

重组产毒多杀性巴氏杆菌毒素 PMT 的 N-端和 C-端蛋白的生物学活性及免疫原性

汤细彪¹, 吴斌^{1*}, 赵战勤¹, 邓永², 何华¹, 何启盖¹, 陈焕春¹

(¹华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

(²中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘要: 将 5 个 *tox A* 基因片段 N1518、C2345、N3172、N3388 和 C2115 分别克隆到合适的原核表达载体 pET-28a(b,c)系统, 其中 pET28a-N1518 和 pET28b-C2115 在大肠杆菌成功表达, 获得大小分别为 57kDa 和 78kDa 的融合蛋白 rPMT-N 和 rPMT-C, Western blot 检测证实两种表达产物均具有反应原性。分别以 200 μ g rPMT-N 和 rPMT-C 对小白鼠进行体内生物学活性试验, 结果两种表达蛋白均不能致死小白鼠; 体外细胞毒性试验证实 896ng/mL 的 rPMT-N 能使 Vero 细胞发生病变, 而 rPMT-C 对 Vero 细胞无明显毒性作用。将 rPMT-N 和 rPMT-C 制成亚单位疫苗, 同时设天然 PMT 及无菌 PBS 对照组, 间隔 2 周分 2 次皮下免疫小白鼠。二免后 2 周用 8.2×10^5 CFU 的 HN-13 株 T⁺Pm 进行腹腔攻毒, 结果 rPMT-N 组保护率为 90.0%(9/10), rPMT-C 组保护率为 50.0%(5/10), 天然 PMT 组保护率为 80.0%(8/10)。综上试验表明, rPMT-N 具有良好的生物学活性和免疫原性, 可作为 PAR 疫苗添加成分, 显示了良好的应用前景。

关键词: 产毒多杀性巴氏杆菌; PMT; 亚克隆; 生物学活性; 免疫原性

中图分类号: S852.61+5 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 02-0213-07

产毒多杀性巴氏杆菌(*toxigenic Pasteurella multocida*, T⁺Pm)是引起猪进行性萎缩性鼻炎(progressive atrophic rhinitis, PAR)的主要病原菌。该菌分泌一种约 146kDa 的皮肤坏死毒素(*Pasteurella multocida* toxin, PMT), 由 *tox A* 基因编码, 可直接引起猪鼻炎、鼻梁变形、鼻甲骨萎缩甚至消失, 全身代谢障碍, 生产性能下降, 同时可诱发其它病原微生物感染, 甚至导致死亡^[1~3]。PAR 被誉为世界规模化养猪五大传染病之一, 并被国际兽疫局(OIE)定为 B 类动物传染病^[4]。

PMT 是 T⁺Pm 在对数生长期后期分泌的, 培养 24h 内 T⁺Pm 分泌的 PMT 一般存在于胞内, 而 24h 以后 PMT 可直接分泌到胞外^[5]。该毒素是一种有丝分裂原, 它与哺乳动物细胞上的受体结合、进入细胞后, 可以

启动 DNA 的合成, 独自可引起细胞生长和分裂; 同时, PMT 通过对造骨细胞有丝分裂的激活, 使造骨细胞出现异常生长及形态变化, 最终导致破骨细胞对骨细胞的裂解^[6, 7]。PMT 具有很强的致病性, 小鼠对该毒素极其敏感, LD₅₀ 为 0.2 μ g/只^[8], 且注射少量提纯的天然 PMT 或人工表达 rPMT 就可以复制出典型 PAR 临床症状^[9]。

随着人们对 PAR 致病机理的深入了解, 预防该病的最好方法为疫苗免疫^[10]。目前, 用于预防和控制 PAR 的商品化疫苗主要有灭活菌苗和类毒素苗, 其中类毒素苗免疫效果优于灭活菌苗, 并证实不同型菌株的类毒素具有交叉保护^[11]。然而, 天然 PMT 的分泌量非常有限, 不到菌体蛋白 0.6%, 且纯化工艺

基金项目: 国家自然科学基金(30471292); 湖北省科技攻关项目(2001AA201)

*通讯作者。Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 汤细彪 (1980-), 男, 湖北鄂州人, 博士研究生, 主要从事动物病原分子生物学和免疫学研究。E-mail: tangren77@126.com

收稿日期: 2007-05-25; 修回日期: 2007-11-07

复杂,人工表达全毒素的效率也较低,因此通过提纯天然 PMT 和体外表达 rPMT 来制备类毒素苗需要昂贵的成本,不适和规模化生产^[12]。近几年,有学者预测 PMT 应该包含黏附位点、跨膜位点和催化位点,据此有人推测部分缺失的 PMT 蛋白可以失去其致病性而保留免疫原性^[13,14]。本研究旨在通过分子生物学方法对毒素 *toxA* 基因进行分段亚克隆、表达,开展动物试验,分析毒素 PMT 的主要免疫原性区段,为 PAR 新型疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:产毒多杀性巴氏杆菌 HN-13 株由本实验室分离、鉴定并保存; *E.coli* DH5 α 、*E.coli* BL21(DE3)、原核表达质粒 pET-28a(b,c)、重组表达质粒 pET28a-*toxA* 和各种阴、阳性血清及 Vero 细胞均由本室保存。

1.1.2 主要试剂:T4 DNA 连接酶、限制性内切酶及 PCR 试剂、DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司,UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工, IPTG、硝酸纤维素膜购自 Promega 公司,蛋白质 Marker 购自 NEB 公司,HRP 标记的羊抗猪 IgG 抗体、底物 DAB 购自华美公司,His. Band Purification Kit 购自 Novagen 公司。

1.1.3 引物设计:参考 GenBank 上公布的 *toxA* 基因序列(登录号:Z28388),利用 Primer 5.0 软件,自行设计一对引物,扩增 *toxA* 基因 C-端 2115bp 片段,其序列见表 1。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 *toxA* 基因 C-端表达载体 pET28b-C2115 引物序列
Table 1 Primers used to construct recombinant plasmid pET28b-C2115

Primer	Sequence(5'→3')	Gene	Size/bp
P1	TAGGATCCTTCCGTATTGGATTAG	<i>toxA</i> -C	2115
P2	AAGTCGACTTAAGAA AGTTGTATTGG		

1.2 *toxA* 基因 5 个亚克隆表达载体的构建

1.2.1 重组质粒 pET28a-N1518:参考 GenBank 上公布的 *toxA* 序列(登录号:Z28388)可知该毒素基因有唯一的单酶切位点 *Xho* (图 1),以 *Xho* 酶切重组质粒 pET28a-*toxA*,回收大片段,构建重组表达质粒 pET28a-N1518(含 *toxA* 基因 N-端 1518bp)。

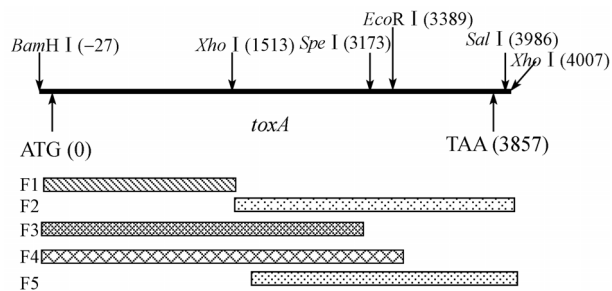


图 1 毒素 *toxA* 基因的分段克隆

Fig.1 subclone of *toxA* gene.

1.2.2 重组质粒 pET28b-C2345:将 pET28a-*toxA* 用 *Xho* 酶切后回收小片段,连接到 pET-28b 的 *Xho* 酶切位点,构建重组表达质粒 pET28b-C2345(含 *toxA* 基因 C-端 2345bp)。

1.2.3 重组质粒 pET28a-N3172:将 pET28a-*toxA* 用 *Spe* 和 *Sal* 双酶切,回收大片段并用 T4 DNA 聚合酶补平后连接,构建重组表达质粒 pET28a-N3172(含 *toxA* 基因 N-端 3172bp)。

1.2.4 重组质粒 pET28a-N3388:将 pET28a-*toxA* 用 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切,回收大片段并用 T4 DNA 聚合酶补平后连接,构建重组表达质粒 pET28a-N3388(含 *toxA* 基因 N-端 3388bp)。

1.2.5 重组质粒 pET28b-C2115:采用 50 μ L 反应体系,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C5min; 94 $^{\circ}$ C30s, 56 $^{\circ}$ C30s, 72 $^{\circ}$ C2min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C10min。将回收的 *toxA* 基因 C-端 2115bpPCR 产物直接克隆到 pET-28b 的 *BamH* 和 *Sal* 之间,构建重组表达质粒 pET28b-C2115。

将构建的 5 个 *toxA* 基因亚克隆表达载体分别转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取转化子,小量制备质粒,用相应的工具酶进行鉴定。

1.3 重组质粒的诱导表达

将构建的原核表达质粒:pET28a-N1518、pET28b-C2345、pET28a-N3172、pET28a-C3388、pET28b-C2115 及空白载体 pET-28b 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单个转化菌落于 3mL 含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素(Kan)的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期(OD_{600} =0.8~1.0)时,加入 0.8mmol/L IPTG 诱导 3.5h,离心收集菌体,并加入等体积的上样缓冲液,进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。结果构建的重组质粒中只有 pET28a-N1518 和 pET28b-C2115 可以成功表达大小分别约 57kDa(rPMT-N)和 78kDa(rPMT-C)的融合

蛋白。

1.4 rPMT-N 和 rPMT-C 的纯化及 Western blot 检测

将诱导的菌体离心收集, 以 PBS(pH 7.2)洗涤菌体一次, 应用德国 Novagen 公司 His. Band Purification Kit 试剂盒提纯 rPMT-N 和 rPMT-C 蛋白。蛋白质浓度用 BCA 法测定, -80°C 保存备用。按照文献[15]的方法进行 Western blot 检测, 一抗为猪抗产毒多杀性巴氏杆菌阳性标准血清, 二抗为羊抗猪 IgG-HRP。

1.5 天然 PMT 提取及毒素抗体 ELISA 检测方法的建立

按文献[8]报道方法提取天然毒素 PMT, 进行 SDS-PAGE 检测。蛋白质浓度用 BCA 法测定, -80°C 保存备用。以不同浓度提取的天然 PMT 包被酶标板, 用猪阴、阳性血清进行方阵滴定, 确定最佳抗原包被浓度、最佳血清稀释度、阴阳性临界值, 用建立的毒素抗体 ELISA 方法检测血清中毒素抗体效价。

1.6 rPMT-N 和 rPMT-C 的生物学活性

1.6.1 体外细胞毒性试验：试验分 4 组, 第一组为 rPMT-N, 第二组为 rPMT-C, 第三组为天然 PMT, 对照组为 DMEM 培养液。参照 Rutter 等方法^[5], 每组在 96 孔微量板上培养 Vero 细胞, 每孔加 $100\mu\text{L}$ 含有 5×10^3 个细胞的悬液, 在含 $5\% \text{CO}_2$ 的 37°C 培养箱中孵育 12 ~ 24h, 至形成 70 ~ 80% 单层细胞, 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 2 倍梯度稀释的蛋白, 同时设两纵排正常细胞对照。在上述 37°C 条件下孵育 3 ~ 4d, 逐日观察并记录最终 CPE, 出现 CPE 的稀释度的倒数即为毒素效价。

1.6.2 小鼠感染试验：32 只 6 周龄雌性 SPF 昆明系小鼠随机分为 4 组, 8 只/组, 第一组为 rPMT-N, 第二组为 rPMT-C, 同时设天然 PMT 和无菌 PBS 对照组。每只小鼠通过腹腔注射 $200\mu\text{g}$, 即 10 倍免疫剂量, 接种后饲养 7d, 每天观察发病及死亡情况。死亡小鼠立即剖检, 无菌采取肺脏、肝脏、心血和脑进行涂片镜检和细菌分离。

1.7 rPMT-N 和 rPMT-C 对小鼠的免疫原性

取 6 周龄雌性 SPF 昆明系小鼠, 共 40 只, 随机分成 4 组, 每组 10 只。第一组免疫 rPMT-N, 第二组免疫 rPMT-C, 同时设天然 PMT 和无菌 PBS 对照组。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, 使各试验组 0.4 mL 亚单位苗中含蛋白 $20\mu\text{g}$ 。采用皮下多点注射免疫小鼠, 首免后 2 周

加强免疫 1 次。首免前、首免后 2、4 周分别经尾静脉采集血清, 应用 1.5 建立的 ELISA 方法分别检测各组毒素抗体水平。二免后 2 周, 用 $2 \times \text{LD}_{50}$ ($8.2 \times 10^5 \text{ CFU}$) T⁺Pm HN-13 株对各组试验小鼠进行腹腔攻毒。

2 结果

2.1 toxA 基因 C-端的扩增

应用优化的 PCR 程序, 成功扩增 *toxA* 基因 C-端 2115bp 片段, 即编码毒素第 581 个氨基酸到终止子, 共 705 个氨基酸。

2.2 toxA 基因亚克隆表达载体的鉴定及序列分析

结果显示, 重组质粒 pET28a-N1518 用 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切, 切出 2 条带: 5329bp(pET-28a), 1541bp(*toxA* 基因 N-端); pET28b-C2345 用 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切, 切出 2 条带: 5369bp(pET-28b), 2494bp(*toxA* 基因 C-端); pET28a-N3172 用 *Xho* 单酶切, 切出 2 条带: 6891bp(pET-28a 及 *toxA* 基因 N-端), 1660bp(*toxA* 基因 C-端); pET28a-N3388 用 *Xho* 单酶切, 切出 2 条带: 6891bp(pET-28a 及 *toxA* 基因 N-端), 1876bp(*toxA* 基因 C-端)。

将酶切鉴定正确的重组质粒 pET28b-C2115, 送上海华诺生物科技有限公司测序, 分析表明: 所克隆的 *toxA* 基因 C-端与 GenBank 已报道的 7 个 *toxA* 基因序列: Z28388, X57775, X52478, AJ566110, X51512, AF240778, AY864768 的同源性都在 99.8% 以上。

2.3 重组质粒的原核表达、纯化及 Western blot 检测

5 个重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 经 0.8 mmol/L IPTG 诱导 3.5h, 10% SDS-PAGE 分析

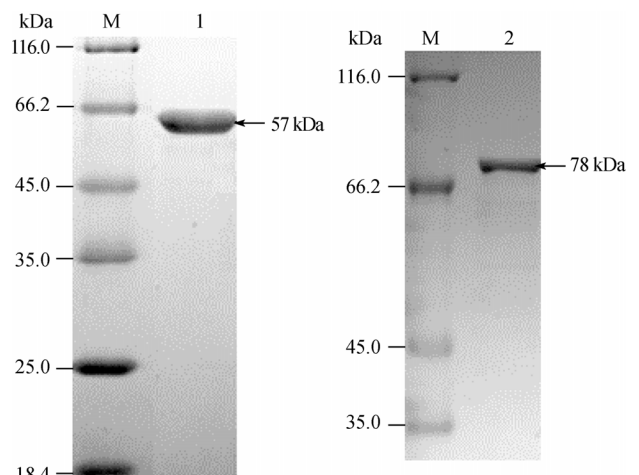


图 2 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified protein. 1. Purified rPMT-N; 2. Purified rPMT-C; M. Protein Marker (SDS-PAGE).

显示, 只有 pET28a-N1518 和 pET28b-C2115 获得成功表达, 分别表达 *tox*A 基因 N-端 1518 个碱基和 C-端 2115 个碱基, 二者之和与 *tox*A 全基因相差 225 个碱基, 表达蛋白大小约为 57kDa 和 78kDa。提纯 rPMT-N 和 rPMT-C 蛋白, 以软件 BandScan 扫描估测 rPMT-N 和 rPMT-C 蛋白纯度达 90.6% 和 94.5%(图 2)。Western blot 检测证实: 两种表达蛋白均具有良好的反应原性(图 3)。

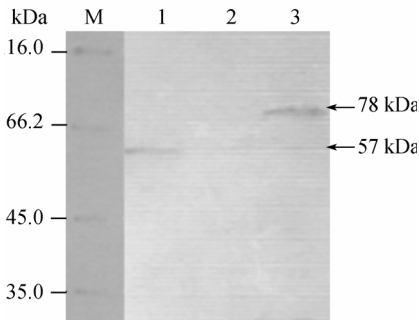


图 3 纯化表达产物的 Western blot 分析

Fig.3 Western-blot analysis of purified protein. 1. Purified rPMT-N; 2. Lysate of pET28b /BL21; 3. Purified rPMT-C; M. Protein Marker.

2.4 毒素抗体 ELISA 检测方法的建立

提取产毒多杀性巴氏杆菌 HN-13 株分泌的天然毒素 PMT。根据方阵滴定实验, 确定抗原最佳包被浓

度为 49.7ng/孔, 最佳血清稀释度为 1: 40; 确定阴、阳性界值为 $OD_{630} > 0.36$ 判为阳性, $OD_{630} \leq 0.36$ 判为阴性。

2.5 rPMT-N 和 rPMT-C 的生物学活性

2.5.1 体外细胞毒性试验 结果显示(图 4), Vero 细胞在接种天然 PMT 后 12h 出现明显的病变(CPE), 具体表现为形态变圆、聚集成团, 并部分脱落; 24h 时, CPE 更加明显, 并开始增多; 接种后 72h 对照孔出现少量变圆死细胞, 试验组天然 PMT 毒素效价达 2048, 即 7ng/mL 的毒素就能使 Vero 细胞发生病变。rPMT-N 在接种 Vero 细胞后 36h 出现少数细胞病变变圆, 72h 后毒素效价为 16, 即 896ng/mL 的 rPMT-N 才能使 Vero 细胞发生病变, 而 rPMT-C 对 Vero 细胞无明显毒性作用。

2.5.2 小鼠毒性试验 : 天然 PMT 组小鼠在攻毒后 5h 开始出现死亡, 12h 后全部死亡, 剖检小鼠可见腹腔积液, 肠道水肿、胀气、出血, 心、肝、脾和脑有不同程度出血、充血, 从心血和脑组织划线接种平皿不能分离致病菌。rPMT-N、rPMT-C 和 PBS 对照组小鼠 7d 内全部存活, 解剖各组小鼠, 结果 rPMT-C 和对照组小鼠没有出现明显的病理变化, rPMT-N 组有 1 只小鼠脾脏肿大, 其它组织无明显的病变。

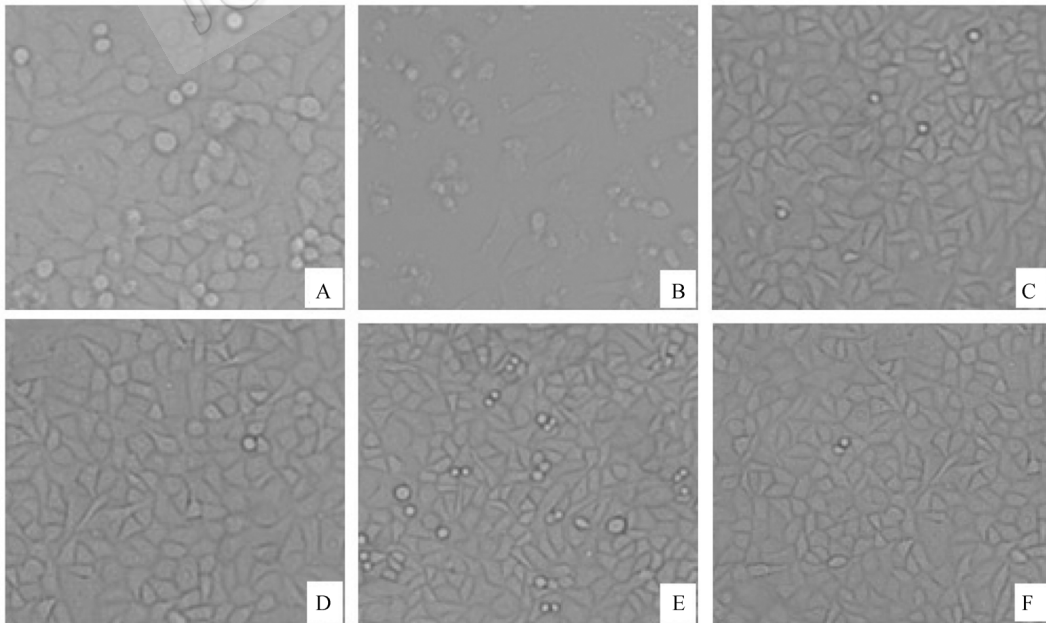


图 4 毒素 PMT 和 rPMT-N 对 Vero 细胞的毒性作用(40×)

Fig.4 Cytopathic effect of PMT and purified rPMT-N on Vero monolayers (40×). A: 12h post-infection of PMT; B: 36h post-infection of PMT; D: 12h post-infection of rPMT-N; E: 36h post-infection of rPMT-N; C and F: Negative control.

2.6 小鼠的免疫效力试验

2.6.1 毒素抗体水平检测：用建立的 ELISA 方法检测各试验组小鼠产生的毒素抗体效价。首免后，rPMT-N 和天然 PMT 组所有小鼠抗体均转为阳性，rPMT-C 组有 7 只小鼠转为阳性，但水平较低。二免后 2 周所有试验组小鼠毒素抗体均转为阳性，其中 rPMT-N 组毒素抗体水平最高，对照组在整个试验期间毒素抗体为阴性(图 5)。

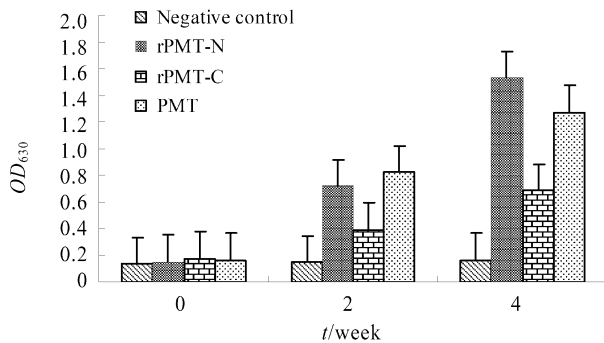


图 5 免疫后不同时间小鼠体内毒素 ELISA 抗体水平
Fig.5 Antibody titers against PMT by ELISA at different time of post-vaccination in mice.

2.6.2 攻毒保护性试验：2 免后 2 周，用 $2 \times LD_{50}$ (8.2×10^5 CFU)的产毒多杀性巴氏杆菌 HN-13 株对各组试验小鼠进行腹腔攻毒，PBS 对照组小鼠于 12h 内全部死亡，剖检死亡小鼠可见肺部有出血点、肝、脾肿大并有出血点。rPMT-N 组 10 只小鼠攻毒后精神沉郁，在 48h 内死亡 1 只，剖检可见肠胀气，肺充血，其余小鼠逐步恢复正常。rPMT-C 组 10 只小鼠，2 只攻毒后 24h 内死亡，3 只攻毒后 36h 内死亡，其余小鼠攻毒后皮毛松乱，不食，扎堆，之后逐步恢复正常。天然 PMT 组 10 只小鼠攻毒后死亡 2 只(表 2)。

表 2 小鼠免疫后的攻毒保护性试验结果
Table 2 Protection of vaccinated mice following challenge with T⁺Pm HN-13 strain

Group	Post challenge	
	Survive / total	Protection rate / %
rPMT-N	9/10	90
rPMT-C	5/10	50
PMT	8/10	80
PBS	0	0

3 讨论

PMT 是 T⁺Pm 最重要的毒力因子，可破坏骨组织内成骨细胞和破骨细胞代谢的动态平衡，导致成骨细胞功能下降；同时，该毒素通过血循环对肝、肾、输尿管等能产生严重的损害效应^[16]。近年来，有许多

学者对 PMT 主要抗原表位和结构功能域进行了研究，Petersen 等选择性地构建了含有 PMT 不同抗原表位的重组衍生物，结果发现部分缺失的无毒重组衍生物其保护效果明显^[17]；Chih-Ming Liao 等将 *tox*A 全基因分 3 段克隆、表达，其中 N-端和 C-端重组衍生物免疫动物后，均获得有效的免疫保护性。这些研究表明应用分子生物学方法对毒素 *tox*A 基因进行操作，构建含有 PMT 主要免疫原性基因片段的无毒重组衍生物来预防 PAR，可能具有良好的保护效果^[18]。本研究继成功扩增 HN-13 株毒素 *tox*A(GenBank 登录号 :AY864768)全基因之后，由于该基因较大(3857bp)，在原核表达系统中表达量较低^[19]，为进一步筛选毒素的主要免疫原性片段，以期研究 PMT 的主要活性位点及其用于疫苗的可行性，我们将毒素 *tox*A 基因分 5 段克隆，结果只有 pET28a-N1518 和 pET28b-C2115 在大肠杆菌中实现了高效表达，分别表达 *tox*A 基因 N-端 1518bp 和 C-端 2115bp 片段，分析表明重组蛋白表达量约占大肠杆菌菌体蛋白 27%~38%，从而打破 *tox*A 全基因表达量低的瓶颈，为该毒素的批量生产提供了技术支撑。*tox*A 基因 N-端 1518bp 与 C-端 2115bp 之和与 *tox*A 全毒素基因相差 225 个碱基，恰好两个表达产物分别包含天然毒素蛋白的黏附作用位点和催化作用位点^[14]。

Western blot 分析表明 *tox*A 基因 N-端和 C-端表达产物均具有良好的反应原性。为深入评估毒素两端原核表达产物生物学活性及安全性，我们将毒素 N-端表达产物(rPMT-N)、C-端表达产物(rPMT-C)和天然毒素(PMT)进行了毒性比较试验，并建立了小鼠体内毒性试验模型和体外 Vero 细胞毒性试验模型。结果天然 PMT 表现很强的生物学活性，小鼠在攻毒后 5h 开始出现死亡，12h 后全部死亡，剖检可见各脏器出现明显的病变；其对 Vero 细胞毒素效价达 2048，即 7ng/mL 的毒素就能使 Vero 细胞发生病变。rPMT-N 含有毒素 1 - 506 氨基酸，虽不能致死小鼠，但其含有与细胞结合的功能域和穿透位点，对细胞产生了很弱的毒性作用，使 Vero 细胞发生病变。rPMT-C 含有毒素 581 - 1285 氨基酸，据 2001 年 Pullinger 等报道该片段很可能含有毒素的催化功能域^[14,18]，但本试验表明：rPMT-C 不能致死小白鼠，也不具有使 Vero 细胞发生病变的细胞毒性作用。我们推测 *tox*A 基因 N-端可能在胞外能与靶细胞上的受体结合，毒素中间为一段跨膜区，而毒素 C-端可能存在于胞内，

刺激 DNA 的合成, 因此, 单一的毒素 C-端没有或者含有很少与靶细胞结合的位点, 故不能进入胞内发挥催化活性, 引起 Vero 细胞发生病变。

在动物试验中, 我们运用小鼠模型对 rPMT-N 和 rPMT-C 的免疫保护性进行了分析, 同时, 应用 PMT-ELISA 方法检测各组试验小鼠产生的毒素抗体水平, 结果 rPMT-N 免疫组毒素抗体水平明显高于 rPMT-C 组, 且二免后 rPMT-N 组毒素抗体水平要高于天然 PMT 组。我们选用我国流行的 D 型 T⁺Pm 对各组试验小鼠进行腹腔攻毒, 试验表明, rPMT-N 组试验小鼠针对 T⁺Pm 强毒株的攻击, 具有较好的保护力, 且明显优于 rPMT-C 组。其原因一方面可能是毒素的催化位点在 C 端, 其抗体水平低可能与毒素 C-端细胞内定位有关; 而据 Jordan 和 Bagley 等先后报道毒素 PMT 会抑制动物体内的体液免疫, 从而降低天然 PMT 组试验小鼠产生毒素抗体的水平^[20,21]。另一方面, T⁺Pm 同时含有其它多种毒力因子如荚膜、脂多糖和菌毛等, 因此试验中出现 1 只小鼠死亡, 但据 Magyar 等报道疫苗中若缺少毒素 PMT, T⁺Pm 野毒株将对猪群带来严重的威胁。

总之, 本研究首次对我国流行的 D 型产毒多杀性巴氏杆菌(T⁺Pm)毒素 *toxA* 基因主要免疫原性片段进行了筛选, 并对毒素各段表达蛋白的生物学活性、免疫原性及其免疫效力进行了分析。试验证实, *toxA* 基因 N-端表达蛋白具有良好的免疫保护性, 同时能避免全毒素 PMT 作为疫苗成分所产生的免疫抑制, 为今后 *toxA* 结构功能域的研究及新型 PAR 疫苗的开发提供了思路和研究基础。

参 考 文 献

- [1] Brockmeier SL, Halbur PG, Thacker EL. Porcine respiratory disease complex. In: Borgden KA, Guthmiller JM. ed. Polymicrobial Diseases. Washington, DC: ASM, 2002, 231–258.
- [2] Dominick MA, Rimler RB. Turbinate osteoporosis in pigs following intranasal inoculation of purified Pasteurella toxin: histomorphometric and ultrastructural studies. *Vet Pathol*, 1988, 25(1): 17–27.
- [3] Chanter N, Magyar T, Rutter JM. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res Vet Sci*, 1989, 47(1): 48–53.
- [4] Rutter JM. Atrophic rhinitis in swine. *Adv Vet Sci Comp Med*, 1985, 29: 239–279.
- [5] Rutter JM, Luther PD. Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet Rec*, 1984, 114(2): 393–396.
- [6] Mullan PB, Lax AJ. Pasteurella multocida toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. *Infect Immun*, 1996, 64(5): 959–965.
- [7] Barbara ES, Sylvie DA, William LM, et al. 猪病学. 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 等译. 第八版. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [8] Nakai T, Sawata A, Tsuji M, et al. Characterization of dermonecrotic toxin produced by serotype D strains of Pasteurella multocida. *Am J Vet Res*, 1984, 45(11): 2410–2413.
- [9] Dominick MA, Rimler RB. Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. *J Vet Res*, 1986, 47(7): 1532–1536.
- [10] Abdoulaye BN. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 5th ed. New York: the OIE International Committee, 2004.
- [11] Chanter N, Rutter JM. *Pasteurellosis in Pigs and the Determinants of Circulence of Toxigenic Pasteurella multocida*. London: Academic Press, 1989.
- [12] Foged NT, Nielsen JP, Jorsal S. Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. *Vet Rec*, 1989, 125(1): 7–11.
- [13] Lax AJ, Pullinger GD, Baldwin MR, et al. The pasteurella multocida toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. *Int J Med Microbiol*, 2004, 293(7-8): 505–512.
- [14] Pullinger GD, Sowdhamini R, Lax AJ. Localization of functional domains of the mitogenic toxin of Pasteurella multocida. *Infect Immun*, 2001, 69(12): 7839–7850.
- [15] Sambrook J, Russell DW, et al. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Lax AJ, Chanter N. Cloning of the toxin gene from Pasteurella multocida and its role in atrophic rhinitis. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(1): 81–87.
- [17] Petersen SK, Foged NT, Bording A, et al. Recombinant derivatives of Pasteurella multocida toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect Immun*, 1991, 59(4): 1387–1393.
- [18] Liao C, Huang C, Hsuan S, et al. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit Pasteurella multocida toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine*, 2006, 24(2): 27–35.
- [19] 王大鹏, 吴斌, 周锐, 等. 猪源 D 型产毒素多杀性巴氏杆菌 *toxA* 基因的克隆与表达. 中国兽医学报(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2006, 26(3): 271–273.
- [20] Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, et al. Pasteurella mul-

- tocida toxin activates human monocyte-derived and murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro but suppresses antibody production *in vivo*. *Infect Immun*, 2005, 73(1): 413-421.
- [21] Jordan RW, Hamilton TD, Hayes CM, *et al*. Modulation of the humoral immune response of swine and mice mediated by toxigenic *Pasteurella multocida*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 39(1): 51-59.
- [22] Magyar T, King VL, Kovacs F. Evaluation of vaccines for atrophic rhinitis - a comparison of three challenge models. *Vaccine*, 2002, 20(13-14): 1797-1802.

Characteristics and immunogenicity of the N-terminal and C-terminal recombinants of *Pasteurella multocida* toxin

Xibiao Tang¹, Bin Wu^{1*}, Zhanqin Zhao¹, Yong Deng², Hua He¹, Qigai He¹, Huanchun Chen

¹State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

²China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In this study, five fragments of recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin (PMT) were constructed. Only pET28a-N1518 and pET28b-C2115 could be expressed efficiently in *Escherichia coli*. The molecular weight of the fusion proteins was 57 kDa and 78 kDa. Western blot confirmed that the two proteins could specifically react with antiserum against *Pasteurella multocida* toxin. No mice died after the intraperitoneal administration of these two proteins with the dose of 200 µg per mouse, but Vero cell was pathologically changed after administration of 896ng/mL rPMT-N. The fusion protein of rPMT-N and rPMT-C was purified, and emulsified with Freund's adjuvant in equal volumes to get subunit vaccine. Groups of Kunming mice were immunized subcutaneously twice at interval of two weeks. All mice were challenged intraperitoneally with 8.2×10^5 CFU HN-13 strain of T⁺Pm. The protection efficiency of rPMT-N, rPMT-C and crude PMT against HN-13 strain were 90%, 50% and 80%, respectively. The data revealed that the fusion protein of rPMT-N had immunogenicity and potential for developing a subunit vaccine against PAR in pigs.

Keywords: toxigenic *Pasteurella multocida*; PMT; subclone; characteristics; immunogenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471292) and the Scientific Breakthrough Fund of Hubei province (2001AA201)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn
Received: 25 May 2007/ Revised: 7 November 2007

答 作 者 问

问：在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表？

答：这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物，有正式书号或刊号，则不能再在本刊发表；(2)如果不是正式出版物，则属于交流材料，论文可以投稿本刊。

问：投稿时都需要哪些材料，是否还需要纸稿？

答：从 2006 年起，本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供：(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位)，介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊 E-mail 发出的“收稿通知”后，需要及时补充纸样的 1 份稿件和介绍信，并缴纳 100 元稿件受理费。

问：贵刊的审稿程序是怎样的？一般多长时间可以知道稿件是否被录用？

答：收到来稿后，首先将请 2 位专家进行初审，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第 3 位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿结果的时间可能会超过 2 个月。