



表达传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白的转基因 柔嫩艾美耳球虫的构建与鉴定

刘跃辉¹, 孙颖颖², 王浩迪¹, 索静霞², 宋铭忻^{1*}, 刘贤勇^{2*}

(1. 东北农业大学动物源性人兽共患病黑龙江省重点实验室, 哈尔滨 150030;

2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 传染性法氏囊病严重制约家禽养殖业经济发展。因此, 研发安全且高效的传染性法氏囊病疫苗成为当下备受瞩目的关键课题。为探索柔嫩艾美耳球虫作为活载体表达及递送传染性法氏囊病毒抗原的可行性, 本研究构建表达该病毒 VP2 蛋白的转基因柔嫩艾美耳球虫株(*Et-VP2*)。构建表达质粒, 酶切后核转入柔嫩艾美耳球虫中, 利用流式细胞分选技术筛选得到表达红色荧光报告基因(mCherry)的阳性虫株, 在基因和蛋白水平上鉴定 VP2 基因的表达。结果显示, 构建表达 VP2 蛋白的转基因柔嫩艾美耳球虫经雏鸡体内 3 次传代阳性球虫荧光率已高于 95%, 在球虫基因和蛋白水平上证实了外源基因的成功插入和稳定表达(后代群体荧光率均达 95%), 间接免疫荧光结果显示融合蛋白(Mic2-linker-VP2)定位于柔嫩艾美耳球虫孢子顶端。本研究成功建立柔嫩艾美耳球虫稳定转染体系, 为后续转基因虫株的传染性法氏囊病免疫保护研究奠定基础。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; 传染性法氏囊病病毒; VP2; mCherry; 转基因

中图分类号: S852.659.4; S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1008-09

Construction and Identification of a Transgenic *Eimeria tenella* Expressing Infectious Bursal Disease Virus VP2 Protein

LIU Yuehui¹, SUN Yingying², WANG Haodi¹, SUO Jingxia², SONG Mingxin^{1*}, LIU Xianyong^{2*}

(1. Heilongjiang Key Laboratory for Zoonosis, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Infectious bursal disease (IBD) severely restricts the economic development of the poultry industry. Therefore, the development of safe and efficient IBD vaccines has become a key topic of considerable interest. To explore the feasibility of using *Eimeria tenella* as a live vector for the expression and delivery of infectious bursal disease virus (IBDV) antigens, this study constructed a genetically modified strain of *E. tenella* (*Et-VP2*) expressing the VP2 protein of the IBDV. An expression plasmid was constructed, digested with enzymes, and then transfected into *E. tenella* using nuclear transfection. Flow cytometry was utilized to sort and select positive strains expressing the red fluorescent reporter gene (mCherry), and the expression of the VP2 gene was identified at both the genetic and protein levels. Results showed that after three passages *in vivo* in chicks, the

收稿日期: 2025-06-23

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2023YFD1802400)

作者简介: 刘跃辉, 主要从事预防兽医学、兽医寄生虫学的研究, E-mail: lyh97163@qq.com; 孙颖颖, 主要从事鸡艾美耳球虫卵囊活载体疫苗的研究, E-mail: 2570035989@qq.com; 刘跃辉和孙颖颖是同等贡献作者

* 通信作者: 宋铭忻, 主要从事兽医寄生虫学与寄生虫病学研究, E-mail: songmx@neau.edu.cn; 刘贤勇, 主要从事艾美耳球虫发育调控相关研究, E-mail: liuxianyong@cau.edu.cn

transgenic *E. tenella* expressing VP2 protein had a positive rate of fluorescence exceeding 95%, confirming successful integration and stable expression of the foreign gene at both the genetic and protein levels (with fluorescence rates reaching 95% in the offspring population). Indirect immunofluorescence results indicated that the fusion protein (Mic2-linker-VP2) was localized at the apical end of the sporozoites of *E. tenella*. This study successfully established a stable transfection system for *E. tenella*, laying the foundation for subsequent research on the immune protection of genetically modified strains against infectious bursal disease.

Keywords: *Eimeria tenella*; infectious bursal disease virus; VP2; mCherry; transgenic

* **Corresponding author:** SONG Mingxin, E-mail: songmx@neau.edu.cn; LIU Xianrong, E-mail: liuxianrong@cau.edu.cn

传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)作为威胁全球养禽业的重要病原体,其 VP2 蛋白是诱导宿主免疫保护的关键抗原^[1]。当前商业化疫苗面临超强毒株免疫逃逸和母源抗体干扰等挑战,而基因工程疫苗如病毒活载体、亚单位疫苗和 DNA 疫苗虽各有优势,但仍存在表达效率或免疫原性不足的问题^[2-3]。VP2 蛋白的构象依赖性中和表位是疫苗研发的核心靶点,如何高效递送 VP2 抗原成为突破现有技术瓶颈的关键。

球虫病由艾美耳属寄生虫(*Eimeria*)引起,转基因球虫技术的发展为多价疫苗开发提供了新路径^[4-6]。球虫具有严格宿主特异性,其基因组可容纳外源抗原基因,且感染过程能模拟自然免疫^[7]。前期研究已成功将禽流感抗原 M2e 定位至柔嫩艾美耳球虫基因组(*E. tenella*) ETH2_0942600 和 ETH2_0942700 的 3' UTR 区域内(转染载体 T-DNA 插入球虫基因组 HG994969.1:2 704 213~2 705 255),且未影响编码完整性,为异源抗原表达奠定了基础^[8-10]。在艾美耳球虫反向遗传操作体系的构建过程中,调控元件的优化以及转染与筛选效率的提升是两个关键的突破性进展,极大地推动了该体系的完善和发展^[11]。近些年,顶复门原虫中一些与入侵相关的组分成为研究的焦点。余瑛等^[12]研究结果显示,与堆型艾美耳球虫(*E. acervulinae*)表面抗原蛋白 1(*EaSag1*)抗原呈递系统相比,球虫微线体蛋白 Mic2(*EaMic2*)在诱导宿主产生特异性免疫保护反应方面展现出更高的效率优势^[13]。本研究计划以转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et-M2e*)为受体虫株,采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术实现外源基因的定点整合,构建表达 VP2 基因的转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et-VP2*),旨在探究柔嫩艾美耳球虫作为重

组活卵囊疫苗载体的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

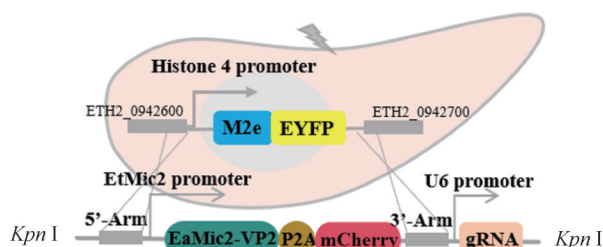
1.1.1 球虫卵囊及实验动物 野生柔嫩艾美耳球虫(*Et-WT*)、转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et-M2e*)北京株、转基因堆型艾美耳球虫(*Ea-VP2*)卵囊由中国农业大学国家原虫实验室索勋教授课题组保存,每两个月进行一次传代以保证球虫卵囊活力,置于 4℃冰箱保存备用。卵囊传代的 1 周龄 AA 肉鸡购自北京爱拔益加家禽育种有限公司。

1.1.2 主要试剂 Q5®高保真 DNA 聚合酶、*Kpn* I-HF 等购自北京百灵克生物科技有限公司; Monoclonal ANTI-FLAG®M2 antibody produced in mouse 购自 Sigma 公司; FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、HRP 偶联山羊抗鼠二抗购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 基因序列 将 VP2 基因利用 GenSmart™ Codon Optimization 密码子优化工具进行球虫密码子偏好性优化并于北京擎科生物科技有限公司合成,网站设计针对 *Et-M2e* 虫株 T-DNA 插入位点的单向导 gRNA (5'-GCATGCAAATGGCTCTAC-ACA-3'), SpCas9 环状质粒由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的设计与构建 设计表达质粒 p5'AMic2linkerVP2m3'A-U6gR, 包含 VP2 基因、mCherry 荧光报告基因及针对球虫 *Et-M2e* 虫株 T-DNA 插入位点的 gRNA。重组质粒的设计和子孢子核转染模式图(图 1)。通过 PCR 扩增获得各相应片段,经同源重组连接后, *Kpn* I-HF 酶切线性化后备用。



EtHistone 4. 柔嫩艾美耳球虫组蛋白4的5'调控区序列;M2e. H5N1亚型禽流感病毒M2蛋白胞外区结构域;EYFP. 增强型黄色荧光蛋白序列;5'Arm和3'Arm. 柔嫩艾美耳球虫ETH2_0942600和ETH2_0942700的3'调控序列;5'*EtMic2*. 柔嫩艾美耳球虫微线体Mic2蛋白启动子序列;*EaMic2*. 堆型艾美耳球虫微线体Mic2蛋白调控区序列;P2A. 具有蛋白质自剪切功能的序列;mCherry. 红色荧光蛋白序列;U6. 柔嫩艾美耳球虫启动子序列;gRNA 针对球虫*Et-M2e*虫株T-DNA插入位点的序列;*Kpn I*-HF. 限制性内切酶

EtHistone 4. Sequence of the 5' regulatory region of *E. tenella* histone 4; M2e. Structural domain of the extracellular segment of the M2 protein of H5N1 subtype avian influenza virus; EYFP. Enhanced yellow fluorescent protein sequence; 5' Arm and 3' Arm. 3' regulatory sequences of *E. tenella* ETH2_0942600 and ETH2_0942700; 5' *EtMic2*. The promoter sequence of the microneme protein Mic2 gene in *E. tenella*; *EaMic2*. The regulatory region of the *E. acervulina* microneme protein Mic2 gene; P2A. Sequence with self-cleaving peptide function; mCherry. The sequence encoding the red fluorescent protein; U6. The U6 promoter sequence from *E. tenella*; gRNA. Guide RNA sequence targeting the T-DNA insertion site in the *Et-M2e* strain; *Kpn I*-HF. Restriction endonuclease

图1 重组质粒的设计和孢子核转染模式图

Fig. 1 Design of recombinant plasmid and schematic diagram of sporozoite nuclear transfection

1.2.2 柔嫩艾美耳球虫孢子的转染 采用 Percoll 密度梯度离心法提取转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et-M2e*)孢子,取孢子原液计数至 4×10^5 个, $2\,000\text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min 沉淀备用。从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出核转缓冲液I和II,融化后混匀。取新电转杯,蒸馏水清洗备用。吸取80 μL 核转缓冲液,吹打孢子沉淀,加入5 μL *Kpn I*-HF 酶、7.5 μL 目的片段酶切后胶回收产物和7.5 μL 环状SpCas9质粒,混匀后加入电转杯。启动核转仪,按程序运行至“OK”字样,表示完成。取出电转杯,加入500 μL DMEM 培养基,混匀后转移至EP管。

1.2.3 阳性球虫的流式筛选和传代 核转后的孢子通过泄殖腔接种至1周龄禁食禁水12 h的无球虫鸡。接虫后5 d 清粪,收取6 d至8 d的粪便,饱和食盐水漂浮法富集和纯化球虫卵囊。用倒置荧光显微镜观察,若卵囊发红光则转染成功。通过荧光激活细胞分选技术(fluorescent activated cell sorting, FACS)筛选红色光卵囊,并多次传代于无球虫鸡,最终获得稳定表达*Et-VP2*的阳性转基因柔嫩艾美耳球虫卵囊。

1.2.4 球虫的基因组鉴定和重测序分析 对野生型柔嫩艾美耳球虫(*Et-WT*)和第4代转基因虫株

(*Et-VP2*)孢子化卵囊进行处理。收集不少于 1×10^6 个卵囊的PBS悬液,沉淀后采用CTAB法提取球虫基因组DNA。设计引物(表1)对*Et-VP2*基因组PCR鉴定。适量的转基因虫株(*Et-VP2*)委托上海派森诺生物科技有限公司进行二代重测序分析。

1.2.5 Western blot 鉴定转基因柔嫩艾美耳球虫VP2蛋白表达 收集转基因球虫样本,以野生型柔嫩艾美耳球虫(*Et-WT*)和表达VP2转基因堆型艾美耳球虫(*Ea-VP2*)分别为阴性和阳性对照,经RIPA裂解、低温离心后取上清测蛋白浓度。蛋白样品加入上样缓冲液后保存。按目标蛋白分子量灌胶,电泳分离后转膜。转膜后用5%脱脂奶粉封闭,依次孵育抗Flag和GAPDH的一抗(1:2 000)和HRP偶联山羊抗鼠二抗(1:2 000),用ECL显色并成像检测。

1.2.6 间接免疫荧光鉴定VP2蛋白在转基因柔嫩艾美耳球虫表达定位 孢子经蒸馏水和甘氨酸润洗的层析柱分离,低速离心重悬后接种含HFF细胞孔板,培养后依次固定、通透、封闭,经抗Flag标签小鼠源单克隆抗体一抗和FITC标记山羊抗小鼠IgG抗体二抗孵育,防荧光淬灭剂封片后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 用于球虫基因组鉴定的引物

Table 1 Primers for coccidia genome identification

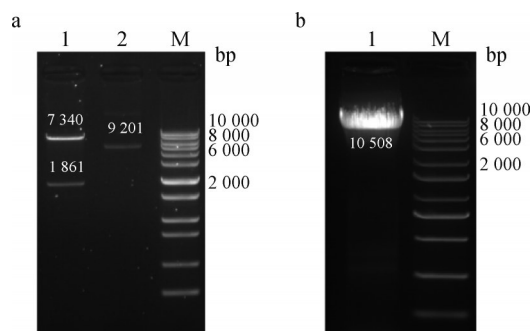
引物名称 Primer name	引物序列(5' → 3') Primer sequence (5' to 3')	片段大小/bp Fragment size/bp
PCR1-F	CCGTTTAGCTTCTCCTGCATCAC	935
PCR1-R	GCCGCAAGAACTCTGAATCC	
PCR2-F	CAAGGCAACAGGTTACTGTAGGT	803
PCR2-R	GGAGTAGCAGCTCTTCTTTGCAG	
PCR3-F	GCGCAACGAATTCTCGTATGC	1 552
PCR3-R	GGTTGTATGTGCTTGTCTCGC	
PCR4-F	CCAGCATGGATCCTCCACAG	1 432
PCR4-R	CCCAAAGCCCCAGCAATCTTC	
PCR5-F	GGATTAAGACAGTGTGGCCTACAAG	1 445
PCR5-R	GCCTGAAACGCATTTCCATGAC	
PCR6-F	GAGCTGTACAAGGCTAGCAAGG	728
PCR6-R	GATCACGCTACACCGACCC	
PCR7-F	CCGGAATTGCGAGAAAAGATTTGC	3 097
PCR7-R	GGTTGTATGTGCTTGTCTCGC	
PCR8-F	GGAGATTGTGACAAGCAAGAGC	2 769
PCR8-R	GAAAAATTGGTTTAAGGGGCACCG	

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

构建表达质粒 p5'AMic2linkerVP2m3'A-U6gR (9 201 bp), *Kpn* I-HF 酶切线性化质粒大小为 7 340 bp,

此外测序结果显示 VP2、mCherry 和 gRNA 基因序列正确连接,结果表明该重组质粒构建成功并酶切成功,环状 SpCas9 质粒大小 10 508 bp,与实际大小相符(图 2)。



a. 质粒 p5'AMic2linkerVP2m3'A-U6gR 酶切鉴定 (M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1. 线性化质粒; 2. 环状质粒对照组); b. SpCas9 质粒鉴定 (M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1. 环状质粒)

a. Plasmid restriction enzyme digestion identification (M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1. Linearized plasmid; 2. Circular plasmid control group); b. Identification of Cas9 plasmid (M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1. Circular plasmid)

图 2 质粒 p5'AMic2linkerVP2m3'A-U6gR 酶切鉴定和 SpCas9 质粒鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of plasmid p5'AMic2linkerVP2m3'A-U6gR and identification of SpCas9 plasmid

2.2 转基因阳性虫株的筛选与稳定性

核转染后的子孢子经泄殖腔接种于无球虫鸡体内,流式细胞分选术记录到第1代转基因球虫*Et-VP2*荧光率为0.02%,经过3次传代操作并结合流

式筛选后,荧光率显著提升,已高于95%,且第4至7代荧光率均保持95%以上(表2)。在荧光显微镜检(100×)观察前3代的卵囊,发现荧光率与流式分选结果基本相符(图3)。

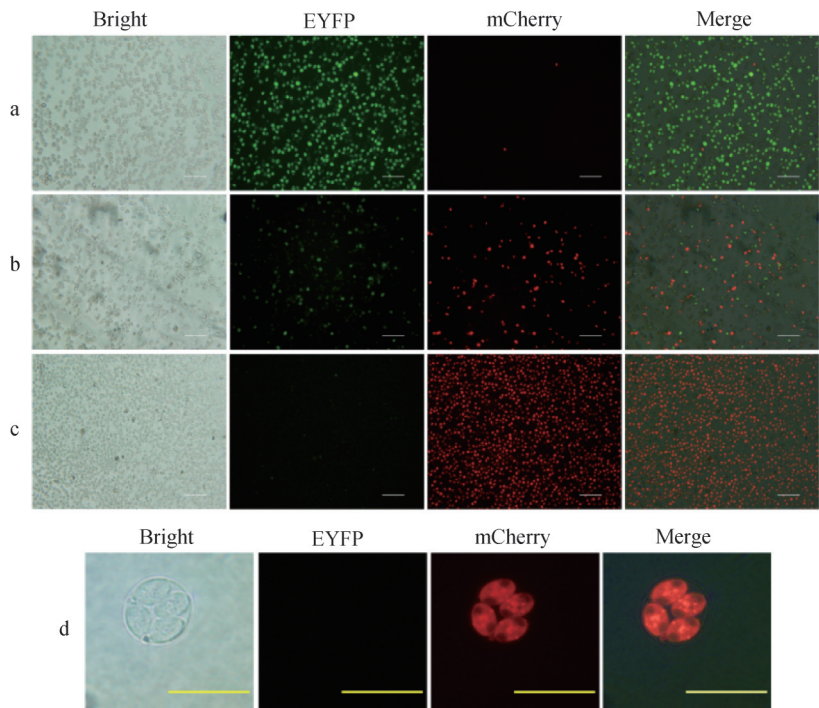
表2 *Et-VP2*虫株传代和流式筛选

Table 2 Passaging and flow cytometry screening of *Et-VP2* strain

虫株 Strain	代次 Generation	接种形式 Inoculation form	接种剂量/只 Inoculation dosage/per	鸡只数量 Chicken numbers	卵囊获取途径 Access to oocysts	荧光率/% Fluorescence rate	筛选方式 Selection strategy
<i>Et-VP2</i>	1	merozoites	3×10^5	3	粪便 Feces	0.02	FACS
	2	oocysts	365	4	粪便 Feces	29.05	FACS
	3	sporangia	3 000	4	粪便 Feces	>95	FACS
	4	sporangia	3 000	4	粪便 Feces	>95	FACS
	5	oocysts	2 000	4	粪便 Feces	>95	-
	6	oocysts	2 000	4	粪便 Feces	>95	-
	7	oocysts	2 000	4	粪便 Feces	>95	-

- 表示未进行流式筛选的情况下,转基因*Et-VP2*球虫荧光率始终保持高于95%,已达到稳定状态

- It indicates that without flow cytometry screening, the fluorescence rate of the transgenic *Et-VP2* coccidia consistently remains above 95%, achieving a stable state



a. 第1代*Et-VP2*(标尺=100 μm); b. 第2代*Et-VP2*(标尺=100 μm); c. 第3代*Et-VP2*(标尺=100 μm); d. 单个*Et-VP2*孢子化卵囊(标尺=25 μm)

a. The first generation of *Et-VP2* (bar=100 μm); b. The second generation of *Et-VP2* (bar=100 μm); c. The third generation of *Et-VP2* (bar=100 μm); d. Single sporulated oocyst of *Et-VP2* (bar=25 μm)

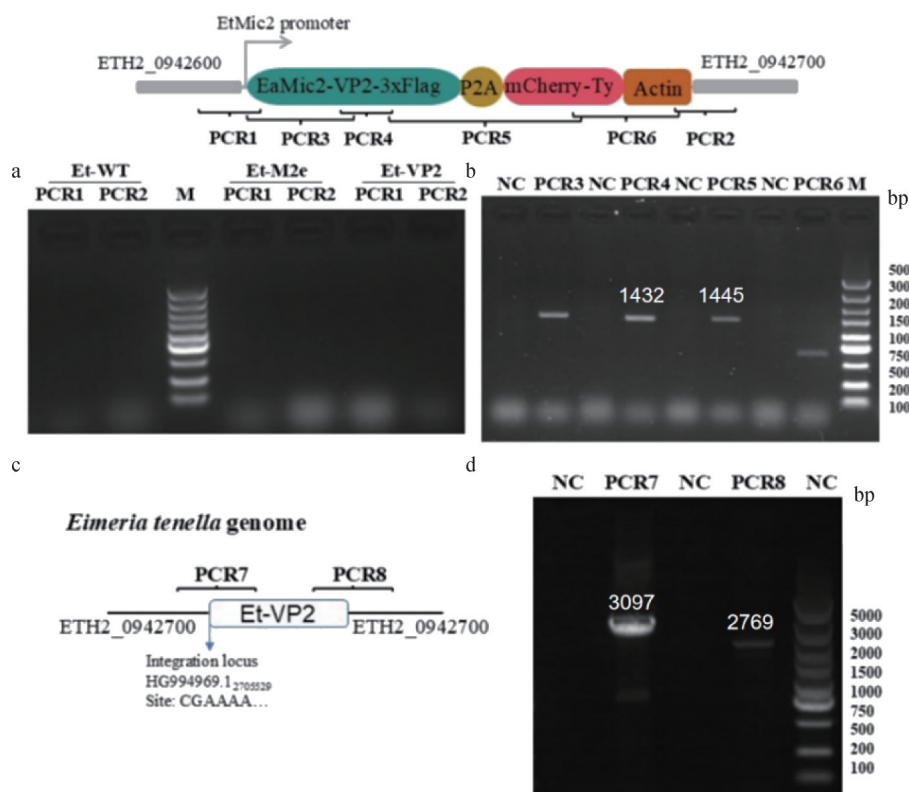
图3 *Et-VP2*孢子化卵囊镜检观察

Fig. 3 Microscopic observation of sporulated oocysts of *Et-VP2*

2.3 表达 *Et*-VP2 的转基因球虫在基因组水平的鉴定

本研究通过 PCR 和基因组重测序分析技术鉴定 VP2 基因在转基因柔嫩艾美耳球虫 (*Et*-M2e) 基因组的整合位置。PCR 结果显示,在插入位点未扩增出 5' 和 3' 同源臂(图 4a),而鉴定出 VP2 (1 359 bp) 和 mCherry (705 bp) 基因,说明转染质粒成功存在于球

虫基因组(图 4b)。基因重测序结果预测 VP2 基因可能整合在柔嫩艾美耳球虫基因组 HG994969.1 的 2 705 529 位置(图 4c),后对此位置进行了 PCR 验证,核酸电泳显示的条带大小与预期大小相符,说明 VP2 基因成功整合转基因柔嫩艾美耳球虫 (*Et*-M2e) 基因组中(图 4d)。



a. *Et*-WT、*Et*-M2e 和 *Et*-VP2 虫株基因组同源臂 PCR 鉴定; b. *Et*-VP2 虫株基因组 VP2 基因(PCR4)和 mCherry 基因(PCR5)的鉴定; c. *Et*-VP2 虫株基因组重测序位置预测; d. *Et*-VP2 虫株基因组重测序位置的 PCR 鉴定; M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; NC. 阴性对照(*Et*-WT)

a. Identification of the genomic homologous arms of the *Et*-WT, *Et*-M2e, and *Et*-VP2 strains by PCR; b. Identification of the VP2 gene (PCR4) and mCherry gene (PCR5) in the genome of the *Et*-VP2 strain; c. Prediction of the genomic resequencing positions in the *Et*-VP2 strain; d. PCR identification of the resequencing positions in the genome of the *Et*-VP2 strain; M. DL5000 DNA marker; NC. Negative control (*Et*-WT)

图 4 球虫基因组的 PCR 鉴定

Fig. 4 The PCR identification of coccidia genome

2.4 表达 *Et*-VP2 的转基因球虫在蛋白水平的鉴定

Western blot 鉴定转基因球虫 Mic2-linker-VP2 融合蛋白表达,在 86 ku 大小处印迹出条带,与预期蛋白大小相符(图 5)。

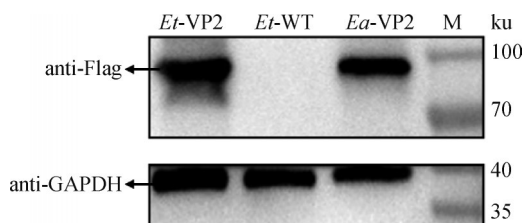
2.5 异源 VP2 在转基因柔嫩艾美耳球虫中表达位置的鉴定

通过 IFA 技术分析 VP2 蛋白在转基因柔嫩艾美耳球虫 (*Et*-M2e) 中的表达位置。荧光显微镜

(1 000×) 观察结果显示,与 *Et*-WT 对照组相比,在球虫子孢子的囊泡内存在 Mic2-linker-VP2 融合蛋白表达,其主要分布在子孢子的顶端(图 6)。

3 讨论

传染性法氏囊病(IBD)导致禽类死亡率上升,更因免疫抑制问题而增加鸡群对其他病原体易感性,给养禽业带来沉重经济负担,VP2 蛋白作为关



M. 三色预染蛋白相对分子质量标准; *Et*-WT、*Et*-VP2 和 *Ea*-VP2. 野生柔嫩、转基因柔嫩和堆型艾美耳球虫

M. Tri-color prestained protein marker; *Et*-WT, *Et*-VP2 and *Ea*-VP2. Wild-type *E. tenella*, transgenic *E. tenella* and *E. acervulina*

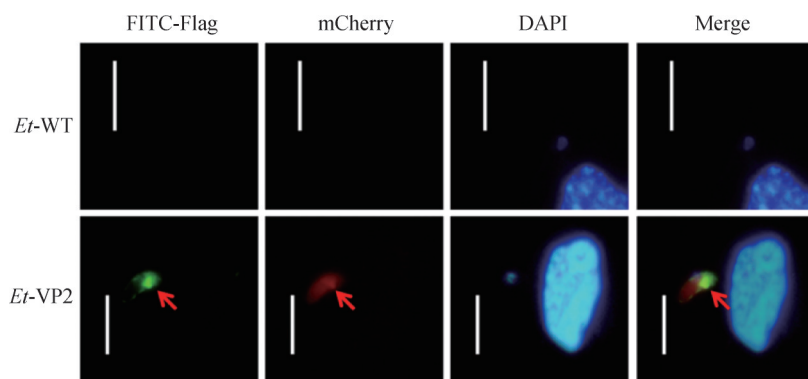
图5 Western blot检测转基因球虫的VP2的表达

Fig. 5 Detection of VP2 expression in transgenic coccidia by Western blot

键性致病抗原,成为疫苗研发的核心靶点^[14-15]。至今,研究学者已成功实现将VP2蛋白介入细菌(乳酸菌、沙门菌等)、真菌(酵母等)和病毒(疱疹病毒等)表达系统中并成功表达^[16-17]。艾美耳球虫是研究寄生虫生物学和免疫学特征的模式生物,被认为是表达病原体抗原的疫苗递送载体,其会在鸡和哺乳动物中引发外来抗原特异性免疫反应^[18]。随着球虫反向遗传技术的不断发展,转基因球虫已成功从瞬时转染跨越至稳定转染阶段,2012年索勋课题组系统全面地比较分析转基因柔嫩艾美耳球虫及其受体-野生型柔嫩艾美耳球虫结果显示两者虽存在一定的株间差异,但转基因柔嫩艾美耳球虫的生

物学特性未发生显著改变,指示可对球虫进行基因操作^[19]。

大量研究指出,CRISPR/Cas9系统能够有效应用于球虫基因组的编辑与改造,为球虫的遗传操作提供了新的工具和可能性^[11,20]。本研究尝试利用CRISPR/Cas9技术将IBDV VP2基因定点整合至柔嫩艾美耳球虫基因组的特定位点。然而,在预期的T-DNA插入位点未检测到同源臂相关的扩增产物。通过全基因组重测序发现,VP2基因实际整合于基因组序列HG994969.1的第2 705 529位点,较预期插入位点后移约100 bp。该结果提示目的基因的插入可能并未通过经典的同源重组机制介导,而可能依赖于微同源介导的末端连接(MMEJ)或非同源末端连接(NHEJ)等修复途径,这也反映出在球虫中开展精准基因编辑可能面临修复机制不确定性的挑战。该结果强调在球虫中进行CRISPR/Cas9编辑后需通过测序手段确认整合位点,并提示未来应优化同源臂设计或结合抑制NHEJ策略,以提高定点整合的准确性。为提高整合效率和精准度,未来研究可考虑采用更长同源臂模板、引入同源重组增强因子,或探索球虫中DNA修复通路的调控机制。本试验中转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et*-VP2)3代荧光率升高至95%,后代群体稳定表达,推测该整合位点适配于柔嫩艾美耳球虫的基因组,这为球虫遗传操作提供数据支持。



Et-WT. 野生柔嫩艾美耳球虫孢子; *Et*-VP2. 转基因柔嫩艾美耳球虫孢子(标尺=20 μm)

Et-WT. Wild-type *E. tenella* sporozoites; *Et*-VP2. Transgenic *E. tenella* sporozoites (Bar=20 μm)

图6 VP2蛋白在球虫孢子中的间接免疫荧光表达定位

Fig. 6 Indirect immunofluorescence expression localization of VP2 protein in coccidian sporozoites

顶复门原虫在入侵宿主时其中一些分泌器官发挥着很关键的作用,微线体便是其中重要的一员,微线体分泌的蛋白参与细胞膜的黏附、入侵和协助形成纳虫空泡^[21-22]。考虑到能否将外源蛋白与

微线体蛋白联合表达的策略,通过微线体的外分泌作用实现抗原的表达。本试验通过柔性基因 linker 连接堆型艾美耳球虫微线体蛋白 Mic2 与 VP2 基因,将其导入柔嫩艾美耳球虫(*Et*-M2e),结果显示

在基因和蛋白水平上均能表达,此结果揭示球虫可作为表达外源蛋白的活载体的可行性。结果也表明顶复门原虫中微线体蛋白表达存在一定的保守性。间接免疫荧光试验观察到 Mic2 和 VP2 蛋白能在球虫表达,主要分布于子孢子的顶端,这与先前研究结果一致^[12,23]。本研究结果为球虫疫苗研究提供科学依据。

4 结 论

本研究成功构建并鉴定了一株表达 IBDV VP2 蛋白的转基因柔嫩艾美耳球虫(*Et-VP2*),实现外源基因的 stable 整合与表达。该研究为利用球虫作为疫苗载体提供了科学依据,为开发新型传染性法氏囊病疫苗奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] LETZEL T, COULIBALY F, REY F A, et al. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus [J]. *J Virol*, 2007, 81(23):12827-12835.
- [2] BRISSE M, VRBA S M, KIRK N, et al. Emerging concepts and technologies in vaccine development[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:583077.
- [3] 杨宵玥,陈 玲,宋亚芬,等. 鸡传染性法氏囊病新型疫苗的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(5): 79-85.
YANG X Y, CHEN L, SONG Y F, et al. Advances in the research of novel vaccines for infectious bursal disease in chickens[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2018, 52(5):79-85. (in Chinese)
- [4] 郝力力,刘贤勇,周晓燕,等. 表达并运送重大禽病病毒蛋白的转基因球虫体系——一种高效诱导保护性粘膜免疫和细胞免疫的大容量活载体疫苗生产体系[C]. 中国畜牧兽医学学会家畜寄生虫学分会第九次学术研讨会论文摘要集,中国农业大学动物医学院, 2006:62.
HAO L L, LIU X Y, ZHOU X Y, et al. Transgenic coccidian system expressing and delivering major avian pathogen proteins—a high-capacity live vector vaccine production system for efficiently inducing protective mucosal and cellular immunity [C]. Abstracts of the Ninth Academic Symposium of the Parasitology Branch of the Chinese Society of Animal Science and Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, 2006:62. (in Chinese)
- [5] 段春慧,汤新明,张思新,等. 艾美耳球虫转基因技术研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 272-278.
DUAN C H, TANG X M, ZHANG S X, et al. Advances in transgenic technology of *Eimeria* [J]. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 2018, 25(4):272-278. (in Chinese)
- [6] 梁瑞英,索静霞,梁 琳,等. 艾美耳球虫的遗传操作:平台建立、应用与展望[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(8):3362-3373.
LIANG R Y, SUO J X, LIANG L, et al. Genetic manipulation of *Eimeria*: platform establishment, applications, and prospects [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55 (8) : 3362-3373. (in Chinese)
- [7] 张思新,汤新明,李 超,等. 我国鸡球虫病疫苗研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 254-261.
ZHANG S X, TANG X M, LI C, et al. Advances in research on coccidiosis vaccines for chickens in China [J]. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 2018, 25(4):254-261. (in Chinese)
- [8] LIU X, SHI T, REN H, et al. Restriction enzyme-mediated transfection improved transfection efficiency *in vitro* in Apicomplexan parasite *E. tenella* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2008, 161(1):72-75.
- [9] 郝振凯,汤新明,张媛媛,等. 利用二代测序技术对柔嫩艾美耳球虫 T-DNA 整合位点的分析及鉴定 [J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(8):183-190.
HAO Z K, TANG X M, ZHANG Y Y, et al. Analysis and identification of T-DNA integration sites in *E. tenella* using next-generation sequencing technology [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(8):183-190. (in Chinese)
- [10] LIU X, ZOU J, YIN G, et al. Development of transgenic lines of *E. tenella* expressing M2e-enhanced yellow fluorescent protein (M2e-EYFP) [J]. *Vet Parasitol*, 2013, 193(1-3):1-7.
- [11] 汤新明. 基于 CRISPR/Cas9 系统的艾美耳球虫基因编辑体系的建立[D]. 北京:中国农业科学院, 2020.
TANG X M. Establishment of a gene editing system for *Eimeria* based on the CRISPR/Cas9 platform [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020. (in Chinese)
- [12] YU Y, TANG X, DUAN C, et al. Microneme-located VP2 in *E. acervulina* elicits effective protective immunity against infectious bursal disease virus [J]. *Infect*

- Immun*, 2024, 92(2):e0045623.
- [13] VÔ T C, NAW H, FLORES R A, et al. Genetic diversity of microneme protein 2 and surface antigen 1 of *E. tenella* [J]. *Genes*, 2021, 12(9):1418.
- [14] LIU T, LIN L, PAN Y, et al. Construction and efficacy of recombinant Newcastle disease virus co-expressing VP2 and VP3 proteins of very virulent infectious bursal disease virus [J]. *Poult Sci*, 2025, 104(1):104388.
- [15] WANG G, JIANG N, YU H, et al. Loop P(DE) of viral capsid protein is involved in immune escape of the emerging novel variant infectious bursal disease virus [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 293:110094.
- [16] 贾艳艳, 刘莎莎, 丁 轲, 等. 表达 NDV HN 和 IBDV VP2 融合蛋白的重组减毒沙门菌的构建及其生物学特性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(6): 567-572.
- JIA Y Y, LIU S S, DING K, et al. Construction and biological characterization of recombinant attenuated salmonella expressing NDV HN and IBDV VP2 fusion protein [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(6):567-572. (in Chinese)
- [17] 赵海棋. IBDV VP2 基因重组火鸡疱疹病毒的构建及免疫分析 [D]. 邯郸: 河北工程大学, 2024.
- ZHAO H Q. Construction and immunological analysis of recombinant herpes virus of Turkey carrying IBDV VP2 gene [D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2024. (in Chinese)
- [18] TANG X, YIN G, QIN M, et al. Transgenic *E. tenella* as a vaccine vehicle: expressing TgSAG1 elicits protective immunity against *Toxoplasma gondii* infections in chickens and mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29379.
- [19] 李秋明, 张 嵩, 李 喆, 等. 表达 M2e-EYFP 融合蛋白的转基因柔嫩艾美耳球虫生物学特性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(7):14-17.
- LI Q M, ZHANG S, LI Z, et al. Analysis of the biological characteristics of transgenic *E. tenella* expressing the M2e-EYFP fusion protein [J]. *China Veterinary Science*, 2013, 49(7):14-17. (in Chinese)
- [20] 肖 琴, 曲自刚, 李文卉, 等. CRISPR/Cas9 技术在构建荧光标记柔嫩艾美耳球虫 β -微管蛋白敲入虫株上的应用 [J]. 中国兽医科学, 2024, 54(6):742-748.
- XIAO Q, QU Z G, LI W H, et al. Application of CRISPR/Cas9 technology in constructing fluorescently labeled *E. tenella* β -tubulin knockin strain [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 54(6):742-748. (in Chinese)
- [21] 吴 燕, 楚越涵, 李 瑾, 等. 顶复门原虫细胞外囊泡的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2025, 20(6): 813-817.
- WU Y, CHU Y H, LI J, et al. Research progress on extracellular vesicles of *Apicomplexan* parasites [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2025, 20(6):813-817. (in Chinese)
- [22] 戚南山, 孙铭飞, 廖申权, 等. 顶复门原虫入侵相关因子的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(2):167-174.
- QI N S, SUN M F, LIAO S Q, et al. Research progress on invasion-related factors of *Apicomplexan* parasites [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(2):167-174. (in Chinese)
- [23] GUO Q, YU Y, SUO J, et al. Oral delivery of *E. acervulina* transfected sequentially with two copies of the VP2 gene induces immunity against infectious bursal disease virus in chickens [J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11:1367912.

(编辑 白永平)