

学校编码：10384 分类号_____ 密级_____

学号：B200126006 UDC_____

厦门大学

博士学位论文

厦门产柔嫩艾美尔球虫生物学及转胸腺素 1 基因蓝藻在抗球虫感
染中的保护作用的研究

Study on the Biology of *Eimeria tenella* from Xiamen and the Effect of Algae
Transformed with Thymosin 1 Gene for Anti-coccidia

周克夫

指导教师姓名：林宇光

专业名称：动物学

论文提交日期：2004 年 7 月 6 日

论文答辩日期：2004 年 7 月 15 日

学位授予日期：

答辩委员会主席：陈佩惠教授

评 阅 人：陈佩惠教授

周述龙教授

熊光华教授

潘沧桑教授

洪凌仙教授

第三部分 柔嫩艾美尔球虫(厦门) (*E.tenella* , 厦门) 的

致病作用.....	202
一、临床症状	202
(一) 对 10 日龄以内的小鸡的危害.....	202
(二) 对 11-15 日龄小鸡的危害	202
(三) 1-10 日龄雏鸡感染后对再次感染的抵抗力	202
(四) 1-15 日龄雏鸡对第三次感染的抵抗力	203
二、肉眼剖检病变	203
三、血液生理生化指标的改变	203
(一) 血常规的改变.....	203
(二) 14 日龄雏鸡感染 <i>E.tenella</i> (厦门)七天后血液生理生化 指标 的影响	204
(三) 光学显微镜下的病理组织化学的观察.....	205
四、电镜下的病理观察	205
(一) 透射电镜观察.....	205
(二) 扫描电镜下的病理观察.....	206

第四部分 鸡感染柔嫩艾美尔球虫(厦门)(*E.tenella* , 厦门) 后的

免疫反应.....	213
一、鸡感染柔嫩艾美尔球虫(厦门)(<i>E.tenella</i> , 厦门) 后血清抗体 的 变化规律.....	213
(一) 鸡感染柔嫩艾美尔球虫(厦门)(<i>E.tenella</i> , 厦门) 后 血 清抗体 ELISA 检测	213
(二) 鸡体球虫感染的抗体效价检测结果.....	214
二、感染柔嫩艾美尔球虫(厦门) (<i>E.tenella</i> , 厦门) 后鸡血清 蛋 白组分的 SDS-PAGE 检测.....	218

第五部分 转胸腺素 1 基因蓝藻在球虫感染中的保护效果 及药

代动力学研究.....	222
-------------	-----

一、转胸腺素 1 基因蓝藻的制备	222
二、鼠抗胸腺素 1 和兔抗胸腺素 1 抗体的制备与鉴定	222
三、胸腺素 1 标准曲线	222
四、胸腺素 1ELISA 检测方法的建立	223
五、喂饲转胸腺素 1 基因蓝藻后，鸡体内的 T α 1 生物分布情况 ...	223
六、喂饲转 T α 1 基因蓝藻后雏鸡抗球虫感染的效果	224
(一) 临床症状的影响.....	224
(二) 转 T α 1 基因蓝藻对鸡血清中抗体水平的影响.....	226
结 论	231
参考文献	235
致 谢	249
图版及说明	132

Content

Abstract	I
-----------------------	----------

Preface	1
Material and method	38
Result	57
Establishment of single-oocyst isolation and purification of <i>E.tenella</i>(Xiamen)	57
1、 The method of single-oocyst isolation of <i>E.tenella</i> (Xiamen)	57
2、 The establishment of purification with discontinuous sucrose gradient	57
The morphology of <i>E.tenella</i>(Xiamen)	60
1、 The morphology of oocyst of <i>E.tenella</i> (Xiamen) and sporogony	60
2、 The morphology of oocyst , sporucyst and sporozoite of <i>E.tenella</i> (Xiamen)	63
The pathogenicity of <i>E.tenella</i>(Xiamen)	82
1、 The clinic symptom.....	82
2、 The variation of physiology and biochemistry indexes	83
3、 The pathological change visibly	83
4、 Pathological change under the optical microscope.....	86
The immune respond of chicken after infection with <i>E.tenella</i>(Xiamen) 95	
1、 The variation of antibody to coccidia in the serum of chicken	95
2、 Detection of protein in serum on chicken after infection with <i>E.tenella</i> (Xiamen)with SDS-PAGE.....	100
Study on the pharmacokinetics of algae transformed with thymosin α1 in the chickens and the effct of this kind of algae to protect the chicken from coccidia	103
1、 The preparation of algae transformed with thymosin α 1	103
2、 The effect to antibody level to coccidian fed with the algae transformed with thymosin α 1 gene	103
3、 Study on the pharmacokinetics of algae transformed with thymosin α 1 gene in the chickens.....	103
Conclusion	112
References	117

Acknowledgement	131
Figure and illustration	132

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

2001 年 8 月份至 2004 年 7 月份，作者对厦门产的柔嫩艾美尔球虫 (*E.tenella*) 的病原生物学、生活史各期形态特征、球虫的致病作用等方面进行了详细的研究，在此基础上对鸡感染从厦门获得的柔嫩艾美尔球虫{以下简称柔嫩艾美尔球虫(厦门)}后血清抗体变化规律也进行了考察，并对转胸腺素 1 基因蓝藻在球虫感染中的保护作用及药代动力学进行探讨，研究内容结果如下：

一、柔嫩艾美尔球虫厦门 (*E.tenella*) 病原生物学考察，此项内容包括：

1. 采用单卵囊分离技术分离并增殖到柔嫩艾美尔球虫(厦门)，建立了用蔗糖梯度离心的方法纯化球虫卵囊的方法。

2. *E.tenella*(厦门)内生发育阶段的各期形态的研究包括采用直接涂片、石蜡组织切片和冰冻切片的方法在光学显微镜下进行观察以及采用透射电镜手段进行内生阶段形态观察。结果显示，*E.tenella*(厦门)具有 3 代裂殖体，其中第二代具有大小两型的裂殖子，吞噬细胞在裂殖子的移行和转运中起作用，裂殖子中的棒状体先于或与微线同时出现，裂殖子发育过程中出现类似蜕皮现象，裂殖生殖同时具备两种生殖分裂方式，盲肠内发育的大配子体数量是小配子数量的 50 倍以上。小配子具有 4 根鞭毛，几个小配子体分布在相邻的宿主细胞内。大配子体的疏松形的成囊体 1 先于致密形的成囊体 2 出现。经冰冻切片和苏丹黑 B 染色证明，大配子体内主要是脂肪性质的成分。

3. 27℃ 下，*E.tenella* 厦门卵囊孢子化时间为 20h，潜伏期为 146h，孢子化卵囊在 4℃ 下保存 4 个月致病作用明显减弱，未孢子化卵囊在 4℃ 和 8℃ 下 30d，孢子化率接近 0。

二、*E.tenella* 厦门的致病作用：

1. 10000 个卵囊/只的感染量，鸡的死亡率为 40-60%。对 10 日龄以内的雏鸡危害相对大。第二次感染对 1-8 日龄小鸡危害大，而第二次感染对 10 日龄以后的小鸡危害小。

2. 感染球虫的鸡血清生化指标发生明显改变，并出现明显贫血的症状。

3. 电镜下发现被感染的小鸡盲肠绒毛变少、折断，被寄生的宿主细胞内线粒体数量明显减少，小配子体寄生的宿主细胞核还发生核膜损伤的现象。

三、虫感染后血清抗体消长规律的研究

1. 运用冻融的方法制备了球虫抗原，建立了检测鸡感染球虫后血清抗体的 ELISA 方法。

2. 血清中抗球虫抗体在第一次和第二次感染后的第 4d 均出现一个峰值，而第三次感染在 7d 内没有检测到抗体水平升高。

3. 对 3 次感染球虫的鸡血清蛋白进行 SDS-PAGE 分析，第一次和第二次感染后 7d 出现 14 条带，增加的 3 条分子量分别为 21kDa、33kDa 和 50 kDa，另外 30kDa 的蛋白带在第一次感染和第二次感染后 7d 量明显增多，而第三次感染后 7d 出现 12 条带。其中 33 kDa 和 50kDa 两条带消失。

四、转胸腺素 1 (T_H1) 基因蓝藻在鸡体内分布和对球虫感染中的保护作用的研究

1. 建立了检测 T_H1 的 ELISA 方法，并检测到喂转胸腺素 1 基因蓝藻的小鸡几种器官和组织中 T_H1 出现升高。

2. 通过实验观察发现，转基因藻在改善球虫感染的症状方面具有明显的效果，同时，在提高抗体水平方面也有一定作用。

本项研究完善了该球虫的生物学特性，补充了内生发育超微结构方面的资料，为球虫病的药物和免疫防治提供理论依据。同时，为应用转胸腺素 1 基因蓝藻作为鸡免疫增强剂提供科学依据。

关键词：柔嫩艾美尔球虫；生物学；免疫增强剂

Abstract

The present paper deals with the morphology , developmental cycle and pathogenicity of *E.tenella* from Xiamen , the paper also deals with the immune response of chicken to *E.tenella* ,and study on the effect of algae transformed T 1 gene for anti-coccidia , the results as follows:

一、The study on the biology of *E.tenella* from Xiamen ,it deals with the following contents:

1. The *E.tenella* was separated from chicken in Xiamen using a new single-oocyst isolation technical , and the other method for purification of *E.tenella* was also established with discontinuous sucrose gradient. The result showed that both of these methods are effective.

2. Study on the endogenous cycle of *E.tenella* from Ximen , the technical involves the smear of caecum mucosa, tissue section and electron microscope , the results indicated that schizont of *E.tenella* including 3 generations , there are 2 types in the second generation schizont , the phagocytes were important in transferring of merozoite; The rhotry(RH) of merozoite was earlier appeared than the microneme(MN) and a phenomenon of molting appeared during the period of maturation of merozoites. The number of macrogametocytes is more 50 times than that of microgametocytes. There are 4 flagellum in microgamete and there are several microgametes appeared in one region of several host cells.

3. The wall-forming body 1(WF1) was loose , and earlier appeared than the wall-forming body2(WF2)that is fine and close. With Cryostate sections combining freezing , stained with Sudan black B , the result indicated that the chemical composition in macrogamet is lipid.

4. It spended about 20h at 27 for sporulation , the incubation period is 146h , the pathogenicity of sporulated oocyst is declined obviously stored at 4

for 4 months. When the oocysts were stored at 4 °C and 8 °C for 30 days before sporulation, the sporulation rate was nearly zero.

一、 The pathogenicity of *E.tenella* from Xiamen

1. Oral infection with the dosage of 10⁷, 10⁸, 10⁹ oocysts, the death rate of chicken was 40%-60%. It is relatively more harmful to chickens within 10 day age than other age chickens.

2. The biochemical indexes number changed in chickens after infection with *E.tenella* XM and showed the anaemia symptom.

3. It was found that the villus of caecum of chicken reduced and broke off after infection with *E.tenella* XM, the host cell membrane of nucleus was damaged obviously and this damage was only found in host cell that infected with microgametocyt. The number of mitochondrion decreased obviously in host cell after infection *E.tenella*(Xiamen).

二、 Study on antibody to coccidia

1. Preparation the the antigen of coccidian with freezing and melting, the result proved it was a good method, and also found it was better than that of ultrasonic crushing.

2. An indirect ELISA for detecting serum *E.tenella* -specific antibody in chicken was successfully established, and result proved that the peak value was appeared at 4th day after infection.

三、 The biodistribution of Thymosin α 1 in chickens and the effect of algae transformed Thymosin α 1 gene.

1. An indirect ELISA for detecting T α 1 was established, with this assay, the result indicted that the content of T α 1 in several organs of chickens fed with algae transformed Thymosin α 1 gene were higher than that of control chickens.

2. The experiment showed that the transformed algae is effective in protecting from coccidia infection, on the other hand, it can increase the level

of anti-body to coccidian.

The paper perfected the endogenous cycle about *E.tenella* , and provide the new stuff about the life cycle , morphology , pathology and physiology of *E.tenella*. As an immunopromoter, the usage of algae transformed T 1 gene will give a new way to prevent coccidiasis. This work is very important in theory and practical for preventing coccidiasis.

Key word: *E.tenella* ; biology ; immunopromoter

厦门大学博硕士论文摘要库

文中所用缩写词中英文对照

缩写	中文	英文
A	支链淀粉	amylupentin
AP	顶体	apical body
BG	大配子体	macrogamont
C	锥体	conoid
ELISA	酶联免疫吸附测定	enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	辣根过氧化物酶	horseradish peroxidase
MN	微线	microne me
N	细胞核	nucleoli
P	极环	polar ring
PCR	聚合酶链式反应	polymerase chain reaction
PBS	磷酸缓冲液	phosphate-buffered saline
PBST	磷酸缓冲液吐温-20	phosphate-buffered saline-Tween 20
RB	折光体	refractile body
RH	棒状体	rhotry
RBC	红细胞	red blood cell
RAPD	随机扩增多态性DNA	Random amplified polymorphi DNA
SDS-PAGE	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS-polyacrylamidegel electrophoresis
SG	小配子体	microgamont
T ₁	胸腺素 1、	<i>Thymosin</i> 1
WBC	白细胞	white blood cell
WF1	成囊体1	The wall-forming body 1
WF2	成囊体1	The wall-forming body 2

前 言

随着经济的发展和人们生活水平的提高,发展禽类产业在农业生产中占有重要地位,近年来,我国的养禽业高速发展,2000年禽蛋、禽肉的产量分别居世界第一位和第二位,养殖规模空前,取得了举世瞩目的成绩。但是,我国大部分养殖是庭院养殖,由于生产结构性矛盾,导致生产环境恶化,鸡群发病规模和危害程度有逐年加深趋势。而如何预防和控制禽类疾病尤其是一些重大疾病的暴发是当今禽类产业发展的关键。

以美国为例,1992年共屠宰了约61亿只肉鸡,总重量达1200万吨。每人每年平均消耗肉鸡30公斤以上,且平均每年增加4%-5%。肉鸡的饲养管理也经历了革命性的改变。目前大部分的肉鸡用密集的饲养方式,即集约化生产。然而新的生产方式也带来了新的多种多样的问题,其中之一就是球虫病的多发或必发。球虫病已成为造成当今世界上畜禽业经济损失的一个重要疾病(索勋,1998)。

球虫病是由细胞内原虫寄生引起的肠道感染,这些原虫隶属于艾美尔属的几个不同种,鸡球虫病(Coccidiosis)就是由艾美尔球虫(*Eimeria*)引起的一种严重危害鸡生长发育的寄生原虫病,分布世界各地,各地普遍感染率高。其中15-50日龄的雏鸡发病率最高。病愈的雏鸡,生长受阻,长期不能复原。成年鸡多为带虫者,但增重和产卵受到一定影响。迄今公认的鸡艾美尔球虫病的病原有9种,其中,致病力最强的为柔嫩艾美尔球虫(*E. tenella*)和毒害艾美尔球虫(*E. necatrix*),这两种球虫都在盲肠下形成大型裂殖子,引起广泛出血;有一定致病力的为堆型艾美尔球虫(*E. acervulina*)和巨型艾美尔球虫(*E. maxima*),而早熟艾美尔球虫(*E. praecox*)和缓艾美尔球虫(*E. mitis*)、变位艾美尔球虫(*E. mivati*)、布氏艾美尔球虫(*E. brunetti*)和哈氏艾美尔球虫(*E. hageni*)的致病力最弱。

致病力最强、分布最广的鸡寄生性原虫——柔嫩艾美尔球虫 *E. tenella* (Biggs P. M., 1981) 寄生于鸡盲肠,严重感染时,盲肠高度肿大,充满凝固的或新鲜的暗红色血液,此时盲肠上皮变厚,有严重的糜烂。卵囊为宽椭圆形,一端稍尖,少数为椭圆形;最大的达 $25 \times 20 \mu\text{m}$,最小的 $20 \times 15 \mu\text{m}$,平均为 $22.62 \times 18.05 \mu\text{m}$ 。原生质呈淡褐色;卵囊壁为淡绿黄色,厚度为1微米。孢子形成时间,最

早为 19.5 小时,最晚为 30.5 小时,大多数为 27 小时。孢子囊最大为 $12.75 \times 6.75 \mu\text{m}$, 最小 $7.5 \times 5 \mu\text{m}$, 平均为 $11.47 \times 6.23 \mu\text{m}$; 无内外残体。人工接种后第 7 天,在鸡粪内发现卵囊(彼得 L·郎,1990)。

雏鸡感染球虫后,大量肠上皮细胞受损、出血,严重者造成死亡。而集约化养鸡场是球虫病爆发的最适宜场所,发病率为 50%~70%。死亡率达 20%~30%,严重时达到 70%~80%(孔繁瑶,1997)。据 Bhogal(1992)称,全世界每年因鸡球虫病造成的损失达 20 亿美元,抗球虫药年消费 32 亿美元。我国年养鸡量为 30~60 亿羽,按郁明发(1989)每只 0.2~0.3 元的抗球虫药支出计算,我国年支出抗球虫药费是 6~18 亿元人民币(孔繁瑶等,1994;汪明等,1996)。迄今,控制肉仔鸡球虫病的主要手段仍然是药物防治,随着药物的防治造成药物耐药性的产生、同时,研制新药费用之高以及人们对药物残留的日益关注和环境保护意识的增强,对药物防治出现了新的挑战。鸡对 9 种球虫的免疫应答不仅存在虫种的特异性,而且也存在着针对同一种不同发育期的特异性,但在种间和种内又存在共同的特异性抗原。大多数虫种一次感染后,鸡能对其再感染产生某种程度的抵抗力,反复免疫(如涓滴免疫)后,鸡能产生较强的免疫力。基于这一现象设计一种免疫方案,即用小剂量强毒或致弱卵囊免疫鸡,球虫卵囊以不足以引起发病数量存在于鸡舍中,鸡由于反复啄食卵囊而引起加强免疫,从而产生较强的免疫力,因而国内外出现了以球虫虫体为材料的各种虫苗(Shirley,1993;索勋,1998)。而雏鸡何时免疫以及采用何种免疫方案对不同种甚至同种不同株的球虫都将产生不同的免疫效果,有关生物学方面,尤其是有关球虫的侵入和移行方式和机理尚未搞清,因此研究不同地域的球虫生物学特性既有理论意义,也对今后的药物和免疫预防提供科学依据(王双怀,2001)。

疫苗接种是预防球虫有效方法,目前已经应用的球虫苗主要包括活苗、弱毒苗,它们在使用过程中可能产生毒力恢复和免疫程序繁琐等因素,因此开发和应用基因工程疫苗(Shirley,1995)是预防球虫病发生的新的途径,但目前能对各种球虫以及一种球虫各个时期都具有明显效果的基因工程疫苗还有待进一步研究,因此,配合各种疫苗,开发和应用各种新的免疫调节剂来提高鸡群整体自身抗病能力对有效防治球虫病是研究者们的重要课题。

以下将从 5 个方面阐述本研究的立论依据。

一、柔嫩艾美球虫 (*E.tenella*) 的分类地位及研究方法的发展

(一) 柔嫩艾美球虫(*E.tenella*)球虫的分类地位

成囊球虫和相关的其它重要球虫的分类目前大多数学者所接受的是 Current (1986) 和 Levine(1990)所修订的分类体系,按照这个体系,柔嫩艾美球虫 (*E.tenella*)隶属于原生动物,具体的分类地位如下:

顶复合门(Phylum Apicomplexa Levine, 1970)

孢子纲(Class Sporozoa Leuckart, 1879)

球虫亚纲(Subclass Coccidia Leuckart, 1879)

真球虫目(Oder Eucoccidiida Leger and Duboscq, 1910)

艾美球虫亚目(Suborder Eimeriina Leger, 1911)

艾美球虫科(Family Eimeriidae Minchin, 1903)

艾美球虫属(Genus *Eimeria* Scheneder, 1875)

柔嫩艾美球虫(*E.tenella*)

在球虫的许多属中,艾美尔球虫属所包括的种类在家禽中具有最重要的经济意义。孢子发育的卵囊的内部构造是这个属与其他几个属可作区别的特征。所有属球虫刚排出的新鲜卵囊都是由一层厚的外壁和一个有核的原生质团块组成。直到孢子发育开始之后,才出现可供鉴别的特征。在艾美球虫属,孢子发育的卵囊内含四个孢子囊,每个孢子囊内含两个香蕉状的子孢子。

关于种株间的指纹差异在艾美尔属内,球虫种的区别传统主要依靠宿主及寄生部位特异性、卵囊形态学、生活史等,但这些方法都各自存在一些难以弥补的缺点。特征性寄生部位并不固定,许多种卵囊形态间存在明显的重叠性。最短潜伏期曾被认为是一个种特异性特征,但好几种球虫早熟株的出现,证实了这种方法的不可靠性。同工酶技术尽管对种间的分类提供了一些借鉴,国内(黄兵等, 1996)对5种球虫的卵囊的同工酶进行了鉴定,认为有助于对不同种类的球虫进行分类。但对于株间的差异分析却无能为力,而且麻烦、费时、需要大量卵囊。Williams 等 Welsh 等于 1990 年先后发展了一种以 PCR 为基础的基因分析方法, Williams 称之为随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphi DNA, RAPD), Welsh 称之为随机引物 PCR (Arbitrarily primed PCR, AP-PCR)。该方法用单一、或多个随机核苷酸序列作引物对基因组 DNA 进行扩增,避免了 PCR

特异性引物设计上的困难,尤其在对未知样本的鉴定方面,显示了其独特的优点。自问世以来,得到了越来越多学者的重视,应用日趋广泛,Procunier 和 MacPherson 等于 1993 年先后将 RAPD 技术用于球虫研究;Shirley 等首次对 *E.tenella* 不同表型(早熟)的球虫株进行比较;Greif 等对 15 个堆型艾美尔球虫(*E.acervilina*)抗药和非抗药虫株和 5 个布氏艾美尔球虫(*E.brunetti*)抗药和非抗药株进行 RAPD 分析。

当 RAPD 技术引入球虫分类后,可以看出,大部分引物组均显示出了特征性的扩增模式图,几乎每个引物组均有种特异性条带,完全可以把 3 个种区分开来。研究者还将该技术用于比较 *E.tenella* 抗药性不同表型株的区别,发现有些片段在一株中出现,在另一株间却并未出现,此外还存在条带的漂移、条带密度的差异,尤其在地理株间及抗药与非抗药株间,差异更加明显。Procunier、MacPherson、Shirley 等提出了 RAPD 能非常有效地用于球虫不同种、株的鉴别的观点。这些种、株特异性条带,有可能被用作探针来鉴定该特定种。最近,在研究遗传标记方面,包括致病性原虫的各种生物学特性如毒力、致病性、早熟、系统发育距离和调控基因的差异等,RAPD 方法都被认为是一种有用的方法,这些遗传标记还可进一步用于诊断。大部分生物体的抗药性都是发生在细胞基因组内的突变造成的。(陈兆国等,2001)对 *E.tenella* 的抗药虫株和敏感虫株的指纹图谱分析发现,球虫不同表型株间可以通过 RAPD 方法鉴别,采用不同组引物对 *E.tenella* 5 个抗药株与 10 P 09 株大多有些 DNA 条带差异,尤其明显的一例是引物 S 120+S 143 组合,5 个抗药株都在约 750 b p 处有一个扩增条带,而 10 P 09 却无,此带可能与抗药性有关,因此,RAPD 为球虫抗药性机理、抗药性相关基因的寻找提供了一个手段(杨照青,2000)。

李安兴等(2002)用 RAPD 方法分析从广东省和中国其它部分省份分离到的 8 个柔嫩艾美尔球虫抗药性虫株和 2 个敏感虫株的遗传变异,旨在寻找鸡球虫抗药性虫株的分子标记。实验结果显示:鸡球虫对药物的抗药性的差异与球虫遗传学上的差异有一定关系,这就表明用 RAPD-PCR 方法可能找到球虫抗药虫株的遗传标记,为今后监测球虫的抗药性提供了一些理论依据和实验的方法。

陈兆国等(2001)从 20 个随机引物中筛选出 7 个引物,成对混合的方式,对 *E.mitis*, *E.maxima* 和 *E.tenella* 3 个种各 2 个单卵囊感染纯株及 *E.tenella* 的 6

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库