

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.03

产气荚膜梭菌 ϵ 毒素突变体的表达及免疫保护力评价

杜吉革, 彭小兵, 张秀坤, 朱 真, 薛 麒, 王 磊, 李启红,
印春生, 姚文生, 康 凯, 蒋玉文, 陈小云*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-01-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0013-08 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为获得产气荚膜梭菌 ϵ 毒素 (ETX) 的重组突变体, 并评价其毒力及免疫原性。对已知的 D 型产气荚膜梭菌 ETX 编码基因进行优化设计, 并将第 106 位组氨酸突变为脯氨酸, 经人工合成获得基因片段 GETX_{H106P}。将 GETX_{H106P} 克隆至原核表达载体 pET30a(+), 转染 BL21 (DE3) 菌中进行表达与纯化, 从而获得重组蛋白 rETX_{H106P}。利用 Western blot 方法检测 rETX_{H106P} 与 D 型产气荚膜梭菌抗血清的反应性, 并检测其对犬肾细胞系 (MDCK 细胞) 以及小鼠的毒力。随后, 将 rETX_{H106P} 与 Montanide ISA 201 佐剂混合乳化制备疫苗, 免疫 4 只健康家兔, 按照《中华人民共和国兽药典》(2015 年版) 规定的方法检测一免及二免后兔血清的中和抗体效价。结果表明, rETX_{H106P} 为可溶性表达, 通过灰度扫描, 其可溶性表达量比例可达 30%; 该重组蛋白能与 D 型产气荚膜梭菌毒素抗血清反应; 细胞毒性试验结果显示, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白仍无细胞毒性; 小鼠安全性实验结果显示, 6.25×10^6 ng/kg 剂量的重组蛋白对小鼠仍无致死性; 每毫升的一免抗血清可中和 450~700 个最小致死量 (MLD)、二免抗血清可中和 3000~4000 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素; 用 1 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素攻毒后, 对照组家兔 4/4 死亡, 免疫组家兔 4/4 保护。以上结果表明, 产气荚膜梭菌 rETX_{H106P} 重组蛋白毒力基本消失, 且保留了良好的免疫原性, 是 D 型产气荚膜梭菌病基因工程亚单位疫苗的理想候选抗原蛋白。

[关键词] 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素; 突变; 重组表达; 毒力; 抗原性

Expression and Evaluation of Protective Efficacy of *Clostridium perfringens* ϵ Toxin Mutant

DU Ji-ge, PENG Xiao-bing, ZHANG Xiu-kun, ZHU Zhen, XUE Qi, WANG Lei, LI Qi-hong,
YIN Chun-sheng, YAO Wen-sheng, KANG Kai, JIANG Yu-wen, CHEN Xiao-yun*

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

Corresponding author: CHEN Xiao-yun, E-mail: caucxy@163.com

基金项目: 科技部十三五"牛羊重要疫病免疫防控新技术研究"重点专项子课题(2017WFD0500903); 中国兽医药品监察所所级课题(201702)

作者简介: 杜吉革, 博士, 从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 陈小云。E-mail: caucxy@163.com

Abstract: This experiment was conducted to obtain recombinant mutant of *Clostridium perfringens* ϵ toxin (ETX) and subsequently evaluate the virulence and immunogenicity of the recombinant toxin. The ETX gene of *Clostridium perfringens* type D strain, GETX_{H106P}, using optimized codons was synthesized based on the sequence reported. At the same time, H106 was substituted with proline. Then, GETX_{H106P} was cloned into prokaryotic expression vector pET30a-(+) to get rETX_{H106P}, following with purification. The reactivity of rETX_{H106P} with antiserum of *Clostridium perfringens* type D was detected by Western blot. Meanwhile, Canine Kidney (MDCK) cell and mice were used to detect the virulence of rETX_{H106P}. According to the method prescribed in Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015), four rabbits were immunized with rETX_{H106P} emulsified with oil adjuvant of ISA 201 to prepare antiserum and detect the neutralizing titer of antisera after first and twice immunization. The results showed that rETX_{H106P} was expressed at a high level as soluble form with a ratio about 30% by gray scale scanning, and it could react with the antiserum of *Clostridium perfringens* type D. For MDCK cell, there were no apparent cytopathic effect (CPE) incubated with rETX_{H106P} of 100 μ g/mL. At the same time, rETX_{H106P} with the injection volume of 6.25×10^6 ng/kg was not fatal to ICR mice. After the first immunization, sera from rabbits immunized with rETX_{H106P} could neutralize 450–700 Minimum Lethal Dose (MLD) *Clostridium perfringens* type D toxin per ml, and 3000–4000 mice MLD after twice immunization. Moreover, rabbits in rETX_{H106P} immunized group fully survived at the dose of 1 MLD of *Clostridium perfringens* type D toxin challenge, whereas all of the rabbits died (4/4) in the control groups. The results suggest that rETX_{H106P} without virulence retains the good immunogenic antigen, which is an ideal candidate antigen for genetic engineering subunit vaccine of *Clostridium perfringens*.

Key words: *Clostridium perfringens* ϵ toxin; mutation; recombinant expression; virulence; antigenicity

产气荚膜梭菌旧称魏氏梭菌,是一种重要的人畜共患病原,常常诱发创伤性气性坏疽和人类食物中毒以及羔羊痢疾、牛羊坏死性肠炎、牛羊肠毒血症^[1-3],对畜牧业造成巨大经济损失^[4-7]。产气荚膜梭菌的主要致病因子是其分泌的引起人和动物发病的外毒素^[8]。根据产生的 4 种主要致死性外毒素 α (CPA)、 β (CPB)、 ϵ (ETX) 和 ι (CPI) 的种类,将该菌分为 A、B、C、D、E 五个毒素型^[9]。由 B 型和 D 型产生的 ETX^[10],在该菌所有外毒素中毒力最强^[11]。该分子主要分为 I、II 和 III 三个区域,且有两条肽链同时跨过 I、II 和 III 三个区域^[12],这导致仅使用 ETX 的一个域作为疫苗候选抗原的策略(如 CPA、CPB 的 C 末端^[13-14])很难应用于该毒素的防控。因此,实现毒素的减毒乃至无毒,对于开发毒素基因工程亚单位疫苗,及以其作为抗原组分的多价亚单位疫苗的研究和应用显得尤为重要。已有的研究发现,106 位组氨酸突变为脯氨酸的重组 ETX 基本是无毒的,且保留了良好的免疫原

性^[15-17]。然而,该蛋白的可溶性表达量非常低,不足 5%^[18-19],这将大大增加该蛋白用于制备亚单位疫苗的纯化难度和生产成本,同时降低了表达蛋白的免疫原性。

已有的研究发现,将目的基因按照大肠杆菌偏好的密码子进行优化后可明显促进目的蛋白的可溶表达^[20-21]。为此,对我国现行 D 型产气荚膜梭菌制苗用菌株(C60-2 株)ETX 的编码基因进行了优化研究,同时突变第 106 位氨基酸,经原核系统表达、纯化和鉴定,并对其毒力和免疫原性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料 D 型产气荚膜梭菌 C60-2 株、D 型产气荚膜梭菌 C60-2 株天然毒素、兔源 D 型产气荚膜梭菌毒素抗血清以及 pET-30a(+) 表达载体均为中国兽医药品监察所基础保障处微生物实验室保存;1.5~2.0 kg 普通级健康日本大耳白兔和 16~18 g ICR 小鼠购自北京维通利华实验动物技术

有限公司;pEASY-Blunt Cloning Vector、感受态细胞 Top10 和 BL21(DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司;Montanide ISA 201 佐剂购自法国赛彼科(seppic)公司;Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒、蛋白 Marker、Western blot Marker、蛋白溶解液(50 mmol/L Tris-HCl, 10% Glycerol, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0), 均购自南京金斯瑞生物科技有限公司;高保真 PCR 酶(KFX-401S) 购自东洋坊公司;premix Taq version 2.0、DNA Marker 购自 Takara 公司;T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promaga 公司;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 购自 NEB 公司;抗 His 标签单抗、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司;明胶缓冲溶液, LB 培养基购自北京中海生物科技有限公司。

1.2 基因合成及密码子优化 以前期扩增的 D 型产气荚膜梭菌 C60-2 株 ETX 编码基因为模版, 按大肠杆菌偏爱的密码子进行了优化设计和人工合成。同时将第 106 位组氨酸突变为脯氨酸。此外, 在突变基因后添加 6 * His 标签蛋白序列。基因合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 合成的基因称为 GETX_{H106P}。

1.3 ETX 突变体原核表达载体的构建 以 GETX_{H106P} 基因为模板, 采用引物对 GETX_{H106P}-F/GETX_{H106P}-R 进行 PCR 扩增。其中上游引物 GETX_{H106P}-F 序列为: 5'-CGCCATATGAAAGAAATCTC-3', 其 5' 端引入限制性内切酶 *Nde* I 位点(下划线部分)及保护性碱基;下游引物 GETX_{H106P}-R 序列为: 5'-CCGAAGCTTTTACTGGTGATG, 其 5' 端引入限制性内切酶 *Hind* III 位点及保护性碱基(下划线部分)。PCR 体系为 50 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 33 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增得到的目的 DNA 条带, 经回收后, 采用 *Nde* I/*Hind* III 双酶切消化, 与经过相同酶切消化的 pET30a(+) 载体连接。将连接好的质粒转化 Top10 感受态细胞, 挑取单克隆至含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定, 鉴定结果为阳性的质粒送

中美泰和公司测序, 将测序正确的质粒命名为 pET30a-GETX_{H106P}。

1.4 重组蛋白的表达与鉴定 将 pET30a-GETX_{H106P} 质粒转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 分别在 16 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 条件下用 IPTG 诱导表达, 收集菌体, 超声破碎后分别收集上清和沉淀, 采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况及其可溶性, 将表达的目的蛋白称为 rETX_{H106P}。采用 Western blot 方法, 以抗 His 标签蛋白抗体为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗进行孵育, 进而对重组蛋白做进一步的鉴定。

1.5 重组蛋白的纯化与鉴定 按照 Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒的使用说明书对菌体裂解上清中呈可溶性表达的目的蛋白进行纯化, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。将纯化后的目的蛋白(0.5 μ g) 经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上, 以免源 D 型产气荚膜梭菌抗毒素为一抗, 以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗进行孵育, 按照底物显色试剂盒说明书进行显色, 检测纯化的重组蛋白与 D 型产气荚膜梭菌抗毒素的反应情况。

1.6 重组蛋白的纯化与鉴定

1.6.1 细胞毒性试验 将 MDCK 细胞接种 96 孔细胞培养板, 置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养至形成细胞单层后, 弃细胞生长液。将 rETX_{H106P} 用细胞维持液稀释至 100 μ g/mL 以及 10 μ g/mL, 每个稀释度各接种 3 孔细胞, 每孔 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 观察并记录细胞的病变情况。同时将肉肝胃酶消化汤和洗脱液用细胞维持液稀释 100 倍后, 分别孵育细胞, 作为阴性对照组, 将 D 型产气荚膜梭菌 C60-2 株天然毒素做 5000 倍稀释后作为阳性对照。

1.6.2 小鼠的毒力测定 已有的研究发现, 产气荚膜梭菌 ETX 首先以前体毒素形式分泌, 当被蛋白酶, 如胰酶、糜蛋白酶以及羧肽酶等, 切除 N 端以及 C 端相应的氨基酸后, 毒素被活化, 从而发挥相应的生物活性^[22-24]。活化的 ETX 对小鼠的半数致死量可达 50 ng/kg^[25]。按照我国现行《中华人民共

和国兽药典》(2015 年版)规定的方法,用终浓度为 1% 的胰酶对纯化的 rETX_{H106P} 在 37 ℃ 条件下活化 1 h。将 16~18 g ICR 小鼠随机分为 9 组,每组 5 只。分别用活化前和活化后的 rETX_{H106P} 静脉注射,注射剂量分为 1 μg(6.25×10⁴ ng/kg)、10 μg(6.25×10⁵ ng/kg)、100 μg(6.25×10⁶ ng/kg) 3 个梯度。同时设置胰酶消化液(终浓度为 1%)以及蛋白溶解液两个阴性对照和 1 个 MLD 的天然毒素阳性对照。所有样品均用明胶缓冲液进行稀释,注射的液体总体积为 200 μL。注射后观察 2 d,记录小鼠的存活状态。

1.7 免疫原性分析

1.7.1 免疫程序 将合适浓度的纯化 rETX_{H106P} 与 Montanide ISA 201 佐剂以 1:1(V/V) 的比例配制成 rETX_{H106P} 终浓度为 50 μg/ml 的疫苗,另取灭菌 PBS 与 Montanide ISA 201 佐剂以 1:1(V/V) 的比例制备对照疫苗,置 4 ℃ 保存备用。选用体重 1.5~2.0 kg 健康家兔,测定免疫前每只家兔血清对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价。取 8 只对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价为 0 的家兔,其中 4 只各颈部皮下注射疫苗,2.0 mL/只,免疫后 14 d,以相同剂量、相同途径进行二次免疫。另外 4 只以相同剂量、相同途径和相同方法免疫对照疫苗作为对照组。

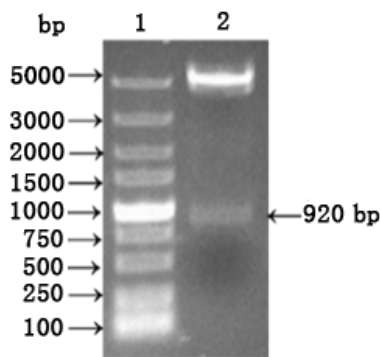
1.7.2 血清中和抗体效价测定 分别在一免后 14 d 以及二免后 21 d,对实验组及对照组所有兔经耳缘静脉采血,分离血清备用。按照《中华人民共和国兽药典》(2015 年版)三部中规定的方法测定血清中和效价^[26]。

1.7.3 攻毒试验 二免后 21 d,对免疫组及对照组所有家兔经耳缘静脉各注射 1 个 MLD 的天然毒素进行攻毒,观察 5 d,记录家兔的死亡情况。根据免疫组及对照组家兔的死亡情况,判定试验疫苗的免疫保护效力。

2 结果

2.1 ETX 毒素突变体原核表达载体的构建 采用引物 GETX_{H106P}-F/GETX_{H106P}-R 进行 PCR 扩增,扩增产物经酶切后克隆至 pET-30a(+) 载体上。获

得的重组质粒经双酶切后电泳观察,结果如图 1 所示。酶切后出现大小约 5 kb 的载体 DNA 片段,以及大小约 920 bp 的目的基因片段,与预期相符。测序结果表明,插入的外源基因序列是正确的。将此重组质粒命名为 pET30a-GETX_{H106P}。



1. DL5000 DNA 相对分子质量标准;

2. 重组质粒 pET30a-GETX_{H106P} 的 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

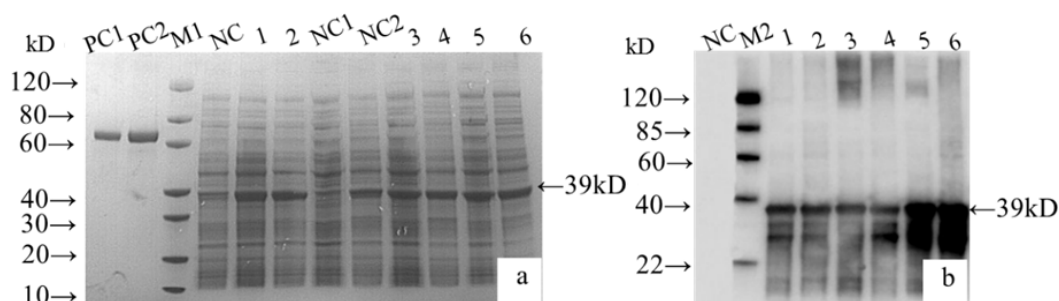
1. DL5000 DNA Marker;

2. pET30a-GETX_{H106P} digested with *Nde* I and *Hind* III

图 1 原核表达重组质粒 pET30a-GETX_{H106P} 的酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant prokaryotic expression plasmids pET30a-GETX_{H106P}

2.2 ETX 毒素突变体的原核表达鉴定 将重组表达质粒 pET30a-GETX_{H106P} 转化至 BL21(DE3) 感受态细胞并诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示,表达的目的蛋白分子量约为 39 kD,大小与预期相符。表达的 rETX_{H106P} 在 BL21(DE3) 菌体中以可溶性和包涵体两种形式存在(图 2)。图 2a 为重组蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定结果,如图所示,37 ℃、诱导 4 h 后,通过灰度扫描显示,可溶性表达的蛋白比例可达 30%。综合考虑重组蛋白的表达量、可溶性及诱导时间等条件,我们确定目的蛋白最适诱导表达条件为 37 ℃,诱导表达 4 h,收获细胞裂解上清。图 2b 为重组蛋白的 Western blot 鉴定结果,表达的目的蛋白能与抗 His 标签抗体发生反应,证明目的蛋白含有 His 标签,与预期相符。



a. 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定; b. 重组蛋白与抗 His 单抗的 Western blot

M1. 蛋白 marker; M2. Western blot marker; PC1. BSA (1 μ g); PC2. BSA (2 μ g); NC. 未诱导细胞裂解物;

1. 15 $^{\circ}$ C、16 h 诱导的细胞裂解物; 2. 37 $^{\circ}$ C、4 h 诱导的细胞裂解物; NC1. 未诱导细胞裂解上清; NC2. 未诱导细胞裂解沉淀;

3. 15 $^{\circ}$ C、16 h 诱导的细胞裂解上清; 4. 15 $^{\circ}$ C、16 h 诱导的细胞裂解沉淀; 5. 37 $^{\circ}$ C、4 h 诱导的细胞裂解上清; 6. 37 $^{\circ}$ C、4 h 诱导的细胞裂解沉淀

a. The identification of recombinant protein expression by SDS-PAGE;

b. The identification of recombinant protein with anti-His monoclonal antibody by Western blot

M1. protein Marker; M2. Western blot Marker; PC1. BSA (1 μ g); PC2. BSA (2 μ g); NC. The cell lysates without induction;

1. The cell lysates induced with IPTG for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 2. The cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37 $^{\circ}$ C;

NC1. The supernatant of cell lysates without induction; NC2. The precipitation of cell lysates without induction;

3. The supernatant of cell lysates induced with IPTG for 16 h at 15 $^{\circ}$ C; 4. The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 16 h at 15 $^{\circ}$ C;

5. The supernatant of cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37 $^{\circ}$ C; 6. The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37 $^{\circ}$ C.

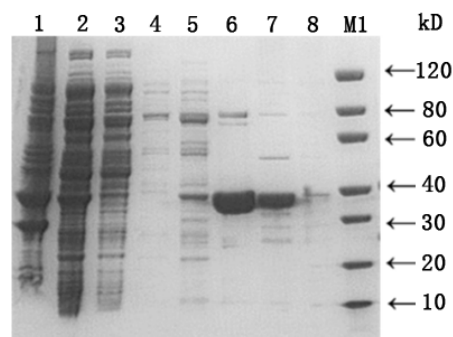
图 2 rETX_{H106P} 的原核表达与鉴定

Fig 2 Prokaryotic expression and identification of rETX_{H106P}

2.3 ETX 毒素突变体的纯化与鉴定 如图 3 所示,按照 Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒说明书对 rETX_{H106P} 进行纯化,收集纯度较高的洗脱液(50 mmol/L Imidazole 以及 300 mmol/L Imidazole 的洗脱液)进行透析,最终获得的蛋白浓度为 1.5 mg/mL,纯度可达 90%以上。将纯化后的 rETX_{H106P} 经 SDS-PAGE 后转印到 PVDF 膜上进行 Western blot 检测。结果显示, rETX_{H106P} 能够与 D 型产气荚膜梭菌抗毒素反应(图 4)。

2.4 ETX 毒素突变体的毒力测定

2.4.1 对 MDCK 细胞的毒力测定 MDCK 细胞加入各组分后继续培养 24 h,显微镜下观察。5000 倍稀释的天然 D 型产气荚膜梭菌毒素接种细胞组出现了明显的细胞病变(图 5a);接种浓度为 100 μ g/mL、10 μ g/mL rETX_{H106P} 蛋白的实验组(图 5b)、接种肉肝胃酶消化汤和洗脱液的阴性对照组及空白对照组细胞均生长良好,未出现细胞病变(图 5c)。



M: 蛋白 Marker; 1: 诱导的细胞裂解沉淀; 2: 诱导的细胞裂解物上清;

3: 上清与 Ni-IDA 孵育后流出液; 4: 无 Imidazole 的洗脱液;

5: 20 mmol/L Imidazole 的洗脱液; 6: 50 mmol/L Imidazole 的洗脱液;

7: 300 mmol/L Imidazole 的洗脱液; 8: Ni-IDA 介质

M: protein marker; 1: The precipitation of cell lysates induced with IPTG;

2: The supernatant of cell lysates after centrifugation;

3: The flow-through from Ni-IDA resin after incubated with supernatant;

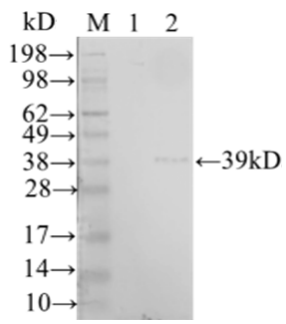
4: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer without Imidazole;

5: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer contain

20 mmol/L Imidazole; 6: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer (contain 50 mmol/L Imidazole); 7: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer (contain 300 mmol/L Imidazole); 8: The elution from Ni-IDA resin

图 3 rETX_{H106P} 的纯化

Fig 3 Purification of rETX_{H106P}



M. 蛋白 Marker;1.未诱导的细胞裂解物;2. 纯化后的 rETX_{H106P}
M:Protein Marker;1:The cell lysates without induction;
2:rETX_{H106P} after purification

图 4 rETX_{H106P} 与 D 型产气荚膜梭菌
抗毒素反应的 Western blot 鉴定

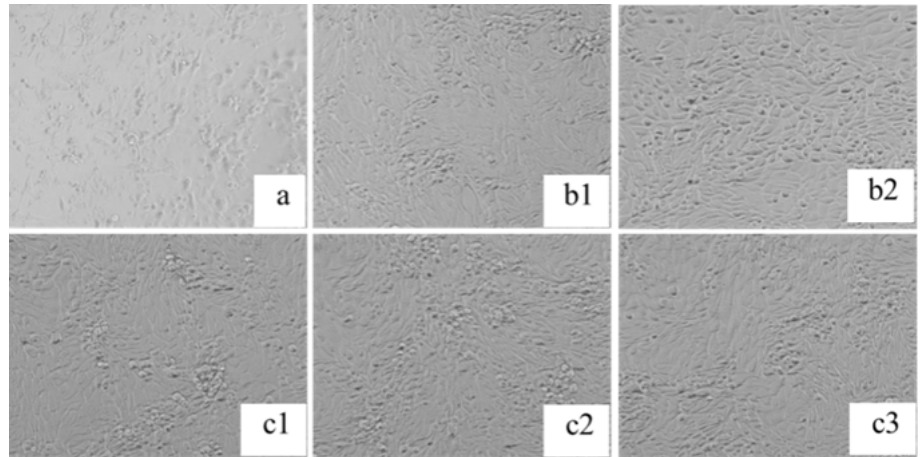
Fig 4 Interaction of rETX_{H106P} with antitoxin serum
of *Clostridium perfringens* type D

2.4.2 对小鼠的毒力测定 未活化和经过胰酶活化的 rETX_{H106P}, 分别以 1、10、100 μg/只的剂量尾静

脉注射小鼠,结果显示:注射组以及蛋白溶解液和胰酶消化液两个阴性对照组小鼠,在注射后 24 h 均存活,未见任何异常。注射 1 个 MLD 天然毒素的小鼠,在注射后 24 h 内全部死亡。以上结果说明 rETX_{H106P} 已成功减毒,即使经过胰酶活化后,本实验注射剂量对小鼠依然是无毒的。

2.5 ETX 毒素突变体的免疫原性分析

2.5.1 血清毒素中和抗体效价的测定 结果如表 1 所示,经血清中和法测定,以 rETX_{H106P} 制备疫苗免疫家兔后,每毫升一免抗血清可中和 450~700 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素;每毫升的二免抗血清可中和 3000~4000 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素,而佐剂对照组的兔血清对 D 型产气荚膜梭菌毒素无中和作用。以上结果表明,rETX_{H106P} 的免疫效力远高于现行《中华人民共和国兽药典》的规定(30 个 MLD/mL),是优良的制苗用候选抗原。



a: 加入 5000 倍稀释的天然毒素培养液后培养 24 h 的细胞;b1-b2:分别加入浓度为 100 μg/mL 及 10 μg/mL 的 rETX_{H106P} 培养液后培养 24 h 的细胞;c1:蛋白洗脱液对照;c2:用于培养 D 型产期荚膜梭菌的肉肝胃酶消化汤对照;c3: 细胞培养基对照
a: MDCK cell cultured with the toxin-containing medium of *Clostridium perfringens* type D with dilution 5000 for 24h;
b1-b2:MDCK cell cultured with rETX_{H106P}-containing medium with concentrate of 100μg/mL and 10μg/mL, respectively, for 24h;
c1:MDCK cell cultured with elution buffer control; c2: MDCK cell cultured with anaerobic beef, liver and stomach digestive enzyme soup used by *Clostridium perfringens* type D; c3: Cell culture control

图 5 rETX_{H106P} 对 MDCK 细胞的影响

Fig 5 The influence of rETX_{H106P} to MDCK cell

2.5.2 攻毒保护实验 表 1 结果显示,在二免后 21 d,对所有 rETX_{H106P} 免疫组和佐剂免疫对照组的家兔,经耳缘静脉注射 1 个 MLD 剂量的天然毒素

进行攻毒,结果表明,佐剂免疫对照组家兔在攻毒后 5 d 内全部死亡,rETX_{H106P} 免疫组家兔全部健活,未见任何不良反应。

表 1 rETX_{H106P} 的免疫保护和免疫血清的中和效价结果

Tab 1 Immunoprotection of rETX_{H106P} and neutralizing titers of rabbit antiserum

项目	rETX _{H106P} 免疫组				佐剂对照组			
	R1	R2	R3	R4	C1	C2	C3	C4
一免血清中和效价/(MLD·mL ⁻¹)	700	450	550	650	0	0	0	0
二免血清中和效价/(MLD·mL ⁻¹)	4000	3000	3300	3500	0	0	0	0
攻毒结果	S	S	S	S	D	D	D	D

“S”代表存活;“D”代表死亡
"S" means survived; "D" means died

3 讨 论

随着研究的深入,与产气荚膜梭菌密切相关的主要致死性外毒素的结构和致病机理越来越清晰,致死性外毒素的部分无毒区域(CPA、CPB 以及 CPI 的 C 末端^[13-14])或者无毒突变体(ETX 和 PFO^[27])作为亚单位疫苗抗原已经被证实能够有效预防相应的毒血症。在无毒重组 ETX 亚单位疫苗的研究中,经典的无细胞毒性突变体为第 106 位组氨酸突变为脯氨酸的重组 ETX 蛋白,其安全性和免疫原性已经得到大量验证^[15-17]。研究制备的 rETX_{H106P} 可溶性表达量较高,可溶性比例可达 30%,这可能是由于研究按照大肠杆菌偏爱的密码子,对 rETX_{H106P} 进行了优化,从而为后续的大量生产以及纯化提供便利。根据已有的文献报道,50 ng/mL 的天然 ETX 即可引起小鼠死亡,而研究结果发现 6.25×10⁶ ng/kg 的 rETX_{H106P} 对 ICR 小鼠尾静脉注射,仍无致死性,证明该重组蛋白具有良好的安全性。

自然环境中对动物致病的梭菌种类较多,且常混合感染,因而梭菌病的预防多采用联苗,以达到一针多防的目的。目前我国商品化的该类疫苗均为天然毒素经甲醛脱毒后制备的类毒素疫苗,其生产过程复杂,易导致产毒不稳定。此外,该类疫苗有效抗原含量较低,制备联苗后免疫剂量过大,容易引起动物的应激反应。彭小兵等对该类疫苗 2006-2015 年间的检验结果进行了统计分析,结果表明:以血清中和法检验,效力不符合规定的产品共有 33 批,其中 β 毒素组分效力不符合规定(低于 1 MLD)的比例最高,约为 72.7%^[28]。然而,鉴于此类联苗免疫剂量的限制,无法再大幅度增加 β 类毒

素的比例。为此,产气荚膜梭菌毒素亚单位疫苗的研制显得极为重要。在一定范围内,可以最大限度增大免疫原性较差的毒素抗原,从而提高联苗的总体免疫保护作用。而研究中制备的 rETX_{H106P},一免兔血清每毫升可中和 450 MLD 以上,二免兔血清每毫升可中和 3000 MLD 以上,效果明显优于目前的商品化疫苗。这说明 ETX 的第 106 位氨基酸突变后,毒力基本消失,但仍保留了良好的免疫原性,是我国现行 D 型产气荚膜梭菌毒素疫苗升级换代的理想候选疫苗抗原。

参考文献:

[1] Novak J S, Juneja V K. *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods [J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2002, 3 (2):127-132.

[2] Uzal F A, Freedman J C, Shrestha A, *et al.* Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(3):361-377.

[3] Decker M, Gomes G D, Galv o A C, *et al.* Evaluation of a new mathematical model to describe *Clostridium perfringens* growth during the cooling of cooked ground beef [J]. *Food Sci Technol*, 2013, 33(3):507-512.

[4] 郑晓丽, 窦贤明, 胡道俊, 等. 产气荚膜梭菌对养牛业的危害及其防治[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8):211-214.

Zheng X L, Dou X M, Hu D G, *et al.* The threat, prevention and control of *Clostridium perfringens* in cattle industry [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 37 (8):211-214.

[5] 钊有科, 肖 啸, 濮永华, 等. 努比亚山羊产气荚膜梭菌病的诊治[J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(12):42-43.

Chuan Y K, Xiao X, Pu Y H, *et al.* Diagnosis and treatment of *Clostridium perfringens* infection in Nubian goats [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(12):42-43.

[6] Van I F, De B J, Pasmans F, *et al.* *Clostridium perfringens* in

- poultry: an emerging threat for animal and public health [J]. Avian Pathol, 2004, 33(6):537-549.
- [7] 郑晓丽, 宋振银, 倪学勤. 产气荚膜梭菌对家禽业的危害及其预防[J]. 中国家禽, 2008, 30(24):69-71.
Zheng X L, Song Z Y, Ni X Q. Hazards and prevention of *Clostridium perfringens* to poultry industry [J]. China Poultry, 2008, 30(24):69-71.
 - [8] Revittmills S A, Rood J I, Adams V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting [J]. Microbiol Aus, 2015, 36(3)114-117.
 - [9] Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge [J]. Can Vet J, 1980, 21(5):141-148.
 - [10] Sayeed S, Li J, McClane B A. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates [J]. Infect Immun, 2007, 75(5):2391-2398.
 - [11] Sakurai J. Toxins of *Clostridium perfringens* [J]. Rev Med Microbiol, 1995, 6(3):175-185.
 - [12] Cole A R, Gibert M, Popoff M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin [J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(8):797-798.
 - [13] Nagahama M, Oda M, Kobayashi K, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens* [J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(5):340-345.
 - [14] Das S, Majumder S, Kingston J J, et al. Generation and characterization of recombinant bivalent fusion protein r-Cpib for immunotherapy against *Clostridium perfringens* beta and iota toxemia [J]. Mol Immunol, 2016, 70:140-148.
 - [15] Alimolaei M, Golchin M, Daneshvar H. Oral immunization of mice against *Clostridium perfringens*, epsilon toxin with a *Lactobacillus casei*, vector vaccine expressing epsilon toxoid [J]. Infect Genet Evol, 2016, 40:282-287.
 - [16] Li Q, Xin W, Gao S, et al. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* erfringens low-toxic site-directed mutant of Closenterotoxemia [J]. Hum Vaccin Immunother, 2013, 9(11):2386-2392.
 - [17] Dorca-Arévalo J, Pauillac S, Dlaz-Hidalgo L, et al. Correlation between *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* lethal activity in mice of epsilon toxin mutants from *Clostridium perfringens* [J]. PLoS One, 2014, 9(7):e102417.
 - [18] 李 箐. 产气荚膜梭菌 α 、 ϵ 毒素突变体构建及应用[D]. 安徽医科大学, 2013.
Li Q. Construction of mutants of *Clostridium perfringens* Alpha, epsilon toxin and it's application [D]. Anhui Medical University, 2013.
 - [19] Oyston P C, Payne D W, Havard H L, et al. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice [J]. Microbiology, 1998, 144(2):333-341.
 - [20] 罗维佳, 邓 晨, 李衍常, 等. 串联杂种泛素结合结构域蛋白 (ThUBD) 在大肠杆菌中的可溶性高效表达[J]. 军事医学, 2016, 40(10):795-800.
Luo W J, Dong C, Li Y C, et al. Soluble expression of tandem hybrid ubiquitin-binding domains (ThUBD) In prokaryotic cytoplasm of *Escherichia coli* BL21 (DE3) [J]. Military Medical Sciences, 2016, 40(10):795-800.
 - [21] 于 蕊, 王 双, 余云舟, 等. B 型肉毒毒素保护性抗原 He 在大肠杆菌中的可溶性高表达[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(3):365-367.
Yu R, Wang S, Yu Y Z, et al. High-level and soluble expression of Botulinum Neurotoxin serotype B protective antigen HC domain in *Escherichia coli* [J]. Letter in Biotechnology, 2008, 19(3):365-367.
 - [22] Hunter S E, Clarke I N, Kelly D C, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli* [J]. Infect Immun, 1992, 60(1):102-110.
 - [23] Minami J, Katayama S, Matsushita O, et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides [J]. Microbiol Immunol, 1997, 41(7):527-535.
 - [24] Freedman J C, McClane, B A, Uzal, F A. New insights into *Clostridium perfringens* epsilon toxin activation and action on the brain during enterotoxemia [J]. Anaerobe, 2016, 41:27-31.
 - [25] Bokori-Brown M, Savva C G, Sp F D C, et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin [J]. FEBS J, 2011, 278(23):4589.
 - [26] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016:45-46.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume III 2015 Edition[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2016:45-46.
 - [27] Verherstraeten S, Goossens E, Valgaeren B, et al. Non-toxic perfringolysin O and α -toxin derivatives as potential vaccine candidates against bovine necrohaemorrhagic enteritis[J]. Veterinary Journal, 2016, 217:89.
 - [28] 彭小兵, 田冬青, 彭国瑞, 等. 产气荚膜梭菌 β 毒素的表达及其抗血清的制备[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(10):93-96.
Peng X B, Tian D Q, Peng G R, et al. Expression of *Clostridium perfringens* erfringensm perfringens of 33antiserum[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015, 47(10):93-96.