

## 百日咳杆菌粘附素中针对支气管败血波氏杆菌的保护性抗原肽的筛选

赵战勤<sup>1</sup>, 王臣<sup>1</sup>, 薛云<sup>2\*</sup>, 丁轲<sup>1</sup>, 张春杰<sup>1</sup>, 程相朝<sup>1\*</sup>, 李银聚<sup>1</sup>, 刘一尘<sup>1</sup>, 吴庭才<sup>1</sup>

(河南科技大学,<sup>1</sup> 动物科技学院, 动物病原微生物实验室,<sup>2</sup> 医学技术与工程学院, 医学工程实验室, 洛阳 471003)

**摘要:**【目的】本研究通过百日咳杆菌黏附素(PRN)基因的分段克隆表达及其在 BALB/c 小鼠的主动和被动免疫保护试验筛选 PRN 中的保护性抗原肽。【方法和结果】利用大肠杆菌进行 PRN 的完整蛋白、N 端和 C 端多肽及其 R I 和 R II 区域多肽(双拷贝)的表达,命名为 GST-PRN、GST-PN、GST-PC、GST-2PR I 和 GST-2PR II。Western blot 检测证实 5 种表达产物均具有良好的反应原性。在主动免疫保护试验中,5 种表达产物均能诱导小鼠产生较高的 PRN 抗体水平;当使用 3 LD<sub>50</sub> 的支气管败血波氏杆菌(Bb)强毒株 HH0809 进行鼻腔攻击后,GST-2PR I 的保护率为 66.7% (6/9),其余 4 者的保护率均为 100% (9/9);当使用 10 LD<sub>50</sub> 的 HH0809 攻击时,其保护率分别为 77.8% (7/9)、33.3% (3/9)、66.7% (6/9)、10% (1/10) 和 60% (6/10)。在被动免疫保护试验中,当使用 10 LD<sub>50</sub> 的 HH0809 进行腹腔攻击时,GST-2PR I 抗血清对小鼠的保护率为 20% (2/10),其余 4 者的保护率均为 100% (10/10);但经天然 PRN 吸附后的 5 种兔抗血清均无任何保护力(0/5)。【结论】本研究表明 PRN 的 N 端和 C 端表达多肽均具有较强的针对 Bb 的保护力,且 C 端强于 N 端;而 C 端 R II 区域的保护力也显著强于 N 端 R I 区域。

**关键词:** 支气管败血波氏杆菌;百日咳杆菌黏附素;保护性抗原

**中图分类号:** S852.65      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1239-07

支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*, Bb) 是一种革兰氏阴性需氧小杆菌,可广泛感染多种哺乳动物,表现为呼吸道的急慢性炎症,统称为波氏菌病 (Bordetellosis)<sup>[1]</sup>。在猪群中,Bb 可引起猪发生萎缩性鼻炎 (Atrophic rhinitis, AR) 和支气管肺炎<sup>[2]</sup>,也是猪呼吸道综合征 (Porcine respiratory disease complex, PRDC) 的重要致病因子之一<sup>[3]</sup>。猪波氏菌病现已遍布养猪业发达国家,世界猪群有 25% - 50% 受感染,已成为猪的重要传染病之一<sup>[4]</sup>。2003 年到 2006 年间,笔者从我国各地发病猪的 2 057 份肺脏病料中分离到 190 株 Bb,分离率高达 9.2%,各省份之间没有明显差异,表明 Bb 在

我国猪场广泛流行和致病<sup>[5]</sup>。多种猪波氏菌病疫苗(主要是佐剂灭活苗)已在世界范围内广泛应用,但免疫效果普遍较差,该病的发生仍然十分普遍<sup>[6-7]</sup>。因此,迫切需要开发新型、经济、免疫保护效果更好的 Bb 疫苗。

百日咳杆菌粘附素 (pertactin, PRN; *prn* 基因编码) 是 Bb 的一个自动转运蛋白,分子量为 68 kDa,由 92 kDa 的 PRN 前体蛋白分解产生(图 1)。PRN 在细菌的定植过程中发挥重要作用,包含一个与细菌定植相关的典型 RGD 结构和两个氨基酸重复区域 R I 和 R II, R I 为 (GGXXP)<sub>n</sub> 重复序列, R II 为 (PQP)<sub>n</sub> 重复序列<sup>[8]</sup>。PRN 具有多态性,目前为止

基金项目:国家“863 计划”(2006AA10A206);河南科技大学科研创新能力培育基金项目(20090001337; 2009CZ0010)

\* 通信作者。薛云, xueyun6688@163.com;程相朝, chengxch@126.com

作者简介:赵战勤(1980-),男,河南兰考人,讲师,博士,主要从事细菌分子生物学及其基因工程疫苗研究。E-mail: zhaozhanqin@126.com

收稿日期:2010-05-18;修回日期:2010-06-13

已经发现 13 个变异体<sup>[9]</sup>。变异主要发生在 R I 和 R II 两个区域。晶体结构的 X 衍射分析发现,16 个  $\beta$ -螺旋的氨基酸结构排列形成一个 V 型结构的 PRN 分子<sup>[10]</sup>。PRN 是波氏菌属的重要免疫保护性外膜蛋白成分。纯化的天然 PRN 及其抗血清均能提供免疫小鼠抵抗致死剂量 Bb 的攻击;同时也能使免疫小鼠显著降低 Bb 在其肺脏的定植水平<sup>[11]</sup>。在猪的感染试验中,不产生 PRN 的 Bb 菌株不能导致猪发生波氏菌病,且猪群的保护率与 PRN 抗体水平呈线性关系,被认为是 Bb 最主要的保护性抗原<sup>[11-12]</sup>。本研究通过 *prn* 基因的分段克隆表达及其在 BALB/c 小鼠的主动和被动免疫保护试验系统筛选 PRN 中的保护性抗原肽。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒、培养基和实验动物:**猪源 Bb 强毒菌株 HH0809 (FHA<sup>+</sup>, PRN<sup>+</sup>, DNT<sup>+</sup>)<sup>[5]</sup>、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21、表达 PRN 蛋白的重组质粒 pGEX-PRN<sup>[13]</sup>、载体质粒 pGEX-KG、HH0809 株猪阳性血清等由本实验室保藏。LB 培养基购自美国 BD

公司。新西兰大白兔、3-4 周龄雌性 BALB/c 小鼠由河南科技大学实验动物中心提供。

**1.1.2 主要仪器和试剂:**Pyrobest DNA Polymerase、T<sub>4</sub> DNA Ligase、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司。GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B 购自 Amersham Biosciences 公司,弗氏佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司。主要仪器有:BioRed 蛋白核酸测定仪、电泳仪、PCR 仪和 UVP 凝胶成像分析系统。

### 1.2 基因的克隆及表达载体的构建

参考 GenBank 公布的 *prn* 基因序列 AJ245927 设计 10 条引物(由上海 Sangon 公司合成),分别扩增 *prn* 的不同区域片段(表 1)。使用 P1/P2 扩增 PRN 的 N 端基因编码序列(1173 bp),构建重组质粒,命名为 pGEX-PN。按同样的方法,用引物 P3/P4、P5/P6 和 P7/P8 扩增 PRN 的 C 端以及 R I 和 R II 区域编码序列(图 1),并构建重组质粒,分别命名为 pGEX-PC、pGEX-PR I 和 pGEX-PR II。进一步使用 P5'/P6' 和 P7'/P8' 分别扩增 R I 和 R II 区域编码序列,并串联克隆到 pGEX-PR I 和 pGEX-PR II,构建双拷贝表达质粒 pGEX-2PR I 和 pGEX-2PR II。

表 1 实验中所用引物及说明

Table 1 The primer sets for PCR in this study

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site	Amplicon size/bp
<i>prn</i> N (PN)	P1	TTTGGATCCGACTGGAACAACCAGTCCAT	<i>Bam</i> H I	1173
	P2	TTTGAATCCGTCGACCGCGGGGTAGCGC	<i>Eco</i> R I	
<i>prn</i> C (PC)	P3	TTTGGATCCGTCGACTCGCTGTCCATC	<i>Bam</i> H I	867
	P4	TTTGAATCCGTCGACCGCGGGGTAGCGC	<i>Eco</i> R I	
<i>prn</i> R I (PR I)	P5	TTGGATCCAAGGAGCTTACGGTTGATGG	<i>Bam</i> H I	327
	P6	TTGTCGACGTGCGGTGCGGACAAGCTGC	<i>Sal</i> I	
<i>prn</i> R I (PR I)	P5'	TTGTCGAAAAGGAGCTTACGGTTGATGG	<i>Sal</i> I	327
	P6'	AACTGCAGGTGCGGTGCGGACAAGCTGC	<i>Hind</i> III	
<i>prn</i> R II (PR II)	P7	TTGGATCCAACACCATGCTGCTGGTG	<i>Bam</i> H I	339
	P8	TTGTCGACCAGAGCGTGCTGGCCAG	<i>Sal</i> I	
<i>prn</i> R II (PR II)	P7'	TAATGTGCGACAACACCATGCTGCTGGTG	<i>Sal</i> I	339
	P8'	TTTAACTGCAGCCAGAGCGTGCTGGCCAG	<i>Hind</i> III	

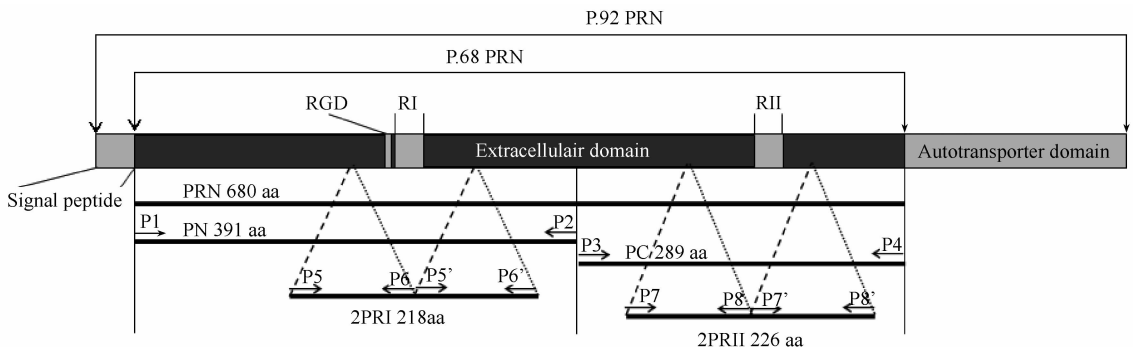


图 1 PRN 的结构及其分段克隆表达

Fig. 1 Structure of PRN and constructed polypeptide segments.

### 1.3 基因的表达、纯化和 Western blot 分析

将重组质粒 pGEX-PRN<sup>[13]</sup> 转化 BL21, 挑取单菌落于含有氨苄青霉素(终浓度为 100 mg/L)的 LB 培养基中, 37℃、225 r/min 摇床培养至对数生长期时( $OD_{600} = 0.6 - 1.0$ ), 加入 IPTG 诱导表达 4 h。通过 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白的表达特性<sup>[14]</sup>。根据产品说明书, 用 GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose™ 4B 对表达产物(命名为 GST-PRN)进行纯化。蛋白浓度通过分光光度计进行测定, 纯度经 SDS-PAGE 电泳和 Bio-Rad Quantity One program(美国 Bio-Rad 公司)进行分析。按同样的方法将重组质粒 pGEX-PN、pGEX-PC、pGEX-2PR I、pGEX-2PR II 和载体质粒 pGEX-KG 分别转化 BL21 并进行诱导表达和纯化, 表达产物分别命名为 GST-PN、GST-PC、GST-2PR I、GST-2PR II 和 GST。对纯化的各表达产物进行 Western blot 分析<sup>[14]</sup>, 一抗为 BbHH0809 株感染猪阳性血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG(美国 SouthernBiotech 公司)。

### 1.4 小鼠主动免疫保护试验

将 146 只 3-4 周龄雌性 BALB/c 小鼠分为 7 组。第 1 组每只皮下免疫 GST-PRN 蛋白 25 μg(与等体积弗氏完全佐剂混合), 14 d 后加强免疫 1 次(使用弗氏不完全佐剂)。第 2-6 组采取同样方法分别免疫 GST-PN、GST-PC、GST-2PR I、GST-2PR II 和 GST 蛋白。第 7 组注射相同体积的无菌 PBS。首免前、首免后 10、30、50、70 d 对每组中 5 只小鼠(不攻毒)进行尾部负压采血, 将其等比例混合, 并用 PRN-ELISA 法检测其平均抗体水平(ELISA 板包被抗原为天然 PRN<sup>[15]</sup>, 10 ng/孔)。首免后 31 d, 对各组中剩余小鼠分别使用约 3 LD<sub>50</sub>( $4.0 \times 10^6$  CFU)或 10 LD<sub>50</sub>( $1.4 \times 10^7$  CFU) Bb HH0809 进行小鼠的鼻腔攻击(表 2), 观察发病及死亡情况至 30 d, 死亡小鼠立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

### 1.5 小鼠被动免疫保护试验

将表达产物 GST-PRN 150 μg 与等体积弗氏完全佐剂均匀混合, 皮下注射新西兰大白兔, 分别在 3 周、5 周和 7 周后各加强免疫 1 次(使用弗氏不完全佐剂)。在最后一次免疫后 10 d 进行心脏采血, 提取血清, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20℃ 保存备用。按同样方法制备 GST-PN、GST-PC、GST-2PR I、GST-2PR II 和 GST 蛋白的兔抗血清。将兔抗血清及其 10 倍稀释血清分别腹腔注射 1 组 BALB/c 小鼠(0.5 mL/只), 另设 GST 的兔抗血清、免疫前兔血清

和无菌 PBS 为对照(表 3)。1 h 后所有小鼠使用 10 LD<sub>50</sub>( $4.4 \times 10^6$  CFU) HH0809 进行腹腔攻击, 观察 30 d 内发病及死亡情况, 死亡小鼠立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

### 1.6 小鼠免疫保护的特异性试验

为进一步验证抗血清的特异性, 将 GST-PRN 的兔抗血清 0.5 mL 与天然 PRN 蛋白<sup>[15]</sup> 50 μg 均匀混合, 加入 PBS 定容为 5 mL 使其稀释 10 倍, 37℃ 孵育 30 min, 用 PRN-ELISA 方法测定两者的抗体水平。然后, 取孵育后的血清腹腔注射 5 只小鼠(0.5 mL/只)。同样的方法处理 GST-PN、GST-PC、GST-2PR I、GST-2PR II 和 GST 蛋白的兔抗血清并注射 5 只小鼠(表 3)。1 h 后所有小鼠使用 10 LD<sub>50</sub>( $4.4 \times 10^6$  CFU) HH0809 进行腹腔攻击, 观察 30 d 内发病及死亡情况, 死亡小鼠立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

### 1.7 统计分析

抗体效价和小鼠免疫保护率分别使用 Student's *t* test 和 Fisher's exact test 进行比较分析并应用 SAS system software 9.0(美国 SAS Institute 公司)进行计算, 当  $P < 0.05$  时判为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 重组蛋白的表达、纯化和 Western blot 分析

SDS-PAGE 结果显示, 含重组质粒 pGEX-PRN、pGEX-PN、pGEX-PC、pGEX-2R I 和 pGEX-2R II 的大肠杆菌 BL21 分别在约 96、66、57、50 和 51 kDa 处有明显的表达带, 是 PRN 及其各片段与 GST 的融合蛋白(图 2-A)。含载体质粒 pGEX-KG 的 BL21 仅在 27 kDa 处有明显的表达带。经 Bio-Rad Quantity One program(美国 Bio-Rad 公司)进行分析, 各重组蛋白和 GST 载体蛋白的表达量分别占菌体总蛋白的 61.4%、69.2%、59.3%、44.7%、61.3% 和 32.8%, 提取后的纯度分别为 92.4%、95.2%、94.4%、88.3%、84.7% 和 91.5%(图 2-C)。Western blot 分析表明, 各重组蛋白均能与 BbHH0809 株的感染猪血清发生特异性的免疫反应, GST 蛋白则不能与之反应(图 2-B)。

### 2.2 重组蛋白免疫小鼠的抗体消长规律

PRN-ELISA 检测结果表明(图 3), GST-PRN 免疫组小鼠的血清抗体水平于首免后 10 d 便迅速升高, 其平均抗体效价达 10240; 二次免疫后 16 d(即首免后 30 d)抗体效价升高到 1310720; 然后出现下降趋势。GST-PN、GST-PC、GST-2PR I 和 GST-2PR II 免疫组的抗体消长趋势与 GST-PRN 免疫组相似,

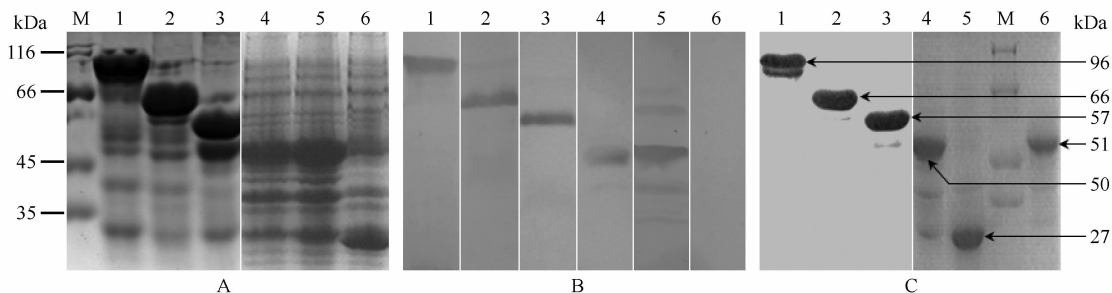


图2 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the recombinant proteins. A: SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins in crude *Escherichia coli* BL21 lysate. M: protein marker; 1 - 6: GST-PRN, GST-PN, GST-PC, GST-2PR I, GST-2PR II and GST proteins in BL21 cell lysates. B: Western blotting analysis of the recombinant proteins. 1 - 6: GST-PRN, GST-PN, GST-PC, GST-2PR I, GST-2PR II and GST. C: SDS-PAGE analysis of purified proteins. M: protein marker; 1 - 6: SDS-PAGE analysis of the purified proteins of GST-PRN, GST-PN, GST-PC, GST-2PR I, GST and GST-PR II.

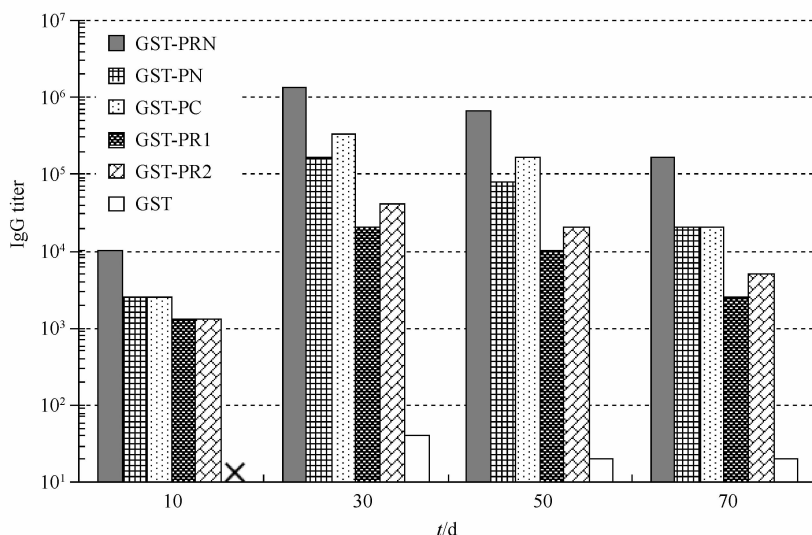


图3 不同免疫组小鼠在不同时间的 PRN ELISA 抗体水平

Fig. 3 Antibody titers against PRN by ELISA at different time points post-vaccination in mice. Series 1-6, immunization by GST-PRN, GST-PN, GST-PC, GST-2PR I, GST-2PR II and GST, respectively. "x", no detectable antibody levels of the titer > 10.

但其抗体效价显著低于后者 ( $P < 0.05$ ); 在首免后 30、50 和 70 d, GST-2PR I 和 GST-2PR II 免疫组的 PRN 抗体水平又显著低于 GST-PN 和 GST-PC 免疫组 ( $P < 0.05$ )。在首免后 70 d, 五个免疫组的 PRN 抗体效价均高于 1000。GST 蛋白对照组的抗体效价在整个免疫期均低于 40。

### 2.3 小鼠主动免疫的保护性试验结果

使用约 3 LD<sub>50</sub> ( $4.0 \times 10^6$  CFU) 的 Bb HH0809 进行攻毒后, GST 和 PBS 对照组小鼠均表现精神萎靡, 不食, 16 h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在第 3 天, 5 d 后死亡停止。死亡小鼠剖检可见肺脏有明显的坏死、出血, 渗出液增多、变稠; 肝、脾坏死, 表面多附有一层伪膜, 易剥离。从死亡小鼠各脏器均能分离到感染菌。GST-PRN、GST-PN、GST-PC 和 GST-

表2 重组蛋白对小鼠的主动免疫保护试验

Table 2 Vaccination with recombinant proteins protect mice against lethal Bb challenge

Groups	No. of survivors/ total No. of mice	
	3 LD <sub>50</sub>	10 LD <sub>50</sub>
GST-PRN	9/9	7/9
GST-PN	9/9	3/9
GST-PC	9/9	6/9
GST-2PR I	6/9	1/10
GST-2PR II	9/9	6/10
GST	3/9	0/5
PBS	1/9	0/5

2PR II 免疫组小鼠全部存活 (9/9), 且在攻毒后没有出现明显的发病症状。GST-2PR I 免疫组小鼠保护率为 66.7% (6/9)。GST 蛋白对照组和 PBS 空白对照组分别存活 3 只和 1 只 (表 2)。5 个免疫组与

2 个对照组之间的保护率差异极显著 ( $P < 0.01$ )。当攻毒剂量增加到  $10 LD_{50}$  时, GST 和 PBS 对照组小鼠在攻毒后 3 d 内全部死亡, 但各免疫组小鼠得到了不同程度的保护 (表 2)。除 GST-2PR II 免疫组外 ( $P > 0.05$ ), 其他 4 个免疫组与 2 个对照组之间的保护率差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 小鼠被动免疫的保护性试验结果

GST 抗血清对照组和 PBS 空白对照组小鼠使用约  $10 LD_{50}$  的 HH0809 进行腹腔攻击后, 表现精神萎靡、不食, 有不同的程度的拉稀现象, 8 h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在 24 - 36 h, 2 组小鼠在

3 d 内全部死亡。死亡小鼠的病变情况与鼻腔攻毒 (见 2.3) 的病变情况相似, 但是肺脏病变较轻, 而出现严重的肠道病变, 有出血和轻微糜烂。从死亡小鼠各脏器均能分离到感染菌。GST-PRN、GST-PN、GST-PC 和 GST-2PR II 抗血清免疫组小鼠腹腔攻毒后表现精神沉郁、不食, 活动明显减少, 但攻毒后 24 h 基本恢复正常, 4 组小鼠全部存活 (10/10); 10 倍稀释的 4 种兔抗血清也得到了相似的结果 (表 3)。但是, 攻毒后 GST-2PR I 抗血清免疫组小鼠仅存活 2 只 (2/10), 10 倍稀释的 GST-2PR I 兔抗血清不能提供任何被动免疫保护 (0/5) (表 3)。

表 3 重组蛋白的兔抗血清对小鼠的被动免疫保护试验

Table 3 Bb challenge survival studies in BALB/c mice using the antisera passively transferred intraperitoneally

Groups	No. of survivors/ total No. of mice			Titers of antisera	
	Intact antisera	Diluted antisera (1: 10)	PRN-absorbed antisera	Unabsorbed	PRN-absorbed
Anti-GST-PRN	10/10	5/5	0/5	2621440	80
Anti-GST-PN	10/10	5/5	0/5	81920	160
Anti-GST-PC	10/10	5/5	0/5	327680	160
Anti-GST-2PR I	2/10	0/5	0/5	10240	40
Anti-GST-2PR II	10/10	5/5	0/5	10240	80
Anti-GST	0/10	ND	ND	<40	ND
Pre-vaccination	0/9	ND	ND	-	ND
PBS	0/9	ND	ND -	ND	

ND: Not determined. “-” means that titers of sera from rabbit inoculated with PBS or pre-vaccination are negative by the PRN-ELISA method.

#### 2.5 小鼠免疫保护的特异性试验结果

特异性试验结果表明, 制备的 GST-PRN、GST-PN、GST-PC、GST-2PR I 和 GST-2PR II 蛋白的兔抗血清效价均高于 10 000, 而使用天然 PRN 蛋白吸附后的其效价均显著降低 ( $P < 0.01$ ; 表 3)。将吸附后的抗血清免疫小鼠并使用  $10 LD_{50}$  剂量的 HH0809 进行腹腔攻击, 发现 PRN 吸附后的 GST-PRN 抗血清失去了保护小鼠的能力 (0/5)。同样, GST-PN、GST-PC、GST-2PR I 和 GST-2PR II 抗血清经天然 PRN 蛋白吸附后也失去了保护小鼠抵抗 Bb 致死性攻击的保护力 (表 3)。

### 3 讨论

PRN 是 Bb 的一种重要的外膜蛋白成分。天然和重组表达的 PRN 均能对小鼠和仔猪提供良好的免疫保护。最初认为 PRN 含有 RGD 结构的 R I 区域主要发挥介导 Bb 黏附宿主呼吸道上皮细胞的作用, 而 R II 区域是主要的保护性抗原结构区域<sup>[16]</sup>。但是, Hijnen 等通过单克隆抗体的肽扫描技术筛选出的 24 个抗原表位分布在 PRN 的不同区域<sup>[17]</sup>; 通过 PRN 突变体的抗体竞争反应试验筛选出的多个非连续性抗原表位也分布在 PRN 的多个

区域<sup>[18]</sup>。这些研究表明 PRN 的不同区域均包含一些抗原表位, 因此可能都具有一定的免疫原性。但是, 对于 PRN 抗原区域分布的研究均没有从动物免疫保护试验的基础上加以证实。因此, 我们将 PRN 的不同免疫功能区域进行重组表达, 并进一步在动物实验的基础上对其进行免疫保护力研究, 从而获得 PRN 保护性抗原肽的区域分布情况, 为更好的开发新型亚单位疫苗或活载体疫苗奠定基础。

通过软件分析发现, PRN 的氨基酸序列保守, 各重组片段均属于稳定型蛋白质。由于 PRN 的 R I (109 aa) 和 R II 区域 (113 aa) 的多肽片段较小, 我们将其进行了双拷贝串联表达。SDS-PAGE 结果表明各重组片段的诱导表达量高且易于纯化, 具备作为基因工程抗原的理化条件。Western blot 分析表明 PRN 的 N-端和 C-端表达多肽均具有良好的免疫学反应活性。通过两种剂量的攻毒保护试验, 我们发现 PRN 的 N 端和 C 端表达产物均为重要的保护性抗原多肽片段, 而 C 端强于 N 端重组多肽针对 Bb 的保护力; C 端 R II 区域也显著强于 N 端 R I 区域重组多肽的保护力。虽然各重组蛋白片段的保护力均低于 GST-RPN, 但也能提供有效的保护力, 特别是 GST-PN、GST-PC 和 GST-2R II 能完全保护免疫

小鼠抵抗致死剂量的猪源 Bb 强毒株 HH0809 的攻击。这表明在预防 Bb 感染中,阻断其感染机制的关键环节就可能起到完全预防波氏菌病的目的。被动免疫保护试验的结果与主动免疫保护试验的结果一致。这表明各种抗原不仅可通过主动免疫用于波氏菌病的预防,也可通过制备抗血清用于波氏菌病的治疗。同时也表明,PRN 作为 Bb 定植过程中的重要黏附因子,是 Bb 定植过程的关键<sup>[19-20]</sup>,抗血清与天然 PRN 结合后,封闭或抑制 PRN 蛋白的活性,最终导致 Bb 丧失定植到黏膜上皮细胞的能力。

本研究分别克隆表达 PRN 及其不同区域的氨基酸多肽,并通过小鼠主动和被动免疫保护试验证明 PRN 的 N 端和 C 端多肽均具有较强的针对 Bb 的保护力,且 C 端强于 N 端。同时证明,C 端 R II 区域重组多肽的保护力显著强于 N 端 R I 区域,是 PRN 重要的保护性抗原肽片段。本研究为将 PRN 用于多肽疫苗或重组细菌活疫苗开发奠定了理论基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, 1980, 44 :722-738.
- [ 2 ] De Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis, p. 355-384. // Straw B. E., d'Allaire S., Mengeling WL Taylor DJ. (eds.), *Diseases of swine*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999.
- [ 3 ] Baysinger A. PRDC: is it new or déjà vu? *Pork* 99, 1999, 19:64.
- [ 4 ] 陈溥言. 兽医传染病学. 第 5 版. 北京:中国农业出版社, 2006.
- [ 5 ] 赵战勤, 裴洁, 薛云, 汤细彪, 吴斌, 何华, 周学利, 程相朝, 何启盖, 陈焕春. 猪源支气管败血波氏杆菌的分离鉴定及其生物学特性研究. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2008, 41(12) :4209-4217.
- [ 6 ] Backstrom L. Present uses of and experiences with swine vaccines. *Advances in veterinary medicine*, 1999, 41 :419-428.
- [ 7 ] United States Department of Agriculture. Part II: reference of swine health and health management in the United States, 2000. CO: USDA: APHIS: VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, #N355.0202; 2002.
- [ 8 ] Shin E, Jung R, Hahn T. Polymorphism of pertactin gene repeat regions in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 2007, 69 (7) :771-774.
- [ 9 ] Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2000, 19(3) :174-181.
- [ 10 ] Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P. 69 pertactin. *Nature*, 1996, 381(6577) :90-92.
- [ 11 ] Novotny P, Kobisch M, Cownley K, Chubb AP, Montaraz JA. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and Immunity*, 1985, 50(1) :190-198.
- [ 12 ] Kobisch M, Novotny P. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infection and Immunity*, 1990, 58(2) :352-357.
- [ 13 ] 赵战勤, 薛云, 吴斌, 汤细彪, 陈焕春, 李增强, 胡睿铭, 张建民, 段龙川. 猪源支气管败血波氏杆菌百日咳杆菌黏附素基因的原核表达及其抗体检测 ELISA 方法研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(3) :330-336.
- [ 14 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 15 ] Zhao Z, Xue Y, Tang X, Wu B, Cheng X, He Q, Zhang C, Guo A, Jin M, Chen H. Vaccination with recombinant protective antigen protects mice against multiple *Bordetella bronchiseptica* infections. *Vaccine*, 2009, 27(3) :1237-1242.
- [ 16 ] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 8(2) :326-382.
- [ 17 ] Hijnen M, Mooi FR, van Gageldonk PG, Hoogerhout P, King AJ, Berbers GA. Epitope structure of the *Bordetella pertussis* protein P. 69 pertactin, a major vaccine component and protective antigen. *Infection and Immunity*, 2004, 72(7) :3716-3723.
- [ 18 ] Hijnen M, de Voer R, Mooi FR, Schepp R, Moret EE, van Gageldonk P, Smits G, Berbers GA. The role of peptide loops of the *Bordetella pertussis* protein P. 69 pertactin in antibody recognition. *Vaccine*, 2007, 25(31) :5902-5914.
- [ 19 ] King AJ, Berbers G, van Oirschot HF, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology*, 2001, 147(11) :2885-2895.

[20] Watanabe M, Komatsu E, Abe K, Iyama S, Sato T, Nagai M. Efficacy of pertussis components in an acellular vaccine, as assessed in a murine model of respiratory

infection and a murine intracerebral challenge model. *Vaccine*, 2002, 31(9):1429-1434.

## Immunogenicity and protective efficacy of pertactin recombinants against *Bordetella bronchiseptica* challenge

Zhanqin Zhao<sup>1</sup>, Chen Wang<sup>1</sup>, Yun Xue<sup>2\*</sup>, Ke Ding<sup>1</sup>, Chunjie Zhang<sup>1</sup>, Xiangchao Cheng<sup>1\*</sup>, Yinju Li<sup>1</sup>, Yichen Liu<sup>1</sup>, Tingcai Wu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, <sup>2</sup>Lab of Medical Engineering, College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] In this study we showed the immunogenicity and protective efficacy of five pertactin recombinants against *Bordetella bronchiseptica* (Bb) challenge. [ **Methods and results** ] The complete coding sequence (2040 bp) of the *prn* gene (PRN) and its fragments, 5'-terminal 1173 bp fragment (PN), 3'-terminal 867 bp fragment (PC), two copies of region I (654 bp; PR I) in PN, and 2 copies of region II (678 bp; PR II) in PC, were separately cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-KG, and expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) using induction by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. The recombinant proteins were named GST-PRN, GST-PN, GST-PC, GST-2PR I and GST-2PR II. All five recombinant proteins showed immunological reactivity in the Western-blot analysis. Mice, immunized subcutaneously with two doses of the purified proteins mixed with an equal volume of Freund's adjuvant, produced robust PRN-specific IgG antibody levels. When challenged, 6 of 9 mice in GST-2PR I group and all 9 mice in the other groups survived intranasal challenge with three times the 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) of virulent Bb HH0809. After challenge with 10 LD<sub>50</sub> 7/9, 3/9, 6/9, 1/10 and 6/10 of the mice survived. Furthermore, complete protection against intraperitoneal (i. p.) challenge with 10 LD<sub>50</sub> of HH0809 was observed in mice that were injected i. p. with 0.5 ml rabbit anti-GST-PRN, GST-PN, GST-PC or GST-2PR II serum. Only 1 of 10 mice survived in the group of mice that received anti-GST-2PR I, and no survivors were noted in the group of mice that received PRN-absorbed rabbit antiserum (0/5). [ **Conclusion** ] In this study, we showed that all of five pertactin recombinants had differential immunogenicity and protective efficacy against Bb challenge. Mice immunized with GST-PC had better survival against fatal Bb challenge than did those immunized with GST-PN. In addition, GST-2PR II and GST-2PR I provided the similar results. These data may have implications for the development of safe and efficacious subunit vaccines for the prevention of bordetellosis on the basis of these five pertactin recombinants.

**Keywords:** *Bordetella bronchiseptica*; pertactin; immunodominant protective antigen

(本文责编:张晓丽)