

分类号：
学 号：20212313202

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学 博 士 学 位 论 文



牛支原体效应蛋白致病机制及新型疫苗的初步研究

学 位 申 请 人	李 芮 芮
指 导 教 师	陈创夫 教授 王 勇 教授 马忠臣 副教授
申请学位门类级别	农学博士
学 科、专 业 名 称	畜 牧 学
研 究 方 向	动物生产与疾病控制
所 在 学 院	动物科技学院

中国 新疆 石河子
2025 年 6 月

分类号：
学 号：20212313202

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学 博 士 学 位 论 文



牛支原体效应蛋白致病机制及新型疫苗的初步研究

学 位 申 请 人	李芮芮
指 导 教 师	陈创夫 教授 王勇 教授 马忠臣 副教授
申请学位门类级别	农学博士
学 科、专 业 名 称	畜牧学
研 究 方 向	动物生产与疾病控制
所 在 学 院	动物科技学院

中国 新疆 石河子
2025 年 6 月

**Pathogenic Mechanisms of *Mycoplasma bovis* Effector Proteins and
Development of Novel Vaccines**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Agriculture

By

Li Rui-rui

(Animal Husbandry Science)

Dissertation Supervisor: Prof. Chen Chuang-fu

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李芮芮

时间：2025 年 5 月 26 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李芮芮

时间：2025 年 5 月 26 日

导师签名：陈剑

时间：2025 年 5 月 26 日

课题来源

1. 兵团重大科技项目

项目编号：2017AA003

2. 石河子大学高层次人才科研启动项目

项目名称：牛支原体效应蛋白的挖掘及其致病机制研究

项目编号：RCZK202456

3. 新疆维吾尔自治区“天池英才（青年博士）计划

摘要

牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) 作为牛群中的重要病原体, 严重威胁全球畜牧业健康发展。该病原体可引发多种临床症状, 包括牛呼吸道疾病综合征、乳腺炎及关节炎, 这些疾病不仅导致牛生长迟缓、生产性能下降, 甚至可能致死, 给畜牧业带来重大经济损失。随着全球养牛业的集约化和工业化发展, 牛支原体的传播风险进一步增加。然而, 目前针对该病原体的致病机制研究仍存在诸多空白, 且尚未开发出有效的疫苗用于防控。因此, 深入研究牛支原体的致病机制并开发新型疫苗具有重要意义。本研究旨在探讨牛支原体效应蛋白的致病机制, 并致力于新型疫苗的开发, 以期为该病的防控提供理论依据和技术支持。

目的: (1) 对新疆石河子地区规模化牛场中牛支原体病原菌进行分离、鉴定, 明确其分子特征、遗传进化关系及药物敏感性, 为临床防控提供科学依据。(2) 解析牛支原体效应蛋白 (MbovP274、ENO1) 及相关蛋白互作网络调控宿主细胞的分子机制, 揭示其致病通路。(3) 针对牛支原体疫苗研发中抗原筛选不足问题, 系统评估重组抗原的免疫原性, 筛选具有保护潜力的候选疫苗抗原, 并设计、构建、评估新型多表位融合抗原及不同疫苗形式 (如亚单位疫苗、DNA 疫苗) 的保护效果。

方法: (1) 采用固液交替培养法纯化病原菌, 利用 PCR 技术扩增 UvrC 基因及 16S rRNA 基因进行分子鉴定, 结合生化试验分析代谢特性, 采用药敏纸片法检测抗生素敏感性, 通过全基因组测序及比较基因组学解析基因组特征与进化关系。(2) 构建效应蛋白 MbovP274 和 ENO1 的重组质粒, 利用 GST-Pulldown 联合质谱筛选互作蛋白, 通过 CO-IP 验证, 结合分子对接鉴定互作关键残基, 利用点突变、siRNA 干扰等评估功能效应, 检测相关炎症因子及信号通路激活水平。(3) 基于比较基因组学和大量文献筛选抗原基因, 构建重组表达菌株, 经诱导表达、纯化获得重组蛋白, 测定蛋白浓度并验证抗原特异性。通过免疫小鼠, 检测血清 IgG 及其亚类水平、脾淋巴细胞 IFN- γ 分泌等评估免疫原性。(4) 构建多表位融合抗原 MbovE3, 进行理化性质、免疫模拟分析。利用原核表达系统制备亚单位疫苗 rMbovE3, 在小鼠和新西兰兔模型中评估免疫及保护效果。(5) 利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统制备多表位融合蛋白 MbovE3, 联合不同佐剂 (ISA206、Quil-A) 制备亚单位疫苗, 并免疫动物评价其免疫原性与保护效力。(6) 构建含多表位融合抗原基因 MbovE3 和佐剂基因 GM-CSF 的真核表达载体, 制备 DNA 疫苗并免疫动物评估免疫保护效果。

结果: (1) 成功分离并鉴定了新疆石河子地区牛支原体 XJ01 株。16S rRNA 序列分析显示, 其与国内流行株 (HB0801、XBY01、Ningxia-1) 的同源性 $\geq 99.9\%$, 与 PG45 国际标准株的相似性为 99.7%。全基因组测序结果表明, XJ01 株基因组大小为 1,023,741 bp, GC 含量为 29.33%, 编码 939 个功能基因, 主要富集于翻译、代谢及细胞过程。生化试验验证, XJ01 株无法水解精氨酸、尿素或

发酵糖类，但可还原氯化三苯基四氮唑，符合牛支原体的典型代谢特征。（2）首次发现牛支原体效应蛋白 MbovP274 通过结合宿主白蛋白（Alb）激活细胞焦亡。通过 GST-Pulldown 联合质谱筛选出 6 个互作蛋白，CO-IP 实验验证了 MbovP274 与 Alb 的特异性结合。分子对接分析表明，MbovP274 的 Asp-498、Lys-501 和 Arg-504 等残基通过氢键、盐桥及疏水作用与 Alb 形成稳定复合物。功能研究表明，过表达 MbovP274 显著上调 IL-1 β 、IL-18 和 LDH 水平，激活 caspase-1 和 GSDMD 焦亡通路；而 Alb 沉默可完全抑制焦亡效应。（3）首次发现牛支原体效应蛋白 ENO1 通过结合宿主 ACTB 蛋白，诱导糖酵解异常激活、ROS 水平升高及 HIF-1 α /IL-1 β 信号轴活化。敲低 ACTB 可逆转代谢异常并抑制 ROS 生成。ACTB 的关键残基（117Glu、372Arg）与 ENO1 形成稳定复合物，调控宿主代谢与炎症反应。ENO1-ACTB 轴是整合宿主代谢、氧化应激与炎症信号的核心枢纽。（4）成功表达六种重组蛋白，免疫实验结果显示，MbovP274、MbovP570 和 ENO1 组在 42 d 时 IgG 水平显著升高，IFN- γ 分泌水平明显上升。其中，ENO1 组诱导 Th1 型免疫应答，而 MbovP274 组呈现 Th2 向 Th1 的动态转换。（5）基于 MbovP274、MbovP570 和 ENO1 的预测表位，成功构建了靶向牛支原体的多表位融合抗原 MbovE3。分析显示，MbovE3 具有高稳定性和可溶性。免疫实验表明，亚单位疫苗 rMbovE3 能诱导强效 Th2 型体液免疫与细胞免疫反应，显著降低肺组织病原载量及病理损伤，且保护效果优于传统灭活疫苗。（6）通过杆状病毒-昆虫细胞表达系统，成功构建了携带牛支原体多表位融合抗原 MbovE3 的重组病毒，并获得高纯度 MbovE3 蛋白。两种疫苗（MbovE3+ISA206 与 MbovE3+Quil-A）均能有效抑制牛支原体在鼻腔排毒和肺部定殖，并减轻肺组织病理损伤。进一步分析表明，相较于 Quil-A，ISA206 佐剂显著增强了疫苗的免疫原性，其诱导的 CD4⁺ T 细胞 IFN- γ 分泌水平及后期特异性 IgG 抗体滴度均显著升高。（7）将 MbovE3 多表位抗原基因和 GM-CSF 基因分别构建至 pVAX1 载体，成功制备了 DNA E3 和 DNA E3+GM-CSF 两种疫苗。免疫实验显示，两种疫苗均能显著抑制牛支原体在鼻腔和肺组织中的定殖，减少病原载量，并减轻肺组织的病理损伤。其中，DNA E3+GM-CSF 疫苗在诱导外周血淋巴细胞分泌 IFN- γ 以及免疫后期特异性抗体 IgG 水平方面优于 DNA E3 疫苗，表明 GM-CSF 作为免疫佐剂能够有效增强免疫应答。

结论：（1）牛支原体 XJ01 株与国内流行株高度保守，其基因组特征与代谢特性为解析遗传进化及区域防控提供了重要依据。（2）MbovP274 通过劫持 Alb-炎症小体轴激活焦亡，揭示了牛支原体调控宿主免疫反应的关键致病机制。（3）ENO1-ACTB 互作介导的代谢重编程与炎症级联反应，为靶向干预牛支原体感染提供了新靶点。（4）MbovP274、MbovP570 和 ENO1 具有显著免疫优势，为牛支原体多表位疫苗的研发奠定了试验基础。（5）基于多表位抗原 MbovE3 的亚单位疫苗（rMbovE3、MbovE3 +ISA206）和 DNA 疫苗（DNA E3+GM-CSF）展现出高效免疫保护潜力，为牛支原体疫苗研发奠定了理论和技术基础。

关键词：牛支原体；细胞焦亡；糖酵解；疫苗；多表位融合抗原

Abstract

Mycoplasma bovis is a significant pathogen in cattle that poses a serious threat to the sustainable development of global animal husbandry. This pathogen is associated with a range of clinical manifestations, including bovine respiratory syndrome, mastitis, and arthritis. These conditions not only result in stunted growth and reduced production performance but can also lead to mortality, thereby inflicting substantial economic losses on the livestock industry. The intensification and industrialization of the global cattle industry have further heightened the risk of *Mycoplasma bovis* transmission. Despite its impact, there remain considerable gaps in understanding the pathogenic mechanisms of this organism, and no effective vaccine has been developed for its prevention and control. Consequently, investigating the pathogenic mechanisms of *Mycoplasma bovis* and developing novel vaccines are of paramount importance. This study aims to elucidate the pathogenic mechanisms of *Mycoplasma bovis* effector proteins and to develop new vaccines, thereby providing a theoretical foundation and technical support for the prevention and control of the associated diseases.

Object: (1) Isolation and characterization of *Mycoplasma bovis* strains from intensive cattle farms in Shihezi, Xinjiang, aimed to delineate their molecular characteristics, including genomic features, phylogenetic relationships, and antimicrobial susceptibility profiles. This research provides a scientific foundation for developing clinical prevention and control strategies. (2) Elucidation of the molecular mechanisms by which *Mycoplasma bovis* effector proteins, such as MbovP274 and ENO1, along with their associated protein interaction networks, regulate host cellular processes focused on uncovering key pathogenic pathways that drive infection and disease progression. (3) Systematic evaluation of conserved recombinant antigens was conducted to address the critical gap in antigen screening for *Mycoplasma bovis* vaccine development. This involved identifying protective candidate antigens, designing and constructing novel multi-epitope fusion antigens, and assessing the protective efficacy of various vaccine formulations, such as subunit and DNA vaccines, through preclinical models.

Methods: (1) The pathogen was isolated and purified using the solid-liquid alternation culture technique. Molecular identification was conducted by amplifying the UvrC gene and 16S rRNA gene via polymerase chain reaction (PCR). Metabolic characteristics were examined through a series of biochemical assays. Antibiotic susceptibility was determined using the disk diffusion method. Genomic features and phylogenetic relationships were elucidated through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. (2) Recombinant plasmids encoding the effector proteins MbovP274 and ENO1 were constructed. To identify interacting proteins, a GST-pulldown assay was performed and analyzed by mass spectrometry, followed by confirmation through co-immunoprecipitation (CO-IP). Molecular docking was employed to pinpoint key interaction residues. Functional implications were assessed through site-directed mutagenesis and small

interfering RNA (siRNA) interference. The expression levels of associated inflammatory factors and the activation status of signaling pathways were quantitatively analyzed. (3) Based on comparative genomics and extensive literature screening of antigen genes, recombinant expression strains were constructed, and recombinant proteins were obtained through induced expression and purification. The protein concentration was determined, and antigen specificity was verified. Immunogenicity was assessed by immunizing mice, detecting serum IgG and its subclass levels, and measuring IFN- γ secretion from splenic lymphocytes. (4) A multi-epitope fusion antigen, MbovE3, was constructed, and its physicochemical properties and immune simulation were analyzed. A prokaryotic expression system was utilized to prepare the subunit vaccine rMbovE3, and its immunogenicity and protective efficacy were evaluated in mouse and New Zealand rabbit models. (5) The baculovirus-insect cell expression system was utilized to prepare the multi-epitope fusion protein MbovE3. This protein was combined with different adjuvants (ISA206, Quil-A) to formulate subunit vaccines, which were then used to immunize animals for assessing immunogenicity and protective efficacy. (6) A eukaryotic expression vector containing the multi-epitope fusion antigen gene MbovE3 and the adjuvant gene GM-CSF was constructed. Subsequently, a DNA vaccine was prepared and administered to immunize animals to evaluate its immunoprotective effects.

Results: (1) The *Mycoplasma bovis* strain XJ01 from Xinjiang Shihezi was successfully isolated and identified. 16S rRNA sequence analysis revealed $\geq 99.9\%$ homology with domestic prevalent strains (e.g., HB0801, XBY01, Ningxia-1) and 99.7% similarity with the international reference strain PG45. Whole-genome sequencing showed that the XJ01 genome spans 1,023,741 bp with a GC content of 29.33%, encoding 939 functional genes primarily enriched in translation, metabolism, and cellular processes. Biochemical assays confirmed that XJ01 cannot hydrolyze arginine, urea, or ferment carbohydrates but reduces triphenyl tetrazolium chloride, consistent with typical metabolic features of *Mycoplasma bovis*. (2) For the first time, the *Mycoplasma bovis* effector protein MbovP274 was found to activate pyroptosis by binding host albumin (Alb). GST-Pulldown coupled with mass spectrometry identified six interacting proteins, and CO-IP validated the specific interaction between MbovP274 and Alb. Molecular docking revealed that residues Asp-498, Lys-501, and Arg-504 of MbovP274 form a stable complex with Alb via hydrogen bonds, salt bridges, and hydrophobic interactions. Functional studies demonstrated that MbovP274 overexpression significantly upregulated IL-1 β , IL-18, and LDH levels, activating caspase-1 and the GSDMD pyroptosis pathway. Alb silencing completely suppressed pyroptosis. (3) The *Mycoplasma bovis* effector protein ENO1 was discovered to bind host ACTB, inducing aberrant glycolysis activation, elevated ROS levels, and HIF-1 α /IL-1 β signaling. ACTB knockdown reversed metabolic dysregulation and inhibited ROS production. Key ACTB residues (117Glu, 372Arg) formed stable complexes with ENO1, regulating host metabolism and inflammation. The ENO1-ACTB axis integrates host metabolism, oxidative stress, and inflammatory signaling. (4) Six recombinant proteins were successfully expressed. Immunization assays revealed significantly elevated IgG levels and IFN- γ secretion at 42 days post-immunization with MbovP274, MbovP570, and ENO1. ENO1 induced Th1-type responses, while MbovP274 triggered a dynamic Th2-to-Th1 shift. (5) A multi-epitope fusion antigen, MbovE3, targeting *Mycoplasma bovis* was constructed using

predicted epitopes of MbovP274, MbovP570, and ENO1. MbovE3 exhibited high stability and solubility. Immunization with the subunit vaccine rMbovE3 elicited robust Th2-type humoral and cellular immunity, significantly reducing lung pathogen load and pathology, outperforming traditional inactivated vaccines. (6) A recombinant baculovirus-insect cell system expressing MbovE3 yielded high-purity protein. Both MbovE3+ISA206 and MbovE3+Quil-A vaccines effectively suppressed nasal shedding and pulmonary colonization of *Mycoplasma bovis* while mitigating lung pathology. ISA206 adjuvant enhanced immunogenicity, elevating CD4+ T cell IFN- γ secretion and late-phase IgG titers compared to Quil-A. (7) DNA vaccines (DNA E3 and DNA E3+GM-CSF) were constructed by cloning MbovE3 and GM-CSF genes into the pVAX1 vector. Both vaccines markedly inhibited *Mycoplasma bovis* colonization in nasal and lung tissues, reduced pathogen load, and alleviated pathology. DNA E3+GM-CSF outperformed DNA E3 in inducing IFN- γ secretion by peripheral blood lymphocytes and late-phase IgG levels, demonstrating GM-CSF as an effective adjuvant for enhancing immune responses.

Conclusion: (1) The *Mycoplasma bovis* XJ01 strain shows high conservation with prevalent strains in China, and its genomic characteristics and metabolic properties provide crucial insights into genetic evolution and regional prevention and control. (2) MbovP274 activates pyroptosis by hijacking the Alb-inflammasome axis, revealing a key pathogenic mechanism through which *Mycoplasma bovis* regulates the host immune response. (3) The metabolic reprogramming and inflammatory cascade mediated by the ENO1-ACTB interaction present new targets for the targeted intervention of *Mycoplasma bovis* infection. (4) MbovP274, MbovP570, and ENO1 demonstrate significant immunodominance, providing an experimental foundation for the development of a multi-epitope vaccine against *Mycoplasma bovis*. (5) The subunit vaccines (rMbovE3, MbovE3+ISA206) and the DNA vaccine (DNA E3+GM-CSF) based on the multi-epitope antigen MbovE3 have demonstrated high efficacy in immunoprotection, thereby laying a theoretical and technical foundation for the development of vaccines against *Mycoplasma bovis*.

Key words: *Mycoplasma bovis*; Pyroptosis; Glycolysis; Vaccine; Multi-epitope fusion antigen

目录

摘要.....	I
Abstract	III
目录.....	VI
英文缩略词表.....	XI
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究目的与意义.....	1
1.2 牛支原体研究进展.....	1
1.2.1 牛支原体的概述.....	1
1.2.2 牛支原体的结构特性和适应性.....	2
1.2.3 牛支原体病的临床症状.....	2
1.2.4 牛支原体病的流行现状.....	3
1.2.5 牛支原体的表面黏附蛋白.....	4
1.2.6 牛支原体的毒力效应蛋白.....	10
1.2.7 牛支原体的免疫逃避机制.....	11
1.2.8 牛支原体的致病机制.....	12
1.2.9 牛支原体的疫苗研究进展.....	14
1.3 研究内容和技术路线.....	18
1.3.1 研究内容.....	18
1.3.2 技术路线.....	20
第 2 章 新疆石河子地区牛支原体的分离与鉴定.....	21
2.1 材料与方法.....	22
2.1.1 材料.....	22
2.1.2 方法.....	24
2.2 结果与分析.....	27
2.2.1 病原的 PCR 鉴定及菌落形态观察.....	27
2.2.2 分离株的 16S rRNA PCR 扩增结果.....	28
2.2.3 分离株的生化试验结果.....	29
2.2.4 分离株的药物敏感性试验结果.....	30
2.2.5 分离株的生长曲线.....	31

2.2.6	分离株的全基因组测序结果.....	31
2.2.7	分离株的比较基因组学结果.....	36
2.3	讨论.....	37
2.4	小结.....	39
第 3 章	效应蛋白 MbovP274 诱导细胞焦亡的分子机制.....	40
3.1	材料和方法.....	41
3.1.1	材料.....	41
3.1.2	方法.....	43
3.2	结果.....	50
3.2.1	双酶切验证重组质粒 pET22b-MbovP274 (GST) 成功构建.....	50
3.2.2	MbovP274 (GST) 蛋白可溶高效表达与高纯度纯化验证.....	51
3.2.3	GST-Pulldown 联合质谱鉴定出 6 个 MbovP274 互作候选蛋白.....	52
3.2.4	CO-IP 证实 MbovP274 与 Alb 的特异性互作.....	53
3.2.5	分子对接揭示 MbovP274-Alb 互作位点.....	54
3.2.6	CO-IP 与点突变验证揭示 MbovP274-Alb 互作的关键氨基酸位点.....	54
3.2.7	MbovP274 重组表达时程优化与 Alb 基因高效干扰片段筛选.....	55
3.2.8	MbovP274-Alb 互作上调细胞焦亡的标志物表达.....	56
3.2.9	MbovP274-Alb 互作激活细胞焦亡执行蛋白 caspase-1 和 GSDMD.....	57
3.2.10	Alb 是焦亡启动阶段的关键宿主因子.....	58
3.2.11	Alb 介导牛支原体感染对 caspase-1/GSDMD 通路的调控作用.....	59
3.3	讨论.....	60
3.4	小结.....	61
第 4 章	效应蛋白 ENO1 介导炎症级联与代谢重编程的机制研究.....	63
4.1	材料和方法.....	64
4.1.1	材料.....	64
4.1.2	方法.....	65
4.2	结果.....	68
4.2.1	双酶切验证重组质粒 pET22b-ENO1 (GST) 成功构建.....	68
4.2.2	ENO1 (GST) 蛋白可溶高效表达与高纯度纯化验证.....	69
4.2.3	GST-Pulldown 联合质谱鉴定出 5 个 ENO1 互作候选蛋白.....	70
4.2.4	CO-IP 证实 ENO1 与 ACTB 的特异性互作.....	71
4.2.5	分子对接揭示 ENO1 与 ACTB 互作位点.....	72
4.2.6	CO-IP 与点突变验证揭示 ENO1 与 ACTB 互作的关键氨基酸位点.....	73
4.2.7	ENO1 重组表达时程优化与 ACTB 基因高效干扰片段筛选.....	74

4.2.8 ENO1-ACTB 互作对宿主糖酵解通路的调控作用	75
4.2.9 ENO1-ACTB 互作通过调控糖酵解-线粒体轴驱动 ROS 异常生成	76
4.2.10 ENO1-ACTB 互作通过 HIF-1 α /IL-1 β 轴驱动代谢-炎症级联效应	77
4.2.11 ENO1-ACTB 互作调控促炎因子分泌	77
4.2.12 牛支原体 XJ01 感染通过 ACTB 调控宿主细胞能量代谢	78
4.2.13 牛支原体 XJ01 感染通过 ACTB 调控宿主细胞 ROS 生成	79
4.2.14 牛支原体 XJ01 感染通过 ACTB 调控宿主细胞 HIF-1 α 与 IL-1 β 表达	80
4.2.15 牛支原体 XJ01 感染通过 ACTB 调控宿主细胞促炎因子表达	81
4.3 讨论	82
4.4 小结	83
第 5 章 牛支原体多抗原筛选与保护性分子鉴定	85
5.1 材料与方法	86
5.1.1 材料	86
5.1.2 方法	87
5.2 结果	91
5.2.1 重组质粒的双酶切验证	91
5.2.2 重组蛋白的表达与纯化	92
5.2.3 重组蛋白的 Western blot 检测	94
5.2.4 重组蛋白的浓度检测	95
5.2.5 小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平	95
5.2.6 小鼠血清中 IgG、IgG1 和 IgG2a 的表达水平	96
5.2.7 Western blot 检测小鼠血清反应原性结果	97
5.3 讨论	98
5.4 小结	99
第 6 章 多表位融合抗原 MbovE3 的设计、表达及免疫保护效果评价	100
6.1 材料和方法	101
6.1.1 材料	101
6.1.2 方法	102
6.2 结果	109
6.2.1 多表位融合抗原的设计与构建	109
6.2.2 多表位融合抗原重组质粒的构建、表达与纯化	113
6.2.3 ELISpot 检测小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 的释放量	115
6.2.4 间接 ELISA 检测特异性抗体 IgG 及其亚类水平	116
6.2.5 Western blot 检测小鼠血清反应原性	117

6.2.6 ELISpot 检测兔外周血淋巴细胞 IFN- γ 分泌	118
6.2.7 间接 ELISA 检测兔血清中 IgG 水平	119
6.2.8 qPCR 检测兔鼻腔和肺组织的牛支原体载量	120
6.2.9 肺组织病理切片的制备与 HE 染色	120
6.2.10 肺组织病理切片的制备与免疫组化分析	121
6.3 讨论	122
6.4 小结	123
第 7 章 杆状病毒系统表达 MbovE3 的亚单位疫苗制备及免疫效果评价	124
7.1 材料和方法	125
7.1.1 材料	125
7.1.2 方法	126
7.2 结果	130
7.2.1 重组杆状病毒的鉴定	130
7.2.2 P2 代重组病毒的滴度测定	131
7.2.3 目的蛋白的表达细胞检测	132
7.2.4 P2 代重组病毒 MOI 的检测	133
7.2.5 目的蛋白的纯化	134
7.2.6 ELISpot 检测兔外周血淋巴细胞 IFN- γ 分泌	135
7.2.7 间接 ELISA 检测兔血清样本中特异性 IgG 抗体的含量	136
7.2.8 ELISA 检测兔血清样本中 IL-4 和 TNF- α 的含量	136
7.2.9 qPCR 检测兔鼻腔和肺组织的牛支原体载量	137
7.2.10 肺组织病理切片的制备与 HE 染色	138
7.2.11 肺组织病理切片的制备与免疫组化分析	139
7.3 讨论	140
7.4 小结	141
第 8 章 基于 MbovE3 的 DNA 疫苗制备及免疫效果评价	143
8.1 材料与方法	144
8.1.1 材料	144
8.1.2 方法	144
8.2 结果	147
8.2.1 重组真核表达载体的构建与鉴定	147
8.2.2 重组质粒的体外表达鉴定	147
8.2.3 ELISpot 检测兔外周血淋巴细胞 IFN- γ 分泌	148
8.2.4 间接 ELISA 检测兔血清样本中特异性 IgG 抗体浓度	149

8.2.5 ELISA 检测兔血清样本中 IL-4 和 TNF- α 含量	150
8.2.6 qPCR 检测兔鼻腔和肺组织的牛支原体载量	150
8.2.7 肺组织病理切片的制备与 HE 染色.....	151
8.2.8 肺组织病理切片的制备与免疫组化分析.....	152
8.3 讨论.....	153
8.4 小结.....	154
第 9 章 结论.....	156
第 10 章 创新点.....	157
参考文献.....	158
附录 A 主要溶液的配制方法	175
附录 B 质粒小提试剂盒	177
附录 C 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒.....	178
附录 D 银染试剂盒.....	179
附录 E 定性蛋白质组检测	180
附录 F 超纯 RNA 提取试剂盒	182
附录 G 通用型逆转录试剂盒.....	183
附录 H 牛 IL-1 β 、IL-18 酶联免疫分析(ELISA).....	184
附录 I L-乳酸脱氢酶(L-LDH)活性检测试剂盒	185
附录 J 葡萄糖检测试剂盒	187
附录 K L-乳酸含量检测试剂盒	188
附录 L ATP 检测试剂盒.....	190
附录 M 活性氧 (ROS) 检测试剂盒.....	191
附录 N His 标签蛋白纯化试剂盒 (可溶性蛋白)	192
附录 O His 标签蛋白纯化试剂盒 (包涵体蛋白)	193
附录 P BCA 蛋白浓度测定试剂盒标准曲线制作方法.....	194
附录 Q 免疫信息学相关在线软件网址	195
附录 R 兔 IL-4、TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒	196
附录 S 无内毒素大提质粒 DNA 试剂盒.....	197
致谢.....	198
作者简介.....	199
石河子大学博士研究生学位论文导师评阅表.....	201

英文缩略词表

英语缩写	英语全称	中文名称
CCU	Colour change unit	颜色改变单位
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性T淋巴细胞
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫
ELISpot	Enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点法
HTL	Helper T cell	辅助性T细胞
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白G
IFN- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
MHCI	Major HistocOMPatibility COMPLex Class I	主要组织相容性复合体I类
MHCII	Major HistocOMPatibility COMPLex Class II	主要组织相容性复合体II类
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Real-timeQuantitativepolymerase chain reaction	实时荧光定量PCR
RT-qPCR	Real-time RT-PCR	实时荧光定量逆转录PCR
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
TCID ₅₀	50% of the tissue culture infected dose	半数组织培养感染剂量
h	Hour	小时
d	Day	天
min	Minute	分钟
r/min	Rotation per minute	转/分钟
kDa	Kilo dalton	千道尔顿
L	Iiter	升
mL	Milliliter	毫升
μ L	Microliter	微升