

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.01

重组产气荚膜梭菌 α 毒素突变体的表达与免疫保护力评价

杜吉革, 朱 真, 薛 麒, 赵俊杰, 彭小兵, 张秀坤,
李启红, 印春生, 姚文生, 康 凯, 陈小云*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-01-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0001-08 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为获得产气荚膜梭菌 α 毒素(CPA)的重组突变体,并评价其毒力和免疫原性,对已知的产气荚膜梭菌 CPA 编码基因进行优化设计,同时引入包括第 56 位和第 130 位的天冬氨酸(D)突变为甘氨酸(G),及第 275 位的酪氨酸(Y)和第 336 位的天冬氨酸(D)突变为天冬酰胺(N)的 4 个氨基酸突变。此外,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_NCPA_{m4} 。将 GTF_NCPA_{m4} 克隆至原核表达载体 pET-30a (+)中进行表达与纯化,获得重组蛋白 rTF_NCPA_{m4} 。利用 Western blot 方法检测 rTF_NCPA_{m4} 与产气荚膜梭菌 A 型毒素抗血清的反应性,并检测该蛋白的卵磷脂酶和溶血活性以及对小鼠的毒力。随后,将重组蛋白与 Montanide ISA 201 佐剂以 1:1 (V/V) 的比例混合乳化,免疫家兔,检测兔血清的中和抗体效价。二免后 21 d,对家兔通过耳缘静脉注射 1 个 MLD 剂量的 A 型产气荚膜梭菌毒素,以检测 rTF_NCPA_{m4} 对家兔的免疫保护效果。结果表明, rTF_NCPA_{m4} 主要以包涵体的形式表达,且能与 A 型产气荚膜梭菌毒素产生血清反应;体外实验显示, rTF_NCPA_{m4} 无卵磷脂酶和溶血活性;小鼠安全性实验显示,5.5 mg/kg 剂量的 rTF_NCPA_{m4} 对小鼠无致死性;免疫重组蛋白后,每毫升的一免抗血清可中和 10 个 MLD、二免抗血清可中和 40 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素;1 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素攻毒后,对照组家兔 4/4 死亡,免疫组家兔得到了 100% (4/4) 的保护。以上数据说明,表达的 CPA 重组突变体蛋白具有良好的安全性和免疫原性,为 A 型产气荚膜梭菌基因工程亚单位疫苗的研制提供了重要的实验数据。

[关键词] A 型产气荚膜梭菌 CPA;突变;Th 细胞表位;鞭毛蛋白;重组表达;毒力;抗原性

Expression and Protective Efficacy of *Clostridium perfringens* α Toxin Derivative

DU Ji-ge, ZHU Zhen, XUE Qi, ZHAO Jun-jie, PENG Xiao-bing, ZHANG Xiu-kun,
LI Qi-hong, YIN Chun-sheng, 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 study was conducted to obtain the *Clostridium perfringens* α toxin (CPA) derivative and to evaluate the virulence and immunogenicity of it. Based on the known sequence, four amino acid mutations, D56G, D130G, Y275N and D336N, were introduced into the gene of *Clostridium perfringens* CPA. Meanwhile, genes of Th cell and were added to 5' of gene of CPA, respectively. Then the gene GTF_NCPA_{m4} was optimized and synthesized and subsequently cloned into prokaryotic expression vector pET-30a (+) for expression and purification to get the recombinant protein rTF_NCPA_{m4}. Reactivity of rTF_NCPA_{m4} with antiserum of *Clostridium perfringens* type A was detected by Western blot. Meanwhile, the activities of the RBC (red blood cells) lysis, phospholipase C, and its toxicity to mice were evaluated. Four rabbits were immunized with rTF_NCPA_{m4} emulsified with oil adjuvant of ISA 201 to prepare antiserum and detect the neutralizing titer. The results showed that rTF_NCPA_{m4} was presented predominantly in an insoluble form (inclusion bodies), and it could react with the antiserum of *Clostridium perfringens* type A. The results of experiments *in vitro* showed that recombinant protein has no biological activities such as the activities of lysing RBC function and phospholipase C. At the same time, rTF_NCPA_{m4} with the injection volume of 5.5 mg/kg was still not fatal to ICR mice. After the first immunization, sera from rabbits immunized with rTF_NCPA_{m4} could neutralize 10 MLD *Clostridium perfringens* type A toxin per ml, and 40 MLD after twice immunization. Moreover, rabbits in the recombinant protein immunized group fully survived at the dose of 1 rabbit MLD of *Clostridium perfringens* type A toxin challenge, whereas all of the rabbits died (4/4) in the control groups. These data suggest that the recombinant protein is a potential vaccine candidate for or genetic engineering subunit vaccine of *Clostridium perfringens* type A.

Key words: *Clostridium perfringens* CPA; mutation; Th cell epitope; flagellin; recombinant expression; virulence; antigenicity

产气荚膜梭菌是一种重要的人畜共患菌^[1-3],不仅威胁着人类的健康,而且对畜牧业造成了巨大的经济损失^[4-6]。根据该菌产生毒素的种类,可分为 A、B、C、D、E 五个毒素型^[7]。其中,对养牛业危害最大的是 A 型,由于病牛往往无任何前驱症状,突然发作死亡^[8-9]。因此,疫苗免疫是防制该病的有效手段。在预防羊的产气荚膜梭菌病方面,虽然产气荚膜梭菌灭活疫苗,达到了一定的效果,但该类疫苗制备过程冗杂,抗原成分复杂,有效抗原量较低。如大剂量的肌肉注射会破坏牛肉的品质。因此,提供安全、纯净、有效的抗原对未来预防该菌感染具有重要意义。

成熟的 α 毒素由 N⁻末端和 C⁻末端两个结构域构成^[10],是一种依赖于 Zn²⁺的金属酶。其中,第 56 位和第 130 位的天冬氨酸是 Zn²⁺结合位点,以上两个氨基酸位点的突变能够明显降低 α 毒素的活性^[11]。Alberto 等^[12]的研究结果发现, Y275N 和 D336N 的溶血活性只占野生型毒素的 11%,细胞毒

性则分别降为野生型毒素的十万分之一和千分之一。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。口蹄疫病毒 VP4 蛋白的第 20-35 位氨基酸被证实是一种良好的 Th 细胞表位^[13]。此外,细菌的鞭毛蛋白(flagellin)作为免疫佐剂能够诱发机体产生更强的体液免疫与细胞免疫应答^[14]。

为了降低因单个氨基酸突变在大规模生产中生物安全隐患,通过 A 型产气荚膜梭菌(C57-1 株)CPA 的 56、130、275 和 336 位氨基酸位点进行突变,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研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料 A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株、A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株天然毒素、A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清及 pET-30a(+) (以下简称 pET)

均为中监所保存;1.5~2.0 kg 普通级日本大耳白兔和 16~18 g ICR 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;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, 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 *Bam*H I 和 *Xho* I 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;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 以前期获得的 A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株 CPA 编码基因为模版进行密码子优化并引入 D56G、D130G、Y275N 和 D336N 等 4 个氨基酸突变。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_NCPA_{m4} 。

1.3 CPA 原核表达载体的构建 以 GTF_NCPA_{m4} 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'-CCCGGATCCATGTC-CATAATC-3',引入限制性内切酶 *Bam*H I 位点(下划线部分)及保护性碱基;下游引物 1R 序列为:5'-CCGCTCGAGTTAGTGGTGATGG,引入限制性内切酶 *Xho* I 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 2 min,共 33 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

回收目的条带,采用 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切消化后,与经过相同酶切消化的 pET 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。对所提质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,将鉴定结果为阳性的质粒送中美泰和公司测

序,测序正确的质粒命名为 pTF_NCPA_{m4} 。

1.4 重组蛋白的表达与鉴定 将质粒 pTF_NCPA_{m4} 和空载体 pET 分别转化 BL21(DE3) 感受态细胞,并分别在 15 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下用 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,并以 BSA 蛋白为标准,利用灰度扫描的方法进行相对表达量和可溶性比例的统计,将表达的重组蛋白称为 rTF_NCPA_{m4} 。采用 Western blot 方法,以抗 His 标签蛋白抗体为一抗,对 rTF_NCPA_{m4} 做进一步的鉴定。

1.5 重组蛋白的纯化及 Western blot 鉴定 对获得的包涵体进行纯化和复性,参照文献^[15] 方法进行操作,最终获得纯化蛋白 rTF_NCPA_{m4} 。

1.6 纯化蛋白的鉴定 纯化复性后的 rTF_NCPA_{m4} (0.5 μ g) 经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,以 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:10000) 为二抗进行孵育,按照底物显色试剂盒说明进行显色,检测纯化的 rTF_NCPA_{m4} 与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清的反应情况。

1.7 重组蛋白的毒力测定

1.7.1 体外毒性检测 制备卵黄琼脂平板,分别取 10 倍浓缩的 A 型产气荚膜梭菌天然毒素、天然毒素原液、肉干胃酶消化汤和 rTF_NCPA_{m4} 各 10 μ L 点于平板上,37 $^{\circ}$ C 温箱培养 1 h^[16]。

制备 1% 的绵羊红细胞悬浮液,分装于 EP 管中,500 μ L/管。分别取 50 μ L 的 rTF_NCPA_{m4} 及 10 倍系列稀释的 A 型产气荚膜梭菌天然毒素,加入装有绵羊红细胞悬浮液的 EP 管中,37 $^{\circ}$ C 温箱培养 1 h 后静置一段时间。同时设置肉肝胃酶消化汤、蛋白溶解液和 dd H₂O 作为对照^[17]。

1.7.2 体内毒性检测 将 16~18 g ICR 小鼠随机分为 6 组,每组 5 只。分别以 1 μ g(5.5 $\times$ 10¹ μ g/kg)、10 μ g(5.5 $\times$ 10² μ g/kg) 以及 100 μ g(5.5 $\times$ 10³ μ g/kg) 三个注射剂量尾静脉注射 rTF_NCPA_{m4} ,同时设置肉肝胃酶消化汤和蛋白溶解液作为阴性对照以及 1 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素的阳性对照。样

品用明胶缓冲液进行稀释,注射的液体总体积为 200 μ L,观察 24 h,记录小鼠的存活状态。

1.8 免疫原性分析

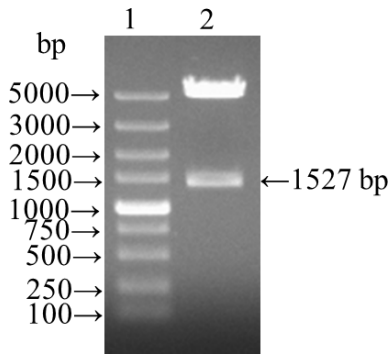
1.8.1 免疫程序 选用对 A 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价为 0 的家兔,进行重组蛋白 rTF_NCPA_{m4} 的免疫^[15]。

1.8.2 血清中和抗体效价测定 采用血清中和的方法测定兔血清的 A 型产气荚膜梭菌毒素中和效价^[15]。

1.8.3 攻毒试验 二免后 21 d,对免疫组及对照组所有家兔通过耳缘静脉各注射 1 个 MLD 剂量的 A 型产气荚膜梭菌毒素,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 CPA 突变体原核表达重组质粒的构建 采用引物 1F/2R 进行 PCR 扩增,扩增片段经酶切后克隆至 pET 载体上。获得的重组质粒双酶切电泳结果见图 1,酶切后出现大小约 5 kb 的载体 DNA 片段,以及大小约 1527 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正确,将此质粒命名为 pTF_NCPA_{m4}。



1: DL5000 DNA 相对分子质量标准;

2: pTF_NCPA_{m4} 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 的双酶切鉴定

1: DL5000 DNA Marker; 2: pTF_NCPA_{m4} digested with *Bam*H I and *Xho* I

图 1 重组原核表达质粒 pTF_NCPA_{m4} 的酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant prokaryotic expression plasmids pTF_NCPA_{m4}

2.2 CPA 突变体的原核表达鉴定 将 pTF_NCPA_{m4} 以及 pET 分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞并诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示, BL21 (DE3) 菌体在 15 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 的条件下, rTF_NCPA_{m4} 均以包涵体的形式表达(图 2A),分子量约为 58 kD,且能与抗 His 标签抗体发生反应(图 2B),与预期相符。考虑到诱导时间,我们确定 rTF_NCPA_{m4} 最适诱导表达条件为 37 $^{\circ}$ C,诱导表达 4 h,收获裂解后的沉淀蛋白,用于后续的纯化。

2.3 rTF_NCPA_{m4} 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_NCPA_{m4} 进行纯化,收集纯度较高的 Lane 5~9 洗脱液进行透析和复性,最终获得的蛋白浓度为 0.85 mg/mL。将纯化后的 rTF_NCPA_{m4} 经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上进行 Western blot 检测。结果显示, rTF_NCPA_{m4} 能够与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清反应(图 4)。

2.4 rTF_NCPA_{m4} 的毒力测定

2.4.1 rTF_NCPA_{m4} 在检测范围内无卵磷脂酶和溶血活性 在 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 1 h 后,可见卵黄琼脂平板上 10 倍浓缩的 A 型产气荚膜梭菌毒素和毒素原液均出现特异的水解卵黄产生的乳浊反应现象,而肉肝胃酶消化汤和纯化后的 rTF_NCPA_{m4} 没有出现上述现象(图 5)。

在 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 1h 后静置,可见 $10^1 \sim 10^5$ 倍稀释的天然毒素使绵羊红细胞发生完全溶血, rTF_NCPA_{m4} 及肉肝胃酶消化汤、蛋白溶解液及 ddH₂O 对照组均无溶血现象(图 6)。

2.4.2 rTF_NCPA_{m4} 对小鼠的毒力检测 结果如表 1 所示, rTF_NCPA_{m4} 注射组,以及蛋白溶解液、肉肝胃酶消化汤 2 个阴性对照组小鼠,在注射后 24 h 均存活,未见任何异常,而注射 1 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素后,小鼠在 24 h 内全部死亡,说明 rTF_NCPA_{m4} 已成功减毒,在检测范围内对小鼠无致死性。

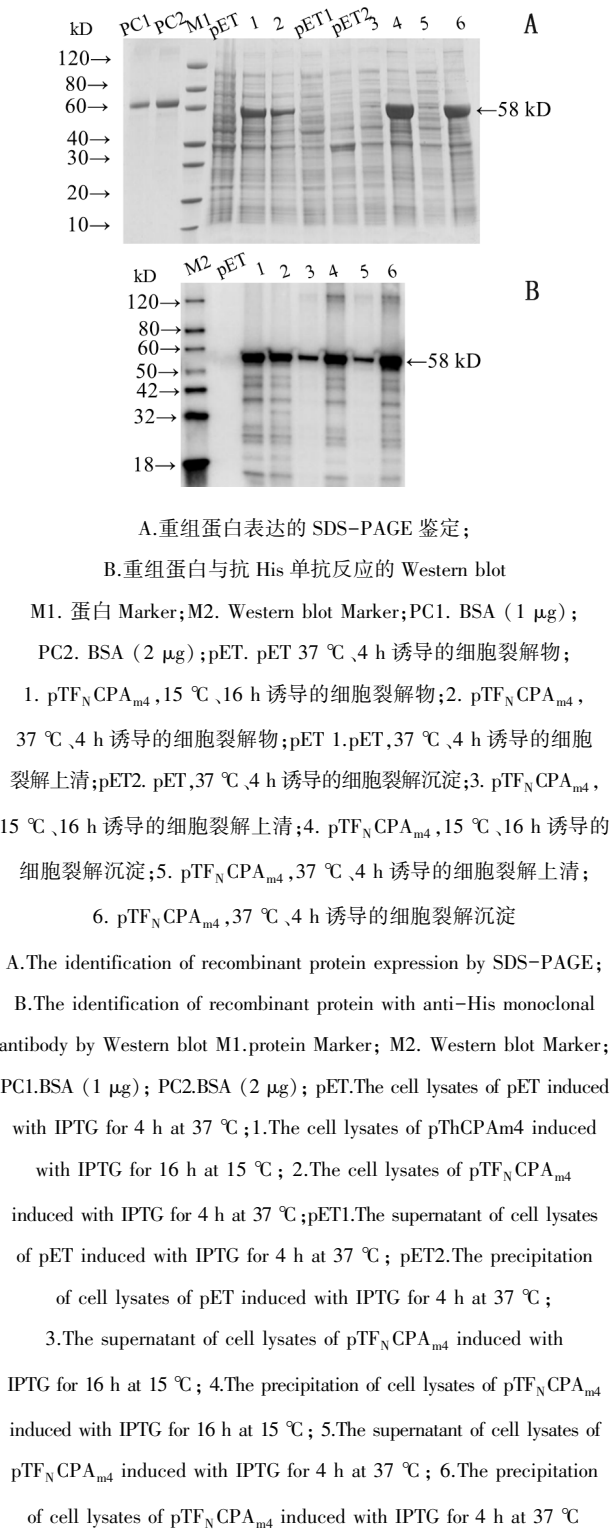


图 2 rTF_NCPA_{m4}的原核表达与鉴定

Fig 2 Prokaryotic expression and identification of rTF_NCPA_{m4}

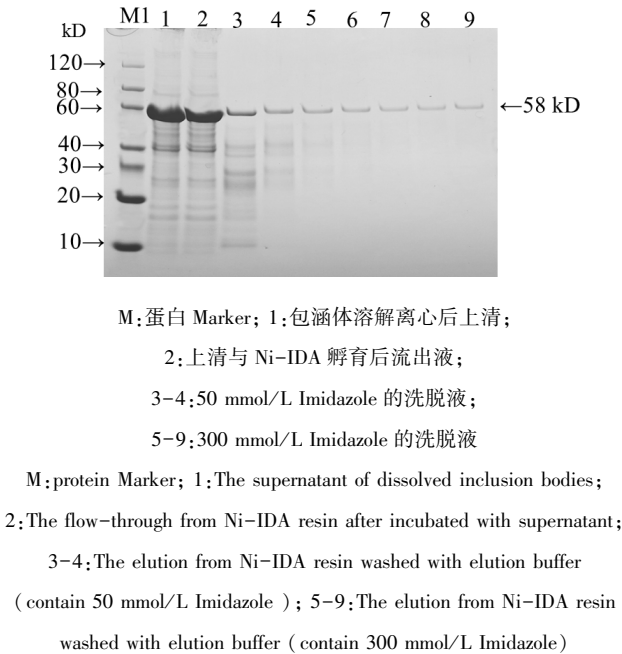


图 3 rTF_NCPA_{m4}的纯化

Fig 3 Purification of rTF_NCPA_{m4}

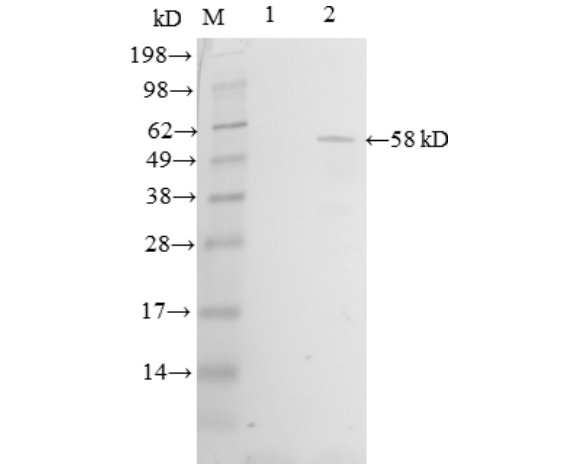
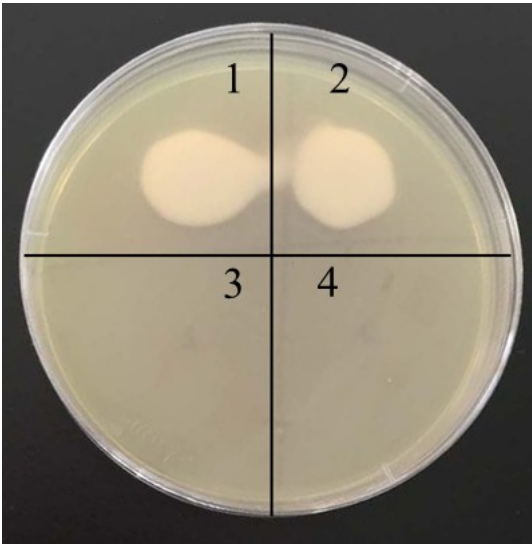


图 4 与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清反应的
Western blot 鉴定

Fig 4 The identification of rTF_NCPA_{m4} with antitoxin
serum of *Clostridium perfringens* type A by Western blot

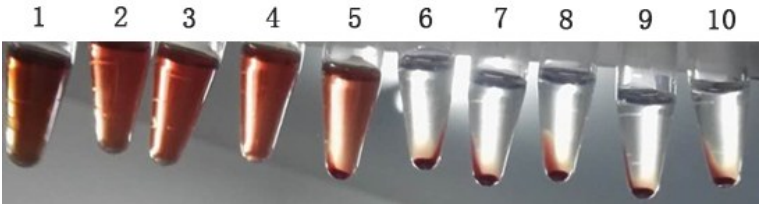


1. 10 倍浓缩的 A 型产气荚膜梭菌毒素;2. A 型产气荚膜梭菌毒素;
3.肉肝胃酶消化汤;4. 纯化后的 rTF_NCPA_{m4}

1. *Clostridium perfringens* type A toxin 10-fold concentrated;
2. *Clostridium perfringens* type A toxin;
3. anaerobic beef, liver and stomach digestive enzyme soup;
4. rTF_NCPA_{m4} after purification

图 5 重组蛋白的卵磷脂酶活性鉴定

Fig 5 The identification of phosphlipase C of rTF_NCPA_{m4}



1-6. 10¹ ~ 10⁶ 倍稀释的 A 型产气荚膜梭菌毒素;7.肉肝胃酶消化汤;8. 纯化后的 rTF_NCPA_{m4};9. 蛋白溶解液;10. dd H₂O

1-6. *Clostridium perfringens* type A toxin with dilution of 10¹ ~ 10⁶; 7. anaerobic beef, liver and stomach digestive enzyme soup;
8. rTF_NCPA_{m4} after purification; 9. elution buffer; 10. dd H₂O

图 6 重组蛋白的溶血活性鉴定

Fig 6 The identification of lysing red blood cells activity of rTF_NCPA_{m4}

表 1 样品的注射以及小鼠存活情况

Tab 1 Injection of sample and the mouse survival

组别	rTF _N CPA _{m4}			肉肝胃酶消化汤	蛋白溶解液	A 型产气荚膜梭菌毒素(1 MLD)
rTF _N CPA _{m4} (μg) 含量	1	10	100	—	—	—
与动物重量比(μg/kg)	5.5×10 ¹	5.5×10 ²	5.5×10 ³	—	—	—
存活数量(24 h)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

2.5 rTF_NCPA_{m4}的免疫原性分析

2.5.1 抗 rTF_NCPA_{m4}兔血清的中和抗体效价测定

经血清中和法测定,以 rTF_NCPA_{m4}免疫兔子后,1 毫升的一免抗血清可中和 10 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素;1 毫升的二免抗血清可中和 40 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素,而佐剂对照组的兔血清对 A 型产气荚膜梭菌毒素无中和作用。

2.5.2 攻毒保护性试验 在二免 21 d 后,对所有 rTF_NCPA_{m4}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 A 型产气荚膜梭菌毒素,结果佐剂免疫对照组家兔在攻毒后 5 d 内全部死亡(4/4),rTF_NCPA_{m4}免疫组家兔全部健活,未见任何不良反应。

3 讨论

基因工程亚单位疫苗研制的关键是免疫原的研究与筛选。与产气荚膜梭菌的其他 3 种主要致死性外毒素(CPB、ETX 及 CPI)不同,天然的 CPA 经过通过甲醛灭活后,其抗原性会明显降低^[18-19],而未经突变的重组 CPA 仍存在一定的毒力,不适合直接用于疫苗制备^[20]。为此,实现 CPA 的减毒乃至无毒,成为众多学者的研究方向。CPA 分子主要由 N 末端(1-246)和 C 末端(247-370)构成。其中,具有细胞毒性的 N 末端是 CPA 的酶活性中心,而无细胞毒性的 C 末端主要发挥着与细胞受体相结合的功能^[10]。虽然单独的 C 末端具有一定的免疫保护作用,但由于分子量较小,该部分需要与 GST 标签蛋白^[21-22]或其他毒素蛋白^[23-24]融合表达,从而造成实际抗原量降低,且难以对 C 末端的免疫保护性进行准确定量。此外,针对 CPA 第 193-198 位氨基酸片段的单抗在体外和体内实验中均被证实有很好的免疫保护作用^[25],这说明完整的 CPA 分子能够更加充分地发挥免疫保护作用。据报道,通过对 CPA 关键氨基酸位点进行点突变能够实现对 CPA 的减毒乃至无毒^[11,26-27]。然而,此类研究仅仅进行了单氨基酸位点的突变,且没有对突变后的 CPA 进行抗原性分析。为此,选择该毒素 N 末端酶活性中心的 Zn²⁺结合位点^[11](第 56 位和第 130 位氨基酸)以及 C 末端与 Ca²⁺结合的主要

位点(第 275 和第 336 位氨基酸)同时进行突变,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。

结果表明,在 15 ℃ 和 37 ℃ 条件下诱导,经灰度扫描测定,rTF_NCPA_{m4}可溶性表达比例均低于 1%,且表达量无明显差异。综合考虑蛋白表达量和诱导时间,实验最终选择 37 ℃ 进行诱导。实验结果证明,以非可溶形式表达的 rTF_NCPA_{m4}经纯化复性后具有较好的免疫原性。此外,与可溶性表达的蛋白纯化过程相比,对以非可溶形式表达的重组蛋白进行纯化,可显著降低纯化产物中内毒素的含量,更适用于大规模兽用疫苗的制备。进一步的实验表明,rTF_NCPA_{m4}在检测范围内无卵磷脂酶和溶血酶活性且 5.5 mg/kg 剂量的 rTF_NCPA_{m4}对小鼠仍无致死性,说明 rTF_NCPA_{m4}已成功减毒。更重要的是,rTF_NCPA_{m4}具有良好的免疫原性,是 A 型产气荚膜梭菌及其它梭菌类毒素联苗的基因工程亚单位疫苗的重要候选抗原。然而,在前期的研究中我们发现可溶性重组 ETX 免疫原性明显高于非可溶性的重组蛋白。因此,如何提高 rTF_NCPA_{m4}的可溶性表达水平,将是后续研究的重点。

参考文献:

- [1] Songer J G. Clostridial enteric diseases of domestic animals [J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9(2):216-234.
- [2] Novak J S, Juneja V K. *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2002, 3(2):127-132.
- [3] Uzal F A, Vidal J E, McClane B A, et al. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases [J]. Changes, 2010, 29: 997-1003.
- [4] Ferreira M R A, Moreira G M S G, da Cunha C E P, et al. Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines [J]. Toxins, 2016, 8(11), 340-364.
- [5] Songer J G, Uzal F A. Clostridial enteric infections in pigs [J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17: 528-536.
- [6] Van Immerseel F, Rood J I, Moore R J, et al. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens [J]. Trends Microbiol, 2009, 17(1):32-36.
- [7] Revittmills S A, Rood J I, Adams V. *Clostridium perfringens*

- extracellular toxins and enzymes; 20 and counting [J]. Microbiology Australia, 2015, 36(3):114-117.
- [8] 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制[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.
- [9] Lebrun M, Mainil J G, Linden A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis [J]. Vet Rec, 2010, 167(1):13-22.
- [10] Oda M, Terao Y, Sakurai J, *et al.* Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. Toxins, 2015, 7: 5268-5275.
- [11] Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, *et al.* Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities [J]. Infect Immun, 1997, 65:3489-3492.
- [12] Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Guillouard I. Identification of residues critical for toxicity in *Clostridium perfringens* phospholipase C, the key toxin in gas gangrene [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 5191-5197.
- [13] 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.
- Sun X H, Zhang B C, Zhang Q, *et al.* Adjuvant effects of flagellin from non-pathogenic *E.coli* on FMDV [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(9):1714-1722.
- [14] 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.
- [15] 杜吉革, 张秀坤, 朱真等. 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[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(7): 27-33.
- Du J G, Zhang X K, Zhu Z, *et al.* Expression and immunocompetence of *Clostridium perfringens* ϵ toxin derivative with three mutations [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(7): 27-33.
- [16] 梁光军, 田银芳, 文其乙, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素基因的克隆表达和生物学活性的鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2004, 20(7): 573-576.
- Liang G J, Tian Y F, Wen Q Y, *et al.* Cloning and expression of α toxin gene of *Clostridium perfringens* and its biological activity [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2004, 20(7):573-576.
- [17] 彭国瑞. 重组腐败梭菌 α 毒素的免疫原性研究[D]. 中国兽医药品监察所, 2014.
- Peng G R. Immunogenicity of recombinant *Clostridium septicum* α toxin [D]. China Institute of Veterinary Drug Control, 2014.
- [18] Byrne M P, Smith L A. Development of vaccines for prevention of botulism [J]. Biochimie, 2000, 82: 955-966.
- [19] Kulkarni R R, Parreira V R, Sharif S, *et al.* Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* alpha-induced necrotic enteritis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14: 1070-1077.
- [20] Goossens E, Verherstraeten S, Valgaeren B R, *et al.* The C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis [J]. Vet Res, 2016, 47(1):52-61.
- [21] Li J, Adams V, Bannam T L, *et al.* Toxin plasmids of *Clostridium perfringens* [J]. Microbiol Mol Biol, 2013, 77: 208-233.
- [22] 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, 57:340-345.
- [23] Williamson E D, Titball R W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene [J]. Vaccine, 1993, 11: 1253-1258.
- [24] Uppalapati S R, Kingston J J, Murali H S, *et al.* Heterologous protection against alpha toxins of *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* induced by binding domain recombinant chimeric protein [J]. Vaccine, 2014, 32:3075-3081.
- [25] Shreya D, Uppalapati S R, Kingston J J, *et al.* Immunization with recombinant bivalent chimera r-Cpae confers protection against alpha toxin and enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A in murine model [J]. Mol Immunol, 2015, 65: 51-57.
- [26] 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]. Vet J, 2016, 217:89-94.
- [27] Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, *et al.* Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 1179-1185.