



表达兔球虫保护性抗原的重组枯草芽胞杆菌的构建与免疫保护效果分析

肖洁, 何维, 熊常明, 郝哥, 许力文, 古小彬, 杨光友*

(四川农业大学动物医学院, 成都 611130)

摘要: 兔球虫病是一种呈世界性分布的寄生性原虫病, 给养兔业造成了巨大的经济损失。传统的化学药物防控方法导致了普遍存在的耐药性及药物残留等问题; 枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)作为常用的益生菌之一, 被广泛用于外源蛋白的表达, 这种基于益生菌的口服疫苗接种策略发生副作用的风险较小, 还可以减少抗球虫药物的使用, 因此具有良好的发展前景。本研究以CotB为锚定蛋白构建整合质粒, 通过同源重组实现*Ei*AMA1、*Ei*IMP1、*Em*GAM56和*Em*ROP17抗原在枯草杆菌芽胞表面的展示。并使用重组芽胞*Ei*IMP1和重组芽胞*Ei*AMA1单独或混合拌料免疫家兔, 对其抗肠艾美耳球虫感染的免疫保护效果进行评估; 使用重组芽胞*Em*GAM56和重组芽胞*Em*ROP17单独或混合拌料免疫家兔, 对其抗大型艾美耳球虫感染的免疫保护效果进行评估。结果显示: 重组芽胞*rEi*AMA1单独拌料免疫家兔后, 卵囊排出量和病变计分都显著降低($P < 0.05$), 卵囊减少率达到59.91%。重组芽胞*Em*GAM56单独拌料免疫组效果相较重组芽胞*Em*ROP17单独和*Em*GAM56+*Em*ROP17混合拌料免疫组更好, 卵囊排量显著降低($P < 0.05$), 卵囊减少率达到68.54%。此外, 重组芽胞免疫后实验兔血清特异性IgG和肠道特异性IgA都出现显著上升($P < 0.05$)。综上, 构建的四种重组芽胞都可以刺激机体产生特异性的全身和局部体液免疫反应, 重组芽胞*rEi*AMA1和重组芽胞*Em*GAM56分别表现出较好的抗肠艾美耳球虫和抗大型艾美耳球虫感染的免疫保护效果, 因此, 枯草芽胞杆菌具有作为兔球虫病疫苗活载体的潜力。

关键词: 兔; 肠艾美耳球虫; 大型艾美耳球虫; 枯草芽胞杆菌; 基因工程疫苗

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1017-17

Surface Display Heterologous Proteins on *Bacillus subtilis* Spores and Their Protective Efficacy against *Eimeria intestinalis* and *Eimeria magna* Infection in Rabbits

XIAO Jie, HE Wei, XIONG Changming, HAO Ge, XU Liwen, GU Xiaobin, YANG Guangyou*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Rabbit coccidiosis is a worldwide-distributed parasitic protozoal disease, which has caused huge economic losses to rabbit industry. Traditional methods of anticoccidial treatment result in drug resistance and drug residue, vaccination is a promising alternative. The *rEi*AMA1, *rEi*IMP1, *Em*GAM56, and *Em*ROP17 were respectively displayed on the surface of *B. subtilis* spores by using a coat protein (CotB) as an anchor. Then the recombinant spores were used to oral immunize rabbits, the protective effects of *B. subtilis*-*rEi*AMA1, -*rEi*IMP1, and -*rEi*AMA1+*rEi*IMP1 against *Eimeria intestinalis* were evaluated; and the protective effects of *B. subtilis*-*Em*GAM56, -*Em*ROP17, and -*Em*GAM56+ *Em*ROP17 against *Eimeria magna* were evaluated. The results

收稿日期: 2025-05-23

基金项目: 四川省科技计划项目(2022ZHYZ0003)

作者简介: 肖洁, 主要从事动物寄生虫病研究, E-mail: xiaojjnu@163.com(现在工作单位: 乐山师范学院)

* 通信作者: 杨光友, 主要从事动物寄生虫病研究, E-mail: guangyou1963@126.com

showed that *B. subtilis*-rEiAMA1 immunized rabbits displayed better anti-*E. intestinalis* protective effect, the oocyst output and lesion score were significantly decreased ($P < 0.05$), the oocyst output decrease ratio was 59.91%. *B. subtilis*-EmGAM56 immunized rabbits displayed better anti-*E. magna* protective effect, the oocyst output was significantly decreased ($P < 0.05$), the oocyst output decrease ratio was 68.54%. Moreover, the immunized rabbits showed significantly increased specific serum IgG levels and specific IgA levels ($P < 0.05$). The four recombinant *B. subtilis* spores can stimulate the body to produce specific intestinal and systemic humoral immune responses. *B. subtilis*-rEiAMA1 and *B. subtilis*-EmGAM56 showed better immunoprotection against *E. intestinalis* and *E. magna*, respectively. Therefore, *B. subtilis* is a potential live vector for rabbit coccidiosis vaccines.

Keywords: rabbit; *Eimeria intestinalis*; *Eimeria magna*; *Bacillus subtilis*; genetically engineered vaccine

* **Corresponding author:** YANG Guangyou, E-mail: guangyou1963@126.com

兔球虫病是养兔业中最常见且危害严重的一种寄生性原虫病,兔球虫由于生活史较短,具有传播迅速的特点,给养兔业造成了巨大的经济损失^[1]。目前生产中使用的药物防治方法存在耐药性和药物残留等问题,耐药性的产生使得禁抗以来国家规定添加量难以发挥有效作用。接种疫苗是预防和控制传染病的重要手段,使用疫苗代替药物进行球虫病防控能很好地解决药物防治导致的许多问题,是有前景的发展方向。目前国内已有获批国家一类新兽药的兔球虫病三价活疫苗(中型艾美耳球虫、大型艾美耳球虫和肠艾美耳球虫),但活疫苗的生产成本和管理成本较高,且存在毒力返强风险。我们前期尝试通过制备肠艾美耳球虫(*Eimeria intestinalis*)和大型艾美耳球虫(*Eimeria magna*)重组亚单位疫苗以克服活疫苗存在的上述缺点,使用的重组蛋白也表现出一定的抗球虫感染效果^[2-3],但重组亚单位疫苗需冷藏,且需要进行皮下注射,家兔容易产生应激反应,影响生长性能。因此有必要寻求一种接种简单、稳定、安全性高的新型疫苗。

枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)是常用的益生菌之一,具有安全性高、不含内毒素、对营养要求低、遗传背景清楚等优点,被广泛用于外源蛋白的表达^[4]。将枯草杆菌芽胞衣壳蛋白基因与外源基因融合后,枯草杆菌在形成芽胞时外源蛋白可以跟随衣壳蛋白一起表达,从而将融合蛋白锚定在芽胞表面,同时形成的芽胞还具有佐剂活性^[5-6]。近年来,已有多位学者将外源蛋白DNA引入枯草芽胞杆菌制成基因工程活载体疫苗,通过口服或滴鼻等免疫方式对实验对象进行免疫,发现此类疫苗可以诱导

机体产生IgG和分泌型IgA抗体,发挥抗感染的免疫保护效果^[7-11]。

本研究以CotB为锚定蛋白构建整合质粒pDG364-CotB-EiIMP1、pDG364-CotB-EiAMA1、pDG364-CotB-EmGAM56和pDG364-CotB-EmROP17,通过同源重组分别实现4个抗原在枯草杆菌芽胞表面的展示。并使用重组芽胞EiIMP1和重组芽胞EiAMA1单独或混合拌料免疫家兔,对其免疫反应性以及抗肠艾美耳球虫感染的免疫保护效果进行评估;使用重组芽胞EmGAM56和重组芽胞EmROP17单独或混合拌料免疫家兔,对其免疫反应性以及抗大型艾美耳球虫感染的免疫保护效果进行评估。

1 材料与方法

1.1 虫株、试验动物和血清

肠艾美耳球虫和大型艾美耳球虫孢子化卵囊由四川农业大学寄生虫研究中心提供。

实验所用新西兰兔与试验场地由四川途达沃斯生物科技有限公司提供,每2只一笼饲养,饲养方法参照Wei等^[12]的报道。含有枯草芽胞杆菌重组芽胞和野生型芽胞的饲料委托四川某兔料厂定制,且无抗球虫药和抗生素。

肠艾美耳球虫和大型艾美耳球虫阳性血清和球虫阴性血清由四川农业大学寄生虫研究中心提供。

1.2 主要试剂和培养基配制

枯草芽胞杆菌168菌株(*Bacillus subtilis* 168)、pDG364质粒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。pMD19-T载体、DNA Marker、2×PrimeSTAR

Max Premix 购自大连宝生物工程有限公司。基因组 DNA 提取试剂盒、DAB 显色试剂盒 (20×) 购自北京索莱宝科技有限公司; 羊抗兔 IgA 二抗 (HRP 标记) 购自赛默飞世尔科技公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、肠杆菌 DH5 α 购、山羊抗兔 IgG 自天根生化科技 (北京) 有限公司。

表 1 PCR 引物名称和序列

Table 1 The names and sequences of PCR primer

基因名称 Gene name	PCR 引物 (5'→3') PCR primer (5'→3')	预期大小/bp Expected size/bp
<i>CotB</i> (登录号: AL009126.3)	F: 5'-CGGGATCCACGGATTAGGCCGTTTGTCC-3', <i>Bam</i> HI R: 5'-CCAAGCTTGGATGATTGATCATCTGAAG-3', <i>Hind</i> III	1 104
<i>EiIMP1</i> (登录号: OQ223223)	F: 5'-CCAAGCTTGGGGCCCTTTGTTTCAC-3', <i>Hind</i> III R: 5'-CGGAATTCTCATTGTCGTTGGGCTT-3', <i>Eco</i> RI	708
<i>EiAMA1</i> (登录号: OQ223222)	F: 5'-CCAAGCTTGTGCACCACAGTCGT-3', <i>Hind</i> III R: 5'-CGGAATTCTTAATCCTCTCCAACATA-3', <i>Eco</i> RI	717
<i>EmGAM56</i> (登录号: OM451230)	F: 5'-CCAAGCTTGAACCCCTCTACCATTGAG-3', <i>Hind</i> III R: 5'-CGGAATTCTTAGAAAGGCATGCCTGC-3', <i>Eco</i> RI	1 314
<i>EmROP17</i> (登录号: OM451229)	F: 5'-CCAAGCTTCTATCAAGAATTAGGAGCAGCC-3', <i>Hind</i> III R: 5'-CGGAATTCTACTCTGAGCTTTTTCCTTCACT-3', <i>Eco</i> RI	1 149

1.4 基因组 DNA 的提取与目的片段的 PCR 扩增

按照试剂盒操作说明提取野生型枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 168 基因组 DNA。

分别以野生型 *B. subtilis* 168 基因组和两种兔球虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后连接到克隆载体 pMD19-T 中, 转化到肠杆菌 DH5 α 并随后送至公司测序, 测序正确的菌株进行扩大培养, 分别提取并纯化质粒, 获得质粒 pMD19-T-*CotB*、pMD19-*EiIMP1*、pMD19-*EiAMA1*、pMD19-*EmGAM56* 和 pMD19-*EmROP17*

1.5 整合质粒的构建

使用 *Bam*H I /*Hind* III 对 pMD19-T-*CotB* 和 pDG364 空载质粒进行双酶切并纯化回收目的条带。将酶切后的 *CotB* 与 pDG364 质粒进行连接后转化到肠杆菌 DH5 α 进行扩培。菌液划线涂布于 LB 固体培养基 (氨苄青霉素, 100 μ g·mL⁻¹), 37 °C 过夜培养, 挑取单克隆进行培养和 PCR 鉴定, 阳性克隆进行质粒抽提以及双酶切鉴定, 验证正确的重组质粒命名为 pDG364-*CotB*。

使用 *Hind* III /*Eco* RI 对 pDG364-*CotB*、pMD19-*EiIMP1*、pMD19-*EiAMA1*、pMD19-*EmGAM56* 和 pMD19-*EmROP17* 进行双酶切并纯化回收目的条

带。将酶切后的目的片段与 pDG364-*CotB* 质粒进行连接。再按上一步的方法对重组质粒进行验证, 验证正确的整合质粒命名为 pDG364-*CotB*-*EiIMP1*、pDG364-*CotB*-*EiAMA1*、pDG364-*CotB*-*EmGAM56*、pDG364-*CotB*-*EmROP17*, 并将最后将验证正确的克隆保种, 保存于 -80 °C 备用。

1.3 引物设计

根据本实验室测得的肠艾美耳球虫和大型艾美耳球虫转录组数据, 以及 GenBank 中发表的枯草芽胞杆菌 *CotB* 基因序列设计特异性引物, 见表 1。

1.6 枯草芽胞杆菌感受态细胞的制备与整合质粒的转化

取野生型 *B. subtilis* 168 划线接种于无抗性 LB 固体培养基, 37 °C 过夜培养, 挑取单克隆于 3 mL 无抗性 LB 液体培养基中, 37 °C, 250 r·min⁻¹ 过夜培养。吸取 160 μ L 过夜培养的菌液于 8 mL SP I 培养基中, 37 °C, 250 r·min⁻¹ 培养 4~5 h 后, 取 0.2 mL 菌液于 2 mL SP II 培养基中, 37 °C, 100 r·min⁻¹ 培养 90 min, 最后在 SP II 培养基的菌液中加入 20 μ L EGTA (10 mmol·L⁻¹), 37 °C, 100 r·min⁻¹ 培养 10 min 即可。将制备好的枯草芽胞杆菌感受态细胞进行分装 (每管 500 μ L)。

使用限制性内切酶 *Xba* I 对整合质粒进行单酶切线性化后, 取 5 μ L 酶切好的产物加入 500 μ L 分装好的枯草芽胞杆菌感受态细胞中, 37 °C, 250 r·min⁻¹ 培养 90 min 后, 菌液划线接种于氯霉素抗性的 LB

固体培养基, 37 °C 过夜培养, 挑取单克隆于 5 mL 氯霉素抗性的 LB 液体培养基中过夜培养。

1.7 重组枯草芽胞杆菌淀粉酶活性鉴定

吸取少量 2.4 中的扩培菌液滴加到含 1% 可溶性淀粉的 LB 固体培养基, 以野生型 *B. subtilis* 168 菌株为对照, 在 37 °C 恒温培养箱中倒置培养过夜。分别滴加碘液, 进行淀粉酶活性分析。

1.8 重组枯草芽胞杆菌 PCR 及测序鉴定

将淀粉酶活性鉴定正确的克隆进行扩大培养后收集菌体, 按照试剂盒操作说明进行基因组 DNA 的提取。分别以 CotB-F/目的序列-R, 目的序列 F/R 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物进行回收和纯化后送公司测序。

1.9 重组枯草芽胞杆菌芽胞的制备与纯化

将验证后的四种重组枯草芽胞杆菌和野生型 *B. subtilis* 168 菌株平板划线后过夜培养, 挑取单菌落接种到 5 mL LB 液体培养基中过夜培养后, 再吸取 100 μ L 菌液到 100 mL 生孢培养基中, 37 °C, 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行 48 h, 镜检观察芽胞率达到 90% 以上时离心收集菌体。加入蛋白酶抑制剂 (1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和溶菌酶 (4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 30 min 后, 用 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 洗涤芽胞, 去离子水洗涤

3 次后用无菌水重悬芽胞, 并于 68 °C 水浴 1 h。

1.10 重组芽胞衣壳蛋白的免疫印记分析

制备好的芽胞用芽胞衣壳蛋白提取缓冲液处理 2 h 后, 用 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤后再悬浮进行超声, 离心取沉淀, 收集衣壳蛋白。以芽胞衣壳蛋白为抗原 (上样量 20 μ L), 一抗分别为肠艾美耳球虫和大型艾美耳球虫阳性血清 (1:100 稀释)。蛋白通过 12% SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜。洗涤缓冲液 (TBST) 洗膜 5 min $\times$ 3 次后加入 5% 脱脂奶粉室温条件下封闭 2 h。加一抗 (1:50 dilution in TBS), 于 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗, 室温孵育 2 h 后, 弃二抗加 TBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次, 使用 DAB 显色试剂盒 (20 $\times$) 避光显色, 至条带出现时加入双蒸水终止反应。

1.11 免疫保护试验设计

试验动物 (138 只, 45 日龄, 1.106 kg $\pm$ 0.098 kg) 分组和免疫程序见表 2。试验时间安排与样品采集见图 1, 肠道组织样本和粪便样本均在试验结束时收集。试验开始前另外选取 6 只实验兔进行安乐死, 收集小肠内容物用作空白对照。

表 2 试验动物分组和免疫程序

Table 2 Animal grouping and immune procedures

组别 Groups	实验兔数量 Number of rabbits	免疫剂量 (拌料) Dosage	免疫时间 (日龄) Immunization time (days old)	免疫途径 Immunization route	攻虫剂量/日龄/途径 Challenge dose/days old/route
空白对照组	10	—	45~73	正常日料	—
Ei 阳性对照组 (野生型芽胞)	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	5×10^4 个肠艾美耳球虫孢子 化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Ei</i> IMP1	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	5×10^4 个肠艾美耳球虫孢子 化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Ei</i> AMA1	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	5×10^4 个肠艾美耳球虫孢子 化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Ei</i> IMP1+ <i>Ei</i> AMA1	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	5×10^4 个肠艾美耳球虫孢子 化卵囊/59 日龄/口服
Em 阳性对照组 (野生型芽胞)	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	1×10^5 个大型艾美耳球虫孢 子化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Em</i> GAM56	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	1×10^5 个大型艾美耳球虫孢 子化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Em</i> ROP17	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	1×10^5 个大型艾美耳球虫孢 子化卵囊/59 日龄/口服
重组芽胞 <i>Em</i> GAM56+ <i>Em</i> ROP17	16	$1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	45~73	拌料	1×10^5 个大型艾美耳球虫孢 子化卵囊/59 日龄/口服

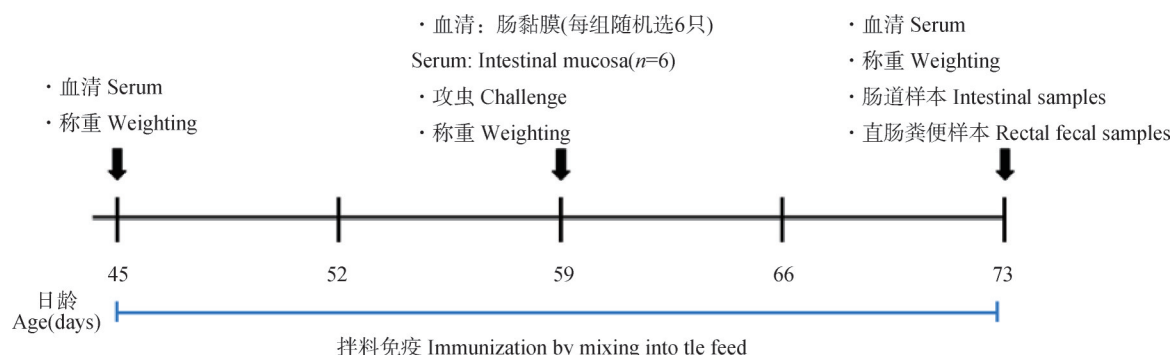


图1 试验时间安排与样品采集

Fig. 1 Time course of the collection of the samples

1.12 免疫保护效果评估

肠艾美耳球虫^[3]和大型艾美耳球虫^[2]的免疫保护效果评估标准参考之前发表的文章,具体如下:

肠艾美耳球虫:与正常动物相似,空肠回肠正常,无肉眼病变计0分;肠道存在少量分散的白色小点或者少量出血点,无增厚计1分;肠壁略微增厚,出血点或白色结节较多计2分;肠壁肥厚,有大量出血点或很多白色结节计3分;肠壁广泛出血,白色结节连接成片,肠壁极度扩张增厚似脑回状,或实验兔死亡计4分。

大型艾美耳球虫:与正常动物相似,空肠回肠正常,无肉眼病变计0分;肠壁有少量出血点,肠壁轻微增厚计1分;肠道内容物有少量血液,肠壁增厚且有散在的出血点或白色结节计2分;肠道内容物少,肠道有大量的出血点或白色结节,肠壁明显增厚计3分;兔死亡计4分。

1.13 血清特异性抗体 IgG 水平的检测

使用间接 ELISA 方法对血清中特异性 IgG 水平进行检测。96 孔板中分别包被对应的单个或组合重组蛋白(即重组蛋白 *EiIMP1*、*EiAMA1*、*EmGAM56* 和 *EmROP17*)。

1.14 兔小肠内容物的收集与特异性抗体 IgA 水平的检测

试验开始前收集 6 只健康实验兔小肠内容物作为空白对照;之后分别在攻虫前和试验结束时,每组随机(健康组不收集)收集 6 只实验兔小肠内容物。在装有小肠内容物的离心管中分别加入 5 倍体积预冷的 PBS,充分混合均匀后,4℃,2 500 r·min⁻¹ 离心 20 min 后收集上清,将上清分装后于 -80℃ 冰箱保存备用。

使用间接 ELISA 方法对收集的样品进行特异性 IgA 水平的检测。96 孔板中分别包被对应的单个或

组合重组蛋白,即重组蛋白 *EiIMP1* (2 μg·孔⁻¹)、*EiAMA1* (2 μg·孔⁻¹)、*EmGAM56* (2 μg·孔⁻¹) 和 *EmROP17* (2 μg·孔⁻¹),使用两种重组蛋白组合包被则每种重组蛋白加入 1 μg (1 μg+1 μg·孔⁻¹);一抗分别为每组收集的肠内容物上清液,二抗为山羊抗兔 IgA (1:10 000)。

1.15 数据分析

所有数据均以“平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,多组间差异性比较方法采取单因素方差分析(one-way ANOVA),使用 IBM SPSS statistics 22.0 进行统计分析。*P* 值小于 0.05 即被判定为数据差异显著,*P* 值小于 0.01 即被判定为数据差异极显著。使用 GraphPad Prism version 8.0.2 (GraphPad Software) 进行作图。

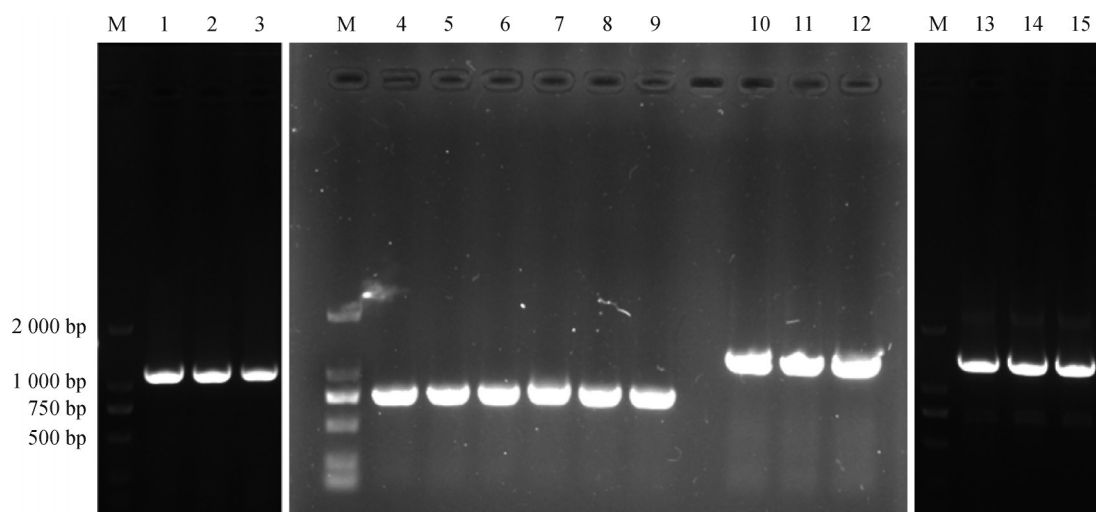
2 结 果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

成功从 *B. subtilis* 168 菌株的基因组 DNA 中扩增出衣壳蛋白 CotB 基因的特异性条带(图 2,泳道 1-3);从肠艾美耳球虫的 cDNA 中扩增出 *EiIMP1* (图 2,泳道 4-6)和 *EiAMA1* (图 2,泳道 7-9)基因的特异性条带;从大型艾美耳球虫的 cDNA 中扩增出 *EmROP17* (图 2,泳道 10-12)和 *EmGAM56* (图 2,泳道 13-15)基因的特异性条带。经克隆测序,扩增片段均与 GenBank 数据库中对应的基因序列吻合。

2.2 整合质粒的酶切鉴定

扩增的 5 个基因序列经鉴定分析后,先与 pMD19-T 载体连接,提取所构建的 pMD19-T-CotB、pMD19-*EiIMP1*、pMD19-*EiAMA1*、pMD19-*EmROP17* 和 pMD19-*EmGAM56* 重组质粒进行双酶切,其中 pMD19-T-CotB 使用 *Bam*H I / *Hind* III 进行双酶切,其余使用 *Hind* III / *Eco*R I,琼脂糖凝



M. DNA 相对分子质量标准(DL2000);1~3. *CotB*;4~6. *EiIMP1*;7~9. *EiAMA1*;10~12. *EmROP17*;13~15. *EmGAM56*
M. DL2000 DNA marker; 1-3. *CotB*; 4-6. *EiIMP1*; 7-9. *EiAMA1*; 10-12. *EmROP17*; 13-15. *EmGAM56*

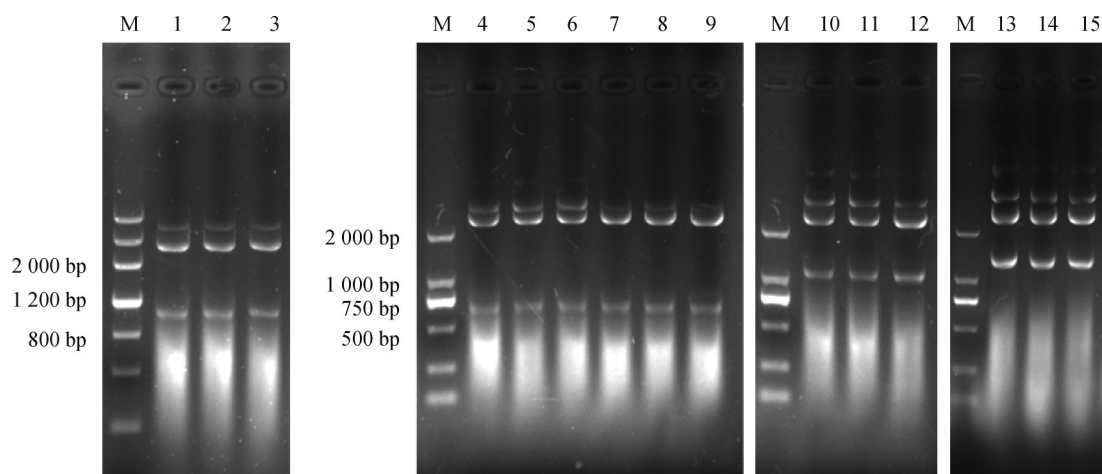
图2 目的基因的PCR扩增

Fig. 2 PCR amplification of target genes

胶电泳检测均获得预期大小的目的片段(图3)。

将上述双酶切获得的 *CotB*、目的基因 *EiIMP1*、*EiAMA1*、*EmROP17* 和 *EmGAM56* 依次连接到质粒 pDG364 中,分别构建重组质粒 pDG364-*CotB*-*EiIMP1*、pDG364-*CotB*-*EiAMA1*、pDG364-*CotB*-

EmROP17 和 pDG364-*CotB*-*EmGAM56*。连接后再使用 *Bam*H I / *Hind* III、*Hind* III / *Eco*R I 和 *Bam*H I / *Eco*R I 三对酶切位点对重组 pDG364 质粒进行双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测均获得预期大小的目的片段(图4)。



M. DNA 相对分子质量标准(Marker III 和 DL2 000);1~3. pMD19-T-*CotB*;4~6. pMD19-T-*EiIMP1*;7~9. pMD19-T-*EiAMA1*;10~12. pMD19-T-*EmROP17*;13~15. pMD19-T-*EmGAM56*
M. DL2 000 DNA marker (Marker III, DL2000); 1-3. pMD19-T-*CotB*; 4-6. pMD19-T-*EiIMP1*; 7-9. pMD19-T-*EiAMA1*; 10-12. pMD19-T-*EmROP17*; 13-15. pMD19-T-*EmGAM56*.

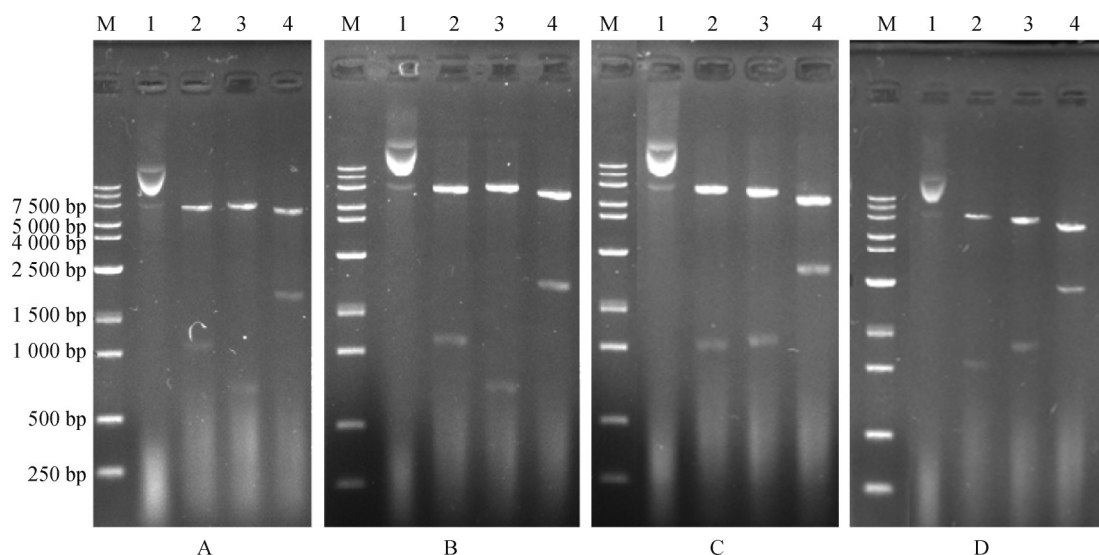
图3 重组 pMD19-T 质粒的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pMD19-T plasmids by double enzyme digestion

2.3 淀粉酶活性的鉴定

重组质粒 pDG364-*CotB*-*EiIMP1*、pDG364-*EiAMA1*、pDG364-*EmROP17* 和 pDG364-*EmGAM56*

与 *B. subtilis* 168 淀粉酶基因拥有同源的 5' 端和 3' 端 DNA 片段,通过同源重组将 *CotB*-*EiIMP1*、*CotB*-*EiAMA1*、*CotB*-*EmROP17* 和 *CotB*-*EmGAM56*



M. DNA 相对分子质量标准 (Marker III); A. 重组质粒 pDG364-CotB-*Ei*IMP1 双酶切产物; B. 重组质粒 pDG364-CotB-*Ei*AMA1 双酶切产物; C. 重组质粒 pDG364-CotB-*Em*ROP17 双酶切产物; D. 重组质粒 pDG364-CotB-*Em*GAM56 双酶切产物; 1. 重组质粒; 2. *Bam*H I / *Hind* III 酶切产物; 3. *Hind* III / *Eco* R I 酶切产物; 4. *Bam*H I / *Eco* R I 酶切产物

M. DL2000 DNA marker (Marker III); A. pDG364-CotB-*Ei*IMP1; B. pDG364-CotB-*Ei*AMA1; C. pDG364-CotB-*Em*ROP17; D. pDG364-CotB-*Em*GAM56; 1. Integrating plasmids; 2. *Bam*H I / *Hind* III digestion products; 3. *Hind* III / *Eco* R I digestion products; 4. *Bam*H I / *Eco* R I digestion products

图4 整合 pDG364 质粒的双酶切鉴定

Fig. 4 Identification of integrating pDG364 plasmids by double enzyme digestion

分别导入 *B. subtilis* 168 菌株基因组中,从而构建分别表达 CotB-*Ei*IMP1、CotB-*Ei*AMA1、CotB-*Em*ROP17 和 CotB-*Em*GAM56 的重组枯草芽胞杆菌。重组后的枯草芽胞杆菌淀粉酶基因由于外源片段的插入失活,无法分解淀粉,根据此特性可对转化子进行初步鉴定筛选。将碘液喷洒在接种有野生型和重组枯草芽胞杆菌的 LB 固体培养基上(含 1% 可溶性淀粉),结果显示重组枯草芽胞杆菌菌落周围培养基与碘液发生反应呈现蓝色,而野生型 *B. subtilis* 168 菌落周围培养基因为淀粉被分解而不发生显色反应(图 5)。

2.4 重组枯草芽胞杆菌的 PCR 鉴定

为了进一步验证重组枯草芽胞杆菌淀粉酶基因失活是由于外源基因的插入所致,以野生型 *B. subtilis* 168 菌株作为对照,分别以 CotB-F/目的序列-R 和目的序列 F/R 为引物,对重组和原始 *B. subtilis* 168 菌株基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。结果显示,四个重组枯草芽胞杆菌分别用两对引物进行 PCR 鉴定,都在观察到符合预期大小的条带,而野生型对照则没有扩增出条带(图 6)。将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,结果表明融合片段 CotB-*Ei*AMA1、-*Ei*IMP1、-*Em*ROP17

和-*Em*GAM56 整合到了 *B. subtilis* 168 菌株的基因组中。

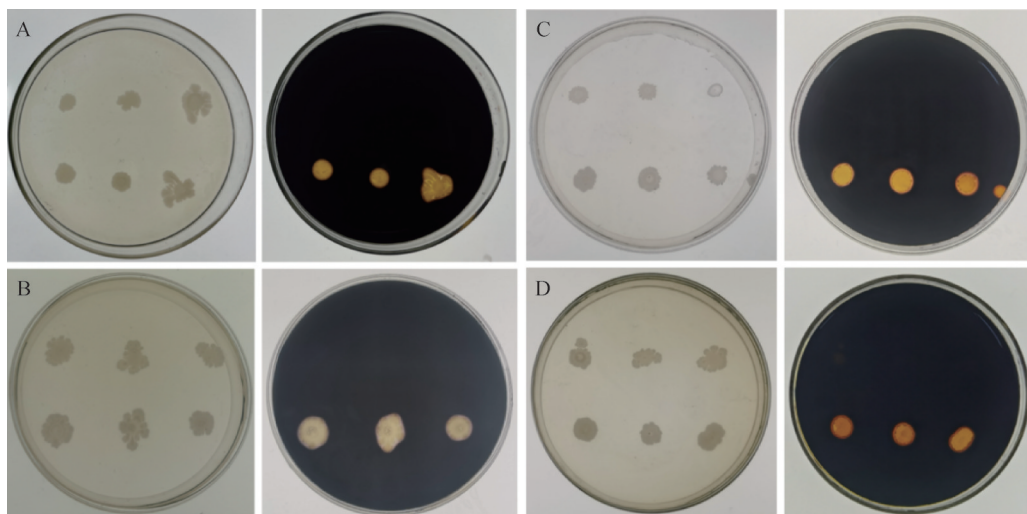
2.5 免疫印记分析

提取野生型和重组 *B. subtilis* 168 的芽胞衣壳蛋白进行免疫印记分析,结果表明在野生型 *B. subtilis* 168 衣壳蛋白中,目标位置附近无阳性反应条带出现(图 7C、7F),而重组芽胞 *Ei*IMP1(图 7A)和重组芽胞 *Ei*AMA1(图 7B)的衣壳蛋白能与肠艾美耳球虫感染兔血清发生反应,在 NC 膜上 66 ku 位置出现阳性反应条带;重组芽胞 *Em*GAM56(图 7D)和重组芽胞 *Em*ROP17(图 7E)的衣壳蛋白能与大型艾美耳球虫感染兔血清发生反应,在 NC 膜上 90 ku 和 80 ku 位置分别出现阳性反应条带,表明 4 个重组芽胞均成功表达目的片段,且具有反应原性。

2.6 重组芽胞 *Ei*AMA1、*Ei*IMP1 和 *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 免疫保护效果的评估

经拌料免疫两周后,各组实验兔之间平均体重增长不存在显著性差异(表 3)($P > 0.05$),无不良反应,说明重组枯草杆菌芽胞安全性良好。

经口感染 5×10^4 个肠艾美耳球虫孢子化卵囊后第一周,实验兔整体出现精神沉郁以及轻微的饮、食欲减退,攻虫对照组死亡一只实验兔;攻虫后第

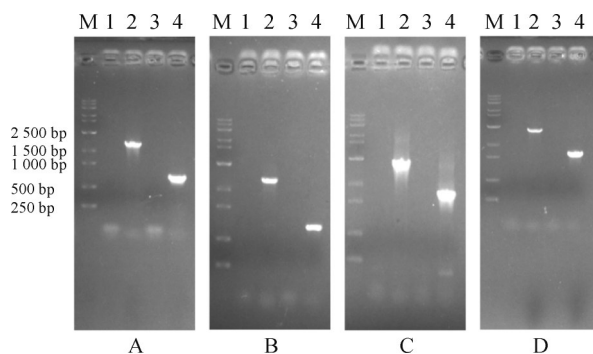


A~D. 上排3个菌落分别为表达 CotB-*EiIMP1*、CotB-*EiAMA1*、CotB-*EmROP17* 和 CotB-*EmGAM56* 片段的重组枯草芽胞杆菌,下排3个菌落为野生型 *B. subtilis* 168 对照;每个图片左边平皿为培养后菌落生长情况,右边为加入碘液后的染色情况

A-D. The three colonies (upper row) are recombinant *B. subtilis* 168 expressing CotB-*EiIMP1*, CotB-*EiAMA1*, CotB-*EmROP17*, and CotB-*EmGAM56* fragments, respectively; the three colonies (lower row) are wild-type *B. subtilis* 168 control

图5 淀粉酶活性鉴定

Fig. 5 Identification of amylase activity



A~D 分别为重组枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 168-*EiAMA1*、-*EiIMP1*、-*EmROP17*、-*EmGAM56*; M: DNA 相对分子质量标准 (D1500); 泳道1: 引物分别为 CotB-F 和目的序列-R, 野生型 *B. subtilis* 168 基因组 DNA 为模板; 泳道2: 引物分别为 CotB-F 和目的序列-R, 对应的重组芽胞基因组 DNA 为模板; 泳道3: 引物为目的序列-F/R, 野生型 *B. subtilis* 168 基因组为模板; 泳道4: 引物为目的序列-F/R, 对应的重组芽胞基因组 DNA 为模板。

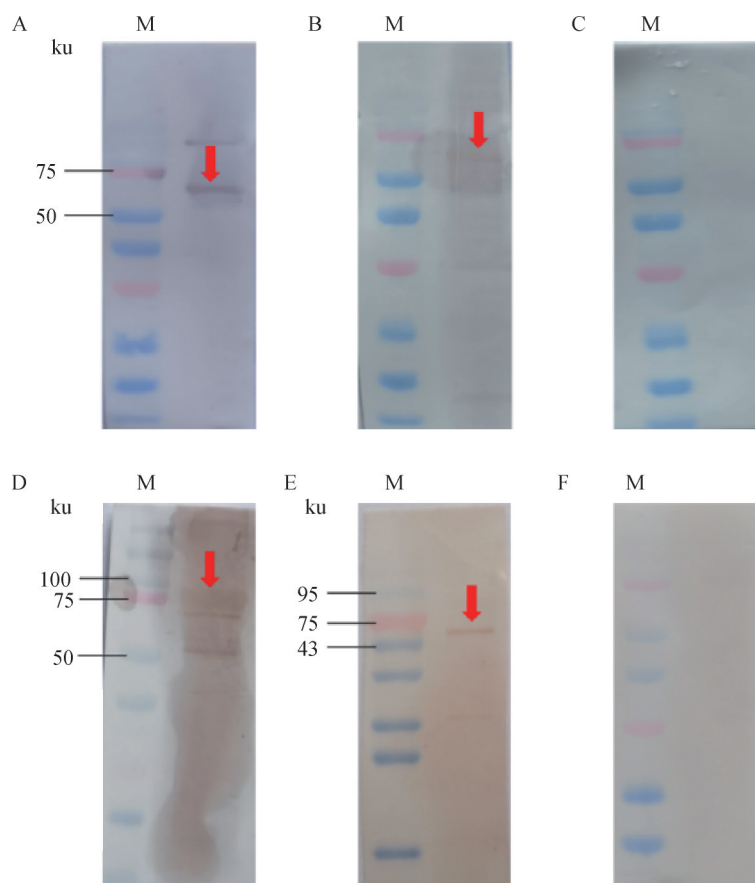
A-D are recombinant *B. s-EiAMA1*, -*EiIMP1*, -*EmROP17*, and -*EmGAM56*, respectively; M: DNA maker D15000; lane 1: primers CotB-F and target-R used for amplification, wild-type *B. s* genomic DNA as template; lane 2: primers CotB-F and target-R used for amplification, recombinant *B. s* genomic DNA as template; lane 3: primers target-F/R used for amplification, wild-type *B. s* genomic DNA as template; lane 4: primers target-F/R used for amplification, recombinant *B. s* genomic DNA as template.

图6 重组枯草芽胞杆菌 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant *B. subtilis* by PCR

二周内攻虫对照组和试验组陆续出现实验兔死亡,死亡兔瘦弱,但无明显的腹泻症状,大多表现为粪便变软不成形。试验结束后进行病理剖检观察,各组死亡兔肠道病变都极其严重,表现为肠壁极度扩张增厚似脑回状,肠道内有大量出血点、血液或炎

性渗出物。整体比较病变程度,三个免疫组中,重组芽胞 *EiAMA1* 免疫组表现最好,重组芽胞 *EiAMA1*+*EiIMP1* 免疫组其次,而重组芽胞 *EiIMP1* 免疫组表现不佳(图8)。



M. 蛋白质分子量标准 marker; A~C 分别为重组芽胞 *Ei*IMP1、重组芽胞 *Ei*AMA1 和野生型芽胞衣壳蛋白与兔肠艾美耳球虫阳性血清反应; D~F 分别为重组芽胞 *Em*GAM56、重组芽胞 *Em*ROP17 和野生型芽胞衣壳蛋白与兔大型艾美耳球虫阳性血清反应。(箭头指示条带所在处)

M. protein molecular weight marker; A-C: recombinant *B. s-Ei*IMP1 spores, recombinant *B. s-Ei*AMA1 spores, and wild-type *B. s* spores capsid protein incubated with anti-*E. intestinalis* positive sera; D-F: recombinant *B. s-Em*GAM56 spores, recombinant *B. s-Em*ROP17 spores, and wild-type *B. s* spores capsid protein incubated with anti-*E. magna* positive sera. (the bands are indicated using arrows)

图7 芽胞衣壳蛋白的免疫印迹分析

Fig. 7 Western blot analysis of spore proteins

重组芽胞 *Ei*AMA1、*Ei*IMP1 和 *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 免疫组的攻虫后相对增重虽然都高于 *Ei* 阳性对照组,但不存在显著差异 ($P>0.05$),其中重组芽胞 *Ei*AMA1 免疫组相对增重介于空白对照组和 *Ei* 阳性对照组之间,与空白对照组相对增重也不存在显著差异 ($P>0.05$),三者的相对增重率分别为 64.92%、53.48% 和 52.30%。与 *Ei* 阳性对照组相比,重组芽胞 *Ei*AMA1 免疫组的卵囊排出量显著降低 ($P<0.05$),卵囊减少率为 59.91%;重组芽胞 *Ei*IMP1 和 *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 免疫组的卵囊排出量虽然相较对照组也出现下降,但不存在显著性 ($P>0.05$),卵囊减少率分别为 37.18% 和 45.37%。除空白对照组外,各组均出现实验兔死亡。此外,

三个重组芽胞免疫组的病变评分均低于 *Ei* 阳性对照组,但只有重组芽胞 *Ei*AMA1 免疫组病变计分显著降低 ($P<0.05$)。

2.7 重组芽胞 *Em*GAM56、*Em*ROP17 和 *Em*GAM56+*Em*ROP17 免疫保护效果的评估

经拌料免疫两周后,各组实验兔之间平均体重增长不存在显著性差异(表4) ($P>0.05$),无不良反应,说明重组蛋白安全性良好。

经口感染 1×10^5 个大型艾美耳球虫孢子化卵囊后第二周,个别实验兔出现精神沉郁,粪便变软不成形的症状。试验结束后进行病理剖检观察,与三个重组芽胞免疫组对比,Em 阳性对照组肠道的出血和增厚更为明显(图9)。

表 3 不同评价指标下重组芽胞 *Ei*AMA1、*Ei*IMP1 和 *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 抗肠艾美耳球虫感染的效果
Table 3 Protective effects of recombinant spores *Ei*AMA1, *Ei*IMP1 and *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 against *E. intestinalis* infection under different evaluation indicators

组别 Groups	攻虫前 平均增重/g Average body weight gain before challenge (g)	攻虫后 平均增重/g Average body weight gain after challenge (g)	相对增重 率/% Relative body weight gain rate (%)	克粪便卵囊 排出量 ($\times 10^2 \cdot g^{-1}$) Oocyst per gram of faeces ($\times 10^7/g$)	卵囊减少 率/% Oocyst decrease ratio (%)	存活率/% Survival rate (%)	平均病变计分 Mean lesion scores	ACI
空白对照组	467.50 $\pm$ 108.20 ^a	495.50 $\pm$ 157.03 ^a	100	0 ^a	—	100	0 ^a	200
Ei 阳性对照组	463.60 $\pm$ 135.34 ^a	216.00 $\pm$ 341.38 ^b	43.59	2.19 $\pm$ 1.56 ^b	0	50	3.80 $\pm$ 0.63 ^b	15.59
重组芽胞 <i>Ei</i> AMA1	428.30 $\pm$ 176.42 ^a	321.67 $\pm$ 74.25 ^{ab}	64.92	0.88 $\pm$ 0.60 ^c	59.91	90	2.80 $\pm$ 1.13 ^c	116.92
重组芽胞 <i>Ei</i> IMP1	486.40 $\pm$ 85.71 ^a	265.00 $\pm$ 137.02 ^b	53.48	1.38 $\pm$ 0.91 ^{bc}	37.18	50	3.20 $\pm$ 0.92 ^{bc}	36.36
重组芽胞 <i>Ei</i> AMA1+ <i>Ei</i> IMP1	480.00 $\pm$ 175.93 ^a	259.17 $\pm$ 56.07 ^b	52.30	1.20 $\pm$ 0.89 ^{bc}	45.37	60	3.00 $\pm$ 0.94 ^{bc}	62.30

数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”的形式展示。在每一列,不同的字母标注的数据间存在显著差异($P < 0.05$),相同字母标注的数据间不存在显著差异($P > 0.05$)

The data is presented in the form of “ $\bar{x} \pm s$ ”. In each column, there is a significant difference ($P < 0.05$) between data labeled with different letters, while there is no significant difference ($P > 0.05$) between data labeled with the same letter



(图 8 Fig.8)

(转下页 Carried forward)

(续图8 Continued)



A~E 分别为空白对照组、Ei 阳性对照组、重组芽胞 *Ei*AMA1 免疫组、重组芽胞 *Ei*IMP1 免疫组和重组芽胞 *Ei*AMA1+*Ei*IMP1 免疫组

A-E represent black control group, Ei positive group, recombinant *B. s-Ei*AMA1 spore group, recombinant *B. s-Ei*IMP1 spore group, recombinant *B. s-Ei*AMA1+*Ei*IMP1 spore group

图8 肠道病变观察

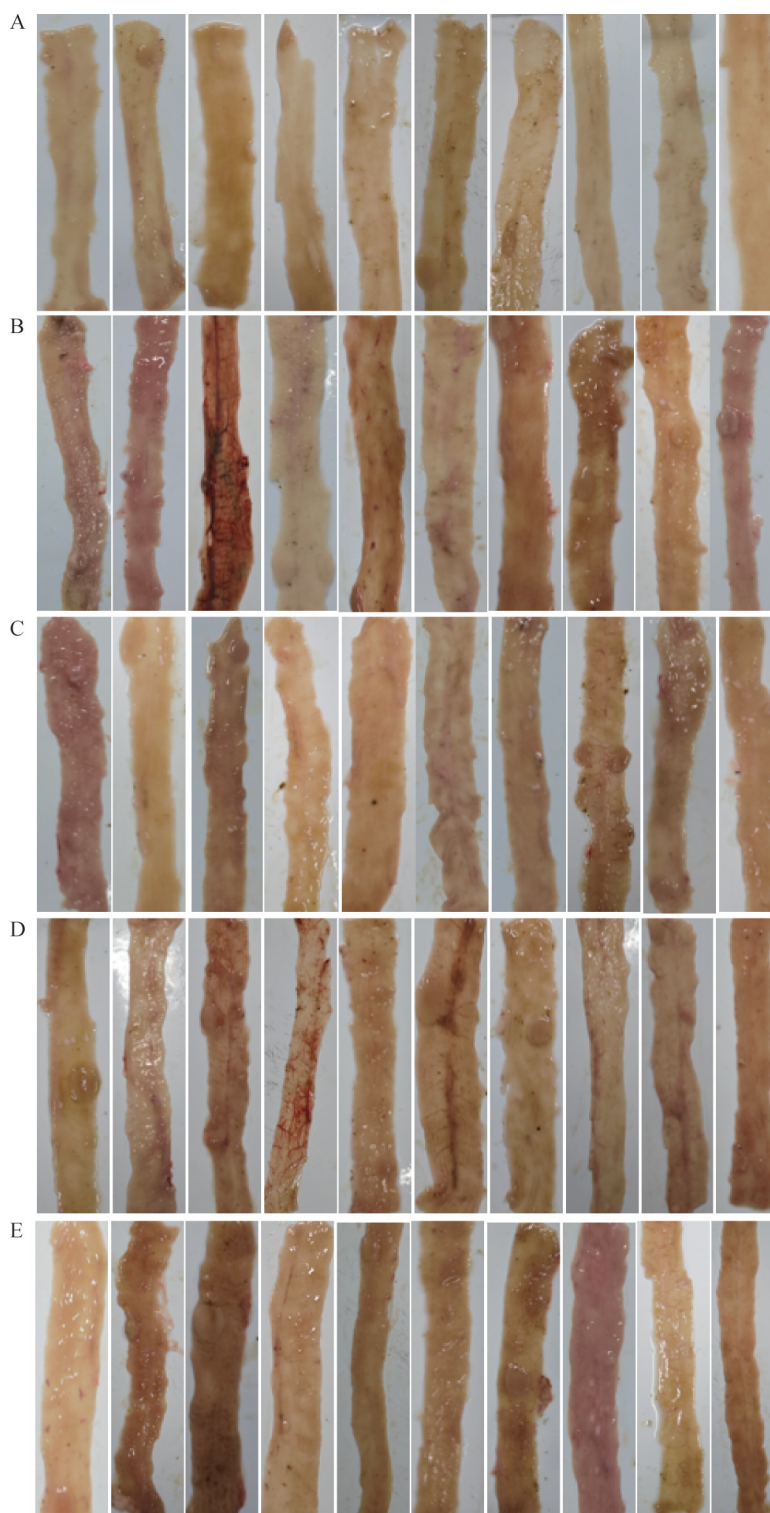
Fig. 8 Gross postmortem examinations

表4 不同评价指标下重组芽胞 *Em*GAM56、*Em*ROP17 和 *Em*GAM56+*Em*ROP17 抗大型艾美耳球虫感染的效果Table 4 Protective effects of recombinant spores *Em*GAM56, *Em*ROP17 and *Em*GAM56+*Em*ROP17 against *E. magna* infection under different evaluation indicators

组别 Groups	攻虫前平均 增重/g Average body weight gain before challenge (g)	攻虫后平均 增重/g Average body weight gain after challenge (g)	相对增重 率/% Relative body weight gain rate (%)	克粪便卵囊 排出量 ($\times 10^4 \cdot g^{-1}$) Oocyst per gram of faeces ($\times 10^4 \cdot g^{-1}$)	卵囊减少 率/% Oocyst decrease ratio (%)	存活 率/% Survival rate (%)	平均病变 计分 Mean lesion scores	ACI
空白对照组	467.50 $\pm$ 108.20 ^a	495.50 $\pm$ 157.03 ^a	100	0 ^a	—	100	0 ^a	200
Em 阳性对照组	421.60 $\pm$ 93.22 ^a	271.56 $\pm$ 62.79 ^b	54.80	4.26 $\pm$ 2.75 ^b	0	90	2.30 $\pm$ 0.95 ^b	88.53
重组芽胞 <i>Em</i> GAM56	429.30 $\pm$ 85.65 ^a	371.00 $\pm$ 119.44 ^{bc}	74.87	1.34 $\pm$ 0.82 ^c	68.54	100	1.30 $\pm$ 0.95 ^c	151.87
重组芽胞 <i>Em</i> ROP17	495.50 $\pm$ 177.57 ^a	381.88 $\pm$ 64.36 ^c	77.07	1.73 $\pm$ 0.84 ^c	59.30	90	1.90 $\pm$ 0.99 ^c	136.07
重组芽胞 <i>Em</i> GAM56+ <i>Em</i> ROP17	525.50 $\pm$ 223.46 ^a	345.00 $\pm$ 76.24 ^{bc}	69.63	1.91 $\pm$ 1.07 ^c	55.23	90	1.80 $\pm$ 1.13 ^c	131.63

数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”的形式展示。在每一列,不同的字母标注的数据间存在显著差异($P < 0.05$),相同字母标注的数据间不存在显著差异($P > 0.05$)

The data is presented in the form of “ $\bar{x} \pm s$ ”. In each column, there is a significant difference ($P < 0.05$) between data labeled with different letters, while there is no significant difference ($P > 0.05$) between data labeled with the same letter



A~E 分别为空白对照组、Em 阳性对照组、重组芽胞 *EmAMA1* 免疫组、重组芽胞 *EmROP17* 免疫组和重组芽胞 *EmGAM56+EmROP17* 免疫组

A-E represent black control group, Em positive group, recombinant *B. s-EmGAM56* spore group, recombinant *B. s-EmROP17* spore group, recombinant *B. s-EmGAM56+EmROP17* spore group

图9 肠道病变观察

Fig. 9 Gross postmortem examinations

重组芽胞 *EmGAM56*、*EmROP17* 和 *EmGAM56* + *EmROP17* 免疫组的攻虫后相对增重虽然都高于 *Em* 阳性对照组,但只有重组芽胞 *EmROP17* 免疫组呈现显著差异 ($P < 0.05$),三者的相对增重率分别为 74.87%、77.07% 和 69.63%。与 *Em* 阳性对照组相比,免疫组的卵囊排出量和病变计分都出现显著降低 ($P < 0.05$)。

2.8 血清中特异性 IgG 抗体的检测

实验兔血清特异性 IgG 抗体水平的检测结果表明,与拌料饲喂野生型枯草杆菌芽胞的实验兔相比,拌料饲喂重组枯草杆菌芽胞的实验兔在第二周均表现出显著的特异性抗体水平上升,且在攻虫后第二周仍处于较高水平(图 10)。

2.9 血清中特异性 IgA 抗体的检测

通过间接 ELISA 检测实验兔小肠内容物特异性 IgA 抗体水平(图 11),结果表明,在攻虫前的时间点上,与野生型芽胞-*Ei* 攻虫对照组相比,重组芽胞 *EiAMA1* 免疫组特异性 IgA 水平在连续拌料饲喂两周后显著上升 ($P < 0.05$),而重组芽胞 *EiIMP1* 和 *EiIMP1* + *EiAMA1* 免疫组虽然也出现上升,但与攻虫对照组无显著差异 ($P > 0.05$);攻虫后两周各组特异性 IgA 水平又进一步上升,其中重组芽胞 *EiAMA1* 和 *EiIMP1* + *EiAMA1* 免疫组显著高于攻虫对照组 ($P < 0.05$)。

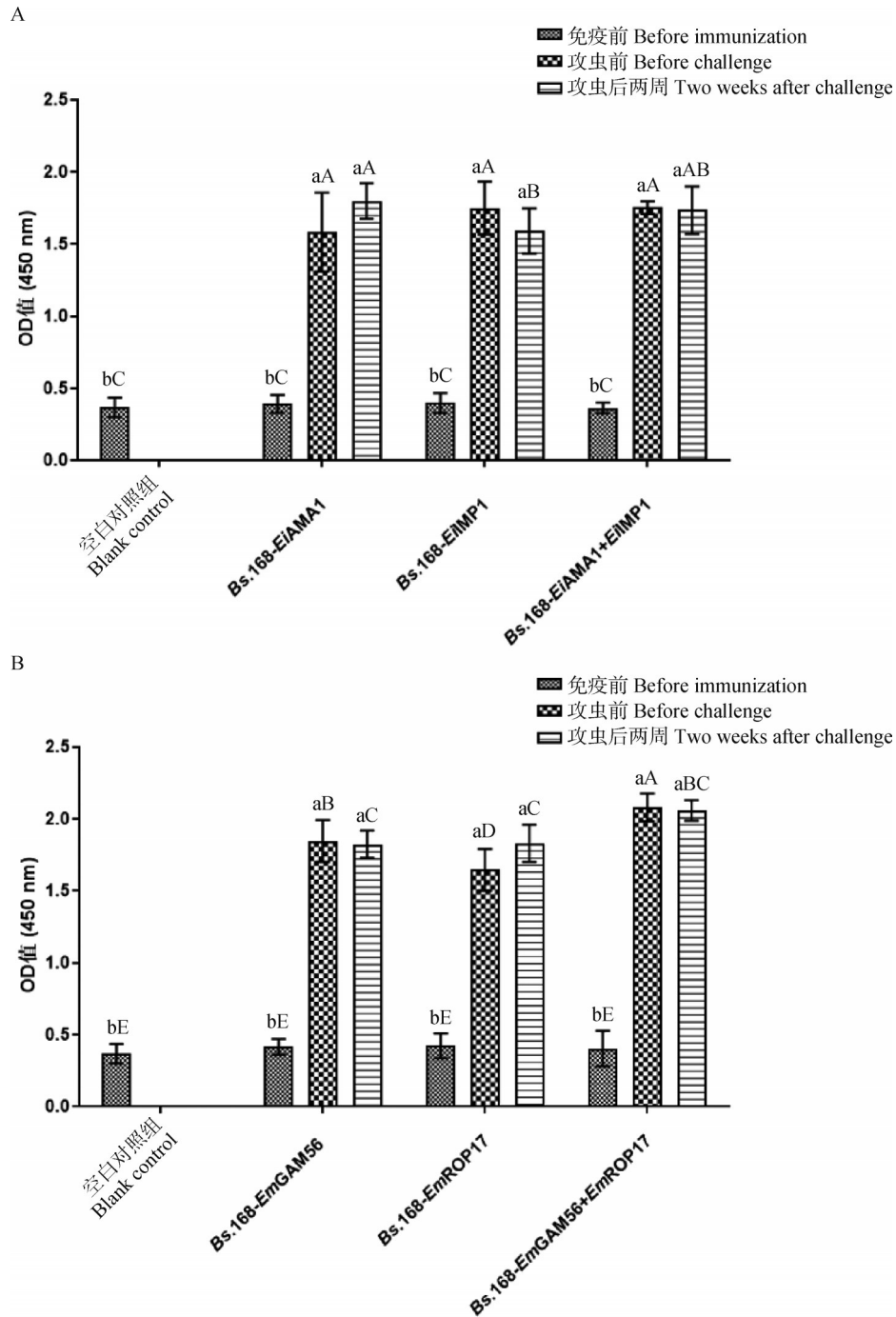
在大型艾美耳球虫攻虫的四个试验组中,在攻虫前的时间点,与野生型芽胞-*Em* 攻虫对照组相比,三个拌料免疫组实验兔的特异性 IgA 抗体水平都有一定程度上升,但只有重组芽胞 *EmROP17* 免疫组上升显著 ($P < 0.05$);攻虫后两周重组芽胞 *EmGAM56* 和 *EmROP17* 免疫组特异性 IgA 抗体水平显著高于攻虫对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

实验室前期对肠艾美耳球虫重组蛋白 *rEiAMA1* 和 *rEiIMP1*^[3],大型艾美耳球虫重组蛋白 *EmGAM56* 和 *EmROP17*^[2] 的免疫保护效果进行了评估,上述四种抗原均表现出一定的抗球虫感染效果,分别具有作为肠艾美耳球虫和大型艾美耳球虫候选疫苗抗原的潜力。但在重组亚单位疫苗的免疫保护试验中,我们发现反复捕捉实验兔进行疫苗注射,会产生较强的应激反应,与同日龄正常存栏兔相比,增重明显受到影响;此外,重组亚单位疫苗中添加了疫苗佐剂,导致其不适合长期储备,保质期有限;重

组亚单位疫苗难以在常温条件下储存,需冷藏运输,成本较高。以枯草杆菌芽胞为载体的基因工程活载体疫苗,具有耐热稳定、可口服免疫的特点。研究发现,将构建的重组枯草杆菌芽胞破伤风疫苗冻干并在 45℃ 条件下保存 12 个月后,用于免疫小鼠仍能表现出良好免疫保护效果^[13]。并且表达外源蛋白的重组枯草芽胞杆菌具有传代稳定性,为疫苗的大规模生产提供了基础^[14]。这种基于益生菌的口服疫苗接种策略发生副作用的风险较小^[15],还可以减少抗球虫药物的使用,从而降低机体药物残留和虫体产生耐药性的风险。近年来,枯草杆菌芽胞表面递呈技术在肠道寄生虫研究领域已有较多报道,将重组枯草杆菌芽胞制成口服疫苗对试验动物进行免疫后,可以一定程度上抵抗寄生虫的感染^[16-17]。表达鸡裂解肽 cNK-2 的重组枯草杆菌芽胞口服免疫鸡群后,可以改善鸡群生长性能,减少堆型艾美耳球虫卵囊的排出量^[10]。利用鸡柔嫩艾美耳球虫 3-1E 蛋白构建的重组枯草杆菌芽胞口服免疫鸡群后可以显著提高抗球虫指数,病变计分显著降低^[9]。由于肉兔生长期较短以及兔颗粒饲料工厂化生产的特殊性,因此在本研究中全过程饲喂添加野生/重组枯草杆菌芽胞的特制饲料,不仅可以作为口服疫苗载体持续递呈抗原刺激兔产生黏膜免疫,同时也作为益生菌发挥作用。通过评估重组芽胞 *rEiAMA1* 和 *rEiIMP1* 单独或混合使用对家兔抗肠艾美耳球虫感染的免疫保护效果发现,重组芽胞 *rEiAMA1* 单独拌料免疫家兔表现出更好的免疫保护效果,存活率达到 90%,与对照组相比卵囊排出量和病变计分都显著降低 ($P < 0.05$),卵囊减少率达到 59.91%;而重组芽胞 *rEiIMP1* 单独拌料和 *rEiAMA1* + *rEiIMP1* 混合拌料免疫组则表现不佳。通过评估重组芽胞 *EmGAM56* 和 *EmROP17* 单独或混合使用对家兔抗大型艾美耳球虫感染的免疫保护效果发现,三个拌料免疫组都表现出一定的抗感染效果,但重组芽胞 *EmGAM56* 单独拌料免疫组综合表现更好,卵囊排出量显著降低 ($P < 0.05$),卵囊减少率达到 68.54%。针对两种兔球虫的拌料免疫均是单独拌料免疫组效果更好,可能是机体免疫系统优先对其中一种抗原产生强烈反应,抑制对另一种抗原的应答,导致整体保护效果下降;也可能是混合后稀释了单种疫苗的有效剂量,无法达到免疫激活阈值所致。

黏膜是机体与外部环境进行交流的场所,肠黏

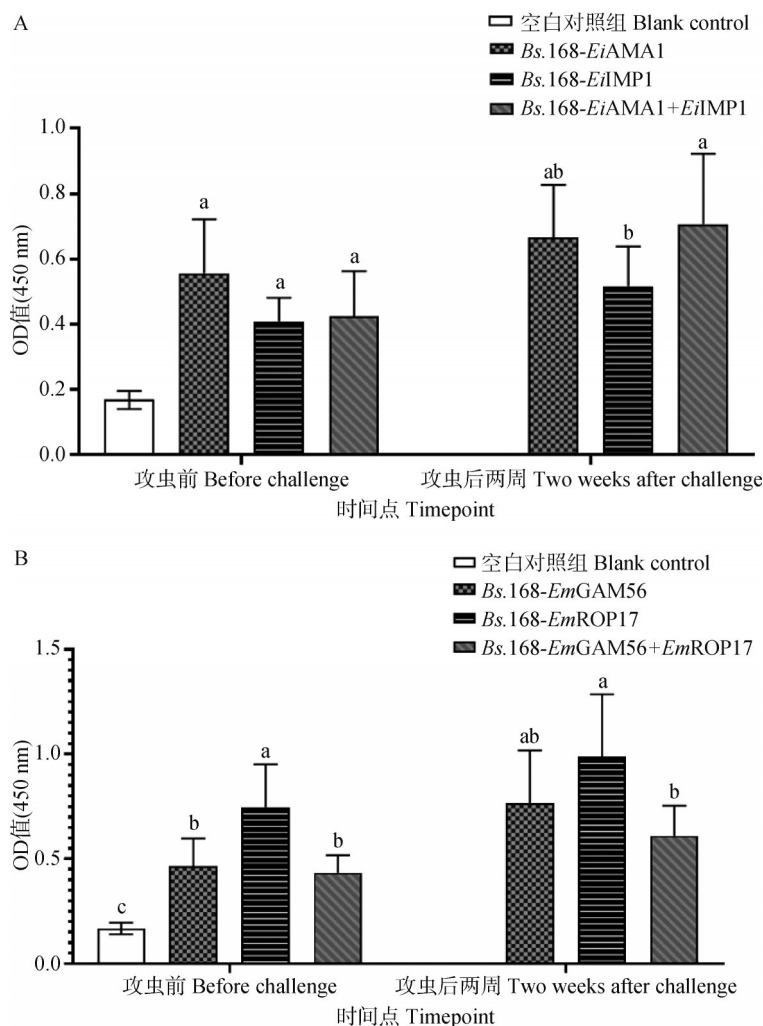


不同上标的小写字母(a,b)表示同一组实验兔在不同时间点的血清特异性抗体水平存在显著差异($P<0.05$),不同上标的大写字母(A~E)表示不同组实验兔在相同时间点的血清特异性抗体水平存在显著差异($P<0.05$),相同字母标注的数据间不存在显著差异($P>0.05$)

Different superscripts (lowercase letters; a, b) indicate that there were significant difference ($P<0.05$) in specific serum IgG levels between different time points of the same group, different superscripts (capital letters; A, B, C, D, E) indicate that there were significant difference ($P<0.05$) in specific serum IgG levels between different groups in the same time points; the same superscript indicates no significant difference ($P>0.05$)

图10 血清特异性IgG抗体水平

Fig. 10 The specific serum IgG levels



不同上标的小写字母(a'c)表示在同一时间点,不同组实验兔的特异性IgA抗体水平存在显著差异($P < 0.05$),相同字母标注的数据间不存在显著差异($P > 0.05$)

Different superscripts (lowercase letters; a, b, c) indicate that there were significant difference ($P < 0.05$) in specific IgA levels between different groups in the same time points; the same superscript indicates no significant difference ($P > 0.05$)

图 11 拌料免疫后血清特异性IgA抗体水平

Fig. 11 The specific IgA levels after oral immunization

膜免疫系统是黏膜免疫系统的重要组成部分,其表面积大,与肠腔内的日粮及微生物广泛接触,是机体抵御病原菌侵袭的第一道屏障。枯草芽胞杆菌可以调节肠道微生态平衡,增强宿主免疫功能,家兔饲喂枯草芽胞杆菌后,可明显改善生长性能,血清IgG和sIgA水平更高^[18-19]。因此枯草芽胞杆菌在禁抗、限抗后的畜禽养殖中具有广阔的应用前景^[20]。活载体疫苗的抗原载量是影响免疫原性的关键因素,特别是通过口服免疫途径,而枯草杆菌芽胞可以很大程度上抵抗胃肠道环境的影响并定植,在肠道内完成生命周期后排出^[7]。经口免疫的疫苗通常有利于产生sIgA抗体^[21]。表达华支睾吸

虫副肌球蛋白的重组枯草杆菌芽胞免疫小鼠可以诱导高水平的血清特异性IgG,说明构建的重组芽胞可以刺激机体的全身免疫反应,同时与对照组相比,重组芽胞免疫小鼠的肠黏膜、粪便和胆汁中的sIgA水平更高^[22]。表达细粒棘球绦虫原肌球蛋白和副肌球蛋白的重组枯草杆菌芽胞免疫犬后,可以刺激机体产生特异性体液免疫反应^[23]。表达鸡柔嫩艾美耳球虫3-1E蛋白的重组枯草杆菌芽胞免疫鸡群后也可以刺激盲肠黏膜sIgA显著上升^[9]。在本研究中,与空白对照组实验兔相比,野生型枯草杆菌芽胞和重组芽胞免疫组实验兔在感染前都表现出IgA水平的上升,可能是由于枯草芽胞杆菌本

身作为活载体,发挥了其益生菌作用刺激机体产生免疫反应。感染后,重组芽胞免疫组实验兔 IgA 水平上升幅度明显大于野生型芽胞免疫组。此外,重组芽胞免疫后,实验兔血清特异性 IgG 水平显著上升($P<0.05$)。以上结果表明,表达 r*Ei*AMA1、r*Ei*IMP1、*Em*GAM56 和 *Em*ROP17 的重组枯草杆菌芽胞可以刺激机体产生特异性的全身和局部体液免疫反应。

本文初步探究了重组枯草杆菌芽胞递呈的抗兔球虫疫苗的免疫保护效果与免疫反应特征。研究表明,枯草芽胞杆菌作为外源蛋白表达系统也存在表达具有密码子偏好性以及表达水平不高等缺点,因此,可通过优化密码子来提高目的基因在枯草芽胞杆菌中的表达量^[24-25]。此外,大分子蛋白在枯草芽胞杆菌中进行表达非常困难,选择该系统作为疫苗抗原递送载体,还需对抗原表位进行筛选和优化^[26]。因此,今后的研究可聚焦于优化枯草芽胞杆菌的外源蛋白表达效率和抗原优势表位筛选等方面,通过优化密码子、插入强启动子等提升转录翻译效率;针对大分子抗原表达,可通过生物信息学分析筛选抗原优势表位。

4 结 论

以 CotB 为锚定蛋白,通过同源重组实现肠艾美耳球虫 *Ei*IMP1 和 *Ei*AMA1 抗原、大型艾美耳球虫 *Em*GAM56 和 *Em*ROP17 抗原在枯草杆菌芽胞表面的展示。动物保护试验结果表明,重组芽胞 r*Ei*AMA1 单独拌料免疫家兔表现出更好的免疫保护效果,存活率达到 90%,与对照组相比卵囊排出量和病变计分都显著降低($P<0.05$),卵囊减少率达到 59.91%。重组芽胞 *Em*GAM56 单独拌料免疫组综合表现好于重组芽胞 *Em*ROP17 单独拌料和 *Em*GAM56+*Em*ROP17 混合拌料免疫组,卵囊排出量显著降低($P<0.05$),卵囊减少率达到 68.54%。此外,构建的四种重组枯草杆菌芽胞可以不同程度刺激机体产生特异性的全身和局部体液免疫反应。

参考文献(References):

- [1] PAKANDL M. Coccidia of rabbit: a review[J]. *Folia Parasitol (Praha)*, 2009, 56(3): 153-166.
- [2] XIAO J, CHEN H, ZHENG R, et al. Recombinant GMA56 and ROP17 of *Eimeria magna* conferred protection against infection by homologous species[J]. *Front Immunol*, 2022(13): 1037949.
- [3] XIAO J, HE W, XIONG C, et al. Protective efficacy of recombinant proteins AMA1 and IMP1 in rabbits infected with *Eimeria intestinalis* [J]. *Vet Parasitol*, 2023(320): 109985.
- [4] CUI W, HAN L, SUO F, et al. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(10): 145.
- [5] 郭彦. 口服重组枯草杆菌芽孢呈递型流感候选疫苗基础研究[D]. 北京: 军事科学院, 2018.
GUO Y. Fundamental study on oral recombinant *Bacillus subtilis* spore-based influenza candidate vaccine [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2018.
- [6] ROSALES-MENDOZA S, ANGULO C. *Bacillus subtilis* comes of age as a vaccine production host and delivery vehicle [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(8): 1135-1148.
- [7] FU L L, LI W F, DU H H, et al. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 46(5): 581-586.
- [8] LUIZ W B, CAVALCANTE R C M, PACCEZ J, et al. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit [J]. *Vaccine*, 2008, 26(32): 3998-4005.
- [9] LIN Z, SHI Y, DENG B, et al. Protective immunity against *Eimeria tenella* infection in chickens following oral immunization with *Bacillus subtilis* expressing *Eimeria tenella* 3-1E protein [J]. *Parasitol Res*, 2015, 114(9): 3229-3236.
- [10] WICKRAMASURIYA S S, PARK I, LEE Y, et al. Oral delivery of *Bacillus subtilis* expressing chicken NK-2 peptide protects against *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens [J]. *Front Vet Sci*, 2021(8): 684818.
- [11] DE ALMEIDA M E M, ALVES K C S, DE VASCONCELOS M G S, et al. *Bacillus subtilis* spores as delivery system for nasal *Plasmodium falciparum* circumsporozoite surface protein immunization in a murine model [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1531.

- [12] WEI W, SHEN N, XIAO J, et al. Expression analysis and serodiagnostic potential of microneme proteins 1 and 3 in *Eimeria stiedai* [J]. *Genes*, 2020, 11(7):725.
- [13] LEE S, BELITSKY B R, BROWN D W, et al. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C [J]. *Vaccine*, 2010, 28(41):6658-6665.
- [14] 张贵恒. 基于枯草芽胞杆菌表面展示的重组益生菌抗捻转血矛线虫感染研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2020.
- ZHANG G H. Study on recombinant probiotic based on surface-displayed *Bacillus subtilis* spores against *Haemonchus contortus* infection [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [15] COPLAND A, DIOGO GR, HART P, et al. Mucosal delivery of fusion proteins with *Bacillus subtilis* spores enhances protection against tuberculosis by *Bacillus calmette-guérin* [J]. *Front Immunol*, 2018(9):346.
- [16] 周珍文, 胡旭初, 余新炳. 枯草杆菌芽孢载体疫苗的研究及其在寄生虫病防治中的应用前景 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(9):934-936.
- ZHOU Z W, HU X C, YU X B. Research on *Bacillus subtilis* spore carrier vaccines and their application prospects in the prevention and control of parasitic diseases [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2007, 7(9):934-936.
- [17] LV P, SONG Y, LIU C, et al. Application of *Bacillus subtilis* as a live vaccine vector: a review [J]. *J Vet Med Sci*, 2020, 82(11):1693-1699.
- [18] 薛 云, 周 锋, 王乐伟. 枯草芽胞杆菌在断奶仔兔生长和预防腹泻中的应用研究 [J]. 中国饲料, 2018(14):84-87.
- XUE Y, ZHOU F, WANG L W. Application of *Bacillus subtilis* in growth performance and diarrhea prevention of weaned rabbits [J]. *China Feed*, 2018(14):84-87.
- [19] Guo M, Wu F, Hao G, et al. *Bacillus subtilis* improves immunity and disease resistance in rabbits [J]. *Front Immunol*, 2017(8):354.
- [20] 王文娟, 孙冬岩, 孙笑非, 等. 黏膜免疫及枯草芽胞杆菌增强肠黏膜免疫应答的机制 [J]. 饲料研究, 2020, 43(5):106-108.
- WANG W J, SUN D Y, SUN X F, et al. Mucosal immunity and the mechanism by which *Bacillus subtilis* enhances intestinal mucosal immune responses [J]. *Feed Research*, 2020, 43(5):106-108.
- [21] WANG J, THORSON L, STOKES R W, et al. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis [J]. *J Immunol*, 2004, 173(10):6357.
- [22] SUN H, LIN Z, ZHAO L, et al. *Bacillus subtilis* spore with surface display of paramyosin from *Clonorchis sinensis* potentializes a promising oral vaccine candidate [J]. *Parasit Vectors*, 2018, 11(1):156.
- [23] VOGT C M, ARMÚA-FERNÁNDEZ M T, TOBLER K, et al. Oral application of recombinant *Bacillus subtilis* spores to dogs results in a humoral response against specific *Echinococcus granulosus* paramyosin and tropomyosin antigens [J]. *Infect Immun*, 2017, 86(33):e00495.
- [24] 陈灵艳, 陈现金, 蒋 烨, 等. 猪圆环病毒衣壳蛋白在枯草芽胞杆菌中的表达研究 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(5):140-145.
- CHEN L Y, CHEN X J, JIANG Y, et al. Expression of porcine circovirus capsid protein in *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(5):140-145.
- [25] KUMAR N, PANDEY R, PRABHU A, et al. Genetic and substrate-level modulation of *Bacillus subtilis* physiology for enhanced extracellular human interferon gamma production [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2018, 48(5):391-401.
- [26] LIN B, LI Z, ZHANG H, et al. Cloning and expression of the γ -polyglutamic acid synthetase gene pgsBCA in *Bacillus subtilis* WB600 [J]. *Biomed Res Int*, 2016(2016):3073949.

(编辑 白永平)