

表达 ApxIA 的血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌弱毒菌株的构建及特性分析

刘金林^{1,2*}, 陈砚^{1*}, 胡琳琳¹, 贝为成¹, 陈焕春¹

1 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

2 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

摘要: 猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌引起的一种高度接触传染疾病, 严重阻碍着全球养猪业的发展, 疫苗接种是控制该病的有效措施。为提高胸膜肺炎放线杆菌弱毒疫苗的免疫效力, 以及探索胸膜肺炎放线杆菌弱毒疫苗作为呼吸系统病原疫苗载体的可行性, 通过穿梭质粒 pJFF224-XN 将完整的 *apxIA* 基因导入 *apxIIC* 基因缺失突变株 HB04C- 中, 构建了含有 *apxIA* 和 *apxIIA* 基因的弱毒疫苗菌株 HB04C2 (*apxIIC*⁻/*apxIIA*⁺/*apxIA*⁺)。通过对 HB04C2 的生物学特性分析发现, 穿梭质粒可稳定传代, 并表达 ApxIA, 其生长特性未受穿梭质粒的影响。将 HB04C2 以气管接种方式免疫仔猪, 可产生针对 ApxIA 和 ApxIIA 的抗体。二免后 2 周以高致病性的血清 1 型胸膜肺炎放线杆菌攻毒, 该弱毒疫苗可提供良好的免疫保护效果。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌, 弱毒疫苗, 多价疫苗, 载体

Construction and characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 live attenuated vaccine strain co-expressing ApxIA

Jinlin Liu^{1,2*}, Yan Chen^{1*}, Linlin Hu¹, Weicheng Bei¹, and Huanchun Chen¹

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2 College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

Abstract: *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*), the causative agent of porcine contagious pleuropneumonia (PCP), is a significant pathogen of the world pig industry, vaccination is potentially an effective tool for the prevention of PCP. The purpose of present study was to enhance the immunogenicity of *A. pleuropneumoniae* live vaccine strain HB04C- (serovar 7), which was unable to express ApxIA, and to develop effective multivalent vaccines for the respiratory pathogens based on the attenuated *A. pleuropneumoniae*. We introduced a shuttle vector containing intact *apxIA* gene into HB04C-, generating HB04C2, an *A. pleuropneumoniae* serovar 7 live attenuated vaccine strain co-expressing ApxIA. Then we investigated the biological characteristics of HB04C2. We found that the shuttle vector expressing ApxIA was stable in HB04C2, and the growth ability of

Received: October 23, 2009; **Accepted:** January 7, 2010

Supported by: National Nature Science Foundation of China (Nos. 30970109, 30600025, 30530590), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A206).

Corresponding author: Weicheng Bei. Tel/Fax: +86-27-87282608; E-mail: beiwc@mail.hzau.edu.cn

*These authors contributed equally to this work.

国家自然科学基金项目 (Nos. 30970109, 30600025, 30530590), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10A206) 资助。

HB04C2 was not affected by the shuttle vector. We observed that HB04C2 elicited detectable antibodies against ApxIA and ApxIIA when it was administrated intratracheally as a live vaccine in pigs, and all immunized pigs were protected from heterologous virulent *A. pleuropneumoniae* (serovar 1) challenge. In conclusion, we demonstrated that *A. pleuropneumoniae* live vaccine could be used as a vector for expression of heterologous antigens.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, live attenuated vaccine, multivalent vaccine, vector

胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 为革兰氏阴性杆菌, 目前该菌共有 15 个血清型^[1], 除血清 13 和 14 型细菌生长为不依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 的生物 II 型外, 其余 13 种血清型菌均为依赖 NAD 生长的生物 I 型, 并都与猪致病相关。APP 可引起猪传染性胸膜肺炎(Porcine contagious pleuropneumonia, PCP), 在世界各国均有发生, 给全球养猪业带来巨大经济损失^[2]。抗生素在预防和控制细菌性传染病上曾起到很大作用, 但随着耐药菌株的频繁出现以及国家对抗生素使用的严格限制, 疫苗将成为控制猪传染性胸膜肺炎的主要手段。目前所使用的疫苗主要是全细菌灭活疫苗或亚单位疫苗。由于 APP 血清型多, 各血清型之间交叉保护率较低, 大大增加了防治该病的难度^[3]。近年来, 胸膜肺炎放线杆菌减毒活疫苗的研究, 为该病的防治带来新希望^[4-6]。可以预见, 应用新型安全、高效的基因缺失疫苗将成为控制猪传染性胸膜肺炎的一种趋势。由于血清 7 型胸膜肺炎放线杆菌不分泌毒素 ApxI 仅分泌毒素 ApxII, 而毒素 ApxI 和毒素 ApxII 既是 APP 两个主要的毒力因子, 同时又是作为 APP 两个关键的免疫保护性蛋白, 因此, 拟通过本研究探索提高胸膜肺炎放线杆菌弱毒疫苗免疫原性的途径, 同时可以通过该系统表达其他呼吸系统病原的重要免疫原, 为呼吸系统疾病的预防与控制提供新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 购自美国Sigma公司。各种限制性内切酶、LA Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、

DNA Marker、pMD18-T载体购自大连宝生物工程(大连)有限公司。DNA凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。胰蛋白大豆琼脂 (Tryptic soy agar, TSA)、胰蛋白大豆肉汤 (Tryptic soy broth, TSB) 购自美国Difco公司。

1.1.2 菌株与质粒

胸膜肺炎放线杆菌血清7型*apxIIC*基因缺失弱毒疫苗菌株HB04C-由本实验室贝为成博士构建并保存^[7]。血清1型胸膜肺炎放线杆菌SLW01为本实验室分离并保存。大肠杆菌*Escherichia coli* DH5α由本实验室保存。穿梭质粒pJFF224-XN由瑞士伯尼尔大学Joachim Frey教授惠赠^[8]。

1.1.3 引物

引物设计见表1。

1.1.4 实验动物

6~8周龄仔猪购自湖北省某大型猪场, 胸膜肺炎放线杆菌血清学和病原学检测均为阴性。

1.2 方法

1.2.1 APP基因组制备及*apxIA*基因扩增

取血清1型APP分离株SLW01的新鲜培养物, 根据文献^[10]描述的方法提取APP基因组。以基因组为模板, 通过引物P1和P2为扩增到*apxIA*基因。扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 共30个循环; 然后72℃延伸10 min。

表1 本研究所用引物及说明

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Length (bp)	Remark
<i>apxIA</i>	P1	GCCTGCAGATGGCTA A CTCTCAGCTC	3069	<i>Pst</i> I
	P2	ATGCGGCCCGCTTAAG C TGCTTGTGCTAAC		<i>Not</i> I
<i>apxIAN</i>	P3	ATGGCTAACTCTCAG CTCG	826	Reference ^[9]
	P4	CGCTTTACCGATATTG CCTA		

1.2.2 穿梭质粒的构建

将前述 PCR 产物 *apxIA* 基因连接到 pMD18-T 载体, 得到质粒 pMD-*apxIA*, 经酶切鉴定正确后, 以 *Pst* I/*Not* I 双酶切, 回收 *apxIA* 片段并连接到经同样酶切的穿梭质粒 pJFF224-XN 中, 得到携带外源基因的穿梭质粒 pJFF-IA。

1.2.3 突变株的筛选

大量制备质粒 pJFF-IA, 以电转化将重组穿梭质粒 pJFF-IA 转化胸膜肺炎放线杆菌弱毒株 HB04C-。胸膜肺炎放线杆菌电转化感受态的制备以及电转化条件参考文献[7]进行。经过氯霉素抗性筛选, 得到氯霉素抗性的菌株, 再以 PCR (引物 P3/P4) 加以验证。将得到的突变株命名为 HB04C2 (*apxIIC*⁻/*apxIIA*⁺/*apxIA*⁺)。

1.2.4 HB04C2 的遗传稳定性分析

将得到的重组菌 HB04C2 分别在含有氯霉素抗性的 TSA 培养基和不含抗性的 TSA 培养基上传 20 代, 每代细菌均取样, 用引物 P3/P4 PCR 鉴定, 以确定 HB04C2 的遗传稳定性。

1.2.5 HB04C2 分泌性外毒素的检测

首先提取亲本菌和重组菌株天然毒素^[11], 然后以本实验室制备的抗 ApxIA 的单克隆抗体为一抗, 进行 Western blotting 检测^[12]。

1.2.6 HB04C2 的增殖能力分析

将过夜培养的 HB04C- 和 HB04C2 分别以 1:1000 比例接种到 100 mL TSB 培养基 (含 NAD 和 10% 小牛血清), 接种后每隔 1 h 取样, 测定菌液在 600 nm 下的吸光值, 共计 10 h, 重复 3 次取平均值。比较 2 个菌株的增长能力。

1.2.7 HB04C2 对仔猪的免疫保护性研究

选取 10 头健康仔猪 (6~8 周龄, APP 病原学血清学均为阴性), 随机分为 2 组, 每组 5 头。将 HB04C2 (活菌含量 1×10^8 CFU) 通过气管接种免疫第一组仔猪, 间隔 2 周, 以同样方式加强免疫, 第二组仔猪接种 TSB 作为阴性对照。在一免前、二免前以及攻毒前通过前腔静脉采血, 用本实验室建立的 ApxI-ELISA、ApxII-ELISA 检测方法检测毒素 ApxIA、ApxIIA 抗体^[13-14]。第 2 次免疫 2 周后, 连同 TSB 对照, 用血

清 1 型 APP 分离菌株 SLW01 (活菌含量 1×10^8 CFU) 通过气管注射对仔猪进行攻毒, 观察攻毒后仔猪的状态, 并于 7 d 后将存活猪处死观察剖检病变。仔猪临床症状指数 (Clinical sign score) 的评定参考 Tumamao 等^[15]描述的标准: 0=无症状; 1=呼吸频率增加; 2=腹式呼吸; 3=咳嗽; 4=呼吸困难; 5=死亡。按照 Hannan 等^[16]描述的方法评价仔猪肺部损伤情况: 即将整个肺分成 7 个部分, 按肺部病变程度给每部分评分, 每部分的最高分为 5 分, 损伤越大, 分值越高, 各部分分数之和作为肺部损伤指数 (Lung lesion score)。

2 结果

2.1 穿梭质粒 pJFF-IA 的构建

PCR 扩增的 *apxIA* 基因产物克隆到 pMD18-T 载体中, 序列分析证实无碱基误配。经 *Pst* I 和 *Not* I 酶切 *apxIA* 并插入到穿梭质粒 pJFF224-XN 的 T4 启动子下游。构建的重组质粒经 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切后得到 2 条约为 7000 bp 和 3000 bp 的片段, 表明质粒构建正确 (图 1)。

2.2 穿梭质粒 pJFF-IA 的电转化及 HB04C2 的筛选

通过高效电穿孔方法将穿梭质粒 pJFF-IA 转化到 HB04C-。通过氯霉素抗性筛选, 得到阳性克隆, 以 *apxIA* N 端特异性引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增, 可得到 826 bp 特异片段, 而亲本菌 HB04C- 为阴性 (图略)。

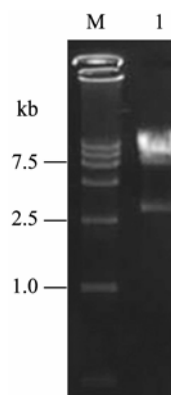


图 1 重组质粒 pJFF-IA 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pJFF-IA by enzyme digestion. M: DNA ladder 15 000; 1: pJFF-IA digested with *Not* I/*Pst* I.

2.3 HB04C2 的生物学特性

HB04C2在含氯霉素培养基和不含氯霉素培养基连续传代后，都能扩增出 $apxIA$ N端826 bp特异片段（图略），表明穿梭质粒pJFF-IA在APP菌株HB04C2中能够稳定传代。提取重组菌HB04C2和亲本菌HB04C-的分泌性蛋白，用抗Ap xIA 单克隆抗体作为一抗进行Western blotting检测，结果显示重组菌HB04C2在110 kDa处出现一条特异性带，与预期的分子量相当（图2），但同时发现另有一条略小的杂交带，笔者推测其可能是 $apxIA$ 从469~3069 bp的表达产物（大小约为93.8 kDa）。而亲本菌株HB04C-未出现该特异性带，结果表明稳定携带穿梭质粒pJFF-IA的基因工程重组菌株HB04C2能够表达且分泌具有免疫学活性的Ap xIA 。重组菌HB04C2和亲本菌HB04C-的生长曲线如图3所示。可见重组菌和亲本菌生长能力差别不大，表明携带穿梭质粒并没有明显影响APP的生长速度。

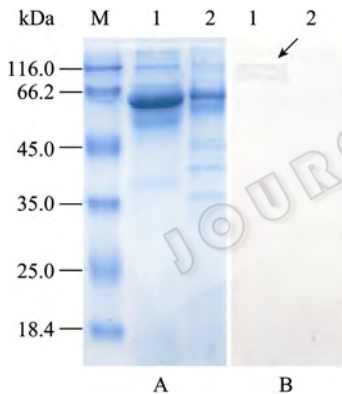


图2 SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B) 检测重组菌株 Ap xIA 的表达
Fig. 2 Detection of Ap xIA secreted by HB04C2. (A) SDS-PAGE. (B) Western blotting. 1: HB04C2; 2: HB04C-.

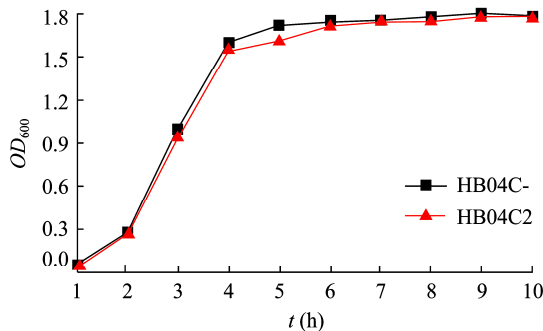


图3 HB04C2 体外增殖能力分析
Fig. 3 Growth ability of attenuated *A. pleuropneumoniae* strains *in vitro*.

2.4 HB04C2 的免疫原性研究

2.4.1 免疫仔猪血清学检测

结果显示，经气管接种 HB04C2 后，在 14 d 可以检测到 Ap xIA 和 Ap $xIIA$ 的抗体，到首免后 28 d，抗体提高很多（图 4），与对照组比较差异均极显著 ($P<0.01$)，对照组的仔猪在整个试验过程血清抗体均呈阴性。

2.4.2 攻毒保护效果

对照组仔猪在攻毒后表现出厌食、喘气、呼吸极度困难，有的口吐白沫等传染性胸膜肺炎临床症状，攻毒后 24 h 内全部死亡，解剖后可见肺部严重出血。气管免疫组仔猪在攻毒后，当天表现嗜睡、喘气，但攻毒 2 d 后基本恢复正常；解剖只有 1 头仔猪肺局部有出血点，其余 4 头正常。免疫组的肺

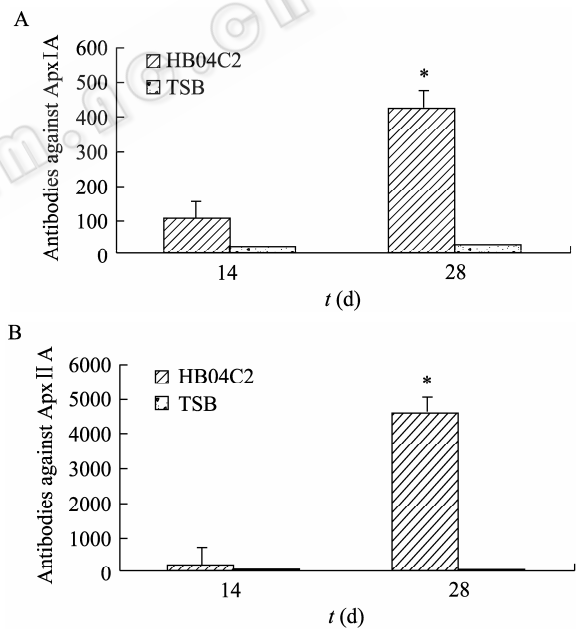


图4 仔猪血清抗体检测
Fig. 4 Evaluation of antibodies against Ap xIA (A) and Ap $xIIA$ (B). * $P < 0.01$ compared with the TSB group.

表2 HB04C2 免疫动物的攻毒保护结果

Table 2 Protection of pigs against challenge with heterologous virulent *A. pleuropneumoniae* serovar 1

Vaccine	Survival (Number of animals)	Animals number of with pneumonia/ total number.	Lung lesion score ($\bar{x}\pm s$)	Clinical sign score ($\bar{x}\pm s$)
HB04C2	5/5	1/5	1.26 \pm 1.86 ^a	0.85 \pm 1.18 ^a
TSB	0/5	5/5	29.68 \pm 3.16	5 \pm 0

^a Difference highly significant between the mutant vaccinated group and the TSB control group ($P < 0.01$).

损伤指数显著低于对照组 ($P<0.01$) (表 2)。结果表明, HB04C2 能提供仔猪对异源血清 1 型 APP 攻击的有效保护。

3 讨论

胸膜肺炎放线杆菌是猪传染性胸膜肺炎的致病菌, 该病是一种急性或慢性呼吸道疾病, 以肺部出血性、纤维素性和坏死性肺炎为特征, 具有高度的传染性, 各种年龄的猪均可感染发病, 对养猪业造成了巨大的经济损失。疫苗免疫可预防 APP 的感染, 而弱毒疫苗则以其高效和可诱导交叉保护的特点吸引着诸多研究者的目光。随着分子生物学发展及 APP 分子致病机理研究的深入, 利用现代分子生物学技术和基因工程方法, 通过失活毒力相关因子, 构建低毒力甚至无毒力 APP 基因工程弱毒活疫苗菌株, 成为目前猪传染性胸膜肺炎疫苗研究的热点领域。

APP 共有 4 种 RTX 毒素, 分别为 ApxI、ApxII、ApxIII 和 ApxIV。其中 ApxI 有强的溶血活性和强细胞毒性, ApxII 的溶血活性和细胞毒性都相对较弱, ApxIII 无溶血活性, 但有强的细胞毒性^[17]。除 ApxIV 在所有血清型 APP 都存在外, 每种血清型 APP 最多只含 ApxI、ApxII、ApxIII 中的两种^[17-18]。同时含有 ApxI 和 ApxII 的菌株表现为高致病性。本研究选用本实验室构建的 *apxIIC* 基因缺失菌株 HB04C-为亲本菌株, 是因为先前已对该基因缺失菌株的安全性、免疫原性和诱导动物的免疫保护率都有了全面的研究^[7,19]。该弱毒菌株免疫动物能完全抵抗同源血清 7 型 APP 的攻击, 但对毒力最强的异源血清 1 型 APP 的保护率只有 70%, 因为该弱毒菌株不能产生重要的保护性抗原 ApxIA。为了提高 HB04C-对异源血清 1 型 APP 的保护率, 增强该菌株的免疫效力, 本研究使用穿梭质粒, 可以在 HB04C-中稳定表达 ApxIA, 且血清 7 型 APP 中含有 *apxIB/apxID* 基因, 可以为 ApxIA 的分泌提供通道^[17]。作为 APP 重要的免疫原, 单独免疫 ApxIA 天然毒素或原核表达产物^[20], 或 ApxIA 的部分片段^[21], 或是某些抗原表位^[22], 均可产生较好的保护效果。经气管免疫 HB04C2 后, 可诱导仔猪产生针对 ApxIA 的抗体,

表明重组菌株产生的 ApxIA 具有良好的免疫原性, 经过加强免疫后, ApxIA 抗体水平显著提高, 表明该表达系统具有较高的表达活性, 外源基因的表达产物可刺激动物产生显著的免疫应答反应。以强毒血清 1 型 APP 攻击后, 空白对照组表现严重的胸膜肺炎症状并死亡, 免疫组仔猪表现为轻微或中等程度的临床症状, 但于观察期内恢复正常, 重组菌株对致死性剂量的强毒菌株的攻击提供了完全保护, 表明该菌株具有较好的交叉保护能力。

本实验中免疫方式为气管注射免疫, 其操作难度较大, 易对仔猪造成应激, 而且在注射部位及周边组织会水肿等问题。本实验室曾尝试采用滴鼻免疫, 可以达到较好的免疫效果^[23]。有资料显示, 可通过密闭的气雾发生装置, 让动物吸入携带 APP 的气溶胶来进行接种, 能达到较好的感染效果^[24]。因此, 对于弱毒疫苗在规模化养殖场中的推广应用, 采用气雾免疫或滴鼻免疫的方式可能会更加适用, 但这些方法的广泛应用, 还需要一段时间的探索。

虽然穿梭质粒本身携带的抗生素抗性基因产生的食品安全隐患, 有待进一步改善, 如构建无抗生素基因的平衡致死系统。ApxIA 的血清 7 型 APP 菌株的构建及特性分析, 为今后开发以 APP 弱毒菌株为载体的呼吸系统疾病的新型多价疫苗以及研究 APP 的基因功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Blackall PJ, Klaasen HL, van Den BH, *et al.* Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*, 2002, **84**(1/2): 47–52.
- [2] Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc*, 1994, **204**(9): 1334–1340.
- [3] Higgins T, Lariviere S, Mittal KR, *et al.* Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumonia due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can Vet J*, 1985, **26**(2): 86–89.
- [4] Rosendal S, MacInnes JI. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am J Vet Res*, 1990, **51**(5): 711–717.
- [5] Inzana TJ, Todd J, Veit HP. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect Immun*,

- 1993, **61**(5): 1682–1686.
- [6] Fuller TE, Thacker BJ, Duran CO, *et al.* A genetically-defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine. *Vaccine*, 2000, **18**(25): 2867–2877.
- [7] Bei W, He Q, Yan L, *et al.* Construction and characterisation of a live, attenuated *apxII*CA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **243**(1): 21–27.
- [8] Frey J. Construction of a broad host range shuttle vector for gene cloning and expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and other *Pasteurellaceae*. *Res Microbiol*, 1992, **143**(3): 263–269.
- [9] Chen F, Chen ML, Chen HC, *et al.* Development of genotyping system for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its clinical application. *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44**(5): 679–682.
陈凡, 陈美玲, 陈焕春, 等. 胸膜肺炎放线杆菌基因分型方法的建立及其临床应用. *微生物学报*, 2004, **44**(5): 679–682.
- [10] Prideaux CT, Pierce L, Krywult J, *et al.* Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol*, 1998, **37**(5): 324–332.
- [11] Nielsen R, van den Bosch JF, Plambeck T, *et al.* Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*, 2000, **71**(1/2): 81–87.
- [12] Huang H, Zhou R, Fan H, *et al.* Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol Immunol*, 2006, **43**(13): 2130–2134.
- [13] Liu J, He Q, Chen H, *et al.* Cloning, expression of *apxI* gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and development of ELISA. *Sci Agric Sin*, 2003, **5**(2): 578–582.
- [14] Liang WW, He QG, Liu ZF, *et al.* Cloning and expression of ApxII and development an indirect ELISA for detection of antibody against *A. pleuropneumoniae*. *Chin J Vet Sci*, 2005, **25**(2): 145–147.
梁旺望, 何启盖, 刘正飞, 等. 胸膜肺炎放线杆菌毒素 ApxII 蛋白的表达, 纯化及其间接 ELISA 检测方法的建立与应用. *中国兽医学报*, 2005, **25**(2): 145–147.
- [15] Tumamao JQ, Bowles RE, van den Bosch H, *et al.* Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Aust Vet J*, 2004, **82**(6): 370–374.
- [16] Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP. Tylosin tartrate and tiamulin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res Vet Sci*, 1982, **33**(1): 76–88.
- [17] Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol*, 1995, **3**(7): 257–261.
- [18] Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, *et al.* Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**(8): 2105–2116.
- [19] Bei W, He Q, Zhou R, *et al.* Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB04C-mutant lacking a drug resistance marker in the pigs. *Vet Microbiol*, 2007, **125**(1/2): 120–127.
- [20] Yan KX, Liu JJ, Zhou R, *et al.* Acute toxicity and immunoprotection of recombinant ApxI toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(1): 65–70.
严克霞, 刘建杰, 周锐, 等. 重组胸膜肺炎放线杆菌毒素 ApxI 对小鼠的急性毒性和免疫保护性研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(1): 65–70.
- [21] Mei L, Zhou R, Lu HS, *et al.* Study on immunogenicity of the N terminal polypeptide of RTX toxin I of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(1): 40–45.
梅岭, 周锐, 卢海松, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型 RTX 毒素 I 的 N 端表达多肽具有良好的免疫原性. *生物工程学报*, 2006, **22**(1): 40–45.
- [22] Bagdasarian MM, Nagai M, Frey J, *et al.* Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine*, 1999, **17**(5): 441–447.
- [23] Lin L, Bei W, Sha Y, *et al.* Construction and immunogenicity of DeltaapxIC/DeltaapxIIC double mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, **274**(1): 55–62.
- [24] Jacobsen MJ, Nielsen JP, Nielsen R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet Microbiol*, 1998, **49**(3/4): 159–168.