



孙颖颖, 汤新明, 秦梅, 胡丹丹, 闫鑫磊, 张思新, 史芳芸, 孙霏, 殷光文, 石团员, 刘贤勇, 闫文朝, 董辉, 索勋. 艾美耳球虫转基因操作研究 30 年: 进展、挑战与未来方向[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(10): 254-265.

SUN Yingying, TANG Xinming, QIN Mei, HU Dandan, YAN Xinlei, ZHANG Sixin, SHI Fangyun, SUN Pei, YIN Guangwen, SHI Tuanyuan, LIU Xianyong, YAN Wenchao, DONG Hui, SUO Xun. Thirty years of genetic manipulation of *Eimeria* parasites: Advances, challenges and future directions[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(10): 254-265.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.10.19

艾美耳球虫转基因操作研究 30 年： 进展、挑战与未来方向

孙颖颖¹ 汤新明² 秦梅³ 胡丹丹⁴ 闫鑫磊⁵ 张思新⁶
史芳芸⁷ 孙霏⁸ 殷光文⁹ 石团员¹⁰ 刘贤勇¹
闫文朝¹¹ 董辉¹² 索勋^{1*}

- (1. 中国农业大学 动物医学院/兽医公共卫生安全全国重点实验室/
农业农村部动物流行病学与人畜共患病重点实验室/国家动物寄生原虫实验室, 北京 100193;
2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;
3. 中国农业大学 科学技术发展研究院/中国农业大学学报编辑部, 北京 100193;
4. 广西大学 动物科学技术学院, 南宁 530004;
5. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010010;
6. 西南大学 动物医学院, 重庆 400715;
7. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 精准医学研究院, 上海 200125;
8. 华中农业大学 动物科学技术学院动物医学院, 武汉 430070;
9. 福建农林大学 动物科学学院, 福州 350002;
10. 浙江省农业科学院 畜牧兽医研究所, 杭州 310021;
11. 河南科技大学 动物科技学院, 洛阳 471023;
12. 中国农业科学院 上海兽医研究所, 上海 200241)

摘 要 由艾美耳属球虫感染引起的球虫病是全球畜禽业最常见、最重要的寄生虫病之一。过去 30 年, 随着分子生物学与基因工程技术的协同发展, 艾美耳球虫转基因操作技术实现了从基础载体构建到高效基因编辑系统的革命性突破, 这一技术演进不仅深化了科研工作者对球虫基础生物学的认知, 更为开发新一代基因工程活疫苗提供了关键技术支撑。本文综述了近 30 年来球虫转基因操作技术的重要突破与挑战, 包括: 1) 从瞬时转染到稳定转染系统的技术演进, 包括启动子筛选、报告基因优化等表达调控体系的建立。2) CRISPR/Cas9 等新型基因编辑工具的引入与应用。3) 重点探讨了球虫转基因操作技术在多价疫苗开发、多病原广谱保护性疫苗设计以及耐药基因筛选与作用机制解析等领域的创新应用。4) 尽管球虫作为疫苗活载体具有宿主特异性强、高质量免疫应答等独特优势, 但在体外连续培养体系、外源基因表达水平精准调控、免疫保护效力存在显著个体差异等诸多挑战。未来, 随着球虫功能基因组学和转录组学的深入研究, 通过结合 CRISPR/Cas9 基因编辑系统与条件诱导表达技术, 有望实现目的基因的特异性精准调控, 突破转基因球虫规模化制备的技术瓶颈, 进而推动其在多病原广谱新型黏膜疫苗开发中的实际应用。

关键词 艾美耳球虫; 转基因技术; 重组疫苗; 功能基因组学

中图分类号 S831

文章编号 1007-4333(2025)10-0254-12

文献标志码 A

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: “十四五”国家重点研发计划项目(2023YFD1802400)

第一作者: 孙颖颖(ORCID: 0009-0000-5753-6576), 博士研究生, E-mail: sunnyyy@cau.edu.cn

通讯作者: 索勋(ORCID: 0000-0003-0668-8187), 教授, 主要从事球虫免疫学与遗传学研究, E-mail: suoxun@cau.edu.cn

Thirty years of genetic manipulation of *Eimeria* parasites: Advances, challenges and future directions

SUN Yingying¹, TANG Xinming², QIN Mei³, HU Dandan⁴, YAN Xinlei⁵, ZHANG Sixin⁶,
SHI Fangyun⁷, SUN Pei⁸, YIN Guangwen⁹, SHI Tuanyuan¹⁰, LIU Xianyong¹,
YAN Wenchao¹¹, DONG Hui¹², SUO Xun^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine/National Key Laboratory of Veterinary Public Health and Safety/Key Laboratory of Animal Epidemiology and Zoonosis of Ministry of Agriculture/National Animal Protozoa Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Academy of Science and Technology Development/Editorial Office of Journal of China Agricultural University, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

4. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

5. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010010, China;

6. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China;

7. Institute of Precision Medicine, Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China;

8. College of Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

9. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

10. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;

11. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China;

12. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract Coccidiosis, caused by infection with *Eimeria* spp., is one of the most common and economically significant parasitic diseases affecting the global livestock and poultry industry. Over the past three decades, advances in molecular biology and genetic engineering have driven transformative progress in the development of transgenic manipulation techniques for *Eimeria*. This progress has enabled a shift from basic vector construction to the establishment of efficient gene editing systems, which has not only deepened scientific understanding of *Eimeria* biology but also laid a solid technical foundation for the development of next-generation recombinant live vaccines. This review summarizes the key breakthroughs and challenges in *Eimeria* transgenic manipulation achieved over the past 30 years, including: 1) The evolution of transient and stable transfection systems, encompassing promoter screening and optimization of reporter genes for refined expression control. 2) The introduction and application of novel gene-editing tools such as the CRISPR/Cas9 system. 3) The innovative application of these techniques in the development of multivalent vaccines, the design of broad-spectrum cross-pathogen protection against multiple pathogens, and the screening and mechanism analysis of drug resistance genes were discussed in detail. 4) Despite the unique advantages of strong host specificity and high-quality immune response of *Eimeria* as a live vaccine vector, there are many challenges such as difficulty in precise regulation of exogenous gene expression levels in continuous *in vitro* culture, and significant individual differences in immune protection efficacy. In the future, with the deepening of functional genomics and transcriptomics research on coccidiosis, combined with CRISPR/Cas9-based gene editing and conditional expression technologies, it is expected to enable precise regulation of target gene expression and overcome bottlenecks in the large-scale production of transgenic *Eimeria* strains. These advances will ultimately promote the practical application of transgenic *Eimeria* in the development of novel broad-spectrum mucosal vaccines.

Keywords *Eimeria*; genetically modified technology; recombinant vaccines; functional genomics

由艾美耳属球虫(*Eimeria* spp.)感染引起的球虫病是畜禽最严重的肠道原虫病之一,广泛流行于全球,尤其以鸡球虫病最为常见、危害最为严重。球虫感染会导致畜禽食欲减退、生长迟缓、肠道出血甚至死亡,严重影响养殖经济效益与动物福利^[1]。据估算,球虫病每年给全球家禽业造成的经济损失高达数十亿美元^[2]。因此,球虫病的有效防控始终是畜牧兽医领域的研究重点。

目前,球虫病的主要防控手段包括药物防治和活卵囊疫苗免疫预防。尽管药物防治具有快速、高效等特点,但长期使用易导致耐药性产生和药物残留问题^[3]。活卵囊疫苗因能够高度模拟自然感染过程,可同时激发机体产生强效、持久的免疫应答,目前被国际公认为活卵囊疫苗是防控球虫病最为有效且不可替代的免疫手段之一^[4]。早熟弱毒疫苗可保持原有免疫原性,具有发育周期短、复制力适中、致病性低等特点^[5]。相比传统毒力较强的活疫苗,早熟弱毒疫苗不仅安全性更高,是当前球虫病防控中应用最为广泛的一类疫苗。随着分子生物学与基因工程技术的发展,艾美耳球虫转基因技术获得了突破,因其具有生物安全性高、免疫原性强、耐受性高、真核表达以及接种方便等优势,转基因球虫逐渐被开发用作寄生虫基因功能和宿主免疫应答研究的重要工具^[6]。通过对球虫进行遗传改造,可实现抗原精准表达、佐剂分泌或免疫调节因子的共表达,从而构建新型、可控、安全的转基因球虫载体疫苗。同时,遗传操作技术的不断完善也为深入解析球虫的生物学特性、致病机制及宿主-寄生虫相互作用提供了重要手段。借助稳定表达系统、亚细胞定位标签、荧光标记与CRISPR/Cas9等基因编辑工具,研究者可以在球虫复杂的生命周期各阶段实现精细调控与功能验证,从而系统性鉴别关键致病因子和发育调控基因,为球虫病的基础研究提供了高效的分子工具平台^[7]。另外,该技术还可用于构建低致病性或定向减毒虫株^[8],作为安全性更高的候选疫苗株,这一进展标志着球虫疫苗研发模式从传统的经验依赖型向基于分子机制的科学设计型转变。由此可预见,随着艾美耳球虫基因操作技术的持续突破与完善,该技术平台将在畜禽球虫病的综合防控、新型分子疫苗设计、寄生虫基因组的系统性研究3个领域展现出日益重要的价值。

自1998年国际上实现球虫首次瞬时转染突破,

国内于2005年获得国家科研专项资助后,艾美耳球虫转基因技术进入快速发展阶段。本文系统梳理了过去30年来在该领域的研究进展,包括分子操作工具的开发与优化、球虫功能基因组学研究的深入以及疫苗活载体应用的探索。在总结现有技术瓶颈的基础上,结合基因编辑、条件表达系统、多组学分析和多抗原设计等前沿技术,进一步提出了工具优化、表达系统改进和规模化应用等重点方向,以期为后续基础研究和疫苗开发提供理论指导与技术参考。

1 球虫遗传操作技术的发展历程

自20世纪90年代末首次实现外源基因在艾美耳球虫中的表达以来,艾美耳球虫的遗传操作技术经历3个重要发展阶段:从早期转染方法的建立与优化,到CRISPR/Cas9等精准基因编辑工具的成功应用,直到当前多组学与遗传杂交策略的系统整合(图1)。这一技术演进历程反映了基础操作工具的持续革新,也彰显了分子寄生虫学研究方法的重大突破。

1.1 初期阶段:基础工具与初始局限

转基因技术是实现球虫遗传操作的基石,其发展初期聚焦于有效转染系统的构建。1998年,Kelleher等^[9]首次以 β -半乳糖苷酶为报告分子对柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)进行瞬时转染,构建了以球虫自身微线体基因(Microneme, MIC)EtMIC-1为启动子、融合大肠杆菌*lacZ*基因的质粒,通过电穿孔导入孢子,成功实现了 β -半乳糖苷酶(β -gal)的表达,为球虫外源基因的表达奠定基础。然而,由于当时检测手段主要依赖X-Gal显色,其灵敏度与特异性较低,难以在复杂宿主体内有效筛选阳性虫株,致使该技术在随后的10年内未能推广。同期,筛选手段多依赖药物抗性基因,其筛选效率低,缺乏可靠的可视化工具,限制了遗传操作体系的稳定性与高通量应用。此后,研究者围绕报告基因、筛选标记和电穿孔条件等方面持续进行了多种尝试与技术摸索,为后续筛选体系和稳定表达的逐步完善提供了方法积累与经验基础。

1.2 中期突破:球虫转染与筛选平台的构建与优化

稳定、高效的遗传操作平台是实现球虫表达外源基因的前提与基础。过去十余年间,研究者通过

系统探索与持续优化,逐步建立起一套适用于艾美耳属球虫的转染与筛选体系,实现了从“瞬时表达”到“稳定遗传”的关键跨越,主要包括以下 4 大方面技术突破:

1.2.1 转基因球虫稳定表达体系的建立

稳定、高效的转染与筛选体系是构建转基因球虫株的核心基础。在转染效率方面,限制性内切酶介导转染(Restriction enzyme-mediated integration, REMI)技术的引入是关键突破。通过优化电穿孔缓冲液组分、采用线性化质粒载体以及在转染体系中添加特异性限制性内切酶,成功将 *E. tenella* 孢子的转染效率从 0.1% 提升到 20%~25%,整体提高了 200 倍以上。该技术突破有效解决了传统电穿孔方法效率低、外源基因表达不稳定等瓶颈问题,为建立稳定转基因球虫株提供了可靠的技术支持^[10]。

在筛选体系方面,早期多依赖药物抗性筛选(如 TgDHFR),但该方法筛选周期较长,且存在增加耐药性或药物残留的潜在风险^[11]。荧光蛋白的引入显著提升了筛选效率与准确性,使得球虫转基因研究进入了可视化时代。2007 年,研究人员首次将增强型荧光蛋白(EYFP)应用于 *E. tenella* 的转基因研究,成功实现了球虫孢子、裂殖子等各发育阶段的活体示踪^[12]。相比传统药物筛选,荧光筛选显著提升了筛选效率与准确性。研究者通过优化核转染技术并结合流式细胞分选(Fluorescence activated cell sorting, FACS),成功将 *E. tenella* 转基因卵囊的初代转染率提升到 3%~10%,经 3~5 轮荧光标记筛选后,阳性虫体的荧光表达率可稳定维持在 80%~95%^[13]。相比之下,单独使用药物筛选时,YFP 阳性虫株比例仅由初代 0.04% 提高至第二代 22.7%,第三代最高仅达 35.5%^[14]。为进一步提升筛选效率并减少耐药性累积风险,后续研究发展了流式分选与药物联合筛选(如“DHFR-TS 耐药标记+EYFP”融合表达)联合使用策略,通过对荧光表达虫体的直接富集,初代转染筛选阳性率可由 0.04% 提高到 55%~70%,明显优于单独药物筛选^[14]。值得注意的是,研究表明,在鼠球虫中,FACS 与药物联合筛选可在较短周期内将稳定表达率提升至近乎 100%,而在鸡球虫中多维持在 90% 左右,显示出不同物种之间在遗传背景或宿主适应性上的差异^[15]。

流式分选与药物联合筛选已成为当前主流策略,并在鼠球虫与鸡球虫中均得到成功应用。这一联合体系可通过多质粒共转、双表达框或 P2A 自切割肽等方式灵活实现,不仅大幅提高了筛选通量与阳性率,还显著增强了筛选过程的可控性和安全性^[16-17]。目前,该套筛选体系已广泛应用于和缓艾美耳球虫(*E. mitis*)、肠艾美耳球虫(*E. intestinalis*)、大型艾美耳球虫(*E. magna*)及毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)等多种寄生虫种,为后续的基因功能研究和疫苗载体开发提供了可靠的技术支撑^[18-21]。

1.2.2 针对球虫不同发育阶段转染方法的探索

基于球虫不同发育阶段的操作需求,已逐步建立了适用于孢子、裂殖子及卵囊等阶段的多种转染方法。*E. tenella* 在体外条件下可从孢子发育至配子体及卵囊阶段,这为体外培养观察提供了便利^[14,22]。尽管显微注射将外源 DNA 经显微注射导入卵囊的尝试未能成功实现基因表达,但仍为卵囊阶段的基因转染探索了新思路^[23]。首次将基因枪技术用于巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)未孢子化卵囊的质粒递送,虽未检测到荧光蛋白表达,却为该阶段的遗传操作奠定了基础^[24]。此外,通过裂殖子核转染结合体内繁殖的流程,已建立起更高效的稳定虫株获取标准化方案,进一步完善了多阶段转染体系^[13,21]。

1.2.3 调控元件与信号序列的筛选与优化

为实现外源基因的定向表达与亚细胞定位,先后系统筛选了包括 EtSAG13、Actin 和 Histone 4 等多个启动子^[25],并且验证了异源信号肽(如弓形虫 GRA7、GRA8 和疟原虫 RIFIN 信号肽)能有效引导蛋白定位表达^[26]。而后比较了信号肽分泌与 GPI 锚定 2 种定位方式对 *mCherry* 抗原免疫原性的影响,发现表面锚定抗原更易被免疫系统识别^[27]。后续工作进一步将这一思路拓展到堆型艾美耳球虫(*E. acervulina*)和 *E. necatrix* 等多种球虫中,验证了 VP2、IL-1 β 和 IL-17 等异源分子在不同定位序列下的表达效果^[28-29],并对 SAG1 信号肽、MIC2 等多种分泌或表面蛋白定位元件进行了系统评估,明确了其在抗原亚细胞分布优化中的应用价值^[30]。

此外, piggyBac 转座子系统可作为稳定插入手段,进一步扩展表达策略,实现抗原表达分布的精准定位^[31]。而 P2A 自切割肽技术可实现双荧光蛋白独立表达和精准定位(RFP 通过 GRA8 信号肽定

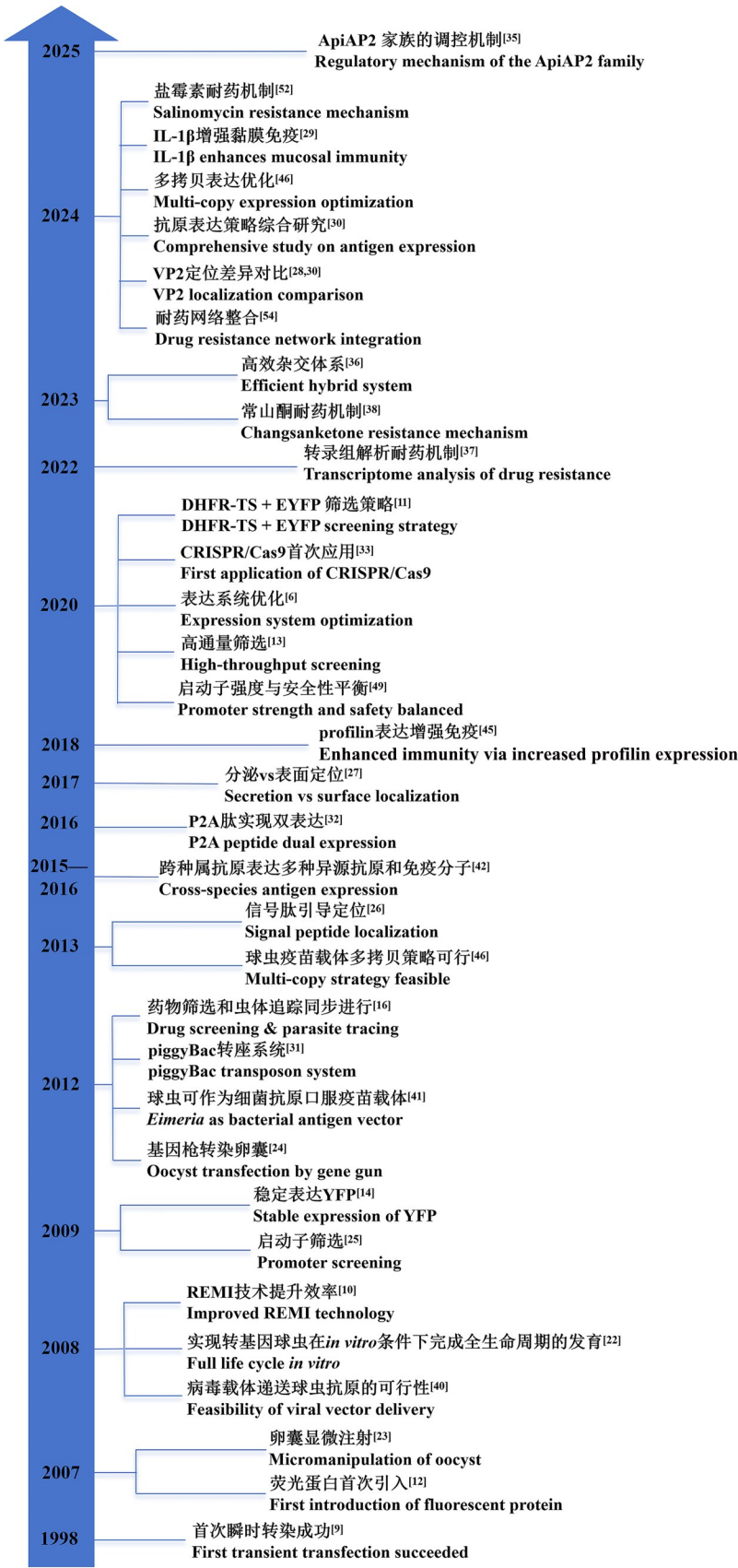


图1 1998—2025年艾美耳球虫基因编辑技术发展

Fig. 1 The development of genetic manipulation technology for *Eimeria coccidia* from 1998 to 2025

位至纳虫空泡, EYFP 定位于细胞核), 为多基因共表达和定位研究奠定了重要技术基础^[32]。

1.2.4 CRISPR/Cas9 的引入与靶向编辑的实现

基因编辑技术是制约重组球虫作为疫苗载体进行优化、异源抗原高效精准表达的“卡脖子”技术。2020 年, 研究者建立稳定表达 Cas9 的转基因株, 成功敲除了内源性 YFP 基因, 并实现 GRA9 的内源性表达, 成功将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统应用在球虫中, 并初步证实球虫 8 000 余个基因中百余种“冗余”基因可以进行敲除, 为将球虫作为疫苗载体的构想提供了重要的理论依据^[33]。同一时期, 进一步拓展了 CRISPR/Cas9 在球虫基因功能研究、抗原表达调控以及耐药机制验证等多方面的应用潜力, 为后续复杂基因操作提供了多样化的技术手段^[6,8,34]。此外, 基因编辑技术在球虫中的突破性发展为球虫疫苗的精准减毒策略开辟了新途径, 为开发安全高效的基因工程球虫疫苗提供了全新思路。研究人员可实现毒力基因的精准敲除或修饰, 可保留关键免疫原性基因的完整性, 可支持多基因协同编辑以优化减毒效果。研究表明, 通过基因编辑技术敲除柔嫩艾美耳球虫 ApiAP2 家族转录因子 EtAP2-S1 后, 虫体毒力显著降低, 值得注意的是, 该突变株表面抗原(SAGs)的表达水平上调约 2.5 倍, 同时卵囊排出量减少超过 90%, 免疫保护率提升至 85% 以上^[35]。

球虫遗传操作平台在转染方法、筛选机制和调控工具等方面均取得系统性进展, 这些突破使艾美耳球虫转变为一种模式生物, 并推动其成为极具前景的疫苗载体平台。

1.3 近期进展: 多组学分析与遗传杂交技术的整合

2020 年以来, 球虫基因编辑技术逐步与多组学研究的融合取得了显著进展。通过整合基因组学、转录组学与蛋白质组学分析, 研究者系统筛选出数 10 个与耐药性、毒力和宿主免疫调节相关的候选基因, 并鉴定出 6 个与药物耐受密切相关的插入位点。基于荧光报告的双亲系虫株 EaGAM56 和 EaHAP2, 建立了高效的有性杂交体系, 在感染剂量提高时, 双荧光标记的杂合子比例可达约 11%, 显著高于低剂量条件下的 6.5%, 表明可通过调节感染剂量和亲本比例(1:1 较 1:100 提高 2 倍)有效提高杂合子筛选效率, 这为解析药物耐受等复杂性状

的遗传机制提供重要技术支撑^[36]。

在此基础上, 对球虫全基因组注释与转录调控网络的深入解析进一步推动了其耐药机制的系统研究。基于 *E. tenella* 敏感与耐药虫株模型的对比研究, 揭示了其对药物应激的早期转录反应^[37]。通过逐剂量递增法及模拟田间快速诱导策略在鸡体内诱导出常山酮(halofuginone)耐药的 *E. tenella* 株(Halo^R), 并结合全基因组重测序与反向遗传操作, 鉴定脯氨酰-tRNA 合成酶(prolyl-tRNA synthetase, *EtcPRS*)上的 T618A 突变为关键耐药位点^[38], 为后续耐药机制解析与分子标记筛选奠定了基础。

最新研究表明, 艾美耳球虫遗传操作技术已实现三大关键突破, 高效杂交体系的建立与优化; 耐药相关基因及其调控网络解析; 基因导入技术的持续改进。这些技术进步相辅相成, 不仅为解析顶复门寄生虫的生物学特性提供了理想模型, 更为基因工程减毒活疫苗的分子设计奠定坚实基础。

2 球虫转基因技术的应用

稳定且高效的遗传操作体系是推动球虫异源基因持续表达与功能研究的重要前提。经过近 30 年的积累与技术改进, 相关方法已从最初的瞬时表达探索, 发展到如今可实现多代稳定遗传、可追溯筛选的完整体系, 其应用领域已从基础研究扩展到疫苗设计、功能基因筛选及耐药机制解析等多个方向。

2.1 单价或多价活载体疫苗的开发

近年来, 随着生物技术的不断进步, 兽用新型疫苗的研制与开发呈现快速发展趋势。作为其中的重要分支, 基因工程活载体疫苗因其能够同时诱导机体产生体液和细胞免疫反应, 并可灵活整合多价甚至多联抗原, 逐渐成为寄生虫疫苗研究中最具潜力和应用前景的方向之一。伴随球虫转基因技术的持续突破, 转基因球虫被开发为活载体疫苗的可行性逐步得到验证与拓展。例如, 通过电穿孔将含 YFP 基因的质粒导入 *E. tenella* 子孢子, 并在体外鸡肾细胞培养体系中实现了对虫体各发育阶段的持续表达, 奠定了口服疫苗载体的体外模型的基础^[22,39]。进一步的研究还通过构建由 *E. tenella* 免疫定位蛋白 1(EtIMP1)和鸡 CD40 配体(CD40L)组成的嵌合亚单位疫苗, 经大肠杆菌表达纯化后无佐剂免疫鸡, 证实其诱导的免疫应答及抗 *E. tenella* 感

染效果优于弗氏佐剂的 EtIMP1,为球虫亚单位疫苗开发提供新策略^[40]。在后续的探索中,通过构建表达弯曲杆菌抗原 CjaA 的转基因 *E. tenella*,口服免疫后宿主肠道病原定植量降低 86%~91%,首次实证了球虫具有可作为细菌抗原口服疫苗载体的潜力^[41]。

为扩大免疫覆盖与调节免疫类型,研究者尝试在载体中引入了多种异源抗原与免疫分子。例如,在 *E. mitis* 中表达分泌型鸡 IL-2 后,IFN- γ 分泌淋巴细胞数较野生型显著提升约 1.5 倍,单只鸡卵囊排出量平均降低至原来的 1/3,显著增强了细胞免疫反应和抑制虫体增殖^[42];构建表达鸡 IgY Fc 片段的转基因株 (*Emi. chFc*),通过 Fc 受体介导增强抗原呈递,IFN- γ /IL-2 水平和鸡体保护率较野生型均显著提升^[43];在 *E. necatrix* 中表达鸡 IL-1 β ,免疫后黏膜屏障因子 (Claudin-1、AvBD-1) 及 IL-17 水平上调,卵囊排出减少 40%,首次在球虫载体中实证 IL-1 β 增强黏膜免疫的安全性及有效性^[29]。此外,已尝试在 *E. tenella* 中表达传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白与传染性喉气管炎病毒 gI,虽能诱导特异性抗体,但未产生中和抗体,提示需结合佐剂或优化表达水平^[44]。还有研究构建表达 *E. tenella* profilin 的转基因株 *Et-EmPro*,口服免疫后 IFN- γ 分泌与细胞免疫显著增强,卵囊排出减少 44%,同时肠道微生物组显著重构,表明 profilin 兼具抗原和佐剂双重功能^[45]。

抗原在载体内的表达位点和拷贝数直接影响其免疫原性。已有研究通过单孢子囊分离构建 *M2e-EYFP* 多拷贝表达株,评估其保护效果与野生型相当,验证了多拷贝策略的可行性^[46]。但在 *E. acervulina* 中,采用 REMI 技术构建的 12 拷贝 *M2e* 稳定株虽具备较高表达水平,却未能显著提升抗体滴度,提示仅提高拷贝数并不足以增强免疫效果,表达位点和定位策略同样关键^[47]。近期,双拷贝 VP2 融合株的开发及 FACS 高效筛选,进一步表明较高的拷贝数可使抗体水平明显优于单拷贝组,尽管与商业疫苗相比尚有提升空间,但仍表明抗原拷贝数与免疫强度呈正相关^[48]。同时,亚细胞定位对免疫效果的影响也受到关注,比较微线体定位 (*EaMIC-VP2*) 与表面定位 (*EaSAG-VP2*) VP2 株,发现前者可显著诱导抗体与保护,后者几乎未产生应答,凸显了亚细胞定位在表达优化中的关键作

用^[28,30]。综合对上述研究成果的系统分析表明,启动子强度、基因拷贝数与定位方式共同决定表达水平与免疫类型。有观点认为,高强度启动子驱动的高表达株虽能快速激发抗体应答,但可能增加载体的致病性,因此在表达强度与安全性之间需权衡^[49]。针对分泌与表面定位的对比研究则表明,表面锚定更有利于初期抗体应答,分泌定位则更易触发细胞免疫反应,提示多种定位策略的组合应用可进一步优化免疫谱系^[27],未来需根据目标病原和宿主免疫特点,精确调控表达量与定位以实现最佳保护效力^[6]。

基于球虫载体的多抗原表达能力,研究人员已开始探索其在跨病原体免疫中的应用潜力。研究表明,通过在 *E. tenella* 中表达弓形虫 (*T. gondii*) 主要表面抗原 *SAG1* (*Et-TgSAG1*),不仅在免疫鸡群中诱导产生高水平的 IgY 抗体与 IFN- γ ,还在小鼠中产生显著的 Th1 型免疫应答。这一重要发现充分揭示了球虫载体具有突破物种限制独特免疫潜能^[50]。此外,构建的 *Et-EmIMP1* 重组株在攻毒试验中表现出显著的双重保护效果,针对同源 *E. tenella* 与异源 *E. maxima* 感染,试验组卵囊排出量分别减少 58.7% 和 62.3%。这一重要发现为开发具有交叉保护作用的多价、广谱肠道病原疫苗奠定基础^[51]。

基于艾美耳属球虫为基础的重组疫苗平台在抗原表达形式的多样化设计、表达位点的精准定位、表达水平的可控调控及免疫效应的有效增强 4 个关键技术环节方面取得了重要突破。该平台展现出良好的安全性与免疫保护潜力,尤其在口服递送、多价抗原共表达及肠道黏膜免疫激活方面具有独特优势。未来,通过整合 CRISPR 介导的精确编辑技术与高通量筛选技术,可有望进一步优化抗原表达的稳定性与保护广谱性,从而为开发新一代口服多价疫苗提供坚实基础。

2.2 球虫耐药基因的筛选与验证

近年来,借助转基因球虫平台及多组学技术,研究者在耐药基因挖掘、功能验证及关键分子靶点筛选方面取得重要进展。

利用转基因技术对耐药基因进行功能验证,有效弥补了传统筛选难以直接确认候选基因作用的不足。近年来,研究通过借助过表达和 CRISPR/Cas9 定点突变策略,分别鉴定出常山酮和盐霉素耐

药相关基因 *EtcPRS* 与 *EtADR*, 明确了其突变 (如 *EtADR F204S*) 赋予球虫稳定耐药性, 揭示其在药物作用位点的关键结构功能, 为开发分子诊断标记与新药靶点提供基础^[38,52]。

构建转基因株结合转录组分析可揭示耐药适应策略。通过结合转基因株与转录组分析发现, 耐药株基因表达谱显著沉默, 仅少数代谢相关基因如 *FAD* 依赖单加氧酶显著上调, 提示其可能参与药物代谢; 而敏感株激活泛素降解与抗氧化通路^[37]。此类研究展示了转基因平台在验证特异通路激活与适应策略中的优势。此外, 对 *E. necatrix* 第二代和第三代裂殖子进行转录组分析, 经 RNA 测序和 qRT-PCR 验证, 获得大量基因数据, 发现 2 代裂殖子之间存在许多差异表达基因, 为解析艾美耳球虫裂殖生殖转换的分子机制奠定基础^[53]。近期关于 *EtCYP450*、药物转运蛋白等耐药候选靶基因的系统梳理也强调了结合 CRISPR 和组学工具解析耐药网络的重要性^[54]。结合多组学手段与异源表达系统, 未来可基于已建立的转基因平台在不同球虫种中构建表达筛选模型, 提升对靶基因保守性和耐药谱的系统性认知。

转基因球虫平台已成为解析抗球虫药物耐药机制的重要技术手段。通过基因编辑、异源基因表达与转录组学联用, 不仅可实现耐药候选基因的功能验证, 还可为构建高效、可控的药物筛选模型与新型疫苗平台提供支撑。未来, 结合多物种转基因体系、高通量筛选技术及蛋白功能注释数据库, 将有望全面揭示球虫耐药网络, 并推动“靶向阻断+基因改造”的精准防控策略发展。

3 当前挑战

尽管近年来球虫基因工程技术已在转染系统构建、异源抗原表达及口服疫苗开发方面取得显著进展, 但将其真正转化为高效、稳定的疫苗载体仍面临多重技术与生物学挑战, 这些挑战不仅来自转基因技术本身的局限, 也源于疫苗设计与免疫机制理解的不足。

3.1 缺乏连续体外培养体系

缺乏连续体外培养体系仍是制约球虫疫苗平台开发的核心障碍之一。目前转基因效率评估、免疫效果验证等研究仍依赖动物体内感染模型, 该模型存在操作周期长、可控性差且批次间个体差异较

大等问题。早在 1965 年, Patton^[55]就在 *Science* 上报道 *E. tenella* 可在体外培养中完成无性裂殖生殖。1970 年 Long^[56]进一步在 *Nature* 上描述了皮质类固醇处理后 *E. tenella* 在鸡肝脏中进行裂殖生殖的过程。目前用于球虫研究的体外培养模型主要有鸡胚、原代/传代和类器官培养模型^[57-59], 鸡球虫能在鸡胚上进行繁殖发育, 但鸡胚培养仍存在可繁殖球虫种类有限、繁殖效率低、不易体外实时观察等弊端; 用于鸡球虫培养的原代细胞种类包括鸡原代肾细胞(PCKCs)、盲肠上皮细胞(CECs)等^[16,60], 用于鸡球虫培养的传代细胞系包括 MDBK、MDCK、VERO 和 BHK 等^[61], 传代细胞具有遗传稳定、实时监测且操作简便等优点, 但现有传代细胞系无法支持虫体发育完成整个生活史, 只能应用于子孢子和无性生殖阶段研究。类器官在球虫培养上的应用尚处于初步研究阶段, 仅 Nash 等^[62]有初步研究的公开报道。上述研究虽为球虫体外培养操作提供了依据, 但至今尚未实现球虫真正意义上的细胞传代高效扩增培养, 仍有待进一步突破。

3.2 重组球虫载体疫苗的免疫效力有待提升

抗原表达水平仍难以满足高效免疫所需, 成为当前重组球虫载体疫苗效力提升的关键制约因素。已有研究明确指出, 提高拷贝数可显著增强抗原表达与免疫效力。如构建的双拷贝 VP2 表达株 *Ea2VP2* 相较于单拷贝株诱导更高抗 VP2 抗体滴度, 并在 IBDV 攻毒后显著降低法氏囊病变评分, 显示出更强的保护效果^[48]。这表明抗原表达量与保护力之间呈正相关, 但在缺乏高效启动子库、表达增强元件或多拷贝控制工具的前提下, 大多数转基因虫株抗原表达量偏低, 难以激发高效且持久的免疫应答。

多价疫苗载体的设计不仅要解决多抗原插入位点、串联顺序和连接方式 (如 P2A、IRES 或双启动子等元件) 的最优化组合, 还要考虑各抗原之间的表达平衡, 避免出现优势抗原过度表达、弱势抗原表达不足的问题。此外, 抗原的亚细胞定位与稳定性在多价表达中更显关键。若多个抗原需定位至不同细胞器 (如微线体、顶体或表面), 则如何同时精准调控信号肽和锚定元件仍需系统优化。例如, 表面定位的 VP2 蛋白因易受消化道蛋白酶降解, 未能激发高效免疫应答, 而微线体定位策略则显著提升抗体水平和保护效果^[27]。这表明亚细胞

定位与表达稳定性直接决定疫苗效果,但目前抗原表达多依赖天然启动子和信号肽,缺乏对表达时空和水平的精准调控机制,尤其在黏膜抗原递呈中仍存在表达不足、持续性弱等问题。因此,未来可探索靶向递送系统的优化策略,如利用M细胞特异性靶向肽(M cell-targeting peptides)及其导向信号序列^[63],可显著提升抗原在肠道派氏结(Peyer's patches)等黏膜免疫关键部位的富集效率,促进抗原被专职递呈细胞(如树突状细胞)的有效摄取,增强局部黏膜免疫应答强度,实现外源抗原在肠道黏膜组织的精准定位与递呈。佐剂系统设计不足是当前转基因球虫疫苗的另一短板。已有研究尝试通过表达IL-2、IL-1 β 或profilin等分子佐剂增强Th1型应答和肠道黏膜免疫^[20,29,51],但多为初步验证,尚缺乏对不同佐剂机制协同、表达时机与部位选择的系统性评估。目前尚未建立成熟的“抗原-佐剂-递呈”三位一体策略,尤其在多抗原共表达或跨病原免疫模型中,免疫干扰与免疫分化现象亟待深入机制解析。

3.3 稳定转基因球虫虫株筛选策略有待优化

筛选方式的安全性及灵活性亦亟待改进。当前转基因球虫的稳定株筛选多采用荧光报告基因结合流式细胞术(FACS)进行富集,已显著提升了筛选的可视化程度与操作通量。然而,在多轮转染及异源抗原多价共表达构建中,仍存在表达水平波动、宿主个体差异影响虫株扩增效率及筛选批次间一致性不足等问题,易导致免疫效力不稳定。因此,探索可替代荧光或药物标记的无标记筛选策略,如基于条件可诱导表达、配子体特异性标记或结合CRISPR/Cas9精确插入内源标签等新技术,有望在保障筛选效率同时规避安全风险^[64]。

此外,宿主个体差异、球虫繁殖率不稳定及表达构建缺乏标准化等问题,仍导致不同批次虫株免疫保护力波动大、重复性差,限制了其作为商品化疫苗平台的可控性和一致性。

4 总结与展望

回顾近30年来的发展历程,球虫基因工程技术已从早期的瞬时转染探索逐步迈向稳定表达系统的构建与精准调控机制的解析,在分子工具、表达策略及遗传操作范围等方面均实现了显著突破。艾美耳球虫遗传操作技术从系列核心技术平台的建立,到以艾美耳球虫作为疫苗载体的应用构想,

并在后续研究中取得一系列突破性进展,这些进展不仅为解析球虫发育调控、抗原定位与宿主-寄生虫互作机制提供了强有力的技术支撑,也推动了其在重组疫苗载体开发中的广泛应用。作为一种兼具自主侵袭、黏膜感染及免疫刺激能力的工程化载体,转基因球虫在诱导局部与系统免疫、承载多种异源抗原以及实现口服免疫方面展现出独特优势,但将其真正转化为高效、稳定的疫苗载体仍面临多重技术与生物学挑战。

未来,球虫功能基因组学与转录调控网络的持续完善将为精准疫苗设计提供基础;CRISPR/Cas9与FnCas12a等新型编辑工具的应用,将推动构建条件诱导表达、可控敲除及免疫调节元件库。同时,结合高表达启动子筛选、P2A多基因表达策略与佐剂递送模块的整合设计,有望打造“可控表达-精准定位-协同调节”的下一代转基因球虫疫苗系统。基于转基因球虫的新一代多价、可控、黏膜免疫疫苗有望成为动物疫苗乃至人类疫苗研究的重要方向,进一步拓展球虫载体应用宿主类别,实现更广谱、更稳定的多病原、跨物种疫苗开发,为多病原联合防控及低成本口服免疫策略提供全新解决路径。

参考文献 References

- [1] Dalloul R A, Lillehoj H S. Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccine development[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2006, 5(1): 143-163
- [2] Blake D P, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, Ayoade S, Gilbert W, Adebambo A O, Jatau I D, Raman M, Parker D, Rushton J, Tomley F M. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens [J]. *Veterinary Research*, 2020, 51: 115
- [3] Chapman H D. Milestones in avian coccidiosis research: A review[J]. *Poultry Science*, 2014, 93(3): 501-511
- [4] 张思新, 汤新明, 李超, 刘贤勇, 吕艳丽, 索勋. 我国鸡球虫病疫苗研究进展[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2018, 25(4): 254-261
Zhang S X, Tang X M, Li C, Liu X Y, Lu Y L, Suo X. Research progress of chicken coccidiosis vaccine in China [J]. *Journal of Parasitology and Medical Insects*, 2018, 25(4): 254-261 (in Chinese)
- [5] 李仁良, 谭志坚, 林瑞庆, 翁亚彪. 鸡球虫病弱毒疫苗的免疫机理及研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(2): 132-134
Li R L, Tan Z J, Lin R Q, Weng Y B. Immune mechanism and research progress of avian coccidiosis attenuated vaccine [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary*, 2010, 37(2): 132-134 (in Chinese)
- [6] Tang X M, Liu X Y, Suo X. Towards innovative design and application of recombinant *Eimeria* as a vaccine vector[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(5): e00861-19
- [7] 秦梅, 汤新明, 龚玉姣, 史芳芸, 王思, 索勋. 鸡球虫病疫苗研发新思考[J]. 中

- 国农业大学学报, 2023, 28(6): 1-11
- Qin M, Tang X M, Gong Y J, Shi F Y, Wang S, Suo X. Rethinking novel anticoccidial vaccine design[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(6): 1-11 (in Chinese)
- [8] Peek H W, Landman W J. Coccidiosis in poultry: Anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies [J]. *Veterinary Quarterly*, 2011, 31 (3): 143-161
- [9] Kelleher M, Tomley F M. Transient expression of beta-galactosidase in differentiating sporozoites of *Eimeria tenella*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1998, 97(1/2):21-31
- [10] Liu X Y, Shi T Y, Ren H B, Su H L, Yan W C, Suo X. Restriction enzyme-mediated transfection improved transfection efficiency *in vitro* in Apicomplexan parasite *Eimeria tenella*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 161(1): 72-75
- [11] Clark J D, Billington K, Bumstead J M, Oakes R D, Soon P E, Sopp P, Tomley F M, Blake D P. A toolbox facilitating stable transfection of *Eimeria* species[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008, 162(1): 77-86
- [12] Hao L L, Liu X Y, Zhou X Y, Li J D, Suo X. Transient transfection of *Eimeria tenella* using yellow or red fluorescent protein as a marker[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007, 153(2):213-215
- [13] Duan C H, Tang X M, Hu D D, Zhang S X, Liu J, Bi F F, Hao Z K, Suo J X, Yu Y, Wang M, Sun P, Du L Y, Suo X, Liu X Y. Nucleofection and *in vivo* propagation of chicken *Eimeria* parasites [J/OL]. *Journal of Visualized Experiments*. DOI:10.3791/60552
- [14] Yan W C, Liu X Y, Shi T Y, Hao L L, Tomley F M, Suo X. Stable transfection of *Eimeria tenella*: Constitutive expression of the YFP-YFP molecule throughout the life cycle [J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39(1): 109-117
- [15] Li Y R, Suo J X, Liang R Y, Liang L, Liu X Y, Ding J B, Suo X, Tang X. Genetic manipulation for the non-model protozoan *Eimeria*: Advancements, challenges, and future perspective[J]. *iScience*, 2025, 28(3):112060
- [16] Hanig S, Entzeroth R, Kurth M. Chimeric fluorescent reporter as a tool for generation of transgenic *Eimeria* (Apicomplexa, Coccidia) strains with stage specific reporter gene expression [J]. *Parasitology International*, 2012, 61 (3): 391-398
- [17] Hermosilla C, Stamm I, Taubert A, Lutz K, Zahner H, Menge C. Fluorescent *Eimeria bovis* sporozoites and meront stages *in vitro*: A helpful tool to study parasite - host cell interactions[J]. *Parasitology Research*, 2008, 102(4): 777-786
- [18] Qin M, Liu X Y, Tang X M, Suo J X, Tao G R, Suo X. Transfection of *Eimeria mitis* with yellow fluorescent protein as reporter and the endogenous development of the transgenic parasite[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114188
- [19] Shi T Y, Tao G R, Bao G L, Suo J X, Hao L L, Fu Y, Suo X. Stable transfection of *Eimeria intestinalis* and investigation of its life cycle, reproduction and immunogenicity [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 807
- [20] Tao G R, Shi T Y, Tang X M, Duszynski D W, Wang Y Z, Li C, Suo J X, Tian X L, Liu X Y, Suo X. Transgenic *Eimeria magna* P  rard, 1925 displays similar parasitological properties to the wild-type strain and induces an exogenous protein-specific immune response in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L)[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8:2
- [21] Duan C H, Hu D D, Tang X M, Suo J X, Wang S, Zhang S X, Tao G R, Li C, Wang C Y, Gu X L, Tang X L, Huang G P, Xiang B Q, Wu S Q, Mamoun C B, Suo X, Liu X Y. Stable transfection of *Eimeria necatrix* through nucleofection of second generation merozoites[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2019, 228: 1-5
- [22] Shi T Y, Liu X Y, Hao L L, Li J D, Gh A N, Abdille M H, Suo X. Transfected *Eimeria tenella* could complete its endogenous development *in vitro*[J]. *The Journal of Parasitology*, 2008, 94(4): 978-980
- [23] 何芳, 柔嫩艾美耳球虫卵囊显微注射方法的建立[D]. 北京: 中国农业大学, 2007
- He F. Studies on microinjection of *Eimeria tenella* oocyst[D]. Beijing: China Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [24] Li J N, Zou J, Yin G W, Liu X Y, Suo X. Plasmid DNA could be delivered into *Eimeria maxima* unsporulated oocyst with gene gun system[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2012, 60(4): 431-440
- [25] Zou J, Liu X Y, Shi T Y, Huang X X, Wang H Y, Hao L L, Yin G W, Suo X. Transfection of *Eimeria* and *Toxoplasma* using heterologous regulatory sequences[J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39(11): 1189-1193
- [26] Yin G W, Qin M, Liu X Y, Suo J X, Suo X. Expression of *Toxoplasma gondii* dense granule protein7 (GRA7) in *Eimeria tenella*[J]. *Parasitology Research*, 2013, 112(5):2105-2109
- [27] Marugan-Hernandez V, Long E, Blake D, Crouch C, Tomley F. *Eimeria tenella* protein trafficking: Differential regulation of secretion versus surface tethering during the life cycle [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4557
- [28] Yu Y, Tang X M, Duan C H, Suo J X, Crouch C, Zhang S X, Liu X Y, Liu J, Bruton B, Tarpey I, Suo X. Microneme-located VP2 in *Eimeria acervulina* elicits effective protective immunity against infectious bursal disease virus[J]. *Infection and Immunity*, 2024, 92(2): e0045623
- [29] Duan C H, Abudurehman T, Wang S, Suo J X, Yu Y, Shi F Y, Liu X Y, Salama D B, Srivastav R K, Gupta N, Suo X. Expression of IL-1   in transgenic *Eimeria necatrix* enhances the immunogenicity of parasites and promotes mucosal immunity against coccidiosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1435702
- [30] Yu Y, Zhang S X, Duan C H, Crouch C, Suo J X, Tang X M, Liu X Y, Liu J, Bruton B, Tarpey I, Suo X. Developing efficient strategies for localizing the enhanced yellow fluorescent protein subcellularly in transgenic *Eimeria* parasites[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 4851
- [31] Su H L, Liu X Y, Yan W C, Shi T Y, Zhao X X, Blake D P, Tomley F M, Suo X. piggyBac transposon-mediated transgenesis in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40075
- [32] Tang X M, Liu X Y, Tao G R, Qin M, Yin G W, Suo J X, Suo X. "Self-cleaving" 2A peptide from porcine teschovirus-1 mediates cleavage of dual fluorescent proteins in transgenic *Eimeria tenella*[J]. *Veterinary Research*, 2016, 47(1): 68
- [33] Hu D D, Tang X M, Ben Mamoun C, Wang C Y, Wang S, Gu X L, Duan C H, Zhang S X, Suo J X, Deng M E, Yu Y L, Suo X, Liu X Y. Efficient single-gene and gene family editing in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella* using CRISPR-Cas9 [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 128
- [34] Tang X M, Suo J X, Liang L, Duan C H, Hu D D, Gu X L, Yu Y L, Liu X Y, Cui S J, Suo X. Genetic modification of the protozoan *Eimeria tenella* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 41

- [35] Li P Y, Su R N, Ren G L, Si H B, Song X J, Hu D D. Molecular mechanisms of surface antigen suppression by ApiAP2 and its implications for vaccine development[J]. *Veterinary Research*, 2025, 56(1):63
- [36] Liu J, Shi F Y, Zhang Y Y, Tang X M, Wang C Y, Gao Y, Suo J X, Yu Y, Chen L L, Zhang N, Sun P, Liu X Y, Suo X. Evidence of high-efficiency cross fertilization in *Eimeria acervulina* revealed using two lines of transgenic parasites[J]. *International Journal for Parasitology*, 2023, 53(2): 81-89
- [37] Zhang H T, Zhang L, Si H B, Liu X Y, Suo X, Hu D D. Early transcriptional response to monensin in sensitive and resistant strains of *Eimeria tenella*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 934153
- [38] Sun P, Zhang Y Y, Wang C Y, Hu D D, Liu J, Chen L L, Shi F Y, Tang X M, Hao Z K, Suo J X, Yu Y L, Suo X, Liu X Y. *EtcPRS^{Mut}* as a molecular marker of halofuginone resistance in *Eimeria tenella* and *Toxoplasma gondii* [J]. *iScience*, 2023, 26(4): 106334
- [39] Shi T Y, Yan W C, Ren H B, Liu X Y, Suo X. Dynamic development of parasitophorous vacuole of *Eimeria tenella* transfected with the yellow fluorescent protein gene fused to different signal sequences from apicomplexan parasites[J]. *Parasitology Research*, 2009, 104(2): 315-320
- [40] Yin G W, Lin Q, Qiu J H, Qin M, Tang X M, Suo X, Huang Z J, Liu X Y. Immunogenicity and protective efficacy of an *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and chicken CD40 ligand[J]. *Veterinary Parasitology*, 2015, 210(1/2): 19-24
- [41] Clark J D, Oakes R D, Redhead K, Crouch C F, Francis M J, Tomley F M, Blake D P. *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: Anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*—delivered CjaA[J]. *Vaccine*, 2012, 30(16): 2683-2688
- [42] Li Z R, Tang X M, Suo J X, Qin M, Yin G W, Liu X Y, Suo X. Transgenic *Eimeria mitis* expressing chicken interleukin 2 stimulated higher cellular immune response in chickens compared with the wild-type parasites[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 533
- [43] Qin M, Tang X M, Yin G W, Liu X Y, Suo J X, Tao G R, Ei-Ashram S, Li Y, Suo X. Chicken IgY Fc expressed by *Eimeria mitis* enhances the immunogenicity of *E. mitis*[J]. *Parasites & Vectors*, 2016, 9: 164
- [44] Marugan-Hernandez V, Cockle C, Macdonald S, Pegg E, Crouch C, Blake D P, Tomley F M. Viral proteins expressed in the protozoan parasite *Eimeria tenella* are detected by the chicken immune system[J]. *Parasites & Vectors*, 2016, 9(1): 463
- [45] Tang X M, Suo J X, Li C, Du M Z, Wang C Y, Hu D D, Duan C H, Lyu Y L, Liu X Y, Suo X. Transgenic *Eimeria tenella* expressing profilin of *Eimeria maxima* elicits enhanced protective immunity and alters gut microbiome of chickens[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(9): e00888-17
- [46] Liu X Y, Zou J, Yin G W, Su H L, Huang X X, Li J N, Xie L, Cao Y Q, Cui Y J, Suo X. Development of transgenic lines of *Eimeria tenella* expressing M2e-enhanced yellow fluorescent protein (M2e-EYFP) [J]. *Veterinary Parasitology*, 2013, 193(1/3): 1-7
- [47] Zhang S X, Tang X M, Wang S, Shi F Y, Duan C H, Bi F F, Suo J X, Hu D D, Liu J, Wang C Y, Suo X, Liu X Y. Establishment of recombinant *Eimeria acervulina* expressing multi-copies M2e derived from avian influenza virus H9N2[J]. *Vaccines*, 2021, 9(7): 791
- [48] Guo Q B, Yu Y, Suo J X, Tang X M, Zhang S X, Crouch C, Bruton B, Tarpey I, Liu X Y, Zhao G H, Suo X. Oral delivery of *Eimeria acervulina* transfected sequentially with two copies of the VP2 gene induces immunity against infectious bursal disease virus in chickens[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 11: 1367912
- [49] Fatoba A J, Adeleke M A. Transgenic *Eimeria parasite*: A potential control strategy for chicken coccidiosis[J]. *Acta Tropica*, 2020, 205: 105417
- [50] Tang X M, Yin G W, Qin M, Tao G R, Suo J X, Liu X Y, Suo X. Transgenic *Eimeria tenella* as a vaccine vehicle: Expressing TgSAG1 elicits protective immunity against *Toxoplasma gondii* infections in chickens and mice[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29379
- [51] Tang X M, Liu X Y, Yin G W, Suo J X, Tao G R, Zhang S X, Suo X. A novel vaccine delivery model of the apicomplexan *Eimeria tenella* expressing *Eimeria maxima* antigen protects chickens against infection of the two parasites[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 8: 1982
- [52] Sun P, Wang C Y, Xie F J, Chen L L, Zhang Y Y, Tang X M, Hu D D, Gao Y, Zhang N, Hao Z K, Yu Y L, Suo J X, Suo X, Liu X Y. The F204S mutation in adrenodoxin oxidoreductase drives salinomycin resistance in *Eimeria tenella*[J]. *Veterinary Research*, 2024, 55(1): 170
- [53] Su S J, Hou Z F, Liu D D, Jia C L, Wang L L, Xu J J, Tao J P. Comparative transcriptome analysis of second and third-generation merozoites of *Eimeria necatrix*[J]. *Parasites & Vectors*, 2017, 10(1): 388
- [54] Gao Y, Sun P, Hu D D, Tang X M, Zhang S X, Shi F Y, Yan X L, Yan W C, Shi T Y, Wang S, Zou J, Yin G W, Liu X Y, Dong H, Suo X. Advancements in understanding chicken coccidiosis: From *Eimeria* biology to innovative control strategies[J]. *One Health Advances*, 2024, 2(1): 6
- [55] Patton W H. *Eimeria tenella*: Cultivation of the asexual stages in cultured animal cells[J]. *Science*, 1965, 150(3697): 767-769
- [56] Long P L. Development (schizogony) of *Eimeria tenella* in the liver of chickens treated with corticosteroid[J]. *Nature*, 1970, 225(5229): 290-291
- [57] Long P L. Development of *Eimeria tenella* in avian embryos[J]. *Nature*, 1965, 208(5009):509-510
- [58] Feix A S, Cruz-Bustos T, Rutkowski B, Joachim A. *In vitro* cultivation methods for coccidian parasite research [J]. *International journal for parasitology*, 2023, 53(9): 477-489
- [59] 苏丁泽阳, 高阳, 陶建平. 鸡球虫体外细胞培养的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(2): 141-146
- Suding Z Y, Gao Y, Tao J P. Research progress in *in vitro* cell culture of chicken coccidia [J]. *Animal Husbandry and Veterinary*, 2018, 50(2): 141-146
- [60] 古少鹏, 侯金环, 陈赵英, 李宝钧, 郑明学. 柔嫩艾美耳球虫在鸡胚盲肠上皮细胞中体外培养营养条件的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(12): 1622-1628
- Gu S P, Hou J H, Chen Z Y, Li B J, Zheng M X. Study on the nutritional conditions of *Eimeria tenella* cultured in chicken embryo cecal epithelial cells *in vitro* [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 41(12): 1622-1628 (in Chinese)
- [61] 潘晓婷, 李娟, 陈兵, 刘俊杰, 戚南山, 廖申权, 吕敏娜, 林翊慧, 蔡海明, 胡俊菁, 宋勇乐, 白银山, 孙铭飞. 鸡球虫体外培养模型及应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(1):292-301
- Pan X T, Li J, Chen B, Liu J J, Qi N S, Liao S Q, Lü M N, Lin X H, Cai H M, Hu J J, Song Y L, Bai Y S, Sun M F. Research progress on chicken *Coccidia in vitro* culture models and application [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(1): 292-301 (in Chinese)
- [62] Nash T J, Morris K M, Mabbott N A, Vervelde L. Inside-out chicken

- enteroids with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1):377
- [63] Kim S H, Lee K Y, Jang Y S. Mucosal immune system and M cell-targeting strategies for oral mucosal vaccination[J]. *Immune Network*, 2012, 12(5): 165-175
- [64] Qu Z G, Gong Z X, Olajide J S, Wang J, Cai J P. CRISPR-Cas9-based method for isolating microgametes of *Eimeria tenella* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2024, 327: 110131

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 孙颖颖, 中国农业大学在读博士研究生。2022年获得硕士研究生二等学业奖学金, 2023年获中国农业大学“三好学生”称号, 2023年、2024年获得两次博士研究生一等学业奖学金。主要从事鸡球虫活载体疫苗相关研究。参与的基金项目有新型活载体疫苗创新(国家重点研发计划, 2023YFD1802402); 参与发明专利“融合表达 IBV VP2 抗原与分子佐剂 Trimer-tag 和 C3d 的鸡球虫活卵囊疫苗及其构建方法”。



通讯作者简介: 索勋, 中国农业大学教授、博士生导师, 中国农业大学杰出教师、北京市优秀教师、全国优秀教师。兼任中国动物学会常务理事、中国动物学会寄生虫学专业委员会理事长、中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会副理事长、北京市动物学会理事、北京市畜牧兽医学会理事、《寄生虫与医学昆虫学报》副主编、同时担任 30 余家国内外专业期刊的同行评阅人。主要从事寄生虫免疫学和遗传学的研究。首次提出利用艾美耳球虫作为疫苗载体的假设, 已取得重大进展, 受到国内外学术界高度认可。近年来主持国家自然科学基金重点项目、面上项目、主任基金项目, 现代农业产业体系岗位科学家项目, 863 计划项目等 20 余项国家级课题及比尔盖茨·梅琳达基金等国际合作项目。发表学术论文 200 余篇, 其中百余篇被 SCI 收录, 主编、参编或翻译教材专著 20 余部, 获得中国、美国和欧洲专利多项。传承导师孔繁瑶先生的教育观: 为师者要有培养创新型和国际化人才的教育思想, 授学生以鱼亦授学生以渔的教学理念, 给学生一碗水, 自己须有一桶水的教学储备, 善言、善喻、善问、善导的教学技法, 致力于“解民生之多艰, 育天下之英才”。