

支气管败血波氏杆菌外膜蛋白的提取 及其免疫效果的检测

肖海君 闫振贵 崔金生 刘冠华 王小娥 杨春晓 朱瑞良*

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘要: 本研究以小鼠为实验动物模型, 研究支气管败血波氏杆菌的外膜蛋白(OMP)和其中的有效保护抗原成分(OMP68)的免疫原性及免疫保护作用。本研究利用改进的Wooldridge的方法提取了支气管败血波氏杆菌P11 和P13 的OMP, 利用SDS-PAGE比较了 2 株之间差异, 采用Western-blotting进行了分析并确定了P13 菌株OMP(P13-OMP)中的有效保护性抗原成分, 采用电洗脱方法获的分子量为 68 kD的P13-OMP有效保护抗原成分(OMP68), 然后制备了油乳剂P13的全菌、P13-OMP和OMP68免疫抗原。抗体动态变化: 将清洁级小鼠 70 只随机分成 7 组, 10 只/组, 用油乳剂P13 的全菌和不同剂量的P13-OMP和OMP68 免疫抗原分别免疫, 采用间接 ELISA 检测免疫小鼠的相应抗体水平并分析抗体动态变化; 主动免疫保护试验: 将清洁级小鼠 80 只随机分成 8 组, 10 只/组, 分别采用制备的油乳剂P13-OMP($25 \mu\text{g}/\text{只}$)、OMP68($25 \mu\text{g}/\text{只}$)和P13 菌体免疫抗原在免疫 10 d后, 分别用 100 LD₅₀的P11 和P13 腹腔攻毒, 然后统计保护率并分析免疫原所提供的免疫保护力。免疫P13-OMP和OMP68 油乳剂抗原后, 7 d时, 抗体水平开始逐渐上升, 42 d时, 抗体水平分别达到 $2^{15.3}$ 和 $2^{14.8}$, 然后逐渐下降, 70 d时, 抗体水平分别达到 $2^{9.1}$ 和 $2^{10.2}$ 。主动免疫时, P11 和P13 攻毒的P13-OMP免疫组分别均得到 9/10 和 9/10 的保护, OMP68 免疫组分别均得到 9/10 和 10/10 的保护, 而P13 全菌免疫组分别得到 4/10 和 6/10 保护, 对照组全部死亡。P13-OMP 和OMP68 抗原均具有良好的免疫原性和免疫保护作用, 为支气管败血波氏杆菌OMP亚单位疫苗的研制奠定了良好的理论基础。

关键词: 支气管败血波氏杆菌, 小鼠, 外膜蛋白, 免疫原性

Extraction and Detect on Immunization of Outer Membrane Protein of *Bordetella bronchiseptica*

XIAO Hai-Jun YAN Zhen-Gui CUI Jin-Sheng LIU Guan-Hua

WANG Xiao-E YANG Chun-Xiao ZHU Rui-Liang*

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: In order to evaluate the immunogenicity and their protection of outer membrane protein of *Bordetella bronchiseptica* and effective antibody (OMP68, we established a mice model. The research improved

on the method of Wooldridge in order to extract OMP of *Bordetella bronchiseptica* (P13, P11), and the differences of OMP were analyzed by SDS-PAGE. The P13-OMP was analyzed with Western blotting and OMP68 was gained by the way of electrophoretic elution. Then we made the effective antibodies of P13-OMP. Then P13-OMP, OMP68 and whole-cell bacterin (WCB) immunizing antigen was prepared 70 mice were equally assigned to 7 groups at random. They were immunized by P13-OMP, OMP68 and P13-WCB of different dose respectively. The indirect ELISA was used to detect antibody responses. 80 mice were equally assigned to 8 groups at random. Group a and b were immunized by P13-OMP (25 μ g) respectively. Groups c and d were immunized by OMP68(25 μ g); Groups e and f were immunized by WCB(P13). Ten days after the immunizations, group a, c, e and f were challenged with P13. The other groups were challenged with P11. Then we registered the rate of protective potency and evaluated protection given by P13-OMP, OMP68 and P13-WCB. Results showed that at 42th day, the titer of serum reach the top: P13-OMP($2^{15.3}$)> OMP68($2^{14.8}$). Then, the titer of serum started the slow-moving descent At 70th day, the titer of serum reach the OMP68 ($2^{10.2}$)> P13-OMP ($2^{9.1}$). P13-OMP and OMP68 group challenged with P13 and P11 can be effectively protected; P13-WCB group challenged with P13 and P11 can not be effectively protected; the control group were died out. The P13-OMP and OMP68 of *Bordetella bronchiseptica* has good immunogenicity and protection, so the results of this study lay good theoretical foundation for OMP subunit vaccine.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, Mice, Immunogenicity, OMP

支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)是一种重要的病原菌, 可感染包括猪、犬、兔在内的多种哺乳动物, 造成急慢性的呼吸道疾病^[1-5], 并且也可感染人, 尤其是免疫力低下的人群^[6,7]。此外, 机体感染该菌后, 往往容易继发或并发感染其他细菌和病毒, 导致更严重的呼吸道疾病^[8,9], 给动物健康造成严重的危害, 带来严重的经济损失。

近年来, 细菌细胞膜中的一种重要组成成分外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)的免疫作用越来越受到科技人员的关注。实验证明, OMP具有良好的免疫原性, 不仅可刺激机体产生良好的体液免疫反应, 而且也可产生细胞免疫反应^[10], 减少疫苗的副作用。目前, 支气管败血波氏杆菌OMP作为一种潜在的重要抗原, 一些科学家只是进行了初步的研究^[11-15], 很多问题仍待解决。本课题研究支气管败血波氏杆菌的OMP的提取方法, 利用免疫印迹试验(Western-blotting)确定支气管败血波氏杆菌P13菌株的OMP(P13-OMP)中有效抗原成分, 并根据Western-blotting结果, 利用电洗脱(Electric elution)方法获得支气管败血波氏杆菌P13-OMP中有效抗原成分OMP68(P13-OMP中分子量为68 kD的有效抗原成分), 通过主动免疫后的抗体动态检测和保护试验分析其免疫原性及其免疫保护效果, 从而为兔支气管败血波氏杆菌OMP亚单位疫苗的研制奠定了良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要菌株: 兔源性支气管败血波氏杆菌P11株(LD₅₀为 5.1×10^5 CFU), 由扬州大学兽医学院微生物实验室惠赠, 兔源性P13株(LD₅₀为 4.8×10^5 CFU)为本研究室分离、鉴定并保存。

1.1.2 实验动物: 清洁级小鼠(18 g/只~23 g/只), 购自山东泰邦生物制品公司。

1.1.3 主要培养基: 血红素喹啉酮改良麦康凯琼脂(HFMA)培养基, 绵羊血改良鲍姜氏琼脂(B-G)培养基, SS液体培养基, 由本实验室按常规方法制备。

1.1.4 主要试剂和仪器: 曲拉通 X-100、10#白油、Span-80、Tween-80、硬脂酸铝购自天津大学实验化工厂; Acr—Bis、SDS、硫酸铵、TEMED、考马斯亮蓝 R-250 购自 Sigma 公司; 可见分光光度计购自英国 JENWAY 公司; 电泳仪和转印电泳仪均购自北京六一仪器厂; 电洗脱仪、酶标仪和凝胶成像及分析系统均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 OMP的提取: 取支气管败血波氏杆菌菌株 P11、P13 划线接种于B-G培养基中 37 °C 培养 48 h。按照加以改进的Wooldridge等^[16]的方法, 获得支气管败血波氏杆菌OMP的粗提物, 经过透析处理后, 分装, 置-20 °C 保存备用。参照Bradford^[17]方法测出

样品中的OMP含量。

1.2.2 OMP SDS-PAGE电泳: 参照Lameli^[18]方法, 采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳, 以商品化的低分子量标准蛋白的对数值和电泳迁移率绘制标准曲线, 求出各分离蛋白的分子量。

1.2.3 OMP Western-blotting 分析: 参照文献[19]方法, 其中一抗使用在兔抗 P13-OMP 血清, 37 °C 孵育 2 h, 洗膜, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, DAB 显色, 在凝胶成像及分析系统拍照并分析。

1.2.4 OMP68 的纯化: 参照文献[20]方法, 将含 OMP68 目的蛋白的凝胶切下, 用蒸馏水洗涤 3 次, 用电洗脱仪(ATTO)从凝胶带中纯化OMP68, 冷的无水乙醇进行浓缩, SDS-PAGE电泳和Western-blotting 鉴定洗脱产物, 鉴定后正确产物经过透析处理后, 分装, 置-20 °C 备用。参照Bradford^[17]方法测出样品中的OMP68 含量。

1.2.5 抗体动态检测

1) OMP免疫原的制备^[21]: 提取的P13-OMP和 OMP68 用灭菌生理盐水稀释至 100 µg/mL; 使用前将白油佐剂和抗原在 30 °C 左右预热, 然后将佐剂和抗原按 3 : 1 的体积比进行混合乳化, 经常规检验合格后备用。

2) 全菌免疫原的制备^[22]: 分离菌P13 纯培养物接种于SS液体培养基, 37 °C 振荡培养 36 h~48 h, 通过细菌计数, 将菌液浓度调整为 150 亿/mL, 0.5% 甲醛溶液灭活, 然后与高压灭菌的油佐剂按 1 : 3 的比例乳化, 制备成油乳剂灭活苗, 经常规检验合格后备用。

3) 小鼠免疫接种及其血清抗体的 ELISA 检测: 将清洁级小鼠 70 只随机分成 7 组, 10 只/组, 免疫组 a、b、c 分别每只接种 P13-OMP 10 µg、25 µg、35 µg, 免疫组 d、e、f 分别每只接种 OMP68 10 µg、25 µg、35 µg, d 组用全菌免疫原免疫, 0.2 mL/只。每组均在 1 d、15 d、29 d 进行 3 次免疫。4 个组均从第 1 次免疫后的 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d、49 d、56 d、63 d、70 d 采血、分离血清。用间接 ELISA 法测定血清中的中和抗体效价, 然后计算中和抗体的几何平均数(GMT), 研究其抗体动态变化。

1.2.6 主动免疫保护效果检测: 将清洁级小鼠 80 只随机分成 8 组, 10 只/组, 免疫组a和b每次分别

免疫P13-OMP 25 µg/只, 免疫组c和d每次分别免疫 OMP68 25 µg/只, 免疫组e和f分别免疫P13 全菌免疫原 0.2 mL/只, 对照组g和h不免疫。免疫组免疫 10 d后, a、c、e和g组分别用P13 腹腔攻毒, b、d、f和h组分别用P11 腹腔攻毒, P11 和P13 的用量都为 100 LD₅₀。攻毒后, 观察 7 d, 统计各组保护率, 同时从死亡小鼠的气管、扁桃体、肺脏和鼻腔等分离病原并进行鉴定。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳结果表明(图 1): P11 株、P13 株均含有相对分子量为 94 kD、85 kD、68 kD、49 kD 和 46 kD 的 5 条蛋白主带; P13 株还有 37 kD、33 kD 和 21 kD 蛋白带。P13 株相对于 P11 株蛋白主带颜色深浅有一定差异。

2.2 Western-blotting 结果

如图 2 所示, 兔抗 P13-OMP 血清主要识别 94 kD、68 kD、49 kD、46 kD、33 kD 和 21 kD 蛋白带, 但颜色深浅程度存在一定的差异。

2.3 OMP68 的纯化和鉴定结果

SDS-PAGE 电泳结果表明(图 3): 采用电洗脱方法从 P13-OMP 中纯化获得分子量约为 68 kD 的 OMP68 的外膜蛋白。Western-blotting 结果表明(图 4): 兔抗 P13-OMP 血清在 68 kD 处与 OMP68 蛋白

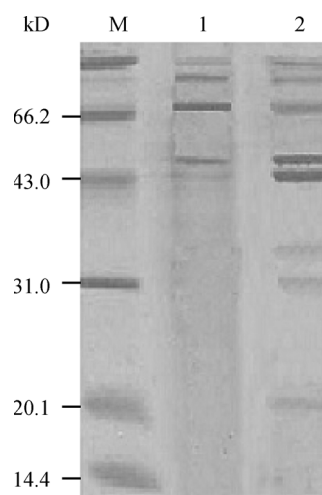


图1 支气管败血波氏杆菌 OMP 的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig. 1 SDS-PAGE of the outer membrane protein of *Bordetella bronchiseptica*

M: Marker; 1: P11 strain; 2: P13 strain

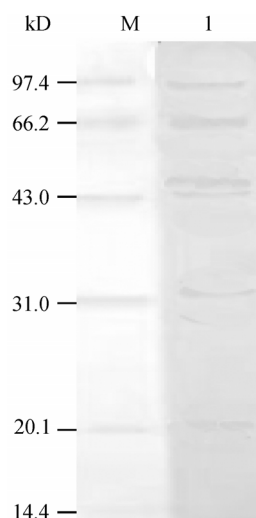


图 2 支气管败血波氏杆菌 P13-OMP 的 Western-blotting 结果

Fig. 2 Western-blotting of the P13-OMP of *Bordetella bronchiseptica*

M: Marker; 1: P13-OMP

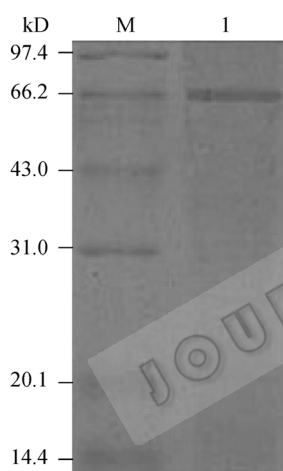


图 3 支气管败血波氏杆菌 OMP68 的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 SDS-PAGE of the OMP68 of *Bordetella bronchiseptica*

M: Marker; 1: OMP68

带有清晰的反应条带。

2.4 抗体动态检测

35 份阴性血清 OD_{450} 平均值在 0.203 左右, 标准方差(s)为 0.034, 临界值=阴性血清平均 OD_{450} 值+3×标准方差(s), 最终确定为 0.305。因此, 确定血清样品的 $P/N \geq 2.1$, 且 $OD \geq 0.305$ 即可判为阳性。以 OD 值大于阴性血清临界值的最大稀释倍数作为该血清的 ELISA 效价(表 1); 并根据血清的 ELISA 效价作出抗 P13-OMP 和 OMP68 的抗体消长规律图

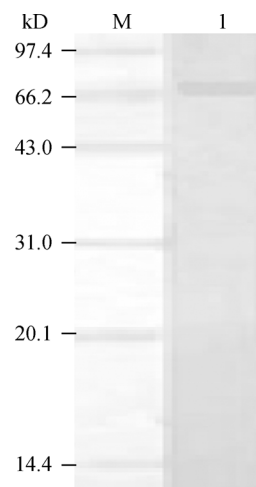


图 4 支气管败血波氏杆菌 OMP68 的 Western-blotting 结果

Fig. 4 Western-blotting of the OMP68 of *Bordetella bronchiseptica*

M: Marker; 1: OMP68

(图 5)。

2.5 主动免疫保护试验

攻毒后, 小鼠的主动免疫保护试验结果见表 2。由表 2 可以看出 a 组和 b 组 36 h 时各有 1 只出现死亡; c 组没出现死亡, d 组 36 h 时有 1 只出现死亡; 而 e 组和 f 组 12 h 后出现死亡, 36 h 停止死亡, 最后统计死亡只数/总数分别为 4/10 和 6/10; 对照组 g 组和 h 组在 12 h 内全部死亡, 死亡率 100%。小鼠死前都表现为精神沉郁、反应迟钝、呼吸困难、活动明显减少、离群独处直至死亡。死亡鼠剖检均为脾脏萎缩和肺炎病变; 分离的细菌经鉴定与接种菌一致^[1]。

3 讨论

目前, 对于支气管败血波氏杆菌感染的防治主要是利用抗生素和全菌灭活疫苗, 但是抗生素的长期使用易使动物产生耐药性, 并且抗生素残留会对人类食品安全构成很大威胁; 同时支气管波氏杆菌全菌菌苗普遍反映保护作用不太理想, Montaraz 等^[14]证实支气管败血波氏杆菌 OMP 主要成分之一的百日咳粘着素(Pertactin P68)免疫小鼠后可以对支气管败血波氏杆菌的感染产生理想的保护作用; 另外 Daniel J Keil 等^[15]证实支气管败血波氏杆菌 OMP 的另一组分丝状血凝素(Filamentous hemagglutinin,

表 1 小鼠免疫支气管败血波氏杆菌 P13-OMP 和 OMP68 后的血清抗体滴度 X±S(每组取 10 只)
Table 1 Serum neutralizing antibody titer of mice after immunization with the P13-OMP and OMP68 of *Bordetella bronchiseptica*

免疫后天数 Days after immunization	分组 Group						
	a	b	c	d	e	f	g
3 d	2.9±0.55	3.5±0.45	3.3±0.71	3.4±0.45	3.4±0.54	3.5±0.45	2.9±0.89
7 d	5.3±0.55	5.1±0.84	4.9±0.55	4.8±0.45	5.5±0.71	5.3±0.71	4.9±0.45
14 d	6.5±0.45	7.9±0.55	7.9±0.89	6.9±0.55	8.9±0.45	8.4±0.84	6.1±0.45
21 d	8.1±0.45	9.5±0.45	9.1±0.84	7.7±0.85	9.8±0.84	8.8±0.89	7.3±0.71
28 d	10.3±0.71	11.6±0.55	11.9±0.45	10.8±0.37	12.0±0.55	11.5±0.89	7.9±0.55
35 d	11.3±0.71	13.8±0.55	12.9±1.14	12.3±0.71	14.0±0.45	13.4±0.14	8.9±0.55
42 d	12.5±0.84	15.3±0.71	14.5±0.45	14.6±0.44	14.8±0.75	14.5±0.35	10.7±0.71
49 d	11.3±1.1	14.9±0.89	12.9±0.55	13.3±0.85	14.4±0.39	13.8±0.85	10.3±1.0
56 d	10.6±0.45	12.1±0.84	10.7±1.1	11.6±0.55	13.8±0.89	11.5±0.13	8.8±0.89
63 d	8.5±0.55	10.5±0.89	9.7±0.89	10.2±0.35	11.3±0.85	10.7±1.1	7.5±0.84
70 d	6.9±0.89	9.1±0.84	8.9±0.55	9.0±0.29	10.2±0.54	9.6±0.45	5.7±0.89

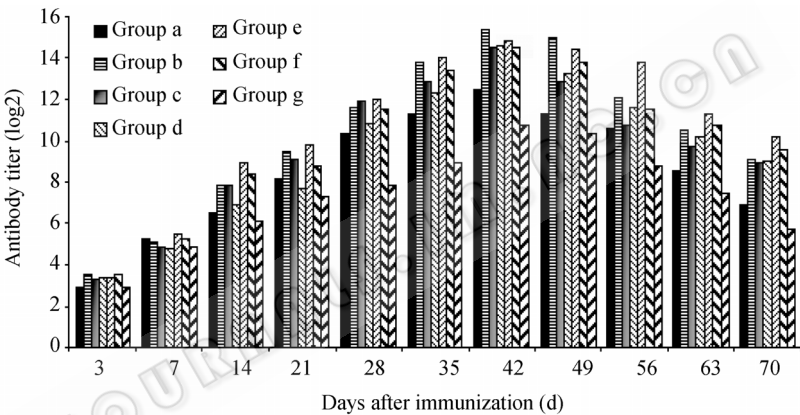


图 5 小鼠免疫支气管败血波氏杆菌 P13-OMP 和 OMP68 后的血清抗体水平动态变化
Fig. 5 Optical density values for serum antibody of mice after immunization with the P13-OMP and OMP68 of *Bordetella bronchiseptica*

表 2 小鼠的主动免疫保护试验
Table 2 Active protective potency of mice

分组 Group	攻毒菌株 Challenge strain	攻毒剂量 Challenge dose	总数 Total	存活只数 Survivors	死亡只数 Death	死亡只数/总数 Dead/total
a	P13	100 LD50	10	9	1	1/10
b	P11	100 LD50	10	9	1	1/10
c	P13	100 LD50	10	10	0	0/10
d	P11	100 LD50	10	9	1	1/10
e	P13	100 LD50	10	6	4	4/10
f	P11	100 LD50	10	4	6	6/10
g	P13	100 LD50	10	0	10	10/10
h	P11	100 LD50	10	0	10	10/10

FHA), 可抑制支气管败血波氏杆菌在成纤维细胞上的定殖, 有效率达到 65%。因此, 以上研究成果为研
究兔源支气管败血波氏杆菌 OMP 在小鼠模型中的免疫效果奠定了良好的理论基础。

本研究所使用的膜蛋白提取方法是对 Wooldridge 等的方法进行了改进, 不再使用超速离心, 改用高速离心, 并且减少了离心的次数, 同时增加了 Triton X-100 对内膜蛋白的消化时间, 使本研究所使用的方法更加省时、省力, 为研究 OMP 的成分及功能奠定了基础。P11 和 P13 的 OMP 的 SDS-PAGE 图谱存在一定的差异, 这可能与菌株的差异有关^[23]。

通过对免疫印迹试验(Western-blotting)结果的分析, 其中在分子量为 94 kD、68 kD、49 kD、46 kD、33 kD 和 21 kD 的蛋白条带处出现了明显的褐色, 这充分说明这 6 种组分是 P13-OMP 的主要保护性抗原。Ben Lugtenberg 等^[24]研究表明的支气管败血波氏杆菌 OMP 中的保护性抗原成分与本研究结果存在较大差异, 这可能与菌株的来源差异和 OMP 的提取方法不同有关。

关于免疫小鼠后抗体的测定, 从图 5 和表 1 可以看出, 7 组产生的抗体水平高低不同, 但抗体的消长规律基本一致; 42 d 时, 以 P13-OMP 免疫组 b (25 μ g/只)产生的抗体水平最高, OMP68 免疫组 e (25 μ g/只)产生的抗体水平次之, 菌体免疫组 d 产生的抗体水平最低; P13-OMP 免疫组 b (25 μ g/只)和 OMP68 免疫组 e (25 μ g/只)高水平抗体维持时间较长, 菌体免疫组 d 维持时间较短。25 μ g 的 P13-OMP 和 OMP68 免疫原为最佳免疫剂量。在小鼠免疫 P13-OMP 和 OMP68 油乳剂抗原后第 7 d 开始, 抗体水平开始逐渐上升, 在免疫后 42 d 时抗体水平分别达到 $2^{15.3}$ 和 $2^{14.8}$, 高抗体水平维持约 4 周的时间, 然后逐渐下降, 免疫后 70 d 时, 免疫 OMP68 油乳剂抗原的抗体水平 ($2^{10.2}$) 比免疫 P13-OMP 油乳剂抗原的抗体水平 ($2^{9.1}$) 明显要高, 但都与免疫后第 21 d 的抗体水平相当。本研究首次验证了兔源支气管败血波氏杆菌 P13-OMP 和 OMP68 均能够诱导机体产生良好的体液免疫反应, 产生较高的抗体水平, 也同时为进一步研究支气管败血波氏杆菌 OMP 免疫保护与 ELISA 血清抗体效价的关系, 确定支气管败血波氏杆菌 OMP 的免疫保护临界值提供了条件。

在主动免疫保护试验中可知, 用 100LD₅₀ 的 P11 和 P13 分别腹腔攻击试验小鼠, P13-OMP 免疫组保护率均为 9/10, OMP68 免疫组保护率分别为 10/10 和 9/10, 而菌体免疫组的保护率分别为 4/10 和 6/10,

空白对照组全部死亡。这充分说明 P13-OMP 和 OMP68 均具有较好的免疫保护作用, 其作用效果明显优于全菌免疫原。

本研究着重对支气管败血波氏杆菌的 OMP 总组分和其中的有效保护性抗原成分诱导机体产生的体液免疫应答在支气管败血波氏杆菌感染中的免疫原性和免疫保护作用进行了对照研究。结果表明, 二者均能够诱导机体良好的体液免疫反应, 产生较高的抗体水平; 同时, 二者均具有较好的免疫保护作用。这将为支气管败血波氏杆菌 OMP 其他有效抗原成分筛选奠定良好的理论基础, 也将对兔源性支气管败血波氏杆菌的亚单位疫苗的研制具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2002, pp.275-277.
- [2] DA Bemis. *Bordetella* and *Mycoplasma* respiratory infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1992, **22**: 1173-1186.
- [3] ET Harvill, P Cotter, J Miller, *et al.* Comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect Immun*, 1999, **67**: 6109-6118.
- [4] SL Brockmeier, KB Register. Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 2007, **125**(3-4): 284-289.
- [5] LE Friedman, MT Messina, L Santoferrara, *et al.* Characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers. *Veterinary Microbiology*, 2003, **117**(2-4): 313-320.
- [6] Mesnard R, Gusio N, Michelet C, *et al.* Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1993, **12**: 304-306.
- [7] M Llombart, E Chiner, C Senent. Necrotizing Pneumonia Due to *Bordetella bronchiseptica* in an Immunocompetent Woman. *Archivos de Bronconeumologia*, 2006, **42**(5): 255-256.
- [8] Susan L Brockmeier. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, 2004, **99**: 75-77.
- [9] Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR, *et al.* Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or

- acomination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. *Am J Vet Res*, 2001, **62**: 521–525.
- [10] 赵香汝, 杨汉春. 细菌外膜蛋白的研究现状. *中国兽医杂志*, 1997, **12**(23): 41–42.
- [11] Beatriz N Passerini de Rossi, Laura E Friedman, Cora B Belzoni, *et al.* vir90, a virulence-activated gene coding for a *Bordetella pertussis* iron-regulated outer membrane protein. *Research in Microbiology*, 2003, **154**(6): 443–450.
- [12] Kobisch M, Novotny P. Identification of a 68-kilo dalton outer membrane protein as the major Protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific pathogen free piglets. *Infect Immun*, 1990, **58**: 352–357.
- [13] Lakshmi Gopinathan, Girish S Kirimanjeswara, Daniel N Wolfe, *et al.* Different mechanisms of vaccine-Induced and infection-induced immunity to *Bordetella bronchiseptica*. *Microbes and Infection*, 2007, **9**(4): 442–448.
- [14] Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 1985, **47**: 744–751.
- [15] Daniel J Keil, Eugene H Burns Jr, William R Kisker, *et al.* Cloning and immunologic characterization of a truncated *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin fusion protein. *Vaccine*, 2000, **18**: 860–886.
- [16] Wooldridge KG, Williams PH. Sensitivity of *Escherichia coli* to cloacin DF13 involves the outer membrane protein
- OmpF. *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**(8): 2420–2424.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [18] Lameli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970: **227**: 680–685.
- [19] Walker JM. The protein protocols handbook. Totowa. New jersey: Human press, 2002, pp.317–319.
- [20] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 刘祝祥, 李 科, 等. 猪丹毒丝菌 C43311 株 spaA 基因 N 端免疫保护区的克隆与表达. *微生物学报*, 2008, **48**(2): 207–212.
- [21] 胡晓娜, 朱瑞良, 刘红珍, 等. 禽波氏杆菌外膜蛋白的提取及其免疫原性的检测. *微生物学报*, 2007, **47**(4): 714–717.
- [22] 张培君, 龚玉梅. 胶体磨制作油乳剂灭活苗工艺探讨. *中国兽药杂志*, 1997, **31**(2): 43.
- [23] 张晓华, Robertson P, Austin B, 等. 弧菌标准菌株外膜蛋白的比较研究. *微生物学报*, 1997, **37**(6): 449–454.
- [24] Ben Lugtenberg, Ria van Boxtel, Renée van den Bosch, *et al.* Biochemical and immunological analyses of the cell surface of *Bordetella bronchiseptica* isolates with special reference to atrophic rhinitis in swine. *Vaccine*, 1984, **4**(2): 265–273.

新辟栏目介绍

显微世界

“显微世界”栏目将刊出一些精美清晰的显微照片,带您走进显微镜下的微生物世界,希望在阅读期刊相关科学新进展的同时,给您带来一种愉悦的科学艺术视觉享受。同时欢迎广大作者、读者朋友积极为我们推荐或提供高质量、高清晰的显微照片(提供者保证该图片无任何知识产权问题)。