

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

表达禽 β -防御素的重组乳酸菌作为免疫佐剂 的研究

硕 士 研 究 生: 王婷婷

学 号: 82101175228

指 导 教 师: 崔红玉 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2020 年 6 月

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

表达禽 β -防御素的重组乳酸菌作为免疫佐剂的研究

硕 士 研 究 生: 王婷婷

学 号: 82101175228

指 导 教 师: 崔红玉 副研究员

申 请 学 位 类 别: 兽医硕士

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所
研究生院

2020 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

**Study on recombinant lactic acid bacteria expressing
avian β -defensin as immune adjuvant**

Candidate: Wang Tingting

Student ID: 82101175228

Supervisor: Associate Professor Cui Hongyu

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Major: Veterinary Medicine

**Institution: Harbin Veterinary Research
Institute**

Graduate School

June 2020

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		表达禽 β -防御素的重组乳酸菌作为免疫佐剂的研究				
论文作者		王婷婷	领域	兽医	研究方向	
指导教师		崔红玉		培养单位		哈尔滨兽医研究所
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	杨志彪	教授	硕导 ☒ 博导 ☐	上海交通大学	预防兽医学	
	李呈军	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	
答 辩 主 席	李一经	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	东北农业大学	预防兽医学	李一经
答 辩 委 员	蔡雪辉	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	蔡雪辉
	王靖飞	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	王靖飞
	李呈军	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	李呈军
	孙刚	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	黑龙江省动物疫病 预防与控制中心	预防兽医学	孙刚
			硕导 ☐ 博导 ☐			
			硕导 ☐ 博导 ☐			
			硕导 ☐ 博导 ☐			
会议记录(秘书)		张艳萍				
论文答辩时间地点		哈尔滨兽医研究所 综合楼 4096 会议室				

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：王婷婷

时间：2020年6月4日

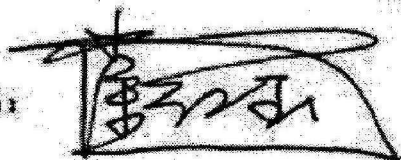
关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：王婷婷

时间：2020年6月4日

导师签名：



时间：2020年6月7日

摘 要

益生乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 菌体较大, 不存在内毒素, 可以吸附黏膜细胞上并定居于黏膜表层。因此, 乳酸菌是表达和传递治疗性和预防性外源蛋白的首选载体。禽 β -防御素 (AvBDs) 是主要存在于天然黏膜系统的天然抗菌肽之一, 主要发挥抗感染、广谱抗菌和广泛的免疫调节作用, 特别是禽 β -防御素是一种小的阳离子非糖基化的多肽, 非常适合于原核表达。因此, 本研究采用食品级乳酸乳球菌 NZ3900 宿主菌株, 构建了完全食品级表达禽 β -防御素的重组乳酸菌。

本研究利用 3 种表达质粒和食品级宿主菌株构建了 3 套表达禽 β -防御素的重组乳酸菌。采用的 3 种表达系统和食品级乳酸乳球菌 NZ3900 菌株作为宿主菌株, 分别构建了表达禽 β -防御素 1 (AvBD1)、禽 β -防御素 2 (AvBD2)、禽 β -防御素 6 (AvBD6)、禽 β -防御素 13 (AvBD13) 和融合禽 β -防御素 1/2/6/13 功能片段组成的融合禽 β -防御素 AvBD12613, 共 11 株重组乳酸菌, 其中 5 株重组乳酸菌的表达量稳定, 蛋白大小正确, 是本研究用于体外筛选和体内动物试验验证的重组乳酸菌。

利用表达 β -防御素的重组乳酸菌的菌体裂解混合物与巨噬细胞、外周血单个核细胞等的相互作用, 对构建的重组乳酸菌体外免疫调节活性的检测, 体外筛选试验结果表明, 表达禽 β -防御素的重组乳酸菌 r-L. Lactis-AvBD12613 菌体裂解混合物可以显著激活巨噬细胞报告细胞系 J774-Dual™ 细胞的 IRF 及 NF- κ B 信号通路; 5 种表达重组禽 β -防御素 rAvBD1、rAvBD2、rAvBD6、rAvBD13 及 rAvBD12613 重组乳酸菌菌体裂解混合物均能够诱导鸡巨噬细胞系 HD11 产生较高水平的 IL-10; 其中 rAvBD12613 还能够诱导 HD11 表达较高水平的 CD80 和 CD86 分子; 而重组禽 β -防御素 rAvBD12613、rAvBD1 及 rAvBD6 能够诱导鸡外周血单个核细胞 (PBMCs) 产生较高水平的 IL-12 与 IL-10; 并且 rAvBD12613 还能诱导鸡 PBMCs 表达较高水平的 CD80 和 CD86 分子, 体外筛选表明, 表达重组禽 β -防御素 rAvBD12613 重组乳酸菌具有较强的免疫调节活性。

利用表达组合禽 β -防御素 rAvBD12613 重组乳酸菌的菌体裂解混合物作为新城疫活疫苗和新城疫灭活疫苗的免疫佐剂, 通过检测血清中细胞因子表达水平, PBMCs 和外周血白细胞的增殖活性以及抗体水平等方式来验证组合禽 β -防御素 rAvBD12613 的免疫佐剂活性。动物实验结果表明: 在重组禽 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂活疫苗试验中, 注射免疫 1 周后, 显著提高了实验组鸡血清中 IL-4 和 IL-1 β 表达水平, 而 IL-10 和 IFN- γ 在血清中的表达水平差异不显著; 与野生菌对照组和活疫苗对照组相比, 在免疫 3 周攻毒 1 周后, 显著提高了实验组的抗体水平; 免疫 3 周及攻毒 1 周后, 极显著提高了实验组鸡 PBMCs 的增殖活性; 免疫 1 周及攻毒 1 周后, 显著提高了实验组鸡 PBMCs 的增殖活性。而在鸡新城疫重组禽 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂油乳剂灭活疫苗试验中, 在免疫 3 周攻毒 1 周后, 可以显著提高实验组的抗体水平; 免疫 3 周及攻毒 1 周后, 可以显著提高实验组鸡 PBMCs 和白细胞的增殖活性, 显著高于灭活疫苗对照组。结果表明, 重组禽 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂在新城疫活疫苗和灭活疫苗试验中均具有较好的免疫佐剂活性。

本研究构建表达的重组禽 β -防御素 rAvBD12613 在体内外均显示了较强的免疫调节活性, 具

有作为免疫佐剂或免疫增强剂的潜力，为新型食品安全级动物免疫佐剂或免疫增强剂的研发奠定了基础。

关键词：重组乳酸菌，禽 β -防御素，免疫调节活性，免疫佐剂，免疫增强剂

Abstract

Probiotic lactic acid bacteria (LAB) are large, without endotoxin, can adsorb on mucosal cells and settle on the mucosal surface. Therefore, lactic acid bacteria are the preferred carrier for expressing and delivering therapeutic and prophylactic foreign proteins. Avian beta-defensins (AvBDs) are one of the natural antibacterial peptides mainly present in the natural mucosal system, which mainly exerts anti-infection, broad-spectrum antibacterial and wide-ranging immunomodulatory effects, and avian β -defensin is a small cationic non-glycosylated polypeptide, which is very suitable for prokaryotic expression. Therefore, this study used the food-grade *Lactococcus lactis* NZ3900 host strain to construct a complete food-grade recombinant lactic acid bacterium expressing avian β -defensin.

In this study, three sets of recombinant lactic acid bacteria expressing recombinant avian β -defensin were constructed using three expression plasmids and food-grade host strains. The expression of avian β -defensin 1 (AvBD1), avian β -defensin 2 (AvBD2), avian β -defensin 6 (AvBD6), and avian β -defensin 13 (AvBD13) and fused avian beta-defensin 1/2/6/13 functional fragment composed of fused avian beta-defensin AvBD12613 were constructed, a total of 11 strains of recombinant lactic acid bacteria. Among them, the expression level of 5 recombinant lactic acid bacteria is stable and the recombinant protein size is correct. It is the recombinant lactic acid bacteria used in this study for in vitro screening and in vivo animal test verification.

Using the interaction of the bacterial lysate mixture of recombinant lactic acid bacteria expressing avian β -defensin with macrophages, peripheral blood mononuclear cells to detect the immunomodulatory activity of the constructed recombinant lactic acid bacteria in vitro. In vitro screening test results showed that recombinant avian β -defensin (recombinant lactic acid bacteria r-L.*Lactis*-AvBD12613 cell lysis mixture) can significantly activate the IRF and NF- κ B signaling pathways of the macrophage reporter cell line J774-DualTM cells; Five recombinant avian beta-defensins rAvBD1, rAvBD2, rAvBD6, rAvBD13 and rAvBD12613 can induce HD11 in chicken macrophage cell line to produce higher levels of IL-10; of which rAvBD12613 can also induce HD11 to express higher levels of CD80 and CD86 molecule. Recombinant avian beta-defensins rAvBD12613, rAvBD1 and rAvBD6 can induce chicken peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to produce higher levels of IL-12 and IL-10; Among them, rAvBD12613 can induce chicken PBMCs to express higher levels of CD80 and CD86 molecules. In vitro screening shows that recombinant avian defensin r-L. *Lactis*-AvBD12613 has strong immunomodulatory activity.

Using the cell lysis mixture of recombinant lactic acid bacteria expressing the combined avian defensin rAvBD12613 as an immune adjuvant for Newcastle disease live vaccine and Newcastle disease inactivated vaccine. The immune adjuvant activity of the combined avian defensin rAvBD12613 was verified by measuring the expression levels of cytokines in serum, the proliferation activity of PBMCs and peripheral blood leukocytes, and antibody levels. The animal experiment results show that: in the recombinant avian beta-defensin rAvBD12613 live adjuvant vaccine test, one week after injection, the

expression levels of IL-4 and IL-1 β in chicken serum of the experimental group were significantly increased, while the serum levels of IL-10 and IFN- γ are not significantly different, compared with the wild bacteria control group and the live vaccine control group; after three weeks of immunization and one week after challenge, the antibody level of the experimental group was significantly increased; After three weeks of immunization and one week of challenge, the proliferation activity of chicken peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in the experimental group was significantly improved; After three weeks of immunization and one week of challenge, the proliferation or cell activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of chickens in the experimental group was significantly improved. In the inactivated vaccine test, after three weeks of immunization and one week after challenge, the antibody level of the experimental group can be significantly increased; After three weeks of immunization and one week of challenge, the proliferative activity of chicken peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and white blood cells in the experimental group can be significantly improved, which is significantly higher than that of the inactivated vaccine control group. The results showed that the recombinant avian beta-defensin rAvBD12613 immune adjuvant had good immune adjuvant activity in both Newcastle disease live vaccine and inactivated vaccine.

The recombinant avian β -defensin rAvBD12613(r-L. Lactis-AvBD12613) constructed in this study showed strong immunomodulatory activity in vivo and in vitro experiment, and has the potential to be an immune adjuvant or immune enhancer. It laid the foundation for the research and development of new food safety animal immune adjuvants or immune enhancers.

Keywords: Recombinant lactic acid bacteria, Chicken β -defensin, Immunomodulatory activity, Immune adjuvant, immune enhancer

目 录

第一章 绪论	1
1.1 乳酸菌概述	1
1.2 乳酸菌活载体表达系统	1
1.2.1 宿主菌的选择	2
1.2.2 乳酸菌表达方式的选择	2
1.2.3 乳酸菌表达系统的优势及展望	3
1.3 免疫佐剂及免疫增强剂	3
1.3.1 免疫增强剂的定义及分类	3
1.3.2 免疫增强剂的作用机制	4
1.3.3 免疫佐剂的定义及分类	4
1.3.4 免疫佐剂的作用机制	4
1.3.5 免疫佐剂及免疫增强剂的研究现状及展望	5
1.4 禽 β -防御素概述	5
1.4.1 禽 β -防御素的定义及分类	5
1.4.2 禽 β -防御素的免疫学功能	6
1.4.3 禽 β -防御素作为免疫佐剂或免疫增强剂的研究进展及展望	6
1.4.4 新城疫灭活疫苗及其免疫佐剂	6
1.4.5 新城疫活疫苗及其免疫佐剂	7
1.5 目的与意义	7
第二章 表达禽 β -防御素的重组乳酸菌的构建	8
2.1 材料	8
2.1.1 质粒和菌株	8
2.1.2 主要试剂和仪器	8
2.2 方法	8
2.2.1 引物设计及合成	8
2.2.2 目的片段的线性扩增	10

2.2.3 目的片段的胶回收.....	15
2.2.4 宿主菌株 NZ3900 感受态的制备.....	15
2.2.5 重组质粒 pNZ8149-AvBDs 构建.....	16
2.2.6 重组质粒 pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 的构建.....	16
2.2.7 重组质粒 pNZ2103-AvBDs 构建.....	16
2.2.8 重组乳酸菌的构建.....	17
2.2.9 重组乳酸菌的鉴定.....	17
2.2.10 重组乳酸菌的诱导表达.....	18
2.3 结果.....	18
2.3.1 目的基因片段的扩增.....	18
2.3.2 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定.....	21
2.3.3 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定.....	23
2.3.4 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定.....	25
2.3.5 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBDs 目的蛋白的表达鉴定.....	27
2.3.6 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 目的蛋白的表达 鉴定.....	27
2.3.7 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBDs 目的蛋白的表达鉴定.....	28
2.4 表达禽 β -防御素重组乳酸菌菌体裂解混合物的制备.....	28
2.5 讨论.....	29
第三章 重组禽 β -防御素体外免疫调节活性的检测.....	30
3.1 材料.....	30
3.1.1 细胞.....	30
3.1.2 主要试剂及仪器.....	30
3.2 方法.....	30
3.2.1 重组禽 β -防御素激活 J774-Dual™ 报告细胞系免疫信号通路的检测.....	30
3.2.2 重组 β -防御素刺激 PBMCs 产生细胞因子的检测.....	31
3.2.3 重组 β -防御素刺激鸡巨噬细胞(HD11)产生细胞因子的检测.....	32

3.3 结果.....	32
3.3.1 重组禽 β -防御素激活 J774-Dual™报告细胞系免疫信号通路的检测.....	33
3.3.2 重组 β -防御素刺激 PBMCs 产生细胞因子的检测.....	34
3.3.3 重组 β -防御素激活 PBMCs CD80 及 CD86 分子的检测.....	35
3.3.4 重组 β -防御素激活 HD11 IL-10 的检测.....	35
3.3.5 重组 β -防御素激活 HD11 CD80 和 CD86 分子的检测.....	36
3.4 讨论.....	37
第四章 重组 β -防御素作为新城疫活疫苗免疫佐剂的初步研究.....	38
4.1 材料.....	38
4.1.1 毒株、动物及疫苗.....	38
4.1.2 主要试剂与仪器.....	38
4.2 方法.....	38
4.2.1 新城疫活疫苗、重组 β -防御素免疫佐剂制备及注射剂量.....	38
4.2.2 动物实验设计方案.....	38
4.2.3 血凝试验和血凝抑制试验检测血清抗体滴度.....	39
4.2.4 ELISA 检测血清细胞因子的含量.....	39
4.2.5 PBMCs 和外周血白细胞的活性检测.....	40
4.3 结果.....	41
4.3.1 ELISA 检测血清中细胞因子.....	41
4.3.2 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性.....	42
4.3.3 LPS 激活 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性检测.....	44
4.3.4 NDV 攻毒 PBMCs 和外周血白细胞后增殖活性检测.....	45
4.3.5 HA 和 HI 试验检测血清抗体滴度.....	46
4.4 讨论.....	47
第五章 重组 β -防御素作为新城疫油乳剂灭活疫苗免疫佐剂的研究.....	49
5.1 材料.....	49
5.1.1 毒株、动物及疫苗.....	49
5.1.2 主要试剂与仪器.....	49

5.2 方法.....	49
5.2.1 重组 β -防御素免疫佐剂新城疫灭活疫苗的制备及注射剂量.....	49
5.2.2 动物实验设计方案.....	50
5.2.3 血凝试验和血凝抑制试验检测血清抗体滴度.....	50
5.2.4 ELISA 检测血清细胞因子的含量.....	50
5.2.5 PBMCs 和外周血白细胞的增殖活性检测.....	50
5.3 结果.....	51
5.3.1 ELISA 检测血清中细胞因子.....	51
5.3.2 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性.....	51
5.3.3 LPS 激活 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性.....	53
5.3.4 HA 和 HI 试验检测血清抗体滴度.....	54
5.4 讨论.....	55
第六章 全文结论.....	57
参考文献.....	58
致 谢.....	66
作者简历.....	67

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
bp	Base pair	碱基对
CFU	Colony-Forming Units	菌落形成单位
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
ELD50	50% median embryo lethal dose	鸡胚半数致死量
FAO/WHO	Food&Agriculture Organization/World Health Organization	联合国粮农组织/世界卫生组织
kDa/kD	Kilodalton	千道尔顿
LAB	Lactic acid bacteria	乳酸菌
NICE	Nisin-controlled gene expression system	Nisin 调控基因表达系统
OD	Optical density	光密度
pgsA	poly- γ -glutamate synthetase	聚 γ 谷氨酸合成酶
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
SPF	Specific pathogen free	无特定病原体

第一章 绪论

1.1 乳酸菌概述

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 就是指将糖类进行发酵, 主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称, 仅部分乳酸菌属于食品级微生物。乳酸菌在人体的肠道内大量存在, 多属于益生菌种, 对人体的肠道及机体免疫系统有重要的免疫调节等益生作用。益生作用可以体现在以下几个方面: 第一个方面, 能够调节肠道菌群, 杀灭对肠道有坏处的腐败菌, 以及它们所产生的毒素, 清理肠道等; 第二个方面, 很多益生菌能影响机体代谢, 能有效降低人体胆固醇、降低血糖或降低高血压等; 第三个方面, 通过肠道粘膜免疫系统, 调节系统免疫功能, 可以提高人体系统免疫力等。数千年来, LAB 已广泛成功地应用于食品发酵(WANG et al., 2019)。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 在将糖类发酵过程中产物不仅仅只含有乳酸, 还产生一些有机酸, 例如乙酸、丁酸等(BONGERS ET al., 2003; SYBESMA et al., 2003a, 2003b)。益生乳酸菌主要包括四大类, 即双歧杆菌类、芽孢杆菌类、乳酸杆菌类和乳酸球菌类, 除此之外, 还包括一些酵母菌及霉菌类, 在这四类当中研究最多的是乳酸杆菌类和乳酸球菌类。目前, 益生菌的鉴别分类有很多种(庞会利 等, 2008), 但通过引物将 16s rDNA 扩增的生物学方法是乳酸菌鉴定分类方法中最常用的(刘朝军 等, 2011)。

在过去的二十年中, 人类营养领域最有前途的发展是使用益生菌及认识其对人类健康和疾病的作用。产生乳酸的乳酸菌是食品中最常用的益生菌。自从希波克拉底时代以来, 人们就知道乳酸菌在促进人类健康和福祉中的作用。关于在人体中发现的有益菌群, 早有相关性特别说明并有文献记载。益生菌给机体带来诸多福祉, 它们在保护宿主免受有害微生物的侵害中起着重要作用, 还可以增强免疫系统功能(ZIELIŃSKA et al., 2018)。乳酸菌的免疫学功能也得到了广泛的研究, 乳酸菌不仅能够调节机体特异性免疫应答, 还能够激活非特异性免疫应答。

1.2 乳酸菌活载体表达系统

迄今为止, 已经开发了许多细菌表达系统以生产用于各种生物技术的重组蛋白。在原核系统中, 使用大肠杆菌作为细胞工厂可获得最高的蛋白质水平(JANA et al., 2014), 然而, 在大肠杆菌中, 最常用的生产策略是细胞内的 (在周质中, 甚至在细胞质中), 并且涉及昂贵的下游纯化过程, 并且常常存在成本和纯化程度问题, 如必须从蛋白质中去除内毒素或脂多糖, 以施用于人类。另一种具有“一般公认的安全”状态的革兰氏阳性细菌, 乳酸乳球菌, 正在成为异源蛋白质表达的一种有吸引力的替代载体。乳酸乳球菌已被研究了近 20 年, 其代谢相对简单(BOLOTIN et al., 2001), 不会产生内毒素, 多数情况下无需蛋白质的纯化。

乳酸菌作为表达载体具有很多优势: 具有生物安全特性并具有益生作用; 可以粘附黏膜细胞并短暂定居黏膜表面; 可以直接向粘膜免疫系统递呈活性蛋白, 不会导致免疫耐受; 乳酸菌所有菌体成分包括其核酸均具有天然免疫佐剂活性, 可以诱导区域内粘膜免疫应答的同时激活系统免疫应答, 乳酸菌尤其是肠道乳酸菌是机体免疫系统的最大免疫调节使者。乳酸菌菌体较大、表面

积大, 有着触发机体免疫系统的天然优势。

1.2.1 宿主菌的选择

迄今为止, 乳酸乳球菌仍是实验室研究的模型微生物。利用乳酸菌进行治疗和预防的研究早在 21 世纪初迅速取得进展。使用组成型和诱导型启动子开发了许多不同的乳酸菌表达系统, 用于在乳球菌细胞中表达编码异源蛋白基因。乳酸菌最常用表达系统是利用乳链菌肽启动子的 NICE 诱导系统来表达异源蛋白(李良, 2015)。

各种各样克隆系统的发展已使乳酸乳球菌作为宿主菌株的许多特性得以改善, 而这些特性对于大量工业乳制品和其他食品发酵来说是必不可少的。这些经过基因改良的乳球菌及其产品在食品工业中具有巨大的潜力。但是, 所使用的生产菌株应不含可能损害其在食品中应用的任何抗生素抗性标记。因此, 宿主菌的载体系统应包含食品工业可接受的选择标记, 因此将其称为食品等级选择标记(PLATTEEUW et al., 1996a)。

乳酸乳球菌系列衍生菌株(包括乳酸乳球菌 NZ3900 菌株)作为益生菌在商业上广泛使用, 乳酸乳球菌 NZ3900 菌株是乳酸乳球菌 MG1363 模型益生菌菌株的衍生菌株(Van et al., 2018), 乳酸乳球菌是在许多乳业中使用的工业上重要的微生物发酵菌株(作为同型发酵细菌)。其被广泛研究的功能特性包括细胞外和细胞内蛋白水解系统, 碳代谢, 抗生物物质的产生以及它们与噬菌体的相互作用和耐药性等。丰富的知识和经验导致了乳球菌在生物技术的多个领域中的广泛应用。乳酸乳球菌表达细菌和病毒抗原以通过粘膜免疫进行安全疫苗接种, 易于操作且受到严格控制的基因表达系统(NICE®)的可用性对于开发许多此类应用至关重要(CHAUDHRY et al., 2005)。

1.2.2 乳酸菌表达方式的选择

1.2.2.1 Nisin 诱导表达系统

Nisin(乳酸链球菌肽)是一种完全食品安全级的具有天然生物活性的抗菌肽。它是从乳酸链球菌发酵产物中提取的一种安全有效的多肽活性物质, 它不仅能够抑制多种革兰氏阳性腐败菌, 还能抑制许多致病阴性菌的生长, 并且对抑制某些耐热的孢子形成细菌(例如嗜热脂肪芽孢杆菌, 蜡状芽孢杆菌和肉毒梭菌)特别有效。Nisin 在食品中可降低热处理温度和时间, 最大程度减少营养损失, 并改善食品质量、安全性和保质期。由于使用添加量低而具有成本效益, 食用后被肠道中的蛋白酶水解为氨基酸, 对天然肠道菌群(包括益生菌)没有影响。

乳酸乳球菌 NZ3900(lacF-, pepN: nisR nisK)是标准的食品级 LAB 菌株, 根据其在乳糖上的生长能力进行选择。pNZ8149 是包含 lacF 的广泛宿主载体质粒, 可用于生长的乳糖选择, 携带 nisA 启动子, 然后是 1 个 NcoI 位点, 用于 ATG 的翻译融合。乳酸乳球菌 NZ3900 和 pNZ8149 载体共同构成了由 NIZO Food Research 开发的严格控制的乳链菌肽调节基因表达系统(NICE®)(HENRICH et al., 2002; PLATTEEUW et al., 1996b)。该系统易于操作, 有利于过表达同源和异源基因, 并获得大量特定基因产物(JEE et al., 2017; LIU et al., 2018)。

1.2.2.2 组成型表达系统

乳酸菌表达载体 pNZ2103 携带了可控制的强 Lac 启动子（来源 *Lactococcus* 的乳糖操纵子），为氯霉素抗性(林琳 等, 2006)。pNZ2103 质粒为乳酸菌组成型表达载体，乳酸菌广宿主范围、穿梭型表达质粒，蛋白表达不需要 Nisin 诱导，该表达系统操作简易，安全可靠，属于食品级表达系统。

1.2.2.3 优化的 Nisin 诱导表达系统

Nisin 诱导表达系统(NICE)已经广泛应用并商业化，是目前革兰氏阳性菌最常用的表达系统(KLEEREBEZEM et al., 1997)，乳酸乳球菌 NZ3900 (lacF⁻, pepN: nisR nisK) 是标准的食品级 LAB 菌株，含有 nisR 和 nisK 基因，但诱导蛋白的表达量仍有待提高。因此，为开发高效、可控的表达系统，本研究将 pNZ8149 载体插入 nisR 和 nisK 基因，有望提高表达效果。

1.2.3 乳酸菌表达系统的优势及展望

乳酸菌不仅具有益生功能还具有天然佐剂活性，乳酸菌重组蛋白制备过程简单，生产成本也低廉，被广泛用于各种病原抗原的传递和表达载体的研究。近年的研究表明，乳酸菌尤其是肠道乳酸菌是机体免疫系统的最大免疫调节使者，益生乳酸菌菌体较大，表面积大，不存在内毒素，可以粘附黏膜细胞并短暂定居黏膜表面，对黏膜免疫系统和全身系统免疫具有重要的免疫调节作用。乳酸菌可以通过黏膜免疫发挥作用，它能同时激发机体的多种免疫应答（体液免疫、黏膜免疫和细胞免疫反应）(曹海鹏 等, 2014)，所以乳酸菌活载体疫苗的研究是目前黏膜疫苗研究的一大热点。此外，乳酸菌一些成分如细胞壁和核酸等，本身就具有一定的免疫佐剂活性，重组乳酸菌可以作为活载体，用于表达和递送治疗性和预防性外源药物，是治疗和预防疫病及激活免疫应答的理想制剂(BANDAY et al., 2015)。

1.3 免疫佐剂及免疫增强剂

1.3.1 免疫增强剂的定义及分类

免疫增强剂是单独给予机体就能够增强机体免疫力的一种免疫治疗性药物。有人将非特异性免疫称为免疫佐剂(林飞卿, 1980)。免疫增强剂单独使用能够增强机体的抗肿瘤作用，抗感染能力，修复免疫缺陷，免疫增强剂还能激活免疫细胞，增强机体特异性和非特异性免疫应答，减少发病的次数。有人认为免疫增强剂可以调节免疫力的过高或者过低，使免疫力保持合理的平衡状态。免疫增强剂可以和疫苗同时使用，从而增强疫苗的抗原反应能力，提高免疫应答和抗体滴度等，此时就是“免疫佐剂”。

根据免疫增强剂或佐剂的来源不同，免疫增强剂或佐剂可分为以下四类：微生物来源的免疫增强剂或佐剂，包括如卡介苗、辅酶 Q10、真菌多糖类等；人或动物免疫系统天然调节产物来源的免疫增强剂或佐剂，如干扰素、白介素等、人免疫球蛋白、防御素等；化学合成来源的免疫增强剂或佐剂，如左旋咪唑、人工合成纳米颗粒、脂质颗粒、金颗粒等；中药及天然植物提取类免疫增强剂或佐剂，如黄芪制剂、人参皂苷等。其中微生物来源、天然调节产物来源和中药及天然

植物提取类的免疫增强剂或佐剂，已广泛应用于临床。化学合成来源的免疫增强剂或佐剂因生物安全特性需要长期验证，故在临床应用方面受到了限制。

1.3.2 免疫增强剂的作用机制

免疫增强剂作用于机体的研究较为复杂，免疫系统是由不同免疫细胞构成，并通过各种不同反应途径发挥作用，其中有些环节至今为止仍不清楚。有的免疫增强剂可通过激活免疫活性细胞，提高机体的特异性免疫和非特异性应答；有的免疫增强剂具有强大的免疫调节功能，既能提高免疫应答，又能调节免疫反应维持在合理的水平，下调过度的炎症反应，维持机体免疫稳态。免疫增强剂，主要用于增强机体的抗肿瘤作用、抗感染能力，纠正免疫抑制或免疫麻痹及免疫缺陷，此类药物能激活 1 种或者多种免疫活性细胞，参与激活免疫反应的细胞主要有淋巴细胞、单核巨噬细胞以粒细胞等。

1.3.3 免疫佐剂的定义及分类

免疫佐剂就是和疫苗同时使用，能够特异性或非特异性增强疫苗的反应和机体的免疫应答能力，起到增强免疫应答和抗体滴度等的作用，此类物质就是“免疫佐剂”。具有宿主免疫激活潜力的微生物模式分子大多可作为免疫佐剂。在宿主来源的多种传染性微生物和内源性物质中发现了免疫佐剂活性。由与矿物油结合的死分枝杆菌组成的弗氏完全佐剂（FCA）可增强疫苗反应，即抗体（Ab）产生，CTL 诱导和 NK 激活(FREUND,1956; LALLOUETTE et al.,1968)。如果没有免疫佐剂，通常在接种疫苗后只能观察到较差的免疫反应。因此，免疫佐剂一直是引起强烈的宿主免疫应答的重要因素，是疫苗产业重要的辅助因素。

目前应用的免疫佐剂包括多种成分，包括矿物油，细菌提取物，病毒和氢氧化铝金属的悬浮液等。有的免疫佐剂是参照微生物来源化学合成的成分，这些成分也是有效的免疫佐剂(MBOW et al., 2005)。但是，尚未将这些佐剂用于免疫疗法，这是因为佐剂增强的免疫反应可能加剧亚临床自身免疫性疾病。目前免疫佐剂主要包括生物性佐剂、无机佐剂、人工合成佐剂、油剂、弗氏佐剂等五大类。

1.3.4 免疫佐剂的作用机制

传染病，尤其是由病毒引起的传染病，通常会给畜牧业造成严重的经济损失。疫苗接种是控制由传染源引起的疾病的最成功的干预策略之一。在疫苗制剂中，为了提高疫苗接种的保护效力，通常会添加免疫佐剂。迄今为止，科学文献中已经描述了 100 多种免疫佐剂(ZHAI et al.,2011)。免疫佐剂增强机体免疫应答的机制各有不同，有的是通过改变抗原的物理形状来延长抗原在机体内保留时间；有的免疫佐剂激活单核吞噬细胞对抗原的递呈能力；有的免疫佐剂激活淋巴细胞分化，增加扩大免疫应答能力。髓样树突状细胞（mDCs），抗原呈递细胞的代表性细胞群和浆细胞样树突状细胞（pDCs）（以前称为产生 I 型干扰素（IFN）的细胞）是大多数佐剂的靶标。在这种情况下，Janeway 和 Medzhitov(MEDZHITOV et al.,1997)提出树突细胞（DC）表达两种受体，即 MHC 呈递抗原的抗原（Ag）摄取受体和作为佐剂的微生物模式分子的受体。Ags 和佐剂型分子

均来自微生物,并差异地作用于 mDC,可以有效诱导继发淋巴细胞的活化。

1.3.5 免疫佐剂及免疫增强剂的研究现状及展望

免疫佐剂和免疫增强剂都是通过调节机体免疫应答,从而提高机体免疫力。(王宏江,谷新利,2009)。免疫佐剂就是和疫苗同时使用,能够特异性或非特异性增强疫苗的反应和机体的免疫应答能力,起到增强免疫应答和抗体滴度等的作用。免疫增强剂是单独给予机体就能够增强机体免疫力的 1 种免疫治疗性药物。现代疫苗中常见的佐剂包括活性免疫刺激剂,载体和媒介物佐剂,其特征是化合物的种类不同,例如明矾盐和其他矿物质佐剂,张力活性剂,细菌衍生物,媒介物和细胞因子。但是迄今为止,这些佐剂中的大多数都有 1 个或多个缺点,例如诱发生理疾病,过敏反应,超敏反应甚至毒性。生物安全和绿色食品安全对未来的生物制剂,尤其是预防性生物制剂(包括免疫佐剂或免疫增强剂等)提出了更高的要求(BANDAY et al.,2015)。佐剂是有效疫苗的重要组成部分,可通过增强抗原特异性免疫反应来提高功效。然而,由于设计安全、有效和经济可行的佐剂的复杂程度和困难很多,成功的佐剂设计很不容易。表达的天然佐剂大多位于培养液的提取液或裂解液中,含有培养基质成分和病原体非免疫原成分,易产生不良反应,但含有“内佐剂效应”,往往免疫效果却较好。纯化疫苗采用离心、层析等技术进行纯化,减少细胞基质以及病原体非有效成分的含量,但同时去除了“内佐剂效应”,必须需要佐剂来增强其免疫反应。佐剂研究工程巨大,往往需要 10 年以上时间和数亿美元,而且具有极大风险,成功率很低。疫苗佐剂作为疫苗的主要成分之一,佐剂需要满足更高的安全性和有效性的需求,由于在某种程度上的通用性,一旦批准用于某种疫苗,将有可能用于更多的疫苗,因此具有更高的安全性和有效性的天然免疫佐剂和免疫增强剂是满足未来绿色食品安全的基本要求。因此研制出一种天然的、新型高效安全的免疫佐剂或免疫增强剂是一个亟待解决的问题。

1.4 禽 β -防御素概述

1.4.1 禽 β -防御素的定义及分类

防御素是一种阳离子小肽,它们对致病微生物具有广谱抗感染活性。在多种无脊椎动物和脊椎动物中产生的这些防御素小肽,代表着宿主对微生物防御的古老形式。除其抗菌功能外,防御素还表现出多种免疫调节活性,使其成为先天和适应性免疫系统的重要组成部分(VAN DIJK A et al., 2011b; SEMPLE et al., 2012; CUPERUS et al.,2013)。

在脊椎动物中鉴定出的 3 个防御素亚家族(α , β 和 θ)中,仅在鸟类中发现了 β -防御素(XIAO et al.,2004; HELLGREN et al.,2010a)。禽 β 防御素(AvBDs)先前已在鸡(*Gallus gallus*),斑马雀(*Taeniopygia guttata*),野鸭(*Anas platyrhynchos*)和朱鹮(*Nipponia nippon*)中描述,基因簇中含有 14、22、18 和 14 个紧密相连的 β 防御素基因分别在每个基因组中发现(HUANG et al.,2013)。AvBD 基因通常由 3~4 个外显子组成(XIAO et al.,2004),在保守区内包含 3 个二硫键(Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 和 Cys3-Cys6) 6 个半胱氨酸框架。已有研究显示 AvBD 在许多具有不同表达水平的组织中表达(ZHANG ET AL.,2014),并在先天性宿主防御病毒、革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌以及

消化系统中的寄生虫中发挥作用(Milona et al., 2007; DERACHE et al., 2009; CRHANOVA et al., 2011; HONG et al., 2012), 且在生殖系统(YOSHIMURA et al.,2006; HERVÉ-GRÉPINET et al.,2010; DAS et al.,2011; MICHAELIDIS et al.,2012)发挥作用。研究证据还表明, 它们在各种免疫过程(例如趋化性, 伤口愈合以及诱导或抑制炎症反应)中可能具有与哺乳动物 β -防御素相似的调节功能; 在雀形目鸟类中已观察到 AvBD 的种内遗传多样性和种间多态性(HELLGREN et al.,2011b)。

1.4.2 禽 β -防御素的免疫学功能

β -防御素具有强大的免疫佐剂和免疫增强剂的潜力, 可以显著提高疫苗的免疫效力(REHAUME et al., 2008)。研究表明 β -防御素具有很多免疫调节功能, β -防御素不仅能直接杀灭细菌、病毒, 中和内毒素等, 调节巨噬细胞的免疫应答, 还能促进单核细胞的趋化性, 使其迅速到达感染部位, 还可直接促进血管生成, 增强中性粒细胞的吞噬活性, 刺激外周血单核细胞的趋化性、促进肥大细胞释放组胺, 增加细胞通透性, 促进产生更多防御素等抗微生物多肽。 β -防御素还能启动特异性的巨噬细胞反应, 招募 T 细胞, 调控特异性免疫反应, 促进成纤维细胞的生长和粘连、促进伤口愈合, 抑制 LPS 等引起的吞噬反应, 避免过量的炎症反应等。

β -防御素可由吞噬细胞和淋巴细胞等细胞产生, 可启动、动员并增强适应性免疫宿主防御, 防御素除可显著增强巨噬细胞活性和诱导促炎性细胞因子产生外, 还可同时诱导免疫调节性细胞因子的产生, 维持机体免疫稳态(WYSZYŃSKA et al., 2015)。

1.4.3 禽 β -防御素作为免疫佐剂或免疫增强剂的研究进展及展望

多项研究已证明禽类 β -防御素在鸡中的抗菌特性。希格斯等报道, AvBD13 可以杀死浓度为 500 μ g/mL 的鼠伤寒沙门氏菌和单核李斯特菌(HIGGS et al.,2005)。通过体外试验证明, 禽 β -防御素 AvBD6, AvBD4 和 AvBD5 具有针对沙门氏菌的杀菌活性(MILONA et al.,2007)。在另一项研究中, 显示了 AvBD6 在 6 周龄肉鸡的盲肠扁桃体中的表达及其对肠道病原体的抗菌活性(VAN DIJK A et al.,2007a)。最近的研究表明禽 β -防御素可以调节免疫反应。

在增强免疫功能方面, β -防御素显示出强大的免疫佐剂潜力,可以显著提高疫苗的免疫效力。许多研究表明, 利用大肠杆菌表达系统能够表达重组禽类的 β -防御素(KOHLGRAF et al.,2010), 且可作为免疫佐剂, 但大肠杆菌表达的重组 β -防御素大多是以包涵体形式存在 (WYSZYŃSKA et al.,2015), 且获得的重组 β -防御素残留有种类繁多的内毒素, 作为免疫佐剂存在较大的安全隐患。因此, 如何开发出一种无内毒素、食品安全级、高效、简便和低成本的生产方式是一个亟待解决的问题, 乳酸菌活载体表达 β -防御素有望解决这一难题。

1.4.4 新城疫灭活疫苗及其免疫佐剂

新城疫是由副粘病毒科的一种 RNA 病毒, 即新城疫病毒(NDV, 也称为禽副粘病毒-1)引起的(ALEXANDER, 2000), 新城疫(ND)是家禽和其他鸟类的急性病毒性疾病, 主要表现为呼吸道疾病, 在许多国家中呈地方性流行, 是一个世界性的难题。控制新城疫的唯一方法是预防接种和生物安全措施, 具有各种免疫方案的活疫苗和灭活疫苗可用于控制该疾病, 但没有一种方法

能够完全成功地预防该疾病。尽管活疫苗通常很便宜、容易给药并可获得较持久免疫力，却不能产生高滴度的抗体水平，并且存在毒力返祖等生物安全隐患；而灭活疫苗虽然安全可靠，无安全隐患，但也不能产生高滴度抗体和持久的免疫力。这些问题必须通过使用免疫佐剂来克服。

新城疫灭活疫苗是普遍使用的油乳剂灭活苗，各种日龄的鸡均可免疫，有效地刺激机体产生免疫应答，产生高 HI 抗体效价。矿物油包水 (W/O) 乳剂佐剂被广泛用于新城疫灭活疫苗制剂，可诱导家禽的长期疫苗应答。但是，应该注意的是，所使用的油相和水相的表面活性剂的质量（包括硬脂酸铝、Tween-80 及 Span-80 等）以及油的品质（必须是化妆品级以上），仍然存在安全问题 (AROUS et al., 2013)。研究表明 W/O 佐剂主要用于增加体液免疫反应，而新的佐剂的加入还可以加强细胞免疫应答，从而获得全面免疫应答，可以提高新城疫疫苗的免疫效力。例如，新型佐剂的加入可以有望帮助扩展针对不同病毒株或血清型的疫苗交叉保护等。

1.4.5 新城疫活疫苗及其免疫佐剂

活疫苗又称弱毒疫苗，相比于灭活疫苗，通常弱毒疫苗可以刺激更全面的免疫应答，因为弱毒疫苗模拟自然感染途径接种动物。但是，一些动物在接种弱毒疫苗很有可能会出现轻微症状或感染，通常不会严重。由于活疫苗的免疫效力更全面，既有体液免疫应答，又有细胞免疫应答，价格低，使用量少，因此它是市场上最常用的疫苗。新城疫弱毒主要分为 I 系、II 系、III 系、IV 系。II 系、III 系、IV 系常用于雏鸡的首免，这与它的毒力较弱息息相关。I 系毒力相对较强，由于雏鸡抵抗弱，因此不适用于雏鸡，而多用于青年以上鸡的加强免疫。

由于活疫苗中含有活病毒，因此会产生更多种类的抗体。活病毒感染了靶细胞，并通过内源蛋白水解途径加工病毒蛋白，这将导致抗原与 MHC I 类分子一起呈递至靶细胞并刺激 CD8 + T 细胞，产生细胞免疫应答。但外源性抗原较少，虽然会产生更多种类的抗体，但不能诱导高水平抗体的产生。尽管活疫苗通常很便宜、容易给药并可获得较持久免疫力，会产生更多种类的抗体，所以，佐剂的加入，将导致疫苗抗原呈递细胞（如巨噬细胞和树突状细胞）的激活，并且改变抗原呈递细胞对其进行加工的方式和强度，外源性加工过的抗原肽将与抗原呈递细胞上的 II 类 MHC 分子结合出现，并会刺激 CD4 + T 细胞充当 B 细胞的辅助细胞，有利于提高抗体应答水平。并且活疫苗免疫佐剂的应用，有可能减少活疫苗的接种反应。

1.5 目的与意义

本研究的目的是采用食品级乳酸乳球菌 NZ3900 宿主菌株结合食品级 Nisin 诱导表达系统、优化的诱导表达系统及组成型表达系统构建完全食品级表达禽 β -防御素的重组乳酸菌，进行重组 β -防御素作为活疫苗或灭活疫苗天然免疫佐剂或增强剂的研究。在食品安全和生物安全形势十分严峻的今天，乳酸菌以其绝对的食品安全和生物安全特性，使其成为表达天然免疫佐剂或天然免疫增强剂等活性肽的首选载体，天然免疫佐剂或天然免疫增强剂是未来提高黏膜免疫和疫苗免疫效力的必然发展趋势，因此，构建与乳酸菌安全和益生功能相适应的免疫调节天然活性肽（ β -防御素）的重组乳酸菌具有重要意义。

第二章 表达禽 β -防御素的重组乳酸菌的构建

禽 β -防御素(AvBDs)是主要存在于天然黏膜系统的天然抗菌肽之一,主要发挥抗感染、广谱抗菌和广泛的免疫调节作用,特别是禽 β -防御素是一种小的阳离子非糖基化的多肽,非常适合于原核表达。因此,本研究利用3种表达质粒和食品级宿主菌株构建了3套表达重组禽 β -防御素的重组乳酸菌。采用的3种表达系统和食品级乳酸乳球菌NZ3900菌株作为宿主菌株,分别构建了表达禽 β -防御素1(AvBD1)、禽 β -防御素2(AvBD2)、禽 β -防御素6(AvBD6)、禽 β -防御素13(AvBD13)和融合禽 β -防御素1/2/6/13功能片段组成的融合禽 β -防御素AvBD12613共11株重组乳酸菌,其中5株重组乳酸菌的表达量稳定,蛋白大小正确,是本研究用于体外筛选和体内动物试验验证的重组乳酸菌。

2.1 材料

2.1.1 质粒和菌株

pNZ8149 表达质粒(德国拜力生物科技有限公司); pNZ2103 表达质粒(购自 Biovector Co., LTD); p8149-NisRK 表达质粒由实验室保存; 乳酸乳球菌 NZ3900 感受态由实验室制备保存。

2.1.2 主要试剂和仪器

L-Elliker 液态培养基; L-Elliker 固态培养基(含 10%琼脂糖); M17 肉汤; GM17 培养基: 在 M17 肉汤的基础上含 0.5%葡萄糖; GSGM17 培养基: GM17 培养基中加入的 2.5%的蔗糖和 0.5 mol/L 的甘氨酸溶液; EPB: 0.5 mol/L 蔗糖和 10%甘油; EPBT: EPB 中加入 0.05 mol/L 的 EDTA; 电转复苏液; 胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司; One Step Cloning Kit 购自 Vazyme 公司; PrimerStar Max、SYBR Green Realtime PCR Master Mix、Premix Ex Taq (Probe qPCR)试剂盒为东洋纺生物科技股份有限公司产品; Ex Taq 酶、RNAiso Plus 为 TAKARA 公司产品; HA 鼠源单抗购自北京博奥龙公司。

恒温培养箱为 Thermo Scientific 公司产品; 超净工作台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品; PCR 仪购自美国 Bio-Rad; 水平离心机为 Eppendorf 公司产品; 超声细胞破碎仪(S-250D); 凝胶电泳仪为北京六一仪器厂产品; 凝胶成像系统为赛默飞公司产品。

2.2 方法

2.2.1 引物设计及合成

根据 GenBank 禽 β -防御素1(AvBD1)、禽 β -防御素2(AvBD2)、禽 β -防御素6(AvBD6)、禽 β -防御素13(AvBD13)的参考序列,去掉分泌信号肽,将以上四者序列合成为新的基因序列 AvBD12613,由 Genescript 公司根据乳酸菌密码子偏嗜性将以上五者进行了基因优化并合成。应用 Oligo7 软件设计引物,扩增优化后的 AvBDs 基因片段。根据新合成的基因序列 AvBDs 及质粒

pNZ8149 的全基因序列, 应用 DNASTAR 软件设计带有同源臂的引物 (表 2-1), PCR 扩增载体线性化片段; 根据新合成的基因序列 AvBDs, 质粒 pNZ8149-NisRK 的全基因序列, Cm 基因序列, 应用 Oligo7 软件设计带有同源臂的引物 (表 2-2), PCR 扩增相应的线性化片段; 根据新合成的基因序列 AvBDs, 质粒 pNZ2103 的全基因序列, 应用 DNASTAR 软件设计带有同源臂的引物 (表 2-3), PCR 扩增相应的线性化片段。

表 2-1 Nisin 诱导表达系统构建引物

Table 2-1 Nisin Inducible Expression System to Construct Primers

引物	序列(5'-3')
AvBD1-F	ATGGGTACTGCAGGCATGCTTGGTCGTAAATCAGATTGTTTCGTA AATCT
AvBD1-R	CTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTACCCGAAAATTTTCTTGCAACAAAAGAAAAATCTTGAGCATT TCCAGAAATAATAAAT
AvBD2-F	ATGGGTACTGCAGGCATGCTTTTTTTATGTCGTAAAGGATCATGTCA TT
AvBD2-R	CTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTAAACATCCCAAGGAAGTTTACAACATGAAC
AvBD6-F	ATGGGTACTGCAGGCATGCTTTCACCAATTCATGCTTGTCGTTATC
AvBD6-R	CTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTATGCCCATCTATTACGAACACAACATGATTTTAAACCTGAA
AvBD13-F	ATGGGTACTGCAGGCATGCTTTTTTCAGATTCTCAATTATGTCGTAA TAATCATG
AvBD13-R	CTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTAAGTACCTCCAAGTGATGGAGAAGGGTCCTGTTCTGCTGTATG TAAACTGAATG
AvBD12613-F	ATGGGTACTGCAGGCATGCTTGGAGGTGGAGGTTTCAGGTCGTAAAT CAGATTGTTTTTCGTAAA
AvBD12613-R	CTCTCTAGAACTAGTGGTACCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTAAGTTCACCAAGTGAAGGAGATGGATCTTGTTTCAGCTGTATG AAG
8149-F	GGTACCACTAGTTCTAGAGAG
8149-R	AAGCATGCCTGCAGTACCCAT

表 2-2 优化 Nisin 诱导表达系统构建引物

Table 2-2 Optimize Nisin Inducible Expression System to Construct Primers

引物	序列(5'-3')
LAC8-F	TTAATGCATAAACTCATTGAACTTATTGAG
LAC8-R	AACAATATCCTCCGTTTTATGTTTTACT
CM-F	AAAGTCGACATGGACTGATAAAGTATAGTAAAAACATAAAACGGA GGATATTGTTATGAACTTTAATAAAATTGATTAGA
CM-R	TGATCCGTCGTTTCCCTTTCTCAATAAGTTCAATGAGTTTATGCATT AATTATAAAAGCCAGTCATTAGGCCTAT
8149RK-F	GGTACCACTAGTTCTAGAGAGCTC
8149RK-R	CATGCCTGCAGTACCCATGGT
T-Rec-F	ACCATGGGTACTGCAGGCATG
T-Rec-R	GAGCTCTCTAGAACTAGTGGTACC

表 2-3 持续诱导表达系统构建引物

Table 2-3 Continuous induction of expression system construction primers

引物	序列(5'-3')
AvBD1-F	TTTAGGAGGTAGTCCAAATGGGTCGTAAATCAGATTGTTTT
AvBD1-R	TCTGCACCAACAACAATAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTA
AvBD2-F	TTTAGGAGGTAGTCCAAATGTTTTTATGTCGTAAAGGATCA
AvBD2-R	TCTGCACCAACAACAATAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTA
AvBD6-F	TTTAGGAGGTAGTCCAAATGTCACCAATTCATGCTTGTCGT
AvBD6-R	TCTGCACCAACAACAATAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTA
AvBD13-F	TTTAGGAGGTAGTCCAAATGTTTTCAGATTCTCAATTATGT
AvBD13-R	TCTGCACCAACAACAATAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTA
AvBD12613-F	TTTAGGAGGTAGTCCAAATGGGAGGTGGAGGTTTCAGGTCGT
AvBD12613-R	TCTGCACCAACAACAATAGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATG GGTA

2.2.2 目的片段的线性扩增

根据表 2-1 的引物分别以 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 和 pNZ8149 为模板扩增出带有同源臂的 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 和 pNZ8149 载体基因片段序列,

用于 Nisin 诱导表达系统。用 PrimeStar Max PCR-DNA 聚合酶进行基因的 PCR 扩增, AvBD1 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-4, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; AvBD2 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-5, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 35 s, 35 个循环; AvBD6 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-6, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 72℃ 10 min; AvBD13 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-7, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; AvBD1 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-8, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; pNZ8149 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-9, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 2 min 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

表 2-4 扩增 AvBD1 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-4 PCR system amplification of AvBD1

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD1-F	1
AvBD1-R	1
pUC57-AvBD1	1
ddH ₂ O	22

表 2-5 扩增 AvBD2 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-5 PCR system amplification of AvBD2

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD2-F	1
AvBD2-R	1
pUC57-AvBD2	1
ddH ₂ O	22

表 2-6 扩增 AvBD6 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-6 PCR system amplification of AvBD6

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD6-F	1
AvBD6-R	1
pUC57-AvBD6	1
ddH ₂ O	22

表 2-7 扩增 AvBD13 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-7 PCR system amplification of ABD13

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD13-F	1
AvBD13-R	1
pUC57-AvBD13	1
ddH ₂ O	22

表 2-8 扩增 AvBD12613 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-8 PCR system amplification of AvBD12613

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD12613-F	1
AvBD12613-R	1
pUC57-AvBD12613	1
ddH ₂ O	22

表 2-9 扩增 pNZ8149 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-9 PCR system amplification of pNZ8149

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
8149-F	1
8149-R	1
pNZ8149	1
ddH ₂ O	22

根据表 2-2 的引物分别以 P8149-nisRK, PPG612, AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 和 AvBD12613 为模板扩增出带有同源臂的 Cm, AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 片段和不含 LAC 基因的 pNZ8149- nisRK 载体片段序列, 用于优化的 Nisin 诱导表达系统。用 PrimeStar Max DNA 聚合酶进行基因的扩增, 扩增 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 及 AvBD12613 基因片段的 PCR 反应体系的 PCR 反应体系见表 2-10, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、52℃ 30 s、72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增不含 LAC 基因的 pNZ8149- nisRK 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-11, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 CM 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-12, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 pNZ8149- nisRK-CM 基因片段的 PCR

反应体系见表 2-13，反应程序为：95℃ 5 min；95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 30 s，35 个循环；72℃ 10 min。用 1 %琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

表 2-10 扩增 AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-10 PCR reaction system for amplifying AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 and AvBD12613 gene fragments

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
T-Rec-F	1
T-Rec-R	1
P8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613	1
ddH ₂ O	22

表 2-11 扩增不含 LAC 基因的 pNZ8149- nisRK 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-11 PCR reaction system for amplifying pNZ8149-nisRK gene fragment without LAC

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
LAC8-F	1
LAC-R	1
pNZ8149- nisRK	1
ddH ₂ O	22

表 2-12 扩增 CM 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-12 PCR reaction system for amplifying CM gene fragments

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
CM-F	1
CM-R	1
PPG612	1
ddH ₂ O	22

表 2-13 扩增 pNZ8149- nisRK-CM 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-13 PCR reaction system for amplifying pNZ8149- nisRK-CM gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
8149-F	1
8149-R	1
pNZ8149- nisRK-CM	1
ddH ₂ O	22

根据表 2-3 的引物分别以 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 和 AvBD12613 为模板扩增出带有同源臂的 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 基因片段序列, 用于持续表达系统。用 PrimeStar Max DNA 聚合酶进行基因的扩增, 扩增 AvBD1 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-14, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 AvBD2 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-15, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 35 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 AvBD6 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-16, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 AvBD13 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-17, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 10 min; 扩增 AvBD12613 基因片段的 PCR 反应体系见表 2-18, 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

表 2-14 扩增 AvBD1 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-14 PCR reaction system for amplifying AvBD1 gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD1-F	1
AvBD1-R	1
pUC57-AvBD1	1
ddH ₂ O	22

表 2-15 扩增 AvBD2 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-15 PCR reaction system for amplifying AvBD2 gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD2-F	1
AvBD2-R	1
pUC57-AvBD2	1
ddH ₂ O	22

表 2-16 扩增 AvBD6 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-16 PCR reaction system for amplifying AvBD6 gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD6-F	1
AvBD6-R	1
pUC57-AvBD6	1
ddH ₂ O	22

表 2-17 扩增 AvBD13 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-17 PCR reaction system for amplifying AvBD13 gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD13-F	1
AvBD13-R	1
pUC57-AvBD13	1
ddH ₂ O	22

表 2-18 扩增 AvBD12613 基因片段的 PCR 反应体系

Table 2-18 PCR reaction system for amplifying AvBD12613 gene fragment

反应组分	反应体系 (μL)
PrimerStar Max	25
AvBD12613-F	1
AvBD12613-R	1
pUC57-AvBD12613	1
ddH ₂ O	22

通过 DNAMAN 软件对该重组质粒 p2103 基因序列进行酶切位点分析, 选取 *Hind*III 酶切位点。以提取的 pNZ2103 质粒为模板, 用内切酶 *Hind*III 对质粒进行酶切, 详细酶切体系如下见表 2-19。

表 2-19 载体 pNZ2103 酶切反应体系

Table 2-19 Single enzyme digestion reaction system of pNZ2103

反应组分	体积
pNZ2103	10 μL
10 xbuffer	2 μL
ddH ₂ O	7 μL
<i>Hind</i> III	1 μL
合计	20 μL

目的片段经 PCR 扩增或酶切后, 用 1%琼脂糖凝胶进行电泳实验, 凝胶成像系统扫描观察, 大小正确的 PCR 产物送至吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

2. 2. 3 目的片段的胶回收

将 PCR 扩增后的目的片段用 1%琼脂糖凝胶进行电泳后, 将与预期大小一致的片段切割下, 按照胶回收试剂盒使用说明, 将目的片段纯化回收, 回收后的各目的片段的浓度使用分光光度计测量, -20℃冻存备用。

2. 2. 4 宿主菌株 NZ3900 感受态的制备

将宿主菌株 NZ3900 从-80℃冰箱中取出,于 L-Elliker 固态培养基中划线纯化后,挑取单克隆于 L-Elliker 液态培养基中培养至对数期,取 100 μ L 培养菌液接种至 GSGM17 培养基中培养 24 h。第 2 天,将培养好的菌液接种至 50mL GSGM17 培养基中培养 24 h。第 2 天,将培养好的菌液接种至 500 mL GSGM17 培养基中培养 24 h。将培养好的菌液分装于 50 mL 离心管中,于 4℃的温度下,4000 g 水平转子离心 10 min 后,用 EPB 洗涤两次后。将洗涤好的菌液用 EPB+EDTA 重悬,并于冰上静置 20 min,3000 g 水平转子离心 20 min 后,用 EPB 将菌液重悬,保存于-80℃冰箱备用。(注:以上所有操作均于冰上操作)

2.2.5 重组质粒 pNZ8149-AvBDs 构建

按照 One Step Cloning Kit 的说明书要求进行,将 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 和 pNZ8149 的线性化片段进行同源重组,构建重组质粒 pNZ8149- AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613,具体同源重组反应体系如下:

表 2-20 同源重组的反应体系

反应组分	体积
pNZ8149 线性化片段	50 ng
AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 基因片段	60 ng
5 $\times$ CE Multi S Buffer	4 μ L
ddH ₂ O	补齐至 20 μ L
酶	2 μ L
总计	20 μ L

按照表 2-20 将表中各成分按照体积由大到小的顺序加入酶切管中,最后加入同源重组酶,于 37℃水浴 30 min,4℃终止反应,-20℃冰箱保存备用。

2.2.6 重组质粒 pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 的构建

按照克隆重组试剂盒的说明书要求进行,将 Cm 片段和不含 LAC 基因的 pNZ8149-NisRK 线性化片段进行同源重组,先构建重组质粒 pNZ8149-NisRK-CM,具体体系及操作步骤参考 2.2.5 进行。

同样按照克隆试剂盒的说明书要求将 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 与载体 pNZ8149-NisRK-Cm 线性化片段进行同源重组,构建重组质粒 pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 等 5 个重组质粒,具体体系及操作步骤参考 2.2.5 进行。

2.2.7 重组质粒 pNZ2103-AvBDs 构建

按照克隆试剂盒的说明书要求进行,将 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 与载体 pNZ2103 线性化片段进行同源重组,构建重组质粒 pNZ2103-AvBDs 等 5 个重组质粒,具体

体系及操作步骤参考 2.2.5 进行。

2.2.8 重组乳酸菌的构建

采用电转化法将重组质粒 pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613、和重组质粒 pNZ8149-NisRK-Cm-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 及重组质粒 pNZ2103-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 导入已制备好的乳酸乳球菌 NZ3900 感受态中,得到了 3 套重组乳酸菌(11 株),分别是 r-*L. Lactis*-pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 5 株重组乳酸菌;r-*L. Lactis*-pNZ8149-NisRK -Cm- AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 5 株重组乳酸菌;r-*L. Lactis*-pNZ2103- AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 5 株重组乳酸菌。具体操作步骤:将制备好的宿主菌株 NZ3900 感受态细胞,于-80℃冰箱中取出,于冰水浴上融化,将 2.2.6 中同源重组后的产物取 6 μL 用移液枪打入 100 μL 感受态细胞中,于冰上作用 5 min,使用电转仪按照以 2000 V、25 μF、200 Ω 的程序电转后,迅速加入电转复苏液中,于 30℃温箱中培育 1 h。将重组的感受态细胞于 L-Elliker 固态培养基涂板,培养 36 h 后挑取单克隆。

2.2.9 重组乳酸菌的鉴定

分别挑取构建的疑似 pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 重组乳酸菌单克隆菌落,分别于乳糖筛选 L-Elliker 液体培养基中培养至对数期,以对数期菌液为模板,T-Rec-F 和 T-Rec-R 为引物(见表 2-2),以空载体 pNZ8149 乳酸菌为阴性对照,进行 PCR 扩增,具体菌液 PCR 反应体系见表 2-21,反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s、54℃ 30 s、72℃ 40 s,35 个循环。PCR 扩增结束后,将扩增片段进行凝胶电泳,紫外灯下扫描观察结果,若出现特异性扩增片段,且与预期片段大小一致,经测序正确的菌株即为目的重组乳酸菌。

表 2-21 菌液 PCR 反应体系

Table 2-21 Bacterial PCR reaction system	
反应组分	反应体系 (μL)
Taq Max	10
T-Rec-F	1
T-Rec-R	1
菌液	2
ddH ₂ O	6

同样,分别挑取构建的 pNZ8149-NisRK-Cm-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 重组乳酸菌单克隆菌落,分别于氯霉素筛选 L-Elliker 选液体培养基中 30℃静置培养至对数期,以对数期菌液为模板,T-Rec-F 和 T-Rec-R 为引物(见表 2-2),以空载体 pNZ8149-NisRK-Cm 乳酸菌为阴性对照,进行 PCR 扩增,具体菌液 PCR 反应体系及程序按照表 2-21 进行。PCR 扩增结

束后,将扩增片段进行凝胶电泳,紫外灯下扫描观察结果,若出现特异性扩增片段,且与预期片段大小一致,经测序正确的菌株即为目的重组乳酸菌。

同样,分别挑取构建的 pNZ2103-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 疑似重组乳酸菌单克隆菌落,分别于氯霉素筛选液体培养基中 30℃ 静置培养至对数期,用表 2-2 中的特异性引物,以对数期菌液为模板,设置空载体 pNZ2103 为阴性对照,进行 PCR 扩增,具体菌液 PCR 反应体系及程序按照表 2-4 进行。PCR 扩增结束后,将扩增片段进行凝胶电泳,紫外灯下扫描观察结果,若出现特异性扩增片段,且与预期片段大小一致,经测序正确的菌株即为目的重组乳酸菌。

将 PCR 结果为阳性且测序结果正确的的菌液取 10 μ L 于 L-Elliker 固体平板上进行划线培养,于 30℃ 培养箱中培养 24 h 后,挑取单克隆菌落,按照上述 2.2.9 的方法再次进行 PCR 鉴定,结果正确后,保存于-80℃ 备用。

将 PCR 结果为阳性的 PCR 产物送至吉林库美生物有限公司进行测序。将 PCR 结果为阳性且测序结果正确的的菌液取 10 μ L 于 L-Elliker 固体平板上按照划线规则划线,于 30℃ 培养箱中培养 24 h 后,挑取单克隆按照上述操作 2.2.9 进行 PCR 鉴定后,保存于-80℃ 备用。

2.2.10 重组乳酸菌的诱导表达

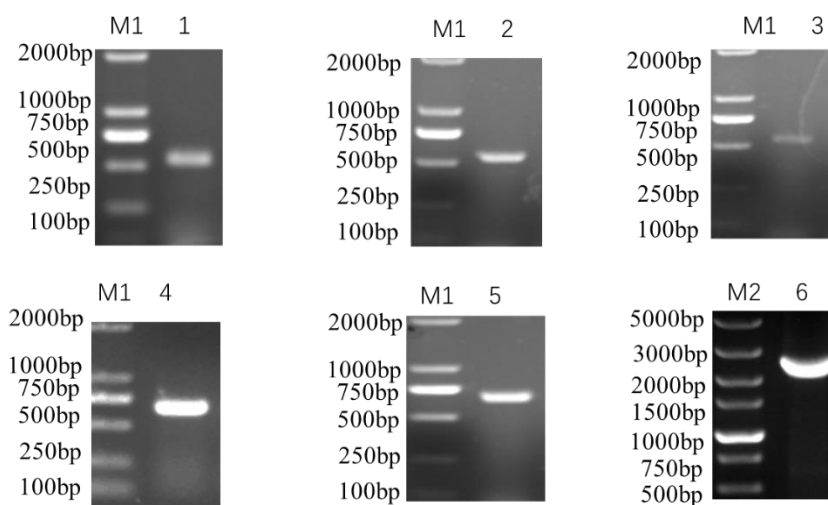
分别将 2.2.9 中构建的重组乳酸菌接种于 L-Elliker 筛选固体培养基中划线培养 24 h 后,挑取单克隆菌株于 L-Elliker 筛选液体培养基中培养至对数期,取对数期菌液按照 1:25 的比例接种于 L-Elliker 筛选液体培养基中培养约 3 h,待 OD 值为 0.35 OD 时,加入,加入诱导剂 Nisin 至终浓度为 20 ng/mL,30℃ 温箱静置培养 6 h,用 PBS 洗涤两次后,10 倍浓缩菌液,使用超声破碎仪进行超声破碎后,3000g 离心 10 min,收集上清。

将超声破碎后的上清进行 Western blot 检测,具体步骤如下:样品经 12% SDS-PAGE 后,电转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 的脱脂乳将膜于室温封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次后,加入 HA 鼠源单抗(1:2000)室温孵育 1.5 h, PBST 洗涤 3 次后,加入羊抗鼠红外标记二抗进行室温孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次后利用 Odyssey 红外扫描仪进行成像。

2.3 结果

2.3.1 目的基因片段的扩增

分别以优化合成的 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13, AvBD12613 基因片段和载体 pNZ8149 为模板, 通过表 2-1 中引物 AvBD1-F 和 AvBD1-R 扩增出长度为 570 bp 的 AvBD1 基因片段; 通过引物 AvBD2-F 和 AvBD2-R 扩增出长度为 522 bp 的 AvBD2 基因片段; 通过引物 AvBD6-F 和 AvBD6-R 扩增出长度为 594 bp 的 AvBD6 基因片段; 通过引物 AvBD13-F 和 AvBD13-R 扩增出长度为 669 bp 的 AvBD13 基因片段; 通过引物 AvBD12613-F 和 AvBD12613-R 扩增出长度为 657 bp 的 AvBD12613 基因片段; 通过引物 8149-F 和 8149-R 扩增出长度为 2550 bp 的载体 pNZ8149 片段; 各片段的扩增结果如图 2.1 所示, 产物片段大小与预期结果相符。试验结果表明, 成功扩增出用于同源重组 pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 质粒的目的片段。

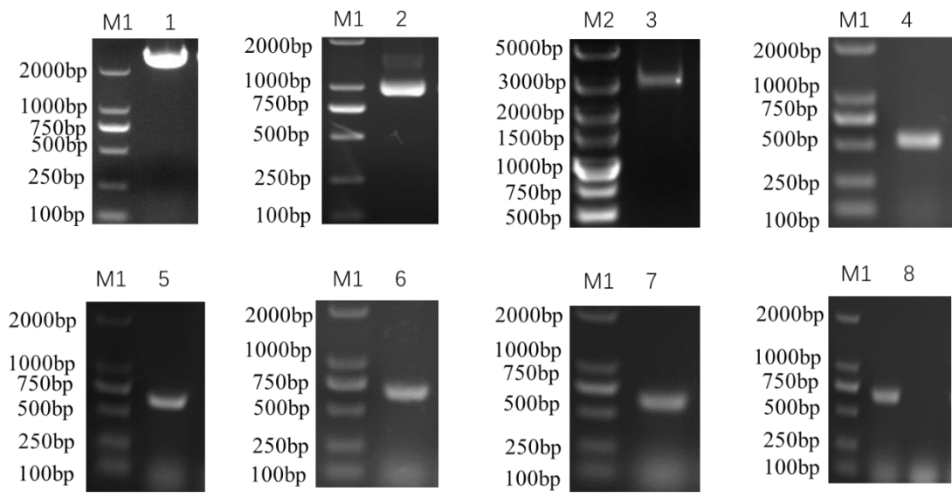


M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: AvBD1; 2: AvBD2; 3: AvBD6; 4: AvBD13; 5: AvBD12613; 6: pNZ8149

图 2.1 Nisin 诱导表达系统目的基因扩增结果

Fig. 2.1 Nisin induced expression system target gene amplification results

同样, 根据表 2-2 的引物, 分别以 p8149-nisRK, pPG612, AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 和 AvBD12613 为模板, 通过引物 LAC8-F 和 LAC8-R 扩增出不含 LAC 基因长度为 2232 bp 的 p8149-nisRK 基因片段; 以 pPG612 为模板, 通过引物 CM-F 和 CM-R 扩增出长度为 919 bp 的 Cm 基因片段, 通过同源重组构建出大小为 3141 bp 的 p8149-nisRK-Cm 质粒; 以 p8149-nisRK-Cm 为模板, p8149RK-F 和 p8149RK-R 为引物扩增出带有同源臂片段大小为 3141 bp 的 P8149-nisRK-Cm 线性片段; 以 T-Rec-F 和 T-Rec-R 为通用引物, 以 AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 和 AvBD12613 为模板, 扩增出 570 bp 的 AvBD1, 522 bp 的 AvBD2, 594 bp 的 AvBD6, 669 bp 的 AvBD13 和 657 bp 的 AvBD12613。各片段的扩增结果如图 2.2 所示, 产物片段大小与预期结果相符。试验结果表明, 成功扩增出用于同源重组 pNZ8149-NisRK -Cm- AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 质粒的目的片段。

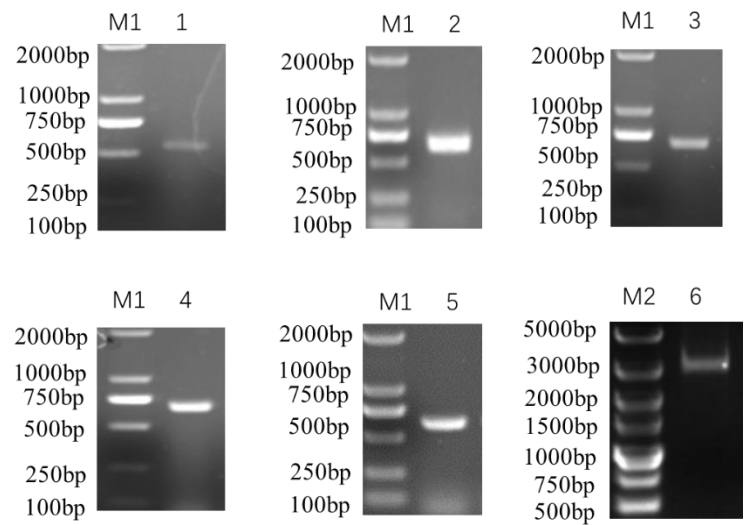


M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: pNZ8149-nisRK; 2: Cm; 3: pNZ8149-nisRK-Cm; 4: AvBD1; 5: AvBD2; 6: AvBD6; 7: AvBD13; 8: AvBD12613

图 2.2 优化的 Nisin 诱导表达系统目的基因扩增结果

Fig. 2.2 Optimized Nisin Induced Expression System Target Gene Amplification Results

分别以 AvBD1, AvBD2, AvBD6, AvBD13 和 AvBD12613 基因片段为模板，通过表 2-3 中引物 AvBD1-F 和 AvBD1-R 扩增出长度为 570 bp 的 AvBD1 基因片段；通过引物 AvBD2-F 和 AvBD2-R 扩增出长度为 522 bp 的 AvBD2 基因片段；通过引物 AvBD6-F 和 AvBD6-R 扩增出长度为 594 bp 的 AvBD6 基因片段；通过引物 AvBD13-F 和 AvBD13-R 扩增出长度为 669 bp 的 AvBD13 基因片段；通过引物 AvBD12613-F 和 AvBD12613-R 扩增出长度为 657 bp 的 AvBD12613 基因片段；使用 *Hind*III 内切酶对质粒 p2103 进行酶切，获得片段大小为 3667 bp 的 p2103 基因片段。各片段的扩增结果如图 2.3 所示，产物片段大小与预期结果相符。试验结果表明，成功扩增出用于同源重组 pNZ2103-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 质粒的目的片段。



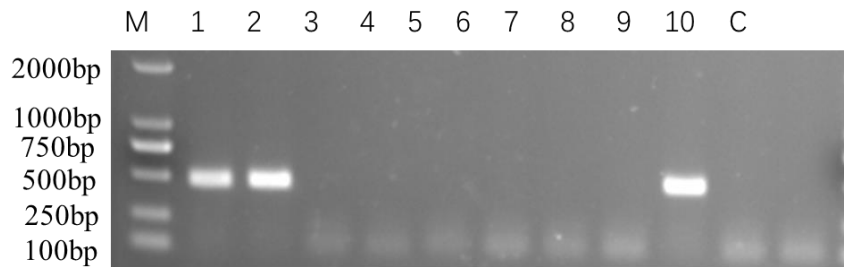
M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker; 1: AvBD1; 2: AvBD2; 3: AvBD6; 4: AvBD13; 5: AvBD12613; 6: pNZ2103

图 2.3 持续表达系统目的基因扩增结果

Fig. 2.3 Continuous expression system target gene amplification results

2.3.2 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定

分别挑取单克隆菌落于相应的液体培养基中培养至对数期，经菌液 PCR 鉴定，初步筛选出 1、2、9 号共 3 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1（见图 2.4）；1、4、6、7、8、9 和 10 号共 7 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD2（见图 2.5）；1-10 号共 10 株疑似阳性菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD6（见图 2.6）；1、2、3、4、5、7、8、9 和 11 号共 9 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD13（见图 2.7）；2、7、8、10 和 11 号共 5 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD12613（见图 2.8）。PCR 产物经测序鉴定序列正确。结果表明，正确构建了重组乳酸菌 r-L. Lactis- pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 菌株。

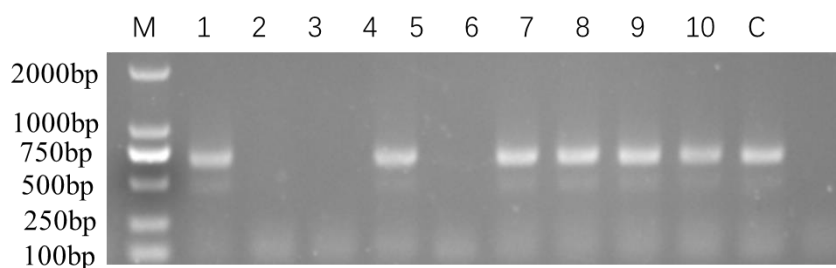


M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1; C: negative control

图 2.4 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1 的 PCR 鉴定

Fig. 2.4 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1

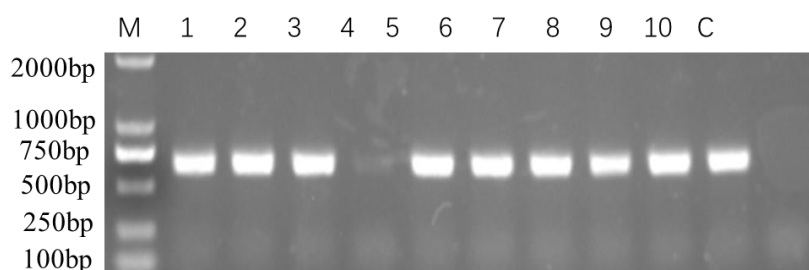


M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD2; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD2; C: negative control

图 2.5 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD2 的 PCR 鉴定

Fig. 2.5 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD2

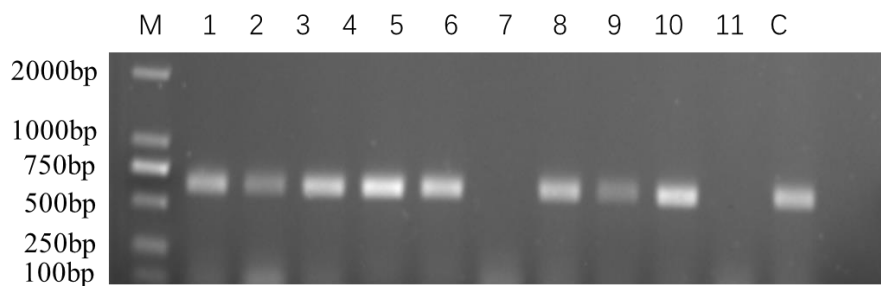


M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD6; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD6; C: negative control

图 2.6 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD6 的 PCR 鉴定

Fig. 2.6 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD6

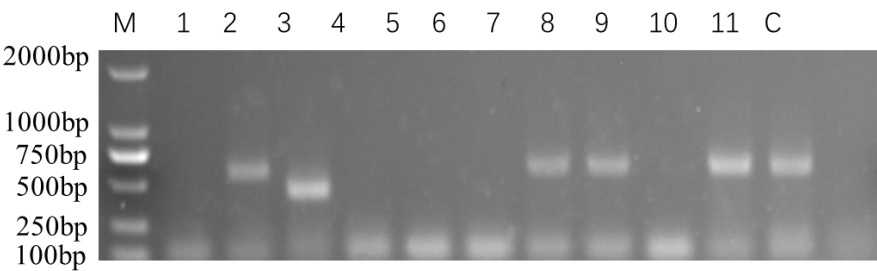


M: DL2000 DNA Marker; 1-11: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD13; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-11: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD13; C: negative control

图 2.7 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD13 的 PCR 鉴定

Fig. 2.7 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD13



M: DL2000 DNA Marker; 1-11: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD12613; C: 阴性对照

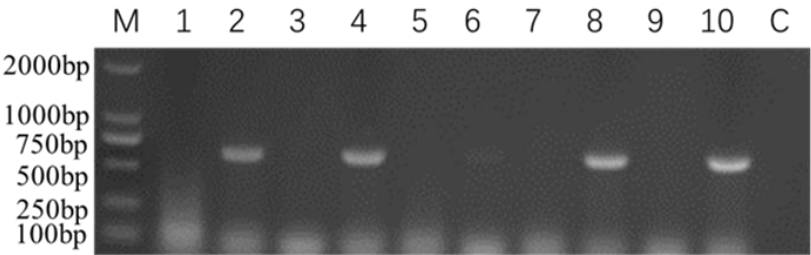
M: DL2000 DNA Marker; 1-11: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD12613; C: negative control

图 2.8 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD12613 的 PCR 鉴定

Fig. 2.8 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD12613

2.3.3 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定

分别挑取单克隆菌落于相应的液体培养基中，培养至对数期，经菌液 PCR 鉴定，初步筛选出 2、4、8、10 号共 4 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD1（见图 2.9）；获得 1、2、3、5、7、8 和 9 号共 7 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK -Cm-AvBD2（见图 2.10）；获得 1 和 9 号共 2 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK -Cm -AvBD6（见图 2.11）；获得 1、2、3、5、7、8 和 9 号共 7 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK -CM -AvBD13（见图 2.12）；获得 1、3、5 和 6 号共 4 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisR -Cm -AvBD12613（见图 2.13）。PCR 产物经测序鉴定，序列正确。结果表明，正确构建了重组乳酸菌 r-L. Lactis- pNZ8149- NisRK-Cm-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 菌株。

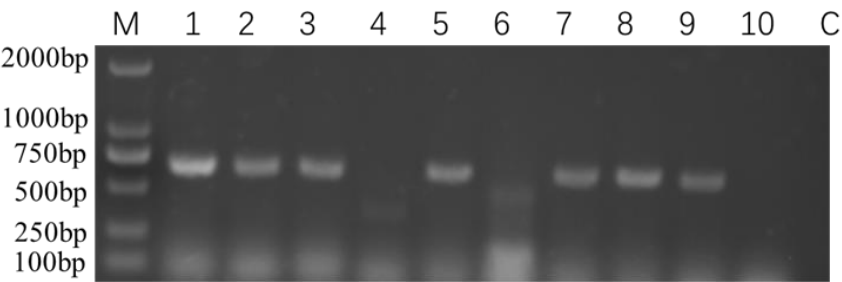


M: DL2000 DNA Marker; 1-10 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD1; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD1; C: negative control

图 2.9 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD1 的菌液 PCR 鉴定

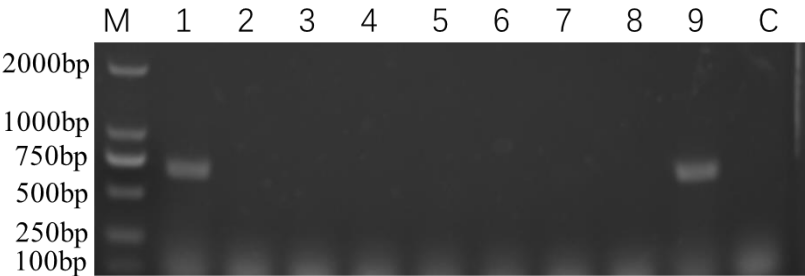
Fig. 2.9 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD1



M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD2; C: 阴性对照
M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD2; C: negative control

图 2.10 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD2 的菌液 PCR 鉴定

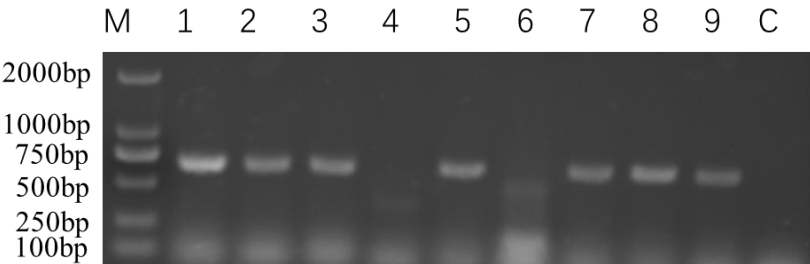
Fig. 2.10 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD2



M: DL2000 DNA Marker; 1-9: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD6; C: 阴性对照
M: DL2000 DNA Marker; 1-9: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD6; C: negative control

图 2.11 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD6 的菌液 PCR 鉴定

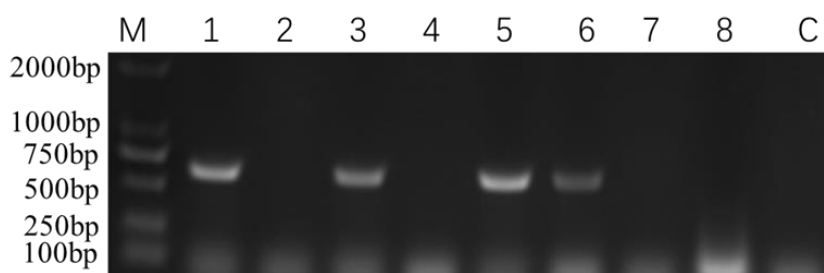
Fig. 2.11 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD6



M: DL2000 DNA Marker; 1-9: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD13; C: 阴性对照
M: DL2000 DNA Marker; 1-9: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD13; C: negative control

图 2.12 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD13 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.12 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD13



M: DL2000 DNA Marker; 1-8: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD12613; C: 阴性对照

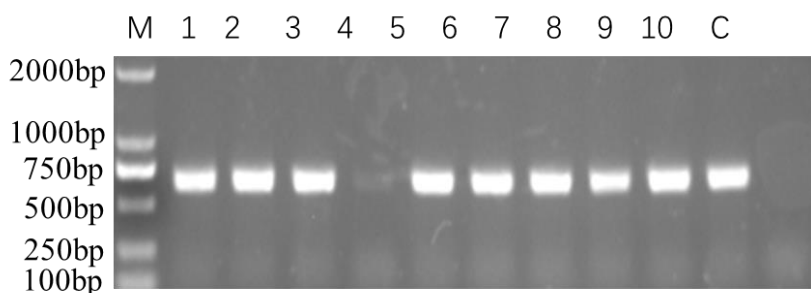
M: DL2000 DNA Marker; 1-8: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD12613; C: negative control

图 2.13 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD12613 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.13 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm -AvBD12613

2.3.4 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBDs 的筛选及 PCR 鉴定

分别挑取单克隆菌落于相应的液体培养基中培养至对数期,经菌液 PCR 初步筛选出 1、2、3、5、6、7、8、9 和 10 号共 9 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD1 (见图 2.14); 获得 1、4、6、7、8、9 和 10 号共 7 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD2 (见图 2.15); 获得 1、2、3、4、5、7、8、9 和 11 号共 9 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD6 (见图 2.16); 获得 1、4、6 和 11 号共 9 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD13 (见图 2.17); 获得 1、2 和 9 号共 3 株疑似阳性重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD12613 (见图 2.18)。PCR 产物经测序鉴定,序列正确。结果表明,正确构建了重组乳酸菌 r-L. Lactis- pNZ2103-NisRK-Cm-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 菌株。

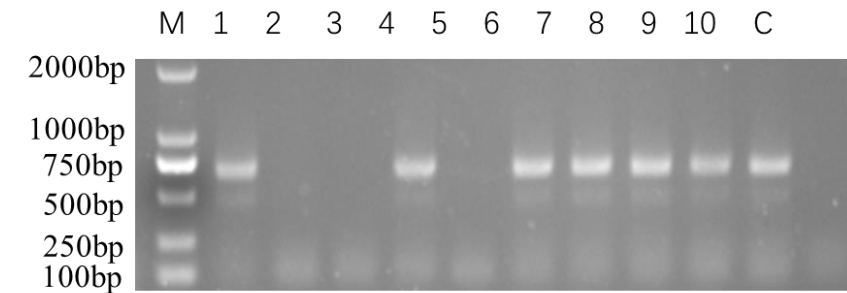


M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD1; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD1; C: negative control

图 2.14 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD1 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.14 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD1

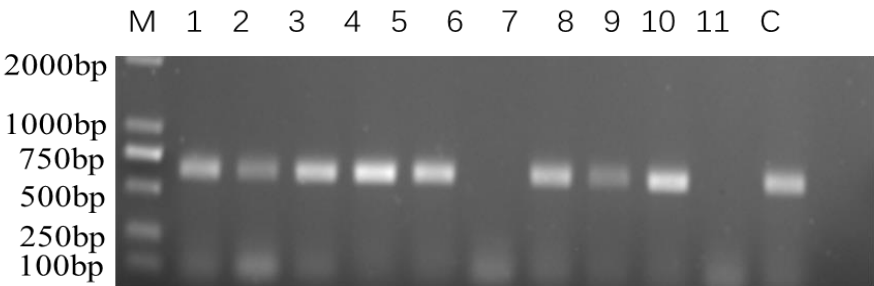


M: DL2000 DNA Marker; 1-10: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD2; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD2; C: negative control

图 2.15 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD2 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.15 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD2

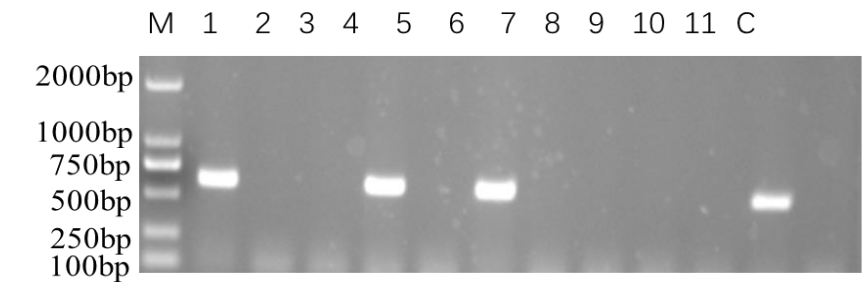


M: DL2000 DNA Marker; 1-11: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD6; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-11: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD6; C: negative control

图 2.16 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD6 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.16 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD6

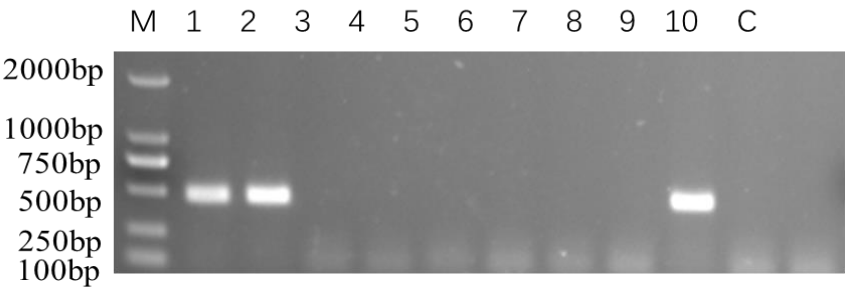


M: DL2000 DNA Marker; 1-11: 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD13; C: 阴性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-11: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD13; C: negative control

图 2.17 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD13 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.17 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD13



M: DL2000 DNA Marker; 1-10 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD12613; C: 阴性对照

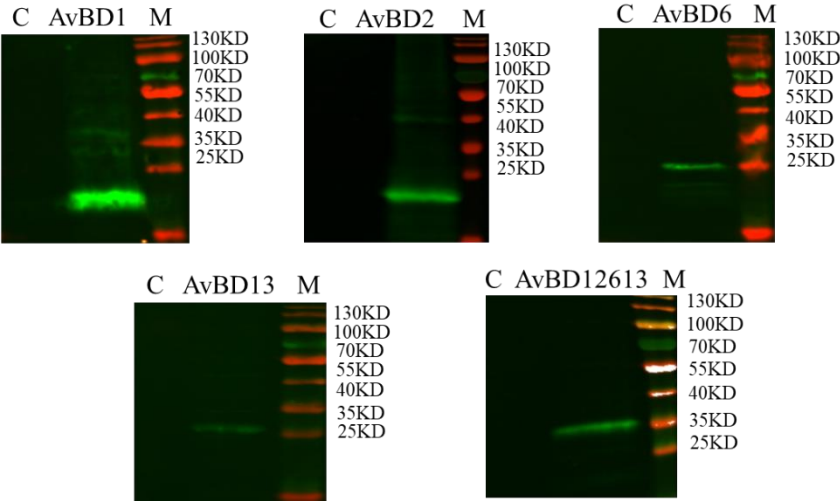
M: DL2000 DNA Marker; 1-10: Recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD12613; C: negative control

图 2.18 重组菌株 r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD12613 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 2.18 PCR identification of recombinant strain r-L. Lactis-pNZ2103-AvBD12613

2.3.5 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBDs 目的蛋白的表达鉴定

按上述 2.2.10 的方法对重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 分别进行诱导表达，分离获得菌体裂解上清，以 pNZ8149 空载体菌株作为阴性对照，经 Western blot 鉴定获得了与预期目的蛋白大小相符合的 20 KD 的 rAvBD1，19 KD 的 rAvBD2，24 KD 的 rAvBD13；25 KD 左右 rAvBD6，35 KD 左右的 AvBD12613。（见图 2.19）。结果表明，重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-AvBD1、AvBD2 及 AvBD13 正确表达了相应的重组禽 β-防御素。



1: AvBD1; 2: AvBD2; 3: AvBD6; 4: AvBD13 5: AvBD12613 C: 阴性对照

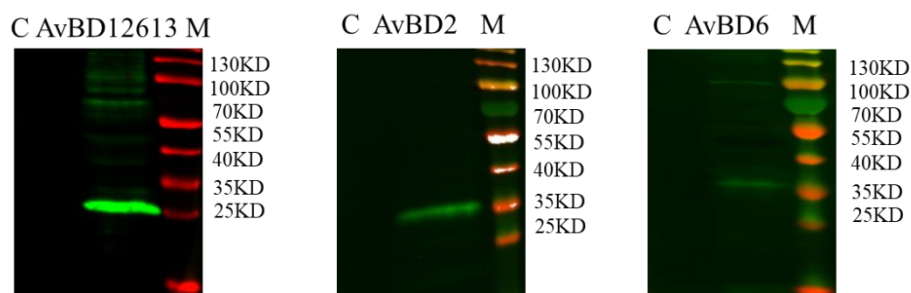
1: AvBD1; 2: AvBD2; 3: AvBD6; 4: AvBD13 5: AvBD12613 C: negative control

图 2.19 重组蛋白 AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 的表达

Fig 2.19 Expression of recombinant protein AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613

2.3.6 重组乳酸菌 r-L. Lactis-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBDs 目的蛋白的表达鉴定

按上述 2.2.10 方法分别对重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 进行目的蛋白的诱导表达, 以 pNZ8149-NisRK-Cm 空载体菌株作为阴性对照, 经 Western blot 鉴定分别获得了与预期目的蛋白大小相符合的 19 KD 的 rAvBD2, 21 KD 的 rAvBD6, 23 KD 的 rAvBD12613 重组蛋白 (见图 2.20)。重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBD1 和 rAvBD13 不表达目的蛋白。结果表明, 重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ8149-NisRK-Cm-AvBD2、AvBD6 及 AvBD12613 正确表达了目的重组禽 β -防御素。



1: AvBD12613; 2: AvBD2; 3: AvBD6; C: 阴性对照

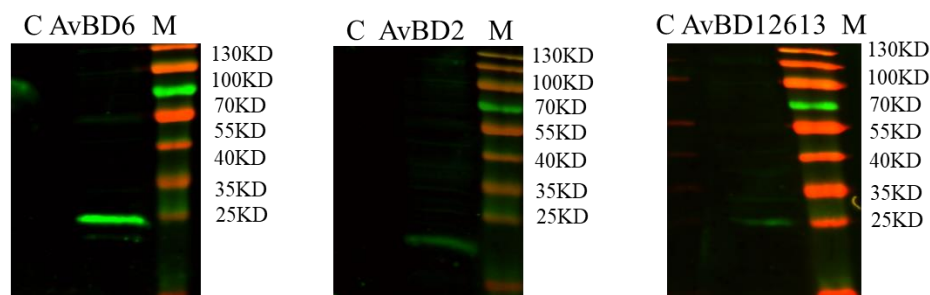
1: AvBD12613; 2: AvBD2; 3: AvBD6; C: negative control

图 2.20 重组蛋白 AvBD2/AvBD6/AvBD12613 的表达

Fig 2.20 Expression of recombinant protein /AvBD2/AvBD6/AvBD12613

2.3.7 重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ2103-AvBDs 目的蛋白的表达鉴定

按上述 2.2.10 的方法对重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ2103-AvBD1、AvBD2、AvBD6、AvBD13 及 AvBD12613 进行目的蛋白的诱导表达, 以 pNZ8149 空载体菌株作为阴性对照, 经 Western blot 鉴定, 获得了与目的重组蛋白大小相符合的 20 KD 的 rAvBD1, 25 KD 大小的 rAvBD6, 35 KD 大小的 rAvBD12613 重组蛋白 (见图 2.21)。重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ2103-AvBD2 和 rAvBD13 不表达目的蛋白。结果表明, 重组乳酸菌 r-L. *Lactis*-pNZ2103-AvBD1、AvBD6 及 AvBD12613 正确表达了相应的重组禽 β -防御素。



1: AvBD6; 2: AvBD1; 3: AvBD12613; C: 阴性对照

1: AvBD6; 2: AvBD1; 3: AvBD12613; C: negative control

图 2.21 重组蛋白 AvBD1、AvBD6 及 AvBD12613 的表达

Fig 2.21 Expression of recombinant protein AvBD2、AvBD6 及 AvBD12613

2.4 表达禽 β -防御素重组乳酸菌菌体裂解混合物的制备

选取能够正确表达目的重组蛋白的重组乳酸菌,按照 2.2.10 的实验方法进行重组乳酸菌目的蛋白的诱导表达,诱导表达结束后,首先用无菌 PBS 洗剂清洗菌体 2-3 次,在用 PBS 将菌体重悬,将菌液 OD600 值调至 2 OD (乳酸菌浓度约为 2×10^8 CFU/mL),按照 2.2.10 中的方法经超声破碎(超声时间调整为 18 min),然后 12000 g 离心 10 min,收集上清,利用 BCA 法对重组蛋白进行绝对定量。结果显示,重组蛋白 rAvBD1、rAvBD2、rAvBD6、rAvBD13、rAvBD12613 含量分别 23、28、33、30 及 27 μ g/mL。重组蛋白混合物上清经 0.45 μ m 滤器过滤后,保存于 -80°C 备用。

2.5 讨论

蛋白表达系统是指由宿主、外源基因、载体和辅助成分组成的体系。通过这个体系可以实现外源基因在宿主中表达的目的。不同表达系统的组成结构有所不同,蛋白表达含量、表达效率以及生物学功能都会有所不同,因此为了确保正确成功表达各种重组禽 β -防御素,本研究采用了 3 种表达系统分别表达重组禽 β -防御素(常规诱导表达系统(食品级 Nisin 诱导表达系统);持续组成型表达系统(无需诱导)以及优化的 Nisin 诱导表达系统)。本研究均采用公认的食品级安全级宿主菌株(食品级乳酸乳球菌 NZ3900 菌株)作为表达载体,以便符合生物安全和完全绿色食品安全的要求。首先食品级乳酸乳球菌 NZ3900 菌株是在人类和动物中已使用数千年的益生菌株演化而来的,是目前公认的食品级益生菌;诱导表达系统采用食品级 Nisin 诱导剂,Nisin 也是公认的使用数百年的天然抗菌小肽。

本研究结果表明,不同表达系统,重组蛋白的表达量及表达效率都有所不同。持续表达系统的优点为不需诱导即可持续表达,但相比于其他表达系统蛋白表达量较低。优化的 Nisin 表达系统蛋白表达量比其他表达系统普遍较高。常规 Nisin 诱导表达系统,目的蛋白的表达量仅次于优化 Nisin 表达系统,蛋白表达效率较高。

通过 3 种表达系统的构建,我们筛选出了蛋白表达量高、蛋白表达效率高,蛋白表达正确的 5 株重组乳酸菌。

第三章 重组禽 β -防御素体外免疫调节活性的检测

为了筛选出具有免疫调节活性的重组禽 β -防御素,本试验首先通过体外筛选,重组禽 β -防御素与3种细胞分别共培养。体外筛选试验结果表明,重组禽 β -防御素(重组乳酸菌 r-L. Lactis-AvBD12613 菌体裂解混合物)可以显著激活巨噬细胞报告细胞系 J774-Dual™细胞的 IRF 及 NF- κ B 信号通路;5种重组禽 β -防御素 rAvBD1、rAvBD2、rAvBD6、rAvBD13 及 rAvBD12613 均能够诱导鸡巨噬细胞系 HD11 产生较高水平的 IL-10;其中 rAvBD12613 还能够诱导 HD11 表达较高水平的 CD80 和 CD86 分子;重组禽 β -防御素 rAvBD12613、rAvBD1 及 rAvBD6 能够诱导鸡外周血单个核细胞(PBMCs)产生较高水平的 IL-12 与 IL-10;其中 rAvBD12613 还能诱导鸡 PBMCs 表达较高水平的 CD80 和 CD86 分子,体外筛选表明,重组禽 β -防御素 rAvBD12613 具有较强的免疫调节活性。

3.1 材料

3.1.1 细胞

鸡外周血单个核细胞和外周血白细胞均采用外周血淋巴试剂盒于成年 SPF 鸡新鲜血液中分离;SPF 鸡饲养于哈尔滨兽医研究所动物实验室;J774-Dual™细胞系香港 Invivogen 公司;鸡巨噬细胞(HD11)保存于哈尔滨兽医研究所禽免疫抑制病研究创新团队实验室。

3.1.2 主要试剂及仪器

100 $\times$ 青-链霉素;0.25%胰酶-EDTA;培养基 DMEM 购自赛默飞公司;RMPI 1640 购自赛默飞公司;胎牛血清购自 Corning 公司;鸡外周血淋巴细胞分离试剂盒购自索莱宝公司;选择抗生素 Normocin 购自 Invivogen;QUANTI-Blue™和 QUANTI-Luc™ 均购自香港 Invivogen 公司。

水平离心机、细胞培养皿、微孔板化学发光检测仪-3f (LB 960)、紫外可见分光光度计,超净化工作台、显微镜、细胞培养箱。

3.2 方法

3.2.1 重组禽 β -防御素激活 J774-Dual™报告细胞系免疫信号通路的检测

3.2.1.1 J774-Dual™细胞系的培养

将 J774-Dual™细胞系从液氮中取出,37℃水浴融化至半固态,迅速加入生长培养基(10%热灭活胎牛血清(56℃,30 min)、DMEM、100 mg/mL Normocin、100 U/mL 青链霉素)于细胞冻存管中,立刻转移至预热的生长培养基中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养3小时后,观察细胞状态,若细胞贴壁则立刻更换新鲜的生长培养液,若细胞不贴壁,则继续培养。待贴壁至70%-80%时,进行传代,更换生长培养液,至少传代两次。

生长培养基条件下传代完成后,将细胞更换为选择培养基(生长培养基、5 μ g/mL Blasticidin、

100 $\mu\text{g/L}$ Zeocin), 培养至细胞贴壁至 70%-80%时, 用于后续试验使用。

3.2.1.2 重组 β -防御素刺激 J774-Dual™细胞

将培养好 J774-Dual™ 细胞收集至离心管中, 500 g 水平离心 10 min, 用生长培养基将细胞稀释至浓度为 2.8×10^6 个/mL。96 孔细胞培养板中加入 100 μL 细胞悬液, 每个测试孔中分别加入 20 μL 相应的重组 β -防御素菌体裂解液, 阳性对照(分别加入 10 μL 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 每组样品设置 3 个重复。将细胞于 37℃ 5% CO_2 培养 24 h 后, 收集细胞上清用于后续检测。

3.2.1.3 重组 β -防御素激活 J774-Dual™细胞 NF- κ B 信号通路和干扰素 IRF 信号通路的检测

① NF- κ B 信号通路的检测

按照 J774-Dual™细胞的使用说明书配制 QUANTI-Blue™溶液, 96 孔板加入 170 μL 配置好的 QUANTI-Blue 溶液后, 加入重组 β -防御素 AvBDs, 37℃, 5% CO_2 培养箱中孵育 4~8 h, 使用微孔板分光光度计在 620-655 nm 条件下检测吸光度, 进一步测定 NF- κ B 诱导的碱性磷酸酶表达水平。

② 干扰素 IRF 信号通路的检测:

按照 J774-Dual™细胞的使用说明书配制 QUANTI-Luc™溶液, 以下参数设置微孔板化学发光检测仪(LB 960): 50 μL 进样, 终点测量, 开始时间为 4 s, 终止读数为 0.1 s。移取样品(每孔 20 μL)到 96 孔白色(不透明)或黑色板或发光管。用化验溶液灌注注射器, 然后继续进行测量。用微孔板化学发光检测仪(LB 960)进行检测。

3.2.2 重组 β -防御素刺激鸡 PBMCs 产生细胞因子的检测

3.2.2.1 PBMCs 的制备

取成年 SPF 鸡新鲜抗凝血液, 根据鸡外周血单个核细胞试剂盒说明书分离外周血单个核细胞, 分离出的外周血单个核细胞用含有胎牛血清的 1640 培养液重悬备用。

3.2.2.2 重组 β -防御素刺激 PBMCs

将 3.5.1 分离的细胞于培养液(RMPI 1640、10%灭活 FBS、100 mg/mL Normocin、1%青-链霉素)中培养, 将细胞浓度调至 2.8×10^5 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板中。将重组 β -防御素蛋白 50 μL 加入于细胞上清中, 轻轻将细胞与重组蛋白吹吸均匀, 然后置于细胞培养箱中, 37℃, 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h, 后收集细胞沉淀, 用于后续试验。

3.2.2.3 重组 β -防御素激活 PBMCs 产生 IL-10、IL-12 及 CD80、CD86 分子的检测

以 3.2.2.2 收集的细胞为检测对象, 采用荧光定量的方法检测重组 β -防御素 rAvBD1, rAvBD2, rAvBD6, rAvBD13 及 rAvBD12613 激活鸡外周血单个核细胞(PBMCs)产生细胞因子 IFN- γ 、IL-12 及细胞 CD80、CD86 分子的相对表达量, 分别以 L-12p70-F/R, IL-10-F/R 为引物(表 3.1), 采用 SYBY Green I 荧光定量 PCR 方法定量检测培养细胞中 IL-12p70、IL-10 及细胞的 CD80、CD86

分子的转录水平。

表 3.1 引物基因序列

Table 3.1 Gene sequences of primers

引物	序列(5'-3')
IL-10-F	CTGTCACCGCTTCTTCACCT
IL-10-R	ACTCCCCCATGGCTTTGTA
IL-12p70-F	AGATGCTGGCAACTACACCTG
IL-12p70-R	CATTTGCCCATTGGAGTCTAC
CD80-F	CAGCAAGCCGAACATAGAAAGA
CD80-R	AGCAAAGTGGTGGACCTGAGA
CD86-F	TACCTTGCCAGGAAAAACA
CD86-R	ATACTGCCCCTCATCCACAA

3.2.3 重组 β -防御素刺激鸡巨噬细胞 (HD11) 产生细胞因子的检测

3.2.3.1 HD11 的复苏、传代培养

将 HD11 细胞系从液氮中取出, 37℃ 水浴融化至半固态, 迅速加入培养基 (10% 热灭活胎牛血清、DMEM、100 mg/mL Normocin 、100 U/mL 青链霉素) 于细胞冻存管中, 立刻转移至预热的生长培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 小时后, 观察细胞状态, 若细胞贴壁则立刻更换新鲜的生长培养液, 若细胞不贴壁, 则继续培养。至少传代两次。

待细胞贴壁且生长至 70%-80% 时, 用 PBS 缓冲液或无血清培养基将细胞表面的离子血清清洗掉, EDTA 胰酶消化至细胞间出现间隙, 加入血清, 中和胰酶, 加入生长培养基, 500 g 水平离心 10 min, 去除上清, 用生长培养基重悬用于后续试验使用。

3.2.3.2 重组 β -防御素与 HD11 的相互作用

将消化洗涤后的细胞, 用新鲜预热的生长培养基重悬细胞, 将细胞浓度调至 2.8×10^6 个/mL, 接种于 24 孔细胞培养板中, 并分别加入 50 μ L 重组 β -防御素 AvBD12613 为实验孔, 加入 50 μ L PMA (50 ng/mL)+ionomycin (3 μ g/mL) 为阳性对照孔, 加入 50 μ L 的 PBS 为阴性对照孔, 细胞培养箱中培养, 24 h 后收集细胞培养上清及细胞, 储存于 -80℃ 冰箱备用。

3.2.3.3 重组 β -防御素诱导 HD11 产生 IL-10 及 CD80、CD86 分子的检测

以 3.2.3.2. 收集的细胞为检测对象, 采用荧光定量的方法检测重组 β -防御素 rAvBD12613 激活 HD11 产生细胞因子 IL-10、IL-12 的相对表达量, 分别以 IL-12p70-F/R, IL-10-F/R 为引物 (表 3.1), 采用 SYBY Green I 荧光定量 PCR 方法定量检测培养细胞中细胞因子 IL-10、IL-12 的 mRNA 转录水平及 CD80 和 CD86 分子的 mRNA 转录水平。

3.3 结果

3.3.1 重组禽 β -防御素激活巨噬细胞 J774-Dual™ 报告细胞系免疫信号通路的检测

3.3.1.1 重组 β -防御素激活 J774-Dual™ 细胞 NF- κ B 信号通路

按照 3.2.1.3 的方法检测激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞系 NF- κ B 信号通路的强度。检测结果显示：重组 β -防御素 rAvBD12613 可以高效激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 NF- κ B 信号通路（与野生菌对照组、阴性空白对照组、PBS 对照组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与重组 β -防御素 rAvBD1 组、rAvBD2 组、rAvBD6 组及 rAvBD13 组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与 LPS 刺激巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 NF- κ B 信号通路阳性标准对照组相比较，差异不显著， $P \geq 0.05$ ）（见图 3.1）。结果说明，重组 β -防御素 rAvBD12613 可以高效激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 NF- κ B 信号通路。

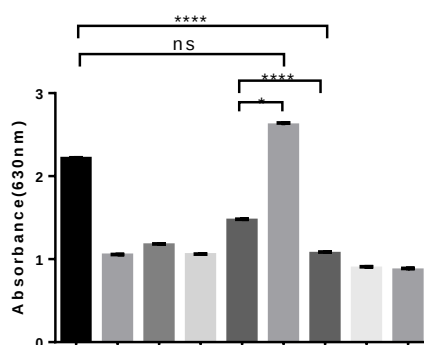


图 3.1 重组蛋白激活 NF- κ B 途径

Fig.3.1 Recombinant protein activates NF- κ B pathway

3.3.1.2 重组 β -防御素激活 J774-Dual™ 细胞干扰素 IRF 信号通路

按照 3.2.1.3 的方法检测激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞系 IRF 信号通路的强度。检测结果显示：重组 β -防御素 rAvBD12613 可以高效激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 IRF 干扰素调节因子信号通路（与野生菌对照组、阴性空白对照组、PBS 对照组相比较，差异极显著， $P < 0.01$ ；与重组 β -防御素 rAvBD1 组、rAvBD2 组、rAvBD6 组及 rAvBD13 组相比较，差异极显著， $P < 0.01$ ；与 LPS 刺激巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 IRF 信号通路阳性标准对照组相比较，差异不显著， $P \geq 0.05$ ）（见图 3.2）。结果说明，重组 β -防御素 rAvBD12613 可以高效激活巨噬细胞 J774-Dual™ 细胞的 IRF 干扰素调节因子信号通路。

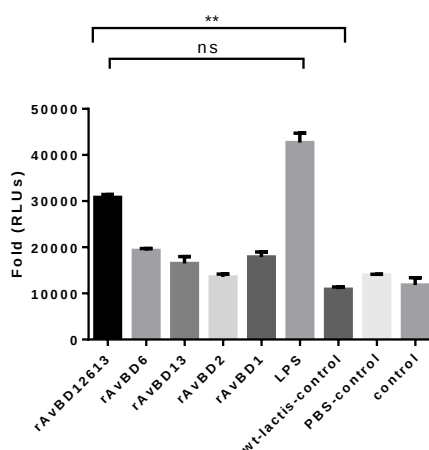


图 3.2 重组蛋白激活 IRF 途径

Fig.3.2 Recombinant protein activates IRF pathway

3.3.2 重组 β -防御素刺激 PBMCs 产生细胞因子的检测

按照 3.2.2.1 的方法收集相互作用后的细胞，检测细胞 IL-10 和 IL-12 的 mRNA 转录水平。

IL-10 的检测结果显示：重组 β -防御素 rAvBD12613、rAvBD6 和 rAvBD1 可以高效刺激鸡 PBMCs 产生细胞因子 IL-10（见图 3.3a）。其中重组 β -防御素 rAvBD12613 组与野生菌对照组、阴性空白对照组、PBS 对照组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与重组 β -防御素 rAvBD2 组、rAvBD13 组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与重组 β -防御素 rAvBD1 组相比较，略高于 rAvBD1 组，差异显著， $P < 0.05$ ；与 LPS 刺激鸡 PBMCs 阳性标准对照组相比较，差异不显著， $P \geq 0.05$ 。

IL-12 的检测结果显示：重组 β -防御素 rAvBD12613 和 rAvBD6 可以高效刺激鸡 PBMCs 产生细胞因子 IL-12（见图 3.3b）。其中重组 β -防御素 rAvBD12613 组与野生菌对照组、阴性空白对照组、PBS 对照组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与重组 β -防御素 rAvBD1 组、rAvBD2 组、rAvBD13 组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与 LPS 刺激鸡 PBMCs 阳性标准对照组相比较，差异不显著， $P \geq 0.05$ 。

结果表明，表明重组蛋白 rAvBD6 及 rAvBD12613 可以有效激活鸡外周血单个核细胞，既能上调 IL-12p70 的表达进行免疫激活，又能上调 IL-10 的表达进行免疫负调控，来维持免疫稳态。

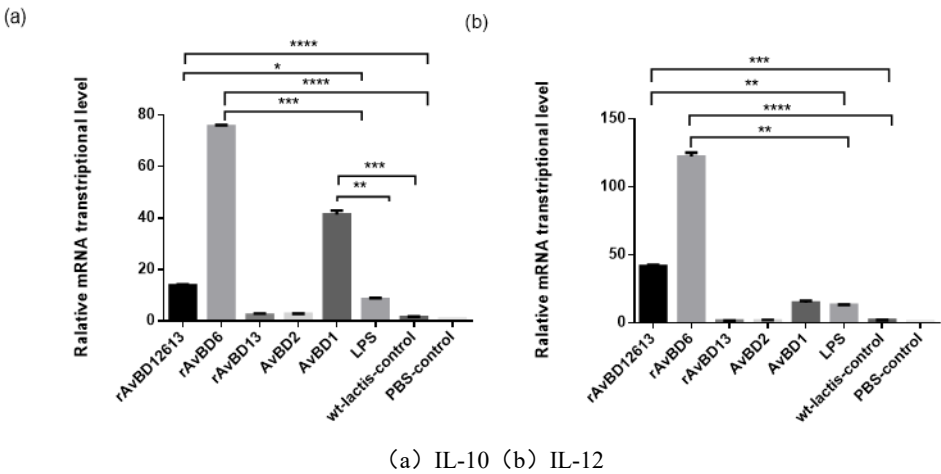


图 3.3 细胞沉淀中 IL-10 和 IL-12 的转录水平

Fig.3.3 Transcription levels of IL-10 and IL-12 in cell pellets

3.3.3 重组 β -防御素激活 PBMCs CD80 及 CD86 分子的检测

按照 3.2.3.3 的方法收集相互作用后的细胞，检测 CD80及CD86分子的mRNA 转录水平。结果显示，重组 β -防御素 rAvBD12613 能够显著提高鸡 PBMCs 的 CD80 和 CD86 的表达（见图 3.4a 和图 3.4b）。重组 β -防御素 rAvBD12613 组与野生菌对照组、PBS 对照组相比较，差异显著， $P < 0.05$ ；与 LPS 刺激鸡 PBMCs 阳性标准对照组相比较，高于 LPS 阳性对照组，差异显著， $P < 0.05$ 。结果表明，重组 β -防御素 rAvBD12613 能够显著活化鸡 PBMCs，激活细胞免疫应答。

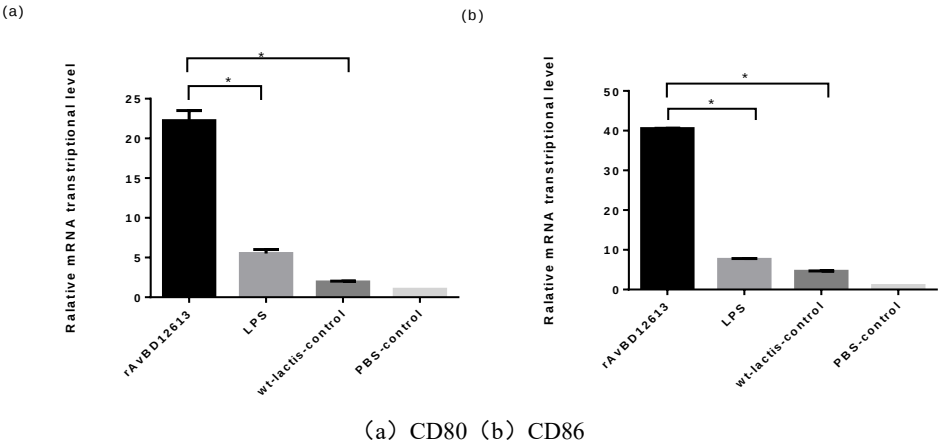


图 3.4 细胞沉淀中 CD80 和 CD86 的转录水平

Fig.3.4 Transcription levels of CD80 and CD86 in cell pellets

3.3.4 重组 β -防御素激活 HD11 IL-10 的检测

按照 3.2.3.2 方法收集相互作用后的细胞，检测细胞因子IL-10的mRNA 转录水平。结果显示，重组 β -防御素 rAvBD12613 和 rAvBD13 能够显著提高鸡 HD11 IL-10 的表达（见图 3.5）。重组 β

-防御素 rAvBD12613 组和 rAvBD13 组与野生菌对照组、PBS 对照组相比较，差异极其显著， $P < 0.0001$ ；与 LPS 刺激鸡 HD11 阳性标准对照组相比较，显著高于 LPS 阳性对照组，差异显著， $P < 0.05$ 。结果表明，重组 β -防御素 rAvBD12613 能够显著活化 HD11，产生免疫调节细胞因子 IL-10。

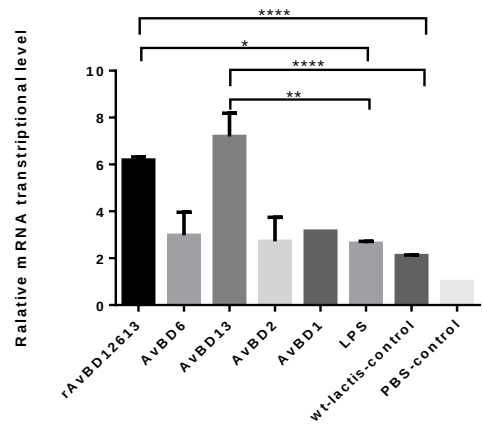
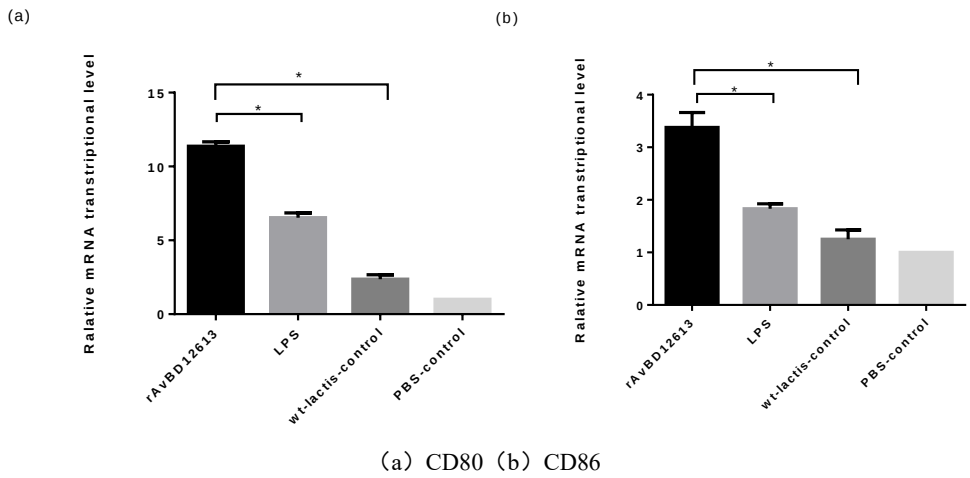


图 3.5 细胞沉淀中 IL-10 的转录水平

Fig.3.5 Transcription levels of IL-10 in cell pellets

3.3.5 重组 β -防御素激活 HD11 CD80 和 CD86 分子的检测

按照 3.2.3.2 方法收集相互作用后的细胞，检测 CD80及CD86分子的mRNA 转录水平。结果显示，重组 β -防御素 rAvBD12613 能够显著提高鸡 HD11 的 CD80 和 CD86 的表达（见图 3.6）。重组 β -防御素 rAvBD12613 组与野生菌对照组、PBS 对照组相比较，差异显著， $P < 0.05$ ；与 LPS 刺激鸡 HD11 阳性标准对照组相比较，显著高于 LPS 阳性对照组，差异显著， $P < 0.05$ 。结果表明，重组 β -防御素 rAvBD12613 能够显著活化 HD11。



(a) CD80 (b) CD86

图 3.6 细胞沉淀中 CD80 和 CD86 的转录水平

Fig.3.6 Transcription levels of CD80 and CD86 in cell pellets

3.4 讨论

J774-Dual™报告细胞系是通过稳定整合两个诱导的报告基因而衍生自小鼠 J774.1 巨噬细胞样的细胞系。第一个报告基因：J774-Dual™细胞在 IFN- β 最小启动子的控制下表达一个分泌的碱性磷酸酶(SEAP)报告基因,该启动子与 5 个拷贝的 NF- κ B 共有转录反应元件和 3 个拷贝的 c-Rel 结合位点融合,因此,检测细胞上清的碱性磷酸酶(SEAP)的活性,即可反应细胞 NF- κ B 信号通路的激活;第二个报告基因:在 ISG54 最小启动子的控制下,插入表达 Lucia 萤光素酶基因的 报告基因,该基因编码分泌的萤光素酶,并与五个 IFN 刺激的响应元件结合在一起,因此,检测细胞上清的 Lucia 萤光素酶活性,即可检测干扰素调节因子(IRF)信号通路的激活水平。本研究结果表明,重组蛋白 rAvBD12613 可以显著激活 J774-Dual™细胞的 NF- κ B 和 IRF 信号通路。本研究通过可靠的 J774-Dual™报告细胞系,真实地评估了表达重组 β -防御素的重组乳酸菌裂解物对巨噬细胞的NF- κ B 和 IRF 信号通路的激活,方法重复性好,可靠性好,获得数据规范,结果可信。

本研究发现重组 β -防御素rAvBD12613 可在体外可诱导较高水平的 IL-12 和 IFN- γ , 同时又可诱导产生较高水平的 IL-10。IL-12 和 IFN- γ 属于典型的 Th1 型细胞因子,主要功能是促进免疫应答,促进淋巴细胞和巨噬细胞的发育和分化,同时又能抑制 Treg 型细胞因子的分泌(LI et al., 2020)。而 IL-10 是典型的 Treg 型细胞因子,主要功能是抑制 Th1 型免疫应答,抑制炎性细胞因子的产生和释放,进行免疫负调节作用(ROMAN et al., 2018; 马兵 等, 2005)。现代免疫学表明,IL-10 的生物学作用具有惊人的多面性和两面性,IL-10 抑制性作用的靶细胞包括淋巴细胞,单核细胞,巨噬细胞,肥大细胞,中性粒和嗜酸性细胞(倪志宇,2005),抑制炎症介质的释放,阻碍 Th1 免疫反应,抗原呈递,同时具有免疫刺激作用。因此,IL-10 是抗炎因子,又对机体免疫调节具有重要作用。与本研究结果相比较,重组 β -防御素 rAvBD12613 可激活机体免疫应答的同时又能维持免疫调节稳态。

在哺乳动物中,CD28 与 CD80 或 CD86 均属于共刺激分子,它们相互作用为 T 细胞活化提供了共刺激信号,导致活化的 T 细胞导致 IL-2 基因和蛋白质表达增加。T 细胞活化需要通过 APC 表面分子和 T 细胞之间的相互作用传递的共刺激信号(GREENWALD et al., 2005)。APC 上两个最重要的细胞共刺激分子是 CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2),它们都属于 B7 家族。为了发挥它们的共刺激活性,CD80 和 CD86 通过与 T 细胞上的受体 CD28 结合,触发活化 T 细胞产生 IL-2 是至关重要的,而 IL-2 是诱导 T 细胞增殖的细胞因子(CARRENO et al.,2002; SHARPE et al.,2002; WANG et al.,2004)。众所周知,某些促细胞分裂剂(例如 PHA)可以诱导 T 细胞产生 IL-2(KIM et al.,2006)。尽管 IL-2 在幼稚 T 细胞上的主要作用是促进 Ag 活化后的增殖(LAN et al.,2008),但它也可以诱导活化 T 细胞的凋亡(ZAMBRICKI et al.,2005)。此外,还已知 IL-2 在其他免疫细胞上发挥多种生物学作用,包括 NK 细胞(BECKNELL et al.,2005),B 细胞(ARMITAGE et al.,1995)和单核细胞(CIVALLERO et al.,2000)。与本研究结果相比较,重组 β -防御素rAvBD12613 在体外还可诱导较高水平的 CD80 和 CD86,说明重组 β -防御素rAvBD12613 有助于抗原提呈 APC 和 T 细胞的活化和及其参与免疫应答的激活。

第四章 重组 β -防御素作为新城疫活疫苗免疫佐剂的初步研究

为了验证重组 β 防御素 rAvBD12613 的免疫佐剂功能, 将重组 β -防御素作为新城疫活疫苗免疫佐剂, 检测血清中细胞因子的含量、鸡外周血单个核细胞 (PBMCs) 和外周血白细胞的增殖活性及抗体滴度等免疫指标。动物实验结果表明: 在重组禽 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂活疫苗试验中, 注射免疫 1 周后, 显著提高了实验组鸡血清 IL-4 和 IL-1 β 表达水平, 而 IL-10 和 IFN- γ 的血清含量差异不显著; 与野生菌对照组及活疫苗对照组相比, 在免疫 3 周攻毒 1 周后, 显著提高了实验组的抗体水平; 免疫 3 周及攻毒 1 周后, 极显著提高了实验组鸡外周血单个核细胞 (PBMCs) 的增殖活性; 免疫 3 周及攻毒 1 周后, 显著提高了实验组鸡外周血单个核细胞 (PBMCs) 的增殖活性或细胞活性。

4.1 材料

4.1.1 毒株、动物及疫苗

新城疫油乳剂灭活疫苗、新城疫活疫苗 (Lasota 株) 均购自哈尔滨维科生物有限公司; 新城疫病毒强毒株 (F48E9) 由本实验室保存; 1 日龄 SPF 雏鸡购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物实验中心。

4.1.2 主要试剂与仪器

1% 甲醛溶液、磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4)、Tween-80, Span-80, 白油 (10 号, 化妆品级); Lasota 株病毒尿囊液 (HA 效价在 $1:2^7$ 至 $1:2^{10}$)。Cell Counting Kit-8 (购自日本 Dojindo 公司); 恒温培养箱为 Thermo Scientific 公司产品; 恒温水浴锅为上海精宏实验设备有限公司产品; 超净工作台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品。

4.2 方法

4.2.1 新城疫活疫苗、重组 β -防御素免疫佐剂制备及注射剂量

lasota 株 1000 羽份冻干苗用 PBS 稀释成 40 mL (40 μ L/羽份), 每只 SPF 鸡注射活苗 50 μ L 和重组 β -防御素蛋白 rAvBD12613 100 μ L (按照 2.4 的方法制备)。注射前, 将 50 μ L 活苗和重组 β -防御素蛋白 rAvBD12613 100 μ L 混合后肌肉注射。

4.2.2 动物实验设计方案

采用简单随机分组的方法将 1 日龄 SPF 鸡分为空白对照组、空载体对照组、疫苗对照组和注射免疫组共 4 组, 每组 10 只。各组在 10 日龄时进行免疫; 每周采集血液, 制备血清; 免疫 2 周和 3 周时, 采集抗凝血, 制备外周血单个核细胞 (PBMCs); 免疫后第 3 周, 口服给予 1000 个

ELD₅₀ 的 F48E9-NDV 超强毒株。攻毒后每天观察各组 SPF 鸡的发病状态，1 周后捕杀。

4.2.3 血凝试验和血凝抑制试验检测血清抗体滴度

4.2.3.1 红血球的制备

采集新鲜 SPF 成年鸡抗凝血，第 1 次离心：500g，5min，去除上层白细胞血浆层等；加入 PBS 或生理盐水，颠倒混匀；第 2 次离心：500g，5min。去除上层血浆层等，加入 PBS 或生理盐水，颠倒混匀；第 3 次离心：400g，10min，去除上层清；40 mL 生理盐水或 PBS 加入 200 μ L 红细胞泥，颠倒混匀，即得 0.5%鸡红细胞悬液，用前摇匀。

4.2.3.2 血凝试验（HA 试验）

① 准备 96 孔血凝板，用排枪每孔加入 50 μ L PBS（生理盐水）；在第 1 列每孔加入 Lasota 株病毒尿囊液 50 μ L，重复 5 排（5 个重复）。更换吸头，从第 1 列吸入 50 μ L，反复吹吸 2 到 3 次，再次吸入 50 μ L 加入到第 2 列，反复吹吸 2 到 3 次，再次吸入 50 μ L 加入到第 3 列，依次操作，进行 2 倍倍比稀释，从第 1 列到第 11 列逐次稀释，到第 11 列稀释完成后，吸入 50 μ L 连同吸头一起弃去，第 12 列为空白对照。

② 每孔加入 50 μ L 配制好的 0.5%鸡红细胞悬液，然后置于 37℃温箱或者室温反应 30 min 左右，进行判读。判读标准，以红细胞完全凝集的病毒的最高稀释倍数，称之为病毒的血凝效价，即病毒的 HA 效价。将原病毒尿囊液进行稀释（红细胞完全凝集的病毒的最高稀释倍数，进行稀释），获得的病毒稀释液的浓度为 1 个血凝单位的病毒。

③ 根据 Lasota 株病毒尿囊液的 HA 效价，配制 4 单位病毒稀释液和 8 单位病毒稀释液备用。

4.2.3.3 血凝抑制试验（HI 试验）

① 准备 96 孔血凝板，第 1 列每孔加入 8 单位病毒稀释液，第 2 列至第 11 列每孔加入 50 μ L 的 4 单位病毒稀释液，第 12 列作为阴性对照。

② 第 1 列每孔加入 50 μ L 待测血清，每 1 排对应 1 个被检血清，更换新吸头，从第 1 列到第 11 列按照上述方法逐次稀释，进行 2 倍倍比稀释，到第 11 列稀释完成后，吸入 50 μ L 连同吸头一起弃去，第 12 列为对照（阴性血清对照）。

③ 每孔加入 50 μ L 配制好的 0.5%鸡红细胞悬液，然后置于 37℃温箱或者室温反应 30 分钟左右，进行判读。判读标准，以红细胞凝集作用被完全抑制的血清的最高稀释倍数，称之为血清的抗体效价，即血清的 HI 效价（ND 的血凝抑制抗体效价）。抗体效价用血清稀释倍数表示为 1:2ⁿ（n 为以 100%的红细胞凝集作用被完全抑制的血清的最高稀释倍数的孔数），或用 1:2ⁿ 的负对数表示为 nLog₂。

4.2.4 ELISA 检测血清细胞因子的含量

根据 ELISA 试剂盒说明书检测，酶标仪在 450 nm 波长测量的光密度值（OD 值）。

4.2.5 PBMCs 和外周血白细胞的活性检测

4.2.5.1 PBMCs 和外周血白细胞的制备

① 采集鸡新鲜抗凝血（不超过两小时，3.5%柠檬酸钠抗凝）。

② 向 15 mL 离心管中先加入 4 mL 分离液 I（1.119 g/mL）再缓慢加入 2 mL 分离液 II（1.077-1.083 g/mL）。取 3 至 4 mL（不大于 5 mL）抗凝血，缓慢加入到分离液 II 上，水平转子 800 g，离心 5 min。

③ 用 1 mL 移液枪将上层血浆等吸出，将上层外周血单个核细胞层（PBMCs 层）吸出放入 15 mL 离心管中，将下层粒细胞层（PMNCs 层）吸出放入另一个 15 mL 离心管中。

④ 分别加入 10 mL 洗涤液水平转子 800 g，离心 10 min。

⑤ 弃上清，PMNCs 加入 2 mL 红细胞裂解液，室温放置 2 min，水平转子 800 g，离心 10 min 后弃上清，加入 5 mL 洗涤液，水平转子 800 g，离心 10 min，弃上清。向 PMNCs 与 PBMCs 分别加入 4 mL 稀释液，重悬。

⑥ 用细胞计数仪（Counterstar）测 PBMCs 浓度，稀释至约为 5×10^5 - 1×10^6 cell/mL 的 PBMCs（PBMCs 悬液）

⑦ 将部分等体积的 PBMCs 与 PMNCs 混匀一起，即为外周血白细胞，用细胞计数板计数混合液细胞浓度，稀释至约为 5×10^5 - 1×10^6 cell/mL 的外周血白细胞。

4.2.5.2 PBMCs 和外周血白细胞的细胞计数

将制备的外周血单个核细胞（PBMCs）和外周血白细胞进行胎盼兰染色，确保活的 PBMCs 或外周血白细胞维持在 5×10^5 个/mL 至 1×10^6 个/mL。

4.2.5.3 PBMCs 和外周血白细胞增殖试验：

将各组制备的 PBMCs 和外周血白细胞调整细胞密度为一固定数值（确保活的 PBMCs 或外周血白细胞维持在 5×10^5 至 1×10^6 个/mL，每孔 100 μ L 细胞），以便进行增殖活性比较。在铺有 PBMCs 或外周血白细胞的 96 孔板中，每孔加入细胞增殖刺激物 ConA 和 PMA 混合液 20 μ L（ConA 50 μ g/mL 及 PMA 1 μ g/mL 各 10 μ L，工作浓：ConA 5 μ g/mL + PMA 100 ng/mL），将培养板在培养箱孵育 48 h，然后向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，恒温培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

4.2.5.4 NDV 攻毒后的 PBMCs 和外周血白细胞活性检测

将各组制备的 PBMCs 和外周血白细胞调整细胞密度为一固定数值（确保活的 PBMCs 或外周血白细胞维持在 5×10^5 至 1×10^6 个/mL，每孔 100 μ L 细胞），每孔加 80 个 HA 单位的 NDV（Lasota 株尿囊液）10 μ L，将培养板在培养箱孵育 48 h，然后向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，恒温培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

4.2.5.5 LPS 激活下 PBMCs 的增殖活性检测

将各组制备的 PBMCs 调整细胞密度为一固定数值（确保活的 PBMCs 或外周血白细胞维持在 5×10^5 至 1×10^6 个/mL，每孔 100 μ L 细胞），在铺有 PBMCs 的 96 孔板中，每孔加 LPS 10 μ L 激活剂：LPS 浓度为 10 μ g/mL（工作浓度 LPS 1 μ g/mL），将培养板在培养箱孵育 72 h，向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，将培养板在培养箱内孵育 4 h，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

4.2.5.6 LPS 激活下外周血白细胞增殖活性检测

将各组制备的外周血白细胞调整细胞密度为一固定数值（确保活的 PBMCs 或外周血白细胞维持在 5×10^5 至 1×10^6 个/mL，每孔 100 μ L 细胞），每孔加 LPS（Toll-like receptor 激动剂）10 μ L：LPS 浓度为 10 μ g/mL（工作浓度 LPS 1 μ g/mL），将培养板在培养箱孵育 72 h，向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液，将培养板在培养箱内孵育 4 h，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

4.3 结果

4.3.1 ELISA 检测血清中细胞因子

采用 ELISA 的检测方式检测血清中的细胞因子含量，检测结果表明，免疫 1 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组与疫苗组相比较，IL-10、IFN- γ 的含量差异不显著， $P > 0.05$ ；而 IL-4 和 IL-1 β 的含量，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组显著高于疫苗对照组， $P < 0.05$ 。（见图 4.1a,b,c,d）

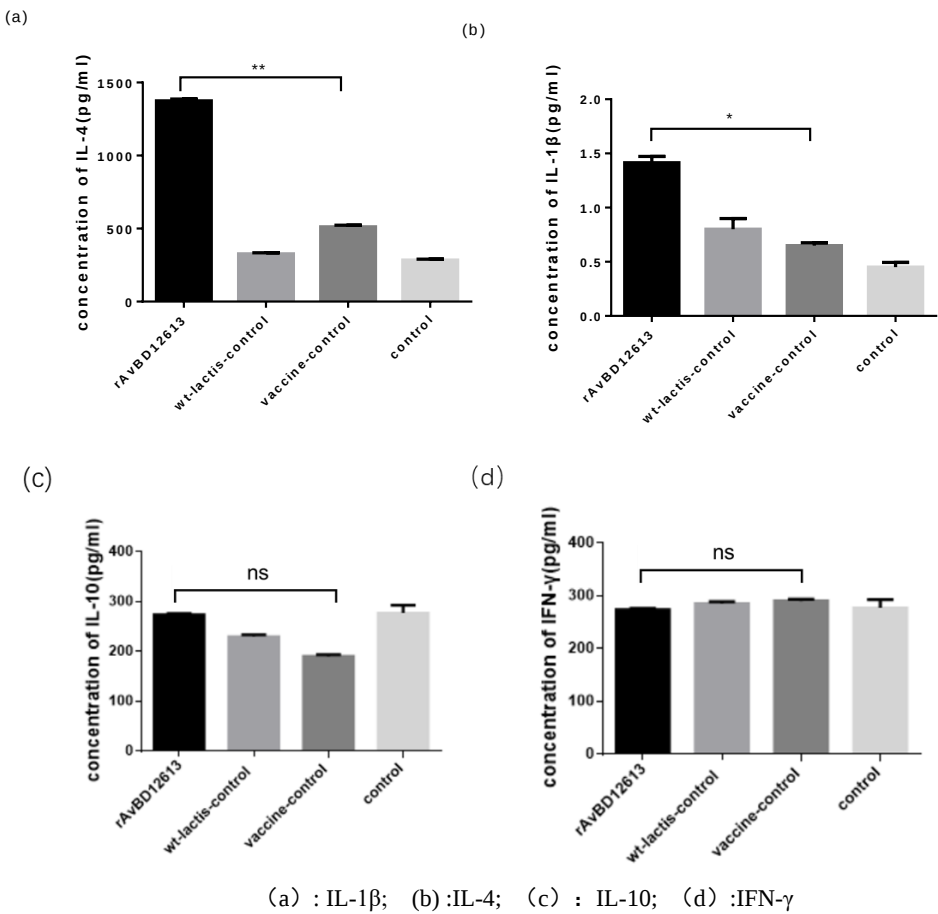
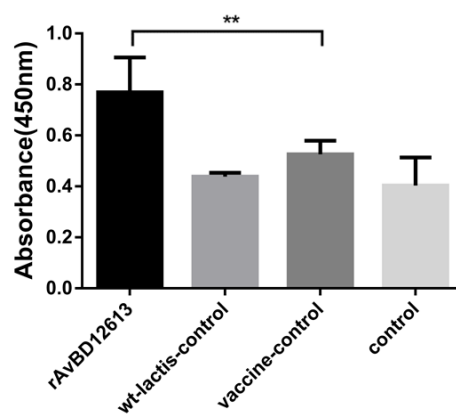


图 4.1 免疫 1 周后血清中细胞因子的分泌量

Fig 4.1 Cytokine secretion in serum after one week of immunization

4.3.2 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性

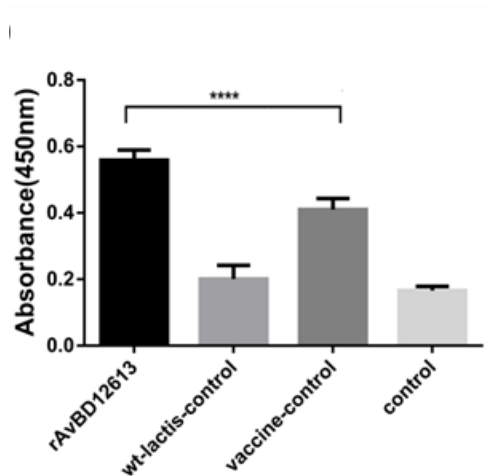
按照 4.1.8.2 和 4.1.8.3 的方法检测 PBMCs和外周血白细胞在ConA 和 PMA 联合激活时的增殖活性。结果表明：免疫 3 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极显著高于疫苗对照组（无佐剂疫苗对照组）， $P<0.01$ ，见图 4.2；免疫 3 周攻毒 1 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极其显著高于疫苗对照组（无佐剂疫苗对照组）， $P<0.0001$ ，见图 4.3；并且免疫 3 周攻毒 1 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血白细胞的增殖活性极其显著高于疫苗对照组（无佐剂疫苗对照组）， $P<0.0001$ ，见图 4.4；试验结果说明，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs和外周血白细胞增殖活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



ConA 和 PMA 混合液刺激 PBMCs

图 4.2 免疫 3 周后 PBMCs 的增殖活性

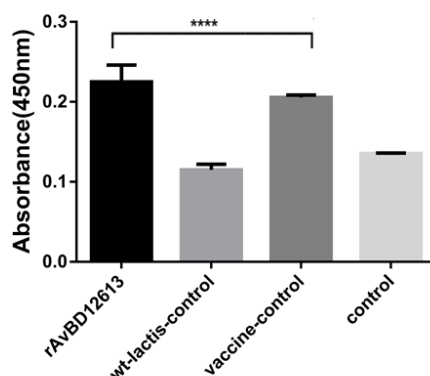
Fig 4.2 Proliferative activity of peripheral blood mononuclear cells after three weeks of immunization



ConA 和 PMA 混合液刺激 PBMCs

图 4.3 免疫 3 周攻毒后一周 PBMCs 的增殖活性

Fig 4.3 Proliferative activity of peripheral blood mononuclear cells one week after three weeks of challenge



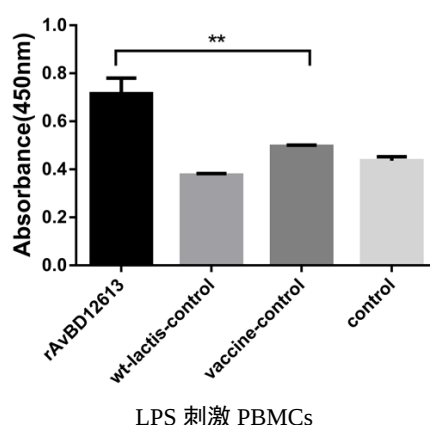
ConA 和 PMA 混合液刺激外周血白细胞

图 4.4 免疫 3 周攻毒后 1 周外周血白细胞的增殖活性

Fig 4.4 Proliferative activity of peripheral blood leukocytes one week after three weeks of challenge

4.3.3 LPS 激活 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性检测

按照 4.1.8.5 和 4.1.8.6 的方法检测 PBMCs 和外周血白细胞在 LPS 激活时的增殖活性 (LPS 主要激活 B/DC/M Φ 等 APC 细胞增殖)。结果表明: 免疫 3 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.01$, 见图 4.5; 免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.01$, 见图 4.6; 并且免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血白细胞的增殖活性显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.01$, 见图 4.7; 试验结果说明, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



LPS 刺激 PBMCs

图 4.5 免疫 3 周后 PBMCs 的增殖活性

Fig 4.5 Proliferative activity of peripheral blood mononuclear cells after three weeks of immunization

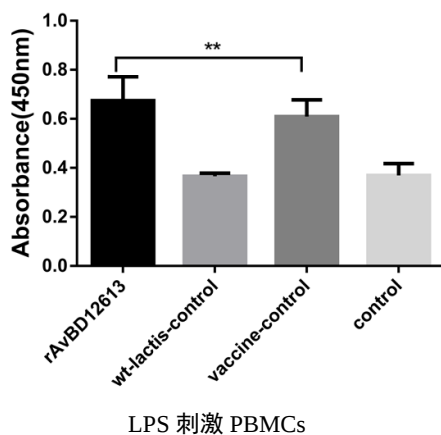


图 4.6 免疫 3 周攻毒后 1 周 PBMCs 的增殖活性

Fig 4.6 Proliferative activity of peripheral blood mononuclear cells one week after three weeks of challenge

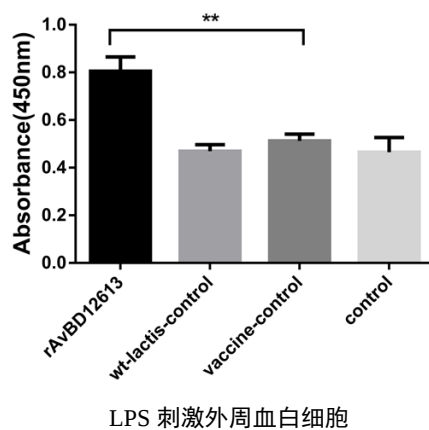
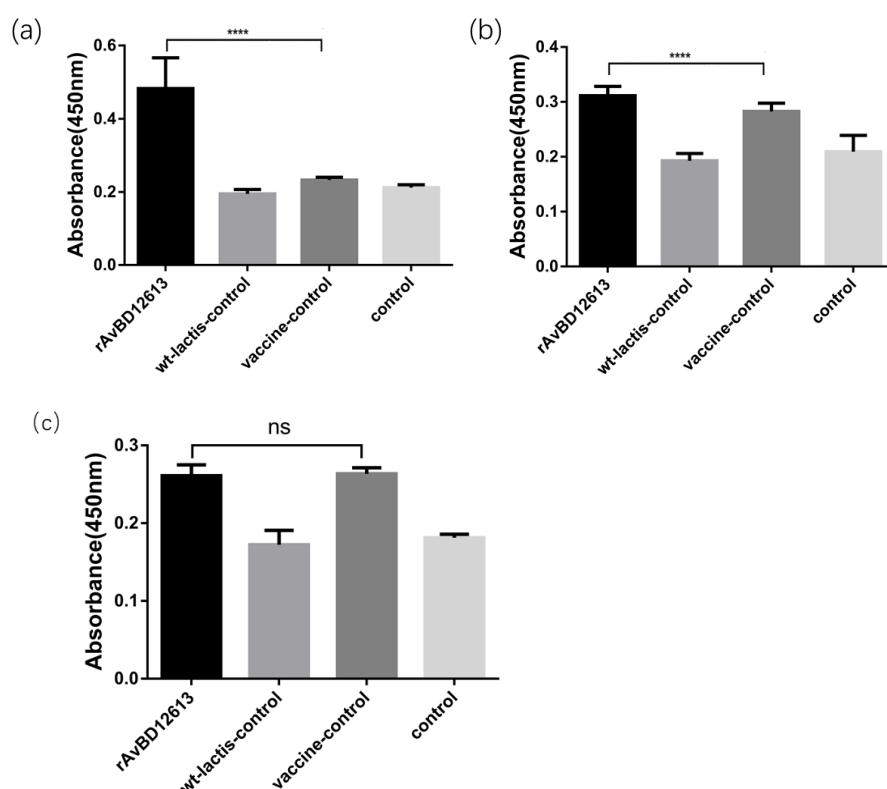


图 4.7 免疫 3 周攻毒后 1 周外周血白细胞增殖活性

Fig 4.7 Proliferative activity of peripheral blood leukocytes one week after three weeks of challenge

4.3.4 NDV 攻毒 PBMCs 和外周血白细胞后增殖活性检测

按照 4.1.8.4 的方法检测 PBMCs 和外周血白细胞攻毒 NDV 病毒 48 小时后,直接检测 PBMCs 和外周血白细胞的增殖活性。结果表明:免疫 3 周后,重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极其显著高于疫苗对照组(无佐剂疫苗对照组), $P<0.0001$,见图 4.8a;免疫 3 周攻毒 1 周后,重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极其显著高于疫苗对照组(无佐剂疫苗对照组), $P<0.0001$,见图 4.8b;但是免疫 3 周攻毒 1 周后,重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血白细胞的增殖活性与疫苗对照组(无佐剂疫苗对照组)差异不显著, $P>0.05$,见图 4.8c;试验结果说明,重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的抗 NDV 活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



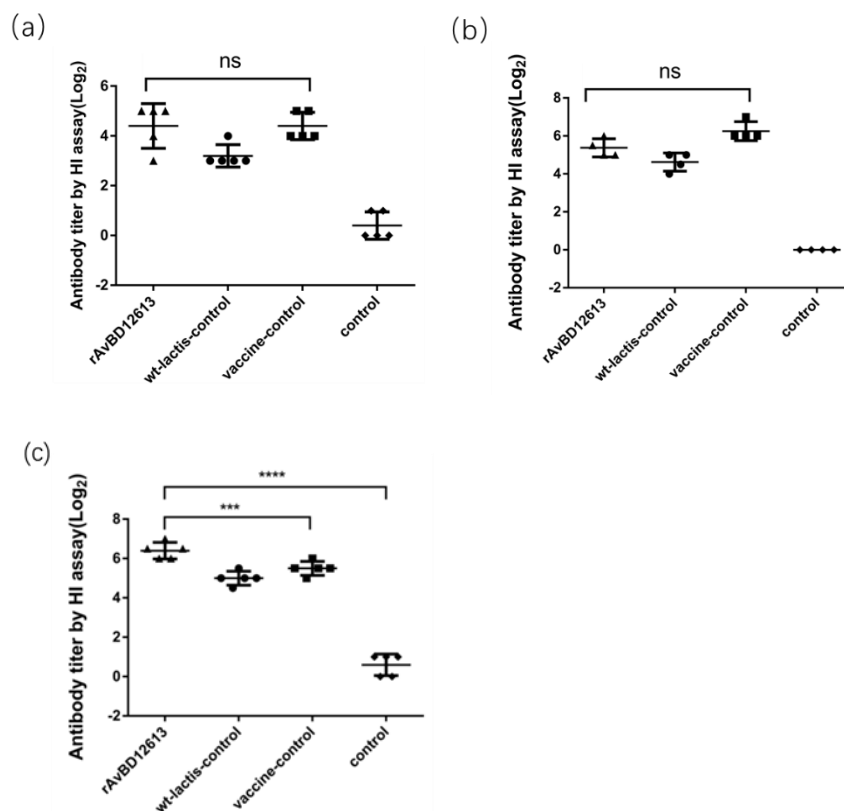
(a): 免疫 3 周后 NDV 刺激 PBMCs; (b): 免疫 3 周后攻毒 1 周 NDV 刺激 PBMCs; (c): 免疫 3 周后攻毒 1 周 NDV 刺激外周血白细胞

图 4.8 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性检测

Fig 4.8 Detection of proliferative activity of PBMCs and peripheral blood leukocytes

4.3.5 HA 和 HI 试验检测血清抗体滴度

按照 4.1.6 方法检测各组血清 ND 抗体滴度。结果表明：免疫 2 周和免疫 3 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 ND 抗体滴度与疫苗对照组(无佐剂疫苗对照组)比较差异不显著， $P>0.05$ ，见图 4.9a 和图 4.9b；但是免疫 3 周攻毒 1 周后，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 ND 抗体滴度极其显著高于疫苗对照组（无佐剂疫苗对照组）， $P<0.0001$ ，见图 4.9c。试验结果说明，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的抗 NDV 活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



(a) :免疫 2 周; (b) :免疫 3 周; (c) : 免疫 3 周后攻毒 1 周

图 4.9 血清中抗体滴度测定检测

Fig 4.9 Detection of antibody titer in serum

4.4 讨论

本研究通过动物试验发现，肌肉注射重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂的新城疫活疫苗后，首先可以诱导机体产生抗炎细胞因子 IL-4 以及促炎细胞因子 IL-1 β 。白介素 4 属于 TH2 细胞亚型，由活化的 T 细胞产生，是一种多效淋巴因子，在免疫系统中起重要作用。IL-4 能够活化 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞等，IL-4 是巨噬细胞的趋化因子，促进巨噬细胞呈递抗原，但抑制单核细胞 IL-1、TNF 和 IL-6 的产生(YAO et al., 2020)。IL-1 β 是一种促炎细胞因子，由单核巨噬细胞产生，它可以促进 β -防御素 4 的产生，局部低浓度的 IL-1 β 可协同刺激 APC 和 T 细胞活化，促进 B 细胞增殖和分泌抗体(DING et al., 2020)。本研究肌肉注射重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂的新城疫活疫苗后，可以同时诱导机体产生抗炎因子 IL-4 以及促炎细胞因子 IL-1 β ，说明注射重组 β -防御

素 rAvBD12613 免疫佐剂可激活机体免疫应答的同时又能维持免疫调节稳态, 这与现代适度免疫调节的理念相一致, 进一步说明了重组 β -防御素 rAvBD12613 作为免疫佐剂具有提高免疫应答能力, 提高免疫力而又不具有致炎特性 (不会导致机体免疫系统的过度激活)。因此, 本研究为天然免疫佐剂的研究奠定了基础。

T 细胞、B 细胞表面具有识别抗原的受体和有丝分裂原受体, 在特异性抗原刺激下可使相应淋巴细胞克隆发生增殖。植物血凝素 (PMA)、刀豆蛋白 A (ConA), 作为多克隆刺激剂可选择性地刺激 T 细胞增殖; 脂多糖 (LPS) 则刺激 B 细胞和 APC 细胞发生增殖。本研究注射重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血单个核细胞 (PBMCs) 和外周血白细胞在 PMA 和 ConA 联合刺激及 LPS 刺激下, 增殖活性均能显著高于疫苗对照组, 说明注射重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂可以提高外周血单个核细胞 (PBMCs) 和外周血白细胞中 T 细胞、B 细胞及 APC 细胞的增殖活性, 进而提高了机体的免疫应答能力。

免疫佐剂是须与抗原结合使用, 可提高抗原的免疫应答水平。本研究制备的重组 β -防御素 rAvBD12613 作为免疫佐剂可激活机体免疫应答, 并且在体内外的免疫调节特性相一致, 激活机体免疫应答的同时又能维持免疫调节稳态。因此, 本研究构建的表达重组 β -防御素 rAvBD12613 重组乳酸菌有望成为一种新型的、有潜力的天然免疫佐剂或免疫增强剂。本研究为重组 β -防御素作为疫苗佐剂和免疫增强剂的研究提供了实验依据, 对未来畜牧业的绿色食品发展具有重大现实意义。

第五章 重组 β -防御素作为新城疫油乳剂灭活疫苗免疫佐剂的研究

控制新城疫的疫苗主要是弱毒活疫苗和灭活疫苗，通常都需要使用免疫佐剂来提高疫苗的免疫效力。

为了验证重组 β 防御素 rAvBD12613 的免疫佐剂功能，本研究将重组 β -防御素作为新城疫活疫苗免疫佐剂，在免疫 3 周攻毒 1 周后，可以显著提高实验组的抗体水平；免疫 3 周及攻毒 1 周后，可以显著提高实验组鸡外周血单个核细胞（PBMCs）和白细胞的增殖活性，显著高于灭活疫苗对照组。结果表明，重组禽 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂在新城疫活疫苗和灭活疫苗试验中均具有较好的免疫佐剂活性。

5.1 材料

5.1.1 毒株、动物及疫苗

参考 4.1.1

5.1.2 主要试剂与仪器

鸡新城疫油乳剂灭活疫苗及疫苗油乳剂由哈尔滨维科公司提供（疫苗油乳剂由白油+硬脂酸铝+Span-80 组成，三者按照一定比例配制而成，已灭菌备用，为 W/O 型疫苗，配比为 1:2，即制备疫苗油乳剂疫苗时，油相（油乳剂）为 2 份，水相（灭活的抗原液）为 1 份，两相混合经乳化而成 W/O 型油乳剂疫苗成品）；Tween-80（日本进口分装，高压灭菌备用，用于制备水相）；由其它仪器与试剂参考 4.1.2。

5.2 方法

5.2.1 重组 β -防御素免疫佐剂新城疫灭活疫苗的制备及注射剂量

重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗的制备：

（1）制备重组 β -防御素 rAvBD12613 油乳剂：水相的制备（将 2.4 制备的重组 β -防御素 rAvBD12613 菌体裂解混合物中按照比例加入制备的表面活性剂 Tween-80，37℃温浴 30 分钟，摇匀后静止备用）；油相制备（疫苗油乳剂由白油+硬脂酸铝+Span-80 三者按照一定比例配制而成，已灭菌备用）；乳化（油相（油乳剂）为 2 份，水相（加 Tween-80 的重组 β -防御素 rAvBD12613 液）为 1 份，两相混合经乳化而成 W/O 型油乳剂）。

（2）重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗的制备：按照 1:1 比例将鸡新城疫油乳剂灭活疫苗 1 份加入 1 份重组 β -防御素 rAvBD12613 油乳剂，经乳化器重新破乳而乳化，从而获得重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗。

(3) 注射免疫:

重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗试验组,注射剂量为 0.6 mL/羽);新城疫油乳剂灭活疫苗对照组,注射剂量为 0.3 mL/羽。本试验确保了免疫佐剂组抗原注射量与疫苗对照组抗原注射量完全相同的情况下,免疫佐剂组的免疫佐剂注射量为 100 μ L/羽(重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗试验组,注射剂量为 0.6 mL/羽,实际注射抗原量为 0.3 mL/羽(与新城疫油乳剂灭活疫苗对照组的注射剂量为 0.3 mL/羽,免疫剂量保持一致;免疫佐剂注射量为 0.6 mL/羽,其中免疫佐剂的含量为 100 μ L)。

5.2.2 动物实验设计方案

参考 4.2.2, 1 日龄进行免疫,免疫佐剂新城疫油乳剂灭活疫苗试验组,注射剂量为 0.6 mL/羽;新城疫油乳剂灭活疫苗对照组,注射剂量为 0.3 mL/羽。

5.2.3 血凝试验和血凝抑制试验检测血清抗体滴度

5.2.3.1 红血球的制备

参考 4.2.3.1

5.2.3.2 血凝试验 (HA 试验)

参考 4.2.3.2

5.2.3.3 血凝抑制试验 (HI 试验)

参考 4.2.3.3

5.2.4 ELISA 检测血清细胞因子的含量

参考 4.2.4

5.2.5 PBMCs 和外周血白细胞的增殖活性检测

5.2.5.1 PBMCs 和外周血白细胞的制备

参考 4.2.5.1

5.2.5.2 PBMCs 和外周血白细胞的细胞计数

参考 4.2.5.2

5.2.5.3 PBMCs 和外周血白细胞增殖试验

参考 4.1.8.3

5.2.5.4 LPS 激活下 PBMCs 的增殖活性检测

参考 4.2.5.5

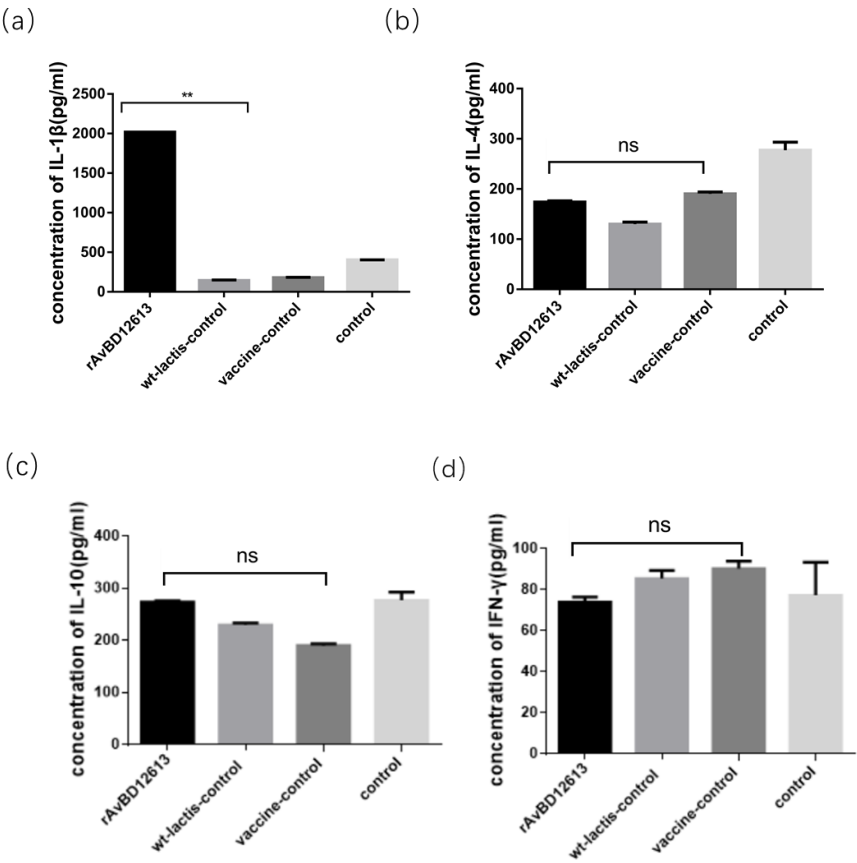
5.2.5.5 LPS 激活下外周血白细胞的增殖活性检测

参考 4.2.5.6

5.3 结果

5.3.1 ELISA 检测血清中细胞因子

采用 ELISA 检测血清中的细胞因子含量，检测结果表明，免疫 1 周后，重组β-防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组与疫苗组相比较，IL-10、IFN-γ 和 IL-1β 的含量差异不显著， $P>0.05$ ；而 IL-4 的含量，重组β-防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组显著高于疫苗对照组， $P<0.05$ 。（见图 5.1 a,b,c,d）



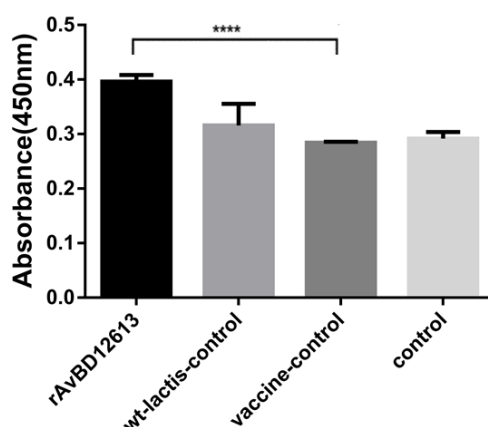
(a) :IL-1β; (b) :IL-4; (c) : IL-10; (d) :IFN-γ

图 5.1 免疫 1 周后血清中细胞因子的分泌量

Fig 5.1 Cytokine secretion in serum after one week of immunization

5.3.2 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性

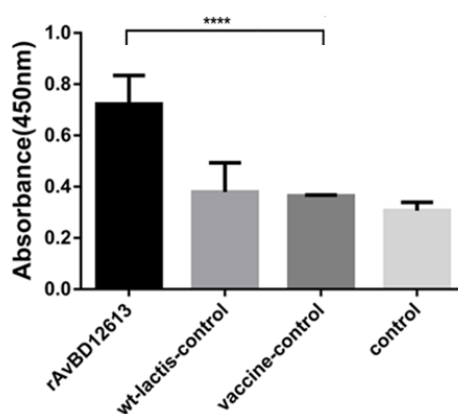
按照 4.1.8.2 和 4.1.8.3 的方法检测 PBMCs 和外周血白细胞在 ConA 和 PMA 联合激活时的细胞增殖活性, 结果表明: 免疫 3 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血单个核细胞 (PBMCs) 的增殖活性极显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.0001$, 见图 5.2; 免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极其显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.0001$, 见图 5.3; 并且免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血白细胞的增殖活性极其显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.0001$, 见图 5.4。试验结果说明, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



ConA 和 PMA 混合液刺激 PBMCs

图 5.2 免疫 3 周后 PBMCs 的增殖活性

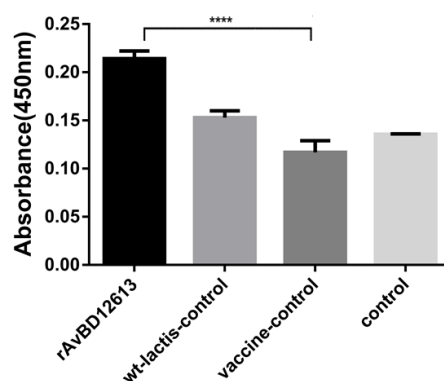
Fig 5.2 Proliferative activity of peripheral blood lymphocytes after three weeks of immunization



ConA 和 PMA 混合刺激 PBMCs

图 5.3 免疫 3 周攻毒后 1 周 PBMCs 的增殖活性

Fig 5.3 Proliferative activity of peripheral blood lymphocytes one week after three weeks of challenge



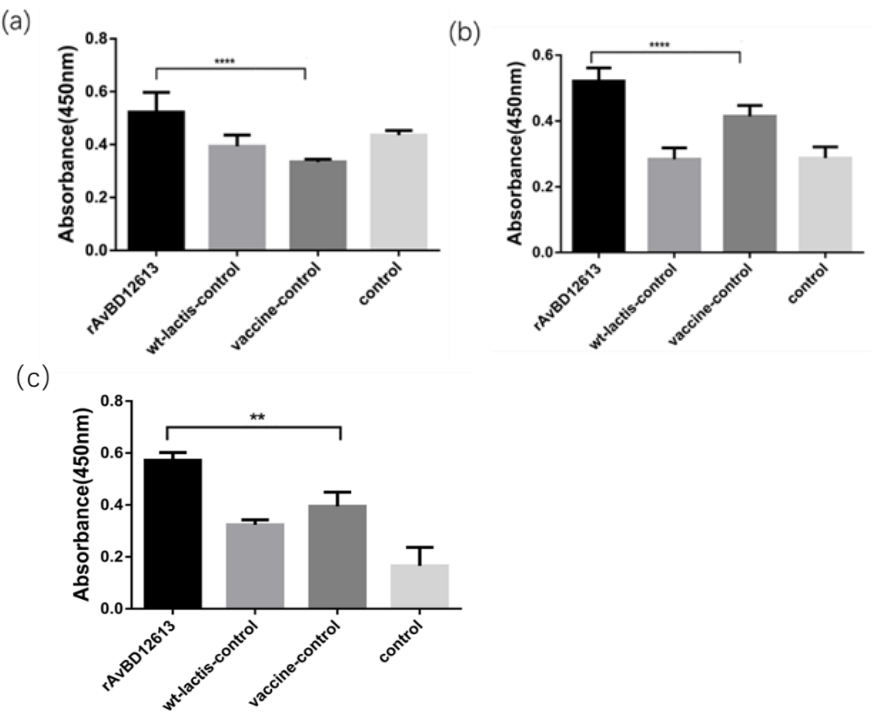
ConA 和 PMA 混合刺激外周血白细胞

图 5.4 免疫 3 周攻毒后 1 周外周血白细胞增殖活性

Fig 4.11 Lymphocyte proliferative activity one week after three weeks of challenge

5.3.3 LPS 激活 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性

按照 4.1.8.5 和 4.1.8.6 的方法检测 PBMCs 和外周血白细胞在 LPS 激活时的增殖活性 (LPS 主要激活 B/DC/M Φ 等 APC 细胞增殖), 结果表明: 免疫 3 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血单个核细胞 (PBMCs) 的增殖活性极显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.0001$, 见图 5.5a; 免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 的增殖活性极显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.0001$, 见图 5.5b; 并且免疫 3 周攻毒 1 周后, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的外周血白细胞的增殖活性显著高于疫苗对照组 (无佐剂疫苗对照组), $P < 0.01$, 见图 5.5c。试验结果说明, 重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性显著高于无佐剂疫苗对照组。



(a) :免疫 3 周后 LPS 刺激 PBMCs; (b) :免疫 3 周后攻毒 1 周 LPS 刺激 PBMCs; (c) : 免疫 3 周后攻毒 1 周 LPS 刺激外周血白细胞

图 5.5 PBMCs 和外周血白细胞增殖活性检测

Fig 4.12 Detection of proliferative activity of PBMCs and peripheral blood leukocytes

5. 3. 4 HA 和 HI 试验检测血清抗体滴度

按照 4.1.6 方法检测各组血清ND抗体滴度。结果表明：免疫 2 周和免疫 3 周后，重组β-防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 ND 抗体滴度与疫苗对照组(无佐剂疫苗对照组)比较差异不显著， $P>0.05$ ，见图 5.6a 和图 5.6b；但是免疫 3 周攻毒 1 周后，重组β-防御素 rAvBD12613 免疫佐剂组的 ND 抗体滴度显著高于疫苗对照组（无佐剂疫苗对照组）， $P<0.01$ ，见图 5.6 c。试验结果说明，重组β-防御素 rAvBD12613 免疫佐剂可以显著提高在病毒攻击时 NDV 的抗体滴度。

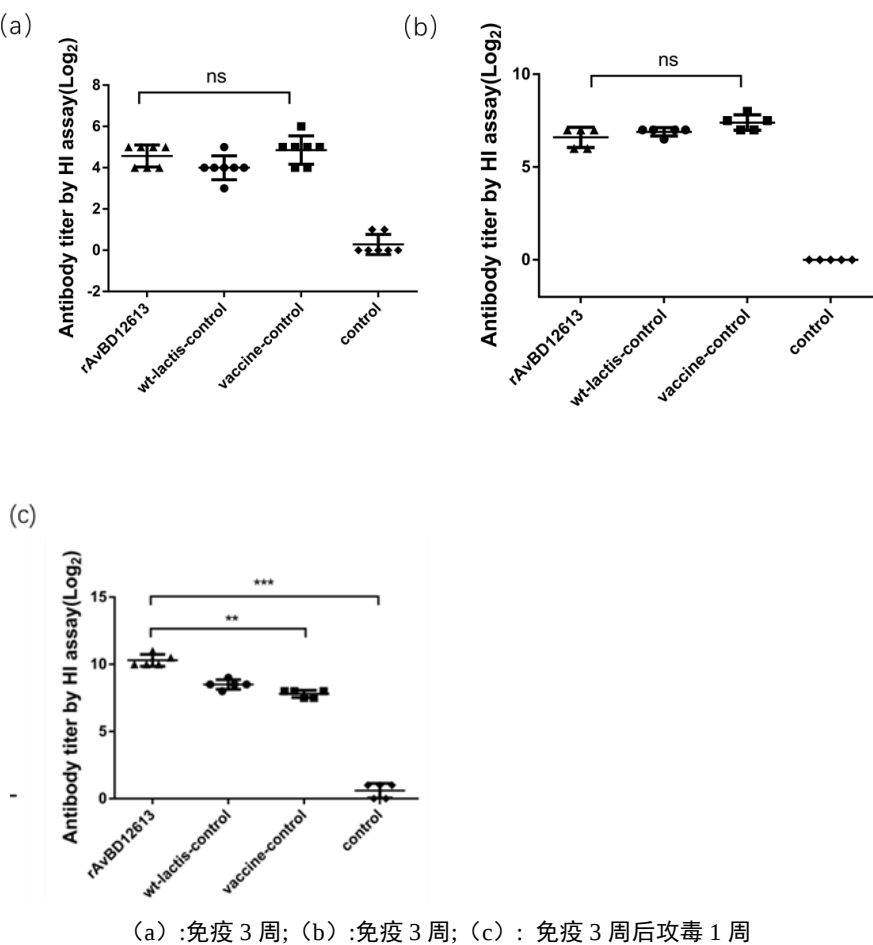


图 5.6 血清中抗体滴度测定检测

Fig 5.6 Detection of antibody titer in serum

5.4 讨论

控制新城疫的唯一方法是预防接种和生物安全措施。具有各种方案的活疫苗和杀死的疫苗可用于控制该疾病，但没有一种方法能够完全成功地预防该疾病。尽管活疫苗通常很便宜，但容易给药并获得高滴度却具有短暂的免疫力，这一问题可以通过用油佐剂灭活疫苗来克服(PELEG et al.,1993)。矿物油包水（W/O）乳剂佐剂被广泛用于各种灭活疫苗制剂。由于油乳剂的缓释及佐剂作用，大大提高了灭活疫苗的抗体滴度和高滴度免疫保护抗体的维持时间，油乳剂灭活疫苗是养禽业应用最广泛的一类疫苗，目前主要应用于流感疫苗、新城疫疫苗、传染性支气管炎疫苗等禽类主要疫病的防控。因此，基于新城疫活疫苗和新城疫灭活疫苗的广泛应用极其禽病疫苗的代表性，本研究进行了重组 β -防御素免疫佐剂新城疫疫苗的研究，为新型佐剂在其它疫苗中的扩展应用奠定基础。

本研究结果表明，重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂可以显著提高免疫动物的血清 IL-4 水平；重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂可以显著提高外周血单核细胞和外周血白细胞增殖活

性，并且重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂可以显著提高在病毒攻击时 NDV 的抗体滴度。灭活疫苗动物实验的免疫增强效果与重组 β -防御素 rAvBD12613 免疫佐剂活疫苗中免疫增强效果相似，进一步证实了体外免疫调节活性筛选试验结果的可靠性，三者又相互验证了重组 β -防御素 rAvBD12613 作为免疫佐剂的可行性。

本研究表达重组 β -防御素 rAvBD12613 的重组乳酸菌裂解物作为疫苗免疫佐剂和免疫增强剂的研究为新型天然免疫佐剂的研究提供了参考，对新型佐剂疫苗的研发和未来畜牧业的绿色食品发展具有重大现实意义。

第六章 全文结论

1. 本研究针对 5 种优化的编码禽 β -防御素的目的基因, 利用 3 种表达质粒和食品级宿主菌 NZ3900 株成功构建了 11 株表达禽 β -防御素的重组乳酸菌, 筛选出 5 株稳定表达目的蛋白的重组乳酸菌 (r-L. Lactis-AvBD1、r-L. Lactis-AvBD2、r-L. Lactis-p2103-AvBD6、r-L. Lactis-AvBD13、r-L. Lactis-nisRK-AvBD12613), 将其作为本研究下一步用于体外筛选和体内动物试验验证的候选重组乳酸菌。

2. 经过对重组乳酸菌裂解物体外免疫调节活性的检测, 筛选获得一株具有显著免疫调节活性的重组乳酸菌 rAvBD12613, 该菌株能够组合表达 4 种禽 β -防御素 (AvBD1、AvBD2、AvBD6 和 AvBD13)。

3. 组合表达 4 种禽 β -防御素的重组乳酸菌 rAvBD12613 裂解物作为免疫佐剂可以显著提高新城疫活疫苗和新城疫灭活疫苗的免疫效果, 表明该菌株具有良好的免疫佐剂和免疫增强剂活性。

参考文献

- 曹海鹏, 王红宁, 张安云, 杨鑫, 马炳存, 徐鹏卫, 丁梦蝶, 2014. 乳酸菌活载体疫苗研究进展. 中国畜牧兽医, 041(9): 258-264.
- 李睿, 白惠卿, 2005. IL-4 研究进展. 菏泽医学专科学校学报, (4): 91-92.
- 林琳, 任凤, 赵宝昌, 2006. BALB / c 小鼠金属硫蛋白-1 cDNA 基因在乳酸菌质粒表达载体 pNZ2 103 上的克隆. 中国微生物学杂志, (1): 29-31.
- 林炜明, 戴爱玲, 尹会方, 杨小燕, 2015. 人外周血巨噬细胞培养及功能鉴定%Culture and functional identification of macrophages from human peripheral blood. 中国免疫学杂志, 000(1): 86-89.
- 刘朝军 (综述), 沈定霞 (审校), 2011. 16SrDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用. 解放军医学院学报, 32(7): 774-776.
- 刘敏, 谢利波, 王群兴, 2014. IL-10 在病毒持续性感染中的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志, 30(2).
- 马兵, 夏照帆, 2005. 促/抗炎性细胞因子对外科脓毒症效应机制的研究进展. 中华医学杂志, 85(41): 2943-2947.
- 庞会利, 谈重芳, 蔡义民, 秦广雍, 2008. 乳酸菌分类鉴定方法的研究进展. 中国酿造, (6): 6-10.
- 王宏江, 谷新利, 2009. 畜禽免疫增强剂的研究现状. 青海畜牧兽医杂志, 39(2): 40-41.
- 湛剑龙, 胡萍, 陈韵, 李立郎, 朱秋劲, 王晓宇, 谢和, 2014. 功能性乳酸菌的应用研究. 食品安全质量检测学报, (4): 1002-1009.
- 周琳, 周光炎, 路丽明, 2012. IL-10 的双向免疫调节作用. 细胞与分子免疫学杂志, (10): 96-98+102.
- ALEXANDER D J, 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev Sci Tech, 19(2): 443. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0394>. DOI:10.1053/rvsc.2000.0394
- ARMITAGE R J, MACDUFF B M, EISENMAN J, PAXTON R and GRABSTEIN K H, 1995. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. J Immunol, 154(2): 483-490. <https://doi.org/10.1097/00007890-199501270-00027>. DOI: 10.1097/00007890-199501270-00027
- AROUS J B, DEVILLE S, PAL J K, BAKSI S, BERTRAND F and DUPUIS L, 2013. Reduction of Newcastle Disease Vaccine Dose Using a Novel Adjuvant for Cellular Immune Response in Poultry. Procedia Vaccinol, 7: 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2013.06.006>. DOI: 10.1016/j.provac.2013.06.006
- BANDAY A H, JEELANI S and HRUBY V J, 2015. Cancer vaccine adjuvants--recent clinical progress and future perspectives. Immunopharmacol Immunotoxicol, 37(1): 1-11. <https://doi.org/10.3109/08923973.2014.971963>. DOI: 10.3109/08923973.2014.971963.

- BECKNELL B and CALIGIURI M A, 2005. Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells. *Adv Immunol*, 86: 209-239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86006-1). DOI: 10.1016/S0065-2776(04)86006-1
- BOLOTIN A, WINCKER P, MAUGER S, JAILLON O, MALARME K, WEISSENBAACH J, E HRLICH S D and SOROKIN A, 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*, 11(5): 731-753. <https://doi.org/10.1101/gr-1697r>. DOI: 10.1101/gr-1697r.
- BONGERS R S, HOEFNAGEL M H, STARRENBURG M J, SIEMERINK M A, ARENDS J G, HUGENHOLTZ J and KLEEREBEZEM M, 2003. IS981-mediated adaptive evolution reverts lactate production by *ldhB* transcription activation in a lactate dehydrogenase-deficient strain of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 185(15): 4499-4507. <https://doi.org/10.1128/jb.185.15.4499-4507.2003>. DOI: 10.1128/jb.185.15.4499-4507.2003.
- CARRENO B M and COLLINS M, 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 20: 29-53. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806>. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806.
- CHAUDHRY A, DAS S R, HUSSAIN A, MAYOR S, GEORGE A, BAL V, JAMEEL S and RATH S, 2005. The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol*, 175(7): 4566-4574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4566>. DOI: 10.4049/jimmunol.175.7.4566.
- CIVALLERO M, BARNI S, NANO R and CAPELLI E, 2000. Dendritic cells and interleukin-2: cytochemical and ultrastructural study. *Histol Histopathol*, 15(4): 1077-1085. <https://doi.org/10.14670/HH-15.1077>. DOI: 10.14670/HH-15.1077.
- CRHANOVA M, HRADECKA H, FALDYNNOVA M, MATULOVA M, HAVLICKOVA H, SISK K F and RYCHLIK I, 2011. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Infect Immun*, 79(7): 2755-2763. <https://doi.org/10.1128/IAI.01375-10>. DOI: 10.1128/IAI.01375-10.
- CUPERUS T, COORENS M, van DIJK A and HAAGSMAN H P, 2013. Avian host defense peptides. *Dev Comp Immunol*, 41(3): 352-369. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.019>. DOI: 10.1016/j.dci.2013.04.019.
- DAS S C, ISOBE N and YOSHIMURA Y, 2011. Expression of Toll-like receptors and avian β -defensins and their changes in response to bacterial components in chicken sperm. *Poult Sci*, 90(2): 417-425. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00850>. DOI: 10.3382/ps.2010-00850.
- DERACHE C, ESNAULT E, BONSERGENT C, LE V Y, QUÉRÉ P and LALMANACH A C, 2009. Differential modulation of beta-defensin gene expression by *Salmonella Enteritidis* in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbred lines. *Dev Comp Immunol*, 33(9): 959-966. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.03.005>. DOI: 10.1016/j.dci.2009.03.005.

- DIAMOND G, BECKLOFF N and RYAN L K, 2008. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. *J Dent Res*, 87(10): 915-927. <https://doi.org/10.1177/154405910808701011>. DOI: 10.1177/154405910808701011.
- FREUND J, 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc*, (10): 130-148.
- DING S L, PANG Z Y, CHEN X M, LI Z, LIU X X, ZHAI Q L, HUANG J M and RUAN Z Y, 2020. Urolithin A attenuates IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage degradation via inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathways in rat articular chondrocytes. *J Inflamm (Lond)*, 17: 13. <https://doi.org/10.1186/s12950-020-00242-8>. DOI: 10.1186/s12950-020-00242-8.
- GEE K, GUZZO C, CHE M N F, MA W and KUMAR A, 2009. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 8(1): 40-52. <https://doi.org/10.2174/187152809787582507>. DOI: 10.2174/187152809787582507.
- GREENWALD R J, FREEMAN G J and SHARPE A H, 2005. THE B7 FAMILY REVISITED [J]. *annual review of immunology*, 23(1):515-548.
- HELLGREN O and EKBLOM R, 2010a. Evolution of a cluster of innate immune genes (beta-defensins) along the ancestral lines of chicken and zebra finch. *Immunome Res*, 6: 3. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-3>. DOI: 10.1186/1745-7580-6-3.
- HELLGREN O and SHELDON B C, 2011b. Locus-specific protocol for nine different innate immune genes (antimicrobial peptides: β -defensins) across passerine bird species reveals within-species coding variation and a case of trans-species polymorphisms. *Mol Ecol Resour*, 11(4): 686-692. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02995.x>. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.02995.x.
- HENRICH B, KLEIN J R, WEBER B, DELORME C, RENAULT P and WEGMANN U, Food-Grade Delivery System for Controlled Gene Expression in *Lactococcus lactis*. *Applied & Environmental Microbiology*, 68(11): 5429-5436.
- HERVÉ-GRÉPINET V, RÉHAULT-GODBERT S, LABAS V, MAGALLON T, DERACHE C, LAVERGNE M, GAUTRON J, LALMANACH A C and NYS Y, 2010. Purification and characterization of avian beta-defensin 11, an antimicrobial peptide of the hen egg. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(10): 4401-4409. <https://doi.org/10.1128/AAC.00204-10>. DOI: 10.1128/AAC.00204-10.
- HIGGS R, LYNN D J, GAINES S, MCMAHON J, TIERNEY J, JAMES T, LLOYD A T, MULCAHY G and O'FARRELLY C, 2005. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. *Immunogenetics*, 57(1-2): 90-98. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0777-3>. DOI: 10.1007/s00251-005-0777-3.
- HONG Y H, SONG W, LEE S H and LILLEHOJ H S, 2012. Differential gene expression profiles of β -defensins in the crop, intestine, and spleen using a necrotic enteritis model in 2 commercial broiler chicken lines. *Poult Sci*, 91(5): 1081-1088. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01>

948. DOI: 10.3382/ps.2011-01948.
- HUANG Y, LI Y, BURT D W, CHEN H, ZHANG Y, QIAN W, KIM H, GAN S, ZHAO Y, LI J, YI K, FENG H, ZHU P, LI B, LIU Q, FAIRLEY S, MAGOR K E, Du Z, HU X, GOODMAN L, TAHER H, VIGNAL A, LEE T, KIM K W, SHENG Z, AN Y, SEARLE S, HERRERO J, MAM G, RPMA C, FARAUT T, CAI Q, WEBSTER R G, ALDRIDGE J R, WARREN W C, BARTSCHAT S, KEHR S, MARZ M, STADLER P F, SMITH J, RHS K, ZHAO Y, REN L, FEI J, MORISSON M, KAISER P, GRIFFIN D K, RAO M, PITEL F, WANG J and LI N, 2013. The duck genome and transcriptome provide insight into an avian influenza virus reservoir species. *Nat Genet*, 45(7): 776-783. <https://doi.org/10.1038/ng.2657>. DOI: 10.1038/ng.2657.
- JANA S, DEB J K, 2014. Retraction note: strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(12): 5787. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5822-4>. DOI: 10.1007/s00253-014-5822-4.
- JEE P F, TIONG V, SHU M H, KHOO J J, WONG W F, ABDUL R R, ABUBAKAR S and CHANG L Y, 2017. Oral immunization of a non-recombinant *Lactococcus lactis* surface displaying influenza hemagglutinin 1 (HA1) induces mucosal immunity in mice. *PLoS One*, 12(1): e0187718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187718>. DOI: 10.1371/journal.pone.0187718.
- JIN M, IWAMOTO T, YAMADA K, SATSU H, TOTSUKA M and SHIMIZU M, 2011. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(7): 1283-1289. <https://doi.org/10.1271/bbb.110055>. DOI: 10.1271/bbb.110055.
- KIM H P, IMBERT J and LEONARD W J, 2006. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(5): 349-366. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.07.003>. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.07.003.
- KLEEREBEZEM M, BEERTHUYZEN M M, VAUGHAN E E, de VOS WM and KUIPERS O P, 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 63(11): 4581-4584.
- KOHLGRAF K G, PINGEL L C, DIETRICH D E and BROGDEN K A, 2010. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiol*, 5(1): 99-113. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.104>. DOI: 10.2217/fmb.09.104.
- KUSHIDA T, MAKINO T, TOMOMURA M, TOMOMURA A and SAKAGAMI H, 2011. Enhancement of Dectin-2 gene expression by lignin-carbohydrate complex from *Lentinus edodes* mycelia extract (LEM) in a mouse macrophage-like cell line. *Anticancer Res*, 31(4): 1241-1248.
- LALLOUETTE P, RICHOU R and RICHOU, 1968. [Immunologic adjuvants and staphylococcal anatoxin. Studies on the mode of action of saponin]. *Rev Immunol Ther Antimicrob*, 32(1):

- 1-9.
- LAN R Y, SELMI C and GERSHWIN M E, 2008. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2(IL-2). *JAutoimmun*, 31(1): 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.03.002>. DOI: 10.1016/j.jaut.2008.03.002.
- LEE Y and LEE T S, 2005. Enhancement in ex vivo phagocytic capacity of peritoneal leukocytes in mice by oral delivery of various lactic-acid-producing bacteria. *Curr Microbiol*, 50(1): 24-27. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4377-5>. DOI: 10.1007/s00284-004-4377-5.
- LIU L, ZHANG W, SONG Y, WANG W, ZHANG Y, WANG T, LI K, PAN Q, QI X, GAO Y, GAO L, LIU C, ZHANG Y, WANG Y, HE G, WANG X and CUI H, 2018. Recombinant *Lactococcus lactis* co-expressing OmpH of an M cell-targeting ligand and IBDV-VP2 protein provide immunological protection in chickens. *Vaccine*, 36(5): 729-735. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.027>. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.027>. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.12.027.
- LI J, LIN W, CHEN H, XU Z, YE Y and CHEN M, 2020. Dual-target IL-12-containing nanoparticles enhance T cell functions for cancer immunotherapy. *Cell Immunol*, 349: 104042. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104042>. DOI: 10.1016/j.cellimm.2020.104042.
- MA D Y, LIU S W, HAN Z X, LI Y J and SHAN A S, 2008. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 58(2): 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.11.017>. DOI: 10.1016/j.pep.2007.11.017.
- MBOW M L and SARISKY R T, 2005. Modulating toll-like receptor signalling as a novel anti-infective approach. *Drug News Perspect*, 18(3): 179-184. <https://doi.org/10.1358/dnp.2005.18.3.892763>. DOI: 10.1358/dnp.2005.18.3.892763.
- MEDZHITOV R and JANEWAY C A, 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3): 295-298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2). DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- MICHAILIDIS G, AVDI M and ARGIRIOU A, 2012. Transcriptional profiling of antimicrobial peptides avian β -defensins in the chicken ovary during sexual maturation and in response to *Salmonella enteritidis* infection. *Res Vet Sci*, 92(1): 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.010>. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.10.010.
- MILONA P, TOWNES C L, BEVAN R M and HALL J, 2007. The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella* serovars. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(1): 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.098>. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.02.098.
- PELEG B A, SAMINA I and BRENNER J, 1993. Immunization of chickens with live Newcastle disease vaccine adjuvanted with oil. *Vaccine*, 11(10): 1074-1076.
- PLATTEEUW C, ALLEN-BOERRIGTER I J V, SCHALKWIJK S V and VOS W M D, 1996b. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Applied & Environmental*

- Microbiology, 62(3): 1008-1013.
- PLATTEEUW C, van ALEN-BOERRIGTER I, van SCHALKWIJK S and de VOS WM, 1996a. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 62(3): 1008-1013.
- REHAUME L M and HANCOCK R E, 2008. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. Crit Rev Immunol, 28(3): 185-200. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v28.i3.10>. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v28.i3.10.
- ROMAN P and VAJGER U, 2018. The tolerogenic role of IFN- γ . Cytokine & Growth Factor Reviews: S1359610118300261. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.04.001>. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.04.001
- SARAIWA M and O'GARRA A, 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol, 10(3): 170-181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>. DOI: 10.1038/nri2711.
- SEMPLE F and DORIN J R, 2012. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more. J Innate Immun, 4(4): 337-348. <https://doi.org/10.1159/000336619>. DOI: 10.1159/000336619.
- SHARPE A H and FREEMAN G J, 2002. The B7-CD28 superfamily. Nature Reviews Immunology, 2(2): 116-126.
- SYBESMA W, STARRENBURG M, KLEEREBEZEM M, MIERAU I, de VOS WM and HUGENHOLTZ J, 2003a. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 69(6): 3069-3076. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3069-3076.2003>. DOI: 10.1128/aem.69.6.3069-3076.2003.
- SYBESMA W, Van DEN BORN E, STARRENBURG M, MIERAU I, KLEEREBEZEM M, De VOS WM and HUGENHOLTZ J, 2003b. Controlled modulation of folate polyglutamyl tail length by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 69(12): 7101-7107. <https://doi.org/10.1128/aem.69.12.7101-7107.2003>. DOI: 10.1128/aem.69.12.7101-7107.2003.
- SZATRAJ K, SZCZEPANKOWSKA A K and CHMIELEWSKA-JEZNACH M, 2017. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. J Appl Microbiol, 123(2): 325-339. <https://doi.org/10.1111/jam.13446>. DOI: 10.1111/jam.13446.
- TAKEDA Y, SHIMADA N, KANEKO K, SHINKAI S and SAKURAI K, 2007. Ternary complex consisting of DNA, polycation, and a natural polysaccharide of schizophyllan to induce cellular uptake by antigen presenting cells. Biomacromolecules, 8(4): 1178-1186. <https://doi.org/10.1021/bm0611937>. DOI: 10.1021/bm0611937.
- VAN DIJK A, VELDHUIZEN E J, KALKHOVE S I, TJEERDSMA-VAN B J L, ROMIJN R A and HAAGSMAN H P, 2007a. The beta-defensin gallinacin-6 is expressed in the chicken digestive tract and has antimicrobial activity against food-borne pathogens. Antimicrob Agents Chemother, 51(3): 912-922. <https://doi.org/10.1128/AAC.00568-06>. DOI: 10.1128/AAC.00568-06.

- VAN DIJK A, MOLHOEK E M, BIKKER F J, YU P L, VELDHUIZEN E J and HAAGSMA N H P, 2011b. Avian cathelicidins: paradigms for the development of anti-infectives. *Vet Microbiol*, 153(1-2): 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.028>. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.03.028.
- VAN HOANG V, OCHI T, KURATA K, ARITA Y, OGASAHARA Y and ENOMOTO K, 2018. Nisin-induced expression of recombinant T cell epitopes of major Japanese cedar pollen allergens in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(1): 261-268. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8579-8>. DOI: 10.1007/s00253-017-8579-8.
- WANG S and CHEN L, 2004. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol*, 1(1): 37-42.
- WANG W, SONG Y, LIU L, ZHANG Y, WANG T, ZHANG W, LI K, QI X, GAO Y, GAO L, LIU C, ZHANG Y, WANG Y, PAN Q, HE G, WANG X and CUI H, 2019. Neutralizing-antibody-mediated protection of chickens against infectious bursal disease via one-time vaccination with inactivated recombinant *Lactococcus lactis* expressing a fusion protein constructed from the RCK protein of *Salmonella enterica* and VP2 of infectious bursal disease virus. *Microb Cell Fact*, 18(1): 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1061-9>. DOI: 10.1186/s12934-019-1061-9.
- WILDEN H, FOURNIER P, ZAWATZKY R and SCHIRRMACHER V, 2009. Expression of RIG-I, IRF3, IFN-beta and IRF7 determines resistance or susceptibility of cells to infection by Newcastle Disease Virus. *Int J Oncol*, 34(4): 971-982. https://doi.org/10.3892/ijo_00000223. DOI: 10.3892/ijo_00000223.
- WYSZYŃSKA A, KOBIERECKA P, BARDOWSKI J and JAGUSZTYN-KRYNICKA E K, 2015. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(7): 2967-2977. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6498-0>. DOI: 10.1007/s00253-015-6498-0.
- XIAO Y, HUGHES A L, ANDO J, MATSUDA Y, CHENG J F, SKINNER-NOBLE D and ZHANG G, 2004. A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics*, 5(1): 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-56>. DOI: 10.1186/1471-2164-5-56.
- YAO Y, XU X, LI Y, WANG X, YANG H, CHEN J, LIU S, DENG Y, ZHAO Z, YIN Q, SUN M and SHI L, 2020. Study of the association of seventeen single nucleotide polymorphisms and their haplotypes in the TNF- α , IL-2, IL-4 and IL-10 genes with the antibody response to inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Hum Vaccin Immunother*, : 1-7. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1724743>. DOI: 10.1080/21645515.2020.1724743.
- YOSHIMURA Y, OHASHI H, SUBEDI K, NISHIBORI M and ISOBE N, 2006. Effects of age, egg-laying activity, and *Salmonella*-inoculation on the expressions of gallinacin mRNA in the vagina of the hen oviduct. *J Reprod Dev*, 52(2): 211-218. <https://doi.org/10.1262/jrd.17070>.

- DOI: 10.1262/jrd.17070.
- ZAMBRICKI E, SHIGEOKA A, KISHIMOTO H, SPRENT J, BURAKOFF S, CARPENTER C, MILFORD E and MCKAY D, 2005. Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am J Transplant*, 5(11): 2623-2631. [https://doi.org/ 10.1111/j.1600-6143.2005.01075.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01075.x). DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.01075.x.
- ZHANG G and SUNKARA L T, 2014. Avian antimicrobial host defense peptides: from biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7(3): 220-247. <https://doi.org/10.3390/ph7030220>. DOI: 10.3390/ph7030220.
- ZIELIŃSKA D and KOŁOŻYN-KRAJEWSKA D, 2018. Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Res Int*, 2018:5063185. <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>. DOI: 10.1155/2018/5063185.
- ZHAI L , LI Y , WANG W, 2011. Effect of oral administration of ginseng stem-and-leaf saponins (GSLs) on the immune responses to Newcastle disease vaccine in chickens. *vaccine*, 29(31): 0-5014.2014.

致 谢

五月，虽有疫情，但阳光灿烂；六月，人不见面，也要曲终人散。在哈尔滨兽医研究所学习的这三年，有过欢笑，有过泪水，有过成就，有过挫折。在此论文即将完成之际，我要衷心的感谢王笑梅研究员、导师崔红玉副研究员在课题完成过程中给予的指导和帮助。

首先我要向我的导师崔红玉副研究员致以最崇高的敬意和最由衷的感谢，感谢导师一直来对我的包容、理解与支持，感谢您的悉心指导与关怀。感谢您带我进入了科研的大门，感谢您对我实验上的指导与精神上的鼓励，感谢您让我对科研有了更深刻的理解。您对科研诚信和学术道德的追求深深影响着我，这也将是我一生恪守的原则。您豁达的生活态度，对事物独到的见解也深深影响着我，非常幸运成为您的学生，再次向您表示衷心的感谢。

我要感谢首席王笑梅研究员，感谢您给我们提供的一流的科研平台和严谨求实的科研氛围，感谢您让我成为禽免疫抑制创新团队大家庭的一员。

感谢禽免疫抑制病研究创新团队的所有老师们在工作和生活中给予的指导和帮助。

感谢我的师兄师姐们，在工作生活中帮助和照顾。感谢我的师弟师妹们一直以来的陪伴与鼓励。

感谢 17 级硕士同学们，与你们相遇，我感到无比的幸运，以前共同进步、欢声笑语的日子，我将珍藏，以后不可预测的日子，愿你们保重。

最后我要感谢我的父母，感谢你们含辛茹苦的把我抚养长大，无条件的支持我的梦想，给予我鼓励和支持。教会我独立思考，吃苦耐劳，引导我学习生存的技能，有立足社会的能力和素质。

再次感谢这三年来给我鼓励与支持的家人，授业解惑，指点迷津的老师，陪伴与帮助的朋友，感谢人生路上有你们！

感谢十三五国家重点研发计划项目（2017YFD0500802；2016YFE0203200）、国家自然科学基金项目（31570930）、国家现代农业体系肉鸡体系项目（CARS-41-G15）、国家科技重大专项和重点研发项目黑龙江省级资金（GX18B011）对本研究的资助！

作者简介

王婷婷，女，汉族，1994年12月生，山东威海人。2013年9月-2017年6月就读于山东农业大学动物科技学院，动物医学专业，获得农学学士学位；2017年9月-2020年6月在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽免疫抑制病创新团队完成了硕士阶段的学习。

硕士期间发表的论文：

张园, 王文骞, 宋雨心, 王婷婷, 祁小乐, 高玉龙, 王永强, 高宏雷, 李凯, 刘长军, 张艳萍, 高立, 王笑梅, 崔红玉, 何高明, 2019. 正交试验法在优化重组乳酸乳球菌诱导表达中的应用研究. 中国家禽, 41(05):30-33.

WANG W, SONG Y, LIU L, ZHANG Y, WANG T, ZHANG W, LI K, QI X, GAO Y, GAO L, LIU C, ZHANG Y, WANG Y, PAN Q, HE G, WANG X and CUI H, 2019. Neutralizing-antibody-mediated protection of chickens against infectious bursal disease via one-time vaccination with inactivated recombinant *Lactococcus lactis* expressing a fusion protein constructed from the RCK protein of *Salmonella enterica* and VP2 of infectious bursal disease virus. *Microb Cell Fact*, 18(1): 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1061-9>. DOI: 10.1186/s12934-019-1061-9.

王婷婷, 王文骞, 王志浩, 米洁兰, 高玉龙, 刘长军, 祁小乐, 张艳萍, 李凯, 高立, 潘青, 王笑梅, 崔红玉, 2020. 表达鸡 AvBD6 重组乳酸菌的构建及其免疫调节生物学活性检测. 中国预防兽医学报. (已接收)