

腐败梭菌 α 毒素基因的克隆表达及其类毒素的免疫原性研究

The Study on the Cloning and Expression of Alpha Toxin Gene of *Clostridium septicum* and the Immunity of the Toxoid

张 燕^{1,2} 边艳青¹ 赵宝华^{1*}

ZHANG Yan^{1,2}, BIAN Yian-Qing¹ and ZHAO Bao-Hua^{1*}

1. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

2. 石家庄市二中, 石家庄 050000

1. College of Life Science Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2. The Number Two Middle School in Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China

摘 要 根据 GenBank 公布的腐败梭菌 α 毒素基因序列, 设计了一对引物, 并以腐败梭菌基因组为模板, 经 PCR 特异性扩增出腐败梭菌菌株 HeB01 的 α 毒素基因。序列分析表明, 该基因产物大小为 1323bp, 与 GenBank 报道的 4 个腐败梭菌参考菌株 α 毒素基因序列同源性高于 99.5%。将扩增的 α 毒素基因定向克隆到原核表达载体 pQE30 中, 得到重组质粒 pQE30- α , 将重组质粒转化大肠杆菌 M15 中, 得到重组菌株 M15(pQE30- α)。经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析可见表达的 48 kD 特异条带; Western blot 和 ELISA 检测实验表明, 表达的 α 毒素与抗天然 α 毒素抗体发生特异性反应, 说明 α 毒素蛋白具有较好的免疫原性。将表达的 α 毒素蛋白制成类毒素疫苗, 免疫小鼠后, 具有一定的保护能力, 表明该重组菌株有望作为腐败梭菌基因工程类毒素疫苗的候选生产菌株。

关键词 α 毒素, 类毒素, 免疫原性

中图分类号 S858.317 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0067-06

Abstract In order to amplify alpha toxin gene of *Clostridium septicum* HeB01 strain, one pair of primers was designed according to the GenBank sequence, and a 1323bp alpha toxin gene fragment was obtained by PCR. Sequence analysis indicated that the homology of the nucleotide sequence of HeB01 strain to those other reference strains was more than 99.5%. The expression plasmid pQE30- α was constructed by inserting alpha toxin gene into the prokaryotic expression vector pQE30. The plasmid pQE30- α was transformed into *E. coli* M15 and the recombinant strain M15(pQE30- α) was obtained. The alpha toxin was highly expressed when the recombinant strain M15(pQE30- α) was induced by IPTG. The specific 48 kD protein was detected SDS-PAGE and the immunogenicity of the expressed alpha toxin was confirmed by Western blot and ELISA. The expressed alpha toxin was transformed into alpha toxoid vaccine by adding 0.3% formaldehyde into alpha toxin. The protective immune response was proved after the mice was immunized with alpha toxoid vaccine. The results showed that the recombinant strain M15(pQE30- α) could be as a candidate of alpha toxoid vaccine to provide protective immune response against *clostridium septicum* infection.

Key words *clostridium septicum*, alpha toxin, toxoid, immunity

Received: August 8, 2006; Accepted: September 21, 2006.

This work was supported by a grant from Natural Science Fund of Hebei Education Office (No. 2005131).

* Corresponding author. Tel: +86-311-86268434; Fax: +86-311-86268313; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

河北省教育厅自然科学基金项目(No.2005131)资助。

腐败梭菌是一个厌氧致病微生物,对畜禽养殖业危害极大^[1]。腐败梭菌所引起的疾病一般为急性传染病,病程短,死亡快,来不及治疗,必须加强平时防疫工作^[2]。但国内广泛使用的灭活菌苗制备复杂,效果不尽理想。因此,该研究采用基因工程手段制备 α 类毒素疫苗具有十分重要的理论意义和应用前景。国内外许多研究表明,腐败梭菌可分泌多种毒素和扩散因子,其中的 α 毒素和致病性有密切关系。它是一个分子量大约为48kD的细胞溶解蛋白分子,同时它又具有很强的抗原性^[3]。因此,对 α 毒素基因的研究将对腐败梭菌引起疾病的诊断、预防和治疗具有重要的意义。为了制备高保护效力的 α 类毒素疫苗,本实验扩增得到了 α 毒素基因,构建了原核表达载体,并对它的反应原性和免疫原性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

腐败梭菌菌株 HeB01 由吉林大学柳增善教授惠赠; pUCm-T 载体购自上海生工生物技术有限公司; 表达载体 pQE30, 受体菌 *E. coli* M15 由本校细胞组惠赠; 质粒 pQE30 共 3462bp, 多酶切位点上游含有噬菌体 T5 启动子和两个 Lac 操纵子序列以及 ribosome 结合和识别位点 RBS II。

1.2 腐败梭菌 HeB01 的培养

将配制好的牛肉膏蛋白胨培养基分装于试管中,每管 5mL,再往每个试管中加入一小片猪肝。121℃灭菌 20min。培养基经灭菌冷却后,随即接种腐败梭菌菌株 HeB01,再用无菌的石蜡油封闭液面。置于恒温培养箱中 37℃培养 24h,可见培养液变混浊。经灭菌的培养基若不立即使用,则可置于 4℃保存,但在接种前应将其置于沸水浴中再加热 10min,以除去溶氧,待冷却后,再行接菌^[4]。

1.3 腐败梭菌 α 毒素基因的克隆与序列分析

1.3.1 腐败梭菌 α 毒素基因的 PCR 扩增:根据 GenBank 公布的腐败梭菌 α 毒素基因序列而设计一对引物 P1 和 P2,引物序列分别为: P1: 5'-GAATTCATGTCAAAAAATCTTTT-3'; P2: 5'-CTGCAGTTAATTAATATCAATTTT-3'。以提取的腐败梭菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应在 50 μ L 体系中进行,扩增条件为: 94℃ 5min、94℃ 1min、45℃ 1min、72℃ 2min, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10min。

1.3.2 腐败梭菌 α 毒素基因的克隆:将 α 毒素基因 PCR 产物连接到 pUCm-T 载体上,反应体系: 回收的 α 毒素基因 PCR 产物 6 μ L, pUCm-T vector 0.8 μ L, T4 连接酶 1 μ L, 于 16℃ 连接过夜。将 5 μ L 连接产物转化到感受态细胞 DH5 α 中,经 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白菌落筛选,随机挑选白色菌落,提取质粒后进行 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切鉴定。

1.3.3 腐败梭菌 α 毒素基因的序列分析:将克隆的 α 毒素基因片段送上海生工生物技术有限公司进行序列测定。并采用 DNASTar 软件对基因序列进行同源性分析。

1.4 腐败梭菌 α 毒素基因原核表达载体的构建和表达

1.4.1 腐败梭菌 α 毒素基因的 PCR 扩增:根据表达载体 pQE30 的酶切位点和 α 毒素基因序列,设计另一对引物 P3 和 P4,引物序列为: P3: 5'-CGCGGATCCCATGTCAAAAAATCTTTT-3'; P4: 5'-ACGCGTCTGACTTAATTAATATCAATTTT-3'。以提取的 pUCm-T- α 质粒为模板进行 PCR 反应。PCR 反应在 50 μ L 体系中进行,扩增条件为: 94℃ 5min、94℃ 1min、45℃ 1min、72℃ 2min, 30 个循环,再 72℃ 延伸 10min。

1.4.2 腐败梭菌 α 毒素基因表达载体的构建:将 α 毒素基因 PCR 回收产物克隆到 pQE30 载体的 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点上,并转化到感受态细胞 DH5 α 中,在含氨苄青霉素的选择培养板上 37℃ 孵育过夜,酶切鉴定含重组质粒的阳性克隆菌。再将阳性重组质粒转入感受态细胞 M15 中,涂布于含氨苄青霉素和卡那霉素的培养板上。

1.4.3 重组菌株 α 毒素基因的诱导表达:重组菌接种于 5mL 含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 液体培养液中,37℃ 活化过夜后,按 2%(V/V) 接种于含氨苄青霉素和卡那霉素的新鲜 LB 液体培养液中,培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.6 ~ 1.0),加 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L 诱导表达重组蛋白,另一试管作为对照,于 20℃ 下继续培养 8h。收集菌体,重悬于 TE (pH8.0) 中,并加入等量的 2 \times 蛋白 buffer,煮沸 5min 后,进行 SDS-PAGE 分析^[5]。

1.4.4 表达产物在大肠杆菌细胞中的分布:取诱导的菌液 1mL,在冰浴中进行超声波破菌,每次超声 30s,间隔 30s,共超声 8 次。裂解后的菌液于 4℃ 5000r/min 离心 5min,分别收集上清和沉淀,取样进行 SDS-PAGE 电泳分析,确定表达产物在大肠杆菌

细胞中的分布。

1.4.5 表达产物的 Western blot 分析 : 参照文献 [6] 将重组菌 M15(pQE30- α) 和粗提包涵体经 SDS-PAGE 电泳后转印硝酸纤维素膜, 以鼠抗 α 毒素高免血清为一抗, HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot 分析。

1.5 腐败梭菌类毒素疫苗的制备和免疫原性的研究

1.5.1 α 毒素包涵体粗提物的制备 : 挑单个重组菌株 M15(pQE30- α) 的菌落接入 3 mL 含 100 μ L/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 160r/min 培养过夜进行活化, 按 1.5% 的量接种 200 mL (同时诱导 2 瓶, 每瓶 200 mL) 含 100 μ L/mL Amp 的 LB 液体培养基中进行扩大培养, 37 $^{\circ}$ C 160r/min 培养至对数生长期时 ($OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$), 加入 IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L。然后再在 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器上以 160r/min 继续诱导培养 5 h 后, 收集菌体, 参照文献 [7], 按常规方法获取包涵体。

1.5.2 天然 α 毒素的提取 : 将 0.5 mL 过夜的细菌培养物接种于 500 mL 的含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 160r/min 振荡培养 24 h。培养上清液离心收菌 (4 $^{\circ}$ C 35000r/min, 20min)。沉淀物用磷酸盐缓冲液 (pH7.4, 0.2mg/mL PolymyxinB sulfate) 洗涤 2 次, 再用 500 mL 的磷酸盐缓冲液悬浮细胞。轻轻振荡 2 h, 将悬浮液再次离心 (4 $^{\circ}$ C 35000r/min, 20min)。其上清液里含有 PolymyxinB, 用纤维素膜 (0.4 μ m 孔径) 进行过滤。

1.5.3 类毒素的制备 : 将得到的包涵体和天然 α 毒素用 1mol/L NaOH 调 pH 值至 7.2, 然后加入甲醛溶液至终浓度为 0.3%, 振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 作用 32 h, 其间振摇 8 ~ 10 次, 制成类毒素。

1.5.4 安全性测定 : 取包涵体和天然毒素两种类毒素疫苗分别接种 5 只小鼠, 每只腹腔接种 0.2 mL, 对照组腹腔注射 0.2 mL 培养基, 观察 2 周, 观察小鼠存活情况。

1.5.5 小鼠 α 毒素最小致死剂量 (MLD) 的确定 : 将腐败梭菌 HeB01 株用培养基分别稀释成含菌量 1×10^8 、 2×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 1×10^{10} CFU/mL 的菌液, 每个浓度接种 5 只健康小鼠, 每只腹腔注射 0.2 mL; 另设培养基对照组小鼠 5 只。接种后观察 1 周, 确定最小致死剂量。

1.5.6 动物免疫实验 : 将天然 α 毒素、包涵体灭活疫苗分别和等量弗氏不完全佐剂乳化, 分点进行皮

下注射免疫小鼠。将健康小鼠雌雄各半随机分成 3 组, 每组 16 只, 每组分别进行腹腔注射免疫制剂或对照用培养基与佐剂混合物。第 1 组注射灭活天然毒素制剂, 第 2 组灭活包涵体制剂, 第 3 组注射培养基和佐剂的等量混合物作为对照。注射量为 0.2 mL。3 d 后加强免疫 1 次。从最后 1 次免疫结束算起, 2 周后尾静脉采血并分离血清, 参照文献 [8] 介绍的毒素间接 ELISA 检测血清样品。

1.5.7 攻毒实验 : 免疫结束 2 周后, 每组同时接种最小致死剂量的腐败梭菌 HeB01。同时进行未免疫小鼠接种作为对照。观察 1 周统计其死亡情况。

2 结果

2.1 腐败梭菌 α 毒素基因的克隆与序列分析

2.1.1 α 毒素基因的 PCR 扩增结果 : 以提取的基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 扩增得到 α 毒素基因。PCR 产物 α 毒素基因大小约为 1.3 kb, 与实验设计相符。

2.1.2 腐败梭菌 α 毒素基因的克隆 : 将 α 毒素基因与 pUCm-T 载体连接, 构建重组质粒 pUCm-T- α , 转化受体菌 DH5 α 后提取质粒后进行酶切鉴定, 可以看出 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切后得到 2 个片段, 即 T 载体质粒的 3 kb 片段和目的基因的略大于 1.3 kb 的片段。

2.1.3 α 毒素基因的序列测定与同源性比较 : 对 α 毒素基因测序结果表明 : 该基因长度为 1323 bp, 含有完整的开放性读框架 (ORF)。利用 DNASTar 软件将得到的序列与 GenBank 公布的与 4 个参考毒株的 α 毒素基因进行比对, 并进行同源性分析, 结果表明五种毒株的 α 毒素基因高度同源, 达到 99.5% 以上, 说明该基因是非常保守的。将所得 α 毒素基因序列登录 GenBank, 获得登录号为 DQ403251。

2.2 腐败梭菌 α 毒素基因原核表达载体的构建和表达

2.2.1 α 毒素基因的 PCR 扩增结果 : 以提取的 pUCm-T- α 质粒为模板, 采用 PCR 扩增得到 α 毒素基因。从图 1 可以看出, PCR 产物 α 毒素基因大小为 1.3 kb, 与实验设计相符。

2.2.2 腐败梭菌 α 毒素基因重组质粒的酶切鉴定 : 将 α 毒素基因与 pQE30 载体连接, 转化受体菌 M15, 提取质粒后进行酶切鉴定 (见图 2), 可以看出 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后得到 2 个片段, 即 pQE30 载体质粒的 3 kb 左右片段和目的基因的略大于

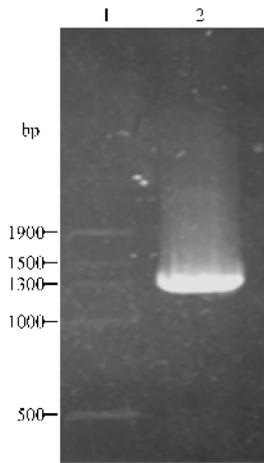


图1 腐败梭菌 α 毒素基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of alpha-toxin gene by PCR

1 :DNA marker 2 :PCR amplified alpha-toxin gene.

1.3kb 的片段, 酶切结果表明获得了含 α 毒素基因的阳性重组质粒, 将其命名为 pQE30- α 。

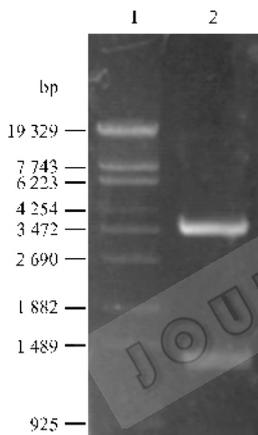


图2 重组质粒 pQE30- α 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pQE30- α

1 :DNA marker 2 :pQE30- α /BamH I + Sal I .

2.2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析: 大肠杆菌 M15、大肠杆菌 M15(pQE30)和重组菌株 M15(pQE30- α), 以 2% 的接菌量接种到新鲜培养基中, 待进入对数生长期后, 加入 IPTG 诱导 4 ~ 5h。收集菌体进行 SDS-PAGE 分析, 重组菌株 M15(pQE30- α) 可见分子量 48 kD 左右的目的条带, 这与预期的 α 毒素基因表达的相对分子量一致, 说明重组质粒 pQE30- α 在大肠杆菌中得到了表达。

2.2.4 表达产物在大肠杆菌中的分布: 将重组菌株 M15(pQE30- α) 超声破碎后, 将上清液(可溶性蛋白)和沉淀(包涵体)分别经 SDS-PAGE 电泳鉴定, 结果如图 4 所示。可见表达蛋白主要以包涵体的形式存在于菌体内。

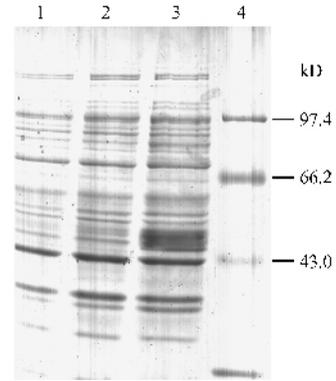


图3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed recombinant protein in *E. coli*

1 :The total proteins of M15(pQE30) 2 :The total proteins of M15(pQE30- α) without induction 3 :The total proteins of M15(pQE30- α) induced by IPTG 4 :The molecular weight protein markers.

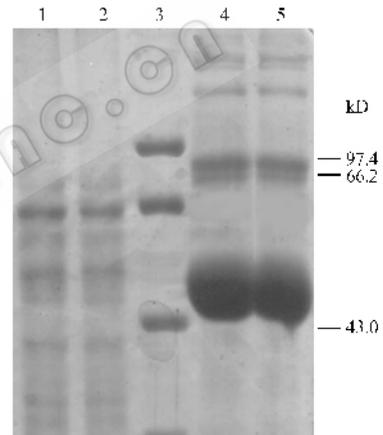


图4 表达蛋白在大肠杆菌中的分布

Fig.4 Distribution of expression a toxin protein in *E. coli*

1 2 soluble protein of expression protein 3 :the molecular weight protein markers 4 5 :inclusion body of expression protein.

2.2.5 表达产物的 Western blot 检测: 将重组菌 M15(pQE30- α) 和粗提包涵体经 SDS-PAGE 电泳后转印硝酸纤维素膜, 以鼠抗 α 毒素高免血清为一抗, HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot 分析, DAB 显色后, 仅在 48kD 左右出现特异性阳性带, 证实 48kD 为特异性表达产物并具有反应原性, 见图 5。

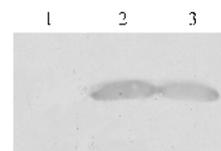


图5 表达产物的 Western blot 分析

Fig.5 Analysis of expressed productions with Western blot
1 :control of *E. coli* M15(pQE30) 2 :expressed productions of *E. coli* M15(pQE30- α) 3 :inclusion body of *E. coli* M15(pQE30- α).

2.3 腐败梭菌类毒素疫苗的制备和免疫原性的研究

2.3.1 最小致死剂量(MLD)的确定:小鼠接种后,对实验小鼠和对照小鼠观察1周,记录致死情况。经确定最小致死剂量为 1×10^9 CFU/mL。

表1 小鼠 MLD 测定结果

Table 1 Results of MLD for the mice

Challenge dose(CFU/mL)	1×10^8	2×10^8	1×10^9	2×10^9	1×10^{10}
Died mice/total mice	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5

2.3.2 免疫抗体的 ELISA 检测:将得到的包涵体和天然 α 毒素分别做包被抗原,用得到的天然 α 毒素和包涵体高免血清分别做一抗,进行交叉 ELISA 检测实验。第1组:抗原为天然 α 毒素,抗体为包涵体产生的高免血清;第2组:抗原为包涵体,抗体为天然 α 毒素产生的高免血清;第3组:阳性对照组,抗原抗体均为天然 α 毒素及其产生的高免血清;第4组:阴性对照组,大肠杆菌 M15(pQE30)和天然 α 毒素产生的高免血清。ELISA 结果表明,阴性对照组不与高免血清特异结合,而包涵体和天然 α 毒素均可和交叉的高免血清特异结合。说明表达产物与相应抗体可发生特异性反应。

表2 免疫抗体的 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA detection results of the anti- α toxin antibody (mean OD_{630})

Groups	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
OD_{630}	0.526 ± 0.18	0.492 ± 0.15	0.556 ± 0.12	0.115 ± 0.08

2.3.3 类毒素免疫保护结果:表达的毒素与天然毒素制成类毒素,分别经过免疫小鼠2次后,进行攻毒,1周后结果为:对照第3组小鼠全部死亡,死亡时口鼻流出血样泡沫状液体,剖检死亡小鼠,发现胃部严重的出血膨胀,从心血和胃部都分离出了很纯的攻毒用的腐败梭菌;第1组:死亡3只;第2组死亡4只;其余小鼠攻毒后第三天和攻毒前无异。攻毒结果见表3。

可以看出组间保护率差异不显著,说明表达的毒素与天然毒素相比,免疫原性和产生抗体的能力相差不大,表达的蛋白可以替代天然毒素作为候选疫苗。

表3 类毒素免疫保护结果测定

Table 3 Results of immunogenicity assay for α toxin toxoid

Groups	Group 1	Group 2	Group 3
Died mice	3/16	4/16	16/16
Protective rate(%)	81%	75%	0

3 讨论

腐败梭菌(*Clostridium septium*)是人类创伤性气性坏疽和多种动物传染病的病原,广泛分布于土壤及动物的消化道内,具有重要的病原学和公共卫生学意义。该菌所引起的畜禽疾病是一类急性传染病,以突然发病、病程很短、多呈急性死亡为特征,给畜禽养殖业造成了很大的损失^[8]。在腐败梭菌产生的 α 、 β 、 γ 和 δ 四种毒素中, α 毒素是最主要的致死性毒力因子和保护性抗原,并且是唯一经过鉴定的毒力因子,该毒素具有溶血、致死和坏死三种生物活性,能使消化道粘膜(尤其是真胃粘膜)发生炎症和坏死,同时经血液循环进入体内,刺激中枢神经系统,引起畜禽急性休克而迅速死亡^[9]。

由于 α 毒素是腐败梭菌的主要致死性毒力因子和保护性抗原,所以从分子生物学角度对该毒素的研究具有重要实际意义,将对该病的预防和诊治起到不可忽视的作用。但多年以来,国内对腐败梭菌的研究长期停留在其所引起的羊快疫的诊断与防治上,从未涉及对其主要毒力因子的分子生物学研究^[10]。如何有效地预防腐败梭菌引起的疾病一直是国内外急于解决的问题。目前,国内对腐败梭菌的研究尚处于基础研究,对于其引起疾病例如羊快疫等所用疫苗多为常规灭活疫苗如“羊快疫、肠毒血症、猝击三联苗”等^[11]。但我国生产这些疫苗所用的培养基需要大量的牛肉、肝脏和胃酶,不仅成本较高,而且来源困难,制造工艺复杂,费时费力,影响生产厂家的经济效益。而且灭活疫苗需多次接种,所诱发的免疫力强度和保持时间均不是很理想。因此有必要研究一种可以避免上述缺点的新型疫苗。国外正在研究的用纯化的腐败梭菌 α 毒素制成 α 类毒素的方法恰好为此提供了可能^[12]。

本研究首先克隆了腐败梭菌 HeB01 分离株的 α 毒素基因,并对插入重组质粒的 α 毒素全基因进行了序列分析和同源性比较,然后将扩增得到的 α 毒素基因定向克隆于原核表达载体 pQE30 中,构建了重组质粒 pQE30- α ,并成功地在大肠杆菌 M15 中进行了表达。在此基础上将表达的产物制成疫苗,免疫小鼠,进行了初步安全性和有效性试验。结果表明腐败梭菌 HeB01 分离株的 α 毒素基因与国外其它菌株相比,其 α 毒素基因的变异率都相当低,这就极大地有利于将来进一步研制基因工程疫苗以及建立新型诊断方法。将表达的 α 毒素产物制成疫苗,免疫小鼠,虽然抗体效价较低,但免疫原性较好,可能

的原因是得到的抗体是线性表位的。鉴于以上实验结果,该重组菌株有希望作为腐败梭菌基因工程类毒素疫苗的候选生产菌株。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Peter JR, Pelletier MD, Plumbley MD, *et al.* The role of *Clostridium septicum* in Paraneoplastic sepsis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2004, **124**(3): 353 – 356.
- [2] Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol*, 2005, **18**(9): 216 – 234.
- [3] Ballard J, Sokolov Y, Yuan WL, *et al.* Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol Microbiol*, 2003, **10**(3): 627 – 634.
- [4] Barnham M, Weightman N. *Clostridium septicum* infection and hemolytic uremic syndrome. *Emerg Infect Dis*, 1998, **32**(4): 321 – 324.
- [5] Yu XL, Xiao SB, Fang LR, *et al.* High expression of the foot and mouth disease structural protein in P1 *E. coli* and analysis of its biology activity. *Chinese J of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**(1): 163 – 166.
- [6] Xu YM, Jin NY, Xia ZP, *et al.* Expression of AIV subtype H5HA, H7HA and H9HA hemagglutinin gene in *Pichia pastoris*. *Chinese J of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22**(2): 231 – 236.
- [7] Peng QS, LI YH, Zhu P. High level expression, purification and cytotoxicity of 1L1018 57 PE40. *Chinese J of Biotechnology* (生物工程学报), 2006, **22**(1): 87 – 93.
- [8] Ma TS, Zhang Y(张燕), Zhao BH(赵宝华), *et al.* The cultural conditions of *Clostridium septicum* and the identification of biochemistry. *J of Hebei Normal University* (河北师范大学学报), 2005, **29**(5): 516 – 518.
- [9] Chen XY, Zhang CS, Guan FS, *et al.* Cloning and sequencing of atoxin gene from *Clostridium septicum*. *Chinese J of Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报), 2005, **27**(2): 112 – 115.
- [10] Amimoto K, Ohgitali T, Sasaki O, Oishi E, Katayama S, Isogai M, Ota S. Protective effect of *Clostridium septicum* alpha-toxoid vaccine against challenge with spores in guinea pigs. *J Vet Med Sci*, 2002, **64**(1): 67 – 69.
- [11] Jiang YW, Wang TJ, Tu WY, *et al.* The identification and structure of the membrane-spanning domain of the *Clostridium septicum* alpha toxin. *J Biol Chem*, 2004, **279**(14): 14315 – 14322.
- [12] Imagawa T, Dohi Y, Higashi Y. Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum*. *FEMS Microbiol Lett* 2004, **117**(3): 287 – 292.