

猪产毒多杀性巴氏杆菌皮肤坏死毒素的 细胞毒性及其抗体的制备*

胡军勇 汤金梅 汤细彪 杨明柳 赵战勤 吴 斌** 陈焕春

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 将猪产毒多杀性巴氏杆菌(*toxigenic Pasteurella multocida*, T^+ Pm)增菌后经超声波破碎,用 DEAE-52 阴离子交换柱和 Sephadex G-200 处理,提纯天然多杀性巴氏杆菌皮肤坏死毒素(*Pasteurella multocida* toxin, PMT)。经 Western blot 和细胞毒性试验证实,该毒素具有良好的反应原性,且 7 ng/mL 的 PMT 能使 Vero 细胞病变。用该毒素制成的类毒素菌苗免疫 2 头健康断奶仔猪,同时设 T^+ Pm 灭活苗和 PBS 对照组。4 次免疫后,琼脂扩散试验检测类毒素菌苗组毒素抗体效价达 1:16,而灭活苗组未见毒素抗体产生。用 200 μ g 提纯的 PMT 和 50 亿 T^+ Pm 混合液经耳静脉攻毒各组试验猪,结果发现对照组和灭活苗组试验猪在攻毒后出现明显的急性败血症症状,未产生毒素抗体;类毒素菌苗组试验猪 10 d 后耐过,经颈动脉采血收集高免血清,效价达 1:32。

关键词 产毒多杀性巴氏杆菌;多杀性巴氏杆菌皮肤坏死毒素;生物学活性;类毒素菌苗;毒素抗体

中图分类号 S 852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0479-05

多杀性巴氏杆菌皮肤坏死毒素(*Pasteurella multocida* toxin, PMT)是猪产毒素多杀性巴氏杆菌(*toxigenic Pasteurella multocida*, T^+ Pm)重要的毒力因子,由 *tox A* 基因编码,分子质量约 146 ku,是目前发现效力最强的促有丝分裂原之一^[1]。该毒素可直接与组织细胞上的受体结合,引起猪鼻甲骨萎缩或消失,进而出现鼻炎、鼻梁扭曲变形、全身代谢障碍,生产性能下降等猪进行性萎缩性鼻炎(progressive atrophic rhinitis, PAR)的临床症状,同时该毒素损伤猪呼吸系统的正常结构和功能后,致使机体抵抗力降低,极易诱发其它病原微生物感染,增加猪的死亡率。近年来 PAR 在我国发病率日益增高,在某些大型集约化猪场 PAR 的阳性率达 50% 以上^[2],给我国养猪业造成巨大的经济损失,严重危害我国养猪业的健康发展。研究发现, PMT 与其他菌体抗原(如外膜蛋白、脂多糖等)间可能不存在交叉保护,而且目前市场上针对 PAR 的商品化疫苗多以灭活苗为主,效果不稳定,往往不能很好地诱导机体产生针对 PMT 的抗血清,经常导致免疫失败^[3-4]。本研究通过建立提纯天然 PMT

的技术方法,分析 PMT 的生物活性及对 PAR 的免疫保护性,旨在为研发 PAR 新型诊断试剂及有效保护性疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株及供试猪

D 型产毒多杀性巴氏杆菌 HN-13 株、Vero 细胞和重组表达质粒 pET28b-C2115 由笔者所在实验室提供^[5]。

健康 25 日龄二元长大阉公猪选自无 PAR 的猪场。

1.2 PMT 的纯化

将 T^+ Pm 接种于 TSB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 h 后,离心收集菌体并用灭菌双蒸水重悬,使细菌浓度达到 10^{12} cfu/mL。将重悬菌液置冰浴中经超声波破碎后,10 000 r/min 离心 30 min,上清用 0.22 μ m 滤膜过滤,滤液为粗制天然毒素。用 TE(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1 mmol/L EDTA)平衡 DEAE-52 柱,以含 0~0.5 mol/L NaCl 的 TE 线性梯度洗脱,流速 30 mL/h。收集各峰,取 50

收稿日期:2009-10-08;修回日期:2010-03-29

* 国家自然科学基金项目(30471292)资助

** 通讯作者。E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

胡军勇,男,1974 年生,兽医师。研究方向:动物病原微生物学。E-mail: hjiy0804@mail.hzau.edu.cn

μL 进行 SDS-PAGE 分析。将 DEAE-52 分离到的样品用蔗糖浓缩后上 Sephadex G-200 柱,用 TE 以 6 mL/h 流速洗脱,分段收集各峰,进行 SDS-PAGE 分析,同时 SDS-PAGE 电泳后进行 Western blot 检测,一抗为表达的 PMT 毒素 N 端和 C 端片段的兔抗高免血清。二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG。

1.3 PMT 对 Vero 细胞的毒性

在 96 孔微量板上培养 Vero 细胞,每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 含有 5×10^3 个细胞的悬液,在含 5% (体积分数) CO_2 的 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 $12\sim 24\text{ h}$,至形成 70%~80% 单层细胞,每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 2 倍梯度稀释的 PMT,同时设两纵排正常细胞对照。在上述 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下孵育 $3\sim 4\text{ d}$,逐日观察并记录细胞病变数 (cytopathic effect, CPE),出现 CPE 的稀释度的倒数即为毒素效价。

1.4 表达的 PMT 毒素 C 端片段的纯化及 ELISA 方法的建立

将重组质粒 pET28b-C2115 转化大肠杆菌 BL21,诱导、收集工程菌 BL21/pET28b-C2115,以 PBS (pH 7.2) 洗涤菌体 1 次,应用德国 Novagen 公司 His, Band Purification Kit 试剂盒提纯表达的毒素 C 端片段 rPMT-C。蛋白质浓度用 BCA 法测定, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

以不同浓度提取的 rPMT-C 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,建立毒素抗体 ELISA 方法以检测血清中毒素抗体效价。

1.5 动物免疫及抗血清的制备

1) 免疫方法。试验分 3 组,每组 2 头健康断奶

仔猪,1 组免疫含提纯 PMT 的类毒素菌苗,1 组免疫灭活菌苗 (武汉科前动物生物制品有限责任公司产品),同步设对照组。

2) 免疫程序。首免肌注用完全弗氏佐剂乳化的含 PMT 的类毒素菌苗 2 mL (细菌数为 30 亿, PMT 为 $50\text{ }\mu\text{g}$),灭活菌苗免疫剂量同类毒素菌苗组。21 d 后进行第 2 次免疫,且从第 2 次免疫开始各组均用不完全弗氏佐剂乳化,类毒素菌苗组免疫剂量为 4 mL (细菌数为 30 亿, PMT 为 $100\text{ }\mu\text{g}$),灭活菌苗免疫剂量同类毒素菌苗组。各组连续免疫 3 次,每次间隔 14 d 。最后 1 次用 $200\text{ }\mu\text{g}$ 提纯的 PMT 和 50 亿菌量的 T^+Pm 经耳静脉攻毒各组试验猪,耐过后经颈动脉采血,离心制备高免血清。

3) 抗血清效价的测定。每次免疫前采血 $3\sim 5\text{ mL}$ 制备血清,用本文“材料与方法”中 1.4 建立的 ELISA 方法和琼脂扩散试验检测毒素抗体水平。

2 结果与分析

2.1 PMT 的提纯

粗提 PMT 经 DEAE-52 ($2.6\text{ cm}\times 45\text{ cm}$) 柱时,共出现 5 个峰,SDS-PAGE 分析发现前 3 个峰为杂蛋白,后 2 个峰含约 146 ku 目的条带。将含目的条带的样品浓缩后,用 Sephadex G-200 柱处理。根据分子筛的原理, 146 ku 的目的蛋白带先被洗脱,由图 1 可见有 2 个峰。分别取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 样品经 SDS-PAGE 电泳后,用考马斯亮蓝 R250 染色,发现第 2 峰含目的蛋白带。

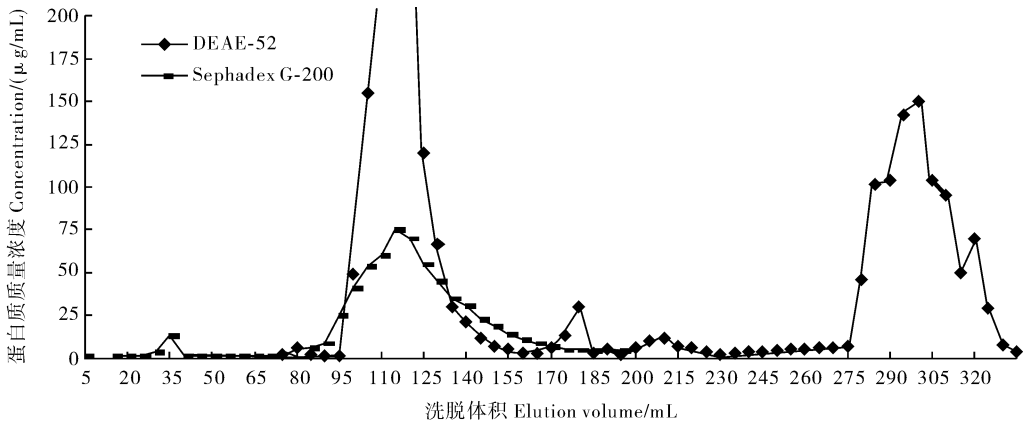
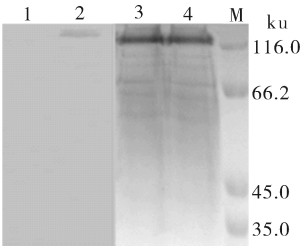


图 1 DEAE-52 柱处理的样品过 Sephadex G-200 柱

Fig. 1 An elution profile of gel filtration with a Sephadex G-200 column of DEAE eluate

2.2 PMT 的 SDS-PAGE 检测与 Western-blot 分析结果

分析结果表明，提纯的天然 PMT 能够与 rPMT-C 的抗血清发生反应，在约 146 ku 处出现明显的特异性反应带，分子质量与预期相符(图 2)。



M. 蛋白质分子质量标准 Protein marker;
1. 阴性对照 Negative control; 2. 天然毒素的 Western blot 分析 PMT (Western blot); 3, 4. 天然毒素的 SDS-PAGE 分析 PMT (SDS-PAGE).

2.3 体外细胞毒性试验结果

Vero 细胞在感染提纯的天然 PMT 后出现明显的细胞病变(CPE)。感染后 12 h,可观察到少数细胞形态变圆,但大多数细胞仍完整;感染后 24 h CPE 更加明显,并且开始增多(图 3);感染后 72 h 对照孔出现少量变圆死细胞,试验孔天然 PMT 毒素效价达到 1 : 2 048,即 7 ng/mL 的毒素 PMT 就能使 Vero 细胞发生病变。

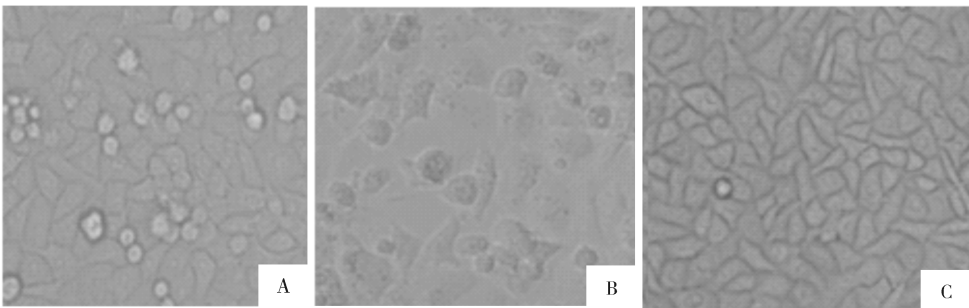
2.4 rPMT-C 的纯化及 ELISA 方法的建立

用 His. Band Purification Kit 获得纯度较高的 rPMT-C(图 4)。根据方阵滴定实验,确定抗原最佳包被量为 100.7 ng/孔,最佳血清稀释度为 1 : 40;确定阴、阳性阈值, $D_{630} > 0.38$ 判为阳性、 $D_{630} \leq 0.38$ 判为阴性。

2.5 毒素 PMT 的抗血清效价

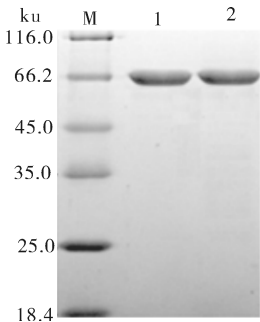
毒素抗体消长曲线见图 5。类毒素菌苗组第 2 次免疫后,ELISA 检测毒素抗体效价 D_{630} 为 1.027,而灭活菌组未见抗毒素抗体产生。第 3 次免疫后类

图 2 提纯 PMT 的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析
Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of purified protein



A. 感染后 12 h 的细胞 12 h post-fection of PMT; B. 感染后 24 h 的细胞 24 h post-infection of PMT; C. 培养正常对照细胞 Control buffer.

图 3 PMT 感染 Vero 细胞倒置相差显微镜(40×)观察
Fig. 3 Cytopathic effects on Vero monolayers(40×)



M. 蛋白质分子质量标准 Protein marker;
1, 2. 提纯的天然毒素 Purified toxin.

图 4 rPMT-C 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified protein

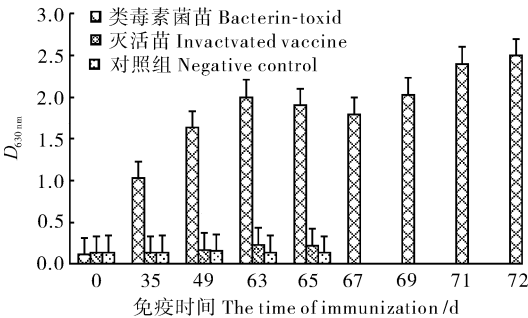
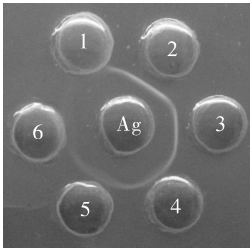


图 5 ELISA 检测猪抗 PMT 抗体消长曲线

The antibody level against rPMT-C by ELISA
毒素菌苗组获得的毒素抗体效价较第 2 次免疫有不同程度的提高, D_{630} 为 1.636,而灭活菌组仍未产生

毒素抗体。第 4 次免疫后类毒素菌苗组 D_{630} 达 2.001, 琼脂扩散试验检测毒素抗体滴度达 1:16; 灭活苗组仍未见抗毒素抗体产生。为提高抗体水平, 第 4 次免疫后 14 d 经耳静脉攻毒各组试验猪, 结果对照组猪加强免疫后突然倒地, 眼角充血、肿胀, 呼吸困难; 灭活苗组试验猪耳部充血、站立不稳、喘息急促; 30 min 后, 对照组和灭活苗试验猪都卧地不起、皮肤泛红、四肢抽搐、身体颤抖等急性临床症状, 28 d 后剖杀, 观察到试验猪肺部出血、胸腔粘连。类毒素菌苗虽没有前 2 组反应强烈, 但骚动不安、喜饮水, 体温达 40.7℃; 48 h 后, 类毒素菌苗组猪体温降到 39.8℃, 采食量增多; 6 d 时, 类毒素菌苗组攻毒猪体温、采食量、精神基本恢复正常, 10 d 时经颈动脉采血, 用所建立的毒素抗体 ELISA 方法检测 D_{630} 为 2.501 (滴度为 1:1024), 琼脂扩散试验检测毒素抗体滴度达 1:32 (图 6)。



1. 阴性对照 Negative control; 2~6. 血清样品从 21 到 25 的梯度稀释 The samples diluted to 21~25; Ag. 抗原 Antigen PMT.

图 6 琼脂扩散试验检测抗体效价

Fig.6 Gel diffusion analysis of antibody titers

3 讨论

PAR 于 1830 年最早发现于德国, 现已分布于世界养猪业发达的各个国家和地区^[1]。我国于 1964 年首次在“约克”种猪中发现 PAR, 目前该病在我国发病率高达 50% 以上。PAR 每年给养猪业带来巨大的经济损失, 被誉为世界规模化养猪五大传染病之一, 并被世界动物卫生组织 (OIE) 定为 B 类动物传染病^[3-5]。目前, 世界上许多养猪业发达的国家已启动了 PAR 的根除计划, 并投入了大量的人力和物力对 T^+Pm 开展研究。研究表明, T^+Pm 及其所分泌的 PMT 是 PAR 的直接致病因子, 该毒素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, 可通过血循环对肝、肾、输尿管等产生严重的损害效应^[6-8]。PMT 具有很强的致病性, 小鼠对其极其敏感, LD_{50} 为 0.2 $\mu\text{g}/\text{只}$, 且注射少量提纯的天然 PMT 就可以复制出

典型 PAR 临床症状^[8]。有研究报道, 目前用于预防和控制 PAR 的商品化灭活疫苗已不能有效地保护猪群, 且不能诱导机体产生针对 PMT 的毒素抗体^[9-10]。为分析天然 PMT 的生物学活性及免疫保护性, 进而研制 PAR 新型诊断试剂及有效保护性疫苗, 本研究通过离子交换和分子筛方法, 从 T^+Pm 野毒株中提纯大小约 146 ku 天然 PMT, 分析显示天然 PMT 的分泌量非常有限, 不到菌体蛋白的 0.6%, 且提纯的天然 PMT 为不耐热蛋白, 沸水浴 5 min 就能使蛋白分解, 因而用传统的 SDS-PAGE 样品处理方法不能检测到目的蛋白带。

Western-blot 分析表明, 提纯的 PMT 具有良好的反应原性, 能与表达 rPMT-C 的抗血清发生反应, 在约 146 ku 处出现明显的特异性反应带。为深入评估毒素的生物学活性及安全性, 笔者建立了体外 Vero 细胞毒性试验模型, 结果发现天然 PMT 表现很强的生物学活性, 其对 Vero 细胞毒素效价达 1:2048, 即 7 ng/mL 的毒素在 12 h 内就能使 Vero 细胞发生病变。另外, 笔者在相关的试验中进行了小鼠体内毒性试验和小鼠皮肤坏死试验, 证实小鼠在 1 μg (约 $5 \times LD_{50}$) 攻毒后 5 h 开始出现死亡, 12 h 后全部死亡, 剖检可见各脏器出现明显病变, 且 0.1 μg 的 PMT 能使小鼠出现约 1.5 cm 大小坏死皮肤, 具有很强的毒性^[5]。

在制备抗毒素高免血清试验中, 类毒素菌苗组试验猪能抵抗加强免疫原的攻击, 10 d 后耐过; 而灭活苗和 PBS 对照组试验猪加强免疫后, 试验猪出现急性败血症等临床症状, 剖杀后, 观察到试验猪有肺炎和胸膜炎等临床症状。其原因可能是该毒素属于分泌型毒素, 菌体灭活后, 不能分泌该毒素, 因此灭活菌苗中不含该毒素抗原, 所以灭活苗和 PBS 对照组试验猪体内未产生毒素抗体, 不能抵抗 200 μg 提纯 PMT 和 50 亿菌量的 T^+Pm 攻击; 而加有 PMT 的类毒素菌苗组试验猪体内已产生高滴度毒素抗体, 因此可中和加强免疫抗原, 提供有效保护。

参 考 文 献

- [1] 斯特劳 B E, 阿莱尔 S D, 蒙加林 W L, 等. 猪病学 [M]. 8 版. 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [2] 吴斌, 陈焕春, 何启盖. 应用乳胶凝集实验进行猪传染性萎缩性鼻炎血清流行病学调查 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31 (6): 21-22.
- [3] FOGED N T. *Pasteurella multocida* toxin. The characterisati-

on of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs[J]. APMIS Suppl, 1992,25;1-56.

[4] KAMP E M,BOKKEN G C,VERMEULEN T M,et al. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs[J]. J Vet Diagn Invest,1996,8(3):304-309.

[5] TANG X B,ZHAO Z Q,HU J Y,et al. Isolation,antimicrobial esistance and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 951-958.

[6] 唐先春,吴斌,索绪峰,等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(6):590-595.

[7] FINCO-KENT D L,GALVIN J E,SUITER B T,et al. *Pasteurella multocida* toxin type D serological assay as an alternative to the toxin neutralisation lethality test in mice[J]. Biologicals, 2001,29(1):7-10.

[8] MULLAN P B,LAXA J. *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture[J]. Infect Immun, 1996,64(5):959-965.

[9] TOYOTSUGU N K,AKIRA S,MASAYO S,et al. Characterization of dermonecrotic toxin produced by serotype D strains of *Pasteurella multocida* [J]. Am J Vet Res, 1984, 45(11): 2410-2413.

[10] PETESERN S K,FOGED N T,BORDING A,et al. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin:candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis[J]. Infect Immun,1991,59(4):1387-1393.

Characterization and Its Antibody Preparation of
Pasteurella multocida Toxin

HU Jun-yong TANG Jin-mei TANG Xi-biao YANG Ming-liu
ZHAO Zhan-qin WU Bin CHEN Huan-chun

National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong
Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract PMT was purified from sonic extracts of a serotype D strain of toxigenic *Pasteurella multocida* (T⁺Pm), with a DEAE-52 sephacel column and a sephadex G-200 column. Western blot confirmed that the toxin could specifically react with antiserum against T⁺Pm. Cytotoxicity on Vero cells showed that there were pathologically changes after administration of 7 ng/mL purified toxin. The toxin was emulsified with Freund’s adjuvant in equal volumes to get toxoid vaccine. Groups of healthy pigs were vaccinated four times with an interval of two weeks. The neutralization antibody titer of toxoid vaccine detected by the agar gel diffusion test was 1 : 16. However, groups of inactivated bacterin and negative control didn’t produce antibodies against the toxin. All pigs were challenged intravenously with compounds of 200 μg toxin and 5 × 10⁹ cfu HN-13 strain of T⁺Pm. The protection efficiency of toxoid vaccine group was 100%, and the neutralization antibody titer was 1 : 32. Inactivated bacterin and negative control groups couldn’t provide any protection. The data revealed that the toxin had immunogenicity and the prepared antiserum could be used to develop diagnosis methods.

Key words toxigenic *Pasteurella multocida* ; PMT; bio-characteristics; anatoxine vaccine; toxin antibody

(责任编辑:边书京)