

蔡金双, 耿琰, 张宝戈, 等. 胸膜肺炎放线杆菌 Apx I 蛋白单克隆抗体制备和抗原表位初步鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (5): 119-126.  
CAI J S, GENG Y, ZHANG B G, et al. Monoclonal antibody preparation and preliminary epitope identification of Apx I antigenic determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (5): 119-126.

## 胸膜肺炎放线杆菌 Apx I 蛋白单克隆抗体制备和 抗原表位初步鉴定

蔡金双<sup>1</sup>, 耿琰<sup>1</sup>, 张宝戈<sup>1</sup>, 车巧林<sup>2</sup>, 丁文僊<sup>2</sup>, 李玉峰<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学/农业部动物细菌学重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2. 江苏南农高科技股份有限公司, 江苏 无锡 214400)

**摘要:** 为了制备胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) I 型 Apx I 毒素 (Apx I) AI2 蛋白特异性单克隆抗体, 进而建立用于评估亚单位疫苗免疫效果的阻断 ELISA 方法, 以实验室前期筛选得到的 Apx I 抗原优势决定簇 AI2 重组蛋白为免疫原, 免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠。利用常规细胞融合和间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞, 获得 4 株单克隆抗体, 命名为 2C2、4E4、5E7 和 6F2, 上清液效价分别为 1:6400、1:6400、1:12800 和 1:6400。ELISA 与 Western blot 结果表明, 制备的 4 株单克隆抗体均与重组 AI2 蛋白有良好的反应性。其中 5E7 可与 APP 天然 Apx I 毒素蛋白特异性结合, 同时 4 株单克隆抗体均不与多杀性巴氏杆菌、支气管败血波氏菌、猪丹毒丝菌、副猪格拉菌和猪链球菌 2 型反应。亚类分型结果表明, 2C2、4E4、5E7 属于 IgG1 亚类, 6F2 属 IgG2a 亚类, 4 株单抗轻链均为  $\kappa$  链。通过构建 AI2 重组蛋白截短体, 初步确定线性表位在 74~93 aa 之间。本研究成功制备了 4 株针对 AI2 蛋白单克隆抗体, 为 APP 亚单位疫苗免疫效果评估方法的建立奠定了基础。

**关键词:** 胸膜肺炎放线杆菌; AI2 蛋白; 单克隆抗体; 抗原表位

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0119-08

## Monoclonal antibody preparation and preliminary epitope identification of Apx I antigenic determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

CAI Jinshuang<sup>1</sup>, GENG Yan<sup>1</sup>, ZHANG Baoge<sup>1</sup>, CHE Qiaolin<sup>2</sup>, DING Wenxi<sup>2</sup>, LI Yufeng<sup>1\*</sup>

(1. Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal Bacteriology of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China;

2. Jiangsu Nannong High-tech Co., Ltd., Wuxi 214400, China)

**Abstract:** This study was to prepare monoclonal antibodies against AI2 protein of APP and to establish a blocking ELISA method for evaluating the immune effect of subunit vaccine. 6-week-old female BALB/c mice were immunized with the recombinant AI2 protein, an antigen dominant determinant for Apx I. The positive hybridoma cells were prepared and screened by conventional cell fusion and indirect ELISA, and 4 monoclonal antibodies were obtained, which named 2C2, 4E4, 5E7 and 6F2, with supernatant titers of 1:6400, 1:6400, 1:12800 and 1:6400, respectively. The results of ELISA and Western blot showed that all the 4 monoclonal antibodies (McAbs) reacted well with the recombinant AI2 protein. Among them, 5E7 could specifically bind to the native Apx I toxin protein of APP, but none of the 4 McAbs could react with *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Glaesserella parasuis* and *Streptococcus suis* serotype 2. The subtyping results showed that 2C2, 4E4, 5E7 belonged to the IgG1 subclass, and 6F2 belonged to the IgG2a subclass. And, all the light chains of the 4 monoclonal antibodies strains were of the  $\kappa$ -chain. The linear epitope between 74 and 93 aa was preliminarily determined by constructing a truncated recombinant protein of AI2. In this study, 4 monoclonal antibodies against AI2 protein were successfully prepared, which laid a foundation for the establishment of the immune evaluation method of APP subunit vaccine.

**Keywords:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*; AI2 protein; monoclonal antibody; epitope

收稿日期: 2023-10-20; 修回日期: 2024-03-24

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1800902); 横向课题 (江苏南农高科技股份有限公司, 090HMQY21042)

第一作者: 蔡金双, 男, 博士研究生

\* 通信作者: 李玉峰, 教授, 博导, 主要从事动物传染病诊断与防治的研究, E-mail: yufengli@njau.edu.cn.

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 感染引起的一种以纤维索性肺炎为特征的传染性、高度接触性疾病, 各年龄段猪群均易感<sup>[1-2]</sup>。根据细菌荚膜抗原的不同, 可以分为 19 个血清型<sup>[3]</sup>, 我国主要流行血清型为 1、2、3、5 和 7 型。

APP 毒力因子众多, 最主要的毒力因子是溶血毒素, 即 Apx 毒素。目前已发现的 Apx 毒素有 4 种, 分别是 Apx I、Apx II、Apx III 以及 Apx IV<sup>[4]</sup>。其中 Apx I 可引起典型的肺部病变, 是造成胸膜肺炎最强的毒力因子<sup>[5]</sup>, 具有强溶血活性和细胞毒性, 已有多项研究表明在 APP 感染后, Apx I 毒素蛋白通过介导细胞死亡和溶血活性损伤宿主免疫系统, 并造成组织损伤<sup>[6-8]</sup>。同时 Apx I 抗原表位高度保守, 不易发生突变<sup>[9]</sup>, 这也使得 Apx I 成为研制 APP 亚单位疫苗的重要抗原。Seah 等<sup>[10]</sup>将 Apx I N 端蛋白免疫小鼠, 在使用不同血清型 APP 攻毒后, 该抗原表现出较好的免疫保护效果。严客霞等<sup>[11]</sup>通过表达重组 Apx I 蛋白并作为免疫原, 在进行 APP-10 攻毒后表现出 75% 的保护率。鉴于 Apx I 蛋白良好的免疫原性, 已有研究人员建立了相应的检测方法用以评估亚单位疫苗的免疫效果。Jung 等<sup>[12]</sup>利用重组 Apx I 蛋白特异性抗原区域建立了 ELISA 方法, 并检测豚鼠对于 Apx I 特异性免疫反应; 胡耀方等<sup>[13]</sup>利用天然 Apx I 毒素蛋白建立了中和抗体检测方法。本实验室前期通过生物信息学分析以及不同重组 Apx I 截短体抗原反应原性筛选, 获得 Apx I 抗原优势决定簇 AI2 蛋白<sup>[14]</sup>。为了建立评估猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗免疫效果的有效方法, 本研究利用重组 AI2 蛋白免疫小鼠, 制备单克隆抗体, 通过单抗的表位分析和 HRP 标记为开发 APP 亚单位疫苗免疫效果评估方法和开发可能的治疗制剂奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、质粒与菌种

骨髓瘤细胞系 SP2/0, 猪链球菌 2 型, 副猪格拉菌, APP 5 型 LH19 株, 猪丹毒丝菌 HX130709, 多杀性巴氏杆菌 ZXT<sup>+</sup> Pm, 支气管败血波氏菌 AHBb, 重组大肠杆菌 Rosetta (表达蛋白 AI2), APP 阳性血清, 均由本实验室保存。

### 1.2 实验动物

4~6 周龄 BALB/c 雌鼠购自上海西普尔-必凯实验动物公司。

### 1.3 主要实验试剂

弗氏佐剂, HT 培养基以及 HAT 培养基剂购自 Sigma 公司, TMB 购自碧云天生物, 山羊抗鼠 IgG

(H+L) 购自博士德生物, 抗体亚型鉴定试剂盒购自 Proteintech 公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自 Biosharp 生物科技有限公司, 胎牛血清购自杭州四季青, 烟酰胺嘌呤二核苷酸 (NAD) 购自南京生兴生物技术有限公司。

### 1.4 重组蛋白 AI2 表达纯化

将实验室保存的携带 pCold-sumo-AI2 重组质粒的大肠杆菌 Rosetta 菌株接种于含有氨苄青霉素抗性的液体 LB 培养基中培养, 待培养至  $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$  时, 加入 1 mmol/L IPTG, 15 °C, 160 r/min 诱导 24 h。诱导结束后, 离心收集菌体, 低温高压破碎后收集沉淀和上清液, 进行 SDS-PAGE 鉴定表达情况。确定目标蛋白表达后利用亲和层析进行纯化。

### 1.5 动物免疫及抗体效价检测

选取 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 将纯化后的 AI2 重组蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合并充分匀浆, 100  $\mu\text{g}$ /只背部皮下多点注射进行免疫。后续每隔 2 周利用弗氏不完全佐剂进行一次加强免疫, 抗原含量与首免相同, 共免疫 3 次。在第 3 次免疫后 2 周, 采集免疫后小鼠血清, 利用 AI2 间接 ELISA 检测抗体效价。在融合前 3 d, 选取效价最高小鼠, 利用 AI2 蛋白腹腔注射加强免疫。

### 1.6 单克隆抗体的制备

#### 1.6.1 细胞融合与筛选

选取 AI2 蛋白加强免疫后的小鼠, 分离脾细胞, 利用常规方法将脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行融合。融合后 5 d, 每天观察杂交瘤细胞生长情况, 待长至细胞孔面积 2/3 左右时, 利用 AI2 间接 ELISA 筛选阳性细胞孔, 并进行 3 次亚克隆, 待所有亚克隆细胞孔均为阳性后进行扩大培养, 获得分泌 AI2 抗体的杂交瘤细胞株。

AI2 间接 ELISA 方法: 将重组蛋白 AI2 以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度包被于酶标板, 4 °C 包被过夜, PBST 洗涤 3 次, 利用 10% 脱脂乳封闭 3 h, PBST 洗涤 3 次, 以杂交瘤细胞上清液作为一抗, 37 °C 孵育 1 h, 羊抗鼠 IgG (H+L) 为二抗, 孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 避光显色 10 min, 再次加入 50  $\mu\text{L}$  终止液。

#### 1.6.2 Western blot 鉴定

以 AI2 蛋白为待检抗原, 含 pCold I-sumo 空载体的 Rosetta 菌体裂解物为对照, 以筛选获得的阳性杂交瘤细胞上清液为一抗, 羊抗鼠 IgG (H+L) 为二抗, 进行 Western blot 检测。

### 1.7 单克隆抗体生物学特性鉴定

#### 1.7.1 杂交瘤细胞株抗体分泌稳定性

将阳性杂交瘤细胞进行连续传代, 每 5 代收集细

胞上清液，利用 AI2 间接 ELISA 检测效价，以确定杂交瘤细胞分泌抗体情况。

### 1.7.2 单克隆抗体亚型鉴定

根据试剂盒说明书，将单克隆抗体 1 : 100 稀释加入 ELISA 酶标板中后，不需孵育，再次加入试剂盒中 IgG + IgM + IgA 抗体，稀释比例根据说明书。37 °C 孵育 2 h，避光加入 TMB 进行显色，再次加入终止液进行读数。

### 1.7.3 单克隆抗体特异性鉴定

以猪链球菌 2 型、副猪格拉菌、猪丹毒丝菌、多杀性巴氏杆菌、支气管败血波氏菌为受检菌，利用间接 ELISA 检测单克隆抗体与受检菌反应性。将受检菌菌体裂解物包被于酶标板中，以杂交瘤细胞上清液为一抗，羊抗鼠 IgG (H+L) 为二抗进行检测。同时将受检菌菌体裂解物进行 SDS-PAGE 检测，转印至 PVDF 膜中，封闭过夜，同样以杂交瘤细胞上清液为一抗，羊抗鼠 IgG (H+L) 为二抗进行检测。

### 1.7.4 单克隆抗体与天然 ApxI 毒素蛋白反应性鉴定

根据参考文献 [15] 略作调整，将 App 5 型接种于液体 TSB (含 20 μg/mL NAD) 中培养过夜，调整 OD<sub>600</sub> 值，以 1 : 100 的比例接种于液体 LB (含 20 μg/mL NAD) 中，并添加 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 培养 8 h。离心收集上清液，加入饱和硫酸铵至 60% 饱和度，4 °C 沉淀过夜。离心收集沉淀利用无菌 PBS 进行溶解后，透析 24 h，所获样品即为天然 Apx I 毒素蛋白。将天然 Apx I 毒素蛋白进行 Western blot，以杂交瘤细胞上清液为一抗，羊抗鼠 IgG (H+L) 为二抗进行检测。

### 1.8 单克隆抗体识别表位初步鉴定

为防止因破坏二级结构影响截短体表达，利用在线网站 NetSurfP Ver.1.1 ([http://gps.biocuckoo.cn/online\\_full.php](http://gps.biocuckoo.cn/online_full.php)) 预测 AI2 蛋白二级结构，根据预测结果进行截短<sup>[16]</sup>。所需引物见表 1，将截短的基因与 pGEX6p-1 载体相连并转入 Rosetta 宿主菌中进行诱导表达，利用 Western blot 鉴定单克隆抗体与截短体的反应性。

表 1 AI2 截短体引物序列

引物名称	引物序列 (5' → 3')	内切酶	基因长度 /bp
AI2-1-F	CGCGGATCCTATGGCAGCGATGCTACTAAC	BamH I	279
AI2-1-R	CGCGTGGACTAACCAATCTTTAATCGTGAGCG	Sal I	
AI2-2-F	CGCGGATCCGGAGGAACACTGTATTACCAT	BamH I	261
AI2-2-R	CGCGTGGACTAAGATTTGTTCAATATCTTTTCTG	Sal I	

注：下划线处表示酶切位点。

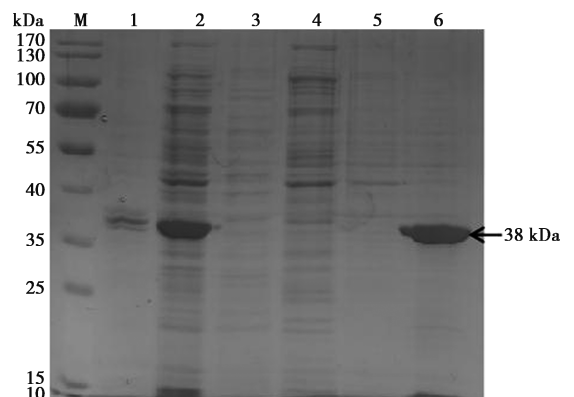
## 2 结果

### 2.1 重组蛋白 AI2 表达与纯化

将诱导后的 AI2 进行 SDS-PAGE 分析，结果表明诱导后的重组蛋白大部分以可溶形式表达。通过亲和层析方法进行纯化，结果表明，纯化后蛋白条带与预期相符，且纯度较好，可用于后续试验 (图 1)。

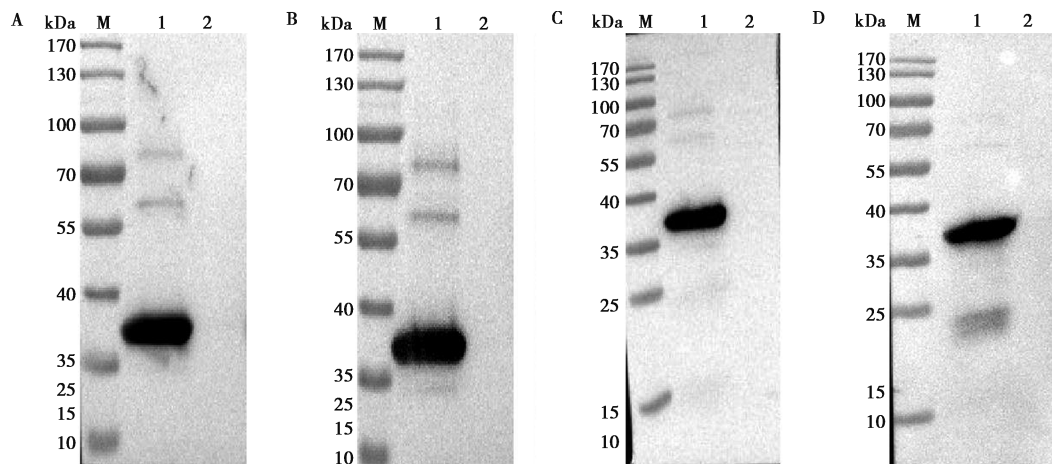
### 2.2 单克隆抗体制备与筛选

三免后小鼠血清 AI2 抗体效价均超过 1 : 204 800，可以进行细胞融合。经过 3 次亚克隆后，利用 AI2 间接 ELISA 共筛选得到 4 株杂交瘤细胞株，分别命名为 2C2、4E4、5E7 和 6F2。同时 Western blot 检测结果表明，4 株单抗对重组蛋白 AI2 具有良好的反应性 (图 2)。



M. Marker; 1. 携带 pCold-sumo-AI2 重组质粒的大肠杆菌 Rosetta 诱导后破碎沉淀; 2. 携带 pCold-sumo-AI2 重组质粒的大肠杆菌 Rosetta 诱导后破碎上清液; 3. 流穿液; 4-5. 洗涤液; 6. 洗脱产物。

图 1 重组蛋白 AI2 纯化



M. Marker; 1. 重组蛋白 AI2; 2. 携带空载体 pColdI-sumo 的菌体裂解物。  
A. 2C2; B. 4E4; C. 5E7; D. 6F2。

图 2 单抗对重组蛋白 AI2 反应性鉴定

### 2.3 单克隆抗体生物学特性鉴定

#### 2.3.1 杂交瘤细胞株抗体分泌稳定性检测

将 4 株杂交瘤细胞株连续传至第 20 代，利用间接 ELISA 检测相应分泌抗体效价。结果表明（表 2），4 株杂交瘤细胞株均能稳定分泌抗体。在第 20 代时，6F2 效价最低，5E7 效价最高。

表 2 杂交瘤细胞株上清液抗体效价

单克隆抗体	P5	P10	P15	P20
2C2	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400
4E4	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 6 400	1 : 3 200
5E7	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800	1 : 12 800
6F2	1 : 6 400	1 : 3 200	1 : 3 200	1 : 1 600

#### 2.3.2 单克隆抗体亚型鉴定

经鉴定，4 株单克隆抗体中，2C2、4E4 和 5E7 重链属于 IgG1 亚型，6F2 重链属于 IgG2a 亚型，4 株单克隆抗体轻链均属于 κ 型（表 3）。

表 3 单克隆抗体亚型鉴定

亚型	单克隆抗体			
	2C2	4E4	5E7	6F2
IgG1	2.475	2.468	2.367	0.063
IgG2a	0.063	0.081	0.059	2.299
IgG2b	0.062	0.060	0.063	0.067
IgG3	0.064	0.061	0.064	0.065
IgA	0.064	0.061	0.061	0.060
IgM	0.065	0.068	0.064	0.064
κ	1.125	1.135	1.078	1.668
λ	0.072	0.058	0.060	0.059

#### 2.3.3 单克隆抗体特异性检测

以 5 种异源细菌为受检菌，检测单克隆抗体特异性。ELISA（图 3）和 Western blot（图 4）结果表明，4 株单抗与多杀性巴氏杆菌、支气管败血波氏菌、猪丹毒丝菌、猪链球菌 2 型和副猪格拉菌抗原均不反应，所制备单抗具有较好的特异性。

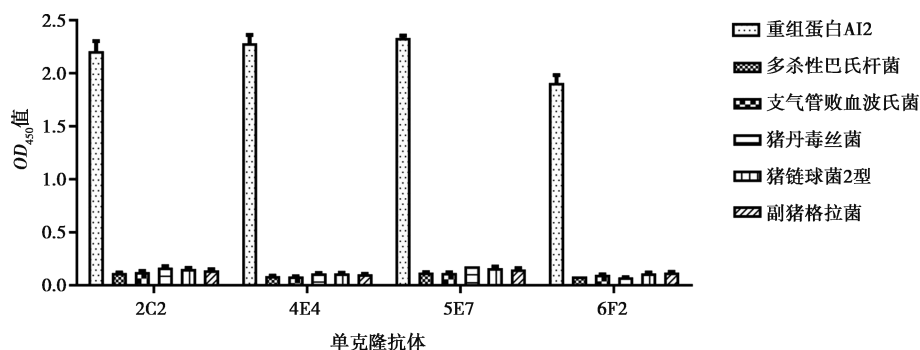
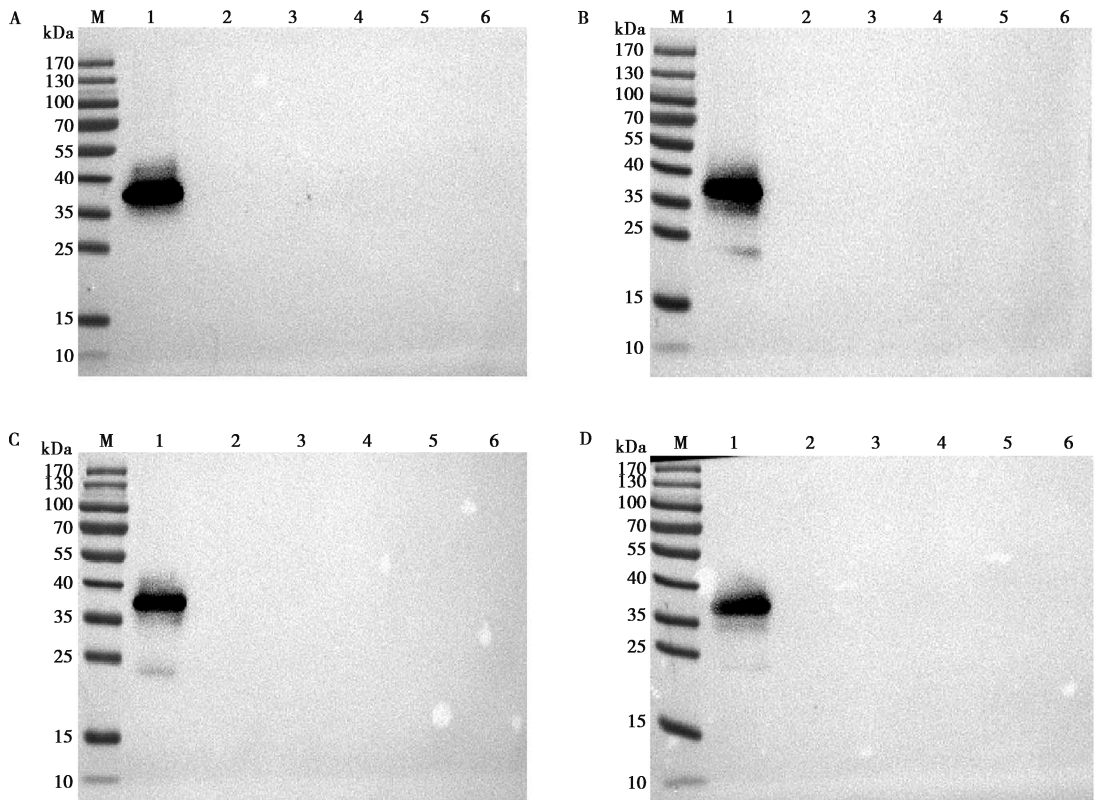


图 3 单抗特异性检测 (ELISA)



M. Marker; 1, AI2 重组蛋白; 2. 多杀性巴氏杆菌; 3. 支气管败血波氏菌; 4. 猪丹毒丝菌; 5. 猪链球菌 2 型; 6. 副猪格蓝菌。  
A. 2C2; B. 4E4; C. 5E7; D. 6F2。

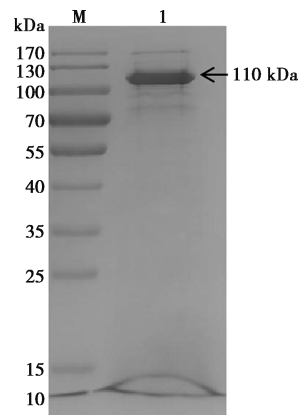
图 4 单抗特异性鉴定 (Western blot)

### 2.3.4 单克隆抗体与天然 Apx I 毒素蛋白反应性鉴定

经鉴定，单克隆抗体 5E7 可以与天然 Apx I 毒素蛋白结合 (图 5、图 6)。

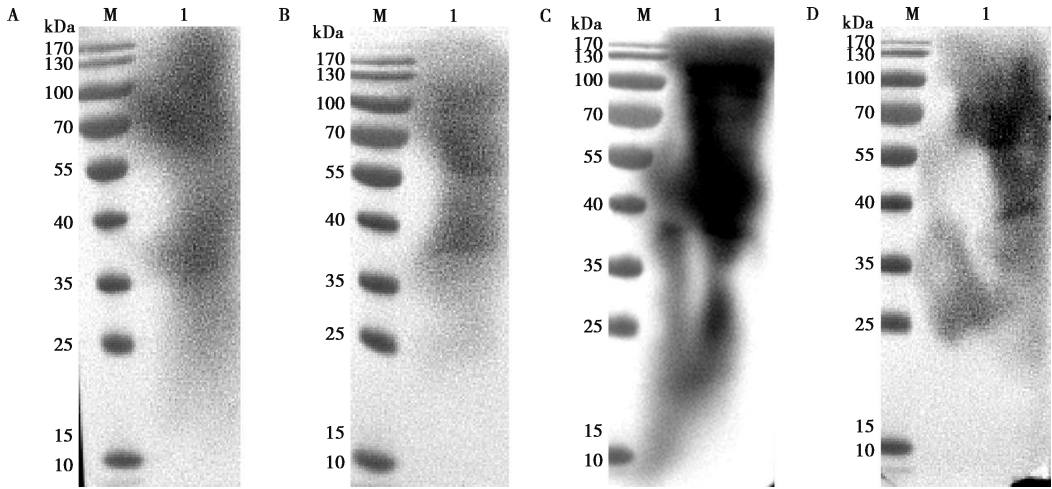
### 2.4 单克隆抗体识别表位初步鉴定

根据二级结构预测结果，将 AI2 重组蛋白截为 2 段，重复 20 个氨基酸 (如图 7A)，分别克隆至 pGEX6p-1 中进行诱导表达。将表达的截短蛋白分别孵育 4 株单克隆抗体鉴定反应性。结果表明，2C2 和 5E7 均可与 AI2-1 和 AI2-2 反应，4E4 和 6F2 均不与 2 个截短重组蛋白反应 (见图 7)。



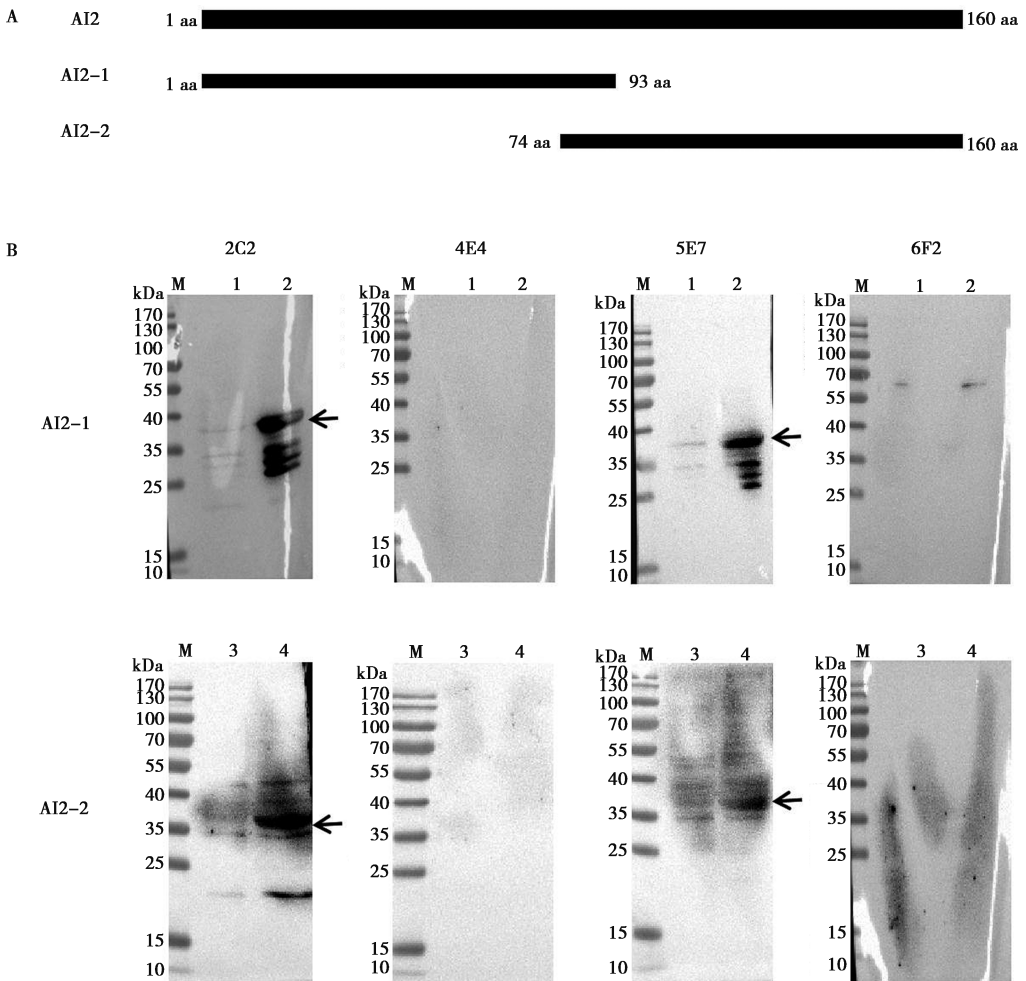
M. Marker; 1. Apx I 毒素。

图 5 天然 Apx I 毒素蛋白提取



M. Marker; 1. 天然 Apx I 毒素蛋白。A. 2C2; B. 4E4; C. 5E7; D. 6F2。

图 6 单克隆抗体与天然 Apx I 毒素蛋白反应性鉴定



M. Marker; 1. 携带 A12-1-pGEX6p-1 重组质粒大肠杆菌 Rosetta 未诱导菌体; 2. 诱导表达后 A12-1 重组蛋白; 3. 携带 A12-2-pGEX6p-1 重组质粒的大肠杆菌 Rosetta 未诱导菌体; 4. 诱导表达后 A12-2 重组蛋白。A. A12 截短示意图; B. 单克隆抗体与 A12-1 和 A12-2 反应性的 Western blot 鉴定。

图 7 单克隆抗体与 A12 重组蛋白截短体反应原性鉴定

### 3 讨论

APP可引起猪传染性胸膜肺炎,该病典型病变包括纤维素性出血性胸膜炎或者肺脏出现干酪样化脓病灶<sup>[17-18]</sup>。我国自1987年发现该病后,逐渐在全国范围内流行,成为养猪业主要的细菌性疾病,造成了巨大的经济损失<sup>[19-20]</sup>。因此对于APP的防控尤为重要,但鉴于灭活疫苗的局限性,研制亚单位疫苗成为目前的热点<sup>[21-23]</sup>。而在APP亚单位疫苗抗原筛选的研究中,Apx I蛋白成为应用最为广泛的抗原之一。Shin等<sup>[24]</sup>以真核表达的截短Apx I蛋白为免疫原,在免疫小鼠后,可以检测到较高水平的抗体,同时对野毒感染具有一定的防护效果。Shao等<sup>[25]</sup>通过原核表达,制备包含rApx I、rApx II、rApx III和rOMP重组蛋白的亚单位疫苗,在小鼠中可以提供一定交叉保护性。Jin等<sup>[26]</sup>利用减毒沙门菌表达Apx I A、Apx II A、Apx III A和OmpA,免疫小鼠后可有效诱导Th1和Th2型免疫反应。同时目前商品化的进口亚单位疫苗中也同样包含Apx I抗原<sup>[27]</sup>。

实验室前期通过构建表达不同Apx I蛋白截短体,筛选得到抗原优势决定簇AI2蛋白,并实现了高效可溶性表达。由于单克隆抗体制备周期较长,致使每一步试验都至关重要,抗原的纯度、免疫程序、细胞融合方法等均会对其性质造成一定影响<sup>[28]</sup>。有文献表明,免疫原纯度越高,所制备出的单克隆抗体效价越高<sup>[29]</sup>。因此,对其纯化条件进行优化,最终纯化后纯度达到85%以上,并作为免疫原,利用常规细胞融合的方法,最终获得4株单克隆抗体。4株单克隆抗体均具有较好的特异性,可与AI2蛋白发生特异性结合,不与表达宿主菌和其他外源细菌反应,可稳定持续分泌AI2抗体。同时,5E7还可与天然Apx I毒素蛋白结合。

随着抗原表位的深入研究,表位疫苗的研究方法逐渐多样化,成为疾病防治的一大热点领域<sup>[30-31]</sup>。抗原表位又称抗原决定簇,可以被机体识别并产生抗体。因此与传统疫苗相比,表位疫苗达到更好的免疫效果<sup>[32]</sup>。本研究中通过原核表达的方式,初步鉴定2C2和5E7所识别线性表位在74~93 aa之间。对于其他2株单克隆抗体与AI2-1和AI2-2均不反应,推测AI2蛋白本身为Apx I蛋白的抗原优势决定簇,再次截短后可能破坏了表位完整性,进而无法发生反应,这一推论还需进一步试验。

### 4 结论

本研究成功制备4株胸膜肺炎放线杆菌AI2蛋白单克隆抗体,为建立猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗免

疫效果评估方法奠定基础。

### 参考文献:

- [1] SASSU E L, BOSSE J T, TOBIAS T J, et al. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65 (Suppl 1): 72-90.
- [2] MAKRAI L, SARKOZI R, FODOR L. Carbon source utilisation and evaluation of the biologic system in the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Acta Vet Hung*, 2019, 67 (3): 327-337.
- [3] STRINGER O W, BOSSE J T, LACOUTURE S, et al. Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 255: 109021.
- [4] 刁有祥, 丁家波, 姜世金, 等. 地高辛标记探针检测猪胸膜肺炎放线杆菌的研究与应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005 (6): 585-589.
- [5] KAMP E M, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, VAN LEENGOED L A, et al. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs [J]. *Infect Immun*, 1997, 65 (10): 4350-4354.
- [6] WU C M, CHEN Z W, CHEN T H, et al. Mitogen-activated protein kinases p38 and JNK mediate *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin Apx I-induced apoptosis in porcine alveolar macrophages [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151 (3/4): 372-378.
- [7] HSU C W, LI S C, CHANG N Y, et al. Involvement of NF- $\kappa$ B in regulation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin Apx I-induced proinflammatory cytokine production in porcine alveolar macrophages [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 195: 128-135.
- [8] CHANG N Y, CHEN Z W, CHEN T H, et al. Elucidating the role of Apx I in hemolysis and cellular damage by using a novel *apxIA* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 [J]. *J Vet Sci*, 2014, 15 (1): 81-89.
- [9] 何玉龙, 赵娜, 伍晓雄, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌毒素I抗原模拟表位的筛选与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006 (10): 1073-1077.
- [10] SEAH J N, FREY J, KWANG J. The N-terminal domain of RTX toxin Apx I of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice [J]. *Infect Immun*, 2002, 70 (11): 6464-6467.
- [11] 严克霞, 刘建杰, 周锐, 等. 重组猪胸膜肺炎放线杆菌毒素Apx I对小鼠的急性毒性和免疫保护性研究 [J]. *生物工程学报*, 2006 (1): 65-70.
- [12] JUNG M, WON H, SHIN M K, et al. Development of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx I, Apx II, and Apx III-specific ELISA methods for evaluation of vaccine efficiency [J]. *J Vet Sci*, 2019, 20 (2): e2.
- [13] 胡耀方, 吴昊, 江昌盛, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌Apx I毒素中和试验的建立与初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (2): 158-164.
- [14] 耿琰, 蔡金双, 佘婷, 等. 胸膜肺炎放线杆菌 RTX 毒素抗原优势决定簇的筛选和融合表达 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (5): 87-94.
- [15] 吕佩师, 张丽红, 丁小松, 等. 胸膜肺炎放线杆菌在不同培养基中生长、生物膜形成及Apx毒素分泌能力的差异研究 [J]. *动*

- 物医学进展, 2022, 43 (1): 6-11.
- [16] 刘桃雪, 苏冰倩, 齐艳丽, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白单克隆抗体制备及其抗原表位鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54 (8): 3415-3423.
- [17] SASSU E L, FROMBLING J, DUVIGNEAU J C, et al. Host-pathogen interplay at primary infection sites in pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. BMC Vet Res, 2017, 13 (1): 64.
- [18] DOREY L, HOBSON S, LEES P. Factors influencing the potency of marbofloxacin for pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* [J]. Res Vet Sci, 2017, 111: 93-98.
- [19] PERRY M B, ANGEN O, MACLEAN L L, et al. An atypical biotype I *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America [J]. Vet Microbiol, 2012, 156 (3/4): 403-410.
- [20] 杨旭夫, 彭发泉. 我国猪胸膜肺炎嗜血杆菌感染症的确定和诊断 [J]. 畜牧兽医学报, 1990 (3): 243-245.
- [21] BOSSE J T, JANSON H, SHEEHAN B J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection [J]. Microbes Infect, 2002, 4 (2): 225-235.
- [22] HIGGINS R, LARIVIERE S, MITTAL K R, et al. Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae* [J]. Can Vet J, 1985, 26 (2): 86-89.
- [23] 何啟云, 闫康, 贝为成. 猪传染性胸膜肺炎的防控进展 [J]. 养殖与饲料, 2021, 20 (5): 77-80.
- [24] SHIN M K, KANG M L, CHA S B, et al. An immunosorbent assay based on the recombinant Apx I a, Apx II a, and Apx III a toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera [J]. J Vet Diagn Invest, 2011, 23 (4): 736-742.
- [25] SHAO M, WANG Y, WANG C, et al. Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice [J]. Acta Vet Scand, 2010, 52 (1): 52.
- [26] JIN H, EO S K, PARK S Y, et al. Immunological study of an attenuated *Salmonella typhimurium* expressing Apx I A, Apx II A, Apx III A and OmpA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a mouse model [J]. J Vet Med Sci, 2016, 77 (12): 1693-1696.
- [27] 薛惠莉. 猪传染性胸膜肺炎的克星: 爱普克: 默沙东猪传染性胸膜肺炎亚单位灭活疫苗上市 [J]. 猪业科学, 2017, 34 (9): 78.
- [28] 曹慧刚, 易立, 程悦宁, 等. 抗犬瘟热病毒核蛋白单克隆抗体的制备及其线性抗原表位鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39 (7): 578-582.
- [29] 闫慧丽, 席俊, 高学梅, 等. 抗 Gly m Bd 28K 单克隆抗体的制备及其免疫学特性 [J]. 浙江农业学报, 2016, 28 (5): 748-752.
- [30] PARVIZPOUR S, POURSEIF M M, RAZMARA J, et al. Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches [J]. Drug Discov Today, 2020, 25 (6): 1034-1042.
- [31] GONG W, PAN C, CHENG P, et al. Peptide-based vaccines for tuberculosis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 830497.
- [32] MOISE L, MCMURRY J, RIVERA D S, et al. Progress towards a genome-derived, epitope-driven vaccine for latent TB infection [J]. Med Health R I, 2007, 90 (10): 301-303.