

重组 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素保护性抗原的制备 及初步免疫保护作用研究

林明辉¹ 荫俊^{2*} 邢洪光² 侯晓军² 王慧² 宋伟²

¹(昆明总医院检验科,昆明 650032)

²(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘 要 诱导表达重组工程菌 pBV/cpa408 后,将表达菌体超声破碎,上清经 80% 饱和硫酸铵一次沉淀,经透析,上凝胶过滤层析柱进行分离纯化,薄层凝胶扫描结果显示,纯化的蛋白纯度达 95% 以上;用纯化蛋白免疫昆明小鼠,以 1.0MLD₁₀₀ 腹腔进行攻击,被免疫小鼠获得了 100% 的保护。

关键词 α 毒素,保护性抗原,免疫保护作用

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0063-03

在成功构建重组高效表达工程菌株 pBV220/cpa408 的基础上,实现了 cpa408 基因(A 型产气荚膜梭菌 α 毒素 C 端基因)在大肠杆菌中的高效表达(表达量达 43.75%),且表达形式为可溶性的^[1]。为进一步研究 cpa408 基因表达产物的免疫原性并对其抗体保护性作用做出评价,对表达产物进行了分离纯化,以纯化产物进行昆明小鼠主动免疫保护实验,从而为 α 毒素疫苗及抗毒素的研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组高效表达工程菌 pBV/cpa408,自己构建;A 型产气荚膜梭菌菌株 NCTC64609,购自中国生物制品检定所。

1.1.2 仪器与试剂 pH 8.0 TE 裂解液、饱和硫酸铵溶液、pH 7.4 PBS 缓冲液、1.0mol/L NaOH,为分析纯试剂;福氏佐剂,购自宝生物公司;Sephacryl S-100 凝胶过滤层析柱,AKTAPurifier,为 Amersham 产品。

1.1.3 实验动物 昆明小鼠(体重 18g),由军事医学科学院丰台动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 重组高效表达工程菌 pBV220/cpa408 的诱导表达 以 1:50 的比例接种重组表达菌种于 Amp + LB 培养液中,30℃活化后,42℃诱导表达 3~5h。离心

集菌,-20℃保存。

1.2.2 表达蛋白的纯化 诱导表达菌液离心沉淀后,按每克湿菌加入 3.0mL pH8.0 TE 裂解缓冲液溶解菌体,置冰浴中超声破碎至菌液不再粘稠。用 80% 饱和硫酸铵沉淀超声破碎上清,离心后,沉淀经 pH7.4 PBS 缓冲液透析,选择 Pharmacia Sephacryl S-100 预装凝胶过滤层析柱(柱体积为 200cm³),固定于 AKTA-Purifier 仪上,5 倍柱体积 pH7.4PBS 缓冲液平衡柱子至 UV 值为 0,上样 1%~5% 柱体积样品,按照仪器要求设定 0.3cm/min 的流速开始分离纯化,收集各分离成分后,SDS-PAGE 鉴定。薄层凝胶扫描仪扫描纯化目的蛋白纯度。

1.2.3 动物免疫实验 将一定量纯化 cpa408 蛋白与等体积福氏完全佐剂混匀并乳化完全后,以 1.0 mg/kg 剂量腹腔注射 8 只昆明小鼠(体重 18g,雌雄各半),并同时设立对照组(昆明小鼠 8 只,雌雄各半,体重 18g);2 周后,取适量纯化的 cpa408 蛋白与等体积不完全福氏佐剂混匀并乳化完全后,以 1/2 初次免疫剂量腹腔注射加强免疫。

1.2.4 抗体滴度值测定 分别采集初次及二次免疫后 1 周昆明小鼠尾静脉血,用 A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609 培养上清包被酶联板,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,ELISA 法测定小鼠尾静脉血抗体滴度。

1.2.5 攻毒实验 取静止厌氧培养 2 周的 A 型产气荚膜梭菌菌株 NCTC64609 浓缩培养上清,分不同剂量腹腔注射昆明小鼠,筛选确定最小致死剂量(MLD₁₀₀)。以 1.0MLD₁₀₀腹腔注射 2 次免疫 4 周后昆明小鼠,观察免疫保护效果。

2 结果

2.1 诱导表达蛋白的纯化

SDS-PAGE 分析显示,诱导表达菌体超声破碎上清经 80% 饱和硫酸铵沉淀后得到了浓缩(图 1),沉淀物经透析后,进一步以凝胶过滤层析方法有效地纯化到了目的蛋白(图 2)。经薄层凝胶扫描分析,纯化到的蛋白纯度达 95% 以上(图 3)。

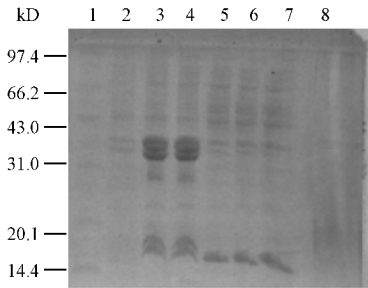


图 1 80% 饱和硫酸铵沉淀后上清及沉淀 SDS-PAGE 鉴定
Fig.1 SDS-PAGE of protein pipeted by 80%(NH₄)₂SO₄
1 :Marker ; 2 :Control ; 3 ~ 4 : Pipetion after supersoniced ; 5 ~ 6 : Supper fluid after supersoniced ; 7 :Pipetion after 80% (NH₄)₂SO₄ ; 8 Supper fluid after 80%(NH₄)₂SO₄

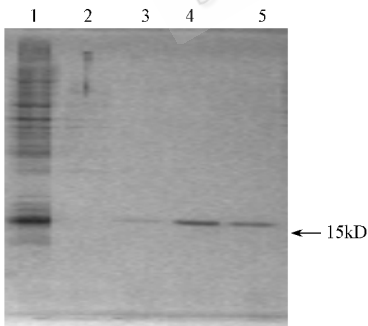


图 2 凝胶过滤层析纯化分离成分 SDS-PAGE 鉴定
Fig.2 SDS-PAGE of Purified protein
1 : pBV/cpa408 induced by 42℃ ; 2 ~ 5 :The protein purified

2.2 昆明小鼠免疫攻毒实验

2.2.1 昆明小鼠尾静脉血抗体滴度测定 :分别于初次及二次免疫后 1 周采集昆明小鼠尾静脉血,ELISA 法测定抗体滴度,结果初次免疫后 1 周抗体滴度值为 1:800,而二次免疫后 1 周抗体滴度值则达 1:6400 (表略)。

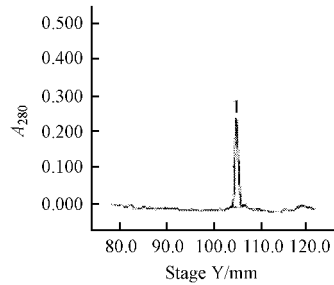


图 3 纯化蛋白薄层凝胶扫描结果
Fig.3 Purification of the purified protein

2.2.2 昆明小鼠免疫攻毒实验 :以 1.0 倍 MLD₁₀₀ 剂量 腹腔攻击二次免疫 4 周后及对照组昆明小鼠各 8 只,结果免疫组 8 只小鼠全部存活,获得了 100% 的保护,而对照组 8 只小鼠全部死亡(表略)。

3 讨论

成功克隆了 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素 C 端基因(cpa408 基因)并实现在大肠杆菌中的高效表达后,高表达的菌液离心沉淀后,菌体经超声破碎,上清用 80% 饱和硫酸铵一次沉淀浓缩后,沉淀蛋白用 pH7.4PBS 缓冲液透析后,上凝胶过滤层析柱,即得纯度达 95% 以上的表达目的蛋白,这与重组工程菌 pBV/cpa408 的高效可溶表达有关。

用制备好的表达目的蛋白免疫昆明小鼠后,以 1.0 倍 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌浓缩培养上清腹腔攻击,被免疫小鼠获得了 100% 的保护。文献报道^[2,3,5,6] α 毒素中第 11、68、126、136、148 位上的组氨酸对其具有活性至关重要,68 位或 148 位组氨酸残基被其它氨基酸残基取代,即可丧失全部的溶血性和致死性。文献^[7]报道 α 毒素中第 56、130、152 位上的氨基酸被其它氨基酸残基取代,就可丧失 α 毒素的溶血活性。本研究所克隆的 cpa408 基因为 152 位氨基酸残基后面的基因,即去掉了在 α 毒素中起关键作用的 56、68、130、148 及 152 位氨基酸残基,从理论上讲,该克隆基因的表达产物就可丧失 α 毒素本身的溶血性和致死性。昆明小鼠 cpa408 基因表达产物主动免疫保护实验结果证明,cpa408 基因表达产物无 α 毒素本身的致死性且具有良好的免疫原性,其免疫昆明小鼠后产生的抗体效价值在第 1 周时就达 1:800,到第 3 周(21d)时达 1:6400,1MLD 腹腔攻击后,被免疫小鼠获 100% 的保护,揭示所产生的抗体具有良好的免疫保护作用,说明 cpa408 基因可作为保护性抗原的候选基因,其表达产物为保护性抗原。

甲醛脱毒的产气荚膜梭菌 α 毒素类毒素免疫羊后,有保护作用,然而这一类毒素中可能还含有产气荚膜梭菌的其它抗原成分,且其最大问题在于类毒素诱发抗体产生所需时间通常超过气性坏疽症状出现的时间。相比之下,本研究所分离纯化的 cpa408 保护性抗原,容易制备且纯度高,避免了使用甲醛脱毒的步骤,不再含有其它被完全或部分脱毒的产气荚膜梭菌毒素成分,使用起来就更加安全,免疫原性也更好。这在 cpa408 表达产物昆明小鼠主动免疫实验过程中未观察到其对昆明小鼠有任何不良影响。文献报道^[8],所克隆表达的 950bp 保护性片段对小鼠模型有保护作用,其表达产物为包涵体形式,表达量为 33.21%;而本研究中的 cpa408 保护性片段表达形式为可溶性的,表达量为 43.75%,这在保护性抗原制备过程中就省却了变性、复性的繁琐步骤,简化了纯化分离过程,43.75% 的高表达量进一步加大了 cpa408 保护性抗原制备的简便性并有助于提高分离纯度。

cpa408 基因表达蛋白具有良好免疫原性,其免疫昆明小鼠后产生的抗体对 1.0MLD 腹腔攻击具有 100% 的保护作用,这就为更大剂量的免疫保护实验及进一步 α 毒素疫苗及抗毒素的研究奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Lin MH (林明辉), Yin J (荫俊), Wang H (王慧) *et al.* High Ex-

pression of recombinant alpha-toxin's c-terminal gene of *Clostridium perfringens* type A in *E. coli*. *Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志) 2003 **23** (12): 60-62

[2] Nagaham M, Okagawa Y *et al.* Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Bacteriol*, 1995 **177** (5): 1179-1185

[3] Guillouard I, Garnier T *et al.* Use of site-directed mutagenesis to probe structure-function relationships of alpha-toxin from *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, 1996 **64** (7): 2440-2444

[4] Alape-Giron A, Flores-Dia M *et al.* Identification of residues critical for toxicity in *Clostridium perfringens* phospholipase C, the key toxin in gas gangrene. *Eur J Biochem*, 2000 **267**: 5191-5197

[5] Walker, Holley T *et al.* Identification of residues in the Carboxy-Terminal Domain of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (phospholipase C) which are required for its biological activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000 **384** (1): 24-30

[6] Naylor CE, Eaton JT *et al.* Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat Struct Biol*, 1998 **5** (8): 738-746

[7] Nagahama M, Nakayama T *et al.* Site specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes the loss of the hemolysis. *J Mol Biol*, 1999 **294** (3): 757-760

[8] Xu CH (许崇波), Zhu P (朱平). High expression of alpha-toxin's protective antigen gene of *Clostridium perfringens* type A. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报), 1999 **19** (1): 29-32

Preparation of Alpha-toxin's Protective Antigen of *Clostridium perfringens* Type A and Research for Its Primary Immunological Protective Function

LIN Ming-Hui¹ YIN Jun^{2*} XING Hong-Guang² Hou Xiao-Jun² WANG Hui² SONG Wei²

¹(Laboratory Department of Kunming General Hospital, Kunming 650032, China)

²(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract Induced by 42°C, the recombinant engineering bacterial pBV/cpa408 was highly expressed. After having been pelleted by 80% (NH₄)₂SO₄ and dialysed, the expressed protein was isolated and purified by the gel filtration chromatography. Then according to an amount of 1.0mg/kg, the Kunming Mice (body weighted 18g) were immunized with the purified protein by intraperitoneal inoculation. One week after the first enhanced immunization, the Kunming Mice were attacked with an amount of 1.0MLD alpha-toxin, in which the eight mice immunized all survive and the control group all died. During the period of immunization, the titre of the mouse's serum antibody was measured by ELISA. One week after the first immunization, the titre of the mice's serum antibody was 1:800, but that of one week after the first enhanced immunization reached to 1:6400.

Key words alpha-toxin, protective antigen, preparation, immunological protective function

Received: 07-16-2003

This work was supported by Science and Research Foundation of Military Medical Health (No. 01MB059).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948531, E-mail: june0482@sina.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>