

坏死梭杆菌 FN(A)型毒力株保护性抗原筛选及初步鉴定

苗利光¹, 杨福合^{1*}, 刘艳环¹, 王志刚¹, 李艳¹, 王克坚², 肖佳美¹

(1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109;

2. 厦门大学环境科学研究中心/海洋环境科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 通过胰蛋白酶裂解坏死梭杆菌 FN(A)型毒力菌株菌体, 分别以菌体裂解物上清和沉淀作为抗原免疫家兔制备血清。利用 SDS-PAGE/Western-blot 技术在菌体中筛选出 4 种具有免疫原性的组分, 通过免疫后的攻毒试验, 筛选出 1 种具有免疫保护性的抗原。抗原分离纯化后, 进行 N 端氨基酸序列测定、免疫试验及生物学特性研究, 据试验结果可初步判定该抗原为溶血素类似物或一种新发现的抗原物质。该抗原不仅能使机体产生保护性免疫反应, 而且不同菌株中此种抗原间可产生明显的交叉免疫。

关键词: 坏死梭杆菌; 保护性抗原; 筛选

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)07-0930-05

Protective Antigens from Virulent Isolates of *Fusobacterium necrophorum* FN(A)

MIAO Li-guang¹, YANG Fu-he^{1*}, LIU Yan-huan¹, WANG Zhi-gang¹,

LI Yan¹, WANG Ke-jian², XIAO Jia-mei¹

(1. Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China; 2. Environmental Sciences Research Center, Research Lab of SEDC of Marine Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A virulent isolate of the bacterium FN(A) was lysed with trypsin. Supernatants and precipitates of the bacterial lysates were used to prepare anti-FN serum by immunizing rabbits. Four immunogenic components were isolated using SDS-PAGE/Western-blot. Immunized rabbits were challenged, and one protective antigen was screened. After antigen isolation and purification, the N-terminal amino acid sequence was determined and an immunological test and hemolysis test were performed. Results suggested that this antigen is either a hemolysin analogue or a new antigenic substance. The antigen was able to induce a protective immune response as well as generate a marked cross-immune reaction among different bacterial strains.

Key words: *Fusobacterium necrophorum*; protective antigen; screen

坏死梭杆菌属革兰氏阴性、无芽孢、多形性厌氧微生物, 为动物和人消化道中常在的条件性致病菌, 可引起多种坏死病, 常造成牛的肝脓肿^[1]、反刍动物的肢蹄病^[2]、人的口腔及咽喉感染^[3-4]。坏死梭杆菌病多年来一直是反刍动物养殖业中的重大疾病, 由于该病临床治疗效果不佳, 且反复发作。所以, 人们

一直期望能通过疫苗免疫来防治坏死梭杆菌病。研制坏死梭杆菌病疫苗的关键问题是找到保护性抗原。为此, 国内外学者曾作过许多这方面的研究^[5-7], 他们通过利用完整菌体、菌体裂解物及菌体代谢产物进行免疫研究。但由于坏死梭杆菌免疫成分复杂, 免疫效果不稳定, 所得结论也不一致。作者

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 国家科技部奶牛专项(2002BA518A04); 中国农业科学院特产研究所科研基金项目(tcs-20041)

作者简介: 苗利光(1966-), 男, 吉林集安人, 副研究员, 博士, 主要从事动物细菌分子生物学和免疫学研究, E-mail: mliguang66@sohu.com

* 通讯作者: 杨福合(1956-), 男, 河北博野人, 研究员, 博士生导师, E-mail: yangfh@163.com

对坏死梭杆菌 FN(A)型毒力菌株免疫原性组分进行了筛选研究,利用攻毒试验确定出一种有免疫保护性的抗原。为坏死梭杆菌致病机制研究和亚单位疫苗研制提供了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

FN(A)型毒力株共 6 株,为中国农业科学院特产所预防兽医学研究室保存的牛源坏死梭杆菌毒力菌株。

1.2 仪器设备

厌氧手套培养箱,美国 Forma Scientific 公司产品;825A 厌氧罐(沈阳第五人民医院产品);高速冷冻离心机,美国 Sorvall 公司产品;柱层析设备及 Sephadex G-75,Amersham 公司产品;PVDF 膜,悬浮式透析装置,美国 SPECTREM 公司产品。

1.3 主要培养基及试剂

厌氧培养基(EY)、肝肉汤培养基、胰蛋白酶,宝泰克公司生产;碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司产品;弗氏不完全佐剂 GIBCO 公司产品。

1.4 实验动物

2~2.5 kg 健康家兔(中国白兔)、25~30 g 小白鼠(昆明鼠,清洁级)均购于卫生部长春生物制品研究所。

1.5 菌株感染及最小致死量测定^[8]

菌株按 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 /只,经家兔耳后颈部皮下注射,进行攻毒。观察临床表现、死亡后进行病理剖检。

1.6 免疫原性组分的筛选

1.6.1 抗血清制备 坏死梭杆菌厌氧培养 24 h。无菌取培养物,6 000 r/min 离心 30 min 后弃去上清,沉淀按 1:30 的比例用灭菌去离子水悬浮,然后加 0.5%胰酶(10 g 菌体加 0.05 g 胰蛋白酶),45 °C、pH7.5、40 min 裂解菌体,之后 6 000 r/min 离心 30 min,收集上清,沉淀用与上清等体积的灭菌去离子水悬浮。将制备的 2 种抗原分别加等量弗氏不完全佐剂乳化,取 1 mL 肌肉接种家兔,7 d 后进行第 2 次接种,28 d 后采血制备血清。将制备的 2 种血清混合后用于免疫原的筛选。

1.6.2 筛选免疫原性组分^[9] 菌体经胰蛋白酶裂解,通过 12%SDS-PAGE 电泳分离,转印至硝酸纤维素膜上,经 5%脱脂乳封闭处理后,用制备的免疫

血清(上清与沉淀抗原制备的血清等量混合后使用)37 °C 作用 30 min,再与碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 37 °C 作用 1 h,加显色底物显色。15%SDS-PAGE 电泳分离回收目的条带,冷冻后压碎,按每 50 μ L 样品加 150 μ L 灭菌水混匀,每只小鼠 20 μ L 皮下多点注射,免疫后第 20 天采血,通过对流免疫电泳试验检测其免疫原性。

1.7 保护性抗原筛选

用凝胶层析柱分离回收 55、40、38 ku 抗原,之后与等量弗氏不完全佐剂混合乳化。将健康家兔随机分成 4 组,每组 3 只。前 3 组为试验组,分别经皮下接种 500 μ L 乳化的免疫原性组分,每周静脉采血检测抗体。于免疫后第 4 周,用相应坏死梭杆菌毒力菌株(10^7 /只)进行攻毒。每天观察临床表现,死亡家兔剖检观察病理变化。

1.8 交叉免疫试验

制备 1%琼脂生理盐水平板,打孔。中心孔加 55 ku 抗原免疫血清,周围各孔分别加不同菌株的 55 ku 抗原提取物。37 °C 4 h 后观察各菌株抗原间有无交叉免疫反应。

1.9 保护性抗原分离纯化与序列测定

1.9.1 抗原的初步分离 用 60%饱和度硫酸铵溶液对菌体胰蛋白酶裂解液中的抗原粗提后,样品装入悬浮式透析装置中对生理盐水透析。

1.9.2 抗原的纯化 用凝胶层析柱分离纯化保护性抗原。选择 SephadexG-75 凝胶,层析柱为 20 cm。按每管 1 mL 量逐管收集洗脱液,用 15%SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 鉴定 55 ku 抗原的提取与纯化效果。

1.9.3 抗原氨基酸序列测定 纯化样品经 SDS-PAGE 电泳后,染色切取 55 ku 抗原,转印到 PVDF 膜上,送上海基康生物技术有限公司,采取 PRO-CISE cLC 蛋白测序系统进行蛋白质 N 末端氨基酸序列测定。

1.10 55 ku 抗原提取物及菌株裂解物的溶血性比较

将 1%琼脂生理水高压灭菌,冷却至 45 °C 左右,按 0.5%加健康家兔脱纤血后铺平板,凝固后打孔。按每孔 5 μ L 加入保护性抗原提取物(5.0 mg/mL)及各菌株菌体裂解物,37 °C 静置 12 h 后观察。

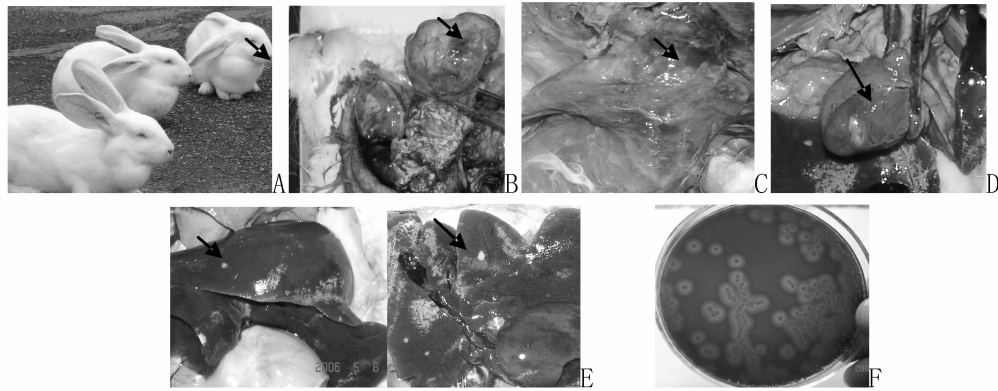
2 结果与分析

2.1 毒力菌株感染及最小致死量确定

以 10^9 、 10^8 /只菌量攻毒的家兔 3~6 d 全部死

亡,无典型病理变化。 10^7 /只菌量攻毒的家兔 5 d 后发现颈下部有明显的肿物,并逐渐变大,10~13 d 死亡,剖检发现家兔颈部有一较大的球状肿物,胸部肌肉严重坏死,肝脏及心脏有多处明显的白色坏死

灶,无菌取肝脏坏死灶组织,涂厌氧血平板分离培养,菌落周围出现典型的溶血环(图 1)。 10^6 /只攻毒的家兔 60 d 后仍健活。说明 10^7 /只为该毒力菌株对家兔的最小致死量。



A. 临床症状; B. 颈部病理变化; C. 胸部病理变化; D. 心脏病理变化; E. 肝脏病理变化; F. FN(A)012 菌株溶血结果

A. Clinical signs; B. Pathological changes in the neck tissue; C. Pathological changes in the chest tissue; D. Pathological changes in the heart; E. Pathological changes in the liver; F. FN(A) 012 hemolytic spots

图 1 坏死梭杆菌毒力菌株 FN(A) 012 家兔感染试验结果

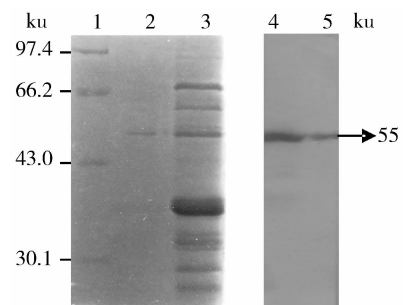
Fig. 1 Pathological changes in rabbits inoculated with a virulent isolate of FN(A) 012

2.2 免疫原性组分筛选

SDS-PAGE 结果显示裂解物沉淀有 2 条明显的条带,裂解物上清有多条清晰的条带;Western-blot 结果显示 55 和 21 ku 有明显杂交带,40 和 38 ku 有较弱杂交带(图 2)。免疫发现 55、40、38 ku 抗原有免疫原性。

2.3 免疫和保护性抗原分离

55、40、38 ku 抗原分别经 SephadexG-75 凝胶层析柱分离纯化,再经等量的弗氏不完全佐剂乳化。取 500 μ L 乳化抗原(浓度为 5.0 mg/mL)皮下注射免疫家兔,免疫后 4 周,收获抗血清并测定其凝集效价,55、40、38 ku 抗原的凝集效价分别为 1:1 024、1:128 和 1:256。用 FN(A)(10^7 /只)对家兔进行攻毒,阴性对照组家兔在 13 d 内全部死亡,病理变化明显;40、38 ku 组也相继在 21 d 内死亡,病理变化轻重不一,如在肝脏和心脏出现白色坏死灶;55 ku 组攻毒后均无明显的临床表现,于攻毒后第 30 天,心脏取血致死家兔,剖检无明显病理变化。取肝、脾、肾等组织抹片镜检和细菌分离培养,没发现病菌。上述试验表明 55 ku 抗原免疫组的攻毒存活



1. 蛋白质 marker; 2. 裂解物沉淀 SDS-PAGE; 3. 裂解物上清 SDS-PAGE; 4. 裂解物沉淀 Western-blot; 5. 裂解物上清 Western-blot

1. Protein marker; 2. SDS-PAGE of lysate precipitates; 3. SDS-PAGE of lysate supernatants; 4. Western-blot of lysate precipitates; 5. Western-blot of lysate supernatants

图 2 免疫原性组分的 SDS-PAGE/ Western-blot 结果

Fig. 2 Screening immunogenic components using SDS-PAGE and Western-blot

率(100%)显著高于其他组(经 F 检验, $P < 0.01$) (表 1)。

表 1 抗原对兔感染的保护性试验结果

Table 1 Ability of antigens to protect against infection in rabbits

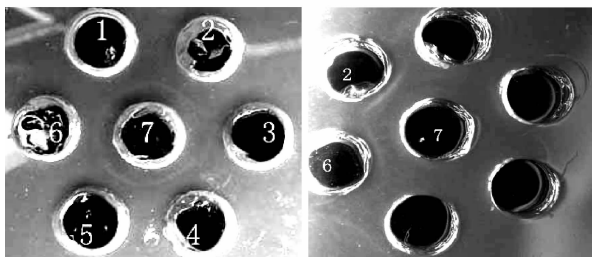
组别 Group	攻毒后时间 Time after inoculating							存活率/% Survival rate
	10 d	12 d	13 d	15 d	19 d	21 d	30 d	
1 组 Group 1	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100
2 组 Group 2	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	—	—	0
3 组 Group 3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	—	0
对照组 Control	2/3	1/3	0/3	—	—	—	—	0

1、2 和 3 组分别免疫 55、40 和 38 ku 抗原;表中数据分子为存活数,分母为试验数

Group 1, 2, 3 were immunized with 55, 40 and 38 ku antigen, respectively; numerator represents survival number, denominator represents total animal number

2.4 交叉免疫试验

发现各抗原孔与血清孔间均有沉淀线,且沉淀线末端完全融合。说明试验各菌株的 55 ku 抗原可产生交叉免疫,且具有相同的抗原决定簇(图 3)。



1. FN(A)011 抗原; 2. FN(A)012 抗原; 3. 生理盐水;
4. FN(A)014 抗原; 5. FN(A)015 抗原; 6. FN(A)016
抗原; 7. FN(A)012 抗原血清

1. FN(A)011 antigen; 2. FN(A)012 antigen; 3. Normal saline; 4. FN(A)014 antigen; 5. FN(A)015 antigen; 6. FN(A)016 antigen; 7. FN(A)012 antiserum

图 3 不同菌株 55 ku 蛋白交叉免疫试验

Fig. 3 Cross-immunity test of 55 ku protein between different strains

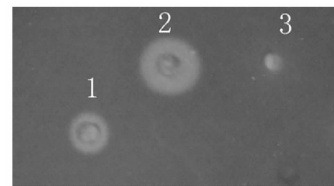
2.5 抗原的纯化与氨基酸序列测定

经 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 鉴定,选出的目标样品有较高的纯度。测序结果表明由菌体形态有区别的菌株长丝状的 FN(A)012(M₂)和短杆状的 FN(A)016(M₆)提取的 55 ku 抗原,蛋白质 N 末端序列基本一致(各测 10 个氨基酸,只是第 1 个氨基酸不同),且在 GenBank 中未检索到与其相同的蛋白质序列。测序结果如下: M2 STYAPA-ECDT; M6 ATYAPAECDT。

2.6 55 ku 抗原及菌体裂解物的溶血性比较

55 ku 抗原提取物及菌体裂解物均有明显的溶血现象,但抗原提取物溶血环明显大于菌体裂解物

(图 4)。



1. 菌体裂解物; 2. 保护性抗原提取物; 3. 生理盐水

1. Bacterial lysates; 2. Protective antigen extracts; 3. Normal saline

图 4 FN(A)012 保护性抗原提取物及菌体裂解物的溶血试验

Fig. 4 Haemolytic test of protective antigen extracts and bacterial lysate of FN(A)012

3 讨论

20 世纪 70 年代末对坏死梭杆菌免疫的研究有了新进展,大量试验证明,坏死梭杆菌菌体及其代谢产物中存在抗坏死杆菌免疫原。但除培养物上清液中的主要免疫原被筛选出来,证明是白细胞毒素外^[10],菌体中的其它主要免疫原仍在筛选和研究之中。

本项研究在毒力菌株分离及动物感染模型的基础上^[8,11],将菌体裂解后,以 SDS-PAGE 和 Western-blot 技术筛选有免疫原性的组分,之后利用攻毒试验筛选出免疫保护性抗原。研究发现利用胰蛋白酶对坏死梭杆菌进行裂解,有利于免疫原组分的筛选研究,曾尝试用超声波裂解菌体,但裂解物电泳条带不清晰,无法对组分进行分离。由于坏死梭杆菌抗原间存在免疫干扰现象^[12],试验中用菌体裂解物上清和沉淀分别做成抗原制备血清,再将 2 种血清混合,用于 Western-blot 筛选研究,一定程度上

避免了由于免疫干扰而造成的部分免疫原被漏选。通过动物感染试验,交叉免疫试验及抗原的纯化与氨基酸序列测定,发现 55 ku 抗原具有免疫保护性,在各菌株间不仅可产生交叉免疫反应,且抗原间有相同的抗原决定簇,氨基酸序列测定结果的一致性也进一步印证了这一结论。这对坏死梭杆菌疫苗的研制具有重要的价值,也为保护性抗原基因的筛选提供了有价值的线索。

通过保护性抗原提取物及菌体裂解物的溶血试验及毒力菌株感染试验,发现保护性抗原的一个重要特性,即有较强的溶血性,毒力菌株感染可引起胸肌、肝及心肌的坏死等病理现象。

综上所述,根据免疫原筛选的样品处理方法、抗原最小分子量、纯化抗原的生物学特性及蛋白检索结果可初步判定该抗原为溶血素类似物或一种新发现的抗原物质。

参考文献:

- [1] CHRINO-TREJO M, WOODBURY M R, HUANG F. Antibiotic sensitivity and biochemical characterization of *Fusobacterium* spp. and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from farmed white-tailed deer (*Odocoiles virginianus*) with necrobacillosis [J]. J Zoo Wildlife Med, 2003, 34: 262-268.
- [2] STOKKA G L, LECHTENBERG K F, EDWARDS T, et al. Lameness in feedlot cattle [J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2001, 17: 189-207.
- [3] HAGELSKJAER K L, PRAG L. Human necrobacillosis, with emphasis on Lemierre's syndrome [J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(2): 524-532.
- [4] ANTONIA B M, WREN W D, GAL M. *Fusobacterium necrophorum* as the cause of recurrent sore throat: comparison of isolates from persistent sore throat syndrome and Lemierre's disease [J]. Journal of Infection, 2005, 51(4): 299-236.
- [5] JONES G, JAYAPPA H, HUNSAKER B, et al. Efficacy of an *Arcanobacterium pyogenes*-*Fusobacterium necrophorum* bacterintoxoid as an aid in the prevention of liver abscesses in feedlot cattle [J]. Bovine Pract, 2004, 38: 36-44.
- [6] SMITH G R, TURNER A, MURRAY L G. The weak immunogenicity of *Fusobacterium necrophorum* [J]. J Hyg Camb, 1985, 95: 59-68.
- [7] SMITH G R, WALLACE L M. Further observations on the weak immunogenicity of *Fusobacterium necrophorum* [J]. Res Vet Sci, 1992, 52: 262-263.
- [8] 王克坚, 苗利光, 刘晓颖. 鹿源坏死梭杆菌毒力菌株 FN(AB)94 实验动物感染模型的建立 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(2): 134-136.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 880-898.
- [10] NARAYANAN S K, NAGARAJA T G, CHENGAPPA M M, et al. Leukotoxins of gram-negative bacteria [J]. Vet Microbiology, 2002, 84: 337-356.
- [11] 王克坚, 刘晓颖, 陈立志, 等. 鹿源坏死梭杆菌毒力菌株 FN(AB)94 抗原的免疫原性 [J]. 中国兽医学报, 2002, 5: 468-469.
- [12] SAGINALA S, NAGARAJA T G, TAN Z L, et al. Serum neutralizing antibody response and protection against experimentally induced liver abscesses in steer vaccinated with *Fusobacterium necrophorum* 1 [J]. Am J Vet Res, 1996, 57: 483-488.