

表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的重组枯草芽孢杆菌的构建及其在小鼠上的免疫原性评价

程中林, 黄浩, 曹思艺, 石华辉, 高继业, 李继祥*

西南大学 动物医学院, 重庆 402460

程中林, 黄浩, 曹思艺, 石华辉, 高继业, 李继祥. 表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的重组枯草芽孢杆菌的构建及其在小鼠上的免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4521-4532.

CHENG Zhonglin, HUANG Hao, CAO Siyi, SHI Huahui, GAO Jiye, LI Jixiang. Construction of a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing SpaA and CbpB of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and evaluation of the strain immunogenicity in a mouse model[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4521-4532.

摘要: 为了构建表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的口服重组枯草芽孢杆菌活载体候选疫苗菌株, 经融合 PCR 及无缝克隆构建了重组整合质粒 pDG1730-CBJA, 使用自然法转化枯草芽孢杆菌 KC 菌株, 通过壮观霉素抗性平板筛选、淀粉降解实验及 PCR 检测获得重组菌 KC-*spaA-cbpB*。用免疫印迹及间接免疫荧光实验检测重组菌表达的 SpaA 和 CbpB 蛋白, 并测定了重组菌在小鼠体内的遗传稳定性。构建壮观霉素抗性基因敲除质粒 pMAD- Δspe^r , 转化 KC-*spaA-cbpB*, 筛选、鉴定获得 KC-*spaA-cbpB::\Delta spe^r*, 并进行了小鼠的口服免疫实验。实验结果显示, 重组菌 KC-*spaA-cbpB* 在菌体表面表达 SpaA 蛋白, 在芽孢表面表达 CbpB 蛋白, 在小鼠体内稳定。壮观霉素抗性基因敲除菌 KC-*spaA-cbpB::\Delta spe^r* 能表达 SpaA 和 CbpB 蛋白, 其芽孢经灌胃免疫小鼠 42 d 后, 小鼠血清中 SpaA 和 CbpB 蛋白的特异性抗体 IgG 和粪便中特异性 sIgA 均极显著高于阴性对照($P < 0.01$), 攻毒保护率为 67.5%。本研究成功构建了表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的重组枯草芽孢杆菌, 为研究猪丹毒口服活载体疫苗奠定了基础。

关键词: 红斑丹毒丝菌; SpaA 蛋白; CbpB 蛋白; 枯草芽孢杆菌

资助项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2021jscx-tpyzxX0012)

This work was supported by the Technology Innovation and Application Development Special Project of Chongqing (cstc2021jscx-tpyzxX0012).

*Corresponding author. E-mail: jixianglucky@swu.edu.cn

Received: 2024-06-03; Accepted: 2024-11-01; Published online: 2024-11-04

Construction of a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing SpaA and CbpB of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and evaluation of the strain immunogenicity in a mouse model

CHENG Zhonglin, HUANG Hao, CAO Siyi, SHI Huahui, GAO Jiye, LI Jixiang*

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: To construct a recombinant *Bacillus subtilis* strain expressing SpaA and CbpB of *Erysipelothrix rhusiopathiae* for oral administration, we constructed the recombinant plasmid pDG1730-CBJA by fusion PCR and seamless cloning. The plasmid was introduced into *B. subtilis* KC strain by natural transformation, and the recombinant strain KC-*spaA-cbpB* was screened out on the plate containing spectinomycin (*spe*^r) and confirmed by PCR and starch degradation test. The SpaA and CbpB expressed by KC-*spaA-cbpB* were detected by Western blotting and indirect immunofluorescence assay, and the genetic stability of the recombinant strain in mice was determined. The plasmid pMAD- Δ *spe*^r with knockout of *spe*^r was constructed and transformed into KC-*spaA-cbpB*. The *spe*^r-deleted mutant strain KC-*spaA-cbpB*:: Δ *spe*^r was screened and identified, and its immunogenicity in a mouse model was evaluated by oral immunization. The results showed that the recombinant strain KC-*spaA-cbpB* was stable in mice, expressing SpaA on the cell surface and CbpB on the spore surface. KC-*spaA-cbpB*:: Δ *spe*^r expressed SpaA and CbpB. The mice vaccinated with the spores of KC-*spaA-cbpB*:: Δ *spe*^r had higher levels of SpaA and CbpB-specific IgG in the serum than those vaccinated with the wild-type spores 42 days after vaccination by gavage ($P < 0.01$). The protective rate of mice immunized with the recombinant spores was 67.5%. The results indicated that a recombinant *B. subtilis* strain expressing SpaA and CbpB of *E. rhusiopathiae* was successfully constructed, and the recombinant strain laid a foundation for the development of oral live vector vaccines for swine erysipelas.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; SpaA; CbpB; *Bacillus subtilis*

红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)是一种兼性厌氧的无鞭毛、不形成芽孢的革兰氏阳性菌,在世界范围内广泛分布,在富含腐殖质的养殖废弃物中存活时间长,可感染包括人在内的大多数哺乳动物、部分禽类和水生动物,会引起具有自然疫源性的人畜共患丹毒丝菌病^[1]。自1886年首次系统报道猪的感染病例猪丹毒(swine erysipelas)以来,红斑丹毒丝菌成为了危害养猪业的重要病原性细菌^[2]。近年来,我国许多养猪场暴发猪丹毒^[3],临床分离菌株

对四环素类、氨基糖甙类等常用药物具有多重耐药性^[4-5],育肥猪扁桃体样品中红斑丹毒丝菌检出率超过22%^[6]。因此,猪丹毒的防控越来越受到重视,新兴疫苗成为研究热点。

红斑丹毒丝菌的表面保护性抗原A(surface protective antigen A, SpaA)蛋白较保守,是多数血清型菌株具有的共同抗原,除C端重复序列外的区域是候选疫苗的靶点,在被动和主动免疫实验中均具有保护作用^[7-8]。胆碱结合蛋白B(choline-binding protein B, CbpB)能诱导小鼠和

猪产生特异性的血清抗体,且该抗体能增强血清杀菌活性及能促进巨噬细胞体外的吞噬作用,对红斑丹毒丝菌强毒菌株的攻击具有保护作用^[9-10]。枯草芽孢杆菌作为益生菌广泛用于养殖业,可以通过基因整合的方式构建重组菌株,在芽孢及菌体表面表达抗原分子^[11]。重组菌的芽孢作为口服活载体疫苗使用,能有效诱导全身性免疫和消化道黏膜免疫^[12-13]。本研究以益生性枯草芽孢杆菌 KC 菌株为载体^[14],构建在菌体及芽孢表面分别表达红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 蛋白的重组菌株,并通过小鼠免疫实验初步评价其免疫效果,以期为猪丹毒口服活载体疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细菌、血清、实验动物和主要试剂

枯草芽孢杆菌 KC 株^[14]、红斑丹毒丝菌 Y83 株和小鼠抗红斑丹毒丝菌 Y83 株血清^[6]、红斑丹毒丝菌 G4T10 株、rSpaA 和 rCbpB 及其鼠抗血清为本课题组保存。PrimeSTAR HS DNA Polymerase、限制性核酸内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司。大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭质粒 pDG1730 购自淼灵质粒平台。温敏型质粒 pMAD 购自杭州宝赛生物科技有限公司。双色预染蛋白质 Marker、DNA Ligation Kit Ver2.1、Taq 酶、质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、Ni-NTA 6FF (His-Tag)蛋白琼脂糖纯化树脂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 购自洛阳佰奥通公司。兔抗鼠 IgA 购自北京博奥森生物有限公司。无缝克隆试剂盒、特超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)单组分显色液购自江苏无锡英飞克科技有限公

司。6 周龄雌性昆明小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。本研究的动物实验经重庆市畜牧科学院实验动物伦理委员会批准(批准号为 XKY-20230425)。

1.2 锚定基因和目的基因克隆与序列分析

以枯草芽孢杆菌 KC 株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增锚定基因 *cotC* 和 *spoIIIJ* 及其启动子序列,以红斑丹毒丝菌 Y83 株的基因组 DNA 为模板扩增目的基因 *spaA* 和 *cbpB*。实验中涉及的引物见表 1。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、切胶回收,用 pMD19-T 载体进行克隆。测序获得的插入片段序列在 NCBI 网站中利用 blast 软件进行比对分析。

1.3 整合质粒 pDG1730-CBJA 的构建

整合质粒构建策略如图 1 所示。在 PCR 扩增 *spoIIIJ*、*spaA*、*cotC* 与 *cbpB* 基础上,经融合 PCR 扩增获得融合片段 *spoIIIJ-spaA* 和 *cotC-cbpB*。质粒 pDG1730 经 *BamH* I 和 *Hind* III 线性化后,利用无缝克隆试剂盒与 *spoIIIJ-spaA* 连接,构建重组质粒 pDG1730-*spoIIIJ-spaA*。用无缝克隆试剂盒把 *BamH* I 酶切线性化的重组质粒 pDG1730-*spoIIIJ-spaA* 与 *cotC-cbpB* 片段连接,构建重组整合质粒 pDG1730-CBJA,并测序验证。

1.4 重组枯草芽孢杆菌的构建

整合质粒 pDG1730-CBJA 与枯草芽孢杆菌 KC 株基因组 DNA 发生同源重组双交换模式见图 2。参照文献[15]的方法制备枯草芽孢杆菌 KC 株感受态细胞,并转化整合质粒 pDG1730-CBJA,经壮观霉素抗性平板筛选获得转化子。筛选平板上的单菌落连续划线传 3 代,用 PCR 及淀粉降解实验进行重组菌的鉴定。在淀粉降解实验中,将细菌点种于含 0.5%可溶性淀粉的营养琼脂平板,37 °C 培养 24 h,加碘溶液,室温放置 3 min,弃去碘液后观察菌苔周围是否存在透明

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primers	Sequences (5'→3')	Notes
<i>cotC</i> -F	GATAAATCGTTTGGGCCG	Amplification of <i>cotC</i> and promoter
<i>cotC</i> -R	GTAGTGTTTTTTATGCTTTTATAC	
<i>spoIIIJ</i> -F	CCAGAAAACCGGCGAGCCA	Amplification of <i>spoIIIJ</i> and promoter
<i>spoIIIJ</i> -R	CTTTTCTTTCTCCGGCTT	
<i>spaA</i> -F	GATTCGACAGATATTTT	Amplification of <i>spaA</i>
<i>spaA</i> -R	TATCTTAGGTTTTTCTT	
<i>cbpB</i> -F	GAGGAGCGAAAACCGAGAGA	Amplification of <i>cbpB</i>
<i>cbpB</i> -R	TTGGCTATGTTTTACGATTA	
<i>spoIIIJ</i> -F ₁	AACTGGTCTGATCGGATCCCAGAAAACCGGCGAGCC	<i>spoIIIJ</i> and <i>spaA</i> fused PCR primers
<i>spoIIIJ</i> -R ₁	CCGCTTCCACCGCCACCCTTTTTCTTTCTCCGGCTTT	
<i>spoIIIJ</i> -R ₂	GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTTCC ACCGCCACCCTTTTTCT	
<i>spaA</i> -F ₁	CGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGATTTCGAC AGATATTTCTGTGA	<i>cotC</i> and <i>cbpB</i> fused PCR primers
<i>spaA</i> -R ₁	GCAGGAATTCGATAAGCTATCTTTAGGTTTTTCTTTATCAA	
<i>cotC</i> -F ₁	AACTGGTCTGATCGGATCTGTAGGATAAATCGTTT	
<i>cotC</i> -R ₁	CCGCTTCCACCGCCACCGTAGTGTTTTTTATGCTTTTATA	
<i>cotC</i> -R ₂	GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTTCCACCG CCACCGTAGTGT	
<i>cbpB</i> -F ₁	CGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGAGGAGCGAA AACCGAGA	Amplification the upstream fragment of <i>spe^r</i>
<i>cbpB</i> -R ₁	CGCCGGTTTTCTGGGATCTTGGCTATGTTTTACGATTA	
<i>spe</i> -F ₁	GAATTCGTAACGTGACTGGCAAGAGA	
<i>spe</i> -R ₁	GTCGACCTTGTTGGGAGGATGATTC	Amplification the downstream fragment of <i>spe^r</i>
<i>Spe</i> -F ₂	GTCGACTGGACAGCCTGAGGAACTCT	
<i>Spe</i> -R ₂	GGATCCTGATTCTGACCGGGCACTTG	Detection of pMAD
pMAD-F	TACTAAATTCACCCCGCTT	
pMAD-R	TGATGGTCGTCATCTACCTG	

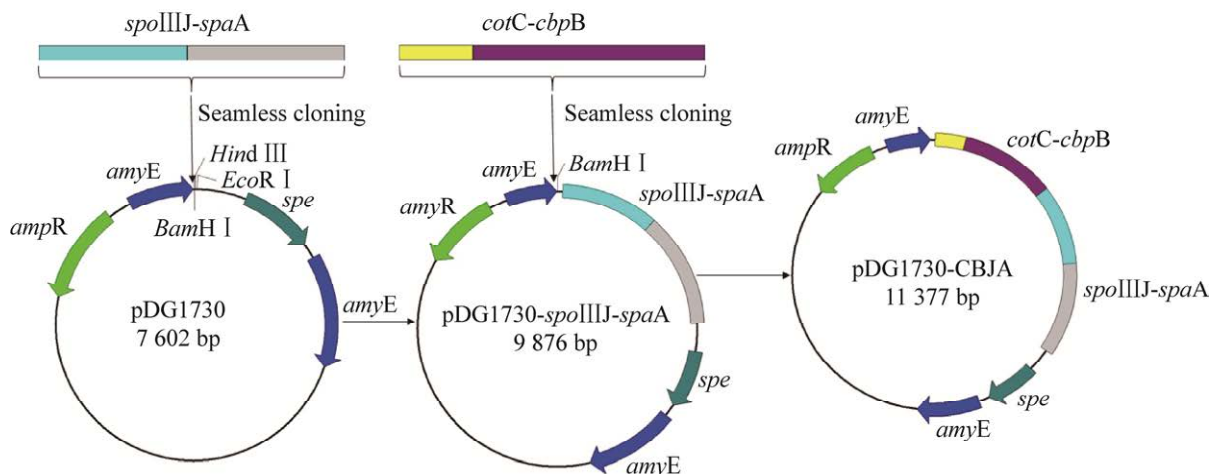


图 1 整合质粒 pDG1730-CBJA 的构建

Figure 1 Construction of integration plasmid pDG1730-CBJA.

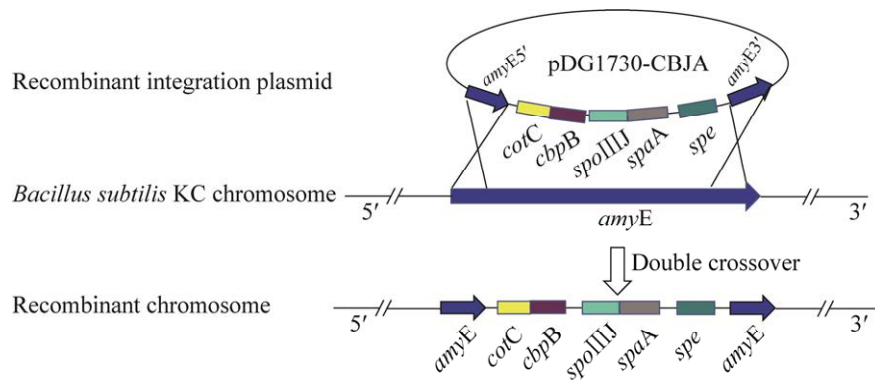


图2 整合质粒 pDG1730-CBJA 与枯草芽孢杆菌基因组发生同源重组双交换

Figure 2 Homologous recombination double crossover between integration plasmid pDG1730-CBJA and the *Bacillus subtilis* genomes.

水解圈。野生型 KC 菌株能分泌淀粉酶，菌苔周围呈现透明圈；由于重组菌淀粉酶基因插入失活，菌苔周围没有透明圈。

1.5 Western blotting 和间接免疫荧光实验

将枯草芽孢杆菌的菌体及芽孢分别经超声波裂解后进行变性 SDS-PAGE，利用转移电泳槽将凝胶中的蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 进行 Western blotting 分析。检测菌体的一抗为小鼠抗 rSpaA 蛋白血清(1: 1 000)，检测芽孢的一抗为小鼠抗 rCbpB 蛋白血清(1: 1 000)，二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1: 8 000)，使用 ECL 显色。

在间接免疫荧光实验中，将适当浓度的菌体或芽孢涂布于载玻片，4%多聚甲醛固定 30 min，洗涤后用 1.0%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA) 于 37 °C 封闭 1 h，以小鼠抗重组蛋白血清为一抗(1: 1 000)、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗(1: 200)，荧光显微镜观察。

1.6 重组枯草芽孢杆菌在小鼠体内的稳定性

利用灌胃实验测定了重组枯草芽孢杆菌在小鼠体内的稳定性。实验分为 5 组，第 1 组和第 2 组分别为重组枯草芽孢杆菌的菌体和芽孢灌胃，第 3 组和第 4 组分别为枯草芽孢杆菌 KC 株的菌体和芽孢灌胃，小鼠灌胃剂量为 0.2 mL/只，

其中含菌体或芽孢 5×10^9 CFU，第 5 组为 PBS 0.2 mL/只灌胃。每间隔 24 h 灌胃 1 次，连续 3 次，最后一次灌胃后不同时间采集小鼠粪便。粪便经灭菌水充分混悬，静置 5 min，上清液涂布于含有壮观霉素(250 μ g/mL)的 LB 平板，37 °C 培养 12 h 后进行菌落计数，并计算每 g 粪便中的菌落总数。从 12、96 和 216 h 粪便样品检测平板上各随机挑取 3 个菌落扩大培养，然后进行革兰氏染色观察、PCR 及 Western blotting 检测，确定细菌是否为重组枯草芽孢杆菌以及是否表达外源目的蛋白。

1.7 重组枯草芽孢杆菌壮观霉素抗性基因的敲除

用 PCR 扩增壮观霉素抗性基因(spectinomycin resistance gene, *spe^r*) 5'端及 3'端各约 600 bp 片段，经相应的限制性酶切位点插入温敏型质粒 pMAD，构建重组质粒 pMAD- Δ *spe^r*。利用自然法将 pMAD- Δ *spe^r* 转化重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB*，用含 X-gal 及红霉素的营养琼脂平板筛选，挑取蓝色菌落并以引物 *spe-F₁/spe-R₂* 进行菌落 PCR 扩增，鉴定单交换子。参照文献[16]的方法筛选双交换子，用 PCR 及 Western blotting 进行验证，获得敲除 *spe^r* 的重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB::\Delta spe^r*。

1.8 小鼠口服免疫与攻毒保护实验

培养重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB*: Δ *spe^r*, 分别收集菌体及芽孢, 计数后用于 6 周龄雌性昆明小鼠的口服免疫实验。小鼠每周的前 3 天用灌胃针一次性灌胃(每只为 5×10^9 CFU), 连续 6 周。在免疫前及免疫 21 d 和 42 d 后, 分别随机抽取 3 只小鼠用于采样; 其余小鼠在免疫 42 d 后用于攻毒实验。以枯草芽孢杆菌 KC 株的菌体及芽孢作为阴性对照、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)作为空白对照, 红斑丹毒丝菌弱毒 G4T10 株作为阳性对照。G4T10 株细菌的免疫方法及程序是每只小鼠灌胃 1×10^9 CFU, 间隔 3 周加强免疫 1 次。

1.8.1 血清特异性 IgG 抗体检测

以 rSpaA 和 rCbpB 分别为包被抗原进行间接 ELISA 检测血清中特异性 IgG, 以 TMB 单组分显色液进行显色, 以 OD_{450} 值表示抗体水平。

1.8.2 粪便中 sIgA 检测

在小鼠粪便中加入裂解液, 涡旋仪上充分混悬 5 min, 置 4 °C 过夜后 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 用间接 ELISA 测定 sIgA 含量。在间接 ELISA 中, 聚苯乙烯酶标板每孔加入 100 μ L 小鼠粪便处理样品, 37 °C 孵育 1 h; 兔抗小鼠 IgA 100 μ L/孔(1: 5 000), 37 °C 孵育 1 h; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 100 μ L/孔(1: 8 000), 37 °C 孵育 1 h; 用 TMB 显色液 100 μ L/孔显色, 室温 10 min; 用显色终止液 50 μ L/孔终止反应; 酶标仪测定 OD_{450} 值。

1.8.3 攻毒实验

小鼠经背皮下注射接种红斑丹毒丝菌 Y83 株细菌, 每只的接种剂量为 5 个半数致死量(median lethal dose, LD_{50})。接种后连续观察 10 d, 记录小鼠的死亡情况。

1.8.4 数据统计

实验的数据结果以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 *t* 检验进行差异显著性检验, *表示差异显

著($0.01 < P \leq 0.05$), **表示差异极显著($P \leq 0.01$), ns 表示无显著性差异($P > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 锚定基因与目的基因融合

利用 PCR 扩增枯草芽孢杆菌 KC 株 *cotC* 和 *spoIIIJ* 基因及其启动子序列, 经克隆及测序结果显示, 分别为 372 bp 与 1 028 bp。*cotC* 基因及启动子在核苷酸水平上与枯草芽孢杆菌 ATCC 21228 株(GenBank 登录号: CP020023.1)的相似性在 99% 以上, *spoIIIJ* 基因及启动子与枯草芽孢杆菌 168 株(GenBank 登录号: CP053102.1)的相似性在 99% 以上。PCR 扩增的红斑丹毒丝菌 Y83 株 *spaA* 和 *cbpB* 基因片段分别为 1 206 bp 与 1 080 bp。利用融合 PCR, 将 *cotC* 及启动子与 *cbpB* 基因、*spoIIIJ* 及启动子与 *spaA* 基因融合, 获得的融合片段 *cotC-cbpB* 和 *spoIIIJ-spaA* 分别为 1 492 bp 和 2 279 bp (图 3)。

2.2 重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 的构建

利用无缝克隆技术将 *spoIIIJ-spaA* 片段插入质粒 pDG1730 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点, 构建重组质粒 pDG1730-JA。将 pDG1730-JA 用 *Bam*H I 线性化, 利用无缝克隆技术与 *cotC-cbpB* 片段连接, 构建重组整合质粒 pDG1730-CBJA。测序验证, 重组整合质粒中的插入片段未发生核苷酸突变、缺失和插入。利用自然法将重组整合质粒 pDG1730-CBJA 转化枯草芽孢杆菌 KC 株的感受态细胞, 利用壮观霉素抗性平板筛选获得转化子, PCR 扩增 *spaA*、*cbpB* 及 *cbpB-spoIIIJ* 片段阳性, 不分解淀粉(图 4)。以上结果显示, 目的基因整合入细菌基因组 DNA 中, 获得重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 菌株。

2.3 重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 表达 SpaA 和 CbpB 蛋白

将重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 菌体

及芽孢超声裂解,经变性 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜,以小鼠抗重组蛋白血清为一抗,进行 Western blotting,结果显示,菌体及芽孢分别为 SpaA 蛋白和 CbpB 蛋白阳性(图 5A、5B)。在间接免疫荧光实验中,重组菌的菌体与小鼠抗 rSpaA 血清作用后,能被 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 标记,在荧光显微镜下呈现绿色荧光(图 5C);芽孢与小鼠抗 rCbpB 血清作用后也能被标记,呈现绿色荧光(图 5D)。以上结果表明,重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 菌体表达 SpaA 蛋白及其芽孢表达 CbpB 蛋白。

2.4 KC-*spaA-cbpB* 菌体及其芽孢口服后在小鼠体内的稳定性

小鼠粪便中的菌落总数见表 2。利用壮观霉素抗性营养琼脂平板检测,重组枯草芽孢杆

菌 KC-*spaA-cbpB* 株的芽孢灌胃后 12 h,每 g 小鼠粪便中的菌落总数在 10^7 以上,72-192 h 均维持在 10^3 以上;菌体灌胃,12-24 h 菌落总数为 1×10^2 - 5×10^3 ,之后的粪便样品则无细菌生长。枯草芽孢杆菌 KC 株的菌体、芽孢及 PBS 灌胃,小鼠粪便经壮观霉素抗性平板培养,无细菌生长。从 12、96 和 216 h 粪便样品检测平板上各随机挑取 3 个菌落扩大培养,革兰氏染色后镜检均为革兰氏阳性杆菌,PCR 检测 *spaA* 和 *cbpB* 基因均为阳性,Western blotting 检测菌体均为 SpaA 蛋白阳性、检测芽孢为 CbpB 蛋白阳性。

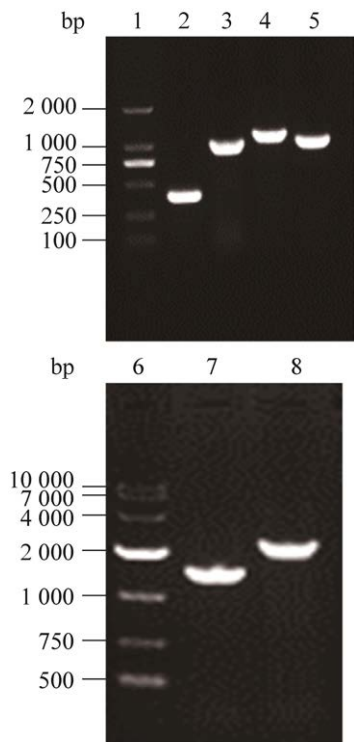


图 3 锚定基因与目的基因的克隆与融合

Figure 3 Cloning and fusion of anchoring gene and target gene. Lane 1: DL2000 DNA Marker; Lane 2: *cotC*; Lane 3: *spoIIIJ*; Lane 4: *spaA*; Lane 5: *cbpB*; Lane 6: DL10000 DNA Marker; Lane 7: *cotC-cbpB*; Lane 8: *spoIIIJ-spaA*.

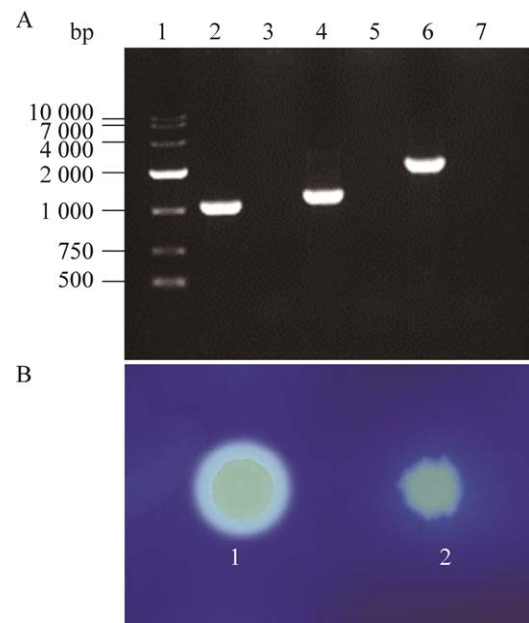


图 4 重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB* 菌株的鉴定

Figure 4 Identification of the recombinant *Bacillus subtilis* KC-*spaA-cbpB*. A: PCR detection. Lane 1: DL10000 DNA Marker; Lane 2: KC-*spaA-cbpB* (primers *spaA-F/spaA-R*); Lane 3: KC (primers *spaA-F/spaA-R*); Lane 4: KC-*spaA-cbpB* (primers *cbpB-F/cbpB-R*); Lane 5: KC (primers *cbpB-F/cbpB-R*); Lane 6: KC-*spaA-cbpB* (primers *cbpB-F/spoIIIJ-R*); Lane 7: KC (primers *cbpB-F/spoIIIJ-R*). B: Starch degradation test. 1: KC; 2: KC-*spaA-cbpB*.

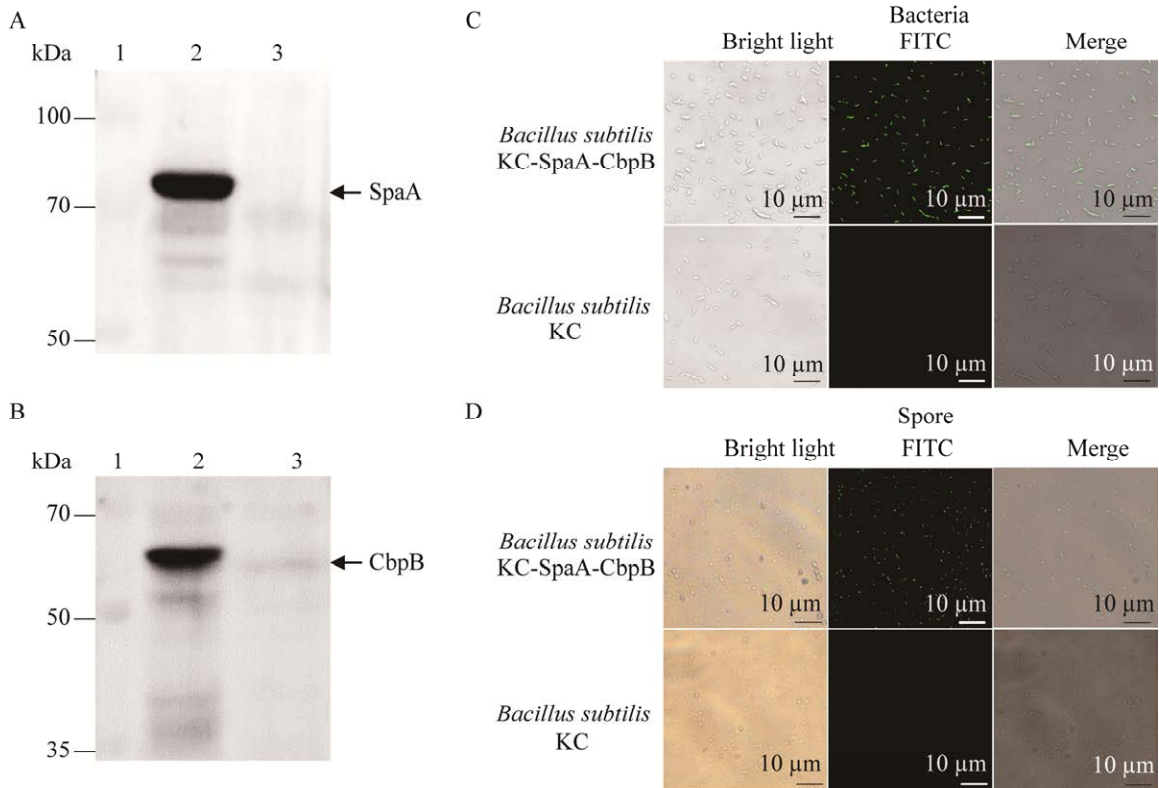


图 5 免疫印迹及免疫荧光实验检测目的蛋白

Figure 5 Detected the target proteins by western blotting and immunofluorescence assay. A: Detection of SpaA of bacteria by Western blotting. Lane 1: Protein marker; Lane 2: KC-*spaA-cbpB* bacteria; Lane 3: KC bacteria. B: Detection of CbpB of spores by Western blotting. Lane 1: Protein marker; Lane 2: KC-*spaA-cbpB* spores; Lane 3: KC spores. C: Immunofluorescence assay detection of the bacteria. D: Immunofluorescence assay detection of the spores.

表 2 小鼠粪便中菌落总数

Table 2 Total number of colonies in mouse feces (CFU/g)

Time (h)	Oral administration of KC- <i>spaA-cbpB</i> bacteria				Oral administration of KC- <i>spaA-cbpB</i> spores			
	1	2	3	4	1	2	3	4
12	2.3×10^7	1.2×10^7	4.9×10^7	5.1×10^7	3.9×10^3	2.1×10^3	4.8×10^2	4.6×10^3
24	9.5×10^6	3.5×10^6	4.8×10^4	4.0×10^5	4.1×10^2	2.9×10^2	3.3×10^2	4.3×10^2
48	7.0×10^4	1.1×10^4	9.7×10^3	1.0×10^4	0	0	0	0
72	7.4×10^3	1.5×10^3	4.7×10^3	5.6×10^3	0	0	0	0
96	4.3×10^4	3.9×10^3	1.4×10^4	1.0×10^3	0	0	0	0
120	4.9×10^3	4.5×10^4	2.1×10^3	2.2×10^3	0	0	0	0
144	2.1×10^3	1.9×10^3	2.0×10^3	1.9×10^3	0	0	0	0
168	5.7×10^3	3.0×10^3	5.5×10^3	3.7×10^3	0	0	0	0
192	2.1×10^4	6.9×10^3	3.4×10^3	4.1×10^3	0	0	0	0
216	1.3×10^3	6.4×10^2	2.9×10^2	1.6×10^3	0	0	0	0

2.5 重组菌 KC-*spaA-cbpB* 敲除 *spe^r* 基因

利用自然法将质粒 pMAD- Δspe^r 转入重组菌 KC-*spaA-cbpB*, 在获得单交换子的基础上

(图 6A)继续筛选, 获得双交换子, 即 *spe^r* 敲除菌株 KC-*spaA-cbpB*:: Δspe^r (图 6B)。Western blotting 检测结果表明, 该菌株的菌体和芽孢能

分别表达 SpaA 和 CbpB 蛋白(图 6C、6D)。

2.6 小鼠口服免疫实验

小鼠口服免疫后不同时间血清中特异性 IgG 抗体及粪便中特异性 sIgA 抗体水平见图 7。小鼠口服免疫重组菌的菌体, 42 d 后检测血清中 SpaA 和 CbpB 抗体水平均与阴性和空白对照差异不显著, 粪便中 SpaA 的特异性 sIgA 水平极显著升高, 而 CbpB 的 sIgA 抗体水平则差异不显著。小鼠口服免疫重组菌的芽孢, 42 d 后检测, 血清和粪便中 SpaA、CbpB 的特异性抗体水平均极显著高于阴性和空白对照。小鼠攻毒后不同时间的存活情况如图 8 所示。结果显示, 小鼠口服免疫重组菌的芽孢, 攻毒存活率 62.5% (5/8), 免疫红斑丹毒丝菌弱毒株 G4T10 的存活率 87.5% (7/8), 而免疫重组菌的菌体、阴性对照和空白对照小鼠均 100% (8/8) 死亡。

以上结果表明, 小鼠口服重组枯草芽孢杆菌的芽孢能较好诱导产生体液和黏膜免疫应答, 并对红斑丹毒丝菌强毒菌株的攻击具有一定的保护力。

3 讨论与结论

猪丹毒是一种人畜共患的自然疫源性疾病, 在 20 世纪 80–90 年代, 是危害我国养猪业的三大传染病之一, 但随着抗菌药物添加剂的广泛使用以及减毒活疫苗的免疫预防接种, 该种疾病在一段时间内得到了较好的控制。有研究发现, 在日本养猪场中使用的弱毒活疫苗存在毒力回复突变^[17], 临床上 37% 慢性病例是免疫弱毒活疫苗引起的^[18], 我国上海地区标准化屠宰场上市猪的肺脏、脾脏和下颌淋巴结红斑丹毒丝菌的检出率分别为 42.86%、70.00% 和 43.18%^[19]。弱毒活疫苗在美洲和亚洲的一些养猪场还在使用, 而

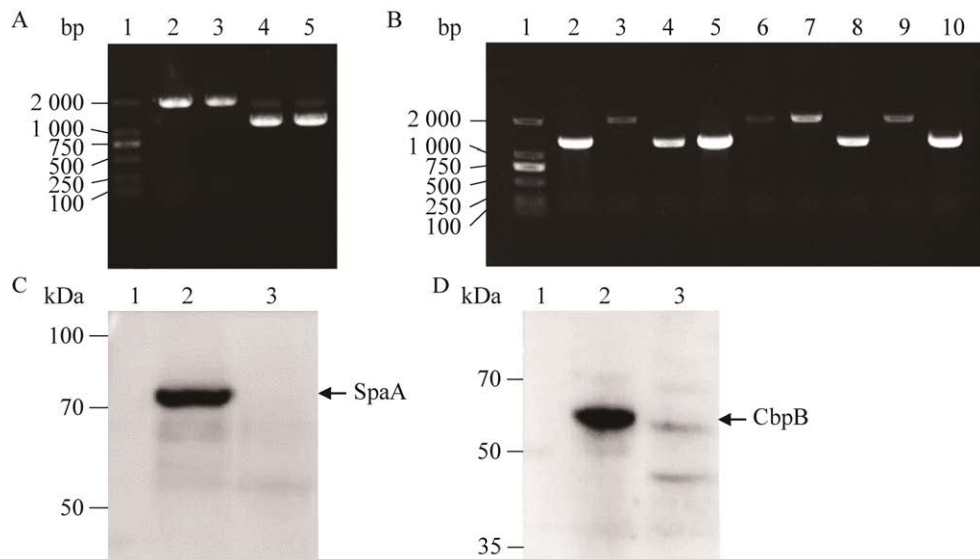


图 6 *Spe^r* 缺失菌株筛选与表达目的蛋白检测

Figure 6 Screening of *spe^r*-knockout strain and detection of the target protein. A: Single exchanger identified by PCR. Lane 1: DL2000 DNA Marker; Lane 2 and 3: Wild type strain; Lane 4 and 5: Single exchanger. B: Double exchanger identified by PCR. Lane 1: DL2000 DNA Marker; Lane 3, 6, 7 and 9: Recovery mutants; Lane 2, 4, 5, 8, and 10: Double exchanger. C: Detected SpaA of bacteria by Western blotting. Lane 1: Protein marker; Lane 2: KC-*spaA-cbpB::Δspe^r* bacteria; Lane 3: KC bacteria. D: Detected CbpB of spores by Western blotting. Lane 1: Protein marker; Lane 2: KC-*spaA-cbpB::Δspe^r* spores; Lane 3: KC spores.

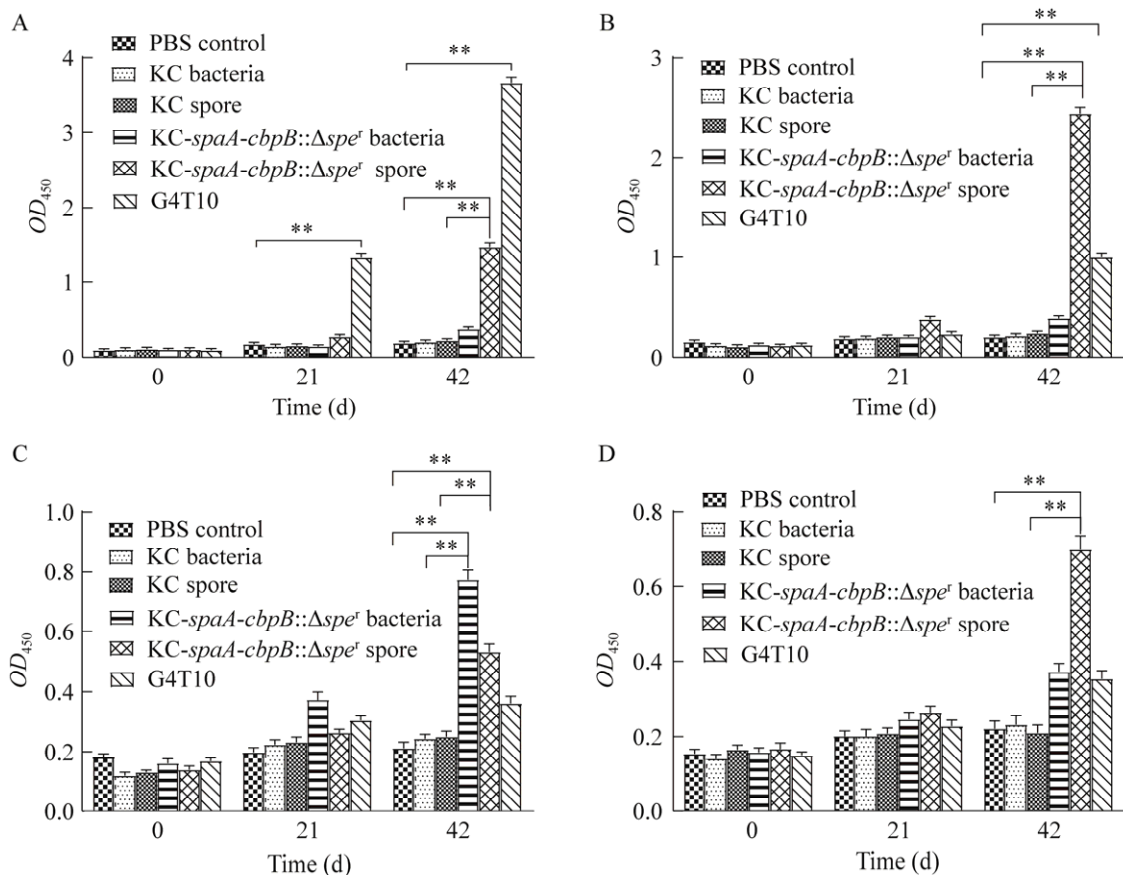


图7 小鼠免疫后的应答反应

Figure 7 Immune responses after immunizing mice with different methods. A: The levels of SpaA-specific IgG antibody in serum. B: The levels of CbpB-specific IgG antibody in serum. C: The levels of SpaA-specific sIgA antibody in feces. D: The levels of CbpB-specific sIgA antibody in feces. The levels of specific antibody were expressed as OD_{450} values. Data were presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $0.01 < P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

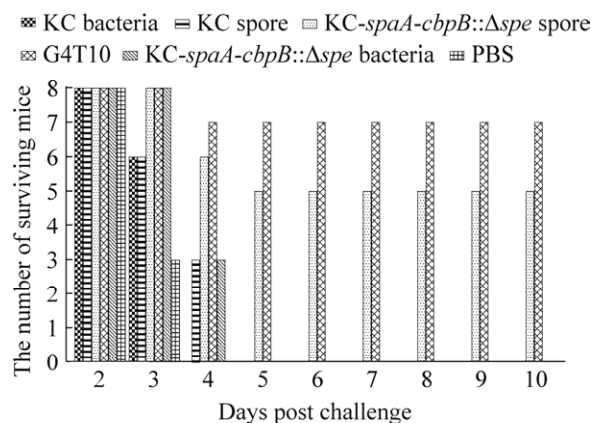


图8 攻毒后不同时间小鼠存活数量

Figure 8 Survival number of mice at different times after challenge.

在欧洲几乎不使用^[20]。猪丹毒仍然广泛流行，随着我国养殖业实施“限抗禁抗”政策，养殖业对抗菌药物替代品及新型疫苗具有迫切需求^[21]。

革兰氏阳性病原菌的某些表面蛋白是重要的毒力因子，能调节巨噬细胞的吞噬杀伤作用，是疫苗开发选择的优良靶点^[22-23]。红斑丹毒丝菌表面保护性抗原蛋白 SpaA 在大多数血清型菌株中都被看作是主要的保护性抗原之一，被动和主动免疫实验均证实其作为疫苗抗原具有良好保护作用^[24-25]。SpaA 在红斑丹毒丝菌中不易突变，对英国 1985–2014 年从猪群中分离的红斑丹

毒丝菌 SpaA 蛋白进行分析发现,所有菌株与使用的疫苗菌株间仅有 1 个氨基酸残基的变异^[26]。使用胆碱结合蛋白 CbpB 免疫小鼠和猪,血清特异性抗体具有杀菌活性及促进巨噬细胞体外吞噬作用,对强毒菌株攻击具有保护作用^[27]。因此在本研究中,选择红斑丹毒丝菌 SpaA 和 CbpB 作为抗原分子用于构建活载体疫苗。

枯草芽孢杆菌的芽孢具有独特的抗逆性,是内生性的,形成过程中不需要穿过细胞膜,有利于表达外源抗原分子的正确折叠,及其表面有 CotC、CotB 等多个锚定蛋白,每个锚定蛋白可以融合表达几千个抗原分子,现广泛用于构建口服活载体疫苗^[28]。在前期研究中分离鉴定的枯草芽孢杆菌 KC 株具有抗菌、促生长及无毒副作用等特点^[14],以此菌为载体构建活载体疫苗,以期口服免疫后既能诱导机体产生特异性免疫应答,又具有益生菌作用。本研究通过基因组整合构建的无抗性标记基因的重组枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB::Δspe^r* 能在菌体表面表达 SpaA 蛋白及芽孢表面表达 CbpB 蛋白(图 6C、6D)。小鼠口服菌体免疫,仅能在粪便中检出抗 SpaA 蛋白的特异性 sIgA,对红斑丹毒丝菌强毒株的攻击无保护作用;小鼠口服免疫芽孢,SpaA 蛋白和 CbpB 蛋白的血清抗体 IgG 及粪便中 sIgA 均为阳性,攻毒保护率 62.5% (5/8),这可能与芽孢具有良好的抗逆性,能顺利通过胃肠屏障,以及芽孢在体内能萌芽成营养细胞表达 SpaA 有关^[29]。

本研究成功构建了枯草芽孢杆菌 KC-*spaA-cbpB::Δspe^r* 菌株,菌体和芽孢能分别表达红斑丹毒丝菌的抗原分子 SpaA 和 CbpB,小鼠口服免疫芽孢能较好诱导体液和黏膜免疫应答,有较好的抗感染作用,具有进一步开发应用的前景,但在猪中的免疫保护及益生作用等有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] WANG Q, CHANG BJ, RILEY TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 140(3/4): 405-417.
- [2] WANG HR, XU Y, OUYANG ML, GAO L, GAO X, LI SH, GAO HY, XIAO JH. Potential risk factors of swine erysipelas outbreak in Northeast Mainland China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 68(3): 1652-1662.
- [3] WU C, LV CJ, ZHAO Y, ZHU WF, LIU L, WANG T, KANG C, YANG Y, SUN XM, ZHANG Q, JIN ML. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from diseased pigs in 15 Chinese Provinces from 2012 to 2018[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(12): 2615.
- [4] ZHANG AY, XU CW, WANG HN, LEI CW, LIU BH, GUAN ZB, YANG CM, YANG YQ, PENG LY. Presence and new genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene *lsa(E)* in *Erysipelothrix rhusiopathiae* of swine origin[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(1/2): 162-167.
- [5] GU J, LI YX, XU CW, XIE XJ, LI P, MA GX, LEI CW, LIU JX, ZHANG AY. Genome sequence of multidrug-resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* ZJ carrying several acquired antimicrobial resistance genes[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 21: 13-15.
- [6] 罗雪刚, 罗永芳, 戴怡雪, 胡书月, 李继祥. 红斑丹毒丝菌的分离鉴定及疫苗的免疫保护作用[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(11): 1882-1886.
LUO XG, LUO YF, DAI YX, HU SY, LI JX. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the immunoprotection of swine erysipelas vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(11): 1882-1886 (in Chinese).
- [7] SHIMOJI Y, MORI Y, FISCHETTI VA. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(4): 1646-1651.
- [8] TO H, NAGAI S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, 14(7): 813-820.
- [9] SHI F, OGAWA Y, SANO A, HARADA T, HIROTA J, EGUCHI M, OISHI E, SHIMOJI Y. Characterization and identification of a novel candidate vaccine protein through systematic analysis of extracellular proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(12): 4333-4340.
- [10] 刘君雯, 吴琼娟, 邢刚, 占松鹤, 魏建忠, 孙裴, 刘雪兰, 李郁. 猪丹毒丝菌 CbpB 蛋白对小鼠的免疫效果分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1689-1699.
LIU JW, WU QJ, XING G, ZHAN SH, WEI JZ, SUN P,

- LIU XL, LI Y. Immunogenicity analysis and protective effects of CbpB protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in mice[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(6): 1689-1699 (in Chinese).
- [11] MOU CX, ZHU LQ, XING XP, LIN J, YANG Q. Immune responses induced by recombinant *Bacillus subtilis* expressing the spike protein of transmissible gastroenteritis virus in pigs[J]. Antiviral Research, 2016, 131: 74-84.
- [12] HONG HA, DUC LH, CUTTING SM. The use of bacterial spore formers as probiotics[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 813-835.
- [13] BARNES AGC, CEROVIC V, HOBSON PS, KLAVINSKIS LS. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen[J]. European Journal of Immunology, 2007, 37(6): 1538-1547.
- [14] 温余东. 益生性枯草杆菌的特性测定及初步应用[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2014.
WEN YD. Characterization and preliminary application of probiotic *Bacillus subtilis*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2014 (in Chinese).
- [15] 李瑞芳, 薛雯雯, 黄亮, 熊前程, 王彬. 枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究[J]. 生物技术通报, 2011(5): 227-230.
LI RF, XUE WW, HUANG L, XIONG QC, WANG B. Competent preparation and plasmid transformation of *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(5): 227-230 (in Chinese).
- [16] 张明俐, 柳鹏福, 史吉平, 曾勇. 无痕敲除法构建食品安全级枯草芽孢杆菌无芽孢菌株[J]. 食品工业科技, 2016, 37(14): 175-180.
ZHANG ML, LIU PF, SHI JP, ZENG Y. Construction of a food safe grade *Bacillus subtilis* nonspore strain with clean deletion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(14): 175-180 (in Chinese).
- [17] SHIMOJI Y, OGAWA Y, TSUKIO M, SHIRAIWA K, NISHIKAWA S, EGUCHI M. Genome-wide identification of virulence genes in *Erysipelothrix rhusiopathiae*: use of a mutant deficient in a *tagF* homolog as a safe oral vaccine against swine erysipelas[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(12): e00673-19.
- [18] SHIRAIWA K, OGAWA Y, NISHIKAWA S, KUSUMOTO M, EGUCHI M, SHIMOJI Y. Single nucleotide polymorphism genotyping of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs affected with chronic erysipelas in Japan[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 2017, 79(4): 699-701.
- [19] 徐锋, 王晓旭, 张维谊, 宁昆, 齐新永, 沈莉萍. 上海地区屠宰场猪红斑丹毒丝菌的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(1): 227-235.
XU F, WANG XX, ZHANG WY, NING K, QI XY, SHEN LP. Isolation and identification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from abattoirs in Shanghai area[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(1): 227-235 (in Chinese).
- [20] McNEIL M, GERBER PF, THOMSON J, WILLIAMSON S, OPRIESSNIG T. Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015)[J]. The Veterinary Journal, 2017, 225: 13-15.
- [21] OPRIESSNIG T, FORDE T, SHIMOJI Y. *Erysipelothrix* spp.: past, present, and future directions in vaccine research[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 174.
- [22] NI H, LI M, WANG QQ, WANG J, LIU XM, ZHENG F, HU D, YU X, HAN YF, ZHANG Q, ZHOU TT, WANG YW, WANG CH, GAO JM, SHAO ZQ, PAN XZ. Inactivation of the *hpsA* gene affects capsule development and pathogenicity of *Streptococcus suis*[J]. Virulence, 2020, 11(1): 927-940.
- [23] SHIMOJI Y, BITO M, SHIRAIWA K, OGAWA Y, NISHIKAWA S, EGUCHI M. Disassociation of Spa type and serovar of an *Erysipelothrix rhusiopathiae* serovar 6 strain isolated from a diseased pig[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2019, 31(3): 488-491.
- [24] ZHU WF, WANG Y, CAI CZ, LI JT, WU C, KANG C, JIN ML. *Erysipelothrix rhusiopathiae* recruits host plasminogen via the major protective antigen SpaA[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(5). DOI: 10.1093/femsle/fnx036.
- [25] TO H, TSUTSUMI N, TAZUMI A, KAMADA T, NAGANO T, NAGAI S, IWATA A, NUNOYA T. Protection of immunized mice and swine to challenge exposure with *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains obtained from recent swine erysipelas outbreaks in Japan[J]. Acta Veterinaria Brno, 2013, 82(2): 119-124.
- [26] FORDE TL, KOLLANANDI RATHEESH N, HARVEY WT, THOMSON JR, WILLIAMSON S, BIEK R, OPRIESSNIG T. Genomic and immunogenic protein diversity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in great Britain: implications for vaccine protection[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 418.
- [27] ZHU WF, WU C, KANG C, CAI CZ, WANG Y, LI JT, ZHANG Q, SUN XM, JIN ML. Evaluation of the protective efficacy of four newly identified surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Vaccine, 2018, 36(52): 8079-8083.
- [28] LIN P, YUAN HB, DU JK, LIU KQ, LIU HL, WANG TF. Progress in research and application development of surface display technology using *Bacillus subtilis* spores[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(6): 2319-2331.
- [29] DUC LH, HONG HA, FAIRWEATHER N, RICCA E, CUTTING SM. Bacterial spores as vaccine vehicles[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(5): 2810-2818.

(本文责编 郝丽芳)