

胸膜肺炎放线杆菌毒力因子重组
蛋白免疫原性研究

贺 英,赵 萍,储岳峰,高鹏程,石 琴,逯忠新
(中国农业科学院 兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,
农业部畜禽病毒学重点开放实验室,甘肃 兰州 730046)

【摘 要】 【目的】研究猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(APP)重组亚单位疫苗的免疫保护效果。【方法】用 1.0 mmol/L IPTG 诱导重组表达质粒 pET-Apx I A、pET-ApxⅢ A 和 pPRoAppOML-1,SDS-PAGE 鉴定。纯化的表达产物通过 Western blot 分析有较好的免疫原性。将 rApx I、rApxⅢ 和 rOmp 组合作为疫苗 I 组,rApx I、rApxⅢ、rOmp 和灭活菌苗组合作为疫苗 II 组,APP 1、3、7 型菌制备的灭活疫苗作为疫苗 III 组,PBSⅣ作为空白对照组,进行家兔的免疫试验。免疫共分 2 次,每次间隔 2 周。【结果】疫苗 II 组的抗体水平均显著高于疫苗 III 组,疫苗 I 组抗体水平不如疫苗 III 组,其血清效价最高滴度为 1 : 256。【结论】猪传染性胸膜肺炎毒力因子重组蛋白具有一定的免疫原性,为进一步研究新型亚单位疫苗奠定了基础。

【关键词】 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌;免疫原性;基因工程苗;免疫试验
【中图分类号】 S852.4⁺1;S859.79⁺7 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)10-0014-05

Study on immunogenic recombinant proteins of virulence factors
of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

HE Ying,ZHAO Ping,CHU Yue-feng,GAO Peng-cheng,SHI Qin,LU Zhong-xin
(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture,State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,Lanzhou
Veterinary Research Institute,Chinese Academy of Agricultural Sciences,Lanzhou,Gansu 730046,China)

Abstract: 【Objective】 The research studied immunoprotection effect of *Actinobacillus pleuropneumonia* recombination subunit vaccine. 【Method】 The recombinants pET- Apx I A,pET- ApxⅢ A,pPRoAppOML-1 were constructed by testing laboratory. Bacterial lyses prepared from 1.0 mmol/L IPTG induced cultures were loaded directly on to SDS-PAGE. The proteins were immunogenic when detected by Western-blot analysis. These results suggest that purified protein has bioactivity. The rabbit were immunized with recombinants of rApx I ,rApxⅢ and rOmp (group I);that of rApx I ,rApxⅢ ,rOmp and viable organism (group II);inactivated vaccine of *Actinobacillus pleuropneumonia* (APP) serotype 1,3 and 7 (group III);PBS (control group). After detecting antibody titers,the immune protection efficacy of multicomponent re-combinant subunit vaccines was assessed. 【Result】 Results showed that the levels of antibodies,group II were significantly higher than those of the other two groups,but levels of antibodies of group I were lower than group III . and sera titers reached the highest dilution of 1 : 256. 【Conclusion】 Recombinant proteins of virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* have immunogenic,which is the basis to study new

* [收稿日期] 2007-10-25
[基金项目] 国家科技支撑计划子课题(2006BAD06A12)
[作者简介] 贺 英(1980—),女,内蒙古乌兰察布市察哈尔右翼中旗人,研究实习员,主要从事细菌分子生物学研究。
[通讯作者] 逯忠新(1955—),男,甘肃秦安人,研究员,主要从事细菌分子生物学研究。E-mail:luzhongxin@hotmail.com

type subunit vaccine.

Key words: APP;immunogenicity;vaccine;immunity test

自 1957 年 Pattison 首次报道猪传染性胸膜肺炎以来,本病几乎遍及世界所有养猪国家,且流行日趋严重,已成为世界性规模化养猪业的重大疫病之一^[1]。实践证明,抗生素只能应用于本病的早期治疗,对慢性感染和急性感染后期,抗生素的疗效极不明显,且猪胸膜肺炎放线杆菌(APP)极易产生耐药性,所以预防和控制本病的重要措施为疫苗免疫。目前,国内外运用最多的疫苗为 APP 全菌灭活疫苗。在国内,由中国农业科学院兰州兽医研究所逯忠新研究员首先研制出的三价灭活疫苗,为控制猪传染性胸膜肺炎的流行起到了至关重要的作用。但 APP 血清型较多,血清型之间的交叉保护作用小,三价灭活疫苗虽然控制了我国主要流行血清型的蔓延,但随着国际贸易的日趋频繁,其他血清型已经逐步流行于我国。鉴于此,为了更加有效地减少猪传染性胸膜肺炎对养猪业造成的经济损失,更好地控制该病的流行,当务之急是要研究出一种具有较高的交叉保护性、且成本低、实用性好的新型疫苗。

据研究,APP 毒力因子是其主要抗原^[2-4],故本研究尝试将其毒力因子结构蛋白中的特异性片段重组,通过表达和反应原性试验进行验证,制备一种重组亚单位疫苗,以期获得免疫原性强、交叉保护性好的优质疫苗,为猪传染性胸膜肺炎重组亚单位疫苗的研究奠定基础,同时为控制猪传染性胸膜肺炎的发生及传播提供一条途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 1.5 kg 的比利时大白兔,购自兰州兽医研究所试验动物场。

1.1.2 主要试剂 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、盐酸胍(guanidine hydrochloride)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚乙二醇(PEG1500)、二硫苏糖醇(DTT)、甘氨酸(Glycine)、尿素等,购自 BBI 公司;低分子质量标准蛋白 Marker,购自 Promega 公司;丙烯酰胺溶液(29:1)储存液、Trion-X 100、Tween-20、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、硝酸纤维素膜(NC 膜)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、月桂肌氨酸、20×PBS 浓缩液、氨基黑等,购自上海生工生物工程技术有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗猪 IgG(HRP-IgG),

购自 Gibco 公司;二氨基联苯胺(DAB)、牛血清白蛋白(BSA),购自 Sigma 公司;其余试剂均为国产分析纯。ISO206 油佐剂、APP 正向间接血凝试剂盒,由兰州兽医研究所传染病室传胸组提供。

1.1.3 菌种及质粒 APP 标准菌株和 APP 毒素重组质粒 pET-Apx I A、pPRoAppOml-1、pET-ApxⅢ A,由兰州兽医研究所传染病室传胸组构建并保存。

1.2 细菌培养及计数

按实验室常规方法进行。

1.3 毒素基因在 JM109(DE3)中的诱导表达及包涵体的制备纯化

1.3.1 毒素基因在 JM109(DE3)中的诱导表达 将兰州兽医研究所传染病室传胸组保存的重组质粒 pET-Apx I A、pET-ApxⅢ A 转入大肠杆菌 *E. coli* JM109(DE3),然后将其涂布于含有卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 培养基上,37 ℃培养 18 h 可挑取单菌落划线培养,再接入 5 mL LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 摇菌培养 6~8 h 后,用 0.5~1.0 mmol/L IPTG 诱导表达,在同样条件下继续培养约 8 h。

同时将本实验室保存的 pPRoAppOml-1 转入大肠杆菌 *E. coli* JM109(DE3),然后将其涂布于含有标准氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 培养基上,37 ℃培养 18 h 后挑取单菌落划线培养,再接入 5 mL LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 摇菌培养 6~8 h 后,用 0.5~1.0 mmol/L IPTG 诱导表达,在同样条件下继续培养约 8 h。

1.3.2 包涵体的制备纯化 收集诱导表达的重组菌全菌液,4 ℃、7 500 r/min 离心 10 min,弃上清。分别用去离子水和冰冷的 1×PBS(pH 7.4)洗涤菌体沉淀各 1 次,每次 4 ℃、7 500 r/min 离心 10 min,弃上清。按 5 mL PBS/100 mL 原菌液量重新悬浮菌体沉淀,4 ℃作用 30 min 后置冰上进行超声波破碎(250 W 下,脉冲 5 s,间隔 5 s,作用温度 4 ℃,处理 10~15 min。处理应以不产生泡沫、尖锐刺耳声和菌液成半透明为度),-20 ℃冻存数小时,再次进行超声波破碎(同上述条件)。超声破碎 2 次后,4 ℃、7 500 r/min 离心 10 min,弃上清,所得沉淀即为包涵体。用细胞裂解液Ⅱ洗涤所得包涵体 2~3 次,去离子水洗涤 1~2 次,之后将其置于-20 ℃冻存

备用^[5]。

1.4 疫苗的制备

1.4.1 重组蛋白浓度的测定 用 2 mmol/L 尿素对 3 种包涵体 rApx I、rApxⅢ 和 rOmp 进行纯化,纯化产物进行 10 倍稀释,并设 PBS 为空白对照,用紫外分光光度计分别在 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 处测吸光度,根据公式 $2 \times (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260})$ 计算出蛋白浓度^[6]。

1.4.2 疫苗的制备 (1)灭活疫苗的制备。将 APP 1、3、7 型纯培养后^[7],挑取单个菌落 8~10 个,涂于猪传染性胸膜肺炎琼脂平板上(含 100 μg/mL NAD 和体积分数 10% 灭活马血清)。37 ℃ 培养 16~18 h 后,用灭菌的 0.01 mol/L PBS 将平板上的菌苔洗下,稀释至 1×10^9 cfu/mL,用甲醛(体积分数 0.3%)灭活 24~48 h,然后与 ISO206 油佐剂按比例混和,制备油乳剂灭活疫苗,APP 的终浓度为 5×10^8 cfu/mL。

(2)多组份重组亚单位菌苗的制备。将用甲醛灭活的灭活苗和各种重组蛋白按照一定的比例组合后,与 ISO206 油佐剂按比例混合乳化,使菌苗中每种蛋白终浓度为 125 μg/mL。

(3)多组份重组亚单位疫苗的制备。将各种重组蛋白按照一定的比例组合后,与 ISO206 油佐剂按比例混合乳化,使疫苗中每种蛋白终浓度为 125

μg/mL。对照组则用 PBS 代替抗原组份与 ISO206 油佐剂按比例混合乳化^[8]。

1.5 动物分组及免疫

将 24 只比利时雄白兔分为 4 组,疫苗 I 组(rApx I+rApxⅢ+rOmp)、疫苗 II 组(rApx I+rApxⅢ+rOmp+灭活疫苗)和疫苗 III 组(灭活疫苗),以 PBS 为对照组,每组 6 只。背部皮下六点注射,免疫后 2 周再加强免疫 1 次,免疫剂量均为 1.4 mL/只。

1.6 猪传染性胸膜肺炎毒素重组蛋白疫苗免疫效果的监测

供试兔首次免疫前采血 1 次,并于首免后 14 d 及二免后 7,14,21,28,40 和 40 d 后(即首免后 14,21,28,35,42,54 和 68 d 后)分别采血,运用兰州兽医研究所传染病室传胸组实验室提供的 APP 间接血凝试剂盒进行监测和抗体效价的评估。

2 结果与分析

2.1 猪传染性胸膜肺炎毒素重组蛋白及纯化产物的鉴定

2.1.1 SDS-PAGE 鉴定 由图 1 可以看出,pET-Apx I A 和 pET-ApxⅢ A 重组菌表达产物得到了表达,经 SDS-PAGE 可见,在 41 ku 处均出现蛋白条带,与预期的目的蛋白大小一致。

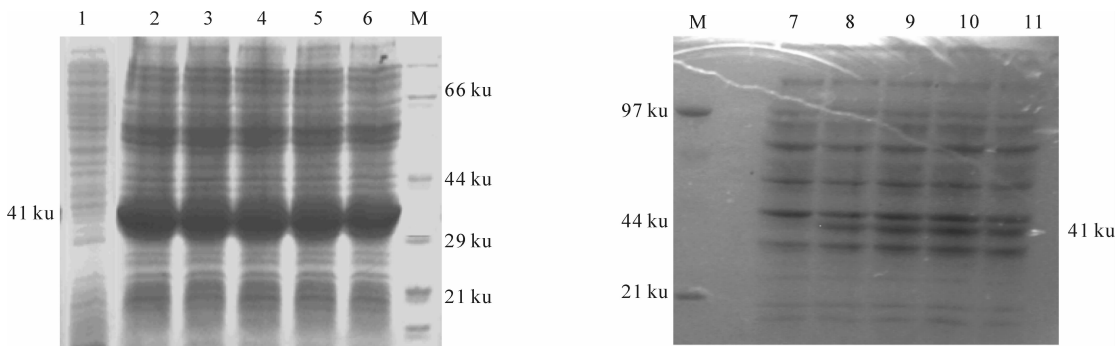


图 1 pET-Apx I A 和 pET-ApxⅢ A 重组菌表达产物的 SDS-PAGE

1,7. IPTG 诱导的 pET-28a 产物;2~6. 分别为诱导 2,4,6,8,10 h 的 pET-Apx I A 产物;8~11. 分别为诱导 2,4,6,8 h 的 pET-ApxⅢ A 产物;M. 蛋白分子质量标准

Fig. 1 SDS-PAGE of expression products of the pET-Apx I A and pET-ApxⅢ A

1,7. pET-28a product induced with IPTG;2~6. pET-Apx I A 2,4,6,8,10 h product induced with IPTG;
8~11. pET-ApxⅢ A 2,4,6,8,10 h product induced with IPTG;M. Protein Marker

由图 2 可知,pPRoAppOml-1 重组菌得到表达,经过蛋白电泳出现一条大小约 45 ku 的目的条带,与预期大小一致。

由 3 种重组菌表达产物纯化后的 SDS-PAGE 电泳图可以看出,经过纯化后杂蛋白得到处理,得到了较纯的目的蛋白。

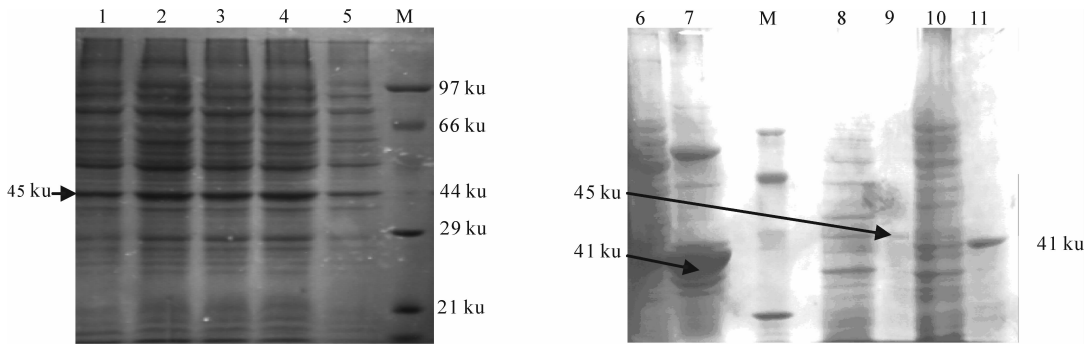


图 2 pPRoAppOml-1 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 和重组菌表达产物纯化的 SDS-PAGE

1~5. IPTG 分别诱导 10,8,6,4,2 h 的 pET-ApxⅢ A 产物;M. 蛋白分子质量标准;6,8,10. 分别为诱导 pET-Apx I A、pPRoAppOml-1 和 pET-ApxⅢ A 的产物;7,9,11. 分别为诱导 pET-Apx I A、pPRoAppOml-1 和 pET-ApxⅢ A 纯化后的产物

Fig. 2 SDS-PAGE of expression products of the pPRoAppOml-1 and expression products of the recombinant bacteria
1—5. pET-ApxⅢ A 10,8,6,4,2 h products;M. Protein Marker;6,8,10. pET-Apx I A,pPRoAppOml-1,pET-ApxⅢ A products;
7,9,11. pET-Apx I A,PPRocAppOML-1,pET-ApxⅢ A purified expression products

2.1.2 Western-blot 鉴定 经过 Western-blot 分析可知,3 种重组菌的纯化产物分别在 41,45 ku 处出现特异性条带(图 3),说明所表达蛋白具有良好的反应原性。

2.2 猪传染性胸膜肺炎毒素重组蛋白疫苗抗体监测结果

从表 1 可以看出,疫苗Ⅱ组免疫效果最好,其次是疫苗Ⅲ组,最后是疫苗Ⅰ组,PBS 组(Ⅳ组,CK)均为阴性,说明重组蛋白在免疫过程中起到了一定的作用,但是当其单独作为亚单位疫苗免疫动物时,效果不是最佳。

由图 4 可以直观看出,各试验组抗体消长规律基本一致,均在首免后 35 d(二免后 21 d)左右达到高峰,并持续一段时间,在首免后 40 d 抗体效价有所下降,但仍保持较高水平。

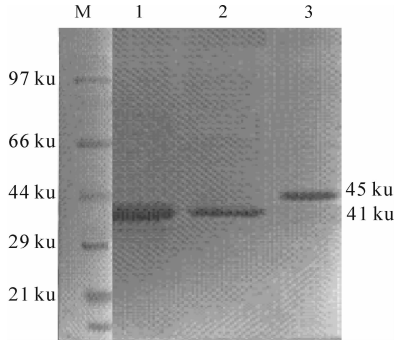


图 3 3 种重组菌表达产物的 Western-blot 分析
M. 蛋白 Marker;1~3. 分别为 IPTG 诱导 pET-Apx I A、pET-ApxⅢ A、pPRoAppOml-1 的产物

Fig. 3 Western-blot test three kinds of expression product
M. Protein Marker;1—3. pET-Apx I A,pET-ApxⅢ A and pPRoAppOml-1 expression products with IPTG

表 1 APP 毒素重组蛋白疫苗免疫比利时大白兔后的正向间接血凝试验结果

测定时间 Determination time	分组 Group			
	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ(CK)
首免前 Before a first immunity	—	—	—	—
首免 14 d First immunity 14 d	1 : 32	1 : 512	1 : 256	—
二免 7 d Second immunity 7 d	1 : 64	1 : 2 048	1 : 1 024	—
二免 14 d Second immunity 14 d	1 : 128	1 : 4 096	1 : 1 024	—
二免 21 d Second immunity 21 d	1 : 256	1 : 4 096	1 : 1 024	—
二免 28 d Second immunity 28 d	1 : 256	1 : 4 096	1 : 1 024	—
二免 54 d Second immunity 54 d	1 : 128	1 : 2 048	1 : 512	—
二免 68 d second immunity 68 d	1 : 128	1 : 2 048	1 : 512	—

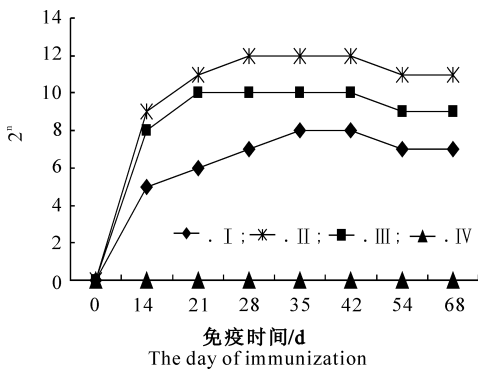


图 4 APP 毒素重组蛋白疫苗免疫比利时大白兔后抗体的消长规律

Fig. 4 Change law of levels of serum antibodies to APP toxins recombination protein vaccine immune Belgian albino rabbit

3 讨 论

APP 是一种多毒力因子的条件致病菌,其致病因子及其致病机理非常复杂。近年来的研究表明,与病原菌毒力相关的因子有外毒素、荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、脲酶、转铁结合蛋白酶和菌毛等,在所有致病因子中最重要的是外毒素和外膜蛋白,其也是 APP 的主要免疫原^[9-10]。自发的毒素阴性的 APP 菌株被证明是无毒力的,这也通过转座子诱变及同源 APPapxC 插入突变得得到证实^[8-9]。故运用毒素和外膜蛋白进行重组,有望研制新型亚单位疫苗,以控制猪传染性胸膜肺炎的流行和减少相应的经济损失。

有研究发现,APP 毒素对各血清型间的交叉保护起着重要的作用,加有毒素的菌苗交叉保护力大为提高^[11-13]。传统的毒素提取方法成本较高,而利用基因工程的方法则可解决这一问题。本试验利用大肠杆菌表达 APP 的 2 种毒素和外膜蛋白,先利用 Western blot 方法证实表达毒素可以与天然毒素的抗体进行反应;再通过动物试验进一步验证了表达毒素的抗体产生能力及免疫效价。

本次研究的亚单位疫苗虽然有一定的免疫效价,但与国内首选的灭活疫苗相比效果较差,而亚单位菌苗的抗体效价却远远高于灭活疫苗,这充分说明表达抗原起到了很大作用,为进一步研制新型疫苗奠定了良好基础。

[参考文献]

[1] Beaudet R, Mcsween G, Boulay G, et al. Protection of mice and

swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 39(1/2): 71-81.

[2] Bhatia B, Mittal K R, Frey J. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 29(2): 147-158.

[3] Cruz W T, Nedialkov Y A, Thacker B J, et al. Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(1): 83-90.

[4] Van D B H, Frey J. Interference of outer membrane protein PaIA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs [J]. *Vaccine*, 2003, 21(25/26): 3601-3607.

[5] Deneer H G, Potter A A. Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Infect Immun*, 1989, 57(3): 798-804.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 17.

The Veterinary Drugs Dispensatory Committee of China. The veterinary drugs dispensatory of the People's Republic of China [M]. Beijing: Chinese Agriculture Publishing House, 2000: 17. (in Chinese)

[7] Frey J, Kuhnert P, Villiger L, et al. Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins [J]. *Res Microbiol*, 1996, 147(5): 351-361.

[8] Hensel A, Huter V, Katinger A, et al. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state [J]. *Vaccine*, 2000, 18(26): 2945-2955.

[9] Huter V, Hensel A, Brand E, et al. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine [J]. *Biotechnol*, 2000, 83(1/2): 161-172.

[10] Seath J N, Frey J, Kwang J. The N-terminal domain of RTX toxin Apx I of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicit protective immunity in mice [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(4/5): 6464-6467.

[11] Gerlach G F, Anderson C, Klashinsky S, et al. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmIA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 [J]. *Infect Immun*, 1993, 61(2): 565-572.

[12] Frey J. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 216(7/8): 87-95.

[13] Frey J, Beck M, Stucki U, et al. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Gene*, 1993, 123(1): 51-58.