

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.11.009

袁凌琳, 徐晓蓉, 赵自亮, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌 OppA 蛋白的免疫原性及免疫保护性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(11): 111-120.

猪源多杀性巴氏杆菌 OppA 蛋白的 免疫原性及免疫保护性分析

袁凌琳¹, 徐晓蓉¹, 赵自亮², 刘霞³, 倪兴维³,
徐婷婷³, 程钟坤¹, 朱桓奕¹, 杨晓伟¹, 赵光伟¹

1. 西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 国家生猪技术创新中心, 重庆 荣昌 402460;
3. 贵州省动物疫病预防控制中心, 贵阳 550008

摘要: 为探究猪源多杀性巴氏杆菌寡肽渗透酶 A (oligopeptide permease A, OppA) 的免疫原性和免疫保护性, 通过对 *OppA* 基因克隆与原核表达, 鉴定重组蛋白的免疫活性, 而后将其免疫 SPF 小鼠通过 ELISA 方法检测血清中特异性 IgG 抗体水平和细胞因子 IL-2、TNF- α 的动态变化, 评估其免疫原性, 进而对小鼠进行攻毒保护性试验, 通过存活时间和主要脏器组织病理变化分析其免疫保护性。结果表明: OppA 蛋白为含有 21 个 B 细胞抗原表位的稳定蛋白, 原核表达并变、复性处理后能与小鼠抗多杀性巴氏杆菌阳性血清发生结合反应; 通过重组蛋白免疫小鼠后 7 d、21 d 和 35 d, 血清中 OppA 特异性 IgG 抗体均显著高于未免疫组; 细胞因子 IL-2 的变化与抗体相似, 均显著升高; TNF- α 首免后显著下降, 在二免、三免后与未免疫组无显著差异。保护性试验结果显示未免疫组小鼠在攻毒后 24 h 内全部死亡, 免疫组小鼠 24 h 内死亡 7 只, 剩余 3 只观察期内存活, 存活率 30%; 病理组织学观察发现两组死亡小鼠的肝脏、脾脏和肺脏均出现典型的病理变化(出血、炎性细胞浸润等), 但免疫组小鼠病变程度较轻。表明猪源多杀性巴氏杆菌 OppA 蛋白具有良好的免疫原性, 能够刺激小鼠产生免疫应答, 具有一定的免疫保护效果。

关键词: 多杀性巴氏杆菌; OppA 蛋白; 免疫原性; 免疫保护性

中图分类号: S969.3

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)11-0111-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Immunogenicity and Immunoprotection Analysis of Oligopeptide Permease A (OppA) of *Pasteurella multocida* Originated from Swine

收稿日期: 2025-01-22

基金项目: 贵州省科技支撑项目(黔科合支撑[2023]一般 022)。

作者简介: 袁凌琳, 硕士研究生, 从事动物疾病诊断及预防的研究。

通信作者: 赵光伟, 博士, 副教授。

YUAN Linglin¹, XU Xiaorong¹, ZHAO Ziliang²,
LIU Xia³, NI Xingwei³, XU Tingting³, CHENG Zhongkun¹,
ZHU Huanyi¹, YANG Xiaowei¹, ZHAO Guangwei¹

1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. National Center of Technology Innovation for Pigs, Rongchang Chongqing 402460, China;

3. Guizhou Provincial Center for Animal Disease Control and Prevention, Guiyang 550008, China

Abstract: To investigate the immunogenicity and immunoprotection of oligopeptide permease A (OppA) derived from porcine *Pasteurella multocida*, *OppA* gene was cloned, and expressed in a prokaryotic system to identify the immunological activity of recombinant protein. SPF mice were immunized with OppA. To evaluate its immunogenicity, ELISA method was employed to detect the dynamic changes of the specific IgG antibody and cytokines (IL-2 and TNF- α) in the mouse serum. Furthermore, challenge protection experiment was conducted. Survival rate and pathological changes in the tissues of major organs were analyzed to assess the immune protection. The results showed that OppA was a stable protein containing 21 B cellular antigenic epitopes. After denaturation and renaturation, the prokaryotic expressed protein could bind with *P. multocida* specific antibodies. On the days 7, 21 and 35 post-immunization (DPI), the OppA-specific IgG antibodies were significantly higher than those in the non-immunized group. Similarly, the dynamics of IL-2 levels in the immune group were significantly increased. However, levels of TNF- α exhibited a notable decline after initial immunization, but showed no significant difference compared to the non-immunized group after the second and third immunizations. The protective test results showed that all mice in the non-immunized group died within 24 hours after challenge, while 7 mice in the immunized group died within 24 hours. The remaining 3 mice survived during the observation period, with a survival rate of 30%. Histopathological examination revealed typical pathological changes (hemorrhage and inflammatory cell infiltration) in liver, spleen, and lung tissues of all died mice. However, lesions observed in the immunized and died mice were comparatively milder than that in the challenge-only mice. All these findings suggested that OppA protein of *P. multocida* had good immunogenicity and could stimulate immune responses in mice, showing a certain degree of immune protection effect.

Key words: *Pasteurella multocida*; OppA protein; immunogenicity; immunoprotection

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)隶属巴氏杆菌科巴氏杆菌属,是一种两端钝圆,中间微凸,无芽孢,无鞭毛,有荚膜的败血性革兰阴性菌。Pm属条件性致病菌,正常情况下存在于动物口腔、消化道和呼吸道,一般不致病^[1]。当天气骤变、饲养环境差(如通风不良、潮湿、拥挤、饲料霉变等)、营养缺乏、疲劳等应激因素出现导致动物免疫力降低时,该菌易突破机体的防御屏障,经淋巴液侵入黏膜并大量增殖,逃避宿主的固有免疫系统造成内源性感染^[2]。该菌可导致动物呼吸系统疾病、局灶性感染及出血性败血症,如牛肺炎、禽霍乱、兔鼻瘘、有蹄动物的出血性败血症、牛羊猪等的船运热等^[3]。该菌可引发猪肺疫,也可引起慢性感染造成严重的呼吸系统疾病(如猪萎缩性鼻炎),并诱发其他病原混合或继发感染,严重制约中国养猪业的健康发展^[4-5]。

Pm致病力的强弱与其毒力因子有关。毒力因子是Pm在宿主体内存活、繁殖、致病的关键,有利于细菌入侵和定植,避免宿主启动防御机制,损伤细胞组织,刺激宿主产生炎症反应^[1]。目前发现的毒力因子主要包括LPS、荚膜、OMPs、三聚体自转运蛋白、铁调节外膜蛋白(IROMPs)、脂蛋白E(PlpE)、皮肤坏

死毒素(PMT)、脂蛋白 B(PlpB)、Ⅳ型菌毛(PtfA)、丝状血球凝集素蛋白(FhaB)、黏附相关因子、蛋白酶等, 根据其荚膜抗原和脂多糖, 可分为 A、B、D、E、F 5 种血清群或 1~16 个血清型^[6-7]。寡肽渗透酶 A (*OppA*)是三聚体自转运蛋白家族的成员, 在革兰阳性菌和阴性菌中均有发现, 作为细胞质中的一种底物结合蛋白, 其主要功能是捕获寡肽, 或作为细胞膜的表面受体。常规培养条件(营养丰富的培养基)下, *OppA* 属于低丰度蛋白, 通常在菌体总蛋白中的占比小于 1%, 但当环境中寡肽匮乏时, *Opp* 系统被激活, 此时 *OppA* 的表达量显著上升, 可达总蛋白的 2%~5%。此外, 该蛋白非常保守, 与 GenBank 中收录的牛源、鹅源、鸡源等多株 Pm 进行比较, 其相似性高于 99%。文献[1]从福建部分猪场发病猪中分离出 10 株猪巴氏杆菌, 其中 6 株为荚膜 A 型, 4 株为荚膜 D 型, 并从分离株中成功克隆了 *OppA* 基因, 相似性分析结果在 97.27%~99.81%之间, 进一步表明 *OppA* 基因具有很高的保守性, 存在于国内报道流行的荚膜型中。*OppA* 几乎存在于所有血清型 Pm 菌株中^[8], 但与其他种属细菌存在较大差异。因此, *OppA* 可能是一个抵抗巴氏杆菌病的良好的交叉保护性抗原。目前 *OppA* 已在多种细菌研究中出现过报道, 如: 文献[9]对副猪嗜血杆菌的 *OppA* 基因进行了克隆、表达, 并构建了间接 ELISA 检测方法; 文献[10]对鼠伤寒沙门 *OppA* 的调控机理进行了分析; 文献[11]对迟缓爱德华氏菌 *OppA* 蛋白进行了免疫原性研究; 文献[12]证实了 *OppA* 是猪链球菌毒力因子之一。分析发现不同种属细菌 *OppA* 基因大小、蛋白结构均存在差异, 且目前针对 Pm *OppA* 的研究鲜有报道, 本试验通过对猪源 Pm 分离株的 *OppA* 基因进行克隆表达, 对其免疫原性和免疫保护性进行初步探索, 以期为开发相关防控制剂奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、实验动物来源

猪源多杀性巴氏杆菌血清 A 型菌株(PM-1), 分离自 2022 年 9 月重庆云阳某养殖场发病猪肺脏, 由西南大学动物医学院动物疾病快速诊断中心鉴定并保存; SPF 昆明鼠 20 只(20~25 g, 雌性), 购自重庆国家生物产业基地实验动物中心。

1.2 主要试剂

Easy Pure Viral DNA/RNA Ki(ER201-01)、FlyCut *EcoR* I(JE201-01)、FlyCut *Xho* I(JX201-01)和 T4 DNA Ligase(FL101-01)均购自北京全式金生物技术股份有限公司; 2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)(P520-01)和 DL2000 DNA marker(MD101-01)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Prestained Protein Ladder(10-180 kDa)(AB116027)购自上海圣尔生物科技有限公司; Ni-NTA His Bind Resin(PANF001-005C)购自上海七海复泰生物科技有限公司; SanPrep 核酸纯化套件(胶回收)(B51503)和 San-Prep 柱式质粒 DNA 抽提试剂盒(B518191)、BCA 蛋白定量试剂盒(C503021)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Top10 感受态细胞、Rosetta 感受态细胞和 pET32a 质粒保存于本实验室, 山羊抗鼠 IgG-HRP(SA00001-1)、小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒(KE10100)和小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(KE10001)均购自 Proteintech 公司; 弗氏佐剂(P2036/P2031)购自碧云天生物科技有限公司; 小鼠抗巴氏杆菌阳性血清由西南大学动物医学院动物疾病快速诊断中心实验室制备。

1.3 主要仪器

凝胶成像仪(Viber Lourmat quantum-ST5)、蛋白成像系统(VILBER BIO IMAGING-Fusion FX5)、垂直电泳系统(CAVOY MP-8000)、多功能酶标仪(TECAN Infinite 200 PRO)、超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-IIID)、金属浴恒温加热器(Thermo Fisher)、高速冷冻离心机(6-10)、高速均质乳化仪(RCD-1A)、光学显微镜(CX31RTSF)。

1.4 *OppA* 蛋白的生物信息学分析

利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 在线工具中的 Protparam 分析 *OppA* 蛋白的基本理化性质; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 在线工具中的 SignalP 4.1 Server 对亲疏水

性进行预测;利用 <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>在线工具中的 IEDB AnalysisResource 预测 B 细胞表位。

1.5 猪源多杀性巴氏杆菌 *OppA* 基因克隆

参考 GenBank 中 Pm UNMSM 株 *OppA* 的基因序列(登录号为: KP660626.1),利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物。引物序列: *OppA*-F: 5'-CCGGAATTCGCAGCAGAAGTACCC-3'; *OppA*-R: 5'-CCGCTCGAGTGTCTTACCAGGATG3。扩增片段预期 1 533 bp,斜体部分为 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点,引物由华大基因重庆分公司合成。利用一管式临床样品 DNA 抽提试剂盒提取纯化菌 PM-1 基因组,作为后续 PCR 反应的模板。基因 *OppA* PCR 反应体系: DNA 模板 4 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 13 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/ μ L)各 4 μ L。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 37 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物以 1% 凝胶电泳并利用胶回收试剂盒纯化,阳性产物送至华大基因重庆分公司测序。

1.6 *OppA* 基因重组质粒的构建与鉴定

利用限制性核酸内切酶 FlyCut *EcoR* I 和 FlyCut *Xho* I 分别对 PCR 扩增产物和 pET-32a 载体进行酶切反应,胶回收黏端片段,利用 T4 DNA 连接酶将 *OppA* 片段与 pET-32a 载体进行连接,并转化至 TOP10 感受态细胞中,涂布 LB 固体培养基(含 1% Amp),37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取单菌落进行 PCR 鉴定,阳性菌利用质粒提取试剂盒提取重组质粒,测序鉴定正确后命名为 pET32a-*OppA*,保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

1.7 *OppA* 基因的诱导型表达及变复性

将质粒 pET32a-*OppA* 转化至 BL-21 感受态细胞,阳性重组子接种于 LB 液体培养基(含 1% Amp)中恒温振荡培养 4 h 左右,测定菌液 OD₆₀₀ nm 值,待至 0.6~0.8 后加入 1% 比例 IPTG (1 m mol/L),继续 180 转 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h 左右。取出置于 4 $^{\circ}$ C 终止诱导。将菌液置于 4 $^{\circ}$ C,以 8 000r/min 的速度离心 5 min,然后收集沉淀和上清液。使用 PBS 将菌体沉淀充分重悬后,使用细胞破碎仪破碎 3~5 次,破碎产物于 4 $^{\circ}$ C,8 000r/min 离心收集沉淀。沉淀中加入 20 mL 预冷的快速洗涤液充分吹打混匀,静置 10 min 后于 4 $^{\circ}$ C,8 000r/min 离心收集沉淀,再加入 20 mL 预冷的快速溶解液使蛋白变性,最后取 10 mL 表达产物进行透析复性。

1.8 *OppA* 重组蛋白鉴定及免疫活性的验证

将诱导型表达的重组蛋白通过 Ni-NTA 重力柱进行蛋白纯化,纯化后的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳,再经考马斯亮蓝染色后鉴定结果。纯化蛋白进一步通过 Western blot 验证其生物活性,经 SDS-PAGE 电泳后转印至 NC 膜,以小鼠抗巴氏杆菌阳性血清作为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western blot,利用 DAB 显色试剂盒显色并记录结果。

1.9 *OppA* 重组蛋白免疫小鼠血清中 IgG 抗体和细胞因子的检测

动物试验方案如图 1 所示,20 只雌性 SPF 小鼠随机分为 2 组,每组 10 只,分别为免疫组和未免疫组。其中免疫组注射弗氏佐剂乳化的 *OppA* 蛋白,分别于第 0 d、14 d、28 d 通过背部皮下注射进行 3 次免疫,免疫剂量均为 12 μ g/只;未免疫组均注射等量无菌生理盐水。两组小鼠在第 0 d(免疫前)、7 d、21 d 和 35 d 共 4 个时间点采集尾静脉血,分离血清,通过间接 ELISA 方法检测其 *OppA* 特异性抗体水平,并利用试剂盒对细胞因子 IL-2 和 TNF- α 的含量进行检测。*OppA* 抗体间接 ELISA 检测方法步骤如下:利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 *OppA* 蛋白浓度,按照 1 μ g/mL 浓度包被至 96 孔酶标板,4 $^{\circ}$ C 过夜;利用 PBST 洗涤 5 次,每次 1 min;拍干后每孔加入 100 μ L 5% 脱脂奶粉置 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,甩干孔内液体,利用 PBST 洗涤 5 次,每次 1 min;拍干后加入 20 倍稀释的待检小鼠血清 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,重复洗涤后加入 1:6 000 稀释的 HRP 羊抗鼠 IgG(酶标二抗),每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,重复洗涤;每孔加入 100 μ L TMB 显色液,避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,最后每孔加入 50 μ L 终止液,酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值。细胞因子 IL-2 和 TNF- α 的检测按照试剂盒说明书进行。

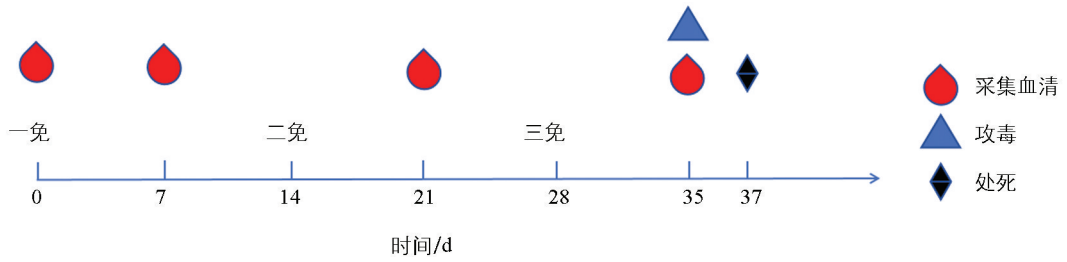


图 1 动物试验方案

1.10 *OppA* 重组蛋白对小鼠的免疫保护性试验

攻毒之前, 挑取 PM-1 菌落在液体培养基中培养, 测量菌液 OD₆₀₀ nm 值, 待其约 0.8 时取出。梯度稀释 PM-1 菌液并涂布平板过夜培养, 观察平板并选择合适稀释倍数的分离菌悬液进行攻毒。预试验结果显示小鼠感染剂量为 1×10^6 CFU/只时小鼠不会迅速死亡并表现明显临床症状, 便于观察攻毒后小鼠临床表现并记录存活时间。第 35 d 采血后, 两组小鼠腹腔感染 PM-1 菌, 感染剂量为 0.2 mL (1×10^6 CFU/只)。分离菌悬液, 分别记为免疫攻毒组与未免疫攻毒组。感染后每 4 h 观察一次小鼠的临床表现, 共连续观察 48 h, 统计各组小鼠的存活时间, 绘制存活曲线图。小鼠死亡后立即进行解剖, 取肝、脾、肺 3 种脏器进行病理组织学观察, 具体步骤参考文献[13]进行, 组织切片经 HE 染色后置显微镜下观察病变。

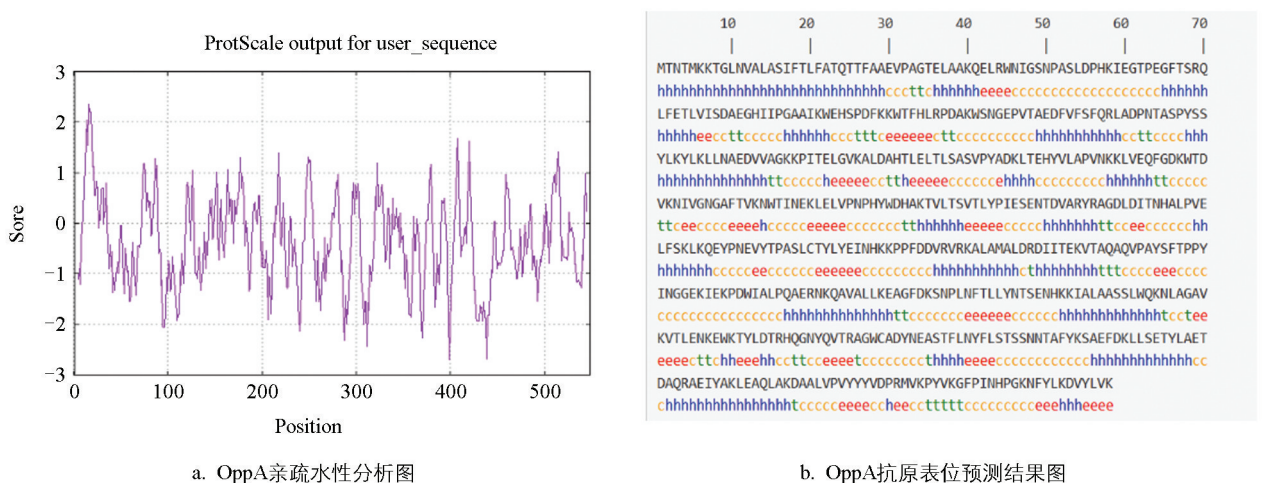
1.11 数据处理与统计学分析

试验数据均利用 GraphPad Prism9.0 软件进行统计学分析及作图。采用方差分析(ANOVA)比较免疫组与空白组间的差异, $p < 0.05$ 为差异显著。小鼠攻毒后存活曲线采用 Log rank 检验分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *OppA* 基因生物学软件分析

分析显示 *OppA* 蛋白由 548 个氨基酸组成, 其中占比最高的蛋白是丙氨酸(10.6%), 脂溶指数 83.72, 亲水性总平均值 -0.368, 不稳定性指数为 29.48, 判定该蛋白为稳定蛋白; 亲疏水性预测显示, *OppA* 蛋白高疏水性区域位于第 16 位氨基酸附近, 高亲水性区域位于第 399 位氨基酸附近(图 2a)。抗原表位预测显示, *OppA* 蛋白有 B 细胞抗原表位, 其中优势表位为第 11~21、72~78、119~127 位等 21 个抗原表位(图 2b)。



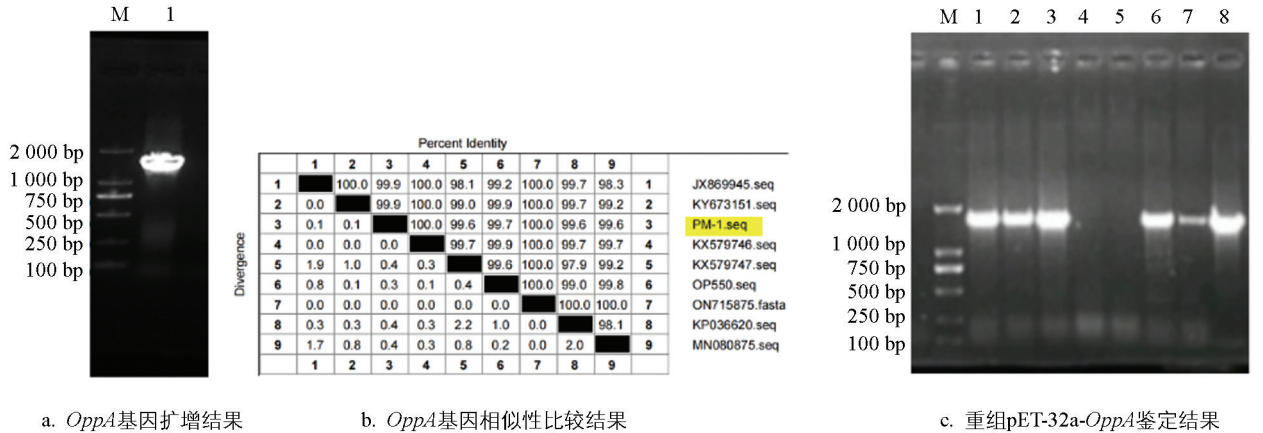
a. *OppA* 亲疏水性分析图

b. *OppA* 抗原表位预测结果图

图 2 *OppA* 基因生物学软件分析结果

2.2 猪源 *Pm OppA* 基因克隆及原核表达载体的构建

PCR 扩增得到大小 1 533 bp 的目的条带(图 3a), 与预期结果一致; 测序后利用 NCBI 数据库中 BLAST 功能进行相似性比对分析, 结果显示猪源 *Pm OppA* 基因与 Genbank 中收录的牛源(ON715874)、山羊源(ON715875)、鸭源(JX869945、KX579747)、鸡源(KY673151)、鹅源(KX579746、KP036620)和 人源(MN080875)的 *Pm* 相似性在 99.6% ~100%之间(图 3b), 说明 *OppA* 基因克隆成功。将 *OppA* 基因与 pET32a 载体连接, 转化后挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 结果如图 3c 所示, 显示 8 个克隆中有 6 个为阳性, 阳性重组子经测序后显示构建成功, 菌株于 -20 °C 保存备用。

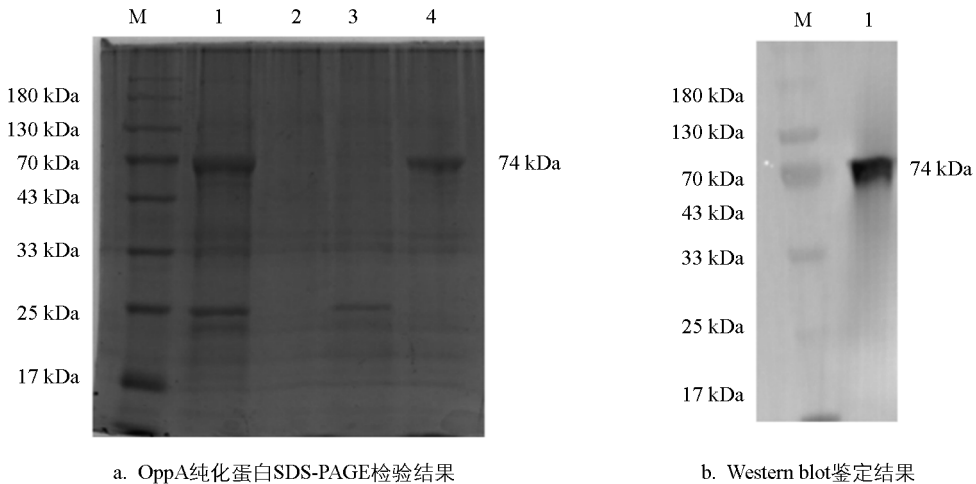


a 中 M 为 DL 2000 DNA marker, 1 为 *OppA* 基因扩增结果; b 中黄色高亮标注部分为本试验扩增结果; c 中 M 为 DL 2000 DNA marker, 1~8 分别为 8 个重组子 PCR 鉴定结果。

图 3 *OppA* 基因克隆及原核表达载体构建、鉴定结果

2.3 猪源 *Pm OppA* 重组蛋白表达与免疫活性鉴定

IPTG 诱导猪源 *OppA* 蛋白表达纯化后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果(图 4a)显示, *OppA* 重组蛋白大小约为 74 kDa, 与预期大小一致, 且经过纯化, 在其洗脱液中杂蛋白条带明显减少。Western blot 鉴定结果(图 4b)显示, *OppA* 重组蛋白能够与小鼠抗巴氏杆菌阳性血清发生反应, 说明该蛋白具有免疫活性。



a 中 M 为 10~180 kDa 蛋白分子量标准, 1~4 泳道分别为纯化蛋白的穿液液、洗杂液 1、洗杂液 2 和洗脱液的结果; b 中 M 为 10~180 kDa 蛋白 marker, 1 泳道为 *OppA* 蛋白与小鼠抗巴氏杆菌阳性血清反应结果。

图 4 *OppA* 重组蛋白的纯化与 Western blot 鉴定结果

2.4 小鼠血清 *OppA* 特异性抗体水平检测结果

以复性后 *OppA* 作为包被抗原, 利用间接 ELISA 方法对 0 d、7 d、21 d 和 35 d 小鼠血清中 *OppA* 特异性抗体水平进行检测。测定结果(图 5)显示, 一免后第 7 d, 免疫组小鼠血清中抗体水平显著上升, 与空白

组小鼠差异显著($p < 0.05$); 二免、三免过后, 免疫组小鼠血清中抗体水平进一步升高, 均显著高于空白组($p < 0.05$)。未接种免疫组小鼠血清中相应抗体水平自始至终变化不明显。

2.5 小鼠血清中细胞因子检测结果

利用 ELISA 试剂盒对小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 TNF- α 的含量进行检测, 结果发现免疫组小鼠 IL-2 在一免后迅速上升(图 6a), 二免、三免后仍现缓慢上升趋势, 第 35 d 时仍保持较高水平, 在第 7 d、21 d 和 35 d 3 个时间点均显著高于未免疫组小鼠($p < 0.05$); 而未免疫组小鼠血清中 IL-2 含量均无显著变化。血清中 TNF- α 检测结果如图 6b 所示, 一免后第 7 d 其含量显著低于未免疫组($p < 0.05$), 但在第 21 d 和 35 d 时其含量又逐渐上升, 与未免疫组之间差异不显著($p > 0.05$)。

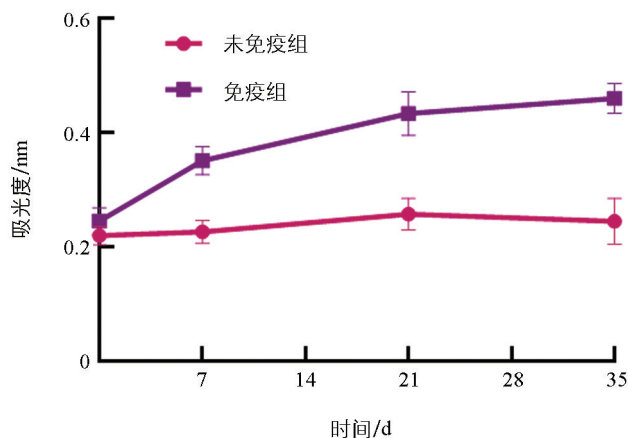
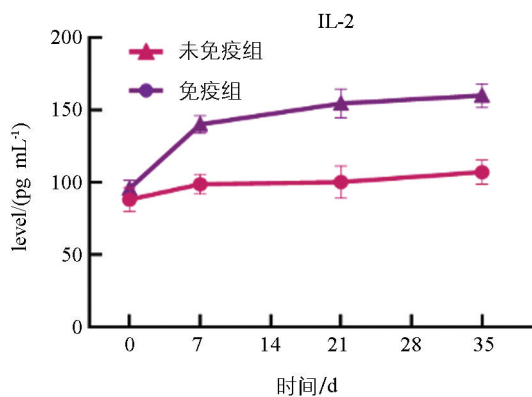
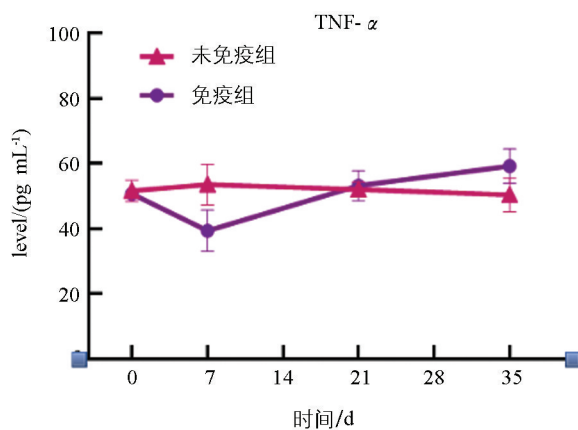


图 5 小鼠血清 OppA 特异性 IgG 抗体水平检测结果



a. 小鼠血清细胞因子 IL-2 检测结果



b. 小鼠血清细胞因子 TNF- α 检测结果

图 6 小鼠血清中细胞因子 IL-2 和 TNF- α 的动态变化结果

2.6 攻毒后小鼠存活时间

第 35 d, 两组小鼠攻毒后均出现精神萎靡, 双眼微闭, 被毛凌乱的现象。未免疫攻毒组小鼠最先(攻毒后 4 h)出现死亡, 并在 24 h 内 100% 死亡(图 7); 免疫攻毒组小鼠在攻毒后 8 h 出现死亡, 24 h 内共死亡 7 只, 其余 3 只小鼠在观察期内均存活, 该组死亡率为 70%, 尽管存活率高于未免疫接种组, 但统计学分析显示两组之间差异不显著($p > 0.05$)。

2.7 攻毒小鼠组织病理学观察

攻毒后死亡小鼠肺、脾、肝脏等组织病理变化如图 8 所示。未免疫攻毒组小鼠肺脏

组织中发现肺泡上皮增生, 肺泡壁变厚, 肺泡内有大量炎性细胞浸润, 并伴有明显的出血现象; 脾脏组织出血, 炎性细胞浸润; 肝脏组织明显出血, 血管扩张, 血细胞溢出, 肝细胞肿胀。免疫攻毒组小

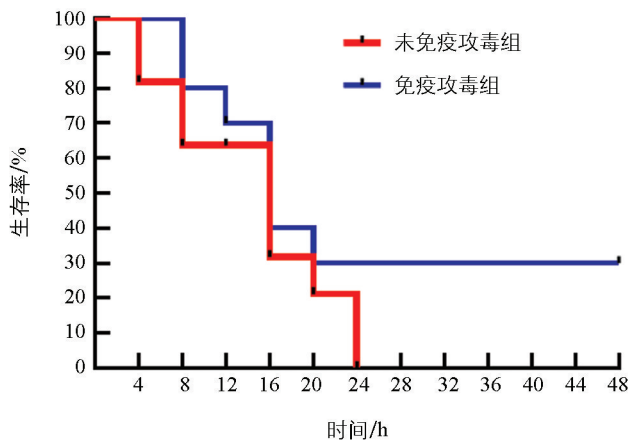


图 7 攻毒后小鼠存活曲线

鼠的病理特征与未免疫攻毒组相似,但病变程度相对较轻,如肺脏、脾脏有轻微出血和炎性细胞浸润,肝脏出血、水肿等。

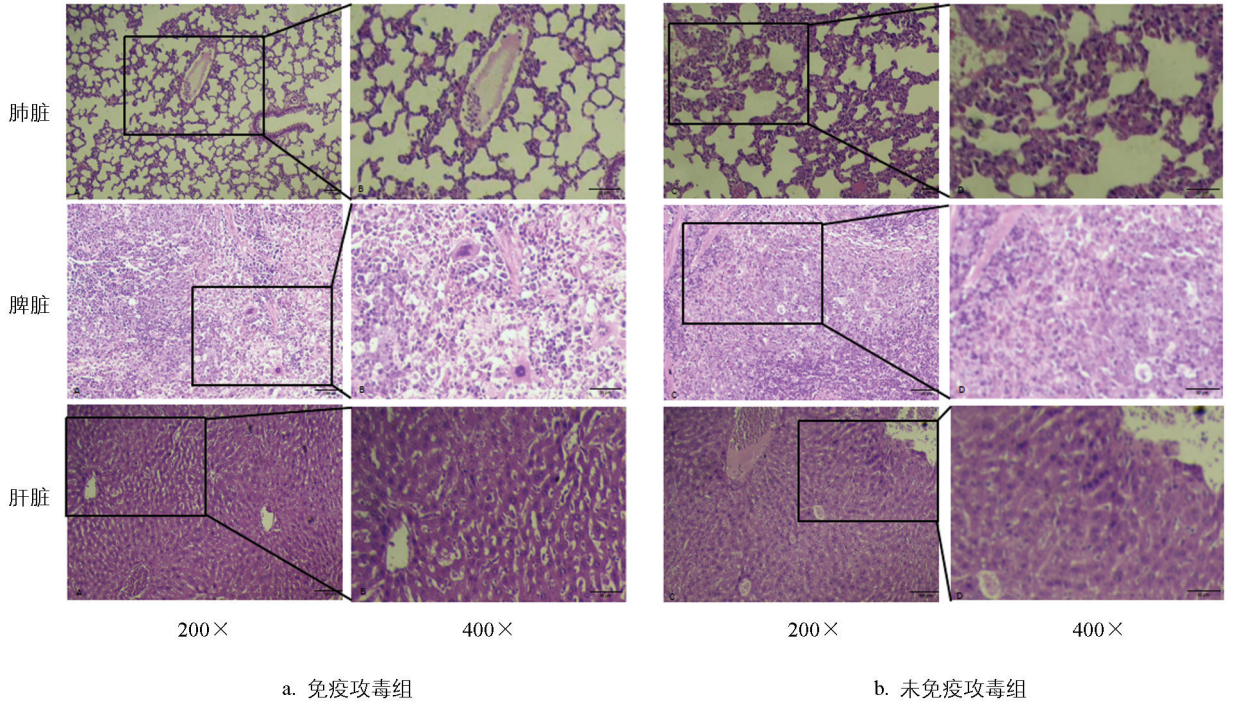


图 8 攻毒小鼠组织病理学观察

3 讨论与结论

多杀性巴氏杆菌的血清型较多,感染宿主谱非常广泛,目前我国感染猪的血清型主要是 A 和 D 型^[14],国内也有商品化的疫苗,主要以灭活苗和弱毒苗为主。然而灭活疫苗对不同血清型的多杀性巴氏杆菌的交叉免疫保护力较差,需要较大的免疫剂量才能达到可靠的保护率;弱毒苗存在毒力返祖返强的风险,在储存和长途运输中存在着一定的弊端,并且与我国现阶段流行的优势血清型不符,导致免疫效果并不理想^[15]。鉴于此,开发新型防控制剂尤为重要,而重组亚单位疫苗因不含病原体的“活”成分,相较于含有完整病原体的疫苗更安全和稳定,且可针对多种血清型,因此开展猪多杀性巴氏杆菌的亚单位疫苗的研制非常重要。

通常一些细菌组分(尤其是分泌蛋白和外膜蛋白)和致病菌的毒力因子被认为是亚单位疫苗的候选靶标^[16-17],而 OppA 是多杀性巴氏杆菌中重要的跨膜蛋白,在不同血清型菌株中均存在,且在同种细菌中高度保守,业已证实鼠伤寒沙门菌^[10]、迟缓爱德华菌^[11]、副猪嗜血杆菌^[18-19]中能引起特异性免疫应答,对宿主具有一定的保护作用。本试验首先通过生物信息学软件对多杀性巴氏杆菌的 OppA 蛋白的亲水性及细胞表位进行分析,推测其也应该具有较强的免疫原性,进而通过原核表达系统将该蛋白进行表达,复性后的蛋白经 Western blot 鉴定能够与小鼠抗巴氏杆菌阳性血清发生结合反应,说明该蛋白具有生物学活性。

抗体是机体抵抗多杀性巴氏杆菌感染和产生免疫保护的主力,抗体水平是验证其抗原蛋白免疫原性及其诱导机体产生体液免疫应答的主要指标^[20-21]。本试验采用间接 ELISA 方法对 3 次免疫后小鼠血清中 OppA 特异性抗体进行测定,发现在首免后 7 d 即可产生高滴度的抗体,两次加强免疫均能使其抗体维持在较高水平,说明 OppA 能够诱导小鼠产生强烈的体液免疫应答反应。IL-2 和 TNF- α 均属于 Th1 类细胞因子,研究表明 IL-2 是引起 T 细胞增殖的主要细胞因子,它具有促进 T、B 淋巴细胞的增殖和分化,增强单核细胞以及 NK 细胞的杀伤活性等免疫调节功能,主要介导细胞免疫应答,调节细胞毒性 T

细胞分化和参与迟发型超敏反应^[22]。TNF- α 是重要的炎性因子, 主要由单核巨噬细胞产生, 当其与受体结合后启动细胞内信号, 诱导激活炎性细胞聚集, 导致细胞坏死和凋亡而引起急性炎症反应^[23]。本试验对 3 次免疫 OppA 蛋白小鼠血清中的 IL-2 和 TNF- α 进行检测, 发现一免后 IL-2 的含量迅速上升, 二免、三免后仍呈现缓慢上升趋势, 35 d 时仍保持较高水平, 究其原因, 其一是 OppA 蛋白能够活化机体 T 细胞的增殖, 促进其分化, 能够诱导宿主的细胞免疫, 其二可能是制作抗原不纯, 残留 LPS 导致 IL-2 含量迅速上升。炎性因子 TNF- α 在一免后显著下降, 二免和三免后与对照组差异不显著, 说明多杀性巴氏杆菌 OppA 蛋白不会引起机体的炎性反应。这一结果与文献[19]利用副猪嗜血杆菌重组 OppA 蛋白进行小鼠免疫保护性试验结果一致。

保护性试验显示 OppA 蛋白免疫组小鼠的存活率为 30%, 未免疫组全部死亡, 说明 OppA 蛋白虽对小鼠有一定的保护性, 但保护率较低。进一步通过观察死亡小鼠主要脏器的病理组织学变化, 发现无论是否免疫 OppA 蛋白, 其病理变化均十分明显, 尽管免疫组的病变略显轻微, 但均已造成脏器的损伤, 这一结果与文献[24]利用副猪嗜血杆菌重组 OppA 蛋白对猪进行保护性试验的结果十分相似, 文献[11]利用 OppA 刺激大菱鲆产生免疫应答, 尽管延长了免疫组死亡时间, 但最终的免疫保护率为 25.9%。究其原因, 其一是因为细菌的毒力因子众多, 仅凭单个蛋白尽管能够激发机体的免疫系统, 但仍不能产生足够的保护力; 其二, 实验动物小鼠对多杀性巴氏杆菌极为敏感, 当免疫系统产生的细胞免疫和体液免疫不足以清除所有的细菌时, 残余的多杀性巴氏杆菌足以对其产生致死性后果。因而本试验结果证实 OppA 蛋白对小鼠具有一定保护性, 但若将其开发为亚单位疫苗, 可能需要联合多个保护性抗原才能取得更好的保护作用。目前已有对猪多杀性巴氏杆菌 OmpW、TbpA 蛋白的免疫原性进行的研究报道, 发现 OmpW 和 TbpA 蛋白在不同血清群猪多杀性巴氏杆菌中均高度保守, 且攻毒保护试验表明 OmpW 和 TbpA 蛋白对小鼠的保护率分别为 50.0% 和 37.5%^[25]。OppA 蛋白可与不同抗原蛋白进行组合, 筛选最佳组合方案, 以获得免疫效力较强的亚单位疫苗。

综上所述, 本试验对猪源多杀性巴氏杆菌 OppA 蛋白进行了原核表达及免疫原性的初步探索, 结果显示该蛋白具有良好的免疫原性, 能够激发小鼠产生免疫应答反应, 具有一定的免疫保护效果。

参考文献:

- [1] 李红婕, 董紫凡, 车勇良, 等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及 *OppA* 基因遗传进化分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(12): 4786-4794.
- [2] 关丽君. 猪多杀性巴氏杆菌 A 型和 D 型二价灭活疫苗的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [3] 张哲玮, 曹维维, 代小童, 等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定、血清分型及耐药性分析 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43(5): 930-936.
- [4] 吴俊楠, 王颢然, 王鑫宇, 等. 2010—2020 年我国猪巴氏杆菌病的流行情况与空间聚集性分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2023, 31(3): 164-171.
- [5] MOSTAAN S, GHASEMZADEH A, SARDARI S, et al. *Pasteurella multocida* Vaccine Candidates: A Systematic Review [J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2020, 12(3): 140-147.
- [6] 尹媛媛, 何芳, 赵光夫, 等. 多杀性巴氏杆菌主要毒力因子研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(6): 1210-1218.
- [7] KUBATZKY K F. *Pasteurella Multocida* and Immune Cells [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012, 361: 53-72.
- [8] DETMERS F J, LANFERMEIJER F C, POOLMAN B. Peptides and ATP Binding Cassette Peptide Transporters [J]. Research in Microbiology, 2001, 152(3-4): 245-258.
- [9] 车勇良, 陈如敬, 江斌, 等. 副猪嗜血杆菌 *OppA* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(3): 282-288.
- [10] 潘永. 沙门菌中伴侣蛋白 Hfq 与小 RNA GcvB 及其靶基因 *OppA* 的调控机理分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.

- [11] 王妍妍, 李贵阳, 李杰, 等. 迟缓爱德华氏菌 OppA 蛋白的免疫原性及免疫保护分析 [J]. 海洋科学, 2011, 35(5): 19-23.
- [12] 林玲, 李春玲, 臧莹安, 等. 猪链球菌毒力因子研究进展 [J]. 动物医学进展, 2020, 41(9): 82-86.
- [13] 何书海, 陈宏智, 焦凤超. 动物病理组织切片制作方法的改良 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(11): 130-132.
- [14] PENG Z, LIANG W, LIU W J, et al. Genomic Characterization of *Pasteurella multocida* HB01, a Serotype a Bovine Isolate from China [J]. Gene, 2016, 581(1): 85-93.
- [15] 赵梦坡, 朱志森, 黄育浩, 等. 多杀性巴氏杆菌疫苗研究进展 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2022, 47(6): 45-51.
- [16] RUIZ A, OLIVEIRA S, TORREMORELL M, et al. Outer Membrane Proteins and DNA Profiles in Strains of *Haemophilus Parasuis* Recovered from Systemic and Respiratory Sites [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(5): 1757-1762.
- [17] WISSELINK H J, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, HILGERS L A T, et al. Assessment of Protective Efficacy of Live and Killed Vaccines Based on a Non-Encapsulated Mutant of *Streptococcus Suis* Serotype 2 [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 84(1-2): 155-168.
- [18] 李大鹏. 副猪嗜血杆菌病重组亚单位疫苗候选抗原蛋白的免疫保护效力评价 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [19] 赵谦, 龚俊, 栾天, 等. 基于细菌表面展示技术的猪链球菌病-副猪嗜血杆菌病二联亚单位疫苗的小鼠保护效果评价 [J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(1): 58-64.
- [20] 孙鑫妍, 王怡滢, 关丽君, 等. 猪多杀性巴氏杆菌 4 个重组蛋白的小鼠免疫保护效力比较 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(11): 1172-1178.
- [21] WILKIE I W, HARPER M, BOYCE J D, et al. *Pasteurella Multocida*: Diseases and Pathogenesis [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012, 361: 1-22.
- [22] 李慧峰, 单明辉, 程淑琴. 归参汤对免疫抑制小鼠血清中 IL-2、TNF- α 和脾细胞 Th1/Th2 细胞因子的影响 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 973-976.
- [23] 楚甜甜. 恶性血液肿瘤患者血小板无效输注及干预研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [24] MACEDO N, OLIVEIRA S, TORREMORELL M, et al. Immune Response to Oligopeptide Permease a (OppA) Protein in Pigs Naturally and Experimentally Infected with *Haemophilus Parasuis* [J]. Research in Veterinary Science, 2016, 107: 62-67.
- [25] 张哲玮, 代小童, 韦祖丹, 等. 猪多杀性巴氏杆菌 OmpW、TbpA 蛋白的原核表达及免疫原性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(4): 1489-1498.

责任编辑 张枸