

## 表达重组猪瘟病毒 E290 多肽的干酪乳杆菌口服免疫特性及诱导特异性 CTL 反应的研究

# The Oral Immune Efficacy of Recombinant *Lactobacillus casei* Expressing CSFV E290 Peptide and It Elicited Specific CTL Response

徐义刚<sup>1</sup>, 崔丽春<sup>2</sup>, 葛俊伟<sup>1</sup>, 赵丽丽<sup>1</sup>, 李一经<sup>1\*</sup>

XU Yi-Gang<sup>1</sup>, CUI Li-Chun<sup>2</sup>, GE Jun-Wei<sup>1</sup>, ZHAO Li-Li<sup>1</sup> and LI Yi-Jing<sup>1\*</sup>

1 东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030

2 东北林业大学 哈尔滨 150040

1 Department of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2 Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**摘 要** 经 PCR 扩增获得约 60bp 编码猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽基因片段,克隆至表达载体 pPG-VP2 中 VP2 基因 5' 端上游,命名为 pPG-VP2-E290。电转化干酪乳杆菌,构建了表达猪瘟病毒 E290 多肽的重组乳酸菌系统。口服免疫 BALB/c 鼠和新西兰兔,检测诱导小鼠和兔体内产生特异性抗猪瘟病毒 E290 多肽 IgG 水平,并对 E290 多肽的 CTL 活性进行检测,同时对免疫兔进行猪瘟病毒攻毒实验,检测 E290 多肽抗体对免疫兔的保护作用。构建的重组猪瘟病毒 T 细胞表位的干酪乳杆菌具有良好的免疫性,口服免疫后的小鼠和兔血清中均检测到了较高水平的抗 E290 多肽抗体 IgG,且能诱导小鼠机体产生抗猪瘟病毒的特异性 CTL 反应,亦证实猪瘟病毒 E290 免疫兔能够抵抗猪瘟病毒的攻击。

**关键词** 猪瘟病毒, T 细胞表位,干酪乳杆菌,细胞毒性 T 淋巴细胞反应

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0930-05

**Abstract** The gene encoding classical swine fever virus (CSFV) T cell epitope E290 peptide was synthesized by PCR, cloned into the expression vector pPG-VP2 and named pPG-VP2-E290. The recombinant plasmid was electrotransformed into *Lactobacillus casei* 393 generating pPG-VP2-E290/*L. casei* 393. Specific anti-CSFV E290 peptide immunoglobulin G (IgG) antibody was detected by indirect ELISA in the serum of BALB/c mice and rabbits immunized with recombinant strain by oral administration. The CTL of E290 was analyzed with lymphocytes taken from the immunized mice, and the immunized rabbits were attacked with CSFV to validate the protective function of E290 antibody induced. Result: The recombinant expression system constructed with *L. casei* 393 in this study show a good immunization property and could elicit the mice and rabbits to produce high anti-E290 antibody levels. Furthermore, E290 peptide antibody could elicit specific CTL response, and restrain attack of CSFV to rabbits.

**Key words** CSFV, T cell epitope, *Lactobacillus casei* 393, CTL

Received: January 26, 2007; Accepted: March 22, 2007.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30371074).

\* Corresponding author. Tel: +86-451-55190385; E-mail: yijingli@yahoo.com

国家自然科学基金项目(No.30371074)

猪瘟是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种急性、亚急性、慢性及典型、非典型的疾病过程,病毒经口、鼻等黏膜感染是其主要感染途径<sup>[1]</sup>。由于猪瘟的高传染性和高致死性,严重威胁着养猪业的发展,给养猪业造成巨大的经济损失<sup>[2,3]</sup>,被国际兽疫局(OIE)列为 A 类动物传染病<sup>[4]</sup>。

疫苗免疫接种是预防本病的主要措施<sup>[5-7]</sup>,猪瘟弱毒疫苗在控制猪瘟疾病的过程中起到了重要的作用,亦是目前应用最为广泛的 CSFV 疫苗<sup>[8]</sup>。然而猪瘟弱毒疫苗接种存在与野毒重组或自然突变而造成毒力返强,并通过动物机体排散病毒,加之家畜和畜产品的贸易检疫等原因,使其应用受到一定的限制。另外由于猪瘟弱毒疫苗干扰猪瘟的血清诊断,难以区分感染猪和免疫猪,欧洲许多国家已禁止使用猪瘟弱毒疫苗,而采用扑杀感染猪和猪瘟血清阳性猪来控制 and 消灭猪瘟。因此研究和开发新型猪瘟疫苗是十分必要的。

已证明 CSFV 非结构基因 NS2-3 编码的 E290 多肽(KHKVRNEVMVHWFD)是辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞抗原表位,在诱导特异性细胞免疫和体液免疫中发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。因此,该表位是研制猪瘟表位疫苗的首选目标表位。

本研究选择能在肠道中定植的食品级微生物干酪乳杆菌作为递呈抗原物质的载体<sup>[11-13]</sup>,构建了重组猪瘟病毒 E290 多肽的干酪乳杆菌表达系统,并进行了动物免疫试验、E290 多肽诱导的 CTL 反应试验以及免疫后的动物攻毒保护试验等相关研究,以期获得 CSFV 口服活菌疫苗,达到预防本病的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株、病毒株和细胞

分泌型表达载体 pPG-VP2(含有猪细小病毒 VP2 基因)由本实验室构建保存;干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*393 荷兰 ZIRO 研究所惠赠,猪瘟兔化弱毒疫苗,购自齐鲁动物保健品有限公司;P815 细胞由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

兔抗猪瘟血清由本实验室制备保存;HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司;丝裂霉素 C、CytoTox96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒购自 Promega 公司;E290 多肽:KHKVRNEVMVHWFD,由上海生物工程有限责任公司合成,纯度大于 95%;rhIL-2 购自北京瑞得合

通药业有限公司。

### 1.3 实验动物

BALB/c 鼠和新西兰兔均为清洁级,购自哈尔滨医科大学第二临床医院实验动物中心。

### 1.4 重组猪瘟病毒 T 细胞表位的干酪乳杆菌的构建及诱导表达

根据猪瘟病毒非结构蛋白 NS2-3 的辅助性 T 细胞表位及杀伤性 T 细胞表位 E290 序列,设计出一对寡核苷酸引物进行 E290 基因的 PCR 合成。引物序列如下:上游引物 P1:5'-GCAGGATCCATGAAACACA AAGTGAGGAATGAAGTAATGGTC-3',下游引物 P2:5'-TCGGGTACCGTCATCAAACCAGTGGACCATTACTTCAT TCCT-3'。PCR 反应体系:上游引物 P1 2.5  $\mu$ L、下游引物 P2 2.5  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 2.5  $\mu$ L、dNTP 5.0  $\mu$ L、10  $\times$  Buffer 5.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 32.5  $\mu$ L。反应程序为:70 $^{\circ}$ C,5min;23 $^{\circ}$ C,5min;37 $^{\circ}$ C,30min;最后 70 $^{\circ}$ C,10min。PCR 产物经引入的酶双切后插入分泌型表达载体 pPG-VP2 中 VP2 基因的 5'端上游,电转化感受态干酪乳杆菌 *L. casei* 393,将转化子涂布于 MRS (含 10  $\mu$ g/mL 氯霉素)固体培养基,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 36h,挑选阳性菌落,重组质粒命名为 pPG-VP2-E290。

将重组干酪乳杆菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393 接种于 MRS 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 活化培养,取培养菌以 1:10 比例接种于 20mL 含 2%乳糖的 MRS 培养基中进行诱导。将诱导表达上清液浓缩,SDS-PAGE 及 Western blot 分析融合蛋白的表达,同时以诱导表达上清液作为抗原 ELISA 方法测定针对猪瘟病毒 E290 多肽的表达情况。

### 1.5 实验动物分组及免疫

6~8 周龄 BALB/c 小鼠分成 3 组,每组 15 只;实验 I 组每只小鼠口服接种 100  $\mu$ L 10<sup>10</sup> CFU/mL 的重组干酪乳杆菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393;实验 II 组口服同等剂量的 pPG-VP2/*L. casei*393;实验 III 组口服 100  $\mu$ L PBS 溶液。

健康、体重相近的 9 只新西兰兔分成 3 组:实验 I 组攻猪瘟弱毒、实验 II 组口服免疫 10mL 10<sup>11</sup> CFU/mL 重组干酪乳杆菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393 后攻猪瘟弱毒、实验 III 组为正常对照组(不进行免疫和攻毒组)。

免疫程序:免疫 3 次,每次免疫时间间隔为 2 周,每次连续免疫 3d,每天 1 次。

### 1.6 免疫鼠和兔血清中抗 E290 特异性 IgG 抗体的测定

采集初次免疫后第 4d、18d、32d、38d、46d 小鼠血

液 同时采集初免疫后第 7d、21d、35d、42d 兔血液。血液经 37℃促凝 2h 4℃静置过夜 4000r/min 离心 5min , 收集血清。以合成的 E290 多肽作为免疫原包被 96 孔 ELISA 反应板 4℃反应过夜 ,用含有 5%脱脂乳的 PBS 液 37℃封闭 2h ,分别以采集的免疫小鼠和兔血清为一抗(相应的未经免疫的阴性血清作为对照) 37℃反应 1h ,相应加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 37℃反应 1h ,加 OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物显色液 37℃避光显色 10min ,加终止液后 ,酶标测定仪在波长 490nm 处测定每孔的光吸收值。

1.7 免疫兔攻击猪瘟兔化弱毒

实验 II 组口服免疫重组菌兔于第三次口服免疫后第 8d 与实验 I 组家兔一起攻猪瘟兔化弱毒疫苗 , 每只兔经耳静脉注射 0.8mL 猪瘟兔化弱毒疫苗( 40 头份/支的猪瘟兔化弱毒疫苗用 0.9%生理盐水稀释至 5mL )。攻毒后 ,三组兔同步每 6h 测量体温 1 次 , 连续测 4d ,所得数据进行对比分析。

1.8 特异性 CTL 杀伤活性检测

断颈处死三兔后第 8 d 小鼠 , 无菌条件下取脾 , 分离脾细胞制备单细胞悬液。用 Tris-NH<sub>4</sub>Cl( Tris 2.06g ,NH<sub>4</sub>Cl 7.47g ,定容至 1L )裂解红细胞 ,室温静置 15min 2 000r/min 离心 10min ,弃上清 ,再用不含血清的 1640 培养液洗细胞 2 次 ,重悬于含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液中 ,调整细胞浓度至 1×10<sup>7</sup> 个/mL。

将 T 细胞表位多肽 KHKVRNEVMVHWFDD 作为体外刺激原( 终浓度 25μg/mL ) ,与正常小鼠的脾细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱共孵育 2h ,加入丝裂霉素 C 至终浓度为 40mg/L 培养 2h 后用无菌 PBS 洗细胞 4 次 ,以除掉丝裂霉素 ,重悬于含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液中 ,调整细胞浓度至 1×10<sup>7</sup> 个/mL ,即为相应肽标记的刺激细胞。免疫小鼠的脾细胞和刺激细胞各 1mL 加入 6 孔细胞板 ,补加 2mL RPMI 1640 培养液 24h 后 ,加入 rhIL-2 至终浓度为 100u/mL 继续培养 5d。收集细胞 ,调整细胞浓度至 1×10<sup>7</sup> 个/mL ,即为效应细胞。

培养的 P815 细胞经计数后 ,加入 25μg/mL E290 多肽 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱共孵育 2h ,与未经肽冲击的 P815 细胞一起作为靶细胞 ,以乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测 CTL 的杀伤活性 ,效靶细胞的比例(E/T)分别为 50:1、25:1 和 12.5:1 ,每组实验设 3 个复孔 ,效靶细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱共孵育至少 4h。具体操作按试剂盒说明书进行 ,按下列公式计算杀伤率 :杀伤率(%)=(实验孔 A 值 - 效应细胞自然释放孔 A 值 - 靶细胞自然释放孔 A 值) / (靶细胞最大释放孔 A 值 - 靶细胞自然释放孔 A 值) × 100%。

2 结果

2.1 融合蛋白的诱导表达与鉴定

取过夜活化重组菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393 以 1:10 比例接种于 20mL 含 2% 乳糖的 MRS 培养基中进行诱导。诱导上清浓缩物中目的蛋白的表达鉴定结果见图 1。

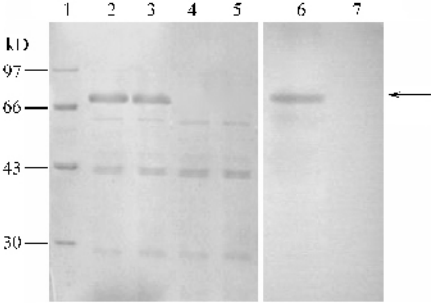


图 1 诱导上清液经浓缩后表达蛋白的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 1 The identification of expressed protein in

concentrated supernatants by SDS-PAGE and Western blot

1 : protein marker( 97kD-14kD ); 2 3 : recombinant strain was induced , expressed protein in the concentrated supernatants was identified by SDS-PAGE ; 4 , 5 : recombinant strain was not induced , there was not the interest protein in the culture supernatants ; 6 : the result of Western blot of protein expressed ; 7 : brecombinant strain noinduced , the result of Western blot was negative.

2.2 E290 多肽的表达与鉴定

重组干酪乳杆菌经 2% 乳糖进行诱导 ,以诱导表达上清液为抗原包被 ELISA 反应板 ,以兔抗猪瘟血清为一抗 ,以抗体检测抗原的间接 ELISA 结果表明 猪瘟病毒 T 细胞表位 E290 多肽获得分泌表达 , 见图 2 所示。

2.3 免疫鼠和兔血清中抗 E290 特异性 IgG 抗体的测定结果

合成的 E290 多肽作为免疫原包被 96 孔 ELISA 反应板 ,分别与口服重组干酪乳杆菌 pPG-VP2-E290/*L. casei*393 的免疫小鼠和兔血清为一抗、相应的 HRP 标记羊抗鼠和羊抗兔 IgG 为二抗 ,检测重组菌口服免疫鼠和兔产生抗 E290 抗体 IgG 水平。结果

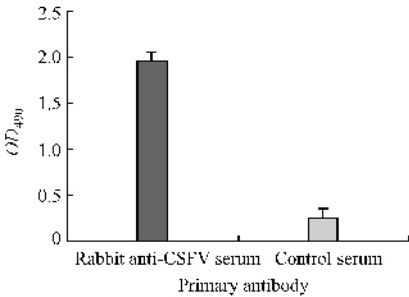


图 2 ELISA 检测 E290 多肽的表达

Fig. 2 Identification of expressed

E290 peptide by ELISA

表明(见图 3),小鼠和兔体内均产生较明显的针对 E290 多肽的特异性 IgG 抗体(抗体效价 1:500)。

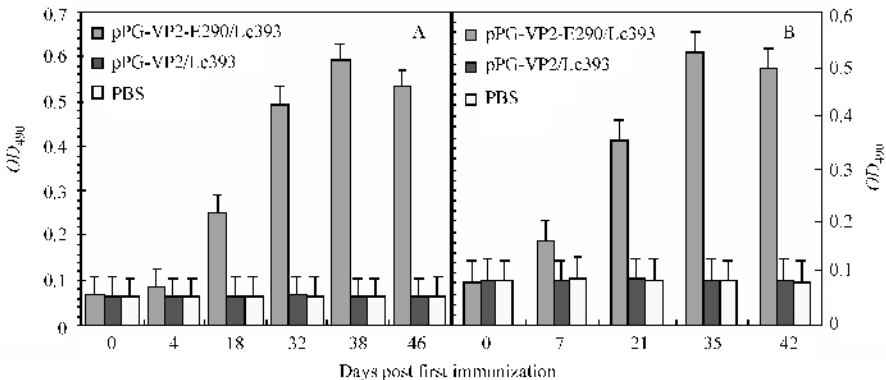


图 3 口服重组干酪乳杆菌免疫鼠和兔血清中特异性抗 E290 多肽 IgG 水平  
Fig. 3 Anti-E290 IgG level in the serum of mice and rabbits orally immunized by recombinant *L. casei* 393  
A :mice ;B :rabbits .

2.4 重组干酪乳杆菌免疫兔攻猪瘟弱毒体温变化情况

实验 II 组口服免疫重组菌兔于初次免疫后第 38d 与实验 I 组家兔一起攻猪瘟兔化弱毒疫苗,攻毒后,三组兔同步每 6h 测量体温 1 次,连续测 4 d,所得数据进行对比分析,兔攻毒后的体温变化情况见图 4。

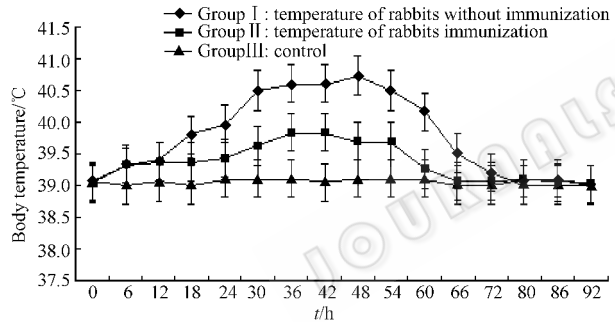


图 4 攻毒后兔体温变化情况  
Fig. 4 The change of body temperature of rabbits attacked with CSFV

结果如图 4 所示:对照组(实验 III 组)兔的体温保持恒定;直接攻猪瘟弱毒组(实验 I 组)兔的体温上升比较明显,平均体温最高值接近 41℃,体温涨幅较大,且高温体稽留时间较长;口服重组菌免疫后攻猪瘟弱毒组(实验 II 组)兔的体温虽有上升,但比较平缓,出现的高温值小于直攻毒组且稽留时间短,恢复时间快。

2.5 特异性 CTL 的体外细胞毒性实验结果

采用乳酸脱氢酶(LDH)法检测,所得数据进行统计分析,见图 5。效靶细胞比为 12.5:1~50:1 时,诱导小鼠产生针对 CSFV T 细胞表位的 P815 细胞为靶细胞的特异性 CTL 杀伤活性,其杀伤率显著高于未经肽冲击的 P815 细胞的杀伤率( $P < 0.05$ ),其中,效靶比为 50:1 时杀伤率达 52%。结果表明本研

究所构建的重组干酪乳杆菌免疫可诱导 BALB/c 小鼠产生针对 CSFV CTL 表位的特异性杀伤效应,且总 CTL 杀伤效应显著增强。

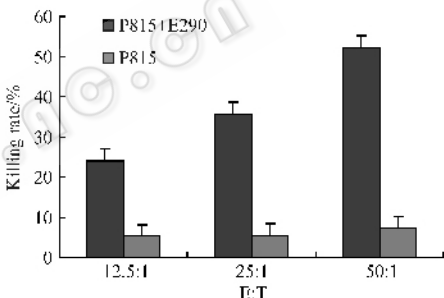


图 5 乳酸脱氢酶法检测 CTL 对 P815 细胞的杀伤率  
Fig. 5 The killing rate of CTL on P815 cells detected by LDH assay

3 讨论

猪瘟以出血和发热为主要特征,呈急性或慢性经过,是一种对猪危害性极大的传染病<sup>[14]</sup>。在世界许多国家和地区,传统疫苗接种是控制猪瘟的重要手段。目前使用的传统疫苗主要是弱毒疫苗。20 世纪 70 年代后期,猪瘟的流行形式发生了很大变化,地区散发性流行及非典型猪瘟症状的发生,猪瘟免疫屡屡失败<sup>[15]</sup>,研究和开发新型猪瘟疫苗是非常必要的。

目前,在猪瘟的免疫防治中,主要利用其结构蛋白 Erns 和 E2。Pauly 等研究猪瘟病毒多肽时发现猪瘟病毒非结构基因 NS2-3 编码的一段多肽 E290 含有猪瘟病毒的辅助性 T 细胞和 CTL 的抗原表位<sup>[9]</sup>。本实验以乳酸菌作为抗原的传递系统,进行猪瘟病毒重组表位口服疫苗的研制,对所构建的重组乳酸菌表达系统进行诱导表达,间接 ELISA 检测表明,含有 E290 多肽的重组蛋白能够与 CSFV 全病毒制备

的抗血清发生反应,说明所构建的重组乳酸菌表达系统能够有效的表达外源目的蛋白。

为探讨重组猪瘟疫病毒 E290 多肽基因的乳酸菌表达系统作为猪瘟疫活菌疫苗潜在的应用价值,本实验以家兔和小鼠为试验动物,进行相关免疫学研究。口服接种后不同时间分别测定了小鼠和家兔抗 E290 多肽血清抗体产生情况,ELISA 检测结果表明小鼠和家兔口服重组菌后,在其血液中检测到了血清抗体,说明该重组系统可刺激机体产生系统的体液免疫应答。

家兔不是猪瘟疫病毒的易感动物,猪瘟疫强毒接种也不引起家兔发生任何反应。猪瘟疫化弱毒疫苗接种家兔后,可引起明显的体温反应,但有特异性抵抗力的家兔再接种猪瘟疫化弱毒就能抵抗其攻击,其体温反应就不明显了。本实验依据这一原理,对免疫重组菌的家兔进行猪瘟疫化弱毒的攻击,连续测定其体温曲线变化,观察猪瘟疫 E290 多肽刺激机体产生的特异免疫力。实验结果表明,口服免疫重组菌的家兔,对猪瘟疫化弱毒的攻击,无论是体温升高的幅度还是持续时间均低于未免疫重组乳酸菌直接攻毒组。实验结果充分证明,重组乳酸菌表达的猪瘟疫 E290 多肽能够刺激机体产生有效的免疫保护作用。

细胞毒性 T 淋巴细胞在抗病毒感染的细胞免疫中发挥着关键性作用,本研究所设计的重组乳酸菌 CSFV 表位疫苗可有效激发特异性 CTL 反应,实验结果充分说明构建的重组乳酸菌表达系统作为猪瘟疫口服疫苗具有潜在的应用价值。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Harkness JW. Classical swine fever and its diagnosis: a current view. *Vet Rec*, 1985, **6**: 288 – 293.

[ 2 ] Fukuhso A. Overview of classical swine fever in Japan and South East Asia and control measures. OIE symposium on Classical Swine Fever. Birmingham, UK, 1998: 9 – 19.

[ 3 ] Elbers ARW, Stegeman JA, Moster H, *et al.* The classical swine fever epidemic 1997 – 1998 in the Netherlands: descriptive epidemiology. *Vet Med*, 1999, **42**: 157 – 184.

[ 4 ] International Animal Health Code. Education part 2, chapter 2.1.1. 1998.

[ 5 ] Dalsgaard K, Overby E. Vaccination of pigs against hog cholera

( Classical Swine Fever ) with a detergent split vaccine. *Acta Vet Scand*, 1976, **17**: 465 – 474.

- [ 6 ] De Smit AJ, Bouma A, Van Gennip HGP, *et al.* Chimeric C-strain virus induce clinical protection of CSFV between vaccinated pigs. *Vaccine*, 2001, **19**: 1467 – 1476.
- [ 7 ] Koning M, Lengsfeld T, Pauly T, *et al.* Classical Swine Fever Virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol Oct*, 1995, **69**( 10 ): 6479 – 6486.
- [ 8 ] Volker M. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology*, 2000, **73**: 93 – 102.
- [ 9 ] Pauly T, *et al.* Classical swine fever viruses-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *Gen Virol*, 1995, **76**: 3039 – 3049.
- [ 10 ] Armengol E, Wiesmuller KH, Wienhold D, *et al.* Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *Gen Virol*, 2002, **83**: 541 – 556.
- [ 11 ] Lorenz S, Monique V, Adrian W, *et al.* Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 2002, **20**: 2913 – 2920.
- [ 12 ] Tomohiko O, Yasuyuki A, Kenji Y, *et al.* Oral immunoadjuvant activity of a new symbiotic *Lactobacillus casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutrition Research*, 2005, **25**: 295 – 304.
- [ 13 ] Ho PS, Kwang J, Lee YK. Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production. *Vaccine*, 2005, **23**: 1335 – 1342.
- [ 14 ] Moenning V. Characteristics of the virus. In Liess B. ( ed. ) Classical swine fever and related infections. Boston, Mass: Martinus Nijhoff Publishers, 1988, pp. 55 – 80.
- [ 15 ] Gergor M, Aemin SL, Mathlas B. Mutations abrogating the Rnase activity in glycoprotein E<sup>0</sup> of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Viro*, 1999, **73**( 12 ): 10224 – 10235.
- [ 16 ] Ishikawa K, nagai H, Katayama K, *et al.* Comparison of the entire nucleotide and deduced amino acid sequence of the attenuated hog cholera vaccine strain GPE- and the wild-type parental strain ALD. *Virology*, 1995, **140**: 1385 – 1391.
- [ 17 ] Kimman TG. Cellular immune response to hog cholera virus ( HCV ): T cells of immune pigs proliferate *in vitro* upto upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J Virol*, 1993, **67**: 2922 – 2927.
- [ 18 ] Rumenapf T, Stark R, Meyers G, *et al.* Structural proteins of hog cholera virus expresses by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, 1991, **65**: 589 – 597.