

# 表达猪传染性胃肠炎 S-AD 片段的重组乳酸菌对小鼠的免疫原性影响

黄海楠<sup>1</sup> 黄海鸥<sup>2</sup> 刘云志<sup>1</sup> 杨金生<sup>1</sup> 邵洪泽<sup>1</sup> 许志林<sup>1</sup>

任锐<sup>1</sup> 程荣华<sup>1</sup> 吕雪峰<sup>1</sup> 李昱洁<sup>1</sup> 丁志杰<sup>1\*</sup>

1.吉林省畜牧兽医科学研究所,长春 130062;2.吉林省长春市动物检疫站,长春 130062

**摘要** 将已证实能稳定复制猪传染性胃肠炎 S 基因 AD 片段的重组乳酸菌口服免疫 BALB/c 小鼠,每组于免疫前和免疫后的第 7 天、第 14 天、第 21 天分别取 3 只小鼠眼球采血、取肠道内容物、分离脾细胞,于免疫的第 28 天将剩下的小鼠全部取眼球采血、取肠道内容物、分离脾细胞,用于 ELISA 抗体、肠黏膜 SIgA 水平及淋巴细胞增殖的检测。经细胞免疫和体液免疫检测,该乳酸菌口服疫苗具有良好的免疫效果。

**关键词** 重组乳酸菌;SIgA;淋巴细胞;增殖;免疫原性

乳酸菌——作为机体胃肠道中的正常菌群,黏附和定植在肠道上皮细胞,属于天然主动免疫,可抵抗致病菌的定植和繁殖,加之它能激活腹膜巨噬细胞的吞噬作用,产生干扰素、抗体及增强细胞免疫等<sup>[1]</sup>,可提高机体的抗病能力。乳酸菌可抑制一些低温细菌和腐败菌<sup>[2]</sup>,因此可防治便秘、腹泻、肠炎及多种肠道功能紊乱病<sup>[3-4]</sup>。

乳酸杆菌载体疫苗主要的免疫方式是口服免疫,口服给药经济、便捷,适合大范围应用。因此本试验选用口服的免疫方式免疫小鼠,检测相应的免疫指标,以确定该疫苗的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1)试验动物:SPF 级 4~5 周龄、体重 14~15 g 的 BALB/c 小鼠购自吉林大学基础医学院实验动物中心。

2)试剂和耗材:MTS 试剂盒为 Promega 公司产品;1640 培养基,小鼠 SIgA ELISA 试剂盒,酶标板为北京鼎国生物公司产品。

### 1.2 乳酸菌脱脂乳液的制备

将含重组质粒的乳酸菌株接种于 MRS 培养基

(含红霉素 100 μg/mL),静置厌氧培养过夜(37℃),5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用灭菌生理盐水离心洗涤沉淀,用 10%灭菌脱脂乳液调整其菌数为 2×10<sup>10</sup> cfu/mL,混匀备用。其他乳酸菌脱脂乳液的制备同上。

### 1.3 动物分组与免疫

小鼠随机分为对照 A 组、空载体 B 组、重组乳酸菌 C 组、正常乳酸菌 D 组,每组 22 只,剂量为 10 mL/kg (小鼠的等效剂量相当于人体推荐量的 10 倍,卫生部卫生监督司(1996))。试验动物按表 1 的方式 1 次/d 灌服脱脂乳悬液,并饲喂常规饲料,对照组饲喂灭菌水和常规饲料,共饲喂 28 d。

### 1.4 标本采集与检测

免疫前和免疫第 7 天、第 14 天、第 21 天随机每组选取 3 只小鼠眼球取血,分离血清(3 000 r/min 离

表 1 试验动物的饲喂表

组别	饲养方式
对照组 A	灭菌水 + 常规饲料
空载体 B	空载体乳酸菌 + 常规饲料
重组菌 C	重组乳酸菌 + 常规饲料
正常菌 D	正常乳酸菌 + 常规饲料

收稿日期:2016-04-21

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20140101030JC)

\* 通讯作者

黄海楠,女,1981 年生,博士,副研究员。

心 5 min),用于检测血清抗体;取肠道内容物,用于检测肠黏膜 SIgA;分离脾细胞用于淋巴细胞增殖试验。于第 28 天将每组剩下的 10 只小鼠按照上述方法采集相应样品。

1)ELISA 抗体的检测。

①TGEV 抗原的制备:取 200 mL 猪传染性胃肠炎病毒液(细胞培养病毒,紫外线灭活),5 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀后 20 000 r/min 离心 1 h。沉淀溶于 0.5 mL 灭菌生理盐水中。

②将 TGEV 抗原按 160 μg/孔用碳酸盐包被缓冲液(pH9.5)包被,4 °C 过夜或放置湿盒内 37 °C 1 h。

③用 BSA(1%)封闭酶标板,37 °C 1 h,用 PBS (0.01 mol/L 含 0.25%BSA)洗板,5 min/次,洗 5 次。

④用 PBST(含 0.1%BSA)倍比稀释待检血清,100 μL/孔,每板都必须有阴性血清和阳性血清对照,37 °C 放置湿盒内 1.5 h 后洗板,5 min/次,洗 5 次。

⑤每孔加 100 μL 酶标二抗(PBST 稀释),37 °C 作用 1.5 h 后洗板,5 min/次,洗 5 次。

⑥每孔加 100 μL 底物,37 °C 作用 20 min 显色。每孔加 50 μL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,492 nm 处测定 OD 值。

2)肠黏膜 SIgA 的测定。

①小白鼠处死后立即取肠段内容物 0.5 mL 加入等体积 PBS 缓冲液(pH7.4)混匀,8 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液 -20 °C 保存备用。

②按试剂盒方法,用抗小鼠 SIgA 单抗、生物素标记的抗小鼠 SIgA 抗体、辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与生物素结合,在 492 nm 处测定 OD 值。

3)淋巴细胞增殖实验(MTS 法)。

①小鼠脾淋巴细胞的制备。制备方法参照参考文献[5]。

②淋巴细胞增殖反应试验。试验步骤参照参考文献[5],淋巴细胞增殖的滴度由刺激指数(SI)判断。SI 值的计算:试验孔 OD<sub>492 nm</sub> 均值 / 对照孔 OD<sub>492 nm</sub> 均值。

2 结 果

2.1 ELISA 抗体检测结果

小鼠 ELISA 抗体检测结果如图 1,在第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天时,重组乳酸菌组的 ELISA 抗体水平均极显著高于其他 3 组(P<0.01),正常乳酸菌组的 ELISA 血清抗体水平与对照组比差异显著(P<0.05)。空载体组血清抗体差异不显著。

2.2 小鼠肠黏膜 SIgA 检测结果

小鼠肠黏膜 SIgA OD 值的检测结果如图 2 所示。在第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天时,重组乳酸菌组小鼠肠黏膜 SIgA OD 值均极显著高于其他 3 组(P<0.01)。正常乳酸菌组小鼠肠黏膜 SIgA OD 值增加与对照组比差异显著(P<0.05),空载体组小鼠肠黏膜 SIgA OD 值增加的差异不显著。重组乳酸菌组与正常乳酸菌组小鼠肠黏膜 SIgA OD 值均于第 7 天达最高值。

2.3 淋巴细胞增殖试验结果

淋巴细胞增殖试验结果如图 3。重组乳酸菌组淋巴细胞的刺激指数在各个检测的时间点均极显著高于其他 3 组(P<0.01),且在第 21 天时刺激指数最高。空载体乳酸菌组与对照组比较,刺激指数有所增加,但差异不显著。

3 小 结

1)ELISA 结果说明正常乳酸菌也能促进体内 ELISA 抗体的产生,对于体液免疫有促进作用,而重组乳酸菌能产生比其他 3 组显著高的 ELISA 抗体,增强体液免疫的能力更强。

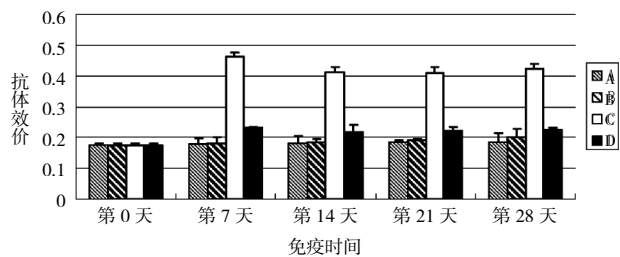


图 1 小鼠 ELISA 抗体检测结果

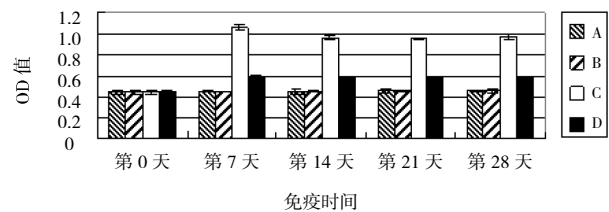


图 2 小鼠肠黏膜 SIgA OD 值检测结果

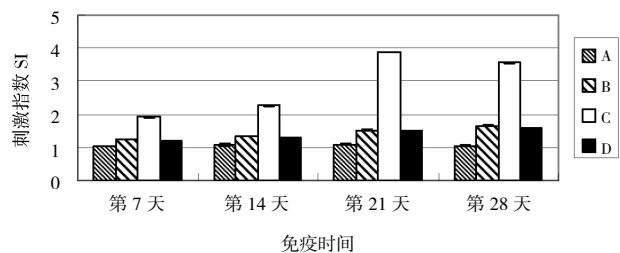


图 3 淋巴细胞增殖实验结果

# 胚胎移植受体羊主动助产技术的探索

刘艳敏

河北省廊坊市动物疫病预防控制中心,河北廊坊 065000

**摘要** 胚胎移植受体羊分娩时容易发生难产,胎儿过大、产道狭窄、产力过弱等均可造成难产,产程过长会使胎儿窒息死亡,为减少难产造成的胎儿死亡,建议在母羊分娩时实行主动助产,根据难产原因采取相应的助产方法,提高羔羊成活率。

**关键词** 胚胎移植;受体;主动助产;难产

近年来,我国肉羊养殖业发展迅速,并逐步趋向于规模化饲养,随着优良肉羊品种的不断引进,胚胎移植技术已被广泛应用于良种扩群生产中。良种肉羊胎儿时期生长快、个体大,初生重在 4~6 kg 的羔羊占 40%,甚至更重。胚胎移植受体羊大多为舍饲,运动不足,易发生难产。由于胚胎移植种羊价值高,若不及时进行助产,极易造成羔羊死亡。根据笔者多年的经验,建议在母羊分娩时实施主动助产,以尽可能地提高羔羊成活率。

## 1 难产原因

1)胎儿过大。肉用品种羔羊在母体内生长迅速,个体大,初生重大。

2)产道狭窄。受体羊大多为小尾寒羊,虽然个体大,但产道相对较狭窄,易发生难产。

3)产力过弱。受体羊到妊娠末期受饲养管理水平和和其他不良因素的影响造成体质下降,产力过弱。

4)胎位不正,胎向、胎势异常。

5)缺乏运动。在规模养殖场,羊大多采取圈舍饲养方式,妊娠母羊运动不足,体质下降容易发生难产。

6)营养过剩。能量水平过高,造成母羊过肥,胎儿后期增重过大。

## 2 主动助产

胚胎移植是为了尽可能地获得产活羔数。所以对胚胎移植临产母羊采取主动助产,可以减少因难

收稿日期:2016-03-25

刘艳敏,女,1979年生,畜牧兽医师。

2)小鼠肠黏膜 SIgA 检测结果说明正常的乳酸菌也可刺激产生肠黏膜 SIgA,而重组乳酸菌可以更有效地促进肠黏膜 SIgA 的生成,增强了肠黏膜免疫,这也解释了乳酸杆菌为何具有增强免疫的功能,可防制腹泻、下痢、肠炎、便秘及多种肠道功能紊乱疾病的原因。

3)细胞免疫功能的重要指标之一就是淋巴细胞体外增殖活性,其增殖的程度反映了机体细胞免疫水平。本试验选用的 MTS 法没有放射性污染,灵敏度高、稳定性好、重复性好,不需要特殊设备便可完成。淋巴细胞增殖试验的结果表明,含重组质粒乳酸菌组能刺激产生较高的细胞免疫水平,到第 21 天时达到顶峰,28 d 以后有所下降,可以在第 28 天加强

免疫,可能会起到更好的刺激细胞免疫的效果。

## 参 考 文 献

- [1] 张英春,张兰威,马微.乳酸菌对免疫系统功能的调节作用[J].食品研究与开发,2003,24(5):80-82.
- [2] 李铁军,李爱云.乳酸菌抗菌机理研究进展[J].微生物学通报,2002,29(5):81-85.
- [3] 陈世琼,李平兰.特殊性能乳酸菌在治疗仔猪腹泻中的应用前景[J].饲料研究,2003(1):20-22.
- [4] 杨辅直,李伟生.乳酸菌素治疗婴幼儿腹泻疗效观察[J].中国微生态杂志,2001,13(5):304.
- [5] 黄海楠.狂犬病毒保护性抗原基因重组伪狂犬病毒/杆状病毒活疫苗的实验研究[D].长春:吉林大学,2011.