

产气荚膜梭菌重组 ϵ 毒素突变体的免疫保护力评价

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

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: 旨在获得产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的重组突变体, 并评价其毒力及免疫原性。对已知的 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素编码基因进行了优化设计和人工合成, 同时引入 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。将该基因片段克隆至原核表达载体 pET30a-(+) 中进行表达, 并纯化。利用 Western blot 方法检测纯化蛋白质与 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素抗血清的反应性, 并检测其对小鼠的毒力。随后, 以纯化的重组蛋白质免疫兔, 根据《中华人民共和国兽药典》(2015 年版) 规定的方法检测兔血清的中和抗体效价。结果表明, ϵ 毒素的重组突变体为可溶性表达, 通过灰度扫描, 其表达量比例可达 40%; 该蛋白质能与 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素抗血清反应, 小鼠安全试验显示, $6.25 \times 10^6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蛋白质仍无毒性; 免疫兔血清对 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的中和效价在一免后可达 50~60 最小致死量 (MLD), 二免后可达 400~450 MLD; 用 1 个 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素攻毒后, 对照组 4/4 死亡, 免疫组得到保护。由此表明, 产气荚膜梭菌重组 ϵ 毒素突变体无毒性且保留了良好的免疫原性, 为 D 型产气荚膜梭菌病新型疫苗的研制提供了重要的实验数据。

关键词: 产气荚膜梭菌 ϵ 毒素; 突变; 重组表达; 毒力; 抗原性

中图分类号: S852.616.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0777-09

Evaluation of Protective Efficacy of Recombinant Mutant of *Clostridium perfringens* ϵ Toxin

DU Ji-ge, ZHU Zhen, XUE Qi, LI Qi-hong, YIN Chun-sheng,

PENG Xiao-bing, YAO Wen-sheng, KANG Kai, CHEN Xiao-yun*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: This experiment was conducted to obtain recombinant mutant of *Clostridium perfringens* ϵ toxin and subsequently evaluate the virulence and immunogenicity of the recombinant toxin. The ϵ toxin gene of *C. perfringens* type D strain using optimized codons was synthesized based on the sequence reported. At the same time, three amino acid mutations: Y30 and Y196 substituted with alanine, H106 substituted with proline, were introduced into this sequence synthesized. Then, this ϵ toxin gene was cloned into prokaryotic expression vector pET3a-(+) to construct a recombinant *E. coli*, followed by induction with IPTG to yield the recombinant protein, following with purification. The reactivity of the purified protein with antiserum of *C. perfringens* type D was determined by Western blot and the mouse was used to evaluate the virulence of purified protein. The rabbit antiserum against the recombinant proteins was prepared and the neutralizing titer was measured according to the method prescribed in *Chinese Veterinary Pharmacopoeia* (2015). The results showed that recombinant protein was expressed at a high level in a soluble form with a ratio of about 40% by gray scale scanning, And the protein could react with the

收稿日期: 2017-09-07

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); 中国兽医药品监察所级课题(201702)

作者简介: 杜吉革(1987-), 男, 山东即墨人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物微生物学与免疫学研究, E-mail: du19371@163.com; 朱 真(1989-), 女, 湖南汉寿人, 研究实习员, 主要从事动物微生物学与免疫学研究, E-mail: zhuzhen89@sina.com。两人对本文章的贡献相同, 同为第一作者

* 通信作者: 陈小云, Tel: 010-61255342, E-mail: caucxy@163.com

antiserum of *C. perfringens* type D. The protein with the injection volume of 6.25×10^6 ng \cdot kg⁻¹ still shows no virulence to mouse. The titer of rabbit antiserum against *Clostridium perfringens* type D could reach 50-60 and 400-450 Minimum Lethal Dose (MLD) after the first and second immunization and respectively. After challenge with 1MLD of *C. perfringens* type D toxin, all the rabbits immunized with recombinant protein were protected. The results suggest that the recombinant mutant of *C. perfringens* ϵ toxin without virulence retains the good immunogenic antigen, which provides important experimental data for the development of novel *C. perfringens* vaccine.

Key words: *Clostridium perfringens* ϵ toxin; mutation; recombinant expression; virulence; antigenicity

产气荚膜梭菌旧称魏氏梭菌,是一种重要的人畜共患病原,常常诱发创伤性气性坏疽和人类食物中毒以及羔羊痢疾、牛羊坏死性肠炎、牛羊肠毒血症^[1-6],给畜牧业造成巨大经济损失^[7-12]。产气荚膜梭菌的主要致病因子是其分泌的外毒素,该菌可至少分泌 18 种外毒素,并通过这些外毒素引起人和动物发病^[13]。根据产生的 4 种主要致死性外毒素 α (CPA)、 β (CPB)、 ϵ (ETX)和 ι (CPI)的种类,将该菌分为 A、B、C、D、E 五个毒素型^[14]。产气荚膜梭菌病具有发病急、病程短且死亡率极高的特点^[15],一旦发病,往往还来不及治疗就因外毒素中毒而发生猝死,因此免疫接种是防控该病的有效方法。目前,通过灭活梭菌培养物上清而制备的天然类毒素疫苗是预防该菌感染的主要疫苗。但该类疫苗制备过程繁琐,抗原成分复杂,有效抗原含量较低,免疫效果不尽理想。因此,筛选安全、有效、纯净的抗原,用于研制新型产气荚膜梭菌病疫苗,对预防该菌感染具有重要意义。

由 B 型和 D 型产气荚膜梭菌产生的 ϵ 毒素 (ETX)^[16],是该菌所有外毒素中毒力最强的毒素^[17]。该毒素全长 296 个氨基酸,以毒素前体的形式分泌于菌体外^[18]。毒素前体被宿主的胰蛋白酶、糜蛋白酶或梭菌自身的蛋白酶作用后,去除 N 端 11~13 个以及 C 端 22~29 个氨基酸,从而活化为成熟毒素^[19-20]。ETX 分子主要分为 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^[21]。此外,ETX 分子中有 2 条 35 个氨基酸的肽链同时跨过 I、II 和 III 三个区域^[22]。 ϵ 毒素的这些特性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^[23-24])很难应用于该毒素的防控。因此,实现毒素的减毒甚至无毒以及构建相关减毒或无毒突变体,对于开发毒素

基因工程亚单位疫苗及将其作为抗原组分的多价亚单位疫苗的研究和应用就显得尤为重要。已有的研究发现,106 位组氨酸突变为脯氨酸的重组 ETX 基本是无毒的,且保留了良好的免疫原性^[25-27]。此外,I 区域内的第 29、30、36、196 以及 199 位氨基酸的无毒单突变重组 ETX 也保留了较好的免疫原性^[26,28-29]。

为了最大限度地保留天然毒素蛋白的完整性和空间构象,保持其免疫原性,同时避免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,本文同时对我国现行 D 型产气荚膜梭菌制苗用菌株(C60-2 株)ETX 基因的 30、196 和 106 位氨基酸位点进行突变,通过原核系统表达、纯化和鉴定,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、D 型产气荚膜梭菌抗毒素以及 pET-30a(+)表达载体为本实验室保存;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 206 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 \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 10% Glycerol, 150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, pH 8.0),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 Promega 公司;限

制性内切酶 *Nde* 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;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 C60-2 株 ETX 编码基因为模板,按大肠杆菌偏爱的密码子进行了优化设计和人工合成。同时,引入 3 个氨基酸点突变,分别是第 30 位酪氨酸突变为丙氨酸,第 106 位组氨酸突变为脯氨酸,第 196 位酪氨酸突变为丙氨酸。此外,在突变基因后添加 6 * His 标签蛋白序列。基因合成由中美泰和公司完成,合成的基因称为 GETX_{m3}。

1.3 ETX 突变体原核表达载体的构建

以人工合成的 GETX_{m3} 基因为模板,采用引物对 GETX_{m3}-F/GETX_{m3}-R 进行 PCR 扩增。其中上游引物 GETX_{m3}-F 序列:5'-CGCCATATGAAAGAAATCTC-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 GETX_{m3}-R 序列:5'-CCGCTCGAGTTAGTGGTGATG-3',其 5'端引入限制性内切酶 *Xho* I 位点(下划线部分)。PCR 体系为 50 μ L。PCR 反应条件: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/*Xho* I 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-GETX_{m3}。

1.4 重组蛋白质的表达与鉴定

将 pET30a-GETX_{m3} 质粒转化 BL21(DE3) 感受态细胞,分别在 37 和 16 $^{\circ}$ 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 检测重组蛋白质的表达情况及其可溶性,将表达的目的蛋白质称为 rETX_{m3}。采用 Western blot 方法,以抗 His 标签蛋白抗体为一抗,对重组蛋白质做进一步的鉴定。

1.5 重组蛋白质的纯化及 Western blot 鉴定

按照 Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒的使用说明书对菌体裂解上清中呈可溶性表达的目的蛋白质进行纯化,用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白

质浓度,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。将纯化后的目的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,分别以抗 His 标签抗体和 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清为一抗,HRP 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 为二抗进行孵育,按照底物显色试剂盒说明书进行显色,检测纯化的重组蛋白质与抗 His 标签抗体及 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清的反应情况。

1.6 重组蛋白质的毒力测定

已有的研究发现,产气荚膜梭菌 ETX 毒素首先以前体毒素形式分泌,当被蛋白酶(如胰酶、糜蛋白酶以及羧肽酶等)切除 N 端以及 C 端相应的氨基酸后,毒素被活化,从而挥发相应的生物活性^[18-20]。活化的 ETX 对小鼠的半数致死量可达 50 ng \cdot kg⁻¹^[30]。本文按照我国现行《中华人民共和国兽药典》(2015 年版)规定的方法,用终浓度为 1% 的胰酶对纯化的 rETX_{m3} 在 37 $^{\circ}$ C 条件下活化 1 h。首先对抗原的免疫剂量和免疫途径进行优化,将 16~18 g ICR 小鼠随机分为 9 组,每组 5 只。分别用活化前和活化后的 rETX_{m3} 静脉注射,注射剂量分为 1、10、100 μ g 3 个梯度。同时设置胰酶消化液(终浓度为 1%)以及蛋白溶解液两个阴性对照和 1 个 MLD 的天然毒素阳性对照。其中,样品均用明胶缓冲液进行稀释,注射的液体总体积为 350 μ L,观察 2 d,记录小鼠的存活状态。

1.7 免疫原性分析

1.7.1 免疫程序 将合适浓度的纯化 rETX_{m3} 与 Montanide ISA 206 佐剂以体积比 1:1 的比例配制成 rETX_{m3} 终质量浓度为 50 μ g \cdot mL⁻¹ 的疫苗,置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。用体重 1.5~2.0 kg 健康家兔 4 只,各颈部皮下注射疫苗,2.0 mL \cdot 只⁻¹,免疫后 14 d,以相同剂量、相同途径进行二次免疫。另取灭菌 PBS 与 Montanide ISA 206 佐剂以体积比 1:1 的比例制备对照疫苗,各颈部皮下注射相同条件的健康家兔 4 只,2.0 mL \cdot 只⁻¹,作为对照组。

1.7.2 血清中和和抗体效价测定 分别在一免后 14 d 以及二免后 21 d,对试验组及对照组所有兔经耳缘静脉采血,分离血清备用。按照《中华人民共和国兽药典》(2015 年版)三部中规定的方法进行血清中和效价测定^[31]。

1.7.3 攻毒试验 二免后 21 d,对免疫组及对照组所有家兔经耳缘静脉各注射 1 MLD 的天然毒素进行攻毒,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。

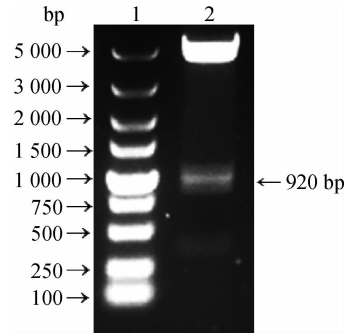
2 结果

2.1 ETX 毒素突变体原核表达载体的构建

采用引物 GETX_{m3}-F/GETX_{m3}-R 进行 PCR 扩增,扩增片段经酶切后克隆至 pET-30a(+)载体。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 920 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-GETX_{m3}。

2.2 ETX 毒素突变体的原核表达鉴定

将重组表达质粒 pET30a-GETX_{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,表达的目的蛋白质相对分子质量约为 39 ku,大小与预期相符。表达的 rETX_{m3} 重组蛋白质在 BL21 (DE3) 菌体中以可溶性和包涵体两种形式存在(图 2)。图 2a 为重组蛋白质表达的 SDS-PAGE 鉴定结果,如图所示,37 °C、诱导 4 h 后,重组蛋白质的表达量以及可溶性均优



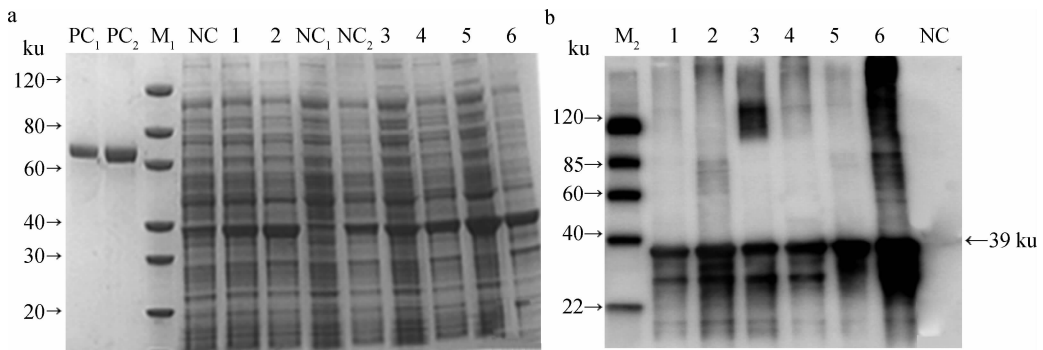
1. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 2. 重组质粒 pET30a-GETX_{m3} 的 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

1. DL5000 DNA marker; 2. pET30a-GETX_{m3} digested with *Nde* I and *Xho* I

图 1 原核表达重组质粒 pET30a-GETX_{m3} 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant prokaryotic expression plasmids pET30a-GETX_{m3}

于其他诱导条件。为此,确定目的蛋白质最适诱导表达条件为 37 °C,诱导表达 4 h,收获细胞裂解上清。图 2b 为重组蛋白质的 Western blot 鉴定结果,表达的目的蛋白质能与抗 His 标签抗体发生反应,证明目的蛋白质含有 His 标签,与预期相符。



a. 重组蛋白质表达的 SDS-PAGE 鉴定;b. 重组蛋白质与抗 His 单抗反应的 Western blot;M₁. 蛋白质相对分子质量标准;M₂. Western blot 蛋白质相对分子质量标准;PC₁. BSA (1 μg);PC₂. BSA (2 μg);NC. 未诱导细胞裂解物;1. 细胞裂解物(15 °C、16 h 诱导);2. 细胞裂解物(37 °C、4 h 诱导);NC₁. 未诱导细胞裂解上清;NC₂. 未诱导细胞裂解沉淀;3. 细胞裂解上清(15 °C、16 h 诱导);4. 细胞裂解沉淀(15 °C、16 h 诱导);5. 细胞裂解上清(37 °C、4 h 诱导);6. 细胞裂解沉淀(37 °C、4 h 诱导)

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. Protein marker of Western blot; PC₁. BSA (1 μg); PC₂. BSA (2 μg); NC. The cell lysates without induction; 1. The cell lysates induced with IPTG for 16 h under 15 °C; 2. The cell lysates induced with IPTG for 4 h under 37 °C; 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 under 15 °C; 4. The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 16 h under 15 °C; 5. The supernatant of cell lysates induced with IPTG for 4 h under 37 °C; 6. The precipitation of cell lysates induced with IPTG for 4 h under 37 °C

图 2 rETX_{m3} 的原核表达与鉴定

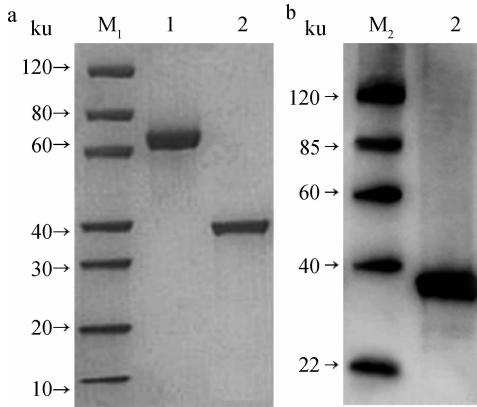
Fig. 2 Prokaryotic expression and identification of rETX_{m3}

2.3 ETX 毒素突变体的纯化与鉴定

按照 Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒说明书对 rETX_{m3} 进行纯化,收集纯度较高的洗脱液进行透析,

最终获得的蛋白质质量浓度为 0.302 mg · mL⁻¹,纯度可达 90% 以上,结果见图 3a。将纯化后的 rETX_{m3} 经 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上进行

Western blot 检测。结果 rETX_{m3} 能够与抗 His 标签抗体(图 3b)以及 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清(图 4)发生反应。



a. 纯化蛋白的 SDS-PAGE 鉴定; b. 纯化蛋白与抗 His 单抗反应的 Western blot 鉴定; M₁. 蛋白质相对分子质量标准; M₂. Western blot 蛋白质相对分子质量标准; 1. BSA; 2. 纯化后的 rETX_{m3}

a. The identification of purified recombinant protein by SDS-PAGE; b. The identification of purified recombinant protein with anti-His monoclonal antibody by Western blot; M₁. Protein marker; M₂. Protein marker of Western blot; 1. BSA; 2. rETX_{m3} after purification

图 3 rETX_{m3} 的纯化与鉴定

Fig. 3 Purification and identification of rETX_{m3}

2.4 产气荚膜梭菌 ETX 突变体的毒性分析

未活化和经过胰酶活化的 rETX_{m3}, 分别以 1、10、100 μ g 的剂量注射小鼠, 结果注射组以及蛋白溶解液、胰酶消化液两个阴性对照组小鼠, 在注射后 21 d 内均存活, 未见任何异常。注射 1 个 MLD 天然

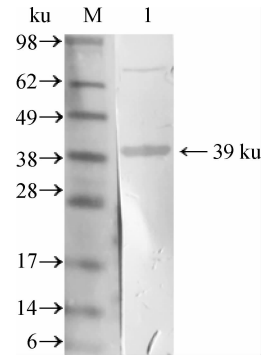
表 1 rETX_{m3} 免疫兔血清对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和抗体效价

Table 1 The titers of neutralization potency against toxins of *Clostridium perfringens* type D generated by rETX_{m3} in rabbits

分组 Groups	rETX _{m3} 免疫组				佐剂免疫组			
	Rabbits immunized with rETX _{m3}				Rabbits immunized with adjuvant			
兔编号 Number	P1	P2	P3	P4	C1	C2	C3	C4
一免后中和抗体效价(MLD) The serum neutralization titers after first immunization (MLD)	50	60	60	55	0	0	0	0
二免后中和抗体效价(MLD) The serum neutralization titers after second immunization (MLD)	400	425	450	420	0	0	0	0

2.6 攻毒保护试验结果

二免后 21 d, 对所有 rETX_{m3} 免疫组和佐剂免疫对照组的家兔, 经耳缘静脉注射 1 MLD 剂量的天然



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 纯化后的 rETX_{m3}

M. Protein molecular weight marker; 1. rETX_{m3} after purification

图 4 rETX_{m3} 与 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清的反应

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

毒素(0.000 25 mL)的小鼠, 在注射 24 h 内全部死亡, 说明重组表达的产气荚膜梭菌 ETX 毒素突变体已成功减毒, 即使经过胰酶活化后, 对小鼠依然是无毒的。

2.5 血清中和抗体效价的测定

经血清中和法测定, rETX_{m3} 免疫组的 D 型产气荚膜梭菌毒素中和抗体效价在一免后均大于 50 MLD (即 0.1 mL 家兔血清可中和 50 MLD 以上的 D 型产气荚膜梭菌毒素), 最高达 60 MLD; 二免后中和抗体效价均大于 400 MLD, 最高达 450 MLD (表 1)。以上试验结果表明, 制备的产气荚膜梭菌 ETX 毒素突变体 rETX_{m3} 的免疫效力远高于现行《中华人民共和国兽药典》的规定, 是优良的制苗用候选抗原。

毒素进行攻毒, 结果佐剂免疫对照组家兔在攻毒后 5 d 内全部死亡, rETX_{m3} 免疫组家兔全部健活, 未见任何不良反应。试验结果表明, 产气荚膜梭菌 ETX

毒素突变体 rETX_{m3} 能产生可靠的免疫攻毒保护效力。

3 讨论

作为一种重要的人畜共患病原,产气荚膜梭菌不仅严重威胁着人类的健康,而且对畜牧业造成了巨大经济损失。随着研究的深入,与产气荚膜梭菌密切相关的主要致死性外毒素的结构和致病机制越来越清晰,致死性外毒素的部分无毒区域(α 、 β 以及 ϵ 毒素的 C 末端^[23-24])或者无毒突变体(ϵ ^[25-26, 28] 和 θ 毒素^[32])作为亚单位疫苗抗原已经被证实能够有效预防相应的毒血症。作为一种潜在生物武器的 ϵ 毒素,其毒力仅次于肉毒毒素和破伤风毒素。该毒素能够导致家禽和家畜特别是反刍动物强烈的肠毒血症,给畜牧业造成严重的经济损失^[11]。因此,加强 ϵ 毒素防治方面的研究非常必要,尤其需要关注其生物安全性。李箐^[33] 通过原核系统获得了具有可溶性的重组 ϵ 毒素,该蛋白具有较强的毒力,在亚单位疫苗的制备过程中同样涉及外毒素的灭活,导致存在毒素外泄或灭活不彻底等生物安全隐患。

在无毒重组 ϵ 毒素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重组 ϵ 毒素蛋白,其安全性和抗原保护性已经得到充分的验证^[25-27]。其中,李箐^[33] 对 ϵ 毒素的第 106 位组氨酸、第 111 位色氨酸及第 199 位苯丙氨酸的突变体进行了研究。结果表明,rETX^{H106P} 的安全性最高。ETX 对犬的肾上皮细胞(MDCK)的 CT₅₀ 为(37.73 ± 12.55) ng · mL⁻¹,而质量浓度为 100 μ g · mL⁻¹ 的 rETX^{H106P} 对 MDCK 细胞仍无毒力。根据已有的文献报道,50 ng · mL⁻¹ 的天然 ETX 即能引起小鼠死亡。为此,本研究直接选用小鼠来检测 rETX_{m3} 的毒性,结果发现质量浓度为 100 μ g · mL⁻¹ 的 rETX_{m3} 对小鼠仍无毒力作用。此外,作为一个较为经典的无细胞毒性的突变体 rETX^{H106P},该蛋白的可溶性表达量非常低^[33-34],如果需要大量生产会增加纯化的难度。然而,本研究中的无毒重组蛋白 rETX_{m3} 可溶性表达量较高,可溶比例可达到 40%,这可能由于按照大肠杆菌偏爱的密码子进行优化引起的,或者是其余两个点突变更利于 rETX_{m3} 的可溶表达。用抗 His 抗体进行 Western blot 试验结果发现,未纯化的 rETX_{m3} 显色膜上出现杂带,这可能是抗体的浓度过高引起的(图 2b)。对于纯化后的 rETX_{m3},用抗 His 抗体进行

Western blot 时出现单一的条带(图 3b),而用 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清作为一抗时,显色膜上出现了两条明显的条带(图 4)。因为 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清是通过灭活的 D 型产气荚膜梭菌培养物免疫日本大耳白兔制备,抗原不仅含有类毒素,还含菌体的其他成分。为此,笔者认为在纯化的 rETX_{m3} 中残留了一部分原核生物的共有抗原,才导致图 4 中出现两条明显的条带。

目前,活化 ETX 毒素可以采用胰酶、糜蛋白酶以及羧肽酶,3 种酶活化 ETX 的机制基本相同,均为切除 ETX 毒素前体蛋白的 N 端以及 C 端相应的氨基酸,使其活化。但是不同的酶活化后 ETX 毒素对小鼠的 LD₅₀ 却存在很大差异,范围从 50 至 320 ng · kg⁻¹。目前大多数的研究论文,以及我国现行《中华人民共和国兽药典》(2015 年版)均采用胰酶进行活化,为使本研究的数据与其他研究人员的数据更具有可比性,故本研究采用了胰酶进行活化。

为了进一步降低未来基因工程疫苗大规模生产中可能存在的 ϵ 毒素基因回复突变带来的生物安全风险,除了第 106 位氨基酸的点突变外,本研究同时还对 ϵ 毒素的第 30 位和 196 位氨基酸进行了突变。其中,第 30 位和 196 位氨基酸均位于 ETX 的 I 结构域,可能和毒素分子与受体的结合有关^[29]。第 30 位氨基酸进行突变,能够降低 ϵ 毒素的毒力,但突变后的毒素抗原性没有得到深入研究。最近的研究发现,与 rETX^{Y196E} 相比,添加 C-末端氨基酸的 rETX^{Y196E} (rETX^{Y196E-C}) 毒力更低,且具有良好的免疫原性^[28]。然而,添加 C-末端氨基酸的重组突变体仍然有被蛋白酶重新切掉的可能,存在一定的安全风险。本文的研究发现,同时有三个点突变的重组毒素 rETX_{m3},在本文的检测浓度范围内对小鼠没有毒力作用,具有很高的安全性,但仍然保留了良好的免疫原性。由于 ETX 分子中有 2 条 35 个氨基酸的肽链同时跨过 I、II 和 III 三个区域^[22],导致仅使用 ETX 分子的一个域作为疫苗候选抗原的策略(如 α 、 β 毒素的 C 末端^[23-24])很难应用于该毒素的防控。因此,对于 ϵ 毒素的突变体研究通常聚焦在突变个别氨基酸位点,而直接去掉某个氨基酸的研究还没有报道。为此,制备免疫原性良好的缺失某些关键氨基酸位点的无毒 ETX 分子将是我们的后续研究的重点。

由于致病的梭菌种类较多,且常混合感染,导致

梭菌病的预防多采用联苗,以达到一针多防的目的。该类疫苗均为天然毒素经甲醛脱毒后制备的类毒素疫苗,其抗原成分复杂,有效抗原量较低,导致效果不理想。特别是联苗中每种菌株的类毒素免疫量均较高,组合后的总免疫量过大,容易引起动物的应激反应。根据《中华人民共和国兽药典》(2015年版)三部的规定,在此类疫苗检验中,对 D 型产气荚膜梭菌毒素的兔血清中和效价达到 3 MLD 即可判为合格。虽然该标准为疫苗的最低标准,但从中国兽医药品监察所历年的兽用生物制品监督检验结果来看,目前我国该类疫苗的免疫效力不容乐观,疫苗抽检不合格的情况时有发生^[35]。彭小兵等对自 2006 年至 2015 年间的此类疫苗检验结果的统计发现,以血清中和法检验后效力不符合规定的产品共有 33 批,其中 β 毒素组分效力不符合规定(低于 1 MLD)的比例最高,约为 72.7%^[36]。然而,鉴于此类联苗免疫剂量的限制,无法再大幅度增加 β 类毒素的比例。为此,产气荚膜梭菌毒素亚单位疫苗的研制显得极为重要。在一定的范围内,我们可以最大程度地增大免疫原性较差的毒素抗原,从而提高联苗总体的免疫保护作用。而本研究中制备的 rETX_{m3} 一免兔血清中和效价可达 50 MLD,二免后甚至可达 400 MLD,效果明显优于目前的商品化疫苗。这说明 ϵ 毒素的 30、106 和 196 氨基酸突变后,毒力基本消失,但仍保留了良好的免疫原性,是我国现行 D 型产气荚膜梭菌毒素疫苗升级换代的理想候选疫苗抗原。

4 结 论

优化设计并克隆 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素编码基因,在原核表达系统成功表达。 ϵ 毒素的重组蛋白质为可溶性表达,且能与该菌 ϵ 毒素抗血清反应;重组蛋白质免疫兔血清对该菌 ϵ 毒素的中和效价较高;用该菌 ϵ 毒素攻毒后,对照小鼠全部死亡,重组蛋白质免疫组得到保护。可见产气荚膜梭菌重组 ϵ 毒素突变体无毒力且保留了良好的免疫原性。

参考文献 (References):

[1] MCCLANE B A, UZAL F A, MIYAKAWA M E, et al. The enterotoxic clostridia[M]//FALKOW S, DWORKIN M, ROSENBERG E, et al. The Prokaryotes. New York, NY, USA: Springer, 2006: 698-752.

[2] HATHEWAY C L. Toxigenic clostridia[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1990, 3(1): 66-98.

[3] SONGER J G. Clostridial enteric diseases of domestic animals[J]. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9(2): 216-234.

[4] NOVAK J S, JUNEJA V K. *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods[J]. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2002, 3(2): 127-132.

[5] UZAL F A, FREEDMAN J C, SHRESTHA A, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease[J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(3): 361-377.

[6] DECKER M, DE ALMEIDA GOMES G, GALVÃO A C, et al. Evaluation of a new mathematical model to describe *Clostridium perfringens* growth during the cooling of cooked ground beef[J]. *Food Sci Technol*, 2013, 33(3): 507-512.

[7] 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): 340-363.

[8] 王莹莹,乔艺然,赵蕾,等. 产气荚膜梭菌重组 NetB 毒素细胞毒性作用研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(5): 1018-1025.

WANG Y Y, QIAO Y R, ZHAO L, et al. The study on cytotoxicity of recombinant NetB toxin of *Clostridium perfringens* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(5): 1018-1025. (in Chinese)

[9] 柳美玲,王爱华,陈凤梅,等. 浅析牛产气荚膜梭菌病[J]. *山东畜牧兽医*, 2015(2): 59-61.

LIU M L, WANG A H, CHEN F M, et al. *Clostridium perfringens* in cattle industry[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(2): 59-61. (in Chinese)

[10] 钭有科,肖啸,濮永华,等. 努比亚山羊产气荚膜梭菌病的诊治[J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50(12): 42-43.

CHUAN Y K, XIAO X, PU Y H, et al. Diagnosis and treatment of *Clostridium perfringens* infection in Nubian goats[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(12): 42-43. (in Chinese)

[11] VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, PASMANS F, et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health[J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(6): 537-549.

- [12] 郑晓丽, 宋振银, 倪学勤. 产气荚膜梭菌对家禽业的危害及其预防[J]. 中国家禽, 2008, 30(24): 69-71. ZHENG X L, SONG Z Y, NI X Q. Emerging threat and prevention of *Clostridium perfringens* in poultry industry[J]. *China Poultry*, 2008, 30(24): 69-71. (in Chinese)
- [13] REVITT-MILLS S A, ROOD J I, ADAMS V. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting[J]. *Microbiol Aust*, 2015, 36(3): 114-117.
- [14] NILO L. *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge[J]. *Can Vet J*, 1980, 21(5): 141-148.
- [15] LEBRUN M, MAINIL J G, LINDEN A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis[J]. *Vet Rec*, 2010, 167(1): 13-22.
- [16] SAYEED S, LI J H, MCCLANE B A. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates [J]. *Infect Immun*, 2007, 75 (5): 2391-2398.
- [17] SAKURAI J. Toxins of *Clostridium perfringens* [J]. *Rev Med Microbiol*, 1995, 6(3): 175-185.
- [18] HUNTER S E, CLARKE I N, KELLY D C, et al. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(1): 102-110.
- [19] MINAMI J, KATAYAMA S, MATSUSHITA O, et al. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides[J]. *Microbiol Immunol*, 1997, 41(7): 527-535.
- [20] FREEDMAN J C, MCCLANE B A, UZAL F A. New insights into *Clostridium perfringens* epsilon toxin activation and action on the brain during enterotoxemia[J]. *Anaerobe*, 2016, 41: 27-31.
- [21] ALVES G G, DE ÁVILA R A M, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C D, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin; the third most potent bacterial toxin known[J]. *Anaerobe*, 2014, 30: 102-107.
- [22] COLE A R, GIBERT M, POPOFF M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11(8): 797-798.
- [23] NAGAHAMA M, ODA M, KOBAYASHI K, et al. A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin in protects mice against *Clostridium perfringens* [J]. *Microbiol Immunol*, 2013, 57(5): 340-345.
- [24] 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]. *Mol Immunol*, 2016, 70: 140-148.
- [25] 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]. *Infect Genet Evol*, 2016, 40: 282-287.
- [26] LI Q, XIN W W, GAO S, et al. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9 (11): 2386-2392.
- [27] DORCA-ARÉVALO J, PAUILLAC S, DÍAZ-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.
- [28] YAO W W, KANG J J, KANG L, et al. Immunization with a novel *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant rETX^{Y196E}-C confers strong protection in mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24162.
- [29] IVIE S E, MCCLAIN M S. Identification of amino acids important for binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to host cells and to HAVCR1[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(38): 7588-7595.
- [30] BOKORI-BROWN M, SAVVA C G, DA COSTA S P F, et al. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin[J]. *FEBS J*, 2011, 278(23): 4589-4601.
- [31] 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 Agriculture Press, 2016: 45-46. (in Chinese)
- [32] VERHERSTRAETEN S, GOOSSENS E, VALGAEREN B, et al. Non-toxic perfringolysin O and alpha-toxin derivatives as potential vaccine candidates against bovine necrohaemorrhagic enteritis [J]. *Vet J*, 2016, 217: 89-94.
- [33] 李 箐. 产气荚膜梭菌 alpha-epsilon 毒素突变体构建及应用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.

- LI Q. Construction of mutants of *Clostridium perfringens* alpha, epsilon toxin and its application[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2013. (in Chinese)
- [34] OYSTON P C, PAYNE D W, HAVARD H L, et al. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin which induces protective immunity in mice[J]. *Microbiology*, 1998, 144(2): 333-341.
- [35] 农业部兽医局. 农业部关于 2015 年第一期兽药质量监督抽检情况的通报[EB/OL]. (2015-04-02)[2017-12-22]. http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/tz/201504/t20150402_4472055.htm.
Veterinary Bureau of the Ministry of Agriculture of PRC. Report of the Ministry of agriculture on the inspection of the first phase of the quality supervision of veterinary drugs in 2015 [EB/OL]. (2015-04-02) [2017-12-22]. http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/tz/201504/t20150402_4472055.htm. (in Chinese)
- [36] 彭小兵, 田冬青, 彭国瑞, 等. 产气荚膜梭菌 β 毒素的表达及其抗血清的制备[J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47(10): 93-96.
- PENG X B, TIAN D Q, PENG G R, et al. Expression of *Clostridium perfringens* β toxin and preparation of its antiserum[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47(10): 93-96. (in Chinese)

(编辑 白永平)