

## 研究报告

## 溶血性曼氏杆菌外膜蛋白 ChaN 生物信息学分析及反应原性和免疫原性分析

许淑芸<sup>1</sup>, 魏京京<sup>1</sup>, 魏增科<sup>1</sup>, 俞杰<sup>1</sup>, 罗超凡<sup>3</sup>, 王卓妮<sup>1</sup>, 周霞<sup>\*1</sup>, 吴洁<sup>\*2</sup>, 孙志华<sup>1</sup>, 王震<sup>1</sup>, 王晓兰<sup>1</sup>, 李劼<sup>1</sup>, 张辉<sup>1</sup>

1 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003

2 新疆生产建设兵团第八师畜牧兽医工作站, 新疆 石河子 832000

3 新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)修复科, 新疆 乌鲁木齐 830054

许淑芸, 魏京京, 魏增科, 俞杰, 罗超凡, 王卓妮, 周霞, 吴洁, 孙志华, 王震, 王晓兰, 李劼, 张辉. 溶血性曼氏杆菌外膜蛋白 ChaN 生物信息学分析及反应原性和免疫原性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1295-1308.

XU Shuyun, WEI Jingjing, WEI Zengke, YU Jie, LUO Chaofan, WANG Zhuoni, ZHOU Xia, WU Jie, SUN Zhizhua, WANG Zhen, WANG Xiaolan, LI Jie, ZHANG Hui. Bioinformatics, reactogenicity, and immunogenicity of the outer membrane protein ChaN of *Mannheimia haemolytica*[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1295-1308.

**摘要:**【背景】牛呼吸道综合征严重影响着牛群健康, 对养殖业有着较为严重的影响, 溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)作为主要的牛呼吸道致病菌, 常在牛免疫力低下时引起牛呼吸道疾病(bovine respiratory disease, BRD), 现阶段溶血性曼氏杆菌病多采用疫苗进行防控。【目的】分析 ChaN 蛋白的部分生物学信息学功能及免疫原性, 为亚单位疫苗的研发奠定基础。【方法】应用 NCBI BLAST 分析筛选溶血性曼氏杆菌潜在抗原并使用 ExPASy ProtParam、ExPASy ProtScale 和 TMHMM-2.0 等多种在线软件分析其抗原特性; RT-qPCR 测定溶血性曼氏杆菌 ChaN mRNA 在体外培养不同时期的转录水平; 通过原核表达重组 ChaN 蛋白(rChaN), 使用牛溶血性曼氏杆菌阳性血清经 Western blotting 检测 rChaN 反应原性; 以不同剂量蛋白与白油佐剂乳化进行小鼠免疫保护试验检测 rChaN 蛋白免疫保护效果, 使用间接 ELISA 检测抗体效价; 第 3 次免疫第 7 天后以  $3 \times 10^8$  CFU/只腹腔注射 Mh95 毒株测定蛋白保护效果。【结果】ChaN 蛋白为亲水性可溶蛋白, 无跨膜结构域, 1 个开放阅读框, 具有 16 个抗原表位和 23 个 B 细胞抗原表位; ChaN 基因对数期的转录水平最高, 其次是稳定期及迟缓期, 在衰亡期的表达量最低, 在 4 个时期的表达量差异极显著( $P < 0.001$ ); ChaN 蛋

资助项目: 新疆生产建设兵团第八师重点领域科技攻关项目(2023NY03); 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划(2021AB012)

This work was supported by the Scientific and Technological Research Project of the Eighth Division of the Xinjiang Production and Construction Corps (2023NY03), and the Scientific and Technological Research Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2021AB012).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Xia, zhoux993@163.com; WU Jie, 18997888015@163.com

Received: 2024-05-28; Accepted: 2024-08-03; Published online: 2024-09-12

白能与牛溶血性曼氏杆菌阳性血清反应; 40  $\mu\text{g}$  ChaN+白油佐剂组免疫后, IgG 抗体水平持续上升; IgG 亚型检测显示 ChaN 蛋白主要使机体产生 IgG1 和 IgG2b 亚型; 第 3 次免疫后第 7 天腹腔注射 Mh95 菌株, 40  $\mu\text{g}$  ChaN+白油佐剂组存活率为 90%, 高于商品化疫苗组、空白对照组、PBS 组和白油佐剂组, 并且空白对照组、PBS 组和白油佐剂组小鼠 7 d 内存活率低于 20%。【结论】ChaN 蛋白具有良好的反应原性和免疫原性且能对小鼠产生保护效果, 可作为溶血性曼氏杆菌潜在免疫原性蛋白进行后续研究, 研究结果为溶血性曼氏杆菌亚单位疫苗的研发提供了科学依据。

关键词: 溶血性曼氏杆菌; ChaN; 生物信息学; 原核表达; 反应原性; 免疫原性

## Bioinformatics, reactogenicity, and immunogenicity of the outer membrane protein ChaN of *Mannheimia haemolytica*

XU Shuyun<sup>1</sup>, WEI Jingjing<sup>1</sup>, WEI Zengke<sup>1</sup>, YU Jie<sup>1</sup>, LUO Chaofan<sup>3</sup>, WANG Zhuoni<sup>1</sup>, ZHOU Xia<sup>\*1</sup>, WU Jie<sup>\*2</sup>, SUN Zhihua<sup>1</sup>, WANG Zhen<sup>1</sup>, WANG Xiaolan<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

2 Animal Husbandry and Veterinary Work Station of the Eighth Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi 832000, Xinjiang, China

3 Department of Prosthodontics, the First Affiliated Hospital/Affiliated Stomatology Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] Bovine respiratory syndrome seriously affects the health of cattle and has a serious impact on the breeding industry. *Mannheimia haemolytica*, as the main pathogenic bacteria of bovine respiratory tract, often causes bovine respiratory disease (BRD) when the immunity of cattle is low. At present, *Mannheimia haemolytica* is mostly controlled by vaccine. [Objective] To analyze the bioinformatics function and immunogenicity of ChaN protein and lay a foundation for the development of subunit vaccines. [Methods] NCBI BLAST was used to screen the potential antigens of *Mannheimia haemolytica*, and online tools such as ExpASy ProtParam, ExpASy ProtScale, and TMHMM-2.0 were used to analyze their antigenic characteristics. RT-qPCR was conducted to determine the mRNA level of ChaN in *M. haemolytica* cultured for different time periods. The recombinant ChaN (rChaN) was obtained by prokaryotic expression, and the reactivity of rChaN was examined by Western blotting with the *M. haemolytica*-positive bovine serum. Mice were vaccinated with different doses of rChaN emulsified with white oil as the adjuvant, and the immunogenicity of rChaN was evaluated. Indirect ELISA was employed to measure the antibody titer. Seven days after the third vaccination, mice were subjected to intraperitoneal injection of the pathogen strain Mh95, and the protective effect of rChaN was tested. [Results] ChaN was a hydrophilic soluble protein with no transmembrane domain, an open reading frame, 16 epitopes, and 23 B cell epitopes. The mRNA level of ChaN was the highest in the logarithmic phase, moderate in the stationary phase and lag phase, and the lowest in the decline phase, showing differences in the four phases ( $P < 0.001$ ). ChaN reacted with the *M. haemolytica*-positive bovine serum. After immunization with 40  $\mu\text{g}$  ChaN+white oil, the IgG level kept rising. IgG subtyping results showed that ChaN mainly caused the body

to produce IgG1 and IgG2b. After mice were injected intraperitoneally with Mh95 strain on day 7 after the third immunization, the survival rate of mice in the 40 µg ChaN+white oil group was 90%, which was higher than those in the commercial vaccine, blank control, PBS, and white oil groups. The survival rates of mice in the blank control, PBS, and white oil groups were less than 20% within 7 days. **[Conclusion]** ChaN has good reactogenicity and immunogenicity and thus can be used as a potential immunogenic protein of *M. haemolytica* for subsequent research. The results provide a scientific basis for developing subunit vaccines against *M. haemolytica*.

**Keywords:** *Mannheimia haemolytica*; ChaN; bioinformatics; prokaryotic expression; reactivity; immunogenicity

牛呼吸道疾病(bovine respiratory disease, BRD)在世界范围内广泛存在, 据估计, 美国饲养场 BRD 发病率为 16.2%, BRD 严重危害牛群健康并造成牛养殖业经济损失<sup>[1-2]</sup>。近年随着我国养殖规模的扩大、养殖密度的增高且养殖环境不理想, BRD 发病率在不断增加, 其中细菌病原微生物是主要致病因素之一, 包括多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)和支原体属(*Mycoplasma*)等。

Mh 作为引起 BRD 的常见病原菌, 常定殖于健康牛的鼻咽部, 通常在牛免疫力低下、应激条件下引起 BRD 的发生<sup>[3]</sup>。近年来, 溶血性曼氏杆菌病主要采用抗生素治疗, 但长时间使用抗生素易导致菌株产生多重耐药, 对 Mh 的净化产生不利的影 响, 所以疫苗接种是应对该病发生的有效手段之一。目前 Mh 疫苗主要为全菌灭活疫苗, 并且仅针对单一血清型感染进行保护, 所以作为免疫防制剂的补充亚单位疫苗成为研究热点。目前发现与牛 Mh 免疫原性相关蛋白包括外膜蛋白 A (outer membrane pro-tein A, OmpA)、脂蛋白 E (lipoprotein E, PlpE)、白细胞毒素(leukotoxin, LKT)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等, 但其对牛的免疫保护效果不理想, 所以有必要寻找新的抗原性蛋白<sup>[4-15]</sup>。

ChaN 是一种假定的脂蛋白, 被认为与外膜

蛋白相关并能与 ChaR 相互作用进行铁的摄取和利用。已证实 ChaN 在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中对血红素获取具有重要作用, 并且与细菌对铁的摄取有关<sup>[16]</sup>。Holmes 等<sup>[17]</sup>研究表明, 相较于富铁条件, 铁限制条件下生长的细菌的 ChaN 转录本水平增加了 25 倍。因此, 本研究经 NCBI BLAST 分析筛选了 ChaN 蛋白, 并在使用多种在线软件预测其免疫原性基础上, 通过原核表达重组 ChaN 蛋白(rChaN)并检测其反应原性和免疫原性, 以期评价 ChaN 的疫苗潜力奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

溶血性曼氏杆菌 Mh95 菌株和 pET-32a(+), 石河子大学人畜共患病防控实验室。90 只 BALB/c 小鼠来自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司。所有动物实验都得到了石河子大学生物伦理委员会批准(批准号: A2023-286)。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基和脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒和 2×*Taq* Plus Master MixII, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DL2000 DNA

marker、pMD<sup>TM</sup>19-T 载体、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III, TaKaRa Bio 公司; ProteinIso<sup>®</sup> Ni-NTA Resin, 北京全式金生物技术有限公司; ELISA 包被液、5%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭液、ELISA 终止液、双组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色液 (ELISA)、10×磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered solution, PBST)、10×Tris-Borate-Sodium Tween-20 (TBST), 北京索莱宝科技有限公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 康为世纪生物科技股份有限公司; Ni-IDA Resin 蛋白纯化试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; 1×PBS buffer, Biosharp 公司。氨苄青霉素 (Amp, 100 mg/mL) 液体配方: 将 1 g 氨苄青霉素溶于 8 mL ddH<sub>2</sub>O, 定容至 10 mL 充分溶解后使用 0.22 μm 滤膜过滤, 分装至 1.5 mL EP 管, 使用时按 1:1 000 加入试剂中, 使工作液中 Amp 终浓度为 100 μg/mL。

超声波细胞粉碎机, 宁波新芝公司; 微量台式离心机, Thermo Fisher 公司; 双板垂直电

泳仪和迷你转印电泳仪, 北京六一仪器厂; 化学发光成像仪, Vilber 公司。

### 1.3 ChaN 蛋白的生物信息学分析

利用表 1 所示生物信息学软件或网站对牛溶血性曼氏杆菌 ChaN 蛋白进行生物信息学分析。

### 1.4 引物设计与合成

根据 NCBI GenBank 中公布的 ChaN 基因序列, 使用 Premier 5 设计引物, 下划线分别是酶切位点 *Xho* I 和 *Hind* III。ChaN qPCR 和 16S rRNA Mh 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

### 1.5 体外培养 Mh ChaN 基因转录水平测定

吸取 200 μL 菌株 Mh95 菌液转入 20 mL 的 BHI 液体培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养, 分别于 2 h (迟缓期)、5 h (对数期)、10 h (稳定期)、24 h (衰亡期) 吸取 2 mL 菌液。

Trizol 法提取菌株 Mh95 总 RNA, 以反转录获得的 cDNA 为模板, 使用 ChaN qPCR 和 16S rRNA Mh 引物, 利用荧光定量 PCR 检测菌

表 1 生物信息学分析网址及遗传发育树制作软件

Table 1 Bioinformatics analysis website and genetic development tree making software

功能 Function	网址 Website
理化性质 Physicochemical property	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
疏水性/亲水性预测和分析 Hydrophobicity/Hydrophilicity prediction and analysis	<a href="http://web.expasy.org/protscale/">http://web.expasy.org/protscale/</a>
跨膜结构预测 Transmembrane structure prediction	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>
信号肽预测 Signal peptides prediction	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/</a>
开放阅读框 Open reading frame (ORF)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html</a>
蛋白质二级结构 Protein secondary structure	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>
蛋白质三级结构模型 Protein tertiary structure model	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>
抗原表位预测 Epitope prediction	<a href="http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl">http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl</a>
B 细胞抗原表位预测 Antigen epitope prediction of B cell	<a href="https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html">https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html</a>
遗传发育树 Phylogenetic tree	MEGA 11

表 2 本研究所用引物信息

Table 2 Information of primers used in this study

引物名称	序列	退火温度	产物大小
Primer name	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
ChaN	CCG <sup>gctcgag</sup> ATGGCTTTTTTTCTTTTAGGCTGCTC CCC <sup>aagctt</sup> TTATTGAGTGACCCAAAGATAATCTG	62.7	798
ChaN qPCR	GTGGCAGTACAACAATTCCGTGATC GCAATCAGCAAGCTAGTCGATAACG	58.3	80
16S rRNA Mh	CACCTGCCATAAGATGAGCCCAAG CCCCTGCTGCCTCCCGTAG	62.0	147

下划线分别是酶切位点 *Xho* I 和 *Hind* III。

The underscores represent the enzyme cleavage sites *Xho* I and *Hind* III, respectively.

株 ChaN 基因 mRNA 转录水平。荧光定量 PCR 反应体系：2×Ultra SYBR Mixture 25 μL，上、下游引物(表 2) (0.2 μmol/L)各 1 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH<sub>2</sub>O 21 μL。PCR 反应条件：94 °C 30 s；94 °C 5 s，退火(表 2) 20 s，72 °C 10 s，共 50 个循环。每个基因做 3 个重复，使用 16S rRNA 基因为内参基因，采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算 ChaN 蛋白的相对转录水平。

### 1.6 ChaN 基因的扩增及表达载体的构建

以提取的菌株 Mh95 基因组为模板进行 PCR 扩增，PCR 反应体系：2×Taq Plus Master MixII 25 μL，ddH<sub>2</sub>O 21 μL，ChaN 上、下游引物各(25 μmol/L) 1 μL，模板 2 μL。反应条件：95 °C 5 min；94 °C 30 s，62 °C 30 s，72 °C 60 s，共 35 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证后进行胶回收。

将目的片段与 pMD<sup>TM</sup>19-T 连接，构建重组质粒 pMD<sup>TM</sup>19-T-ChaN，并转化至 DH5α 感受态细胞，扩增后提取质粒。使用 *Hind* III 和 *Xho* I 限制性内切酶对重组质粒 pMD<sup>TM</sup>19-T-ChaN 和 pET-32a 载体进行双酶切，酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后胶回收产物；胶回收产物使用 T4 DNA 连接酶进行连接，然后转化至大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)感受态细胞，活化后涂布在含有 Amp 抗性 LB 固体培养基上，37 °C

培养过夜。挑选单克隆菌落接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中，37 °C、180 r/min 培养 4 h，根据质粒提取试剂盒说明书对重组质粒进行提取，提取结束后对其分别进行双酶切鉴定和 PCR 鉴定，PCR 反应体系和条件同前，模板为提取的重组质粒。将测序鉴定正确的质粒称为 pET-32a(+)-ChaN。

### 1.7 重组蛋白的诱导表达及纯化

挑取测序正确的表达工程菌阳性菌落接种至 1 mL LB 液体培养基中，37 °C、180 r/min 培养 10 h，再以 1% 接种量接种至 100 mL LB 液体培养基中进行扩大培养(Amp 浓度为 100 μg/mL)，用终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 16 °C 低温过夜诱导表达。取 2 mL 菌液经 8 000 r/min、4 °C 离心 15 min，收集菌体，经 PBS 重悬，与 5×SDS-PAGE 上样缓冲液按 4:1 比例混匀，沸水煮 5 min，经 SDS-PAGE 电泳进行检测。

将样本在冰水浴中使用超声波细胞粉碎机 60 W 超声破碎 30 min (工作 5 s，停 5 s)，随后 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min，收集沉淀和上清。沉淀经 PBS 重悬后和上清分别进行 SDS-PAGE 电泳。对重组蛋白进行可溶性分析。

为了获得含有单一条带的目的蛋白，利用 3 mL 含有 His 标签的纯化柱将表达后的菌液进行纯化。将制备好的重组蛋白放于 -80 °C 保存。

## 1.8 重组蛋白的反应原性检测

将纯化的重组蛋白与5×SDS-PAGE上样缓冲液按4:1比例混匀,95℃煮沸5 min,3 000 r/min离心30 s,将蛋白样进行SDS-PAGE,随后使用转膜仪进行转膜,使用5% BSA封闭液封闭、使用牛Mh阳性血清为一抗4℃过夜孵育、兔抗牛二抗37℃孵育2 h,显色发光使用化学发光仪观察并记录结果。

## 1.9 重组蛋白的免疫剂量筛选

体重20–24 g的BALB/c雌雄对半,一组6只,共5组于第0天背部皮下分点注射200 μL/只。分组为80 μg ChaN+白油佐剂组、60 μg ChaN+白油佐剂组、40 μg ChaN+白油佐剂组、30 μg ChaN+白油佐剂组、20 μg ChaN+白油佐剂组。注射后第7天眼眶静脉采血,3 000 r/min离心后分离血清,检测抗体效价。96孔板以 $1\times 10^8$  CFU/孔包被灭活Mh,4℃孵育过夜,用1×PBST洗涤缓冲液洗涤3次,晾干;用含5% BSA封闭缓冲液每孔200 μL封板,37℃孵育2 h;1×PBST洗涤缓冲液洗涤3次,晾干,小鼠血清每孔100 μL稀释比例为1:50,37℃孵育1 h;1×PBST洗涤缓冲液洗涤3次,晾干,加入按1:3 000稀释的HRP标记山羊抗小鼠IgG二抗,37℃孵育1 h;1×PBST洗涤缓冲液洗涤5次,晾干,加入双组分TMB显色液100 μL显色25 min,每孔加入50 μL终止液,15 min内测量每孔的 $OD_{450}$ 吸光度。

## 1.10 重组蛋白的免疫保护性检测

体重20–24 g的BALB/c雌雄对半,一组12只,4组于第0、7和14天背部皮下分点注射200 μL/只,Mh商品化疫苗组按0.2 mL/只接种(Mh抗原含量 $2.0\times 10^8$ – $3.0\times 10^8$  CFU,白细胞毒素抗原含量128–256 CU),空白对照组1组,雌雄对半共10只,总共5组。分别在第0、7、

11、14、17、21、24、28、35天使用毛细玻璃吸管进行眶静脉采血,收集血清,免疫分组为PBS组、白油佐剂组、40 μg ChaN+白油佐剂组和Mh商品化疫苗组构成。抗体效价及IgG亚型使用1.9方法。第3次免疫7 d后以 $3\times 10^8$  CFU/只( $3\times LD_{50}$ )腹腔注射Mh95毒株测定蛋白保护效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 ChaN蛋白的生物信息学分析结果

#### 2.1.1 ChaN蛋白的理化性质及亲疏水性预测

ChaN编码蛋白的分子式为 $C_{1337}H_{2156}N_{368}O_{405}S_{10}$ ,分子量为32 kDa,不稳定指数为35.27,编码该蛋白为稳定蛋白,理论等电点为5.91,负电荷总残基数(Asp+Glu)31个,正电荷总残基数(Arg+Lys)26个,在哺乳动物体外网织红细胞中的半衰期为30 h;总平均亲水性为-0.221,为亲水性可溶蛋白(图1),通过ProtScale进一步分析显示亲水区域大于疏水区域。

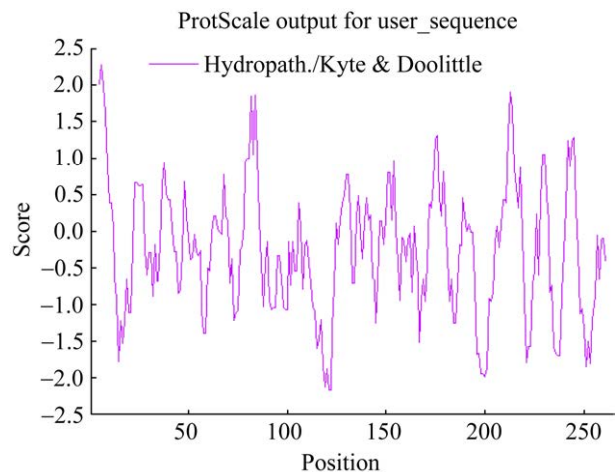


图1 ChaN蛋白的亲/疏水性预测结果

Figure 1 Hydrophilicity/hydrophobicity prediction results of ChaN protein.

### 2.1.2 ChaN 蛋白的部分生物信息学分析结果

预测结果显示 ChaN 蛋白可能为外膜蛋白, 无跨膜结构, 有信号肽。该蛋白保守区域在 1-798 位氨基酸, 使用 NCBI ORF Finder 预测其开放阅读框, 结果显示该蛋白有 1 个开放阅读框。

用 SOPMA 在线软件预测 ChaN 蛋白质二级结构发现, 蛋白由  $\alpha$ -螺旋(42.64%)、 $\beta$ -折叠(14.34%)、延伸链(4.15%)和无规则卷曲(38.87%)组成; 通过 SWISS-MODEL 平台预测 ChaN 蛋白三级结构, 发现该蛋白主要由  $\alpha$ -螺旋所形成的三维立体结构组成(图 2)。

### 2.1.3 ChaN 蛋白抗原表位预测结果

经 Tools 预测显示, ChaN 蛋白含有 16 个抗原表位(表 3)。

### 2.1.4 ChaN 蛋白 B 细胞抗原表位预测结果

经 ABCPred 预测显示 ChaN 蛋白有 23 个 B 细胞抗原表位(表 4)。

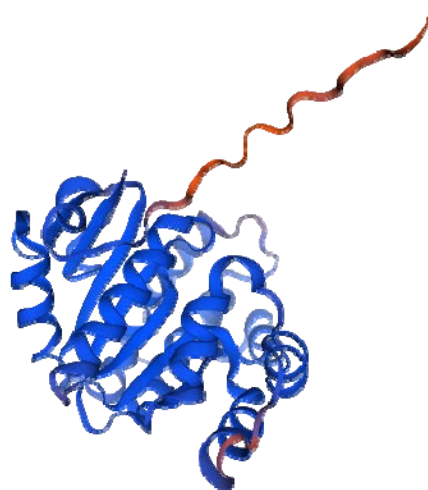


图 2 ChaN 蛋白的三级结构预测结果

Figure 2 The tertiary structure prediction results of ChaN protein.

### 2.1.5 ChaN 蛋白保守性和同源性分析

使用 NCBI BLAST 分析 ChaN 蛋白保守性显示该蛋白在 Mh 菌株间保守性为 95.85%–100%, 结果见图 3。

表 3 ChaN 蛋白抗原表位预测结果

Table 3 Prediction result of antigenic determinants of ChaN protein

序号 Serial number	开始位点 Start position	序列 Sequence	结束位点 End position
1	4	FLLGCSVST	12
2	19	NVDSIGQII	27
3	36	SFTELLSRLSSQDYVLVG	53
4	56	HTQLIHHQIELYLFN	70
5	73	TKKAKLHLIALEM	85
6	87	NVDQQPAID	95
7	101	RPVNLSA	107
8	124	YQDLVVES	131
9	134	SNSRVIA	140
10	147	EVEILLNG	154
11	157	PLKGSVSTSSEVKQKIAQLLS	178
12	189	NMVAVQQ	195
13	202	AEKLVKN	208
14	210	LSTSLLIAGNHHVRKDLGVPLHIA	233
15	239	KKVAVLM	245
16	254	TSSQADYL	261

表 4 ChaN 蛋白 B 细胞抗原表位预测结果  
Table 4 B cell epitope prediction of ChaN protein

序号 Rank	序列 Sequence	起始位点 Start position	评分 Score
1	REAIQWQKWDWKMYQD	111	0.91
2	REEITSSQADYLWVTQ	250	0.90
3	QQPAIDRIQFNRPVNL	90	0.88
4	WKMYQDLVVESLGSNS	121	0.86
5	SMNHGMPYPMENMVAV	178	0.85
6	RLSSQDYVLVGEHTQ	43	0.81
7	TSLLIAGNHVVRKDLG	212	0.79
8	VPLHIAEYDRTKKVVAV	228	0.78
9	DRRMAEKLVKNALSTS	198	0.77
10	IGQIIDLNTNQTISFT	23	0.76
10	QKIAQLLSMNHGMPY	170	0.76
11	KVAVLMLKTEREEITS	240	0.75
11	VAVQQFRDRRMAEKLKLV	191	0.75
11	GSVSTSSEVKQKIAQL	160	0.75
12	GCSVSTQSLNEQNVDS	7	0.72
13	AKLHLIALEMLNVDQQ	76	0.71
14	ESLGSNSRVIATNLTD	130	0.70
15	TQLIHHQIELYLFNQL	57	0.68
16	IATNLTDKEVEILLNG	139	0.66
17	HHVRKDLGVPLHIAEY	220	0.60
17	LLNGAEPLKGSVSTSS	151	0.60
18	QTISFTELLSRLSSQD	33	0.57
19	KLVKNALSTSLLIAGN	204	0.53

## 2.2 牛源溶血性曼氏杆菌体外培养时 ChaN 基因在不同生长阶段转录水平测定

以 16S rRNA 基因为内参基因,通过 RT-qPCR 检测菌株 ChaN 在不同生长时间的 mRNA 转录水平。结果显示 ChaN 基因的转录水平在对数期的表达量最高,其次是稳定期及迟缓期,在衰亡期的表达量最低,在 4 个时期的表达量为差异极显著( $P < 0.001$ ) (图 4)。

## 2.3 重组质粒 pET-32a-ChaN 的构建及鉴定结果

以溶血性曼氏杆菌 DNA 基因组为模板,经 PCR 扩增得到 798 bp 的目的片段(图 5),与预期结果一致。构建重组质粒经双酶切鉴定并测

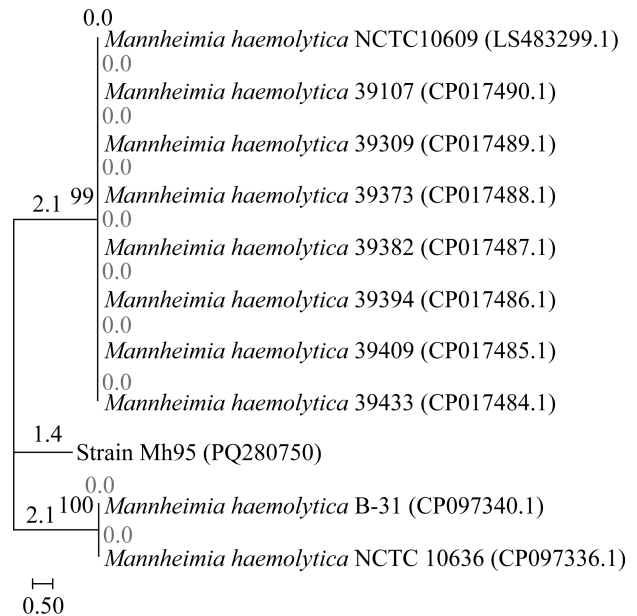


图 3 溶血性曼氏杆菌 ChaN 基因系统发育树 括号内为 GenBank 登录号;标尺表示遗传距离长度;节点处数字代表 1 000 次重复取样 bootstrap 检验置信度值。

Figure 3 Phylogenetic tree of ChaN gene of *Mannheimia haemolytica*. The GenBank accession number is in brackets; The scale represents the length of genetic distance; The numbers at nodes represent the confidence values of bootstrap test with 1 000 repeated samples.

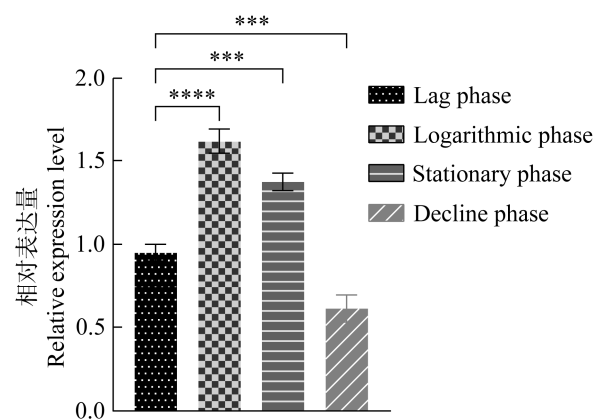


图 4 Mh95 的 ChaN 基因在不同生长时间的转录水平

Figure 4 Transcription level of ChaN gene in Mh95 at different growth time. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



序, 检测结果经 NCBI BLAST 比对, 显示插入基因与目的基因结果一致, 成功构建重组质粒 pET-32a-ChaN (图 6)。测序结果经 NCBI BLAST 比对为目的基因。

## 2.4 rChaN 表达、纯化及鉴定

*E. coli* BL21(DE3)诱导表达后经超声破碎, 离心分离沉淀和上清, 进行 SDS-PAGE。结果

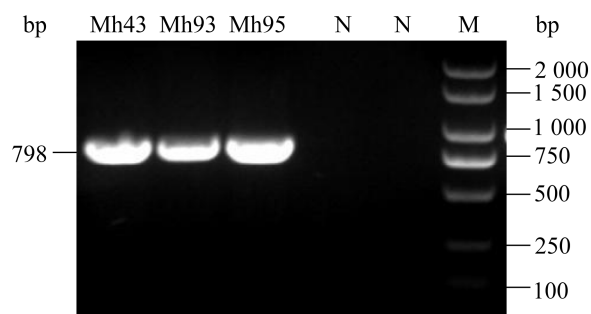


图 5 溶血性曼氏杆菌 ChaN 基因扩增 M: DL2000 Plus DNA marker; Mh43、Mh93 和 Mh95: 分离菌; N: 阴性对照。

Figure 5 Amplification of ChaN gene of *Mannheimia haemolytica*. M: DL2000 Plus DNA marker; Mh43, Mh93 and Mh95: Isolated bacteria; N: Negative control.

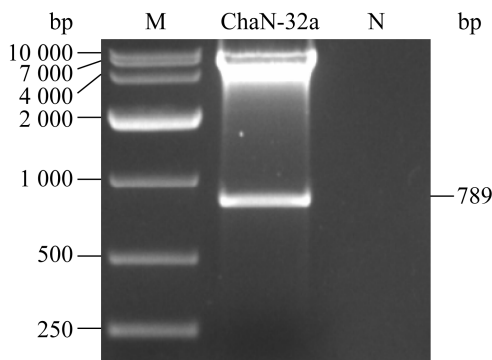


图 6 溶血性曼氏杆菌 ChaN-32a 双酶切 M: DL10000 DNA marker; ChaN-32a: 重组质粒 pET-32a-ChaN; N: 阴性对照。

Figure 6 Double digestion of ChaN-32a of *Mannheimia haemolytica*. M: DL10000 DNA marker; ChaN-32a: Recombinant plasmid pET-32a-ChaN; N: Negative control.

显示, ChaN 蛋白在 32 kDa 处有明显的条带, 大小符合预期, 并且蛋白主要在沉淀中表达, 上清中蛋白表达含量较低(图 7)。蛋白按 Ni-IDA Resin 蛋白纯化试剂盒纯化, 随后进行 SDS-PAGE, 结果显示, 纯化后蛋白条带较为单一, 纯化效果良好(图 8)。

## 2.5 rChaN 蛋白的反应原性分析

纯化后 ChaN 蛋白经 Western blotting 检测显示, 蛋白能与阳性血清一抗结合, 结果表明该蛋白具有反应原性(图 9)。

## 2.6 重组蛋白的免疫剂量筛选结果

间接 ELISA 检测抗体水平结果显示, 各免疫接种组接种蛋白后第 7 天以 40  $\mu$ g+白油佐剂组免疫效果最佳(图 10), 抗体检测显示实验组 OD 值/对照组 OD 值(P/N)>2.1。

## 2.7 重组蛋白的免疫保护性试验

间接 ELISA 测定血清样本 IgG 抗体水平, 结果表明, 在 40  $\mu$ g ChaN+白油佐剂组免疫后, IgG 抗体水平持续上升。Mh 商品化疫苗在首免

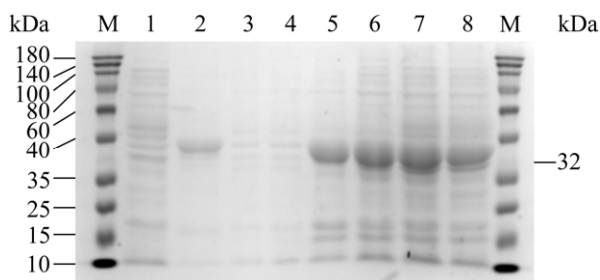
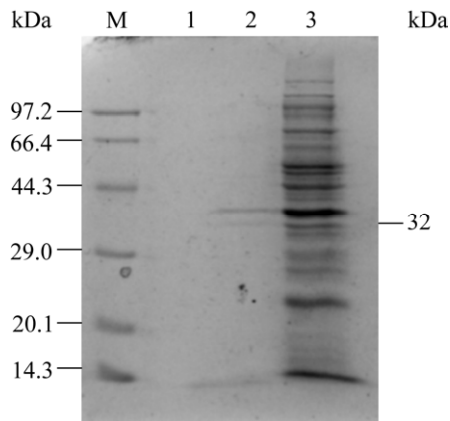
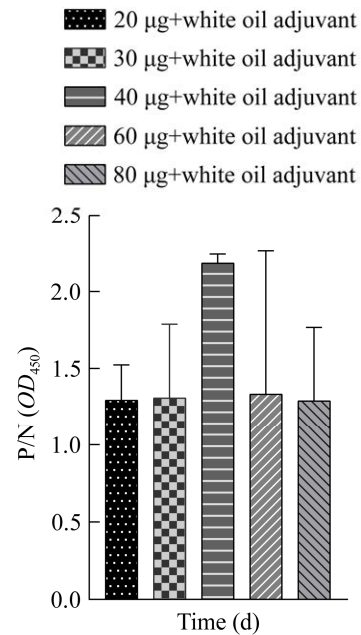


图 7 蛋白诱导及超声破碎结果 M: 蛋白 marker; 1: 超声上清; 2: 超声沉淀; 3: 诱导前; 4: 诱导 0 h; 5: 诱导 2 h; 6: 诱导 4 h; 7: 诱导 6 h; 8: 诱导 8 h。

Figure 7 Results of protein induction and ultrasonication. M: Protein marker; 1: Ultrasonic supernatant; 2: Ultrasonic precipitation; 3: Before induction; 4: Induction for 0 h; 5: Induction for 2 h; 6: Induction for 4 h; 7: Induction for 6 h; 8: Induction for 8 h.

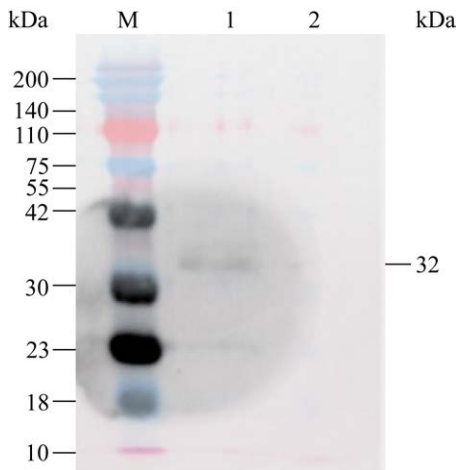


**图 8 蛋白纯化结果** M: Protein marker; 1: 空白对照; 2: 蛋白纯化结果; 3: pET-32a(+)菌体。  
 Figure 8 Protein purification results. M: Protein marker; 1: Blank control; 2: Protein purification results; 3: pET-32a(+) bacteria.



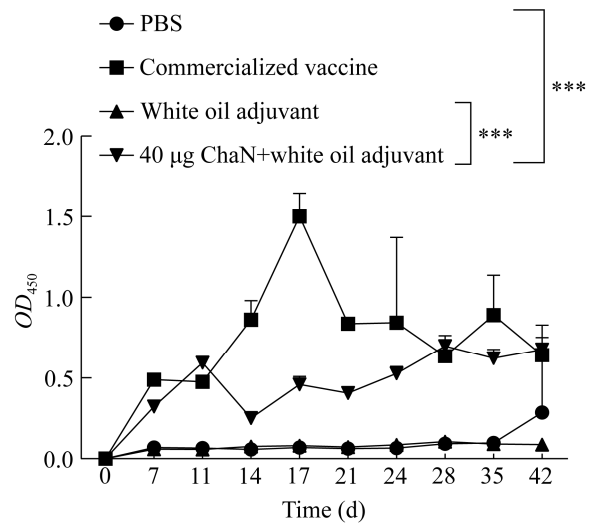
**图 10 rChaN 蛋白免疫剂量筛选结果**

Figure 10 Immune dose screening results of rChaN protein.



**图 9 rChaN 蛋白 Western blotting 结果** M: Protein marker; 1: rChaN 蛋白 Western blotting 结果; 2: 空白对照。

Figure 9 Western blotting results of rChaN protein. M: Protein marker; 1: Western blotting results of rChaN protein; 2: Blank control.



**图 11 rChaN 蛋白 IgG 抗体水平检测**

Figure 11 Detection of IgG antibody level of rChaN protein. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

后第 17 天抗体效价最高, 其后抗体水平不断下降, 40 µg ChaN+白油佐剂组免疫后抗体水平持续上升, 并在第 28 天与商品化疫苗接近(图 11), 42 d 后 IgG2a/IgG1>1 (图 12); IgG 亚型检测显示

ChaN 蛋白主要使机体产生 IgG1 和 IgG2b 亚型 (图 13)。

第 3 次免疫后第 7 天腹腔注射 Mh95 菌株, 40 µg ChaN+白油佐剂组存活率为 90%, 高于商

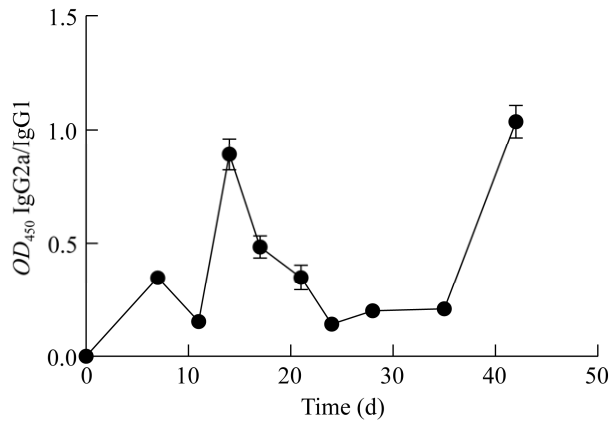


图 12 rChaN 蛋白 IgG2a/IgG1 检测结果  
Figure 12 Detection results of rChaN protein IgG2a/IgG1.

品化疫苗组，空白对照组、PBS 组和白油佐剂组小鼠 7 d 内存活率低于 20% (图 14)。结果表明，rChaN 蛋白能够对溶血性曼氏杆菌致死性攻毒有一定的保护效果。

### 3 讨论

Mh 能够引起牛纤维性肺炎或胸膜肺炎，对全球养牛业造成严重的经济损失，目前使用疫苗是其有效的防控及进化手段之一。北美和欧洲常使用多联疫苗用于 BRD 的免疫预防，但其免疫效果不完全<sup>[16-17]</sup>。由于 Mh 对牛、羊致病性较为普遍，临床多采用抗生素治疗，对 Mh 的

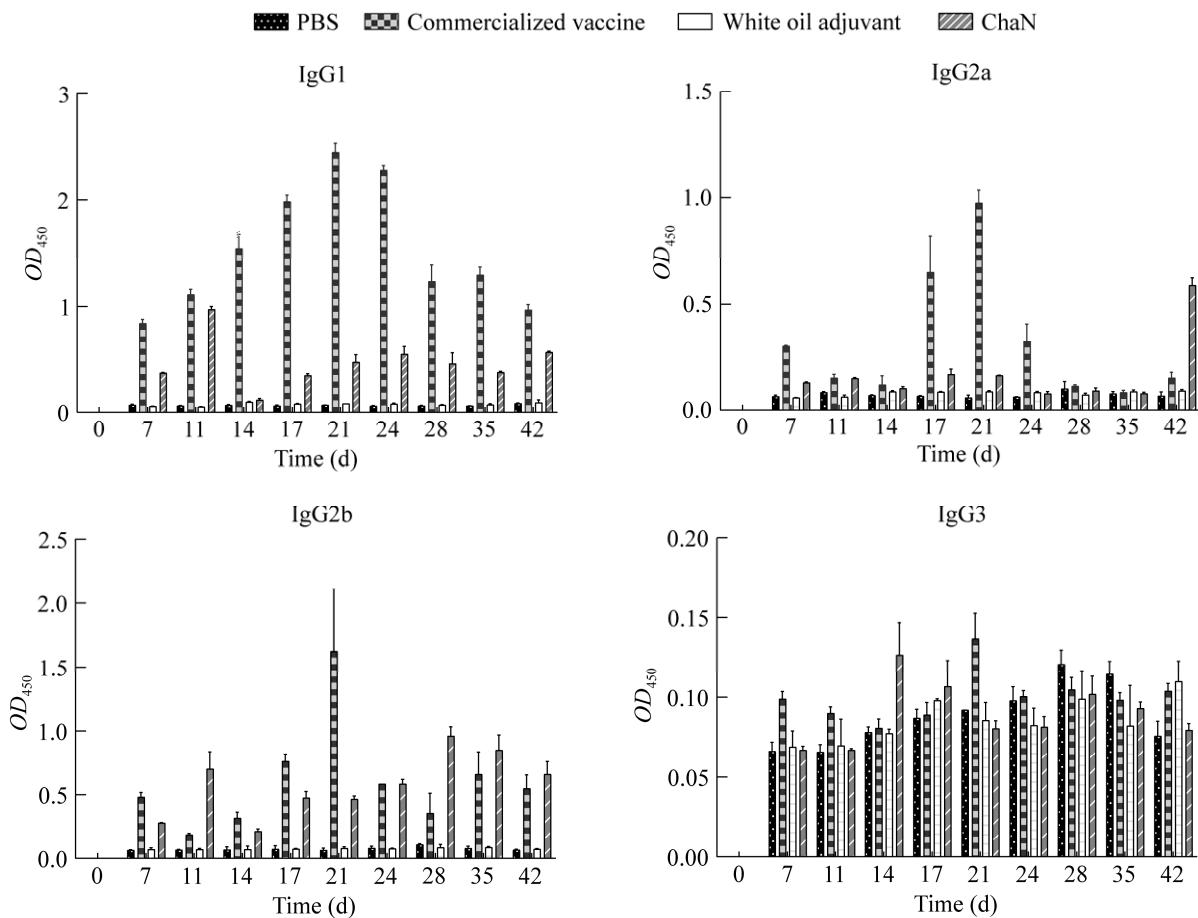


图 13 rChaN 蛋白 IgG 亚型检测结果  
Figure 13 The results of rChaN protein IgG subtype detection.

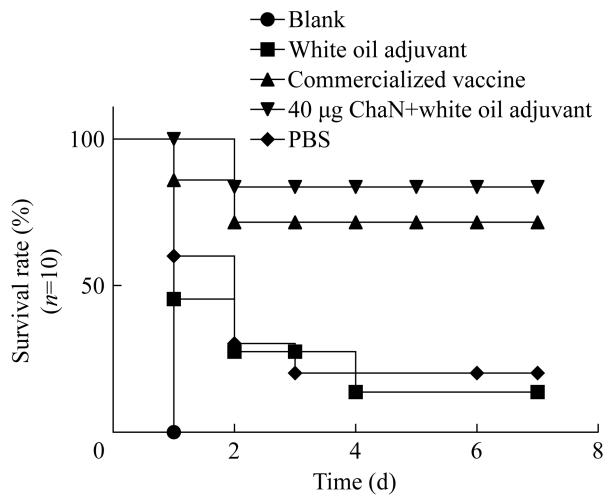


图 14 rChaN 蛋白攻毒保护结果

Figure 14 The results of rChaN protein challenge protection.

防控及净化产生不利影响, 因此不同类型的免疫制剂以及与免疫相关蛋白的研究成为了目前的研究热点。

铁对病原菌维持正常生命活动、生长发育、致病性等具有重要作用, 如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 利用血红素摄取系统和 2 个高亲和力的铁吸收载体葡萄铁蛋白 A 和 B 来获取铁元素, 以维持基本生命活动并发挥毒力作用<sup>[18-19]</sup>。ChaN 作为一种铁调节外膜相关蛋白, 与 ChaR 相互作用促进对血红素的摄取<sup>[20]</sup>。如 ChaN 在铜绿假单胞菌血红素获取中具有重要作用, 与富铁条件相比, 铁限制条件下细菌 ChaN 转录水平增加了 25 倍<sup>[17]</sup>。本研究通过对 NCBI 上已有的 Mh 全基因组分析发现 ChaN 蛋白, 经生物信息学分析分子式为 C<sub>1337</sub>H<sub>2156</sub>N<sub>368</sub>O<sub>405</sub>S<sub>10</sub>, 分子量为 32 kDa, 为亲水性可溶蛋白, 无跨膜结构域, 1 个开放阅读框。ChaN 与一些表征良好的血红素摄取蛋白同源, 如与铜绿假单胞菌血红素摄取相关蛋白 PhuW 有 30% 同源性<sup>[21]</sup>; 遗传进化显示牛源与羊源 Mh ChaN 蛋白存在一定差异, 可能与物种之间的血红素摄取机制不

完全相同有关。抗原表位作为蛋白质序列中能被相应细胞受体或抗体特异性识别并有效诱导免疫应答的位点, 包括抗原表位和 B 细胞抗原表位<sup>[22-23]</sup>。Mh ChaN 蛋白具有 16 个潜在抗原表位、23 个潜在的 B 细胞抗原表位, 可能参与感染过程中的免疫应答反应, 具有较强的免疫原性, 因此 ChaN 蛋白可作为 Mh 亚单位疫苗候选抗原及诊断的潜在靶标。体外培养 Mh95 菌株, ChaN 基因的转录水平对数期的表达量最高, 其次是稳定期及迟缓期, 在衰亡期的表达量最低, 比较不同时期的 ChaN 基因 mRNA 表达量差异极显著 ( $P < 0.001$ )。Western blotting 结果显示该蛋白能够与 Mh 感染动物阳性血清相结合, 说明该蛋白具有一定的反应原性, 能够诱导机体发生体液免疫。

IgG 是机体血清中的主要抗体, 分为 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 等亚型。Th2 型体液免疫反应对于阻止病原菌的侵入有重要作用, 是机体适应性免疫应答的重要组成部分; Th1 型细胞免疫反应是增强吞噬细胞介导的抗感染免疫, 特别是抗胞内病原体的感染, 还能促进 IgG 的生成<sup>[24-25]</sup>。Th1 型细胞和 Th2 型细胞可分别促进 IgG2a 和 IgG1 的产生。本研究发现 rChaN 能够持续刺激机体产生 IgG 抗体, 这有助于机体对 Mh 产生较高的抗感染能力。

Ayalew 等<sup>[26]</sup>研究表明, 包含 PlpE 主要抗原表位区域的截短片段能够诱导小鼠产生特异性 IgG 抗体, 进而介导补体杀菌效应, 但该项研究未开展进一步的攻菌保护试验; 而接种 rOmpA 能诱导小鼠和牛产生高水平的体液免疫应答, 但是该蛋白对动物的免疫保护作用并未得到进一步的验证<sup>[7]</sup>。李奕欣等<sup>[10]</sup>通过使用 rPlpE 截短片段, 2 次免疫小鼠后经 ELISA 检测发现, 虽然免疫小鼠血清中存在特异性 IgG 抗体, 但是使用最小致死量 (minimum lethal dose,

MLD)=1 的 ZD06 株菌液攻击后,小鼠在 24 h 内全部死亡,表明截短的 rPlpE 不能诱导小鼠产生保护性免疫;而使用全长 PlpE 重组蛋白免疫小鼠后的攻菌结果显示,接种 rPlpE 能够有效降低 ZD06 强毒菌液对小鼠的致死率。陆奕彤<sup>[27]</sup>通过截断表达 LKT A 蛋白并免疫小鼠,发现重组 LKT A 蛋白对同型菌株具有较好的免疫原性。本研究通过使用不同剂量的重组 ChaN 蛋白免疫小鼠发现,40 μg ChaN+白油佐剂组产生抗体水平最高,这和 Ayalew 等<sup>[26]</sup>、陆奕彤<sup>[27]</sup>研究结果相似,间接 ELISA 实验证明了保护作用来自 ChaN 蛋白,而不是白油佐剂。本研究中表达的是 ChaN 全长重组蛋白,免疫保护效果与 PlpE 全长重组蛋白对小鼠保护效果较为接近,并且比成品疫苗对小鼠免疫保护效果高。

## 4 结论

本研究结果表明,rChaN 能够诱导小鼠产生较高的特异性 IgG 抗体水平,免疫小鼠能有效抵抗 Mh 强毒株的攻击。本研究证明了 ChaN 蛋白具有良好的抗原性,能够作为 Mh 候选保护抗原,作为潜在的免疫原性蛋白进行研究。

## REFERENCES

- [1] Feedlot 2011 Part IV: health and health management on U.S. feedlots with a capacity of 1 000 or more head[S]. USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS, 2013.
- [2] Death loss in U.S. cattle and calves due to predator and nonpredator causes, 2015[S]. USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS, 2017.
- [3] AMAT S, HOLMAN DB, TIMSIT E, SCHWINGHAMER T, ALEXANDER TW. Evaluation of the nasopharyngeal microbiota in beef cattle transported to a feedlot, with a focus on lactic acid-producing bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1988.
- [4] AYALEW S, CONFER AW, HARTSON SD, SHRESTHA B. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates[J]. *Proteomics*, 2010, 10(11): 2151-2164.
- [5] KISIELA DI, CZUPRYNSKI CJ. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(1): 446-455.
- [6] SAMANIEGO-BARRÓN L, LUNA-CASTRO S, PIÑA-VÁZQUEZ C, SUÁREZ-GÜEMES F, deLa GARZA M. Two outer membrane proteins are bovine lactoferrin-binding proteins in *Mannheimia haemolytica* A1[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47(1): 93.
- [7] AYALEW S, SHRESTHA B, MONTELONGO M, WILSON AE, CONFER AW. Immunogenicity of *Mannheimia haemolytica* recombinant outer membrane proteins serotype 1-specific antigen, OmpA, OmpP2, and OmpD15[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(12): 2067-2074.
- [8] PANDHER K, CONFER AW, MURPHY GL. Genetic and immunologic analyses of PlpE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of *Pasteurella haemolytica* serotype 1[J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(12): 5613-5619.
- [9] CONFER AW, AYALEW S, PANCIERA RJ, MONTELONGO M, WHITWORTH LC, HAMMER JD. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine[J]. *Vaccine*, 2003, 21(21/22): 2821-2829.
- [10] 李奕欣, 姜志刚, 于力. 牛溶血性曼氏杆菌白细胞毒素、脂蛋白 E 和外膜蛋白 A 的免疫原性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(7): 753-758.
- [11] LI YX, JIANG ZG, YU L. The immunogenicity of leukotoxin, PlpE and OmpA of bovine *Mannheimia haemolytica*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(7): 753-758 (in Chinese).
- [12] CRUZ WT, YOUNG R, CHANG YF, STRUCK DK. Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella* leukotoxin[J]. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(11): 1933-1939.
- [13] SHEWEN PE, WILKIE BN. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1988, 52(1): 30-36.
- [14] ZHAO XX, YANG FX, SHEN H, LIAO Y, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, LIU MF, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, TIAN B, CHENG AC. Immunogenicity and protection of a *Pasteurella multocida* strain with a truncated lipopolysaccharide outer core in ducks[J]. *Veterinary Research*, 2022, 53(1): 17.
- [15] ZHAO XX, SHEN H, LIANG S, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, LIU MF, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, ZHANG L, LIU YY, YU YL, PAN LC, CHENG AC. The lipopolysaccharide outer core transferase genes *pcgD* and *hptE* contribute differently to the virulence of *Pasteurella multocida* in ducks[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 37.
- [16] KIRKPATRICK JG, STEP DL, PAYTON ME, RICHARDS JB, McTAGUE LF, SALIKI JT, CONFER AW, COOK BJ, INGRAM SH, WRIGHT JC. Effect of age at the time of vaccination on antibody titers and feedlot performance in beef calves[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2008, 233(1): 136-142.

- [16] OCHSNER UA, JOHNSON Z, VASIL ML. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology*, 2000, 146(Pt 1): 185-198.
- [17] HOLMES K, MULHOLLAND F, PEARSON BM, PIN C, MCNICHOLL-KENNEDY J, KETLEY JM, WELLS JM. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of *Fur*[J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 1): 243-257.
- [18] KARASH S, JIANG TS, KWON YM. Genome-wide characterization of *Salmonella typhimurium* genes required for the fitness under iron restriction[J]. *BMC Genomic Data*, 2022, 23(1): 55.
- [19] CONROY BS, GRIGG JC, KOLESNIKOV M, MORALES LD, MURPHY MEP. *Staphylococcus aureus* heme and siderophore-iron acquisition pathways[J]. *BioMetals*, 2019, 32(3): 409-424.
- [20] PARKHILL J, WREN BW, MUNGALL K, KETLEY JM, CHURCHER C, BASHAM D, CHILLINGWORTH T, DAVIES RM, FELTWELL T, HOLROYD S, JAGELS K, KARLYSHEV AV, MOULE S, PALLAN MJ, PENN CW, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, RUTHERFORD KM, van VLIET AH, WHITEHEAD S, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 665-668.
- [21] PALYADA K, THREADGILL D, STINTZI A. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4714-4729.
- [22] 张晶, 田晓薇, 梅雪芳, 张振超, 李祥瑞, 王帅. 刚地弓形虫钙网蛋白的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(3): 260-265.
- ZHANG J, TIAN XW, MEI XF, ZHANG ZC, LI XR, WANG S. Bioinformatics analysis of *Toxoplasma gondii* calcinetin[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2022, 17(3): 260-265 (in Chinese).
- [23] 刘慧婷. 金黄色葡萄球菌 *GapC* 与无乳链球菌 *GapC* 诱导的交叉免疫保护作用研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2022.
- LIU HT. Cross-immune protection induced by *Staphylococcus aureus* *GapC* and *Streptococcus agalactiae* *GapC*[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [24] 冯宇, 丁家波. 布鲁氏菌免疫应答研究进展[J]. *生命科学*, 2016, 28(9): 1067-1074.
- FENG Y, DING JB. Research advance on immune response against *Brucella*[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2016, 28(9): 1067-1074 (in Chinese).
- [25] 王春芳, 邱佳熠, 姜秀云, 马红霞, 王春风, 钱爱东. 母牛分枝杆菌感染引起小鼠细胞免疫应答的特征分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(12): 981-984.
- WANG CF, QIU JY, JIANG XY, MA HX, WANG CF, QIAN AD. Effect of *Mycobacterium vaccae* infection on cellular immune responses of mice[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(12): 981-984 (in Chinese).
- [26] AYALEW S, CONFER AW, PAYTON ME, GARRELS KD, SHRESTHA B, INGRAM KR, MONTELONGO MA, TAYLOR JD. *Mannheimia haemolytica* chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin[J]. *Vaccine*, 2008, 26(38): 4955-4961.
- [27] 陆奕彤. 溶血性曼氏杆菌重组 *LktA-OmpA* 融合蛋白的免疫原性及免疫保护作用研究[D]. 成都: 西南民族大学硕士学位论文, 2022.
- LU YT. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Mannheimia haemolytica* *LktA-OmpA* fusion protein[D]. Chengdu: Master's Thesis of Southwest Minzu University, 2022 (in Chinese).