

# Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp FliC của *Salmonella enteritidis*

- Trần Thị Bảo Châu
- Nguyễn Việt Anh
- Trần Văn Hiếu

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG –HCM

( Bài nhận ngày 05 tháng 07 năm 2016, nhận đăng ngày 21 tháng 11 năm 2016)

## TÓM TẮT

Protein flagellin FliC của *Salmonella enteritidis* từ lâu đã được các nhà nghiên cứu trên thế giới quan tâm như một tá dược tiềm năng cho các thể hệ vaccine tái tổ hợp. Tuy vậy, các bằng chứng thực nghiệm từ các nghiên cứu trong nước về hiệu quả bổ trợ miễn dịch của protein này vẫn còn hạn chế. Nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu sâu hơn về tác dụng bổ trợ miễn dịch của FliC, chúng tôi tiến hành tạo dòng gene *fliC* trên chủng chủ *Escherichia coli* với vector mang gen là plasmid pET-28a bằng phương pháp PCR

**Từ khóa:** flagellin, FliC, protein tái tổ hợp, *Salmonella enteritidis*, tá dược

và cắt giới hạn hai enzyme *NdeI* và *XhoI*. Kết quả xác nhận sự biểu hiện của protein FliC tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG đã được xác định thông qua phương pháp SDS-PAGE và lai miễn dịch Western blot với kháng thể kháng đười đười dung hợp 6xHis. Với độ tinh sạch trên 95 %, protein FliC tái tổ hợp được tạo ra từ nghiên cứu này có thể trở thành nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu đánh giá hoạt tính bổ trợ miễn dịch về sau của FliC.

## MỞ ĐẦU

Một trong những quan tâm lớn trong việc phát triển vaccine hiện nay là tìm kiếm các tá dược hiệu quả để bổ trợ cho hiệu lực của các vaccine, đặc biệt là các vaccine tái tổ hợp và vaccine tiểu phần [1]. Do đa số các kháng nguyên mục tiêu của các loại vaccine này có bản chất là protein, hơn nữa chúng thường không có thụ thể nhận diện đặc trưng trong hệ thống miễn dịch của vật chủ nên các kháng nguyên này ít có khả năng kích thích hệ miễn dịch khởi tạo một đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ, dẫn đến các vaccine không đạt được hiệu quả bảo vệ mong muốn. Với khả năng kích thích mạnh hệ miễn dịch bẩm sinh và thông qua đó hỗ trợ hoạt động của miễn dịch thích ứng nên các tá dược miễn dịch trở thành một giải pháp cho vấn đề này [2].

Protein flagellin FliC có nguồn gốc từ vi khuẩn *Salmonella* spp. từ lâu đã được chú ý đến như một tá dược tiềm năng bởi các đặc tính bổ trợ

miễn dịch của nó. Flagellin FliC là một trong những thành phần cấu tạo nên lông roi của *Salmonella* spp., được mã hóa bởi gene *fliC* của *Salmonella* spp. với 505 amino acid trong trình tự. Mặc dù có cùng bản chất là protein nhưng khác với các kháng nguyên mục tiêu trong vaccine, FliC còn là phối tử của hệ thống thụ thể nhận diện kiểu mẫu của các tế bào miễn dịch. Khi các vi khuẩn *Salmonella* spp. xâm nhập vào cơ thể, FliC được nhận diện và gắn bởi thụ thể Toll-like receptor số 5 (TLR-5) có trên bề mặt của các tế bào miễn dịch bẩm sinh, từ đó kích hoạt một con đường truyền tín hiệu bên trong tế bào dẫn đến sự hoạt hóa của nhân tố phiên mã NF- $\kappa$ B [3]. Nhân tố phiên mã này sau đó điều hòa việc phiên mã tạo ra các cytokine tiền viêm (như IL-1, TNF- $\alpha$ , v.v.) có tác dụng hỗ trợ, hoạt hóa các tế bào miễn dịch ở các đáp ứng tiếp theo của vật chủ đối với tác nhân xâm nhiễm, từ đó

giúp vật chủ hình thành một đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ chống lại các tác nhân xâm nhiễm [4].

Cho đến hiện nay, khả năng hỗ trợ miễn dịch của FliC đã được nhiều công trình ngoài nước kiểm chứng [5, 6, 7, 8]. Tuy vậy, các nghiên cứu có liên quan đến khả năng này của FliC trong nước chưa được tiến hành. Nhằm tạo một nguồn cung cấp chủ động FliC tái tổ hợp, hướng đến việc tạo cơ sở thực nghiệm vững chắc cho khả năng hỗ trợ miễn dịch của FliC, phục vụ cho nghiên cứu phát triển các thể hệ vaccine tái tổ hợp hiệu lực cao về sau, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch FliC tái tổ hợp có nguồn gốc từ *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* (*S. enteritidis*) trên hệ thống chủng chủ *Escherichia coli*. Chủng vi khuẩn *S. enteritidis* được dùng làm nguồn thu nhận đoạn gene *fliC* vì các công trình nghiên cứu đã công bố cho thấy rằng FliC từ chủng *S. Enteritidis* có khả năng kích thích mạnh hệ miễn dịch bẩm sinh của các vật chủ thí nghiệm [9, 10].

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng làm chủng chủ để nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) sử dụng làm chủng chủ biểu hiện protein tái tổ hợp. Chủng *S. enteritidis* dùng làm nguồn thu nhận đoạn gene mục tiêu. Plasmid pET-28a có kích thước 5369bp, được sử dụng làm vector dòng hóa gene *fliC*, đồng thời là vector biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ vào promoter T7 có trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gene thông qua chất cảm ứng IPTG. Các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET-*fliC*

Gene *fliC* được thu nhận từ bộ gene của *S. enteritidis* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 5'-*fliC-NdeI* và 3'-*fliC-XhoI*. Gene *fliC* và plasmid pET-28a được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase sau khi được xử lý tạo đầu dính với hai

enzyme cắt hạn chế *NdeI* và *XhoI*. Dung dịch phản ứng nối sau đó được hóa biến nạp vào chủng chủ *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các thể biến nạp thu được trên môi trường LB chứa kháng sinh kanamycin nồng độ cuối 50  $\mu\text{g/mL}$  được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 5'-*fliC-NdeI* và 3'-*fliC-XhoI*. Kết quả tạo dòng được khẳng định bằng phương pháp giải trình tự với mồi T7pro (mồi trên plasmid pET-28a).

### Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*fliC*

Vector tái tổ hợp pET *fliC* có kết quả giải trình tự đúng được hóa biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và trải trên môi trường LB có kháng sinh kanamycin nồng độ cuối 50  $\mu\text{g/mL}$ . Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET *fliC* được sàng lọc thông qua kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi 5'-*fliC-NdeI* và 3'-*fliC-XhoI*.

### Cảm ứng biểu hiện FliC tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* được nuôi cấy lắc ở 37 °C trong môi trường LB chứa kháng sinh kanamycin (50  $\mu\text{g/mL}$ ). Sau 16 giờ nuôi cấy, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37 °C. Đến khi OD<sub>600</sub> của dịch vi khuẩn đạt giá trị 0,8–1,0, chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 0,1 mM, tiếp tục lắc mẫu ở 37 °C. Sau 4 giờ cảm ứng, tiến hành thu sinh khối tế bào và phá màng tế bào bằng sóng siêu âm để thu được protein ở các pha tổng, tan và tủa. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được xác nhận bằng phương pháp SDS-PAGE và lai miễn dịch Western blot với kháng thể kháng 6xHis. Thực hiện đồng thời với mẫu đối chứng âm là mẫu dịch pha tổng của *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a có cảm ứng IPTG.

Tinh sạch FliC bằng phương pháp sắc ký ái lực

Dịch protein tổng được thu nhận sau khi chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* được cảm ứng biểu hiện và ly giải bằng sóng siêu âm. Dịch protein này được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tinh sạch

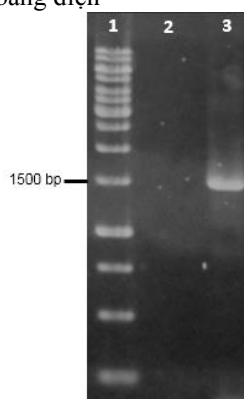
FliC tái tổ hợp bằng phương pháp tinh chế sắc ký ái lực với cột Hitrap HP (GE Healthcare). Các bước tinh chế được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất cột tinh chế. Kết quả tinh chế FliC tái tổ hợp được phân tích thông qua phương pháp SDS-PAGE.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo dòng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang vector tái tổ hợp pET-*fliC*

Để cấu trúc vector tái tổ hợp pET-*fliC*, chúng tôi tiến hành thu nhận gene *fliC* từ bộ gene của *S. enteritidis* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 5'-*fliC*-*NdeI* và 3'-*fliC*-*XhoI*. Gene thu nhận từ phản ứng PCR được kiểm tra kích thước bằng điện

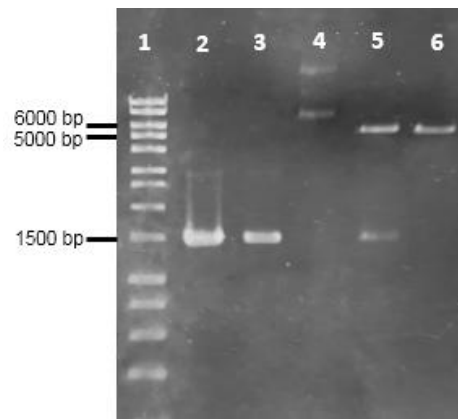
di trên gel agarose 1 %. Kết quả phân tích cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 1515 bp (Hình 1, giếng 3), đúng với kích thước gene *fliC*. Bên cạnh đó, chứng âm của phản ứng PCR được chúng tôi thiết lập với đầy đủ các thành phần như phản ứng thu gene ngoại trừ khuôn là bộ gene của *S. enteritidis* nhằm kiểm soát sự ngoại nhiễm của phản ứng PCR. Khi điện di chứng âm này, chúng tôi không ghi nhận bất kỳ vạch DNA nào trên bản gel (Hình 1, giếng 2), điều này chứng tỏ phản ứng PCR thu gene *fliC* không bị ngoại nhiễm, đoạn gene thu được có nguồn gốc từ bộ gene của *S. enteritidis*.



**Hình 1.** Thu nhận gene *fliC*. 1. Thang DNA 1 kb; 2. Chứng âm; 3. Sản phẩm PCR thu gen *fliC*

Gene *fliC* và plasmid pET-28a được nối lại với nhau sau khi được xử lý tạo các đầu dính tương ứng bằng cặp enzyme *NdeI* và *XhoI*. Sản phẩm nối được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$ . Do gene kháng kháng sinh kanamycin được thiết kế trên plasmid pET-28a nên các thể biến nạp mang vector tái tổ hợp pET-*fliC* được sàng lọc bước đầu bằng môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh kanamycin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc

để xác nhận sự hiện diện của gene *fliC* bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu cho gene. Các dòng cho kết quả dương tính được tiếp tục nuôi cấy và tách chiết plasmid. Các plasmid tách chiết được sau đó được kiểm tra lại sự hiện diện của gene *fliC* (do phản ứng PCR khuẩn lạc có thể cho kết quả dương tính giả) cũng như kiểm tra cấu trúc vector tái tổ hợp thu được so với thiết kế ban đầu.



**Hình 2.** Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp pET-*fliC*. 1. Thang DNA 1 kb; 2: Gene *fliC*; 3. Sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp pET-*fliC* với cặp mồi đặc hiệu 5'-*fliC*-*NdeI* và 3'-*fliC*-*XhoI*; 4. Plasmid tái tổ hợp pET-*fliC*; 5. Plasmid tái tổ hợp pET-*fliC* được xử lý với hai enzyme *NdeI* và *XhoI*; 6. Plasmid pET-28a được xử lý với hai enzyme *NdeI* và *XhoI*.

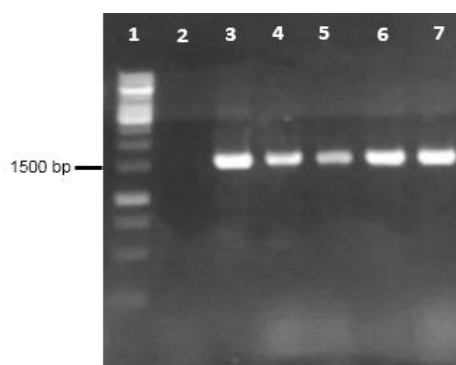
Sự hiện diện của gene *fliC* trên plasmid thu được và được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene. Kết quả thể hiện ở Hình 2, giếng 3 cho thấy sản phẩm PCR chứa duy nhất một vạch DNA có kích thước bằng với kích thước 1515 bp của gene *fliC* ở giếng 2. Bên cạnh đó, chúng tôi tiến hành cắt plasmid thu được với cặp enzyme *NdeI* và *XhoI* đã dùng để cấu trúc vector tái tổ hợp. Kết quả thể hiện ở giếng 5 chỉ ra rằng sản phẩm cắt plasmid dự tuyển chứa hai đoạn DNA, một đoạn bằng kích thước với sản phẩm cắt plasmid pET-28a bằng *NdeI* và *XhoI* (giếng 6), đoạn còn lại có cùng kích thước với gene *fliC* (giếng 2). Như vậy, chúng tôi đã chèn thành công đoạn gene *fliC* vào plasmid pET-28a ở vị trí trình tự nhận biết của enzyme *NdeI* và *XhoI* trên plasmid theo đúng với thiết kế ban đầu.

Kết quả giải trình tự đoạn gene *fliC* trên plasmid tái tổ hợp pET-*fliC* bằng mồi T7pro (kết

quả không thể hiện) cho thấy đoạn gene này có độ tương đồng 100 % so với trình tự gene *fliC* của *S. enteritidis* đã được công bố và đồng khung dịch mã.

#### Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*fliC*

Vector tái tổ hợp pET-*fliC*, sau khi được cấu trúc thành công, được biến vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Hỗn hợp biến nạp được trải trên môi trường thạch LB có bổ sung kanamycin. Những khuẩn lạc mọc được trên môi trường sàng lọc được lựa chọn ngẫu nhiên để tiến hành PCR kiểm tra sự hiện diện của vector tái tổ hợp bằng cặp mồi đặc hiệu cho gene *fliC*. Kết quả ở Hình 3 cho thấy giếng 4, 5, 6 và 7 đều xuất hiện một vạch DNA tương ứng với kích thước 1515 bp của gene *fliC* ở giếng 3. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*fliC*.

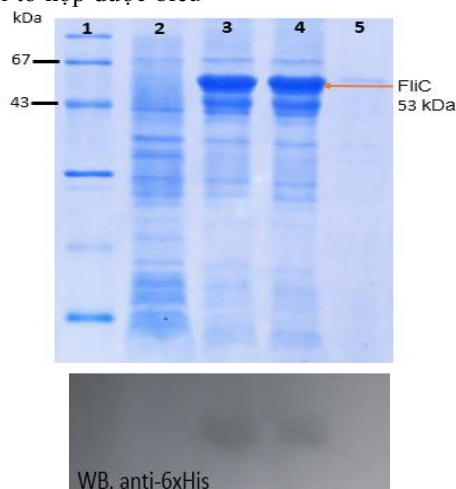


**Hình 3.** Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu. 1: Thang DNA 1 kb; 2. Chứng âm; 3: Gene *fliC*; 4-7: PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu

### Kiểm tra sự biểu hiện của protein FliC tái tổ hợp

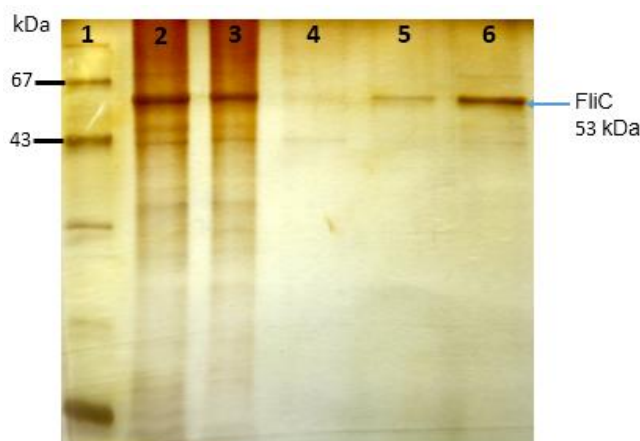
Protein FliC tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* như mô tả ở phần phương pháp. Các mẫu protein pha tổng, tan và tủa được thu nhận và phân tích sự biểu hiện của FliC tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE và Western blot. Kết quả phân tích ở Hình 4 cho thấy có một vạch protein biểu hiện vượt mức ở giếng 3 với kích thước khoảng 53 kDa bằng với kích thước của protein FliC tự nhiên và không thấy có sự xuất hiện của vạch này ở chứng âm là chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a có cảm ứng IPTG ở giếng 2. Thêm vào đó, do protein FliC tái tổ hợp được biểu

hiện dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis được mã hóa bởi sáu codon có sẵn trên vector pET-28a nên sự hiện diện của FliC tái tổ hợp có thể được xác nhận gián tiếp thông qua đuôi 6xHis này. Kết quả xác nhận sự hiện diện của FliC tái tổ hợp bằng phương pháp Western blot với kháng thể kháng đuôi 6xHis ở Hình 4 cho thấy vạch protein biểu hiện vượt mức trong bản điện di SDS-PAGE chính là protein FliC tái tổ hợp và protein này được biểu hiện hầu hết ở pha tan (Hình 4, giếng 4). Như vậy, FliC tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis.



**Hình 4.** Kết quả phân tích sự biểu hiện của protein FliC tái tổ hợp trong *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*. 1: Thang protein phân tử lượng thấp; 2: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a (+)IPTG; 3: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* (+)IPTG, pha tổng; 4: *E.*

*coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* (+)IPTG, pha tan; 5: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* (+)IPTG, pha tủa. Gel được nhuộm với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250



**Hình 5.** Kết quả nhuộm bạc các phân đoạn tinh chế protein FliC tái tổ hợp. 1: Thang protein phân tử lượng thấp; 2: Dịch protein tổng từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC* (+)IPTG; 3: Phân đoạn dịch protein sau khi qua cột; 4: Phân đoạn dịch rửa cột; 5, 6: Phân đoạn dung ly protein mục tiêu.

### Tinh sạch protein FliC tái tổ hợp

Thông qua việc gắn đuôi dung hợp 6xHis, FliC tái tổ hợp dễ dàng được tinh sạch bằng phương pháp tinh chế sắc ký ái lực. Khi dịch protein tổng số được cho chảy qua cột tinh chế, những protein có mang histidine được giữ lại trong cột thông qua ái lực của histidine với ion  $\text{Ni}^{2+}$  có trong cột. Protein mục tiêu sau đó sẽ được dung ly ra khỏi cột và được phân tích độ tinh sạch trên bản gel polyacrylamide.

Kết quả phân tích các phân đoạn tinh chế ở Hình 5 cho thấy phân đoạn dung ly ở giếng 5 cho một vạch protein mục tiêu với kích thước bằng với kích thước của FliC với độ tinh sạch trên 95 %; phân đoạn dung ly ở giếng 6 thu được protein mục tiêu với độ tinh sạch 80 %. Các kết quả phân tích độ tinh sạch được thực hiện bằng phần mềm Quantity One (Bio-rad). Như vậy, chúng tôi đã bước đầu tinh sạch và thu nhận thành công protein FliC tái tổ hợp với độ tinh sạch 95 %. Tuy nhiên,

để thu được FliC tái tổ hợp tinh sạch với lượng lớn, các khảo sát thêm trong quá trình tinh chế là cần thiết.

### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã cấu trúc thành công vector tái tổ hợp mang gene *fliC* (pET-*fliC*) mã hóa cho protein FliC có nguồn gốc từ *S. enteritidis*; tạo thành công dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pET-*fliC* có khả năng biểu hiện protein FliC tái tổ hợp ở pha tan và thu nhận được FliC tái tổ hợp với độ tinh sạch trên 95 %. Nghiên cứu này đã tạo được nguồn cung cấp FliC tái tổ hợp để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm đánh giá hoạt tính hỗ trợ miễn dịch của FliC hướng tới việc phát triển các thể hệ vaccine tái tổ hợp hiệu lực cao.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được tài trợ một phần bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-TPHCM trong khuôn khổ đề tài mã số T2015-14.

# Cloning, expression and purification of the recombinant FliC from *Salmonella enteritidis*

- Tran Thi Bao Chau
- Nguyen Viet Anh
- Tran Van Hieu

University of Science, VNU-HCM

## ABSTRACT

*FliC protein from Salmonella enteritidis is currently interested due to its immunologic adjuvant property for the novel generation of recombinant vaccines. To produce a source for further researches on the immune effects of FliC, we generated an Escherichia coli based on recombinant vector called pET-fliC which is ligated from fliC gene with NdeI and XhoI double*

*digested pET vectors. The results of expression of recombinant FliC, which was induced by IPTG, were confirmed by SDS-PAGE and Western blot probed with anti-6xHis tag. With the purity above 95 %, this recombinant FliC can be used as a material source for next studies on evaluating the adjuvant property of FliC.*

**Key words:** adjuvant, flagellin, FliC, recombinant protein, *Salmonella enteritidis*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N. Petrovsky, J.C. Aguilar, Vaccine adjuvants: Current state and future trends, *Immunology and Cell Biology*, 82, 488–496 (2004).
- [2]. F.R. Vogel, Improving Vaccine Performance with Adjuvants, *Clin Infect Dis.*, 30 (Supplement 3): S266–S270 (2000).
- [3]. T. Kaisho, S. Akira, Toll-like receptors as adjuvant receptors, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1589, 1–13 (2002).
- [4]. M.R.A. Karam, M. Oloomi, M. Mahdavi, M. Habibi, S. Bouzari, Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice, *Vaccine*, 31, 1210–1216 (2013).
- [5]. T. Gewirtz, P.O. Simon, Jr., C.K. Schmitt, L.J. Taylor, C.H. Hagedorn, A.D. O'Brien, et al., *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response, *J Clin Invest*, 107, 99–109 (2001).
- [6]. J. Braga, L.M. Massis, B.C. Alencar, M.M. Rodrigues, M.E. Sbrogio-Almeida, L.C. Ferreira, Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins, *Braz J Microbiol*, 39, 44–9 (2008).
- [7]. J. Kremer, K.M. O'Meara, S.L. Layton, B.M. Hargis, K. Cole, Evaluation of recombinant *Salmonella* expressing the flagellar protein fliC for persistence and enhanced antibody response in commercial turkeys, *Poultry Science*, 90, 752–758 (2010).
- [8]. P.F. McDermott, F. Ciacci-Woolwine, J.A. Snipes, S.B. Mizel, High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation, *Infect Immun*, 68, 5525–9 (2000).
- [9]. F. Liu, J. Yang, Y. Zhang, D. Zhou, Y. Chen, W. Gai, et al., Recombinant flagellins with

- partial deletions of the hypervariable domain lose antigenicity but not mucosal adjuvancy, *Biochem Biophys Res Commun*, 392,582–7, (2010).
- [10]. S.K. Gupta, P. Bajwa, R. Deb, M.M. Chellappa, S. Dey, Flagellin A Toll-Like Receptor 5 agonist as an adjuvant in Chicken Vaccines, *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI, 21, 3, 261–270 (2014).