

陈丽璇, 符颖, 陈政权, 等. 表达副猪格拉瑟菌 GAPDH 和 Omp26 的重组猪霍乱沙门氏菌构建及免疫学评价 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(3): 319-325.

CHEN Lixuan, FU Ying, CHEN Zhengquan, et al. Construction and immunological evaluation of recombinant *Salmonella choleraesuis* expressing GAPDH and Omp26 of *Glaesserella parasuis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(3): 319-325.

表达副猪格拉瑟菌 GAPDH 和 Omp26 的 重组猪霍乱沙门氏菌构建及免疫学评价

陈丽璇, 符颖, 陈政权, 李莉莉, 张伟孝, 张建民

(人兽共患病防制剂国家地方联合工程实验室/农业农村部人兽共患病重点实验室/农业农村部兽用疫苗创制
重点实验室/广东省动物源性人兽共患病重点实验室/华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】构建能同时表达副猪格拉瑟菌 *Glaesserella parasuis* 关键抗原 GAPDH 和 Omp26 的重组猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*, 并评估其作为二联疫苗候选株的潜力, 以期预防 *G. parasuis* 和 *S. choleraesuis* 感染提供一种新型高效的解决方法。【方法】选取多种血清型的 *G. parasuis* 中广泛存在的抗原 GAPDH 和 Omp26 作为外源抗原, 以 *S. choleraesuis* C500 Δ asd 缺失株为载体, 构建同时表达 GAPDH 和 Omp26 的 *G. parasuis*-*S. choleraesuis* 重组菌株, 并对其生物学特性和免疫效果展开研究。【结果】PCR 与测序结果共同表明, 本研究成功构建重组菌株 C501(pYA-GAPDH-Omp26), 该菌株能稳定携带 GAPDH 和 Omp26 基因片段 (大小分别为 1 020 和 798 bp), 在连续传代 100 次中均能稳定扩增目标片段; 且生长曲线、生化特性与对照菌 C501(pYA3493) 一致。重组菌株 C501(pYA-GAPDH-Omp26) 对 *S. choleraesuis* C78-1 和 *G. parasuis* 5 型强毒株 SH0165 的保护率分别为 62.5% 和 50.0%, 而 C501(pYA3493) 对 *S. choleraesuis* C78-1 的保护率为 50.0%, 对 *G. parasuis* 5 型强毒株 SH0165 则无保护作用。【结论】重组沙门氏菌 C501(pYA-GAPDH-Omp26) 能稳定携带异源基因, 具有与亲本菌株相近的生物学特性及良好的表达特性, 能够诱导机体对 *G. parasuis* 和 *S. choleraesuis* 产生联合免疫反应, 为 *G. parasuis*-*S. choleraesuis* 二联基因工程疫苗的研发奠定了基础。

关键词: 猪; 副猪格拉瑟菌; 猪霍乱沙门氏菌; C500 Δ asd 缺失株; GAPDH; Omp26

中图分类号: S855.12

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)03-0319-07

Construction and immunological evaluation of recombinant *Salmonella choleraesuis* expressing GAPDH and Omp26 of *Glaesserella parasuis*

CHEN Lixuan, FU Ying, CHEN Zhengquan, LI Lili, ZHANG Weixiao, ZHANG Jianmin

(National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control/Key Lab for Zoonosis of
Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Animal Vaccine Development of Ministry of Agriculture and Rural
Affairs/Guangdong Key Laboratory of Zoonotic Diseases of Animal Origin/College of Veterinary Medicine, South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to construct a recombinant *Salmonella choleraesuis* strain co-expressing GAPDH and Omp26, two immunogenic antigens derived from *Glaesserella parasuis*,

收稿日期: 2024-11-08 网络首发时间: 2025-03-06 18:32:02

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20250306.1111.004>

作者简介: 陈丽璇, E-mail: 13411904202@163.com; 通信作者: 张建民, 主要从事多种畜禽重要细菌病基础和应用研究,
E-mail: junfeng-v@163.com

基金项目: “十四五”国家重点研发计划 (2022YFD1800901)

evaluate its potential as a bivalent vaccine candidate, and provide a novel and efficacious solution for the prevention of both *G. parasuis* and *S. choleraesuis* infections in swine populations. 【Method】 GAPDH and OmP26, which are widely present in various serotypes of *G. parasuis*, were selected as exogenous antigens. A recombinant strain of *G. parasuis*-*S. choleraesuis*, which was capable of expressing both the GAPDH and OmP26, was constructed by using *S. choleraesuis* C500Δ*asd* deletion strain as vector. The biological characteristic and immune effect of the recombinant strain were then investigated. 【Result】 Results of PCR and Sanger-sequencing showed that we successfully constructed the recombinant strain C501 (pYA-GAPDH-OmP26), which was able to stably harbor GAPDH and OmP26 (sizes of 1 020 and 798 bp, respectively) . The target fragments were stably amplified from the strain in 100 consecutive passages, and the recombinant strain was consistent with the parent strain C501(pYA3493) in terms of growth curves and biochemical characteristics. The recombinant strain C501 (pYA-GAPDH-OmP26) showed 62.5% and 50.0% protection rates against *S. choleraesuis* C78-1 and *G. parasuis* type 5 strong strain SH0165, respectively, while C501 (pYA3493) showed 50.0% protection rate against *S. choleraesuis* C78-1 and no protection effect against *G. parasuis* type 5 strong strain SH0165. 【Conclusion】 The recombinant *S. choleraesuis* C501 (pYA-GAPDH-OmP26) can stably carry heterologous genes. Compared with the parent strain, the recombinant strain has similar biological and good expression characteristics, can induce the organism's combined immune response against *G. parasuis* and *S. choleraesuis*. The study lays the foundation for the development of the bivalent genetically engineered vaccine for *G. parasuis* and *S. choleraesuis*.

Key words: Pig; *Glaesserella parasuis*; *Salmonella choleraesuis*; C500Δ*asd* deletion strain; GAPDH; OmP26

猪格拉瑟病是由副猪格拉瑟菌 *Glaesserella parasuis* 引起的以猪的多发性浆膜炎、脑膜炎、关节炎、心包炎为特征的细菌性传染病^[1]。 *G. parasuis* 可感染断奶至屠宰任何阶段的猪群，并且与多种细菌、病毒、支原体等病原的混合感染广泛发生，给养猪业带来严重损失^[2-3]。 *G. parasuis* 具有很强的基因变异性^[4]，目前已知有 15 种血清型，不同血清型在基因型构成、毒力方面差异较大，这极大地制约了人们对 *G. parasuis* 感染的控制^[5-7]，使得该病成为世界范围内引起仔猪死亡的重要因素之一。在临床治疗中，抗生素的广泛使用加速了 *G. parasuis* 耐药性的产生，为该病的防控带来巨大挑战。疫苗免疫是 *G. parasuis* 防控的主要手段，当前中国市场上的 *G. parasuis* 可用商品化疫苗主要是本地分离株灭活苗类。但灭活苗的保护效果有限，不同血清型之间缺少交叉保护作用^[8]，而不同猪群流行的 *G. parasuis* 血清型可能不同，甚至同一头病猪的不同部位也可能存在不止一种血清型^[9]。因此，研究具有交叉保护力的新型疫苗成为 *G. parasuis* 防控研究的重点^[10]。

磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 是广泛存在于真核生物以

及原核生物中的一种酶，可与免疫细胞表面的受体结合激活相关信号通路。研究发现，GAPDH 是 *G. parasuis* 的新型免疫原^[11]，Fu 等^[12] 通过基因测序与生物信息学分析发现，GAPDH 广泛存在于各种血清型的 *G. parasuis* 中并且高度保守。但 GAPDH 作为 *G. parasuis* 普遍存在的免疫原性蛋白，却较少有针对该蛋白重组疫苗株的研究。外膜蛋白 (Outer membrane proteins, OMPs) 是细菌表面重要的抗原成分，能够参与决定宿主的特异性免疫应答。有学者发现在针对 *G. parasuis* 的免疫应答中存在 OMPs 的抗体，但没有脂多糖等成分的抗体，这表明 OMPs 比该生物体其他成分或许更具有免疫原性^[13]。多个团队的研究者^[14-16] 从 *G. parasuis* 基因组中筛选出不同的 OMPs 作为潜在毒力相关因素，并证实其在豚鼠、小鼠模型中对致死量 *G. parasuis* 的攻击具有显著的保护作用。已有研究^[17] 显示，编码 *G. parasuis* GAPDH 和 OmP26 蛋白的基因在 *G. parasuis* 不同血清型菌株中普遍存在，且能够介导免疫反应，这意味着它们有可能成为广谱的免疫原。

理想的疫苗载体应具备多种优良特性，包括安全性、免疫原性等。赵战勤等^[18] 通过基因工程方法构建猪霍乱沙门氏菌 *Salmonella choleraesuis*

asd 缺失株 C500Δ*asd*, 并证明该缺失株相较亲本菌株 C500 毒力降低; 同时具有良好的生长特性、稳定的遗传背景及高效的表达能力。随后, 徐引弟等^[19]和赵战勤等^[20]对 C500Δ*asd* 缺失株展开更进一步研究, 证实在 C500Δ*asd* 缺失株中插入不同外源抗原如支气管败血波氏杆菌免疫原性基因、巴氏杆菌毒素基因后重组菌株仍具有良好的遗传稳定性, 并高效表达外源抗原, 将重组菌株通过口服免疫小鼠和仔猪, 外源抗原有良好的表达活性, 且接种动物无任何不良反应。上述研究成果表明, C500Δ*asd* 缺失株是构建重组菌株的有力候选载体。

因此, 本研究选择 *GAPDH* 基因和 *OmP26* 基因作为免疫原性基因, 将上述基因同时导入 *S. choleraesuis* C500Δ*asd* 缺失株, 以求构建能够高效表达 *G. parasuis* 免疫基因, 同时能有效刺激机体产生针对 *S. choleraesuis* 特异性免疫保护作用的重组菌株, 并对其基本生物学特性及免疫效果进行评估; 旨在探索一种更为有效的猪格拉瑟病防控策略, 同时为 *G. parasuis* 和 *S. choleraesuis* 混合感染的防控提供新的思路和方法, 以应对这 2 种疾病给养猪业带来的挑战。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和试验动物

S. choleraesuis C500 弱毒疫苗株的 *asd* 基因缺失株、大肠埃希菌 *Escherichia coli* x6097 及无抗性原核表达质粒 pYA3493 由华南农业大学兽医学院动物传染病教研室保存; 限制性内切酶 *EcoR* I + *Sal* I、*Sal* I + *Hind* III 等各种内切酶购自 New England Biolabs 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; His 标签蛋白纯化试剂盒 (P2226) 购自碧云天公司; 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自广东省实验动物中心。

1.2 引物设计和基因克隆

参考 Genebank 中 *G. parasuis* 血清 5 型 SH02165 菌株的膜蛋白基因 *GAPDH*(GenBank ID: 72785966) 和外膜蛋白基因 *OmP26*(GenBank ID: 219691637) 的序列, 利用 Primer 5.1 设计引物 (*GAPDH*-F: CGG AATTCATGGCAATTAAAATTG, *GAPDH*-R: GCG TCGACTTAGCCTTTGTAGTTG; *OmP26*-F: GCG TCGACATGAAAAATTTATTTAACTTGC, *OmP26*-R: CCAAGCTTTTATTTTTCCTTCTTCTGG), 并以 *G. parasuis* SH02165 菌株的基因组为模板扩增引物。

1.3 重组质粒的构建

分别利用限制性内切酶 *EcoR* I + *Sal* I、*Sal* I + *Hind* III 对“1.2”回收获得的基因片段 *GAPDH*、*OmP26* 进行双酶切, 原核表达质粒 pYA3493 使用对应限制性内切酶进行双酶切, 然后经琼脂糖凝胶电泳回收 *GAPDH*、*OmP26* 基因片段与相应的线性质粒 pYA3493, 以 T4 DNA 连接酶进行连接。将质粒转入 x6097, 涂布在无抗性培养基上, 挑取单菌落, 在 LB 液体培养基中于 37℃ 培养 12 h 后进行质粒小提, 以酶切鉴定方法获取阳性克隆 pYA-*GAPDH* 和 pYA-*OmP26*。用 *Sal* I + *Hind* III 双酶切基因片段 *OmP26* 与 pYA-*GAPDH* 载体, 回收、纯化、连接后转入 x6097, 重复上述步骤, 获得 pYA-*GAPDH*-*OmP26* 质粒, 并将其送至上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定。

1.4 重组菌株的构建

将重组质粒 pYA-*GAPDH*、pYA-*OmP26* 和 pYA-*GAPDH*-*OmP26* 电转入 C501, 完成电击后迅速加入 37℃ 预热培养基, 并将菌液转移到无菌管中; 于 37℃、120 r/min 震荡 1 h 培养后离心收集菌体, 重悬于单纯培养基并涂布于 LB 平皿表面。使用目的基因引物对平皿表面生长的菌落进行扩增鉴定。

1.5 重组菌株的遗传与生长稳定性

重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*)、C501(pYA-*OmP26*) 及 C501(pYA-*GAPDH*-*OmP26*) 在无抗性 LB 液体培养基中连续传代培养, 每 25 代进行 PCR 鉴定, 测定其遗传特性。于 37℃ 条件下培养重组菌株, 每隔 1 h 测定 $D_{600\text{ nm}}$, 以菌液培养时间为横坐标, 菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制重组菌株的生长曲线。

1.6 重组菌株的生化特性与表达特性

将重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*)、C501(pYA-*OmP26*) 及 C501(pYA-*GAPDH*-*OmP26*) 培养于无抗性 LB 液体培养基中, 转接至以阿拉伯糖、乳糖、棉子糖、山梨醇、淀粉、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、鼠李糖和麦芽糖等为唯一碳源的细菌微量生化鉴定管进行生化试验。对重组菌株全菌裂解物进行 Western-Blot 鉴定。

1.7 重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*-*OmP26*) 对小鼠的免疫试验

选取 40 只 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 分 3 组: C501(pYA-*GAPDH*-*OmP26*) 组 (20 只小鼠)、C501(pYA3493) 组 (10 只小鼠)、PBS 阴性对照组 (10 只

小鼠), 按每只 5×10^8 CFU/mL 剂量皮下多点位注射。首次免疫后第 14 天进行加强免疫, 操作程序同首次免疫。加强免疫 14 d 后各组分别按照每只 2.5×10^9 CFU/mL 剂量腹腔攻毒 *G. parasuis* 5 型强毒株 SH0165 和每只 5×10^7 CFU/mL 剂量灌胃攻毒 *S. choleraesuis* 强毒株 C78-1, 各小组中 2 种菌株攻毒相同数量小鼠, 连续观察 14 d, 记录发病及死亡情况。

2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建

目的基因 *GAPDH* 和 *OmP26* 扩增结果分别为 1 020、798 bp, 与预期片段长度一致, 测序结果正确 (图 1)。重组质粒 pYA-*GAPDH*、pYA-*OmP26* 酶切鉴定均能成功扩增出约 3 000 bp 的外源基因片段 (图 2)。pYA-*GAPDH*、pYA-*OmP26* 和 pYA-*GAPDH-OmP26* 测序结果均符合预期。重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*)、C501(pYA-*OmP26*) 及 C501(pYA-*GAPDH-OmP26*) 用 *GAPDH*、*OmP26* 引物扩增, 测序结果与目的外源基因一致。

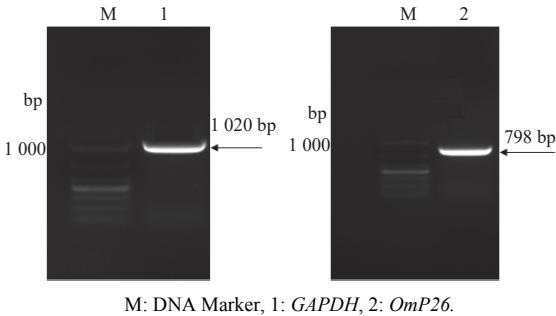


图 1 目的基因 PCR 扩增片段

Fig. 1 PCR amplified fragments of target genes

2.2 重组菌株遗传与生长稳定性

重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*)、C501(pYA-

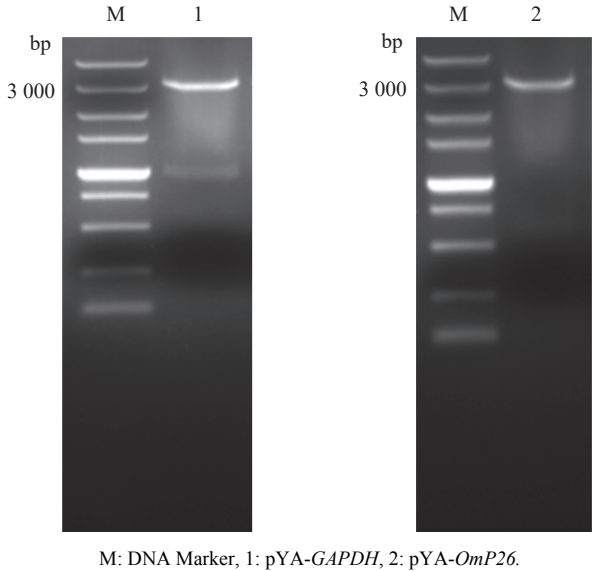


图 2 重组质粒 pYA-*GAPDH* 和 pYA-*OmP26* 的酶切鉴定
Fig. 2 Enzymatic identification of recombinant plasmids pYA-*GAPDH* and pYA-*OmP26*

OmP26) 及 C501(pYA-*GAPDH-OmP26*) 连续传代 100 代, 每 25 代进行 1 次 PCR 鉴定, 结果显示, 不同代次均能扩增出外源基因条带 (图 3), 表明重组质粒 pYA-*GAPDH*、pYA-*OmP26* 和 pYA-*GAPDH-OmP26* 均能在宿主菌菌株 C501 中稳定遗传。重组菌株的生长曲线与对照菌株 C501(pYA3493) 非常接近 (图 4), 表明外源基因基本不影响宿主菌株生长趋势。

2.3 重组菌株生化特性

重组菌株 C501(pYA-*GAPDH*)、C501(pYA-*OmP26*) 及 C501(pYA-*GAPDH-OmP26*) 与对照菌株 C501(pYA3493) 均不能利用阿拉伯糖、乳糖、棉子糖、山梨醇、淀粉和半乳糖, 但可以利用葡萄糖、甘露醇、果糖、麦芽糖和鼠李糖 (表 1), 表明外源片段引入不影响 *Salmonella* 自身的生化特性。

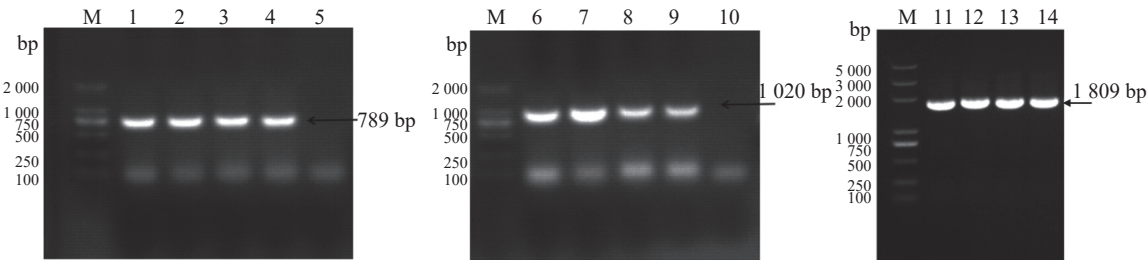


图 3 重组菌株遗传稳定性

Fig. 3 Genetic stability of recombinant strains

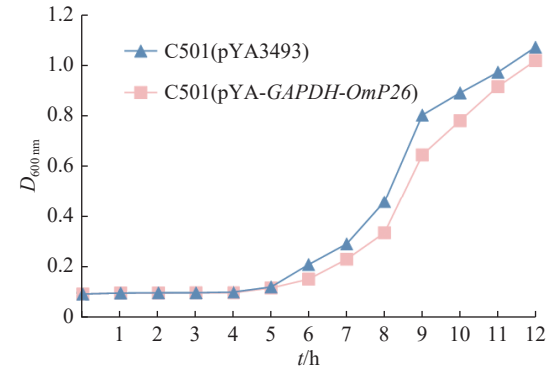


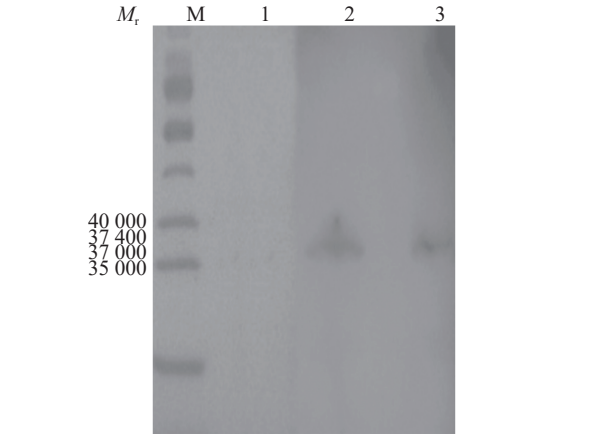
图 4 重组菌株 C501(pYA-GAPDH-OmP26) 与对照菌株 C501(pYA3493) 的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of recombinant strain C501 (pYA-GAPDH-OmP26) and control strain C501 (pYA3493)

表 1 重组沙门氏菌对不同碳源的利用情况¹⁾
Table 1 Utilization of different carbon sources by recombinant *Salmonella* spp.

菌株 Strain	阿拉伯糖 Arabinose	乳糖 Lactose	棉子糖 Raffinose	山梨醇 Sorbitol	淀粉 Starch	半乳糖 Galactose	葡萄糖 Glucose	甘露醇 Mannitol	果糖 Fructose	鼠李糖 Rhamnose	麦芽糖 Maltose
C501(pYA3493)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C501(pYA-GAPDH)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C501(pYA-OmP26)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C501(pYA-GAPDH-OmP26)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

1) -: 阴性; +: 阳性。
1) -: Negative; +: Positive.



Mr: 相对分子质量, M: Marker, 1: C501(pYA3493), 2: C501(pYA-GAPDH), 3: C501(pYA-OmP26)。
Mr: Relative molecular mass, M: Marker, 1: C501(pYA3493), 2: C501(pYA-GAPDH), 3: C501(pYA-OmP26).

图 5 重组菌株 Western-Blot 分析

Fig. 5 Western-Blot analysis of recombinant strains

3 讨论与结论

3.1 讨论

接种疫苗是预防猪格拉瑟病的有效措施。但现有的商业疫苗对异源菌株的交叉保护作用有限, 不

2.4 重组菌株表达特性

重组菌株 C501(pYA-GAPDH)、C501(pYA-OmP26) 全菌裂解物 Western-Blot 结果显示, 与空质粒对照相比, 重组疫苗菌株能够正确表达外源蛋白, 蛋白相对分子质量分别为 37 400、37 000(图 5)。

2.5 免疫小鼠攻毒保护试验

C501(pYA-GAPDH-OmP26) 组免疫小鼠对 *S. choleraesuis* 强毒株 C78-1 攻毒的保护率为 62.5%, 对 *G. parasuis* 5 型强毒株 SH0165 攻毒的保护率为 50.0%; C501(pYA3493) 组、PBS 对照组对 *G. parasuis* 5 型强毒株 SH0165 攻毒的保护率均为 0(图 6)。

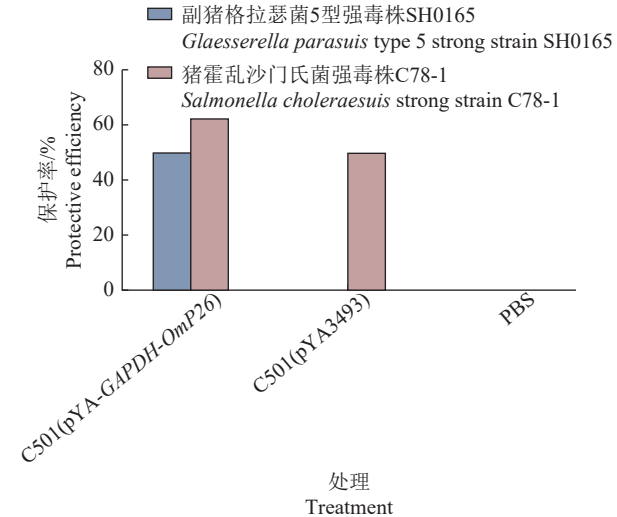


图 6 免疫小鼠的攻毒保护率

Fig. 6 Attack protection rate of immunized mice

能提供广泛的异源保护^[21]。如基于血清型 2 和 5 组合、血清型 1 和 6 组合的市售疫苗, 对其他血清型甚至同一血清型不同菌株的保护力常常无法达到预期^[22]。因此, 研发对不同血清型具有交叉保护作用的新型疫苗对该病的防治具有重要意义。诸多研

究表明, *S. choleraesuis* C500Δ*asd* 缺失株作为活疫苗载体能够同时表达多种不同病原的抗原, 且具有极高的安全性和可行性, 作为胞内侵袭细菌, *Salmonella* 能够有效递呈抗原, 激发机体产生抗 *Salmonella* 免疫反应, 同时诱导产生针对外源基因的特异性细胞免疫和体液免疫^[23-24]。 *S. choleraesuis* C500Δ*asd* 缺失株导入含 *asd* 质粒后才能在无外源二氨基庚二酸条件下存活, 这使得质粒携带的外源基因不易丢失, 同时避免 *Salmonella* 过度繁殖^[25-26]。本研究选取的外源抗原 OmP26 是 *G. parasuis* 的外膜蛋白, 本身具有良好的免疫活性; GAPDH 作为 *G. parasuis* 多种血清型普遍存在的蛋白, 具有免疫调节功能。将二者结合同时克隆, 可增加机体可识别的抗原位点, 从而提高机体免疫应答的效率。同时, GAPDH 和 OmP26 二者同时表达可能存在协同刺激免疫系统的效果, 产生更强的免疫反应。此外, 同时包含 GAPDH 和 OmP26 基因的表达载体对于血清型众多的 *G. parasuis* 而言, 能够提供更广泛的保护。

基于此, 本研究从 *G. parasuis* 中筛选出具有良好免疫效应的蛋白 GAPDH、OmP26, 将其同时插入 *S. choleraesuis* C500Δ*asd* 缺失株, 成功构建二联基因工程弱毒株 C501(pYA-GAPDH-OmP26)。试验结果显示, C501(pYA-GAPDH-OmP26) 能稳定携带、表达外源基因, 并与对照菌株 C501(pYA3493) 具有相近的生物学特性, 表明外源片段的插入基本不影响宿主菌株的生长与代谢。通过皮下注射 C501(pYA-GAPDH-OmP26) 免疫的小鼠对致死剂量的 *G. parasuis* 强毒株表现出 50.0% 的保护率, 与对照组 C501(pYA3493) 组、PBS 组 (保护率为 0) 均存在明显差异。同时, C501(pYA-GAPDH-OmP26)、C501(pYA3493) 对 *S. choleraesuis* C78-1 的保护率分别为 62.5%、50.0%, 说明外源 GAPDH 和 OmP26 抗原的表达没有降低 C500Δ*asd* 缺失株针对 *Salmonella* 感染的免疫保护力。但该重组菌株在小鼠与在猪体内引发的免疫反应可能存在差异, 目前针对 *G. parasuis* 重组疫苗菌株的研究也大多都在小鼠试验模型上进行, 少有在猪模型上检验^[27]。在后续研究中, 有必要在本体动物仔猪动物模型中进一步评估该重组菌株的免疫效力。

3.2 结论

本研究选取 *G. parasuis* 的 GAPDH 和 OmP26 为外源性抗原并成功研制 *G. parasuis*-*S. choleraesuis* 二联基因工程弱毒株 C501(pYA-GAPDH-OmP26), 与空质粒组 C501(pYA3493) 相比, 该重组菌株对

G. parasuis 5 型强毒株 SH0165 的保护效果更好且存在明显差异, 同时保留了对 *S. choleraesuis* C78-1 的高效保护, 为进一步研发 *G. parasuis* 新型疫苗提供了参考。

参考文献:

[1] 赵谦. 猪链球菌病-副猪嗜血杆菌病二联亚单位疫苗的研制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.

[2] OLVERA À, CALSAMIGLIA M, ARAGON V. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3984-3992.

[3] 薛国聪, 任涛. 副猪嗜血杆菌病流行病学及致病因子的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(5): 168-171.

[4] 蒋征, 李军星, 姜平, 等. 副猪嗜血杆菌病分离与基因分型鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2008, 40(6): 47-49.

[5] ZHANG P, ZHANG C Y, ARAGON V, et al. Investigation of *Haemophilus parasuis* from healthy pigs in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 231: 40-44.

[6] ZHAO Y D, GUO L L, LI J, et al. Characterization of antimicrobial resistance genes in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in China[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4613.

[7] 董婉玉, 王馨雨, 张聚民, 等. 2020 年~2021 年我国副猪嗜血杆菌和链球菌的血清型、耐药基因型流行情况分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(10): 1045-1051.

[8] 穆永才, 罗天瑶, 徐铭. 副猪嗜血杆菌病多价油乳剂灭活疫苗的研制[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(6): 108-109.

[9] 王金合, 石冬梅, 郭素琴, 等. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及自家灭活苗的研制[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(8): 144-147.

[10] 张昆丽, 李春玲. 副猪嗜血杆菌病研究进展[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(12): 166-174.

[11] 孔里程, 王兆飞, 孙建和. 猪链球菌保护性抗原表位串联亚单位疫苗设计及小鼠免疫保护效力分析[J]. *上海交通大学学报 (农业科学版)*, 2019, 37(3): 1-8.

[12] FU S L, ZHANG M M, OU J W, et al. Construction and immune effect of *Haemophilus parasuis* DNA vaccine encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(48): 6839-6844.

[13] MINIATS O P, SMART N L, ROSENDAL S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 1991, 55(1): 37-41.

[14] LI M, LI C L, SONG S, et al. Development and antigenic characterization of three recombinant proteins with potential for Glässer's disease prevention[J]. *Vaccine*, 2016, 34(19): 2251-2258.

[15] ZHANG B, TANG C, YANG F L, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of the outer membrane protein A gene from *Haemophilus parasuis*[J]. *Veterin-*

ary Microbiology, 2009, 136(3/4): 408-410.

[16] 刘栋, 薛少华, 龙凡利, 等. 副猪嗜血杆菌 OMP5 抗原免疫刺激复合物的制备及其对小鼠免疫功能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(9): 67-72.

[17] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ S, FRANDOLOSO R, FERRI E F R, et al. Immunoproteomic analysis of the protective response obtained with subunit and commercial vaccines against Glässer's disease in pigs[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013, 151(3/4): 235-247.

[18] 赵战勤, 徐引弟, 吴斌, 等. 猪霍乱沙门氏菌 Δ asdC500 株的生物学特性及作为活疫苗表达载体的应用[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1): 29-36.

[19] 徐引弟, 郭爱珍, 刘维红, 等. 绿荧光蛋白基因在猪霍乱沙门氏菌 C500 株 asd 缺失株平衡致死载体系统中的表达[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(4): 493-496.

[20] 赵战勤, 王臣, 丁轲, 等. 表达 T⁺ Pm 保护性抗原的重组猪霍乱沙门氏菌 C500 株的构建及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 91-97.

[21] TAKAHASHI K, NAGA S, YAGIHASHI T, et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2001, 63(5): 487-491.

[22] PANG M N, TU T, WANG Y, et al. Design of a multi-epitope vaccine against *Haemophilus parasuis* based on pan-genome and immunoinformatics approaches[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 1053198. doi: 10.3389/fvets.2022.1053198.

[23] 房晓文, 李扬陇, 黄昌炳, 等. 仔猪副伤寒弱毒菌苗的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1981, 12(2): 29-34.

[24] 韩国全, 郭万柱, 林华, 等. 减毒猪霍乱沙门菌 C500 作为基因疫苗运载体的研究现状[J]. 猪业科学, 2009, 26(6): 80-83.

[25] 胡娇. 猪霍乱沙门菌 C500 Δ asd 缺失株的构建及其作为疫苗活载体的初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.

[26] XU Y D, GUO A Z, LIU W H, et al. Construction and characterization of delta crp delta asd mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(3): 366-372.

[27] FRANDOLOSO R, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ S, RODRÍGUEZ-FERRI E F, et al. *Haemophilus parasuis* subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin prevent the expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pigs[J]. Clinical & Developmental Immunology, 2013, 2013: 132432. doi: 10.1155/2013/132432.

【责任编辑 李庆玲】