



湖南农业大学

Hunan Agricultural University

## 全日制硕士专业学位论文

# 猪衣原体多表位融合蛋白的表达 和免疫原性研究

研究生姓名	张林
所在学院	动物医学院
指导教师	胡仕凤
学位类型	兽医硕士
学科领域	兽医
研究方向	动物疫病防治

二〇二二年五月

分类号 S85

密 级 公开

UDC                     

单位代码 10537

# 湖南农业大学

## 全日制硕士专业学位论文

### 猪衣原体多表位融合蛋白的表达 和免疫原性研究

Expression and immunogenicity research of  
multi-epitope fusion protein of *Chlamydia suis*

研究生姓名	<u>张林</u>
指导教师	<u>胡仕凤</u>
学位类型	<u>兽医硕士</u>
学科领域	<u>兽 医</u>
研究方向	<u>动物疫病防治</u>

论文答辩日期 2022.05.12 答辩委员会主席 尹崇 教授

论文评阅人 学位办

## 摘 要

衣原体 (*Chlamydia spp*) 是一类介于细菌与病毒之间专性细胞内寄生的原核微生物, 直径约为 0.2 $\mu$ m~0.5 $\mu$ m, 具有独特的双相发育周期 (biphasic development cycle), 可感染人和多种动物而引起多种传染性疾病。猪衣原体作为衣原体属的一个成员, 被认为是我国猪衣原体病的唯一致病原, 猪衣原体病带来的生殖系统和呼吸系统疾病严重影响了我国生猪养殖行业的发展。疫苗在衣原体的防控上是一个具有潜力的方向, 而目前国内尚无获准上市的猪衣原体疫苗。因此需要一种安全有效的猪衣原体疫苗来预防猪衣原体病为养殖业带来的损害。本文根据猪衣原体 OmpA、PmpD、MIP 三个免疫候选蛋白, 通过生物信息技术对其抗原表位经进行测, 成功构建了两个多表位重组蛋白。并将其重组质粒连接至大肠杆菌中表达, 经纯化、变性、复性最终获得了可溶性重组蛋白。Western-blot 和质谱检测表明重组蛋白序列与预测序列一致。

使用复性后的蛋白与弗氏佐剂联合免疫小鼠, 收集免疫前后的血清进行 Western-blot 和细胞因子检测。结果表明, 复性后的两个重组蛋白均能刺激小鼠产生抗原特异性抗体, 成功引起了小鼠的体液免疫。通过对免疫前后小鼠血清 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  变化的监测, 发现复性后的两个蛋白均可在一定程度上引起这三种细胞因子升高, 因此认为本文构建的两个多表位重组蛋白具有免疫原性, 均可引起体液免疫和一定程度的细胞免疫, 为后续安全有效的猪衣原体重组亚单位疫苗奠定基础。

**关键词:** 猪衣原体; 多表位融合蛋白; 亚单位疫苗; 原核表达; 免疫原性;

## Abstract

Chlamydia spp (Chlamydia spp) is a kind of specific intracellular parasitic prokaryotic microorganisms between bacteria and viruses. Its diameter is about 0.2um ~ 0.5um. It has a unique biphasic development cycle. It can infect people and animals and cause various infectious diseases. Porcine Chlamydia is a part of Chlamydia and the only pathogen of swine Chlamydia disease in China. The reproductive and respiratory diseases caused by porcine Chlamydia have seriously affected the development of pig breeding industry in China. Vaccine is a potential direction in the prevention and control of Chlamydia, but there is no approved porcine Chlamydia vaccine in China. Therefore, a safe and effective porcine Chlamydia vaccine is needed to prevent the damage caused by porcine Chlamydia to the breeding industry. Based on the three immune candidate proteins of Chlamydia pig OmpA, pmpd and MIP, two multi epitope recombinant proteins were successfully constructed by predicting their antigenic epitopes through bioinformatics technology. After purification, denaturation and renaturation, the soluble recombinant protein was finally obtained. Western blot and mass spectrometry showed that the recombinant protein sequence was consistent with the predicted sequence.

The reconstituted protein and Freund adjuvant were used to immunize mice, and the serum before and after immunization was collected for Western blot and cytokine detection. The results showed that the two recombinant proteins after renaturation could stimulate mice to produce antigen specific antibody, and successfully induced humoral immunity in mice. By monitoring the changes of serum IL-2、IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in mice before and after immunization, it is found that the two proteins after renaturation can cause the increase of these three cytokines to a certain extent. Therefore, it is considered that the two multi epitope recombinant proteins constructed in this paper have immunogenicity and can cause humoral immunity and a certain degree of cellular immunity, To lay the foundation for the follow-up safe and effective subunit vaccine of porcine tunica original body weight group.

**Key words:** Chlamydia suis; Multi epitope fusion protein; Subunit vaccine; Prokaryotic expression; Immunogenicity;

# 目 录

第一章 前言.....	1
1.1 衣原体概述.....	1
1.1.1 猪衣原体.....	2
1.1.2 流行病学.....	2
1.1.3 临床症状.....	2
1.1.4 病理变化.....	3
1.1.5 诊断方法.....	3
1.2 衣原体疫苗的研究进展.....	6
1.2.1 减毒活疫苗与灭活疫苗.....	6
1.2.2 亚单位疫苗.....	6
1.2.3 基因疫苗.....	8
1.3 研究的目的是与意义.....	9
第二章 猪衣原体多表位重组蛋白的设计和生物学分析.....	11
2.1 猪衣原体多表位重组蛋白的设计.....	11
2.1.1 生物信息学分析软件.....	11
2.1.2 抗原片段的选取与设计.....	11
2.2 候选抗原的分析与重组蛋白设计结果.....	12
2.2.1 候选蛋白的跨膜区分析.....	12
2.2.2 候选蛋白的信号肽分析.....	13
2.2.3 候选蛋白的 B 细胞表位分析.....	14
2.2.4 多表位融合基因的设计.....	14
2.2.5 目的蛋白的表达分析.....	15
2.2.6 重组蛋白的分子量、疏水性和稳定性预测.....	17
2.3 讨论.....	17
第三章 猪衣原体多表位重组蛋白的表达和纯化.....	19
3.1 试验材料.....	19
3.1.1 基因、质粒和载体.....	19
3.1.2 主要生物试剂.....	19
3.1.3 主要试验仪器.....	19
3.1.4 主要试剂的配制.....	20
3.2 试验方法.....	22
3.2.1 重组质粒的构建.....	22
3.2.2 原核表达及 SDS-PAGE 分析.....	25
3.2.3 目的蛋白的纯化.....	28

3.2.4 蛋白免疫印迹分析.....	29
3.3 结果与分析.....	30
3.3.1 重组质粒的双酶切鉴定结果.....	30
3.3.2 目的蛋白表达及 SDS-PAGE 分析.....	31
3.3.3 目的蛋白的纯化结果.....	34
3.3.4 目的蛋白的复性结果.....	34
3.3.5 复性蛋白的 Western-blot 鉴定结果.....	35
3.4 讨论.....	36
第四章 猪衣原体多表位重组蛋白的质谱分析和免疫原性研究.....	37
4.1 试验材料.....	37
4.1.1 试验动物.....	37
4.1.2 主要生物试剂.....	37
4.1.3 主要试验仪器.....	37
4.1.4 主要试剂的配制.....	37
4.2 试验方法.....	38
4.2.1 复性蛋白的质谱验证.....	38
4.2.2 纯化蛋白浓度的测定.....	39
4.2.3 小鼠免疫试验.....	39
4.3 结果与分析.....	41
4.3.1 复性蛋白的质谱结果.....	41
4.3.2 复性蛋白浓度的测定结果.....	43
4.3.3 小鼠血清中细胞因子的检测结果.....	43
4.3.4 小鼠血清中抗体的 Western-blot 结果.....	50
4.4 讨论.....	51
全文总结.....	53
缩略词表.....	55
参考文献.....	57
附件:重组蛋白 A、B 部分质谱图.....	67

## 第一章 前言

### 1.1 衣原体概述

衣原体(*Chlamydia*)是指一种介于细菌和病毒之间的专性细胞内寄生的原核微生物,直径约为 0.2 $\mu$ m~0.5 $\mu$ m,革兰氏染色呈阴性,具有特殊的双相发育周期(biphasic development cycle),可感染包括人类在内的多种动物而引起许多传染性病症<sup>[1, 2]</sup>。衣原体中存在着 DNA 和 RNA 两类遗传物质,成熟的衣原体颗粒被称做原体(elementary bodies, EBs),而原体则在侵染宿主细胞后转化为代谢活跃并具备分裂能力的网状体(reticulate bodies, RBs)<sup>[3, 4]</sup>,它们在细胞外具有传染性的原体和细胞内非传染性的网状体之间来回交替<sup>[5]</sup>,原体在侵入黏膜细胞后再在黏膜细胞的隔膜中分化成网状体-包涵体,经数轮复制后网状体重新分化为原体并从宿主细胞中释放出来,感染邻近细胞<sup>[6]</sup>。

根据最新的第二版《伯杰系统细菌学手册》分类,衣原体依据 16s rRNA 基因的同源性把所有的衣原体归入统一的衣原体门,而衣原体门下只有 1 个衣原体目,下设 8 个衣原体科分 11 个属,其中与人兽共患病相关的所有衣原体都归入一个衣原体科一个衣原体属,此属目前共包含 12 个衣原体种<sup>[7]</sup>,即肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、流产衣原体(*Chlamydia abortus*)以及对畜禽具有致病性的家畜衣原体(*Chlamydia pecorum*)、猪衣原体(*Chlamydia suis*)、猫衣原体(*Chlamydia felis*)、鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*)、豚鼠衣原体(*Chlamydia caviae*)、朱鹭衣原体(*Chlamydia ibidis*)、家禽衣原体(*Chlamydia gallinacea*)和鸟衣原体(*Chlamydia avium*)。

衣原体寄生谱广泛,是一种常见的人兽共患病病原,感染人类后可引起肺炎、结膜炎、心肌炎等症状,严重者可导致失明或死亡。衣原体亦可寄生于各种圈养动物和野生动物,如猪、牛、羊、鸡、鸭,野生的哺乳动物和禽类等均有感染衣原体的报道。动物感染衣原体后可能出现呼吸系统和生殖系统损伤,导致孕期动物流产、死胎;不同的衣原体感染出现的临床症状不同,有的表现出肺炎、结膜炎、肠炎、关节炎等症状<sup>[8-10]</sup>。

### 1.1.1 猪衣原体

猪感染衣原体的病例最早由 Willigan 于 1955 年报道, 并首次从患病的猪身上分离出了衣原体, 开启了猪源性衣原体研究的篇章<sup>[11]</sup>。由于猪衣原体与沙眼衣原体的 *OmpA* 基因高度同源性, 因此在 Everett 1999 年正式提出猪衣原体 (*Chlamydia suis*) 分类前, 猪衣原体一直被国内外学者认为是沙眼衣原体<sup>[12, 13]</sup>。猪衣原体普遍具有四环素抗性基因 *Tet (C)*, 体外证据也证明了四环素抗性基因在共感条件下可以通过水平基因传递给沙眼衣原体<sup>[14]</sup>, 虽然目前认为猪仍是猪衣原体的主要宿主, 但有些证据表明猪衣原体可能通过猪传播给人类, 具有人兽共患风险<sup>[15]</sup>。

### 1.1.2 流行病学

由衣原体感染猪所引起的传染性疾病称为猪衣原体病, 国内早年普遍认为能够感染猪的衣原体主要包括流产衣原体、家畜衣原体、鸚鵡热衣原体和猪衣原体<sup>[16-19]</sup>。但根据扬州大学最近几年的猪衣原体病分子生物学调查数据表明, 在我国猪衣原体为感染猪的唯一衣原体种, 并且存在高度流行性和遗传多样性<sup>[20,21]</sup>。

发病猪、隐性感染猪以及各种携带病原体的媒介物都是本病的主要传染源<sup>[22]</sup>。猪衣原体主要聚集在病猪肠道和呼吸道, 病猪的口鼻拭子、肛肠拭子、结膜拭子、粪便和流产胎儿等均有较高的检出率。猪衣原体可通过分泌、排泄、呼吸等方式排出体外导致养殖场饲养环境污染, 进而经口鼻或交配等方式导致场区感染, 此外蝇和蜚在猪衣原体病的传播上起着媒介作用<sup>[23]</sup>。猪舍的卫生条件和通风条件较差时, 以及进出场消毒不严格等均可导致猪衣原体发病率增加, 规模猪场管理不善时, 保育仔猪、育肥猪的平均感染力高达 10%~30%<sup>[24, 25]</sup>。

### 1.1.3 临床症状

猪衣原体被认为是猪中感染最广泛的衣原体物种, 其感染的症状主要表现为无症状感染或地方性亚临床感染。在发生临床症状的猪的身上, 猪衣原体可以引起多种器官病变。

眼部症状: 可以从患有结膜炎或角膜炎的猪结膜拭子中分离出猪衣原体, 在感染猪衣原体的前七天内, 病猪表现为不同程度的结膜炎、眼睑肿胀、眼部分泌物增多等临床症状, 并且后续可能发展为呼吸系统疾病<sup>[26]</sup>。

呼吸系统症状: 猪衣原体感染可导致猪肺功能障碍和肺部疾病。在感染一周左右, 病猪表现为呼吸困难, 干咳和浆液性流鼻涕, 病危猪的呼吸困难伴有痉挛性呼吸音<sup>[27]</sup>。

消化系统症状: 猪衣原体能够很好的适应肠内环境, 肠道一直被认为是猪衣原体的天然储存库。猪衣原体的消化系统症状可表现为肠内升温出现肠炎, 中度至重度腹



泻、轻微和短暂的厌食、虚弱和体重减轻，病情严重的可出现肠道糜烂<sup>[28]</sup>。

生殖系统症状：猪衣原体感染与母猪的返情和公猪精液品质低下直接相关，可感染母猪导致生殖道充血，并发炎症；进而导致待产母猪流产、死胎（超过 50% 的妊娠母猪的早期胚胎死亡）<sup>[29]</sup>，并可继发胎衣滞留而导致的子宫内膜炎；公猪感染可能导致睾丸炎、睾丸肿大、精子失活、后期睾丸逐渐坏死萎缩等症状。

#### 1.1.4 病理变化

病猪的病理性变化大多聚集于呼吸和消化系统，眼部通常无明显病理变化，偶见溃疡和糜烂；感染的母猪生殖道充血肿大，上皮细胞变性或坏死，可见炎性细胞浸润<sup>[30]</sup>。呼吸道型病变主要表现为肺部弥散性肺实变和局灶性肺气肿，气管管腔内可见炎性细胞浸润并伴有细支气管炎。严重感染的出现局灶性肺炎，可见间质浸润淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞、肺泡内巨噬细胞聚集，以及呼吸肌张力障碍<sup>[27]</sup>。消化道型感染的猪的衣原体复制主要位于小肠绒毛肠细胞中，其他复制位点包括大肠肠上皮细胞、固有层和黏膜下层以及肠系膜淋巴结<sup>[31]</sup>。肠道中有明显的中度至重度绒毛萎缩伴肠细胞扁平化和局灶性绒毛尖端糜烂<sup>[28]</sup>，远端空肠、回肠和结肠的黏膜下层、肌层和浆膜中可观察到淋巴管炎及淋巴组织细胞和中性粒细胞聚集。

#### 1.1.5 诊断方法

衣原体的临床症状并不典型，根据其地区流行情况、临床症状只能初步怀疑为衣原体感染，真正的分型确诊需要实验室检测。通过采集到的病料组织、排泄物、眼口鼻拭子、肛门拭子、血制品，可以从病原学、血清学和分子生物学等方面进行鉴别诊断。衣原体在全世界范围内广泛流行，是影响人类健康和畜牧业发展的重要病原微生物之一，因此衣原体的早期诊断对衣原体病的治疗与防控具有重要意义。

##### ①病原学检测：

涂片镜检：从感染动物或流产胎儿取病变的组织、各种拭子、细胞培养物等制作镜检涂片，衣原体在吉姆萨染色法或改良的尼氏染色法作用下，使用高倍镜镜检，在视野中央可以观察到被染红或紫红色的衣原体颗粒。此方法操作简单，但对于低感染的样品可能存在假阴性结果，同时也需要注意在吉姆萨染色法中与衣原体颜色形态相近的柯克斯氏体的鉴别诊断。

分离鉴定：衣原体作为一种专性胞内寄生菌，必须依靠活细胞生存、繁衍，衣原体的分离培养鉴定被认为是衣原体诊断的“金标准”，根据培养方式不同分为鸡胚培养法和细胞培养法。细胞培养的成本高于鸡胚培养，是有条件的实验室首选的方法，比较常见的细胞系包括人喉癌上皮细胞（Hep-2）、非洲绿猴肾细胞（Vero）、布法罗绿猴

肾细胞 (BGMK)、人肺癌细胞 (H292) 和人宫颈癌上皮细胞 (HeLa229) 等<sup>[32]</sup>。鸡胚培养法一般采用 5-7 日龄鸡胚, 卵黄囊膜接种后, 放入 37° 培养箱培养。由于衣原体感染导致鸡胚死亡一般需要 4-13 日, 因此若有 4 日前死亡的鸡胚则直接舍弃。在 4 日后死亡的鸡胚的卵黄囊膜中含有数量较多的衣原体颗粒, 直接涂片镜检可见衣原体原体、包涵体、网状体颗粒<sup>[33]</sup>。

②血清学检测: 血清学检测的是基于抗原抗体的特异性反应, 较常用的方法有酶联免疫吸附试验 (ELISA)、间接血凝试验 (IHA)、补体结合试验 (CFT) 等。

酶联免疫吸附试验 (ELISA): ELISA 用于检测特异性抗体 IgG 的含量, 有夹心法、间接法和竞争法三种方式, 由于被感染动物的血清里含有衣原体特异性抗体, 用标准阳性抗原与固相载体结合后, 再与待检血清反应, 最后与酶标抗原 (或抗抗体) 结合, 底物在相对应的酶的催化下进行显色反应, 通过酶标仪读取其对应波长的吸光值, 根据其标准阳性和阴性的吸光值不同来进行结果判定。该方法灵敏度和特异性较好, 操作方法和实验室要求相对简单, 并且可以确定抗原/抗体含量, 是血清学检测的最常用方法。国内目前已用于建立衣原体 ELISA 检测方法的抗原包括衣原体的主要外膜蛋白 (MOMP)<sup>[34, 35]</sup>、巨噬细胞感染增强蛋白 (MIP)<sup>[36]</sup>、蛋白酶样活性因子 (CPAF)<sup>[37]</sup> 等蛋白。

间接凝血试验 (IHA): 间接血凝试验 (IHA) 是一种根据红细胞凝聚程度来判定样品阴、阳性的试验, 需要将衣原体标准阳性抗原 (或抗体) 通过人工耦合的方式包被于红细胞表面, 使其成为致敏红细胞。与相应的抗体 (或抗原) 结合后致敏红细胞相互聚合, 发生凝集反应, 该反应肉眼可见。常见的红细胞载体有兔、鸡、绵羊红细胞及人 O 型血红细胞。该检测方法操作简单, 不需要特殊仪器, 结果可肉眼直接观察。但其特异性和灵敏性较低, 不同厂家的试剂盒抗原和批次不同, 可能出现检测结果不一致<sup>[38]</sup>。

补体结合试验 (CFT): 补体结合试验是一种年代久远的血清学技术, 诞生于 1901 年, 曾经广泛应用于禽衣原体的血清学检测。补体组合试验的基本原理是补体能够与任意的抗原抗体复合物非特异性的结合。游离的补体也能够与红细胞和溶血素的复合物结合, 当反应体系同时存在待检衣原体抗原 (抗体)、衣原体阳性血清 (抗原)、补体、红细胞和溶血素的时, 补体与待检系统中的抗原抗体复合物和指示系统中红细胞-溶血素复合物的结合相互竞争, 若不发生溶血反应, 结果判定为阳性; 若发生溶血反应, 结果为阴性。补体结合试验操作相对复杂且特异性不足, 对衣原体的种间交叉反应区分能力较差, 目前在临床已经很少使用<sup>[39]</sup>。

③分子生物学检测：衣原体的分子生物学检测主要依据 PCR 技术及其衍生技术，对衣原体的核酸片段进行扩增，并对扩增产物验证比对，进而精确到物种的一种检测方法。除 PCR 方法外，一些学者也开发了如环介导等温扩增（LAMP）<sup>[40-41]</sup>、重组聚合酶扩增（RPA）<sup>[42]</sup>等新型检测技术用于衣原体的诊断。

PCR 检测技术：常用的 PCR 检测技术包括普通 PCR，巢式 PCR，实时荧光定量 PCR 等，PCR 技术需要根据目的基因设计一对上游引物和下游引物，根据 DNA 在高温解旋在低温聚合这一特性在体外完成目的基因的大量扩增。衣原体的 16S rRNA、23S rRNA 和主要外膜蛋白基因（*OmpA*）是使用最广泛检测靶点。*OmpA* 是衣原体主要外膜蛋白的编码基因，该基因有 4 个可变区(variable domains, VDs)，每个 VDs 的两侧 DNA 序列相对保守，VDs 序列也与衣原体的种属特异性相关，这种序列的特异性使 *OmpA* 基因成为 PCR 检测的理想靶点，使其可用于衣原体物种间鉴别<sup>[43]</sup>。目前国内有许多依据上述基因建立的常规 PCR 检测技术，如唐泰山等使用衣原体 *OmpA* 基因和 23S rRNA 分别建立了衣原体属通用的常规 PCR 检测方法，其检测下限分别为 10000 拷贝和 900 拷贝<sup>[44]</sup>。李应国以 *OmpA* 为靶向基因建立了猪衣原体、肺炎衣原体和针对衣原体种属的四种不同的常规 PCR 方法，用于衣原体的鉴别诊断<sup>[45]</sup>。

巢式 PCR：巢式 PCR 是一个特殊的 PCR 反应，相比于普通 PCR，巢式 PCR 利用了两对 PCR 引物，并通过两次 PCR 反应最终扩增出目的片段。第二对 PCR 引物也被叫做巢式引物。巢式 PCR 中第二次扩增的模板为第一次扩增的产物，若与第一次扩增反应错配。则第二次反应能扩增出目的片段的几率极低，所以巢式 PCR 特异性高于一般 PCR。该方法的缺点则是反应时间长，操作更为繁琐。巢式 PCR 目前是衣原体诊断技术中行业标准的推荐技术<sup>[46]</sup>。

实时荧光定量 PCR（Quantitative Real-time PCR, qPCR）：qPCR 在传统 PCR 的基础上添加了荧光基团，利用荧光信息累积实时监测整个 PCR 进度，分为探针法和染料法。染料法在反应系统中添加了过量的荧光染料，染料可以以非特异的方式与体系中的双链 DNA 结合，结合的染料释放出荧光信息，使荧光信息与反应同步；探针法在 PCR 基础上增加一条特异性探针，PCR 反应进行时 Taq 酶的 5'—3' 外切酶活性将探针酶切降解，将标记于探针上的荧光基团释放，荧光信号与合成的 DNA 链呈正相关<sup>[47]</sup>，从而实时监测 PCR 反应。普通 PCR 反应只能确定样本有无特定病原的核酸，而 qPCR 通过构建标准曲线，将监测数据代入标准曲线求解，便可分析该样本中某一细菌的数量。因此 qPCR 无需后续繁琐的电泳试验，缩短了检测的时间。灵敏度和特异性上 qPCR 明显优于普通 PCR，是衣原体分子生物学检测的首选方法，郭伟娜基于 23S rRNA 构

建了能同时检测并大致区分 11 个衣原体种的 qPCR 方法,该方法最低检测限度在 10-100 拷贝左右<sup>[48]</sup>。

环介导等温扩增 (LAMP): LAMP 由日本学者 Notomi 在 2000 年首次提及<sup>[49]</sup>,该技术可以在等温条件下 (60°C-65°C) 在 1 小时内将几个 DNA 拷贝扩增至 10<sup>9</sup>,并且结果肉眼可见。LAMP 需要针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 进行反应,反应不需要精密的仪器,并且特异性和灵敏性较高,是一种“简便、快速、精确、低价”的基因扩增方法。目前国内已有许多用于检测衣原体的 LAMP 方法<sup>[40-41]</sup>。

## 1.2 衣原体疫苗的研究进展

衣原体的疫苗研究起源于上世纪五十年代,随着研究的深入,衣原体疫苗经历了从全菌疫苗到亚单位疫苗再到基因疫苗的发展。衣原体的发病机制复杂,抗原构象和基因组学研究尚不完善,目前虽无人用衣原体疫苗的问世<sup>[50]</sup>,但在预防动物衣原体疾病上,已取得一部分进展。

### 1.2.1 减毒活疫苗与灭活疫苗

减毒活疫苗:减毒活疫苗是通过人工致弱或自然筛选的弱毒株,在保留生物活性的同时对宿主不致病,可以产生良好的细胞免疫和体液免疫。2010 年 Laszlo Kari 等证实了沙眼衣原体质粒缺陷型 A2497P 菌株能有效的防止沙眼衣原体对猴类的感染,该发现对人类衣原体感染和疫苗研制具有极好的预测价值<sup>[51]</sup>。中国学者 Zengzi Zhou 等通过小鼠模型发现鼠衣原体突变株在缺乏整个质粒或仅缺乏质粒编码基因 *PGP3* 时高度减毒,口服接种 *PGP3* 缺陷型菌株可诱导产生针对鼠衣原体的强大免疫力<sup>[52]</sup>。

灭活疫苗:灭活疫苗在杀死病原的同时保留其抗原的完整性,相对于活疫苗更加安全,没有变异和疫苗毒风险,但无法诱导机体产生细胞免疫应答和粘膜免疫应答<sup>[53]</sup>。2018 年蔡金山等人完成了牦牛衣原体灭活疫苗的研究,动物试验表明该疫苗能够有效抵抗流产衣原体的侵袭,对牦牛具有良好的免疫保护作用<sup>[54]</sup>。

### 1.2.2 亚单位疫苗

亚单位疫苗是通过基因工程手段提取病原的蛋白质或是抗原决定簇制成的生物工程疫苗,由于不含有病原核酸,所以十分安全。亚单位疫苗一般需要与佐剂联用,能诱发机体同时产生体液免疫和细胞免疫,单独注射效果不佳。常用于设计衣原体亚单位疫苗的免疫蛋白包括主要外膜蛋白(major outer membrane protein, MOMP)、多态膜蛋

白 (polymorphic membrane proteins, PMPs)、巨噬细胞感染增强蛋白 (microphage infectivity potentiator, MIP)、衣原体质粒糖蛋白 3 (PGP3)、衣原体蛋白酶样活性因子 (Chlamydia proteaselike activity factor, CPAF) 等。

**主要外膜蛋白 (MOMP):** MOMP 大约占据外膜蛋白总量的 60% 左右, 被认为在维持衣原体生物体结构完整性方面发挥作用<sup>[55]</sup>。MOMP 含有四个可变区 (VD), 具有大量 B 细胞表位和 T 细胞表位, B 细胞表位已覆盖到 MOMP 的所有四个可变区, 而 T 细胞表位主要在恒定区 (CD) 中。在衣原体复制过程中 MOMP 充当孔蛋白, 用于将离子和糖类转运到外膜<sup>[56]</sup>。MOMP 具有天然三聚体结构, 在 MOMP 用于疫苗开发时易受到溶解度差、产量低和蛋白质错误折叠的限制<sup>[57]</sup>。Marion Desclozeaux<sup>[58]</sup> 使用含有 MOMP 的重组亚单位疫苗对一组野生考拉免疫注射, 接种疫苗的考拉 90% 以上产生抗衣原体 IgG 抗体和黏膜免疫反应。Sukumar<sup>[59]</sup> 使用两种阳离子脂质体佐剂 CAF01 和 CAF09 与天然或重组鼠衣原体 MOMP 一起免疫小鼠产生了强大的细胞免疫反应, 其中接种天然 MOMP 的小鼠明显比接种重组 MOMP 的小鼠受到更好的保护, 这表明该抗原的结构构象在保护中的重要性。

**多态膜蛋白 (PMPs):** PMPs 是一个表面暴露的膜结合蛋白家族, 成员众多, 在所有衣原体中均会表达, 不同的衣原体编码 PMPs 的基因数量不同, 因此 PMPs 在不同衣原体中数量并不相等。作为典型的 V 型自转运蛋白, 所有 PMPs 的 N 端均有保守的 GGA 和 FxxN 四肽基序<sup>[60]</sup>。在衣原体感染的初始阶段, PMPs 主要负责转运和黏附功能, 能够通过激活转录因子 NF- $\kappa$ B, 在感染细胞中诱导免疫反应<sup>[61]</sup>。由于蛋白个体的不同, PMPs 家族蛋白引起免疫应答的能力也不同, 目前用于疫苗研究的主要 PmpD, PmpG 等。PmpD 是一个很有潜力的免疫原候选蛋白, 它在衣原体中是比较保守的, 而且是中和抗体的靶标<sup>[62]</sup>。Tina Müller<sup>[63]</sup> 用沙眼衣原体的 PmpA 和佐剂 CpG-ODN 1826 对小鼠进行了免疫接种, 攻毒试验证明疫苗降低了生殖道病变的发生率和严重程度。Shanshan Liu<sup>[64]</sup> 将鹦鹉热衣原体 PmpD 基因的 N 端插入火鸡疱疹病毒 (HVT) 基因组, 用构建体表达的 PmpD-N 重组蛋白免疫后, 再用鹦鹉热衣原体 CB7 菌株攻击, 试验组呼吸窘迫减轻、病变和衣原体颗粒含量显著降低。

**巨噬细胞感染增强蛋白 (MIP):** MIP 蛋白是一种含量丰富的衣原体脂蛋白, 所有的衣原体均含有该蛋白。MIP 蛋白的氨基酸序列在衣原体种间是非常保守的, 表现出肽基-脯氨酰顺/反异构酶 (peptidyl-prolyl isomerase, PPIase) 活性<sup>[65]</sup>。MIP 蛋白存在于 EB 和 RB 中<sup>[66]</sup>, 被认为与衣原体的早期感染有关<sup>[67]</sup>, 可以协助衣原体其他未折叠和部分折叠的蛋白进行正确折叠<sup>[68]</sup>。MIP 蛋白是一种具有潜力的衣原体疫苗候选抗原,

Chunxue Lu 等<sup>[69]</sup>通过小鼠攻毒试验发现 MIP 蛋白对鼠衣原体 (*C. muridarum*) 感染具有显著的保护作用, 可诱导高水平的抗 MIP 和 MoPn EB 抗体。

衣原体质粒糖蛋白 3 (PGP3): 衣原体质粒是感染发病机制中的中心毒力因子, 其大小约为 7.5Kb, 是一种高度保守的非整合 DNA 分子, 存在于大多数衣原体种<sup>[70]</sup>。质粒基因蛋白 4 (PGP4) 调节质粒基因蛋白 3 (PGP3) 和染色体糖原合酶 (GlgA) 的表达, 当衣原体感染时, PGP3 和 GlgA 需要穿过包涵体膜抵达宿主细胞的胞质溶胶, 而这种从包涵体分泌到宿主细胞质的机制尚不清楚<sup>[71]</sup>。Xiuli Luan<sup>[72]</sup>发现单独接种 MIP 或 PGP3 或 MIP 加 PGP3 联用, 都会在小鼠中诱导产生特异性抗体和 Th1 介导的细胞免疫反应, 引起衣原体生殖道感染的跨血清型保护。

衣原体蛋白酶样活性因子 (CPAF): CPAF 是一种保守的衣原体蛋白酶, 作为一种多肽在衣原体包涵体中合成, 被迅速加工成两个亚基, 这些亚基组装成异二聚体并且会分泌到宿主胞质溶胶中获得蛋白水解活性<sup>[73]</sup>, 可切割和降解许多宿主和衣原体蛋白<sup>[74]</sup>。CPAF 与衣原体的免疫逃避机制有关<sup>[75, 76]</sup>, 既具有抗凋亡活性, 又能诱导非凋亡性细胞死亡<sup>[77, 78]</sup>, 是衣原体致病性的一个重要因素。CPAF 可以引起 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫反应, 产生 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IgG2a 和 IgA 抗体, 是一种免疫原性很强的衣原体抗原。

亚单位疫苗作为蛋白质疫苗, 有效的回避了全菌疫苗的生物安全问题。随着研究的不断发展和完善, 人们逐渐意识到, 单一抗原制成的疫苗诱导机体产生的免疫保护有限。所以, 在研制疫苗时, 将更多抗原表位重组融合的重组亚单位疫苗, 就成了亚单位疫苗的研发热点。Yumeng Li 等<sup>[79]</sup>使用 MOMP (24-32, 262-272) 和 CPSIT\_p6 蛋白 (109-119, 173-181) 构建的重组亚单位疫苗免疫 BALB/c 小鼠产生有意义的高水平抗原特异性抗体和 Th1 细胞免疫反应。Pengfei Jiang<sup>[80]</sup>开发了一种同时包含沙眼衣原体多表位肽 (MOMP 370-387) 和乙型肝炎病毒核心抗原 (HBcAg) 疫苗, 而后将表位肽 (MOMP 370-387) 与 MOMP 另外的两个表位相互串联连接, 结果表明, 串联 Ct MOMP 多表位的免疫原性和保护作用均远优于单表位。成分单一的亚单位疫苗可能无法提供最佳的免疫保护, 在小鼠衣原体感染模型中, 多抗原、多表位的亚单位疫苗对衣原体感染的交叉免疫保护效果更优<sup>[81, 82, 83, 84]</sup>。在未来衣原体疫苗的研究方向上, 多表位重组亚单位疫苗是具有潜力的研究思路, 在安全、低成本的同时进一步提高疫苗的免疫效果。

### 1.2.3 基因疫苗

基因疫苗通常特指 DNA 疫苗, 不同于传统的以蛋白质多肽为抗原亚单位疫苗, DNA 疫苗将编码外源性抗原的基因插入含有质粒的真核表达系统, 然后直接将质粒导入宿主细胞, 在宿主细胞中表达抗原蛋白并诱导免疫应答。Changbo Ou<sup>[85]</sup>使用基于

OmpA 的噬菌体介导的 DNA 衣原体疫苗候选物对仔猪进行肌肉注射免疫, 结果表明该 DNA 疫苗可以诱发强烈的抗原特异性细胞免疫和体液免疫。DNA 疫苗可以编码具有天然三维结构的多表位抗原<sup>[86]</sup>, 能够刺激机体同时产生体液免疫和细胞免疫<sup>[87]</sup>, 但由于其可能引起抗 DNA 抗体或自身免疫病及插入的基因可能发生突变<sup>[86, 87, 88]</sup>, 这些因素仍是 DNA 疫苗发展所面临的难题。

### 1.3 研究的目的与意义

根据扬州大学王成明团队<sup>[20, 21]</sup>的研究表明, 我国猪感染衣原体种类单一且高度流行, 猪衣原体病带来的生殖系统和呼吸系统疾病严重影响了我国生猪养殖行业的发展。猪感染猪衣原体后, 一般使用土霉素、四环素等抗生素进行治疗, 但目前许多国家发现的猪衣原体均获得了四环素抗性基因<sup>[89, 90]</sup>, 畜牧行业的抗生素滥用最终会导致人类食品的安全问题, 这种问题尤其是在猪衣原体这种具有人兽共患病潜力的病原下更加严峻<sup>[15, 91]</sup>。如果继续采用这种不良的畜牧业管理方法, 我们最终可能会看到具有抗生素抗性的衣原体在人类社会传播和流行<sup>[92]</sup>。在猪衣原体的防控上, 科学的饲养管理、保证猪舍的卫生及通风, 对进出猪场和生产区的人和物全面消毒, 能很好地预防疾病的发生<sup>[93]</sup>。这种普适的防控手段无法提高猪群对某一病原的抵抗力, 一旦病原侵入则可能导致大面积的传播。疫苗在猪衣原体病的防控上仍是一个具有吸引力的研究方向, 通过中国兽药信息网 (<http://m.ivdc.org.cn/>) 和国家兽药基础数据库 (<http://124.126.15.169:8081/cx/#>) 查询, 目前国内尚无获准上市的猪衣原体疫苗。衣原体主要外膜蛋白(MOMP)、多态膜蛋白(PMPs)、巨噬细胞感染增强蛋白(MIP)等蛋白是衣原体亚单位疫苗的强力候选抗原, 本文通过生物信息软件对上述三种蛋白的 B 细胞表位进行筛选和重组设计, 在大肠杆菌系统中进行原核表达。经小鼠免疫试验评估其细胞免疫和体液免疫水平, 为探索免疫效果良好的猪衣原体多表位重组亚单位疫苗提供理论基础。





## 第二章 猪衣原体多表位重组蛋白的设计和生物学分析

根据国内外相关研究成果,衣原体 MOMP 蛋白、PmpD 蛋白以及 MIP 蛋白在衣原体感染早期的黏附过程中起到了不可或缺的作用,均含有衣原体特异性抗原表位,能够刺激机体产生的特异性抗体。本章通过使用生物信息学软件及各种生物信息数据库,筛选三种蛋白中的 B 细胞表位片段,以大肠杆菌 BL21(DE3)为表达载体, pCold II 为质粒载体,设计了两个多表位重组蛋白,通过在线蛋白分析软件对构建的蛋白进行生物学分析和结构预测。为下一步蛋白表达纯化奠定基础。

### 2.1 猪衣原体多表位重组蛋白的设计

#### 2.1.1 生物信息学分析软件

使用以下生物信息学软件对蛋白序列进行分析: NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); IEDB 免疫表位库 (<http://tools.iedb.org/bcell/>); ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/>); TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); Expasy 蛋白在线分析软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>); SnapGene 软件; SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html));

#### 2.1.2 抗原片段的选取与设计

通过使用 IEDB 免疫表位库查询并获得了猪衣原体 OmpA 三段可以与特异性血清发生高度反应 B 细胞线性肽段<sup>[94]</sup>,从 NCBI 数据库中获得了该蛋白的登录号 KP165539。同时从 NCBI 数据库中下载了猪衣原体 PmpD (ACL83363.1), MIP 蛋白序列 (ESN89325.1)。之后分别使用生物信息学软件 TMHMM2.0 与 SignalP5.0 对获得的猪衣原体 MOMP、MIP、PmpD 蛋白的跨膜区与信号肽进行分析,并在后面的抗原片段的选择上规避掉蛋白的跨膜区和信号肽。然后使用 IEDB 免疫表位库和 ABCpred 对 MIP、PmpD 蛋白的 B 细胞线性表位预测,选取两种软件同时预测出的区域作为候选片段。

将来自于 IEDB 数据库中的三段 B 细胞线性表位分别重复三次后串联构建,在相同的重复序列中添加连接子(氨基酸 GGGS),在不同的重复序列中添加柔性连接肽

(氨基酸 GGGGS)，并使用 SnapGene 软件将其基因序列嵌入 pCold II 质粒载体（酶切位点为 *NdeI* 和 *XhoI*），对其表达产物进行分析，并在后续试验中将其称为猪衣原体重组蛋白 A。

将来自于 IEDB 数据库中的三段 B 细胞线性表位中亲水性较高的肽段与 MIP、PmpD 蛋白的候选表位分别重复三次后串联构建，在相同的重复序列中添加连接子（氨基酸 GGGGS），在不同的重复序列中添加柔性连接肽（氨基酸 GGGGS），并使用 SnapGene 软件将其基因序列嵌入 pCold II 质粒载体（酶切位点为 *NdeI* 和 *XhoI*），对其表达产物进行分析，并在后续试验中将其称为猪衣原体重组蛋白 B。

之后使用 ExPASy 软件在线分析蛋白 A、B 的稳定性和亲水性，并使用 SOPMA 和 SWISS 对其二级、三级结构预测，为后续蛋白的表达纯化试验奠定基础。

## 2.2 候选抗原的分析与重组蛋白设计结果

### 2.2.1 候选蛋白的跨膜区分析

使用 TMHMM 2.0 软件对猪衣原体 OmpA、PmpD 和 MIP 三个蛋白的跨膜区进行预测。软件预测结果显示：OmpA、PmpD 和 MIP 的氨基酸序列均位于膜外区，不含有跨膜区，见图 2-1。

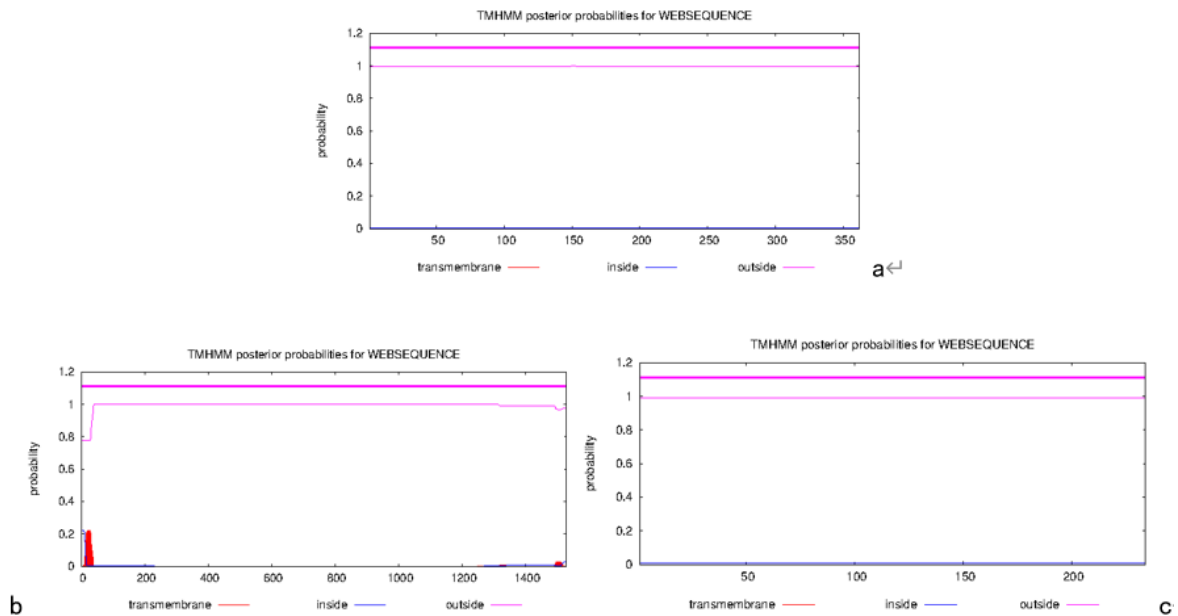


图 2-1 通过 TMHMM 预测 OmpA、PmpD 和 MIP 三个蛋白的跨膜区

Figure2-1 Predicts the transmembrane region of OmpA, PmpD and MIP proteins by TMHMM

注：a: OmpA; b: PmpD; c: MIP

## 2.2.2 候选蛋白的信号肽分析

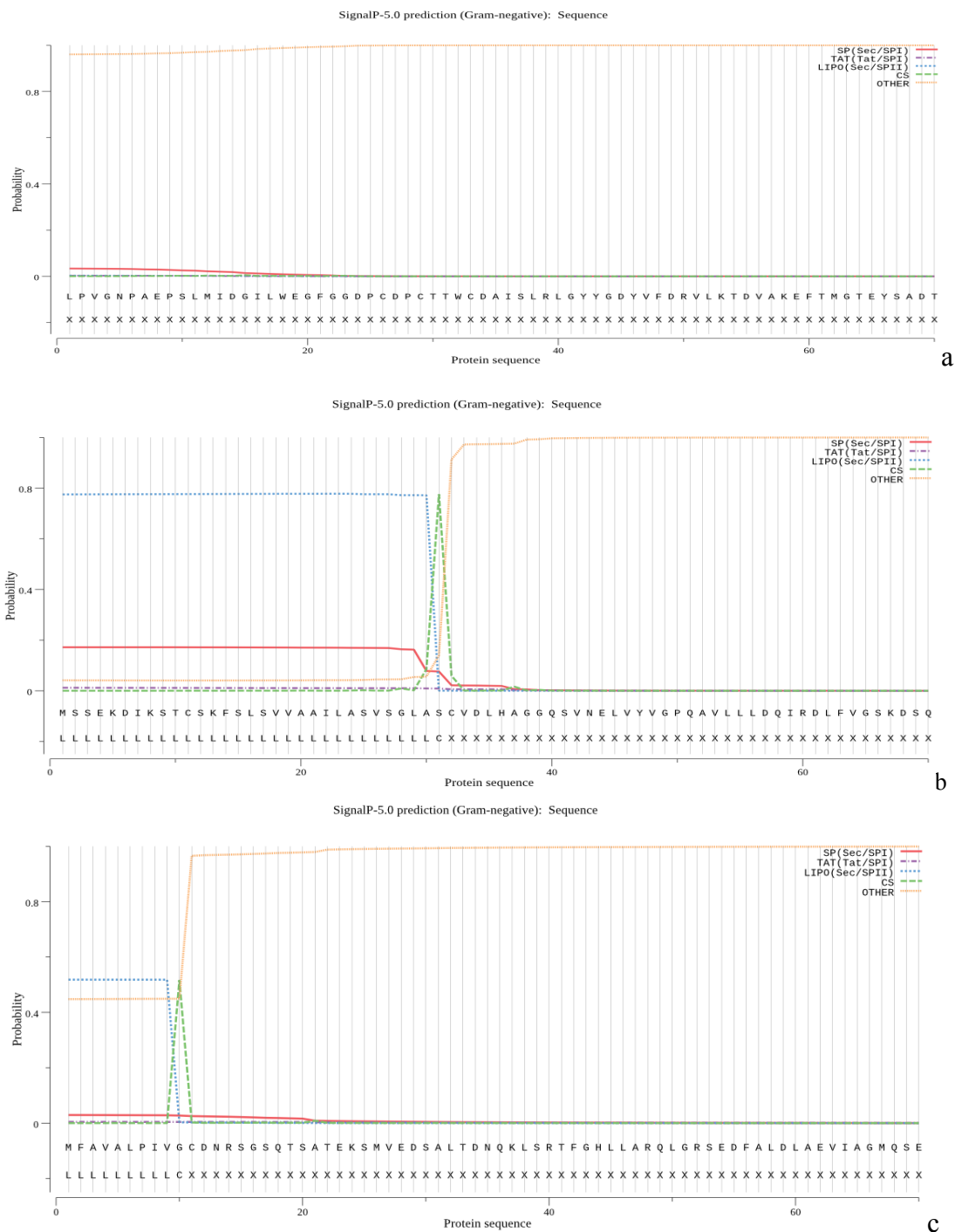


图 2-2 通过 Signal 5.0 预测 OmpA、PmpD 和 MIP 三个蛋白的信号肽

Figure2-2 Predicts the signal peptide of OmpA、PmpD and MIP proteins by Signal 5.0

注：a:OmpA; b:PmpD; c: MIP

使用 SignalP 5.0 软件对猪衣原体 OmpA 蛋白、PmpD 蛋白和 MIP 蛋白的信号肽进行预测，如图 2-2。软件预测结果显示：OmpA 蛋白有信号肽的概率为 3.500%，其切割位点未明确；PmpD 蛋白有信号肽的概率为 77.540%，切割位点位于第 31-32 氨基酸，

信号肽序列为：MSSEKDIKSTCSKFSLSVVAAILASVSGLAS；MIP 蛋白有信号肽的概率为 51.650%，切割位点位于第 10-11 氨基酸，信号肽序列为：MFAVALPIVG。

### 2.2.3 候选蛋白的 B 细胞表位分析

通过上述软件分析，在表位选择时规避掉跨膜区及信号肽，通过 IEDB 免疫表位数据库下载的 B 细胞线性表位均不含有跨膜区和信号肽，作为 OmpA 蛋白的候选抗原；利用 IEDB 免疫表位数据库和 ABCpred 软件对猪衣原体 PmpD 蛋白和 MIP 蛋白的 B 细胞线性表位进行预测，对两款软件预测分值高、且氨基酸序列相同或相近的片段作为候选抗原，如表 2-1。

表 2-1 候选蛋白的抗原表位

Table 2-1 Antigenic epitopes of candidate proteins

蛋白名称	获得方式	氨基酸片段
OmpA	IEDB 免疫表位	TISGKGQDAQTLQDTM;
	数据库查询	FGLTTTSVAAQDLPNV; RKSCGLAVGTTIVDADKYAVTVETRLIDERA AHVNAQFRF
MIP	IEDB、ABCpred 预测	EYEIQMAAVQKASFEQKCSENLAAAELFLKENKDKEG
PmpD	IEDB、ABCpred 预测	YVGPQAVLLLDQIRDLFVGSKDSQAEGQYRLIVGDPSSFQEKD ADTLPGKVEQS

### 2.2.4 多表位融合基因的设计

根据上述的蛋白分析和表位选择，在猪衣原体 OmpA、MIP、PmpD 蛋白中共筛选出 5 个猪衣原体特异性 B 细胞表位片段：将 OmpA 三段 B 细胞表位分别重复三次，在相同的重复序列中添加连接子（氨基酸 GGGs），在不同的重复序列中添加柔性连接肽（氨基酸 GGGGS），最终设计成猪衣原体 OmpA 多表位融合蛋白（见表 2-2），本文后续称蛋白 A。根据蛋白 A 的氨基酸顺序，通过 NCBI 数据库可以检索其抗原肽段的编码基因，在重组基因的首位添加 *NdeI* 酶切位点和启动子（catATG），末尾添加终止子和 *XhoI* 酶切位点（TGActcgag），最终成功构建猪衣原体多表位重组蛋白 A 目的基因。

将 OmpA 第一段 B 细胞表位与 MIP、PmpD 的预测表位分别重复三次，在相同的重复序列中添加连接子（氨基酸 GGGs），在不同的重复序列中添加柔性连接肽（氨基酸 GGGGS），最终设计成猪衣原体 OmpA-MIP-PmpD 多表位融合蛋白（见表 2-2），本文后续称蛋白 B。根据蛋白 B 的氨基酸顺序，通过 NCBI 数据库可以检索其抗原肽段

的编码基因，其中 MIP 蛋白属于肽基-脯氨酰顺/反异构酶 (peptidyl-prolyl isomerase, PPIase) 家族，在 NCBI 数据库中位反向翻译，因此在基因设计上选择其反向基因。在重组基因的首位添加 *NdeI* 酶切位点和启动子 (catATG)，末尾添加终止子和 *XhoI* 酶切位点 (TGActcgag)，最终成功构建猪衣原体多表位重组蛋白 B 目的基因。

表 2-2 重组蛋白的氨基酸序列设计

Table 2-2 Amino acid sequence design of recombinant protein

蛋白名称	氨基酸片段
多表位重组蛋白 A	MFGLTTTSVAAQDLPNV <b>GGGS</b> FGLTTTSVAAQDLPNV <b>GGGS</b> FGL
	TTTSVAAQDLPNV <b>GGSG</b> TISGKGQDAQTLQDTM <b>GGGS</b> TISGK
	QDAQTLQDTM <b>GGGS</b> TISGKGQDAQTLQDTM <b>GGSG</b> RKSCGL
	AVGTTIVDADKYAVTVETRLIDERAHVNAQFRF <b>GGGS</b> RKSCGL
	AVGTTIVDADKYAVTVETRLIDERAHVNAQFRF <b>GGGS</b> RKSCGL
	AVGTTIVDADKYAVTVETRLIDERAHVNAQFRF-
	MTISGKGQDAQTLQDTM <b>GGGS</b> TISGKGQDAQTLQDTM <b>GGGS</b> TI
	SGKGQDAQTLQDTM <b>GGSG</b> EYEIQMAAVQKASFEQKCSENLA
	AAELFLKENKDKEG <b>GGGS</b> EYEIQMAAVQKASFEQKCSENLAAA
	ELFLKENKDKEG <b>GGSG</b> EYEIQMAAVQKASFEQKCSENLAAELF
多表位重组蛋白 B	LKENKDKEG <b>GGSG</b> YVGPOAVLLLDQIRDLFVGSKDSQAEGQY
	RLIVGDPSSFQEKDADTLPGKVEQS <b>GGGS</b> YVGPOAVLLLDQIRD
	LFVGSKDSQAEGQYRLIVGDPSSFQEKDADTLPGKVEQS <b>GGGS</b> Y
	VGPOAVLLLDQIRDLFVGSKDSQAEGQYRLIVGDPSSFQEKDAD
	TLPGKVEQS-

注：‘   ’；‘   ’；‘   ’标注为 3 次重复，‘**加粗**’为连接子和柔性链接肽

### 2.2.5 目的蛋白的表达分析

使用 SnapGene 软件对构建好的蛋白 A 基因和蛋白 B 基因与 pCold II 载体的基因相链接（酶切位点为 *NdeI* 和 *XhoI*），使用软件的蛋白质翻译功能对表达产物预测，如图 2-3、2-4。由于 pCold II 载体自带 TEE（翻译增强元件）和 6xHis 标签基因，因此在翻译过程中蛋白 A 和蛋白 B 的 N 端比设计时多了氨基酸 MNHKVHHHHHH。TEE 直接保留在 *cspA* 5'UTR 后的一段氨基酸序列，可以增强重组蛋白的初始翻译<sup>[95, 96]</sup>，6xHis 标签是蛋白纯化中 Ni 柱的识别位点，因此这额外表达的氨基酸并不是多余的，而是有意的设计。

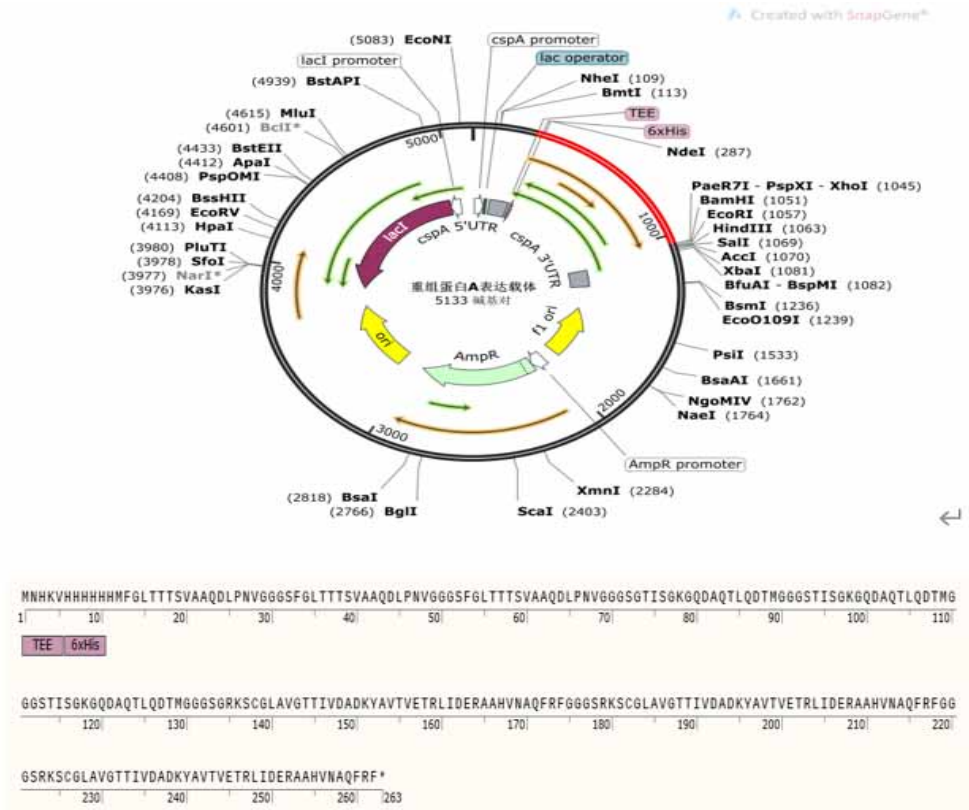


图 2-3 重组蛋白 A 质粒的构建

Figure2-3 Recombinant protein A plasmid constructed

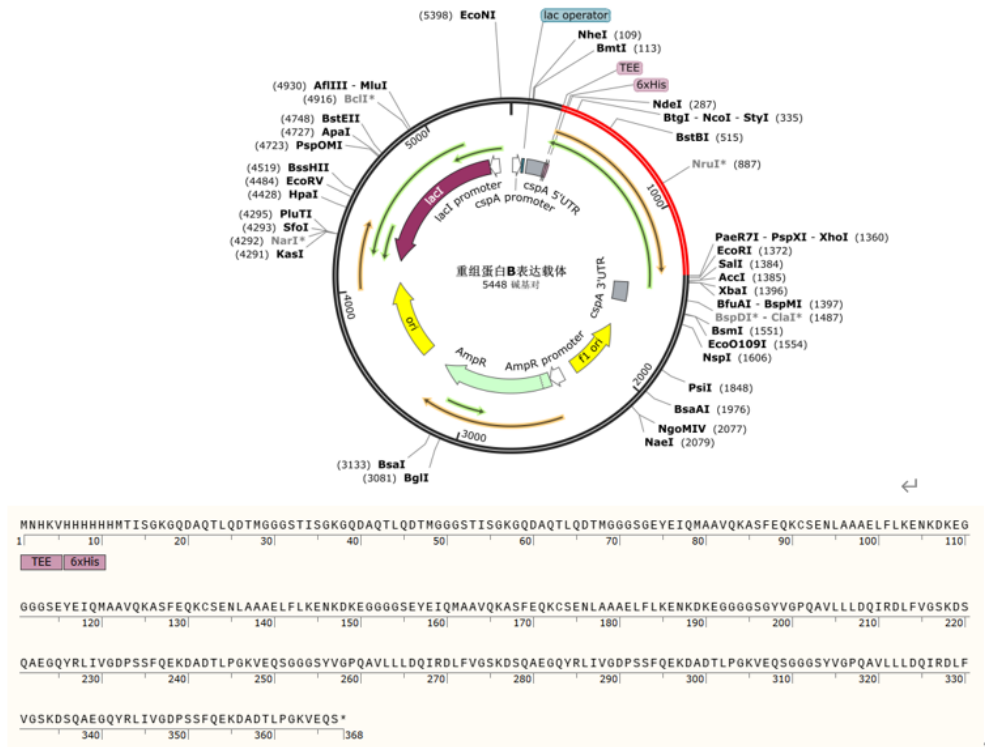


图 2-4 重组蛋白 B 质粒的构建

Figure2-4 Recombinant protein B plasmid constructed

## 2.2.6 重组蛋白的分子量、疏水性和稳定性预测

使用 ExPASy 蛋白在线分析软件对构建的重组蛋白进行分子量、疏水性和稳定性分析，结果如图 2-5 所示。重组蛋白 A 的分子量为 26851，提示其蛋白大小约为 26.8KDa；蛋白的疏水性为-0.248，疏水性量程在-1 至 1 之间，越小说明蛋白越亲水，说明蛋白 A 可能是一个亲水蛋白；蛋白的不稳定性为 24.2，一般认为蛋白不稳定性小于 40，蛋白是稳定的，因此提示重组蛋白 A 是一个稳定的蛋白。重组蛋白 B 的分子量为 38984，提示该蛋白大小约为 38.9KDa；疏水性-0.628，表明重组蛋白 B 可能是一个亲水蛋白；蛋白的不稳定性为 34.27，说明该蛋白是一个稳定的蛋白。

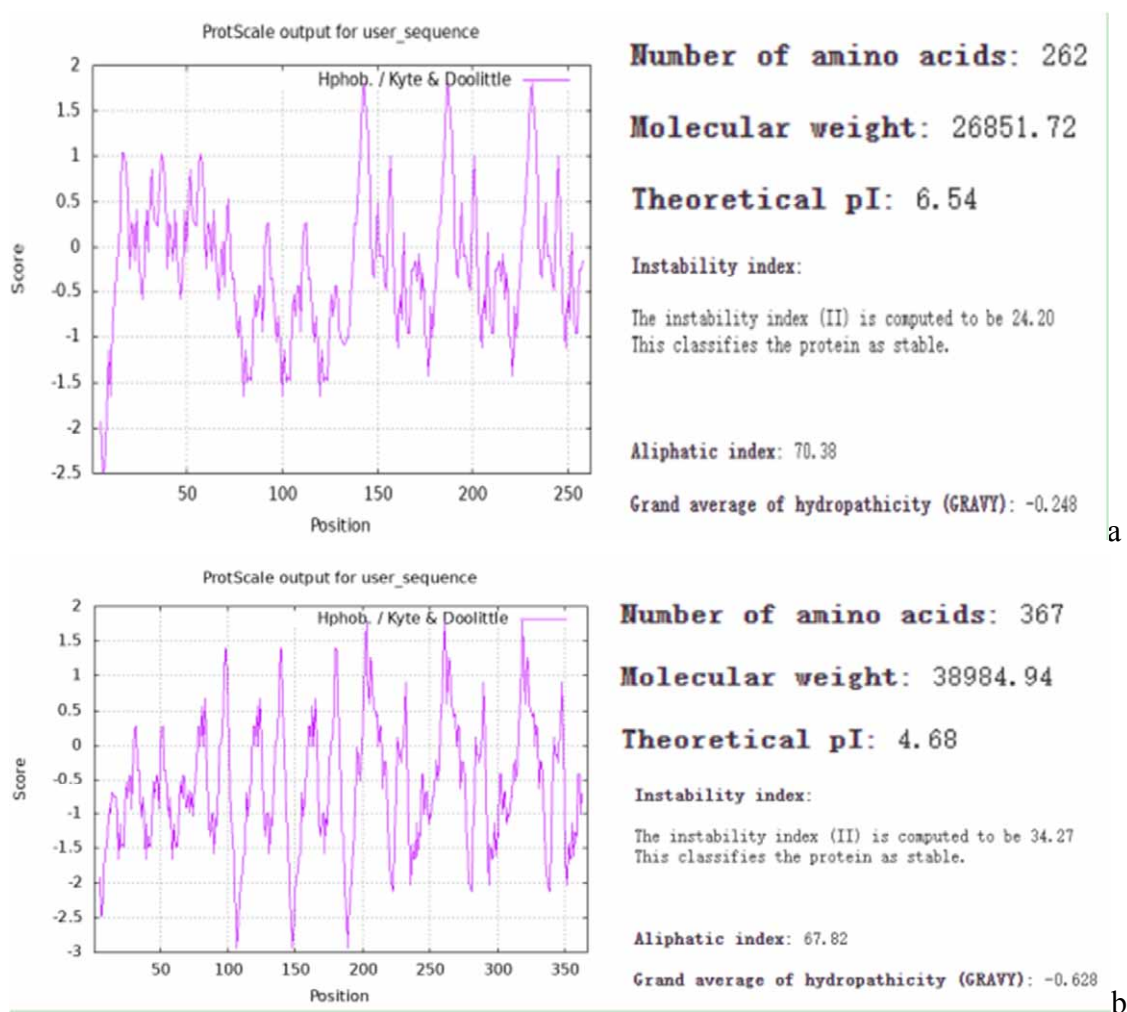


图 2-5 重组蛋白的疏水性分析

Figure2-5 Hydrophobicity analysis of recombinant protein

注：a: 蛋白 A； b: 蛋白 B

## 2.3 讨论

大肠杆菌作为一种表达系统被广泛运用于重组蛋白的表达，具有经济、表达量高、操作简单等优点<sup>[97]</sup>。信号肽常存在于分泌蛋白和膜蛋白的 N 端，用于引导新合成的肽段前往不同膜结构的亚细胞器内。大肠杆菌细胞结构简单，不具有真核细胞翻译后修饰的能力<sup>[98]</sup>，在大肠杆菌表达系统中通常无法正确表达含有外源信号肽的蛋白质，从而导致表达产物不具有生物活性<sup>[99]</sup>。

蛋白质的跨膜区通常由疏水性氨基酸所构成，在大肠杆菌表达系统中也常表达出不具有活性的包涵体蛋白<sup>[100-101]</sup>，因此本章通过生物信息软件对猪衣原体的 OmpA、MIP 和 PmpD 三个蛋白进行预测，在抗原选择上规避掉了信号肽和跨膜区。衣原体的 OmpA、MIP 和 PmpD 在综述中已经详细介绍，是设计衣原体重组蛋白理想的候选抗原蛋白。重组蛋白 A 和蛋白 B 分别是不同的抗原表位重复三次，表位重复的目的是为了获得更强的免疫原性。

由于 pCold II 载体自带 His tag 标签，因此并没有在蛋白本身加上 his 标签，这并不影响后期的蛋白纯化。连接子和柔性链接肽广泛应用于重组蛋白的构建上，起到对重组蛋白不同功能片段链接的作用，防止不同蛋白直接链接对重组蛋白结构和功能产生影响<sup>[102]</sup>。对重组蛋白 A 和蛋白 B 的稳定性和疏水性预测，结果表明两个蛋白都是稳定的蛋白，不易降解；蛋白的亲水性和疏水性的差异是由于氨基酸的不同，亲水性越好则蛋白可溶性概率越大，但并非亲水的蛋白在大肠杆菌系统中都是可溶性表达，蛋白的可溶性表达还与蛋白质的翻译速率、蛋白质的折叠和修饰有密不可分的联系。大多数蛋白质只有在正确折叠成天然构象的时候才能发挥完全的生物学活性，因此在大肠杆菌表达系统中如何表达出具有天然构象的可溶性蛋白是绕不开的话题，这也是该表达系统中的难点。



## 第三章 猪衣原体多表位重组蛋白的表达和纯化

本章将构建好的重组基因与 pCold II 载体相链接并转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达系统中进行原核表达, 对目的蛋白的表达形式和表达条件进行了探索、优化。使用高浓度尿素溶解, 梯度透析复性的方式将获得的包涵体蛋白变性复性, 将复性后的上清蛋白进行 Western Blot 验证, 最终获得了具有生物活性的可溶性重组蛋白 A 和重组蛋白 B, 为下一步动物免疫试验奠定基础。

### 3.1 试验材料

#### 3.1.1 基因、质粒和载体

设计好的重组蛋白 A、B 目的基因由湖南擎科生物有限公司合成;  
大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  由湖南农业大学兽医传染病实验室提供;  
大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)购自天根生物科技有限公司;  
pCold II 载体由湖南擎科生物有限公司提供。

#### 3.1.2 主要生物试剂

T4 DNA 连接酶、内切酶 NdeI、内切酶 XhoI、DNA 分子量标准 Marker (100~5000 bp)、TureColor 双色预染蛋白 Marker (常规范围)、Ni-IDA 6FF 预装重力柱、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、DNA 分子量标准 Marker (100~2000 bp)等均购于上海生工生物工程公司;

高纯度质粒小量提取试剂盒购自湖南擎科生物有限公司;

HRP 标记羊抗鼠 IgG、即用型生物透析袋、1.0mol Tris-HCl 溶液、1.5mol Tris-HCl 溶液、30%制胶液购自北京索莱宝公司;

其它试剂均为国产分析纯。

#### 3.1.3 主要试验仪器

恒温变频摇床 (中国赛福, BHWY-100B); 电热恒温培养箱 (中国泰斯特, DH5000B); 化学发光成像系统 (美国 Bio-rad, ChemiDoc XRS+); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf, 5424R); 超声波破碎仪 (美国 Sonics, VCX130); 蛋白电泳仪 (美国 Bio-rad, 170-4485); 琼脂糖凝胶核酸电泳仪 (北京六一厂, DYY-6C); -80 °C超低温

冰箱、4 °C冰箱、-20 °C冰箱 (青岛海尔股份有限公司)

### 3.1.4 主要试剂的配制

#### 3.1.4.1 培养基相关试剂的配制

氨苄青霉素钠 (Amp 100 mg/mL) 贮存液: 称取氨苄青霉素钠 1.0 g, 去离子水溶解后定容至 10 mL, 用 0.22  $\mu$ m 细菌过滤器过滤后分装, 于-20 °C 保存。

LB 液体培养基: 称取胰蛋白胨 10.0 g, 酵母浸出物 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 溶解于 950mL 去离子水后定容至 1000 mL, 在高压灭菌锅下灭菌 20 min 后, 置于 4°C 冰箱保存。

LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>): 取配置好的温度低于 50°C 的 LB 液体培养基 200mL, 加入 200 $\mu$ L (Amp 100 mg/mL) 贮存液, 置于 4°C 冰箱保存。

LB 固体培养基 (Amp<sup>+</sup>): 称取胰蛋白胨 5.0 g, 酵母浸出物 1.0 g, 氯化钠 1.0 g, 琼脂粉 3g 溶于 200mL 去离子水中, 在高压灭菌锅下灭菌 20 min 后等待溶液冷却至 50°C 以下, 加入 200 $\mu$ L (Amp 100 mg/mL) 贮存液充分摇匀后浇制平板。

TB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>): 称取磷酸二氢钾 0.462 g, 三水合磷酸氢二钾 3.286g, 胰蛋白胨 2.4 g, 酵母提取物 4.8 g, 甘油 0.8mL, 加入 150mL 去离子水充分溶解后定容至 200 mL, 使用 NaOH 和 HCl 调节 PH 值至 7.2-7.4 之间, 在高压灭菌锅下灭菌 20 min。后等待溶液冷却至 50°C 以下, 加入 200 $\mu$ L (Amp 100 mg/mL) 贮存液, 置于 4°C 冰箱保存。

IPTG 贮存液 (100 mM/mL): 称取 IPTG 粉末 0.48g 至于 20mL 离心管中, 去离子水溶解后定容至 20 mL, 用 0.22  $\mu$ m 细菌过滤器过滤后分装, 于-20 °C 保存。

#### 3.1.4.2 琼脂糖凝胶电泳试剂

琼脂糖凝胶电泳缓冲液 (1 $\times$ TAE): 取 50 倍的 TAE 缓冲液 (50 $\times$ TAE) 40mL, 量筒量取 1960mL 去离子水后与其充分混合, 置于 3L 容量瓶室温保存。

1%琼脂糖凝胶: 取 60mL (1 $\times$ TAE) 缓冲液, 加入 0.6g 琼脂糖后充分混匀, 置于微波炉加热至沸腾无沉淀, 40 °C 以下时加入溴化乙锭 (EB) 3.0 $\mu$ L, 充分混匀后倒入制胶槽, 除去气泡后插上梳子。

#### 3.1.4.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂

Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 称取 6.0 g Tris-Base, 28.8 g 甘氨酸, 2.0 g SDS, 溶解于适量去离子水后定容至 2000 mL, 置于 3L 容量瓶室温保存。

10%过硫酸铵 (AP): 称取 0.5 g 过硫酸铵在 5 mL 去离子水中完全溶解, 4°C 保存。

10% SDS: 称取 0.5 g SDS 在 5 mL 去离子水中完全溶解, 室温保存。

考马斯亮蓝染色液: 称取 0.5 g 考马斯亮蓝 R-250 粉末, 放置棕形瓶后, 加入 90 mL 甲醇, 20mL 冰乙酸, 90 mL 去离子水摇匀混合, 室温保存。

2×SDS 上样缓冲液: 将 0.1M Tris-HCl (PH6.8), 2% SDS, 0.03%溴酚蓝, 20%甘油, 2% β-巯基乙醇 (临用前加入) 按比例使用去离子水溶解后分装, 于 4℃ 保存。

5×SDS 上样缓冲液: 将 0.25M Tris-HCl (PH6.8), 10% SDS, 0.05%溴酚蓝, 50%甘油, 5% β-巯基乙醇 (临用前加入) 按比例使用去离子水溶解后分装, 于 4℃ 保存。

#### 3.1.4.4 蛋白纯化试剂

裂解缓冲液: 称取二水合磷酸二氢钠 7.8g, 咪唑 0.675 g, 氯化钠 8.775 g, 氯化钾 3.725g, Tris-HCl 0.6g 溶解于 400 mL 去离子水中, 再加入 20 mL 甘油混匀定容至 500 mL, 置于 4℃ 冰箱保存。临用前取 100mL 裂解液, 加入 0.5 mL Triton X-100 和 70 uL β-Me, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤备用。

裂解缓冲液 (含 8moL 尿素): 称取二水合磷酸二氢钠 7.8g, 咪唑 0.675 g, 氯化钠 8.775 g, 氯化钾 3.725g, Tris-HCl 0.6g, 尿素 240g 溶解于适量去离子水中, 再加入 20 mL 甘油混匀定容至 500 mL, 置于 4℃ 冰箱保存。临用前取 100mL 裂解液, 加入 0.5 mL Triton X-100 和 70 uL β-Me, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤备用。

蛋白 A 洗杂缓冲液 (含 8moL 尿素): 称取二水合磷酸二氢钠 3.90 g, 咪唑 0.85 g, 氯化钠 14.61 g, 尿素 240g 溶解于适量去离子水中, 加入 50 mL 甘油混匀定容至 500 mL, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 置于 4℃ 冰箱保存。

蛋白 B 洗杂缓冲液 (含 8moL 尿素): 称取二水合磷酸二氢钠 3.90 g, 咪唑 1.70 g, 氯化钠 14.61 g, 尿素 240g 溶解于适量去离子水中, 加入 50 mL 甘油混匀定容至 500 mL, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 置于 4℃ 冰箱保存。

洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素): 称取二水合磷酸二氢钠 3.9 g, 咪唑 17.03 g, 氯化钠 8.78 g, 尿素 240g 溶解于适量去离子水中, 再加入 50 mL 甘油混匀定容至 500 mL, 用 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 置于 4℃ 冰箱保存。

#### 3.1.4.5 蛋白复性试剂

洗脱缓冲液 (含 4moL 尿素): 除尿素为 120g 外其余同洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素)。

洗脱缓冲液 (含 2moL 尿素): 除尿素为 60g 外其余同洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素)。

洗脱缓冲液 (含 1moL 尿素): 除尿素为 30g 外其余同洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素)。

洗脱缓冲液 (含 0.5moL 尿素): 除尿素为 15g 外其余同洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素)。

洗脱缓冲液 (不含尿素): 除尿素为 0g 外其余同洗脱缓冲液 (含 8moL 尿素)。

### 3.1.4.6 蛋白质免疫印迹试剂

转膜缓冲液：称取 6.0 g Tris base，28.8 g 甘氨酸放入 3L 容量，加入 400mL 甲醇，1600mL 去离子水后充分混匀，室温保存。

10xPBS 缓冲液：称取氯化钠 80.0 g，磷酸二氢钾 2g，十二水合磷酸氢二钠 36.28 g，氯化钾 2 g，溶解于适量纯水后定容至 1000 mL，调 pH 至 7.4，在高压灭菌锅下灭菌 20 min，置于 4℃冰箱保存。

PBS 缓冲液：10xPBS 缓冲液 50mL，加入 450mL 灭菌去离子水后混匀，置于 4℃冰箱保存。

PBST 缓冲液：取 500mL PBS 缓冲液后加入 500uL Tween-20，充分溶解后室温保存。

WB 封闭液：称取 2.5g 脱脂奶粉溶解到 50 mL PBST 缓冲液中制备，充分溶解后室温保存。

小鼠 His-tag 抗体：取 20mL PBST 加入 10uL 小鼠 His-tag 抗体，按 1：2000 比例稀释，置于 4℃冰箱保存。

HRP 标记羊抗鼠 IgG：取 20mL PBST 加入 4uL HRP 标记羊抗鼠 IgG，1：5000 比例稀释，置于 4℃冰箱保存。

## 3.2 试验方法

### 3.2.1 重组质粒的构建

将湖南擎科生物有限公司合成好的猪衣原体蛋白 A、蛋白 B 的目的基因和 pCold II 载体分别使用 *NdeI*、*XhoI* 内切酶进行双酶切，将酶切产物切胶回收后使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒重新提取，之后立即使用 T4 DNA 连接酶连接。然后将连接产物转化至大肠杆菌 (*E.coli*) 感受态细胞 DH5 $\alpha$ ，将其接种至 LB 固体培养基培养，随机挑取单菌落扩增并提取质粒进行双酶切鉴定，将酶切鉴定无误的质粒切胶回收后送至擎科公司测序，测序结果在 *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW* 上比对分析，比对结果正确即认为重组质粒构建成功。

#### 3.2.1.1 目的基因和载体的双酶切

将合成好的蛋白 A、蛋白 B 基因和载体基因分别双酶切，把反应所需的试剂加入至 PCR 管中充分混匀，在 PCR 仪中以 37℃恒温作用 2 h，之后用 1%琼脂糖凝胶电泳验证酶切效果，并对产物进行回收，反应体系如表 3-1 所示：

表 3-1 双酶切反应体系

Table 3-1 Double enzyme digestion system

试剂和 DNA 片段	反应体系 ( $\mu\text{L}$ )
<i>NdeI</i>	2.0
<i>XhoI</i>	2.0
Single Buffer	2.0
蛋白 DNA	10.0
nuclease-free water	4.0

### 3.2.1.2 酶切产物的胶回收

利用 SanPrep 柱式的 DNA 胶回收试剂盒对双酶切产物进行处理,具体步骤如下:

- (1) 酶切产物在电泳仪中电泳并尽可能的使目的条带和其他杂带分开, 将电泳后的 1% 琼脂糖凝胶放置于紫外灯下并迅速取下目的条带
- (2) 将切下的胶称重后放入 1.5mL 离心管, 并在离心管中加入大约胶块 3-6 倍重量的 Buffer B2, 之后将 EP 管 50℃ 水浴加热 10 分钟溶胶。
- (3) 将离心管中的溶胶混合物移入套有收集管的吸附柱中, 室温条件下 8000 离心力离心 30 秒, 之后弃掉收集管内的液体, 这样目的片段就被转移至吸附柱上了。
- (4) 在吸附柱中加入 500uL 的 Wash Solution, 9000 离心力离心 30 秒, 之后弃掉收集管内的液体。
- (5) 重复步骤 (4) 一次。
- (6) 将吸附柱与收集管分离, 丢弃收集管, 在吸附柱底下放置一个洁净的 1.5mL 离心管, 在吸附膜中央悬空加入 40uL 的 Elution Buffer (注意加的时候不要触碰管壁), 之后室温孵育 1 分钟。
- (7) 将孵育好的样品 12000rpm 离心 1min, 弃去吸附柱, 离心管内的液体即为回收的目的片段。可用于后续试验, 或放置于 -20℃ 冰箱保存。

### 3.2.1.3 蛋白 A、B 基因片段与 pCold II 载体片段的连接

将酶切后的蛋白 A、B 基因分别与酶切后的 pCold II 基因使用 T4 连接酶链接, 反应在 PCR 管中进行, 充分混匀后在 PCR 仪中以 22℃ 恒温反应 2 h, 连接体系如表 3-2 所示:

表 3-2 目的基因片段和载体片段的连接反应体系

Table 3-2 Linking reaction system of target gene segment and carrier segment

试剂和 DNA 片段	连接体系 ( $\mu\text{L}$ )
T <sub>4</sub> DNA Ligase	2.0
10X Ligase buffer	2.0
载体 DNA (已双酶切)	4.0
蛋白 DNA (已双酶切)	12.0

#### 3.2.1.4 连接产物与大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 的转化

将连接产物转化到 E.coli 感受态细胞 DH5 $\alpha$ ，具体步骤如下：

- (1) 从 -80 $^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中取出 E.coli 感受态细胞 DH5 $\alpha$  (100  $\mu\text{L}$ /管)，迅速插入冰盒内，使其缓慢溶解。
- (2) 取 10 $\mu\text{L}$  蛋白 A、B 连接产物，在无菌条件下分别与 E.coli 感受态细胞 DH5 $\alpha$  (100  $\mu\text{L}$ /管) 在洁净的离心管中混合，在冰上静置 30 分钟。
- (3) 42 $^{\circ}\text{C}$  水浴热激 45 秒，之后迅速放回冰盒中静置 2 分钟，期间注意不要晃动离心管。
- (4) 在无菌条件下，在离心管内加入 700 $\mu\text{L}$  的 LB 液体培养基，之后 37 $^{\circ}\text{C}$  震荡培养 1 小时，转数为 160~220rpm。
- (5) 在无菌条件下，吸取适量体积的菌液，均用的涂布在 LB 固体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 上，在 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱正面朝上静置 10min 至菌液完全吸收。
- (6) 将培养基倒置，37 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养，约 12h 左右。

#### 3.2.1.5 蛋白 A、B 重组质粒的提取

挑取蛋白 A、蛋白 B 平板上长势良好的单菌落，将其放入 LB 液体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 中以 37  $^{\circ}\text{C}$ 、230 rpm 在恒温摇床上过夜培养，约 12h。之后使用高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒提取 DH5 $\alpha$  内蛋白 A、蛋白 B 的重组质粒，具体步骤如下：

- (1) 将吸附柱 AC 放在收集套上，加入 250 $\mu\text{L}$  Buffer BL，12,000 g 离心 1 min，活化硅胶膜，之后弃去收集套内的液体。
- (2) 取 4mL 过夜培养的菌液，12,000 rpm 离心 1 min，倒掉上清液，收集细菌沉淀。
- (3) 将细菌沉淀转移至一个离心管内，加入 200 $\mu\text{L}$  Buffer S1，吹打重悬细菌沉淀至无菌块。
- (4) 离心管内加入 200 $\mu\text{L}$  Buffer S2，温和的上下翻转 4-7 次，使菌体充分裂解。

(5) 离心管内加入加 200uL Buffer S3, 温和地上下翻转 4-7 次, 使溶液充分混匀 (溶液此时由紫红色转至淡黄色并出现白色絮状沉淀), 之后 12000 离心力离心 10-15 min。

(6) 小心吸取上清液, 并将上清液转移至吸附柱 AC 中, 12000 离心力离心 1 min, 弃去收集套内的废液。

(7) 在吸附柱 AC 中加入 700uL Buffer W2, 12000 离心力离心 1 min 后弃去收集套内的废液。

(8) 重复步骤 (7) 一次。

(9) 将吸附柱 AC 放入空的收集套内, 12000 离心力空转 1 min。

(10) 将吸附柱 AC 与收集套分离, 取一个洁净的 1.5mL 离心管, 将吸附柱 AC 置于离心管上。

(11) 在吸附膜的中间部位悬空加入 50uL Buffer Eluent (注意加的时候不要触碰管壁), 室温条件下静置孵育 2min。

(12) 12,000 g 离心 2 min, 如需较多量 DNA, 可将得到的溶液重新转入吸附柱中, 离心 2 min, 之后弃去吸附柱, 离心管内的液体即为回收的重组质粒。

#### 3.2.1.6 重组质粒的双酶切验证及测序

将重组蛋白 A、B 质粒提取后, 进行双酶切验证, 反应体系见表 3-3。在 PCR 仪中以 37°C 恒温作用 2 h 后, 将酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 观察酶切条带是否在预期位置, 若与预期位置相符, 则将样品送至湖南擎科生物有限公司进行 DNA 测序, 保留测序正确的菌株用于后续试验。

表 3-3 重组质粒的双酶切反应体系

Table 3-3 Double enzyme digestion system of recombinant plasmid

试剂和 DNA 片段	反应体系 (μL)
<i>NdeI</i>	2.0
<i>XhoI</i>	2.0
Single Buffer	2.0
质粒 DNA	10.0
nuclease-free water	4.0

#### 3.2.2 原核表达及 SDS-PAGE 分析

将测序正确的蛋白 A、B 重组质粒转化至大肠杆菌 (*E.coli*) 感受态细胞 BL21(DE3), 之后置于 LB 固体培养基 (Amp<sup>+</sup>) 过夜培养。随机在培养皿中挑取 6

株长势良好的单菌落，分别放入 LB 液体培养基（Amp<sup>+</sup>）过夜培养。之后提取质粒进行双酶切验证，保存验证无误的菌株。使用 IPTG 诱导大肠杆菌 BL21(DE3)表达重组蛋白，使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）筛选高效表达菌株，分析目的蛋白的表达形式。然后对蛋白表达的温度、时间、IPTG 浓度等条件进行了优化，在最适的条件下大量表达重组蛋白。

### 3.2.2.1 重组质粒的转化及酶切验证

重组蛋白 A、B 质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)的方法与 3.2.1.4 相同；重组质粒的提取方法与 3.2.1.5 相同；重组质粒的双酶切验证方法与 3.2.1.6 相同。

### 3.2.2.2 蛋白诱导表达及表达形式的分析

使用 IPTG 诱导 BL21(DE3)表达重组蛋白，并对蛋白的表达形式进行分析，具体步骤如下：

- （1）将双酶切验证正确的 BL21(DE3)菌株接种至 TB 液体培养基（Amp<sup>+</sup>）中，在 37℃ 恒温摇床中 230rpm 过夜培养，约 12h。
- （2）取 10mL TB 液体培养基（Amp<sup>+</sup>）至玻璃试管，在超净工作台内加入步骤（1）中过夜培养的 BL21(DE3)菌液 100uL。使培养液和细菌的比值为 100：1。（若为大量表达，则取 200mL TB 液体培养基（Amp<sup>+</sup>）于锥形瓶中加入 2mL 的菌液）在 37℃ 恒温摇床中 230rpm 培养约 4.5h，此时两个蛋白的细菌 OD 值均在 0.6~0.8 之间。
- （3）取 1mL 诱导前的菌液，作为阴性组。
- （4）将培养液冷却至 15℃ 冷激 30min，并在剩余培养基中加入适量的 IPTG，使其终浓度为 1 mM。
- （5）将添加过 IPTG 的 TB 液体培养基(阴性对照一同)转移至低温摇床, 15℃、180rpm 摇菌 24h。
- （6）取添加 IPTG 的菌液 1mL 作为表达组，未添加 IPTG 的阴性组同取 1mL 菌液。12000rpm 离心 2 分钟，倒去上清，收集细菌沉淀。
- （7）在细菌沉淀中加入适量裂解缓冲液（每毫升菌液沉淀加 200uL），重悬细菌沉淀至无菌块，之后冰上孵育 10 分钟，使细菌充分裂解。
- （8）使用超声破壁仪对含菌的裂解液超声破壁，超声 3 s，停 3 s，功率 180W，时间 1.5min。若为大量表达，则超声时间延长至 30min。
- （9）样品超声破壁后，10000~12000rpm 条件下 4℃ 离心 15~20min，收集表达组、阴性组的上清液、细菌沉淀，并做好标记。



(10) 向 160  $\mu\text{L}$  的上清样品中加入 40  $\mu\text{L}$  的 5 $\times$ SDS 上样缓冲液、沉淀样品中加入 200  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液，反复吹打混匀后煮沸 7min。

(11) 煮沸好的样品即可用于 SDS-PAGE 分析，或可长期保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 3.2.2.3 筛选高效表达的菌株

按 3.2.2.2 的方法对 6 株经双酶切验证正确的菌株进行诱导表达，收集目的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析，根据目的条带大小来判断每个菌株的蛋白表达能力，筛选并保留高效表达菌株。

### 3.2.2.4 诱导表达条件的优化

使用 3.2.2.2 的方法探索重组蛋白 A、B 的最佳表达条件。分别对诱导表达的 IPTG 浓度 (0.2mM、0.5mM、0.8mM、1.0mM)、诱导表达的时间 (16h、20h、24h、28h) 和诱导表达的温度 (15  $^{\circ}\text{C}$ 、20  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$ ) 三个条件进行探索，如表 3-5 至表 3-7 所示。阴性对照条件为 IPTG 浓度 1 mM，诱导表达时间 24h，诱导表达温度 15 $^{\circ}\text{C}$ 。将上述条件的表达产物进行 SDS-PAGE 分析，并根据蛋白条带的粗细程度判断最佳表达条件。

### 3.2.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

(1) 将置胶模板组装好，加入 10mL 去离子水静置 10min 观察是否漏液，不漏液则倒掉去离子水用吸水纸擦干模板备用。

(2) 配置分离胶，将去离子水 3.3mL、30%置胶液 4mL、1.5mol Tris-HCl 2.5mL、10% SDS 0.1mL、10%过硫酸铵 0.1mL、TEMED 4 $\mu\text{L}$  充分混匀后加入置胶模板至基准线，之后加入异丙醇压平液面等待分离胶凝固。

(3) 配置浓缩胶，将异丙醇倒出后擦干置胶模板。将去离子水 2.1mL、30%置胶液 0.5mL、1.0mol Tris-HCl 0.38mL、10%SDS 30 $\mu\text{L}$ 、10%过硫酸铵 30 $\mu\text{L}$ 、TEMED 3 $\mu\text{L}$  充分混匀后倒入置胶模板，之后插上梳子等待凝固。

(4) 将配置好的 SDS-PAGE 凝胶放入电泳槽中，加入适量电泳液，小心翼翼的在梳孔间加入处理好的 SDS-PAGE 样品，上样量为蛋白 Mraker 5 $\mu\text{L}$ ，蛋白样品 20 $\mu\text{L}$ 。

(5) 启动电泳仪电泳，第一阶段 80V，35min；第二阶段 120V，50min。

(6) 电泳完成后分离凝胶与玻璃板，将其放入小盒内，倒入考马斯亮蓝染色液至完全没过，室温震荡染色 2h。

(7) 回收考马斯亮蓝染色液，将胶块放入烧杯内加入去离子水煮沸脱色，期间可更换去离子水以便脱色效果更佳。

(8) 将脱色完成的胶块放入化学发光成像系统拍照保存结果。

### 3.2.3 目的蛋白的纯化

经上述诱导条件优化分析，蛋白 A 和蛋白 B 的目的蛋白均以包涵体的形式在沉淀中表达。因此采用高浓度尿素溶解包涵体沉淀，过 Ni 柱纯化，对纯化的包涵体蛋白梯度透析的方式获得可溶性蛋白 A、B。

#### 3.2.3.1 包涵体蛋白的溶解变性

该方法（1-9）步骤与 3.2.2.2 相同，在最佳表达条件下，200mL TB 培养液大量表达。

（10）在收集好的细菌沉淀中转移至 50mL 离心管中，加入 40mL 的裂解缓冲液（含 80mL 尿素），重悬细菌沉淀至无菌块，之后放入震荡仪室温震荡 1-2h，充分溶解包涵体蛋白。

（11）包涵体溶解后在 10000~12000rpm 条件下 4℃离心 15~20min，收集上清液，弃去沉淀。

（12）使用 45 μmum 负压式过滤器过滤上清液，此时上清液中含有包涵体蛋白。

#### 3.2.3.2 包涵体蛋白的纯化

（1）取出 Ni-IDA 6FF 预装重力柱，打开顶部盖子和底部滴孔，使 Ni 柱内的 20%乙醇滴出，之后使用 5 倍柱体积的去离子水清洗纯化柱。

（2）将上述的包涵体上清液加入 Ni 柱中缓慢滴落，收集流穿液，为保证蛋白与 Ni 柱的结合率穿流液可以再次通过纯化柱。

（3）用 5 倍柱体积的洗杂缓冲液（含 8moL 尿素）清洗柱子，可反复清洗直到流穿液在 280 nm 处吸光度接近基线，收集流穿液。

（4）用 2 倍柱体积的洗脱缓冲液（含 8moL 尿素）清洗柱子，收集洗脱液，为保证蛋白洗脱率可将洗脱液再次过柱，此时的洗脱液即为获得的纯化蛋白。

（5）用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（含 8moL 尿素）清洗柱子，可反复清洗直到洗脱液在 280 nm 处吸光度接近基线。

（6）用 5 倍柱体积的去离子水清洗，平衡 Ni 柱，之后在柱内加入 20%乙醇溶液，置于 4℃冰箱保存。

#### 3.2.3.3 包涵体蛋白的透析复性

（1）取出即用型生物透析袋，剪取合适的长度，用透析袋夹子将透析袋一端夹紧，分别将蛋白 A、B 的洗脱液倒入不同的透析袋，预留一部分空气后再用夹子封紧。

（2）将含有蛋白溶液的透析袋放入烧杯中，倒入 500mL 洗脱缓冲液（含 4moL 尿素），放于 4℃冰箱透析 6-12h，期间可不时摇动烧杯，增加透析效率。

(3) 重新收集烧杯内的洗脱缓冲液 (含 4moL 尿素), 再往烧杯内倒入 500mL 洗脱缓冲液 (含 2moL 尿素), 放于 4℃ 冰箱透析 6-12h, 期间可不时摇动烧杯, 增加透析效率。

(4) 按此方法依次透析至尿素含量为 1moL、0.5moL 和 0moL。

(5) 打开透析袋夹子, 收集透析袋内的蛋白溶液, 12000rpm 条件下 4℃ 离心 10min, 此时的上清液为复性完成的可溶性纯化蛋白。

### 3.2.4 蛋白免疫印迹分析

对复性后的重组蛋白 A、B 进行蛋白免疫印迹法 (Western-Blot) 分析: 使用小鼠 His-tag 抗体一抗, HRP 标记羊抗鼠 IgG 作为二抗, 使用化学发光成像系统观察是否出现目的条带, 验证目的蛋白是否具有免疫活性。

(1) 对复性后的蛋白 A、B 分别进行 SDS-PAGE 电泳, 方法同 2.2.3.5, 但并不染色脱色。

(2) 取电泳过后的胶块, 根据目的蛋白的位置切下适当大小的胶块和 PVDF 膜。

(3) 在烧杯中倒入 50mL 甲醇, 将 PVDF 膜放入甲醇内活化 30S, 之后在烧杯内倒入适量的转膜缓冲液。

(4) 打开电转板使其阴极朝下, 依次放入泡沫垫、3 层滤纸、切好的凝胶块、PVDF 膜、3 层滤纸、泡沫垫, 放置时用棉签刮去滤纸和 PVDF 膜中的气泡, 盖上电转板扣好扣子, 此步骤因小心防止气泡干扰试验结果。

(5) 将电转板放入转膜仪中, 注意阴极转阳极, 倒入转膜液后加入适量冰块, 至液体漫过电转板。转膜条件为 200mA 恒流, 80min。

(6) 将转好的 PVDF 膜取出, 放入孵育盒, 用 PBST 漂洗 3 次, 之后倒入封闭液, 室温在摇床上匀速摇晃 2h。

(7) 倒掉封闭液, 用 PBST 在摇床上匀速洗涤 3 次, 每次 15min。

(8) 将洗好的 PVDF 膜与一抗结合, 在摇床上匀速摇晃 2h 孵育盒上覆盖冰袋, 或 4℃ 过夜孵育。

(9) 回收一抗, 用 PBST 在摇床上匀速洗涤 3 次, 每次 15min。

(10) 将洗好的 PVDF 膜与二抗结合, 在摇床上匀速摇晃 1h, 孵育盒上覆盖冰袋。

(11) 回收二抗, 用 PBST 在摇床上匀速洗涤 3 次, 每次 15min。

(12) 预热化学发光成像系统成像, 在曝光盒中铺上保鲜膜 (避免气泡和褶皱), 将 PVDF 膜放置于成像系统视野中央, 蛋白面朝上均匀滴加配制好的 HPR 显色液, 孵育

1-2min 后使用化学发光成像系统并拍照记录。

### 3.3 结果与分析

#### 3.3.1 重组质粒的双酶切鉴定结果

##### 3.3.1.1 DH5 $\alpha$ 双酶切验证

将蛋白 A、蛋白 B 的重组基因链接上 pCold II 载体后，连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  克隆菌株克隆重组质粒。培养后使用高纯度质粒量提取试剂盒提取菌内质粒进行双酶切验证，如图 3-1 所示，蛋白 A (765bp)、蛋白 B (1080bp) 酶切条带和 pCold II 载体 (4375bp) 均处于预期位置，重组质粒构建成功。

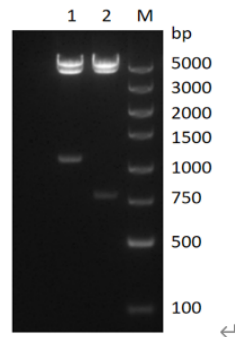


图 3-1 重组质粒的双酶切鉴定图

Figure 3-1 Double enzyme digestion identification diagram of recombinant plasmid

M: DL5000 Marker; 1: *pCold II-蛋白 A<sub>765bp</sub>* 双酶切; 2: *pCold II-蛋白 B<sub>1080bp</sub>* 双酶切

##### 3.3.1.2 BL21(DE3)双酶切验证

将上述双酶切验证正确蛋白 A、蛋白 B 重组质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)，经培养后分别挑选 6 株长势良好的单菌落，进行双酶切验证，将双酶切验证正确的质粒送至湖南擎科生物科技有限公司测序，测序结果正确。如图 3-2 所示 12 株单菌落除 3、4、6、10、12 号菌株目的条带偏暗外，其余菌株均可见两条明显的双酶切目的条带，因此认为蛋白 A、蛋白 B 重组质粒已成功转化至 BL21(DE3)表达菌株。

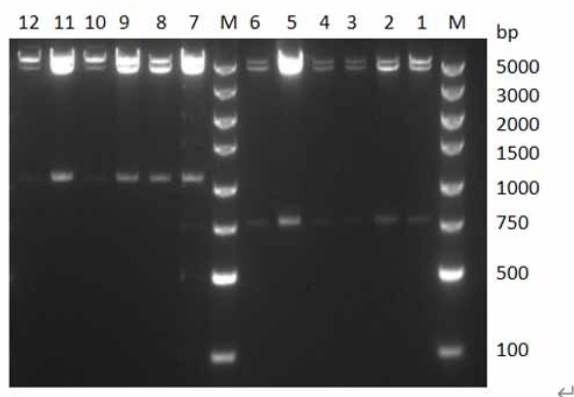


图 3-2 表达菌株的重组质粒双酶切鉴定图

Figure 3-2 Double enzyme digestion identification diagram of recombinant plasmid expressing strain

M: DL5000 Marker; 1-6: 蛋白 A 表达菌株质粒双酶切; 7-12: 蛋白 B 表达菌株质粒双酶切

### 3.3.2 目的蛋白表达及 SDS-PAGE 分析

#### 3.3.2.1 目的蛋白的表达形式鉴定

将诱导表达的初始条件设立为摇床转速 180rpm、IPTG 浓度 1 mM、温度 15℃、表达时间 24h。菌株超声破壁后收集表达组、阴性组的上清液、细菌沉淀，做好标记后进行 SDS-PAGE 鉴定。如图 3-3 所示，蛋白 A 诱导表达后在沉淀蛋白 25-35Kda 间表达了大量的目的蛋白约 26.8KDa，蛋白 B 诱导表达后在沉淀蛋白 35-50Kda 间也表达了大量的目的蛋白约 38.9KDa，而上清中几乎均不可见，因此认为蛋白 A、B 在大肠杆菌中均主要以包涵体沉淀的方式表达。

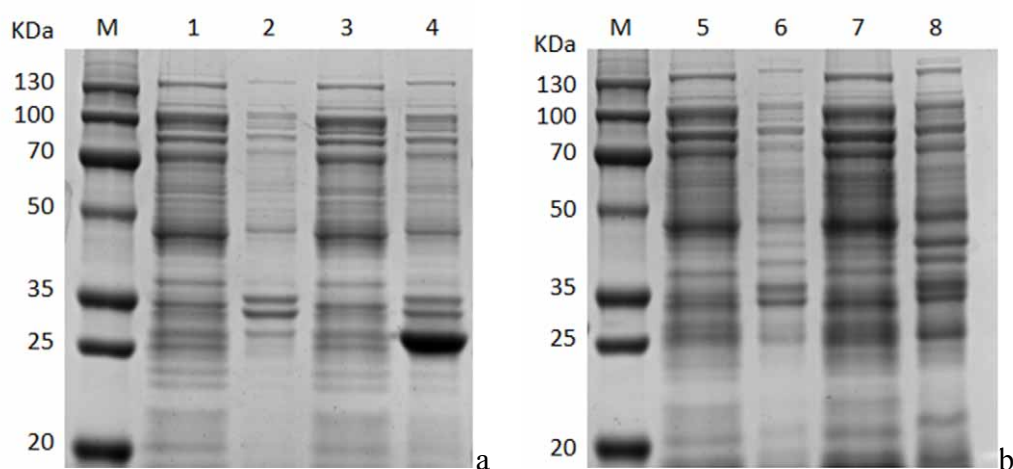


图 3-3 SDS-PAGE 对目的蛋白表达形式的鉴定

Fig. 3-3 The expression form of the target protein was identified by SDS-PAGE  
M: 蛋白分子质量标准; 1, 5: 诱导前的上清蛋白; 2, 6: 诱导前的沉淀蛋白;  
3, 7: 诱导后的上清蛋白; 4, 8: 诱导后的沉淀蛋白  
注: a: 蛋白 A; b: 蛋白 B

#### 3.3.2.2 高效表达菌株的筛选

分别挑取上述诱导表达蛋白 A、蛋白 B 的单菌落各 6 个进行筛选，如图 3-4 所示，蛋白 A 的 6 个单菌落中有 4 个在 25-35Kda 间表达了目的蛋白，其中 5 号菌株表达量最高；蛋白 B 的 6 个单菌落均在 35-50Kda 间表达了目的蛋白，其中 8 号菌株表达量最高。因此将 5 号菌株作为蛋白 A 的高效表达菌株，8 号菌株作为蛋白 B 的高效表达菌株留存，用于后续试验。

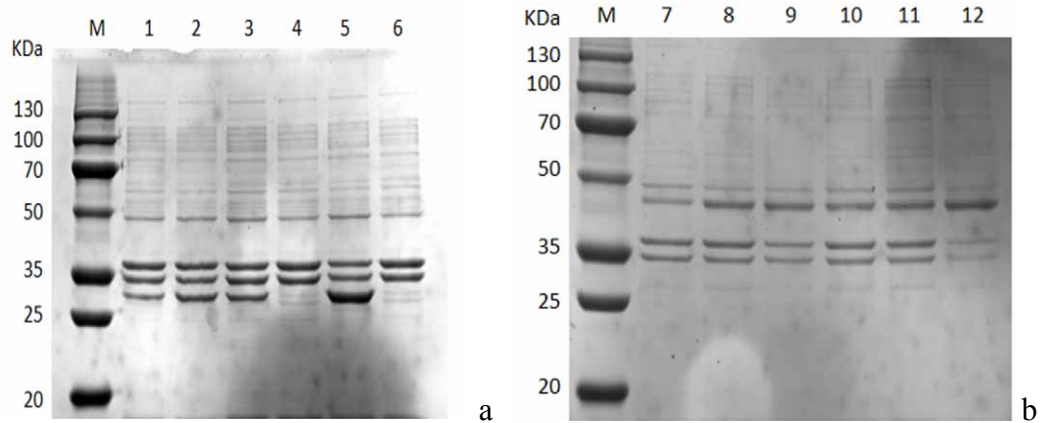


图 3-4 高效表达菌株的筛选

Fig. 3-4 Screening of high expression strains

M: 蛋白分子质量标准; 1-6, 7-12: 表达后的 6 株单菌落

注: a: 蛋白 A; b: 蛋白 B

### 3.3.2.3 诱导表达条件的优化

采用控制变量法对蛋白 A、蛋白 B 的表达条件优化。固定转速 180rpm、温度 15℃、表达时间 24h 不变，IPTG 终浓度分别设为 0.2、0.4、0.8、1 mM 四个梯度探究两种蛋白表达的最佳 IPTG 诱导浓度。如图 3-5 所示，蛋白 A 沉淀在 IPTG 终浓度为 0.2mM 时目的蛋白表达量相对较高；蛋白 B 沉淀在 IPTG 终浓度为 0.8mM 时目的蛋白表达量相对较高。

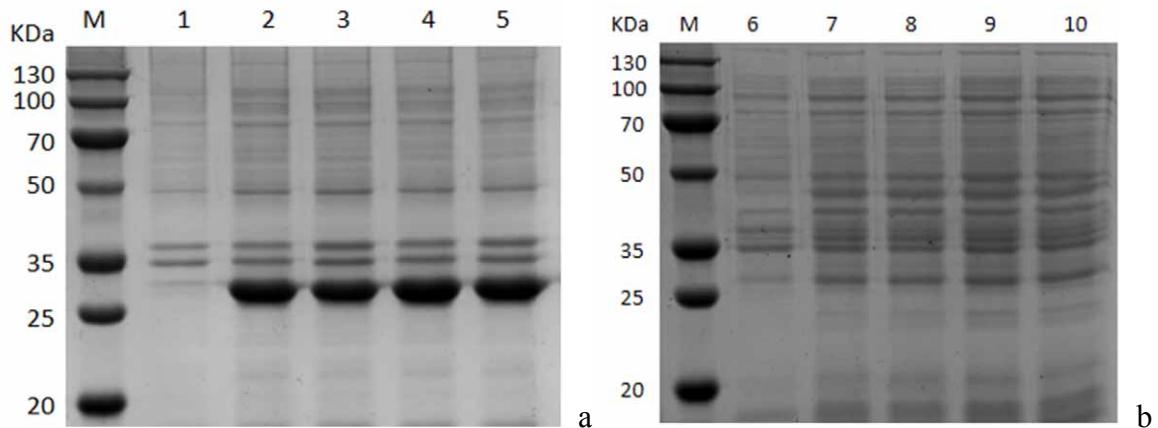


图 3-5 不同 IPTG 浓度对目的蛋白表达量的影响

Fig. 3-5 Effect of different IPTG concentrations on the expression of target protein

M: 蛋白分子质量标准; 1,6: 诱导前的沉淀蛋白; 2-5, 7-10: 依次为在 IPTG 浓度为 0.2、0.5、0.8、1.0 mM 条件下的沉淀蛋白

注: a: 蛋白 A; b: 蛋白 B

固定转速 180rpm、温度 15℃、蛋白 A IPTG 终浓度 0.2 mM、蛋白 B IPTG 终浓度 0.8 mM 条件不变。诱导表达时间设置为 16h、20h、24h、28h 探究重组蛋白的最佳诱导时间。如图 3-6 所示，蛋白 A 沉淀在表达时间为 28h 时目的蛋白表达量相对较高；蛋白 B 沉淀在表达时间为 28h 时目的蛋白表达量相对较高。

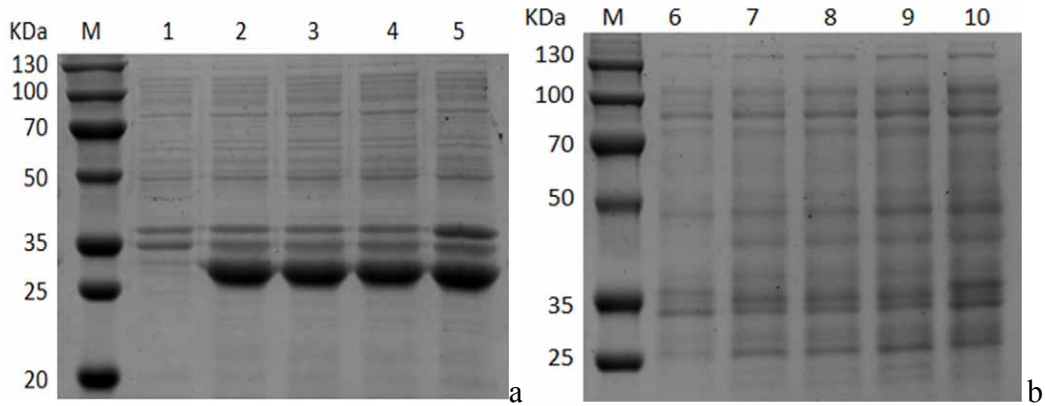


图 3-6 不同诱导时间对目的蛋白表达量的影响

Fig. 3-6 Effects of different induction time on the expression of target protein

M: 蛋白分子质量标准；1,6: 诱导前的沉淀蛋白；2-5, 7-10: 依次为在诱导表达时间为 16h、20h、24h、28h 条件下的沉淀蛋白

注：a: 蛋白 A； b: 蛋白 B

固定转速 180rpm、诱导时间 28h、蛋白 A IPTG 终浓度 0.2 mM、蛋白 B IPTG 终浓度 0.8 mM 条件不变。诱导表达温度设置为 15℃、20℃、25℃探究重组蛋白的最佳诱导温度。如图 3-7 所示，蛋白 A 沉淀在诱导温度为 25℃时目的蛋白表达量相对较高；蛋白 B 沉淀在诱导温度为 25℃时目的蛋白表达量相对较高。

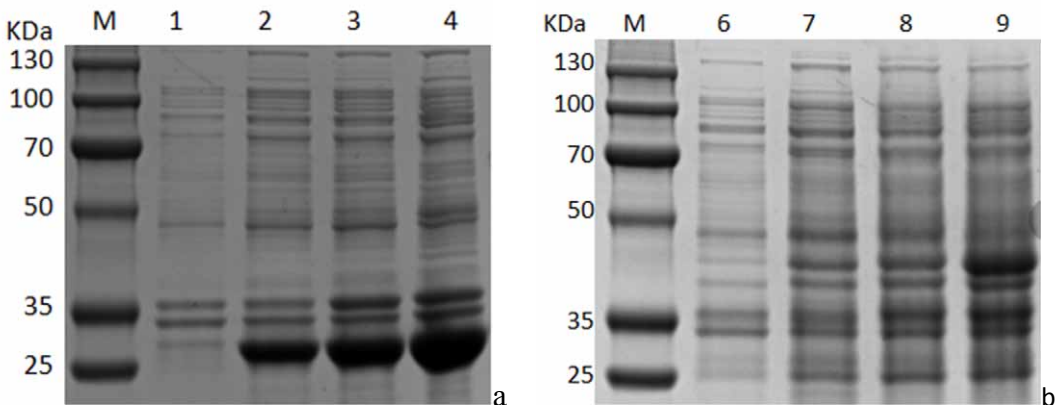


图 3-7 不同温度对目的蛋白表达量的影响

Fig. 3-7 Effects of different temperatures on the expression of target protein

M: 蛋白分子质量标准；1,6: 诱导前的沉淀蛋白；2-4, 7-9: 依次为在诱导温度为 15℃、20℃、25℃条件下的沉淀蛋白

注：a: 蛋白 A； b: 蛋白 B

经过诱导条件优化，蛋白 A、蛋白 B 仍以包涵体的形式在沉淀中表达。蛋白 A 的最佳表达条件为 IPTG 终浓度 0.2 mM、诱导时间 28h、诱导温度 25℃；蛋白 B 的最佳表达条件为 IPTG 终浓度 0.8 mM、诱导时间 28h、诱导温度 25℃。

### 3.3.3 目的蛋白的纯化结果

将蛋白 A、蛋白 B 用含有 8mol/L 尿素裂解缓冲液溶解后，过 Ni 柱纯化，对纯化的穿流液、洗杂液、洗脱液进行 SDS-PAGE 鉴定，如图 3-8 所示。蛋白 A、B 经 Ni 柱纯化后均无杂带，说明纯化效果较好，其中蛋白 A 洗杂缓冲液的咪唑浓度为 25mM，蛋白 B 洗杂缓冲液的咪唑浓度为 50mM。

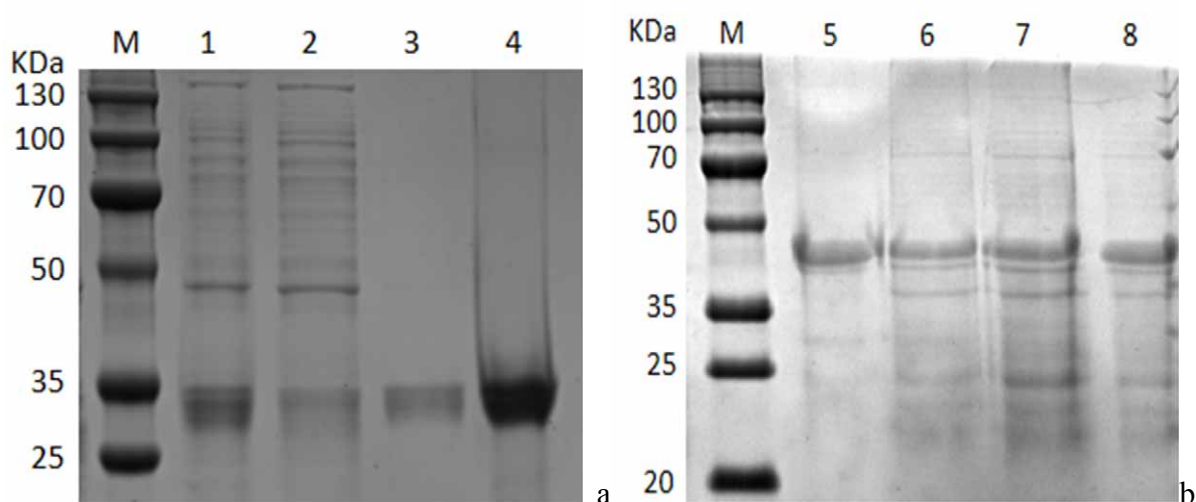


图 3-8 目的蛋白的纯化图

Fig. 3-8 Purification map of target protein

M: 蛋白分子质量标准；1,8: 蛋白尿素溶解液；2, 7: 蛋白纯化穿流液；3, 6: 蛋白纯化洗杂液；4, 5: 蛋白纯化洗脱液

注：a: 蛋白 A； b: 蛋白 B

### 3.3.4 目的蛋白的复性结果

将梯度透析复性后的蛋白 A、蛋白 B 离心后取上清液，进行 SDS-PAGE 鉴定，如图 3-9 所示。纯化蛋白 A、B 复性后的上清液均含有可溶性目的蛋白，说明蛋白复性成功。



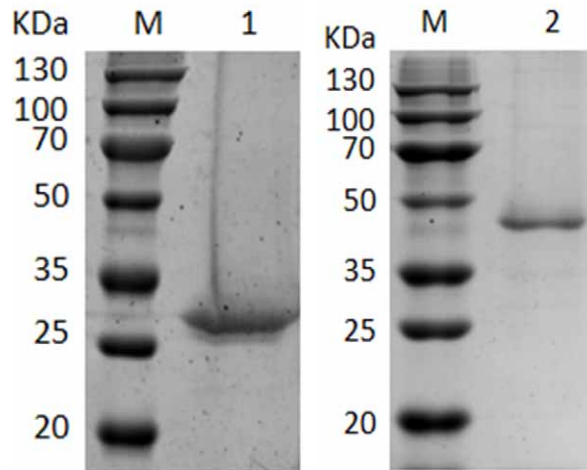


图 3-9 纯化目的蛋白的复性鉴定图

Fig. 3-9 Renaturation identification diagram of purified target protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 纯化蛋白 A 复性后; 2: 纯化蛋白 B 复性后

### 3.3.5 复性蛋白的 Western-blot 鉴定结果

将复性后的蛋白 A、蛋白 B 作为抗原，以小鼠 His-tag 单克隆抗体作为一抗，HRP 标记羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western-blot 验证。如图 3-10 所示，两种复性蛋白均可与鼠 His-tag 单克隆抗体发生反应，且条带位置与预期位置相符，说明本试验成功表达了含有 His 标签的目的蛋白。

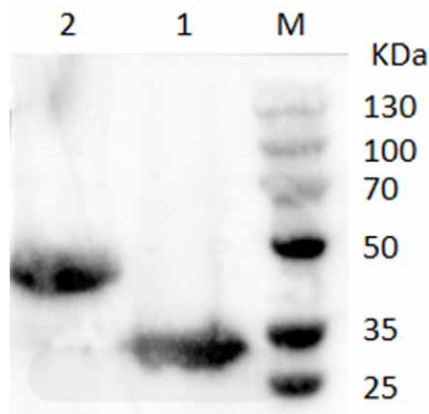


图 3-10 复性蛋白的 Western-Blot 鉴定图

Fig. 3-10 Western blot identification of refolded protein

M: 蛋白分子质量标准; 1: 蛋白 A; 2: 蛋白 B

### 3.4 讨论

本章在前一章重组蛋白的设计的基础上，完成了蛋白 A、B 的重组质粒的构建，并成功的将重组质粒转化至大肠杆菌 BL (21) 表达菌株。经过表达形式鉴定和表达条件优化，发现两种重组蛋白均以包涵体的形式在沉淀中表达。包涵体是外源基因在原核细胞表达时，由于蛋白质的错误折叠而产生的一种不具有生物活性的蛋白质颗粒。包涵体的形式机制比较复杂，一般认为与胞内多肽的形成速率、翻译后修饰、表达的条件以及蛋白本身的特性有关。

本试验候选的三个蛋白中 MIP 和 PmpD 蛋白常以可溶蛋白的形式在大肠杆菌表达系统中表达；而作为衣原体免疫原性最佳的 MOMP 蛋白由于其翻译后折叠困难，难以形成天然结构，常以包涵体形式在各个表达系统中存在，这也是衣原体疫苗发展缓慢的原因之一。为了防止重组蛋白 A、B 在包内翻译过快而导致错误折叠，选用了 Pcold 冷表达载体以降低蛋白表达速率，且重组蛋白 A、B 均为亲水蛋白，因此推测可能由于 A、B 蛋白均带有 MOMP 蛋白表位而导致重组蛋白未能正确折叠。

包涵体一般不溶于水，但可溶于有机促溶剂，如尿素、盐酸胍等<sup>[103]</sup>。因此，采用了高浓度尿素变性溶解包涵体，过 Ni 柱纯化，梯度透析复性的方式，最终获得了可溶性的重组蛋白 A、B。经 SPS-PAGE 和 Western-blot 验证，包涵体蛋白纯化、复性效果较好，可以与小鼠 His-tag 单抗发生抗原特异性反应，具有生物活性，可用于下一步动物免疫试验。

## 第四章 猪衣原体多表位重组蛋白的质谱分析和免疫原性研究

本章节使用胶内酶切的方法对复性后的重组蛋白进行酶切处理，并将处理样品送至生物公司进行质谱验证。通过与佐剂联合免疫的方式将复性蛋白定量注射小鼠，在免疫初期和末期收集小鼠血清，监测小鼠体内白细胞介素-2、 $\gamma$ -干扰素、和 $\alpha$ -肿瘤坏死因子的变化量，评价其细胞免疫效果。通过免疫组和对照组小鼠的血清 Western-blot 检测，验证其是否产生了抗原特异性抗体，为下一步研究有效的猪衣原体重组亚单位疫苗奠定基础。

### 4.1 试验材料

#### 4.1.1 试验动物

35 只 6-8 周龄昆明小鼠，购自湖南农业大学实验动物中心。

#### 4.1.2 主要生物试剂

BCA 蛋白定量试剂盒购于大连美伦生物有限公司；

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于北京博奥龙有限公司；

白细胞介素-2、 $\gamma$ -干扰素、和 $\alpha$ -肿瘤坏死因子酶联免疫分析（ELISA）试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司；

HRP 标记羊抗鼠 IgG 购买于北京索莱宝公司；

TPCK-胰蛋白酶（0.5ug/uL）购于普洛麦格（北京）生物技术有限公司；

其它试剂均为国产分析纯。

#### 4.1.3 主要试验仪器

快速混匀器（中国荣华，SK-1）；低温高速离心机（德国 Eppendorf，5424R）；电热恒温培养箱（中国泰斯特，DH5000B）；酶标仪（瑞士 TECAN，Infinite F50）；回旋式振荡器（中国荣华，HY-5）

#### 4.1.4 主要试剂的配制

##### 4.1.4.1 蛋白质谱相关试剂的配制

100mM 碳酸氢铵溶液：称取碳酸氢铵 7.9g 后加入适量去离子水定容至 1000mL，

置于 4℃ 冰箱保存。

25mM 碳酸氢铵溶液：称取碳酸氢铵 1.975g 后加入适量去离子水定容至 1000mL，置于 4℃ 冰箱保存。

考马斯亮蓝脱色液：称取碳酸氢铵 7.9g 与 300mL 乙腈混合后使用去离子水定容至于 1000mL，室温保存。

三氟乙酸缓冲液：量取 0.1mL 三氟乙酸与 60mL 纯乙腈充分混合后去离子水定容至 100mL，置于 4℃ 冰箱保存。

100mM DTT 溶液：称取二硫苏糖醇 1.54g 溶于 100mL 100mM 碳酸氢铵溶液中，现用现配。

200mM 吡啶乙酸溶液：称取吡啶乙酸 3.7g 溶于 100mL 100mM 碳酸氢铵溶液中，现用现配。

胰蛋白酶溶液：按 1：1000 将原液稀释至 5ng/μL，放于 4℃ 冰箱保存。

## 4.2 试验方法

### 4.2.1 复性蛋白的质谱验证

#### 4.2.1.1 复性蛋白的胶内酶切

(1) 将复性重组蛋白 A、B 进行 SPS-PAGE 电泳验证，验证方法同 3.2.2.5。

(2) 用手术刀片切下胶上复性蛋白的目标条带，置于 1.5mL 离心管中，同时切下空的胶块作对照。

(3) 在离心管中加入考马斯亮蓝脱色液 400μL 脱色，反复晃动清洗至透明（期间至少更换三次脱色液，清洗时间至少 4h）后弃去脱色液，将样品冷冻干燥。

(4) 每个离心管内加入 100mM 碳酸氢铵溶液 90μL，100mM DTT 溶液 10μL，摇晃混匀后置于 56℃ 恒温培养箱内孵育 30min，使蛋白质还原。

(5) 孵育完成后弃去管内上清，加入纯乙腈 100μL，混匀静置 5min 后吸去。

(6) 离心管内加入 100mM 碳酸氢铵溶液 70μL，200mM 吡啶乙酸溶液 30μL，避光室温孵育 20min。

(7) 孵育完成后弃去管内上清，每管加入 100mM 碳酸氢铵溶液 100μL，室温孵育 15min。

(8) 弃去上清液，加入纯乙腈 100μL，静置 5min 后吸取管内液体，将样品冷冻干燥。

(9) 将干燥后的样品加入 5ng/μL 胰蛋白酶溶液 5μL，置于 4℃ 冰箱静置 30-60min，

使胶块充分吸胀(若仍有剩余液,用移液器吸出)。

(10) 离心管内加入 25mM 碳酸氢铵溶液缓冲液适量,缓冲液没过胶块。

(11) 将样品放置 37℃温箱过夜孵育,约 20h,放置时注意缓冲液液面是否在胶块上。

(12) 吸出酶解液,转移至新 EP 管中,原管加入三氟乙酸缓冲液,超声 15min 后吸出溶液,并入前次溶液,将样品冻干。

(13) 样品制备完成,用干冰封存送至上海厚基生物有限公司进行质谱检测。

#### 4.2.2 纯化蛋白浓度的测定

使用 BCA 蛋白定量试剂盒对复性后的重组蛋白 A、蛋白 B 上清液的蛋白浓度进行测定,具体步骤如下:

(1) 取出试剂盒中的蛋白标准配制液和蛋白标准(BSA),从蛋白标准配制液内取出适量液体,加入至蛋白标准(BSA)的 1.5mL 可立式离心管中,充分溶解,配置成 1mg/mL 的蛋白标准 BSA 母液。

(2) 取适当体积的试剂(A)和试剂(B)按体积比 50:1 的比例充分混匀,配置成 BCA 工作液。

(3) 把需要检测的孔内加入 200uL BCA 工作液,其中标准曲线 6 孔。

(4) 使用 PBS 缓冲液将 BCA 母液稀释成蛋白浓度依次为 0、200、400、600、800、1000 $\mu$ g/mL BCA 子液。

(5) 按浓度梯度依次取 20uL BCA 子液,加入标准曲线孔;取 20uL 待测样品加入待测孔。使用酶标仪震板轻微震荡 30s 混匀后 37℃孵育 30min。

(6) 使用酶标仪测定波长 562nm 时的 OD 值。以蛋白标准的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标构建标准曲线。

(7) 将待测样品的 OD 值代入线性回归方程,求解蛋白浓度。

#### 4.2.3 小鼠免疫试验

将 35 只昆明小鼠随机分为 7 组,每组 5 只。分别为蛋白 A 高、中、低剂量组(70ug、40ug、10ug),蛋白 B 高、中、低剂量组(70ug、40ug、10ug)和对照组(0ug,为等体积的 PBS 缓冲液)。

使用 PBS 缓冲液将复性蛋白稀释成 400、114.29、28.57 $\mu$ g/mL 三个浓度,与弗氏佐剂 1:1 混合后使用 5ml 注射器反复抽打至完全乳化,采用腹腔注射的方式对小鼠共进行 3 次免疫,注射量为 0.35mL。初次免疫为第 1 天,使用弗氏完全佐剂与复性蛋白乳化;二免、三免分别在初免后的第 8 天、第 16 天,使用弗氏不完全佐剂与复性蛋白

乳化。

在初免后第 24 天采用眼球采血的方式收集小鼠血液，做好标记，在 37℃ 恒温培养箱中静置 1 h 后，置于 4℃ 冰箱过夜，次日在 4℃ 条件下离心 2min，3500rpm，分离血清，用于  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2 (IL-2) 和  $\alpha$ -肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 检测。

表 4-1 动物免疫试验方案

Table 4-1 Animal immunity test protocol

动物组	免疫原量 ( $\mu\text{g}$ )	注射 方式	首免时间 (d)	二免时间 (d)	三免时间 (d)	采血时间 (d)
蛋白 A 低剂量组	10	腹腔	1	8	16	0, 24
蛋白 A 中剂量组	40	腹腔	1	8	16	0, 24
蛋白 A 高剂量组	70	腹腔	1	8	16	0, 24
蛋白 B 低剂量组	10	腹腔	1	8	16	0, 24
蛋白 B 中剂量组	40	腹腔	1	8	16	0, 24
蛋白 B 高剂量组	70	腹腔	1	8	16	0, 24
对照组 (PBS 缓冲液)	0	腹腔	1	8	16	0, 24

#### 4.2.3.1 小鼠血清中的 IL-2、IFN- $\gamma$ 和 TNF- $\alpha$ 检测

使用 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的 ELISA 试剂盒检测小鼠中对应细胞因子的含量，除试剂盒中细胞因子标准品的浓度不同外其余步骤均一样，具体如下：

- (1) 将试剂盒从 4℃ 冰箱内移至实验室，室温回温 60min。
- (2) 设置细胞因子标准品加样，其中 IL-2 的浓度 (pg/mL) 依次为 320、160、80、40、20、0；IFN- $\gamma$  的浓度 (pg/mL) 依次为 800、400、200、100、50、0；TNF- $\alpha$  的浓度 (pg/mL) 依次为 640、320、160、80、40、0。
- (3) 设置空白孔加样，空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同。
- (4) 待测样品加样，在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 $\mu\text{L}$ ，然后再加待测样品 10 $\mu\text{L}$  (使样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
- (5) 除空白孔外每孔加入酶标试剂 100 $\mu\text{L}$ ，用振荡器震荡 30S 后用封板膜封板，置 37℃ 恒温培养箱温育 60 分钟。
- (6) 将 20 倍浓缩洗涤液用去离子水 20 倍稀释后备用。
- (7) 温育完成后小心揭掉封板膜，弃去板内液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去洗涤液，重复 5 次后拍干抗原包被板。
- (8) 每孔先加入显色剂 A50 $\mu\text{L}$ ，再加入显色剂 B50 $\mu\text{L}$ ，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 15 分钟。
- (9) 每孔加终止液 50 $\mu\text{L}$ ，终止反应 (此时蓝色立转黄色)。

(10) 以空白孔调零, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

(11) 按照 OD 值建立标准曲线, 将所有待测样的 OD 值纳入标准曲线, 再乘以相应的溶液稀释倍数 (5 倍稀释), 求解细胞因子含量。

#### 4.2.3.2 小鼠血清中抗体检测——Western-blot 检测

用蛋白免疫印迹法 (Western-Blot) 检验免疫后小鼠是否产生了相应的体液免疫: 使用复性蛋白 A、B 作为抗原, 小鼠免疫后的相应血清作为一抗, HRP 标记羊抗鼠 IgG 作为二抗, 使用化学发光成像系统观察是否出现目的条带, 验证目的蛋白是否具有免疫原性。Western-blot 的操作方法同 3.2.4。

### 4.3 结果与分析

#### 4.3.1 复性蛋白的质谱结果

质谱测试原始文件 (Raw File) 用软件 Mascot 2.2 检索相应的数据库, 检索条件如表 4-2 所示, 质谱结果如表 4-3 所示。

根据蛋白质谱结果, 重组蛋白 A、B 在胰蛋白酶消化后, 根据检索条件分别检测到了 9 条唯一肽段和 20 条唯一肽段, 将检测到的肽段与重组蛋白的氨基酸序列比对, 其肽段覆盖率分别为 70.23% 和 94.28% (图 4-1), 就单酶切质谱来说覆盖率较高。由于蛋白 A 的前 78 位氨基酸除 TEE 表达增强原件外, 均不含胰蛋白酶识别位点, 所以导致前端肽段未能酶切无法被质谱仪识别, 所以肽段覆盖率低于蛋白 B。根据质谱仪结果, 重组蛋白 A、B 的 Score 得分分别为 4039.3 和 4831.3, 分值较高, 结果可信。根据测序结果, 重组蛋白 A、B 表达成功, 由于重组蛋白 A、B 表位序列来自于猪衣原体 OmpA、PmpD 和 MIP, 因此认为重组蛋白 A、B 可以作为猪衣原体重组亚单位疫苗候选蛋白进行动物免疫试验。

表 4-2 Mascot 查库所用参数

Table 4-2 Parameters used by Mascot for database query	
项目	参数
酶	胰蛋白酶
允许的最大漏切位点数目	2
固定修饰类型	Carbamidomethyl (C)
可变修饰类型	Oxidation (M)
诱饵数据库模式	Reverse
一级离子质量容差	± 20 ppm
二级离子质量容差	0.1Da
结果过滤标准	Score ≥ 20

表 4-3 重组蛋白 A、B 的质谱结果

Table 4-3 Mass spectrometric results of recombinant proteins A and B

蛋白名称	检测到的肽段序列	肽段长度	肽段在蛋白中的位置	覆盖率	Score 得分
重组蛋白 A	K.GQDAQTLQDTMGGGSGR.K	19	118-136	70.23%	4039.3
	K.GQDAQTLQDTMGGGSTISGK.G	22	78-99, 98-119		
	K.GQDAQTLQDTMGGGSGRK.S	20	118-137		
	K.SCGLAVGTTIVDADK.Y	17	136-152, 180-196, 224-240		
	K.YAVTVETR.L	10	151-160, 195-204, 239-248		
	R.AAHVNAQFR.F	11	164-174, 208-218, 252-262		
	R.AAHVNAQFRFGGSR.K	18	164-181, 208-225		
	R.KSCGLAVGTTIVDADK.Y	18	135-152, 179-196, 223-240		
R.LIDERAHVNAQFR.F	16	159-174, 203-218, 247-262			
重组蛋白 B	K.ASFEQKCSENLAAAELFLKENK.D	24	84-107, 125-148, 168	94.28%	4831.3
	K.CSENLAAAELFLK.E	15	90-104, 131-145, 172-186		
	K.CSENLAAAELFLKENK.D	18	90-107, 131-148, 172-189		
	K.CSENLAAAELFLKENKDK.E	20	90-109, 131-150, 172-191		
	K.DADTLPGK.V	10	239-248, 297-306, 355-354		
	K.DKEGGGGSEYEIQMAAVQK.A	21	106-186, 147-167		
	K.DKEGGGGSGYVGPQAVLLLDQIR.D	25	188-212		
	K.DSQAEGQYR.L	11	218-228, 277-287, 334-344		
	K.DSQAEGQYRLIVGDPSSFQEK.D	23	218-240, 277-299, 334-389		
	K.EGGGGSEYEIQMAAVQK.A	19	108-126, 149-167		
	K.EGGGGSEYEIQMAAVQKASFEQK.C	25	108-132, 149-173		
	K.EGGGGSGYVGPQAVLLLDQIR.D	23	190-212		
	K.ENKDKEGGGGSEYEIQMAAVQK.A	24	103-126, 144-167		
	K.ENKDKEGGGGSGYVGPQAVLLLDQIR.D	28	185-212		
	K.GQDAQTLQDTMGGGSGEYEIQMAAVQK.A	29	57-85		
	K.GQDAQTLQDTMGGGSTISGK.G	22	17-38, 37-58		
	K.VEQSGGGSYVGPQAVLLLDQIR.D	24	247-270, 305-328		
	R.DLFGVSKDSQAEGQYR.L	18	211-228, 269-286, 327-344		
	R.LIVGDPSSFQEK.D	14	227-240, 285-298, 343-356		
	R.LIVGDPSSFQEKDADTLPGK.V	22	227-248, 285-306, 343-364		

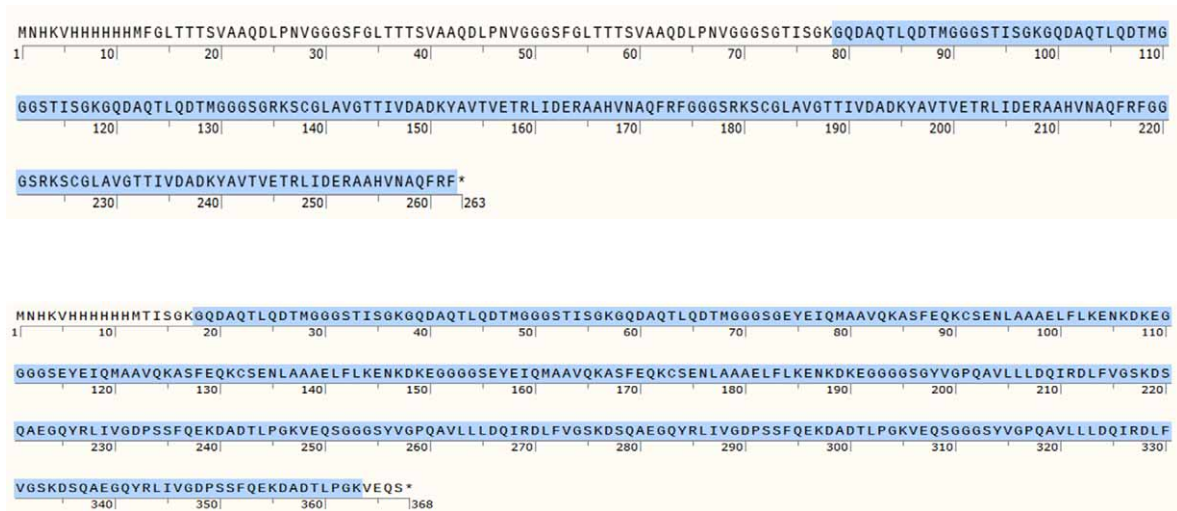


图 4-1 重组蛋白的肽段覆盖图

Figure 4-1 Peptide coverage of recombinant protein

注：蓝色选中区表示覆盖，未选中区表示未覆盖



### 4.3.2 复性蛋白浓度的测定结果

使用 CurveExpert 软件根据 BCA 蛋白定量试剂盒在波长 562nm 下测的蛋白标准品的 OD 值构建标准曲线,如图,将复性蛋白 A 和复性蛋白 B 的平均 OD 值 0.454 和 0.414,代入标准曲线求解得到复性蛋白 A 的浓度为 507.83 $\mu\text{g/mL}$ , 蛋白 B 的浓度为 447.42 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 4-4 BCA 标准品检测值

Table 4-4 BCA standard test value

阳性标准品浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	OD <sub>562nm</sub>
0	0.156
100	0.207
200	0.243
400	0.336
600	0.518
800	0.670
1000	0.727

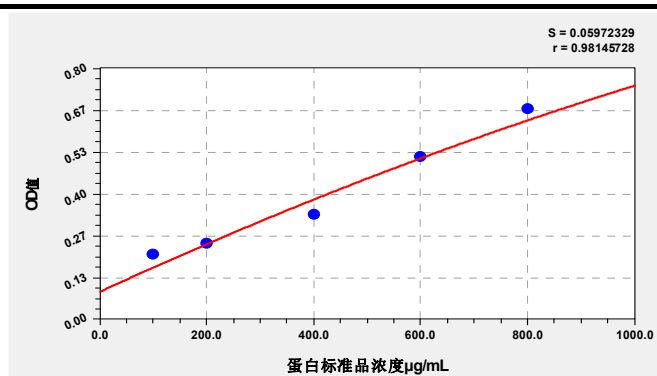


图 4-2 BCA 标准品的标准曲线

Figure 4-2 Standard curve of BCA standard

注: 二次多项式标准曲线公式:  $y=a+bx+cx^2$

$$a = 8.84206646677, b = 7.85389180410, c = -1.28991754123$$

### 4.3.3 小鼠血清中细胞因子的检测结果

#### 4.3.3.1 小鼠 IL-2 的 ELISA 检测结果

用小鼠 IL-2 检测试剂盒对收集的免疫前后各 35 份小鼠血清进行检测,使用 CurveExpert 构建标准曲线(文中不显示),将 OD 值代入到标准曲线回归方程中求解小鼠血清中 IL-2 的含量;根据公式:  $A_{\text{试验组实际增加量}} = (T_{\text{试验组免疫后}} - T_{\text{试验组免疫前}}) - (C_{\text{对照组免疫后}} - C_{\text{对照组免疫前}})$ , 计算免疫后各组小鼠血清中 IL-2 的实际增加量。

根据公式求解可得:对照组的 IL-2 增加量为-10.62pg/mL, 蛋白 A 低、中、高剂量组 IL-2 实际增加量分别为 43.72pg/mL、49.52pg/mL、42.64pg/mL; 蛋白 B 低、中、高剂量组 IL-2 实际增加量分别为 38.33pg/mL、47.19pg/mL、63.36pg/mL。除对照组之外

各免疫组与免疫前相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中 A 低剂量组为显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其余各试验组均为极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 如表 4-6、图 4-3。提示两种重组蛋白均可刺激小鼠产生一定程度的 IL-2, 其中蛋白 A 中剂量组、蛋白 B 高剂量组的实际增加量高于其他试验组。

表 4-5 免疫前、后 IL-2 标准品的 ELISA 检测值

Table 4-5 ELISA value of IL-2 standard before and after immunization

阳性标准品浓度 (pg/mL)	免疫前 OD <sub>450nm</sub>	免疫后 OD <sub>450nm</sub>
0	0.0487	0.0708
20	0.1867	0.1680
40	0.346	0.2993
80	0.6148	0.5444
160	1.1448	0.9988
320	2.2299	2.0968

表 4-6 免疫前、后小鼠血清 IL-2 的 ELISA 检测值

Table 4-6 ELISA value of serum IL-2 in mice before and after immunization

采血时间	项目组	OD <sub>450nm</sub> 测量值					OD <sub>450nm</sub> 平均值	IL-2 计算值 pg/mL
		1	2	3	4	5		
免疫前	A 低剂量组	0.4870	0.4305	0.4614	0.4520	0.4450	0.4552 ± 0.0211	289.12 ± 15.27
	A 中剂量组	0.4541	0.4423	0.4551	0.4837	0.4866	0.4644 ± 0.0197	295.77 ± 14.26
	A 高剂量组	0.4288	0.4215	0.4465	0.4723	0.456	0.4450 ± 0.0201	281.75 ± 14.87
	B 低剂量组	0.4804	0.4842	0.4652	0.4411	0.4632	0.4668 ± 0.0171	297.56 ± 12.37
	B 中剂量组	0.4651	0.4499	0.4750	0.4511	0.4367	0.4556 ± 0.0148	289.39 ± 10.73
	B 高剂量组	0.4656	0.4548	0.4322	0.5024	0.4736	0.4657 ± 0.0257	296.76 ± 18.67
	对照组	0.4813	0.4952	0.4516	0.4772	0.4710	0.4753 ± 0.0159	303.68 ± 11.56
免疫后	A 低剂量组	0.4681	0.4247	0.416	0.4417	0.4183	0.4338 ± 0.0218	322.22 ± 18.65
	A 中剂量组	0.4237	0.4382	0.4572	0.4821	0.4399	0.4482 ± 0.0223	334.67 ± 8.59
	A 高剂量组	0.4446	0.4266	0.409	0.4099	0.4296	0.4239 ± 0.0149	313.77 ± 12.84
	B 低剂量组	0.4359	0.4537	0.4289	0.4276	0.4403	0.4373 ± 0.0105	325.27 ± 9.07
	B 中剂量组	0.4206	0.4354	0.4563	0.4462	0.4319	0.4381 ± 0.0137	325.96 ± 11.78
	B 高剂量组	0.4315	0.4407	0.4724	0.4897	0.4933	0.4655 ± 0.0282	349.50 ± 24.17
	对照组	0.3888	0.4199	0.3740	0.3811	0.4020	0.3932 ± 0.0182	293.06 ± 16.57

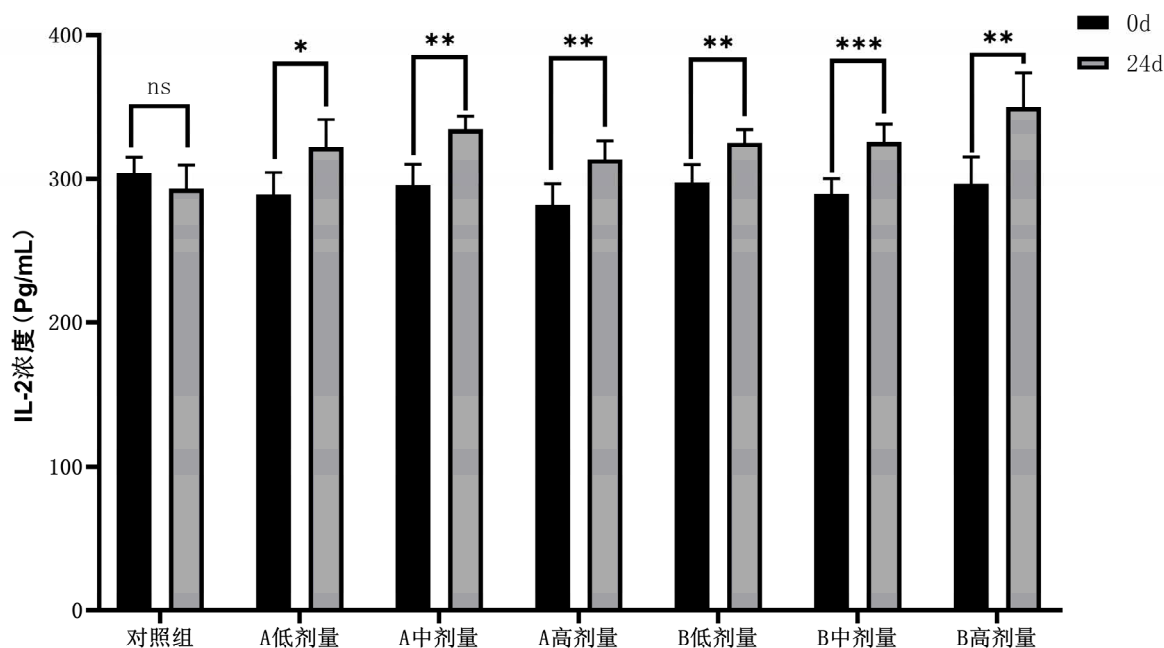


图 4-3 免疫前后小鼠血清的 IL-2 柱状图

Figure 4-3 IL-2 histogram of mouse serum before and after immunization

注: ns( $P > 0.05$ ); \* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ); \*\*\* ( $P < 0.001$ ), P 值越小越显著

#### 4.3.3.2 小鼠血清 IFN- $\gamma$ 的 ELISA 检测结果

用小鼠 IFN- $\gamma$  检测试剂盒对收集的免疫前后各 35 份小鼠血清进行检测, 使用 CurveExpert 构建标准曲线 (文中不显示), 将 OD 值代入到标准曲线回归方程中求解小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的含量; 根据公式:  $A_{\text{试验组实际增加量}} = (T_{\text{试验组免疫后}} - T_{\text{试验组免疫前}}) - (C_{\text{对照组免疫后}} - C_{\text{对照组免疫前}})$  计算出免疫后各组小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的实际增加量。

根据公式求解可得: 对照组的 IFN- $\gamma$  增加量为  $-71.12\text{pg/mL}$ , 蛋白 A 低、中、高剂量组 IFN- $\gamma$  实际增加量分别为  $17.91\text{pg/mL}$ 、 $3.59\text{pg/mL}$ 、 $35.42\text{pg/mL}$ ; 蛋白 B 低、中、高剂量组 IFN- $\gamma$  实际增加量分别为  $33.93\text{pg/mL}$ 、 $28.12\text{pg/mL}$ 、 $19.53\text{pg/mL}$ , 其中蛋白 A 高剂量组、蛋白 B 低剂量组的 IFN- $\gamma$  实际增加量高于其他试验组。对照组和各免疫组与免疫前相比均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 如表 4-8、图 4-4。这提示两种重组蛋白在  $10\text{-}70\mu\text{g}$  的注射量下可刺激小鼠产生一定程度的 IFN- $\gamma$ , 但不具有显著性差异。

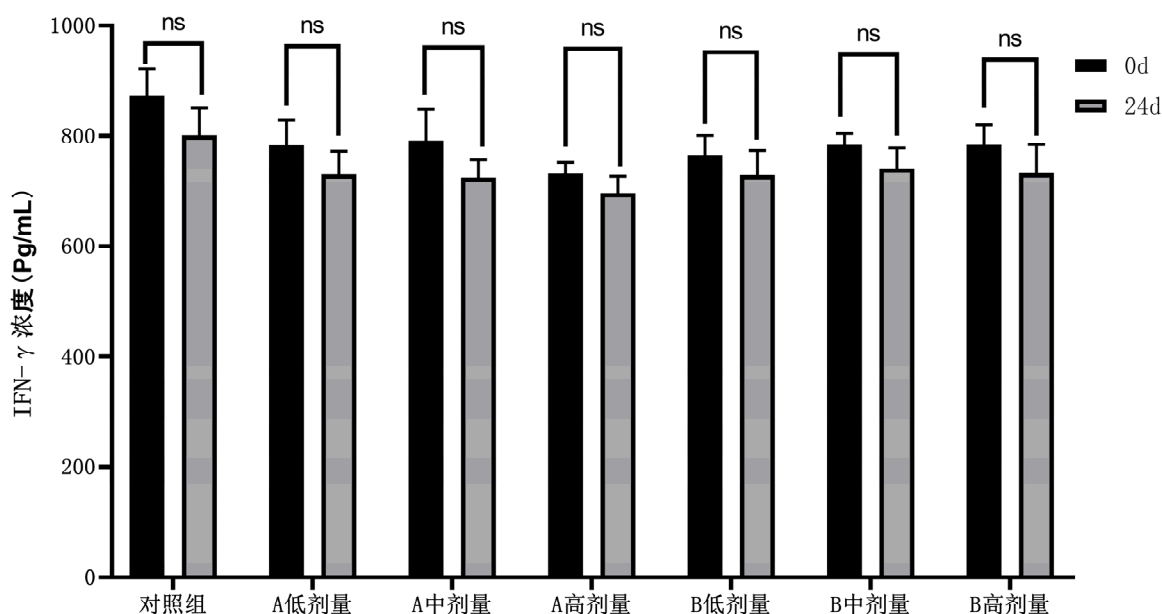
表 4-7 免疫前、后 IFN- $\gamma$  标准品的 ELISA 检测值Table 4-7 ELISA value of IFN- $\gamma$  standard before and after immunization

阳性标准品浓度 (pg/mL)	免疫前 OD <sub>450nm</sub>	免疫后 OD <sub>450nm</sub>
0	0.0470	0.0640
50	0.1551	0.1557
100	0.3024	0.2609
200	0.5640	0.4990
400	1.0290	0.9643
800	1.9908	1.8992

表 4-8 免疫前、后小鼠血清 IFN- $\gamma$  的 ELISA 检测值Table 4-8 ELISA value of serum IFN- $\gamma$  in mice before and after immunization

采血时间	项目组	OD <sub>450nm</sub> 测量值					OD <sub>450nm</sub> 平均值	IFN- $\gamma$ 计算值 pg/mL
		1	2	3	4	5		
免疫前	A 低剂量组	0.4788	0.4323	0.4294	0.4356	0.4206	0.4393±0.0228	783.11±45.47
	A 中剂量组	0.4514	0.4343	0.4832	0.4450	0.4041	0.4436±0.0286	791.63±57.19
	A 高剂量组	0.4272	0.4035	0.4101	0.4052	0.4210	0.4131±0.0103	731.30±20.55
	B 低剂量组	0.4481	0.4392	0.4316	0.4016	0.4328	0.4307±0.0175	765.76±34.96
	B 中剂量组	0.4350	0.4324	0.4332	0.4408	0.4573	0.4397±0.0104	783.84±20.59
	B 高剂量组	0.4178	0.4367	0.4407	0.4342	0.4688	0.4396±0.0185	783.70±36.93
	对照组	0.4656	0.4516	0.5047	0.4922	0.5056	0.4839±0.0242	872.30±48.53
免疫后	A 低剂量组	0.4027	0.3597	0.3751	0.3894	0.3586	0.3771±0.0191	729.90±42.31
	A 中剂量组	0.3665	0.3674	0.3997	0.3741	0.3647	0.3745±0.0145	724.10±32.25
	A 高剂量组	0.3617	0.3424	0.3598	0.3629	0.3814	0.3616±0.0138	695.60±30.71
	B 低剂量组	0.3915	0.4007	0.3561	0.3560	0.3782	0.3765±	728.57±45.05

						0.0203	
B 中剂量组	0.3697	0.3708	0.3677	0.4027	0.3979	0.3818± 0.0171	740.84±37.34
B 高剂量组	0.3627	0.3576	0.3638	0.3964	0.4100	0.3781± 0.0235	732.11±52.18
对照组	0.3987	0.3778	0.4332	0.4093	0.4273	0.4093± 0.0224	801.18±49.54

图 4-4 免疫前后小鼠血清的 IFN- $\gamma$  柱状图Figure 4-4 IFN- $\gamma$  histogram of mouse serum before and after immunization注: ns( $P>0.05$ );\*( $P<0.05$ );\*\* ( $P<0.01$ );\*\*\*( $P<0.001$ ), P 值越小越显著4.3.3.3 小鼠血清中 TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测结果

用小鼠 TNF- $\alpha$  检测试剂盒对收集的免疫前后各 35 份小鼠血清进行检测, 使用 CurveExpert 构建标准曲线(文中不显示), 将 OD 值代入到标准曲线回归方程中求解小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的含量; 根据公式:  $A_{\text{试验组实际增加量}} = (T_{\text{试验组免疫后}} - T_{\text{试验组免疫前}}) - (C_{\text{对照组免疫后}} - C_{\text{对照组免疫前}})$  计算出免疫后各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  的实际增加量。

根据公式求解可得: 对照组的 TNF- $\alpha$  增加量为-105.79pg/mL, 蛋白 A 低、中、高剂量组 TNF- $\alpha$  实际增加量分别为 28.36pg/mL、42.17pg/mL、34.27pg/mL; 蛋白 B 低、中、高剂量组 TNF- $\alpha$  实际增加量分别为 18.56pg/mL、44.55g/mL、36.42pg/mL。所有试验组除 B 高剂量组没有显著性下降外 ( $P<0.05$ ), 其余各组均有极显著性的下降趋

势 ( $P < 0.01$ ), 其中试验组的 TNF- $\alpha$  下降量低于对照组, 如表 4-10、图 4-5。提示这两种重组蛋白可刺激小鼠产生一定程度的 TNF- $\alpha$ , 其中蛋白 A 中剂量组、蛋白 B 中剂量组的实际增加量高于其他试验组。

表 4-9 免疫前、后 TNF- $\alpha$  标准品的 ELISA 检测值Table 4-9 ELISA value of TNF- $\alpha$  standard before and after immunization

阳性标准品浓度 (pg/mL)	免疫前 OD <sub>450nm</sub>	免疫后 OD <sub>450nm</sub>
0	0.0546	0.0536
40	0.2099	0.1764
80	0.4026	0.3342
160	0.8054	0.5968
320	1.4633	1.2377
640	2.4067	2.1838

表 4-10 免疫前、后小鼠血清 TNF- $\alpha$  的 ELISA 检测值Table 4-10 ELISA value of serum TNF- $\alpha$  in mice before and after immunization

采血时间	项目组	OD <sub>450nm</sub> 测量值					OD <sub>450nm</sub> 平均值	TNF- $\alpha$ 计算值 pg/mL
		1	2	3	4	5		
免疫前	A 低剂量组	0.5866	0.5569	0.5815	0.5708	0.5251	0.5642±0.0246	544.40±26.16
	A 中剂量组	0.5758	0.5312	0.5738	0.5643	0.5776	0.5645±0.0193	544.76±20.53
	A 高剂量组	0.5292	0.5257	0.5280	0.5581	0.5415	0.5365±0.035	515.34±14.52
	B 低剂量组	0.5601	0.5513	0.5850	0.5285	0.5156	0.5481±0.0272	527.33±28.84
	B 中剂量组	0.5264	0.5753	0.5234	0.5396	0.5501	0.5430±0.0210	521.85±22.28
	B 高剂量组	0.5477	0.5225	0.5238	0.6485	0.6561	0.5797±0.0671	561.31±71.76
	对照组	0.6669	0.6662	0.5705	0.5829	0.5812	0.6135±	597.36±52.38

							0.0486	
免 疫 后	A 低剂量组	0.4232	0.3874	0.3894	0.3746	0.3751	0.3899± 0.0198	466.97±26.14
	A 中剂量组	0.3774	0.3966	0.3950	0.4293	0.4051	0.4007± 0.0189	481.14±24.97
	A 高剂量组	0.3996	0.3851	0.3541	0.3569	0.3661	0.3724± 0.0194	443.82±25.63
	B 低剂量组	0.3547	0.3933	0.3847	0.3537	0.3610	0.3695± 0.0182	440.10±24.14
	B 中剂量组	0.3792	0.3639	0.3777	0.3792	0.4254	0.3851± 0.0234	460.61±30.93
	B 高剂量组	0.3939	0.3866	0.4070	0.4616	0.3950	0.4088± 0.0304	491.94±40.27
	对照组	0.4059	0.3800	0.4379	0.4099	0.4091	0.4086± 0.0205	491.57±27.13

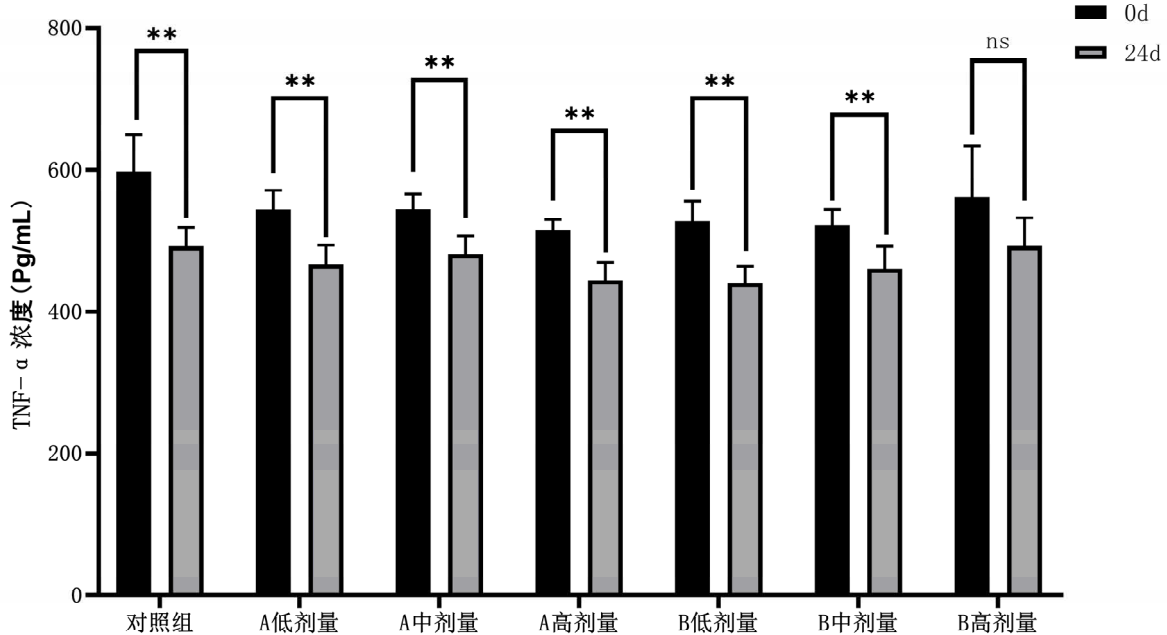
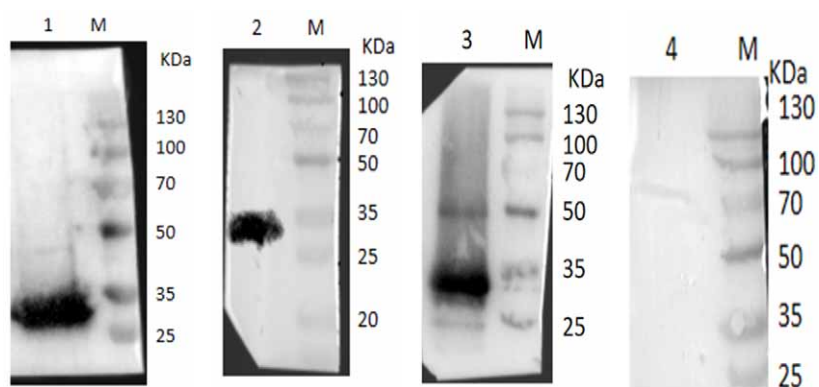


图 4-5 免疫前后小鼠血清的 TNF- $\alpha$  柱状图

Figure 4-5 TNF- $\alpha$  histogram of mouse serum before and after immunization  
 注: ns( $P > 0.05$ );\*( $P < 0.05$ );\*\* ( $P < 0.01$ );\*\*\*( $P < 0.001$ ), P 值越小越显著

#### 4.3.4 小鼠血清中抗体的 Western-blot 结果

以复性后的重组蛋白 A、B 作为抗原，免疫后对应的小鼠血清和对照组血清作为一抗，用 Western-blot 方法验证免疫后的小鼠是否产生了特异性抗体。如图所示，重组蛋白 A、B 各个免疫组均可在预期位置观察到特异性条带，而对照组无条带。说明复性后的重组蛋白 A、B 成功刺激小鼠产生了体液免疫，重组蛋白 A、B 均具有良好免疫原性。





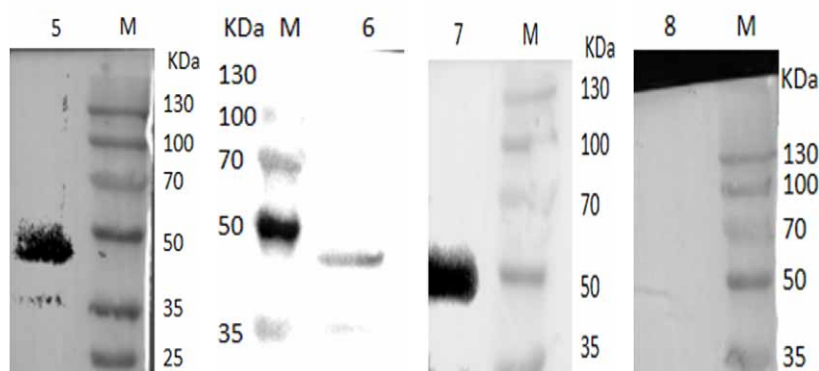


图 4-6 免疫后小鼠血清的 Western blot 结果

Figure 4-6 Western blot results of serum of immunized mice

M: 蛋白分子质量标准; 1: 蛋白 A 低剂量组; 2: 蛋白 A 中剂量组; 3: 蛋白 A 高剂量组; 4:

对照组

5: 蛋白 B 低剂量组; 6: 蛋白 B 中剂量组; 7: 蛋白 B 高剂量组; 8: 对照组

#### 4.4 讨论

猪衣原体作为我国猪感染的唯一衣原体种, 且尚未有有效的疫苗预防, 为我国畜牧业安全带来了严重的影响。本章通过对前一章获得的复性蛋白进行了进一步的质谱验证, 蛋白 A 和蛋白 B 的肽段覆盖率分别为 70.23% 和 94.28%, 蛋白整体 Score 得分为 4039.3 和 4831.3。重组蛋白 A 的覆盖率低于重组蛋白 B 的原因是因为重组蛋白 A 前端无胰蛋白酶识别位点 (赖氨酸、精氨酸), 就单酶切质谱来说结果已经非常理想, 因此认为质谱结果可信。根据蛋白质谱结果显示获得的复性蛋白 A、B 与设计重组蛋白 A、B 氨基酸序列结果一致, 将重组蛋白 A、B 的有效抗原肽段在 NCBI 进行 BLAST 对比, 结果显示抗原肽段均来自于猪衣原体 OmpA、PmpD、MIP 三个免疫候选蛋白, 因此认为本文构建的猪衣原体重组蛋白 A、B 可以作为猪衣原体重组亚单位疫苗的候选抗原进行动物免疫试验。

IL-2、IFN- $\gamma$ 、和 TNF- $\alpha$  是评价细胞免疫的三种重要的细胞因子指标<sup>[104· 105]</sup>，通过监测免疫前后小鼠血清中这三种细胞因子含量的变化来评价重组蛋白 A、B 引起细胞免疫的能力。结果显示不管是实验组还是对照组，小鼠血清中 IFN- $\gamma$ 、和 TNF- $\alpha$  的含量均有所降低，但对照组的降低程度高于实验组，因此根据公式： $A_{\text{试验组实际增加量}} = (T_{\text{试验组免疫后}} - T_{\text{试验组免疫前}}) - (C_{\text{对照组免疫后}} - C_{\text{对照组免疫前}})$  可得实验组小鼠血清中的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  实际是有所增加的，其中 A 高剂量组、B 低剂量组 IFN- $\gamma$  的实际增加量相对较高；A 中剂量组、B 中剂量组 TNF- $\alpha$  实际增加量相对较高。在 IL-2 指标中，对照组血清中 IL-2 的含量略微降低，而实验组均有所升高，其中 A 中剂量组、B 高剂量组 IL-2 实际增加量相对较高。这提示重组蛋白 A、B 均在一定程度上引起了小鼠的细胞免疫。小鼠的 Western-blo 结果显示，复性后的重组蛋白 A、B 均能通过 Western-blot 试验见到其特异性条带，而对照组无条带，说明复性后的重组蛋白 A、B 均可引起小鼠针对这两个蛋白产生抗原特异性体液免疫。

本研究将复性后的多表位重组蛋白 A、B 在小鼠体内进行了初步探索，成功诱导小鼠产生了体液免疫和一定程度的细胞免疫，证明了本文构建的两个重组蛋白均具有良好的免疫原性，为探究猪衣原体多表位重组亚单位疫苗奠定了基础，但在猪体内产生的实际免疫效应还有待进一步验证。

## 全文总结

1. 本试验通过生物信息学软件分析分别设计出了多表位重组蛋白 A 和多表位重组蛋白 B，成功构建了这两个蛋白的重组质粒并将其在大肠杆菌中表达，通过包涵体变性复性的方式成功获得了可溶性的重组蛋白 A、B。

2. 通过蛋白质谱对复性蛋白验证，证明复性后的重组蛋白氨基酸序列与预测序列基本一致，可以作为猪衣原体重组亚单位疫苗的候选抗原。

3. 通过小鼠免疫试验证明了两种重组蛋白均具有免疫原性，为猪衣原体基因工程多表位疫苗奠定了基础。



## 缩略词表

英文缩写	中文全称
DNA	脱氧核糖核酸
PCR	聚合酶链式反应
SDS-PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
Western-blot	蛋白质免疫印迹
ELISA	酶联免疫吸附试验
HRP	辣根过氧化物酶
DNA	脱氧核糖核苷酸
INF- $\gamma$	$\gamma$ -干扰素
IL-2	白细胞介素-2
TNF- $\alpha$	$\alpha$ -肿瘤坏死因子
IgG	免疫球蛋白 G
bp	碱基对
kDa	千道尔顿
mL	毫升
$\mu$ L	微升
min	分钟
h	小时
g	克
mg	毫克
$\mu$ g	微克
pg	皮克
moL	摩尔
mM	毫摩尔
OD	吸光度



## 参考文献

- [1] De Puyseleyr Kristien, De Puyseleyr Leentje et al. Development and validation of a real-time PCR for Chlamydia suis diagnosis in swine and humans.[J]. PLoS one, 2014, 9(5).
- [2] Virginie, Hulin, Sabrina, et al. Host preference and zoonotic potential of Chlamydia psittaci and C. gallinacea in poultry[J]. Pathogens & Disease, 2015.
- [3] P. Librado, J. Rozas. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):
- [4] Matthew Kearse, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, Alex Cooper, Sidney Markowitz, Chris Duran, Tobias Thierer, Bruce Ashton, Peter Meintjes, Alexei Drummond. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(12):
- [5] Bastidas RJ, Elwell CA, Engel JN, Valdivia RH. Chlamydial intracellular survival strategies. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013;3:a010256..
- [6] Elwell, Cheryl et al. “Chlamydia cell biology and pathogenesis.” Nature reviews. Microbiology vol. 14, 6 (2016): 385-400. doi:10.1038/nrmicro.2016.30
- [7] Noel RTS, Daniel RB, Brian P. Bergey’ s manual of systematic bacteriology [M]. New York:Springer 2010: 843-878.
- [8] Beeckman D S , De Puyseleyr L , De Puyseleyr K , et al. Chlamydial biology and its associated virulence blockers[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2014, 40(4):313-328.
- [9] Elwell, C., Mirrashidi, K. & Engel, J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol 14, 385 - 400 (2016).
- [10] Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. Chlamydia genomics: providing novel insights into chlamydial biology. Trends Microbiol. 2014;22(8):464-472. doi:10.1016/j.tim.2014.04.013
- [11] WILLIGAN DA, BEAMER PD. Isolation of a transmissible agent from pericarditis of swine. J Am Vet Med Assoc. 1955;126(935):118-122.

- [12] Everett, K D et al. “Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms.” International journal of systematic bacteriology vol. 49 Pt 2 (1999): 415-40. doi:10.1099/00207713-49-2-415.
- [13] Kaltenboeck B, Storz J. Biological properties and genetic analysis of the ompA locus in chlamydiae isolated from swine. Am J Vet Res. 1992;53(9):1482-1487.
- [14] Suchland RJ, Sandoz KM, Jeffrey BM, Stamm WE, Rockey DD. Horizontal transfer of tetracycline resistance among Chlamydia spp. in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(11):4604-4611. doi:10.1128/AAC.00477-09
- [15] De Puyseleir K, De Puyseleir L, Dhondt H, et al. Evaluation of the presence and zoonotic transmission of Chlamydia suis in a pig slaughterhouse. BMC Infect Dis. 2014;14:560. Published 2014 Oct 30. doi:10.1186/s12879-014-0560-x
- [16] 叶自霞,杨俊,聂福平,王昱,袁曾壮,李应国,王国民,李贤良,保雨,刘亚娟,刘力.家畜嗜衣原体 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医学科学,2015,45(04):380-384.DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2015.04.005.
- [17] 蒋法成,葛东红,范兆才,贾洪.江苏省淮安市淮安区猪衣原体病的血清学调查[J].中国猪业,2013,8(05):41-42.DOI:10.16174/j.cnki.115435.2013.05.012.
- [18] Sheng CY, Gong QL, Ma BY, et al. Prevalence of Chlamydia in Pigs in China from 1985 to 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vector Borne Zoonotic Dis. 2021;21(7):517-533. doi:10.1089/vbz.2020.2694
- [19] 何德鹏.猪衣原体病的病原特性、临床症状、诊断和防控措施[J].现代畜牧科技,2017(12):112.DOI:10.19369/j.cnki.2095-9737.2017.12.103.
- [20] 杨峰,李敏,李静,王瑶瑶,张继垒,王成明.浙江省猪衣原体(Chlamydia suis)的高度流行性和遗传多样性[J].畜牧与兽医,2018,50(09):51-55.
- [21] 李敏.我国部分地区猪衣原体(Chlamydia suis)基因多样性的研究[D].扬州大学,2018.
- [22] 董海鹏.猪衣原体病的流行病学、临床表现、实验室诊断及防控措施[J].现代畜牧科技,2020(04):135-136.DOI:10.19369/j.cnki.2095-9737.2020.04.076.
- [23] 蔡志军.猪衣原体病的防制[J].今日畜牧兽医,2019,35(09):96.



- [24] 郑国龙,姜小伟,张春雷,马文元.猪衣原体肺炎发病特点与防治分析[J].中国畜禽种业,2019,15(01):145.
- [25] 李红林. 猪衣原体病诊治[J]. 畜牧兽医科技信息,2014(03):91.
- [26] Unterweger C, Inic-Kanada A, Setudeh S, et al. Characteristics of Chlamydia suis Ocular Infection in Pigs. Pathogens. 2021;10(9):1103. Published 2021 Aug 29. doi:10.3390/pathogens10091103
- [27] Reinhold P, Kirschvink N, Theegarten D, Berndt A. An experimentally induced Chlamydia suis infection in pigs results in severe lung function disorders and pulmonary inflammation. Vet Res. 2008;39(3):35. doi:10.1051/vetres:2008012
- [28] Guscetti F, Schiller I, Sydler T, Heinen E, Pospischil A. Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with Chlamydia suis strain S45. Vet Microbiol. 2009;135(1-2):157-168. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.038
- [29] Schautteet K, Vanrompay D. Chlamydiaceae infections in pig. Vet Res. 2011;42(1):29. Published 2011 Feb 7. doi:10.1186/1297-9716-42-29
- [30] De Clercq E, Devriendt B, Yin L, Chiers K, Cox E, Vanrompay D. The immune response against Chlamydia suis genital tract infection partially protects against re-infection. Vet Res. 2014;45(1):95. Published 2014 Sep 25. doi:10.1186/s13567-014-0095-6
- [31] Rogers DG, Andersen AA. Intestinal lesions caused by a strain of Chlamydia suis in weanling pigs infected at 21 days of age. J Vet Diagn Invest. 2000;12(3):233-239. doi:10.1177/104063870001200306
- [32] 陆承平主编, 兽医微生物第四版, 中国农业出版社, 2007.
- [33] 全国动物检疫标准化技术委员会. 动物衣原体病诊断技术: NY/T 562-2015[S] 北京: 中国标准出版社, 2015,1-2
- [34] 付明哲,吴浩阳,许信刚,张琪.羊流产嗜性衣原体重组 ompA 蛋白的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报,2019,39(11):2184-2189.DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2019.11.16.
- [35] 吕棠山,徐芝勇,潘建平.检测肺炎衣原体血清 IgM 抗体 ELISA 的建立和应用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2012(04):376-377.
- [36] 蔺俊丽. 流产衣原体 MIP 蛋白的双抗原夹心 ELISA 诊断方法建立及单克隆抗体制备[D].中国农业科学院,2015.

- [37] 温渊. 流产衣原体实时荧光定量 PCR 和 ELISA 诊断方法的建立[D].西北农林科技大学,2021.DOI:10.27409/d.cnki.gxbnu.2021.001498.
- [38] 王新秋,高艳,李功勇,贺现辉,翁亚彪,林瑞庆.广东省清远市鹅衣原体病血清学调查[J].中国家禽,2012,34(05):63-64.DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2012.05.020.
- [39] Onorini D, Donati M, Marti H, et al. The influence of centrifugation and incubation temperatures on various veterinary and human chlamydial species. *Vet Microbiol.* 2019;233:11-20. doi:10.1016/j.vetmic.2019.04.012
- [40] 孙翔翔,张培培,刘蒙达,樊晓旭,孙世雄,孙明军.鸚鵡热衣原体荧光环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J].中国动物检疫,2020,37(09):101-105.
- [41] 杨军. 动物衣原体病通用 LAMP 方法的建立[D].四川农业大学,2013.
- [42] 费媛媛,李兆才,娄忠子,Muhammed MUSTAFA,张志君,赵宏涛,祁世荣,李长云,周继章. 动物衣原体 RPA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学,2018,48(02):142-147.DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0022.
- [43] 刘萍,刘星,李兆才,娄忠子,马晓霞,颜鲁军,马忠仁,周继章.流产衣原体检测技术与分型方法研究进展 [J]. 动物医学进展,2020,41(03):100-105.DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.03.020.
- [44] 唐泰山,王建忠,陈国强,马雪丽,姚火春,张常印,姜焱,王凯民.鸚鵡热衣原体 PCR 检测方法的建立[J].畜牧与兽医,2014,46(09):26-30.
- [45] 李应国. 动物衣原体分子检测方法研究和诊断试剂盒的研制及应用[D].重庆大学,2012.
- [46] 5.NYT 562-2015, 动物衣原体病诊断技术[S].
- [47] 周晓丽,朱国坡,李雪华,王艳玲,刘兴友.实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J].中国畜牧兽医,2010,37(02):87-89.
- [48] 郭伟娜. 中国禽类衣原体多样性及 *Chlamydia gallinacea* 基因组学研究[D].扬州大学,2016.
- [49] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- [50] 蒙丽君,胡丹,彭杰,黄洁武,陈丽丽.衣原体疫苗研究进展[J].实用预防医学,2019,26(12):1538-1542.
- [51] Kari L, Whitmire WM, Olivares-Zavaleta N, et al. A live-attenuated chlamydial vaccine protects against trachoma in nonhuman primates. *J Exp Med.* 2011;208(11):2217-2223.

- doi:10.1084/jem.20111266
- [52] Zhou Z, Tian Q, Wang L, Zhong G. Chlamydia deficient in plasmid-encoded glycoprotein 3 (pGP3) as an attenuated live oral vaccine [published online ahead of print, 2022 Jan 31]. *Infect Immun*. 2022;IAI0047221. doi:10.1128/IAI.00472-21
- [53] 余南燕, 向文静, 周洲. 衣原体疫苗的研究策略与进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(05):455-461.
- [54] 蔡金山, 牦牛衣原体灭活疫苗研究与示范. 青海省, 青海省动物疫病预防控制中心, 2018-01-11.
- [55] Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1981;31(3):1161-1176. doi:10.1128/iai.31.3.1161-1176.1981
- [56] Li M, Shi W, Yang J, et al. Generation of a novel affibody molecule targeting *Chlamydia trachomatis* MOMP. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(4):1477-1487. doi:10.1007/s00253-021-11128-x
- [57] He W, Felderman M, Evans AC, et al. Cell-free production of a functional oligomeric form of a *Chlamydia* major outer-membrane protein (MOMP) for vaccine development. *J Biol Chem*. 2017;292(36):15121-15132. doi:10.1074/jbc.M117.784561
- [58] Desclozeaux M, Robbins A, Jelocnik M, et al. Immunization of a wild koala population with a recombinant *Chlamydia pecorum* Major Outer Membrane Protein (MOMP) or Polymorphic Membrane Protein (PMP) based vaccine: New insights into immune response, protection and clearance. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178786. Published 2017 Jun 2. doi:10.1371/journal.pone.0178786
- [59] Pal S, Tifrea DF, Follmann F, Andersen P, de la Maza LM. The cationic liposomal adjuvants CAF01 and CAF09 formulated with the major outer membrane protein elicit robust protection in mice against a *Chlamydia muridarum* respiratory challenge. *Vaccine*. 2017;35(13):1705-1711. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.020
- [60] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(4):692-744. doi:10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004
- [61] Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, Baud D. Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence*.

- 2016;7(1):11-22. doi:10.1080/21505594.2015.1111509
- [62] Russi RC, Bourdin E, García MI, Veaute CMI. In silico prediction of T- and B-cell epitopes in PmpD: First step towards to the design of a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Biomed J.* 2018;41(2):109-117. doi:10.1016/j.bj.2018.04.007
- [63] Müller T, Becker E, Stallmann S, et al. Vaccination with the polymorphic membrane protein A reduces *Chlamydia muridarum* induced genital tract pathology. *Vaccine.* 2017;35(21):2801-2810. doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.017
- [64] Liu S, Sun W, Chu J, et al. Construction of Recombinant HVT Expressing PmpD, and Immunological Evaluation against *Chlamydia psittaci* and Marek's Disease Virus. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124992. Published 2015 Apr 20. doi:10.1371/journal.pone.0124992
- [65] Neff L, Daher S, Muzzin P, et al. Molecular characterization and subcellular localization of macrophage infectivity potentiator, a *Chlamydia trachomatis* lipoprotein. *J Bacteriol.* 2007;189(13):4739-4748. doi:10.1128/JB.01889-06
- [66] Lundemose AG, Birkelund S, Fey SJ, Larsen PM, Christiansen G. *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila* mip gene product. *Mol Microbiol.* 1991;5(1):109-115. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb01831.x
- [67] Lundemose AG, Kay JE, Pearce JH. *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection. *Mol Microbiol.* 1993;7(5):777-783. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01168.x
- [68] 陈利,李美娟,柏琴琴,刘璐瑶,黄巧玲,李丹靓,陈丽丽. 鹦鹉热衣原体 MIP 蛋白生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z1):1976-1982.
- [69] Lu C, Peng B, Li Z, et al. Induction of protective immunity against *Chlamydia muridarum* intravaginal infection with the chlamydial immunodominant antigen macrophage infectivity potentiator. *Microbes Infect.* 2013;15(4):329-338. doi:10.1016/j.micinf.2013.02.001
- [70] 刘星. 鹦鹉热衣原体质粒 Pgp3 基因的克隆表达及抗原性研究[D]. 中国农业科学院, 2020. DOI:10.27630/d.cnki.gznky.2020.000301.
- [71] Lei L, Yang C, Patton MJ, et al. A Chlamydial Plasmid-Dependent Secretion System for the Delivery of Virulence Factors to the Host Cytosol. *mBio.* 2021;12(3):e0117921. doi:10.1128/mBio.01179-21

- [72] Luan X, Peng B, Li Z, et al. Vaccination with MIP or Pgp3 induces cross-serovar protection against chlamydial genital tract infection in mice. *Immunobiology*. 2019;224(2):223-230. doi:10.1016/j.imbio.2018.11.009
- [73] Dong F, Pirbhai M, Zhong Y, Zhong G. Cleavage-dependent activation of a chlamydia-secreted protease. *Mol Microbiol*. 2004;52(5):1487-1494. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04072.x
- [74] Paschen SA, Christian JG, Vier J, et al. Cytopathicity of Chlamydia is largely reproduced by expression of a single chlamydial protease. *J Cell Biol*. 2008;182(1):117-127. doi:10.1083/jcb.200804023
- [75] Zhong G, Fan P, Ji H, Dong F, Huang Y. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J Exp Med*. 2001;193(8):935-942. doi:10.1084/jem.193.8.935
- [76] Kawana K, Quayle AJ, Ficarra M, et al. CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem*. 2007;282(10):7368-7375. doi:10.1074/jbc.M610754200
- [77] Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, et al. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med*. 2004;200(7):905-916. doi:10.1084/jem.20040402
- [78] Ying S, Fischer SF, Pettengill M, et al. Characterization of host cell death induced by Chlamydia trachomatis. *Infect Immun*. 2006;74(11):6057-6066. doi:10.1128/IAI.00760-06
- [79] Li Y, Zheng K, Tan Y, et al. A recombinant multi-epitope peptide vaccine based on MOMP and CPSIT\_p6 protein protects against Chlamydia psittaci lung infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(2):941-952. doi:10.1007/s00253-018-9513-4
- [80] Jiang P, Cai Y, Chen J, et al. Evaluation of tandem Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model. *Vaccine*. 2017;35(23):3096-3103. doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.031
- [81] O' Neill LM, Keane OM, Ross PJ, et al. Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from Chlamydia abortus as novel vaccines for enzootic abortion of

- ewes[J].Vaccine,2019,37(36):5428-5438.DOI:10.1016/j.vaccine.2019.06.088
- [82] Jiang PF,Cai YQ,Chen J,et al.Evaluation of tandem Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model[J].Vaccine,2017,35(23):3096-3103.DOI:10.1016/j.vaccine.2017.04.031
- [83] Wang C,Li Y,Wang S,et al.Evaluation of a tandem Chlamydia psittaci Pgp3 multiepitope peptide vaccine against a pulmonary chlamydial challenge in mice[J].Microb Pathog,2020,147:104256.DOI:10.1016/j.micpath.2020.104256
- [84] Pal S, Tifrea DF, Follmann F, Andersen P, de la Maza LM. The cationic liposomal adjuvants CAF01 and CAF09 formulated with the major outer membrane protein elicit robust protection in mice against a Chlamydia muridarum respiratory challenge. Vaccine. 2017;35(13):1705-1711. doi:10.1016/j.vaccine.2017.02.020
- [85] Ou C, Tian D, Ling Y, et al. Evaluation of an ompA-based phage-mediated DNA vaccine against Chlamydia abortus in piglets. Int Immunopharmacol. 2013;16(4):505-510. doi:10.1016/j.intimp.2013.04.027
- [86] 梁明星,陈超群,吴移谋.衣原体疫苗的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2016,44(01):66-71.DOI:10.13309/j.cnki.pmi.2016.01.015.
- [87] 傅连臣,刘灵芝,侯佩强.DNA疫苗研究进展[J].预防医学论坛,2019,25(10):797-800.DOI:10.16406/j.pmt.issn.1672-9153.2019.10.024.
- [88] 王宁,赵鹏鹏,张艳艳,马勋,王正荣,薄新文.寄生虫 DNA 疫苗研究进展[J].中国畜牧兽医,2021,48(03):1034-1045.DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2021.03.028.
- [89] Lenart J, Andersen AA, Rockey DD. Growth and development of tetracycline-resistant Chlamydia suis. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(8):2198-2203. doi:10.1128/AAC.45.8.2198-2203.2001
- [90] Schautteet K, De Clercq E, Miry C, et al. Tetracycline-resistant Chlamydia suis in cases of reproductive failure on Belgian, Cypriote and Israeli pig production farms. J Med Microbiol. 2013;62(Pt 2):331-334. doi:10.1099/jmm.0.042861-0
- [91] Jeffrey BM, Suchland RJ, Eriksen SG, Sandoz KM, Rockey DD. Genomic and phenotypic characterization of in vitro-generated Chlamydia trachomatis recombinants. BMC Microbiol. 2013;13:142. Published 2013 Jun 20. doi:10.1186/1471-2180-13-142
- [92] Rodolakis A, Laroucau K. Chlamydiaceae and chlamydial infections in sheep or goats. Vet Microbiol. 2015;181(1-2):107-118. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.010

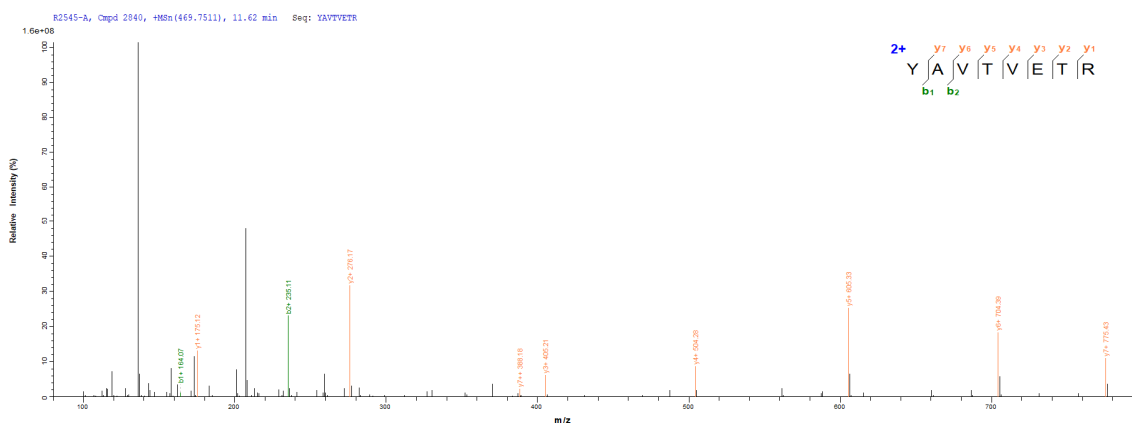
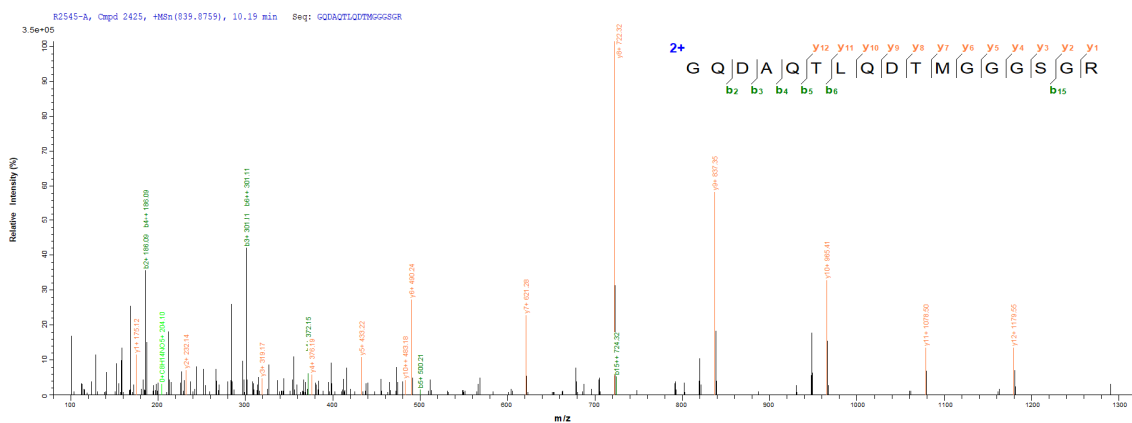
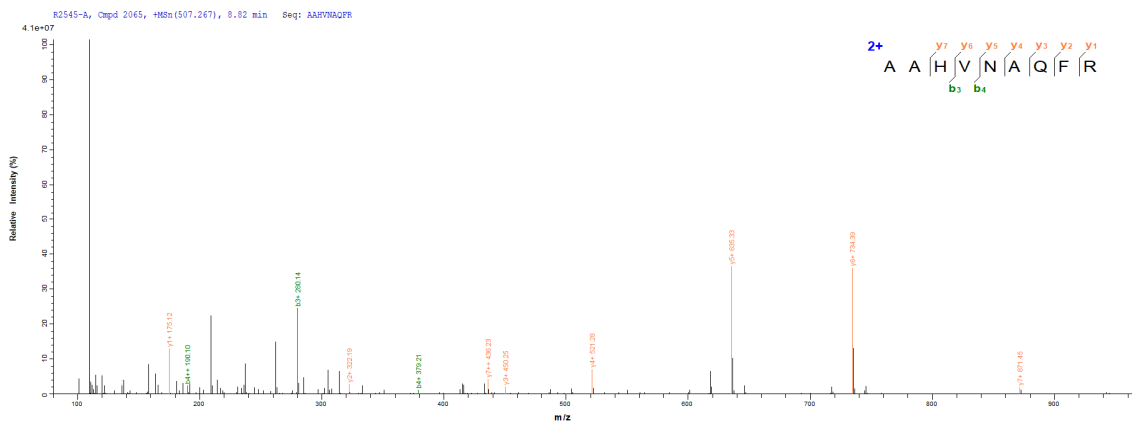
- [93] 凌国煌.猪衣原体病的临床症状及防治措施[J].兽医导刊,2021,(07):17+83.
- [94] Rahman KS, Chowdhury EU, Poudel A, Ruettinger A, Sachse K, Kaltenboeck B. Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of *Chlamydia* species. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(5):539-552. doi:10.1128/CVI.00102-15
- [95] Qing G, Ma LC, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004;22(7):877-882. doi:10.1038/nbt984
- [96] Etchegaray JP, Inouye M. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1999;274(15):10079-10085. doi:10.1074/jbc.274.15.10079
- [97] 何若昱,林福玉,高向东,刘金毅.信号肽在大肠杆菌分泌系统中的研究与应用进展[J].中国生物工程杂志,2021,41(05):87-93.
- [98] Tsai WC, Wu TC, Chiang BL, Wen HW. Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2017;130:35-43. doi:10.1016/j.pep.2016.06.009
- [99] Li G,Zeng Y,Yin J, et al. Cloning, Prokaryotic Expression, and Biological Analysis of Recombinant Chicken Ifn-gamma.[J]. *Hybridoma*, 2010, 29(1): 1-6.
- [100] Olivella M,Gonzalez A,Pardo L, et al. Relation Between Sequence and Structure in Membrane Proteins.[J]. *Bioinformatics (oxford, England)*, 2013, 29(13): 92-1589.
- [101] Chen CP,Kernytsky A,Rost B. Transmembrane Helix Predictions Revisited[J]. *Protein Science a Publication of the Protein Society*, 2010, 11(12): 2774-2791.
- [102] 于健,Sarra Setrerrahmane,徐寒梅.连接肽在融合蛋白设计中的选择及应用[J].药物生物技术,2016,23(03):260-263.
- [103] 付明娟,林接玉,谢捷明.包涵体蛋白复性的研究进展[J].医学综述,2015,21(20):3657-3659.
- [104] Käser T, Pasternak JA, Delgado-Ortega M, et al. *Chlamydia suis* and *Chlamydia trachomatis* induce multifunctional CD4 T cells in pigs. *Vaccine.* 2017;35(1):91-100. doi:10.1016/j.vaccine.2016.11.050

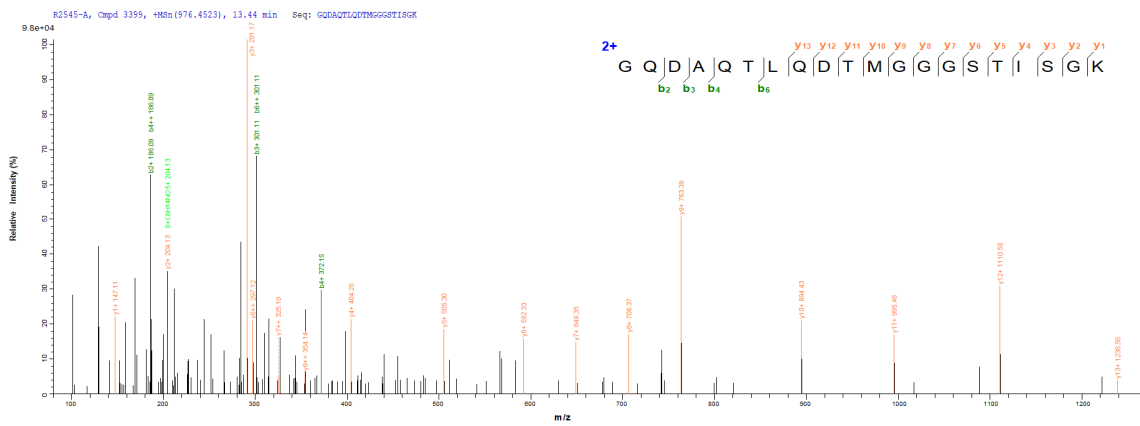
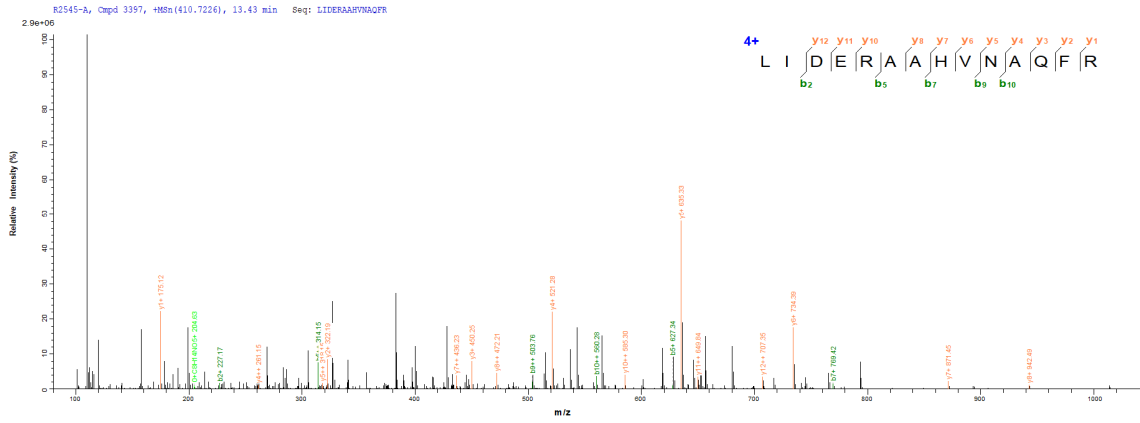
- [105] Sahu R, Dixit S, Verma R, et al. Encapsulation of Recombinant MOMP in Extended-Releasing PLGA 85:15 Nanoparticles Confer Protective Immunity Against a *Chlamydia muridarum* Genital Challenge and Re-Challenge. *Front Immunol.* 2021;12:660932. Published 2021 Apr 14. doi:10.3389/fimmu.2021.660932



# 附件：重组蛋白 A、B 部分质谱图

## 重组蛋白 A：





# 重组蛋白 B:

