



山羊支原体山羊肺炎亚种膜表面蛋白P4的制备及免疫原性评价

梁晋嘉^{1,2}, 郝华芳^{1,2*}, 陈胜利^{1,2}, 陈睿^{1,2}, 雒明阳^{1,2}, 张一帆^{1,2}, 兰仕梅^{1,2}, 储岳峰^{1,2*}

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 兰州 730000;

2. 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 兰州 730046)

摘要: 旨在评估山羊支原体山羊肺炎亚种(*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp)膜表面蛋白P4的免疫原性和作为疫苗候选抗原的潜力。前期实验室筛选出Mccp的膜表面蛋白P4,本研究利用原核表达系统制备重组蛋白,纯化后与佐剂混合乳化制备疫苗,在山羊上进行免疫攻毒实验,通过临床症状、病理变化、血清抗体、肺脏载菌量、细胞因子等评价免疫效果。结果表明:成功表达纯化rP4蛋白,能够与His标签抗体、rP4多克隆抗体和Mccp感染抗体发生特异性反应;免疫动物能够刺激山羊产生高水平的抗体,但没有减轻临床症状,山羊存活率只有40%,与PBS对照组相同;病理学观察显示无论是急性还是慢性病例,P4组都要比PBS对照组更严重;肺脏载菌量高于全菌灭活组和PBS对照组;血清细胞因子结果显示P4组免疫后上调IL-2,下调IL-4水平。本研究成功表达纯化了rP4,制备疫苗免疫山羊能够诱导高水平抗体,但不能保护山羊免受Mccp的攻毒,甚至会加重病变。研究结果为山羊传染性胸膜肺炎新型疫苗的设计研制提供了参考。

关键词: 山羊传染性胸膜肺炎;山羊;疫苗;免疫保护评价;细胞因子

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1063-11

Preparation and Immunogenicity Evaluation of Membrane Surface Protein P4 of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum pneumoniae*

LIANG Jinjia^{1,2}, HAO Huafang^{1,2*}, CHEN Shengli^{1,2}, CHEN Rui^{1,2}, LUO Mingyang^{1,2},
ZHANG Yifan^{1,2}, LAN Shimei^{1,2}, CHU Yuefeng^{1,2*}

(1. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, China)

Abstract: This study aims to evaluate the immunogenicity of membrane surface protein P4 from *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) and its potential as a candidate antigen for vaccine. Preliminary laboratory work identified the membrane surface protein P4. In this study, recombinant protein was prepared using a prokaryotic expression system, after purification, the recombinant protein was emulsified with an adjuvant to prepare vaccine. Immunization and challenge

收稿日期: 2025-03-10

基金项目: 甘肃省科技重大专项(23ZDNA007); 甘肃省2024年度重点人才项目(2024RCXM36); 中国农业科学院创新工程项目(CAAS-ASTIP-2021-LVRI)

作者简介: 梁晋嘉, 硕士生, 主要从事支原体疫苗研究, E-mail: lj493679138@163.com, Tel: 010-62815987

* 通信作者: 郝华芳, 主要从事动物支原体病原学、致病免疫机制及防控技术研究, E-mail: haohuafang@caas.cn; 储岳峰, 主要从事动物支原体病、布鲁菌病和结核病防控研究, E-mail: chuyuefeng@caas.cn

experiments were conducted on goats, and the immune efficacy was evaluated based on clinical symptoms, pathological changes, serum antibodies, bacterial load in lung, and cytokines. The results showed that the rP4 protein was successfully expressed and purified, and could specifically react with the His-tag antibody, rP4 polyclonal antibody and Mccp infection antibody. Immunization with the rP4 stimulated high levels of antibody production in goat but did not alleviate clinical symptoms, with a survival rate of only 40%, the same as the PBS control group. Pathological observations indicated that both acute and chronic cases in the P4 group were more severe than those in the control group. The average bacterial load in the lungs was higher in the P4 group than that in the inactivated vaccine group and the PBS control group. Serum cytokines analysis revealed that the P4 group had upregulated IL-2 level and downregulated IL-4 level post-immunization. In conclusion, this study successfully expressed and purified rP4 and the prepared P4 protein induced antibody production in goats but failed to protect them from Mccp challenge, even exacerbating the pathogenic effects of Mccp on the goats. The findings provide a reference for the design and development of future new type vaccines for contagious caprine pleuropneumonia.

Keywords: Contagious caprine pleuropneumonia; goat; vaccine; immune protection evaluation; cytokine

* **Corresponding authors:** HAO Huafang, E-mail: haohuafang@caas.cn; CHU Yuefeng, E-mail: chuyuefeng@caas.cn

山羊传染性胸膜肺炎 (Contagious caprine pleuropneumonia, CCPP) 是由山羊支原体山羊肺炎亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp) 引起的高度接触性传染病^[1], 诱发山羊、绵羊^[2]的呼吸道症状可演变为致命性急性或慢性胸膜肺炎, 急性型疾病的特点是单侧纤维性胸膜肺炎伴严重胸腔积液^[3]。世界动物卫生组织 (World Organization of Animal Health, WOAH) 将 CCPP 列为法定报告动物传染病之一, 在我国被列为二类传染病。尤其近年来, CCPP 在我国的报道逐渐增多, 流行范围逐渐扩大, 并有越来越多的证据显示, 野生反刍动物如野生山羊、瞪羚、藏羚羊、阿拉伯大羚羊能被感染^[4]。目前该病的防控产品主要有组织灭活疫苗和菌体灭活疫苗^[5-6]。长期以来, 虽然灭活疫苗在疾病防控中起了很大的作用, 但由于 Mccp 的菌体生长缓慢、活菌滴度较低、需要在培养基中添加大量的马血清等成分, 这导致 CCPP 疫苗的生产成本很高^[7], 且组织灭活苗生产存在抗原制备工艺复杂、生物安全风险等问题, 严重限制了 CCPP 疫苗的大量生产和推广应用, 目前迫切需要改进现有疫苗。

支原体对宿主动物致病首先开始于对机体细胞的定殖, 支原体没有细胞壁, 通过不同的膜结构或膜蛋白黏附在表层细胞上^[8], 此后激活免疫系统

并刺激炎症和氧化级联反应引起广泛的浆液性炎症和液体渗出^[9]。支原体细胞膜上的脂蛋白、半乳糖、多糖是主要抗原^[10], 也是毒力因子。病原体的毒力因子是其致病的关键因素, 同时也是新型疫苗的重要靶标。本实验室团队在基因组学和免疫蛋白组学等分析基础上, 结合生物信息学分析对 Mccp 全基因组进行系统分析, 结果筛选出一种潜在的疫苗靶标 P4 蛋白。本研究拟对其进行蛋白表达纯化, 并免疫山羊进行免疫原性分析, 通过对存活率、临床症状、剖检变化、组织病理、抗体水平、载菌量、细胞因子等指标进行分析, 以评价其免疫保护效果及机体的免疫反应, 为 CCPP 新型疫苗设计和研制提供试验数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选取 15 只 3~4 月龄、体重在 15 kg 左右的健康山羊, 无 Mccp 和布鲁氏菌感染, 无 CCPP 疫苗免疫史, 购自甘肃某羊场。

1.2 菌株与质粒

Mccp M1801 菌株由中国农业科学院兰州兽医研究所分离保存。P4 蛋白是 PDxPFG protein (Genbank: WP_019269141), 重组质粒 pET-30a-P4 由本实验室构建和保存。

1.3 主要试剂和仪器

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞、Premix Ex Taq™(Probe qPCR)均购自 TaKaRa 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、硫酸卡那霉素均购自索莱宝生物公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、BCA 定量试剂盒、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自上海碧云天生物技术有限公司;His-Tag 抗鼠单克隆抗体购自 proteintech 公司;高亲和镍充填树脂填料购自南京金斯瑞生物有限公司;三色预染蛋白 Marker 购自 SMOBIO 公司;PPLO 肉汤购自美国 BD-Pharmingen 公司;马血清购自 Gibco 公司;丙酮酸钠购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗山羊 HRP-IgG 购自 Sigma-Aldrich 公司;组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;细胞因子试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司;山羊支原体山羊肺炎亚种间接 ELISA 抗体检测试剂盒购自兰州兽研生物科技有限公司。

主要仪器:SCIENTZ-950E 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司);实时荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司);全波长多功能微孔板检测仪/酶标仪(TECAN 公司)。

1.4 蛋白的表达与纯化

将重组质粒 pET-30a-P4 转入感受态细胞 BL21(DE3)中,涂布于卡那霉素抗性 LB 固体培养基上,37 °C 静置过夜培养。挑取单菌落转接至 LB 液体培养基中(含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素),37 °C 摇床培养 12 h,后按 1:100 转接至 100 mL 新鲜 LB 培养基,37 °C 震荡培养至 OD_{600 nm} 为 0.6 左右加入终浓度为 0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG,16 °C 下诱导 16 h。收集菌体,用含有 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的裂解液进行重悬,超声破碎后,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 收集上清,与镍柱结合后用不同浓度的咪唑洗涤液进行纯化。通过 SDS-PAGE 分析,选择纯度和浓度高的洗脱液进行透析去除咪唑,BCA 测定蛋白浓度,-80 °C 保存备用。

1.5 Western blot 分析

将纯化的蛋白 rP4 在 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜,PVDF 膜在 5% 的 BSA 中室温封闭 2 h,分别以抗 His 标签的鼠单克隆抗体、抗 rP4 多克隆抗体以及山羊感染 Mccp 后的血清作为一抗(稀释比均为 1:20 000),在室温孵育 1 h。洗膜后,以抗 His 标签的鼠单克隆抗体作为一抗的,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,稀释比为 1:20 000;抗

rP4 多克隆抗体和山羊感染 Mccp 后的血清作为一抗的,加入 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 抗体,稀释比为 1:20 000,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;避光加入显色液显色,显色完毕后观察分析结果。

1.6 动物免疫及攻毒试验

1.6.1 菌液培养 将冻存的 Mccp 菌株用改良 MTB 培养基以 1:9 比例复苏与传代,37 °C 温箱中静置培养至培养基颜色由红色变为黄色。攻毒菌液在培养至对数生长后期进行 20 倍浓缩,在 96 孔板中进行 10 倍梯度稀释测定菌液滴度^[11]。

1.6.2 疫苗制备 全菌灭活疫苗制备是将培养好的 Mccp 菌液离心,用无菌 PBS 离洗 2 次,除去菌体以外的成分,PBS 重悬后测定全菌蛋白浓度,调整至合适的蛋白浓度,灭活后与 ISA201 佐剂进行乳化,制备疫苗。纯化的 rP4 蛋白按照上述方法与佐剂进行乳化制备疫苗,同时制备 PBS 佐剂作为对照组。

1.6.3 动物免疫与攻毒 将 15 只山羊随机分成 3 组,每组 5 只,分别为 P4 蛋白组、全菌灭活组和 PBS 对照组。通过颈部肌肉注射的方式进行免疫,每次免疫剂量为 2 $\text{mL}\cdot\text{只}^{-1}$ 。在第一次免疫 14 d 后进行第二次免疫;二免后 21 d 进行攻毒。参考文献[12]的方法进行攻毒,攻毒剂量 10⁸ CCU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。攻毒后死亡动物进行剖检和取样,未死亡动物在攻毒后 30 d 进行剖检。

1.6.4 免疫效力评估 攻毒后每天测直肠体温、心率和呼吸频率,并观察相应的临床症状如呼吸、精神状态、行为活动、饮食等,记录死亡情况。每周测量体重、采集血清和鼻拭子。对死亡的动物进行剖检,观察胸腔和肺病变,采集胸水(若有),进行 Mccp PCR 检测和滴度测定;采集肺健康和病变交界处组织固定进行后续的组织病理学观察;统一采集右尖叶样品进行肺脏载菌量测定和病原分离^[6,13]。

1.6.5 血清中特异性抗体水平检测 免疫前和免疫后每周采集非抗凝血分离血清保存,利用间接 ELISA 方法测定血清中 Mccp 抗体,以及 P4 蛋白特异性抗体水平。简述如下:rP4 重组蛋白以 3.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 包被 96 孔酶标板,37 °C 温箱放置 1 h 后,4 °C 过夜;洗涤封闭后加入待检血清,37 °C 孵育 1 h;洗涤后以 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 为二抗,37 °C 孵育 1 h,洗涤后 TMB 显色,2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂SO₄

作为终止液在酶标仪上在 450 nm 读取 OD 值。

1.6.6 血清细胞因子水平 分别采集免疫前(免疫第 0 d)、二免前(免疫第 14 d)和攻毒前(免疫第 35 d)血清,采集的血清用商品化的试剂盒检测细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 水平。

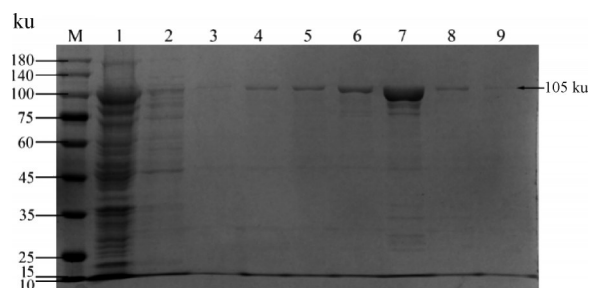
1.7 数据分析

数据采用 Graphed Prism 10 软件进行数据统计分析和图表绘制,结果表示为“平均数 $\pm$ 均值标准差”。采用单向或者双向方差分析(ANOVA)和 T 检验对组间进行差异分析(* $P < 0.05$)。

2 结果

2.1 重组蛋白纯化及鉴定

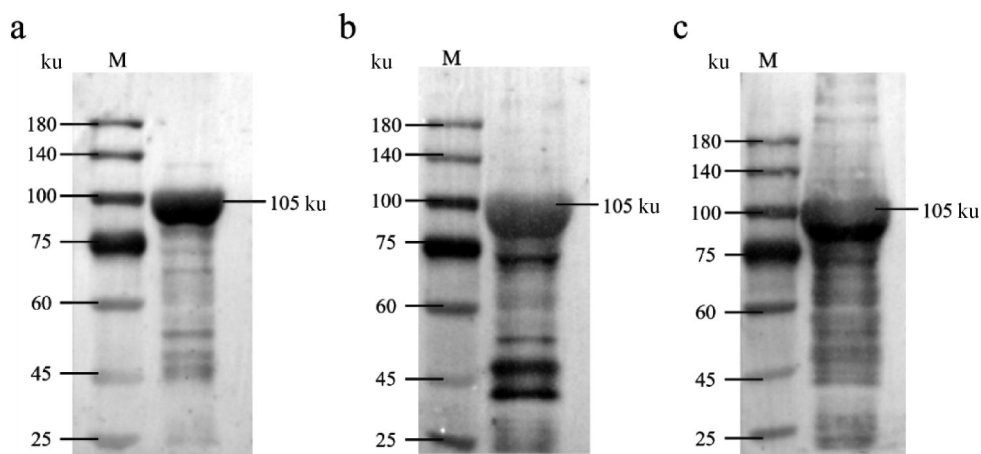
重组蛋白 rP4 为可溶性表达,用不同浓度咪唑洗脱液洗脱和镍株结合的蛋白,通过 SDS-PAGE 分析可知在 200 mmol $\cdot$ L⁻¹咪唑洗脱液下目的蛋白最容易洗脱下来,成功获得与目标蛋白大小 105 ku 相符的重组蛋白(图 1)。分别用抗 His 标签的鼠单克隆抗体、抗 rP4 多克隆抗体以及山羊感染 Mccp 后的血清作为一抗进行 Western blot 分析,结果显示在 rP4 蛋白相应的分子质量位置出现显色带(图 2)。



M. 蛋白分子质量标准;1. 流穿液;2~5:20、40、60、80 mmol $\cdot$ L⁻¹咪唑洗涤液;6~9. 100、200、300、1 000 mmol $\cdot$ L⁻¹咪唑洗脱液
M. Protein molecular weight Marker; 1: Lysis buffer; 2-5. 20, 40, 60, 80 mmol $\cdot$ L⁻¹ Imidazole Wash buffer; 6-9. 100, 200, 300, 1 000 mmol $\cdot$ L⁻¹ Imidazole Elution buffer

图 1 重组蛋白 rP4 的纯化结果

Fig. 1 The purification results of recombinant protein rP4



a. rP4 蛋白与 His 标签抗体的反应;b. rP4 蛋白和 Mccp 感染血清的反应;c. rP4 蛋白与 rP4 多克隆抗体的反应

a. rP4 protein reaction with His-tag antibody; b. rP4 protein reaction with Mccp infection serum; c. rP4 protein reaction with anti-rP4 polyclonal antibody

图 2 重组蛋白 rP4 的 Western blot 分析结果

Fig. 2 The results of the Western blot analysis of the recombinant protein rP4

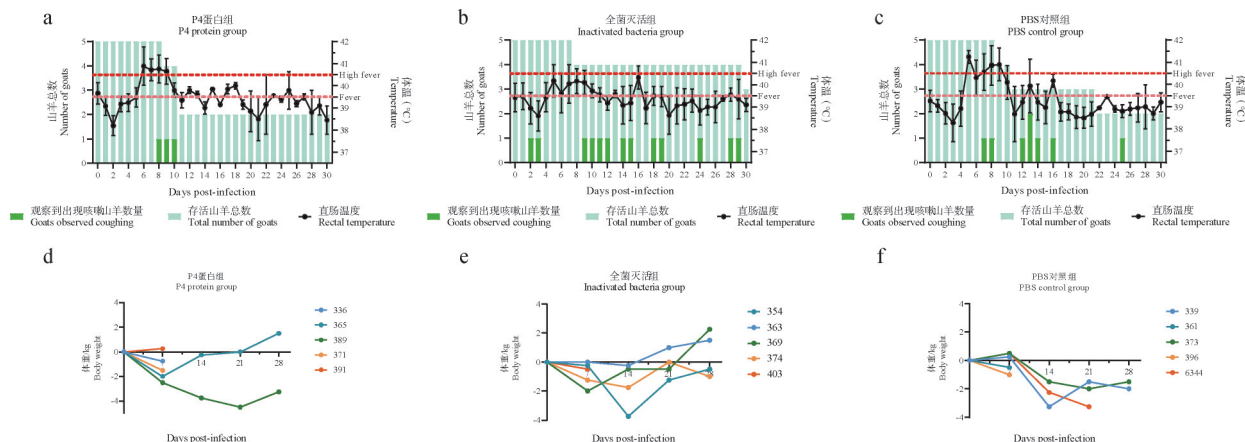
2.2 临床症状监测和存活率

攻毒 1 周后山羊体温出现明显升高,全菌灭活

组体温明显低于其他组,在攻毒两周后各组动物体温开始有所恢复。攻毒后各组羊均出现发热、咳

嗽、食欲下降和精神状态不佳等症状。攻毒1周后体重也出现下降,在2~3周后体重开始有所恢复,全菌灭活组体重下降幅度相比较其他组较小(图3)。直至观察结束,P4蛋白组、全菌灭活组和PBS对照

组的存活率分别是40%、60%、40%(图4)。结果显示P4蛋白组在临床症状表现上并没有提供良好的免疫保护效果,全菌灭活组有一定的保护作用。



a~c. 平均直肠温度与整个观察期间的山羊咳嗽数量;d~f. 以0 dpi作为基线测量每周体重变化

a-c. The mean rectal temperature and the number of goat coughs recorded throughout the observation period; d-f. Weekly body weight changes were measured at 0dpi as a baseline

图3 动物临床症状监测

Fig. 3 Clinical symptom monitoring

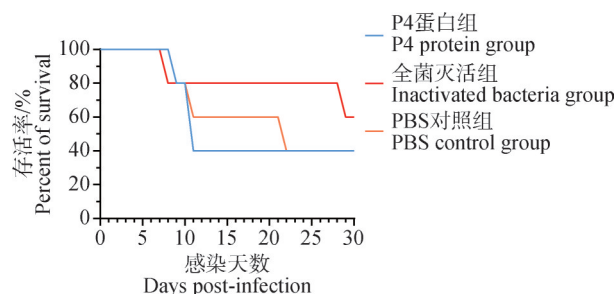


图4 山羊的存活率

Fig. 4 Survival rate of goats

2.3 大体病变及组织病理学观察

临床症状和病程以14 d为基准进行判断,存活时间 ≤ 14 dpi为急性型,存活时间 > 14 dpi的为慢性型^[14],参考文献^[15]并结合病程对大体病变和组织病变的典型症状进行归纳整理,确定评分标准(表1)。P4蛋白组中3只为急性型,出现胸腔积液和胸膜粘连,左右肺叶均呈大范围酒红色肝实变;组织学检查显示肺泡结构消失、大量坏死细胞碎片,肺泡壁毛细血管和间质血管充血。慢性型无胸腔积液,但有胸膜粘连,肺以右尖叶干酪样病变为主,组织病变表现纤维结缔组织增生和大范围肺泡实质化。全菌灭活组只有一只山羊为急性型,右尖叶和右心叶肝变明显,慢性型肺有少量干酪样病

变,肺泡结构清晰,呼吸道周围出现淋巴细胞浸润;PBS对照组中急性型有2只,出现胸腔积液,左右肺尖叶和心叶出现肺实变;组织学观察结构出现多灶性实质化,伴随肺泡壁毛细血管充血;慢性型为散在干酪样病变,组织学检查多见肺泡出现实质化(图5)。评分结果显示,P4蛋白组病理变化在3组内最严重(图6)。

2.4 血清中特异性抗体水平检测

分别对采集的血清进行Mccp特异性抗体和rP4蛋白相应抗体检测(图7)。结果显示,以rP4为抗原检测免疫山羊的抗体效价,在免疫两周后血清抗体明显上升,并且在免疫后两个月内都保持高的抗体水平,证明P4蛋白有良好的免疫原性。全菌灭活组在免疫后14 d血清中Mccp的抗体呈阳性,对照组则在攻毒两周后血清中Mccp抗体呈现阳性。

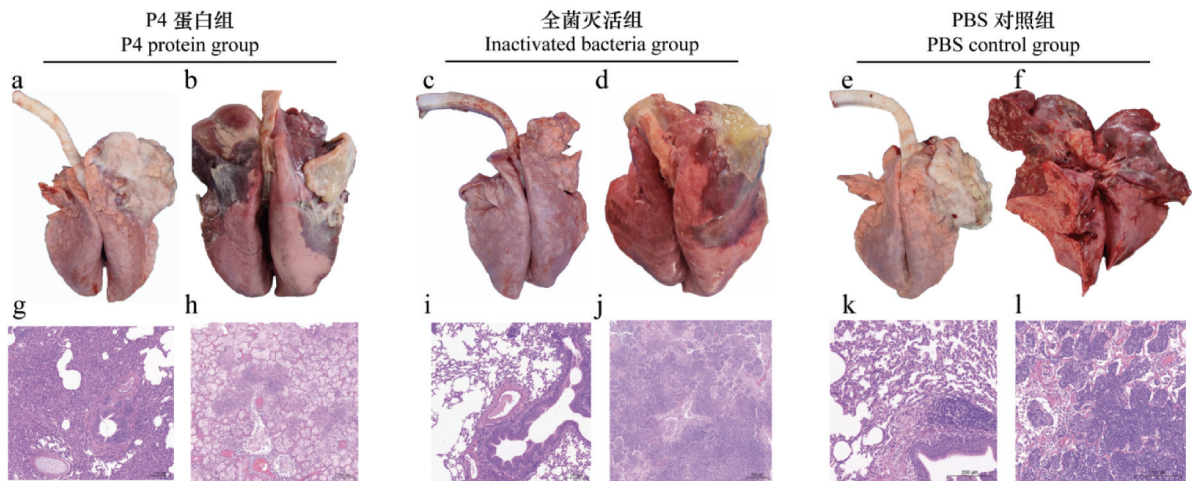
2.5 肺组织病原分离和载菌量

取攻毒后山羊的肺组织进行载菌量测定,各组均可检测到Mccp DNA,其中P4蛋白组肺的载菌量最高,PBS对照组次之,全菌灭活组最低(图8)。此外,从胸水样品中可检测到病原Mccp,其中P4蛋白组中胸水Mccp滴度可以到达 10^7 CCU $\cdot$ mL⁻¹(表2)。

表 1 试验动物的大体病变和组织病变评分标准

Table 1 The criteria for gross lesion and histopathological lesion scoring of experimental animals

病变类型 Type of lesion	分值 Score			
	0	1	2	3
肺组织损伤 Pulmonary tissue damage	无明显变化	尖叶出现肝变或者干酪样病变	尖叶和心叶,有时蔓延至副叶出现肝变或干酪样病变	肝变大范围出现,蔓延至膈叶
肺脏颜色 Pulmonary color	粉红	苍白	暗红	暗红且有出血斑
肺组织与胸腔黏连 Adhesion of pulmonary tissue to the pleural cavity	无	轻微黏连	大范围黏连	—
胸腔积液 Pleural effusion	无	较少	适中	较多
组织病理学变化 Histopathological changes	肺泡壁由单层肺泡细胞组成	多灶性肺泡壁增厚、多灶性实质化、肺泡充满纤维素蛋白	肺泡结构消失、可见大量坏死细胞、大范围实质化	肺泡壁毛细血管及间质血管充血
感染后存活时间(dpi) Survival time after infection (dpi)	剖杀前未死亡 (30dpi)	21 dpi<存活时间<30 dpi	14 dpi<存活时间≤21 dpi	存活时间≤14 dpi



a~f. 肺部大体病变图像,其中a,c和e为慢性病例,b,d和f为急性病例;g~l. 相应的肺部组织病理学图像(100×)
a-f. Gross images of pulmonary lesions, where a, c, and e are chronic cases, b, d, and f are acute cases; g-l. Corresponding histopathological images of lung tissue (100×)

图5 动物病理学观察

Fig. 5 Pathological observation of experimental animals

2.6 血清细胞因子水平

采集不同时间血清进行细胞因子检测。结果显示,P4蛋白组 IL-2第35天显著高于第0天,而IL-4第35天显著低于第0天,IL-10虽在免疫后呈现上升趋势但是不显著,IFN-γ均未检测到(图9)。血清中IL-4的显著降低和IL-2的显著增加可能表明P4蛋白在一定程度上诱导了Th1型免疫反应的增强,抑制了Th2型反应。

3 讨论

CCPP是WOAH法定报告动物疫病,在我国被列为二类动物疫病。根据中国农业农村部疫情发布数据,从2023年初至2024年CCPP多次占据二类主要动物疫病报告发病数前三位,目前对于疫病最好的防控依旧是疫苗免疫。1958年,传统组织灭活疫苗曾起到很大作用,但是该疫苗制备方法导致的

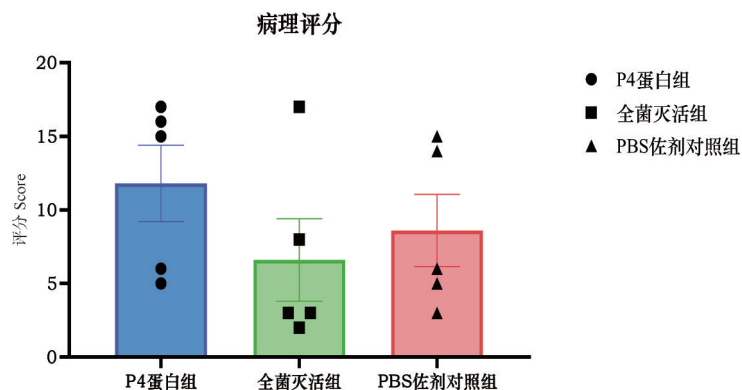
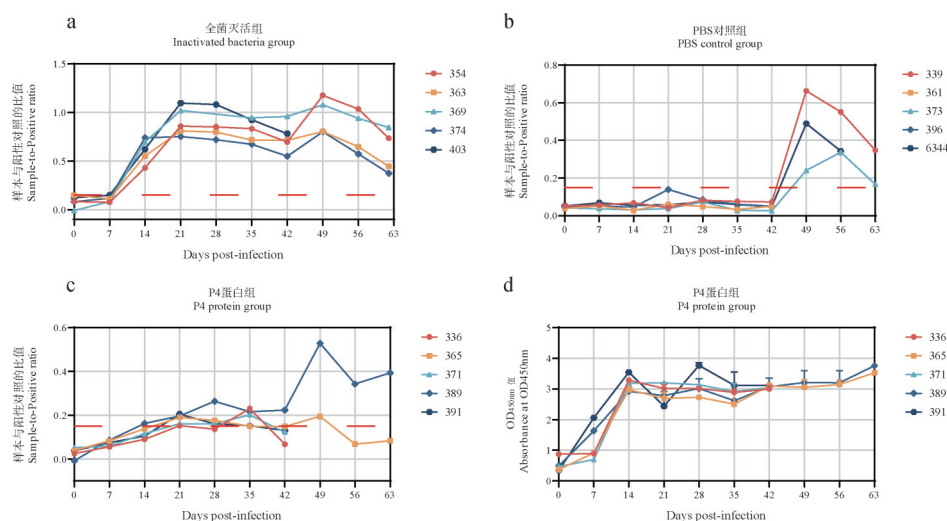


图6 病理评分

Fig. 6 Pathological scoring



a~c. 血清 Mccp 抗体水平; d. P4 蛋白组血清 rP4 抗体水平

a-c. Serum levels of antibodies against Mccp; d. Serum IgG antibody levels of P4 protein group

图7 动物血清中特异性抗体水平检测

Fig. 7 Evaluation of the levels of specific antibodies in sera

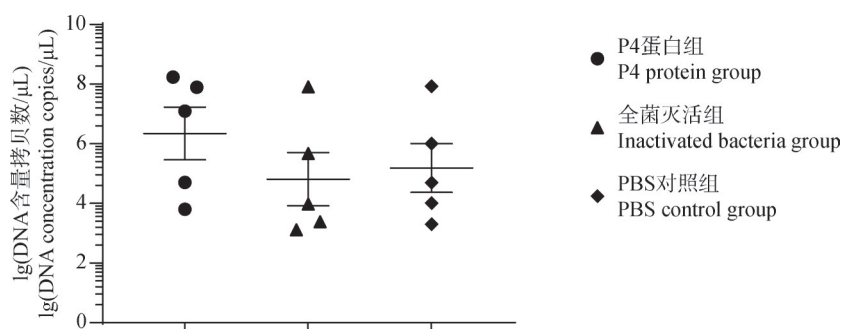


图8 肺部载菌量

Fig. 8 Lung bacterial load

生物安全风险问题和不同批次质量难以保证。菌体培养物灭活疫苗虽然很大程度避免了组织灭活疫苗的问题,但是由于支原体生长缓慢,培养需要大量的马血清,其生产成本低,且灭活疫苗中常有

其他成分污染^[16],推广受到严重限制。Mccp 疫苗急需产品升级换代。

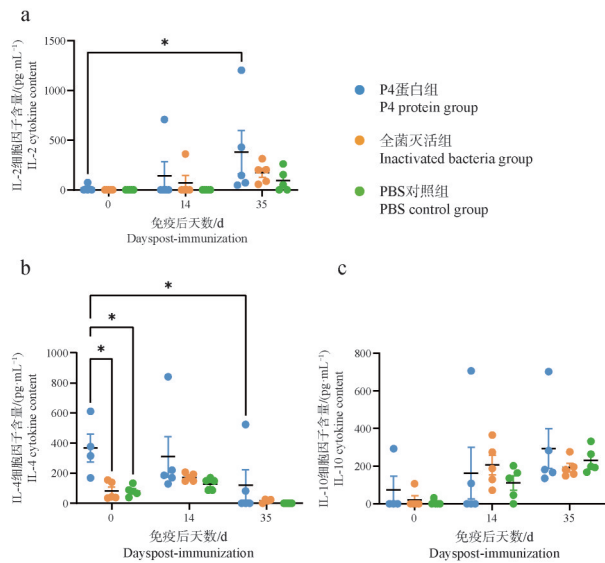
通过 SDS-PAGE 分析,重组蛋白 rP4 在 200 mmol·L⁻¹咪唑下较容易洗脱。rP4 分别和 His

表 2 肺部病原分离结果和胸水 Mccp 滴度

Table 2 Results of pulmonary pathogen isolation and pleural Mccp tiration

组别 Group	编号 No.	病料是否分离出 Mccp Is Mccp isolated from the diseased material	胸水中 Mccp 滴度/(CCU·mL ⁻¹) Mccp titer in pleural liquid
P4 蛋白组 P4 protein group	336	+	6.15×10 ⁶
	365	—	—
	371	—	—
	389	—	—
	391	—	1.925×10 ⁷
全菌灭活组 Inactivated bacteria group	354	—	—
	363	—	—
	369	—	—
	374	+	—
	403	—	1.775×10 ⁴
PBS 对照组 PBS control group	339	—	—
	361	—	4.91×10 ⁷
	373	—	—
	396	—	1.925×10 ⁵
	6344	—	—

“+”表示检测结果为阳性;“—”表示检测结果为阴性
“+” indicates a positive test result; “—” indicates a negative test result



a. IL-2 细胞因子水平; b. IL-4 细胞因子水平; c. IL-10 细胞因子水平。*. $P < 0.05$
a. IL-2 cytokine levels; b. IL-4 cytokine levels; c. IL-10 cytokine levels. *. $P < 0.05$

图 9 免疫后血清中细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10 水平检测

Fig. 9 Evaluation of the levels of IL-2, IL-4 and IL-10 cytokines of the sera of immunized animals

标签抗体、P4 多抗血清以及 Mccp 攻毒后的血清进行 Western blot 验证,发现均可以在目的蛋白出现显色带;但是和 P4 多抗血清及 Mccp 攻毒后血清的 WB 验证中出现杂带。这可能是 Mccp 攻毒后血清中的抗体与重组 P4 蛋白的某些结构域或其他蛋白

片段发生非特异性结合;P4 多抗血清是通过免疫动物获得的,可能包含针对 P4 蛋白不同表位的抗体,其中部分抗体可能识别了非特异性抗原或蛋白片段,或表明多抗血清的制备过程中可能存在一些非特异性抗体的残留。

P4蛋白为筛选的潜在疫苗靶标,免疫山羊后产生特异抗体,在免疫14 d后上升,整个试验期间抗体水平一直维持高水平,但其产生的特异性抗体可能不一定是有效的中和抗体。P4蛋白组免疫后在临床症状、存活率等方面并无改善,大体病变和组织病理变化观察P4蛋白组无论是急性还是慢性病例都要比PBS组严重,肺的载菌量虽然没有显著性差异,但是P4蛋白组均值要高于其余组。这种现象推测可能是引发了抗体依赖性增强作用,具体作用还需要进一步验证。

在本研究中,免疫后,山羊血清中的IL-4显著下调,而IL-2显著上调,提示诱导了偏向Th1应答,可能导致Th1/Th2失衡。这种失衡可能引发过度的细胞免疫反应,从而引起组织损伤。这种现象可能是由免疫蛋白本身引起的,也可能是由于疫苗中的佐剂所致。皂苷能有效刺激Th1型免疫应答并产生特异性细胞毒性T淋巴细胞,ISA201是一种内部为水包油(W/O/W)矿物油的佐剂乳剂,可以快速诱导体液免疫反应,也能增强细胞免疫反应,诱导具有Th1偏向的免疫反应。IL-4的变化趋势可能反映了Th2型免疫反应的早期激活,随后受到免疫调节机制的抑制。IL-10作为一种抗炎细胞因子,在免疫后第35天较第0天有所上升,提示可能存在免疫调节机制,有助于维持免疫反应的平衡,防止过度的炎症反应。值得注意的是,尽管IL-4和IL-10均为Th2型细胞因子,但它们的检测结果呈现出不同的变化趋势。这种差异可能与免疫反应的动态变化、免疫调节机制的作用以及疾病进展的影响有关。此外,未检测到IFN- γ ,可能是由于Th1型免疫反应未被充分激活,导致IFN- γ 产生不足。

此外,本研究对于山羊传染性胸膜肺炎的不同病程导致的病理学变化有进一步认识和深入。CCPP临床表现通常分为最急性型、急性型和慢性型。最急性型和急性型表现为暴发性的疾病,感染后不久便发生纤维性胸膜肺炎,死亡率很高^[10]。慢性病程较轻,无急性死亡^[17]。本次研究发现,在攻毒2周内死亡的急性病例出现稻草色胸液、胸膜黏连、大范围肝实变,右肺病变程度往往比左肺严重,这与前期研究得出的结论相似^[18-20]。组织病变中肺泡腔充满纤维蛋白、肺泡结构不清晰或出现大范围实质化,若肺泡腔出血或可见大量坏死细胞碎片,往往羊死亡急且症状更重。慢性病变胸腔很少有胸水,肺组织多出现干酪样坏死病变,肝实变则多

为散发。组织病变呈现部分肺泡壁增厚导致肺泡腔狭窄,部分肺泡出现代偿性轻度扩张。在病原分离上,本次试验中只有2只羊的肺组织分离纯化出了Mccp,胸腔积液中均分离到了Mccp活菌,说明Mccp在胸腔积液中更容易分离,这与之前的试验结果相符^[17,21]。

动物支原体疾病中已经有很多支原体尝试亚单位疫苗研究^[22],有一些单组份亚单位疫苗会加重病变^[23-25],而多组分亚单位疫苗可能更容易起到保护作用^[26-28]。B细胞和T细胞表位的鉴定在基于多个表位的疫苗开发中具有重要意义,选择预测多个蛋白的T细胞和B细胞表位进行串联,B细胞表位在体液免疫反应的启动中起关键作用^[29],而T细胞识别的表位可以诱导细胞免疫反应并增强整体免疫激活^[30],从而达到减少工艺成分并达到免疫效果。本研究中疫苗免疫后血清中特异性抗体和细胞因子水平表明体液免疫被激活但细胞免疫反应可能相对不足,这一发现提示需要进一步优化疫苗设计:一是要思考细胞免疫、体液免疫哪一个对于Mccp的感染更能提供有效保护;同样也需要思考Th1和Th2免疫反应的平衡,例如在牛支原体中已鉴定出多种免疫原性蛋白,这些蛋白能够诱导体液免疫,但未能有效激活细胞免疫,这导致目前尚无有效的牛支原体亚单位疫苗能够提供显著的免疫保护,这一现象提醒对于支原体而言,免疫保护的关键可能不在于单纯的体液或细胞免疫,而在于Th1和Th2细胞免疫的平衡。因此,需要通过对抗原进行设计或选择不同的佐剂^[28,31],诱导更均衡的免疫反应以增强疫苗的保护效力^[22]。

4 结 论

本研究表达纯化了重组蛋白rP4并制备疫苗,通过山羊免疫及免疫攻毒试验对其免疫效果进行了评价。试验结果表明,P4蛋白尽管产生了高水平抗体,但仍无法提供免疫保护作用,为山羊传染性胸膜肺炎新型疫苗的设计制备提供了数据支持。

参考文献(References):

- [1] MACOWAN K J, MINETTE J E. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya [J]. *Trop Anim Health Prod*, 1976, 8(2): 91-95.
- [2] AHADUZZAMAN M. Contagious caprine pleuropneumonia (CCPP): A systematic review and

- meta-analysis of the prevalence in sheep and goats[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68(3):1332-1344.
- [3] WOA. Contagious Caprine Pleuropneumonia[M/OL]. WOA. Terrestrial Manual. Paris: WOA, 2021, Chapter 3.8.4. Contagious caprine pleuropneumonia - WOA - World Organisation for Animal Health
- [4] LIGNEREUX L, CHABER A, SAEGERMAN C, et al. Unexpected field observations and transmission dynamics of contagious caprine pleuropneumonia in a sand gazelle herd[J]. *Prev Vet Med*, 2018, 157:70-77.
- [5] 房晓文, 于光熙, 刘光本. 山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝疫苗制造及免疫试验[J]. 畜牧兽医学报, 1958, 3(1):44-52.
- FANG X W, YU G X, LIU G B. Experimental Production and immunization trial of a contagious caprine pleuropneumonia vaccine with aluminum hydroxide[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1958, 3(1):44-52. (in Chinese)
- [6] 储岳峰. 我国山羊(接触)传染性胸膜肺炎病原学、流行病学研究及灭活疫苗的研制[D]. 兰州: 中国农业科学院, 2011.
- CHU Y F. An etiological and epidemiological study on contagious caprine pleuropneumoniae in China and development of a bacterin against it [D]. Lanzhou: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011. (in Chinese)
- [7] IQBAL YATOO M, RAFFIQ PARRAY O, TAUSEEF BASHIR S, et al. Contagious caprine pleuropneumonia - a comprehensive review[J]. *Vet Q*, 2019, 39(1):1-25.
- [8] EL-DEEB W, FAYEZ M, ELSOHABY I, et al. Investigation of acute-phase proteins and cytokines response in goats with contagious caprine pleuropneumonia with special reference to their diagnostic accuracy [J]. *PeerJ*, 2020, 8:e10394.
- [9] CHAMBAUD I, WROBLEWSKI H, BLANCHARD A. Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system[J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7(12):493-499.
- [10] MCMARTIN D A, MACOWAN K J, SWIFT L L. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia; from original description to aetiology [J]. *Br Vet J*, 1980, 136:507-515.
- [11] 张晓亮, 马水燕, 郝华芳, 等. 山羊支原体山羊肺炎亚种在 2 种培养基上的生长特性比较[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(05):911-914, 919.
- ZHANG X L, MA S Y, HAO H F, et al. Comparison of growth feature of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* in two different culture mediums[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(5):2021, 41(05):911-914, 919. (in Chinese)
- [12] LILJANDER A, SACCHINI F, STOFFEL M H, et al. Reproduction of contagious caprine pleuropneumonia reveals the ability of convalescent sera to reduce hydrogen peroxide production in vitro [J]. *Vet Res*, 2019, 50(1):10.
- [13] 朱建勋, 赵 萍, 郝华芳, 等. 山羊支原体山羊肺炎亚种 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(4):403-411.
- ZHU J X, ZHAO P, HAO H F, et al. Establishment and application of TaqMan real-time PCR for the detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(4):403-411. (in Chinese)
- [14] 吴移谋, 邵国青. 支原体学(第三版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022.
- WU Y M, SHAO G Q. *Mycoplasmatology* (3rd Edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2022. (in Chinese)
- [15] 王开胜. 杜泊羊、湖羊 MHC-DRB1 基因外显子 2 多态性与绵羊支原体肺炎抗性关联分析[D]. 石河子大学, 2017.
- WANG K S. Association analysis of MHC-DRB1 gene second exon polymorphism of Dorper and Hu sheep with hydatidosis resistance[D]. Shihezi: Shihezi University, 2017. (in Chinese)
- [16] THIAUCOURT F, PIBLE O, MIOTELLO G, et al. Improving quality control of contagious caprine pleuropneumonia vaccine with tandem mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2018, 18(17):e1800088.
- [17] WESONGA HO, BÖLSKE G, THIAUCOURT F, et al. Experimental contagious caprine pleuropneumonia: a long term study on the course of infection and pathology in a flock of goats infected with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* [J]. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3-4):167-79.
- [18] KALINER G, MACOWAN K J. The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1976, 23:652-661.
- [19] WESONGA H O, LINDBERG R, LITAMOI J K, et al. Late lesions of experimental contagious caprine pleuropneumonia caused by *Mycoplasma capricolum* ssp. *capripneumoniae* [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*,

- 1998,45(2):105-114.
- [20] DHAYGUDE V, KAMDI B, BARATE A, et al. Pathological and molecular diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in naturally infected goats (*Capra hircus*) from Maharashtra, India [J]. *Emerg Anim Species*, 2023, 7(100024).
- [21] EL-DEEB W, ALMUJALLI A, ELJALII I, et al. Contagious caprine pleuropneumonia: The first isolation and molecular characterization of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* in the Kingdom of Saudi Arabia[J]. *Acta Trop*, 2017, 168: 74-79.
- [22] 陈胜利, 郝华芳, 季文恒, 等. 动物支原体相关蛋白的免疫原性研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(5): 1230-1237.
- CHEN S L, HAO H F, JI W H, et al. Research Advances in Immunogenicity of Related Proteins of Animal Mycoplasmas [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(5): 1230-1237.
- [23] MOURA L, DOHMS J, ALMEIDA J M, et al. Development and evaluation of a novel subunit vaccine for *Mycoplasma gallisepticum* [J]. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2012, 64(6): 1569-1576.
- [24] MULONGO M, FREY J, SMITH K, et al. Cattle immunized against the pathogenic 1- α -glycerol-3-phosphate oxidase of *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides* fail to generate neutralizing antibodies and succumb to disease on challenge [J]. *Vaccine*, 2013, 31(44): 5020-5025.
- [25] MULONGO M, FREY J, SMITH K, et al. Vaccination of cattle with the N terminus of LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* results in type III immune complex disease upon experimental infection. *Infection and Immunity* [J]. *Infect Immun*, , 2015, 83(5): 1992-2000.
- [26] MARCHIORO S B, SÁCRISTAN RDEL P, MICHIELS A, et al. Immune responses of a chimaeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs [J]. *Vaccine*, 2014, 32 (36) : 4689-4694.
- [27] HE Y, XIE K, YUAN Z, et al. A subunit vaccine based on P97R1, P46, P42 and P65 from *Mycoplasma hyopneumoniae* can induce significant immune response in piglets [J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11: 1493650.
- [28] NICHOLAS RA, AYLING RD, MCAULIFFE L. Vaccines for Mycoplasma Diseases in Animals and Man [J]. *J Comp Pathol*, 2009, 140(2-3): 85-96.
- [29] YANO A, ONOZUKA A, ASAHIOZAKI Y, et al. An ingenious design for peptide vaccines [J]. *Vaccine*, 2005, 23(17-18): 2322-2326.
- [30] NEGAHDARIPOUR M, NEZAFAT N, ESLAMI M, et al. Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine [J]. *Infect, Genet Evol*, 2018, 58: 96-109.
- [31] LIU W, JIANG P, SONG T, et al. A Recombinant Chimera Vaccine Composed of LTB and *Mycoplasma hyopneumoniae* Antigens P97R1, mhp390 and P46 Elicits Cellular Immunologic Response in Mice [J]. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11(8): 1291.

(编辑 范子娟)