

## 猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型 RTX 毒素 I 的 N-端表达多肽具有良好的免疫原性

# Study on Immunogenicity of the N-terminal Polypeptide of RTX Toxin I of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

梅 岭<sup>1</sup>, 周 锐<sup>1,2\*</sup>, 卢海松<sup>1</sup>, 贝为成<sup>2</sup>, 刘维红<sup>1</sup>, 林荔雯<sup>1</sup>, 洪文洲<sup>2</sup>, 陈焕春<sup>1,2</sup>

MEI Ling<sup>1</sup>, ZHOU Rui<sup>1,2\*</sup>, LU Hai-Song<sup>1</sup>, BEI Wei-Cheng<sup>2</sup>, LIU Wei-Hong<sup>1</sup>, LIN Li-Wen<sup>1</sup>,  
HONG Wen-Zhou<sup>2</sup> and CHEN Huan-Chun<sup>1,2</sup>

1 农业微生物学国家重点实验室动物病原微生物分室, 武汉 430070

2 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

1 Division of Animal Infectious Disease in the State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

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

**摘 要** *ApxI* 外毒素是猪胸膜肺炎放线杆菌( APP)最重要的毒力因子,为了研究其 N 端多肽的免疫原性,分别将 *apxIA* 基因的全长编码区( *apxIA*, 3146bp)及其 5'端 1140bp 的片段( *apxIA5*)克隆到原核表达载体 pET-28a,经 IPTG 诱导后在大肠杆菌中实现了表达。表达产物 *ApxIA* 和 *ApxIAN* 均以包涵体的形式存在,Western-blot 检测证实两种表达产物均具有免疫反应性。将纯化的重组蛋白( *rApxIA* 和 *rApxIAN*)和提取的天然毒素 *ApxI*( *nApxI*)分别经腹腔免疫 BALB/c 小鼠,于免疫前、免疫 2 周和 4 周后分别检测了 ELISA 抗体和毒素中和抗体水平。结果表明, *rApxIAN* 免疫组的 ELISA 抗体显著低于 *rApxIA* 免疫组和 *nApxI* 免疫组,但 *rApxIAN* 免疫组血清中和试验中测定的溶血单位与 *rApxIA* 及天然 *nApxI* 免疫组没有显著差异。第二次免疫 2 周后,用 1 个 LD<sub>50</sub> 的 APP 血清 1 型 J101 株和 2 型标准菌株攻击试验动物, *rApxIAN* 免疫组对血清 1 型和 2 型菌株的保护率分别为 80% 和 100%。

**关键词** 猪胸膜肺炎放线杆菌, *ApxI* 毒素, N-端多肽, 原核表达, 免疫原性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)01-0039-07

**Abstract** *ApxI* is one of the most important virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ( APP). To study the immunogenicity of the *ApxI*, the complete coding sequence ( 3146bp) and its 5'-terminal 1140 bp fragment of the *apxIA* gene were separately cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a, and expressed in the *E. coli* BL21 ( DE3) with induction by IPTG. The expression products, *rApxIA* and *rApxIAN*, were present in a form of inclusion bodies and showed the same immunological reactivity as natural *ApxI*( *nApxI*) in Western-blot analysis. BALB/c mice were intraperitoneally immunized with the *rApxIA*, *rApxIAN* and *nApxI* respectively. The serum antibody levels of the *rApxIAN* immunized mice were significantly lower than those immunized with *rApxIA* or *nApxI* in an *ApxI*-specific ELISA, but serum neutralization test demonstrated that immunized mice with *rApxIAN*, *rApxIA* and *nApxI* could generate similar levels of antibodies neutralizing the hemolytic activity

Received: August 8, 2005; Accepted: November 1, 2005.

This work was supported by the grants for New Century Excellent Talents in University ( NCET-04-0740) and National Natural Science Foundation of China ( No. 30200011).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87281878; Fax: 86-27-87281795; E-mail: rzhou@mail.hzau.edu.cn

教育部新世纪优秀人才支持计划( NCET-04-0740) 和国家自然科学基金( No. 30200011) 生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

of the natural ApxI. The rApxIAN was able to elicit 80% protection rate against APP serovar 1 and 100% against serovar 2 when challenged at a dose of one LD50 after 2 weeks of boost immunization.

**Key words** *A. pleuropneumoniae*, N-terminal polypeptide of ApxI, prokaryotic expression, immunogenicity

猪传染性胸膜肺炎 (Porcine contagious pleuropneumonia, PCP) 是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起的一种猪传染性呼吸道疾病, 给世界养猪业造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。预防和控制该病的主要措施是疫苗免疫接种。

目前商品化的全菌灭活疫苗和亚单位疫苗能够减轻同血清型菌株感染猪引起的临床症状并降低死亡率, 但不能阻止慢性感染和肺部病变, 也不能对异源血清型菌株的感染提供完全的交叉保护。与灭活疫苗和亚单位疫苗不同, 自然感染或试验感染能够诱导抗任一异源血清型的保护<sup>[2,3]</sup>, 弱毒活疫苗也许是解决当前商品化疫苗不足的一种可行方法。

RTX 毒素是 APP 最主要的毒力因子, 被称为 Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* -RTX-toxins)。目前已知的 Apx 有 4 种, 即 Apx I、Apx II、Apx III 和 Apx IV。研究发现, 除 Apx IV 没有明显的毒力以外, 其它 3 种 Apx 均具有溶血活性和细胞毒性, 也是刺激动物产生保护性免疫应答的重要抗原成分, 尤其是 ApxIA 是最主要的保护性抗原<sup>[5,6]</sup>。

目前已经鉴定的 APP 有 15 种血清型, 不同血清型的菌株产生不同组合的 4 种 Apx (各血清型均在体内分泌 Apx IV)。血清 1、2、3、7 型是我国流行的优势血清型, 除 Apx IV 外, 1 型菌含有 Apx I 和 Apx II, 2 型和 3 型菌均分泌 Apx II 和 Apx III, 但 7 型菌只分泌 Apx II。本实验室以 APP 血清 7 型 HB 株为亲本菌株, 利用同源重组技术和正负双向选择方法, 缺失了 Apx II 的毒力激活因子 Apx II C 的编码基因 *apx II C*, 获得了基因工程毒力缺失突变株 HBC<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup>, 其毒力显著减弱, 并能诱导试验动物产生免疫保护, 对同血清 7 型 APP 的攻击保护率为 100%, 但对异源血清 1 型的攻击保护率只有 75%<sup>[4]</sup>, 这可能与该突变株缺乏 ApxI 有关。为了进一步提高 HBC<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup> 突变株的免疫效力, 我们设想以该基因缺失菌株为载体表达 ApxI 的结构基因 *apxIA*, 构建新的重组菌株。然而, *apxIA* 全长 3000 多个碱基, 采用同源重组的方法引入全长 *apxIA* 非常困难, 如果能找出其主要免疫原性区段, 将会使重组效率大为提高。本研究分别克隆表达 ApxIA 全长 1023 个氨基酸和 N 端 380 个氨基酸的多肽, 通过免疫 BALB/c

小鼠证实了 N 段 380 个氨基酸的多肽具备有较强的免疫原性, 是 ApxIA 的主要免疫原性区段。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 细菌菌株与质粒** 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型 (APP-1) 菌株由本研究室自行分离、鉴定并保存。而 APP 血清 2、10 型 (APP-2、APP-10) 菌株由澳大利亚 Blackall 博士惠赠。原核表达质粒 pET-28a 与大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 均由本室保存。

**1.1.2 工具酶与试剂** 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 购自中国上海化学试剂公司。各种限制酶、ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶 (CIAP) 等工具酶、DNA Marker 均为大连宝生物公司产品。DNA 回收试剂盒为上海生物工程公司产品。猪抗 APP ApxI 抗血清由本室自行制备。针对 HRP 标记二抗的化学发光底物 DAB 为 Pierce 公司产品。

**1.1.3 培养基和培养条件** APP 生长液体培养基为 Tryptic Soy Broth (TSB), 固体培养基 Tryptic Soy Agar (TSA), 培养基加入 10% 犊牛血清和 0.1% NAD, APP 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中生长良好。用于大肠杆菌培养的 LB 培养基参照文献 [7]。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 APP-1 基因组 DNA 的提取** 将 APP J101 株单菌落接种固体培养基, 置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 10~12h 后可长出单菌落, 挑取单个菌落在液体培养基中培养, 37°C 摇床培养 9~10h 后收获菌体, 按文献 [8] 方法提取基因组 DNA。

**1.2.2 *apxIA* 基因全长和 5' 端 1140bp 编码区的克隆与序列测定**

根据 GenBank 上的多个 ApxIA 基因全长序列的比对结果, 在保守区设计三条引物 P1、P2 和 P3, P1 和 P2 用于扩增 *apxIA* 全长编码区 (命名为 *apxIA*), P1 和 P3 用于扩增 *apxIA* 5'-端 1140bp 的片段 (命名为 *apxIA5*)。引物序列如下:

P<sub>1</sub>: 5'-ATACGTGAATTCATGGCTAACTCTCAGCTC-3' (下划线为 EcoRI 酶切位点)

P<sub>2</sub>: 5'-CTCGAGTCGCACCTCTCCATAAATAA AATAGC-3' (下划线为 SalI 酶切位点)

P<sub>3</sub>: 5'-CTGGACTGGACCTTA AGCCCGAACACCTGCG-3' (下划线为

Sal I 酶切位点)

PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中,鉴定正确后送大连宝生物公司测定序列,并将全长基因序列与 GenBank 上已知序列比对分析。

**1.2.3 重组表达质粒的构建与鉴定** 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 PCR 产物,回收长约 3.3kb 的 *apxIA* 和长约 1140bp 的 *apxIA5*,分别与经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的原核表达载体 pET-28a 连接,连接产物转化 *E. coli*(DH5 $\alpha$ ) 重组转化子经碱裂解法小量制备质粒,分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切鉴定。阳性重组质粒分别命名为 pET-IA 及 pET-IA5。

**1.2.4 诱导表达、表达产物的纯化及 Western-blotting 分析** 分别将 pET-IA、pET-IA5 及空载体 pET-28a 转化 BL21(DE3),挑取单菌落于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 8~10h,然后以 1:100 稀释度转接种到 200mL LB 液体培养基,在 37 $^{\circ}$ C 继续培养 3h,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L 诱导培养,置 37 $^{\circ}$ C 再培养 3h,先取 1mL 培养物离心弃上清,用 50 $\mu$ L PBS 悬浮,再加入等体积的上样缓冲液,煮沸 10min,按参考文献 [7] 方法进行 12% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝 R250 染色分析。pET-IA 和 pET-IA5 对应的表达产物分别命名为 rApxIA 和 rApxIAN。

收集剩余诱导后的菌液的菌体并用等体积 PBS 重悬,超声波裂解,离心后分别收集上清液和沉淀,沉淀再用等体积的 TE 重悬。从收集的上清和重悬的沉淀中各取加入等体积的上样缓冲液,煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 电泳检测,确定蛋白在沉淀中后离心提取包涵体。包涵体提取方法按参考文献 [7] 蛋白质浓度用 BCA 法测定,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

将 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带转移至硝酸纤维素膜上,用含 0.5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 2h,以猪抗 APP ApxI 抗血清高免血清为一抗,HRP 标记的抗猪 IgG 为二抗,DAB 显色。

**1.2.5 天然 ApxI 毒素的提取及 SDS-PAGE 鉴定** 利用  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀法提取。由于 APP 血清 10 型只分泌 ApxI,我们选取 10 型菌来提取 ApxI。冻干的菌种复苏后,先用细菌瓶小量培养,之后用 250 mL 的盐水瓶扩大培养到对数中期,12000 r/min 离心 10 min,收集上清,缓慢加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 42.5~45g/100mL 上清,边加边搅拌,4 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,第二天离心 12000 r/min 离心 15 min,去上清,沉淀即所需毒素,用 pH8.0 的 TE 溶解,透析 3 d 取出。之后取样进行浓度为 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色鉴定纯度,蛋白质浓度用 BCA 法测定,-20 $^{\circ}$ C

保存备用。提取的天然毒素命名为 nApxI。

**1.2.6 实验动物分组及免疫剂量,免疫周期** 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自湖北省医学科学院,共 40 只。试验组随机分成 4 组,每组 10 只。第一组为 TE 缓冲液对照组,第二组为 rApxIA 免疫组,第三组为 rApxIAN 免疫组,第四组为 nApxI 免疫组。首免用等量弗氏完全佐剂乳化,二免用等量弗氏不完全佐剂乳化,使每 0.2 mL 亚单位疫苗中含有纯化的蛋白 25 $\mu$ g,采用腹腔内注射免疫小鼠,首免后 2 周加强免疫 1 次。二次免疫 2 周后分别用 1 个 LD<sub>50</sub> 的 APP-1 型和 APP-2 型菌液攻击试验动物。

**1.2.7 天然毒素 ELISA 最佳工作浓度的确定及实验动物抗体水平检测** 已经提纯的天然毒素包被 96 孔酶联板,和猪阴、阳性血清进行方阵滴定,确定最佳抗原包被浓度、最佳血清稀倍数。根据建立的 ELISA 检测方法分别检测试验小鼠免疫后第 0、2、4 周血清中抗体的变化。

**1.2.8 天然毒素的溶血素单位测定及血清毒素中和抗体水平检测** 采用参考文献 [9] 的方法测定天然毒素的溶血素单位(HU/mL)。将已测定的天然毒素的溶血素单位调整到 50HU/mL。三组试验小鼠攻毒前采集血清,经 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min。TS 缓冲液倍比稀释小鼠血清后每孔中加入 100 $\mu$ L 的天然毒素(50HU/mL),37 $^{\circ}$ C 作用 30min 后测定每个稀释度的溶血素单位。

**1.2.9 实验动物的攻毒** 预试验确定 1 型菌和 2 型菌 LD<sub>50</sub> 的大概范围,利用五个梯度浓度的 1 型菌和 2 型菌分别对小鼠进行了攻毒,依据寇氏(Karbor)法确定攻毒菌株 1 型和 2 型的半数致死量(LD<sub>50</sub>)。本试验中采用 1 个 LD<sub>50</sub> 的细菌量通过腹腔注射方式对小鼠进行攻毒。

## 2 结果

### 2.1 *apxIA* 全长编码区及其 5' 端 1140bp 片段 *apxIA5* 的克隆及序列测定

利用优化后的 PCR 程序获得的产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析表明扩增片段(含限制酶位点及保护碱基等)与预期大小一致,扩增出 *apxIA* 全长编码区大小约为 3146bp 及其 5' 端 1140bp 的片段,结果见图 1。PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中测定序列,全长基因序列与 GenBank 上收录的多个 ApxI 序列比对后发现其与 X73117 在核苷酸水平上具有 100% 的同源性。与 AF240779,AF363361,D16582,04954,X52899,X68595 在核苷酸水平上具有 99.9%

的同源性。

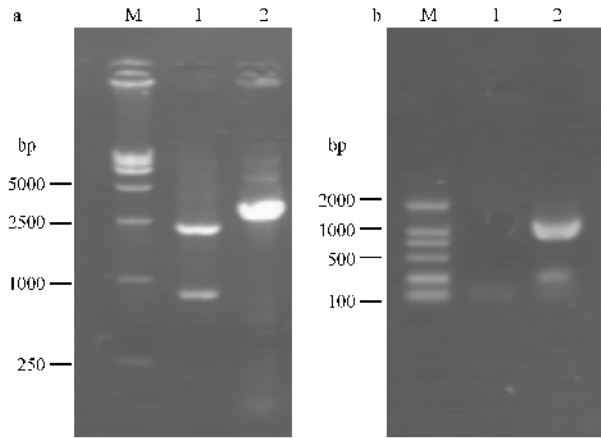


图1 PCR扩增的 *apxIA* 全长编码区(a)及其5'端1140bp *apxIA5* 片段(b)的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Amplification of the complete coding sequence *apxIA* (a) and its 5'-end 1140bp fragment *apxIA5* (b)

M: Marker; a. 1: *apxIA/EcoRV*; 2: *apxIA* (PCR product)

b. 1: negative control; 2: *apxIA5*.

## 2.2 重组质粒 pET-IA 及 pET-IA5 构建与鉴定

PCR产物和分别经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切,回收长约 3.1 kb 的 *apxIA* 和长约 1.1kb 的 *apxIA5*, 将其与经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的原核表达载体 pET-28a 分别连接。pET-IA 阳性克隆子与 pET-IA5 阳性克隆子酶切后均符合预期的大小见图 2, 证实表达质粒构建正确。鉴定正确的阳性克隆子送大连宝生物公司测序证明序列及读码框正确。

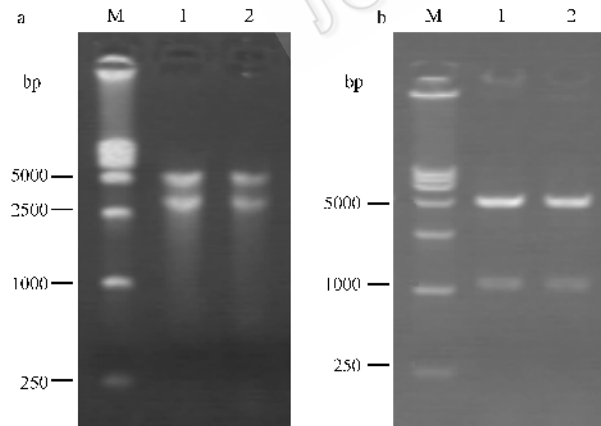


图2 重组质粒 pET-IA (a) 和 pET-IA5 (b) 的酶切鉴定

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmids pET-IA (a) and pET-IA5 (b)

M: Marker; a. 1 and 2: pET-IA/*EcoR* I + *Sal* I;

b. 1 and 2: pET-IA5/*EcoR* I + *Sal* I.

## 2.3 pET-IA 及 pET-IA5 的诱导表达、纯化及 Western-blotting 分析

重组质粒 pET-IA 及 pET-IA5 和空白载体质粒 pET-28a 同步转化 BL21(DE3) 培养、诱导、收获和裂

解后,经 12% SDS-PAGE 电泳后检测, pET-IA 转化克隆子在 110kD 处出现特异性表达带,而 pET-IA5 转化克隆子在约 38kD 处出现特异性表达带,与预期的大小相符(图 3)。将诱导表达的菌体经超声波破碎后,分别收集上清和沉淀并进行 SDS-PAGE 检测,发现表达蛋白主要在沉淀中,而上清中的量很少,表明表达产物主要以包涵体的形式存在。BCA 法测定重组蛋白 rApxIA 和 rApxIAN 的浓度分别为 3.09  $\mu\text{g/mL}$  和 2.88  $\mu\text{g/mL}$ 。

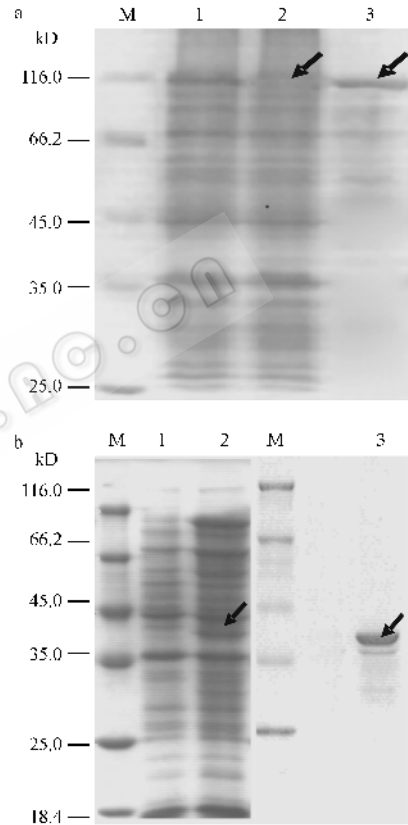


图3 SDS-PAGE 分析重组蛋白 rApxIAN 和 rApxIA 的表达与纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products of rApxIA and rApxIAN

M: protein marker; 1: lysate of BL21 (DE3) pET-28a; 2: lysate of BL21 (DE3) pET-IA (a) and BL21 (DE3) pET-IA5 (b); 3: purified rApxIA (a) and rApxIAN (b) from inclusion bodies.

将 pET-IA 及 pET-IA5 表达的蛋白纯化后进行 SDS-PAGE。然后将 12% SDS-PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜,2% 脱脂牛奶封闭 30min 后加入一抗阳性血清 1h,羊抗猪 IgG-HRP 37 $^{\circ}\text{C}$  1h,经 TBS 洗后 DAB 显色。pET-IA 表达的蛋白在约 110kD 处出现一条特异性带, pET-IA5 在约 38kD 处出现一条特异性带(图 4),与预期的分子量相当,表明表达的两种蛋白具有免疫反应活性。

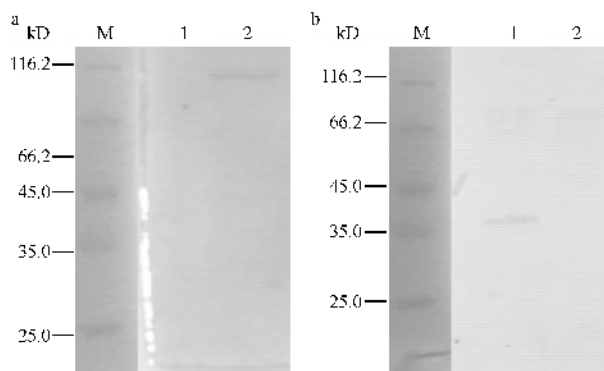


图 4 表达产物的 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of the expression products

M : Protein molecular weight marker ;  
a-1 and b-2 : Lysate of BL21( DE3 )pET-28a ;  
a-2 : purified rApxIA ;  
b-1 : purified rApxIAN.

## 2.4 天然毒素 ApxI 的提取及 SDS-PAGE 鉴定

提取 APP-10 型菌分泌的天然 ApxI 毒素后,取少量进行 SDS-PAGE 电泳以检测其纯度(图 5),其中 ApxI 大小约为 105 ~ 110kD,BCA 法测定其浓度为 6.27 $\mu$ g/mL。

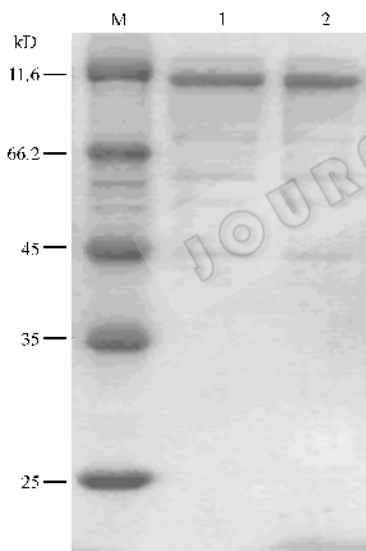


图 5 SDS-PAGE 分析从 APP-10 型菌培养液中提取的天然 ApxI 毒素

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the natural toxin ApxI extracted from the culture medium of APP serovar 10.

M : protein marker ; 1 , 2 : natural ApxI ( duplicate ).

## 2.5 实验动物体液抗体水平检测

提纯的天然毒素包被 96 孔酶联板,用猪阴、阳性血清进行方阵滴定,确定最佳抗原包被浓度为 1:4(0.157 $\mu$ g/mL),最佳血清稀释倍数 1:20。

将提取 rApxAN、rApxIA 和 nApxI 乳化后分别经腹腔免疫小鼠,间隔 2 周免疫两次。对照组用 TE 缓冲液乳化后同时免疫。首免后 2、4 周尾静脉采血并

分离血清,采用建立的天然毒素 ApxI 间接 ELISA 检测血清样品。

由图 6 可以看出,首免后天然毒素组抗体水平不及 ApxIA 表达蛋白组,但二免之后天然毒素组的抗体上升水平较之 ApxI 表达蛋白组要高。

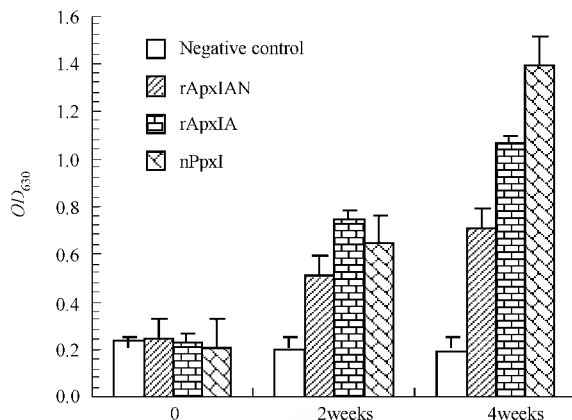


图 6 试验组一免和二免后针对天然毒素 ApxI 的体液抗体水平

Fig. 6 The antibody against natural ApxI after first and second immunization

## 2.6 天然毒素的溶血单位测定及血清毒素中和抗体水平检测

首次免疫 4 周后尾静脉采血并分离血清,与 50HU/mL 溶血素作用后测定溶血素的溶血素单位。本试验中阳性血清为野毒感染猪分离的阳性血清。

由图 7 可以看出,阴性血清不能中和天然毒素,阳性血清高度稀释仍然保持较高的中和能力。ApxIAN 试验组与 ApxIA 天然毒素组在血清低稀释度下几乎具备相同的中和天然毒素的能力,在血清高度稀释下, ApxIAN 组中和毒素能力较之其他两组要弱。

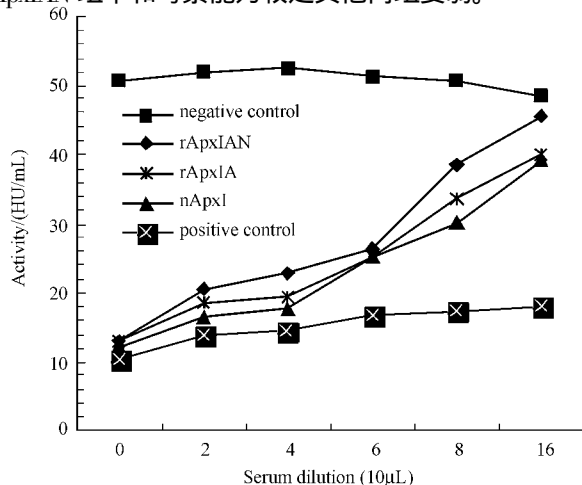


图 7 天然毒素 ApxI 中和试验

Fig. 7 Neutralization of the ApxI hemolytic activity.

The results show the arithmetic means of the hemolytic means of the hemolytic neutralization findings from three experiments

## 2.7 实验动物的攻毒

根据预试验结果确定 APP 血清 1 型菌及血清 2 型菌的大致 LD<sub>50</sub> 利用 5 个梯度的 1 型菌和 2 型菌分别对小鼠进行了攻毒,攻毒结果根据寇氏 (Karbor) 法计算得到攻毒菌株 APP 血清 1 型菌 LD<sub>50</sub> 为  $3.8 \times 10^6$  CFU, APP 血清 2 型菌 LD<sub>50</sub> 为  $4.5 \times 10^6$  CFU。

第二次免疫 2 周后,各试验组分别选用 5 只小鼠用 APP 血清 1 型(J101)型菌(活菌含量  $3.8 \times 10^6$  CFU)和 APP 血清 2 型(活菌含量  $4.5 \times 10^6$  CFU)对免疫小鼠进行攻毒。TE 对照组 APP 血清 1 型菌攻毒 24h 内 3 只小鼠死亡,TE 对照组 APP 血清 2 型菌攻毒 24h 内 2 只小鼠死亡。死亡小鼠肺部有出血,从心血和肺脏能分离攻毒用 APP。rApXIAN 试验组 APP 血清 1 型攻击的 5 只小鼠死亡 1 只,而 APP 血清 2 型攻击的 5 只小鼠无一死亡,死亡小鼠解剖可见肺部轻微出血。rApXIA, nApXI 试验组用 APP 血清 1 2 型菌攻毒的 20 只小鼠均没有死亡,攻毒小鼠初始 24h 内呈现精神沉郁、不食、扎堆,之后逐步恢复正常(表 1)。

表 1 小鼠免疫后的攻毒保护率试验

Table 1 Protection of vaccinated mice following challenge with APP serovar 1 and 2

Antigen	No. survive/No. total( % mice surviving)	
	Serovar 1	Serovar 2
rApXIAN	4/5 ( 80 )	5/5 ( 100 )
rApXIA	5/5 ( 100 )	5/5 ( 100 )
nApXI	5/5 ( 100 )	5/5 ( 100 )
None ( control )	2/5 ( 40 )	3/5 ( 60 )

## 3 讨论

Bagdasarian 等通过 GCG 软件预测 ApXIA 毒素全长基因的抗原表位,并选择性地将其毒素的多个抗原表位与新型佐剂分子大肠杆菌热不稳定肠毒素 EtxB 融合后在体外进行高效表达,表达产物免疫实验动物,免疫动物获得良好的免疫保护<sup>[9]</sup>。Seah JN 等将 ApXIA 全长基因分成三段在体外表达后免疫实验动物,其中 N 端 340 个氨基酸免疫动物能抵抗至少 3 种血清型 APP 的攻击<sup>[10]</sup>。这些研究表明 N 端编码区具有较强的免疫原性。我们克隆了 apXIA 的全长基因,用 DNA star 软件分析发现 ApXIA 毒素全长序列多个抗原性表位位于 N 端(分析结果未显示),于是进一步克隆了编码 ApXIA 毒素 N 端 380 个氨基酸的基因序列,并有意避开了 RTX 毒素的 Ca<sup>2+</sup> 激活功能域。为了深入评价 N 端编码区段的免疫

原性,我们将其表达产物(rApXIAN)与全长基因的体外表达产物(rApXIA)和天然毒素(nApXI)的免疫原性进行了比较试验。

APP 分泌的 4 种外毒素,都属于 RTX 毒素家族。RTX 毒素主要是由 N 端疏水区, G/D 重复区(包含 Ca<sup>2+</sup> 结合区), C 端结构域三部分组成。Frey J 等对 Ca<sup>2+</sup> 诱导溶血素产生有活性形式的动力学试验表明:随着 Ca<sup>2+</sup> 浓度不断增加(0.07mmol/L ~ 3.2mmol/L)溶血素的活性也随之显著升高<sup>[11]</sup>。为了更接近于生理环境,天然毒素与 ApXIAN 的抗血清在 1mmol/L Ca<sup>2+</sup> 浓度存在下相互作用后,溶血素单位的测定结果与其他两组的结果差距并不是很大,这出乎我们的意料。避开 Ca<sup>2+</sup> 激活功能域的 ApXIAN 蛋白,与另外两组相比同样能激发产生有效水平的抗体并阻断 Ca<sup>2+</sup> 与天然毒素的结合。我们推测这可能是由于 N 端蛋白编码的疏水区主要是形成镶嵌于细胞膜之中类似孔型的疏水性蛋白<sup>[12]</sup>,而 rApXIAN 蛋白的抗体能够很好的对这种穿孔样蛋白进行阻断,从而避免红细胞表面由于过多穿孔造成裂解。另外我们注意到, Betsou 在研究百日咳嗜血杆菌腺苷酸环化溶血素(Adenylate Cyclase-Hemolysin) C 端结构时发现,溶血素的 Ca<sup>2+</sup> 结合区对提呈抗原表位具有重要作用<sup>[13]</sup>。而我们在研究中发现,缺失了 Ca<sup>2+</sup> 激活区和结合区的 rApXIAN 同样具备诱导机体产生毒素中和抗体(抗毒素抗体)的能力,这可能是由于 ApXIA 氨基端的保护性抗原表位空间构象的变化与百日咳嗜血杆菌腺苷酸环化溶血素的不同,后者的抗原表位构象过于依赖 Ca<sup>2+</sup> 与毒素重复序列结合。

在动物试验中,我们设立天然毒素对照组是为了在小鼠体内获得抗 ApXI 的抗血清,同时便于对 rApXIAN 和 rApXIA 的免疫原性进行评价。我国流行的 APP 多种血清型以 1、2、7 型居多。试验攻毒阶段,我们选用了毒力最强的血清 1 型菌和 2 型菌进行攻毒。在攻毒剂量上采用了 1 个 LD<sub>50</sub> 的活菌量,主要是为了能够较好的区分对照组与 rApXIAN 试验组在保护率上的差异。试验动物血清中针对 ApXI 天然毒素的特异性 ELISA 抗体水平的检测结果表明, rApXIA 和天然毒素(nApXI)免疫组抗体水平相当,这与本实验室刘建杰博士的研究结果相一致。rApXIAN、rApXIA 和 nApXI 免疫小鼠的血清在稀释度较低时几乎具有相同的中和天然毒素的能力,这可能是决定最后攻毒试验结果的主要原因。而 rApXIA 和 nApXI 免疫小鼠的血清在稀释度较高时虽然能表

现出较强的中和能力,但与对照阳性血清仍有较大差距。这一方面可能是由于在动物实验中免疫剂量和免疫周期等原因导致有效抗体水平不高,另一方面也表明 Apx 毒素除 N 端多肽以外还存在某些结构域能阻断 RTX 溶血素与靶细胞结合。Edward TL 等人研究发现,针对 HlyA 溶血素酰化结构域、G/D 重复区及 C 末端结构的特异性单克隆抗体 mAb28、mAb83、mAb107 能阻断 RTX 溶血素与靶细胞的结合<sup>[14]</sup>。这进一步印证了我们的推测,也为下一阶段我们研究 Apx 溶血素 N 端多肽外的重要功能性结构域提供了思路。综合上述各项指标的检测结果表明 ApxIA 端 380 个氨基酸可以作为 ApxI 主要保护性抗原。

Apx 操纵子中的 C 基因通过酰基化作用介导毒素的翻译后活化。通过使用位点特异性突变构建胸膜肺炎毒素调节基因 *apxC* 基因插入失活的基因工程突变株可开发成可便于鉴别诊断的基因缺失弱毒疫苗而前景诱人。Prideaux<sup>[15,16]</sup>和本实验室<sup>[4]</sup>以 APP 血清 7 型为亲本菌构建的 *apxIIC* 基因缺失菌株 (APP *apxIIC*<sup>-</sup>),研制的弱毒活疫苗能完全抵抗 APP 血清 7 型的攻击,但对毒力最强的异源血清 1 型的保护率只有 75%,因为该缺失菌株不能产生重要的保护性抗原 ApxIA。根据本研究结果,下一步将通过同源重组的方法将编码 ApxIA 主要保护性抗原结构域的 *apxIA5* 基因片段(即 5'端 1140bp 编码区)的表达盒插入 APP *apxIIC*<sup>-</sup> 基因工程缺失菌株的 *apxIIC* 基因缺失位点,构建表达 ApxIAN 的胸膜肺炎血清 7 型 *apxIIC*<sup>-</sup>/*apxIA5*<sup>+</sup> 的重组菌株,以提高 *apxIIC*<sup>-</sup> 基因工程缺失菌株对异源血清型的保护率。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Bossé JT, Janson H, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of Infection. *Microbes and Infection*, 2002, **4**: 225 - 235
- [ 2 ] Tumamao JQ, Bowles RE, van den Bosch H. Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Aust Vet J*, 2004, **82**(6): 370 - 374
- [ 3 ] Stephens LR. Positive and negative aspects of host immune response to haemophilus, actinobacillus and pasteurilla. *Can J Vet Res*, 1990, **54**: S41 - 44
- [ 4 ] Bei WC, He QG, Chen HC *et al.* Construction and Characterization of a live, attenuated apx II CA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking drug resistance marker. *FEMS Microbiology Letter*, 2005, **243**: 21 - 27
- [ 5 ] Frey J, Nicolet J. Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet Microbiol*, 1991, **28**(1): 61 - 73
- [ 6 ] Frey J, Bosse JT, Chang YF. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**(Pt 8): 1723 - 1728
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, pp. 3326 - 3336
- [ 8 ] Christopher T, Prideaux, Lesley Pierce. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, after live vaccination. *Current Microbiology*, 1998, **37**: 324 - 332
- [ 9 ] Bagdasarian MM, Nagai M, Bagdasarian M. Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine*, 1999, **17**(5): 441 - 447
- [ 10 ] 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
- [ 11 ] Frey J, Nicolet J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca<sup>2+</sup>. *Infect Immun*, 1988, **56**(10): 2570 - 2575
- [ 12 ] Maier E, Reinhard N, Frey J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins Apx I, Apx II, and Apx III of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun*, 1996, **64**: 4415 - 4423
- [ 13 ] Betsou F, Sebo P, Guiso N. The C-terminal domain is essential for protective activity of the Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, 1995, **63**: 3309 - 3315
- [ 14 ] Edward TL, Blake HR, Irene RK. The interaction between RTX toxins and target cells. *Curr Microbiol*, 1999, **7**(9): 356 - 361
- [ 15 ] Prideaux CT, Pierce L, Hodgson AL. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol*, 1998, **37**(5): 324 - 332
- [ 16 ] Prideaux CT, Lenghaus C, Hodgson AL. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the Apx II operon. *Infect Immun*, 1999, **67**(4): 1962 - 1966