

密级:

论文编号:



中国农业科学院

# 学位论文

## 马链球菌马亚种 8 组分融合蛋白的构建及其 小鼠免疫原性的研究

硕士研究生: 何聆瑜

学 号: 82101195307

指 导 教 师: 郭巍 副研究员

申请学位类别: 兽医硕士

领 域: 兽医

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所  
研究生院

2022 年 6 月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis**

## **Construction of Eight-Component Fusion Protein Against Strangles and Its Immunogenicity in Mice**

**Candidate: HE Lingyu**

**Student ID: 82101195307**

**Supervisor: Associate Prof. GUO Wei**

**Degree Type: Master of Professional Degree in  
Veterinary Medicine**

**Major: Veterinary Medicine**

**Institution: Harbin Veterinary Research Institute  
Graduate School**

**June 2022**

## 摘 要

马腺疫是由马链球菌马亚种 (*Streptococcus equi subspecies equi*, *S. equi*) 引起的一种急性接触性传染病, 严重影响幼驹的成长发育, 是马属动物最常见的传染病之一。我国将马腺疫列为三类动物疫病, 但在我国尚无预防该病的有效疫苗, 也缺乏 *S. equi* 动物感染和保护模型。*S. equi* 表达多种起到毒力作用的蛋白质, 其中包括胶原蛋白结合蛋白 CNE,  $\alpha 2$ -巨球蛋白/白蛋白/IgG 结合蛋白 EAG, 胶原蛋白样蛋白家族成员 SclC、SclI 和 SclF, 具有典型的细菌表面蛋白特征的 Eq5 和 Eq8 等 7 种表面蛋白, 以及 1 种分泌蛋白 IgG 内肽酶 IdeE。这些蛋白质在参与促进细菌黏附、免疫逃避以及对天然和适应性宿主防御产生抵抗等过程中发挥着重要作用。

本研究旨在利用 8 种 *S. equi* 的蛋白作为亚单位疫苗候选蛋白, 构建多组分融合蛋白, 探究其作为马腺疫亚单位疫苗的潜力。以 *S. equi* HLJ2018 株基因组 DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增编码这 8 种蛋白的 *cne*、*eag*、*SclC*、*SclI*、*SclF*、*eq5*、*eq8* 和 *ideE* 基因, 将扩增到的 DNA 片段分别插入载体 pGEX-6p-1, 构建了重组表达质粒 pGEX-6p-1-CNE、pGEX-6p-1-EAG、pGEX-6p-1-SclF、pGEX-6p-1-SclI、pGEX-6p-1-SclC、pGEX-6p-1-EQ8、pGEX-6p-1-EQ5 和 pGEX-6p-1-ideE。通过大肠杆菌系统表达并纯化蛋白, 初步建立能够分别检测这 8 种抗原特异性抗体效价的间接 ELISA 方法。通过同源重组技术依次串联该 8 个基因, 构建重组质粒 pET-28a-SE8, 转化大肠杆菌后诱导表达 8 组分融合蛋白 SE8 (rSE8), 利用 *S. equi* 阳性马血清和 *S. equi* 感染小鼠血清通过 western blot 检测 rSE8 的反应原性, 添加 8%佐剂后制备成多组分融合蛋白疫苗; 将 HLJ2018 株利用甲醛灭活后添加 8%佐剂制备成灭活疫苗。以 rSE8 疫苗和 HLJ2018 灭活疫苗分别免疫小鼠。利用 8 种单组分蛋白和一种 GST 标签的 SE8 融合蛋白建立的间接 ELISA 方法, 检测 rSE8 免疫后小鼠血清中各蛋白特异性抗体水平以及 rSE8 特异性抗体亚型水平。以梯度浓度的 HLJ2018 株菌液感染小鼠, 建立 HLJ2018 株感染小鼠模型, 确定 HLJ2018 株对小鼠的最小完全致死剂量。在攻菌保护试验中, 以 10 倍最小完全致死剂量 HLJ2018 株感染小鼠后, 检测免疫小鼠的攻菌保护率、体质量变化、器官病理变化、器官含菌量和细胞因子变化等指标。

结果表明, 成功构建大肠杆菌表达质粒 pET-28a-SE8, 纯化后的 rSE8 大小为 181 kU, 具有与 *S. equi* 自然感染马阳性血清和 *S. equi* 感染小鼠血清结合的良好反应原性。rSE8 免疫小鼠后, 可诱导小鼠产生 rSE8 及其所包含的 8 种抗原的特异性 IgG 抗体, 且 rSE8 特异性 IgG1 水平显著高于 IgG2a 和 IgG2b 水平 ( $P < 0.0001$ ); HLJ2018 株感染 rSE8 免疫组小鼠, 可得到完全保护, 而 HLJ2018 灭活疫苗免疫组小鼠的保护率只有 66.7%; rSE8 免疫组小鼠体质量很快恢复正常, 灭活疫苗免疫组和对照组小鼠体质量在观察期内呈现持续下降的趋势; rSE8 免疫组的各脏器未见明显病变, 灭活疫苗免疫组和对照组小鼠各器官出现不同程度的病变; rSE8 免疫组小鼠的各脏器均未分离到 HLJ2018 株, 从灭活疫苗免疫组和对照组小鼠器官中分离到了 HLJ2018 株。

结果提示, rSE8 疫苗和灭活疫苗都能诱导小鼠产生有效的保护性免疫应答, 但 rSE8 能够诱导小鼠产生更高免疫水平, 更有效地保护机体免受 *S. equi* 的攻击, 阻止 *S. equi* 引起的器官病变, 具有更强的免疫调节和免疫诱导能力。本研究为马腺疫亚单位疫苗的研究提供了参考依据。

**关键词:** 马链球菌马亚种, 多组分融合蛋白, 亚单位疫苗

## Abstract

Strangles was classified as Class III animal disease, which is an acute equine infectious disease and one of the most common infectious diseases among equine caused by *Streptococcus equi subspecies equi* (*S. equi*), causing severe impact on the growth of foals. There were no effective vaccines against it and no *S. equi* infection and protection animal models in China. A variety of proteins were considered to be virulence factors expressed by *S. equi* including surface proteins such as collagen-binding protein CNE,  $\alpha$ 2-macroglobulin/albumin/IgG-binding protein EAG, collagen-like protein family members SclC, SclI, and SclF, proteins with typical bacterial surface protein signatures Eq5 and Eq8, as well as IgG endopeptidase IdeE. These proteins were considered to be involved in helping bacterial adhesion, immune evasion, and resistance to natural and adaptive host defenses.

This study was conducted to construct a multi-component fusion protein and to discuss its potential as a subunit vaccine against strangles.

The genes involving *cne*, *eag*, *SclC*, *SclI*, *SclF*, *eq5*, *eq8*, and *ideE* were amplified using the genomic DNA of *S. equi* HLJ2018 as a template by PCR and transformed into plasmid pGEX-6p-1 respectively, and the recombinant expression plasmids pGEX-6p-1-CNE, pGEX-6p-1-EAG, pGEX-6p-1-SclF, pGEX-6p-1-SclI, pGEX-6p-1-SclC, pGEX-6p-1-EQ8, pGEX-6p-1-EQ5 and pGEX-6p-1-ideE were constructed. These eight proteins were expressed by the *E. coli* system and purified to preliminarily establish eight indirect ELISA methods capable of detecting specific antibodies to each of them. The recombinant plasmid pET-28a-SE8 was constructed by sequentially linking these eight genes through homologous recombination technology. The eight-component fusion protein SE8 (rSE8) was purified after induced expression by *E. coli* system. Western blot was used to detect the reactogenicity of rSE8 using positive sera from equine naturally infected with *S. equi* and sera from mouse infected with *S. equi*, and adjuvant was added to prepare the rSE8 vaccine while *S. equi* HLJ2018 were inactivated by formaldehyde, and then adjuvant was added to prepare HLJ2018 inactivated vaccine. Mice were immunized with rSE8 vaccine and HLJ2018 inactivated vaccine, respectively. The levels of each protein-specific antibody and rSE8-specific antibody subtypes in the sera were measured by indirect ELISA methods established previously. Mice were infected with gradient diluted HLJ2018 bacteria, and the mouse infection model was established to determine the minimum complete lethal dose (MLD) of HLJ2018 to mice. In the challenge protection experiment, the survival rates, weight changes, organ pathological changes, organ bacterial loads, and cytokine changes of immunized mice were evaluated after being infected with a 10-fold MLD dose of HLJ2018.

The results showed that pET-28a-SE8 was successfully constructed, and the purified rSE8 was 181 kU with good reactogenicity binding to positive sera from equine naturally infected with *S. equi* and sera from mouse infected with *S. equi*. High levels of specific IgG antibodies against these nine proteins could be induced in mice after being immunized with rSE8. rSE8-specific IgG1 levels were significantly higher than those of IgG2a and IgG2b ( $p < 0.0001$ ); Mice immunized with rSE8 were

completely protected after being infected with HLJ2018, while the protection rate of HLJ2018 inactivated vaccine immunized mice was only 66.7%. In terms of the rSE8 immune group, the weight of the mice returned to normal quickly, and no obvious pathological changes were observed in the organs along with no *S. equi* being isolated from these organs. While different situations can be seen in the HLJ2018 inactivated vaccine immune group and the control group. Specifically, the weight of mice experienced a continuous downward trend during the observation period and different degrees of pathological changes in the organs can be seen in addition to a different amount of *S. equi* can be isolated from these organs.

The results indicated that both rSE8 vaccine and HLJ2018 inactivated vaccine can induce effective protective immune responses in mice. Compared with HLJ2018 inactivated vaccine, rSE8 can induce more effective immune protection against *S. equi* infection, thereby preventing organ pathological changes. In brief, rSE8 has stronger immune regulation and induction ability. This study provided an experimental basis for further study of subunit vaccines against strangles.

**Keywords:** *Streptococcus Equi Subspecies Equi*, Multi-Component Fusion Protein, Subunit Vaccine

# 目 录

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 第一章 绪论.....                                   | 1  |
| 1.1 马腺疫概述.....                                | 1  |
| 1.2 病原学及流行病学.....                             | 1  |
| 1.3 临床症状.....                                 | 2  |
| 1.4 马链球菌的毒力相关因子 .....                         | 3  |
| 1.5 马腺疫疫苗的研究进展.....                           | 4  |
| 1.5.1 灭活疫苗 .....                              | 5  |
| 1.5.2 提取物疫苗 .....                             | 5  |
| 1.5.3 减毒活疫苗 .....                             | 5  |
| 1.5.4 亚单位疫苗 .....                             | 6  |
| 1.5.5 其他类型疫苗 .....                            | 7  |
| 1.6 本研究的目的和意义.....                            | 7  |
| 第二章 重组蛋白的构建 .....                             | 8  |
| 2.1 材料.....                                   | 8  |
| 2.1.1 菌种和载体.....                              | 8  |
| 2.1.2 主要仪器 .....                              | 8  |
| 2.1.3 主要耗材 .....                              | 8  |
| 2.1.4 主要试剂.....                               | 9  |
| 2.1.5 主要溶液和培养基的配制.....                        | 10 |
| 2.1.6 本研究所使用的质粒.....                          | 11 |
| 2.2 重组蛋白的纯化.....                              | 11 |
| 2.2.1 单组分重组蛋白表达载体的构建.....                     | 11 |
| 2.2.2 多组分融合蛋白 SE8(rSE8)表达载体的构建 .....          | 14 |
| 2.2.3 rSE8 最佳表达条件的确定.....                     | 16 |
| 2.2.4 重组蛋白的纯化.....                            | 17 |
| 2.2.5 重组蛋白的鉴定 .....                           | 18 |
| 2.3 结果及分析.....                                | 18 |
| 2.3.1 目的基因的 PCR 扩增结果 .....                    | 18 |
| 2.3.2 rSE8 表达载体的构建结果.....                     | 19 |
| 2.3.3 重组蛋白的表达和纯化结果.....                       | 19 |
| 2.3.4 单组分重组蛋白以及 rSE8 的 western blot 鉴定结果..... | 23 |
| 第三章 rSE8 对小鼠免疫效果的评价 .....                     | 24 |
| 3.1 材料.....                                   | 24 |
| 3.1.1 菌种及实验动物.....                            | 24 |

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 3.1.2 主要仪器.....                                    | 24 |
| 3.1.3 主要耗材.....                                    | 24 |
| 3.1.4 主要试剂.....                                    | 25 |
| 3.1.5 主要溶液和培养基的配制.....                             | 25 |
| 3.2 方法.....                                        | 26 |
| 3.2.1 S. equi 小鼠感染模型的建立 .....                      | 26 |
| 3.2.2 HLJ2018 灭活疫苗的制备.....                         | 26 |
| 3.2.3 小鼠免疫试验.....                                  | 27 |
| 3.2.4 间接 ELISA 检测 rSE8 免疫小鼠血清中各蛋白特异性抗体水<br>平 ..... | 27 |
| 3.2.5 小鼠免疫保护试验.....                                | 28 |
| 3.2.6 统计学分析.....                                   | 30 |
| 3.3 结果及分析.....                                     | 30 |
| 3.3.1 HLJ2018 株感染小鼠的最小完全致死剂量.....                  | 30 |
| 3.3.2 rSE8 诱导小鼠产生的免疫应答.....                        | 31 |
| 3.3.3 rSE8 疫苗和 HLJ2018 灭活疫苗对小鼠的保护效果的比较 .....       | 32 |
| 第四章 讨论与分析 .....                                    | 36 |
| 第五章 全文结论 .....                                     | 39 |
| 参考文献.....                                          | 40 |

## 第一章 绪论

### 1.1 马腺疫概述

马属动物传染病是现代马产业的重要威胁,尤其是马腺疫(Strangles)这种高度传染性上呼吸道疾病,是最古老也是最常见的马属动物传染病之一。患病的马的肿胀的喉部淋巴结及其破溃后引起的喉囊积液症会限制呼吸道而造成窒息,因此被称为“Strangles”。中医也称马腺疫为喷喉、喉骨胀和槽结等。1251年,丹麦骑士 Jordanus Rufus 首次对腺疫进行了描述和记载,由于大多数马匹都会患腺疫,而且病马痊愈后不会再发病,当时人们普遍认为这种传染病是无法避免的,甚至认为越早患病越有利于疾病的痊愈。到了1811年,法国皇帝拿破仑要求军队的马必须是之前感染过腺疫并已痊愈的马,因为他们认为这样的马在参战期间就不太容易再次患病(WALLER, 2018)。

1888年,英国皇家兽医学院的教授 Schutz 首次从病马的淋巴结脓汁中分离出病原,并确认其为马链球菌马亚种(*Streptococcus equi subspecies equi, S. equi*)。*S. equi*可感染所有年龄阶段的马属动物,但主要感染幼驹,严重影响生长发育(HARRINGTON et al., 2002)。在发病早期对病马采用青霉素治疗具有一定的效果,但治疗后的马不能产生对*S. equi*的免疫力,并且仍然保持易感性(SWEENEY et al., 2005)。据估计,大约75%康复马能获得保护性免疫(HAMLEN et al., 1994)。疫苗是保护马匹免受该病影响的有效途径,在欧洲和美国已经有针对马腺疫的灭活疫苗和减毒活疫苗,但接种后存在颌下淋巴结和肌肉内脓肿等不良反应。中国目前仍没有马腺疫的疫苗。

### 1.2 病原学及流行病学

*S. equi*是C型链球菌,属于革兰氏阳性菌,属于。电子显微镜观察可见*S. equi*菌体主要呈圆形或卵圆形,直径在0.5~1 μm左右,成对、短链或长链状。37℃时血平板上培养24 h出现典型的β溶血,形成0.8~1.2 mm的圆形光滑、半透明或不透明、露珠样菌落。在混有鲜血的液体培养基或患马脓汁中,菌体通常排列为长链,约由5~15个菌体组成。在干燥条件下的脓汁病料中,*S. equi*可以存活数周,在水中可生存一周,对外界环境抵抗力较强,但对普通消毒剂较为敏感(WALLER, 2014)。

马链球菌与引起化脓性感染的主要人类病原体化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes, S. pyogenes*)具有80%的同源性(HOLDEN et al., 2009)。*S. equi*和马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi subspecies zooepidemicus, S. zooepidemic*)是马链球菌的两个亚种,*S. equi*是由*S. zooepidemic*进化而来(WEBB et al., 2008),二者具有97%以上的DNA同源性。*S. equi*和*S. zooepidemic*表达许多相同的蛋白质和毒力因子,但*S. zooepidemicus*是一种人畜共患条件致病菌,宿主较为广泛,能够感染人、犬、猪、马等在内的多种动物(ABBOTT et al., 2010; EYRE et al., 2010),在养猪业中,*S. zooepidemicus*一直是猪链球菌病的重要病原体,在2019年9月和10月,美国俄亥俄州和田纳西州发生了由*S. zooepidemicus*导致的败血症引起的猪死亡率高达50%的疫情(CHEN et al., 2020);与*S. zooepidemicus*不同的是,*S. equi*有高度的宿主

特异性，主要感染马属动物，其中马最易感，驴骡次之（TIMONEY, 1993）。

据统计，目前全球只有冰岛没有发生过马腺疫，由于冰岛的地理位置处于隔离状态，上千年来没有进口过马匹，是马腺疫等马属动物传染病的天然无疫区（BJÖRNSDÓTTIR et al., 2017）。据英国环境食品和乡村事务部（Defra）/动物健康信托基金（AHT）/英国马兽医协会（BEVA）的马病季度监测报告的数据估计，英国每年约有 600 起腺疫暴发事件（NEWTON et al., 2000），但由于没有专门的监测措施，确切的数字仍然未知（PARKINSON et al., 2011）。中国近些年来马产业发展迅速，对该病的报道主要集中在新疆地区。2011 年至 2017 年间，伊犁昭苏县各个马场的血清学调查显示，*S. equi* 抗体阳性率达到 24.69%（袁贝，2017）；2011 年，在春季幼驹繁育期，新疆伊犁某马场饲养的马腺疫发病率达 80%~100%，死亡率不高（康立超等，2013）。

马腺疫多发于气候较为寒冷的九月至次年的四月间，此时马匹集中，其他季节多呈散发性（郭纪珂 等，2013）。感染腺疫后，患病动物的脓汁或脓性鼻液是主要传染源，通过直接或间接接触传播，例如头部互相接触，饮用污染的水源和摄入污染的草料，甚至通过兽医的衣物或者未消毒的医疗器具进行传播。当 *S. equi* 入侵马体后，迅速定植于扁桃体组织，细菌的增殖和脓肿的形成引起淋巴结肿胀（WALLER, 2014），大约在感染后 4 d 到 3 w 左右，造成脓汁从破裂的皮肤流出或由咽后淋巴结流入喉囊，并在咽鼓管中逐渐膨大，然后流入鼻腔。所以常见的患马流出粘脓性鼻液就是由喉囊中流入鼻腔的脓汁所形成，大部分患马通过这种形式来清除感染，但少部分患马无法彻底清除脓汁，残留的脓汁汇集浓缩干燥后，形成一种能在患马喉囊中存在数年甚至终身的软骨样组织（WALLER, 2014）。由此可见，除了表现出临床症状的患马腺疫的马匹是该病的重要传染源外，亚临床感染、处于潜伏期和已经痊愈的马也是不可忽视的传染源。*S. equi* 能够长期存在于马体内，感染后的马匹变成持续感染的病原携带者，这些“携带者”看起来完全健康，但会间歇性地散播 *S. equi*，引发新的疫情。一个“携带者”仅喝一口水就能将数百万的细菌转移到水槽中，理论上，这些细菌足以感染成千上万匹易感马，造成马腺疫的高度传染性（WALLER, 2018），这是马腺疫在全球范围内流行的重要原因之一。因此，要防止新的马腺疫爆发，对“携带者”识别和治疗至关重要。

### 1.3 临床症状

腺疫大致可以分为一过性腺疫、典型腺疫和恶性腺疫。典型腺疫的潜伏期为 3~14 d，发病后首先出现发热和精神沉郁的症状，体温处于 39~41℃左右，有时体温可高达 42℃。病原菌的增殖和机体的免疫应答是体温升高的主要原因，发热可持续至淋巴结脓肿破溃（WALLER, 2014）。随后发生咽炎，然后形成颌下和咽后淋巴结脓肿。出现咽炎症状的马匹会表现出不愿意进食水分较少的食物的情况，多数马会出现头颈极力前伸的姿势。严重咽炎时常常会流鼻涕，挤压喉部会引起明显疼痛、喘鸣和呕吐。上气道内窥镜检查可见淋巴结肿大引起的咽部淋巴样增生和咽部压迫。同样，鼻粘膜和眼粘膜可因化脓性眼分泌物而发炎，从该化脓性分泌物中可分离出 *S. equi*。淋巴结肿大是典型的临床特征。最常见的是颌下淋巴结和咽后淋巴结肿胀，但有时也会出现腮腺淋巴结肿胀。一般脓肿在感染后一周到四周可成熟破裂，其内容物流入喉囊中，经过咽鼓管进入鼻咽部，最后由鼻腔流出大量的粘脓性鼻液。颈部淋巴结和气管/支气管淋

巴结形成脓肿的话，几周后脓汁可在皮肤破裂后向外排出。此后，患马的体温会逐渐下降，病情逐渐好转，最终在 2~3 W 左右恢复到健康状态。虽然大多数马会出现典型的临床症状，但并不是每匹患马都出现相同的症状。一过性症状的病例在生产中较常见，一般不影响食欲和精神状态，表现为体温微升，鼻腔黏膜卡他，流浆液性鼻液，下颌淋巴结发炎肿胀但一般不化脓（BOYLE et al., 2018）。表现为一过性腺疫的患马的症状常在不知不觉中消失，恢复健康。此外，并非所有 *S. equi* 感染都局限于上呼吸道，也会出现肺炎的病例，多由良性腺疫治疗不及时转化而来或马匹本身抵抗力差导致，脓肿也可能出现在多个部位，包括脑、腹部和乳腺，这些病例属于恶性马腺疫，多继发脓毒败血症或出现严重衰弱而预后不良（SLATER, 2003）。

各年龄阶段的马均可发病，美国对急性上呼吸道疾病病例的监测发现，*S. equi* 是 6~10 岁马匹最常见的病原体（PUSTERLA et al., 2011），但发病的严重程度根据动物的免疫状态会出现显著差异。比如，年幼的马倾向于出现更严重的临床症状，同时伴有淋巴结脓肿和破裂，而年龄较大的马通常受到的影响较小，恢复也比较快。

## 1.4 马链球菌的毒力相关因子

*S. equi* 表达多种毒力因子，其中，菌体表面蛋白在介导 *S. equi* 和宿主细胞之间的相互作用发挥着重要作用，参与促进细菌黏附到宿主细胞上、免疫逃避以及对天然和适应性宿主防御产生抵抗等过程（KLINE et al., 2009）。还有一些表面毒力因子可以促进 *S. equi* 获取营养，该过程依赖于可能会造成宿主损伤或病原体扩散的降解酶（GENTRY-WEEKS et al., 2002）。

CNE 蛋白（a collagen-binding protein）由位于 *S. equi* 和 *S. zooepidemicus* 的 FimI 菌毛位点的 *cne* 基因编码，是一种胶原结合蛋白。胶原蛋白是在哺乳动物细胞外基质中发现的一组保守蛋白质，Lannergård 等证明马链球菌对胶原蛋白的黏附是由 CNE 介导的（LANNERGÅRD et al., 2003）。CNE 由 657 个氨基酸组成，包含一个典型的 N 末端信号序列和一个疏水性 C 末端跨膜区，其中跨膜区前端包含有 LPXTG 基序，具有革兰氏阳性细菌细胞表面锚定蛋白的典型特征，其氨基酸序列与金黄色葡萄球菌胶原结合蛋白 CNA 具有相似性（LANNERGÅRD et al., 2003）。CNA 与胶原蛋白结合可以促进金黄色葡萄球菌的感染，是感染性关节炎的毒力因子（HIENZ et al., 1996）。因此，阻断马链球菌对胶原蛋白的结合可能会阻碍感染过程（NILSSON et al., 1998）。

EAG 蛋白（ $\alpha$ 2-macroglobulin, albumin, and IgG-binding protein）是一种由 *eag* 编码的 IgG 结合蛋白，可以与 IgG、白蛋白和血浆蛋白酶抑制剂  $\alpha$ -2 巨球蛋白（ $\alpha$ 2M）结合，可参与该菌的黏附、吞噬调理和免疫逃避（FLOCK et al., 2004）。EAG 中间的短氨基酸序列与来自链球菌的白蛋白结合蛋白具有同源性，介导其与白蛋白的结合。EAG 与 *S. zooepidemicus* 的 IgG 结合蛋白 ZAG 具有相似性，前者 C-末端彼此高度同源的两个重复结构域介导 EAG 与 IgG 的结合；N-末端由一段独特的氨基酸组成，介导与  $\alpha$ 2M 的结合（JONSSON et al., 1995; FLOCK et al., 2004）。IgG 结合蛋白与  $\alpha$ 2M 的结合可以增强 C 群链球菌的抗吞噬能力，帮助其免疫逃避（ROCHA et al., 1999）；与 IgG 的结合会影响抗体介导的补体激活和吞噬作用（KIHLEBERG et al., 1999; SCHALÉN et al., 1985）。

SclF, SclI, SclC 蛋白是胶原蛋白样蛋白（collagen-like protein）家族的成员，这个家族在 *S.*

*equi* 中有 7 个成员。每个成员都有 N-末端信号序列，后接一个非重复区域 A；中间是由含有 50 个连续的 Gly-Xaa-Yaa 三重氨基酸基序（GXY）的类胶原区（collagen-like region, CL）组成；C-末端是含有丰富脯氨酸的细胞壁锚定区域 M，前面包含 LPXTG 基序和疏水性跨膜区 M（BOSCHWITZ et al., 1994a; 1994b）。*S. equi* 的 SclC 类似于 A 组链球菌（GAS）中的胶原蛋白样蛋白，在 GAS 中已经鉴定出两种胶原蛋白样蛋白 SclA/Scl1 和 SclB/Scl2（LUKOMSKI et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2001; WHATMORE, 2001）。Scl1 的某些氨基酸基序可以和哺乳动物胶原蛋白结合整合素（collagen-binding integrins）相互作用，这种相互作用由能够促进人肺成纤维细胞的黏附和扩散（HUMTSOE et al., 2005），但 *S. equi* 的胶原蛋白样蛋白是否能与宿主的整合素相互作用仍有待研究。在 *S. equi* 和 *S. zooepidemicus* 中均能检测到 SclC 基因（KARLSTRÖM et al., 2004），感染过腺疫的马的血清中，能够检测到针对 SclC 的抗体，并可以和该家族其他成员发生交叉反应，表明该家族的蛋白质在感染期间表达，并且可能在免疫应答中起关键作用（KARLSTRÖM et al., 2006）。

Eq8 和 Eq5 蛋白包含典型的细胞表面蛋白特征和 N 端非重复结构域（GUSS et al., 2009），功能未知，是否存在与宿主的相互作用仍有待研究，且暂未发现任何同源蛋白。据报道，德国某农场的一岁马爆发异常轻微的腺疫与存在 61 bp 缺失的截短 SEQ0402（Eq8）有关（TSCHESCHLOK et al., 2018）。因此，导致编码 EQ8 抗原的基因的截短突变可能降低 *S. equi* 的毒力。

CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、Eq8 和 Eq5 等这些表面蛋白的抗体具有黏附阻断和调理作用的双重活性（FLOCK, 1999）。除此以外，马链球菌编码的分泌蛋白 IdeE 和 IdeE2（IgG-degrading enzyme of *S. equi*），是两种不同的 IgG 内肽酶，能够裂解马血清中的 IgG，从而减少抗体对马链球菌的识别，干扰吞噬作用（HULTING et al., 2009; VON PAWEL-RAMMINGEN et al., 2003）。IdeE 和白细胞受体 Mac-1（CD11b）具有同源性，Mac-1（CD11b/CD18）是黏合素家族成员之一，在吞噬和杀死病原中发挥着关键作用（CORBI et al., 1988），而 ideE 在 *S. equi* 感染过程中表达，通过直接与中性粒细胞结合而具有抗吞噬活性，可引起血清和粘膜抗体反应，其在血清中维持在显著水平超过 200 天（TIMONEY et al., 2008）。研究表明，加入重组 IdeE 和 IdeE2 能够显著增强针对马腺疫多组分亚单位疫苗的保护效果，表明靶向 IdeE 和 IdeE2 这两种分泌蛋白的抗体对于诱导马体产生针对马链球菌的保护性免疫发挥着重要作用（GUSS et al., 2009）。

这些毒力因子和宿主黏膜细胞表面受体的相互作用对 *S. equi* 在宿主呼吸道表面的定殖和生长有着重要的作用，深入研究它们的致病机理可以推进马腺疫疫苗的研发工作。

## 1.5 马腺疫疫苗的研究进展

在患腺疫的马匹恢复期间，体内能产生保护性免疫反应，表明刺激机体产生保护性抗体是预防本病的手段之一（HAMLEN et al., 1994）。目前中国还没有预防马腺疫的商品化疫苗，国外研发了灭活疫苗、减毒活疫苗和提取物疫苗等，以及一些新型疫苗如 DNA 疫苗、纳米球颗粒载体疫苗、雾化吸入式疫苗和亚单位疫苗等，然而现有的商品化疫苗可能会使马匹出现不良反应，并且免疫保护力不高。因此研发高效和安全的疫苗对于该病的有效控制具有重要意义。

### 1.5.1 灭活疫苗

1840 年, 澳大利亚军队兽医 Bazeley 研发出马腺疫商用灭活疫苗, 传统的灭活疫苗是用合适的灭活剂对培养后收集到的菌液进行灭活, 随后再加入合适的佐剂乳化制备而成。目前有 Equivac S 和 Strepguard 等商用灭活疫苗, 但相关的报道不多, 引起的免疫保护效果较差。鉴于 *S. equi* 会引起黏膜感染, IgA 亚型的抗体对于黏膜感染的细菌具有更好的免疫效果 (TIMONEY et al., 2007; TIMONEY et al., 2008), 然而灭活疫苗诱导 IgA 抗体表达的能力较弱, 同时介导 T 细胞免疫反应的能力较差, 可能是免疫效果不佳的原因。可以通过研发能够增加疫苗抗原滴度的新型佐剂来解决这个问题, 比如有研究表明 *S. zooepidemic* 的超抗原可将抗原导给抗原提呈细胞, 有增强抗原提呈和改善免疫应答的作用 (DOMINGUEZ-MEDINA et al., 2020)。

### 1.5.2 提取物疫苗

提取物疫苗是通过溶菌酶将细菌的细胞壁水解, 用热酸裂解法除去抗酸性蛋白, 从而使菌体释放出完整的表面蛋白。但提取物疫苗的可靠性一直受到人们的质疑, 目前很少有提取物疫苗的后续研究。一些国家使用过的提取物疫苗如 Equivac S (Zoetis New Zealand)、Strepguard (MSD Animal Health) 和 Strepvax II (Boehringer Ingelheim)。Strepvax II 是将单一的 *S. equi* SeM 蛋白提取后制备而成, 该疫苗肌肉注射免疫马匹 7~10 天后, 能够在马匹的血清中检测到针对 SeM 的 IgG 抗体 (GALÁN et al., 1987), 但据报道, 该疫苗使马匹的临床发病率仅下降了 50%, 不能够提供足够的免疫保护效果且免疫保护持续时间短 (HOFFMAN et al., 1991), 并会引起注射部位疼痛或脓肿, 以及偶尔出现的紫癜出血等不良反应。细菌提取物作为单一的免疫组分其诱导的抗体所产生的中和能力较差, 同时该提取物可能保留了该蛋白的毒力活性因子, 因此安全性较差。

### 1.5.3 减毒活疫苗

减毒活疫苗具有操作简单、用量少、价格便宜等优点, 但存在毒力返强的问题, 同时需要严格的运输和保存条件。虽然弱毒疫苗的毒力大幅度降低, 但部分毒力因子依然保持着生物学活性, 导致免疫接种后, 一些动物会出现一些不良反应 (FLOCK et al., 2004)。

减毒活疫苗可以通过传代培养或者基因突变的方法来构建, 鼻内注射减毒活疫苗的方法能够激活马匹产生以分泌大量的 IgA 为特征的黏膜免疫反应, 因此相较于产生 IgG 的灭活疫苗, 减毒活疫苗往往能够提供更高的保护水平, 目前在欧美国家有两种类型的马腺疫商用减毒活疫苗, Pinnacle IN 和 Equilis StrepE。

美国、加拿大和新西兰几个国家使用的减毒活疫苗是 Zoetis 公司的 Pinnacle IN, 该疫苗是基于 1981 年在纽约从一匹患有腺疫的马身上分离出来的 *S. equi* SEM-2 系 CF32 (SeCF32) 株通过 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 处理后缺失透明质酸合成酶基因 (*hasA*) 的减毒株 (BORST et al., 2011; WALKER et al., 2002), 其具有 DIVA (区分感染动物和接种动物) 能力。该疫苗给健康动物免疫接种, 需间隔 2~3 周加强免疫, 之后每年免疫一次 (SWEENEY et al., 2005)。Pinnacle IN 存在着安全性问题, 包括毒力残留可能会导致马腺疫的发生, 或者出现不

良反应，比如形成慢性下颌脓肿，免疫性血管炎病例等情况（CURSONS et al., 2015）。

欧洲唯一可用的马腺疫减毒活疫苗是 Intervet 公司的 Equilis Strep，是基于 1990 年在荷兰的一匹患马腺疫的病马身上分离的 TW 株，缺失突变 *aroA* 基因后形成减毒疫苗株 TW928，通过上嘴唇内侧粘膜下注射免疫，提供大约持续 3~6 个月的免疫保护效果，肌肉注射显示能提供保护作用，但鼻内给药并不能提供保护（JACOBS et al., 2000）。Equilis Strep 的缺点一个是缺乏 DIVA 能力，另一个是可能会发生颌下淋巴结和肌肉内脓肿等不良反应（KEMP-SYMONDS et al., 2007），由于该疫苗的安全性问题，于 2007 年被撤回。

选择合适的基因缺失位点，通过对编码毒力因子的基因的进一步缺失使得在保证细菌抗原性的同时减少机体不良反应的发生，以取得强大免疫保护力和不良反应之间的平衡，是成功制备高效安全的减毒活疫苗的关键。

### 1.5.4 亚单位疫苗

亚单位疫苗通常是由大肠杆菌表达和纯化而来的重组的 *S. equi* 的菌体表面蛋白构建，这些疫苗通常只含有所需要的靶蛋白，所以具有良好的安全性。而且，亚单位疫苗中不含 *S. equi* 的 DNA，故具有 DIVA 能力。但目前全球仍然没有获批的马腺疫重组亚单位疫苗。

目前，国外对亚单位疫苗的研究已经有了一定的进展，Meehan 等研制的亚单位疫苗能够给小鼠提供保护力（MEEHAN et al., 1998），但在马匹试验中未达到理想的保护效果，攻菌免疫后的马匹免疫效果不理想（SHEORAN et al., 2002）。Guss 等研制的一种包含有五种表面蛋白和两种分泌型蛋白的亚单位疫苗 Septavac，能够为马匹提供 85% 的保护率（GUSS et al., 2009）。Robinson 等通过改进亚单位疫苗 Septavac 为 Strangvac，该疫苗包含 *S. equi* 的 8 种蛋白，通过鼻内和皮下注射，可以获得以局部黏膜和全身抗体反应。第三次接种该疫苗两周后进行测试，发现保护率为 95%，但是在接种后两个月的时间里，保护作用有所下降，因此需要加强免疫（ROBINSON et al., 2018）。之后 Robinson 通过肌肉注射 Strangvac，对免疫的安全性、免疫原性和免疫保护作用持续时间进行了分析，发现肌肉注射 Strangvac 是安全的，并在血清和鼻咽中产生了针对疫苗成分的强大抗体反应，在初免四周后加强免疫，这种强大的抗体反应增强，持续长达 12 个月，并且具有 DIVA 能力（ROBINSON et al., 2020）。Matheus C. Rosa 等将重组 SeM 蛋白和 *S. equi* 全菌苗联用，能够 100% 保护攻菌小鼠，并产生了抗 rSeM 和抗 *S. equi* 的抗体（ROSA et al., 2021）。Hayoung Lee 等通过腹腔注射免疫 *S. equi* 的细胞外囊泡（extracellular vesicles, EVs）的小鼠，在攻菌后的存活率明显高于经热灭活菌免疫的小鼠（LEE et al., 2021）。

国内研究马腺疫亚单位疫苗还处于初级阶段，徐全圆发现 FNE 蛋白对小鼠不能产生保护，但 FNEB 蛋白具有较好的免疫保护效果，琪免疫后对小鼠的保护率约为 60%，说明 FNEB 具有作为马腺疫亚单位疫苗的候选蛋白的潜力（徐全圆，2014）。Ya-nan Zhao 等发现，将 *S. equi* 表面毒力因子甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）截短优化后得到的重组蛋白 GAPDH-S 能够诱导小鼠产生有效免疫应答（ZHAO et al., 2021）。Xiaomeng Chen 发现，EAG、SeM 和 GAPDH 三抗原联合免疫小鼠后，TCR, MHC I 和 TLR-4 表达水平显著升高，并且攻菌后具有显著的保护效果（CHEN et al., 2021）。吕芬芳等将 SrtA, SeM, EAG 联合免疫小鼠发现其诱导产生的抗体效价及 IgG、IgG1 和 IgG2b 的抗体水平均高于各种蛋白单独免疫组，并可显著提高 MHC I 分子

及 TLR-3 分子的转录水平（吕芬芬 等，2021）。以上研究表明 FNEB, SrtA, SeM, EAG, GAPDH 等在开发马腺疫亚单位疫苗中具有一定潜力。

### 1.5.5 其他类型疫苗

DNA 疫苗是指在含有真核启动子的质粒上连接病原的相关抗原基因，将其导入动物体后，机体通过表达特异性抗原蛋白而产生特异性免疫反应，包括体液和细胞免疫。Xiaohui Ma 等通过融合 *S. equi* 的 SeM 蛋白和马产沙门氏菌 FljB 鞭毛蛋白，构建了 FljB-SEM DNA 疫苗，能够诱导小鼠和马产生高水平的特异性抗体，同时干扰素- $\gamma$  和 IL-4 的表达水平也显著升高，该疫苗可以同时诱导 I 型辅助 T 细胞（T helper cells 1, Th1）和 II 型辅助 T 细胞（T helper cells 2, Th2）型反应（MA et al., 2019）。H.F. Florindo 以聚乙烯醇、海藻酸钠和壳聚糖为原料，制备了吸附了马链球菌 SeM 蛋白的聚己内酯纳米颗粒载体疫苗，经皮下免疫后，相比与直接免疫 SeM 蛋白，纳米微球诱导了更高的淋巴因子水平，成功地激活了通向 Th1 和 Th2 细胞的途径（FLORINDO et al., 2008）。Miguel A. Rodrigues 等将马链球菌可溶性提取物和壳聚糖的溶液进行干燥雾化后得到完全水溶性纳米球，该纳米球在动物机体内释放缓慢，这种雾化吸入式疫苗在小鼠模型中引起了有效的免疫反应，能够引起均衡的 Th1 和 Th2 细胞反应（RODRIGUES et al., 2012）。

## 1.6 本研究的目的是和意义

本研究将 CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ5、EQ8 和 IdeE 等 8 种蛋白相关基因，通过同源重组的方式，以柔性肽串联，将串联的序列 *se8*（*cne-eag-SclC-SclI-SclF-eq5-eq8-ideE*）克隆大肠杆菌表达载体 pET-28a，表达和纯化后，制备 rSE8 疫苗。在小鼠免疫试验和免疫保护试验中，通过检测小鼠血清中特异性抗体水平以及记录攻菌后小鼠的生存状态，评价了 rSE8 的免疫效果，探究其作为亚单位疫苗的潜力，为马腺疫重组蛋白疫苗的研发和建立小鼠替代马作为 *S. equi* 感染和保护模型提供一定参考。

## 第二章 重组蛋白的构建

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌种和载体

*S. equi* HLJ2018 株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所马传染病与慢病毒研究创新团队实验室从黑龙江某马场一匹患腺疫的馬的下颌破溃处脓汁中分离并保存；DH5 $\alpha$  克隆感受态细胞、BL21 (DE3) 表达感受态细胞购自天根生化科技有限公司；pGEX-6p-1 和 pET-28a 原核表达载体由本实验室保存。

#### 2.1.2 主要仪器

表 2-1 主要仪器

Table 2-1 main instruments in this study

| 仪器                                   | 公司              |
|--------------------------------------|-----------------|
| 核酸电泳仪 (MP-300V)                      | Major Science   |
| 蛋白电泳仪 (165-8004)                     | BIO-RAD         |
| 快速湿转仪 (eBlot L1)                     | 金斯瑞生物科技有限公司     |
| PCR 仪 (SensoQuest LabCycler D-37085) | SENSO           |
| 凝胶成像系统 (Universal Hood II)           | BIO-RAD         |
| 超纯水仪 (GENPURE PRO UV/UF)             | Thermo          |
| 台式 pH 计 (S210-B)                     | METTLER TOLEDO  |
| 台式离心机 (5424)                         | Eppendorf       |
| 超声波破碎机 (CP 750)                      | Cole-Parmer     |
| 蛋白电泳仪 (165-8004)                     | BIO-RAD         |
| 超纯水仪 (GENPURE PRO)                   | Thermo          |
| 往复式脱色摇床 (TS.B-108)                   | 海林市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| 超微量紫外分光光度计 (NanoPhotometer P330)     | IMPLEN          |
| 电热恒温培养箱 (DHP-9272)                   | 上海一恒科学仪器有限公司    |
| 高速离心机 (CR21G II)                     | HiTACHI         |
| 水浴锅 (DK-8D)                          | 上海精宏实验设备有限公司    |
| 洁净工作台 (DL-CJ-2MD II)                 | 北京东联哈尔仪器制造有限公司  |
| 漩涡振荡器 (HYQ-3110)                     | Crystal         |
| 微波炉 (M1-211A)                        | Midea           |
| 双色红外成像系统 (OYSSEY Clx-2674)           | LI-COR          |
| LED 医用胶片观察灯 (JD-01Y)                 | 长沙锦德电子科技有限公司    |

#### 2.1.3 主要耗材

表 2-2 实验耗材

Table 2-2 Experimental consumables in this study

| 实验耗材                     | 来源        |
|--------------------------|-----------|
| 离心管                      | NEST      |
| 96 孔 PCR 板               | 康宁        |
| 蛋白预制胶                    | 金斯瑞       |
| 0.22 $\mu$ M 滤膜、超滤管、NC 膜 | Millipore |

### 2.1.4 主要试剂

表 2-3 主要试剂

Table 2-3 main reagents in this study

| 试剂                                            | 公司                       |
|-----------------------------------------------|--------------------------|
| 限制性核酸内切酶                                      | Thermo Fisher Scientific |
| 细菌基因组 DNA 提取试剂盒                               | 天根                       |
| 2×Taq PCR StarMix                             | GenStar                  |
| HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗                             | KPL                      |
| HRP 标记的兔抗马 IgG 二抗                             | Abcam                    |
| His-tag 蛋白纯化磁珠 (IDA-Ni)                       | 海狸生物                     |
| GST 标签蛋白纯化试剂盒, 溶菌酶, PMSF                      | 碧云天                      |
| 20×DAB 显色液 A 液和 B 液                           | 索莱宝                      |
| 琼脂糖                                           | 擎科                       |
| 核酸染料                                          | 金博益                      |
| KOD FX Neo 聚合酶 DNA                            | TOYOBO                   |
| DNA Marker、10×Loading buffer、反转录试剂盒           | TAKARA                   |
| 2×Taq PCR StarMix                             | GenStar                  |
| 限制性核酸内切酶、蛋白 Marker                            | Thermo Fisher Science    |
| DEPC 水、甘油                                     | 索莱宝                      |
| DNA 大提试剂盒                                     | Invitrogen               |
| 胶回收试剂盒、DNA 小提试剂盒                              | 诺唯赞                      |
| DH5 $\alpha$ 克隆感受态细胞、BL21 (DE3) 表达感受态细胞       | 唯地生物                     |
| Clone Smarter 无缝克隆试剂盒                         | 中美泰和                     |
| pClone007 通用型 TOPO 载体                         | 擎科                       |
| 氨苄青霉素、卡那霉素                                    | Biosharp                 |
| 蛋白电泳液、蛋白预制胶、High Affinity Ni-Charged Resin FF | Genscript                |
| QuickBlue 快速染胶液                               | 博奥龙                      |
| Tween 20、IPTG 诱导剂                             | Sigma                    |

表 2-3 (续)

| 试剂        | 公司    |
|-----------|-------|
| THB 培养基   | 海博生物  |
| Skim milk | BD    |
| 哥伦比亚血平板   | OXOID |

### 2.1.5 主要溶液和培养基的配制

本实验涉及的溶液和培养基的配置见表 2-4。

表 2-4 主要溶液及培养基的配置方法

Table 2-4 Main solutions and mediums preparation in this study

| 溶液                          | 成分                                                                                                   | 操作                                                                                        |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS 缓冲液                     | 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 加水溶解，pH 7.4，灭菌后室温保存。                                                                      |
| PBST 缓冲液                    | 1 L PBS、0.05% Tween 20                                                                               | 充分混匀。                                                                                     |
| TBS 缓冲液 (10×)               | 0.2 M Tris-HCl、1.5 M NaCl                                                                            | 加水溶解，室温保存。                                                                                |
| TBST 缓冲液 (1×)               | 100 mL 10×TBS、500 μL Tween 20                                                                        | 充分混匀。                                                                                     |
| IPTG 诱导剂                    | 1M IPTG                                                                                              | 2.4 g IPTG 加水溶解后定容到 10 mL，0.22 μm 滤膜过滤后-20℃分装保存。                                          |
| SDS Loading buffer (5×)     | 0.25 M Tris、10%SDS、50%甘油、0.5%溴酚蓝、2 M HCl、1 M DTT                                                     | 乙酸钠溶解，分装冻于-20℃。                                                                           |
| 转膜液                         | 39 mM Glycine、48 mM Tris、0.037% SDS、20%甲醇                                                            | 加水溶解，定容至 1 L，室温保存。                                                                        |
| Western blot 封闭液            | 5%脱脂乳、95% 1×TBS                                                                                      | 溶解后 4℃保存。                                                                                 |
| TAE 缓冲液 (10×)               | 0.4 M Tris-醋酸、25 mM EDTA                                                                             | 加水溶解，定容至 1 L，室温保存。                                                                        |
| Todd Hewitt Broth 培养基 (THB) | 36.4 g Todd Hewitt 粉末、10 g Yeast Extract                                                             | 加去离子水溶解，定容至 1 L，pH 7.4，灭菌后 4℃保存。                                                          |
| 大肠杆菌 Luria-Bertani (LB)培养基  | 10 g Tryptone、5 g 酵母提取物、10 g NaCl                                                                    | 加去离子水溶解，定容至 1 L，滴加 5 N NaOH (约 0.2 mL)，pH 7.0。压蒸汽灭菌后 4℃保存。需要时加入终浓度为 50 μg/mL 的卡那霉素或氨苄青霉素。 |
| GST 标签蛋白纯化裂解缓冲液             | NaCl 140 mM、KCl 2.7 mM、Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM、KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.8 mM | 加水溶解，调 pH 7.3。                                                                            |

表 2-4（续）

| 溶液                                               | 成分                                                                   | 操作             |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| GST 标签蛋白纯化洗脱缓冲液                                  | Tris-HCl 50 mM、GSH 10 mM                                             | 加水溶解，调 pH 7.3。 |
| His 标签蛋白纯化 Lysis equilibration buffer（LE buffer） | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、500 mM NaCl、2%Triton-X100    | 加水溶解，pH 7.3    |
| His 标签蛋白纯化 Elution buffer                        | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、500 mM NaCl、500 mM 咪唑，pH 7.3 | 加水溶解，pH 7.3    |

2.1.6 本研究所使用的质粒

表 2-5 本研究中所使用的质粒

Table 2-5 Plasmids used in this study

| 质粒名称                   | 表达蛋白     | 载体        | 来源    |
|------------------------|----------|-----------|-------|
| pGEX-6p-1-HLJ2018-CNE  | CNE      | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-EAG  | EAG      | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-ScIC | ScIC     | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-ScII | ScII     | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-ScIF | ScIF     | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-EQ5  | EQ5      | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-EQ8  | EQ8      | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-ideE | IdeE     | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pGEX-6p-1-HLJ2018-SE8  | SE8（GST） | pGEX-6p-1 | 本研究构建 |
| pET-28a-SE8            | rSE8     | pET-28a   | 本研究构建 |

2.2 重组蛋白的纯化

2.2.1 单组分重组蛋白表达载体的构建

2.2.1.1 HLJ2018 株基因组 DNA 提取

HLJ2018 株的基因组 DNA 的提取使用天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒，按照说明书操作，得到的 *S. equi* HLJ2018 株基因组 DNA 产物保存于-20℃，防 DNA 降解。

2.2.1.2 目的基因的扩增

根据已发表的 *S. equi* 4047 基因序列（GenBank: FM204883.1），按照同源重组原则，使用 SnapGene 4.2 软件设计 8 对 PCR 引物，并在引物的 5'和 3'端分别加上载体和目的基因的同源臂。引物核苷酸序列见表 2-6，由库美生物科技有限公司合成。以 *S. equi* HLJ2018 株基因组 DNA 为模板，PCR 扩增 *cne*、*eag*、*ScIC*、*ScII*、*ScIF*、*eq5*、*eq8* 和 *ideE* 基因，预期基因的大小见表 2-7。

表 2-6 PCR 引物序列

Table 2-6 PCR primer sequences

| 引物名称<br>primer names | 引物序列 (5'~3')<br>primer sequences                         | 产物/bp<br>Products/bp |
|----------------------|----------------------------------------------------------|----------------------|
| cneSEco(6p-1) F      | CCCTGGGATCCCCGGAATTCATACTTAGTGACAACATCACATCATT<br>GAC    | 912                  |
| cneSXho(6p-1) R      | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTACTTGACAGTAAAGCTGGTATAGCG<br>AC   |                      |
| eagSEco(6p-1) F      | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTAGACGCAGCAACAGTGTTAGAG             | 483                  |
| eagSXho(6p-1) R      | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTATTTGGCTTTGTTGATTAAGGTCACA<br>TAG |                      |
| SclFsEco(6p-1) F     | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTCGGAACCCAATCCATATCCAGATG           | 150                  |
| SclFsXho(6p-1) R     | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTAAGGACCTTGTTTGCCATTTTAAAGT<br>TC  |                      |
| SclIsEco(6p-1) F     | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTATCTGGTCCGCCAGGATACCCAC            | 168                  |
| SclIsXho(6p-1) R     | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTATGGACCTCGGGTACCGCC               |                      |
| SclCsEco(6p-1) F     | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTAGACCAGCCAGCAGCA                   | 174                  |
| SclCsXho(6p-1) R     | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTATGGCTTTTGGGCAGCTTCTTC            |                      |
| eq8sEco(6p-1) F      | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTAGCGACTACCCTAGCAGGACAAACAG         | 588                  |
| eq8sXho(6p-1) R      | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTAGTGCTTAAGCTTTCAATCTGAGC          |                      |
| eq5sEco(6p-1) F      | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTAGAAACGACTACTGCTAGTGCAATTTG        | 1320                 |
| eq5sXho(6p-1) R      | TCACGATGCGGCCGCTCGAGTAGCAACCAAGGCTGCCTTGGC               |                      |
| ideEsEco(6p-1) F     | CCCTGGGATCCCCGGAATTCCTAGACGATTACCAAAGGAATGCTACGG         | 948                  |
| ideEXho R            | GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTAGCTCAGTTTCTGCCATATGTCCTTG        |                      |

表 2-7 预期目的基因大小

Table 2-7 Length of expected target genes

| 基因名称  | <i>cne</i> | <i>eag</i> | <i>SclC</i> | <i>SclI</i> | <i>SclF</i> | <i>eq8</i> | <i>eq5</i> | <i>IdeE</i> | <i>se8</i> |
|-------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| 大小/bp | 912        | 483        | 174         | 168         | 150         | 588        | 1320       | 948         | 4803       |

### 2.2.1.3 目的基因的克隆及测序

将扩增产物进行凝胶电泳，具体操作如下：配制浓度为 1% 的琼脂糖凝胶，待凝胶冷却至 60℃ 左右，加入核酸染料，倒入凝胶板，插入电泳梳。待其凝固后向孔中加入相应核酸 Marker 和 PCR 扩增样品，150 V 电泳 25 min。使用凝胶成像分析仪观察条带，在紫外灯下根据分子量大小快速切下目的条带，进行胶回收。

胶回收使用诺唯赞生物科技有限公司提供的产物纯化试剂盒。具体操作如下：称取凝胶重量，100 mg 凝胶加入 100  $\mu$ L Buffer GDP，加入等倍体积 GDP 后，50~55°C 水浴 7~10 min。凝胶块完全溶解后，瞬离。将 FastPure DNA Mini Columns-G 吸附柱置于 Collection Tubes 2 mL 收集管中，把少于 700  $\mu$ L 的溶胶液转移至吸附柱中，12,000  $\times g$  离心 30~60 sec。弃滤液，吸附柱置于收集管。加入 300  $\mu$ L Buffer GDP 至吸附柱中。静置 1 min。12,000  $\times g$  离心 30~60 sec。弃滤液，吸附柱置于收集管。加 700  $\mu$ L Buffer GW（已加无水乙醇）至吸附柱中。12,000  $\times g$  离心 30~60 sec。再次加 700  $\mu$ L Buffer GW 重复操作。弃滤液，吸附柱放回收集管，12,000  $\times g$  离心 2 min。将吸附柱转移至 1.5 mL 离心管中，加 20~30  $\mu$ L Elution Buffer 到吸附柱中央，室温放置 5 min。12,000  $\times g$  离心 1 min，-20°C 保存 DNA。

胶回收产物与 pClone007 通用型 TOPO 载体在以下体系进行连接：

5 $\times$ pClone007 Versatile Simple Vector Mix 2  $\mu$ L，PCR 产物按 100~1000 bp 加入 10~50 ng，1000~2000 bp 加入 50~100 ng，2000~3000 bp 加入 100~200 ng 的量加入 1~8  $\mu$ L 到体系中，ddH<sub>2</sub>O 补齐到 10  $\mu$ L，室温连接 5 min，将连接产物转化至 DH5 $\alpha$ 。具体操作方法如下：从 -80°C 拿出 DH5 $\alpha$ ，迅速插入冰中，5 min 后待菌块融化，向装有 25  $\mu$ L DH5 $\alpha$  的离心管中加入 2.5  $\mu$ L 连接产物，并用手拨打离心管底轻轻混匀（避免用枪吸打），冰浴 25 min。42°C 水浴热激 45 sec，迅速放回冰中冰浴 2 min。加入 400  $\mu$ L 无抗 LB 培养基，在 37°C 摇床 180 rpm 复苏 1 h。取 100  $\mu$ L 涂布到含相应抗生素的 LB 平板，37°C 培养箱倒置过夜培养。10  $\mu$ L 无菌枪头挑取单一菌落，放入 5 mL 添加相应抗生素的 LB 液体培养基中，振荡培养 12~16 h，PCR 鉴定为阳性的样品送库美生物公司测序。测序结果正确的样品利用诺唯赞生物科技有限公司提供的 DNA 小提试剂盒提取质粒。

根据实验需求，利用 Invitrogen 公司的大提质粒试剂盒进行质粒的大量提取。具体的操作步骤如下：将小摇的阳性菌液按 1:100 的体积比接种至 250 mL 含有相应抗生素的 LB 培养基中，在 37°C 摇床 180 rpm 振荡培养 16~18 h，得到大量阳性菌液。向平衡柱滤膜正中心位置加入 30 mL Equilibration Buffer (EQ1)，在使用前确保溶液完全随重力作用流尽。将培养好的阳性菌液加入 500 mL 离心瓶中，4,000  $\times g$  离心 10 min，收集菌体沉淀，向其中加入 10 mL R3 重悬液（已加入 RNase A），充分混匀。将混合后的溶液转移到 50 mL 离心管中，加入 10 mL 裂解缓冲液 L7，上下颠倒混匀 5~8 次，室温静置 5 min。加入 10 mL N3，上下颠倒混匀 5~8 次，10,000  $\times g$  离心 10 min，取上清液至平衡柱中，溶液自然流干，向平衡柱中加入 50 mL Wash Buffer，溶液流尽后将平衡柱转移至离心管上。向平衡柱中加入 15 mL Elution buffer，溶液全部自然流尽后，弃去平衡柱，向管中加入 10.5 mL 异丙醇，立即震荡混匀。4°C，10,000  $\times g$  离心 30 min，弃上清，向沉淀中加入 2 mL 70%乙醇，充分混匀后转移到一个新的 1.5 mL 离心管，4°C 条件下 10,000  $\times g$  离心 5 min，弃上清。再次向沉淀中加入 2 mL 70%乙醇重复操作，将剩余的 DNA 沉淀尽量洗脱干净。待 DNA 沉淀干燥后（呈现半透明胶冻状），加入 200  $\mu$ L TE Buffer 溶解，测定 DNA 浓度，-20°C 保存。

#### 2.2.1.4 重组蛋白 pGEX-6p-1-CNE/EAG/ScfC/ScfI/ScfF/EQ5/EQ8/ideE 表达载体的构建

将测序正确的目的基因分别用表 2-6 中的引物 cneSEco(6p-1)F/cneSXho(6p-1)R、eagSEco(6p-1)F/eagSXho(6p-1)R、ScfFsEco(6p-1)F/ScfFsXho(6p-1)R、ScfIsEco(6p-

1)F/SclIsXho(6p-1)R、SclCsEco(6p-1)F/SclCsXho(6p-1)R、eq8sEco(6p-1)F/eq8sXho(6p-1)R、eq5sEco(6p-1)F/eq5sXho(6p-1)R 和 ideEsEco(6p-1)F/ideEXho R 扩增 cne、eag、SclF、SclI、SclC、eq8、eq5 和 ideE 后与 pGEX-6p-1 连接,转化至 DH5 $\alpha$ 。经 PCR 鉴定阳性的重组质粒送库美生物科技有限公司测序。测序成功的重组质粒分别命名为 pGEX-6p-1-CNE、pGEX-6p-1-EAG、pGEX-6p-1-SclF、pGEX-6p-1-SclI、pGEX-6p-1-SclC、pGEX-6p-1-EQ8、pGEX-6p-1-EQ5 和 pGEX-6p-1-ideE。

## 2.2.2 多组分融合蛋白 SE8 (rSE8) 表达载体的构建

首先,通过同源重组引物设计原则设计 14 对引物,并引入蛋白接头 Gly-Gly-Gly 的核苷酸序列 (ggaggtgga) (见表 1),用引物 cne.eag1-cne.eag2、SclC.SclI1-SclC.SclI2、SclF.eq81-SclF.eq82 和 eq5.ideE1-eq5.ideE2 分别对 pGEX-6p-1-CNE、pGEX-6p-1-SclC、pGEX-6p-1-SclF 和 pGEX-6p-1-EQ5 进行载体线性化,用引物 cne.eag3-cne.eag4、SclC.SclI3-SclC.SclI4、SclF.eq83-SclF.eq84 和 eq5.ideE3-eq5.ideE4 分别从 pGEX-6p-1-EAG、pGEX-6p-1-SclI、pGEX-6p-1-EQ8、pGEX-6p-1-IdeE 扩增出包含同源片段的 eag、SclI、eq5 和 ideE。利用中美泰和生物技术有限公司的 Clone Smarter 无缝连接试剂盒分别将扩增得到的线性化载体和含有同源臂的基因片段进行重组反应,构建 pGEX-6p-1-CNE-EAG、pGEX-6p-1-SclC-SclI、pGEX-6p-1-SclF-EQ8 和 pGEX-6p-1-EQ5-IdeE。用引物 5eag.SclC1-5eag.SclC2 和 6eq8.eq51-6eq8.eq52 分别对 pGEX-6p-1-CNE-EAG 和 pGEX-6p-1-SclF-EQ8 进行载体线性化,用引物 5eag.SclC3-5eag.SclC4 和 6eq8.eq53-6eq8.eq54 从 pGEX-6p-1-SclC-SclI 和 pGEX-6p-1-EQ5-IdeE 分别扩增出含有同源片段的 SclC-SclI 和 eq5-ideE。分别将扩增得到的线性化载体和含有同源片段的基因片段进行重组反应,构建 pGEX-6p-1-CNE-EAG-SclC-SclI 和 pGEX-6p-1-SclF-EQ8-EQ5-IdeE。用引物 7SclI.SclF1-7SclI.SclF2 对 pGEX-6p-1-CNE-EAG-SclC-SclI 进行载体线性化,用引物 7SclI.SclF3-7SclI.SclF4 从 pGEX-6p-1-SclF-EQ8-EQ5-IdeE 扩增得到含有同源片段的 SclF-eq8-eq5-ideE,将扩增得到的线性化载体和含有同源臂的基因片段重组反应,构建 pGEX-6p-1-SE8 (图 2-1)。

设计 1 对引物 28a-8 F/ R (见表 2-8),分别引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点,以重组质粒 pGEX-6p-1-SE8 为模板扩增 se8 片段。用 EcoR I 和 Xho I 限制性核酸内切酶对 pET-28a 载体和 se8 片段双酶切,连接酶切产物,构建 pET-28a-SE8 (图 2-1)。

表 2-8 同源重组引物序列

Table 2-8 In-fusion PCR primer sequences

| 引物名称<br>primer names | 引物序列 (5'~3') primer sequences            | 产物/bp<br>Products/bp |
|----------------------|------------------------------------------|----------------------|
| cne.eag1             | TAATCCACCTCCCTTGACAGTAAAGCTGGTATAGCGAC   | 5896                 |
| cne.eag2             | AAGCCAAATAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| cne.eag3             | AAGGGAGGTGGATTAGACGCAGCAACAGTGTTAGAG     |                      |
| cne.eag4             | TCGAGTTATTTGGCTTTGTTGATTAAGGTCACATAG     |                      |
| ScI.C.ScII1          | TAATCCACCTCCTGGCTTTTGGGCAGCTTCTTC        | 5161                 |
| ScI.C.ScII2          | GAGGTCCATAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| ScI.C.ScII3          | CCAGGAGGTGGATTATCTGGTCCGCCAGGATACC       |                      |
| ScI.C.ScII4          | TCGAGTTATGGACCTCGGGTACCGCC               |                      |
| ScIF.eq81            | CGCTCCACCTCCAGGACCTTGTTTGCCATTTTAAAGTTC  | 5134                 |
| ScIF.eq82            | TTAAGCACTAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| ScIF.eq83            | CCTGGAGGTGGAGCGACTACCCTAGCAGGAC          |                      |
| ScIF.eq84            | TCGAGTTAGTGCTTAAGCTTTTCAATCTGAGCC        |                      |
| eq5.ideE1            | GTCTCCACCTCCAGTAGCAACCAAGGCTGCC          | 6305                 |
| eq5.ideE2            | AACTGAGCTAACGAGCGGCCGCATCG               |                      |
| eq5.ideE3            | ACTGGAGGTGGAGACGATTACCAAAGGAATGCTACG     |                      |
| eq5.ideE4            | GCTCGTTAGCTCAGTTTCTGCCATATGTCCTTG        |                      |
| 5eag.ScIC1           | GTCTCCACCTCCTTTGGCTTTGTTGATTAAGGTCACATAG | 6388                 |
| 5eag.ScIC2           | GAGGTCCATAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| 5eag.ScIC3           | AAAGGAGGTGGAGACCAGCCAGCAGCACTAAAATATC    |                      |
| 5eag.ScIC4           | TCGAGTTATGGACCTCGGGTACCGCC               |                      |
| 6eq8.eq51            | TTCTCCACCTCCGTGCTTAAGCTTTTCAATCTGAGCC    | 5731                 |
| 6eq8.eq52            | AACTGAGCTAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| 6eq8.eq53            | CACGGAGGTGGAGAAACGACTACTGCTAGTGCAATTTG   |                      |
| 6eq8.eq54            | TCGAGTTAGCTCAGTTTCTGCCATATGTCCTTG        |                      |
| 7ScII.ScIF1          | CGATCCACCTCCTGGACCTCGGGTACCGC            | 6762                 |
| 7ScII.ScIF2          | AACTGAGCTAACTCGAGCGGCCGCATC              |                      |
| 7ScII.ScIF3          | CCAGGAGGTGGATCGGAACCCAATCCATATCCAG       |                      |
| 7ScII.ScIF4          | TCGAGTTAGCTCAGTTTCTGCCATATGTCCTTG        |                      |
| 28a-8 F              | TGGGATCCCCGGAATTCATAATCTTAGT             | 4914                 |
| 28a-8 R              | TGCGGCCGCTCGAGTTAGCTCA                   |                      |

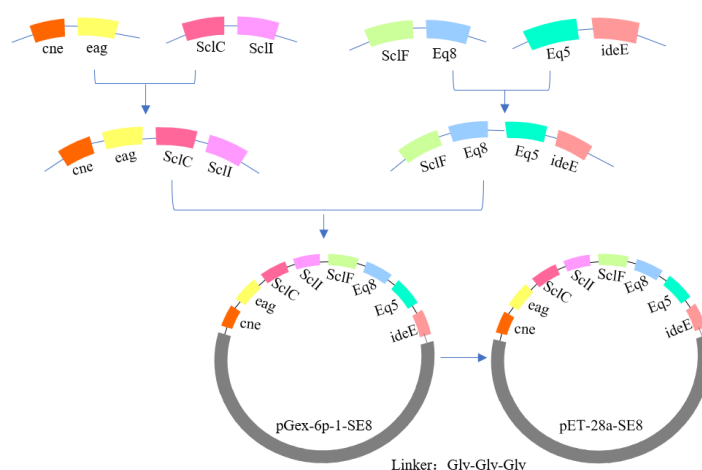


图 2-1 pET-28a-SE8 构建过程示意图

Fig. 2-1 Schematic diagram of pET-28a-SE8 construction process

## 2.2.3 rSE8 最佳表达条件的确定

### 2.2.3.1 rSE8 最佳 IPTG 诱导浓度的确定

将 BL21 (DE3) 表达感受态细胞从  $-80^{\circ}\text{C}$  取出后立即放入冰上, 冰浴融化后, 分别取  $50\ \mu\text{L}$  加到新的  $1.5\ \text{mL}$  离心管中, 分别向其中加入  $50\ \text{ng}$  pGEX-6p-1-SE8 和 pET-28a-SE8 重组质粒以及空载体 pGEX-6p-1 和 pET-28a, 冰浴  $20\ \text{min}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$  水浴热激  $45\ \text{sec}$ , 冰浴  $2\ \text{min}$ , 加入  $400\ \mu\text{L}$  无抗 LB 培养基, 在  $37^{\circ}\text{C}$  摇床  $180\ \text{rpm}$  振荡培养  $1\ \text{h}$ , 无菌取  $100\ \mu\text{L}$  均匀涂布在含对应抗生素的 LB 平板上, 于  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱倒置培养过夜, 用  $10\ \mu\text{L}$  无菌枪头随机挑取单菌落到  $5\ \text{mL}$  含对应抗生素的 LB 培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$  摇床振荡培养  $12\ \text{h}$ , 按  $1:100$  接种至  $5\ \text{mL}$  含对应抗生素的 LB 培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$  摇床振荡培养至  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  为  $0.6-0.8$ , 取出冷却至室温, 分别加入终浓度为  $0.1\ \text{mM}$ ,  $0.5\ \text{mM}$ ,  $1.0\ \text{mM}$ ,  $1.5\ \text{mM}$  的 IPTG, 在  $28^{\circ}\text{C}$  条件下振荡培养  $12\ \text{h}$ 。离心收集菌体, 按菌液体积: 裂解液体积 =  $10:1$  加入裂解液重悬, 超声破碎菌体后收集上清液和沉淀, 沉淀和上清用相同体积的 PBS 重悬, 各取  $40\ \mu\text{L}$ , 加入  $10\ \mu\text{L}$  SDS loading buffer,  $95^{\circ}\text{C}$  加热  $5\ \text{min}$  变性。以诱导的空载体和未诱导的菌液作阴性对照, SDS-PAGE, 用 QuickBlue 快速染胶液染色  $20\sim 30\ \text{min}$ , 分析 rSE8 表达情况, 确定 rSE8 的最佳 IPTG 诱导浓度。

### 2.2.3.2 rSE8 最佳诱导温度和诱导时间的确定

接种 pET-28a-SE8/BL21 (DE3) 到  $5\ \text{mL}$  含  $50\ \mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中, 同时接种 pET-28a /BL21 (DE3) 作为空载体对照,  $37^{\circ}\text{C}$  摇床振荡培养过夜, 将小摇的 pET-28a-SE8/BL21 (DE3) 菌液按  $1:100$  的比例分别接种至 3 瓶  $250\ \text{mL}$  含  $50\ \mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中。将小摇的 pET-28a /BL21 (DE3) 菌液于  $37^{\circ}\text{C}$  恒温摇床振荡培养至  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  为  $0.6\sim 0.8$ , 取出后冷却至室温, 先取未诱导的菌液  $4\ \text{mL}$  备用, 作为对照。然后加入终浓度  $1\ \text{mM}$  的 IPTG, 将 3 瓶 pET-28a-SE8/BL21 (DE3) 菌液分别放置于  $16^{\circ}\text{C}$ 、 $28^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  三个恒温摇床中诱导表达, 将 1 瓶 pET-28a /BL21 (DE3) 菌液放入  $28^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中诱导表达。各瓶菌液分别于诱导后  $4\ \text{h}$ 、 $6\ \text{h}$ 、 $7\ \text{h}$ 、 $8\ \text{h}$ 、 $9\ \text{h}$ 、 $10\ \text{h}$ 、 $11\ \text{h}$ 、 $12\ \text{h}$  和  $24\ \text{h}$  各取  $4\ \text{mL}$  菌液,  $12,000\times g$  离心  $1\ \text{min}$ , 收集菌体, 按菌

液体积:裂解液体积=10:1 加入裂解液重悬, 超声破碎菌体, 收集上清和沉淀, 分别用相同体积的 PBS 重悬, 分别取样 40  $\mu$ L 后加入 10  $\mu$ L SDS loading buffer, 95°C加热 5 min 变性。以诱导的空载体和未诱导的菌液作为阴性对照, SDS-PAGE 电泳后用 QuickBlue 快速染胶液染色 20~30 min 后分析蛋白表达情况, 确定最佳诱导温度和诱导时间。

## 2.2.4 重组蛋白的纯化

### 2.2.4.1 单组分重组蛋白和 rSE8 的大量表达

将 pGEX-6p-1-CNE、pGEX-6p-1-EAG、pGEX-6p-1-SclF、pGEX-6p-1-SclI、pGEX-6p-1-SclC、pGEX-6p-1-eq8、pGEX-6p-1-eq5、pGEX-6p-1-ideE、pGEX-6p-1-SE8 和 pET-28a-SE8 重组质粒转化入 BL21 (DE3) 后, 随机挑取单菌落到 5 mL 含 50  $\mu$ g/mL 对应抗生素的 LB 培养基中, 37°C振荡培养 12 h。将小摇菌液按 1:100 接种至 250 mL 含对应抗生素的 LB 培养液中, 37°C恒温振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.6~0.8, 取出后冷却至室温, 按照确定的最佳诱导条件诱导表达 rSE8。

### 2.2.4.2 单组分重组蛋白以及 SE8 (GST) 的纯化

使用碧云天生物技术有限公司提供的 GST 标签蛋白纯化试剂盒纯化各 GST 重组蛋白。具体操作如下: 收集菌液至 500 mL 离心瓶中, 4°C 4,000 g 离心 20 min, 收集菌体沉淀。按照诱导菌液体积:裂解缓冲液=10:1 的比例加入裂解缓冲液, 充分重悬菌体, 添加终浓度为 1mM 的 PMSF 抑制目的蛋白的降解。加入终浓度为 1mg/mL 的溶菌酶后, 冰水浴 30min。冰水浴上超声裂解细菌(超声功率 750 W, 间隔 10 sec 超声一次, 每次处理 10 sec, 共超声 20 min)。4°C 10,000 g 离心 20~30 min, 分离上清和沉淀, 沉淀和上清用相同体积的裂解液重悬, 并置于冰水浴上, 各取 40  $\mu$ L 留作后续检测用。在空柱中加入混合均匀 2 mL BeyoGold™ GST-tag Purification Resin, 打开底帽, 自然流干后, 再加 4 倍柱体积的裂解缓冲液平衡树脂, 自然流干, 盖上底帽。加入 2 mL 裂解液到柱子中, 重悬树脂, 将重悬后的树脂转移到超声后的上清中, 4°C旋转混匀 2 h。将结合后的树脂加入到柱中, 打开底帽, 自然流出, 收集流穿液, 并取 40  $\mu$ L 留作后续检测用。洗柱 8 次, 每次加入 1 mL 裂解缓冲液, 每次均收集 40  $\mu$ L 洗涤的液体留作后续检测用。洗脱缓冲液洗脱目的蛋白 6~10 次, 每次 1 mL, 各管收集的洗脱液即为纯化的 GST 标签重组蛋白。每管各取 40  $\mu$ L, 各加 10  $\mu$ L 5×SDS Loading buffer 95°C煮样 5min 变性, SDS-PAGE 电泳, QuickBlue 快速染胶液染色 20~30 min 后分析结果。将有目的条带的洗脱液混合后, 分光光度计测浓度, 并利用超滤管浓缩到 1 mg/mL, 分装于-80°C保存备用。

### 2.2.4.3 His 标签蛋白 rSE8 的纯化

使用金斯瑞生物科技有限公司提供的 High Affinity Ni-Charged Resin FF 纯化 His 标签蛋白 rSE8。具体操作方法如下: 收集菌液至 500 mL 离心瓶中, 4°C 4,000  $\times$ g 离心 20 min, 收集菌体沉淀。按照诱导菌液体积:LE buffer=10:1 的比例加入 LE buffer 重悬菌体, 添加终浓度 1mM 的 PMSF。加入终浓度为 1mg/mL 的溶菌酶冰水浴 30min。冰水浴上超声裂解细菌(超声功率 750 W, 间隔 10 sec 超声一次, 每次处理 10 sec, 共超声 20 min)。4°C 10,000  $\times$ g 离心 20~30 min, 分离上清和沉淀, 沉淀和上清用相同体积的裂解液重悬, 并置于冰水浴上, 各取 40  $\mu$ L 留作后续检测用。在空柱中加入混合均匀 2 mL High Affinity Ni-Charged Resin FF, 打开底帽, 自然流干后, 再加 4 倍柱体积的 LE buffer 平衡树脂, 自然流干, 盖上底帽。加入 2 mL LE buffer 到柱

子中，重悬树脂，将重悬后的树脂转移到超声后的上清中，4℃旋转混匀 2 h。将结合后的树脂加入到柱中，打开底帽，自然流出，收集流穿液，并取 40  $\mu$ L 留作后续检测用。每次加入 1 mL Wash buffer 洗柱 8 次，每次均收集 40  $\mu$ L 洗涤的液体留作后续检测用。每次用 1 mL Elution buffer 洗脱目的蛋白 6~10 次。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中。收集获得的洗脱液即为纯化的 His 标签重组蛋白 rSE8。每份样品各取 40  $\mu$ L 留作检测用。将所有的样品加 10  $\mu$ L 5×SDS Loading buffer 混匀后 95℃煮样 5 min 变性，SDS-PAGE 电泳，QuickBlue 快速染胶液染色 20~30 min 后分析结果。将有目的条带的蛋白洗脱液混合，利用 50 kU 超滤管置换缓冲液为 PBS，超微量紫外分光光度计测浓度，用 PBS 将浓度调整为 1 mg/mL，分装于-80℃保存备用。

## 2.2.5 重组蛋白的鉴定

Western blot 对纯化后的单组分蛋白以及 rSE8 进行分析。具体操作如下：

(1) SDS-PAGE：分别取 40  $\mu$ L 纯化所得的 1 mg/mL 单组分重组蛋白和 rSE8 以及 pGEX-6p-1/BL21 (DE3)，pET-28a/BL21 (DE3) 工程菌作为空载体对照，各加入 10  $\mu$ L 5×SDS loading buffer，95℃煮样 5 min 变性，使用金斯瑞生物技术有限公司提供的蛋白预制胶进行 SDS-PAGE 电泳。单组分蛋白用 4%的浓缩胶，80 V 电泳 20 min，12% 的分离胶，120V 电泳 45 min，rSE8 用 8%的分离胶，120 V 电泳 1 h。

(2) 转膜：电泳结束后，切胶，根据胶的大小裁剪 NC 膜，将 NC 膜在转膜缓冲液中平衡数秒，预处理膜后，按照“三明治模式”：转膜夹黑色负极面—海绵—蛋白胶—NC 膜—海绵—转膜夹红色正极面的顺序，注意保持膜与胶之间不要有气泡，放置好后合上转膜夹，插入快速湿转仪，将目的蛋白转印至 NC 膜上。

(3) 封闭：5%的脱脂乳室温封闭 1 h，封闭结束后用 1×TBST 洗涤三次，每次洗涤 10 min。

(4) 一抗孵育：使用 *S. equi* 自然感染马阳性血清或者 *S. equi* HLJ2018 株攻菌后的小鼠血清作为一抗（用 5%脱脂乳 1:200 稀释），室温孵育 2 h，用 1×TBST 洗 3 次，10 min/次。

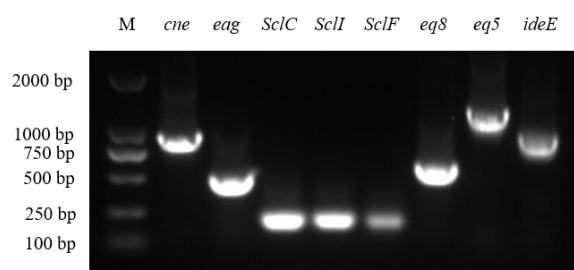
(5) 二抗孵育：加入 HRP 标记的兔抗马 IgG 抗体（用 5%脱脂乳 1:5000 稀释），室温孵育 1 h，1×TBST 洗 3 次，10 min/次。

(6) 结果分析：对于 *S. equi* 自然感染马阳性血清作为一抗的试验，取 DAB 显色试剂盒中的 A 液和 B 液各 50  $\mu$ L，加入到 900  $\mu$ L PBS 中混匀，均匀滴于膜上，避光显色 10 min，拍照分析结果；对于 *S. equi* HLJ2018 株攻菌后的小鼠血清作为一抗的试验，结果用红外双色成像系统分析。

## 2.3 结果及分析

### 2.3.1 目的基因的 PCR 扩增结果

以提取的 HLJ2018 株基因组 DNA 为模板，利用设计的针对 *cne*、*eag*、*ScfC*、*ScfI*、*ScfF*、*eq5*、*eq8* 和 *ideE* 的特异性引物进行扩增，分别得到 912 bp、483 bp、174 bp、168 bp、150 bp、1320 bp、588 bp 和 948 bp 的片段，与预期大小相符（图 2-2）。

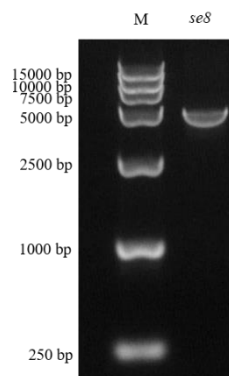
图 2-2 目的基因 *cne*、*eag*、*SclC*、*SclI*、*SclF*、*eq8*、*eq5* 和 *ideE* 的 PCR 扩增结果Fig. 2-2 PCR Amplification of *cne*, *eag*, *SclC*, *SclI*, *SclF*, *eq8*, *eq5* and *ideE*

### 2.3.2 rSE8 表达载体的构建结果

将 *cne*、*eag*、*eq5*、*eq8*、*SclC*、*SclI*、*SclF* 和 *ideE* 分别克隆到 pGEX-6p-1 原核表达载体中，测序无误，证实成功构建重组表达质粒 pGEX-6p-1-CNE，pGEX-6p-1-EAG，pGEX-6p-1-EQ5，pGEX-6p-1-EQ8，pGEX-6p-1-SclC，pGEX-6p-1-SclI，pGEX-6p-1-SclF 和 pGEX-6p-1-ideE。

通过同源重组技术，依次将 *cne*、*eag*、*SclC*、*SclI*、*SclF*、*eq8*、*eq5* 和 *ideE* 基因片段以蛋白接头 Gly-Gly-Gly 的核苷酸序列连接，得到的融合基因大小为 4914 bp，命名为 *se8*（见图 2-3），克隆至 pGEX-6p-1 原核表达载体中（见图 2-1），经 PCR 鉴定，*se8* 与预期大小相符，测序无误，证实 pGEX-6p-1-SE8 构建成功。

用引物 28a-8 F/28a-8 R 扩增 *se8* 融合基因片段，*EcoR* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶对 *se8* 和 pET-28a 载体进行双酶切，连接酶切片段，测序无误，证实 pET-28a-SE8 表达载体构建成功，并将该 8 组分融合蛋白命名为 rSE8。

图 2-3 *se8* 融合基因片段的 PCR 扩增结果Fig. 2-3 PCR Amplification of *se8*

### 2.3.3 重组蛋白的表达和纯化结果

将少量的 pET-28a/BL21 (DE3) 空载体工程菌和 pET-28a-SE8/BL21 (DE3) 重组蛋白工程菌加入 IPTG 诱导剂诱导表达，取未诱导和诱导后全菌样品，超声破碎后离心，检测上清中可溶性 rSE8 和沉淀中的包涵体蛋白表达量，将所取样品进行 SDS-PAGE 观察 181 kU 左右处条带大小。结果表明，rSE8 在经诱导后，沉淀和上清在预期大小位置均有明显条带，并且上清中的 rSE8 表达量明显高于沉淀中的包涵体蛋白表达量，而未诱导的样品几乎未见目的条带。证明经

IPTG 诱导后，rSE8 以可溶性的形式表达（见图 2-4）。

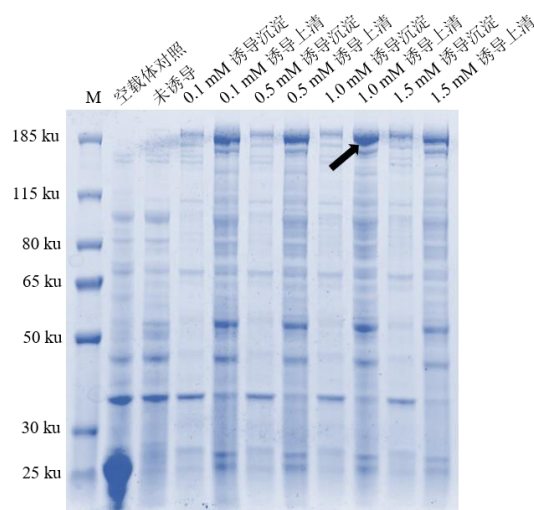


图 2-4 不同浓度 IPTG 诱导剂下 rSE8 表达情况的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2-4 SDS-PAGE identification of expression of rSE8 in different concentrations of IPTG

M. 蛋白质相对分子质量标准。箭头所示为 rSE8。

M. Protein Ladder. Arrow shows rSE8.

通过预表达 rSE8 筛选最佳诱导表达的 IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度。当 IPTG 诱导剂浓度分别为 0.1 mM、0.5 mM、1.0 mM 和 1.5 mM 时，rSE8 的可溶性表达量在 IPTG 浓度为 1.0 mM 时最大，在 1.5 mM 时有所降低（见图 2-4）。确定最佳 IPTG 诱导浓度为 1.0 mM 后，设置诱导温度分别为 37℃、28℃、16℃，诱导时间达到 4 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、11 h、12 h 和 24 h 时分别取样，筛选最佳诱导温度和诱导时间。结果表明，rSE8 的表达量在 37℃ 时最低，在 16℃ 最高；随着诱导时间延长，rSE8 总表达量增加，其中上清的蛋白表达量在 24 h 时最高，包涵体蛋白的表达量在 24 h 时最低（见图 2-5）。因此，rSE8 的最佳诱导条件为 IPTG 1.0 mM，诱导温度 16℃，诱导时间 24 h。

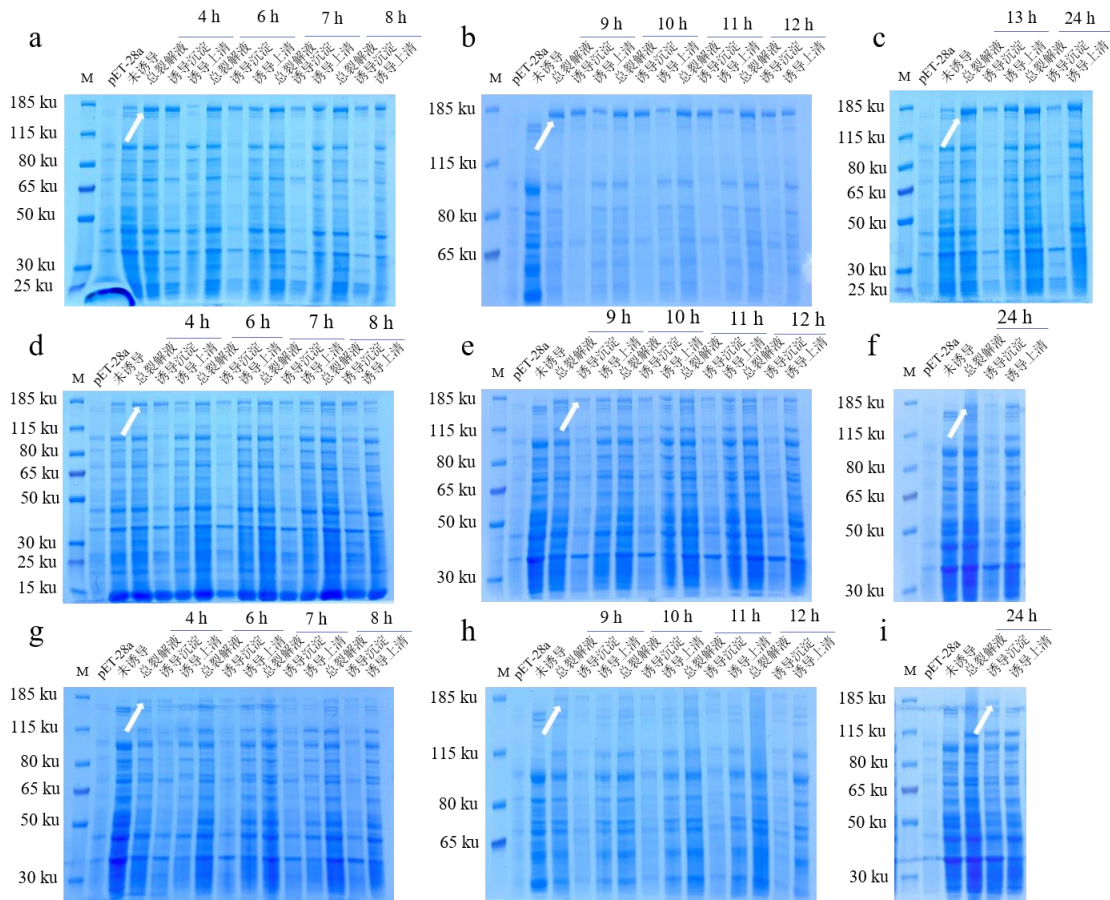


图 2-5 不同时间和温度下 rSE8 表达情况的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2-5 SDS-PAGE identification of expression of rSE8 at different times and temperatures

箭头所示为 rSE8。a~c: 16°C 诱导表达时不同诱导时间的 rSE8 表达量；d~f: 28°C 诱导表达时不同诱导时间的 rSE8 表达量；g~i: 37°C 诱导表达时不同诱导时间的 rSE8 表达量。

Arrows show rSE8. a~c: rSE8 expression levels at different inducing times at 16°C; d~f: rSE8 expression levels at different inducing times at 28°C; g~i: rSE8 expression levels at different inducing times at 37°C.

将 pGEX-6p-1-CNE、pGEX-6p-1-EAG、pGEX-6p-1-SclC、pGEX-6p-1-SclI、pGEX-6p-1-SclF、pGEX-6p-1-EQ5、pGEX-6p-1-EQ8、pGEX-6p-1-ideE、pGEX-6p-1-SE8 和 pET-28a-SE8 重组质粒转化至 BL21（DE3），对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析（见图 2-6）和 western blot 验证（见图 2-7），各蛋白大小见表 2-9，与预期目的蛋白大小相符，均以可溶性形式表达。

表 2-9 各蛋白分子量

Table 2-9 Molecular weight of each protein

| 蛋白名称     | CNE  | EAG  | SclC | SclI | SclF | EQ8  | EQ5  | IdeE | SE8(GST) | rSE8 |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|------|
| 蛋白分子量/kU | 59.8 | 43.9 | 32.8 | 32.5 | 31.9 | 73.6 | 48.7 | 61.6 | 204      | 181  |

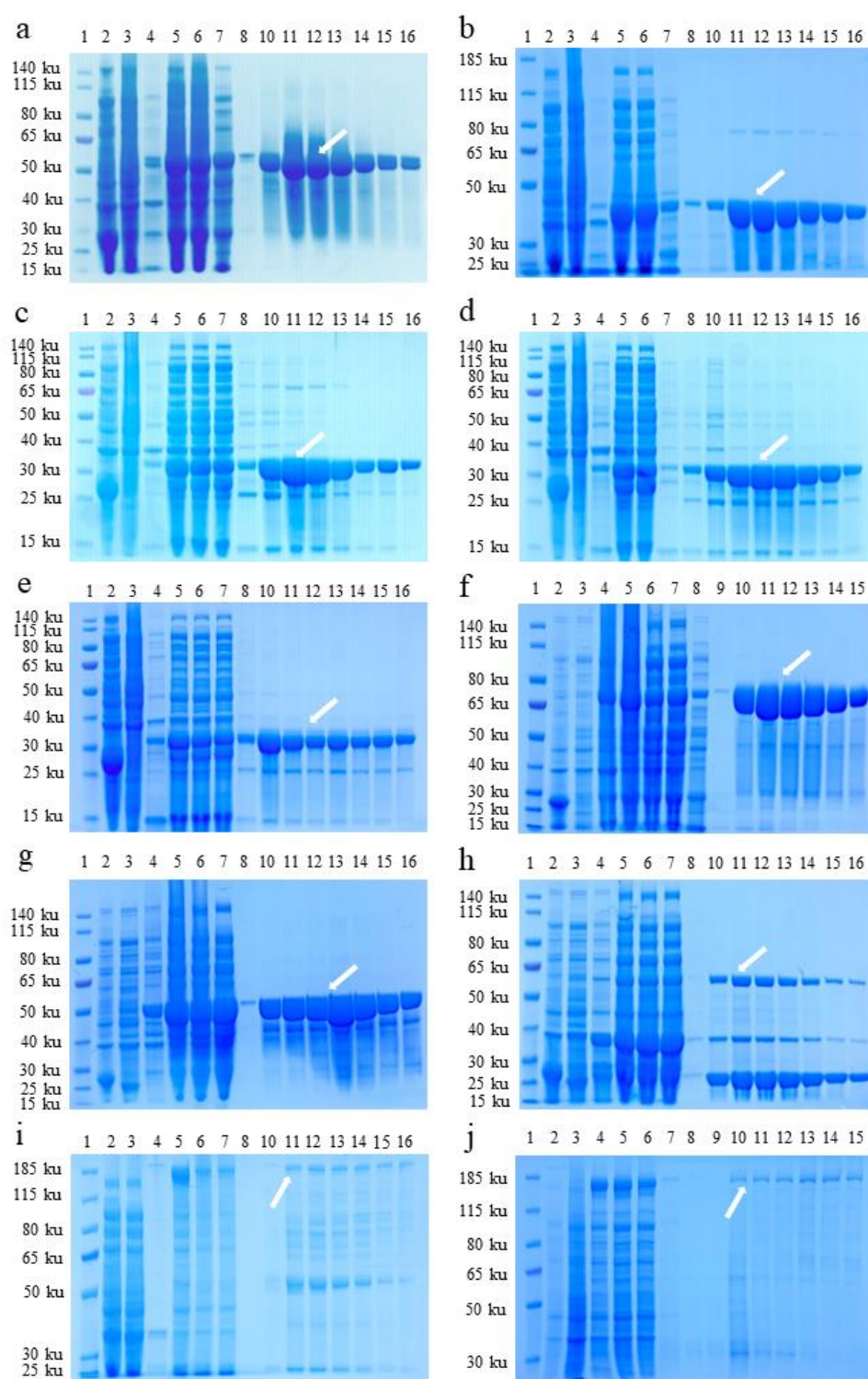


图 2-6 各重组蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.2-6 Results of expression and purification of recombinant proteins identified by SDS-PAGE

a~j: 分别为 CNE, EAG, ScIC, ScII, ScIF, EQ5, EQ8, ideE, rSE8, SE8(GST) 的表达纯化; 1. 蛋白质相对分子质量标准; 2. 空载体对照; 3. 未诱导; 4. 诱导沉淀; 5. 诱导上清; 6. 流穿液; 7~9. 洗涤液; 10~16. 蛋白洗脱液。箭头所示为目的蛋白。

a~j. Expression and purification of CNE, EAG, SclC, SclI, SclF, EQ5, EQ8, ideE, SE8(GST) and rSE8; 1. Protein Ladder; 2. Plasmid control; 3. Uninduced; 4. Induced precipitation; 5. Induced supernatant; 6. Flow through fluid; 7~9. Washing fluid; 10~16. Eluent. Arrows show the purified proteins.

### 2.3.4 单组分重组蛋白以及 rSE8 的 western blot 鉴定结果

使用 *S. equi* 自然感染马阳性血清作为一抗（1:200 稀释），HRP 标记的兔抗马 IgG 抗体（1:5000 稀释）作为二抗，western blot 检测纯化后的 CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ8、EQ5 和 ideE 等单组分蛋白和 rSE8（见图 2-7 a 和 b）；攻菌后的小鼠血清（1:200 稀释）为一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG（1:10000 稀释）作为二抗，western blot 检测 rSE8（见图 2-7 c）。结果表明这 8 种蛋白以及 rSE8 均能与 *S. equi* 自然感染马阳性血清和 *S. equi* 感染小鼠血清特异性结合。

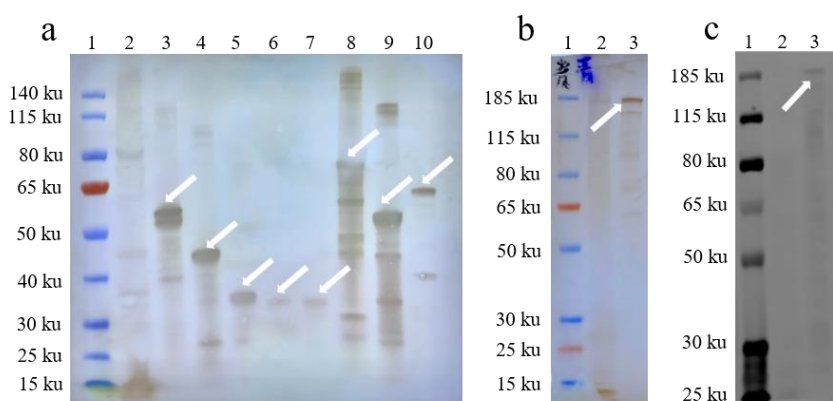


图 2-7 重组蛋白反应原性的 western blot 验证

Fig. 2-7 Western blot analysis of reactogenicity of recombinant proteins

a. 单组分重组蛋白与 *S. equi* 自然感染马阳性血清结合的 western blot 验证：1. 蛋白质标准分子量；2 pGEX-6p-1 空载体对照；3~10. 分别为 CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ5、EQ8 和 IdeE；b. rSE8 和 *S. equi* 自然感染马阳性血清结合的 western blot 验证：1. 蛋白质标准分子量；2. pET-28a 空载体对照；3. rSE8；c. rSE8 与 *S. equi* 感染小鼠血清结合的 western blot 验证：1. 蛋白质标准分子量；2. pET-28a 空载体对照；3. rSE8

a. Verification of binding of recombinant proteins to positive sera from equine naturally infected with *S. equi* by western blot: 1. Protein Ladder; 2 pGEX-6p-1 control; 3~10. CNE, EAG, SclC, SclI, SclF, EQ5, EQ8, ideE; b. Verification of binding of rSE8 to positive sera from equine naturally infected with *S. equi* by western blot: 1. Protein Ladder; 2. pET-28a control; 3. rSE8; c. Verification of binding of rSE8 to sera from *S. equi* infected mice by western blot: 1. Protein Ladder; 2. pET-28a control; 3. rSE8.

第三章 rSE8 对小鼠免疫效果的评价

3.1 材料

3.1.1 菌种及实验动物

*S. equi* HLJ2018 株由本实验室分离并保存；BALB/c 雌鼠购自辽宁长生生物技术有限公司。实验小鼠按照中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物饲养标准执行，饲养于哈尔滨兽医研究所 SPF 级动物实验中心；所有小鼠实验均已通过中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物伦理委员会审批并严格参照中国农业科学院哈尔滨兽医研究所动物伦理委员会规则进行。实验动物伦理表批准文号（IACUC 210105-01）。

3.1.2 主要仪器

表 3-1 主要仪器

Table 3-1 main instruments in this study

| 仪器                                | 公司              |
|-----------------------------------|-----------------|
| 荧光定量 PCR 仪（MA-688）                | 雅睿生物            |
| 酶标仪（ELx808）                       | Bio Tek         |
| 台式 pH 计（S210-B）                   | METTLER TOLEDO  |
| 细胞计数仪（IC1000）                     | 上海睿钰生物科技有限公司    |
| 台式离心机（5424）                       | Eppendorf       |
| 超纯水仪（GENPURE PRO UV/UF）           | Thermo          |
| 微孔板快速震荡器（QB-9002）                 | 海林市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| 超微量紫外分光光度计（NanoPhotometer P330）   | IMPLEN          |
| 流式细胞仪（BD Accuri™ C6）              | BD Biosciences  |
| 恒温培养箱（DHP-9272）                   | 上海一恒科学仪器有限公司    |
| 洁净工作台（DL-CJ-2MDII）                | 北京东联哈尔仪器制造有限公司  |
| 高速离心机（CR21G II）                   | HiTACHI         |
| 水浴锅（DK-8D）                        | 上海精宏实验设备有限公司    |
| 往复式脱色摇床（TS.B-108）                 | 海林市其林贝尔仪器制造有限公司 |
| 96 孔微孔洗板机（888）                    | Thermo          |
| 组织研磨仪 Ultracool GeneReady（BSH-C2） | 杭州遂真生物技术有限公司    |
| 漩涡振荡器                             | Crystal         |

3.1.3 主要耗材

表 3-2 实验耗材

Table 3-2 Experimental consumables in this study

| 实验耗材       | 来源        |
|------------|-----------|
| 细胞筛网       | Falcon    |
| 无菌注射器      | BD        |
| 离心管        | NEST      |
| 0.22 μM 滤膜 | Millipore |

3.1.4 主要试剂

表 3-3 主要试剂

Table 3-3 Main reagents in this study

| 试剂                                                                 | 公司               |
|--------------------------------------------------------------------|------------------|
| HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗                                                  | KPL              |
| 小鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒，红细胞裂解液                                               | 索莱宝              |
| 抗体亚型鉴定试剂盒                                                          | Southern Biotech |
| BSA                                                                | Biosharp         |
| DEPC 水、甘油                                                          | 索莱宝              |
| 异丙醇，甲醛                                                             | 国药化试             |
| 75% 酒精                                                             | 利尔康              |
| Tween 20、Triton X-100、氯仿                                           | Sigma            |
| TRIzol                                                             | Invitrogen       |
| Biopanda 单组分 TMB 显色液                                               | 英创               |
| Skim milk                                                          | BD               |
| THB 培养基                                                            | 海博生物             |
| 哥伦比亚血平板                                                            | OXOID            |
| APC anti-mouse CD8a、FITC anti-mouse CD4、PE/Cy7 anti-mouse CD3 流式抗体 | Biolegend        |
| 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒                                                     | TAKARA           |

3.1.5 主要溶液和培养基的配制

本实验涉及的溶液和培养基的配置见表 3-4。

表 3-4 主要溶液及培养基的配置方法

Table 3-4 Main solutions and mediums preparation in this study

| 溶液                         | 成分                                                                                                  | 操作                                               |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| PBS 缓冲液                    | 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 加水溶解，调 pH 7.4，灭菌后室温保存。                           |
| PBST 缓冲液                   | 1 L PBS、0.05% Tween 20                                                                              | 充分混匀。                                            |
| TBS 缓冲液（10×）               | 0.2M Tris-HCl、1.5 M NaCl                                                                            | 充分溶解后室温保存。                                       |
| TBST 缓冲液（1×）               | 100 mL 10×TBS、500 μL Tween 20                                                                       | 充分混匀。                                            |
| ELISA 封闭液和抗原抗体稀释液          | 95% PBS、5% BSA                                                                                      | 混匀后 4℃ 保存。                                       |
| 2 M 硫酸终止液                  | 160 mL H <sub>2</sub> O、20 mL 38%浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                   | 浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 缓慢加入水中并混匀，室温保存。 |
| Todd Hewitt Broth 培养基（THB） | 36.4 g Todd Hewitt 粉末、10 g 酵母提取物                                                                    | 加水溶解，定容至 1 L，调 pH 7.4，灭菌后 4℃ 保存。                 |

3.2 方法

3.2.1 *S. equi* 小鼠感染模型的建立

3.2.1.1 HLJ2018 株菌液配制

从-80℃拿出保存的 HLJ2018 株甘油菌，在哥伦比亚血平板上划线，37℃过夜培养，挑取溶血单菌落，接种于 5 mL THB 培养基中，37℃振荡培养 12~16 h，将小摇的菌液按照 1:100 的比例接种到 200 mL THB 液体培养基，37℃振荡培养至对数生长期（OD<sub>600 nm</sub>=0.8~1.0），然后将菌液 10 倍比稀释后，涂血平板进行平板计数。在计数的同时，将原菌液保存于 4℃。

根据平板计数结果，将原菌液进行梯度稀释，使各组浓度分别为 5×10<sup>7</sup>、5×10<sup>6</sup>、5×10<sup>5</sup>、5×10<sup>4</sup> 和 5×10<sup>3</sup> CFU/mL（CFU: colony forming units，菌落形成单位）。

3.2.1.2 梯度浓度 HLJ2018 株菌液感染小鼠

将 8 周龄 BALB/c 小鼠分 6 组，每组 8 只小鼠，一组对照组，腹腔注射 0.2 mL THB 培养基。其余五组实验组各腹腔注射 10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> CFU HLJ2018 株菌液，即浓度为 5×10<sup>3</sup>、5×10<sup>4</sup>、5×10<sup>5</sup>、5×10<sup>6</sup>、5×10<sup>7</sup> CFU/mL 的菌液各 0.2 mL。

攻菌后给予小鼠相同的饲养环境，每天观察并统计两周内小鼠的生存状态。存活鼠安乐死。统计存活率，分析得出 HLJ2018 株菌株感染小鼠的最小完全致死剂量（MLD）。

3.2.2 HLJ2018 灭活疫苗的制备

（1）菌液制备：拿出保存于-80℃的 HLJ2018 株甘油菌，在哥伦比亚血平板上划线，37℃过夜培养，挑取溶血单菌落，接种于 5 mL THB 培养基中，37℃振荡培养 12~16 h，将小摇的菌液按照 1:100 的比例接种到 200 mL THB 培养基，37℃振荡培养至对数生长期（OD<sub>600 nm</sub>=0.8~1.0）。

(2) 菌液灭活: 取 5 mL 摇好的菌液进行稀释涂血平板计数, 同时, 在剩下的菌液中加入终浓度为 0.2% 的甲醛溶液, 于 16°C 恒温摇床, 120 rpm 灭活 3 d。

(3) 去除甲醛: 将灭活好的菌液  $5,000 \times g$  离心 10 min, 弃上清, 加入适量无菌 PBS 重悬菌体, 洗 3 遍, 根据菌液计数结果, 加入无菌 PBS 稀释到  $10^9$  CFU/mL。

(4) 添加佐剂: 加入终浓度为 8% 的疫苗佐剂, 混合均匀后, 无菌条件下调节 PH 至 7.0。将 HLJ2018 灭活疫苗于 4°C 保存备用。

### 3.2.3 小鼠免疫试验

#### 3.2.3.1 小鼠分组情况

本研究的小鼠实验方案已获得动物福利伦理委员会的批准。取健康 4 周龄 BALB/c 雌鼠 54 只, 随机分成 6 组, 每组 9 只。其中重组蛋白疫苗免疫组 2 组 (一组只免疫不攻菌, 另一组二免两周后攻菌), HLJ2018 灭活疫苗免疫组 2 组 (一组只免疫不攻菌, 另一组二免两周后攻菌), 对照组 2 组 (一组只免疫不攻菌, 另一组二免两周后攻菌)。免疫试验在 IVC 正压环境下进行, 攻菌后在负压环境、隔离器中进行。

#### 3.2.3.2 免疫方案

首先将 100  $\mu$ g rSE8 (浓度为 1 mg/mL)、 $10^8$  CFU HLJ2018 灭活疫苗 (浓度为  $10^9$  CFU/mL) 和 100  $\mu$ L 无菌 PBS 分别与终浓度为 8% 的疫苗佐剂在无菌条件下混合均匀后, 分别为 rSE8 免疫组、灭活疫苗免疫组和对照组的小鼠, 首免剂量分别为 100  $\mu$ g rSE8,  $10^8$  CFU HLJ2018 株, 100  $\mu$ L 无菌 PBS, 背部皮下多点注射。间隔两周加强免疫, 免疫剂量和途径同首免。

三组都在免疫前、一免后 1 W、2 W 及二免后 1 W、2 W、3 W、4 W、5 W、6 W 进行眼眶下静脉采血, 每只小鼠采血 200  $\mu$ L, 37°C 放置 1 h 后,  $4,000 \times g$ , 10 min 离心收集血清, 用作检测 IgG 水平。免疫日程见图 3-1。

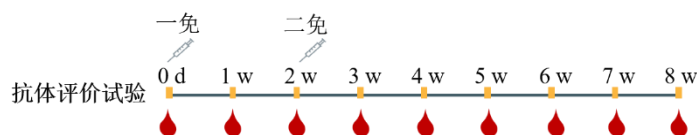


图 3-1 抗体评价试验设计示意图

Fig. 3-1 Schematic diagram of antibody detection experiments design

#### 3.2.4 间接 ELISA 检测 rSE8 免疫小鼠血清中各蛋白特异性抗体水平

采用间接 ELISA (iELISA) 检测免疫后每周采集的血清中抗原特异性 IgG 水平, 以及二免后 2 W rSE8 的特异性抗体亚型 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的水平。具体方法如下:

(1) 抗原稀释: 用 PBS 将抗原稀释到 1 ng/ $\mu$ L。

(2) 包被: 包被抗原分别为纯化后的单组分重组蛋白 CNE、EAG、ScIC、ScII、ScIF、EQ8、EQ5、ideE 以及多组分融合蛋白 SE8(GST), 稀释后的抗原溶液包被 96 孔板 (100  $\mu$ L/孔), 4°C 过夜。

(3) 洗涤: PBST 洗板 3 次, 并用吸水纸拍干。

(4) 封闭: 加入 200  $\mu$ L/孔封闭液, 37°C 封闭 2 h。

(5) 洗涤: PBST 洗涤包被板 3 次, 吸水纸拍干。

(6) 一抗孵育: 待测血清 2 倍比稀释, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 37°C 孵育 1 h。为了确定临界值, 取 24 份已知 *S. equi* 阴性小鼠血清, 每份样品稀释 200 倍, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 3 个重复。

(7) 洗涤: PBST 洗涤包被板 3 次, 吸水纸拍干。

(8) 二抗孵育: 在测 IgG 水平的试验中, 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 100  $\mu\text{L}$ /孔; 在测抗体亚型水平的试验中, 将 Southern Biotech 提供的抗体亚型鉴定试剂盒中的 Goat Anti-Mouse IgG1 (Human ads-HRP)、Goat Anti-Mouse IgG2a (Human ads-HRP) 和 Goat Anti-Mouse IgG2b (Human ads-HRP) 稀释 200 倍后, 加入 100  $\mu\text{L}$ /孔。37°C 孵育 30 min (期间拿出显色液, 避光放至室温)。

(9) 洗涤: PBST 洗涤包被板 3 次, 吸水纸拍干。

(10) 显色: 加入 TMB 显色剂, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 室温避光显色 10 min。

(11) 终止: 加入 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液, 50  $\mu\text{L}$ /孔, 并在微孔板震荡仪上震荡 30 sec, 使反应充分终止。

(12) 读值: 酶标仪测定每孔的  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  值, 计算样本  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  值的平均值 ( $\bar{X}$ ) 和标准方差 ( $SD$ ), 根据统计学原则, 当的  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  (待测血清)  $\geq \bar{X}$  (阴性血清) + 3SD (阴性血清) 时, 可以在 99.9% 的水平上判定为阳性。判定为阳性的最大稀释倍数即为该待测血清的抗体滴度。

### 3.2.5 小鼠免疫保护试验

根据建立的小鼠 HLJ2018 株感染模型得出的 MLD 确定攻菌剂量。三个攻菌组都在二免后 2 W 用 10 MLD 的 HLJ2018 株菌液攻菌, 攻菌方式为腹腔注射 200  $\mu\text{L}$  稀释到相应浓度的菌液。免疫保护试验日程见图 3-2。

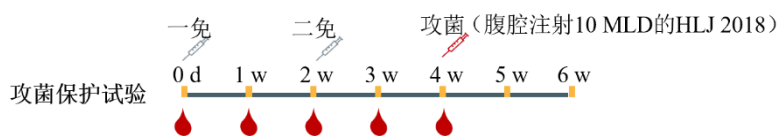


图 3-2 攻菌保护试验设计示意图

Fig. 3-2 Schedule of challenge experiments

#### 3.2.5.1 小鼠攻菌后的生存状态

攻菌后 2 W 内每天观察小鼠的生存状态, 根据三组小鼠的存活率绘制生存曲线, 并比较三组小鼠的体质量变化。

#### 3.2.5.2 小鼠攻菌后组织病理变化及含菌量检测

将刚死亡的小鼠剖检, 观察病变, 同时无菌条件下取心、肝、脾、肺和大脑等器官后, 取一部分用 4% 甲醛固定, 制成病理切片, 显微镜病理变化; 另一部分称重后, 加入 PBS 进行组织匀浆, 1,200  $\times g$  离心 2 min, 取上清涂布于哥伦比亚血平板进行平板计数, 计算 CFU/g 的值, 比较各组小鼠组织含菌量。

#### 3.2.5.3 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$ 基因表达水平检测

荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测小鼠脾脏中白介素 4 (Interleukin 4, IL-4)、白介素 10 (Interleukin 10, IL-10) 和  $\gamma$  干扰素 ( $\gamma$  interferon, IFN- $\gamma$ ) 相关基因表达水平。

(1) 取脾脏组织：二免后 2 W 攻菌，在攻菌后 24 h 从攻菌的 rSE8 免疫组、灭活疫苗免疫组和对照组中分别取 3 只小鼠，脱颈处死后取脾脏。

(2) TRIzol 提取 RNA：切取 50~100 mg 组织，用酒精棉擦拭剪刀、镊子，将组织切成碎块，尽可能小或者碎；加入到有研磨珠的离心管中，加入 TRIzol 1 mL /管，使用组织研磨仪研磨脾脏；研磨结束后，12,000 ×g 离心 5 min，取上清至新的离心管中，室温放置 5 min。向离心管中加 200 μL 氯仿，吹打混匀，室温静置 2~3 min；4℃，12,000 ×g 离心 15 min，此时液相分上中下层；取上层液体（水相层）到新的离心管；加入 0.5 mL 异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置 10 min；4℃，12,000 ×g 离心 10 min，弃上清；向离心管中加入 1mL 75%酒精吹打混匀；4℃，7,500 ×g 离心 5 min，弃上清；打开管盖室温干燥 5~10 min，至乙醇完全挥发；向离心管内加入 30 μL DEPC 水，55℃促溶 5 min；分光光度计测 RNA 浓度；分装，-80℃保存。

(3) 反转录：使用 TAKARA 提供的反转录试剂盒，具体操作如下：  
a. 去除基因组 DNA：体系见表 3-5。充分混匀后瞬离，42℃反应 2 min，结束后将产物放置冰上。

表 3-5 去除基因组 DNA 体系

Table 3-5 Erase DNA reaction mixture

| 试剂                          | 使用量       |
|-----------------------------|-----------|
| 5×gDNA Eraser Buffer        | 2 μL      |
| gDNA Eraser                 | 1 μL      |
| Total RNA                   | 1 μg      |
| RNase FreedH <sub>2</sub> O | 补齐至 10 μL |

b. 反转录反应：反转录体系见表 3-6。

表 3-6 反转录体系

Table 3-6 PCR reverse transcription mixture

| 试剂                          | 使用量/μL |
|-----------------------------|--------|
| 上一步的反应液                     | 10 μL  |
| RT Primer Mix               | 1 μL   |
| 5×PrimeScript Buffer 2      | 4 μL   |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 1 μL   |
| RNase FreedH <sub>2</sub> O | 4 μl   |

在冰上配制反应液。反应条件为：37℃ 15 min、85℃ 5 sec。cDNA 测浓度后用 3 倍 dH<sub>2</sub>O 稀释成相同的浓度，保存于-20℃。

(4) qRT-PCR  
以逆转录产物 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。引物序列根据 GenBank 中收录的基因全序列用 SnapGene 4.2 软件设计以及参考文献获得。引物合成由库美生物科技有限公司完成，再通过普通 PCR 确定最佳引物和最适退火温度。每对引物确定 3 个适当的温度梯度，以 cDNA 为模板，PCR 扩增后对产物进行分析，选择能扩增出单一条带且条带最亮的引物进行后续试验。最后筛选出的引物的序列及扩增长度见表 3-7。

表 3-7 荧光定量 PCR 引物

Table 3-7 The primer sequences for real-time quantitative PCR amplifications in this study

| 检测基因           | 引物序列 (5'~3')                                                          | 产物大小/bp     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------|
| Detected genes | primer sequences                                                      | Products/bp |
| IL-10          | F: ACAGCCGGGAAGACAAT<br>R: GCAGCTCTAGGAGCATGT                         | 66          |
| IL-4           | F: 5'-TCC TGC TCT TCT TTC TCG-3',<br>R: 5'-TTT TCC TGT GAC CTC GTT-3' | 98          |
| IFN- $\gamma$  | F :5'-CGCTACACACTGCATCTTGG-3'<br>R:5'-TTCCACATCT ATGCCACTTGAG-3'      | 130         |
| $\beta$ -actin | F: 5'-GAG ACCTTCAACACCCCAGCC-3'<br>R: 5'-AATG TCACGCACGATTTCCT-3'     | 263         |

qRT-PCR 反应在雅睿生物荧光定量 PCR 仪中进行。分别用检测 IL-10、IL-4 和 IFN- $\gamma$  相关基因的引物和内参引物扩增，以  $\beta$ -actin 的表达量作为校准。反应体系见表 3-8，冰上配制，在雅睿生物荧光定量 PCR 仪中进行反应，反应条件：Stage 1: 95°C 预变性 30 sec；Stage 2: 95°C 变性 5 sec、60°C 退火 1 min，40 个循环；Stage 3: 95°C 1min、55°C 30 sec、95°C 30 sec。每个样品设置 3 个重复。

结果用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析， $\beta$ -actin 的表达量作为内参，计算 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  mRNA 的相对表达量。

表 3-8 qRT-PCR 反应体系

Table 3-8 qRT-PCR reaction mixture

| 试剂                                                        | 使用量/ $\mu$ L |
|-----------------------------------------------------------|--------------|
| TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) | 12.5         |
| PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)                           | 1            |
| PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)                           | 1            |
| cDNA (10 pg~100 ng)                                       | 2            |
| 灭菌水                                                       | 8.5          |

### 3.2.6 统计学分析

本研究所有的数据表示为平均值 $\pm$ 标准差，GraphPad Prism 8 软件进行单因素方差分析。 $p<0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 3.3 结果及分析

### 3.3.1 HLJ2018 株感染小鼠的最小完全致死剂量

将倍比稀释的浓度分别为  $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$  和  $5 \times 10^7$  CFU/mL 的 HLJ2018 株菌液各取 0.2 mL 腹腔注射感染小鼠后，每天观察并统计三组小鼠的生存情况和体质量变化。

$10^7$ 、 $10^6$  和  $10^5$  CFU 攻菌组小鼠分别在攻菌后第 1 d，3 d，6 d 开始死亡，第 3 d，6 d，12 d 全部死亡，死亡率 100%； $10^4$  CFU 攻菌组小鼠在攻菌后第 6 d 开始死亡，第 9 d 不再死亡，死亡率 50%； $10^4$  CFU 攻菌组小鼠在攻菌后第 12 d 开始死亡，其余小鼠存活到观察期结束，死亡率 20%；对照组小鼠全部存活。HLJ2018 株对小鼠的最小完全致死剂量（MLD）为  $10^5$  CFU。根据小鼠存活率，绘制生存曲线（见图 3-3 a）。

$10^7$ ， $10^6$ ， $10^5$  CFU 攻菌组小鼠的体质量持续下降， $10^4$  和  $10^3$  CFU 攻菌组小鼠体质量从第三天开始下降，分别于第 9 d 和第 11 d 开始回升，对照组小鼠体质量增加了 7%。根据小鼠的平均体质量变化绘制体质量变化曲线（见图 3-3 b）。

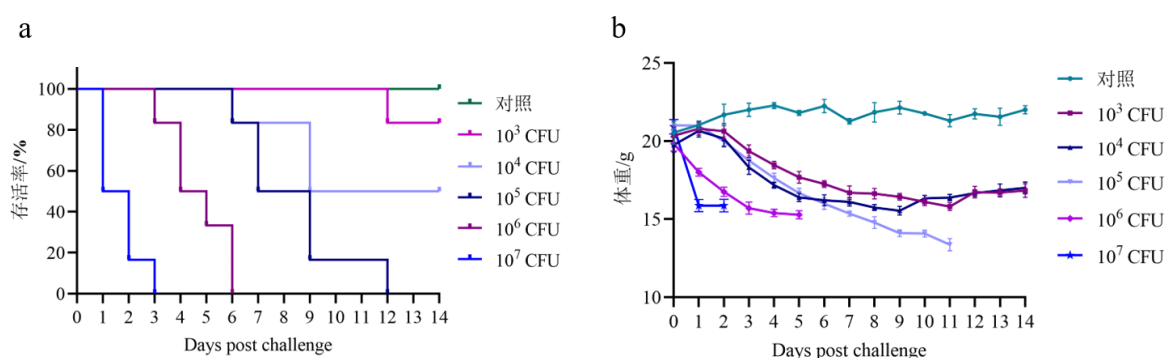


图 3-3 不同浓度 *S. equi* 感染小鼠后存活率 (a) 及体质量变化 (b) 结果

Fig. 3-3 Survival rate and weight changes of mice after being infected with different concentrations of *S. equi*

CFU: 菌落形成单位。

CFU: Colony forming units.

### 3.3.2 rSE8 诱导小鼠产生的免疫应答

#### 3.3.2.1 免疫小鼠血清特异性 IgG 水平

根据建立的间接 ELISA 检测方法，检测 rSE8、CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ5、EQ8 和 IdeE 特异性 IgG 的 iELISA 临界值（cut off 值）见表 3-9。当  $D_{450\text{ nm}} \geq \text{cut off 值}$  时，判定为阳性， $D_{450\text{ nm}} < \text{cut off 值}$  时，判定为阴性。对免疫后每周采集的小鼠血清 2 倍比稀释后，检测各抗原（rSE8、CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ5、EQ8 和 IdeE）特异性 IgG 水平（见图 3-4 a）。结果表明，在首次免疫后 7 d 即可检测到针对各抗原的特异性 IgG，并且其水平持续上升至第 28 d，然后保持在一个相对稳定的水平。各抗原的最高特异性抗体效价水平见表 3-9。

表 3-9 各蛋白 iELISA 临界值及最高抗体效价

Table3-9 The cut off value and highest antibody titer of iELISA for each protein

| 蛋白名称 | iELISA 临界值 | 最高特异性抗体效价 | 蛋白名称 | iELISA 临界值 | 最高特异性抗体效价 |
|------|------------|-----------|------|------------|-----------|
| rSE8 | 0.59       | 1:32768   | ScIF | 0.08       | 1:1024    |
| CNE  | 0.13       | 1:65536   | EQ8  | 0.08       | 1:131072  |
| EAG  | 0.21       | 1:16384   | EQ5  | 0.14       | 1:131072  |
| ScIC | 0.07       | 1:32768   | IdeE | 0.13       | 1:1024    |
| ScII | 0.09       | 1:256     |      |            |           |

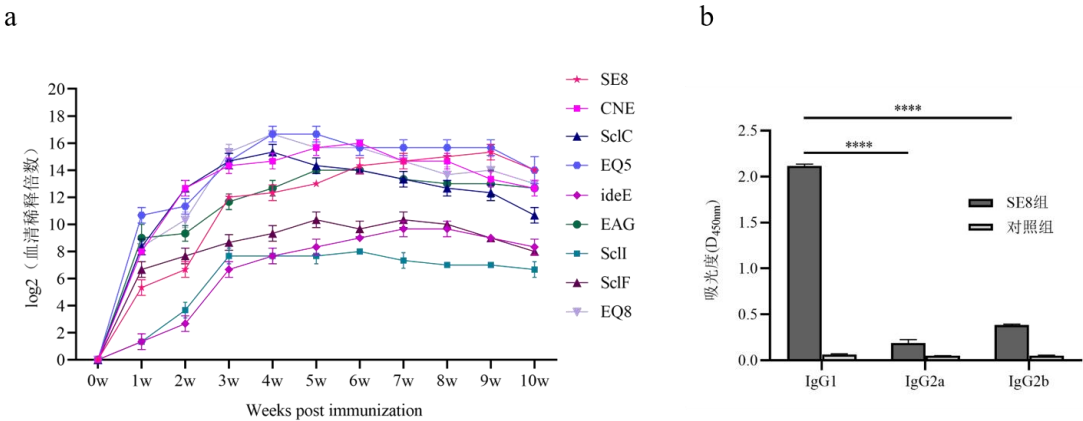


图 3-4 免疫小鼠血清中特异性抗体水平的 iELISA 检测

Fig. 3-4 Specific antibodies levels in sera of immunized mice measured by iELISA

a. 免疫后每周小鼠血清中各抗原的特异性 IgG 水平；b. 二免后 2 W 时小鼠血清中 rSE8 的特异性 IgG1, IgG2a 和 IgG2b 水平；\*\*\*\*:  $p<0.0001$ , 表示具有极显著差异。

a. Specific IgG levels of each antigen in sera of mice every week after immunization; b. Specific IgG1, IgG2a and IgG2b levels of rSE8 in sera of mice 2 weeks after boost immunization; \*\*\*\*: indicates  $p<0.0001$  (a very significant difference).

3.3.2.2 免疫小鼠血清特异性抗体亚型 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 水平

二免后 2 W 小鼠血清中 rSE8 的特异性 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 水平用抗体亚型检测试剂盒检测，结果表明，rSE8 免疫后小鼠血清的 rSE8 的特异性 IgG1 水平显著高于 IgG2a 和 IgG2b 水平（\*\*\*\*:  $p<0.0001$ ）（见图 3-4 b）。

3.3.3 rSE8 疫苗和 HLJ2018 灭活疫苗对小鼠的保护效果的比较

3.3.3.1 免疫小鼠攻菌后的生存状态

在攻菌保护试验中，加强免疫两周后，对免疫小鼠腹腔注射 10 MLD（即  $10^6$  CFU）HLJ2018 株攻菌。持续两周观察各组小鼠（n=6）的生存状态。结果表明，rSE8 免疫组所有的小鼠均受到了保护（见图 3-5 a），灭活疫苗免疫组小鼠在攻菌后第 7 d 开始死亡，在观察期结束时存活率为 67%，对照组的小鼠在 7 d 内全部死亡，表明 rSE8 能给小鼠提供完全保护，相对于灭活疫苗来说有更好保护作用。

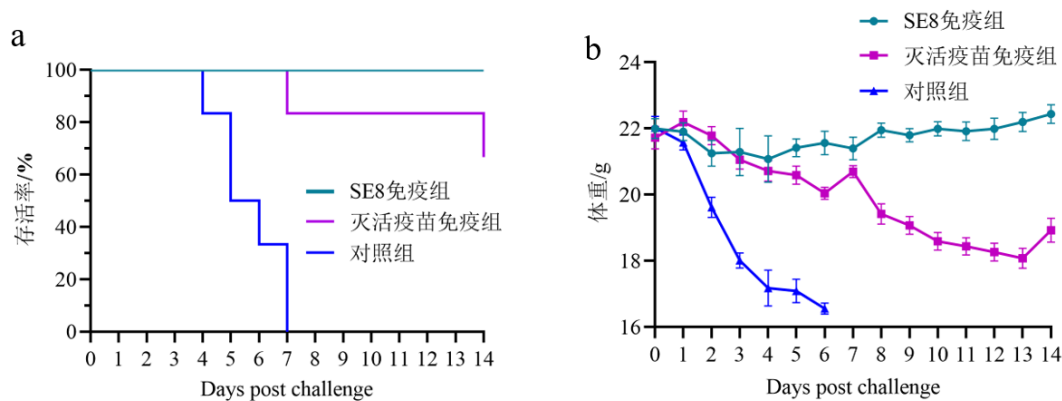


图 3-5 攻菌后各组小鼠存活率 (a) 及体质量变化 (b) 结果

Fig. 3-5 Survival rate (a) and weight changes (b) of mice in each group of immunized mice challenged with *S. equi*

此外, rSE8 免疫组小鼠体质量在攻菌后第 4 d 开始恢复, 在第 8 d 恢复正常, 灭活疫苗免疫组小鼠体质量在观察期内, 从第 2 d 开始直到第 13 d, 呈现持续下降的趋势, 对照组小鼠的体质量始终呈快速下降趋势 (见图 3-5 b)。

3.3.3.2 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  基因表达水平检测结果

为了进一步评估 rSE8 对小鼠的免疫保护作用, 二免后 2 W 攻菌, qRT-PCR 检测攻菌后 24 h rSE8 免疫组、灭活疫苗免疫组和对照组小鼠脾脏中 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  相关基因表达水平。结果表明, rSE8 免疫组在诱导 IL-4、INF- $\gamma$  和 IL-10 表达方面具有优势, 其中 IL-4 和 IL-10 的表达量显著高于对照组和灭活疫苗免疫组 (见图 3-6), 说明 rSE8 主要诱导机体产生体液免疫应答, 并且有效抑制小鼠体内的炎症反应。

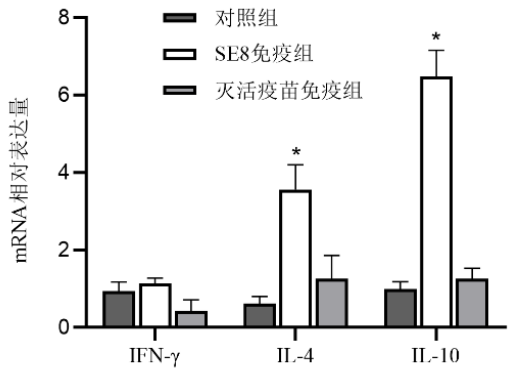


图 3-6 小鼠脾脏中 IL-4、IL-10 和 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达水平的 qRT-PCR 检测结果

Fig. 3-6 Relative mRNA expression of IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  in spleen of challenged mice measured by qRT-PCR

\*:  $p < 0.05$ , 表示具有显著差异。

\*: indicates  $p < 0.05$  (a significant difference).

3.3.3.3 免疫小鼠攻菌后组织病理变化及含菌量检测

攻菌后, 剖检刚死亡的小鼠, 无菌取小鼠心脏、肝脏、肺脏和大脑等器官, 经固定, 石蜡包埋, HE 染色, 在显微镜下观察发现, rSE8 免疫组的各脏器未见明显病变 (见图 3-7 b, e, h,

k)。灭活疫苗免疫组小鼠肝细胞少量变性，小胆管周围少量炎性细胞浸润（见图 3-7 f）；肺有少量炎性细胞浸润（见图 3-7 i）；大脑胶质细胞轻度增生，神经元细胞部分变性坏死（见图 3-7 l）。对照组小鼠心外膜被覆纤维素性渗出物，淤血，局灶性坏死，多量炎性细胞浸润（见图 3-7 a）；肝局部肝细胞多量坏死，炎性细胞浸润，可见球状菌体增殖（见图 3-7 d）；肺血管外膜水肿，少量炎性细胞浸润（见图 3-7 g）；大脑胶质细胞增生，部分神经元细胞变性坏死（见图 3-7 j）。

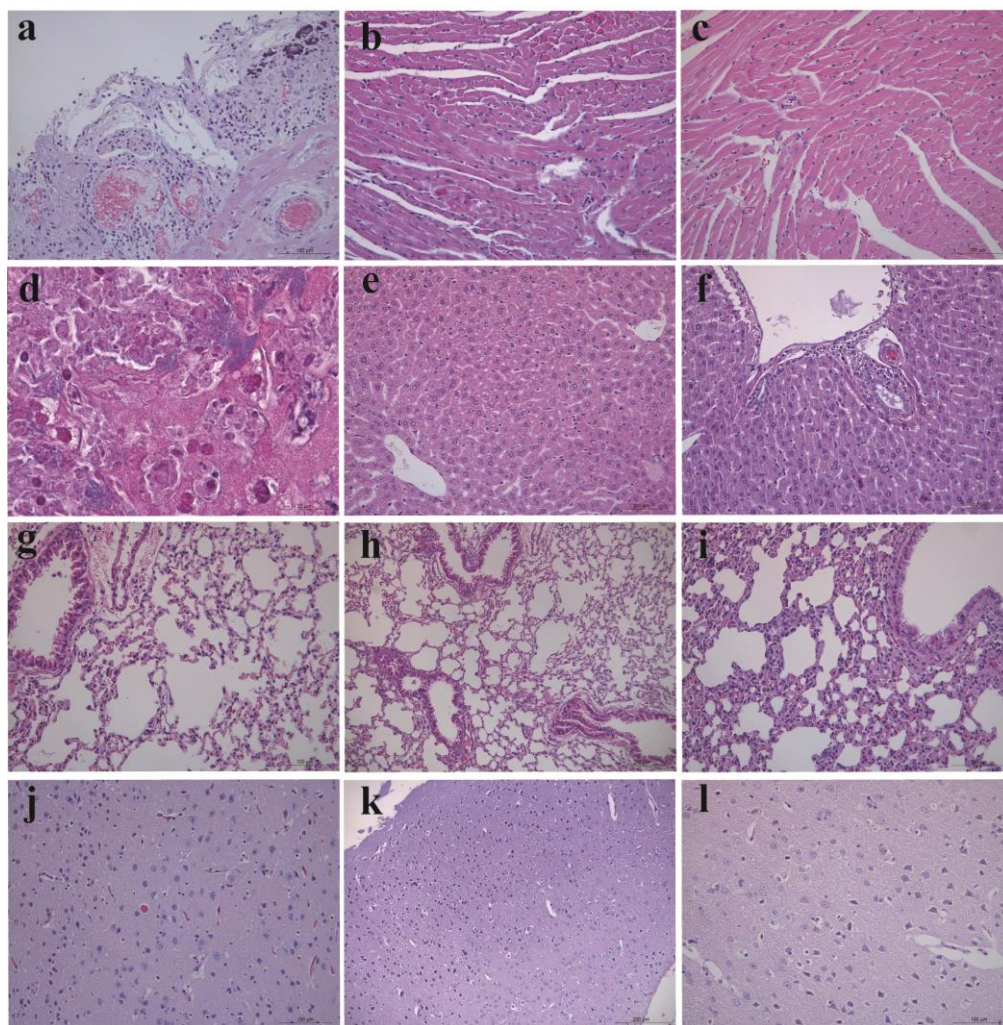


图 3-7 攻菌后各组小鼠器官的病理切片

Fig. 3-7 Pathological changes of organs in each group after being challenged with *S. equi* observed through HE staining

a~c: 分别取样于对照组、rSE8 免疫组和灭活疫苗免疫组的心（标尺：100  $\mu\text{m}$ ）；d~f: 分别分别取样于对照组、rSE8 免疫组和灭活疫苗免疫组的肝（标尺分别为 20  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ ）；g~h: 分别取样于对照组、rSE8 免疫组和灭活疫苗免疫组的肺（标尺分别为 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ ）；j~l: 分别取样于对照组、rSE8 免疫组和灭活疫苗免疫组的大脑（标尺分别为 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ ）。

a~c: The heart of control group, rSE8 group and inactivated vaccine group respectively (Scale: 100  $\mu\text{m}$ ); d~f: The liver of control group, rSE8 group and inactivated vaccine group respectively (Scale: 20  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , respectively); g~h: The lung of control group, rSE8 group and inactivated vaccine group respectively (Scale: 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , respectively).

respectively); j~l: The cerebrum of control group, rSE8 group and inactivated vaccine group respectively (Scale: 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , respectively).

攻菌后细菌分离鉴定结果显示, rSE8 免疫组小鼠的各脏器均未分离到病原菌 HLJ2018 株, 从灭活疫苗免疫组小鼠的心脏和肺脏中分离到病原菌, 其心脏的含菌量为  $1.38 \times 10^8$  CFU/g, 肺脏的含菌量为  $4.27 \times 10^8$  CFU/g; 对照组小鼠的心脏, 肝脏, 脾脏, 肺脏中均分离到了病原菌, 含菌量分别为  $1.46 \times 10^8$  CFU/g,  $1.95 \times 10^7$  CFU/g,  $1.50 \times 10^8$  CFU/g,  $8.08 \times 10^8$  CFU/g, 高于免疫组 (见图 3-8)。

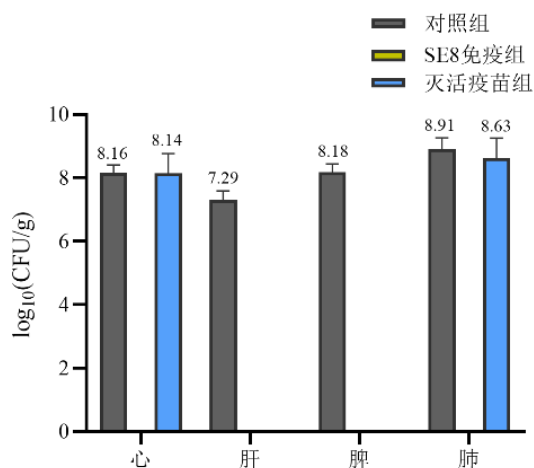


图 3-8 攻菌后各组小鼠器官含菌量的测定结果

Fig. 3-8 The loads of *S. equi* in organs of mice after being challenged with *S. equi*

## 第四章 讨论与分析

马腺疫是马属动物最常见的传染病之一,由 *S. equi* 引起,以上呼吸道感染、咽后淋巴结脓肿为特征,是一种高度接触性传染病 (WALLER et al., 2007); 该病死亡率低,但发病率高,尤其是马匹大量集中的地区尤其常见,而预防马腺疫最有效和成本最低的方式就是接种疫苗。虽然马腺疫是一种古老的疾病,但是多位点序列分型 (MLST) 表明,来自美国、加拿大、澳大利亚和欧洲的 *S. equi* 分离株均为 ST-179,或是单位点变异株 ST-151 (WEBB et al., 2008) (<http://pubmlst.org/szooepidemicus/>)。近年来对 *S. equi* 基因组的分析也表明其基因组多样性较小,稳定性较强 (HARRIS et al., 2015), 表明有效的 *S. equi* 疫苗可以为世界各地的马匹提供广泛的保护。有研究表明,马腺疫灭活疫苗、提取物疫苗和弱毒疫苗等疫苗对马匹的保护效果并不理想,并且常常会在接种后出现颌下淋巴结脓肿、注射部位脓肿和疼痛等不良反应 (NEWTON et al., 2005; KEMP-SYMONDS et al., 2007), 因此早期研发的灭活疫苗、提取物疫苗和弱毒疫苗等并没能实际应用起来,随着技术的发展,世界各地的科学家们继续开发各种新型马腺疫疫苗,其中亚单位疫苗只包含所需的靶蛋白,可以根据所使用的佐剂的性质,通过特异性体液免疫或者细胞免疫,对特定病原体提供保护,没有毒力返强的风险,并且由于不含 *S. equi* 的 DNA 而具有 DIVA 能力。因此,亚单位疫苗是目前马腺疫疫苗领域的颇有前景的研究方向,但是国内仍没有商品化疫苗可用。

本研究利用 CNE、EAG、ScIC、ScII、ScIF、EQ5 和 EQ8 等 7 种 *S. equi* 的表面毒力蛋白和一种 IgG 内肽酶 IdeE 蛋白,使用同源重组技术,获得含有 8 种组分的融合蛋白,首次制备了 rSE8 疫苗。通过将添加 8% 的疫苗佐剂的 100  $\mu$ g rSE8、 $10^8$  CFU HLJ2018 灭活疫苗背部皮下多点注射,间隔 2 W 加强免疫一次小鼠后,证明 rSE8 可诱导小鼠产生九种针对各组分抗原的高水平特异性抗体。小鼠免疫保护实验结果表明,相比于 HLJ2018 灭活疫苗, rSE8 可以有效地刺激机体产生针对 *S. equi* 的保护性体液免疫应答,为马腺疫亚单位疫苗研发提供参考依据。

亚单位疫苗研制成功的难点和关键是选取合适的抗原表位。有许多研究中使用 *S. equi* 的单一抗原配方免疫动物 (DOMINGUEZ-MEDINA et al., 2020; LEE et al., 2021; ZHAO et al., 2021), 虽然可能在各种动物模型中对马腺疫提供部分保护,但是如果在开发马腺疫疫苗时加入多个靶点,将会显著提高疫苗的有效性 (CHEN et al., 2021; MA et al., 2019)。最近,有多项研究表明多组分疫苗,包括融合蛋白,能够能为链球菌感染提供良好的保护效果 (ROBINSON et al., 2020; REGLINSKI et al., 2016; KUO et al., 2017; BURLET et al., 2017; CONVERSO et al., 2017)。类似于其他链球菌, *S. equi* 的一些表面成分可以与宿主蛋白特异性结合,如 IgG (MYHRE et al., 1980)、血清白蛋白 (WIDEBÄCK et al., 1983)、纤连蛋白 (MAMO et al., 1987)、胶原蛋白 (MAMO et al., 1987) 和  $\alpha$ -2 巨球蛋白 ( $\alpha$ 2M) (FLOCK et al., 2004), 这些参与宿主-病原之间识别的表面成分可以发挥黏附素、抗调理素或宿主模拟因子的作用,对病原的毒力具有重要意义。另一些促进免疫逃避,有助于细菌对天然和适应性宿主防御产生抵抗 (KLINE et al., 2009), 还有一些通过可能会造成宿主损伤或病原体扩散的降解酶促进 *S. equi* 获取营养 (GENTRY-WEEKS et al., 2002)。感染过腺疫的马很少在之后再次感染,说明感染后的马体能产生保护性免疫 (HAMLEN et al., 1994), 由于抗体应答主要针对抗吞噬的 M 样蛋白 SeM, 恢

复期马血清和鼻分泌物中都具有针对 SeM 的 IgG 和 IgA, 很多学者研究了 SeM 作为疫苗组分的作用 (NALLY et al., 2000; SHEORAN et al., 1997), 但发现使用不同佐剂和不同免疫途径给马免疫 SeM 蛋白, 对 *S. equi* 的感染没有显著的保护作用 (SHEORAN et al., 2002; SHEORAN et al., 1997)。

本研究选择 8 种 *S. equi* 的蛋白作为亚单位疫苗候选蛋白, 包括 7 种表面蛋白: 胶原蛋白结合蛋白 CNE,  $\alpha 2$ -巨球蛋白/白蛋白/IgG 结合蛋白 EAG, 胶原蛋白样蛋白家族成员 SclC、SclI 和 SclF, 包含典型的细菌表面蛋白特征的 Eq8 和 Eq5, 以及 1 种分泌蛋白 IgG 内肽酶 IdeE。有研究在分析来自 19 个国家的 759 株 *S. equi* 分离株的基因组序列后发现, 这 8 种蛋白的氨基酸序列高度保守 (FROSTH et al., 2022)。这些参与细菌的定植, 破坏扁桃体先天免疫防御, 逃避吞噬和刺激机体免疫反应 (TIMONEY et al., 2008), 其抗体具有黏附阻断和调理作用的双重活性 (FLOCK, 1999)。而 IdeE 是分泌蛋白, 能够裂解马血清中的 IgG, 从而减少抗体对马链球菌的识别并通过免疫应答杀死细菌 (HULTING et al., 2009)。已有研究表明, 再针对马腺疫的多组分疫苗中加入 IdeE 可显著提高保护效力, 表明靶向 IdeE 抗体对于诱导马体产生针对 *S. equi* 的保护性免疫发挥着重要作用 (GUSS et al., 2009)。为了降低成本和增强疫苗的安全性, 本研究探索将 CNE、EAG、SclC、SclI、SclF、EQ5 和 EQ8 等 7 种 *S. equi* 的表面蛋白和 1 种分泌蛋白 IgG 内肽酶 IdeE, 使用同源重组技术串联表达, 获得 8 组分单一融合蛋白, 制备了多组分亚单位疫苗 rSE8。为了使 rSE8 各个结构域能够正确折叠, 空间构象尽量与天然蛋白接近, 且所包含的 8 种蛋白质的抗原表位都能被免疫系统识别, 本研究引入结构简单、易于折叠并具有低电荷效应和亲水性的 Gly-Gly-Gly 氨基酸序列作为柔性蛋白接头, 可以降低 rSE8 的空间位阻。

对 rSE8 表达条件进行了优化, 结果表明, 在 IPTG 浓度为 1.0 mM 时, rSE8 的可溶性表达量最大, 1.5 mM 的 IPTG 由于浓度过高, 会影响大肠杆菌的代谢而降低 rSE8 的表达量。以最佳 IPTG 诱导浓度诱导 rSE8 表达, 结果表明 rSE8 的表达量在 16°C 时最高, 37°C 时最低, 随着诱导时间延长, 上清中的表达量升高, 诱导 24 h 时, 上清表达量最高, 沉淀表达量最低。可能是由于 rSE8 的分子量较大, 低温长时间诱导有助于降低 rSE8 的合成速度、折叠中间体形成聚集体的速度, 减小疏水作用力, 从而减少包涵体的形成, 促进可溶性 rSE8 的表达。

与对照组相比, rSE8 免疫后能够显著诱导小鼠产生各蛋白的特异性抗体, 并且 rSE8 的特异性 IgG1 水平明显高于 IgG2a 和 IgG2b 水平。IgG2a、IgG2b 和 IgG1 抗体分别通过调理作用/互补结合和免疫效应功能在病原防御中发挥重要作用 (HAZENBOS et al., 1998; OISHI et al., 1992), IgG2a、IgG2b 与 Th1 免疫应答有关, IgG1 与 Th2 免疫应答有关 (GERMANN et al., 1995)。另外, IgG1 在 Th0 前体细胞向 Th2 细胞转化过程中发挥着重要作用 (FINKELMAN et al., 1990), Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-10、IL-5 和 IL-13, 主要参与炎症抑制反应, 在体液免疫方面发挥着重要作用 (ZHANG et al., 2014)。小鼠 IgG1 抗体已被证明对肺炎链球菌鼻咽部定植的反应增加, 相当于在防御肺炎链球菌过程中发挥重要作用的人 IgG4 抗体 (DOMMASCHK et al., 2017; BARDARDOTTIR et al., 1990), 这与我们的研究结果一致, 提示 rSE8 特异性抗体的 Th2 免疫反应更明显, 诱导小鼠产生以体液免疫应答为主的保护性免疫应答, 并且诱导的特异性抗体在阻止链球菌定植的过程中发挥着重要作用。抗体亚型检测结果表明 rSE8 特异性抗体的 Th2 免疫反应更明显, 诱导机体产生以体液反应为主的免疫保护应答。

为进一步验证 rSE8 诱导小鼠产生的免疫应答类型和对小鼠的免疫保护作用,本研究检测了攻菌后 24 h 小鼠脾脏 IL-4、INF- $\gamma$  和 IL-10 相关基因表达水平。细胞因子对免疫应答的调控具有重要作用,其中 INF- $\gamma$  主要来自 Th1 细胞,促进细胞免疫应答;IL-4 主要来自于 Th2 细胞,促进体液免疫应答;IL-10 主要来自于 Th2 细胞,是一种抗炎细胞因子,参与炎症抑制反应,还可刺激抗体的产生(WOOD et al., 1996)。检测结果表明,rSE8 免疫组在诱导 IL-4、INF- $\gamma$  和 IL-10 表达方面具有优势,并且 IL-4 和 IL-10 的表达量显著高于对照组和灭活疫苗组,说明 rSE8 一方面可能是通过诱导 IL-4 的表达来促进 Th2 增殖,抑制 Th1 增殖,同时辅助 B 细胞活化,诱导机体产生体液免疫应答;另一方面可能通过促进 IL-10 的表达,在机体受到感染后抑制机体的炎症反应,刺激机体产生抗体。灭活疫苗中的菌体作为外源抗原,主要是通过 MHC II 类分子途径加工提呈给 CD4<sup>+</sup>T 细胞,辅助 B 细胞,产生体液免疫应答,本研究检测结果表明灭活疫苗免疫组小鼠的 IL-4 和 IL-10 的表达水平略高于对照组,说明 HLJ2018 灭活疫苗在一定水平上可以诱导小鼠产生体液免疫应答,但是诱导能力很弱。

在免疫保护试验中,rSE8 免疫组小鼠在受到 *S. equi* 感染后,全部得到保护,而灭活疫苗免疫组和对照组在观察期内的死亡率分别为 33%和 100%;rSE8 免疫组小鼠体质量很快恢复正常,灭活疫苗免疫组小鼠体质量在观察期内呈现持续下降的趋势;病理观察发现 rSE8 免疫组的各脏器未见明显病变,而灭活疫苗免疫组小鼠的病变主要集中在肝脏和肺脏,大脑可见轻度病变,对照组小鼠在心脏、肝脏、肺脏和大脑可见更严重的病变,肝脏甚至可见球状菌体增殖。细菌分离实验发现,rSE8 免疫组小鼠的各脏器均未分离到 HLJ2018 株,从灭活疫苗免疫组小鼠的心和肺中均能分离到 HLJ2018 株,对照组小鼠的心、肝、脾和肺中均分离到了病原菌,说明无论是 rSE8 疫苗还是灭活疫苗免疫小鼠后,都能使机体产生有效的保护性免疫应答,但灭活疫苗组在小鼠心脏和肺脏中检测出的病原菌数量与对照组无显著差异,而在肝脏和脾脏中却未检测出病原菌,原因有待进一步分析。但与灭活疫苗相比,rSE8 诱导机体产生的这九种蛋白的抗体水平显著升高,这是因为灭活疫苗细菌菌体抗原复杂,所以针对特定蛋白产生的抗体水平有限;rSE8 能更有效地保护机体免受 *S. equi* 的攻击,阻止 *S. equi* 引起的器官病变,诱导机体产生的免疫应答更为有效,分析其中可能的原因,一方面是链球菌全菌苗成分复杂,可能导致有效成分递呈不充分,而亚单位疫苗成分简单,可有效递呈抗原,诱导免疫;另一方面是链球菌感染会有免疫抑制现象,灭活疫苗中可能有某些成分引起免疫抑制,影响疫苗效果。为了更合理解释这些原因,后续还应补充亚单位疫苗、灭活疫苗不同剂量的免疫效力,全菌中有效抗原定量等研究工作。

动物感染和保护模型是疫苗效力评价中的重要组成部分,由于马的价值较高,其疫苗效力评价的成本也远高于其它动物疫苗,建立替代动物势在必行,本研究证明以多组分融合蛋白构建的疫苗免疫小鼠可以使感染小鼠完全保护,而且可以评价疫苗诱导抗体的效价,为建立马腺疫疫苗效力评价替代动物奠定了重要基础。

## 第五章 全文结论

本研究首次将 *S. equi* 的 7 种表面蛋白和 1 种分泌蛋白串联表达，获得分子量大小为 181 kU 的 8 组分融合蛋白 rSE8，具有与 *S. equi* 自然感染马阳性血清和 *S. equi* 感染小鼠血清结合的良好反应原性。

小鼠免疫试验中，rSE8 制备疫苗可诱导小鼠产生高水平体液免疫应答，能完全保护 HLJ2018 株感染的小鼠，显著高于 HLJ2018 株感染后灭活疫苗免疫组小鼠的存活率（66.7%），rSE8 免疫后可缓解 *S. equi* 对小鼠各器官的损伤，但灭活疫苗免疫组和对照组小鼠各器官出现不同程度的病变，并分离到了 HLJ2018 株，证明 rSE8 疫苗免疫保护效果优于 HLJ2018 灭活疫苗。

## 参考文献

- 郭纪珂, 王晓钧, 2013. 马腺疫. 畜牧兽医科技信息, (10): 16-18.
- 康立超, 陈新华, 钟发刚, 黄新, 韩猛立, 何延华, 2013. 马腺疫链球菌的分离鉴定与疫苗的研制. 黑龙江畜牧兽医, (09): 109-111.
- 吕芬芬, 马晓慧, 汪丽, 马陈, 张宝江, 苏艳, 2021. 马链球菌马亚种 3 种抗原蛋白对小鼠免疫的免疫原性分析. 畜牧兽医学报, 52(03): 752-762.
- 徐全圆, 2014. 马腺疫链球菌的分离鉴定及 FN 结合蛋白免疫原性的研究. 新疆农业大学.
- 袁贝, 2017. 新疆昭苏县马腺疫、马鼻肺炎、马流产沙门菌病血清流行病学调查及马腺疫灭活苗免疫后抗体水平的检测. 新疆农业大学.
- ABBOTT Y, ACKE E, KHAN S, MULDOON E G, MARKEY B K, PINILLA M, LEONARD F C, STEWARD K, WALLER A, 2010. Zoonotic transmission of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from a dog to a handler. *Journal of medical microbiology*, 59(Pt 1): 120-123. DOI: 10.1099/jmm.0.012930-0.
- BARDARDOTTIR E, JONSSON S, JONSDOTTIR I, SIGFUSSON A, VALDIMARSSON H, 1990. IgG subclass response and opsonization of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of healthy adults. *The Journal of infectious diseases*, 162(2): 482-488. DOI: 10.1093/infdis/162.2.482.
- BJÖRNSDÓTTIR S, HARRIS S R, SVANSSON V, GUNNARSSON E, SIGURDARDÓTTIR Ó G, GAMMELJORD K, STEWARD K F, NEWTON J R, ROBINSON C, CHARBONNEAU A R L, PARKHILL J, HOLDEN M T G, WALLER A S, 2017. Genomic Dissection of an Icelandic Epidemic of Respiratory Disease in Horses and Associated Zoonotic Cases. *mBio*, 8(4): e00826-17. DOI: 10.1128/mBio.00826-17.
- BORST L B, PATTERSON S K, LANKA S, BARGER A M, FREDRICKSON R L, MADDOX C W, 2011. Evaluation of a commercially available modified-live *Streptococcus equi* subsp. *equi* vaccine in ponies. *American journal of veterinary research*, 72(8): 1130-1138. DOI: 10.2460/ajvr.72.8.1130.
- BOSCHWITZ J S, TIMONEY J F, 1994a. Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood. *Infection and immunity*, 62(8): 3515-3520. DOI: 10.1128/iai.62.8.3515-3520.1994.
- BOSCHWITZ J S, TIMONEY J F, 1994b. Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Microbial pathogenesis*, 17(2): 121-129. DOI: 10.1006/mpat.1994.1058.
- BOYLE A G, TIMONEY J F, NEWTON J R, HINES M T, WALLER A S, BUCHANAN B R, 2018. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(2): 633-647. DOI: 10.1111/jvim.15043.
- BURLET E, HOGENESCH H, DUNHAM A, MOREFIELD G, 2017. Evaluation of the Potency, Neutralizing Antibody Response, and Stability of a Recombinant Fusion Protein Vaccine for

- Streptococcus pyogenes*. The AAPS journal, 19(3): 875-881. DOI: 10.1208/s12248-017-0069-5.
- CHEN X, RESENDE-DE-MACEDO N, SITTHICHAROENCHAI P, SAHIN O, BURROUGH E, CLAVIJO M, DERSCHIED R, SCHWARTZ K, LANTZ K, ROBBE-AUSTERMAN S, MAIN R, LI G, 2020. Genetic characterization of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* associated with high swine mortality in the United States. *Transboundary and emerging diseases*, 67(6): 2797-2808. DOI: 10.1111/tbed.13645.
- CHEN X, ZHAO Y, SU L, WANG L, MA X, ZHANG B, SU Y, 2021. Enhanced immune effects and protection conferred by simultaneously targeting GAPDH, SeM, and EAG of *S. equi* via TLR4. *Research in veterinary science*, 138: 100-108. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.06.001.
- CONVERSO T R, GOULART C, DARRIEUX M, LEITE L C C, 2017. A protein chimera including PspA in fusion with PotD is protective against invasive pneumococcal infection and reduces nasopharyngeal colonization in mice. *Vaccine*, 35(38): 5140-5147. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.08.010.
- CORBI A L, KISHIMOTO T K, MILLER L J, SPRINGER T A, 1988. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. *The Journal of biological chemistry*, 263(25), 12403-12411.
- CURSONS R, PATTY O, STEWARD K F, WALLER A S, 2015. Strangles in horses can be caused by vaccination with Pinnacle I. N. *Vaccine*, 33(30): 3440-3443. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.009.
- DOMINGUEZ-MEDINA C C, RASH N L, ROBILLARD S, ROBINSON C, EFSTRATIOU A, BROUGHTON K, PARKHILL J, HOLDEN M T G, LOPEZ-ALVAREZ M R, PAILLOT R, WALLER A S, 2020. SpeS: A Novel Superantigen and Its Potential as a Vaccine Adjuvant against Strangles. *International journal of molecular sciences*, 21(12): 4467. DOI: 10.3390/ijms21124467.
- DOMMASCHK A, DING N, TORT TARRES M, BITTERSOHL L F, MAUS R, STOLPER J, JONIGK D, BRAUBACH P, LIPPMANN T, WELTE T, MAUS U A, 2017. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* triggers dendritic cell dependent antibody responses against invasive disease in mice. *European journal of immunology*, 47(3): 540-551. DOI: 10.1002/eji.201646700.
- EYRE D W, KENKRE J S, BOWLER I C J W, MCBRIDE S J, 2010. *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* meningitis--a case report and review of the literature. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 29(12), 1459-1463. DOI: 10.1007/s10096-010-1037-5.
- FINKELMAN F D, HOLMES J, KATONA I M, URBAN J F J, BECKMANN M P, PARK L S, SCHOOLEY K A, COFFMAN R L, MOSMANN T R, PAUL W E, 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annual review of immunology*, 8: 303-333. DOI: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001511.
- FLOCK J I, 1999. Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus*

- aureus infections. *Molecular medicine today*, 5(12): 532-537. DOI: 10.1016/s1357-4310(99)01597-x.
- FLOCK M, JACOBSSON K, FRYKBERG L, HIRST T R, FRANKLIN A, GUSS B, FLOCK J, 2004. Recombinant *Streptococcus equi* proteins protect mice in challenge experiments and induce immune response in horses. *Infection and immunity*, 72(6): 3228-3236. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3228-3236.2004.
- FLORINDO H F, PANDIT S, GONÇALVES L M D, ALPAR H O, ALMEIDA A J, 2008. *Streptococcus equi* antigens adsorbed onto surface modified poly-epsilon-caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. *Vaccine*, 26(33): 4168-4177. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.05.074.
- FROSTH S, MORRIS E R A, WILSON H, FRYKBERG L, JACOBSSON K, PARKHILL J, FLOCK J, WOOD T, GUSS B, AANENSEN D M, BOYLE A G, RIIHIMÄKI M, COHEN N D, WALLER A S, 2022. Conservation of vaccine antigen sequences encoded by sequenced strains of *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Equine veterinary journal*. 10.1111/evj.13552. DOI: 10.1111/evj.13552.
- GALÁN J E, TIMONEY J F, 1987. Molecular analysis of the M protein of *Streptococcus equi* and cloning and expression of the M protein gene in *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 55(12): 3181-3187. DOI: 10.1128/iai.55.12.3181-3187.1987.
- GENTRY-WEEKS C, COBURN P S, GILMORE M S, 2002. Phages and other mobile virulence elements in gram-positive pathogens. *Current topics in microbiology and immunology*, 264(2): 79-94.
- GERMANN T, BONGARTZ M, DLUGONSKA H, HESS H, SCHMITT E, KOLBE L, KÖLSCH E, PODLASKI F J, GATELY M K, RÜDE E, 1995. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *European journal of immunology*, 25(3): 823-829. DOI: 10.1002/eji.1830250329.
- GUSS B, FLOCK M, FRYKBERG L, WALLER A S, ROBINSON C, SMITH K C, FLOCK J, 2009. Getting to grips with strangles: an effective multi-component recombinant vaccine for the protection of horses from *Streptococcus equi* infection. *PLoS pathogens*, 5(9): e1000584. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000584.
- HAMLEN H J, TIMONEY J F, BELL R J, 1994. Epidemiologic and immunologic characteristics of *Streptococcus equi* infection in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(5): 768-775.
- HARRINGTON D J, SUTCLIFFE I C, CHANTER N, 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and infection*, 4(4): 501-510. DOI: 10.1016/s1286-4579(02)01565-4.
- HARRIS S R, ROBINSON C, STEWARD K F, WEBB K S, PAILLOT R, PARKHILL J, HOLDEN M T G, WALLER A S, 2015. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *Genome research*, 25(9): 1360-1371. DOI: 10.1101/gr.189803.115.
- HAZENBOS W L, HEIJNEN I A, MEYER D, HOFHUIS F M, RENARDEL DE LAVALETTE C R,

- SCHMIDT R E, CAPEL P J, van de WINKEL J G, GESSNER J E, van den BERG T K, VERBEEK J S, 1998. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 161(6): 3026-3032.
- HIENZ S A, SCHENNINGS T, HEIMDAHL A, FLOCK J I, 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *The Journal of infectious diseases*, 174(1): 83-88. DOI:10.1093/infdis/174.1.83.
- HOFFMAN A M, STAEMPFLI H R, PRESCOTT J F, VIEL L, 1991. Field evaluation of a commercial M-protein vaccine against *Streptococcus equi* infection in foals. *American journal of veterinary research*, 52(4), 589-592.
- HOLDEN M T G, HEATHER Z, PAILLOT R, STEWARD K F, WEBB K, AINSLIE F, JOURDAN T, BASON N C, HOLROYD N E, MUNGALL K, QUAIL M A, SANDERS M, SIMMONDS M, WILLEY D, BROOKS K, AANENSEN D M, SPRATT B G, JOLLEY K A, MAIDEN M C J, KEHOE M, CHANTER N, BENTLEY S D, ROBINSON C, MASKELL D J, PARKHILL J, WALLER A S, 2009. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS pathogens*, 5(3): e1000346. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000346.
- HULTING G, FLOCK M, FRYKBERG L, LANNERGÅRD J, FLOCK J, GUSS B, 2009. Two novel IgG endopeptidases of *Streptococcus equi*. *FEMS microbiology letters*, 298(1): 44-50. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01698.x.
- HUMTSOE J O, KIM J K, XU Y, KEENE D R, HÖÖK M, LUKOMSKI S, WARY K K, 2005. A streptococcal collagen-like protein interacts with the alpha2beta1 integrin and induces intracellular signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280(14): 13848-13857. DOI:10.1074/jbc.M410605200.
- JACOBS A A, GOOVAERTS D, NUIJTEN P J, THEELEN R P, HARTFORD O M, FOSTER T J, 2000. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *The Veterinary record*, 147(20), 563-567. DOI: 10.1136/vr.147.20.563.
- JONSSON H, LINDMARK H, GUSS B, 1995. A protein G-related cell surface protein in *Streptococcus zooepidemicus*. *Infection and immunity*, 63(8): 2968-2975. DOI: 10.1128/iai.63.8.2968-2975.1995.
- KARLSTRÖM A, JACOBSSON K, FLOCK M, FLOCK J, GUSS B, 2004. Identification of a novel collagen-like protein, SclC, in *Streptococcus equi* using signal sequence phage display. *Veterinary microbiology*, 104(3-4): 179-188. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.09.014.
- KARLSTRÖM A, JACOBSSON K, GUSS B, 2006. SclC is a member of a novel family of collagen-like proteins in *Streptococcus equi* subspecies *equi* that are recognised by antibodies against SclC. *Veterinary microbiology*, 114(1-2): 72-81. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.10.036.
- KEMP-SYMONDS J, KEMBLE T, WALLER A, 2007. Modified live *Streptococcus equi* ('strangles') vaccination followed by clinically adverse reactions associated with bacterial replication. *Equine*

- veterinary journal, 39(3): 284-286. DOI: 10.2746/042516407x195961.
- KIHLBERG B M, COLLIN M, OLSÉN A, BJÖRCK L, 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity*, 67(4): 1708-1714. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1708-1714.1999.
- KLINE K A, FÄLKER S, DAHLBERG S, NORMARK S, HENRIQUES-NORMARK B, 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 5(6): 580-592. DOI: 10.1016/j.chom.2009.05.011.
- KUO C, TSAO N, HSIEH I, LIN Y, WU J, HUNG Y, 2017. Immunization with a streptococcal multiple-epitope recombinant protein protects mice against invasive group A streptococcal infection. *PLoS one*, 12(3): e174464. DOI: 10.1371/journal.pone.0174464.
- LANNERGÅRD J, FRYKBERG L, GUSS B, 2003. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS microbiology letters*, 222(1): 69-74. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00222-2.
- LEE H, YUN S H, HYON J, LEE S, YI Y, CHOI C, JUN S, PARK E C, KIM S I, 2021. *Streptococcus equi*-derived extracellular vesicles as a vaccine candidate against *Streptococcus equi* infection. *Veterinary microbiology*, 259: 109165. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109165.
- LUKOMSKI S, NAKASHIMA K, ABDI I, CIPRIANO V J, IRELAND R M, REID S D, ADAMS G G, MUSSER J M, 2000. Identification and characterization of the scl gene encoding a group A *Streptococcus* extracellular protein virulence factor with similarity to human collagen. *Infection and immunity*, 68(12): 6542-6553. DOI: 10.1128/IAI.68.12.6542-6553.2000.
- MA X, WANG C, ZHANG B, XIA L, SU Y, 2019. Antibody kinetics and immune profile analysis of a *Streptococcus equi* DNA vaccine expressing the FljB and SeM fusion protein in murine and equine models. *Research in veterinary science*, 125: 82-88. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.05.014.
- MAMO W, FRÖMAN G, SUNDÅS A, WADSTRÖM T, 1987. Binding of fibronectin, fibrinogen and type II collagen to streptococci isolated from bovine mastitis. *Microbial pathogenesis*, 2(6): 417-424. DOI:10.1016/0882-4010(87)90048-9.
- MEEHAN M, NOWLAN P, OWEN P, 1998. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt4): 993-1003. DOI: 10.1099/00221287-144-4-993.
- MYHRE E B, KRONVALL G, 1980. Demonstration of a new type of immunoglobulin G receptor in *Streptococcus zooepidemicus* strains. *Infection and immunity*, 27(3): 808-816. DOI: 10.1128/iai.27.3.808-816.1980.
- NALLY J E, ARTIUSHIN S, SHEORAN A S, BURNS P J, SIMON B, GILLEY R M, GIBSON J, SULLIVAN S, TIMONEY J F, 2000. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by intranasal vaccination using a sucrose acetate isobutyrate based delivery system. *Vaccine*, 19(4-5): 492-497. DOI: 10.1016/s0264-410x(00)00187-0.
- NEWTON J R, VERHEYEN K, TALBOT N C, TIMONEY J F, WOOD J L, LAKHANI K H, CHANTER N, 2000. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified

- using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine veterinary journal*, 32(6): 515-526. DOI: 10.2746/042516400777584721.
- NEWTON R, WALLER A, KING A, 2005. Investigation of suspected adverse reactions following strangles vaccination in horses. *The Veterinary record*, 156(9): 291-292. DOI: 10.1136/vr.156.9.291.
- NILSSON I M, PATTI J M, BREMELL T, HÖÖK M, TARKOWSKI A, 1998. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *The Journal of clinical investigation*, 101(12): 2640-2649. DOI: 10.1172/JCI1823.
- OISHI K, KOLES N L, GUELDE G, POLLACK M, 1992. Antibacterial and protective properties of monoclonal antibodies reactive with *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide: relation to antibody isotype and complement-fixing activity. *The Journal of infectious diseases*, 165(1): 34-45. DOI: 10.1093/infdis/165.1.34.
- PARKINSON N J, ROBIN C, NEWTON J R, SLATER J, WALLER A S, 2011. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010. *The Veterinary record*, 168(25): 666. DOI: 10.1136/vr.d1485.
- PUSTERLA N, KASS P H, MAPES S, JOHNSON C, BARNETT D C, VAALA W, GUTIERREZ C, MCDANIEL R, WHITEHEAD B, MANNING J, 2011. Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. *The Veterinary record*, 169(1): 12. DOI: 10.1136/vr.d2157.
- RASMUSSEN M, BJÖRCK L, 2001. Unique regulation of SclB - a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology*, 40(6): 1427-1438. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02493.x.
- RASMUSSEN M, EDÉN A, BJÖRCK L, 2000. SclA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity*, 68(11): 6370-6377. DOI: 10.1128/IAI.68.11.6370-6377.2000.
- REGLINSKI M, LYNSEY N N, CHOI Y J, EDWARDS R J, SRISKANDAN S, 2016. Development of a multicomponent vaccine for *Streptococcus pyogenes* based on the antigenic targets of IVIG. *The Journal of infection*, 72(4): 450-459. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.002.
- ROBINSON C, FRYKBERG L, FLOCK M, GUSS B, WALLER A S, FLOCK J, 2018. Strangvac: A recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 36(11): 1484-1490. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.01.030.
- ROBINSON C, WALLER A S, FRYKBERG L, FLOCK M, ZACHRISSON O, GUSS B, FLOCK J, 2020. Intramuscular vaccination with Strangvac is safe and induces protection against equine strangles caused by *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 38(31): 4861-4868. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.05.046.
- ROCHA C L, FISCHETTI V A, 1999. Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infection and immunity*, 67(6): 2720-2728. DOI:

- 10.1128/IAI.67.6.2720-2728.1999.
- RODRIGUES M A, FIGUEIREDO L, PADRELA L, CADETE A, TIAGO J, MATOS H A, GOMES DE AZEVEDO E, FLORINDO H F, GONÇALVES L M D, ALMEIDA A J, 2012. Development of a novel mucosal vaccine against strangles by supercritical enhanced atomization spray-drying of *Streptococcus equi* extracts and evaluation in a mouse model. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 82(2): 392-400. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.07.005.
- ROSA M C, CONRAD N L, MORAES C M, LEITE F P L, 2021. Immunogenicity of *Streptococcus equi* subsp. *equi* recombinant SeM protein and bacterin in mice. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 41. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-6910.
- SCHALÉN C, TRUEDSSON L, CHRISTENSEN K K, CHRISTENSEN P, 1985. Blocking of antibody complement-dependent effector functions by streptococcal IgG Fc-receptor and staphylococcal protein A. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 93(6): 395-400. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1985.tb02908.x.
- SHEORAN A S, ARTIUSHIN S, TIMONEY J F, 2002. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. *Vaccine*, 20(11-12): 1653-1659. DOI: 10.1016/s0264-410x(01)00488-1.
- SHEORAN A S, SPONSELLER B T, HOLMES M A, TIMONEY J F, 1997. Sera and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 59(3-4): 239-251. DOI: 10.1016/s0165-2427(97)00074-3.
- SLATER J D, 2003. Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. *Equine Vet J*, 35(2): 118-120. DOI: 10.2746/042516403776114252.
- SWEENEY C R, TIMONEY J F, NEWTON J R, HINES M T, 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *Journal of veterinary internal medicine*, 19(1), 123-134.
- TIMONEY J F, 1993. Strangles. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 9(2): 365-374. DOI: 10.1016/s0749-0739(17)30403-0.
- TIMONEY J F, KUMAR P, 2008. Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine veterinary journal*, 40(7): 637-642. DOI: 10.2746/042516408x322120.
- TIMONEY J F, QIN A, MUTHUPALANI S, ARTIUSHIN S, 2007. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 25(30): 5583-5590. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.02.040.
- TIMONEY J F, YANG J, LIU J, MERANT C, 2008. IdeE reduces the bactericidal activity of equine neutrophils for *Streptococcus equi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 122(1-2): 76-82. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.10.017.
- TSCHESCHLOK L, VENNER M, STEWARD K, BÖSE R, RIIHIMÄKI M, PRINGLE J, 2018.

- Decreased Clinical Severity of Strangles in Weanlings Associated with Restricted Seroconversion to Optimized *Streptococcus equi* ssp *equi* Assays. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1): 459-464. DOI: 10.1111/jvim.15037.
- VON PAWEL-RAMMINGEN U, BJÖRCK L, 2003. IdeS and SpeB: immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Streptococcus pyogenes*. *Current opinion in microbiology*, 6(1): 50-55. DOI: 10.1016/s1369-5274(03)00003-1.
- WALKER J A, TIMONEY J F, 2002. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. *Veterinary microbiology*, 89(4): 311-321. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00205-5.
- WALLER A S, 2014. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 30(3): 591-607. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.08.007.
- WALLER A, 2018. *Streptococcus equi*: breaking its strangles-hold. *The Veterinary record*, 182(11): 316-318. DOI: 10.1136/vr.k1231.
- WALLER A, FLOCK M, SMITH K, ROBINSON C, MITCHELL Z, KARLSTRÖM A, LANNERGÅRD J, BERGMAN R, GUSS B, FLOCK J, 2007. Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 25(18): 3629-3635. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.060.
- WEBB K, JOLLEY K A, MITCHELL Z, ROBINSON C, NEWTON J R, MAIDEN M C J, WALLER A, 2008. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology (Reading, England)*, 154(Pt 10): 3016-3024. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018911-0.
- WHATMORE A M, 2001. *Streptococcus pyogenes* sclB encodes a putative hypervariable surface protein with a collagen-like repetitive structure. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 2): 419-429. DOI: 10.1099/00221287-147-2-419.
- WIDEBÄCK K, HAVLÍČEK J, KRONVALL G, 1983. Demonstration of a receptor for mouse and human serum albumin in *Streptococcus pyogenes*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*, 91(6):373-382. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1983.tb00063.x.
- WOOD P R, SEOW H F, 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Veterinary immunology and immunopathology*, 54(1-4): 33-44. DOI: 10.1016/s0165-2427(96)05711-x.
- ZHANG Y, ZHANG Y, GU W, HE L, SUN B, 2014. Th1/Th2 cell's function in immune system. *Advances in experimental medicine and biology*, 841: 45-65. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9\_3.
- ZHAO Y, WANG H, SU L, WANG H, ZHANG B, SU Y, 2021. Optimized GAPDH-truncated immunogen of *Streptococcus equi* elicits an enhanced immune response and provides effective protection in a mouse model. *Veterinary microbiology*, 254: 108953. DOI: 10.1016/j.vetmicA.2020.108953.