

分类号 _____
UDC _____

学 号 MX120180711
密 级 _____



硕 士 学 位 论 文

(全日制学术学位)

毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体的制备及其保护作用

学 院： 兽医学院
专 业： 预防兽医学
研 究 生： 李文静
指 导 教 师： 陶建平 教授
答 辩 委 员 会 主 席： 戴亚斌 研究员
答 辩 日 期： 2021 年 5 月 29 日

Preparation of Monoclonal Antibodies against *Eimeria necatrix* Gametocyte Antigen EnGAM22 and Its Protection

A thesis submitted to
Yangzhou University
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of
Master of Agriculture

By

Wenjing Li

Supervisor: Prof. Jianping Tao

Preventive Veterinary Medicine

May 2021

毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体的制备及其 保护作用

本论文研究得到：国家重点研发计划（2017YFD0500402）、国家自然科学基金
（31972698）、江苏省高校优势学科建设工程等项目资助。

扬州大学学位论文原创性声明和版权使用授权书

学位论文原创性声明

本人声明：所呈交的学位论文是在导师指导下独立进行研究工作所取得的研究成果。除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

作者签名：李文静

签字日期：2021年6月15日

学位论文版权使用授权书

本人完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子文档，允许论文被查阅和借阅。本人授权扬州大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

- 1、保密□，在___年解密后适用本授权书。
- 2、不保密□。

作者签名：李文静

导师签名：陶建平

签字日期：2021年6月15日

签字日期：2021年6月15日

目 录

目 录.....	I
中文摘要.....	II
ABSTRACT.....	IV
符号说明.....	VII
文献综述：球虫配子体蛋白与抗寄生原虫单克隆抗体研究进展.....	1
1 球虫卵囊壁与配子体蛋白.....	1
2 抗原虫单克隆抗体研究与应用进展.....	4
3 本研究目的与意义.....	8
参考文献.....	9
第一章 毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体制备与鉴定及其定位应用.....	14
1 材料与方法.....	15
2 结果.....	20
3 讨论.....	28
参考文献.....	30
第二章 单克隆抗体 2F3 和 3D3 的抗原表位初步鉴定.....	32
1 材料与方法.....	32
2 结果.....	35
3 讨论.....	39
参考文献.....	39
第三章 单克隆抗体 2F3 和 3D3 对雏鸡的被动免疫保护试验.....	40
1 材料与方法.....	40
2 结果.....	43
3 讨论.....	49
参考文献.....	51
全文结论.....	52
攻读学位期间发表的学术成果.....	53
致谢.....	54

中文摘要

鸡球虫病 (Coccidiosis) 是由艾美耳属球虫 (*Eimeria*) 寄生于鸡肠道内引起的一种严重危害养鸡业的原虫病。鸡球虫发育经历裂殖生殖、配子生殖和孢子生殖 3 个阶段, 配子生殖形成的卵囊从鸡粪便排出, 卵囊在外界环境中进行孢子生殖, 形成具有感染性的孢子化卵囊, 鸡食入孢子化卵囊后感染, 因此, 阻碍卵囊形成可阻断病原的传播。在球虫大配子体中, 位于成壁体的配子体蛋白是卵囊壁的前体蛋白。基于上述原理和发现, 国外学者用分离于巨型艾美耳球虫 (*E. maxima*) 配子体的抗原研制了鸡球虫病亚单位疫苗。此外, 发现抗巨型艾美耳球虫配子体抗原的单抗可以阻断配子体的受精过程, 并用单抗证实成壁体蛋白参与卵囊壁的形成。

毒害艾美耳球虫 (*E. necatrix*) 是 7 种鸡球虫中致病性最强的球虫之一, 可引起鸡的急性小肠球虫病, 导致育成鸡的大批死亡。毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 是卵囊壁的前体蛋白, 本实验室在前期研究中已对该蛋白基因进行了克隆与原核表达, 研究发现用重组蛋白免疫鸡能产生高水平的血清抗体, 对毒害艾美耳球虫感染有一定的免疫保护力。但该配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体对感染了毒害艾美耳球虫的雏鸡是否具有免疫保护效果尚不了解。为此, 本文开展了毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体的制备及其保护作用的研究。研究结果可为鸡球虫多肽和新型疫苗分子的设计及诊断试剂的开发奠定基础, 也为球虫卵囊壁形成机制研究提供工具。

1. 毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体制备与鉴定及其定位应用

用 NI-NTA 亲和层析介质纯化重组配子体抗原 rEnGAM22, 免疫 BALB/c 小鼠, 3 次免疫后取脾脏细胞与杂交瘤细胞进行融合, 用预先建立的 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞, 用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行 4 次亚克隆, 获得 2 株能稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株 2F3 和 3D3, 并对单抗亚类和特异性进行鉴定以及应用单抗进行天然蛋白的虫体定位。结果显示, 单克隆抗体 2F3 和 3D3 亚型分别为 IgG2a、IgG2b, 纯化后腹水效价分别为 1:256000、1:64000, 能特异性识别重组抗原 rEnGAM22 和毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白, 不能识别异种球虫天然配子体蛋白。免疫荧光定位显示单克隆抗体 2F3 和 3D3 能特异性识别大配子体的成壁体和卵囊壁, 表明 EnGAM22 抗原参与成壁体以及卵囊壁的形成。

2. 单克隆抗体 2F3 和 3D3 的抗原表位初步鉴定

结合 *Engam22* 基因的氨基酸序列分析和抗原表位预测结果, 将 *Engam22* 基因分为相互重叠的 4 个片段: *Engam22-1* (20-73aa)、*Engam22-2* (64-112aa)、*Engam22-3* (112-151aa)、*Engam22-4*(142-186aa), 分别构建原核表达载体, 转化至宿主菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳以及 Western blot 鉴定结果显示, 重组菌均能正确表达截短的融合蛋白。用 2 株单抗对截短蛋白分别进行 Western blot 分析和 ELISA 试验, 确定单抗 2F3 和 3D3 均识别的线性表位段是 aa142-186。

3. 单克隆抗体 2F3 和 3D3 对雏鸡的被动免疫保护试验

以黄羽鸡为试验动物, 以病变记分、平均增重、相对增重率、卵囊减少率、卵囊孢子化率等为指标, 评价单克隆抗体 2F3 和 3D3 对毒害艾美耳球虫的保护效力, 并与兔抗 EnGAM22 多克隆抗体比较。进行 2 次试验。第一次试验设 9 组: 2F3 单抗高剂量 (150 μg)、低剂量组 (75 μg), 3D3 单抗高剂量 (150 μg)、低剂量组 (75 μg), 兔多抗 IgG 高剂量 (150 μg)、低剂量组 (75 μg), 正常鼠 IgG 对照组, 未免疫攻虫组 (阳性对照组) 和未免疫未攻虫组 (阴性对照组); 第二次试验设 7 个组: 2F3 单抗组 (150 μg), 兔多抗 IgG 组 (150 μg), 2F3 单抗与兔多抗联合免疫组 (150 μg + 150 μg), 正常鼠 IgG 组、正常兔 IgG 对照组, 未免疫攻虫组 (阳性对照组) 和未免疫未攻虫组 (阴性对照组)。攻虫后第 3 d 各免疫组按规定剂量经腹腔注射单抗或多抗, 每天一次, 连续用 5 d。攻虫后第 7.5 d 结束试验。第一次试验结果: 成活率均为 100%; 除 3D3 单抗低剂量组外, 各免疫组的病变记分均显著低于未免疫攻虫组 ($P < 0.05$); 免疫组的平均增重 1 (3D3 单抗低剂量组除外) 显著高于未免疫攻虫组 ($P < 0.05$), 平均增重 2 (3D3 单抗高、低剂量组除外) 显著高于未免疫攻虫组 ($P < 0.05$); 多抗高剂量组的卵囊减少率最高 (58.04%), 其次为 2F3 高剂量组 (53.47%); 2F3 高剂量组的卵囊孢子化率最低 (42.50%), 未免疫攻虫组为 92.50%。第二次试验结果: 各试验组成活率均为 100%; 各免疫组的病变记分均显著低于正常鼠 IgG、正常兔 IgG 和未免疫攻虫组 ($P < 0.05$); 免疫组的平均增重 1 和平均增重 2 显著大于未免疫攻虫组 ($P < 0.05$); 联合免疫组的卵囊减少率最高 (59.28%); 联合免疫组的卵囊孢子化率最低 (47.00%), 未免疫攻虫组为 94.50%。结论: 抗 EnGAM22 单克隆抗体有一定的被动免疫保护力。

关键词: 毒害艾美耳球虫; 配子体抗原; 单克隆抗体; 制备; 免疫保护力

Preparation of Monoclonal Antibodies Against *Eimeria necatrix* Gametocyte Antigen EnGAM22 and Its Protection

ABSTRACT

Chicken coccidiosis is a protozoal disease caused by *Eimeria* species that parasitize the chicken intestine. Coccidian parasite has a complex life cycles including stages of schizogony, gametogony and sporogony. Oocysts from gametogony are shed with faeces. In the external environment, the oocysts sporulate to form the infective sporulated oocysts. Once sporulating oocysts are ingested by birds, the chickens are infected with coccidia. Therefore, impeding the progress of the oocyst formation can block the transmission of pathogens. The oocyst wall proteins are derived from the wall-forming bodies (WFB) in macrogamete. Based on these discoveries, a subunit vaccine against chicken coccidiosis was developed from the gametocyte antigen of *E. maxima*. In addition, the monoclonal antibody (McAb) against the gametocyte antigen of *E. maxima* could block the fertilization process of the gametocyte, confirming that the wall-forming bodies was involved in the formation of oocyst wall.

Of seven chicken coccidia, *E. necatrix* is the most pathogenic of the chicken coccidia, causing small intestinal coccidiosis. *E. necatrix* gametocyte protein 22 (EnGAM22) is a precursor protein of oocyst wall. In a previous study, our lab has cloned and expressed *Engam22* gene of *E. necatrix* in prokaryotic cells, the immune protection against *E. necatrix* afforded by EnGAM22 could produce high level of serum antibody and had certain protective effect. However, the immune protective efficacy of McAb against *E. necatrix* gametocyte antigen EnGAM22 still remain unclear. In the present study, McAbs against *E. necatrix* gametocyte antigen EnGAM22 were prepared, and its immunological protection were studied. Our results may lay the foundation for molecular design of novel vaccines against avian coccidiosis and development of diagnostic reagents, and the McAbs could be employed for studying the mechanism of oocyst wall formation.

1. Preparation and identification of monoclonal antibody against the gametocyte antigen EnGAM22 and its application for localization

BALB/c mice were immunized with recombinant gametocyte antigen rEnGAM22 purified

by Ni-NTA affinity chromatography. After three immunization, the spleen cells of the immunized mice were fused with myeloma cells SP2/0. Hybridoma culture supernatant were examined by the ELISA assay. After four serial subclones, two hybridomas stably secreting specific antibody were obtained, namely 2F3 and 3D3, respectively. The results of identification showed that the isotypes of 2F3 and 3D3 were IgG2a and IgG2b, respectively. The titer of purified ascites were 1:256000 and 1:64000, respectively. The McAb 2F3 and 3D3 could recognize recombinant antigen rEnGAM22 and the native gametocyte protein of *E. necatrix*, but not reacted with the gametocyte proteins of other chicken coccidia. The indirect immunofluorescence assay with McAb 2F3 and 3D3 showed that EnGAM22 were located in the WFB of macrogametocyte and oocyst wall of *E. necatrix*, which indicated that EnGAM22 protein was involved in the formation of oocyst wall.

2. Preliminary identification of epitopes of monoclonal antibodies 2F3 and 3D3

According to the amino acid sequence analysis and predicted epitopes of EnGAM22, *Engam22* gene was divided into four overlapping sequences, *Engam22-1* (20-73aa), *Engam22-2* (64-112aa), *Engam22-3* (112-151aa) and *Engam22-4* (142-186aa), respectively. The truncated sequences were used to construct prokaryotic expression vectors, respectively. The expression vectors then were transformed into *E. coli* BL21 cells and IPTG-induced expression. SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the truncated fusion protein could be expressed correctly. Western blot analysis and ELISA assay with McAb 2F3 and 3D3 showed that that the two McAbs only recognize a B-cell liner epitope at amino acids 142-186.

3. Passive immune protection of monoclonal antibodies 2F3 and 3D3 against *E. necatrix* in chickens

In order to explore the immune protective efficacy of McAb 2F3 and 3D3, two protective efficacy trails were carried out in yellow-feather broilers. Meanwhile, the protective efficacy was compared with rabbit anti-rEnGAM22 serum. The immune protective efficacy was assessed by lesion score, weight gain, relative weight gain rate, oocyst reduction rate, oocyst sporulation rate, respectively. In the first test, nine groups were set up, including McAb 2F3

high and low dose groups (2F3-H and 2F3-L), McAb 3D3 high and low dose groups (3D3-H and 3D3-L), anti-rEnGAM22 serum high and low dose groups (PcAb-H and PcAb-L), mouse IgG control group (M-IgG-C), the unimmunized and challenge group (UC) and the unimmunized and unchallenge group (UU). In the second test, seven groups were set up, including the group of co-immunized with McAb 2F3 and rabbit anti-rEnGAM22 serum (2F3-PcAb), rabbit IgG control group (R-IgG-C), Group 2F3, PcAb, M-IgG-C, UC and UU. The results showed as follows: (1) Results of the first test: the survival rate of all the immunized group was 100%. The lesion scores of all immunized groups (except 3D3-L group) were significantly lower than that of UC group ($P<0.05$). The first average weight gain in the immunized group (except 3D3-L group) were significantly higher than that of UC group ($P<0.05$), and the second average weight gain (except 3D3-H and 3D3-L groups) were significantly higher than that of UC group ($P<0.05$). The oocyst reduction rate was the highest (58.04%) in the PcAb-H group, followed by the 2F3-H group (53.47%). The oocyst sporulation rate of 2F3-H group was 42.50%, which was the lowest among immunized groups, and was 92.50% in the UC group. (2) Results of the second test: the survival rate of all the immunized group was 100%. The lesion scores of all immunized groups were significantly lower than that of M-IgG-C, R-IgG-C and UC groups ($P<0.05$). The first and second average weight gains among the immunized groups were significantly higher than that of UC group ($P<0.05$). The oocyst reduction rate of 2F3-PcAb group was 59.28%, which was the highest among immunized groups. The oocyst sporulation rate of 2F3-PcAb group was 47.00%, which was the lowest among three immunized groups, and 94.50% in UC group. Conclusion: Anti-EnGAM22 monoclonal antibody has certain immune protection against *E. necatrix*.

Key words: *Eimeria necatrix*; gametocyte antigen; monoclonal antibody; preparation; immunological protection

符号说明

英文缩写	英文全称	中文名称
<i>E. necatrix</i>	<i>Eimeria necatrix</i>	毒害艾美耳球虫
<i>E. tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>	柔嫩艾美耳球虫
<i>E. acervuline</i>	<i>Eimeria acervuline</i>	堆型艾美耳球虫
<i>E. maxima</i>	<i>Eimeria maxima</i>	巨型艾美耳球虫
kDa	Kilodalton	千道尔顿
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
IFA	Indirect fluencescreen assay	间接免疫荧光试验
McAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	改良型 Eagle 培养
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
HAT	Hypoxathineand-Aminopterin-Thymidine	HAT 培养基
HT	Hypoxathineand-Thymidine	HT 培养基
pH	Potential Of Hydrogen	酸碱度
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲液
PBST	Tween Phosphate Buffered Saline	磷酸盐吐温缓冲液
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
h	Hour	小时
min	Minute	分钟
μg	Microgram	微克
mL	Milliliter	毫升
μL	Microliter	微升
rpm	Rotation Per Minute	转/分
OD	Optical Density	光密度值

文献综述：球虫配子体蛋白与抗寄生原虫单克隆抗体研究进展

鸡球虫病 (Coccidiosis) 是由艾美耳属 (*Eimeria* spp.) 的一种或多种球虫寄生于鸡肠道内引起的一种寄生性原虫病^[1,2], 临床表现为腹泻、便血和食欲减退等, 严重时会发生死亡^[3], 是全球家禽业的主要威胁^[4]。据不完全统计, 全球每年用于防治鸡球虫病的费用超过 30 亿美元, 约占所有禽球虫病的 30%^[5]。长期以来, 鸡球虫病的防治主要依赖药物, 但长期用药引发了耐药性和药物残留肉蛋等问题, 因此鸡球虫病的防治方法转向了免疫预防。目前, 临床上应用的鸡球虫病疫苗多为强毒疫苗和弱毒疫苗, 其免疫原理是通过低水平球虫感染激发宿主产生免疫应答, 当再次感染时可产生保护性免疫力, 但存在毒力返强、散毒等缺点, 加上鸡球虫特殊的生物学特性以及复杂的生活史, 导致活卵囊疫苗并不能完全取代抗球虫药物^[6], 因此迫切需要寻找一种更加有效的方法来防治鸡球虫病。

球虫为单宿主寄生虫, 其发育经历裂殖生殖、配子生殖和孢子生殖 3 个阶段, 配子生殖形成的卵囊从宿主粪便排出^[7]。卵囊在外界环境中进行孢子生殖, 形成具有感染性的孢子化卵囊, 宿主食入孢子化卵囊后感染。因此, 阻碍卵囊形成可阻断病原的传播。在球虫大配子体中, 位于成壁体的配子体蛋白是卵囊壁的前体蛋白。基于上述原理, 国外学者用分离于巨型艾美耳球虫 (*E. maxima*) 配子体的抗原研制了鸡球虫病亚单位疫苗, 并发现抗巨型艾美耳球虫配子体抗原的单抗可以阻断配子体的受精过程。因此对配子体蛋白的研究有助于解析卵囊壁的形成和阻断病原的传播, 本文就球虫卵囊壁的特性、配子体蛋白的研究现状、单克隆抗体在原虫领域的研究现状与应用等方面进行文献综述。

1 球虫卵囊壁与配子体蛋白

1.1 鸡球虫种类

鸡球虫在分类上属于顶复虫门 (Apicomplexa)、孢子虫纲 (Sporozoea)、真球虫目 (Eucoccidiida)、艾美耳科 (Eimeriidae)、艾美耳属, 世界上公认的鸡球虫有 7 种, 分别是柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*)、毒害艾美耳球虫 (*E. necatrix*)、堆型艾美耳球虫 (*E. acervulina*)、巨型艾美耳球虫、布氏艾美耳球虫 (*E. brunetti*)、和缓艾美耳球虫 (*E. mitis*)

和早熟艾美耳球虫 (*E. praecox*) [8]。在 7 种鸡球虫中, 柔嫩艾美耳球虫与毒害艾美耳球虫的致病性最强, 分别引起急性盲肠球虫病和小肠球虫病; 布氏艾美耳球虫致病性稍次, 巨型艾美耳球虫和堆型艾美耳球虫有中等的致病性, 和缓艾美耳球虫和早熟艾美耳球虫致病性弱, 但这些球虫均可引起鸡的亚临床球虫病[9]。近年来, 随着黄羽鸡因肉质佳、味浓郁等特点而深受消费者的喜爱, 使得黄羽鸡饲养量不断攀升, 但其饲养周期相对较长, 常采用地面放养或圈养等原因, 常受到毒害艾美耳球虫的威胁, 严重会导致育成鸡的大批死亡[10]。

1.2 球虫生活史与卵囊

球虫生活史包括无性生殖(裂殖生殖、孢子生殖)和有性生殖(配子生殖), 具有感染能力的孢子化卵囊被鸡只食入后、嗦囊挤压研磨使卵囊壁破裂, 释放的子孢子可以侵入到肠上皮细胞进行 2~3 次裂殖生殖后形成的大、小配子体, 分别形成大、小配子并结合受精形成合子, 合子发育为卵囊[7]。因此, 卵囊是球虫在宿主间的传播阶段。球虫卵囊的卵囊壁十分坚硬, 对机械与化学损害均有抵抗力, 主要由来自大配子成壁体中的配子体蛋白组成[11, 12], 配子体蛋白在酶和辅助因子的作用下最后形成结构坚固的卵囊壁, 因此开展配子体蛋白功能的研究有助于解析球虫卵囊壁形成的分子机制, 阐明球虫传播阻断疫苗的免疫原理。

1.3 球虫卵囊壁的结构与化学组成

球虫卵囊壁的结构基本一致[13], 分为内外两层: 卵囊壁外层(WFB 1)和卵囊壁内层(WFB 2), 但卵囊壁的内外层壁的厚度不完全一致的[14, 11], 内外层的厚度最终决定成壁体的结构。巨型艾美耳球虫WFB 1约0.5~1.7 μm , WFB 2厚度比WFB 1要小[15], 0.5~1.4 μm 。弓形虫(*Toxoplasma gondii*) WFB 1厚度比WFB 2要小且结构更致密, WFB 1的平均厚度为0.35 μm , WFB 1出现在WFB 2之前, WFB 1由光滑内质网产生的小泡中形成的, 而WFB 2形成于粗糙内质网的腔隙中, 这与艾美耳属球虫相似。弓形虫卵囊壁的不同寻常之处在于其卵囊壁由5层组成, 它有额外的3层且所有5层都是在原始大配子体的膜外形成的[16]。在化学组成上, 球虫卵囊壁主要由蛋白质和脂肪组成, 碳水化合物的含量在1.5%到19%之间, 其主要与蛋白质共价结合[17], 目前仅有少数艾美耳球虫蛋白被研究, 这在很大程度上是由于获取大量球虫卵囊来分离卵囊壁的限制, 以及卵囊壁的固有性质, 这使得卵囊壁蛋白的特性研究变得极其困难[11]。

在卵囊超微结构水平上，不同球虫类寄生虫之间的卵囊壁结构基本一致。国内外学者通过应用透射电镜对艾美耳球虫对卵囊的超微结构进行剖析研究^[18]，这为球虫配子生殖阶段的发育史作了进一步完善。例如柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*) 早期^[19]大配子体的细胞核较大，核外周有高尔基附体，顶复器在大配子体发育早期消失，在大配子体内部先后形成了 WFB 2 和 WFB 1，并混合在大配子体的细胞质中，WFB 1 为电子结构致密成分，WFB 2 是均匀的电子透光层，此时储存能源的支链淀粉和脂肪体逐渐形成，大配子体在与小配子体受精发育成合子时，支链淀粉与脂肪体数量达到最多，成壁体先后解体，混合在大配子体细胞质中的 WFB 1 被转移到大配子细胞的外围，分解并融合在一起形成卵囊壁的外层，位于粗糙内质网中的 WFB 2，形成卵囊内壁^[20, 21, 22]，高尔基附体在外壁形成后消失^[23]。

球虫中常用巨型艾美耳球虫来研究卵囊壁的形成分子机制，并提出了富含酪氨酸卵囊壁蛋白掺入艾美耳球虫卵囊壁的模式^[11]。位于大配子的特异性蛋白酶将 EmGAM56 和 EmGAM82 蛋白加工形成富含酪氨酸的小分子多肽，再经过氧化物酶氧化，形成一个由二酪氨酸键交联的基质，脱水形成卵囊，因此研究卵囊壁分子机制可为控制危害人类健康以及造成经济损失的原虫病奠定基础。

1.4 球虫的配子体蛋白

成壁体中的配子体抗原是卵囊壁的前体蛋白，对配子体抗原的研究有助于解析卵囊壁形成的分子机制以及配子体蛋白的功能，并有可能发现药物或免疫治疗靶点、或疫苗候选抗原。目前对配子体蛋白的研究主要来自于艾美耳球虫属，例如巨型艾美耳球虫、毒害艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫和堆型艾美耳球虫等。

Belli 等^[24]发现巨型艾美耳球虫 EmGAM56 和 EmGAM82 是卵囊壁形成过程中的两个关键蛋白。这两个蛋白主要存在配子体内，且酪氨酸富集区域的相似性极高，在卵囊壁形成过程中，其被水解加工成较小的糖蛋白后被整合发育成卵囊壁，用高压液相色谱鉴定卵囊提取物发现可在完整的卵囊中检测到蓝色自发荧光，表明卵囊壁硬化过程中存在二酪氨酸和 DOPA 蛋白的交联。

Mouafo 等^[25]应用 Wallach^[26]的方法制备了抗柔嫩艾美耳球虫配子体 McAbs E1D8 和 E2E5，间接免疫荧光和免疫电镜鉴定结果显示 McAb E2E5 能够识别 WFB 2，McAb E1D8 能够识别 WFB 1。McAb E2E5 在大配子纯提物的 Western blot 上识别一个 51 kDa 的抗原，在发育后期，卵囊内壁形成后，McAb E2E5 与 23、25 和 30 kDa 的三种多肽

发生反应。蛋白水解过程可能是调控卵囊壁中不同调控蛋白的机制。在卵囊内壁形成后, McAb E2E5 与 23、25 和 30 kDa 的三种多肽可发生反应, 说明形成卵囊壁过程中发生了蛋白水解。通过亲和层析和蛋白质序列分析应用 McAb E2E5 发现其能够识别柔嫩艾美耳球虫配子体抗原 EtGAM56, 说明 EtGAM56 是 EmGAM56 蛋白的具有同源基因。此外 E2E5 鉴定出了一种新的大小为 22 kDa 蛋白即柔嫩艾美耳球虫配子体抗原 EtGAM22, 是一个新的卵囊壁蛋白家族^[27], 该蛋白编码基因以高拷贝数存在, 且富含组氨酸和脯氨酸的蛋白, 表明该基因在卵囊壁形成中非常重要。Northern 印迹显示, *Etgam22* mRNA 主要在配子体阶段表达, 但是 22 kDa 蛋白是否加工成小的多肽以及如何参与卵囊壁形成的机制尚不清楚。

刘丹丹^[28]以柔嫩艾美耳球虫 *Etgam22* 基因序列克隆表达了毒害艾美耳球虫配子体蛋白 EnGAM22, 该基因编码的氨基酸序列与柔嫩艾美耳球虫 *Etgam22* 基因编码的氨基酸序列同源性 94.7%, 组氨酸和脯氨酸的富集区位于第 73-176 位氨基酸。IFA 试验结果显示, 蛋白存在于配子体上, 在裂殖生殖阶段此蛋白不存在。在配子体发育初期荧光标记的蛋白主要散在于配子体内, 随着配子体的生长发育, 逐渐形成向四周扩散分布的、形状规则的圆形颗粒物; 在卵囊壁形成初期, 此蛋白开始相互融合, 表现为配子体四周线形荧光, 参与卵囊壁的形成。

2 抗原虫单克隆抗体研究与应用进展

2.1 抗原虫单克隆抗体的研究现状

单克隆抗体是由纯净的抗原免疫动物诱导适当的免疫反应引发产生的, 如今已有兔子^[29]、大鼠^[30]或绵羊^[31]被用于制备单克隆抗体, 但最常见的生物仍然是小鼠。自 1975 年单克隆抗体技术创立以来, 无论是抗原制备、免疫方法、融合过程以及筛选方法方面都积累了丰富的经验。单克隆抗体技术作为当今世界上生物学技术的里程碑, 其克服了传统多克隆抗体固有的缺点。国内外许多学者都制备了各种杂交瘤细胞株, 由此产生的单克隆抗体可被应用于原虫病的诊断与检测、靶抗原识别分析和球虫领域疾病防控^[32]。

制备单克隆抗体的关键一步是用适量、纯净的抗原对机体进行免疫^[33]。对于免疫原的选择常用天然蛋白或重组抗原。天然蛋白拥有完整的抗原表位结构以及糖基化、磷酸化等空间修饰等位点, 深受国内外研究者的喜爱, 例如王承民^[34]、Bonnin 等^[35]、

Mouafo 等^[25]人将天然蛋白作为免疫原。大肠杆菌表达系统生产的重组抗原蛋白以及多肽和载体偶联因可大量制备等优点，使得刘卿^[36]、平宪卿^[37]、张静等^[38]、宋军澎等^[39]用大肠杆菌表达系统生产的重组抗原蛋白来替代天然抗原制备单克隆抗体，Naghi^[40]采用传统方法制备抗 SAG1 蛋白单克隆抗体，将 SAG1 蛋白的合成肽与 KLH 偶联免疫 BALB/c 小鼠制备得到的。同样武晓东^[41]选用该方法制备了抗微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 卵囊壁单克隆抗体。

在筛选方法上常用 ELISA 方法和 IFA 方法进行杂交瘤细胞的筛选，王承民^[42]和 Bonnin 等^[43]ELISA 方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选。Mouafo 等^[25]用柔嫩艾美耳球虫配子体作为免疫原，用 IFA 方法筛选阳性杂交瘤细胞从而得到单克隆抗体。IFA 筛选方法特异性较强，但方法繁琐，耗时长，ELISA 方法省时省力可大量筛选。但因原核表达的重组抗原中存在 His 标签蛋白或者 GST 标签蛋白质，为排出标签蛋白的干扰，在第一次阳性杂交瘤细胞筛选时需要进行重组蛋白和标签蛋白 GST 蛋白质作为包被抗原进行 ELISA 的正向和反向筛选。在筛选出稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株后，经 Western blot 方法进一步鉴定单克隆抗体的特异性。此外近年不少国内外学者在研究筛选单克隆抗体省时省力的方法，Akagi 等^[44]研究出一种使用高通量流式细胞仪筛选分泌抗体的杂交瘤细胞的方法，该方法可以优先选择识别有结构的抗体以及避免了繁琐的重复筛选和克隆过程。Puligedda 等^[45]研究出的筛选杂交瘤细胞的方法与 Akagi 等^[44]的原理类似。这些新方法为单克隆抗体筛选技术提供了主要的技术与方便，克服了杂交瘤细胞筛选的核心挑战，为单抗的制备和生产提供了新的方式。

2.2 单克隆抗体技术在原虫领域的应用

2.2.1 单克隆抗体在原虫病检测诊断方面的应用

PCR 方法是原虫病诊断常用的方法，通过提取粪便 DNA 和血液 DNA 等进行 PCR 方法对疑似感染原虫的临床样品进行检测。例如张盈^[46]提取粪便基因组 DNA，采用 PCR 检测某香猪场隐孢子虫和十二指肠贾第虫 (*Giardia duodenalis*) 的感染情况。袁淑萍^[47]建立了猪弓形虫实时荧光定量 PCR 检测方法，对 60 份疑似弓形虫感染的临床样品进行了检测。贾西帅^[48]建立 PCR-RFLP 方法检测疟疾患者血样，分析该方法的灵敏度和特异度，并与巢式 PCR 相比较，评价其应用价值。但 PCR 检测技术灵敏度不高，需要较强的特异性引物，单克隆抗体的出现克服了这些不足，单克隆抗体技术具有较强的度特异性和高敏感性，与 ELISA、IFA、胶体金实验技术相结合可用于弓形虫、隐

孢子虫、疟原虫 (*Plasmodium*)、新孢子虫 (*Neospora caninum*) 等寄生虫的常规血清以及虫体检测。

Cesbron 等^[49]和 Araujo 等^[50]用抗弓形虫单克隆抗体建立了检测弓形虫抗原的 ELISA 方法, Araujo 制备的 6 种单克隆抗体中有 4 种均可检测出弓形虫裂解液、小鼠腹膜液和急性感染弓形虫的人血清中的弓形虫的抗原, 未感染弓形虫个体和慢性感染弓形虫个体的对照血清均为阴性。Kaushal 等^[51]建立的双抗体夹心 ELISA 法, 可用于检测手指穿刺血液样本中疟疾寄生虫。结果显示镜检阳性的 120 份疟疾血标本中, 微板夹心 ELISA 法检出疟疾 118 份(98%), 研究结果为高通量筛选与 PfLDH 底物特异性环区结合的抑制剂提供了一种可靠、特异的微板夹心 ELISA, 为合理设计和修饰天然来源或组合化学库中的抗疟药物提供了可能。

杨红玉^[52]利用单克隆抗体建立了检测隐孢子虫的两种方法, 即双抗体夹心 ELISA 方法以及间接免疫荧光方法, 双抗体夹心 ELISA 方法具有属特异性, 不与艾美耳球虫卵囊和贾第虫 (*Giardia duodenalis*) 包囊发生交叉反应。同时利用抗酸染色镜检法与间接免疫荧光法检测疑似隐孢子虫的奶牛粪便样品, 结果显示, 该两种方法均检出同样的阳性样品, 但对抗酸染色阴性的 2 份判断为阳性, 这与安春霞^[53]应用单克隆抗体建立的 IFA 检测方法结果类似, 结果表明在检测卵囊含量较低的样品时, IFA 检测方法更敏感。杨升^[54]利用制备的抗 NcP40 单抗建立了间接 ELISA、双抗体夹心 ELISA、Dot-ELISA 和胶体金试纸条检测方法检测牛微小隐孢子虫, 四种检测方法与牛瑟氏泰勒虫 (*Theileria sergenti*) 及其阳性血清均不发生交叉反应, 且双抗体夹心 ELISA 的检测率与市售的牛新孢子虫检测试剂盒结果一致。

2.2.2 单克隆抗体在鉴定原虫优势抗原方面的应用

单克隆抗体仅针对某一特定抗原表位的抗体, 具有亲和力较高且特异性强的能优点^[55], 与免疫荧光、免疫电镜等技术结合可将目的抗原定位在虫体, 使得国内外许多学者以单克隆抗体为探针对原虫特定靶抗原和优势抗原进行识别、分析和鉴定抗原表达, 可进一步研究原虫发育以及致病机理。

国内外学者常用单克隆抗体鉴定艾美耳球虫卵囊壁形成过程中参与的优势抗原。刘卿^[56]利用制备的抗 EtMIC 单克隆抗体来进一步研究 EtMIC1 和 EtMIC2 蛋白在柔嫩艾美耳球虫整个内生性发育阶段表达的动态变化, 结果表明单抗与裂殖子、裂殖体、配子体作用后, 均可观察到荧光反应, EtMIC1 和 EtMIC2 参与了裂殖子、裂殖体、配子体的表达。利用该单克隆抗体对含有裂殖体、配子体的肠组织进行 western blot, 分别

特异性识别了 100 kDa 和 50 kDa 左右的目的条带，大小与理论值相符。

李莎等^[57]制备的柔嫩艾美耳球虫乳酸脱氢酶 (EtLDH) 单克隆抗体 2F7, 该单抗定位主要分布于裂殖子的细胞质, 结果表明第二代裂殖子中含有乳酸脱氢酶。且该单克隆抗体能特异性识别柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子中大小约为 35 kDa 的天然蛋白, 该实验结果为深入研究 EtLDH 的功能和特性奠定了基础且为后续用免疫共沉淀技术筛选相互作用蛋白, 以及从球虫 cDNA 文库或噬菌体展示文库中分离鉴定功能基因等奠定了基础。

Gondim 等^[58]制备的抗弓形虫组织囊壁和孢子囊壁单克隆抗体 G1/19 和 K8/15-15, 其中 G1/19 仅与子孢子反应, K8/15-15 可识别寄生虫孢子囊壁和体内或体外产生的组织囊壁中的抗原, 该单抗的应用有助于鉴定弓形虫孢子囊和囊壁中的结构成分以及与之密切相关的球虫囊壁中的结构成分, 单克隆抗体 G1/19 能与弓形虫的子孢子发生反应且该单抗可用于弓形虫子孢子的特异性检测和弓形虫特异性蛋白的潜在鉴定。

除此之外, Baszler 等^[59]用制备的抗犬新孢子虫速殖子单克隆抗体 4A4-2, 利用 Western blot 方法鉴定出了速殖子表面抗原蛋白, 并鉴定出该单克隆抗体识别的表位具有碳水化合物性质。单克隆抗体 (McAb 4A4-2) 识别的犬新孢子虫速殖子抗原, 可特异性地检测已知感染犬新孢子虫的牛中的新孢子抗体, 而不检测牛中常见的密切相关的形成囊肿的原虫的抗体。McAb 4A4-2 识别的 65 kDa 抗原和表位具有明显的免疫优势, 提示其在新孢子牛的敏感和特异性鉴定中具有潜在的应用价值。

综上所述, McAb 因高度的特异性和均一性等优点被广泛应用于新基因筛选、发育过程与致病机理探索研究, 是原虫研究领域一种十分重要的生物学技术^[60]。

2.2.3 单克隆抗体在原虫病防治方面的应用

免疫防治技术是疾病防控手段之一, 近几十年来, 单克隆抗体在疾病预防中的优越性被广泛认可, 使得该项技术在传染病治疗以及研制疫苗中被广泛使用, 目前国外已制备出多株抗球虫病的抗体应用于免疫治疗。早前国外学者首次研究巨型艾美耳球虫配子体中提纯的抗原制备的单克隆抗体可以阻断配子体的受精过程, 首次证实了单克隆抗体的免疫保护效力。

基于抗巨型艾美耳球虫配子体抗原单克隆抗体的免疫保护研究结果, Wallach 等^[61]首次选用一种 IgM 亚类的抗巨型艾美耳球虫天然配子体抗原的单克隆抗体与亲和纯化的 56 kDa 和 82 kDa 抗原的免疫鸡血清一起静脉注射被动免疫感染了巨型艾美耳球虫的 14 周雏鸡。根据卵囊总产量指标, 研究表明单克隆抗体对巨型艾美耳球虫攻击感染

具有部分保护作用，卵囊减少率可达 40~50%。除此之外，Wiedmer 等^[62]连续 5 d 腹腔注射不同浓度的抗柔嫩艾美耳球虫^[25]配子单克隆抗体 E2E5 (75 μ g 和 150 μ g) 感染了柔嫩艾美耳球虫的鸡，结果表明在免疫的第 7 d 血清中均可以检测到 McAb E2E5，使用更多的 McAb E2E5 会导致更高的血清浓度，抗体随着时间的推移，血清中的浓度下降，在免疫的第 12 d 几乎检测不到 McAb E2E5，根据卵囊总产量指标，McAb E2E5 可使卵囊脱落率降低 78%。结果表明配子体抗原具有保护性免疫作用，抗体可以到达肠粘膜并影响寄生虫的发育，可以有效地阻断寄生虫的传播，而且可以降低球虫的致病性。

另外有学者制备了球虫入侵蛋白相关的单克隆抗体，该研究可能为阻止虫体入侵细胞和在细胞内的发育预防和控制球虫病的有效方法。平宪卿等^[37]制备了柔嫩艾美耳球虫 A08 蛋白 (EtA08) 单克隆抗体 1G7 和 4F11 以及抗棒状体蛋白 (EtRP) 单克隆抗体 2E3，结果表明 McAb 2E3 定位分布于子孢子顶端，而当子孢子在培养基中孵育 1 h 后，该蛋白则将分布于整个虫体，入侵抑制试验显示，McAb 2E3 对子孢子入侵体外培养的 DF-1 细胞的抑制率达 63.5%，说明 EtRP 在虫体入侵宿主细胞过程中起重要作用，该发现为开发新的控制鸡球虫病的方法提供有价值的试验依据。陈浩^[63]等用制备的抗柔嫩艾美耳球虫存在抗原 EtRP 单克隆抗体进行鸡的被动免疫保护试验，结果显示相对增重率、病变评分、卵囊减少率均随着免疫剂量的增加而增大，表明一定剂量的单克隆抗体可以有效减少柔嫩艾美耳球虫对鸡群的感染。

3 本研究目的与意义

毒害艾美耳球虫的致病性最强，可引起鸡的急性小肠球虫病，导致育成鸡大批死亡。大配子成壁体中的配子体抗原是卵囊壁的前体蛋白，对配子体蛋白功能的研究有助于解析球虫卵囊壁形成的分子机制，阐明球虫传播阻断疫苗的免疫原理。单克隆抗体相比于多克隆抗体因具有无限生产、特异性高等特点被应用于研究寄生虫的免疫治疗和致病机理。近年来，关于鸡球虫配子体蛋白 McAb 的研究较少，有关毒害艾美耳球虫单克隆抗体尚未见有报道。毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 是卵囊壁的前体蛋白，在本实验室前期研究中已对该蛋白基因进行了克隆与原核表达，用重组蛋白免疫鸡能产生高水平的血清抗体，对毒害艾美耳球虫感染有一定的免疫保护力。但该配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体对感染了毒害艾美耳球虫的雏鸡是否具有免疫保护

效果尚不了解，为此，本研究制备了抗 EnGAM22 单克隆抗体，对单抗亚类和特异性进行鉴定，并应用单抗进行天然蛋白的虫体定位；鉴定单克隆抗体的抗原表位；最后通过动物保护试验评价抗配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体的免疫保护效果。研究结果为鸡球虫多肽和新型疫苗分子的设计及诊断试剂的开发奠定了基础，也为球虫卵囊壁形成机制研究提供工具。

参考文献

- [1] Fatoba AJ, Adeleke MA. Transgenic *Eimeria* parasite: A potential control strategy for chicken coccidiosis [J]. *Acta Trop*, 2020, 205: 105417.
- [2] Quiroz Castañeda RE, Dantán González E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives [J]. *Biomed Res Int*, 2015: 430610.
- [3] Kim WH, Chaudhari AA, Lillehoj HS. Involvement of T Cell Immunity in Avian Coccidiosis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2732.
- [4] Blake DP, Tomley FM. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge [J]. *Trends Parasitol*, 2014, 30(1): 12–9.
- [5] Godwin RM, Morgan JA. A molecular survey of *Eimeria* in chickens across Australia [J]. *Vet Parasitol*, 2015, 214(1–2): 16–21.
- [6] Blake DP, Pastor-Fernandez I, Nolan MJ, et al. Recombinant anticoccidial vaccines a cup half full [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 55: 358–65.
- [7] Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15: 58–65.
- [8] Geng T, Ye C, Lei Z, et al. Prevalence of *Eimeria* parasites in the Hubei and Henan provinces of China [J]. *Parasitol Res*, 2021, 120(2): 655–663.
- [9] Blake DP. *Eimeria* genomics: Where are we now and where are we going [J]. *Vet Parasitol*, 2015, 212(1–2): 68–74.
- [10] 梁正鹏. 毒害艾美耳球虫疫苗株重复免疫剂量和交叉免疫保护研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [11] Belli Sabina I, Smith Nicholas C, Ferguson David J P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack [J].

- Trends Parasitol, 2006, 22(9): 416–23.
- [12] Michael E. The formation and final structure of the oocyst wall of *Eimeria acervulina*: a transmission and scanning electron microscope study [J]. Z Parasitenkd, 1978, 57(3): 221–8.
- [13] Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Hutchison WM, et al. Ultrastructural studies on the endogenous development of *Eimeria brunetti*. IV. Formation and structure of the oocyst wall [J]. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1977, 85(3): 201–11.
- [14] Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii* [J]. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1975, 83(5): 491–505.
- [15] Scholtyseck E, Mehlhorn H, Hammond DM. Fine structure of macrogametes and oocysts of Coccidia and related organisms [J]. Z Parasitenkd, 1971, 37(1): 1–43.
- [16] Ferguson DJ, Hutchison WM, Siim JC. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii* [J]. Acta Pathol Microbiol Scand B, 1975, 83(5): 491–505.
- [17] Stotish RL, Wang CC, Meyenhofer M. Structure and composition of the oocyst wall of *Eimeria tenella* [J]. J Parasitol, 1978, 64(6): 1074–81.
- [18] Wiedmer S, Kurth T, Buder U, et al. Correlative light and electron microscopy of wall formation in *Eimeria nieschulzi* [J]. Parasitol Res, 2020, 119(8): 2667–2678.
- [19] 安健, 汪明, 孔繁瑶, 等. 柔嫩艾美耳球虫卵囊形成的超微结构 [J]. 北京农学院学报, 2001, 4: 58–63.
- [20] Mai K, Sharman PA, Walker RA, et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009, 104(2): 281–9.
- [21] Scholtyseck E, Mehlhorn H, Hammond DM. Fine structure of macrogametes and oocysts of Coccidia and related organisms [J]. Z Parasitenkd, 1971, 37(1): 1–43.
- [22] Ferguson DJ, Belli SI, Smith NC, et al. The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima*: immuno-light and electron microscopy [J]. Int J Parasitol, 2003, 33(12): 1329–40.
- [23] 周书林, 张顺祥, 李开平. 斯氏艾美耳球虫内生发育超微结构及杀球灵超微结构效应研究 [J]. 广西农业大学学报, 1992, 4: 73–77.
- [24] Belli SI, Wallach MG, Luxford C, et al. Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and dityrosine- and 3,4-dihydroxyphenylalanine-mediated protein cross-linking in development of the oocyst wall in the

- coccidian parasite *Eimeria maxima* [J]. *Eukaryot Cell*, 2003, 2(3): 456–64.
- [25] Mouafo AN, Weck-Heimann A, Dubremetz JF, et al. Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of *Eimeria tenella* macrogametes (Coccidia, Apicomplexa) [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(3): 217–24.
- [26] Wallach MG, Ashash U, Michael A, et al. Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease [J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3948.
- [27] Krücken J, Hosse RJ, Mouafo AN, et al. Excystation of *Eimeria tenella* sporozoites impaired by antibody recognizing gametocyte/oocyst antigens GAM22 and GAM56 [J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(2): 202–11.
- [28] 刘丹丹. 毒害艾美耳球虫配子体抗原基因的克隆表达与功能研究 [D]. 扬州：扬州大学, 2014.
- [29] Spieker-Polet H, Sethupathi P, Yam PC, et al. Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(20): 9348–52.
- [30] Kilmartin JV, Wright B, Milstein C. Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line [J]. *J Cell Biol*, 1982, 93(3): 576–82.
- [31] Osborne J, Harrison P, Butcher R, et al. Novel super-high affinity sheep monoclonal antibodies against CEA bind colon and lung adenocarcinoma [J]. *Hybridoma*, 1999, 18(2): 183–91.
- [32] 许保疆, 游一, 郭成留, 等. 单克隆抗体在农业和医学上的应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(7): 86–89.
- [33] Hnasko RM, Stanker LH. Hybridoma Technology [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1318: 15–28.
- [34] 王承民. 鸡堆型艾美耳球虫单克隆抗体细胞株的建立 [D]. 郑州：河北农业大学, 2003.
- [35] Bonnin A, Dubremetz J F, Camerlynck P. Characterization and immunolocalization of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa) [J]. *Parasitology*, 1991, 103(2): 171–177.
- [36] 刘卿. 鸡柔嫩艾美耳球虫 EtMIC1 和 EtMIC2 蛋白单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用 [D]. 泰安：山东农业大学, 2014.
- [37] 平宪卿, 韩红玉, 姜连连, 等. 一种柔嫩艾美耳球虫棒状体蛋白单抗的制备及初步应用 [J]. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(2): 47–51.
- [38] 张静, 赵继学, 韩福松, 等. 抗微小隐孢子虫 TSP6 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(4): 325–327.
- [39] 宋军澎. 抗微小隐孢子虫 TSP3 蛋白质单克隆抗体的制备及鉴定 [D]. 长春：吉林大学, 2012.
- [40] Naghi Vishteh M, Javadi Mamaghani A, Rashidi S, et al. Peptide-Based Monoclonal Antibody

- Production Against SAG1 (P30) Protein of *Toxoplasma gondii* [J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2020, 39(2): 51–56.
- [41] 武晓东. 抗微小隐孢子虫卵囊壁单克隆抗体的制备 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [42] 王承民. 鸡堆型艾美耳球虫单克隆抗体细胞株的建立 [D]. 郑州: 河北农业大学, 2003.
- [43] Bonnin A, Dubremetz J F, Camerlynck P. Characterization and immunolocalization of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa) [J]. *Parasitology*, 1991, 103(2): 171–177.
- [44] Akagi S, Nakajima C, Tanaka Y, et al. Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, 125(4): 464–469.
- [45] Puligedda RD, Sharma R, Al-Saleem FH, et al. Capture and display of antibodies secreted by hybridoma cells enables fluorescent on-cell screening [J]. *MAbs*, 2019, 11(3): 546–558.
- [46] 张盈, 徐春艳, 邢金明, 等. 阿克苏某香猪场隐孢子虫和十二指肠贾第虫 PCR 检测 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41 (11): 68–71.
- [47] 袁淑萍, 谢彩华, 王东方, 等. 猪弓形虫实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国动物检疫*, 2020, 37 (5): 106–110.
- [48] 贾西帅, 左玉婷, 陈芳, 等. PCR-RFLP 检测疟原虫方法的建立和应用效果[J]. *热带病与寄生虫学*, 2020, 18 (4): 211–215.
- [49] Cesbron JY, Caron A, Santoro F, et al. A new ELISA method for the diagnosis of toxoplasmosis. Assay of serum IgM by immunocapture with an anti-*Toxoplasma gondii* monoclonal antibody [J]. *Presse Med*, 1986, 15(16): 737–40.
- [50] Araujo FG, Handman E, Remington JS. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids [J]. *Infect Immun*, 1980, 30(1): 12–6.
- [51] Kaushal NA, Kaushal DC. Production and characterization of monoclonal antibodies against substrate specific loop region of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase [J]. *Immunol Invest*, 2014, 43(6): 556–71.
- [52] 杨红玉. 检测隐孢子虫卵囊的单抗介导 IFA 和夹心 ELISA 方法的建立及初步应用 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- [53] 安春霞. 抗猪隐孢子虫 (*Cryptosporidium suis*) 单克隆抗体的研制及初步应用 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [54] 杨升. 抗 NcP40 单抗制备及牛新孢子虫感染 ELISA 和胶体金检测方法的建立 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.

- [55] 王耀, 李燕虹, 吴佳蓓, 等. 大豆 Bowman-Birk 胰蛋白酶抑制因子单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(7): 216–221.
- [56] 刘卿. 鸡柔嫩艾美耳球虫 EtMIC1 和 EtMIC2 蛋白单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [57] 李莎, 梁思婷, 赵其平, 等. 柔嫩艾美耳球虫乳酸脱氢酶单克隆抗体的制备及其在蛋白定位中的应用 [J]. 中国动物传染病学报, 2015, 23(2): 47–52.
- [58] Gondim LF, Wolf A, Vrhovec MG, et al. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii* [J]. Exp Parasitol, 2016, 163: 46–56.
- [59] Baszler TV, Knowles DP, Dubey JP, et al. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(6): 1423–8.
- [60] 平宪卿, 姜连连, 黄兵, 等. 单克隆抗体在球虫研究中的应用 [J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17 (3): 81–86.
- [61] Wallach M, Pillemer G, Yarus S, et al. Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen [J]. Infect Immun, 1990, 58(2): 557–62.
- [62] Wiedmer S, Alnassan AA, Volke B, et al. Passive immunization with *Eimeria tenella* gametocyte antigen 56 (EtGAM56) specific antibodies and active immunization trial with the epitope containing peptide [J]. Vet Parasitol, 2017, 247: 100–107.
- [63] 陈浩, 蔡宇威, 刘兰, 等. 抗柔嫩艾美耳球虫 EtRP 单克隆抗体的制备及其免疫保护效果 [J]. 中国家禽, 2017, 39 (7): 20–23.

第一章 毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体制备与鉴定及其定位应用

鸡球虫病(Coccidiosis)是一个全球性的禽类健康问题,是由艾美耳属(*Eimeria* spp.)的一种或数种鸡球虫寄生于鸡肠道引起的一种寄生性原虫病,引起鸡的食欲不振、腹泻、下痢、消瘦,体重减轻,饲料报酬降低,严重时可导致鸡衰竭死亡,给全球养殖业造成巨大的经济损失^[1,2]。寄生于鸡的球虫有7种,其中毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)的致病性强,主要危害8~18周龄的青年鸡,可引起鸡的急性小肠球虫病,导致育成鸡的大批死亡^[3]。在上世纪80年代中期,随着从国外引进大型白羽肉鸡祖代种鸡,使得白羽肉鸡的饲养极为普遍^[4]。因白羽肉鸡的饲养周期较短,而产蛋鸡一般为笼养,故毒害艾美耳球虫引起的急性小肠球虫病较少见。进入21世纪,随着对优质黄鸡配套系培育与开发利用,以及黄羽黄色表型与独特的肉类风味颇受消费者的青睐,使得黄羽鸡饲养量不断增多^[5]。因黄羽鸡饲养周期相对较长,常采用地面放养或圈养,因此毒害艾美耳球虫引起的急性小肠球虫病越来越多见。另外,随着耐药性虫株、药物残留肉蛋和病原污染环境等问题的出现,迫切需要寻找一种有效、安全的方法来替代抗球虫药^[6]。因此,对球虫的生物学与分子生物学进行深入研究,发现药物或免疫治疗靶点或疫苗候选抗原是控制球虫病的关键。

鸡球虫是单宿主细胞内专性寄生虫,其生活史包括裂殖生殖、配子生殖和孢子生殖三个阶段,其中裂殖生殖、配子生殖在鸡的肠道黏膜细胞内进行,孢子生殖在外界环境中进行^[7]。孢子生殖形成的孢子化卵囊被鸡食入后,在肠道内释放出子孢子,后者侵入肠黏膜细胞进行裂殖生殖,接着进行配子生殖,最后形成卵囊。卵囊随宿主细胞的破裂进入肠腔,并随粪便排出体外^[8]。因此,卵囊是球虫在宿主间的传播阶段。球虫卵囊有一坚韧的卵囊壁,主要来自大配子成壁体中的配子体蛋白组成^[9,10]。所以,开展对配子体蛋白的研究,不仅有助于解析球虫卵囊壁形成的分子机制,而且有助于阐明球虫传播阻断疫苗的免疫原理。

单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb)是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体,具有高特异性和灵敏性,与免疫荧光、免疫电镜等技术结合可将目的抗原定位在虫体,是研究寄生虫虫体细微结构和发育分子机制的重要检测工具,对寄生虫病的免疫治疗与机理研究也具有重大意义^[11]。近年来,关于鸡球虫配子体抗原 McAbs 的研究较少,有关毒害艾美耳球虫单克隆抗体尚未见有报道。本

章以原核表达的重组配子体抗原 rEnGAM22 免疫 BALB/c 小鼠，制备了 2 株抗 EnGAM22 的特异性 McAbs。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞、虫株、虫体

重组菌株 pET-28a(+)-Engam22/BL21 由本实验室构建保存；小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由扬州大学兽医学院张小荣老师惠赠；毒害艾美耳球虫扬州株、柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*) 扬州株、堆型艾美耳球虫 (*E. acervulina*) 扬州株、巨型艾美耳球虫 (*E. maxima*) 扬州株，均由扬州大学兽医学院寄生虫病学教研室建株并定期传代保种；毒害艾美耳球虫第三代裂殖子、配子体和未孢子化卵囊由本实验室制备保存。

1.2 实验动物

BALB/c 与 ICR 小鼠，购自扬州大学比较医学中心。黄羽鸡，购自江苏省海门市京海肉鸡集团公司。雏鸡孵出后即运回实验室，饲养在无球虫卵囊污染的笼具和环境中，饲喂不添加抗球虫药物的全价饲料，鸡自由采食。

1.3 主要试剂与仪器

主要试剂：High Affinity Ni-Charged Resin亲和纯化层析柱、Protein G纯化介质均购自金斯瑞生物科技有限公司；HRP标记羊抗鼠IgG购自BBI公司；SDS-PAGE蛋白上样缓冲液（6×）、TMB显色液和青霉素-链霉素（100×）均购自碧云天生物技术公司；QuickAntibody-Mouse 3W、腹水专用佐剂和小鼠单抗Ig类亚型鉴定用酶标二抗均购自北京博奥龙免疫技术有限公司；胎牛血清（FBS）购自上海双洙生物科技有限公司；PEG1500购自Sigma公司；DMEM basic、50×HAT和100×HT均购自Gibico公司；无血清细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司；硝酸纤维素膜购自默克公司；ECL化学发光试剂购自Tanon公司；FITC标记羊抗鼠IgG购自KPL公司；小牛血清白蛋白（BSA）购自上海生工生物有限公司；分子量8000~14000透析袋购自BIOSHARP公司；PEG8000购自索莱宝生物科技有限公司；Brofdrod蛋白定量试剂盒购自TaKaRa公司；预染和非预染蛋白Marker购自Thermo Fisher公司；其他相关试剂均为国际分析纯试剂。

主要仪器：NanoDrop2000/2000c 型超微量核酸蛋白测定仪（Thermo 公司），SUNRISE-BASIC 型酶标仪（瑞士 TECAN 公司），JY92-II DN 型超声波细胞粉碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司），PowerPacbasic 型 SDS-PAGE 电泳仪（BIO-RAD），荧光显微镜（Leica 公司），移液器（Eppendorf 公司），X1R 型高速冷冻离心机（Thermo 公司），W6M 型电热恒温水浴箱（美国 SHELLAB 公司）。

1.4 重组抗原 rEnGAM22 的制备

重组蛋白诱导表达：将本研究室构建保存的重组菌株 pET28a(+)-Engam22/BL21，接种到 4 mL LB 培养液中（含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素），37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 振荡培养过夜，按 1 : 100 转接 500 mL 含相同浓度抗生素 LB 中，37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 振荡培养 2 h，加入终浓度为 1 mM 的 IPTG，37 $^{\circ}\text{C}$ 200 rpm 诱导 4 h。

重组蛋白纯化：取诱导菌 500 mL，PBS 洗涤离心收集菌体重悬于 10 mL PBS 中，冰浴超声裂解（功率 30%，超声 2 s，间隙 3 s，15 min），释放包涵体；4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm 离心 15 min，弃去上清。将沉淀中加入 10 mL LE Buffer (100 mM Na_2HPO_4 ，10 mM Tris-HCl，8 M Urea，pH 8.0)，冰浴超声加速包涵体溶解；4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm 离心 15 min。将上清转移到含有 6 \times His 标签 Ni-NTA 亲和纯化层析柱中，4 $^{\circ}\text{C}$ 结合 60 min，期间不断摇晃，使目的蛋白与层析柱充分结合。用 Washing Buffer (100 mM Na_2HPO_4 ，10 mM Tris-HCl，10 mM Imidazole，8 M Urea，pH 8.0) 洗涤层析柱，重复 5 次；用 Elution Buffer (100 mM Na_2HPO_4 ，10 mM Tris-HCl，500 mM Imidazole，8 M Urea，pH 8.0) 洗脱蛋白，重复 5 次；收集洗脱液，A280 紫外光吸收法测定蛋白浓度。将收集到的洗脱液转移到透析袋中，分别在含有 6 M、4 M、2 M、1 M 尿素的透析液（1% Glycine，50 mM Tris，0.5 mM EDTA，50 mM NaCl，5% Glycerine，pH 8.0）和 0.1 M PBS 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 复性 6~8 h，最终 PEG8000 浓缩，收集蛋白。A280 紫外光吸收法测定蛋白的浓度，SDS-PAGE 检测重组抗原 rEnGAM22 的纯化情况。

1.5 动物免疫

取重组抗原 rEnGAM22 与 QuickAntibody-Mouse 3W 免疫佐剂 1 : 1 混合免疫 BALB/c 小鼠，20 $\mu\text{g}/\text{只}$ ，100 $\mu\text{L}/\text{只}$ ，腿部肌肉注射；第二周进行第二次免疫，免疫方式、剂量与体积同前。第三周眼眶后静脉丛采血，建立 ELISA 方法并检测小鼠血清抗体效价，血清抗体效价 1 : 10000 以上认定为合格，合格后进行加强免疫，3 d 后取小

鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合。

1.6 间接 ELISA 检测方法的建立

采用方阵滴定法确定重组抗原 rEnGAM22 的包被浓度,并测定小鼠血清抗体效价。将重组抗原 rEnGAM22 用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)进行稀释并包被,抗原浓度从 4 $\mu\text{g/mL}$ 倍比稀释到 0.125 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{L/孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,弃掉包被液, PBST 洗三次, 5 min/次。拍干后加入 1% BSA 封闭液, 200 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗三次, 5 min/次, 拍干。用 PBS 将待检血清以及阴性血清从 1:200 倍比稀释到 1:25600, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗三次, 5 min/次, 拍干。二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 用 PBS 按 1:20000 倍稀释(说明书推荐倍数), 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗 5 次, 5 min/次。拍干后加入 TMB 显色液, 100 $\mu\text{L/孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 15 min, 立即加入 2M H_2SO_4 , 50 $\mu\text{L/孔}$, 终止反应, 用酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。当待检血清 OD₄₅₀ 值/阴性血清 OD₄₅₀ 值 ≥ 2.1 (即 P/N ≥ 2.1), 判定为阳性。选择小鼠待检血清孔 OD₄₅₀ 值接近于 1.0 且 P/N 值最大时待检孔的包被浓度为抗原包被浓度。

1.7 单克隆抗体的制备

1.7.1 SP2/0 细胞的复苏与培养

融合前一周复苏 SP2/0 细胞,从液氮罐中取出 SP2/0 细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速融化。融化后转移至适量 DMEM 培养基中, 800 rpm 离心 8 min。弃上清加入 6 mL 20% FBS-DMEM 培养基将细胞轻轻吹起并移至细胞瓶中, 5% CO_2 培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 培养至良好状态时即可准备融合。

1.7.2 脾细胞的制备

取加强免疫后的 BALB/c 小鼠,眼眶采血备用,脱颈处死后泡于 75%的酒精中消毒 10 min。将小鼠四肢固定在解剖台上,用无菌的剪刀、镊子剪开小鼠腹部皮肤,充分暴露腹膜,打开腹膜取出脾脏并放入含有 DMEM 培养基的一次性培养皿中,去除脾脏表面附着的脂肪和结缔组织后将脾脏放入含有 DMEM 培养基的一次性培养皿中,用无菌注射器针头反复穿刺脾脏并挤压使脾细胞释放,收集脾细胞悬液置于 50 mL 离心管内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min 备用。

1.7.3 饲养层细胞的制备

选取一只 10 周龄的 ICR 小鼠进行饲养层细胞的制备。脱颈致死后, 75%酒精消毒

10 min。将小鼠固定在解剖台上，用无菌的剪刀、镊子剪开小鼠腹部皮肤，暴露腹膜。用无菌注射器抽取 5 mL 的 1% HAT 培养基推注到小鼠腹腔内，轻轻按摩腹部后，用注射器将混有饲养层细胞的培养基抽出至装有 95 mL 的 1% HAT 培养基瓶中备用。

1.7.4 细胞融合

参照张梦迪^[11]方法进行细胞融合。将制备好的小鼠脾细胞悬液以及 6~8 瓶骨髓瘤细胞混匀，800 rpm 离心 8 min，弃上清后用手掌心轻柔地将沉淀散开混匀，将离心管放入 37℃ 水浴中，在 1 min 以内边转动离心管边加入提前预热至 37℃ 的 1 mL PEG1500，速度由慢变快，静置 1 min 后加入 25 mL 提前预热至 37℃ 的 DMEM 基础培养基终止融合，速度由慢变快，90 s 内加完。将 50 mL 离心管放在 37℃ 培养箱中静置 10 min 后 800 rpm 离心 8 min，弃上清，用适量 1% HAT 培养基重悬细胞。将含有饲养层细胞、SP2/0 细胞、脾细胞的 100 mL 1% HAT 培养基混匀后滴加至 96 孔细胞培养板，中间 2 滴，外周 3 滴，置于 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37℃ 培养。

1.7.5 阳性杂交瘤细胞的筛选

在 5 d 后用 1% HAT 培养基进行半换液，10 d 后用 1% HT 培养基进行全换液。待细胞长至底面积的 1/3 时，吸取细胞上清，用建立好的间接 ELISA 方法进行阳性杂交瘤细胞的筛选。以重组抗原 rEnGAM22 为检测原，设置阴、阳性小鼠血清对照孔，筛选三次后挑选 ELISA 读值均为阳性的细胞孔及时亚克隆并冻存。

1.7.6 阳性杂交瘤细胞的亚克隆及稳定性测定

采用有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆，用建立好的间接 ELISA 方法进行检测。参照 1.7.3 的方法提前一天制备饲养层细胞铺板，中间 2 滴，外周 3 滴。次日将生长状态良好的阳性杂交瘤细胞用 1 mL 1% HT 培养基吹打混匀后计算细胞密度，并用 1% HT 进行稀释，取出含有 80 个细胞的培养基，加入到 10 mL 1% HT 培养基中，吹打混匀后滴加到含有饲养层细胞的 96 孔细胞培养板内，每孔两滴，置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养，第 5 d 标记单克隆细胞团数，第 10 d 对单克隆细胞进行检测，并将第一次亚克隆阳性的单克隆细胞孔进行二次亚克隆，直至筛选出的亚克隆细胞全部是阳性、单克隆时定株，并及时将能够稳定分泌单抗的杂交瘤细胞株扩大培养至细胞瓶中，并命名冻存。将定株的杂交瘤细胞在冻存后的第 15 d、30 d、60 d 进行复苏，取细胞培养上清用建立好的 ELISA 方法进行细胞上清效价测定，考察杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性。

1.7.7 腹水的制备

选取 12 周龄的 BALB/c 雌鼠，提前两周腹腔注射 0.4 mL 腹水专用佐剂，将稀释好的 1×10^6 个杂交瘤细胞腹腔注射小鼠，0.5 mL/只。接种后第 7 d，小鼠腹部变大，行动迟缓。用无菌的 5 mL 注射器针头抽取小鼠腹水，3500 rpm 离心 10 min，2 d 后用同样方法抽取小鼠腹水，直至小鼠死亡。

1.7.8 单克隆抗体纯化

用 Protein G 亲和层析柱介质纯化小鼠腹水，将抽取的腹水样品用 Binding/Wash Buffer (20 mM Na_2HPO_4 , 0.15 M NaCl, pH 8.0) 1:1 稀释后倒入装有树脂的层析柱中，1 mL/min 的流速收集流出液，用 30 mL Binding/Wash Buffer 洗涤树脂，流速保持在 2 mL/min，用 15 mL Elution Buffer (0.1 M 甘氨酸, pH 2.5) 洗脱抗体，流速维持在 1 mL/min，将收集到的含有目的免疫球蛋白的洗脱液中加入 1/10 洗脱液体积的中和 Buffer (1 M Tris-HCl, pH 8.5)，调节 pH 至 7.4， -80°C 保存备用。

1.7.9 单克隆抗体效价测定以及亚型鉴定

用重组抗原 rEnGAM22 为包被原，利用建立好的 ELISA 方法进行杂交瘤细胞上清以及小鼠腹水单抗效价检测。设置阴、阳性小鼠血清对照孔，杂交瘤细胞上清用 PBS 从 1:100 开始倍比稀释，腹水首孔用 PBS 从 1:1000 开始倍比稀释。

用 Goat Anti-Mouse Ig (G1/G2a/G2b/G3/M/A) -HRP 酶标二抗进行单抗亚型鉴定。重组抗原 rEnGAM22 为包被原，每孔 100 μL 合 100 ng， 4°C 放置 12 h，甩去包被液用 PBST 洗一次，5 min/次；加入待测杂交瘤细胞培养上清，100 μL /孔，置 37°C 温育 30 min，PBST 洗 5 次，5 min/次；6 种酶标记物每孔 100 μL 置 37°C 温育 30 min，PBST 洗 5 次，5 min/次；随后加 TMB 显色液 37°C 避光显色 20 min，即可判定结果。肉眼观察兰色孔即为阳性，此孔对应的酶标二抗就可判定此株单抗的 Ig 类别。

1.8 单克隆抗体的特异性鉴定

1.8.1 球虫天然配子体蛋白提取物的制备

将毒害艾美耳球虫 (2×10^4)、柔嫩艾美耳球虫 (2×10^4)、堆型艾美耳球虫 (1×10^5)、巨型艾美耳球虫 (5×10^4) 孢子化卵囊接种 30 日龄无球虫感染的黄羽鸡，分别在感染后卵囊出现的前 5 h，每隔 1 h 剖杀感染球虫的鸡只，打开肠腔，用生物显微镜 (10×40 倍) 观察盲肠 (毒害艾美耳球虫和柔嫩艾美耳球虫)、小肠前段 (堆型艾美耳球虫)、小肠中段 (巨型艾美耳球虫) 中配子体的数量，直至出现大量配子体时，剖杀全部试验鸡，取出肠道，剖开肠腔后弃内容物，用预冷 PBS 冲洗肠道黏膜，用手术刀片刮取肠黏膜。

将肠黏膜在冰浴中超声裂解（功率 30%，超声 2 s，间隙 3 s，30 min），用 Bradford 蛋白定量试剂盒法测定蛋白浓度后分装保存于 -80°C 备用。

1.8.2 特异性鉴定

将重组抗原 rEnGAM22，毒害艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min 后离心，取上清进行 SDS-PAGE 电泳；随后转印到硝酸纤维素膜上，转印结束后置于含 3% BSA 封闭液中 4°C 过夜封闭；杂交瘤细胞上清原液为一抗，室温孵育 50 min；二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG，用 3% BSA 封闭液按 1 : 25000 倍稀释（说明书推荐倍数），室温孵育 40 min；ECL 显色，Tanon5200 全自动化学发光成像分析系统观察结果并扫描拍照。

1.9 EnGAM22 蛋白在虫体中的定位

取保存的第三代裂殖子、配子体和未孢子化卵囊用 PBS 稀释涂布于载玻片上，用预冷的甲醇作用 10 min，PBST 洗涤 3 次，5 min/次；0.1% Triton X 室温作用 10 min 后，PBST 洗涤 3 次，5 min/次；10% 山羊血清封闭，湿盒内 37°C 封闭 1 h；一抗为杂交瘤细胞上清，湿盒内 37°C 孵育 1 h，PBST 洗涤 5 次，5 min/次；二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG，用 10% 山羊血清按 1 : 100 倍稀释（说明书推荐倍数），湿盒内 37°C 孵育 1 h，PBST 洗涤 5 次，5 min/次；滴加抗荧光淬灭液封片，荧光显微镜观察结果并拍照。

2 结果

2.1 重组抗原 rEnGAM22 的制备

重组菌株 pET28a(+)-Engam22/BL21 诱导表达获得的重组蛋白，经纯化后进行 SDS-PAGE 电泳分析显示融合蛋白在约 29 kDa 处有单一条带（图 1-1），表明蛋白纯化效果较好。经过透析复性浓缩后，重组抗原 rEnGAM22 浓度为 1.8 mg/mL。

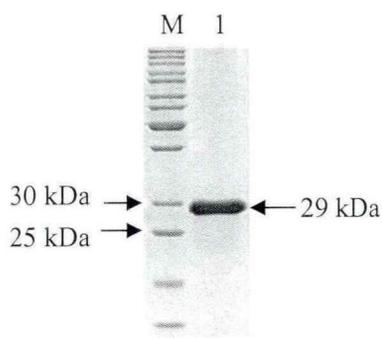


图 1-1 重组抗原的纯化

Fig. 1-1 Purified rEnGAM22

M: 标准蛋白质分子量;

1: rEnGAM22 蛋白

M: Protein molecular weight Marker;

1: rEnGAM22 protein

2.2 间接 ELISA 方法的建立

采用方阵滴定法确定抗体和抗原的工作浓度。将纯化的重组抗原 rEnGAM22 包被酶标板，抗原浓度从 $4 \mu\text{g/mL}$ 开始倍比稀释到 $0.125 \mu\text{g/mL}$ ，阳性血清以及阴性血清从 1:200 到 1:25600 进行倍比稀释。选择小鼠待检血清孔 OD_{450} 值接近于 1.0 且 P/N 值最大时的待检孔的抗原浓度为抗原包被浓度。当抗原浓度在 $0.125 \mu\text{g/mL}$ ，阳性血清以 1:25600 稀释时，P/N 值为 26.16，由此确定重组抗原 rEnGAM22 的包被浓度为 $0.125 \mu\text{g/mL}$ 。

2.3 融合前小鼠血清抗体效价的测定

将纯化的重组抗原 rEnGAM22 包被酶标板，用建立好的 ELISA 方法对融合前的小鼠血清抗体效价进行测定（图 1-2）。小鼠血清抗体效价均达到 1:10000 以上，效价合格，加强免疫，第 3 d 可进行细胞融合。

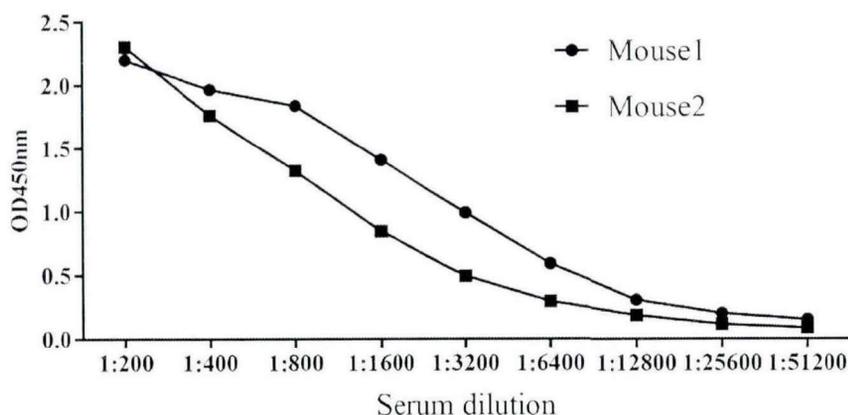


图 1-2 免疫小鼠血清效价

Fig. 1-2 Titer of immune serum in mice

2.4 阳性杂交瘤细胞建株及稳定性测定

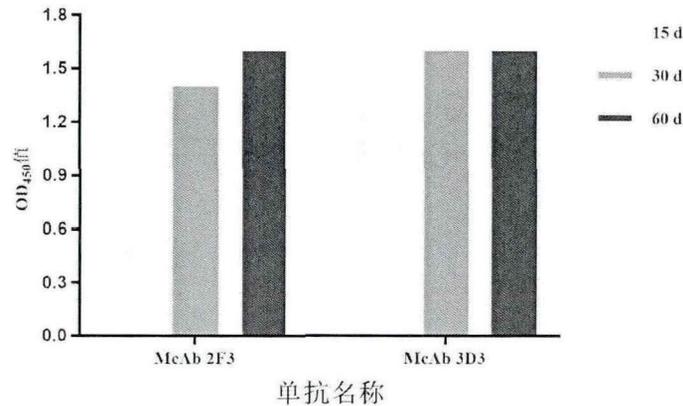


图 1-3 杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的稳定性

Fig. 1-3 The stability of hybridoma cells

待融合细胞长至底面积的 1/3 时，用建立好的 ELISA 方法进行三次阳性杂交瘤细胞的筛选并通过有限稀释法对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆，4 次亚克隆之后获得两株能稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 2F3、3D3。将定株的杂交瘤细胞在冻存后的第 15 d、30 d、60 d 进行复苏，取细胞培养上清用建立好的 ELISA 方法进行细胞上清效价测定，结果表明复苏后的杂交瘤细胞能稳定分泌抗体，说明杂交瘤细胞稳定性较好（图 1-3）。

2.5 腹水纯化效果

将处于对数生长期的 2F3、3D3 杂交瘤细胞计数后注射到已致敏的 BALB/c 雌鼠腹腔。待小鼠腹部变大后（约 7 d），抽取小鼠腹水。采用 Protein G 亲和层析纯化法纯化小鼠腹水，纯化后的 2 株单抗经 SDS-PAGE 电泳分析，均显示出大、小 2 条主带，分子量分别约为 50 kDa（重链）和 25 kDa（轻链），未见其它杂带（图 1-4），显示小鼠腹水单抗纯化效果较好。

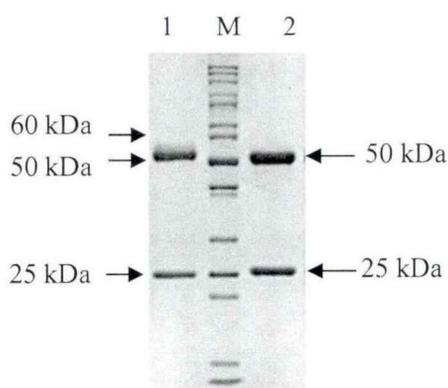


图 1-4 纯化后 McAbs 2F3 和 3D3 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1-4 SDS-PAGE analysis of purified McAbs2F3 and 3D3

M: 标准蛋白质分子量; 1: 纯化后的 2F3; 2: 纯化后的 3D3

M: Protein molecular weight marker; 1: Purified McAb 2F3; 2: Purified McAb 3D3

2.6 单克隆抗体效价测定以及亚类鉴定

将纯化的重组抗原 rEnGAM22 包被酶标板测定杂交瘤细胞培养上清、腹水效价以及鉴定抗体亚类。单抗的腹水效价明显高于细胞上清，单抗 2F3 腹水效价在纯化前为 1:4096000，纯化后为 1:256000；3D3 单抗腹水效价在纯化前为 1:1024000，纯化后为 1:64000。单抗 2F3 的亚型为 IgG2a，单抗 3D3 的亚型为 IgG2b（表 1-1）。

表 1-1 单抗的效价和亚类鉴定

Table 1-1 Titer and isotype identification of the monoclonal antibody

杂交瘤细胞株	细胞上清效价	纯化前腹水效价	纯化后腹水效价	抗体亚型
2F3	1:12800	1:4096000	1:256000	IgG2a
3D3	1:3200	1:1024000	1:64000	IgG2b

2.7 球虫天然配子体蛋白提取物的浓度测定及定量

冰浴超声裂解后的毒害艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫的肠黏膜配子体用 Bradford 法测定蛋白浓度后并定量（图 1-5），用于单克隆抗体的特异性鉴定试验。通过公式计算得出毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物的浓度为 1.69 mg/mL，柔嫩艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物的浓度为 1.68 mg/mL，堆型艾美耳球虫的天然配子体蛋白提取物的浓度为 2.02 mg/mL，巨型艾美耳球虫的天然配

子体蛋白提取物的浓度为 1.47 mg/mL。

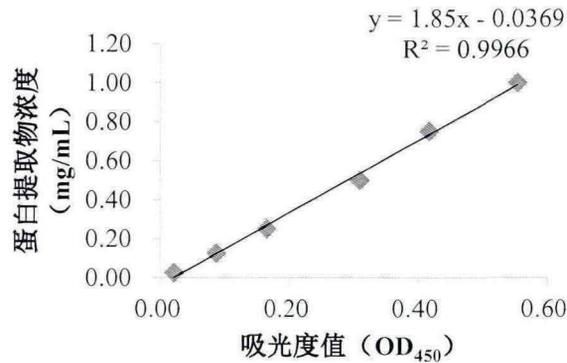


图 1-5 Bradford 蛋白定量试剂盒法标准曲线

Fig. 1-5 The standard curve line by Bradford protein Assay Kit

2.8 单克隆抗体的特异性鉴定

2.8.1 对重组抗原进行特异性识别

Western blot 检测两株杂交瘤细胞上清作为一抗与重组抗原 rEnGAM22 的反应，结果显示，单抗 2F3、3D3 均能特异性识别重组抗原 rEnGAM22，大小在 29 kDa 左右（图 1-6、1-7），而不与 His 标签蛋白发生特异性反应。

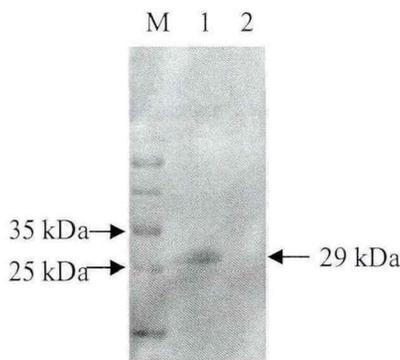


图 1-6 重组抗原对单克隆抗体 2F3 的 Western blot 鉴定

Fig. 1-6 Identification of McAb 2F3 by Western blot with recombinant protein

M: 标准蛋白分子质量;
1: 重组抗原 rEnGAM22; 2: His 标签蛋白
M: Protein molecular weight Marker;
1: rEnGAM22 protein; 2: His label protein

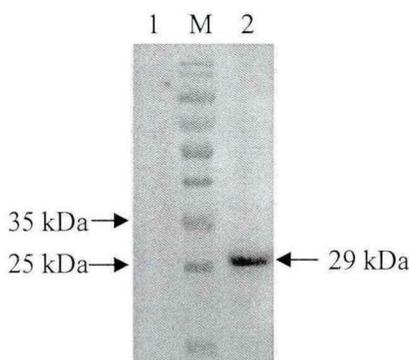


图 1-7 重组抗原对单克隆抗体 3D3 的 Western blot 鉴定

Fig. 1-7 Identification of McAb 3D3 by Western blot with recombinant protein

M: 标准蛋白分子质量;
1: His 标签蛋白; 2: 重组抗原 rEnGAM22
M: Protein molecular weight marker;
1: His label protein; 2: rEnGAM22 protein

2.8.2 对毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白特异性识别

应用 Western blot 试验检测单抗 2F3 和 3D3 对毒害艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物的反应。结果显示, 单抗 2F3 和 3D3 均能特异性识别毒害艾美耳球虫配子体约 37 kDa 大小的天然目的蛋白 (图 1-8、1-9), 而鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体识别的天然目的蛋白条带大小在 35 kDa~37 kDa 之间 (图 1-10), 这表明单抗 2F3 和 3D3 能特异性识别虫体中的天然的 EnGAM22 抗原。

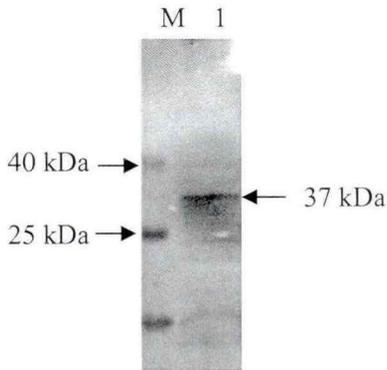


图 1-8 配子体蛋白提取物对单克隆抗体 2F3
Western blot 鉴定

Fig. 1-8 Identification of McAb 2F3 by
Western blot with gametocyte extracts

M: 标准蛋白分子质量;

1: 配子体蛋白提取物

M: Protein molecular weight marker;

1: Gametocyte extracts of *E. necatrix*

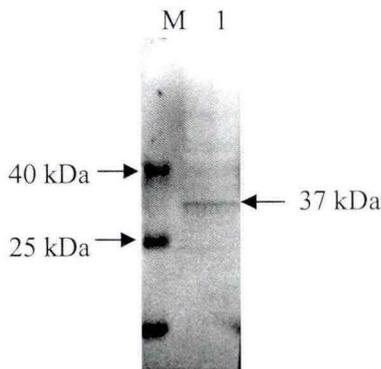


图 1-9 配子体蛋白提取物对单克隆抗体 3D3 的
Western blot 鉴定

Fig. 1-9 Identification of McAb 3D3 by
Western blot with gametocyte extracts

M: 标准蛋白分子质量;

1: 配子体蛋白提取物

M: Protein molecular weight marker;

1: Gametocyte extracts of *E. necatrix*

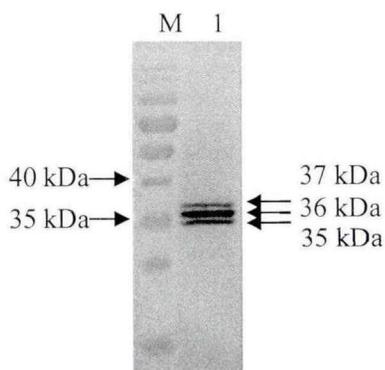


图 1-10 鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体对配子
体蛋白提取物的 Western blot 检测

Fig. 1-10 Detection of gametocyte extracts with
Western blot using anti-rEnGAM22 antibody

M: 标准蛋白分子质量;

1: 配子体蛋白提取物

M: Protein molecular weight marker;

1: Gametocyte extracts of *E. necatrix*.

2.8.3 对异种球虫天然配子体蛋白特异性识别

应用 Western blot 试验检测两株单抗 2F3 和 3D3 与异种球虫天然配子体蛋白提取物的反应，Western blot 结果显示，单抗 2F3 和 3D3 均不能特异性识别柔嫩、堆型、巨型艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物（图 1-11、1-12），而用鼠 EnGAM22 抗原多克隆抗体检测时，在柔嫩、堆型、巨型艾美耳球虫配子体蛋白提取物中均出现了蛋白条带（图 1-13），其中在柔嫩、堆型艾美耳球虫配子体蛋白提取物中的蛋白大小约 17 kDa，在巨型艾美耳球虫配子体蛋白提取物中的蛋白大小在 10~14 kDa 之间。结果表明单抗 2F3 和 3D3 的特异性较鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体要好。

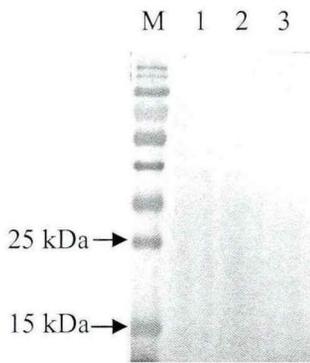


图 1-11 异种球虫配子体蛋白提取物对单克隆抗 2F3 的 Western blot 鉴定

Fig. 1-11 Identification of McAb 2F3 by Western blot with gametocyte extracts of other *Eimeria* species

M: 标准蛋白分子质量; 1: 柔嫩艾美耳球虫; 2: 堆型艾美耳球虫; 3: 巨型艾美耳球虫

M: Protein molecular weight Marker;

1: *E. tenella*; 2: *E. acervulina*; 3: *E. maxima*

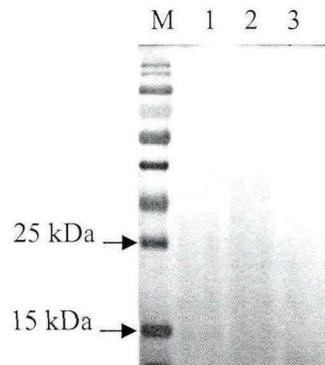


图 1-12 异种球虫配子体蛋白提取物对单克隆抗体 3D3 的 Western blot 鉴定

Fig.1-12 Identification of McAb 3D3 by Western blot with gametocyte extracts of other *Eimeria* species

M: 标准蛋白分子质量; 1: 柔嫩艾美耳球虫; 2: 堆型艾美耳球虫; 3: 巨型艾美耳球虫

M: Protein molecular weight Marker;

1: *E. tenella*; 2: *E. acervulina*; 3: *E. maxima*

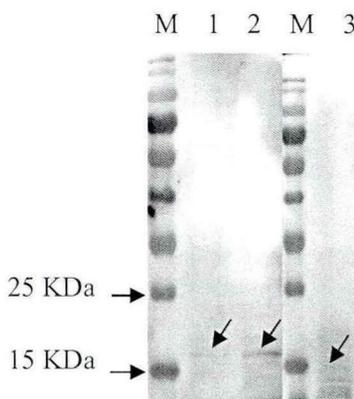


图 1-13 异种球虫配子体蛋白提取物对鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体的 Western blot 检测

Fig.1-13 Detection of other *Eimeria* species gametocyte extracts with Western blot using anti-rEnGAM22 antibody

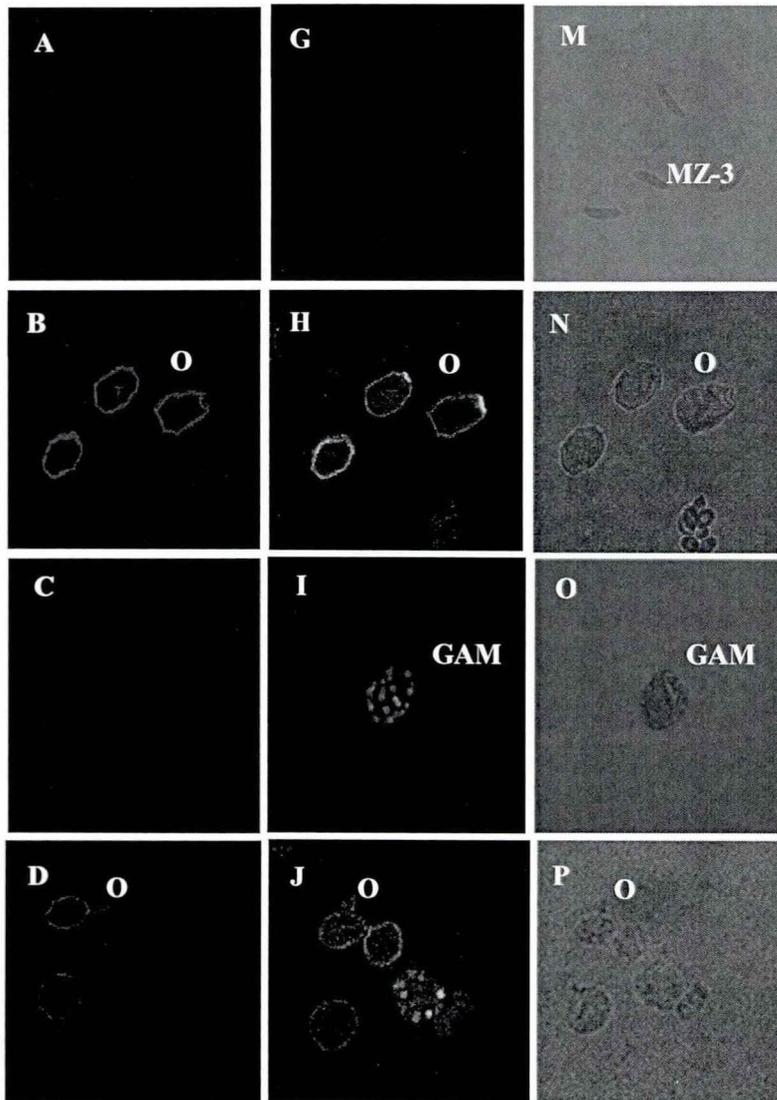
M: 标准蛋白分子质量; 1: 柔嫩艾美耳球虫; 2: 堆型艾美耳球虫; 3: 巨型艾美耳球虫

M: Protein molecular weight marker;

1: *E. tenella*; 2: *E. acervulina*; 3: *E. maxima*

2.9 EnGAM22 蛋白在毒害艾美耳球虫的虫体中定位

以两株单克隆抗体和鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体为一抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 对配子体蛋白 EnGAM22 在毒害艾美耳球虫不同发育阶段进行定位 (图 1-14)。结果显示, 未孢子化卵囊的卵囊壁因存在二酪氨酸键交联自发蓝色荧光 (图 B、图 D、图 E), 第三代裂殖子 (图 A) 以及配子体 (图 C、图 F) 未出现自发蓝色荧光现象, 单克隆抗体 2F3 (图 H、图 I) 与 3D3 (图 J) 均可定位在毒害艾美耳球虫成壁体以及未孢子化卵囊的卵囊壁, 而不定位在第三代裂殖子 (图 G)。结果表明 *Engam22* 基因表达产物定位在成壁体以及未孢子化卵囊的卵囊壁, EnGAM22 抗原参与卵囊壁的形成。



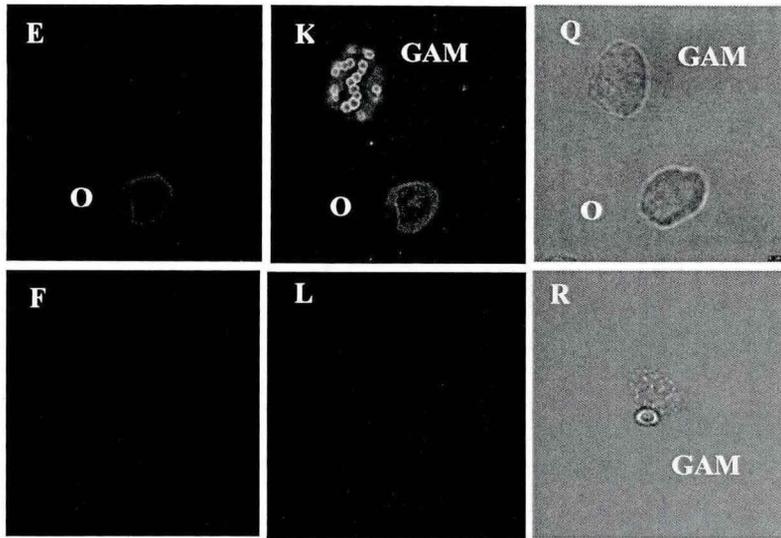


图 1-14 EnGAM22 蛋白在裂殖子、配子体和未孢子化卵囊上的免疫荧光定位 (1000×)

Fig. 1-14 Localization of EnGAM22 in the third-generation merozoites, gametocytes and unsporulated oocysts of *E. necatrix* (1000×)

A-F: 虫体自发荧光; G-L: 免疫荧光定位结果; M-R: 光镜下的第三代裂殖子 (MZ)、卵囊 (O)、配子体 (GAM); G: McAb 2F3 免疫荧光定位结果; H, I: McAb 2F3 免疫荧光定位结果; J: McAb 3D3 免疫荧光定位结果; K: 鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体的免疫荧光定位结果; L: 小鼠阴性血清的免疫荧光定位结果

A-F: Autofluorescence; G-L: Immunofluorescence localization results; M-R: The third-generation merozoites, unsporulated oocyst and gametocyte under bright-field; G: Immunofluorescence localization results of McAb 2F3; H, I: Immunofluorescence localization results of McAb 2F3; J: Immunofluorescence localization results of McAb 3D3; K: Immunofluorescence localization results of anti-rEnGAM22 antibody; L: Immunofluorescence localization results of negative serum

3 讨论

相比与多克隆抗体, 单克隆抗体因具有无限生产且特异性高等特点, 被作为一种新型工具应用于原虫发育及致病机制的研究。至今已有应用抗弓形虫卵囊单克隆抗体鉴定弓形虫孢子囊壁和卵囊壁的组成成分^[13], 应用抗隐孢子虫卵囊单克隆抗体研究隐孢子虫卵囊壁的形成过程^[14], 应用抗柔嫩艾美耳球虫配子体单克隆抗体研究柔嫩艾美耳球虫卵囊内外壁的形成过程^[15]。本实验室前期研究显示^[16], EnGAM22 蛋白中富含的组氨酸和脯氨酸是卵囊壁形成过程中的关键氨基酸, 且重组抗原 EnGAM22 具有良好的免疫保护效果, 因此本研究以重组抗原 EnGAM22 为免疫原制备抗配子体抗原

EnGAM22 单克隆抗体。结果显示,成功制备了两株抗 EnGAM22 抗原单克隆抗体 2F3 和 3D3,亚型分别为 IgG2a、IgG2b,特异性强,纯化后腹水效价分别为 1:256000、1:64000,免疫荧光定位试验结果显示单克隆抗体 2F3 和 3D3 能特异性定位在大配子体成壁体和未孢子化卵囊的卵囊壁上,表明 EnGAM22 抗原参与了卵囊壁的形成。

高纯度的免疫原是制备单克隆抗体的关键,天然蛋白结构复杂且难达到较高纯度,而原核表达的重组抗原易获得且表达量和纯度较高,因此本研究用重组抗原 rEnGAM22 作为免疫原制备单克隆抗体,这与 Possenti 等^[17]的免疫方法一致。虽然 pET-28a(+)原核表达载体中 His 标签蛋白是小分子量多肽,但赵向绒等^[18]研究表明 His 多肽仍可以刺激机体产生抗 His 抗体,为了准确筛选出分泌特异性抗体的阳性杂交瘤细胞,本试验在第一次阳性杂交瘤细胞的筛选时利用建立好的间接 ELISA 方法进行筛选,将重组抗原以及 His 标签蛋白作为检测原进行杂交瘤细胞的筛选,在单克隆抗体的特异性鉴定中,将 His 标签蛋白作为对照进行单克隆抗体的特异性验证,本试验用建立好的间接 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞的好处在于快速、敏感、可大量筛选杂交瘤细胞孔^[19]。

本研究制备的小鼠腹水单抗 3D3 纯化前的效价为 1:1024000,纯化后的效价为 1:64000,相差较大的原因可能在于小鼠腹水单抗 3D3 杂质较多,使得 Protein G 亲和层析柱介质与腹水单抗结合率低导致纯化后的腹水单抗效价较低,后期试验中可先过滤除杂再延长结合时间。在本研究中单克隆抗体 2F3 和 3D3 能特异性识别虫体中天然配子体中的 EnGAM22 抗原,条带大小为 37 kDa,但识别重组抗原 EnGAM22 的条带大小为 29 kDa,两者识别条带大小不一致的原因可能在于天然蛋白存在翻译后的糖基化、磷酸化等加工修饰导致天然蛋白的分子质量比重组抗原的分子质量大^[20]。鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体识别天然配子体蛋白提取物的 35 kDa~37 kDa 三条目的条带,推测可能原因在于成壁体中的配子体在形成卵囊壁前被某种蛋白酶水解成多肽导致的,这与 Mouafo 等研究结果相似,Mouafo 等^[15]报道抗柔嫩艾美耳球虫配子体单抗 E1D8 也可识别多条不同的天然配子体蛋白条带。本研究制备的单克隆抗体 2F3 和 3D3 均不与柔嫩、堆型、巨型艾美耳球虫配子体蛋白提取物发生特异性反应,但鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体可识别柔嫩、堆型艾美耳球虫天然配子体蛋白提取物,条带大小约 17 kDa,识别的巨型艾美耳球虫配子体蛋白提取物,目的条带大小在 10~14 kDa 之间,原因可能在于各球虫配子体之间存在相似的保守氨基酸序列。

多克隆抗体因识别多个表位,可放大低表达水平的靶蛋白信号,能识别出与免疫

原具有高度同源性的蛋白质，而单克隆抗体可填补这些缺陷，单克隆抗体的强特异性能够准确检测靶抗原，且批次间无差异，在检测组织中的抗原时，背景色会低于多克隆抗体，因此以两株单抗和鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体为一抗定位 EnGAM22 抗原在虫体中的表达情况。

单克隆抗体 2F3 和 3D3 的 Western blot 特异性鉴定结果和免疫荧光定位结果一致，因此可应用该单抗鉴定 EnGAM22 蛋白的抗原表位是否相同或者相近，以期开发鉴别球虫诊断方法和新型表位疫苗等提供信息。

参考文献

- [1] Wallach Michael. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis [J]. Trends Parasitol, 2010, 26(8): 382–387.
- [2] Liu Jin, Tuo Wenbin, Wu Xiangdong, et al. Immunoproteomic and mass spectrometric analysis of *Eimeria acervulina* antigens recognized by antisera from chickens infected with *E. acervulina*, *E. tenella* or *E. necatrix* [J]. Parasites vectors, 2020, 13(1): 143–163.
- [3] 刘梅, 李建梅, 刘丹丹, 等. 毒害艾美耳球虫田间分离株的致病性试验 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48 (6): 18–20.
- [4] Liang P, Pradee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257(5072): 967–971.
- [5] 罗平涛. 白羽肉鸡选育方法研究及主要经济性状的遗传分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [6] 马艺飞, 杜彩娟, 王乐乐, 等. 毒害艾美耳球虫蔗糖非酵解解旋酶 2 基因片段的克隆与原核表达 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49 (8): 72–75.
- [7] Huang Xunhe, Otecko Newton O, Peng Minsheng, et al. Genome-wide genetic structure and selection signatures for color in 10 traditional Chinese yellow-feathered chicken breeds [J]. BMC Genom, 2020, 21(8): 97–101.
- [8] Canning EU, Anwar M. Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites [J]. J Protozool, 1968, 15(2): 290–8.
- [9] Belli SI, Smith NC, Ferguson DJ. The coccidian oocyst: a tough nut to crack [J]. Trends Parasitol, 2006, 22(9): 416–23.
- [10] Michael E. The formation and final structure of the oocyst wall of *Eimeria acervulina*: a transmission

- and scanning electron microscope study [J]. *Z Parasitenkd*, 1978, 57(3): 221–228.
- [11] 贾世玉. 单克隆抗体技术在寄生虫学中的应用 [J]. *中国兽医杂志*, 1990 (1): 45–46.
- [12] 张梦迪. 一株非致病性血清 1 型禽腺病毒生物学特性分析及单克隆抗体的制备 [D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [13] Luís F.P. Gondim, Alexander Wolf, Majda G. Vrhovec, et al. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii* [J]. *Exp Parasitol*, 2016, 163: 46–56.
- [14] Yu J R, O'Hara S P, Lin J L C, et al. A common oocyst surface antigen of *Cryptosporidium* recognized by monoclonal antibodies [J]. *Parasitol res*, 2002, 88(5): 412–420.
- [15] Mouafo AN, Weck-Heimann A, Dubremetz JF, et al. Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of *Eimeria tenella* macrogametes (Coccidia, Apicomplexa) [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(3): 217–24.
- [16] 刘丹丹. 毒害艾美耳球虫配子体抗原基因的克隆表达与功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [17] Possenti Alessia, Cherchi Simona, Bertuccini Lucia, et al. Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation [J]. *Int J Parasitol*, 2010, 40(14): 1639–1649.
- [18] 赵向绒, 张海祥, 刘杨, 等. His 标签单克隆抗体的制备及交叉抗原的表位分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32 (5): 683–687.
- [19] 孙蓓, 沈关心, 王晓林, 等. 杂交瘤细胞分泌抗体筛选方法的比较 [J]. *同济医科大学学报*, 1988, 4: 312.
- [20] 阮班军, 代鹏, 王伟, 等. 蛋白质翻译后修饰研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(7): 1027–1037.

第二章 单克隆抗体 2F3 和 3D3 的抗原表位初步鉴定

抗原表位又称抗原决定簇，是抗原分子表面具有特殊立体构型和免疫活性的化学基团，是免疫识别的标志，是抗原特异性的结构基础^[1]。所以，明确蛋白质的抗原表位对多肽和新型疫苗分子的设计及诊断试剂的发展具有重要意义。为进一步研究毒害艾美耳球虫 EnGAM22 抗原的免疫学与生物学功能，本文结合 *Engam22* 基因的氨基酸序列分析和抗原表位预测结果，将该基因分 4 段序列进行截短表达，对表达产物分别用单克隆抗体 2F3 和 3D3 进行免疫印迹试验，鉴定两株单抗抗原表位的所在的肽段，为进一步准确鉴定其抗原表位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

表达宿主菌 BL21(DE3)由本研究室保存；pET32a(+)-*Engam22*-1/Host10、pET32a(+)-*Engam22*-2/Host10、pET32a(+)-*Engam22*-3/Host10、pET32a(+)-*Engam22*-4/Host10 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成；pET-32a(+)、Host10 由南京金斯瑞生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂和仪器

TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0 购自 Takara 生物技术有限公司；High Affinity Ni-Charged Resin 亲和纯化层析柱购自金斯瑞生物科技有限公司；Anti-6×His 标签小鼠单抗、HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 BBI 公司；硝酸纤维素膜购自默克公司；ECL 化学发光试剂购自 Tanon 公司；PEG8000 购自索莱宝生物科技有限公司；SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(6×)、TMB 显色液购自碧云天生物技术公司；小牛血清白蛋白(BSA) 购自上海生工生物有限公司；氨苄霉素购自上海生物工程公司；分子量 8000~14000 透析袋购自 BIOSHARP 公司；其他相关试剂均为国际分析纯试剂。

Universal Hood II 型核酸凝胶成像系统 (BIO-RAD)；JS-380 全自动数码型凝胶成像分析仪 (上海培清科技有限公司)；VCX-130 型超声波细胞粉碎仪 (Thermo 公司)；SUNRISE-BASIC 型酶标仪 (瑞士 TECAN 公司)；NanoDrop2000/2000c 型超微量核酸蛋白测定仪 (Thermo Fisher)；PowerPac basic 型 SDS PAGE 电泳仪 (BIO-RAD)；X1R

型高速冷冻离心机 (Thermo 公司); 移液器 (Eppendorf 公司)。

1.3 截短表达策略

Engam22 基因序列 (GenBank 的登陆号为 KF649255) 拥有一个完整的开放阅读框序列 (561bp), 编码 186 个氨基酸, 刘丹丹^[2]已分析了 EnGAM22 抗原蛋白的亲水性、柔性区、抗原性、表面可能性、二级结构和预测抗原决定簇, 本文结合其氨基酸序列分析和抗原表位预测结果, 将去除信号肽的 *Engam22* 基因分为相互重叠的 4 段基因序列 (表 2-1), 上游酶切位点选取 *EcoR* I, 下游酶切位点 *Hind*III, 原核表达载体选用 pET-32a(+), 送至南京金斯瑞生物科技有限公司构建至 Host10 中, 并将克隆转化至表达宿主菌 BL21(DE3)中进行诱导表达和抗原表位鉴定。

表 2-1 *Engam22* 截短合成基因序列

Table 2-1 Truncated *Engam22* synthetic gene sequences

Name	Synthetic sequences (5'-3')	Position	Vector
EnGAM22-1	GACGAAGCACCTGAGTATCCTTCTCAGCTTGCAGTT GAAATCGATCCAGAAGCGATTATTGCGATCCAGCAA GATGCAAACGCCGACCCACGTCTCTTTTTCCCACTGAG CGGGCTTGCTCCGCCAAACTTGTCAAAGTCTTCAACCC AACATATACCCA	20-73aa	pET-32a(+)
EnGAM22-2	GTCAAAGTCTTCAACCCAACATATACCCAACCCCTCC TAATCCCAGACAACCTTACCCTTTACCTCCATCCTCAT CCCCATTATCCGCATCCTCAGCCAAATTATCCTCATCCCC ATTCTCATCCTCATCCCCATCATCCTCAT	64-112aa	pET-32a(+)
EnGAM22-3	CATTCTCATCCTCATCCCCATCATCCTCATCCTCATCCCCAT CAACATCCTCATCCTCATTCCGACCATCATCCCCACCATCAT CCTCACCATCATGAACATACTGTTTCATGTGCCTCAACATCAG CACGCTCAACACAACGGCCAC	112-151aa	pET-32a(+)
EnGAM22-4	CAACATCAGCACGCTCAACACAACGGCCACCAGAACCA CGGTGGCCAGCTCATTATCACCATGACTACCATTTTGCGCAT CCTCATCAAGAGAACCAGCATACCGCGAGGAAGAGCAGC TTACCGACATCAACTAA	142-186aa	pET-32a(+)

1.4 截短蛋白的诱导表达

选取构建成功的截短菌株, 平板划线过夜培养, 挑选单克隆过夜培养, 提取质粒转化至 BL21 中并涂板, 单菌落接种到 3 mL LB 培养液中 (含 100 μ g/mL 氨苄霉素), 200 rpm 振荡培养 37°C 过夜, 按 1:100 转接种 5 mL 含相同浓度抗生素 LB 中, 200 rpm

振荡 37°C 培养 2 h 加入终浓度 1 mM 的 IPTG 诱导 4 h。取 1 mL 诱导菌 PBS 洗涤三次，200 μ L PBS 重悬菌体，加入 40 μ L 6 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 12 min，12000 rpm 离心 5 min，取 10 μ L 上清，进行 12% SDS-PAGE 检测表达情况。

1.5 重组抗原的特异性检测

将诱导阳性的重组菌蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳，并转移到硝酸纤维素膜（NC 膜）上。转印结束将 NC 膜置于含 3% BSA 封闭液中，室温封闭 3 h；以鼠抗 6 \times His 标签单克隆抗体（3% BSA 封闭液稀释至 1 μ g/mL）为一抗，室温下作用 1 h；PBST 洗涤 5 min，重复 3 次；HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗，用 3% BSA 封闭液 1:25000 稀释（说明书推荐倍数），室温下作用 1 h；PBST 洗涤 5 min，重复 5 次；ECL 显色，Tanon-5200 全自动化学发光成像分析系统观察结果并扫描拍照。

1.6 重组抗原的可溶性分析

取 4 mL 诱导重组菌，悬浮于 500 μ L PBS 中洗涤，冰浴超声裂解（功率 30%，超声 2S，间歇 3S，5 min），4°C 12000 rpm 离心 15 min，分别取上清和沉淀（沉淀用 500 μ L PBS 稀释），进行 SDS-PAGE 分析，以确定融合蛋白存在形式。

1.7 重组抗原的纯化与复性

将本教研室构建保存的截短重组菌株，接种到 4 mL LB 培养液中（含 100 μ g/mL 氨苄霉素），37°C 200 rpm 振荡培养过夜，按 1:100 转接 500 mL 含相同浓度抗生素 LB 中，37°C 200 rpm 振荡培养 2 h，加入终浓度为 1 mM 的 IPTG，37°C 200 rpm 诱导 4 h。取诱导菌 500 mL，PBS 洗涤离心收集菌体重悬于 10 mL LE 中，冰浴超声裂解；4°C 12000 rpm 离心 15 min，回收上清。将上清转移到含有 6 \times His 标签 Ni-NTA 亲和纯化层析柱中，4°C 结合 60 min，期间不断摇晃，使目的蛋白与层析柱充分结合。用 Washing Buffer（100 mM Na₂HPO₄，10 mM Tris-Cl，30 mM Imidazole，8 M Urea，pH 9.0）洗涤层析柱，重复 5 次；用 Elution Buffer（100 mM Na₂HPO₄，10 mM Tris-Cl，500 mM Imidazole，8 M Urea，pH 9.0）洗脱蛋白，重复 5 次；收集洗脱液，A280 紫外光吸收法测定蛋白浓度。将收集到的洗脱液转移到透析袋中，放在 0.1 M PBS 中 4°C 复性 6~8 h，最终 PEG8000 浓缩，收集蛋白。A280 紫外光吸收法测定蛋白的浓度，SDS-PAGE

检测各截短重组抗原的纯化情况。

1.8 抗原表位鉴定

ELISA 鉴定方法见第一章 1.6、Western blot 鉴定方法见第一章 1.8.2。

2 结果

2.1 重组抗原的诱导表达

截短的各重组菌诱导表达后进行 SDS-PAGE 分析，融合蛋白 EnGAM22-1、EnGAM22-2、EnGAM22-3、EnGAM22-4 大小分别为 34 kDa、28 kDa、30 kDa、27 kDa，与预期大小基本符合（图 2-1）。

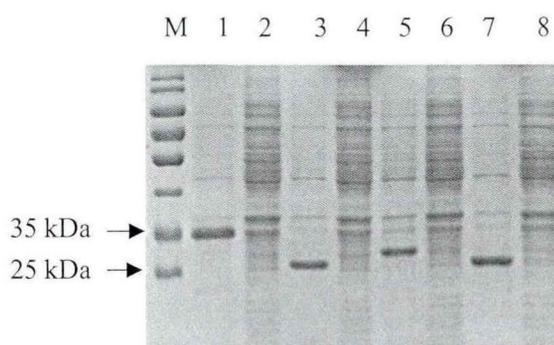


图 2-1 重组抗原 SDS-PAGE 分析

Fig.2-1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

M: 标准蛋白质分子量; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 IPTG 诱导; 2: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 IPTG 未诱导; 3: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 IPTG 诱导; 4: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 IPTG 未诱导; 5: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 IPTG 诱导; 6: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 IPTG 未诱导; 7: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 IPTG 诱导; 8: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 IPTG 未诱导
M: Protein molecular weight Marker; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 induced by IPTG; 2: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 uninduced by IPTG; 3: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 induced by IPTG; 4: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 uninduced by IPTG; 5: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 induced by IPTG; 6: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 uninduced by IPTG; 7: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 induced by IPTG; 8: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 uninduced by IPTG

2.2 重组抗原的特异性检测

Western blot 检测结果显示, 体外重组表达的 4 段截短的融合蛋白均能够被抗 His 单抗特异性识别, 分别在 34 kDa、28 kDa、30 kDa、27 kDa 左右出现目的条带, 证实 Engam22 截短基因在体外成功表达 (图 2-2)。

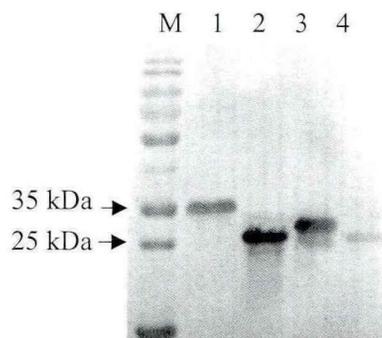


图 2-2 Western blot 鉴定融合蛋白特异性

Fig.2-2 Western blot analysis of recombinant protein

M: 标准蛋白分子质量; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 IPTG 诱导; 2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 IPTG 诱导; 3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 IPTG 诱导; 4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 IPTG 诱导

M: Protein molecular weight Marker; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 induced by IPTG; 2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 induced by IPTG; 3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 induced by IPTG; 4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 induced by IPTG

2.3 重组抗原的可溶性分析

重组抗原可溶性分析结果显示 (图 2-3), 4 段截短的融合蛋白均在上清中表达, 也以包涵体的形式表达, 其中主要以上清表达为主。

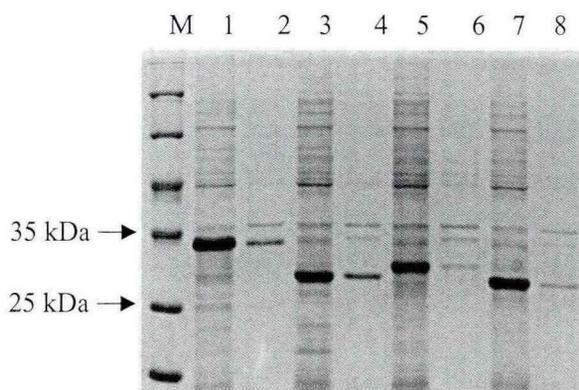


图 2-3 重组抗原的可溶性分析

Fig.2-3 Solubility analysis of fusion protein

M: 标准蛋白质分子量; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 诱导后的超声裂解液上清; 2: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 诱导后的超声裂解液沉淀; 3: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 诱导后的超声裂解液上清; 4: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 诱导后的超声裂解液沉淀; 5: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 诱导后的超声裂解液上清; 6: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 诱导后的超声裂解液沉淀; 7: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 诱导后的超声裂解液上清; 8: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 诱导后的超声裂解液沉淀

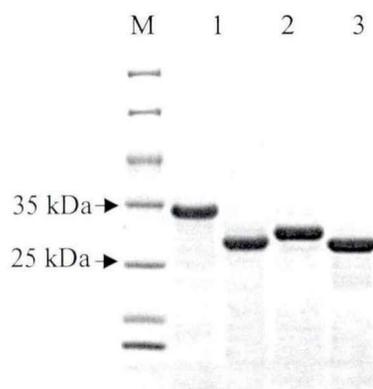
M: Protein molecular weight Marker; 1: Supernatant of pET32a(+)-Engam22-1/BL21; 2: Sediments of pET32a(+)-Engam22-1/BL21; 3: Supernatant of pET32a(+)-Engam22-2/BL21; 4: Sediments of pET32a(+)-Engam22-2/BL21; 5: Supernatant of pET32a(+)-Engam22-3/BL21; 6: Sediments of pET32a(+)-Engam22-3/BL21; 7: Supernatant of pET32a(+)-Engam22-4/BL21; 8: Sediments of pET32a(+)-Engam22-4/BL21

2.4 重组抗原的纯化与复性

将 4 段截短的重组抗原大量诱导表达, 超声裂解大肠杆菌, 变性蛋白经含有 His 标签的 NI-NTA 亲和层析柱纯化。结果显示蛋白纯化效果较好, 无杂带 (图 2-4)。

图 2-4 重组抗原的纯化与复性

Fig.2-4 The purification and renaturation level of recombinant proteins



M: 标准蛋白质分子量;

1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 IPTG 诱导;

2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 IPTG 诱导;

3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 IPTG 诱导;

4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 IPTG 诱导

M: Protein molecular weight Marker;

1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 induced by IPTG;

2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 induced by IPTG;

3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 induced by IPTG;

4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 induced by IPTG

2.5 McAbs 抗原表位鉴定

截短表达的蛋白通过 Western blot 进行鉴定, 结果表明, 鼠抗 EnGAM22 抗原多克

隆抗体均能特异性识别 4 段截短蛋白 (图 2-5-A), McAbs 2F3 和 3D3 能特异性识别 EnGAM22-4 蛋白 (图 2-5-B、2-5-C), 该结果与 ELISA 结果一致 (图 2-5-D)。McAbs 2F3 和 3D3 针对的抗原表位段为 aa142-186。

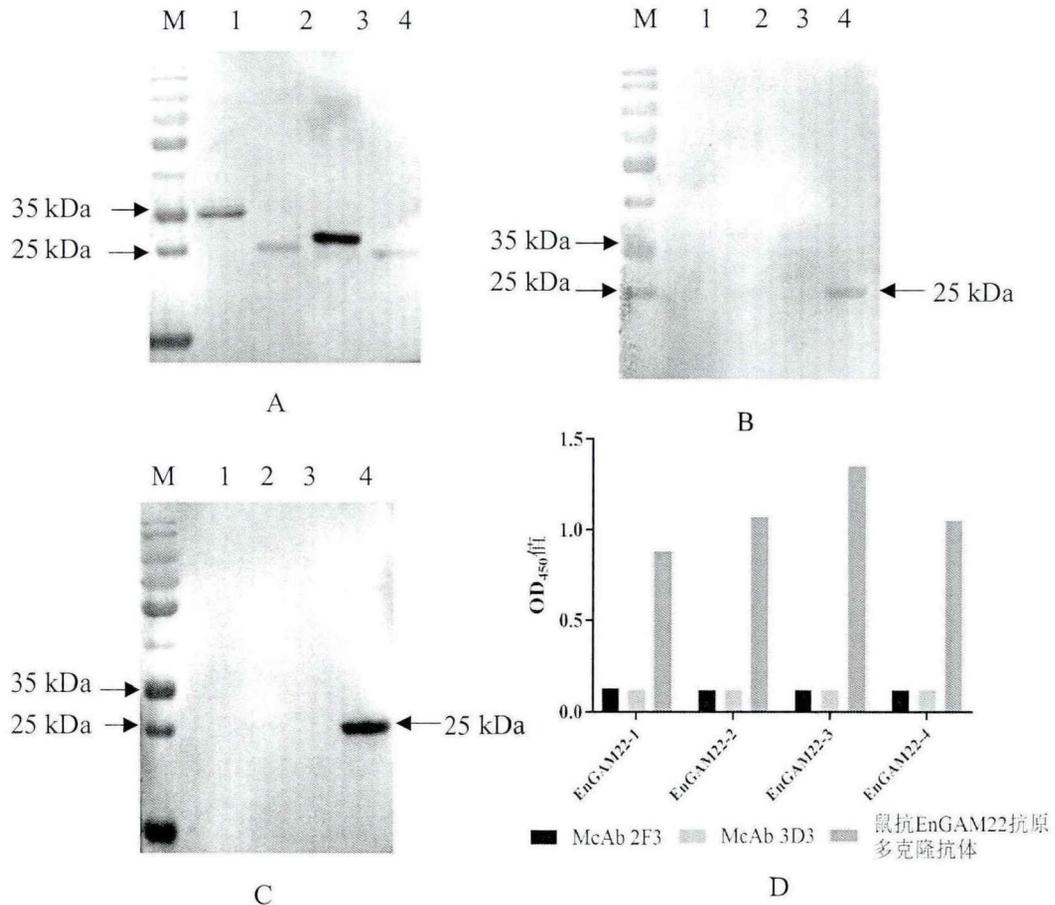


图 2-5 通过 Western blot 和 ELISA 方法鉴定 McAbs 的抗原表位

Fig.2-5 McAbs epitope mapping by Western blot and ELISA analysis

M: 标准蛋白分子质量; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 IPTG 诱导; 2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 IPTG 诱导; 3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 IPTG 诱导; 4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 IPTG 诱导; A-C: Western blot 方法鉴定 McAbs 的抗原表位; A: 截短蛋白被鼠抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体鉴定; B: 截短蛋白被 McAb 2F3 鉴定; C: 截短蛋白被 McAb 3D3 鉴定; D: ELISA 方法鉴定 McAbs 的抗原表位

M: Protein molecular weight Marker; 1: pET32a(+)-Engam22-1/BL21 induced by IPTG; 2: pET32a(+)-Engam22-2/BL21 induced by IPTG; 3: pET32a(+)-Engam22-3/BL21 induced by IPTG; 4: pET32a(+)-Engam22-4/BL21 induced by IPTG. A-C: McAbs epitope mapping by Western blot analysis; A: The protein was identified by mouse polyclonal antibody against EnGAM22 protein; B: The protein was identified by McAb 2F3; C: The protein was identified by McAb 3D3; D: McAbs epitope mapping by ELISA analysis

3 讨论

EnGAM22 蛋白在真核生物界内为分泌蛋白，信号肽位于前 19 位氨基酸，因此本试验从第 20 位氨基酸开始，将 *Engam22* 基因分为相互重叠的 4 个片段：*Engam22-1* (20-73aa)、*Engam22-2* (64-112aa)、*Engam22-3* (112-151aa)、*Engam22-4*(142-186aa)，分别构建原核表达载体，转化至宿主菌 BL21(DE3)，IPTG 诱导表达。以制备的 McAbs 为一抗，进行 Western blot 和 ELISA 方法鉴定，根据反应结果初步鉴定出单抗 2F3 和 3D3 识别同一线性抗原表位段为 aa142-186，具体抗原表位有待进一步的研究。

目前国内外学者已有应用鉴定出的抗原表位构建表位疫苗进行动物保护试验的研究，范久波等^[6]研究出弓形虫新基因 WX、WX2 表位疫苗能够保护小鼠抗弓形虫感染，李晔^[7]成功构建日本血吸虫表膜蛋白的二价多表位疫苗具有显著的免疫保护效果。目前随着球虫配子体抗原被不断发现，配子体抗原亚单位疫苗的研究逐渐增多，但毒害艾美耳球虫配子体蛋白表位疫苗尚未有人研究，因此本研究鉴定的配子体蛋白的抗原表位，可为多肽和新型疫苗分子的设计及诊断试剂的发展奠定基础。

参考文献

- [1] El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar VG. In Silico Prediction of Linear B-Cell Epitopes on Proteins [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1484: 255–264.
- [2] 刘丹丹. 毒害艾美耳球虫配子体抗原基因的克隆表达与功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [3] Woodward MP, Young WW Jr, Bloodgood RA. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation [J]. *J Immunol Methods*, 1985, 78(1): 143–53.
- [4] Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics [J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5(1): 1–15.
- [5] 方钟, 罗文新, 夏宁邵. 表位疫苗研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27 (11): 86–91.
- [6] 范久波, 吴翔, 谭逵, 等. 弓形虫新基因表位疫苗免疫效果的观察 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(6): 421–424.
- [7] 李晔. 抗日本血吸虫病二价多表位疫苗研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.

第三章 单克隆抗体 2F3 和 3D3 对雏鸡的被动免疫保护试验

毒害艾美耳球虫 (*Eimeria necatrix*) 是 7 种鸡球虫中致病性最强的一种球虫, 主要危害 8~18 周龄的青年鸡, 可引起鸡的急性小肠球虫病, 导致育成鸡的大批死亡^[1]。近年来随着黄羽鸡的饲养量不断增多^[2], 以及鸡球虫病活虫苗的使用增多, 毒害艾美耳球虫引起的急性小肠球虫病越来越多见, 给养鸡业造成巨大的经济损失。因此, 迫切需要采用新的策略来防治该病。本实验室前期研究显示, 重组抗原 rEnGAM22 能提高免疫鸡的平均增重、降低卵囊产量, 并产生高水平的血清抗体^[3]。在前 2 章中, 成功制备了 2 株抗毒害艾美耳球虫配子体蛋白 EnGAM22 的单克隆抗体, 免疫荧光定位试验显示单克隆抗体 2F3 和 3D3 能特异性的识别大配子体成壁体和卵囊壁。在动物体内, 这 2 株单抗能否影响配子体的发育和卵囊的形成、以及卵囊的孢子生殖, 从而具有免疫保护作用。为此, 本章通过动物试验观察了单克隆抗体 2F3 和 3D3 对毒害艾美耳球虫感染雏鸡的免疫保护效力, 并以实验室保存的兔抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体进行比较, 为新型球虫疫苗的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 虫株、实验动物、杂交瘤细胞

毒害艾美耳球虫扬州株, 由扬州大学兽医学院寄生虫病学教研室建株并定期传代保种。黄羽鸡, 购自江苏京海禽业集团有限公司, 出雏后运回动物房, 饲养在严格消毒无球虫的笼具中, 自由采食饮水, 饲喂无抗球虫药的全价饲料, 在试验前 2 d, 每天用饱和盐水漂浮法粪检卵囊, 确定无球虫感染; BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。2F3、3D3 杂交瘤细胞见第一章。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂: Protein G 纯化介质购自金斯瑞生物科技有限公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (6×)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) 均购自碧云天生物技术公司; 其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器: NanoDrop2000/2000c 型超微量核酸蛋白测定仪 (Thermo 公司);

PowerPacbasic 型 SDS PAGE 电泳仪 (BIO-RAD); PYX-PHS-350-B-11 型隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司)。

1.3 抗体

单克隆抗体 2F3 和 3D3 的制备, 见第一章; 兔抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体血清与正常兔血清, 由本实验室制备保存; 抗体 IgG 纯化方法见第一章 1.7.8; 纯化出的 IgG 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定抗体蛋白浓度; 正常鼠 IgG, 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.4 试验设计和免疫程序

第一次试验: 共设 9 个组 (表 3-1), 分别为 2F3 单抗高剂量 (2F3-H)、低剂量组 (2F3-L), 3D3 单抗高剂量 (3D3-H)、低剂量组 (3D3-L), 兔多抗 IgG 高剂量 (多抗-H)、低剂量组 (多抗-L), 正常鼠 IgG 组 (抗体阴性对照组, 鼠抗-C), 未免疫攻虫组 (阳性对照组, UC), 未免疫未攻虫组 (阴性对照组, UU)。每组 10 只鸡, 鸡逐只称重, 每组鸡的平均体重相近。鸡在 17 日龄称重分组后, 除了阴性对照组外, 其余组每鸡经嗉囊感染毒害艾美耳球虫孢子化卵囊。感染球虫后第 3 d 起, 各免疫组按规定剂量经腹腔注射单抗或多抗, 每天一次, 连续使用 5 d。阳性对照组和阴性对照组分别注射灭菌 PBS 液。在感染第 7.5 d, 鸡逐只称重后每组随机剖杀 5 只, 观察小肠中部病变。

表 3-1 第一次试验设计和免疫程序

Table 3-1 Experimental design and immune program

组别	攻虫日龄 (d)	攻虫剂量 (羽)	免疫日龄 (d)	免疫剂量 (μg)	免疫体积 (μL)	免疫途径
2F3-H	17	1.0×10^4	20-24	150	200	腹腔注射
2F3-L	17	1.0×10^4	20-24	75	200	腹腔注射
3D3-H	17	1.0×10^4	20-24	150	200	腹腔注射
3D3-L	17	1.0×10^4	20-24	75	200	腹腔注射
多抗-H	17	1.0×10^4	20-24	150	200	腹腔注射
多抗-L	17	1.0×10^4	20-24	75	200	腹腔注射
鼠抗-C	17	1.0×10^4	20-24	150	200	腹腔注射
UC	17	1.0×10^4	/	/	200	腹腔注射
UU	17	/	/	/	200	腹腔注射

余下的 5 只鸡，每天收集粪便，进行卵囊计数，直至感染后第 13 d，统计卵囊产量。在感染后粪便查见毒害艾美耳球虫卵囊的第 3 d，分离粪便中卵囊，进行孢子化培养，观察卵囊的孢子化情况。感染后第 13 d，鸡逐只称重后结束试验。

第二次试验：根据第一次试验结果，选择单抗 2F3 与兔多抗进行单免和联合免疫保护试验。共分 7 个组（表 3-2），分别为 2F3 单抗组（2F3），兔多抗 IgG 组（多抗），联合免疫组（2F3-多抗），正常鼠 IgG 组（鼠抗体阴性对照组，鼠抗-C），正常兔 IgG 组（兔抗体阴性对照组，兔抗-C），未免疫攻虫组（阳性对照组，UC），未免疫未攻虫组（阴性对照组，UU）。除了鸡日龄为 15 日龄外，其余内容均与第一次试验相同。

表 3-2 第二次试验设计和免疫程序

Table 3-2 Experimental design and immune program

组别	攻虫日龄 (d)	攻虫剂量 (羽)	免疫日龄 (d)	免疫剂量 (μg)	免疫体积 (μL)	免疫途径
2F3	15	1.0×10^4	18-22	150	200	腹腔注射
多抗	15	1.0×10^4	18-22	150	200	腹腔注射
2F3-多抗	15	1.0×10^4	18-22	150+150	200	腹腔注射
鼠抗-C	15	1.0×10^4	18-22	150	200	腹腔注射
兔抗-C	15	1.0×10^4	18-22	150	200	腹腔注射
UC	15	1.0×10^4	/	/	/	腹腔注射
UU	15	/	/	/	/	腹腔注射

1.5 临床观察

攻虫后每天观察各组鸡的食欲、粪便、精神状况，每隔 12 h 统计一次排出血便数。死亡鸡称重后剖检，判定其是否死于球虫病。

1.6 卵囊计数与卵囊产量

鸡感染球虫卵囊后，从粪便出现卵囊至试验结束，每隔 24 h 收集各组鸡的粪便，采用 MacMaster 法计算卵囊数；试验结束时扑杀鸡，取盲肠，采用同样方法计算盲肠中卵囊数。最后，统计粪便与盲肠的卵囊总量，除以每组的鸡数，即得各组的每鸡平均排卵囊量。具体步骤参照陶建平等^[4]方法。

1.7 卵囊孢子化培养

感染后粪便出现卵囊的第 3 d, 按照李巧巧^[5]的方法分离粪便中卵囊, 并将卵囊放入含 2.5%重铬酸钾溶液的锥形瓶中, 置于 28℃ 恒温培养箱中培养, 每天定时摇晃锥形瓶 6 次以上, 培养 3 d。

1.8 免疫保护效果评价指标

(1) 成活率 (%) = (成活鸡数/试验开始时鸡数) × 100%。

(2) 相对增重率 (%) = (免疫攻虫组或未免疫攻虫组的平均增重/未免疫未攻虫组的平均增重) × 100%。其中: 平均增重 1=免疫结束时体重-攻虫时体重, 平均增重 2=试验结束时体重-攻虫时体重。平均增重 1 每组 10 只鸡, 平均增重 2 每组 5 只鸡。

(3) 病变记分: 肠道病变记分标准参照 Johnson 和 Reid^[6], 即: 0 分: 未见病变; 1 分: 小肠中部有散在的针点状出血点和白色斑点, 黏膜损伤不明显; 2 分: 小肠中段有多量的出血点, 肠管稍肿胀; 3 分: 肠道出血, 浆膜面布有红色出血点或白斑, 肠壁增厚, 肠道有明显肿胀, 内容物为粘液及血液; 4 分: 小肠因严重出血呈暗红色, 小肠肠道内有红褐色粘液, 整个小肠的肠壁增厚、肿胀。

(4) 卵囊减少率 (%) = [(未免疫攻虫组排卵囊数-免疫攻虫组排卵囊数)/未免疫攻虫组排卵囊数] × 100%。

(5) 卵囊孢子化率: 卵囊培养 3 d 后, 取一滴卵囊液滴加在洁净载玻片上, 盖上盖玻片后用生物显微镜 (10×40 倍) 观察卵囊结构, 统计 100 个卵囊中的孢子化卵囊数。每组样品重复 2 次, 取平均值。

2 结果

2.1 临床观察

第一次试验: 在攻虫后前 120 h, 各试验组所有鸡只精神、采食、饮水以及排出的粪便性状均正常。攻虫后 132 h 左右, 各试验组均相继出现血便, 同时鸡群出现精神沉郁、食欲减退、羽毛粗乱, 缩头呆立等症状。攻虫后 156 h 各组排出血便最多。攻虫后 180 h 鸡群食欲精神状态、采食饮水逐渐恢复, 血便数下降。在试验结束前, 未免疫攻虫组仍有少量血便。与未免疫攻虫组和正常鼠 IgG 组相比, 免疫攻虫组症状轻、排出血便少, 其中兔多抗 IgG 高剂量组排出的血便数最少, 2F3 单抗高剂量组和 3D3 单抗

高剂量组接近（表 3-3）。

表 3-3 第一次试验各组鸡血便统计结果

Table 3-3 The numbers of bloody stool in each group post-challenged

组别	鸡数 (只)	感染后小时 (h)								合计
		96	108	120	132	144	156	168	180	
2F3-H	10	0	0	0	0	13	15	13	5	46
2F3-L	10	0	0	0	0	14	16	13	9	52
3D3-H	10	0	0	0	0	7	16	12	10	45
3D3-L	10	0	0	0	0	15	20	14	8	57
多抗-H	10	0	0	0	0	7	16	13	6	42
多抗-L	10	0	0	0	0	12	18	16	8	54
鼠抗-C	10	0	0	0	0	16	19	16	12	63
UC	10	0	0	0	2	23	38	20	6	89
UU	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

第二次试验：在攻虫后前 120 h，各试验组所有鸡只精神、采食、饮水以及排出的粪便性状均正常。攻虫后 132 h 左右，未免疫攻虫组、正常鼠 IgG 组和正常兔 IgG 组的临床症状与第一次试验相同。攻虫后 156 h 各组排出血便最多。攻虫后 180 h 鸡群食欲精神状态、采食饮水逐渐恢复，血便数下降。在试验结束前，未免疫攻虫组仍有少量血便。与未免疫攻虫组、正常鼠 IgG 组和正常兔 IgG 组相比，免疫攻虫组症状轻、排出血便少，其中联合免疫组和 2F3 单抗组接近（表 3-4）。

表 3-4 第二次试验各组鸡血便统计结果

Table 3-4 The numbers of bloody stool in each group post-challenged

组别	鸡数 (只)	感染后小时 (h)								合计
		96	108	120	132	144	156	168	180	
2F3	10	0	0	0	0	13	14	10	9	46
多抗	10	0	0	0	0	10	24	16	7	57
2F3-多抗	10	0	0	0	0	11	19	13	5	48
鼠抗-C	10	0	0	0	0	19	30	22	15	86
兔抗-C	10	0	0	0	1	20	25	20	13	79
UC	10	0	0	0	4	24	35	24	10	97
UU	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 平均增重与相对增重率

第一次试验的平均增重与相对增重率见表 3-5。平均增重 1，除了 3D3 单抗低剂量组，免疫组的平均增重显著高于未免疫攻虫组 ($P < 0.05$)，均显著低于未免疫未攻虫组

($P<0.05$)。2F3 单抗高剂量组相对增重率最高, 其次为 2F3 单抗低剂量组和兔多抗 IgG 高剂量组。平均增重 2, 除了 3D3 单抗高、低剂量组, 免疫组的平均增重显著高于未免疫攻虫组 ($P<0.05$), 均显著低于未免疫未攻虫组 ($P<0.05$)。3D3 单抗高、低剂量组与未免疫攻虫组和正常鼠 IgG 组差异不显著 ($P<0.05$)。

表 3-5 第一次试验各组鸡平均增重与相对增重率

Table 3-5 Average weight gain and relative weight growth rates of each group post-challenge

组别	平均增重 1* (g)	相对增重率 1* (%)	平均增重 2 [§] (g)	相对增重率 2 [§] (%)
2F3-H	112.60±6.5 ^b	70.95	189.40±14.19 ^b	81.49
2F3-L	108.80±8.26 ^b	68.55	191.20±9.63 ^b	82.27
3D3-H	103.00±9.43 ^b	64.90	171.40±11.26 ^{ab}	73.75
3D3-L	80.10±7.19 ^{ab}	50.79	144.60±7.33 ^a	62.22
多抗-H	107.20±13.4 ^b	67.54	197.60±12.77 ^b	85.02
多抗-L	91.10±7.22 ^b	57.40	194.20±7.35 ^b	83.56
鼠抗-C	61.30±4.13 ^a	38.62	154.60±15.24 ^a	66.52
UC	53.40±6.15 ^a	33.64	147.80±5.56 ^a	63.59
UU	158.70±7.88 ^c	100.00	232.40±10.11 ^c	100.00

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($P<0.05$); *为每组 10 只鸡, §为每组 5 只鸡。Note: The date with a different letters means significant difference ($P<0.05$); * 10 chickens per group, § 5 chickens per group.

第二次试验的平均增重与相对增重率见表 3-6。平均增重 1, 免疫组的平均增重显著高于未免疫攻虫组 ($P<0.05$), 均显著低于未免疫未攻虫组 ($P<0.05$)。联合免疫组相对增重最高, 其次为兔多抗 IgG 高剂量组, 2F3 单抗低剂量组最低, 但三者间差异不显著 ($P>0.05$)。平均增重 2, 免疫组的平均增重情况与平均增重 1 结果相似, 相对增重率 2 比相对增重率 1 高。

表 3-6 第二次试验各组鸡平均增重与相对增重率

Table 3-6 Average weight gain and relative weight growth rates of each group post-challenge

组别	平均增重 1* (g)	相对增重率 1* (%)	平均增重 2 [§] (g)	相对增重率 2 [§] (%)
2F3	119.99±14.52 ^b	66.23	208.58±8.48 ^b	79.39
多抗	124.48±11.50 ^b	67.26	211.56±22.00 ^b	80.53
2F3-多抗	122.84±8.16 ^b	68.22	217.40±14.51 ^b	82.75
鼠抗-C	55.02±5.70 ^a	33.13	136.26±10.02 ^a	51.86
兔抗-C	56.35±4.20 ^a	33.93	146.70±12.00 ^a	55.84
UC	50.32±4.38 ^a	30.30	134.42±10.70 ^a	51.16
UU	166.06±9.95 ^c	100.00	262.70±10.04 ^c	100.00

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($P<0.05$); *为每组 10 只鸡, §为每组 5 只鸡。Note:

The date with a different letters means significant difference ($P<0.05$); * 10 chickens per group, § 5 chickens per group.

2.3 成活率和肠道病变记分

第一次试验各组鸡的成活率和肠道病变记分见表 3-7。在整个试验期间, 免疫组均无鸡只死亡, 成活率均为 100%。各免疫组病变记分均小于未免疫攻虫组, 其中兔多抗 IgG 高剂量组的病变记分最低, 与未免疫攻虫组相比差异显著 ($P<0.05$)。除了 3D3 单抗低剂量组, 在病变记分与未免疫攻虫组和正常鼠 IgG 组间差异不显著 ($P>0.05$), 其他免疫组的肠道病变记分均显著低于未免疫攻虫组和正常鼠 IgG 组 ($P<0.05$)。

Table 3-7 第一次试验各组鸡的肠道病变记分

Table 3-7 The mortality rate and pathological score of each group post-challeng

组别	鸡数 (只)	成活鸡数 (只)	成活率 (%)	平均肠道记分*
2F3-H	10	10	100	2.30±0.20 ^b
2F3-L	10	10	100	2.20±0.20 ^b
3D3-H	10	10	100	2.10±0.33 ^b
3D3-L	10	10	100	2.50±0.22 ^{bc}
多抗-H	10	10	100	1.90±0.24 ^b
多抗-L	10	10	100	2.20±0.12 ^b
鼠抗-C	10	10	100	2.90±0.10 ^c
UC	10	10	100	3.00±0.10 ^c
UU	10	10	100	0.00±0.00 ^a

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($P<0.05$); *5 只鸡。Note: The date with a different letters means significant difference ($P<0.05$). *five chickens.

第二次试验各组鸡的成活率和肠道病变记分见表 3-8。在整个试验期间, 免疫组均无鸡只死亡, 成活率均为 100%。攻虫后第 8 d 所有成活鸡剖杀剖检, 进行病变记分。各免疫组病变记分均小于未免疫攻虫组, 其中联合免疫组的病变记分最低, 各免疫组病变记分与未免疫攻虫组、正常鼠 IgG 组和正常兔 IgG 组间相比显著降低 ($P<0.05$)。

表 3-8 第二次试验各组鸡病死率和平均肠道病变记分

Table 3-8 The mortality rate and pathological score of each group post-challenge

组别	鸡数 (只)	成活鸡数 (只)	成活率 (%)	平均肠道记分*
2F3	10	10	100	1.90±0.18 ^b
多抗	10	10	100	2.00±0.15 ^b
2F3-多抗	10	10	100	1.80±0.33 ^b
鼠抗-C	10	10	100	2.50±0.15 ^c
兔抗-C	10	10	100	2.60±0.18 ^c
UC	10	10	100	2.90±0.10 ^c
UU	10	10	100	0.00±0.00 ^a

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($P<0.05$); *5 只鸡。Note: The date with a different letters means significant difference ($P<0.05$). *five chickens.

2.4 卵囊产量与卵囊减少率

第一试验各组鸡卵囊产量与卵囊减少率见表 3-9。未免疫攻虫组卵囊产量最高, 为平均每只鸡 22.74×10^6 个卵囊。在各免疫组间, 兔多抗 IgG 高剂量组卵囊产量最低, 为每鸡 9.54×10^6 个卵囊, 卵囊减少率为 58.04%, 其次为 2F3 单抗高剂量组和兔多抗 IgG

表 3-9 第一次试验各组鸡卵囊产量与卵囊减少率

Table 3-9 The oocyst output and reduction of each group post-challenge

组别	平均卵囊量 ($\times 10^6$)							盲肠卵囊 1	盲肠卵囊 2	总计	卵囊减少率 (%)
	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d				
2F3-H	0.22	0.86	2.84	2.26	1.92	1.82	0.36	0.28	0.02	10.58	53.47
2F3-L	0.60	0.80	2.32	2.68	2.58	1.28	0.80	0.31	0.03	11.40	49.87
3D3-H	0.64	1.24	3.24	3.07	2.94	0.60	0.26	0.41	0.04	12.44	45.29
3D3-L	0.52	1.30	1.78	3.08	2.53	1.92	0.90	0.57	0.06	12.66	44.33
多抗-H	0.94	0.96	2.94	2.62	0.90	0.78	0.08	0.31	0.01	9.54	58.04
多抗-L	0.68	2.16	3.00	2.62	1.70	0.50	0.10	0.39	0.05	11.20	50.74
鼠抗-C	1.10	1.98	2.52	3.18	2.44	2.02	0.20	0.56	0.10	14.10	37.99
UC	1.66	6.43	4.38	3.80	2.92	1.78	1.00	0.64	0.13	22.74	-
UU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

低剂量组，卵囊产量分别为每鸡 10.58×10^6 个卵囊和 11.2×10^6 个卵囊，卵囊减少率为 53.47% 和 50.74%。在两种单抗免疫组中，3D3 单抗低剂量组卵囊产量低于 2F3 单抗高剂量组。

第二次试验各组鸡卵囊产量与卵囊减少率见表 3-10。未免疫攻虫组卵囊产量最高，为平均每只鸡 22.64×10^6 个卵囊。在各免疫组间，联合免疫组卵囊产量最低，为每鸡 9.22×10^6 个卵囊，卵囊减少率为 59.28%，其次为兔多抗 IgG 组和 2F3 单抗组，卵囊产量分别为每鸡 9.84×10^6 个卵囊和 10.68×10^6 个卵囊，卵囊减少率分别为 56.54% 和 52.83%。在联合免疫组与单独免疫组比较中，联合免疫组卵囊产量低于单独免疫组。

表 3-10 第二次试验各组鸡卵囊产量与卵囊减少率

Table 3-10 The oocyst output and reduction of each group post-challenge

组别	平均卵囊量 ($\times 10^6$)									卵囊减少率 (%)	
	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	盲肠卵囊 1	盲肠卵囊 2		总计
2F3	0.96	1.84	1.38	2.03	2.00	1.20	0.70	0.47	0.10	10.68	52.83
多抗	1.30	1.00	2.03	1.76	1.46	1.00	0.80	0.40	0.09	9.84	56.54
2F3-多抗	0.98	1.00	1.60	2.20	1.60	1.00	0.46	0.32	0.06	9.22	59.28
鼠抗-C	1.58	1.20	2.05	3.94	2.90	1.00	1.42	0.52	0.15	14.76	34.81
兔抗-C	1.00	1.72	3.18	3.32	3.84	1.68	0.55	0.50	0.14	15.93	29.64
UC	1.88	3.46	3.60	6.90	2.60	2.20	1.28	0.56	0.16	22.64	-
UU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5 卵囊孢子化率

第一次试验各组的卵囊孢子化率见表 3-11。未免疫攻虫组的孢子化率为 92.50%，除了未免疫未攻虫组，其他各组均有卵囊排出。与未免疫攻虫组和正常鼠 IgG 组相比，各免疫组的卵囊孢子化率均有不同程度的下降。其中 2F3 单抗高剂量组和兔多抗 IgG 高剂量组的卵囊孢子化率最低，分别为 42.50% 和 43.50%，3D3 单抗低剂量组和兔多抗 IgG 低剂量组卵囊孢子化率最高，分别为 64.00% 和 65.50%。

表 3-11 第一次试验各组卵囊孢子化率情况

Table 3-11 The oocysts sporulated rate of post-challenge

组别	鸡数 (只)	孢子化率 (%)
2F3-H	5	42.50
2F3-L	5	53.50
3D3-H	5	52.50
3D3-L	5	64.00
多抗-H	5	43.50
多抗-L	5	65.50
鼠抗-C	5	87.50
UC	5	92.50
UU	5	-

第二次试验各组的卵囊孢子化率情况见表 3-12。未免疫攻虫组的孢子化率为 94.50%，除了未免疫未攻虫组，其他各组均有卵囊排出。与未免疫攻虫组、正常鼠 IgG 组和正常兔 IgG 组相比，各免疫组的卵囊孢子化率均有不同程度的下降。2F3 单抗组、兔多抗 IgG 组和联合免疫组的卵囊孢子化率分别为 50.50%，49.00%，47.00%。可见在免疫组中，联合免疫组的卵囊孢子化率最少，其次为兔多抗 IgG 组。

表 3-12 第二次试验各组卵囊孢子化率情况

Table 3-12 The oocysts sporulated rate of post-challenge

组别	鸡数 (只)	孢子化率 (%)
2F3	5	50.50
多抗	5	49.00
2F3-多抗	5	47.00
鼠抗-C	5	89.00
兔抗-C	5	84.00
UC	5	94.50
UU	5	-

3 讨论

商品化的配子体抗原疫苗 COXABIC 是由巨型艾美耳球虫配子体的三种纯化抗原组合而成，免疫后可使球虫卵囊量下降 50%-80%，其免疫机理在于配子体抗原是卵囊

壁的前体蛋白, 所以针对配子体抗原的抗体能阻止卵囊壁的形成, 从而阻断球虫病的传播, 是一种传播阻断免疫。基于这个原理, Wallach 等^[7]选用 IgM 亚型的抗巨型艾美耳球虫天然配子体抗原 GAM56 的单克隆抗体免疫感染的雏鸡, 卵囊减少率可达 43%。Wiedmer 等^[8]用不同浓度的抗柔嫩艾美耳球虫配子单克隆抗体 E2E5 (75 μg 和 150 μg) 免疫感染了柔嫩艾美耳球虫的鸡, 卵囊减少率可达 78%。本实验室前期研究显示重组抗原 rEnGAM22 能降低卵囊产量与病变记分, 提高免疫鸡的平均增重并产生高水平的血清抗体^[3], 具有良好的免疫保护作用, 因此本试验利用 EnGAM22 抗原制备的单克隆抗体被动免疫感染毒害艾美耳球虫的雏鸡来评价其免疫保护效力。

本试验中的免疫程序和评价标准是在 Wallach 等^[7]以及 Wiedmer 等^[8]方法的基础上进行综合, 采用血便记分、病变记分、平均增重、相对增重率、卵囊减少率、卵囊孢子化率为评价指标, 血便记分和病变记分反映鸡攻虫后的发病程度, 平均增重与相对增重率反映球虫感染对鸡生产性能的影响, 卵囊产量与卵囊减少率反映抗体阻断虫体完成内生性发育的能力, 卵囊孢子化率反映抗体阻断卵囊完成孢子生殖的能力。其中卵囊孢子化率指标是在卵囊出现的高峰期即第 3 d 收集、分离未孢子化卵囊。另外鸡球虫病一般在人工感染的第 6~7 d 临床症状逐渐减轻^[9], 为准确评价抗体对感染球虫的鸡的免疫保护效果, 本研究在感染球虫的第 180 h 结束试验, 以血便记分、成活率、病变记分、平均增重与相对增重率为评价指标; 汪飞燕等^[10]发现感染 10000 个毒害艾美耳球虫卵囊时会出现 1 个排卵囊峰值且在第 7~13 d 产出卵囊量占总产量的 97.64%。因此本试验感染 10000 个卵囊后的第 13 d 结束试验, 以卵囊产量与卵囊减少率为评价指标。该试验方案能更客观地评价抗 EnGAM22 抗原单克隆抗体以及兔抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体的免疫保护力。

在本试验中联合免疫组的总体治疗效果比单独免疫组治疗效果较好些, 但是总体差别不是太大, 且两次动物试验中均出现无关抗体免疫组在各指标方面也有效果, 这与国外学者研究结果一致。Wallach 等^[7]选用 IgM 亚型的抗巨型艾美耳球虫天然配子体抗原 GAM56 的单克隆抗体与巨型艾美耳球虫天然配子体抗原 (56 kDa 和 82 kDa) 的鸡免疫血清被动免疫感染了巨型艾美耳球虫的雏鸡, 结果显示两种抗体均具有部分保护作用, 卵囊减少率分别为 43%和 49%, 鸡免疫血清并不能显著提高单独使用抗 GAM56 的单克隆抗体时所观察到的免疫保护作用。抗 EnGAM22 抗原单克隆抗体以及兔抗 EnGAM22 抗原多克隆抗体均可抑制卵囊的孢子生殖的结果进一步验证了前期研究, 即 EnGAM22 蛋白参与了毒害艾美耳球虫孢子化卵囊的卵囊壁的形成^[3]。研究结果

表明抗体可以到达肠黏膜并影响寄生虫的发育，从而减少卵囊排泄量，干扰鸡球虫的生活史，这为鸡球虫新型疫苗分子设计及研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘梅, 李建梅, 刘丹丹, 等. 毒害艾美耳球虫田间分离株的致病性试验 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48 (6): 18–20.
- [2] 朱志刚, 孙田, 蒋向君. 浅谈鸡球虫疫苗在肉鸡养殖上的应用 [J]. 中国畜牧业, 2020 (16): 82.
- [3] 刘丹丹. 毒害艾美耳球虫配子体抗原基因的克隆表达与功能研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [4] 陶建平, 沈永林, 李文超, 等. 11 株巨型艾美耳球虫的免疫原性分析 [J]. 南京农业大学学报, 2005 (4): 104–108.
- [5] 李巧巧. 毒害艾美耳球虫早熟株选育及 Engam59 基因原核表达与免疫保护力研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [6] Johnson J, Reid W M. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens [J]. Exp parasitol, 1970, 28(1): 30–36.
- [7] Wallach M, Pillemer G, Yarus S, et al. Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. [J]. Infect Immun, 1990, 58(2): 557–62.
- [8] Wiedmer S, Alnassan AA, Volke B, et al. Passive immunization with *Eimeria tenella* gametocyte antigen 56 (EtGAM56) specific antibodies and active immunization trial with the epitope containing peptide [J]. Vet Parasitol, 2017, 247: 100–107.
- [9] 索勋, 李国清. 鸡球虫病学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- [10] 汪飞燕, 闫欣, 刘悦, 等. 不同感染剂量对毒害艾美耳球虫繁殖力的影响 [J]. 中国家禽, 2019, 41 (1): 62–64.

全文结论

制备了 2 株抗毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体 2F3 和 3D3，亚型分别为 IgG2a、IgG2b，纯化后腹水效价分别为 1：256000 和 1：64000；用单抗定位 EnGAM22 于大配子体的成壁体和卵囊壁。

单抗 2F3 和 3D3 识别的抗原表位为线性表位，均识别线性表位段为 aa142-186，序列为 ¹⁴²QNHGGPAHYHHDYHFAHPPHQENQHREEEQLTDIN¹⁸⁶。

单抗 2F3 和 3D3 对毒害艾美耳球虫均能产生一定的免疫保护效力，能提高鸡的平均增重，减轻肠道病变，减少卵囊产量，降低卵囊孢子化率。

攻读学位期间发表的学术成果

- [1] 李文静, 蔡为民, 汪飞燕, 等. 毒害艾美耳球虫重组配子体蛋白 rEnGAM22 与 rEnGAM59 联合免疫对鸡的保护效果观察 [J]. 中国兽医科学, 2020, 50 (12): 1549-1555.
- [2] 申请发明专利: 专利号: 202010799040; 申请日 2020 年 8 月 11 日; 导师第一, 本人第二.

致谢

时光飞逝，转眼间三年紧张而又充实的研究生学习生涯即将画上句号，而刚踏进学校的一件件场景还历历在目。值得欣慰的是，我这三年多的时间是在汗水和拼搏中度过的，学到了受用一生的知识，获得了一辈子去珍贵的友情及师生情，成为了一个可以独当一面的有用之人。在成长的路上，一切都值得铭记。借此，我要向所有在扬州大学帮助关心我的人表示深深的谢意！

首先感谢我的导师陶建平教授渊博的学识、严谨的治学态度、对学术与科研的探索精神始终感染着我、激励着我，这些都将成为宝贵的财富让我终身受益。师恩浩瀚，无以回报。在此谨向陶老师表示由衷的感谢和诚挚的敬意！其次我要由衷感谢许金俊教授、黄思扬教授、刘丹丹副教授、宿世杰老师、侯照峰老师、潘明老师精湛的实验技术，严谨的实验态度，以及积极向上的生活态度永远深深的影响着我，尤其感谢老师们在生活和学习中对我无微不至的关心、帮助和照顾。

感谢兽医学院的各位老师，你们认真负责的态度以及渊博的学识不仅使我学习到了许多专业知识，也学到了许多人生哲理。在此向各位老师表达我最诚挚的祝福和深深的谢意。

感谢实验室的师兄王乐乐、苏丁泽阳、蔡为民、华恩玉、孔令明，师姐高阳、朱玉、汪飞燕，同门徐向东、刘悦、龚静芝、范益敏、姚娜、程振扬、戎杰、陈乔光，师妹张阿敏、陈晨、王双、张知之、冯茜茜、范雪莲、彭月梅、张会、吴云萍、师弟叶状、王礼跃、樊峥嵘、朱世范，徐康智、张育铭、成成、祭天锴等。感谢你们在日常生活以及学习上、科研实验以及动物实验上给予我的关心和帮助，让我顺顺利利、开开心心地完成科研任务。

最后我要感谢我的家人，感谢我的爸爸、妈妈、男朋友徐尚立、姐姐李丹阳给予我的包容、关爱和鼓励。焉得谖草，言树之背，养育之恩，无以回报，你们永远健健康康是我最大的心愿！