

曾 瑾,马臣杰,邓光存,等. 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位与产气荚膜梭菌毒素融合蛋白的免疫原性[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):216-218.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.077

大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位与产气荚膜梭菌毒素融合蛋白的免疫原性

曾 瑾, 马臣杰, 邓光存, 刘晓明

(宁夏大学生命科学学院/西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室;宁夏银川 750021)

摘要:梭菌毒素作为产气荚膜梭菌的主要致病因子可引起家畜的多种疾病,其中 β_1 毒素和 β_2 毒素是由 C 型菌产生的 2 种引起动物坏死性肠炎的主要致病因子。基因工程重组毒素蛋白已作为潜在候选疫苗用于预防该菌所引起的多种传染性疾病,大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)是一种常用的黏膜免疫佐剂。本研究将 *ltb*-*cpb*₂-*cpb*₁ 及 *ltb*-*cpa* 融合基因进行 IPTG 的诱导表达,制备了包涵体粗提物,并对小白鼠进行免疫攻毒试验及其免疫后抗原免疫保护期的免疫原性的研究。结果显示,经 LTB-CPB₂B₁ 及 LTB-CPA 重组蛋白免疫后的小白鼠在第 28、第 56 天时用产气荚膜梭菌强毒攻击,可获得很好的保护,产气荚膜梭菌毒素与 LTB 融合基因重组菌株能够有效刺激免疫小白鼠产生特异性抗体。说明该重组菌株可以作为预防产气荚膜梭菌所引起疾病的候选菌株。

关键词:产气荚膜梭菌;毒素;大肠杆菌不耐热肠毒素;亚单位;免疫原性;疫苗保护周期

中图分类号:R392;Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0216-03

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)属腐生性厌氧芽孢致病菌,在土壤中广泛存在,具有广泛的疫源地,是引起动物出血性坏死性肠炎、肠毒血症以及人类食物中毒、创伤性气性坏疽的主要病原菌之一,主要引起动物猝死症和肠毒血症^[1]。该菌分为 A、B、C、D、E 等 5 型,其致病因子主要是菌体产生的外毒素,各种毒素引起的动物猝死症和幼畜出血性坏死性肠炎(羔羊痢疾、犊牛肠毒血症等)是一类世界性的人兽共患传染病,在我国广大牧区的流行十分严重,有较高的发病率(30%~80%)和死亡率(10%~30%),即使是病愈存活的幼畜,其生长发育和生产性能也会受到严重的影响,给畜牧业造成巨大的经济损失,对我国畜牧业生产构成严重威胁^[2]。该菌的免疫预防是控制这类疾病的最佳选择。安全高效预防产气荚膜梭菌的基因工程疫苗市场前景广阔。

β_1 毒素是多种产气荚膜梭菌的一种重要的致死性毒素,能引起仔猪出血性坏死性肠炎。Hunter 等首先克隆了 β_1 毒素基因,其大小为 1.0 kb,分子量为 34 ku,但它在种族菌株中常以多聚体形式存在^[3]。许崇波等将从 C 型产气荚膜梭菌中克隆的 β 毒素基因与大肠杆菌耐热肠毒素基因(ST)融合,成功表达出了相应的融合蛋白,该表达产物免疫小白鼠后,可诱发机体产生中和抗体^[2]。1997 年法国巴斯德研究所的 Gibert 等首次报道,从 1 株分离自仔猪坏死性肠炎病例的 C 型产气荚膜梭菌(CWC245)的培养上清中纯化到一种 β_2 毒素,结果表明, β_2 毒素的基因序列与 β_1 毒素及其他已知的产

气荚膜梭菌毒素的序列没有明显的同源性,但具有同样的生物学活性,它们都可导致肠壁的出血和坏死,对小白鼠均有致死活性;而且 β_2 毒素和 β_1 毒素的免疫学相关性较差^[4]。王玉炯等已克隆了 β_1 毒素基因和 β_2 毒素基因,并测定了其核苷酸序列^[5],Zeng 等将从 C 型产气荚膜梭菌中克隆的 α 、 β_1 、 β_2 毒素基因融合,成功表达出了相应的融合蛋白,该表达产物免疫小白鼠、牛及猪后,可诱发机体产生中和抗体^[6]。

大肠杆菌热不稳定性肠毒素(*Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, LT)是由大肠杆菌产毒株合成的一种毒素,是继霍乱弧菌肠毒素 CTB 后发现的一种新公认的强效黏膜免疫原和黏膜免疫佐剂,该毒素及其亚单位在过去 20 年中研究范围较广^[7]。LT 的作用与其 A、B 亚单位紧密联系。LTA 特有 ADP 核糖基化活性,可致肠上皮细胞持续合成 cAMP 和大量电解质及肠液的分泌,引起腹泻;LTB 与表达于细胞表面的 GM1 神经节苷脂及其受体有极高亲和力,在 LT 的免疫原性和佐剂作用中扮演极重要的角色^[8]。将其与目的抗原混合或与目的抗原偶联起来免疫动物,可促进黏膜细胞对目的抗原的摄取,激发机体的免疫应答。LTB 还具有消除机体对免疫抗原的耐受,诱发机体对免疫抗原的长期记忆^[9],所以 LTB 不但对有大肠杆菌热不稳定性肠毒素所引起的腹泻具有一定预防作用,也可作为免疫佐剂加强其他抗原的免疫应答。为了充分发挥 LTB 的免疫佐剂作用和免疫原性,利用基因工程可构建抗原融合蛋白、纯化重组 LTB 与其他抗原协同诱发免疫机体的免疫应答反应。在人口腔常驻菌戈登变形链球菌表面表达的 LTB-M6 融合蛋白,刺激 Bal B/C 小白鼠高水平的局部和系统免疫反应。Rask 等以人丙种球蛋白模拟蛋白抗原与 LTB 混合或化学偶联,再与无毒 LT 联合时诱导的免疫反应也大大增强^[9]。将 LTB 的编码基因导入载体 pNU212 后,在短杆菌中高水平表达,这种重组 LTB 的氨基酸序列、分子量、GM1 黏结能力与天然 LTB 几乎相同,有良好应用前景^[10]。

收稿日期:2014-04-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360609)。

作者简介:曾 瑾(1973—),女,山东郓城人,硕士,副教授,从事微生物与基因工程方面的研究。E-mail:zengjinnxu@163.com。

通信作者:刘晓明,博士,教授,博士生导师,从事微生物研究。E-mail:erc1080@gmail.com。

笔者所在实验室已利用基因工程技术构建了 $\beta_2 - \beta_1$ 毒素融合基因并在大肠杆菌中得到了表达,同时还进行了免疫原性研究^[11]。在研究中发现,该基因工程灭活疫苗还存在免疫原性不稳定、免疫效果与生产工艺密切相关等问题。LTB 是一种常用的黏膜免疫佐剂,由于 LTB 与靶细胞神经节苷脂结合的功能,常作为抗原载体,与抗原联合时以佐剂作用加强免疫细胞对抗原的摄取^[10]。本研究构建了 *ltb - cpb₂ - cpb₁* 融合基因,在大肠杆菌中实现了表达,并以融合蛋白作为免疫原进行小白鼠免疫攻毒试验,获得了理想的保护效果。该研究为生产工艺简化的产气荚膜梭菌疫苗提供良好的候选菌株,最终解决了仔猪红痢和反刍动物坏死性肠炎或肠毒血症免疫预防这一难题。

1 材料与方法

1.1 菌株

受体菌 BL₂₁ (DE₃) (LTB - CPA) (含 *ltb - cpa* 融合基因)、BL₂₁ (DE₃) (LTB - CPB₂B₁) (含 *ltb - cpb₂ - cpb₁* 融合基因) 由西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室构建并保存; C 型产气荚膜梭菌强毒株 C59 - 44 购自中国兽药监察所。

1.2 试验动物

18 ~ 20 g ICR 小白鼠购自宁夏医学院实验动物中心。

1.3 试验方法

1.3.1 免疫用抗原的制备

1.3.1.1 LTB - CPA 及 LTB - CPB₂ - CPB₁ 融合蛋白的表达及包涵体的纯化 取 BL₂₁ (DE₃) (含 LTB - CPA 质粒)、BL₂₁ (DE₃) (含 LTB - CPB₂B₁ 质粒) 冻存菌种各 1 支,在含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上划线,挑取 LB 平板的单个菌落,接种于 25 mL 含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 试管中,于 37 $^{\circ}$ C 下振荡至 $D_{600\text{nm}}$ 值达 1.0 为止,加 IPTG 诱导 4 h,取 25 mL 以超声破碎仪超声处理 5 个 10 s 后,洗涤沉淀,获得融合蛋白的包涵体;将制备的 LTB - CPA 及 LTB - CPB₂ - CPB₁ 包涵体粗提物以 BCA 蛋白法定量后用灭菌生理盐水稀释,按质量比 1 : 1 均匀混合,至终浓度为 2 mg/mL,作为免疫用抗原^[12]。

1.3.1.2 CPA 及 CPB₂ - CPB₁ 包涵体的制备及化学佐剂的添加 取 BL₂₁ (pCPA)、BL₂₁ (pCPB₂B₁) 冻存菌种各 1 支,在含 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上划线,制备包涵体,BCA 法定量。将制备好的 CPA 及 CPB₂ - CPB₁ 包涵体粗提物用灭菌生理盐水稀释,按质量比 1 : 1 均匀混合,至终浓度为 2 mg/mL,加入氢氧化铝凝胶至终浓度为 10%,作为对照组小白鼠免疫用抗原^[12]。

1.3.2 C 型产气荚膜梭菌毒素粗提物的制备及 ICR 小白鼠 LD₁₀₀ 测定 将 C 型产气荚膜梭菌强毒株 (C59 - 44) 接种于肝片肉汤厌氧培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 20 min,以 0.44 μ m 微孔滤膜过滤除菌制成毒素粗提物;将毒素粗提物用灭菌生理盐水稀释 10 倍后以不同剂量 (0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mL 原液) 分别腹腔注射 6 组 ICR 小白鼠,每组 4 只;48 h 后观察各组小白鼠死亡情况,确定 ICR 小白鼠 LD₁₀₀^[13]。

1.3.3 小白鼠免疫接种 取 18 ~ 20 g 雌性小白鼠 180 只,随机分成 9 组,每组 20 只,其中第 1、第 2、第 3 组皮下注射 LTB - CPA、LTB - CPB₂B₁ 包涵体抗原各 0.5 mL,第 4、第 5、

第 6 组小白鼠腹腔注射 LTB - CPA、LTB - CPB₂B₁ 包涵体抗原各 0.5 mL,第 7、第 8 组小白鼠腹腔注射 CPA、CPB₂B₁ 包涵体氢氧化铝胶体抗原 0.5 mL,第 9 组小白鼠皮下注射相同剂量生理盐水 (对照),间隔 14 d 进行二免。

1.3.4 小白鼠攻毒保护试验 将毒素粗提物以 $1 \times \text{LD}_{100}$ 剂量分别对第 1、第 4、第 7 组免疫小白鼠进行攻毒,以 $2 \times \text{LD}_{100}$ 剂量对第 2、第 5、第 8 组免疫小白鼠进行攻毒,同时以 $1 \times \text{LD}_{100}$ 剂量注射对照组小白鼠,48 h 后观察各组小白鼠的死亡情况,观察免疫保护效果。

1.3.5 解剖学检查 取生理盐水组攻毒死亡后的小白鼠和免疫组攻毒后未死亡的小白鼠,进行解剖观察。

1.3.6 LTB - CPA、LTB - CPB₂B₁ 融合蛋白免疫小白鼠免疫保护期初步测定 初次免疫 56 d 后,将毒素粗提物以 $1 \times \text{LD}_{100}$ 剂量对第 3、第 6 组免疫小白鼠腹腔注射进行攻毒,48 h 后观察各组小白鼠死亡情况及免疫保护效果。

2 结果与分析

2.1 C 型产气荚膜梭菌毒素粗提物的制备及 ICR 小白鼠 LD₁₀₀ 的测定

将毒素粗提物用灭菌生理盐水稀释 10 倍后以不同剂量 (0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 mL 原液) 分别腹腔注射 6 组 ICR 小白鼠,每组 4 只;48 h 后观察各组小白鼠死亡情况,确定 C 型产气荚膜梭菌培养上清的 LD₁₀₀ 为 0.05 mL (表 1)。

表 1 C 型产气荚膜梭菌培养上清的 LD₁₀₀ 测定结果

注射剂量 (mL)	存活数量/试验数量 (只)
0.01	2/4
0.02	1/4
0.05	0/4
0.10	0/4
0.20	0/4
0.50	0/4

2.2 重组菌株表达产物的小白鼠攻毒保护性分析结果

从表 2 可看出,LTB - CPA 与 LTB - CPB₂B₁ 融合蛋白联合作用时对产气荚膜梭菌毒素的保护效果很好,抵御 $1 \times \text{LD}_{100}$ 与 $2 \times \text{LD}_{100}$ 毒素攻击时的保护率均达 100%;与氢氧化铝胶体作用化学佐剂添加组的保护效果相当。皮下免疫途径与腹腔免疫途径未发现差异。从攻毒保护结果可看出,初次免疫 56 d 后,用 $1 \times \text{LD}_{100}$ 剂量的 C59 - 44 强毒株毒素进行攻毒,免疫组小白鼠依然具有较高的保护率,与初免后 28 d 攻毒保护率相差不大,表明该 LTB - CPA 及 LTB - CPB₂B₁ 融合蛋白的免疫原性较好,LTB 能诱发机体产生针对免疫抗原的长期免疫应答,对小白鼠免疫保护期至少为 2 个月。

2.3 解剖学检查结果

取生理盐水组攻毒死亡后的小白鼠和免疫组攻毒后未死亡的小白鼠进行剖检,结果显示病变主要在回肠和空肠部分。攻毒死亡小白鼠肠壁脆弱、扩张、充满气体,内有黑褐色肠内容物,可出现肠壁出血;对照组空肠肠壁菲薄,黏膜充血。而氢氧化铝胶体佐剂组小肠虽未有病变,但脾脏肿大,组织间有粘连现象出现,而 LTB 作为免疫佐剂组与正常小白鼠结果没有肉眼可见的差别 (图 1)。

表 2 免疫小白鼠 C 型产气荚膜梭菌毒素攻毒保护性试验结果

试验组	存活率(%)			
	LTB - CPA 加 LTB - CPB ₂ B ₁ 皮下免疫	LTB - CPA 加 LTB - CPB ₂ B ₁ 腹腔免疫	CPA + CPB ₂ B ₁ 包涵体加铝胶免疫组	生理盐水
1 × LD ₁₀₀ ^a	100	100	100	0
2 × LD ₁₀₀ ^a	100	100	100	0
1 × LD ₁₀₀ ^b	100	100	100	0

注:a 表示末次免疫 14 d 后的攻毒结果;b 表示末次免疫 42 d 后的攻毒结果;n = 20 只。

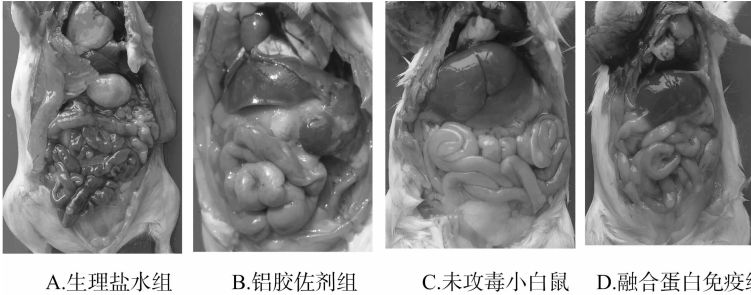


图1 毒素攻毒小白鼠解剖学检测结果

3 结论与讨论

随着生物技术的发展,利用重组蛋白制备安全、高效及价廉的人或动物疫苗的研究正受到人们越来越广泛的关注。产气荚膜梭菌毒素是通过黏膜系统感染机体、动物及人体的小肠黏膜后引起机体一系列的毒性反应。而在机体黏膜微环境中会产生分泌型 IgA (sIgA) 及特异的免疫淋巴细胞,从而构成机体抵御病原体感染的第一道防线^[12]。大肠杆菌热不稳定肠毒素是继霍乱弧菌肠毒素 CTB 后发现的一种公认的新的强效黏膜免疫原和黏膜免疫佐剂,该毒素及其亚单位在过去 20 年中研究较广^[7]。其中,LTB 与表达于细胞表面的 GM1 神经节苷脂及其受体有极高的亲和力,在 LT 的免疫原性和佐剂作用中扮演着极其重要的角色^[8]。

本试验结果表明,LTB 作为免疫佐剂与 CPA 或 CPB₁、CPB₂ 融合时能促进免疫动物的黏膜细胞对目的抗原的摄取,发挥良好的免疫佐剂效应,从而使免疫动物抵御 1 × LD₁₀₀ 与 2 × LD₁₀₀ 毒素攻击时的保护率均达到 100%;与氢氧化铝胶体作用化学佐剂添加组的保护效果相当。众所周知,化学佐剂虽有加强抗原免疫应答的能力,但其本身的毒性也不容忽视,注射于动物机体中常常会在注射部位形成肉芽肿,若注射于腹腔,常会引起动物炎症反应而使组织器官粘连,免疫动物常常较为痛苦;而 LTB 本身即为蛋白,不但对机体的刺激性较小,而且可以作为产肠毒性大肠杆菌的部分抗原。本试验选取了皮下免疫与腹腔免疫 2 种免疫途径,但未发现二者有所差异,其原因有待深入研究。

参考文献:

[1] Niilo L. Clostridium perfringens in animal disease;a review of current knowledge[J]. Can Vet J May,1980,21(5):141-148.
[2] 许崇波,王玉炯,卫广森,等. C 型产气荚膜梭菌 β 毒素基因克隆与核苷酸序列分析[J]. 中国预防兽医学报,1999,21(2):111-114.
[3] Hunter S E, Brown J E, Oyston P C, et al. Molecular genetic analysis

of beta - toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha - toxin, gamma - toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Immun Sep,1993,61(9):3958-3965.
[4] Gilbert M, Jolivet - Reynaud C, Popoff M R. Beta - toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*[J]. Gene,1997,203(1):65-73.
[5] 王玉炯,邓光存,曾 瑾,等. 产气荚膜梭菌的 β_2 毒素基因克隆及其核苷酸序列分析[J]. 宁夏大学学报:自然科学版,2004,25(1):63-65.
[6] Zeng J, Deng G C, Wang J, et al. Potential protective immunogenicity of recombinant *Clostridium perfringens* $\alpha - \beta_2 - \beta_1$ fusion toxin in mice, sows and cows[J]. Vaccine,2011,29:5459-5466
[7] Boyaka P N, Ohmura M, Fujihashi K, et al. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit [J]. Journal of Immunology, 2003, 170(1):454-462.
[8] Ricci S, Medaglini D, Rush C M, et al. Immunogenicity of the B monomer of *Escherichia coli* heat - labile toxin expressed on the surface of *Streptococcus gordonii* [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(2):760-766.
[9] Rask C, Fredriksson M, Lindblad M, et al. Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co - administration with free toxin as adjuvant[J]. APMIS, 2000, 108(3):178-186.
[10] Weltzin R, Guy B, Thomas W D, et al. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat - labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(5):2775-2782.
[11] 曾 瑾,王玉炯,谢 琴,等. 产气荚膜梭菌 $\beta_2 - \beta_1$ 毒素融合基因重组菌株免疫原性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(12):62-63.
[12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[13] 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 Sep,1993,11(12):1253-1258.