

俞浩, 王振东, 朝鲁门, 等. 胞内劳森菌亚单位疫苗佐剂的筛选与候选抗原的免疫原性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 110-118.

YU H, WANG Z D, CHAO L M, et al. Adjuvant screening and immunogenicity analysis for subunit vaccine candidates against *Lawsonia intracellularis* [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 110-118.

## 胞内劳森菌亚单位疫苗佐剂的筛选与候选抗原的免疫原性分析

俞浩, 王振东, 朝鲁门, 李玉峰\*

(南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点开放实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了筛选胞内劳森菌亚单位疫苗的合适佐剂并评估疫苗的免疫原性, 以实验室分离的胞内劳森菌基因组 DNA 为模板, 特异性扩增了针对重组鞭毛蛋白 (rFliC)、碳端截短的神经氨酸酶蛋白 (tNA-C) 和重组寡肽结合蛋白 A (rOppA) 3 个重组蛋白的目的基因并进行了原核表达。将 rFliC 分别与 Gel 02、ISA 201、ISA 15A 和 Carbopol 971P 佐剂乳化后以 150  $\mu\text{g}$ /只的剂量免疫小鼠, 通过抗体水平、淋巴细胞增殖试验和细胞因子水平检测筛选最佳免疫效果的佐剂; 将 3 个重组蛋白与最佳佐剂乳化, 以每种抗原 50  $\mu\text{g}$ /只的剂量混合免疫仔猪, 通过检测抗体水平和细胞因子水平, 评估其对猪体的免疫原性。结果: rFliC 与不同佐剂乳化二免小鼠后血清抗体水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且在第 18 周时仍维持在较高水平, 用 rFliC 刺激各免疫组小鼠的淋巴细胞后均出现了细胞增殖, ISA 15A 组的淋巴细胞活力是对照组的 3.4 倍, 且显著高于其他免疫组 ( $P < 0.05$ )。3 个重组蛋白混合后经 ISA 15A 乳化后免疫仔猪, 间接 ELISA 检测针对 3 个重组蛋白抗体效价达 1:102 400 以上, 干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 (IL)-4 水平上升级显著 ( $P < 0.000 1$ ), IL-12 水平虽有上升但不显著。本研究为后续胞内劳森菌亚单位疫苗的开发筛选了合适的佐剂, 并提供了优势的候选抗原。

**关键词:** 胞内劳森菌; 原核表达; 佐剂; 亚单位疫苗; 免疫原性

中图分类号: S852.61 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)02-0110-09

## Adjuvant screening and immunogenicity analysis for subunit vaccine candidates against *Lawsonia intracellularis*

YU Hao, WANG Zhendong, CHAO Lumen, LI Yufeng\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In order to screen suitable adjuvants for *Lawsonia intracellularis* subunit vaccines and to evaluate the immunogenicity of the vaccines, the genomic DNA of isolated *L. intracellularis* was used as template to amplify three genes for three recombinant proteins (rFliC, tNA-C, and rOppA) which were then expressed in *Escherichia coli*. The rFliC protein was emulsified with Gel 02, ISA 201, ISA 15A and aqueous adjuvant Carbopol 971P (150  $\mu\text{g}$ /dose) for mouse immunization, with antibody levels, lymphocyte proliferation assays and cytokine profiles being measured to select the optimal adjuvants. The three recombinant proteins were then emulsified with the optimal adjuvant and administered to piglets (50  $\mu\text{g}$  each antigen/dose) to assess their immunogenicity through antibody and cytokine responses. The results showed significantly elevated serum antibody levels after the secondary immunization ( $P < 0.01$ ) and the antibody maintained high levels until week 18. Lymphocyte proliferation was observed in all immunized groups upon rFliC stimulation, with the ISA 15A group exhibiting 3.4-fold higher lymphocyte viability, compared with the control group and the viability was significantly higher than that of other adjuvant groups ( $P < 0.05$ ). When piglets were immunized with a mixture of the three recombinant proteins emulsified with ISA 15A, indirect ELISA detected high-titer antibodies ( $> 1:102\ 400$ ) against all targeted proteins, accompanied by highly significant increases in IFN- $\gamma$  and IL-4 levels ( $P < 0.000 1$ ), though only modest elevation was observed in IL-12. These findings successfully identified an effective adjuvant and provided promising candidate antigens for development of *L. intracellularis* subunit vaccines.

**Keywords:** *L. intracellularis*; prokaryotic expression; adjuvant; subunit vaccine; immunogenicity

收稿日期: 2025-04-14; 修回日期: 2025-12-18

第一作者: 俞浩, 男, 硕士

\* 通信作者: 李玉峰, 博士, 教授, 研究方向为动物传染病防治, E-mail: yufengli@njau.edu.cn.

猪增生性肠病 (porcine proliferative enteropathy, PPE) 是猪感染胞内劳森菌 (*Lawsonia intracellularis*, LI) 后所引起的以肠道隐窝上皮细胞增殖、肠黏膜增厚为特征的肠道传染病。临床上主要表现为急性增生性出血性肠炎 (proliferative haemorrhagic enteropathy, PHE), 表现为急性肠道出血, 严重病例可迅速致死, 或在腹泻前出现便血与黑便的症状<sup>[1]</sup>。慢性猪肠腺瘤病 (porcine intestinal adenomatosis, PIA) 是慢性 PPE 的表现形式, 其特征是黏膜皱襞增厚呈波纹状, 并伴有继发感染及严重并发症<sup>[2]</sup>。继发性感染的坏死型肠炎 (necrotic enteritis, NE) 是在黏膜增厚的基础上, 继发机会性细菌感染, 黏膜表面形成纤维素坏死性渗出物附着<sup>[3]</sup>。

总体而言, 在饲料或饮水中添加大环内酯类和截短侧耳素抗生素对 PPE 有显著的治疗效果<sup>[4]</sup>。由于不同猪之间的发病时间可能存在较大差异, 如果抗菌药物添加过晚, 难以有效缓解临床症状或提升生产性能<sup>[5]</sup>。当前, 该病的主要防控手段是药物治疗和疫苗免疫。2001年, 首个用于口服接种的减毒活 LI 疫苗 (Enterisol<sup>®</sup> Ileitis, 勃林格殷格翰) 上市, 许多学者对其效果进行了评估。Meschede 等<sup>[6]</sup>研究了 Enterisol<sup>®</sup> 口服疫苗对猪沙门菌病和 PPE 共感染的免疫效果, 结果显示免疫组沙门菌阳性率降低了 59%<sup>[7]</sup>。另一种肌内注射的商品化灭活疫苗 Porcilis<sup>®</sup> Ileitis (默克, 美国) 于 2015 年在美国上市, Jacobs 等<sup>[8]</sup>将 Porcilis<sup>®</sup> 与减毒活疫苗的保护效力进行了评估, 免疫组的猪均体重增加、粪便排毒量降低以及肠道病变减少, 且 Porcilis<sup>®</sup> 诱导的免疫保护效果优于 Enterisol<sup>®</sup>。

越来越多的研究证实, 亚单位疫苗在预防 LI 感染方面表现出显著的有效性。Montesino 等<sup>[9]</sup>构建了含有 2 种外膜蛋白和 1 种分泌蛋白的嵌合抗原亚单位疫苗并与猪重组干扰素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 联合使用, 在小鼠和猪体内诱导了高水平的 IgG 水平, 对 LI 的感染具有保护效果。Obradovic 等<sup>[10]</sup>分析发现了 11 个独特的胞内劳森菌蛋白, 进一步分析表明其中 4 个蛋白有成为亚单位疫苗候选抗原的潜力<sup>[11]</sup>。

从哺乳动物宿主的角度来看, 鞭毛与免疫防御有关, 免疫系统识别鞭毛蛋白, 会触发适应性和先天免疫反应。与鞭毛组装有关的单体鞭毛蛋白的保守 N 和 C 末端与真核细胞中的细胞质核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 样受体相互作用, 并诱导炎症小体的形成, 从而导致炎症<sup>[12-14]</sup>。此外, 有学者通过基因敲除和抑制剂试验首次揭示了胞内劳森菌鞭毛蛋白 LI0710 (GenBank 登录号: CAJ54764.1) 通过 Toll 样受体 5 (Toll-like receptor 5, TLR5) 非依赖性机制激活宿主

免疫反应的机制, 为理解其致病机制和开发新型疫苗提供了重要依据<sup>[15]</sup>。神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 在致病细菌中的作用主要有以下 3 个方面: 帮助细菌从环境中摄取/从头合成唾液酸; 将唾液酸整合到其细胞表面结构中; 通过表面唾液酸化修饰介导细菌和宿主之间的相互作用<sup>[16]</sup>。Manco 等<sup>[17]</sup>用 MF1 小鼠感染模型证实了神经氨酸酶 A (NanA) 和神经氨酸酶 B (NanB) 对肺炎链球菌的定殖非常重要, 提示其可能作为疫苗靶点。Bouchet 等<sup>[18]</sup>发现流感嗜血杆菌利用宿主唾液酸增强其毒力, 提示针对 NA 的疫苗可能有助于预防感染。细菌寡肽通透酶 (oligo-peptide permease, Opp) 系统是一种重要的寡肽转运系统, 广泛存在于多种细菌中, 负责摄取外源性寡肽, 参与营养吸收、信号传导及环境适应等过程。研究最多并且最深入的是寡肽结合蛋白 OppA<sup>[19-22]</sup>。Zheng 等<sup>[23]</sup>从高毒力的猪链球菌 2 型菌株 05ZYH33 中鉴定出 OppA 同源物, 流式细胞术和蛋白质印迹证实 OppA 是一种表面免疫原性蛋白, 并在猪链球菌感染期间表达。

本研究在实验室前期成功分离得到 1 株胞内劳森菌的基础上, 对候选抗原基因进行生物信息学分析并进行原核表达, 筛选具有最佳免疫效果的佐剂, 制备亚单位疫苗并评估其对仔猪的免疫原性, 从而为后续胞内劳森菌亚单位疫苗的开发筛选了合适的佐剂, 并提供了优势的候选抗原选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

胞内劳森菌菌株、pET-32a (+) 载体、PPE 阳性血清、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、Rosetta, 由本实验室保存; 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒购自杭州倍沃医学科技有限公司; 琼脂糖凝胶回收盒购自 Biomega 公司; SDS-PAGE 试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司; His 多抗 (兔抗组氨酸标签多克隆抗体, Rabbit anti-His-Tag polyAb), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG, 购自 Proteintech 公司; HRP 标记的蛋白 A 购自上海碧云天生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司; 小鼠和猪外周血淋巴细胞分离液试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; HiScript<sup>®</sup> II Q Rt SuperMix for qPCR 试剂盒、细胞增殖检测试剂 CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 伴刀豆球蛋白 A (ConA) 购自 Sigma-Aldrich 公司; Applied Biosystems PowerUp SYBR Green 预混液购自 Thermo Fisher Scientific 公司; Montanide<sup>™</sup> ISA 15A、ISA 201 和 Gel 02 佐剂购自法国 SEPPIC 公司; Carbolpol 971P

佐剂是由本实验室改良的卡波姆佐剂。

7 周龄 BALB/c 小鼠和 ICR 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司；60 日龄外三元仔猪由立华牧业股份有限公司茆圩场提供并饲养。

### 1.2 重组蛋白的表达

提取胞内劳森菌 DNA，根据 GenBank 中收录的鞭毛蛋白 FliC、NA 蛋白 C 端 NA-C 和 OppA 基因序列，应用 Detailbio 在线分析蛋白亲疏水性，IEDB 预

测 B 细胞表位，选择基因序列中亲水性好、B 细胞抗原表位集中的部分基因序列或全长进行扩增，PCR 扩增引物见表 1。将扩增的目的片段通过 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切克隆入 pET-32a 载体，重组质粒经酶切鉴定正确后进行测序验证。

将重组质粒转化到 Rosetta 感受态细胞，经终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导超声破碎菌体，分别收集上清液和沉淀，SDS-PAGE 进行鉴定。

表 1 基因扩增和细胞因子检测引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	用途
FliC	CGCGGATCCATGCTTTGGTCATTAACAACAA	
	GCGTCGACTTAGCCACTAATGAGTTGG	
NA-C	CGCGGATCCACAAATCATATTATTGCAAATTCA	目的蛋白 基因扩增
	GCGTCGACTTAGAATCTATAAGTAGCTCCTAC	
OppA	CGCGGATCCATGGATAAAATTATACATT	
	GCGTCGACTATTGAAGCTTTTTAGGA	
IFN- $\gamma$	TCAAAGTGCATAGATGTGGAAGAA	
	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
IL-12	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	小鼠细胞 因子检测
	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	
IL-4	ACAGGAGAAGGACGCCAT	
	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	
	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
IFN- $\gamma$	GAGGTTCTAAATGGTAGCTCTGGG	
	GATGAGTTCAGTATGGCTTGCC	
IL-12	CGTGGCTAGTCAAGTGTAAAG	猪细胞因子检测
	CAGGCCCAGGAATGTCAAA	
IL-4	GTCTGCTTACTGGCATGTACCA	
	GCTCCATGCACGAGTTCITTTCT	
GAPDH	TCGGAGTGAACGATTTCG	
	TGGGTGGAATCATACTGGAAC	

注：下划线为酶切位点，*Bam*H I 识别序列为 5'-GGATCC-3'，*Sal* I 识别序列为 5'-GTCGAC-3'。IL-12，白细胞介素-12；IL-4，白细胞介素-4；IFN- $\gamma$ ，干扰素- $\gamma$ ；GAPDH，磷酸甘油醛脱氢酶。

### 1.3 重组蛋白的纯化

鉴于重组蛋白的主要表达形式为包涵体，所以采用包涵体洗涤的方式进行纯化。取 200 mL 诱导表达的菌液，分别应用 Buffer I、Buffer III 重悬包涵体沉淀并溶解过夜。第 2 天加入 2~3 mL 的 Buffer IV 溶液，12 000 r/min 4 °C 离心 10 min，收集纯化后的蛋白上清液样品。

### 1.4 小鼠抗重组 FliC 蛋白 (rFliC) 多克隆抗体的制备

将 150  $\mu$ g 纯化后的 rFliC 蛋白与弗式完全佐剂混

合后进行乳化后免疫 BALB/C 小鼠，采用背部皮下多点免疫。首免后 2 周时，将等量纯化蛋白与弗式不完全佐剂乳化后进行二免和三免，间隔时间为 2 周。三免 2 周后采血分离血清。将 rFliC 蛋白按 2  $\mu$ g/mL 包被于 96 孔 ELISA 板，通过间接 ELISA 测定血清抗体效价。

### 1.5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

将纯化后的 rFliC、C 端截短的 NA 蛋白 (tNA-C) 和重组 OppA (rOppA) 进行 SDS-PAGE，通过半干转印仪转印到 NC 膜上，分别以 His 多抗为一抗，

HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 免疫小鼠制备的多克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 以及 PPE 临床血清为一抗, HRP 标记的 Protein A 为二抗, 进行曝光分析。

## 1.6 亚单位疫苗佐剂的筛选

### 1.6.1 小鼠分组与免疫

30 只 6 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 5 组, 每组 6

只。将纯化后的 rFliC 蛋白分别与 Gel 02、ISA 201、ISA 15A 和 Carbopol 971P 佐剂乳化, 背部皮下多点免疫小鼠, 每只小鼠免疫 150  $\mu\text{g}$  (表 2)。3 周后对小鼠进行加强免疫。

表 2 试验动物分组情况

组别	免疫组分	抗原: 佐剂
空白对照	PBS	0
rFliC+Gel 02	150 $\mu\text{g}$ 蛋白+PBS+佐剂	80:20
rFliC+ISA 201	150 $\mu\text{g}$ 蛋白+PBS+佐剂	50:50
rFliC+ISA 15A	150 $\mu\text{g}$ 蛋白+PBS+佐剂	90:10
rFliC+Carbopol	150 $\mu\text{g}$ 蛋白+PBS+佐剂	50:50

### 1.6.2 血清抗体水平的检测

在第 6 周 (二免 2 周后) 和第 18 周时随机挑选 3 只小鼠进行尾尖采血, ELISA 检测血清抗体水平。

### 1.6.3 细胞因子水平的检测

每组取 3 只小鼠采集抗凝血 1 mL 分离外周血淋巴细胞, 使用 Omega Total RNA Kit I 试剂盒从淋巴细胞中提取总 RNA。使用 HiScript<sup>®</sup> II Q Rt SuperMix for qPCR 试剂盒反转录为 cDNA, 反应条件为 50  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 以 GAPDH 作为内参基因, 用 SYBR Green qPCR 方法检测 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-12 的 mRNA 表达水平, 检测基因表达水平的引物见表 1。qPCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ): 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ PowerUp SYBR Green 预混液, 8  $\mu\text{L}$  DEPC 水, 1  $\mu\text{L}$  模板, 各 0.5  $\mu\text{L}$  上、下游引物。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 1 min, 40 个循环。最后, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 通过溶解曲线分析验证扩增特异性。通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各细胞因子的相对表达量。当相对表达量 > 1 时, 表示目标基因在样本中的表达量高于对照组; 当相对表达量 < 1 时, 表示目标基因在样本中的表达量低于对照组。

### 1.6.4 淋巴细胞增殖试验

分离脾脏淋巴细胞, 经计数后铺 96 孔细胞板, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养 4 h 后, 每孔分别加入 20  $\mu\text{L}$  的 Con A (终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 20  $\mu\text{L}$  纯化后的 rFliC 蛋白 (终浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和相同体积的 1640 营养液刺激细胞, 每种刺激物 3 个重复。继续培养 40 h, 再加入 20  $\mu\text{L}$  CCK-8 培养 4 h 后测定  $OD_{450}$  值并计算刺激指数。刺激指数 = (试验组平均  $OD$  值 - 空白对照组平均  $OD$  值) / (阴性对

照组平均  $OD$  值 - 空白对照组平均  $OD$  值)。

## 1.7 亚单位疫苗对猪体的免疫原性分析

### 1.7.1 试验猪的分组与免疫程序

将 20 头 60 日龄的外三元仔猪随机分为 2 组, 每组 10 只, 分别在第 0 周和第 4 周时进行肌肉注射免疫。免疫组为 3 种蛋白各 50  $\mu\text{g}$  混合后加入 PBS 稀释, 并与 ISA 15A 佐剂乳化进行免疫; 对照组接种 ISA 15A 佐剂和 PBS 混合液。

### 1.7.2 血清抗体水平的检测

在首免前 (60 日龄, 第 0 周), 二免前 (88 日龄, 第 4 周), 二免 4 周 (116 日龄, 第 8 周) 后进行前腔静脉采血并分离血清, 分别用 rFliC、tNA-C 和 rOppA 重组蛋白按 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  进行抗原包被, 间接 ELISA 检测抗体水平。

### 1.7.3 细胞因子水平的检测

二免前和二免 4 周后, 采集抗凝血分离外周血单核细胞。以  $2 \times 10^6$  个/mL 的密度铺 24 孔板 (500  $\mu\text{L}$  每孔), 在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 16 h。然后, 分别加入 500  $\mu\text{L}$  相同培养基稀释的 rFliC 抗原 (终浓度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、Con A (终浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 500  $\mu\text{L}$  相同培养基, 继续培养 24 h。将细胞重悬离心, 按 1.6.3 所述从细胞沉淀中提取总 RNA, 通过 RT-qPCR 测定相关细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-12 的 mRNA 表达水平, 检测基因表达水平的引物见表 1。

## 1.8 数据统计与分析

采用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。不同组的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey 事后检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。除非在图注中另有说明, 所有定

量数据均以“均值±标准误”表示。每个试验均使用至少3个独立的生物学重复 ( $n \geq 3$ )。qPCR数据经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法转换为相对于对照组的表达倍数后进行分析与绘图。细胞活力数据(刺激指数)为校正背景值后的吸光度计算得出。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组蛋白的表达情况

将IPTG诱导表达后的菌液和超声破碎后收集的

上清液和沉淀分别进行SDS-PAGE分析,蛋白的分布情况如图1所示。rFliC和tNA-C主要在包涵体中表达(图1A和1B),rOppA在上清液和包涵体中均有表达,但在上清液中有杂带,在包涵体中无杂带(图1C)。

### 2.2 重组蛋白的Western blot分析

将包涵体蛋白进行SDS-PAGE分析,用His多抗进行Western blot鉴定,分别在51、64和80 kDa处出现了抗原抗体结合带(图2)。

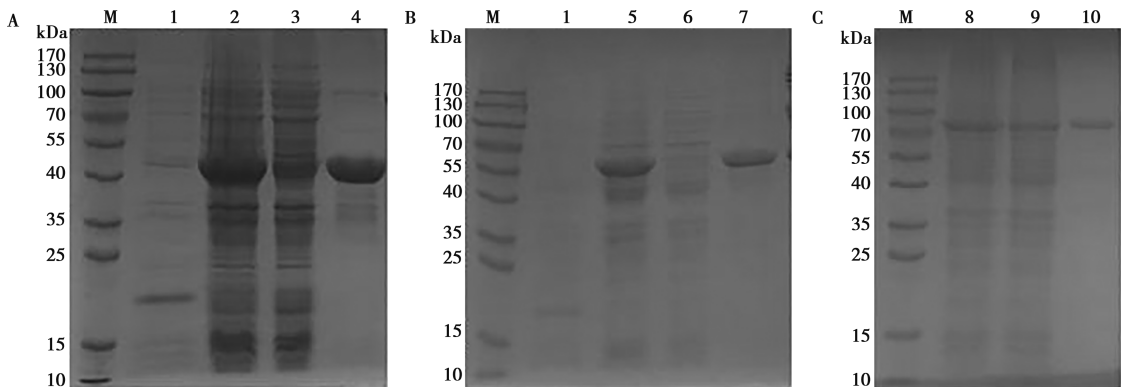


图1 SDS-PAGE分析重组蛋白rFliC(A)、tNA-C(B)和rOppA(C)的表达情况  
M. 蛋白Marker; 1. 空载体(pET-32a); 2. rFliC诱导全菌; 3. rFliC超声上清液; 4. rFliC超声沉淀; 5. tNA-C诱导全菌; 6. tNA-C超声上清液; 7. tNA-C超声沉淀; 8. rOppA诱导全菌; 9. rOppA超声上清液; 10. rOppA超声沉淀。

图1 SDS-PAGE分析重组蛋白rFliC(A)、tNA-C(B)和rOppA(C)的表达情况

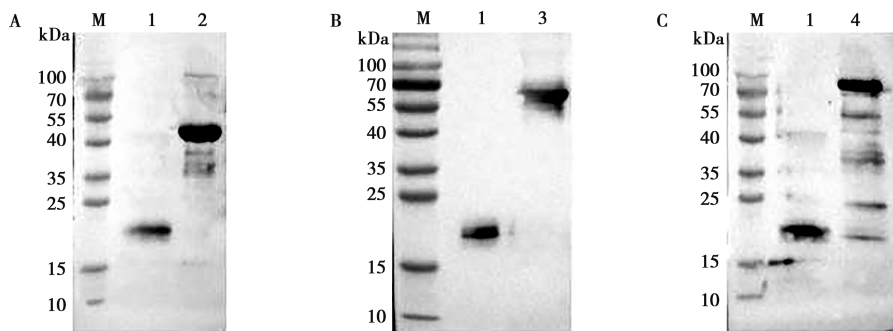


图2 重组蛋白rFliC(A)、tNA-C(B)和rOppA(C)的Western blot鉴定(His多抗为一抗)  
M. 蛋白Marker; 1. 空载体蛋白; 2. rFliC; 3. tNA-C; 4. rOppA。

图2 重组蛋白rFliC(A)、tNA-C(B)和rOppA(C)的Western blot鉴定(His多抗为一抗)

### 2.3 rFliC蛋白的抗原性分析

将rFliC蛋白进行SDS-PAGE分析,分别与免疫小鼠制备的多克隆抗体和PPE临床血清进行Western blot分析,结果均在51 kDa处出现了特异性结合带(图3)。表明成功制备了针对rFliC蛋白的多克隆抗体,且rFliC具有良好的免疫原性。

### 2.4 亚单位疫苗佐剂效果评估

#### 2.4.1 小鼠淋巴细胞增殖试验

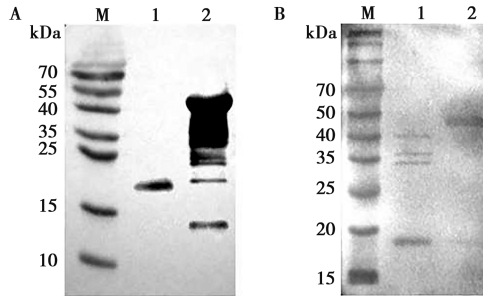
将小鼠脾淋巴细胞悬液进行增殖试验,读取 $OD_{450}$ 值后计算刺激指数,结果如图4C所示。用

Con A刺激后的值显著高于未刺激的PBS组,阳性对照成立。ISA 15A组的淋巴细胞活力是对照组的3.4倍,并显著高于其他免疫组( $P < 0.05$ ),说明rFliC-ISA 15A组的淋巴细胞活性最强。

#### 2.4.2 小鼠外周血淋巴细胞的细胞因子水平

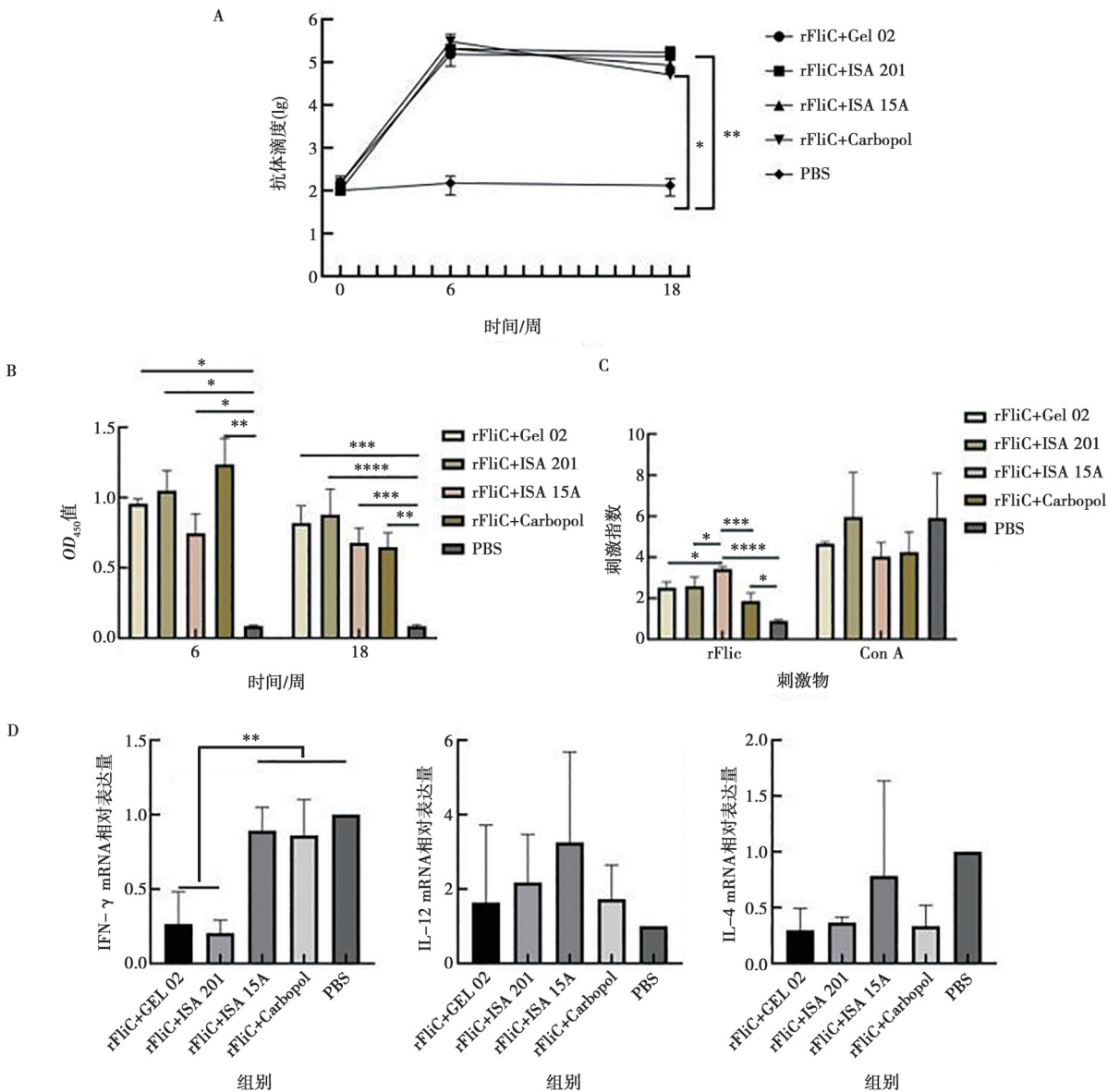
以GAPDH作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各细胞因子的相对表达量,结果如图4D所示,发现Gel 02和ISA 201组的IFN- $\gamma$ 水平极显著低于ISA 15A组、Carbopol组和对照组( $P < 0.01$ ),各免疫组的IL-12水平相比于对照组均有上升但并不显著

( $P>0.05$ ), 各免疫组的 IL-4 水平相比于对照组均有下降但也并不显著 ( $P>0.05$ )。



M. 蛋白 Marker; 1. 空载体蛋白; 2. rFliC 蛋白。A. rFliC 多抗作为一抗; B. PPE 临床血清作为一抗。

图3 rFliC 的抗原性分析



A. 血清抗体水平; B. 血清按 1 : 12 800 稀释的  $OD_{450}$  值; C. 淋巴细胞增殖试验刺激指数; D. 细胞因子相对表达量。

\* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ , \*\*\* 表示  $P<0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P<0.0001$ , 下同。

图4 不同佐剂亚单位疫苗对小鼠的免疫原性分析

## 2.5 亚单位疫苗对猪体的免疫原性分析

### 2.5.1 仔猪血清特异性抗体水平检测

用3个重组蛋白混合免疫猪后,在一免前(第0周)、二免前(第4周)和二免4周(第8周)后采集血清,分别用3个重组蛋白独立包被ELISA板,通过间接ELISA检测抗体水平,结果如图5所示。一免后针对3种蛋白的抗体水平虽有上升但并不显著( $P>0.05$ ),二免后针对3种蛋白的抗体水平与一免

前相比,上升极显著( $P<0.001$ )。说明仔猪在二免后对rFliC、tNA-C和rOppA产生了较强的免疫应答。

### 2.5.2 仔猪细胞因子水平检测

二免后(第8周)猪外周血单核细胞中各细胞因子的相对表达水平如图6所示。与对照组相比,IFN- $\gamma$ 水平在二免后极显著升高( $P<0.0001$ ),IL-4水平同样也极显著升高( $P<0.0001$ ),但IL-12水平虽有上升但与对照组相比无显著区别( $P>0.05$ )。

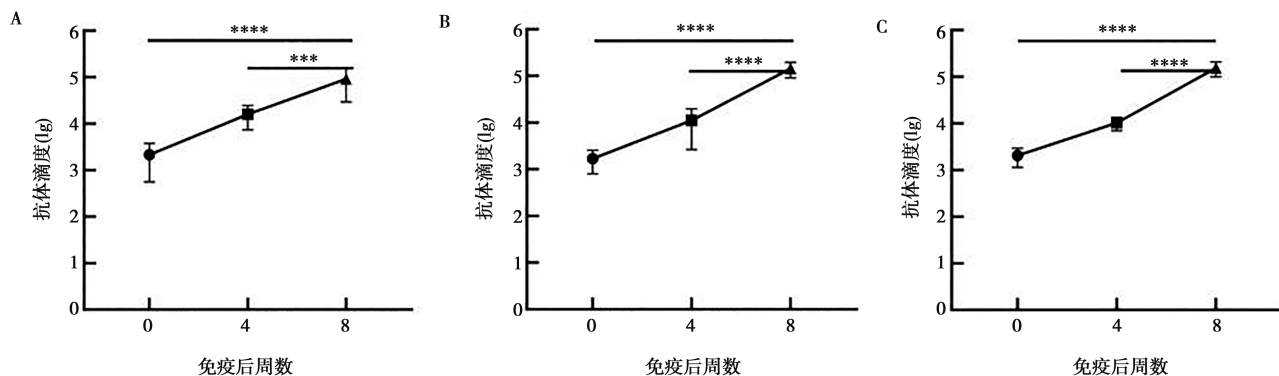


图5 仔猪 rFliC (A)、tNA-C (B)、rOppA (C) 抗体水平检测

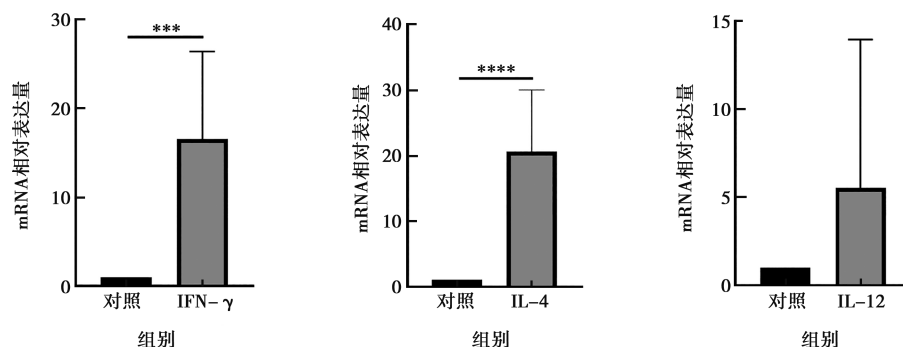


图6 仔猪的细胞因子水平检测

## 3 讨论

本研究对FliC、OppA全长和NA-C进行了原核表达,与His多抗反应后经Western blot曝光分析出现了符合预期大小的条带;将rFliC与PPE临床血清进行Western blot反应后出现了特异性条带,而tNA-C和rOppA与PPE临床血清反应并未出现特异性条带,分析原因可能是胞内劳森菌中的NA蛋白和OppA表达量较低,而鞭毛蛋白由单一的FliC蛋白重复组成,相对表达量较高。Western blot结果表明了FliC蛋白具有良好的免疫原性,故在后续筛选佐剂时选用rFliC作为免疫原。

佐剂可以提高特定抗原的免疫应答的强度和持续时间,已被广泛用于疫苗免疫<sup>[24]</sup>。ISA 201和ISA

15A属于矿物油佐剂,与传统矿物油型佐剂相比,其能够形成更稳定的低黏度乳液<sup>[25]</sup>。GEL 02是一种新型佐剂,基于聚合物凝胶分散于水中的技术,大大提升了水性疫苗的安全性和有效性<sup>[26]</sup>。Carbopol佐剂是基于聚丙烯酸聚合物的凝胶型佐剂,通过延长抗原在注射部位的滞留时间激活强大的体液免疫和T细胞免疫。脾脏是机体重要的免疫器官,机体接种疫苗后,根据疫苗中不同的抗原特性,有些抗原直接被B淋巴细胞识别,刺激机体的体液免疫,有些被APCs捕获识别,并提呈给T淋巴细胞,刺激机体的细胞免疫。两种免疫应答均会形成免疫记忆,当再次接触相同免疫原时,记忆性淋巴细胞会迅速识别并启动更强的免疫反应,包括淋巴细胞的增殖<sup>[27]</sup>。在筛选佐剂的小鼠免疫试验中,小鼠在免疫后出现了显著升高

的 IgG 抗体水平,且在二免后的 14 周时仍能维持在较高水平。用免疫原 (rFliC) 刺激分离的小鼠淋巴细胞后,免疫组淋巴细胞均出现了一定水平的增殖,其中 ISA 15A 组的增殖水平显著高于其他免疫组,ISA 15A 佐剂使免疫后的小鼠达到了更高的免疫激活状态。故在后续猪体试验时,采用 ISA 15A 作为亚单位疫苗佐剂。

试验猪在接受 3 种重组蛋白的混合免疫后,产生了针对 3 种不同免疫原的特异性抗体,且抗体水平显著升高。Montesino 等<sup>[9]</sup>和 Salazar 等<sup>[28]</sup>分别制备了重组蛋白亚单位疫苗免疫仔猪并进行攻毒保护试验,结果发现 IFN- $\gamma$  和 IL-12 水平升高,表明猪体感染胞内劳森菌后,主要诱导发生强烈的 Th1 型的细胞免疫应答。虽然在小鼠免疫试验中未发现这种变化,但在猪体免疫试验中,IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平上升极显著,IL-12 水平虽有上升但不显著。IFN- $\gamma$  和 IL-12 水平的升高是 Th1 型细胞免疫的标志,这也是消除细胞内病原体所需的淋巴细胞反应类型。IL-4 是一种抗炎因子,是 Th2 细胞分泌的细胞因子。由于在猪体试验中没有对免疫仔猪进行攻毒而导致急性炎症的产生,因此 IL-4 的上升可能是对 IFN- $\gamma$  和 IL-12 过度反应的负反馈调节,试图抑制过强的 Th1 反应。Salazar 等<sup>[28]</sup>在其亚单位疫苗研究中也检测了细胞因子水平,但其并未检测到商品化疫苗组细胞因子水平的变化,故本研究未设置商品化疫苗阳性对照组。此外,由于本实验室尚未对分离的胞内劳森菌摸索攻毒剂量以及建立发病模型,亚单位疫苗的免疫试验未进行攻毒,未来可在大规模培养胞内劳森菌后攻毒,通过检测 IgA 水平、粪便细菌载量对亚单位疫苗的免疫保护作用进行相关研究。

综上,本研究成功表达了胞内劳森菌优势候选抗原 FliC、NA-C 和 OppA,通过 Western blot 证实了 FliC 的强抗原性并将其与不同佐剂混合免疫小鼠,筛选出最佳效果的 ISA 15A 佐剂,将 3 个蛋白与 ISA 15A 佐剂乳化混合免疫仔猪,评估了亚单位疫苗对猪体的免疫原性,为未来设计开发胞内劳森菌亚单位疫苗奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] LAWSON G H K, ROWLAND A C, ROBERTS L, et al. Proliferative haemorrhagic enteropathy [J]. Res Vet Sci, 1979, 27 (1): 46-51.
- [2] ROWLAND A C, LAWSON G H. Intestinal adenomatosis in the pig: a possible relationship with a haemorrhagic enteropathy [J]. Res Vet Sci, 1975, 18 (3): 263-268.
- [3] COLLINS A M, BARCHIA I M. The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs [J]. Vet Microbiol, 2014, 168: 455-458.
- [4] WATTANAPHANSAK S, SINGER R S, GEBHART C J. *In vitro* antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates [J]. Vet Microbiol, 2009, 134 (3/4): 305-310.
- [5] PULS C L, HAMMER J M, EGGERS K, et al. Effects of two feeding periods of tiamulin fed in combination with chlortetracycline for control and treatment of swine respiratory and enteric disease and subsequent growth performance of growing - finishing pigs [J]. Transl Anim Sci, 2018, 3 (1): 113-122.
- [6] MESCHEDE J, HOLTRUP S, DEITMER R, et al. Reduction of *Salmonella* prevalence at slaughter in *Lawsonia intracellularis* co-infected swine herds by Enterisol® Ileitis vaccination [J]. Heliyon, 2021, 7 (4): e06714.
- [7] LEITE F L L, SINGER R S, WARD T, et al. Vaccination against *Lawsonia intracellularis* decreases shedding of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in co-infected pigs and alters the gut microbiome [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 2857.
- [8] JACOBS A A C, HARKS F, PAUWELS R, et al. Efficacy of a novel intradermal *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions [J]. Porcine Health Manag, 2020, 6: 25.
- [9] MONTESINO R, GUTIÉRREZ N, CAMACHO F, et al. Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against *Lawsonia intracellularis*: the etiological agent of porcine proliferative enteropathy [J]. Vaccine, 2019, 37 (10): 1340-1349.
- [10] OBRADOVIC M, PASTERNAK J A, HON NG S, et al. Immunoproteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* identifies candidate neutralizing antibody targets for use in subunit vaccine development [J]. Vet Microbiol, 2019, 235: 270-279.
- [11] MAGDELDIN S, ENANY S, YOSHIDA Y, et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Clin Proteomics, 2014, 11 (1): 16.
- [12] GONG Y N, SHAO F. Sensing bacterial infections by NAIP receptors in NLRC4 inflammasome activation [J]. Protein Cell, 2012, 3 (2): 98-105.
- [13] HAYASHI F, SMITH K D, OZINSKY A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 [J]. Nature, 2001, 410 (6832): 1099-1103.
- [14] HALFF E F, DIEBOLDER C A, VERSTEEG M, et al. Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (46): 38460-38472.
- [15] LIU Q, DAI Y, WU X, et al. *Lawsonia intracellularis* flagellin protein Lflic stimulates NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways independently of TLR5 interaction [J]. Vet Microbiol, 2024, 289: 109960.
- [16] SEVERI E, HOOD D W, THOMAS G H. Sialic acid utilization by bacterial pathogens [J]. Microbiology, 2007, 153 (Pt 9): 2817-2822.
- [17] MANCO S, HERNON F, YESILKAYA H, et al. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis [J]. Infect Immun, 2006, 74

- (7): 4014–4020.
- [18] BOUCHET V, HOOD D W, LI J, et al. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (15): 8898–8903.
- [19] HAVLASOVÁ J, HERNYCHOVÁ L, HALADA P, et al. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain [J]. Proteomics, 2002, 2 (7): 857–867.
- [20] JUNGBLUT P R, BUMANN D. Immunoproteome of *Helicobacter pylori* [J]. Methods Enzymol, 2002, 358: 307–316.
- [21] VYTVYTSKA O, NAGY E, BLÜGGEL M, et al. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis [J]. Proteomics, 2002, 2 (5): 580–590.
- [22] LOCK R A, COOMBS G W, MCWILLIAMS T M, et al. Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori* [J]. Helicobacter, 2002, 7 (3): 175–182.
- [23] ZHENG F, SHAO Z Q, HAO X, et al. Identification of oligopeptide-binding protein (OppA) and its role in the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Microb Pathog, 2018, 118: 322–329.
- [24] BRUDESETH B E, WIULSRØD R, FREDRIKSEN B N, et al. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming [J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35 (6): 1759–1768.
- [25] TORRES-CORRAL Y, GIRON S A, GONZÁLEZ-BARREIRO O, et al. Effect of bivalent vaccines against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* subspecies achromogenes on health and survival of turbot [J]. Vaccines, 2021, 9 (8): 906.
- [26] WANGKAGHART E, DEVILLE S, WANG B, et al. Immune response and protective efficacy of two new adjuvants, Montanide™ ISA 763B VG and Montanide™ GEL02, administered with a *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2021, 116: 19–29.
- [27] 吴长有. 免疫记忆与疫苗研究开发 [J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21 (1): 4–7.
- [28] SALAZAR S, STARCK M F, VILLEGAS M F, et al. New formulation of a subunit vaccine candidate against *Lawsonia intracellularis* increases humoral and cellular immune responses [J]. Vaccines, 2023, 11 (12): 1817.