

章石楠, 韩生义, 石田, 等. 牦牛源大肠杆菌 F17 菌毛 A 亚基和 G 亚基蛋白免疫保护效果比较分析 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (2): 61-70.  
ZHANG S N, HAN S Y, SHI T, et al. Comparative analysis of the immunoprotective effects of the A and G subunit proteins of yak-derived *Escherichia coli* F17 hairs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (2): 61-70.

## 牦牛源大肠杆菌 F17 菌毛 A 亚基和 G 亚基蛋白免疫保护效果比较分析

章石楠<sup>1,2,3</sup>, 韩生义<sup>1,2,3</sup>, 石田<sup>1,2,3</sup>, 李淑萍<sup>1,2</sup>, 胡国元<sup>1,2,3</sup>, 高瑞<sup>1,2,3</sup>,  
田嘉琪<sup>1,2,3</sup>, 周雯雯<sup>1,2,3</sup>, 屈亚鹏<sup>1,2,3</sup>, 陈逸雅<sup>1,2,3</sup>, 李生庆<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 青海大学, 青海 西宁 810016;

2. 青海省畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016;

3. 青海省动物疫病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 为评价牦牛源大肠杆菌 F17 菌毛 A 亚基 (F17A) 和 G 亚基 (F17G) 的免疫原性, 以本实验室分离的大肠杆菌 QML2206-1 为研究对象, 采用生物信息学软件将 F17A 和 F17G 蛋白进行理化性质分析、跨膜结构和信号肽预测、二级结构和保守结构域预测; 诱导表达并纯化 F17A 和 F17G 蛋白; 将纯化后的重组蛋白分为高 (100  $\mu\text{g}/\text{只}$ )、低 (50  $\mu\text{g}/\text{只}$ ) 剂量组免疫小鼠, 利用 ELISA 方法检测小鼠特异性免疫球蛋白 G (IgG) 抗体水平及血清中细胞因子簇分化抗原 4 (CD4)、簇分化抗原 8 (CD8)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 4 (IL-4) 的表达水平, 并通过小鼠攻毒保护试验评价其免疫保护效果。结果显示: 2 种蛋白均为稳定蛋白且具有信号肽区域; F17A 蛋白无跨膜结构域, 存在 1 个菌毛蛋白 A (FimA) 保守结构域, F17G 蛋白有跨膜结构域, 存在 FimA 和菌毛黏附素凝集素 (Fim-adh-lectin) 2 个保守结构域; 2 种蛋白的二级结构主要以无规则卷曲为主。经原核表达成功获得相对分子质量约为 37 和 54 kDa 的重组蛋白; 重组蛋白免疫小鼠后, F17A 高、低剂量组血清特异性 IgG 抗体效价最高可达 1:32 000 和 1:16 000, F17G 高、低剂量组血清特异性 IgG 抗体效价最高可达 1:32 000 和 1:25 600; 与对照组相比, 免疫小鼠血清中 CD4、CD8、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及 IL-4 的表达水平均有所升高 ( $P < 0.05$ )。分别用最小致死量 (MLD)、1.5 MLD、2 MLD、2.5 MLD 攻毒小鼠后, 除 F17A 高剂量免疫组最高仅能保护小鼠抵抗 1.5 MLD 攻毒菌量外, 其余免疫组小鼠对 4 种攻毒菌量的存活率均为 100%。综上, F17A 和 F17G 重组蛋白具有良好的抗原性和一定的免疫保护作用。本研究为下一步基于 F17 蛋白的牦牛适用性大肠杆菌基因工程亚单位疫苗的研制提供了试验依据。

**关键词:** 牦牛源大肠杆菌; F17 蛋白; 原核表达; 生物信息学分析; 免疫原性

**中图分类号:** S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)02-0061-10

## Comparative analysis of the immunoprotective effects of the A and G subunit proteins of yak-derived *Escherichia coli* F17 hairs

ZHANG Shinan<sup>1,2,3</sup>, HAN Shengyi<sup>1,2,3</sup>, SHI Tian<sup>1,2,3</sup>, LI Shuping<sup>1,2</sup>, HU Guoyuan<sup>1,2,3</sup>, GAO Rui<sup>1,2,3</sup>,  
TIAN Jiaqi<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Wenwen<sup>1,2,3</sup>, QU Yapeng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Yiya<sup>1,2,3</sup>, LI Shengqing<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Province Academy of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xining 810016, China;

3. Qinghai Province Key Laboratory of Pathogen Diagnosis and Green Prevention and Control Technology

Research of Animal Diseases, Xining 810016, China)

**Abstract:** In order to evaluate the immunogenicity of yak-derived *Escherichia coli* F17A and F17G proteins, we first used bioinformatics software, in this study, to analyze the physicochemical properties, transmembrane structure and signal peptide prediction, secondary structure and conserved structural domains prediction of the *E. coli* QML2206-1 F17A and F17G proteins isolated in our laboratory. We then induced the expression of and purified the F17A and F17G proteins. Next, we administered the purified recombinant proteins to mice at high (100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) and low (50  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) doses for immunization, and detected, by ELISA, the levels of specific Immunoglobulin G (IgG)

收稿日期: 2025-03-06; 修回日期: 2025-12-15

基金项目: 中央引导地方专项资金 (2024-ZY-013)

第一作者: 章石楠, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 李生庆, 研究员, 研究方向为动物疫病诊断与防治, E-mail: lsq.8008@163.com.

antibodies and the expression levels of cytokines cluster of differentiation 4 (CD4), cluster of differentiation 8 (CD8), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-4 (IL-4) in mouse serum. Finally, the immunoprotective effects of the proteins were evaluated by mouse tetanus protection assay. The results showed that both proteins are stable ones with signal peptide regions. The F17A protein had no transmembrane structural domains but one fimbrial protein A (FimA) conserved structural domain, while the F17G protein had transmembrane structural domains and two conserved structural domains, FimA and Fimbrial adhesin lectin (Fim-adh-lectin). The secondary structures of the two proteins were mainly irregularly coiled. The recombinant proteins with relative molecular masses of 37 kDa and 54 kDa were successfully obtained by prokaryotic expression. After the recombinant proteins were immunized in mice, the serum-specific IgG antibody potency of the F17A high and low-dose groups reached as high as 1 : 32 000 and 1 : 16 000, respectively; and that of the F17G high- and low-dose groups reached 1 : 32 000 and 1 : 25 600, respectively. Compared with the control group, the expression levels of CD4, CD8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-4 in the serum of the immunized mice were elevated ( $P < 0.05$ ). After the mice were poisoned with the minimum lethal doses (MLD), 1.5 MLD, 2 MLD, and 2.5 MLD, the survival rate of the rodents in the immunized groups was 100% against the four attacking bacterial loads, except for the F17A high-dose immunized group, which only protected the mice up to a maximum of 1.5 MLD of the attacking bacterial load; and the mice in the remaining immunized groups had 100% survival against all four attacking bacterial loads. In conclusion, the F17A and F17G recombinant proteins possessed high antigenicity and some immunoprotective effects. This study provided a technical basis for further development of a genetically engineered subunit vaccine against *E. coli* based on the F17 protein, which would be applicable to yak.

**Keywords:** yak-derived *Escherichia coli*; F17 protein; prokaryotic expression; bioinformatics analysis; immunogenicity

牦牛是青藏高原特有的物种，是当地牧民重要的生活和经济来源<sup>[1]</sup>。在牦牛养殖过程中，腹泻是一种高发性疾病，其临床症状主要表现为体重显著下降、持续性腹泻以及生产性能降低。在严重病例中，该疾病可引发脱水甚至死亡，对牦牛养殖业的经济效益造成重大负面影响<sup>[2]</sup>。细菌感染是引起牦牛腹泻的原因之一，其中致病性大肠杆菌所引起的腹泻在牦牛养殖过程中是一种常发疾病<sup>[3]</sup>。目前，大肠杆菌所引起的牦牛腹泻主要依赖于现有的传统灭活苗，但由于大肠杆菌的血清型众多，且市场上尚无针对牦牛的大肠杆菌疫苗产品，预防效果无法达到预期，所以利用大肠杆菌相关免疫蛋白研制亚单位疫苗对于有效防控牦牛腹泻具有良好的应用前景。

致病性大肠杆菌是通过产生菌毛黏附素与宿主细胞受体结合，从而定殖或入侵宿主细胞<sup>[4]</sup>。F17 菌毛是常见黏附素之一<sup>[5]</sup>，由 4 个亚基单位组成，分别为结构亚基 F17A、黏附亚基 F17G、伴侣亚基 F17D 和引航亚基 F17C，其中 F17A 和 F17G 被认为在 F17 菌毛介导的黏附过程中起关键作用<sup>[6]</sup>。F17 菌毛的结构组装依赖于 F17A 蛋白的核心作用，其通过数百个 F17A 亚基的聚合形成菌毛主干结构；F17G 黏附蛋白位于 F17 菌毛的尖端，通过识别反刍动物小肠上皮细胞微绒毛表面 N-乙酰氨基葡萄糖受体，介导细菌对宿主的特异性识别与黏附，进而引发宿主腹泻或败血症等病理反应<sup>[7-8]</sup>。F17G 是一种双功能蛋白，其高度保守的 N 端结构域负责受体识别和黏附，而 C 端结构域则参与菌毛的生物合成过程<sup>[9]</sup>。

研究发现，菌毛具有高度免疫原性，其能够诱导机体产生保护性抗体，进而抑制细菌与肠上皮细胞的

黏附，阻止细菌在肠道内定殖<sup>[10]</sup>。针对致病性大肠杆菌引发的腹泻，疫苗免疫是预防与控制其传播的重要措施之一。F17 菌毛作为与犊牛腹泻大肠杆菌高度相关的菌毛黏附素，利用其作为免疫抗原的相关研究较少。本研究利用从牦牛粪便中分离出的大肠杆菌菌株进行 F17A、F17G 蛋白的原核表达，并免疫小鼠，通过测定免疫小鼠 IgG 抗体效价、血清中细胞因子水平以及攻毒保护试验，对 2 种蛋白的免疫效果进行评价，为今后研制大肠杆菌亚单位疫苗时目的蛋白的选择提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和实验动物

大肠杆菌 QML2206-1，由青海大学畜牧兽医学院兽医研究所高原动物疾病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室（以下简称本实验室）从牦牛腹泻粪便样品中分离并鉴定。

16~18 g 昆明系小鼠，购买自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心 [生产许可证号：SCXK(甘)2020-0002]。

### 1.2 主要试剂

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、高保真 PCR 酶为 TaKaRa 公司产品；大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞为北京全式金公司产品；原核表达载体 pET-32a 为武汉森灵生物科技有限公司产品；TB 培养基、His 标签抗体均为北京索莱宝公司产品；山羊抗鼠 IgG 为武汉塞维尔生物科技有限公司产品；限制性内切酶 BamH I、Xho I 为赛默飞世尔科技公司产品；T4 DNA 连接酶为天根生化科技公司产品；小鼠细胞因

子检测试剂盒为江苏酶标生物公司产品。

### 1.3 F17A、F17G 蛋白生物信息学分析

用在线软件 ProtParam 分析预测蛋白的理化性质; TMHMM Server v. 2.0 和 Sufnal-4.1 分析预测蛋白的跨膜结构和信号肽; SOPMA 预测蛋白的二级结构; 保守结构域数据库 (conserved domain database, CDD) 预测蛋白的保守结构域。

### 1.4 F17A、F17G 蛋白的原核表达

#### 1.4.1 引物设计与目的基因的扩增

根据本实验室前期对大肠杆菌菌株 QML2206-1 进行全基因组测序所获得的该菌株 F17A、F17G 基因序列 (登录号: CP132064.1), 去除信号肽区域后设计了 2 对引物, 引物 F17A-F: 5'-CGCGGATCCATG-TATGACGGTACAATTAA-3', F17A-R: 5'-CCGT-CTCGAGCTGATAAGCGATGGTGAAT-3' (下划线处分别为 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点), PCR 扩增产物大小为 486 bp; F17G-F: 5'-CGCGGATCCATG-GCAGTTTCATTTATTGG-3', F17G-R: 5'-CCGTCTC-GAGCTGATAGGAAAACGTAATG-3' (下划线处分别为 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点), PCR 扩增产物大小为 966 bp。引物由西安擎科生物科技有限公司合成。2 种基因的 PCR 扩增体系均为 50  $\mu$ L: 5 $\times$ buffer 10  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, DNA polymerase 1  $\mu$ L, 上下游引物各 1.5  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 片段的大小, 切胶回收目的片段。

#### 1.4.2 重组质粒的构建

PCR 产物及 pET-32a 载体质粒均用限制性内切酶进行双酶切, 电泳对目的片段进行胶回收后, 用 T4 连接酶进行连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取平板中的单菌落, 提取重组质粒进行 PCR 鉴定及酶切鉴定, 将鉴定结果正确的质粒送西安擎科生物科技有限公司进行测序。检验正确后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 进行 F17A、F17G 蛋白的诱导表达。

#### 1.4.3 重组蛋白的表达及诱导条件的优化

将 pET-32a 空载体对照与鉴定正确的 F17A、F17G 重组菌分别接种到含有 Amp 的 TB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养至  $OD_{600\text{nm}}$  值约为 0.6 至 0.8 时, 加入 IPTG 终浓度 1 mmol/L, 37  $^{\circ}$ C 诱导 6 h, 诱导后的菌液离心收集菌体, 用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。鉴定正确后, 调整重组菌中加入的 IPTG 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mmol/L, 调整诱导时间分别

为 2、4、6、8、10 h 后分别进行 SDS-PAGE 检测蛋白表达, 观察其在不同条件下的表达量, 以确定最佳诱导条件。

#### 1.4.4 重组蛋白的纯化及 Western blot 鉴定

用确定的最佳诱导条件诱导重组蛋白, 经超声破碎后用 His Trap 预装柱纯化, 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后, 转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 1:5 000 稀释 His 标签抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 回收一抗, TBST 洗膜 3 次, 1:8 000 稀释 HRP 标记的山羊抗鼠二抗, 室温孵育 1.5 h, 洗膜 3 次后滴加显影液, 用成像系统进行显色拍照。

### 1.5 重组蛋白 F17A 和 F17G 免疫原性分析

#### 1.5.1 小鼠免疫接种

将 100 只 16~18 g 健康的昆明系小鼠平均分成 5 组, 分别为 F17A 低剂量免疫组 (50  $\mu$ g/只)、F17A 高剂量免疫组 (100  $\mu$ g/只)、F17G 低剂量免疫组 (50  $\mu$ g/只)、F17G 高剂量免疫组 (100  $\mu$ g/只) 和 PBS 对照组, 将纯化好的重组蛋白与弗氏完全佐剂等比例混合, 经颈部皮下多点注射免疫小鼠, 于初次免疫后 14 d 将重组蛋白与弗氏不完全佐剂等比例混合进行加强免疫。分别于免疫前及初次免疫后 7、14、21、28、35 d 经小鼠眼周采血后分离血清, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 1.5.2 特异性 IgG 抗体水平动态监测

参照文献 [11], 采用 ELISA 方法对一免后 7、14 d 及二免后 7、14、21 d 免疫组和对照组的小鼠血清的抗体水平进行检测。比较血清样本 (S) 与阴性对照血清 (N)  $OD_{450\text{nm}}$  的比值 (S/N),  $S/N \geq 2.1$  时判定为阳性, 以  $S/N \geq 2.1$  的最大稀释度为小鼠血清 IgG 抗体效价。

#### 1.5.3 免疫小鼠血清细胞因子检测

使用小鼠簇分化抗原 4 (CD4)、簇分化抗原 8 (CD8)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 检测试剂盒检测血清细胞因子水平, 具体步骤参照说明书进行。

#### 1.5.4 小鼠攻毒保护试验

取 20 只小鼠平均分成 5 组, 分别给每组小鼠皮下注射不同剂量的大肠杆菌 QML2206-1 菌液 (0.8 $\times$ 10<sup>8</sup>、1.6 $\times$ 10<sup>8</sup>、4 $\times$ 10<sup>8</sup>、8 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU), 观察并记录 7 d 内小鼠的死亡情况, 以组内小鼠全部死亡的最低浓度作为该菌株的最小致死量 (MLD)。

二免后 21 d 分别用最小致死量 (MLD)、1.5 MLD、2 MLD、2.5 MLD 的攻毒剂量对各组小鼠经皮下注射攻毒, 并记录观察小鼠临床症状及死亡情况。

### 1.6 数据统计与分析

试验数据用 SPSS 26.0 软件进行统计处理, 以

“平均值±标准差”表示，采用单因素方差分析，用LSD法比较各组的差异显著性， $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

理化性质分析显示，F17A 蛋白共有 182 个氨基酸，分子质量约为 18.6 kDa，理论等电点 (PI) 为 4.98，不稳定系数为 22.17，是一种稳定蛋白。跨膜结构及信号肽预测显示，F17A 蛋白为分泌蛋白，无跨膜结构域，有 1 个信号肽区域 (1~21 aa) (图 1A，图 2A)。二级结构预测分析显示，该蛋白主要由无规则卷曲 (47.8%) 构成；CDD 分析显示，

F17A 存在 1 个菌毛蛋白 A (FimA) 保守结构域 (1~182 aa)。

F17G 蛋白共有 343 个氨基酸，分子质量约为 36.4 kDa，理论等电点 (PI) 为 5.91，不稳定系数为 27.18，是一种稳定蛋白。跨膜结构及信号肽预测显示，F17G 蛋白为膜蛋白，有跨膜结构域，有 1 个信号肽区域 (1~22 aa) (图 1B，图 2B)。二级结构预测分析显示，该蛋白主要由无规则卷曲 (66.76%) 构成；CDD 分析显示，F17G 存在 2 个保守结构域，分别为 FimA (175~343 aa) 结构域和菌毛黏附素凝集素 (Fim-adh-lectin) (24~193 aa) 结构域。

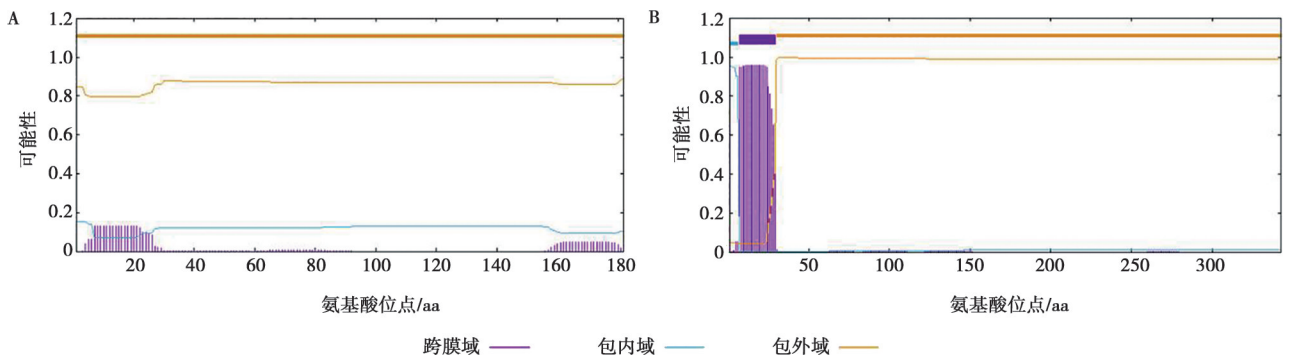


图 1 F17A (A) 和 F17G (B) 蛋白跨膜结构域预测

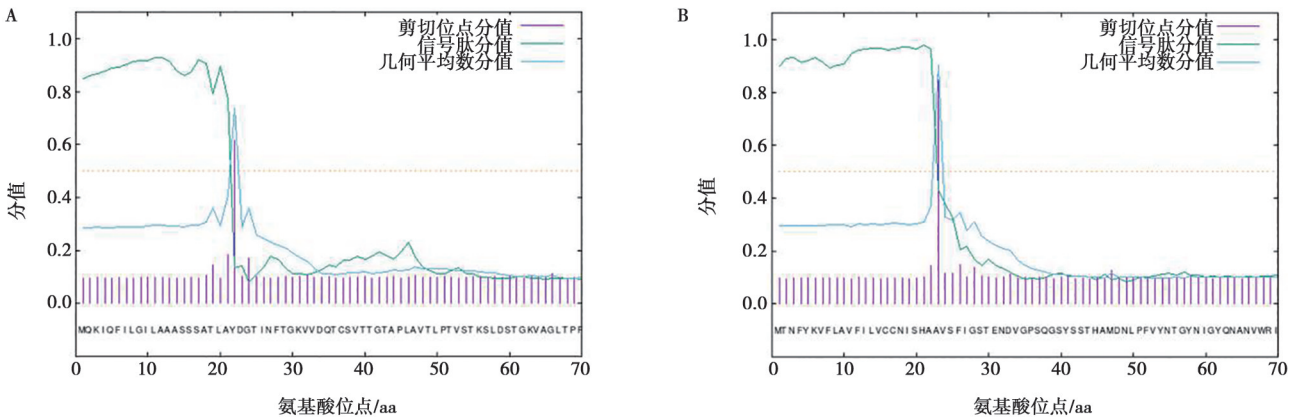


图 2 F17A (A) 和 F17G (B) 蛋白信号肽预测

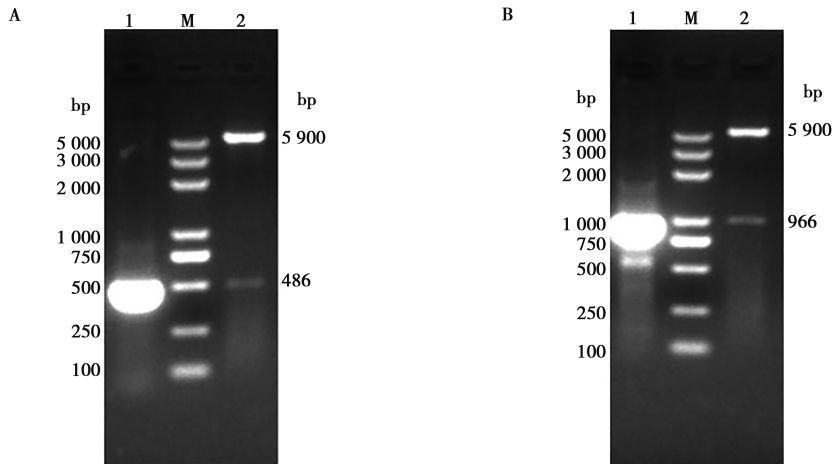
### 2.2 蛋白的原核表达

#### 2.2.1 重组质粒的 PCR 鉴定及酶切鉴定

重组质粒 pET32a-F17A 和 pET32a-F17G 经双酶切后分别得到 486、966 bp 的目的基因条带及 5 900 bp 的载体条带，PCR 结果也得到与目的片段大小相符的片段 (图 3)，且测序结果与预期结果一致，说明原核表达载体构建成功。

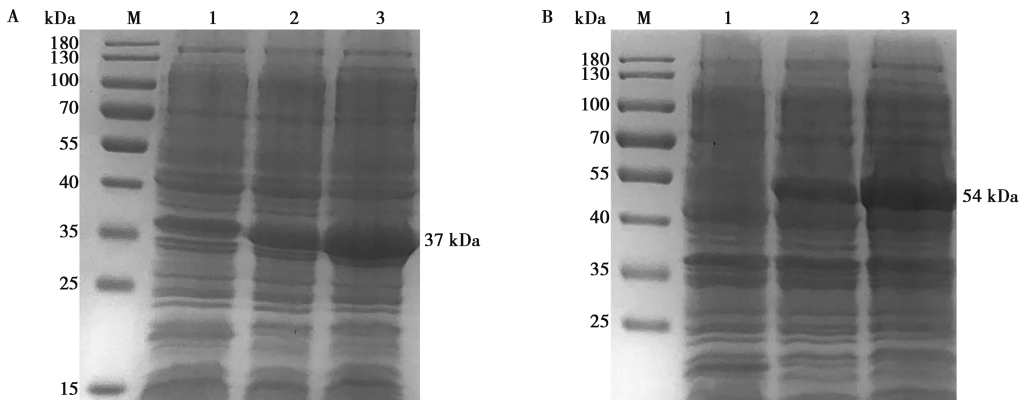
#### 2.2.2 重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定及 Western blot 验证

F17A、F17G 重组菌表达产物经 SDS-PAGE 检测，结果显示在约 37 和 54 kDa 处出现条带，与预期大小一致 (图 4)。将纯化后的蛋白进一步进行 Western blot 验证，结果显示 F17A 和 F17G 蛋白分别在 37 和 54 kDa 附近出现条带，而对照组无此条带出现 (图 5)。



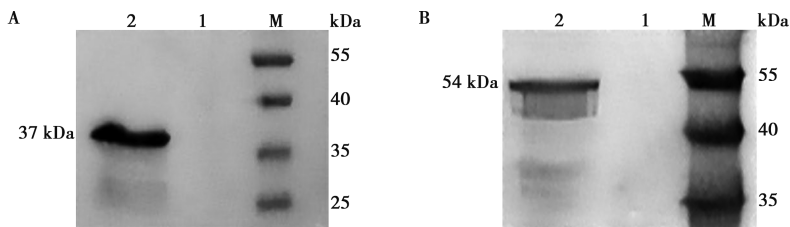
M. DNA Marker; 1. PCR 鉴定; 2. 双酶切鉴定。

图3 重组质粒 pET32a-F17A (A) 和 pET32a-F17G (B) 的 PCR 鉴定及酶切鉴定



M. 蛋白 Marker; 1. pET-32a/BL21 (DE3); 2. 未诱导重组菌; 3. 诱导后重组菌。

图4 重组蛋白 F17A (A) 和 F17G (B) SDS-PAGE 检测



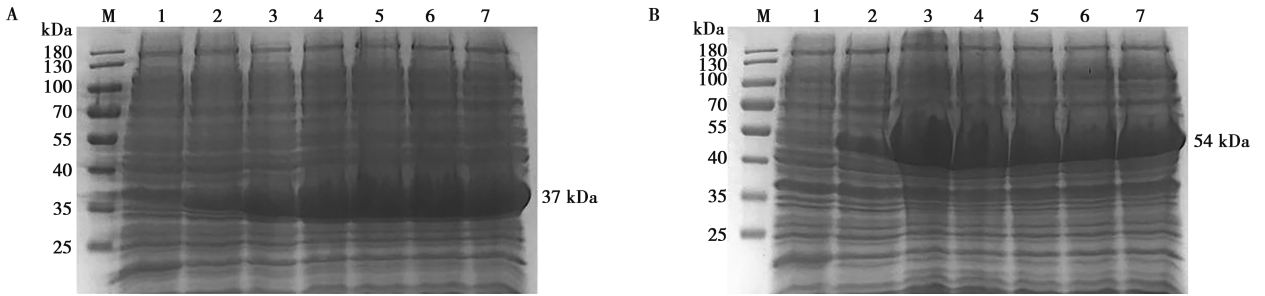
M. 蛋白 Marker; 1. pET-32a/BL21 (DE3); 2. 目的蛋白。

图5 重组蛋白 F17A (A) 和 F17G (B) Western blot 验证

### 2.2.3 蛋白表达条件的优化

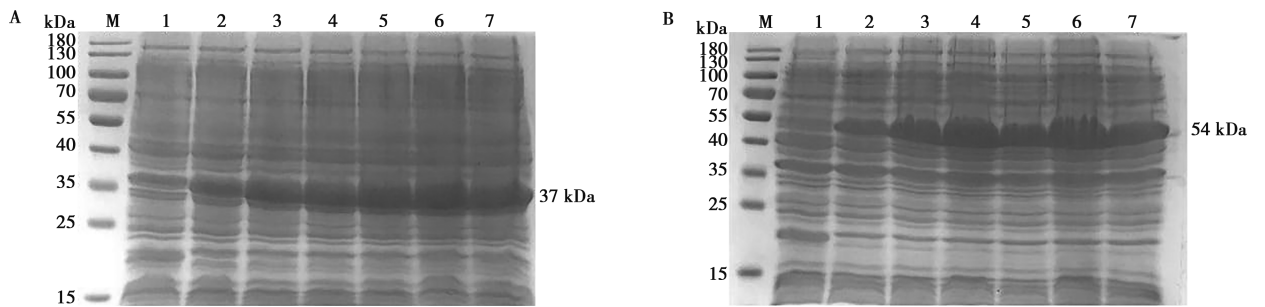
将 IPTG 以浓度梯度对 2 种蛋白进行诱导, 结果显示, F17A 蛋白在 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L 时条带最为明显, F17G 蛋白在 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L

时条带最为明显 (图 6); 分别以 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L、0.2 mmol/L 对 F17A、F17G 蛋白诱导不同时间, 结果显示 2 种蛋白均在诱导 8 h 时条带最为明显 (图 7)。



M. 蛋白 Marker; 1. pET-32a/BL21 (DE3); 2. 未诱导重组菌; 3~7. 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白。

图 6 重组蛋白 F17A (A) 和 F17G (B) IPTG 诱导浓度优化



M. 蛋白 Marker; 1. pET-32a/BL21 (DE3); 2. 未诱导重组菌; 3~7. 分别为 2、4、6、8、10 h 诱导重组蛋白。

图 7 重组蛋白 F17A (A) 和 F17G (B) 诱导时间的优化

### 2.3 蛋白免疫原性分析

#### 2.3.1 特异性 IgG 抗体水平动态监测

通过间接 ELISA 方法对免疫小鼠不同时期的 IgG 抗体效价进行检测。结果显示，2 种重组蛋白均可诱导小鼠产生特异性抗体，其中 F17A 蛋白低剂量免疫组和高剂量免疫组的抗体效价在初次免疫后 14 d 达到最高，分别为 1 : 16 000 和 1 : 32 000，之后随着免疫时间的增加抗体效价呈现逐步下降的趋势；F17G 蛋白低剂量免疫组抗体效价随着免疫次数和时间的增加逐步上升，在二次免疫后 21 d 最高可达 1 : 25 600，而 F17G 蛋白高剂量免疫组抗体效价在二次免疫后 7 d 达到最高为 1 : 32 000，随后逐步下降（图 8）。

#### 2.3.2 免疫小鼠血清细胞因子检测

取免疫小鼠不同时间段的血清进行细胞因子检测，结果显示，F17A 和 F17G 免疫组小鼠血清中的 CD4 水平在首免后 7 d 显著升高 ( $P < 0.001$ )，随后短暂下降，在二免后 7 d（即首免后 21 d）再次升高，但维持时间较短，在首免后 35 d 与对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ )；2 个免疫组小鼠血清中的 CD8 水平在首免后 7 d 显著升高 ( $P < 0.05$ )，且随免疫时间的延长在一定水平保持稳定；F17A 和 F17G

免疫组 IL-4 水平在首免后 7 d 达到峰值，与对照组相比差异显著 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )，随后逐渐下降，但在首免后 35 d 仍与对照组存在显著差异；2 个免疫组的 IFN- $\gamma$  水平整体均呈现先升高后降低的动态变化趋势，其中 F17A 低剂量免疫组 IFN- $\gamma$  水平在首免后 35 d 与对照组差异不再显著；2 个免疫组在免疫前期 TNF- $\alpha$  水平与对照组相比均无显著性差异，自首免后 28 d（即二免后 14 d）开始逐渐出现显著性差异，在首免后 35 d，各免疫组 TNF- $\alpha$  水平与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )（图 9）。

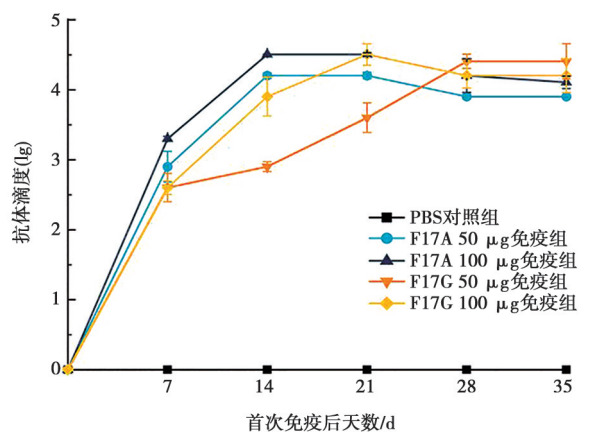
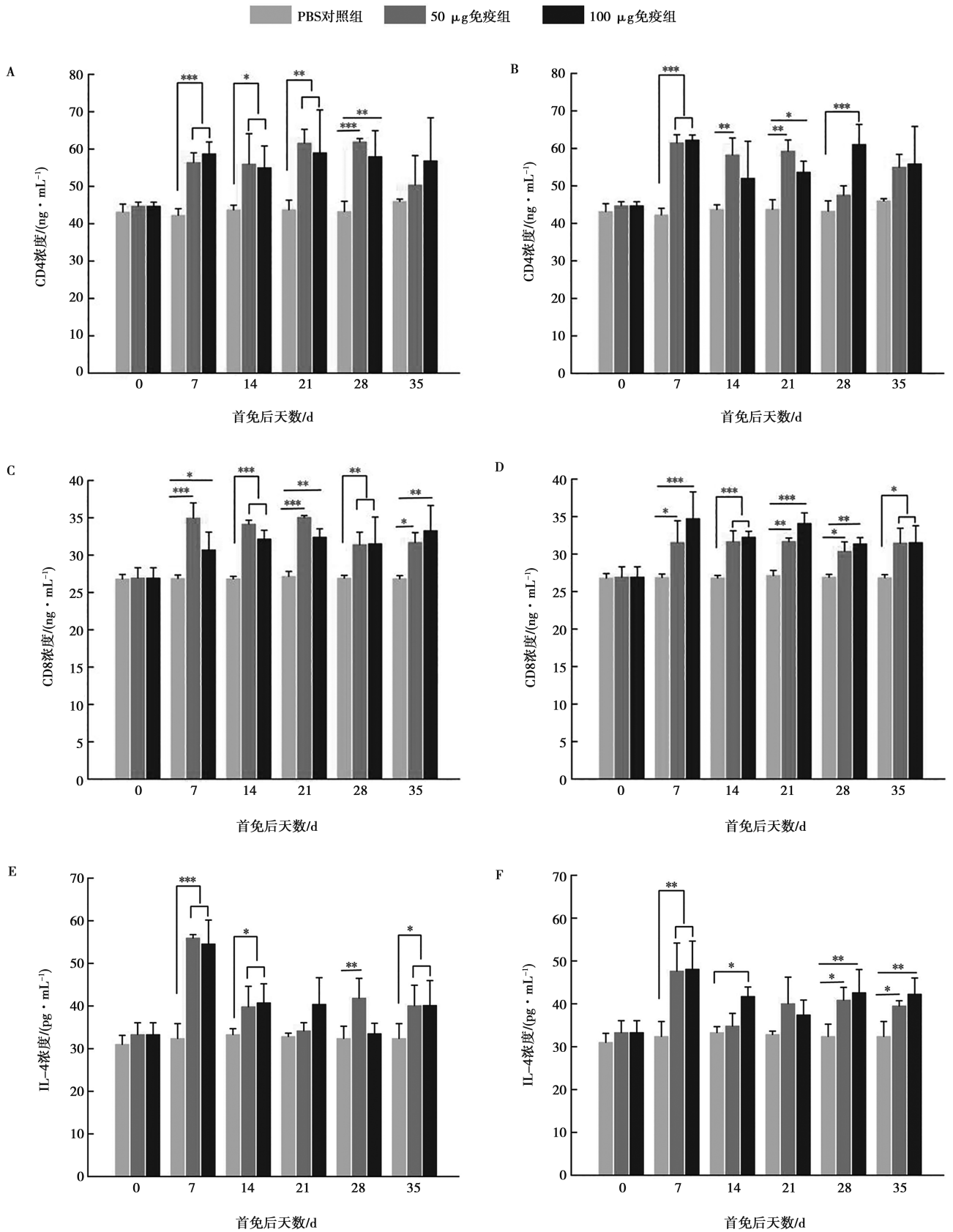
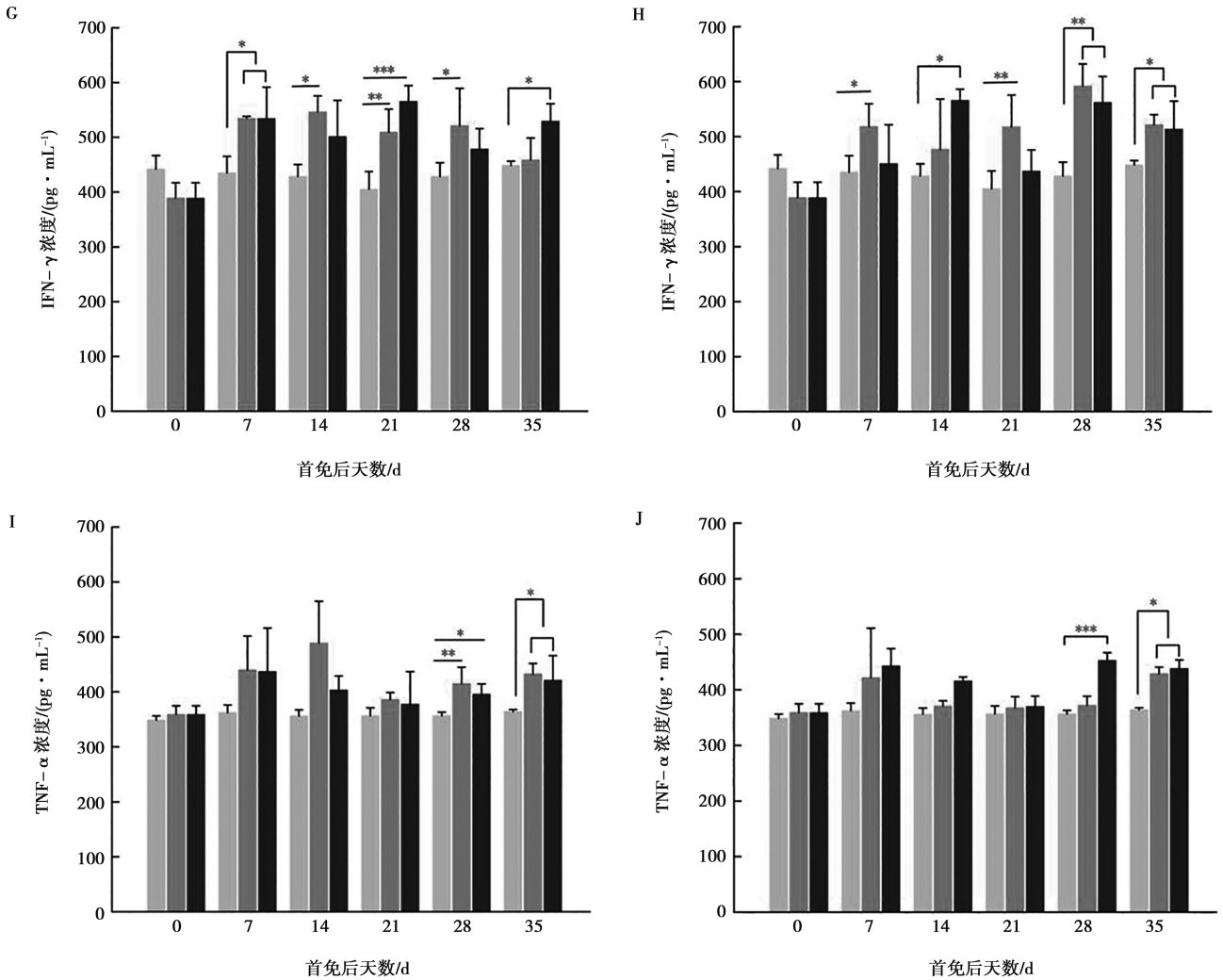


图 8 免疫小鼠特异性 IgG 抗体水平动态曲线





A、C、E、G、I. F17A 蛋白免疫组；B、D、F、H、J. F17G 蛋白免疫组。\* 表示  $P < 0.05$ ，\*\* 表示  $P < 0.01$ ，\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 11 免疫小鼠细胞因子检测

### 2.3.3 菌液 MLD 的确定

用不同浓度的菌液对小鼠进行皮下注射，7 d 内  $8 \times 10^8$  CFU 浓度注射组小鼠全部死亡，确定该浓度为大肠杆菌 QML2206-1 菌株的 MLD (表 1)。

表 1 菌液 MLD 测定结果 ( $n=5$ )

注射菌量/CFU	小鼠死亡数量/只
$0.8 \times 10^8$	0
$1.6 \times 10^8$	2
$4 \times 10^8$	4
$8 \times 10^8$	5

### 2.3.4 小鼠攻毒保护试验

二免后 21 d 分别用 MLD ( $8 \times 10^8$  CFU)、1.5 MLD ( $12 \times 10^8$  CFU)、2 MLD ( $16 \times 10^8$  CFU)、2.5 MLD ( $20 \times 10^8$  CFU) 4 个攻毒剂量对各组小鼠经皮下注射攻毒。结果显示，攻毒 14 d 后，PBS 对照组小鼠全部死亡，与对照组相比各剂量组免疫小鼠均能产生较好的免疫保护效果。除 F17A 高剂量免疫组最高仅能保护小鼠抵抗 1.5 MLD 攻毒菌量外，其余免疫组小鼠对 4 种攻毒菌量的存活率均为 100% (表 2)。

表2 小鼠攻毒保护试验结果 (n=5)

组别	攻毒菌量/CFU	存活率/%
PBS 对照	8×10 <sup>8</sup>	0
	12×10 <sup>8</sup>	0
	16×10 <sup>8</sup>	0
	20×10 <sup>8</sup>	0
F17A 50 μg 免疫	8×10 <sup>8</sup>	100
	12×10 <sup>8</sup>	100
	16×10 <sup>8</sup>	100
	20×10 <sup>8</sup>	100
F17A 100 μg 免疫	8×10 <sup>8</sup>	100
	12×10 <sup>8</sup>	100
	16×10 <sup>8</sup>	0
	20×10 <sup>8</sup>	0
F17G 50 μg 免疫	8×10 <sup>8</sup>	100
	12×10 <sup>8</sup>	100
	16×10 <sup>8</sup>	100
	20×10 <sup>8</sup>	100
F17G 100 μg 免疫	8×10 <sup>8</sup>	100
	12×10 <sup>8</sup>	100
	16×10 <sup>8</sup>	100
	20×10 <sup>8</sup>	100

### 3 讨论

在牦牛养殖过程中,由致病性大肠杆菌引起的牦牛腹泻极为常见,其发病率和病死率都较高。尽管疫苗接种被认为是防控此类疾病的有效策略之一,但由于大肠杆菌血清型的高度多样性及其从非致病性菌株向强致病性菌株演化的遗传可塑性,目前尚未成功研制出具有广谱保护效力的预防性疫苗<sup>[12]</sup>。亚单位疫苗是基于DNA重组技术,将病原微生物当中具有免疫原性的特定抗原基因在体外进行表达,再经过分离纯化蛋白作为抗原进行免疫,并以其作为免疫原诱导宿主体内产生特异性免疫应答,从而实现免疫保护作用的一种疫苗策略<sup>[13-14]</sup>。与传统灭活苗相比,亚单位疫苗具有成本低、产量高、副作用少等优点。F17菌毛作为与犊牛腹泻高度相关的菌毛黏附素,利用其作为免疫原的相关研究报道较少。因此,基于F17蛋白开发针对预防牦牛致病性大肠杆菌腹泻疾病的亚单位疫苗具有可行性。本研究利用从牦牛粪便中分离的致病性大肠杆菌,对F17菌毛的2个主要亚基F17A和F17G蛋白进行生物信息学分析和原核表达,发现2种蛋白均具备成为优势抗原的条件,经SDS-PAGE和Western blot鉴定确定表达了该蛋白,并对其诱导

条件进行了优化,发现F17A蛋白在37℃下IPTG终浓度0.8 mmol/L诱导8 h表达量最大;F17G蛋白在37℃下IPTG终浓度0.2 mmol/L诱导8 h表达量最大。

为探究获得的F17A和F17G蛋白的免疫原性,本研究用高(100 μg/只)、低(50 μg/只)2个剂量对小鼠进行2次免疫,初次免疫后,各免疫组小鼠IgG抗体水平均明显上升,F17A蛋白低剂量免疫组和高剂量免疫组IgG抗体效价最高可达1:16 000和1:32 000;F17G蛋白低剂量免疫组和高剂量免疫组IgG抗体效价最高可达1:25 600和1:32 000,说明2种蛋白均能在小鼠体内产生良好的免疫应答,诱导小鼠产生保护性抗体。尽管亚单位疫苗在安全性和稳定性方面表现优异,但其免疫原性相对较弱,其免疫效力的优化依赖于免疫程序的合理设计以及佐剂的选择与配伍,以实现长效免疫应答和免疫原性的有效增强<sup>[15]</sup>。本研究发现4个免疫组中,除F17G低剂量组的IgG抗体效价随免疫时间的增加呈逐步上升的趋势外,其余3组IgG抗体效价随免疫时间的增加均呈现先上升后下降的趋势,这可能与免疫次数、佐剂类型有关,后续试验将通过添加不同赋形剂、增加免疫次数等方式进一步提高其免疫效果。

T细胞介导的细胞免疫应答主要包含2种基本形式,一种为迟发型超敏反应T细胞(DTH, CD4<sup>+</sup>),其通过分泌特异性细胞因子参与抗原识别与免疫调控;一种为细胞毒性T细胞(TC, CD8<sup>+</sup>),其能够通过特异性识别并杀伤靶细胞,在细胞免疫中发挥直接效应功能。CD4<sup>+</sup>Th细胞活化后可分化为Th1细胞和Th2细胞,其中Th1细胞分泌Th1型细胞因子,如IFN-γ、TNF-α等,发挥细胞免疫作用;Th2细胞分泌Th2型细胞因子,如IL-4、IL-5等,发挥体液免疫作用<sup>[16-17]</sup>。本研究检测了不同免疫阶段小鼠血清中5种细胞因子(CD4、CD8、IL-4、IFN-γ、TNF-α)的水平,各免疫组细胞因子的水平均显示出不同的动态变化,与对照组相比差异显著,说明免疫重组蛋白F17A和F17G能刺激小鼠产生细胞免疫和体液免疫。攻毒保护试验是评价疫苗免疫效果的重要指标,本研究在二次免疫后21 d分别用4个浓度梯度的大肠杆菌(QML2206-1)对小鼠进行攻毒,结果显示,除F17A高剂量免疫组最高仅能保护小鼠抵抗1.5 MLD攻毒菌量外,其余免疫组小鼠对4种攻毒菌量的存活率均为100%,说明F17A和F17G重组蛋白对小鼠有一定的免疫保护效果,但对于F17A高剂量免疫组相比低剂量组攻毒保护效果较差,推测其原因可能是高剂量抗原产生了大量针对非关键表位的抗体或过度刺激B细胞导致产生的抗体亲和力不足,而

F17G 蛋白高、低剂量免疫组均有较好的攻毒保护效果可能与其有更加稳定的构象或更容易被抗原呈递细胞加工的关键表位有关。根据这一试验结果, 后续试验可通过验证 F17A 蛋白免疫机制、优化 F17A 剂量与佐剂组合、解析 F17G 蛋白结构优势等方式进一步提高其免疫效果, 并可结合二者优势开发 F17A 蛋白和 F17G 蛋白嵌合抗原。

综上所述, 本研究成功表达了大肠杆菌 F17A 和 F17G 蛋白, 通过免疫小鼠对 2 种蛋白的免疫效果进行了初步评价, 证明其可诱导小鼠产生体液免疫和细胞免疫, 并对小鼠提供有效的免疫保护, 为后续疫苗的开发提供了基础数据及技术支持。

## 参考文献:

- [1] 罗润波, 吴丹, 蔡重振, 等. 青藏高原地区牦牛的牛病毒性腹泻流行病学调查及疫苗免疫保护期研究 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55 (8): 79-85.
- [2] 马丁允, 李森阳, 陈九思, 等. 牦牛腹泻的病因及中药防治现状 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (7): 119-123.
- [3] 周洪婷, 陈姝宇, 辛娇娇, 等. 牦牛腹泻源大肠杆菌 O 抗原血清型鉴定与 HPI 相关基因检测 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024 (14): 111-117.
- [4] BIHANNIC M, GHANBARPOUR R, AUVRAY F, et al. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle [J]. Vet Res, 2014, 45 (1): 76.
- [5] GHANBARPOUR R, OSWALD E. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran [J]. Res Vet Sci, 2010, 88 (1): 6-10.
- [6] BERTIN Y, MARTIN C, OSWALD E, et al. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34 (12): 2921-2928.
- [7] 刘嘉利, 侯美佳, 赵佳慧, 等. 产肠毒素大肠杆菌 F17 菌毛黏附亚基单克隆抗体的制备及其抗原表位分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44 (11): 1208-1215.
- [8] BUTS L, BOUCKAERT J, DE GENST E, et al. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic *Escherichia coli* has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine [J]. Mol Microbiol, 2003, 49 (3): 705-715.
- [9] DHEHIBI A, TERRAK M, SEDDIK M M, et al. Development of a bispecific nanobody anti-F17 Fimbria as a potential therapeutic tool [J]. Protein Expr Purif, 2024, 215: 106411.
- [10] DUBREUIL J D. Pig vaccination strategies based on enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins [J]. Braz J Microbiol, 2021, 52 (4): 2499-2509.
- [11] 林海, 涂飞, 李楠, 等. 布鲁氏菌 BP26 蛋白细菌样颗粒疫苗的制备和免疫学评价 [J]. 中国兽医杂志, 2024, 60 (6): 37-46.
- [12] 海永慧, 钦倩, 李蓓蓓, 等. 牛源致脑炎大肠杆菌多表位抗原的制备及免疫效果的初步评价 [J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2022, 40 (2): 193-197.
- [13] 蒋倩, 闵芳, 马志刚, 等. 牛冠状病毒 N 蛋白的原核表达及对小鼠免疫原性的初步评价 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (12): 2540-2548.
- [14] 汪梦竹, 蒲飞洋, 赵泽阳, 等. 新型疫苗的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (9): 141-147.
- [15] WANG N, SHANG J, JIANG S, et al. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 298.
- [16] 彭勤, 曹伟军, 杨帆, 等. STING agonist 22 免疫增强剂配伍 ASFV P30 蛋白对猪免疫效果的评价 [J]. 中国兽医科学, 2024, 54 (9): 1137-1148.
- [17] DONG C, FLAVELL R A. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses [J]. Arthritis Res, 2000, 2 (3): 179-188.