

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.02.002

王磊, 游怡宁, 吴天乐, 等. 柔嫩艾美耳球虫表面抗原 SAG12 对鸡的免疫保护效果评价 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(2): 17-25.

柔嫩艾美耳球虫表面抗原 SAG12 对鸡的免疫保护效果评价

王磊, 游怡宁, 吴天乐, 孙雪,
王冰楠, 毕师诚, 周荣琼

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为评估柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*, *E. tenella*)表面抗原(Surface antigen, SAG)SAG12 对鸡的免疫保护效果, 首先构建 EtSAT12/pET-32a 原核表达载体, 对 EtSAG12 重组蛋白进行纯化并制备多克隆抗体; 然后进行动物试验, 将 100 只 1 日龄海兰灰雏公鸡分成 5 个组, 分别是感染对照组(PC)、空白对照组(NC)、EtSAG12 重组蛋白 50 μ g、100 μ g 和 150 μ g 组。通过统计相对增质量率、卵囊减少率、抗球虫指数(ACI)和血清中特异性 IgG 抗体等指标评价 EtSAG12 重组蛋白的免疫保护效果。结果显示: 成功表达出 EtSAG12 重组蛋白, 大小约为 43 Ku, 主要以可溶性形式表达; Western Blot 结果显示所制备的多克隆抗体有较强的特异性。免疫保护试验结果显示: 与 PC 组相比, 3 个重组蛋白组的平均增质量显著增加($p < 0.05$)、病变计分显著降低($p < 0.05$), 且均能有效降低卵囊产量, 其中重组蛋白 150 μ g 组相对增质量率(97.34%)和卵囊减少率(52.54%)均为最高, ACI 值达到 165.34, 具有中效抗球虫效果; 3 个重组蛋白组血清中特异性 IgG 抗体水平与 PC 组和 NC 组相比, 在 $p < 0.05$ 水平差异均有统计学意义, 且二免 7 d 后血清中特异性 IgG 抗体水平达到最高, 其中重组蛋白 150 μ g 组特异性 IgG 抗体水平最高, 且显著高于另外两个重组蛋白组($p < 0.05$)。综上所述, EtSAG12 重组蛋白能减轻因球虫感染导致的增质量损失和肠道病变, 减少卵囊排出, 刺激宿主产生体液免疫, 具有一定的免疫保护作用。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; EtSAG12 重组蛋白; 原核表达; 免疫保护效果; 表面抗原

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)02-0017-09

Evaluation of the Immunoprotective Effect of Surface Antigen SAG12 of *Eimeria tenella* on Chickens

收稿日期: 2024-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32473075)。

作者简介: 王磊, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学的研究。

通信作者: 周荣琼, 教授。

WANG Lei, YOU Yining, WU Tianle, SUN Xue,
WANG Bingnan, BI Shicheng, ZHOU Rongqiong

School of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To evaluate the immunoprotective effect of the surface antigen (SAG) SAG12 of *Eimeria tenella* (*E. tenella*) on chickens. The prokaryotic expression vector EtSAT12/pET-32a was constructed. The Et-SAG12 recombinant protein was purified and polyclonal antibody was prepared. In the animal experiment, 100 one-day-old Hy-Line Sonia male chicks were divided into five groups: infection control group (PC), blank control group (NC), and EtSAG12 recombinant protein 50 μg , 100 μg , and 150 μg groups. The immunoprotective effect was assessed by measuring relative weight gain, oocyst reduction rate, lesion score, anti-coccidial index (ACI) and the levels of IgG in serum. The results showed that the EtSAGR12 recombinant protein was about 43 Ku in size and mainly expressed in soluble form. Western Blot showed that the antibody had good specificity. Compared to the PC group, the three immunized groups showed significantly higher weight gain ($p < 0.05$), lower lesion scores ($p < 0.05$), and reduced oocyst output. In the group immunized with 150 μg , the relative weight gain (97.34%) and the oocyst reduction rate (52.54%) were the highest, with an ACI of 165.34, indicating moderate anticoccidial effects. The levels of IgG in serum antibody levels were significantly higher in the immunized groups than in the PC and NC groups ($p < 0.05$), and reached peak at 7 days after the second immunization, with the 150 μg group showing the highest levels ($p < 0.05$). In summary, The EtSAG12 recombinant protein can reduce weight loss and oocyst shedding, stimulate humoral immunity in the host, and have a certain degree of immunoprotective effect against coccidial infection.

Key words: *Eimeria tenella*; EtSAG12 recombinant protein; prokaryotic expression; immunoprotective effect; surface antigen

鸡球虫病(Coccidiosis)是由艾美耳科(Eimeriidae)艾美耳属(*Eimeria*)的一种或多种球虫寄生于鸡肠道中而引起的一种原虫病,该病呈全球分布,发病率为50%~70%,死亡率最高可达到80%^[1-2]。目前报道的鸡球虫有7种,其中柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)是致病力最强的虫种,由此虫种导致的原虫病使鸡盲肠显著出血肿胀,肠内出现黄白色干酪样坏死物,引起鸡贫血、消瘦、生长发育不良和产蛋性能下降等症状^[3]。据统计,该病每年会对全球家禽养殖业造成约30亿美元的损失^[4]。目前对于球虫病的防治主要依赖于药物和弱毒苗。然而过度使用药物,会导致虫株产生耐药性,并出现药物残留、环境污染等问题。尽管弱毒苗有良好的抗球虫效果,但同时也存在毒力恢复的风险^[5]。重组亚单位疫苗是通过抗原蛋白与佐剂混合形成的具有免疫效果的疫苗,与弱毒苗相比不仅安全稳定,而且具有生产时间短和经济效益好的优点,因此筛选出有良好免疫保护性的抗原是制备出优秀亚单位疫苗的关键^[6]。

表面抗原 SAG(Surface antigen)是顶复门原虫中一类富含半胱氨酸的蛋白质,该蛋白均在 N 段末端有一疏水的信号肽,且在 C 段末端含有糖基化磷脂酰肌醇(Glycosylphosphatidylinositol, GPI)的结构区域^[7]。SAG 利用自身的 GPI 结构锚定在宿主细胞膜表面,主要在虫体的入侵和存活、免疫调节、诱导炎症反应等过程中发挥重要作用。弓形虫(*Toxoplasma gondii*)SAG1 与宿主细胞表面硫酸肝素发生特异性结合,促进虫体入侵^[8];恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)分泌的 SAG 蛋白与裂殖子发生交联,进而有效阻断裂殖子黏附和入侵红细胞,从而保证虫体存活^[9];犬新孢子虫(*Neospora caninum*)SAG1 可以促进

细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 上调, 激发机体的 Th1 和 Th2 型免疫反应^[10]; *E. tenella* SAG4 和 SAG5 可促进巨噬细胞产生白介素-1 β 并分泌 NO, 诱导宿主发生炎症反应^[11]。

目前关于 EtSAG12 的免疫原性和免疫保护作用尚无报道, 本研究构建 EtSAT12/pET-32a 原核表达载体, 制备多克隆抗体, 通过动物试验评价 EtSAG12 重组蛋白的免疫保护效果, 为 *E. tenella* 重组亚单位疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 虫株与实验动物

试验虫株为西南大学动物医学院寄生虫实验室保存的 *E. tenella* 上海株, 试验前经感染无球虫鸡传代增殖得到大量柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊。新西兰大白兔购自西南医科大学实验动物中心。1 日龄海兰灰雏公鸡购自重庆华裕畜禽有限公司。

1.2 材料

HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Sangon Biotech 公司, Ni-NTA 纯化树脂预装柱、EasyPure[®] 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京 TransGen Biotech(全式金)公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 TMB 显色液均购自北京索莱宝科技有限公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自碧云天生物技术(上海)有限公司。

1.3 裂殖子的提取

取 10 只 1 日龄海兰灰雏公鸡饲养于经甲醛熏蒸消毒无鸡球虫的房间内, 并且饲养所用鸡笼、水盘和饲料盘等用具都经过高温消毒处理, 试验期间全程使用未添加抗球虫药物的饲料。待雏鸡长至 14 日龄后, 每只雏鸡经口感染 *E. tenella* 孢子化卵囊按 5×10^4 个, 并在感染后 120 h 剖杀试验鸡只收集盲肠。按照文献[12]的方法提取 *E. tenella* 裂殖子, 最后将提取的裂殖子放入液氮保存。

1.4 引物的设计与合成

根据柔嫩艾美耳球虫 EtSAG12 基因组数据(GenBank: XM_013375898), 利用 Primer-Premier 6.0 对 EtSAG12 进行引物设计。原核表达引物(F2: 5'-CCCCGAATTCATGAGCGACGGAACGCCTG-3', 引入酶切位点 EcoRI; R2: 5'-CCCCCTCGAGTTACAGTGCTGTAATCCGAATGCG-3', 引入酶切位点 Xho I)送至重庆擎科兴业生物科技有限公司进行合成。

1.5 EtSAT12/pET-32a 原核表达载体的构建

采用 TRIzol 法提取第二代裂殖子总 RNA, 再反转录合成 cDNA, 由 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 30 s、63 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。回收产物与 pMD19-T (simple) Vector 载体进行连接, 再将连接产物转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞中, 将菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送至重庆擎科兴业生物科技有限公司测序。然后按质粒提取试剂盒说明书提取阳性重组质粒 EtSAT12/pMD19-T 和 pET-32a 质粒, 经限制性内切酶 EcoRI 和 Xho I 双酶切, 将切胶回收的目的基因 EtSAT12 与 pET-32a 质粒连接, 再将重组表达质粒转化至 DH5 α 感受态细胞; 最后提取重组质粒, 进行双酶切和测序鉴定。

1.6 EtSAG12 重组蛋白的诱导表达和纯化

挑选阳性菌, 经 PCR 鉴定后提取质粒, 并将其转化至 BL21(DE3)感受态细胞, 挑单菌落接种于 LB/Amp⁺ 液体培养基中, 振荡培养 4 h, 加入 0.4 mmol/L 的 IPTG 37 °C 诱导 8 h; 离心收集菌体, 加入缓冲液重悬菌体, 并进行超声破碎、离心, 取破碎后上清液和破碎后沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测; 用

Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组蛋白, 并选择 20、50、100、150、250 mmol/L 的咪唑洗脱液对目的蛋白进行洗脱, 最后用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化结果。

1.7 多克隆抗体的制备

按照文献[13]的方法进行多克隆抗体的制备, 将 EtSAG12 重组蛋白与佐剂混合, 对新西兰大白兔进行免疫, 共计免疫 4 次, 并在末次免疫 7 d 后采血, 离心取血清。再利用间接 ELISA 法检测抗体效价, 酶标仪检测 OD₄₅₀ 值, 检测孔与阴性孔的比值大于或等于 2.1 时的最大稀释倍数为该血清最高的抗体效价。达到所需效价后采血制备, 纯化多克隆抗体, 进行 Western Blot 检测。

1.8 免疫保护效果的评价

1.8.1 试验设计及免疫程序

试验共分为 5 个组, 即感染对照组(PC)、空白对照组(NC)、EtSAG12 重组蛋白 50 μg 组、EtSAG12 重组蛋白 100 μg 组、EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组, 每组 20 只 1 日龄海兰灰雏公鸡。各组的免疫程序见表 1。其中雏鸡饲养环境要求与 1.3 相同。

表 1 动物试验的免疫程序

组别	免疫日龄/d	免疫途径	攻虫日龄/d	攻虫剂量/个
重组蛋白 50 μg 组	7、14	皮下注射	21	5×10 ⁴
重组蛋白 100 μg 组	7、14	皮下注射	21	5×10 ⁴
重组蛋白 150 μg 组	7、14	皮下注射	21	5×10 ⁴
空白对照组	/	/	/	/
感染对照组	/	/	21	5×10 ⁴

1.8.2 亚单位疫苗的制备

用无菌的 PBS 稀释 EtSAG12 重组蛋白至各个免疫组所需的浓度, 再将重组蛋白与佐剂以 1 : 1 的比例进行混合(首次免疫选用弗式完全佐剂, 第二次免疫选用弗式不完全佐剂), 混合液经超声乳化后, 用于免疫接种。

1.8.3 免疫保护效果评价指标

参照文献[14]的方法, 以存活率、平均增质量、相对增质量率、卵囊减少率、卵囊值、盲肠病变计分和抗球虫指数(Anti-coccidial index, ACI)作为免疫保护效果的评价指标。

1.8.4 血清中特异性 IgG 抗体检测

分别在 7 d、14 d、21 d, 各个试验组随机选取 4 只鸡心脏采血 1ml 并分离血清。参考文献[15], 运用 ELISA 法检测血清中特异性 IgG 抗体变化水平。

1.8.5 统计学分析

用 SPSS 27.0 将得到的数据进行一维方差描述性统计分析, 并用 Duncan 氏新复极差法对组间平均值进行多重比较, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $p > 0.05$ 表示差异无统计学意义。

2 结果和分析

2.1 EtSAT12/pET-32a 原核表达载体的构建

EtSAG12 基因通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示目的条带大小约为 780 bp, 与预期大小相符(图 1a)。将测序成功的 EtSAG12 基因亚克隆至 pET-32a, 经菌液 PCR 检测, 可见 1% 琼脂糖凝胶电泳结果具有清晰明亮的条带, 且大小与预期相符(图 1c)。通过双酶切鉴定, 表明 EtSAG12 已成功连接至 pET-32a(图 1d)。

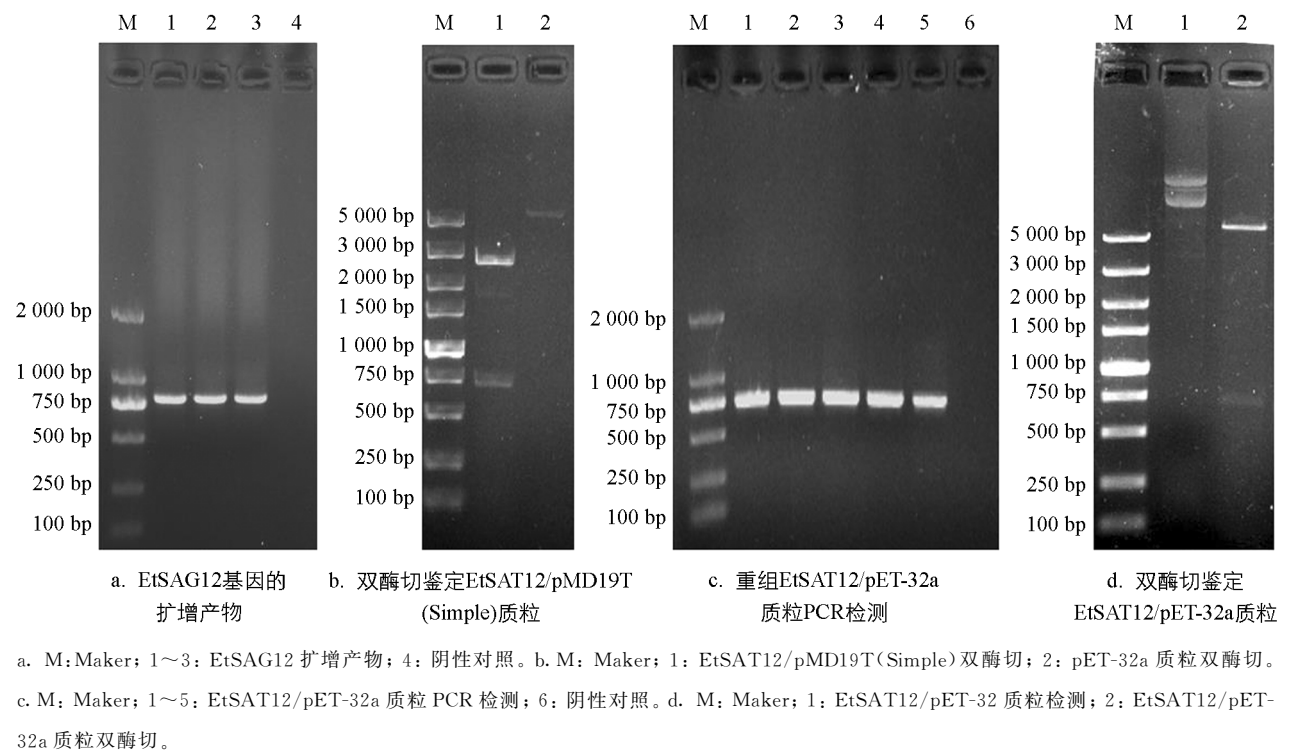


图 1 EtSAT12/pET-32a 表达质粒构建

2.2 EtSAG12 重组蛋白的诱导表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示 EtSAG12 重组蛋白大小约为 43 Ku, 表达产物大多数都是以可溶性蛋白的形式存在于上清液中, 只有少量存在于沉淀中(图 2a)。纯化后的蛋白无明显杂带, 且在筛选纯化条件时, 选择 50 mmol/L 咪唑洗脱液进行洗脱的蛋白浓度更高, 效果更好(图 2b)。

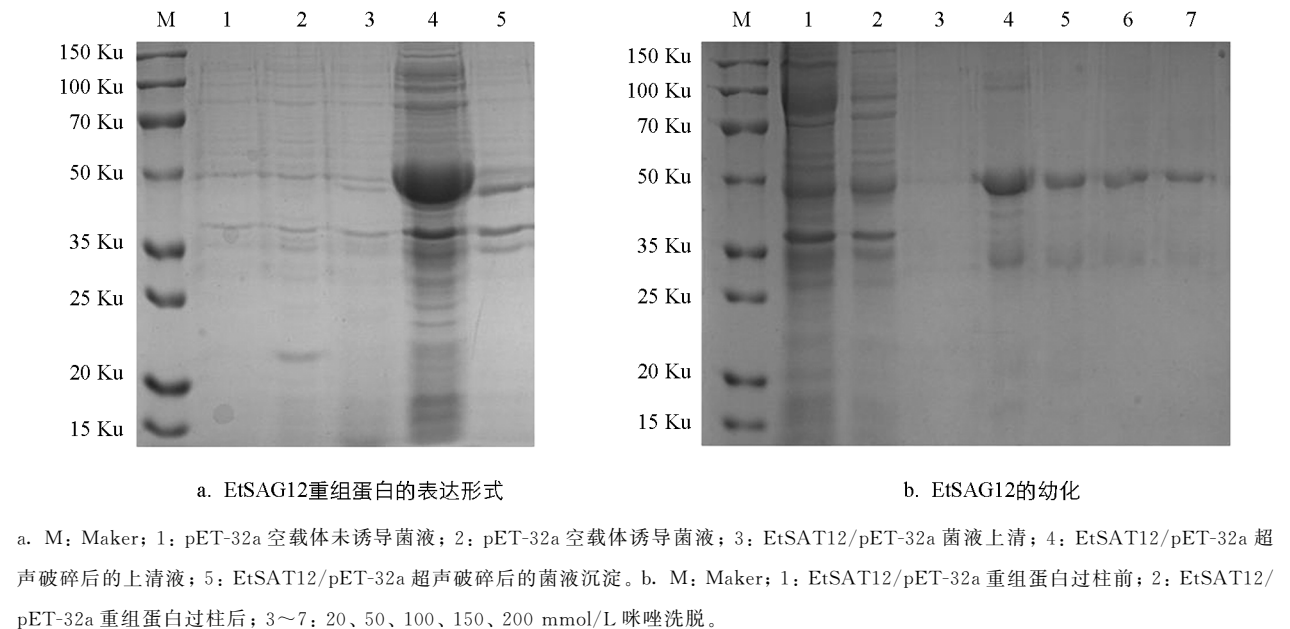


图 2 EtSAG12 重组蛋白的表达形式鉴定及纯化

2.3 多克隆抗体的鉴定

利用间接 ELISA 法测定兔抗 EtSAG12 多克隆抗体的效价, 结果显示抗体滴度大于 1 : 640 000。Western Blot 检测结果显示兔抗 EtSAG12 多克隆抗体能和 EtSAG12 重组蛋白特异性结合(图 3b), 表明其

具有较好的特异性。

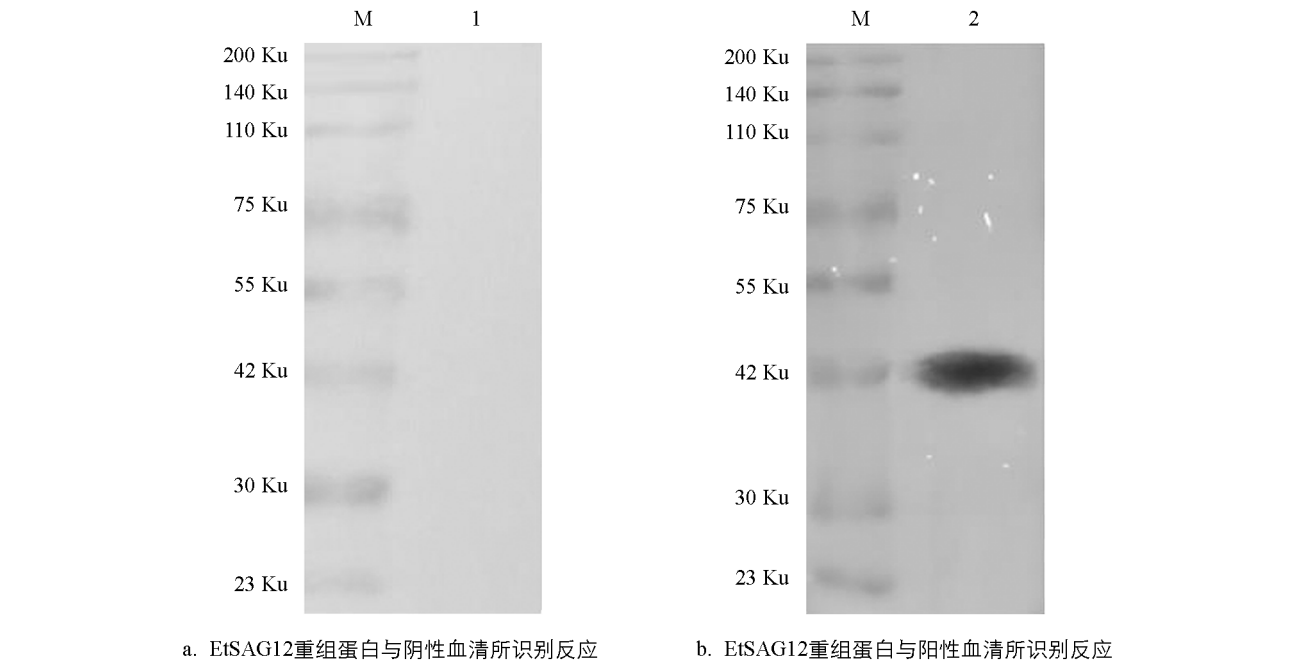


图 3 EtSAG12 多克隆抗体特异性分析

2.4 EtSAG12 的免疫保护效果观察

2.4.1 临床观察

在攻虫后第 4 天，除了 NC 组其它试验组鸡均开始出现精神沉郁、食欲减退、饮水减少、羽毛凌乱等症状。在第 5 天各个试验组鸡开始出现血便，第 6 天血便症状最严重。在第 6 天 PC 组死亡 1 只鸡，其他组均无鸡死亡。

2.4.2 各试验组鸡增质量情况、盲肠病变计分、卵囊产量和卵囊减少率

由表 2 可知，各免疫组的平均增质量均显著高于 PC 组($p<0.05$)，其中 150 μg 组的增质量效果最好，相对增质量率为 97.34%；各个免疫组均能有效降低卵囊产量，卵囊减少率在 21.66%~52.51%，并且各免疫组的病变计分均显著小于未免疫攻虫组($p<0.05$)。

表 2 各试验组鸡的各项指标

组别	平均增质量/ g	相对增质量率/ %	总卵囊产量 ($\times 10^6$)/个	卵囊减少率/ %	病变计分
EtSAG12 重组蛋白 50 μg 组	22.70 $\pm$ 7.31a	87.64	2.12	28.14	3.10 $\pm$ 0.55b
EtSAG12 重组蛋白 100 μg 组	23.53 $\pm$ 3.88a	90.85	2.31	21.69	2.95 $\pm$ 0.55b
EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组	25.21 $\pm$ 3.74a	97.34	1.40	52.54	2.20 $\pm$ 0.61a
空白对照组	25.90 $\pm$ 0.91a	100.00	0.00	100.00	0.00 $\pm$ 0.00c
感染对照组	14.49 $\pm$ 0.10b	55.95	2.95	0.00	3.60 $\pm$ 0.50d

注：同列数据肩标不同字母代表差异有统计学意义($p<0.05$)，字母相同或无字母表示差异无统计学意义($p>0.05$)。下同。

2.4.3 ACI 检测

根据存活率、平均增质量率、病变计分和卵囊值这些参数综合进行 ACI 分析。由表 3 可知，EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组的 ACI 值为 165.34，具有中效抗球虫水平；50 μg 和 100 μg EtSAG 重组蛋白组的 ACI 值介于 120 到 160 之间，属于低效抗球虫水平。

表 3 各试验组的抗球虫指数

组别	存活率/%	相对增质量率/%	病变值	卵囊值	抗球虫指数
EtSAG12 重组蛋白 50 μg 组	100.00	87.64	31.00	20.00	136.64
EtSAG12 重组蛋白 100 μg 组	100.00	90.85	29.50	20.00	141.35
EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组	100.00	97.34	22.00	10.00	165.34
空白对照组	100.00	100.00	0.00	0.00	200.00
感染对照组	95.00	55.95	36.00	40.00	74.95

2.4.4 血清中特异性 IgG 抗体水平变化

利用间接 ELISA 法检测血清中 IgG 抗体的变化水平,结果显示免疫前各试验组血清中特异性 IgG 抗体水平差异无统计学意义($p>0.05$)。首免和二免后 3 个免疫组血清中特异性 IgG 抗体均显著提高($p<0.05$),其中二免后血清中特异性 IgG 抗体迅速产生,且 EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组产生 IgG 抗体效果最好(表 4)。

表 4 各试验组鸡血清中特异性 IgG 抗体水平

组别	7 d	14 d	21 d
EtSAG12 重组蛋白 50 μg 组	0.21±0.05a	0.55±0.03a	1.35±0.08b
EtSAG12 重组蛋白 100 μg 组	0.21±0.03a	0.60±0.05a	1.41±0.07b
EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组	0.21±0.03a	0.57±0.03a	1.63±0.18a
空白对照组	0.21±0.03a	0.38±0.03b	0.41±0.03c
感染对照组	0.20±0.03a	0.39±0.03b	0.39±0.03c

3 讨论与结论

3.1 讨论

SAG 具有维持细胞活力、增强虫体感染力、促进虫体入侵和免疫逃避等多种生物学功能。*Toxoplasma gondii* SAG1 蛋白与蛋白激酶 C1 受体(Receptor of activated protein kinase C1, RACK1)相互作用,调控 RACK1 发生自噬,进而维持宿主细胞的活力^[16]。堆型艾美尔球虫(*E. acervulina*)SAG 能减少宿主体内黏蛋白 2(mucoprotein2, MUC2)基因的表达式,间接增强虫体的感染力^[17]。*E. tenella* SAG1 蛋白外表面的正电荷区域与宿主细胞表面带负电荷的硫酸化多糖区域相互结合,能促进虫体入侵宿主细胞^[18]。此外,*E. tenella* SAG10 能够促进纳虫空泡的形成,使虫体不能被淋巴细胞识别,从而逃避宿主免疫反应^[19]。

SAG 对球虫具有一定的免疫保护效果,有利于减少宿主因感染球虫而造成的体重损失、卵囊产量降低和肠道病变等作用。大型艾美耳球虫(*E. magna*)SAG11 能减少球虫感染造成的体重损失,并且提高饲料利用率^[20];斯氏艾美耳球虫(*E. stiedae*)SAG13 可以减缓球虫入侵机体,并有效抑制其在肠道内的发育,从而显著降低卵囊产量^[21]; *E. tenella* SAG16 和 SAG22 能显著降低肠道病变计分,缓解因球虫感染造成的盲肠出血、盲肠肿大、盲肠壁增厚等症状^[22]。本试验利用 EtSAG12 重组蛋白制备亚单位疫苗免疫雏鸡,结果显示 3 个免疫组均能有效减少因球虫感染而导致的增质量损失,卵囊排出量减少和盲肠病变。其中 EtSAG12 重组蛋白 150 μg 组抗球虫效果最好,相对增质量率为 97.34%,卵囊减少率为 52.54%,病变计分最低,ACI 值达到 165.34,具有中效抗球虫效果。证明 EtSAG12 重组蛋白对球虫感染具有一定的保护性。

血清中的 IgG 抗体可与球虫表皮膜抗原结合,激活补体溶解球虫的裂殖子,从而抑制球虫的生长发

育^[23], 因此血清中特异性 IgG 抗体水平和抗球虫效果呈现一定相关性。文献[24]发现母源抗体越高的雏鸡其抗球虫能力越强; 文献[25]用 *E. acervulina* MIC3、MAR3 和 MAR6 制备亚单位疫苗免疫雏鸡, 结果显示 EaMIC3 免疫组产生特异性 IgG 抗体最高, 并且其 ACI 值也最高。本试验通过间接 ELISA 法检测血清中 IgG 抗体水平, 结果显示免疫后的 3 个免疫组 IgG 抗体水平较 PC 组和 NC 组显著上升 ($p < 0.05$), 在二免后 7 天抗体水平达到最高, 并且 IgG 抗体水平随免疫剂量的增加而升高。说明 EtSAG12 重组蛋白诱导机体产生了体液免疫反应。通过比较各个免疫组 IgG 抗体水平和 ACI 值发现, 150 μg 组血清中的 IgG 特异性抗体水平最高, 其 ACI 值也最高。然而血清中的 IgG 抗体水平与抗球虫效果并非均呈正相关关系。文献[26]用毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*) ApiAP2 重组蛋白制备 3 个浓度梯度(低、中、高浓度)的亚单位疫苗免疫雏鸡, 结果显示高剂量组产生的 IgG 抗体水平最高, 而低剂量组的抗球虫效果最好, 即此处 IgG 抗体水平与抗球虫效果有负相关性。但在本试验中并未出现类似现象, 因此其具体的作用机制还有待进一步研究。

3.2 结论

本试验成功表达并纯化了 EtSAG12 重组蛋白, 动物试验结果显示该重组蛋白能有效减少卵囊排出和减轻肠道病变程度, 并激发机体自身的体液免疫, 对 *E. tenella* 感染有一定的免疫保护效果。

参考文献:

- [1] DEBBOU-IOUKNANE N, BENBAREK H, AYAD A. Prevalence and Aetiology of Coccidiosis in Broiler Chickens in Bejaia Province, Algeria [J]. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2018, 85(1): e1-e6.
- [2] 由焕霞. 鸡球虫病防治措施研究 [J]. 吉林畜牧兽医, 2023, 44(7): 89-90.
- [3] THABET A, HONSCHA W, DAUGSCHIES A, et al. Quantitative Proteomic Studies in Resistance Mechanisms of *Eimeria tenella* Against Polyether Ionophores [J]. Parasitology Research, 2017, 116(5): 1553-1559.
- [4] BLAKE D P, TOMLEY F M. Securing Poultry Production from the Ever-Present *Eimeria* Challenge [J]. Trends in Parasitology, 2014, 30(1): 12-19.
- [5] SHIRLEY M W. Development of a Live Attenuated Vaccine Against Coccidiosis of Poultry [J]. Parasite Immunology, 1989, 11(2): 117-124.
- [6] GUPTA S K, SHUKLA P. Advanced Technologies for Improved Expression of Recombinant Proteins in Bacteria: Perspectives and Applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(6): 1089-1098.
- [7] TABARÉS E, FERGUSON D, CLARK J, et al. *Eimeria tenella* Sporozoites and Merozoites Differentially Express Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Variant Surface Proteins [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2004, 135(1): 123-132.
- [8] 高俊莹, 张东超, 李璇, 等. 弓形虫表面抗原 SAG1 黏附宿主细胞表面硫化肝素的特性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(9): 1874-1881.
- [9] GILSON P R, NEBL T, VUKCEVIC D, et al. Identification and Stoichiometry of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum * S [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2006, 5(7): 1286-1299.
- [10] 刘梦丽, 许正茂, 吉尔格勒, 等. 新孢子虫 NcSRS2 和 NcSAG1 重组蛋白免疫小鼠诱导的免疫应答 [J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(5): 47-52.
- [11] CHOW Y P, WAN K L, BLAKE D P, et al. Immunogenic *Eimeria tenella* Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Surface Antigens (SAGs) Induce Inflammatory Responses in Avian Macrophages [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25233.
- [12] 刘立恒, 李俊, 徐立新, 等. 柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子的分离纯化 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(12): 38-40.
- [13] 吴天乐, 王磊, 王冰楠, 等. 犬弓首蛔虫超氧化物歧化酶的分子特性及原核表达 [J]. 西南大学学报(自然科学版),

2024, 46(2): 62-70.

[14] 王礼跃, 蔡为民, 张阿敏, 等. 柔嫩艾美耳球虫 3 种重组配子体蛋白免疫雏鸡的抗球虫免疫保护效果 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52(6): 744-752.

[15] 毕天奇, 肇英池, 马丹, 等. 堆型艾美耳球虫重组亚单位疫苗的制备及其免疫效果评价 [J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(7): 790-794, 801.

[16] 张梓轩. 弓形虫表面抗原 1 与宿主细胞互作蛋白的筛选及鉴定 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2021.

[17] ZHAO Y L, WANG C M, LU Y M, et al. Prokaryotic Expression and Identification of 3-1E Gene of Merozoite Surface Antigen of *Eimeria* *Acervulina* [J]. Parasitology Research, 2011, 109(5): 1361-1365.

[18] JAHN D, MATROS A, BAKULINA A Y, et al. Model Structure of the Immunodominant Surface Antigen of *Eimeria* *tenella* Identified as a Target for Sporozoite-Neutralizing Monoclonal Antibody [J]. Parasitology Research, 2009, 105(3): 655-668.

[19] LIU G L, ZHU S H, ZHAO Q P, et al. Molecular Characterization of Surface Antigen 10 of *Eimeria* *tenella* [J]. Parasitology Research, 2019, 118(10): 2989-2999.

[20] PU J Y, XIAO J, BAI X, et al. Prokaryotic Expression of *Eimeria* *magna* SAG10 and SAG11 Genes and the Preliminary Evaluation of the Effect of the Recombinant Protein on Immune Protection in Rabbits [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10942.

[21] 罗跃军, 任永军, 白鑫, 等. 斯氏艾美耳球虫重组表面抗原 SAG13 和 SAG14 对兔的免疫保护效果初步观察 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3): 883-893.

[22] ZHAO P F, WANG C F, DING J, et al. Evaluation of Immunoprotective Effects of Recombinant Protein and DNA Vaccine Based on *Eimeria* *tenella* Surface Antigen 16 and 22 in Vivo [J]. Parasitology Research, 2021, 120(5): 1861-1871.

[23] 高建广, 杨文平, 郑明学. 柔嫩艾美耳球虫实验感染雏鸡体液免疫机制研究 [J]. 家禽科学, 2005(7): 9-13.

[24] 郑明学, 高建广, 史喜菊. 柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria* *tenella*)感染鸡 IgG 生成细胞及血清 IgG 变化 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(5): 447-450.

[25] 刘佳斌, 张杨, 王茗悦, 等. 巨型艾美耳球虫微线蛋白 3 结构域蛋白的免疫保护作用 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(8): 1539-1545.

[26] 王乐乐, 王礼跃, 蔡为民, 等. 鸡球虫重组蛋白 rEnApiAP2 对鸡免疫保护效果的观察 [J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(4): 1716-1727.

责任编辑 崔玉洁

廖坤