



西北农林科技大学

博士学位论文

滑液囊支原体亚单位疫苗免疫保护效果的评价和抗体检测 ELISA 方法的建立

专业学位类别 兽 医 博 士

论 文 作 者 韩 水 仲

指 导 教 师 王晶钰 教授

合作指导教师

论文提交时间 2024 年 5 月

Dissertation Submitted to Northwest A&F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Doctor of Professional Degree in Veterinary Medicine

Evaluation of the protective efficacy of
Mycoplasma synoviae subunit vaccines and the
establishment of ELISA for detecting antibodies

Degree Type: Doctor of Professional Degree in Veterinary Medicine

Candidate: Han Shuizhong

Supervisor: Prof. Wang Jingyu

Co- Supervisor:

Date of submission: May 2024

Veterinary Medicine College, Northwest A&F University

分类号：S855.3

UDC：579.6

密级：公开

学校代码：10712

研究生学号：2020065006

西北农林科技大学博士学位论文

滑液囊支原体亚单位疫苗免疫保护效果的评价 和抗体检测 ELISA 方法的建立

论文作者：韩水仲

指导教师：王晶钰 教授

答辩委员会：

西北农林科技大学动物医学院 张彦明教授（主席）

中国兽医药品监察所 薛青红研究员

中国农业科学院兰州兽医研究所 朱紫祥研究员

山西农业大学 杨勃研究员

西北农林科技大学动物医学院 邓文教授

答辩日期：2024 年 05 月 26 日

摘要

滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS) 感染引起鸡的关节炎、气囊炎等, 严重危害我国养禽业的健康发展。疫苗免疫及血清学监测是防控 MS 的重要手段。MS-H 活疫苗需用于未感染鸡群, 限制了该疫苗的广泛使用。同时, MS-H 株在接种鸡的上呼吸道长时间定殖, 不利于种鸡群 MS 的净化。MS 灭活疫苗生产成本较高, 需逐只注射且具有局部反应。因此, 有必要开发新型 MS 疫苗。此外, 持续的血清学检测是防控 MS 感染的必要措施。本研究评价了 6 个 MS 主要免疫原性蛋白 (DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78、NADH oxidase) 对鸡的免疫保护效果, 此外, 利用重组蛋白建立了 MS 抗体的间接 ELISA 检测方法。研究结果如下:

(1) MS 的六个主要免疫原性蛋白的表达、纯化和鉴定。分别构建了含 MS 的 *dnak*、*enolase*、*ef-tu*、*mspb*、*lp78* 和 *nadh oxidase* 基因的重组质粒, 然后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行诱导表达和纯化。用 western blot 和 ELISA 对 6 个纯化的重组蛋白的反应原性进行评价。重组蛋白在 MS 的亚细胞定位通过 western blot 进行鉴定。用间接免疫荧光检测各重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附, 并用 ELISA 检测重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合。结果, 6 个重组蛋白均以可溶形式在大肠杆菌表达, 可结合 His 标签单抗和 MS 阳性血清。各重组蛋白在 MS 膜蛋白和胞浆蛋白均有分布。除 rMSPB 外, 5 个重组蛋白可黏附 DF-1 细胞并结合 DF-1 细胞膜蛋白。

(2) 六个重组 MS 蛋白对鸡的免疫保护效果评价。将重组 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78、NADH oxidase 和生理盐水分别与 ISA206 VG 佐剂乳化后, 以 50 μg /只分别经颈部皮下免疫 21 日龄鸡, 14 日后加强免疫。检测血清抗体、IFN- γ 和 IL-4 水平, 并进行淋巴细胞增殖试验。首免后 28 日, 将 MS W1 株 (10^8 CCU/mL) 经气管途径以 0.2 mL/只接种鸡进行攻毒。攻毒前 5 日, 经气管途径接种 1 羽份新支二联活疫苗。攻毒后 14 日, 观察气囊损伤并对气管粘膜厚度进行测定, 同时, 用实时荧光 PCR 检测气管拭子中 MS 核酸载量。结果, 亚单位疫苗免疫鸡的血清抗体于免疫后 7 日转阳, 免疫后 21~28 日达到高峰。相对于生理盐水对照组, 免疫组 IFN- γ 和 IL-4 水平显著 ($p < 0.05$) 升高, 淋巴细胞增殖水平显著 ($p < 0.01$) 增强。攻毒后, 虽然疫苗免疫鸡的气管拭子均可检出 MS, 但 rEnolase、rEF-Tu 和 rMSPB 亚单位疫苗免疫鸡的 MS 载量显著 ($p < 0.05$) 降低。相对于攻毒对照组的气囊损伤评分 (3.5 ± 0.7), rEnolase (1.9 ± 0.7)、rEF-Tu (2.0 ± 0.9)、rMSPB (2.1 ± 0.7)、rLP78 (2.5 ± 1.0)、rNADH oxidase (2.7 ± 0.5) 和商品苗 (2.0 ± 1.1) 显著 ($p < 0.05$) 降低, 同时, 气管粘膜厚度也显著 ($p < 0.05$) 降低。

(3) MS 表位疫苗的构建及对鸡的免疫保护效果评价。用生物信息学方法预测 MS 的 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 的 T 和 B 细胞表位。将筛选的抗原表位连接合成嵌

合多表位基因（命名为 B78EE）。通过生物学软件分析了 B78EE 蛋白的二级结构、亲水性、抗原性和三级结构。将重组质粒 pET-28a-B78EE 转化大肠杆菌并进行诱导表达和纯化。用 western blot 对 B78EE 蛋白的反应原性进行鉴定。将纯化的 B78EE 和 rMSPB/rLP78/rEF-Tu/rEnolase 混合抗原分别与 ISA206 VG 佐剂乳化制备表位疫苗（MS-B78EE）和混合抗原疫苗（Cocktail subunit vaccine），然后以 50 μg /只经颈部皮下分别免疫 21 日龄鸡，14 日后加强免疫。检测血清抗体、IFN- γ 和 IL-4 水平，同时进行淋巴细胞增殖试验。免疫后 28 日，将 MS W1 株（ 10^8 CCU/mL）经气管途径以 0.2 mL/只接种鸡进行攻毒。攻毒前 5 日，试验鸡经气管途径接种新支二联活疫苗。攻毒后 14 日，观察气囊损伤并对气管粘膜厚度进行测定，同时，用实时荧光 PCR 检测气管拭子中 MS 核酸载量。结果表明，B78EE 有良好的亲水性、柔性及抗原性。B78EE 的分子量为 55 kDa 左右，可以包涵体形式在大肠杆菌表达。Western blot 表明 B78EE 可结合 MS 阳性血清。MS-B78EE 和 Cocktail subunit vaccine 免疫鸡于免疫后 14 日血清抗体转阳。相对于生理盐水对照组，疫苗免疫组的血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平显著升高（ $p < 0.05$ ），同时，淋巴细胞增殖显著（ $p < 0.01$ ）增强。相对于攻毒对照组，疫苗免疫组鸡的气管拭子中 MS 载量显著（ $p < 0.05$ ）降低。剖检后，MS-B78EE 和 Cocktail subunit vaccine 免疫鸡的气囊损伤评分分别为 1.4 ± 0.8 和 1.2 ± 0.8 ，显著（ $p < 0.01$ ）低于攻毒对照组（ 3.2 ± 0.6 ）。同时，疫苗免疫鸡的气管粘膜厚度均显著（ $p < 0.01$ ）降低。

（4）rMSPB 和 rLP78 间接 ELISA 检测 MS 抗体方法的建立。用重组 MSPB 和 LP78 分别作为包被抗原建立 MS 抗体间接 ELISA 检测方法。对抗原包被浓度、血清和二抗稀释度进行了优化。通过检测 83 份 MS 阴性血清分别确定了 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 的 Cut-off 值。对 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 的敏感性和特异性进行了评价。同时，分别检测了人工感染 MS、免疫 MS 灭活疫苗和临床感染鸡血清。结果，检测不同稀释度的 MS 阳性血清（HI 效价 1:128）的检测限，rMSPB iELISA 为 1:25600 rLP78 iELISA 为 1:6400~1:12800。两种 ELISA 方法与其它禽病原的阳性血清（NDV、AIV（H5）、AIV（H7）、AIV（H9）、IBV、IBDV、ADV-4、Hpg 和 MG）均无交叉反应。rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 于 MS 感染后 7 日可检出阳性，阳性检出比例分别为 6/10 和 4/10。鸡免疫后 7 日血清抗体转阳，阳性检出比例均为 1/5。检测临床血清，rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 同商品化试剂盒的总符合率分别为 94.7%和 88.2%。

综上所述，大肠杆菌表达 MS 的 rEnolase、rEF-Tu、rMSPB、rLP78 和 rNADH oxidase 均能诱导鸡的体液和细胞免疫应答并显著减轻 MS 感染所致气囊炎和气管粘膜损伤。基于 enolase、EF-Tu、MSPB 和 LP78 的多表位疫苗能提供有效保护。重组 MSPB 可用于建立 MS 抗体的 ELISA 检测方法。研究成果有助于 MS 新型疫苗及诊断试剂的研发。

关键词：滑液囊支原体；亚单位疫苗；表位疫苗；原核表达；ELISA；抗体检测

ABSTRACT

Mycoplasma synoviae (MS) causes synovitis and airsacculitis in chickens, which brings huge damage to the poultry industry in China. Vaccination and serological monitoring play important roles in the control of MS infections. The live vaccine MS-H strain should be applied to MS-free birds, which limits its wide applications. Furthermore, the MS-H strain persists in the upper respiratory tract for a long time in immunized chickens, making MS eradication challenging for breeders. The production of inactivated MS vaccine is costly and can be limited by the need for individual administration and local vaccine reactions. Therefore, it is necessary to develop new types of vaccines against MS. Additionally, consistently applied serological monitoring is essential for the prevention of MS infections. The purpose of this study is to evaluate the protective efficacy of six major immunogenic proteins of MS in chickens, including DnaK, enolase, EF-Tu, MSPB, LP78, and NADH oxidase. In addition, the recombinant protein was utilized to establish an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting MS antibodies. The results of this study are as follows:

(1) **Expression, purification, and identification of six major immunogenicity proteins in MS.** The recombinant plasmids containing *dnak*, *enolase*, *ef-tu*, *mspb*, *lp78*, and *nadh oxidase* of MS were constructed and then introduced into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) for induction of expression and purification, respectively. Western blot and ELISA were performed to evaluate the reactivity of the six purified recombinant proteins. Subcellular localization of the six recombinant proteins in MS was determined by western blot. Adherence of the six recombinant proteins to DF-1 cells was detected through indirect immunofluorescence assay (IFA), and their binding activity to DF-1 membrane proteins was further evaluated by ELISA. Results showed that the six recombinant proteins were obtained in the soluble fractions of *E.coli*, and can be recognized by anti-His-Tag monoclonal antibody and antisera against MS. The six recombinant proteins were located both on the membrane and in the cytoplasm of MS. Except for rMSPB, the five recombinant proteins can adhere to DF-1 cells and bind to the membrane proteins of DF-1 cells.

(2) **Evaluation of the protective efficacy of six recombinant proteins of MS in chickens.** The recombinant DnaK, enolase, EF-Tu, MSPB, LP78, NADH oxidase, and saline were emulsified with MontanideTM ISA 206 VG adjuvant, respectively. Then, the six subunit vaccines were subcutaneously inoculated into the necks of chickens (50 μ g per chicken) at 21 days of age, and a booster injection was administered at 14 days post immunization (dpi). The levels of serum antibodies, interferon- γ (IFN- γ), and interleukin-4 (IL-4) were determined, and lymphocyte proliferation assays were performed. At 28 days post the first immunization,

chickens were challenged with 0.2 mL of MS W1 strain culture (10^8 CCU/mL) by the intratracheal route. Five days prior to the challenge, chickens were inoculated with one dose of the NDV-IBV live vaccine by the intratracheal route. At 14 days post challenge (dpc), air sac lesions and tracheal mucosal thickness were evaluated, and the MS genomic loads in tracheal swabs were quantitated by real-time quantitative PCR (qPCR). Results showed that chickens immunized with the subunit vaccines became seropositive at 7 dpi and peaked at 21 and 28 dpi. Compared with the saline control group, a remarkable ($p<0.05$) increase in the levels of IFN- γ and IL-4 was observed in the immunized groups, and lymphocyte proliferation responses were significantly ($p<0.01$) enhanced. After challenge, although MS was detected in all of the tracheal swabs collected from the immunized chickens, the loads of MS were significantly ($p<0.05$) reduced in chickens immunized with rEnolase, rEF-Tu, and rMSPB subunit vaccines. Compared with the score of air sac lesions in the challenge control group (3.5 ± 0.7), chickens in the rEnolase (1.9 ± 0.7), rEF-Tu (2.0 ± 0.9), rMSPB (2.1 ± 0.7), rLP78 (2.5 ± 1.0), rNADH oxidase (2.7 ± 0.5), and bacterin (2.0 ± 1.1) groups exhibited significantly ($p<0.05$) lower air sac lesion scores. A significantly ($p<0.05$) less tracheal mucosal thickness was also observed.

(3) Design of a multi-epitope vaccine against MS and evaluated its protective efficacy in chickens. Bioinformatics methods were used to predict T and B cell epitopes of MSPB, LP78, EF-Tu, and enolase of MS. The screened antigenic epitopes were synthesized into a chimeric multi-epitope gene (named B78EE). The secondary structure, hydrophilicity, antigenicity, and tertiary structure of B78EE were analyzed by bioinformatics software tools. The recombinant plasmid pET-28a-B78EE was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) for induction of expression and purification. The reactivity of B78EE was identified by western blot. The purified B78EE and a mixture of MSPB, EF-Tu, enolase, and LP78 were separately emulsified with MontanideTM ISA 206 VG adjuvant to prepare the multi-epitope vaccine (named MS-B78EE) and cocktail subunit vaccine. Then, the vaccines were subcutaneously inoculated into the necks of chickens (50 μ g per chicken) at 21 days of age, and a booster injection was administered at 14 dpi. The levels of serum antibodies, IFN- γ , and IL-4 were determined, and lymphocyte proliferation assays were performed. Chickens were challenged with 0.2 mL of MS W1 strain culture (10^8 CCU/mL) by the intratracheal route at 28 dpi. Five days prior to the challenge, chickens were inoculated with the NDV-IBV live vaccine by the intratracheal route. At 14 dpc, air sac lesions and tracheal mucosal thickness were evaluated, and the MS genomic loads in tracheal swabs were quantitated by qPCR. The results indicated that B78EE showed favorable hydrophilicity, flexibility, and antigenicity. B78EE was expressed in insoluble form in *E.coli*, with a molecular weight of 55 kDa. Western blot showed that B78EE was recognized by antisera against MS. The serum antibodies of chickens

immunized with MS-B78EE, or cocktail subunit vaccine, became positive at 14 dpi. Compared with the saline control group, the levels of IFN- γ and IL-4 significantly ($p<0.05$) increased in the immunized groups, and lymphocyte proliferation responses were significantly ($p<0.01$) enhanced. Compared with the challenge control group, MS-B78EE and cocktail subunit vaccine-immunized-chickens had significantly ($p<0.05$) lower MS loads in tracheal swabs. Scores of air sac lesions in the MS-B78EE group (1.4 ± 0.8) and cocktail subunit vaccine group (1.2 ± 0.8) were significantly ($p<0.01$) lower than the challenge group (3.2 ± 0.6). Furthermore, chickens in the immunized groups exhibited significantly ($p<0.05$) less tracheal mucosal thickness than the challenge group.

(4) Establishment of indirect ELISAs based on rMSPB or rLP78 for the detection of MS antibodies. Recombinant MSPB and LP78 were separately utilized to establish indirect ELISAs for the detection of antibodies against MS. The coating concentrations and dilution ratios of the tested sera and secondary antibody were optimized. The cut-off values of rMSPB iELISA and rLP78 iELISA were determined by testing 83 MS-negative serum samples, respectively. The sensitivity and specificity of rMSPB iELISA and rLP78 iELISA were evaluated. Furthermore, the two ELISAs were used to detect anti-MS antibodies in experimentally infected chickens, in chickens immunized with MS bacterin, and in field-infected chickens. Results showed that the maximum dilutions of MS-positive serum (HI titer, 1:128) detected via rMSPB iELISA was 1:25,600, and rLP78 iELISA was 1:6,400–1:12,800. The two ELISAs had no cross-reaction with positive sera against other avian pathogens, including NDV, AIV (H5), AIV (H7), AIV (H9), IBV, IBDV, ADV-4, Hpg, and MG. The sera antibodies against MS became positive on day 7 after infection when detected via rMSPB iELISA and rLP78 iELISA, and the positive rates were 6/10 and 4/10, respectively. Chickens seroconverted on day 7 after immunization, and the positive rate was 1/5 for both of the two ELISAs. In the detection of field sera, the total agreement of rMSPB iELISA and rLP78 iELISA with the commercial ELISA kit was 94.7% and 88.2%, respectively.

In conclusion, rEnolase, rEF-Tu, rMSPB, rLP78, and rNADH oxidase of MS expressed in *E. coli* can induce both humoral and cellular immune responses in chickens and significantly reduce the lesions of the air sac and tracheal mucosa caused by MS infections. The multi-epitope vaccine, consisting of cell epitopes of enolase, EF-Tu, MSPB, and LP78, can provide effective protection against MS infections. The recombinant MSPB was a good candidate for the development of an ELISA for detecting MS antibodies. These findings may contribute to the development of novel vaccines and diagnostic tests for MS infections.

KEY WORDS: *Mycoplasma synoviae*; subunit vaccine; multi-epitope vaccine; prokaryotic expression; ELISA; antibody detection

目 录

第一章 滑液囊支原体及其疫苗研究进展	1
1.1 滑液囊支原体病原学研究	1
1.1.1 生物学分类及特征	1
1.1.2 形态结构及功能	1
1.1.3 基因组成	2
1.1.4 蛋白质组学研究	2
1.1.5 流行病学	3
1.1.6 致病机制	4
1.1.7 免疫应答	5
1.1.8 免疫逃避	7
1.2 滑液囊支原体疫苗研究进展	8
1.2.1 灭活疫苗	8
1.2.2 活疫苗	8
1.2.3 亚单位疫苗	10
1.3 滑液囊支原体亚单位疫苗候选蛋白的研究进展	11
1.3.1 DnaK	11
1.3.2 EF-Tu	11
1.3.3 enolase	11
1.3.4 MSPB	12
1.3.5 NADH oxidase	13
1.4 滑液囊支原体抗体检测方法	13
1.5 研究目的与意义	15
第二章 滑液囊支原体的六个主要免疫原性蛋白的制备与鉴定	16
2.1 材料	16
2.1.1 数据库与软件	16
2.1.2 质粒、菌种、细胞和实验动物	16
2.1.3 主要试剂	17
2.1.4 主要仪器设备	17
2.2 方法	17
2.2.1 生物信息学分析	17
2.2.2 目的基因的扩增及突变	18
2.2.3 重组表达质粒的构建	18
2.2.4 重组蛋白的诱导表达和纯化	18
2.2.5 Western blot 鉴定	18

2.2.6 重组蛋白的反应原性测定.....	19
2.2.7 鼠抗重组蛋白多克隆抗体的制备.....	19
2.2.8 重组蛋白的亚细胞定位.....	19
2.2.9 间接免疫荧光检测重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附.....	19
2.2.10 ELISA 检测重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合.....	20
2.3 结果.....	20
2.3.1 生物信息学分析.....	20
2.3.2 目的基因的扩增及突变.....	21
2.3.3 重组蛋白的诱导表达和纯化.....	24
2.3.4 Western blot 鉴定.....	27
2.3.5 重组蛋白的反应原性测定.....	27
2.3.6 重组蛋白的亚细胞定位.....	28
2.3.7 间接免疫荧光检测重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附.....	28
2.3.8 ELISA 检测重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合.....	30
2.4 讨论.....	31
2.5 小结.....	31
第三章 滑液囊支原体的六个主要免疫原性蛋白对鸡的免疫保护效果评价.....	32
3.1 材料.....	32
3.1.1 菌种与实验动物.....	32
3.1.2 主要试剂.....	32
3.1.3 主要仪器设备.....	33
3.2 方法.....	33
3.2.1 动物饲养和管理.....	33
3.2.2 MS 的培养及含量测定.....	33
3.2.3 MS(W1 株)感染鸡模型的建立.....	33
3.2.4 重组亚单位疫苗的制备.....	34
3.2.5 疫苗免疫.....	35
3.2.6 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体.....	35
3.2.7 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定.....	35
3.2.8 淋巴细胞增殖试验.....	35
3.2.9 攻毒.....	36
3.2.10 统计分析.....	36
3.3 结果.....	36
3.3.1 MS(W1 株)感染鸡模型的建立.....	36
3.3.2 重组亚单位疫苗的制备.....	38
3.3.3 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体.....	38
3.3.4 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定.....	39

3.3.5 淋巴细胞增殖试验.....	40
3.3.6 攻毒.....	41
3.4 讨论.....	42
3.5 小结.....	44
第四章 滑液囊支原体表位疫苗的构建及对鸡的免疫保护效果评价	45
4.1 材料.....	45
4.1.1 菌种与实验动物.....	45
4.1.2 主要试剂.....	45
4.1.3 主要仪器设备.....	45
4.2 方法.....	45
4.2.1 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 表位的预测.....	45
4.2.2 表达表位蛋白重组质粒的构建.....	46
4.2.3 表位蛋白的理化参数和抗原性的预测.....	46
4.2.4 表位蛋白二级和三级结构的预测.....	46
4.2.5 表位蛋白的诱导表达和纯化.....	46
4.2.6 Western blot.....	47
4.2.7 疫苗的制备.....	47
4.2.8 免疫.....	47
4.2.9 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体.....	47
4.2.10 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定.....	47
4.2.11 淋巴细胞增殖试验.....	47
4.2.12 攻毒.....	47
4.2.13 统计分析.....	47
4.3 结果.....	48
4.3.1 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 表位的预测.....	48
4.3.2 表位蛋白的理化参数和抗原性的预测.....	49
4.3.3 表位蛋白的二级和三级结构的预测.....	49
4.3.4 表位蛋白的诱导表达和纯化.....	51
4.3.5 Western blot.....	51
4.3.6 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体.....	51
4.3.7 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定.....	52
4.3.8 淋巴细胞增殖试验.....	52
4.3.9 攻毒.....	53
4.4 讨论.....	54
4.5 小结.....	55
第五章 滑液囊支原体重组 MSPB 和 LP78 间接 ELISA 抗体检测方法 的建立.....	56
5.1 材料.....	56

5.1.1 血清及实验动物来源.....	56
5.1.2 主要试剂.....	56
5.1.3 主要仪器设备.....	56
5.2 方法.....	57
5.2.1 rMSPB 和 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的测定	57
5.2.2 酶标抗体稀释度的测定.....	57
5.2.3 判界的确定.....	57
5.2.4 与其它病原的交叉反应性.....	57
5.2.5 灵敏度.....	57
5.2.6 人工感染和免疫 MS 抗体的检测.....	58
5.2.7 临床样本的检测.....	58
5.3 结果.....	58
5.3.1 rMSPB 和 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的确定	58
5.3.2 酶标抗体稀释度的确定.....	59
5.3.3 判界的确定.....	60
5.3.4 与其它病原的交叉反应性.....	60
5.3.5 灵敏度.....	61
5.3.6 人工感染和免疫 MS 抗体的检测.....	61
5.3.7 临床样本的检测.....	63
5.4 讨论.....	64
5.5 小结.....	64
全文结论.....	65
本文的创新点.....	66
参考文献.....	67
附录.....	82
主要符号对照表	84

第一章 滑液囊支原体及其疫苗研究进展

1.1 滑液囊支原体病原学研究

1.1.1 生物学分类及特征

滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS) 是由 Olson 等于 1954 年在患有关节肿大鸡中首次报道, Chalquest 等于 1960 年鉴定, Olson 等于 1964 年对其正式命名 (Chalquest et al. 1960; Olson et al. 1954; Olson et al. 1965)。近年来, MS 在全球广泛流行, 其对养禽业的危害已超过鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 并已引起广泛重视 (Chaidez-Ibarra et al. 2021)。MS 属于柔膜体纲 (*Mollicutes*), 支原体目 (*Mycoplasmatales*), 支原体属 (*Mycoplasma*) 成员。支原体属包括 101 个种和 4 个亚种, 其中对养禽业危害严重的主要是 MG 和 MS, 两种支原体的培养特性 (如培养时对特殊生长因子的需求)、血清学、代谢试验 (如对葡萄糖、精氨酸、 β -D-葡萄糖苷酸酶的需求)、G+C% 含量等不同 (吴移谋 等. 2008)。支原体培养时需添加烟酰胺嘌呤二核苷酸、含脂肪酸和胆固醇的血清、嘌呤或嘧啶碱基等, 其生长最适培养温度为 36~37℃, pH 为 7.0~8.0, 生长缓慢, 固体培养基培养 2~3 日 (有时两周), 在低倍镜下可见“荷包蛋”样菌落 (Adler et al. 1974)。支原体对温度抵抗力较差, 45℃ 维持 15~30 min 可灭活, 4℃ 存活 1~2 周, -20℃ 存活 6~12 个月, -70℃ 或冷冻干燥可长期保存 (Woode et al. 1974)。MS 可吸附鸡的红细胞并呈现血凝, 且只有一个血清型 (Noormohammadi et al. 1997)。血凝抑制试验 (Hemagglutination inhibition, HI) 可用于 MS 和 MG 的鉴别检验 (Vardaman et al. 1970)。

1.1.2 形态结构及功能

支原体大小约 0.1~0.3 μm , 能通过 0.45 μm 滤膜, 加压过滤能通过 0.22 μm 滤膜, 无细胞壁, 常采用吉姆萨和瑞氏染色, 呈多形态球状体或“烧瓶状”, 电镜观察最外层结构包括荚膜、黏附结构与黏附相关蛋白, 其内为三层结构的单位膜, 胞质内含核质、核糖体、胞质颗粒、质粒或转座子 (Bradbury et al. 1993; Levisohn et al. 1973) (图 1-1 A)。一般在体内, 支原体可形成荚膜, 在体外荚膜容易消失, 荚膜具有抵抗宿主细胞的吞噬作用, 是致病性支原体的重要毒力因子。支原体通过顶端结构黏附于呼吸道等上皮细胞, 黏附及黏附相关蛋白是支原体致病的基础 (Aldridge et al. 1978; Razin et al. 1992) (图 1-1 B)。单位膜在支原体吸收营养物质, 合成生存所需物质, 排出代谢产物等方面具有重要作用 (吴移谋 等. 2008)。

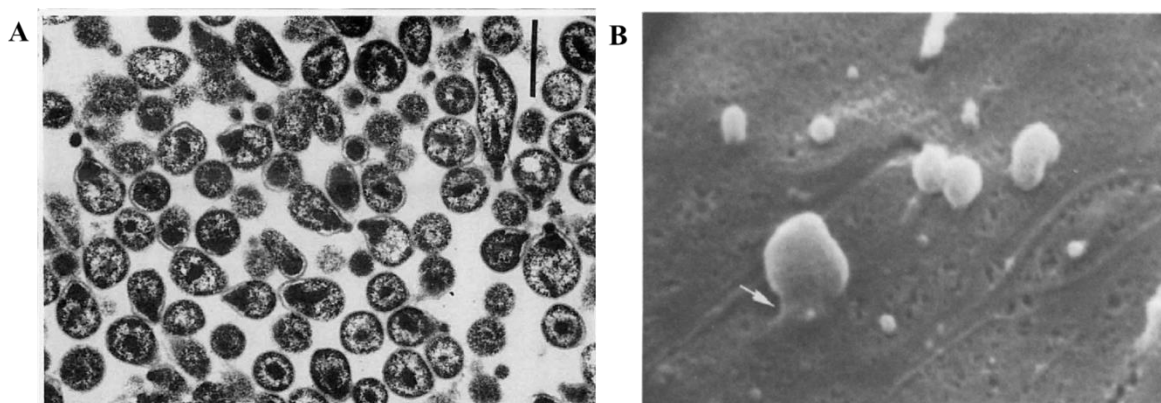


图 1-1 电镜观察支原体的形态 (A) (Bradbury et al. 1993)及对细胞的黏附 (B) (Aldridge et al. 1978)

Fig. 1-1 Electron micrographs of mycoplasma (A) and the attachment to cells (B)

1.1.3 基因组组成

按基因功能,支原体基因组主要包括有关基因复制和修复、基因转录、蛋白表达和调控、翻译、核苷酸合成、蛋白转运系统、脂蛋白合成、蛋白质分泌、糖类代谢和能量代谢、表面结构及细胞黏附相关蛋白、细胞分裂蛋白、毒力相关蛋白等基因(吴移谋等, 2008)。国内外有多株 MS 完成基因组测序,国外包括 53 株 (NC 007294)、WVU1853T 株 (NZ_CP011096.1) 和 MS-H 株 (NZ_CP021129.1),国内有 HN01 株 (CP034544.1)、FJ-01 株 (CP079705)、SD2 株 (CP107525)、WF18 株 (CP069379) 等。根据 HN01 株测序结果,MS 基因组大小为 817 087 bp, G+C 含量为 28.32%, 含 738 基因, 包括 656 个编码蛋白基因、44 个 RNA 基因 (34 个 tRNAs, 7 个 rRNAs, 3 个非编码 RNAs) 以及 38 个假基因(Xu et al. 2020b)。在编码蛋白的基因中,有 23% 还未鉴定,国内有通过生物信息学对 MS 未知功能基因进行分析,阐明了 95% 基因的功能(Si et al. 2023)。支原体编码色氨酸的密码子为 UGA 和 UGG, 其中 UGA 密码子在其它微生物为终止密码子(Inamine et al. 1990)。利用大肠杆菌表达支原体重组蛋白需将 UGA 突变为 UGG(Yoshida et al. 2000)。

1.1.4 蛋白质组学研究

将 MS 亲水相和疏水相分别与 MS 阳性血清反应,鉴定出其免疫原性蛋白主要是可变脂蛋白及血凝素蛋白(variable lipoprotein haemagglutinin, VlhA), 包括 MSPB 和 MSPA 蛋白(Gurevich et al. 1995; Noormohammadi et al. 1997)。通过氮端测序,除 MSPB 和 MSPA 蛋白外,鉴定出 EF-Tu、enolase、NADH oxidase、DnaK、LP78 等 18 个 MS 的主要免疫原性蛋白(Bercic et al. 2008a) (表 1-1)。将 MS 破碎离心后的上清和沉淀测序,除上述蛋白外,鉴定出二氢硫辛酰胺脱氢酶 (PDHD)、丙酮酸脱氢酶 α 亚基 (PDHA) 和 β 亚基 (PDHB) 等 30 个蛋白(Menegatti et al. 2010)。国内学者鉴定丙酮酸脱羧酶 (PDC)、EF-Tu、NADH oxidase、PDHD 为 MS 膜表面蛋白(包世俊 2014)。将 MS 接种无血清培养基后,收集培养上清,鉴定出 19 个分泌蛋白(Rebollo Couto et al. 2012)。用免疫共沉

淀联合质谱鉴定出 208 个蛋白, 包括 57 个膜蛋白和 60 个分泌蛋白(Zhang et al. 2023a)。

表 1-1 MS 主要免疫原性蛋白 (N-末端测序鉴定) (Bercic et al. 2008a)

Table 1-1 Identification of MS proteins by N-terminal sequencing

Protein	Amino acid sequence	Protein	Protein	Amino acid sequence	Protein
P42	A K L D F D R S K E	EF-Tu	P78-2	X G D K T D G G G	LP 78
P47	A I K K I H A R E V L D S R G	enolase	P82-1	A R D Y D L K D Y	EF-G
P50-1	M E N K K I I V V G A N H A G	NADH oxidase	P82-2	X G A P Q E E K	LP 85
P50-2	M G E A A E D S E X S E T Q L	MSPA	P85-1	S I A K L G S F F R	PtsG
P50-3	A K I T K I X S D V V	ATP D-3	P85-2	X G A P Q E E K K	LP 85
P55-1	S D F K F T N T E T E L V V S	Trigger factor	P90	M E K Q	?ABC
P55-2	M Y K E T D K R T K L V A X I	Pyruvate kinase	P110-1	X G R S D S E	LP 110
P65	A K E I V L X I D L G	DnaK	P110-2	M K K X K	?NanH
P78-1	M Y T F K F A D I G	PdhD	P160	M K N X N	?hypo.

1.1.5 流行病学

鸡、火鸡和珍珠鸡是 MS 的自然宿主, 鸭和鹅在自然条件下也可感染 MS, 但无临床症状(Bencina et al. 1988; Benoina et al. 1988; Kleven et al. 1975)。MS 感染可导致滑膜炎、气囊炎, 一些菌株可感染输卵管, 导致蛋壳顶端异常 (eggshell apex abnormalities, EAA) 以及产蛋率下降(Catania et al. 2016; Hinz et al. 2003; Kleven et al. 1975)。不同日龄鸡均可感染 MS, 但雏鸡普遍携带 MS 母源抗体, 21 日龄时母源抗体基本消失, 逐渐易感(Xue et al. 2017; 孙石开 2018; 仲翠微 等.2023)。人工感染条件下, 14 日龄(Kerr et al. 1970)、30 日龄(孙石开 2018)、49 日龄(马爽 等. 2016a)和 60 日龄(丁美娟 2013)鸡接种 MS 后可出现典型症状。不同菌株的毒力差异较大, 有些菌株接种后可同时出现滑膜炎和气囊炎, 有些菌株接种后仅出现滑膜炎或气囊炎, 同一菌株不同接种途径所表现出的临床症状也有较大差异(Hinz et al. 2003; Kleven et al. 1975)。MS 既可以通过水平传播也可经蛋垂直传播, 接触传播的潜伏期为 30 日左右, 感染 MS 鸡所产蛋中 3%~10%为阳性(Kerr et al. 1970; MacOwan et al. 1984a; Vardaman et al. 1977)。MS 感染所致呼吸道症状通常不明显, 主要呈慢性亚临床型, 而易出现爪垫和关节肿大、跛行等临床症状。MS 感染蛋鸡导致产蛋率下降, 所产蛋出现 EAA(Catania et al. 2016; Feberwee et al. 2009a)。

MS 在世界各地常以散发性为主, 未曾有大范围流行的报道。2010 年以来, 在广东、广西省鸡场大量出现行动障碍、腿部关节肿大、生长发育不良的鸡, 剖检可见关节腔渗出物增加, 经病原学鉴定为 MS 感染(Sun et al. 2017b)。2010—2015 年对全国 16 个省 9773 个鸡群进行 MS 调查, MS 在各省调查鸡群的总体发病率为 10%~100%, 群内发病率为 5%~8%(Sun et al. 2017b)。也有报道 2010—2015 年我国 11 个省 MS 平均发病率为 5.75%~25.77%, 不同品种鸡的平均发病率为 13.92%, 死亡率为 4.09~15.68%(马爽 等. 2016b)。对全国 21 个省 2010—2015 年 44 395 只鸡进行 MS 抗体检测, 阳性率为 41.19%, 463 个商品鸡场中 80.99%为 MS 抗体阳性(Xue et al. 2017)。2015—2017 年对南方 5 省

10 个不同地区进行调查,不同品种鸡感染率为 5.89%~14.23%,死亡率为 0.85%~3.47%(招丽婵 等. 2019)。2020—2021 年对我国部分省的鸡关节等病料进行检测,阳性率为 66.53%(Wei et al. 2023)。据此,MS 感染已成为危害我国养禽业发展的重要疫病。MS 在气管拭子样品的分离率高于爪垫(Kleven et al. 1975),但目前 MS 在我国鸡群呼吸道的检出率还未见报道。自 2000 年以来,国外养殖场 MS 感染率已超 MG(Landman 2014)。在法国,对蛋鸡场采集的气管拭子进行检测,MS 检出率为 59%(Cisneros-Tamayo et al. 2020)。在西班牙,MS 在蛋鸡场的气管拭子检出率为 95%,在肉鸡为 35%(Cortes et al. 2021)。在意大利,MS 在蛋鸡场的气管拭子检出率为 42.8%(Galluzzo et al. 2022)。在加拿大,气管拭子中 MS 检出率超过 50%(Bergeron et al. 2021)。对全球已报道的文献分析,MS 感染率已超过 MG,其感染率在种鸡为 62.6%,蛋鸡为 38.4%,肉鸡为 25.4%(Chaidez-Ibarra et al. 2021)。

MS 有不同的基因型,根据 VlhA 蛋白氮端脯氨酸富集重复区 (PRRs) 大小,可分为 A—K 型(Bencina et al. 2001)。在美国和加拿大,主要是 A—E 型,在英国主要是 C、E、F 型,在泰国主要是 C 和 E 型(Bencina et al. 2001; Hammond et al. 2009; Hong et al. 2004)。我国 2013—2014 年分离的 MS 菌株以 K 型为主,2017—2019 年以 L 型为主,但也有报道 2016-2019 年我国流行的 MS 基因型仍以 K 型为主(Sui et al. 2022; Sun et al. 2017a; 谢迪 等. 2021)。不同基因型 MS 的致病性没有表现出明显差异(Sun et al. 2017a)。

1.1.6 致病机制

1.1.6.1 致病性研究

不同 MS 分离菌株的毒力存在较大差异。将自患关节炎鸡分离的多个菌株通过肌肉途径接种,接种鸡有 11%~100%出现滑液囊炎,10%~40%鸡也同时出现气囊炎(孙石开 2018)。虽然不同菌株所致气囊炎和滑液囊炎有较大差异,从滑液囊分离的菌株易引起滑液囊炎,从气管或气囊分离的菌株易导致气囊炎,但有报道不同菌株对关节滑膜或气管组织未表现出明显的嗜性(Hinz et al. 2003)。接种途径对 MS 感染鸡后的临床症状也有显著影响。将分离自关节的 WVU1853 株分别经关节和气溶胶途径接种,均能出现关节炎症状,但都不能引起气囊炎;经胸气囊和静脉分别接种,可同时观察到关节炎和气囊炎;经足垫途径接种能引起关节炎等,但未出现气囊炎;经滴鼻途径接种,关节炎和气囊炎均未出现(Hinz et al. 2003; Kleven et al. 1975; Kume et al. 1976; Lockaby et al. 1998)。将 FZ 株以爪垫、皮下、气管、点眼途径接种,爪垫和皮下途径接种可致 100%鸡出现爪垫肿胀但不出现气囊炎,而气管途径接种鸡 33%~55%出现气囊炎但未出现爪垫肿胀,点眼途径不出现临床症状(侯博 等. 2021)。将分离自患关节炎鸡的 HN03 株以滴鼻、静脉、肌肉、爪垫途径接种鸡,滑液囊炎发病率分别为 0、100%、100%、83.3%(孙石开 2018)。将分离自患关节炎鸡的 HN01 株经滴鼻点眼、静脉、皮下、爪垫接种鸡,静脉、爪垫接种后爪垫肿胀发病率分别为 2/5 和 5/5,而滴鼻点眼和皮下途径未出现爪

垫肿胀(丁美娟 2013)。将 MS 分别经爪垫、静脉和气囊途径接种,爪垫途径接种鸡出现爪垫和关节肿胀比例最高,静脉次之,气囊最低(尹丽萍 等. 2023)。IBV 和 NDV 等能显著加重 MS 感染所引起的气囊损伤。种鸡感染 MS 后,其子代免疫新支二联活疫苗后,大部分出现明显的气囊损伤(Kleven et al. 1972)。雏鸡接种新支二联活疫苗前后感染 MS 能显著增加气囊炎比例,而感染 MS 前接种疫苗较感染后接种疫苗引起的损伤严重(Kleven et al. 1972)。MS 可致死鸡胚,不同菌株对鸡胚的毒力存在显著区别,同一菌株经多次传代,对鸡胚的毒力减弱(Lockaby et al. 1999a; Ma et al. 2023)。

1.1.6.2 组织细胞损伤

MS 感染引起组织炎性细胞浸润及渗出物增多,炎性渗出物可沿肌腱进入滑膜腔,引起关节滑膜细胞出现肥大和增生,进而导致关节炎(Kerr et al. 1970; Morrow et al. 1997; Walker et al. 1978)。关节软骨在 MS 感染后变薄甚至溶解,进而蔓延侵袭至骨层,形成肉芽肿或坏死,导致胫跗骨长度比正常鸡变短(Kerr et al. 1970; Morrow et al. 1997)。关节肿胀及骨损伤是 MS 引起鸡跛行的主要原因(Morrow et al. 1997)。经气溶胶途径接种,感染鸡出现气囊炎和气管粘膜增厚,气囊、气管和肺有不成程度的淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞浸润,细胞外有大量纤维素渗出(Fletcher et al. 1976; Kawakubo et al. 1980; Kleven et al. 1975)。MS 可黏附气管纤毛和上皮细胞,影响纤毛活性(Hirano et al. 1978)。

MS 可侵入鸡红细胞、成纤维细胞、关节软骨细胞和腱鞘滑膜细胞(Dusanic et al. 2009; Xu et al. 2020a)。MS 可黏附鸡胚成纤维细胞并在细胞膜周围形成小集落,随着细胞外 MS 的增多,细胞质出现空泡,细胞核出现颗粒和泡状物并逐渐死亡(Aldridge 1975; Walker et al. 1978)。细胞中其它一些基因,主要包括细胞增殖、凋亡、炎症调节因子等,在 MS 感染后也出现差异表达(Dusanic et al. 2014; Liu et al. 2020)。有报道 MS 感染细胞的细胞质和细胞核出现固缩,主要通过激活 caspase3 信号通路引起细胞凋亡(Dusanic et al. 2012)。MS 也可黏附并侵入鸡的腱鞘滑膜细胞,感染鸡的腱鞘滑膜层周围有炎性细胞浸润(Liu et al. 2020; Xu et al. 2020a)。MS 可调节细胞代谢相关基因的表达,改变细胞脂质物质的转运,从而利于自身的生长(Chen et al. 2022)。支原体膜脂蛋白在刺激细胞产生炎症前细胞因子方面具有重要作用(Rawadi et al. 1996)。MSPB 为 MS 膜上脂蛋白,可刺激鸡的单核细胞分泌 IL-6,巨噬细胞释放 NO 增加(Lavric et al. 2007)。MS 感染鸡胚的细胞因子(包括 γ -IFN、IL-1 β 、IL-6、IL-12 β 、IL-16、IL-18 等)和趋化因子(CCL4、iNOS、XCL1 等)升高(Bolha et al. 2013)。

1.1.7 免疫应答

1.1.7.1 体液免疫

MS 的 RSA 抗体于感染后 7 日产生,14 日后全部转阳,HI 抗体出现时间较 RSA 抗体晚,但感染后 14 日全部转阳,也有报道感染后 21 日 HI 抗体开始转阳(Avakian et al. 1990b; Narat et al. 1998; Timms et al. 1976; Weinack et al. 1976)。MS 的 IgM 抗体出现最早,

然后是 IgG 抗体, IgM 和 IgA 抗体在感染后 14—21 日降低甚至消失, 而 IgG 抗体持续升高(Narat et al. 1998)。不同感染途径对抗体产生时间有较大影响, 如爪垫途径接种鸡后 14 日, 仅 33% HI 抗体转阳, 接种后 56 日全部转阳; 点眼和滴鼻途径接种鸡, 接种 21 日后抗体开始转阳, 接种 28 日后全部为阳性(Ewing et al. 1998; Kerr et al. 1970)。有报道不同感染途径对抗体产生时间影响不大, 感染鸡均可于接种后 14 日抗体转阳, 但气溶胶感染较爪垫和气囊产生的抗体效价高(Vardaman et al. 1977)。MS 可垂直传播, 孵化期感染 MS, 孵化后 14 日抗体转阳, 孵化后 28 日全部为阳性, 可持续至 23 周龄(Bradbury et al. 1975)。有报道 1 日龄雏鸡经滴鼻途径接种 MS, 接种后 28 日, 血清 RSA 抗体出现阳性(MacOwan et al. 1984b)。血清中 MS 抗体可维持 180 日不降低, 感染后 203 日仍为阳性(Kerr et al. 1970; Timms et al. 1976)。

MS 灭活疫苗 YBF-MS1 株免疫鸡后 21 日, RSA 抗体效价不低于 1:8, 至少持续 6 个月。MS 灭活疫苗 HN01 株、HN03 株、CHN-WF224-2016 株免疫鸡后 21 日, 用 IDEXX ELISA 抗体检测试剂盒检测为阳性, 至少持续 6 个月(Gong et al. 2020; 丁美娟 2013; 孙石开 2018)。MS-H 株活疫苗接种后, 气管粘膜淋巴滤泡中 B 淋巴细胞显著增加, 接种后 14 日, 血清经 RSA 检测 20%为阳性, ELISA 检测 70%为阳性, 接种后 21 日, RSA 和 ELISA 检测全部为阳性(Jones et al. 2006c; Omotainse et al. 2022)。

在 14 日龄鸡胚的卵黄、卵白和尿囊液中可检出 MS 母源抗体, 母源抗体在 13—16 日龄时基本消失(Bencina et al. 2005; MacOwan et al. 1984b)。母源抗体能提高雏鸡的孵化率但无法阻断 MS 感染(Levisohn et al. 1985; MacOwan et al. 1984a)。雏鸡体内的 MS 抗体水平同攻毒保护相关性不大, 最高保护率仅为 30%(孙石开 2018)。母源抗体对雏鸡有限的保护力在 MG 也有报道, 有和无母源抗体的雏鸡接种 MG 后的病理损伤和 MG 分离率并无明显差异(Lin et al. 1984)。雏鸡经皮下注射高免血清, 也不能减轻支原体感染所造成的气囊损伤(Lin et al. 1984)。

1.1.7.2 细胞免疫

MS 感染鸡的细胞免疫较血清中抗体产生的时间早(Timms et al. 1976)。将胸腺破坏的鸡接种 MS 后仅出现轻微关节肿胀, 而未破坏的鸡病变严重, 说明细胞免疫在 MS 所致病变的形成方面具有重要作用(Kawakubo et al. 1981; Kume et al. 1977)。用免疫抑制剂地塞米松处理鸡后再经关节途径接种 MS, 其出现关节炎症状较未处理组晚, 临床症状相对于给药前接种 MS 严重, 且地塞米松用量同感染鸡临床症状严重程度呈剂量关系(Kume et al. 1979)。免疫抑制剂环孢菌素 A (CsA) 可抑制 CD8⁺细胞的激活, 将 CsA 与 MS 同时经关节接种鸡, 能显著减轻关节损伤程度(Narat et al. 1998)。接种 MS 鸡的关节滑液的主要细胞成分是细胞毒性 T 淋巴细胞(Narat et al. 1998)。将感染 MS 鸡的关节滑液中的细胞接种鸡, 能够诱导急性关节炎(Narat et al. 1998)。MS 可刺激淋巴细胞产生干扰素, 免疫 MS 灭活疫苗鸡的 IFN- γ 升高, 同时可刺激淋巴细胞增殖(Cole et al. 1977; Cole

et al. 1976; Gong et al. 2020)。MS 感染鸡的气管主要以 Th1 型免疫应答为主，而活疫苗 MS-H 株主要诱导 Th17 型免疫应答，两者都可诱导 CD4⁺细胞和巨噬细胞显著增加，但 CD8⁺细胞未增加(Omotainse et al. 2022)。

1.1.8 免疫逃避

1.1.8.1 可变脂蛋白及血凝素蛋白 (VlhA)

支原体感染宿主主要依靠其黏附蛋白与宿主细胞的结合。由于假基因的插入、重复区数量、基因组中其它片段高频率的基因重组、移码突变等，VlhA 蛋白具有多样性(Noormohammadi et al. 1998; Noormohammadi et al. 2000; Noormohammadi et al. 1997)。在免疫压力下，支原体可通过改变膜蛋白抗原以逃避宿主免疫系统的清除。MS 的 VlhA 蛋白同 MG 黏附素 pMGA 均为支原体膜表面脂蛋白，在介导黏附以及免疫逃避扮演重要角色(Bencina 2002; Bencina et al. 2001)。MS 与 MG 逃避宿主免疫的机制不同，MG 的 pMGA 基因在基因组中有多个（约 30—70 个），每个基因有单独的启动子，其可在免疫压力下通过控制转录起始区上游的 GAA 碱基数目对各 pMGA 基因是否表达进行控制，进而逃避清除(Glew et al. 1998)。MS 的 v_{lhA} 基因的 5' 端在基因组中只有一个，但 3' 端在基因组中有几十个相似序列，但相似序列缺少启动子，为假基因，v_{lhA} 基因可与假基因重组产生不同种抗原(Noormohammadi et al. 2000)。测定 MS 菌株在体外连续传代不同代次的 v_{lhA} 基因序列，其同源性不到 90%(Slavec et al. 2011; 孙石开 2018)。同一菌株来源的 MS 菌落只有 5%克隆可观察到与原菌株一致的红细胞吸附，不同克隆的 MSPA 表达存在差异，使 MS 表面出现相变(Noormohammadi et al. 1997)。

1.1.8.2 唾液酸酶和类木瓜蛋白酶等

细菌唾液酸酶能催化水解含 α -(2-3)、 α -(2-6) 糖苷键的寡糖、糖蛋白、脂蛋白等，从而有利于其在体内定殖、扩散以及获取营养(Corfield 1992)。唾液酸酶由 *nanH* 基因编码，其参与支原体的黏附及扩散。有报道敲除 *nanH* 基因的 MG 黏附气管的数量显著减少同时对气管的损伤显著降低(May et al. 2012)。鸡胚成纤维细胞表面有唾液酸受体，用唾液酸酶处理后，MS 不能黏附细胞(Aldridge 1975)。黏膜组织表面的黏蛋白为携带唾液酸链的糖蛋白，该黏蛋白为 MS 与黏膜细胞的唾液酸受体结合的屏障，唾液酸酶可破坏该屏障，有利于 MS 黏附(Bercic et al. 2011)。MS 唾液酸酶可将鸡血清中 IgG 重链恒定区的 α -(2-6) 唾液酸侧链水解，以便于其在感染鸡血清中长期存在，同时也有利于扩散到其它器官(Bercic et al. 2011)。有报道 MS 在感染鸡气管黏膜中存在时间长达 203 日，感染鸡的血清带菌时间长达 54 日(Olson et al. 1967)。不同支原体的唾液酸酶活性有显著差异，MG 和 MS 的唾液酸酶活性较火鸡支原体和依阿华支原体高(Bercic et al. 2008b)。唾液酸酶活性可能与菌株致病性相关，一般高致病性菌株的唾液酸酶活性较低致病性高，同一菌株的低代次较高代次的唾液酸酶活性高(May et al. 2007; May et al. 2012; Narat et al. 1998)。

MS 细胞膜上的半胱氨酸酶类似于木瓜蛋白酶,可在抗体的铰链区裂解抗体,缺失 Fc 片段的抗体不具有补体结合活性以及结合巨噬细胞 Fc 受体的功能,使机体不易清除 MS(Cizelj et al. 2011)。此外,MS 的 EF-Tu、P146 蛋白等可与 H 因子结合,可避免激活补体,从而逃避机体清除(Yu et al. 2020)。MS 感染鸡关节软骨细胞时,其 *vlhA*、唾液酸酶、半胱氨酸酶基因的表达均上调,同时感染细胞上调可降解软骨细胞外基质的酶的表达,包括组织蛋白酶、聚蛋白多糖酶以及基质金属蛋白酶等,进而有利于扩散(Cizelj et al. 2016)。

1.2 滑液囊支原体疫苗研究进展

1.2.1 灭活疫苗

目前,青岛易邦生物工程有限公司的鸡 MS 灭活疫苗(YBF-MS1 株)已获新兽药证书,用于预防鸡传染性滑膜炎。江苏省农业科学院兽医研究所的鸡 MS 灭活疫苗(HN01 株)正开展临床试验,另有多家单位研发的 MS 联合新城疫、鸡毒支原体、传染性鼻炎等多联苗也处于临床试验阶段。广西大学研发的 HN03 株灭活疫苗也取得良好的免疫效果(孙石开 2018)。在进行效力评价时,YBF-MS1 株和 HN01 株经爪垫途径接种,而 HN03 株为肌肉途径接种。有报道免疫灭活疫苗的鸡经爪垫途径接种 MS 的发病率为 83%,而经肌肉接种的发病率为 16.67%,认为爪垫接种途径不适合进行疫苗的效力评价(孙石开 2018)。上述灭活疫苗进行免疫效果评价时,主要以预防 MS 感染引起的爪垫肿胀等滑膜炎为评价指标,未对疫苗预防气囊炎等呼吸道症状进行评价。经鼻腔途径接种 WVU1853 株,灭活疫苗免疫鸡的关节和气囊中 MS 载量较对照组显著降低(陆凤 2015)。IBV 接种后可加重 MS 感染后形成的气囊炎(Goren 1979; Hopkins et al. 1982; Kleven et al. 1972)。国内有比较不同佐剂 CHN-WF224-2016 株灭活疫苗的免疫效果,在攻毒前接种新支二联活疫苗,然后经爪垫和气管途径同时攻毒,免疫组气囊和爪垫损伤评分及气管中 MS 载量较对照组显著降低,ISA 71VG 佐剂效果最好(Gong et al. 2020)。比较 4 种 CHN-J2-2016 株不同佐剂灭活疫苗的免疫效果,经爪垫和气管同时攻毒,除 71R VG 佐剂组对气管中 MS 有清除作用外,其余佐剂组几乎无清除作用,但由于攻毒对照组的气囊炎症状不明显,其对气囊的保护作用仍需进一步评价;同时各佐剂疫苗组虽然能显著降低爪垫损伤,但仍有 2/5~5/5 出现爪垫肿胀(王昆 2018)。有报道 YBF-MS1 株在临床应用中能提高孵化率,降低种鸡产蛋下降率和破蛋率,减少后代发病率(范庆增 等. 2022)。

1.2.2 活疫苗

目前,全球有 2 款商品化 MS 活疫苗,包括澳大利亚生物资源公司的 MS-H 株和默沙东公司的 MS1 株,只有 MS-H 株在我国注册销售。MS1 株是由 WVU1853 株在体外传代自发突变获得,其生长不需要添加烟酰胺嘌呤二核苷酸(NAD)(Kreizinger et al. 2017)。MS-H 株为温度敏感株,是用 86079/7NS 株(分离自蛋鸡的咽拭子)经甲基硝基

亚硝基胍 (NTG) 化学诱变后筛选获得, 其菌液浓度在 33℃ 培养时较 39.5℃ 高 10^4 倍, 可同时用于鸡和火鸡的预防(Morrow et al. 1998; Noormohammadi et al. 2007)。MS-H 株的温度敏感特征使其可在鸡上呼吸道长期定殖, 可通过占位作用抑制野毒感染(魏泽华 2020)。将 MS-H 株以 10 倍剂量经点眼、气囊、气溶胶途径接种, 接种鸡未观察到气囊病变, 体内传代 5 次, 未观察到毒力返强, 体外传代 10 次, 该菌株仍保持温度敏感特性, 同时可与传染性法氏囊 (infectious bursal disease virus, IBDV) 和 IBV 活疫苗共接种(Markham et al. 1998a)。MS-H 株接种鸡后, 在外界环境的作用下, 部分菌株基因可发生回复突变, 不具有温度敏感特性(Markham et al. 1998c; Shahid et al. 2013)。通过比较含有 *obg*、*oppF1* 和 *gap* 回复突变的不同 MS-H 株的毒力, 其对气管粘膜的损伤无明显区别, 但同时含有 3 个回复突变的 MS-H 株可引起气囊炎和气管粘膜损伤, 而 *Obg* 蛋白 Ala210Val 是引起菌株对温度敏感的关键突变(Klose et al. 2022; Klose et al. 2023)。MS-H 株免疫鸡经气溶胶途径同时接种 IBV 和 MS 或经胸气囊途径接种 MS 可获得良好保护(Markham et al. 1998b)。MS-H 株经点眼途径的最小免疫剂量为 4.8×10^5 CCU/羽, 接种后 28 日可诱导免疫保护, 免疫持续期为 44 周(Jones et al. 2006a; Jones et al. 2006b; Jones et al. 2006c)。在临床应用中, MS-H 株接种蛋鸡可水平传播但不能垂直传播, 其在预防 MS 引起的产蛋下降及 EAA 方面也有良好的效果(Feberwee et al. 2009b; Markham et al. 1998c)。国内用 MS-H 株预防三黄鸡的传染性滑膜炎取得良好效果, 但用国内分离株经胸气囊接种 MS-H 株免疫鸡, 仍有 5/10 出现气囊损伤(孙石开 2018; 魏泽华 2020)。将 MS-H 株与新支二联活疫苗共同接种, 不影响新支二联活疫苗的免疫效果(华利忠 等. 2021)。母源抗体不影响 MS-H 株接种, MS-H 株可在 7—28 日龄不同母源抗体水平的鸡的上呼吸道定殖, 攻毒后均可获得保护(仲翠微 等. 2023)。MS-H 株常用于未感染 MS 鸡群的预防, 有报道对已经感染 MS 的鸡群, 接种 MS-H 株的免疫效果不理想, 甚至可增加呼吸道疾病(石晓磊 2018)。此外, 日本也进行了温度敏感型 MS 活疫苗 MSts44 株的研究, 该疫苗能显著降低气囊炎的发生率并减轻气囊病变, 免疫持续期不低于 21 周(Nonomura et al. 1982)。国内也进行了温度敏感型 MS 活疫苗 Ningxia/2017-1 株的开发, 其对 1 日龄雏鸡具有良好的安全性, 能显著减轻攻毒后的气囊炎, 虽然仍有 7/10% 出现气囊损伤, 但与 MS-H 株 (5/10) 效果相当(魏泽华 2020)。武汉科前生物股份有限公司的 MS 活疫苗 (CR05-R 株) 正处于临床试验阶段。

MS-H 株接种后可在气管长期定殖, 为种鸡场 MS 的净化和疫病的监测带来困难(Markham et al. 1998c)。通过对 MS-H 株与 86079/7NS 株进行测序比较, 前者存在 32 个核苷酸突变(Kordafshari et al. 2020; Zhu et al. 2019)。对从接种 MS-H 株的鸡群中再次分离的 MS-H 进行测序分析, 在 32 个相对于亲本株突变的基因中, 28 个未发生回复突变, 所有分离株至少在 *obg*、*oppF1* 和 *gap* 基因处保持突变(Kordafshari et al. 2020)。在所分离的 MS-H 株的 *obg* 基因均存在 G369A 突变, 可用于 MS-H 株和野毒株的鉴别检验

(Shahid et al. 2013)。使用针对 *obg* 突变基因的荧光定量 PCR 或基于高分辨率溶解曲线 (HRM) 等方法可用于鉴别野毒株和 MS-H 株(Dijkman et al. 2017; Shahid et al. 2014)。MS-H 株在 OppF 蛋白氮端部分同亲本株存在差异, 基于 OppF 蛋白建立的 ELISA 方法可用于疫苗株和野毒株的血清学鉴别检验(Kordafshari et al. 2019)。

1.2.3 亚单位疫苗

目前, 国内外对 MS 的主要免疫原性蛋白有研究, 但各蛋白的免疫保护效果未见报道。MG 一直危害养禽业的健康发展, 相对于 MS, 国内外对 MG 免疫原性蛋白的免疫保护效果的研究较多。有保护作用的 MG 蛋白主要包括 TM1(Okuda et al. 2003; Saito et al. 1993; Zhang et al. 2018; 冯秋霖 2013; 李小慧 2017; 王秀青 2004; 张东超 2016)、MGC(Ferguson-Noel et al. 2012; Leigh et al. 2013; Zhang 等. 2010)、P64(Czifra et al. 2000; 胡思顺 等. 2015)。TM1、MGC 和 P64 参与 MG 黏附细胞, P64 也参与 MG 血凝(Avakian et al. 1991; Hnatow et al. 1998; Keeler et al. 1996; Kheyar et al. 1995; Saito et al. 1993)。将 MG 上述具有保护作用的蛋白序列与 MS 进行比对分析, 未找到相似序列。2023 年国内有报道从 24 个应用生物信息学预测具有良好抗原性和黏附性的 MS 蛋白中选择 5 个具有不同功能的蛋白进行保护效果评价, 包括 RS01790 (variable surface lipoprotein), BMP (ABC transporter substrate-binding protein), GrpE (nucleotide exchange factor GrpE), RS00900 (hypothetical protein) 和 RS00275 (variable surface lipoprotein), 各重组蛋白均能显著减轻感染鸡的气囊损伤, 同时显著降低气管中 MS 载量及气管粘膜厚度(Zhang et al. 2023a)。研究者进一步构建的含这 5 个重组蛋白表位的疫苗也取得了良好的保护效果(Zhang et al. 2023b)。

支原体黏附细胞是其感染的重要步骤, 缺乏黏附能力的支原体对宿主的感染性显著降低(Krause et al. 1983; Krause et al. 1982)。支原体缺乏细胞壁, 其黏附宿主细胞主要依靠黏附素和辅助蛋白的共同作用(Razin et al. 1992)。支原体具有黏附作用的结构统称为黏附素, 是支原体致病的基础。目前, 人的肺炎支原体的黏附素研究最为清楚, 其为一烧瓶样的顶端结构, 主要包括 P1 和 P30 蛋白(Razin et al. 1992)。在 MG 和 MS 具有免疫保护作用的蛋白中, 各蛋白都具有黏附细胞的作用(Avakian et al. 1993a; Indikova et al. 2013; Saito et al. 1993; Zhang et al. 2023a)。因此, 黏附素及黏附辅助蛋白是 MS 优选保护性蛋白。在已鉴定的 18 个 MS 主要免疫原性蛋白(表 1-1)中, DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、NADH oxidase 在支原体黏附细胞中具有重要作用(Bao et al. 2014; Bencina et al. 1999; Hu et al. 2022; Li et al. 2022b; Yu et al. 2018)。同时, 其它病原体的上述蛋白能诱导体液或细胞免疫应答, 并提供保护作用。因此, 本研究从 MS 的主要免疫原性蛋白中选择 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase 作为候选蛋白并评价其免疫保护效果。

1.3 滑液囊支原体亚单位疫苗候选蛋白的研究进展

1.3.1 DnaK

DnaK 又称热休克蛋白 70 (Heat shock protein 70, HSP70), 其参与新生多肽链的正确折叠以及蛋白结构和功能的维持(Li et al. 2022b)。DnaK 可分布在支原体细胞膜并参与支原体对细胞的黏附(Jiang et al. 2016; Li et al. 2022b; 刘佳 等. 2020)。DnaK 为支原体潜在的毒力因子, 其在强毒力菌株的表达量显著高于弱毒株(Li et al. 2022b)。免疫 DnaK 可刺激小鼠产生强烈的体液和细胞免疫应答(Chen et al. 2003; Chou et al. 1997; Jiang et al. 2016)。虽然猪肺炎支原体 DnaK (P42) 能诱导猪产生较强的体液和细胞免疫应答, 但其保护效果未见报道(Jorge et al. 2014)。含牛支原体 DnaK 和 EF-Tu 的重组溶血性曼氏杆菌活载体疫苗可显著降低肺组织中支原体载量并减轻感染牛的临床症状(Briggs et al. 2021)。含结核分枝杆菌 DnaK 的 DNA 疫苗和亚单位疫苗经鼻内接种小鼠后可产生黏膜免疫, 且具有与卡介苗相当的保护效果(Lowrie et al. 1997; Yu-Min et al. 2018)。免疫重组布鲁氏菌 DnaK 疫苗可诱导小鼠产生保护性免疫应答, 显著减少损伤(Delpino et al. 2007; Ghasemi et al. 2014)。组织胞浆菌 DnaK 免疫小鼠可诱导保护性免疫应答, 可抵抗致死性攻击(Gomez et al. 1995; Gomez et al. 1992)。含诺卡菌或柱状黄杆菌 DnaK 的疫苗能诱导鱼产生保护性免疫应答(Chen et al. 2019; Lange et al. 2019)。此外, 也有利用 DnaK 作为免疫刺激剂增强宿主天然免疫反应, 提高对病原体的抵抗力(Yaacob et al. 2019)。

1.3.2 EF-Tu

转录延伸因子 (Elongation factor Tu, EF-Tu) 是支原体的保守性蛋白, 通过与 tRNA 结合, 完成氨基酰-tRNAs 的转运, 促进蛋白质的合成。肺炎支原体 P1 蛋白能黏附宿主细胞并可刺激机体产生强烈的免疫应答, 是重要的保护蛋白。肺炎支原体 P1 蛋白与 MS EF-Tu 蛋白具有共同表位(Bencina et al. 1999; Lockaby et al. 1999b)。虽然 EF-Tu 主要在细胞浆中执行生物合成功能, 但有报道 EF-Tu 可在支原体的细胞膜上分布并可黏附细胞, 是支原体重要的毒力因子(Balasubramanian et al. 2008; Dallo et al. 2002; Jiang et al. 2016; Sowmya et al. 2008; Yu et al. 2018; 包世俊 2014; 王艳芳 等. 2019)。绵羊肺炎支原体和牛支原体 EF-Tu 均可诱导小鼠的体液和细胞免疫应答(Jiang et al. 2016; Zhang et al. 2013)。含牛支原体 EF-Tu 的重组溶血性曼氏杆菌活载体疫苗能显著降低感染牛肺组织支原体载量并改善临床症状(Briggs et al. 2021)。猪链球菌 2 型 EF-Tu 免疫小鼠能诱导 Th1 和 Th2 型免疫应答, 显著减轻攻毒后脑和肺组织损伤(Feng et al. 2018)。肺炎链球菌 EF-Tu 免疫小鼠后能显著降低感染后肺组织中肺炎链球菌含量, 增加巨噬细胞的吞噬活性, 减轻肺组织损伤, 同时, 免疫小鼠对不同血清型肺炎链球菌性均具有保护作用, 可用于广谱疫苗的开发(Cui et al. 2022; Nagai et al. 2019)。

1.3.3 enolase

烯醇化酶(enolase)是多功能酶,其主要参与微生物的糖酵解步骤。enolase在支原体细胞膜和胞浆中均存在,且参与支原体对细胞的黏附(Bao et al. 2014; Chen et al. 2011; Schreiner et al. 2012; Song et al. 2012; Wang et al. 2022; Xie et al. 2022; 徐彬 等. 2024)。小鼠免疫猪链球菌2型 enolase 后可产生强的体液免疫应答,攻毒后可获得完全保护(Feng et al. 2009; Zhang et al. 2009)。重组链球菌 enolase 可诱导同全菌疫苗相当的免疫保护效果(Membrebe et al. 2016)。猪附红细胞体 enolase 可刺激猪产生细胞和体液免疫应答,但仅提供部分保护作用(Xue et al. 2021)。白色念珠菌 enolase 免疫小鼠可显著降低炎性细胞浸润,降低各组织中真菌含量(Li et al. 2011)。孢子丝菌 enolase 可诱导小鼠产生 Th1 型免疫应答,攻毒后可降低组织中真菌含量,延长小鼠存活时间(Portuondo et al. 2019; Tellez-Martinez et al. 2019)。重组疟原虫 enolase 免疫可显著降低疟原虫含量,延长存活时间(Dutta et al. 2015)。

1.3.4 MSPB

Vlha 为 MS 膜表面脂蛋白,在介导 MS 黏附宿主细胞以及免疫逃避中扮演重要角色,也是其主要的血凝蛋白(Bencina et al. 2001)。MSPA 和 MSPB 是 Vlha 翻译后的裂解产物,N 端为 MSPB,C 端为 MSPA(Noormohammadi et al. 1998)。有报道预测 MSPA 和 MSPB 裂解位点位于 300~540 aa 间,可能为 344 aa(Bencina et al. 1999; Narat et al. 1998)。MSPB 含有一个脯氨酸富集重复区(PRRs),该区含有多个重复片段(如 WVU-1853 株为 2 个),每个片段含 19 个氨基酸,富含脯氨酸(Pro)和半胱氨酸(Asn)(Noormohammadi et al. 1998)。支原体 PRRs 在支原体黏附宿主细胞具有重要作用,不同 MS 菌株 PRRs 重复区数量不同,其长度为 57~114 bp,但其对毒力的影响还未见报道(Bencina et al. 2001; Narat et al. 1998)。

MSPA 和 MSPB 在 MS 黏附细胞都具有重要作用,抗 MSPA 抗体具有 HI 活性,虽然抗 MSPB 抗体不具有 HI 活性,但可抑制 MS 黏附红细胞(Khiari et al. 2012; Noormohammadi et al. 1997)。MSPB 的 5' 端(27~421 bp)相对比较保守,不同菌株体外传代不同代次,该序列变异程度相对较低(Bencina et al. 2001)(图 1-2)。不同 MS 菌株表达 MSPA 和 MSPB 分子量差异较大(Noormohammadi et al. 1997)。MSPA 分子量不同与 MS 基因组中存在多个与 MSPA 序列相近的不同长度基因序列有关,该序列可与表达 MSPA 可变区基因发生重组,使其长度变化(Noormohammadi et al. 2000)。MSPB 包含脯氨酸富集重复区(PRRs),PRRs 重复片段数量的不同使不同菌株 MSPB 的长度不同(Bencina et al. 2001; Narat et al. 1998; Noormohammadi et al. 1998)。MSPB 还包括一个遗传高度多态区(RIII, 343~400 nt)及一个多变区(421~1024 nt),后者由于假基因插入及重组使其长度大小变化较大(Noormohammadi et al. 2000; Noormohammadi et al. 1997)。抗原重组、假基因插入等使不同菌株或同一菌株不同代次 Vlha 区域长度差异较大,抗原决定簇发生变化(Bencina et al. 2001)。

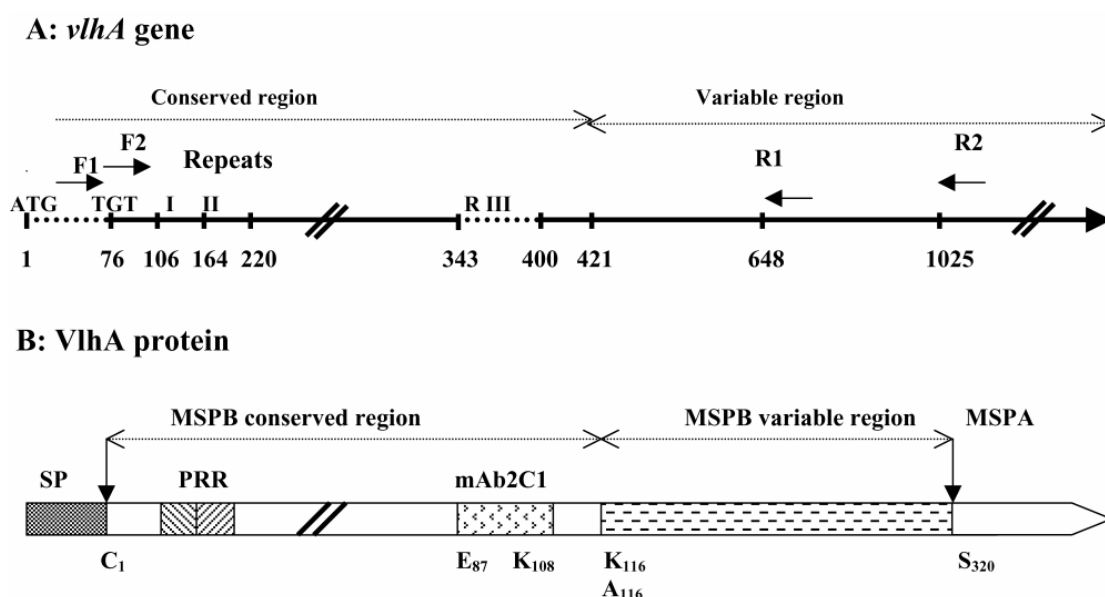


图 1-2 滑液囊支原体 WVU1853 株 *vlhA* 基因及 VlhA 蛋白结构示意图(Bencina et al. 2001)

Fig. 1-2 Schematic representation of the *vlhA* gene and VlhA protein of the type strain WVU1853 of MS

1.3.5 NADH oxidase

支原体能量的产生主要依靠底物水平磷酸化，NADH oxidase 可将 NADH 氧化成 NAD^+ 并将 O_2 还原成 H_2O_2 ，该过程在能量传递中具有重要作用，抑制 NADH oxidase 活性可抑制支原体生长(Gaissier et al. 1987)。NADH oxidase 由 *nox* 基因编码，其可在 MS 细胞膜表面表达并黏附细胞(Hu et al. 2022)。牛支原体和猪肺炎支原体 NADH oxidase 在支原体膜和胞浆中均存在，其在支原体黏附上皮细胞中也扮演重要角色，不同毒力支原体表达 *nox* 水平具有显著差异，缺失 *nox* 基因，支原体黏附细胞的能力显著降低(Hao et al. 2022; Zhao et al. 2017)。猪肺炎支原体 NADH oxidase 经滴鼻和肌肉途径免疫小鼠，可刺激气管和机体体液和细胞免疫应答(Xu et al. 2022)。NADH oxidase 在肺炎链球菌的细胞黏附中具有重要作用，小鼠免疫后攻毒，该重组蛋白可提供较好保护，降低死亡率(Muchnik et al. 2013)。

1.4 滑液囊支原体抗体检测方法

MS 抗体的检测方法包括快速血清凝集试验 (rapid serum agglutination, RSA)、血凝抑制试验 (hemagglutination inhibition, HI)、酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 等。不同方法检测 MS 抗体的敏感性存在差异，RSA 抗体一般于感染后 7 日转阳，14 日后全部转阳，HI 抗体出现时间较 RSA 抗体晚，但感染后 14 日完全转阳，ELISA 敏感性与 RSA 相当(Avakian et al. 1990b; Avakian et al. 1988; Timms et al. 1976; Weinack et al. 1976)。检测活疫苗免疫后抗体，ELISA 于免疫后 20 日可检测出阳性，而 RSA 于免疫后 40 日检测出阳性(Normohammadi et al. 2002)。鸡感染

支原体后血清中最早出现 IgM 抗体, 然后是 IgG 抗体, RSA 检测抗体始为 IgM 抗体。RSA 操作简便, 但有报道 MG 阳性血清同 MS 的 RSA 抗原 4.17%~58.7% 交叉反应, MS 阳性血清同 MG 的 RSA 抗原会出现 12% 左右交叉反应(Vardaman et al. 1970)。也有报道 MG 阳性血清同 MS 的 RSA 抗原无交叉反应, 但 MS 阳性血清同 MG 的 RSA 抗原 有交叉反应(Roberts et al. 1967)。将 MS 抗原电泳后与 MG 阳性血清进行 western blot 反应出现条带, 说明两种支原体有共同抗原(Avakian et al. 1990b; Noormohammadi et al. 1997; Yorgev et al. 1989)。RSA 在检测禽其它病原的免疫血清也会出现不同程度的非特异性凝集反应, 将血清进行灭活处理, 加入巯基乙醇或高浓度的盐等措施也未能有效解决(Yoder 1989)。HI 特异性良好, MS 与 MG 的 HI 抗体无交叉反应, 可用于鉴别检验(Vardaman et al. 1970; Yoder 1989)。HI 抗体一般于鸡感染后 10 日出现, 该方法不适于早期诊断, 易产生假阴性。用不同株 MS 作为血凝抗原检测 HI 抗体的效价具有显著差异(Vardaman et al. 1980)。相较于 RSA 和 HI, ELISA 检测 MS 抗体的敏感性同 RSA 相当, 特异性与 HI 相当(Opitz et al. 1983)。目前, 商品化 MS 抗体 ELISA 检测试剂盒主要是 IDEXX 和 Biochek 公司产品。用 MS 或 MG 培养菌液作为包被抗原检测会出现非特异性结合, 将血清进行灭活, 加入巯基乙醇、酶, 优化抗原包被浓度等措施仍存在非特异性结合(Higgins et al. 1986; Opitz et al. 1983; Yadav et al. 2021)。将提取的 MS 膜蛋白用核酸酶处理后作为包被抗原可降低该非特异性结合, 但仍不能完全消除(Opitz et al. 1983; Talkington et al. 1985b)。此非特异性结合可能与支原体存在与免疫球蛋白非特异性结合的成分, 或培养基存在与支原体非特异性结合的成分有关(Bradbury et al. 1971; Bradbury et al. 1972)。有报道用提取的 MS 膜蛋白作为包被抗原建立的 ELISA 检测人工感染 MS 鸡血清, 可于感染后第 4 日检测出阳性, 敏感性同 RSA 相当, 但检测自然感染血清会出现假阳性 (Gurevich et al. 1995; Opitz et al. 1986; Opitz et al. 1983)。由于 MS 体外培养较困难, 菌液需要进一步纯化, 生产成本较高且存在生物安全风险, 同时, 全菌包被检测抗体存在一定程度的非特异性结合, 而用提取的膜蛋白作为包被抗原用于抗体检测虽具有较好的敏感性和特异性, 但仍存在部分非特异性结合。MSPB 经鉴定为 MS 的主要结构蛋白, 且该蛋白在所有菌株中均有表达(Gurevich et al. 1995; Noormohammadi et al. 1997)。用大肠杆菌表达 MSPB 蛋白碳端(27-317)部分作为 ELISA 包被抗原具有良好的敏感性和特异性(Noormohammadi et al. 2002; Noormohammadi et al. 1999)。ELISA 也可用于鸡蛋中支原体抗体的检测, 检出率同血清相当, 而用氯仿抽提抗体的检测效果较生理盐水抽提方法的效果好(Brown et al. 1991; Hagan et al. 2004; Mohammed et al. 1986a; Mohammed et al. 1986b)。此外, 也有研究者开发出间接免疫过氧化物酶和 dot-ELISA 用于 MS 抗体的检测(Bencina et al. 1991; Yadav et al. 2021)。

1.5 研究目的与意义

目前, MS 在我国流行并严重危害养禽业发展, 亟需通过免疫预防和抗体监测等方法降低发病率进而净化该病。活疫苗常用于未感染 MS 鸡群的预防, 而灭活疫苗存在生产成本低和效力等问题, 因此, 有必要开发新型 MS 疫苗。然而, 国内外对 MS 具有保护作用的蛋白还未研究清楚。

本研究从 MS 的主要免疫原性蛋白中选择 6 个可能有黏附作用的蛋白进行原核表达和纯化, 并对各重组蛋白对鸡的免疫保护效果进行评价, 进一步构建并评价了基于保护蛋白的表位疫苗的免疫保护效果。同时, 分别建立了重组 MSPB 和 LP78 检测 MS 抗体的 ELISA 方法。本研究将有助于 MS 新型疫苗和诊断试剂的开发及改进, 进而为 MS 的防控提供帮助。

第二章 滑液囊支原体的六个主要免疫原性蛋白的制备与鉴定

支原体黏附细胞是其感染宿主的先决条件，具有黏附功能的黏附素及其辅助蛋白也是支原体主要的毒力因子。MG 具有免疫保护作用的蛋白包括 TM1、MGC 和 P64，均参与 MG 对细胞的黏附(Avakian et al. 1991; Hnatow et al. 1998; Keeler et al. 1996; Kheyar et al. 1995; Saito et al. 1993)。目前，国内外对 MS 具有保护作用的蛋白研究较少。2023 年国内有报道评价了 5 个具有不同生物功能且具有细胞黏附特性的 MS 蛋白的保护效果，包括 RS01790, BMP, GrpE, RS00900 和 RS00275，各重组蛋白能显著减轻气囊损伤并降低气管中 MS 载量(Zhang et al. 2023a)。在已鉴定的 MS 主要免疫原性蛋白中，DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、NADH oxidase 在支原体的细胞黏附中具有重要作用(Bao et al. 2014; Bencina et al. 1999; Hu et al. 2022; Li et al. 2022b; Yu et al. 2018)。LP78 为 P80 脂蛋白成员，经鉴定为 MS 主要免疫原性蛋白(Bercic et al. 2008a)。此外，其它病原体的上述蛋白能诱导体液和细胞免疫应答，具有免疫保护功能（见第一章 1.3）。

MS 主要免疫原性蛋白 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase 的免疫保护效果还未见评价。本章拟构建上述六个蛋白的原核表达载体并对各重组蛋白进行鉴定，主要研究内容如下：

2.1 材料

2.1.1 数据库与软件

表 2-1 生物信息学分析所用数据库与工具

Table 2-1 Databases and tools used in the bioinformatics analysis

数据库/工具	功能描述	网址
VaxiJen v2.0	预测蛋白抗原性	http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/
CELLO v.2.5	预测蛋白在细胞的位置	http://cello.life.nctu.edu.tw/
vaxign	预测蛋白黏附能力	https://violinet.org/vaxign2
VFDB	毒力基因预测	http://www.mgc.ac.cn/VFs/
Uniprot	蛋白质组	https://www.uniprot.org/
SignalP-5.0	信号肽预测	https://services.healthtech.dtu.dk/
TMHMM-2.0	预测跨膜区	https://services.healthtech.dtu.dk/

2.1.2 质粒、菌种、细胞和实验动物

原核表达质粒 pET-28a, *E.coli* DH5 α 和 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态, DF-1 细胞, 均由本实验室保存; 滑液囊支原体 W1 株, 由本实验室于 2022 年分离自陕西某养殖公司患有气囊炎的 2 月龄海兰褐鸡; 2 月龄雌性 Balb/c 小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

2.1.3 主要试剂

IPTG、30%丙烯酰胺、脱脂奶粉、考马斯亮蓝 R250, 购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白胨和酵母浸出物, 购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 卡那霉素, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白 marker, 购自 Thermo 公司; 2×PrimeSTAR Max Premix 与核酸 marker, 购自 Takara 公司; 闪电克隆试剂盒, 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 细菌核酸提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒, 购自天根生化科技(北京)有限公司; 镍离子亲和层析柱, 购自武汉汇研生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 购自 Biosharp 公司; TMB 底物显色液, 购自碧云天生物; PVDF 膜和 ECL 发光液, 购自 Millipore 公司; 鼠抗 His 标签抗体, 购自 Proteintech 公司; HRP 标记兔抗鸡 IgY, 购自 ABclonal 公司; HRP 标记羊抗鼠抗体, 购自北京博奥森生物技术有限公司; 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒, 购自碧云天生物; MS 活疫苗 (MS-H 株), 购自 Bioproperties Pty Ltd; 商品化滑液囊支原体灭活疫苗, 购自国内某生物制品公司; MS 自然感染、免疫 MS 灭活疫苗鸡血清和 SPF 鸡血清, 由本实验采集或制备; MontanideTM ISA 206 VG 佐剂, 购自赛彼科(上海)公司; 胎牛血清 (FBS) 和青霉素-链霉素溶液, 购自 GIBCO 公司; DMEM 培养基, 购自 Hyclone 公司; 改良 Frey 培养基, 购自北京中海生物科技有限公司; 碳酸钠 (Na_2CO_3)、碳酸氢钠 (NaHCO_3)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸 (Glycine) 等均为国产分析纯。

2.1.4 主要仪器设备

PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司); 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 细菌摇床 (上海天呈实验仪器制造有限公司); 恒温培养箱 (上海智城分析仪器制造有限公司); 超声破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司); AKTA 层析仪 (苏州赛谱仪器有限公司); 电泳仪和凝胶成像仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); 脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司); 二氧化碳培养箱、酶标仪以及微量核酸定量仪 (Thermo Fisher Scientific); 倒置荧光显微镜 (德国蔡司)。

2.2 方法

2.2.1 生物信息学分析

从 NCBI 获取 MS-H 株 (CP021129) 的 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase 蛋白质序列。用软件分别对上述蛋白的抗原性 (VaxiJen v2.0)、黏附性 (vaxign)、亚细胞定位 (CELLO v.2.5) 和毒力因子 (VFDB) 进行分析。选择 NCBI 收录的国内外不同 MS 菌株, 包括美国 WVU1853T (NZ_CP011096)、巴西 53 株 (NC_007294)、韩国 G3 株 (CP082195)、福建 FJ-01 株 (CP079705)、河南 HN01 株 (CP034544)、广东 SD2 株、江苏 5-9 株、山东 WF18 株, 用 DNASTar 比较各菌株上述

核酸序列的同源性。

2.2.2 目的基因的扩增及突变

根据 MS-H 株核酸序列 (CP021129), 用 SignalP-5.0 和 TMHMM-2.0 预测信号肽和跨膜区, 然后用 SnapGen 4.2 软件设计引物, 用于扩增不含信号肽和跨膜区的各目的基因片段。同时, 由于 MS 利用 UGA 编码色氨酸, 而 UGA 在大肠杆菌中为终止密码子, 设计突变引物, 通过 PCR 将 UGA 突变为 UGG。目的基因扩增引物及突变引物见附录。用细菌基因组提取试剂盒提取 MS-H 株核酸, 然后分别扩增各目的基因片段。将扩增的核酸片段用 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 将各片段混合作为模板, 通过引物进行 Overlap PCR 连接。PCR 扩增体系为 50 μL , 其中含上、下游引物各 2 μL , 2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix 25 μL , 水 19 μL , 模板 DNA 2 μL 。PCR 扩增程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、50~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 将目的基因片段用核酸凝胶回收试剂盒回收。

2.2.3 重组表达质粒的构建

根据目的基因和 pET-28a 载体的浓度将两者混合, 然后加入 DNA 重组酶, 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 然后转化 DH5 α , 接种 LB 固体培养基 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。将 PCR 鉴定为阳性的重组菌扩大培养后, 提取质粒, 送基因公司测序。将测序正确的质粒按上述方法转化 BL21 (DE3) 感受态。将阳性菌扩大培养后, 加入等体积 50% 甘油, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.2.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

将重组 BL21 (DE3) 菌按 1% 接种 LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养, 待菌液 OD_{600nm} 达到 0.6~0.8 时, 添加 1 mmol/L 的 IPTG, 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。将菌液以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 按每克菌体湿重加 10 毫升 20 mmol/L Tris 缓冲液重悬。将重悬的菌体在冰水浴中超声破碎, 10000 r/min 离心 5 min, 将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

采用镍离子亲和层析柱纯化重组蛋白。将亲和层析柱用含 150 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris 的缓冲液平衡 3~5 个柱体积。将超声破碎的上清用 0.45 μm 孔径滤膜过滤, 滤液以 2 mL/min 加至亲和层析柱, 然后用含 150 mmol/L 氯化钠、500 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Tris 的缓冲液洗脱目的蛋白, 收集洗脱产物。将洗脱产物装入透析袋中, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。

2.2.5 Western blot 鉴定

将样品进行 SDS-PAGE, 然后用转膜仪将重组蛋白转至 PVDF 膜。将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 于室温封闭 2 h。PBST 洗涤后, 加入抗 His 标签单克隆抗体 (1:3000), 室温条件下孵育 2 h。洗涤后, 加入 HRP 标记羊抗鼠抗体 (1:10000), 室温条

件下反应 2 h。洗涤后, 加入 ECL 显色液显色。

2.2.6 重组蛋白的反应原性测定

将各重组蛋白和 MS 菌体分别用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 9.6) 稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$, 2~8°C 包被过夜。弃包被液, 然后用 PBST 洗涤, 每孔加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 于 37°C 封闭 2 h。将 10 份自然感染 MS 阳性血清 (5 份 MS 强阳性血清和 5 份 MS 弱阳性血清)、5 份免疫 MS 灭活疫苗鸡血清和 5 份 SPF 鸡血清分别用 PBS 稀释 500 倍, 然后取 100 μL 稀释液分别加至酶标板, 37°C 作用 2 h。洗涤后, 每孔加入 HRP 标记的兔抗鸡 IgY (1:10000) 100 μL , 37°C 作用 1 h。洗涤后, 每孔加入 50 μL TMB 底物溶液, 37°C 避光显色 15 min, 然后加入 2 mol/L H_2SO_4 终止, 测定各孔 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。

2.2.7 鼠抗重组蛋白多克隆抗体的制备

将纯化的重组蛋白用 PBS 稀释至 200 $\mu\text{g/mL}$, 然后缓慢加至等质量的 ISA206 VG 佐剂进行乳化, 2~8°C 保存。将重组蛋白亚单位疫苗经颈背部皮下多点注射 Balb/c 小鼠, 30 $\mu\text{g/只}$, 各免疫 5 只, 间隔 14 日后加强免疫, 同时设未免疫对照。三免后 14 日采血, 分离血清, -20°C 保存。将免疫血清及对照血清分别用 PBS 稀释 100 倍, 然后 2 倍梯度稀释至 1:102400。将各稀释度血清分别加至抗原包被的 ELISA 板, 按上述方法进行检测, 其中 HRP 标记羊抗鼠抗体稀释度为 1:10000。计算各稀释度阳性血清和阴性血清的比值 (P/N) 值, 以 $\text{P/N} \geq 2.1$ 的最高稀释度作为待检血清的 ELISA 效价。

2.2.8 重组蛋白的亚细胞定位

将 W1 株按 10% 接种改良 Frey 培养基, 37°C、5% CO_2 培养 96 h。将菌液以 12000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀, PBS 洗涤 3 遍。将菌体用预冷的含 4% (v/v) Triton X-114 的 PBS 重悬, 4°C 放置 1 h, 中间混匀几次后, 于 37°C 水浴 10 min, 然后 4°C 12000 r/min 离心 20 min, 上层为胞浆蛋白, 下层为膜蛋白。分别加入 3 倍体积的冷丙酮, -20°C 静置过夜后, 4°C 12000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 自然风干后, -20°C 保存。

将胞浆蛋白和膜蛋白分别进行 SDS-PAGE, 按上述方法转印至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭后, 加入各重组蛋白鼠多抗 (1:500), 室温条件下孵育 2 h。洗涤后, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:10000), 室温条件下孵育 2 h, 然后加入 ECL 显色。

2.2.9 间接免疫荧光检测重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附

将 DF-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37°C、5% CO_2 培养至单层, 经 0.125% 胰酶消化后进行细胞计数。将细胞稀释至 2×10^5 cells/mL, 取 100 μL 接种至 96 孔板中培养 24 h。将培养基弃去, 用 PBS 洗 2 次, 300 $\mu\text{L/孔}$, 每次 5 min, 然后每孔加入 100 μL 的 4% 多聚甲醛于室温固定 10 min。PBS 洗 1 次, 每孔加入 300 μL 的 5% BSA 在 37°C 封闭 1 h。将各重组蛋白稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$, 然后取 100 μL 加至 96 孔板, 37°C 孵育 1 h。洗涤后, 每孔加入 100 μL 抗 His 标签单克隆抗体 (1:1000), 37°C 作用 1 h。

洗涤后, 每孔加入 100 μL FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:500), 37°C 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后, 每孔加入 DAPI 试剂, 染色 10 min, 然后于倒置荧光显微镜下观察。在黏附抑制试验中, 将各稀释重组蛋白分别与 1:10 稀释的鼠抗各重组蛋白阳性血清或未免疫鼠血清于 37°C 孵育 1 h, 然后按上述方法加至 DF-1 细胞。

2.2.10 ELISA 检测重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合

将培养至单层的 DF-1 细胞 (2×10^7 cells/mL) 用 PBS 洗一遍, 然后用细胞刮刀刮下细胞, 4°C、1000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 按试剂盒说明书提取膜蛋白和胞浆蛋白。

将提取的 DF-1 细胞膜蛋白和胞浆蛋白, BSA 蛋白, 分别用碳酸盐缓冲液稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$, 按 100 μL /孔包被酶标板, 4°C 包被过夜。PBST 洗涤 3 次, 然后用 5% 脱脂奶粉于 37°C 封闭 2 h。将重组蛋白用 PBS 进行梯度稀释, 取 100 μL 加至酶标板, 每个稀释度重复 3 孔, 于 37°C 孵育 2 h, 同时设置 PBS 对照。洗涤后, 每孔加入 100 μL 抗 His 标签单克隆抗体 (1:1000), 37°C 孵育 2 h。洗涤后, 每孔加入 100 μL HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:10000), 37°C 孵育 1 h。洗涤后, 按 2.2.6 项显色后测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。在抑制试验中, 将鼠抗各重组蛋白阳性血清稀释 10 倍, 然后进行 2 倍梯度稀释至 1:2560。将各稀释度阳性血清分别与 100 $\mu\text{g/mL}$ 重组蛋白混合, 于 37°C 孵育 1 h, 然后加至上述包被酶标板进行检测。

2.3 结果

2.3.1 生物信息学分析

生物信息软件预测 6 个蛋白的抗原性均 >0.4 , 具有较好的抗原性; 黏附性预测, MSPB 和 LP78 具有黏附功能; 亚细胞位置分析, 除 MSPB 和 LP78 为膜蛋白外, 其余为胞浆蛋白 (表 2-2)。enolase 和 EF-Tu 与已知链球菌毒力因子的序列相似性分别为 58% 和 72%。不同菌株编码上述蛋白的核酸同源性分别为 *dnak* (99.5%~99.9%)、*enolase* (99.3%~99.7%)、*ef-tu* (99.6%~100%)、*mspb* (84.5%~90.2%)、*lp78* (98.7%~99.4%)、*nadh oxidase* (99.6%~99.9%) (表 2-3)。

表 2-2 六个 MS 蛋白的生物信息学分析

Table 2-2 Bioinformatics analysis of six MS proteins

名称	基因名称	氨基酸	分子量	抗原性	黏附性	亚细胞位置	毒力因子
DnaK	MSH_01775	596	69 kDa	0.5281	0.273	Cytoplasmic	
enolase	MSH_00070	452	53 kDa	0.467	0.284	Cytoplasmic	是
EF-Tu	MSH_03475	394	44 kDa	0.4134	0.109	Cytoplasmic	是
MSPB	MSH_01355	313	33 kDa	0.6210	0.716	Periplasmic	
LP78	MSH_01690	770	84 kDa	0.6189	0.785	OuterMembrane	
NADH	MSH_02670	458	50 kDa	0.5157	0.318	Cytoplasmic	

注: 抗原性预测阈值为 0.4; 黏附性预测阈值为 0.5。

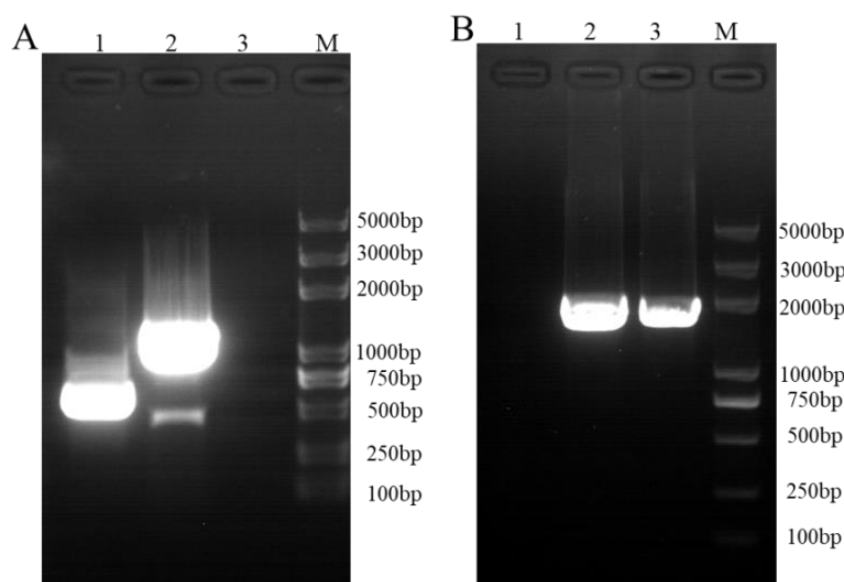
表 2-3 编码 6 个候选蛋白基因在不同菌株的同源性分析

Table 2-3 Multiple nucleotide sequences alignments of the six genes of MS with reference strains

Country	Strains	Accession number	Nucleotide identities (%)					
			<i>dnak</i>	<i>enolase</i>	<i>ef-tu</i>	<i>mspb</i>	<i>lp78</i>	<i>nadh</i>
America	WVU1853T	NZ_CP011096	99.5	99.7	99.7	86.5	99.0	99.6
Brazil	53	NC_007294	99.6	99.3	99.6	90.2	99.4	99.6
Korea	G3	CP082195	99.9	99.5	99.7	84.5	99.4	99.9
China	FJ-01	CP079705	99.6	99.3	99.7	87.5	99.7	99.6
China	HN01	CP034544	99.6	99.7	99.7	87.2	98.7	99.6
China	SD2	CP107525	99.6	99.7	100	84.8	98.7	99.6
China	5-9	CP083748	99.6	99.3	99.7	87.3	99.7	99.6
China	WF18	CP069379	99.6	99.7	99.7	86.3	98.7	99.6

2.3.2 目的基因的扩增及突变

目的基因含 TGA 密码子，其中 *dnak* (2 个)、*enolase* (3 个)、*ef-tu* (0 个)、*mspb* (2 个)、*lp78* (6 个)、*nadh oxidase* (3 个)。TMHMM-2.0 分析，各重组蛋白均不含跨膜区，SignalP-5.0 分析，LP78 蛋白的 1-24 个氨基酸序列为信号肽，其余蛋白均不含信号肽序列。通过 PCR 方法扩增各目的基因片段并将 TGA 突变为 TGG，分别获得各片段，然后通过 Overlap PCR 将各突变片段连接，各扩增和连接片段见图 2-1~图 2-6。

图 2-1 Overlap PCR 突变 *dnak* 的 TGA 密码子及全长扩增Fig. 2-1 Overlap PCR mutation of TGA codon and the full length of *dnak*

A: Lane M: DL5000 marker; Lane 1: *dnaK*-1F/1R 扩增产物 (635 bp); Lane 2: *dnaK*-2F/2R 扩增产物 (1190 bp); Lane 3: 阴性对照; B: Lane M: DL5000 marker; Lane 1: 阴性对照; Lane 2-3: *dnaK*-1F/2R 扩增产物 (1788 bp)。

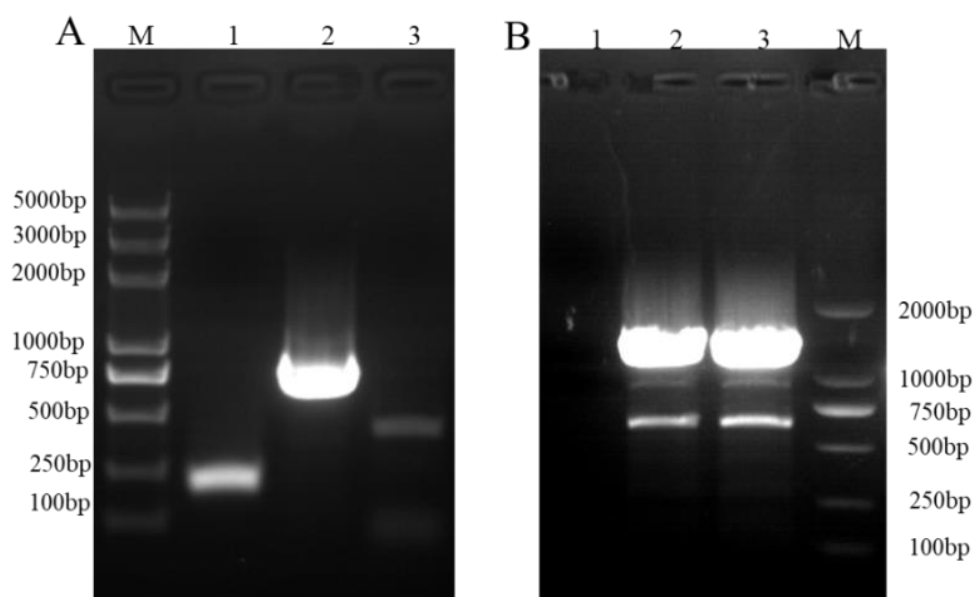


图 2-2 Overlap PCR 突变 *enolase* 的 TGA 密码子及全长扩增

Fig. 2-2 Overlap PCR mutation of TGA codon and the full length of *enolase*

A: Lane M: DL5000 marker; Lane 1: eno-1F/1R 扩增产物 (202 bp); Lane 2: eno-2F/2R 扩增产物 (785 bp); Lane 3: eno-3F/3R 扩增产物 (413 bp); B: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: 阴性对照; Lane 2-3: eno-1F/3R 扩增产物 (1356 bp)。

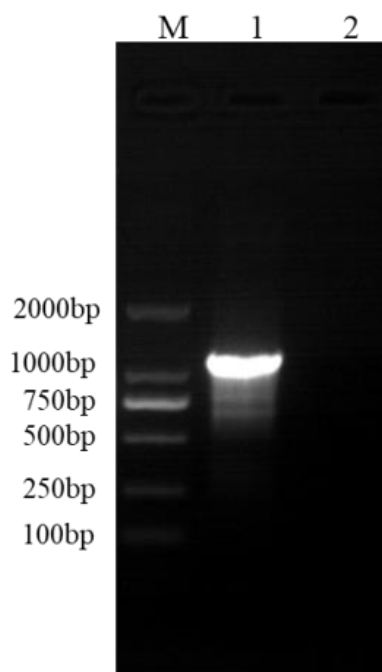


图 2-3 PCR 扩增 *ef-tu* 产物

Fig. 2-3 PCR amplification product of the full length of *ef-tu*

Lane M: DL2000 marker; Lane 1: ef-tu-F/R 扩增产物 (1182 bp); Lane 2: 阴性对照。

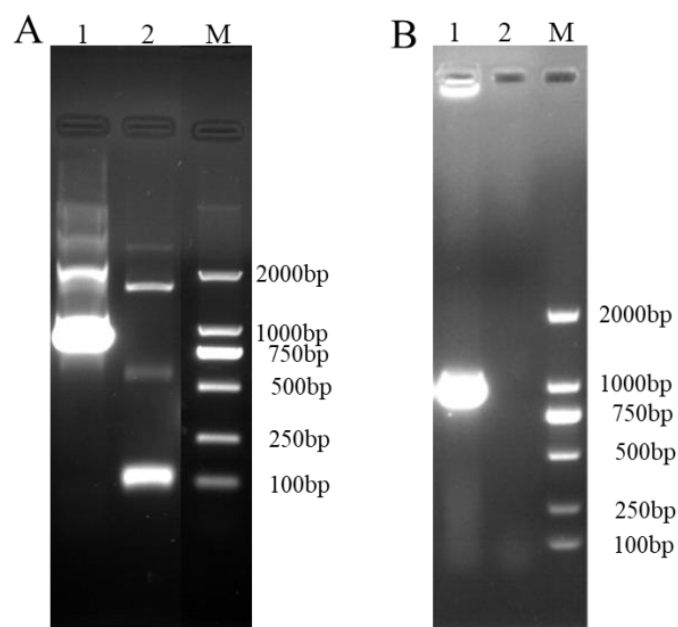


图 2-4 Overlap PCR 突变 *mspB* 的 TGA 密码子及全长扩增

Fig. 2-4 Overlap PCR mutation of TGA codon and the full length of *mspB*

A: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: *mspB*-1F/1R 扩增产物 (857 bp); Lane 2: *mspB*-2F/2R 扩增产物 (108 bp); B: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: *mspB*-1F/2R 扩增产物 (939 bp); Lane 2: 阴性对照。

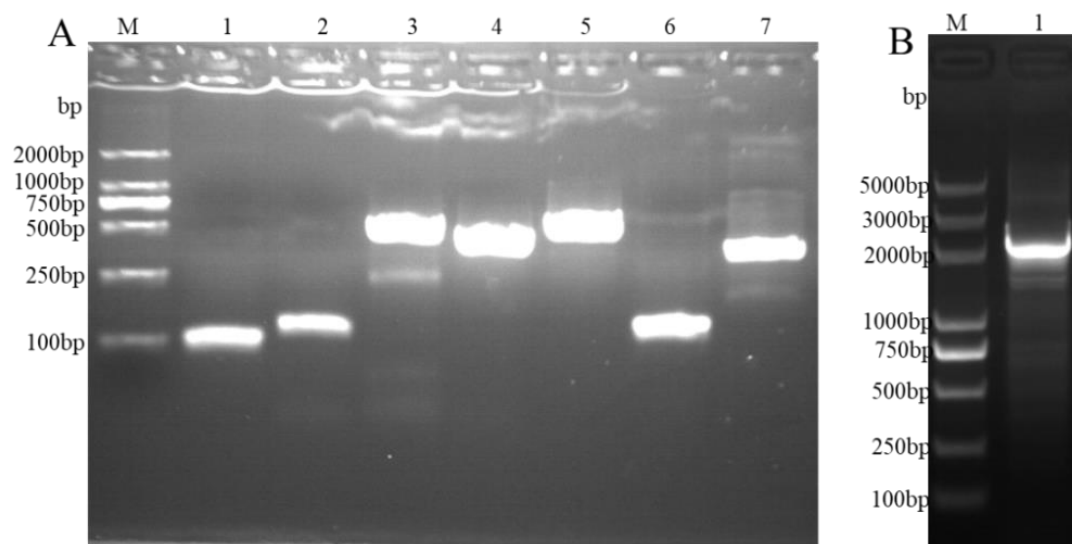


图 2-5 Overlap PCR 突变 *lp78* 的 TGA 密码子及全长扩增

Fig. 2-5 Overlap PCR mutation of TGA codon and the full length of *lp78*

A: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: *lp78*-1F/1R 扩增产物 (99 bp); Lane 2: *lp78*-2F/2R 扩增产物 (126 bp); Lane 3: *lp78*-3F/3R 扩增产物 (552 bp); Lane 4: *lp78*-4F/4R 扩增产物 (482 bp); Lane 5: *lp78*-5F/5R 扩增产物 (611 bp); Lane 6: *lp78*-6F/6R 扩增产物 (129 bp); Lane 7: *lp78*-7F/7R 扩增产物 (398 bp); B: Lane M: DL5000 marker; Lane 1: *lp78*-1F/7R 扩增产物 (2310 bp)。

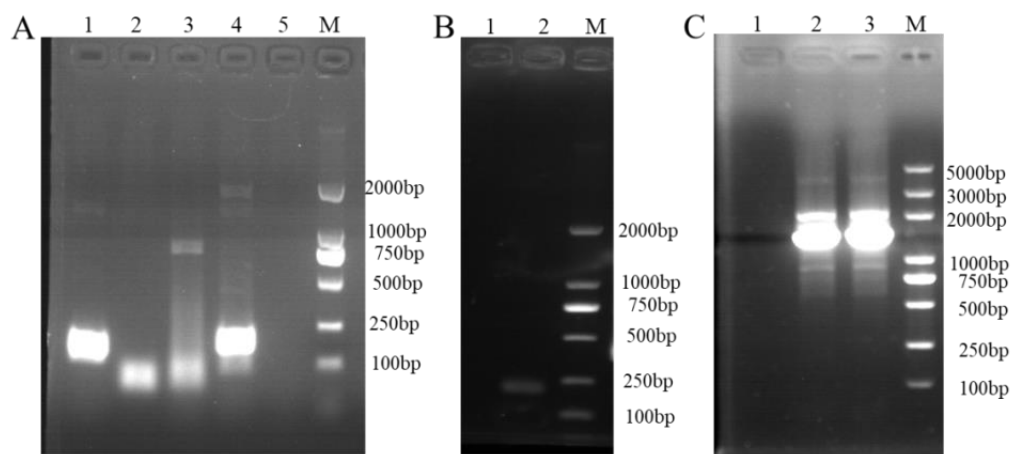


图 2-6 Overlap PCR 突变 *nadh oxidase* 的 TGA 密码子及全长扩增

Fig. 2-6 Overlap PCR mutation of TGA codon and the full length of *nadh oxidase*

A: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: nox-1F/1R 扩增产物 (158 bp); Lane 2: nox-2F/2R 扩增产物 (229 bp); Lane 3: nox-3F/3R 扩增产物 (869 bp); Lane 4: nox-4F/4R 扩增产物 (183 bp); Lane 5: 阴性对照; B: Lane M: DL2000 marker; Lane 1: nox-2F/2R 扩增产物 (229 bp)。C: Lane M: DL5000 marker; Lane 1: 阴性对照; Lane 1: nox-1F/4R 扩增产物 (1374 bp)。

2.3.3 重组蛋白的诱导表达和纯化

将含各目的基因的重组质粒分别转化 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导后, 对各重组蛋白进行 SDS-PAGE, 同时将上清用镍离子亲和层析柱纯化。重组 DnaK (69 kDa)、enolase (53 kDa)、EF-Tu (44 kDa)、MSPB (38 kDa)、LP78 (84 kDa)、NADH (50 kDa) 分别于相应位置附近出现明显条带, 主要以可溶形式存在于诱导菌破碎上清, 可结合镍离子亲和层析柱, 洗脱后于相应位置出现目的条带 (图 2-7~图 2-12)。

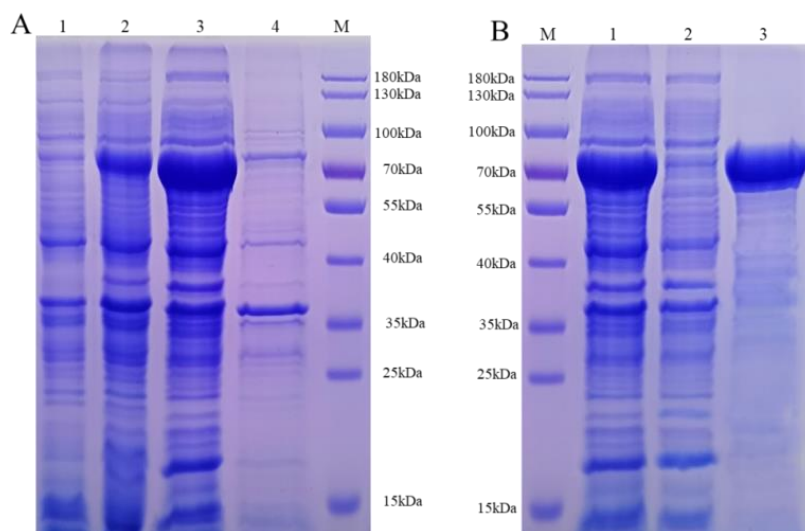


图 2-7 重组 DnaK 蛋白 (69 kDa) 的表达和纯化

Fig. 2-7 Expression and purification of recombinant DnaK (69 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 破碎后上清; Lane 4: 破碎后沉淀。B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 上柱前; Lane 2: 流穿液; Lane 3: 洗脱液。

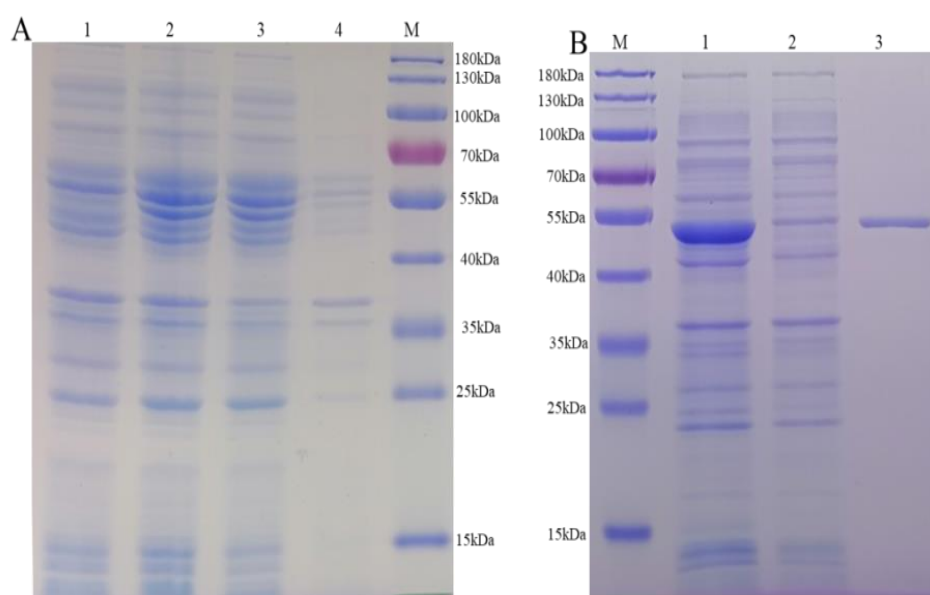


图 2-8 重组 enolase 蛋白（53 kDa）的表达和纯化

Fig. 2-8 Expression and purification of recombinant enolase (53 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 破碎后上清; Lane 4: 破碎后沉淀。B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 上柱前; Lane 2: 流穿液; Lane 3: 洗脱液。

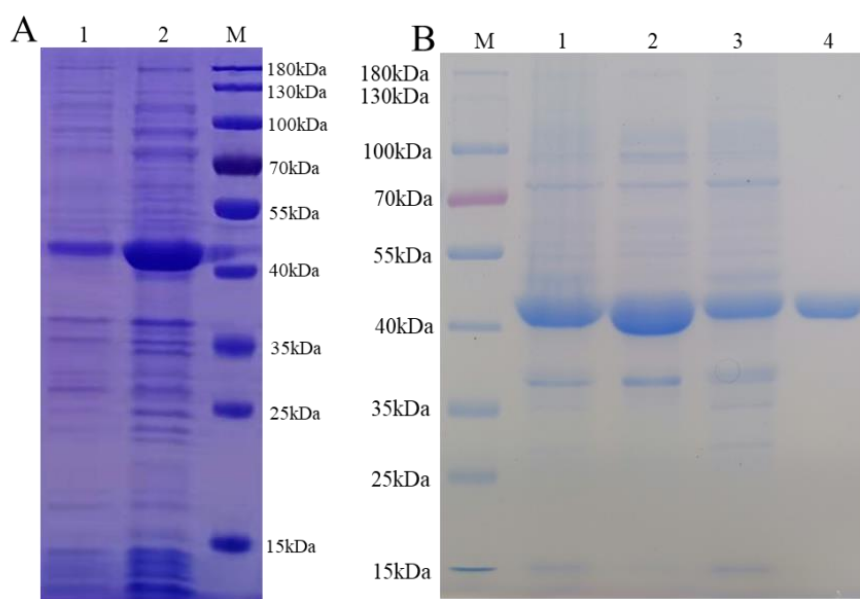


图 2-9 重组 EF-Tu 蛋白（44 kDa）的表达和纯化

Fig. 2-9 Expression and purification of recombinant EF-Tu (44 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 破碎前; Lane 2: 破碎后上清; Lane 3: 破碎后沉淀; Lane 4: 洗脱液。

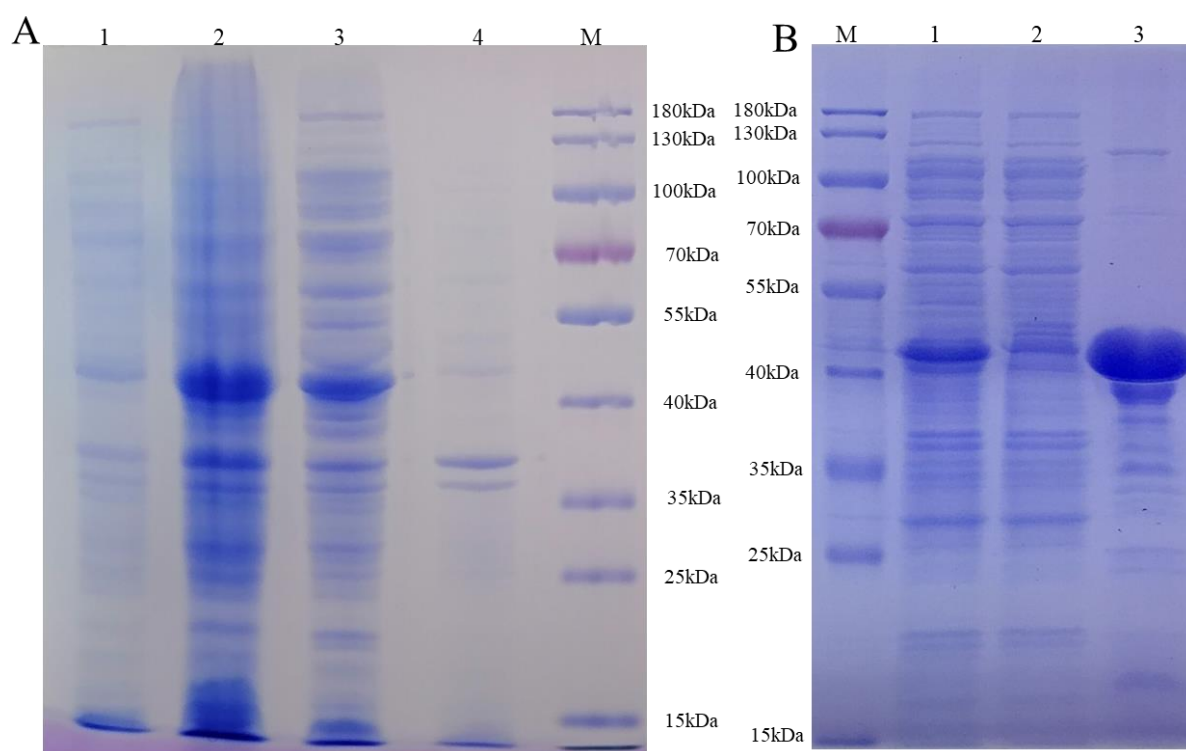


图 2-10 重组 MSPB 蛋白 (38 kDa) 的表达和纯化

Fig. 2-10 Expression and purification of recombinant MSPB (38 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 破碎后上清; Lane 4: 破碎后沉淀; B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 上柱前; Lane 2: 流穿液; Lane 3: 洗脱液。

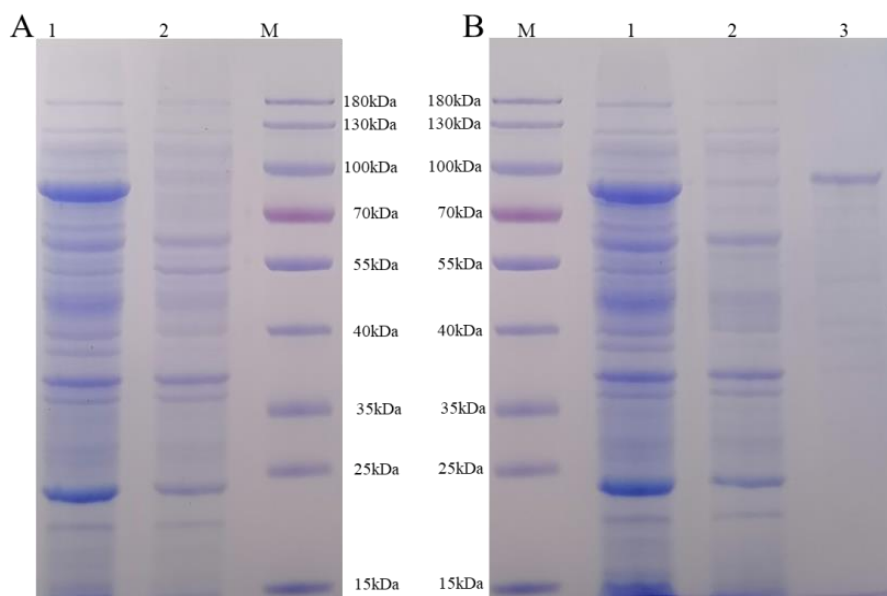


图 2-11 重组 LP78 蛋白 (84 kDa) 的可溶性分析和纯化

Fig. 2-11 Solubility analysis and purification of recombinant LP78 (84 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 破碎后上清; Lane 2: 破碎后沉淀; B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 上柱前; Lane 2: 流穿液; Lane 3: 洗脱液。

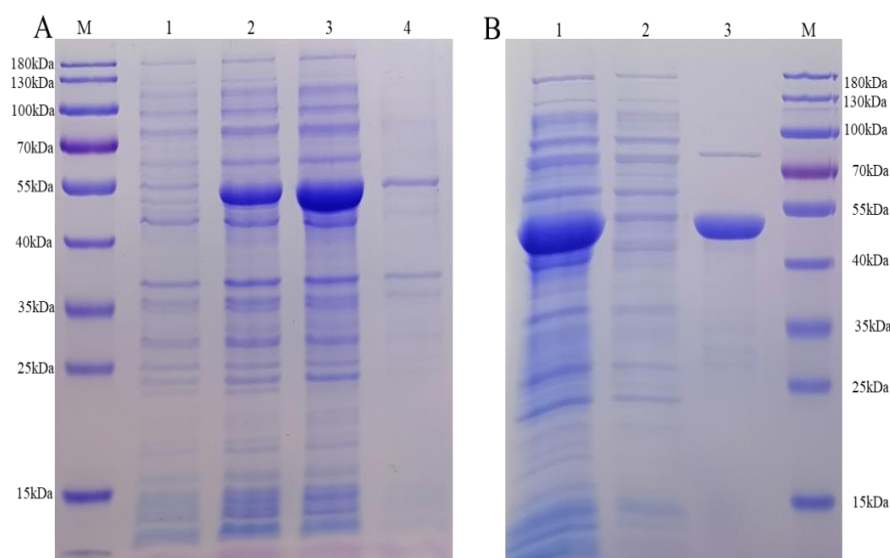


图 2-12 重组 NADH oxidase 蛋白（50 kDa）的表达和纯化

Fig. 2-12 Expression and purification of recombinant NADH oxidase (50 kDa)

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 破碎后上清; Lane 4: 破碎后沉淀; B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 上柱前; Lane 2: 流穿液; Lane 3: 洗脱液。

2.3.4 Western blot 鉴定

将各重组蛋白转膜后，与鼠抗 His 标签单克隆抗体反应，显色后，在相应位置出现目的条带，说明各重组蛋白获得表达且可与 His 标签抗体特异性结合（图 2-13）。

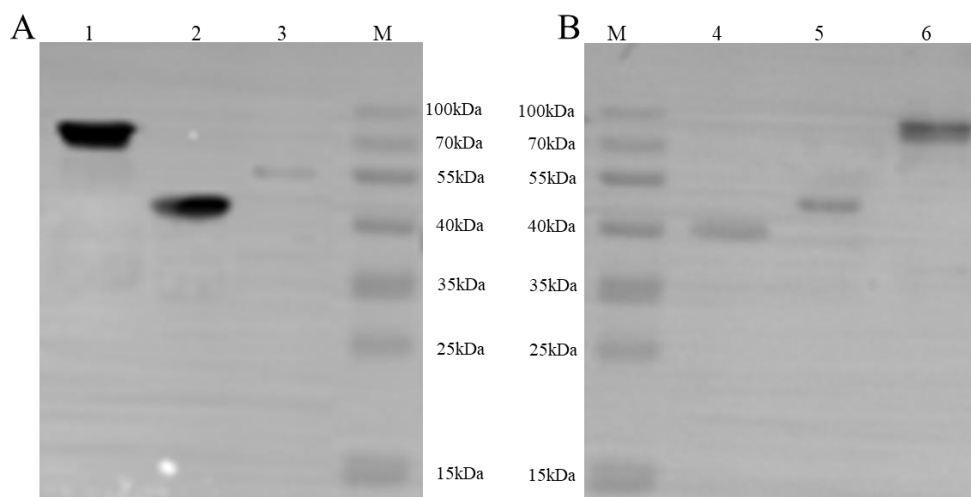


图 2-13 重组蛋白用 His 标签抗体进行 Western blot 鉴定

Fig. 2-13 Identification of the recombinant proteins by Western blot using anti-His-Tag antibody

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: rDnaK; Lane 2: rEF-Tu; Lane 3: rEnolase;

B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 4: rMSPB; Lane 5: rLP78; Lane 6: rNADH oxidase。

2.3.5 重组蛋白的反应原性测定

各重组蛋白与 MS 自然感染鸡血清均可发生反应，其 OD_{450nm} 值 $rMSPB > rLP78 > rNADH > rDnaK > rEF-Tu > rEnolase$ ，说明各蛋白在 MS 感染过程中均可表达（图 2-14）。

此外, 各重组蛋白与 MS 免疫血清均可发生反应而不与阴性血清反应。

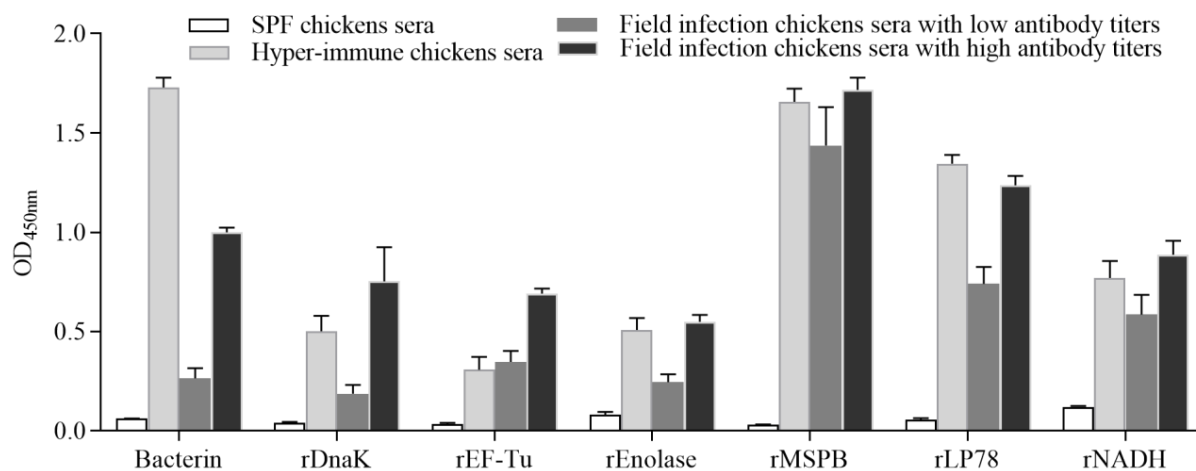


图 2-14 各重组蛋白与 MS 自然感染和免疫鸡血清反应

Fig. 2-14 Reactions among recombinant proteins with MS convalescent sera and immune sera

2.3.6 重组蛋白的亚细胞定位

各重组蛋白鼠多抗 (ELISA 效价 $\geq 1:51200$) 均可识别 MS 全菌蛋白、膜蛋白和胞浆蛋白, 其中重组 enolase、EF-Tu、LP78 和 NADH oxidase 主要分布于 MS 细胞浆, 重组 MSPB 主要分布于 MS 细胞膜, 而重组 DnaK 蛋白在 MS 细胞膜和细胞浆蛋白的分布相近 (图 2-15)。

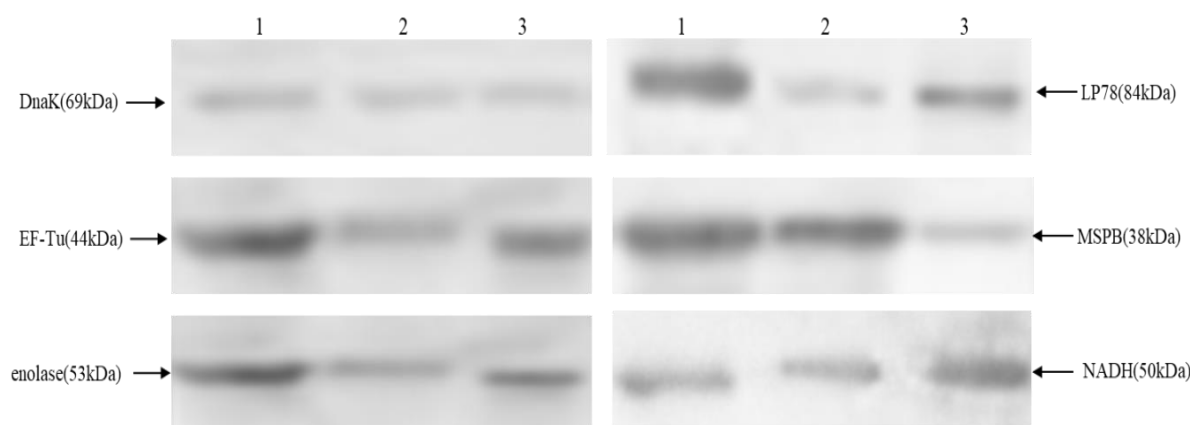


图 2-15 重组蛋白在 MS 的亚细胞定位 Western blot

Fig. 2-15 Subcellular localization of recombinant proteins in MS by Western blot

Lane 1: MS 全菌蛋白; Lane 2: MS 膜蛋白; Lane 3: MS 胞浆蛋白

2.3.7 间接免疫荧光检测重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附

除 rMSPB 外, 各重组蛋白与 DF-1 细胞孵育后, 荧光显微镜下可见绿色荧光, 且该结合可被鼠抗重组蛋白阳性血清抑制, 而未免疫血清不能抑制该结合 (图 2-16)。

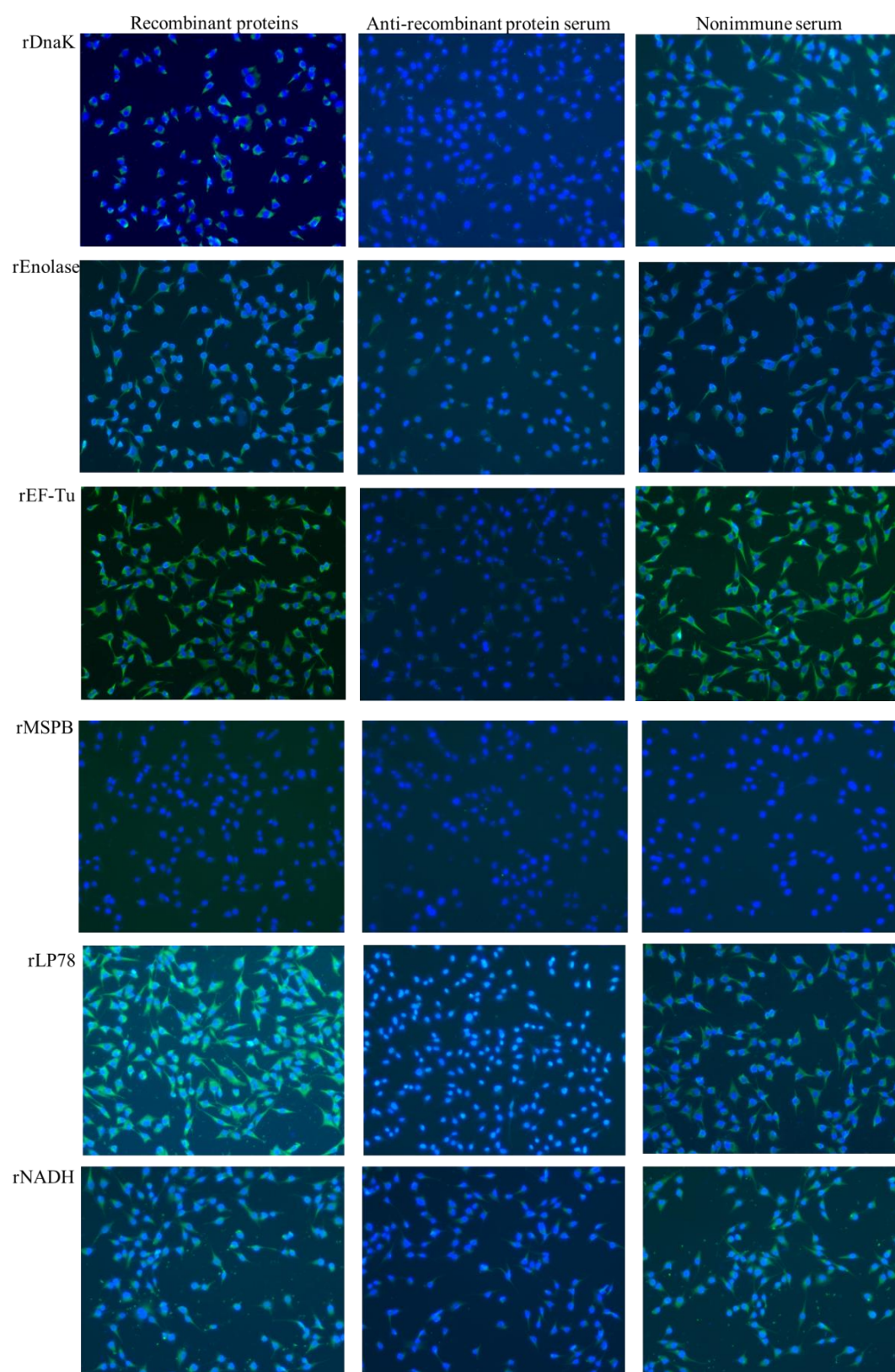


图 2-16 间接免疫荧光检测重组蛋白对 DF-1 细胞的黏附和黏附抑制

Fig. 2-16 Adherence and adherence inhibition of recombinant proteins to DF-1 cells detected by IFA

2.3.8 ELISA 检测重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合

重组蛋白可结合 DF-1 细胞膜蛋白和胞浆蛋白, 其在 $6.25 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值与浓度具有剂量梯度且显著高于对照 ($p < 0.05$), 其中 rMSPB 与 DF-1 细胞膜蛋白结合较弱, $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值为 0.3 左右 (图 2-17)。鼠抗重组蛋白阳性血清可抑制重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白和胞浆蛋白的结合, 随着血清稀释度的升高, $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值逐渐增加 (图 2-18)。

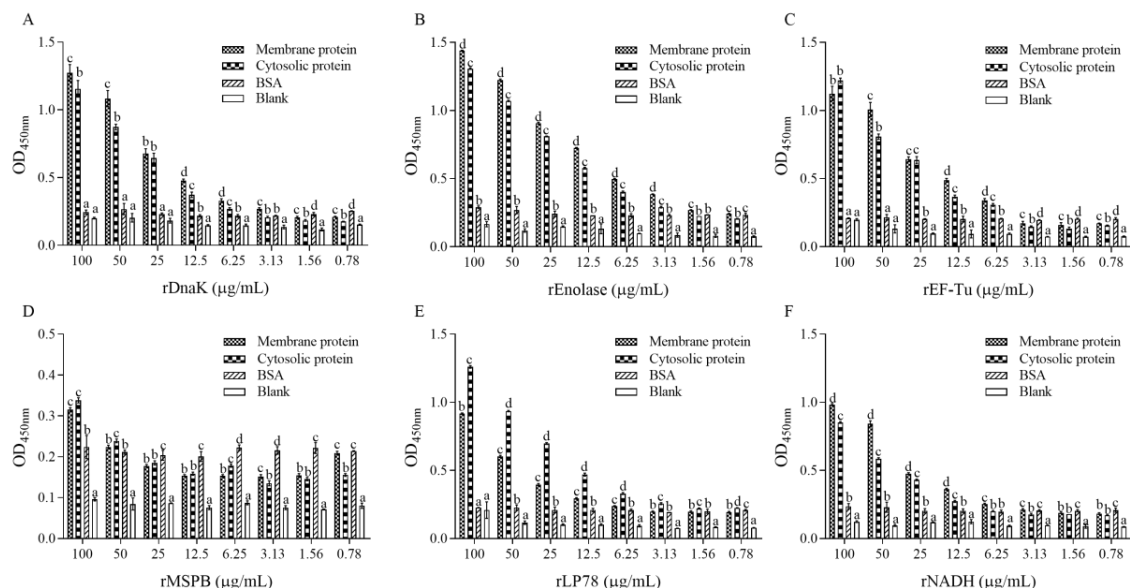


图 2-17 ELISA 检测重组蛋白结合 DF-1 细胞膜蛋白

Fig. 2-17 Binding of recombinant proteins to membrane proteins of DF-1 cells detected by ELISA

注: 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

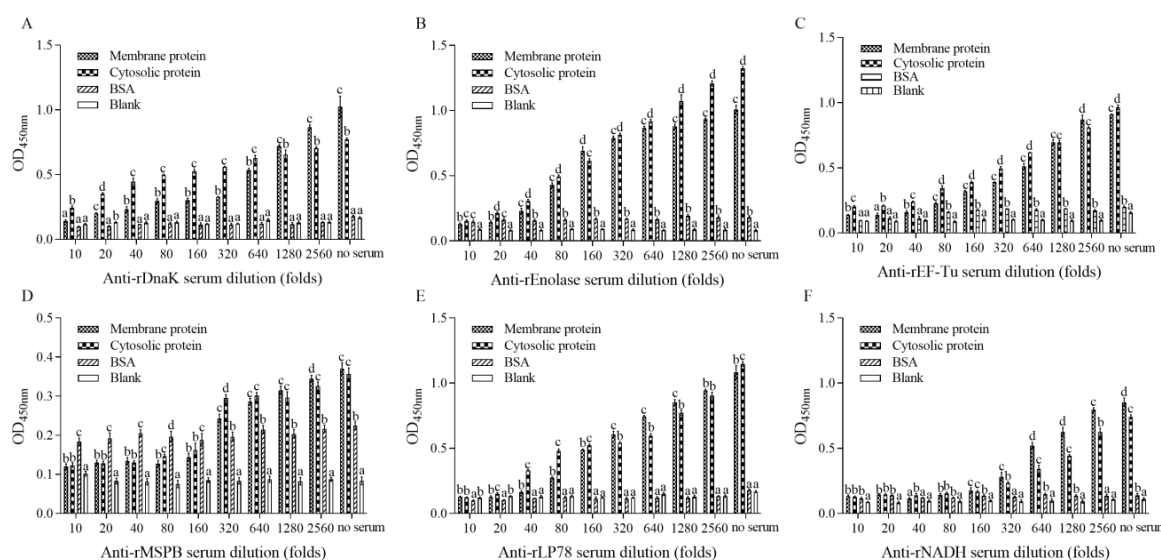


图 2-18 ELISA 检测阳性血清抑制重组蛋白与 DF-1 细胞膜蛋白的结合

Fig. 2-18 Ability of anti-recombinant protein serum in the inhibition of binding to membrane proteins of DF-1 cells detected by ELISA

注: 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.4 讨论

MS-H 株在全世界广泛应用,具有良好的免疫原性和安全性。对 MS-H 株编码 DnaK、enolase、EF-Tu、LP78 和 NADH oxidase 的基因进行生物信息学分析, 其在不同菌株间高度保守, 预示疫苗具有广谱性。MSPB 为 VlhA 蛋白翻译后的裂解产物, 氮端较为保守, 碳端在不同菌株间有较大差异(Noormohammadi et al. 1998)。在本研究中, 对不同菌株 MSPB 序列进行分析, 其同源性的 84.5%~90.2%, 低于其余蛋白。虽然 LP78 氮端含有信号肽, 但其是否为分泌蛋白仍需进一步鉴定。为使各基因在大肠杆菌中表达, 本试验通过 PCR 将 TGA 突变为 TGG, 并将构建的 6 个含候选基因的表达载体分别转化大肠杆菌进行诱导表达。可溶性分析表明, 6 个候选蛋白均以可溶形式表达。检测 MS 感染鸡血清, 6 个重组蛋白均可识别, 说明该蛋白在 MS 感染过程中表达。

支原体主要通过其表面的黏附素、辅助蛋白、酶等突破宿主防御屏障并在体内定殖和扩散, 产生代谢产物等毒素样物质, 进而对宿主细胞产生破坏(Krause et al. 1983; Krause et al. 1982)。有报道 enolase 和 NADH oxidase 可在 MS 细胞膜表达且为黏附蛋白(Bao et al. 2014; Hu et al. 2022)。猪鼻支原体 DnaK 和猪肺炎支原体 EF-Tu 经鉴定为黏附蛋白(Li et al. 2022b; Yu et al. 2018)。本研究证实 DnaK、EF-Tu 和 LP78 也可在 MS 膜上表达且具有黏附 DF-1 细胞的功能。在黏附细胞试验中, 重组 MSPB 与 DF-1 细胞孵育后未观察到明显的荧光, 同时, 其与细胞膜蛋白未见明显结合, 说明重组 MSPB 可能不具有黏附细胞的作用。由于支原体对细胞的黏附可能是多蛋白协同作用, 同时抗 MSPB 血清可抑制 MS 菌落对鸡红细胞的吸附(Khiari et al. 2012), MSPB 在 MS 黏附 DF-1 细胞中的作用仍需进一步研究。有报道 EF-Tu 和 enolase 在支原体感染细胞过程中大量表达, DnaK、MSPB 和 NADH oxidase 在强毒力菌株表达量高于弱毒株, 为支原体潜在的毒力因子(Li et al. 2022b; Narat et al. 1998; Yu et al. 2018; Zhao et al. 2017)。

2.5 小结

(1) 本研究成功构建了表达 *dnak*、*enolase*、*ef-tu*、*mspb*、*lp78* 和 *nadh oxidase* 的原核表达载体, 各重组蛋白在大肠杆菌均可获得可溶性表达。

(2) 重组蛋白均可与 MS 感染鸡血清反应, 亚细胞定位各重组蛋白均可在 MS 膜上表达, 除 rMSPB 外, 重组蛋白均可黏附 DF-1 细胞并结合细胞膜蛋白。

第三章 滑液囊支原体的六个主要免疫原性蛋白对鸡的免疫保护效果评价

黏附素及黏附辅助蛋白是 MS 优选保护性蛋白。在上一章节中,我们表达了六个 MS 主要免疫原性蛋白,除 MSPB 外,重组 DnaK、enolase、EF-Tu、LP78 和 NADH oxidase 均可黏附 DF-1 细胞。MS 感染可导致鸡出现滑膜炎和或气囊炎,但不同菌株的致病性及表现出的临床症状差异较大,同一菌株不同接种途径所引起的临床症状也有较大区别(Hinz et al. 2003; 侯博 等. 2021)。目前临床广泛使用的 MS-H 株活疫苗在进行效力评价时,主要以对气囊炎的预防效果作为指标(Jones et al. 2006c)。国内在进行 MS 活疫苗研究时,也主要以疫苗预防气囊炎的效果作为评价指标(魏泽华 2020)。国内在开展 MS 灭活疫苗研究时,既有以疫苗对滑膜炎(如爪垫肿胀等)的预防效果进行评价,也有以预防气囊炎等作为判定标准(Gong et al. 2020; Zhang et al. 2023a; 丁美娟 2013)。在进行 MS 亚单位疫苗评价时,研究者主要对疫苗免疫减轻 MS 所致气囊炎等呼吸系统损伤进行评价(Zhang et al. 2023a)。

本实验室近年来对陕西省周边发生 MS 养殖场进行检测和调查,MS 在气管中检出率较高,感染鸡大多出现气囊炎。据此,本研究拟使用从患有气囊炎症状鸡群分离的 MS W1 株对各重组蛋白的免疫保护效果进行评价,主要研究内容如下:

3.1 材料

3.1.1 菌种与实验动物

滑液囊支原体 W1 株,2022 年分离自陕西某养殖公司患有气囊炎的 2 月龄海兰褐鸡;表达 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78、NADH oxidase 的重组 BL21(DE3) 菌,均由本实验室构建和保存。1 日龄海兰褐鸡,由杨凌周边某养殖公司提供,该公司雏鸡购自国内某支原体等疫病净化场,试验鸡的支原体、禽白血病等病原的核酸或抗体经检测均为阴性。

3.1.2 主要试剂

新支二联活疫苗(La Sota 株+H52 株),购自青岛易邦生物工程有限公司;鸡滑液支原体灭活疫苗,购自国内某生物制品公司;鸡 γ -干扰素和 IL-4 ELISA 检测试剂盒,购自武汉赛培生物科技有限公司;鸡外周血淋巴细胞提取试剂盒,购自北京索莱宝科技有限公司;细胞增殖活性检测试剂盒(MTT),购自碧云天;RPMI1640 培养基,购自 HyClone;PerfectStart Green qPCR SuperMix,购自北京全式金生物技术有限公司;其它试剂同 2.1.3。

3.1.3 主要仪器设备

荧光定量基因扩增仪 (Bio-Rad), 其它所用仪器设备同 2.1.4。

3.2 方法

3.2.1 动物饲养和管理

将海兰褐蛋鸡于动物房饲养, 自由饮食。试验前采集鸡咽喉拭子和血清, 分别用 PCR 方法和实验室建立的 MS ELISA 抗体检测方法检测。

3.2.1.1 PCR 检测

将采集的拭子置于生理盐水, 充分振荡混匀, 然后用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA。参照《禽支原体 PCR 检测方法》(NY/T 553-2015), 设计引物, 用于扩增 MS (211 bp) 和 MG (186 bp) 的 16s RNA, 引物由北京擎科生物科技有限公司合成, 序列如下:

MS-F: 5'-GAGAAGCAAAATAGTGATATC-3';

MS-R: 5'-CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA-3';

MG-F: 5'-GAG CTAATCTGTAAAGTTGGT C-3';

MG-R: 5'-GCT TCCTTGCGGTTAGCA AC-3'。

PCR 扩增体系为 25 μL : H_2O (9.5 μL), DNA 模板 (2.0 μL), Premix (12.5 μL), 上、下引物 (10 pmol/ μL) 各 0.5 μL 。PCR 扩增程序: 94°C 变性 5 min, 94°C 变性 30 秒、55°C 退火 30 s、72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

3.2.1.2 抗体检测

用实验室建立的滑液囊支原体重组 MSPB 间接 ELISA 抗体检测方法对血清进行检测, 具体操作见第五章。

3.2.2 MS 的培养及含量测定

将 MS (W1 株) 冻存菌种复苏后, 按 10% 比例 (v/v) 接种改良 Frey 液体培养基, 37°C、5% CO_2 培养 48 h, 待培养基颜色变黄时收获菌液。将收获的菌液进行 10 倍系列稀释至 10^{-10} , 然后将各稀释度培养物接种改良 Frey 液体培养基培养 168 h, 使培养基颜色发生变化所对应的最高稀释度为待测菌液的 CCU。

3.2.3 MS (W1 株) 感染鸡模型的建立

将 49 日龄鸡随机分成 5 组, 每组 10 只。第 1 组 (MS) 鸡于 49 日龄时经爪垫和气管途径各接种 0.2 mL MS 菌液 (10^8 CCU/mL); 第 2 组 (MS (H) +NDV-IBV) 和第 3 组 (MS (L) +NDV-IBV) 鸡于 44 日龄时经气管途径接种新支二联活疫苗 1 羽份, 49 日龄时经爪垫和气管途径各接种 0.2 mL MS 菌液, 菌液浓度分别为 10^8 CCU/mL 和 10^7 CCU/mL; 第 4 组为新支疫苗对照 (NDV-IBV control), 于 44 日龄时经气管途径接种新支二联活疫苗 1 羽份; 第 5 组为空白对照 (Blank control), 经爪垫和气管途径各接种 0.2

mL 生理盐水。

3.2.3.1 临床症状及剖检病变

接种后每日观察鸡的精神、食欲和饮水等。接种后 14 日剖检，观察爪垫和气囊（胸气囊和腹气囊）病变，并按文献(Kleven et al. 1975)对爪垫和气囊损伤分别进行评分。

爪垫损伤（0~4 分）：0 分（无明显病变）；1 分（肿胀，疑似肿胀）；2 分（轻微肿胀）；3 分（明显肿胀）；4 分（同 3 分，但更严重）。

气囊损伤（0~4 分）：0 分（气囊透明，无增厚或浑浊损伤）；1 分（可见淋巴滤泡病变或气囊膜出现轻微云状浑浊）；2 分（气囊膜轻度增厚，通常有少量干酪样渗出物聚集）；3 分（气囊膜显著增厚并且出现肉变，有单一气囊具有大量干酪样渗出物聚集）；4 分（和 3 分类似，但有 2 个或 2 个以上气囊出现病变）。

3.2.3.2 qPCR 检测气管拭子的 MS 载量

采集感染后 3、7、10、14 日气管拭子，置于生理盐水，充分振荡混匀。用商品化细菌基因组提取试剂盒提取气管拭子 MS 核酸。用实时荧光定量 PCR（Real-time quantitative PCR, qPCR）对拭子样品中 MS 载量进行检测。所用引物针对 MS 16sRNA，其序列见 3.2.1.1。体系如下：Green qPCR Super Mix 12.5 μL ，上下游引物各 0.5 μL ，模板 2 μL ，水 9.5 μL 。扩增步骤为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s（读取荧光），40 个循环；65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5s。以已知浓度的含有 MS 16sRNA 片段的阳性质粒作为标准品，建立浓度（copies/ μL ）和 Ct 值标准曲线，根据样品 Ct 值计算浓度。

3.2.4 重组亚单位疫苗的制备

3.2.4.1 抗原的制备

将表达 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78、NADH oxidase 的重组 BL21（DE3）菌复苏后，按 2.2.4 项进行培养，收获诱导后菌液，破碎后，将上清使用镍离子亲和层析柱进行纯化。将各重组蛋白透析后，用 0.22 μm 滤膜过滤，滤液用 BCA 法进行蛋白浓度的测定。

3.2.4.2 重组蛋白浓度的测定

用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各重组蛋白的浓度。将 BSA 标准品分别稀释成 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、750 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 。将不同浓度的 BSA 标准品和待测样品加入到 96 孔酶标板，25 μL /孔，然后每孔加入 200 μL BCA 工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，测定 OD_{562nm} 吸光度。绘制标准品浓度与吸光度的标准曲线，根据标准曲线计算出待检样品的蛋白浓度。

3.2.4.3 疫苗的制备

将重组蛋白（200 $\mu\text{g/mL}$ ）分别与 ISA206 VG 佐剂等质量混合，于 32 $^{\circ}\text{C}$ 充分乳化，2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.2.5 疫苗免疫

将 100 只 21 日龄海兰褐鸡分成 10 组，10 只/组，分组如下：组 1 (rDnaK)、组 2 (rEnolase)、组 3 (rEF-Tu)、组 4 (rMSPB)、组 5 (rLP78)、组 6 (rNADH)、组 7 (商品苗)、组 8 (攻毒对照)、组 9 (新支疫苗对照)、组 10 (空白对照)。将制备的重组蛋白亚单位疫苗连同商品化 MS 灭活疫苗分别经颈部皮下途径接种 21 日龄海兰褐鸡，0.5 mL/只 (50 μ g/只)，间隔 14 日进行二免，对照鸡免疫相同剂量的生理盐水 (图 3-1)。

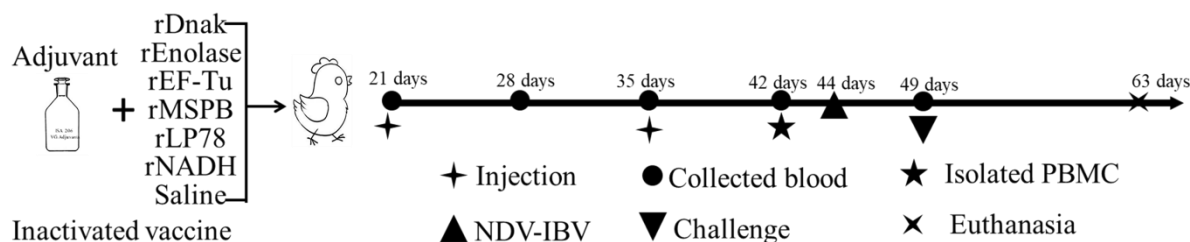


图 3-1 重组亚单位疫苗免疫和攻毒试验示意图

Fig. 3-1 Schematic diagram of the immunization and challenge experiment in chickens

3.2.6 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体

采集免疫前和免疫后 7、14、21 和 28 日血清，用间接 ELISA 检测血清中特异性抗体。将各重组蛋白和 MS 菌体用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 9.6) 分别稀释至最适包被浓度，2~8℃包被过夜。弃包被液，用 PBST 洗涤 3 次后，加入含 5%脱脂奶粉的 PBST 进行封闭，37℃封闭 2 h。将待检血清分别用 PBS 稀释，然后取 100 μ L 加至酶标板，37℃反应 2 h。用 PBST 洗涤 3 次后，每孔加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的兔抗鸡 IgY 抗体 100 μ L，37℃反应 1 h。用 PBST 洗涤 3 次后，每孔加入 50 μ L TMB 底物溶液，37℃避光显色 15 min，加入 2 mol/L H_2SO_4 终止，测定各孔 OD_{450nm} 值。

3.2.7 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定

疫苗免疫后 21 日，采集各免疫组的鸡血清，用商品化鸡 IFN- γ 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒按说明书进行含量测定。具体操作如下：将标准品和待检样品用稀释液稀释 2 倍后，取 50 μ L 加入反应孔，然后立即加入 50 μ L 生物素标记的抗 IFN- γ 或 IL-4 抗体，37℃孵育 1 h。弃去孔内液体，加入洗涤液，振荡 30 s，共洗涤 3 次，最后 1 次拍干，然后加入 50 μ L 的 HRP 标记的亲合链酶素，轻轻振荡混匀，37℃孵育 30 min，弃去孔内液体，再次洗涤 3 次。每孔加入显色液，37℃反应 10 min，测定各孔 OD_{450nm}。根据标准品含量，建立 OD_{450nm} 与浓度标准曲线。根据待检样品 OD_{450nm} 计算其含量。

3.2.8 淋巴细胞增殖试验

采集免疫后 21 日鸡抗凝全血，用鸡外周血淋巴细胞分离试剂盒分离淋巴细胞。将抗凝血全血用组织稀释液进行等体积稀释，然后加至淋巴细胞分离液表面。室温下水平离心，2200 r/min 离心 20 min，此时离心管中出现分层，小心吸取血浆与分离液之间的

白膜层即淋巴细胞层。将淋巴细胞用 10 mL 细胞洗涤液洗涤 3 次, 1000 r/min 离心 10 min。将淋巴细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基调至 1×10^6 cells/mL, 然后以 100 μ L/孔加至 96 孔板。将各重组蛋白用 RPMI1640 完全培养基稀释至 50 μ g/mL, 然后加至 96 孔板, 每孔 100 微升, 阴性对照加入 100 μ L 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 h。每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 轻微晃动使均匀, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。弃去细胞培养物, 每孔加入 100 μ L Formazan 溶解液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3~4 h。测定各孔 OD_{570nm} 值, 计算刺激指数 SI=(样本 OD_{570nm} 值-空白 OD_{570nm} 值)/(阴性 OD_{570nm} 值-空白 OD_{570nm} 值)。

3.2.9 攻毒

二免后 14 日(49 日龄)攻毒, 攻毒前 5 日(44 日龄), 各疫苗免疫组、攻毒对照组及新支疫苗对照组的鸡经气管途径接种新支二联活疫苗, 1 羽份/只。攻毒时, 疫苗免疫组和攻毒对照组经气管途径接种 MS W1 株菌液 (10^8 CCU/mL), 0.2 mL/只, 而新支疫苗免疫组和空白对照组经气管途径接种空白培养基。采集攻毒后 14 日气管拭子, 按 3.2.3 项提取 MS 基因组, 并用 qPCR 对拭子中 MS 载量进行测定。攻毒后 14 日剖检, 观察气囊损伤, 并按 3.2.3 项对气囊损伤进行评分。同时取剖检鸡的气管, 用 4% 多聚甲醛固定, 经过脱水、包埋和切片后, 用苏木精和伊红分别进行染色, 然后对气管黏膜厚度进行测定。

3.2.10 统计分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 使用 IBM SPSS Statistics 20 统计软件进行方差分析。 p 值 <0.05 表示差异显著, p 值 <0.01 表示差异极显著。

3.3 结果

3.3.1 MS (W1 株) 感染鸡模型的建立

3.3.1.1 大体剖检病变

接种前, 试验鸡气管拭子 MS 核酸和血清中 MS 抗体均为阴性。W1 株接种后第 2 日, 接种鸡出现咳嗽、甩头等呼吸道症状, 持续 3~5 日逐渐恢复正常, 而对照鸡正常。接种后第 14 日剖检, MS+NDV-IBV 组和 MS 组均有 9/10 鸡出现气囊炎, 而前者的气囊损伤评分 (3.1 ± 1.1) 显著 ($p < 0.05$) 较后者 (2.1 ± 0.6) 高(图 3-2)。MS (L)+NDV-IBV 组有 7/10 鸡出现气囊炎, 其气囊损伤评分 (2.5 ± 1.2) 较 MS (H)+NDV-IBV 组低, 但差异不显著 ($p > 0.05$) (表 3-1)。接种鸡在试验期间均未观察到跛行等关节炎症。除 MS (H)+NDV-IBV 组有 2 只鸡出现轻微爪垫肿胀外, 其余组鸡的爪垫均正常(表 3-1)。

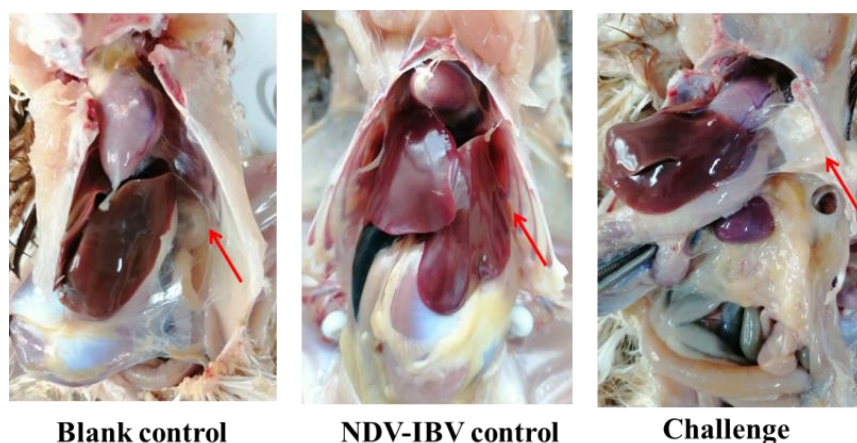


图 3-2 滑液囊支原体 W1 株感染鸡的气囊炎病变

Fig. 3-2 Air sac lesions of chickens after challenge with MS strain W1

表 3-1 滑液囊支原体 W1 株感染鸡的气囊和爪垫病变

Table 3-1 Lesions of air sac and foot pad of chickens after challenge with MS strain W1

组别	浓度	新支疫苗	气囊损伤	发病率	爪垫损伤	发病率
Group	Concentration	NDV-IBV	Air sac lesion	Incidence	Foot pad lesion	Incidence
MS	10^8 CCU/mL	/	2.1 ± 0.6^a	9/10	0	0
MS(H)-NDV-IBV	10^8 CCU/mL	1 羽份	3.1 ± 1.1^b	9/10	0.5 ± 0.8	2/10
MS(L)-NDV-IBV	10^7 CCU/mL	1 羽份	2.5 ± 1.2^{ab}	7/10	0.3 ± 0.5	0
NDV-IBV control	/	1 羽份	0	0	0	0
Blank control	/	/	0	0	0	0

注：相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3.3.1.2 qPCR 检测气管拭子的 MS 载量

用 qPCR 检测感染后不同时间气管拭子的 MS 载量。MS+NDV-IBV 组和 MS 组均可检出 MS，且 MS 载量在感染后第 7 日最高，而对照组为阴性（图 3-3）。虽然 MS (H) +NDV-IBV 组的 MS 载量高于 MS 组，但仅在感染后第 7 日差异显著 ($p < 0.05$)。

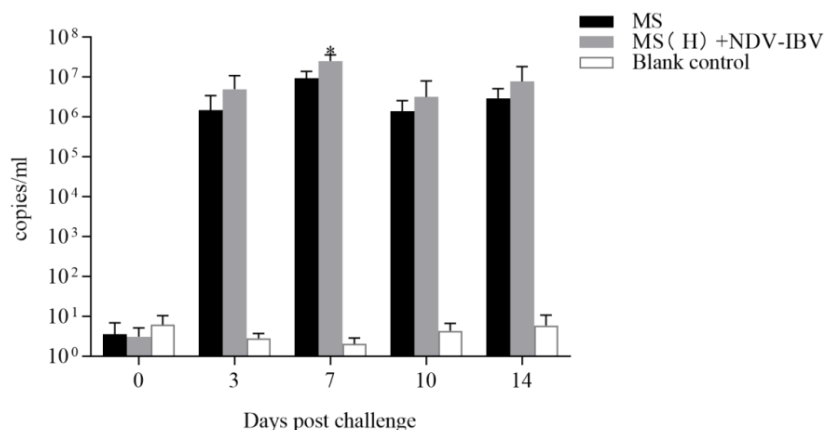


图 3-3 qPCR 检测 W1 株接种后不同时间鸡气管拭子中的 MS 载量

Fig. 3-3 Mean values of the number of MS genomic copies in tracheal swabs from chickens inoculated with strain W1 at different days by qPCR

注：“※”表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3.3.2 重组亚单位疫苗的制备

重组蛋白纯化后电泳，均于相应位置出现目的条带（图 3-4）。BCA 法测定各重组蛋白的浓度分别为 2.229 mg/mL(rDnaK)、0.211 mg/mL(rEnolase)、0.389 mg/mL(rEF-Tu)、1.170 mg/mL (rMSPB)、1.455 mg/mL (rLP78)、0.712 mg/mL (rNADH oxidase)。将各重组蛋白稀释至 200 μ g/mL，然后分别与 ISA 206VG 佐剂乳化。

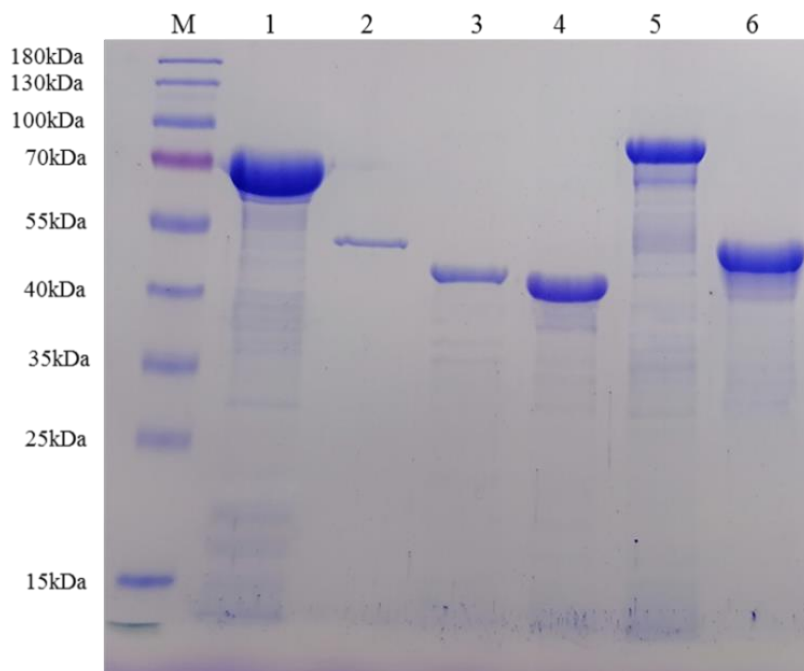


图 3-4 重组蛋白纯化后的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3-4 Identification of the purified recombinant proteins by SDS-PAGE

Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: rDnaK; Lane 2: rEnolase; Lane 3: rEF-Tu; Lane 4: rMSPB; Lane 5: rLP78; Lane 6: rNADH oxidase。

3.3.3 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体

免疫后 7 日，各疫苗免疫组血清的 OD_{450nm} 值升高，免疫后 21 日，rEnolase、rEF-Tu 和 rLP78 组的 OD_{450nm} 值达到峰值，而 rDnaK、rMSPB、rNADH 组和商品疫苗组的 OD_{450nm} 值于免疫后 28 日达到峰值（图 3-5）。

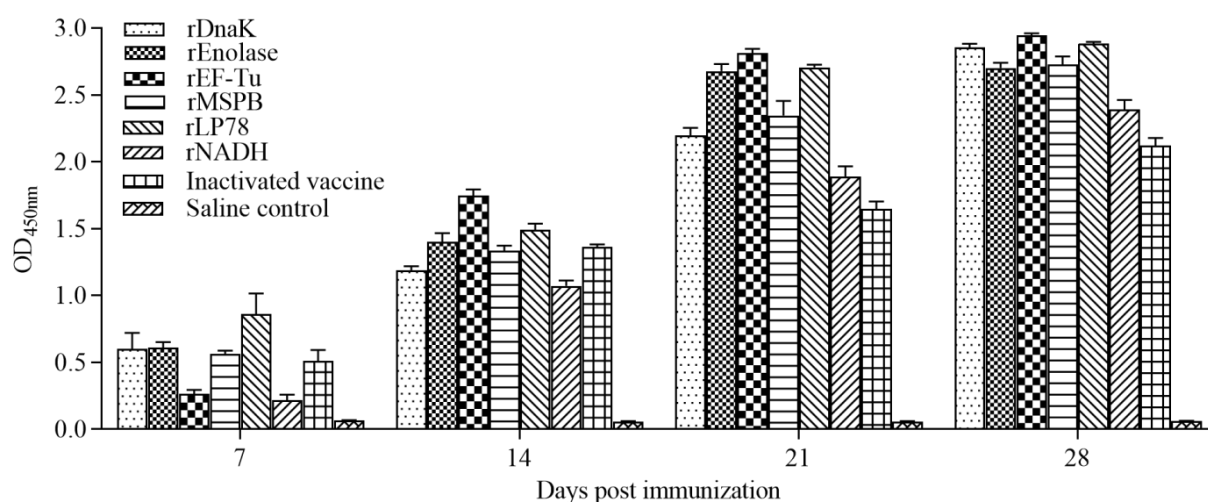


图 3-5 重组蛋白免疫鸡后不同时间血清中抗体的 ELISA 检测

Fig. 3-5 Antibodies levels in sera of chickens after the inoculation of recombinant subunit vaccines at different days after immunization detected by ELISA

注：各重组蛋白检测时的抗原包被浓度和血清稀释度分别是：rDnaK（100 ng/well，1/400）、rEnolase（20 ng/well，1/200）、rEF-Tu（100 ng/well，1/600）、rMSPB（20 ng/well，1/400）、rLP78（100 ng/well，1/600）、rNADH（20 ng/well，1/400）。

3.3.4 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定

相对于生理盐水对照组，rEnolase、rEF-Tu、rMSPB、rLP78 组和商品疫苗组鸡的血清中 IFN- γ 水平在免疫后 14 日显著（ $p < 0.05$ ）升高；免疫后 21 日，各疫苗组鸡的血清中 IFN- γ 含量均显著（ $p < 0.05$ ）升高，其中 rEnolase 组和 rEF-Tu 组显著（ $p < 0.05$ ）高于商品疫苗组（图 3-6）。

免疫后 14 和 21 日，各疫苗组鸡的血清中 IL-4 水平均显著（ $p < 0.05$ ）升高，除 rEnolase 组在免疫后 21 日较商品疫苗低外，其余组与商品疫苗组无显著差异（ $p > 0.05$ ）（图 3-6）。

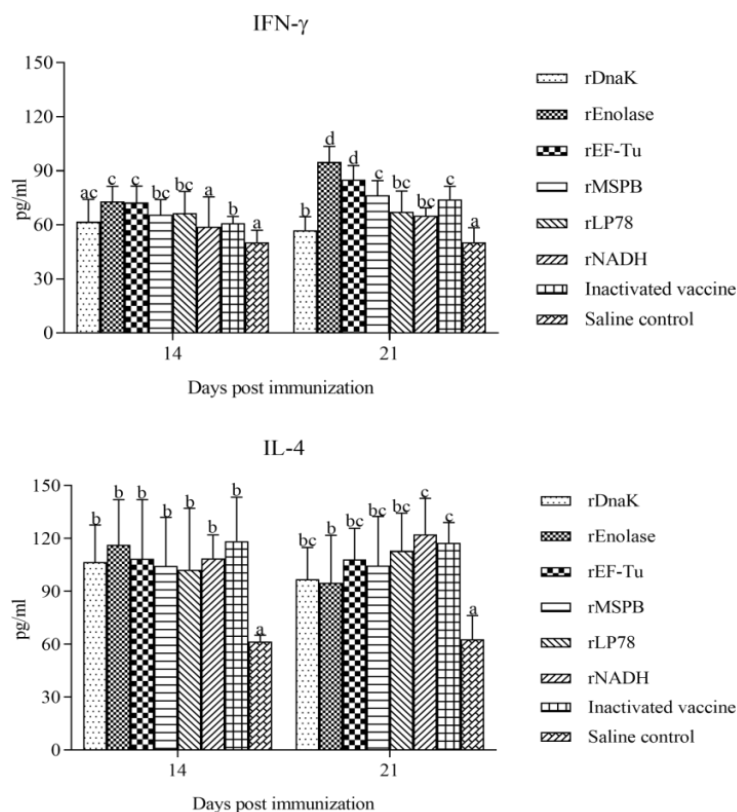
图 3-6 重组蛋白免疫鸡血清中 IFN- γ 和 IL-4 的 ELISA 测定

Fig. 3-6 Measurement of the levels of IFN- γ and IL-4 in serum from the immunized chickens by ELISA

注：相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

3.3.5 淋巴细胞增殖试验

免疫组和对照组鸡的外周血淋巴细胞分别用重组蛋白刺激。与生理盐水对照组相比，重组亚单位疫苗组的 SI 值均显著 ($p<0.01$) 升高，商品疫苗组的 SI 值也显著 ($p<0.05$) 升高。与商品疫苗组相比，rDnaK、rEnolase 和 rMSPB 组的 SI 值显著 ($p<0.05$) 升高，而其余亚单位疫苗组与商品疫苗组无显著差异 ($p>0.05$) (图 3-7)。

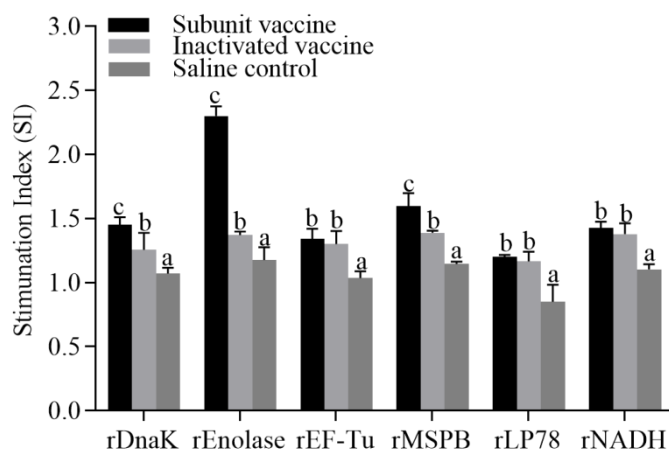


图 3-7 免疫鸡外周血淋巴细胞增殖试验

Fig. 3-7 Lymphocyte proliferative assays of peripheral blood lymphocytes from the immunized chickens

注：相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

3.3.6 攻毒

3.3.6.1 气管拭子 MS 载量

攻毒后 14 日, qPCR 测定各组鸡的气管拭子中 MS 载量均大于 $10^{5.0}$ copies/mL (图 3-8)。相对于攻毒对照组, rEnolase、rEF-Tu、rMSPB 组和商品疫苗组鸡的气管拭子中 MS 载量显著 ($p < 0.05$) 降低, 而 rDnaK、rLP78 和 rNADH 组无显著差异 ($p > 0.05$)。与商品疫苗组相比, rEnolase 和 rMSPB 组鸡的气管拭子中 MS 载量无显著差异 ($p > 0.05$)。

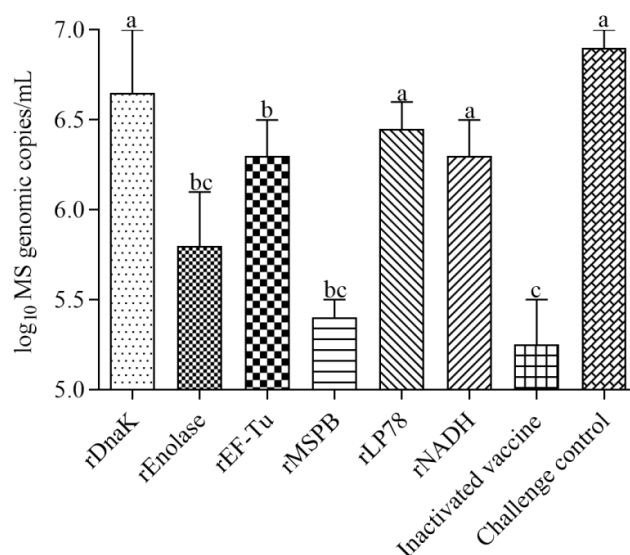


图 3-8 qPCR 检测攻毒后 14 日鸡的气管拭子中 MS 的载量

Fig. 3-8 Mean values of the number of MS genomic copies in tracheal swabs from chickens at 14 days after challenge detected by qPCR

注: 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3.3.6.2 气囊损伤评分和气管粘膜厚度测定

攻毒后 14 日剖检, 攻毒对照组的气囊出现大量干酪样渗出物, 而新支活疫苗对照组除 1 只气囊膜增厚外, 其余均正常, 空白对照组的气囊全部正常 (图 3-9A)。疫苗免疫组的鸡攻毒后有 7/10~10/10 出现不程度的气囊炎, 其发病率同攻毒对照组相比虽有降低但无显著差异 ($p > 0.05$)。相对于攻毒对照组的气囊损伤评分 (3.5 ± 0.7), 除 rDnaK 组 (3.2 ± 0.6) 外, rEnolase (1.9 ± 0.7)、rEF-Tu (2.0 ± 0.9)、rMSPB (2.1 ± 0.7)、rLP78 (2.5 ± 1.0)、rNADH (2.7 ± 0.5) 组和商品疫苗 (2.0 ± 1.1) 组的气囊损伤评分显著 ($p < 0.05$) 降低。rEnolase、rEF-Tu、rMSPB 和 rLP78 组的气囊损伤评分差异不显著 ($p > 0.05$), 与商品疫苗组相比无显著差异 ($p > 0.05$) (图 3-9B)。

相对于新支疫苗对照组和空白对照组, 攻毒对照组的气管粘膜显著 ($p < 0.05$) 增厚 (图 3-9C)。相对于攻毒对照组, 除 rDnaK 组外, 各疫苗组的气管粘膜厚度显著 ($p < 0.05$) 降低, 但仍然比空白对照组显著 ($p < 0.05$) 增厚。除 rLP78 组外, 各亚单位疫苗组与商品疫苗组的气管粘膜厚度无显著差异 ($p > 0.05$)。

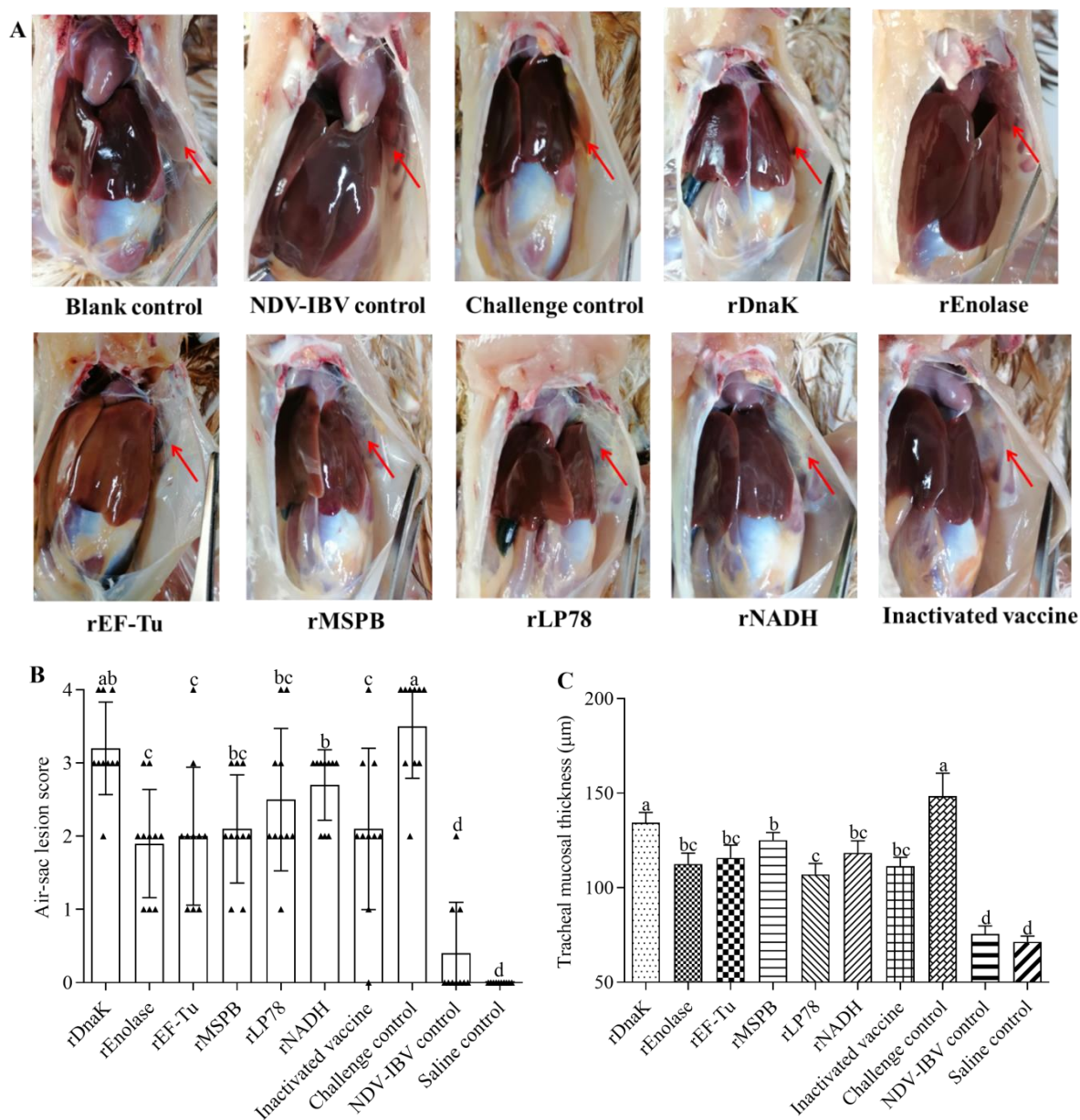


图 3-9 攻毒后鸡的气囊损伤和气管粘膜厚度

Fig. 3-9 Gross air sac lesions and tracheal mucosa thickness of chickens after challenge

A: 气囊剖检病变; B: 气囊损伤评分; C: 气管粘膜厚度。

注: 相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

3.4 讨论

MS 主要通过呼吸道途径感染, 进而突破机体屏障导致全身感染, 引起滑液囊炎和气囊炎等。在全球广泛应用的 MS-H 株活疫苗主要通过滴鼻途径接种, 其效力评价为气管途径接种 MS 感染, 观察疫苗预防气囊炎的效果。由于 MS-H 株用于未感染 MS 鸡群的预防, 对已感染鸡群的预防效果不理想, 而我国 MS 感染率较高, 限制了该疫苗的应用(Wei et al. 2023; 石晓磊 2018; 孙石开 2018)。国内目前开展有 MS 灭活疫苗和亚单位疫苗的开发, 在进行疫苗效力评价时的攻毒途径有多种, 包括爪垫(马爽 等. 2016a), 肌

肉(孙石开 2018), 爪垫和气管同时接种(Gong et al. 2020; Zhang et al. 2023a)。据实验室近年来对陕西周边养殖场 MS 检测情况, 由 MS 引起的滑膜炎相对较少, 大部分发病鸡场主要是由 MS 感染引起的呼吸道疾病及产蛋性能下降。

不同 MS 分离菌株所致气囊炎和滑液囊炎有较大差异, 同一菌株不同接种途径所引起的临床症状也有较大区别(Hinz et al. 2003; 侯博 等. 2021)。通常从具有滑膜炎症状的鸡分离的 MS 菌株易引起滑膜炎, 而从有气囊炎症状的鸡分离的菌株更易导致气囊炎(Kume et al. 1976)。实验室在 2022 年从患有严重气囊炎的海兰褐鸡的气管分离出一株 MS (W1 株)。在测定 W1 株致病性时, 通过爪垫和气管途径分别接种, 可出现严重的气囊损伤, 但爪垫损伤轻微, 说明 W1 株为呼吸型 MS。此外, MS 感染引起气囊炎的发生率和严重程度和呼吸道病毒(如 IBV 和 NDV)感染和环境条件(如温度)有较大关系。鸡在新支疫苗免疫前后感染 MS 及感染后在温度较低(7~10℃)环境中饲养能显著增加气囊炎的发生率和损伤程度(Hopkins et al. 1982; Kleven et al. 1972)。国内在肉鸡中使用新支疫苗免疫后感染 MS 建立了动物感染模型用于评价 MS 疫苗免疫效果(Gong et al. 2020; 王昆 2018)。本研究比较了单独感染 MS 和接种新支疫苗后感染 MS 气囊炎的发病率和损伤程度, 虽然两种感染方式在发病率没有差异, 但后者引起的气囊损伤程度更加严重。IBV 和 NDV 能显著增加感染鸡气管中 MS 载量及气囊炎损伤程度(孙通行 2021)。本研究对感染后不同时间气管中 MS 载量进行测定, 新支疫苗免疫后感染 MS 组的载量较单独感染 MS 高并在感染后第 7 日差异显著。

标准化的实验动物对科学研究非常重要, 使用 SPF 鸡能排除其它因素的干扰, 更有利于试验的开展及结果的分析。在进行 MS 亚单位疫苗研究的过程中, 由于试验所需动物及分组较多, 试验周期较长, 而学校的隔离器等设施资源有限, 试验成本和设施限制了我们使用 SPF 鸡开展动物试验。为了尽可能地减少其它因素的干扰, 我们选择经过支原体等疫病净化的海兰褐鸡开展试验。试验前, 鸡只的支原体、禽白血病等病原的核酸或抗体检测均为阴性。试验过程中, 将各组鸡严格分开饲养, 尽可能保证试验鸡的健康, 试验结束时, 空白对照鸡正常。

将雏鸡法氏囊切除后感染 MS, 其感染 MS 后表现出更严重的气囊炎和关节损伤, 说明体液免疫能减轻 MS 感染所致损伤(Giambrone et al. 1977; Kume et al. 1977; Vardaman et al. 1973)。细胞因子在机体免疫系统激活及消灭病原微生物中具有重要作用。IL-4 主要由 Th2 型细胞分泌, 能促进 B 细胞的增殖和分化; IFN- γ 主要由 Th1 型细胞分泌, 能介导细胞免疫并促进巨噬细胞的吞噬作用(Yin et al. 2021)。MS 全菌灭活疫苗免疫后可诱导鸡的 IFN- γ 和 IL-2 水平升高, 促进淋巴细胞增殖(Gong et al. 2020)。本研究中, MS 的六个重组蛋白和商品化 MS 灭活疫苗均能显著提高免疫鸡的 IL-4 和 IFN- γ 水平, 说明重组蛋白可能诱导 Th1 和 Th2 型混合免疫应答。重组绵羊肺炎支原体和猪肺炎支原体 DnaK 和 EF-Tu 免疫小鼠后, 血清 IL-4 和 IFN- γ 水平升高, 能诱导 Th1 和 Th2 型混

合免疫应答(Chen et al. 2003; Jiang et al. 2016)。重组猪附红细胞体 enolase 可诱导小鼠 IL-4 和 IFN- γ 水平升高(Xue et al. 2021)。重组猪肺炎支原体 NADH oxidase 免疫小鼠后,可诱导气管局部 IL-4 和 IFN- γ 分泌升高(Xu et al. 2022)。MS 的 MSPB 可激活巨噬细胞,促进 IL-1 β 和 IL-6 分泌,进而促进体液免疫应答(Lavric et al. 2007)。本试验中免疫鸡外周血淋巴细胞经重组蛋白刺激后均可出现增殖,说明重组蛋白可诱导细胞免疫。

MS 的六个重组蛋白均能诱导鸡的体液和细胞免疫应答,虽然免疫组相对于攻毒对照组的 MS 载量显著降低,但是仍不能完全阻断 MS 感染,该现象在 MS 灭活疫苗的评价中也有报道(Gong et al. 2020; 王昆 2018)。首先,灭活疫苗和亚单位疫苗在减少感染鸡气管中 MS 载量的有限作用可能与气管中缺乏抗体有关。免疫 MG 灭活疫苗可减少发病率和气管中 MG 载量,但该保护作用与血清抗体效价没有显著的相关性(Kleven 1985; Talkington et al. 1985a)。用感染 MG 鸡的气管洗液在体外能显著减少 MG 对气管纤毛的黏附和损伤且效果与气管洗液中 IgG 和 IgA 抗体效价相关(与 IgG 相关性更大),说明气管中抗体具有一定的保护作用,但并不能完全阻断 MG 感染(Avakian et al. 1993b; Yagihashi et al. 1986)。然而,MG 灭活疫苗不能显著提高鸡气管中 IgG 和 IgA 抗体水平,虽然免疫鸡血清中 IgG 显著升高,但气管中 IgG 含量很低(Elfaki et al. 1992)。其次,MS 载量较高可能与单组分亚单位疫苗免疫抗体不能有效抑制 MS 对气管的黏附有关。MS 预测编码 656 个蛋白,其中多个蛋白参与黏附过程,抗单一蛋白抗体可能不能完全阻断 MS 的黏附。再次,气管中 MS 载量较高可能与动物评价模型、菌株毒力和攻毒剂量有关。新支疫苗免疫后感染 MS 引起的气囊损伤及气管中 MS 载量显著高于 MS 单独感染鸡,同时,试验鸡气管接种 MS 的含量远高于自然条件下感染剂量。MS 可黏附气囊和气管导致粘膜组织出现单核/巨噬细胞和淋巴细胞等浸润,细胞外出现纤维素渗出进而引起气囊膜和气管粘膜增厚(Fletcher et al. 1976; Kawakubo et al. 1980; Kleven et al. 1975)。相对于攻毒对照,疫苗免疫组气管中 MS 载量显著降低,虽然其具体原因未清楚,推测可能与攻毒后气管粘膜损伤引起特异性抗体渗出及气管粘膜组织淋巴细胞增多有关。

本研究中,所评价的亚单位候选疫苗虽然不能阻止 MS 感染,但重组 enolase、EF-Tu、MSPB 和 LP78 亚单位疫苗显著减少了感染鸡气管中 MS 载量,减轻了感染鸡气囊和气管粘膜的损伤。虽然亚单位疫苗的保护机制不清楚,推测体液和细胞免疫应答在机体抗 MS 感染方面都有重要作用。

3.5 小结

(1) 建立了滑液囊支原体 W1 株感染鸡的模型,接种新支二联活疫苗能显著增加 MS 感染鸡的气囊炎。

(2) 评价了 6 个 MS 重组蛋白的免疫保护效果,rEnolase、rEF-Tu、rMSPB、rLP78 能显著降低感染鸡气管中 MS 载量,减轻感染鸡气囊和气管粘膜损伤。

第四章 滑液囊支原体表位疫苗的构建及对鸡的免疫保护效果评价

在上一章节中,对重组 DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase 的免疫效果进行了评价,除 DnaK 外,其余 5 个蛋白,特别是 enolase、EF-Tu、MSPB 和 LP78,可显著减轻 MS 引起的气囊炎,但免疫鸡气囊炎发生率仍然较高。在猪肺炎支原体亚单位疫苗研究过程中,单个抗原不能提供足够保护,多个抗原混合物或包含多个抗原组分的嵌合抗原可诱导更广泛的免疫应答(Chen et al. 2008; Galli et al. 2012; Marchioro et al. 2014; Tao et al. 2019)。随着生物信息学的发展,人们可以有选择的将免疫优势表位进行串联聚集构建表位疫苗,以诱导不同类型的免疫应答进而提高免疫效力,同时可剔除无免疫作用或有副反应的序列进而增加疫苗的安全性(Oyarzun et al. 2016)。表位疫苗在对病毒病如口蹄疫(Chathuranga et al. 2022)和流感(Pan et al. 2023),细菌病如链球菌(Zhang et al. 2022)和布鲁氏菌病(Zhang et al. 2022)的预防中取得良好的效果,具有广泛的应用前景。国内构建包含 4 个 MG 黏附蛋白的表位疫苗取得了良好的免疫效果(钟乐苗等. 2023)。将 5 个 MS 黏附蛋白的表位进行连接,构建的表位疫苗也能显著降低感染鸡气管 MS 载量并减轻气囊和气管损伤(Zhang et al. 2023b)。

本研究预测了 MS 的 enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 的 B 和 T 细胞表位,然后将各表位串联构建了表位疫苗并对其免疫保护效果进行评价,主要研究内容如下:

4.1 材料

4.1.1 菌种与实验动物

本章所用菌种与实验动物同 3.1.1。

4.1.2 主要试剂

本章所用试剂同 3.1.2,其中 rEnolase、rEF-Tu、rMSPB、rLP78 的制备见第三章。

4.1.3 主要仪器设备

本章所用仪器设备同 3.1.3。

4.2 方法

4.2.1 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 表位的预测

用 NetMHCcons_1.1 和 NetMHCIIpan 3.2 在线服务器对蛋白的 MHC-I 和 MHC-II 细胞表位进行预测。由于鸡的等位基因信息较少,根据文献(Mugunthan et al. 2021)选择与鸡等位基因相似的人等位基因 HLA-I 中 HLA^{*}-B40:06、HLA^{*}-B41:03 和 HLA^{*}-B41:04

及 HLA-II 中 DRB1_1482、DRB1_1366、DRB1_1310 和 DRB1_14453 作为筛选条件。用 IEDB 在线预测服务器中 Bepipred 对各蛋白的 B 细胞线性表位进行预测。

4.2.2 表达表位蛋白重组质粒的构建

将预测的表位用 Linker 进行连接, 其中 CTL 表位间用 AAY 连接, HTL 表位间用 GPGPG 连接, B 细胞表位间用 KK 连接。将连接的表位氨基酸序列转化为核苷酸序列, 依据大肠杆菌密码子偏好性对核苷酸序列进行优化, 优化后序列由金斯瑞生物科技公司进行合成, 同时连接至 pET-28a 载体, 命名为 pET-28a-B78EE。

4.2.3 表位蛋白的理化参数和抗原性的预测

ExPASy-ProtParam 预测表位蛋白 B78EE 的相对分子量、理论等电点 (pI)、稳定性、亲水性平均值 (GRAVY) 等。用在线服务器 VaxiJen2.0 对表位蛋白 B78EE 的抗原性进行预测, AllerTOP v.2.0 预测表位蛋白是否为过敏原, SOLpro server 对表位蛋白在大肠杆菌表达是否可溶进行预测。

4.2.4 表位蛋白二级和三级结构的预测

用 DNASTar 软件分析表位蛋白 B78EE 的亲水性、抗原性和表面可及性。用 prabi 和 PSIPRED 4.0 在线服务器预测表位蛋白二级结构中 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲。I-TASSER 在线服务器对表位蛋白的三级结构进行模拟。模型质量通过 SAVE v6.2 进行结构验证并绘制拉氏图 (Ramachandran plot)。

4.2.5 表位蛋白的诱导表达和纯化

将构建的 pET-28a-B78EE 质粒按 2.3 项方法转化 BL21 (DE3) 感受态。将测序正确的阳性菌按 1% 接种 LB 液体培养基 (含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养, 待菌液 OD_{600nm} 达到 0.6~0.8 时, 添加 1 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。将菌液以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 洗涤后, 超声破碎, 然后以 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE。将上清用 0.45 μm 滤膜过滤后, 按 2.2.4 项用镍离子亲和层析柱进行纯化。

由于重组蛋白未有效结合镍离子亲和层析柱, 对以包涵体形式表达的重组蛋白进行纯化。将诱导后菌体用 10 倍菌体积的 Buffer I (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 100 mmol/L β -mercaptoethanol, pH 值 8.0) 重悬后破碎, 12000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。将沉淀用 Buffer I 重悬, 涡旋振荡洗涤 2 次, 离心, 沉淀用 Buffer II (Buffer I + 0.3 mol/L 尿素) 重悬, 涡旋振荡洗涤 2 次, 沉淀再次用 Buffer III (Buffer I + 0.6 mol/L 尿素) 重悬, 涡旋振荡洗涤 2 次后, 离心, 将沉淀溶于 8 mol/L 尿素溶液, 然后用含 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、0 mol/L 尿素的 Tris 缓冲液 (0.02 mol/L, pH 值 7.4) 进行梯度透析, 每个梯度透析 3 h。将透析液 12000 r/min 离

心 10 min, 收集上清。用 BCA 方法测定表位蛋白 B78EE 的蛋白浓度。

4.2.6 Western blot

将表位蛋白 B78EE 进行 SDS-PAGE, 按 2.2.5 项进行 western blot, 其中鼠抗 MS 多克隆抗体用 PBS 稀释 500 倍作为一抗, 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗, 加入 ECL 显色液显色。

4.2.7 疫苗的制备

将 B78EE 用 PBS 稀释至 200 $\mu\text{g/mL}$ 。将纯化的 rMSPB、rEnolase、rEF-Tu、rLP78 混合, 各重组蛋白的终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。将 B78EE、蛋白混合物、生理盐水分别与 ISA206 VG 佐剂乳化, 作为表位疫苗 (MS-B78EE)、混合抗原疫苗 (Cocktail subunit vaccine) 和生理盐水对照 (Saline), 2~8°C 保存。

4.2.8 免疫

将 50 只 21 日龄海兰褐鸡分成 5 组, 10 只/组。组 1: MS-B78EE; 组 2: Cocktail subunit vaccine; 组 3: 攻毒对照; 组 4: 新支疫苗对照; 组 5: 空白对照。将制备的表位疫苗和混合抗原疫苗分别经颈部皮下途径接种 21 日龄海兰褐鸡, 0.5 mL/只 (50 μg /只), 间隔 14 日后进行二免, 对照鸡免疫相同剂量的生理盐水。

4.2.9 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体

采集免疫前和免疫后 7、14、21 和 28 日血清, 然后用 rMSPB、rEnolase、rEF-Tu、rLP78 分别作为包被抗原, 按 3.2.6 项用间接 ELISA 检测血清中特异性抗体。

4.2.10 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定

采集疫苗免疫后 21 日血清, 用商品化鸡 IFN- γ 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒按 3.2.7 项进行测定。

4.2.11 淋巴细胞增殖试验

采集免疫后 21 日鸡抗凝全血, 按 3.2.8 项分离鸡外周血淋巴细胞后, 分别用 rMSPB、rEnolase、rEF-Tu、rLP78 刺激, 然后测定淋巴细胞刺激指数 SI。

4.2.12 攻毒

二免后 14 日, 按 3.2.9 项用 MS W1 株菌液 (10^8 CCU/mL) 攻毒。攻毒前 5 日, 组 1~组 4 鸡经气管途径接种新支二联活疫苗, 1 羽份/只。采集攻毒后 14 日气管拭子, 按 3.2.3 项用 qPCR 测定 MS 载量。攻毒后 14 日剖检, 观察气囊损伤, 并按 3.2.3 项对气囊损伤进行评分。取剖检鸡气管, 按 3.2.9 项进行气管黏膜厚度测定。

4.2.13 统计分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 使用 IBM SPSS Statistics 20 版本统计软件进行方

差分析。 p 值 <0.05 表示差异显著, p 值 <0.01 表示差异极显著。

4.3 结果

4.3.1 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 表位的预测

CTL 表位(9 个氨基酸)分值小于 0.5 为强结合肽段,共筛选 5 个表位序列(表 4-1); HTL 表位(15 个氨基酸)分值小于 2 为强结合肽段,共筛选 5 个表位序列(表 4-2)。B 细胞表位选择阈值高于 0.5,长度为 11~15 个氨基酸,共筛选 22 个表位序列(表 4-3)。

表 4-1 预测 MSPB、LP78、EF-tu 和 enolase 的 CTL 表位

Table 4-1 Prediction of CTL epitopes of MSPB, LP78, EF-tu and enolase

等位基因 Allele	蛋白 Protein	位置 Position	序列 Sequence	分值 Rank	蛋白 Protein	位置 Position	序列 Sequence	分值 Rank
HLA-B40:06	MSPB	130-138	LEAKLTAAI	0.25	EF-Tu	149-157	VEMEIRDLL	0.40
HLA-B41:04				0.20				0.17
HLA-B41:03				0.12				0.40
HLA-B40:06	LP78	197-205	LESLVNTAL	0.50	enolase	240-248	GEKAVAIAM	0.50
HLA-B41:04				0.30				0.12
HLA-B41:03				0.05				0.10
HLA-B40:06	LP78	161-169	AEYDMLLN	0.50	enolase	240-248	GEKAVAIAM	0.50
HLA-B41:04				0.40				0.12
HLA-B41:03				0.40				0.10

表 4-2 预测 MSPB、LP78、EF-tu 和 enolase 的 HTL 表位

Table 4-2 Prediction of HTL epitopes of MSPB, LP78, EF-tu and enolase

等位基因 Allele	蛋白 Protein	位置 Position	序列 Sequence	分值 Rank	蛋白 Protein	位置 Position	序列 Sequence	分值 Rank
DRB1_1482	MSPB	225	ATTMLVN	3.50	EF-Tu	165	DNAPIVRG	3.00
DRB1_1366				5.00				1.60
DRB1_1310				7.00				1.20
DRB1_1445	LP78	146	YNLTLNYS	1.80	enolase	185	ANFVFHNL	1.10
DRB1_1482				1.70				0.60
DRB1_1366				2.00				0.17
DRB1_1310	LP78	639	NVAARLA	0.80	enolase	185	AKLLKKH	0.17
DRB1_1445				0.70				1.00
DRB1_1482				0.30				0.60
DRB1_1366	LP78	639	RLFLKWLL	0.40	enolase	185	AKLLKKH	0.17
DRB1_1310				1.00				0.17
DRB1_1445				0.70				1.00

表 4-3 预测 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 的 B 细胞表位
Table 4-3 The Prediction of B-cells epitopes of MSPB, LP78, EF-tu and enolase

蛋白	位置	序列	蛋白	位置	序列
Protein	Position	Sequence	Protein	Position	Sequence
MSPB	71-85	KEALKRQVEATTTES	LP78	105-114	ADAEVKVSPF
	113-126	AVKDDAEYSKVTGT		124-133	GNGYSDGNKQ
	176-186	SALMPELTFVK		170-182	NSLDRRLNVDLSS
EF-Tu	178-188	ALEGDAVYEDK		188-199	TGENTRTSFVVN
	198-208	TYIENPVKELD		232-244	GATLKMSDSDFKS
	260-270	EMFRKNLKEAL		272-286	KAALSGYEVSMDFR
	314-326	KEEGGRHTPFFKN		300-312	DLFTKTRNNPSGQ
enolase	53-67	DKGSKFESNWFEGKG		586-598	TVKSITTANQLNE
	198-209	KKHGHGVQVGDE		651-664	KLNFDATDATKMET
	233-243	SGYKPATSGEK		719-730	YYSPGTTVQNDF
	438-448	KASTFPKDAFY		741-753	VQNSSQNGTDAPT

4.3.2 表位蛋白的理化参数和抗原性的预测

表位蛋白 B78EE 由 503 个氨基酸构成, ExPASy-ProtParam 预测其相对分子质量为 55 kDa, 等电点 (pI) 为 9.86, 半衰期为 10 h, 脂肪系数为 61.39, 总平均疏水指数为 -0.787, 表明具有较好的亲水性。不稳定性指数为 20.13, 显示该蛋白稳定性较好。VaxiJen2.0 预测 B78EE 的抗原性分值为 0.7814, 显著高于阈值 (0.4), 抗原性良好。AllerTOP v.2.0 server 预测 B78EE 非过敏原。SOLpro server 预测 B78EE 可在大肠杆菌中以可溶形式表达。

4.3.3 表位蛋白的二级和三级结构的预测

DNAstar 预测 B78EE 为亲水性蛋白, 抗原性和表面可及性良好 (图 4-1A)。B78EE 的 503 个氨基酸中, α 螺旋占 37.77% (190/503), 延伸链占 16.5% (83/503), β 折叠占 7.16% (36/503), 无规则卷曲占 38.57% (194/503) (图 4-1B 和 C)。I-TASSER 预测的 5 个模型中, 选取综合评分最高的三级结构模型, 其 C-score 为 -1.68, TM-score 为 0.51 $\pm$ 0.15 (图 4-2A)。通过拉氏图对预测的模型结构进行检验, 65.5%的残基位于核心区, 28.8%位于允许区, 3.8%位于大致允许区, 1.8%位于不允许区 (图 4-2B)。

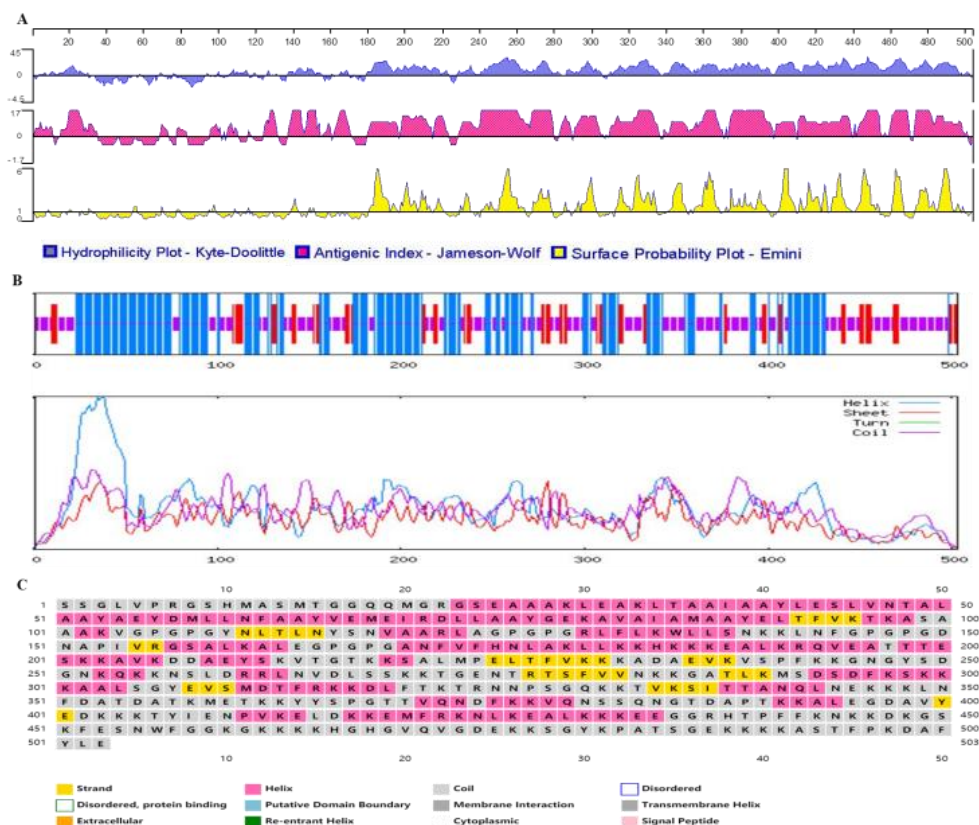


图 4-1 表位蛋白 B78EE 的二级结构预测

Fig. 4-1 Prediction of secondary structure of B78EE construct

A: DNASTar 预测表位蛋白 B78EE 的亲水性、抗原性和表面可及性; B: prabi 预测表位蛋白 B78EE 的二级结构; C: PSIPRED 4.0 预测表位蛋白 B78EE 的二级结构。

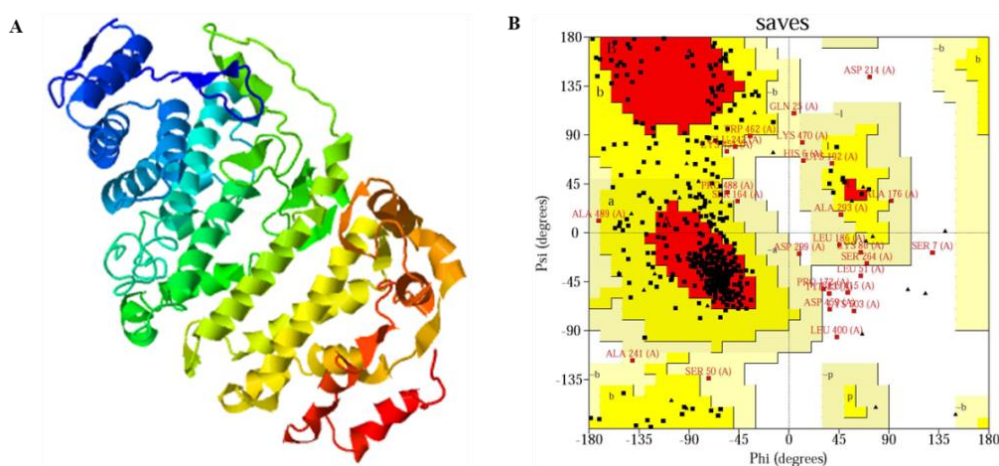


图 4-2 表位蛋白 B78EE 的三级结构

Fig. 4-2 Tertiary structure model of B78EE construct

A: I-TASSER 预测的表位蛋白 B78EE 的三级结构; B: Ramachandran 图。

4.3.4 表位蛋白的诱导表达和纯化

将重组菌诱导后电泳，可在 55 kDa 附近出现目的条带，目的蛋白在上清和沉淀中均存在（图 4-3A）。将上清用镍离子亲和层析柱纯化，目的蛋白未有效结合。将表位蛋白进行包涵体纯化，纯化后的包涵体及透析后上清电泳后均于相应位置出现目的条带（图 4-3B）。BCA 检测透析后 B78EE 的蛋白浓度为 1.2 mg/mL。

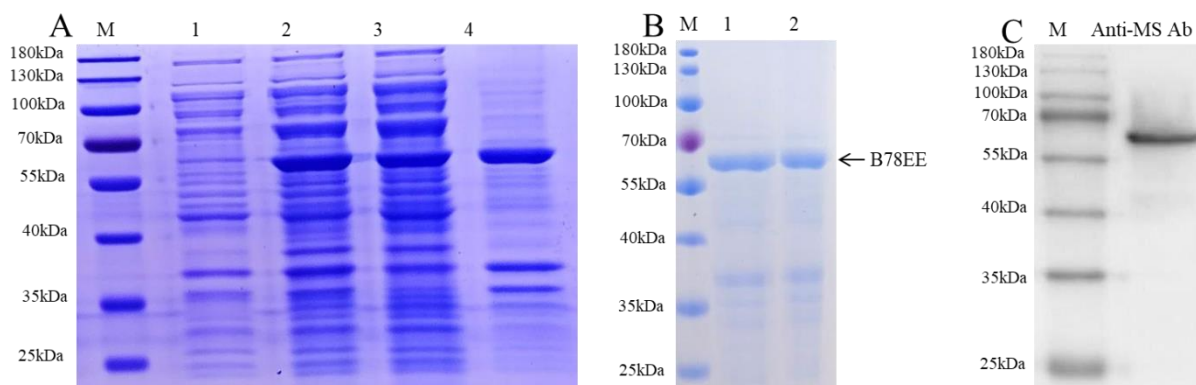


图 4-3 表位蛋白 B78EE 的诱导表达、包涵体纯化及 western blot 鉴定

Fig. 4-3 Induction of the expression of B78EE, purification of inclusion and western blot analysis

A: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 上清; Lane 4: 沉淀; B: Lane M: 蛋白 marker; Lane 1: 8 mol/L 尿素溶解 B78EE 包涵体; Lane 2: 透析后 B78EE。C: B78EE 用鼠抗 MS 多克隆抗体进行 western blot 鉴定。

4.3.5 Western blot

Western blot 鉴定，表位蛋白 B78EE 可与鼠抗 MS 多克隆抗体反应，于相应位置出现目的条带（图 4-3C）。

4.3.6 间接 ELISA 检测血清中特异性抗体

免疫后不同时间，用各重组蛋白包被 ELISA 板分别检测表位疫苗组（MS-B78EE）、混合抗原疫苗组（Cocktail subunit vaccine）和生理盐水（Saline）对照组鸡血清的 OD_{450nm} 值。rMSPB 检测，表位疫苗组和混合抗原疫苗组于免疫后 14 日血清 OD_{450nm} 升高；rLP78 检测，表位疫苗和混合抗原疫苗组于免疫后 7 日血清 OD_{450nm} 升高；rEF-Tu 检测，表位疫苗和混合抗原疫苗组于免疫后 14 日血清 OD_{450nm} 升高；rEnolase 检测，表位疫苗组于免疫后 14 日血清 OD_{450nm} 升高，而混合抗原疫苗组于免疫后 7 日血清 OD_{450nm} 升高（图 4-4）。免疫后 28 日，各疫苗组的 OD_{450nm} 值最高，免疫后 14~28 日，混合抗原疫苗组的 OD_{450nm} 值显著（ $p < 0.01$ ）高于表位疫苗组。

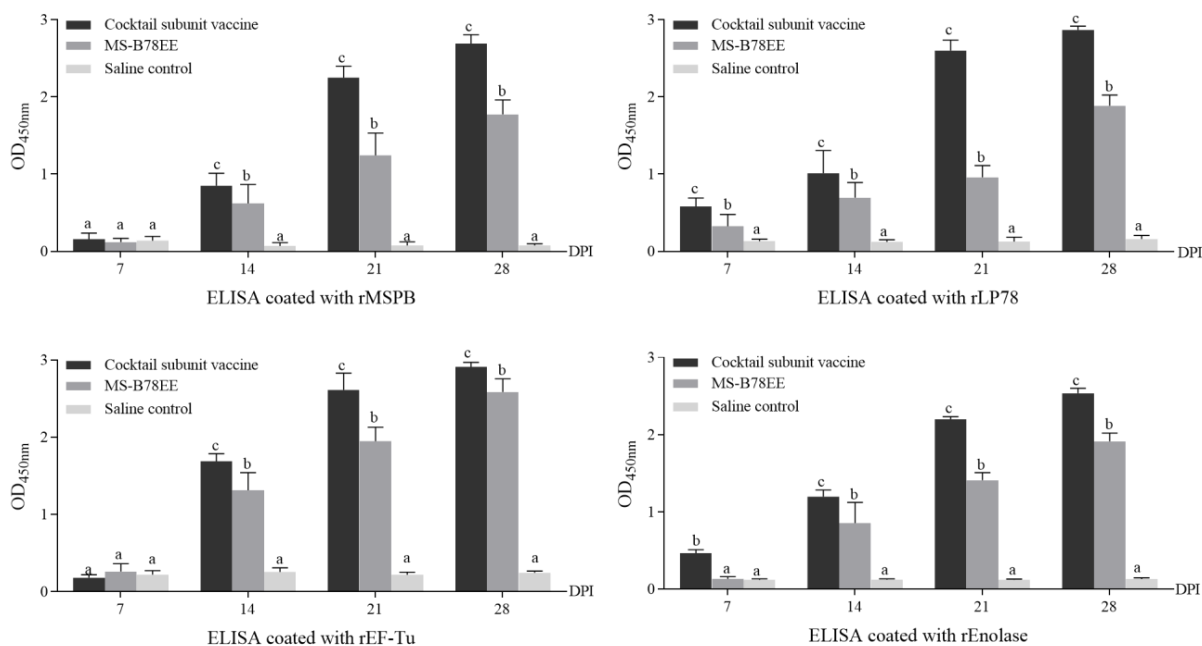


图 4-4 间接 ELISA 检测免疫后抗体应答

Fig. 4-4 Detection of antigen specific serum antibody responses in vaccinated chickens by iELISA

注：相同字母表示差异不显著 ($p > 0.01$)，不同字母表示差异显著 ($p < 0.01$)。DPI 表示免疫后天数。

4.3.7 IFN- γ 和 IL-4 水平的测定

免疫后 14 日，表位疫苗组的 IFN- γ 水平升高，免疫后 21 日，表位疫苗和混合抗原疫苗组的 IFN- γ 水平均升高，且无显著差异 ($p > 0.05$) (图 4-5)。表位疫苗组和混合抗原疫苗组的 IL-4 水平均于免疫后 14 日升高，且两组无显著差异 ($p > 0.05$)。

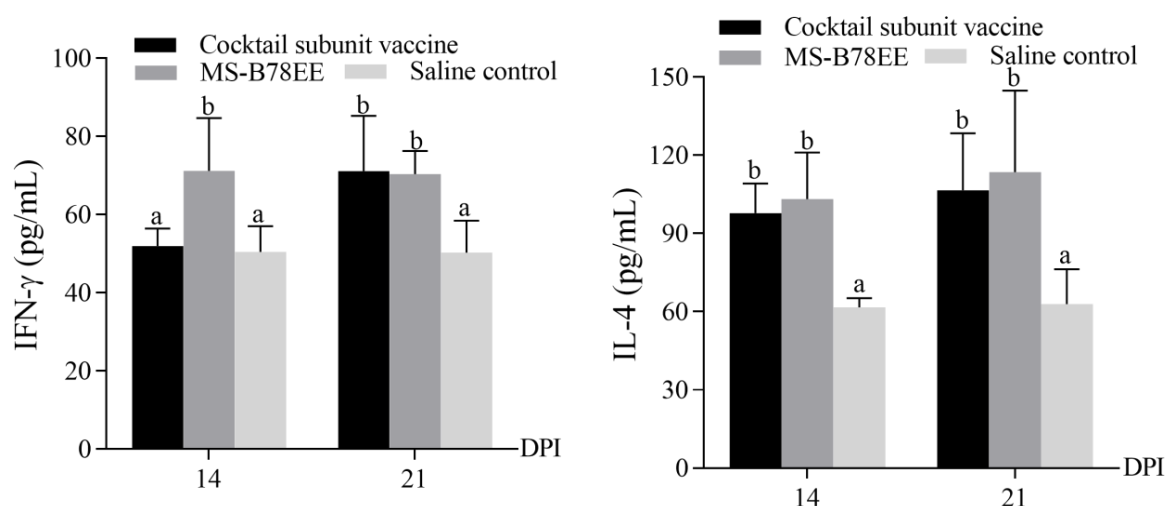
图 4-5 免疫鸡血清中 IFN- γ 和 IL-4 浓度的测定

Fig. 4-5 Measurement of the levels of IFN- γ and IL-4 in serum from immunized chickens

注：相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。DPI 表示免疫后天数。

4.3.8 淋巴细胞增殖试验

分离鸡的外周血淋巴细胞，然后分别用 rMSPB、rLP78、rEF-Tu、rEnolase 进行刺

激。相对于生理盐水对照组，表位疫苗组和混合抗原疫苗组的 SI 值均显著 ($p<0.01$) 升高，其中 rEF-Tu 和 rLP78 诱导表位疫苗组的 SI 值较混合抗原疫苗组高 ($p<0.05$) (图 4-6)。

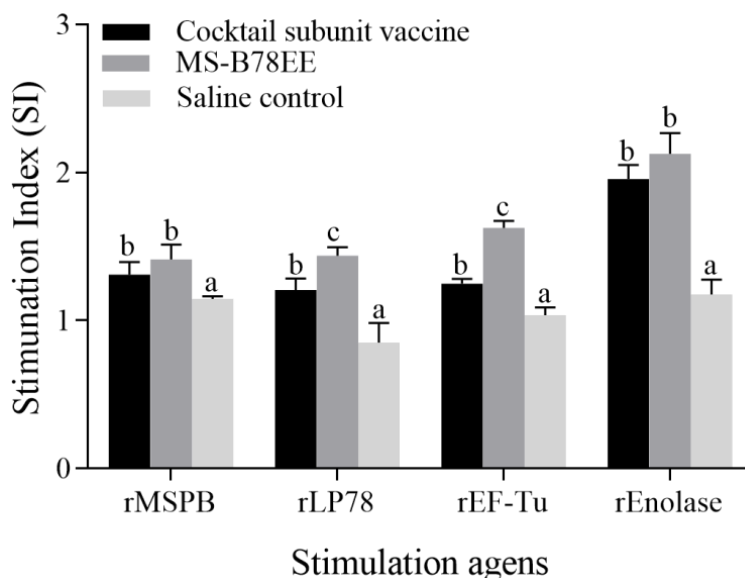


图 4-6 重组蛋白免疫后淋巴细胞增殖指数 (SI) 的测定

Fig. 4-6 Lymphocyte proliferative assays from chickens vaccinated with recombinant subunit vaccines

注：相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

4.3.9 攻毒

4.3.9.1 气管拭子 MS 载量

攻毒后 14 日，qPCR 测定各组鸡的气管拭子中 MS 载量均大于 $10^{4.0}$ copies/mL。相对于攻毒对照组，表位疫苗组和混合抗原疫苗组的 MS 载量显著降低 ($p<0.05$)，而混合抗原疫苗组的 MS 载量显著低于表位疫苗组 ($p<0.05$) (图 4-7)。

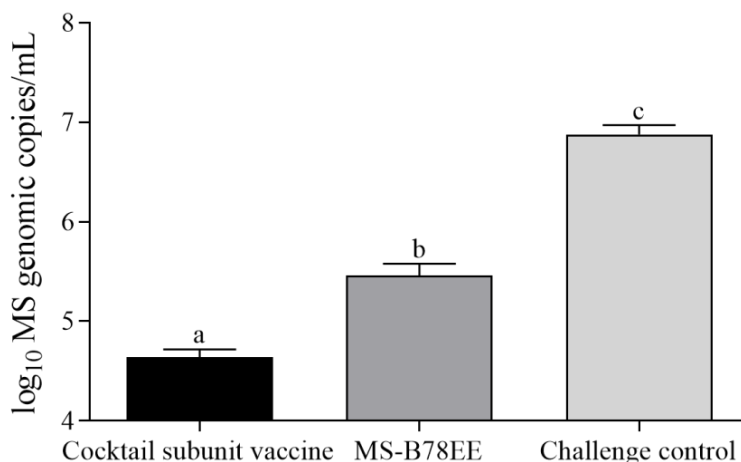


图 4-7 攻毒后鸡的气管拭子中 MS 载量

Fig. 4-7 Mean values of the number of MS genomic copies in tracheal swabs from chickens after challenge

注：相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$)，不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

4.3.9.2 气囊损伤评分及气管粘膜厚度测定

攻毒后 14 日剖检, 攻毒对照组鸡 10/10 出现气囊损伤 (3.2 ± 0.6), 表位疫苗组有 4/10 出现气囊损伤 (1.4 ± 0.8), 混合抗原疫苗组有 4/10 出现气囊损伤 (1.2 ± 0.8), 疫苗免疫组的气囊损伤评分相对于攻毒对照组显著 ($p < 0.01$) 降低, 而两疫苗组间差异不显著 ($p > 0.05$) (图 4-8A-B)。新支疫苗对照组鸡有 3/10 出现气囊轻微浑浊 (0.3 ± 0.5), 空白对照组的气囊全部正常 (图 4-8A-B)。

攻毒后 14 日, 攻毒对照组鸡的气管粘膜显著 ($p < 0.01$) 增厚, 表位疫苗组和混合抗原疫苗组鸡的气管粘膜厚度显著 ($p < 0.01$) 降低, 且两个疫苗组间的差异不显著 ($p > 0.05$) (图 4-8C)。

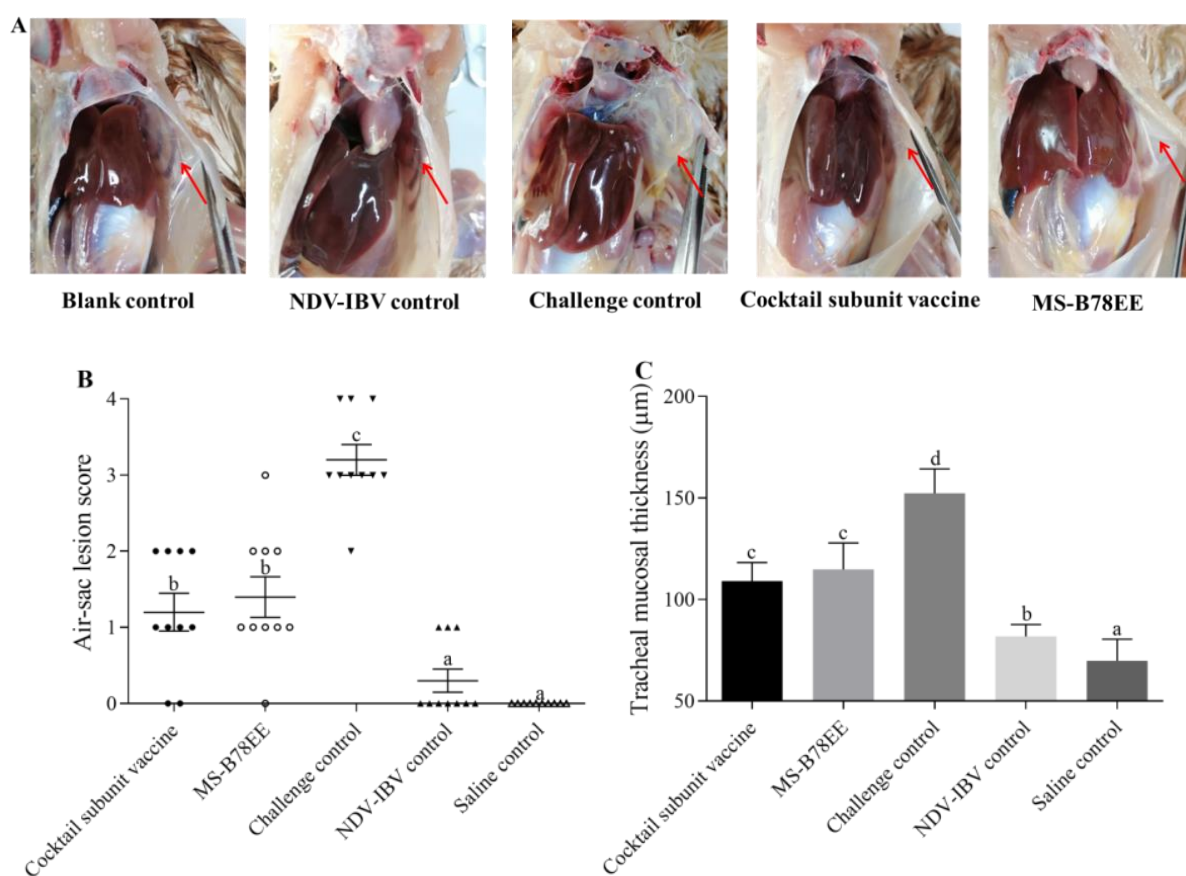


图 4-8 攻毒后鸡的气囊损伤和气管粘膜厚度

Fig. 4-8 Gross air sac lesions and tracheal mucosa thickness of chickens after challenge

A: 攻毒后鸡的气囊剖检病变; B: 攻毒后鸡的气囊损伤评分; C: 攻毒后鸡的气管粘膜厚度。

注: 相同字母表示差异不显著 ($p > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

4.4 讨论

目前, 对 MS 疫苗的预防保护机制仍未研究清楚, 体液和细胞免疫可能同时在机体抗 MS 中具有重要作用(Kume et al. 1977; Omotainse et al. 2022)。因此, 本研究选择蛋白的 T 和 B 淋巴细胞表位。在表位疫苗的构建中, 表位间的间隔序列 (linker) 影响表位

蛋白的稳定性、构象及表达等,其中 AAY、GPGPG 和 KK 常用于表位间的连接(Zhang et al. 2023b)。间隔序列 AAY 能防止表位间聚集,改善表位的递呈,常用于 MHC-I 型表位间的连接(Yang et al. 2015)。间隔序列 GPGPG 能改善表位的稳定性、可及性和蛋白的折叠,可用于 MHC-II 型表位间的连接(Reddy Chichili et al. 2013)。间隔序列 KK 有助于表位蛋白在细胞内的递呈,增强表位的免疫原性(Yano et al. 2013)。构建的表位蛋白(B78EE)经预测具有天然蛋白的理化特性等,为可溶性蛋白。B78EE 可以可溶形式表达,但是,用镍柱纯化时,B78EE 不能有效结合镍柱。亲和层析纯化效率受多种因素影响,包括蛋白结构、离子浓度等。我们推测 His 标签未完全暴露于 B78EE 表面,影响其与镍离子的结合。用不同浓度的表面活性剂和尿素等对包涵体进行充分洗涤可去除大部分杂蛋白(Li et al. 2022a)。我们通过此方法对 B78EE 包涵体进行纯化,取得了较好的效果,纯化的 B78EE 可与 MS 多克隆抗体结合,表明具有反应活性。

B78EE 经预测具有良好的抗原性。将 B78EE 乳化后免疫鸡,间接 ELISA 检测免疫鸡可产生针对各重组蛋白的特异性抗体,表明 B78EE 具有良好的免疫原性。细胞因子在机体天然和特异性免疫应答中扮演重要角色(Toews 2001)。表位疫苗 MS-B78EE 可同时诱导免疫鸡血清中 IL-4 和 IFN- γ 水平升高,说明其可能同时诱导 Th1 和 Th2 型免疫应答。鸡的外周血淋巴细胞经不同重组蛋白刺激后可显著增殖,说明 B78EE 也可诱导细胞免疫应答。表位疫苗 MS-B78EE 和抗原混合疫苗均能显著减轻感染鸡的气囊损伤,其保护效果均优于单组份重组 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 亚单位疫苗,这可能与前者能诱导更广泛的体液和细胞免疫应答有关。在上一章节中,重组 MSPB、LP78、EF-Tu 和 enolase 亚单位疫苗在减轻 MS 感染鸡的气囊等损伤同商品化 MS 灭活疫苗相当,因此,本研究中表位疫苗 MS-B78EE 和抗原混合疫苗的免疫保护效果可能不低于商品化 MS 灭活疫苗。虽然 MS-B78EE 和抗原混合疫苗均能显著降低感染鸡气管中 MS 载量,但也不能完全阻断 MS 感染,具体原因同上一章讨论部分。

4.5 小结

(1) 构建了含 MSPB、LP78、EF-Tu、enolase 细胞表位的重组质粒并在大肠杆菌表达,纯化后的 B78EE 可结合 MS 抗体,具有良好的抗原性。

(2) 表位疫苗 MS-B78EE 能诱导鸡的体液和细胞免疫应答,显著降低感染鸡气管中 MS 载量,减轻感染鸡气囊和气管粘膜损伤,其效果与各蛋白混合疫苗相当。

第五章 滑液囊支原体重组 MSPB 和 LP78 间接 ELISA 抗体检测方法建立

在第二章中,对 6 个重组蛋白的反应原性进行检测,其中重组 MSPB 和 LP78 优于其余 4 个蛋白。MS 抗体的检测方法包括 RSA、HI、ELISA 等。RSA 敏感性较好,同时使用方便,但其结果不易观察,且与 MG 存在部分交叉反应(Vardaman et al. 1970)。HI 方法特异性较好,常用于 MS 和 MG 抗体的鉴别检验,但其操作较繁琐,不利于临床大量样品的检测,同时,该方法敏感性较差且不同血凝抗原对其敏感性有较大影响(Vardaman et al. 1980; Vardaman et al. 1970)。相较于 RSA 和 HI,用 ELISA 方法检测 MS 抗体,其敏感性同 RSA 相当,特异性与 HI 方法相同(Avakian et al. 1990a; Opitz et al. 1983)。用 MS 全菌或其裂解物作为包被抗原会出现部分交叉反应和非特异性结合,虽然通过对抗原进行不同方式处理能降低非特异性结合,但仍不能完全解决(Higgins et al. 1986; Opitz et al. 1983; Yadav et al. 2021)。国内外有报道使用重组 MS 抗原能显著降低非特异性吸附,且同 MG 无交叉反应(Noormohammadi et al. 1999; 王宇 等. 2020)。

本研究分别建立了基于重组 MSPB 和 LP78 的间接 ELISA 用于 MS 抗体检测,并对其检测性能进行了比较。

5.1 材料

5.1.1 血清及实验动物来源

MS、NDV、H5、H7、H9 亚型禽流感(Avian influenza virus, AIV)、IBV、IBDV、血清 4 型禽腺病毒(Fowl adenovirus serotype-4, ADV-4)、副鸡嗜血杆菌(Haemophilus paragallinarum, Hpg)和 MG 阳性血清及 SPF 鸡血清,均由本实验室制备与保存。MS 阴性血清,采自种鸡场,该场为 MS/MG 净化场,用商品化 IDEXX 试剂盒检测 MS 和 MG 抗体均为阴性;临床感染 MS 鸡血清,采自杨凌周边养殖公司;SPF 鸡,购自杨凌绿方生物工程有限公司。

5.1.2 主要试剂

重组 MSPB 和 LP78,其制备及鉴定见本研究第二章节。商品化 MS ELISA 抗体检测试剂盒,购自 IDEXX 公司;MS 平板凝集试验抗原,购自北京中海生物科技有限公司;其余试剂同 3.1.2。

5.1.3 主要仪器设备

本章所用仪器设备同 3.1.3。

5.2 方法

5.2.1 rMSPB 和 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的测定

5.2.1.1 rMSPB 最适包被浓度与血清稀释度的测定

用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 9.6) 将 rMSPB 分别稀释至终浓度 1000、200、40、8、1.6 ng/mL, 2~8℃ 包被过夜。弃包被液, 用 PBST 洗涤 3 次后, 加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST, 37℃ 封闭 2 h。将 MS 阳性血清和阴性血清分别用 PBS 稀释 100~800 倍, 然后将各稀释度分别取 100 μL 加至酶标板, 各重复 3 孔, 37℃ 反应 2 h。按 2.2.6 项测定 OD_{450nm} 值, 计算各稀释度 MS 阳性血清 (P) 和阴性血清 (N) OD_{450nm} 值的比值 (P/N), 选择 P/N 值最高所对应的抗原浓度和血清稀释度作为最适抗原包被浓度和待检样品的血清稀释度。

5.2.1.2 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的测定

用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 9.6) 将 rLP78 分别稀释至终浓度 5000、4000、3000、2000、1000 ng/mL, 然后按 5.2.1.1 项进行包被和检测。由于以 1000 ng/mL 的 rLP78 包被检测 MS 阴性血清的 OD_{450nm} 值大于 0.1, 为进一步优化 rLP78 的包被浓度, 将 rLP78 继续稀释至终浓度 1000、200、40、8、1.6 ng/mL 进行包被和检测。选择 P/N 值较高, 检测 MS 阳性血清 OD_{450nm} 值为 1.0 左右, 阴性血清 OD_{450nm} 值较低所对应的抗原浓度和血清稀释度。

5.2.2 酶标抗体稀释度的测定

用碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 9.6) 按 5.2.1 项确定的包被浓度包被酶标板, 2~8℃ 包被过夜。封闭后, 加入按 5.2.1 项确定的稀释的 MS 阳性血清和阴性血清 100 μL, 各重复 3 孔, 37℃ 反应 2 h。将 HRP 标记的兔抗鸡 IgY 抗体用 PBST 分别作 10000~50000 倍稀释, 每孔加入 100 μL, 37℃ 反应 1 h。计算各稀释度酶标抗体检测 MS 阳性血清 (P) 和阴性血清 (N) OD_{450nm} 值的比值 (P/N), 选择 P/N 值最高所对应的酶标抗体稀释度。

5.2.3 判界的确定

用上述建立的 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 分别检测 83 份经商品化 ELISA 试剂盒检测为 MS 抗体阴性的鸡血清样品, 计算各检测血清的 S/P 值的平均值和标准差。各检测方法的判界为 S/P 值=平均值+3×标准差。

5.2.4 与其它病原的交叉反应性

用上述建立的 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 分别检测 NDV、AIV-H5、AIV-H7、AIV-H9、IBV、IBDV、ADV、Hpg、MG 阳性血清, 确定各方法的交叉反应性。

5.2.5 灵敏度

取免疫 MS 灭活疫苗、人工感染及自然感染 MS 的鸡血清 (HI 效价 1:128) 各 3 份, 用 PBS 稀释 100 倍, 然后作 2 倍梯度稀释至 1:51200。用建立的 rMSPB iELISA、

rLP78 iELISA 及商品化 ELISA 试剂盒分别检测, 根据试剂盒判界, 以检测为阳性的 MS 最高稀释度作为各方法的灵敏度。

5.2.6 人工感染和免疫 MS 抗体的检测

5.2.6.1 检测 MS 人工感染抗体

将 W1 株 (10^8 CCU/mL) 经气管途径接种 10 只 21 日龄鸡, 0.2 mL/只, 分别于接种后 3、7、10、14、21、28、42、60 日采血, 分离血清。将上述血清分别用 rMSPB iELISA、rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒进行检测。

5.2.6.2 检测 MS 灭活疫苗免疫抗体

用商品化 MS 灭活疫苗经腿部肌肉接种 5 只 21 日龄鸡, 0.5 mL/只, 分别于接种后 3、7、10、14、21、28、42、60 日采血, 分离血清。将上述血清分别用 rMSPB iELISA、rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒进行检测。

5.2.7 临床样本的检测

采集 MS 发病场的鸡血清 170 份, 分别用 rMSPB iELISA、rLP78 iELISA、商品化 ELISA 试剂盒和平板凝集试验 (RSA) 检测, 比较 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 同商品化 ELISA 试剂盒的符合率。

5.3 结果

5.3.1 rMSPB 和 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的确定

5.3.1.1 rMSPB 最适包被浓度与血清稀释度的确定

当 rMSPB 包被浓度为 200 ng/mL, 血清稀释 400 倍时, P/N 值最高, 可有效分辨 MS 阴性血清和阳性血清, 此时 MS 阳性血清 OD_{450nm} 大于 1.0, 阴性血清 OD_{450nm} 小于 0.1 (图 5-1 A-C)。

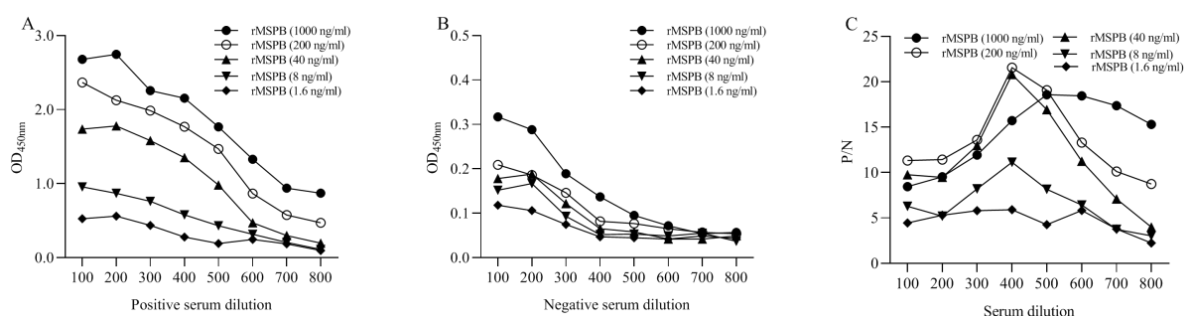


图 5-1 rMSPB iELISA 最适包被浓度和血清稀释度的确定

Fig. 5-1 Determination of the optimal coating concentrations and dilutions of tested chicken serum in rMSPB iELISA

A: 不同浓度 rMSPB 包被检测 MS 阳性血清的 OD_{450nm} 值; B: 不同浓度 rMSPB 包被检测 MS 阴性血清的 OD_{450nm} 值; C: 不同浓度 rMSPB 包被检测 MS 阳性血清和阴性血清的 P/N 值。

5.3.1.2 rLP78 最适包被浓度与血清稀释度的确定

使用 1000 ng/mL~5000 ng/mL 的 rLP78 包被时, 当 rLP78 包被浓度为 1000 ng/mL, 血清稀释 600 倍时, 此时 P/N 值最高, 但检测阴性血清的 OD_{450nm} 值大于 0.1 (0.127) (图 5-2A-C)。为进一步降低检测阴性血清的 OD_{450nm} 值, 将 rLP78 进一步稀释后包被检测, 随着 rLP78 包被浓度降低, 检测阴性血清 OD_{450nm} 值虽有下降但不显著, 而检测 MS 阳性血清的 OD_{450nm} 值显著下降。当 rLP78 包被浓度为 1000 ng/mL, 血清稀释 800 倍时, P/N 值最高, 但此时检测 MS 阳性血清 OD_{450nm} 值小于 1.0 (0.855), 而当血清稀释 600 倍时, P/N 值较高, 同时检测 MS 阳性血清 OD_{450nm} 值为 1.084。据此, 选择 1000 ng/mL 作为 rLP78 的最适包被浓度, 1:600 作为血清最适稀释度 (图 5-2D-F)。

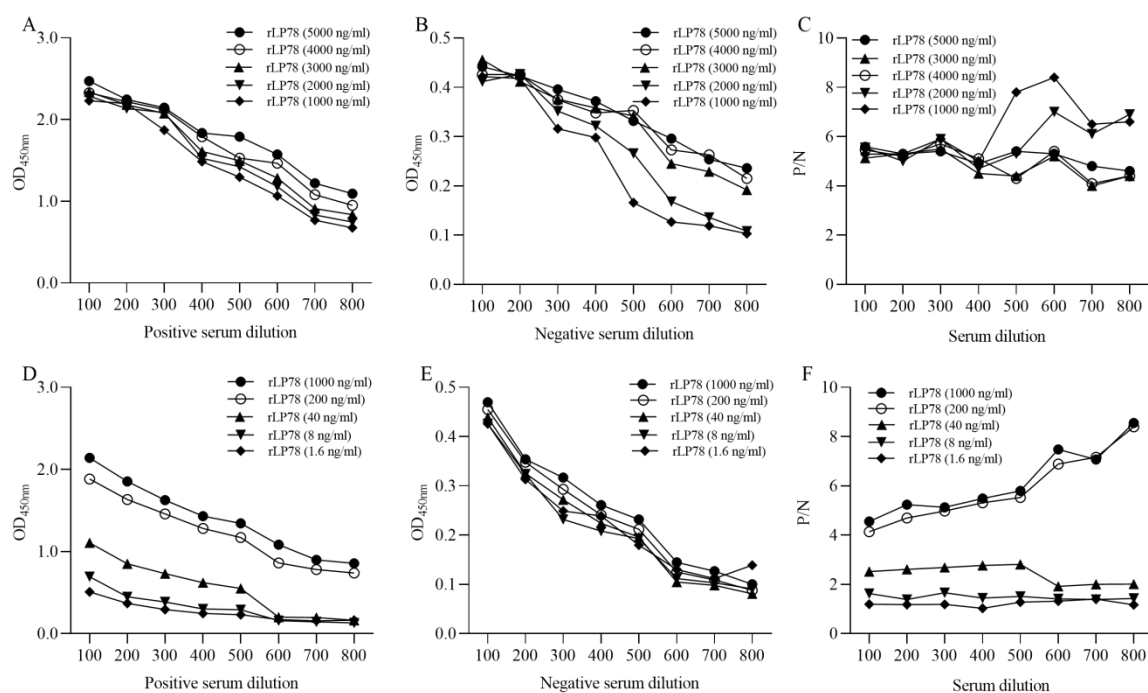


图 5-2 rLP78 iELISA 最适包被浓度和血清稀释度的确定

Fig. 5-2 Determination of the optimal coating concentrations and dilutions of tested chicken serum in rLP78 iELISA

A 和 D: 不同浓度 rLP78 包被检测 MS 阳性血清的 OD_{450nm} 值; B 和 E: 不同浓度 rLP78 包被检测 MS 阴性血清的 OD_{450nm} 值; C 和 F: 不同浓度 rLP78 包被检测 MS 阳性血清和阴性血清的 P/N 值。

5.3.2 酶标抗体稀释度的确定

rMSPB 包被酶标板, 当酶标二抗作 20000 倍稀释时, P/N 值最高, 选择 1:20000 作为 rMSPB iELISA 酶标二抗的使用浓度; rLP78 包被酶标板, 当酶标二抗作 10000 倍稀释时, P/N 值最高, 选择 1:10000 作为 rLP78 iELISA 酶标二抗的使用浓度 (图 5-3)。

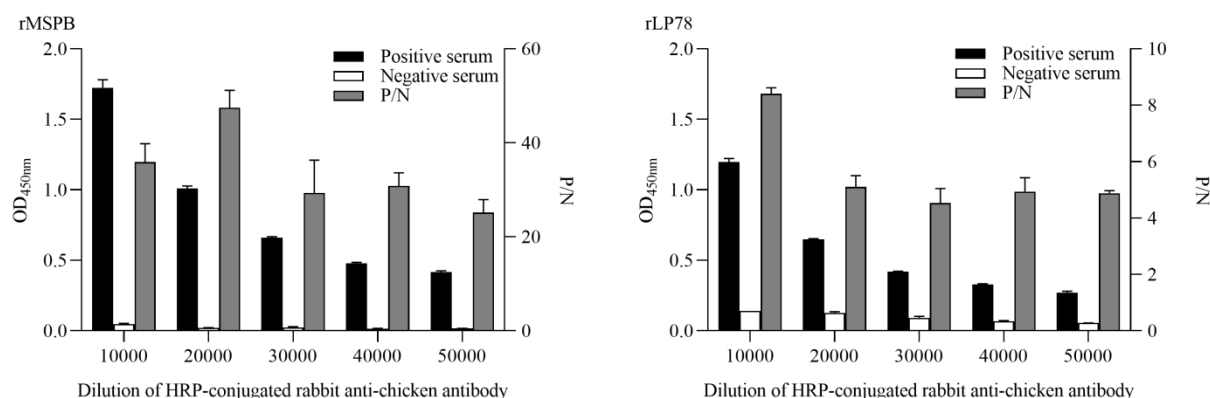


图 5-3 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 酶标二抗使用浓度的确定

Fig. 5-3 Determination of the optimal dilutions of secondary antibody used in rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

5.3.3 判界的确定

检测 83 份 MS 阴性血清, rMSPB iELISA 的 S/P 值平均值为 0.182, 标准差为 0.099, 判界 (平均值+3 标准差) 为 0.479。rLP78 iELISA 的 S/P 值平均值为 0.092, 标准差为 0.083, 判界 (平均值+3 标准差) 为 0.341。

5.3.4 与其它病原的交叉反应性

rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 分别检测 NDV、AIV (H5)、AIV (H7)、AIV (H9)、IBV、IBDV、ADV-4、Hpg 和 MG 血清, 其 OD_{450nm} 小于 0.2, 与各病原阳性血清均无交叉反应 (图 5-4)。

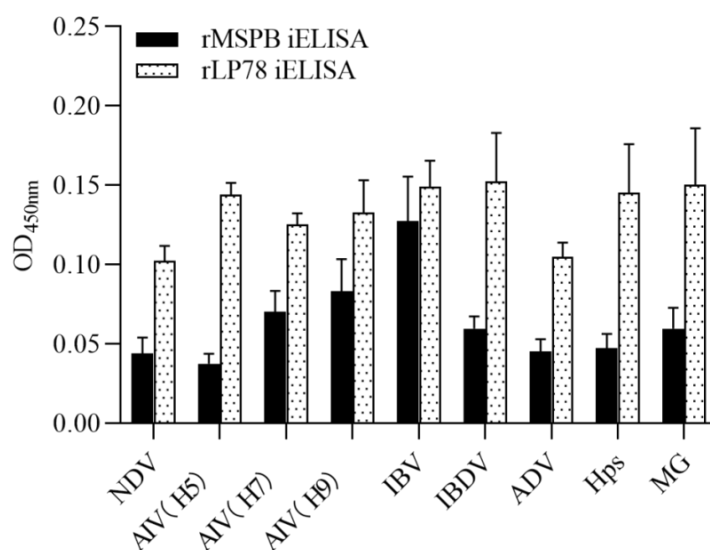


图 5-4 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 与其它禽病原阳性血清的交叉反应性

Fig. 5-4 Cross-reactivity of rMSPB iELISA and rLP78 iELISA with other avian pathogens positive serum

5.3.5 灵敏度

rMSPB iELISA、rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒分别检测不同稀释度的 MS 阳性血清 (HI 效价 1:128), 其最低检测稀释度分别为 25600、6400~12800 和 25600 (图 5-5)。rMSPB iELISA 的灵敏度同商品化 ELISA 试剂盒相当, 而 rLP78 iELISA 的灵敏度较 rMSPB 和商品化 ELISA 试剂盒的灵敏度低 2~4 倍。

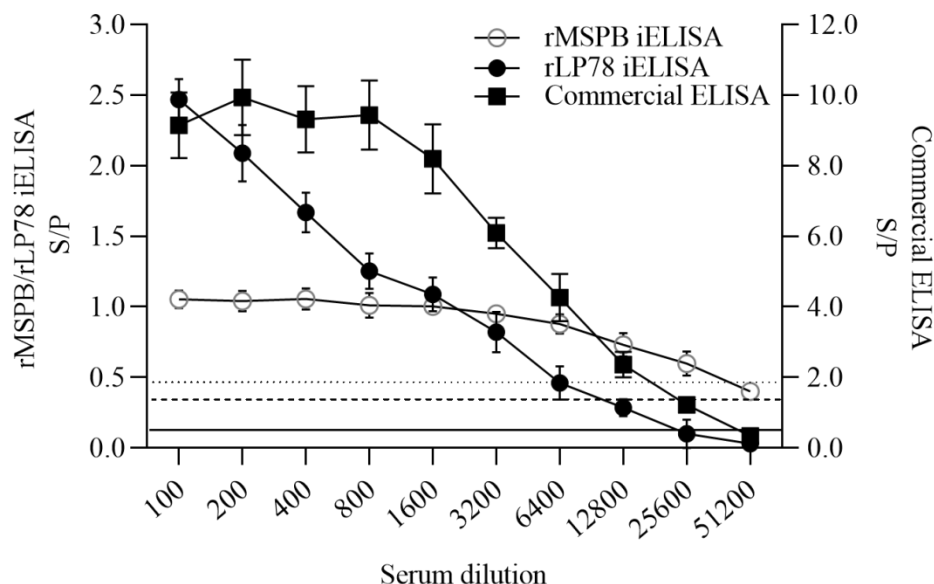


图 5-5 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测 MS 阳性血清的最高稀释度

Fig. 5-5 Determination of the largest dilution of chicken anti-M. synoviae antibodies serum by rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

注: “...”表示 rMSPB iELISA 判界 (0.479), “---”表示 rLP78 iELISA 判界 (0.341), 两条基线对应左纵坐标 S/P 值; “—”表示商品化试剂盒判界 (0.5), 基线对应右纵坐标 S/P 值。

5.3.6 人工感染和免疫 MS 抗体的检测

5.3.6.1 检测人工感染 MS 鸡血清

rMSPB iELISA、rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒均于 MS 感染鸡后第 7 日检出阳性, 阳性比例分别为 6/10、4/10 和 9/10, 感染后第 10 日, 除 rMSPB 检测 9/10 外, 其余两组均检测 10/10 为阳性 (表 5-1 和图 5-6)。

表 5-1 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测人工感染 MS 鸡不同时间的阳性血清比例

Table 5-1 The positive rate of MS infected-chickens serum at different days post inoculum detected by rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

方法 Assays	感染后不同时间 (日) 的阳性比例 Positive rate at different days after challenge								
	0	3	7	10	14	21	28	42	60
rMSPB	0/10	0/10	6/10	9/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10
rLP78	0/10	0/10	4/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Commercial	0/10	0/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

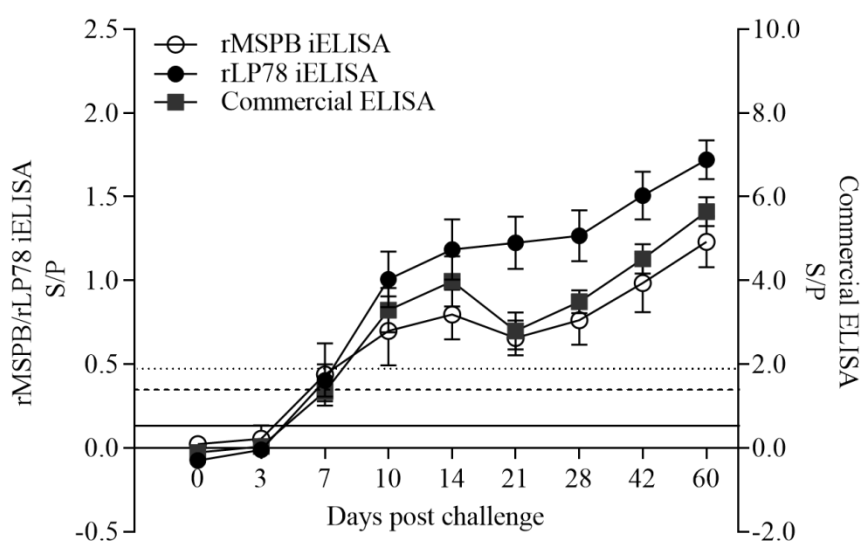


图 5-6 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测人工感染 MS 抗体

Fig. 5-6 Detection of antibody response in chickens after the inoculum of MS by rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

注：“...”表示 rMSPB iELISA 判界（0.479），“---”表示 rLP78 iELISA 判界（0.341），两条基线对应左纵坐标 S/P 值；“—”表示商品化试剂盒判界（0.5），基线对应右纵坐标 S/P 值。

5.3.6.2 检测人工免疫 MS 灭活疫苗的鸡血清

rMSPB iELISA、rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒均于 MS 灭活疫苗免疫后第 7 日检出阳性，阳性比例分别为 1/5、1/5、2/5，免疫后第 14 日，各试剂盒检测均为阳性（表 5-2 和图 5-7）。

表 5-2 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测人工免疫 MS 灭活疫苗鸡不同时间的阳性比例

Table 5-2 The positive rate of chickens immunized with MS inactivated vaccine at different days detected by rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

方法 Assays	免疫后不同时间（日）的阳性比例 Positive rate at different days after immunization								
	0	3	7	10	14	21	28	42	60
rMSPB	0/5	0/5	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
rLP78	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Commercial	0/5	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

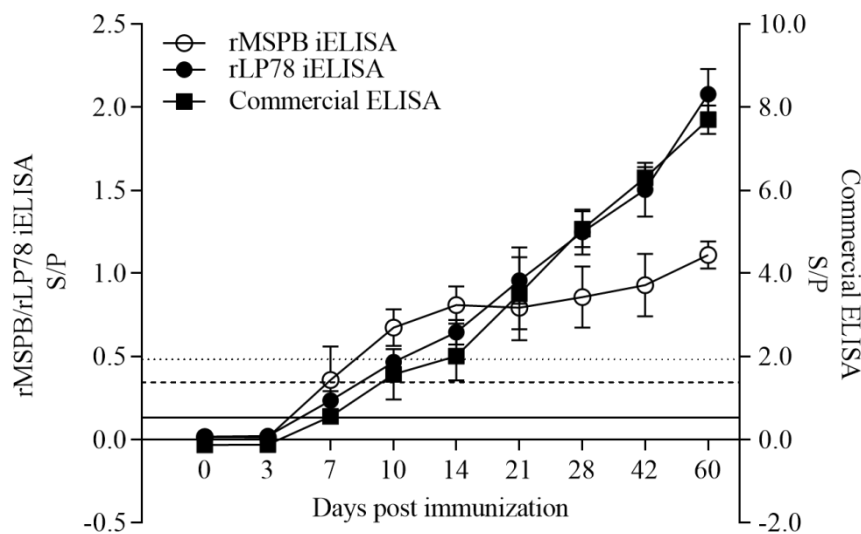


图 5-7 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测免疫 MS 灭活疫苗鸡的抗体

Fig. 5-7 Detection of antibody response in chickens after the immunization of MS inactivated vaccine by rMSPB iELISA and rLP78 iELISA

注：“...”表示 rMSPB iELISA 判界（0.479），“---”表示 rLP78 iELISA 判界（0.341），两条基线对应左纵坐标 S/P 值；“—”表示商品化试剂盒判界（0.5），基线对应右纵坐标 S/P 值。

5.3.7 临床样本的检测

商品化 ELISA 试剂盒检测为 MS 抗体阳性的样品 119 份，rMSPB iELISA 检测为阳性 117 份，阳性符合率为 98.3%，不符合的 2 份样品，RSA 检测均为阳性；商品化 ELISA 试剂盒检测为 MS 抗体阴性的样品 51 份，rMSPB iELISA 检测为阴性 44 份，阴性符合率为 86.3%，不符合的 7 份样品，RSA 检测为阳性 1 份，阴性 6 份；rMSPB iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒的总符合率为 94.7%（表 5-3）。

商品化 ELISA 试剂盒检测为 MS 抗体阳性的样品 119 份，rLP78 iELISA 检测为阳性 102 份，阳性符合率为 85.7%，不符合的 17 份样品，RSA 检测为阳性 15 份，阴性 2 份；商品化 ELISA 试剂盒检测为 MS 抗体阴性的样品 51 份，rLP78 iELISA 检测为阴性 48 份，阴性符合率为 94.1%，不符合的 3 份样品，RSA 检测均为阴性；rLP78 iELISA 和商品化 ELISA 试剂盒的总符合率为 88.2%（表 5-4）。

表5-3 rMSPB iELISA与商品化ELISA试剂盒和RSA的比较

Table 5-3 Comparision of rMSPB iELISA with commercial ELISA kit and RSA

		商品化 ELISA 试剂盒		RSA	
		阳性	阴性	阳性	阴性
rMSPB iELISA	阳性	117	7	110	14
	阴性	2	44	6	40
	合计	119	51	116	54

表5-4 rLP78 iELISA与商品化ELISA试剂盒和RSA的比较

Table 5-4 Comparison of rLP78 iELISA with commercial ELISA kit and RSA

		商品化 ELISA 试剂盒		RSA	
		阳性	阴性	阳性	阴性
rLP78 iELISA	阳性	102	3	96	9
	阴性	17	48	20	45
	合计	119	51	116	54

5.4 讨论

MS 主要通过生物安全、药物控制和疫苗防治。MS 可垂直传播，因此种鸡场 MS 的净化是 MS 防控的重要措施。良好的生物安全环境是保持种鸡场无 MS 感染的重要保障，同时对种鸡场持续进行血清学监测也是维持 MS 净化的重要措施。美国等发达国家通常在产蛋前和产蛋后间隔 60~90 日对种鸡进行血清学监测，其中 ELISA 被广泛用于 MS 抗体的监测(Kleven 2008)。MS 菌体抗原包被检测通常会产生非特异性结合并与 MG 抗体产生交叉发应，同时，MS 菌体抗原的制备成本较高且具有潜在的生物安全风险。

利用 MS 重组抗原作为包被抗原，如 MSPB、LP78 等，可减少 MS 非特异性结合(Noormohammadi et al. 1999; 王宇 等. 2020)。虽然 MSPB 和 LP78 都可用于 MS 抗体的检测，但其检测性能的比较未见报道。在本研究中，检测 HI 效价为 1:128 的 MS 阳性血清，rMSPB 和商品化试剂盒的最低检测限可达 1:25600，较 rLP78 灵敏 2~4 倍。在检测 MS 感染血清时，rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 均可于感染后第 7 日检出，而前者检出率较后者高。检测临床血清，商品化 ELISA 试剂盒检测为阴性而 rMSPB iELISA 或 rLP78 iELISA 检测为阳性的样品，除 1 份经 RSA 检测为阳性外，其余经 RSA 检测为阴性，推测可能与纯化蛋白中含有大肠杆菌源的杂蛋白有关。商品化 ELISA 试剂盒检测为阴性的血清有 5 份经 RSA 检测为阳性，可能与检测方法有关。ELISA 试剂盒检测血清中 IgG 抗体，RSA 除 IgG 外，也可检测 IgM 抗体。rMSPB iELISA 检测临床血清同商品化试剂盒的总符合率为 94.7%，高于 rLP78 iELISA (88.2%)，具有开发成检测试剂盒的潜力。

5.5 小结

(1)对 rMSPB 和 rLP78 的最适包被浓度、血清稀释度和酶标抗体浓度进行了优化，分别建立了检测 MS 抗体的间接 ELISA。

(2) rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 的特异性良好，rMSPB iELISA 的灵敏度同商品化试剂盒相当，较 rLP78 iELISA 灵敏，都可用于 MS 感染和免疫血清的检测，rMSPB iELISA 检测临床血清与商品化试剂盒的符合率为 94.7%，较 rLP78 iELISA 高。

全文结论

1 构建了 6 个 MS 主要免疫原性蛋白(DnaK、enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase)的原核表达载体,各重组蛋白均可在 MS 膜表面表达,除 rMSPB 外,均可黏附 DF-1 细胞并与 DF-1 细胞膜蛋白结合。

2 制备的 6 个重组亚单位疫苗均能诱导鸡的体液和细胞免疫应答,其中重组 enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 和 NADH oxidase 均能显著减轻感染 MS 鸡的气囊和气管粘膜损伤,为 MS 的保护性蛋白。

3 构建了融合 enolase、EF-Tu、MSPB、LP78 抗原表位的原核表达载体。用融合蛋白制备的表位疫苗能诱导鸡的体液和细胞免疫应答,并可保护鸡抵抗 MS 感染,免疫效果同 4 个抗原混合的疫苗相当,可作为 MS 候选疫苗。

4 分别建立了 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA,均具有良好的特异性,rMSPB iELISA 较 rLP78 iELISA 灵敏,同商品化试剂盒的符合率达 94.7%,具有开发成试剂盒的潜力。

本文的创新点

1 原核表达了 6 个 MS 主要免疫原性蛋白，其中 DnaK、EF-Tu 和 LP78 可在 MS 膜表面表达并可黏附 DF-1 细胞。

2 评价了 6 个 MS 主要免疫原性蛋白及基于 4 个蛋白的表位疫苗对鸡的免疫保护效果，可用于 MS 新型疫苗的开发。

3 建立了 rMSPB iELISA 和 rLP78 iELISA 检测 MS 抗体方法，可用于制备 MS 诊断试剂盒。

参考文献

- Adler, H. E., DaMassa, A. J., Field, S. W. 1974. Factors influencing growth of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 18(4):568-77.
- Aldridge, K. E. 1975. Growth and cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryo cell cultures. *Infect Immun*, 12(1):198-204.
- Aldridge, K. E., Cole, B. C. 1978. Immunofluorescence and electron microscopy of the attachment of *Mycoplasma synoviae* to chicken embryo fibroblasts. *Infect Immun*, 21(1):328-32.
- Avakian, A. P., Kleven, S. H. 1990a. Evaluation of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis purified proteins of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* as antigens in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*, 34(3):575-84.
- Avakian, A. P., Kleven, S. H. 1990b. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* studied by immunoblotting. *Vet Microbiol*, 24(2):155-69.
- Avakian, A. P., Kleven, S. H., Glisson, J. R. 1988. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test, and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis*, 32(2):262-72.
- Avakian, A. P., Kleven, S. H., Ley, D. H. 1991. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains and identification of immunogenic integral membrane proteins with Triton X-114 by immunoblotting. *Vet Microbiol*, 29(3-4):319-28.
- Avakian, A. P., Ley, D. H. 1993a. Inhibition of *Mycoplasma gallisepticum* growth and attachment to chick tracheal rings by antibodies to a 64-kilodalton membrane protein of *M. gallisepticum*. *Avian Dis*, 37(3):706-14.
- Avakian, A. P., Ley, D. H. 1993b. Protective immune response to *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated in respiratory-tract washings from *M. gallisepticum*-infected chickens. *Avian Dis*, 37(3):697-705.
- Balasubramanian, S., Kannan, T. R., Baseman, J. B. 2008. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infect Immun*, 76(7):3116-23.
- Bao, S., Guo, X., Yu, S., Ding, J., Tan, L., Zhang, F., Sun, Y., Qiu, X., Chen, G., Ding, C. 2014. *Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein. *BMC Vet Res*, 10223.
- Bencina, D. 2002. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol*, 31(6):535-47.
- Bencina, D., Bradbury, J. M. 1991. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken *Mycoplasma* infections. *Avian Pathol*, 20(1):113-24.
- Bencina, D., Drobnic-Valic, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., Dovc, P. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett*, 203(1):115-23.
- Bencina, D., Narat, M., Bidovec, A., Zorman-Rojs, O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathol*, 34(6):463-72.
- Bencina, D., Narat, M., Dovc, P., Drobnic-Valic, M., Habe, F., Kleven, S. H. 1999. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal

- amino acid sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 173(1):85-94.
- Bencina, D., Tadina, T., Dorrer, D. 1988. Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathol*, 17(2):441-9.
- Benoina, D., Tadina, T., Dorrer, D. 1988. Natural infection of geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and egg transmission of the mycoplasmas. *Avian Pathol*, 17(4):925-8.
- Bercic, R. L., Cizelj, I., Dusanic, D., Narat, M., Zorman-Rojs, O., Dovc, P., Bencina, D. 2011. Neuraminidase of *Mycoplasma synoviae* desialylates heavy chain of the chicken immunoglobulin G and glycoproteins of chicken tracheal mucus. *Avian Pathol*, 40(3):299-308.
- Bercic, R. L., Slavec, B., Lavric, M., Narat, M., Bidovec, A., Dovc, P., Bencina, D. 2008a. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Vet Microbiol*, 127(1-2):147-54.
- Bercic, R. L., Slavec, B., Lavric, M., Narat, M., Zorman-Rojs, O., Dovc, P., Bencina, D. 2008b. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Vet Microbiol*, 130(3-4):391-7.
- Bergeron, N., Hebert, G., Pelletier, M. C., Cai, H. Y., Brochu-Morin, M. E., Vaillancourt, J. P. 2021. Prevalence of *Mycoplasma synoviae* and Its Impact on Productivity in Commercial Poultry Farms in Quebec, Canada. *Avian Dis*, 65(4):547-553.
- Bolha, L., Bencina, D., Cizelj, I., Oven, I., Slavec, B., Rojs, O. Z., Narat, M. 2013. Effect of *Mycoplasma synoviae* and lentogenic Newcastle disease virus coinfection on cytokine and chemokine gene expression in chicken embryos. *Poult Sci*, 92(12):3134-43.
- Bradbury, J. M., Abdul-Wahab, O. M., Yavari, C. A., Dupiellet, J. P., Bove, J. M. 1993. *Mycoplasma imitans* sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *Int J Syst Bacteriol*, 43(4):721-8.
- Bradbury, J. M., Howell, L. J. 1975. The response of chickens to experimental infection 'em ovo' with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol*, 4(4):277-86.
- Bradbury, J. M., Jordan, F. T. 1971. The absorption of γ -globulins to *Mycoplasma gallisepticum* and the possible role in non-specific serological reactions. *Vet Rec*, 89(11):318.
- Bradbury, J. M., Jordan, F. T. 1972. Studies on the adsorption of certain medium proteins to *Mycoplasma gallisepticum* and their influence on agglutination and haemagglutination reactions. *J Hyg (Lond)*, 70(2):267-78.
- Briggs, R. E., Billing, S. R., Boatwright, W. D., Jr., Chriswell, B. O., Casas, E., Dassanayake, R. P., Palmer, M. V., Register, K. B., Tatum, F. M. 2021. Protection against *Mycoplasma bovis* infection in calves following intranasal vaccination with modified-live Mannheimia haemolytica expressing *Mycoplasma* antigens. *Microb Pathog*, 161(Pt A):105159.
- Brown, M. B., Stoll, M. L., Scasserra, A. E., Butcher, G. D. 1991. Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in egg yolk versus serum samples. *J Clin Microbiol*, 29(12):2901-3.
- Catania, S., Gobbo, F., Bilato, D., Gagliazzo, L., Moronato, M. L., Terregino, C., Bradbury, J. M., Ramirez, A. S. 2016. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet Microbiol*, 193:60-6.
- Chaidez-Ibarra, M. A., Velazquez, D. Z., Enriquez-Verdugo, I., Castro Del Campo, N., Rodriguez-Gaxiola, M. A., Montero-Pardo, A., Diaz, D., Gaxiola, S. M. 2021. Pooled molecular occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- Chalquest, R. R., Fabricant, J. 1960. Pleuropneumonia-Like Organisms Associated with Synovitis in Fowls. Full publication date: Nov., 1960, *Avian Diseases*, 4(4):515-539.

- Chathuranga, W. A. G., Hewawaduge, C., Nethmini, N. A. N., Kim, T. H., Kim, J. H., Ahn, Y. H., Yoon, I. J., Yoo, S. S., Park, J. H., Lee, J. S. 2022. Efficacy of a Novel Multiepitope Vaccine Candidate against Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O and A. *Vaccines (Basel)*, 10(12).
- Chen, A. Y., Fry, S. R., Daggard, G. E., Mukkur, T. K. 2008. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice. *Vaccine*, 26(34):4372-8.
- Chen, H., Yu, S., Shen, X., Chen, D., Qiu, X., Song, C., Ding, C. 2011. The *Mycoplasma gallisepticum* alpha-enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen. *Microb Pathog*, 51(4):285-90.
- Chen, J., Wang, W., Hou, S., Fu, W., Cai, J., Xia, L., Lu, Y. 2019. Comparison of protective efficacy between two DNA vaccines encoding DnaK and GroEL against fish nocardiosis. *Fish Shellfish Immunol*, 95:128-139.
- Chen, W., Sun, Q., Yan, Z., Zhou, Q., Cao, Y., Chen, F., Wei, X. 2022. Transcriptional profiling of the chicken tracheal and splenic response to virulent *Mycoplasma synoviae*. *Poult Sci*, 101(3):101660.
- Chen, Y. L., Wang, S. N., Yang, W. J., Chen, Y. J., Lin, H. H., Shiuan, D. 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun*, 71(3):1155-60.
- Chou, S. Y., Chung, T. L., Chen, R. J., Ro, L. H., Tsui, P. I., Shiuan, D. 1997. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochem Mol Biol Int*, 41(4):821-31.
- Cisneros-Tamayo, M., Kempf, I., Coton, J., Michel, V., Bougeard, S., de Boisseson, C., Lucas, P., Bayon-Auboyer, M. H., Chiron, G., Mindus, C. et al. 2020. Investigation on eggshell apex abnormality (EAA) syndrome in France: isolation of *Mycoplasma synoviae* is frequently associated with *Mycoplasma pullorum*. *BMC Vet Res*, 16(1):271.
- Cizelj, I., Bercic, R. L., Dusanic, D., Narat, M., Kos, J., Dovc, P., Bencina, D. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* express a cysteine protease CysP, which can cleave chicken IgG into Fab and Fc. *Microbiology (Reading)*, 157(Pt 2):362-372.
- Cizelj, I., Dusanic, D., Bencina, D., Narat, M. 2016. *Mycoplasma* and host interaction: In vitro gene expression modulation in *Mycoplasma synoviae* and infected chicken chondrocytes. *Acta Vet Hung*, 64(1):26-37.
- Cole, B. C., Aldridge, K. E., Ward, J. R. 1977. *Mycoplasma*-dependent activation of normal lymphocytes: mitogenic potential of mycoplasmas for mouse lymphocytes. *Infect Immun*, 18(2):393-9.
- Cole, B. C., Overall, J. C., Jr., Lombardi, P. S., Glasgow, L. A. 1976. Induction of interferon in ovine and human lymphocyte cultures by mycoplasmas. *Infect Immun*, 14(1):88-94.
- Corfield, T. 1992. Bacterial sialidases--roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology*, 2(6):509-21.
- Cortes, V., Sevilla-Navarro, S., Garcia, C., Tudon, A., Marin, C., Catala-Gregori, P. 2021. Seroprevalence and prevalence of *Mycoplasma synoviae* in laying hens and broiler breeders in Spain. *Poult Sci*, 100(3):100911.
- Cui, Y., Miao, C., Chen, W., Shang, W., Qi, Q., Zhou, W., Wang, X., Li, Y., Yan, Z., Jiang, Y. 2022. Construction and protective efficacy of a novel *Streptococcus pneumoniae* fusion protein vaccine NanAT1-TufT1-PlyD4. *Front Immunol*, 13:1043293.
- Czifra, G., Sundquist, B. G., Hellman, U., Stipkovits, L. 2000. Protective effect of two *Mycoplasma gallisepticum* protein fractions affinity purified with monoclonal antibodies. *Avian Pathol*,

- 29(4):343-51.
- Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W., Baseman, J. B. 2002. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 46(4):1041-51.
- Delpino, M. V., Estein, S. M., Fossati, C. A., Baldi, P. C., Cassataro, J. 2007. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, 25(37-38):6721-9.
- Dijkman, R., Feberwee, A., Landman, W. J. M. 2017. Development, validation and field evaluation of a quantitative real-time PCR able to differentiate between field *Mycoplasma synoviae* and the MS-H-live vaccine strain. *Avian Pathol*, 46(4):403-415.
- Dusanic, D., Bencina, D., Narat, M., Oven, I. 2014. Phenotypic characterization of *Mycoplasma synoviae* induced changes in the metabolic and sensitivity profile of in vitro infected chicken chondrocytes. *Biomed Res Int*, 2014613730.
- Dusanic, D., Bencina, D., Oven, I., Cizelj, I., Bencina, M., Narat, M. 2012. *Mycoplasma synoviae* induces upregulation of apoptotic genes, secretion of nitric oxide and appearance of an apoptotic phenotype in infected chicken chondrocytes. *Vet Res*, 437.
- Dusanic, D., Bercic, R. L., Cizelj, I., Salmic, S., Narat, M., Bencina, D. 2009. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Vet Microbiol*, 138(1-2):114-9.
- Dutta, S., DasSarma, P., DasSarma, S., Jarori, G. K. 2015. Immunogenicity and protective potential of a *Plasmodium* spp. enolase peptide displayed on archaeal gas vesicle nanoparticles. *Malar J*, 14406.
- Elfaki, M. G., Kleven, S. H., Jin, L. H., Ragland, W. L. 1992. Sequential intracoelomic and intrabursal immunization of chickens with inactivated *Mycoplasma gallisepticum* bacterin and iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*, 10(10):655-62.
- Ewing, M. L., Cookson, K. C., Phillips, R. A., Turner, K. R., Kleven, S. H. 1998. Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. *Avian Dis*, 42(2):230-8.
- Feberwee, A., de Wit, J. J., Landman, W. J. 2009a. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol*, 38(1):77-85.
- Feberwee, A., Morrow, C. J., Ghorashi, S. A., Noormohammadi, A. H., Landman, W. J. 2009b. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol*, 38(5):333-40.
- Feng, L., Niu, X., Mei, W., Li, W., Liu, Y., Willias, S. P., Yuan, C., Bei, W., Wang, X., Li, J. 2018. Immunogenicity and protective capacity of EF-Tu and FtsZ of *Streptococcus suis* serotype 2 against lethal infection. *Vaccine*, 36(19):2581-2588.
- Feng, Y., Pan, X., Sun, W., Wang, C., Zhang, H., Li, X., Ma, Y., Shao, Z., Ge, J., Zheng, F. et al. 2009. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *J Infect Dis*, 200(10):1583-92.
- Ferguson-Noel, N., Cookson, K., Laibinis, V. A., Kleven, S. H. 2012. The efficacy of three commercial *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in laying hens. *Avian Dis*, 56(2):272-5.
- Fletcher, O. J., Anderson, D. P., Kleven, S. H. 1976. Histology of air sac lesions induced in chickens by contact exposure to *Mycoplasma synoviae*. *Vet Pathol*, 13(4):303-14.
- Gaisser, H. D., de Vries, J., van der Goot, H., Timmerman, H. 1987. Inhibition of NADH oxidase and

- lactate dehydrogenase of *Mycoplasma gallisepticum* by copper complexes of 2,2'-bipyridyl analogues. *Biochem Pharmacol*, 36(19):3237-41.
- Galli, V., Simionatto, S., Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Conceicao, F. R., Dellagostin, O. A. 2012. Immunisation of mice with *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. *Vaccine*, 31(1):135-40.
- Galluzzo, P., Migliore, S., Galuppo, L., Condorelli, L., Hussein, H. A., Licitra, F., Coltraro, M., Sallemi, S., Antoci, F., Cascone, G. et al. 2022. First Molecular Survey to Detect *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Poultry Farms in a Strategic Production District of Sicily (South-Italy). *Animals (Basel)*, 12(8).
- Ghasemi, A., Jeddi-Tehrani, M., Mautner, J., Salari, M. H., Zarnani, A. H. 2014. Immunization of mice with a novel recombinant molecular chaperon confers protection against *Brucella melitensis* infection. *Vaccine*, 32(49):6659-66.
- Giambrone, J. J., Eidson, C. S., Kleven, S. H. 1977. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *Mycoplasma synoviae*, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res*, 38(2):251-3.
- Glew, M. D., Baseggio, N., Markham, P. F., Browning, G. F., Walker, I. D. 1998. Expression of the pMGA genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. *Infect Immun*, 66(12):5833-41.
- Gomez, F. J., Allendoerfer, R., Deepe, G. S., Jr. 1995. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun*, 63(7):2587-95.
- Gomez, F. J., Gomez, A. M., Deepe, G. S., Jr. 1992. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. *Infect Immun*, 60(7):2565-71.
- Gong, X., Chen, Q., Ferguson-Noel, N., Stipkovits, L., Szathmary, S., Liu, Y., Zheng, F. 2020. Evaluation of protective efficacy of inactivated *Mycoplasma synoviae* vaccine with different adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol*, 220109995.
- Goren, E. 1979. [The effect of *Mycoplasma synoviae* infection on the state of health and results of fattening of broiler chickens compared with the effects of various virus infections. A field study (author's transl)]. *Tijdschr Diergeneeskd*, 104(9):369-79.
- Gurevich, V. A., Ley, D. H., Markham, J. F., Whithear, K. G., Walker, I. D. 1995. Identification of *Mycoplasma synoviae* immunogenic surface proteins and their potential use as antigens in the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*, 39(3):465-74.
- Hagan, J. C., Ashton, N. J., Bradbury, J. M., Morgan, K. L. 2004. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma synoviae* in UK laying hens. *Avian Pathol*, 33(1):93-7.
- Hammond, P. P., Ramirez, A. S., Morrow, C. J., Bradbury, J. M. 2009. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2):61-68.
- Hao, F., Xie, X., Feng, Z., Chen, R., Wei, Y., Liu, J., Xiong, Q., Shao, G., Lin, J. 2022. NADH oxidase of *Mycoplasma hyopneumoniae* functions as a potential mediator of virulence. *BMC Vet Res*, 18(1):126.
- Higgins, P. A., Whithear, K. G. 1986. Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*,

- 30(1):160-8.
- Hinz, K. H., Blome, C., Ryll, M. 2003. Virulence of *Mycoplasma synoviae* strains in experimentally infected broiler chickens. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116(1-2):59-66.
- Hirano, H., Hayatsu, E., Kume, K., Kawakubo, Y., Nakagawa, S., Nishiyama, Y., Yoshioka, M. 1978. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken tracheal organ cultures. *Nihon Juigaku Zasshi*, 40(2):147-56.
- Hnatow, L. L., Keeler, C. L., Jr., Tessmer, L. L., Czymmek, K., Dohms, J. E. 1998. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun*, 66(7):3436-42.
- Hong, Y., Garcia, M., Leiting, V., Bencina, D., Dufour-Zavala, L., Zavala, G., Kleven, S. H. 2004. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Diseases*, 48(3):606-616.
- Hopkins, S. R., Yoder, H. W., Jr. 1982. Influence of infectious bronchitis strains and vaccines on the incidence of *Mycoplasma synoviae* airsacculitis. *Avian Dis*, 26(4):741-52.
- Hu, Z., Li, H., Zhao, Y., Wang, G., Shang, Y., Chen, Y., Wang, S., Tian, M., Qi, J., Yu, S. 2022. NADH oxidase of *Mycoplasma synoviae* is a potential diagnostic antigen, plasminogen/fibronectin binding protein and a putative adhesin. *BMC Vet Res*, 18(1):455.
- Inamine, J. M., Ho, K. C., Loechel, S., Hu, P. C. 1990. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol*, 172(1):504-6.
- Indikova, I., Much, P., Stipkovits, L., Siebert-Gulle, K., Szostak, M. P., Rosengarten, R., Citti, C. 2013. Role of the GapA and CrmA cytoadhesins of *Mycoplasma gallisepticum* in promoting virulence and host colonization. *Infect Immun*, 81(5):1618-24.
- Jiang, F., He, J., Navarro-Alvarez, N., Xu, J., Li, X., Li, P., Wu, W. 2016. Elongation Factor Tu and Heat Shock Protein 70 Are Membrane-Associated Proteins from *Mycoplasma ovipneumoniae* Capable of Inducing Strong Immune Response in Mice. *PLoS One*, 11(8):e0161170.
- Jones, J. F., Whithear, K. G., Scott, P. C., Noormohammadi, A. H. 2006a. Determination of the effective dose of the live *Mycoplasma synoviae* vaccine, Vaxsafe MS (strain MS-H) by protection against experimental challenge. *Avian Dis*, 50(1):88-91.
- Jones, J. F., Whithear, K. G., Scott, P. C., Noormohammadi, A. H. 2006b. Duration of immunity with *Mycoplasma synoviae*: Comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain, 86079/7NS. *Avian Diseases*, 50(2):228-231.
- Jones, J. F., Whithear, K. G., Scott, P. C., Noormohammadi, A. H. 2006c. Onset of immunity with *Mycoplasma synoviae*: comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain (86079/7NS). *Avian Dis*, 50(1):82-7.
- Jorge, S., de Oliveira, N. R., Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Hartleben, C. P., Conceição, F. R., Dellagostin, O. A. 2014. The *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 37(4):229-236.
- Kawakubo, Y., Kume, K., Yoshioka, M., Nishiyama, Y. 1980. Histo- and immuno-pathological studies on experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *J Comp Pathol*, 90(3):457-67.
- Kawakubo, Y., Kume, K., Yoshioka, M., Nishiyama, Y. 1981. Effects of thymectomy and bursectomy on the systemic lesions of experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *J Comp Pathol*,

- 91(1):143-51.
- Keeler, C. L., Jr., Hnato, L. L., Whetzel, P. L., Dohms, J. E. 1996. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun*, 64(5):1541-7.
- Kerr, K. M., Olson, N. O. 1970. Pathology of chickens inoculated experimentally or contact-infected with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 14(2):290-320.
- Kheyar, A., Reddy, S. K., Silim, A. 1995. The 64 kDa lipoprotein of *Mycoplasma gallisepticum* has two distinct epitopes responsible for haemagglutination and growth inhibition. *Avian Pathol*, 24(1):55-68.
- Khiari, A. B., Mardassi, B. B. 2012. Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant vlhA gene. *Vet Microbiol*, 156(3-4):322-9.
- Kleven, S. H. 1985. Tracheal populations of *Mycoplasma gallisepticum* after challenge of bacterin-vaccinated chickens. *Avian Dis*, 29(4):1012-7.
- Kleven, S. H. 2008. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis*, 52(3):367-74.
- Kleven, S. H., Fletcher, O. J., Davis, R. B. 1975. Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. *Avian Dis*, 19(1):126-35.
- Kleven, S. H., King, D. D., Anderson, D. P. 1972. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis*, 16(4):915-24.
- Klose, S. M., Omotainse, O. S., Zare, S., Vaz, P. K., Armat, P., Shil, P., Wawegama, N., Kanci Condello, A., O'Rourke, D., Disint, J. F. et al. 2022. Virulence factors of *Mycoplasma synoviae*: Three genes influencing colonization, immunogenicity, and transmissibility. *Front Microbiol*, 13:1042212.
- Klose, S. M., Shil, P., Underwood, G. J., Morrow, C. J., Marenda, M. S., Noormohammadi, A. H. 2023. Opg plays a significant role in temperature sensitivity of *Mycoplasma synoviae* live attenuated vaccine strain MS-H. *Vet Microbiol*, 284:109818.
- Kordafshari, S., Marenda, M. S., O'Rourke, D., Shil, P., Noormohammadi, A. H. 2019. Mutation of oppF gene in the *Mycoplasma synoviae* MS-H vaccine strain and its implication for differential serological responses to vaccination versus field challenge. *Vet Microbiol*, 231:48-55.
- Kordafshari, S., Shil, P., Marenda, M. S., Olaogun, O. M., Konsak-Ilievski, B., Disint, J., Noormohammadi, A. H. 2020. Preliminary comparative analysis of the genomes of selected field reisolates of the *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H reveals both stable and unstable mutations after passage in vivo. *BMC Genomics*, 21(1):598.
- Krause, D. C., Leith, D. K., Baseman, J. B. 1983. Reacquisition of specific proteins confers virulence in *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*, 39(2):830-6.
- Krause, D. C., Leith, D. K., Wilson, R. M., Baseman, J. B. 1982. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. *Infect Immun*, 35(3):809-17.
- Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Grozner, D., Beko, K., Dan, A., Szabo, Z., Gyuranecz, M. 2017. Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type *Mycoplasma synoviae* and MS-H vaccine strains. *PLoS One*, 12(4):e0175969.
- Kume, K., Hayatsu, E., Yoshioka, M. 1976. Comparison of pathogenicity in chickens of *Mycoplasma synoviae* with special reference of a Japanese isolate. *Nihon Juigaku Zasshi*, 38(5):445-50.
- Kume, K., Kawakubo, Y., Morita, C., Hayatsu, E., Yoshioka, M. 1977. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*: effects of bursectomy and thymectomy on course of the infection for the first four weeks. *Am J Vet Res*, 38(10):1595-1600.

- Kume, K., Kawakubo, Y., Yoshioka, M. 1979. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*: effects of dexamethasone treatment. *Am J Vet Res*, 40(2):280-4.
- Landman, W. J. 2014. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol*, 43(1):2-8.
- Lange, M. D., Abernathy, J., Farmer, B. D. 2019. Evaluation of a Recombinant *Flavobacterium columnare* DnaK Protein Vaccine as a Means of Protection Against Columnaris Disease in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Front Immunol*, 10:1175.
- Lavric, M., Bencina, D., Kothlow, S., Kaspers, B., Narat, M. 2007. *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VlhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1beta in chicken macrophages. *Vet Microbiol*, 121(3-4):278-87.
- Leigh, S. A., Branton, S. L., Evans, J. D., Collier, S. D. 2013. Impact of fowlpox-vectored *Mycoplasma gallisepticum* vaccine Vectormune FP MG on layer hen egg production and egg quality parameters. *Poult Sci*, 92(12):3172-5.
- Levisohn, S., Glisson, J. R., Kleven, S. H. (1985). In ovo pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* strains in the presence and absence of maternal antibody. In *Avian Dis*, vol. 29, pp. 188-97.
- Levisohn, S., Razin, S. 1973. Isolation, ultrastructure and antigenicity of *Mycoplasma gallisepticum* membranes. *J Hyg (Lond)*, 71(4):725-37.
- Li, G., Shu, J., Jin, J., Shu, J., Feng, H., Chen, J., He, Y. 2022a. Development of a Multi-Epitope Vaccine for *Mycoplasma hyopneumoniae* and Evaluation of Its Immune Responses in Mice and Piglets. *Int J Mol Sci*, 23(14).
- Li, W., Hu, X., Zhang, X., Ge, Y., Zhao, S., Hu, Y., Ashman, R. B. 2011. Immunisation with the glycolytic enzyme enolase confers effective protection against *Candida albicans* infection in mice. *Vaccine*, 29(33):5526-33.
- Li, Y., Wang, J., Liu, B., Yu, Y., Yuan, T., Wei, Y., Gan, Y., Shao, J., Shao, G., Feng, Z. et al. 2022b. DnaK Functions as a Moonlighting Protein on the Surface of *Mycoplasma hyorhinis* Cells. *Front Microbiol*, 13:842058.
- Lin, M. Y., Kleven, S. H. 1984. Transferred humoral immunity in chickens to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis*, 28(1):79-87.
- Liu, R., Xu, B., Yu, S. Q., Zhang, J. F., Sun, H. W., Liu, C. M., Lu, F. Y., Pan, Q. X., Zhang, X. F. 2020. Integrated Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Interaction Between Chicken Synovial Fibroblasts and *Mycoplasma synoviae*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Lockaby, S. B., Hoerr, F. J., Kleven, S. H., Lauerma, L. H. 1999a. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryos. *Avian Dis*, 43(2):331-7.
- Lockaby, S. B., Hoerr, F. J., Lauerma, L. H., Kleven, S. H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Vet Pathol*, 35(3):178-90.
- Lockaby, S. B., Hoerr, F. J., Lauerma, L. H., Smith, B. F., Samoylov, A. M., Toivio-Kinnucan, M. A., Kleven, S. H. 1999b. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 43(2):251-61.
- Lowrie, D. B., Silva, C. L., Colston, M. J., Ragno, S., Tascon, R. E. 1997. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*, 15(8):834-8.
- Ma, X., Wang, L., Li, J., Guo, Y., He, S. 2023. The pathogenicity and immune effects of different generations of *Mycoplasma synoviae* on chicken embryos. *Br Poult Sci*.
- MacOwan, K. J., Atkinson, M. J., Bell, M. A., Brand, T. F., Randall, C. J. 1984a. Egg transmission of a

- respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and infection of the chicken embryo. *Avian Pathol*, 13(1):51-8.
- MacOwan, K. J., Atkinson, M. J., Bennett, G., Brand, T. F., Randall, C. J. 1984b. Maternal antibody to a respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and contagious infection of chicks after hatching. *Avian Pathol*, 13(1):59-64.
- Marchioro, S. B., Fisch, A., Gomes, C. K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D., Dellagostin, O., Conceicao, F. R. 2014. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT_B. *Vet Microbiol*, 173(1-2):166-71.
- Markham, J. F., Morrow, C. J., Scott, P. C., Whithear, K. G. 1998a. Safety of a temperature-sensitive clone of *Mycoplasma synoviae* as a live vaccine. *Avian Dis*, 42(4):677-81.
- Markham, J. F., Morrow, C. J., Whithear, K. G. 1998b. Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis*, 42(4):671-6.
- Markham, J. F., Scott, P. C., Whithear, K. G. 1998c. Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis*, 42(4):682-9.
- May, M., Kleven, S. H., Brown, D. R. 2007. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 51(4):829-33.
- May, M., Szczepanek, S. M., Frasca, S., Jr., Gates, A. E., Demcovitz, D. L., Moneypenny, C. G., Brown, D. R., Geary, S. J. 2012. Effects of sialidase knockout and complementation on virulence of *Mycoplasma gallisepticum*. *Vet Microbiol*, 157(1-2):91-5.
- Membrebe, J. D., Yoon, N. K., Hong, M., Lee, J., Lee, H., Park, K., Seo, S. H., Yoon, I., Yoo, S., Kim, Y. C. et al. 2016. Protective efficacy of *Streptococcus iniae* derived enolase against *Streptococcal* infection in a zebrafish model. *Vet Immunol Immunopathol*, 170:25-9.
- Menegatti, A. C., Tavares, C. P., Vernal, J., Klein, C. S., Huergo, L., Terenzi, H. 2010. First partial proteome of the poultry pathogen *Mycoplasma synoviae*. *Vet Microbiol*, 145(1-2):134-41.
- Mohammed, H. O., Yamamoto, R., Carpenter, T. E., Ortmyer, H. B. 1986a. Comparison of egg yolk and serum for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*, 30(2):398-408.
- Mohammed, H. O., Yamamoto, R., Carpenter, T. E., Ortmyer, H. B. 1986b. A statistical model to optimize enzyme-linked immunosorbent assay parameters for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in egg yolk. *Avian Dis*, 30(2):389-97.
- Morrow, C. J., Bradbury, J. M., Gentle, M. J., Thorp, B. H. 1997. The development of lameness and bone deformity in the broiler following experimental infection with *Mycoplasma gallisepticum* or *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol*, 26(1):169-87.
- Morrow, C. J., Markham, J. F., Whithear, K. G. 1998. Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. *Avian Dis*, 42(4):667-70.
- Muchnik, L., Adawi, A., Ohayon, A., Dotan, S., Malka, I., Azriel, S., Shagan, M., Portnoi, M., Kafka, D., Nahmani, H. et al. 2013. NADH oxidase functions as an adhesin in *Streptococcus pneumoniae* and elicits a protective immune response in mice. *PLoS One*, 8(4):e61128.
- Mugunthan, S. P., Harish, M. C. 2021. Multi-epitope-Based Vaccine Designed by Targeting Cytoadherence Proteins of *Mycoplasma gallisepticum*. *ACS Omega*, 6(21):13742-13755.
- Nagai, K., Domon, H., Maekawa, T., Hiyoshi, T., Tamura, H., Yonezawa, D., Habuka, R., Saitoh, A., Terao, Y. 2019. Immunization with pneumococcal elongation factor Tu enhances serotype-independent

- protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Vaccine*, 37(1):160-168.
- Narat, M., Bencina, D., Kleven, S. H., Habe, F. 1998. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infect Immun*, 66(12):6004-9.
- Nonomura, I., Imada, Y. 1982. Temperature-sensitive mutant of *Mycoplasma synoviae*. I. Production and selection of a nonpathogenic but immunogenic clone. *Avian Dis*, 26(4):763-75.
- Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., Jones, J., Whithear, K. G. 2002. Improved detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* vaccine MS-H using an autologous recombinant MSPB enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathol*, 31(6):611-7.
- Noormohammadi, A. H., Hemmatzadeh, F., Whithear, K. G. 2007. Safety and efficacy of the *Mycoplasma synoviae* MS-H vaccine in turkeys. *Avian Dis*, 51(2):550-4.
- Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Duffy, M. F., Whithear, K. G., Browning, G. F. 1998. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infect Immun*, 66(7):3470-5.
- Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Kanci, A., Whithear, K. G., Browning, G. F. 2000. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of mycoplasma synoviae. *Mol Microbiol*, 35(4):911-23.
- Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Markham, J. F., Whithear, K. G., Browning, G. F. 1999. *Mycoplasma synoviae* surface protein MSPB as a recombinant antigen in an indirect ELISA. *Microbiology (Reading)*, 145 (Pt 8)2087-2094.
- Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Whithear, K. G., Walker, I. D., Gurevich, V. A., Ley, D. H., Browning, G. F. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infect Immun*, 65(7):2542-7.
- Okuda, T., Saito, S., M.Moore, K., Lenexa, K., Tsuzaki, Y. (2003). Modified DNA molecule, recombinant containing the same, and uses thereof, vol. US 2003/0165534 A1. US.
- Olson, N. O., Bletner, J. K., Shelton, D. C., Munrd, D. A., Anderson, G. C., Weakley, C. E. 1954. Enlarged joint condition in poultry caused by an infectious agent. *Poultry Science*, 33(5):1075.
- Olson, N. O., Kerr, K. M. 1967. The duration and distribution of synovitis-producing agent in chickens. *Avian Dis*, 11(4):578-85.
- Olson, N. O., Yamamoto, R., Ortmyer, H. 1965. Antigenic Relationship Between *Mycoplasma Synoviae* and *Mycoplasma Gallisepticum*. *Am J Vet Res*, 26:195-8.
- Omotainse, O. S., Wawegama, N. K., Kulappu Arachchige, S. N., MJ, C. C., Vaz, P. K., Woodward, A. P., Kordafshari, S., Bogeski, M., Stevenson, M., Noormohammadi, A. H. et al. 2022. Tracheal cellular immune response in chickens inoculated with *Mycoplasma synoviae* vaccine, MS-H or its parent strain 86079/7NS. *Vet Immunol Immunopathol*, 251:110472.
- Opitz, H. M., Cyr, M. J. 1986. Triton X-100-solubilized *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* ELISA antigens. *Avian Dis*, 30(1):213-5.
- Opitz, H. M., Duplessis, J. B., Cyr, M. J. 1983. Indirect micro-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *M. gallisepticum*. *Avian Dis*, 27(3):773-86.
- Oyarzun, P., Kobe, B. 2016. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Hum Vaccin Immunother*, 12(3):763-7.
- Pan, J., Wang, Q., Qi, M., Chen, J., Wu, X., Zhang, X., Li, W., Zhang, X. E., Cui, Z. 2023. An Intranasal Multivalent Epitope-Based Nanoparticle Vaccine Confers Broad Protection against Divergent

- Influenza Viruses. *ACS Nano*, 17(14):13474-13487.
- Portuondo, D. L., Dores-Silva, P. R., Ferreira, L. S., de Oliveira, C. S., Tellez-Martinez, D., Marcos, C. M., de Aguiar Loesch, M. L., Guzman, F., Gava, L. M., Borges, J. C. et al. 2019. Immunization with recombinant enolase of *Sporothrix* spp. (rSsEno) confers effective protection against sporotrichosis in mice. *Sci Rep*, 9(1):17179.
- Rawadi, G., Roman-Roman, S. 1996. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 64(2):637-43.
- Razin, S., Jacobs, E. 1992. Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol*, 138(3):407-22.
- Rebollo Couto, M. S., Klein, C. S., Voss-Rech, D., Terenzi, H. 2012. Extracellular Proteins of *Mycoplasma synoviae*. *ISRN Vet Sci*, 2012802308.
- Reddy Chichili, V. P., Kumar, V., Sivaraman, J. 2013. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein Sci*, 22(2):153-67.
- Roberts, D. H., Olesiuk, O. M. 1967. Serological studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 11(1):104-19.
- Saito, S., Fujisawa, A., Ohkawa, S., Nishimura, N., Abe, T., Kodama, K., Kamogawa, K., Aoyama, S., Iritani, Y., Hayashi, Y. 1993. Cloning and DNA sequence of a 29 kilodalton polypeptide gene of *Mycoplasma gallisepticum* as a possible protective antigen. *Vaccine*, 11(10):1061-6.
- Schreiner, S. A., Sokoli, A., Felder, K. M., Wittenbrink, M. M., Schwarzenbach, S., Guhl, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L. E. 2012. The surface-localised alpha-enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. *Vet Microbiol*, 156(1-2):88-95.
- Shahid, M. A., Markham, P. F., Marenda, M. S., Agnew-Crumpton, R., Noormohammadi, A. H. 2014. High-resolution melting-curve analysis of obg gene to differentiate the temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H from non-temperature-sensitive strains. *PLoS One*, 9(3):e92215.
- Shahid, M. A., Markham, P. F., Markham, J. F., Marenda, M. S., Noormohammadi, A. H. 2013. Mutations in GTP binding protein Obg of *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H: implications in temperature-sensitivity phenotype. *PLoS One*, 8(9):e73954.
- Si, D., Sun, J., Guo, L., Yang, F., Tian, X., He, S., Li, J. 2023. Hypothetical Proteins of *Mycoplasma synoviae* Reannotation and Expression Changes Identified via RNA-Sequencing. *Microorganisms*, 11(11).
- Slavec, B., Bercic, R. L., Cizelj, I., Narat, M., Zorman-Rojs, O., Dovc, P., Bencina, D. 2011. Variation of vlhA gene in *Mycoplasma synoviae* clones isolated from chickens. *Avian Pathol*, 40(5):481-9.
- Song, Z., Li, Y., Liu, Y., Xin, J., Zou, X., Sun, W. 2012. alpha-Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*. *PLoS One*, 7(6):e38836.
- Sowmya, B., R, K. T., B, B. J. 2008. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infection and immunity*, 76(7).
- Sui, C., Cui, H., Ji, J., Xu, X., Kan, Y., Yao, L., Bi, Y., Zhang, X., Xie, Q. 2022. Epidemiological investigations and locally determined genotype diversity of *Mycoplasma synoviae* in Central China from 2017 to 2019. *Poult Sci*, 101(1):101522.
- Sun, S., Lin, X., Liu, J., Tian, Z., Chen, F., Cao, Y., Qin, J., Luo, T. 2017a. Phylogenetic and pathogenic analysis of *Mycoplasma Synoviae* isolated from native chicken breeds in China. *Poult Sci*, 96(7):2057-2063.
- Sun, S. K., Lin, X., Chen, F., Wang, D. A., Lu, J. P., Qin, J. P., Luo, T. R. 2017b. Epidemiological

- investigation of *Mycoplasma Synoviae* in native chicken breeds in China. *BMC Vet Res*, 13(1):115.
- Talkington, F. D., Kleven, S. H. 1985a. Evaluation of protection against colonization of the chicken trachea following administration of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin. *Avian Dis*, 29(4):998-1003.
- Talkington, F. D., Kleven, S. H., Brown, J. 1985b. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected chickens. *Avian Dis*, 29(1):53-70.
- Tao, Y., Shu, J., Chen, J., Wu, Y., He, Y. 2019. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res Vet Sci*, 123:144-152.
- Tellez-Martinez, D., Leandro Portuondo, D., Loesch, M. L., Batista-Duharte, A., Zeppone Carlos, I. 2019. A Recombinant Enolase-Montanide PetGel A Vaccine Promotes a Protective Th1 Immune Response against a Highly Virulent *Sporothrix schenckii* by Toluene Exposure. *Pharmaceutics*, 11(3).
- Timms, L., Cullen, G. A. 1976. Cell-mediated and humoral immune response of chickens to *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*, 20(1):96-107.
- Toews, G. B. 2001. Cytokines and the lung. *Eur Respir J Suppl*, 34:3s-17s.
- Vardaman, T. H., Drott, J. H. 1977. The effect of *Mycoplasma synoviae* on meat type hens exposed by injection into air sacs, foot pads and trachea and by aerosol. *Poult Sci*, 56(1):72-8.
- Vardaman, T. H., Drott, J. H. 1980. Comparison of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating antigens by the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis*, 24(3):637-40.
- Vardaman, T. H., Landreth, K., Whatley, S., Dreesen, L. J., Glick, B. 1973. Resistance to *Mycoplasma synoviae* is bursal dependent. *Infect Immun*, 8(4):674-6.
- Vardaman, T. H., Yoder, H. W., Jr. 1970. *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* infections: differentiation by the hemagglutination-inhibition test. *Poult Sci*, 49(1):157-60.
- Walker, E. R., Friedman, M. H., Olson, N. O., Sahu, S. P., Mengoli, H. F. 1978. An ultrastructural study of avian synovium infected with an arthrotropic *Mycoplasma*, *Mycoplasma synoviae*. *Vet Pathol*, 15(3):407-16.
- Wang, J., Yu, Y., Li, Y., Li, S., Wang, L., Wei, Y., Wu, Y., Pillay, B., Olaniran, A. O., Chiliza, T. E. et al. 2022. A multifunctional enolase mediates cytoadhesion and interaction with host plasminogen and fibronectin in *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Res*, 53(1):26.
- Wei, X., Chen, W., Sun, Q., Zhong, Q., Yan, Z., Zhou, Q., Cao, Y., Chen, F., Zhang, X. 2023. Epidemiological investigations and multilocus sequence typing of *Mycoplasma synoviae* isolates from chicken farms in China. *Poult Sci*, 102(6):102006.
- Weinack, O. M., Snoeyenbos, G. H. 1976. Serologic studies with *Mycoplasma synoviae* in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis*, 20(2):253-9.
- Woode, G. N., McMartin, D. A. 1974. Effect of temperature on the growth of *Mycoplasma gallisepticum* and on its inhibition by antiserum. *J Gen Microbiol*, 84(2):383-5.
- Xie, Q., Xing, H., Wen, X., Liu, B., Wei, Y., Yu, Y., Xie, X., Song, D., Shao, G., Xiong, Q. et al. 2022. Identification of the multiple roles of enolase as an plasminogen receptor and adhesin in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microb Pathog*, 105934.
- Xu, B., Liu, R., Ding, M., Zhang, J., Sun, H., Liu, C., Lu, F., Zhao, S., Pan, Q., Zhang, X. 2020a. Interaction of *Mycoplasma synoviae* with chicken synovial sheath cells contributes to macrophage recruitment and inflammation. *Poult Sci*, 99(11):5366-5377.
- Xu, B., Liu, R., Tao, L., Ding, M., Lu, F., Zhang, J., Sun, H., Liu, C., Pan, Q., Zhao, S. et al. 2020b. Complete Genome Sequencing of *Mycoplasma synoviae* Strain HN01, Isolated from Chicken in

- Henan Province, China. *Microbiol Resour Announc*, 9(6).
- Xu, L., Hao, F., Wang, J., Feng, Z., Zhang, L., Yuan, T., Chen, R., Zhang, Z., Shao, G., Xiong, Q. et al. 2022. Th1 and Th17 mucosal immune responses elicited by nasally inoculation in mice with virulence factors of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microb Pathog*, 172105779.
- Xue, J., Xu, M. Y., Ma, Z. J., Zhao, J., Jin, N., Zhang, G. Z. 2017. Serological investigation of *Mycoplasma synoviae* infection in China from 2010 to 2015. *Poult Sci*, 96(9):3109-3112.
- Xue, S., Seo, K., Yang, M., Cui, C., Yang, M., Xiang, S., Yan, Z., Wu, S., Han, J., Yu, X. et al. 2021. *Mycoplasma suis* Alpha-Enolase Subunit Vaccine Induces an Immune Response in Experimental Animals. *Vaccines (Basel)*, 9(12):1506.
- Yaacob, E. N., Norouzitallab, P., De Geest, B. G., Bajek, A., Dierckens, K., Bossier, P., Vanrompay, D. 2019. Recombinant DnaK Orally Administered Protects Axenic European Sea Bass Against Vibriosis. *Front Immunol*, 103162.
- Yadav, J. P., Batra, K., Singh, Y., Singh, M. 2021. Comparative evaluation of indirect-ELISA and DOT blot assay for serodetection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in poultry. *J Microbiol Methods*, 189106317.
- Yagihashi, T., Tajima, M. 1986. Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis*, 30(3):543-50.
- Yang, Y., Sun, W., Guo, J., Zhao, G., Sun, S., Yu, H., Guo, Y., Li, J., Jin, X., Du, L. et al. 2015. In silico design of a DNA-based HIV-1 multi-epitope vaccine for Chinese populations. *Hum Vaccin Immunother*, 11(3):795-805.
- Yano, A., Miwa, Y., Kanazawa, Y., Ito, K., Makino, M., Imai, S., Hanada, N., Nisizawa, T. 2013. A novel method for enhancement of peptide vaccination utilizing T-cell epitopes from conventional vaccines. *Vaccine*, 31(11):1510-5.
- Yin, D., He, L., Zhu, E., Fang, T., Yue, J., Wen, M., Wang, K., Cheng, Z. 2021. A fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) Fiber2 subunit vaccine candidate provides complete protection against challenge with virulent FAdV-4 strain in chickens. *Vet Microbiol*, 263109250.
- Yoder, H. W., Jr. 1989. Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Dis*, 33(1):60-8.
- Yogev, D., Levisohn, S., Razin, S. 1989. Genetic and antigenic relatedness between *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Vet Microbiol*, 19(1):75-84.
- Yoshida, S., Fujisawa, A., Tsuzaki, Y., Saitoh, S. 2000. Identification and expression of a *Mycoplasma gallisepticum* surface antigen recognized by a monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism. *Infect Immun*, 68(6):3186-92.
- Yu-Min, C., Pinn, M. L., Karakousis, P. C., Chien-Fu, H. 2018. Intranasal Immunization with DnaK Protein Induces Protective Mucosal Immunity against Tuberculosis in CD4-Depleted Mice. *J Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 831-.
- Yu, Y., Wang, H., Wang, J., Feng, Z., Wu, M., Liu, B., Xin, J., Xiong, Q., Liu, M., Shao, G. 2018. Elongation Factor Thermo Unstable (EF-Tu) Moonlights as an Adhesin on the Surface of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Binding to Fibronectin. *Front Microbiol*, 9974.
- Yu, Y., Wang, J., Han, R., Wang, L., Zhang, L., Zhang, A. Y., Xin, J., Li, S., Zeng, Y., Shao, G. et al. 2020. *Mycoplasma hyopneumoniae* evades complement activation by binding to factor H via elongation factor thermo unstable (EF-Tu). *Virulence*, 11(1):1059-1074.
- Zhang, A., Chen, B., Mu, X., Li, R., Zheng, P., Zhao, Y., Chen, H., Jin, M. 2009. Identification and

- characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*, 27(9):1348-53.
- Zhang, D., Long, Y., Li, M., Gong, J., Li, X., Lin, J., Meng, J., Gao, K., Zhao, R., Jin, T. 2018. Development and evaluation of novel recombinant adenovirus-based vaccine candidates for infectious bronchitis virus and *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Pathol*, 47(2):213-222.
- Zhang, G., Han, L., Li, Z., Chen, Y., Li, Q., Wang, S., Shi, H. 2023a. Screening of immunogenic proteins and evaluation of vaccine candidates against *Mycoplasma synoviae*. *NPJ Vaccines*, 8(1):121.
- Zhang, G., Han, L., Zhao, Y., Li, Q., Wang, S., Shi, H. 2023b. Development and evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against *Mycoplasma synoviae* infection. *Int J Biol Macromol*, 253(Pt 2):126685.
- Zhang, G. Z., Zhang, R., Zhao, H. L., Wang, X. T., Zhang, S. P., Li, X. J., Qin, C. Z., Lv, C. M., Zhao, J. X., Zhou, J. F. 2010. A safety assessment of a fowlpox-vectored *Mycoplasma gallisepticum* vaccine in chickens. *Poult Sci*, 89(6):1301-6.
- Zhang, X., Chu, Y.-f., Zhao, P., Gao, P.-c., He, Y., Wang, N., Lu*, Z.-x. 2013. Characterization of Elongation Factor Tu of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(4).
- Zhang, Y., Liang, S., Zhang, S., Zhang, S., Yu, Y., Yao, H., Liu, Y., Zhang, W., Liu, G. 2022. Development and evaluation of a multi-epitope subunit vaccine against group B *Streptococcus* infection. *Emerg Microbes Infect*, 11(1):2371-2382.
- Zhao, G., Zhang, H., Chen, X., Zhu, X., Guo, Y., He, C., Anwar Khan, F., Chen, Y., Hu, C., Chen, H. et al. 2017. *Mycoplasma bovis* NADH oxidase functions as both a NADH oxidizing and O₂ reducing enzyme and an adhesin. *Sci Rep*, 7(1):44.
- Zhu, L., Shahid, M. A., Markham, J., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., Marenda, M. S. 2019. Comparative genomic analyses of *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H and its wild-type parent strain 86079/7NS: implications for the identification of virulence factors and applications in diagnosis of *M. synoviae*. *Avian Pathology*, 48(6):537-548.
- 包世俊. 2014. 滑液支原体膜表面丙酮酸脱羧酶的生物学特性研究[D]: 中国农业科学院.
- 丁美娟. 2013. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及部分生物学特性研究[D]: 南京农业大学.
- 范庆增, 李彬, 刘红祥, 周建超, 谭鹏, 刘东. 2022. 鸡滑液支原体灭活疫苗(YBF-MS1 株)的临床应用效果. *中国动物检疫*, 39(08):103-106.
- 冯秋霖. 2013. 新城疫病毒载体疫苗免疫鸡对新城疫和鸡毒支原体感染具有有效免疫保护[D]: 中国农业科学院.
- 侯博, 王晨燕, 邵国青. 2021. 滑液囊支原体不同感染途径的致病力比较. *微生物学通报*, 48(08):2704-2713.
- 胡思顺, 王晓丽, 陆时娟, 张金娟, 李自力, 许青荣, 刘梅, 毕丁仁. 2015. 鸡毒支原体 HS 株 pMGA1.2 重组蛋白的免疫保护性研究. *中国预防兽医学报*, 37(3):225-228.
- 华利忠, 党海斌, 冯志新, 袁厅, 张磊, 刘蓓蓓, 甘源, 韦艳娜, 邵国青. 2021. 鸡滑液囊支原体活疫苗(MS-H 株)同时免疫对新支二联活疫苗免疫效力影响的调查. *畜牧与兽医*, 53(01):61-65.
- 李小慧. 2017. 融合表达 TM-1 基因和 gD 基因重组腺病毒的构建及免疫效果评价[D]: 天津农学院.
- 刘佳, 张生英, 邢小勇, 武小椿, 温峰琴, 包世俊. 2020. 滑液支原体 DnaK 的原核表达及免疫原性分析和亚细胞定位. *中国兽医科学*, 50(8):1029-1036.
- 陆凤. 2015. 鸡毒支原体、滑液支原体二联灭活苗的研究[D]: 甘肃农业大学.
- 马爽, 范根成, 孙健, 于国营, 宋新宇, 郭莉莉, 窦小龙, 程增青, 赵鹏, 郭伟伟. (2016a). 一种鸡滑液囊支原体灭活疫苗.

- 马爽, 郭莉莉, 宋新宇, 孙健, 窦小龙, 赵鹏, 郎枫, 刘东, 王义. 2016b. 鸡滑液囊支原体感染的流行病学调查与分析. *中国家禽*, 38(23):68-71.
- 石晓磊. 2018. 鸡滑液囊支原体的分离鉴定及其活疫苗免疫效果的评价[D]: 西北农林科技大学.
- 孙石开. 2018. 本地品种鸡传染性关节炎的病因鉴定、流行病学分析及防控技术研究[D]: 广西大学.
- 孙通行. 2021. 鸡滑液囊支原体与传染性支气管炎病毒、H9 亚型禽流感病毒和新城疫弱毒疫苗协同致病作用的研究[D]: 扬州大学.
- 王昆. 2018. 禽滑液囊支原体灭活疫苗的初步研究[D]: 甘肃农业大学.
- 王秀青. 2004. 鸡毒支原体 H₃ 株 TM-1 基因的原核表达与基因免疫的研究[D]: 内蒙古农业大学.
- 王艳芳, 周雅坪, 郭婷, 张新竹, 吴倩, 陈昕迪, 郝永清. 2019. 牛支原体 EF-Tu 基因的克隆表达、亚细胞定位及间接 ELISA 方法建立. *畜牧兽医学报*, 50(01):134-142.
- 王宇, 李浩然, 温政, 尚原冰, 刘婷, 丁铲, 高崧, 祁晶晶, 于圣青. 2020. 基于脂蛋白 P80 的滑液支原体抗体 ELISA 检测方法的建立及应用. *微生物学报*, 60(3):512-524.
- 魏泽华. 2020. 温度敏感型滑液囊支原体减毒株的培育与生物学特性鉴定[D]: 扬州大学.
- 吴移谋, 叶元康. 2008. 支原体学. 北京: 人民卫生出版社.
- 谢迪, 马爽, 楚电峰, 孙通行, 陈梦瑶, 何吉鑫, 吴艳涛, 杜元钊, 范根成, 张小荣. 2021. 2016-2019 年我国部分地区鸡滑液囊支原体分离株 vlhA 基因遗传进化分析. *中国兽医学报*, 41(01):81-85.
- 徐彬, 孙玉, 王树, 于岩飞, 王晓丽, 马孙婷, 孙华伟, 张敬峰, 刘传敏, 吕立新. 2024. 滑液支原体烯醇化酶在感染宿主中的反应原性和细胞黏附性. *中国兽医学报*, 44(01):88-96.
- 尹丽萍, 王建, 李昌明, 王莉, 张凯云, 姜平, 秦爱建, 刘岳龙. 2023. 鸡滑液囊支原体致病模型建立与灭活疫苗免疫效果评价. *中国兽医杂志*, 59(08):67-71.
- 张东超. 2016. IBV S1 基因和 MG TM-1 基因重组腺病毒的构建与鉴定[D]: 天津农学院.
- 招丽婵, 覃健萍, 王占新, 林欣, 孙石开, 鲁俊鹏. 2019. 鸡滑液囊支原体的流行调查及不同地区分离株药物敏感性分析. *中国兽医杂志*, 55(6):9-13.
- 钟乐苗, 刘秉琿, 吴春琳, 吴异健. 2023. 基于鸡毒支原体黏附素蛋白的表位疫苗制备及免疫效果评价. *畜牧兽医学报*, 54(12):5171-5183.
- 仲翠微, 程敏, 何吉鑫, 陈杨, 陈梦瑶, 曹永忠, 吴艳涛, 张小荣. 2023. 母源抗体对禽滑液囊支原体减毒活疫苗免疫效果的影响评估. *中国动物传染病学报*, 31(6):151-154.

附录

表 S Overlap PCR 扩增目的基因所用的引物序列

Table S Primers used for overlap PCR amplification of the selected genes

Protein names	Gene names	Primer names	Sequence 5'-3'
Chaperone protein DnaK	MSH_01775	dnaK-1F	ATGGCAAAAGAAATAGTATTAGG
		dnaK-1R	GTTAACCATTTAACTATTTTCGTTATCCCAATCA TCTC
		dnaK-2F	GAGATGATTGGGATAACGAAATAGTTAAATGG TTAAC
		dnaK-2R	TTCTTCTACAACCTGTAGCTACTTCTTCTTGG
		eno-1F	ATGTCAGCAATTAAAAAATCC
enolase	MSH_00070	eno-1R	CACCTTTTCCACCAAACCAATTAG
		eno-2F	CTAATTGGTTTGGTGGAAAAGGTG
		eno-2R	AAATCCAGCCCAGTCGCTTT
		eno-3F	AAAGCGACTGGGCTGGATTT
		eno-3R	TTTTTTAAGATTGTAAAATGCGTC
Elongation factor Tu	MSH_03475	ef-tu-F	ATGGCAAAATTAGATTTTGAC
		ef-tu-R	TTTAACGATTTTTGTAACTG
Hemagglutinin	MSH_01355	mspb-1F	CAAACCTCCAGCACCTGCTC
		mspb-1R	GATTGAGCTGTCCATTTGAATGCTGG
		mspb-2F	CCAGCATTCAAATGGACAGCTCAATC
		mspb-2R	TTTGAATTCTGATTTTTCTCTAGCTTTGGTCCA TGCTCTAGGG
Uncharacterized protein	MSH_01690	lp78-1F	GGAGATAAACTGATGGTGGATCTG
		lp78-1R	GTTATTAATTCTTTTCCATTCTTCAGGAG
		lp78-2F	CTCCTGAAGAATGGAAAAGAATTAATAAC
		lp78-2R	CTTCTCCTTCGCTCCATGGAGCACCAAG
		lp78-3F	CTTGGTGCTCCATGGAGCGAAGGAGAAG
		lp78-3R	ACCCACAGTTCTTTAACTGCTTC

表 S1 (续) Overlap PCR 扩增目的基因所用的引物序列

Table S1 (continue) Primers used for overlap PCR amplification of the selected genes

Protein names	Gene names	Primer names	Sequence 5'-3'
Uncharacterized protein	MSH_01690	lp78-4F	GAAGCAGTTAAAGAACTGTGGGGT
		lp78-4R	GATCTTCCCCAGTGTGATGTTGAAACA
		lp78-5F	TGTTTCAACATCACACTGGGGAAGATC
		lp78-5R	CATTTTCCATTTTCCAGGAACA
		lp78-6F	TGTTCTGGGAAAATGGAAAATG
		lp78-6R	GATAGAAGCCATTTTAGGAATAATCTTGTAG
		lp78-7F	CTACAAGATTATTCCTAAAATGGCTTCTATC
NADH oxidase	MSH_02670	lp78-7R	GTTGTTAGTAGCTCTAACGGTTGATACAA
		nox-1F	ATGGAAAACAATAAAATTATAG
		nox-1R	CCTCCAACCCAAACAGCAATACC
		nox-2F	GGTATTGCTGTTTGGGTTGGAGG
		nox-2R	GAAGTATAGGCCATGTTCTCTCC
		nox-3F	GGAGGAACATGGCCTATAGTTC
		nox-3R	CTTGTCCCCAAGAACCAAC
		nox-4F	GTTGGTTCTTGGGGACAAG
		nox-4R	AGCTTTATATTTTAAACCAAGTG

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
ADV	Adenovirus	禽腺病毒
AIV	Avian influenza virus	禽流感病毒
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCU	Colour change unit	颜色改变单位法
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	杜氏改良 Eagle 培养基
EAA	Eggshell apex abnormalities	蛋壳顶端异常
EF-Tu	Elongation factor Tu	转录延伸因子
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制试验
Hpg	Haemophilus paragallinarum	副鸡嗜血杆菌
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSP70	Heat shock protein 70	热休克蛋白 70
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
IFN- γ	Interferon- γ	γ 干扰素
IL-4	Interleukin-4	白介素-4
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
kDa	Kilo-dalton	千道尔顿
MG	Mycoplasma gallisepticum	鸡毒支原体
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性抗原
MS	Mycoplasma synoviae	滑液囊支原体
NDV	Newcastle disease virus	新城疫病毒
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Real-time quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
RSA	Rapid serum agglutination	快速血清凝集试验
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
Vlha	Variable lipoprotein haemagglutinin	可变脂蛋白及血凝素蛋白