

密级：

论文编号：

中国农业科学院 博士学位论文

鸡源鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白（MOMP）基 因重组腺病毒活载体疫苗研究

Study on vaccine of recombinant adenovirus containing MOMP gene of
Chlamydia psittaci of chicken origin

博 士 研 究 生： 周继章

指 导 教 师： 邱昌庆 研究员

申 请 学 位 类 别： 农学博士

专 业： 预防兽医学

研 究 方 向： 动物传染病分子流行病学与免疫学

培 养 单 位： 研究生院

兰州兽医研究所

提交日期 2006 年 5 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

Study on vaccine of recombinant adenovirus containing MOMP gene of
Chlamydia psittaci of chicken origin

Ph.D Candidate: Zhou JiZhang

Advisor: Prof. Qiu ChangQing

Major: Preventive Veterinary Science

Specialty: Molecular Epidemiology and Immunology
of Animal Infectious Diseases

Chinese Academy of Agricultural Sciences

May 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	鸡源鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白（MOMP）基因重组腺病毒活载体疫苗研究				
论文作者	周继章	指导教师	邱昌庆	培养单位	兰州兽医研究所
	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人					
答辩主席	才学鹏	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
答辩委员	才学鹏	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
	黄有德	教 授	硕士生导师	甘肃农业大学	临床兽医学
	吴 润	教 授	博士生导师	甘肃农业大学	预防兽医学
	胡永浩	教 授	博士生导师	甘肃农业大学	预防兽医学
	殷 宏	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
	刘湘涛	研究员	硕士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
	刘在新	研究员	博士生导师	兰州兽医研究所	预防兽医学
答辩时间与地址	2006 年 6 月 16 日于兰州兽医研究所学术厅				
记录人员	鲁炳仪				

鸡源鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白（MOMP）基因重组腺病毒

活载体疫苗研究

摘 要

本研究分离了鸡源鸚鵡热衣原体，建立了鸡衣原体病 PCR 诊断方法。利用 E1 和 E3 缺失的人腺病毒 5 型载体，首次在国内外成功构建了含有鸡源鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白（MOMP）基因的重组腺病毒。并用重组腺病毒对本动物鸡进行了免疫试验和安全试验。

（1）从疑似患鸚鵡热衣原体病鸡分离到衣原体，经涂片观察、接种鸡胚，碘染色试验、磺胺嘧啶钠试验、电子显微镜观察，确定为鸚鵡热衣原体，命名为hnq株，用鸡胚法测定其毒力为 $1.8 \times 10^{-7}/0.2\text{ELD}_{50}$ ，CpL株的毒力为 $5.6 \times 10^{-10}/0.2\text{ELD}_{50}$ 。选择CpL株为研究对象。建立了鸡源鸚鵡热衣原体PCR诊断方法，并对其特异性、敏感性和灵敏度进行了验证。

（2）对鸡源鸚鵡热衣原体 CpL 株 MOMP 基因进行了克隆和测序，并与禽源鸚鵡热衣原体其他菌株的 MOMP 基因进行了序列比较。结果表明，与禽源衣原体鸭（GD）株的 MOMP 氨基酸序列同源性为 89.7%；与火鸡（CT1）株 MOMP 氨基酸序列同源性为 88.7%；与鸽子（CP3）株 MOMP 氨基酸序列同源性为 82.3%；与长尾小鸚鵡（VS225）株的 MOMP 氨基酸序列同源性为 94.4%。

（3）通过基因操作的方法，将鸡源鸚鵡热衣原体CpL株MOMP基因置于腺病毒穿梭载体的巨细胞瘤（CMV）启动子和SV40 Poly(A) 尾巴之间，构建成目的基因的表达盒。构建的穿梭载体与腺病毒骨架载体在BJ5183 工程菌内进行同源重组，筛选阳性重组腺病毒质粒，命名为Ad-MOMP。序列测定表明，Ad-MOMP重组腺病毒所带的鸡源鸚鵡热衣原体MOMP基因的氨基酸序列完全正确。转染HEK293 细胞，用间接免疫荧光对表达产物检测，证明所构建的重组腺病毒能正确表达目的基因。减蛋综合征（EDS₇₆）阳性血清中和试验表明，不能中和重组腺病毒。重组腺病毒稳定性试验表明，该重组病毒能稳定携带外源基因进行传代（23 代）。

（4）禽源鸚鵡热衣原体MOMP基因重组腺病毒免疫SPF小鸡，第 21 天测定抗MOMP抗体，达到 1 : 32，用 $6.8 \times 10^9\text{TCID}_{50}$ 免疫SPF小鸡，能够抵抗 $5.6 \times 10^{10}\text{ELD}_{50}$ 同源强毒CpL株的攻击获得保护，保护率达 9/10；用减蛋综合征病毒（EDS_{76V}）检测重组腺病毒抗体，表明二者无抗原—抗体交叉反应。用野生型腺病毒和HEK293 细胞免疫的对照组均未产生任何的免疫保护效果。肌肉与皮下两种免疫途径试验结果表明，二者基本无差别，考虑到田间免疫的实用性，选择肌肉免疫。

（5）根据SPF小鸡免疫攻毒试验结果，用 $6.8 \times 10^9\text{TCID}_{50}$ 重组腺病毒一次肌肉免疫 7 日龄小鸡，21 天后用同源强毒CpL株进行攻击，观察结果 6 个月，表明免疫小鸡能够抵抗 $1.1 \times 10^{10}\text{ELD}_{50}$ 鸚鵡热衣原体强毒的攻击，保护率达 8/10。对照组 10 只鸡剖检后全部表现出鸚鵡热衣原体症状。抗体持续期试验表明，免疫后 21 天抗体水平达到最高（1 : 64），随后开始逐渐下降，至 180 天时，抗体水平仍然维持在保护水平。应用衣原体IHA和四甲基偶氮唑盐（MTT）法检测了小鸡的体液免疫和细胞免疫，表明二者都有应答。重组腺病毒安全性试验表明，小鸡生长正常，无排毒现象。重组腺病毒保存期试验显示，-20℃保存 1 年后 该重组腺病毒滴度有所下降，但不影响免疫力。

关键词：鸡源鸚鵡热衣原体，MOMP 基因，重组腺病毒疫苗，雏鸡

Study on vaccine of recombinant adenovirus containing MOMP gene of *Chlamydia psittaci* of chicken origin

Abstract

A *chlamydia psittaci* were isolated from affected chickens and the PCR method for chicken chlamydiosis was established. Recombinant adenovirus containing major outer membrane protein (MOMP) gene of *Chlamydia psittaci* of chicken origin were successfully constructed with human adenovirus type 5 vector which lack E1 and E3 genes. The MOMP genes were expressed in HEK293 cells and the recombinant adenovirus were evaluated in vitro and in vivo. It is the first time to construct recombinant adenovirus containing MOMP gene of avian *chlamydia psittaci* on the world.

(1) Avian *Chlamydia psittaci* were isolated from chicken which were suspected suffering from *Chlamydia psittaci* through iodine staining, chicken embryo vaccination, sulfadiazine sodium test and electron microscopic observation. The virulence of hnq strain was measured in chicken embryo, which can reach $1.8 \times 10^{-7}/0.2\text{ELD}_{50}$, CpL strain can reach $5.6 \times 10^{-10}/0.2\text{ELD}_{50}$. The CpL strain was chosen as research object. The PCR method for chicken chlamydiosis with good specificity and sensitivity was established.

(2) The MOMP genes were cloned and sequenced. Comparisons of the MOMP amino acid sequence of CpL with other strains of avian *chlamydia psittaci* showed that there was 89.7%, 88.7%, 82.3%, and 94.4% of homology of MOMP of CpL with duck strain, turkey, pigeon, and parrot, respectively.

(3) Using the way of gene ligation and recombination, avian *chlamydia psittaci* MOMP genes were inserted into the region between CMV promoter and SV40 Poly (A) of pShuttle-CMV vector to form a gene expression cassette. The positive pShuttle-CMV vector and skeleton vector of adenovirus were recombined in BJ5183 competent cells. Then positive recombinant adenovirus was picked out and named as Ad-MOMP. Sequence detection showed that the sequence of MOMP gene in recombinant adenovirus hadn't any mutation. Detecting the target genes and products expressed in HEK293 cells with an indirect immunofluorescent assay and PCR technique after transfection, it was proved that the recombinant adenovirus could express the target genes efficiently. Neutralization test showed that there was no cross response between EDS₇₆ positive serum and the recombinant adenovirus in vitro. The stability test showed that the recombinant adenovirus with MOMP gene could stably passage in HEK293 cells.

(4) Anti-MOMP antibodies of vaccinated SPF chicks were detected on 21th, the result showed that it can reach 1 : 32. SPF chicks vaccinated with $6.8 \times 10^9\text{TCID}_{50}$ Ad-MOMP recombinant adenovirus could resist $5.6 \times 10^{10}\text{ELD}_{50}$ CpL strain challenge on the day 21 post vaccination(dpv) and the protection rate was 9/10. But no chicks of both wild type adenovirus and HEK293 groups were protected from the challenge. No antibody against EDS₇₆ was detected, which suggested that inoculation of Ad-MOMP recombinant adenovirus to chicks would not inhibit vaccination against

EDS₇₆. Intramuscular and subcutaneous administrations were chosen in the test. The results suggested that the efficacy of both administrations was same. In order to meet practicability, we selected Intramuscular administration of the vaccine in the test.

(5) According to the test results of SPF chicks, 7 days old chicks were vaccinated with 6.8×10^9 TCID₅₀ Ad-MOMP recombinant adenovirus and challenged with the vaccine strain after 21 days. The results showed that chicks of the immunized group could resist 1.1×10^{10} ELD₅₀ of the vaccine strain attacking while the control group failed after 6 months. The protection rate was 8/10. Antibody duration test showed that anti-MOMP antibody can reach 1 : 64 on 21th day post vaccination. Then began down slowly still keeping a protective level on the 180th day. Specific antibody and T lymphocyte proliferation were detected with the IHA for Chlamydia antibody and MTT. The results showed that both of them had responses to Ad-MOMP recombinant adenovirus. The safety tests confirmed that the Ad-MOMP recombinant adenovirus had no side-effects on the inoculated chicks' health and gain and no recombinant adenovirus was discharged outside. In conservation period test, when the Ad-MOMP recombinant adenovirus was kept at -20°C for a year, its violence titer fell a little down, but immunity efficacy of the vaccine was un-reduced.

Keywords: *Chlamydia psittaci* of chicken origin; MOMP gene; recombinant adenovirus vaccine; chicks

目 录

第一章 绪 言	1
1.1 衣原体概述	1
1.2 衣原体分类	1
1.3 禽衣原体病	2
1.4 我国动物衣原体病流行情况	3
1.4.1 流行情况	3
1.5 衣原体分子生物学结构与功能	5
1.5.1 基因组研究进展	5
1.5.2 蛋白组学研究进展	8
1.6 鸚鵡热衣原体疫苗研究进展	10
1.6.1 减毒活疫苗	10
1.6.2 灭活疫苗	10
1.6.3 基因工程疫苗	11
1.6.4 结语	12
1.7 腺病毒载体的应用	12
1.7.1 腺病毒概况	12
1.7.2 腺病毒载体在疫苗研究中的应用	12
1.8 我国动物衣原体病研究概况	14
第二章 鸡源鸚鵡热衣原体分离与鉴定	16
2.1 材料和方法	16
2.1.1 鸡胚、实验动物及试剂	16
2.1.2 方法	16
2.2 结果	17
2.2.1 血清学检查	17
2.2.2 病原分离鉴定	17
2.3 讨论	21
第三章 鸡衣原体病PCR诊断方法的研究	22
3.1 材料	22
3.1.1 菌种、仪器及试剂	22
3.1.2 引物	22
3.2 方法	22
3.2.1 鸡衣原体基因组DNA的提取	22
3.2.2 PCR反应体系及条件	23
3.2.3 PCR产物的观察	24
3.2.4 减蛋综合症病毒（EDS76V）DNA、新城疫病毒（NDV）RNA、传染性支气管炎病毒（IBV）的RT-PCR	24
3.2.5 鸡衣原体MOMP蛋白基因引物特异性检测	25
3.2.6 鸡衣原体PCR灵敏度的检测	25

3.2.7 鸡衣原体病PCR诊断与间接血凝（IHA）试验敏感性的比较	25
3.2.8 鸡源鹦鹉热衣原体病PCR诊断稳定性试验	25
3.3 结果	25
3.3.1 套式PCR反应结果	25
3.3.2 PCR反应特异性试验结果	26
3.3.3 灵敏度试验	26
3.3.4 鸡衣原体病PCR诊断与间接血凝（IHA）试验敏感性的比较	26
3.3.5 鸡衣原体病PCR诊断方法稳定性试验	26
3.4.讨论	27
第四章 鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因的克隆与序列分析	28
4.1 材料和方法	28
4.1.1 试剂	28
4.1.2 鸡源鹦鹉热衣原体（CpL株）MOMP 基因的PCR产物琼脂糖凝胶电泳	28
4.1.3 PCR产物回收	28
4.1.4 回收的PCR产物与pMD-18T载体的连接与转化	29
4.1.5 质粒DNA的提取	29
4.1.6 重组质粒酶切鉴定	29
4.1.7 重组质粒PCR鉴定	30
4.1.8 序列测定	30
4.1.9 序列同源性分析	30
4.2 结果	30
4.2.1 重组质粒酶切鉴定	31
4.2.2 重组质粒PCR鉴定	31
4.2.3 序列同源性比较	31
4.3 讨论	32
第五章 鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因重组腺病毒载体的构建	33
5.1 材料与方法	33
5.1.1 质粒载体与宿主菌	33
5.1.2 引物	33
5.1.3 MOMP基因的PCR扩增	34
5.1.4 MOMP片段与pMD18-simple T载体的连接	35
5.1.5 MOMP基因片段插入穿梭载体	35
5.1.6 BJ5183 感受态细胞的制备	36
5.1.7 细菌内同源重组	36
5.2 结果	37
5.2.1 MOMP/pMD18-simple-T 重组质粒PCR鉴定	37
5.2.2 MOMP/pMD18-simple-T重组质粒酶切鉴定	38
5.2.3 重组穿梭质粒酶切鉴定和PCR鉴定	38
5.2.4 重组穿梭质粒序列测定	38
5.2.5 重组腺病毒质粒PCR鉴定和酶切鉴定	39
5.3 讨论	39

第六章	鸡源鸚鵡热衣原体MOMP基因重组腺病毒质粒	42
	转染与鉴定	42
6.1	材料与方法	42
6.1.1	细胞、菌株和试剂	42
6.1.2	重组腺病毒质粒转染HEK293 细胞	42
6.1.3	重组腺病毒的培养	43
6.1.4	PCR检测目的基因	43
6.1.5	间接免疫荧光检测目的基因的表达	43
6.1.6	重组腺病毒与减蛋综合征阳性血清的中和试验	44
6.1.7	重组腺病毒稳定性试验	44
6.1.8	有限稀释法测定重组腺病毒毒价	44
6.1.9	重组腺病毒噬斑试验测定毒价	44
6.1.10	重组腺病毒电镜观察	45
6.2	结果	45
6.2.1	重组腺病毒转染HEK293 细胞	45
6.2.2	PCR检测MOMP基因	45
6.2.3	间接免疫荧光检测MOMP基因的表达	46
6.2.4	重组腺病毒减蛋综合征阳性血清中和试验	46
6.2.5	重组腺病毒稳定性检测	47
6.2.6	重组腺病毒毒价测定	47
6.2.7	重组腺病毒噬斑试验测定毒价	48
6.2.8	重组腺病毒电镜观察	48
6.3	讨论	49
第七章	鸡源鸚鵡热衣原体MOMP基因重组腺病毒的SPF雏鸡免疫试验	50
7.1	材料与方法	50
7.1.1	细胞和培养基	50
7.1.2	重组腺病毒制备	50
7.1.3	CpL鸡胚适应毒	50
7.1.4	试验动物及分组	50
7.1.5	血清抗体效价测定	50
7.1.6	重组腺病毒血清抗体检测	51
7.1.7	攻毒保护试验	51
7.2	结果	51
7.2.1	免疫前的鸚鵡热衣原体抗体水平	51
7.2.2	免疫后血清抗体的测定	52
7.2.3	肌肉免疫和皮下免疫抗体水平比较	55
7.2.4	重组腺病毒血清抗体的测定	55
7.2.5	攻毒保护试验结果	55
7.3	讨论	56

第八章 鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因重组腺病毒本动物试验及生物学

评价	57
8.1 材料与方法	57
8.1.1 细胞和培养基	57
8.1.2 重组腺病毒制备	57
8.1.3 CpL鸡胚适应毒	57
8.1.4 试验动物及分组	57
8.1.5 抗MOMP抗体持续水平监测	57
8.1.6 淋巴细胞增殖试验	57
8.1.7 攻毒试验	58
8.1.8 重组腺病毒安全性评价	58
8.1.9 疫苗保存期试验	58
8.2 结果	58
8.2.2 抗MOMP抗体水平变化检测	58
8.2.3 淋巴细胞增殖试验	59
8.2.4 攻毒试验	59
8.2.5 重组腺病毒安全性评价	60
8.2.6 疫苗保存期试验	61
8.3 讨论	62
第九章 结论	64
参考文献	65
附录	77
致谢	86
作者简介	87

英文缩略词表

缩写词	英 文	中 文
AC	Avian Chlamydiosis	禽衣原体病
Ad	adenovirus	腺病毒
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APCs	Antigen present cells	抗原递呈细胞
BHV1	Bovine herpesvirus type 1	牛疱疹病毒 1 型
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BVDV	Bovine viral diarrhea virus	牛病毒性腹泻-粘膜病病毒
CD ⁴⁺	Cluster of differentiation	分化群
CDC	Center for disease control	疾病控制中心
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CDV	Canine distemper virus	犬温热病毒
CF	Complement fixation	补体结合试验
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟疫病毒
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
DMEM	Dulbecco' s Minimum essential Medium	Dulbecco 极限必需培养基
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EB	Elementary body	原生小体
EBV	Epstein-Barr virus	埃-巴二氏病毒
EDTA	Ethylene diamine	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清.
FMD	Foot-and-mouth disease	口蹄疫
FMDV	Foot-and-mouth disease virus	口蹄疫病毒
gE	Glycoprotein E	糖蛋白 E
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HEK293	Human embryonic kidney cells	人胚胎肾细胞
HEV	Hepatitis E virus	戊型肝炎病毒
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
hCMV	Human cytomegalovirus	人巨细胞瘤病毒
HSP	Heat shock protein	热休克蛋白
IBDV	Infectious bursal disease virus	传染性法氏囊病毒
IBV	Infectious bronchitis virus	传染性支气管炎病毒
IF	Immuno-fluorescence	免疫荧光
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgA	Immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
IHA	Indirect hemagglutination	间接血凝试验
LB	Lyria broth	LB 培养基

LCT	Large cytotoxin of <i>Clostridium</i>	梭菌大细胞毒素
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MCS	Multi-clone site	多克隆位点
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
MOMP	Major outer membrane protein	主要外膜蛋白
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazoyl2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	四甲基偶氮唑盐
NDV	New castle disease virus	新城疫病毒
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate saline buffer	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PHA	Phytohemagglutinin	植物血球凝集素
POMP _s	Putative outer membrane proteins	推定的外膜蛋白
EDSV	Eggs drop syndrome virus	产蛋下降综合征病毒
ELD ₅₀	Eggs lethal dose	鸡胚半数致死剂量
RB	Reticular body	网状体
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性分析
PFU	Plaque forming unit	噬斑形成单位
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
rMOMP	Recombinant major outer membrane protein	重组的主要外膜蛋白
RT	Reverse transcriptase	反转录
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录-多聚酶链式反应
SDS	Sodium dodecyl surface	十二烷基磺酸钠
SIV	Swine influenza virus	猪流感病毒
SPF	Specific pathogen free	无特定病原
SV40	Simian vacuolating virus-40	猿猴空泡病毒-40
TBEV	Tick-borne encephalitis virus	蜱传性脑炎病毒
TCID ₅₀	50% tissue culture infectious dose	组织培养半数感染量
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
Th	Helper T cell	辅助性 T 细胞

第一章 绪 言

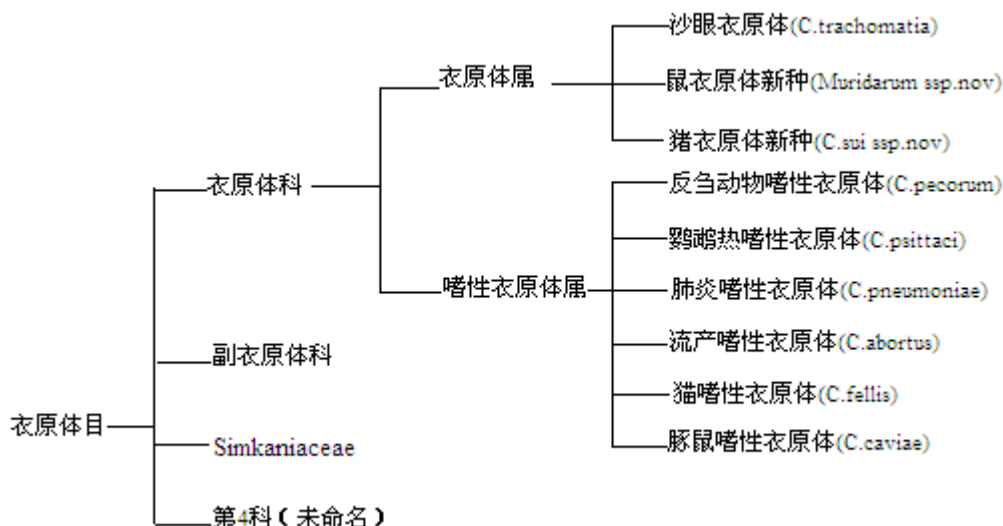
1.1 衣原体概述

衣原体是一类具有滤过性、严格细胞内寄生，并经独特发育周期以二等分裂繁殖和形成包涵体的革兰氏阴性原核细胞型微生物，直径 $0.2-1.5\mu\text{m}$ ，它只能在寄主细胞原生质内部以一种发育史进行繁殖。此发育史是以小的原生小体(elementary body, EB)变成较大的网状体(reticular body, RB)为特征的，RB 以分裂方式繁殖，发育成熟后破裂，释放出大量的 EB。EB 是一个小的，电子密度大的小球，直径 $0.2-0.4\mu\text{m}$ ，含有一个核和许多核糖体，核和核糖体被包在一个多层壁中；RB 是一个大的，具有薄壁的网状球形体，直径 $0.8-1.5\mu\text{m}$ ，含有核丝和核糖单位，还存在一种中间体，代表网状体和原体之间的过渡阶段。EB 具有感染性，而网状体对新的宿主细胞未见有感染性。衣原体细胞壁的结构和成分与其他革兰氏阴性细菌的相似，但无胞壁酸或微量。细胞壁有属特异脂多糖抗原 (R.E 布坎南等，1974)。

1.2 衣原体分类

图 1-1 衣原体分类

Fig.1-1 Classifying of Chlamydia



衣原体分类在 70 年代以前，根据衣原体包涵体糖原与碘染色的反应性、分离株对磺胺嘧啶的敏感性，将衣原体属 (*Chlamydia*) 分为沙眼衣原体 (*C.trachomatis*) 和鹦鹉热衣原体 (*C.psittaci*) 两个种。1979 年，根据某些分离株 EB 的超微结构、DNA 同源性及致病性有别于沙眼衣原体和鹦鹉热衣原体，从鹦鹉热衣原体中独立出第 3 个种，即与肺炎和心血管疾病有关的肺炎衣原体 (*C.pneumonia*)。1999 年，美国学者 Everett 等应用基因测序技术、遗传发生树分析技术、特征序列鉴定技术、脉冲电场凝胶电泳技术和免疫印迹技术，根据被检株全长 16SrRNA 和 23SrRNA 的同源性，将衣原体目 (Chlamydiales) 分为 4 科，即衣原体科 (Chlamydiaceae)、副衣原体科 (Parachlamydiaceae)、Simkaniaceae 科和第 4 个科 (尚未定名) 含 WSU86~1044 株。

详见图 1-1（邱昌庆，2000）。

1.3 禽衣原体病

禽衣原体病是由嗜性鹦鹉热衣原体感染禽类而引起的一种疾病。目前该病被称为“鹦鹉病”或“鹦鹉热”，该病最早被认为与鹦鹉鸟以及与这些鹦鹉鸟接触的人相关联。1941 年，“鸟疫”一词被引入到家禽或野鸟或与家禽野鸟相关联的衣原体病，而不是指鹦鹉鸟的衣原体病（Meyer K F, 1941）。现在，这些病在鸟类中被认为是同一类疾病，因此“禽衣原体病”相对来说用的要更广泛一些（Andersen A A, 1997）。“鹦鹉热”一词更被趋向于人的衣原体病。鹦鹉热衣原体由 8 个血清型组成（表 1-1）。这些血清型是通过使用血清特异性单克隆抗体直接免疫荧光试验（Andersen A A, 1991）或通过 PCR 核苷酸序列分析或限制型片段长度多态性分析（RFLP）被鉴定出来（Sayada C H *et al*, 1995; Vanrompay D *et al*, 1997a）。至少有 6 个血清型（A~F）被认为在家禽中流行。每个血清型明显的与不同的鸟群相关联。一些血清型与已知的宿主非常密切，可能起到传播媒介的作用。这种现象多少年来发生在鸽子和鹦鹉鸟中，对其他鸟类的衣原体的传播起到了承载作用。然而，已知宿主的血清型与这些血清型在这些宿主中流行没有多大的关联，例如流行于火鸡中的血清型最有可能来自于野鸟（Andersen A A, 1997）。

表 1-1 鹦鹉热衣原体血清型

Table 1-1 the serum of *Chlamydia psittaci*

血清型	代表株	相关宿主
A	VS1	鹦鹉鸟
B	CP3	鸽子
C	GR9	鸭、鹅
D	NJ1	火鸡
E	MN	鸽子、火鸡
F	VS225	鹦鹉鸟
WC	WC	牛
M56	M56	麝鼠、野兔

到目前为止，鹦鹉热衣原体感染大部分宠物鸟，家禽（包括火鸡、鸭、鹅、鸡以及相关的家养品种）和野鸟（Vanrompay D *et al*, 1995）。报道的次数也越来越多，持续感染的时间可能是几个月或几年都是很正常的。鹦鹉热衣原体感染不同宠物鸟或在动物园流行的情况没有相关的文献报道。然而，报道在野鸟之间广泛的流行，其中 376 种鸟是通过涂片染色或分离的方法而证实衣原体的存在（Taday EMA, 1998）。鹦鹉鸟和鸽子对鹦鹉热衣原体非常易感，通过病原分离的方法研究发现，大约超过 10% 的鸟感染衣原体；通过血清学方法检测，有 30% 的鸟患过衣原体（Andersen AA, 2000）。在家禽中，大爆发也经常发生在火鸡场和鸭场，并且导致人的感染，也有个别的报道鹅场爆发衣原体病（Durfee *et al*, 1975; Sadowski and Minta, 1979; Bracewell and Bevan, 1982; Farmer *et al*, 1982; Barr *et al*, 1986; Malkinson *et al*, 1987; Hedberg *et al*, 1989; New

mann, 1989; Arzey, 1990; Newman *et al*, 1992; Hinton *et al*, 1993; Hafez and Sting, 1997; Vanrompay *et al*, 1997b)。

禽类感染衣原体后多呈隐性状态,尤其是鸡、鹅、野鸡等,仅能发现有抗体存在。鹦鹉、鸽、鸭、火鸡等可呈显形感染。患病鹦鹉精神萎顿,不食,眼和鼻有粘性分泌物,拉稀,后期脱水,消瘦。幼龄鹦鹉常归于死亡,成年者则症状轻微,康复后长期带菌。病鸽精神不安,眼和鼻有分泌物,厌食、拉稀,成年鸽多数可康复成带菌者,雏鸽大多归于死亡。病鸭眼和鼻流出浆性和脓性分泌物,不食,拉稀,排除绿色水样便,病初震颤,步样不稳,后期明显消瘦,常发生惊厥而死亡,雏鸭病死率一般较高,成年鸭多为隐形经过。火鸡患病后精神萎顿,不愿采食、拉稀,粪便呈液状并带血,消瘦,病死率一般不高,当症状严重时,病死率会有所上升(Grimes *et al*, 1994)。

1.4 我国动物衣原体病流行情况

1.4.1 流行情况

衣原体具有广泛的宿主,但家畜中以羊、牛、猪较为易感。畜禽不分年龄均可感染,但不同年龄的畜禽其症状表现不一。幼羊(1—8)月龄多表现为关节炎、结膜炎,犊牛(6月龄以前)、仔猪多表现为肺肠炎,怀孕牛、羊、猪则多数发生流产(蔡宝祥, 2001)。衣原体还可感染人,如沙眼衣原体在人可以引起沙眼、弥漫性结膜炎、新生儿眼炎、非淋性尿道炎、淋性淋巴肉芽肿等(张炜, 1991)。肺炎衣原体引起人的肺炎、支气管炎,还可引起心包炎、心肌炎和心内膜炎(Grayston J T, 1992)。鹦鹉热衣原体引起人的发热、头痛、肌痛和以阵发性咳嗽为主要表现的间质性肺炎(Hinton D G *et al*, 1993)。

(1) 羊衣原体病流行情况

我国对羊的衣原体病的研究始于1978年,兰州兽医研究所对从青海、甘肃、内蒙、西藏等地的羊流产病料进行了分离、鉴定及免疫学研究(帅永玉等, 1981, 1982),从而揭开了羊衣原体病在我国流行的面纱。同时调查发现,这些地区山羊的流产率高达20%~25%,而绵羊很少发生流产(杨学礼等, 1981)。保广祺等对青海省海北州羊衣原体性流产进行了调查(保广祺等, 1990),感染发病率为5.75%~14%不等。李志杰等对甘肃省华池县羊衣原体病进行了调查(李志杰等, 1990),感染发病率为20%~40%。梁督军等报道对陕西省的甘泉、白水、乾县、千阳、汉中等五县2369只羊进行衣原体血清学调查,结果平均阳性率为2.45%(梁督军等, 1989)。陈廷和等对宁夏回族自治区部分县采集山羊血清,进行了衣原体检测(陈廷和等, 1994),感染发病率为19.77%。吴礼洁等报道广西14个养羊规模较大的县衣原体平均阳性率为1.98%(吴礼洁等, 2000)。杨秀环等对北京郊区县1991-2002年采集的山羊血清(3398份)进行羊衣原体病血清抗体检测,检出的平均阳性率为21%,个别县的阳性率达52%(杨秀环等, 2003)。1994年,张宝发等对内蒙古山羊流产进行了调查和研究(张宝发等, 1994)。

(2) 猪衣原体病的流行情况

我国猪衣原体病的研究始于上个世纪八十年代。湖北省畜牧兽医研究所的姜天童学者等首先研制了间接血凝实验来检测猪的衣原体病(姜天童等, 1985)。蒋成武等对湖(南)北省的猪衣原体病进行了血清学调查(蒋成武等, 1989),阳性感染率为9%。刁永祥等报道了青海省德令哈

1985 年间流产母猪衣原体病的情况, 阳性感染率为 33.3% (刁永祥等, 1990)。易奇珍等对广西 11 个地(市)的 30 个县采集各类猪血清 2314 头份, 用间接血凝试验检测的总阳性率为 17.33% (易奇珍等, 1994)。罗公平等对黑龙江省牡丹江市各县猪进行了衣原体病的调查, 阳性感染率为 6% (罗公平等, 1998)。邱昌庆等对湖北等 6 省区部分规模化猪场猪衣原体病进行了检测, 阳性感染率为 16.5~52.7%不等 (邱昌庆等, 1998)。李海念等对内蒙古地区 11 个盟市的 48 个旗县(市) 3100 多头猪进行衣原体病的调查, 阳性感染率为 50% (李海念等, 1999)。邱昌庆等对河北省衡水地区某规模化猪场的猪衣原体病进行了检测, 阳性率可达 35% (邱昌庆等, 2000)。王琼秋等报道了 1993 年发生在云南省红河州建水县羊于农场母猪发生的流产, 经间接血凝试验检测为猪衣原体 (王琼秋等, 2001)。胡龙阳对福建惠安县某猪场的猪衣原体病进行了报道 (胡龙阳, 2002)。高双娣等报道了甘肃省猪衣原体病的流行情况, 阳性感染率为 34.4% (高双娣等, 2003)。白挨泉等对广东部分地区猪衣原体病的血清学做了调查, 阳性感染率为 14.3% 到 94.1% 不等 (白挨泉等, 2004)。胡海志对辽宁铁岭市 6 个规模较大的养猪场的猪的衣原体病进行了调查, 平均阳性率可达 5.16% (胡海志等, 2004)。索绪峰等对海南省部分市县 13 个猪场的 972 份血清用间接血凝试验进行猪衣原体病抗体检测, 结果表明猪场整体抗体阳性率为 49.5%, 其中母猪群抗体阳性率为 53.66% (索绪峰等, 2005)。

(3) 牛衣原体病流行情况

我国从八十年代开始, 一些省区陆续报道该病。邱昌庆等对陕西西安市 6 个奶牛场进行衣原体病血清学调查, 阳性检出率达 28.31% (邱昌庆等, 2005)。周继章等报道了运用间接血凝试验 (IHAT) 对采自山东、河北、河南、陕西、宁夏、甘肃、青海和四川等 8 个省区的肉用牛、肉役兼用黄牛和牦牛血清 (642 份) 进行衣原体抗体检测 (周继章等, 2001)。兰州兽医研究所对采自广西、安徽和江苏 12 个县的 343 份水牛血清 IHAT 检测, 发现各县水牛群均不同程度地存在衣原体感染, 阳性检出率最低的为 3.3%, 最高为 39.3%。2002~2004 年, 陕西和宁夏一些地区的奶牛场怀孕牛流产问题比较严重, 兰州兽医研究所用血清学和病原学方法再次证明奶牛流产是由衣原体引起 (邱昌庆, 2005)。

(4) 禽衣原体病流行情况

1959 年, 我国从家禽和人的鸟疫开始了对鹦鹉热衣原体的研究。朱关福等在 1984 年叙述了 1960 年初北京病鸭及鸽的肝脾中分离到衣原体, 其抗原性与苏联鸟疫衣原体 B 株一致 (潘达鑫, 1987)。胡起等在 1981 报道天津 1964 年由病鸽引起人群鸟疫, 并从鸽子中分离到 3 株衣原体 (胡起等, 1982)。郭元吉等 1986 年报道北京某鸡场鸡群中一次呼吸道疾病爆发流行, 最后鉴定为由衣原体引起 (郭元吉等, 1986)。段跃进等报道了一些大中型鸡场和户养的鸡群表现腹部明显膨大或者呈企鹅状, 输卵管囊肿等症状, 经分离鉴定后为衣原体 (段跃进等, 1993)。杨宜生等报道了在 6 种野鸟体内分离出了鹦鹉热衣原体 (杨宜生等, 1993)。王琼秋等报道了 1994 年对云南省红河州 14 个大中型养鸡场疫病进行了检测, 经分离鉴定后确定为鹦鹉热衣原体 (王琼秋等, 1997)。于维军等连云港市商品 AA 肉鸡场的衣原体病进行了调查, 感染发病率为 25% 到 92.2% 不等 (于维军, 1994)。刘棋等对广西 6 个地市的 1568 份鸡血清用间接血凝法检测衣原体抗体, 结果显示阳性率高达 20.66% (刘棋等, 2001)。石岩等对北京、天津地区肉鸡流行的严重呼吸道疾病的鸡群进行血清学鉴定, 结果肉鸡血清抗体出现 10%~30% 的阳性 (石岩等, 2003)。张济培等对广东部分地区 13 个鸽场 197 份血清经间接血凝试验检验, 总阳性率达到 59.9% (张济培

等, 2003)。肖金东等对北京某赛鸽场赛鸽突然发生以结膜炎、鼻炎、呼吸道病为主要症状的传染病, 经分离鉴定确定为衣原体(肖金东等, 2004)。胡新岗等对江苏省姜堰市某个体养鸭户 500 余羽发病的樱桃谷鸭进行了流行病学的调查以及病原的分离鉴定, 最后确定为衣原体(胡新岗等, 2004)。

1.5 衣原体分子生物学结构与功能

1.5.1 基因组研究进展

目前, 已经对 4 个种衣原体: 豚鼠嗜性衣原体、鼠衣原体、沙眼衣原体和肺炎嗜性衣原体(Read TD *et al*, 2003; Hatch T, 1998) 基因组进行了较详细的研究。

Read 等(Read T D *et al*, 2003) 测定了豚鼠嗜性衣原体(以前称为鹦鹉热衣原体豚鼠包涵体结膜炎分离株)的完整基因组序列, 长度 1173390nt, 质粒 7966nt, 在 1009 个注释的基因中, 有 798 个基因是保守的。豚鼠嗜性衣原体的基因组中含有 68 个定向进化同源基因, 而鼠衣原体、沙眼衣原体(D 型)、肺炎嗜性衣原体的基因组中缺乏这些基因。

(1) 生态位特异性基因

Read 等(Read T D *et al*, 2000) 用随机鸟枪法测定豚鼠嗜性衣原体基因组序列。通过豚鼠嗜性衣原体、鼠衣原体、沙眼衣原体和肺炎嗜性衣原体完整基因组序列比较发现, 豚鼠嗜性衣原体编码功能蛋白的基因大约 3/4 是保守的, 与其它 3 个种交叉一致; 而剩余的 1/4 ORFs 可编码“生态位特异性”功能蛋白。Read 等(Read T D *et al*, 2003) 发现在独特的生态位基因组中有几个基因编码诸如象犬尿氨酸酶和色氨酸生物合成蛋白那样的潜在性毒力的决定簇。

(2) 毒素基因

10038nt 的 CCA00558 菌株编码一个 3364 个氨基酸残基产品(*tox*), 其非常相似于编码 EHEC 黏附因子的细胞毒性肠杆菌基因、淋巴抑制素(LifA) 和梭菌大细胞毒素(LCT)。

在 LCTs 中单一糖基化糖基转移酶激活, 这样可在功能上阻碍 Rho GTP 酶的活性, 而导致肌动蛋白骨架解体, 表现出明显的关联的致细胞病变效应(Busch C *et al*, 1998)。LCTs 的中央疏水区被鉴定为跨膜片段, 其可能在向细胞溶胶移位时发挥作用(Richard J F *et al*, 1999), 这样的中央疏水区在豚鼠嗜性衣原体和鼠衣原体的毒素基因中也存在。最近证明, 与宿主完整肌动蛋白作用, 需要衣原体入侵, 在入侵部位发生组织改变和对细胞骨架进行修改。毒素基因产品是重要的衣原体蛋白, 对宿主细胞骨架有破坏作用, 对衣原体的入侵起作用。最近, 还鉴定鼠衣原体的毒素基因是 III 型分泌的半胱氨酸蛋白酶 YopT 效应基因家族的成员(Shao F *et al*, 2002) 该家族起源于植物或动物细胞的病原体。沙眼衣原体各血清型间的一个重要差别就是是否存在肌动蛋白断裂毒素, 有可能说明各血清型间在早期内涵体(endosome) 内通过介导交流对不同点所产生的感染以及对系统散布影响的程度(Belland R J *et al*, 2001)。

(3) 侵染素/内膜素(invasin/intimin) 基因

豚鼠嗜性衣原体 CCA00886 株的 3874nt 编码一个含 1291 个氨基酸残基的产品, 其被鉴定为革兰氏阴性菌外膜蛋白毒力相关侵染素/内膜素家族(III F) 的成员。该家族现在包括肠杆菌病原的耶尔森氏菌原型侵染素和内膜素(例如, 支气管炎博氏菌的 Bvg 相关蛋白 BipA, 伤寒沙门氏

菌 (sivH), 大肠埃希氏菌 O157:H7 和 K12)。

(4) 多形态膜蛋白基因 (Pmp)

某些衣原体的多基因家族具有与别的衣原体基因组交叉的保守的定向进化同源基因, 但是许多展示短期的可变性。在当今测序的衣原体中, 最多的平行进化同源基因 (paralogous gene) 家族是多形态外膜蛋白基因 (Pmp genes), 该基因编码一组重要的表面蛋白, 首先在豚鼠嗜性衣原体发现该表面蛋白 (Cevenini R *et al*, 1991), 并且最近证明其相似于自体运转蛋白。豚鼠嗜性衣原体有 17 个 Pmp 基因成群分布在 4 个区域, 依据序列的同源性分为 6 个家族。对肺炎嗜性衣原体和豚鼠嗜性衣原体的 PmpG 和 PmpE/F 分析研究, 发现其与沙眼衣原体及鼠衣原体的基因组相关。

完整的衣原体基因组对于认识 Pmp 蛋白大家族也很重要。最初, 是应用抗体筛选程序鉴定了鸚鵡衣原体 Pmp 蛋白抗原大分子。Longbottom 等 (Longbottom D *et al*, 1998) 从鸚鵡衣原体绵羊流产株表达文库鉴定了 2 个基因, 该基因编码大小为 90 或 91kDa 蛋白。与推测蛋白的同源性达 82% 以上。沙眼衣原体编码 9 个不同的 Pmp 蛋白, 而肺炎衣原体已扩展到有 21 个 Pmp 基因 (Grimwood J *et al*, 1999; Stephens R S *et al*, 1998)。

(5) 包涵体膜蛋白基因 (Inc)

Longbottom 等 (Longbottom D *et al*, 1998) 分离到编码推定外膜蛋白 (POMPs) 基因家族中的 4 个基因, 该 POMPs 分子量大约为 90kDa, 存在于引起绵羊地方性流产鸚鵡热衣原体 (S26/3 株) 亚型的外膜中。用流产绵羊血清对衣原体外膜蛋白复合体做免疫印迹试验, 证明这些蛋白虽然少, 但是重要的免疫原。衣原体原生小体 (EB) 的细胞外膜与革兰氏阴性细菌的相似, 含有脂多糖, 但是缺乏肽聚糖层。衣原体的 40-kDa 外膜主蛋白 (MOMP)、1 或 2 个富含半胱氨酸的大蛋白 (60-kDa) (EnvB or Omp2) 和 1 个富含半胱氨酸的小蛋白 (12-kDa) (EnvA or Omp3) 细胞间广泛的交错联结的二硫键形成巨大的分子网格决定了 EB 结构的稳定性 (Raulston J E, 1995)。由于 EB 外表面在衣原体感染附着于宿主细胞膜过程中起重要作用, 大量衣原体血清学诊断技术和疫苗的研究都聚焦在 EB 的外膜蛋白上。近来英国在进行改进衣原体血清学诊断方法 (Anderson I E, 1995) 和绵羊地方性流产重组疫苗 (Herring A J *et al*, 1994) 研究。

衣原体产生一种衣原体属内保守的群特异性脂多糖 (LPS) 决定簇 (Brade L *et al*, 1990)。所有的衣原体都编码一种丰富的表面蛋白, 称之为外膜主蛋白 (MOMP 或 OmpA), OmpA 含有衣原体血清学分类的主要的决定簇。对 6 个衣原体基因组测序研究工作的完成、补充和扩大了衣原体前基因组学领域更多的信息 (Rockey D D *et al*, 2000)。在已知蛋白组中, 有 2 组蛋白包涵体膜 (Inc) 蛋白和多形态膜蛋白 (Pmp) 是衣原体独有的。其它 2 组蛋白, 与肽聚糖 (PG) 的合成及衣原体 III 型分泌系统相关, 别的细菌也具有。然而, 这 4 组蛋白是截然不同并毫不相关, 各自代表着衣原体独特性质的一个方面。

最初, 人们在研究鸚鵡衣原体感染动物和福尔马林灭活 EB 免疫动物所产生血清学应答时, 发现了 Inc 蛋白 (Rockey D D *et al*, 1994) 鉴定了 3 个基因: IncA、IncB 和 IncC。最近, Scidmore-Carison 用针对沙眼衣原体感染细胞膜片段的抗血清鉴定 1 个染色体片段, 其编码 4 个新的沙眼衣原体 Inc 蛋白 (IncD-IncG)。作为一个组, 这些不同的蛋白相互不具有显著的一致性。

沙眼衣原体和肺炎衣原体基因组测序的完成, 建立了鉴定 Inc 蛋白的方法。应用测定的序列可以快速确定编码 IncA、IncB 和 IncC 开放读码框 (ORFs) 的位置。鉴定后, 生产抗沙眼衣原体

和肺炎衣原体 IncA 蛋白的抗血清,并用此抗血清验证来自每个种的 IncA (Bannantine J P *et al*, 1999)。对沙眼衣原体完整基因组进行研究以了解拥有二级结构 ORF 编码的蛋白。鉴定结果发现了 40 多个候选 Inc 序列具有相似的结构图形。

现有的 Inc 蛋白资料显示其疏水性图是定位于包涵体膜的一个标志,应用抗重组 Inc 蛋白特异性抗体技术可以回答这个问题。应用免疫荧光显微镜技术检测,在检测的 6 种蛋白中有 5 种被证实定位于包涵体膜 (Bannantine J P *et al*, 1999)。对肺炎衣原体 CWL029 基因组测序完成,获得多个候选的 Inc。在几个病例中,沙眼衣原体和肺炎衣原体之间,有清晰的定向进化同源基因 (Kalman S *et al*, 1999),但是,一半以上的沙眼衣原体和肺炎衣原体候选的 Inc 序列并没有显著的相似性。现在研究发现沙眼衣原体的 IncA、IncF、IncG 和鹦鹉衣原体的 IncA 是暴露在包涵体细胞质表面。最新资料 (Hackstadt T *et al*, 1999) 证明沙眼衣原体 IncA 在不同沙眼衣原体包涵体之间参与同型泡 (homotypic vesicle) 的融合。

为了鉴定衣原体感染宿主细胞内时期的蛋白,使用衣原体感染豚鼠恢复期抗血清和福尔马林灭活的纯化衣原体 EB 免疫血清分别对鹦鹉衣原体 DNA 的 λ 表达文库进行筛选。鉴定一个文库克隆拥有 2 个 ORF,其编码大小相似约 20kDa 的蛋白,这些蛋白称为 IncB 和 IncC。对 IncB 和 IncC 上游区序列分析表明 2 个 ORF 与 1 种氨基酸转运蛋白和 1 种钠依赖转运蛋白有强同源性。反转录酶-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测结果证明,在一个操纵子调节下转录了 IncB 和 IncC。免疫荧光显微镜技术证明 IncB 和 IncC 各自都定位于感染细胞的包涵体膜上。IncA 与 IncB 或 IncC 的主要序列之间存在差异,但是它们都含有一个大的疏水区,其大小和特征与 IncA 的相似 (Bannantine J P *et al*, 1998)。

(6) 肽聚糖合成基因

数十年前就知道衣原体发育对 β -乳胺和 D-环丝氨酸高度敏感。这两种抑制剂阻断其他细菌肽聚糖 (PG) 合成的路径。也已经证实,虽然衣原体 PG 存在于衣原体 RB 中对 RB 发育发挥着重要的生物学作用,但是在提纯的衣原体 EB 中不能检测到 PG 或合成的 PG 前体 (Barbour A G *et al*, 1982)。对衣原体基因组研究的结果清楚地揭示无论是肺炎衣原体还是沙眼衣原体都编码蛋白形成近乎完整的 PG 合成路径。将已知的 PG 合成基因与衣原体产生的蛋白比较,证明衣原体在 3 个主要成分方面缺乏同源性,首先,衣原体不能编码青霉素结合蛋白 (PBP1),这是一种具有转糖苷酶和转肽酶活性的酶。而衣原体所编码的 PBP2 和 PBP3,据报道都是相似具有双功能酶活性 (Matsuhashi M *et al*, 1990),但是没有体外实验资料证明 PBP2 和 PBP3 具有转糖苷酶活性。

(7) III 型蛋白分泌物基因

Hsia 等 (Hsia R C *et al*, 1997) 发现了与衣原体 III 型分泌路径相关的编码蛋白的第一个基因。对鹦鹉衣原体基因进行鉴定,发现其与编码 III 型分泌系统蛋白的 *yscU*、*IcrD*、*IcrE* 基因和伴侣基因 *sycE* 一致。这些衣原体基因序列中排列有一个操纵子,其包括别的 ORF。Matsumoto 等发现衣原体的表面突起,在形态上相似于鼠伤寒沙门氏菌的 III 型蛋白分泌系统结构 (Matsumoto A, 1981),并对衣原体 EB 和 RB 上所看到突起的超微结构进行了细致的描述,其位于 RB 的一侧,在感染细胞内好象刺透了包涵体膜。推测这些东西就是衣原体产生的 III 型蛋白分泌系统结构。对编码 III 型分泌蛋白的完整基因研究后发现,III 型效应器蛋白有可能是衣原体与宿主细胞之间相互作用的关键。

Hsia 等从鹦鹉热衣原体豚鼠包涵体结膜炎株克隆到 4 个基因与其它细菌病原的 III 型分泌系

统有高度同源性。这些基因代表着染色体的毒力位点，即毒力相关 III 型分泌位点。在衣原体存在接触依赖性分泌系统，有力地说明衣原体的致病机制类似于别的细胞内细菌病原（Hsia R C *et al*, 1997）。

（8）外膜蛋白基因（Omp）

对鸚鵡热衣原体豚鼠包涵体结膜炎株（GPIC）的 3.1kd 基因组 DNA 片段进行了测定，该基因片段携带有 Omp3、Omp2 和 *srp* 基因同族体。将 GPIC 序列与其他衣原体 Omp2 连接序列做比较分析，结果表明不同种的 Omp3 和 Omp2 上游区序列高度保守，说明衣原体的转录启动机制相同。对翻译产品检测表明，不同种的 Omp3 和 Omp2 蛋白具有高度的同源性。对 *srp* 基因表达产品的氨基酸序列比较分析揭示其具有种内高度同源性，而不同种的同源性较低（Hsia R C and Bavoil P M, 1996）。

1.5.2 蛋白组学研究进展

（1）外膜蛋白（Omp）

衣原体是严格的细胞内寄生菌，其细胞外膜的结构与其它革兰氏阴性细菌的相似，即由含有脂多糖外膜、一层周质和一层内膜构成，但其细胞外膜缺乏肽聚糖（PG），外膜和周质中存在二硫键交叉连接蛋白，这是衣原体外膜结构的独特特征。已经从几株衣原体克隆到编码 3 种膜蛋白 [外膜主蛋白（MOMP）、富含半胱氨酸大蛋白和富含半胱氨酸小蛋白（CRPs）] 的基因，并作了测序分析研究。在衣原体 EB 的外膜，含有 3 种富含半胱氨酸的外膜蛋白（OMP）。衣原体的 RB 具有代谢活性，其大小是 EB 直径的 3 倍，不稳定。沙眼衣原体（Omp3）和鸚鵡热衣原体（EnvA）的小 CRPs 好象是脂蛋白：在 Omp3 和 EnvA 的主要序列中都含有潜在性脂修饰信号肽酶 II 识别位点（Allen J E *et al*, 1990; Everett K D E and Hatch TP, 1991）。进一步的研究揭示，鸚鵡热衣原体 6BC 富含半胱氨酸小蛋白（EnvA）的主要序列拥有潜在性脂修饰信号肽酶 II 识别位点。成熟的 EnvA 在肽链 N-端缺乏蛋氨酸，显示疏水性。Omp2 是所有衣原体种的高度保守结构蛋白，含有多个 N-端片段。用 ELISA 检测发现 Omp2 蛋白是肺炎衣原体和沙眼衣原体感染的主要免疫原（Mygind P *et al*, 1998）。

（2）热休克蛋白（HSP）

病原性鸚鵡热衣原体有能力在其天然宿主家禽和家畜的巨噬细胞内繁殖（Mygind P *et al*, 1998），这说明衣原体持续暴露于应激环境中而能存活下来，关键是具有应激应答蛋白。衣原体热休克蛋白 60（cHSP60）在各种衣原体病中引起免疫病理学损伤时起主要作用（Mygind P *et al*, 1998）。Ochial （Wyrick P B, Brownridge E A, 1978）对 7 株鸚鵡热衣原体的 cHSP60 编码基因进行测序研究，发现所测各菌株衣原体的 cHSP60 核苷酸序列同源性很高，达 81% 以上。将衣原体 cHSP60 的氨基酸序列同其它细菌的热休克蛋白 60（HSP60）的比较，发现有 3 个区域高度保守，说明这些区域起某些功能作用。在沙眼衣原体的外膜中，发现了一种 75kDa 蛋白可以和中和抗体发生反应。为了进一步认识该蛋白，Danition （Danition S L *et al*, 1990）从沙眼衣原体克隆到编码 75kDa 蛋白基因，并进行了表达和测序，研究发现该基因位于 2.9 kb DNA 片段，由含 1956 个核苷酸的 ORF 构成，在 5' 段一侧有启动子元件和一个核糖体结合位点，在 3' 段一侧有一个典型的 ρ -非依赖性终止子。

(3) 多态外膜蛋白 (POMPs)

衣原体基因组编码的外膜蛋白家族, 又称为多态外膜蛋白 (POMPs)。该蛋白在躲避宿主免疫防卫系统方面发挥作用。Tanzer 等 (Ochial Y *et al*, 2000) 用 PAGE 技术对鹦鹉热衣原体菌株 6BC 的 POMPs 进行分析, 根据其大小 (90-100kDa) 和用外膜特异性探针标记, 至少鉴定了 6 个 POMPs。其中 3 个 POMPs 与抗重组的鹦鹉热衣原体绵羊株 POMPs 抗血清反应, 并且 2 个具有胰岛素敏感表面位点。

(4) 主要外膜蛋白 (MOMP)

衣原体外膜主蛋白 (MOMP), 也称为外膜蛋白 A (OmpA) 在外膜中约占 60% (Danilition S L *et al*, 1990)。MOMP 是制备衣原体疫苗的最佳抗原, 因为其含有血清特异性中和抗体决定簇, 在引起保护性免疫中起关键作用。MOMP 含有 7 个半胱氨酸残基, 并且这些半胱氨酸残基在当前发现的衣原体种中是保守的, 对二硫键连接 MOMP 低聚物的形成起重要作用。而这些低聚物对维持衣原体外膜的完整性是必不可少的。

Caldwell H D 等用二维免疫电泳被来分析衣原体的抗原性。用非离子型洗涤剂 (Triton X-100) 发现能成功溶解衣原体的多种抗原并得到了一个抗原 0.65。抗原 0.65 的特异性通过感染 HeLa 细胞中衣原体包涵体的单特异性抗血清, 经过间接免疫荧光染色, 进一步得到了显示 (Caldwell H D *et al*, 1975)。Sacks D L 等对沙眼衣原体血清型 A 株型特异性抗原进行了分离。沙眼衣原体原生小体先通过超声波破碎以及 P40 诺乃洗涤剂的处理、免疫共沉淀, 通过 SDS-PAGE 对这个蛋白的大小进行比较, 其分子量大约在 27kDa 左右 (Sacks D L *et al*, 1979)。Hourihan JT 等用分子转换色谱仪将沙眼衣原体特异性抗原从细胞中进行分离和纯化, 经过几个方面的分析, 纯化的型特异性抗原片断的分子量大小大约在 30kDa-32kDa 之间 (Hourihan J T *et al*, 1980)。Caldwell H D 等对沙眼衣原体 MOMP 的纯化和部分特征被进行了研究。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳表明, 有一个明显亚单位分子量约 39.5kDa 大小的主要表面蛋白, 这个表面蛋白对每一个沙眼衣原体血清型来说都具有, 并且与免疫性相关联 (Caldwell H D *et al*, 1981; Caldwell H D, Schachter J, 1982)。Caldwell H D 等也对衣原体 MOMP 抗原结构进行了分析。通过试验推出以下的结论: (1) 不同的衣原体种成员之间其 MOMP 结构也不相同; 鹦鹉热衣原体的 MOMP 明显的与沙眼衣原体的 MOMP 不同。(2) 同一沙眼衣原体的不同血清型最大程度上具有相同的结构主要存在于 MOMP。然而, 每一个沙眼衣原体的 MOMP 一级结构却明显的不同。(3) 这些不同主要体现在表面用乳过氧化物酶介导的放射碘标记的衣原体 MOMP 的缩氨酸分布图上 (Caldwell H D, Judd R C, 1982)。Newhall W J 等对衣原体外膜蛋白二硫键连接的寡聚体进行了研究 (Newhall W J, Jones R B, 1983)。

Hatch, T P 等对衣原体亚种的繁殖生活史和感染的外膜在结构和多肽方面不同进行了研究。发现鹦鹉热衣原体 6BC 繁殖期 (始体) 和感染形式 (原生小体) 的外膜蛋白复合体富含半胱氨酸蛋白以及去污剂相关溶解成分具有很大的不同, 并对鹦鹉热衣原体和沙眼衣原体非宿主内始体蛋白合成, MOMP 二硫键合成进行了研究 (Hatch T P *et al*, 1984, 1985, 1986)。Hackstadt T 等对纯化的沙眼衣原体 LGV-434 和鹦鹉热衣原体脑膜脑炎原生小体一系列生物学特征通过外部还原剂效应进行了检测, 通过这个试验来确定感染性的原生小体 (EB) 到复制的细胞型和始体 (RB) 在早期相关联体内的分化 (Hackstadt T *et al*, 1985)。

Ma JJ 等对沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原保护区特异性表位通过免疫印迹进行了鉴定, 发现

种表位存在于主要外膜蛋白的保守区域 (Ma J J *et al*, 1987)。日本学者对禽和哺乳动物鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白的免疫化学的多样性进行了研究, 试验表明MOMPs在免疫学特征和分子量的大小上表现各异 (Fukushi H, Hirai K, 1988)。

Zhang 等对两株鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白进行了克隆和测序, 开始从基因的水平去研究鹦鹉热衣原体 (Zhang Y X *et al*, 1989)。Herring A J 对鹦鹉热衣原体羊流产株主要外膜蛋白进行了序列分析, 发现与沙眼衣原体具有相同的结构 (Herring A J *et al*, 1989)。鹦鹉热衣原体与沙眼衣原体免疫型 1 和 2 主要外膜复合体属特异性表位也被进行了确定。运用单克隆抗体和多克隆抗体研究发现, 在外膜复合体上, 主要外膜蛋白和由 57kDa 和 62kDa 蛋白形成的双联体组成 (Mondesire R R *et al*, 1989)。Yuan Y 等对鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白基因 (Omp1) 多串连启动子进行了研究 (Yuan Y Zhang *et al*, 1990)。Kikuta A 等对禽鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白的抗原性进行了分析 (Kikuta A *et al*, 1991)。Black C M 等研究发现, 衣原体种之间可以用限制性片段长度多态型分析 (RFLP) 进行区别 (Black C M *et al*, 1992)。Zhao Q 等对 GPIC 株的等位基因进行了研究, 发现不像沙眼衣原体, 鹦鹉热衣原体 GPIC 缺乏等位基因 (Zhao Q *et al*, 1993)。Westbay T D 对鹦鹉热衣原体 GPIC 株外膜蛋白的免疫决定簇进行了研究 (Westbay T D *et al*, 1994)。

Tanzer R J 等结合表位定位研究, 对衣原体种间和种内 MOMP 的氨基酸序列进行比较, 发现衣原体的中和表位位于 MOMP 的 4 个不同的片段。用衣原体外膜复合物生产的疫苗制剂富含天然状态的 MOMP, 证明用该疫苗免疫可以保护绵羊、豚鼠和老鼠免受衣原体病危害。但是, 用变性的或非天然的重组 MOMP 制剂免疫动物仅仅只能产生部分保护 (Tanzer R J *et al*, 2001)。研究表明 (Wyllie S *et al*, 1998) MOMP 特异性抗体应答与主要组织相容性复合体 (MHC) 相关。

1.6 鹦鹉热衣原体疫苗研究进展

1.6.1 减毒活疫苗

Nichols R L 等 (Nichols R L *et al*, 1978) 用从豚鼠结膜炎包涵体分离鹦鹉热衣原体制备成 60% 卵黄囊悬液作为肠疫苗来免疫豚鼠, 得到了明显的保护。Rodolakis A 等 (Rodolakis A *et al*, 1983) 通过亚硝基胍 (NTG) 处理获得两株温度敏感性绵羊株 1B 和 1H, 免疫山羊、奶牛, 获得了很好的结果 (Rodolakis A *et al*, 1983; 1986; 1987)。Wills J M 等 (Wills J M *et al*, 1987) 初步对鹦鹉热衣原体的致病机理进行了探讨, 用鹦鹉热衣原体猫肺炎株感染 SPF 猫, 结果表现出严重的结膜炎临床症状。Chalmers M S 等 (Chalmers W S *et al*, 1997) 将羊鹦鹉热衣原体温度敏感株 1B 冻干, 对绵羊进行低效价的活疫苗免疫, 结果揭示了该疫苗还降低母羊的感染率。

1.6.2 灭活疫苗

Martinov S 等 (Martinov S *et al*, 1985) 用浓缩、纯化的鹦鹉热衣原体灭活抗原制备疫苗进行试验, 表明加强免疫的效果优于单次免疫。Aderson I E 等 (Aderson I E *et al*, 1990) 用纯化的鹦鹉热衣原体 EB 制备灭活疫苗, 皮下注射免疫绵羊, 然后进行攻毒, 免疫印迹表明, 主要持续性抗体反应发生在鹦鹉热衣原体的 MOMP 上。Wilsmore A J 等 (Wilsmore A J *et al*, 1990) 用从羊地方性

流产鸚鵡热衣原体A22 菌株制成灭活的佐剂疫苗进行试验, 获得了较好的结果。Rank R G等(Rank R G *et al*, 1990) 用紫外线对鸚鵡热衣原体进行灭活后, 经眼、口、肌肉和皮下几个途径进行免疫, 然后进行攻毒, 研究发现, 除经口服免疫途径外, 其他免疫途径都不同程度产生了多种抗体。为了研究病原的免疫原性, Gajdosova E等(Gajdosova E *et al*, 1994) 用纯化的、经甲醛灭活的鸚鵡热衣原体颗粒免疫羊, 通过淋巴细胞转换试验发现, 疫苗接种后产生免疫的时间间隔与疫苗的剂量的大小无关。Jones G E等(Jones G E *et al*, 1995) 用组织培养物制备的灭活抗原做效力试验, 以不同的佐剂加不同量的灭活抗原免疫动物, 获得了最佳的免疫剂量、免疫佐剂以及免疫途径, 为预防鸚鵡热衣原体病提供了有效的方法。Kerr K等建立小鼠模型研究衣原体的致病机理以及特异性免疫细胞的作用, 为新型疫苗的研制寻找科学依据(Kerr K *et al*, 2005)。我国学者杨学礼、帅永玉等(杨学礼等, 1981; 帅永玉等, 1981) 在 20 世纪 70 年代, 首先对羊的鸚鵡热衣原体性流产进行了系统的研究, 在国内首先研制成功羊流产衣原体灭活疫苗, 并进行了大面积推广应用, 有效控制了衣原体病对养羊业的危害。20 世纪 80 年代, 兰州兽医研究所和广西兽医研究所合作研制成功的猪流产衣原体灭活苗, 对预防猪衣原体病起到了很大的作用(邱昌庆, 1997)。

1.6.3 基因工程疫苗

(1) 基因工程亚单位疫苗

Tan T W 等(Tan T W *et al*, 1990) 开始了亚单位疫苗的研究, 认为在 MOMP 上存在重要的免疫保护抗原决定簇。Sandbulte J 等(Sandbulte J *et al*, 1996) 用鸚鵡热衣原体的 EB、外膜复合体(COMC)、MOMP、脂多糖(LPS) 以及脂多糖和主要外膜蛋白的混合物分别制成疫苗免疫小鼠, 发现 MOMP 是刺激机体产生保护性抗体的主要抗原。我国学者利用鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白在大肠杆菌中的表达产物, 纯化后与白油佐剂乳化成疫苗, 获得了较好的结果(何诚等, 2004)。

(2) DNA 疫苗

比利时学者 Vanrompay D E 等对禽源鸚鵡热衣原体 A 型株和 D 型株的 MOMP 编码基因 Omp1 基因克隆到哺乳动物表达质粒 pcDNA1, 然后给 SPF 火鸡肌肉注射 pcDNA1/MOMP, 可在免疫火鸡检出与天然 MOMP 结构一致的 rMOMP, 并从血浆中检出抗 MOMP 抗体。用 Helios 基因枪转导质粒表达的禽衣原体 MOMP 进行了评价, 结果发现, 在火鸡上, 将表达质粒结合在 0.6 mg 金珠上具有最佳的免疫效果。将质粒 DNA 通过基因枪肌肉或粘膜免疫(将质粒 DNA 滴鼻), 也能诱导产生 T 辅助细胞和 B 淋巴细胞记忆。该研究组将肌肉内注射、粘膜免疫与其他 3 种方法(肌肉内培育, 滴鼻, 气囊免疫) 进行比较, 发现用质粒和 γ -干扰素免疫的火鸡 80% 得到了保护, 用质粒滴鼻进行粘膜免疫的火鸡有 60% 得到了保护(Vanrompay D *et al*, 1998, 1999)。Van Loock M 等(Van Loock M *et al*, 2004) 在母源抗体存在的情况下, 用质粒 DNA (pcDNA+MOMP D) 通过不同的途径(肌肉注射和滴鼻) 对火鸡进行免疫, 酶联免疫吸附试验检测结果表明, 母源抗体会干扰疫苗特异性抗体的产生。外周血淋巴细胞(PBL) 增殖试验表明, 细胞介导的免疫反应起主要作用。Verminnen K 等(Verminnen K *et al*, 2005) 用禽鸚鵡热衣原体血清 D 型株质粒 DNA 表达的 MOMP 以及含有免疫佐剂和不含免疫佐剂的重组外膜蛋白(rMOMP), 分别免疫火鸡, 进行效力试验, 结果表明, 用质粒 DNA 表达的 MOMP 首次免疫火鸡, 用同一血清强毒株攻击, 获

得了保护；而用 rMOMP 进行首次免疫，用强毒攻击后未能保护。

1.6.4 结语

衣原体灭活疫苗和弱毒疫苗对预防哺乳动物衣原体病的流行起到了巨大的作用。有人也曾尝试研制预防禽类衣原体病的灭活疫苗，并没有获得预期的效果。目前，对禽衣原体 DNA 疫苗取得了一定的成就，但是，到目前为止还没有商业化的禽衣原体疫苗供应市场。因此研制安全、高效、经济的禽衣原体疫苗势在必行。

1.7 腺病毒载体的应用

1.7.1 腺病毒概况

腺病毒 (adenovirus, Ad) 属于腺病毒科 (Adenoviridae)，包括哺乳动物腺病毒属 (Mastadenovirus) 和禽腺病毒属 (Aviadenovirus)。腺病毒无囊膜，核衣壳 20 面体对称，直径 80~100nm。病毒颗粒由 252 个壳粒组成，包括 242 个六邻体和 12 个五邻体。每个五邻体上有突出的纤丝，长约 20~50nm，末端为球状。禽腺病毒的纤丝则为分叉状 (陆承平，2001)。

腺病毒的基因组为线形双链 DNA，长度约为 36kb，被包装在一个二十面体的蛋白质外壳内，可分为编码区和非编码区。编码区又可分为早期转录区和晚期转录区两种，前者有 E1、E2、E3、E4 四个区，编码病毒的调节蛋白，后者有 L1、L2、L3、L4、L5 五个区，编码病毒的结构蛋白。非编码区含有病毒进行复制和包装等功能所必需的顺式作用元件。除 E3 区外，其余的编码区及顺式作用元件均为病毒复制所必需。

腺病毒家族的成员可感染种类相当广泛的分裂期和静止期细胞，甚至包括来自高度分化的组织中的细胞，例如骨骼肌细胞、肺细胞、脑细胞和心肌细胞。腺病毒具有将自身基因组递送到细胞核中进行高效复制的能力，但是腺病毒基因组一般不会整合到宿主细胞基因组中，因此，腺病毒作为活载体应用较安全。在腺病毒基因组特定区域插入外源基因，不影响病毒复制而能使外源基因良好表达。这些优点，使腺病毒载体的研究成为热点。

至今，腺病毒载体已经发展了 3 代，第一代腺病毒载体 (通常来源于 Ad5 和 Ad2) 主要去除了毒力基因 E1 和 (或) E3 区；第二代腺病毒在 E1、E3 的基础上进一步去除了 E2 和 (或) E4 区；后来人们对腺病毒进行了彻底的缺失，发展了第三代腺病毒载体，即 high-capacity AD vectors(HC-AD)，它仅含有 ITRS 和包装信号 (付华，2005)。

1.7.2 腺病毒载体在疫苗研究中的应用

将腺病毒作为载体来进行疫苗研究具有很多优点：如腺病毒具有广泛的宿主范围；重组腺病毒在 293 细胞中具有很高的滴度；用重组腺病毒免疫动物，刺激机体产生免疫反应与病毒感染的途径一致；重组腺病毒在包装细胞中稳定传代；因此腺病毒载体从被开发的那一天起，就被广泛应用于疫苗研究中。

McDermott M R 等用腺病毒载体表达单纯疱疹病毒糖蛋白 B 免疫小鼠，然后用单纯疱疹病毒

攻击, 获得了保护 (McDermott M R *et al*, 1989)。Jacobs S C 等, 将蜚传播的脑炎病毒 (TBEV) 非结构糖蛋白 NS1 在腺病毒载体 Rad51 中进行了高效表达, 表达的产物直接免疫小鼠, 用 TBEV 进行攻击, 该糖蛋白特异性抗体对小鼠具有保护作用 (Jacobs S C *et al*, 1992)。Ragot T 等对埃-巴二氏病毒 (EBV) (又称非洲淋巴瘤病毒) 膜糖蛋白 gp340/220 构建到复制缺陷型重组腺病毒中进行表达 (Ragot T *et al*, 1993)。Lutze-Wallace C 等对重组腺病毒的遗传稳定性在体外进行了检测, 试验结果说明异源基因插入到腺病毒中, 在组织培养中连续传代能够保持其完整性 (Lutze-Wallace C *et al*, 1995)。Yarosh O K 等用重组腺病毒表达狂犬病糖蛋白 (RG), 免疫鼠、犬、鼬等模型动物, 能够产生抵抗狂犬病的相对应抗体 (Yarosh O K *et al*, 1996)。Rothel J S 等将重组腺病毒载体用于抵抗寄生虫病的感染 (Rothel J S *et al*, 1997)。Fooks A R 等将麻疹病毒 (MV) 血凝素 (H) 和融合 (F) 蛋白构建于一个带有人巨细胞病毒介导的早期启动子复制缺陷型腺病毒载体, 通过口腔和口腔以外的途径进行免疫, 用 MV 进行攻击, 得到了保护。而表达的 F 抗原免疫小鼠后却没有得到保护 (Fooks A R *et al*, 1998)。

Sheppard M 等将传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 的 VP2 基因构建到禽腺病毒载体中, 用重组腺病毒免疫 SPF 小鸡, 产生了针对 VP2 蛋白的特异性血清抗体, 用 IBDV V877 攻击, 小鸡得到了保护 (Sheppard M *et al*, 1998)。Elahi S M 等将牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 核衣壳 (C 蛋白或 P14) 构建到腺病毒载体中 (Elahi S M *et al*, 1999)。Hammond J M (Hammond *et al*, 2000; 2003 等利用猪腺病毒 PAV3 载体, 构建了表达猪瘟病毒 (CSFV) E2 基因的可复制重组腺病毒, 用这种重组腺病毒免疫猪, 用 CSFV 攻击, 得到了保护。Gogev S 等将牛疱疹病毒 1 型的糖蛋白 gC 和 gD 构建到复制缺陷型人腺病毒 5 型 (HA5) 中, 初步的免疫试验在兔体上进行, 结果显示, 鼻内接种重组腺病毒产生的中和抗体比肌肉内接种产生的抗体高 (Gogev S *et al*, 2002)。Fischer L 等为了解决幼犬的免疫问题, 将犬瘟热病毒 (CDV) 血凝素基因和融合蛋白基因构建到具有复制能力的犬腺病毒 2 型载体中, 表达产生了血凝素抗原 (HA) 和融合蛋白 (F) 抗原 (Fischer L *et al*, 2002)。Tang M 等将腺病毒载体用于研制猪流感活载体疫苗。将 H3N2 猪流感病毒 (SIV) 的 HA 基因构建到腺病毒载体, 免疫小鼠, 两周后用血凝抑制试验检测到高效价的抗体, 在随后的 3 周中, 中和抗体的稳定性在继续增加, 但是, 这些抗体不能中和 A/HK/68 (H3N2) 病毒 (Tang M *et al*, 2002)。Arribillaga L 等将 C 型肝炎病毒 (HCV) NS3 蛋白构建到复制缺陷型重组腺病毒中进行表达表达的蛋白在体外进行了检测, 证明诱导产生了针对 NS3 蛋白的体液、T 辅助性细胞和细胞毒性 T 细胞。将含有 NS3 基因的重组腺病毒免疫小鼠, 用 Vhcv1-3011 攻击, 得到了保护 (Arribillaga L *et al*, 2002)。

Gagnon C A 等将猪繁殖障碍综合症病毒 (PRRSV) 的 GP5 蛋白构建的腺病毒载体中, 对猪繁殖障碍综合症活载体疫苗进行了探讨 (Gagnon C A *et al*, 2003)。Wu Q 等将两株口蹄疫病毒 (FMDV) 的核衣壳蛋白基因插入到人腺病毒 5 型 (Ad5) 载体中, 构建了口蹄疫活载体疫苗 (Wu Q *et al*, 2003)。Dong X 等将 E 型肝炎病毒 (HEV) ORF2 抗原基因构建到人腺病毒载体中, 构建的腺病毒免疫小鼠, 诱导产生了体液 IgG 免疫球蛋白, 鼻内免疫产生了黏膜免疫反应 (IgA) (Dong X Hu *et al*, 2003)。Jaiswal S 等将 2 型登革病毒膜蛋白的胞外结构域构建到复制缺陷型腺病毒载体, 构建的腺病毒免疫小鼠, 产生了针对 2 型登革病毒的特异性 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞反应。在体外, 免疫的抗血清能特异的中和 2 型登革病毒 (Jaiswal S *et al*, 2003)。Pinto AR 等认为, 有相当多的成年人接触腺病毒 5 型 (AdHu5), 体内具有抗腺病毒 5 型的抗体, 为了减少体内抗体

对重组腺病毒载体疫苗的影响,他们构建了异源 E1 缺失腺病毒载体,将 HIV-1 的部分 gag 基因插入到异源的 E1 缺失的腺病毒载体中,诱导产生了 gag 特异性 CD8(+) T 细胞 (Pinto A R *et al*, 2003)。Gao W 等将禽流感 A/Vietnam 株的血凝素构建到腺病毒载体中,用重组的腺病毒免疫 BALB/c 小鼠,产生了针对 HA 的特异性抗体,用 VN/1203/04 毒株进行攻击,小鼠全部得到了保护 (Gao W *et al*, 2006)。

1.8 我国动物衣原体病研究概况

我国动物衣原体病始于 1959 年。报道北京某个鸭场 13 名患肺炎职工恢复期的鸟疫补体结合抗体 7 例阳性 (潘达鑫, 1987)。1960 年初北京病鸭及鸽的肝脾中分离到衣原体,其抗原性与苏联鸟疫衣原体 B 株一致,鸭场人群及家畜血清的衣原体补体结合抗体阳性。七十年代,我国对鹦鹉热衣原体的研究转向家畜。杨学礼、帅永玉等 (杨学礼等, 1981; 帅永玉等, 1981) 首先对羊的鹦鹉热衣原体性流产进行了系统研究,包括流行病学调查、病原特性研究、诊断方法研究和免疫研究,在国内首先研制成羊流产衣原体苗,大面积推广应用,有效控制了衣原体病对羊业的危害。1984 年,杨宜生等 (杨宜生等, 1984) 根据一些猪场的流产情况开始了猪鹦鹉热衣原体的研究。他们成功的分离和鉴定了病原并建立了间接血凝试验 (IHA) 来检测鹦鹉热衣原体抗体。并同补体结合试验 (CF) 以及间接补体结合试验进行比较;表明 IHA 在检测鹦鹉热衣原体抗体中能发生特异性的双交叉反应,而且重复性良好,比 CF 敏感 8-16 倍,比 ICF 敏感 64-128 倍。而在此期间,我国对禽衣原体的研究停滞不前。

1990 年,杨子平 (杨子平, 1990) 首先建立用 ABC-ELISA 检测羊流产衣原体的抗体,并分别与常规 ELISA 以及 CF 做比较,其敏感性分别提高了 1.89 倍和 17.54 倍,进一步提高了检测衣原体的灵敏度和特异性。1994 年,段跃进等 (段跃进等, 1994) 对流产鹦鹉热衣原体的抗原结构和免疫原性进行了分析,证实流产鹦鹉热衣原体的主要抗原由 38KD (MOMP)、60KD、80KD 和 110KD 的蛋白组成。赵亚芳等 (赵亚芳等, 1996) 从纯化的山羊流产衣原体颗粒提取 DNA,用酶光生物素标记,制成核酸探针,用斑点杂交法检测衣原体核酸,灵敏度可达 10Pg。苗振川等用 PCR 技术 (聚合酶链反应) 对羊流产衣原体检测进行了初步的研究,利用 PCR 技术,扩增出了 1170bp 大小的片断,与预期的结果大小一致。可用来检测羊的流产衣原体病 (苗振川等, 1999)。

2000 年 (刘向伟等, 2002),军事医学科学院微生物流行病学研究所的刘向伟等对 10 株鹦鹉热衣原体 (2 株来自猪的肠道, 2 株来自绵羊的肠道, 3 株来自鸟, 2 株来自奶牛, 1 株来自鸭) 的 MOMP 基因进行了测序和比较研究,发现它们之间有很高的同源性,是适合的疫苗研究位点。2002 年 (刘向伟等, 2002),他们对鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白基因序列进行了扩增,并对其克隆和原核表达,为进一步进行鹦鹉热衣原体的诊断试剂和疫苗研究创造了条件。2002 年 (糜祖煌等, 2002),糜祖煌等对鹦鹉热衣原体套式 PCR 和 DNA 测序方法进行了研究,4 株鹦鹉热衣原体均能扩增出 214bp 的条带,而沙眼衣原体、肺炎衣原体,肺炎支原体均不能扩出,用此方法来区别鹦鹉热衣原体和其他衣原体。邱昌庆等在 2002 年建立了猪的衣原体病 PCR 诊断技术,并对三株不同血清型猪衣原体 MOMP 基因进行了克隆和测序,比较了它们之间的同源性 (邱昌庆等, 2002)。谢琴等用研制的猪、羊、牛衣原体单克隆抗体检测猪、牛、羊的衣原体病,获得了满意的结果 (谢琴等, 2002)。2003 年 (张浩杰等, 2003) 张浩杰等鹦鹉热衣原体 B 细胞表位进行了

表达和抗原鉴定，验证了对所筛选表位的真实性。

2004（何诚等，2004）年，中国农业大学实验动物研究所利用鸕鹚热衣原体重组主要外膜蛋白在大肠杆菌中的表达产物，纯化后与白油佐剂乳化成疫苗，对3批疫苗的物理性状、无菌试验、安全试验、最小保护剂量、效力检验、免疫期、保存期和田间试验等各项技术指标进行了测定。利用该苗免疫肉鸡40000只，保护率达93%，对照组为85%。2006年周继章等报道了将禽衣原体MOMP插入到腺病毒载体中，构建成重组腺病毒。用该重组腺病毒免疫SPF鸡，产生了保护性的抗体，用同一血清型的禽衣原体进行攻击，免疫小鸡全部得到了保护（周继章等，2006）。

尽管国内在动物衣原体病方面做了很多的研究工作，但是到目前为止，在预防禽衣原体病方面还没有商业化的疫苗。衣原体灭活疫苗曾在哺乳动物取得了很好的效果，但在禽上没有取得成功。所以研制可靠，高效，安全的衣原体疫苗势在必行。

第二章 鸡源鹦鹉热衣原体分离与鉴定

近年来,河南省、海南省等地的某些规模化养鸡场鸡群发病,临床主要表现严重的结膜炎、鼻炎和口腔炎,呼吸困难,腹泻,消瘦,采食量下降,生长发育缓慢;腹部肿大,产蛋率下降;发病率、死亡率和淘汰率高。尸体剖检,可见口腔和咽部充血、有溃疡干酪坏死灶,肝脾肿大,布有出血点(斑)和白色坏死灶,还可见明显的气囊炎、肺炎和肠炎病变,腹腔有多量渗出液。从鸡群采血清及部分病变器官进行衣原体病检查。

2.1 材料和方法

2.1.1 鸡胚、实验动物及试剂

莱航鸡 SPF 受精蛋由卫生部兰州生物制品研究所实验动物中心提供, 37.5℃~39℃孵化至 7 日龄用于衣原体分离、毒力测定等试验。实验动物为肉杂鸡, 购自兰州市种鸡场共 20 只。衣原体间接血凝试剂由中国农业科学院兰州兽医研究所提供, 批次为 200405018。碘, 磺胺嘧啶钠, 购自上海生工生物工程有限公司。CpL 株为兰州兽医研究所从连云港分离、鉴定保存的鸡源鹦鹉热衣原体。

2.1.2 方法

1) 血清学试验 采集发病鸡血共 30 份, 每份采血约 2mL, 置 37℃温箱 2h, 取出后置 4℃冰箱 1h, 使血清充分析出。用衣原体病间接血凝(IHA)试验诊断试剂盒测定感染抗体。操作和结果判定按部颁规程进行(邱昌庆, 2002)。

2) 病原的分离和鉴定

取临床发病鸡的肺脏组织, 冻融 3 次后做组织研磨, 加入适量的磷酸盐缓冲液(PBS)2000r/min 离心 10min, 按 2000U/mL 卡那霉素处理后, 接种 7~8 天的 SPF 鸡胚卵黄囊腔, 每胚 0.4mL, 盲传三代。可致鸡胚于接种后 4~7 天规律的死亡。取 4~7 天规律死亡鸡胚的卵黄囊进行涂片, 用甲醇固定后, 进行姬姆萨染色, 并用显微镜检查。

3) 药物敏感性试验

(a) 青霉素敏感试验

取卵黄囊膜研磨液进行系列稀释, 分成 2 份, 一份每毫升加青霉素 2500U, 在 4℃作用 4h, 接种 8 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚接种 0.4mL; 另一份接种 0.4mL 卵黄膜研磨液, 接种 5 枚作为对照

(b) 磺胺嘧啶钠敏感试验

取卵黄囊膜研磨液进行系列稀释, 分别加入磺胺嘧啶钠 10mg, 7.5mg, 5.0mg 和 2.5mg, 4℃

条件下作用 1h, 对照组不加磺胺嘧啶钠, 取 0.4mL 接种 8 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚; 另取 0.4mL 卵黄囊膜研磨液接种 5 枚作为对照。

4) 碘染色试验

取分离培养的卵黄囊膜进行涂片, 甲醇固定 3min, 碘染色溶液染色 10min, 水洗吸干, 油镜观察。

5) 衣原体电镜观察

取接种后第 4~7d 规律死亡鸡胚的卵黄囊膜涂片染色镜检, 只见到大量衣原体 EB 颗粒而没有发现其他细菌, 把这些卵黄膜囊合并, 研磨, 按照参考文献 (杨学礼等, 1982) 进行衣原体形态电镜观察。

6) 毒力测定

取一只规律死亡的鸡胚, 研磨后用灭菌的 0.9% 的生理盐水 10 倍系列稀释, 然后分别接种 8 日龄鸡胚, 每个稀释度接种 4 枚, 接种量为 0.2mL, 置 39℃ 孵育, 弃 72 小时之内死亡的鸡胚, 然后每日观察, 收集死亡鸡胚, 并作记录。

7) 人工感染试验

选择 15 日龄的肉杂鸡 20 只, 用 IHA 检测其抗体全部为阴性。试验组用 4~8 天内死亡的鸡胚卵黄囊膜经研磨, 10 倍稀释, 加硫酸卡那霉素 1000U/mL 处理后, 试验组 (n=10) 每只腹腔注射 0.5mL, 对照组 (n=10) 每只腹腔注射 0.5mL 生理盐水。4 个月后全部处死, 观察肝、脾等器官的病理变化。

8) CpL 菌株毒力测定

毒力测定方法与 (6) 操作方法一致。

2.2 结果

2.2.1 血清学检查

30 份被检鸡血清用 IHA 检查衣原体抗体, 其中 16 份衣原体抗体滴度 $\geq 1:16$ (++) , 为阳性。阳性检出率 53.3%。

2.2.2 病原分离鉴定

从鸡病料分离到菌株经 7 日龄鸡胚盲传 3 代可致鸡胚于接种后第 4~7d 规律地死亡。用第 3 d 以后死亡鸡胚的卵黄囊膜涂片, 姬姆萨染色 1000 倍镜下检查, 可见大量紫红色、针尖大小、类似于衣原体原生小体 (EB) 的颗粒, 鉴定如下。

1) 分离株接种人工培养基试验 (表 2-1)

表 2-1 分离菌株接种人工培养基试验

Table 2-1 Artificial media test of isolated strain

被检菌株	分离株
琼脂斜面	—
血琼脂	—
普通肉汤	—
厌气肉肝汤	—

结果表明该菌株是一类不能在人工培养基上生长的非细菌性微生物。

2) 青霉素敏感试验 (表 2-2)

表 2-2 青霉素敏感试验

Table 2-2 The penicillium sensitivity test

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
分离株	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
对照组	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

*死亡鸡胚/接种鸡胚

根据表 2-2 的鉴定结果, 分离株的卵黄囊膜研磨液对青霉素均敏感。试验组鸡胚全部存活。对照组鸡胚全部死亡。

3) 磺胺嘧啶钠敏感性试验

表 2-3 磺胺嘧啶钠敏感性试验

Table 2-3 Sulfadiazine sodium sensitivity test

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
10mg	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
7.5mg	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
5.0mg	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
2.5mg	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
对照组	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

*死亡鸡胚/接种鸡胚

根据表可以看出, 分离株对磺胺嘧啶钠不敏感。

4) 碘染色试验

将分离物涂片后用甲醇固定, 碘染色 10min 后用油镜 (1000X) 观察, 可以看到紫红色的原生小体 (EB) 颗粒和蓝色的始体 (RB) 颗粒。

通过磺胺嘧啶钠敏感性试验和碘染色试验, 鉴定该分离株为鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*), 定名为 Cp/04/chick/hnq 株, 以下简称 hnq 株。

5) 衣原体 hnq 株电镜观察 (图 2-1)

箭头 1 所指的花样结构为衣原体的网状体 (reticular body, RB), 箭头 2 所指的圆形物为衣原体的原生小体 (elementary body, EB)。

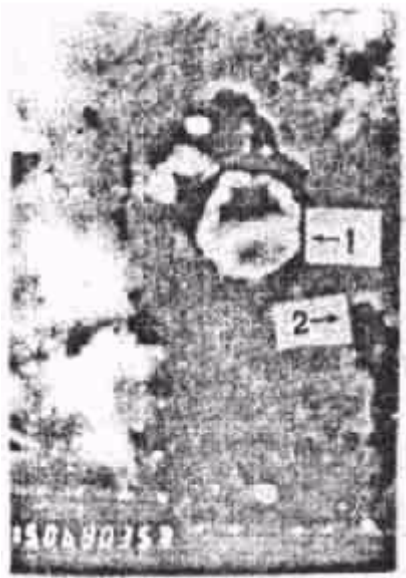


图 2-1 鹦鹉热衣原体 hnq 株的电镜观察

Fig 2-1 Electromicroscopic Observation of *C. psittaci* hnq Isolate

6) 鸡源鹦鹉热衣原体 hnq 株的毒力测定

收集死亡的鸡胚，并作详细的记录，结果如表 2-4

表 2-4 鹦鹉热衣原体 hnq 株毒力测定

Table 2-4 Measurement of virulence of *C. psittaci* hnq strain

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	control
24h(1d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
48h(2d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
72h(3d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
96h(4d)	3/4	2/4	1/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
120h(5d)	1/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
144h(6d)	-	-	1/4	1/4	4/4	2/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4
168h(7d)	-	-	-	-	-	2/4	0/4	3/4	1/4	0/4	0/4
192h(8d)	-	-	-	-	-	-	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
216(9d)	-	-	-	-	-	-	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

根据表 2-4 统计如表 2-5

表 2-5 鹦鹉热衣原体 hnq 株毒力测定

Table 2-5 Measurement of virulence of *C. psittaci* hnq strain

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
死亡鸡胚	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	0/4
对照组	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

根据Karber 法计算ELD₅₀。

公式: $\lg\text{ELD}_{50} = L - d(s - 0.5)$

其中, L =最高稀释度的对数; d =稀释对数之间的差; s =阳性管比例总和

因此本试验鸚鵡热衣原体毒价为:

$$\lg\text{ELD}_{50} = -1 - 1(6 + 1/4 - 0.5) = -6.75$$

故 $\text{ELD}_{50} = 1.8 \times 10^{-7}/0.2$ 每毫升中所含的鸚鵡热衣原体数 $= 9 \times 10^7$

7) 人工感染试验

用分离株 hnq 感染肉杂鸡在最初的 1 个月内无任何症状, 但随着时间的增长, 部分鸡表现出精神萎顿、食欲不佳现象。处死后剖检, 肝脾肿大, 有的鸡肝脏肿大至原来的 3 倍, 脾脏肿大呈紫色的大理石样, 个别肿大至原来的 4~5 倍; 心脏有淤血现象, 冠状沟周围有积液; 部分鸡卵巢有轻微的肿胀。肺部有轻微的纤维素性渗出, 少数鸡呼吸道内有粘性分泌物。

8) 鸡源鸚鵡热衣原体 CpL 株的毒力测定

收集死亡的鸡胚, 并作详细的记录, 结果如表 2-6

表 2-6 鸚鵡热衣原体 CpL 株毒力测定

Table 2-6 Measurement of virulence of *C. psittaci* laboratory strain

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	control
24h(1d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
48h(2d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
72h(3d)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
96h(4d)	3/4	2/4	1/4	2/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
120h(5d)	1/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
144h(6d)	-	-	1/4	1/4	4/4	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4
168h(7d)	-	-	-	-	-	2/4	2/4	3/4	1/4	0/4	0/4
192h(8d)	-	-	-	-	-	-	-	-	2/4	0/4	0/4
216(9d)	-	-	-	-	-	-	-	-	0/4	0/4	0/4

根据表 2-6 统计如表 2-7

表 2-7 鸚鵡热衣原体 CpL 株毒力测定

Table 2-5 Measurement of virulence of *C. psittaci* laboratory strain

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
死亡鸡胚	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4
对照组	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

根据 Karber 法计算 ELD_{50} 。

公式: $\lg\text{ELD}_{50} = L - d(s - 0.5)$

其中, L =最高稀释度的对数; d =稀释对数之间的差; s =阳性管比例总和

因此本试验鸚鵡热衣原体毒价为:

$$\lg\text{ELD}_{50} = -1 - 1(8 + 3/4 - 0.5) = -9.25$$

故 $\text{ELD}_{50} = 5.6 \times 10^{-10}/0.2$ 每毫升中所含的鸚鵡热衣原体数 $= 2.8 \times 10^{11}$

从鸡胚法测定 hnp 株和 CpL 株来看, hnp 的毒力远远低于 CpL 株的毒力, 选择 CpL 株做为研究对象。

2.3 讨论

近年来随着经济的发展, 人们对“肉、蛋、奶”的需求量逐渐增加, 畜牧业得到了空前的发展, 养鸡业也不例外。但养殖户在重视鸡主要传染病的同时却忽视了衣原体病对鸡造成的危害。许多养鸡场由于衣原体病引起的产蛋率下降却误诊为其他疾病(如减蛋综合征)所引起, 结果延误了对衣原体病的治疗, 造成衣原体病在鸡群中的流行。

鹦鹉热衣原体目前有 6 个禽血清型和 2 个哺乳动物血清型(即麝鼠 M56 和牛 WC)。6 个血清型分别为 A、B、C、D、E 和 F 型, 每个血清型表现出一定的宿主嗜性, 即 A 型主要感染鹦鹉, B 型感染鸽子, C 型感染鸭和鹅, D 型感染火鸡, E 型主要感染鸽子和平胸鸟, F 型是从鹦鹉分离的单一菌株(Andersen, 1991)。

禽衣原体病(AC)与哺乳动物衣原体病比较, 前者对人类健康的危害性更严重, 国际兽疫局(OIE)把 AC 和羊地方性流产规定为 B 类传染病。AC 容易感染人, 感染后表现为发热、头痛、肌痛和以阵发性咳嗽为主要表现的间质性肺炎。到目前为止, 许多国家报道了人感染鹦鹉热衣原体的报道。如美国疾病控制中心(CDC)报道了从 1988 年至 1998 年, 有 813 例人感染鹦鹉热衣原体, 大部分由于与宠物鸟接触而感染的(CDC, 1998)。德国报道有 790 例人感染鹦鹉热衣原体, 丹麦报道有 57 例, 意大利报道 76 例, 瑞典报道 336 例, 英国截至 1983 年, 大约有 887 例(Faber *et al*, 1999; Maffei *et al*, 1987; WHO, 1976; 1977; Harris, 1983; Isaacs, 1984)。我国很多地区的鸡场、鸭场发生了衣原体病, 但接触人群是否感染了 AC, 感染危害程度如何, 没有展开全面详细的调查研究。

通过对河南淇县分离类似鸡源鹦鹉热衣原体经过分离、鉴定后, 进行鸡胚毒力测定, 发现该株的毒力远远小于实验室保存菌株的毒力。感染鸡群中的发病率低说明了这一点。由于没有单克隆抗体, 不能确定该株的血清型。鉴于这种状况, 将实验室保存的 CpL 菌株作为研究鸡源鹦鹉热衣原体重组腺病毒活载体疫苗的首选菌株。

第三章 鸡衣原体病 PCR 诊断方法的研究

目前,我国用于禽衣原体病的诊断技术包括:病原的分离与鉴定,涂片染色(姬姆萨氏染色)镜检,碘染色试验、磺胺嘧啶钠敏感试验;血清学诊断包括补体结合(CF)试验、间接血凝(IHA)试验、免疫荧光(IF)试验、琼脂扩散(AGID)试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)。在病原学诊断方面,常规鸡胚或细胞分离鉴定技术是动物衣原体病诊断的“黄金标准”,但其检测周期长,敏感性有限,因此,开展快速、高灵敏度的 PCR 诊断技术研究,既是实验室诊断的需求,也是深入开展 AC 病原分子研究的需求。

3.1 材料

3.1.1 菌种、仪器及试剂

鸡鹦鹉热衣原体 Cpl 株由兰州兽医研究所分离、鉴定,并保存;减蛋综合征病毒(EDSV)新城疫病毒(NDV)由兰州兽医研究所保存;传染性支气管炎病毒(IBV)活疫苗从市场购买。TECHGENE (Techne,英国);2K15 高速低温高速离心机(Sigma 公司);DYY-III-8B 稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);紫外凝胶成像仪(Genegenius);TE buffer(自配)、RnaseA 酶、蛋白酶 K、溶菌酶、Taq DNA 聚合酶、RNA 提取试剂盒等均购自(大连)宝生物有限公司;SDS、饱和酚、无水乙醇、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、琼脂糖等购自上海生物工程有限公司。

3.1.2 引物

登录 Genbank,下载相关的基因序列,用 DNASTar 和 OLIGO 软件针对禽衣原体主要外膜蛋白(MOMP)基因设计合成了 2 套引物(表 3-1)。并用该软件分析退火温度。

表 3-1 MOMP 扩增引物序列

Table 3-1 Primers sequence for amplification MOMP gene

编号	序列	长度(base)
MP1	5'-GAG GTG AGT ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG GC-3'	32
MP2	5'-GGT TCT GAT AGC GGG ACA AAA AGT TAG GAT AG-3'	32
MP3	5'-ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG GC-3'	23
MP4	5'-TTA GAA TCG GAA TTG AGC ATT CAT GT-3'	26

3.2 方法

3.2.1 鸡衣原体基因组 DNA 的提取

1) 取新鲜或冰冻发病鸡肝组织块 0.3-0.5cm³,剪碎,研磨,加入 400μL TE 缓冲液,转入到 1.5mL 的 Ep 管中,以 100μL 的 TE 缓冲液冲洗匀浆器,冲洗液一并转入 Ep 管中。

- 2) 加入 100 μ L 20%的 SDS, 混匀。加入 proteinase K 至终浓度为 200 μ g/ μ L,混匀后 60 $^{\circ}$ C作用 30min。
- 3) 振摇混匀后转入 37 $^{\circ}$ C水浴 2h,中间不时振摇数次。
- 4) 加入溶菌酶 30 μ L,置 65 $^{\circ}$ C水浴 30min。
- 5) 取出置沸水浴中 5min。
- 6) 加入等体积的平衡酚, 倒转混匀, 4 $^{\circ}$ C下 7500 转/min 离心 10min, 取上层水相, 重复操作一次;加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),颠倒摇匀 2-3 次,4 $^{\circ}$ C下 7500 转/min 离心 10 min。
- 7) 转移上清液于另一离心管中。
- 8) 加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C沉淀 30min, 12000 转/min 离心 10min, 弃去所有液相。
- 9) 用 1mL 70%乙醇漂洗 2-3 次, 12000 转/min 离心 2min。
- 10) 真空或室温干燥, DNA 沉淀物用 50 μ L 无菌双蒸水溶解, 保存在-20 $^{\circ}$ C备用。

3.2.2 PCR 反应体系及条件

表 3-2 MOMP 基因扩增体系 (一扩)

Table 3-2 The amplification system of MOMP gene (first PCR)

扩增体系(一扩)	总体积 50 μ L
10 \times PCR buffer	5 μ L
dNTP(2.5mmol/L)	4 μ L
上游引物: Mp1 (50pmol/L)	1 μ L
下游引物: Mp2 (50pmol/L)	1 μ L
提取的 DNA 模板	6.0 μ L
Pyrobest TM DNA polymerase(5 U/ μ L)	0.25 μ L
灭菌双蒸水	32.75 μ L

表 3-3 MOMP 基因扩增体系 (二扩)

Table 3-3 The amplification system of MOMP gene (nested PCR)

扩增体系(二扩)	总体积 50 μ L
10 \times PCR buffer	5 μ L
dNTP(2.5mmol/L)	4 μ L
上游引物: Mp3 (50pmol/L)	1 μ L
下游引物: Mp4 (50pmol/L)	1 μ L
一扩产物	1.0 μ L
Pyrobest TM DNA polymerase(5 U/ μ L)	0.25 μ L
灭菌双蒸水	37.75 μ L

反应条件

- 一扩: 首先 95 $^{\circ}$ C充分变性 5min, 然后 35 个循环, 分别为: 94 $^{\circ}$ C变性 1min; 54 $^{\circ}$ C退火 1min; 72 $^{\circ}$ C延伸 3min。72 $^{\circ}$ C延伸 10min。
- 二扩: 20 个循环, 分别为: 94 $^{\circ}$ C变性 30sec; 49 $^{\circ}$ C退火 1min; 72 $^{\circ}$ C延伸 2min。72 $^{\circ}$ C延伸 10min。

3.2.3 PCR 产物的观察

取 PCR 扩增产物 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 并用凝胶成像系统拍照, 记录试验结果。

3.2.4 减蛋综合症病毒 (EDS₇₆V) DNA、新城疫病毒 (NDV) RNA、传染性支气管炎病毒 (IBV) 的 RT-PCR

(I) ND 和 IB 的 RNA 提取

按 TAKARA 公司生产的 RNA 提取试剂盒进行如下操作:

- 1) 取购买的弱毒疫苗 1~2mL, 加入等量的 Catrimox-14TM液。如果细胞是沉淀状, 需要轻轻振荡后再加入 1mL Catrimox-14TM液, 然后充分混匀。
- 2) 将离心管平衡, 置台式高速离心机中 3000rpm 离心 5min。
- 3) 除去溶液, 加入 1mL 的 DEPC 处理水, 上下颠倒混合数次后, 12000rpm 离心 2min。除去溶液。
- 4) 激烈振荡直至沉淀松动。
- 5) 向管中加入 0.5mL 的异硫氰酸胍溶液。
- 6) 加入 0.5mL 水饱和的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混合液。
- 7) 在 4℃ 条件下, 12000rpm 离心 5min。
- 8) 将上清(水层)移至新的 1.5mL 离心管中, 加入等量的异丙醇, -20℃ 放置 30min 后, 12000rpm 离心 10min。
- 9) 除去液体, 沉淀用 70% 的冷乙醇清洗一次。
- 10) 将离心管置 37℃ 温箱, 干燥 30min, 然后加入适量的双蒸水或 DEPC 处理水。

(II) 反转录合成 cDNA

在新的 PCR 反应管中加入总 RNA 提取液 11 μ L, MP2 引物 (50pmol/ μ L) 1 μ L 混匀后 65℃ 热浴 10min, 立即冰浴 5min。然后按以下体系进行反转录 (表 3-4)

表 3-4 反转录体系

Table 3-4 The system of reverse transcription

反转录体系	总体积 10 μ L
5 \times RT buffer	4 μ L
dNTP(25mmol/ μ L)	2 μ L
RNasin(20u/ μ L)	1 μ L
AMV (10u/ μ L)	1 μ L

在 42℃ 水浴 1h, 然后煮沸 5min, 置 -20℃ 备用。

(III) PCR 和套式 PCR

反应体系根据表 3-2 和表 3-3 进行。

反应条件: 先在 95℃ 下变性 5min 后, 然后 95℃ 下 1min, 54℃ 下 1min, 72℃ 下 2min, 35 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 10min。将上述 PCR 产物 1 μ L 做模板, 再以 MP3 和 MP4 为配对引物完成套式 PCR。反应条件为: 94℃ 30s, 49℃ 1min, 72℃ 2min, 35 个循环, 最后在 72℃ 下

延伸 10 min。

3.2.5 鸡衣原体 MOMP 蛋白基因引物特异性检测

用设计的鸡源Cp MOMP基因引物对鸡源Cp、EDS₇₆V、IBV、NDV的基因组同时进行扩增，看能否扩到与鸡衣原体MOMP基因大小一致的片断，以验证鸡源鹦鹉热衣原体引物特异性。

3.2.6 鸡衣原体 PCR 灵敏度的检测

提取鸡源鹦鹉热衣原体CpL株的DNA，用核酸检测仪测定其含量，对核酸进行系列稀释 (10^{-1} - 10^{-4})，然后进行PCR扩增，观察其敏感度。

3.2.7 鸡衣原体病 PCR 诊断与间接血凝 (IHA) 试验敏感性的比较

购买 30 日龄左右的小鸡 20 只，分成 4 组，翅静脉采血，用间接血凝试验检测抗体全部为阴性。第一组腹腔注射研磨的、生理盐水 10 倍稀释的 CpL 株卵黄囊膜培养物悬液 0.1mL,第二组腹腔接毒 0.3mL，第三组腹腔接毒 0.5mL，第四组腹腔注射生理盐水，一个月后检测抗体和用 PCR 检测衣原体。

3.2.8 鸡源鹦鹉热衣原体病 PCR 诊断稳定性试验

将 PCR 诊断试剂及蛋白酶 K 置于-20℃保存 6 个月，取出，进行 PCR 诊断，检测试剂是否有效，是否可以检测出鸡源鹦鹉热衣原体。

3.3 结果

3.3.1 套式 PCR 反应结果

根据试验设计，用两套引物进行套式 PCR 反应，结果鹦鹉热衣原体分离株扩增后电泳出现与预测大小基本一致的目的带 (1170bp)。图 3-1 所示。

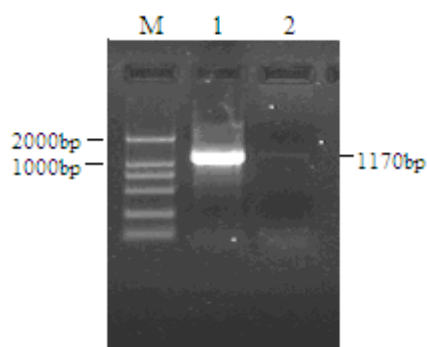


图 3-1 套式 PCR 扩增鸡源鹦鹉热衣原体 CpL MOMP 基因

M DL 2000 DNA Marker;

1 扩增的 PCR 产物

2 阴性对照

Fig 3-1 MOMP gene of avian *C. psittaci* CpL was amplified by the nested PCR

M. DL2000 Marker; 1 PCR product of CpL

2 the negative control

3.3.2 PCR 反应特异性试验结果

从鸡源Cp、EDS₇₆V、IBV、NDV纯化提取DNA或cDNA进行相同条件的PCR反应，其展示出很好的特异性，即本试验只扩增鸡源Cp，而不扩增EDS₇₆V、IBV、NDV。结果见图 3-2。

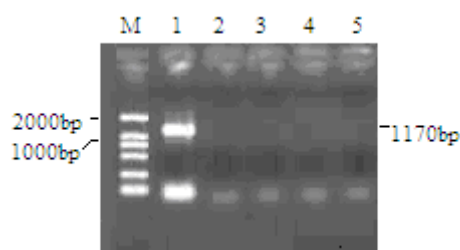


图 3-2 PCR 特异性检测结果

M DL2000 DNA Marker; 1 鸡源鹦鹉热衣原体阳性对照; 2 减蛋综合症病毒; 3, 传染性支气管炎; 4, 新城疫病毒 5, 阴性对照

Fig 3-2 Test of the PCR specificity

M DL2000 DNA Marker; 1positive control of Cp L MOMP genes; 2 EDS₇₆V DNA; 3 IBV cDNA; 4 NDV cDNA.

3.3.3 灵敏度试验

提取鸡源鹦鹉热衣原体CpL株的DNA，用核酸检测仪测定其含量，对核酸进行系列稀释 (10^{-1} - 10^{-4})，然后进行PCR扩增，观察其敏感度，结果如图 3-3 所示。

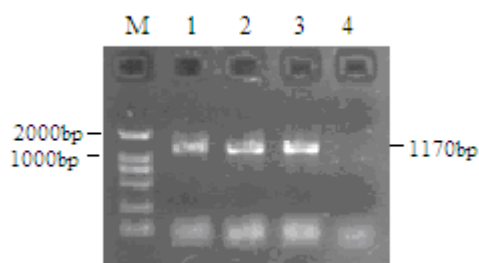


图 3-3 鸡源鹦鹉热衣原体 PCR 灵敏度检测结果

M : DL2000marker; 1 DNA 10 倍稀释的反应结果; 2 DNA 10^2 倍稀释的反应结果; 3 DNA 10^3 倍稀释的反应结果; 4 DNA 10^4 倍稀释的反应结果

Fig 3-3 Sensitivity test of PCR for *C. psittaci* CpL

M DL2000 marker; 1 the result for 10 dilution; 2 the result for 10^2 dilution; 3, the result for 10^3 dilution; 4 the result for 10^4 dilution

从图可以看出，对提取的 DNA 进行 1000 倍稀释时仍然能扩增出 MOMP 基因，而在本反应中，加入的模板量为 4 μ L，而测定的浓度为 7 μ g/ μ L，经计算，本试验中 PCR 的灵敏度可达到 28ng/ μ L。

3.3.4 鸡衣原体病 PCR 诊断与间接血凝（IHA）试验敏感性的比较

15 只接毒鸡采血后全部处死，采集肝脏，进行 PCR 检测和对所采的血进行 IHA 试验，试验结果：用 IHA 检测，8 只鸡血清呈现阳性，检出率为 8/15；用 PCR 检测，从 13 只鸡检出了衣原体，检出率为 13/15。检测 AC，PCR 要远比 IHA 敏感。

3.3.5 鸡衣原体病 PCR 诊断方法稳定性试验

将 PCR 试剂在-20℃条件下保存 6 个月后用于检测上述 CpL 感染的鸡病料,结果仍然从肝脏、脾脏中扩增出鸡源鹦鹉热衣原体 CpL 的 MOMP 基因。

3.4. 讨论

聚合酶链反应 (PCR) 是二十世纪八十年代发展起来的一种体外核酸扩增技术。该法快速、灵敏度高,操作简便,在疾病诊断的过程中发挥了巨大的作用。目前动物衣原体病的诊断主要依靠间接血凝试验和补体结合试验,尽管在诊断鸡衣原体病的过程中发挥了一定的作用,但是间接血凝试验所用的抗原为鹦鹉热衣原体羊流产株抗原,其与禽源鹦鹉热衣原体可能存在抗原表位差异,用此来诊断鸡衣原体病可能存在漏检。为了更进一步提高病原诊断的敏感性,我们建立了鸡源鹦鹉热衣原体的 PCR 诊断技术。在建立该技术的过程中,我们遇到了几个方面的困难,其中最主要的就是从组织中提取衣原体基因组 DNA。为了解决这个问题,我们对病料分三步进行处理:首先将组织充分的研磨,使一些纤维组织断裂,使部分细胞释放出来。二是加入使细胞裂解的化学试剂,使细胞充分裂解,释放出细胞内感染的衣原体。三是加入溶菌酶,破坏衣原体的细胞壁,释放衣原体。为了使衣原体基因组充分释放出来,我们还采取了加热的方法使衣原体细胞壁蛋白变性,释放出衣原体。在解决了这个问题后,其他的问题迎刃而解。

用建立的 PCR 诊断方法对人工复制的鸡衣原体病病历检测,检出率为 13/15,有 2 例没有检出,可能与样品处理不当使部分基因丢失有关。总之,通过敏感性、特异性和稳定性试验证明所建立的 PCR 方法相关性能良好,再做进一步的完善可以用于鸡的衣原体病的病原学诊断或核酸鉴定。

第四章 鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因的克隆与序列分析

禽鹦鹉热衣原体到目前为止,通过单克隆抗体确定具有 6 个血清型,即 A、B、C、D、E、F,这些血清型对不同的禽类的嗜性是不一样的。A 型主要感染鹦鹉, B 型感染鸽子, C 型感染鸭和鹅, D 型感染火鸡, E 型主要感染鸽子和平胸鸟, F 型是从鹦鹉分离的单一菌株。从国外的资料来看,鸡究竟对哪一个血清型敏感,目前还不清楚。本试验是通过对鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因进行克隆、鉴定后,进行测序,然后与国外报道的鸽子株、鸭子株、鹦鹉株和火鸡株的 MOMP 进行序列比较,分析鸡源株与其他株的同源性。

4.1 材料和方法

4.1.1 试剂

琼脂糖、溴化乙锭购自上海生工, DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒购自北京博大泰克公司, pMD18-T 载体、*Hind* III、*Bam*HI 酶, DNA Marker、DNA 回收试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

4.1.2 鸡源鹦鹉热衣原体(CpL 株) MOMP 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

- 1) 将电泳槽用自来水冲洗干净,干燥。电泳胶床放入凹型槽中,插好梳子。
- 2) 用电泳缓冲液在微波炉中将琼脂糖颗粒用最短的时间完全溶解,熔化的琼脂糖溶液冷却到 60℃左右,加入溴化乙锭,其终浓度为 0.5 μ g/mL,充分混匀。
- 3) 将温热的胶倒入胶模中,凝胶的厚度在 3~5mm 之间。倒胶时要注意避免产生气泡。
- 4) 在室温放置凝胶 20~30min,小心的移取梳子。
- 5) 加入电泳缓冲液,使液面高出凝胶表面 1~2mm。
- 6) 取 PCR 产物 5 μ L 与 1 μ L 的上样缓冲浓缩液混合,加入的加样孔中,同时加 DNA Marker。
- 7) 打开电泳仪电源,调解电压在 80~120V 之间,持续 15~20min。
- 8) 取出凝胶,在凝胶成像仪中观察,拍照。

4.1.3 PCR 产物回收

鸡源鹦鹉热衣原体 CpL 株 MOMP 基因 PCR 产物的回收依照宝生物工程(大连)有限公司的胶回收试剂盒进行。

- 1) 在紫外灯下切出含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶,装入事先准备好的 1.5mL 管中。
- 2) 加入 500 μ L 的 DR-I 缓冲液。
- 3) 均匀混合后 75℃加热融化胶块(低熔点琼脂糖凝胶只需要在 45℃加热),此间振荡混匀,使胶块充分融化。
- 4) 加入 1/2 体积的 DR-II 缓冲液,混合均匀。

- 5) 将试剂盒中的 Spin Column 安置在 Collection 管上。
- 6) 将操作步骤 4) 中溶液转移至 Spin Column 中, 12000rpm 离心 1min, 弃去滤液。
- 7) 将 500 μ L 的洗液 A 加入到 Spin Column 中, 12000rpm 离心 30s, 弃去滤液。
- 8) 将 700 μ L 的洗液 B 加入到 Spin Column 中, 12000rpm 离心 30s, 弃去滤液。
- 9) 重复操作步骤 8)。
- 10) 将 Spin Column 安置于新的 1.5mL 的离心管上, 加入 25 μ L 的灭菌水或溶解液, 置室温 1min。
- 11) 12000rpm 离心 1min 洗脱 DNA。

4.1.4 回收的 PCR 产物与 pMD-18T 载体的连接与转化

- 1) 取回收的 CpL 株 MOMP 基因 PCR 扩增产物 4.5 μ L, pMD-18T 载体 0.5 μ L, 连接液 5 μ L 于 200 μ L 的 PCR 反应管中混匀。
- 2) 16 $^{\circ}$ C 连接 1h (或 4 $^{\circ}$ C 过夜)。
- 3) 取连接产物 10 μ L, 试剂 A 20 μ L, 无菌水稀释至 100 μ L, 冰上备用。
- 4) 将以上混合液加入到一管 DH5 α 感受态细胞 (80~100 μ L) 中混匀, 冰浴 20min。随后室温放置 10min。
- 5) 加入 400 μ L 的 LB 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 的条件下振荡 10~40min。
- 6) 在上述管中加入 4 μ L X-gal 和 16 μ L 的 IPTG 混匀, 涂布于含有氨苄抗性的 LB 平板中。
- 7) 将平板置于 37 $^{\circ}$ C 温箱, 培养 16~18h。
- 8) 根据蓝、白斑, 挑取阳性克隆, 置 37 $^{\circ}$ C 摇床, 220rpm 条件下振荡 12~16h。

4.1.5 质粒 DNA 的提取

利用北京博大泰克公司生产的质粒小样快速提取试剂盒提取质粒, 操作步骤如下:

- 1) 收集 1.5~3mL 的菌液, 8000rpm 离心 1min, 弃去上清。
- 2) 加入 100 μ L 溶液 1, 振荡, 使沉淀充分溶解。
- 3) 加入 150 μ L 溶液 2, 立即轻轻颠倒离心管数次, 使菌体充分裂解, 裂解后的菌体变得清亮, 随后将离心管放置于冰上 1~2min。
- 4) 加入 150 μ L 溶液 3, 立即温和颠倒离心管数次, 室温放置 5 分钟。12000rpm 离心 12min。
- 5) 将 420 μ L 结合缓冲液加入到离心吸附柱中, 然后将步骤 4 中的上清加入到离心吸附柱中 (尽量除去杂质), 混匀, 12000rpm 离心 30s, 倒掉收集管中的废液。
- 6) 加入 750 μ L 漂洗液于离心吸附柱中, 静止 1min, 12000rpm 离心 15s, 倒掉收集管中的废液。重复操作一次。再次于 12000rpm 离心 2min, 尽量除去漂洗缓冲液。
- 7) 小心取出离心吸附柱, 将其置入一个干净的 1.5mL 离心管中, 加入 50 μ L 的洗脱缓冲液, 室温放置 2~5min, 12000rpm 离心 1min。

4.1.6 重组质粒酶切鉴定

将提取的质粒按照表 4-1 体系进行酶切鉴定，检测是否插入了目的基因片段。

表 4-1 酶切鉴定体系

Table 4-1 The system of identification by restriction enzymes

体系	总体积 10 μ l
重组质粒 DNA	4 μ L
K buffer	1 μ L
<i>Hind</i> III	0.5 μ L
<i>Bam</i> H I	0.5 μ L
双蒸水	4 μ L

置 37℃ 水浴中 2h。取出，电泳观察。

4.1.7 重组质粒 PCR 鉴定

按照表 4-2 体系，对提取的阳性质粒进行 PCR 鉴定，检测插入的片段是否为鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因。

表 4-2 重组质粒 PCR 鉴定

Table 4-2 Identification of the recombinant plasmids by PCR

扩增体系	总体积 50 μ L
10 \times PCR buffer	5 μ L
dNTP(2.5mmol/L)	4 μ L
上游引物: MP3 (50pmol/L)	1 μ L
下游引物: MP4 (50pmol/L)	1 μ L
重组质粒模板	1.0 μ L
Pyrobest TM DNA polymerase(5 U/ μ L)	0.25 μ L
灭菌双蒸水	37.75 μ L

反应条件为：94℃ 变性 30s，49℃ 退火 30s，72℃ 延伸 2min，总共 30 个循环，最后 72℃ 延伸 10min。取 PCR 鉴定产物，进行电泳观察。

4.1.8 序列测定

经酶切鉴定和 PCR 鉴定的阳性重组质粒，取菌液 1.5mL，送宝生物工程（大连）有限公司测序。

4.1.9 序列同源性分析

将测回的 CpL 株 MOMP 基因序列与其他禽源分离株（鹦鹉株，鸭子株，鸽子株，火鸡株）进行序列比较，分析其核苷酸和氨基酸序列的同源性。

4.2 结果

4.2.1 重组质粒酶切鉴定

将在 37℃ 经过 2h 酶切的重组质粒进行电泳，结果如图 4-1 所示

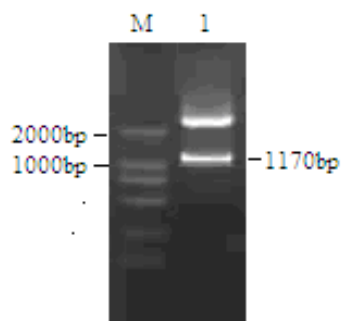


图 4-1 重组质粒酶切鉴定

M: DL2000Marker; 1, 重组质粒酶切产物

Fig 4-1 The identification of the recombinant plasmids by restriction enzymes

M: DL2000Marker;

1, the product of plasmids by restriction enzymes.

从图中可以看出，切出一条大小约 1200bp 的条带，说明插入了外源基因片段，且大小与预测的鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 片段大小（1170bp）一致。

4.2.2 重组质粒 PCR 鉴定

对重组质粒经过 PCR 扩增，电泳，结果如图 4-2 所示

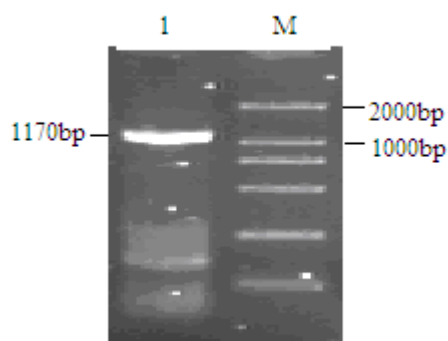


图 4-2 重组质粒 PCR 鉴定

M DL2000Marker; 1. PCR 扩增产物

Fig 4-2 The identification of recombinant plasmids by PCR

M: DL2000Marker;

1 the product of PCR

从图中可以看出，扩增出一条大小约 1200bp 的条带，说明插入的片段为鸡源鹦鹉热衣原体 CpL 株的 MOMP 基因片段。

4.2.3 序列同源性比较

测回的 CpL 株的 MOMP 基因序列与其他禽鹦鹉热衣原体菌株（鹦鹉株，鸭子株，鸽子株，火鸡株）进行序列比较，其核苷酸序列如表 4-3

表 4-3 禽鹦鹉热衣原体不同分离株核苷酸序列比较

Table 4-3 Comparisons of MOMP gene sequences of different strains of avian *C. psittaci*

		Percent Identity					
Di. ergence		1	2	3	4	5	
	1		71.5	78.8	79.0	82.0	1 — cp3.seq
	2	18.0		87.1	87.9	92.2	2 — CpL.seq
	3	18.2	11.8		99.5	89.9	3 — CT1.seq
	4	18.0	11.6	0.1		89.1	4 — GD.seq
	5	14.0	6.9	9.7	9.6		5 — VS225.seq
		1	2	3	4	5	

*cp3 为鸽子分离株；CpL 为鸡分离株；CT1 为火鸡分离株；GD 为鸭子分离株；VS225 为长尾小鹦鹉分离株。

与禽鹦鹉热衣原体其他分离株的 MOMP 氨基酸序列比较，如表 4-4 所示。

表 4-4 禽鹦鹉热衣原体不同分离株 MOMP 的氨基酸序列比较

Table 4-4 The amino acid sequence of MOMP comparison through different avian *C. psittaci*

		Percent Identity					
Di. ergence		1	2	3	4	5	
	1		82.3	74.7	75.1	75.2	1 — cp3.seq
	2	17.7		88.7	89.7	94.4	2 — CpL.seq
	3	25.0	10.7		97.9	88.5	3 — CT1.seq
	4	24.7	10.6	0.7		87.7	4 — GD.seq
	5	24.0	4.3	10.9	11.2		5 — VS225.seq
		1	2	3	4	5	

*cp3 为鸽子分离株；CpL 为鸡分离株（本实验室分离株）；CT1 为火鸡分离株；VS225 为长尾小鹦鹉分离株

4.3 讨论

通过酶切鉴定和 PCR 鉴定，说明鸡源鹦鹉热衣原体 CpL 株的 MOMP 基因片断正确插入到 pMD18-T 载体之中，并通过大连宝生物工程有限公司进行了正确的测序。

与鹦鹉热衣原体其他分离株 MOMP 核苷酸序列和氨基酸序列分析表明，CpL 与长尾小鹦鹉分离株的同源性最高，二者的核苷酸序列的同源性为 92.2%，氨基酸序列的同源性为 94.4%。而与鸽子的同源性最低，二者的核苷酸序列为 71.5%，氨基酸序列的同源性为 82.3%。相反，火鸡与鸭子之间 MOMP 核苷酸和氨基酸序列具有很高的同源性，其同源性分别为 99.5%和 97.9%。这说明火鸡和鸭子的鹦鹉热衣原体可能来自同一个血清型，但根据(Andersen 和 Vanrompay, 2000)报道，鸭子一般感染 C 型，而火鸡一般感染 D 型和 E 型，这与序列比较有一定的差距，但这种差距是如何产生的，有待进一步研究。

在本试验中，CpL 与长尾小鹦鹉株 VS225 (F 型) 具有较高的同源性，CpL 株是兰州兽医研究所上世纪 90 年代从某发病鸡场病鸡分离到的，发病鸡场疫源是否来自鹦鹉当时没有记录。由于没有买到鹦鹉热衣原体单克隆抗体，无法对 CpL 分离株定型，因此只能根据 MOMP 基因片断的同源性对 CpL 的血清型做大概的推断，具体的定型还需通过单克隆抗体进行确定。

第五章 鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒载体的构建

有人尝试研制禽衣原体病灭活疫苗没有成功,主要是衣原体为细胞内感染,免疫涉及细胞免疫,而灭活疫苗免疫家禽激发细胞免疫的能力很差。到目前为止,国内外尚无预防禽衣原体病的商品化疫苗问世。国际上,尤其发达国家对研究家禽衣原体疫苗非常重视。Vanrompay D 等为了刺激机体产生细胞免疫,构建了核酸疫苗,将禽源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因片段构建至表达质粒,然后皮下免疫火鸡,之后用同一血清型菌株进行攻击,火鸡得到了保护,之后,对核酸疫苗做了一系列的试验,如免疫途径,免疫剂量,母源抗体对核酸疫苗的干扰等 (Vanrompay D 等, 1999; 1999; 2001; 2004)。我国学者利用鹦鹉热衣原体重组主要外膜蛋白在大肠杆菌中的表达产物,纯化后与白油佐剂乳化制成亚单位疫苗,对 3 批疫苗的物理性状、无菌试验、安全试验、最小保护剂量、效力检验、免疫期、保存期和田间试验等各项技术指标进行了测定 (何诚, 2004)。

本研究的目的基于衣原体在细胞内感染的特性,设计、构建鸡源鹦鹉热衣原体重组腺病毒质粒,将鸡源鹦鹉热衣原体的 MOMP 基因片段连接克隆到腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV 中,使目的基因置于巨细胞病毒 (CMV) 启动子之下,再经过与腺病毒骨架载体在 BJ5183 工程菌中进行同源重组,构建腺病毒质粒,为后面的重组腺病毒质粒转染 HEK-293 细胞做好准备工作。

5.1 材料与方法

5.1.1 质粒载体与宿主菌

pShuttle-CMV、BJ5183 工程菌穿梭载体由兰州兽医研究所病毒室卢曾军博士惠赠,其多克隆位点及结构见图 5-1; DH5 α 宿主菌为本实验室保存。高保真 *Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bgl* II、*Sa* I 等均为 Biolabs 产品。pMD18-simple T 载体、DNA Marker 宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

5.1.2 引物

通过对鸡源鹦鹉热衣原体 (CpL 株) MOMP 基因片段的克隆和测序,利用 DNASTAR 软件分析其酶切位点,结合 pShuttle-CMV 穿梭载体上的多克隆位点上的酶切位点,在第二套引物,即 MP3 和 MP4 引物各设计一个酶切位点,在上游引物起始密码子前增加 *Bgl* II 酶切位点,在下游引物终止密码子后增加 *Sa* I 酶切位点,分别命名为 Mbd1 和 Mbd2。设计的引物如表 5-1。

表 5-1 所用引物序列

Table 5-1 The primers sequence for amplification of the targeted gene fragments

引物名称	序列	长度(base)	酶切位点
Mbd1	5'-AGGAGATCTATGAAAACTCTTGAAATCG-3'	30	<i>Bgl</i> II
Mbd2	5'-TGGGTCGACTTAGAATCTGAATTGAGCATTTC-3'	31	<i>Sa</i> I

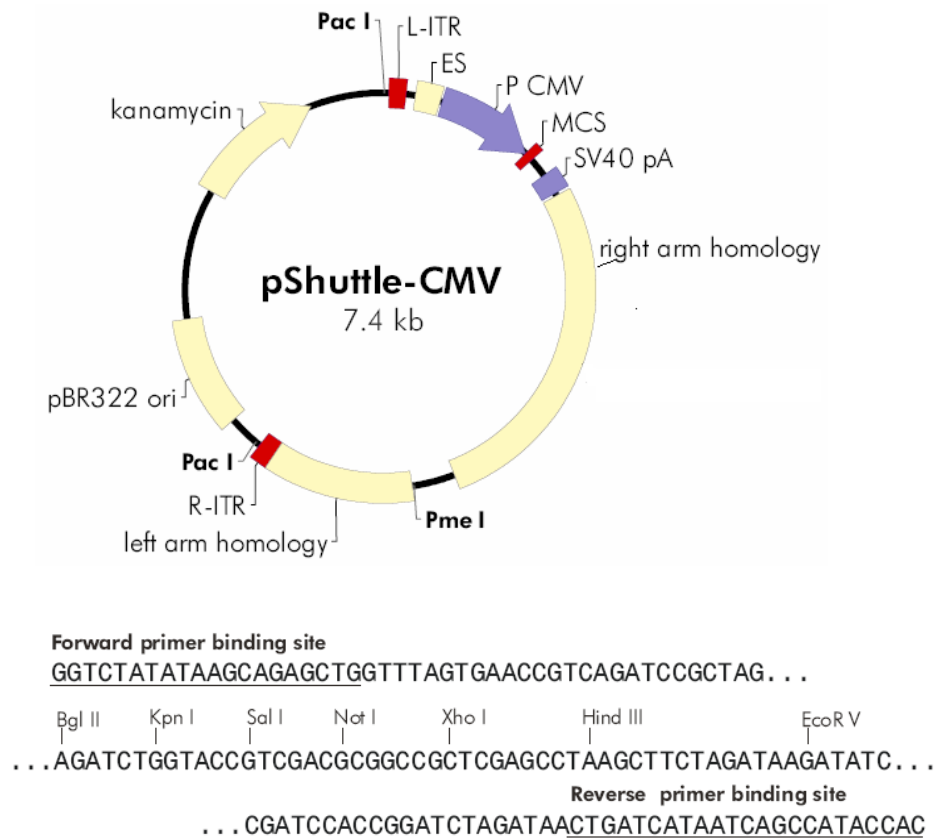


图 5-1 pShuttle-CMV 载体结构和多克隆位点示意图

Fig.5-1 pShuttle-CMV vector map and multiple cloning site region

5.1.3 MOMP 基因的 PCR 扩增

用 Mbd1 和 Mbd2 引物从 pMD18-T 阳性克隆载体扩增带有 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点的 MOMP 基因片段。PCR 扩增体系如表 5-2。

表 5-2 MOMP 基因的 PCR 扩增体系

Table5-2 The PCR amplification system of MOMP gene

扩增体系	总体积 50μL
10×PCR buffer	5uL
dNTP(2.5mmol/L)	4μL
上游引物：Mbd1（50pmol/L）	1 μL
下游引物：Mbd2（50pmol/L）	1μL
MOMP/PMD18-T 质粒模板	1.0μL
Pyrobest™ DNA polymerase(5 U/μL)	0.25μL
灭菌双蒸水	37.75μL

反应条件: 94℃变性 30s, 54℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 35 个循环, 最后 72℃延伸 10min, 用 DL2000 Marker 作为分子质量参照物, 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物的分子大小。

5.1.4 MOMP 片段与 pMD18-simple T 载体的连接

扩增的 MOMP 片段经过电泳观察、凝胶回收, 与载体 pMD18-simple T 载体连接, 连接体系见表 5-3。连接产物转化 DH5 α 感受态菌, 采用非热击法进行转化, 转化方法及质粒提取方法依照第四章。挑取克隆菌, 提质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定。将鉴定阳性的带 MOMP 片段的重组质粒分别用 *Bgl* II 和 *Sa*L I 酶切。鉴定的阳性质粒命名为 MOMP/pMD18-simple -T。

表 5-3 MOMP 基因片段与 T 载体的连接体系

Table 5-3 The ligation system of MOMP products with pMD18-simple T vector

连接体系	总体积 10 μ L
Ligation mix buffer	5.0 μ L
MOMP 基因片段	4.5 μ L
pMD18-simple T vector	0.5 μ L

上述连接反应在 16℃进行 1h 后, 转化 DH5 α 感受态菌。

5.1.5 MOMP 基因片段插入穿梭载体

用 *Bgl* II 和 *Sa*L I 从重组 pMD18-simple T 载体上切取 MOMP 基因插入 pShuttle-CMV 已线性化的穿梭载体, 酶切和连接体系如下表 5-4 和 5-5。经质粒电泳, PCR 扩增和酶切鉴定确定阳性重组穿梭质粒。重组穿梭质粒命名为 pSh-MOMP。

表 5-4 *Bgl* II 和 *Sa*L I 双酶切重组质粒与 pShuttle-CMV 穿梭质粒

Table 5-4 Double digestion recombinants pShuttle-CMV plasmids and pShuttle-CMV

双酶切体系	总体积 100 μ L
10 \times H buffer	10 μ L
<i>Bgl</i> II (10 IU/ μ L)	2.5 μ L
<i>Sa</i> L I (10IU/ μ L)	2.5 μ L
pShuttle-CMV vector	30 μ L
灭菌蒸馏水	55 μ L

表 5-5 MOMP 片段与 pShuttle-CMV 穿梭载体的连接

Table 5-5 Ligation MOMP with pShuttle-CMV

连接体系	总体积 10 μ L
10 \times T4 ligase buffer	1.0 μ L
T4 DNA ligase (40 IU/ μ L)	1.0 μ L
MOMP	6.0 μ L
pShuttle-CMV 双切线性化片段	2.0 μ L

上述连接反应在 4℃ 进行 24h 后，转化 DH5 α 感受态菌。

5.1.6 BJ5183 感受态细胞的制备

- 1) 取 1 μ g pAdeasy 质粒，1 管 -80℃ 保存的大肠杆菌 BJ5183 感受态菌，置冰上慢慢融化。
- 2) 取 100 μ L 感受态菌加入到 2mm 的电转杯中，加入 1 μ g pAdeasy 质粒，并轻轻振荡。
- 3) 将电转杯置入电转仪中，在 200 Ω ，1.25KV，25 μ F 条件下电击 5ms
- 4) 加入 1mL LB 培养基，37℃ 培养 1h，取出，涂布于 4 个含有卡那霉素的 LB 平板中，37℃ 过夜培养。
- 5) 挑取单克隆菌，37℃ 增菌培养 12h。提取质粒进行电泳检测，质粒大小约为 33.5kbp

5.1.7 细菌内同源重组

根据 stratagene 公司操作手册，进行如下步骤：

- 1) 用 *Pme* I 酶对鉴定为阳性克隆的 pSh-MOMP 穿梭载体进行酶切（酶切体系见表 5-6），使重组的穿梭载体线性化。
- 2) 取 1 只洁净、消毒后的电转杯（间隙为 0.1cm），置冰上预冷。
- 3) 取 1 只 -80℃ 保存的 BJ5183 感受态细胞，置冰上慢慢融化。
- 4) 加入 1 μ L 已线性化的 pSh-MOMP 穿梭载体，轻轻拍打管壁，然后置于冰上。
- 5) 将管中的混合液转移到电转杯中，并轻轻振荡。
- 6) 将电转杯置入电转仪中，在 200 Ω ，1.25KV，25 μ F 条件下电击 3ms。
- 7) 加入 1mL LB 培养基，37℃ 培养 1h。
- 8) 取出，涂布于 4 个含有卡那霉素的 LB 平板中，涂布的量分别为 50 μ L、150 μ L、300 μ L、450 μ L。
- 9) 置 37℃ 温箱，培养 12-21h。
- 10) 提取菌落（小菌落），在 37℃，220rpm 的条件下增菌培养 12h。
- 11) 提取质粒进行 PCR 鉴定（表 5-7）和酶切鉴定（表 5-8）。

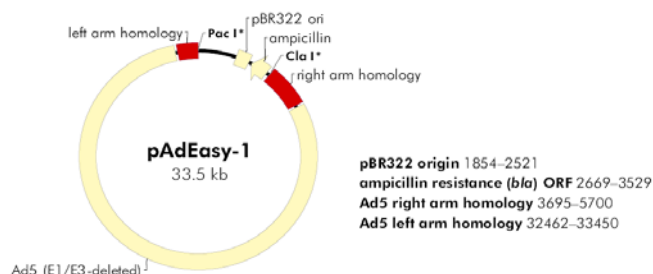


图 5-2 缺失 E1/E3 的腺病毒骨架载体图

将 pBR322 复制起点序列和氨苄抗性基因插入到 Pac I 和 Cla I 位点之间，形成可在大肠杆菌内复制的质粒形式。

Fig5-2 The map of adenovirus vector with E1/E3 deleted

a pBR322 origin sequence and ampicillin resistant gene was inserted between a Pac I and Cla I restriction site of adenovirus DNA, forming a plasmid form for replication in *E. coli*

表 5-6 *Pme* I 酶切线性化 pSh-MOMPTable 5-6 The digestion of linearization pSh-MOMP plasmids by *Pme* I

酶切体系	总体积 50μL
10×NEB buffer	5μL
100×BSA	0.5μL
<i>Pme</i> I	1μL
pSh-MOMP vector	15μL
灭菌双蒸水	28.5μL

表 5-7 PCR 扩增重组腺病毒质粒

Table 5-7 The amplification of recombinant adenovirus plasmids by PCR

扩增体系	总体积 50μL
10×PCR buffer	5μL
dNTP(2.5mmol/L)	4μL
上游引物: Mbd1 (50pmol/L)	1 μL
下游引物: Mbd2 (50pmol/L)	1μL
重组腺病毒质粒模板	1.0μL
Pyrobest TM DNA polymerase(5 U/μL)	0.25μL
灭菌双蒸水	37.75μL

表 5-8 *Pac* I 酶切线性化重组腺病毒质粒Table 5-8 The digestion of linearization adenovirus plasmids by *Pac* I

酶切体系	总体积
10×NEB buffer	5μL
100×BSA	0.5μL
<i>Pac</i> I	1μL
重组腺病毒质粒	15μL
灭菌双蒸水	28.5μL

5.2 结果

5.2.1 MOMP/pMD18-simple-T 重组质粒 PCR 鉴定

根据扩增体系和反应条件, MOMP/pMD18-simple-T 扩增后在 0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳, 结果如图 5-3 所示。说明插入的目的片段为鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因片段。

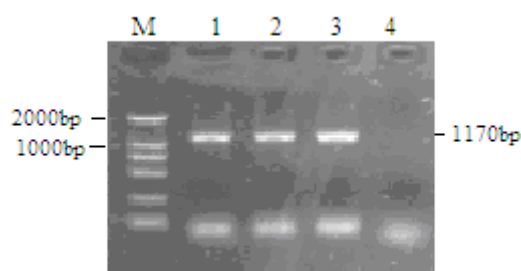


图 5-3 MOMP/pMD18-simple-T 重组质粒 PCR 鉴定

M, DL2000 Marker; 1~3, PCR 产物; 4, 阴性对照

Fig 5-3 Identification of MOMP /pMD 18-simple-T plasmids by PCR.

M, DL2000 Marker; 1~3, the products of PCR; 4, negative control.

5.2.2 MOMP/pMD18-simple-T 重组质粒酶切鉴定

MOMP/pMD18-simple-T 用 *Bgl* II 和 *Sa*L I 酶进行双酶切后电泳，结果如图 5-4 所示。说明插入片段的大小与目的片段一致。

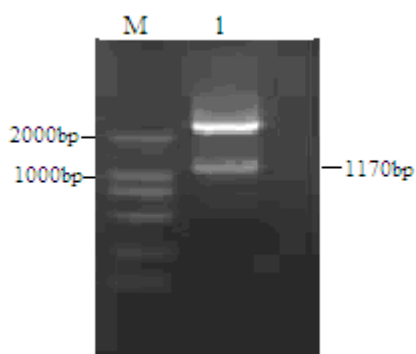


图 5-4 MOMP/pMD18-simple-T 重组质粒酶切鉴定

M, DL2000 Marker; 1, 酶切产物

Fig 5-4 The identification of MOMP/pMD18-simple-T plasmids by restriction enzymes.

M, DL2000 Marker; 1, the product of restriction enzymes digestion

5.2.3 重组穿梭质粒酶切鉴定和 PCR 鉴定

pSh-MOMP 重组质粒用 *Bgl* II 和 *Sa*L I 酶进行双酶切，切出一条大小约 1200bp 大小的片段，用 PCR 进行扩增，扩出一条大小约 1200bp 的片段，说明鸡鹦鹉热衣原体 MOMP 基因正确连接到 pShuttle-CMV 载体中。如图 5-5 所示。

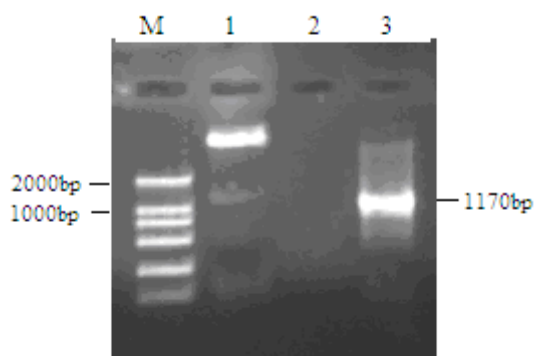


图 5-5 重组穿梭质粒酶切鉴定和 PCR 鉴定

M, DL2000 Marker; 1, 酶切产物; 2, 阴性对照; 3, PCR 扩增产物

Fig 5-5 The identification of recombinant pShuttle-MOMP plasmids by restriction enzymes and PCR.

1, The product of restriction enzymes digestion;

2, negative control

3, The product of PCR

5.2.4 重组穿梭质粒序列测定

合成 pShuttle-CMV 穿梭质粒多克隆位点两侧的测序引物，上游引物为：5'-GGTCTATATAAGCAGAGCTG-3'；下游引物为：5'-GTGGTATGGCTGATTATGATCAG-3'；对 pSh-MOMP 进行扩增，并进行序列测定，结果表明，MOMP 基因片段正确插入到 pShuttle-CMV 穿梭载体中。

5.2.5 重组腺病毒质粒 PCR 鉴定和酶切鉴定

经过在细菌内同源重组、37℃培养 12h 后，挑取 10 个菌落，增菌培养，利用质粒提取试剂盒提取重组腺病毒质粒，进行 PCR 鉴定，用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检查，结果如图 5-6 所示。

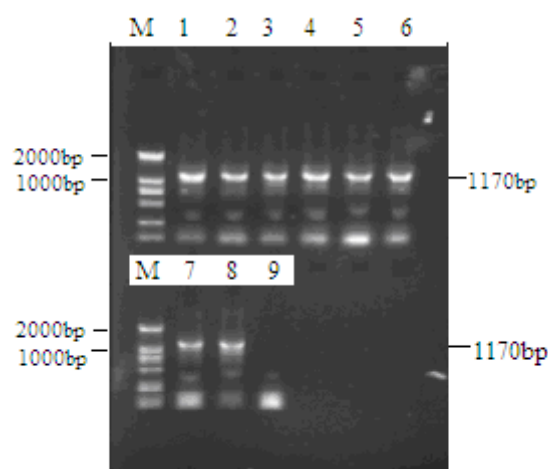


图 5-6 重组腺病毒质粒 PCR 鉴定

M, DL2000 Marker; 1~8, PCR 扩增产物;
9, 阴性对照

Fig 5-6 The identification of recombinant adenovirus plasmids by PCR.

M, DL2000 Marker; 1~8, the products of PCR; 9, negative control

用 *Pac* I 酶对这 8 个 PCR 阳性重组腺病毒质粒进行酶切，结果有 3 个阳性质粒切出了大小约 4.4kb 大小的片段，说明同源重组成功。如图 5-7 所示

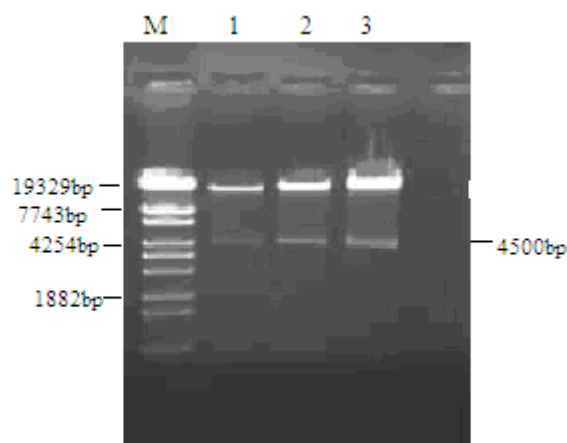


图 5-7 重组腺病毒阳性质粒 *Pac* I 酶切鉴定

M, λ EcoT14 I Marker; 1~3, 酶切产物

Fig 5-7 The identification of recombinant adenovirus positive plasmids by *Pac* I

M, λ EcoT14 I Marker; 1~3, the product of restriction enzymes digestion

通过 PCR 鉴定和酶切鉴定，说明鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因片段已被正确重组到腺病毒质粒当中。

5.3 讨论

在重组腺病毒载体的构建过程中，目的基因与穿梭载体的正确连接至关重要。连接方法、连接方式的选择，直接与工作效率相关联。一般来说，基因两端都是平末端的，连接效果最差；一

端为平末端, 另一端为粘性末端, 连接效果次之; 两端都为粘性末端的, 连接效果最好。直接用 PCR 产物经过酶切后进行连接, 虽然会减少连接步骤, 但由于酶切受保护碱基的影响, 降低酶切效率, 连接机率降低。

构建方法不同也会产生不同的效果。体外连接法将外源基因的表达盒克隆到腺病毒基因组的一个片段上, 在体外与腺病毒的基因组相连, 重新构建成一个完整的腺病毒 DNA 分子, 转染敏感细胞, 即可获得重组腺病毒 (ImLer J L, 1995)。但这类连接法由于腺病毒基因组上合适的克隆酶切位点有限而受到限制。

同源重组法是将具有共同或重叠序列的两种 DNA 分子, 通过共转染方式转移到另一生物体中, 在生物体内有关酶的作用下, 将含有外源基因的穿梭质粒转移到骨架载体中。生物体不同, 构建的方法也有差异。在真核细胞中进行同源重组, 分为哺乳动物细胞和酿酒酵母细胞两种 (Ketner G, 1994; Reddy P S, 1999) 常用细胞为 293 细胞和 911 细胞, 来源于人胚肾及人胚成视网膜细胞, 将腺病毒基因进行整合, 可表达腺病毒 E1 蛋白, 用于 E1 缺失的腺病毒载体。这种构建方法一般效率不是很高, 费时, 要求技术条件要好。相反, 报道用酿酒酵母细胞构建腺病毒载体有一定的优越性, 但该法也要将完整的腺病毒基因组克隆到酵母人工染色体中, 并要从大量培养的酵母细胞中提取人工染色体, 同时在拟重组的区域内将腺病毒分子线性化, 做到这点也并非容易的事。

位置特异性重组原理是源于 P1 噬菌体的 Cre-LoxP 系统包括 38000 的重组酶 (Cre) 和 34bp 的 loxP 靶序列。Cre 重组酶可介导存在于同一条 DNA 分子内部的两个相同的 loxP 位点之间进行重组, 使嵌于位点之间的序列被切除 (顺式剪切作用) 产生两个重组产物, 各含一个 loxP 位点 (Benihoud K, 1999)。基于这种原理构建的 E1 缺失腺病毒载体, 可获得克隆容量高达 37kb 的全缺失载体, 和容量为 10kb 的部分缺失载体。但由于 Cre 酶为美国的专利产品, 国际上仅有几家实验室享有使用这种酶的特权, 因此以该酶为基础构建的腺病毒载体系统现难以广泛使用。

最近, T.C He和他的同事们建立了更为快速的重组腺病毒构建系统, 即AdEasy™系统。就是将腺病毒的骨架载体pAdEasy-1 和带有外源基因的穿梭载体在大肠杆菌工程菌中高效率同源重组。这种方法减少了腺病毒DNA分子在体外的大量操作, 不需要噬斑纯化, 几个星期之内就能获得重组腺病毒 (He T C, 1998)。

在本研究中, 获得PCR产物时使用了宝生物工程 (大连) 有限公司的Pyrobest™ DNA聚合酶, 该酶的特点是保真性能极高。在试验过程中也证明了这一点。从获得PCR产物到穿梭质粒的构建后测序, 序列的碱基没有发生变化, 这为MOMP基因片段在重组腺病毒中正确表达出与自然感染一致的MOMP至关重要, 为以后的动物试验产生保护性抗体奠定了基础。

试验方法、思路的选择直接会影响试验的进展。在与 pShuttle-CMV 载体连接时, 改变了将带有酶切位点的 PCR 产品进行酶切, 再连接的思路。将 PCR 产物与 pMD18-simple T 载体连接。该载体的特点是没有多克隆位点, 但 β 一半乳糖苷酶能够正确表达。通过蓝白斑挑选, 获得阳性克隆。用设计的特异酶切位点对阳性克隆载体酶切, 可获得纯度很高的产物。本试验中, 酶切后获得的产物两端带有粘性末端, 因此提高了与 pShuttle-CMV 载体连接的机率。

在使用腺病毒载体系统时对载体系统也进行了选择。本研究使用的载体系统为 Stratagene's AdEasy XL 腺病毒载体系统。该系统在早期的 AdEasy 系统增加了新的成分, 减少了构建步骤。AdEasy XL 系统包括已将 pAdEasy-1 质粒转入的 BJ5183 感受态细胞, 这种构建方式大大减少了非重组穿梭质粒的影响, 很容易获得含有外源基因的重组腺病毒质粒。用这种转化方式, 大约有

80~90%卡那抗性的克隆为重组子，而传统的转化方法只能获得 20%的重组子。可见，使用该方法不但省时（3~4 周可获得重组腺病毒质粒），而且转化效率高，为快速获得重组腺病毒赢得了时间。

第六章 鸡源鸚鵡热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒质粒转染与鉴定

本章研究是将禽源鸚鵡热衣原体 MOMP 基因构建于腺病毒载体中,产生重组腺病毒质粒,这些质粒在 HEK293 细胞中进行包装,产生具有感染力的重组腺病毒。腺病毒感染机体与禽鸚鵡热衣原体对宿主的自然感染具有相似的途径,属细胞内感染。因此,构建的重组腺病毒能否表达 MOMP 是该活载体疫苗的关键。在本试验中,用运 PCR 方法检测 MOMP 基因在重组腺病毒中存在和用间接免疫荧光检测 MOMP 基因的正确表达。

6.1 材料与方法

6.1.1 细胞、菌株和试剂

大肠杆菌 BJ5183 和 XL10 感受态菌、HEK293 细胞由兰州兽医研究所病毒室卢曾军博士惠赠;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自杭州四季清生物公司;荧光素标记的兔抗鸡二抗购自北京中杉金桥生物有限公司;减蛋综合征阳性血(批号 200311)购自中国兽药监察所。

6.1.2 重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞

用质粒中量提取试剂盒(上海生工生物工程有限公司)提取重组质粒,重组腺病毒质粒用 *Pac* I 酶切 50 μ g,75%乙醇沉淀灭菌,超净工作台无菌吹干,用 50 μ L 的无菌超纯水溶解沉淀,保证质粒的浓度约为 1 μ g/ μ L,用 *Pac* I 酶 37 $^{\circ}$ C 酶切 3h (表 6-1),然后用 Lipofectamine2000 (Invitrogen)转染试剂进行转染,按说明书进行。具体操作步骤如下。

1) 转染前 24h 分 HEK293 细胞至 6 孔细胞培养板(不含抗生素),于含 5%CO₂气体的恒温培养箱中培养,至转染时 HEK293 细胞约为 80%-90%满。

2) 用 Opti-MEM[®] I (Invitrogen) 培养基 1250 μ L 稀释 20 μ g 的线化质粒,用等量的培养基稀释 50 μ L 的脂质体,然后将二者混合均匀,室温放置 20-30min。

3) 小心的吸干 6 孔细胞培养板中的液体,用无血清的培养基洗细胞一次,然后每孔加入约 1.5mL 的 Opti-MEM[®] I 培养基,每孔加入 500 μ L 上述混合物,使分布均匀。留 1 孔作对照。

4) 将培养板置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 4-6h 后,加入等体积的含 20%胎牛血清的培养基,观察 1w,待病变明显时,刮取并离心收获细胞,用约 500 μ L 的 PBS 重悬细胞,37 $^{\circ}$ C/-70 $^{\circ}$ C 冻融 3 次,离心弃沉淀,将上清保存于-70 $^{\circ}$ C,即为初代重组腺病毒。

表 6-1 重组腺病毒质粒 *Pac* I 酶切

Table 6-1 The digestion of recombinant adenovirus plasmids by *Pac* I

酶切体系	总体积 500 μ L
------	-----------------

10×NEB buffer	50μL
100×BSA	5μL
<i>Pac</i> I	10μL
重组腺病毒质粒	20μL
灭菌双蒸水	415μL

6.1.3 重组腺病毒的培养

将初代腺病毒再感染单层 HEK293 细胞，培养 3~5d，同时观察有无细胞病变，若没有，收集细胞继续传代，直到出现明显的细胞病变时进行其他检测工作。

6.1.4 PCR 检测目的基因

利用北京博大泰克生物技术有限公司的质粒少量提取试剂盒从 HEK293 细胞中提取重组腺病毒质粒，操作步骤见第五章。然后进行 PCR 鉴定，以确定目的基因是否存在于腺病毒质粒中。PCR 反应体系如表 6-2。

表 6-2 重组腺病毒 PCR 检测

Table 6-2 The detection of the recombinant adenovirus by PCR

扩增体系	总体积 50μL
10×PCR buffer	5μL
dNTP(2.5mmol/L)	4μL
上游引物: MP3 (50pmol/L)	1 μL
下游引物: MP4 (50pmol/L)	1μL
重组腺病毒质粒模板	1.0μL
Pyrobest TM DNA polymerase(5 U/μL)	0.25μL
灭菌双蒸水	37.75μL

反应条件为：94℃变性 30s，49℃退火 30s，72℃延伸 2min，总共 30 个循环，最后 72℃延伸 10min。取 PCR 鉴定产物，进行电泳观察

6.1.5 间接免疫荧光检测目的基因的表达

取第 5 代重组腺病毒病变细胞，进行如下操作：

1) 将盖玻片洗净，高压。灭菌后置入灭菌过的 6 孔细胞培养板中，每孔加入以分散好的 HEK293 细胞 2mL，置 37℃培养。

2) 待细胞长满后（约 24h）4 孔接入反复冻融 3 次的重组腺病毒细胞液 200μL，2 孔留作对照。

3) 置 37℃培养，同时不断观察，至细胞本病出现时取出培养板，用冷丙酮于-20℃固定 20min，自然干燥。

4) 将鸡源鹦鹉热衣原体阳性血清进行原倍和 10 倍稀释，然后分别加入到用固定的 HEK293

细胞盖玻片, 加入的量使盖薄片刚好覆盖, 置湿盒 37℃ 孵育 30min。

- 5) 取出, 磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 每次 5min。
- 6) 加入原倍和 10 倍稀释的荧光标记兔抗鸡二抗, 置湿盒, 37℃ 孵育 30min。
- 7) 用 PBS 液洗涤 3 次, 每次 5min。
- 8) 将盖玻片置荧光显微镜下进行观察, 并拍照。

6.1.6 重组腺病毒与减蛋综合征阳性血清的中和试验

用减蛋综合征阳性血清检测是否对重组腺病毒的繁殖有抑止作用。聚体操作步骤如下:

- 1) 取反复冻融的重组腺病毒 HEK293 细胞液 1mL, 进行 10^{-1} , 10^{-2} …… 10^{-9} 系列稀释。
- 2) 将购买的减蛋综合征阳性血清置 56℃ 水浴中, 灭活 30min。
- 3) 取各个稀释度的重组腺病毒 HEK293 细胞液 100 μ L, 分别加入灭活的减蛋综合征阳性血清 100 μ L, 37℃ 作用 1h。
- 4) 将中和液加入到已长满的 HEK293 细胞单层, 37℃、5% 的 CO₂ 条件下培养, 观察结果。同时做 HEK293 空白细胞对照。

6.1.7 重组腺病毒稳定性试验

- 1) 将重组腺病毒连续传代 20 代以上, 观察并记录细胞病变时间。
- 2) 取第 5 代、第 10 代、第 15 代、第 20 代病变细胞, 反复冻融 3 次。
- 3) 取 1mL 的冻融液, 加入 50 μ L 10% SDS 和 3 μ L (20 μ g/ μ L), 60℃ 作用 30min, 然后置 37℃ 作用 2h。
- 4) 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 进行抽提, 将上清液转入另一干净管中。
- 5) 加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 沉淀 DNA。
- 6) 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 加入 70% 的乙醇洗涤, 12000rpm 离心 1min, 弃上清。
- 7) 将离心管置 37℃ 温箱, 干燥 30min。加入 30 μ L 的灭菌双蒸水, 进行 PCR 检测。

6.1.8 有限稀释法测定重组腺病毒毒价

用 DMEM 细胞培养基 10 倍系列稀释第 20 代病毒液至 10^{-10} , 每个稀释度加 6 孔, 每孔 200 μ L 加于长满 HEK293 细胞的 96 孔细胞培养板, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 3-7d, 计数每个稀释度细胞病变孔数, 按 Karber 法计算组织培养半数感染量 (TCID₅₀), 参考《动物病毒学》第二版。

6.1.9 重组腺病毒蚀斑试验测定毒价

- 1) 在 2 个 6 孔细胞培养板上, 使每孔的细胞密度达到 5×10^5 个左右, 37℃ 培养过夜。
- 2) 将病毒进行 1: 10 系列稀释, 每个稀释度的体积为 1mL, 稀释到 10^{-10} , 然后将 10^{-5} 至 10^{-9} 稀释的重组腺病毒接种于已长好的细胞中, 接种量为 1mL, 留一孔为对照。37℃ 培养 2h。
- 3) 取 30mL PBS 液, 加入琼脂糖, 使终浓度为 5%, 高压、灭菌。

- 4) 加热琼脂糖, 加入 90mL 的 DMEM 营养液, 凉至 37℃, 每孔从侧壁轻轻加入约 3mL, 37℃ 培养 2~7 天, 肉眼观察结果。

6.1.10 重组腺病毒电镜观察

- 1) 取于 36h 内病变的细胞, 反复冻融三次, 取 2mL 3000rpm 离心 30min, 除去细胞碎片。
- 2) 将磷钨酸配置成 2% 的溶液, 以 1mol/L 的氢氧化钠调整 pH 为 6.8, 滤过后盖紧瓶盖, 4℃ 保存。
- 3) 将染液与病毒液等量混合后, 在无菌柜或防尘罩内用喷雾器将 样品喷到带膜的载网上。
- 4) 待干燥后进行电镜观察。

6.2 结果

6.2.1 重组腺病毒转染 HEK293 细胞

用线性化的重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞, 连续盲传 3 代, 第 3 代培养至第 3 天时出现细胞病变, 细胞变圆、变大、少数细胞粘连。第 6 天收取病毒继续培养, 传至第 4 代时细胞于 24~48 完全病变, 如葡萄状。如图 6-1

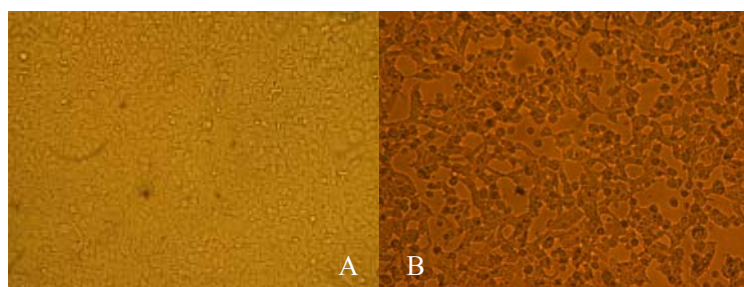


图 6-1 转染后第四代重组腺病毒 48 小时病变情况

A, 正常 HEK293 细胞; B, 在 48h 病变的 HEK293 细胞(10×40)

Fig 6-1 The CPE of HEK293 cells by the fourth generation recombinant adenovirus after transfection for 48hs

A, normal HEK293 cells; B, CPE of HEK293 cells after the transfection for 48h (10×40)

6.2.2 PCR 检测 MOMP 基因

对转染后的重组腺病毒外源基因 MOMP 进行 PCR 检测并测序, 验证 MOMP 在重组腺病毒中的正确性。结果表明, MOMP 在重组腺病毒中无发生碱基突变。图 6-2

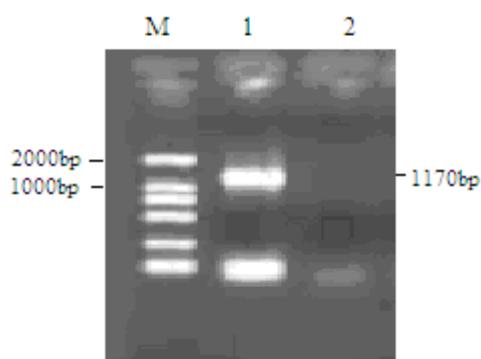


图 6-2 PCR 检测 MOMP 基因

M, DL2000 Marker ; 1, PCR 产物; 2, 阴性对照

Fig 6-2 Detection of MOMP gene by PCR.

1, The product of PCR; 2, negative control

6.2.3 间接免疫荧光检测 MOMP 基因的表达

将置于第 6 代重组腺病毒细胞培养瓶中的盖玻片及对照盖薄片取出, 经过冷丙酮固定, 加入 1 抗孵育 30min 后, 洗涤, 加入 2 抗, 洗涤后用荧光显微镜观察并拍照, 结果如图 6-3, 说明 MOMP 基因在 HEK293 细胞中进行了正确的表达。

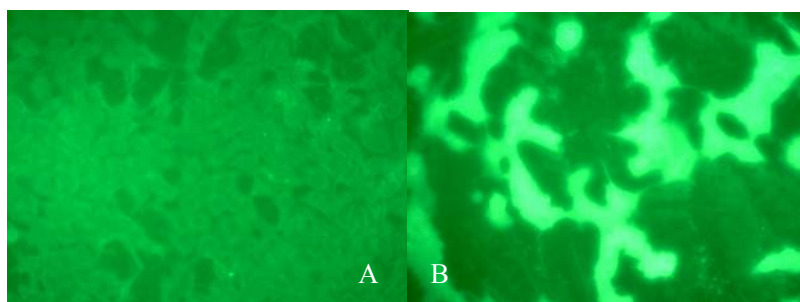


图 6-3 间接免疫荧光检测 MOMP 基因在 HEK293 细胞中的表达

A, 正常的 HEK293 细胞; B, 重组腺病毒感染 HEK293 细胞后 20h

Fig 6-3 Detection of the MOMP gene expressed in HEK293 cells by indirect immunofluoresences assay.

A, Normal HEK293 cells; B, HEK293 cells which were infected by the recombinant adenovirus for 20hrs

6.2.4 重组腺病毒减蛋综合征阳性血清中和试验

将重组腺病毒 HEK293 细胞反复冻融, 系列稀释后与减蛋综合征阳性血清作用, 接入已长满 HEK293 细胞的 96 孔细胞培养板, 37℃、5%的 CO₂ 条件下培养培养 2-6 天, 结果如表 6-3。

表 6-3 重组腺病毒-减蛋综合征阳性血清中和试验

Table 6-3 The neutralization assay of recombinant adenovirus and EDS₇₆ positive serum

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*其中 A、B、C、D、E、F 为试验组 G、H 为对照组。

从表 6-3 中可以看出, 减蛋综合征阳性血清对重组腺病毒没有中和作用。

6.2.5 重组腺病毒稳定性检测

取第 5 代、第 10 代、第 15 代、第 20 代重组腺病毒, 用前述方法提取腺病毒 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增产品用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳观察结果, 结果如图 6-4。从结果来看, 所选择的代次均扩增出了与预期大小一致的片段, 说明重组腺病毒质粒中均含有禽源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因, 重组腺病毒质粒比较稳定。

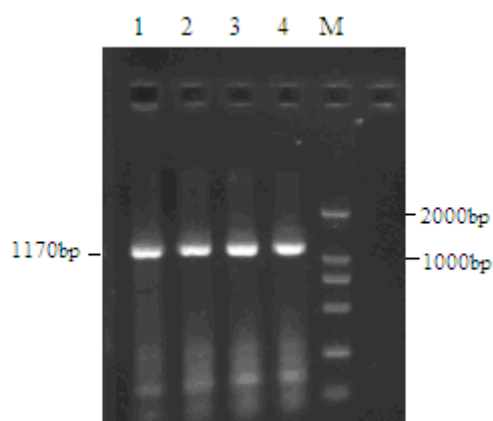


图 6-4 重组腺病毒稳定性测定

M, DL2000 Marker; 1,2,3,4 分别为第 5 代、第 10 代、第 15 代、第 20 代重组腺病毒 PCR 产物。

Fig 6-4 Stability detection of the recombinant adenovirus

M, DL2000 Marker; 1,2,3,4 was the PCR product of the 5th, 10th, 15th and 20th generation of recombinant adenovirus, respectively.

6.2.6 重组腺病毒毒价测定

将第 10 代重组腺病毒进行 10 倍系列稀释, 加入到已长满 HEK293 细胞的 96 孔细胞培养板中, 其中 A、B、C、D、E、F 为接毒组 G、H 为对照组。培养 6 天后的结果如表 6-4

表 6-4 有限稀释法重组腺病毒毒价测定

Table 6-4 The recombinant adenovirus was titrated by series dilution

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* +表示 HEK293 细胞发生病变；- 表示 HEK293 细胞正常。

根据表 6-4 可以看出病变孔数统计如下：

表 6-5 重组腺病毒第 10 代毒 TCID₅₀测定

Table 6-5 The TCID₅₀ of the 10th recombinant adenovirus were detected

稀释度	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
正常孔数	0	0	0	0	0	0	2	06	6
病变孔数	6	6	6	6	6	6	4	0	0

根据Karber 法计算TCID₅₀。

公式：lgTCID₅₀=L-d(s-0.5)

其中，L=最高稀释度的对数；d=稀释对数之间的差；s=阳性管比例总和

因此本试验重组腺病毒毒价为：

$$\lg \text{TCID}_{50} = -3 - 1(6 + 4/6 - 0.5) = -9.17$$

故TCID₅₀=6.8×10⁻⁹/0.2 每毫升中所含的病毒数=3.4×10¹⁰=3.4×10¹⁰

6.2.7 重组腺病毒蚀斑试验测定毒价

统计 2 个 6 孔细胞培养板中的病毒蚀斑数，结果见表 6-6

表 6-6 重组腺病毒TCID₅₀测定

Table 6-6 The TCID₅₀ detection of recombinant adenovirus

稀释度	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
蚀斑数 1	142	83	68	34	14
蚀斑数 2	168	151	90	38	18
平均数	155	117	79	36	16

$$\text{每mL中的PFU} = 32/1/2 \times 10^9 = 1.6 \times 10^{10}$$

从有限稀释法和蚀斑数测定重组腺病毒的毒价，可以看出，蚀斑法测定的重组腺病毒毒价稍低于有限稀释法，但二者在同一个稀释度内，说明重组腺病毒的毒价接近其实际值。

6.2.8 重组腺病毒电镜观察

通过对 HEK293 细胞反复冻融，进行病毒分离、染色、电镜观察，病毒的直径大约为 80nm，呈六边形，与腺病毒相似，说明产生的细胞病变是由腺病毒感染而引起的。如图 6-5 所示。

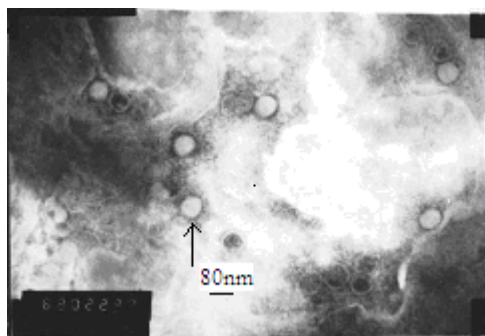


图 6-5 重组腺病毒电镜观察

Fig 6-5 The electron microscope observation of recombinant adenovirus(60000×)

6.3 讨论

用重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞，盲传 3 代，待 HEK293 细胞出现病变后，用 PCR 技术和间接免疫荧光技术对包含在重组腺病毒 DNA 中 MOMP 基因和 MOMP 基因的表达进行了检测。在进行间接免疫荧光试验时对鸡源鸚鵡热衣原体阳性血清和荧光素标记的二抗进行原倍和 10 倍稀释物分别进行试验，发现原倍血清及标记的二抗容易产生非特异性现象，对照组有荧光存在。对血清和标记抗体进行 10 倍稀释后，对照组消除了非特异性荧光现象。

重组腺病毒是表达外源基因和传递外源基因很有用的工具。腺病毒的生物学特性表明，腺病毒载体可用于许多方面。因为，腺病毒感染细胞的类型很多，并且这种感染不受宿主细胞分化的影响。腺病毒感染细胞具有很高的繁殖滴度。本试验中所用的载体为人用腺病毒 5 型，它属于哺乳动物腺病毒属。目前，腺病毒科分为哺乳动物腺病毒属（*Mastadenovirus*）和禽腺病毒属（*Avianadenovirus*），专家还建议设立腺胸腺病毒属（*Atadenovirus*），鸡的减蛋综合征病毒属于该属。但是，改造的腺病毒 5 型与减蛋综合征病毒是否具有相同的抗原表位，为了解决这个问题，用减蛋综合征病毒阳性血清与不同稀释度的重组腺病毒在体外进行作用，然后再接入长好的 HEK293 细胞，试验结果表明，减蛋综合征病毒的阳性血清不能中和重组腺病毒，这说明改造的腺病毒 5 型与减蛋综合征没有相同的抗原表位。这为以后的田间免疫提供了科学的依据。

本研究中用有限稀释法和噬斑计数来测定重组病毒滴度。两种方法测定的结果基本一致。说明测定的重组腺病毒滴度接近其实际值。在本试验中，病毒的滴度似乎高于同一载体插入外源基因片段较大的重组腺病毒滴度，这可能与插入的片段较小，有利于重组腺病毒的复制，有利于外源基因的表达。

将感染的 HEK293 细胞收集，经过离心，用 PBS 液重悬，反复冻融 3 次，离心，取上清，就能获得高滴度且较纯的重组腺病毒。用这种方法获得的病毒经过染色，电镜观察，可以看到较多的病毒粒子。证明感染 HEK293 细胞的是重组腺病毒。

第七章 鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒的 SPF 雏鸡免疫试验

为了准确评价重组腺病毒免疫鸡的效果,以 SPF 雏鸡做为动物模型,接种构建的鸡源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒进行免疫试验,并以野生型重组腺病毒和 HEK293 细胞作为对照。

7.1 材料与方法

7.1.1 细胞和培养基

人胚胎肾细胞 (HEK293) 由兰州兽医研究所病毒室卢曾军博士提供; DMEM、RPMI1640 培养基购自 Gibco ; 胎牛血清购自杭州四季青生物科技有限公司; 植物血凝素 (PHA) 购自北京博大泰克生物科技有限公司。SPF 小鸡购自甘肃省中医学院

7.1.2 重组腺病毒制备

免疫用重组腺病毒 Ad-MOMP 为第 21 代毒,其毒价为 3.4×10^{10} TCID₅₀/mL。收集于 30 小时内病变的 HEK293 细胞,用 PBS 重悬,反复冻融 3 次,6000rpm 离心 30min,收取上清,直接用于小鸡免疫。空白对照 HEK293 细胞悬液、野生型腺病毒 Ad5 的制备方法同上。

7.1.3 CpL 鸡胚适应毒

CpL 菌株在 7 日龄鸡胚测定其毒力,毒力为 2.8×10^{11} 。

7.1.4 试验动物及分组

试验动物为 7 日龄 SPF 雏鸡,共 60 只,按表 7-1 进行分组。

表 7-1 试验动物分组

Table 7-1 Groups of SPF chicks test

分组	翅根肌肉接种数	翅根皮下接种数	接种量 (0.2mL)
重组腺病毒组	10 只	10 只	6.8×10^9 TCID ₅₀
野生型腺病毒组	10 只	10 只	4×10^8 TCID ₅₀
293 细胞对照组	10 只	10 只	0.4mL

7.1.5 血清抗体效价测定

于接种前一天和免疫后第 15 天,分别于试验鸡翅根部静脉采血,用衣原体间接血凝 (IHA) 试验检测血清衣原体抗体。操作步骤如下。

- 1) 取经处理过的干净的 96 孔 V 型板, 每孔加入 25 μ L 的稀释液。
- 2) 取 25 μ L 自然析出的血清, 加入到第一孔中, 混匀, 吸取 25 μ L, 加入到下一孔, 如此对倍稀释, 直至第 7 孔, 混匀后吸弃 25 μ L。同时作对照
- 3) 每孔加入抗原致敏红细胞 25 μ L, 在振荡器上轻轻振荡 1min。
- 4) 置室温下 2~3h, 观察并记录结果。

7.1.6 重组腺病毒血清抗体检测

对重组腺病毒组进行随机采血, 分离血清, 用减蛋综合征诊断试剂盒检测血清中的腺病毒抗体。具体操作步骤如下:

- 1) 取一只清洁的 96 孔 V 型板, 用微量移液器在第 1~6 孔内加稀释液 25 μ L, 第 7 孔加 50 μ L。
- 2) 用微量移液器吸取被检血清 25 μ L 加至第 1 孔, 混匀后, 吸出 25 μ L 加入第 2 孔混匀。如此倍比稀释到第 7 孔, 从第 7 孔吸出 25 μ L 弃去。
- 3) 每孔加入 EDS₇₆ 抗原 25 μ L。
- 4) 置振荡器上振荡 1~2min, 置 18~22 $^{\circ}$ C 静止 20min。
- 5) 每孔再加 0.5% 红细胞悬液 25 μ L, 放在振荡器上振荡 1~2min, 置 18~22 $^{\circ}$ C 60min。
- 6) 观察结果。

7.1.7 攻毒保护试验

免疫后第 21 天用鸡分离株 CpL 进行攻击, 攻毒量为 0.2mL (5.6×10^{10} ELD₅₀), 攻毒途径为鼻内接种。攻毒后逐日观察, 记录发病情况。

7.2 结果

7.2.1 免疫前的鹦鹉热衣原体抗体水平

用兰州兽医研究所生产的衣原体 IHA 试剂盒对 7 日龄小鸡衣原体血清抗体进行检测, 随机抽样, 每组 2 只, 结果如表 7-2。

表 7-2 免疫前 SPF 雏鸡血清衣原体抗体检测

Table 7-2 Measurement of antibody against *Chlamydia* sp in sera from chicks before vaccination by IHA

稀释度	2 \times	4 \times	8 \times	16 \times	32 \times	64 \times
1	++	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	++	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-

6	+	-	-	-	-	-
阳性对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++
阴性对照	-	-	-	-	-	-
空白对照	-	-	-	-	-	-

根据 IHA 的判定标准,当鸡血清抗体效价 $\leq 1:4$ (+),判定为阴性。本结果表明,供试的雏鸡在免疫前无衣原体感染,可以用于试验。

7.2.2 免疫后血清抗体的测定

免疫后第 15 天、21 天采血,测定抗 MOMP 血清抗体,结果见表 7-3、表 7-4。

表 7-3 免疫后第 15 天血清抗体效价

Table 7-3 Titer of anti-MOMP antibody detected by IHA on 15th day after vaccination

血清效价		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
重	1	+++	+++	++	-	-	-
组	2	+++	++	+	-	-	-
腺	3	+++	++	+	-	-	-
病	4	++	++	-	-	-	-
毒	5	+++	++	+	-	-	-
免	6	+++	++	+	-	-	-
疫	7	+++	++	+	-	-	-
组	8	+++	++	+	-	-	-
	9	++	++	+	-	-	-
	10	++	+	-	-	-	-
野	1	++	+	-	-	-	-
生	2	+	-	-	-	-	-
型	3	++	+	-	-	-	-
腺	4	+	-	-	-	-	-
病	5	-	-	-	-	-	-
毒	6	-	-	-	-	-	-
免	7	+	-	-	-	-	-
疫	8	++	-	-	-	-	-
组	9	+	-	-	-	-	-
	10	++	-	-	-	-	-
HEK293	1	+	-	-	-	-	-
细	2	+	-	-	-	-	-
胞	3	++	-	-	-	-	-
免	4	+	-	-	-	-	-

疫	5	-	-	-	-	-	-
组	6	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-	-
	8	++	-	-	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-	-
阳性对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
阴性对照	-	-	-	-	-	-	
空白对照	-	-	-	-	-	-	

表 7-4 免疫后第 21 天血清抗体效价

Table 7-4 Titer of anti-MOMP antibody detected by IHA on 21th day after vaccination

		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
重	1	+++	+++	++	++	+	-
组	2	+++	+++	+++	++	+	-
腺	3	+++	+++	++	++	+	-
病	4	+++	+++	++	+	-	-
毒	5	++++	++++	+++	++	++	+
免	6	+++	+++	++	++	+	-
疫	7	+++	+++	++	++	-	-
组	8	+++	+++	+++	++	++	-
	9	+++	+++	+++	++	+	-
	10	+++	++	++	+	-	-
野	1	++	++	-	-	-	-
生	2	++	-	-	-	-	-
型	3	++	-	-	-	-	-
腺	4	+	-	-	-	-	-
病	5	-	-	-	-	-	-
毒	6	-	-	-	-	-	-
免	7	++	+	-	-	-	-
疫	8	++	+	-	-	-	-
组	9	+	-	-	-	-	-
	10	++	-	-	-	-	-
HEK293	1	++	+	-	-	-	-
细	2	+	-	-	-	-	-
胞	3	++	+	-	-	-	-
免	4	++	+	-	-	-	-

疫	5	+	-	-	-	-	-
组	6	+	-	-	-	-	-
	7	++	-	-	-	-	-
	8	++	-	-	-	-	-
	9	++	-	-	-	-	-
	10	++	-	-	-	-	-
阳性对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
阴性对照	-	-	-	-	-	-	-
空白对照	-	-	-	-	-	-	-

* ++++表示 100%凝集；+++表示 75%凝集；++表示 50%凝集；+表示 25%凝集

从免疫后第 15 天和第 21 天的血清抗体来看，第 15 天时 8 只小鸡的血清抗体的水平达到 1：8，2 只小鸡的血清抗体水平较低，这时的抗体水平还没有达到保护水平。对第 21 日抗体水平进行检测发现，大部分小鸡的血清抗体水平达到 1：32，个别甚至达到 1：64。

根据表 7-3、表 7-4 统计如表 7-5

表 7-5 免疫前和免疫后各组 SPF 小鸡的衣原体抗体应答（IHA）

Table 7-5 Chlamydial antibody response of SPF chicks in different groups before and after vaccination(IHA)

分组	免疫前	免疫后 15d	免疫后 21d
Ad-MOMP	0-1：4（+）	1:4（++~++++）-1:8	1：32-1:64
Ad5	0-1：4（+）	1：2	1：4
HEK293	0-1：4（+）	1：2	1：4
阳性对照	0-1：4（+）	1：64	1：64

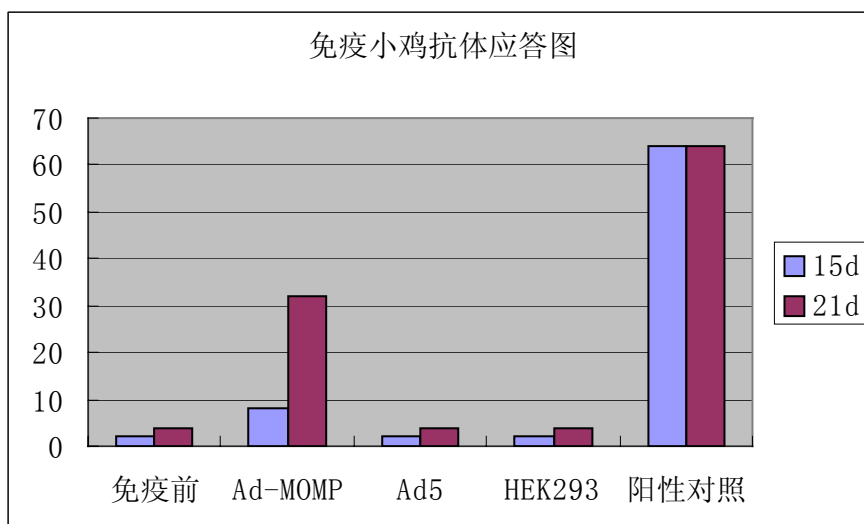


图 7-1 免疫小鸡抗体应答柱型图

Fig 7-1 Chlamydial antibody response of SPF chicks in different groups before and after vaccination (IHA)

7.2.3 肌肉免疫和皮下免疫抗体水平比较

通过两种途径对小鸡进行免疫，在第 15 天和第 21 天分别采血，用衣原体 IHA 分别对两组进行抗体检测，检测结果表明，二者产生抗体的水平基本一致。

7.2.4 重组腺病毒血清抗体的测定

表 7-6 减蛋综合征诊断试剂盒测定重组腺病毒抗体

Table 7-6 Detection of antibody against the recombinant adenovirus by EDS₇₆ kit

Table 1-3-1 Reaction of antibody against the recombinant adenovirus Ad5-28-2										
血清稀释度		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	抗原 对照	红细 胞 对照
重 组 腺 病 毒 组	1	-	-	+	++	++	+++	+++	++++	-
	2	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	3	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	5	-	-	-	++	++	+++	++++	++++	-
	6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	7	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	8	-	-	++	++	+++	++++	++++		
	9	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++		
	10	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++		
阳性血清对照		-	-	-	-	-	-	-		

根据减蛋综合征诊断试剂盒判定标准，当血凝抑制达到 1:32 以上可以判定为阳性。从本试验的结果来看，减蛋综合征抗原不能与重组腺病毒血清抗体发生反应。

7.2.5 攻毒保护试验结果

野生型腺病毒免疫组、HEK293 细胞免疫组用 CpL 菌株攻击后于第 6 个月开始发病，部分产蛋鸡产软壳蛋，产蛋率下降。HEK293 免疫组有一只鸡死亡，剖检肝脾肿大，心包积液，输卵管囊肿。将野生型腺病毒免疫组和其他 HEK293 细胞免疫鸡全部处死，剖检，全部出现肝脾肿大，部分鸡心包积液，部分鸡肺部有纤维素性渗出，部分鸡输卵管肿胀，但没有观察到有结膜炎的现象。

重组腺病毒免疫组除 1 只出现肝脾肿大外，其他 9 只剖检肝脾正常，无肿大现象。产蛋鸡输卵管正常，产蛋率也高于发病组。并且无畸形蛋、软壳蛋。具体保护情况见表 7-7。

表 7-7 雏鸡攻毒保护试验结果

Table 7-7 Symptoms of the vaccinated SPF chicks in 6 months after challenge

组别	HEK293	Ad5	Ad-MOMP	保护率
肝脏肿大	10/10	10/10	1/10	90%
脾脏肿大	10/10	10/10	1/10	90%
输卵管囊肿	6/10	7/10	0/10	100%
心包积液	7/10	6/10	0/10	100%
肺部纤维素性渗出	8/10	7/10	0/10	100%
产软壳蛋、畸形蛋	6/10	7/10	0/10	100%

7.3 讨论

在本试验中,重组腺病毒疫苗免疫途径采取了皮下注射和肌肉注射两个途径,来确定哪一个途径更为有效,从试验的结果来看,二者在重组腺病毒刺激机体产生抗 MOMP 抗体和 T 淋巴细胞方面没有多大的区别,这为后来的免疫试验及田间免疫提供了依据。

从免疫后第 15 天所测的血清抗体来看,抗体水平较低,可能与免疫的早期产生 IgM 有关,在理论上 IgM 的抗原结合价为 10 价,但与大分子抗原结合时,由于受到空间结构的限制,实际上只表现出 5 价有效(龚非力, 2001)。第 21 天测定抗体水平时,平均水平已上升到 1:32,个别小鸡抗体水平达到 1:64。在本试验中用衣原体 IHA 试剂盒检测血清中的抗体,该试剂盒中的抗原为羊衣原体株,该株 MOMP 与本试验室获得的 CpL 株的 MOMP 氨基酸序列的同源性为 82.3%,因此在测定小鸡血清中的抗 MOMP 抗体降低了敏感性。而实际可能抗 MOMP 抗体水平要高一些。而这时产生的抗体主要以 IgG 为主。由此而测定的结果比第 15 天测定的血清抗体水平要高。

用 EDS₇₆ 试剂盒抗原检测重组腺病毒抗体,来判断二者之间是否存在抗原抗体反应,若二者之间发生反应,说明 EDS₇₆ 与重组腺病毒之间具有相同的抗原位点,这使带有减蛋综合征母源抗体的小鸡免疫失败,使重组腺病毒活载体疫苗的使用受到限制。从检测的结果来看,二者之间不存在抗原抗体反应。所以该重组腺病毒活载体疫苗即可以用于带有减蛋综合征母源抗体的雏鸡,也可以用于 EDS 疫苗免疫过的鸡群。

鸚鵡热衣原体可感染大部分宠物鸟,禽类(包括家禽、火鸡、鹅、鸭等相关的家养品种)和野鸟,并且感染率很高。持续性感染可存在几个月,几年是很正常的(Vanrompay D *et al*, 1995)。禽感染鸚鵡热衣原体强毒株后表现为精神萎顿、不食,眼和鼻有粘性分泌物,拉稀,后期脱水,消瘦。剖检肝脾肿大,气囊发炎,纤维素性心包炎。有的有严重的肠炎病变。但鸡对衣原体表现出具有抵抗力(Barr D A *et al*, 1986)。在本动物试验中,攻毒后对照鸡没有表现出眼和鼻有粘性分泌物,但表现出轻度的拉稀,生长缓慢的症状。到 6 个月后个别鸡死亡,其他鸡处死后剖检,发现这些鸡表现出肝脾肿大,心包积液,肺部纤维素性渗出,部分鸡卵巢肿大,输卵管囊肿。这与国内报道小鸡感染衣原体大约为 15~50 日龄,死亡率达 20~30% 不相符(于维军等, 1994)。但免疫组除一只鸡表现除这些症状外,其他鸡剖检肝脾大小正常,输卵管无肿胀。说明,用该重组腺病毒疫苗免疫鸡产生了良好的保护效果。然而,在试验过程中用鸡胚测定衣原体的毒力时,能引起鸡胚的死亡,但用双倍的剂量攻击 1 日龄的小鸡,却不能引起小鸡的死亡,小鸡似乎表现出对衣原体不甚敏感。这个问题有待于进一步研究。

第八章 鸡源鸚鵡热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒本动物试验及生物学评价

根据鸡源鸚鵡热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒对 SPF 小鸡免疫结果，用该疫苗对小鸡进行免疫试验，以评价疫苗对本动物的效果。同时，对疫苗的安全性、保存期等进行了试验。

8.1 材料与方法

8.1.1 细胞和培养基

人胚胎肾细胞（HEK293）由兰州兽医研究所病毒室卢曾军博士提供；DMEM、RPMI1640 培养基购自Gibco；胎牛血清购自杭州四季青生物科技有限公司；EDS₇₆抗原、阳性血清购自中国兽药监察所。

8.1.2 重组腺病毒制备

免疫用重组腺病毒Ad-MOMP为第 22 代毒，其毒价为 3.4×10^{10} TCID₅₀/mL。收集于 30 小时内病变的HEK293 细胞，用PBS重悬，反复冻融 3 次，6000rpm离心 30min，收取上清，直接用于小鸡免疫。空白对照HEK293 细胞悬液。

8.1.3 CpL 鸡胚适应毒

CpL株是本实验室分离的鸚鵡热衣原体，用 7 日龄鸡胚测定其毒力，毒力效价为 2.8×10^{11} 。

8.1.4 试验动物及分组

试验动物为 7 日龄肉杂鸡，从兰州种鸡场购买。共 40 只，鸚鵡热衣原体血清抗体为阴性，体重大约在 40~50g 左右。随机分为 4 组：A 组为重组腺病毒免疫组，10 只鸡；B 组为免疫抗体水平持续检测组，10 只；C 组为不免疫攻毒对照组，10 只，D 组为不免疫不攻毒对照组。A、B 组的免疫剂量为 0.2mL。

8.1.5 抗 MOMP 抗体持续水平监测

将 B 组小鸡用重组腺病毒免疫，分别与免疫后 15 天、21 天、60 天、120 天、180 天用衣原体 IHA 测定抗体水平，观察重组腺病毒的免疫持续期。

8.1.6 淋巴细胞增殖试验

用 MTT 法测定测定淋巴细胞转化率。依照下列操作步骤分离外周血淋巴细胞：

- 1) 10mL 的试验管中加入含抗凝剂的 2mL 平衡盐溶液, 然后加入 2mL 采集的鲜血。
- 2) 用移液器轻轻吹打混匀。
- 3) 吸取 3mL 的淋巴细胞分离液加入到一个新的离心管中, 然后小心的沿管壁加入稀释的血液 (4mL)。在 18~20℃ 条件下 400g 离心 30~40min。
- 4) 吸取上层液, 留下淋巴细胞层, 注意不要破坏该层。
- 5) 将淋巴细胞层用洁净的枪头转移到新的离心管中。
- 6) 加入至少 3 倍体积的平衡盐溶液, 用枪轻轻吹打混匀。在 18~20℃ 条件下 60~100g 离心 10min, 移去上清液。
- 7) 重复步骤 6。
- 8) 将淋巴细胞悬浮于 RPMI1640 培养基中。显微镜下计数, 配成 1×10^7 /mL 细胞悬液。

8.1.7 攻毒试验

免疫后第 21 天用鸡分离株 CpL 进行攻击, 攻毒量为 0.4mL (1.1×10^{11} ELD₅₀), 攻毒途径为鼻内接种。攻毒后逐日观察, 记录发病情况。

8.1.8 重组腺病毒安全性评价

对重组腺病毒免疫组免疫后第 2 日开始, 观察试验鸡的精神状态、饮食情况、体重、粪便等生物学特征, 并从粪便中检测是否有重组腺病毒排出, 总体评价重组腺病毒的安全性。

8.1.9 疫苗保存期试验

- 1) 重组腺病毒保存 1 年后重组腺病毒滴度测定

将病变的 HEK293 细胞 (第 21 代毒), 其毒价为 3.4×10^{10} TCID₅₀/mL, 反复冻融 3 次, 离心去除细胞碎片, 将上清置 -20℃ 冰箱保存 1 年, 取出后用 96 孔板测定其滴度, 操作方法见第六章。

- 2) 重组腺病毒保存 1 年后动物免疫

将重组腺病毒在 -20℃ 条件下保存 1 年, 免疫经测定鸚鵡热衣原体血清抗体为阴性的 4 月龄肉杂鸡 10 只, 接种剂量 0.2mL, 免疫后第 15 天测定抗体。

8.2 结果

8.2.2 抗 MOMP 抗体水平变化检测

对 B 组免疫组鸡, 经重组腺病毒疫苗免疫后于 15 天、21 天、60 天、120 天、180 天翅根部静脉采血, 用衣原体 IHA 检测, 统计, 结果如表 8-1

表 8-1 重组腺病毒表达的 MOMP 抗体动态检测

Table 8-1 Dynamic measurement of Antibody to the recombinant adenovirus expressed MOMP by IHA

抗体平均值	15d	21d	60	120	180
免疫组 B 的 MOMP 抗体	1 : 8	1 : 64	1 : 32	1 : 32	1 : 16

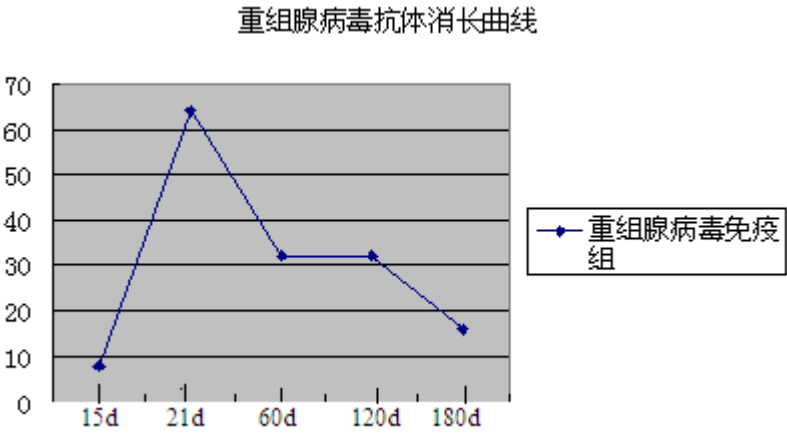


图 8-1 重组腺病毒抗体消长图
Fig 8-1 Antibody change of recombinant adenovirus/MOMP

从图中可以看出，免疫后第 21 天抗体水平急剧上升，随后下降，2-4 个月保持在 1 : 32 的水平，至 6 个月时，抗体水平仍然维持在 1 : 16。

8.2.3 淋巴细胞增殖试验

对免疫组鸡，在免疫前和攻毒前随机对应采血 10 份，用 MTT 法测定淋巴细胞增殖情况，结果见表 8-2

表 8-2 重组腺病毒免疫鸡淋巴细胞增殖反应

Table 8-2 Lymphocyte proliferation response of chicks vaccinated with recombinant adenovirus											
时间	OD570										
免疫前	0.391	0.435	0.423	0.416	0.384	0.456	0.439	0.446	0.455	0.378	0.418
	± 0.029										
免疫后	0.649	0.656	0.656	0.673	0.666	0.673	0.657	0.659	0.647	0.652	0.672
	± 0.031										

根据 SPSS 统计软件，t=23.583 Sig=0 即 P<0.05，表明差异显著。

8.2.4 攻毒试验

对照组用 CpL 菌株攻击后于第 6 个月开始发病，部分产蛋鸡产软壳蛋，产蛋率下降。将对照组鸡全部处死，剖检，全部出现肝脾肿大（图 8-2），部分鸡心包积液，部分鸡肺部有纤维素性渗出，部分鸡输卵管肿胀，但没有观察到有结膜炎的现象。

重组腺病毒免疫组除 2 只鸡肺部有轻微的纤维素性渗出，1 只有轻微的心包积液外，其他剖检无肝脾肿大，心包无积液，产蛋鸡输卵管正常，产蛋率也高于空白对照组。并且无畸形蛋、软壳蛋。具体保护情况见表 8-3。

表 8-3 攻毒保护试验结果

Table 8-3 Challenge results of vaccinated chicks after 180 dpv

组别	肝脏肿大	脾脏肿大	输卵管囊肿	心包积液	肺部纤维素性渗出	产软壳蛋、畸形蛋
空白对照组	10/10	10/10	7/10	7/10	5/10	6/10
Ad-MOMP	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10
保护率	100%	100%	100%	86%	60%	100%



图 8-2 攻毒后对照组肝脾肿大 A 正常肝脏; B, 肝脏肿大; C, 脾脏肿大
Fig 8-2 Swollen liver and spleen of chicken 180th d post challenge
A, normal liver; B, swollen liver; C, swollen spleen.

8.2.5 重组腺病毒安全性评价

1) 试验鸡临床观察

雏鸡免疫后精神良好，活泼好动，饮食正常，粪便正常，羽毛丰满。

2) 试验鸡体重检测

免疫组鸡和对照组鸡分别于免疫后 1 天、免疫后 4 天、20 天、60 天、170 天进行体重检测，取其平均值，结果见表 8-4

表 8-4 试验鸡体重检测

Table 8-4 Detection of the chicks's body weight

组别	1 st d	4 th d	20 th d	60 th d	170 th
免疫组	45.2g	54.2g	87.2g	1130g	3480g
对照组	44.4g	54.4g	94.2g	1230g	3430g

根据 SPSS 统计软件统计， $t=0.462$ ， $Sig=0.668$ ， $p>0.05$ ，差异不显著。说明用重组腺病毒免疫小鸡，不影响小鸡的体重的增加。

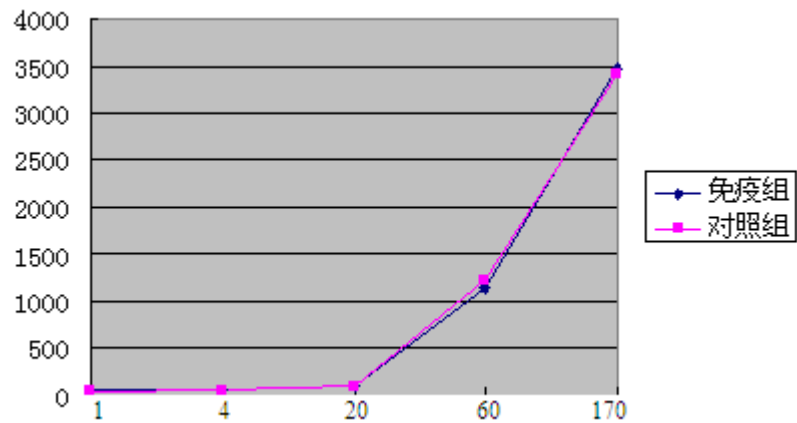


图 8-3 试验鸡体重增长曲线
Fig 8-3 Graph of the chicks's body weight gain

3) 粪便中重组腺病毒的检测
分别收集第 15 天、60 天、第 120 天、和第 180 天免疫鸡的粪便，提取重组腺病毒 DNA，用 PCR 检测，是否有重组腺病毒排出，结果见图 8-4

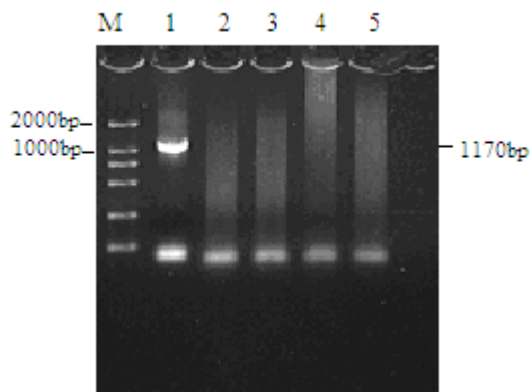


图 8-4 免疫鸡粪便中重组腺病毒检测
M, DL2000marker; 1 为阳性对照; 2,3,4,5 分别为第 15 天、第 60 天、第 120 天、第 180 天粪便 PCR 扩增物。
Fig 8-4 Detection of the recombinant adenovirus in dejecta from the immunized chicks
1, positive control; 2,3,4,5 was recombinant adenoviruses detected by PCR in dejecta from the chickens on 15th, 60th, 120th, 180th day, respectively.

从电泳图中可以看出，从免疫开始到 6 个月，粪便中没有重组腺病毒的排泄。

8.2.6 疫苗保存期试验

1) 动物试验
疫苗在-20℃保存一年，然后免疫 4 月龄左右的肉杂鸡，免疫后 15 天随机抽取 5 只鸡采集血液，分离血清，用衣原体 IHA 诊断试剂盒检测血清中的抗体，结果如表 8-5

表 8-5 重组腺病毒血清抗体检测

Table 8-5 Serum antibody detection of recombinant adenovirus						
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
1	++++	++++	++++	+++	+	-
2	++++	++++	++++	++	-	-
3	++++	++++	++++	++++	++	-

4	++++	++++	++++	++++	++	-
5	++++	++++	++++	++++	++++	++
阳性对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++
阴性对照	-	-	-	-	-	-
空白对照	-	-	-	-	-	-

从表中可以看出，4 月龄鸡免疫后 15 日抗体水平可达 1：32，个别可以达到 1：64。

2) 重组腺病毒滴度测定

将在-20℃保存了 1 年的重组腺病毒上清加入已长满HEK293 细胞单层的 96 孔细胞培养板，每个稀释度加 4 孔，每孔 200μL，置 37℃ 5%CO₂条件下培养 4~6 天，结果如表 8-6。

表 8-6 有限稀释法重组腺病毒毒价测定

Table 8-6 Detection of the recombinant adenovirus titer through series limited dilution

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
A	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* +表示 HEK293 细胞发生病变；-表示 HEK293 细胞正常。

根据表 8-6 可以看出病变孔数统计如下：

表 8-7 重组腺病毒滴度测定

Table 8-7 Titer detection of recombinant adenovirus

稀释度	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
正常孔数	0	0	0	0	3	4	4	4	4
病变孔数	4	4	4	4	1	0	0	0	0

根据Karber 法计算TCID₅₀。

公式：lgTCID₅₀=L-d (s-0.5)

其中，L=最高稀释度的对数；d=稀释对数之间的差；s=阳性管比例总和

因此本试验重组腺病毒毒价为：

$$\lg \text{TCID}_{50} = -3 - 1(4.25 - 0.5) = -6.75$$

故TCID₅₀=1.8×10⁻⁷/0.2 每毫升中所含的病毒数=9.0×10⁷=9.0×10⁷

从结果中可以看出，重组腺病毒在-20℃保存 1 年后，其滴度由 3.4×10¹⁰下降到 9.0×10⁶，但从动物试验结果来看，毒价虽下降但不影响其免疫力。

8.3 讨论

疫苗免疫持续期直接与疫苗接种次数息息相关，好的疫苗只免疫 1 次就能产生坚强的免疫力，

能够长时间的保护动物免受病菌的入侵。重组腺病毒免疫小鸡,从整个免疫期来说,可以达到 6 个月。这对于肉鸡来说已经足够,因为肉鸡饲养 2 个月就可以出笼。对于蛋鸡来说,一个免疫期还不能完全保证蛋鸡免受鹦鹉热衣原体的攻击,至少需要 2 次免疫。从抗体持续的情况来看,免疫后第 15 天抗体水平为 1:8,随后抗体水平急剧上升,达到了最高(1:64),这可能与后期产生的 IgG 有关。随后抗体水平逐渐下降,到 60 天时抗体水平回落到 1:32。到第 6 个月时,抗体水平下降到 1:16,在这种情况下,对鸡仍然具有保护作用。

用 MTT 法检测显示,免疫鸡体内有淋巴母细胞产生。当用重组腺病毒免疫小鸡时,重组腺病毒被巨噬细胞和树突状细胞所捕获,通过对重组腺病毒的吞噬或吞饮等方式进入抗原递呈细胞(APC),在胞内被质膜所包裹,形成吞噬小体,与溶酶体融合成吞噬溶酶体;蛋白质在内中被降解,所形成的免疫原性多肽与 MHC-II 类分子结合,被转运到 APC 表面供 T 细胞抗原受体(TCR)识别。在抵抗衣原体的感染中,T 细胞介导的免疫主要是 CD4+辅助性细胞(Th1)、CD8+ T 细胞、单核巨噬细胞和分泌细胞因子(Vanrompay D *et al*, 1999)。

评价任何疫苗(常规疫苗和基因工程疫苗),关键在其对动物的免疫效果和安全性,重组腺病毒也不例外。本试验腺病毒载体的安全性主要从以下 2 个方面进行考虑:(1)免疫后动物是否排出重组的腺病毒,污染环境;(2)对宿主有无不良影响。

腺病毒生物学分布表明,不同的免疫途径腺病毒侵入的部位不一致。全身应用(如静脉注射)可引起广泛的组织分布,根据报告基因检测,肝脏分布最多,其次是肺脏,然后是其他器官。经猕猴鼻腔内滴注重组腺病毒,便常规检查未检测到腺病毒的存在。采用抗体形成单位(AFU)检测猴胸腔内注射腺病毒试验表明,鼻炎拭子、血、尿、便样品检测均为阴性(张晓志,1999)。

本试验对鸡源鹦鹉热衣原体重组腺病毒安全性进行了监测。从免疫的第 1 天起,小鸡精神无异常现象,饮食正常,羽毛丰满,体重稳定增加;观察免疫部位,无肿胀、坏死等现象。收集免疫鸡不同时期(1-180 天)排出的新鲜粪便,用 PCR 方法检测粪便中的重组腺病毒,结果表明全部为阴性,这说明重组腺病毒较为安全。但潜在的危险是重组腺病毒载体可能与体内已感染的野生型腺病毒基因之间发生重组,而产生有复制能力的腺病毒。虽然这种互补是有限的,载体与野生型腺病毒之间的互相作用可反式提供 E1 功能区,使病毒的结构基因启动而表达。这两种情况均可引起 CTL 介导的对受体细胞的清除,而且形成免疫记忆,阻碍再次免疫(刘雪丰,1998)。本试验研制的衣原体重组腺病毒是否会与野生型腺病毒基因之间发生重组,还需要更长期的检测才能明了。

疫苗保存期试验,将重组腺病毒疫苗保存于-20℃ 条件下 1 年,然后检测了其滴度和免疫原性。滴度有所下降,但用同样的剂量免疫 4 月龄鸡,免疫效力没有下降。应该说明的是,本试验用 293 细胞所繁殖的衣原体重组腺病毒在冷冻时没有加保护剂(甘油、蔗糖),今后在疫苗冷冻工艺方面进行改进,以保证疫苗的质量在常规包藏条件(-10~-20℃)下基本保持不变。

第九章 结 论

1 从疑似患鹦鹉热衣原体鸡体内分离到衣原体,通过鸡胚传代,碘染色试验,磺胺嘧啶钠敏感试验,涂片显微镜检查,电子显微镜检查,鉴定为鹦鹉热衣原体。命名为hnq株,用7日龄鸡胚测定,毒价为 9×10^7 ELD₅₀,CpL株的毒价为 2.8×10^{11} ELD₅₀。选择CpL株作为研究对象。

2 建立了禽源鹦鹉热衣原体PCR诊断方法。并对该方法的特异性、敏感性、重复性进行了验证。

3 对鸡源鹦鹉热衣原体(CpL)MOMP基因进行克隆、鉴定和测序。与禽源鹦鹉热衣原体其他菌株的MOMP基因片段氨基酸序列进行了比较。氨基酸序列比较结果显示,与鸽鹦鹉热衣原体MOMP基因片段的同源性为82.3%,与鸭鹦鹉热衣原体MOMP基因片段的同源性为89.7%,与火鸡鹦鹉热衣原体MOMP基因片段同源性为88.7%,与长尾小鹦鹉衣原体MOMP基因片段同源性为94.4%。

4 成功构建了带有鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因片段的重组腺病毒,通过病毒在HEK293细胞内的传代和细胞内表达产物的检测,证实重组腺病毒可以稳定的携带外源基因,并可以在细胞内高效表达外源基因。

5 用减蛋综合征阳性血清中和重组腺病毒,二者无抗原抗体反应,不影响重组腺病毒感染HEK293细胞;用减蛋综合征病毒检测重组腺病毒抗体,二者无抗原抗体反应。这为重组腺病毒免疫小鸡免受禽腺病毒疫苗免疫母源抗体的干扰提供了科学依据。

6 用 6.8×10^9 TCID₅₀的重组腺病毒免疫7日龄小鸡,21天后用 1.1×10^{11} ELD₅₀的CpL株剂量攻击,6个月后对照组全部发病,免疫组除一只只有轻微的肝脾肿大外,其他全部保护。通过血清抗体检测和T淋巴细胞增殖试验表明,免疫鸡产生了良好的体液免疫和细胞免疫。这一结果说明,鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因片段重组腺病毒活载体疫苗能够预防鸡的鹦鹉热衣原体病。

7 鸡源鹦鹉热衣原体MOMP基因重组腺病毒活载体疫苗安全性试验表明,该疫苗对小鸡无毒副作用,对小鸡的成长没有影响,免疫鸡不排毒对环境无影响。保存期试验表明,-20℃保存一年后毒价虽有下降,但不影响免疫力。

8 首次在国内外成功构建了鹦鹉热衣原体MOMP基因重组腺病毒,并进行了一系列的相关试验,为预防动物的衣原体病提供了新技术,新思路,填补了该研究领域的空白。

参 考 文 献

- 白挨泉, 冯国金. 广东部分地区猪衣原体病的血清学调查. 中国畜牧兽医, 2004, 31(12):37-39
- 保广祺, 郭红纬, 余大忠等. 青海省海北州羊衣原体性流产病原诊断, 中国兽医科技, 1990, 8: 19-21.
- R.E 布坎南, N.E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册, <第八版>. 科学出版社, 1974, P: 1271-1275
- 蔡宝祥等主编. 家畜传染病学, 北京, 中国农业出版社, 2001.
- 陈廷和, 王守智, 李景水等. 宁夏羊衣原体病的血清学诊断及预防试验, 宁夏农林科技, 1994, 6: 30-32.
- 刁永祥, 余桂兰, 赵永孝等. 青海省德令哈农场猪衣原体性流产的诊断和免疫预防. 中国兽医科技, 1990, 3: 21-22.
- 段跃进, 李英才, 杨学军等. 不明原因小鸡死亡和产蛋鸡输卵管囊肿病原诊断的研究. 中国兽医科技, 1993, 23(6): 6-7
- 段跃进, 杨学军, 李英才. 猪流产鸚鵡热衣原体的抗原结构及抗原性和免疫原性分析, 畜牧兽医学报, 1994, 25(6):551-554
- 付华, 周玲, 曾毅. 新一代腺病毒载体研究进展. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19(2): 190-193.
- 高双娣, 程淑敏, 周继章等. 甘肃省部分猪场猪衣原体血清抗体的检测. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 27-28
- 龚非力. 医学免疫学. 科学出版社, 2001, 37-39.
- 郭元吉等. 中国人兽共患病杂志, 1986, 2(2): 24.
- 何诚, 朱虹, 王传武等. 鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白免疫肉鸡效果观察. 中国农业大学学报, 2004, 9(1): 45-48.
- 胡海志. 规模养猪场猪衣原体病的血清学调查. 现代畜牧兽医, 2004, 11: 26
- 胡龙阳. 规模化猪场猪衣原体病的诊断与防治. 福建畜牧兽医, 2002, 24(6): 46-47
- 胡起等. 中华微生物与免疫学杂志. 1982, (2): 180
- 胡新岗, 黄银云. 樱桃谷鸭衣原体病病例. 中国兽医杂志, 2004, 10(2): 50.
- 蒋成武, 肖克宇, 向秀成. 湖南省牛和猪衣原体病感染的血清学调查. 湖南农学院学报, 1989, 15(1): 97-101.
- 姜天童, 杨宜生, 孟庆友等. 中国兽医科技, 1985, 10: 23-25
- 姜志龙, 陈诗书. 关于腺病毒载体的免疫原性问题. 1998, 生命的化学, 18(1): 39-40.
- 李海念, 赵心力, 菊花等. 内蒙古地区猪衣原体病的血清学调查. 当代畜禽养殖业, 1999, 4: 20-21.
- 李志杰, 王庆粉, 方畴鑫等. 华池县山羊衣原体性流产的免疫预防试验. 中国兽医科技, 1990, 6: 24-26.
- 梁督军, 黄明睿, 林治涌. 陕西省羊衣原体血清学调查研究, 中国兽医科技, 1989, 5: 16.
- 刘棋, 李华明, 郭建刚等. 鸡衣原体的血清学调查. 养禽与禽病防治, 2001, 11: 13.
- 刘向伟, 端青, 罗朝霞等. 10 株鸚鵡热衣原体菌株主要外膜蛋白基因的比较性研究. 中国人兽共患

- 病杂志, 2002, 18(1): 16-18
- 刘向伟, 端青, 张浩杰等. 鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白基因序列的扩增、克隆和原核表达. 微生物学免疫学进展, 2002, 30(2): 32-34
- 刘雪丰, 张连峰, 王丽华等. 腺病毒载体有效性和安全性的改进. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 304—307。
- 陆承平. 兽医微生物学(第三版). 中国农业出版社, 2001, 478—480
- 罗公平, 胡天阳, 张云贵等. 牡丹江地区猪衣原体病的调查. 黑龙江畜牧兽医, 1998, 6: 23.
- 苗振川, 哈斯阿古拉, 赵亚芳等. 用聚合酶链反应检测羊流产衣原体的初步研究. 中国兽医杂志, 1999, 25(2): 3-4.
- 糜祖煌, 秦玲. 鹦鹉热衣原体套式 PCR 和 DNA 测序方法研究. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(3): 68-70
- 潘达鑫. 我国沙眼衣原体和鹦鹉热衣原体研究近况. 中国人兽共患病杂志, 1987, 3(2): 47—49。
- 邱昌庆. 动物衣原体及 COST 研究. 畜牧兽医科技信息, 2003, 8: 21-24
- 邱昌庆. 动物衣原体疫苗. 中国兽医科技, 1997, 12: 15-17
- 邱昌庆. 牛衣原体病及其防制. 中国动物保健, 2005, 3: 18-20.
- 邱昌庆. 衣原体分类研究进展. 中国兽医科技, 2000, 30(12): 19-21.
- 邱昌庆, 程淑敏, 周继章等. 规模化猪场猪衣原体病的检测. 中国兽医杂志, 2000, 26(3): 23-24.
- 邱昌庆, 高双娣, 周继章等. 中华人民共和国农业行业标准: 动物衣原体病诊断技术. 中国标准出版社, 2002.
- 邱昌庆, 周继章, 高双娣等. 湖北等六省(区)规模化猪场猪衣原体病的检测. 中国兽医科技, 1998, 28(10): 3-5
- 邱昌庆, 周继章, 谷玉辉. 猪源鹦鹉热衣原体外膜主要蛋白编码基因的克隆和序列测定. 中国兽医科技, 2002, 32(6): 10-14
- 王琼秋, 刘伯庶. 红河州鸡衣原体病的研究—病原分离鉴定和人工感染试验. 中国兽医科技, 1997, 27(3): 10-12
- 王琼秋, 刘伯庶, 李永斌等. 云南省红河州猪衣原体性流产的病原分离鉴定. 中国兽医科技, 2001, 31(1): 19-20.
- 吴礼洁, 刘祺, 郑列丰等. 广西山羊衣原体病血清学调查. 中国兽医科技, 2000, 30(9): 41.
- 石岩, 何诚, 朱虹等. 肉鸡鹦鹉热衣原体的分离和鉴定. 中国比较医学杂志. 2003, 13(4): 217-221.
- 帅永玉, 葛文楠, 黄美群等. 羊衣原体性流产的研究—免疫试验初报. 兽医科技杂志, 1982, 11: 10-13.
- 帅永玉, 黄美群, 葛文楠等. 羊衣原体性流产的研究—病原分离鉴定. 兽医科技杂志, 1981, 8: 1-5
- 肖金东, 孙克良, 王秀芹. 赛鸽衣原体病的诊断与控制. 当代畜牧, 2004, 2: 9-10.
- 谢琴, 高跃路, 何存利等. 动物衣原体病的单克隆抗体诊断研究. 黑龙江畜牧兽医, 2002, 3: 28-29.
- 索绪峰, 王大林, 张嗣华等. 海南省规模化猪场衣原体病血清流行病学调查. 养猪, 2005, 3: 31-32.
- 杨秀环, 李秀敏, 郑瑞峰等. 威胁京郊养羊业的传染性疾病羊衣原体病调查报告. 北京农业, 2003, 5: 25.
- 杨学礼, 张永欣, 许登艇等. 羊衣原体性流产的研究—流行病学调查. 兽医科技杂志, 1981, 7:

13-15.

杨宜生,方雨玲,甘桂娥等. 从六种野鸟体内分离出鹦鹉热衣原体. 湖北畜牧兽医, 1993, 1: 1-2.

杨宜生, 姜天童, 方雨玲. 衣原体和动物衣原体病. 湖北科学技术出版社, 1994.

杨宜生, 姜天童, 孟庆友等. 间接血凝试验检测衣原体抗体的研究. 畜牧兽医学报, 1984, 15(3): 181-187

杨宜生, 姜天童, 孟庆友等. 猪衣原体病的病原分离和鉴定. 中国兽医杂志, 1984, 9: 5-9

杨子平. 用 ABC-ELISA 检测羊流产衣原体抗体的研究. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6(2): 38-41

易奇珍, 陈泽祥, 郑列丰等. 广西猪衣原体病血清学调查. 中国兽医杂志, 1994, 20(6): 20

于维军, 马维礼, 朱其太等. 鸡衣原体病的调查研究—流行病学、临床症状及病理学研究. 中国兽医科技, 1994, 24(2): 13-15.

张宝发等. 内蒙古山羊流产病的调查和研究. 中国兽医杂志, 1994, 10(3): 6-7.

张浩杰, 端青. 鹦鹉热衣原体 B 细胞表位的表达及抗原鉴定. 微生物学免疫学进展, 2003, 31(1): 22-25

张济培, 卢玉葵, 陈建红. 鸽衣原体病的血清学调查. 中国兽医杂志, 2003, 39(6): 29

张炜. 沙眼衣原体感染与性传播疾病. 前卫医学情报, 1991, 7(2): 48-50

张晓志, 彭朝晖. 有关腺病毒安全性问题. 国外医学病毒学分册, 1999, 6(1): 24-27.

赵亚芳, 苗振川, 何秀贤. 应用核酸杂交技术检测禽衣原体病的研究, 中国兽医杂志, 1996, 22(10): 6-7

周继章, 邱昌庆, 程淑敏等. 我国部分地区肉用牛群衣原体病的血清学调查. 中国兽医科技, 2000, 30(7): 14-15.

周继章, 邱昌庆, 张小英等. 禽源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定. 中国兽医科学, 2006, 36(1): 13-17.

Allen J E, Cerrone M C, Beatty P R, *et al.* Cystein-rich outer membrane proteins of *Chlamydia trachomatis* display compensatory sequence changes between biovariants. Molecular Microbiology, 1990, 4: 1543-1550

Andersen A A. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. Journal of Clinical Microbiology, 1991, 29(4): 707-711

Andersen A A. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North America birds. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1997, 9(2): 159-164.

Andersen AA, Vanrompay D. Avian Chlamydiosis. OIE Revue Scientifique et Technique, 2000, 19(2): 396-404.

Anderson I E, Herring A J, Jones G E, *et al.* Development and evaluation of an indirect ELISA to detect antibodies to abortion strains of *Chlamydia psittaci* in sheep sera. Veterinary Microbiology, 1995, 43: 1-12

Anderson I E, Tan T W, Jones G E, *et al.* Efficacy against ovine enzootic abortion of an experimental vaccine containing purified elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. Veterinary Microbiology, 1990, 24(1): 21-27.

Arribillaga L, de Cerio A L, Sarobe P. *lynnet* and *dagriorglynnet*. Vaccination with an adenoviral vector

- encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 2002, 21(3-4): 202-210.
- Arzey G G, and Arzey K E. Chlamydiosis in layer chickens. *Australian Veterinary journal*, 1990, 67(12): 461
- Bannantine J P, Griffiths R S, Viratyosin W, *et al.* A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cellular Microbiology*, 1999, 2: 35-48
- Bannantine J P, Rockey D D, Hackstadt T. Tandem genes of *Chlamydia psittaci* that encode proteins localized to the inclusion membrane. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(5): 1017-1026
- Barbour A G, Amanok, Hackstadt T, *et al.* *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol*, 1982, 151: 420-428
- Belland R J, Scidmore M A, Grane D D, *et al.* *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98, 13984-13989
- Black C M, Tharpe J A, Russell H. Distinguishing *Chlamydia* species by restriction analysis of the major outer membrane protein gene. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6(5): 395-400.
- Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10: 440-447.
- Brade L, Holst O, Kosma P, *et al.* Characterization of murine monoclonal and murine, rabbit, and human polyclonal antibodies against chlamydial lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 1990, 58: 205-213
- Barr D A, Scott P C, O'Rourke M D, *et al.* Isolations of *Chlamydia psittaci* from commercial broiler chickens. *Australian Veterinary Journal*, 1986, 63(11): 377-378.
- Bracewell C D, Bevan B J. *Chlamydia* infection in ducks: Preliminary communication. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1982, 75(4): 249-252.
- Busch C, Hofmann F, Selzer J, *et al.* A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273, 19566-19572
- Caldwell H D, Kromhout J, Schachter J, *et al.* Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 1981, 31: 1161-1176
- Caldwell H D, Judd R C. Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins. *Infection and Immunity*, 1982, 38(3): 960-968.
- Caldwell H D, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*, 1981, 31(3): 1161-1176.
- Caldwell H D, Kuo C C, Kenny G E. Antigenic analysis of *Chlamydiae* by two-dimensional immunoelectrophoresis. I. Antigenic heterogeneity between *C. trachomatis* and *C. psittaci*. *Journal of Immunology*, 1975, 115(4): 963-968.
- Caldwell H D, Kuo C C, Kenny G E. Antigenic analysis of *Chlamydiae* by two-dimensional immunoelectrophoresis. II. A trachoma-LGV-specific antigen. *Journal of Immunology*, 1975,

- 115(4): 969-975.
- Caldwell H D, Schachter J. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. *Infection and Immunity*, 1982, 35(3): 1024-1031.
- CDC. Centers for Disease Control and prevention. Summary of notifiable disease. *MMWR*, 1998, 47(53).
- Cevenini R, Donati M, Brocchi E, *et al.* Partial characterization of an 89-kDa highly immunoreactive protein from *Chlamydia psittaci* A/22 causing ovine abortion. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 65, 111-115
- Chalmers W S, Simpson J, Lee S J, *et al.* Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *The Veterinary Record*, 1997, 141(3): 63-67.
- Danilition S L, Maclean I W, Peeling R, *et al.* The 75-kilodalton protein of *Chlamydia trachomatis* : a member of the heat shock protein 70 family?. *Infection and Immunity*, 1990, 58(1): 189-196
- Dong X, Hu J Y, Xie T H. Construction of a recombinant human adenovirus expressing the ORF2 antigen of HEV and immunization of mice by mucosal system. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2003, 25(3): 324-328.
- Durfee P T, Pullen M M, Currier R W II, *et al.* Human psittacosis associated with commercial processing of turkey. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1975, 167(9): 804-808.
- Elahi S M, Shen S H, Talbot B G. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology*, 1999, 261(1): 1-7.
- Everett K D E, Hatch T P. Sequence analysis and lipid modification of the cysteine-rich envelope proteins of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 3821-3830
- Faber H, Lind I, Christiansen AH, *et al.* Psittacosis. *EPI-Newsletter*, 1995-1998. 6: 1-2.
- Farmer H, Chalmers W S and Woolcock P R. *Chlamydia psittaci* isolated from the eyes of domestic ducks (*Anas platyrhynchos*) with conjunctivitis and rhinitis. *Veterinary Record*, 1982, 110(3): 59
- Fischer L, Tronel J P, Pardo-David, *et al.* Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine*, 2002, 20(29-30): 3485-3497.
- Fooks A R, Jeevarajah D, Lee J, *et al.* Oral or parenteral administration of replication-deficient adenoviruses expressing the measles virus haemagglutinin and fusion proteins: protective immune responses in rodents. *The Journal of General Virology*, 1998, 79 (Pt 5): 1027-1031.
- Fukushi H, Hirai K. Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian *Chlamydia psittaci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(4): 675-680.
- Gagnon C A, Lachapelle G, Langelier Y. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Archives of Virology*, 2003, 148(5): 951-972.
- Gajdosova E, Kovacova E, Kazar J, *et al.* The immunogenicity of a vaccine against enzootic abortion in

- sheep. *Veterinary Medicine*, 1994, 39(10): 589-596.
- Gao W, Soloff A C, Lu X. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *Journal of Virology*, 2006, 80(4): 1959-1964.
- Gogev S, Vanderheijden N, Lemaire M. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine*, 2002, 20(9-10): 1451-1465.
- Grayston J T. Infections caused by chlamydia pneumoniae strain TWAR. *Clinical Infectious Diseases*, 1992, 15(5):757-761
- Grimes J E, Tully T N, Arizmendi Jr F, *et al.* Elementary body agglutination for rapidly demonstrating chlamydial agglutinins in avian serum with emphasis on testing cockatiels. *Avian Diseases*, 1994, 38(4): 822-831.
- Grimwood J, Stephens R S. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microbial and Comparative Genomics*, 1999, 4: 187 – 201
- Hackstadt T, Scidmore-carlson M A, shaw E I, *et al.* The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion. *Cellular Microbiology*, 1999, 1: 119-130
- Hackstadt T, Todd W J, Caldwell H D. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of chlamydiae?. *Journal of Bacteriology*, 1985, 161(1): 25-31
- Hafez H M, and Sting R. über das Vorkommen von Chlamydien-Infektionen beim Mastgeflügel. *Tierärztliche Umschau*, 1997, 52: 281-285
- Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, *et al.* protection of pigs against ‘in contact’ challenge with classical swine fever following oral or subcutaneous vaccination with a recombinant porcine adenovirus. *Virus Research*, 2003, 97: 151-157.
- Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S, *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55(E2) gene protect pigs against classical swine fever. *Vaccine*, 2000, 18:1040-1050.
- Harris J W. Zoonotic human chlamydiosis of avian origin: a review with particular reference to epidemiology and control. *World’s Poultry Science Journal*, 1983, 39: 5-23.
- Hatch T. *Chlamydia*: old ideas crushed, new mysteries bared, *Science*, 1998,282, 638-639
- Hatch T P, Allan I, Pearce J H. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157(1): 13-20.
- Hatch T P, Miceli M, Silverman J A. Synthesis of protein in host-free reticulate bodies of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 162(3): 938-942.
- Hatch T P, Miceli M, Sublett J E. Synthesis of disulfide-bonded outer membrane proteins during the developmental cycle of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 1986, 165(2): 379-385.

- Hedberg K, White K E, Forfang J C, *et al.* An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control. *American Journal of Epidemiology*, 1989, 130(3): 569-577.
- Herring A J. Vaccination against chlamydial abortion in sheep: problem and progress with a recombinant vaccine. *Societa Editrice Esculapio*, 1994, 118-121.
- Herring A J, Tan T W, Baxter S, *et al.* Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 53(1-2): 153-158.
- Hinton D G, Shipley A, Galvin J W, *et al.* Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Australian Veterinary Journal*, 1993, 70(5): 174-176.
- Hourihan J T, Rota T R, MacDonald AB. Isolation and purification of a type-specific antigen from *Chlamydia trachomatis* propagated in cell culture utilizing molecular shift chromatography. *Journal of Immunology*, 1980, 124(5): 2399-2404.
- Hsia R C, Pannekoek Y, Ingerowski E, *et al.* Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Molecular Microbiology*, 1997, 25(2):351-359.
- Hsia R C, Bavoi P M. Sequence analysis of omp2 region of *Chlamydia psittaci* strain GPIC: structural and functional implications, *Gene*, 1996, 176: 155-162.
- ImLer JL. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccine. *Vaccine*, 1995, 13: 1143-1151.
- Isaacs D. Psittacosis. *British Medical Journal*, 1984, 289: 510-511.
- Jacobs S C, Stephenson J R, Wilkinson G W. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model. *Journal of Virology*, 1992, 66(4): 2086-2095.
- Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S. *et al.* Replication-defective adenoviral vaccine vector for the induction of immune responses to dengue virus type 2. *Journal of Virology*, 2003, 77(23): 12907-12913.
- Jones G E, Jones K A, Machell J, *et al.* Efficacy trials with tissue-culture grown, inactivated vaccines against *Chlamydia* abortion in sheep. *Vaccine*, 1995, 13(8): 715-723.
- Kalman S, Mitchell W, Marathe R, *et al.* Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*. 1999, 21: 385-389.
- Kerr K, Entrican G, McKeever D, *et al.* Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Research in Veterinary Science* 2005, 78(1): 1-7.
- Ketner G, Spencer F, Tugendreich S, *et al.* Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 6186-6190.
- Kikuta, A., Furukawa, N., Yoshida, T, *et al.* Antigenic analysis of avian *Chlamydia psittaci* using monoclonal antibodies to the major outer membrane protein. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1991, 53(3): 385-389.
- Longbottom D, Russell M, Dunbar S M, *et al.* Molecular cloning and characterization of the genes

- coding for the highly immunogenic cluster of 90-kilodalton envelope proteins from the *Chlamydia psittaci* subtype that causes abortion in sheep. *Infection and Immunity*, 1998, 66(4):1317-1324
- Lutze-Wallace C, Sapp T, Sidhu M, *et al.* In vitro assessments of the genetic stability of a live recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1995, 59(2): 157-160.
- Ma J J, Chen K C, Kuo C C. Identification of conserved regions for species and subspecies specific epitopes on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Microbial Pathogenesis*, 1987, 3(4): 299-307.
- Maffei C, Marracino A, Stanislao F Di, *et al.* Psittacosis in a highly endemic area in Italy. *Epidemiology and Infection*, 1987, 99: 413-419.
- Malkinson M, Machany S, Aronovici A, *et al.* Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. *Veterinary Record*, 1987, 120(19): 461-462.
- Martinov S, Popov G. Use of a concentrated and purified vaccine against Chlamydial abortion in sheep. *Veterinarno-Meditsinski Nauki*, 1985, 22(5): 25-31.
- Matsushashi M, Wachi M, Ishino F, *et al.* Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Research in Microbiology*, 1990, 141: 89-103.
- Matsumoto A. Electron microscopic observations of surface projection and related intracellular structures of *Chlamydia* organism. *Journal of Electron Microscopy*, 1981, 30: 315-320.
- McDermott, M. R., Graham, F. L., Hanke, T, *et al.* Protection of mice against lethal challenge with herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing HSV glycoprotein B. *Virology*, 1989, 169(1): 244-247.
- Meyer K F. Phagocytosis and immunity in psittacosis. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 1941, 71: 436-438
- Mondesire R R, Maclean I W, Shewen P E, *et al.* Identification of genus-specific epitopes on the outer membrane complexes of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* immunotypes 1 and 2. *Infection and Immunity*, 1989, 57(9): 2914-2918.
- Mygind P, Christiansen G, Persson K, *et al.* Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5(3):313-318
- Newhall W J, Jones R B. Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of chlamydiae. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(2): 998-1001.
- Newman C P St J, Palmer S R, Kirby F D, *et al.* A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. *Epidemiology and Infection*, 1992, 108: 203-210.
- Newmann J A. *Chlamydia* spp. Infection in turkey flocks in Minnesota. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1989, 195(11): 1528-1530.
- Nichols R L, Murray E S, Nisson P E. Use of enteric vaccines in protection against chlamydial infections of the genital tract and the eye of guinea pigs. *The Journal of Infectious Diseases*, 1978,

- 138(6): 742-746.
- Ochial Y, Fukushi H, Yom C, *et al.* Comparative analysis of the putative amino acid sequences of chlamydial heat shock protein 60 and *Escherichia coli* GroEL. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, 2000, 62(9):941-945.
- Pinto A R, Fitzgerald J C, Giles-Davis W, *et al.* Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *Journal of Immunology*, 2003, 171(12): 6774-6779.
- Ragot T, Finerty S, Watkins P E, *et al.* Replication-defective recombinant adenovirus expressing the Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp340/220 induces protective immunity against EBV-induced lymphomas in the cottontop tamarin. *The Journal of General Virology*, 1993, 74 (Pt 3): 501-507.
- Rank R G, Batteiger B E, Soderberg L S. Immunization against chlamydia genital infection in guinea pigs with UV-inactivated and viable *Chlamydia* administered by different routes. *Infection and Immunity*, 1990, 58(8): 2599-2605.
- Raulston J E. Chlamydial envelope component and pathogen-bear cell interactions. *Molecular Microbiology*, 1995, 15: 607-616.
- Read T D, Brumham R C, Shen C, *et al.* Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 1397-1406.
- Read T D, Myers G S, Brumham R C, *et al.* Genome sequence of *Chlamydomphila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the Chlamydiaceae. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(8): 2134-2147.
- Reddy P S, Idamakanti N, Hyun B H, *et al.* Development of porcine adenovirus-3 as an expressing vector. *The Journal of General Virology*, 1999, 80: 563-570.
- Richard J F, Petit L, Gibert T, *et al.* Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. *International Microbiology*, 1999, 2, 185-194.
- Rockey D D, Lenart J, Stephens R S, *et al.* Genome sequencing and our understanding of Chlamydiae. *Infection and Immunity*, 2000, 68(10):5473-5479.
- Rockey D D, Rosquist J L. Protein antigens of *Chlamydia psittaci* present in infected cells but not detected in the infectious elementary body. *Infection and Immunity*, 1994, 62: 106-112.
- Rodolakis A, Souriau A. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci*(var ovis) obtained by NTG mutagenesis. *Annals of Veterinary Research*, 1983, 14(2): 155-61.
- Rodolakis A, Souriau A. Response of goats to vaccination with temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* obtained by nitrosoguanidine mutagenesis. *American Journal of Veterinary Research*, 1986, 47(12): 2627-2631.
- Rodolakis A, Souriau A. Vaccination against bovine chlamydial abortion with a temperature-sensitive mutant of *Chlamydia psittaci*. *Annals of Veterinary Research*, 1987, 18(4): 439-41.
- Rothel J S, Boyle D B, Both G W, *et al.* Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep.

- Parasite Immunology, 1997, 19(5): 221-227.
- Sacks D L, MacDonald A B. Isolation of a type-specific antigen from *Chlamydia trachomatis* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Immunology*, 1979, 122(1): 136-139.
- Sayada C H, Andersen A A, Storey C H, *et al.* Usefulness of *ompI* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. *Research in Microbiology*, 1995, 146(2): 155-165.
- Sadowski J M, Minta Z. Chlamydiosis of the air sacs in geese. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 1979, 23(3-4): 111-115.
- Sandbulte J, TerWee J, Wigington K, *et al.* Evaluation of *Chlamydia psittaci* subfraction and subunit preparations for their protective capacities. *Veterinary Microbiology*, 1996, 48(3-4):269-282.
- Shao F, Merritt P M, Bao Z, *et al.* A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis, *Cell*, 2002, 109, 575-588
- Sheppard, M., Werner, W., Tsatas, E, *et al.* Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Archives of Virology*, 1998, 143(5): 915-930.
- Stephens R S, Kalman S, Lammel C, *et al.* Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 1998, 282: 754-759
- Taday EMA. Organveränderungen und Erregernachweise nach infektionen mit *Chlamydia* spp. Beim Vogel unter besonderer Berücksichtigung des aviaren Wirtsspektrums. *Veterinary Dissertation*, 1998, 184.
- Tan T W, Herring A J, Anderson I E, *et al.* Protection of sheep against *Chlamydia psittaci* infection with a subcellular vaccine containing the major outer membrane protein. *Infection and Immunity*, 1990, 58(9): 3101-3108.
- Tang M, Harp J A, Wesley R D. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/1/68 (H3N2). *Archivers of Virology*, 2002, 147(11): 2125-2141.
- Tanzer R J, Longbottom D, Hatch T P, *et al.* Identification of polymorphic outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Infection and Immunity*, 2001, 69(4): 2428-2434.
- Van Loock M, Lambin S, Volckaert G, *et al.* Influence of maternal antibodies on *Chlamydia psittaci*-specific immune responses in turkeys elicited by naked DNA. *Vaccine*, 2004, 16: 22(13-14): 1616-1623.
- Vanrompay D, Butaye P, Sayada C, *et al.* Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *ompI* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Research in Microbiology*, 1997a, 148(4): 327-333.
- Vanrompay D, Butaye P, Van Nerom A, *et al.* The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poult. *Veterinary Microbiology*, 1997b, 54(1): 85-93.
- Vanrompay D, Cox E, Vandenbussche F *et al.* Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine*, 1999, Jun 4; 17(20-21): 2628-2635.

- Vanrompay D, Cox J, Mast, *et al.* High-level expression of *Chlamydia psittaci* major outer membrane protein in COS cells and in skeletal muscles of turkeys. *Infection and Immunity*, 1998, 66: 5494-5500.
- Vanrompay D, Cox E, Kaiser P, *et al.* Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by parenteral and mucosal inoculations and the effect of turkey interferon-gamma on genetic immunization. *Immunology*, 2001, 103(1): 106-112.
- Vanrompay D, Cox E, Vandenbussche F, *et al.* Protection of Turkey against *Chlamydia psittaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine*, 1999, 17(20-21): 2628-2635.
- Vanrompay D, Cox E, Volckaert G, *et al.* Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clinical and Experimental Immunology*, 1999, 118(1): 49-55.
- Vanrompay D, Ducatelle R, and Haesebrouck. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, 1995, 45(2-3): 93-119.
- Verminden K, Looock M V, Cox E, *et al.* Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by DNA and rMOMP vaccination and evaluation of the immunomodulating effect of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3). *Vaccine*, 2005, 23(36): 4509-4516.
- Westbay T D, Dascher C C, Hsia R C, *et al.* Dissociation of immune determinants of outer membrane proteins of *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Infection and Immunity*, 1994, 62(12): 5614-5623.
- WHO. World Health Statistics Annual, Volume II, 1973-1976, Case, deaths and vaccinations. 1976. WHO, Geneva.
- WHO. World Health Statistics Annual. 1977, Volume II, Infectious Disease: Cases and deaths. WHO, Geneva.
- Wills J M, Gruffydd-Jones T J, Richond S J, *et al.* Effect of vaccination on feline *Chlamydia psittaci* infection. *Infection and Immunity*, 1987, 55(11): 2653-2657.
- Wilsmore A J, Wolsmore B C, Dagnall G J, *et al.* Clinical and immunological responses of ewes following vaccination with an experimental formalin-inactivated *Chlamydia psittaci* (ovis) vaccine and subsequent challenge with the live organism during pregnancy. *The British Veterinary Journal*, 1990, 146(4): 341-8.
- Wu Q, Moraes M P, Grubman M J. Recombinant adenovirus co-expressing capsid proteins of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): in vitro characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. *Virus Research*, 2003, 93(2): 211-219.
- Wyllie S, Ashley R H, Longbottom D, *et al.* The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* function as a porin-like ion channel, *Infection and Immunity*, 1998, 66: 5202-5207
- Wyrick P B, Brownridge E A. Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages, *Infection and Immunity*, 1978, 19: 1054-1060
- Yarosh O K, Wandeler A I, Graham F L, *et al.* Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine*, 1996, 14(13): 1257-1264.

- Yuan Y, Zhang Y X, Manning D S, *et al.* Multiple tandem promoters of the major outer membrane protein gene (omp1) of *Chlamydia psittaci*. *Infection and Immunity*, 1990, 58(9): 2850-2855.
- Zhang Y X, Morrison S G, Caldwell H D, *et al.* Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia psittaci* strains. *Infection and Immunity*, 1989, 57(5): 1621-1625.
- Zhao Q, Schachter J, Stephens R S. Lack of allelic polymorphism for the major outer membrane protein gene of the agent of guinea pig inclusion conjunctivitis (*Chlamydia psittaci*). *Infection and Immunity*, 1993, 61(7): 3078-3080.

附录

1 禽源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因序列比较

cp3.se	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCGGCTCTCTCCTTA	60
CpL.se	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCGGCTCTCTCCTTA	60
CT1.seCTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCGGCTCTCTCCTTA	51
GD.seq	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCGGCTCTCTCCTTA	60
VS225.CTCTTGAAATCGGCATTATTGTTTGCCGCTACGGGTTCGGCTCTCTCCTTA	51
cp3.se	CAAGCCTTGCCGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGG	120
CpL.se	CAAGCCTTGCCGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGG	120
CT1.se	CAAGCCTTGCCGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGG	111
GD.seq	CAAGCCTTGCCGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGG	120
VS225.	CAAGCCTTGCCGTAGGGAACCCAGCTGAACCAAGTTTATTAATCGATGGCACTATGTGG	111
cp3.se	GAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCTCTACTTGGTGTGATGCTATCAGCATC	180
CpL.se	GAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCTCTACTTGGTGTGATGCTATCAGCATC	180
CT1.se	GAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCTCTACTTGGTGTGATGCTATCAGCATC	171
GD.seq	GAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCTCTACTTGGTGTGATGCTATCAGCATC	180
VS225.	GAAGGTGCTTCAGGAGATCCTTGCGATCCTTGCTCTACTTGGTGTGATGCTATCAGCATC	171
cp3.se	CGCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGTATTAAAAAGTTGATGTGAATAAA	240
CpL.se	CGCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGTATTAAAAAGTTGATGTGAATAAA	240
CT1.se	CGCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGTATTAAAAAGTTGATGTGAATAAA	231
GD.seq	CGCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGTATTAAAAAGTTGATGTGAATAAA	240
VS225.	CGCGCAGGATACTACGGAGATTATGTTTTTCGATCGTGTATTAAAAAGTTGATGTGAATAAA	231
cp3.se	ACTTTTACGGGCATGGCTGCACTCCTACGAGGTCACAGGTAAACGCAAGTAACTAAAT	300
CpL.se	ACTTTTACGGGCATGGGTGCACTCCTACAGGTAACGAGGTCACAGGTAAACGCAAGTAACTAAAT	293
CT1.se	ACTTTTACGGGCATGGCTGCACTCCTACAGGTAACGAGGTCACAGGTAAACGCAAGTAACTAAAT	284
GD.seq	ACTTTTACGGGCATGGCTGCACTCCTACAGGTAACGAGGTCACAGGTAAACGCAAGTAACTAAAT	293
VS225.	ACTTTTACGGGCATGGGTGCACTCCTACAGGTAACGAGGTCACAGGTAAACGCAAGTAACTAAAT	284
cp3.se	CAGCCAGGAGCAATGGGAGACCGAACATCGCTTACGGCAGGCAATGCAAGATGCAAGAG	360
CpL.seAACTCCTACGGATAGACCCAAACATCGCTTACGGCAGGCAATGCAAGATGCAAGAG	348
CT1.seAAATGCTCAAGATAGACCCAAACGTCGCTTATGGCAGACATTGCAAGACATCCGAA	339
GD.seqAAATGCTCAAGATAGACCCAAACGTCGCTTATGGCAGACATTGCAAGACATCCGAA	348
VS225.AACTCCTACGGATAGACCCAAACATCGCTTATGGCAGGCAATGCAAGATGCAAGAG	339
cp3.se	TGGTTTACAAATGCAGCTTTCTAGCTTAAATGATTTGGGATCGCTTGGATATTTTCTGC	420
CpL.se	TGGTTTACAAATGCAGCTTTCTAGCTTAAATGATTTGGGATCGCTTGGATATTTTCTGC	408
CT1.se	TGGTTTACAAATGCAGCTTTCTAGCTTAAATGATTTGGGATCGCTTGGATATTTTCTGC	399
GD.seq	TGGTTTACAAATGCAGCTTTCTAGCTTAAATGATTTGGGATCGCTTGGATATTTTCTGC	408
VS225.	TGGTTTACAAATGCAGCTTTCTAGCTTAAATGATTTGGGATCGCTTGGATATTTTCTGC	399
cp3.se	ACATTAGGCGCTTCTAATGGGTACTTCAAAGCTAGTTCTGCGGCATTCAACTCTCGTTGGT	480
CpL.se	ACATTAGGCGCTTCTAATGGGTACTTCAAAGCTAGTTCTGCGGCATTCAACTCTCGTTGGT	468
CT1.se	ACATTAGGCGCTTCTAATGGGTACTTCAAAGCTAGTTCTGCGGCATTCAACTCTCGTTGGT	459
GD.seq	ACATTAGGCGCTTCTAATGGGTACTTCAAAGCTAGTTCTGCGGCATTCAACTCTCGTTGGT	468
VS225.	ACATTAGGCGCTTCTAATGGGTACTTCAAAGCTAGTTCTGCGGCATTCAACTCTCGTTGGT	459
cp3.se	TTTATAGGGTTTTCAGCTACCACTCAACCTCTACCGATCTTCAATGCAACTTCCCTAAC	540
CpL.se	TTGATTGG.....TGTTAAAGGAACCTCCAT.....ACCACTGATCAACTTCCCAAT	516
CT1.se	TTGATTGG.....TGTTAAAGGAACCTCCAT.....ACCAANTGACCAACTTCCCAAC	507
GD.seq	TTGATTGG.....TGTTAAAGGAACCTCCAT.....ACCAANTGACCAACTTCCCAAC	516
VS225.	TTGATTGG.....TGTTAAAGGAACCTCCAT.....ACCACTGATCAACTTCCCAAC	507
cp3.se	GTAGGCATCACTCAAGGTTGTTGTTGAGTTTACACAGATACAACTTCTCTTGGAGCGTA	600
CpL.se	GTAGGCATCACTCAAGGTTGTTGTTGAGTTTACACAGATACAACTTCTCTTGGAGCGTA	576
CT1.se	GTAGGCATCACTCAAGGTTGTTGTTGAGTTTACACAGATACAACTTCTCTTGGAGCGTA	567
GD.seq	GTAGGCATCACTCAAGGTTGTTGTTGAGTTTACACAGATACAACTTCTCTTGGAGCGTA	576
VS225.	GTAGGCATCACTCAAGGTTGTTGTTGAGTTTACACAGATACAACTTCTCTTGGAGCGTA	567
cp3.se	GGTGCACGTGGAGCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCAACTTTAGGAGCTGATTTCCAAATAC	660

CpL.se	GGTGCACGCGGAGCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCGACTTTAGGAGCGAGTTCCAATAC	636
CT1.se	GGTGCACGTTGGAGCTCTATGGGAATGTGGTTGCGCAACTTTAGGAGCTGAATTCCAATAC	627
GD.seq	GGTGCACGTTGGAGCTCTATGGGAATGTGGTTGCGCAACTTTAGGAGCTGAATTCCAATAC	636
VS225.	GGTGCACGTGGTCTTTATGGGAATGTGGTTGTGCAACTTTAGGAGCTGAATTCCAGTAT	627
cp3.se	GCTCAATCTAATCCTAAAGATTGAAATACTCAACGTCACTTCAGCCCCAGCACAATTTGTG	720
CpL.se	GCTCAATCTAATCCTAAAGATTGAAATGTGGAATGTATCTCCAGCCCCAGCACAATTTGTG	696
CT1.se	GCTCAATCTAATCCTAAAGATTGAAATGTGGAATGTATCTCCAGCCCCAGCACAATTTGTG	687
GD.seq	GCTCAATCTAATCCTAAAGATTGAAATGTGGAATGTATCTCCAGCCCCAGCACAATTTGTG	696
VS225.	GCTCAATCTAATCCTAAAGATTGAAATGTGGAATGTATCTCCAGCCCCAGCACAATTTGTG	687
cp3.se	ATTACAAACCAAGAGGCTATTAAGGAAGTAGCTCGAATTTTCCTTTACCTATAACGGCT	780
CpL.se	GTTACAAGCCTAGAGGATACAAGGGAACAGCCTTTCCTTTACCTCTAACAGCT	750
CT1.se	GTTACAAGCCTAGAGGATACAAGGGAACGTCGGCAACTTTTCCTTTACCTGCATATGCA	747
GD.seq	GTTACAAGCCTAGAGGATACAAGGGAACGTCGGCAACTTTTCCTTTACCTGCATATGCA	756
VS225.	GTTACAAGCCTAGAGGATACAAGGGAACAGGATCGAAGCTTTTCCTTTACCTCTAACAGCT	747
cp3.se	GCAACAAACCAAGCTACAGCAACCAATCAAGCTACAAATTAATAACCATGAATGGCAAGTA	840
CpL.se	GCTACTGATTCAGGCACTGACTAAGTCGGCTACAAATTAATAACCATGAATGGCAAGTT	810
CT1.se	GCCACAGAGGCTGCTACGGATACTAAATCTGCAACACTCAAAATATCATGAATGGCAAGTT	807
GD.seq	GCCACAGAGGCTGCTACGGATACTAAATCTGCAACACTCAAAATATCATGAATGGCAAGTT	816
VS225.	GCTACAGATGCTGCTACAGATACTAAATCTGCAACACTCAAAATATCATGAATGGCAAGTT	807
cp3.se	GGCTCGGCTCTCTTACAGATTGAATATGCTTGTTCCTATTATTGGCGTAAACTGGTCA	900
CpL.se	GGTTAGCGCTCTCTTATCGATTGAACATGCTTGTTCCTTACATTGGCGTAAACTGGTCA	870
CT1.se	GGTCTAGCCTCTCTTACAGATTGAACATGTTGTTTCCTTACATTGGCGTAAACTGGTCA	867
GD.seq	GGTCTAGCCTCTCTTACAGATTGAACATGTTGTTTCCTTACATTGGCGTAAACTGGTCA	876
VS225.	GGTTAGCGCTCTCTTACAGATTGAACATGCTTGTTCCTTACATTGGCGTAAACTGGTCA	867
cp3.se	AGAGCAACTTTTGATGCTGATCTATCCGCATGCTCAACCTAAATTAAATCGGAGATT	960
CpL.se	CGAGCAACTTTTGATGCTGACCTATCCGCATCGCTCAACCTAAATTAGCTGCTGTTG	930
CT1.se	CGAGCAACTTTTGATGCGGACACTATCCGCATCGCTCAACCTAAATTGGCCTCTGCTGTT	927
GD.seq	CGAGCAACTTTTGATGCGGACACTATCCGCATCGCTCAACCTAAATTGGCCTCTGCTGTT	936
VS225.	AGAGCAACTTTTGATGCTGACTCTATCCGCATCGCTCAACCTAAATTAGCGCTGCTGTT	927
cp3.se	CTTAACATTAATACATGGAACCCAAAGCCTTTAGGATCAACCACTGCTTTGCCAATAT	1020
CpL.se	TTAAACTTGACCACATGGAACCCAAACCTTTTAGGAGAAAGCTTACAGCTTTA...GATACT	987
CT1.se	ATGAACCTTGACCACATGGAACCCAAACCTTTTAGGGGAAGCCACATGCTTT...GATACT	984
GD.seq	ATGAACCTTGACCACATGGAACCCAAACCTTTTAGGGGAAGCCACATGCTTT...GATACT	993
VS225.	TTGAACCTTGACCACATGGAACCCAACTCTTTTAGGGGAAGCTTACAGCTTTA...GATGCT	984
cp3.se	AGTGGTAAAGGATGTTCTATCTGATGCTCTTCCAAATGCTTCGATTTCAGATCAACAAAATG	1080
CpL.se	AGCAACCAAA...TTGCT...GACTTCTTCCAAATGCTTCGATTTCAGATCAACAAAATG	1041
CT1.se	TCCAATAAA...TTGCT...GACTTCTTACAAATCGCTTCGATTTCAGATCAACAAAATG	1038
GD.seq	TCCAATAAA...TTGCT...GACTTCTTACAAATCGCTTCGATTTCAGATCAACAAAATG	1047
VS225.	AGCAACCAAA...TTGCT...GACTTCTTACAAATCGCTTCGATTTCAGATCAACAAAATG	1038
cp3.se	AAATCTAGAAAATCTTGTGGTGTAGCTGTTGGTGCAACGTTAATCGACGCTGACAAAATGG	1140
CpL.se	AAGTCTAGAAAAGCTTGTGGTGTAGCTGTTGGTGCAACGTTAATCGACGCTGACAAAATGG	1101
CT1.se	AAGTCTAGAAAAGCTTGGGTTTAGCTTTTGGTGCAACGTTAATCGAGCGGACAAAATGG	1098
GD.seq	AAGTCTAGAAAAGCTTGGGTTTAGCTTTTGGTGCAACGTTAATCGAGCGGACAAAATGG	1107
VS225.	AAATCTAGAAAAGCTTGTGGTGTAGCTGTTGGTGCAACGTTAATCGACGCTGACAAAATGG	1098
cp3.se	TCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAAGAGCTGCTCACATGAATGCTCAATTG	1200
CpL.se	TCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAAGAGCGCTCACATGAATGCTCAATTG	1161
CT1.se	TCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAAGAGCTGCTCACATGAATGCTCAATTG	1158
GD.seq	TCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAAGAGCTGCTCACATGAATGCTCAATTG	1167
VS225.	TCAATCACTGGTGAAGCACGCTTAATCAATGAAAAGAGCTGCTCACATGAATGCTCAATTG	1158
cp3.se	AGATTCTAAGGATTTAGTTTATACTATCCTAACTTTTTGTCCGCTATCAGAACTGGGA	1260
CpL.se	AGATTCTAA.....	1170

CT1.se	AGATTCTAAGGATTTAGTTTATACTATCCTAACTTTTTGTCCCGCTATCAGAACC	CA	GGG	1218									
GD.seq	AGATTCTAAGGATTTAGTTTATACTATCCTAACTTTTTGTCCCGCTATCAGAACC	CA	GGG	1227									
VS225.	AGATTCTAAGGATTTAGTTTATACTATCCTAACTTTTTGTCCCGCTATCAGAACC	CA	GGG	1218									
cp3.se	GTCTCTGGGTTCTGATTTTTTTTGCT	AC	CA	CCCTTTT	CA	GAGTTT	CA	AA	TCTCTTTT	CT	1319		
CpL.se	GTCTCTGGGTTCTGATTTTTTTTGCT	AC	CA	CCCTTTT	CA	GAGTTT	CA	AA	TCTCTTTT	CT	1170		
CT1.se	GTCTCTGGGTTCTGATTTTTTTTGCT	CA	CA	TCCCTTTT	GT	AT	AG	CTT	AA	TAC	CTCTTTT	TT	1278
GD.seq	GTCTCTGGGTTCTGATTTTTTTTGCT	CA	CA	TCCCTTTT	GT	AT	AG	CTT	AA	TAC	CTCTTTT	TT	1287
VS225.	GTCTCTGGGTTCTGATTTTTTTTGCT	CA	CA	CCCTTTT	GT	AT	AG	CTT	CA	AA	TCTCTTTT	CT	1278
cp3.se	AAAAATCC	TTTCGCA	TA	AGAATTC	ACTGATTATCTAAAAATTTTCTAGAAAGCT	TA	GAAACCTA	1379					
CpL.se	AAAAATCC	TTTCGCA	TA	AGAATTC	ACTGATTATCTAAAAATTTTCTAGAAAGCT	TA	GAAACCTA	1170					
CT1.se	AAAAATCC	TTTCGCA	TA	AGAATTC	ACTGATTATCTAAAAATTTTCTAGAAAGCT	TA	GAAACCTA	1338					
GD.seq	AAAAATCC	TTTCGCA	TA	AGAATTC	ACTGATTATCTAAAAATTTTCTAGAAAGCT	TA	GAAACCTA	1347					
VS225.	AAAAATCC	TTTCGCA	TA	AGAATTC	ACTGATTATCTAAAAATTTTCTAGAAAGCT	TA	GAAACCTA	1338					
cp3.se	GAGATTACAA	CTTGCGTAAAAAGCATTATTAA	TA	TC	TCTCTATTCTTAGCACGCGC	1438							
CpL.se	GAGATTACAA	CTTGCGTAAAAAGCATTATTAA	TA	TC	TCTCTATTCTTAGCACGCGC	1170							
CT1.se	GAGATTACAA	CTTGCGTAAAAAGCATTATTAA	TA	TC	TCTCTATTCTTAGCACGCGC	1398							
GD.seq	GAGATTACAA	CTTGCGTAAAAAGCATTATTAA	TA	TC	TCTCTATTCTTAGCACGCGC	1407							
VS225.	GAGATTACAA	CTTGCGTAAAAAGCATTATTAA	TA	TC	TCTCTATTCTTAGCACGCGC	1398							
cp3.se	CCGTAG	T	1445										
CpL.se	CCGTAG	T	1170										
CT1.se	CCGTAGCTCAATGG	1412											
GD.seq	CCGTAGCTCAATGG	T	1421										
VS225.	CCGTAGCTCAATGG	TAGAGCTGTAGCC	1425										

2 核酸蛋白换算数据及所用部分试剂配制

1. 常用核酸蛋白换算数据

(1) 重量换算

$$1\mu\text{g}=10^{-6}\text{g} \quad 1\text{pg}=10^{-12}\text{g}$$

$$1\text{ng}=10^{-9}\text{g} \quad 1\text{fg}=10^{-15}\text{g}$$

(2) 分光光度换算:

$$1A_{260}\text{双链DNA}=50\mu\text{g/mL}$$

$$1A_{260}\text{单链DNA}=30\mu\text{g/mL}$$

$$1A_{260}\text{单链RNA}=40\mu\text{g/mL}$$

(3) DNA 摩尔换算:

$$1\mu\text{g } 100\text{bp DNA}=1.52\text{pmol}=3.03\text{pmol 末端}$$

$$1\mu\text{g pBR322 DNA}=0.36\text{pmol}$$

$$1\text{pmol } 1000\text{bp DNA}=0.66\mu\text{g}$$

$$1\text{pmol pBR322}=2.8\mu\text{g}$$

$$1\text{kb双链DNA (钠盐)}=6.6\times 10^5\text{道尔顿}$$

$$1\text{kb单链DNA (钠盐)}=3.3\times 10^5\text{道尔顿}$$

$$1\text{kb单链RNA (钠盐)}=3.4\times 10^5\text{道尔顿}$$

(4) 蛋白摩尔换算:

$$100\text{pmol 分子量 } 100,000 \text{ 蛋白质}=10\mu\text{g}$$

$$100\text{pmol 分子量 } 50,000 \text{ 蛋白质}=5\mu\text{g}$$

$$100\text{pmol 分子量 } 10,000 \text{ 蛋白质}=1\mu\text{g}$$

$$\text{氨基酸的平均分子量}=126.7 \text{ 道尔顿}$$

(5) 蛋白质/DNA 换算:

1kb DNA=333 个氨基酸编码容量= 3.7×10^4 MW蛋白质

10, 000MW 蛋白质=270bp DNA

30, 000MW 蛋白质=810bp DNA

50, 000MW 蛋白质=1.35kb

100, 000MW 蛋白质=2.7kb DNA

2. 溶菌酶

【配制方法】

用水配制成 50mg/mL 的溶菌酶溶液，分装成小份并保存于-20℃。每一小份一经使用后便予丢弃。

3. 无 DNA 酶的 RNA 酶

将胰 RNA 酶（RNA 酶 A）溶于 10mmol/L Tris·HCl(pH7.5)、15mmol/L NaCl 中，配成 10mg/mL 的浓度，于 100℃加热 15min，缓慢冷却至室温，分装成小份保存于-20℃。

4. 30%丙烯酰胺溶液

【配制方法】

将 29g 丙烯酰胺和 1g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60mL 的水中。加热至 37℃溶解之，补加水至终体积为 100mL。用 Nalgene 滤器（0.45μm 孔径）过滤除菌，查证该溶液的 pH 值应不大于 7.0，置棕色瓶中保存于室温。

【注意】

丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可以通过皮肤吸收，其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒，但也应谨慎操作，因为它还可能会含有少量未聚合材料。

一些价格较低的丙烯酰胺和双丙烯酰胺通常含有一些金属离子，在丙烯酰胺贮存液中加入大约 0.2 体积的单床混合树脂（MB-1Mallinckrodt），搅拌过夜，然后用 Whatman 1 号滤纸过滤以纯化之。

在贮存期间，丙烯酰胺和双丙烯酰胺会缓慢转化成丙烯酰和双丙烯酸。

5. 40%丙烯酰胺

【配制方法】

把 380g 丙烯酰胺（DNA 测序级）和 20g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 600mL 的蒸馏水中。继续按上述配制 30%丙烯酰胺溶液的方法处理，但加热溶解后应以蒸馏水补足至终体积为 1L。

【注意】

见上述配制 30%丙烯酰胺的说明，40%丙烯酰胺溶液用于 DNA 序列测定。

6. 10%过硫酸铵溶液

【配制方法】

把 1g 过硫酸铵溶解于终量为 10mL 的水溶液中，该溶液可在 4℃保存数周。

7. 1mol/L CaCl_2 溶液

【配制方法】

在 200mL蒸馏水中溶解 54g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 10mL小份贮存于-20℃。

【注意】

制备感受态细胞时，取出一小份解冻并用蒸馏水稀释至 100mL，用 Nalgene 滤器（0.4 μm 孔径）过滤除菌，然后骤冷至 0℃。

8. 2.5mol/L CaCl_2 溶液

【配制方法】

在 20mL蒸馏水中溶解 13.5g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 1mL小份贮存于-20℃。

9. 1mol/L 二硫苏糖醇（DTT）溶液

【配制方法】

用 20mL 0.01mol/L 乙酸钠溶液（pH5.2）溶解 3.09g DTT，过滤除菌后分装成 1mL 小份贮存于-20℃。

【注意】

DTT 或含有 DTT 的溶液不能进行高压处理。

10. 0.5mol/L EDTA(pH8.0)溶液

【配制方法】

在 800mL 水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na \cdot 2H $_2$ O)，在磁力搅拌器上剧烈搅拌，用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0（约需 20g NaOH 颗粒）然后定容至 1L，分装后高压灭菌备用。

【注意】

EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将溶液的 pH 值调至接近 8.0，才能完全溶解。

11. 溴化乙锭 (10mg/mL 溶液)

【配制方法】

在 100mL 水中加入 1g 溴化乙锭，磁力搅拌数小时以确保其完全溶解，然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中，保存于室温。

【注意】

小心：溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性，使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套，称量染料时要戴面罩。

12. IPTG 溶液

【配制方法】

IPTG 为异丙基硫代- β -D-半乳糖苷（分子量为 238.3），在 8mL 蒸馏水中溶解 2g IPTG 后，用蒸馏水定容至 10mL，用 0.22 μ m 滤器过滤除菌，分装成 1mL 小份贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

13. 酚/氯仿溶液

【配制方法】

把酚和氯仿等体积混合后用 0.1mol/L Tris \cdot HCl(pH7.6)抽提几次以平衡这一混合物，置棕色玻璃瓶中，上面覆盖等体积的 0.01mol/l Tris \cdot HCl(pH7.6)液层，保存于 4 $^{\circ}$ C。

【注意】

酚腐蚀性很强，并可引起严重灼伤，操作时应戴手套及防护镜，穿防护服。所有操作均应在化学通风橱中进行。与酚接触过的部位皮肤应用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇。

14. 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 溶液

【配制方法】

在 800mL 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和 0.24g KH₂PO₄,用HCl 调节 溶液的pH值至 7.4 加水定容至 1L, 在 15lbf/in²(1034×10⁵Pa)高压下蒸气灭菌 20min。保存于室温。

15. 3mol/L 乙酸钠 (pH5.2 和 pH7.0) 溶液

【配制方法】

在 80mL 水中溶解 408.1g 三水乙酸钠,用冰乙酸调节 pH 值至 5.2 或用稀乙酸调节 pH 值至 7.0, 加水定容到 1L, 分装后高压灭菌。

16. 5mol/L NaCl 溶液

【配制方法】

在 800mL 水中溶解 292.2g NaCl 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

17. 10%十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液

【配制方法】

在 900mL 水中溶解 100g 电泳级 SDS, 加热至 68℃助溶, 加入几滴浓盐酸调节 溶液的 pH 值至 7.2, 加水定容至 1L, 分装备用。

【注意】

SDS 的微细晶粒易扩散, 因此称量时要戴面罩, 称量完毕后要清除残留在称量工作区和天平上的 SDS, 10%SDS 溶液无须灭菌。

18. 1mol/L Tris 溶液

【配制方法】

在 800mL 水中溶解 121.91g Tris 碱, 加入浓 HCl 调节 pH 值至所需值。

pH	HCl
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

应使溶液冷至室温后方可最后调定 pH 值, 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

【注意】

如 1mol/L 溶液呈现黄色, 应予丢弃并置备质量更好的 Tris。

尽管多种类型的电极均不能准确测量 Tris 溶液的 pH 值,但仍可向大多数厂商购得合适的电极。

Tris 溶液的 pH 值因温度而异,温度每升高 1℃,pH 值大约降低 0.03 个单位。例如:0.05mol/L 的溶液在 5℃、25℃、和 37℃时的 pH 值分别为 9.5、8.9 和 8.6。

19. X-gal 溶液

【配制方法】

X-gal 为 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D 半乳糖苷。用二基甲酰胺溶解 X-gal 配制成的 20mg/mL 的贮存液。保存于一玻璃管或聚丙烯管中,装有 X-gal 溶液的试管须用铝箔封裹以防因受光照而被破坏,并应贮存于-20℃。X-gal 溶液无须过滤除菌。

20. LB 液体培养基

【配制方法】

胰蛋白胨	10.0g
酵母提取物	5.0g
NaCl	10.0g

在 900mL 的去离子水中加入表中的试剂,磁力搅拌至溶质完全溶解,用 5mol/L 的 NaOH (约 0.2mL) 调解 pH 值至 7.0。定容至总体积为 1L,15 磅高压灭菌 20min。

致 谢

日月如梭，光阴似箭，转眼间三年多的学习生活就要结束了。三年来，我的导师邱昌庆研究员对我的学业给予了各方面的悉心的指导，从选题、查资料、论文的开始到完成，一丝不苟、孜孜不倦，严谨治学以及对知识无限渴求的精神深深地震撼着我，使我懂得在人生的生涯中追求知识，不断提高自身素质，为国家和社会做贡献。导师严谨的学风和对科研的执着是我今后学习的榜样。他宽阔的胸怀和慈父般的关怀为我在做人方面树立了一面镜子，永远激励着我。在试验过程中，曾经遇到挫折，心情沮丧、灰心丧气，是导师耐心的开导我，鼓励我，使我战胜了困难。三年来，导师不仅授予我科学文化知识、社会经验，而且为我树立了做人的榜样，使我终身受益。毕业之际，衷心感谢我的导师三年来对我各方面的关怀和教诲。

感谢兰州兽医研究所所长才学鹏研究员、科研处处长殷宏研究员及其他领导给予的关怀和支持。

感谢兰州兽医研究所病毒病研究室刘湘涛主任、刘在新副主任、卢曾军博士提供帮助和技术指导。

感谢军事医学科学院刘伯华博士在试验过程中提出宝贵的建议。

感谢本课题组的程淑敏、曹小安、蔺国珍、高双娣在论文过程中给予的大力帮助和支持。

感谢郑福英博士、胡慧博士、杨春华硕士大力支持和帮助。

感谢兰喜博士、张强博士、孙世琪博士、李学瑞博士、付宝权博士、殷相平博士、窦永喜博士、林青博士、郑海学博士、郭建宏博士、尹双辉硕士给予的帮助。

感谢我的爱人、继父、母亲、岳父、岳母为我提供宝贵的时间，使论文能够顺利的完成以及亲戚朋友对我的关心和支持。

本研究得到了国家高技术研究发展计划（863）项目（2003AA241110）的资助。

本研究在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和农业部畜禽病毒学重点开放实验室完成。

作者简历

周继章，男，1972年5月25日生，青海省乐都县人，中共党员，助理研究员。1991年考入西北农业大学（现西北农林科技大学）兽医系兽医专业，1996年毕业分配到兰州兽医研究所传染病研究室工作。1999-2002年在中国农业科学院研究生院攻读在职申请硕士学位，2003年考入中国农业科学院研究生院，攻读预防兽医学博士学位。在工作期间，本人参加青海省牦牛疑难病的诊治研究，获青海科学技术进步奖；先后参加“九五”攻关项目《规模化猪场疫病控制与监测》、《规模化肉牛场疫病控制与监测》的诊断工作；参加社会公益项目《畜禽重大疫病控制—猪瘟灭活苗的研制》工作；参加奶业专项《牛奶中布鲁氏菌快速诊断技术》工作；主持“863”项目《禽衣原体活载体疫苗》的研制工作。申请国家发明专利两项，受理1项。先后发表论文23篇。编著《动物疫病基因工程疫苗研究与进展》1本。

在攻读博士期间发表论文情况如下：

1. 周继章. 鹦鹉热衣原体疫苗研究进展. 动物医学进展, 2006, 27(1):1-4.
2. 禽源鹦鹉热衣原体 MOMP 基因重组腺病毒载体的构建与鉴定. 中国兽医科学, 2006, 36(1):13-17.
3. 奶牛衣原体 PCR 诊断方法的研究. 中国兽医杂志. 已接受