

# 副猪嗜血杆菌 SC-1 株荚膜多糖输出蛋白的表达及其免疫原性分析

张 飞<sup>1</sup>, 都启晶<sup>1</sup>, 张洋溢<sup>1</sup>, 文心田<sup>1,2,3\*</sup>, 黄小波<sup>1,2,3</sup>, 曹三杰<sup>1,2,3</sup>

(1. 四川农业大学预防兽医研究所猪病研究中心, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物医学院人兽共患病研究室, 成都 611130; 3. 农业部兽用药物与兽医生物技术四川科学观测实验站, 雅安 625014)

**摘 要:** 运用 PCR 方法扩增副猪嗜血杆菌 SC-1 株荚膜多糖输出蛋白(CPEP)基因, 克隆至 pMD-19T 载体。经鉴定测序验证后, 将获得的 CPEP 基因克隆至 pET-32a(+ )原核表达载体, 构建原核表达质粒 pET-32a-CPEP, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 进行 SDS-PAGE 以及 Western blot 分析免疫原性, 纯化 CPEP, 并用纯化的蛋白免疫小鼠, 检测其特异性血清 IgG 抗体水平及攻毒保护率。结果显示, 成功构建原核表达质粒 pET-32a-CPEP; SDS-PAGE 分析结果显示, 得到约 35 ku 的蛋白; Western blot 分析显示, CPEP 能与 Hps SC-1 阳性血清发生抗原抗体的特异性反应, 证实该重组 CPEP 蛋白具有反应原性。以致死剂量的强毒株 SC-1 攻毒 CPEP 免疫小鼠, 重组蛋白的免疫能够减缓发病, 并表现出 40% 的保护率。重组蛋白 CPEP 的部分保护作用表明其可以作为免疫候选因子, 为未来副猪嗜血杆菌标准化疫苗的研制奠定基础。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 荚膜多糖输出蛋白基因; 克隆表达; 免疫原性

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0621-10

## Expression and Immunogenicity Analysis of Capsular Polysaccharide Export Protein of *Haemophilus parasuis* SC-1 Isolate

ZHANG Fei<sup>1</sup>, DU Qi-jing<sup>1</sup>, ZHANG Yang-yi<sup>1</sup>, WEN Xin-tian<sup>1,2,3\*</sup>, HUANG Xiao-bo<sup>1,2,3</sup>, CAO San-jie<sup>1,2,3</sup>

(1. Swine Research Center, Institute of Preventive Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural

University, Ya'an 625014, China; 2. Laboratory of Zoonosis, College of Veterinary Medicine,

Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 3. Sichuan Science-observation Experiment

of Veterinary Drugs and Veterinary Biological Technology of Ministry of Agriculture, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Capsular polysaccharide export protein (CPEP) gene of *Haemophilus parasuis* SC-1 was amplified by PCR and then was cloned into the pMD-19T vector. After being certified by sequence and digestion with *Bam*H I and *Xho* I respectively, the gene were cloned into the pET-32a (+) vector. The recombinant vector was transformed into BL21(DE3) and then induced by IPTG. The product of expression was studied by SDS-PAGE and Western blot, and then was purified. We further evaluated the immune responses and protective efficacy of purified CPEP in mice models. The results showed that the recombinant vector pET32a-CPEP was constructed successfully. The SDS-PAGE and the western blot results showed that the purified protein was 35 kDa and the recombinant CPEP possessed reactogenicity respectively. The protective capacity of the anti-CPEP antibodies was evaluated by the inoculation of highly virulent strain SC-1. Vaccinated animals had a delayed course of disease and 40% of the animals survived the lethal challenge. The partial pro-

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303034-1)

作者简介: 张 飞(1987-), 男, 河南尉氏人, 硕士, 主要从事动物传染病的研究工作, E-mail: zhf19861016@126.com

\* 通信作者: 文心田, E-mail: xintian@sicau.edu.cn

tection achieved with the recombinant CPEP supports their potential as candidates to be included in future vaccine formulations against *H. parasuis*.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; capsular polysaccharide export protein gene; expression; immunogenicity analysis

猪的多发性浆膜炎和关节炎(革拉泽病, Glässer's disease),由副猪嗜血杆菌感染引起,该病已成为全球范围内影响养猪业的典型细菌性疾病之一<sup>[1]</sup>。近几年,副猪嗜血杆菌病在中国日趋流行,很多地区分离到该病原体。副猪嗜血杆菌血清型复杂多样,中国流行的优势血清型为 4、5、12、13 型,与国外的优势血清型 4、5、13 基本相同并存在差异<sup>[2]</sup>。不同血清型副猪嗜血杆菌之间的致病力差异较大,且同一血清型的不同分离株其毒力也存在差异性<sup>[3]</sup>。由于不同血清型之间缺乏有效的交叉保护性,未感染猪群与感染猪群混养后,交叉感染严重,造成单独群体感染多个血清型,甚至单个个体感染不同血清型的困境,使得应用疫苗防控该病尤为困难。

型特异性的灭活疫苗可以成功控制该病的发生,而不同血清型之间缺乏交叉保护,多价灭活疫苗对不同血清型毒株攻击时的安全有效保护作用在实验室及田间试验中都得到了证实<sup>[4]</sup>。然而,还有研究证实有毒力的菌株对相同血清型的不同菌株没有保护性,甚至对同源菌株也没有保护性,这表明保护抗原与毒力因子或型特异性抗原并不一致<sup>[5-6]</sup>。体外培养菌株制备的灭活疫苗不能有效抵抗同血清型甚至同株菌株的感染,推测跟灭活疫苗不能提供感染过程中病原特异性表达(在宿主体内表达而在体外培养不表达)的那部分抗原有关。因此疫苗研究过程应该加深对副猪嗜血杆菌保护性抗原以及毒力因子的认识,从而改善现有灭活疫苗效果。

荚膜多糖输出蛋白(capsular polysaccharide export protein, CPEP)是通过体内诱导抗原技术(*in vivo*-induced antigen technology, IVIAT)<sup>[7]</sup>筛选到的 1 个副猪嗜血杆菌体内诱导基因,其表达产物为荚膜多糖输出蛋白,推测它可能在细菌感染机体的过程中起到重要的作用。大多数报道称荚膜多糖蛋白是很多细菌的毒力因子<sup>[8-11]</sup>。T. Morozumi 等<sup>[12]</sup>研究报道,分离自健康猪上呼吸道的大多数副猪嗜血杆菌都有荚膜,从其他部位分离的菌株中无荚膜的菌株占多数。荚膜与巴氏杆菌科的几个成员在上呼吸道的定居有关,包括嗜血杆菌属。对于属于巴

氏杆菌科嗜血杆菌属的副猪嗜血杆菌而言,还没有报道称荚膜多糖蛋白与其毒力有关,目前仅认为该蛋白为巴氏杆菌科的潜在毒力因子。荚膜多糖输出蛋白基因位于荚膜多糖合成基因的上游,该基因编码产物通常负责将荚膜多糖从细胞质输送到细胞表面。该基因在体内的表达上调有可能导致荚膜多糖蛋白的表达上调。因此,笔者先选择荚膜多糖输出蛋白基因进行克隆表达,证实它的功能与作用具有重要意义。

本研究采用 pET-32a(+) 表达载体构建原核表达质粒 pET-32a-CPEP,选用 BL21(DE3) 作为宿主菌进行表达,通过优化条件,以期获得高水平的表达。运用 Western blot 方法分析了该蛋白的生物学活性,同时,将大量表达的产物经镍离子柱纯化并免疫小鼠,测定抗体水平及保护率,为副猪嗜血杆菌疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、血清、实验动物与试剂

副猪嗜血杆菌 SC-1 株(血清 12 型),由本室分离鉴定并保存<sup>[13]</sup>;DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)株,表达载体 pET-32a(+),本室保存;人工感染 *H. parasuis* SC-1 株阳性血清由本实验室制备保存;IVI-3 阳性质粒由本实验室构建。4~8 周龄雌性昆明鼠,购自四川大学华西医学院。pMD-19T Simple 载体、BamH I、Xho I、DNA Ligation Kit Ver. 2. 1、ExTaq DNA polymerase 及低分子量蛋白质 Marker 均购自大连宝生物有限公司;Marker III 购自天根生物公司;E. I. N. A plasmid miniprep kit 及 E. I. N. A Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司;琼脂糖购自 Promega 公司;胰蛋白胨及酵母浸出干粉均为 OX-OID 公司产品;辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG,购自北京博奥森生物技术有限公司;酶标板购自 Costar;可溶性 TMB 底物显色液、DAB 购自北京天根生化工程有限公司。Ni-affinity chromatograph 购自 Bio-Rad 公司。咪唑购自美国 Amresco 公司。

### 1.2 副猪嗜血杆菌 SC-1 株 CPEP 基因的扩增

根据 IVI-3 基因的序列(GenBank 登录号:

HM063414)以及表达载体 pET-32a(+ )的特性,设计 1 对扩增全长基因的引物,扩增 *CPEP* 基因,产物长度为 1 152 bp。引物由上海英骏公司合成。设计合成引物序列如下,CPEP-F: 5'-GGATCCATGTGTAAGTTAACTAAAGCTCTTG-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点),CPEP-R: 5'-CTC-GAGTTACCAATTCCTCACTCTTAAGAT-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点)。

以 IVI-3 为模板,PCR 的反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.3 副猪嗜血杆菌 SC-1 株荚膜多糖输出蛋白基因的克隆及鉴定

把回收纯化的 *CPEP* 基因片段克隆进 pMD-19T simple Vector,连接体系:pMD19-T Simple 载体 1  $\mu$ L;*CPEP* 基因胶回收 PCR 产物 4  $\mu$ L;Solution I 5  $\mu$ L;总体积为 10  $\mu$ L。16 °C 连接过夜,转化 DH5 $\alpha$ 。

挑选转化后生长的白色菌落进行菌落 PCR 鉴定和酶切鉴定。PCR 鉴定反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将 LB 平板上经菌落 PCR 鉴定为阳性单菌落接种于 5 mL 含 Amp(100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)LB 液体培养基中,37 °C 振荡过夜。按照 OMEGA 公司质粒小量抽提试剂盒要求,进行抽提质粒。将抽提的质粒进行 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,取 10  $\mu$ L 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测结果。

### 1.4 重组质粒的序列测定及序列分析

将菌落 PCR 鉴定、双酶切鉴定均正确的菌液送上海英骏有限公司测序,用 Blast 将测序结果与 GenBank 上公布的基因参考序列相比较,分析其相似性。

### 1.5 原核表达载体 pET-32a-CPEP 的构建与鉴定

将保存的 pMD-19T-CPEP 重组菌和 pET-32a(+ )原核表达载体菌扩大培养并抽提质粒 DNA 后同时用 *Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切,取酶切产物琼脂糖凝胶电泳,将目的片段切下回收纯化,采用 DNA Ligation Kit 进行 16 °C 连接,过夜后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,将培养液涂布于含 Amp(100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)的平板上,37 °C 培养过夜,挑选单个菌落进行菌落 PCR 鉴定。

在平板上挑取经鉴定正确菌落的剩余部分,接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基,振荡培养 12~16 h,提取质粒,进行 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定,取双酶切产物进行琼脂糖电泳分析。将成功构建的 pET-32a-CPEP 重组菌扩大培养,抽提质粒,转化 BL21(DE3)。将鉴定为阳性的菌种保存。

### 1.6 重组荚膜多糖输出蛋白的表达与鉴定

#### 1.6.1 重组荚膜多糖输出蛋白的初步表达鉴定

在菌液中加入 IPTG,使其终浓度为 1.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 进行诱导。然后继续培养 3 h,取 1 mL 离心后冰中待用,在样品中加入 1  $\times$  SDS Loading Buffer 100  $\mu$ L,沸水中煮 5 min,12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1 min,取 15  $\mu$ L 上清液上样电泳,并加入低分子量蛋白质 Marker 作参考,凝胶经考马斯亮蓝染色后脱色,照相保存。

1.6.2 表达条件的优化 重组表达菌经过初步表达鉴定,对其表达条件进行优化:诱导剂 IPTG 终浓度选用 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>;诱导时间分别选用 2、3、5 h。

1.6.3 重组 *CPEP* Western blot 分析 用副猪嗜血杆菌 SC-1 株阳性猪血清对重组 *CPEP* 进行免疫印迹检测,具体方法:IPTG 诱导的重组 *CPEP* 菌超声破碎裂解液经 SDS-PAGE 电泳后,半干电转印至 NC 膜上。电转印结束后,转移 NC 膜至含 5% BSA 封闭液中,37 °C 反应 1 h,倒掉封闭液,用 PBST 清洗膜 3 次,每次 5 min;加入用封闭液 1:50 倍稀释的副猪嗜血杆菌 SC-1 株的混合血清,完全浸泡 NC 膜,在水浴振荡器上 60 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>、37 °C 反应 1 h,尽弃血清,用 PBST 清洗膜 3 次,每次 5 min;加入用封闭液 1:500 倍稀释的辣根酶标记兔抗猪 IgG,37 °C 60 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 反应 1 h,弃尽二抗反应液,用 PBST 清洗膜 3 次,每次 5 min;倒掉洗液,加入 DAB,反应 5~15 min,观察显色情况。用去离子水洗膜以终止显色,对 NC 膜上的条带进行照相、分析及保存。

#### 1.7 重组荚膜多糖输出蛋白的纯化与复性

将阳性重组菌菌液按 1:500 接种 1 L LB(含 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> Amp)培养基,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.5~0.8 加入 IPTG,使其 IPTG 终浓度为最佳诱导浓度,再将其 37 °C 振荡培养至最佳诱导时间。裂解后将重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。Tris-HCl 重悬细菌,12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1 min,弃上清。在沉淀中加入 36 mL 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>

pH 8.0 Tris-HCl 重悬细菌, 并加入溶菌酶 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 4 mL, 使溶菌酶的终浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  过夜。再将溶菌酶处理后的菌液在冰浴条件下进行超声波破碎处理 ( $200 \sim 300 \text{ W}$ , 间歇使用, 超声破碎 30 min),  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清。加上样 Buffer 20 mL, 漩涡振荡 30 min 重悬沉淀, 再  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 收集上清, 并用  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜过滤样品。先用超纯水洗脱存留在填料中的酒精, 流速为  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱 20~30 min, 至紫外吸收值平衡。换用上样 Buffer, 流速为  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗 30 min, 至紫外吸收值平衡之后换用处理后的样品, 上样流速应尽量慢,  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 待上完样品仍用上样 Buffer 至平衡。分别依次从低浓度到高浓度的咪唑 Buffer 梯度 ( $20, 40, 60, 100, 200, 500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 洗脱, 洗脱流速为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 洗脱体积为 2 CV (CV 为柱床体积), 当紫外吸收值出现峰时应及时收集该段液体, 每收集完待平衡后换下一种浓度的咪唑, 至  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  咪唑洗脱平衡。将收集的液体吸取  $16 \mu\text{L}$  加入  $4 \mu\text{L}$   $5 \times$  SDS Loading Buffer 煮沸 5 min, 取  $15 \mu\text{L}$  上样 SDS-PAGE 电泳鉴定。

将收集的样品装入已经处理好的透析袋中, 置于复性缓冲液中 ( $1 \times \text{PBS}$ ,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 尿素, pH 8.0) 在  $4^\circ\text{C}$  进行梯度透析, 复性缓冲液中的尿素浓度依次递减, 即按 6、4、3、2、1 和  $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  依次进行蛋白复性, 换液间隔时间为 12 h, 最后测定其蛋白质的含量。

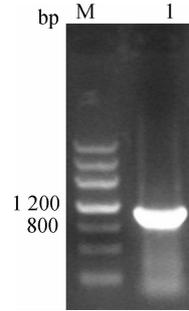
### 1.8 重组 CPEP 免疫保护性研究

将纯化的重组荚膜多糖输出蛋白 (A 组)、副猪嗜血杆菌 SC-1 全菌灭活抗原 (B 组), 与弗氏佐剂进行乳化, 分 2 次间隔 2 周皮下多点接种小鼠, 同时, 设立 PBS 加佐剂 (C 组)、PBS (D 组) 作为对照, 每组 10 只昆明小鼠。A 组疫苗含有重组荚膜多糖输出蛋白  $100 \mu\text{g}$ , 并用弗氏佐剂进行 1:1 乳化; B 组免疫活菌数达  $10^{10} \text{ CFU} \cdot 0.3 \text{ mL}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$  甲醛灭活 24 h, 再用弗氏佐剂进行 1:1 乳化; 首免佐剂为完全弗氏佐剂, 二免佐剂为不完全弗氏佐剂。均采用皮下多点注射免疫, 共免疫 2 次, 每次间隔 2 周, 并在 0、14、28 d 断尾采血参照文献 [14] 方法做 ELISA 检测免疫效果。参照文献 [15] 中给出的 *H. parasuis* SC-1 半数致死量  $\text{LD}_{50} = 1.43 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 二免 2 周后以  $1\,000 \text{ LD}_{50}$  进行攻毒。连续 1 周观察小鼠死亡情况, 并统计保护率。

## 2 结果

### 2.1 副猪嗜血杆菌 SC-1 株荚膜多糖输出蛋白基因的扩增

荚膜多糖输出蛋白基因的 PCR 产物大小为 1 152 bp, 经过琼脂糖凝胶电泳分析, 获得与预期大小相符的片段 (图 1)。



M. DNA 相对分子质量标准 (Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1. CPEP PCR 产物  
M. DNA marker (Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1. PCR product of CPEP

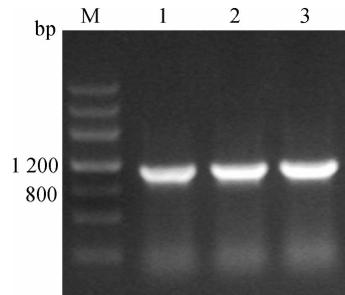
图 1 荚膜多糖输出蛋白基因 PCR 产物

Fig. 1 The PCR product of capsular polysaccharide export protein gene

### 2.2 副猪嗜血杆菌 SC-1 株荚膜多糖输出蛋白基因的 T-A 克隆及鉴定

#### 2.2.1 pMD-19T-CPEP 的菌落 PCR 鉴定

胶回收纯化 CPEP 基因与 pMD-19T simple Vector 相连, 转化至 DH5 $\alpha$ , 过夜培养后随机挑取 3 个菌落进行菌落 PCR 鉴定, 扩增出与预期 1 155 bp 相符的条带 (图 2)。



M. DNA 相对分子质量标准 (Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1~3. pMD-19T-CPEP PCR 鉴定  
M. DNA marker (Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1-3. Product of pMD-19T-CPEP

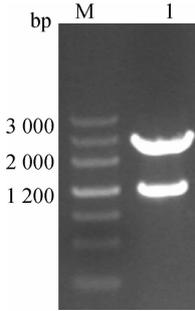
图 2 pMD-19T-CPEP 的菌落 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Colony PCR confirmation of pMD-19T-CPEP

#### 2.2.2 pMD-19T-CPEP 的双酶切鉴定

挑取经菌落 PCR 鉴定正确的菌落接种于 5 mL 的 LB 中振荡培养 12~16 h, 抽提质粒。用 BamH I、Xho I 对

该质粒进行双酶切,然后经过琼脂糖凝胶电泳分析结果。经过双酶切后,得到大约 2 700 和 1 200 bp 大小的 2 条条带(图 3),与预期相符,表明该基因已经成功克隆到 T 载体上。



M. DNA 相对分子质量标准(Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1. pMD-19T-CPEP 双酶切鉴定(*Bam*H I / *Xho* I)

M. DNA marker (Marker III: 4.5、3.0、2.0、1.2、0.8、0.5、0.2 kb); 1. Digestion of recombinant plasmid of *CPEP* gene (*Bam*H I / *Xho* I)

图 3 *CPEP* 基因的 T 克隆重组质粒的双酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification the recombinant plasmids of *CPEP* gene by enzyme digestion

### 2.3 重组质粒的序列测定及序列分析

*CPEP* 基因的 T-A 克隆质粒测序结果表明,扩增的 *CPEP* 基因长度为 1 155 bp。运用 DNASTar 软件包中 MegAlign 模块将 SC-1 株 *CPEP* (HM063414.1) 基因序列同包括 SH0165、ZJ0906 两个中国分离株在内的另外 17 株相应序列进行同源性比对,并对中国分离株的氨基酸序列进行比对。运用 ClustalX1.83 和 MEGA5.0 (NJ 法) 绘制系统

进化树。

结果显示,SC-1 株与 SH0165 株相似性高达 99.7% (图 4),而 SC-1 株、SH0165 株与 ZJ0906 的 *CPEP* 基因序列对比,相似性仅分别为 38.7%、39.1%。系统进化分析显示(图 5),SC-1 株与 SH0165 株位于同一分支。参考 NCBI 注释及文献[16],在系统进化树中标记了菌株来源、所属血清型及各血清型的致病性。H425 株、SD-84-15995 株、SC-1 株、Nagasaki 株、SH0165 株等致病性较强的菌株位于同一分支,而 131 株、C5 株、SW114 株、D74 株、174 株等致病性较弱的菌株位于同一分支,可推测 *CPEP* 基因与 *H. parasuis* 的致病性相关,其相关机理有待进一步研究。

根据 3 株中国分离株测序结果推测其 *CPEP* 序列均编码 384 个氨基酸,序列比对显示,3 个基因高度相似。同为 *H. parasuis* 血清 12 型的 SC-1 株与 ZJ0906 株 *CPEP* 基因虽然基因序列比对相似度较低,但氨基酸序列比对相似度为 100%。*H. parasuis* 血清 5 型 SH0165 株与 SC-1 株及 ZJ0906 株 *CPEP* 基因推测氨基酸相比,同样表现出较高的相似度,不同之处在于,SH0165 株第 122 位氨基酸由 T 变为 A,316 位氨基酸由 T 变为 I (图 6)。

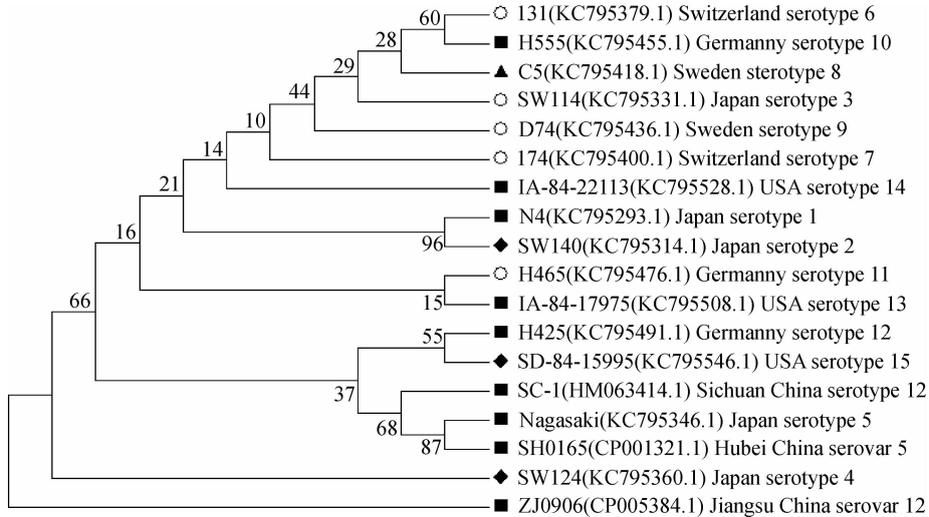
运用 DNASTar 软件中的 Protean 模块对 SC-1 株 *CPEP* 推测氨基酸序列的亲水性和抗原指数分析表明(图 7),*CPEP* 蛋白具有较高的亲水性,主要包括 29—46、58—85、94—121、164—186、200—223、231—253、300—323 区段,同时可以看出亲水性区域的抗原指数都较高。

		Percent Identity																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Divergence	1	■	99.6	99.7	99.6	98.7	99.0	99.8	99.0	99.3	99.1	98.4	98.7	99.6	86.7	99.1	38.8	98.4	98.7	1
	2	0.4	■	99.6	99.7	99.1	99.5	99.6	99.5	99.7	99.6	98.5	99.1	99.5	86.7	99.6	38.6	98.5	98.9	2
	3	0.3	0.4	■	99.6	98.7	99.0	99.7	99.0	99.3	99.2	98.4	98.7	99.6	86.6	99.2	38.8	98.4	98.7	3
	4	0.4	0.3	0.4	■	98.8	99.1	99.7	99.1	99.4	99.2	98.4	98.8	99.5	86.8	99.2	38.6	98.4	98.8	4
	5	1.3	0.9	1.3	1.2	■	99.5	98.7	99.3	99.4	98.7	99.2	99.7	99.0	86.2	98.7	38.9	99.2	99.2	5
	6	1.0	0.5	1.0	0.9	0.5	■	99.0	99.5	99.4	99.1	98.7	99.3	99.0	86.2	99.0	38.5	98.7	98.7	6
	7	0.2	0.4	0.3	0.3	1.3	1.0	■	99.0	99.3	99.1	98.4	98.7	99.6	86.7	99.1	38.6	98.4	98.7	7
	8	1.0	0.5	1.0	0.9	0.7	0.5	1.0	■	99.4	99.2	98.9	99.5	99.0	86.2	99.2	38.8	98.9	98.9	8
	9	0.7	0.3	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	■	99.3	98.8	99.2	99.6	86.6	99.3	38.6	98.8	99.0	9
	10	0.9	0.4	0.8	0.8	1.3	1.0	0.9	0.9	0.7	■	98.1	98.7	99.0	86.5	100.0	38.8	98.1	98.4	10
	11	1.7	1.5	1.7	1.6	0.8	1.3	1.7	1.1	1.2	1.9	■	99.2	98.6	86.2	98.1	38.9	100.0	99.7	11
	12	1.3	0.9	1.3	1.2	0.3	0.7	1.3	0.5	0.8	1.3	0.8	■	98.8	86.1	98.7	38.8	99.2	99.2	12
	13	0.4	0.5	0.4	0.5	1.0	1.0	0.4	1.0	0.4	1.0	1.4	1.2	■	86.6	99.0	38.7	98.6	99.0	13
	14	14.7	14.7	14.9	14.6	15.4	15.4	14.7	15.3	14.9	15.0	15.4	15.5	14.9	■	86.5	35.5	86.2	86.5	14
	15	0.9	0.4	0.8	0.8	1.3	1.0	0.9	0.8	0.7	0.0	1.9	1.3	1.0	15.0	■	38.8	98.1	98.4	15
	16	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	■	39.1	38.7	16
	17	1.7	1.5	1.7	1.6	0.8	1.3	1.7	1.1	1.2	1.9	0.0	0.8	1.4	15.4	1.9	100.0	■	99.7	17
	18	1.3	1.1	1.3	1.2	0.8	1.3	1.3	1.1	1.0	1.6	0.3	0.8	1.0	15.0	1.6	100.0	0.3	■	18
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

131(KC795379.1)Switzerland serotype 6  
174(KC795400.1)Switzerland serotype 7  
C5(KC795418.1)Sweden serotype 8  
D74(KC795436.1)Sweden serotype 9  
H425(KC795491.1)Germany serotype 12  
H465(KC795476.1)Germany serotype 11  
H555(KC795455.1)Germany serotype 10  
IA-84-17975(KC795508.1)USA serotype 13  
IA-84-22113(KC795528.1)USA serotype 14  
N4(KC795293.1)Japan serotype 1  
Nagasaki(KC795346.1)Japan serotype 5  
SD-84-15995(KC795546.1)USA serotype 15  
SW114(KC795331.1)Japan serotype 3  
SW124(KC795360.1)Japan serotype 4  
SW140(KC795314.1)Japan serotype 2  
ZJ0906(CP005384.1)Jiangsu China Serovar  
SH0165(CP001321.1)Hubei China serovar 5  
SC-1(HM063414.1)Sichuan China serotype

图 4 *CPEP* 基因的相似性分析

Fig. 4 Homology analysis of *CPEP* genes



■. 96 h 内致死; ◆. 尸体剖检可见严重多发性浆膜炎; ▲. 临床症状温和, 总体有轻微损伤; ○. 无临床症状和损伤  
 ■. The isolate caused death or moribundity within 4-day; ◆. The isolate caused polyserositis; ▲. The isolate caused mild symptoms and lesions; ○. No clinical symptoms or gross lesions

图 5 CPEP 基因遗传进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of CPEP genes

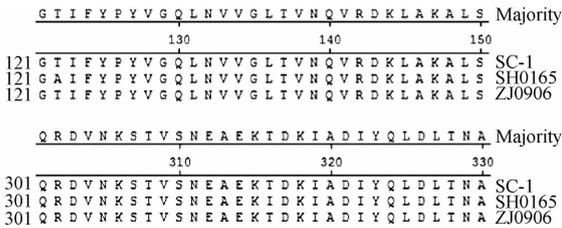


图 6 中国分离株 CPEP 氨基酸序列对比

Fig. 6 Comparison of amino acid in CPEP of China isolates

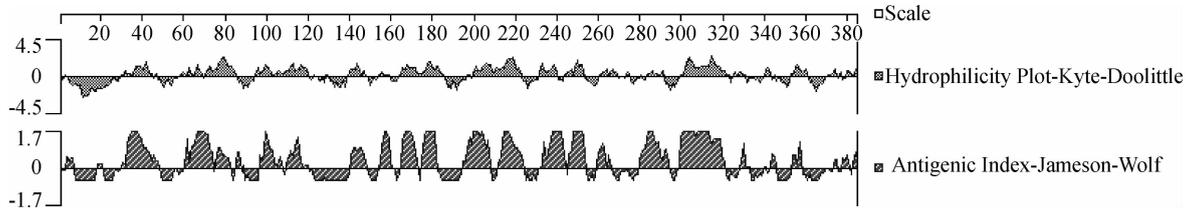


图 7 SC-1 CPEP 蛋白的亲水性和抗原指数分析

Fig. 7 Hydrophilicity plot, antigen index analysis of SC-1 CPEP protein

转入大肠杆菌 BL21(DE3)用 IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 结果表明:诱导后的 pET-32a-CPEP 原核表达重组大肠菌在分子量约 35 ku 处出现特异性蛋白条带,与预期的重组荚膜多糖输出蛋白大小基本一致。相对应未经诱导的重组大肠菌没有出现此条带(图 10),上述结果初步表明重组荚膜多糖输出蛋白(pET-32a-CPEP)在大肠杆菌中获得表达。

2.5.2 表达条件的优化 选择不同浓度的

## 2.4 原核表达载体 pET-32a-CPEP 的构建与鉴定

挑取重组原核表达质粒的转化菌落进行 PCR, 能扩增出大约 1 152 bp 的条带(图 8)。将该质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切, 分别获得 1 152 bp 和约 5 900 bp 的条带(图 9)。菌落 PCR 结果和双酶切结果表明原核表达载体构建成功。

## 2.5 重组荚膜多糖输出蛋白的表达与鉴定

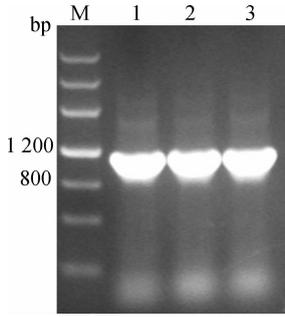
### 2.5.1 重组荚膜多糖输出蛋白的初步表达鉴定

将 CPEP 基因的原核表达质粒 pET-32a-CPEP

IPTG 对重组荚膜多糖输出蛋白进行诱导表达, 样品经处理后上样电泳, SDS-PAGE 电泳结果显示, IPTG 最佳的工作浓度为终浓度 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> (图 11)。对最佳诱导时间的优化, 可见诱导 5 h 的目的条带着色最浓, 则最佳诱导时间为诱导后 5 h (图 12)。

### 2.5.3 重组荚膜多糖输出蛋白 Western blot 分析

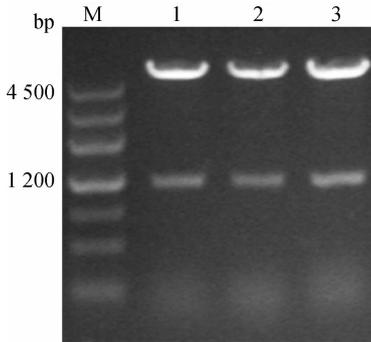
用副猪嗜血杆菌 SC-1 株阳性猪血清对重组荚



M. DNA 相对分子质量标准 (Marker III: 4.5, 3.0, 2.0, 1.2, 0.8, 0.5, 0.2 kb); 1~3. pET-32a-CPEP PCR 鉴定  
M. DNA marker (Marker III: 4.5, 3.0, 2.0, 1.2, 0.8, 0.5, 0.2 kb); 1-3. Product of pET-32a-CPEP

**图 8 pET-32a-CPEP 的菌落 PCR 鉴定结果**

**Fig. 8 Colony PCR confirmation of pET-32a-CPEP**

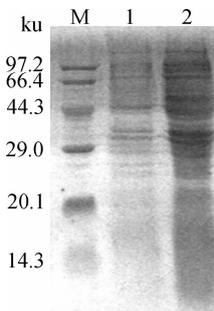


M. DNA 相对分子质量标准 (Marker III: 4.5, 3.0, 2.0, 1.2, 0.8, 0.5, 0.2 kb); 1~3. pET-32a-CPEP PCR 的 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切鉴定

M. DNA marker (Marker III: 4.5, 3.0, 2.0, 1.2, 0.8, 0.5, 0.2 kb); 1-3. pET-32a-CPEP digested by *Bam*HI / *Xho*I

**图 9 pET-32a-CPEP 的双酶切鉴定结果**

**Fig. 9 Identification the recombinant plasmids of pET-32a-CPEP gene by enzyme digestion**

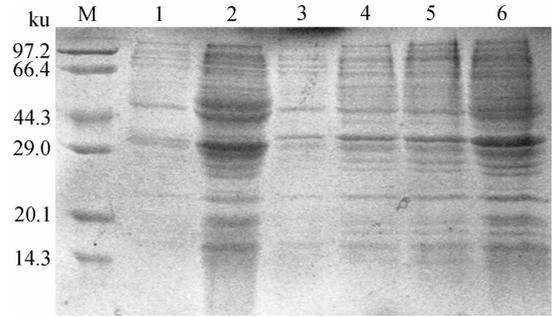


M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 重组菌的诱导期表达; 2. 重组菌的诱导后表达

M. Protein marker; 1. pET-32a-CPEP before induction; 2. pET-32a-CPEP after induction

**图 10 重组质粒 pET-32a-CPEP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达结果**

**Fig. 10 Expression of the recombinant plasmids pET-32a-CPEP in *E. coli* BL21 (DE3)**

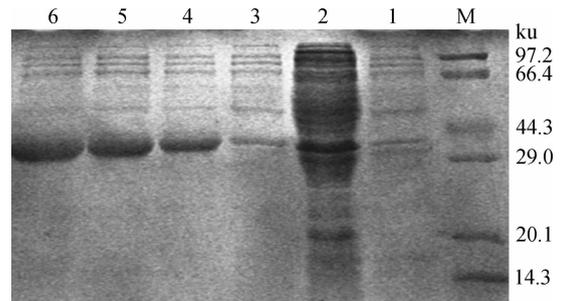


M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导 pET-32a (+) 表达; 2. 诱导后 pET-32a (+) 表达; 3. IPTG  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 4. IPTG  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5. IPTG  $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6. IPTG  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

M. Protein marker; 1. pET-32a (+) before induction; 2. pET-32a (+) after induction; 3.  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 4.  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 5.  $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 6.  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

**图 11 不同 IPTG 浓度诱导重组质粒 pET-32a-CPEP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达结果**

**Fig. 11 The results of expression of the recombinant plasmids pET-32a-CPEP in *E. coli* BL21 (DE3) at different concentration of IPTG**



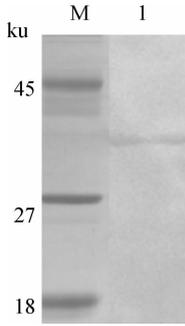
M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 未诱导 pET-32a (+) 表达; 2. 诱导后 pET-32a (+) 表达; 3. 未诱导 pET-32a-CPEP 表达; 4. 诱导 2 h 后 pET-32a-CPEP 表达; 5. 诱导 3 h 后 pET-32a-CPEP 表达; 6. 诱导 5 h 后 pET-32a-CPEP 表达

M. Protein marker; 1. pET-32a (+) before induction; 2. pET-32a (+) after induction; 3. pET-32a-CPEP uninduced; 4. pET-32a-CPEP induced for 2 hours; 5. pET-32a-CPEP induced for 3 hours; 6. pET-32a-CPEP induced for 5 hours

**图 12 重组质粒 pET-32a-CPEP 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中不同诱导时间的表达结果**

**Fig. 12 The results of expression of the recombinant plasmids pET-32a-CPEP in *E. coli* BL21 (DE3) at different time after induction**

膜多糖输出蛋白进行免疫印迹检测,结果显示,在硝酸纤维素膜上出现 35 ku 左右有 1 条特异条带,与重组荚膜多糖输出蛋白样品的上样位置相对应,表明重组 CPEP 蛋白与 Hps SC-1 阳性血清发生了抗原抗体的特异性反应,证实了该重组 CPEP 蛋白具有反应原性(图 13)。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 重组菌体裂解物的免疫印迹鉴定结果

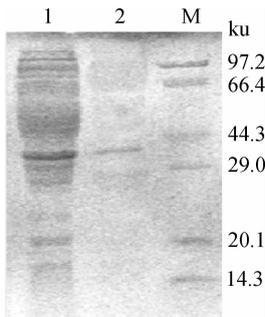
M, Protein marker; 1. The western blot result of pET-32a-CPEP

图 13 重组菌体裂解物的 Western blot 鉴定结果

Fig. 13 Western blot analysis expression product of pET-32a-CPEP

## 2.6 重组荚膜多糖输出蛋白的纯化

对重组荚膜多糖输出蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 分析,从图 14 可以看出,100 mmol · L<sup>-1</sup> 咪唑 Buffer 洗脱时收集的液体在 35 ku 左右出现 1 条带,并无其他明显的杂条带,与重组菌诱导表达出现



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 含 pET-32a-CPEP 重组质粒的全菌表达产物; 2. 纯化的重组质粒 pET-32a-CPEP 的表达蛋白

M, Protein marker; 1. The expression product of recombinant plasmid pET-32a-CPEP; 2. Purified pET-32a-CPEP recombinant protein

图 14 pET-32a-CPEP 重组蛋白纯化 SDS-PAGE 结果

Fig. 14 Purification of the pET-32a-CPEP recombinant protein

的目的条带的位置相当,因此该蛋白的纯化效果较好。用紫外分光光度计测量其蛋白的含量为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2.7 重组荚膜多糖输出蛋白免疫保护性研究

2.7.1 重组荚膜多糖输出蛋白免疫小鼠及其抗体检测 将纯化的重组荚膜多糖输出蛋白(A组)、副猪嗜血杆菌 SC-1 全菌灭活抗原(B组),与弗氏佐剂进行乳化,分 2 次间隔 2 周皮下多点接种小鼠,同时,设立 PBS 加佐剂(C组)、PBS(D组)作为对照,每组 10 只昆明小鼠。在免疫前(0 d)以及免疫后的 14、28 d 采集免疫小鼠血清,间接 ELISA 检测特异性抗副猪嗜血杆菌的抗体水平(表 1)。在接种 14 d 后,A组、B组检测到特异性抗副猪嗜血杆菌抗体的产生。首免后 28 d,A组与 B组检测到特异性抗体的产生较 2 周前抗体水平进一步提高,其中 B组抗体水平高于 A组。C组与 D组整个免疫过程未检测到特异性副猪嗜血杆菌抗体。

2.7.2 重组荚膜多糖输出蛋白免疫小鼠保护性试验 二免 2 周后以副猪嗜血杆菌 SC-1 株的 1 000 倍半数致死量<sup>[15]</sup>进行攻毒。A组小鼠在攻毒后 3 d 开始出现死亡;攻毒 2 d 后,C组和 D组开始有小鼠死亡,5 d 内 2 组的小鼠全部死亡。观察 1 周后,A组死亡 6 只,保护率为 40%;B组小鼠没有死亡,保护率为 100%;C组及 D组全部死亡。

## 3 讨论

体内诱导抗原鉴定技术(IVIAT)是在基因组表达文库构建、菌落免疫印迹等技术的基础上,建立的一种操作简便、设备要求简单的筛选体内诱导表达基因的方法。此方法自建立以来,已广泛应用到了结核分枝杆菌、链球菌、布鲁菌等<sup>[17-19]</sup>多种病原体诱导表达基因的筛选,这些基因的免疫原性、毒力作用等特性也得到了证实<sup>[20-21]</sup>。因此通过该技术对体

表 1 试验小鼠抗副猪嗜血杆菌抗体检测结果

Table 1 The results of the anti-Hps antibody in murine serum after immunization

组别 Groups	免疫处理 Immunization	免疫后 0 d 0 d post immunization	免疫后 14 d 14 d post immunization	免疫后 28 d 28 d post immunization
A 组 Group A	重组 CPEP	0.155 ± 0.014	0.567 ± 0.028	0.721 ± 0.020
B 组 Group B	SC-1 灭活抗原 + 弗氏佐剂	0.152 ± 0.019	0.774 ± 0.021	1.168 ± 0.014
C 组 Group C	PBS + 弗氏佐剂	0.140 ± 0.029	0.153 ± 0.031	0.141 ± 0.021
D 组 Group D	PBS	0.146 ± 0.016	0.158 ± 0.023	0.150 ± 0.012

内诱导抗原进行筛选,结合生物信息学分析筛选抗原的基因特点,有目的地选择有意义的基因进行研究,将推动病原微生物特性以及病原微生物与宿主作用机理的研究。副猪嗜血杆菌的荚膜多糖输出蛋白基因即为体内诱导表达基因,因此对该基因进行原核表达以及对其表达蛋白的免疫原性、免疫保护性的研究有助于新型疫苗的研究。

荚膜与巴氏杆菌科的几个成员在上呼吸道的定居有关<sup>[22]</sup>,包括嗜血杆菌属<sup>[23]</sup>。荚膜多糖输出蛋白基因位于荚膜多糖合成基因的上游,该基因编码产物通常负责将荚膜多糖从细胞质输送到细胞表面。该基因在体内的表达上调有可能导致荚膜多糖蛋白的表达上调。因此,通过对荚膜多糖输出蛋白基因进行成功扩增并测序后,推导它编码的氨基酸序列(文中未列出),发现该蛋白有比较保守的结构域。经抗原指数分析(图 7),表明该蛋白有多个抗原决定簇,预示其具有良好的抗原性,对它们进一步研究可以为今后开发副猪嗜血杆菌新型疫苗或诊断试剂盒奠定基础。因此,本研究选择荚膜多糖输出蛋白基因进行克隆表达,以初步证实它的功能与作用。

pET-32a-CPEP 重组蛋白经 SDS-PAGE 初步分析后,采用猪抗副猪嗜血杆菌阳性血清对重组表达蛋白进行 Western blot 分析,结果显示在表达蛋白相应的位置出现了条带,表明重组荚膜多糖输出蛋白具备免疫反应原性。这是因为荚膜多糖输出蛋白基因是一个经过体内诱导抗原技术筛选出来的 1 个仅在体内诱导表达的蛋白质。大量研究报道使用通过体内诱导抗原技术筛选到的基因表达的蛋白具有良好的免疫原性,可以作为疫苗候选成分<sup>[17-21]</sup>。

细菌荚膜由多糖类、多肽类或多糖蛋白复合体组成,虽然它不是细菌结构的主要组成成分,但其功能越来越为人们所认识。关于荚膜的免疫原性作用,更多研究集中在荚膜多糖,如在猪胸膜肺炎放线杆菌、禽多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、B 群链球菌<sup>[24-30]</sup>等细菌中已有广泛而深入的研究,有的已被制成疫苗进入临床应用,如克雷伯菌多价苗<sup>[31]</sup>。关于荚膜多糖蛋白成分免疫原性的研究很少。W. N. Campbell 等<sup>[31]</sup>认为脑膜炎奈瑟菌(*neisseria meningitidis*)的荚膜多糖蛋白可能与荚膜的生物合成有关。

荚膜多糖输出蛋白纯化后在小鼠上经过免疫及抗体检测,表明该蛋白具有一定免疫原性,但是和全菌灭活抗原相比,诱导产生的抗体水平还较低。M.

Handfield 等<sup>[7]</sup>在首次提出 IVIAT 技术时,就报道通过该方法筛选出来的基因不一定具有很强的免疫原性,它可能是病原菌进入有机体由于表达上调产生的蛋白。这一点在荚膜多糖输出蛋白的动物试验中得到了体现。

## 4 结 论

重组荚膜多糖输出蛋白具有较好的抗体反应原性,免疫小鼠试验表明该重组蛋白有一定的免疫原性,免疫小鼠保护性试验,表明该重组蛋白对副猪嗜血杆菌 SC-1 株攻毒具有一定的保护率,可以作为免疫候选因子。

## 参考文献:

- [1] 芭芭拉 E S,杰弗里 J Z,塞尔维 D A,等.猪病学[M].赵德明,张仲秋,沈建忠,等译.9版.北京:中国农业大学出版社,2008.
- [2] 蔡旭旺,刘正飞,陈焕春,等.副猪嗜血杆菌的分离培养和血清型鉴定[J].华中农业大学学报,2005,24(1):55-58.
- [3] OLIVEIRA S,PIJOAN C. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fringerprints [J]. *Can J Vet Res*,2004,68(1):71-75.
- [4] TAKAHASHI K,NAGA S,YAGIHASHI T,et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions [J]. *J Vet Med Sci*,2001,63(5):487-491.
- [5] KIELSTEIN P,RABBACH A. Serologische Typisierung und Nachweis immunogener Kreuzreaktionen von *Haemophilus parasuis* (Glassersche Krankheit) [J]. *Mh Vet Med*,1991,46:586-589.
- [6] RAPP-GABRIELSON V J,KOCUR G J,CLARK J T,et al. *Haemophilus parasuis*: Immunity in swine following vaccination [J]. *Vet Med*,1997,92:83-90.
- [7] HANDFIELD M,BRADY L J,PROGULSKE-FOX A,et al. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections [J]. *Trends Microbiol*,2000,8(7):336-339.
- [8] 崔焕忠,张 辉,钱爱东.猪链球菌 2 型致病机制的研究进展[J].畜牧与兽医,2007,39(1):58-61.
- [9] 王春来,杨旭夫,刘 杰.胸膜肺炎放线杆菌主要毒力因子的致病性及其免疫原性研究进展[J].预防兽医学进展,2001,3(1):10-12.
- [10] 张 燕,李轻舟,杜连祥,等.肺炎克雷伯氏菌荚膜多

- 糖的提取纯化及其对细胞免疫活性的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 461-465.
- [11] 张晓艳, 易绍琼, 陈 薇. 金黄色葡萄球菌疫苗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37(2): 74-78.
- [12] MOROZUMI T, PAULI U, BRAUN R, et al. Deoxyribonucleic acid relatedness among stains of *Haemophilus parasuis* and other *Haemophilus spp.* of swine origin [J]. *Int J System Bacteriol*, 1986, 36: 17-19.
- [13] 都启晶, 庞 倩, 文心田, 等. 副猪嗜血杆菌 SC-1 株的分离培养及鉴定[C]// 中国畜牧兽医学学会 2009 学术年会论文集, 2009: 580-586.
- [14] 崔治中. 兽医免疫学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [15] 庞 倩. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及多重 PCR 检测 Hps 和 APP 方法的建立[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- [16] KIELSTEIN P, RAPP-GABRIELSON V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of Immunodiffusion using heat-stable antigen extracts [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(4): 862-865.
- [17] KUMAR M, KHAN F G, SHARMA S, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* genes preferentially expressed during human infection [J]. *Microb Pathog*, 2011, 50(1): 31-38.
- [18] LI S, SONG J, HUANG H, et al. Identification of *in vivo* induced genes of *Streptococcus suis* serotype 2 specially expressed in infected human [J]. *Microb Pathog*, 2013, 63: 8-15.
- [19] LOWRY J E, GOODRIDGE L, VERNATI G, et al. Identification of *Brucella abortus* genes in elk (*Cervus elaphus*) using *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) reveals novel markers of infection [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 142(3-4): 367-372.
- [20] JIAO X D, DANG W, HU Y H, et al. Identification and immunoprotective analysis of an *in vivo*-induced *Edwardsiella tarda* antigen [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2009, 27(5): 633-638.
- [21] JIAO X D, ZHANG M, HU Y H, et al. Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigens [J]. *Vaccine*, 2009, 27(38): 5195-5202.
- [22] BIBERSTEIN E L. Our understanding of the *Pasteurellaceae* [J]. *Can J Vet Res*, 1990, 54: S78-S82.
- [23] NICOLET J. Overview of the virulence attributes of HAP-group bacteria [J]. *Can J Vet Res*, 1990, 54: S12-S15.
- [24] INZANA T J, MA J, WORKMAN T, et al. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5 [J]. *Infect Immun*, 1988, 56(8): 1880-1889.
- [25] INZANA T J, MATHISON B. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5 [J]. *Infect Immun*, 1987, 55(7): 1580-1587.
- [26] INZANA T J, CLARK G F, TODD J. Detection of serotype-specific antibodies or capsular antigen of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a double-label radioimmunoassay [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(2): 312-318.
- [27] LENSER D K, MCDONALD T L, MILLER N G. Protection of mice against the lethal effect of an intraperitoneal infection with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* after vaccination with capsular proteins [J]. *Vet Microbiol*, 1988, 18(3-4): 335-348.
- [28] KODAMA H, MATSUMOTO M, SNOW L M. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys [J]. *Am J Vet Res*, 1981, 42(10): 1838-1841.
- [29] KOTLOFF K L, NORIEGA F, LOSONSKY G A, et al. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(11): 4542-4548.
- [30] KOTLOFF K L, FATTOM A, BASHAM L, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent group B streptococcal polysaccharide vaccine in healthy adults [J]. *Vaccine*, 1996, 14(5): 446-450.
- [31] CAMPBELL W N, HENDRIX E, CRYZ S J, et al. Immunogenicity of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma [J]. *Clin Infect Dis*, 1996, 23(1): 179-181.