

构象稳定的破伤风毒素 Hc 片段突变体 (HcM) 的制备及其免疫原性分析

于蕊, 侯利华, 刘树玲, 于长明, 张晓艳, 刘颖, 陈薇

军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 破伤风是由破伤风杆菌侵入人体伤口、生长繁殖、产生毒素而引起的一种急性特异性感染, 其死亡率高, 严重危害人民生命健康。研究证实破伤风毒素重链 C 端 (Hc) 具有与毒素受体结合的活性, 完全保留了全分子的免疫原性, 有望开发成为新的基因工程破伤风亚单位疫苗以替换传统的甲醛灭活类毒素疫苗。由于野生型 Hc 蛋白 (HcW) 易形成分子间及分子内二硫键, 且各构象分子之间易发生不稳定的转换, 为疫苗的生产工艺带来困难, 因此, 通过将破伤风 HcW 蛋白的 869 位半胱氨酸突变为丙氨酸, 构建构象稳定的破伤风亚单位疫苗突变体 HcM, 对 HcM 进行表达、发酵和纯化, 研究其在不同条件下的稳定性, 比较其与受体 GT1b 亲和力的变化及免疫原性。实验结果表明 HcM 在大肠杆菌中获得了高效可溶性表达, 通过 QXL 柱、phenyl-Hs 柱和 source30Q 柱三步纯化, 可获得纯度 95% 以上的 HcM 蛋白。纯化后的 HcM 蛋白在不同保存条件下构象稳定且保持了与破伤风毒素受体 GT1b 结合的活性。免疫小鼠后, HcM 能够诱导小鼠产生高滴度抗体并能够保护小鼠抵御 1×10^3 LD₅₀ 剂量的破伤风毒素攻击。以上结果表明构象稳定的 HcM 有望成为新的破伤风重组亚单位疫苗候选者, 其生产工艺简单、稳定且保持了与野生型相似的免疫原性, 不论是针对日常破伤风治疗还是对于国家应对突发事件 (战争、地震等灾害) 的药品储备均具有重大意义。

关键词: 破伤风, HcM, 构象稳定, 亚单位疫苗

Production and immunogenicity analysis of conformation-stable fragment-C mutant of tetanus toxin

Rui Yu, Lihua Hou, Shuling Liu, Changming Yu, Xiaoyan Zhang, Ying Liu, and Wei Chen

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: Tetanus is caused by tetanus toxin synthesized by *Clostridium tetani*. Fragment C (Hc), the 50 kDa carboxy-terminal portion of tetanus toxin, is nontoxic but has receptor protein binding activities, which has been evaluated as a potential new recombinant subunit vaccine to replace the traditional formaldehyde inactivated toxoid vaccine. It is easy for wild Hc (HcW) to form inter- and intra-molecular disulfide bonds and the different conformations changes unstably, which brings difficulties for vaccine production technology. In our study, the Cys 869 of HcW was mutated to Ala and the conformation-stable fragment-C mutant of tetanus toxin (HcM) was constructed. The HcM was expressed, fermented and purified and its stability, receptor binding and

Received: May 26, 2010; **Accepted:** August 18, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81025018).

Corresponding author: Wei Chen. Tel/Fax: +86-10-63815273; E-mail: chenwei0226@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 81025018) 资助。

immunogenicity were evaluated. The result showed that the HcM got high-level expression and was purified to >95% of purity. The purified HcM was conformation-stable at different temperature for different time and kept the binding activities with one of its receptor GT1b. Mice given three vaccinations by HcM developed a protective immune response and were 100% protected against an intraperitoneal administration of 1×10^3 50% lethal doses (LD_{50} s) of tetanus neurotoxin. All the results showed that the conformation-stable HcM had potent immunogenicity as a recombinant tetanus vaccine candidate with simple production process and similar immunogenicity with HcW. Whether for routine tetanus therapy or for countries to respond to unexpected events (war, earthquake or other disaster), it is of great significance.

Keywords: tetanus, HcM, conformation-stable, sub-unit vaccine

破伤风是一种严重危害人类生命健康的疾病, 它是由革兰氏阳性、厌氧的梭状芽胞杆菌——破伤风杆菌侵入人体伤口、生长繁殖、产生破伤风毒素引起的一种急性特异性感染, 破伤风毒素入侵神经系统可导致人全身性肌肉痉挛, 进而全身性衰竭或窒息死亡。一切开放性损伤, 均有发生破伤风的可能^[1]。破伤风毒素的毒性非常强烈, 仅次于肉毒毒素^[2], 约 100 ng 的破伤风毒素便可以致人死亡。破伤风在广大贫困落后的第三世界国家和地区非常严重。据估计, 世界上每年约有 100 万病例发生, 死亡率在 50% 左右。在发展中国家, 新生儿破伤风死亡率高达 90%。因此各国均致力于寻找高效、安全的破伤风预防药物^[3]。

破伤风毒素全长 1 315 个氨基酸, 分子量为 150 kDa, 共由 A、B、C 三部分组成, 每部分分子量均为 50 kDa。C 片段是重链的 C 端, 具有结合神经细胞的作用^[4]。B 片段是重链的 N 端, 具有导入作用^[5]。A 片段是轻链, 有蛋白酶活性, 可抑制神经传递物质的释放, 具有麻痹作用^[6]。传统的类毒素疫苗是破伤风毒素经甲醛脱毒、铝佐剂吸附精制而成的, 虽然其免疫效果较好, 但仍存在一些问题: 接种类毒素后有一定的副反应发生; 破伤风梭菌可形成芽胞形式, 毒性高, 生产疫苗有一定危险性; 甲醛处理类毒素容易造成污染; 化学处理后的类毒素可能发生毒性逆转; 而且重要的是免疫期短, 随着年龄的增长, 对破伤风免疫力下降, 儿童需要 4~6 年加强免疫, 成人需要每 10 年加强一次免疫。因此, 现有的类毒素疫苗还需进一步改进和发展, 而开发新型的基因工程疫苗是方向之一。实验已证实完整的毒素分子进行免疫并不是必需的^[7]。破伤风天

然 C 片段 (HcW) 保留了完整毒素与神经节苷脂结合等许多性质^[8], 免疫效价与毒素相当, 无毒性, 过敏原性低, 是将来发展亚单位疫苗和基因工程疫苗的候选者^[9-10], 已被用于研究亚单位疫苗、细菌和病毒载体疫苗、粘膜疫苗等很多方面^[11]。

野生型 HcW 分子内含有 4 个半胱氨酸, 极易形成分子间及分子内二硫键, 导致不同形式的单体及多聚体出现, 且这种不同构象形式可随着蛋白浓度、环境温度及缓冲液条件的不同而发生相互转换^[12], 这在疫苗的生产工艺上造成了一定的困难。为了解决这个问题, 我们将 HcW 分子中的一个关键半胱氨酸进行了突变, 构建了 Hc 突变体 HcM, 该突变体为构象稳定的单体, 简化了整个疫苗的生产工艺并能够保证各批次疫苗之间的稳定性。我们对改造后的 HcM 进行了表达、发酵和纯化, 并研究了其与受体的结合活性、稳定性、免疫原性等, 探讨其作为人用破伤风疫苗的可行性, 为制备构象稳定的破伤风亚单位疫苗奠定基础。

通过以上研究, 我们希望能够通过研究制备构象稳定的破伤风亚单位疫苗, 为破伤风的预防提供一条更加安全、有效、简便的道路, 其最终目的是希望能够替代目前使用的存在很多毒副作用及生产繁琐生产成本高的类毒素疫苗, 这对日常破伤风治疗和国家应对突发事件 (战争、地震等灾害) 的药品储备均具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

Q Sepharose XL 柱、Phenyl-HS 柱和 source30Q 柱购自通用电气 (中国) 医疗集团。DNA 核酸内切

酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司。Isopropylthio-D-galactoside (IPTG) 和神经节苷酯 *GT1b* 购自 Sigma。 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂购自 Brenntag Biosector (丹麦)公司。表达载体 pET-32a(+) 和其宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 购自 Novagen。野生型 HcW 基因片段为本实验室全合成后保存。HcW 蛋白为本实验室表达纯化后保存。小鼠抗破伤风类毒素多抗血清为本实验室制备保存。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥北京有限公司。BALB/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。破伤风毒素和甲醛灭活的破伤风类毒素均为国家药品生物制品检定所赠送。

1.2 方法

1.2.1 HcM 的原核可溶性高表达

选用本实验室之前全合成的 HcW (865-1351) 基因片段为模板,上游引物 ML: 5'-ccggaattcctaagaaaaacttgatgcatgggtcgacaacgaagaag-3' (下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点) 和下游引物 MR: 5'-ccgctcggatcattagtcgttggtccaaccttcac-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点), 采用 *probest* DNA 聚合酶, 致突变 PCR 扩增将原 HcW 片段中的 Cys869 (tgt) 突变为 Ala869 (gca), 从而获得完整的 HcM DNA 片段。HcM 片段回收、酶切后连接入 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后的 pET32a(+) 载体中, 转化后挑取阳性克隆送测序。将测序正确的 HcM 表达质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单克隆至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 28 °C、220 r/min 继续诱导表达 4 h。离心收获菌体沉淀, PBS 重悬后超声碎菌, 离心取上清, 进行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳以检测目的蛋白的表达。

1.2.2 无标签 HcM 的发酵及纯化

表达 HcM 蛋白的种子液 1 L, 转接入 30 L 发酵罐中, 培养至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 28 °C、300 r/min 继续培养 4 h。10 000×g、4 °C 离心收集菌体, 用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液

(pH 8.5) 重悬后匀浆碎菌。20 000×g、4 °C 离心收集上清。上清液过 Q Sepharose XL 柱进行阴离子交换, 用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 平衡后, 用含 0~0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱。含有目的蛋白的洗脱液加入终浓度为 0.8 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后, 过苯基疏水 phenyl-HS 柱进行下一步纯化。目的蛋白用含浓度 0.8~0 mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 Tris-HCl (pH 8.5) 缓冲液进行梯度洗脱。含有目的蛋白的洗脱液用脱盐柱置换缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) 后, 过 source30Q 柱进行进一步的阴离子交换, 目的蛋白用含 0~0.5 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 进行梯度洗脱, 收集产物用 SDS-PAGE 蛋白电泳确定蛋白纯度。

1.2.3 HcM 和 HcW 构象稳定性比较

将纯化后的 HcM 及 HcW 蛋白分别于 4 °C、-20 °C、-80 °C 保存 0 d、2 d、7 d 和 2 个月, 采用非还原 SDS-PAGE 检测蛋白的构象稳定性。

1.2.4 HcM 和 HcW 与神经节苷酯 *GT1b* 的结合

神经节苷酯 *GT1b* 用甲醇稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /孔包被 96 孔酶联板, 室温放置过夜至甲醇完全挥发, PBST 洗涤 5 min, 重复 4 次。将 HcM 和 HcW 分别用 PBST 从 20 $\mu\text{g/mL}$ 进行倍比稀释, 100 μL /孔加入 96 孔板中, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 5 min, 重复 4 次后加入 1:800 稀释的小鼠抗破伤风类毒素多抗血清, 100 μL /孔, 37 °C 继续孵育 1 h。PBST 洗涤 5 min, 重复 4 次后加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗, 37 °C 反应 30~40 min。加入 TMB 显色液, 50 μL /孔, 显色后用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 酶标仪 450 nm 测定光吸收值。

1.2.5 HcM 和 HcW 的免疫原性比较

20 $\mu\text{g/mL}$ 的 HcM 和 HcW 蛋白加入终浓度为 1.5 mg/mL 的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂制成疫苗悬液, 免疫 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 0.5 mL/只进行腹部皮下注射, 6 只/组, 同时设 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂阴性对照组, 每 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次, 每次免疫后 2 周、下一

次免疫前取血检测血清中的抗体滴度; 抗体滴度的测定采用 ELISA 的方法, 破伤风类毒素 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $100\text{ }\mu\text{L}$ /孔包被 96 孔酶联板, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。PBST 洗涤 4 次, 5 min/次 。将抗血清用 PBST 从 $1:100$ 依次倍比稀释后, 加入酶联板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h , 同时设 PBS 免疫后的血清为对照。PBST 洗涤 4 次, 5 min/次 。加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 $30\sim 40\text{ min}$ 。加入 TMB 显色液, $50\text{ }\mu\text{L/孔}$, 显色后用 $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 终止, 酶标仪 450 nm 测定光吸收值。以加入阴性对照血清孔的显色值为对照, 以 OD_{450} 大于 0.1 且高于阴性孔 2 倍为阳性稀释滴度。

1.2.6 HcM 对小鼠的攻毒保护性

将破伤风毒素用硼酸盐缓冲液稀释, 腹腔注射 HcM 和 HcW 免疫 3 次后的小鼠, 每只小鼠注射 0.5 mL , 含 $1\times 10^3\text{ LD}_{50}$ 的破伤风毒素, 每组 6 只小鼠, 同时设阴性对照组。攻毒后每天观察并记录小鼠的发病及存活情况。

2 结果与分析

2.1 HcM 的原核可溶性高表达

PCR 扩增得到的 HcM 片段经酶切后连接入原核表达载体 pET32a(+) 中, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了高效可溶性表达 (图 1), 目的蛋白分子量为 50 kDa 左右, 主要以可溶性的形式存在于碎菌上清中, 约占碎菌上清总蛋白的 40% 。

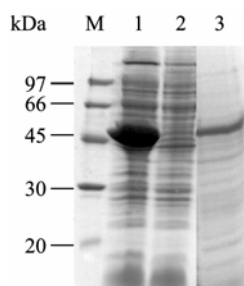


图 1 HcM 在 BL21(DE3) 表达碎菌上清及沉淀中的 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE detection of HcM expressed in the ultrasonic supernatants of BL21(DE3). M: protein marker; 1: supernatant of pET32a(+)-HcM; 2: supernatant of pET32a(+); 3: precipitation of pET32a(+)-HcM.

2.2 无标签 HcM 的发酵与纯化

HcM 蛋白在 30 L 发酵罐中成功进行了发酵, 发酵罐中 pH 控制在 7.0 ± 0.5 , 溶氧控制在 $30\%\sim 80\%$, 通气量 $3\sim 6\text{ L/min}$, 罐压控制在 $0\sim 0.05\text{ MPa}$, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导表达 4 h 后, 收获菌体沉淀, 经匀浆后离心收集表达上清, 依次过 Q Sepharose XL 柱、Phenyl-HS 柱和 source30Q 柱进行纯化, 经过三步纯化后, 无标签的目的蛋白 Hc 得到了很好地纯化, 纯度可达 95% 以上 (图 2), 得率在 300 mg/L 以上, 目的蛋白最终保存在 PBS 缓冲液中。

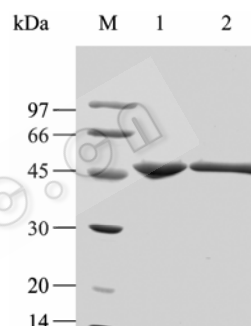


图 2 三步纯化后获得的 HcM 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图
Fig. 2 SDS-PAGE detection of purified HcM after 3 steps purification. M: protein marker; 1,2: purified HcM.

2.3 HcM 的构象稳定性

将纯化后的 HcM 和 HcW 分别在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置不同时间, 观察它们的构象稳定性。实验结果表明 HcW 存在多聚体及 2 种构象形式的单体——氧化型和还原型, 新鲜纯化后的 HcW 主要以还原型为主, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 d 后, HcW 由还原型向氧化型转变, 2 种单体构象形式约各占一半; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 7 d 及 2 个月, HcW 主要以氧化型单体存在且多聚体也有明显增加。而 HcM 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 个月以上仍能保持构象的稳定 (图 3)。HcW 和 HcM 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置不同时间后各构象形式均基本稳定 (数据未显示)。

2.4 HcM 与受体神经节苷酯 GT1b 的结合活性

采用 ELISA 的方法检测了 HcM 及 HcW 与破伤风毒素受体之一 GT1b 的结合活性, 结果表明 (图 4), 与 HcW 相比, HcM 与 GT1b 的结合能力较弱,

这也意味着 HcM 引起体内病理学反应的几率降低，从而可以降低副作用，更加适合用作人用疫苗。

2.5 HcM 的免疫原性分析

采用 Al(OH)₃ 为佐剂，HcM 和 HcW 为蛋白疫苗分别免疫小鼠 3 次，每 2 周免疫 1 次，从每次免疫后测得的小鼠抗破伤风类毒素滴度 (图 5) 可以

看出，第 1 次免疫后 2 周，2 组小鼠抗体的平均滴度均在 1：500 左右；第 2 次免疫后，两组小鼠抗体的平均滴度均高于 1：10 000，且 HcM 组略高于 HcW 组；第 3 次免疫后，2 组小鼠抗体的滴度均为 1：100 000 左右，且 2 组小鼠的抗体滴度之间无明显差别。

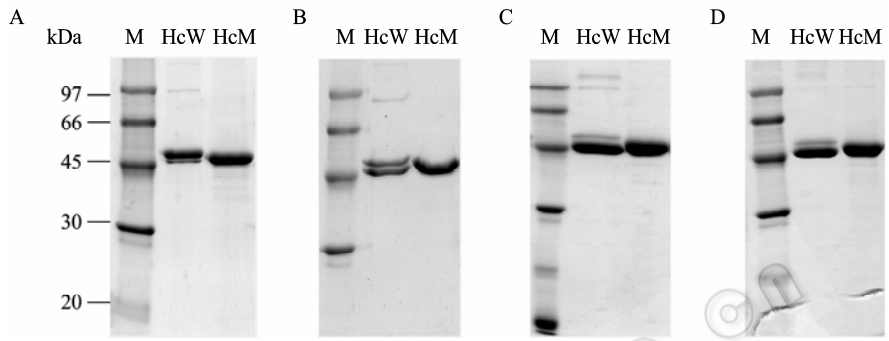


图 3 HcW 和 HcM 在 4 °C 放置不同时间的构象稳定性
Fig. 3 The conformational stability of HcW and HcM at 4 °C for different time. A: 4 °C for 0 d; B: 4 °C for 2 d; C: 4 °C for 7 d; D: 4 °C for 2 months. M: protein marker.

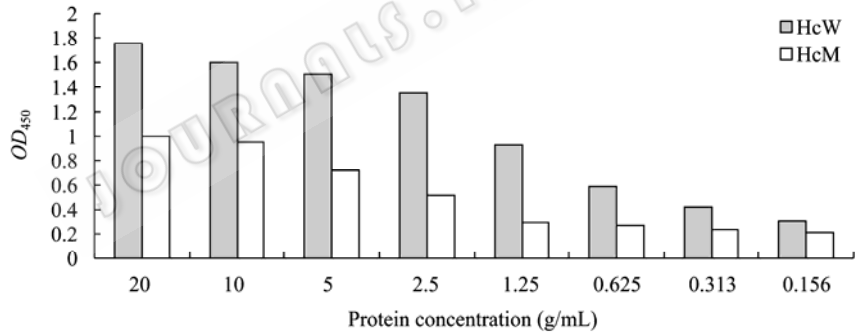


图 4 不同浓度的 HcW 和 HcM 与神经节苷酯 GT1b 的结合活性
Fig. 4 The binding of GT1b with HcW and HcM in different concentration.

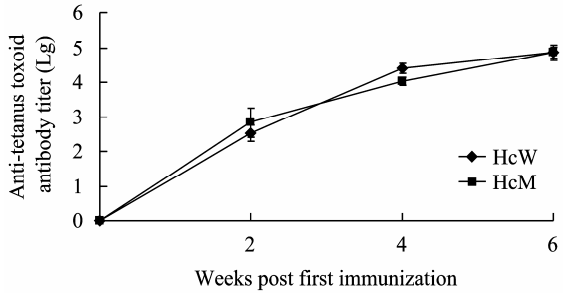


图 5 HcW 和 HcM 免疫小鼠后不同时间测得的抗破伤风类毒素抗体滴度
Fig. 5 The anti-tetanus toxoid antibody titers of mice after HcW and HcM immunization.

表 1 HcW 和 HcM 作为亚单位疫苗对小鼠的体内保护作用

Table 1 <i>In vivo</i> protection of HcW and HcM used as sub-unit vaccine					
Group	Vaccine	Adjuvant	Immune times	Target tetanus toxin	Survival rate
1	PBS	1.5 mg/mL Al(OH) ₃	3	10 ³ LD ₅₀	0/6
2	HcM 10 μg	1.5 mg/mL Al(OH) ₃	3	10 ³ LD ₅₀	6/6
3	HcW 10 μg	1.5 mg/mL Al(OH) ₃	3	10 ³ LD ₅₀	6/6

2.6 HcM 对小鼠的攻毒保护性

用含 1×10^3 LD₅₀ 的破伤风毒素攻击免疫 3 次后的小鼠, 观察小鼠的存活情况, 从实验结果 (表 1) 可以看出, 10 μ g 的 HcM 可以完全保护小鼠抵御 1×10^3 LD₅₀ 的破伤风毒素攻击, 其保护效果同 HcW 相当。

3 讨论

破伤风毒素的毒性非常强烈, 仅次于肉毒毒素, 约 100 ng 的破伤风毒素便可以致人死亡, 因此极有可能被用于生物战剂。1997 年召开的生物武器公约缔约国政府专家特设小组第七次会议确定的生物战剂标准与战剂病原体清单中, 破伤风毒素被列为用于攻击人的毒素。安全、有效的破伤风疫苗对于部队的平、战时均具有特殊意义, 在进行野外作战、执行维和任务及抗震救灾时可作为药品储备及安全保障。一切开放性的伤口均由发生破伤风的可能, 随着我国饲养宠物的家庭越来越多, 感染破伤风的风险和几率也在逐渐扩大, 基因工程破伤风亚单位疫苗的研制成功, 将使广大民众能接种安全有效的新型疫苗, 减少破伤风发病率, 具有良好的应用前景。

目前国内外均没有重组破伤风疫苗临床前或临床研究的报道, 原因是表达纯化的 Hc 蛋白存在表达量较低、易形成包涵体且免疫原性低等问题。本实验室已经在大肠杆菌中成功获得了野生型 HcW 蛋白的可溶性高表达, 其免疫原性与类毒素相当, 但由于破伤风毒素 HcW 片段在 869、1077、1093 和 1301 位存在 4 个半胱氨酸 cys, 其中 869 位和 1093 位的 cys 易形成分子内二硫键, 其余的 cys 可形成分子间二硫键^[12], 因此其构象极其不稳定, 这给疫苗后续的生产工艺带来了一定的困难, 因此, 本研究通过将 Hc 片段 869 位关键的 cys 突变为 Ala, 使其形成条带均一、构象稳定的蛋白 HcW, 并且对其蛋白稳定性、受体结合能力及免疫原性进行了分析, 实验结果表明突变后的蛋白保持了单一的单体构

象, 在 4 $^{\circ}$ C 放置 2 个月以上仍能保持构象的稳定; 尽管与 HcW 相比, HcM 与受体神经节苷酯 GT1b 的结合活性略有下降, 但这也意味着 HcM 在体内引起的病理反应也会相应减少, 从而减少疫苗的毒副作用。但突变后的 HcW 仍能够诱导小鼠产生高滴度的抗破伤风类毒素抗体, 并能保护小鼠抵御至少 1×10^3 LD₅₀ 的破伤风毒素的攻击。

构象稳定的破伤风 HcW 蛋白具有开发成为新型破伤风重组亚单位疫苗的潜力, 其成功研制可为破伤风的预防提供一条更加安全、有效、简便的道路。

REFERENCES

- [1] Mallick IH, Winslet MC. A review of the epidemiology, pathogenesis and management of tetanus. *Int J surg*, 2004, 2(2): 109–112.
- [2] Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nature Struct Biol*, 1998, 5(10): 898–902.
- [3] Quinn HE, McIntyre PB. Tetanus in the elderly –An important preventable disease in Australia. *Vaccine*, 2007, 25(7): 1304–1309.
- [4] Bizzini B, Stoeckel K, Schwab M. An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. *J Neurochem*, 1977, 28(3): 592–542.
- [5] Matsuda M, Lei DL, Sugimoto N, et al. Isolation, purification, and characterization of fragment B, the NH22-terminal half of the heavy chain of tetanus toxin. *Infect Immun*, 1989, 57(11): 3588–3593.
- [6] Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, et al. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J*, 1992, 11(10): 3577–3583.
- [7] Lafaye P, Nato F, Mazié JC, et al. Similar binding properties for a neutralizing anti-tetanus toxoid human monoclonal antibody and its bacterially expressed Fab. *Res Immunol*, 1995, 146(6): 373–382.
- [8] Rummel A, Bade S, Alves J, et al. Two carbohydrate binding sites in the H_{cc}-domain of tetanus neurotoxin are

- required for toxicity. J Mol Biol, 2003, 326(3): 835–847.
- [9] Halpern JL, Loftus A. Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. J Biol Chem, 1993, 268(15): 11188–11192.
- [10] Herreros J, Lalli G, Schiavo G. C-terminal half of tetanus toxin fragment C is sufficient for neuronal binding and interaction with a putative protein receptor. Biochem J, 2000, 347(Pt 1): 199–204.
- [11] Wells JM, Wilson PW, Norton PM, et al. *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. Mol Microbiol, 1993, 8(6): 1155–1162.
- [12] Qazi O, Bolgiano B, Crane D, et al. The H_C fragment of tetanus toxin forms stable, concentration-dependent dimers via an intermolecular disulphide bond. J Mol Biol, 2007, 365(1): 123–134.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

医学免疫学

西安交通大学研究生教育系列教材

袁育康 主编

开本: B5 营销分类: 医药卫生教材 装帧: 平装

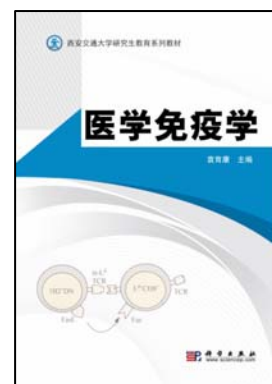
ISBN 978-7-03-029329-9 ¥ 48.00 2010 年 11 月出版

内容简介

本书是西安交通大学研究生院为配合研究生学位课程教学改革而组织编写的研究生系列教材之一, 由国内 7 所医科大学和综合性大学医学院免疫学专业教师共同编写而成。在编写过程中, 根据编者多年的免疫学教学经验及对研究生、本科生免疫学学习的了解, 为减少与本科教材的重复, 本书在内容的取舍上做了尝试, 省略了在本科阶段已重点学习过的抗原、抗体、补体 3 个章节, 免疫系统也仅作简要介绍。另考虑到自身免疫病的发病机制可以理解针对自身成分的过度的、不受控制的应答分别属于 II、III、IV 型过敏反应, 故本书尝试将它与过敏反应合为 1 章, 旨在突出在研究生学习阶段免疫学需掌握的重点。

本书各章重点突出, 层次清晰, 文字力求简洁通顺。结合研究生阶段的学习特点, 全书在内容上既强调“三基”, 又适当增加了现代免疫学最新进展及免疫学研究历史上的经典实验, 以期学生能有所借鉴。

本书主要读者对象为医学院校基础及临床专业的研究生, 也可供本科生、长学制医学生及有关专业临床医生作为参考书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目