

# 禽致病性大肠杆菌菌影负载鸭源鸡杆菌 *flfA* 基因核酸疫苗的研制及免疫效果评价

马立静<sup>1,3</sup>, 彭泽宇<sup>1</sup>, 翟金丽<sup>1</sup>, 于静玥<sup>1</sup>, 王增<sup>1,2</sup>, 隗梦蝶<sup>1</sup>, 王新卫<sup>1</sup>, 陈陆<sup>1</sup>, 杨霞<sup>1,2\*</sup>

1 河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州

2 动物病原与生物安全教育部重点实验室, 河南 郑州

3 商丘美兰生物工程有限公司, 河南 商丘

马立静, 彭泽宇, 翟金丽, 于静玥, 王增, 隗梦蝶, 王新卫, 陈陆, 杨霞. 禽致病性大肠杆菌菌影负载鸭源鸡杆菌 *flfA* 基因核酸疫苗的研制及免疫效果评价[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1181-1196.

MA Lijing, PENG Zeyu, ZHAI Jinli, YU Jingyue, WANG Zeng, WEI Mengdie, WANG Xinwei, CHEN Lu, YANG Xia. Development and immune efficacy evaluation of a *Gallibacterium anatis flfA* DNA vaccine with avian pathogenic *Escherichia coli* ghost as the vector [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1181-1196.

**摘要:** 【目的】研制禽致病性大肠杆菌菌影负载鸭源鸡杆菌 *flfA* 基因的核酸疫苗, 并评估其在鸡体内的免疫保护效果。【方法】以鸭源鸡杆菌的菌毛基因 *flfA* 为目的基因, 采用携带鸡  $\beta$  肌动蛋白启动子的 pCAGGS-HA 质粒作为表达载体, 构建 pCAGGS-*flfA* 真核表达质粒; 构建温控质粒 PBV-E-SN, 并将其转化至对氨苄青霉素敏感的禽致病性大肠杆菌分离株制备菌影; 将 pCAGGS-*flfA* 质粒装载入菌影制备菌影疫苗, 设计菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒组、pCAGGS-*flfA* 质粒组、空菌影组、PBS 组及正常对照组。对 7 日龄雏鸡进行首次免疫, 首免 2 周后二次加强免疫, 首免 4 周后对鸡进行鸭源鸡杆菌攻毒试验, 检测疫苗的免疫保护效果。【结果】所构建的真核表达质粒 pCAGGS-*flfA* 能在体外细胞中成功表达; 构建的禽致病性大肠杆菌菌影菌株在 42 °C 热诱导 210 min 后, 裂解率达到 99.94%; 免疫保护试验结果显示, 无论是通过 ELISA 检测的特异性 IgG 抗体水平, 还是对鸡泄殖腔拭子和咽拭子的排菌情况以及组织脏器中细菌载量的测定, 菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒组的免疫保护效果均显著高于其他免疫组, 包括单独免疫 pCAGGS-*flfA* 质粒组。与单独免疫 pCAGGS-*flfA* 质粒组相比, 菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒组的免疫保护效果更为优越。【结论】本研究表明菌影作为 pCAGGS-*flfA* 的负载载体显著增强了该核酸疫苗的免疫保护效果。

**关键词:** 禽致病性大肠杆菌菌影; *flfA* 基因; 核酸疫苗; 免疫效果

资助项目: 河南省高等学校重点科研项目(22A230004)

This work was supported by the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (22A230004).

\*Corresponding author. E-mail: yangxia66@163.com

Received: 2024-09-27; Accepted: 2024-12-27; Published online: 2025-02-11

## Development and immune efficacy evaluation of a *Gallibacterium anatis flfA* DNA vaccine with avian pathogenic *Escherichia coli* ghost as the vector

MA Lijing<sup>1,3</sup>, PENG Zeyu<sup>1</sup>, ZHAI Jinli<sup>1</sup>, YU Jingyue<sup>1</sup>, WANG Zeng<sup>1,2</sup>, WEI Mengdie<sup>1</sup>, WANG Xinwei<sup>1</sup>, CHEN Lu<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>1,2\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, China

2 Ministry of Education Key Laboratory for Animal Pathogens and Biosafety, Zhengzhou, Henan, China

3 Shangqiu Meilan Biotechnology Co., Ltd., Shangqiu, Henan, China

**Abstract:** [Objective] To develop a DNA vaccine by loading avian pathogenic *Escherichia coli* ghosts with the fimbrium gene *flfA* of *Gallibacterium anatis* and evaluate the immune effect of this vaccine in chickens. [Methods] Taking *flfA* of *G. anatis* as the target gene, we constructed the eukaryotic expression plasmid pCAGGS-*flfA* from the plasmid pCAGGS-HA carrying the chicken  $\beta$ -actin promoter, which enhanced the efficacy of vaccine. The temperature-sensitive plasmid PBV-E-SN was then constructed and transformed into the ampicillin-sensitive avian pathogenic *E. coli* isolate to prepare a bacterial ghost. Finally, pCAGGS-*flfA* was loaded into the bacterial ghost to prepare a bacterial ghost vaccine. Seven-day-old chickens were assigned into five groups: bacterial ghost loading pCAGGS-*flfA*, pCAGGS-*flfA*, empty bacterial ghost, PBS, and normal control. The primary vaccination was carried out for 7-day-old chickens, and the booster immunization was performed two weeks after the primary immunization. The chickens were challenged with *G. anatis* four weeks after the primary immunization, and the immune effect of the vaccine was evaluated. [Results] The eukaryotic expression plasmid pCAGGS-*flfA* was successfully expressed in cells *in vitro*. The lysis rate of the constructed avian pathogenic *E. coli* ghosts heated at 42 °C for 210 min reached 99.94%. The specific IgG antibody titer measured by ELISA, the number of shedding bacteria in chicken cloacal swabs and throat swabs, and the bacterial loads in tissue and organs of challenged chickens showed that the immune effects in the bacterial ghost loading pCAGGS-*flfA* group and the pCAGGS-*flfA* group were much higher than those in other groups. Moreover, the bacterial ghost loading pCAGGS-*flfA* showed stronger immune effect than pCAGGS-*flfA*. [Conclusion] Bacterial ghosts as the carriers of pCAGGS-*flfA* significantly enhanced the immune effect of the DNA vaccine.

**Keywords:** avian pathogenic *Escherichia coli* ghost; *flfA*; DNA vaccine; immune effect

鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*)属于巴氏杆菌科鸡杆菌属,是定殖于禽类上呼吸道和下生殖道的一种常在菌,最近研究表明其也是肠道正常菌群的组成部分之一<sup>[1-3]</sup>。作为条件性致病菌,该菌感染蛋鸡后可导致输卵管囊肿、输

卵管炎、败血症、卵巢炎和腹膜炎等疾病,进而引发产蛋量下降和死亡率上升,特别是在鸡处于免疫抑制或应激条件下,更易引发呼吸道、生殖道和全身性疾病,加剧其他病原体的感染,对家禽养殖业的经济效益造成严重危害<sup>[1,4-5]</sup>。早

在 2011 年, 王珊等<sup>[6]</sup>对河南、山东和山西等省份进行流行病学调查, 发现这些地区部分鸡群的阳性率分别为 23.12%、25.27% 和 52.94%。2023 年, 张家浩<sup>[7]</sup>对新疆部分地区蛋鸡群的鸭源鸡杆菌感染情况进行了调查, 发现阿克苏、喀什及和田地区的检出率分别为 22.00%、13.79% 及 9.59%。此外, 贵州、辽宁、四川、湖北等地也有鸭源鸡杆菌感染的报道<sup>[8-11]</sup>。目前, 国内外分离的鸭源鸡杆菌菌株普遍存在多重耐药性问题<sup>[1,12]</sup>, 且尚无商品化的鸭源鸡杆菌疫苗, 给该病的预防与控制带来了很大困难。Kudirkiene 等<sup>[13]</sup>针对鸭源鸡杆菌的菌毛蛋白 F1fA 开展了免疫相关研究, 证明重组蛋白 F1fA 不仅能诱导机体产生较高且持久的抗体水平, 还能提高对鸭源鸡杆菌感染后的损伤保护作用, 从而证实了菌毛蛋白 F1fA 是鸭源鸡杆菌的重要保护性抗原。

细菌菌影(bacterial ghosts, BG)是通过基因工程、物理或化学方法在细菌包膜上形成跨膜孔道, 导致细胞质内容物(包括 DNA)通过穿孔膜流失后而形成的细菌空壳, 其保留了与活菌表面相似的抗原成分和结构, 不仅本身具有良好的免疫效果和低廉的成本, 可以作为有效的候选疫苗和佐剂<sup>[14-16]</sup>, 而且菌影空壳内可装载外源物质, 易被免疫细胞识别并捕获, 因此可作为蛋白质、核酸、药物和可溶性化合物等物质的递送系统用<sup>[17-18]</sup>。

疫苗是预防和控制家禽传染病最重要的手段之一。鉴于鸭源鸡杆菌对养鸡业, 尤其是对蛋鸡的危害, 以及其易与大肠杆菌、鸡传染性支气管炎病毒等病原体混合感染的特点, 研制用于预防和控制该菌感染的疫苗显得尤为必要。因此, 本研究以鸭源鸡杆菌菌毛基因 *flfA* 为目的基因, 选用携带鸡的  $\beta$  肌动蛋白启动子的 pCAGGS-HA 质粒作为表达载体, 构建

pCAGGS-*flfA* 真核表达质粒。随后构建温控载体, 并将其转化至致病性大肠杆菌分离株以制备菌影, 最后将 pCAGGS-*flfA* 装载入菌影, 探究其对鸡的免疫保护效果, 旨在为预防鸭源鸡杆菌感染奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

鸭源鸡杆菌 PDS-RZ-1-SLG 分离株、对氨基青霉素敏感的禽致病性大肠杆菌 10 号分离株均由本实验室分离并保存。pCAGGS-HA 质粒为本实验室保存, pBV220 质粒由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收及纯化试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 脂质体 3000 转染试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 血琼脂平板购自郑州人福博赛生物技术有限责任公司; brain heart infusion (BHI)培养基购自 BD 公司; 胎牛血清购自河南润研生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗鸡 IgG 二抗及山羊抗兔 IgG 二抗均购自 Proteintech 公司; 抗鸭源鸡杆菌多克隆抗体、pET32a-F1fA 纯化蛋白均由河南农业大学传染病教研室制备并保存。

### 1.3 试验动物

50 只 1 日龄雏鸡购自郑州正德农牧科技有限公司, 经泄殖腔和咽拭子检测无 *G. anatis*。

本研究获得了河南农业大学动物伦理委员会批准, 批准号为 HNND2025011701。

### 1.4 重组质粒的构建与鉴定

根据 GenBank 中 *G. anatis* 12656-12 的 *flfA*

基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计一对特异性引物 *flfA*-F (5'-CCGGAATTCATGAAAAAATTGCTTTTAA-3') 和 *flfA*-R (5'-CGGGGTACCCGGTTATTCGTATGCGATAGT-3') 用于扩增 *G. anatis flfA* 目的基因, 在引物的 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切位点, 目标基因扩增长度为 597 bp。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq DNA Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, *G. anatis* 基因组 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收目的基因与 pMD18T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取阳性克隆进一步提取 pMD18T-*flfA* 质粒, 经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切、胶回收 *flfA* 基因片段, 同步对 pCAGGS-HA 载体进行酶切与胶回收, 随后将 *flfA* 目的基因经 T4 DNA 连接酶连接至 pCAGGS-HA 载体, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 均匀涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板上, 置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养过夜。挑选单克隆菌进一步进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定。

### 1.5 重组质粒的体外表达

将生长良好的 HD11 细胞以每孔  $2 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞长至约 90% 时, 弃去培养基, 并用 PBS 洗涤 3 次, 按照脂质体 3000 转染试剂盒的说明书将 2  $\mu$ g pCAGGS-*flfA* 重组质粒与 2  $\mu$ g 转染试剂分别转染至 6 孔细胞培养板中的细胞中, 在 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 6 h 后, 弃去培养基, 更换为含有 2% 血清和 1% 双抗的 1640 培养基继续培养 48 h。弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 并用细胞裂解液在冰上裂解 30 min。用细胞刮将细胞刮下, 以 8 000 r/min 离心 5 min 后, 吸出上清液后进行 SDS-PAGE, 取适量样品进行蛋白

电泳转膜。用 5% 脱脂奶稀释的鸭源鸡杆菌多克隆抗体 (1:1 000 稀释), 在 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 经 3 次洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔多克隆抗体 (1:10 000 稀释), 在室温下 120 r/min 孵育 1 h, 加入 ECL 显色液进行显影。

## 1.6 禽致病性大肠杆菌菌影的制备与鉴定

### 1.6.1 重组质粒 pBV-E-SN 的构建

参照文献[19]的方法, 根据 GenBank 上噬菌体 PhiX174 裂解基因 E 编码的基因序列和金黄色葡萄球菌核酸酶 A (SN) 编码的基因序列, 设计将 E 基因和 SN 基因通过 3 个重复的 (Gly-4-Ser) 序列 (共 15 个氨基酸) 作为 Linker 连接起来, 合成 E-SN 串联基因并克隆至 pBV220 载体上构建重组质粒 pBV-E-SN, E-SN 串联基因的合成及其与 pBV220 载体的连接由苏州金维智生物科技有限公司完成。

### 1.6.2 重组菌 DH5 $\alpha$ 溶菌动力学试验

为了验证 pBV-E-SN 是否能在菌体内正常表达其溶菌功能, 选取已合成、连接并转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的重组菌进行试验, 挑取转化的单菌落接种于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中。参照文献[13]的方法, 诱导菌影的形成并绘制溶菌动力曲线。同时, 在升温诱导前、后分别收集 100  $\mu$ L 菌液进行倍比稀释后, 取 100  $\mu$ L 均匀涂布于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上进行细菌计数 (colony-forming unit, CFU), 根据对诱导前后的菌落计数结果, 计算裂解率, 如公式(1)所示。

$$\text{裂解率} = (1 - \text{诱导后 CFU} / \text{诱导前 CFU}) \times 100\% \quad (1)$$

### 1.6.3 禽致病性大肠杆菌菌影的制备及转化

参照文献[19]的方法, 将禽致病性大肠杆菌分离株在 37  $^{\circ}$ C 振荡培养至  $OD_{600}$  值约为 0.4, 制备电转化感受态细胞。取 10  $\mu$ L 经去盐离子处理的重组质粒 pBV-E-SN, 加入到制备的电转化禽

致病性大肠杆菌感受态细胞中, 冰浴 10 min, 将重组质粒和电转化感受态细胞的混合物倒入预先冷却的电转杯中进行电转化, 电转化参数设置为电阻 200  $\Omega$ , 电容 25  $\mu\text{F}$ , 电压设置不同值以摸索最适电压。电转结束后, 按照文献[19]的方法处理转化物, 并将其涂布在含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 平板上, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 至菌落出现, 挑取转化子进行菌液 PCR 鉴定。

#### 1.6.4 禽致病性大肠杆菌菌影的溶菌动力学及裂解率测定

将经划线接种鉴定为阳性的禽致病性大肠杆菌重组菌, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜后, 按照 1.6.2 所述方法测定其菌影的溶菌动力学, 并根据结果计算裂解率。

#### 1.6.5 禽致病性大肠杆菌菌影扫描电镜观察

将 1.6.3 中制备的禽致病性大肠杆菌菌影 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min 后, 用浓度为 2.5% 的戊二醛溶液在常温固定 2 h, 经过一系列处理后使用扫描电子显微镜观察菌影的形态。

### 1.7 菌影疫苗的制备与检验

#### 1.7.1 冻干菌影的无菌检测

将禽致病性大肠杆菌菌影进行真空冷冻干燥处理, 取 5 mg 菌影冻干粉重悬于 0.01 mol/mL 的无菌 PBS 中, 并调整浓度至  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL。将此溶液涂布于含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h。若培养板上无菌落生长, 则表明菌影已完全失活, 重复 3 次。

#### 1.7.2 禽致病性大肠杆菌菌影装载 pCAGGS-*flfA* 质粒及无菌检验

将菌影冻干粉重悬于含有 pCAGGS-*flfA* 质粒(浓度 1 mg/mL)的 100  $\mu\text{L}$  缓冲液中, 加入  $\text{CaCl}_2$  使终浓度达到 50 mmol/L, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡孵育 30 min。菌影重悬液振荡孵育后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 5 min, 分别收集

沉淀和上清, 沉淀用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 用 PBS 缓冲液重悬沉淀, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 同时测定上清中质粒 DNA 的浓度, 计算装载率, 如公式(2)所示。

$$\text{装载率} = (1 - \frac{\text{上清中DNA浓度}}{\text{装载前质粒浓度}}) \times 100\% \quad (2)$$

同时取 200  $\mu\text{L}$  制备的菌影装载核酸疫苗, 涂布于含有 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养板上, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 48 h, 以检测是否有细菌生长。

### 1.8 菌影疫苗对鸡的免疫保护效果

#### 1.8.1 动物分组、免疫及攻毒程序

将 50 只 1 日龄雏鸡适应性饲养至 1 周龄后, 随机分为 5 组, 具体分组情况如下: I-IV 组均为 10 只鸡/组, 分别免疫 pCAGGS-*flfA* 质粒、BG 负载 pCAGGS-*flfA* 质粒、BG 对照组、PBS 作为未免疫攻毒组; V 组(control 组)为正常饲养组, 通过肌肉注射进行免疫, 具体免疫程序与剂量见表 1。首免后 2 周进行 2 次加强免疫, 首免 4 周后对鸡攻毒, 攻毒参照文献[14]的模型并稍作改动, 通过肌肉注射途径将鸭源鸡杆菌 PDS-RZ-1-SLG 株以  $1 \times 10^9$  CFU/只感染试验鸡, 观察鸡在 7 d 内的发病情况, 并通过排菌及脏器载菌率评价保护效果。

#### 1.8.2 排菌检测

首免 4 周后攻毒, 随后每 24 h 采集各组鸡的咽拭子和泄殖腔拭子, 每份拭子加入 500  $\mu\text{L}$  含有 30% 甘油的无菌 PBS 中, 充分涡旋振荡后冻存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ , 后期使用 PCR 检测病毒排菌情况, PCR 所用引物同 1.4 的 *flfA* 引物。

#### 1.8.3 ELISA 检测抗体水平

首次免疫前与免疫后每周翅下静脉采血, 分离血清以测定抗 *G. anatis* 血清抗体水平, 具体操作如下: 使用纯化的 pET32a-FlfA 蛋白作为包被抗原(100 ng/孔), 在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h 后, 转

表1 动物免疫和攻毒分组方案

Table 1 Experimental scheme for animal immunization and challenge

| 组别<br>Group | 免疫物<br>Immune substance  | 鸡只数量<br>Number of chickens | 免疫剂量<br>Immunization dose         | 免疫途径<br>Route of vaccination    | 攻毒毒株<br>Challenge strain | 攻毒剂量<br>Challenge dose (CFU) | 攻毒途径<br>Route of challenge      |
|-------------|--|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| I           | pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid                  | 10                         | 100 μg                            | 肌内注射<br>Intramuscular injection | <i>G. anatis</i>         | 1×10 <sup>9</sup>            | 肌内注射<br>Intramuscular injection |
| II          | BG 装载 pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>BG loading pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid | 10                         | 1×10 <sup>8</sup> CFU<br>(100 μg) | 肌内注射<br>Intramuscular injection | <i>G. anatis</i>         | 1×10 <sup>9</sup>            | 肌内注射<br>Intramuscular injection |
| III         | 空菌影<br>Empty bacterial ghosts  | 10                         | 1×10 <sup>8</sup> CFU             | 肌内注射<br>Intramuscular injection | <i>G. anatis</i>         | 1×10 <sup>9</sup>            | 肌内注射<br>Intramuscular injection |
| IV          | PBS  | 10                         | 100 μL                            | 肌内注射<br>Intramuscular injection | <i>G. anatis</i>         | 1×10 <sup>9</sup>            | 肌内注射<br>Intramuscular injection |
| V           | PBS  | 10                         | 100 μL                            | 肌内注射<br>Intramuscular injection |                          | /                            |                                 |

/表示V组不做攻毒处理。

/ indicates that group V will not undergo poison attack treatment.

至 4 °C 过夜。使用 PBST 洗涤 3 次后，用 5% 脱脂牛奶(200 μL/孔)在 37 °C 下封闭 1 h。再次用 PBST 洗涤 3 次后，加入 100 μL 待测血清(1:800 稀释)于反应孔中，每个样本设置 3 个重复孔，在 37 °C 孵育 1 h；PBST 洗涤 3 次后每孔加入 100 μL HRP 标记的兔抗鸡 IgG 二抗(1:8 000 稀释)，37 °C 孵育 1 h；再次用 PBST 洗涤 3 次后在各反应孔中加入 100 μL TMB 单组分显色液，37 °C 显色 15 min；最后在各孔中加入终止液以终止反应，并在酶标仪上测定 OD<sub>450</sub> 处的吸光度值。

#### 1.8.4 组织脏器中细菌载量检测

攻毒后 7 d，对所有存活鸡进行安乐死，并进行剖检，观察并记录临床剖检病变。采集各组鸡的上颚裂、气管、肺脏、脾脏和肝脏。使用荧光定量 PCR 方法测定各组织中的细菌载量。

鸭源鸡杆菌 *flfA* 基因的荧光定量 PCR 方法建立如下：首先根据 *G. anatis flfA* 基因设计荧光扩增引物 *flfA*-q-F (5'-ACCTTATGCGGAACAAACTAAAG-3') 和 *flfA*-q-R (5'-CCTGCCGGATTAGT TGCATA-3')，扩增片段大小 109 bp。PCR 反应体系：2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μL，上、下游引物 *flfA*-q-F 和 *flfA*-q-R (10 μmol/L) 各 0.5 μL，模板 DNA 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR 反应程序：95 °C 3 min；95 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳后，切胶回收克隆至 pMD18T 载体构建 pMD18T-*flfA*q 重组质粒，测定质粒浓度为 66 ng/μL，根据公式(3)计算重组质粒的拷贝数。

$$\text{拷贝数(number of copies)} = (\text{质粒浓度 ng/}\mu\text{L} \times 6.02 \times 10^{23}) / (\text{DNA length} \times 10^9 \times 660 \text{ Da/bp}) \quad (3)$$

换算得到标准品质粒拷贝数为  $2.7 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

将 pMD18T-*flfA*q 质粒标准品进行 10 倍倍比稀释, 得到浓度  $1.0 \times 10^4$ – $1.0 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  的系列溶液, 以最佳反应条件建立检测鸭源鸡杆菌 *flfA* 基因拷贝数的荧光定量 PCR 标准曲线, 扩增引物为 *flfA*-q-F (5'-ACCTTATGCGGAACAACTAAAG-3') 和 *flfA*-q-R (5'-CCTGCCGGATTAGTTGCATA-3')。PCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ):  $2 \times \text{Taq DNA Master Mix}$  10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 稀释 pMD18T-*flfA*q 模板 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^\circ\text{C}$  1 min; 95  $^\circ\text{C}$  10 s, 53  $^\circ\text{C}$  15 s, 72  $^\circ\text{C}$  10 s, 共 40 个循环; 95  $^\circ\text{C}$  15 s, 60  $^\circ\text{C}$  30 s, 95  $^\circ\text{C}$  15 s。采集荧光信号得到扩增产物的熔解曲线, 以质粒拷贝数的对数为横坐标、相应的循环阈值 ( $C_q$ ) 为纵坐标, 建立标准曲线。以稀释后的标准质粒为模板和优化过后的反应条件进行荧光定量 PCR 扩增, 每个稀释度重复 3 次, 并绘制荧光定量标准曲线。

为了测定各组织器官中的鸭源鸡杆菌载量, 称量 0.1 g 组织并使用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 使用实时荧光定量 PCR 方法测定各个器官中的细菌拷贝数。

## 1.9 数据统计分析

使用统计软件 GraphPad Prism 9 进行数据分析和绘图, 数据以 mean $\pm$ SD 表示, 并采用 *t* 检验分析和单因素方差分析进行数据分析,  $P < 0.05$  表示有统计学意义(差异显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pCAGGS-*flfA* 的成功构建

如图 1A 所示, 通过 PCR 扩增获得了长度为 597 bp 的 *G. anatis flfA* 基因片段。将其克隆

至 pMD18T 载体中, 经 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定, PCR 扩增片段的大小约为 597 bp (图 1B), 与预期相符。如图 1C 所示, 重组质粒 pMD18T-*flfA* 被切成大小约为 2 692 bp 和 597 bp 的 2 个片段, 这也与预期结果一致, 表明 pMD18T-*flfA* 质粒克隆成功。进一步地, 将鉴定正确的 pMD18T-*flfA* 与 pCAGGS-HA 载体分别进行 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切, 回收目的片段克隆至载体质粒上构建 pCAGGS-*flfA*, 该质粒经 PCR 以及双酶切鉴定, 结果如图 1D 所示, PCR 片段大小与上述一致。如图 1E 所示, 经过双酶切处理重组质粒 pCAGGS-*flfA* 被切成 4 807 bp 和 597 bp 左右 2 个大小片段, 进一步进行序列测定后, 证实 pCAGGS-*flfA* 构建成功。

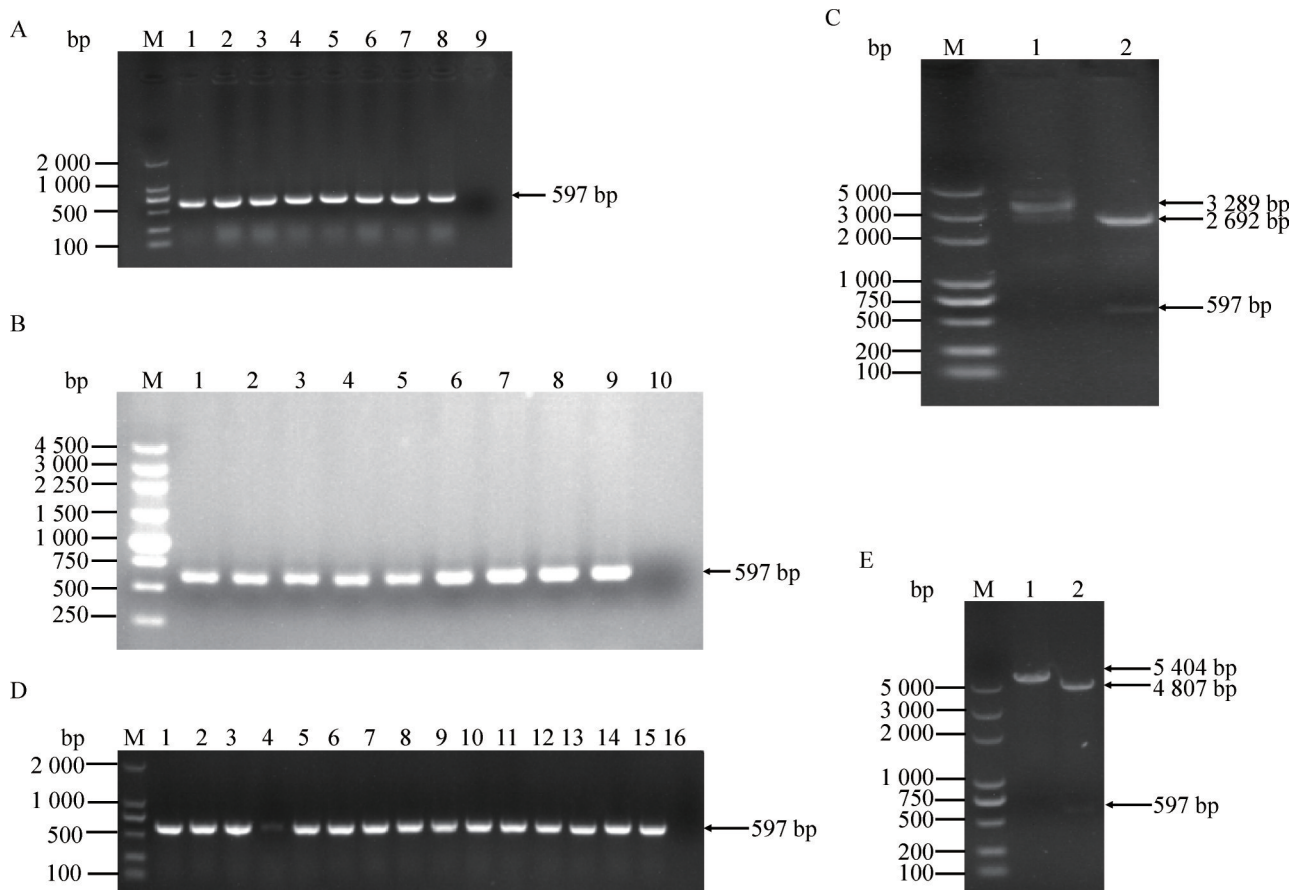
### 2.2 pCAGGS-*flfA* 的体外表达

为验证重组质粒 pCAGGS-*flfA* 能否正确表达鸭源鸡杆菌 FlfA 蛋白, 将质粒 pCAGGS-*flfA* 转染至 HD11 细胞后进行裂解, 收取裂解后上清, 用兔抗鸭源鸡杆菌多克隆抗体作为一抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗进行 Western blotting 检测。如图 2 所示, 可以检测到与鸭源鸡杆菌 FlfA 蛋白分子量相符的约 22 kDa 的蛋白条带, 表明重组质粒 pCAGGS-*flfA* 能够正确表达鸭源鸡杆菌 FlfA 蛋白。

### 2.3 禽致病性大肠杆菌菌影的成功制备

#### 2.3.1 重组质粒 pBV-E-SN 的构建

将 E 基因和 SNA 基因通过 15 个氨基酸 (Gly-4-Ser) 的 Linker 连接起来, 合成 E-SN 基因并将其连接至 pBV220 载体上, 同时将构建好的质粒转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选出重组质粒 pBV-E-SN, 进一步经 PCR 鉴定(图 3)、*EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定(图 4), 获得分别为 3 665 bp 和 770 bp 左右 2 个片段, 与预期片段大小一致, 同时经序列测定证明 pBV-E-SN 构建成功。



**图1** 重组质粒pCAGGS-*flfA*的构建与鉴定。A: *flfA*基因的扩增(泳道M: DL2000 DNA Marker; 泳道1-8: 目的基因*flfA*; 泳道9: 阴性对照); B: pMD18T-*flfA*的PCR鉴定(泳道M: DL4500 DNA Marker; 泳道1-9: *G. anatis flfA*基因PCR产物; 泳道10: 阴性对照); C: pCAGGS-*flfA*的PCR鉴定(泳道M: DL5000 DNA Marker; 泳道1: 未酶切pMD18T-*flfA*; 泳道2: 双酶切pMD18T-*flfA*); D: pMD18T-*flfA*的酶切鉴定(泳道M: DL2000 DNA Marker; 泳道1-15: *G. anatis flfA*基因PCR产物; 泳道16: 阴性对照); E: pCAGGS-*flfA*的酶切鉴定(泳道M: DL5000 DNA Marker; 泳道1: 未酶切pCAGGS-*flfA*; 泳道2: 双酶切pCAGGS-*flfA*)。

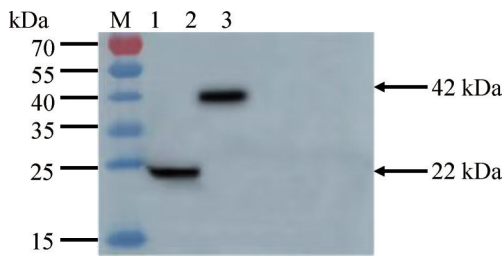
Figure 1 Construction and identification of recombinant plasmid pCAGGS-*flfA*. A: Amplification of *flfA* gene (Lane M: DL2000 DNA Marker; Lanes 1-8: Target gene *flfA*; Lane 9: Negative control); B: PCR identification of pMD18T-*flfA* (Lane M: DL4500 DNA Marker; Lanes 1-9: PCR products of *G. anatis flfA* gene; Lane 10: Negative control); C: PCR identification of pCAGGS-*flfA* (Lane M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: PMD18T-*flfA* without enzymatic digestion; Lane 2: Double enzyme digestion of pMD18T-*flfA*); D: Enzyme digestion identification of pMD18T-*flfA* (Lane M: DL2000 DNA Marker; Lanes 1-15: PCR products of *G. anatis flfA* gene; Lane 16: Negative control); E: Enzyme digestion identification of pCAGGS-*flfA* (Lane M: DL5000 DNA Marker; Lane 1: pCAGGS-*flfA* not digested; Lane 2: Double enzyme digestion of pCAGGS-*flfA*).

### 2.3.2 重组菌 DH5 $\alpha$ 溶菌动力学检测结果

经验证, pBV-E-SN 能在 DH5 $\alpha$  中正常表达其溶菌功能。将重组菌在 28  $^{\circ}$ C 下培养至  $OD_{600}$

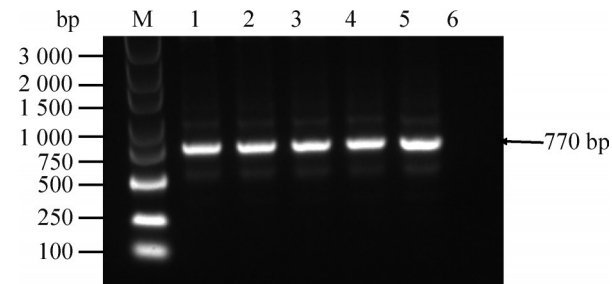
为 0.4 后, 迅速升温至 42  $^{\circ}$ C 以诱导细菌裂解。

在诱导后的 30 min 内,  $OD_{600}$  吸光度值短暂上升, 随后开始下降, 直至诱导 210 min 之后,



**图2 Western blotting鉴定pCAGGS-*fffA*体外表达。**泳道M: 预染蛋白质分子量标准15–150 kDa Marker; 泳道1: pCAGGS-*fffA*体外表达; 泳道2:  $\beta$ -actin内参; 泳道3: pCAGGS载体体外表达。

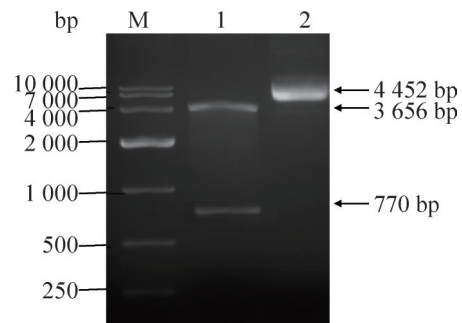
Figure 2 Western blotting analysis of pCAGGS-*fffA* expression *in vitro*. Lane M: Pre-stained protein molecular weight standards 15–150 kDa Marker; Lane 1: Expression of pCAGGS-*fffA* *in vitro*; Lane 2:  $\beta$ -actin internal reference; Lane 3: Expression of pCAGGS *in vitro*.



**图3 pBV-E-SN的PCR鉴定。**泳道M: DL4500 DNA Marker; 泳道1–5: E-SN的PCR产物; 泳道6: 阴性对照。

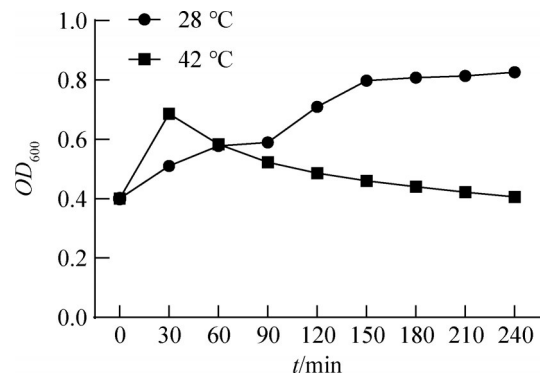
Figure 3 PCR identification of pBV-E-SN. Lane M: DL4500 DNA Marker; Lanes 1–5: PCR products of CDS of E-SN gene; Lane 6: Negative control.

$OD_{600}$  吸光度值基本保持稳定。相比之下, 未诱导的对照组在 28 °C 培养过程中,  $OD_{600}$  吸光度值持续上升(图 5)。通过活菌菌落计数测定裂解率, 结果显示诱导前细菌菌液的活菌数为  $4.1 \times 10^8$  CFU/mL, 诱导后细菌菌液的活菌数为  $2.0 \times 10^5$  CFU/mL, 重组 DH5 $\alpha$  经升温诱导后有 99.95% 的细菌成功裂解。



**图4 pBV-E-SN的酶切鉴定。**泳道M: DL10000 DNA Marker; 泳道1: *Sal*I和*Eco*R I双酶切pBV-E-SN质粒; 泳道2: pBV-E-SN质粒对照。

Figure 4 Enzyme digestion identification of pBV-E-SN. Lane M: DL10000 DNA Marker; Lane 1: The pBV-E-SN plasmid was digested by *Sal*I and *Eco*R I; Lane 2: pBV-E-SN plasmid.



**图5 含有pBV-E-SN的DH5 $\alpha$ 的裂解动力学曲线**  
Figure 5 Lysis dynamics curves of DH5 $\alpha$  containing pBV-E-SN.

### 2.3.3 禽致病性大肠杆菌菌影的制备及溶菌动力学测定结果

在电阻 200  $\Omega$ 、电容 25  $\mu$ F、电压 1.8 kV 的电转参数下, 将 pBV-E-SN 电转入禽致病性大肠杆菌感受态细胞中, 挑取并鉴定阳性单克隆, 进一步进行溶菌动力学测定。结果显示, 将重组禽致病性大肠杆菌在 28 °C 下培养至  $OD_{600}$  为 0.4 后, 迅速升温至 42 °C 诱导细菌裂解。在诱导 30 min 内,  $OD_{600}$  吸光度值短暂上升, 随后开始下降, 直至诱导后 180 min,  $OD_{600}$  吸光度

值达到最低,而未诱导对照组在培养过程中 $OD_{600}$ 吸光度值持续上升(图6)。通过活菌菌落计数测定裂解率,结果显示诱导前细菌菌液的活菌数为 $3.4 \times 10^8$  CFU/mL,诱导后细菌菌液的活菌数为 $2.0 \times 10^5$  CFU/mL,裂解率为99.94%。

### 2.3.4 禽致病性大肠杆菌的菌影扫描电镜观察

在 $42^\circ\text{C}$ 诱导培养后,通过扫描电镜观察制备的菌影,可见细菌中央形成了跨膜孔道结构,细菌表面呈现皱缩状态,但整体形态未发生明显改变,仍保持着完整的杆状结构(图7B)。

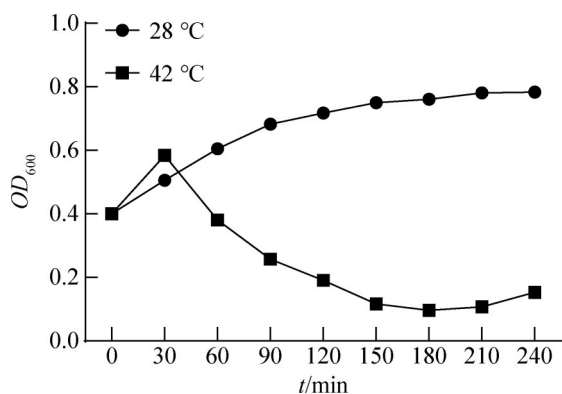


图6 含有pBV-E-SN的禽致病性大肠杆菌的裂解动力学曲线

Figure 6 Lysis dynamics curves of avian pathogenic *Escherichia coli* containing pBV-E-SN.

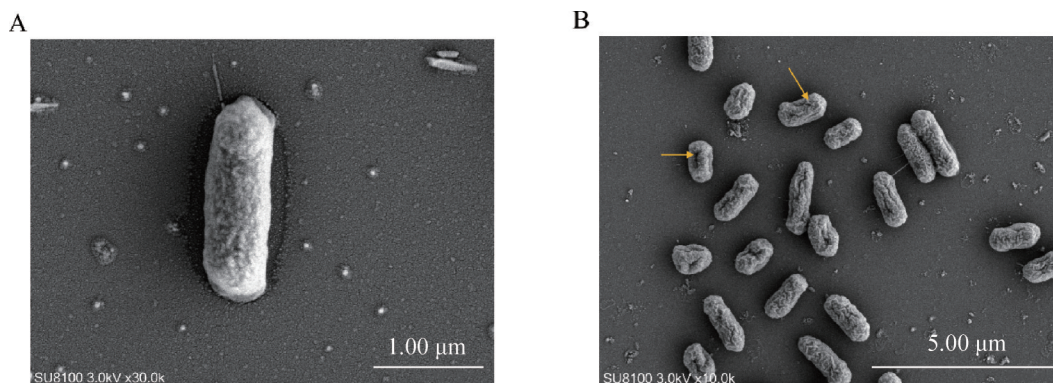


图7 禽致病性大肠杆菌的菌影扫描电镜图。A: 溶菌前正常的大肠杆菌细胞; B: 大肠杆菌菌影,黄色箭头指向中间形成的跨膜通道。

Figure 7 Scanning electron micrograph of avian pathogenic *Escherichia coli* ghosts. A: Normal *E. coli* cells before lysis mediated by controlled expression of gene E+SN; B: Ghost cells of *E. coli*, the yellow arrow points to the lysis channel formed at the middle portion of bacterial cell.

显改变,仍保持着完整的杆状结构(图7B)。

## 2.4 菌影疫苗的制备及其对鸡的免疫保护效果

### 2.4.1 菌影冻干粉与菌影装载DNA疫苗的无菌检测

将禽致病性大肠杆菌菌影冻干粉稀释液及菌影装载的DNA疫苗分别均匀涂布于LB固体培养基上培养,将平板倒置于 $37^\circ\text{C}$ 培养箱培养过夜。结果显示,平板上均无活菌生长,证明菌影及其装载的质粒无菌检验合格。

### 2.4.2 临床症状观察

第2次免疫14 d后,分别对I-IV组攻鸭源鸡杆菌,在攻毒后7 d内各组均无死亡现象,但III组(空菌影组)和IV组(攻毒对照组)的部分鸡在攻鸭源鸡杆菌后第2天有羽毛松乱、精神不振、拉稀的现象,第4天逐渐恢复正常。其余组与正常对照组无明显临床差异。

### 2.4.3 排菌检测

在攻毒后1-7 d内每间隔24 h分别收集各组鸡的泄殖腔拭子和咽拭子,以检测各组鸡的排毒情况。攻鸭源鸡杆菌组鸡的排菌情况如表2和表3所示,免疫组的鸡在攻毒2 d、3 d后停

表2 泄殖腔拭子中检测的*Gallibacterium anatis*Table 2 Detection of *Gallibacterium anatis* in cloacal swabs

| 组别<br>Group | 免疫物质<br>Immune substance   | 攻毒菌株<br>Challenge strain | 存活数<br>Survival numbers | 排菌<br>Shedding bacteria (d) |      |       |       |       |       |       |       |
|-------------|--|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             |  |                          |                         | 1                           | 2    | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |       |
| I           | pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid                  | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 1/10 | 3/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |
| II          | BG 负载 pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>BG loading pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 1/10 | 2/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |
| III         | BG   | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 4/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| IV          | PBS  | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 3/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| V           | PBS  | -                        | 10/10                   | 0/10                        | 0/10 | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |

I-V: 分别代表pCAGGS-*flfA*质粒组、BG负载pCAGGS-*flfA*质粒组、BG对照组、未免疫攻毒组、正常对照组；-表示V组不做攻毒处理。

I-V: Representing pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG-loaded pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG control group, non-immune challenge group and normal control group, respectively; - indicates that Group V will not undergo poison attack treatment.

表3 咽拭子中检测的*Gallibacterium anatis*Table 3 Detection of *Gallibacterium anatis* in throat swabs

| 组别<br>Group | 免疫物质<br>Immune substance   | 攻毒菌株<br>Challenge strain | 存活数<br>Survival numbers | 排菌<br>Shedding bacteria (d) |      |      |       |       |       |       |       |
|-------------|--|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             |  |                          |                         | 1                           | 2    | 3    | 4     | 5     | 6     | 7     |       |
| I           | pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid                  | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 1/10 | 3/10 | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |
| II          | BG 装载 pCAGGS- <i>flfA</i> 质粒<br>BG loading pCAGGS- <i>flfA</i> plasmid | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 1/10 | 2/10 | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |
| III         | BG   | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 3/10 | 8/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| IV          | PBS  | <i>G. anatis</i>         | 10/10                   | 0/10                        | 4/10 | 8/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| V           | PBS  | -                        | 10/10                   | 0/10                        | 0/10 | 0/10 | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  | 0/10  |

I-V: 分别代表pCAGGS-*flfA*质粒组, BG负载pCAGGS-*flfA*质粒组, BG对照组, 未免疫攻毒组, 正常对照组; -表示V组不做攻毒处理。

I-V: Representing pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG-loaded pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG control group, non-immune challenge group and normal control group, respectively; - indicates that Group V will not undergo poison attack treatment.

止排菌, 而未免疫的攻毒组所有鸡持续排菌直至试验结束, 对照组的所有拭子样本均为阴性。

#### 2.4.4 免疫后特异性抗体水平监测

免疫1周龄鸡后, 每隔7d通过翅下静脉采血, 分离并收集血清, 使用间接ELISA法测定特异性抗体反应。结果如图8所示, 首免7d后, III组(空菌影组)和IV组(PBS组)抗体升高不

明显, 与对照组无显著差异; I组与II组2个免疫组的抗体水平逐渐升高, 与对照组相比抗体水平均差异极显著, 但2个免疫组之间无显著差异; 二免后I组和II组抗体水平均快速升高, 且随时间延长II组抗体水平显著高于I组, 结果说明免疫质粒组的抗体水平显著低于菌影负载质粒组。

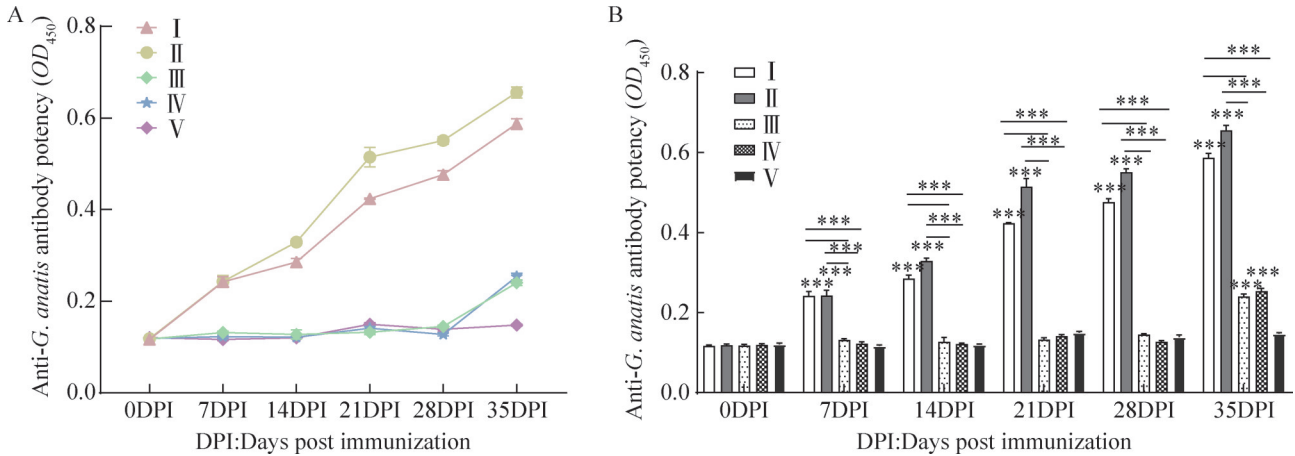


图8 抗鸭源鸡杆菌特异性IgG抗体水平。A: 折线图; B: 柱状图。I-V: 分别代表pCAGGS-*flfA*质粒组, BG负载pCAGGS-*flfA*质粒组, BG对照组, 未免疫攻毒组, 对照组。

Figure 8 Serum specific IgG antibody against *G. anatis*. A: Line figure; B: Bar graph. I-V: Representing pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG-loaded pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG control group, non-immune challenge group and control group, respectively. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

2.4.5 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

选取  $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  稀释度的 pMD18T-*flfA* 质粒为模板进行 SYBR Green I 荧光定量 PCR, 采用 Bio-Rad CFX Maestro 软件对荧光定量结果进行分析, 可知标准曲线斜率为 -3.063, 纵截距为 37.947。以拷贝数为  $x$ 、 $C_q$  值为  $y$  建立的标准曲线方程为  $y = -3.063x + 37.947$ , 相关系数  $R^2$  为 0.992, 扩增效率为 112.1%, 标

准曲线与熔解曲线分别见图 9 与图 10。

2.4.6 组织脏器中细菌载量结果

用鸭源鸡杆菌的荧光定量 PCR 方法测定脾、肝、气管、上颚裂和肺的细菌载量, 结果如图 11 所示。攻毒后, I 组(pCAGGS-*flfA* 质粒)与 II 组(BG 负载 pCAGGS-*flfA* 质粒) 2 个免疫组试验鸡只的肝、气管、上颚裂和肺组织中的细菌拷贝数显著低于 III 组(空菌影组)及未免疫攻毒

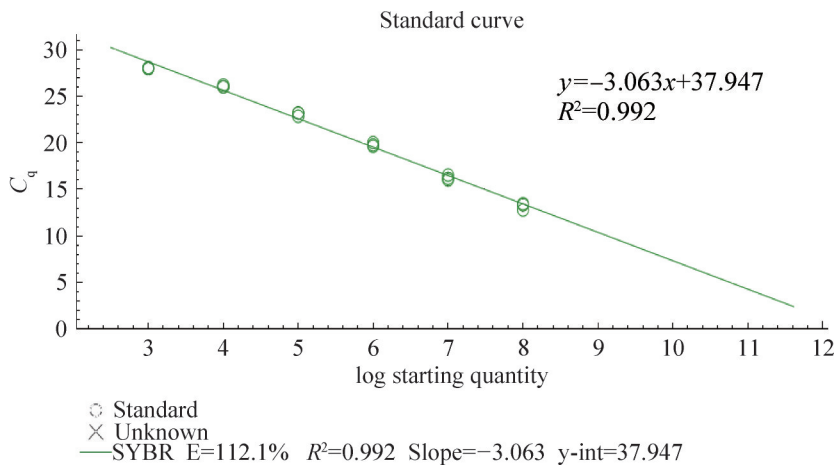


图9 *Gallibacterium anatis* SYBR Green I 荧光定量 PCR 标准曲线

Figure 9 SYBR Green I quantitative real-time PCR stand curve of *Gallibacterium anatis*.

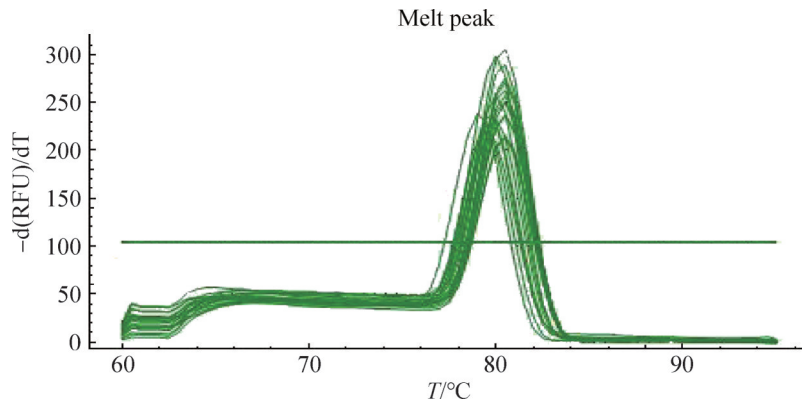


图10 *Gallibacterium anatis* SYBR Green I荧光定量PCR溶解曲线

Figure 10 SYBR Green I quantitative real-time PCR melting curve of *Gallibacterium anatis*.

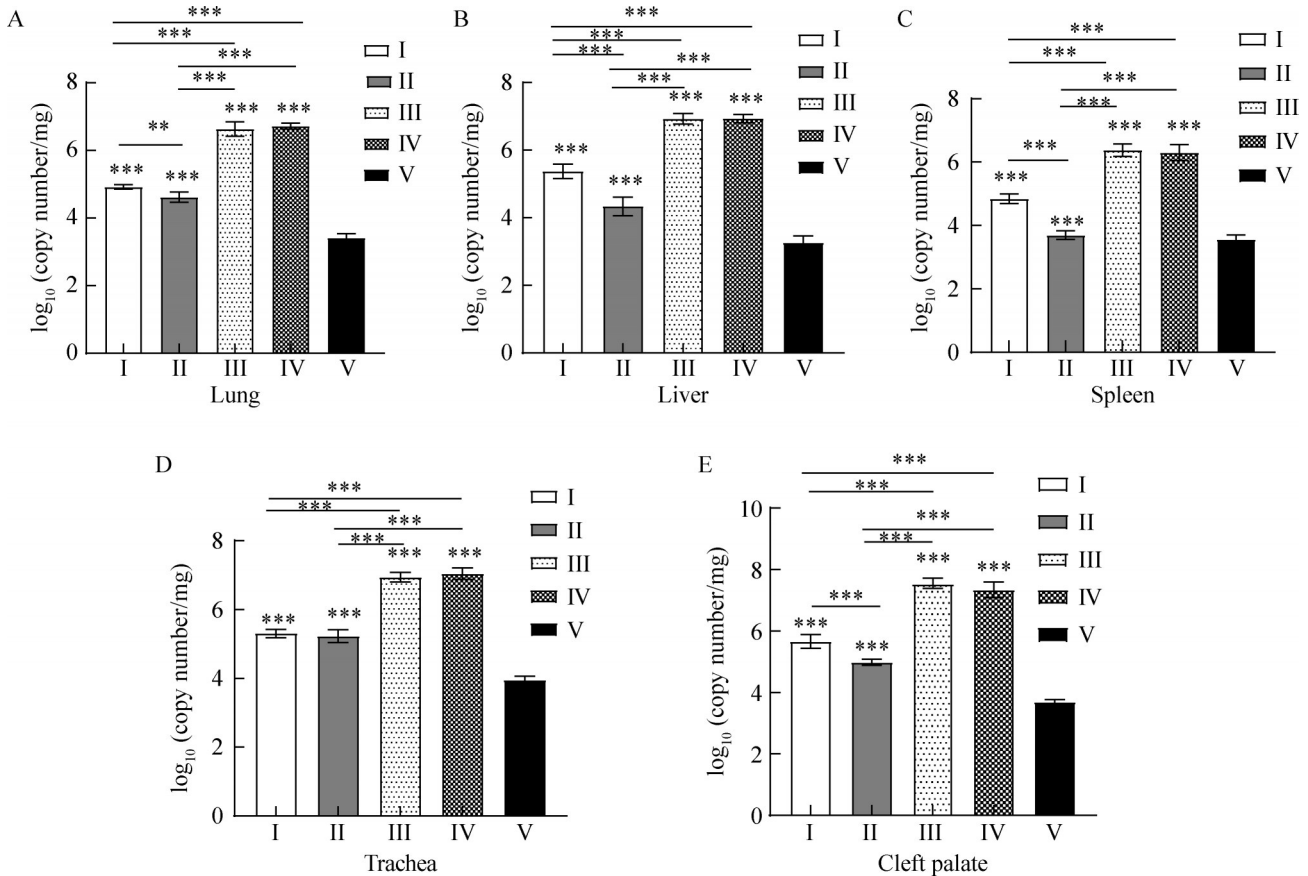


图11 各组织器官中鸭源鸡杆菌载量分析。I-V: 分别代表pCAGGS-*flfA*质粒组、BG负载pCAGGS-*flfA*质粒组、BG对照组、未免疫攻毒组、对照组。

Figure 11 Analysis of the load of *G. anatis* in various tissues and organs. I-V: Representing pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG-loaded pCAGGS-*flfA* plasmid group, BG control group, non-immune challenge group and control group, respectively. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

IV组,且质粒免疫组(I组)的细菌拷贝数显著高于菌影负载质粒组(II组)。

### 3 讨论与结论

鸡输卵管炎和输卵管囊肿是产蛋鸡的重要疫病,常导致蛋鸡产蛋量下降,特别是当年生的高产母鸡更多见,这些鸡往往发展为慢性卵黄性腹膜炎,其特征是干酪性输卵管炎、输卵管堵塞和输卵管囊肿<sup>[20-21]</sup>。鸭源鸡杆菌是引起这类疾病的一个重要病原,它存在于禽类的上呼吸道和下生殖道中,是一种条件性致病菌。最近的研究还发现,它也是鸡肠道正常微生物群的一部分,但能引起蛋鸡产蛋量下降和病死率增加<sup>[2,22]</sup>。研究显示鸭源鸡杆菌在我国鸡群中广泛流行,且存在耐药现象<sup>[1]</sup>。此外,该菌还能感染人类,引起菌血症和痢疾<sup>[22]</sup>,因此具有公共卫生学意义,应引起足够重视。传染病的防治重在预防,目前针对鸭源鸡杆菌引起的感染尚无商品化疫苗,因此研究安全、有效的疫苗具有重要意义。

国内外研究均证明鸭源鸡杆菌的菌毛蛋白具有良好的免疫原性,是一种理想的疫苗候选蛋白<sup>[7,14]</sup>,细菌菌影不仅本身具有良好的免疫效果和低廉的成本,可以作为有效的候选疫苗和佐剂<sup>[8-10]</sup>,还可以作蛋白质、核酸和药物等的递送系统用<sup>[17-18]</sup>。同时,考虑到禽致病性大肠杆菌不仅可以引起鸡卵黄性腹膜炎、输卵管堵塞、输卵管囊,而且往往与鸭源鸡杆菌混合感染,如果用该菌做菌影,可以对同型禽大肠杆菌感染起到预防作用,鉴于此,本研究选择禽致病性大肠杆菌作为菌影制备对象,鸭源鸡杆菌的菌毛基因 *flfA* 作为核酸疫苗研究对象,选用携带鸡的  $\beta$  肌动蛋白启动子的 pCAGGS 质粒作为表达载体<sup>[23]</sup>,首先制备了禽致病性大肠杆菌

菌影,同时以真核表达载体 pCAGGS 构建了表达鸭源鸡杆菌菌毛蛋白 FlfA 的重组表达质粒,然后将重组表达质粒以一定比例装载于禽大肠杆菌菌影中,并对上述装载产物进行免疫效果评价。该研究对减少蛋鸡输卵管炎与输卵管囊肿的发生率及养禽业的生物安全和快速发展具有重要意义,将为蛋鸡输卵管炎和输卵管囊肿的防控奠定基础。

在评价菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒的疫苗对鸭源鸡杆菌的免疫保护效果时,无论是通过 ELISA 检测的特异性 IgG 抗体水平,还是对鸡泄殖腔拭子和咽拭子排菌情况以及组织脏器中细菌载量的测定,结果均显示菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒组和单独免疫 pCAGGS-*flfA* 质粒组的免疫保护效果均远高于其他免疫组,并且与单独免疫 pCAGGS-*flfA* 质粒组相比,菌影负载 pCAGGS-*flfA* 质粒组的免疫保护效果更为显著,说明菌影作为 pCAGGS-*flfA* 的负载载体明显增强了该核酸疫苗的免疫保护效果。总体而言,禽致病性大肠杆菌菌影负载 pCAGGS-*flfA* 核酸疫苗对鸭源鸡杆菌感染能够提供较好的保护,然而禽致病性大肠杆菌菌影本身作为疫苗对同型细菌感染的保护作用还有待进一步验证。

### 作者贡献声明

马立静:实验设计和操作、数据收集和处理、论文撰写和修改;彭泽宇:协助实验操作、数据收集和处理;翟金丽:协助实验操作;于静玥:协助实验操作;王增:技术支持;魏梦蝶:协助实验操作;王新卫:论文讨论、技术支持;陈陆:论文讨论、技术支持;杨霞:实验方案的设计、论文讨论、技术支持、论文撰写和修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 彭志锋, 杨霞, 郑鹿平, 王川庆. 我国鸭源鸡杆菌的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(12): 2075-2078. PENG ZF, YANG X, ZHENG LP, WANG CQ. Research progress on duck derived chicken bacilli in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(12): 2075-2078 (in Chinese).
- [2] LI J, LI Y, XIAO H, LI W, YE F, WANG L, LI Y, WANG C, WU Y, XUAN R, HUANG Y, HUANG J. The intestinal microflora diversity of aboriginal chickens in Jiangxi Province, China[J]. Poultry Science, 2024, 103(2): 103198.
- [3] 李乔晶. 鸡群鸭源鸡杆菌流行病学调查及流行菌株对雏鸡和雏鸭的感染特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2012. LI QJ. Epidemiological investigation of chicken *Bacillus* from ducks in chicken flocks and study on infection characteristics of epidemic strains to chicks and ducklings[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [4] PAUDEL S, LIEBHART D, HESS M, HESS C. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers[J]. Avian Pathology, 2014, 43(5): 443-449.
- [5] PAUDEL S, RUHNAU D, WERNSDORF P, LIEBHART D, HESS M, HESS C. Presence of *Avibacterium paragallinarum* and histopathologic lesions corresponds with clinical signs in a co-infection model with *Gallibacterium anatis*[J]. Avian Diseases, 2017, 61(3): 335-340.
- [6] 王珊, 陈陆, 付仁一, 杨霞, 赵军, 高冬生, 李乔晶, 姚惠霞, 王川庆. 我国部分地区蛋鸡群鸭源鸡杆菌血清流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(2): 114-117. WANG S, CHEN L, FU R Y, YANG X, ZHAO J, GAO GS, LI QJ, YAO HX, WANG CQ. Seroepidemiological survey of *Gallibacterium anatis* infection in layer chicken flocks in some provinces[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011, 33(2): 114-117 (in Chinese).
- [7] 张家浩. 新疆南疆部分地区蛋鸡群鸭源鸡杆菌的感染情况调查及毒力与耐药性检测[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2023. Zhang JH. Investigation of infection and virulence and drug resistance detection in layer farm *Gallibacterium anatis* in some areas of southern Xinjiang[D]. Ala'er: Master's Thesis of Tarim University, 2023 (in Chinese).
- [8] 张政钢, 金鑫鑫, 梁睿钦, 蔡梦雷, 赵东旭, 刘建钊, 罗青平, 崔国林. 蛋鸡输卵管内鸭源鸡杆菌的分离鉴定与生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2024. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240814.001. ZHANG ZG, JIN XX, LIANG RQ, CAI ML, ZHAO DX, LIU JC, LUO QP, CUI GL. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Gallibacterium Anatis* in the reproductive tract of laying hens[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2024. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20240814.001 (in Chinese).
- [9] 唐诗, 庞雪晴, 曾红梅, 王印, 罗燕, 姚学萍, 任梅滢, 杨泽晓. 鸭源鸡杆菌的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3253-3266. TANG S, PANG XQ, ZENG HM, WANG Y, LUO Y, YAO XP, REN MS, YANG ZX. Isolation, identification and whole-genome sequencing of *Gallibacterium anatis* from chicken[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3253-3266 (in Chinese).
- [10] 张玉杰, 刘东, 孙宁, 刘红祥, 高天佐, 郭玉广, 于静, 袁飞, 宋姗姗, 王玉超, 钟声, 马冬, 张宇龙, 杜元钊. 引起人工授精种鸡产蛋下降的鸭源鸡杆菌的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(8): 1604-1611. ZHANG YJ, LIU D, SUN N, LIU HX, GAO TZ, GUO YG, YU J, YUAN F, SONG SS, WANG YC, ZHONG S, Ma D, ZHANG YL, DU YZ. Isolation and identification of *Gallibacterium anatis* causing decline of egg laying capacity of artificially inseminated breeders[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(8): 1604-1611 (in Chinese).
- [11] 陈国权, 王娜, 张旭, 赵大杰, 阎朝华, 周碧君, 王开功, 程振涛, 文明. 一株鸭源鸡杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 贵州畜牧兽医, 2020, 44(4): 32-36. CHEN GQ, WANG N, ZHANG X, ZHAN DJ, YAN CH, ZHOU BJ, WANG KG, CHENG ZT, WEN M. Isolation and identification of *Gallibacterium anatis* and drug sensitivity test from chicks[J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 44(4): 32-36 (in Chinese).
- [12] ALLAHGHADRY T, NG DYK, DIBAEI A, BOJESSEN AM. Clonal spread of multi-resistant *Gallibacterium anatis* isolated among Iranian broilers and layers[J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 27.
- [13] KUDIRKIENĖ E, BAGE RJ, JOHNSON TJ, BOJESSEN AM. Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium genomes*[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1093.
- [14] TADDESE R, BELZER C, AALVINK S, de JONGE MI, NAGTEGAAL ID, DUTILH BE, BOLEIJ A. Production of inactivated Gram-positive and Gram-negative species with preserved cellular morphology and integrity[J]. Journal of microbiological methods, 2021, 184: 106208.
- [15] MA Y, ZHU WJ, ZHU GS, XU Y, LI SY, CHEN R, CHEN LD, WANG JF. Efficient robust yield method for preparing bacterial ghosts by *Escherichia coli* phage ID52 lysis protein E[J]. Bioengineering, 2022, 9(7): 300.
- [16] HAJAM IA, DAR PA, WON G, LEE JH. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential[J]. Veterinary Research, 2017, 48(1): 37.

- [17] ESLAMINEJAD T, MOSHAFI MH, HASANPORE M, AYATOLLAHI SA, ANSARI M. Evaluation of the anticandidal activity of clotrimazole using *Lactobacillus casei* ghosts as biological drug carrier[J]. *Daru*, 2022, 30(1): 67-73.
- [18] YU XL, WANG L, YANG XR, ZHANG SS, LI GW, ZHANG LL, LI JX, WANG XN, ZHOU H, JIANG YP, CUI W, LI YJ, TANG LJ, QIAO XY. *Lactobacillus casei* ghosts as a vehicle for the delivery of DNA vaccines mediate immune responses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 849409.
- [19] 王圆月. 鸡大肠杆菌菌影的制备及免疫效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.  
Wang YY. Development of avian *Escherichia coli* ghosts and its immune efficacy[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016.
- [20] JOHNSON TJ, DANZEISEN JL, TRAMPEL D, NOLAN LK, SEEMANN T, BAGER RJ, BOJESSEN AM. Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54844.
- [21] 王继洋, 王艳, 彭志锋, 杨霞. 鸭源鸡杆菌相关致病因子研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(8): 1627-1632.  
WANG JY, WANG Y, PENG ZF, YANG X. Research process on the virulence factors of *Gallibacterium anatis* in poultry[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(8): 1627-1632 (in Chinese).
- [22] AUBIN GG, HALOUN A, TREILHAUD M, REYNAUD A, CORVEC S. *Gallibacterium anatis* bacteremia in a human[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(11): 3897-3899.
- [23] 姜永萍, 张洪波, 步志高, 李呈军, 赵有淑, 王秀荣, 于康震, 陈化兰. 表达载体 pCAGGS 显著增强禽流感 DNA 疫苗的免疫保护效果[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(4): 825-830.  
JIANG YP, ZHANG HB, BU ZG, LI CJ, ZHAO YS, WANG XR, YU KZ, CHEN HL. Enhanced protective efficacy of avian influenza DNA vaccine with expressive vector pCAGGS[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 825-830 (in Chinese).