控方案是依靠抗生素进行治疗，而在当今细菌耐药性日趋严重、各地政府禁抗政策不断推出的严峻形势下，使用疫苗逐渐成为本病防控的重要发展趋势。然而，目前临床上在售的疫苗产品选择较少，且多数缺乏广泛保护效果，因此，临床上仍急缺一种适用于本病防控的疫苗产品。

本研究首先检测了临床分离的 ETEC 菌株菌毛及毒素基因流行情况，并针对流行菌毛类型开发疫苗。之后利用乳酸乳球菌表达系统，构建了三株重组乳酸菌载体抗原表面展示菌株，并将三株重组菌株配制成活载体口服疫苗进行了动物免疫保护试验，探究其在防控产肠毒素大肠杆菌感染中的作用，以期为该口服疫苗的临床应用提供参考。最后本研究评估了重组乳酸菌的生长性能、抗逆性、耐药性以及保存期等生物学特性，以期为该疫苗制剂形式和使用方案的确定提供参考。具体研究结果如下所示：

1. ETEC 菌株的菌毛黏附素及毒素基因流行情况探究

本研究分别检测了三个批次病料样品中分离到的 ETEC 菌株，结果表明，三个批次病料样品的分离率存在较大差异，腹泻样品分离率较高，健康猪群样品中分离率较低，分离来源主要为肠道相关样品，不同地区流行菌株携带的毒素和菌毛情况也有较大差异，表明 ETEC 在猪群中不是常在菌。同时，分离到的 ETEC 中，毒素流行率最高的为 STb 肠毒素，菌毛流行率最高的为 F4（K88）菌毛，流行率最高的菌毛与毒素组合为 K88/Sta/Stb。此外，检测结果也提示出，含有 K88 菌毛黏附素或 LT 蛋白两种抗原其中一种的菌株总数，在临床分离菌株中的占比较高，因此，有望

将这两种抗原作为本病疫苗开发的靶标抗原。

2. 重组乳酸菌的构建及生物学特性研究

本研究利用食品级乳酸乳球菌 NZ3900 及无抗表达质粒 pNZ8149 作为载体分别成功表达了产肠毒素大肠杆菌不耐热肠毒素 LT 双突变减毒的 A 亚基、未做任何改变的 B 亚基以及 F4 菌毛的主要黏附亚基 FaeG, 并利用分泌表达肽 Usp45 及细胞壁非共价连接基序 *LysM* 成功将三个抗原各自展示在重组乳酸乳球菌表面。同时对不含质粒的乳酸乳球菌菌株、含有空载质粒的菌株以及三株重组菌株进行了生物学特性研究。结果表明, 相比于空载菌株, 重组菌株对数生长期的时间提前了一个小时, 在发酵过程中 pH 值也提前一个小时到达平台期, 这些结果提示重组质粒的存在并未影响乳酸乳球菌的生长, 反而使其生长活性更强。同时, 重组乳酸乳球菌适宜在 pH=6-8 的环境下生长, 活菌量处于最高水平, 在强酸 (pH=1-2) 环境下无法存活, 在弱酸 (pH=4-8)、弱碱 (pH=9-10) 和强碱 (pH=11-12) 中有一定存活率, 但死亡数量达到 1-3 个数量级, 下降较为明显。重组菌株以 15%脱脂牛奶作为保护剂, 储存在-20℃环境时, 在 20 周的保存期内保持活菌数无显著变化。重组乳酸菌对大部分的常见抗生素均无耐药性, 仅对诺氟沙星, 复方新诺明, 环丙沙星三种抗生素耐药, 对丁胺卡那及多粘菌素 B 存在一定程度的耐药。

3. 针对 F4⁺ETEC 的重组乳酸乳球菌活载体口服疫苗研制

本研究将三株重组菌按照等比例进行混合后制成活载体口服疫苗进行动物实验, 评价活载体口服疫苗诱导动物机体产生免疫保护的效果。小鼠口服免疫结果表明, 四轮口服免疫能够完全保护 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染; 无母源抗体仔猪免疫保护结果表明, 在无母源抗体存在的情况下, 三轮口服免疫能保护仔猪在断奶阶段遭受 F4⁺ETEC 攻击时不发生腹泻; 妊娠后期母猪免疫结果表明, 四轮口服免疫能够提高母猪血清和初乳中的 IgG 抗体水平, 并且促使仔猪通过初乳获得了母源抗体; 存在母源抗体的哺乳仔猪感染结果表明, 母源抗体能够帮助 8 日龄仔猪抵御 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染, 防止仔猪出现腹泻及死亡等情况。但由于母源抗体在哺乳期间逐渐减低, 至断奶期时几乎完全消失, 母源抗体在仔猪断奶时已无法保护其免受 F4⁺ETEC 感染, 因此本研究在母体抗体存在的情况下, 对哺乳期仔猪进行了三轮口服免疫, 结果表明口服免疫能够帮助含母源抗体的仔猪在断奶阶段抵抗 F4⁺ETEC 感染, 杜绝断奶仔猪腹泻情况的出现。综上所述, 本研究开发的重组乳酸菌活载体口服疫苗通

过在妊娠母猪生产前一个月内进行免疫并在仔猪出生后继续进行免疫，可有效预防新生仔猪在哺乳期至断奶期的 F4⁺ETEC 感染，为该病的预防和控制提供了一种新的免疫策略。

综上所述，本研究探索了临床分离 ETEC 菌株中菌毛黏附素及毒素基因的流行情况，表明 F4⁺ETEC 菌株是当前最主要的流行菌株，同时，含有 F4 菌毛黏附素或 LT 肠毒素的菌株数量总和，在临床分离菌株中占的比例较高，提示可以选择这两种抗原开发疫苗防控本病的发生。因此，本研究利用乳酸乳球菌表达系统，并将 LT 毒素的 A 亚基进行双突变减毒处理，联合 LTB 亚基以及 F4 菌毛黏附素中的主要黏附亚基 FaeG，分别构建了三株重组乳酸菌活载体抗原表面展示菌株，并等比混合制成活载体口服疫苗进行动物试验。结果表明该疫苗无论直接免疫仔猪还是免疫母猪使仔猪获得抗体，都能够帮助仔猪抵抗 F4⁺ETEC 的感染，提示该疫苗有较好的应用前景。此外，对重组菌株的生物学特性的研究结果表明，该疫苗要进行产品化还有一定的困难需要克服，比如不耐胃酸、对大部分抗生素敏感以及如何长久储存的问题等，这直接关系着本疫苗的制剂形式和给药方式，甚至跟疫苗最终的应用效果也息息相关，这些问题的解决有望为本疫苗的产品化提供参考。

关键词：产肠毒素大肠杆菌；毒素基因分析；F4 菌毛；重组乳酸乳球菌；载体疫苗；口服疫苗免疫

Abstract

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a pathogenic strain of *Escherichia coli* known to induce diarrhea in young animals, especially piglets. It often manifests as yellow-white diarrhea in piglets during lactation, post-weaning diarrhea (PWD), and other related conditions, leading to significant economic losses in the pig industry. ETEC primarily produces heat-labile enterotoxins (LT) and heat-stable enterotoxins (STs), along with different fimbriae such as F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, and F41. The F4⁺ETEC is particularly prevalent. Currently, antibiotics are the main approach for disease prevention in the breeding industry. However, due to increasing bacterial resistance and antibiotic limitations, vaccines are becoming essential for disease control. Despite this, there are limited approved vaccine options for use in breeding practices, emphasizing the urgent need for effective vaccines against ETEC.

This study initially examined the prevalence of pili and toxin genes in clinically isolated ETEC strains, followed by the development of vaccines targeting prevalent pili types. Subsequently, a *Lactococcus lactis* expression system was used to create three recombinant lactic acid bacteria (LAB) that displayed antigens on their surface. These recombinant strains were then formulated into oral vaccines for animal immune protection tests to evaluate their efficacy in preventing and controlling ETEC infections. The primary goal was to provide insights for the clinical application of this oral vaccine. Furthermore, the biological characteristics such as growth performance, stress resistance, drug resistance, and shelf life of the recombinant lactic acid bacteria were assessed, laying a solid foundation for vaccine preparation and eventual integration into real breeding production processes. The specific research findings are detailed below:

1. Investigation on the prevalence of pilus adhesin and toxin genes of ETEC strains

In this study, ETEC strains isolated from three batches of diseased samples were studied. The results revealed significant differences in isolation rates among the three

batches of diseased samples. The isolation rate of diarrhea samples was higher than that of healthy pigs, and the main source of ETEC isolation was the intestine. These results indicate that ETEC is not a common bacterium in pigs. Among the isolated ETEC strains, STb exhibited the highest prevalence of toxin, and F4 (K88) had the highest prevalence of fimbriae. The most common pili and toxin combination observed was K88/Sta/Stb. Furthermore, the study suggested that the combination of K88 pilus adhesin and LT protein showed a high coverage rate among clinical isolates, indicating its potential as a vaccine target for disease development.

2. Construction and biological characteristics of recombinant lactic acid bacteria

In this study, we utilized food-grade *Lactococcus lactis* NZ3900 and expression plasmid pNZ8149 as live vectors to effectively express the mutant attenuated LTA subunit of ETEC heat-labile enterotoxin, the LTB subunit, and the main adhesion subunit FaeG of the F4 pilus. We employed the secreted expression peptide Usp45 and the cell wall non-covalent linking motif *LysM* to effectively present the three antigens on the surface of recombinant lactic acid bacteria (LAB). The presence of the recombinant plasmid did not hinder the growth of *L. lactis*; instead, it enhanced its activity. The recombinant *L. lactis* exhibited growth capability in neutral or weakly acidic and basic environments, but failed to survive in highly acidic conditions while demonstrated survival in highly basic conditions. Furthermore, the recombinant strain could be preserved in 15% skim milk as a protective agent for up to 20 weeks at -20°C, with minimal changes in the number of viable bacteria. Additionally, the recombinant LAB displayed susceptibility to most common antibiotics, except for norfloxacin, compound sulfamethoxazole, and ciprofloxacin, and exhibited partial resistance to amikacin and polymyxin B.

3. Development of a live vector oral vaccine of *L. lactis* against F4⁺ETEC

By combining the three recombinant LAB in equal proportions, we developed a live vector oral vaccine and assessed the efficacy of this vaccine in the prevention of F4⁺ETEC infection. Results from oral immunization in mice demonstrated that four rounds of immunization conferred protection against all LD₅₀ doses of F4⁺ETEC infection. Moreover, the results of immune protection in piglets lacking maternal antibodies indicated that three

rounds of oral immunization effectively safeguarded them from F4⁺ETEC infection during the weaning stage. Additionally, sow immunization during late pregnancy revealed that four rounds of oral immunization significantly increased serum antibody levels in sows and colostrum. Maternal antibodies acquired through colostrum were found to protect piglets against F4⁺ETEC infection at the LD₅₀ dose during lactation, thereby preventing diarrhea and mortality. As maternal antibodies gradually decreased and eventually disappeared during the weaning period, we conducted three additional rounds of booster immunization on piglets during lactation while they still possessed maternal antibodies. The results revealed that booster immunization significantly enhanced piglets' resistance to F4⁺ETEC infection during the weaning stage. The present study highlights the efficacy of an oral LAB vaccine in preventing F4⁺ETEC infection in piglets from the lactation period to the weaning period through sow immunization and booster immunization of piglets. These findings demonstrate a promising vaccination strategy for the future prevention and control of diarrhea in piglets caused by ETEC.

In summary, this study investigated the prevalence of pilus adhesion and toxin genes in clinical ETEC isolates, highlighting F4⁺ETEC strains as the most common. The combination of F4 pilus adhesion and LT protein demonstrated high coverage in clinical isolates. In this study, we utilized the *L. lactis* expression system, the A subunit of LT toxin was attenuated by double mutation, along with the inclusion of LTB subunit and FaeG (the main adhesion subunit of F4 fimbriae), to create three recombinant lactic acid bacteria strains displaying antigens on their surface. These strains were mixed equally to formulate an oral live vector vaccine. Results indicated the vaccine's efficacy against F4⁺ETEC infection, whether administered to piglets directly or sows. However, challenges remain, such as susceptibility to stomach acid and long-term storage. Addressing these issues is crucial for the successful production of the vaccine, enhancing its clinical impact in prevention and control.

Key words: Enterotoxigenic *Escherichia coli*; Toxin gene analysis; F4 pili; Recombinant *Lactococcus lactis*; Vector-based vaccines; Oral vaccine immunization

缩略语表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文全称
bp	Base pair	碱基对
CFU	Colony-Forming Unit	菌落形成单位
dmLT	Double mutant LT	双突变不耐热肠毒素
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	产肠毒素大肠杆菌
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
h	Hour	小时
HE	Hematoxylin and Eosin stain	苏木素和伊红染色
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
LT	Heat-labile enterotoxins	不耐热肠毒素
LTA	Heat-labile enterotoxins A	不耐热肠毒素 A 亚基
LTB	Heat-labile enterotoxins B	不耐热肠毒素 B 亚基
LAB	Lactic Acid Bacteria	乳酸菌
min	Minute	分钟
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
PWD	Post-weaning diarrhoea	断奶仔猪腹泻
r/min	Revolutions per minute	转/分
s	Second	秒
ST	Heat-stable enterotoxins	耐热肠毒素
Stx2e	Shiga-like toxin IIe	类志贺毒素II型变异体
WB	Western Blot	免疫印迹
μL	Microlitre	微升
μg	Microgramme	微克

第一章 文献综述

1.1 研究问题的由来

在当前养猪业中,腹泻病是一类严重影响猪群健康的疾病,该病发病原因复杂,包括病毒、细菌、寄生虫等病原因素以及饲养管理不当、营养失衡等非病原因素均可造成腹泻病的发生,临床上还常存在混合感染的情况,防控难度较大(孙宏伟 et al 2016)。产肠毒素大肠杆菌(*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)是引起猪群腹泻的主要细菌性病原之一,其可感染包括人在内的多种动物,导致各种日龄的动物发病,但幼龄动物多发,仔猪、犊牛、羔羊和幼犬等多种动物均为其易感动物(Dubreuil et al 2016)。ETEC 在猪群中主要导致 7 日龄内仔猪发生以剧烈腹泻和脱水为特征的仔猪黄痢,传播迅速,发病率和死亡率均较高;10-30 日龄仔猪多出现仔猪白痢,病死率不高,但容易导致仔猪发育不良,逐渐消瘦,甚至造成僵猪的情况;除引起哺乳阶段仔猪发病外,本菌还是导致断奶仔猪腹泻(PWD)的主要细菌性病原,一些菌株甚至与仔猪水肿病有关,对养殖场造成重大经济损失(Nagy and Fekete 2005, Kopic and Geibel 2010, Dubreuil et al 2016)。

目前养猪业对于 ETEC 的防控主要还是依靠抗生素进行治疗,而临床分离的大肠杆菌普遍耐药,大量应用抗生素有时不仅达不到治疗效果,反而使多重耐药菌株增加,加之世界各国限抗禁抗政策的不断落实,抗生素治疗的方案已经不满足本病的防控,因而接种疫苗是预防本病的最佳方法(Wagenlehner and Naber 2019, Bonetti et al 2022, Kim et al 2022)。ETEC 疫苗的研究距今已逾 30 年,从单纯的物理化学手段到基因工程手段均取得了一系列的进展,但至今尚无一种疫苗能有效地适用于各个地区,大多数疫苗的研究都由于免疫原性达不到要求或是缺乏广泛保护力而停滞不前(Riddle and Savarino 2014)。全菌灭活疫苗是目前试验性及商品化 ETEC 疫苗的主要制备方法,但由于 ETEC 血清型众多,且分布呈地域性差异,全菌灭活疫苗实际使用过程中受地域局限性较大,不具备广谱性;此外,其还存在有效成分占比不高、免疫剂量较大、内毒素和无关成分含量较高、副反应严重等问题,导致其在临床中使用效果并不理想(Bourgeois et al 2016)。本病的亚单位疫苗一直以

来都是备受关注的疫苗类型，具有广谱性强，免疫原性高，动物应激反应小等优点，但在当前的研究中，该菌抗原蛋白的获取仍然存在一定的问题，如提纯成本较高、菌株表达量低、可溶性蛋白获得困难、免疫效果达不到预期等，这些障碍的存在导致目前仍无表现优异的亚单位疫苗产品出现(Seo and Zhang 2020, Dubreuil 2021, Xu et al 2023b)。因此，当前对于 ETEC 的防控，仍急需一种行之有效的疫苗方案。

1.2 产肠毒素大肠杆菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*)，又叫大肠埃希氏菌，革兰氏阴性，需氧或兼性厌氧短杆菌，绝大部分大肠杆菌是动物肠道菌群的正常组成部分，在维持动物肠道稳态上发挥重要作用，另外一部分能够导致动物患病的被称之为致病性大肠杆菌 (Kaper et al 2004)。产肠毒素大肠杆菌首次被报道于 1967 年，是在霍乱毒素被发现后不久发现的 (Dubreuil 2014)。ETEC 作为肠道致病性大肠杆菌，主要定植于小肠黏膜表面，其发挥致病性的首要条件就是通过黏附素与肠上皮细胞上的特异性受体进行结合 (Zhang et al 2018)。黏附素主要是指细菌表面的菌毛，是一种丝状的多聚蛋白结构，介导细菌黏附宿主细胞。在动物源 ETEC 分离株中，最常见菌毛类型为:F4 (K88)、F5 (K99)、F6 (987P)、F18 和 F41 (Nagy and Fekete 1999)。几种常见菌毛的编码基因簇及其功能亚基组成如图 1-1 所示，包含以下几种亚基：主要菌毛亚基（黄色），次要菌毛亚基（蓝色），黏附亚基（橙色），伴侣亚基（绿色），引导亚基（红色），调节亚基（紫色）和移动或接合元件（白色）。

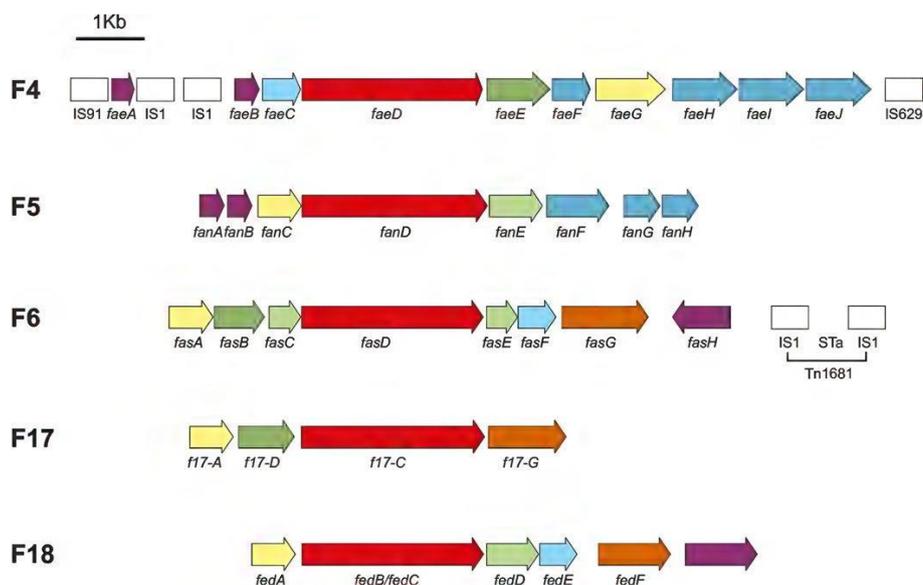


图 1-1 动物 ETEC 编码菌毛的基因簇及其功能亚基 (Dubreuil et al 2016)

Fig. 1-1 Gene clusters encoding pili and their functional subunits of animal ETEC

几种常见菌毛的生物发生亚细胞定位模型如图 1-2 所示，菌毛主体全部都是由一个主要亚基（黄色）和一个或多个次要亚基（蓝色）组成的聚合物，还存在一个菌毛的尖端黏附素亚基（橙色）。其中，F4（K88）和 F5（K99）菌毛的主要亚基也是其黏附亚基，发挥黏附功能。Usher 亚基（红色）位于细胞外膜，主要作用是将菌毛亚基引导至细菌表面。除 F6 菌毛外，所有菌毛输出系统都只有一种周质伴侣亚基（绿色），但 F6 菌毛具有三个周质伴侣亚基，其中两个专用于两个不同的菌毛亚基。所有菌毛蛋白均通过 Sec 途径（黑色）穿过内膜。

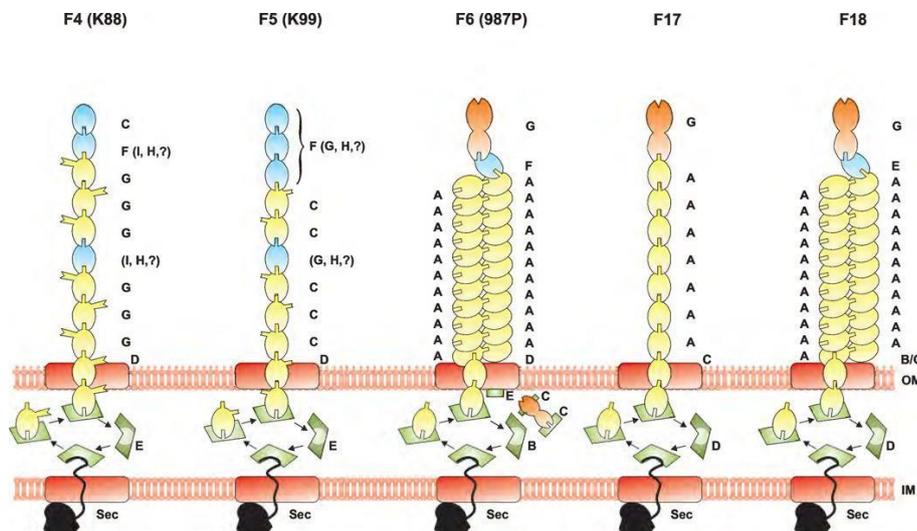


图 1-2 几种常见菌毛的生物发生亚细胞定位模型（Dubreuil et al 2016）

Fig. 1-2 Models of subcellular localization in the biogenesis of several common pili

ETEC 黏附于肠上皮细胞后，通常既不会侵袭刷状缘也不会造成组织病理学损伤，其感染引起的腹泻主要由几种肠毒素单独或共同介导。导致动物发病的肠毒素类型主要包括不耐热肠毒素（heat-labile enterotoxins, LT）和耐热肠毒素（heat-stable enterotoxins, STs）两种（Dubreuil 2021）。在猪体内，LT 肠毒素通常由 A、B 两个亚基组成，而 ST 存在三种类型：STa，STb 和 EAST1（Schifferli 2005）。

图 1-3 描述了各种肠毒素通过激活离子通道和松动紧密连接导致水和电解质损失的信号转导过程。LT 毒素主要通过 B 亚基与宿主黏膜表面的 GM1 受体结合，并通过内吞作用进入上皮细胞（Angström et al 2000）。在高尔基体中分离后，A 亚基被转移到内质网（ER）上并在那里被切割成 A1 和 A2 两个部分。A1 片段转移到细胞质中，并触发其 ADP-核糖基化活性激活腺苷酸环化酶（AC），从而提高细胞内 cAMP

水平(Field et al 1989, Angström et al 2000)。cAMP 水平的升高导致蛋白激酶 A(PKA) 依赖性通路的激活,从而抑制钠-氢(Na/H) 交换器对钠离子的吸收;并通过囊性纤维化跨膜调节因子(CFTR)的磷酸化刺激 Cl⁻ 的分泌(Field et al 1989, Viswanathan et al 2009),共同导致电解质和水的平衡被打破,最终发生严重的水样腹泻,并且 LT 毒素的作用是不可逆的。

STa 肠毒素主要是与肠上皮细胞刷状缘绒毛上糖蛋白受体鸟苷酸环化酶 C (GC-C)的细胞外结构域结合,激活鸟苷酸环化酶胞内催化域进而导致 cGMP 的产生和蓄积。升高的 cGMP 水平激活 cGMP 依赖性蛋白激酶 II (cGMPKII),进而导致 Cl⁻ 通道 CFTR 的磷酸化,从而促进 Cl⁻ 和 HCO₃⁻ 的分泌。升高的 cGMP 也抑制磷酸二酯酶 3 (PDE3) 的产生,从而增加 cAMP 水平,激活 PKA 通路并抑制 NHE3 对 Na⁺ 的重吸收,从而导致了腹泻的发生。与 LT 毒素作用不同的是,STa 的作用是可逆的。

STb 毒素在序列和作用机制上都与 STa 或 EAST 不同,STb 诱导的腹泻不通过激活 GC-C 途径,而是与肠上皮细胞上的脑苷脂结合,之后通过内吞作用进入细胞并刺激 GTP 结合调节蛋白(G),促进 Ca⁺⁺ 进入细胞,这激活了钙调素依赖性蛋白激酶 II (CAMKII)。该酶磷酸化 CFTR,产生 Cl⁻ 和 HCO₃⁻。高水平的 Ca⁺⁺ 也激活蛋白激酶 C,这种酶作用于 CFTR,并通过一个未知的通道抑制 Na⁺ 的摄取,CAMKII 还能打开钙激活的氯离子通道。与此同时, Ca⁺⁺ 水平的升高提高了磷脂酶 A2 和 C 的活性,进一步刺激膜脂合成前列腺素 E2,并在肠嗜铬细胞中产生 5-羟色胺(5-HT) 作用于肠神经系统,使肠壁平滑肌收缩,促进水样粪便的排出,些变化共同引起了十二指肠和空肠的水和电解质分泌(Dubreuil 2014)。与 STa 相同,STb 的作用是可逆的。

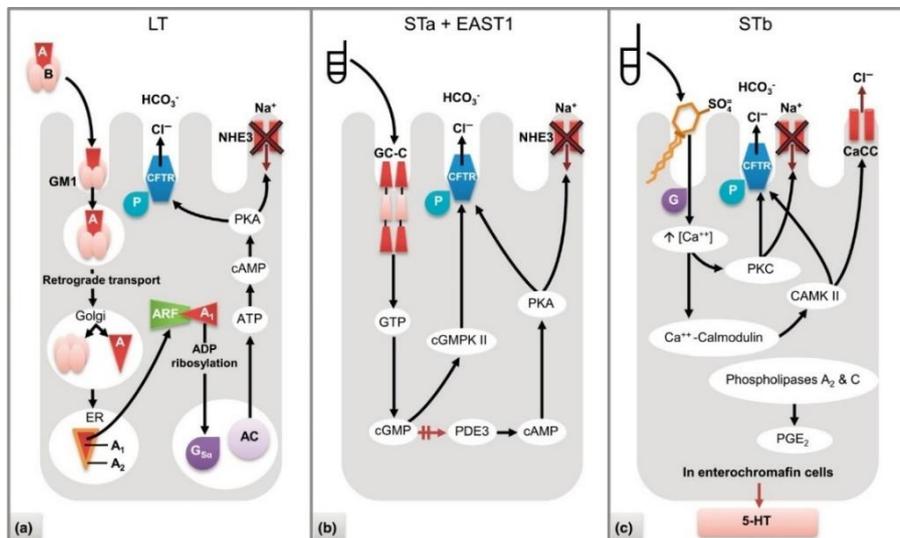


图 1-3 ETEC 毒素对肠上皮细胞的作用机制 (Dubreuil 2014)

Fig. 1-3 Mechanism of action of ETEC toxin on intestinal epithelial cells

图 1-4 显示了几种常见菌毛的黏附素基因及其主要肠道受体, ETEC 的感染与动物体内的受体因素息息相关。ETEC 菌株发生定植及致病的场所是小肠而不是大肠, 这可能与各肠段内受体的分布以及每个肠段内调节菌毛表达的不同环境信号有关 (Edwards and Schifferli 1997, Edwards and Puente 1998)。受体还是解答 ETEC 主要引起幼龄动物腹泻的关键因素 (王通 2021), 例如, 只有新生仔猪和断奶仔猪的肠道黏液层中才含有 K88 受体, 并且后者比前者多 (Conway et al 1990), 而这些受体在 6 月龄仔猪的肠道黏液中几乎检测不到 (Willemsen and de Graaf 1992), 这也是新生仔猪和断奶仔猪多发 F4⁺ETEC 感染的原因。同样, 年长猪的肠道细胞对 K99 介导的黏附具有抵抗力 (Runnels et al 1980), 这与 K99 受体活性所需的肠道糖脂中 N-羟乙酰基 (N-glycolyl) 的年龄依赖性消失相关 (Teneberg et al 1990, Yuyama et al 1993)。对 987P 受体的研究表明, 其主要菌毛受体肠道硫酸脂 (intestinal sulfatide) 在新生仔猪的肠道黏液中释放, 抑制了菌毛介导的黏附和定植 (Dean et al 1989, Dean 1990, Dean-Nystrom and Samuel 1994)。然而, 仅靠肠道受体分子的年龄特异性表现并不能完全决定新生或断奶动物对菌毛介导的定植易感性 (周虹 et al 2012)。除此之外, 动物个体的基因组成决定的受体表达量以及由母源抗体提供的保护力也同样影响了动物是否感染 (Schifferli 2005)。总的来说, 菌毛黏附素与肠毒素相辅相成, 共同在细菌感染过程中发挥重要作用 (Zhang and Zhang 2010, Zhang et al 2022)。

Fimbria	Adhesin	Intestinal receptor molecule(s)
K88ab	FaeG(ab)	b: Transferrin N-glycan (74 kDa) ^a
		bc: IMPTGP (210–240 kDa) ^{a,b}
		bcd: Glycoproteins (45–70 kDa) ^c
K88ac	FaeG(ac)	bc: IMPTGP (210–240 kDa) ^a bcd: Glycoproteins (45–70 kDa) ^c
K88ad	FaeG(ad)	d: Neutral glycosphingolipids ^a bcd: Glycoproteins (45–70 kDa) ^c
F41	Major subunit	Unknown (erythrocytes: glycophorin A ^M)
K99	FanC	N-Glycolylsialoparagloboside N-glycolyl-GM3
987P	FasG FasA	Sulfatide Proteins (32–35 kDa) Ceramide monohexoside (hydroxylated galactosyl-cerebroside)
F18ac	FedF	Unknown [F18ab: α(1,2)-fucosyl-containing glycoconjugates]
F17a	F17-G	Mucins, glycoproteins (170–200 kDa)

图 1-4 几种常见菌毛的黏附素基因及其主要肠道受体 (Schifferli 2005)

Fig. 1-4 Adhesin genes of several common pili and their major intestinal receptors

1.3 菌毛黏附素

ETEC 菌毛类型众多, 图 1-5 展示了两种 ETEC 中常见的菌毛形态, 图中长而直的为菌毛, 而周身覆盖的为鞭毛。Vidotto 等为检测分离出的大肠杆菌中菌毛流行情况, 从巴西南部腹泻仔猪身上分离出 100 株大肠杆菌进行检测, 结果显示, 大肠杆菌中菌毛的流行率为 F4 (44%)、F18 (38%)、F5 (30%)、F41 (32%)、F6 (25%) (Vidotto et al 2009)。多个研究都表明, F4 (K88) 菌毛是猪源 ETEC 中的主要流行菌毛类型之一 (Moon et al 1980, Wittig et al 1995), 在养殖场的分离率很高。Wang 等在中国中部湖北省的集约化养猪场进行了两次调查, 2002~2003 年的 227 份新生仔猪和断奶后仔猪腹泻的粪便样本中, 23 份 (10.1%) 检出菌毛抗原 K88。2004 年对 179 份 1 日龄至 6 周龄腹泻仔猪的粪便样本进行了菌毛抗原基因的检测, K88 抗原阳性率为 20.1%, 两次结果均发现, F4 菌毛在所有菌毛中检出率最高, 表明 F4 (K88) 是中国中部仔猪腹泻相关 ETEC 菌的最常见菌毛抗原 (Wang et al 2006)。吴杨等在山东省青岛、烟台和潍坊地区采集腹泻样品共计 1014 份, 其中分离到大肠杆菌 987 株, 分离率为 97.34%, 含有毒素的大肠杆菌 169 株, 占比 17.12%。在含有毒素的大肠杆菌中, K88 菌毛黏附素占比 47.34%, 为主要的菌毛类型 (吴杨 et al 2022)。陈亮等采集腹泻病死仔猪样本共计 156 份进行大肠杆菌的分离, 共分离到大肠杆菌 148 株, 分离率为 94.87%, 其中具有致病性的 112 株, 87 株为产肠毒素大肠杆菌, K88 检出率为 28.74%, 在所有菌毛基因中检测率最高 (陈亮 et al 2023)。上述结果均表明, F4 (K88) 菌毛是我国引起猪群腹泻的产肠毒素大肠杆菌主要流行菌株。

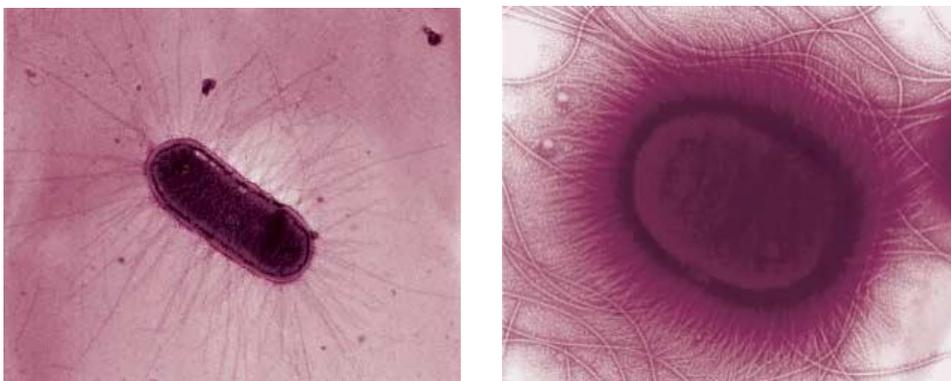


图 1-5 两种常见的菌毛形态

Fig. 1-5 Two common pilus morphologies

1.3.1 F4 菌毛

F4 菌毛又称 K88 菌毛，菌毛抗原（F）早期被称为荚膜（K）抗原，这也是 F4 抗原同时也被称为 K88 抗原的原因，其余几个菌毛抗原同理（Schroyen et al 2012）。K88 是最早被鉴定出来的动物源 ETEC 菌毛，该抗原最早在 1961 年分离于英格兰发生肠炎和水肿病的仔猪体内（Orskov et al 1961, Orskov et al 1964）。利用 ETEC 菌株 F4（K88）菌毛抗原的多克隆抗血清进行凝集和沉淀试验，鉴定出 F4 菌毛存在三种变体，即 F4ab、F4ac（Cahill and Glantz 1978）和 F4ad（Guinée and Jansen 1979）。这是根据鉴定出的表位来命名的，其中，名称中的“a”代表共同的表位，而“b”、“c”和“d”代表特定的表位（van Zijderveld et al 1990）。F4ac 是最常见的一种菌毛变异体类型（Schroyen et al 2012, Dubreuil 2021）。Choi 等通过对 812 株腹泻仔猪中分离出的大肠杆菌菌株进行了 F4（K88）变体（ab、ac 和 ad）基因检测，结果显示，812 株大肠杆菌中有 44 株（5.4%）携带 F4 基因。在已知携带 F4 基因的 44 个分离株中，42 株（96%）含有 F4ac 基因，2 株（4%）含有 F4ab 基因，未检测到 F4ad 基因，这表明 F4ac 是仔猪腹泻主要流行的 F4 变体（Choi and Chae 1999）。

F4 操纵子位于一个质粒上，它编码构成 F4 受体的 10 种不同蛋白质。操纵子的不同亚基被称为 FaeA 到 FaeJ；其中，FaeG 是其主要的亚基，也是其黏附亚基（Lu et al 2019a），辅助细菌黏附到宿主细胞的 F4 受体上（Van den Broeck et al 2000）。Xia 等为了研究参与 F4⁺ETEC 菌毛与肠上皮结合的关键蛋白，利用工程大肠杆菌 SE5000 菌株携带 *fae* 操纵子基因簇，对应于菌毛类型 F4ab、F4ac 和 F4ad，构建了三株在分别表达不同菌毛的重组菌株，命名为 rF4ab、rF4ac 和 rF4ad，结果表明重组菌株 rF4ab、rF4ac 和 rF4ad 具有与野生型 F4⁺ETEC 菌株相同的结合特性，表现为与猪刷状缘和肠上皮细胞的结合增强，并且使用抗 F4 菌毛的单克隆抗体后黏附被阻断。同时，研究者还构建了 *faeG* 基因缺失株与回补菌株，黏附测定和黏附抑制测定表明， $\Delta faeG$ 缺失株与猪刷状缘以及肠上皮细胞系的结合显著降低，而回补菌株 $\Delta faeG/pfaeG$ 恢复了黏附功能。这些数据表明 F4 菌毛的存在促进了大肠杆菌在肠道内的黏附，并且这种结合主要是由其主要的亚基也是黏附亚基 FaeG 直接介导的（Xia et al 2015a）。

F4 菌毛依靠一种保守的分子伴侣引导（chaperone-usheer）途径进行组装，其主

要亚基 FaeG 沿组装好的柔性 F4 菌毛结构暴露出数百个连续的结合表面，发挥黏附作用（Busch and Waksman 2012）。三种自然发生的 F4 菌毛的血清学变体（F4ab, F4ac 和 F4ad）具有相关但不同的结合和血凝谱，并且主要在 FaeG 的序列上存在不同（Orskov et al 1964, Guinée and Jansen 1979）。图 1-5 显示了 FaeG 的三维结构，可以看出菌毛的典型特征，即保守的免疫球蛋白样折叠结构，通过电子显微镜观察，在当前视野下菌毛大约 4nm 宽。分子被交替着色为青色和绿色，红色残基被认为参与受体结合有关，蓝色残基为存在变异性的区域。放大的特写视图为带状展示的残基结构，为可能参与受体结合的区域，在其上存在一个包含两个短 β 链和两个 α 螺旋的子结构域，大部分的变异性都集中在这个额外的亚结构域附近（Van Molle et al 2007）。

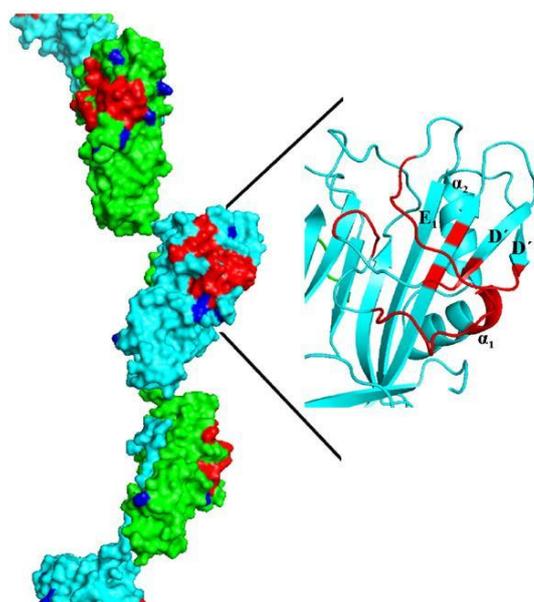


图 1-5 基于 FaeG 结构的 F4 菌毛结构（Van Molle et al 2007）

Fig. 1-5 Structure of F4 pilus based on FaeG structure.

由于 F4 菌毛变体的不同序列主要存在于 FaeG 的序列上，这提示不同的变体可能存在不同的受体蛋白或受体结合区域（Van den Broeck et al 2000）。Baker 等测试了来自 4 个品种 Chester White（切斯特白猪），Duroc（杜洛克），Hampshire（汉普夏猪）和 Yorkshire（约克夏猪）共 24 只纯种猪的上皮细胞刷状缘对每种 K88 变体的黏附性（Baker et al 1997），按照对应的受体情况将猪群分为 6 种易感表型（A-F）（Van den Broeck et al 2000），相应结果见图 1-6 所示。作为 F4 菌毛的主要亚基及黏附亚基，FaeG 在 F4⁺ETEC 定殖动物肠道时发挥重要作用（Xia et al 2015b）。缺失 FaeG 亚单位后，F4ac⁺ETEC 攻毒引起仔猪感染的临床症状及其诱导的肠黏膜损伤都

得到了减轻，证实其在 F4⁺ETEC 感染和致病过程中发挥重要作用 (Xia et al 2021)。同时，FaeG 还显现出了较强的免疫原性 (Zhuai-Zhuai et al 2011) 及保护性效果，Moonens 等将 FaeG 融合到猪免疫球蛋白 IgA 的 Fc 结构域并在拟南芥中进行表达，创造了一种口服的单链抗体饲料，体外试验结果表明，含有本抗体的种子提取物能抑制 F4⁺ETEC 株与体外培养的猪肠道绒毛肠上皮细胞的黏附；仔猪攻毒结果表明，基于口服饲料的被动免疫策略对仔猪具有保护作用，表现为 F4⁺ETEC 细菌肠道脱落减少，仔猪对 F4 菌毛的免疫应答显著降低以及仔猪体重显著增加 (Moonens et al 2015)。Viridi 等利用相同的方法进行试验同样获得了类似的结果 (Viridi et al 2013)。Shen 等将编码 F4 菌毛的主要亚基 *faeG* 的基因引入烟草叶绿体基因组中，结果表明烟草叶绿体中产生的重组 FaeG 蛋白可在小鼠中引发相应的特异性抗体，并且产生的抗体可以在体内中和 F4⁺ETEC (Shen et al 2010)。Verfaillie 等利用 F4ac⁺ETEC 的菌毛黏附素 FaeG 基因构建了一种 DNA 疫苗，同样发现了相应的结果，并且发现肌肉注射相比于基因枪递送的方法获得了更高的抗体滴度，表明其诱发了更强的体液免疫反应 (Verfaillie et al 2004)。这些结果都证实了 FaeG 有作为抗原蛋白靶标开发针对 F4⁺ETEC 疫苗潜力。

Pig phenotype	Fimbria(e)	Receptor(s)
A (IV)	K88ab, K88ac, K88ad	bcd, bcd + bc, bc + d
B (III)	K88ab, K88ac	bc
C (questionable)	K88ad, (K88ab)	d
D (II)	K88ad	d
E (I)	–	–
F ^a	K88ab	b

图 1-6 K88 菌毛几种变异体对应的受体表型 (Schifferli 2005)

Fig. 1-6 Receptor phenotypes corresponding to several variants of K88 pili

1.3.2 其他菌毛类型

除流行率较高的 F4 菌毛外，F18 菌毛的流行率也一直处于较高水平 (Nguyen et al 2017)，在 Luppi 等的检测结果中，从 PWD 病例分离出的大肠杆菌中菌毛和毒素的流行率为：F4 (45.1%)、F18 (33.9%)、F5 (0.6%)、F6 (0.6%)、F41 (0.3%) (Luppi et al 2016)，F18 菌毛的检出率仅次于 F4 菌毛，排在第二位。陈怡洁等在 2014-2021

年分离到 137 个 ETEC 菌株并检测了其菌毛黏附素基因携带情况，结果发现 F18 菌毛的流行率最高，占到 40.9%，甚至高于 K88 菌毛的 20.4%（陈怡洁 et al 2023）。与 F4⁺ETEC 不同的是，F18 菌毛主要与断奶仔猪腹泻密切相关，很少在哺乳仔猪的黄白痢病例中检出（Lu et al 2019b, Jerez-Bogota et al 2023）。与 F4 菌毛类似，F18 菌毛也根据血清学分型分为 F18ac 和 F18ab 两种，并且两种菌毛都由一个主要亚基 FedA 组成，该亚基在血清型（Imberechts et al 1994, Kennan et al 1995, Bosworth et al 1998, Byun et al 2013）之间具有不同的蛋白质序列。目前仅对 F18ab 菌毛的附属基因和产物进行了研究。根据它们的序列情况和对菌毛的贡献，FedB 和 FedC 基因被认为编码 F18ab 菌毛的 usher 和周质伴侣蛋白（Dubreuil et al 2016）。两个次要的菌毛亚基 FedE 和 FedF，不是菌毛形成所必需的，但相应的缺失突变体形成了更长的菌毛，表明它们的产物控制了菌毛的延伸长度（Imberechts et al 1996）。Smeds 等为确定 F18 菌毛的黏附亚基，对 ETEC 基因簇的未知区域进行了测序，并生产和纯化了 FedE 和 FedF 的融合蛋白做多抗血清用于黏附研究，同时利用间接免疫荧光显微镜和黏附抑制试验，确定了 FedF 蛋白是 F18 菌毛的黏附素（Smeds et al 2001）。值得注意的是，FedE 发生突变的菌株不与猪肠绒毛结合，这表明 FedE 可能参与了黏附素亚基 FedF 的输出和组装（Dubreuil et al 2016）。FedF 序列在不同国家的分离菌株之间以及 F18ab 和 F18ac 两种抗原变异株之间均具有保守性，提示 F18ab 和 F18ac 可能具有相同的受体（Tiels et al 2005）。此外，FedF 黏附素中保守的 c 末端区域表明，F18 菌毛是通过供体链机制组装的，总的来说，FedF 的保守性支持菌毛黏附素作为针对 F18⁺ETEC 亚单位疫苗的开发（Tiels et al 2005）。

此外，F5、F6 和 F41 三种菌毛也是在导致猪群腹泻的 ETEC 中存在一定流行的菌毛类型。F5 菌毛又称 K99 菌毛，是一种在仔猪和犊牛中都会被检测到的 ETEC 菌毛类型，有研究表明，表达 K99 菌毛的 ETEC 菌株对牛、羊和猪都具有致病性，而表达 K88 的菌株仅能在猪群中致病（Cassels and Wolf 1995）。近年来的研究发现，猪群中存在一定 K99⁺ETEC 感染，但流行率低于 K88⁺ETEC，而在引起犊牛腹泻的病原中 K99⁺ETEC 流行率较高，这可能跟菌毛的本身的特异性有关，也可能与动物肠道内的受体有关。多个研究表明，ETEC 是引起 4 日龄以内的新生犊牛发生腹泻的主要原因，并且主要以 K99 菌毛为主（Krogh 1983, Acres 1985, Tzipori 1985, Snodgrass et al 1986, Foster and Smith 2009），犊牛一旦感染该菌后常出现水样腹泻。K99⁺ETEC 进入动物机体后，首先在小肠绒毛的肠上皮细胞中繁殖，小肠远端 pH 值

较低 (<6.5), 为 ETEC 定植提供了最有利的环境。定植发生后, 由感染导致的肠上皮细胞破裂和固有层损伤引起的肠绒毛萎缩在受感染的动物小肠中最为常见 (Francis et al 1989)。Brunauer 等人通过对引起全球新生小牛腹泻的几种病原相关研究进行统计分析, 着重观察了混合感染患病率的情况, 结果发现 BRV-ETEC 感染的流行率为 1.64%, 虽然占比没有病毒性病原的比例高, 但 ETEC 是唯一的细菌性病原, 同时本患病率与 ETEC 的流行率高度相关 (Brunauer et al 2021)。Wang 等在 2002-2004 年期间, 先后对两批次的仔猪腹泻粪便样本进行了菌毛检测, 结果发现 K99 菌毛的检出率分别为 5.7%和 1.1%, 低于 K88 基因的检出率 10.1%和 20.1% (Wang et al 2006)。吴杨等在山东省采集腹泻样品分离 ETEC, 共分离到产肠毒素大肠杆菌 169 株, 其中 K99 菌毛黏附素占比 4.14%, 远低于 K88 菌毛的 47.34% (吴杨 et al 2022)。陈亮等在 2020-2021 年采集齐齐哈尔地区腹泻病死仔猪样本共计 156 份进行大肠杆菌的分离, 共分离到 87 株产肠毒素大肠杆菌, 2020 年和 2021 年 K99 菌毛检出率均为 4.6%, 总检出率为 9.2%, 低于 K88 菌毛的 28.74% (陈亮 et al 2023)。上述结果均表明, F5 (K99) 菌毛在我国猪群中产肠毒素大肠杆菌的占比不大, 但仍存在。

F6 菌毛又称为 987P 菌毛, 987P 菌毛是由蛋白质亚基沿丝状轴的螺旋排列组成 (Isaacson and Richter 1981, Schifferli et al 1987)。它是一种由一个主要亚基 FasA 和两个次要亚基 FasF 和 FasG 组成的异聚结构 (Khan and Schifferli 1994)。电子显微镜和输出研究表明, FasG 是第一个输出的亚基, 其次是 FasF 和 FasA (Cao et al 1995)。由于菌毛是从底部生长而来, 因此 FasG 被认为是尖端亚基, 而 FasF 则是连接分子。与大多数菌毛不同, 987P 不凝集哺乳动物的红细胞, 只与相关仔猪肠细胞上的受体结合 (Dean 1990)。Khan 等证实 FasG 是 987P 黏附素中负责参与蛋白受体识别的亚基, 负责 987P 的前结合 (Khan and Schifferli 1994), 而 FasA 作为现阶段研究着公认的黏附亚基, 主要介导 987P 与受体的后结合 (Khan et al 1996)。产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 的 987P 菌毛介导与新生仔猪肠道上皮细胞刷状缘 (BBV) 的黏附。通过黏附肠上皮细胞, 产生局部增殖, F6⁺ETEC 可以在黏膜表面定植并伴随肠毒素的分泌与递送。Zhu 等从仔猪肠上皮细胞和 BBV 中分离猪的组蛋白, 发现 H1 蛋白表现出与来自仔猪肠刷状缘的 987P 特异性蛋白受体相同的 SDS-PAGE 迁移模式和 987P 结合特性, 表明 987P 蛋白受体是仔猪 BBV 来源的组蛋白 H1 蛋白 (Zhu et al 2008)。近年来 F6 菌毛在猪群中的分离率也较低, Luppi 等检测了欧洲患有 PWD 的

农场中大肠杆菌菌毛流行情况，其中 F6 菌毛的检出率为 0.6%，远低于 F4 和 F18 菌毛（Luppi et al 2016）。De Lorenzo 等分析了 2006 年至 2014 年间临床和组织病理学诊断为大肠杆菌病的猪的样本，F6（987P）菌毛的分离率为 15.2%（De Lorenzo et al 2018）。Chen 等在中国东部八个省的断奶后腹泻猪中分离到 215 株 ETEC 菌株，并检测了其中各种菌毛的携带率，结果显示，F6 菌毛的检出率为 15.8%，甚至高于 F4 菌毛（9.8%）的检出率（Chen et al 2004）。

在所有的菌毛中，检测率差异最大的是 F41，它是主要是牛源 ETEC 的一种菌毛黏附素，也能够介导羔羊、山羊幼崽和仔猪的肠道定植（Dubreuil et al 2016, Luppi 2017）。Vidotto 等从巴西南部腹泻仔猪身上分离出 100 株大肠杆菌进行检测，结果显示，大肠杆菌中 F41 菌毛的流行率 32%（Vidotto et al 2009）。而 Luppi 等从欧洲 PWD 病例分离出的大肠杆菌中 F41 菌毛的流行率 0.3%（Luppi et al 2016）F41 菌毛的许多功能目前尚不清楚，可能是由于它能够结合不同的受体或结合不同宿主中的相同受体（Carroll et al 2021）。

1.4 肠毒素

在临床分离菌株的检测中，两种肠毒素的流行率均较高，类志贺毒素的检出率较低，但整体来看，在猪源 ETEC 中，ST 毒素的流行率要高于 LT 毒素，但其中不同的变异体流行率差异较大。如 Luppi 等从欧洲 PWD 病例分离出的大肠杆菌中毒素的流行率为：STb（59.1%）、STa（38.1%）、LT（31.9%）和 Stx2e（9.7%）（Luppi et al 2016），STb 的流行率最高。而 Toledo 对来自墨西哥 10 个农场的哺乳仔猪和断奶仔猪的粪便进行大肠杆菌的分离，共得到了 953 个大肠杆菌分离株，对其毒力基因进行检测发现，EAST1（38%）和 STa（30%）最常见，其次是 STb（17%）、Stx2e（6%）和 LT（5%）（Toledo et al 2012），这里流行率最高的为 EAST1，与 Luppi 等的研究存在一定差异。

1.4.1 不耐热肠毒素 LT

LT 是 ETEC 产生的主要肠毒素类型之一（Gupta et al 2008），完整的 LT 毒素由 1 个 A 亚基和五个 B 亚基组装而成，示意图如下图 1-7 所示，其中 A 亚基为蓝色，五聚体 B 亚基为绿色。A 亚基是主要的毒力中心，导致动物发生剧烈腹泻，而 B 亚基主要发挥黏附作用，几乎无毒性作用（Dubreuil et al 2016, Duan et al 2019, Sheikh

et al 2022)。此外, LT 还可进一步分为来源于人类的 LTh 和来源于仔猪的 LTp, LT 基因在人源和动物源分离的 ETEC 株中都高度流行。在美国仔猪断奶后腹泻(PWD) 相关的 ETEC 分离株中, 有 57.7%检出 LT 基因 (Zhang et al 2007)。在另一项研究中, 与人类腹泻相关的 ETEC 分离株, 表达单独 LT 的菌株占比 27%, LT 和 ST 同时存在的菌株占比 33%, 这一数据的总和达到了 60% (Isidean et al 2011)。

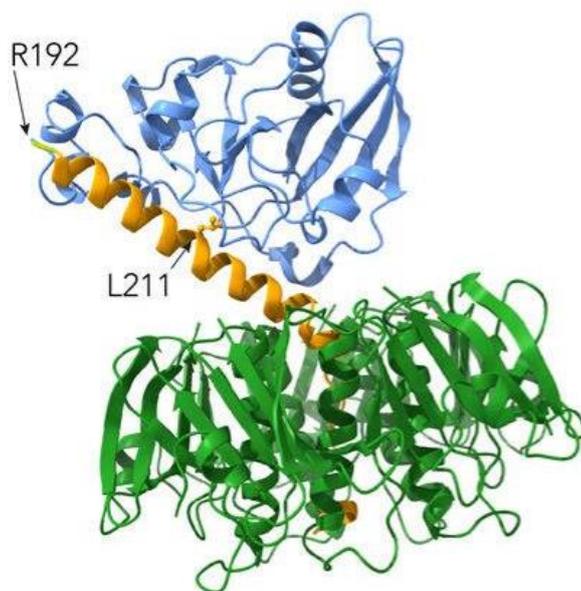


图 1-7 LT 毒素的结构示意图 (Fleckenstein 2021)

Fig. 1-7 Schematic representation of the structure of the LT toxin

有研究表明, LT 主要通过促进 ETEC 与动物肠道黏膜最初的黏附和肠道定植以及其本身产生的毒素效应, 导致动物发病 (Berberov et al 2004, Zhang et al 2006)。LT 介导的细菌黏附增强现象首次在 F4⁺ETEC 菌株感染的无菌化小猪模型中观察到 (Berberov et al 2004)。在这个模型中, 与野生型或互补型菌株相比, 无法产生 LT 的 F4⁺ETEC 突变株在空肠和回肠的定植显著减少。同样, 在另一项研究中, 当 LT 通过遗传学手段被引入非致病性大肠杆菌分离株时, 该菌株的 F4ac 菌毛表达显著增加, 进而促进了菌株在小肠上皮细胞上的黏附 (Zhang et al 2006)。与上述 LT 促进猪源 ETEC 在仔猪小肠上皮中的黏附结果相似, 有研究揭示了 LT 也可以促进人类 ETEC 在小鼠模型中的早期定植。随后, 有报道显示无论是内源性产生还是外源性添加 LT 都显著增强了 K88⁺ETEC 对培养的仔猪上皮细胞系 IPEC-J2 的黏附 (Zhang et al 2006)。迄今为止, 关于 LT 增强细菌黏附作用的研究主要集中在 ETEC 菌株, 然而目前尚不清楚 LT 是否也有助于其他菌株与宿主细胞的黏附。此外, 还有研究表明, 与携带其他菌毛的 ETEC 相比, LT 对 F4⁺ETEC 的黏附作用更强 (Duan et al

2019)。

LT 是 A_1B_5 毒素蛋白家族的成员，与霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 分泌的霍乱毒素 (CT) 在结构、功能和致病机制上均较为相似。LT 全毒素最初在胞质内组装，然后通过经典的 II 型分泌系统 (T2SS) 或 ETEC 释放的外膜囊泡 (OMVs) 两种途径之一分泌到细胞外膜 (吴梦阳 2024)。同时，也有研究认为，即使在 T2SS 存在的情况下，大多数分泌型 LT 仍与 OMVs 相关，因为其 B 亚基主要依赖 OMVs 上的脂多糖 (LPS) 进行运输 (Horstman and Kuehn 2000, 2002)。其促进 ETEC 黏附的机制如图 1-8 所示 (Harford et al 1989, Tsuji et al 1990)。简单来说，LTA 和 LTB 亚基都是 LT 介导的细菌黏附增强所必需的，LTA 亚基主要通过降低细胞膜表面电荷和抗菌肽的表达进而增加表面黏附素的表达，以及改变宿主细胞结构来提高细菌的黏附，而 LTB 亚基主要通过与 GM1 受体相互作用后形成“OMVs-LT-GM1”复合物改变宿主细胞结构和增加表面黏附素的表达促进细菌黏附。并且有研究表明，与单独的某一个亚基相比，LT 全毒素对菌株的黏附增强作用更明显 (Santiago-Mateo et al 2012, Fekete et al 2013)。

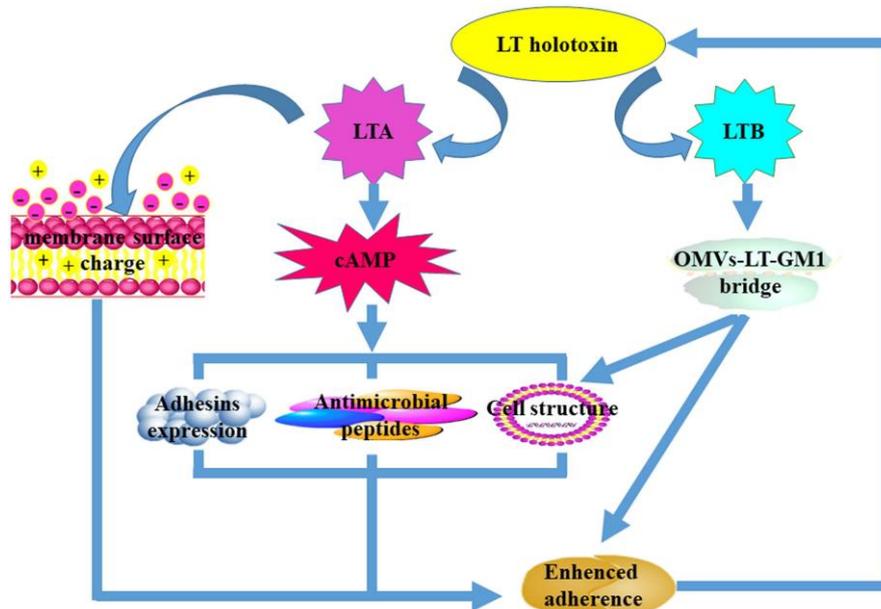


图 1-8 LT 介导的增强细菌黏附的机制 (Duan et al 2019)

Fig. 1-8 Mechanisms of LT-mediated enhancement of bacterial adhesion

近年来的研究表明，除可发挥增强肠道病原体的黏附和定植的作用外，LT 本身也可以作为一种强有效的免疫原防控 ETEC 感染的发生 (Huang et al 2018)。Norton 等评估了来自受到野生型 ETEC 菌株攻击的人血清以及来自生活在 ETEC 流行区的个体的血清中是否存在 LT、LTA 和 LTB 抗体。结果表明，在这两种情况下，大量被

感染的个体和 ETEC 流行区的个体均产生了针对两种 LT 亚基的抗体。此外，有研究专门评估了针对 LTA 亚基的免疫反应以及 LTA 亚基在单独给药或与 LTB 亚基联合给药时作为保护性抗原的潜力，结果显示，免疫重组蛋白的动物均产生了显著的抗体反应，两种 LT 亚基的抗体在与抗原结合时协同发挥中和全毒素的作用，这些数据表明，LT 毒素的 A 亚基和 B 亚基均能够刺激动物机体产生较强的免疫反应，可以作为 ETEC 疫苗开发的抗原靶标 (Norton et al 2015b)。

LT 还被证明是一种能够上调疫苗抗原性的强大佐剂，据报道，LT 可以增强细菌、病毒和真菌抗原的免疫原性，从而提高疫苗的效力 (Sun et al 2013, Thiam et al 2015)。虽然全毒素结构的 LT 分子是一种优秀的佐剂，但其具有的肠道毒性阻碍了天然 LT 的临床应用。为了制备出具有显著佐剂活性的无毒 LT 衍生物，通过取代 LTA 亚基的残基来降低或取消 LT 的 ADP-核糖基化活性一直是研究的重点。目前已产生的 LT 突变形式包括单体突变型 LT (mLT)、双突变型 LT (dmLT) 和三突变型 LT (tmLT)。LTS61K 突变体是第一个能够降低 LT 毒性同时保持毒素佐剂特性的突变体 (Harford et al 1989)。此外，还产生了若干 mLT 突变，这些突变体 (包括 R7K、E112K、V53E/D、S63K、A72R、V97K、Y104K/D、S114K/E、R192G 和 L211A) 主要都是降低 LT 的 ADP-核糖基化活性来降低其毒性 (Tsuji et al 1990, Pizza et al 1994, Pizza et al 2001, Norton et al 2011, Molina Estupiñan et al 2022)。在体外试验和动物研究中，mLT 显示出较低的毒性，并且具有与天然 LT 相似的佐剂活性。然而，有研究表明，当口服 100 μ g LTR192G 时，16.7% 的志愿者出现轻度至中度腹泻 (Clements and Norton 2018)，这表明 mLT 还是存在一定的毒性，在应用时存在一定的毒副作用。为了进一步降低 mLT 突变体的肠道毒性，有研究将 mLT(LTR192G) 的 211 位亮氨酸替换为丙氨酸(L211A)，从而获得了一个新的 dmLT(LTR192G/L211A) (Norton et al 2011) 并进行了小鼠实验，结果表明，与天然 LT 毒素相比，dmLT 突变体在培养的上皮细胞中减少了 1000 倍的 cAMP，并且没有检测到液体蓄积，这表明 dmLT 同时保持了免疫原性和佐剂性。目前为止进行的研究表明，dmLT 是一种强大的佐剂，可通过肠外或黏膜免疫增强抗原特异性的系统和黏膜免疫应答 (Lee et al 2014, Norton et al 2015a, Frederick et al 2018)。此外，有报道将一个三重突变的 LT 类毒素 [LT (S63K/R192G/L211A), tmLT] 与三个拷贝的 STa 类毒素 (STaA14Q) 融合，产生了一个 3 \times STa (A14Q) -tmLT 融合蛋白 (Zhang et al 2013)，结果表明，融合抗原消除了 T84 细胞诱导 cAMP 的能力，同时其在小鼠中进行免疫时无不良反应

发生。这些结果表明，dmLT 或 tmLT 有作为疫苗佐剂的潜力（Duan et al 2019）。

已有研究将无毒的 LT 或 LTB 亚单位用作佐剂与一些抗原共同给药（Nandre and Lee 2014, Qi et al 2015）。例如，dmLT 已被证明是幽门螺杆菌（*H. pylori*）、志贺菌和脊髓灰质炎病毒疫苗的有效黏膜佐剂（Sjökvist Ottsjö et al 2013, Lee et al 2014, Norton et al 2015a）。并且，虽然 dmLT 最初被用作黏膜佐剂，但研究也显示该减毒突变体是一种有效的肠外佐剂（Lalsiamthara et al 2016），以 dmLT 作为佐剂的肠炎沙门菌减毒活疫苗可诱导产生强大的免疫应答（Lalsiamthara et al 2016）。同时，LT 还可作为新型疫苗开发的蛋白质或抗原肽展示平台，并可作为天然衍生的细胞靶向和蛋白质递送工具（Duan et al 2019）。

1.4.2 耐热肠毒素 ST

除上述讲述的 LT 肠毒素外，EPEC 菌株还主要分泌另外一种肠毒素，即耐热肠毒素 ST，并且在从检出率上看，ST 毒素在 EPEC 菌株中的流行率甚至高于 LT 肠毒素。为了更好地了解导致 PWD 的大肠杆菌菌株的毒力因子，Zhang 等从美国患有 PWD 的仔猪中分离出的大肠杆菌菌株 304 株，并利用 PCR 进行了毒素基因的检测，其中各毒素基因的检测率结果为：STb（72.6%）、LT（57.7%）、EAST1（35%）、STa（27.4%）、STx2e（17.4%）（Zhang et al 2007），ST 毒素的流行率高于 LT。EPEC 产生的耐热肠毒素是一种分泌型肽，分为 STa 和 STb 两种类型。STb 肠毒素在动物中毒性更强，以断奶后仔猪最为敏感，但 STa 肠毒素在 EPEC 造成人类、新生仔猪和犊牛的腹泻中更为相关（Weiglmeier et al 2010）。ST 毒素由位于质粒上的两个基因 *estA* 和 *estB* 编码，可以利用在甲醇中的溶解度和蛋白酶的敏感性区分两种毒素。STa 是可溶于甲醇的，对蛋白酶有抗性，而 STb 不溶于甲醇，对蛋白酶敏感（苏雅婷 2020）。ST 毒素两个变体的三维结构图如下图 1-9 所示。

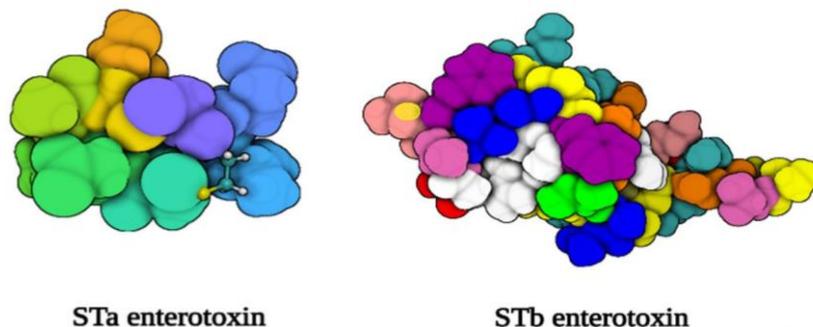


图 1-9 STa 和 STb 的三维结构（Zhang et al 2022）

Fig. 1-9 Three-dimensional structure of STa and STb

根据宿主物种的不同, STa 又可以进一步分为两种亚型, 分别为 STp 和 STh, 它们最初分别是从小猪和人类 ETEC 菌株中分离出来的 (Bölin et al 2006)。STh 仅由人源 ETEC 菌株产生, 而 STp 广泛存在于猪、牛甚至人源的 ETEC 菌株中 (Joffré et al 2016)。与 STa 相比, 编码 STb 肠毒素的基因在全球的 ETEC 分离株中高度保守, 到目前为止, 只报道了一种 STb 等位基因变异, 并且主要与 STa 和 Stx2 阳性 ETEC 菌株相关 (Fekete et al 2003, Taillon et al 2008)。与 STa 一样, STb 先被合成为含有 71 个氨基酸的前肽, 包括分泌信号肽和 48 个氨基酸 (约 5.2 kDa) 的 STb 肠毒素 (Turner et al 2006)。一旦该前肽在周质中释放, 信号肽就会被切割从而形成成熟的 STb 肽段。尽管在人源的 ETEC 菌株中偶有报道, 但 STb 肠毒素在人类腹泻病中的作用仍存在争议, 相比之下, STb 肠毒素与动物源 ETEC 菌株高度有关, 尤其是在断奶后仔猪腹泻的分离菌株中检出率较高 (Chapman et al 2006)。利用使用小肠段灌注技术检测肠毒素在腹泻进程中的作用, 结果显示, 与 STa 和 LT 的贡献相比, STb 主要在肠道早期分泌反应中起主导作用 (Loos et al 2012)。

1.5 产肠毒素大肠杆菌疫苗研究进展

虽然全细胞疫苗产品, 特别是减毒活疫苗产品, 通常可诱导持久的宿主免疫, 但它们需要严格的储存条件来维持效力, 并且由于接种后可能获得毒力基因, 因此存在潜在的安全风险。此外, 如果疫苗接种者预先暴露于表达与疫苗抗原同源毒力因子的菌株, 并且预先存在抗体, 这可能导致疫苗菌株从宿主迅速清除, 则减毒活疫苗产品的效力可能会降低。相比之下, 灭活全细胞制品通常更安全, 但需要多次注射才能诱导持久免疫。总体而言, 全细胞制品通常含有不必要、不需要甚至有害的抗原, 这些抗原可能会降低疗效并增加不良反应。与此同时, 亚单位疫苗已显示出作为预防 ETEC 腹泻有效替代方案的前景, 与全细胞产品不同, 亚单位疫苗含有明确定义和高度特征性的免疫原, 可诱导针对这些免疫原的特异性免疫应答。由于亚单位疫苗通常只含有一种或多种特征明确的蛋白质或多肽, 因此产品安全性比全细胞疫苗更容易管理和实现。由于 ETEC 黏附素和 LT 被认为是 ETEC 腹泻中最重要的毒力决定因子, 因此它们已成为 ETEC 亚单位疫苗研发的主要靶点。近年来, LT 与 STa 类毒素基因融合作为抗原, 以及双突变 LT(dmLT)作为佐剂的研究进展, 显现出了开发安全、广泛有效的 ETEC 腹泻亚单位疫苗的潜力 (Zhang and Sack 2015)。

由于肠毒素会破坏宿主小肠上皮细胞的液体和电解质稳态，导致 ETEC 腹泻，因此中和这些肠毒素的作用被认为是预防 ETEC 腹泻的高效方法。一项早期研究利用纯化的 LT 毒素开发了一种皮肤贴片疫苗，小鼠经皮接种含有纯化 LT 的贴片后，产生了对 LT 的抗体反应，并且在口服 LT 后，其肠道内的液体蓄积较少（Yu et al 2002）。当贴片应用于人体（置于上臂）时，使其对 LT 产生了很强的 IgG 和 IgA 抗体反应（Güereña-Burgueño et al 2002, Glenn et al 2007）。随后的一项安慰剂对照研究虽然证实了诱导产生抗 LT 抗体，但接种疫苗的受试者仅对 ETEC 攻击产生微弱保护（Glenn et al 2007）。令人惊讶的是，随后的一项小规模现场试验报告，在前往墨西哥或危地马拉的健康成人中，经皮免疫接种将 ETEC 和其他肠道病原体引起的中度至重度腹泻的发生率降低 75%（Frech et al 2008）。遗憾的是，第二项临床研究未能证实第一项小规模试验的结果，第二次临床研究的数据表明，LT 皮肤贴片疫苗对 LT⁺ETEC 腹泻提供了 60% 的保护，但对 STa⁺ETEC 或任何其他原因的腹泻无保护作用（Behrens et al 2014）。此外，最近一项临床研究的数据表明，单独使用 LT 皮肤贴片疫苗对 ETEC 腹泻没有保护作用（Steffen et al 2013）。因此，这些研究的总体结果显示，单独使用 LT 皮肤贴片接种预防 ETEC 引起的腹泻的方法仍存在一定的缺陷，不适应于临床上对本病的防控（Riddle and Savarino 2014）。

阻断细菌定植和中和 ETEC 毒素的肠毒性被认为是预防 ETEC 腹泻的有效方法。Rausch 等应用 MEFA（多表位融合抗原）策略创建了携带 ETEC 毒素抗原成分的一类毒素 MEFA，并在小鼠模型中测试了其免疫原性。通过将 STa 类毒素 STaP12F（NTFYCCELCCNFACAGCY）、STb 表位（KKDLCEHY）和 Stx2eA 亚基（QSYVSSLN）的表位嵌入到单体 LT 类毒素（LTR192G）的 A1 肽中，构建了一种类毒素 MEFA，利用其对小鼠进行腹膜内免疫，检测结果表明小鼠产生了针对所有四种毒素的 IgG 抗体。并且诱导产生的抗体显示出对 LT、STa、STb 和 Stx2e 毒素的体外中和活性。此外，用 MEFA 免疫的后备母猪所生的哺乳仔猪在受到 ETEC 菌株的攻击时受到保护，而对照后备母猪所生的仔猪则出现腹泻。该研究的结果表明，类毒素 MEFA 可诱导广泛的抗毒素抗体，并表明类毒素 MEFA 可用于开发针对猪 ETEC 腹泻的广谱疫苗（Rausch et al 2017）。

表达 K88（F4）或 F18 菌毛和热不稳定（LT）和/或热稳定（ST）毒素的产肠毒素大肠杆菌（ETEC）菌株是仔猪腹泻的主要原因。诱导抗黏附素（抗 K88 和抗 F18）和抗毒素（抗 LT 和抗 ST）免疫的有效疫苗能够为仔猪提供广泛的抗 ETEC 保护。

Ruan 等对来自 K88ac 的主要亚基 FaeG、F18 次要亚基 FedF 和 LT 类毒素(LT(192)) 的 A2 和 B 亚基进行遗传融合编码, 构建了黏附素-黏附素-类毒素的融合蛋白(FaeG-FedF-LT (192) A2:B)。这种融合蛋白在小鼠和猪身上进行了免疫接种, 评估了其诱导抗黏附素和抗毒素抗体的性能, 并且还在无菌仔猪攻毒模型中评估了产生的抗黏附素和抗毒素抗体抵抗 ETEC 菌株感染的能力。结果表明, 这种 FaeG-FedF-LT(192) A2:B 融合蛋白在免疫小鼠和猪中引发了 K88、F18 和 LT 的抗体, 抗体抑制了 K88 和 F18 菌毛的黏附作用; 此外, 免疫后的仔猪在受到 ETEC 菌株 30302(K88ac/LT/STb) 攻击时受到保护, 相比之下, 所有对照组中未接种疫苗的仔猪在受到相同 ETEC 菌株的攻击后都出现了严重的腹泻和脱水。这项研究清楚地表明, 由这种 FaeG-FedF-LT (192) A2:B 融合抗原引发的抗体可中和 LT 毒素并抑制 K88 和 F18 菌毛型大肠杆菌菌株的黏附, 可以用作开发疫苗的候选抗原防控 ETEC 引起的猪群腹泻 (Ruan et al 2011)。

Xu 等开发了一种专门针对 ETEC 的新型四价基因工程疫苗, 为了消除 ST₁ 肠毒素的天然毒素活性、增强疫苗的预防效果, 其通过定点突变技术扩增了突变的 ST₁ 和 K88ac、K99、LTB 基因, 构建了 K88ac-K99-3ST₁-LTB 融合蛋白的重组大肠杆菌表达菌并实现高表达, 提取融合抗原的包涵体以及将含有融合抗原的重组菌灭活制成灭活疫苗进行动物实验验证免疫效果。ELISA 检测表明该融合蛋白能与 ST₁ 单克隆抗体、K88ac、K99 和 LTB 抗体结合; 利用 K88 和 K99 菌株进行两轮最小致死剂量攻毒, 包涵体组和灭活疫苗组的保护率分别为 96%和 98%, 表明构建的 K88ac-K99-3ST₁-LTB 疫苗能够促使动物产生较强的免疫力。这项研究表明, 该融合蛋白 K88ac-K99-3ST₁-LTB 疫苗具有较为广泛的免疫谱, 可以通过针对肠毒素和菌毛两种途径预防 ETEC 引起的腹泻 (Xu et al 2023a)。

然而, 由于抗 LT 抗体未显示出预防 ETEC 腹泻的广泛效力, dmLT 被认为单独使用不是开发 ETEC 亚单位疫苗的有效免疫原, 因此在现有研究中, dmLT 主要被用作疫苗佐剂。Lundgren 等在疫苗中加入重组 dmLT, 结果显示提高了产品安全性 (与 mLT 相比), 并增强了灭活或减毒全细胞 ETEC 候选疫苗 (Lundgren et al 2014) 的保护效力。这表明, dmLT 佐剂也可作为一种免疫原, 诱导产生抗 LT 抗体, 从而增强含有该佐剂的 ETEC 候选疫苗的整体效力。Zhang 等证明了当 STa 类毒素突变体的 3 个拷贝与 LTR192G 融合时, 在用该融合蛋白免疫的小鼠中诱导产生了中和的抗 STa 和抗 LT 抗体 (Zhang and Zhang 2010)。

1.6 乳酸乳球菌载体疫苗

活载体疫苗是采用分子生物学技术，将编码目标抗原的基因导入无毒的细菌或病毒载体。这一过程产生了能够在宿主体内传播和复制目的基因的重组菌株，从而导致所需基因的显著表达，并随后诱导免疫保护性应答。乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 是乳酸菌的典型菌种之一，具有生长速度快、操作简单和安全无毒等优点 (马俊飞 et al 2018)，并且因其突出的发酵能力被广泛应用于乳制品和奶酪行业，近年来其表达外源蛋白的能力 (Morello et al 2008) 受到了广泛关注和研究。此外，*L.Lactis* 的全部基因组已完成测序，细菌培养的简单性和低成本，再加上有用于重组构建的大量遗传工具和载体，逐渐使其成为表达外源蛋白和作为活载体疫苗载体的理想选择 (Wyszyńska et al 2015, Szatraj et al 2017, Qiao et al 2021)。具体来讲，乳酸乳球菌在 30°C 条件下即可繁殖，倍增时间为 35~60 min，具有发酵和呼吸代谢两种途径，易于培养和大规模生产 (Frelet-Barrand 2022)。并且，*L.Lactis* 具有不形成包涵体和无内毒素污染的优点 (Morello et al 2008, Frelet-Barrand 2022)；*L.Lactis* 还可以直接将蛋白分泌到培养基中，简化了纯化过程；最后，乳酸乳球菌本身具有适度的蛋白水解活性保证了重组蛋白的完整性和正确折叠，总的来说，这些优点都表明乳酸乳球菌有作为活载体开发疫苗的潜力。

NICE 表达系统 (raisin-controlled gene expression system, NICE) 是目前乳酸乳球菌表达外源蛋白使用最多的一种表达系统，如图 1-10 所示，该系统主要包括以下 3 个部分：携带组氨酸激酶 (*nisR*) 和膜结合感应蛋白 (*nisK*) 基因的宿主菌、诱导分子 *nisin* 和包含启动子 *nisA/nisF* 片段 (李路路 2021) 且具有可插入外源基因的克隆位点的质粒 (Kuipers et al 1993, Mierau and Kleerebezem 2005)。*NisK* 接受乳链菌肽 (*nisin*) 信号，完成自身磷酸化并将磷酸基团传递给 *nisR*，磷酸化的 *nisR* 结合到启动子 *nisA/nisF* 上，启动下游基因的转录表达，从而完成目的基因在乳酸乳球菌中的高效表达 (李路路 2021)。此外，乳酸乳球菌表达的外源蛋白还能够可溶性表达在细胞内、锚定在细胞膜表面或者分泌到细胞外的培养基中 (Yurina et al 2023, Zhang et al 2023)。

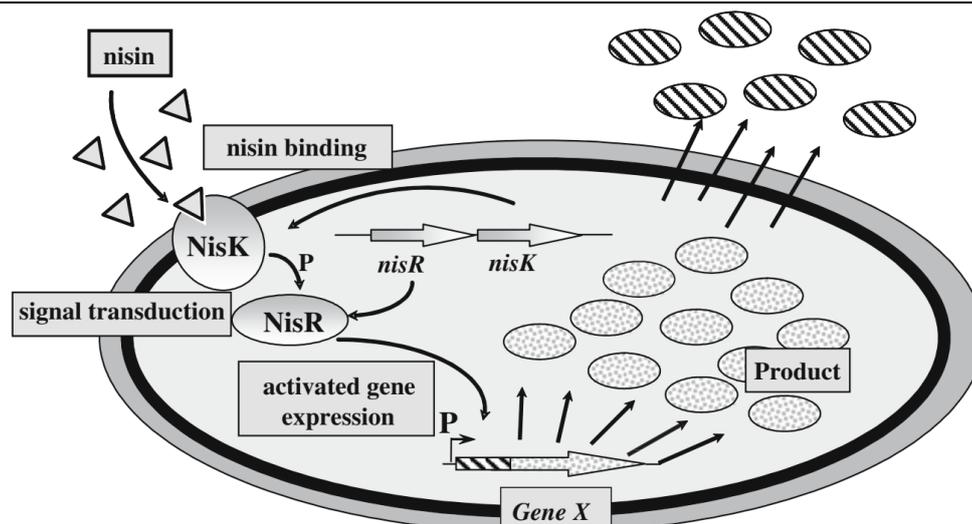


图 1-10 NICE 表达系统示意图 (Mierau and Kleerebezem 2005)

Fig. 1-10 Schematic diagram of the NICE expression system

作为乳酸乳球菌中应用十分广泛的系统，NICE 表达系统具有以下优势：首先，本系统使用的诱导剂 nisin 本身就来源于乳酸乳球菌，因其抗菌特性被作为一种防腐剂广泛应用于食品行业，安全性较高；其次，作为一种诱导表达系统，重组菌株未诱导时几乎不表达，而在加入诱导剂后，一定范围内外源蛋白的表达量呈线性增长，并且表达量高于组成型表达系统；同时，该系统利用乳糖作为筛选标记，不含抗性基因，构建的重组菌株达到食品级，可直接用于生产；最后，乳酸乳球菌几乎不在动物的胃肠道内定殖，避免了因重组菌在体内定殖持续刺激机体产生免疫耐受。因此，乳酸乳球菌有良好的开发新型安全黏膜疫苗的前景 (Naderi-Samani et al 2020, 李路路 2021)。

Douillard 等利用 pTX8048 载体成功表达了浓度为 1.2 mg/L 的硫氧还蛋白融合蛋白 (Douillard et al 2011)。Bera 等使用 pMJ399 载表达了在 p170 启动子控制下的过敏原蛋白 (Bera et al 2015)。Martinez-Jaramillo 等报道了使用 pNZ8048 载体在乳酸乳球菌中表达 mCherry、GFP 和 iRFP 蛋白，为此，他们同时使用 PnisA 和 P53 启动子 (Martinez-Jaramillo et al 2017)。Martinez 报告了利用乳酸乳球菌表达系统对 HIV-1 Tat 蛋白表达的优化，作者评估了两种不同乳酸乳球菌菌株中的五种不同启动子，并检查了 pH、葡萄糖和诱导时间对 Tat 产量和纯度的影响。最后，重组 Tat 在 HLM-1 报告细胞中具有反式激活 HIV-1 启动子的功能 (Martinez-Jaramillo et al 2017)，表明本蛋白被成功的表达并且具有天然蛋白的活性。

然而，乳酸菌具有较高的生物学与遗传基因型多样性，不同外源基因的表达量

差异较大甚至不表达，相同基因在不同宿主菌中表达水平也有所差异，刺激机体产生的细胞免疫和体液免疫水平也不同（刘琼 et al 2019），抗原在重组菌株表面展示的量同样存在较大的差异，而蛋白表达量是载体疫苗发挥效果的关键因素，因而在实际使用过程中，免疫动物收获的效果也参差不齐，这也是乳酸菌载体疫苗发展的难点之一（García-Fruitós 2012, Lu et al 2016）。

1.7 研究的目的是与意义

产肠毒素大肠杆菌引起的仔猪腹泻病在全世界均有流行，对养猪业造成了巨大的经济损失，但目前临床上可供选择的疫苗产品较少，且集中于灭活疫苗，使用效果受地域较大，无法满足本病的防控要求。因此，养殖行业急需一种高效的疫苗产品用于 ETEC 的防控。本研究拟通过分离临床样品中的产肠毒素大肠杆菌（ETEC）并检测毒力因子的分布情况，从而得到当前 ETEC 菌株流行的菌毛及毒素情况，筛选出符合当前流行情况的抗原靶标；并利用食品级乳酸乳球菌 Nisin 控制基因表达（NICE）系统，将筛选得到的抗原蛋白展示在乳酸乳球菌表面，最终得到一种具有安全、高效、广谱且便于使用等优势的重组乳酸菌活载体口服疫苗。进而为临床上由 ETEC 引起的仔猪腹泻病提供一种疫苗方案，补充临床上疫苗缺乏的现状，帮助养殖一线减少产肠毒素大肠杆菌性腹泻导致的损失。

第二章 ETEC 的分离鉴定及毒力基因分析

2.1 前言

产肠毒素大肠杆菌是一种临床上能够引起人和多种动物腹泻的致病性大肠杆菌，尤其以哺乳仔猪阶段的黄白痢比较常见，还能够导致断奶阶段的仔猪腹泻（PWD），甚至在生猪养殖的其他环节也偶有发生，是猪群细菌性腹泻的主要病原之一。ETEC 存在多种毒素，其中主要的毒素类型为两种肠毒素，分别为不耐热肠毒素（LT）和耐热肠毒素（ST），LT 含有 A、B 两个亚基，而耐热肠毒素又可分为 STa、STb 及 EAST1 三种变异体（Fleckenstein et al 2010）；此外，还有志贺毒素 Stx2e 和其他不常见的毒素类型（Melton-Celsa 2014）。常见的菌毛类型包括 F4（K88）、F5（K99）、F6（987P）、F18 和 F41 五种（Martins et al 2000）。在 ETEC 菌株中，至少含有两种肠毒素的一种，而菌毛基因却有可能存在，也可能不存在，同时，这些毒素及菌毛基因的分布在不同地区的临床分离菌株中存在较大的差异，甚至在同一地区的不同时间段都存在差异（Shin et al 1994, Zhang et al 2007, Liu et al 2014, Vidal et al 2020）。因此，在进行疫苗的开发前，对目标地区流行菌株的毒素基因和菌毛黏附素基因分布情况需要尽可能详细的排查，以期得到最真实的临床数据指导疫苗开发。

2.2 材料方法

2.2.1 材料

2.2.1.1 主要试剂及培养基

试剂	生产厂家
胰蛋白胨	英国 Oxoid 公司
酵母浸粉	英国 Oxoid 公司
琼脂粉	安徽 biosharp 生物科技公司
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司
丙三醇（甘油）	丙三醇（甘油）
麦康凯琼脂培养基	青岛海博生物技术有限公司
琼脂糖	英国 Oxoid 公司

核酸染料绿如蓝	上海信裕生物科技有限公司
2×Taq Master Mix (P112)	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
DL2000 Maker	擎科生物技术有限公司
脱脂奶粉	美国 BD 公司

2.2.1.2 主要仪器设备

仪器	生产厂家
超净工作台	北京东联哈尔仪器制造公司
分析天平	德国埃德姆公司
恒温培养振荡器	上海知楚仪器有限公司
细菌培养箱	上海知楚仪器有限公司
高压蒸汽灭菌锅	日本三洋公司
梯度冷冻干燥机	德国 Christ 公司
-20℃、-80℃冰箱	海尔公司
基因扩增仪 (PCR)	北京东胜创新生物科技有限公司
电泳仪	北京六一仪器厂制造
凝胶成像系统	美国伯乐公司
台式冷冻离心机 Centrifuge 5810R	德国 eppendorf 公司

2.2.1.3 主要溶液的配制

LB 液体培养基：胰蛋白胨 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，NaCl 5.0 g，加入 900mL ddH₂O，搅拌均匀，然后加 ddH₂O 定容至 1 L，121℃高压蒸汽灭菌 15 min 后常温保存备用。

LB 固体培养基：在上述 LB 液体培养基的基础上加入 15 g 琼脂，121℃高压蒸汽灭菌 15 min，冷却至 45℃左右，倒入无菌平皿，4℃保存备用。

麦康凯琼脂：使用电子天平称取 52 g 麦康凯琼脂粉末，溶解于 1000 mL 单蒸水中，121℃高压灭菌 15 min，等待温度降至可触摸时倒入无菌平皿，4℃保存备用。

50%甘油：取 200 mL 丙三醇（甘油），加入 200 mL ddH₂O 充分混合均匀，121℃高压灭菌 15 min 备用，常温保存备用。

15%脱脂奶：使用电子天平称取 60 g 脱脂奶粉，加水至 400 mL 充分搅拌均匀，

倒入 500 mL 蓝口瓶中，115°C 高压灭菌 15 min，常温保存备用。

50×TAE 电泳缓冲液：称取 Tris-Base 粉末 242.0 g，乙二胺四乙酸二钠盐二水（EDTA）37.2 g，充分溶解于 800 mL 单蒸水中，加入 57.1 mL 醋酸充分搅拌，补加单蒸水至 1000 mL，室温避光密封保存。

1%琼脂糖凝胶：使用电子天平称取琼脂糖粉末 1 g 放入锥形瓶中，加入 2 mL 50×TAE，再加入 98 mL 单蒸水，放入微波炉加热溶解，待琼脂糖全部溶解后，室温稍冷却后加入 1 μL 绿如蓝核酸染料混匀，倒入插好梳子的胶槽中，冷却凝固后使用。

2.2.1.4 大肠杆菌鉴定引物

表 2-1 大肠杆菌 16S rDNA 引物序列

Table 2-1 Primer sequences of *Escherichia coli* 16S rDNA

引物名称	引物序列 5'-3'	片段大小
16S rDNA-F	GAAGCTTGCTTCTTTGCT	521 bp
16S rDNA-R	GAGCCCGGGGATTCACAT	

表 2-2 产肠毒素大肠杆菌毒素及菌毛黏附素基因引物序列

Table 2-2 Primer sequences of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxin and pilus adhesin genes

名称	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp	参考文献
<i>lt</i>	CCGTGCTGACTCTAGACCCCA	480	(Yang et al 2015)
	CCTGCTAATCTGTAACCATCCTCTGC		
<i>sta</i>	ATGAAAAAGCTAATGTTGGC	193	
	TACAACAAAGTTCACAGCAG		
<i>stb</i>	TGCCTATGCATCTACACAAT	113	
	CTCCAGCAGTACCATCTCTA		
<i>stx2e</i>	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	733	
K88	GTTGGTACAGGTCTTAATGG GAATCTGTCCGAGAATATCA	499	
K99	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	230	
	AACTTTGTGGTAACTTCCT		
987P	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	409	(Baldo et al 2020)
	GTA ACTCCACCGTTTGTATC		
F18	TGGTAACGTATCAGCAACTA	313	
	ACTTACAGTGCTATTCGACG		
F41	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	612	
	CCACTATAAGAGGTTGAAGC		

2.2.2 方法

2.2.2.1 样品采集方法

(1) P1 批次腹泻送检样品

从湖北及江苏两省内共六个发生仔猪腹泻的养殖场进行采样送实验室检测，采样日龄包含哺乳阶段至保育阶段，采样标准为已发生腹泻且疑似黄白痢的猪只肛拭子样品。采样方式为直肠肛拭子：使用医用无菌棉签伸入发生腹泻仔猪的肛门内 3-5 cm 蘸取直肠内粪便，然后将棉签头放入 5 mL 无菌 EP 管内折断、密封放入自封袋内并做好标记。所有样品全程冷链保存送至实验室进行大肠杆菌分离。

(2) P2 批次一般送检样品

本实验室从全国各省份的送检样品中，采取组织样品，肠道样品、粪便样品等进行 ETEC 的分离鉴定，具体的取样标准如下：

组织样品：对送检的死亡猪只样品进行解剖，分离心、肝、脾、肺、肾等实质性器官，使用无菌手术剪从组织中央部位采集 1 cm³ 的大小，立即放入无菌离心管内，做好标记后置于冰上暂存。

肠道样品：对送检的死亡猪只样品进行解剖，使用无菌手术剪从小肠部位采集 1 cm 的肠道样品，立即放入无菌离心管内，做好标记后置于冰上暂存。

粪便样品：对送检的粪便样品，使用医用无菌棉签伸入粪便样品中央位置蘸取粪便，然后将棉签头放入 5 mL 无菌 EP 管内折断，做好标记后置于冰上暂存。

(3) P3 批次全国健康猪群及养殖场环境样品

本实验室胡子喆博士（胡子喆 2023）在全国 31 个省市选择部分养殖场收集健康猪的新鲜腹泻粪便、健康猪直肠拭子、猪圈地板围栏拭子、料槽拭子、饮水器拭子、生猪饮用水、料槽饲料、粪水和运输车表面拭子。所有样品都立即与干冰一起通过顺丰快递运送至实验室，样品到达后立即处理分离大肠杆菌。

2.2.2.2 样品处理方法

根据样品来源进行分批处理，每个装有棉签头的 EP 管中加入 LB 肉汤 2-3 mL，注意避免交叉污染，棉签头要完全浸在培养基中；采集的腹泻粪便使用无菌棉签蘸取适量放入 5 mL 灭菌 EP 管中，加入适量 LB 肉汤培养基，做好标记。使用灭菌手术剪将采集的新鲜肉块剪碎，并将肉块放入无菌 EP 管，加无菌钢珠放入组织匀浆机

中打碎，然后加入 LB 肉汤 2-3 mL，注意避免交叉污染。采集的液体样品则直接加入适量 LB 肉汤培养基，并做好标记。将加入培养基的 EP 管放入 81 孔盒，然后放入摇床 37°C、180 r/min 增菌培养 14-16 h。

2.2.2.3 大肠杆菌的分离鉴定

使用一次性接种环从每份处理后的样品中蘸取一环增菌液，在麦康凯琼脂板上四区划线，然后放入 37°C 温箱过夜培养。第二天根据细菌生长情况、菌落形态，每个平板使用灭菌白枪头挑取单一红色菌落 2-3 个，接种到伊红美蓝琼脂平板，37°C 温箱培养过夜，挑选具有金属光泽的单一菌落再接种于提前分装好的 LB 肉汤中（使用灭菌 1.5 mL EP 管，每管分装 1 mL LB 肉汤），留一个未接种的 LB 肉汤做阴性对照。接种后按顺序放入 81 孔盒，8 个一行（与 96 孔 PCR 板样品对应，以便 PCR 检测后挑选），然后将 81 孔盒放入摇床，37°C、180 r/min 培养过夜。使用大肠杆菌 16S rDNA 引物（表 2-1），以单菌落增菌液为模板扩增大肠杆菌的 16S rDNA 进行初步鉴定和筛选。反应体系总体积为 20 μ L：模板 2 μ L，引物 16S rDNA-F 1 μ L，引物 16S rDNA-R 1 μ L，PCR Mix 10 μ L，ddH₂O 6 μ L；反应条件：预变性 94°C 5 min，变性 94°C 30 s，退火 55°C 30 s，延伸 72°C 30 s，循环数 35 cycles，终末延伸 72°C，5 min。

所有操作均在超净工作台中进行，包括 PCR 扩增体系的配置，以实验室现有的 *E. coli* 作为阳性对照，LB 肉汤作为阴性对照，扩增完成后取 8 μ L PCR 产物，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，然后在凝胶成像系统下观察结果并保存图像。为避免菌株重复，来自同一样品的菌液 PCR 检测大肠杆菌 16S rDNA 都为阳性，则认为是同一株菌，即每份样品只保留一株。

2.2.2.4 产肠毒素大肠杆菌的分离鉴定

以鉴定为大肠杆菌的菌液为模板，继续进行 PCR 鉴定，按照表 2-2 中的引物先扩增 *lt*、*sta*、*stb*、*stx2e* 四种毒素基因，反应体系及扩增程序同 2.2.4 所示。只要有 *lt*、*sta*、*stb* 三种毒素中的一种显示出阳性条带即可判定为产肠毒素大肠杆菌 (ETEC)。

将确定为 ETEC 的菌株全部进行菌毛黏附素基因的检测，按照表 2-2 中的引物分别扩增 K88、K99、987P、F18、F41 五种菌毛基因，反应体系及扩增程序同 2.2.4 所示，扩增完成后记录每一株 ETEC 的毒素及菌毛黏附素基因情况。

2.2.2.5 大肠杆菌的保存

甘油保存：根据 PCR 鉴定结果把所有 16S 阳性菌液保存，每份阳性样品只保留一株菌。取菌液 500 μL 加入 50% 无菌甘油水 500 μL ，充分混匀后做好标记按顺序放入 81 孔冻存盒，然后放入 -80°C 冰箱保存。冻干保存步骤如下所示：

(1) 将菌液在普通 LB 琼脂板上均匀涂布，然后放入 37°C 温箱培养过夜。

(2) 第二天使用 5 mL 移液器向每个琼脂板内加入 5 mL 灭菌 15% 脱脂牛奶，然后使用医用无菌棉签将平板上的菌苔刮下。

(3) 使用 1 mL 移液器将含有菌苔的脱脂奶吹打均匀，每株菌分装至 2 个 7 mL 灭菌青霉素瓶中，2 mL/瓶，盖上已灭菌的瓶塞（半加塞），注意留出缝隙便于冻干机抽真空。

(4) 青霉素瓶上贴上打印标签并使用透明胶带再次固定防止脱落，之后放入 36 孔冻存盒，以上所有操作都必须在超净工作内进行，并注意无菌操作。

(5) 将分装有菌液的青霉素瓶按顺序摆放到冻干机的托盘上，然后将托盘放入梯度冷冻干燥机，冻干程序如下：

预冻（ -42°C 2 h \rightarrow -42°C 2 h \rightarrow -42°C 1 h） \rightarrow 主干燥[（ -30°C 2 h \rightarrow -30°C 3 h \rightarrow -23°C 5 h \rightarrow -15°C 1.5 h \rightarrow -8°C 1.5 h \rightarrow -3°C 2 h \rightarrow 5°C 1 h）0.350 mbar] \rightarrow 终末干燥[（ 5°C 1.5 h \rightarrow 10°C 1.5 h）0.350 mbar]。

(6) 冻干后压上铝盖，按顺序摆放到 36 孔盒，放入 -80°C 冰箱保存。

2.3 试验结果

2.3.1 三批次样品的 ETEC 分离情况

分别从 P1、P2、P3 三批次样品中分离产肠毒素大肠杆菌，分离鉴定示意图如图 2-1 所示：通过麦康凯琼脂选择培养基进行大肠杆菌的分离培养，在麦康凯培养基上生长为桃红色不透明的圆形菌落，菌落中央颜色比外部深，表明光滑，边缘整齐的菌落为疑似大肠杆菌菌落。先通过 PCR 扩增 16S rDNA 基因确定为大肠杆菌后，继续通过 PCR 的方法扩增毒素基因及菌毛黏附素基因，各基因的扩增示意图如图 2-1 所示。记录每一株 ETEC 的毒素及菌毛黏附素基因情况，如附表 1，2，3 所示。本实验室前期工作一共分离得到 ETEC 菌株 73 株，其中 P1 批次分离得到 27 株，P2 批次分离得到 29 株，P3 批次分离得到 17 株。

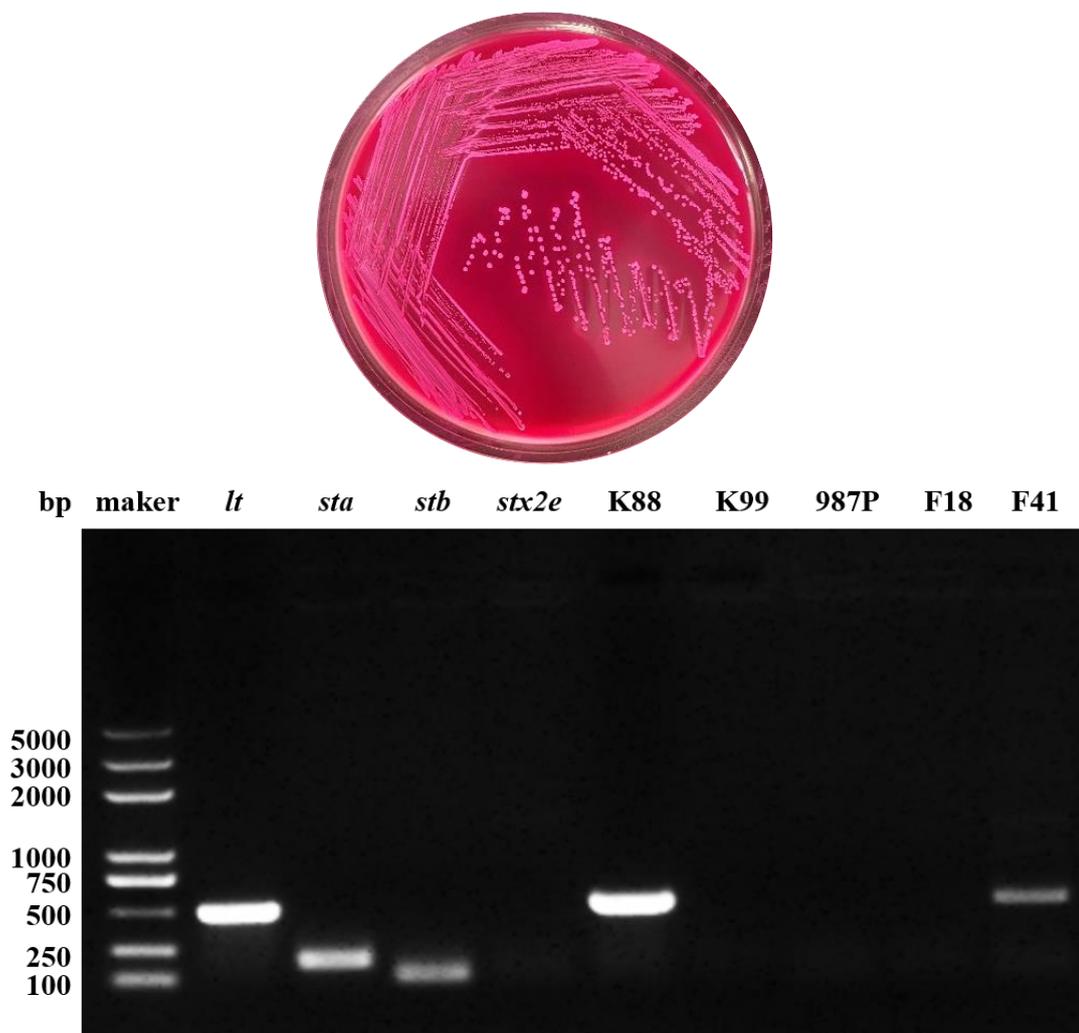


图 2-1 产肠毒素大肠杆菌分离鉴定

Fig. 2-1 The isolation and identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*

2.3.1.1 P1 批次样品毒素及菌毛基因检测情况

从湖北及江苏两省内共六个养殖场采集到疑似黄白痢发病仔猪肛拭子样品 52 份。其中共有 21 份样品检测到 ETEC 阳性，阳性率为 40.38%，分离得到 ETEC 菌株 27 株，分离率 51.92%。其中毒素基因检测情况如下图 2-2 所示：11 株含有 LT 毒素，占比 40.74%，13 株含有 STa 毒素，占比 48.15%，26 株含有 STb 毒素，占比 96.30%，7 株含有 Stx2e 毒素，占比 25.93%。菌毛黏附素基因检测情况如下：18 株含有 F4 (K88ac) 基因，占比 66.67%，9 株含有 F18ab 基因，占比 33.33%，27 株菌株中未检测到 F5 (K99)、F6 (987P)、F41 菌毛基因存在。

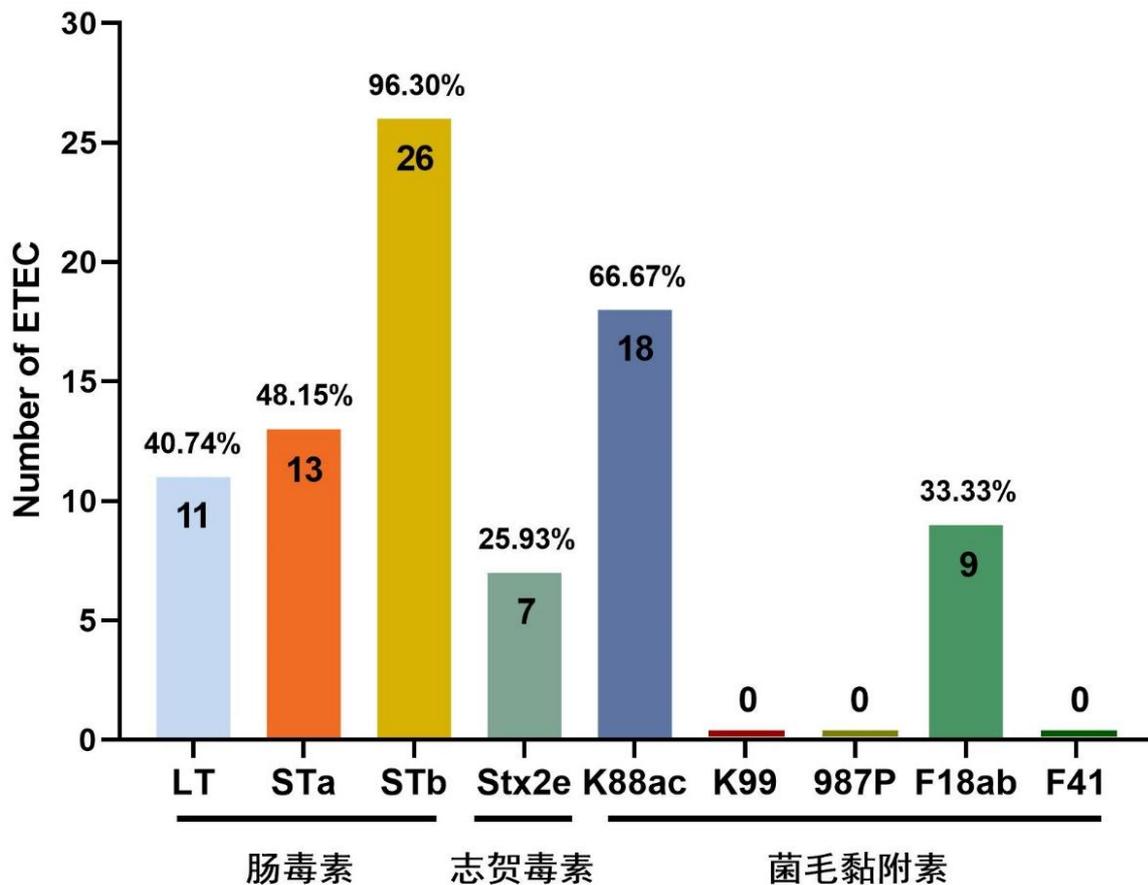


图 2-2 P1 批次 ETEC 菌株毒素基因检测结果

Fig. 2-2 Toxin gene detection results of P1 batch ETEC strains

2.3.1.2 P2 批次样品毒素及菌毛基因检测情况

本实验室从全国各省份一般送检样品中分离 ETEC 菌株，包含组织样品，肠道样品、粪便样品等，共计 360 份，分离得到 ETEC 29 株，分离率为 8.1%。其中毒素基因检测情况如下图 2-3 所示：16 株含有 LT 毒素，占比 55.17%，17 株含有 STa 毒素，占比 58.62%，27 株含有 STb 毒素，占比 93.10%，未检测到 Stx2e 毒素。菌毛黏附素基因检测情况如下：19 株含有 F4(K88ac)基因，占比 65.52%，1 株含有 F18ab 基因，占比 3.45%，1 株含有 F41 基因，占比 3.45%，29 株菌株中未检测到 F5(K99)、F6(987P) 菌毛基因存在。

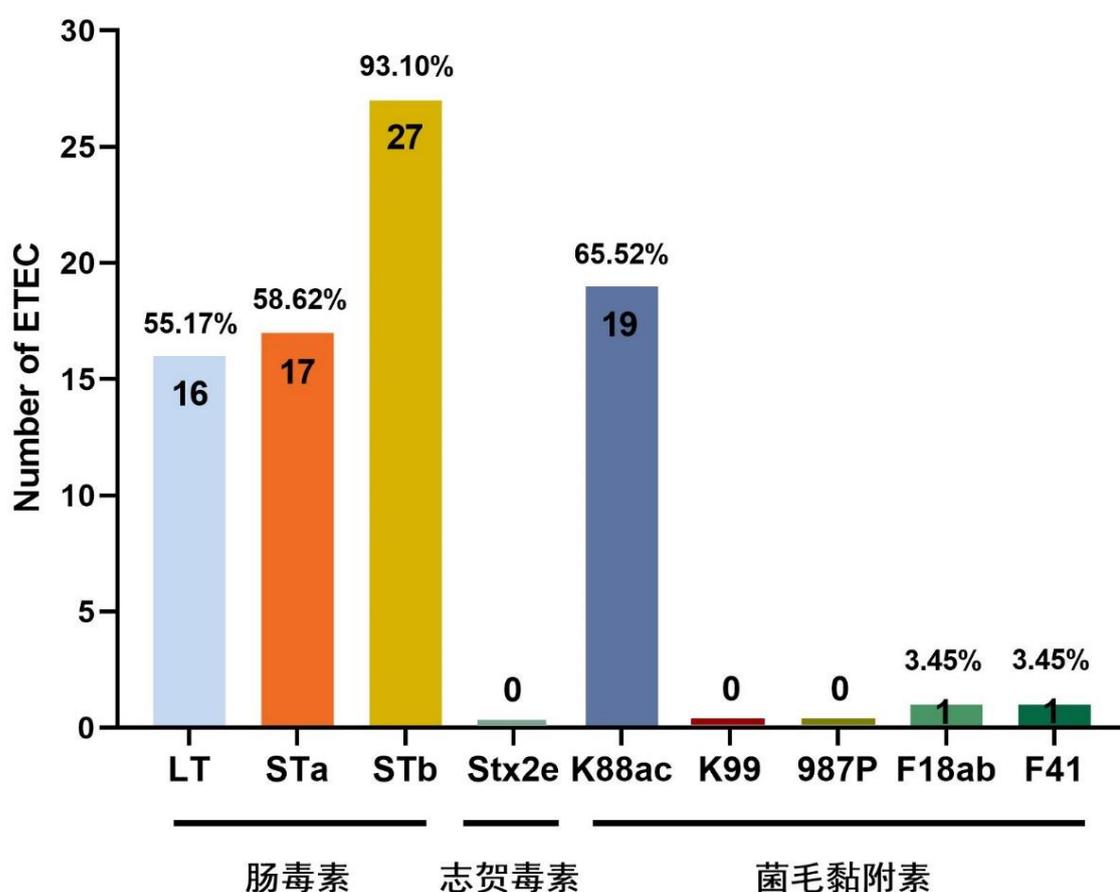


图 2-3 P2 批次 ETEC 菌株毒素基因检测结果

Fig. 2-3 Toxin gene detection results of P2 batch ETEC strains

2.3.1.3 P3 批次样品毒素及菌毛基因检测情况

本实验室前期从全国 31 个省市随机挑选猪场，采集健康猪肛拭子、粪便、地板拭子、料槽拭子、粪水等样品共计 746 份，总计分离大肠杆菌 515 株，其中分离到 ETEC 菌株 17 株，分离率为 2.28%，占大肠杆菌比例为 3.30%。其中毒素基因检测情况如下图 2-4 所示：6 株含有 LT 毒素，占比 35.29%，6 株含有 STa 毒素，占比 35.29%，16 株含有 STb 毒素，占比 94.12%，1 株含有 Stx2e 毒素，占比 5.88%。菌毛黏附素基因检测情况如下：1 株含有 F18ab 基因，占比 5.88%，未检测到 F4(K88ac)、F5(K99)、F6(987P)、F41 菌毛基因存在。

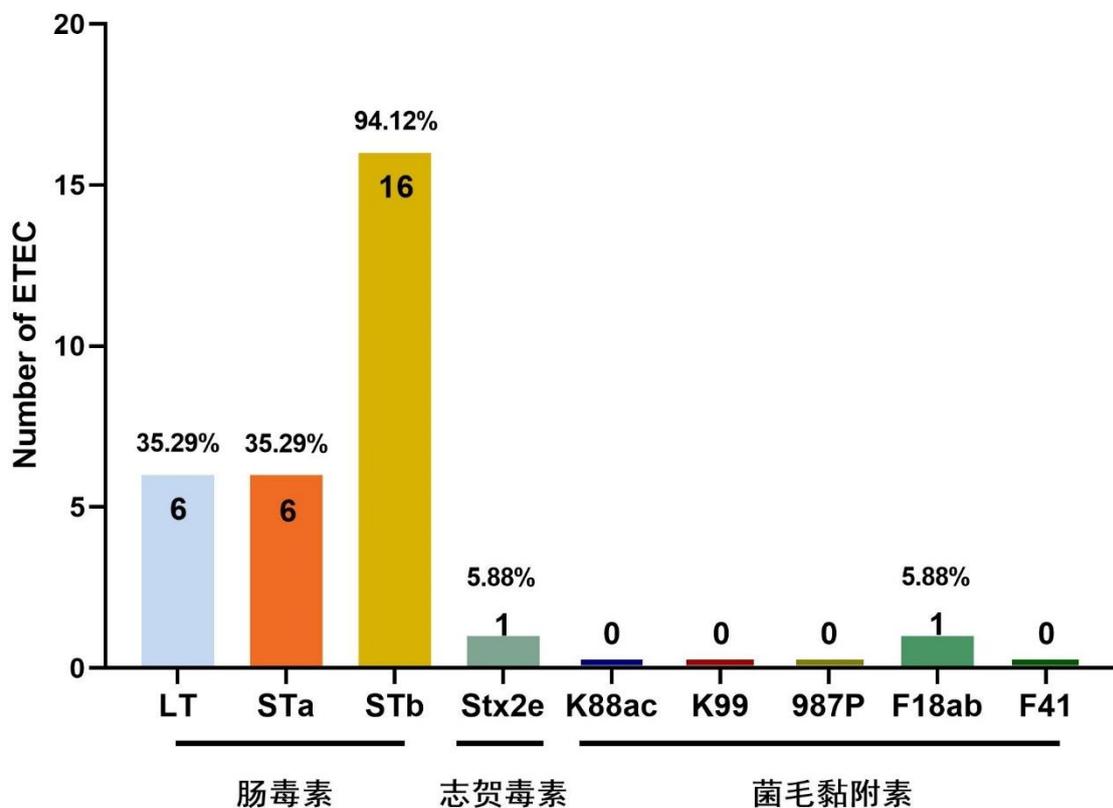


图 2-4 P3 批次 ETEC 菌株毒素基因检测结果

Fig. 2-4 Toxin gene detection results of P3 batch ETEC strains

2.3.2 三批次样品分离 ETEC 菌株对比分析

2.3.2.1 73 株 ETEC 菌株毒素及菌毛黏附素基因检测情况

综合上述三种菌株来源，本实验室前期工作一共分离得到 ETEC 菌株 73 株，其中毒素基因检测情况如下图 2-5 所示：33 株含有 LT 毒素，占比 45.21%，36 株含有 STa 毒素，占比 49.32%，69 株含有 STb 毒素，占比 94.52%，8 株含有 Stx2e 毒素，占比 10.96%。菌毛黏附素基因检测情况如下图 2-5 所示：37 株含有 F4 (K88ac) 基因，占比 50.68%，11 株含有 F18ab 基因，占比 15.07%，1 株含有 F41 基因，占比 1.37%。全部 73 株菌株中未检测到 F5 (K99)、F6 (987P) 菌毛基因存在。

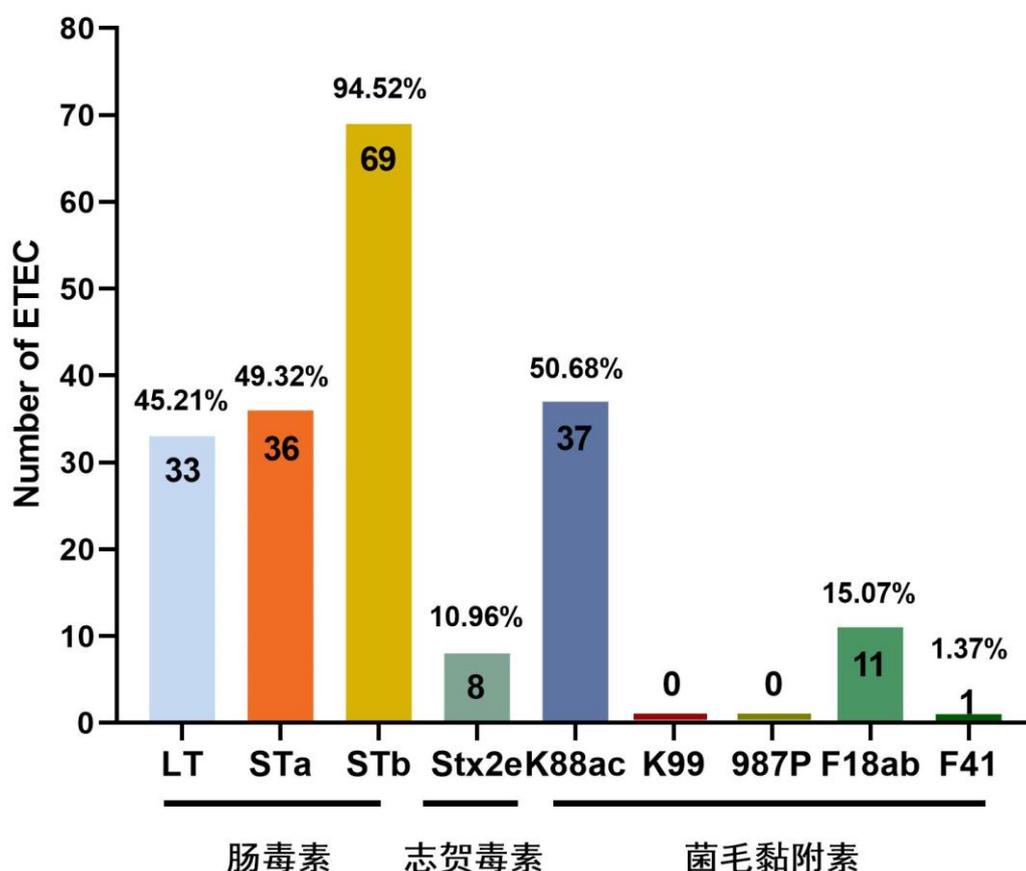


图 2-5 73 株 ETEC 菌株毒素基因检测结果

Fig. 2-5 Results of toxin gene detection of 73 ETEC strains

2.3.2.2 三批次样品 ETEC 菌株含毒素基因数量检测情况

ETEC 菌株含毒素基因数量检测结果如下图 2-6 所示：

P1 批次样品分离到的 27 株 ETEC 中，只检测到 1 种毒素基因的菌株数量为 3

株，占比 11.11%；检测到 2 种毒素基因的菌株数量为 19 株，占比 70.37%；检测到 3 种毒素基因的菌株数量为 4 株，占比 14.81%；检测到 4 种毒素基因的菌株数量为 1 株，占比 3.70%。

P2 批次样品分离到的 29 株 ETEC 中，只检测到 1 种毒素基因的菌株数量为 2 株，占比 6.90%；检测到 2 种毒素基因的菌株数量为 23 株，占比 79.37%；检测到 3 种毒素基因的菌株数量为 4 株，占比 13.79%；未检测到含有 4 种毒素基因的菌株。

P3 批次样品分离到的 17 株 ETEC 中，只检测到 1 种毒素基因的菌株数量为 6 株，占比 35.19%；检测到 2 种毒素基因的菌株数量为 10 株，占比 58.82%；检测到 3 种毒素基因的菌株数量为 1 株，占比 5.88%；未检测到含有 4 种毒素基因的菌株。

三批次汇总情况如下：三批次样品分离到的 73 株 ETEC 中，只检测到 1 种毒素基因的菌株数量为 11 株，占比 15.07%；检测到 2 种毒素基因的菌株数量为 52 株，占比 71.23%；检测到 3 种毒素基因的菌株数量为 9 株，占比 12.33%；检测到 4 种毒素基因的菌株数量为 1 株，占比 1.37%。

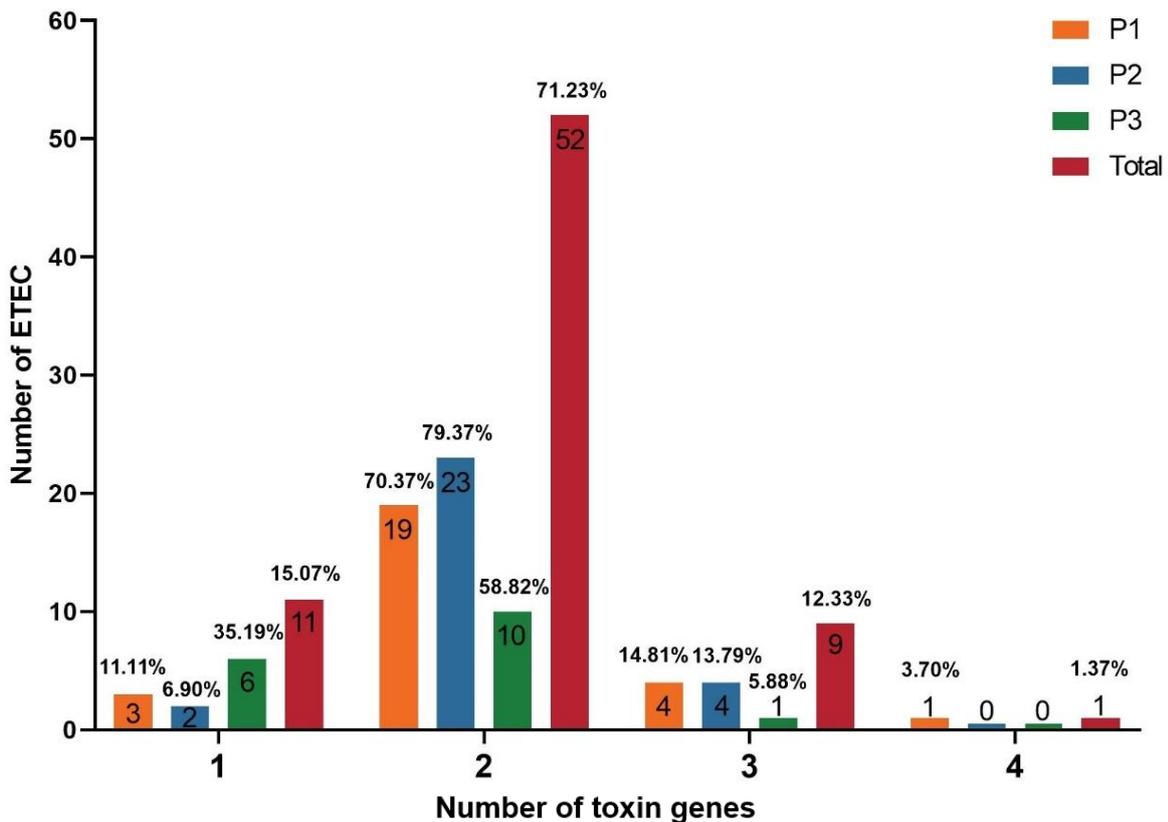


图 2-6 ETEC 菌株含毒素基因数量检测结果

Fig. 2-6 Results of detection of the number of toxin genes in ETEC strains

2.3.2.3 三批次样品 ETEC 菌株菌毛黏附素基因数量检测情况

ETEC 菌株菌毛黏附素基因数量检测结果如下图 2-7 所示：

P1 批次样品分离到的 27 株 ETEC 中，不含有菌毛黏附素基因的菌株数量为 2 株，占比 7.41%；含有 1 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 23 株，占比 85.19%；含有 2 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 2 株，占比 7.41%。

P2 批次样品分离到的 29 株 ETEC 中，不含有菌毛黏附素基因的菌株数量为 9 株，占比 31.03%；含有 1 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 19 株，占比 65.52%；含有 2 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 1 株，占比 3.45%。

P3 批次样品分离到的 17 株 ETEC 中，不含有菌毛黏附素基因的菌株数量为 16 株，占比 94.12%；含有 1 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 1 株，占比 5.88%；未检测到含有 2 种菌毛黏附素基因的菌株。

三批次汇总情况如下：三批次样品分离到的 73 株 ETEC 中，不含有菌毛黏附素基因的菌株数量为 27 株，占比 36.99%；含有 1 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 43 株，占比 58.90%；含有 2 种菌毛黏附素基因的菌株数量为 3 株，占比 4.11%。

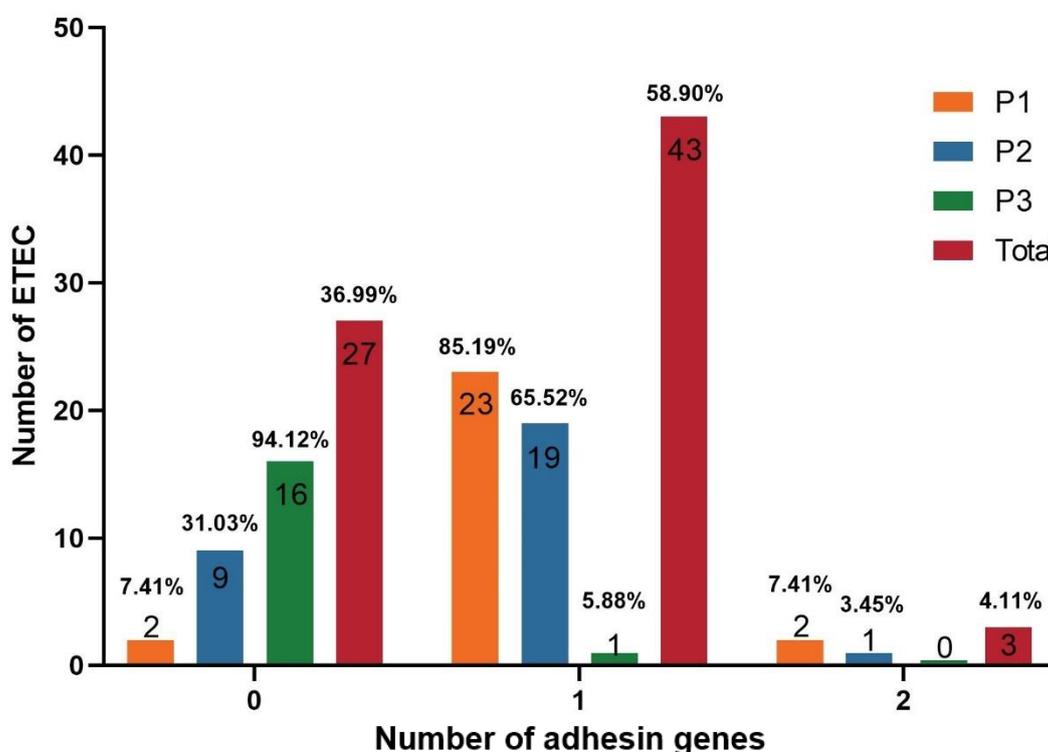


图 2-7 ETEC 菌株含菌毛黏附素基因数量检测结果

Fig. 2-7 Results of the number of pilus-containing adhesin genes in ETEC strains

2.3.2.4 三批次样品 ETEC 菌株毒素基因类型检测情况

ETEC 菌株毒素基因类型检测结果如下表 2-3 所示：

P1 批次样品分离到的 27 株 ETEC 中，毒素类型为 STb 型的菌株数量为 3 株，占比 11.11%；毒素类型为 LT/STa 型的菌株数量为 1 株，占比 3.70%；毒素类型为 LT/STb 型的菌株数量为 6 株，占比 22.22%；毒素类型为 STa/STb 型的菌株数量为 10 株，占比 37.04%；毒素类型为 Stb/Stx2e 型的菌株数量为 2 株，占比 7.41%；毒素类型为 LT/Stb/Stx2e 型的菌株数量为 3 株，占比 11.11%；毒素类型为 Sta/STb/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 3.70%；毒素类型为 LT/STa/STb/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 3.70%；不含有毒素类型为 LT/STa/STb 和 LT/STa/Stx2e 型的菌株。

P2 批次样品分离到的 29 株 ETEC 中，毒素类型为 STb 型的菌株数量为 2 株，占比 6.90%；毒素类型为 LT/STa 型的菌株数量为 2 株，占比 6.90%；毒素类型为 LT/STb 型的菌株数量为 10 株，占比 34.48%；毒素类型为 STa/STb 型的菌株数量为 11 株，占比 37.93%；毒素类型为 LT/STa/STb 型的菌株数量为 4 株，占比 13.79%；不含有毒素类型为 Stb/Stx2e、LT/STa/Stx2e、LT/Stb/Stx2e、Sta/STb/Stx2e 和 LT/STa/STb/Stx2e 型的菌株。

P3 批次样品分离到的 17 株 ETEC 中，毒素类型为 STb 型的菌株数量为 6 株，占比 35.29%；毒素类型为 LT/STb 型的菌株数量为 5 株，占比 29.41%；毒素类型为 STa/STb 型的菌株数量为 5 株，占比 29.41%；毒素类型为 LT/STa/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 5.88%；不含有毒素类型为 LT/Sta、Stb/Stx2e、LT/STa/STb、LT/Stb/Stx2e、Sta/STb/Stx2e 和 LT/STa/STb/Stx2e 型的菌株。

三批次汇总情况如下：三批次样品分离到的 73 株 ETEC 中，毒素类型为 STb 型的菌株数量为 11 株，占比 15.07%；毒素类型为 LT/STa 型的菌株数量为 3 株，占比 4.11%；毒素类型为 LT/STb 型的菌株数量为 21 株，占比 28.77%；毒素类型为 STa/STb 型的菌株数量为 26 株，占比 35.62%；毒素类型为 Stb/Stx2e 型的菌株数量为 2 株，占比 2.74%；毒素类型为 LT/STa/STb 型的菌株数量为 4 株，占比 5.48%；毒素类型为 LT/STa/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 1.37%；毒素类型为 LT/Stb/Stx2e 型的菌株数量为 3 株，占比 4.11%；毒素类型为 Sta/STb/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 1.37%；毒素类型为 LT/STa/STb/Stx2e 型的菌株数量为 1 株，占比 1.37%。

表 2-3 三批次 ETEC 毒素基因类型

Table 2-3 ETEC toxin gene types in three batches

毒素基因	P1		P2		P3		Total	
	数量	比例	数量	比例	数量	比例	数量	比例
STb	3	11.11%	2	6.90%	6	35.29%	11	15.07%
LT/STa	1	3.70%	2	6.90%	-	-	3	4.11%
LT/STb	6	22.22%	10	34.48%	5	29.41%	21	28.77%
STa/STb	10	37.04%	11	37.93%	5	29.41%	26	35.62%
Stb/Stx2e	2	7.41%	-	-	-	-	2	2.74%
LT/STa/STb	-	-	4	13.79%	-	-	4	5.48%
LT/STa/Stx2e	-	-	-	-	1	5.88%	1	1.37%
LT/STb/Stx2e	3	11.11%	-	-	-	-	3	4.11%
STa/STb/Stx2e	1	3.70%	-	-	-	-	1	1.37%
LT/STa/STb/Stx2e	1	3.70%	-	-	-	-	1	1.37%

2.3.2.5 三批次样品 ETEC 菌株菌毛黏附素基因类型检测情况

ETEC 菌株菌毛黏附素基因类型检测结果如下表 2-4 所示:

P1 批次样品分离到的 27 株 ETEC 中, 菌毛黏附素类型为 K88ac 型的菌株数量为 16 株, 占比 59.23%; 菌毛黏附素类型为 F18ab 型的菌株数量为 7 株, 占比 25.93%; 菌毛黏附素类型为 K88ac/F18ab 型的菌株数量为 2 株, 占比 7.41%; 不含菌毛黏附素类型为 K88ac/F41 型的菌株。

P2 批次样品分离到的 29 株 ETEC 中, 菌毛黏附素类型为 K88ac 型的菌株数量为 18 株, 占比 62.07%; 菌毛黏附素类型为 F18ab 型的菌株数量为 1, 占比 3.45%; 菌毛黏附素类型为 K88ac/F41 型的菌株数量为 1 株, 占比 3.45%; 不含菌毛黏附素类型为 K88ac/F18ab 型的菌株。

P3 批次样品分离到的 17 株 ETEC 中, 菌毛黏附素类型为 F18ab 型的菌株数量为 1, 占比 5.88%; 不含菌毛黏附素类型为 K88ac、K88ac/F18ab、K88ac/F41 型的菌株。

三批次汇总情况如下: 三批次样品分离到的 73 株 ETEC 中, 菌毛黏附素类型为 K88ac 型的菌株数量为 34 株, 占比 46.58%; 菌毛黏附素类型为 F18ab 型的菌株数量为 9 株, 占比 12.33%; 菌毛黏附素类型为 K88ac/F18ab 型的菌株数量为 2 株, 占比 2.74%; 菌毛黏附素类型为 K88ac/F41 型的菌株数量为 1 株, 占比 1.37%。

表 2-4 三批次 ETEC 菌毛黏附素基因类型

Table 2-4 ETEC pilus-containing adhesin gene types in three batches

菌毛黏附素基因	P1		P2		P3		Total	
	数量	比例	数量	比例	数量	比例	数量	比例
K88ac	16	59.26%	18	62.07%	-	-	34	46.58%
F18ab	7	25.93%	1	3.45%	1	5.88%	9	12.33%
K88ac/F18ab	2	7.41%	-	-	-	-	2	2.74%
K88ac/F41	-	-	1	3.45%	-	-	1	1.37%

2.3.2.6 三批次样品 ETEC 菌株菌毛黏附素及毒素基因组合类型检测情况

ETEC 菌株菌毛黏附素及毒素基因组合类型检测结果如下表 2-5 所示：

P1 批次样品分离到的 27 株 ETEC 中，判定为 K88⁺的菌株一共 16 株，其中菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/Stb 类型的菌株数量为 2 株，占比 12.50%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/Sta/Stb 类型的菌株数量为 9 株，占比 56.25%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/LT/Stb 类型的菌株数量为 5 株，占比 31.25%。判定为 F18⁺的菌株一共 7 株，其中菌毛黏附素及毒素组合为 F18/stb、F18/Lt/Sta、F18/stx2e/Sta/stb、F18/stx2e/Lt/stb、F18/stx2e/Lt/Sta/stb 类型的菌株各 1 株，分别占比 14.29%；菌毛黏附素及毒素组合为 F18/stx2e/stb 类型的菌株 2 株，分别占比 28.57%。另外还有菌毛黏附素及毒素组合为 K88/F18/stx2e/Lt/stb 类型的菌株 2 株，同时含有 K88 及 F18 菌毛。在上述菌株中，含有 F18 菌毛的菌株一共有 9 株，其中 7 株可以观察到 stx2e 毒素基因，占比 77.78%。

P2 批次样品分离到的 29 株 ETEC 中，判定为 K88⁺的菌株一共 18 株，其中菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/Sta/Stb 类型的菌株数量为 9 株，占比 56.25%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/LT/Stb 类型的菌株数量为 7 株，占比 38.89%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/LT/Sta/Stb 类型的菌株数量为 2 株，占比 11.11%。判定为 F18⁺的菌株一共 1 株，其菌毛黏附素及毒素组合为 F18/Lt/Sta。另外还有菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/F41/Sta/Stb 类型的菌株 1 株，同时含有 K88 及 F41 菌毛。

P3 批次样品分离到的 17 株 ETEC 中，不含有 K88⁺的菌株，判定为 F18⁺的菌株 1 株，菌毛黏附素及毒素组合为 F18/stx2e/Sta 类型，本株 F18⁺菌株中观察到 stx2e 毒素基因，占比 100%。

三批次汇总情况如下：三批次样品分离到的 73 株 ETEC 中，判定为 K88⁺的菌株一共 34 株，其中菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/Stb 类型的菌株数量为 2 株，占

比 5.88%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/Sta/Stb 类型的菌株数量为 18 株，占比 52.94%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/LT/Stb 类型的菌株数量为 12 株，占比 35.29%；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/LT/Sta/Stb 类型的菌株数量为 2 株，占比 5.88%。判定为 F18⁺的菌株一共 9 株，其中菌毛黏附素及毒素组合为 F18/stb、F18/stx2e/Sta/stb、F18/stx2e/Lt/Sta、F18/stx2e/Lt/stb、F18/stx2e/Lt/Sta/stb 类型的菌株各 1 株，分别占比 11.11%；菌毛黏附素及毒素组合为 F18/Lt/Sta、F18/stx2e/stb 类型的菌株各 2 株，分别占比 22.22%。另外还有菌毛黏附素及毒素组合为 K88/F18/stx2e/Lt/stb 类型的菌株 2 株，同时含有 K88 及 F18 菌毛；菌毛黏附素及毒素组合为 K88ac/F41/ Sta/Stb 类型的菌株 1 株，同时含有 K88 及 F41 菌毛。在上述菌株中，含有 F18 菌毛的菌株一共有 11 株，其中 8 株可以观察到 stx2e 毒素基因，占比 72.73%。

表 2-5 三批次 ETEC 菌毛黏附素及毒素基因组合类型

Table 2-5 Types of pilus adhesin and toxin gene combinations of three batches of ETEC

菌株类型	菌毛及毒素基因组合	P1	P2	P3	Total				
K88 ⁺	K88ac/STb	2/16	12.50%	-	-	2/34	5.88%		
	K88ac/STa/STb	9/16	56.25%	9/18	50.00%	18/34	52.94%		
	K88ac/LT/STb	5/16	31.25%	7/18	38.89%	12/34	35.29%		
	K88ac/LT/STa/STb	-	-	2/18	11.11%	2/34	5.88%		
F18 ⁺	F18/STb	1/7	14.29%	-	-	1/9	11.11%		
	F18/LT/STa	1/7	14.29%	1/1	100%	2/9	22.22%		
	F18/Stx2e/STb	2/7	28.57%	-	-	2/9	22.22%		
	F18/Stx2e/STa/STb	1/7	14.29%	-	-	1/9	11.11%		
	F18/Stx2e/LT/STa	-	-	-	1/1	100%	1/9	11.11%	
	F18/Stx2e/LT/STb	1/7	14.29%	-	-	1/9	11.11%		
	F18/Stx2e/LT/STa/STb	1/7	14.29%	-	-	1/9	11.11%		
K88 ⁺ /F18 ⁺	K88/F18/Stx2e/LT/STb	2/2	100%	-	-	2/2	100%		
K88 ⁺ /F41 ⁺	K88/F41/STa/STb	-	-	1/1	100%	1/1	100%		
	F18/Stx2e	7/9	77.78%	0/1	0%	1/1	100%	8/11	72.73%

2.4 讨论与分析

2.4.1 三批次不同样品来源的 ETEC 菌株分离率情况分析

本研究分别从三批次病料样品中分离 ETEC，分离情况如下：从 P1 批次 52 份疑似仔猪黄白痢病猪肛拭子样品中分离得到 ETEC 菌株 27 株，分离率为 51.92%；从 P2 批次 360 份全国病猪送检样品中分离得到 ETEC 29 株，分离率为 8.1%；从 P3 批次 746 份全国健康猪群及养殖场环境样品中分离得到 ETEC 17 株，分离率为 2.28%。结果显示，三种不同情况的病料样品的分离率存在较大差异，P1 批次样品分离率较高，而 P2 样品分离率相对较低，P3 批次分离率最低，并且三批次样品中 ETEC 的分离来源基本上都为肛拭子、粪便、肠道等样品（见附表 1-3），这表明 ETEC 主要定殖在肠道内，为典型的肠道致病菌。同时，从结果来看，疑似发病猪群的分离率较高，健康猪群中的分离率很低，证明本菌不是猪群肠道内的常在菌，而是致病性的 ETEC 侵入肠道内发生定植并增殖到一定数量后导致的动物发病，有研究表明，ETEC 需要在肠道内增殖到 10^9 - 10^{10} CFU 才会导致动物发病（Acres 1985）。Li 等为调查山东省断奶后腹泻仔猪中分离出的大肠杆菌毒力基因的流行情况和特征，对 300 株大肠杆菌分离株进行多重 PCR 确定大肠杆菌的毒力基因，结果显示，其中包含 ETEC 菌株 166 株，分离率为 55.3%（Li et al 2020）；陈亮等采集腹泻病死仔猪样本共计 156 份进行大肠杆菌的分离，87 株为产肠毒素大肠杆菌，检出率为 55.77%（陈亮 et al 2023）。这与本研究 P1 批次样品的分离率相近。吴杨等在山东省青岛、烟台和潍坊地区采集腹泻样品共计 1014 份，分离到 169 株 ETEC，占比 17.12%。（吴杨 et al 2022）；Luppi 等在欧洲 280 个发生 PWD 的猪场中收集了共计 873 个样本，分离到 ETEC 菌株 178 株，分离率为 20.4%（Luppi et al 2016）；Do 等在 2008 年至 2016 年间，从腹泻的断奶仔猪身上分离出 362 株大肠杆菌，其中产肠毒素大肠杆菌的占比为 61.3%（Do et al 2019）。这与本研究几个批次的分离率均有一定差异，同时也表明病料样品的来源背景对分离率有较大的影响，新生至断奶阶段仔猪发生腹泻的样品，尤其是出现典型的黄白痢样腹泻时分离率较高，而其余阶段猪腹泻的样品分离率会降低，未发生腹泻的健康猪群分离率更低。

2.4.2 三批次不同样品来源的 ETEC 菌株毒素及菌毛基因检测情况分析

根据分离结果显示，本实验室前期一共分离得到 ETEC 菌株 73 株，其中分离率

最高的毒素为不耐热肠毒素 STb, 占比 94.52%, 接下来分别为 Sta、LT 及 Stx2e, 分别为 49.32%、45.21%及 10.96%。同时, 71.23%的菌株含有 2 种毒素, 接下来分别是 1 种、3 种、4 种毒素, 分别占比 15.07%、12.33%及 1.37%; 排前三名的毒素组成类型分别为 STa/STb、LT/STb、STb, 分别占比 35.62%、28.77%及 15.07%, 共计占比 79.46%, 其余 6 种毒素类型共计占比 20.54%。上述结果表明, 在 ETEC 分离株中, 优势毒素基因为 STb、Sta、LT, 并且大部分菌株含有其中 2 种或 1 种毒素。Luppi 等对欧洲 280 个养殖场分离到 178 株 ETEC 菌株的毒素基因进行了检测, 结果显示, 毒素基因占比分别为 STb、Sta、LT 和 Stx2e, 分别占比 59.1%、38.1%、31.9%和 9.7% (Luppi et al 2016), 这与本研究检测结果中毒素基因排名完全相同, 占比结果高度相似。Zhang 等从美国患有 PWD 的仔猪中分离得到了 175 株 ETEC 并检测了其中毒素基因的流行情况, 结果显示 STb、LT、Sta 和 Stx2e 是主要流行的的菌毛类型, 分别占比 72.3%、57.7%、27.4%和 17.1% (Zhang et al 2007), 这与本研究相似, 但 LT、Sta 两种毒素的流行率排名与本研究相反。Li 等对 166 株 ETEC 分离株进行多重 PCR 检测大肠杆菌的毒素基因, 结果显示, 优势毒素基因为 LT、Sta、Stb 和 Stx2e, 占比分别为 27.1%、19.3%、12.7%和 11.4%, 除 Stx2e 毒素外, 其余三个毒素的排名与本研究结果完全相反, 这可能与菌株的地域流行差异有关。

菌毛基因检测结果表明, 分离率最高的菌毛为 F4 (K88), 占比 50.68%, 接下来为 F18ab, 占比 15.07%, 这两种为主要的优势菌毛类型, 另外还分离到 1 株分离株含有 F41 菌毛, 占比 1.37%, 73 株菌株中均为未检测到 F5 (K99)、F6 (987P) 菌毛基因存在, 表明在本研究三批次样品所在的猪群中, 这两种菌毛黏附素的流行率较低。同时, 仅含有 1 种菌毛的菌株数量最多, 占比 58.90%, 其次分别是不含菌毛的和含 2 种菌毛的菌株, 分别占比 36.99%及 4.11%。另外还有含两种菌毛的菌株, 分别为 K88ac/F18ab 和 K88ac/F41 型, 分别占比 2.74%和 1.37%。吴杨等 (吴杨 et al 2022) 对分离到 169 株 ETEC 进行菌毛基因检测, 发现 ETEC 中黏附素的主要类型为 K88 (47.34%) 和 F18 (31.95%); Zhang 等从美国患有 PWD 的仔猪中分离大肠杆菌, 并检测了其中菌毛基因的流行情况, 结果显示 K88 和 F18 是主要流行的菌毛类型, 分别占比 64.6%和 34.3% (Zhang et al 2007), 这与本研究的结果相似。陈亮等对 87 株产肠毒素大肠杆菌进行菌毛基因检测, 检出率最高的为 K88 和 987P, 分别为 28.74%和 20.69% (陈亮 et al 2023), 这与本研究存在一定差异, 本研究中未检测到 987P 菌毛。Li 等对 166 株 ETEC 分离株进行多重 PCR 确定大肠杆菌的菌毛基

因,结果显示,几种菌毛的优势顺序为 F5(K99)、F18、F41、F6(987P)和 F4(K88),占比分别为 12.0%、9.0%、7.2%、6.0%和 6.0%(Li et al 2020),这与本研究差异较大,可能是与样品的来源有关,Li 等主要对断奶后腹泻仔猪进行研究,本研究包含了哺乳期和断奶后仔猪腹泻的病例;此外,地域性的优势菌毛流行也可能是导致结果差异的原因。

菌毛及毒素组合类型检测结果显示,在 F4⁺ETEC 菌株中,最多的菌毛及毒素组合类型为 K88/Sta/Stb,占比 52.94%,其次为 K88/LT/Stb,占比 35.29%。在 F18⁺ETEC 中,各种菌毛及毒素组合类型占比差异不大,没有明显的优势组合,但发现 11 株 F18⁺菌株中,含有 stx2e 毒素的占 72.73%,二者高度相关,在 ETEC 菌株中多成对出现。Luppi 等同样对分离到的 178 株 ETEC 菌株的菌毛和毒素基因组合进行了检测,结果显示, F4/LT/Stb、F4/Sta/Stb/LT、F4/Sta/Stb 三种组合的检出率最高,分别为 27.5%、15.7%和 10.1%,作者同样观察到 F18 菌毛 stx2e 毒素存在相关性(Luppi et al 2016),这与本研究结果相似。Zhang 等对 175 株 ETEC 的菌毛和毒素基因组合进行检测,结果显示 K88/LT/Stb 和 K88/LT/Stb/EAST1 是主要流行的的菌毛及毒素组合类型,分别占比 42.5%和 23.9%(Zhang et al 2007),同时作者发现 F18 菌毛与 STa/STb/Stx2e 毒素组合占比较高(31.7%),这与本研究结果相似,但并未显示出本研究中的 K88/Sta/Stb 组合的流行率。

2.4.3 ETEC 分离结果对疫苗研发的提示

根据研究结果提示,在导致仔猪发生黄白痢的产肠毒素大肠杆菌中,主要流行菌株为 K88⁺ETEC,因此控制该流行菌株类型在防控本病的流行中具有重要意义。将检测到的各种菌毛及毒素作为抗原来看,含有 K88 菌毛或 LT 毒素两种抗原任意一种的菌株总和在分离菌株中的占比较高。具体结果如下(见附表 1-3):计算只要含有 K88 或 LT 抗原其中一种或以上的菌株数量,在 P1 批次分离菌株中占比 81.48%(22/27),在 P2 批次分离菌株中占比 89.66%(26/29),在 P3 批次分离菌株中占比 35.29%(6/17),总占比 69.23%(54/73),排除 P3 批次健康猪群的分离菌株来看,这一占比提升到 85.71%(48/56)。这一结果提示,K88 菌毛黏附素及 LT 蛋白两种抗原可以作为一种免疫原组合进行疫苗的开发,产生的特异性抗体能够覆盖到大部分的流行菌株,有望控制本病的流行。

2.5 小结

(1)不同来源的猪群样品中 ETEC 分离率有较大差异,腹泻样品的分离率较高,健康猪群中分离率较低,表明本菌不是常在菌;分离来源主要为肠道相关样品,表明本菌的主要定殖部位为肠道。

(2)分离到的 ETEC 中,毒素流行率最高的为 STb,菌毛流行率最高的为 F4 (K88),流行率最高的菌毛与毒素组合为 K88/Sta/Stb。

(3)含有 F4 菌毛黏附素或 LT 蛋白两种抗原任意一种的菌株在总的分离株数量中占有较高的比例,提示这两个抗原的组合有作为本病疫苗开发靶标的潜力。

第三章 重组乳酸乳球菌的构建及生物学特性研究

3.1 前言

非致病性乳酸菌（LAB）近年来被开发作为一种新型、安全的异源蛋白质生产和递送系统，是经典减毒微生物载体的潜在替代品。大量的研究表明，重组 LAB 菌株可引发针对选定抗原的特异性全身和黏膜免疫反应，同时，重组 LAB 通过黏膜给药，特别是口服途径给药，与全身接种相比具有许多优势，并且从免疫学和实践的角度来看都具有较大的吸引力（Szatraj et al 2017）。基于此，本研究计划利用食品级乳酸乳球菌 NZ3900 及无抗表达质粒 pNZ8149 作为载体分别表达产肠毒素大肠杆菌不耐热肠毒素 LT 双突变减毒的 A 亚基、未做任何改变的 B 亚基以及 F4 菌毛的主要黏附亚基 FaeG，并利用分泌表达肽 Usp45 及细胞壁非共价连接基序 *LysM* 将三个抗原各自展示在重组乳酸乳球菌表面，得到三株表面展示抗原的重组乳酸乳球菌并制成口服疫苗用于 F4⁺ETEC 的防控。

乳酸乳球菌是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌，其最适生长温度为 30°C，倍增时间为 35~60 min（Frelet-Barrand 2022）。乳酸菌是一种对营养需要要求较高的细菌，其在适宜的生长环境中茁壮生长，而在不适宜的条件下生长很差甚至无法生长，因此，寻找并确定一种详细规定了冻存的重组菌株复苏、起始培养物浓度、发酵步骤、保持发酵产物功能以及活力的储存条件等至关重要（Ayivi et al 2022）。对于本研究而言，乳酸乳球菌的生长速率与所能达到的最大菌量，与最终生产的疫苗成本息息相关；乳酸乳球菌是否能在强酸溶液中生存直接决定了其通过胃酸时的存活率，也决定了重组乳酸菌在制剂时的方案；各种保护剂对乳酸菌的保护效果以及各种保存温度同样影响了其疫苗制剂的实际使用效果；而其本身对抗生素的抗性也决定了其在临床使用过程中是否能与抗生素联用共同防控 ETEC 感染。因此，这些问题其实是本研究开发的重组疫苗应用于临床的关键性因素，决定其实际使用中是否能够发挥效力的关键。

3.2 材料方法

3.2.1 材料

3.2.1.1 菌株与质粒

食品级乳酸乳球菌 Nisin 控制基因表达 (NICE) 系统购自德国 MoBioTec 公司, 包括载体 pNZ8149 及乳酸乳球菌菌株 NZ3900。质粒及菌株示意图如下图 3-1 和 3-2 所示, 本系统为无抗筛选系统, 利用乳糖作为筛选标记, 颜色变化辅助进行阳性转化子的筛选。

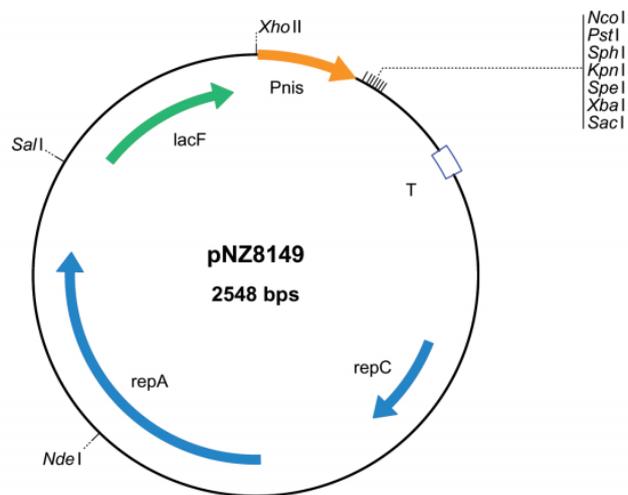


图 3-1 pNZ8149 质粒示意图

Fig. 3-1 Schematic diagram of the pNZ8149 plasmid

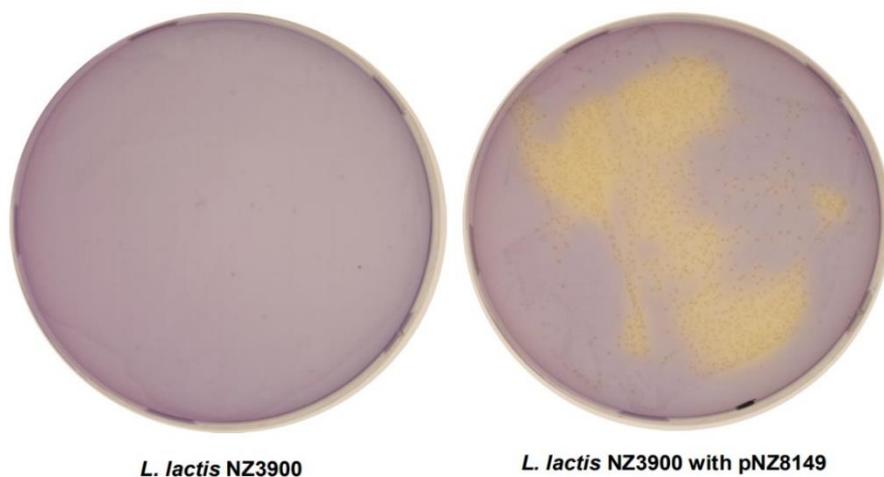
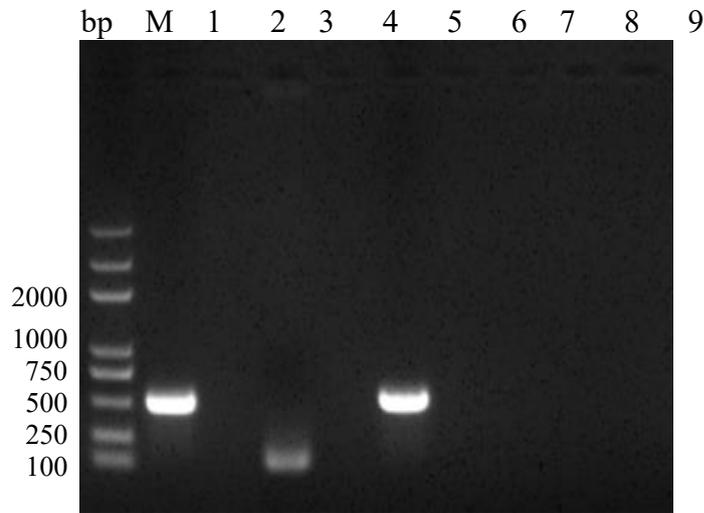


图 3-2 乳酸乳球菌重组菌株筛选示意图

Fig. 3-2 Schematic diagram of screening recombinant strains of *L. lactis*

攻毒用 F4 菌毛阳性产肠毒素大肠杆菌（ETEC）标准菌株 C83549 由本实验室保存，含有 *lt* 和 *stb* 毒素以及 K88 菌毛黏附素基因（图 3-3）。



M, maker; 1, *lt*; 2, *sta*; 3, *stb*; 4, *stx2e*; 5, K88; 6, K99; 7, 987P; 8, F18; 9, F41

图 3-3 产肠毒素大肠杆菌 C83549 毒素及菌毛基因鉴定

Fig. 3-3 Identification of enterotoxin *E. coli* C83549 toxin and pilus gene

3.2.1.2 主要试剂及试剂盒

试剂	生产厂家
L (+)-抗坏血酸	国药集团化学试剂有限公司
乳糖	国药集团化学试剂有限公司
蔗糖	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司
六水合氯化镁	国药集团化学试剂有限公司
氯化钙	国药集团化学试剂有限公司
甘油	国药集团化学试剂有限公司
乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA）	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
明胶	国药集团化学试剂有限公司
溴甲酚紫	上海麦克林生化科技股份有限公司

Tris-base	德国 biofroxx 公司
甘氨酸	德国 biofroxx 公司
M17 肉汤	青岛海博生物技术有限公司
KpnI、XbaI、SacI	大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)
T4 连接酶	大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)
PrimeSTAR	大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)
6×DNA Loading Buffer	北京擎科生物科技股份有限公司
5×SDS PAGE 蛋白上样缓冲液	安徽 biosharp 生物科技公司
BSA	安徽 biosharp 生物科技公司
P213 Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
溶菌酶	北京 Solarbio 科技有限公司
DL5000 Maker	擎科生物科技股份有限公司
0.22μm 滤膜过滤器	安徽 biosharp 生物科技公司
鼠抗 His-Tag 单抗	苏州博奥龙科技有限公司
羊抗鼠 IgG-HRP	苏州博奥龙科技有限公司
药敏纸片	杭州滨和微生物试剂有限公司
细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒	康为世纪生物科技股份有限公司
质粒小提试剂盒 (Plasmid Mini Kit)	美国 Omega 公司
胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit)	美国 Omega 公司
提取试剂盒 HiPure Stool DNA Kits	广州美基生物科技股份有限公司
底物显色试剂盒	美国 biorad 公司

其余试剂及试剂盒详见第二章的 2.1.1

3.2.1.3 主要仪器与设备

仪器	生产厂家
超微量分光光度计	美国 DeNovix 公司
电穿孔仪 (Gene Pulser Xcell)	美国 biorad 公司
化学发光成像系统	美国 biorad 公司
Trans-Blot Turbo 蛋白转印系统	美国 biorad 公司
厌氧培养系统	上海跃进医疗器械有限公司

酶标仪	瑞士帝肯 Tecan 公司
分光光度计	美国 Thermo Fisher 公司
涡旋仪	美国 Thermo Fisher 公司
pH 计	瑞士梅特勒托利多集团

其余仪器详见第二章的 2.1.2

3.2.1.4 主要试剂配制

M17 液体培养基：称取 M17 肉汤 42.3 g，加入 ddH₂O 定容至 1 L，121°C 高压灭菌 15 min，密封室温保存备用。

M17 固体培养基：称取 M17 肉汤 42.3 g，琼脂粉 15 g，加入 ddH₂O 定容至 1 L，121°C 高压灭菌 15 min，冷却至 45°C 左右，倒入无菌平皿，4°C 保存备用。

GM17 液体培养基：称取 M17 肉汤 42.3 g，葡萄糖 5 g，加入 ddH₂O 定容至 1 L，115°C 高压灭菌 20 min，密封室温保存备用。

GM17 固体培养基：称取 M17 肉汤 42.3 g，葡萄糖 5 g，琼脂粉 15 g，加入 ddH₂O 定容至 1 L，115°C 高压灭菌 20 min，冷却至 45°C 左右，倒入无菌平皿，4°C 保存备用。

GSGM17 液体培养基：M17 液体培养基中添加 0.5 M 蔗糖、2.5% 甘氨酸、0.5% 葡萄糖，115°C 高压灭菌 20 min，密封室温保存备用。

GM17 电转恢复培养基：M17 液体培养基、0.5% 葡萄糖、20 mmol/L 氯化镁、2 mmol/L 氯化钙。

BLElliker 固体培养基：胰蛋白胨 20 g，酵母浸粉 5 g，NaCl 4 g，乙酸钠 1.5 g，抗坏血酸钠 0.5 g，琼脂粉 15 g，乳糖 5 g，搅拌均匀，然后加 ddH₂O 定容至 1 L，115°C 灭菌 15 min，高压蒸汽灭菌后温度降至 60°C，加入 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 0.4% 溴甲酚紫使终浓度为 0.004%，倒入无菌平皿，凝固后 4°C 保存备用。

0.4% 溴甲酚紫保存液：称取溴甲酚紫 0.4 g 溶解于 100 mL ddH₂O，0.22 μm 滤膜过滤除菌；变色范围：pH=5.2-6.8（黄→紫）。

Solution I：171.14 g 蔗糖，100 mL 甘油，搅拌均匀，然后加 ddH₂O 定容至 1 L，115°C 高压蒸汽灭菌 20 min 后储存于 4°C 备用。

Solution II：171.14 g 蔗糖，100 mL 甘油，18.612g EDTA，搅拌均匀，然后加 ddH₂O 定容至 1 L，115°C 高压蒸汽灭菌 20 min 后储存于 4°C 备用。

1mg/mL Nisin 溶液: Nisin 0.1 g 溶解于 100 mL 的 0.05%醋酸溶液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌分装后保存于-20℃备用。

磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4): 称取 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.63 g Na₂HPO₄·12H₂O 和 0.24 g KH₂PO₄, 加适量去离子水溶解, 用浓盐酸调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 121℃ 高温高压蒸汽灭菌 15 min, 室温保存。

Enzymatic Lysis Buffer: 20 mM Tris (pH 8.0), 2 mM Na₂-EDTA (pH 8.0), 1.2% Triton X-100, 121℃ 高压灭菌 15 min, 冷却后加入适量溶菌酶使其终浓度为 20 mg/mL, 混匀后 4℃ 保存备用。

5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 15.1 g Tris-base, 94.0 g 甘氨酸, 5.0 g SDS, 加蒸馏水溶解并定容至 1 L, 室温保存备用 (使用时稀释至 1×)。

10%过硫酸铵: 0.1 g 过硫酸铵溶于 1 mL ddH₂O 中, 现配现用。

1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8): 181.65 g Tris-base 溶于 900 mL ddH₂O 中, 用浓盐酸调 pH 值至 8.8, 定容至 1 L, 室温保存备用。

1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8): 121.1 g Tris-base 溶于 900 mL ddH₂O 中, 用浓盐酸调 pH 值至 6.8, 定容至 1 L, 室温保存备用。

1.0 mol/L Tris-HCl (pH8.0): 121.1 g Tris-base 溶于 900 mL ddH₂O 中, 用浓盐酸调 pH 值至 8.0, 定容至 1 L, 室温保存备用。

12% SDS 聚丙烯酰胺 (分离胶, 10 mL): 蒸馏水 3.3 mL, 30%丙烯酰胺溶液 4 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8) 2.5 mL, 10%SDS 0.1 mL, 10%过硫酸铵 0.1 mL, TEMED 0.004 mL, 混匀后制胶。

5% SDS 聚丙烯酰胺 (浓缩胶, 2 mL): 蒸馏水 1.4 mL, 30%丙烯酰胺溶液 0.33 mL, 1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8) 0.25 mL, 10%SDS 0.02 mL, 10%过硫酸铵 0.02 mL, TEMED 0.002 mL, 混匀后制胶。

转膜缓冲液: 称取 3.03 g Tris-base, 15.02 g 甘氨酸溶于 600 mL 蒸馏水中, 加入 200 ml 甲醇, 加蒸馏水定容至 1 L, 室温保存。

TBST 缓冲液: 称取 8.8 g NaCl 溶于 800 mL ddH₂O 中, 加入 20 mL 1.0mol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mL Tween-20, ddH₂O 定容至 1 L, 室温保存。

封闭液 (5%脱脂奶粉): 称取 5.0 g 脱脂奶粉溶于 100 mL TBST 缓冲液中。

包被液 (碳酸盐缓冲液, pH9.6): 称取 Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g, 加适量去离子水溶解, 用浓盐酸调 pH 至 9.6, 定容至 1 L, 4℃ 保存备用。

洗涤液（PBST）：在 1 L PBS 中加入 0.5 mL Tween-20。

3.2.1.5 引物

表 3-1 构建重组乳酸菌所需引物

Table 3-1 Primers required for the construction of recombinant lactic acid bacteria

编号	引物名称	引物序列 5'-3'	片段大小
①	pNZ8149-F	ACGGCTCTGATTA AATTCTGAAGTT	NA
②	pNZ8149-R	GCTTTCATAATCTAACAGACAACATCT	
③	Usp45-KpnI-F	CCGGGTACCATGAAAAAAAAAGATTATCTC AGCTATTTTAATGTCT	119 bp
④	CD-Usp45-speI	CCGTTATGATGATGATGATGATGACTAGTA GCGTAAACACCTGACAACG	
⑤	CD-SpeI-dmLTa	ACGCTACTAGTCATCATCATCATCATCATA ACGGGGATCGACTTTATCG	774 bp
⑥	XbaI-his-dmLTa	CCGTCTAGACTAATGATGATGATGATGATG TAATTCATCACGTATACGA	
⑦	XbaI-ACM-F	CCGTCTAGA ACTACTTATACCGTCAAATCT GGTG	603 bp
⑧	SacI-ACM-R	CGCGAGCTCTTTTATTCGTAGATACTGACC	
⑨	SpeI-his-LTb	CGCACTAGTCATCATCATCATCATCATGCT CCACAGTCTATCACTGAA	363 bp
⑩	XbaI-his-LTb	CCGTCTAGAATGATGATGATGATGATGATT TTCCATACTGATTGCCGC	
⑪	SpeI-his-FaeG	CGCACTAGTCATCATCATCATCATCATTGG ATGACTGGTGATTTTAACGGAT	837 bp
⑫	XbaI-his-FaeG	CCGTCTAGAATGATGATGATGATGATGATA ATAAGTAATCGCTACATTAAGTGGTGC	

3.2.2 方法

3.2.2.1 *his-dmLTa-his*、*his-LTb-his*、*his-FaeG-his* 基因片段的优化与合成

根据 GenBank 上发表的 ETEC 不耐热肠毒素 *Lta* 亚基 (MF990203.1) 的基因序列，为了降低本蛋白的毒性，本研究将第 63 位的丝氨酸突变为赖氨酸，第 72 位的丙氨酸突变为精氨酸，得到了一个命名为 *dmLTa* 的减毒基因序列。为优化蛋白表达效率，丢弃序列中的信号肽，并且分别在序列的 5'端和 3'端插入一段 6×*his* 基因，之后根据乳酸乳球菌密码子偏好性对基因序列进行密码子优化并进行合成，获得抗原基因片段进行后续构建。

LTb 亚基 (MF990203.1)、*FaeG* 亚基 (DQ307495.1) 基因序列同样在 GenBank

上获取, 同样舍弃各自序列中的信号肽, 以及分别在序列的 5'端和 3'端插入一段 6×*his* 基因, 采取与上述蛋白同样的方式进行优化和合成。

3.2.2.2 乳酸乳球菌 NZ3900 基因组的提取

利用基因组提取试剂盒对乳酸乳球菌 NZ3900 基因组进行提取, 依据参考说明书步骤如下:

(1) 取冻存的 NZ3900 甘油菌恢复至室温, 接种环蘸取菌液, 然后在 M17 琼脂上划线复苏。

(2) 挑选单一黄色菌落接种于 5 mL M17 液体培养基, 30°C 静置培养过夜。

(3) 取菌液 10 mL 12000 r/min 离心 2 分钟进行集菌, 使用移液器将上清吸净。

(4) 向沉淀中加入 180 μL Enzymatic Lysis Buffer, 使用移液器充分吹打重悬后置于 37°C 水浴锅孵育 30 分钟。

(5) 向管中加入 20 μL 蛋白酶 K, 涡旋混匀, 56°C 水浴直至菌体完全裂解 (孵育过程中混匀数次), 添加 4 μL 100 mg/mL 的 RNase A 溶液, 去除 RNA。

(6) 混匀 15 s, 加入 200 μL Buffer GL, 充分混匀, 加入 100 μL 无水乙醇, 充分混匀。

(7) 将上一步所溶液包括沉淀全部转移至 Collection Tube 的 Spin Column DM 中, 最大转速离心 1 分钟, 弃掉滤液, 将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

(8) 向 Spin Column DM 中加入 500 μL Buffer GW1, 使用前确认已加入无水乙醇, 最大转速离心 1 分钟, 弃掉滤液, 将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

(9) 向 Spin Column DM 中加入 500 μL Buffer GW2, 使用前确认已加入无水乙醇, 最大转速离心 1 分钟, 弃掉滤液, 将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

(10) 最大转速离心 2 分钟, 弃掉滤液, 将 Spin Column DM 室温放置数分钟, 彻底晾干吸附材料中残留的 Buffer GW2。

(11) 将 Spin Column DM 放入一个干净的离心管中, 向膜中间位置悬空滴加 65°C 的超纯水 30 μL, 室温放置 2 分钟, 最大转速收集细菌基因组, 然后再次加入 20 μL 超纯水, 再次收集基因组, 获得的基因组 -20°C 保存备用。

3.2.2.3 *Usp45* 及 *his-dmLTa-his* 基因片段的扩增

以上述提取的 NZ3900 基因组为模板, 利用上述的③及④引物扩增 *Usp45* 基因片段。以合成的 *his-dmLTa-his* 基因片段为模板, 利用上述的⑤及⑥引物扩增 *his-*

dmLTa-his 基因片段。扩增体系的配置如表 3-2，扩增程序的设置如表 3-3。

表 3-2 PCR 扩增体系

Table 3-2 PCR amplification system

组分	含量
PrimeSTAR	25 μ L
模板	40 ng
上游引物	2.5 μ L
下游引物	2.5 μ L
ddH ₂ O	补充至 50 μ L

表 3-3 PCR 扩增程序

Table 3-3 PCR amplification procedure

步骤	程序	时间
①	98°C	2 min
②	98°C	10 s
③	依据引物 T _m 值确定	15 s
④	72°C	15 s/kb
⑤	72°C	5 min

注：②-④三个程序共 30 个循环

3.2.2.4 目的片段胶回收

使用 OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit 试剂盒对 PCR 扩增的 *Usp45* 及 *his-dmLTa-his* 片段进行胶回收，依据参考说明书步骤如下：

- (1) 在紫外灯下将凝胶上正确大小的目的片段切至 1.5 mL EP 管内，并称重。
- (2) 加入同等体积的 Binding Buffer (XP2)，58°C 水浴锅温浴 8 min 左右，直至全融化。
- (3) 将混合液转移至试剂盒中的回收柱中，室温 10000×g 离心 1 min，弃滤液。
- (4) 加入 350 μ L Binding Buffer (XP2) 至收集柱内，室温 12000 r/min 离心 1 min，弃滤液。
- (5) 加入 650 μ L SPW Buffer，室温 12000 r/min 离心 1 min，弃滤液，重复此操作步骤 2 遍。
- (6) 室温 10000×g 离心 2 min，并将回收柱转移至干净 1.5 mL EP 管，加入 20 μ L ddH₂O，涡旋混匀后室温静置 2 min。

(7) 10000×g 离心 1 min, 收集管底部液体, 分光光度计测目的片段浓度, -20°C 保存备用。

3.2.2.5 重叠 PCR (overlap PCR) 的方法扩增 *Usp45-his-dmLTa-his* 片段

上述的回收的 *Usp45* 片段及 *his-dmLTa-his* 片段按照表 3-4 配制第一轮重叠体系进行扩增。按照重叠区域的 T_m 值确定退火温度, 扩增程序如表 3-3 所示, ②-④三个程序进行 7 个循环的扩增。

表 3-4 重叠 PCR 第一轮扩增体系

Table 3-4 Amplification system for the first round of overlapping PCR

组分	含量
PrimeSTAR	25 μL
<i>Usp45</i> 片段	40 ng
<i>his-dmLTa-his</i> 片段	40 ng
ddH ₂ O	补充至 50 μL

完成第一轮扩增后, 在产物中直接加入表 3-1 中的③及⑥引物, 按照表 3-3 所示扩增程序进行扩增, ②-④三个程序进行 30 个循环的扩增。

3.2.2.6 重叠产物 *Usp45-his-dmLTa-his* 片段的回收

按照 2.2.4 的方法回收片段。

3.2.2.7 乳酸乳球菌 pNZ8149 质粒的提取

从 -80°C 冰箱中取出冻存的 pNZ8149/NZ3900 乳酸球菌菌株, 平板划线于 BLElliker 固体培养板, 封口膜封住平板边缘, 30°C 温箱静置过夜后, 挑取单菌落于 GM17 液体培养基中, 30°C 静置培养过夜, 依据 OMEGA 公司的 Plasmid Mini Kit 试剂盒说明书提取质粒, 依据参考说明书步骤如下:

- (1) 取出 5 mL 菌液, 室温 12000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 收集菌体沉淀。
- (2) 加入 200 μL 20 mg/mL 的溶菌酶, 37°C 水浴锅作用 30 min (期间每 5 min 摇晃一次, 保证充分溶解细胞壁)。
- (3) 加入 250 μL Solution I, 移液枪重悬菌体沉淀。
- (4) 加入 250 μL Solution II, 轻轻颠倒混匀 4-6 次, 静置 2-3 min。
- (5) 加入 350 μL Solution III, 轻轻颠倒混匀, 直至形成白色絮状沉淀。
- (6) 室温 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液至结合柱中。

- (7) 室温 12000 r/min 离心 1 min, 弃去液体, 加入 550 μ L HBC Buffer。
- (8) 室温 12000 r/min 离心 1 min, 弃去液体, 加入 700 μ L DNA Wash Buffer。
- (9) 重复步骤 (8) 一次。
- (10) 弃去液体, 并将回收柱转移至干净 1.5 mL EP 管, 加入 20 μ L ddH₂O, 室温静置 2 min。
- (11) 10000 \times g 离心 2 min, 收集管底部液体, 分光光度计测质粒浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.2.2.8 目的片段 *Usp45-his-dmLTa-his* 和载体 pNZ8149 的双酶切与回收

使用限制性内切酶 KpnI、XbaI 对表达载体 pNZ8149 及重叠片段 *Usp45-his-dmLTa-his* 进行双酶切, 酶切体系如表 3-5 所示, 配置好的体系在 37 $^{\circ}$ C 温箱中反应 2h。

表 3-5 KpnI、XbaI 双酶切反应体系

组分	含量
质粒/片段	2 μ g
KpnI	2 μ l
XbaI	2 μ l
10 \times T buffer	5 μ l
ddH ₂ O	补充至 50 μ L

酶切产物回收: 反应完成后, 将所有产物加入 6 微升 6 \times DNA Loading buffer 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 以 DL5000 DNA Maker 显示条带大小, 在切胶仪下观察结果, 将大小正确的酶切产物胶回收纯化, 方法同 2.2.4, 将纯化的酶切产物 pNZ8149 片段与目的片段用于下一步连接。

3.2.2.9 酶切产物连接

使用上述回收的酶切产物, 按照表 3-6 配制 10 μ L 连接反应体系, 16 $^{\circ}$ C 过夜连接:

表 3-6 连接体系

组分	含量
----	----

线性化载体 pNZ8149	50 ng
基因片段	150 ng
T4 buffer	1 μ L
T4 连接酶	1 μ L
ddH ₂ O	补充至 10 μ L

3.2.2.10 NZ3900 感受态的制备

- (1) 从-80℃冰箱中取出冻存的 NZ3900 乳酸菌菌株，平板划线于 M17 平板，30℃厌氧培养
- (2) 挑取单克隆菌株接种于 5 mL GSGM17 液体培养基，30℃温箱静置过夜(12-24 h)。
- (3) 第二天，将上述菌液转接到 50 mL GSGM17 液体培养基，30℃温箱静置过夜(24 h)。
- (4) 第三天，将 50 mL 菌液转接到 400 mL GSGM17 液体培养基中，30℃继续静置培养，直至 OD₆₀₀ 为 0.2-0.3，约需 3 h。
- (5) 取出菌液，置于冰上静置 10 min，4℃ 6000×g 离心 20 min，弃上清，收集菌体沉淀；用 400 mL 预冷的 solution I 重悬菌体沉淀，冰浴 20 min。
- (6) 4℃ 6000×g 离心 20 min，弃上清，收集菌体沉淀；用 200 mL 预冷的 solution II 重悬菌体沉淀，冰浴 20 min。
- (7) 4℃ 6000×g 离心 20 min，弃上清，收集菌体沉淀；用 100 mL 预冷的 solution I 重悬菌体沉淀，冰浴 20 min。
- (8) 4℃ 6000×g 离心 20 min，弃上清，收集菌体沉淀；用 4 mL 预冷的 solution I 重悬菌体沉淀，分装于预冷的 1.5 mL EP 管，每管 40-100 μ L 保存于-80℃冰箱。

3.2.2.11 连接产物电转化乳酸乳球菌感受态细胞

- (1) 从-80℃冰箱中取出保存的 NZ3900 感受态细胞，置于冰上融化 5 min。
- (2) 将 10 μ L 重组产物加入到 100 μ L NZ3900 感受态细胞中，轻轻弹管壁混合，置于冰上 20 min。
- (3) 将混合菌液转移至事先预冷的电转杯中(注意：电转杯底部不要有气泡)，置于冰上 5 min。
- (4) 冰浴完成后，取出电转杯并擦干外壁水滴，迅速电击，电击参数：电压 2200V，

电阻 200 Ω ，电击时间 5 ms。

(5) 电击结束后，立即加入 900 μL 预冷的 GM17 电转恢复培养基，吹打混匀，转移至预冷的 1.5 mL EP 管，冰浴 5 min 后，转移至 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置培养 3 h。

(6) 室温 5000 r/min 离心 5 min，弃 900 μL 上清，剩余 100 μL 重悬菌体沉淀，涂布到 BLElliker 固体培养基上，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h，观察菌落形态。

3.2.2.12 阳性重组质粒的提取

从 BLElliker 固体培养板上挑取单菌落，接种于 2 mL GM17 液体培养基，30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜，第二天，将菌液转移至 10 mL GM17 液体培养基，30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜，提取质粒，具体步骤同 2.2.7，保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

3.2.2.13 PCR 鉴定

以上述提取的阳性重组质粒为模板，以①和②为上下游引物，进行 PCR 鉴定，反应体系如下表 3-7 所示。PCR 反应程序如表 3-8 所示，其中②-④三个程序设置 30 个循环。

表 3-7 PCR 扩增体系

Table 3-7 PCR amplification system

组分	含量
重组质粒	20 ng
P213 Mix	10 μL
PNZ8149-F	1 μL
PNZ8149-R	1 μL
ddH ₂ O	补充至 20 μL

表 3-8 PCR 扩增程序

Table 3-8 PCR amplification procedure

步骤	程序	时间
①	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min
②	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s
③	55 $^{\circ}\text{C}$	30 s
④	72 $^{\circ}\text{C}$	2 min
⑤	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min

3.2.2.14 测序鉴定

将 PCR 鉴定正确的质粒送去南京擎科生物科技有限公司测序，并将比对序列正确的阳性质粒命名为 pNZ8149-dmLTa。

3.2.2.15 细胞锚定肽 ACM 片段的获取

以上述 2.2.2 中提取的乳酸乳球菌 NZ3900 基因组为模板，利用表中⑦⑧两条引物进行扩增，体系配制如表 3-2 所示，扩增程序如表 3-3 所示。之后按照 2.2.4 方法进行切胶回收获得扩增片段。

3.2.2.16 pNZ8149-dmLTa-ACM 重组质粒的构建

将上述回收的 ACM 片段及 2.2.14 鉴定正确的质粒 pNZ8149-dmLTa，使限制性内切酶 XbaI 和 SacI 按照表 3-9 配制双酶切体系，按照 2.2.8 的方法进行双酶切并回收，之后按照 2.2.9 的方法进行连接，按照 2.2.11 方法进行电转化，按照 2.2.12 的方法阳性菌株质粒的提取，按照 2.2.13 及 2.2.14 的方法进行 PCR 及测序鉴定，鉴定正确的质粒命名为 pNZ8149-dmLTa-ACM，重组菌株命名为 LAB-dmLTa。

表 3-9 XbaI、SacI 双酶切反应体系

组分	含量
质粒/片段	2 μg
XbaI	2 μl
SacI	2 μl
10×M buffer	5 μl
ddH ₂ O	补充至 50 μL

3.2.2.16 pNZ8149-LTb-ACM 及 pNZ8149-FaeG-ACM 重组质粒的构建

以合成的 *his-LTb-his* 及 *his-FaeG-his* 片段为模板，分别利用上述的⑨⑩及⑪⑫两对引物引物分别扩增两片段。扩增体系的配置如表 3-2 所示，扩增程序的设置如表 3-3 所示，扩增完成后按照 2.2.4 方法进行切胶回收获得扩增片段。

his-LTb-his 片段、*his-FaeG-his* 片段及质粒 pNZ8149-dmLTa-ACM 的双酶切：使用 TaKaRa 的限制性内切酶 SpeI 和 XbaI 按照下表 3-10 配制双酶切体系，按照 2.2.8 的方法进行双酶切并回收，之后按照 2.2.9 的方法进行连接，按照 2.2.11 方法进行电

转化,按照 2.2.12 的方法阳性菌株质粒的提取,按照 2.2.13 及 2.2.14 的方法进行 PCR 及测序鉴定,鉴定正确的质粒分别命名为 pNZ8149-*Ltb*-ACM 和 pNZ8149-*FaeG*-ACM,重组菌株分别命名为 LAB-*Ltb* 和 LAB-*FaeG*,空载菌株命名为 LAB。对于四株 LAB 的长期储存,使用含有 15%脱脂牛奶的 M17 培养基并储存在-80°C。

表 3-10 *SpeI*、*XbaI* 双酶切反应体系

Table 3-10 Double digestion reaction system of *SpeI* and *XbaI*

组分	含量
质粒/片段	2 μ g
<i>SpeI</i>	2 μ l
<i>XbaI</i>	2 μ l
10 \times M buffer	5 μ l
ddH ₂ O	补充至 50 μ L

3.2.2.17 western blot 检测三株重组菌株的蛋白表达

三株重组菌株的诱导表达:将单个克隆的 LAB-dmLTA, LAB-LTB, LAB-faeG 和对照菌株 LAB 空载体分别接种于 GM17 液体培养基中静置培养 24 h,然后再按照 1:25 的比例转接于新鲜的 GM17 液体培养基中培养约 3-4 小时,当 OD₆₀₀ 值检测在 0.4 时,加入诱导剂 nisin,使其终浓度为 10 ng/mL,继续诱导培养 6 h。

蛋白样品的制备:诱导完成的菌液在室温下 12000 \times g 离心 10 min 收集菌体,用等量预冷的 PBS 洗涤沉淀后再次离心收集沉淀,反复 3 次,最后用 PBS 按照 1:10 的比例对菌体进行重悬。之后将重悬的菌液超声破碎菌体 15 次(破 10 秒,停 5 秒),直至液体清亮,破碎后的菌液于 4°C, 12000 \times g 离心 10 min,弃上清,沉淀用等量预冷的 PBS 重悬。将 5 \times 蛋白上样缓冲液与三株重组菌株及对照菌的重悬沉淀样品按照 1: 4 比例混匀,于 100°C 金属浴加热 10 min 后置于冰上,加样前瞬时离心 10 秒钟。以蛋白 Marker 作为对照检测蛋白分子量大小,泳道 1 是对照菌株 LAB 样品,泳道 2 分别为诱导后的三个重组菌株,所有样本添加到 12%的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳,先 80V 运行 30 分钟,等蛋白样品跑过浓缩胶后转 120V 运行 1 h 左右,等样品完全分离即可。

蛋白样品的转印:电泳完成后的凝胶先被转移到转膜液中,将滤纸也提前浸泡在转膜液中打湿。根据凝胶大小剪切大小相同的 PVDF 膜,并置于甲醇中活化,活化完成的 PVDF 膜同样转移到转膜液中。按照 Trans-Blot Turbo 蛋白转印系统的要求

安装转膜室，分别是负极-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-正极的顺序，接通电源根据目的蛋白大小确定转印时间（5-15 min）。

抗体孵育：转印完成后的 PVDF 膜被放于含有 5%BSA 的 TBST 溶液中，室温环境下封闭 2 h。封闭完成后转移到 1：5000 稀释的鼠抗 his-tag 抗体中，使用含有 5%BSA 的 TBST 溶液作为稀释液，在 4℃孵育过夜（12 h），之后用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。再将 PVDF 膜转移到 1：8000 稀释的辣草酸过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗鼠 IgG 二抗中，同样使用含有 5%BSA 的 TBST 溶液作为稀释液，在 4℃孵育 12 h；之后用 TBST 洗涤 3 次。

蛋白条带检测：将底物显色试剂盒（Clarity Western ECL Substrate）中的 A、B 液等比例混合，之后加到抗体孵育完成后的 PVDF 膜上，避光显现几分钟，使用化学发光成像系统检测蛋白条带。

3.2.2.18 重组乳酸菌生长曲线测定

将三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 一共四株菌株的甘油菌从 -80℃冰箱取出后，吸取 10 μL 于 BLElliker 固体培养基上分区划线，于 30℃厌氧培养 24h 后挑取单菌落划线传代。分别从四个菌株各自传代培养的 BLElliker 培养基上挑取单个克隆接种于 GM17 液体培养基中静置培养 24h，然后再按照 1:25 的比例转接于新鲜的 GM17 液体培养基中，放入 30℃静置培养 12h。刚转接后的培养液为 0h，从 0h 开始，每小时检测一次菌液的 OD₆₀₀ 值，并以时间为横坐标，OD₆₀₀ 值为纵坐标做折线图，即得到该菌的生长曲线图。不含载体的菌株 NZ3900 同样采用上述方法进行培养和检测生长曲线，只是利用 M17 固体培养基进行复苏和传代，利用 M17 液体培养基进行生长曲线的测定。

3.2.2.19 重组乳酸菌活菌数和时间的关系曲线测定

利用上述 2.2.1 中的方法对三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 以及不含载体的菌株 NZ3900 进行复苏和培养，之后每小时吸取 1 mL 菌液利用平皿进行活菌 CFU 计数检测，检测步骤如下所示：

（1）将菌液按照 1：10 的稀释比例进行梯度稀释，吸取 100 μL 的菌液加入含有 900 μL 灭菌 PBS 的 1.5 mL EP 管中进行稀释，枪头不伸入液面以下，利用涡旋仪涡旋混匀 30s，此时为 10⁻¹ 次方稀释；

（2）从上述得到的 10⁻¹ 倍数稀释菌液中吸取 100 μL 的菌液加入含有 900 μL 灭

菌 PBS 的 1.5 mL EP 管中进行稀释,枪头不伸入液面以下,利用涡旋仪涡旋混匀 30s,此时为 10^{-2} 次方稀释;

(3) 以此类推,稀释到 10^{-7} 次方,之后将每个次方的菌液吸取 100 μ L 均匀涂布于固体培养基上 30°C 厌氧培养 24 h。

(4) 以平板上出现 30-300 个菌落数的稀释度为计数标准,推算出原始菌液的活菌数量即为该时间点的菌液中活菌数量,以时间为横坐标,活菌数的 \log_{10} 值为纵坐标作折线图,即得到该菌活菌数和时间的关系曲线。

3.2.2.20 重组乳酸菌 pH 值和时间的关系曲线测定

利用上述 2.2.1 中的方法对三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 以及不含载体的菌株 NZ3900 进行复苏和培养,之后每小时吸取 1 mL 菌液进行 pH 值检测,以时间为横坐标,菌液的 pH 值为纵坐标作折线图,即得到重组乳酸菌 pH 值和时间的关系曲线。

3.2.2.21 重组乳酸乳球菌耐酸碱能力检测

分别配制 pH 值在 1-12 的液体培养基,灭菌后备用。利用上述 2.2.1 中的方法对三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 以及不含载体的菌株 NZ3900 进行复苏和培养,只是转接时按照 1:25 的比例分别转接于不同 pH 值的液体培养基中进行培养,30°C 静置培养 4 h,之后分别按照 2.2.2 中的方法进行活菌 CFU 计数。以菌液的 pH 值为横坐标,活菌数的 \log_{10} 值为纵坐标作柱状图。

3.2.2.22 重组乳酸乳球菌不同保护剂的保存期试验

按照上述 2.2.1 中的方法对三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 以及不含载体的菌株 NZ3900 进行复苏和培养,分别收集转接后 4 h 时的菌液,按照下述 4 种条件进行保存。

原液:将收集的菌液吸取 10 mL 转移至 15 mL 离心管中,吸取两份分别储存于 4°C 和 -20°C 中。

甘油:将收集的菌液吸取 10 mL 加入 10 mL 灭菌的 50% 甘油溶液中混匀,分成两份转移至 15 mL 离心管中,分别储存于 4°C 和 -20°C 中。

明胶:将收集的菌液吸取 10 mL 加入 10 mL 灭菌的明胶溶液中混匀,分成两份转移至 15 mL 离心管中,分别储存于 4°C 和 -20°C 中。

脱脂乳：将收集的菌液吸取 20 mL 在 4℃预冷的离心机中 3000 r/min 离心 10 min，之后用 20 mL 灭菌后的 15%脱脂乳进行重悬，分成两份转移至 15 mL 离心管中，分别储存于 4℃和-20℃中。

分别在第 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 周进行一次活菌计数；以保存的周数为横坐标，以活菌数的 log₁₀ 值为纵坐标作折线图。

3.2.2.23 重组乳酸乳球菌耐药情况检测

利用药敏纸片法检测重组乳酸乳球菌对 19 种常见抗生素的耐药情况，实验步骤如下：利用上述 2.2.1 中的方法对三株重组菌株 LAB-dmLTa、LAB-LTb、LAB-FaeG 和空载菌株 LAB 以及不含载体的菌株 NZ3900 进行复苏和培养，培养至对数生长期时，各吸取 100 μL 均匀涂布于 BLElliker 培养基上，此时每个平皿上的菌量约为 1×10⁸ CFU，之后将药敏片贴在培养基上，30℃厌氧培养 24 h 后检测结果，并根据表 4-1 进行结果判读。

表 3-11 抗生素种类及判定标准

Table 3-11 Antibiotic types and criteria

药品名	判定标准 (mm)		
	耐药	中介	敏感
四环素	≤11	12-14	≥15
氨苄西林	≤13	14-16	≥17
青霉素 G	≤14	15-18	≥19
丁胺卡那	≤14	15-16	≥17
氧氟沙星	≤12	13-15	≥16
诺氟沙星	≤12	13-16	≥17
复方新诺明	≤10	11-15	≥16
庆大霉素	≤12	13-14	≥15
环丙沙星	≤15	16-20	≥21
多粘菌素 B	≤08	09-11	≥12
大观霉素	≤14	15-17	≥18
克林霉素	≤14	15-20	≥21
氯霉素	≤12	13-17	≥18
麦迪霉素	≤13	14-17	≥18
哌拉西林	≤17	18-20	≥21
链霉素	≤11	12-14	≥15
红霉素	≤13	14-23	≥24
头孢曲松	≤19	20-22	≥23
头孢噻肟	≤22	23-25	≥26

3.3 结果

3.3.1 重组乳酸菌的构建

3.3.1.1 重组乳酸菌表面展示抗原构建方案

本研究利用乳酸乳球菌本身的 *Usp45* 分泌跨膜肽基因序列作为外源蛋白的分泌信号肽，具有更好的适配性，促进外源蛋白的表达和分泌，将其插入抗原蛋白的 5' 端替代抗原本身的信号肽。ACM 为一段由三个重复 *Lysm* 基因序列编码的多肽片段，同样来源于乳酸乳球菌，是一段良好的非共价细胞壁连接肽，能够将抗原蛋白锚定在乳酸乳球菌细胞壁表面，从而实现外源蛋白的表面展示，将其插入抗原蛋白的 3' 端。最终乳酸乳球菌表达外源蛋白的质粒构建方案示意图如下图 3-4 所示；乳酸乳球菌表面展示抗原蛋白的效果示意图如下图 3-5 所示：

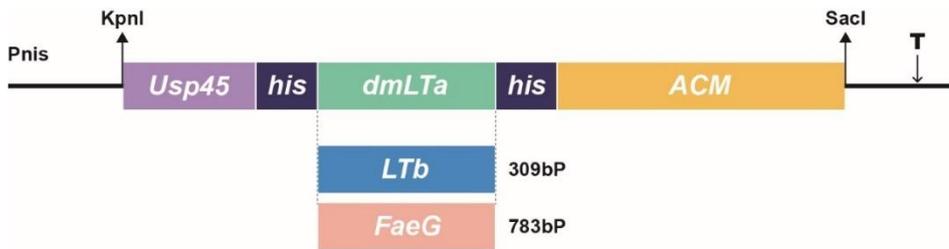


图 3-4 重组乳酸菌构建方案示意图

Fig. 3-4 Schematic diagram of the construction scheme of recombinant lactic acid bacteria

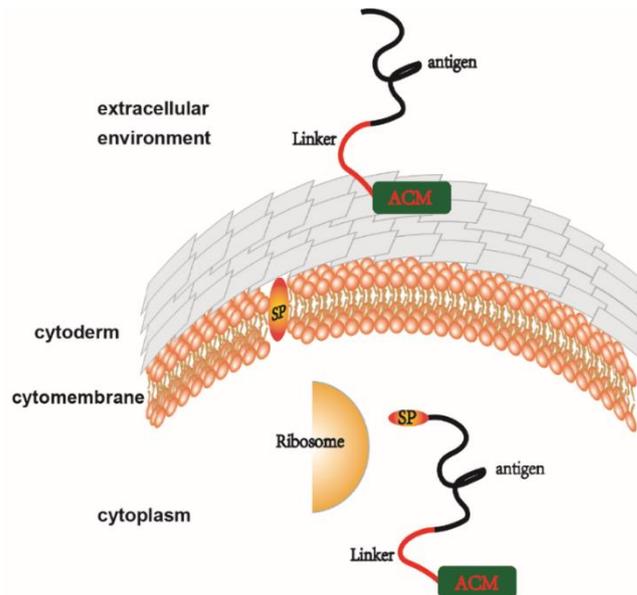


图 3-5 重组乳酸菌表面展示抗原蛋白示意图

Fig. 3-5 Schematic representation of antigen displayed on the surface of recombinant LAB

3.3.1.2 *Usp45* 及 *his-dmLTa-his* 片段的扩增及重叠

利用表 3-1 中③④、⑤⑥两对引物分别扩增得到大小为 119 bp 的 *Usp45* 片段及 774 bp 的 *his-dmLTa-his* 片段，之后通过 over-lap PCR 的方法，利用③⑥两条引物将两段片段进行重叠，得到大小为 867 bp 的 *Usp45-his-dmLTa-his* 片段。

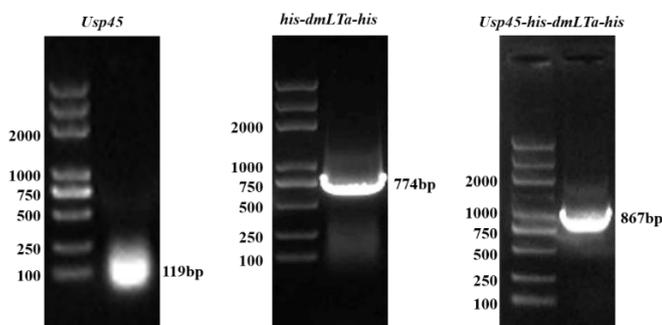
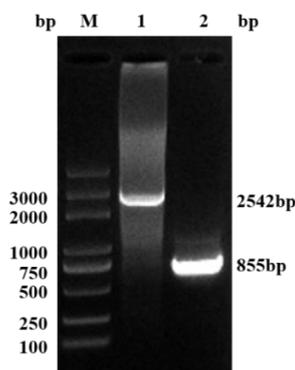


图 3-6 *Usp45* 及 *his-dmLTa-his* 片段的 PCR 扩增及重叠

Fig. 3-6 PCR amplification and overlap of *Usp45* and *his-dmLTa-his* fragments

3.3.1.3 pNZ8149 及 *Usp45-his-dmLTa-his* 片段的双酶切

使用限制性内切酶 KpnI、XbaI 对表达载体 pNZ8149 及重叠片段 *Usp45-his-dmLTa-his* 进行双酶切，分别获得了大小为 2542 bp 及 855 bp 大小的条带，如图 3-7 所示。



M, maker; 1, pNZ8149 双酶切产物; 2, *Usp45-his-dmLTa-his* 双酶切产物

图 3-7 pNZ8149 及 *Usp45-his-dmLTa-his* 片段的双酶切

Fig. 3-7 Double digestion of pNZ8149 and *Usp45-his-dmLTa-his* fragments

3.3.1.4 阳性转化子的菌落形态

利用电转将连接产物转化到 NZ3900 感受态中，并利用电转恢复培养基恢复一段时间后涂布于 BLElliker 固体培养基上，长出的黄色菌落即为阳性转化子，挑取黄色菌落进行鉴定。

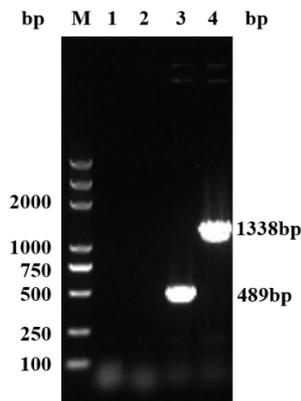


图 3-8 重组乳酸乳球菌在 BLElliker 固体培养基上的菌落形态

Fig. 3-8 Colony morphology of recombinant *Lactococcus lactis* on BLElliker medium

3.3.1.5 PCR 鉴定重组质粒 pNZ8149-dmLTa

利用①和②为上下游引物进行 PCR 鉴定，重组质粒的条带大小为 1338 bp，跟预期相同，证明质粒构建正确。



M, maker; 1, 阴性对照; 2, NZ3900; 3, pNZ8149 空载质粒; 4, pNZ8149-dmLTa 阳性菌落

图 3-9 重组质粒 pNZ8149-dmLTa 的 PCR 鉴定

Fig. 3-9 PCR identification of recombinant plasmid pNZ8149-dmLTa

3.3.1.6 测序鉴定

将 PCR 鉴定鉴定正确的质粒送去测序，并利用 SnapGene 软件进行比对，将鉴定正确的质粒分别命名为 pNZ8149-dmLTa。

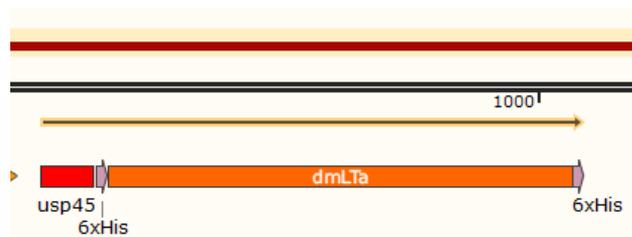


图 3-10 重组质粒 pNZ8149-dmLTa 的测序鉴定

Fig. 3-10 Sequencing identification of recombinant plasmid pNZ8149-dmLTa

3.3.1.7 ACM 片段的扩增

利用表中⑦⑧两条引物扩增得到大小为 603 bp 的 ACM 基因片段，之后进行胶回收。

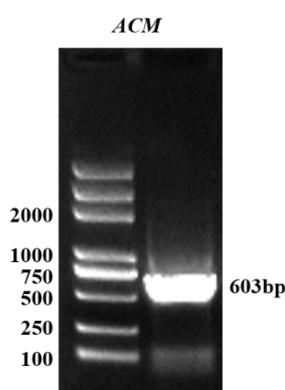


图 3-11 ACM 片段的扩增

Fig. 3-11 Amplification of ACM fragments

3.3.1.8 pNZ8149-*dmLTa* 及 ACM 片段的双酶切

将上述回收 ACM 片段及鉴定正确的质粒 pNZ8149-*dmLTa*，使用限制性内切酶 XbaI 和 SacI 进行双酶切，得到了大小为 3378 bp 和 595 bp 的两个线性片段，进行连接反应并转化至 NZ3900 感受态。

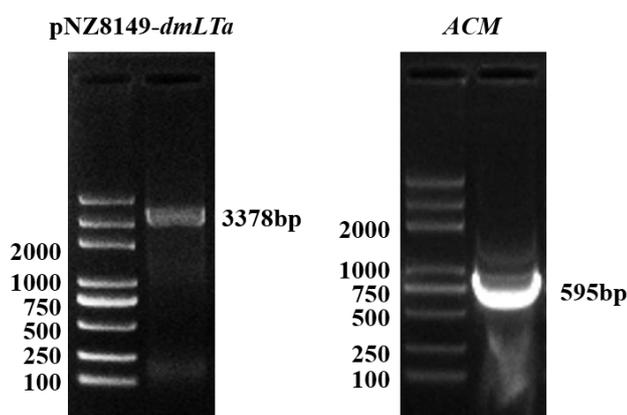


图 3-12 pNZ8149-*dmLTa* 及 ACM 片段的双酶切

Fig. 3-12 Double digestion of pNZ8149-*dmLTa* and ACM fragments

3.3.1.9 PCR 鉴定重组质粒 pNZ8149-*dmLTa*-ACM

利用①和②为上下游引物进行 PCR 鉴定，重组质粒的扩增条带大小为 1920 bp，跟预期相同，证明质粒构建正确。

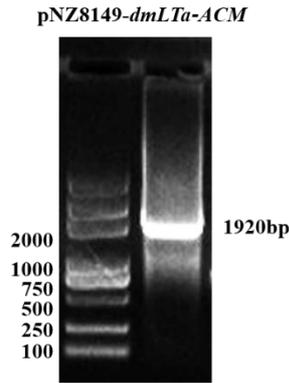


图 3-13 重组质粒 pNZ8149-*dmLTa-ACM* 的 PCR 鉴定

Fig. 3-13 PCR identification of recombinant plasmid pNZ8149-*dmLTa-ACM*

3.3.1.10 测序鉴定

将 PCR 鉴定正确的质粒送去测序，并利用 SnapGene 软件进行比对，将鉴定正确的质粒命名为 pNZ8149-*dmLTa-ACM*，重组菌株命名为 LAB-*dmLTa*。

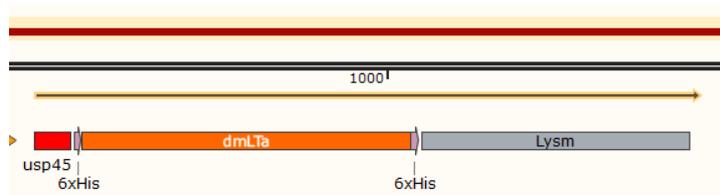


图 3-14 重组质粒 pNZ8149-*dmLTa-ACM* 的测序鉴定

Fig. 3-14 Sequencing identification of recombinant plasmid pNZ8149-*dmLTa-ACM*

3.3.1.11 *his-LTb-his* 及 *his-FaeG-his* 片段 PCR 扩增结果

利用⑨⑩、⑪⑫两对引物分别扩增得到 363 bp 的 *his-LTb-his* 的片段和大小为 837 bp 的 *his-FaeG-his* 片段，如下图 3-15 所示

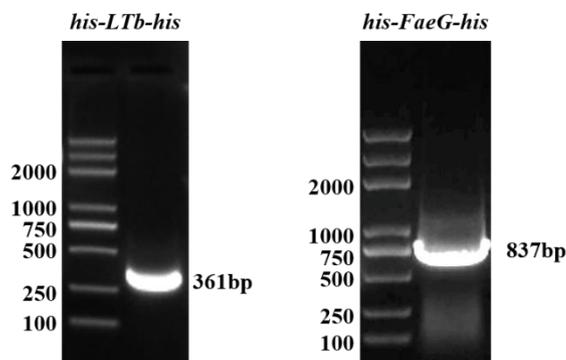


图 3-15 *his-LTb-his* 及 *his-FaeG-his* 片段的扩增

Fig. 3-15 Amplification of *his-LTb-his* and *his-FaeG-his* fragments

3.3.1.12 pNZ8149-*dmLTa*-ACM、*his-LTb*-*his* 及 *his-FaeG*-*his* 片段双酶切结果

将上述回收的 *his-LTb*-*his* 片段、*his-FaeG*-*his* 片段及质粒 pNZ8149-*dmLTa*-ACM 分别使用限制性内切酶 SpeI 和 XbaI 进行双酶切，得到了大小为 3208 bp、355 bp 和 829 bp 的三个线性片段，分别进行连接反应并转化至 NZ3900 感受态。

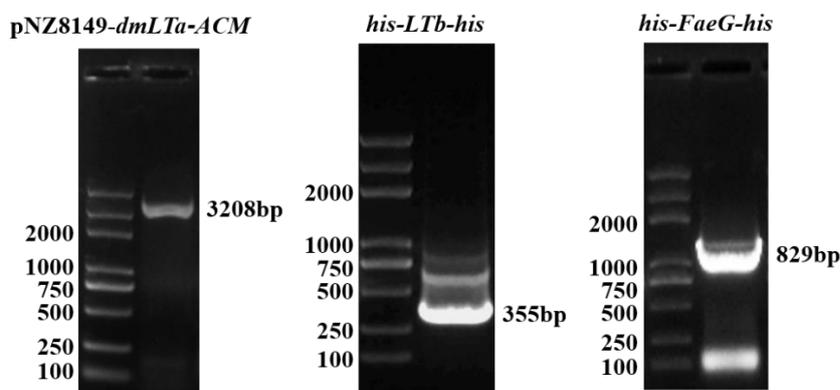
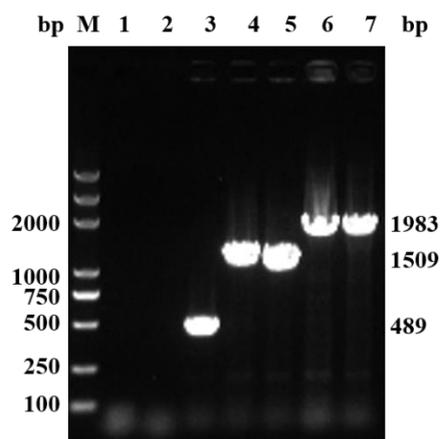


图 3-16 pNZ8149-*dmLTa*-ACM、*his-LTb*-*his* 及 *his-FaeG*-*his* 片段的双酶切

Fig. 3-16 Double digestion of pNZ8149-*dmLTa*-ACM, *his-LTb*-*his* and *his-FaeG*-*his* fragments

3.3.1.13 重组质粒 pNZ8149-*LTb*-ACM 和 pNZ8149-*FaeG*-ACM 的 PCR 鉴定结果

利用①和②为上下游引物进行 PCR 鉴定，重组质粒 pNZ8149-*LTb*-ACM 和 pNZ8149-*FaeG*-ACM 的条带大小分别为 1509 bp 和 1983 bp，跟预期相同，证明质粒构建正确。



M, maker; 1, 阴性对照; 2, NZ3900 ; 3, pNZ8149 空载质粒; 4、5, 重组质粒 pNZ8149-*LTb*-ACM; 6、7, 重组质粒 pNZ8149-*FaeG*-ACM

图 3-17 重组质粒 pNZ8149-*LTb*-ACM 和 pNZ8149-*FaeG*-ACM 的 PCR 鉴定

Fig. 3-17 PCR identification of recombinant plasmid pNZ8149-*LTb*-ACM and pNZ8149-*FaeG*-ACM

3.3.1.14 重组质粒 pNZ8149-LTb-ACM 和 pNZ8149-FaeG-ACM 的测序鉴定结果

将 PCR 鉴定正确的质粒送去测序，并利用 SnapGene 软件进行比对，将鉴定正确的质粒分别命名为 pNZ8149-LTb-ACM 和 pNZ8149-FaeG-ACM，重组菌株分别命名为 LAB-LTb 和 LAB-FaeG。

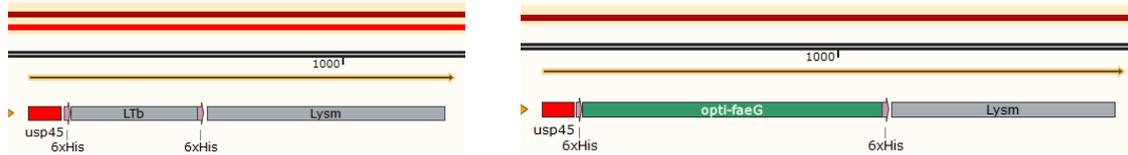


图 3-18 重组质粒 pNZ8149-LTb-ACM 和 pNZ8149-FaeG-ACM 的测序鉴定

Fig. 3-18 Sequencing identification of recombinant plasmid pNZ8149-LTb-ACM and pNZ8149-FaeG-ACM

3.3.2 三株重组乳酸菌的表达鉴定

本研究通过非共价连接的方式将抗原锚定在乳酸菌细胞壁表面，从而实现外源蛋白在乳酸菌表面的稳定展示。蛋白印迹法检测三株重组菌株的外源蛋白表达情况，其中 1 号泳道为诱导后的空载菌株样品，2 号泳道为诱导后的三株重组菌株样品，使用标签抗体 His-tag 抗体进行检测。结果如图 3-19 所示，分别检测到大小为 54 kDa (LAB-dmLTa)，37.9 kDa (LAB-LTb)，53.4 kDa (LAB-FaeG) 的条带，证明三株重组菌株的外源蛋白均正确表达，并且所使用的样品为破碎后的菌体沉淀，表明蛋白表达在菌体的表面，与预期相同。

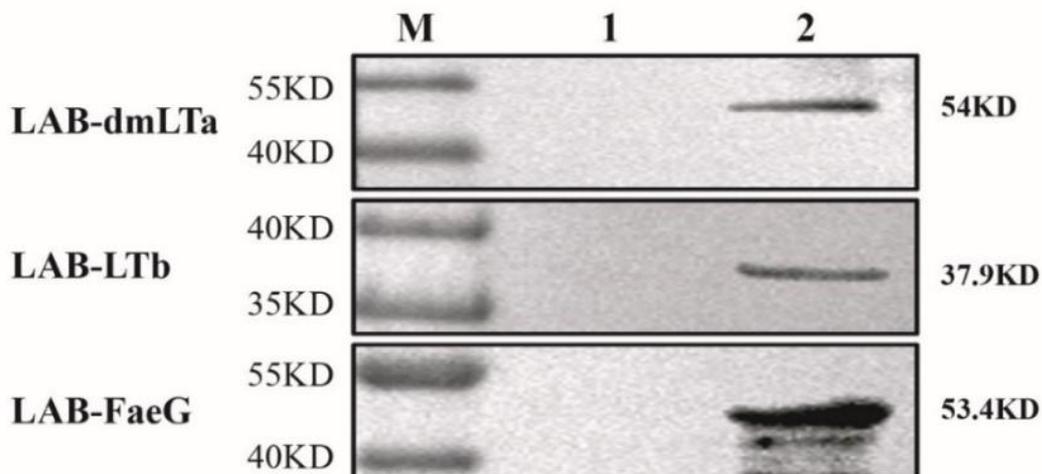


图 3-19 三株重组乳酸菌的 WB 结果

Fig. 3-19 WB results of three recombinant Lactobacillus strains

3.3.3 重组乳酸乳球菌生长曲线

根据图 3-20 所示，三株重组乳酸菌的生长情况相似，对数生长期均在 2-6 h 之间，6 h 之后进入平台期；而空载菌株的对数生长期在 3-7 h 之间，7 h 之后进入平台期相比于重组菌株晚了一个小时。不含有质粒的菌株 NZ3900 的生长情况较差，OD₆₀₀ 值始终在 0.5 以下。

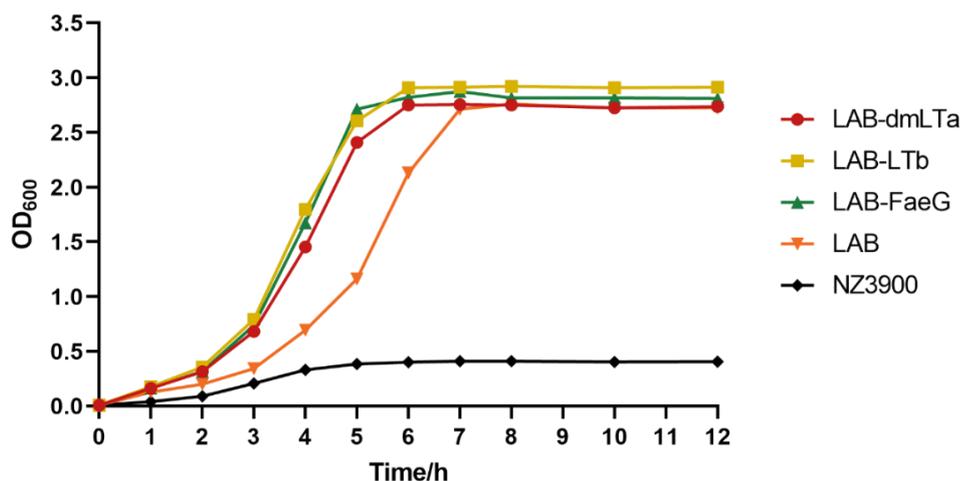


图 3-20 重组乳酸乳球菌生长曲线

Fig. 3-20 Growth curve of recombinant *L. lactis*

3.3.4 重组乳酸菌活菌数和时间的关系曲线

图 3-21 显示了活菌数与时间的关系，从图中可以看出，三株重组菌株以及空载菌株过夜摇菌的菌液转接后的初始菌量在 10^8 CFU 左右，菌株的活菌量峰值保持在 10^9 次方左右，在 6 h 达到峰值，之后继续培养至 12 h，活菌数基本保持不变。不含质粒的菌株过夜摇菌的菌液转接后的初始菌量在 10^7 次方左右，菌株的活菌量峰值保持在 10^8 次方左右，在 3 h 时基本达到峰值，之后继续培养至 12 h，活菌数略微升高，但继续升高的程度不大。与上述生长曲线结合来看，重组菌处于对数生长期中期时（4 h），活菌数约为 1×10^9 CFU/mL，该菌到达平台期时（6 h），活菌数约为 4×10^9 CFU/mL。

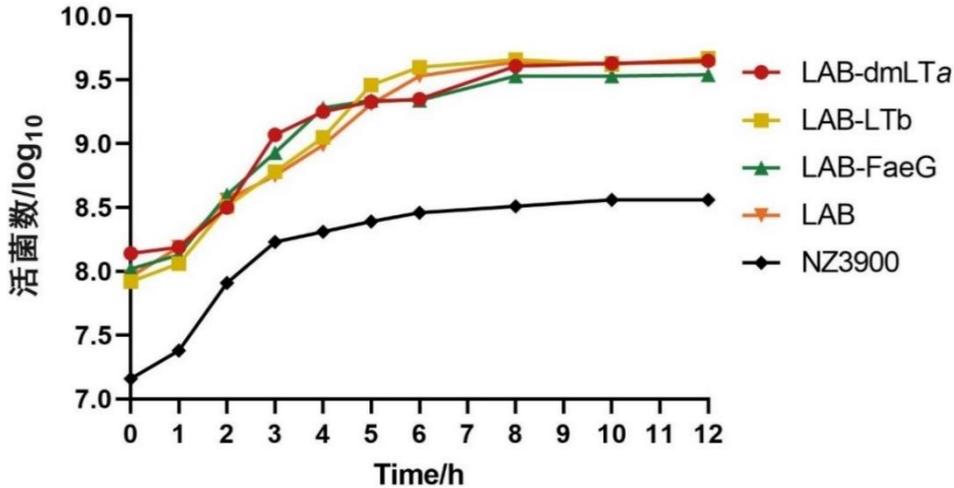


图 3-21 重组乳酸菌活菌数和时间的关系曲线

Fig. 3-21 Curve of the relationship between the viable number of recombinant Lactobacillus and time

3.3.5 重组乳酸菌 pH 值和时间的关系曲线

图 3-22 所示为乳酸乳球菌在生长期间的 pH 值变化情况，空白培养基的 pH 值在 7.2 左右，从图中可以看出，刚转接完（0 h）的初始 pH 值在 7.16 左右，与空白培养几乎没有差异。三株重组菌株以在达到平台期之前，菌液的 pH 值在持续下降，最终在转接后 5 小时稳定在 5.7 左右；空载菌株 LAB 存在相同的趋势，但其 pH 值稳定的时间为转接后 6 小时，比重组菌株迟了一个小时，这与生长曲线的结果相似，并且 pH 值最终稳定在 6.0 左右，略高于重组菌株。不含质粒的 NZ3900 菌株 pH 值基本保持不变甚至略微有一点升高，初始 pH 值为 7.27，终末 pH 值在 7.33，这与重组菌株的情况有较大的差异。

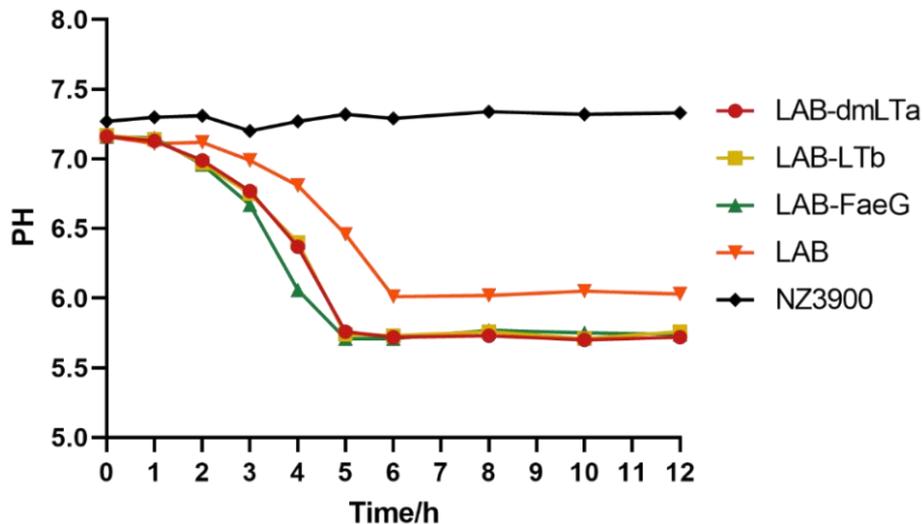


图 3-22 重组乳酸菌 pH 值和时间的关系曲线

Fig. 3-22 Curve of pH and time in recombinant lactic acid bacteria

3.3.6 重组乳酸菌抗逆性检测情况

乳酸乳球菌耐酸碱测试如下图 3-23 所示，所有菌株的趋势基本相同，所有菌株在 pH 值为 1 和 2 的强酸溶液中均不能存活，在 pH 值 6-8 之间时生长情况最好，达到最高的活菌数。当本菌 pH 值在 4-5 和 9-10 两个区间的溶液中时，情况基本相同，活菌数下降了一个数量级，由 10^9 降低至 10^8 ，而 pH 值在 11-12 时降低两个数量级，pH 为 3 时降低 3-4 个数量级，并且重组菌株、空载菌株和不含质粒的菌株情况基本相同。

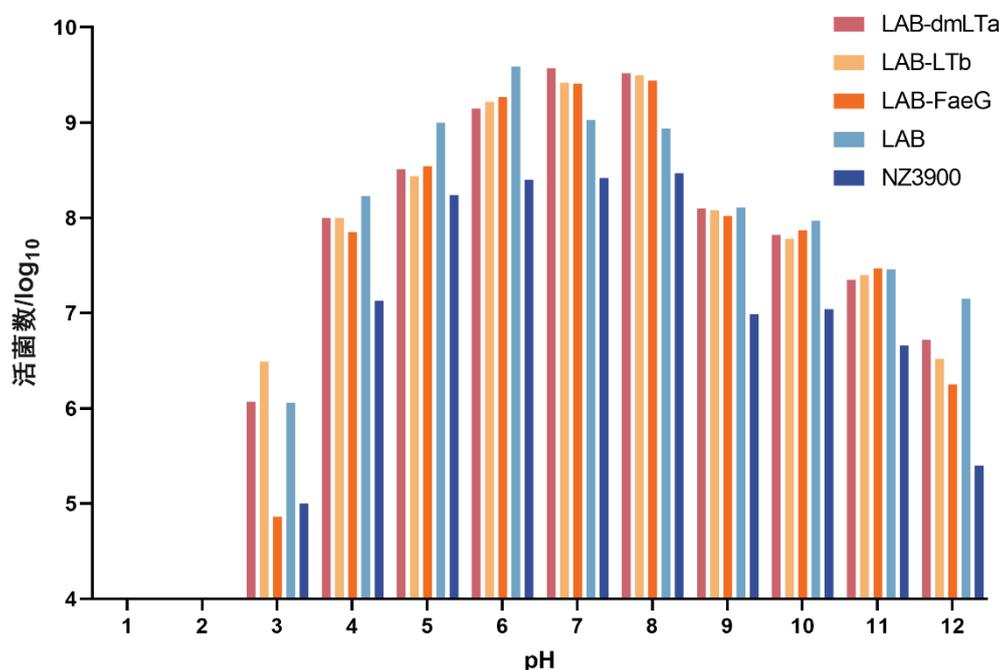


图 3-23 重组乳酸菌耐酸碱情况

Fig. 3-23 Acid-base resistance of recombinant lactic acid bacteria

3.3.7 重组乳酸乳球菌在不同保护剂下的保存期情况

不同保护剂下的保存期试验结果如图 3-24 和 3-25 所示，分别选择了原培养基、25%甘油、明胶以及 15%脱脂奶作为保护剂探究对活菌的保护作用。结果发现，在 4℃ 环境下，脱脂乳作为保护剂时，重组菌株、空载菌株以及不含质粒的菌株活菌数在 4 周内都降低了一个数量级；在 4 周到 20 周之间，活菌数持续下降，至 20 周时，重组菌株及空载菌株的活菌数降低了 4 个数量级，不含质粒的菌株活菌数降低了两个数量级。在其余三种保存条件下，重组乳酸菌及空载菌株在一个月內全部死亡，反而不含质粒的菌株在不含保护剂和明胶作为保护剂的条件下，在 12 周内只降低了

一个数量级；明胶作为保护剂的情况下，20 周内降低了 2 个数量级，不含保护剂的情况下，20 周内降低了 4 个数量级。

在-20℃的保存环境下，脱脂乳作为保护剂的表现效果最好，所有菌株在 8 周内活菌数几乎保持不变，在 20 周内活菌数存在轻微下降，有一半的活菌发生了死亡，但菌量仍保持在 10^9 以上。25%甘油作为保护剂同样具有一定的效果，大部分含有质粒的菌株在 4 周内活菌数几乎保持不变，在 12 周内只降低了一个数量级，不含质粒的菌株在 20 周内有一定降低，但降低程度不大。不含保护剂的情况下菌株在 6-8 周时几乎全部死亡，不含质粒的菌株在 20 周内降低了一个数量级；明胶作为保护剂的情况下，含有质粒的菌株在 3 周内快速降低了 4 个数量级，在 16 周内全部死亡，不含质粒的菌株在 20 周内降低了两个数量级。

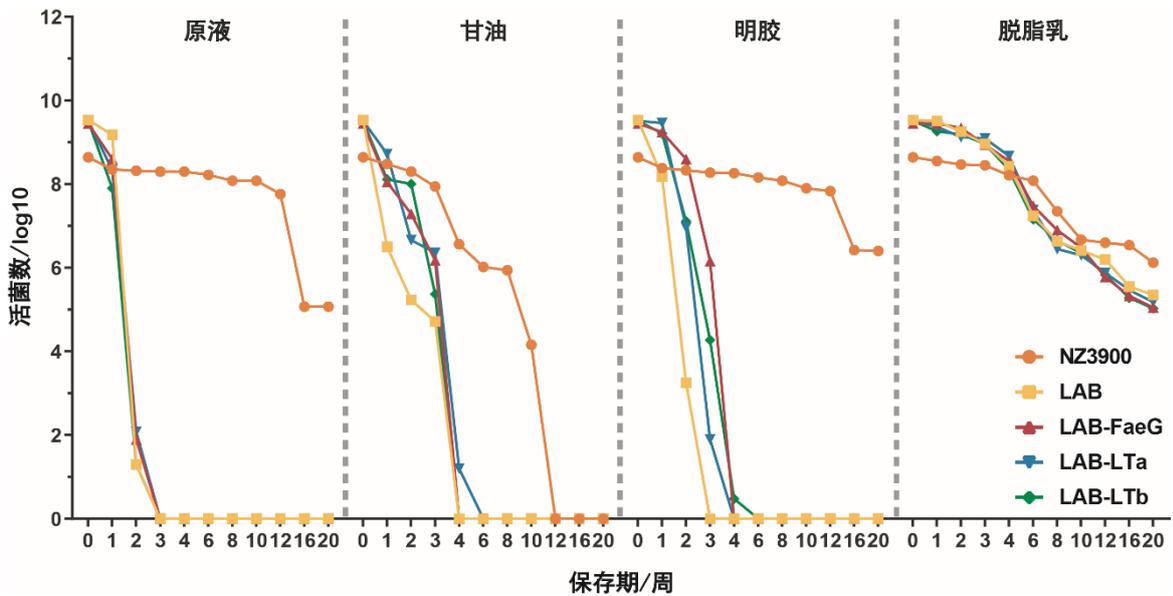


图 3-24 重组乳酸菌在不同保护剂下的保存期情况 (4°C)

Fig. 3-24 shelf life of recombinant lactic acid bacteria under different protective agents (4°C)

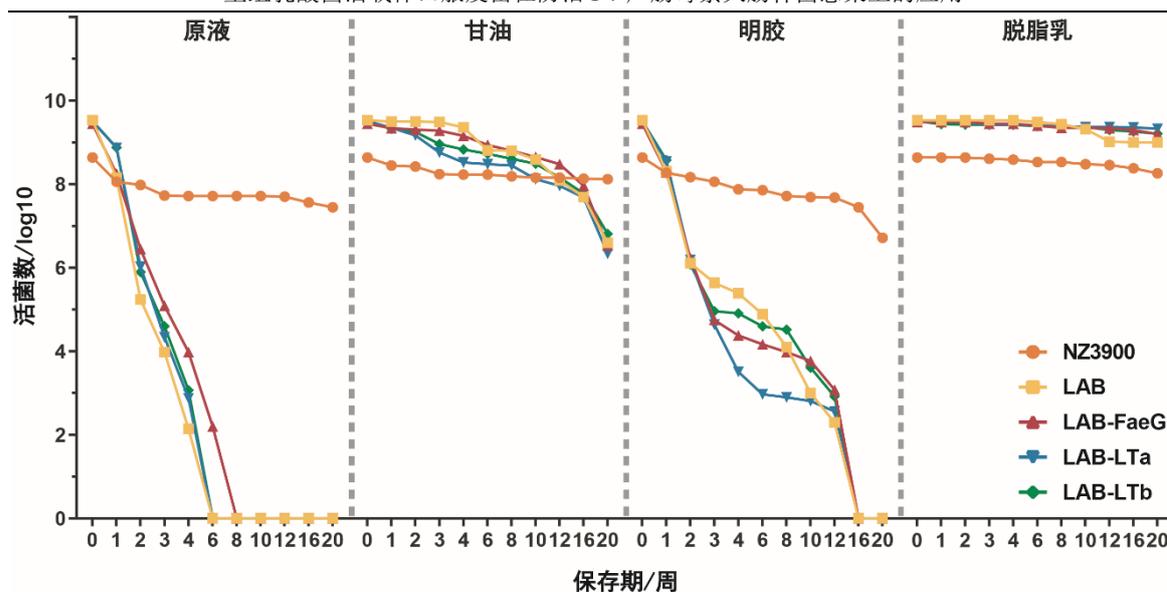


图 3-25 重组乳酸菌在不同保护剂下的保存期情况 (-20°C)

Fig. 3-25 shelf life of recombinant lactic acid bacteria under different protective agents (-20°C)

3.3.8 重组乳酸乳球菌耐药情况检测

重组乳酸乳球菌、空载菌株及不含质粒的菌株耐药情况如表 3-12 所示，含有质粒的菌株与不含质粒的菌株相比，结果基本相同，所有菌株均对诺氟沙星，复方新诺明，环丙沙星三种药物耐药，对丁胺卡那及多粘菌素 B 两种抗生素处于耐药拐点内，而对其余药物均敏感。

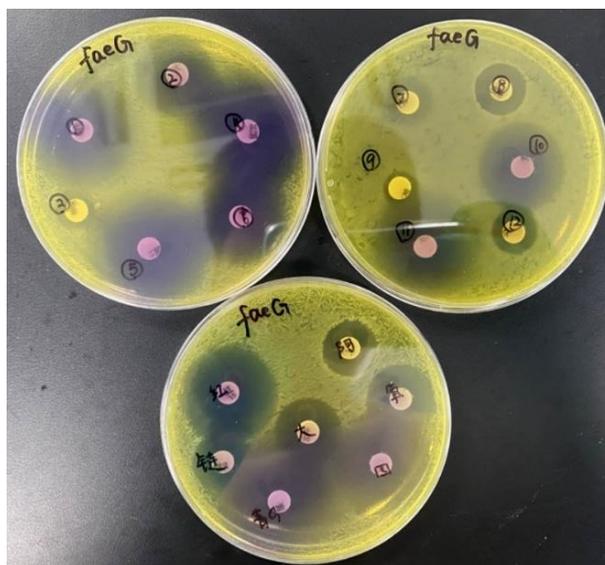


图 3-26 药敏纸片法检测重组乳酸乳球菌耐药性示意图

Fig. 3-26 Schematic diagram of drug susceptibility disk method to detect drug resistance of recombinant *L. lactis*

表 3-12 重组乳酸菌耐药情况

Table 3-12 Drug resistance of recombinant lactic acid bacteria

药品名	NZ3900	LAB	LAB-dmLTa	LAB-LTb	LAB-FaeG	结果
四环素	23	25	23	24	23	敏感
氨苄西林	22	23	22	23	25	敏感
青霉素 G	25	27	24	25	25	敏感
丁胺卡那	17	15	15	16	17	中介
氧氟沙星	21	23	22	23	22	敏感
诺氟沙星	10	11	12	11	10	耐药
复方新诺明	7	7	8	7	7	耐药
庆大霉素	16	16	15	15	15	敏感
环丙沙星	12	12	13	13	11	耐药
多粘菌素 B	9	8	10	11	9	中介
大观霉素	20	22	21	22	21	敏感
克林霉素	23	22	23	22	23	敏感
氯霉素	22	23	22	23	22	敏感
麦迪霉素	22	25	23	24	22	敏感
哌拉西林	22	25	23	25	23	敏感
链霉素	16	17	17	18	16	敏感
红霉素	28	31	29	28	31	敏感
头孢曲松	30	35	31	33	30	敏感
头孢噻肟	32	32	32	33	35	敏感

3.4 讨论

3.4.1 重组乳酸菌的构建

产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 能够导致包括人在内的多种幼龄动物发生腹泻和死亡, 其在仔猪群体中的广泛传播给养猪业造成巨大的经济损失 (Yu et al 2017)。在众多流行菌毛类型中, F4 菌毛阳性型 ETEC 可在新生仔猪、哺乳仔猪以及断奶仔猪中引起急性腹泻甚至是死亡, 相比于其他菌毛流行率更高, 造成的经济损失也更大 (Hur et al 2011)。菌株进入动物体内之后, 首先通过菌毛黏附小肠黏膜, 之后分泌不耐热 (LT) 和/或热稳定肠毒素 (ST) 引起腹泻或严重疾病 (Wen et al 2012)。F4 菌毛黏附素的主要亚基 FaeG 已被证明可诱导有效的菌毛特异性黏膜和全身免疫应答, 提示其具有作为开发针对 F4⁺ ETEC 感染的疫苗的候选免疫原的潜力 (Verdonck et al 2004, Liu et al 2013, Yang et al 2017, Yu et al 2017)。有研究者专门评估了不耐热肠毒素 LT 的 A、B 两个亚基, 结果表明, 两个亚基都具有天然的免疫原性及免疫保护作用, 在联合使用时效果优于任何单独一个亚基, 并且不需要形成 AB₅ 结构。因此,

在 ETEC 候选疫苗中包括这两个亚单位表位似乎比单独一个亚单位更可能促进对 LT 毒素的中和反应 (Norton et al 2012, Norton et al 2015b)。

自 20 世纪 90 年代以来, 乳酸菌 (LAB) 作为各种生物分子的潜在运输系统受到了越来越多的研究 (Berlec et al 2012, Rosales-Mendoza et al 2016)。因具有安全, 低成本, 使用方便, 易于遗传操作和工业化及诱导强烈的系统和黏膜免疫反应等优点, 使其获得了较多的黏膜疫苗研究者的关注 (LeCureux and Dean 2018)。研究表明, 经口腔或鼻腔黏膜接种了表达抗原的重组乳酸菌后, 对几种细菌及病毒都产生了有效的黏膜免疫反应及保护 (Wu and Chung 2007, Ribelles et al 2013, Rosales-Mendoza et al 2016)。因此, 本研究使用乳酸乳球菌作为表达载体, 将 F4⁺ETEC 的三个抗原展示在乳酸菌表面构建重组乳酸菌, 评估其作为防控 F4⁺ETEC 感染候选口服疫苗的潜力。

本研究突变了 LTA 亚基的第 63、72 位氨基酸对其进行减毒处理 (Feng et al 2005, Yu et al 2017, Zhang et al 2020), LTB 亚基保持不变, 选取 F4 (K88) 菌毛的主要黏附亚基 *faeG* 一共三个抗原基因, 并利用来源于乳酸菌本身的分泌跨膜肽基因 *Usp45* (Hernandez-Valdes et al 2020, Roslan et al 2020) 及细胞壁非共价连接基序 *LysM* (Buist et al 2008, Michon et al 2016, Pham et al 2019), 实现抗原在乳酸菌表面的展示, 利用密码子优化的方案提高表达量。利用上述方案, 本研究成功得到了三株分别表面展示上述三种抗原的重组乳酸菌。

3.4.2 乳酸乳球菌生长情况的分析

本研究发现, 含有质粒和不含质粒的乳酸乳球菌在生长上存在较大差异, 不含质粒的菌株始终低于含有质粒的菌株 1 个数量级, 并且在培养过程中其 pH 值保持不变。而重组菌株在培养过程中, 对数生长期以及到达平台期的时间比空载菌株早 1 h; 同时在发酵菌液的 pH 值检测结果中也有所体现, 重组菌株比空载菌株早 1 h 进入稳定期, 这表明重组菌株的生长性能相较于空载菌株更强。但是在活菌数的检测上重组菌株和空载菌株没有明显差异, 达到最大活菌量的时间基本相同, 菌量也相同。此外, 乳酸菌 pH 值与时间关系的检测结果表明, 乳酸乳球菌的培养过程是一种消耗乳糖产酸的过程, 在细菌的生长过程中, 菌液的 pH 值不断下降, 当降低到一定的程度时, 便反过来抑制细菌的生长, 即达到稳定期。

3.4.3 乳酸乳球菌抗逆性结果分析

从乳酸乳球菌耐酸碱检测结果来看，无论是否含有质粒的菌株，本菌主要适宜中性环境，能够耐受一定的酸碱波动，对碱性环境的耐受度要高于酸性环境，在强碱性溶液中都能保持一定量的存活，但是不能在强酸溶液中存活。因此，如果给药途径为口服，则需对给药动物进行胃酸中和或调整给药方法保证该菌顺利到达肠道发挥作用。同时，在制剂过程也要充分考虑这点，尽量给予菌株中性环境保持细菌的存活性。

3.4.4 重组乳酸菌保存条件的初步探索

根据结果显示，在两种保存条件中， -20°C 更适宜本菌的长期保存，在三种保护剂（甘油、明胶、脱脂乳）以及不用保护剂四种条件下，脱脂乳作为保护剂能够达到最理想的效果，在 20 周的保存期内保证该菌存活菌株的数量在一个数量级内，死亡率较小。因此，就目前的情况来看，使用 15%脱脂乳作为保护剂，同时储存在 -20°C 的环境中，在现阶段为本菌的最佳储存条件，同时对于养殖场来讲，也是一种较为容易实现的储存条件。

3.4.5 重组乳酸菌耐抗生素情况的检测

根据结果显示，本菌对大部分的常见抗生素均处于敏感状态，表明本菌不含有大部分抗生素的抗性基因，在使用过程中较为安全，传播抗性基因的风险较小，符合目前对载体菌株的筛选标准。同时，也有研究表明，无论是针剂还是口服药物，抗生素在肠道内存留的时间不久，主要是通过吸收入血发挥作用，因此，对于肠道中乳酸菌的杀伤作用不大，不会造成大量的乳酸菌完全死亡的情况。但同时也仍应注意，在使用本制剂的同时，也要尽量避免与抗生素联用，导致本制剂的效果受到影响，如果必须使用时，可以考虑错时使用（陈亮 et al 2023）。

3.5 小结

(1) 构建了三株表面展示外源抗原蛋白的重组乳酸乳球菌 LAB-dmLTa、LAB-LTb 和 LAB-FaeG, 并且重组质粒的存在并未影响乳酸乳球菌的生长, 反而使其生长活性更强。

(2) 重组乳酸乳球菌适宜在 pH=6-8 的环境下生长, 活菌量处于最高水平, 在弱酸 (pH=4-8) 和弱碱 (pH=9-10) 环境下菌量下降一个数量级, 在强酸 (pH=1-2) 环境下无法存活, 在强碱 (pH=11-12) 中分别下降 2-3 个数量级。

(3) 重组乳酸菌以 15% 脱脂牛奶作为保护剂, 储存环境在 -20°C 时能够保存 20 周, 活菌数无显著变化。

(4) 重组乳酸菌对大部分的常见抗生素均无耐药性, 仅对诺氟沙星, 复方新诺明, 环丙沙星三种抗生素耐药, 对丁胺卡那及多粘菌素 B 存在一定程度的耐药。

第四章 重组乳酸菌活载体口服疫苗的应用研究

4.1 前言

ETEC 能够导致仔猪发生剧烈腹泻、生长迟缓和脱水等症状(Fairbrother et al 2005, Xu et al 2015), 同时还具有传播迅速、发病率和死亡率均较高等特点, 给养殖场造成巨大的经济损失(Deep et al 2023)。目前在兽医临床上, 针对仔猪黄白痢主要还是使用抗生素进行防治。但随着抗生素在养殖上的滥用, 细菌耐药性等问题也日渐突出(Nirupama et al 2018), 导致抗生素在防控本病时的使用效果大幅度降低, 提高了临床上防控本病的成本, 给养殖场造成了损失。同时, 大肠埃希菌耐药株和携带耐药基因的质粒也可通过食物链传播给人类和其他动物(Manges and Johnson 2012), 造成更为严重的公共卫生事件, 世界各国都开始出台一系列的限抗禁抗政策对抗生素的使用进行管控, 我国也已于 2020 年 1 月 1 日起全面禁止在饲料中添加促生长类抗生素。

在药物防治受限的情况下, 疫苗接种被认为是减少 ETEC 腹泻影响的最有效和实用的方法, 可以在不同程度上阻碍发病过程(Dubreuil 2021)。目前临床上可供使用的疫苗种类主要是灭活疫苗, 但由于各地区之间 ETEC 的毒素及菌毛类型等差异较大(Liu et al 2014), 部分地区免疫效果并不明显(Hur and Lee 2012)。除个别灭活疫苗外, 临床上几乎没有其他类型的疫苗存在, 因此, 当前仍然急需一款适用于临床的新型疫苗防控 ETEC 导致的感染(Dubreuil 2021)。基于此, 本研究将上述构建的三株重组乳酸乳球菌等比进行混合, 并以 15%脱脂牛奶为保护剂, 开发了一种乳酸菌活载体的口服疫苗, 并利用小鼠感染模型、哺乳仔猪以及妊娠母猪等进行了动物实验, 验证了口服疫苗的实际使用效果。本疫苗通过口服的方式进行免疫, 避免了疫苗注射带来的应激反应, 同时利用黏膜免疫的高效优势, 进而发挥抵抗大肠杆菌感染的效果。

4.2 材料方法

4.2.1 材料

4.2.1.1 主要试剂及培养基

试剂	生产厂家
HE 染液	武汉百仟度生物科技有限公司
分化液	武汉百仟度生物科技有限公司
返蓝液	武汉百仟度生物科技有限公司
中性树胶	国药集团化学试剂有限公司

其余试剂及培养基详见第二章及第三章的 2.1.1

4.2.1.2 主要仪器设备

仪器	生产厂家
脱水机	武汉俊杰电子有限公司
包埋机	武汉俊杰电子有限公司
冻台	武汉俊杰电子有限公司
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司
组织摊片机	上海徠卡仪器有限公司
烤箱	天津市莱玻璃仪器设备有限公司
防脱载玻片	世泰
正置光学显微镜	日本尼康
成像系统	日本尼康

其余仪器详见第二章及第三章的 2.1.2

4.2.2 方法

4.2.2.1 重组乳酸菌活载体口服疫苗的制备

按照上述 3.2.2.17 中的方法进行三株重组菌株的诱导表达, 诱导完成后通过平皿进行活菌数测定, 调整有效菌浓度至 3×10^9 CFU/mL 进行 1: 1: 1 的比例混合, 混合后 3000 r/min 离心 10 min, 等量 PBS 洗涤菌体 1 次, 利用灭菌后的 15% 脱脂牛

奶重悬并进行 10 倍浓缩，获得乳酸乳球菌口服疫苗组合物。组合物中乳酸乳球菌的总浓度为 3×10^{10} CFU/mL，其中每个重组菌在体系中的终浓度为 1×10^{10} CFU/mL，将本口服疫苗命名为 ABG；同样方法获得浓度相等的 LAB 空载体菌株疫苗，命名为 PNZ。

4.2.2.2 攻毒菌株的准备

攻毒所用的猪源 F4⁺EPEC 菌株 C83549 由本实验室保存，为标准菌株。从 -80℃ 将保存的菌株取出，在 LB 琼脂平皿上复苏并传代一次。从传代的平皿上挑取一个单克隆的 C83549 菌株接种于 LB 液体培养基中，37℃ 摇床 200 r/min 过夜培养，之后按照 1:100 的比例转接于新鲜的 LB 液体培养基，继续 37℃ 摇床培养 2-3 h，当 OD₆₀₀ 值检测在 0.6 时，3000 r/min 离心 10 min 收集菌体，利用灭菌后 PBS 重悬并调整到感染实验需要浓度。

4.2.2.3 动物实验方案

根据湖北省动物伦理委员会批准的方案（No.20230819），妊娠母猪免疫试验在武汉康远牧业发展有限责任公司进行，小鼠免疫保护试验及仔猪动物实验均在武汉科前生物股份有限公司动物实验场地屏障环境下进行。

小鼠 F4⁺EPEC 菌株感染模型的构建：12 只 3-4 周龄 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 2 组，按照表 4-1 进行小鼠感染试验，全程在 SPF 环境中进行试验，小鼠适应环境 2 天后进行灌胃感染，感染后观察 7 天，记录死亡率，死亡小鼠立即解剖，在第 7 天对小鼠进行安乐死并进行病理解剖。

表 4-1 小鼠感染模型试验分组

Table 4-1 Grouping of mouse infection model tests

分组	感染菌株	攻毒剂量	感染方式	数量
Control	PBS	100 μl	灌胃	6 只
C83549	C83549	100 μl (5×10^8 CFU)		

小鼠免疫保护实验安排如图 4-3 (A) 所示：3-4 周龄 BALB/c 雌性小鼠随机分为 4 组，分别为空白对照组 (CK, n=10)；感染对照组 (CG, n=10)；空白活载体免疫对照组 (PNZ, n=10)；口服免疫组 (ABG, n=10)。口服免疫组每周连续 3 天口服免疫 ABG 疫苗，每只小鼠每天 0.5 毫升，之后间隔 4 天，免疫 4 周。空白活载体

免疫对照组与口服免疫组使用相同免疫方案，差异在于使用载体疫苗 PNZ。分别在实验第 1 d，28 d 时采集四组小鼠外周血，间接 ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平。CG、PNZ、ABG 组均在第 29 d 时使用 ETEC (K88⁺) 标准菌株 C83549 进行灌胃感染，剂量为每只小鼠 5×10^8 CFU，此时记为 0 dpi。攻毒后连续 7 天监测小鼠临床体征及存活情况。所有存活的小鼠在感染后 7 天 (dpi) 进行安乐死和尸检，并采集所有小鼠的小肠进行病理切片制作及 HE 染色。

仔猪 F4+ETEC 菌株感染模型的构建：选取 6 只 8 日龄杜长大三元仔猪，饲喂人工乳，使用 ETEC (K88⁺) 标准菌株 C83549 进行灌胃感染，剂量为每头仔猪 1×10^{10} CFU，感染后观察 7 天，记录死亡情况，死亡仔猪立即解剖，所有存活的仔猪在感染后 7 天 (dpi) 进行安乐死和尸检。

无 ETEC 母源抗体仔猪免疫保护实验如图 4-6 (A) 所示：18 只 8 日龄杜长大三元仔猪随机分为 3 组，分别为空白对照组 (CK, n=6)；感染对照组 (CG, n=6)；重组乳酸菌活载体口服免疫组 (ABG, n=6)。ABG 组仔猪每周连续 3 天口服免疫 ABG 疫苗，每头小猪每天 3 毫升，之后间隔 3 天，免疫 3 轮。分别在实验第 1d，18d 时采集 3 组仔猪外周血，间接 ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平。CG、ABG 组均在第 19d 时使用 ETEC (K88⁺) 标准菌株 C83549 进行灌胃感染，剂量为每头仔猪 5×10^{10} CFU，此时记为 0 dpi。感染后连续 7 天监测仔猪临床症状及腹泻情况。分别在实验第 1 d、6 d、12 d、18 d 及 7 dpi 时对所有仔猪称重并记录重量。所有仔猪在感染后第 7 天 (dpi) 时进行安乐死和尸检，分别采集所有仔猪的十二指肠、空肠、回肠及肠系膜淋巴结进行病理切片制作及 HE 染色。

妊娠后期母猪口服免疫实验如图 4-7 (A) 所示：在武汉康远牧业发展有限责任公司养殖场选取 18 头妊娠 86 天母猪，养殖在同一栋舍及生产线上，将其随机分为 3 组，分别为空白对照组 (CK, n=6)；空白活载体免疫对照组 (PNZ, n=6)；重组乳酸菌活载体口服免疫组 (ABG, n=6) ABG 组每周连续 3 天口服免疫 ABG 疫苗，每头母猪每天 5 毫升，之后间隔 4 天，免疫 4 周。PNZ 组与 ABG 组使用相同免疫方案，差异在于使用空白载体活疫苗 PNZ。分别在实验第 1 d、28 d、58 d 时采集 3 组妊娠母猪外周血，间接 ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平。所有母猪在实验第 29 天生产，采集每头母猪初乳，分离乳清间接 ELISA 法检测 IgG 抗体水平。实验第 35 天时，从每头母猪生产的仔猪随机挑选三头，对每一头仔猪称重并采集外周血，间接 ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平。分别在免疫前和免疫后采集各组母猪的粪便样

本，免疫前样本依据各组的组别不同分别命名为 QCK、QPNZ 和 QABG，免疫后样本分别命名为 HCK、HPNZ 和 HABG。

存在母源抗体仔猪哺乳阶段攻毒实验如图 4-14 (A) 所示：以图 4-7 (A) 实验中三组母猪所生仔猪为试验对象，选取 8 日龄仔猪，饲喂人工乳。空白对照组母猪所生仔猪随机挑选 12 头，平均分为两组，分别为空白对照组 (CK, n=6)；感染对照组 (CG, n=6)；空白活载体免疫对照组母猪所生仔猪随机挑选 6 头，为空白活载体免疫对照组 (PNZ, n=6)；重组乳酸菌活载体口服免疫组母猪所生仔猪随机挑选 6 头，为母源抗体组 (ABG, n=6)。除 CK 组外，剩余三组仔猪，使用 ETEC (K88⁺) 标准菌株 C83549 进行灌胃感染，剂量为每头仔猪 1×10^{10} CFU，此时记为 0 dpi。攻毒后连续 7 天监测仔猪临床症状及死亡情况。所有仔猪在感染后第 7 天 (dpi) 进行安乐死和尸检。分别采集所有仔猪的十二指肠、空肠、回肠及肠系膜淋巴结进行病理切片制作及 HE 染色。

存在母源抗体仔猪口服免疫保护断奶阶段实验如图 4-15(A)所示：以图 4-7(A) 实验中三组母猪所生仔猪为试验对象，选取 8 日龄仔猪，饲喂人工乳。空白对照组母猪所生仔猪随机挑选 12 头，分为两组，分别为空白对照组 (CK, n=6)；感染对照组 (CG, n=6)；空白载体免疫对照组母猪所生仔猪随机挑选 6 头，为空白载体免疫对照组 (PNZ, n=6)；口服免疫组母猪所生仔猪随机挑选 12 头，分别为口服免疫组 (BIM, n=6)；母源抗体组 (ABG, n=6)。BIM 组每轮免疫连续 3 天口服免疫 ABG 疫苗，每头小猪每天 3 毫升，之后间隔 3 天，免疫 3 轮。PNZ 组与 BIM 组使用相同免疫方案，差异在于使用空白活载体疫苗 PNZ。ABG 组仔猪持续吃母乳至断奶，保持与试验其余各组相同日龄处理。分别在实验第 1d、18d 时采集 5 组仔猪外周血，间接 ELISA 法检测血清 IgG 抗体水平。CG、PNZ、ABG、BIM 组均在第 19d 时使用 ETEC (K88⁺) 标准菌株 C83549 进行灌胃感染，剂量为每头仔猪 5×10^{10} CFU，此时记为 0 dpi。感染后连续 7 天监测仔猪临床症状及腹泻情况。所有仔猪在感染后第 7 天 (dpi) 进行安乐死和尸检。分别采集所有仔猪的十二指肠、空肠、回肠及肠系膜淋巴结进行病理切片制作及 HE 染色。

4.2.2.4 IgG 抗体的检测

使用间接 ELISA 法进行 IgG 抗体检测，具体步骤如下：

包被：用包被液将抗原 dmLTA-his 蛋白稀释后，每孔 100 μ L 加入 96 孔酶标板，

4°C包被过夜。弃去包被液，每孔加 200 μL 洗涤液，洗 3 次，每次 5 min，尽量拍干。

封闭：每孔加入 200 μL 的封闭液，37°C温箱作用 2 h 后，每孔加 200 μL 洗涤液，洗 3 次，每次 5 min，尽量拍干。

加样：用 PBS 将被检血清按照 1: 100 稀释，每孔 100 μL，37°C温箱作用 1 h 后，每孔加 200 μL 洗涤液，洗 3 次，每次 5 min，尽量拍干。

加酶标二抗：每孔加 100 μL 1: 5000 稀释后的酶标二抗（辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗猪 IgG），37 °C温箱作用 45 min 后，每孔加 200 μL 洗涤液，洗 3 次，每次 5 min，尽量拍干。

显色：每孔先加 50 μL 底物液 A，再加 50 μL 底物液 B，混匀，室温避光显色 10 min，然后每孔加 50 μL 终止液，10 min 内测定结果，在酶标仪上测波长 630 nm 的 OD 值。

4.2.2.5 粪便 DNA 提取及微生物区系分析

根据上述动物试验的安排，分别在上述妊娠后期母猪实验中采集免疫前后的粪便样品，采集方法为：利用一次性 10 mL 无菌粪便采样管采集母猪新鲜粪便，在粪便中心利用采样管自带的小勺采集约 5-10 克粪便，拧紧采样管并利用封口膜密封，做好标记后立刻放入液氮中速冻并保持 2 h 以上，之后转移到-80°C保存并尽快送到广州基迪奥生物科技有限公司进行三代 16S rDNA 扩增子测序，检测粪便中的微生物情况。

使用提取试剂盒 HiPure Stool DNA Kits（型号 D3141）进行粪便 DNA 提取。具体步骤如下：

（1）转移 150-200 mg 粪便样品至 2 mL 离心管中，立即加入 1.2 mL Buffer SSL 至样品中，最高速度涡旋 1 min 充分打散样品。

（2）70 °C水浴 10 min。

（3）涡旋 15 s。室温下 $\geq 14,000\times g$ 离心 10 min。转移 250 μL 上清至新的 1.5 mL 离心管中。

（4）加入 20 μL Proteinase K 和 250 μL Buffer AL 至上清液中。颠倒混匀 10 次。70 °C水浴 10 min。

（5）加入 250 μL 无水乙醇至样品中，颠倒混匀 10 次。

（6）把 HiPure DNAMini Column I 装在 2 mL 收集管中。转移混合液至柱子中。

10,000×g 离心 30-60 s。

(7) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μL Buffer GW1 至柱子上。

10,000×g 离心 30-60s。

(8) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μL Buffer GW2 至柱子中。

10,000×g 离心 30-60 s。

(9) 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000×g 离心 2 min 甩干柱子。

(10) 将柱子装在 1.5 mL 离心管中。加入 50-200 μL 预热至 70°C 的 Buffer AE 至柱子的膜中央，室温放置 2 min，13000×g 离心 1 min。

(11) 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 -20°C 备用。

DNA 样品纯度的检测: 检测需要样品量为 2 μL，浓度测量范围为 2-3000 ng/μL。通过检测核酸的 OD 值，目的是测定核酸的纯度。A260/A280 比值应在 1.8-2.0 之间最好。DNA 260/280 <1.8 说明有蛋白质污染，>2.0 说明有 RNA 污染。另一个衡量核酸纯度的指标是 A260/A230 比值，其值应该在 2.2 左右，低于 1.8 表明有明显的有机物如糖、肽、苯酚、盐离子等的污染。很有可能是在吸上层水相时将有机相吸入。

琼脂糖凝胶电泳检测: 对核酸样本进行琼脂糖凝胶电泳的目的是检验核酸样本的完整性，是否发生降解，是否有蛋白等污染。质量完好的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后，应当是单一的条带。

4.2.2.6 16S rDNA V3-V4 区域扩增

正向引物为 341F (5'-CCTACGGGNGGCWG CAG-3')，反向引物为 806R (5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3')。

(1) 第一轮扩增体系如表 4-2 所示：

表 4-2 第一轮 Q5 酶扩增体系

Table 4-2 The first-round of Q5 enzyme amplification system

组分	含量
5×Q5@ Reaction Buffer	10 μL
5×Q5@ High GC Enhancer	10 μL
2.5 mM dNTPs	1.5 μL
Primer F (10 μM)	1.5 μL
Primer R (10 μM)	1.5 μL
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	0.2 μL

Template X μL	(50 ng)
ddH ₂ O	补充至 50 μL

(2) 第一轮扩增程序如表 4-3 所示:

表 4-3 第一轮 PCR 扩增程序

Table 4-3 The first-round of PCR amplification procedure

步骤	程序	时间
①	95°C	5 min
②	95°C	1 min
③	60°C	1 min
④	72°C	1 min
⑤	72°C	7 min

注: ②-④三个程序 30 个循环

(3) 第一轮 PCR 产物纯化: 利用 AMPure XP Beads 进行 PCR 产物纯化, 纯化后用 Qubit3.0 定量。

(4) 第二轮扩增体系如表 4-4 所示:

表 4-4 第二轮 Q5 酶扩增体系

Table 4-4 The second round of Q5 enzyme amplification system

组分	含量
5×Q5@ Reaction Buffer	10 μL
5×Q5@ High GC Enhancer	10 μL
2.5mM dNTPs	1.5 μL
Index Primer (10 μM)	1.5 μL
Universal PCR Primer (10 μM)	1.5 μL
Q5@ High-Fidelity DNA Polymerase	0.2 μL
Template X μL	(50 ng)
ddH ₂ O	补充至 50 μL

(5) 第二轮扩增程序: 第二轮扩增程序同表 3-12, 但循环数为 12 个循环。

4.2.2.7 文库定量及测序分析

使用 AMPure XP Beads 对第二轮扩增产物进行纯化, 用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies, 产地美国) 进行定量, 根据 Novaseq 6000 的 PE250 模式 pooling 上机测序。

4.2.2.8 石蜡切片制作及 HE 染色

石蜡切片制作（白片）：

（1）取材：新鲜组织用固定液固定 24 h 以上。将组织从固定液取出在通风橱内用手术刀将目的部位组织修平整，将修切好的组织和对应的标签放于脱水盒内。

（2）脱水浸蜡：将脱水盒放进吊篮里于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。75%酒精-85%酒精-90%酒精-95%酒精-无水乙醇 I-无水乙醇 II-醇苯-二甲苯 I-二甲苯 II-65 °C融化石蜡 I-65 °C融化石蜡 II-65 °C融化石蜡 III。

（3）包埋：将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋。先将融化的蜡放入包埋框，待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入包埋框并贴上对应的标签。于-20°冻台冷却，蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整蜡块。

（4）切片：将修整好的蜡块置于石蜡切片机切片，厚 2-4 μm 。切片漂浮于摊片机 40°C温水上将组织展平，载玻片将组织捞起，60 °C烘箱内烤片。水烤干蜡烤化后取出常温保存备用。

HE 染色：

（1）石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯I 15 min-二甲苯II 15 min-二甲苯 III 15 min-无水乙醇I 5 min-无水乙醇II 5 min-95%酒精 5 min-85%酒精 5 min，自来水洗。

（2）苏木素染色：切片入苏木素染液染 1-2 min，自来水洗，分化液分化，自来水洗，返蓝液返蓝，流水冲洗。

（3）伊红染色：伊红染液中染色 2-3 min。

（4）脱水封片：切片依次放入无水乙醇 I 5 min-无水乙醇 II 5 min-无水乙醇III 5 min -二甲苯I 5 min-二甲苯II 5 min 透明，中性树胶封片。

（5）显微镜镜检，图像采集分析。

4.2.2.9 数据分析

所有数据均来自至少 3 次重复进行的独立实验。数据已合并，并以均数 \pm 标准差（SD）表示。数据使用 GraphPad Prism version 8 进行分析，主要采用了单因素方差（ANOVA）分析和 T 检验（T-test）的方法。当 $P \leq 0.05$ 时认为差异是显著的，*表示 $P \leq 0.05$ ，**表示 $P \leq 0.01$ ，***表示 $P \leq 0.001$ 。

4.3 结果

4.3.1 小鼠 F4⁺ETEC 的感染模型的构建

选取小鼠进行 ETEC 感染模型的构建, 从图 4-1 可以看出, 在 5×10^8 CFU 的感染剂量下, 小鼠在感染后 7 天内出现了 50% 的死亡, 小鼠死亡之前粪便变软, 臭味显著, 但未见明显腹泻、糊肛现象。存活小鼠的解剖结果发现, 小肠段肠壁明显变薄, 充满黄色液性内容物 (图 4-2), 无菌采取心、肝、脾、肺、肾, 研磨后与血液样本一起进行大肠杆菌的分离, 发现均无大肠杆菌存在, 表面本菌只在肠道内定殖, 不引起肠道外实质器官的病变。

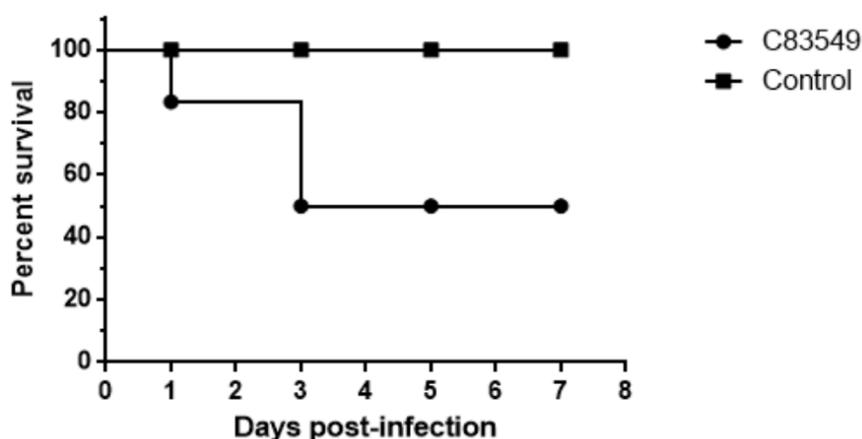


图 4-1 小鼠 ETEC 感染生存曲线

Fig. 4-1 Survival curves of mouse ETEC infection

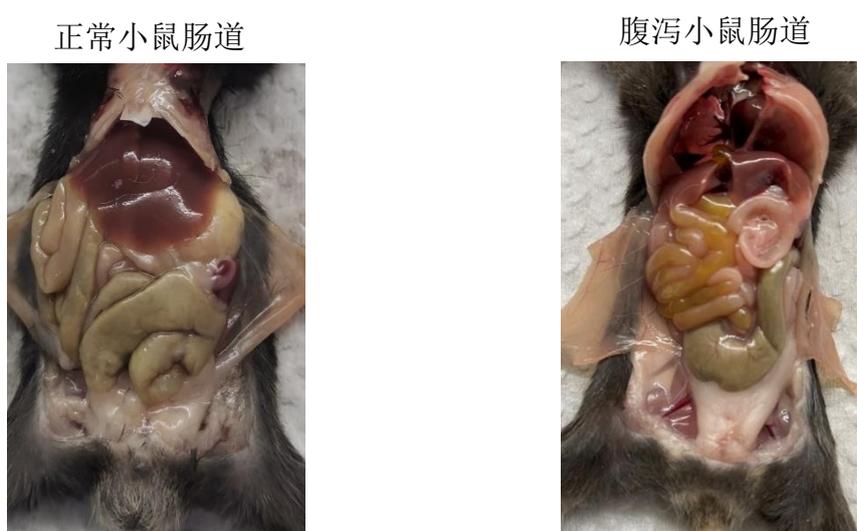
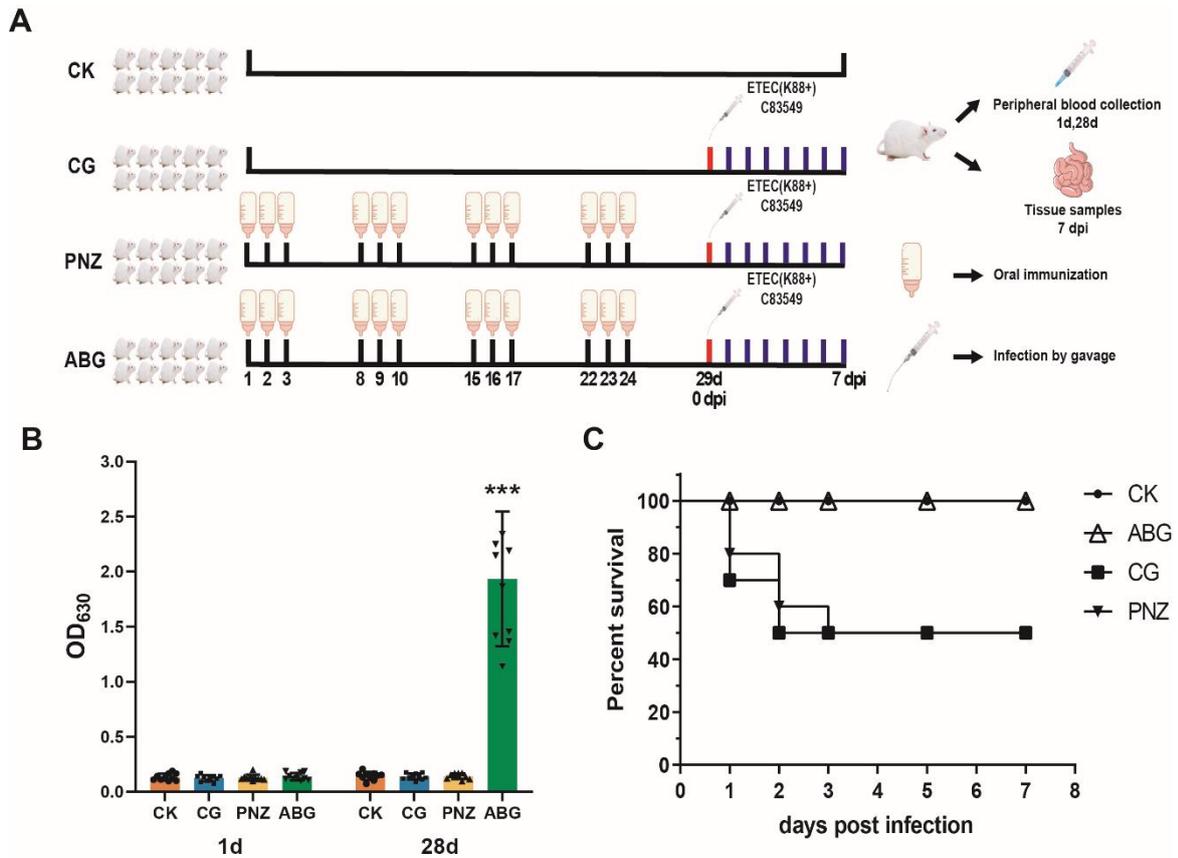


图 4-2 感染 F4⁺ETEC 小鼠剖检病变

Fig. 4-2 Mice infected with F4 + ETEC autopsy lesions

4.3.2 重组乳酸菌活载体疫苗口服免疫保护小鼠免受 F4⁺ETEC 感染

小鼠动物实验结果如图 4-3 所示，其中图 A 为小鼠动物实验示意图。图 B 为免疫前后各组小鼠血清 IgG 抗体水平检测结果，从图中可以看出，免疫前（1d）所有小鼠均无抗体存在，口服免疫后（28d），与 CK、CG、PNZ 三组相比，ABG 组小鼠抗体均极显著提高（ $P \leq 0.001$ ）。与免疫前相比，CK、CG、PNZ 组抗体水平没有明显改变，而 ABG 组显著提高。图 C 为感染后 7 天内各组小鼠的存活情况，攻毒后小鼠生存曲线结果显示，CG 组与 PNZ 组小鼠在攻毒后 7 天内均出现了 50% 的死亡，ABG 组与 CK 组小鼠完全存活，没有出现死亡。感染后第 7 天小鼠解剖结果与组织病理切片 HE 染色结果如图 D 所示，解剖结果可以看出，CG 组及 PNZ 组小鼠小肠段均出现了肠壁变薄、小肠内充满黄色液性内容物的症状，CG 组小肠内存在一定的出血。组织病理切片 HE 染色结果与解剖结果相同，CG 组及 PNZ 组均出现明显的肠绒毛断裂、萎缩、上皮内淋巴细胞浸润、杯状细胞及潘氏细胞减少，固有层内浆细胞缺失，肌肉层变薄的现象，而 ABG 与 CK 组小鼠肠道均无病变。



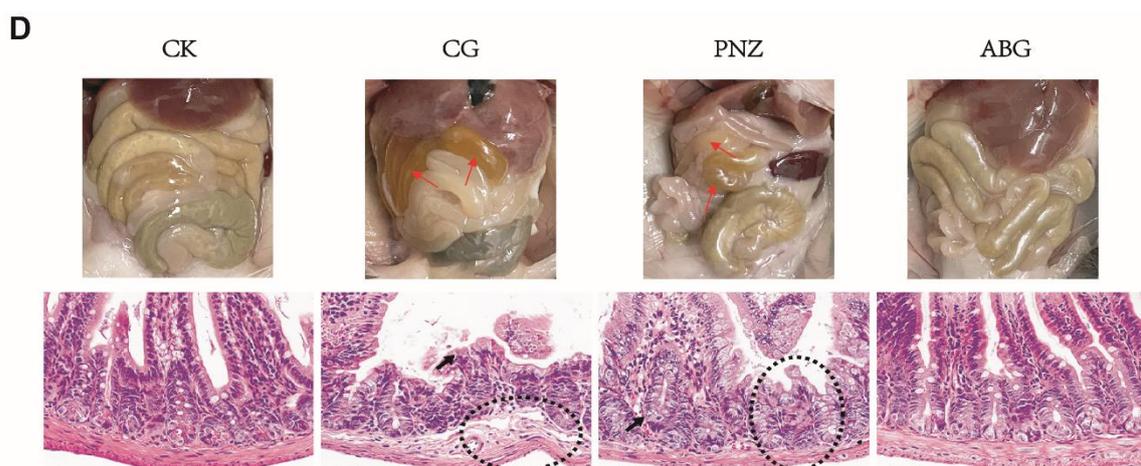


图 4-3 重组乳酸菌活载体口服疫苗小鼠免疫保护效果

(A) 小鼠动物实验示意图。(B) 免疫前后各组小鼠血清 IgG 抗体水平检测结果。(C) 感染后 7 天内各组小鼠的存活情况。(D) 各组小鼠肠道解剖结果及小肠病理切片 HE 染色结果。

Fig. 4-3 Immunoprotective effect of oral vaccine with live recombinant lactic acid bacteria vector in mice

(A) Experimental protocol for the oral immunization assay in mice. (B) Serum IgG antibody levels before and after immunization in each group of mice. (C) Survival rate of mice in each group within 7 days after infection. (D) Anatomical intestinal lesions and HE staining results (40x) of small in-testinal tissue pathological sections in each group of mice.

4.3.3 仔猪 F4⁺EPEC 的感染模型的构建

选取 8 日龄仔猪进行 ETEC 感染模型的构建，采用灌胃的方式进行感染。从图 4-4 可以看出，在 1×10^{10} CFU 的感染剂量下，仔猪在感染后 7 天内出现了 33.33% 的死亡。在感染期间，所有仔猪均出现了显著的腹泻症状，包含了血便以及黄痢、白痢以及由严重腹泻导致的脱水等症状（图 4-5）。此外，解剖结果显示，仔猪的肠道出现了充血、鼓气、肠壁变薄、充满黄色液性内容物等症状，同时仔猪肠道淋巴结严重出血，符合感染 ETEC 导致疾病的典型症状，表明本研究采用的感染方法能够复刻本病在临床上的典型症状。

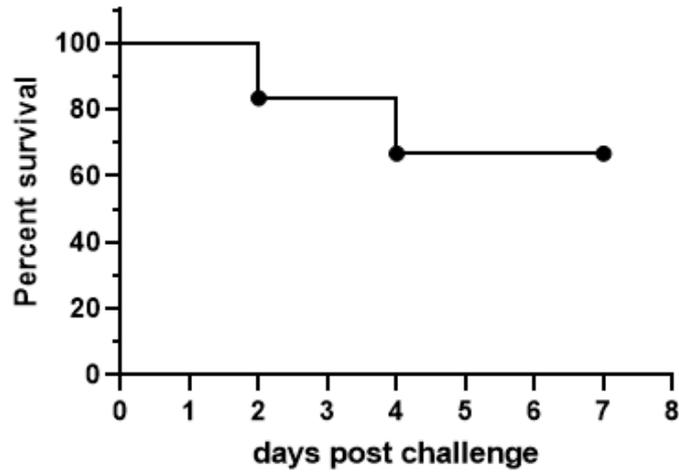


图 4-4 仔猪 ETEC 感染生存曲线

Fig. 4-4 Survival curves of piglets infected with ETEC

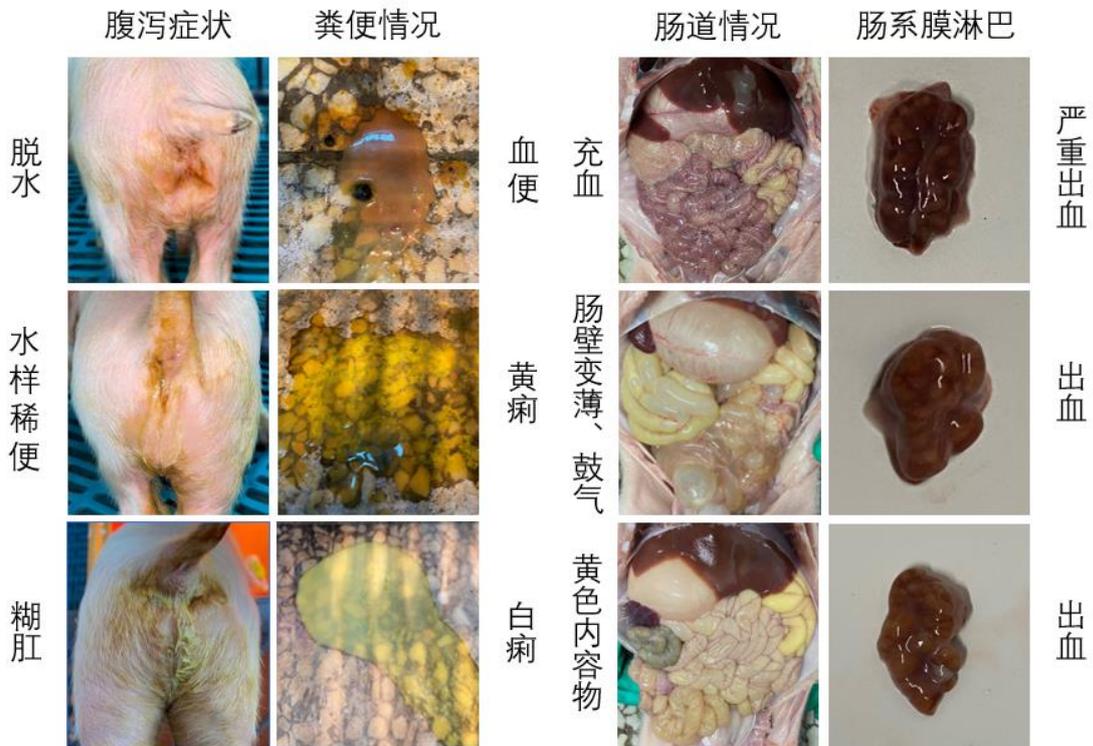


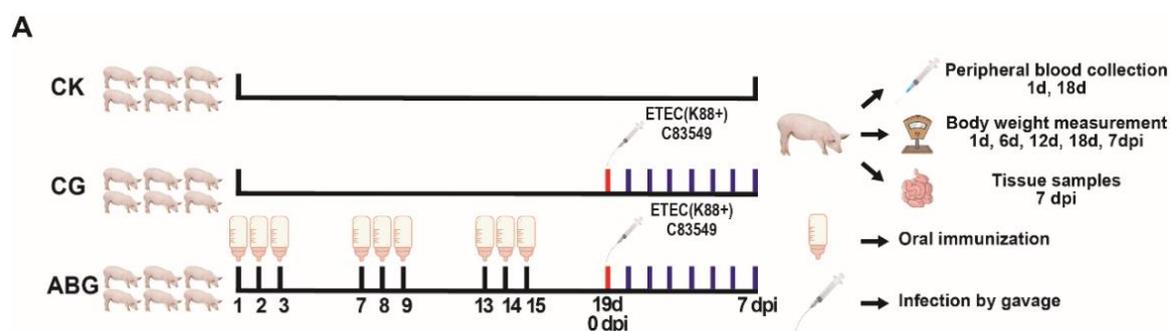
图 4-5 仔猪感染 F4⁺ETEC 症状

Fig. 4-5 Symptoms of F4⁺ETEC infection in piglets

4.3.4 重组乳酸菌活载体口服疫苗保护无母源抗体仔猪断奶阶段免受 F4⁺ETEC 感染

为探究本口服疫苗在本源动物群体内的应用效果，进行了如图 4-6 所示的动物试验，试验方案如 4-6 (A) 所示。图 B 为免疫前后各组仔猪血清 IgG 抗体水平检测

结果,结果显示,对所选取 8 日龄杜长大三元仔猪在试验开始时(1d)检测血清 IgG 抗体水平,所有仔猪均无抗体,证明仔猪体内不存在母源抗体。口服免疫后(18d),与 CK、CG 组相比,ABG 组仔猪抗体极显著提高($P \leq 0.001$)。与免疫前相比,CK、CG 组抗体水平没有明显改变,而 ABG 组显著提高。仔猪在实验期间体重增长情况如 C 图所示,免疫一轮后,即实验第 6d 时,ABG 组仔猪体重显著高于 CK、CG 组($P \leq 0.05$);免疫二轮后(12d),ABG 组仔猪体重显著高于 CK、CG 组($P \leq 0.01$);三轮免疫完成时(18d),ABG 组仔猪体重与 CK 组仔猪相比提高 29.7%($P \leq 0.001$),与 CG 组仔猪相比提高 24.8% ($P \leq 0.001$)。实验第 19d 进行灌胃感染,7dpi 时体重结果显示,CG 组仔猪体重增长明显停滞,显著小于 CK 组 ($P \leq 0.01$),而 ABG 组在感染后体重依旧稳定增长,极显著高于 CK 及 CG 组 ($P \leq 0.001$)。图 D 为感染后各组仔猪的临床症状示意图,CG 组仔猪出现了显著的消瘦、佝偻等情况,ABG 组仔猪无任何症状,生长情况甚至好于 CK 组。图 E 为感染后各组仔猪的腹泻情况及解剖结果示意图,如图所示,CG 组仔猪出现了明显的腹泻情况,ABG 组与 CK 组相同,均未出现腹泻症状。肠道病变结果显示,CG 组仔猪出现了明显的肠壁变薄,透明,充气等症状,尤以小肠段最为严重,充满黄色液性及泡沫性内容物,ABG 组与 CK 组肠道均未出现病变。肠系膜淋巴结结果显示,CG 组出现了明显的出血、肿胀等病变,ABG 及 CK 组均正常。图 F 展示了肠系膜淋巴结病理切片 HE 染色结果,CG 组图中所示黄色信号为红细胞被吞噬后的含铁血黄素沉着,与 CK 组相比,CG 组成熟型淋巴细胞减少,ABG 组成熟淋巴细胞含量提高。图 G-I 分别展示了仔猪十二指肠、空肠、回肠病理切片 HE 染色结果,CG 组均出现了明显的肠壁肌肉层变薄、肠黏膜萎缩、碎裂,出血,肠绒毛坏死灶,上皮内淋巴细胞浸润,固有层内浆细胞缺失等病变,而 ABG 及 CK 组均正常。



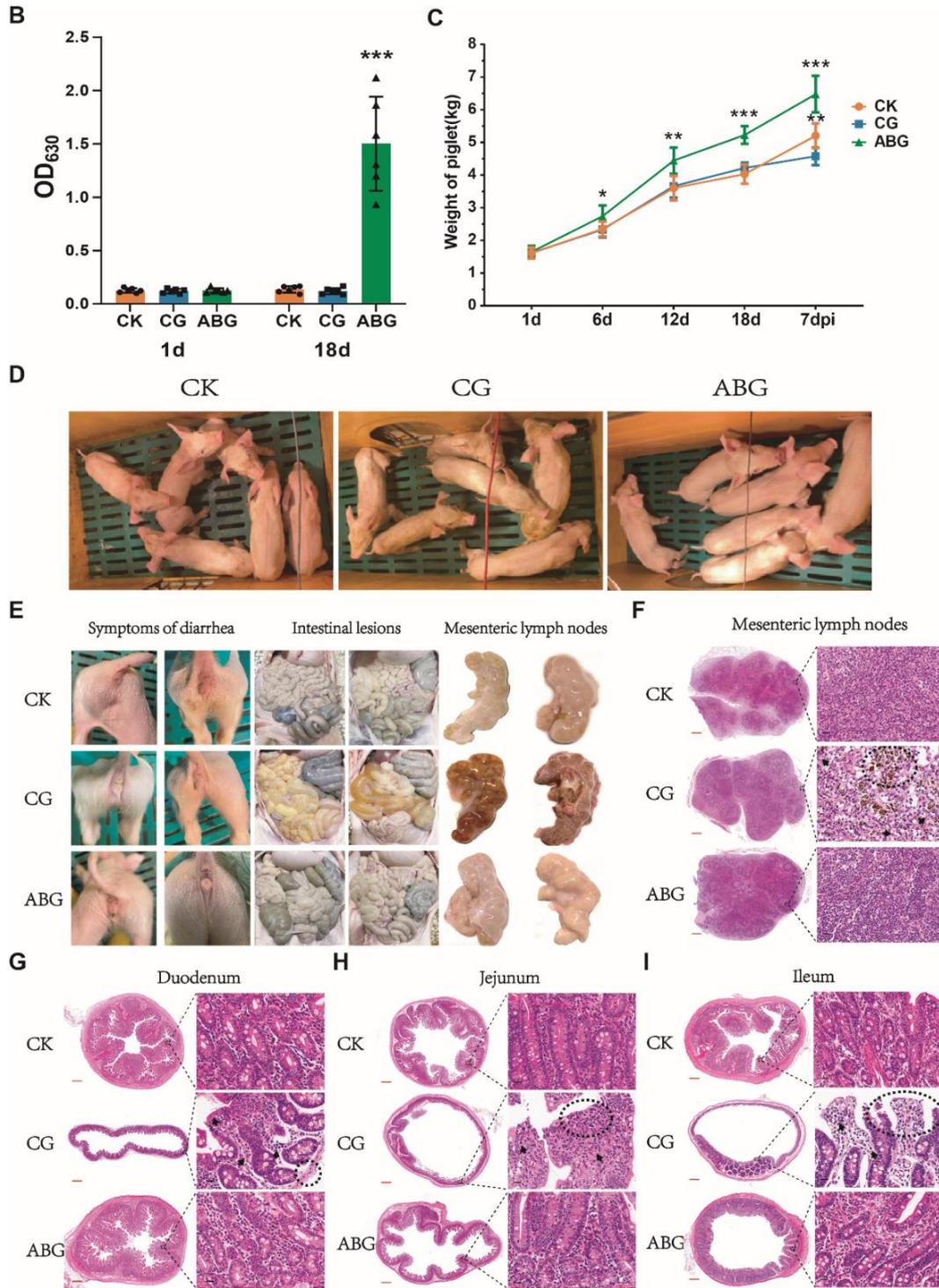


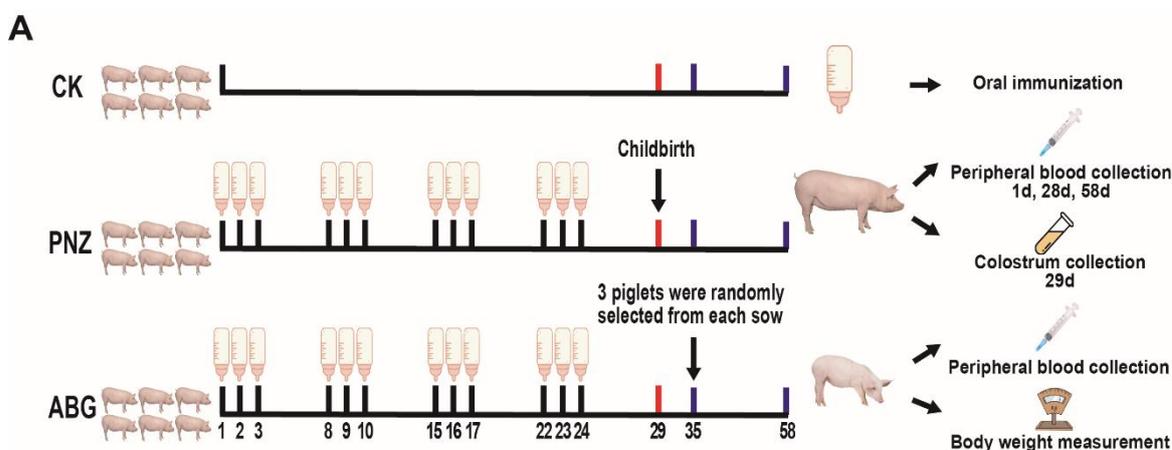
图 4-6 重组乳酸菌活载体口服疫苗无母源抗体仔猪免疫保护效果
 (A) 无母源抗体仔猪动物实验示意图。(B) 免疫前后各组仔猪血清 IgG 抗体水平检测结果。
 (C) 实验期间各组仔猪体重变化情况。(D) 各组仔猪感染后临床症状。(E) 各组仔猪腹泻情
 况、肠道解剖病变、肠系膜淋巴结病变。(F) 各组仔猪肠系膜淋巴结病理切片 HE 染色结果示
 意图。(G) 十二指肠病理切片 HE 染色结果示意图。(H) 空肠病理切片 HE 染色结果示
 意图。(I) 回肠病理切片 HE 染色结果示意图。

Fig. 4-6 Immune protection of piglets without maternal antibodies by oral recombinant *Lactobacillus* live vector vaccine

(A) Experimental protocol for the animal experiment conducted on piglets without maternal antibodies. (B) Serum IgG antibody levels of piglets in each group before and after immunization. (C) The body weight of piglets throughout the experiment in each group. (D) Clinical symptoms observed in piglets after infection for each group. (E) Diarrhea, intestinal anatomical lesions and mesenteric lymph node lesions in piglets. (F) HE staining the pathological sections of mesenteric lymph node (red line:1x, black line:40x, the same as follows). (G) HE staining the pathological sections of duodenal. (H) HE staining the pathological sections of jejunal. (I) HE staining the pathological sections of ileal.

4.3.5 重组乳酸菌活载体口服疫苗免疫妊娠后期母猪使其产生较强免疫力并将母源抗体传递给仔猪

为探究本口服疫苗在妊娠母猪阶段的免疫效果，按照图 4-7 (A) 的实验方案对妊娠 86 天母猪进行了口服免疫试验。免疫前后各组母猪血清 IgG 抗体水平检测结果显示 (图 B)，免疫前母猪均无 ETEC 抗体存在，抗体水平基本持平。四轮免疫后 (28d)，ABG 组母猪抗体显著提高，而 PNZ 组母猪不产生抗体。免疫后 30 天 (58d) 再次检测各组的抗体水平，ABG 组抗体依旧处于较高水平，但是相较于 28d 时有所降低。各组母猪均在实验第 29d 生产，采集各组母猪的初乳，分离乳清检测乳汁中抗体水平，检测结果由图 C 所示，ABG 组母猪初乳中抗体含量极显著高于 CK 及 PNZ 组 ($P \leq 0.001$)。实验第 35d 时在每头母猪所生仔猪中随机挑选三头，按照母猪所在的分组对仔猪进行分组，对所有仔猪分别采血检测抗体及称重。IgG 抗体检测结果如图 D 所示，ABG 组母猪所生仔猪抗体水平极显著高于 CK 及 PNZ 组 ($P \leq 0.001$)，但组内仔猪抗体水平离散度较大。体重结果如图 E 所示，ABG 组母猪所生仔猪体重显著高于 CK 及 PNZ 组 ($P \leq 0.05$)，但 CK 及 PNZ 组之间无显著差异。



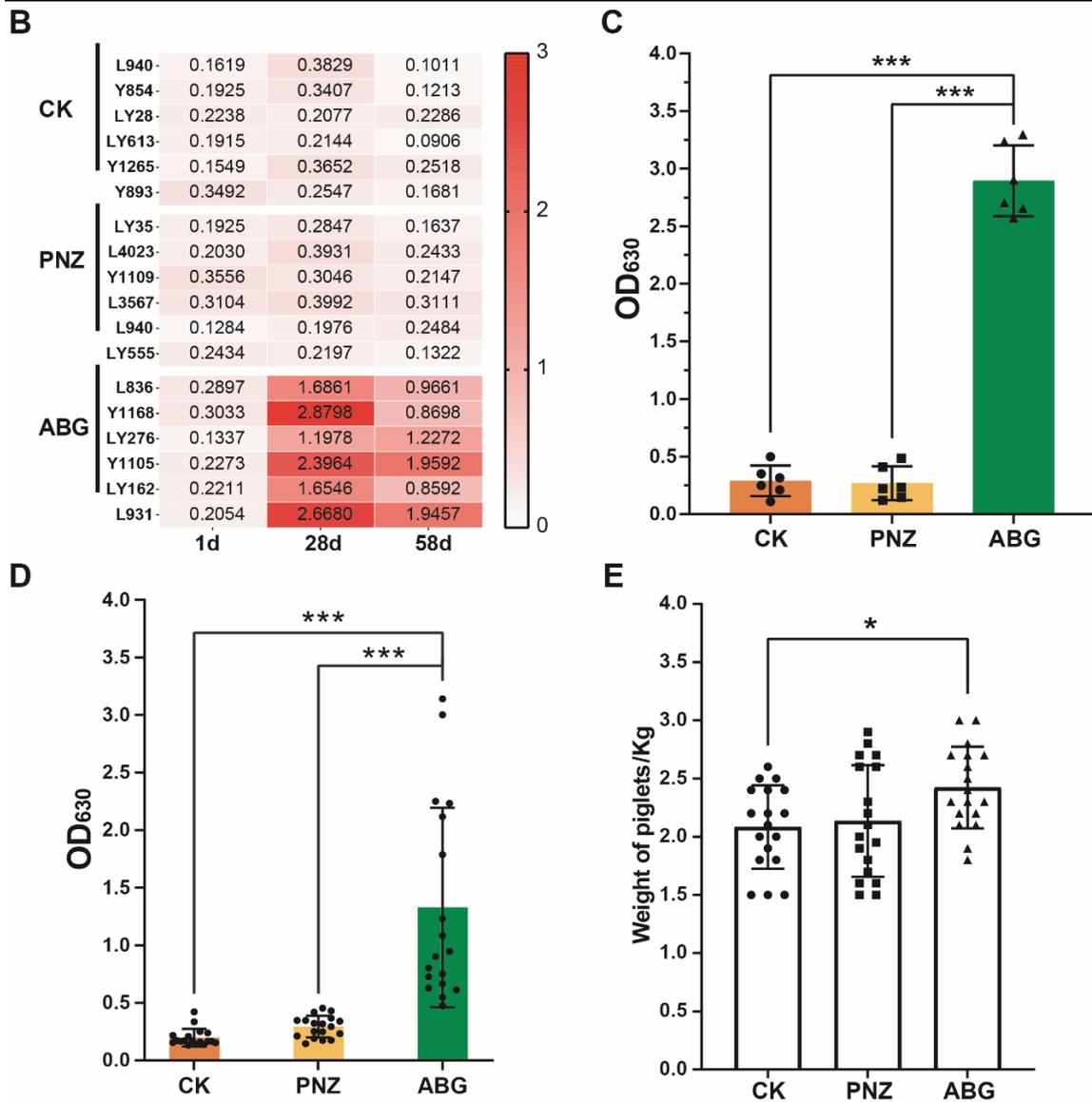


图 4-7 重组乳酸菌活载体口服疫苗妊娠母猪免疫效果

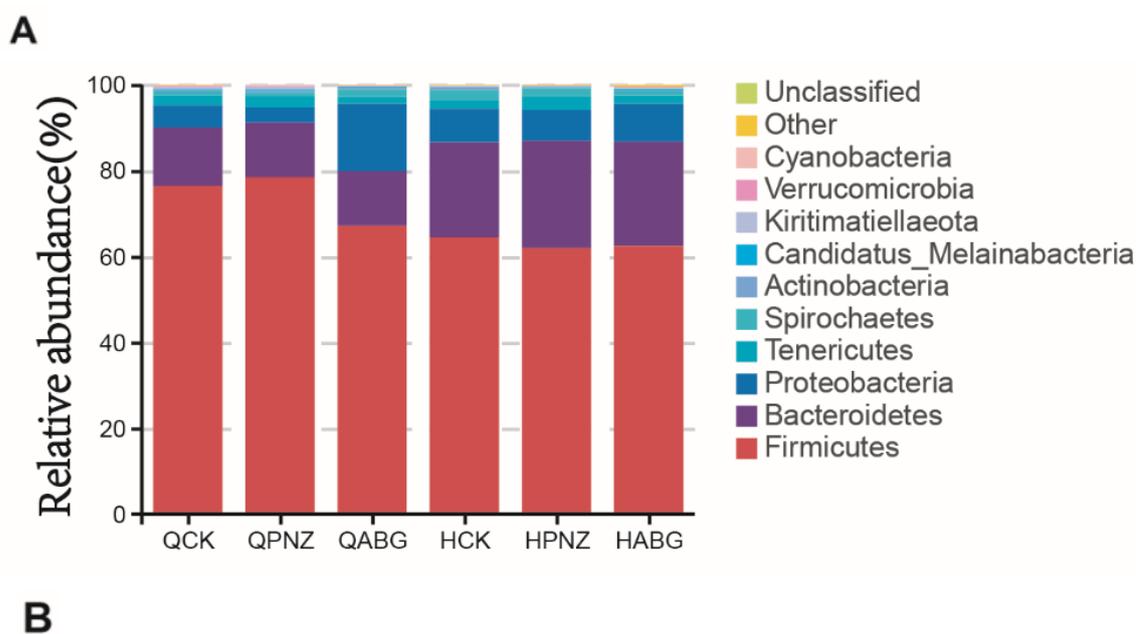
(A) 妊娠后期母猪动物实验示意图。(B) 免疫前后各组母猪血清 IgG 抗体水平检测结果。
 (C) 免疫后各组母猪初乳 IgG 抗体水平检测结果。(D) 各组母猪所产仔猪血清 IgG 抗体水平检测结果。(E) 各组母猪所产仔猪体重检测结果。

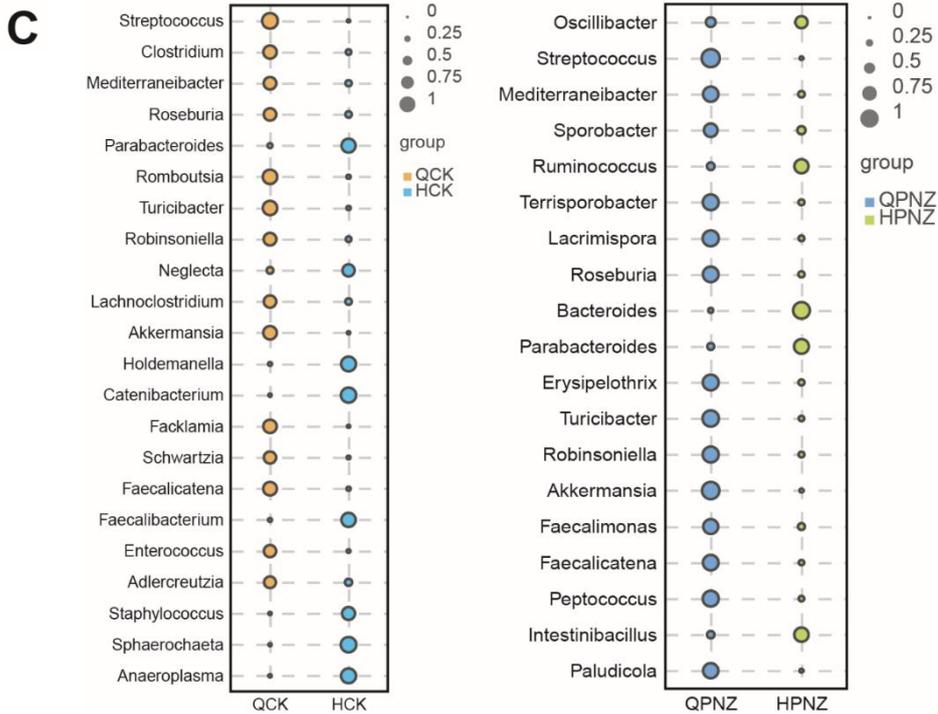
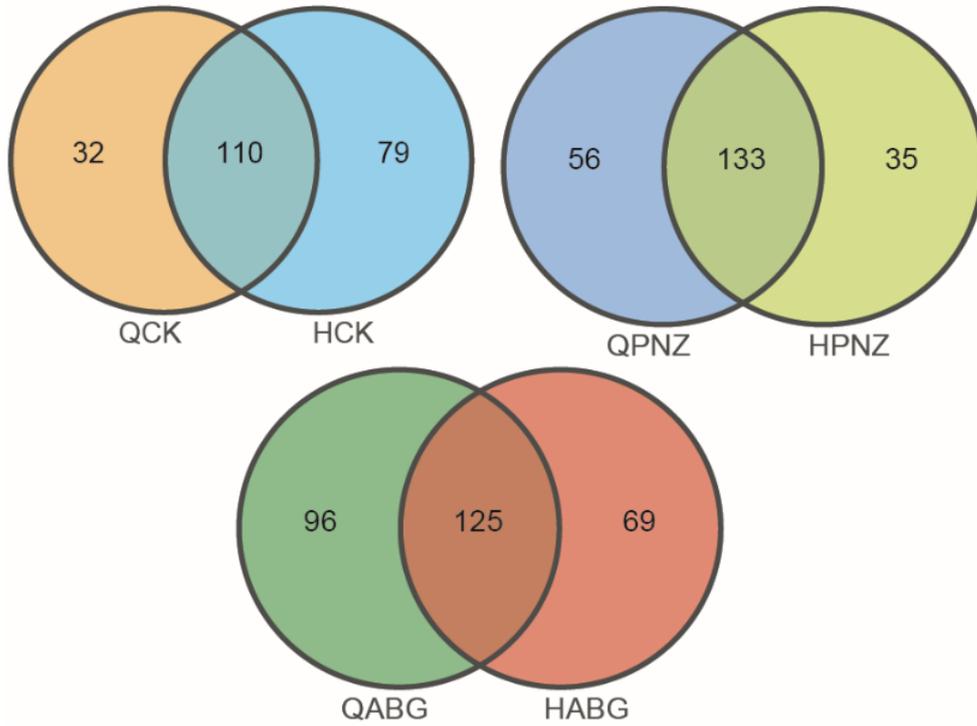
Fig. 4-7 Immune effect of oral vaccine with live vector of recombinant lactobacilli in pregnant sows

(A) Experimental protocol for the late-gestation sow trials. (B) Serum IgG antibody levels of sows in each group before and after immunization. (C) Colostrum IgG antibody levels in each group of sows after immunization. (D) Serum IgG antibody levels in piglets born to sows from each ex-perimental group. (E) Weight measurements of piglets born to sows from each experimental group.

4.3.6 重组乳酸菌活载体口服疫苗免疫显著提高了妊娠晚期母猪肠道中乳酸杆菌的丰度

分别采集图 4-7 (A) 妊娠母猪实验免疫前 (1d) 和免疫后 (28d) 各组母猪粪便样品, 免疫前样品分别为 QCK、QPNZ、QABG, 免疫后样品分别为 HCK、HPNZ、HABG, 对六组样品提取 16s rDNA 进行测序分析。分析结果如图 4-8 所示: 门分类水平上母猪粪便菌群结构如图 A 所示, 六组粪便样品菌群组成相同, 只是不同菌的含量有差异, 证实六组样品均符合要求, 可以进行下一步分析。为了进一步评估肠道菌群在属水平的差异, 本研究分析了各组免疫前后的菌群, 结果以韦恩图的形式进行展示 (图 B), 各组在免疫前 (1d) 与免疫后 (28d) 时肠道菌群均存在部分差异, 且不同组间的差异菌株数量不完全相同。图 C 通过 Indicator 分析显示了三组免疫前后属水平的差异菌群, 所有差异显著的菌种全部被显示出来, 气泡大小表明菌种的含量, 结果显示 ABG 组在免疫后, 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 的占比显著提高, 占到所有差异菌株中的第 3 名, 而 CK、PNZ 组的差异菌群中未观察到乳酸杆菌属。





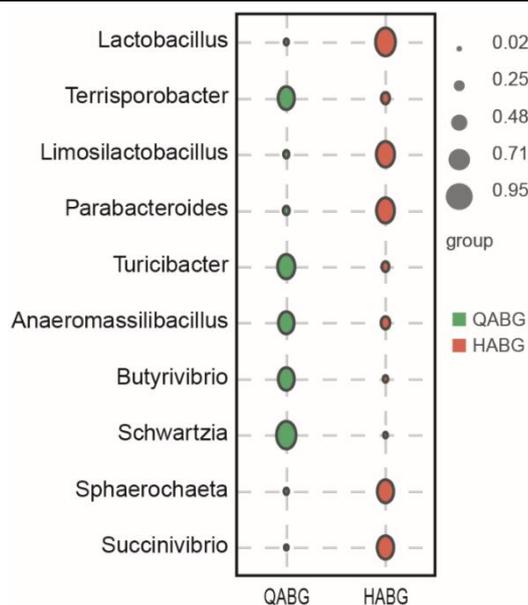


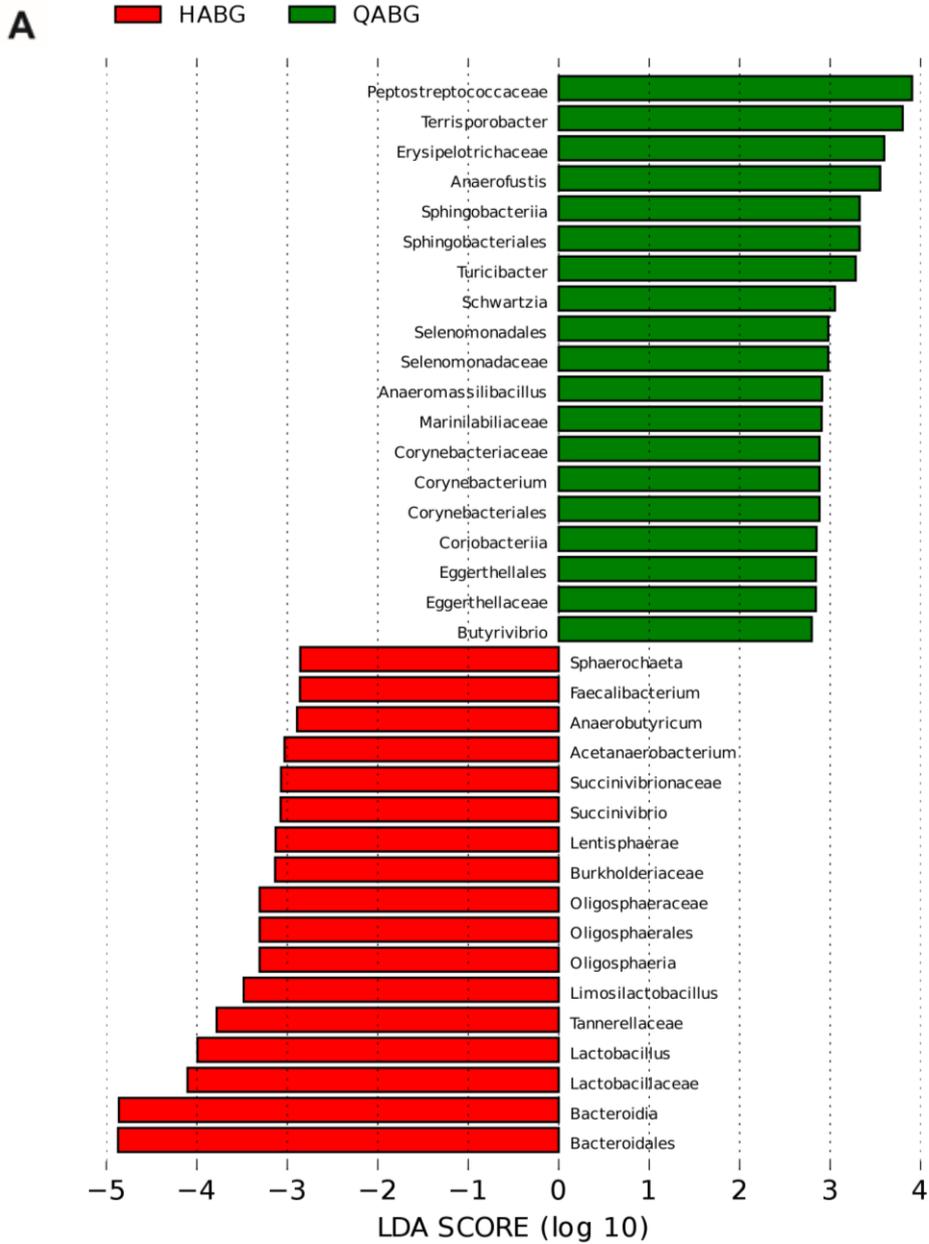
图 4-8 16S rDNA 扩增子测序检测各组肠道菌群结构

(A) 门分类水平上母猪粪便菌群堆叠图。(B) 各组免疫前后粪便微生物群落属水平异同物种数量韦恩图。(C) 各组免疫前后粪便微生物群落属水平差异物种 Indicator 分析。

Fig. 4-8 Gut microbiota structure in each group detected by 16S rDNA amplicon sequencing

(A) Stacked plot of sow fecal microbiota at the phylum taxonomic level. (B) The Venn diagram illustrates the similarities and differences in the genus-level composition of fecal microbial communities before and after immunization within each group. (C) Indicator analysis of the differences in fecal microbial community at the genus level before and after immunization within each group.

进一步将 ABG 组免疫前后属水平的差异物种进行 LEFSE 分析,如图 4-9 所示,采用双侧 Wilcoxon 秩和检验进行统计学分析,最后筛选出的差异使用 LDA (Linear Discriminant Analysis) 得出的结果进行排序得到图 A (默认保留 LDA 得分大于等于 2 的结果),随后通过将差异映射到已知层级结构的分类树的方式得到进化分支图(图 B)。结果显示,免疫后的 ABG 组乳酸杆菌属在肠道菌群中的含量显著提高,乳酸杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 在所有显著提高的菌种中分别排名第 3 和第 4 名(图 4-9A)。其中排名第 6 的黏液乳杆菌属(*Limosilactobacillus*) 原本也属于乳酸杆菌属,如罗伊氏乳杆菌和发酵乳杆菌等,2022 年之后被单独列为新的种属。进化分支图也可以看到,乳酸杆菌属(图中序号为: m)和黏液乳杆菌属(图中序号为: n)在同一个乳酸杆菌科(图中序号为: o)的层级中,均显著升高。



- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| ■ a: Corynebacterium | ■ s: Terrisporobacter |
| ■ b: Corynebacteriaceae | ■ t: Peptostreptococcaceae |
| ■ c: Corynebacteriales | ■ u: Acetanaerobacterium |
| ■ d: Eggerthellaceae | ■ v: Anaeromassilibacillus |
| ■ e: Eggerthellales | ■ w: Faecalibacterium |
| ■ f: Coriobacteriia | ■ x: Turicibacter |
| ■ g: Tannerellaceae | ■ y: Erysipelotrichaceae |
| ■ h: Bacteroidales | ■ z: Schwartzia |
| ■ i: Marinilabiliaceae | ■ a0: Selenomonadaceae |
| ■ j: Bacteroidia | ■ a1: Selenomonadales |
| ■ k: Sphingobacteriales | ■ a2: Oligosphaeraceae |
| ■ l: Sphingobacteriia | ■ a3: Oligosphaerales |
| ■ m: Lactobacillus | ■ a4: Oligosphaeria |
| ■ n: Limosilactobacillus | ■ a5: Burkholderiaceae |
| ■ o: Lactobacillaceae | ■ a6: Succinivibrio |
| ■ p: Anaerofustis | ■ a7: Succinivibrionaceae |
| ■ q: Anaerobutyricum | ■ a8: Sphaerochaeta |
| ■ r: Butyrivibrio | |

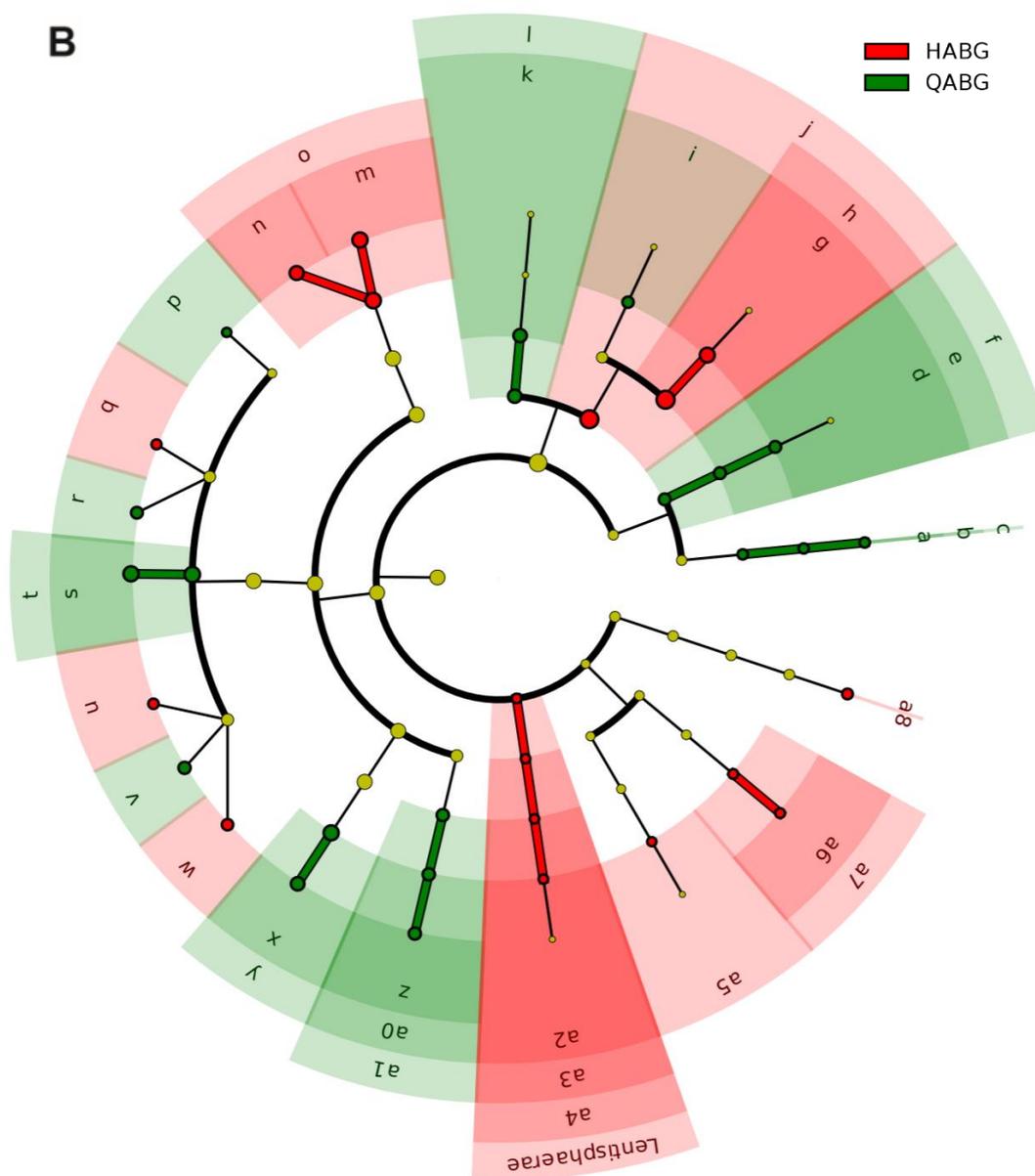


图 4-9 ABG 组菌群属水平的粪便微生物群落 LefSe 分析

Fig. 4-9 LefSe analysis of fecal microbial communities at the genus level in the ABG group

免疫前后 ABG 组差异菌群属水平的 welch's T-test 如图 4-10 所示，图形左半部份纵坐标表示差异物种，横坐标表示物种丰度均值；右半部分横坐标表示组间丰度的差值，点颜色表示丰度更高的分组，点的误差棒表示差值 95%置信区间的波动范围，纵坐标表示对应物种组间差异显著性，即 p 值大小。平均丰度数据显示相比免疫前，乳酸杆菌属在免疫后的平均丰度显著升高，且平均比例差在差异菌株中最大。

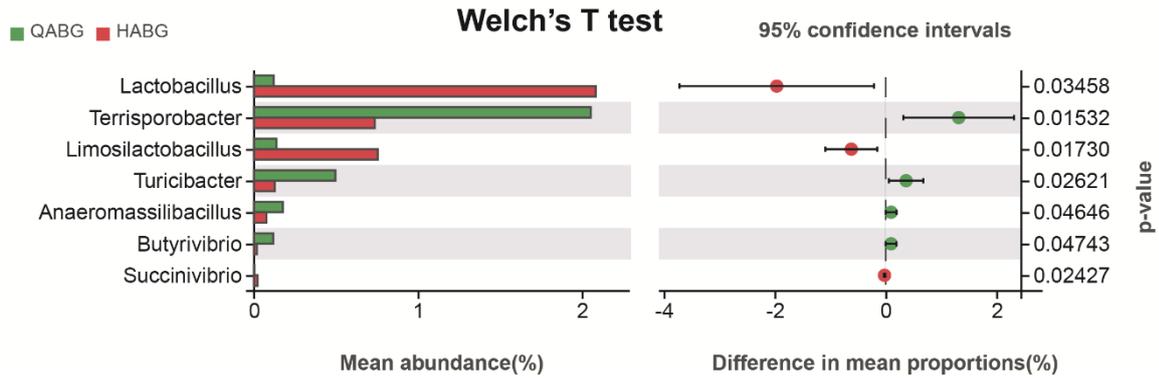


图 4-10 ABG 组菌群属水平的粪便微生物群落 welch's t 检验

Fig. 4-10 welch's t-test of fecal microbial communities at the genus level in the ABG group

对免疫前后 ABG 组差异菌群进行属水平的随机森林（Random Forest）分析（图 B），运用基尼指数（Gini index）、平均精确度减少指数（Mean Decrease Accuracy）两种指数进行分析。图中气泡大小、颜色表示对应物种丰度大小，气泡位置表示指数的大小。两种指数得到的结果有所不同，但是都筛选到了乳酸菌属的指数最大，丰度也较大。

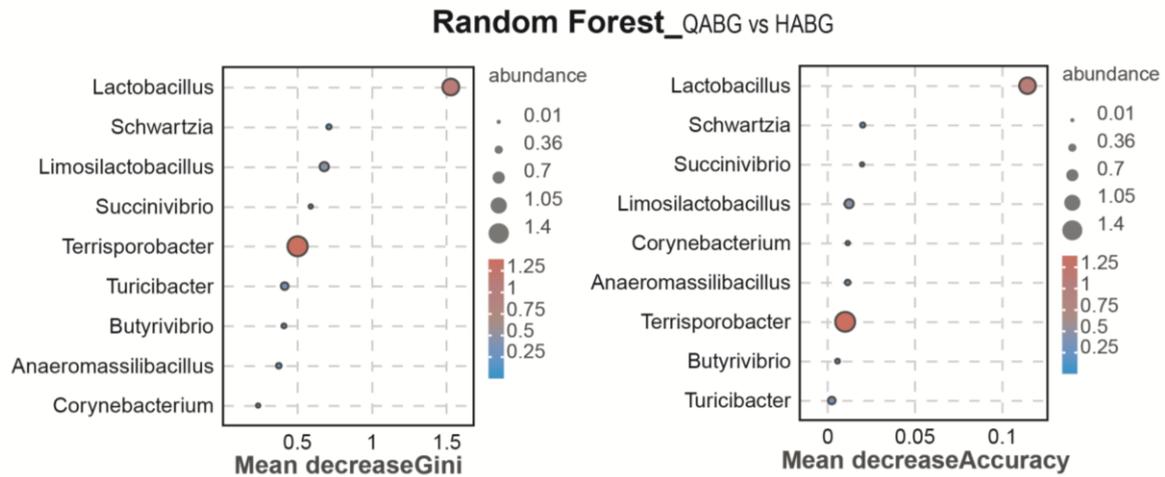


图 4-11 ABG 组菌群属水平的粪便微生物群落随机森林分析

Fig. 4-11 Random forest analysis of fecal microbial communities at the genus level in the ABG group

4.3.7 重组乳酸菌活载体口服疫苗四轮免疫提高了妊娠后期母猪肠道内菌群丰富度及均匀度

α 多样性指数主要用来计算特定环境内的物种多样性情况。本研究运用了 welch's t-test 和 wilcox 秩和检验两种方式分析了免疫前后 ABG 组的物种多样性情况, 结果显示免疫后 ABG 组的多样性升高。同时又运用 Kruskal-Wallis 秩和检验对免疫后(同时间)的 CK、PNZ、ABG 三组进行横向比较, 仍然是 ABG 组的多样性最高, 证明重组乳酸菌活载体口服疫苗的添加使母猪的肠道菌群多样性得到了提高(图 4-12)。

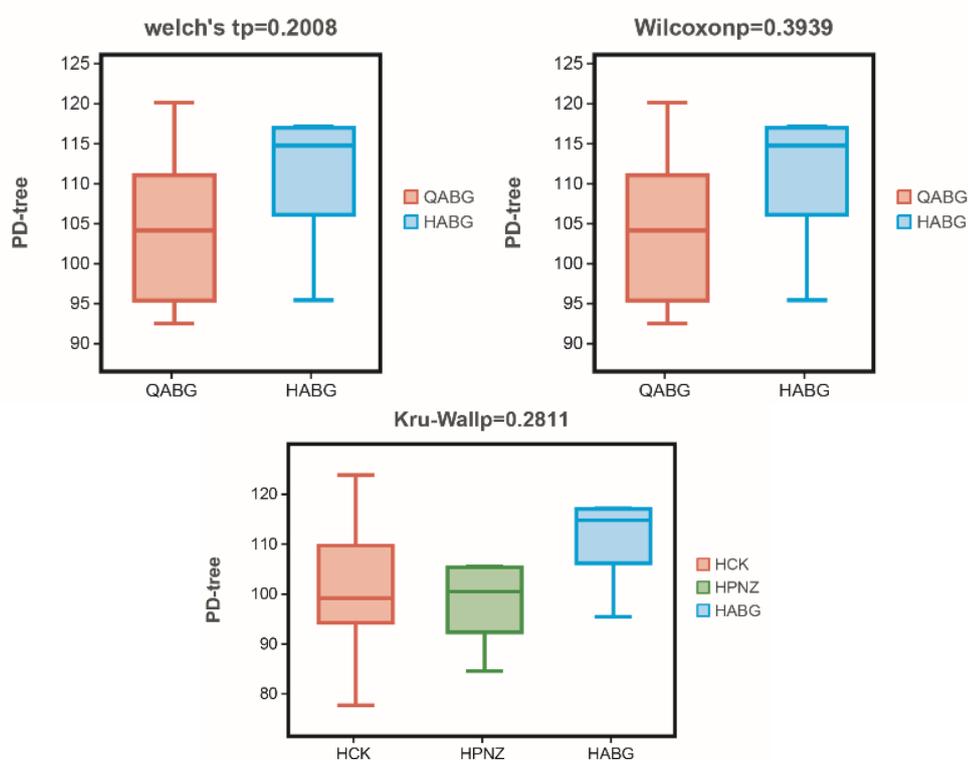


图 4-12 各组免疫前后粪便微生物群 α 多样性差异分析结果

Fig. 4-12 Results of analysis of differences in alpha diversity of fecal microbiota before and after immunization in each group

β 多样性指数主要用来显示物种多样性的差异, 在本研究中利用 PCoA 主坐标分析进行展示, 利用个样品显示在坐标中的点来体现样本间的相异性距离。图 4-13 中有颜色的点分别表示各个样品, 样品越相似, 反映在 PCoA 图中的距离越近。分析结果显示, 在六组样品中, 免疫后的 ABG 在 PCo1、PCo2 坐标上的差异性均最小, 证明其组间样品的相似度最高。

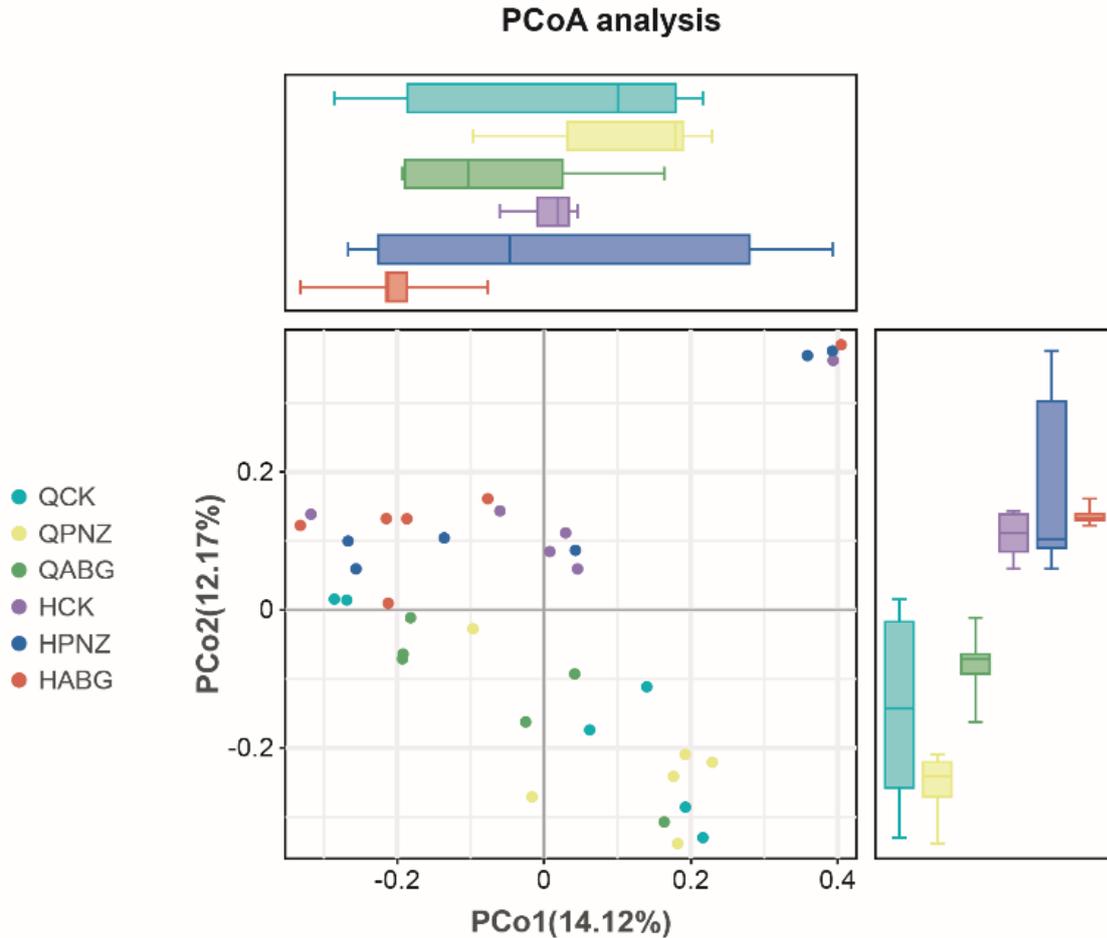


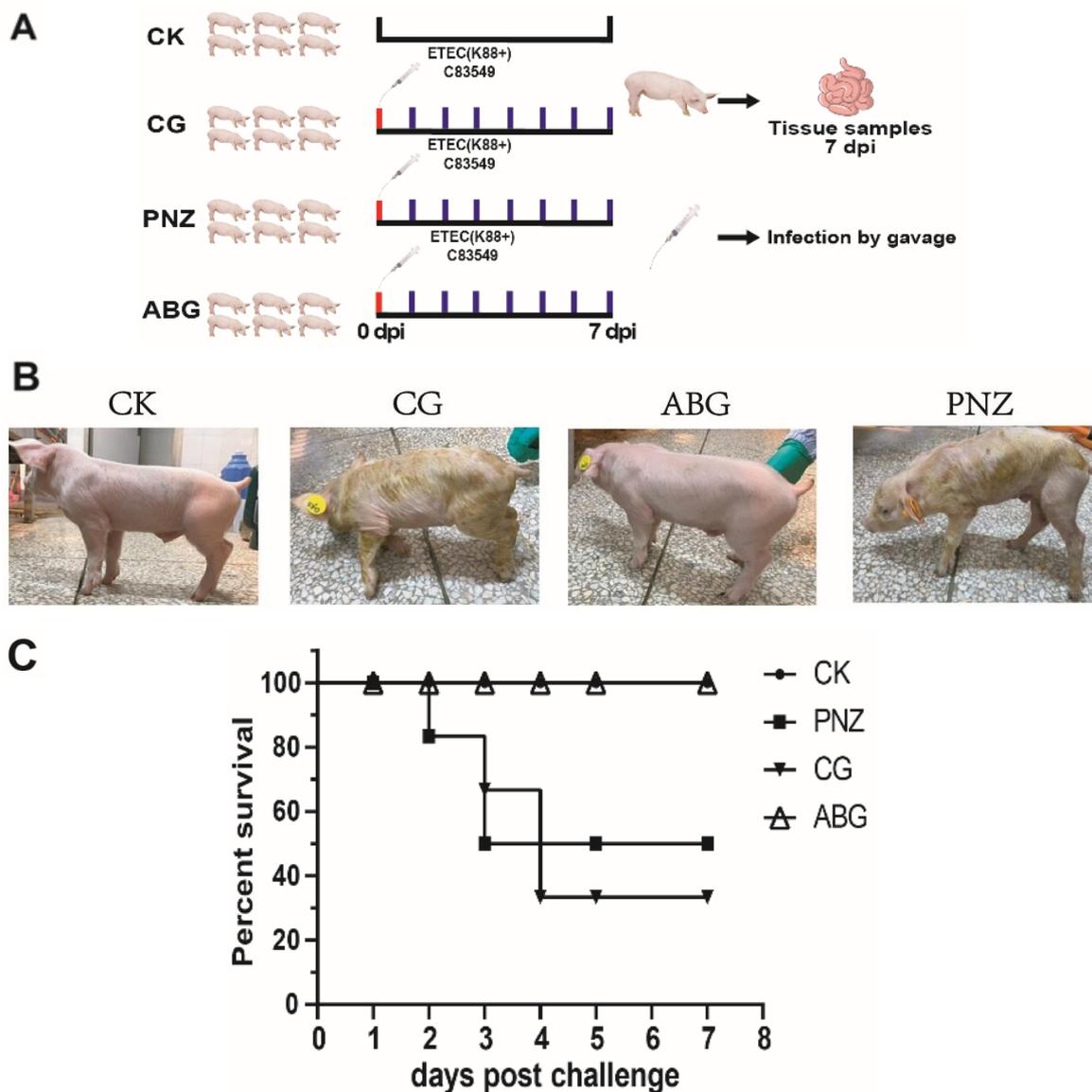
图 4-13 各组免疫前后粪便微生物群 β 多样性差异 PCoA 主坐标分析结果

Fig. 4-13 Results of PCoA principal coordinate analysis of differences in β diversity of fecal microbiota before and after immunization in each group

4.3.8 口服免疫母猪传递的母源抗体保护哺乳阶段（8 日龄）仔猪免受 F4⁺ETEC 感染

感染试验如图 4-14（A）所示，选取图 4-7（A）实验中各组母猪所生的仔猪进行试验，每组 6 头，按照母猪所属分组对仔猪进行分组，同时从 CK 组母猪所生仔猪另外挑选 6 头仔猪作为感染对照组（CG）组，仔猪 8 日龄时进行灌胃感染，感染后观察 7 天。感染后仔猪临床症状如图 B 所示，CG 组及 PNZ 组仔猪均发生了严重腹泻，脱水，消瘦，佝偻，战栗等症状，而 CK 组与 ABG 组仔猪均正常。感染后 7 天内的生存曲线如图 C 所示，CG 组有 4 头仔猪死亡，存活率 33.3%，PNZ 组仔猪有 3 头仔猪死亡，存活率 50%，相比之下，ABG 组存活率为 100%，CK 组仔猪全部存活。图 D 为攻毒后各组仔猪的腹泻症状及解剖图，如图所示，CG 组及 PNZ 组仔

猪均出现了明显的黄色水样腹泻，ABG 组与 CK 组均无腹泻症状。肠道解剖结果显示，CG 组及 PNZ 组仔猪出现了明显的出血，脱水，肠壁变薄，充满液性内容物，充气等症状，ABG 组与 CK 组肠道均较为正常。肠系膜淋巴结结果显示，CG 组出现了明显出血、萎缩，ABG 及 CK 组均正常。图 7E 分别展示了各组肠系膜淋巴结、十二指肠、空肠、回肠组织病理切片 HE 染色结果，在肠系膜淋巴结组织中，CG 组及 PNZ 组均出现了大量红细胞被吞噬后的含铁血黄素沉着，在切片中表现为黄色信号，同时也出现了成熟型淋巴细胞减少的现象。与 CK 相比，ABG 组成熟淋巴细胞含量更高。十二指肠、空肠、回肠组织病理切片 HE 染色结果显示，CG 组及 PNZ 组均出现了明显的充血、出血、肠壁肌肉层变薄、肠黏膜萎缩、碎裂，肠绒毛坏死灶，上皮内淋巴细胞浸润，固有层内浆细胞缺失等病变，相比之下，ABG 及 CK 组均正常。



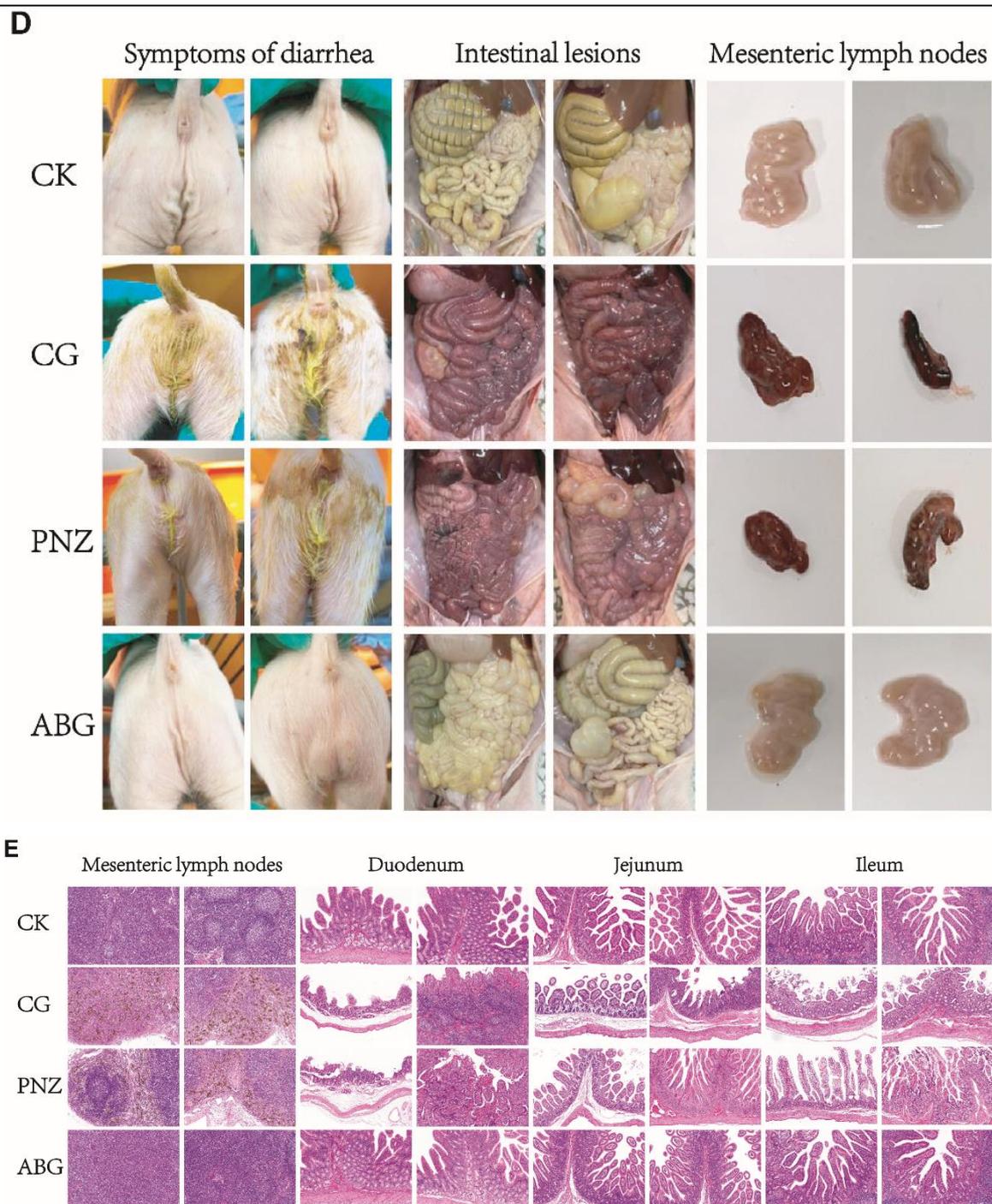


图 4-14 含母源抗体仔猪哺乳阶段 ETEC 感染结果

(A) 含母源抗体仔猪哺乳阶段动物实验示意图。(B) 各组仔猪感染后临床症状示意图。(C) 感染后 7 天内各组仔猪的存活情况。(D) 各组仔猪腹泻情况、解剖肠道病理变化、肠系膜淋巴结病理变化情况。(E) 各组仔猪肠系膜淋巴结及十二指肠、空肠、回肠病理切片 HE 染色结果 (10x)。

Fig. 4-14 Results of ETEC infection during lactation in piglets containing maternal antibodies

(A) Protocol for animal experiments during the suckling stage of piglets with maternal antibodies. (B) Clinical symptoms observed in each group of infected piglets. (C) Survival rates of piglets within 7 days after infection in each group. (D) Diarrhea, intestinal pathological changes, and mesenteric lymph node pathological changes in piglets. (E) Histopathological results from HE staining sections of mesenteric lymph nodes, duodenum, jejunum, and ileum in piglets(10x).

4.3.9 重组乳酸菌活载体口服疫苗保护存在母源抗体仔猪断奶阶段免受 F4+EPEC 感染

动物试验如图 4-15 (A) 所示, 选取图 4-7 (A) 实验中各组母猪所生的 8 日龄仔猪进行试验。各组感染后仔猪临床症状如图 B 所示, CG 组及 PNZ 组仔猪均出现了腹泻, 消瘦, 佝偻等症状, 而 CK 组与 ABG 组仔猪正常。口服免疫前后各组仔猪血清 IgG 抗体水平检测结果如图 C 所示, 试验第 1d 时 ABG 组及 BIM 组血清 IgG 抗体检测结果显示此时两组仔猪均存在母源抗体, 试验第 18d 时血清 IgG 抗体检测结果显示, BIM 组血清抗体水平持续升高, 达到了较高的水平, 而此时 ABG 组母源抗体基本已经消失, 与 CK、CG、PNZ 组没有差异。图 D 为攻毒后各组仔猪的腹泻症状及解剖图, 如图所示, CG 组、PNZ 组及 ABG 组仔猪均出现了腹泻症状, BIM 组与 CK 组均无腹泻症状。肠道解剖结果显示, CG 组、PNZ 组及 ABG 组仔猪出现了明显的肠壁变薄, 充满黄色液性内容物, 鼓气, 出血等症状, BIM 组与 CK 组肠道均较为正常。肠系膜淋巴结结果显示, CG 组、PNZ 组及 ABG 组出现了明显出血, BIM 组与 CK 组正常。图 E 分别展示了各组肠系膜淋巴结、十二指肠、空肠、回肠组织病理切片 HE 染色结果, 在肠系膜淋巴结组织中, CG 组及 PNZ 组均出现了大量的含铁血黄素沉着, 同时也出现了成熟型淋巴细胞显著减少的情况, ABG 组同样出现了上述情况, 但是相对前两组症状稍轻。BIM 组与 CK 组较为正常, 但与 CK 组相比, BIM 组成熟淋巴细胞含量更高。十二指肠、空肠、回肠组织病理切片 HE 染色结果显示, CG 组及 PNZ 组均出现了明显的肠壁肌肉层变薄、肠黏膜萎缩、碎裂, 肠绒毛坏死灶, 上皮内淋巴细胞浸润、固有层内浆细胞缺失、出血等症状, 同样, ABG 也出现了上述情况, 但是相对前两组症状稍轻。相比之下, ABG 及 CK 组均正常。

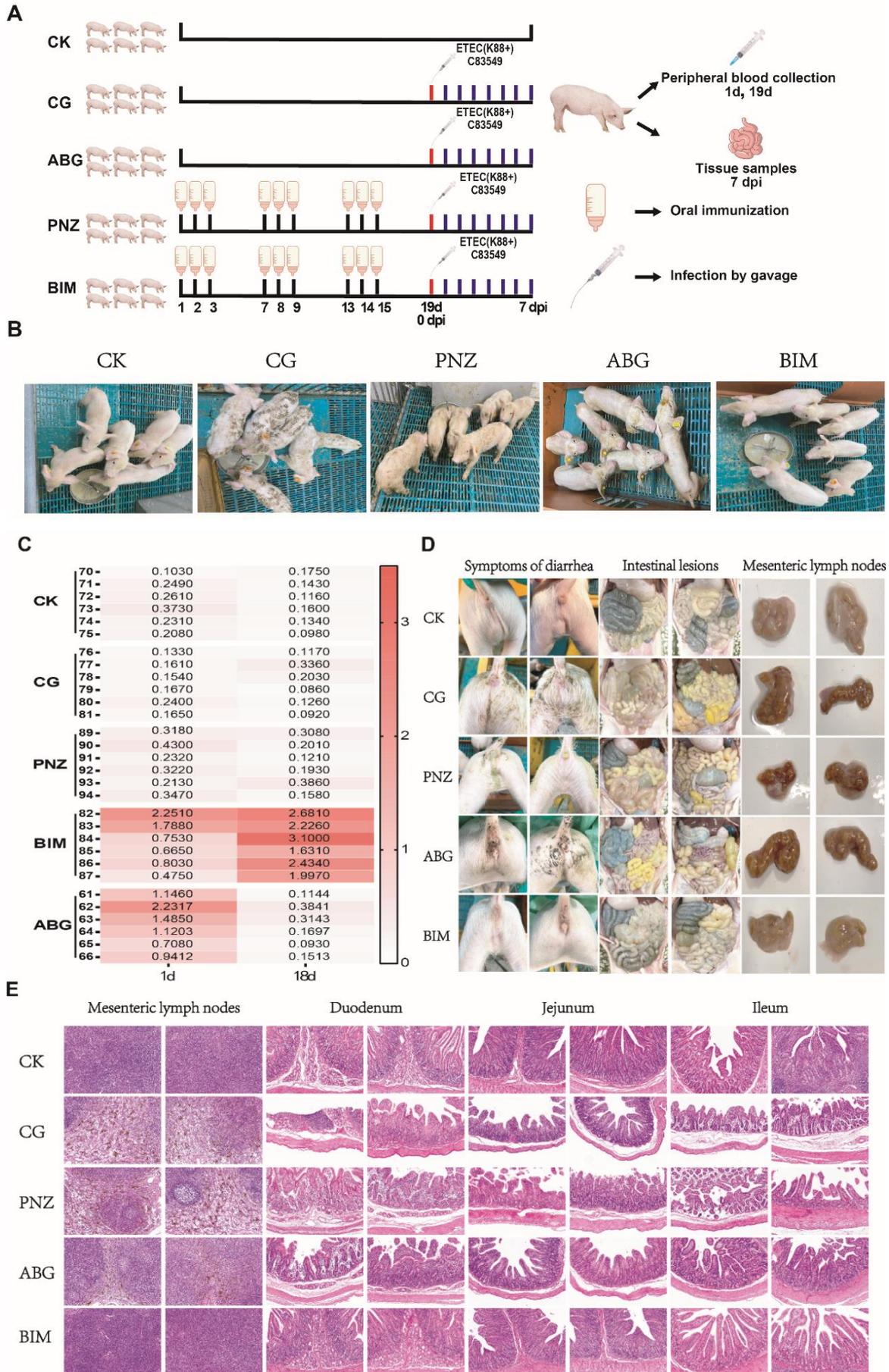


图 4-15 重组乳酸菌活载体口服疫苗母源抗体仔猪免疫保护结果

(A) 含母源抗体仔猪免疫保护断奶阶段实验示意图。(B) 各组仔猪感染后临床症状示意图。
(C) 免疫前后各组仔猪血清 IgG 抗体水平检测结果。(D) 各组仔猪腹泻情况、解剖肠道病变、肠系膜淋巴结病变情况。(E) 各组仔猪肠系膜淋巴结及十二指肠、空肠、回肠病理切片 HE 染色结果(10x)。

Fig. 4-15 Challenge results of piglet containing maternal antibodies immune recombinant lactobacilli live vector oral vaccine

(A) Schematic diagram of the experiment at the weaning stage of immune protection of piglets containing maternal antibodies. (B) Schematic diagram of clinical symptoms of piglets in each group after infection. (C) groups before and after immune piglets serum IgG antibody level test results. (D) Diarrhea, anatomical intestinal lesions and mesenteric lymph node lesions of piglets in each group. (E) HE staining results of pathological sections of mesenteric lymph nodes, duodenum, jejunum and ileum of piglets in each group (10x).

4.4 讨论

将上述三株重组乳酸菌复合制备成口服疫苗，分别在模式动物小鼠和本源易感动物猪只进行了动物实验验证疫苗的保护效果。

小鼠实验表明（图 4-3），通过四轮次的口服免疫，小鼠获得了较高的血清 IgG 抗体水平，并且在半数致死剂量的同源菌株 F4⁺产肠毒素大肠杆菌攻毒下完全保护了小鼠，这与多个研究的结果相似（Liu et al 2009, Wei et al 2010），存活小鼠的组织切片 HE 染色结果证实了上述结果，表明本口服疫苗能够在小鼠体内产生具有抵御 F4⁺ETEC 感染的抗体。

进而，本研究选取了无母源抗体的 8 日龄哺乳仔猪进行动物实验（图 4-6），实验前的血清 IgG 抗体水平进行了验证，证实所有仔猪均无母源抗体存在。所有仔猪均脱离了母猪喂养，采用人工奶粉的喂养模式。结果表明，经历了三轮次的免疫后，仔猪的体重得到了显著的提升，这表明仔猪在口服疫苗的作用下得到了更好的生长，同时也获得了较高的血清 IgG 抗体水平（Craig et al 2019），并且在全部腹泻剂量的感染下，保护仔猪全部不发生腹泻（Hur and Lee 2012）。攻毒后的体重结果可以看出，免疫后的仔猪保持了良好的生长态势，表示未受到感染的影响。解剖结果同样证实了这点，免疫后的仔猪的得到了较好的保护。上述结果证实了本口服疫苗对在

无母源抗体的仔猪中诱导了保护性免疫。

ETEC 对于猪群危害最大的阶段在于新生仔猪阶段，其主要导致 7 日龄以内的仔猪发生严重腹泻甚至脱水死亡，而针对本阶段的仔猪，最好的防护方案是较高的母源抗体传递给仔猪，起到保护仔猪的效果（Rutter and Jones 1973, Melkebeek et al 2013）。因而本研究设计了口服疫苗在母猪妊娠后期进行口服免疫，结果显示，经过四轮口服免疫后，母猪获得了较高的血清 IgG 抗体水平，并且至免疫后 30 天（仔猪断奶阶段）时抗体水平虽有所下降，但仍有较高水平。免疫后母猪的初乳中抗体水平检测获得了同样的结果，免疫组母猪初乳中抗体显著高于另外两组，且抗体水平约为血清中的 2 倍。仔猪的血清抗体水平同样得到了较大的提升，但组间差异较大，证实了母源抗体能够以初乳的形式进行传播，但可能由于仔猪摄取初乳的量不同而导致仔猪抗体水平有差异。8 日龄仔猪体重的差异同样有所提升，这可能提示口服疫苗不仅具有传递抗原的能力，同样具有提高产仔重的效果（图 4-7）。

此外，母猪免疫前后的粪便菌群结果显示，免疫后的母猪肠道内乳酸杆菌属的含量显著提高，而口服疫苗所用的乳酸菌空载体本身并没有提高母猪肠道内的乳酸杆菌的含量，这可能是表面展示的抗原为黏附素，增加了乳酸乳球菌在肠道内的停留时间（Alp and Kuleaşan 2019），进而促进了机体内的乳酸杆菌属含量的提高。同时，在免疫前的母猪肠道中观察到较高的有害细菌存在，而口服免疫后的母猪肠道内有益细菌的丰度增加，这表明口服疫苗的使用可能会引起母猪肠道环境的改变。同样，菌群 α 多样性分析发现，口服疫苗组的肠道菌群多样性得到了提高，这可能与口服疫苗使用的载体乳酸菌有关，乳酸菌在肠道内的含量升高，提升了动物肠道菌群的丰度，促使动物获得更高的肠道健康水平。同时 β 多样性差异分析显示，口服疫苗免疫后的猪只肠道菌群组成相似，在所有组中均匀度最高，证实本活载体疫苗的添加与猪群肠道健康程度的提高是直接相关的，这也更好的解释了免疫后母猪所产仔猪的体重高于对照组的原因。在免疫前后母猪的差异菌群中未发现本口服疫苗所用的载体菌株乳酸乳球菌 (*L. lactis*)，这表明本活载体疫苗菌株不能长期定植于胃肠道。相关研究表明，乳酸乳球菌在人胃肠道 (GIT) (Alp and Kuleaşan 2019) 中只能存活 4 小时，在胃肠道死亡后无法在环境中传播，这使得其作为转基因生物 (GMO) 具有更高的安全性 (Vesa et al 2000, Michon et al 2016, Craig et al 2019)。还有一种观点认为，定殖在肠道的菌容易产生免疫耐受，是一种长期的小剂量的刺激，进而导致免疫效果的降低，不利于疾病的防控，本菌不能长期定殖，在免疫过

程中，反而发挥出较为理想的免疫效果。

本研究同样对免疫后母猪所产 8 日龄仔猪进行了攻毒试验，结果显示，仔猪在母源抗体的保护下，能够抵抗半数致死剂量的攻击，免疫组全部存活，对照组甚至死亡 60%，表明口服疫苗免疫母猪后带来的母源抗体能够帮助新生仔猪抵御 ETEC 的感染。另外一个试验表明，母源抗体并不能保护仔猪在断奶阶段免受 ETEC 的感染，仔猪的母源抗体在哺乳阶段会逐渐降低，断奶时已完全消失(图 4-15)(Melkebeek et al 2013)。基于此，本研究采取了仔猪继续口服免疫的方案，对于含有母源抗体的仔猪，在 8 日龄开始口服免疫，经过三轮免疫后，结果显示在断奶阶段，仔猪的血清 IgG 抗体水平得到了进一步的提升。并且在全部腹泻剂量的感染下，口服免疫组得到了全部保护，母源抗体组与无母源抗体组均发生腹泻，证实母源抗体仔猪继续口服免疫能够保护断奶阶段的仔猪。这也就表明，通过妊娠母猪后期四轮口服免疫以及哺乳仔猪三轮口服免疫，能够保护仔猪在整个哺乳阶段至断奶后均不发生腹泻。

另外，本研究还存在一定不足，如所有实验的仔猪是在脱离母猪喂养，采取人工奶粉喂养的模式下进行的，这里可能排除了乳汁中的抗体对于口服免疫的影响 (Augustyniak and Pomorska-Mól 2023)，这有待进一步试验验证。并且，本研究采用的免疫方式为通过拌料的方式将疫苗加入母猪饲料中实现口服免疫的效果，仔猪免疫也是混匀至仔猪的人工奶粉中，仍需要进一步研究在临床中的具体免疫方式，比如饮水、灌服等对免疫效果的影响。同时，本口服疫苗的免疫流程还比较复杂，免疫持续期长，在临床使用过程中可能会造成一定的遗漏免疫等，还需要进一步优化。此外，能够导致仔猪阶段发生腹泻的菌株，近年来还有 F18 菌毛型，本研究中并未对不同型菌株的感染进行交叉保护评价，有待进一步实验验证。综上所述，本口服疫苗通过合理的免疫后，能够通过免疫母猪进而使仔猪获得母源抗体，保护新生阶段的仔猪免受 F4⁺产肠毒素大肠杆菌的感染，仔猪继续口服免疫后，对断奶后仔猪的感染同样有较强的保护效果。在没有母源抗体的情况下，单独口服免疫仔猪同样保护仔猪不在断奶阶段发生腹泻，本疫苗能够保护整个 ETEC 对于仔猪的易感阶段，具有极大的发展前景。

4.5 小结

(1) 将三株重组菌等比混合后用 15%脱脂乳作为液体保护剂，制成了一款口服疫苗，活菌含量为 3×10^{10} CFU/mL，其中每个重组菌在体系中的终浓度为 1×10^{10} CFU/mL。

(2) 分别构建了小鼠和无母源抗体仔猪 F4⁺ETEC 灌胃感染模型，并利用上述口服疫苗进行免疫保护实验，结果表明四轮口服免疫能够全部保护 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染，三轮口服免疫能够保护仔猪在断奶阶段的 F4⁺ETEC 感染。

(3) 本活载体疫苗四轮口服免疫能够提高母猪血清和初乳中的 IgG 抗体水平，并通过初乳传递给仔猪。母猪口服免疫前后的肠道菌群组成表明，重组乳酸菌不能在肠道内定殖，但其促进了乳酸杆菌在母猪肠道内的繁殖，影响了菌群结构。

(4) 母猪传给给仔猪的母源抗体能够抵御 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染，保护仔猪在哺乳期不发生腹泻及死亡，同时，含母源抗体仔猪在哺乳期进行三轮口服免疫，能够帮助断奶阶段母源抗体消失的仔猪抵抗 F4⁺ETEC 感染。

全文总结

(1) ETEC 的分离率与样品的情况关系密切, 腹泻样品分离率高, 健康猪群分离率低, 这表明本菌不是常在菌, 并且主要定殖于肠道。本研究分离到的 ETEC 中, 毒素流行率最高的为 STb, 菌毛流行率最高的为 F4 (K88), 流行率最高的菌毛与毒素组合为 K88/Sta/Stb。

(2) 含有 F4 菌毛黏附素或 LT 蛋白两种抗原任意一种的菌株总数在分离株中比例较高, 提示这两种抗原有作为本病疫苗开发靶标的潜力。利用这两种抗原构建了三株表面展示外源抗原蛋白的重组乳酸乳球菌 LAB-dmLTa、LAB-LTb 和 LAB-FaeG。

(3) 重组质粒的存在反而使乳酸乳球菌的生长活性更强, 并且重组菌株适宜在 pH=6-8 环境下生长, 在强酸环境下无法存活。重组乳酸菌以 15% 脱脂牛奶作为保护剂, 储存在 -20°C 环境时能够保存 20 周, 活菌数无显著变化。重组乳酸菌对大部分的常见抗生素均无耐药性, 仅对诺氟沙星, 复方新诺明, 环丙沙星三种抗生素耐药, 对丁胺卡那及多粘菌素 B 存在一定程度的耐药。

(4) 利用上述三株重组菌株制成了一款口服疫苗, 每个重组菌的终浓度为 1×10^{10} CFU/mL。分别构建了小鼠和无母源抗体仔猪 F4⁺ETEC 灌胃感染模型, 并利用上述口服疫苗进行免疫保护实验, 结果表明四轮口服免疫能够全部保护 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染, 三轮口服免疫能够保护仔猪在断奶阶段的 F4⁺ETEC 感染。

(5) 本活载体疫苗四轮口服免疫能够提高妊娠母猪血清和初乳中的 IgG 抗体水平, 并通过初乳传递给仔猪。母猪口服免疫前后的肠道菌群组成表明, 重组乳酸菌不能在肠道内定殖, 但其促进了乳酸杆菌在母猪肠道内的繁殖, 影响了菌群结构。母猪传给给仔猪的母源抗体能够抵御 LD₅₀ 剂量的 F4⁺ETEC 感染, 保护仔猪在哺乳期不发生腹泻及死亡, 同时, 含母源抗体仔猪在哺乳期进行三轮口服免疫, 能够帮助断奶阶段母源抗体消失的仔猪抵抗 F4⁺ETEC 感染。

参考文献

1. 陈怡洁, 袁秀芳, 徐丽华, 余斌, 苏菲, 叶十一, 卢碧凯, 蒋利明, 张晖, 李军星. 浙江省猪源产肠毒素大肠杆菌分子流行病学调查. 中国兽医学报, 2023, 43: 1651-1657
2. 陈亮, 刘雪松, 沈思思, 冯万宇, 李丹, 张蕾, 苗艳, 兰世捷, 于辰龙, 张艳, 江波涛. 齐齐哈尔地区致仔猪腹泻产肠毒素大肠杆菌毒力及耐药基因的检测. 黑龙江畜牧兽医, 2023 (06): 76-83
3. 胡子喆, 猪肉供应链耐药大肠杆菌的流行分布规律及其耐药传播特性的研究. [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2023
4. 李路路, 猪病毒性腹泻三联重组乳酸菌的构建及免疫效力评价. [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2021
5. 刘琼, 陈宏亮, 姜延龙, 王春风. 基因工程乳酸菌作为活载体表达外源蛋白及疾病防治研究进展. 中国兽医杂志, 2019, 55 (06): 76-80
6. 马俊飞, 丁承超, 谢曼曼, 曾海娟, 郭亮, 汪冠豪, 刘箐. 活载体疫苗的研究进展. 微生物学杂志, 2018, 38 (03): 91-97
7. 苏雅婷, 肠毒素性大肠杆菌的 RFP 基因特异性标记及表达研究. [硕士学位论文]. 武汉: 中南民族大学图书馆, 2020
8. 孙宏伟, 王泽岩, 任少敏, 高发辉, 高小鹏, 何斌, 区亮欣, 罗胜军. 猪主要腹泻病的发病机制综述. 中国动物检疫, 2016, 33 (03): 63-66
9. 王通, ETEC 菌毛和肠毒素双重阻断特异性多价卵黄抗体研发. [硕士学位论文]. 大连: 大连理工大学图书馆, 2021
10. 吴梦阳, 产肠毒素大肠杆菌诱导小肠上皮细胞焦亡及其机制的初步研究. [硕士学位论文]. 长春: 吉林农业大学图书馆, 2024
11. 吴杨, 闫艳新, 孙虎芝, 潘强, 任慧英, 张灿. 仔猪细菌性腹泻病原菌的分离鉴定与耐药性分析. 中国兽医杂志, 2022, 58 (11): 95-99
12. 周虹, 朱军, 朱国强. 动物源产肠毒素大肠杆菌(ETEC)黏附素研究进展. 微生物学报, 2012, 52 (06): 679-686
13. Chen X, Gao S, Jiao X, Liu XF. Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern

- China. *Vet. Microbiol.*, 2004, 103: 13-20
14. Toledo A, Gómez D, Cruz C, Carreón R, López J, Giono S, Castro AM. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *J. Med. Microbiol.*, 2012, 61: 148-156
 15. Vidotto MC, de Lima NC, Fritzen JT, de Freitas JC, Venâncio MJ, Ono MA. Frequency of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets with diarrhea in the North Parana State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 2009, 40: 199-204
 16. Acres SD. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. *J. Dairy Sci.*, 1985, 68: 229-256
 17. Alp D, Kuleaşan H. Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 35: 156
 18. Angström J, Bäckström M, Berntsson A, Karlsson N, Holmgren J, Karlsson KA, Lebens M, Teneberg S. Novel carbohydrate binding site recognizing blood group A and B determinants in a hybrid of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunits. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 3231-3238
 19. Augustyniak A, Pomorska-Mól M. Vaccination Failures in Pigs-The Impact of Chosen Factors on the Immunisation Efficacy. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11(2): 230
 20. Ayivi RD, Edwards A, Carrington D, Brock A, Krastanov A, Eddin AS, Ibrahim SA. The Cultivation, Growth, and Viability of Lactic Acid Bacteria: A Quality Control Perspective. *J Vis Exp*, 2022, (184): 10.3791/63314
 21. Baker DR, Billey LO, Francis DH. Distribution of K88 *Escherichia coli*-adhesive and nonadhesive phenotypes among pigs of four breeds. *Vet. Microbiol.*, 1997, 54: 123-132
 22. Baldo V, Salogni C, Giovannini S, D'Incau M, Boniotti MB, Birbes L, Pitozzi A, Formenti N, Grassi A, Pasquali P, Alborali GL. Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 545818
 23. Behrens RH, Cramer JP, Jelinek T, Shaw H, von Sonnenburg F, Wilbraham D, Weinke T, Bell DJ, Asturias E, Pauwells HL, Maxwell R, Paredes-Paredes M, Glenn GM, Dewasthaly S, Stablein DM, Jiang ZD, DuPont HL. Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers'

- diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. *Lancet Infect. Dis.*, 2014, 14: 197-204
24. Bera S, Thillai K, Sriraman K, Jayaraman G. Process strategies for enhancing recombinant streptokinase production in *Lactococcus lactis* cultures using P170 expression system. *Biochem. Eng. J.*, 2015, 93: 94-101
 25. Berberov EM, Zhou Y, Francis DH, Scott MA, Kachman SD, Moxley RA. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect. Immun.*, 2004, 72: 3914-3924
 26. Berlec A, Ravnikar M, Strukelj B. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. *Pharmazie*, 2012, 67: 891-898
 27. Bölin I, Wiklund G, Qadri F, Torres O, Bourgeois AL, Savarino S, Svennerholm AM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44: 3872-3877
 28. Bonetti A, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. Thymol as an Adjuvant to Restore Antibiotic Efficacy and Reduce Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Expression in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(8): 1073
 29. Bosworth BT, Dean-Nystrom EA, Casey TA, Neibergs HL. Differentiation of F18ab⁺ from F18ac⁺ *Escherichia coli* by single-strand conformational polymorphism analysis of the major fimbrial subunit gene (fedA). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1998, 5: 299-302
 30. Bourgeois AL, Wierzbza TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2016, 34: 2880-2886
 31. Brunauer M, Roch FF, Conrady B. Prevalence of Worldwide Neonatal Calf Diarrhoea Caused by Bovine Rotavirus in Combination with Bovine Coronavirus, *Escherichia coli* K99 and Cryptosporidium spp.: A Meta-Analysis. *Animals (Basel)*, 2021, 11(4): 1014
 32. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for

- binding to (peptido)glycans. *Mol. Microbiol.*, 2008, 68: 838-847
33. Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367: 1112-1122
 34. Byun JW, Jung BY, Kim HY, Fairbrother JM, Lee MH, Lee WK. Real-time PCR for differentiation of F18 variants among enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from piglets with diarrhoea and oedema disease. *Vet. J.*, 2013, 198: 538-540
 35. Cahill EE, Glantz PJ. Demonstration of K88ac and K88ab antigens of *Escherichia coli* by means of immunoelectrophoresis and immunodiffusion. *Infect. Immun.*, 1978, 20: 811-815
 36. Cao J, Khan AS, Bayer ME, Schifferli DM. Ordered translocation of 987P fimbrial subunits through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1995, 177: 3704-3713
 37. Carroll CJ, Hocking DM, Azzopardi KI, Praszquier J, Bennett-Wood V, Almeida K, Ingle DJ, Baines SL, Tauschek M, Robins-Browne RM. Re-evaluation of a Neonatal Mouse Model of Infection With Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 2021, 12: 651488
 38. Cassels FJ, Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol*, 1995, 15: 214-226
 39. Chapman TA, Wu XY, Barchia I, Bettelheim KA, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72: 4782-4795
 40. Choi C, Chae C. Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *Vet. Microbiol.*, 1999, 67: 307-310
 41. Clements JD, Norton EB. The Mucosal Vaccine Adjuvant LT(R192G/L211A) or dmLT. *mSphere*, 2018, 3(4): e00215-18
 42. Conway PL, Welin A, Cohen PS. Presence of K88-specific receptors in porcine ileal mucus is age dependent. *Infect. Immun.*, 1990, 58: 3178-3182
 43. Craig K, Dai X, Li A, Lu M, Xue M, Rosas L, Gao TZ, Niehaus A, Jennings R, Li J. A Lactic Acid Bacteria (LAB)-Based Vaccine Candidate for Human Norovirus.

- Viruses*, 2019, 11(3):213
44. De Lorenzo C, de Andrade CP, Machado VSL, Bianchi MV, Rolim VM, Cruz RAS, Driemeier D. Piglet colibacillosis diagnosis based on multiplex polymerase chain reaction and immunohistochemistry of paraffin-embedded tissues. *J Vet Sci*, 2018, 19: 27-33
 45. Dean-Nystrom EA, Samuel JE. Age-related resistance to 987P fimbria-mediated colonization correlates with specific glycolipid receptors in intestinal mucus in swine. *Infect. Immun.*, 1994, 62: 4789-4794
 46. Dean EA. Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestines of neonatal and older pig. *Infect. Immun.*, 1990, 58: 4030-4035
 47. Dean EA, Whipp SC, Moon HW. Age-specific colonization of porcine intestinal epithelium by 987P-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1989, 57: 82-87
 48. Deep A, Grakh K, Vaishali, Kumar M, Gupta R, Mittal D, Kumar R, Jindal N. Molecular epidemiology, antibiogram profile and risk factor analysis of pathogenic *Escherichia coli* associated with pre-weaning diarrhoea in piglets from Haryana, India. *J Infect Public Health*, 2023, 16: 1793-1801
 49. Do KH, Byun JW, Lee WK. Prevalence of O-serogroups, virulence genes, and F18 antigenic variants in *Escherichia coli* isolated from weaned piglets with diarrhea in Korea during 2008-2016. *J Vet Sci*, 2019, 20: 43-50
 50. Douillard FP, O'Connell-Motherway M, Cambillau C, van Sinderen D. Expanding the molecular toolbox for *Lactococcus lactis*: construction of an inducible thioredoxin gene fusion expression system. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 66
 51. Duan Q, Xia P, Nandre R, Zhang W, Zhu G. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 292
 52. Dubreuil JD. Pig vaccination strategies based on enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins. *Braz. J. Microbiol.*, 2021, 52: 2499-2509
 53. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*.

- EcoSal Plus*, 2016, 7(1): 10.1128
54. Dubreuil JD. 2014. ESCHERICHIA COLI | Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), In: Batt CA, Tortorello ML (Eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Oxford, 728-734
 55. Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 1998, 6: 282-287
 56. Edwards RA, Schifferli DM. Differential regulation of *fasA* and *fasH* expression of *Escherichia coli* 987P fimbriae by environmental cues. *Mol. Microbiol.*, 1997, 25: 797-809
 57. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev*, 2005, 6: 17-39
 58. Fekete PZ, Mateo KS, Zhang W, Moxley RA, Kaushik RS, Francis DH. Both enzymatic and non-enzymatic properties of heat-labile enterotoxin are responsible for LT-enhanced adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine IPEC-J2 cells. *Vet. Microbiol.*, 2013, 164: 330-335
 59. Fekete PZ, Schneider G, Olasz F, Blum-Oehler G, Hacker JH, Nagy B. Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18⁺ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2003, 293: 287-298
 60. Feng Q, Yang J, Luo P, Zhang WJ, Zou QM. LT(K63/R72), a new mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, exhibits characteristics more similar to LT(K63) than LT(R72). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37: 126-132
 61. Field M, Rao MC, Chang EB. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease (2). *N Engl J Med*, 1989, 321: 879-883
 62. Fleckenstein JM. Confronting challenges to enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine development. *Front Trop Dis*, 2021, 2:709907
 63. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*, 2010, 12: 89-98

64. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2009, 25: 13-36, xi
65. Francis DH, Allen SD, White RD. Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, 50: 822-826
66. Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, McKenzie R, Belkind-Gerson J, Figueroa JF, Okhuysen PC, Guerrero NH, Martinez-Sandoval FG, Meléndez-Romero JH, Jiang ZD, Asturias EJ, Halpern J, Torres OR, Hoffman AS, Villar CP, Kassem RN, Flyer DC, Andersen BH, Kazempour K, et al. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet*, 2008, 371: 2019-2025
67. Frederick DR, Goggins JA, Sabbagh LM, Freytag LC, Clements JD, McLachlan JB. Adjuvant selection regulates gut migration and phenotypic diversity of antigen-specific CD4(+) T cells following parenteral immunization. *Mucosal Immunol*, 2018, 11: 549-561
68. Frelet-Barrand A. *Lactococcus lactis*, an Attractive Cell Factory for the Expression of Functional Membrane Proteins. *Biomolecules*, 2022, 12(2):180
69. García-Fruitós E. Lactic Acid Bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 157
70. Glenn GM, Villar CP, Flyer DC, Bourgeois AL, McKenzie R, Lavker RM, Frech SA. Safety and immunogenicity of an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine patch containing heat-labile toxin: use of skin pretreatment to disrupt the stratum corneum. *Infect. Immun.*, 2007, 75: 2163-2170
71. Güereña-Burgueño F, Hall ER, Taylor DN, Cassels FJ, Scott DA, Wolf MK, Roberts ZJ, Nesterova GV, Alving CR, Glenn GM. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. *Infect. Immun.*, 2002, 70: 1874-1880
72. Guinée PA, Jansen WH. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion, and hemagglutination. *Infect. Immun.*, 1979, 23: 700-705
73. Gupta SK, Keck J, Ram PK, Crump JA, Miller MA, Mintz ED. Part III. Analysis of

- data gaps pertaining to enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. *Epidemiol. Infect.*, 2008, 136: 721-738
74. Harford S, Dykes CW, Hobden AN, Read MJ, Halliday IJ. Inactivation of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by in vitro mutagenesis of the A-subunit gene. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 183: 311-316
75. Hernandez-Valdes JA, Huang C, Kok J, Kuipers OP. Another Breaker of the Wall: the Biological Function of the Usp45 Protein of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020, 86(16): e00903-20
76. Horstman AL, Kuehn MJ. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 32538-32545
77. Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 12489-12496
78. Huang J, Duan Q, Zhang W. Significance of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) Heat-Labile Toxin (LT) Enzymatic Subunit Epitopes in LT Enterotoxicity and Immunogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, 84(15): e00849-18
79. Hur J, Lee JH. Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesins for colibacillosis with a commercial vaccine using a pig model. *Vaccine*, 2012, 30: 3829-3833
80. Hur J, Lee KM, Lee JH. Age-dependent competition of porcine enterotoxigenic *E. coli* (EPEC) with different fimbria genes - short communication. *Acta Vet Hung*, 2011, 59: 411-417
81. Imberechts H, Van Pelt N, De Greve H, Lintermans P. Sequences related to the major subunit gene fedA of F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that express adhesive fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, 119: 309-314
82. Imberechts H, Wild P, Charlier G, De Greve H, Lintermans P, Pohl P. Characterization of F18 fimbrial genes fedE and fedF involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86. *Microb. Pathog.*, 1996, 21:

183-192

83. Isaacson RE, Richter P. Escherichia coli 987P pilus: purification and partial characterization. *J. Bacteriol.*, 1981, 146: 784-789
84. Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*, 2011, 29: 6167-6178
85. Jerez-Bogota K, Jensen M, Højberg O, Cormican P, Lawlor PG, Gardiner GE, Canibe N. Antibacterial plant combinations prevent postweaning diarrhea in organically raised piglets challenged with enterotoxigenic Escherichia coli F18. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1095160
86. Joffré E, von Mentzer A, Svennerholm AM, Sjöling Å. Identification of new heat-stable (STa) enterotoxin allele variants produced by human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Int. J. Med. Microbiol.*, 2016, 306: 586-594
87. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2: 123-140
88. Kennan RM, Moncktor RP, McDougall BM, Conway PL. Confirmation that DNA encoding the major fimbrial subunit of Av24 fimbriae is homologous to DNA encoding the major fimbrial subunit of F107 fimbriae. *Microb. Pathog.*, 1995, 18: 67-72
89. Khan AS, Johnston NC, Goldfine H, Schifferli DM. Porcine 987P glycolipid receptors on intestinal brush borders and their cognate bacterial ligands. *Infect. Immun.*, 1996, 64: 3688-3693
90. Khan AS, Schifferli DM. A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin. *Infect. Immun.*, 1994, 62: 4233-4243
91. Kim K, Song M, Liu Y, Ji P. Enterotoxigenic Escherichia coli infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance. *Front Immunol*, 2022, 13: 885253
92. Kopic S, Geibel JP. Toxin mediated diarrhea in the 21 century: the pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. cholerae and rotavirus infection. *Toxins (Basel)*, 2010, 2: 2132-2157

93. Krogh HV. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhoea. *Nord Vet Med*, 1983, 35: 346-352
94. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, De Vos WM. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 216: 281-291
95. Lalsiamthara J, Kamble NM, Lee JH. A live attenuated *Salmonella* Enteritidis secreting detoxified heat labile toxin enhances mucosal immunity and confers protection against wild-type challenge in chickens. *Vet. Res.*, 2016, 47: 60
96. LeCureux JA-O, Dean GA-O. *Lactobacillus* Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens. *mSphere*, 2018, 3(3): e00061-18
97. Lee S, Picking WL, Tzipori S. The immune response of two microbial antigens delivered intradermally, sublingually, or the combination thereof. *Microbes Infect*, 2014, 16: 796-803
98. Li S, Wang L, Zhou Y, Miao Z. Prevalence and characterization of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets suffering post-weaning diarrhoea in Shandong Province, China. *Vet Med Sci*, 2020, 6: 69-75
99. Liu JK, Hou XL, Wei CH, Yu LY, He XJ, Wang GH, Lee JS, Kim CJ. Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 4491-4497
100. Liu S, Li Y, Xu Z. Induction of specific immune responses in piglets by intramuscular immunization with fimbrial adhesin FaeG expressed in *Lactococcus lactis*. *Res. Vet. Sci.*, 2013, 95: 130-136
101. Liu W, Yuan C, Meng X, Du Y, Gao R, Tang J, Shi D. Frequency of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from suckling pigs with diarrhoea in China. *Vet. J.*, 2014, 199: 286-289
102. Loos M, Geens M, Schauvliege S, Gasthuys F, van der Meulen J, Dubreuil JD, Goddeeris BM, Niewold T, Cox E. Role of heat-stable enterotoxins in the induction of early immune responses in piglets after infection with enterotoxigenic

- Escherichia coli. *PLoS One*, 2012, 7: e41041
103. Lu T, Moxley RA, Zhang W. Mapping the Neutralizing Epitopes of Enterotoxigenic Escherichia coli K88 (F4) Fimbrial Adhesin and Major Subunit FaeG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019a, 85(11): e00329-19
 104. Lu T, Seo H, Moxley RA, Zhang W. Mapping the neutralizing epitopes of F18 fimbrial adhesin subunit FedF of enterotoxigenic Escherichia coli (EPEC). *Vet. Microbiol.*, 2019b, 230: 171-177
 105. Lu WW, Wang T, Wang Y, Xin M, Kong J. A food-grade fimbrial adhesin FaeG expression system in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei*. *Can J Microbiol*, 2016, 62: 241-248
 106. Lundgren A, Bourgeois L, Carlin N, Clements J, Gustafsson B, Hartford M, Holmgren J, Petzold M, Walker R, Svennerholm AM. Safety and immunogenicity of an improved oral inactivated multivalent enterotoxigenic Escherichia coli (EPEC) vaccine administered alone and together with dmLT adjuvant in a double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I study. *Vaccine*, 2014, 32: 7077-7084
 107. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag*, 2017, 3: 16
 108. Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, Bonilauri P, Labarque G, Hidalgo Á. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag*, 2016, 2: 20
 109. Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of Escherichia coli causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, 55: 712-719
 110. Martinez-Jaramillo E, Garza-Morales R, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, McNally LR, Gomez-Gutierrez JG. Development of *Lactococcus lactis* encoding fluorescent proteins, GFP, mCherry and iRFP regulated by the nisin-controlled gene expression system. *Biotech Histochem*, 2017, 92: 167-174
 111. Martins MF, Martinez-Rossi NM, Ferreira A, Brocchi M, Yano T, Castro AF, Silveira WD. Pathogenic characteristics of Escherichia coli strains isolated from

- newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 2000, 76: 51-59
112. Melkebeek V, Goddeeris BM, Cox E. ETEC vaccination in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2013, 152: 37-42
113. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*, 2014, 2: Ehec-0024-2013
114. Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 70
115. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 68: 705-717
116. Molina Estupiñan JL, Aradottir Pind AA, Foroutan Pajoochian P, Jonsdottir I, Bjarnarson SP. The adjuvants dmLT and mmCT enhance humoral immune responses to a pneumococcal conjugate vaccine after both parenteral or mucosal immunization of neonatal mice. *Front Immunol*, 2022, 13: 1078904
117. Moon HW, Kohler EM, Schneider RA, Whipp SC. Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.*, 1980, 27: 222-230
118. Moonens K, Van den Broeck I, Okello E, Pardon E, De Kerpel M, Remaut H, De Greve H. Structural insight in the inhibition of adherence of F4 fimbriae producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by llama single domain antibodies. *Vet. Res.*, 2015, 46: 14
119. Morello E, Bermúdez-Humarán LG, Llull D, Solé V, Miraglio N, Langella P, Poquet I. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 14: 48-58
120. Naderi-Samani M, Soltani M, Dadar M, Taheri-Mirghaed A, Zargar A, Ahmadvand S, Hassanzadeh R, Goudarzi LM. Oral immunization of trout fry with recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900 expressing G gene of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish Shellfish Immunol.*, 2020, 105: 62-70
121. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005, 295: 443-454

122. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) in farm animals. *Vet. Res.*, 1999, 30: 259-284
123. Nandre RM, Lee JH. Generation of a safe *Salmonella Gallinarum* vaccine candidate that secretes an adjuvant protein with immunogenicity and protective efficacy against fowl typhoid. *Avian Pathol.*, 2014, 43: 164-171
124. Nguyen UV, Coddens A, Melkebeek V, Devriendt B, Goetstouwers T, Poucke MV, Peelman L, Cox E. High susceptibility prevalence for F4(+) and F18(+) *Escherichia coli* in Flemish pigs. *Vet. Microbiol.*, 2017, 202: 52-57
125. Nirupama KR, O RV, Pruthvishree BS, Sinha DK, Murugan MS, Krishnaswamy N, Singh BR. Molecular characterisation of bla(OXA-48) carbapenemase-, extended-spectrum β -lactamase- and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from farm piglets in India. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018, 13: 201-205
126. Norton EB, Bauer DL, Weldon WC, Oberste MS, Lawson LB, Clements JD. The novel adjuvant dmLT promotes dose sparing, mucosal immunity and longevity of antibody responses to the inactivated polio vaccine in a murine model. *Vaccine*, 2015a, 33: 1909-1915
127. Norton EB, Branco LM, Clements JD. Evaluating the A-Subunit of the Heat-Labile Toxin (LT) As an Immunogen and a Protective Antigen Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC). *PLoS One*, 2015b, 10: e0136302
128. Norton EB, Lawson LB, Freytag LC, Clements JD. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT(R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18: 546-551
129. Norton EB, Lawson LB, Mahdi Z, Freytag LC, Clements JD. The A subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin functions as a mucosal adjuvant and promotes IgG2a, IgA, and Th17 responses to vaccine antigens. *Infect. Immun.*, 2012, 80: 2426-2435
130. Orskov I, Orskov F, Sojka WJ, Leach JM. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* Kantigens: K 87 and K 88. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1961, 53: 404-422

131. Orskov I, Orskov F, Sojka WJ, Wittig W. K ANTIGENS K88AB(L) AND K88AC(L) IN *E. COLI*. A NEW O ANTIGEN: 0147 AND A NEW K ANTIGEN: K89(B). *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1964, 62: 439-447
132. Pham ML, Tran AM, Kittibunchakul S, Nguyen TT, Mathiesen G, Nguyen TH. Immobilization of β -Galactosidases on the *Lactobacillus* Cell Surface Using the Peptidoglycan-Binding Motif LysM. *Catalysts*, 2019, 9: 443
133. Pizza M, Fontana MR, Giuliani MM, Domenighini M, Magagnoli C, Giannelli V, Nucci D, Hol W, Manetti R, Rappuoli R. A genetically detoxified derivative of heat-labile Escherichia coli enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.*, 1994, 180: 2147-2153
134. Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, Mills KH, Rappuoli R, Del Giudice G. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 2001, 19: 2534-2541
135. Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, Xia X. Incorporation of membrane-anchored flagellin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol*, 2015, 6: 169
136. Qiao N, Du G, Zhong X, Sun X. Recombinant lactic acid bacteria as promising vectors for mucosal vaccination. *Exploration (Beijing)*, 2021, 1: 20210026
137. Rausch D, Ruan X, Nandre R, Duan Q, Hashish E, Casey TA, Zhang W. Antibodies derived from a toxoid MEFA (multiepitope fusion antigen) show neutralizing activities against heat-labile toxin (LT), heat-stable toxins (STa, STb), and Shiga toxin 2e (Stx2e) of porcine enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Vet. Microbiol.*, 2017, 202: 79-89
138. Ribelles P, Benbouziane B, Langella P, Suárez JE, Bermúdez-Humarán LG. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97: 1231-1239
139. Riddle MS, Savarino SJ. Moving beyond a heat-labile enterotoxin-based vaccine against enterotoxigenic Escherichia coli. *Lancet Infect. Dis.*, 2014, 14: 174-175

140. Rosales-Mendoza S, Angulo C, Meza B. Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34: 124-136
141. Roslan AM, Mustafa Kamil A, Chandran C, Song AA, Yusoff K, Abdul Rahim R. Secretion of recombinant xylanase in *Lactococcus lactis* using signal peptides Usp45 and Spk1. *Biotechnol. Lett.*, 2020, 42: 1727-1733
142. Ruan X, Liu M, Casey TA, Zhang W. A tripartite fusion, FaeG-FedF-LT(192)A2:B, of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) elicits antibodies that neutralize cholera toxin, inhibit adherence of K88 (F4) and F18 fimbriae, and protect pigs against K88ac/heat-labile toxin infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18: 1593-1599
143. Runnels PL, Moon HW, Schneider RA. Development of resistance with host age to adhesion of K99+ *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1980, 28: 298-300
144. Rutter JM, Jones GW. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli*-a model for vaccination with a virulence determinant? *Nature*, 1973, 242: 531-532
145. Santiago-Mateo K, Zhao M, Lin J, Zhang W, Francis DH. Avirulent K88 (F4)+ *Escherichia coli* strains constructed to express modified enterotoxins protect young piglets from challenge with a virulent enterotoxigenic *Escherichia coli* strain that expresses the same adhesion and enterotoxins. *Vet. Microbiol.*, 2012, 159: 337-342
146. Schifferli DM. Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains That Infect Animals. *EcoSal Plus*, 2005, 1(2): 10.1128
147. Schifferli DM, Abraham SN, Beachey EH. Use of monoclonal antibodies to probe subunit- and polymer-specific epitopes of 987P fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987, 55: 923-930
148. Schroyen M, Stinckens A, Verhelst R, Niewold T, Buys N. The search for the gene mutations underlying enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac susceptibility in pigs: a review. *Vet. Res.*, 2012, 43: 70
149. Seo H, Zhang W. Development of effective vaccines for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, 20: 150-152
150. Sheikh A, Tumala B, Vickers TJ, Martin JC, Rosa BA, Sabui S, Basu S, Simoes RD, Mitreva M, Storer C, Tyksen E, Head RD, Beatty W, Said HM, Fleckenstein JM.

- Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin drives enteropathic changes in small intestinal epithelia. *Nat Commun*, 2022, 13: 6886
151. Shen H, Qian B, Chen W, Liu Z, Yang L, Zhang D, Liang W. Immunogenicity of recombinant F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in tobacco chloroplast. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42: 558-567
152. Shin SJ, Chang YF, Timour M, Lauderdale TL, Lein DH. Hybridization of clinical *Escherichia coli* isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins (SLT-1, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P). *Vet. Microbiol.*, 1994, 38: 217-225
153. Sjökvist Ottsjö L, Flach CF, Clements J, Holmgren J, Raghavan S. A double mutant heat-labile toxin from *Escherichia coli*, LT(R192G/L211A), is an effective mucosal adjuvant for vaccination against *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.*, 2013, 81: 1532-1540
154. Smeds A, Hemmann K, Jakava-Viljanen M, Pelkonen S, Imberechts H, Palva A. Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect. Immun.*, 2001, 69: 7941-7945
155. Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Syngé BA. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.*, 1986, 119: 31-34
156. Steffen R, Cramer JP, Burchard G, Jelinek T, Schwarz U, Ramdas P, Chatterjee S, Jiang ZD, DuPont HL, Dewasthaly S, Westritschnig K, Behrens RH. Efficacy of a travelers' diarrhea vaccine system in travelers to India. *J. Travel Med.*, 2013, 20: 374-379
157. Sun Z, Lawson S, Langenhorst R, McCormick KL, Brunick C, Opriessnig T, Baker R, Yoon KJ, Zhang W, Huber VC, Fang Y. Construction and immunogenicity evaluation of an epitope-based antigen against swine influenza A virus using *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit as a carrier-adjuvant. *Vet. Microbiol.*, 2013, 164: 229-238
158. Szatraj K, Szczepankowska AK, Chmielewska-Jeznach M. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J. Appl. Microbiol.*, 2017, 123: 325-339

159. Taillon C, Nadeau E, Mourez M, Dubreuil JD. Heterogeneity of Escherichia coli STb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J. Med. Microbiol.*, 2008, 57: 887-890
160. Teneberg S, Willemsen P, de Graaf FK, Karlsson KA. Receptor-active glycolipids of epithelial cells of the small intestine of young and adult pigs in relation to susceptibility to infection with Escherichia coli K99. *FEBS Lett.*, 1990, 263: 10-14
161. Thiam F, Charpilienne A, Poncet D, Kohli E, Basset C. B subunits of cholera toxin and thermolabile enterotoxin of Escherichia coli have similar adjuvant effect as whole molecules on rotavirus 2/6-VLP specific antibody responses and induce a Th17-like response after intrarectal immunization. *Microb. Pathog.*, 2015, 89: 27-34
162. Tiels P, Verdonck F, Smet A, Goddeeris B, Cox E. The F18 fimbrial adhesin FedF is highly conserved among F18+Escherichia coli isolates. *Vet. Microbiol.*, 2005, 110: 277-283
163. Tsuji T, Inoue T, Miyama A, Okamoto K, Honda T, Miwatani T. A single amino acid substitution in the A subunit of Escherichia coli enterotoxin results in a loss of its toxic activity. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 22520-22525
164. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, 263: 10-20
165. Tzipori S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, 1985, 29: 103-206
166. Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris BM. The F4 fimbrial antigen of Escherichia coli and its receptors. *Vet. Microbiol.*, 2000, 71: 223-244
167. Van Molle I, Joensuu JJ, Buts L, Panjekar S, Kotiaho M, Bouckaert J, Wyns L, Niklander-Teeri V, De Greve H. Chloroplasts assemble the major subunit FaeG of Escherichia coli F4 (K88) fimbriae to strand-swapped dimers. *J. Mol. Biol.*, 2007, 368: 791-799
168. van Zijderveld FG, Anakotta J, Brouwers RA, van Zijderveld AM, Bakker D, de Graaf FK. Epitope analysis of the F4 (K88) fimbrial antigen complex of enterotoxigenic Escherichia coli by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*,

- 1990, 58: 1870-1878
169. Verdonck F, Cox E, Van der Stede Y, Goddeeris BM. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vaccine*, 2004, 22: 4291-4299
 170. Verfaillie T, Melkebeek V, Snoek V, Douterlungne S, Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, Goddeeris B, Cox E. Priming of piglets against enterotoxigenic *E. coli* F4 fimbriae by immunisation with FAEG DNA. *Vaccine*, 2004, 22: 1640-1647
 171. Vesa T, Pochart P, Marteau P. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 14: 823-828
 172. Vidal A, Aguirre L, Seminati C, Tello M, Redondo N, Martín M, Darwich L. Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Vet Sci*, 2020, 7(2): 48
 173. Virdi V, Coddens A, De Buck S, Millet S, Goddeeris BM, Cox E, De Greve H, Depicker A. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 11809-11814
 174. Viswanathan VK, Hodges K, Hecht G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, 7: 110-119
 175. Wagenlehner FM, Naber KG. A step further in a vaccine for *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.*, 2019, 19: 565-567
 176. Wang J, Jiang SW, Chen XH, Liu ZL, Peng J. Prevalence of Fimbrial Antigen (K88 variants, K99 and 987P) of Enterotoxigenic *Escherichia coli* from Neonatal and Post-weaning Piglets with Diarrhea in Central China. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2006, 19: 1342-1346
 177. Wei CH, Liu JK, Hou XL, Yu LY, Lee JS, Kim CJ. Immunogenicity and protective efficacy of orally or intranasally administered recombinant *Lactobacillus casei* expressing ETEC K99. *Vaccine*, 2010, 28: 4113-4118
 178. Weiglmeier PR, Rösch P, Berkner H. Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. *Toxins (Basel)*, 2010, 2: 2213-2229

179. Wen LJ, Hou XL, Wang GH, Yu LY, Wei XM, Liu JK, Liu Q, Wei CH. Immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains producing K99, K88 fimbrial protein protects mice against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2012, 30: 3339-3349
180. Willemsen PT, de Graaf FK. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. *Microb. Pathog.*, 1992, 12: 367-375
181. Wittig W, Klie H, Gallien P, Lehmann S, Timm M, Tschäpe H. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. *Zentralbl. Bakteriolog.*, 1995, 283: 95-104
182. Wu CM, Chung TC. Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007, 50: 354-365
183. Wyszynska A, Kobierecka P, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99: 2967-2977
184. Xia P, Song Y, Zou Y, Yang Y, Zhu G. F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion mediated by the major fimbrial subunit FaeG. *J. Basic Microbiol.*, 2015a, 55: 1118-1124
185. Xia P, Wu Y, Lian S, Quan G, Wang Y, Zhu G. Deletion of FaeG alleviated Enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac-induced apoptosis in the intestine. *AMB Express*, 2021, 11: 44
186. Xia P, Zou Y, Wang Y, Song Y, Liu W, Francis DH, Zhu G. Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015b, 99: 4953-4959
187. Xu C, Fu F, She Y, Yang D, Peng K, Lin Y, Xu C. Development of a new candidate vaccine against piglet diarrhea caused by *Escherichia coli*. *Open Life Sci*, 2023a, 18: 20220804
188. Xu C, Peng K, She Y, Fu F, Shi Q, Lin Y, Xu C. Preparation of novel trivalent vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* for preventing newborn piglet

- diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, 2023b, 84
189. Xu G, An W, Wang H, Zhang X. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1103
190. Yang G, Jiang Y, Tong P, Li C, Yang W, Hu J, Ye L, Gu W, Shi C, Shan B, Wang C. Alleviation of enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge by recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing a FaeG- and DC-targeting peptide fusion protein. *Benef Microbes*, 2017, 8: 379-391
191. Yang Y, Galle S, Le MH, Zijlstra RT, Gänzle MG. Feed Fermentation with Reuteran- and Levan-Producing *Lactobacillus reuteri* Reduces Colonization of Weanling Pigs by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81: 5743-5752
192. Yu J, Cassels F, Scharon-Kersten T, Hammond SA, Hartman A, Angov E, Corthésy B, Alving C, Glenn G. Transcutaneous immunization using colonization factor and heat-labile enterotoxin induces correlates of protective immunity for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2002, 70: 1056-1068
193. Yu M, Qi R, Chen C, Yin J, Ma S, Shi W, Wu Y, Ge J, Jiang Y, Tang L, Xu Y, Li Y. Immunogenicity of recombinant *Lactobacillus casei*-expressing F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG in conjunction with a heat-labile enterotoxin A (LTAK63) and heat-labile enterotoxin B (LTB) of enterotoxigenic *Escherichia coli* as an oral adjuvant in mice. *J. Appl. Microbiol.*, 2017, 122: 506-515
194. Yurina V, Rahayu Adianingsih O, Widodo N. Oral and intranasal immunization with food-grade recombinant *Lactococcus lactis* expressing high conserved region of SARS-CoV-2 spike protein triggers mice's immunity responses. *Vaccine X*, 2023, 13: 100265
195. Yuyama Y, Yoshimatsu K, Ono E, Saito M, Naiki M. Postnatal change of pig intestinal ganglioside bound by *Escherichia coli* with K99 fimbriae. *J Biochem*, 1993, 113: 488-492
196. Zhang C, Knudsen DE, Liu M, Robertson DC, Zhang W. Toxicity and immunogenicity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable

- toxoid fusion 3xSTa(A14Q)-LT(S63K/R192G/L211A) in a murine model. *PLoS One*, 2013, 8: e77386
197. Zhang C, Zhang W. *Escherichia coli* K88ac fimbriae expressing heat-labile and heat-stable (STa) toxin epitopes elicit antibodies that neutralize cholera toxin and STa toxin and inhibit adherence of K88ac fimbrial *E. coli*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17: 1859-1867
 198. Zhang H, Dong M, Xu H, Li H, Zheng A, Sun G, Jin W. Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Human LL-37 Prevents Deaths from Viral Infections in Piglets and Chicken. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023,
 199. Zhang H, Xu Y, Zhang Z, You J, Yang Y, Li X. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. *Vaccine*, 2018, 36: 723-728
 200. Zhang W, Berberov EM, Freeling J, He D, Moxley RA, Francis DH. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. *Infect. Immun.*, 2006, 74: 3107-3114
 201. Zhang W, Sack DA. Current Progress in Developing Subunit Vaccines against Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Associated Diarrhea. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22: 983-991
 202. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.*, 2007, 123: 145-152
 203. Zhang X, Yu S, Cheng D, Feng Y, Yang Y, Sun H, Ding J, Wang F. An Attenuated *Escherichia coli* K88ac LT(S63K) Δ STb Efficiently Provides Protection Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Mouse Model. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 620255
 204. Zhang Y, Tan P, Zhao Y, Ma X. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes*, 2022, 14: 2055943
 205. Zhu G, Wang J, Zhu X. Identification of the 987P protein receptors for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2008, 24: 363-

367

206. Zhuai-Zhuai YU, Zhi-Bang Y, Yu-Zhen Z, Yu-Xia X, Hong-Ming HU, Ren-Jv J. Prokaryotic expression and immunological identification of F4ac Fimbrial Subunit FaeG of ETEC. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(03): 204-207

附录一 补充材料

表 1 疑似仔猪黄白痢感染粪便样品 ETEC 分离情况

Table 1 ETEC isolation of stool samples from suspected piglet yellow and white dysentery infection

序号	菌株编号	LT	STa	STb	Stx2e	K88ac	K99	987P	F18ab	F41	分离地	样品类型
1	XZ1		+	+		+					湖北	肛拭子
2	XZ2		+	+		+					湖北	肛拭子
3	XZ3		+	+		+					湖北	肛拭子
4	SH1			+	+				+		湖北	肛拭子
5	SH2	+	+						+		湖北	肛拭子
6	JT1		+	+		+					湖北	肛拭子
7	JT2			+		+					湖北	肛拭子
8	LYS1		+	+		+					湖北	肛拭子
9	LYS2		+	+		+					湖北	肛拭子
10	LYS3		+	+		+					湖北	肛拭子
11	LYS4		+	+	+				+		湖北	肛拭子
12	LYS5	+		+		+					湖北	肛拭子
13	LYS6	+		+							湖北	肛拭子
14	LYS7	+		+		+					湖北	肛拭子
15	LYS8	+		+	+	+			+		湖北	肛拭子
16	LYS9			+	+				+		湖北	肛拭子

续表

17	DJP1	+		+		+					湖北	肛拭子
18	DJP2	+		+	+	+			+		湖北	肛拭子
19	DJP3	+		+		+					湖北	肛拭子
20	DJP4			+					+		湖北	肛拭子
21	DJP5	+		+		+					湖北	肛拭子
22	SHT1	+		+	+				+		江苏	肛拭子
23	SHT2			+		+					江苏	肛拭子
24	SHT3		+	+							江苏	肛拭子
25	SHT4	+	+	+	+				+		江苏	肛拭子
26	SHT5		+	+		+					江苏	肛拭子
27	SHT6		+	+		+					江苏	肛拭子
	总计	11	13	26	7	18	0	0	9	0		

表 2 全国送检样品 ETEC 分离情况

Table 2 ETEC isolation of samples submitted for inspection nationwide

序号	菌株编号	LT	STa	STb	Stx2e	K88ac	K99	987P	F18ab	F41	分离地	样品类型
1	5		+	+		+					江西	肠道
2	19		+	+		+					云南	肠道
3	20		+	+		+					云南	肠道
4	22		+	+		+					云南	肠道
5	31		+	+		+					四川	肠道
6	37	+	+	+							重庆	肠道
7	64			+							甘肃	肠道
8	65	+		+		+					山东	肠道
9	66			+							广东	粪便
10	68	+	+								广东	粪便
11	73	+		+		+					四川	肠道
12	76	+		+		+					四川	肠道
13	84		+	+		+					山西	肠道
14	86		+	+		+					山西	肠道
15	97		+	+		+					山东	肠道
16	104		+	+		+					山东	肠道
17	114	+		+							山西	肠道
18	117	+		+		+					江西	肠道
19	122	+		+		+					江西	肠道

续表

20	123	+		+		+					江西	肠道
21	E59	+	+	+		+					江西	肠道
22	E66	+	+	+		+					贵州	肠道
23	E69	+	+	+							贵州	肠道
24	E98		+	+		+				+	四川	肠道
25	E125	+	+						+		广东	粪便
26	E134	+		+		+					广西	肠道
27	E160	+		+							河南	粪便
28	E193		+	+							陕西	粪便
29	E237	+		+							江西	粪便
	总计	16	17	27	0	21	0	0	1	1		

表 3 全国健康猪群及养殖场环境样品 ETEC 分离情况

Table 3 ETEC isolation of environmental samples from healthy pig herds and farms nationwide

序号	菌株编号	LT	STa	STb	Stx2e	K88ac	K99	987P	F18ab	F41	分离地	样品类型
1	XJ17	+	+		+				+		新疆	料槽拭子
2	FY240	+		+							河南	地板拭子
3	HUN18	+		+							湖南	粪便
4	HUN50	+		+							湖南	粪水
5	S77	+		+							河南	料槽拭子
6	XD1	+		+							河南	饮水器拭子
7	GZ10		+	+							贵州	肛拭子
8	GZ12		+	+							贵州	地板拭子
9	GZ31		+	+							贵州	粪便
10	HB29		+	+							河北	粪水
11	HB37		+	+							河北	粪便
12	AH91			+							安徽	料槽拭子
13	HB27			+							河北	粪水
14	HB33			+							河北	粪便
15	HB44			+							河北	粪便
16	HUBs36			+							湖北	料槽拭子
17	HUBs37			+							湖北	料槽拭子
	总计	6	6	16	1	0	0	0	1	0		