

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.05

重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素三点突变体的融合表达及其免疫活性分析

杜吉革, 张秀坤, 朱 真, 薛 麒, 李启红, 印春生, 彭小兵,
王 磊, 姚文生, 康 凯, 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) 07-0028-07 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为获得并评价重组产气荚膜梭菌 ϵ 毒素 (ETX) 三点突变体蛋白的毒力及免疫活性, 对已知的 D 型产气荚膜梭菌 ETX 编码基因进行优化设计, 同时引入包括第 30 和 196 位酪氨酸突变为丙氨酸, 及第 106 位组氨酸突变为脯氨酸共 3 个氨基酸突变, 并在该基因 5' 端添加 Th 细胞表位 (T) 和鞭毛蛋白 (flagellin) N 末端编码序列, 经人工合成获得基因片段 GTF_NETX_{m3} 。随后, 将该基因片段克隆至原核表达载体 pET30a-(+), 转染 BL21 (DE3) 菌诱导表达、纯化, 从而获得重组蛋白, 进而利用 Western blot 方法检测重组蛋白与 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) 及小鼠的毒力。最后, 将重组蛋白与 Montanide ISA 201 佐剂混合乳化制备疫苗, 免疫 4 只健康家兔, 根据《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。结果显示, 重组蛋白主要以包涵体的形式存在, 且能与 D 型产气荚膜梭菌毒素抗血清反应; 100 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白未显示细胞毒性; 6.25 mg/kg 剂量的重组蛋白对小鼠无致死性; 每毫升的一免抗血清可中和 80~120 个最小致死量 (MLD)、二免抗血清可中和 750~1100 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素; 用 1 个 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。试验表明, 产气荚膜梭菌 ETX 三点突变体的毒力基本消失, 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; 突变体; Th 细胞表位; 鞭毛蛋白; 抗原性

Expression and Immunocompetence of *Clostridium perfringens* ϵ Toxin Derivative with Three Mutations

DU Ji-ge, ZHANG Xiu-kun, ZHU Zhen, XUE Qi, LI Qi-hong, YIN Chun-sheng,
PENG Xiao-bing, WANG Lei, YAO Wen-sheng, KANG Kai, 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”重点专项课题 (2017WFD0500903)

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 *Clostridium perfringens* ETX derivative with three amino acid mutations, and subsequently the virulence and immunogenicity of the recombinant protein. Based on the known sequence, three amino acid mutations, Y30A, H106P and Y196A, were introduced into the gene of *Clostridium perfringens* ETX. Meanwhile, genes of Th cell and were added to 5' of gene of CPA, respectively. Then the gene GTF_NETX_{m3} was optimized and synthesized and subsequently cloned into prokaryotic expression vector pET-30a (+) for expression and purification to get the recombinant protein. The reactivity of recombinant protein with antiserum of *Clostridium perfringens* type D was detected by Western blot. Meanwhile, the recombinant protein was incubated with canine kidney (MDCK) cells and injected into mice to detect the virulence of it. According to the method prescribed in Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015), four rabbits were immunized with recombinant protein emulsified with oil adjuvant of ISA 201 to prepare antiserum and detect the neutralizing titer of antisera after the first and twice immunization. The results showed that the recombinant protein was presented predominantly in an insoluble form (inclusion bodies), and it could react with the antiserum of *Clostridium perfringens* type D. For MDCK cell, there were no apparent cytopathic effect (CPE) incubated with the recombinant protein of 100 µg/mL. At the same time, the recombinant protein with the injection volume of 6.25 mg/kg was not fatal to ICR mice. After the first immunization, sera from rabbits immunized with the recombinant protein could neutralize 80~120 minimum lethal dose (MLD) of *Clostridium perfringens* type D toxin per mL, and 750~1100 MLD after twice immunization. Moreover, rabbits in the recombinant protein 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 *Clostridium perfringens* ETX derivative with three mutations without virulence retains the good immunogenic antigen, which provides important experimental data for the development of novel *Clostridium perfringens* vaccine.

Key words: *Clostridium perfringens* ϵ toxin; mutation; Th cell epitope; flagellin; antigenicity

产气荚膜梭菌是一种重要的人畜共患病原,其主要致病因子是其分泌的外毒素,能引起人和动物发病^[1]。其中,ETX 是该菌所有外毒素中毒力最强的毒素,能够引起动物的坏死性肠炎或者肠毒血症,导致感染动物在很短的时间内死亡,从而使抗生素治疗失去意义^[2]。为此,ETX 的疫苗免疫是防制其所致疾病的主要手段。然而,传统 ETX 的类毒素疫苗仍存在一定的缺点和安全隐患^[2]。因此,无毒的 ETX,对于开发 ETX 基因工程亚单位疫苗,及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。

ETX 主要是由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌产生,属于成孔毒素家族。已有的研究证实,组氨酸残基是影响 ETX 蛋白活性的关键性氨基酸,而第 106 位的组氨酸突变为脯氨酸的重组 ETX 基本是

无毒的,然而该重组突变体的可溶性表达比例较低(小于 5%),不利于后续的大量生产和纯化^[2]。此外,姚文武^[3]研究发现,第 196 位氨基酸突变后能够明显降低 ETX 毒力。在亚单位疫苗的研制中,增加 Th 细胞表位和佐剂能够提高疫苗的免疫原性。已有的研究表明,口蹄疫病毒 VP4 蛋白的第 20~35 位氨基酸是一种良好的 Th 细胞表位^[4]。作为一种应用较为广泛的免疫佐剂,细菌的鞭毛蛋白(flagellin)主要是通过其高度保守的 N 端和 C 端来激动 TLR-5 受体,从而诱发机体产生更强的体液免疫与细胞免疫应答^[5]。本研究利用基因合成技术,在对 ETX 编码基因进行密码子优化的同时,引入了 3 个氨基酸位点突变:Y30A、Y196A 以及 H106Y,从而降低了因单个氨基酸突变在未来基因工程疫苗大规模生产中可能造成的生物安全隐患。

同时,引入 VP4 蛋白的 Th 细胞表位和鞭毛蛋白 N 末端第 84~101 位氨基酸(FN)的编码序列,通过原核系统表达并纯化重组蛋白,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 型产气荚膜梭菌抗血清以及 pET30a-(+)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,pH8.0),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 D 型产气荚膜梭菌 C60-3 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,并引入 3 个氨基酸点突变;第 30 和 196 位酪氨酸突变为丙氨酸,第 106 位组氨酸突变为脯氨酸。此外,在突变基因 5'端添加 VP4 蛋白的 Th 细胞表位和鞭毛蛋白 N 末端第 84~101 位氨基酸的编码序列,在突变基因 3'端添加 6*His 标签蛋白编码序列。由中美泰和公司人工合成基因片段 GTF_NETX_{m3} 。

1.3 ETX 突变体原核表达载体的构建 以 GTF_NETX_{m3} 基因为模板,采用引物对 1F/1R 进行 PCR 扩增。其中上游引物 1F 序列为:5'-CGC-CATATGAATAAAGTAAAATGT-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 1R 序列为:5'-CCGAAGCTTTTACTG-GTGATG,其 5'端引入限制性内切酶 *Hind* III 位点(下划线部分)及保护性碱基。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 90 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- GTF_NETX_{m3} 。

1.4 重组蛋白的表达与鉴定 将质粒 pET30a- GTF_NETX_{m3} 转化 BL21(DE3)感受态细胞,分别在 15 $^{\circ}$ 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 rTF_NETX_{m3} 。采用 Western blot 方法,以抗 His 标签蛋白抗体为一抗,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以包涵体形式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。采用 Western blot 方法检测纯化蛋白与 D 型产气荚膜梭菌抗血清的反应性^[2]。

1.6 重组蛋白的毒力测定^[2] 采用 MDCK 细胞检测 rTF_NETX_{m3} 的细胞毒性;采用 ICR 小鼠检测 rTF_NETX_{m3} 的小鼠毒性。

1.7 免疫原性分析^[2] 以纯化的 rTF_NETX_{m3} 免疫日本大耳白兔,采用血清中和的方法测定兔血清的毒素中和效价;二免后 21 d,用 1 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌天然毒素进行攻毒,判定试验疫苗的免疫保护效力。

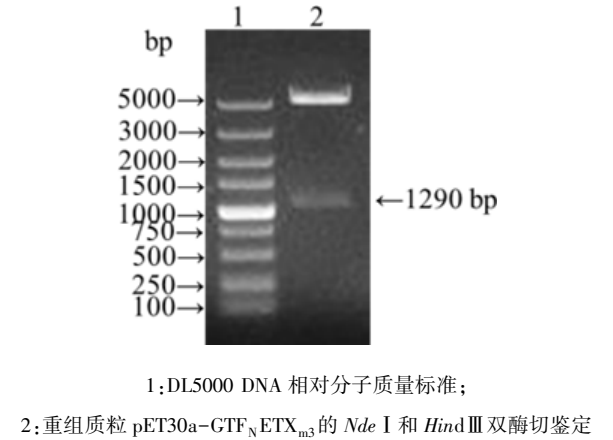
2 结果与分析

2.1 ETX 突变体原核表达载体的构建 采用引物

1F/1R 进行 PCR 扩增,扩增片段经酶切后克隆至 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 1290 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-GTF_NETX_{m3}。

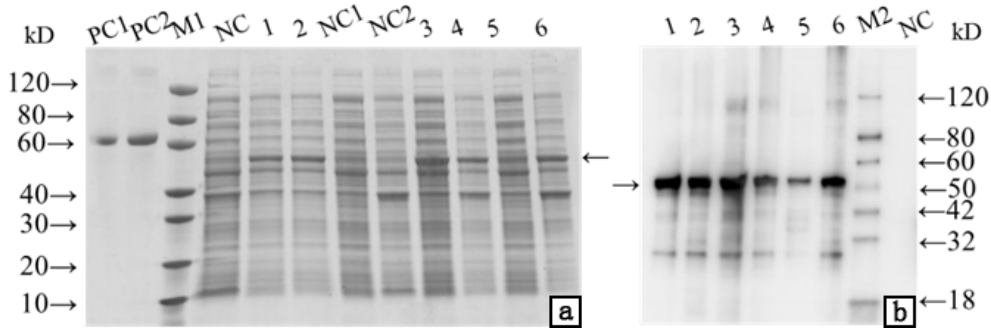
2.2 ETX 突变体的原核表达鉴定 将重组表达质粒 pET30a-GTF_NETX_{m3}转化至 BL21(DE3)感受态细胞并诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示,表达的蛋白分子量约为 51 kD,大小与预期相符。BL21(DE3)菌体在 15℃诱导表达 16 h 后,rTF_NETX_{m3}具有较高比例的可溶性表达,而在 37℃诱导表达 4 h 后,rTF_NETX_{m3}主要以包涵体的形式表达(图 2a)。图 2b 为重组蛋白的 Western blot 鉴定结果,表达的蛋白能与抗 His 标签抗体发生反应,证明目的蛋白含有 His 标签,与预期

相符。综合考虑重组蛋白的表达量及诱导时间等条件,确定目的蛋白最适诱导表达条件为 37℃,诱导表达 4 h,收获裂解后的沉淀蛋白,用于后续的纯化。



1:DL5000 DNA Marker; 2: pET30a-GTF_NETX_{m3} digested with *Nde*I and *Hind*III

图 1 原核表达重组质粒 pET30a-GTF_NETX_{m3}的酶切鉴定
Fig 1 Identification of recombinant prokaryotic expression plasmids pET30a-GTF_NETX_{m3}



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 μg);PC2:BSA (2 μg);NC:未诱导细胞裂解物;
1:15℃16 h 诱导的细胞裂解物;2:37℃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℃16 h 诱导的细胞裂解上清;4:15℃16 h 诱导的细胞裂解沉淀;5:37℃4 h 诱导的细胞裂解上清;6:37℃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 μg) ; PC2:BSA (2 μg); NC:The cell lysates without induction;
1:The cell lysates induced with IPTG for 16 h at 15℃; 2:The cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37℃;
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℃; 4:The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 16 h at 15℃;
5:The supernatant of cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37℃; 6:The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 4 h at 37℃

图 2 rTF_NETX_{m3}的原核表达与鉴定

Fig 2 Prokaryotic expression and identification of rTF_NETX_{m3}

2.3 ETX 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以包涵体形式表达的 rTF_NETX_{m3} 进行纯化,收集纯度较高的 Lane 7~12 洗脱液进行透析和复性,最终获得的蛋白浓度为 1.03 mg/mL。将纯化后的 rTF_NETX_{m3} 经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上进行 Western blot 检测。结果显示,rTF_NETX_{m3} 能够与 D 型产气荚膜梭菌抗血清反应(图 4)。

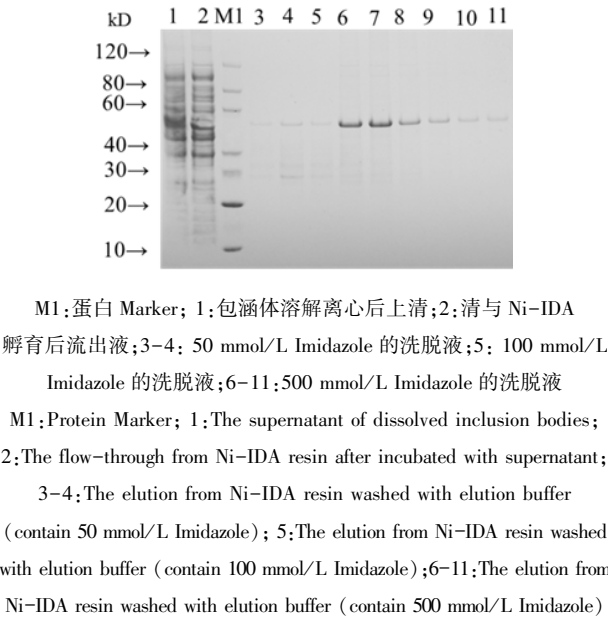
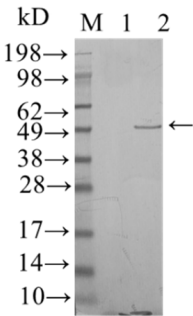


图 3 rTF_NETX_{m3} 的纯化

Fig 3 Purification of rTF_NETX_{m3}



M:蛋白 Marker;1:未诱导的细胞裂解物;2:纯化后的 rTF_NETX_{m3}

M:Protein Marker;1:The cell lysates without induction; 2:rTF_NETX_{m3} after purification

图 4 rTF_NETX_{m3} 与 D 型产气荚膜梭菌抗血清反应的 Western blot 鉴定

Fig 4 Interaction of rTF_NETX_{m3} with antitoxin serum of *Clostridium perfringens* type D

2.4 rTF_NETX_{m3} 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。1000 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,多数细胞崩解(图 5a);接种浓度为 100 μg/mL、10 μg/mL rTF_NETX_{m3} 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)。

2.4.2 rTF_NETX_{m3} 对小鼠的毒力测定 经过胰酶活化的 rTF_NETX_{m3},分别 10 μg/只及 100 μg/只的剂量尾静脉注射小鼠,结果 rTF_NETX_{m3} 注射组及肉肝胃酶消化汤注射组小鼠,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 rTF_NETX_{m3} 已成功减毒,即使经过胰酶活化后,在本实验注射剂量范围内,对小鼠依然是无毒的。

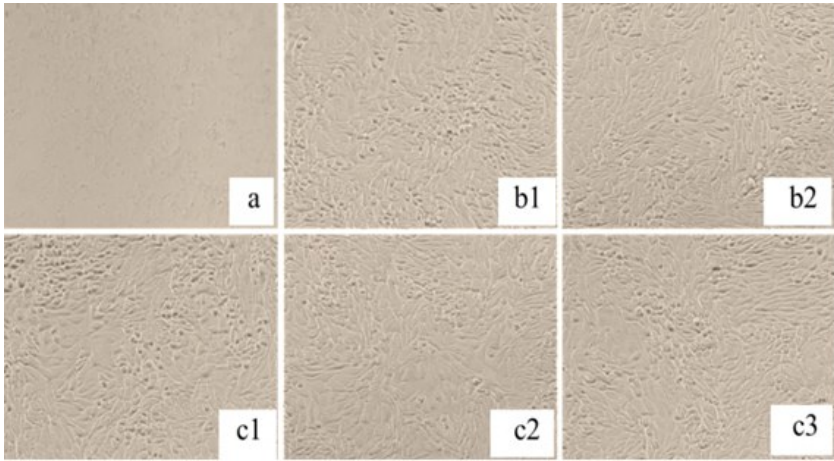
2.5 ETX 突变体的免疫原性分析

2.5.1 血清毒素中和抗体效价的测定 如表 1 所示,经血清中和法测定,以 rTF_NETX_{m3} 制备疫苗免疫家兔后,每毫升的一免抗血清可中和 80~120 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 750~1100 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,rTF_NETX_{m3} 的免疫效力远高于现行《中华人民共和国兽药典》的规定标准,是优良的制苗用候选抗原。

2.5.2 攻毒保护性试验 在二免后 21 d,对所有 rTF_NETX_{m3} 免疫组和佐剂免疫对照组的家兔,经耳缘静脉注射 1 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌天然毒素进行攻毒,结果显示:佐剂免疫对照组家兔在攻毒后 5 d 内全部死亡,rTF_NETX_{m3} 免疫组家兔全部健活,未见任何不良反应,保护率达 100%。

3 讨论与结论

ETX 属于成孔毒素家族,在结构上主要分为 I、II 和 III 三个区域,分别在毒素与细胞受体结合过程、与细胞受体结合稳定性的维持以及细胞膜穿孔的形成过程中发挥着重要作用^[6]。由于毒素中



a: 加入 1000 倍稀释的天然毒素培养液后培养 24h 的细胞;b1-b2:分别加入浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 以及 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ 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 1000 for 24 h;
b1-b2:MDCK cell cultured with $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ -containing medium with concentrate of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for 24 h;
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 $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ 对 MDCK 细胞的影响

Fig 5 The influence of $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ to MDCK cell

表 1 $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ 的免疫保护和免疫兔血清的中和效价结果

Tab 1 Immunoprotection of $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ and neutralizing titers of rabbit antiserum								
组别 group	$\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ 免疫组 rabbits immunized with $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$				佐剂对照组 rabbits immunized with $\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$			
	R1	R2	R3	R4	C1	C2	C3	C4
一免血清中和效价/(MLD $\cdot$ mL ⁻¹) The serum neutralization titers after first immunization/(MLD $\cdot$ mL ⁻¹)	80	120	100	90	0	0	0	0
二免血清中和效价/(MLD $\cdot$ mL ⁻¹) The serum neutralization titers after second immunization/(MLD $\cdot$ mL ⁻¹)	750	1100	1000	850	0	0	0	0
攻毒结果 Challenged with toxin	SSSSsSS	SS	SSS	SS	DDDDD	D	D	D

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

有 2 条 35 个氨基酸的肽链同时跨过 I , II 和 III 三个区域^[7],导致仅使用毒素的一个域作为疫苗候选抗原的策略(如 α 、 β 毒素的 C 末端^[8-9])很难应用于该毒素的防控。在无毒重组 ETX 亚单位疫苗的研究中,经典的无细胞毒性的突变体为第 106 位组氨酸突变为脯氨酸的 ETX 重组蛋白,其安全性和免疫原性已经得到大量验证^[10-11]。虽然该突变体

蛋白可溶性较低,但由于考虑到以包涵体形式表达的蛋白可能缺乏正确的空间构象,导致研究者通常选择表达水平较低的可溶蛋白^[6, 12],而以包涵体形式表达的毒素突变体的活性以及免疫原性尚未见报道。

$\text{rTF}_\text{N}\text{ETX}_\text{m3}$ 是在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 获得的以包涵体形式表达的重组蛋白,对 MDCK 细胞以及小鼠在检

测范围内均未表现出毒性,与已有的文献报道的突变体毒力测定结果相符^[3]。而 rTF_NETX_{m3} 一免兔血清每毫升可中和 80 MLD 以上,二免兔血清每毫升可中和 750 MLD 以上,效果明显优于目前的商品化疫苗标准(30 MLD)^[13],说明以包涵体形式表达的 rTF_NETX_{m3} 经纯化复性后具有良好的免疫原性。与可溶性表达的蛋白纯化过程相比,以包涵体形式表达的重组蛋白在纯化中可最大程度的降低蛋白中内毒素的含量,更适用于大规模兽用疫苗的制备。

参考文献:

- [1] Van I F, De B J, Pasmans F, *et al.* *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health [J]. Avian Pathology, 2004, 33(6):537-549.
- [2] 杜吉革,彭小兵,张秀坤,等. 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素突变体的表达及免疫保护力评价[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 13-20.
Du J G, Zhang X K, Zhu Z, *et al.* Expression and evaluation of protective efficacy of *Clostridium perfringens* ϵ toxin mutant [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(6):13-20.
- [3] 姚文武. 产气荚膜梭菌 epsilon 毒素突变体疫苗的相关基础研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
Yao W W. Basic studies on no-toxin mutant vaccine of *Clostridium perfringens* epsilon toxin [D]. The Academy of Military Medical Sciences of the Chinese PLA, 2016.
- [4] 孙小涵,张碧成,张 强,等. 非致病性大肠杆菌鞭毛蛋白对 O 型口蹄疫病毒的佐剂效果[J]. 中国农业科学, 2017, 50(9): 1714-1722.
- [5] 马鸣潇,金宁一,尹革芬,等. 口蹄疫病毒三价复合多表位佐剂 DNA 疫苗构建及其免疫原性[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4):514-519.
Ma M X, Jin N Y, Yin G F, *et al.* Molecular design and immunogenicity of a multiple-epitope foot-and-mouth disease virus antigen, adjuvants, and DNA vaccination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(4):514-519.
- [6] 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.
- [7] Cole A R, Gibert M, Popoff M, *et al.* *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2004, 11(8):797-798.
- [8] Nagahama M, Oda M, Kobayashi K, *et al.* A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens* [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 57(5):340-345.
- [9] 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]. Molecular Immunology, 2016, 70:140-148.
- [10] 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]. Infection, Genetics and Evolution, 2016, 40:282-287.
- [11] 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.
- [12] Bokori-brown M, Savva C G. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin [J]. FEBS Journal, 2011, 278(23):4589-2011.
- [13] 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.

(编辑:李文平)