

重组猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 ApxI 对小鼠的急性毒性和免疫保护性研究

Acute Toxicity and Immunoprotection of Recombinant ApxI Toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Mice

严克霞^{1 2}, 刘建杰³, 周 锐^{1 2 *}, 吴 斌^{1 2 *}, 刘维红^{1 2}, 陈焕春^{1 2}

YAN Ke-Xia^{1 2}, LIU Jian-Jie³, ZHOU Rui^{1 2 *}, WU Bin^{1 2 *}, LIU Wei-Hong^{1 2} and CHEN Huan-Chun^{1 2}

1 湖北省预防兽医学重点实验室, 武汉 430070

2 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

3 海口农工贸(罗牛山)股份有限公司, 海口 570125

1 Hubei Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Wuhan 430070, China

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

3 Haikou Agriculture & Industry & Trade Luoniushan co., Ltd., Haikou 570125, China

摘 要 研究了猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 I 重组表达蛋白(包括粗提包涵体和经复性处理的重组蛋白)对小鼠的急性毒性以及免疫保护性,并和天然毒素 I(由 APP 血清 10 型菌的培养物上清提取)做了对比。在急性毒性试验中,3 种蛋白均以 200 μg /只的剂量腹腔注射小鼠,并分别于 24h、7d 和 14d 后眼眶放血致死,检测血常规和血液生化相关指标。结果表明,3 种蛋白均不引起小鼠死亡,且重组表达蛋白对小鼠的生长、血常规和血液生化指标没有显著影响。在免疫保护性试验中,用 3 种蛋白乳化后免疫小鼠,2 周后加强免疫 1 次,并在每次免疫后采血检测其效价,二免 2 周后用致死剂量的 APP 血清 10 型菌(1.09×10^8 cfu)腹腔攻毒。结果表明,天然毒素和复性的重组表达蛋白均具有良好的免疫原性,对小鼠具有较好的免疫保护效力。

关键词 胸膜肺炎放线杆菌,重组 apxIA,小鼠,急性毒性,免疫保护性

中图分类号 Q939.91 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)01-0065-06

Abstract Acute toxicity and immunoprotection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) ApxI toxin recombinant proteins (include crude inclusion bodies and refolded recombinant protein) were evaluated in mice, and compared with the natural ApxI extracted from culture supernatant of APP serotype 10. In the acute toxicity experiment, the three proteins were intraperitoneally injected into Kunming mice in a dose of 200 μg per mouse. The body and organ weight, hematological and biochemical indexes were examined at 24h, 7 days and 14 days post administration. There was no death after the intraperitoneal administration of the three proteins, and no significant change was found in the body weight, organ indexes, hematological and biochemical indexes. To study their immunoprotection, the three proteins were emulsified with Freund's adjuvant respectively and vaccinated the mice twice with a 2-week of interval. Two weeks after the second vaccination, the mice were challenged intraperitoneally with a lethal

Received: August 12, 2005; Accepted: November 4, 2005.

This work was supported by the Key Technologies R&D Program (No. 2004BA514A14-4) and the Program for New Century Excellent Talents in University of China (No. NCET-04-0740).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

国家科技攻关项目(No. 2004BA514A14-4)和教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-04-0740) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

dose of APP serotype 10 (1.09×10^8 cfu), and serums were examined by an ApxI-specific ELISA. The results revealed that the recombinant protein had a good immunogenicity and could induce protection immune reaction.

Key words *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Recombinant ApxI, Mouse, Acute toxicity, Immune protection

猪传染性胸膜肺炎是由猪胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)引起的一种急性或慢性以肺炎和胸膜炎为特征的高度接触性传染病,给世界养猪业带来了严重的经济损失^[1,2,3]。目前 APP 已发现有 15 种血清型,各型间没有或仅有较弱的交叉保护力,而含有毒素的亚单位苗或类毒素菌苗由于其较好的交叉保护力已成为国内外 APP 疫苗研究的热点。

APP 是一种多毒力因子的革兰氏阴性菌,其最重要的毒力因子是 4 种分泌外毒素 (ApxI、Apx II、Apx III、Apx IV)^[4],但研究发现 ApxI 是其最重要的毒力因子^[5,9],同时也是最重要的免疫原性因子,在 APP 疫苗的交叉保护中起着最为重要的作用^[6,7]。

Apx I 的操纵子是由 4 个基因 C、A、B、D 串连在一起组成的^[1]。其中 A 基因是 Apx I 的结构基因,其表达产物是没有毒力的,需要 C 基因的表达产物酰基化激活后才能结合到靶细胞上发挥其溶血活性和细胞毒性。但是 apxIA 的表达产物,经过试验证实具有免疫活性,产生的抗体可以中和毒素 ApxI^[6,7]。Prideaux 等 (1998) 利用不含毒素的 APP 7 型缺失株表达了 ApxI,攻毒试验也显示了较好的保护效果^[8]。

但用毒素作为疫苗添加成份是否会对动物产生毒害作用,一直是人们对毒素疫苗关注的焦点问题,而且 APP 的毒素作为疫苗添加成份是否对动物产生毒性反应尚未见报道。在此,我们用大肠杆菌表达了 APP 的 apxIA 基因,并以小鼠为模型,研究了表达产物的毒性反应及其作为疫苗添加成份的免疫原性和保护性,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 APP 血清 10 型菌株由本实验室保存,表达质粒 pET-apxIA 由本实验室构建。

1.2 仪器及试剂

血常规测定仪及血液生化仪由华中农业大学动物医学院临床实验室提供。血液生化试剂购自中生北控生物科技股份有限公司。弗氏佐剂、十二烷基肌胺酸钠 (N-lanrayl sarcosine Na Salt, SKL), Sigma 公

司, IPTG 为 Promega 产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, SouthernBiotech 公司产品,溶菌酶以及氧化型、还原型谷胱甘肽、聚乙二醇 (polyethyleneglycol 4000, PEG4000) 购于北京原平皓生物技术有限公司。

1.3 实验动物

18 ~ 20g 昆明鼠购自湖北省医学科学院,共 72 只,随机分成 4 组,每组 18 只,雌雄各半,即天然毒素组、复性重组蛋白组、粗提包涵体组和 PBS 空白组,用作小鼠急性毒性实验。14 ~ 16g 雌性昆明小鼠,共 48 只,随机分成 4 组,每组 12 只,同样分成四组,用作小鼠保护性实验。

1.4 天然毒素 ApxI 的提取及毒素抗体 ELISA 方法的建立

按文献 [10] 的方法进行。用 TSB 培养基在 37℃ 培养 APP 10 型菌株 6h,利用 55% 饱和硫酸铵沉淀上清,提取培养物上清中的毒素 ApxI,用猪阴、阳性血清进行方阵滴定,确定最佳抗原包被浓度、最佳血清稀释度。之后用确定的最佳抗原包被浓度包被 96 孔聚苯乙烯 ELISA 板,进行多份阴性血清检测,以 $OD_{600} \geq 2x$ 为阳性,用于检测免疫后采集的小鼠血清抗体效价。

1.5 表达蛋白的提取

用鉴定的 pET-apxIA 质粒,转化 BL21,挑取单个菌落,于 37℃ 培养至对数生长期 ($OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$),加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,进行 3h 的诱导表达,收集菌体,用超声波细胞破碎仪破碎细胞,离心收集沉淀即包涵体,一部分包涵体用 SKL 变性,同时去除沉淀中的细胞碎片,然后加入氧化型、还原型谷胱甘肽、聚乙二醇,在 TE Buffer 中透析以缓慢复性;另一部分不作任何处理,作为粗提包涵体使用,提取的蛋白分装置于 -20℃ 保存。蛋白纯度用 SDS-PAGE 分析,浓度用紫外分光光度计测定。

1.6 小鼠急性毒性试验

腹腔注射蛋白 200 μ g/只,即 10 倍的免疫剂量,每只 400 μ L。(1)一般临床观察:包括动物的外表特征和行为活动、精神状况及体重等。体重每两天测 1 次,其他每天至少观察 1 次。(2)每组取雌雄各 3 个样本,分别于注射后 24h、7d、14d 摘眼球放血处

死,并进行血常规、血液生化测定以及剖检。血常规检测:包括红细胞计数(Red blood cell count, RBC)、血红蛋白(Hemoglobin assay, HGB)、白细胞计数(White blood cell count, WBC)、血小板计数(Platelet count, PLT)等项目;血液生化检测:包括谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST/GOT)、谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT/GPT)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、血糖(Glucose, GLU)、总蛋白(Total protein, TP)、白蛋白(Albumin, ALB)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)等项目。

(3)病理学检查:取处死小鼠实质性器官包括心、肝、脾、肺和肾称重,计算脏器系数。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 q 检验。以 $P < 0.05$ 评价差异显著性,用 a、b 标注。

1.7 小鼠的免疫及攻毒

各蛋白用等量弗氏佐剂乳化,每只取 0.2mL 皮下多点免疫,含提取的目的蛋白约 20 μ g。2 周后加强免疫 1 次。对照组用 PBS 缓冲液乳化后免疫。二免 2 周后用致死剂量(1.09×10^8 cfu)的 APP-10 腹腔攻毒。

2 结果

2.1 毒素蛋白及包涵体的提取

按照实验室常规的方法提取包涵体,复性后,取少量进行 SDS-PAGE 电泳以检测其纯度。结果如图 1,1 为天然毒素,2 为复性处理后的重组蛋白,大小都在 105 ~ 110 kD 之间。

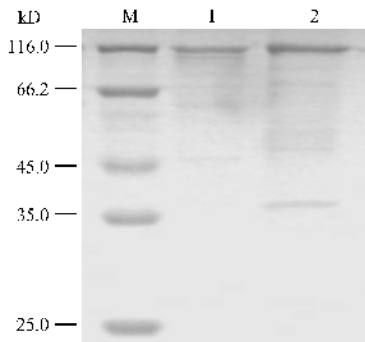


图 1 天然毒素和复性重组蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the natural and refolded recombinant protein

M: protein marker; 1: natural ApxI; 2: refolded recombinant protein.

2.2 小鼠急性毒性试验

2.2.1 一般临床表现及体重变化:见图 2。腹腔注射蛋白后,天然毒素组表现精神沉郁,不食,24h 后恢复正常;复性重组蛋白组有轻微的精神沉郁,并很快恢复正常,其他组均表现良好。第二天体重结果显示,天然毒素组与空白组比较差异显著($P < 0.05$),复性重组蛋白组和粗提包涵体组的体重与空白组比较差异不显著($P > 0.05$);从第 4 天开始,组间比较差异不显著($P > 0.05$)。

快恢复正常,其他组均表现良好。第二天体重结果显示,天然毒素组与空白组比较差异显著($P < 0.05$),复性重组蛋白组和粗提包涵体组的体重与空白组比较差异不显著($P > 0.05$);从第 4 天开始,组间比较差异不显著($P > 0.05$)。

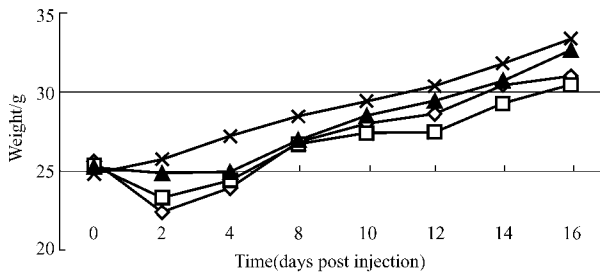


图 2 三种蛋白对小鼠体重的影响 (n = 6)

Fig. 2 The effects of three proteins on the weight of mice

-◇- natural ApxI; -□- refolded recombinant protein; -▲- crude inclusion bodies; -*- negative control.

2.2.2 血液学检查:见表 1。24h 时,复性重组蛋白组的 HGB 与其它组比较差异显著($P < 0.05$),而 3 个蛋白组的 PLT 与空白组比较差异显著($P < 0.05$)。7d 时,天然毒素组的 WBC 与其它组比较差异显著($P < 0.05$)。14d 时,各项指标与空白对照组相比较差异不显著($P > 0.05$)。

2.2.3 血液生化检查:见表 2。24h 时,天然毒素组的 GPT 指标与其它组比较差异显著($P < 0.05$),且天然毒素组 BUN 与其他组比较差异显著($P < 0.05$)。7d 时复性重组蛋白组的 ALP 与其它组比较差异显著($P < 0.05$)。14d 时,各组均恢复正常,和空白组比较差异不显著,此时,各组的 GOT 和 GLU 这两项指标有所增高,组间比较差异不显著,但未见与之相关的病理学改变。

2.2.4 病理学检查:见表 3。每次眼眶放血致死,进行系统解剖,腹腔注射 24h 解剖可见到天然毒素组小鼠的肾肿大,肺部有严重的出血;复性重组蛋白组个别小鼠的脾出现轻微肿大,肺部正常。在第 7 天时解剖可见,天然毒素组的肝、脾、肺的状况与其它组比较差异显著,而其它组之间没有显著性差异。第 14 天解剖结果表现,各组间比较差异不显著。

2.3 小鼠免疫保护性试验

2.3.1 毒素 ELISA 条件的确定:根据方阵滴定可知 ApxI 的最佳包被浓度为 1.249 μ g/mL,最佳的血清稀释度为 1:40,羊抗鼠 IgG 稀释度为 1:5000,ELISA 阴阳界限值为 0.4。

表 1 三种蛋白对小鼠血常规的影响(*n* = 6)
Table 1 The effects of three proteins on the heamatological indexes of mice

Grouping		WBC (10 ⁹ /L)	RBC (10 ¹³ /L)	HGB (g/dL)	PLT (10 ⁹ /L)
24h	1	5.77 ± 2.95	8.24 ± 1.31	8.07 ± 1.33 ^a	749.67 ± 20.65 ^a
	2	8.84 ± 1.23	7.80 ± 0.66	16.50 ± 1.68 ^b	816.00 ± 114.64 ^a
	3	8.20 ± 0.36	9.80 ± 2.61	8.67 ± 0.41 ^a	921.33 ± 188.00 ^b
	4	9.57 ± 4.54	8.60 ± 1.03	8.50 ± .35 ^a	1172.00 ± 120.21 ^b
7d	1	5.67 ± 1.67 ^a	8.23 ± 1.40	7.70 ± 1.22	1284.67 ± 207.56
	2	8.95 ± 1.17 ^b	7.63 ± 0.65	8.43 ± 0.86	929.00 ± 94.75
	3	8.17 ± 0.92 ^b	7.33 ± 1.76	8.93 ± 1.53	1011.50 ± 161.93
	4	9.00 ± 1.00 ^b	8.57 ± 0.55	9.90 ± 0.41	1111.67 ± 137.41
14d	1	6.97 ± 1.36	9.63 ± 0.44	9.17 ± 0.38	ND
	2	7.82 ± 1.85	9.03 ± 0.95	8.57 ± 1.25	ND
	3	7.60 ± 0.72	7.27 ± 1.67	8.46 ± 1.78	ND
	4	6.17 ± 0.85	7.30 ± 2.11	10.11 ± 0.69	ND

1 : natural ApxI ; 2 : refolded recombinant protein ; 3 : crude inclusion bodies ; 4 : negative control ; ND : not detection .

表 2 三种蛋白对小鼠血液生化的影响(*n* = 6)
Table 2 The effects of three proteins on the serum biochemical indexes of mice

Grouping		GPT(u/L)	GOT(u/L)	ALP(u/L)	GLU(mmol/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	BUN(mmol/L)
24h	1	39.10 ± 7.27 ^a	3.70 ± 0.36	56.97 ± 26.86	5.67 ± 0.58	ND	34.65 ± 6.35	16.32 ± 9.38 ^a
	2	29.57 ± 8.06 ^b	4.42 ± 1.07	36.17 ± 15.66	5.00 ± 1.00	75.33 ± 5.77	36.10 ± 1.82	10.20 ± 0.51 ^b
	3	34.92 ± 3.10 ^b	ND	44.95 ± 2.19	6.00 ± 0.31	ND	33.42 ± 1.29	11.05 ± 1.56 ^b
	4	23.27 ± 11.22 ^b	3.84 ± 0.49	67.63 ± 5.38	6.57 ± 0.69	70.67 ± 16.50	33.50 ± 1.85	12.58 ± 2.52 ^b
7d	1	30.26 ± 10.67	1.86 ± 1.06	77.77 ± 8.29 ^a	7.33 ± 0.58	59.00 ± 6.00	28.90 ± 3.28	7.82 ± 1.18
	2	22.11 ± 8.79	2.45 ± 1.48	97.63 ± 5.38 ^b	6.00 ± 1.00	67.33 ± 8.33	31.03 ± 5.93	7.99 ± 1.79
	3	32.59 ± 7.27	3.49 ± 0.32	84.99 ± 33.14 ^a	6.00 ± 0.65	61.33 ± 6.81	28.39 ± 6.76	9.01 ± 2.36
	4	27.93 ± 9.24	ND	50.64 ± 31.33 ^a	6.67 ± 1.15	62.33 ± 11.15	26.55 ± 4.52	8.67 ± 0.88
14d	1	40.74 ± 30.14	195.00 ± 69.20	216.27 ± 29.74	6.00 ± 0.65	58.33 ± 4.04	32.80 ± 1.47	10.37 ± 2.06
	2	30.73 ± 32.92	220.00 ± 96.73	267.27 ± 88.06	5.33 ± 0.58	64.67 ± 8.50	34.10 ± 2.04	11.22 ± 0.51
	3	35.63 ± 9.30	192.05 ± 29.63	202.90 ± 79.95	6.00 ± 0.23	50.50 ± 0.71	29.81 ± 4.84	11.90 ± 3.40
	4	29.10 ± 1.21	273.73 ± 100.49	190.99 ± 134.78	6.33 ± 2.52	55.67 ± 20.03	30.44 ± 0.50	11.73 ± 2.88

1 : natural ApxI ; 2 : refolded recombinant protein ; 3 : crude inclusion bodies ; 4 : negative control ; ND : not detection .

表 3 三种蛋白对小鼠脏器系数(%)的影响(*n* = 6)
Table 3 The effects of three Proteins on the organ indexes of mice

Grouping		Organ indexes/ %				
		Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney
24h	1	0.49 ± 0.12	6.41 ± 0.11	0.48 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.05 ^a	1.40 ± 0.16 ^a
	2	0.52 ± 0.08	6.68 ± 0.45	0.47 ± 0.06 ^a	0.85 ± 0.08 ^b	1.30 ± 0.05 ^{ab}
	3	0.56 ± 0.07	6.68 ± 0.53	0.37 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.07 ^b	0.41 ± 0.10 ^{ab}
	4	0.54 ± 0.02	6.18 ± 0.09	0.30 ± 0.03 ^b	0.77 ± 0.11 ^b	0.78 ± 0.04 ^b
7d	1	0.53 ± 0.08	7.00 ± 0.09 ^a	1.00 ± 0.06 ^a	1.12 ± 0.27 ^a	0.81 ± 0.15
	2	0.49 ± 0.04	5.95 ± 0.22 ^b	0.58 ± 0.21 ^b	0.76 ± 0.01 ^b	1.07 ± 0.14
	3	0.53 ± 0.07	6.20 ± 0.24 ^b	0.46 ± 0.06 ^b	0.75 ± 0.13 ^b	1.21 ± 0.06
	4	0.52 ± 0.03	6.06 ± 0.20 ^b	0.41 ± 0.09 ^b	0.66 ± 0.07 ^b	0.92 ± 0.19
14d	1	0.46 ± 0.01	7.11 ± 1.04	0.80 ± 0.1	0.74 ± 0.11	1.25 ± 0.23
	2	0.53 ± 0.11	6.21 ± 0.43	0.54 ± 0.13	0.85 ± 0.02	1.24 ± 0.03
	3	0.52 ± 0.08	6.25 ± 0.82	0.66 ± 0.09	0.79 ± 0.08	1.04 ± 0.21
	4	0.47 ± 0.04	6.03 ± 0.27	0.42 ± 0.06	0.75 ± 0.06	0.89 ± 0.03

1 : natural ApxI ; 2 : refolded recombinant protein ; 3 : crude inclusion bodies ; 4 : negative control .

2.3.2 两次免疫后抗体水平变化 :将血清作 10 倍稀释后再作倍比稀释 ,最大稀释度为 1 : 20480 ,以 OD₆₀₀ 大于 0.4 的最大稀释度为血清抗体效价。见表 4 ,首免 2 周后及二免 2 周后小鼠血清均为阳性 ,

且二免后 ApxI 抗体均显著升高。
2.3.3 攻毒结果 :见表 4 ,二免 2 周后试验组和对照组分别用致死剂量的 App-10 型 ,即 1.09 × 10⁸ cfu 进行腹腔攻毒。对照组的小鼠于 3h 内全部死亡。天

表 4 两次免疫后血清抗体效价和攻毒保护率
Table 4 The serum antibody levels and protection rates of mice after two times of vaccination

Grouping (n = 12)	The first serum sampling		The second serum sampling		Protection efficacy(%)
	ApxI titer(1 :)	Positive ratio(%)	ApxI titer(1 :)	Positive ratio(%)	
1	2560-20480	100	> 20480	100	10/12(83.3)
2	320-10420	100	≥20480	100	9/12(75.0)
3	160-10424	100	≥20480	100	6/12(50.0)
4	< 40	0	< 40	0	0/12(0)

1 : natural ApxI ; 2 : refolded recombinant protein ; 3 : crude inclusion bodies ; 4 : negative control.

然毒素组死亡 2 只 ,保护率为 88.3% ;复性重组蛋白组死亡 3 只 ,保护率为 75% ;包涵体组死亡 6 只 ,保护率为 50% ;其余小鼠攻毒后 24h 精神沉郁 ,不食 ,扎堆 ,之后逐步恢复正常 ,第 3 天全部恢复正常。

3 讨论

本试验血常规指标选择了 WBC、RBC、HGB、PLT 及血液生化指标选择了 GPT、GOT、ALP、GLU、TP、ALB、BUN 有其一定的目的 ,避免重复检测。对 WBC、RBC、HGB、PLT 的检测以确定是否有贫血的情况出现及是否存在感染。因为我们所用的蛋白可能有溶血作用 ,而检测结果显示 ,天然毒素能引起轻微的贫血 ,如 24h 时 ,天然毒素组的白细胞计数下降 ,与我们所做的溶血试验相一致。对 GPT、GOT 的检测 ,GOT、GPT 是人体内各种脏器(如 :肝脏、心脏、肌肉等)细胞内的重要酶 ,参与体内重要氨基酸的合成 ,他们在体内维持稳定的低量 ,以 GPT 代表肝脏机能 ,TP、ALB 代表蛋白质合成的稳定性 ,也是肝脏机能的一个表现 ;检测 ALP 主要为了检测各蛋白对肝胆系统的影响 ;GLU 指标代表糖代谢状况 ,试验中各组蛋白在各时间内检测指标显示糖代谢正常 ;BUN 指标的检测为了验证我们的蛋白对肾脏是否存在影响 ,24h 时天然毒素组的 BUN 增高 ,与所测相应的肾脏系数结果相一致。重组蛋白组未见明显的毒性反应 ,个别指标与对照组有差异 ,且未见与之对应的病理学改变 ,应为偶发现象。

急性毒性试验中 ,从生长状况、血常规、血液生化指标及解剖结果可见 ,在 24h 时 ,天然毒素组与空白组比较差异显著 ,天然毒素组的 BUN 及肾脏系数增高 ,重组蛋白组与空白组差异不显著 ;在 7d 时 ,天然毒素组有一定的恢复 ;14d 时各组表现基本一致 ,各蛋白组表现均正常。三种蛋白质所产生的影响的大小依次为天然毒素、复性后的重组蛋白、包涵体 ,似乎说明与蛋白质的构象有关。天然毒素具有天然构象 ,复性后部分恢复天然构象而没有毒性 ,包涵体不具有天然构象 ,没有毒性且免疫保护性较低。

Kamp EM 等(1997)和 Boekema BK 等(2004)证明 App 菌株分泌的 ApxI 能使肺部细胞病变^[5,11]。根据 ApxI 溶血活性的检测 ,天然毒素有很高的溶血效价 ,而 ApxIA 基因表达蛋白没有溶血活性 ,也说明表达蛋白没有毒性。

利用 APP 培养物上清提取的天然毒素建立 ELISA 方法 ,对试验小鼠的血清抗体检测发现 ,表达毒素产生的抗体能跟天然毒素很好的反应 ,证明表达的毒素蛋白具有很好的生物学活性。从抗体检测和攻毒结果来看 ,复性重组蛋白较粗提包涵体能诱发更强的保护力。

为了验证表达的 ApxI 的免疫原性及作为疫苗添加成分的可能性 ,采用了只分泌 ApxI 的 APP-10 进行攻毒 ,避免了其它毒素对攻毒结果的干扰。从试验结果来看 ,表达的 ApxI 对只分泌 ApxI 的 APP-10 具有较好的保护作用。而且 ,国内外的研究都证明不同血清型分泌的 ApxI 抗原性基本相同 ,可以起到交叉保护的作用。这里的试验也证明了这一点 ,我们表达的 ApxIA 基因来源于毒性极强的 APP-1 菌株 ,从而为类毒素疫苗的交叉保护提供了理论依据。

原核表达操作过程简单 ,表达蛋白易于提取且成本低廉 ,工艺流程简单 ,易于大规模的生产。从试验结果来看 ,表达蛋白注射小鼠后没有毒性反应 ,而且免疫后具有良好的抗原性和较好的保护性 ,表明我们的复性重组蛋白可以作为一种良好的疫苗添加成份来提高胸膜肺炎疫苗的保护力 ,从而为该病的控制和根除提供保障。

REFERENCES(参考文献)

[1] Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* , 1995 , 3 (7) : 257 - 261
[2] Liu J J (刘建杰) , He Q G (何启盖) , Chen H C (陈焕春) *et al.* Cloning , expression and establishment of the ELISA detection method of the apxICA gene of *actinobacillus pleuropneumoniae* . *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学) 2004 , 37 (1) : 148 -

- [3] Bosse JT , Janson H , Sheehan BJ *et al.* *Actinobacillus pleuropneumoniae* : pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* , 2002 , **4** (2) 225 – 235
- [4] Schaller A , Kuhn R , Kuhnert P *et al.* Characterization of apxIVA , a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* , 1999 , **145** (Pt 8) 2105 – 2116
- [5] Boekema BK , Kamp EM , Smits MA , *et al.* Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet Microbiol* , 2004 , **100** (1-2) :17 – 23
- [6] Seah JN , Frey J , Kwang J. The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. *Infect Immun* , 2002 , **70** (11) 6464 – 6467
- [7] Burdychova R , Rychtera M , Horvath R *et al.* Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene coding for Apx I protein in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* , 2004 , **230** (1) 9 – 12
- [8] Prideaux CT , Pierce L , Krywult J *et al.* Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol* , 1998 , **37** (5) 324 – 332
- [9] Jansen R , Briaire J , Smith HE *et al.* Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect Immun* , 1995 , **63** (1) 27 – 37
- [10] Nielsen R , van den Bosch JF , Plambeck T *et al.* Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* , 2000 , **71** (1-2) 81 – 87
- [11] Kamp EM , Stockhofe-Zurwieden N , van Leengoed LA *et al.* Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun* , 1997 , **65** (10) 4350 – 4354