

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.03.02

猪丹毒杆菌 SpaA 优势表位的串联表达及其免疫效果分析

李 建, 张一帜, 李俊平, 王秀丽, 刘元杰, 李旭妮, 王 甲, 彭国瑞, 张 媛*, 刘 燕*

(中国兽医药品监察所(农业农村部兽药评审中心), 北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 03-0010-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 构建串联 SpaA 优势表位的猪丹毒亚单位疫苗, 对其免疫原性进行研究。将猪丹毒杆菌表面保护抗原 A 优势表位串联表达, 提取并经亲和层析纯化获得重组蛋白, 制备亚单位疫苗, 分别免疫小鼠和猪, 21 日后攻毒。成功制备串联 SpaA 优势表位的猪丹毒亚单位疫苗, 2 μg 重组蛋白可为小鼠抵抗 1000MLD 强毒攻击提供 100% 保护, 100 μg 重组蛋白可为猪抵抗 1MLD 强毒攻击提供 100% 保护, 可为猪抵抗 2MLD 强毒攻击提供 67% 保护。串联 SpaA 优势表位的猪丹毒亚单位疫苗具有良好的免疫原性。

[关键词] 串联; SpaA; 优势表位; 猪丹毒; 疫苗; 免疫原性; 攻毒保护

Tandem Expression of SpaA Dominant Epitopes of *Erysipelothrix erysipelas* and Analysis of Its Immune Effect

LI Jian, ZHANG Yi-zhi, LI Jun-ping, WANG Xiu-li, LIU Yuan-jie, LI Xu-ni, WANG Jia,
PENG Guo-rui, ZHANG Yuan*, LIU Yan*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: Zhang Yuan, E-mail: 8078@sina.com; Liu Yan, E-mail: 13810861788@163.com

Abstract: The purpose of this study was to construct a subunit vaccine of erysipelas with the dominant epitopes of SpaA of *Erysipelothrix erysipelas* in tandem, and to study its immunogenicity. The dominant epitopes of surface protection antigen A of *Erysipelothrix erysipelas* was expressed in tandem, and the recombinant protein was extracted and purified by affinity chromatography. The subunit vaccine was prepared and immunized mice and pigs which was challenged 21 days later. The erysipelas subunit vaccine with the dominant epitopes of SpaA in tandem was successfully prepared. 2 μg recombinant protein can provide 100% protection for mice against 1000MLD virulent attack. 100 μg recombinant protein can provide 100% protection against the attack of 1MLD virulent

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项(GY202006)

作者简介: 李 建, 硕士, 高级兽医师, 从事细菌制品检测相关研究。

通讯作者: 张 媛, E-mail: 8078@sina.com; 刘 燕, E-mail: 13810861788@163.com

attack and 67% protection against the attack of 2MLD virulent attack for pigs. The erysipelas subunit vaccine with the dominant epitope of SpaA in tandem has good immunogenicity.

Key words: tandem; SpaA; dominant epitopes; Erysipelas; vaccine; immunogenicity; protection against challenge

猪丹毒杆菌是一种革兰氏阳性、不形成芽孢、纤细的、直的或稍弯曲的杆菌,经常引起人的类丹毒(皮肤病)^[1]和猪的丹毒,以及其他动物(如绵羊、鸟类、爬行动物、两栖动物和一些鱼类)的多种疾病^[2]。近年来,我国猪的丹毒感染呈上升趋势^[3],临床上常用商品化疫苗(包括活疫苗及全菌灭活疫苗)来控制猪丹毒^[4]。但全菌疫苗可加重接种动物的关节炎^[5],抗生素的使用也会影响活疫苗的免疫保护效果,在这种情况下,亚单位疫苗有望更安全地预防这种疾病。

表面保护性抗原(Surface protective antigen, Spa)蛋白已被证明具有高度免疫原性,是猪丹毒的一种有前景的候选疫苗用抗原^[6]。根据 spa 基因可变区的抗原多样性,猪丹毒杆菌的 Spa 蛋白分为三种类型,即 SpaA、SpaB 和 SpaC^[7],不同类型 Spa 蛋白与血清型相关:血清 1a、1b、2、5、8、9、12、15、16、17 和 N 型产生 SpaA;4、6、11、19 和 21 型产生 SpaB;18 型产生 SpaC^[8]。流行病学研究表明,流行株主要为血清 1a、1b 和 2 型^[9]。接种福尔马林灭活 spaA 基因缺失菌株的小鼠对同源强毒菌株的攻击可提供 40% 的保护,野生型菌株、NaOH 提取抗原或 rSpaA 对相同感染可提供 80% 以上的保护^[10]。相关学者表达的 rSpaA 片段普遍较长,为极力压缩 rSpaA 长度,为融合其它病原关键保护性抗原制备亚单位联苗预留更大的空间,本研究串联 SpaA 优势表位,制备猪丹毒亚单位疫苗,并对其免疫原性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料 pET-28b(+) 购自武汉淼灵生物科技有限公司;BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;IPTG 购自碧云天生物技术有限公司;小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;猪购自北京隆安实验动物养殖中

心;猪丹毒杆菌 C43008 株、C43006 株由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心提供,ER24 株由课题组保存。

1.2 重组蛋白的基因序列设计及合成 以 GenBank 中收录的猪丹毒杆菌 SpaA 氨基酸序列(AB019124.1)为设计基础,使用生物信息学软件对 SpaA 氨基酸序列进行分析,确定信号肽及 C 端重复序列位置,对这 2 个区域之间的序列进行抗原表位分析,确定优势抗原表位。截取优势表位序列,结合 pET-28b(+) 载体表达外源蛋白的开放阅读框编码蛋白的氨基酸序列,设计串联优势表位的重组猪丹毒杆菌表面保护抗原 A 的氨基酸序列。对核苷酸序列进行大肠杆菌的偏爱密码子优化,送至中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。

1.3 重组质粒 pET-28b-spaAE 的构建 将人工合成的编码串联优势表位的重组猪丹毒杆菌 SpaA 的核苷酸序列插入 pET-28b(+) 表达载体的多克隆位点,挑取阳性克隆进行质粒全长测序鉴定。

1.4 重组质粒 pET-28b-spaAE 诱导表达 按常规方法进行转化,获得表达菌株,进行重组蛋白表达、提取、纯化,对温度、时间、IPTG 浓度等诱导表达条件进行优化。

1.5 rSpaAE 重组蛋白 Western blot 分析 分别取 0.1 μg 、0.5 μg 、1 μg rSpaAE 重组蛋白,上样于凝胶中进行电泳,用电转法将凝胶上的蛋白转到硝酸纤维素膜上,经封闭 1 h,洗涤后再与猪丹毒阳性猪血清在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,洗涤后再与羊抗猪 IgG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h,充分洗涤后,显影。

1.6 猪丹毒亚单位疫苗的制备 每 400 μg 猪丹毒重组蛋白 rSpaAE 与 1 mL 佐剂混匀,加超纯水补足 12 mL,混匀,即为猪丹毒亚单位疫苗(100 $\mu\text{g}/3\text{ mL}$)。

1.7 对小鼠的免疫效力试验 取 4 mL 亚单位疫苗,加入 2.7 mL 佐剂稀释至小鼠免疫使用浓度,用体重 16 ~ 18 g 小鼠 16 只,其中 10 只小鼠皮下注射疫苗 0.1 mL(含 2 μg 重组蛋白)/只,另 6 只不接种作对照。接种 21 日后用猪丹毒杆菌 1 型 C43008 株和 2 型 C43006 株强毒混合菌液进行攻毒,10 只免疫小鼠及 3 只对照小鼠皮下注射 1000MLD 强毒菌液,另 3 只对照小鼠皮下注射 1MLD 强毒菌液,观察 10 日。

1.8 对猪的免疫效力试验 用 4 ~ 6 月龄、体重 23 ~ 26 kg 的健康易感巴马香猪 9 头,其中 6 头皮下注射疫苗 3 mL(含 100 μg 重组蛋白),另 3 头不接种作为对照。接种 21 日后,肌肉注射 2MLD 猪丹毒杆菌强毒 ER24 株菌液攻击 3 头免疫猪,肌肉注射 1MLD 攻击另 3 头免疫猪,肌肉注射 1MLD 攻击对照猪,观察 14 日,剖检,死亡猪以及有眼观病变的猪采集各脏器进行组织切片观察。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的序列设计
去除信号肽(MKKKKHLFPKVSLSCLLLTAM-PLQTA)及 C 端重复序列(EKSGMATGWKKVADKWYYLDNTGAIVTGWKKVANKWYYLEKSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVANKWYYLENSGAMATGWKKVSNKWYYLENSGAMATGWKKVANKWYYL),剩余肽段优势表位包括 IGEQ、PVLPGTG VHAQEYNKMT、NQVKVP、EPKGYQS、EEIN、ELKNEGMS、IPELDEAY、VKYEGKVKGRA、DRIRS、PEAHE、LVS-DSSEYNDKLN、RRNRQ、VYPNLER、SLKTIK-DIKQRGKKLQ、QRSGDVRKPDV、KYQSV-VDEEKNKLQDYLESDIFDSYSVDGEKIRNKEI、AQ-SISEIK、FQNEESDSKVEPESPVKVEKPVDEEKPK-DQKKLVDQSKPESNSKEGWIKKDNK,加入连接序列,与 pET-28b(+) 开放阅读框对应的肽段最终拼接成串联 SpaA 优势表位的重组蛋白 rSpaAE,序列如图 1。

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDIGEQPVLPGTG VHAQEYNKMTYNQ
KVKPIEPKGYQSEEEINELKNEGMSNKSIIQGFEIPELDEAYEVKYEGKVKGRA DRIRSAAP
EAHELVS DSSEYNDKLNLLGVIDNRLMERRNRQVYPNLERNAVSLKTIKDIKQRGKKLQQ
RSGDVRKPDVKYQSVVDEEKNKLQDYLESDIFDSYSVDGEKIRNKEIAQSISEIKILLKFQN
EESDSKVEPESPVKVEKPVDEEKPKDQKKLVDQSKPESNSKEGWIKKDNKAAALEHHHH
HH

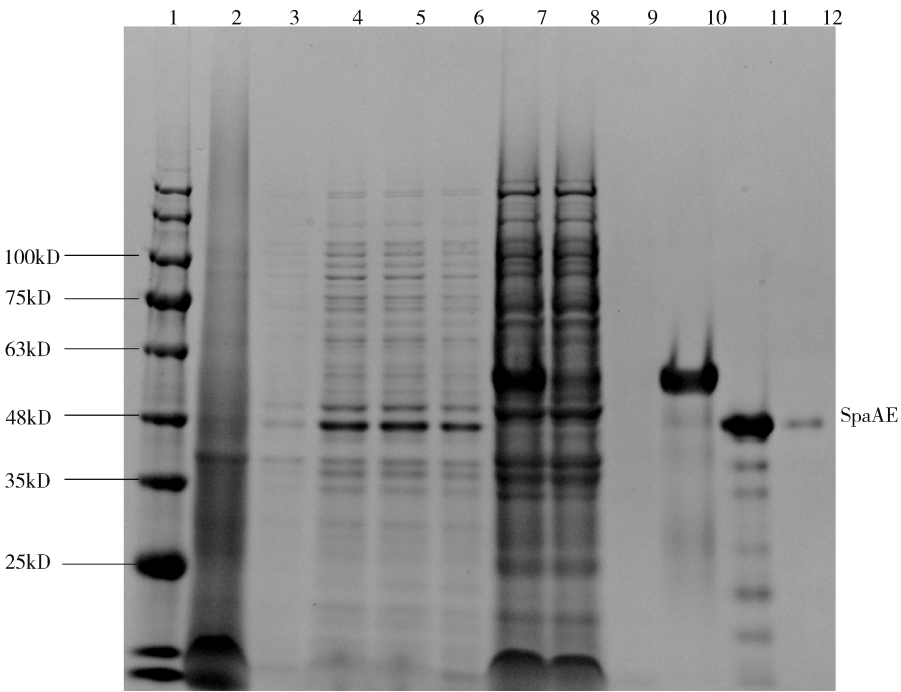
图 1 串联 SpaA 优势表位的重组蛋白 rSpaAE 的氨基酸序列
Fig 1 Amino acid sequence of recombinant protein rSpaAE with tandem dominant epitopes of SpaA

2.2 重组表达质粒 pET-28b-spaAE 的鉴定 重组表达质粒编码 rSpaAE 的核苷酸序列由 906 个碱基对组成,测序结果与预期相符。

2.3 rSpaAE 重组蛋白的表达 rSpaAE 最佳诱导表达条件为 0.5 mmol/L 的 IPTG 在 25 ℃ 诱导表达 6 h,表达后进行 SDS-PAGE 电泳,在 34kDa 附近有明显的特异性条带,如图 2,分子量与预期

相符。

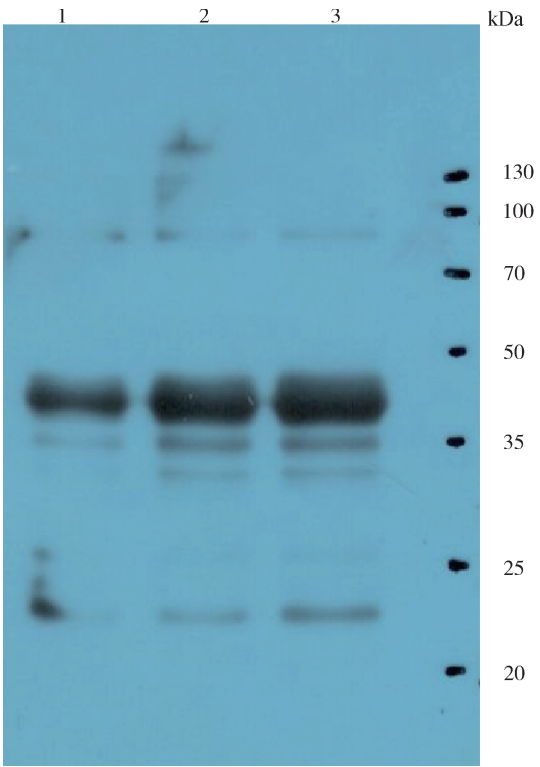
2.4 rSpaAE 重组蛋白 Western blot 分析结果 rSpaAE 重组蛋白,以猪丹毒阳性猪血清为一抗,羊抗猪 IgG 为二抗,进行 Western blot 分析。结果(图 3)表明,表达的重组蛋白 rSpaAE 能与猪源猪丹毒阳性血清发生特异性结合,说明其具有良好的反应原性。



1. Marker;2. 未诱导;3. 菌体破碎上清;4. 菌体破碎沉淀 Triton - 100 清洗上清;5. 菌体破碎沉淀 Triton - 100 清洗第二次上清;6. 菌体破碎沉淀 PBS 清洗上清;7. 清洗完成包涵体(沉淀);8. LB 流出液;9. WB 流出液;10. EB 流出液;11. 透析完成液上清;12. 透析完成液沉淀

图 2 rSpaAE SDS -PAGE 电泳图

Fig 2 SDS -PAGE electrophoretic map of rSpaAE



1. 0.1 μg ; 2. 0.5 μg ; 3. 1 μg

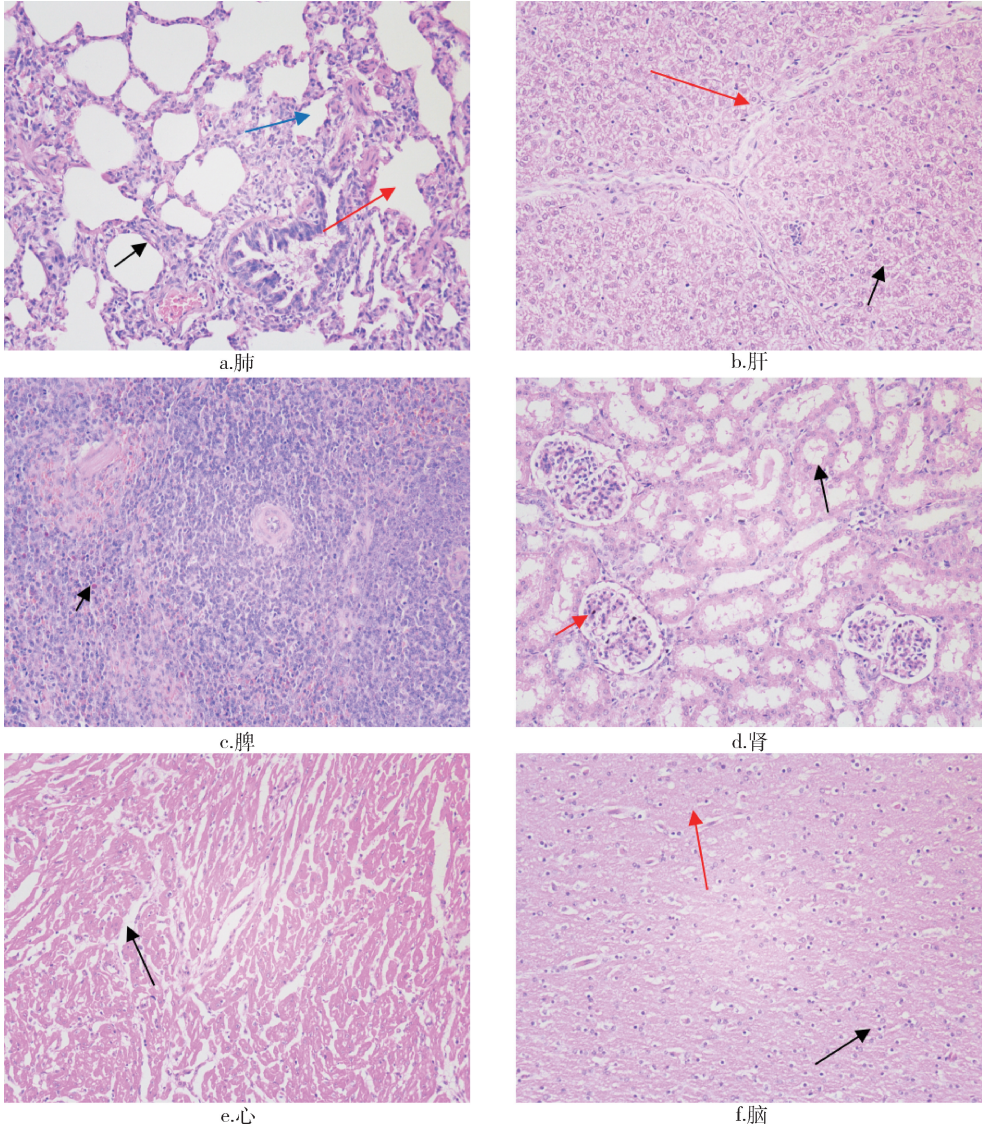
图 3 rSpaAE 蛋白 Western blot 分析结果

Fig 3 Western blot analysis results of rSpaAE protein

2.5 对小鼠的免疫原性 攻击 1MLD(5 CFU) 及 1000MLD(5000 CFU) 的对照组小鼠均 3/3 死亡,其中攻击 1MLD 的对照组小鼠攻毒后第 4 天死亡 3 只,攻击 1000MLD 的对照组小鼠攻毒后第 3 天死亡 2 只,第 4 天死亡 1 只,攻击 1000MLD 的免疫小鼠 10/10 保护。

2.6 对猪的免疫原性 攻击 1MLD(23 CFU) 的对照猪 3/3 死亡,其中攻毒后第 3 天死亡 2 头,第 4 天死亡 1 头,免疫猪 3/3 保护,攻击 2MLD (45 CFU) 的免疫猪 2/3 保护,攻毒后第 4 天死亡 1 头。

死亡猪临床表现主要为精神沉郁,喜卧,不愿走动,厌食,皮肤出现暗红色丘疹;存活猪未表现出明显的临床症状。剖检可见存活猪无明显病变,死亡猪可见脾脏轻度出血,心脏轻度肿大。死亡猪病理组织切片观察结果(图 4)显示,显微病变主要表现为 a. 肺泡隔增粗,肺泡腔狭窄临近肺泡腔扩大;b. 肝细胞广泛气球样变,纤维化形成假小叶;c. 脾组织轻度出血;d. 部分肾小管刷状缘脱落,肾小球足细胞少量深染;e. 心肌间质水肿;f. 脑组织炎性细胞浸润,组织局部水肿。



a. 黑色箭头所示为增粗的肺泡隔,蓝色箭头所示为狭窄的肺泡腔,红色箭头所示为扩张的肺泡腔;b. 黑色箭头所示为肝细胞气球样变,红色箭头所示为假小叶结构;c. 黑色箭头所示为脾出血;d. 黑色箭头所示刷状缘脱落,红色箭头所示足细胞深染;
e. 黑色箭头所示为心肌间质水肿;f. 黑色箭头所示为炎性细胞浸润,红色箭头所示为组织水肿。

图 4 死亡猪病理组织切片

Fig 4 Pathological tissue slices of dead pigs

3 讨论与结论

J. C. Chin 等^[11]发现猪丹毒杆菌 1a 型菌株一种 65 kDa 蛋白与 1a、1b、2 型阳性血清能发生反应,后来发现该蛋白位于菌体表面,故被命名为表面保护性抗原(Spa)。猪丹毒杆菌其它血清型菌株陆续也发现同类蛋白,依据氨基酸序列的同源性分为 A、B、C 等 3 种蛋白,最早发现的蛋白就被命名为 SpaA。SpaA 可分为 2 部分,N 端主要与该蛋白的免疫原性有关,不同 SpaA 该肽段氨基酸序列也较为保守;C 端为重复序列,大部分 SpaA 分子量为 65 kDa,也有部分 SpaA 分子量有所变化,主要原因就在于 C 端重复序列个数有差异。

SpaA 具有良好的免疫原性,单独 1 种蛋白免疫猪或小鼠就可对猪丹毒杆菌强毒致死剂量攻击提供 100% 的保护,是关键保护性抗原,是较为优良的猪丹毒亚单位疫苗候选蛋白。猪的传染病较多,部分疫苗还需加强免疫,免疫程序较为复杂,因此,联苗具有很好的市场潜力。商品化猪丹毒疫苗既有单苗,也常和猪瘟病毒、多杀性巴氏杆菌、细小病毒等制备成联苗。本研究串联表达了 SpaA 优势表位,极力压缩了猪丹毒保护性肽段的长度,为融合表达其它病原保护性抗原研发猪丹毒多联亚单位疫苗提供了足够的空间。

猪丹毒急性死亡多由败血症引起,死亡猪各脏器大体病变轻微或几乎没有明显病变,故商品化疫苗有效性评价一般采用存活或健活与否作为主要评价依据。疫苗有效性评价指标主要包括健活/死亡、存活/死亡、健活/发病、分离不出病原/可分离出病原、生产性能等,有的采用绝对的保护和发病标准,有的只要统计学分析有显著差异就行。其中以健活/死亡作为评价指标对疫苗的有效性要求最高,攻毒菌(毒)株毒力较强的一般可采用此指标,毒力较弱,甚至造病较为困难的攻毒菌(毒)株一般可辅以显微病理学评价指标,但应确定合理的评价指标,尤其是非实验动物。本研究死亡猪部分脏器未见明显大体病变,但在显微病变层面可发现部分病灶,原因可能在于死亡进程太快,还没来得及形成肉眼可见的明显病变。

参考文献:

[1] Gu J, Li Y X, Xu Ch W, et al. Genome sequence of multidrug -

resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* ZJ carrying several acquired antimicrobial resistance genes[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*,2020,21:13 - 15.

[2] Tang H B, Xie J, Wang L B, et al. Complete genome sequence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain GXBY - 1 isolated from acute swine erysipelas outbreaks in south China[J]. *Genomics Data*, 2016,8:70 - 71.

[3] Zhang A Y, Xu Ch W, Wang H N, et al. Presence and new genetic environment of pleuromutilin - lincosamide - streptogramin A resistance gene *lsa* (E) in *Erysipelothrix rhusiopathiae* of swine origin[J]. *Veterinary Microbiology*,2015,177(1 - 2):162 - 167.

[4] Yoshihiro Shimoji, Manae Tsukio, Yohsuke Ogawa, et al. A putative transcription regulator involved in the virulence attenuation of an acriflavine - resistant vaccine strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas[J/OL]. *Veterinary Microbiology*, 2019,239. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108488>.

[5] Da Silva A. J., Horta A. C., Jemma M., et al. Production of potential subunit vaccine against swine erysipelas in fed - batch cultures of *E. coli* BL21 (DE3)[J]. *New Biotechnology*,2009,25:S223.

[6] Mariko Uchiyama, Kinya Yamamoto, Mariko Ochiai, et al. Prevalence of Met - 203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan[J]. *Biologicals*,2014,42(2):109 - 113.

[7] Misako Morimoto, Atsushi Kato, Yuta Akaike, et al. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan [J/OL]. *Veterinary Microbiology*,2022,270. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109458>.

[8] L. G. Giménez - Lirola, C. T. Xiao, P. G. Halbur, et al. Development and evaluation of an enzyme - linked immunosorbent assay based on a recombinant SpaA protein (rSpaA415) for detection of anti - *Erysipelothrix spp.* IgG antibodies in pigs[J]. *Journal of Microbiological Methods*,2012,91(1):191 - 197.

[9] Kazumasa Shiraiwa, Yohsuke Ogawa, Sayaka Nishikawa, et al. Identification of serovar 1a, 1b, 2, and 5 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* by a conventional gel - based PCR[J]. *Veterinary Microbiology*,2018,225:101 - 104.

[10] Borathybay, E (Borathybay, Entomack),Gong, FJ (Gong, Feng - juan),Zhang, L (Zhang, Lei), et al. Role of Surface Protective Antigen A in the Pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Strain C43065[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*,2015,25 (2):206 - 216.

[11] J. C. Chin, B. Turner, G. J. Eamens. Serological assay for swine erysipelas using nitrocellulose particles impregnated with an immunodominant 65 kDa antigen from *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. *Veterinary Microbiology*,1992,31(2 - 3):169 - 180.

(编辑:陈希)