

一种山羊支原体山羊肺炎亚种多重抗原肽的小鼠免疫试验

赵萍, 陈胜利, 郝华芳, 李学瑞, 贺英, 储岳峰*, 刘永生*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
农业部草食动物疫病重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要: 旨在构建一种由山羊支原体山羊肺炎亚种(*Mycoplasma capricolum* Subsp. *capripneumoniae*, Mccp)六个 B 细胞表位和三个 T 细胞表位组成的多重抗原肽(multiple antigenic peptide, MAP), 将其在大肠杆菌中表达后免疫小鼠, 评估其体液免疫和细胞免疫。分别用 MAP、单个 B 细胞表位及全菌超破抗原作为抗原, 检测免疫小鼠抗体水平, 结果显示三种抗原均能和小鼠免疫血清发生很好的反应($P < 0.01$)。体外代谢抑制试验显示, 1:64 倍稀释的免疫小鼠血清可以有效抑制 Mccp 的生长。淋巴细胞增殖试验显示, 当用单个 T 细胞表位及 Mccp 超破抗原分别刺激免疫小鼠的淋巴细胞时均产生明显的增殖现象($P < 0.01$)。细胞因子检测结果显示, 免疫小鼠的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 产量明显升高($P < 0.001$), 而 IL-12 产量明显下降($P < 0.001$)。数据显示, 构建的 MAP 能够引起小鼠的免疫反应, 这一结果为由 Mccp 引起的山羊传染性胸膜肺炎亚单位疫苗的研制奠定了一定的基础。

关键词: 免疫反应; 小鼠; 多重抗原肽; 山羊支原体山羊肺炎亚种

中图分类号: S852.62

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)12-2476-07

Immune Responses in Mice Immunized with a Recombinant Multiple Antigenic Peptide from *Mycoplasma capricolum* Subsp. *capripneumoniae*

ZHAO Ping, CHEN Sheng-li, HAO Hua-fang, LI Xue-rui, HE Ying, CHU Yue-feng*, LIU Yong-sheng*
(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Epizootic Diseases of Grazing Animals of Ministry of Agriculture, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: A multiple antigenic peptide (MAP), composed of six B-cell epitopes and three T-cell epitopes derived from antigenic proteins of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), was designed and expressed in *Escherichia coli* cells, which was then injected into mice to evaluate humoral and cellular immune responses induced by the recombinant MAP. Antibody levels against MAP, each single B-cell epitope, and the ultrasonic-treated crude Mccp antigen were all significantly increased ($P < 0.01$). Results of *in vitro* metabolic inhibition test indicated that diluted sera (1:64) from immunized mice inhibited Mccp growth. Splenic lymphocytes from the immunized mice exhibited remarkable proliferation when stimulated by each single T-cell epitope and crude Mccp antigen ($P < 0.01$). The production of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , and IL-10 were increased ($P < 0.001$), while that of IL-12 was decreased ($P < 0.001$). These data showed that the constructed MAP stimulated immune responses in mice. The results laid a cer-

收稿日期: 2016-06-15

基金项目: 国家科技支撑计划(2015BAD12B02); 十三五项目“牛羊重要病原体分子检测新技术研究”(2016YFD0500907)

作者简介: 赵萍(1973-), 女, 甘肃会宁人, 副研究员, 硕士, 主要从事细菌分子生物学, E-mail: zhaoping73@126.com, Tel: 0931-8342676

* 通信作者: 储岳峰, E-mail: chuyuefeng@caas.cn; 刘永生, E-mail: liuyongsheng@caas.cn

tain foundation to develop subunit vaccine against contagious caprine pleuropneumonia caused by Mccp.

Key words: immune response; mice; multiple antigenic peptides; *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*

山羊支原体山羊肺炎亚种(*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp), 是引起山羊传染性胸膜肺炎(contagious capripneumonia, CCPP)的病原体,该病以咳嗽、呼吸困难、发热为主要特征^[1]。CCPP 被世界动物卫生组织指定为严重危害山羊的疾病之一。由于对 Mccp 的毒力因子、保护性抗原等缺乏全面的认识,所以预防和控制 Mccp 的感染一直是一个很棘手的问题。目前,预防 CCPP 的疫苗主要是灭活疫苗,但由于 Mccp 在体外培养产量相对较低,所以灭活疫苗的广泛应用受到一定的限制。因此研制更加高效的针对 CCPP 的疫苗是众望所归。在诸多分子疫苗的设计方面,由 B 细胞表位和 T 细胞表位组成的多重抗原肽(multiple antigenic peptide, MAP)由于具有很好的免疫原性而成为诸多吸引眼球的设计思路之一,这些研究在乙型肝炎病毒、口蹄疫病毒、艾滋病毒、疟原虫、登革热病毒、曼氏血吸虫等引起的疾病方面都有报道^[2-7]。

丙酮酸脱氢酶是一些支原体和细菌的抗原性物质,具有介导病原体吸附于宿主细胞的功能^[8-10],鉴于此,笔者从前期试验中筛选出的具有良好免疫原性的三个蛋白质中,预测筛选了相关的 B 细胞表位和 T 细胞表位,并构建了 MAP,对编码 MAP 蛋白的基因进行合成并在大肠杆菌中表达,评估了由 MAP 引起的小鼠的体液免疫和细胞免疫。用于筛选表位的 Mccp 的三个免疫原性的蛋白质分别是丙酮酸脱氢酶 E1- α 亚单位(pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, PDHA)、丙酮酸脱氢酶 E1- β 亚单位(pyruvate dehydrogenase complex E1 component beta subunit, PDHB)和丙酮酸脱氢酶复合物二氢硫辛酰基乙酰转移酶(dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase components of the pyruvate dehydrogenase complex, PDHC)^[11-12]。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

Mccp 1601 株分离自甘肃某羊场山羊,培养基采用 Thiaucourt 肉汤培养基(1 L 培养基组成:PP-

LO 肉汤 21 g,葡萄糖 1 g,丙酮酸钠 2 g,质量体积比 25% 的酵母浸液 100 mL,0.4% 的酚红 0.18 mL,灭活马血清 200 mL,及水溶解的青霉素 20 万 IU,其 pH 为 7.4~7.6)。

1.2 Mccp 超破抗原的制备

收获生长滴度为 10^8 CCU \cdot mL⁻¹ 的 Mccp 菌液,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min,沉淀用 0.15 mol \cdot L⁻¹ pH7.2 的磷酸盐缓冲液洗涤、悬浮后,在冰浴上用超声破碎仪(sonicator, Sydney, Australia)破碎,破碎 30 s 停顿 30 s,总计 30 min。用 Bradford 方法测定蛋白质含量(Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, USA)。

1.3 Mccp 高免血清

Mccp 高免血清是由 Mccp 全菌蛋白质免疫的山羊血清,由笔者实验室保存。间接血凝试验(2015 新兽药证字 35 号)检测效价达 1:512。大体制备步骤如下:将灭活后一定浓度的 Mccp 全菌抗原分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂混合乳化,背部皮下多点接种 Mccp 抗体阴性的健康山羊,首次免疫接种弗氏完全佐剂抗原,21 d 后用弗氏完全佐剂抗原进行第二次免疫,隔 11 d 后,用弗氏不完全佐剂抗原进行第三次免疫。

1.4 B 细胞表位、T 细胞表位的选择及 MAP 结构的优化

编码 PDHA、PDHB 及 PDHC 的基因序列来源于 Mccp M1601 株(GenBank accession No.: AENG0100001)^[13],用 ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>)软件预测 B 细胞表位,用 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>)软件预测 T 细胞表位。将根据得分结果筛选出来的单个细胞表位进行合成(Shanghai Invitrogen Biotechnology Co., Ltd. Shanghai, China)。并将九种预测的可能的表位用甘氨酸串联于首尾相连构成 MAP,应用 DNASTar 中的 protean 对组建的 MAP 的结构进行抗原性、疏水性等分析,将最终筛选得到的编码 MAP 的基因序列进行合成(Genscript Biotechnology Co., Ltd. Nanjing, China)。

1.5 重组 MAP 的表达和纯化

将合成的 MAP 基因连接到 pET-32a(+) 载体后在大肠杆菌 *E. coli* strain BL21 中进行诱导表达,并参照说明书用镍柱进行纯化(Genscript Biotechnology Co., Ltd. Nanjing, China)。

1.6 动物和免疫

将购自本单位动物场 6~8 周龄的 SPF 级别的 BALB/C 小鼠 10 只随机分成两组,每组 5 只,分别为免疫组和对照组,免疫组皮下注射含 50 μg MAP 的弗氏佐剂 3 次,每 2 周注射 1 次,对照组皮下注射等量的 PBS 与弗氏佐剂混合物。前两次佐剂为弗氏完全佐剂,第三次佐剂为弗氏不完全佐剂。

1.7 血清抗体滴度和 IgG 亚型分析

免疫前血清作为对照血清,第 3 次免疫后 14 d 采集血清进行抗体检测及亚型分析。以 MAP 作为抗原,应用间接酶联免疫吸附试验检测 IgG、IgG1 和 IgG2a。主要试验步骤如下:以 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MAP 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤封闭后加入待检血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,分别以辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)为二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,以四甲基联苯胺为显色液,以 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓硫酸为终止液,酶标仪(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)上 450 nm 读取 OD 值。同时,为了检测 MAP 产生的抗体及其亚型针对 Mccp 抗原的特异性,以 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Mccp 超破抗原包被酶标板分别检测免疫小鼠的 IgG 抗体及其 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型。同时为了验证预测的 B 细胞表位的功能,以 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与卵清蛋白偶联^[14]的单个表位肽(A1、A2、B1、B2、C1、C2)分别包被酶标板检测免疫小鼠的 IgG 抗体,其余步骤同上。

1.8 代谢抑制试验

在 96 孔平底培养板中,用 Mccp 培养基将热灭活的 MAP 免疫小鼠血清从 1:2 开始倍比稀释至 1:512,然后加入等量的浓度为 10⁸ CCU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Mccp 菌液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 7 d,小鼠免疫前血清作为阴性对照,Mccp 高免血清作为阳性对照,Mccp 培养基作为空白对照,培养液颜色变化作为评估 Mccp 生长抑制试验的标准。

1.9 脾淋巴细胞增殖分析

无菌取出三免 14 d 以后的小鼠脾,将脾经 200

目的尼龙膜用淋巴细胞分离液(Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd., Beijing, China)分离后,将细胞稀释到 1640 培养基中,使其终浓度为 6 $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,于 24 孔平底培养板上,每孔加入 1 mL 细胞悬液,并分别加入单个的 T 细胞表位 TA、TB 和 TC(终质量浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 Mccp 超破抗原(终质量浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行刺激,同时设立不加抗原的细胞悬浮物为阴性对照。将培养板置于 CO₂ 培养箱中培养 5 d 后,根据细胞增殖分析试剂盒的说明书进行操作(Promega Corporation, Madison, WI, USA),根据刺激指数来评估淋巴细胞增殖,刺激指数等于加抗原刺激的 OD_{490 nm} 值/不加抗原刺激的 OD_{490 nm} 值。

1.10 细胞因子分析

向上述处理好的 6 $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞中加入 Mccp 超破抗原使其终质量浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,于 24 孔平底培养板上,每孔加入 1 mL 细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,用商品化的试剂盒检测 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 和 IL-12 五种细胞因子(Dakewe Biotech Co., Ltd., Shenzhen, China)。孵育 72 h 后检测 IL-1 β 和 IL-10,96 h 后检测 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-12^[15]。

1.11 数据分析

数据采用 SPSS 11.0(IBM-SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)软件进行分析,并采用平均值与标准偏差的形式表示,数据间的比较采用方差分析的方法, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 表位的选择及 MAP 的结构

根据得分结果选择了六个 B 细胞表位(A1、A2、B1、B2、C1、C2)和三个 T 细胞表位(TA、TB、TC),通过 DNASTar 中的 protean 软件分析得出用 GG 连接子按 B1、B2、TB、C1、C2、TC、A1、A2、TA 顺序进行首尾相连组成的串联体即为本试验所用的最佳 MAP 结构。相关信息见表 1。

2.2 重组 MAP 的表达、纯化

将合成的 MAP 基因连接到 pET-32a(+) 载体后在大肠杆菌 *E. coli* BL21 株中进行诱导表达,并参照说明书用镍柱进行纯化,表达纯化前、纯化后的结果见图 1。

2.3 抗体及其亚型分析

用 ELISA 方法检测的抗体水平及其亚型分析

表 1 从 Mccp 中筛选的组成 MAP 的肽及 MAP 的结构

Table 1 Selected Mccp peptides for construction of MAP and MAP structure

肽 Peptide	来源 Origin	氨基酸序列 Amino acid sequences	所属表位 Contained epitopes
B1	PDHB(147-154)	CPSTPYDT	B-cell epitopes
B2	PDHB(162-170)	IDSPDPVIV	B-cell epitopes
TB	PDHB(310-319)	FQVNPKKVLV	T-cell epitopes
A1	PDHA(119-130)	EAGGKAPEGVNC	B-cell epitopes
A2	PDHA(266-275)	SSDNPDVYRP	B-cell epitopes
TA	PDHA(175-184)	YEAMNFAKLH	T-cell epitopes
C1	PDHC(151-158)	VTPTGPNQ	B-cell epitopes
C2	PDHC(371-378)	PIINSPES	B-cell epitopes
TC	PDHC(236-245)	FTGMKNTDIT	T-cell epitopes
MAP *	B1-GG-B2-GG-TB-GG-A1-GG-A2-GG-TA-GG-C1-GG-C2-GG-TC		

* 通过 GG 按 B1、B2、TB、A1、A2、TA、C1、C2、TC 的顺序依次相连

* B1, B2, TB, A1, A2, TA, C1, C2 and TC were situated in tandem through the GG spacer sequence

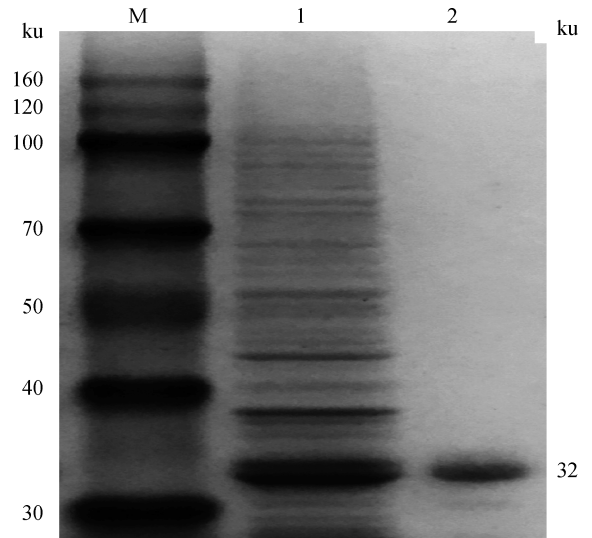
见图 2(a)、图 2(b)和图 2(c),和免疫前相比,分别用单个的 B 细胞表位(A1、A2、B1、B2、C1、C2)、重组的 MAP 以及 Mccp 超破抗原包被酶标板检测的小鼠血清抗体均有明显的升高(所有 $P < 0.01$),对照组免疫前后没有明显变化(数据未显示)。同样的,和免疫前相比,用重组的 MAP 以及 Mccp 超破抗原包被酶标板检测的 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型水平均有明显的升高(所有 $P < 0.01$),对照组免疫前后没有明显变化(数据未显示)。

2.4 代谢抑制试验

试验结果显示,1:2 至 1:128 稀释的阳性对照血清抑制了 Mccp 的生长,1:2 至 1:64 稀释的 MAP 免疫小鼠血清也能够抑制 Mccp 的生长,而免疫前血清没能抑制 Mccp 的生长。在阴、阳性对照成立的前提下,MAP 免疫小鼠血清对 Mccp 的生长具有抑制作用。

2.5 脾淋巴细胞增殖分析

小鼠脾淋巴细胞增殖试验结果见表 2,和对照组相比,免疫组不管是用 TA、TB、TC 刺激,还是用 Mccp 超破抗原刺激,平均刺激指数均有明显提升(TA, $P < 0.01$; TB, $P < 0.01$; TC, $P < 0.01$; Mccp 抗原, $P < 0.001$)。



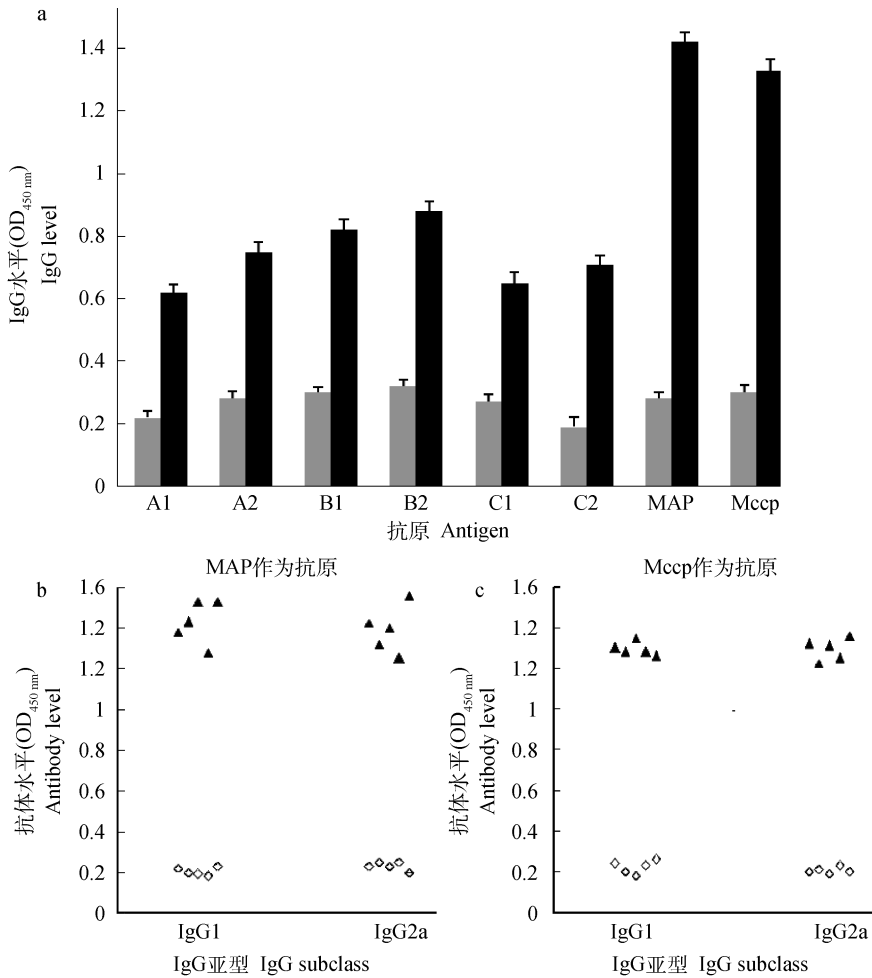
M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 纯化前;2. 纯化后
M. Protein marker; 1. Before purification; 2. Purified recombinant MAP

图 1 重组 MAP 的表达、纯化

Fig. 1 Expression and purification of the recombinat MAP

2.6 细胞因子

体外脾淋巴细胞的细胞因子分泌水平结果见表 3,和对照组相比,免疫组 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 细胞因子水平明显提升(所有 $P < 0.001$),而 IL-12 细胞因子水平明显下降($P < 0.001$)。



■、◇.免疫前; ■、▲.免疫后;免疫前后相比,所有数据均P<0.01
 ■、◇.Before immunization; ■、▲.After immunization. Compared with data before immunization, P<0.01

图2 用 A1、A2、B1、B2、C1、C2、MAP、Mccp 作为抗原检测 IgG 抗体 (a),用 MAP 作为抗原检测 IgG1、IgG2a 抗体亚型 (b),用 Mccp 作为抗原检测 IgG1、IgG2a 抗体亚型 (c)
 Fig. 2 Total IgG against the corresponding peptides of A1, A2, B1, B2, C1, C2, the recombinant MAP and the crude Mccp antigen (a), IgG subclass (IgG1 and IgG2a) against the recombinant MAP (b), and IgG subclass (IgG1 and IgG2a) against the crude Mccp (c)

表2 小鼠脾淋巴细胞增殖试验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Splenic lymphocyte proliferation in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	平均刺激指数 Mean stimulation index			
	TA	TB	TC	Mccp 抗原 Mccp antigen
免疫组 Immunized group	2.03 ± 0.25*	2.45 ± 0.20*	2.28 ± 0.27*	3.47 ± 0.15**
对照组 Control group	1.02 ± 0.13	1.35 ± 0.20	1.20 ± 0.15	1.14 ± 0.23

用 TA、TB、TC 和 Mccp 抗原刺激的淋巴细胞增殖分析,数据用平均值±标准方差表示(每组 5 只)。*、** 免疫组和对照组在统计学上具有显著差异(*. P<0.01, **. P<0.001)

Splenic lymphocyte proliferation assay was performed using TA, TB, TC and crude Mccp antigen. Data are expressed as the mean±SD (n=5, each group). *, ** Statistically significant differences between immunized groups and control groups (*. P<0.01, **. P<0.001)

表 3 体外脾淋巴细胞的细胞因子分泌水平($\bar{x} \pm s$)Table 3 The levels of cytokines produced by splenic lymphocytes *in vitro* ($\bar{x} \pm s$)pg · mL⁻¹

组别 Group	细胞因子 Cytokines				
	TNF- α	IL-1 β	IFN- γ	IL-10	IL-12
免疫组 Immunized group	250.3 \pm 16.4*	33.4 \pm 6.2*	30.6 \pm 5.5*	287.5 \pm 15.3*	<8*
对照组 Control group	<32	<8	<8	<32	25.6 \pm 5.4

最后一次免疫后 2 周的小鼠(每组 5 只),取其脾淋巴细胞培养的上清液,培养 72 h 检测 IL-1 β 和 IL-10,培养 96 h 检测 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-12,用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。* 免疫组和对照组差异显著, $P < 0.001$

The splenic lymphocyte culture supernatants taken from mice ($n=5$, each group) 2 weeks after the last immunization were examined for cytokine production. Values for IL-1 β and IL-10 from 72 h culture and IFN- γ , TNF- α and IL-12 from 96 h culture. Data are expressed as the $\bar{x} \pm s$. * Statistically significant differences between immunized groups and control groups, $P < 0.001$

3 讨 论

多重抗原肽富集大量的靶标抗原,能够引起既定抗原表位的免疫反应^[16]。针对山羊支原体山羊肺炎亚种,目前没有关于 MAP 的相关研究,因此,本研究着眼于山羊传染性胸膜肺炎疫苗候选靶标的 MAP 的免疫原性研究。试验从三个具有免疫原性的抗原 PDHA、PDHB、PDHC 中预测筛选了九个表位,其氨基酸位置分别为 PDHA (A1, 119—130; A2, 266—275; TA, 175—184), PDHB (B1, 147—154; B2, 162—170; TB, 310—319), PDHC (C1, 151—158; C2, 371—378; TC, 236—245),将九个表位两两之间用 GG 连接于首尾相连组成 MAP^[17]。另外,由于支原体密码子的偏好性,在大肠杆菌中作为终止子的 TGA 在支原体中编码色氨酸,因此试验中将编码 MAP 的基因序列进行了突变优化,并通过原核表达、纯化获得目的蛋白质,这样大大降低了用合成的方法制备多肽的费用,更加适应大批量的生产需要。

MAP 刺激机体产生的抗体能够和 MAP 抗原、单个 B 细胞表位、Mccp 超破抗原发生很好的反应,淋巴细胞增殖试验中,分别用单个 T 细胞表位和 Mccp 超破抗原刺激时均能引起细胞增殖,说明预测的表位具有一定的免疫相关功能。

细胞因子在致病性感染的过程中发挥重要的作用,多种免疫细胞和细胞因子之间相互促进、相互调节,形成免疫调节网络,细胞因子之间具有多效性、重叠性、拮抗性和协调性。本试验中小鼠免疫 MAP 后 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-1 β 的分泌量明显增加,而 IL-12 的分泌量则明显减少。IFN- γ 在细胞免疫

中占据很重要的角色,TNF- α 主要是细胞毒性 T 细胞和 Th1 型细胞介导的免疫反应的产物,IL-1 β 能够引导 T 细胞分泌 IL-2 或其他细胞因子,IL-10 与 T 细胞增殖、产生 IgG、IgE 抗体及免疫调节相关,IL-12 的下调可能与 IL-10 上调有关,即细胞因子之间的拮抗作用,这一结论在 S. Chatterjee 等的研究也有报道^[16]。综合分析 IgG1、IgG2a 抗体亚型及多种细胞因子,提示富集多抗原表位的 MAP 可以诱导小鼠产生 Th1/Th2 免疫反应,即能够引起有效的体液免疫和细胞免疫,这一结论与 Francis 等的研究结果基本一致^[3,18-19]。

代谢抑制试验显示,由 MAP 产生的抗体能够中和 Mccp,进一步表明重组的 MAP 能够产生一定的免疫保护作用,提示,MAP 在将来的亚单位疫苗、多抗原表位肽疫苗中的应用潜质,下一步的试验目标是验证 MAP 在山羊的免疫作用。

4 结 论

构建由山羊支原体山羊肺炎亚种六个 B 细胞表位和三个 T 细胞表位组成的多重抗原肽 MAP 免疫小鼠,通过小鼠 IgG 抗体及其 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型检测、免疫小鼠血清代谢抑制试验、淋巴细胞增殖试验、细胞因子检测,结果显示构建的 MAP 能够引起小鼠的体液免疫和细胞免疫,为山羊传染性胸膜肺炎亚单位疫苗的研制起到了积极的作用。

参考文献 (References):

- [1] THIAUCOURT F, BÖLSKE G, LENEGUERSH B, et al. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia[J]. *Rev Sci Tech*, 1996, 15(4):

- 1415-1429.
- [2] TAM J P, LU Y A. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T- and B-cell epitopes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(23): 9084-9088.
- [3] FRANCIS M J, HASTINGS G Z, BROWN F, et al. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus [J]. *Immunology*, 1991, 73(3): 249-254.
- [4] NARDELI B, LU Y A, SHIU D R, et al. A chemically defined synthetic vaccine model for HIV-I[J]. *J Immunol*, 1992, 148(3): 914-920.
- [5] PESSI A, VALMORI D, MIGLIORINI P, et al. Lack of H-2 restriction of the *Plasmodium falciparum* (NANP) sequence as multiple antigen peptide [J]. *Eur J Immunol*, 1991, 21(9): 2273-2276.
- [6] AMEXIS G, YOUN N S. Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus[J]. *Viral Immunol*, 2007, 20(4): 657-663.
- [7] GARCIA T C, FONSECA C T, PACIFICO L G, et al. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice[J]. *Acta Trop*, 2008, 106(3): 162-167.
- [8] DALLO S F, KANNAN T R, BLAYLOCK M W, et al. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46(4): 1041-1051.
- [9] DE BERARDINIS P, HAIGWOOD N L. New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(6): 673-679.
- [10] BURNETT T A, DINLIA K, ROHDE M, et al. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 60(3): 669-686.
- [11] ZHAO P, HE Y, CHU Y F, et al. Identification of novel immunogenic proteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strain M1601[J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(9): 1109-1115.
- [12] ZHAO P, HE Y, CHU Y F, et al. Optimizing and expressing of proteins including PDHA, PDHB and PDHC of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*[J]. *Asian J Anim Vet Adv*, 2013, 8(5): 723-731.
- [13] CHU Y, GAO P, ZHAO P, et al. Genome sequence of the *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* strain M1601[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(21): 6098-6099.
- [14] WAITE E R, MARCH J B. Capsular polysaccharide conjugate vaccines against contagious bovine pleuropneumonia: immune responses and protection in mice [J]. *J Comp Pathol*, 2002, 126(2-3): 171-182.
- [15] WANG Y, WANG M, WANG G, et al. Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens[J]. *Vaccine*, 2011, 29(47): 8619-8623.
- [16] CHATTERJEE S, SHARMA P, KUMAR S, et al. Fine specificity of immune responses to epitopic sequences in synthetic peptides containing B and T epitopes from the conserved *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens[J]. *Vaccine*, 1995, 13(15): 1461-1474.
- [17] TAM J P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(15): 5409-5413.
- [18] LIVINGSTON B D, NEWMAN M, CRIMI C, et al. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19(32): 4652-4660.
- [19] KHAN M A, OGITA K, FERRO V A, et al. Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility [J]. *Vaccine*, 2008, 26(10): 1365-1374.

(编辑 白永平)