

魏后军,范志宇,胡 波,等. 无毒性产气荚膜梭菌 α 毒素重组蛋白的自诱导分泌表达及免疫原性分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(14):166-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.14.023

无毒性产气荚膜梭菌 α 毒素重组蛋白的自诱导分泌表达及免疫原性分析

魏后军, 范志宇, 胡 波, 仇汝龙, 陈萌萌, 宋艳华, 徐为中, 王 芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:为获得分泌表达的无毒性产气荚膜梭菌 α 毒素重组蛋白并分析其免疫原性,根据 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素基因序列,对 α 毒素的第 176 位组氨酸突变为天冬酰胺,同时对信号肽序列进行密码子优化,将化学合成的该序列插入到载体 pET32a,获得重组质粒 pET32a- α H176N,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),通过自诱导的方法分泌表达重组 α H176N 蛋白。SDS-PAGE 及 Western blot 分析结果显示, α H176N 蛋白在乳糖 1~2 g/L、28℃ 诱导条件下高效分泌表达。卵磷脂酶试验及小鼠毒力试验显示, α H176N 蛋白失去磷脂酶 C 活性及毒性。免疫保护试验结果显示, α H176N 蛋白与氢氧化铝胶配制成的疫苗,以 0.25 mL/只免疫试验兔就能达到 100% (6/6) 的免疫保护效果,优于传统灭活疫苗免疫 2 mL/只的保护效果。

关键词:产气荚膜梭菌; α 毒素;自诱导;分泌表达;免疫原性

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)14-0166-04

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 也称魏氏梭菌,是引起各种动物坏死性肠炎、肠毒血症、人畜创伤性气性坏疽的主要病原菌之一。该菌的致病因子是其分泌的外毒素,主要是 α 、 β 、 ϵ 和 ι 毒素,据此将该菌分为 A、B、C、D、E 等 5 个毒素型;各毒素型均产生 α 毒素, α 毒素是产气荚膜梭菌主要的毒力因子,其中 A 型产气荚膜梭菌分泌 α 毒素最多。 α 毒素基因位于染色体上,大小为 1 194 bp,编码的产物由 398 个氨基酸残基组成,其中前 28 个氨基酸为信号肽,成熟肽为 370 个氨基酸^[1]。 α 毒素具有磷脂酶 C 和鞘磷脂酶 2 种酶活性,能同时水解细胞膜上的磷脂酰胆碱和鞘磷脂,导致细胞裂解,因而具有细胞毒性、溶血活性和血小板聚集等特性^[2-4]。因此,研究者利用基因工程技术将毒素去毒性,作为抗原研制疫苗。

Studier 提出了外源基因表达自诱导 (auto-

induction) 的方法^[5]。其原理是大肠杆菌首先以葡萄糖为碳源生长,葡萄糖消耗殆尽,达到一定活力后,开始消耗培养基中的乳糖,在乳糖渗透酶 (lactose permease) 和 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 的作用下,乳糖穿过细胞膜并部分转化为异乳糖开启了 T7 表达系统,乳糖的代谢产物葡萄糖和半乳糖也可作为碳源。与 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 相比,乳糖无细胞毒性、价格较低,自诱导的培养基中含有诱导剂,无需在培养过程中检测重组菌的生长情况添加诱导剂^[6-8]。

本研究对含信号肽的 α 毒素基因进行突变去毒及密码子优化,采用大肠杆菌表达系统自诱导分泌表达了无毒的产气荚膜梭菌 α 毒素重组蛋白,该方法具有安全、抗原免疫原性好、工艺简单、成本低等优点,研制的疫苗能有效避免现有疫苗生产工艺较复杂、成本较高等问题。本研究为研制产气荚膜梭菌 α 毒素基因工程疫苗提供了技术保障。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

A 型产气荚膜梭菌 (苏 84-A 株) 由笔者所在实验室鉴定、保存;免产气荚膜梭菌病 (A 型) 灭活疫苗购自山东华宏生物工程有限公司,主要成分为灭活的苏 84-A 株全菌液,用量为 2 mL/只;细菌基

收稿日期:2022-04-14

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(19)2017];现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:魏后军(1986—),男,江苏南京人,硕士,助理研究员,从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。E-mail:whj280941235@126.com。

通信作者:王 芳,博士,研究员,从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究。E-mail:rwangfang@126.com。

因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;高保真 *Taq* 酶购自 Invitrogen 公司;凝胶回收纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;牛血清白蛋白 (BSA) 购自上海翊圣生物科技有限公司;A 型产气荚膜梭菌毒素为 A 型产气荚膜梭菌 (苏 84 - A 株) 在肉肝胃膜汤中培养的滤液 (16 ~ 20 g 小鼠的毒素含量为 50 MLD/mL), 由笔者所在实验室制备、保存;A 型产气荚膜梭菌毒素的兔源多克隆抗体由笔者所在实验室制备、保存;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;自诱导培养基配方: 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母提取物、5 g/L 甘油、0.25 g/L 葡萄糖、25 mmol/L Na_2HPO_4 、25 mmol/L KH_2PO_4 、50 mmol/L NH_4Cl 、5 mmol/L Na_2SO_4 、2 mmol/L MgSO_4 、1 g/L 乳糖。

1.2 α 毒素基因序列的测定

根据 GenBank 上公布的 α 毒素基因序列 (GenBank: AY823400.1) 设计引物, 上游引物: 5' - GCGAATTCATGAAAAGAAAGATTTGTAAG - 3', 下游引物: 5' - GCGCTCGAGTTATTTTATATTATAAGT TG - 3', 由南京擎科生物科技有限公司合成。以 A 型产气荚膜梭菌 (苏 84 - A 株) DNA 为模板, PCR 反应体系: 模板 1 μL , 高保真 *Taq* 酶 0.2 μL , 10 \times *Taq* Buffer 5 μL , 上、下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , dNTPs (25 mmol/L) 4 μL , MgSO_4 (50 mmol/L) 2 μL , ddH₂O 37 μL ; 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62.0 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒回收目的片段。回收的目的片段测序, 获得 α 毒素基因序列 (苏 84 - A 株)。

1.3 重组菌的构建

根据 α 毒素测序结果, 将 α 毒素的第 176 位组氨酸 (CAT) 突变为天冬酰胺 (AAT), 同时对信号肽序列进行密码子优化; 将化学合成的该序列插入到载体 pET32a (*EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点之间), 获得重组质粒 pET32a - α H176N。将重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素的抗性 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的抗性 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜, 菌液经 PCR 鉴定阳性, 将该菌株命名为大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a - α H176N 株。

1.4 重组蛋白的表达、鉴定

将大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a - α H176N 株

以 1% 接种于含氨苄青霉素的抗性自诱导培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h 后, 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 经 0.22 μm 孔径滤膜过滤后, 获得重组蛋白 α H176N, 在 α H176N 蛋白及 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$ 的 BSA 中分别加入 4 \times SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 5 ~ 8 min, 进行 SDS - PAGE 分析; 同时以 A 型产气荚膜梭菌毒素的兔源多克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 对 α H176N 蛋白进行 Western blot 鉴定。

1.5 自诱导条件的优化

将大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a - α H176N 株以 1% 接种于含 1、2、4 g/L 乳糖的自诱导培养基, 每个乳糖浓度的培养基分别在 16、28、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 24 h 后, 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 经 0.22 μm 孔径滤膜过滤后, 分别加入 4 \times SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 5 ~ 8 min, 进行 12% SDS - PAGE 分析。

1.6 重组蛋白的毒性测定

1.6.1 卵磷脂酶活性试验 α 毒素具有磷脂酶 C 活性, 能将卵黄中的磷酸卵磷脂特异性的水解成磷酸胆碱和 1,2 - 甘油二酯, 产生白色混浊^[9]。将 α H176N 蛋白和野生型 α 毒素, 分别滴加 2 μL 到卵黄琼脂平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后, 观察滴加的位置是否出现白色混浊斑。

1.6.2 小鼠毒力试验 10 只 16 ~ 20 g 小鼠, 随机分成 2 组, 每组 5 只。其中 1 组作为对照组, 将空载体大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a 自诱导的全菌液, 离心后取上清, 经 0.22 μm 孔径滤膜的滤液, 尾静脉注射小鼠 0.3 mL/只; 另 1 组小鼠, 尾静脉注射 α H176N 蛋白液 0.3 mL/只, 连续观察 7 d。

1.7 与灭活疫苗效力试验比较

将制备的 α H176N 蛋白 (62.4 $\mu\text{g/mL}$), 与氢氧化铝胶按 9 : 1 的比例加入氢氧化铝胶佐剂, 作为本次试验用基因工程疫苗; 将 A 型产气荚膜梭菌 (苏 84 - A 株) 在肉肝胃膜汤中培养的滤液 (16 ~ 20 g 小鼠的毒素含量为 50 MLD/mL), 用甲醛灭活后与氢氧化铝胶按 9 : 1 的比例加入氢氧化铝胶佐剂, 作为本次试验用自制类毒素疫苗。分别将基因工程疫苗 (1、0.25、0.125 mL)、自制类毒素疫苗 (2、1 mL)、商品化疫苗 (2 mL) 免疫 1.5 ~ 2.0 kg 健康易感家兔, 每个剂量组各 6 只, 21 d 后, 连同 6 只对照组, 耳缘静脉注射 1 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素, 连续观察 3 ~ 5 d。

2 结果与分析

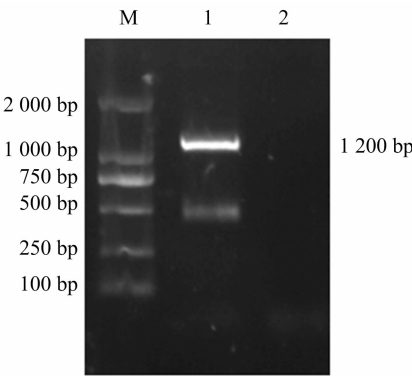
2.1 α 毒素基因序列的测定

以 A 型产气荚膜梭菌(苏 84 - A 株)DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析表明:扩增出约 1 200 bp 的片段,与预期结果相符(图 1)。回收目的片段,测序获得 α 毒素基因序列。

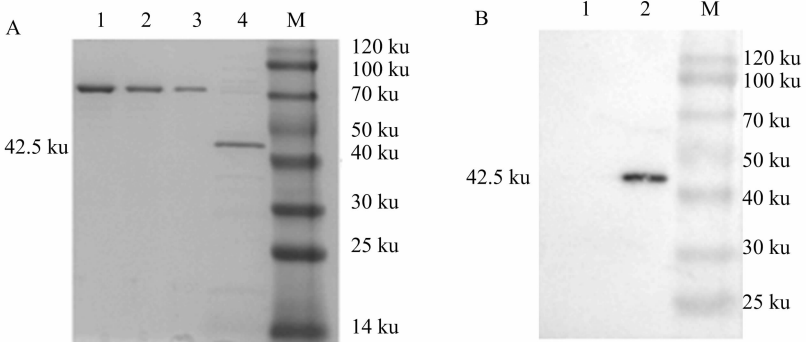
2.2 重组 αH176N 蛋白的表达与鉴定

大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a - αH176N 株在自诱导培养基中发酵培养,SDS - PAGE 电泳分析显示,蛋白分泌到培养基中 (图 2 - A), 通过 QuantiyOne 软件,计算蛋白含量为 50.1 μg/mL。Western blot 结果显示,αH176N 蛋白有约 42.5 ku

大小的目的条带,空载体大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a 经诱导的全菌液无条带,表明目的蛋白已得到分泌表达。



M—DL2000 DNA marker; 1—αH176N; 2—空白对照
图1 α 毒素基因 PCR 扩增结果



A: 1、2、3—100、50、25 μg/mL BSA; 4—αH176N蛋白; M—蛋白质分子质量标准
B: 1—空载体 BL21(DE3)/pET32a 诱导的全菌液; 2—αH176N 蛋白; M—蛋白质分子质量标准

图2 αH176N 蛋白的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定

2.3 自诱导条件的优化结果

将大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET32a - αH176N 株以 1% 接种于含 1、2、4 g/L 乳糖的自诱导培养基,每个乳糖浓度的培养基分别在 16、28、37 ℃ 振荡培养 24 h 后,收获蛋白,经 SDS - PAGE 分析,在含 1 ~ 2 g/L 乳糖的自诱导培养基及 28 ℃ 诱导条件下,可

以获得较多分泌表达的目的蛋白(图 3)。

2.4 重组 αH176N 蛋白的毒性

野生型 α 毒素在卵黄琼脂平板上出现白色混浊斑,而 αH176N 蛋白不出现白色混浊斑,说明 αH176N 蛋白已不具备 α 毒素的磷脂酶 C 活性。将 αH176N 蛋白尾静脉注射小鼠,观察期内,连同对照

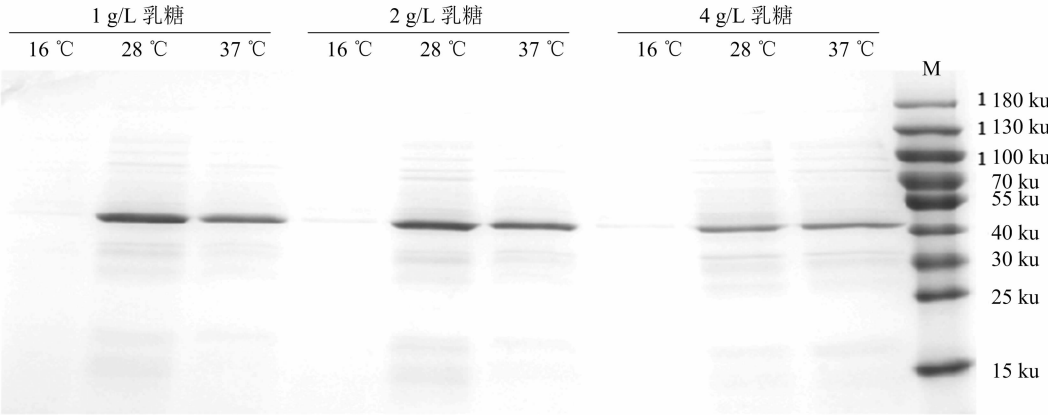


图3 自诱导优化结果

组小鼠均健活且无不良反应,说明重组蛋白 α H176N是无毒的。

2.5 免疫保护试验

分别将基因工程疫苗、自制类毒素疫苗、商品化疫苗免疫试验兔,21 d 后攻毒,结果显示,基因工程疫苗 0.25 mL/只免疫保护效果优于类毒素疫苗 2 mL/只及商品化疫苗 2 mL/只的免疫保护效果(表 1)。

表 1 免疫攻毒试验结果

组别	剂量 (mL/只)	保护数(只)/ 攻毒数(只)
基因工程疫苗	1	6/6
	0.25	6/6
	0.125	4/6
自制类毒素疫苗	2	5/6
	1	2/6
商品化疫苗	2	5/6
对照组	0	0/6

3 讨论与结论

目前商品化的产气荚膜梭菌灭活疫苗是将厌氧培养的产气荚膜梭菌菌液或外毒素灭活制备而成^[10-12],存在抗原成分复杂、稳定性差、副作用大以及灭活不彻底等安全隐患问题。而有关产气荚膜梭菌 α 毒素基因工程疫苗的研究大多采用大肠杆菌表达系统、以截短表达或多点突变的方法使 α 毒素去毒性^[13-16]。 α 毒素蛋白通常在胞内以不可溶性的包涵体或胞内的可溶性蛋白表达。包涵体形式表达影响了 α 毒素的天然结构,使其失去生物活性,需进行复性处理;胞内的可溶性蛋白具有生物活性,但含杂蛋白较多,需进行复杂的纯化过程;且重组大肠杆菌采用 IPTG 作为诱导剂,需要依据检测重组菌的生长情况添加诱导剂。

本研究通过基因工程技术突变 α 毒素蛋白的 1 个氨基酸,使其失去毒性,同时保留其天然结构和分子特征。此外,本研究采用自诱导分泌表达技术,以培养基中天然成分乳糖作为诱导剂,并对信号肽序列进行优化,实现重组 α 毒素“胞外分泌”,直接以可溶的形式分泌释放到培养基中,无需添加化学诱导剂。将制备的 α H176N 蛋白液与氢氧化铝胶配制成的疫苗,免疫 0.25 mL/只就能达到 100% (6/6) 保护的效果,且具有抗原成分单一、安全性好、工艺简单和成本低等优点,可为多联苗、多价苗的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Uppalapati S R, Kingston J J, Qureshi I A, et al. *In silico, in vitro* and *in vivo* analysis of binding affinity between N and C - domains of *Clostridium perfringens* alpha toxin [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e82024.
- [2] Nagahama M. Vaccines against *Clostridium perfringens* alpha - toxin [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2013, 14(10): 913 - 917.
- [3] Nagahama M, Mukai M, Morimitsu S, et al. Role of the C - domain in the biological activities of *Clostridium perfringens* alpha - toxin [J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(10): 647 - 655.
- [4] Petit L, Gibert M, Popoff M R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype [J]. Trends Microbiol, 1999, 7(3): 104 - 110.
- [5] Studier F W. Protein production by auto - induction in high density shaking cultures [J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(1): 207 - 234.
- [6] Fathi - Roudsari M, Maghsoudi N, Maghsoudi A, et al. Auto - induction for high level production of biologically active reteplase in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2018, 151: 18 - 22.
- [7] Chen W B, Nie Y, Xu Y, et al. Enhancement of extracellular pullulanase production from recombinant *Escherichia coli* by combined strategy involving auto - induction and temperature control [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2014, 37(4): 601 - 608.
- [8] Lu Z, Chen W, Liu R, et al. A novel method for high - level production of psychrophilic TAB5 alkaline phosphatase [J]. Protein Expr Purif, 2010, 74(2): 217 - 222.
- [9] 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]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(7): 573 - 576.
- [10] 徐为中, 薛家宾, 诸玉梅, 等. 家兔产气荚膜梭菌 A 型疫苗超纳滤膜浓缩工艺研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(5): 39 - 42.
- [11] 林晓佳. A 型产气荚膜梭菌类毒素疫苗的临床应用和保护效果评价 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [12] 胡波, 魏后军, 范志宇, 等. 兔流行性腹胀病样品中产气荚膜梭菌的分离鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(6): 160 - 163.
- [13] 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.
- [14] 杜吉革, 薛麒, 朱真, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素突变体的表达及免疫保护力评价 [J]. 中国兽医学报, 2019, 39(2): 265 - 270.
- [15] Fernandes D C S, Mot D, Geeraerts S, et al. Variable protection against experimental broiler necrotic enteritis after immunization with the C - terminal fragment of *Clostridium perfringens* alpha - toxin and a non - toxic NetB variant [J]. Avian Pathol, 2016, 45(3): 381 - 388.
- [16] 许崇利, 许崇波, 余玉罕. A 型魏氏梭菌 α 毒素羧基端蛋白基因表达与结构分析 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2020, 41(4): 40 - 45.