

分类号_____

UDC _____

学 号 MZ120201469

密 级 _____



硕士学位论文

(全日制专业学位)

火鸡组织滴虫 ME 1 蛋白的原核表达与免疫保护效果 评价

学 院 : 兽医学院

专 业 学 位 类 别 : 兽医硕士

专 业 学 位 领 域 : 不分领域

研 究 生 : 李在凡

校 内 指 导 教 师 : 许金俊 教授

校 外 指 导 教 师 : 周永华 研究员

江苏省寄生虫病防治研究所

答 辩 委 员 会 主 席 : 严若峰 教授

答 辩 日 期 : 2023 年 06 月 02 日

**Prokaryotic expression and immunoprotective effect
evaluation of ME 1 of *Histomonas meleagridis***

A thesis submitted to
Yangzhou University
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of
Master of Professional Degree in Veterinary Medicine

By

Zaifan Li

Supervisor: Prof. Jinjun Xu

Co-supervisor: Prof. Yonghua Zhou

Professional Degree in Veterinary Medicine

June 2023

火鸡组织滴虫 ME 1 蛋白的原核表达与免疫保护效果分析

本论文研究得到：国家自然科学基金面上项目（编号：31772727）资助

目 录

文献综述: 组织滴虫病及其防治研究进展	1
1. 组织滴虫病的发现.....	1
2. 虫体形态特点.....	2
3. 传播途径和流行病学.....	2
4. 临床症状、病理变化及诊断	3
5. 组织滴虫病防治策略.....	4
6. ME 蛋白研究进展.....	6
7. 本研究的目的是与意义.....	8
参考文献.....	8
第一章 火鸡组织滴虫 ME 1 基因的克隆表达与酶活性鉴定	17
1. 材料与方法.....	17
2. 结果.....	22
3. 小结与讨论.....	26
参考文献.....	27
第二章 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的抗原性和天然蛋白的定位分 析	29
1. 材料与方法.....	29
2. 结果.....	34
3. 小结与讨论.....	39
参考文献.....	40
第三章 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的免疫保护效果评价.....	42
1. 材料与方法.....	42
2. 结果.....	46
3. 小结与讨论.....	55
参考文献.....	56
全文结论.....	59

摘 要

组织滴虫病 (Histomoniasis) 是由单尾滴虫科组织滴虫属的火鸡组织滴虫 (*Histomonas meleagridis*, *H. meleagridis*) 引起的鸡形目禽类的一种原虫病, 主要特征为盲肠肿胀、肝脏坏死和排硫磺样粪便, 所以又称为盲肠肝炎。该病多发生于火鸡, 鸡、鹌鹑、珍珠鸡和孔雀中也存在本病的流行, 部分鸡群死亡率达到 20~30%, 严重影响养禽业发展。该病目前尚无有效疫苗, 有机砷和硝基咪唑等化学药物在组织滴虫病的防治过程中发挥了巨大作用, 但出于药物残留、环境污染等公共安全卫生方面的考虑已被禁用, 导致该病流行日益严峻。本课题组前期通过差异蛋白组学分析发现, 苹果酸酶 1 (Malic enzyme 1, ME 1) 在强毒株中高表达, 而在传代致弱毒株中表达量明显低于强毒株, 与虫体毒力有一定的关系。因此, 本论文运用了基因工程技术, 克隆表达了 ME 1 基因, 对其编码的蛋白进行了抗原性分析, 并制备了鼠多抗和单克隆抗体分析了 ME 1 蛋白在火鸡组织滴虫中的分布, 最后通过动物保护实验分析了重组蛋白对鸡群感染火鸡组织滴虫的免疫保护效果, 旨在为研制火鸡组织滴虫亚单位疫苗奠定一定的基础。

1. 火鸡组织滴虫 ME 1 基因的克隆表达与酶活性鉴定

根据课题组前期获得的火鸡组织滴虫差异蛋白组中 ME 1 序列设计引物, 经 RT-PCR 从虫体 cDNA 中扩增 HmME 1 基因, 将目的基因和表达载体 pET28a (+) 用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后, 构建重组质粒 pET28a(+)-HmME 1, 并转化至 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, 用 HIS 标签单抗鉴定表达产物, 利用 HIS 标签层析法纯化重组蛋白, 并进行酶活性测定。结果表明, 火鸡组织滴虫 ME 1 基因 (基因收录号: MW400608.1) 编码区长 1182 bp, 编码 394 个 aa, 与 GenBank 中收录的火鸡组织滴虫 ME 1 基因位于同一个分支内; 对其氨基酸序列进行分析, 同源性的为 100%~98.5%, 并且与胎儿三毛滴虫 ME 亲缘关系最近, 同源性的为 81.9%。rHmME 1 蛋白以可溶形式存在, 相对分子量约为 46 kDa, 且纯化的重组蛋白条带单一, 纯化的 rHmME 1 蛋白具有酶活性。

2. 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的抗原性和天然蛋白定位分析

将纯化蛋白 rHmME 1 去除酶活性后免疫小鼠，制备该重组蛋白的鼠抗 rHmME 1 阳性血清，采用 Western blot 分别检测 rHmME 1 蛋白与鼠源 rHmME 1 阳性血清和鸡源火鸡组织滴虫阳性血清的反应原性，以及虫体天然表达的 HmME 1 蛋白与鼠源 rHmME 1 阳性血清的反应原性。以除去酶活性的 rHmME 1 为免疫原，经细胞融合、阳性杂交瘤细胞筛选、亚克隆等步骤制备 rHmME 1 蛋白单克隆抗体，并分别以鼠多抗和单克隆抗体通过间接免疫荧光试验（IFA）对虫体内蛋白进行定位分析。结果显示 rHmME 1 蛋白能同时被鸡源抗火鸡组织滴虫阳性血清及鼠源 rHmME 1 阳性血清特异性识别，鼠抗 rHmME 1 阳性血清也可以与虫体天然表达的 HmME 1 蛋白反应。经过三次亚克隆共得到六株稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株，其中 3D12、1A6、1C10 为 IgG1 亚类；3G12 为 IgG2a 亚类；1E12、4B5 为 IgG2b 亚类，能特异性识别重组表达的 rHmME 1 蛋白和火鸡组织滴虫虫体中 HmME 1 天然蛋白。将鼠多抗和单克隆抗体分别作为一抗进行 IFA 检测，结果显示 HmME 1 广泛存在于火鸡组织滴虫的胞质内，其中强毒虫株中表达量明显多于传代致弱虫株。

3. 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的免疫保护效果评价

将除去酶活性的重组蛋白 rHmME 1 与弗氏佐剂混合后进行乳化，制备亚单位疫苗。重组蛋白设置为高中低三个剂量组，分别为 200、100、50 $\mu\text{g}/\text{羽}$ ，同时设置未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组，每组 10 只 SPF 鸡，各免疫组于 5、12 d 接种，各攻虫组于 19 d 经泄殖腔攻虫，攻虫剂量为 3×10^5 个/ $300 \mu\text{L}/\text{羽}$ ，攻虫后 12 d 扑杀。通过发病率、死亡率、平均增重、病变计分、抗体和细胞因子水平变化等方面，对重组蛋白的免疫保护效果进行分析。相较于其他组，rHmME 1 100 μg 组的发病率最低。各试验组均无鸡只死亡。平均增重显示 rHmME 1 100 μg 组显著高于未免疫攻虫组 ($p < 0.05$)。病变计分结果表明 rHmME 1 100 μg 组病变相对轻微，盲肠病变计分与未免疫攻虫组具有显著性差异 ($p < 0.05$)。rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组均能刺激鸡体产生较高水平抗体，使 IFN- γ 和 IL-2 显著升高，IL-4 呈下降趋势。综合发病率、平均增

重、病变计分等临床评价指标，rHmME 1 100 μg 组免疫保护效果最佳。

综上所述，本研究克隆表达了 HmME 1 基因，rHmME 1 蛋白大小约为 46 kDa，定位于火鸡组织滴虫细胞质中，强毒虫株中表达量明显多于传代致弱虫株，rHmME 1 蛋白具有一定的免疫保护效果。

关键词：火鸡组织滴虫；苹果酸酶 1 基因；原核表达；定位；免疫保护效果

Abstract

Histomoniasis is a protozoiasis caused by *Histomonas meleagridis* (*H. meleagridis*), which can infect Galliformes birds. The main lesion features are cecal swelling, liver necrosis and sulfur-like feces. It is also known as infectious enterohepatitis. The disease mostly infects turkeys, but also prevalent in chickens, quail, keets and peacocks. The mortality rate of some chickens reaches 20-30%, which seriously affects the development of poultry industry. At present, there is no effective vaccine for the disease. Chemical drugs such as organic arsenic and nitroimidazole play important roles in the prevention and treatment of Histomoniasis. However, it has been banned for public safety and health considerations due to drug residue and environmental pollution, resulting in severe prevalence. Through differential proteome analysis in previous study, ME 1 was found highly expressed in virulent strains, and the expression level in attenuated strains was significantly lower than that in virulent strains. Therefore, in this study, ME 1 gene was cloned and expressed by genetic engineering technology, and the antigenicity of the protein encoded by the ME 1 gene was analyzed. The mouse polyclonal antibody and monoclonal antibody were prepared to analyze the distribution of ME 1 protein in *H. meleagridis*, and immunoprotective effect has been evaluated, aiming to lay a basis for the development of *H. meleagridis* subunit vaccine.

1. Cloning, expression and enzyme activity identification of ME 1 of *H. meleagridis*

Primers were designed according to the ME 1 gene sequence in the differential proteome of *H. meleagridis* to amplified HmME 1 gene by RT-PCR from the cDNA of *H. meleagridis*. The target gene and pET28a(+) were digested with *Bam*H I and *Not* I to construct the recombinant plasmid pET28a(+)-HmME 1 which is transformed into BL21(DE3) to express induced by IPTG. Following from identifying by HIS tag

monoclonal antibody, the enzyme activity of the recombinant protein was identified. The results showed that the HmME 1 gene (MW400608.1) was 1182 bp, coding 394 amino acids. The amino acid sequence analysis showed that the homology was 100%-98.5% compared with ME 1 of *H. meleagridis* in GenBank., and it was closely related to the ME of *Trichomonas fetalis*, with a homology of 81.9%. The recombinant protein mainly expressed in supernatant and the molecular weight was about 46kDa, which can be specifically recognized by HIS tag monoclonal antibody. The purified recombinant protein band was single, and the rHmME 1 protein had enzyme activity.

2. Antigenicity and immunofluorescence localization analysis of recombinant protein rHmME 1 of *H. meleagridis*

The positive serum (with polyclonal antibody) was prepared by immunizing mice with purified and non-enzyme activity rHmME 1. The reactivity of rHmME 1 was detected with mouse anti-rHmME 1 positive serum and chicken anti-*H. meleagridis* positive serum by western-blot, and the reactivity of the native HmME 1 protein expressed in *H. meleagridis* with mouse anti-rHmME 1 positive serum is also detected. Monoclonal antibodies against rHmME 1 protein were prepared by cell fusion, positive hybridoma cell screening and subcloning with rHmME 1 as immunogen. The localization of rHmME 1 protein was analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA) with mouse polyclonal antibody and monoclonal antibody, respectively. The results showed that the rHmME 1 protein could be specifically recognized by both chicken anti-*H. meleagridis* positive serum and mouse anti-rHmME 1 positive serum. After three times of subcloning, six hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibodies were obtained, which were named as 3D12, 1A6 and 1C10 classified as IgG1, and 3G12, 1E12 and 4B5 classified as IgG2b. The mouse anti-rHmME 1 positive serum and monoclonal antibody could both react with the native HmME 1 protein and rHmME 1 recombinant protein. The IFA results showed that HmME 1 was widely present in the cytoplasm of *H. meleagridis*, and the expression level in virulent strains was significantly higher than that in attenuated strains.

3. Immunoprotective effect evaluation of recombinant protein rHmME 1 of *H. meleagridis*

The recombinant protein was mixed with adjuvant and then emulsified to prepare subunit vaccine. The recombinant protein was divided into three dose immunization groups of 200, 100 and 50 µg/per chicken, and unimmunized challenged group, unimmunized unchallenged group and adjuvant control group were set up, with 10 SPF chickens in each group. Each immunization group was immunized at 5 d and 12 d. Each challenged group was challenged at 19 d via cloaca with 3×10^5 *H. meleagridis*. Then put down all groups after 12 d. The immunoprotective effect of was analyzed by morbidity, mortality, average weight gain, lesion score, humoral and cellular immunity level. The results showed that within immunization groups, the morbidity of recombinant protein 100 µg group was the lowest. There was no death of chickens in each group. The average weight gain of the recombinant protein 100 µg group was significantly higher than unimmunized challenged group ($p < 0.05$). The lesions in 100 µg immunization group were relatively mild while the cecal lesion score was significantly lower than the unimmunized challenged group ($p < 0.05$). Both the 200 µg and 100 µg immunization group can stimulate the high level of antibody. IFN- γ and IL-2 of the 200 µg and 100 µg immunization group were both increased significantly, and IL-4 showed a downward trend. Based on all above, the rHmME 1 100 µg group has the best immunoprotective effect.

Conclusion: The HmME 1 gene was cloned and expressed, and the rHmME 1 recombinant protein was about 46 kDa. It was located in the cytoplasm of *H. meleagridis*. The expression level in the virulent strain was significantly higher than that in the attenuated strain. The recombinant protein rHmME 1 has a certain immunoprotective effect.

Key word: *Histomonas meleagridis*; malic enzyme 1; prokaryotic expression; location; immunoprotective effect

符号说明

缩写符号	英文全称	中文名称
aa	amino acid	氨基酸
bp	base pair	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CDS	coding sequence	编码区序列
CK	cytokine	细胞因子
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
EB	ethyidium bromide	溴化乙锭
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
FCA	Freund's Complete Adjuvant	弗氏完全佐剂
FIA	Freund's Incomplete Adjuvant	弗氏不完全佐剂
<i>H. meleagridis</i>	<i>Histomonas meleagridis</i>	火鸡组织滴虫
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine	HAT 培养基
HT	Hypoxanthine-Thymidine	HT 培养基
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
IL	interleukin	白细胞介素
INF- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
McAB	monoclonal antibody	单克隆抗体
ME	malic enzyme	苹果酸酶
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
OD	optical density	光密度
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应

符号说明 (续)

缩写符号	英文全称	中文名称
RNA	ribonucleic acid	脱氧核苷酸
RT	reverse transcription	反转录
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SPF	specific pathogen free	无特定病原体
tris	tris hydrochloride	三氨基甲烷盐酸盐
U	active unit	酶活性单位
kDa	kilodalton	千道尔顿
L	Liter	升
mg	milligram	毫克
mL	milliliter	毫升
mmol	millimole	毫摩尔
mol/L	mol/litter	摩尔/升
nm	nanometer	纳米
r/min	rotation per minute	转/分
v	volt	伏
μg	microgramme	微克
μL	microliter	微升
μm	micrometer	微米

文献综述：组织滴虫病及其防治研究进展

火鸡组织滴虫 (*Histomonas meleagridis*, *H. meleagridis*) 是单尾滴虫科毛滴虫属的一种兼性厌氧的寄生原虫，能引起鸡形目禽类的组织滴虫病^[1]。火鸡组织滴虫主要寄生于火鸡、鸡、鹌鹑等禽类的肝脏和盲肠，导致病禽肝脏坏死表面形成火山口样坏死灶、盲肠肿大和排硫磺样粪便，因此该病又称盲肠肝炎 (Infectious enterohepatitis)，在发病后期病禽会出现血液循环障碍，导致头部呈紫黑色，又被称之为“黑头病” (Blackhead Disease)^[2]。该病主要侵害火鸡，虽然相较于火鸡，鸡对该病的易感性略低，但仍然对我国养鸡业造成严重的经济损失^[3,4]。多年来，禽类养殖企业一直使用化学药物治疗和预防组织滴虫病，如砷化物和硝基咪唑类药物^[5]。考虑到该类药物残留在肉蛋中有潜在的致癌风险，因此美国和欧盟等一些对于药品监管有严格要求的国家和地区出于对消费者的保护禁止食品动物使用该类药物^[6]。2002年4月我国发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》将硝基咪唑类药物列为食品动物禁用药^[7]。因此目前既无有效防治该病的药物，也无用于预防该病的商品化疫苗，再加上近年来随着生态养殖方式的推广，放养鸡群数量增多，组织滴虫病的流行将愈加严重^[2,4]。

1. 组织滴虫病的发现

组织滴虫病是由单尾滴虫科毛滴虫属的单细胞火鸡组织滴虫寄生于鸡形目禽类肝脏和盲肠中而引发的一种原虫病^[1]，组织滴虫病在其被发现之初被称为“黑头病”，因为在病情严重时，病禽头部发绀变黑而得名^[8]，因为该病主要侵害肝脏和盲肠，1895年，Smith^[9]把这种能引起肝脏和盲肠有特征性病变的禽类疾病命名为传染性盲肠肝炎。Tyzzer^[10]分离并观察发现该病原体有鞭毛和伪足，具有多形性，为区分该病原与其他阿米巴原虫，创建了组织滴虫属，将该病原命名为火鸡组织滴虫，将该病命名组织滴虫病。

2. 虫体形态特点

火鸡组织滴虫是归属于动物界、肉足鞭毛门、动鞭毛纲、毛滴虫目、单尾滴虫科、组织滴虫属的单细胞生物^[10]。火鸡组织滴虫在组织中形态为近圆形，大小 6~20 μm ，在 40℃时可形成伪足^[11]；在盲肠管腔中大小为 3~16 μm 具有单鞭毛，部分虫体可以观察到双鞭毛，在 37~40℃时可以看到鞭毛由于跳动引起虫体的“摇摆运动”^[12]。在大部分研究中，普遍认为火鸡组织滴虫具有两种形态，一是具有多形性的阿米巴阶段，二是具有鞭毛的单鞭毛阶段^[13]。在 Mielewczik 等^[14]的试验中在感染火鸡的粪便中检测到了疑似处于包囊阶段的火鸡组织滴虫，这种结构被推断为与抵抗恶劣环境有关。随后，Munsch 等^[15]用光学和电子显微镜观察到火鸡组织滴虫具有三种形态，阿米巴阶段虫体直径为 6~14 μm ，同时存在许多短伪足，虫体内可见一个细胞核和含淀粉的食物空泡，氢小体和高尔基体稀少；单鞭毛阶段虫体呈卵圆形，略伸长，有一根鞭毛，虫体内有典型的细胞器，如高尔基体、内质网、氢小体、细胞核等；包囊阶段虫体更小约为 4~14 μm ，具有双层膜或无定层结构，虫体内除核糖体之外还有许多糖原颗粒。Liebhart 等^[16]试验证实火鸡组织滴虫可以抵抗胃酸环境，使组织滴虫病经口腔感染获得理论依据。Zaragatzki 等^[17,18]对火鸡组织滴虫在不同环境下的存活能力进行探索，发现在极端酸性环境中（pH=2）火鸡组织滴虫仍能存活。在 40℃的基础上，每隔 30 min 降低 5℃，火鸡组织滴虫仍保持阿米巴状态的结构，数量和形状均未发生变化；每隔 120 min 降温 10℃，在 360 min 后有部分虫体进入用于抵挡外界恶劣环境的包囊结构；每隔 150 min 降温 15℃，也得到了类似的结果。当温度骤然降低到-4℃也会导致虫体出现包囊结构，而将虫体在无冷冻保护剂的情况下置于-22℃或-196℃，虫体未能出现包囊结构而死亡。

3. 传播途径和流行病学

火鸡组织滴虫的主要传播途径需要传播媒介的参与。多种线虫和节肢动物被发现为火鸡组织滴虫的传播媒介^[19]。异刺线虫作为禽类盲肠中常见的线虫，是火鸡组织滴虫最主要的传播媒介^[20]。火鸡组织滴虫寄生于异刺线虫的虫卵中，虫卵能在土壤环境中保存三年之久并在 150 周时仍保持传染性^[21-22]。Lund 等^[23]

研究发现，蚯蚓能够将土壤中的异刺线虫卵聚集于体内，同时保护卵化的异刺线虫幼虫不受外界恶劣环境的影响，被视为鸡异刺线虫的转运宿主。一旦携带感染阶段异刺线虫卵的蚯蚓被易感禽类采食，火鸡组织滴虫就会在异刺线虫幼虫蜕皮时被释放在鸡的肠道中^[24]。火鸡组织滴虫也可以通过水平传播的方式感染宿主，研究发现在不存在异刺线虫等传播媒介的情况下，火鸡组织滴虫依旧可以在易感禽群中水平传播^[25]。健康的易感禽泄殖腔接触到含有组织滴虫的病禽粪便时，虫体通过肠道逆蠕动进入盲肠而感染宿主^[26]。

有研究表明组织滴虫病多发生于春夏季，该病易在大雨过后流行，主要侵害 4~8 周龄火鸡或鸡，该病在火鸡中呈现高发病率和死亡率，部分火鸡群可达 100%，给欧美国家的火鸡饲养业造成巨大影响^[27]。虽然相较于火鸡，鸡对该病的易感性略低，但仍然对我国养鸡业造成严重的经济损失。2012 年 1 月至 2015 年 12 月扬州大学动物医院门诊接诊了 304 例疑似组织滴虫病的病例，其中确诊 276 例^[28]，对有详细记录的 69 例组织滴虫病病例资料的统计分析后发现，家禽中以当地草鸡最为易感，其病例占到总病例数的 88.4%，该病主要发生于放养和圈养的禽类，占总病例数的 98.6%，网上平养和笼养禽类的发病比例极低；发病鸡群中，发病率在 1.6%-100% 之间，平均发病率为 27.4%；大多病例死亡率在 1%-10%，最高可达 40%以上^[29]。

4. 临床症状、病理变化及诊断

组织滴虫病初期临床症状为被毛蓬乱、垂翅低头、步态不稳、厌食和精神萎靡，随后出现体重下降、腹泻，病禽排出硫磺样黄绿色的稀粪，部分病鸡后期因血液循环障碍鸡冠呈紫黑色^[30]，大部分鸡感染后基本不出现明显的临床症状，蛋鸡感染后产蛋率大幅下降，肉鸡感染后常表现为生长缓慢、体重减轻^[31,32]。感染禽类生产性能的降低给养禽业造成极大经济损失。在经泄殖腔接种虫体的研究中发现，感染后 6 天实验鸡出现首次死亡，感染后 13~15 天为病鸡死亡高峰期^[33]。

感染后 8 天左右，盲肠出现病灶，单侧或双侧盲肠出现病变，剖检可见盲肠壁有出血点，甚至出现弥漫性出血、溃疡和坏死^[34]。盲肠壁被虫体入侵后，盲肠壁增厚。来自盲肠粘膜的浆液性和出血性渗出物充满盲肠的管腔。黏膜碎

片、血清蛋白、血液和其他物质形成干酪样淡黄色核心并迫使盲肠壁扩张。盲肠壁的溃疡可能导致穿孔引发腹膜炎。感染后 10 天左右出现肝脏病变，肝脏肿大，有白色坏死点，严重病例会出现边缘清晰的火山口样凹陷坏死灶。病禽死亡原因可能是肝功能异常或腹膜炎或两者兼有^[35,36]。火鸡组织滴虫主要侵害肝脏和盲肠，引起盲肠炎和肝炎，发病中后期还会在腺胃、十二指肠、肾脏、法氏囊等器官出现病变，进而可能发展为全身性疾病^[37-39]。Dolka 等^[40]研究发现，病鸡的其他组织器官也会出现不同程度的病变情况，脾脏充血并出现米白色坏死灶；肺脏充血；肾脏呈浅棕色，输尿管内尿酸盐增多；小肠伴有出血性炎症等。戎杰等^[41]检测了患病鸡各组织的病料，系统描述了虫体在宿主器官中的分布规律，进一步确认了盲肠和肝脏为该寄生虫的主要靶器官，回肠、脾脏和肾脏等脏器也具有较高检出率。

组织滴虫病主要流行于散养或放养的鸡群中^[42]，该病的病变与部分原虫、细菌引起的病变相似度极高，因此流行病学资料、临床症状和病理变化可作为初步诊断的依据，进行进一步确诊还需要结合实验室诊断的方法，如虫体体外培养^[43,44]、电子显微镜观察^[45]、聚合酶链式反应（PCR）^[46]、酶联免疫吸附试验（ELISA）^[47]。进行虫体体外培养时应取疑似感染组织滴虫病鸡的新鲜肝脏组织并剪碎，加入用于体外培养火鸡组织滴虫的培养基中 40℃ 厌氧培养 5 天左右，在显微镜下观察虫体，从而诊断是否是火鸡组织滴虫。PCR 技术已经用于检测疑似感染火鸡组织滴虫的病料，可成功地检测出疑似组织滴虫病的病例，并且没有与病毒、细菌或其他被检测的原生动物发生交叉反应^[3]。Hauck 等^[48]对自然感染和人工感染的火鸡进行了更大规模的试验，盲肠、肝脏、脾脏、肾脏和大脑均呈火鸡组织滴虫 DNA 阳性。这些检测方法的特异性表明，它们将有助于诊断和流行病学调查，PCR 技术已经可以应用于生产实践，且在生产实践检测中发挥着重要作用。

5. 组织滴虫病防治策略

组织滴虫病是一种世界性流行的禽类原虫病。这种疾病会导致鸡群和火鸡群的发病和死亡，造成产蛋量下降，肉鸡增重缓慢等问题，给鸡和火鸡的养殖业造成严重经济损失^[27]，为了有效控制组织滴虫病，人们对许多化合物进行抗组织滴虫的试验，其中硝基咪唑、二甲硝唑、甲硝唑、奥硝唑和替硝唑可有效

抑制体外培养的火鸡组织滴虫生长^[5]。硝基咪唑的作用机制取决于咪唑环上的 5-硝基，这种物质被硝基咪唑还原酶还原为细胞内的多种活性中间体，从而破坏虫体 DNA^[49]。硝基咪唑的作用方式也取决于环上的 5-硝基官能团，它可以破坏寄生虫的 DNA^[50]。硝基咪唑类制剂可作为饲料添加剂，达到预防及治疗组织滴虫病的效果^[51]。砷化物也被用于防治火鸡组织滴虫病，其作用机制是干扰 DNA 的修复过程并使 DNA 低甲基化导致基因异常表达^[52]。研究显示砷化物能够减少动物的死亡，但是治愈后容易复发^[53,54]。考虑到上述药物在肉蛋中的残留物有潜在的致癌风险，会危害消费者健康^[55,56]，因此美国和欧盟等一些对于药品监管有严格要求的国家和地区出于对消费者的保护禁止食品动物继续使用该类药物^[6]。2002 年 4 月我国发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中也将上述药物列为食品动物禁用药^[7]。

研究发现，一些植物提取物的活性成分具有抗寄生虫和抗菌的作用^[57]，因此天然植物提取物受到畜牧业的关注。Feldberg 等^[58]发现大蒜素具有抑菌作用，由于体外培养火鸡组织滴虫时需要与细菌共培养，因此大蒜素也能抑制火鸡组织滴虫的感染效果；Grabensteiner 等^[59]发现香芹酚、肉桂油、含百里香和迷迭香的混合精油及皂苷对火鸡组织滴虫生长具有抑制作用，但上述植物提取物仅限于体外培养的虫体，当对火鸡组织滴虫进行体内抑制试验时并未发现对其具有明显的抑制感染或治疗作用^[60-62]。

随着能有效防治组织滴虫病的药物被禁用，而天然提取物用于治疗该病的效果并不理想，因此急需寻找其他方法预防组织滴虫病的流行。一些学者发现感染过火鸡组织滴虫的耐过鸡不再发生感染，从而萌生了开发疫苗的想法^[63]。在 1936 年，Tyzzer^[64]发现体外培养传代的虫株会出现毒力降低的情况，将传代致弱虫株以较低剂量免疫易感家禽，可以保护其免于发病。Bishop^[13]体外培养火鸡组织滴虫，传代一年左右获得了致弱虫株，通过动物试验证实其致病力明显下降，用虫株进行免疫保护试验结果表明该致弱虫株具有一定的保护效果。Ruff^[65]使用伽马辐射法获得火鸡组织滴虫致弱毒株，并通过泄殖腔攻虫感染火鸡，火鸡出现临床症状，但死亡率下降，证明经辐射的虫株已经成功致弱，但其未能保护火鸡群免于强毒株的感染，表明通过伽马辐射法获得的体外致弱株没有起到免疫保护效果。Libehart 等^[31,66]发现将体外致弱的虫株经口和泄殖腔感染鸡和火鸡，均具有免疫保护效果。Dwyer 等^[67]研究发现经过九周体外培养的

虫株致病力减弱，试验动物多数存活，但该致弱虫株经过连续几代体内培养后致病力逐渐恢复。然而部分研究发现将致弱的虫株感染火鸡后，从病变组织中重新分离虫体，再次感染火鸡，并没有出现毒力增强的情况^[68,69]。虽然试验证明传代致弱虫株确实具有免疫保护效果，目前致弱活疫苗是唯一可行的预防方法，但其具有制备过程较为繁琐，耗时耗力，成本高等缺点，且应用于生产中其毒力是否会返强尚无定论，因此仍需要进一步探索防治组织滴虫病的方法。

重组亚单位疫苗相较于弱毒活疫苗是一种更为安全的重组基因工程疫苗，是基于 DNA 重组技术，将病原微生物的保护性抗原基因导入特定受体并诱导表达，经分离纯化后加工制成的具有免疫原性的疫苗^[70,71]。有研究表明，球虫亚单位疫苗可以诱导宿主产生体液免疫和细胞免疫^[72]，具有免疫原性的蛋白随着虫体入侵宿主被宿主免疫系统识别，引起特异性免疫应答，这些蛋白往往与寄生虫的毒力相关，目前与原虫毒力相关的蛋白大部分位于虫体表面，往往与虫体粘附、入侵宿主组织相关^[73]，比如顶膜抗原^[74]、半胱氨酸蛋白酶^[75]、微线体蛋白^[76]等表面抗原，除此之外还有一些胞质内蛋白，比如 α -actinin^[77]、甘油醛磷酸脱氢酶^[78]、烯醇化酶^[79]等。

但目前对于火鸡组织滴虫内具有免疫原性蛋白的相关研究少之又少。本课题组前期通过差异蛋白组学火鸡组织滴虫强毒株与传代致弱毒株之间的差异表达蛋白进行了筛选，发现了部分与毒力相关的蛋白，可以作为疫苗研制的候选靶标。

6. ME 蛋白研究进展

苹果酸酶 (Malic enzyme, ME) 是一种在自然界中广泛存在的氧化脱羧酶，具有重要的生物学功能^[80]。研究表明，苹果酸酶有三种亚型，根据其在细胞内分布和辅酶特异性分别命名为：胞质 NADP 依赖性苹果酸酶 (ME 1)，线粒体 NAD (P) 依赖性苹果酸酶 (ME 2) 和线粒体 NADP 依赖性苹果酸酶 (ME 3)^[81]。其中 ME 1 参与调节还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 和脂肪酸合成，在维持细胞氧化还原状态、调节细胞代谢和合成生物分子过程中发挥重要作用，因参与为长链脂肪酸或类固醇的生物合成提供 NADPH 而被归类为脂肪合成酶^[82]。Goodridge 等^[83]发现 ME 1 催化苹果酸进行可逆的氧化脱羧反应，在 NADP⁺还原成 NADPH 的过程中生成二氧化碳和丙酮酸，该反应还需要一个

二价金属离子 (Mn^{2+} 或 Mg^{2+}) 来催化。Chang 等^[84]发现 ME 1 蛋白结构存在两个功能结构域, 一是苹果酸酶 N 端的结构域, 另一个是与 NAD(P)结合的特征性基序 NADP-Rossmann 折叠结构域。大多数 ME 1 在催化过程中都会发生开放到闭合的结构转变, 在开放形式时酶的活动中心充分暴露于溶剂中, 是底物结合与释放产物所必须的形式; 当二价阳离子与底物结合后转变为封闭形式, 因此 ME 1 的封闭形式可能是具有催化能力时的构象。在张映瞳等^[85]的研究中发现, 温度、pH、金属离子和中间产物均能对 ME 1 的酶活性产生影响, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对 ME 1 酶活力具有良好的激活作用, 随着金属离子浓度增加酶活逐渐提高, 达到一定浓度后酶活趋于平缓, 而 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 会抑制 ME 1 的酶活性。

Hrdý 等^[86]研究发现胎儿三毛滴虫的 ME 1 存在于胞质中, 大小为 41.5 kDa, 在该研究中不仅证实了 ME 1 的定位存在于胞质中与定位于氢化酶体中的 ME 2 有所不同, 还发现在具有甲硝唑抗性的虫体内 ME 1 表达量升高而 ME 2 表达量大幅降低, 这种变化或与虫株获得耐药性有关, 也可能是由于氢化酶体中的酶类丢失产生的代谢变化。Dolezal 等^[87]研究表明与迄今为止研究的所有真核生物不同, 阴道毛滴虫只具有两种苹果酸酶, 它们属于不同的蛋白质组, 在结构和功能上存在差异。通过系统发育分析, 阴道毛滴虫中这两种苹果酸酶的进化起源不同, 一种是主要存在于阴道毛滴虫细胞质中的 NADP 特异性苹果酸酶, 另一种是阴道毛滴虫氢化酶体苹果酸酶。阴道毛滴虫 ME 1 大小为 42 kDa, 将其纯化后制备多克隆抗体后发现并不会与氢化酶体苹果酸酶发生交叉反应, 将其与 NCBI 数据库中其他蛋白进行比对, 发现其与原核生物具有高同源性。Field 等^[88]对溶组织阿米巴的 ME 1 研究中也显示其与古细菌同源性较高, 研究者们认为出现这种现象的原因是由于抗原转移。Walter 等^[89]发现苏拉明对盘尾丝虫、犬心丝虫的 ME 有抑制作用, ME 可以作为治疗丝虫病的重要靶点。Ranzani 等^[90]研究发现 ME 对维持克氏锥虫体内 NADPH 水平具有重要意义, NADPH 在寄生虫生活过程中起着至关重要的作用, 是还原等价物的来源, 能清除内源性代谢反应导致的活性氧 (ROS) 或宿主细胞产生的外源性免疫损伤^[91], 因此 ME 是治疗克氏锥虫病很有前景的药物靶点。研究发现, ME 与粘附蛋白有高同源性, 在粘附蛋白上具有 ME 结合位点, 这种高同源性或许与寄生虫的免疫逃避机制有关^[92-93]。

7. 本研究的目的与意义

目前对于 ME 1 的研究主要集中于细胞代谢和基因起源, 对该蛋白抗原性的研究少之又少, 本课题组前期通过对火鸡组织滴虫强毒株和传代致弱毒株的差异蛋白组学比较发现, ME 1 在强毒株表达量明显高于弱毒株, 这种差异表达或与虫株的毒力相关。本研究克隆表达了 ME 1 蛋白, 并对其进行了抗原性分析, 制备了鼠多克隆抗体和单克隆抗体并对单抗进行了亚类鉴定和虫体内天然蛋白定位。为进一步探索 ME 1 蛋白的免疫保护作用, 制备了重组亚单位疫苗, 免疫鸡群后评价了其免疫保护效力, 为进一步研究抗火鸡组织滴虫病亚单位疫苗奠定了基础。

参考文献

- [1] Lotfi A R, Abdelwhab E M, Hafez H M. Persistence of *Histomonas meleagridis* in or on Materials Used in Poultry Houses[J]. Avian Dis, 2012, 7(1): e72-e73.
- [2] Liebhart D, Ganas P, Sulejmanovic T. Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy[J]. Avian Pathol, 2017, 46(1):1-18.
- [3] Hafez H M, Hauck R, Luschow D, et al. Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis[J]. Avian Dis, 2005, 49(3): 366-370.
- [4] Xu J J, Qu C B, Guo P, et al. Epidemic Characteristics of Clinical Histomoniasis in Chicken Flocks in Eastern China[J]. Avian Dis, 2018, 62(2): 189-194.
- [5] Hu J H, McDougald L R. The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens[J]. Vet Parasitol, 2004, 121(3-4): 233-238.
- [6] Baynes R E, Dedonder K, Kissell L, et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 88, 112-122.
- [7] 中国农业部 193 号公告. 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单 [S].
- [8] Cushman S. An infectious disease of turkeys[R]. In: Seventh Annual Report of the Rhode Island Agricultural Experimental Station, 1894: 199-201.
- [9] Smith T. An infectious disease among turkeys caused by Protozoa (infectious

- entero-hepatitis)[J]. *Bur Anim Ind Bull*, 1895, 8: 3-27.
- [10] Tyzzer E E. Observations on the Transmission of "Blackhead" in Turkeys.-The Common Fowl as a Source of Infection.[J]. *J Med Res*, 1920, 41(2): 219-237.
- [11] Tyzzer E E. Developmental Phases of the Protozoon of "Blackhead" in Turkeys[J]. *J Med Res*, 1919, 40(1): 1-30.
- [12] Honigberg B M, Bennett C J. Lightmicroscopic observations on structure and division of *Histomonas meleagridis* (Smith)[J]. *J Protozool* 1970, 18(4): 687-700.
- [13] Bishop A. *Histomonas meleagridis* in domestic fowls (*Gallus gallus*) cultivation and experimental infection[J]. *Parasitology*, 1938, 30(2): 181-194.
- [14] Mielewczik M, Mehlhorn H, Al-Quraishy S, et al. Transmission electron microscopic studies of stages of *Histomonas meleagridis* from clonal cultures[J]. *Parasitol Res*, 2008, 103(4): 745-750.
- [15] Munsch M, Lotfi A, Mohammed H H, et al. Light and transmission electron microscopic studies on trophozoites and cyst-like stages of *Histomonas meleagridis* from cultures[J]. *Parasitol Res*, 2009, 104(3): 683-689.
- [16] Liebhart D, Hess M. Oral infection of turkeys with *in vitro* cultured *Histomonas meleagridis* results in high mortality[J]. *Avian Pathol*, 2009, 38(3): 223-227.
- [17] Zaragatzki E, Hess M, Grabensteiner E, et al. Light and transmission electron microscopic studies on the encystation of *Histomonas meleagridis*[J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(4): 977-983.
- [18] Zaragatzki E, Mehlhorn H, Abdel-Ghaffar F, et al. Experiments to produce cysts in cultures of *Histomonas meleagridis* the agent of histomonosis in poultry[J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(4): 1005-1007.
- [19] Frank J F. A note on the experimental transmission of enterohepatitis of turkeys by arthropods[J]. *Can J Comp Med Vet Sci* 1953, 17(5), 230-231.
- [20] Graybill H W. The incidence of blackhead and occurrence of *Heterakis papillosa* in a flock of artificially reared turkeys[J]. *J Exp Med*, 1921, 33(5), 667-673.
- [21] Farr M M. Further observations on survival of the protozoan parasite, *Histomonas meleagridis*, and eggs of poultry nematodes in feces of infected birds[J]. *Cornell Vet*, 1961, 51: 3-13.

- [22] Lund E E. Factors influencing the survival of *Heterakis* and *Histomonas* on soil [J]. *J Parasitol*, 1960,46: 38-38.
- [23] Lund E E, Wehr E E, Elli D J. Earthworm transmission of *Heterakis* and *Histomonas* to turkeys and chickens[J]. *J Parasitol*, 1966, 52(5): 899-902.
- [24] Fine P E. Quantitative studies on *Heterakis gallinarum* infections in the common fowl, *Gallus gallus* L[J]. *J Helminthol*. 1975,49(4):229-43.
- [25] Hu J H, McDougald L R. Direct Lateral Transmission of *Histomonas meleagridis* in Turkeys[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(2): 489-492.
- [26] Hu J H, Fuller L, McDougald L R. Infection of Turkeys with *Histomonas meleagridis* by the Cloacal Drop Method[J]. *Avian Dis*, 2004, 48: 746-750.
- [27] McDougald L R. Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review[J]. *Avian Dis*, 2005, 49(4): 462-476.
- [28] Xu J J, Qu C B, Guo P. Molecular characterization of *Histomonas meleagridis* in clinical samples of chickens from Eastern China[J]. *Thai J Vet*, 2016, 46(3):355-361.
- [29] 曲昌宝. 禽组织滴虫病的流行病学调查及其分子生物学诊断方法的建立与应用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [30] Hess M, Liebhart D, Bilic I, et al. *Histomonas meleagridis*—New insights into an old pathogen[J]. *Vet Parasitol*, 2015, 208(1-2): 67-76.
- [31] Liebhart D, Sulejmanovic T, Grafl B, et al. Vaccination against histomonosis prevents a drop in egg production in layers following challenge[J]. *Avian Pathol*, 2013, 42(1): 79-84
- [32] Hess M, Liebhart D, Grabensteiner E, et al. Cloned *Histomonas meleagridis* passaged *in vitro* resulted in reduced pathogenicity and is capable of protecting turkeys from histomonosis[J]. *Vaccine*, 2008, 26(33): 4187-4193.
- [33] Hauck R, Hafez H M. Experimental infections with the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*: A review (Review)[J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(1): 19-34.
- [34] Callait-Cardinal M P, Leroux S, Venereau E, et al. Incidence of histomonosis in Turkeys in France since the bans of dimetridazole and nifursol[J]. *Vet Rec*, 2007, 161(17): 581-585.

- [35] McDougald L R, Fuller L. Blackhead disease in turkeys: Direct transmission of *Histomonas meleagridis* from bird to bird in a laboratory model. *Avian Diseases*, 2005,49, 328-331.
- [36] Popp C, Hauck R, Balczulat S, et al. Recurring histomonosis on an organic farm[J]. *Avian Dis*, 2011, 55(2): 328-330.
- [37] Huber K, Reynaud M C, Callait M P, et al. *Histomonas meleagridis* in Turkeys: Dissemination Kinetics in Host Tissues After Cloacal Infection[J]. *Poultry Sci*, 2006, 85(6): 1008-1014.
- [38] 孔令明, 糕振男, 郭平, 等. 黄羽肉鸡实验性感染火鸡组织滴虫后体内虫体的动态分布[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41 (7): 755-758.
- [39] Senties-Cué G, Chin R P, Shivaprasad H L. Systemic Histomoniasis Associated with High Mortality and Unusual Lesions in the Bursa of Fabricius, Kidneys, and Lungs in Commercial Turkeys[J]. *Avian Dis*, 2009, 53(2): 231-238.
- [40] Dolka B, Żbikowski A, Dolka I, et al. Histomonosis - an existing problem in chicken flocks in Poland[J]. *Vet Res Commun*, 2015, 39(3): 189-195.
- [41] 戎杰, 孔令明, 陈乔光, 等. 临床疑似病例中火鸡组织滴虫的检测及其在脏器分布规律[J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (01): 113-116.
- [42] 秦建华, 张龙现. *动物寄生虫病学*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 307-308.
- [43] Bayon H P, Bishop A. Cultivation of *Histomonas meleagridis* from the Liver Lesions of a Hen[J]. *Nature*, 1937, 139(3513): 370-371.
- [44] Dwyer D M. An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*[J]. *J Parasitol*, 1970, 56(1): 191-192.
- [45] Schuster F L. Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, a Parasitic Amebo-Flagellate[J]. *The J Parasitol*, 1968, 54(4): 725-737.
- [46] Huber K, Chauve C, Zenner L. Detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence[J]. *Vet Parasitol*, 2005, 131(3-4): 311-316.
- [47] Windisch M, Hess M. Establishing an indirect sandwich enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) for the detection of antibodies against

- Histomonas meleagridis* from experimentally infected specific pathogen-free chickens and turkeys[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 161(1-2): 25-30.
- [48] Hauck R, Luschow D, Hafez H M. Detection of *Histomonas meleagridis* DNA in different organs after natural and experimental infections of meat turkeys[J]. *Avian Dis*, 2006, 50(1): 35-38.
- [49] Xi J, Tang S S, Chen Q, et al. Furazolidone induced oxidative DNA damage via up-regulating ROS that caused cell cycle arrest in human hepatoma G2 cells[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 201(3): 205-212.
- [50] López Nigro H M, Carballo M A. Genotoxicity and cell death induced by tinidazole (TNZ)[J]. *Toxicol Lett*, 2008, 180(1): 46-52.
- [51] Lindquist W D. Some effects of paromomycin sulfate on blackhead in turkeys[J]. *Am J Vet Res*, 1962, 23(96): 1053-1056.
- [52] Cobo J M, Castineira M. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glycemic control: clues from chronic supplementation with Cr³⁺ or As³⁺ to male Wistar rats[J]. *Nutrition*, 1997, 13(11-12): 965-970.
- [53] Sautter J H, Pomeroy B S. Chemotherapy of experimental histomoniasis (enterohepatitis) of turkeys[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1950, 116(879): 436-439.
- [54] Bowen T E, Sullivan T W, Grace O D. Effect of cupric sulfate on the prophylactic efficacy of three arsonic acid compounds against histomoniasis in young turkeys[J]. *Poult Sci*, 1971, 50(3): 861-866.
- [55] Abernathy C O, Liu Y P, Longfellow D, et al. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues[J]. *Environ Health Perspect*, 1999, 107(7): 593-597.
- [56] Zolla L, Timperio A M. Involvement of active oxygen species in protein and oligonucleotide degradation induced by nitrofurans[J]. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83(2): 166-175.
- [57] Bradley R E, Reid W M. *Histomonas meleagridis* and several bacteria as agents of infectious enterohepatitis in gnotobiotic turkeys[J]. *Exp Parasitol*, 1966, 19(1): 91-101.
- [58] Feldberg R S, Chang S C, Kotik A N, et al. *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1988, 32(12):

1763-1768.

- [59] Grabensteiner E, Arshad N, Hess M. Differences in the *in vitro* susceptibility of mono-eukaryotic cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp.* to natural organic compounds[J]. Parasitol Res, 2007, 101(1): 193-199.
- [60] Van Der Heijden H M, Landman W J. *In vivo* effect of herbal products against *Histomonas meleagridis* in turkeys[J]. Avian Pathol, 2008, 37(1): 45-50.
- [61] Grabensteiner E, Liebhart D, Arshad N, et al. Antiprotozoal activities determined *in vitro* and *in vivo* of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp*[J]. Parasitol Res, 2008, 103(6): 1257-1264.
- [62] Hafez H M, Hauck R. Efficacy of a herbal product against *Histomonas meleagridis* after experimental infection of turkey poults[J]. Arch Anim Nutr, 2006, 60(5): 436-442.
- [63] Kendall S B. Some Factors Influencing Resistance to Histomoniasis in Turkeys[J]. Vet J, 1957, 113(10): 435-439.
- [64] Tyzzer E E. A study of immunity produced by infection with attenuated culture-strains of *Histomonas meleagridis*[J]. J Comp Pathol Ther, 1936, 2014(49): 285-303
- [65] Ruff M D, Hansen M F. Effects of gamma radiation on the pathogenicity of *Histomonas meleagridis*[J]. Avian Dis, 1970, 14(4): 646-653.
- [66] Liebhart D, Windisch M, Hess M. Oral vaccination of 1-day-old turkeys with *in vitro* attenuated *Histomonas meleagridis* protects against histomonosis and has no negative effect on performance[J]. Avian Pathol, 2010, 39(5): 399-403.
- [67] Dwyer D M, Honigberg B M. Effect of certain laboratory procedures on the virulence of *Histomonas meleagridis* for turkeys and chickens[J]. J Parasitol, 1970, 56: 694-700.
- [68] Nguyen Pham A D, De Gussem J K, Goddeeris B M. Intracloacally passaged low-virulent *Histomonas meleagridis* protects turkeys from histomonosis[J]. Vet Parasitol, 2013, 196(3-4): 307-313.

- [69] Sulejmanovic T, Liebhart D, Hess M. *In vitro* attenuated *Histomonas meleagridis* does not revert to virulence, following serial *in vivo* passages in turkeys or chickens[J]. *Vaccine*, 2013, 31(46): 5443-5450.
- [70] 叶瑞贤, 张锡宝. 疫苗的发展历史[J]. *皮肤科学通报*, 2020, 37 (04): 329-335+1.
- [71] 汪梦竹, 蒲飞洋, 赵泽阳等. 新型疫苗的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (09): 141-147.
- [72] Arafat N, Abbas I. Coccidia of Japanese Quail: From Identification, Prevalence, Infection, and Immunization[J]. *J Parasitol*, 2018, 104(1): 23-30.
- [73] Clark E L, Macdonald S E, Themozhi V, et al. Cryptic Eimeria genotypes are common across the southern but not northern hemisphere[J]. *Int J Parasitol*, 2016, 46(9): 537-544.
- [74] Remarque E J, Faber B W, Kocken C H, et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review[J]. *Trends Parasitol*, 2008, 24(2): 74-84.
- [75] Chaudhry O A, Petri Jr W A. Vaccine prospects for amebiasis[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(5): 657-668.
- [76] Dzik J M. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization[J]. *Acta Biochim Pol*, 2006, 53(1): 33-64.
- [77] Addis M F, Rappelli P, Pinto De Andrade A M, et al. Identification of *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin as the most common immunogen recognized by sera of women exposed to the parasite[J]. *J Infect Dis*, 1999, 180(5): 1727-1730.
- [78] Bruno S, Margiotta M, Pinto A, et al. Selectivity of 3-bromo-isoxazoline inhibitors between human and *Plasmodium falciparum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(12): 2654-2659.
- [79] Beanan M J, Bailey G B. The primary structure of an Entamoeba histolytica enolase[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, 69(1): 119-121.
- [80] Gourdon P, Baucher M F, Lindley N D, et al. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(7): 2981-2987.
- [81] 罗娅, 齐先梅, 王婧. 苹果酸酶 1 及其对疾病调控的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2021, 52 (5): 181-186.

- [82] Yu H F, Duan C C, Yang Z Q, et al. Malic enzyme 1 is important for uterine decidualization in response to progesterone/cAMP/PKA/HB-EGF pathway [J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 3820-3837.
- [83] Goodridge A G, Klautky S A, Fantozzi D A, et al. Nutritional and hormonal regulation of expression of the gene for malic enzyme[J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1996, 52: 89-122.
- [84] Chang G G, Tong L. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(44): 12721-12733.
- [85] 张映瞳, 陈海琴, 宋元达等. 卷枝毛霉中苹果酸酶同工酶 V 的酶学性质[J]. *微生物学报*, 2016, 56 (02): 309-316.
- [86] Hrdý I, Mertens E, Van Schaftingen E. Identification, purification and separation of different isozymes of NADP-specific malic enzyme from *Tritrichomonas foetus*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 57(2): 253-60.
- [87] Dolezal P, Vanacova S, Tachezy J, et al. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins[J]. *Gene*, 2004, 329: 81-92.
- [88] Field J, Rosenthal B, Samuelson J. Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 38(3): 446-455.
- [89] Walter R D, Albiez E J. Inhibition of NADP-linked malic enzyme from *Onchocerca volvulus* and *Dirofilaria immitis* by suramin[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1981,4(1-2): 53-60
- [90] Ranzani A T, Nowicki C, Wilkinson S R, et al. Identification of specific inhibitors of *Trypanosoma cruzi* malic enzyme isoforms by target-based HTS[J]. *SLAS Discov*, 2017, 22(9): 1150-1161.
- [91] Keauth-Siegel R L, Comini M A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(11): 1236-1248.
- [92] 姜夕玥. 鸽毛滴虫粘附蛋白 AP65 的克隆、鉴定及表面定位[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.

- [93] Alderete J F, Millsap K W, Lehker M W, et al. Enzyme on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity[J]. Cell Microbiol, 2001, 3(6): 359-370.

第一章 火鸡组织滴虫 ME 1 基因的克隆表达与酶活性鉴定

火鸡组织滴虫 (*Histomonas meleagridis*, *H. meleagridis*) 是单尾滴虫科毛滴虫属的一种兼性厌氧的寄生原虫, 能引起鸡形目禽类的组织滴虫病。虫体主要寄生于火鸡、鸡、鹌鹑等禽类的肝脏和盲肠, 以肝脏坏死表面形成火山口样坏死灶、盲肠肿大和病禽排硫磺样粪便为特征^[1]。长期以来, 硝基咪唑类化学药物预防和治疗组织滴虫病效果较好, 但出于对食品安全的要求, 包括我国在内的许多国家已经禁止使用该类药物^[2]。因此目前既无有效预防该病的饲料添加剂, 也无用于防治该病的商品化疫苗, 再加上近年来随着生态养殖方式的推广, 放养鸡群数量增多, 组织滴虫病的流行将愈加严重, 对我国养鸡业造成严重的经济损失^[3-4]。

苹果酸酶 (Malic enzyme, ME) 在自然界中广泛存在, 具有重要的生物学功能^[5]。研究表明, 苹果酸酶具有三种亚型, 根据其在细胞内分布和辅酶特异性分别命名为: 胞质 NADP 依赖性苹果酸酶 (ME 1), 线粒体 NAD (P) 依赖性苹果酸酶 (ME 2) 和线粒体 NADP 依赖性苹果酸酶 (ME 3) ^[6]。其中 ME 1 参与调节还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 和脂肪酸合成^[7]。本课题组前通过对火鸡组织滴虫强毒株和传代致弱毒株的差异蛋白组学发现, 在强毒株中 ME 1 基因的表达量明显高于传代致弱毒株, 这种差异可能与虫株的毒力密切相关 (本课题组研究结果, 尚未发表)。因此, 本篇论文选取 ME 1 进行了克隆、原核表达和酶活性鉴定, 旨在为进一步开展 ME 1 的功能分析、发掘潜在药物靶点和基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株、质粒与菌株

火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株, 由本实验室分离并冻存于液氮中。虫株复苏后将虫体置于每 10 mL 含 90 % M199 培养基、10 % 马血清、11 mg 米粉的培养基

中，在 40℃ 下厌氧培养并进行传代。克隆宿主菌 Trans 5α、表达宿主菌 BL21 (DE3) 购自北京全式金公司；原核表达载体 pET28a(+) 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂：M199 培养基、马血清，购自 Gibco 公司；米粉、IPTG，购自 Sigma 公司；高保真 Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、2×PrimeSTAR Max Premix 高保真酶和 DL5000 DNA Marker 等购自 TaKaRa 公司；RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自南京诺唯赞生物科技公司；限制性内切酶 *Not* I 和 *Bam*H I、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物公司；抗生素卡那霉素、Ni-NTA 亲和层析纯化柱购自金斯瑞生物科技公司；标准低分子量蛋白 Marker、预染蛋白 Marker 购自 Thermo Fisher 公司；Anti-6×His 标签小鼠单抗和 HRP 标记的兔抗鼠 IgG，购自 BBI 公司；NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒，购自北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器：T100 型 PCR 仪、GelDoc XR Biorad 凝胶成像系统、PowerPacbasic 型 SDS PAGE 电泳仪，购自 BIO-RAD 公司；VCX-130 型超声波破碎仪购自 Sonics 公司；NanoDrop2000 超微量核酸蛋白测定仪购自 Thermo 公司；Synergy 2 多功能微孔板检测仪，购自 Bio Tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据本课题组对火鸡组织滴虫蛋白组测序结果中筛选到的强弱毒株差异表达的 HmME 1 基因序列，利用 Primer 5.0 软件设计 1 对特异性引物，上游引物为：5'-CGGGATCCATGACTAATTACGCTCAAGAATCACT-3'，下划线部分为为 *Bam*H I 限制性内切酶的酶切位点；下游引物为：5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAAATTCTTGCAACTCCAGACT-3'，下划线部分为 *Not* I 限制性内切酶的酶切位点，片段预计扩增大小为 1182 bp，引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2.2 火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株虫体总 RNA 的提取及 cDNA 合成

使用 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒，提取火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株虫体总 RNA，并用 NanoDrop2000/2000c 测定浓度。按照反转录试剂盒说明书操作，将总 RNA 反转录成 cDNA 为模板。反转录总体积 20 μL，反应体系见表 1-1。反应步骤为：37℃ 45 min；85℃ 5 s。

表 1-1 逆转录反应体系

Table 1-1 The mixture of reverse transcription

试剂名称	体积 (μL)
10 \times RT Mix	2.00
HiScript III Enzyme Mix	2.00
Oligo (dT) 20VN	1.00
RNase-free ddH ₂ O	12.00
Total RNA (100 ng/ μL)	3.00

1.2.3 扩增目的基因

采用上述引物, 通过 PCR 扩增 HmME 1 基因, 反应体系见表 1-2, 反应条件为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5min; 变性 98 $^{\circ}\text{C}$ 10s; 退火 58 $^{\circ}\text{C}$ 5s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 30 次循环, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min。用 1.0%琼脂糖凝胶进行核酸电泳, 检测扩增产物。将 PCR 产物经北京全式金生物公司胶回收试剂盒回收后, 由北京六合华大基因科技股份有限公司测序鉴定。

表 1-2 PCR 反应体系

Table 1-2 The reaction system of the PCR

试剂名称	体积 (μL)
PrimeSTAR Max Premix (2X)	25.00
Forward Primer (10 μM)	2.00
Reverse Primer (10 μM)	2.00
ddH ₂ O	20.00
JSYZ-F9 cDNA	1.00

1.2.4 目的基因序列分析

将测序获得的基因序列与课题组对火鸡组织滴虫蛋白组测序结果中 ME 1 基因序列比对后提交 GenBank。对获得的 HmME 1 进行信息学分析, 利用 DNASTar Lasergene v7.1 中 Megalign 软件, 使用 Clustal W 算法, 对 HmME 1 氨基酸序列进行同源性分析。将 HmME 1 的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析, 利用 MEGA5.0 软件构建 HmME 1 基因编码的氨基酸序列遗

传进化树，Bootstrap 值为 1000，分析 HmME 1 的遗传进化关系。

1.2.5 构建原核表达载体

采用 *Not* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶对 PCR 产物和表达载体 pET28a(+) 进行双酶切后，将酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行核酸电泳，并使用北京全式金生物公司胶回收试剂盒回收。使用 T4 DNA 连接酶连接二者，构建重组表达质粒并转化至表达菌 BL21 (DE3) 中，通过卡那霉素抗性筛选阳性单克隆菌落。挑取单菌落扩大培养后，北京全式金生物公司的质粒提取试剂盒按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒 pET28a(+)-HmME 1 并对其进行 *Not* I、*Bam*H I 双酶切鉴定，将酶切结果符合预期大小的菌落送北京六合华大有限公司测序进一步验证。

1.2.6 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

将保种的测序结果正确的阳性单克隆菌株取出 30 μ L 接种到 3 mL 含有卡那霉素 (100 μ g/mL) LB 培养液，37 $^{\circ}$ C，220 r/min 振荡培养过夜复苏，取 30 μ L 新鲜菌液接种到 3 mL 含有卡那霉素 (100 μ g/mL) LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C，220 r/min 震荡培养 4 h，加入终浓度为 0.3 mM 的 IPTG，37 $^{\circ}$ C，220 r/min 诱导表达 4 h。同时设置 pET-28a(+) 空质粒转化菌和未转化的 BL21(DE3) 作为对照组。取 1 mL 诱导菌，PBS 洗涤 3 次，500 μ L PBS 重悬菌体，取 30 μ L 重悬液，加入 10 μ L 4 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液并煮沸 12 min，12000 r/min 离心 4 min，取 8 μ L 上清上样，12% SDS-PAGE 电泳检测表达情况。

取 1 mL 诱导菌液，离心后沉淀用 PBS 洗涤 3 次，500 μ L PBS 重悬菌体，冰浴超声裂解 (功率 30%，超声 2 s，间歇 3 s，超声时长 2 min)，4 $^{\circ}$ C 条件下 12000 r/min 离心 10 min，取出上清，沉淀用 500 μ L PBS 重悬，上清和沉淀煮样后进行 SDS-PAGE 电泳，确定重组蛋白的可溶性。

1.2.7 重组蛋白的 Western blot 鉴定

将诱导的阳性重组菌 pET-28a(+)-HmME 1/BL21、pET-28a(+)/BL21 和 BL21 菌体，用 PBS 洗涤 3 次，加入蛋白上样缓冲液后煮沸，12000 r/min 离心 4 min，取 8 μ L 上清上样，进行 12% SDS-PAGE 电泳，并转印至 NC 膜上。将 NC 膜置于含 3% BSA 的封闭液中，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。以 6 \times HIS 标签单克隆抗体 (按 1:5000 倍稀释) 为一抗，37 $^{\circ}$ C 摇床 40 r/min 作用 1.5 h，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (按 1:20000 倍稀释) 为二抗，37 $^{\circ}$ C 摇床 40 r/min 作用 1 h，PBST 洗涤 6 次，每次 5 min。滴加 ECL 显色，用化学发光成像系统观察结果并扫描拍照，进行 Western blot 分析。

1.2.8 重组蛋白的纯化

- (1) 取大量诱导表达的重组菌 200 mL, 用 PBS 洗涤 3 次;
 - (2) 将洗涤后得到的菌体收集至 50 mL 离心管中, 加入 8 mL LE Buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 9.0), 重悬菌体;
 - (3) 在冰浴条件下超声裂解菌体 (功率 30%, 超声 2 s, 间隔 3 s, 超声时长为 18 min), 将目的蛋白释放;
 - (4) 将超声裂解的菌液于 4℃ 条件下离心, 12000 r/min, 10 min, 收集上清;
 - (5) 将所得上清转移至含有 6×HIS 标签的 Ni-NTA 亲和纯化层析柱中, 在 4℃ 条件下结合 30 min, 每 5 min 将 Ni-NTA 亲和纯化层析柱颠倒摇匀, 以便重组蛋白与 Ni-NTA 充分结合;
 - (6) 使用 3 倍层析柱体积的 Washing Buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazole, pH 9.0) 洗涤层析柱, 重复 5 次;
 - (7) 用三倍层析柱体积的 Elution Buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 9.0) 洗脱蛋白, 收集洗脱液, 重复 3 次;
- (6) 用 A280 紫外光吸收法测定收集的洗脱液中的重组蛋白浓度。
- 纯化过程中收集流穿液和纯化后的蛋白, 加入蛋白上样缓冲液煮沸 12 min, 用 12% SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白的纯化效果。

1.2.9 重组蛋白的酶活性测定

按照北京索莱宝科技有限公司的 NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒的说明书配制工作液, 将纯化后所得到的 rHmME 1 作为样本, 并设置一个无关蛋白作为对照组, 将工作液和重组蛋白加入 96 孔 UV 板中, 通过酶标仪测定重组蛋白的酶活性。

单位的定义: 将每 mL 纯化所得的蛋白在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{苹果酸酶酶活性(U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T$$

ΔA : 在 37℃ 条件下, 340nm 波长记录初始吸光度 A1 和反应 1 min 后的吸光度 A2, $\Delta A = A2 - A1$; $V_{\text{反总}}$: 反应总体系体积, 3×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol/cm; d : 比色皿光径, 0.6 cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; T : 反应时间, 1min; 10^9 : 单位换算系数, 1 mol = 10^9 nmol。

1.2.10 重组蛋白的酶活性去除

使用加热的方法将重组蛋白的酶活性去除，选取了 50℃、55℃、60℃三个温度，分别加热 10~20 min 后再次利用试剂盒测定其酶活性。

1.2.11 数据处理与分析

用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件对在 10、15、20 三个加热时长下的不同加热温度的处理组中重组蛋白的酶活性改变进行一维方差描述性统计分析，以 ($p < 0.05$) 作为显著性判断标准。

2. 结果

2.1 目的基因 HmME 1 的扩增

根据本课题组对火鸡组织滴虫差异蛋白组测序结果中筛选到的强弱毒株差异表达的 HmME 1 基因序列，设计 1 对特异性引物，经 RT-PCR 后扩增得到的目的基因条带大小约为 1182bp，与预期大小相符（图 1-1）。

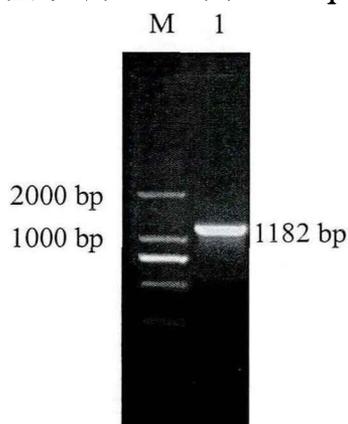


图 1-1 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1-1 The products of RT-PCR

M: DL2000 DNA Marker;

1: RT-PCR 产物

M: DL2000 DNA Marker;

1: The products of RT-PCR

2.2 HmME 1 基因序列及遗传进化分析

HmME 1 基因测序分析后提交至 GenBank (收录号: MW400608.1)，生物信息学分析结果显示，HmME 1 基因编码区长 1182 bp，编码 394 个氨基酸。利用 MEGA5.0 软件采用邻接法 (Neighbor joining) 构建 HmME 1 基因编码的氨基酸遗传进化树，结果显示，本研究获得的火鸡组织滴虫 HmME 1 (MW400608.1) 与已报道的火鸡组织滴虫 ME 1 (KAH0795472.1、KAH0790118.1、KAH0792359.1) 位于同一个分支内；对其氨基酸序列进行分析，同源性分别为 100%、99.5%、98.5%，并且与胎儿三毛滴虫 ME 氨基酸序

列 (OHS98540.1) 分支相邻, 同源率为 81.7%, 与阴道毛滴虫各 ME 氨基酸序列 (XM_001297899.1、XM_001312469) 同源率为 76.1% 和 75.4% (图 1-2)。上述结果表明, HmME 1 基因在火鸡组织滴虫各虫株间高度保守, 与阴道毛滴虫 ME 具有较高同源性, 与胎儿三毛滴虫 ME 同源性最高。

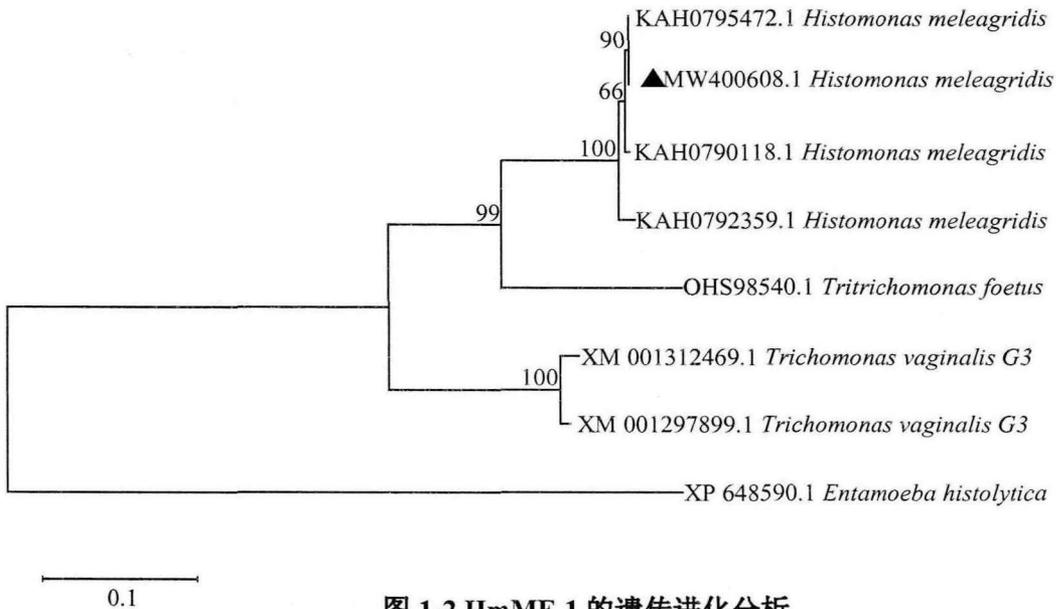


图 1-2 HmME 1 的遗传进化分析
Fig. 1-2 Phylogenetic tree of Hm MEs

2.3 重组表达质粒的鉴定

将 RT-PCR 扩增得到的 HmME 1 基因连接至原核表达载体 pET-28a(+), 构建的重组表达质粒 pET28a(+)-HmME 1 经双酶切鉴定结果显示, 出现两个条带, 分别约为 5337 bp、1182 bp, 与预期相符 (图 1-3) 将酶切结果符合预期大小的菌落送北京六合华大有限公司测序, 将测序结果与课题组对火鸡组织滴虫蛋白组测序结果中 ME 1 基因序列进行比对, 核苷酸序列有一处碱基突变, 氨基酸序列完全一致, 该碱基突变为无义突变。表明重组质粒 pET28a(+)-HmME 1 正确构建。

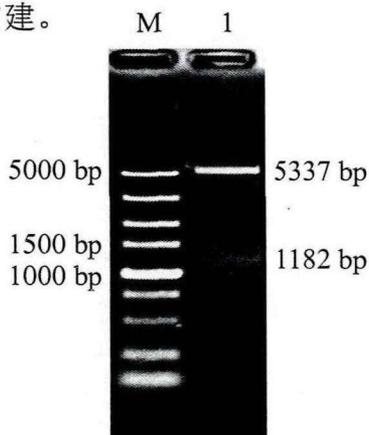


图 1-3 重组表达质粒的酶切鉴定
Fig. 1-3 Recombinant plasmid digested by restriction enzyme
M: DL5000 DNA Marker; 1: *Bam*H I and *Not* I 酶切产物
M: DL5000 DNA Marker; 1: pET28a(+)-HmME 1 digested by *Bam*H I and *Not* I

2.4 重组蛋白的诱导表达和可溶性分析

将重组表达质粒 pET28a(+)-HmME1 转化至 BL21(DE3)，加入终浓度为 0.3mM 的 IPTG 诱导表达，经过 12% SDS-PAGE 电泳分析结果显示，重组蛋白大小约为 46 kDa，与预期相符，主要以可溶形式于上清中表达（图 1-4）。

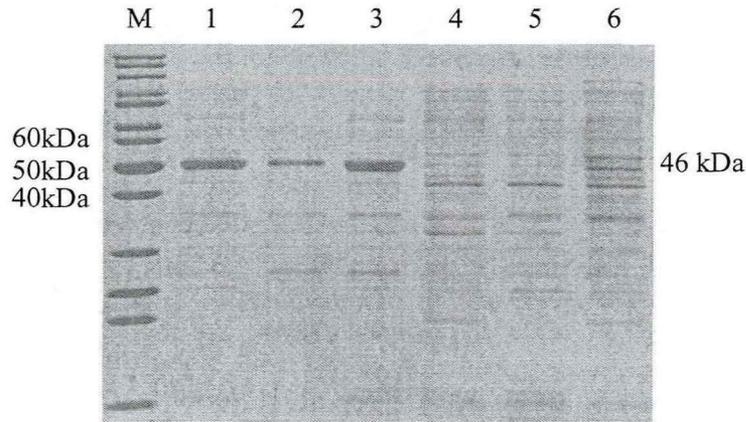


图 1-4 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 1-4 SDS-PAGE of recombinant protein

M: 非预染蛋白质分子量标记；1: 重组菌经 IPTG 诱导后超声裂解上清；2: 重组菌经 IPTG 诱导后超声裂解沉淀；3: 重组菌经 IPTG 诱导；4: 重组菌未经 IPTG 诱导；5: 空载体转化菌经 IPTG 诱导；6: 未转化宿主菌经 IPTG 诱导

M: Unstained protein marker; 1: Supernatant of recombinant with IPTG induction; 2: Sediments of recombinant with IPTG induction; 3: recombinant with IPTG induction; 4: recombinant without IPTG induction; 5: pET28a(+)/BL21 with IPTG induction; 6: BL21 with IPTG induction

2.5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Western blot 检测结果显示，获得的 rHmME 1 能被 6×HIS 标签单抗特异性识别，在 46kDa 处出现特异性条带，诱导的 pET28a(+)/BL21 转化菌以及未经转化的 BL21 均无该特异性条带（图 1-5）。表明 rHmME 1 经原核系统获得了体外重组表达。

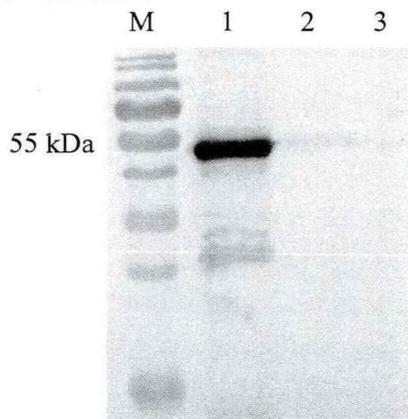


图 1-5 重组蛋白的 Western-blot 鉴定

Fig. 1-5 Western-blot analysis of recombinant protein

M: 预染蛋白质分子量标记；1: 重组菌经 IPTG 诱导；2: 空载体转化菌经 IPTG 诱导；3: 宿主菌经 IPTG 诱导

M: Prestained protein marker; 1: recombinant induced by IPTG; 2: pET28a(+)/BL21 induced by IPTG; 3: BL21 induced by IPTG

2.6 重组蛋白的纯化

大量诱导表达重组菌，超声裂解后，采用含有 6×HIS 标签的 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，收集流穿液。SDS-PAGE 分析结果显示，重组蛋白几乎全部结合到层析柱上，经过 5 次 Washing Buffer 洗涤，杂带基本清除，经 Elution Buffer 洗脱后得到的 rHmME 1 蛋白条带单一无杂带（图 1-6），利用 A280 紫外光吸收法测定纯化后 rHmME 1 蛋白的浓度为 0.4 mg/mL；纯化效果较好。

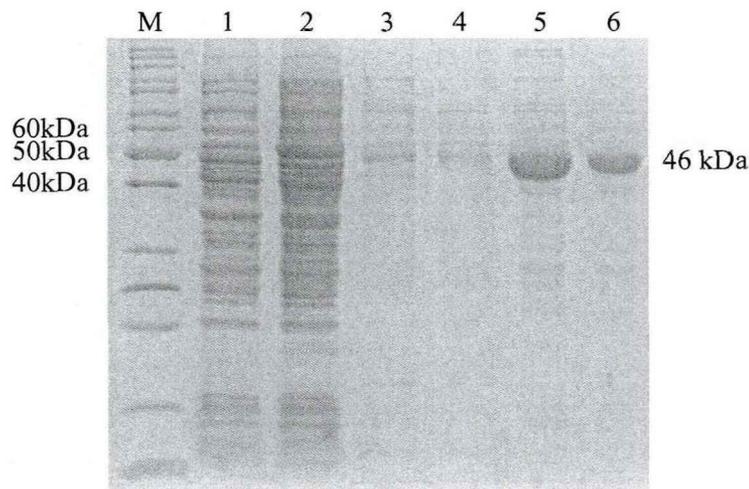


图 1-6 重组蛋白的纯化

Fig. 1-6 The purification of recombinant protein

M: 非预染蛋白质分子量标记；1: 裂解液与 Ni-NTA 结合后的流出液；2: Washing Buffer 第一次洗脱液；3: Washing Buffer 第三次洗脱液；4: Washing Buffer 第五次洗脱液；5: Elution Buffer 第一次洗脱液；6: Elution Buffer 第三次洗脱液

M: Unstained protein marker; 1: Effluent after binding with Ni-NTA; 2: Washing buffer for the first time; 3: Washing buffer for the third time; 4: Washing buffer for the fifth time; 5: Elution buffer for the first time; 6: Elution buffer for the third time

2.7 重组蛋白的酶活性测定

纯化后所得到的 rHmME 1 作为样本 $\Delta A = 0.18$ ，无关蛋白对照组 $\Delta A = 0$ 。苹果酸酶酶活性(U/mL) = 868.14 U/mL 。结果表明该重组蛋白具有明显的酶活性，在后期的免疫保护实验中为了防止酶活性对其结果可能存在的影响，因此应该将酶活性去除。

2.8 重组蛋白酶活性去除

纯化后所得到的 rHmME 1 在不同条件下水浴加热, 重新测定酶活性 (图 1-7), 水浴加热 10 min 三个不同温度组均具有酶活性, 加热 15 min 50°C 组酶活性尚未完全去除, 并与 55°C、60°C 组具有显著性差异 ($p < 0.05$), 55°C、60°C 组酶活性均去除, 加热 20 min 三个温度组酶活性均去除。

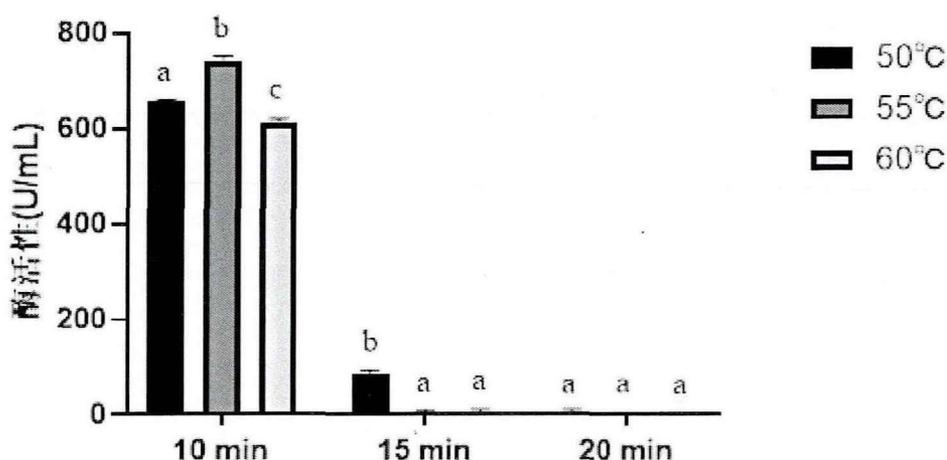


图 1-7 不同温度和时间对重组蛋白酶活性的影响

Fig. 1-7 Effects of different temperatures or reaction time on enzymatic activity of recombinant

3. 小结与讨论

根据本课题组对火鸡组织滴虫差异蛋白组测序结果中筛选到的强弱毒株差异表达的 ME 1 基因序列, 设计了一对特异性引物, 提取火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株的虫体总 RNA 并反转录为 cDNA 作为模板扩增 HmME 1 基因, 并将所获得的火鸡组织滴虫 HmME 1 基因 (MW400608.1) 在 GenBank 中进行比对发现, 目的基因与火鸡组织滴虫 ME 各亚型间同源性较高并且与胎儿三毛滴虫亲缘关系最近。研究表明溶组织内阿米巴胞质中的 ME 1 与原核生物同源性较高, 本研究对得到的 HmME 1 序列进行比对, 也发现与某些细菌等原核生物具有较高同源性, 这种现象提示或许存在抗原转移^[8]。HmME 1 基因全长 1182 bp, 无信号肽活性, 编码 394 个氨基酸, 预测蛋白大小为 42 kDa。在酶活性检测中重组表达的 HmME 1 具有明显酶活性, 在 55°C 水浴 15 min 后酶活性丧失。

张映瞳^[9]等在研究中发现, 温度、pH、金属离子和中间产物均能对 ME 1 的酶活性产生影响, Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对 ME 1 酶活性具有良好的激活作用, 随着金属离子浓度增加酶活逐渐提高, 达到一定浓度后酶活性趋于平缓, 而 Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对 ME 1 具有抑制酶活性的作用。ME 1 在不同物种间具有高度保守的氨基酸序列和相似的拓扑结构, 提示它们具有相似的催化和调节机制^[7]。ME 1 催化苹果酸进行可逆的氧化脱羧反应, 在 $NADP^+$ 还原成 $NADPH$ 的过程中生成二氧化碳和丙酮酸^[10], Ranzani 等^[11]研究发现 ME 对维持克氏锥虫体内 $NADPH$ 水平具有重要意义, $NADPH$ 在寄生虫生活过程中起着至关重要的作用, 是还原等价物的来源, 能清除内源性代谢反应导致的活性氧 (ROS) 或宿主细胞产生的外源性免疫损伤^[12], 因此 ME 是治疗克氏锥虫病很有前景的药物靶点。

基于上述研究, 目前已正确克隆表达具有酶活性 rHmME 1 蛋白, 为进一步探索 rHmME 1 蛋白的免疫原性和反应原性打下了基础, 下一步我们将开展对其抗原性的探索 and 该蛋白在虫体中的定位及强弱毒株之间的差异表达。

参考文献

- [1] Liebhart D, Ganas P, Sulejmanovic T. Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy[J]. Avian Pathol, 2017, 46(1):1-18.
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 193 号: 食品动物禁用的兽药及其他化合物清单[A]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2002.
- [3] Xu J J, Qu C B, Guo P, et al. Epidemic characteristics of clinical Histomoniasis in chicken flocks in eastern China[J]. Avian Dis, 2018, 62(2): 189-194.
- [4] Carrisosa M, Jin S H, McCrea B A, et al. Prevalence of select intestinal parasites in alabama backyard poultry flocks[J]. Animals, 2021, 11, 939.
- [5] Gourdon P, Baucher M F, Lindley N D, et al. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(7): 2981-2987.
- [6] Yu H F, Duan C C, Yang Z Q, et al. Malic enzyme 1 is important for uterine decidualization in response to progesterone/cAMP/PKA/HB-EGF pathway[J]. FASEB J, 2020, 34(3): 3820-3837.

- [7] 罗娅, 齐先梅, 王婧. 苹果酸酶 1 及其对疾病调控的研究进展[J]. 生理科学进展, 2021, 52 (3): 181-186.
- [8] Field J, Rosenthal B, Samuelson J. Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 38(3): 446-455.
- [9] 张映瞳, 陈海琴, 宋元达等. 卷枝毛霉中苹果酸酶同工酶 V 的酶学性质[J]. 微生物学报, 2016, 56 (02): 309-316.
- [10] Chang G G, Tong L. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(44): 12721-12733.
- [11] Ranzani A T, Nowicki C, Wilkinson S R, et al. Identification of specific inhibitors of *Trypanosoma cruzi* malic enzyme isoforms by target-based HTS[J]. *SLAS Discov*, 2017, 22(9): 1150-1161.
- [12] Keauth-Siegel R L, Comini M A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780(11): 1236-1248.

第二章 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的抗原性和天然蛋白的定位分析

组织滴虫病是由单尾滴虫科毛滴虫属的单细胞火鸡组织滴虫寄生于鸡形目禽类肝脏和盲肠中而引发的一种原虫病^[1]，在发病后期病禽会出现血液循环障碍，导致头部发紫，又被称之为“黑头病”^[2]。这种疾病会导致鸡群和火鸡群的发病和死亡，造成产蛋量下降，肉鸡增重缓慢等问题^[3-4]，该病在火鸡中发病率和死亡率较高，部分火鸡群可达 100%，给欧美国家的火鸡饲养业造成巨大影响^[5]。虽然相较于火鸡，鸡对该病的易感性略低，但仍然严重影响我国养鸡产业^[6-7]。

研究表明具有免疫原性的蛋白随着虫体入侵宿主被宿主免疫系统识别，引起特异性免疫应答，这些蛋白往往与寄生虫的毒力相关^[8]，目前有关原虫毒力相关的蛋白大部分位于虫体表面，往往与虫体粘附、入侵宿主组织相关^[9,10]，除此之外还有一些胞质内蛋白^[11]。本课题组在前期进行了火鸡组织滴虫强毒株和传代致弱毒株的差异蛋白组学比较分析，筛选出了多个在强弱毒株中差异表达的蛋白，这些蛋白或与虫株的毒力相关，ME 1 蛋白正是其中之一。本章试验拟进一步探明 ME 1 蛋白的抗原性和其在虫体中的分布，分析强弱毒株中定位的差异，为探寻组织滴虫病亚单位疫苗提供新靶标。

1. 材料与方法

1.1 虫株、细胞与实验动物

火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 强毒株和 JSYZ-D197 传代致弱毒株，小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由本实验室保存；BALB/c 4 周龄小鼠与 ICR 8 周龄小鼠，购自扬州大学比较医学中心；重组表达菌 pET28a(+)-HmME 1/BL21 由本实验构建并保存。

1.2 主要试剂与仪器

QuickAntibody-Mouse3W 快速免疫佐剂、50×HAT、50×HT、鼠单抗 Ig 类亚型鉴定用酶标二抗，购自博奥龙免疫技术有限公司；NC 硝酸纤维素膜，购自默克公司；HRP 标记的羊抗鸡 IgG，购自 HPL 公司；ECL 化学发光试剂，购自 Tanon 公司；HRP 标记的兔抗鼠 IgG、羊抗鸡 IgG 和 Anti-6×His 标签小鼠单抗，购自 BBI 公司；鸡抗火鸡组织滴虫阳性血清，由本实验室制备保存；FBS（胎牛血清），购自上海双洙生物科技有限公司；DMEM basic 培养基，购自 Gibco 公司；米粉、IPTG 和 PEG1500，购自 Sigma 公司；FITC 标记的羊抗鼠 IgG，购自 KPL 公司；抗荧光猝灭封片液，购自 Roche 公司；无血清细胞冻存液，购自苏州 Biotech 公司；M199 培养基、马血清，购自 Gibco 公司。

主要仪器：PowerPacbasic 型 SDS PAGE 电泳仪，购自 BIO-RAD 公司；optima L-100XP 超速离心机，购自 Beckman Coulter 公司；NanoDrop2000 微量核酸蛋白测定仪购自 Thermo 公司；Sunrise-Basic 型酶标仪，购自 Tecan 公司；超高分辨率激光共聚焦显微镜购自 Leica 公司。

1.3 rHmME 1 蛋白的抗原性分析

1.3.1 鼠抗 rHmME 1 蛋白多克隆抗体的制备

参照 QuickAntibody-Mouse3W 快速免疫佐剂的说明书，用纯化后的 rHmME 1 蛋白免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠。取佐剂与稀释后的重组蛋白按 1:1 的比例迅速混匀，剂量为 20 μ g/100 μ L/只，同时设置阴性对照组（佐剂与 PBS 按 1:1 的比例混匀），采取小鼠腿部肌肉注射方式，每只小鼠注射 100 μ L。14 d 后以同样剂量对免疫组和阴性对照组小鼠进行腿部肌肉注射。第 21 d 进行眼球采血，将血液 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 后转入 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h，2000 r/min 离心 5 min，分离血清，保存于 -80 $^{\circ}$ C。采用间接 ELISA 方法^[12]检测血清抗体滴度，以阳性血清大于阴性血清 2 倍的最大稀释倍数为血清的效价。

1.3.2 rHmME 1 蛋白抗原性检测

将诱导的阳性重组菌 pET28a(+)-HmME 1/BL21、pET28a(+)/BL21 和以及未经转化的 BL21 菌体，PBS 洗涤 3 次，加入蛋白上样缓冲液后煮沸裂解，12000 r/min 离心 4 min，取 8 μ L 上清上样，进行 12% SDS-PAGE 电泳，并转印至 NC 膜上。将 NC 膜置于含 3% BSA 的封闭液中，37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。分别以鼠抗

rHmME 1 蛋白的多抗血清 (1:400)、鸡源火鸡组织滴虫阳性血清 (1:200) 为一抗, HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:25000) 和 HRP 标记的羊抗鸡 IgG (1:20000) 分别作为二抗, Western blot 检测重组蛋白的反应原性。

1.3.3 鼠源 rHmME 1 多抗血清与虫体 ME 1 蛋白反应原性的 Western blot 鉴定

取处于传代高峰期的火鸡组织滴虫, 用血球计数板计数, 约为 7×10^5 个/mL, 取 5 mL, 共计约 3.5×10^6 个虫体, 2500 r/min 离心 3 min, 用 1 mL PBS 重悬菌体, 在冰浴条件下超声裂解 (功率 30%, 超声 2 s, 间歇 3 s, 超声时长 10 min), 12000 r/min 离心 5 min, 取上清加入蛋白上样缓冲液煮沸 12 min, 12000 r/min 离心 4 min, 取 8 μ L 上清上样, 12% SDS-PAGE 电泳后转印到 NC 膜上, 将 NC 膜置于含 3% BSA 的封闭液中, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。以鼠抗 rHmME1 的多抗血清 (1:400) 为一抗, 37 $^{\circ}$ C 摇床 40 r/min 作用 1.5 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (按 1:20000 倍稀释) 为二抗, 37 $^{\circ}$ C 摇床 40 r/min 作用 1 h, PBST 洗涤 6 次, 每次 5 min。滴加 ECL 显色, 用化学发光成像系统观察结果并扫描拍照, 进行 Western blot 分析。

1.4 单克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫

参照 QuickAntibody-Mouse3W 快速免疫佐剂的说明书, 用纯化后的 rHmME 1 蛋白免疫 6 周龄的 BALB/c 雄性小鼠。取佐剂与稀释后的重组蛋白按 1:1 的比例迅速混匀, 剂量为 20 μ g/100 μ L/只, 采取小鼠腿部肌肉注射方式, 每只小鼠注射 100 μ L。14 d 后以同样剂量对小鼠进行腿部肌肉注射。第 21 d 进行颌下静脉采血, 间接 ELISA 方法^[12]检测血清抗体滴度, 选取血清抗体效价最高的小鼠, 用 rHmME 1 蛋白以 20 μ g/100 μ L/只的剂量不加入免疫佐剂对小鼠进行腹腔注射冲击免疫。3 d 后取出进行冲击免疫小鼠的脾脏, 进行细胞融合。

1.4.2 SP2/0 细胞的复苏及培养

进行细胞融合前一周复苏 SP2/0 细胞, 将冻存与液氮罐中的 SP2/0 细胞取出后迅速放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中, 待融化后加入适量 DMEM 培养基, 800 r/min 离心 5 min。弃去上清用 5 mL 20% FSB-DMEM 培养基轻轻吹匀将细胞重新悬起并转移至细胞瓶中, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.4.3 饲养细胞的制备

选取 8 周龄的雄性 ICR 小鼠，脱颈处死后在酒精溶液中浸泡消毒 10 min，将小鼠固定于解剖台上，用无菌剪刀和镊子剪开腹部皮肤，暴露腹膜，用无菌注射器抽取 5 mL 1% HAT 培养基，避开脏器注射于小鼠腹腔，轻轻按摩小鼠腹腔，用注射器抽出含有饲养细胞的培养基加入 60mL 1% HAT 培养基中，用巴氏滴管轻柔的吹打混匀。用巴氏滴管按照 96 孔细胞培养板外周 3 滴中间 2 滴将含有饲养细胞的培养基滴加到 6 块 96 孔细胞培养板中，5% CO₂ 37℃ 培养。

1.4.4 脾细胞的制备

取冲击免疫的小鼠，脱颈处死后在酒精溶液中浸泡消毒 10 min，将小鼠固定于解剖台上，用无菌剪刀和镊子剪开腹部皮肤，暴露腹膜，取一套新的无菌剪刀镊子将腹膜剪开，取出脾脏，放入盛有 5 mL DMEM 培养基的培养皿中，除去脾脏表面的结缔组织，将脾脏放在 200 目的不锈钢网上，研磨释放脾细胞，将含有脾细胞的培养基转入 50 mL 离心管中。

1.4.5 细胞融合

将小鼠脾细胞悬液和骨髓瘤细胞混合均匀，800 r/min 离心 5 min，将上清弃去，轻轻拍打离心管管底，使细胞松散均匀的铺在离心管底部，在 37℃ 水浴条件下，在 1 min 中内加入 1 mL 预热至 37℃ 的 PEG1500，过程中轻柔匀速滴加，并缓慢转动离心管。静置 1 min 后加入 25 mL 预热至 37℃ 的 DMEM 培养基终止融合，将离心管放在 37℃ 静置 10 min 后，800 r/min 离心 5 min，将上清弃去，用 60 mL 1% HAT 培养基将细胞重新悬起，滴加至含有饲养细胞的细胞培养板中，每孔 2 滴，5% CO₂ 37℃ 培养。

1.4.6 阳性杂交瘤细胞的筛选

细胞融合 5 d 后，对细胞培养板中的细胞进行半换液，每孔弃去 100 μL 培养基后加入 100 μL 1% HAT 培养基，10 d 后进行全换液，将细胞孔内全部液体弃去后加入 200 μL 1% HT 培养基。待细胞生长至孔底面积的 30% 时，以 rHmME 1 蛋白包被抗原，设置阳、阴性小鼠血清为对照，将细胞上清为一抗，用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞，挑选读值较高的孔进行扩大培养并冻存。

1.4.7 阳性杂交瘤细胞的亚克隆

用有限稀释法进行亚克隆，参照本章 1.4.3 的步骤提前一天制备饲养细胞，次日将之前筛选的阳性杂交瘤细胞进行计数，用 1 mL 1% HT 培养基进行梯度稀释，并吸取约含有 80 个细胞的培养基加入到 10 mL 1% HT 培养基中，吹匀

后滴加到含有饲养细胞的 96 孔培养板中，每孔 2 滴，5% CO₂ 37℃ 培养。第 9 d 观察细胞状态，标记单克隆孔，待细胞生长至孔底面积的 30% 时，用间接 ELISA 法^[12]检测效价，按照先同步步骤进行第二次、第三次亚克隆，筛选出效价较高并且能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株进行扩大培养并冻存。

1.4.8 单克隆抗体亚类鉴定

根据北京博奥龙公司的单抗亚类鉴定酶试剂盒的说明书，鉴定本章 1.4.7 中筛选出的阳性单克隆细胞株的 Ig 类型。

1.4.9 单克隆抗体特异性检测

将纯化的 rHmME 1 蛋白和天然蛋白（制备方式见本章 1.3.3）加入蛋白上样缓冲液煮沸 12 min，12000 r/min 离心 4 min，取 8 μL 上清上样，12% SDS-PAGE 电泳后转印到 NC 膜上，将 NC 膜置于含 3% BSA 的封闭液中，37℃ 封闭 2 h。以细胞上清为一抗，37℃ 摇床 40 r/min 作用 1.5 h，PBST 洗涤 3 次，每次 5 min。以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG（按 1：20000 倍稀释）为二抗，37℃ 摇床 40 r/min 作用 1 h，PBST 洗涤 6 次，每次 5 min。滴加 ECL 显色，用化学发光成像系统观察结果并扫描拍照。

1.5 天然蛋白 HmME 1 在虫体中的定位分析

1.5.1 鼠多抗定位分析

取火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株虫体涂布在载玻片上，用 -20℃ 预冷的 100% 甲醇固定 15 min，PBST 洗 3 次；加入 0.1% Triton X 通透剂在室温下作用 10 min，PBST 洗 3 次；加入 5% BSA，4℃ 封闭过夜；加入鼠源 rHmME 1 多抗血清（1：100 稀释），对照组加入小鼠阴性血清（1：100 稀释），37℃ 孵育 1 h，PBST 洗 5 次；FITC 标记的羊抗鼠 IgG（1：100 稀释）作为二抗，37℃ 孵育 1 h，PBST 洗 5 次；滴加抗荧光淬灭液封片，经激光共聚焦显微镜观察 ME 1 天然蛋白在虫体中的定位。

1.5.2 单克隆抗体定位分析

方法同本章 1.5.1，取火鸡组织滴虫 JSYZ-F9 株和传代致弱的火鸡组织滴虫 JSYZ-D197 株虫体，使用阳性杂交瘤细胞上清作为一抗，对照组使用阴性杂交瘤细胞上清作为一抗。

2. 结果

2.1 鼠源 rHmME 1 阳性血清效价测定

间接 ELISA 法测定血清抗体滴度，结果显示（图 2-1），阳性血清最初按 1:200 稀释时， OD_{450nm} 可达 2.4；血清稀释 409600 倍时， $OD_{450 nm}$ 仍大于阴性血清 2.1 倍，故阳性血清抗体效价为 1:409600，而阴性对照组小鼠血清中未检测到相应抗体。该结果表明 rHmME 1 蛋白能刺激小鼠产生高水平抗体。

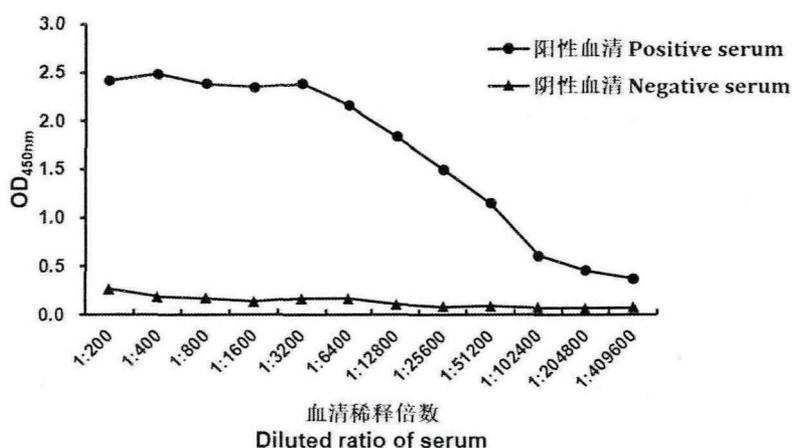


图 2-1 鼠抗重组蛋白 rHmME 1 血清效价的 ELISA 测定

Fig. 2-1 ELISA titer of mouse polyclonal antibody anti-rHmME 1

2.2 rHmME 1 蛋白的抗原性分析

将诱导的重组菌 pET28a(+)-HmME 1/BL21、空载体转化菌 pET28a(+)/BL21 以及未经转化的 BL21 菌体，煮沸裂解后，取上清经 Western blot 鉴定，结果显示，重组蛋白能被鼠源 rHmME 1 阳性血清（图 2-2）和鸡源火鸡组织滴虫阳性血清（图 2-3）特异性识别，均在 46 kDa 处出现特异性条带，表明经原核表达的 rHmME 1 有良好的抗原性。

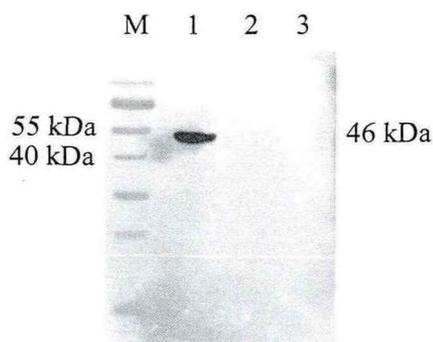


图 2-2 鼠抗 rHmME 1 多克隆抗体 Western-blot 检测

Fig. 2-2 Western-blot analysis by mouse anti-rHmME 1 polyclonal antibodies

M: 预染蛋白质分子量标记；1: 重组菌经 IPTG 诱导；2: 空载体转化菌经 IPTG 诱导；3: 宿主菌经 IPTG 诱导。

M: Prestained protein marker; 1: recombinant induced by IPTG; 2: pET28a(+)/BL21 induced by IPTG; 3: BL21 induced

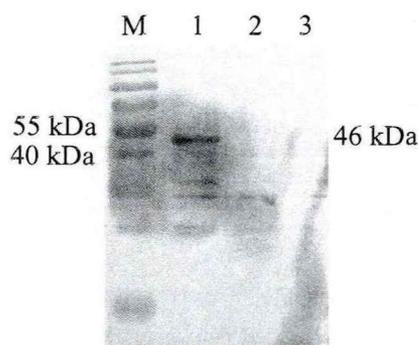


图 2-3 鸡源抗火鸡组织滴虫阳性的血清 Western-blot 检测

Fig. 2-3 Western-blot analysis of positive serum of chicken anti-*Histomonas meleagridis*

M: 预染蛋白质分子量标记; 1: 重组菌经 IPTG 诱导; 2: 空载体转化菌经 IPTG 诱导; 3: 宿主菌经 IPTG 诱导。

M: Prestained protein marker; 1: recombinant induced by IPTG; 2: pET28a(+)/BL21 induced by IPTG; 3: BL21 induced

2.3 鼠源 rHmME 1 多抗血清与虫体 ME 1 蛋白反应原性的 Western blot 鉴定

利用制备的鼠源 rHmME 1 多克隆抗体通过 Western blot 鉴定火鸡组织滴虫中天然表达的 HmME 1 蛋白, 结果显示, 使用鼠源 rHmME 1 阳性血清作为一抗孵育的泳道 1 在 42kDa 处出现特异性蛋白条带 (图 2-4)。鼠源 rHmME 1 阳性血清可以特异性识别天然表达的 HmME 1 蛋白, rHmME 1 蛋白有良好的反应原性。

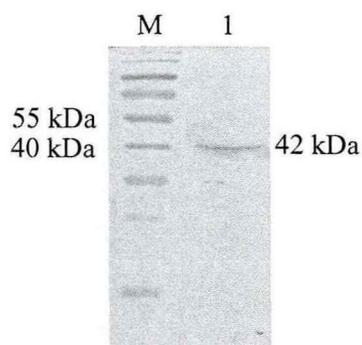


图 2-4 鼠源 rHmME 1 阳性血清与虫体 ME 1 蛋白反应的 Western-blot 检测

Fig. 2-4 The extracts of *H. meleagridis* detected by positive serum of mouse anti-rHmME 1

M: 预染蛋白质分子量标记; 1: 火鸡组织滴虫天然蛋白
M: Prestained protein marker; 1: Extracts of *H. meleagridis*

2.4 单克隆抗体的制备

2.4.1 融合前小鼠血清抗体效价的测定

用纯化后的 rHmME 1 蛋白作为抗原包被酶标板, 间接 ELISA 法测定融合前小鼠血清抗体效价, 抗体效价均达到 1:10000 以上, 最终选取 D 鼠进行冲击免疫, 3 d 后取脾脏进行细胞融合。

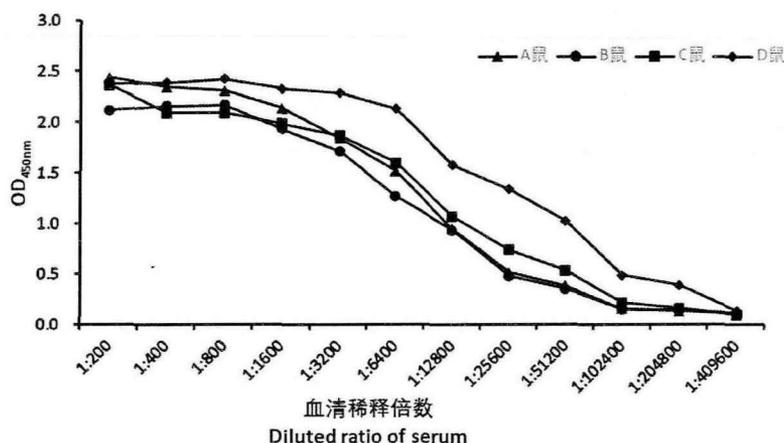


图 2-5 融合前小鼠血清抗体效价测定

Fig. 2-5 Determination of serum antibody titer of mouse before cell fusion

2.4.2 阳性杂交瘤细胞建株及单克隆抗体的亚类鉴定

当融合后的细胞团簇长至细胞孔底 1/3 时用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选, 筛选到 17 个阳性杂交瘤细胞株, 选取其中效价较高的杂交瘤细胞进行亚克隆, 经过三次亚克隆后获得六个阳性杂交瘤细胞株, 命名为 3D12, 1A6, 1C10, 3G12, 1E12 和 4B5。根据北京博奥龙公司的单抗亚类鉴定酶试剂盒的说明书, 对筛选出的阳性单克隆细胞株的 Ig 类型进行鉴定。经鉴定 3D12, 1A6, 1C10 为 IgG1 亚类; 3G12 为 IgG2a 亚类; 1E12, 4B5 为 IgG2b 亚类 (表 2-1)。

表 2-1 单抗的亚类鉴定

Table 2-1 Isotype identification of monoclonal antibodies

亚类	杂交瘤细胞株
IgG1	3D12, 1A6, 1C10
IgG2a	3G12
IgG2b	1E12, 4B5

2.4.3 单克隆抗体特异性检测

通过 Western blot 检测单克隆抗体对 rHmME 1 蛋白和虫体天然蛋白 ME 1 的特异性识别, 选取了 3D12 单克隆细胞株的上清为一抗, 结果显示在 rHmME 1 蛋白在 46 kDa 处出现特异性条带 (图 2-6), 虫体天然蛋白 ME 1 在 42 kDa 处出现特异性蛋白条带 (图 2-7)。表明单克隆抗体具有良好的特异性, 能够识别重组表达的 rHmME 1 蛋白, 也能够特异性识别虫体中的 ME 1。

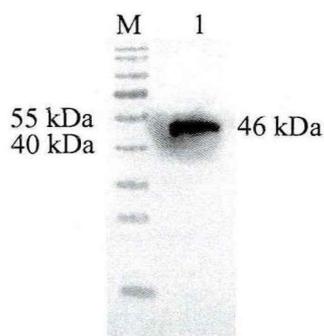


图 2-6 单克隆抗体对 rHmME 1 的 Western-blot 检测

Fig. 2-6 Western-blot analysis of rHmME 1 protein by McAb

M: 预染蛋白质分子量标记; 1: rHmME 1 蛋白

M: Prestained protein marker; 1: rHmME 1 protein

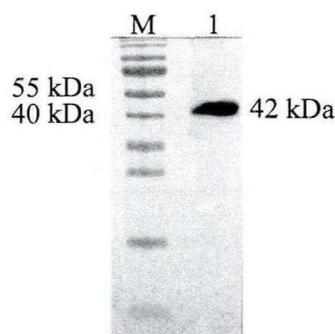


图 2-7 单克隆抗体对虫体天然 ME 1 蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 2-7 The extracts of *H. meleagridis* detected by McAb

M: 预染蛋白质分子量标记; 1: 火鸡组织滴虫天然蛋白

M: Prestained protein marker; 1: Extracts of *H. meleagridis*

2.7 HmME 1 在虫体中的定位分析

2.7.1 鼠多抗定位分析

制备的鼠源 rHmME 1 阳性血清经 IFA 检测后结果显示, 火鸡组织滴虫整个胞质内出现较强的荧光信号, 而阴性对照血清未检测出荧光信号。表明 HmME 1 蛋白广泛存在于虫体的胞质内。(图 2-8)

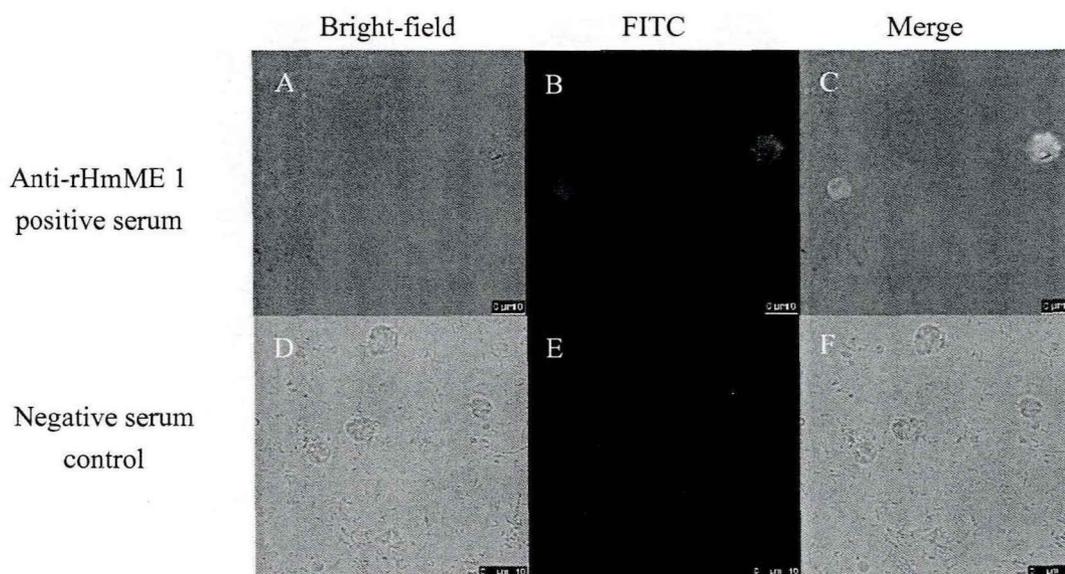


图 2-8 鼠多抗对虫体 ME 1 IFA 的定位结果

Fig. 2-8 IFA localization results of ME 1 using mouse polyclonal antibody

A-C: 鼠源 rHmME 1 阳性血清为一抗孵育 JSYZ-F9 火鸡组织滴虫; D-F: 阴性对照血清为一抗孵育 JSYZ-F9 火鸡组织滴虫; A、D: 明场; B、E: FITC 标记的羊抗鼠 IgG 孵育, C、F: 明场与 FITC 叠加

A-C: IFA with anti-rHmME 1 positive serum of *H. meleagridis* (JSYZ-F9); D-F: IFA with negative serum of *H. meleagridis*(JSYZ-F9); A, D: Bright field; B, E: Stained using FITC sheep anti-mouse IgG; C, F: Meger of bright field and FITC

2.7.2 单克隆抗体定位分析

用阳性杂交瘤细胞上清作为一抗, 对照组使用阴性杂交瘤细胞上清作为一抗, 经 IFA 检测后结果显示, 火鸡组织滴虫强毒株整个胞质内出现较强的荧光信号(图 2-9), 传代致弱毒株的荧光明显暗淡(图 2-10), 而阴性对照组未检测出荧光信号。表明火鸡组织滴虫强毒株和传代致弱毒株胞质中均存在 HmME 1 蛋白, 但强毒株中该蛋白的表达量明显高于传代致弱毒株。

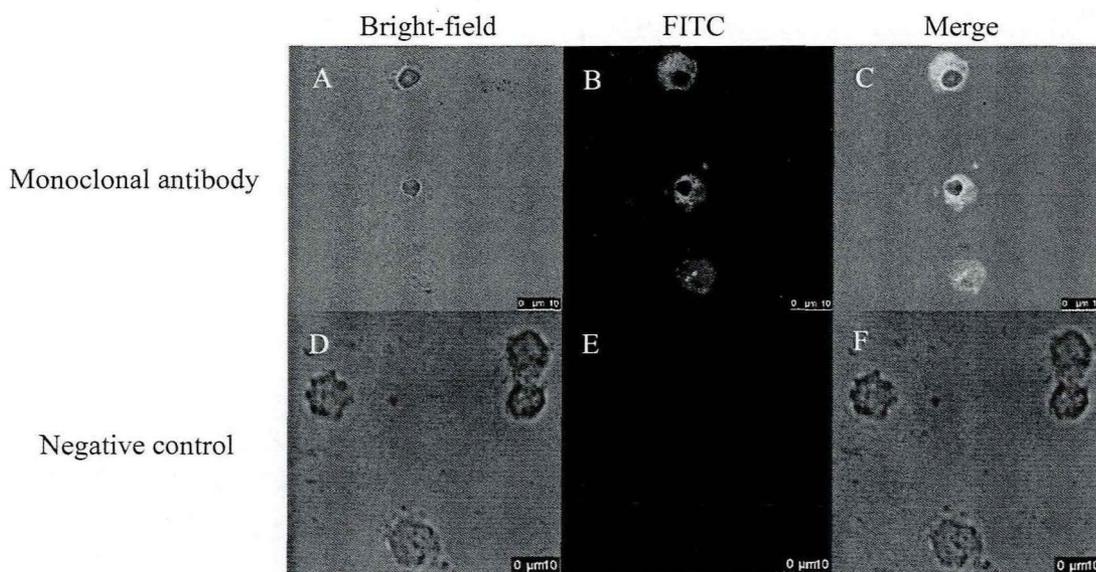


图 2-9 单克隆抗体对强毒株 ME 1 IFA 的定位结果

Fig. 2-9 IFA localization results of virulent strain ME 1 using monoclonal

A-C: 单克隆抗体为一抗孵育 JSYZ-F9 火鸡组织滴虫; D-F: 阴性对照细胞上清为一抗孵育 JSYZ-F9 火鸡组织滴虫; A、D: 明场; B、E: FITC 标记的羊抗鼠 IgG 孵育, C、F: 明场与 FITC 叠加

A-C: IFA with Monoclonal antibody of *H. meleagridis* (JSYZ-F9); D-F: IFA with negative cellular supernatant of *H. meleagridis* (JSYZ-F9); A, D: Bright field; B, E: Stained using FITC sheep anti-mouse IgG; C, F: Meger of bright field and FITC

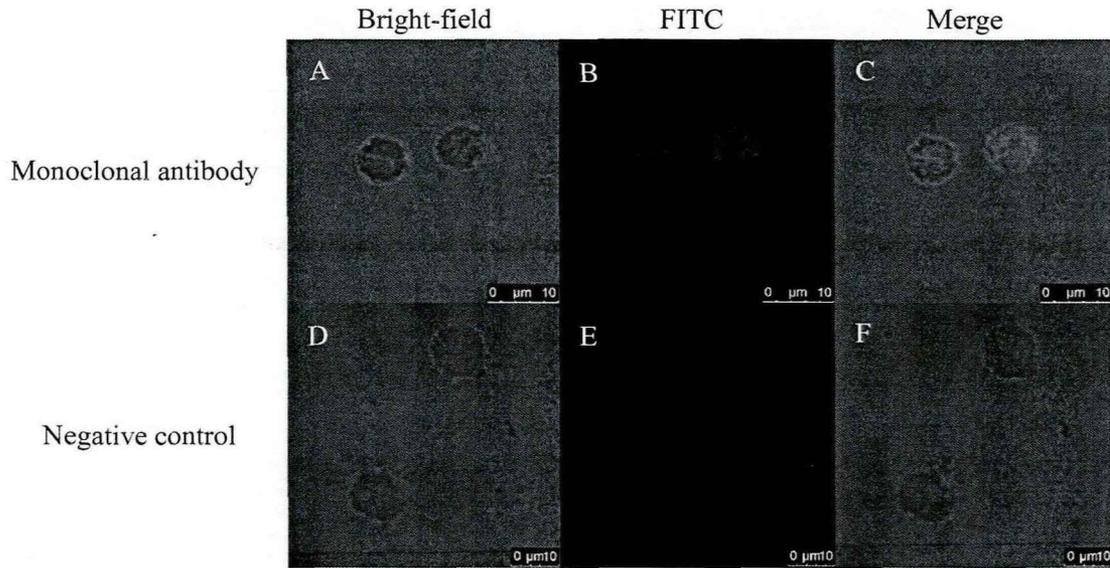


图 2-10 单克隆抗体对弱毒株 ME 1 IFA 的定位结果

Fig. 2-10 IFA localization results of attenuated strain ME 1 using monoclonal antibody

A-C: 单克隆抗体为一抗孵育 JSYZ-D197 火鸡组织滴虫; D-F: 阴性对照细胞上清为一抗孵育 JSYZ-D197 火鸡组织滴虫; A、D: 明场; B、E: FITC 标记的羊抗鼠 IgG 孵育, C、F: 明场与 FITC 叠加

A-C: IFA with Monoclonal antibody of *H. meleagridis* (JSYZ-D197); D-F: IFA with negative cellular supernatant of *H. meleagridis* (JSYZ-D197); A, D: Bright field; B, E: Stained using FITC sheep anti-mouse IgG; C, F: Meger of bright field and FITC

3. 小结与讨论

本章对 rHmME 1 蛋白进行抗原性检测, 结果显示 rHmME 1 蛋白能被鼠抗 rHmME 1 多抗和鸡源抗火鸡组织滴虫阳性血清识别, 具有较好的抗原性 Dolezal 等^[13]对阴道毛滴虫 ME 1 基因研究并表达, 结果发现其大小为 42 kDa, 与本研究前期对 HmME 1 蛋白预测以及以往研究报道大小一致。本研究中经 Western blot 检测到的虫体天然蛋白的大小为 42 kDa, 而 rHmME 1 蛋白在 46 kDa 出现特异性条带, 略大于分析序列时的预估大小, 推测造成这种大小差异的原因是由于重组蛋白中含有 HIS 标签。

单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高和产量大等优点^[14,15], 可应用于寄生虫病的检测、靶抗原识别等^[16-17]。本论文制备了抗火鸡组织滴虫 ME 1 蛋白的单克隆抗体, 最终获得了六株杂交瘤细胞株, 对其进行 Ig 类型鉴定, 经鉴定

3D12, 1A6, 1C10 为 IgG1 亚类; 3G12 为 IgG2a 亚类; 1E12, 4B5 为 IgG2b 亚类。用于制备单克隆抗体的蛋白是重组表达的蛋白, 具有 HIS 标签, 有研究表明 HIS 蛋白可以刺激机体产生 HIS 抗体, 为防止存在 HIS 单克隆抗体而出现假阳性, 因此在亚克隆时增加 HIS 标签蛋白包被抗原的对照组, 成功筛选出了杂交瘤细胞株。

Hrdý 等^[18]研究发现胎儿三毛滴虫的 ME 1 存在于胞质中, 本研究中分别使用鼠源 rHmME 1 阳性血清和单克隆抗体作为一抗进行 IFA 试验, 结果均显示荧光均匀出现于火鸡组织滴虫的胞质中, 证明 ME 1 确实存在于胞质中, 与 Hrdý 等实验结果一致。在以单克隆抗体为一抗的 IFA 试验中, 增加了一组传代致弱毒株, 检测显示传代致弱毒株中荧光信号明显低于强毒株, 此结果符合课题组前期差异蛋白组学的结果, ME 1 在强毒株和传代致弱毒株中确实存在差异表达, 与虫株的毒力相关, 是一个潜在的疫苗靶标。

本论文克隆表达的 HmME 1 基因在火鸡组织滴虫中尚属首次报道, 虽然证实了 rHmME 1 蛋白具有良好的反应原性和抗原性, 但对于该蛋白的免疫保护作用仍然需要进一步探究。

参考文献

- [1] Lotfi A R, Abdelwhab E M, Hafez H M. Persistence of *Histomonas meleagridis* in or on Materials Used in Poultry Houses[J]. Avian Dis, 2012, 7(1): e72-e73.
- [2] Liebhart D, Ganas P, Sulejmanovic T. Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy[J]. Avian Pathol, 2017, 46(1):1-18.
- [3] Liebhart D, Sulejmanovic T, Grafl B, et al. Vaccination against histomonosis prevents a drop in egg production in layers following challenge[J]. Avian Pathol, 2013, 42(1): 79-84
- [4] Hess M, Liebhart D, Grabensteiner E, et al. Cloned *Histomonas meleagridis* passaged *in vitro* resulted in reduced pathogenicity and is capable of protecting turkeys from histomonosis[J]. Vaccine, 2008, 26(33): 4187-4193.
- [5] Hauck R, Hafez H M. Experimental infections with the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*: a review[J]. Parasitol Res, 2013, 112:19-34.

- [6] Xu J J, Qu C B, Guo P, et al. Epidemic characteristics of clinical Histomoniasis in chicken flocks in eastern China[J]. Avian Dis, 2018, 62(2): 189-194.
- [7] Carrisosa M, Jin S H, McCrea B A, et al. Prevalence of select intestinal parasites in alabama backyard poultry flocks[J]. Animals, 2021, 11, 939.
- [8] Clark E L, Macdonald S E, Themozhi V, et al. Cryptic Eimeria genotypes are common across the southern but not northern hemisphere[J]. International journal for parasitology, 2016, 46(9): 537-544.
- [9] Chaudhry O A, Petri Jr W A. Vaccine prospects for amebiasis[J]. Expert Rev Vaccines, 2005, 4(5): 657-668.
- [10] Beanan M J, Bailey G B. The primary structure of an Entamoeba histolytica enolase[J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 69(1): 119-121.
- [11] 陈晨. 火鸡组织滴虫 α -actinin 1 蛋白的原核表达与免疫保护效果分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [12] 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]. 扬州大学; 2014.
- [13] Dolezal P, Vanacova S, Tachezy J, et al. Malic enzymes of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins[J]. Gene, 2004, 329: 81-92.
- [14] 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 (01): 45-46.
- [15] 蔡为民, 李文静, 王乐乐等. 毒害艾美耳球虫配子体抗原 EnGAM22 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53 (03): 875-882.
- [16] 张阿敏. 毒害艾美耳球虫表面抗原 SAG30 与 SAG-CAP 的重组表达与单抗制备及其免疫保护效果评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [17] 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): 183-191.
- [18] Hrdý I, Mertens E, Van Schaftingen E. Identification, purification and separation of different isozymes of NADP-specific malic enzyme from *Trichomonas foetus*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 57(2): 253-60.

第三章 火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白的免疫保护效果评价

组织滴虫病多发生于春夏季，该病易在大雨过后流行，主要侵害 4~8 周龄火鸡或鸡，严重影响养禽业发展^[1]。目前随着化学药物存在致癌风险和其对环境的污染而被禁用^[2-4]，天然植物提取物应用于临床治疗时并无显著疗效^[5-7]，传代致弱虫株制作的致弱活疫苗虽然具有预防火鸡组织滴虫感染的作用但也具有毒力返强的可能性^[8]，因此亟需寻找其他预防该病的方法。

在家禽寄生虫疫苗研究领域目前已研发出用于预防鸡球虫的亚单位疫苗，该疫苗能减少卵囊的排出为鸡群提供免疫保护效力^[9]。亚单位疫苗相较于致弱活疫苗更为安全，国内外对用于防治火鸡组织滴虫的亚单位疫苗的研究较少。本课题组前期克隆表达了火鸡组织滴虫 ME 1 蛋白，并用该重组蛋白免疫小鼠获得了具有高效价的多克隆抗体和单克隆抗体，rHmME 1 蛋白能与鸡源抗火鸡组织滴虫阳性血清特异性结合，具有良好的免疫原性和反应原性。本章将进一步将 rHmME 1 蛋白制备成亚单位疫苗免疫雏鸡，分析该重组蛋白的免疫保护效力，旨在为火鸡组织滴虫亚单位疫苗的研制奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 虫株、实验动物与菌株

火鸡组织滴虫 JSYZ-F9，由本实验室分离并保存，将虫株复苏并培养于基础培养基中（总体积 10 mL：9 mL M199；1mL 马血清；10 mg 米粉）于 40℃ 厌氧传代培养；1 日龄 SPF 鸡，购自江苏立华牧业有限公司，在无火鸡组织滴虫的环境下饲养，在饲料中添加复合维生素，饮水中添加多西环素，采用自由采食的方式喂养。重组表达菌 pET28a(+)-HmME 1/BL21 由本实验构建并保存。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂：BSA、尿素购自 Biofroxx 公司；M199 培养基、马血清，购自 Gibco 公司；米粉、IPTG、弗氏佐剂和弗氏不完全佐剂，购自 Sigma 公司；胰

蛋白胨和酵母提取物购自 OXIDID 公司；卡那霉素抗生素、Ni-NTA 亲和层析纯化柱购自金斯瑞生物科技有限公司；HRP 标记的羊抗鸡 IgG，购自 HPL 公司；TMD 显色液，购自上海生工生物有限公司；细胞因子检测试剂盒，购自菲亚生物科技有限公司

主要仪器：VCX-130 型超声波破碎仪购自 Sonics 公司；optima L-100XP 超速离心机，购自 Beckman Coulter 公司；NanoDrop2000 超微量核酸蛋白测定仪购自 Thermo 公司；Sunrise-Basic 型酶标仪，购自 Tecan 公司

1.3 免疫原制备

参照第一章 1.2.8 的方法纯化 rHmME 1 蛋白。55℃水浴 15 min 将 rHmME 1 蛋白的酶活性去除，将 rHmME 1 蛋白稀释到 2 mg/mL。按照免疫程序中设定的免疫剂量，将蛋白和弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂 1:1 混合，放在蛋白乳化仪中进行乳化，直至疫苗乳化到油包水的状态，滴在水中浮在水面上并且边缘清晰 5 min 内不扩散。将制备好的疫苗分装于 1 mL 无菌注射器中。

1.4 试验设计与免疫程序

试验设计与免疫程序详见表 3-1。试验组分为 rHmME 1 200 μg 免疫组、rHmME 1 100 μg 免疫组、rHmME 1 50 μg 免疫组、未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组，共六个试验组，每组 10 只鸡。

4 个攻虫组鸡 19 d 经过泄殖腔攻虫，攻虫剂量为 3×10^5 个/300 μL/只。在攻虫开始前，将冻存的虫株从液氮中取出，在 40℃水浴中迅速融化后加入含有 8 mL M199、1 mL 马血清和 10 mg 米粉的培养基中总体积为 10 mL，40℃厌氧复苏培养。将处于传代高峰期的火鸡组织滴虫用血球计数板计数，吸取 3×10^5 个虫体，分装于 1.5 mL EP 管，3000 r/min 离心 3 min，每管保留 300 μL 液体，弃去多余上清，吹打混匀，放置于 40℃的保温箱中。未攻虫组接种 300 μL 不含虫体的培养基。

表 3-1 试验设计和免疫程序

Table 3-1 Experimental design and immune program

组别	免疫日龄 (d)	免疫途径	攻虫日龄 (d)	攻虫途径	攻虫剂量 (/羽)
rHmME 1 200 μg 组	5、12	皮下注射	19	泄殖腔	3×10^5
rHmME 1 100 μg 组	5、12	皮下注射	19	泄殖腔	3×10^5
rHmME 1 50 μg 组	5、12	皮下注射	19	泄殖腔	3×10^5
未免疫攻虫组	/	/	19	泄殖腔	3×10^5
未免疫未攻虫组	/	/	/	/	/
佐剂对照组	5、12	皮下注射	19	泄殖腔	3×10^5

1.6 免疫保护效果评价指标

1.6.1 发病率和死亡率

观察鸡群免疫接种和攻虫后的表现, 包括鸡只的生长状态、精神状态、饮食、粪便、发病及死亡情况等。统计攻虫后 12 d 扑杀时鸡只发病数、死亡数。

$$(1) \text{ 发病率 } (\%) = (\text{发病鸡数} / \text{攻虫时鸡数}) \times 100\%$$

$$(2) \text{ 死亡率 } (\%) = (\text{死亡鸡数} / \text{攻虫时鸡数}) \times 100\%$$

1.6.2 增重情况

在一免时 (5 d) 对各组鸡只进行称重, 为首次免疫时体重; 攻虫时 (19 d) 进行称重为攻虫时体重; 攻虫后 12 d 扑杀各组鸡只时进行称重, 为试验结束时体重。增重指标计算方法见表 3-2。

表 3-2 增重指标计算方法

Table 3-2 The calculation method of evaluation index

增重指标	计算方法
平均增重 1	攻虫时体重-首次免疫时体重
相对增重率 1	(试验组增重/未免疫未攻虫增重) $\times 100\%$
平均增重 2	试验结束时体重-攻虫时体重
相对增重率 2	(试验组增重/未免疫未攻虫组增重) $\times 100\%$

1.6.3 病变计分

攻虫后第 12 天将各组鸡只扑杀, 参照戎杰^[10]对盲肠和肝脏的病变进行计分,

评估 rHmME 1 的保护效果。病变计分标准见表 3-3。

表 3-3 病变计分标准

Table 3-3 The standard of lesion score

寄生部位	分值	病变特点
盲肠	0	盲肠壁纵向褶皱特征良好，缺乏肉眼可见病灶，盲肠内容物粘稠，粪便颜色深，无干酪样物质
	1	盲肠壁增厚，或存在散在瘀点或两者兼有
	2	盲肠壁轻度增厚，盲肠有干酪样渗出物或内容物形成干酪样肠芯，盲肠内容物颜色改变或盲肠没有内容物和出血点
	3	盲肠壁增厚，盲肠内容物呈明显的干酪核心，或盲肠无内容物或盲肠壁出现瘀点
	4	盲肠壁显著增厚，盲肠粘膜层出现纤维性坏死和溃疡，盲肠内有干酪样核心或无内容物；存在出血性盲端；或盲肠断裂导致腹膜炎发生
肝脏	0	没有肉眼可见的圆形坏死灶
	1	存在 1-5 个小型的圆形坏死灶（直径小于 5 mm）
	2	出现许多小的圆形坏死灶（超过 5 个），或出现大的坏死灶（直径超过 5 mm）
	3	肉眼可见许多小的和大的坏死灶
	4	呈现复杂病灶和许多混合性损害。

1.6.4 抗体水平检测

各试验组鸡于 5、12、19 d 随机采取 5 只鸡的血液，分离血清，用间接 ELISA 法^[1]检测抗体水平，每个样品设置 3 个重复孔。

1.6.5 细胞因子的检测

购买 ELISA 细胞因子检测试剂盒，按照说明书中操作说明，测定在 5、12、19 d 各试验组鸡血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 的水平。

1.7 数据处理与分析

用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件对病变计分、增重情况、血清抗体水平和细

胞免疫水平等进行一维方差描述性统计分析，以 ($p < 0.05$) 作为显著性判断标准。

2. 结果

2.1 发病率和死亡率

免疫过程中，鸡群未见明显症状。攻虫后 7 d，未免疫攻虫组和佐剂对照组鸡只表现为呆立、精神沉郁，排出黄绿色粪便，各免疫组鸡只表现为羽毛凌乱，精神沉郁，部分排黄绿色稀粪。未免疫未攻虫组的鸡无明显症状，精神状态良好。各试验组均无鸡只死亡。就发病率和死亡率而言，rHmME 1 100 μg 组效果最好（表 3-4）。

表 3-4 各试验组鸡发病率和死亡率

Table 3-4 The morbidity rate and the mortality rate of each group post challenge

组别	攻虫时 鸡数	发病鸡数 (只)	发病率 (%)	死亡鸡数 (只)	死亡率 (%)
rHmME 1 200 μg 组	10	5	50.00	0	0.00
rHmME 1 100 μg 组	10	4	40.00	0	0.00
rHmME 1 50 μg 组	10	7	70.00	0	0.00
未免疫攻虫组	10	10	100.00	0	0.00
未免疫未攻虫组	10	0	0.00	0	0.00
佐剂对照组	10	10	100.00	0	0.00

2.2 增重情况

平均增重结果显示（表 3-5，图 3-1）平均增重 1（免疫阶段），6 个试验组无明显差异 ($p > 0.05$)，表明免疫没有对鸡只产生不良影响。平均增重 2（攻虫阶段）中 rHmME 1 免疫组增重均高于未免疫攻虫组，低于未免疫未攻虫组，其中 rHmME 1 200 μg 免疫组和 rHmME 1 100 μg 免疫组与未免疫攻虫组差异较大 ($p < 0.05$)。就增重情况而言，rHmME 1 100 μg 组效果最好。

表 3-5 各试验组鸡增重情况

Table 3-5 The weight gain of each group post challenge

组别	平均体重 1 (g)	相对增重率	
		1 (%)	2 (%)
rHmME 1 200 μg 组	79.28±1.50 ^a	97.41	78.25±2.71 ^{bc}
rHmME 1 100 μg 组	79.10±2.50 ^a	97.19	81.66±3.56 ^{bc}
rHmME 1 50 μg 组	81.43±0.91 ^a	100.05	73.53±2.53 ^{ab}
未免疫攻虫组	80.77±2.27 ^a	99.24	66.84±3.16 ^a
未免疫未攻虫组	81.39±1.71 ^a	100	86.29±2.01 ^c
佐剂对照组	79.96±1.68 ^a	98.24	71.93±1.17 ^{ab}

注：表中同列不同字母数值间差异显著 ($p < 0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p < 0.05$)

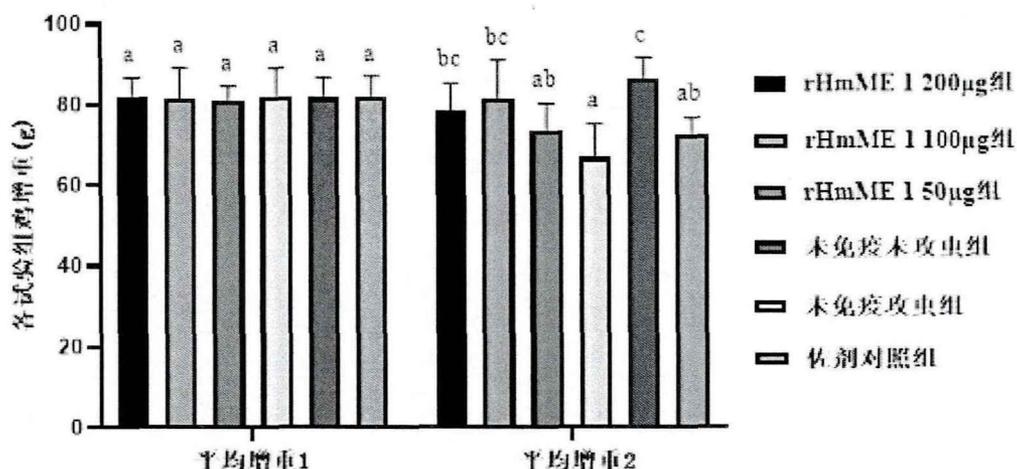


图 3-1 各试验组鸡增重情况

Fig. 3-1 The weight gain of each group post-challenge

2.3 病变计分

攻虫后 12 d, 将各试验组鸡只扑杀, rHmME 1 200 μg 组试验鸡存在肝脏病变, 坏死灶呈圆形直径较小, 大部分鸡出现盲肠肿胀肠壁层厚, 少量鸡未出现明显病变; rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 200 μg 组病变情况基本相同, 但盲肠病变相对轻微; rHmME 1 50 μg 组试验鸡半数出现肝脏病变, 全部试验鸡均

存在盲肠病变，肠壁增厚形成干酪样盲肠芯；佐剂对照组和未免疫攻虫组病变情况基本一致，大部分试验鸡肝脏出现病变，坏死灶数量多，部分坏死灶直径超过 5mm，所有试验鸡均出现盲肠病变，盲肠明显肿胀，形成盲肠栓塞物，肠壁增厚，肠粘膜出血；未免疫未攻虫组试验鸡肝脏和盲肠均未出现明显病变（图 3-2）。

在试验过程中，肝脏病变相对轻微，各组之间无显著差异 ($p>0.05$)。各个免疫组的盲肠病变计分均小于未免疫攻虫组，其中 rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组的平均肠道计分与未免疫攻虫组有显著差异 ($p<0.05$)，rHmME 1 50 μg 组与未免疫攻虫组之间无显著性差异 ($p>0.05$)，佐剂对照组和未免疫攻虫组的平均盲肠计分无明显差异，证明佐剂对于试验影响较小，可忽略不计（表 3-6，图 3-3）。就病变计分来看，rHmME 1 100 μg 组免疫保护效果较好。

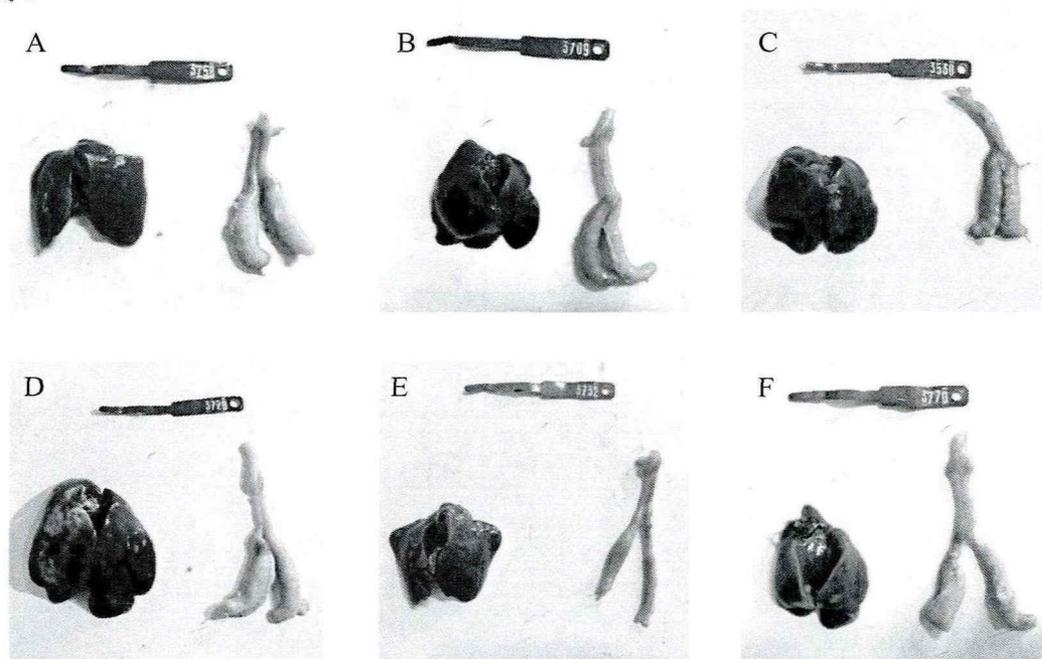


图 3-2 各试验组鸡肝脏和盲肠大体病变

Fig. 3-2 Gross pathological changes of liver and cecum in chickens of each group

A: rHmME 1 200 μg 组; B: rHmME 1 100 μg 组; C: rHmME 1 50 μg 组; D: 未免疫攻虫组; E: 未免疫未攻虫组; F: 佐剂对照组

A: rHmME 1 protein 200 μg dose group; B: rHmME 1 protein 100 μg dose group; C: rHmME 1 protein 50 μg dose group; D: unimmunized challenged group; E: unimmunized unchallenged group; F: adjuvant control group

表 3-6 各试验组鸡平均肝脏盲肠病变计分

Table 3-6 The pathological scores of chickens in each group post challenge

组别	平均肝脏计分	平均盲肠计分
rHmME 1 200 μg 组	0.17 \pm 0.17 ^a	1.00 \pm 0.37 ^{ab}
rHmME 1 100 μg 组	0.17 \pm 0.17 ^a	0.67 \pm 0.33 ^{ab}
rHmME 1 50 μg 组	0.50 \pm 0.34 ^a	1.83 \pm 0.31 ^{bc}
未免疫攻虫组	1.50 \pm 0.72 ^a	2.83 \pm 0.48 ^c
未免疫未攻虫组	0.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
佐剂对照组	0.56 \pm 0.18 ^a	2.50 \pm 0.43 ^c

注：表中同列不同字母数值间差异显著 ($p < 0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p < 0.05$)

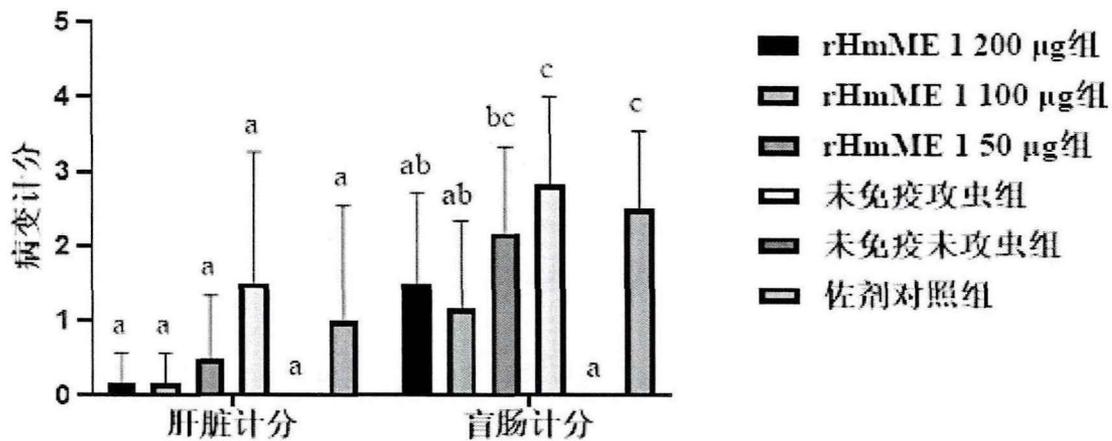


图 3-3 各试验组鸡平均肝脏盲肠病变计分

Fig. 3-3 The pathological scores of chickens in each group post challenge

2.4 抗体水平检测

使用间接 ELISA 法检测免疫前后鸡只抗体水平的变化 (表 3-7, 图 3-4), 结果显示在 5 d (一免前) 各试验组鸡只免疫水平均一, 无明显差异 ($p > 0.05$)。在 12 d (一免后一周) 各免疫组抗体水平均有提升与未免疫的三组存在显著性差异 ($p < 0.05$), 其中 rHmME 1 200 μg 组最高。在 19 d (二免后一周) 各免疫组抗体效价显著升高 ($p < 0.05$) 其中 rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组升高最为明显。未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组始终未产生较大

差异 ($p>0.05$), 说明佐剂未对抗体水平产生影响。就抗体水平而言, rHmME 1 200 μg 组免疫效果最好, rHmME 1 100 μg 组与之相比, 基本接近。

表 3-7 各试验组鸡抗体水平 (OD_{450})

Table 3-7 The immune interaction of each group (OD_{450})

组别	5d	12d	19d
rHmME 1 200 μg 组	0.14±0.02 ^a	0.41±0.05 ^c	1.08±0.07 ^c
rHmME 1 100 μg 组	0.13±0.01 ^a	0.37±0.03 ^d	1.05±0.09 ^c
rHmME 1 50 μg 组	0.14±0.02 ^a	0.34±0.07 ^b	0.79±0.26 ^b
未免疫攻虫组	0.13±0.02 ^a	0.21±0.02 ^a	0.31±0.05 ^a
未免疫未攻虫组	0.13±0.01 ^a	0.21±0.03 ^a	0.37±0.05 ^a
佐剂对照组	0.13±0.02 ^a	0.29±0.09 ^a	0.31±0.02 ^a

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($p<0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p<0.05$)

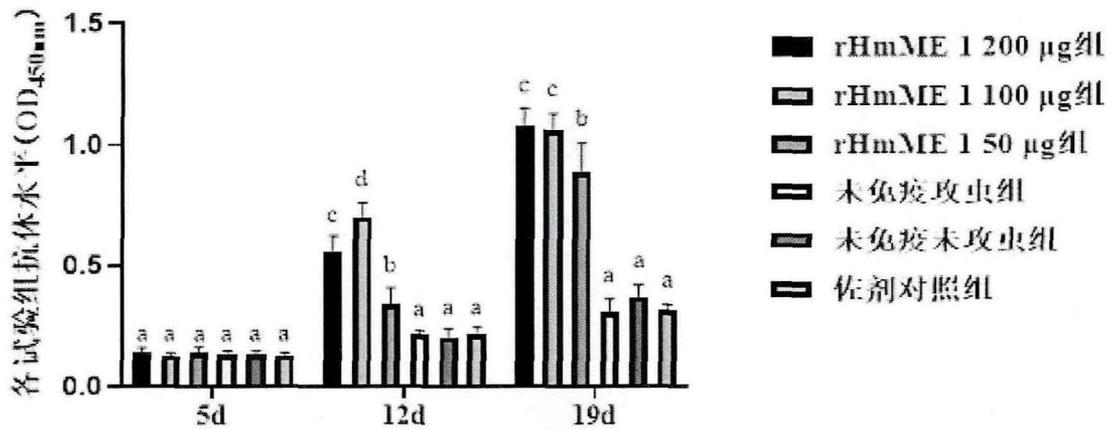


图 3-4 各试验组鸡抗体水平

Fig. 3-4 The immune interaction of each group

2.5 细胞因子检测

2.5.1 IFN- γ

IFN- γ 水平检测结果显示 (表 3-8, 图 3-5), 5 d (一免前) 各试验组 IFN- γ 水平基本一致。12 d (一免后一周), 免疫组与未免疫组之间存在显著差异

($p < 0.05$), 免疫组鸡只血清中 IFN- γ 值明显升高, rHmME 1 100 μg 组升高最为显著。19 d (二免后一周) 重组蛋白免疫组均高于未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组 ($p < 0.05$), rHmME 1 200 μg 组最高。就 IFN- γ 水平而言, rHmME 1 200 μg 组最高, rHmME 1 100 μg 组与之相比, 基本接近。

表 3-8 各试验组鸡 IFN- γ 水平 (pg/mL)

Table 3-8 The levels of IFN- γ of each group (pg/mL)

组别	5d	12d	19d
rHmME 1 200 μg 组	77.14 \pm 2.89 ^a	102.51 \pm 2.55 ^c	123.94 \pm 1.81 ^d
rHmME 1 100 μg 组	73.23 \pm 2.11 ^a	119.88 \pm 2.93 ^d	114.87 \pm 3.03 ^{cd}
rHmME 1 50 μg 组	72.53 \pm 1.23 ^a	109.58 \pm 2.10 ^{cd}	104.68 \pm 2.10 ^{bd}
未免疫攻虫组	79.64 \pm 4.20 ^a	90.32 \pm 3.22 ^b	86.72 \pm 3.63 ^a
未免疫未攻虫组	79.22 \pm 3.48 ^a	76.10 \pm 1.57 ^a	89.36 \pm 3.95 ^a
佐剂对照组	80.56 \pm 3.96 ^a	86.34 \pm 3.56 ^{ab}	96.12 \pm 3.40 ^{ab}

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($p < 0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p < 0.05$)

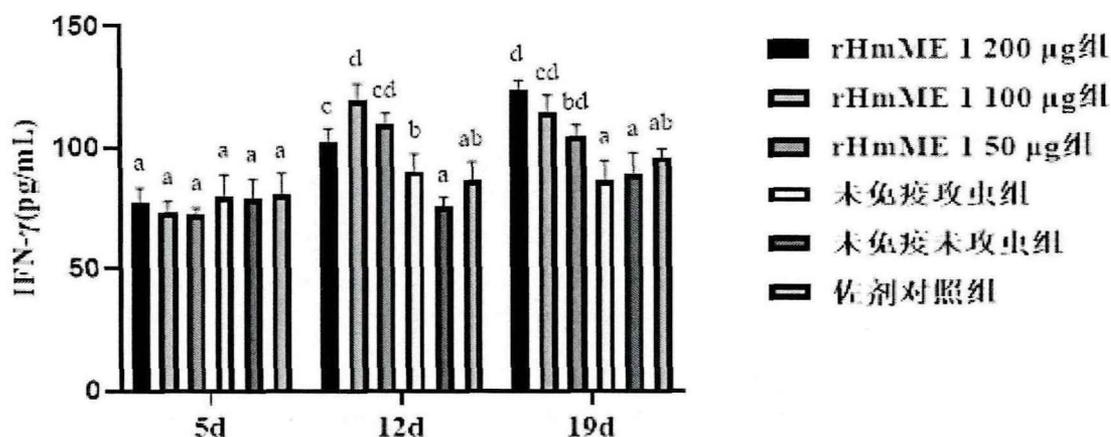


图 3-5 各试验组鸡 IFN- γ 水平

Fig. 3-5 The levels of IFN- γ of each group

2.5.2 IL-2

IL-2 水平检测结果显示 (表 3-9, 图 3-6), 5 d (一免前), 各试验组 IL-2 水平基本一致。12 d (一免后一周) 各组 IL-2 水平均有提升, rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组显著高于其他几组 ($p<0.05$)。19 d (二免后一周), rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组均与未免疫三组具有显著性差异 ($p<0.05$), 其中 rHmME 1 200 μg 组 IL-2 水平最高。就 IL-2 水平而言, rHmME 1 200 μg 组最高, rHmME 1 100 μg 组与之相比, 基本接近。

表 3-9 各试验组鸡 IL-2 水平 (pg/mL)

Table 3-9 The levels of IL-2 of each group (pg/mL)

组别	5d	12d	19d
rHmME 1 200 μg 组	67.84 \pm 5.43 ^a	135.03 \pm 1.81 ^b	145.01 \pm 1.50 ^c
rHmME 1 100 μg 组	69.57 \pm 5.62 ^a	129.05 \pm 1.27 ^b	140.11 \pm 1.64 ^c
rHmME 1 50 μg 组	77.90 \pm 4.05 ^a	105.48 \pm 2.06 ^a	137.28 \pm 0.95 ^c
未免疫攻虫组	71.49 \pm 6.04 ^a	97.33 \pm 3.27 ^a	112.49 \pm 2.76 ^b
未免疫未攻虫组	76.24 \pm 3.63 ^a	96.65 \pm 2.18 ^a	112.57 \pm 4.30 ^b
佐剂对照组	74.69 \pm 6.80 ^a	96.83 \pm 1.91 ^a	98.24 \pm 2.35 ^a

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($p<0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p<0.05$)

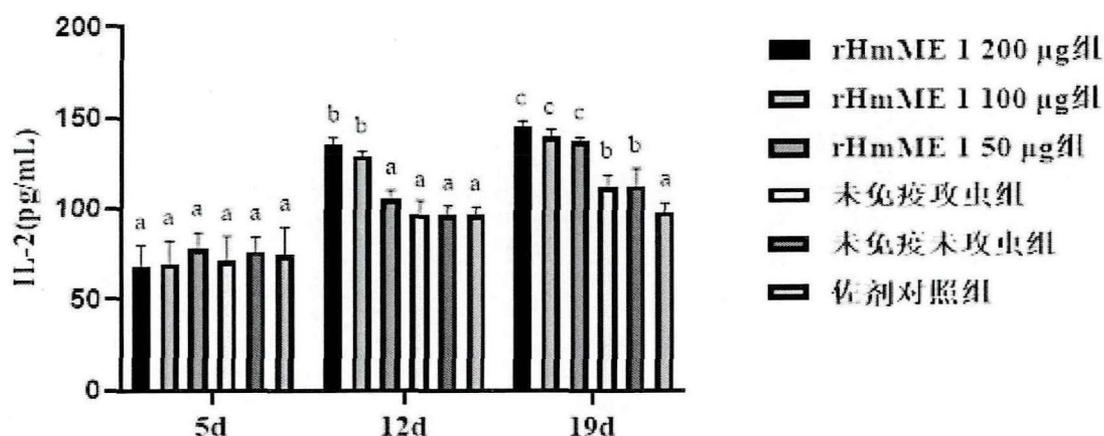


图 3-6 各试验组鸡 IL-2 水平

Fig. 3-6 The levels of IL-2 of each group

2.5.3 IL-4

IL-4 水平检测结果显示 (表 3-10, 图 3-7), 5 d (一免前), 各试验组的 IL-4 水平基本一致。12 d (一免后一周), rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组 IL-4 水平有所降低, 与其他几组存在显著差异 ($p<0.05$)。19 d (二免后一周), rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组显著低于未免疫的三组 ($p<0.05$), 其中 rHmME 1 100 μg 组 IL-4 水平最低。就 IL-4 水平而言, rHmME 1 100 μg 组最低。

表 3-10 各试验组鸡 IL-4 水平 (pg/mL)

Table 3-10 The levels of IL-4 of each group (pg/mL)

组别	5d	12d	19d
rHmME 1 200 μg 组	92.53 \pm 3.23 ^a	109.61 \pm 3.43 ^b	104.27 \pm 1.69 ^b
rHmME 1 100 μg 组	94.99 \pm 2.92 ^a	86.77 \pm 2.82 ^a	80.21 \pm 1.22 ^a
rHmME 1 50 μg 组	93.39 \pm 3.12 ^a	87.97 \pm 0.98 ^a	93.56 \pm 1.65 ^{ab}
未免疫攻虫组	95.20 \pm 2.96 ^a	126.44 \pm 3.71 ^c	146.76 \pm 5.47 ^c
未免疫未攻虫组	93.74 \pm 3.77 ^a	115.93 \pm 2.65 ^{bc}	137.38 \pm 5.25 ^c
佐剂对照组	97.61 \pm 3.45 ^a	106.60 \pm 3.39 ^b	143.28 \pm 4.11 ^c

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($p<0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p<0.05$)

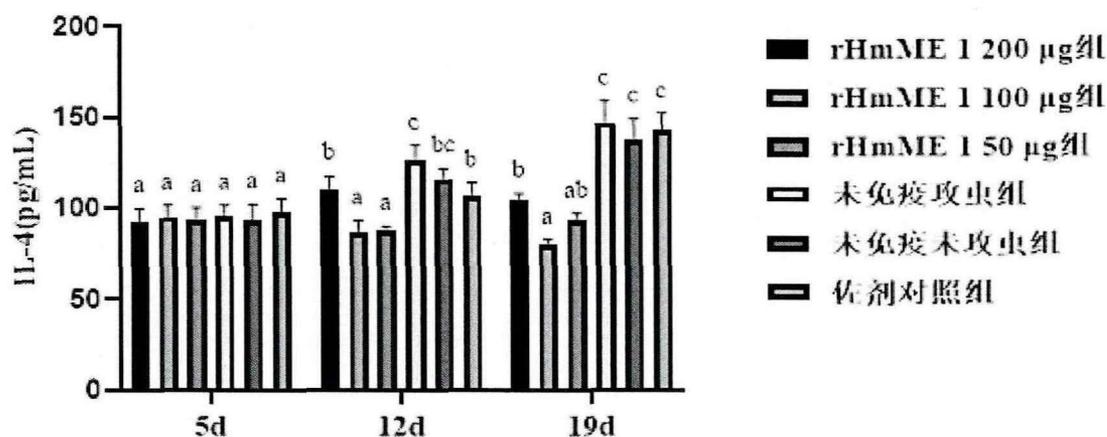


图 3-7 各试验组鸡 IL-4 水平

Fig. 3-7 The levels of IL-4 of each group

2.5.4 IL-10

IL-10 水平检测结果显示 (表 3-10, 图 3-7), 5 d (一免前)、12 d (一免后一周) 和 19 d (二免后一周) 所获得的血清中各组 IL-10 均未存在明显差异 ($p>0.05$)。

表 3-11 各试验组鸡 IL-10 水平 (pg/mL)

Table 3-11 The levels of IL-10 of each group (pg/mL)

组别	5d	12d	19d
rHmME 1 200 μg 组	33.17 \pm 3.23 ^a	36.95 \pm 2.14 ^a	38.61 \pm 1.62 ^a
rHmME 1 100 μg 组	34.91 \pm 4.35 ^a	31.50 \pm 3.55 ^a	44.49 \pm 0.94 ^a
rHmME 1 50 μg 组	32.53 \pm 3.16 ^a	31.33 \pm 3.87 ^a	35.76 \pm 1.95 ^a
未免疫攻虫组	35.37 \pm 4.25 ^a	30.51 \pm 1.76 ^a	41.716 \pm 3.20 ^a
未免疫未攻虫组	33.97 \pm 3.41 ^a	41.83 \pm 3.64 ^a	41.07 \pm 2.55 ^a
佐剂对照组	31.90 \pm 2.56 ^a	34.71 \pm 2.22 ^a	37.70 \pm 2.31 ^a

注: 表中同列不同字母数值间差异显著 ($p<0.05$)。Note: The data with a different letters means significant difference ($p<0.05$)

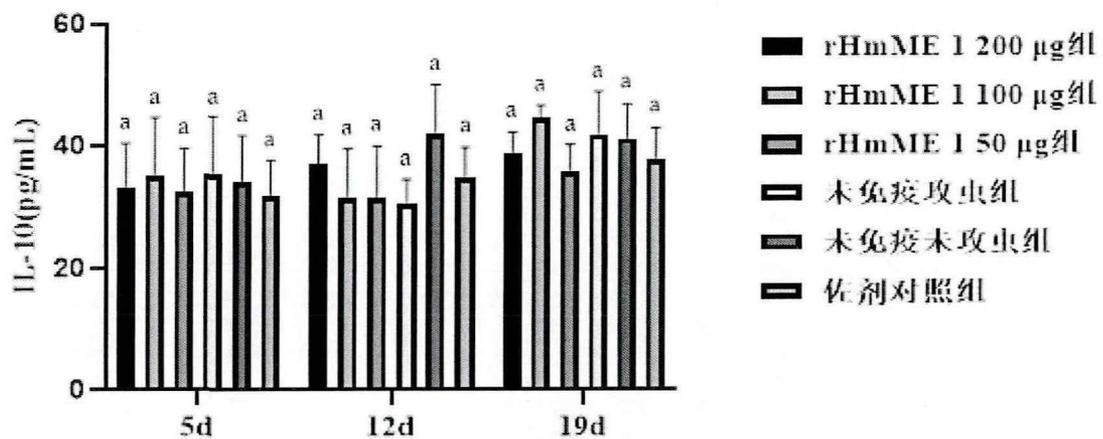


图 3-8 各试验组鸡 IL-10 水平

Fig. 3-8 The levels of IL-10 of each group

3. 小结与讨论

迄今为止, 对于火鸡组织滴虫 ME 1 蛋白功能的研究多集中于细胞代谢和基因起源, 鲜少有人探索 ME 1 蛋白的抗原性和免疫保护效果。本论文前期重组表达了 rHmME 1 蛋白并证明该蛋白具有良好的抗原性, 本章将获得的 rHmME 1 蛋白在 55°C 加热 15 min 后去除酶活性并设计免疫程序将其免疫鸡群, 通过观察记录鸡只的发病率、死亡率、平均增重、病变计分、抗体和细胞因子水平变化等方面对该蛋白进行了免疫保护效果评价。

在临床表现中, 除未免疫未攻虫组各方面表现均正常外, 其他试验组均出现精神沉郁、垂翅低头、排出硫磺样稀粪等症状, 相对其他试验组, rHmME 1 100 μg 组表现临床症状的鸡只较少, 发病率较低。根据平均增重分析, 在免疫阶段 (平均增重 1) 6 个试验组之间无显著差异, 证明免疫过程未对鸡只产生不良影响, 在攻虫阶段 (平均增重 2), 未免疫攻虫组鸡只增重率明显下降, 与 rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组存在显著差异 ($p < 0.05$), rHmME 1 50 μg 组增重率相对较低, 未与未免疫攻虫组产生显著差异 ($p > 0.05$)。在试验过程中, 各试验组均未出现鸡只死亡的情况。肝脏平均病变计分显示除未免疫未攻虫组外各组均存在不同程度的病变, 其中 rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组病变较为轻微, 未免疫攻虫组病变最为严重, 但差异并不显著 ($p > 0.05$)。盲肠平均病变计分显示除未免疫未攻虫组外其余试验组均存在病变, rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组显著低于未免疫攻虫组和佐剂对照组 ($p < 0.05$), 其中 rHmME 1 100 μg 组病变最为轻微。

对于候选疫苗的评估, 体内保护效力是最重要的参数之一, 体液免疫反应和细胞免疫反应则是进一步评估疫苗的保护效力的重要指标^[12,13]。寄生虫感染宿主会诱发复杂的免疫应答其机制, 包括细胞免疫和体液免疫^[14,15]。辅助性 T 细胞起关键作用, 决定了免疫的特异性以及发生何种免疫应答, 细胞因子作为介质既参与抗体介导的免疫也参与细胞介导的免疫^[16,17]。辅助性淋巴细胞 (Th) 包括 Th1 和 Th2 亚群, 其中 Th1 细胞分泌 IL-2、TNF- α 、IFN- γ , 主要功能为介导细胞免疫; Th2 细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-10, 介导体液免疫应答, 辅助抗体生成^[18]。Th1 常介导保护性免疫力, Th2 细胞则介导病理损害作用, 二者常起拮抗作用^[19]。

本论文的抗体水平分析结果显示, 在 5 d (一免前) 六个试验组之间抗体水平平均一, 12 d (一免后一周) rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组抗体水平显著高于未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组 ($p < 0.05$), 其中 rHmME 1 100 μg 组抗体水平最高, 19 d (二免后一周), rHmME 1 200 μg 组和 rHmME 1 100 μg 组抗体水平基本一致, 显著高于其他试验组 ($p < 0.05$)。细胞因子水平检测显示, 5 d 时, 各试验组 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 水平不存在显著性差异 ($p > 0.05$), rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 的 IFN- γ 和 IL-2 水平随着免疫次数逐渐升高, 19 d 时显著高于未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组 ($p < 0.05$), 而 rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组的 IL-4 水平则呈现下降趋势, 该现象提示此时 TH1 起主导作用, IFN- γ 和 IL-2 大量分泌对抑制了 IL-4 的产生; IL-10 各试验组水平始终无显著差异, 推测该重组蛋白免疫鸡只后并未诱导机体产生 IL-10。

综合发病率、死亡率、平均增重、病变计分、抗体和细胞因子水平变化等方面, rHmME 1 100 μg 组免疫保护效果最佳, 下一步课题组将进一步优化免疫程序、筛选合适的佐剂, 为临床应用奠定基础。

参考文献

- [1] McDougald L R. Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review[J]. Avian Dis, 2005, 49(4): 462-476.
- [2] Abernathy C O, Liu Y P, Longfellow D, et al. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues[J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(7): 593-597.
- [3] Zolla L, Timperio A M. Involvement of active oxygen species in protein and oligonucleotide degradation induced by nitrofurans[J]. Biochem Cell Biol, 2005, 83(2): 166-175.
- [4] 中国农业部 193 号公告. 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[S].
- [5] Van Der Heijden H M, Landman W J. *In vivo* effect of herbal products against *Histomonas meleagridis* in turkeys[J]. Avian Pathol, 2008, 37(1): 45-50.
- [6] Grabensteiner E, Liebhart D, Arshad N, et al. Antiprotozoal activities determined

- in vitro* and *in vivo* of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp*[J]. Parasitol Res, 2008, 103(6): 1257-1264.
- [7] Hafez H M, Hauck R. Efficacy of a herbal product against *Histomonas meleagridis* after experimental infection of turkey poults[J]. Arch Anim Nutr, 2006, 60(5): 436-442.
- [8] Dwyer D M, Honigberg B M. Effect of certain laboratory procedures on the virulence of *Histomonas meleagridis* for turkeys and chickens[J]. J Parasitol, 1970, 56: 694-700.
- [9] Wallach M, Smith N C, Petracca M, et al. *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens[J]. Vaccine, 1995, 13(4):347-54.
- [10] 戎杰. 不同品种鸡及火鸡对火鸡组织滴虫田间分离株的易感性研究[D]. 扬州: 扬州大学; 2021.
- [11] 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.
- [12] Riese P, Trittel S, Schulze K, et al. Rodents as pre-clinical models for predicting vaccine performance in humans[J]. Expert Rev Vaccines, 2015;14(9):1213-25.
- [13] Xie Y T, Gao J G, Wu Y P, et al. Recombinant alpha-actinin subunit antigens of *Trichomonas vaginalis* as potential vaccine candidates in protecting against trichomoniasis[J]. Parasit Vector, 2017, 10(1): 83.
- [14] 汪飞燕. 毒害艾美耳球虫配子体抗原的免疫保护分析[D]. 扬州: 扬州大学; 2020.
- [15] 陈晨, 陈乔光, 孔令明等. 禽组织滴虫病免疫与疫苗防治研究进展[J]. 中国家禽, 202143 (06): 80-85.
- [16] 郭亮, 于小桢. 寄生虫细胞因子免疫的研究进展(一)[J]. 中国动物保健, 2013, 15 (06): 26-27.
- [17] 程云, 李建华, 彭景贤. 细胞因子与寄生虫感染关系研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5 (05): 381-384.
- [18] 高海兵, 赵志宏, 霍小琴等. Th1/Th2/Th17 细胞因子在黑热病中的变化分

析[J]. 山西医药杂志, 2022, 51 (10): 1162-1164+1201.

- [19] 温婷媛. 细胞因子与寄生虫免疫关系研究进展[J]. 国外医学(寄生虫病分册), 2001, (05): 211-216.

全文结论

1、对火鸡组织滴虫 ME 1 基因进行克隆、序列分析和诱导表达, 结果显示 HmME 1 基因 (MW400608.1) 全长 1182bp, 编码了 394 个氨基酸, 无信号肽活性, 与已报道的火鸡组织滴虫 ME 1 位于同一个分支内, 同源性分别为 100%、99.5%、98.5%, 并且与胎儿三毛滴虫同源性较高。构建重组表达质粒 pET28a(+)-HmME 1, 并转化至 BL21, 成功诱导表达出重组蛋白, 主要以可溶性形式存在, 大小为 46kDa。rHmME 1 蛋白具有酶活性, 在 55℃加热 15 min 可将酶活性去除。

2、对火鸡组织滴虫 rHmME 1 蛋白进行抗原性分析, 鸡源抗火鸡组织滴虫阳性血清以及鼠抗 rHmME 1 阳性血清均能特异性识别 rHmME 1, 具有良好抗原性。鼠抗 rHmME 1 阳性血清和单克隆抗体均能特异性识别火鸡组织滴虫中 ME 1 天然蛋白。IFA 检测天然蛋白 ME 1 在火鸡组织滴虫中的分布规律, 定位于虫体胞质中, 强毒虫株中分布明显多于传代致弱虫株。

3、为进一步探索 rHmME 1 蛋白的免疫保护效果, 设置三种不同剂量的免疫组 (rHmME 1 200 μg 组、rHmME 1 100 μg 组和 rHmME 1 50 μg 组)、未免疫攻虫组、未免疫未攻虫组和佐剂对照组。综合发病率、死亡率、平均增重、病变计分、抗体和细胞因子水平变化等方面, 评价 rHmME 1 蛋白免疫保护效果, 结果显示, rHmME 1 100 μg 组免疫保护效果最佳。