

陆奕彤, 李 垚, 杨发龙. 溶血性曼氏杆菌重要抗原的免疫原性分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 446-452.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.019

溶血性曼氏杆菌重要抗原的免疫原性分析

陆奕彤, 李 垚, 杨发龙

(西南民族大学/青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 旨在通过分析溶血性曼氏杆菌重要抗原的免疫原性, 为疫苗和诊断试剂研制提供依据。在生物信息学分析的基础上, 构建溶血性曼氏杆菌 *lktA*、*ompA*、*plpE*、*plpF*、*ompP2* 和 *gs60* 基因的原核重组表达载体, 并将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达, 获得重组蛋白质。随后用被抗溶血性曼氏杆菌感染的绵羊血清进行 Western-blot 和酶联免疫吸附测定(ELISA), 评价各蛋白质的免疫原性并筛选优势免疫原; 用各重组蛋白质免疫小鼠, 评价免疫小鼠后诱导其产生的抗体水平, 以评价各重组蛋白质作为重组疫苗的潜在价值。Western-blot 和 ELISA 检测结果表明, 各重组蛋白质均具有良好的免疫原性, 其中 rLktA、rOmpA、rGs60 与感染的绵羊血清结合能力最强, 为优势免疫原; 各重组蛋白质免疫小鼠后均能诱导其产生体液免疫应答, 其中 rOmpA、rPlpE 和 rPlpF 免疫小鼠后诱导其产生的抗体在免疫后 35 d 仍能与全菌蛋白质结合。研究结果为溶血性曼氏杆菌感染血清学诊断试剂的开发和新型疫苗的研制提供了重要的试验数据。

关键词: 溶血性曼氏杆菌; 重要抗原; 免疫原性

中图分类号: S852.61⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2022) 02-0446-07

Immunogenicity analysis of major antigens of *Mannheimia haemolytica*

LU Yi-tong, LI Yao, YANG Fa-long

(Key Laboratory of the Ministry of Education for the Protection and Utilization of Animal Genetic Resources on the Qinghai-Tibet Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The purpose of this study is to compare and analyze the immunogenicity of major antigens of *Mannheimia haemolytica*, and to provide a basis for the development of vaccines and diagnostic reagents. Based on bioinformatics analysis, prokaryotic expression vectors of *lktA*, *ompA*, *plpE*, *plpF*, *ompP2* and *gs60* genes were constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), and recombinant proteins were expressed and purified. Subsequently, Western-blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed by using sheep anti-*Mannheimia haemolytica* serum to evaluate the immunogenicity of each protein, and to screen the dominant immunogens. Meanwhile, mice were immunized with each recombinant protein, and the antibody levels were tested to evaluate potential value of each protein as a recombinant vaccine. The results demonstrated that all tested proteins were good immunogens, while rLktA, rOmpA and rGs60 showed the strongest binding ability to infected sheep serum, suggesting that they were the dominant immunogens of *Mannheimia haemolytica*. All recombinant proteins could induce humoral immune response in mice, while rOmpA, rPlpE and rPlpF could induce high titer antibody after 35 days post immunization. These results provide important data for developing serological diagnostic tools and new vaccines.

Key words: *Mannheimia haemolytica*; important antigen; immunogenicity

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 四川省重点研发项目(2021YFN0008); 西南民族大学研究生创新项目(CX2020SZ57)

作者简介: 陆奕彤(1996-), 女, 辽宁锦州人, 硕士研究生, 研究方向为动物病原生物学。(E-mail) 981489868@ qq.com

通讯作者: 杨发龙, (E-mail) yang.falong@ swun.edu.cn

溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*) 属于巴氏杆菌科曼氏杆菌属, 是一种革兰氏阴性兼性厌氧球杆菌。其作为一种条件致病菌, 溶血性曼氏杆

菌常存在于牛、羊等反刍动物上呼吸道中。当动物受到一些应激因素(如天气骤变、长途运输或病毒、支原体感染等)影响,造成机体免疫能力下降时,溶血性曼氏杆菌便可入侵动物肺部,引起动物发生严重的肺炎^[1-2]。溶血性曼氏杆菌是公认的引起牛呼吸道综合征(Bovine respiratory disease complex, BRDC)的主要病原^[3]。近年来,越来越多的研究发现,溶血性曼氏杆菌同样是导致绵羊和山羊等小反刍动物发生呼吸道疾病的重要病原^[4],还可以导致羔羊败血症和母羊乳房炎的发生^[5-6]。

目前,中国还缺乏针对溶血性曼氏杆菌的使用广泛且安全有效的商品化疫苗,同时也没有特异、敏感的血清学诊断试剂,而国外使用的商品化疫苗仅能提供部分免疫保护^[7]。因此,有必要对溶血性曼氏杆菌的病原特征及其重要的免疫原进行深入研究,从而有助于溶血性曼氏杆菌新型疫苗和血清学诊断试剂的研制。

国内外研究者已经在溶血性曼氏杆菌免疫原方面进行了一些相关研究,发现白细胞毒素(LKT)及OmpA、PlpE等多个外膜蛋白质等均具有良好的免疫原性,可诱导机体产生一定的免疫保护作用^[8-10]。然而,虽然上述研究对一些潜在的诊断抗原和疫苗的候选蛋白质进行了评价,但对于其中哪些可以作为优势免疫原诱导机体产生高水平免疫应答尚不清楚。此外,相关研究多以牛源菌株为对象,分析其感染牛后诱导牛产生的免疫应答情况,而对溶血性曼氏杆菌感染羊后诱导羊产生的免疫应答情况的报道甚少。

本研究分析比较了溶血性曼氏杆菌感染羊后LktA、OmpA、PlpE、PlpF、OmpP2、Gs60等6个重要免疫原在羊体内诱导产生的抗体水平以及这些免疫原的重组蛋白质在小鼠体内诱导产生的免疫应答水平,从而为血清学诊断试剂的开发和新型疫苗的研制提供有用的试验数据。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及血清

溶血性曼氏杆菌临床分离株S4由笔者所在实验室(西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室)分离鉴定和保存;pET-28α(+)载体为Novagen公司产品;大肠杆菌*E. coli* DH5α、BL21(DE3)感受态细胞为天根生化科技(北京)有限公司产品;35份溶血性曼氏杆菌感染绵羊血清及3份阴性

血清由笔者所在实验室收集并保存。

1.2 主要试剂

氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自美国Sigma公司;金牌Mix(green)Golden Star T6 Super PCR Mix(1.1×)购自北京擎科信业生物公司;核酸相对分子质量标准DNA marker、蛋白质相对分子质量标准品、限制性内切酶Bam H I、Xho I与T4 DNA连接酶购自日本TaKaRa公司;Gel Extraction Kit、Plasmid Miniprep Kit、Cycle Pue Kit购自美国Omega公司;镍金属螯合亲和[组氨酸(His)标签蛋白]蛋白质纯化柱购自常州天地人和生物科技有限公司;27 mm透析袋(相对分子质量:35 000)购自广州赛国生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记驴抗绵羊、HRP标记山羊抗鼠、SuperLumia ECL HPR Substrate Kit购自美国Abbkine公司;磷酸缓冲盐溶液(PBS)、酶标抗体稀释液、血清稀释液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、终止液购自武汉博士德生物工程有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白质定量试剂购自江苏凯基生物技术股份有限公司;酶标板购自Corning公司。

1.3 引物设计

为制备原核表达重组蛋白质,对ompA、plpE、plpF、ompP2、gs60基因全长编码序列(CDS)进行克隆;对于lktA基因,对其2 019~2 819位核苷酸编码序列进行截短表达。PCR扩增引物用Primer Premier 5软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物具体信息见表1。

表1 原核表达PCR扩增引物信息

Table 1 Nucleotide sequences of primers

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
lktA	CGggatccGTGACTTCAACTCACACCGCAT	816
	CCctcgagAACATTGAAGTTGGGCTCGCT	
ompA	CGggatccGCTAACACTTTTCTACGAGGTGCTA	1 135
	CCctcgagTTACATAGTTACTTCTTTGAACCTTG	
plpF	CCggatccAGCGGTGTTACAGGTAG	823
	GGctcgagTTATTTTGTCTCTCGGGTTCCTG	
plpE	GTCaggatccTGCAGGAGGAAGCGGTAGC	1 033
	GACTctcgagTTATTTTCTCGCTAACCATTAA	
ompP2	CGCggatccGTTTACGATGCAGAAGGT	1 135
	GTGctcgagTTACCAGTATACACGCATACC	
gs60	CCggatccATGGCAACTATTTTAAAC	1 738
	GGctcgagTTAATAAGCTTGTGAATAG	

ggatcc为Bam H I酶切位点;ctcgag为Xho I酶切位点。

1.4 PCR 扩增

采用常规酚-三氯甲烷法从溶血性曼氏杆菌 S4 株中提取总 DNA 作为模板,利用表 1 中的引物对各基因片段进行 PCR 扩增。反应总体积为 20 μ l,包括 Mix(green) Golden Star T6 Super PCR Mix (1.1 \times) (5 U/ μ l) 10 μ l,上游引物、下游引物各 1 μ l,DNA 模板 2 μ l,去离子水 6 μ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s (*lktA*、*ompA*、*plpF*、*plpE*、*ompP2*、*gs60* 基因对应的退火温度分别为 60.0 $^{\circ}$ C、58.0 $^{\circ}$ C、63.0 $^{\circ}$ C、57.7 $^{\circ}$ C、57.8 $^{\circ}$ C、55.9 $^{\circ}$ C);72.0 $^{\circ}$ C 延伸(其中 *gs60* 基因延伸 1 min 30 s,其他基因均延伸 40 s),共 35 个循环;72.0 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,16 $^{\circ}$ C 结束反应。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 原核表达载体的构建

利用 Gel Extraction Kit 对上述各 PCR 产物进行回收纯化。随后用限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I 对 pET-28a(+) 载体及纯化的目的片段进行双酶切。利用 Cycle Pue Kit 纯化酶切产物,采用 T4 DNA 连接酶进行连接反应。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,然后将重组质粒 DH5 α 工程菌涂布于含有卡那霉素 (50 μ g/ml) 的 LB 琼脂选择培养基上。第 2 d 挑取疑似阳性菌落,利用质粒提取试剂盒 Plasmid Miniprep Kit 对其进行质粒提取,随后进行 PCR 鉴定和 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切鉴定,将鉴定为阳性的样本送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序确认。

1.6 重组蛋白质的诱导表达和可溶性分析

将 pET-28a(+)-X 转化至 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,获得表达工程菌,将表达工程菌菌种按 1:100 的体积比接入 100 ml LB 液体培养基(卡那霉素质量浓度为 50 μ g/ml)中,将终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 9 h,然后取 2 ml 菌液,于 8 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集菌体,经 pH 值为 7.4 的 PBS 重悬,与等体积的 2 \times SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)上样缓冲液混合,加热煮沸 5 min,通过含量为 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 检测。

将检测正确的样本在冰水浴中通过超声波破碎仪于 400 W 破碎 20 min(超声 2 s+暂停 6 s 为 1 个循环),破碎后于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,分别收集沉淀、上清。取少许沉淀,经 pH 值为 7.4 的 PBS 重悬,然后将沉淀、上清均用含量为 12% 的分离胶进

行 SDS-PAGE,对重组蛋白质进行可溶性分析。

1.7 重组蛋白质的纯化

将上述诱导表达后的菌液于 8 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集菌体并用 PBS 重悬,在冰浴中进行超声破碎(400 W,20 min)。破碎后于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃去上清,收集沉淀,将沉淀用破碎 Buffer(Binding Buffer)溶解,在冰浴中进行二次超声破碎,于 400 W 破碎 20 min(超声 2 s+暂停 6 s 为 1 个循环),破碎后于 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,收集上清液,进行镍琼脂糖亲和层析纯化。最后将制备好的各组分蛋白质置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.8 优势免疫原的筛选

为评价溶血性曼氏杆菌感染羊后蛋白质 rOmpA、rPlpE、rPlpF、rOmpP2、rGs60 诱导免疫应答的能力,筛选能够与感染动物血清抗体高效结合的优势免疫原,以上述纯化的各重组蛋白质作为包被抗原,分别以临床感染绵羊阳性血清、阴性血清作为一抗,进行间接酶联免疫吸附剂测定(ELISA)。主要过程如下:每孔用 100 μ l、5 μ g/ml 重组蛋白质包被酶标板,用 PBST(500 ml PBS+25 μ l Tween-20)洗涤 3 次后再用 5%(质量体积比)脱脂奶粉在 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h 进行封闭,洗涤 3 次后加入 100 μ l 按 1:200 稀释的临床感染动物血清或阴性血清,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤 5 次后加入 100 μ l 按 1:6 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记驴抗绵羊免疫球蛋白(IgG),37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,洗涤 5 次后加入 100 μ l 底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),室温下显色 10 min,加入 100 μ l 终止液,并在酶标仪上读取 OD_{450} 。

1.9 重组蛋白质的免疫原性分析

将 40 μ g 重组蛋白质与 ISA 201 佐剂按等体积混合进行乳化,分别免疫 6 只 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,并设 PBS 对照组。首次免疫 14 d 后用相同剂量进行二次免疫,并分别于首次免疫后 0 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 采集小鼠血清。以各重组蛋白质作为包被抗原(1 孔 50 ng),以按 1:50 比例稀释的小鼠血清为一抗进行间接 ELISA 检测,从而评价各重组蛋白质诱导产生的抗体水平(用 OD_{450} 表示)。

2 结果与分析

2.1 溶血性曼氏杆菌重要抗原编码基因的 PCR 扩增

为了构建重要抗原编码基因的原核表达载体,

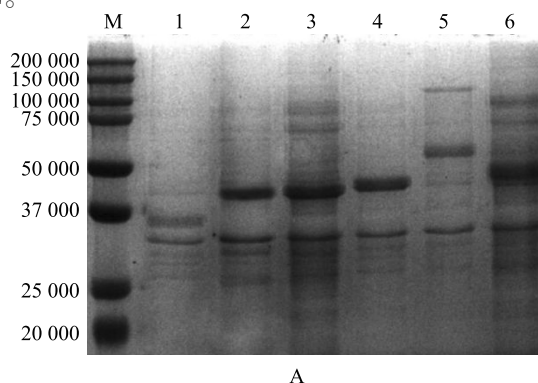
利用表 1 中的引物对各基因片段进行 PCR 扩增,结果均获得与预期大小一致的条带,详见图 1。

2.2 原核表达载体的构建及鉴定结果

对目的片段和 pET-28a(+) 载体进行双酶切后,将酶切所得基因分别与 pET-28a(+) 连接,并用连接后的载体分别转化 DH5 α 感受态细胞,再用含有卡那霉素的 LB 琼脂平板筛选疑似阳性菌落,培养后提取质粒,对质粒进行特异性 PCR 鉴定,且使用 *Bam* H I 和 *Xho* I 对质粒进行双酶切鉴定。结果表明,除了在相应位置出现与预期相符的目的条带外,还在 5 800 bp 左右处出现了条带。此外,测序结果显示,6 个质粒均为阳性质粒,表明本研究成功构建了 6 个重组原核表达载体。

2.3 重组蛋白质的诱导表达和可溶性分析

将诱导的菌液离心,用 PBS 重悬沉淀并洗涤沉淀后在冰水浴中进行超声破碎,破碎完成后,离心分离上清液和沉淀,分别使用上清液、沉淀进行 SDS-PAGE。



A

A:裂解物沉淀;B:裂解物上清液。M:蛋白质相对分子质量标准;1~6:rLktA、rPlpE、rOmpA、rOmpP2、rGs60、rPlpF 蛋白。

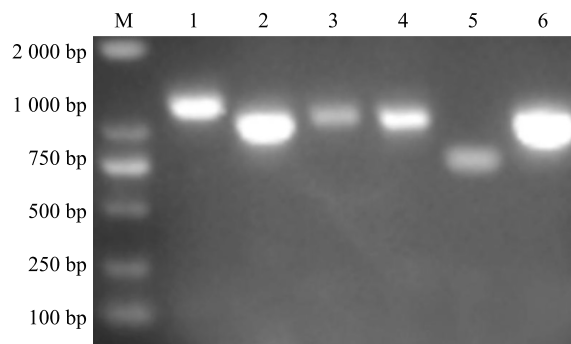
图 2 重组蛋白质的可溶性分析结果

Fig.2 Solubility analysis of recombinant proteins

2.4 重组蛋白质的纯化

将菌体经过第 1 次 PBS 重悬破碎洗涤后,留下的沉淀再用含有 8 mol/L 尿素的 Buffer II 溶解破碎,将离心后留下的上清液过镍柱,进行镍柱亲和层析纯化。在洗杂和洗脱过程中,使用具有不同咪唑浓度 (20 mmol/L、50 mmol/L 和 500 mmol/L) 的 Wash Buffer 进行梯度洗脱,对收集到的蛋白质进行 SDS-PAGE 检测。由图 3 可以看出,各基因对应的重组蛋白质经电泳后均有单一且符合预期大小的目的条带,表示重组蛋白质的纯化效果良好。对纯化结果良好的蛋白质组分进行透析复性、浓缩及二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒蛋白质浓度检测,以便进行进一步的研究。

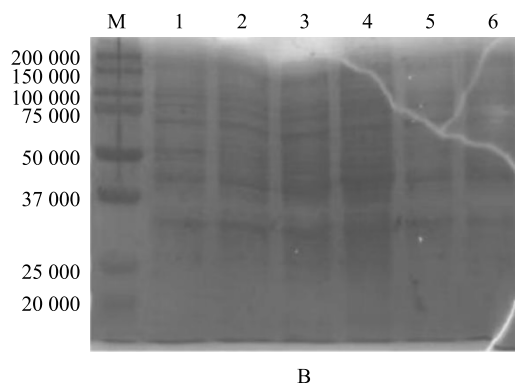
可溶性分析检测结果显示,6 个重组蛋白质破碎后的上清液中均没有出现条带,而沉淀中出现与预期相符的目的条带 (图 2),说明 6 个重组蛋白质都以包涵体的形式表达。



M:DL2 000 DNA 相对分子质量标准;1~6:gs60、plpF、plpE、ompA、lktA、ompP2 基因。

图 1 溶血性曼氏杆菌重要抗原编码基因的扩增结果

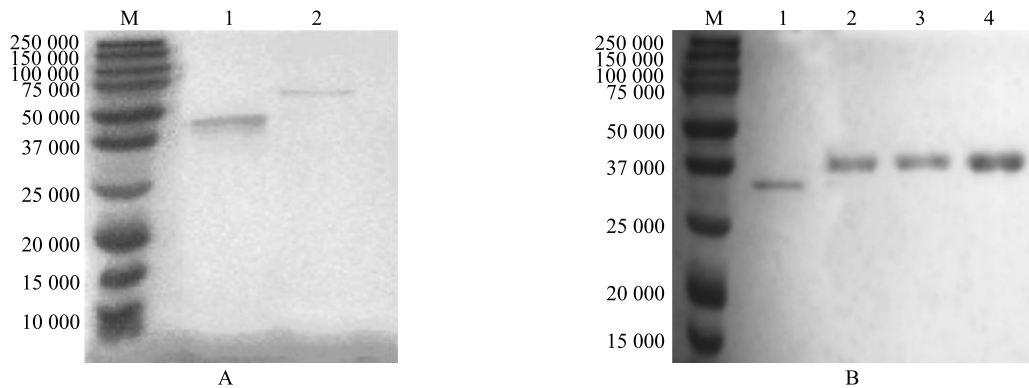
Fig.1 Amplification of *Mannheimia haemolytica* major antigen-encoding genes



B

2.5 优势免疫原的筛选结果

使用按上述步骤制备的纯化重组蛋白质作为包被抗原,以临床感染动物血清及阴性血清作为一抗,进行间接 ELISA 检测,其目的是为了能够筛选与感染动物血清高效结合的优势免疫原。由图 4 可以看出,溶血性曼氏杆菌感染羊后,本研究选择的 6 种免疫原蛋白质在绵羊体内产生的 6 种抗体水平存在明显差异,可见不同重组蛋白质与感染血清的结合能力也有差异,按 OD 值从高到低排序为 rOmpA、rLktA、rGs60、rPlpE、rOmpP2、rPlpF。由此可见,rOmpA、rLktA 和 rGs60 是进行溶血性曼氏杆菌血清学诊断试剂开发的良好候选蛋白质。



M: 蛋白质相对分子质量标准; A 中 1~2 以及 B 中 1~4 分别为: rPlpF、rGs60、rLktA、rPlpE、rOmpP2、rOmpA。

图 3 纯化重组蛋白质的电泳结果

Fig.3 Purification of recombinant proteins

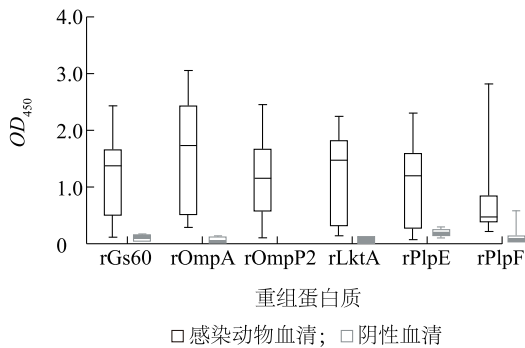


图 4 优势免疫原筛选

Fig.4 Screening of predominant immunogens

2.6 重组蛋白质疫苗诱导小鼠产生的抗体水平

为了评价制备的重组蛋白质作为亚单位疫苗候选蛋白质的潜力,将具有相同蛋白质剂量(40 μg)并且经无菌检验及物理性状检验的重组蛋白质疫苗分组后经皮下注射免疫小鼠,以免疫后不同时间的小鼠血清作为一抗,以纯化的重组蛋白质作为包被抗原,进行间接 ELISA 检测,以评价重组蛋白质免疫小鼠后能否使小鼠产生特异性抗体、抗体水平的变化及抗体的持续时间。由图 5 可以看出,6 个重组蛋白质均能使小鼠产生免疫应答,其中 rLktA、rOmpA、rPlpE、rPlpF、rGs60 经过 2 次免疫后,抗体水平不断上升,并持续至试验首免后 35 d 仍未下降。其中,rOmpA 产生的抗体水平较高;rOmpP2 产生的抗体水平较低,并且持续时间较短,在首免后 28 d 开始下降。由此可见,除 rOmpP2 外,其他重组蛋白质均具有作为亚单位疫苗候选蛋白质的潜力。

2.7 抗重组蛋白质抗体与溶血性曼氏杆菌全菌蛋白质结合能力的评价

为了评价各重组蛋白质免疫后产生的抗体能否

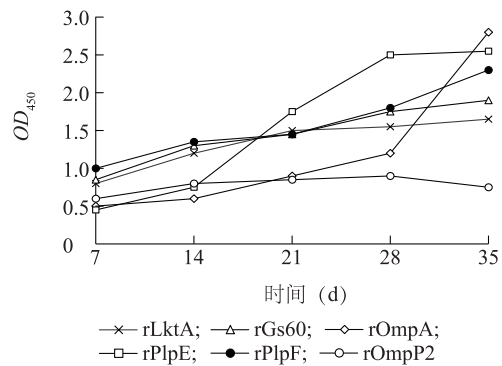


图 5 重组蛋白质免疫小鼠后的抗体水平

Fig.5 Antibody levels of mice immunized with different recombinant proteins

与溶血性曼氏杆菌的菌体结合,从而具有潜在的免疫保护作用,以各重组蛋白质免疫小鼠后的血清作为一抗、以制备的溶血性曼氏杆菌全菌蛋白质作为包被抗原进行 ELISA 检测。由图 6 可以看出,rOmpA、rPlpE、rPlpF 免疫后诱导产生的抗体能与溶血性曼氏杆菌的全菌蛋白质高效结合,抗体水平明显高于阴性对照,并且在免疫后 35 d 仍能与全菌蛋白质结合。由此可见,rOmpA、rPlpE、rPlpF 可能具有潜在的免疫保护作用。

3 讨论

溶血性曼氏杆菌作为引起牛、羊等反刍动物呼吸道疾病的重要病原,给国内外养殖业造成了巨大的经济损失^[11-13],仅在北美地区,每年给肉牛养殖业造成的经济损失就高达数十亿美元^[14],因此对该病进行有效控制尤为紧迫。开发敏感的诊断工具和高效的疫苗是对该病进行防控的重要措施^[15],目前

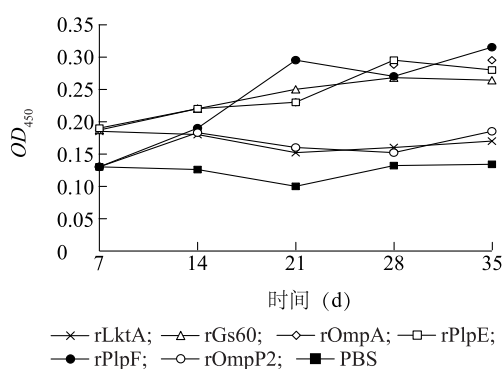


图6 抗重组蛋白质抗体与全菌抗原结合能力的评价

Fig. 6 Binding of antibody against recombinant protein to whole cell antigen

国外使用的商品化疫苗仅能提供部分免疫保护^[7]。因此,为了更好地对该病进行防控,有必要对溶血性曼氏杆菌的免疫原分子进行更全面的认识,国内外学者已进行了一些相关研究。例如,2010年 Ayalew 等^[16,9]通过免疫蛋白质组学分析证实了 55 种可能具有免疫原性的溶血性曼氏杆菌的外膜蛋白质,包括 OmpA、OmpP2、LktA、PlpE 等。其中,脂蛋白 PlpE 是最早发现于溶血性曼氏杆菌中的一种脂蛋白, Yalew 等^[17]通过对 PlpE 的研究发现,重组 PlpE 免疫牛后可诱导牛产生良好的免疫应答,随后他们用重组溶血性曼氏杆菌 OmpA 对牛进行免疫,用补体介导的方式刺激机体产生了高抗体反应^[8]。Omaleki 等^[18]后来将 PlpE 与 LktA 进行融合表达,结果表明,融合表达后免疫小鼠能够使其产生良好的保护效果。为了进一步评价溶血性曼氏杆菌中各重要功能蛋白质在感染动物后的免疫原性,并筛选适合的免疫原蛋白质,后续进行血清学诊断方法的研究和新型疫苗的研制。本研究从绵羊源溶血性曼氏杆菌中对 *lktA*、*ompA*、*plpE*、*plpF*、*ompP2*、*gs60* 等 6 个基因进行了克隆和原核表达,随后评价了各蛋白质的免疫原性及重组蛋白质诱导机体产生的免疫应答水平。

建立血清学检测方法的关键是所采用的抗原能否与大多数临床感染血清反应,并且能够高效结合。为了筛选溶血性曼氏杆菌中适合作为诊断抗原的优势免疫原蛋白质,本研究采用间接 ELISA 方法分析比较了 6 种免疫原与 35 份临床感染阳性血清和 3 份阴性血清的结合反应能力,结果发现,虽然所有 6 种蛋白质均能不同程度地与临床感染血清结合,但各自的结合能力有差别。其中 rOmpA、rLktA、rGs60

可与绝大多数感染动物血清反应,且具有很强的结合能力,说明它们是优势免疫原,可以作为溶血性曼氏杆菌血清学诊断试剂开发的良好候选蛋白质。但是,各蛋白质作为诊断抗原的特异性还需要进行进一步的验证。

开发新型亚单位疫苗是溶血性曼氏杆菌疫苗研发的重要方向。作为疫苗候选蛋白质,必须在免疫后能诱导机体产生强烈和持续的免疫应答。本研究采用制备的 6 种重组蛋白质免疫小鼠,发现所有重组蛋白质均可以诱导机体产生较高水平的体液抗体。其中,rLktA、rOmpA、rPlpE、rPlpF、rGs60 免疫后产生的抗体水平高,且在试验结束时(免疫后 35 d)仍可保持较高水平,说明上述 5 种重组蛋白质,特别是 rOmpA 具有作为亚单位疫苗候选蛋白质的潜力。

本研究在优势免疫原筛选评价中 rLktA 能够检测出更多的阳性血清,是作为血清学诊断试剂开发的良好候选蛋白质。然而,采用 rLktA 免疫小鼠后产生的特异性抗体与溶血性曼氏杆菌全菌蛋白质的结合能力较弱,可能是由于白细胞毒素(LKT)在溶血性曼氏杆菌生长的对数期分泌于培养液的上清液中^[19],作为释放于胞外的毒素蛋白质,在全菌蛋白质中其成分含量很低。因此,作为溶血性曼氏杆菌最为重要的毒力因子,在开发新型亚单位疫苗时,将 OmpA、PlpE 与 LKT 进行融合表达将是重要的策略之一。

本研究对 6 个重要的溶血性曼氏杆菌免疫原蛋白质的免疫原性及其重组蛋白质诱导的体液免疫应答水平进行了比较分析,为进一步将这些蛋白质作为抗原开发血清学诊断试剂和新型疫苗提供了重要的参考依据。

参考文献:

- [1] SRIKUMARAN S, KELLING C L, AMBAGALA A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex[J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8(2):215-229.
- [2] 朱利霞,王洪彬,赵希艳,等.牛细菌性呼吸道疾病研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(14):63-66.
- [3] ANGÉN Ø, QUIRIE M, DONACHIE W, et al. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping[J]. Veterinary Microbiology, 1999, 65(4):283-290.
- [4] 马增军,颀锡良,芮萍,等.羊溶血性曼氏杆菌主要生物学特性测定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005(7):39-40.
- [5] 李娟,刘阳,彭欠欠,等.羊溶血性曼氏杆菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(20):96-97.

- [6] 马冰杰. 羊乳腺炎的发生与诊治[J]. 黑龙江动物繁殖, 2016, 24(3):49-50.
- [7] 周金玲. 牛溶血性曼氏杆菌小鼠感染模型建立及灭活疫苗免疫原性研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2018.
- [8] AYALEW S, SHRESTHA B, MONTELONGO M, et al. Immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* recombinant outer membrane proteins serotype 1-specific antigen, OmpA, OmpP2 and OmpD15 [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2011, 18(12):2067-2074.
- [9] AYALEW S, COMFER A W, BLACKWOOD E R. Characterization of immunodominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(12):7265-7274.
- [10] BATRA S A, SHANTNALINGAM S, DONOFRIO G, et al. A chimeric protein comprising the immunogenic domains of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin and outer membrane protein PlpE induces antibodies against leukotoxin and PlpE[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2016, 175:36-41.
- [11] 冯旭飞, 刀筱芳, 杨发龙, 等. 绵羊肺脏中溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其药物敏感性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8):224-228.
- [12] KUMAR J, DIXIT S K, KUMAR R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture [J]. Veterinary World, 2015, 8(9):1073-1077.
- [13] FERANÁNDEZ S, GALAPERO J, GÓMEZ L, et al. *Mannheimia haemolytica* and *Bibersteinia trehalosi* serotypes isolated from merino breed lambs in extremadura (southwestern Spain) [J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(4):513-515.
- [14] NOYES N R, BENEDICT K M, GOW S P, et al. *Mannheimia haemolytica* in feedlot cattle: prevalence of recovery and associations with antimicrobial use, resistance, and health outcomes[J]. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2015, 29(2):705-713.
- [15] 董捷. 浅谈溶血性曼氏杆菌研究进展[J]. 广西畜牧兽医, 2020, 180(1):45-46.
- [16] AYALEW S, CONFER A W, HARTSON S D, et al. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates[J]. Proteomics, 2010, 10(11):2151-2164.
- [17] YALEW S, CONFER A W, PAYTON M E, et al. *Mannheimia haemolytica* chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin[J]. Vaccine, 2008, 26(38):4955-4961.
- [18] OMALEKI L, BROWNING G F, BARBER S R, et al. Sequence diversity, cytotoxicity and antigenic similarities of the leukotoxin of isolates of *Mannheimia* species from mastitis in domestic sheep[J]. Vet Microbiol, 2014, 174(1/2):172-179.
- [19] SHEWEN P E, WILKIE B N. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes[J]. Infection and Immunity, 1982, 35(1):91-94.

(责任编辑:徐 艳)