

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):360–366; 4 March 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 禽多杀性巴氏杆菌粘附蛋白 Cp39 的交叉免疫保护作用

恩特马克·布拉提白, 彭清忠, 严芳, 何翠, 吾鲁木汗·那孜尔别克\*

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000)

**摘要:**【目的】比较体内外增殖禽多杀性巴氏杆菌荚膜蛋白、天然粘附蛋白 Cp39 和重组粘附蛋白 rCp39 对小鼠的交叉保护作用。【方法】用 NaCl 提取法制备鸡胚尿囊液和 DSA 培养基增殖的 C48-3 株荚膜蛋白, 并用电洗脱方法纯化 Cp39 蛋白, 将 rCp39 蛋白以可溶形式表达在大肠杆菌 BL21 后, 用 Amylose Resin 亲和层析柱纯化。分别以 100  $\mu\text{g}$  剂量的鸡胚尿囊液增殖菌株荚膜蛋白、DSA 培养基培养菌株荚膜蛋白、纯化的 Cp39 蛋白和 rCp39 蛋白通过皮下注射各试验组小鼠, 生理盐水为对照组, 第二次免疫后 2 周分别以 A: 1 型菌 C48-3 株 ( $6.7 \times 10^2 \text{cfu}$ ) 和 A: 3 型菌 C51-3 株 ( $1.1 \times 10^3 \text{cfu}$ ) 进行攻毒试验。采集免疫后小鼠血清, 用 ELISA 法检测抗体水平, 并计算免疫保护率, 来评价 4 种抗原对小鼠的交叉保护效果。【结果】SDS-PAGE 结果显示, 体内外增殖禽多杀性巴氏杆菌荚膜蛋白的条带和分子量相似, 且体内外表达的 Cp39 蛋白的分子量相同; ELISA 结果表明 Cp39 免疫组小鼠和 rCp39 免疫组小鼠血清 rCp39 蛋白特异性抗体的水平显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ ); 保护试验表明, 体外增殖菌株荚膜蛋白免疫组小鼠对同源 C48-3 株和异源 C51-3 株攻毒的保护率分别为 100% 和 60%, 鸡胚尿囊液增殖菌株荚膜蛋白免疫组小鼠、Cp39 免疫组小鼠和 rCp39 免疫组小鼠对同源 C48-3 株和异源 C51-3 株攻毒的保护率分别为 100% 和 80%。【结论】粘附蛋白 Cp39 是禽多杀性巴氏杆菌荚膜蛋白中的主要交叉保护抗原, 可以作为禽霍乱亚单位疫苗。

**关键词:** 多杀性巴氏杆菌; 粘附蛋白; 免疫原性; 交叉保护

**中图分类号:** S852      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0360-07

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, 以下简称巴氏杆菌) 是一种有荚膜的革兰氏阴性杆菌, 能够感染家畜、家禽和野禽等多种动物。其中, 禽霍乱主要由血清型为 A: 1、A: 3 或 A: 4 巴氏杆菌引起, 给养禽业造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。目前预防禽霍乱的疫苗主要是灭活苗和弱毒苗, 对该病的控制起到一定作用, 但这些疫苗一般只对同源菌株的攻击产生免疫保护作用、保护周期短、交叉保护功能低以及应激反应重等缺点。所以, 至今本病仍未能得到有效控制<sup>[2–3]</sup>。因此, 研制安全、广谱、高效的亚单位疫苗对禽霍乱的预防极为重要。

Heddleston 等用火鸡体内或火鸡胚胎增殖禽巴氏杆菌制成灭活苗, 并检测其免疫保护效果, 结果发现该疫苗不但能为免疫火鸡提供同源菌株 P-1059, 而且也能对异源菌株 X-73 的强毒攻击提供免疫保护<sup>[4]</sup>。Syuto 和 Matsumoto 采用 NaCl 提取法制备禽巴氏杆菌 P-1059 株荚膜蛋白, 用层析法从荚膜蛋白中纯化得到了分子量约为 25 kDa、31 kDa 及 44 kDa 的 3 个蛋白, 且保护抗原免疫组火鸡对同源菌株 P-1059 攻毒的保护率为 80%<sup>[5]</sup>。Rimler 用 SDS-PAGE 和电洗脱法分别从体内和体外增殖禽巴氏杆菌中提纯分子量约为 39 kDa 蛋白并检测其保护作

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30972206); 湖南省教育厅基金项目 (08C711)

\* 通信作者。Tel: + 86-743-8565217; Fax: + 86-743-8565323; E-mail: ulum@jsu.edu.cn

**作者简介:** 恩特马克·布拉提白 (1961–), 男, 新疆昭苏县人, 博士, 教授, 从事畜禽传染病致病机理研究。E-mail: etmkb@jsu.edu.cn

**收稿日期:** 2009-08-20; **修回日期:** 2009-11-08

用,结果表明无论在体内或体外增殖禽巴氏杆菌的 39 kDa 蛋白均能对不同血清型菌株的攻击产生了交叉保护,但做被动免疫试验时没有显示交叉保护功能<sup>[6]</sup>。后来 Rimler 和 Brogden 用单克隆抗体和蛋白 A-胶体金经免疫电镜技术观察该 39 kDa 交叉保护蛋白在禽巴氏杆菌细胞中的位置,结果发现该蛋白定位在体内增殖细菌细胞表面和细胞周边,而在体外培养细菌细胞中不存在,暗示了荚膜和 39 kDa 蛋白之间可能存在一定的相关性<sup>[7]</sup>。Borathaybay 等的研究表明,血清型 A 禽巴氏杆菌的荚膜厚度与 39 kDa 蛋白表达量直接相关,而 39 kDa 蛋白是禽巴氏杆菌对鸡胚成纤维细胞(CEF 细胞)的粘附蛋白<sup>[8-9]</sup>。Ali 等用单克隆抗体经免疫电镜技术观察 39 kDa 蛋白在禽巴氏杆菌细胞中的分布时发现,该蛋白定位于有荚膜强毒株细胞壁外的荚膜中,而在无荚膜弱毒株细胞中没有观察到 39 kDa 蛋白,表明 39 kDa 蛋白是具有粘附功能的荚膜蛋白(39 kDa capsular protein, Cp39)<sup>[10]</sup>。吾鲁木汗等从禽巴氏杆菌 C48-3 株基因组 DNA 中克隆了编码 Cp39 的基因全长并测序基因序列,结果表明,该 *cp39* 基因大小为 1062 bp,编码 353 个氨基酸,与 GenBank 中已登录的其他血清型菌株相关基因序列的同源性在 81.5 % ~ 100 % 之间,说明该基因在不同血清型巴氏杆菌中具有很高的保守性<sup>[11]</sup>。后来严芳等用大肠杆菌表达系统表达重组 Cp39(rCp39)并检测其免疫原性,结果表明 rCp39 能与抗天然 Cp39 抗体发生特异性反应<sup>[12]</sup>。

从上述国内外学者对禽巴氏杆菌交叉保护抗原进行的研究结果可以看出,Cp39 是具有粘附功能的交叉保护抗原,是研制禽霍乱亚单位疫苗候选抗原。但是体内外增殖禽巴氏杆菌荚膜蛋白、纯化的 Cp39 蛋白和 rCp39 蛋白在小鼠体内的交叉保护功能的比较尚未研究。所以,本研究利用小鼠模型比较体内外增殖禽巴氏杆菌 C48-3 株荚膜蛋白、纯化的 Cp39 蛋白和 rCp39 蛋白在小鼠体内的交叉保护功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和实验动物:**禽巴氏杆菌 C48-3 株(血清型 A: 1)和兔巴氏杆菌 C51-3 株(血清型 A: 3)购自中国兽医菌种保藏中心;重组菌 pMAL-p2X-cp39/BI21 由本实验构建;清洁级鸡受精卵购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司;清洁级昆明系小鼠购自中南大学实验动物学部。

**1.1.2 主要试剂和培养基:**Tryptose Broth (TB) 培养基、Dextrose Starch Agar (DSA) 培养基为 Bacto 公司产品;IPTG 和 X-Gal 为 Promega 公司产品;弗式完全佐剂,弗式不完全佐剂,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 及二氨基联苯胺(DAB)均为 Sigma 公司产品;低分子量蛋白标准大连宝生物工程公司产品;脱脂奶粉和 BSA 为 Difco 公司产品;pMAL<sup>TM</sup> Protein Fusion and Purification System 为 BioLabs 公司产品。其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 禽巴氏杆菌的体外培养

挑取生长在 DSA 固体培养上的禽巴氏杆菌 C48-3 株单菌落接种于 10 mL 的 TB 液体培养基中,37℃ 培养 18 h,取 0.5 mL 的菌液涂布于 DSA 培养基,37℃ 培养 18 h。将生长在 DSA 固体培养基上的细菌用接种环收集于 10 mL 的 PBS 缓冲液中,15300 × g 离心 5 min 收集菌体,称量细菌湿重后保存于 -80℃ 冰箱,用于荚膜蛋白的制备。

### 1.3 禽巴氏杆菌的鸡胚培养

孵育前的鸡受精卵先用清水以布洗净,再用干布擦干,放入孵卵器内 38℃ 孵育 10 d,孵育 3 d 后,鸡卵每日翻动 1-2 次。用注射器将 0.2 mL 禽巴氏杆菌 C48-3 株菌液接种于 10 日龄的鸡胚尿囊内,38℃ 继续孵育 48 h,放入 4℃ 冰箱 6 h,用注射器从鸡胚尿囊中回收尿囊液,15300 × g 离心 5 min,将菌体用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,称量细菌湿重后保存于 -80℃ 冰箱,用于荚膜蛋白的制备。

### 1.4 荚膜蛋白的制备及 Cp39 蛋白的纯化

用在 1.2 和 1.3 中收集的鸡胚尿囊液培养和体外培养禽巴氏杆菌 C48-3 株菌体,参照 Kodama 等报道的 NaCl 提取法<sup>[13]</sup>制备荚膜蛋白,具体如下:将 0.5 mg 菌体悬浮于 7 mL 的 2.5 % NaCl 溶液中,在 56℃ 水浴锅中振荡处理 1 h,20800 × g 离心 20 min 收集上清,将上清用 0.85 % 的 NaCl 溶液透析 48 h,通过 0.22 μm 滤膜过滤得到荚膜蛋白,Bradford 法测定蛋白含量。

参照 Sá-Pereira 等报道的电洗脱法<sup>[14]</sup>纯化 Cp39,具体如下:通过 SDS-PAGE 电泳分离荚膜蛋白后,将凝胶用 0.3 mol/L CuCl<sub>3</sub> 溶液染色,用刀片从凝胶上切下目的蛋白条带,蒸馏水洗涤 3 次。用电洗脱仪(ATTO)从凝胶中洗脱目的蛋白,PEG6000 干粉进行浓缩,Bradford 法测定蛋白含量。

### 1.5 rCp39 的诱导表达及其纯化

按照严芳等报道的 rCp39 蛋白最适诱导条件<sup>[12]</sup>对重组菌 pMAL-p2X-cp39/BI21 进行 IPTG 诱

导表达。诱导的菌体经超声波破碎后,将菌体破碎液上清过 Amylose Resin 亲和层析柱,用 10 mmol/L 的麦芽糖洗脱液洗脱重组蛋白。洗脱的融合蛋白 MBP-rCp39 加入蛋白酶 Factor Xa,二者比例为 100 mg:1 mg,室温反应 10 h,将 rCp39 从融合蛋白上切下。酶切反应物,于洗脱液中进行透析 24 h,透析的酶切反应液上 Amylose Resin 亲和层析柱,收集流出液,PEG6000 干粉进行浓缩,Bradford 法测定蛋白含量。

### 1.6 小鼠的毒力试验

将禽巴氏杆菌 C48-3 株和兔巴氏杆菌 C51-3 株分别接种于 DSA 固体培养基中,37℃ 培养过夜,挑取单菌落接种于 10 mL TB 液体培养中,37℃ 培养 18 h,用新鲜 TB 液体培养基制备稀释倍数为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的菌悬液,用平板菌落计数法测定在每毫升菌液中的活菌数。90 只 5 周龄雌性昆明系小鼠随机分成 9 组,每组 10 只,试验组小鼠按 0.1 mL/只腹腔注射 C48-3 株或 C51-3 株的不同稀释倍数菌悬液,而非免疫组小鼠腹腔注射 0.1 mL 的 TB 培养基。连续观察 12 d,记录小鼠死亡情况,按寇氏法<sup>[15]</sup>计算 C48-3 株和 C51-3 株对小鼠的半数致死剂量( $LD_{50}$ )。

### 1.7 免疫保护试验

45 只 5 周龄雌性昆明系小鼠随机分成 5 组:鸡胚增殖 C48-3 株荚膜蛋白免疫组、体外培养 C48-3 株荚膜蛋白免疫组、天然 Cp39 免疫组、rCp39 免疫组、非免疫对照组,每组 10 只。首次免疫用等体积弗氏完全佐剂乳化,第二次免疫用等体积弗氏不完全佐剂乳化。将 100  $\mu$ g/0.2 mL 抗原溶液经皮下注射各试验组小鼠,首次免疫后 2 周加强免疫 1 次。首次免疫前、首次免疫后 2、4 周分别经尾静脉采集血清。第二次免疫 2 周后,将每组小鼠再平均分成 2 组,用  $6.7 \times 10^2$  cfu 的 C48-3 株或  $1.1 \times 10^3$  cfu 的 C51-5 株对各组小鼠进行腹腔攻毒,连续观察 7 d,记录各组小鼠死亡数,计算免疫保护率。

### 1.8 ELISA 法检测血清特异性抗体

用 Sthitmatee 等<sup>[16]</sup>建立的 Cp39 蛋白抗体 ELISA 方法检测免疫血清中 rCp39 蛋白抗体水平。即用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)配制蛋白含量为 100  $\mu$ g/mL 的 rCp39 溶液,将 100  $\mu$ L 蛋白溶液加入 ELISA 板孔内,4℃ 包被过夜,用含 1% 脱脂奶粉和 1% BSA 的 PBS-Tween20 封闭液,37℃ 封闭 3 h,将待测鼠血清用封闭液进行 10 倍梯度稀释后加入 ELISA 板孔内,37℃ 孵育 2 h, PBS-Tween20 缓

冲液洗涤 3 次,将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 用封闭液进行 1:1000 稀释,加入孔中,37℃ 孵育 1 h。用 PBS-Tween20 缓冲液洗涤 3 次,将底物溶液(含 0.04% OPD 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液,pH4.8)加入孔中,37℃ 避光反应 30 min,加入 2 mol/L  $H_2SO_4$  溶液终止反应,用酶标仪测定  $OD_{492}$  光吸收值。

### 1.9 Cp39 蛋白免疫原性的 Western 印迹检测

将鸡胚增殖菌体荚膜蛋白、体外培养菌体荚膜蛋白和天然 Cp39 经 SDS-PAGE 电泳后,通过半干式电转仪将蛋白条带转移至 NC 膜上,用 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,分别与稀释倍数为 1:500 的 rCp39 免疫血清或天然 Cp39 免疫血清于室温反应 2 h,然后与 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:1000)室温孵育 1 h,每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 显色液避光显色。

## 2 结果

### 2.1 禽巴氏杆菌荚膜蛋白的制备及 Cp39 的纯化

用普通 DSA 培养基和鸡胚尿囊液培养的禽巴氏杆菌 C48-3 株,经 NaCl 提取法制备荚膜蛋白,用 SDS-PAGE 电泳比较体内外增殖禽巴氏杆菌荚膜蛋白的表达差异。结果显示体内外增殖 C48-3 株荚膜蛋白的条带和分子量相似,即表达了分子量约为 28 kDa、39 kDa、87 kDa、99 kDa 的 4 种蛋白,而鸡胚尿囊液增殖的细菌特异表达了一个分子量约为 109 kDa 的蛋白(图 1),荚膜蛋白含量为 3.54 mg/mL。采用电洗脱方法从鸡胚尿囊液培养 C48-3 株荚膜蛋白中纯化得到了分子量为 39 kDa 的 Cp39(图 1),纯

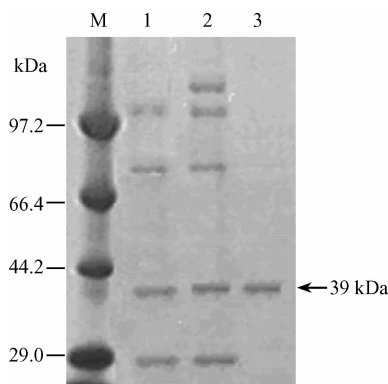


图 1 体内外培养禽巴氏杆菌荚膜蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 SDS-PAGE profiles of capsular proteins of *in vivo* and *in vitro* grown strain C48-3. M. Low molecular protein marker; 1. Capsular proteins of *P. multocida* C48-3 cultured on DSA medium; 2. Capsular proteins of *P. multocida* C48-3 grown in allantoic fluids of chicken embryo; 3. Purified Cp39 protein of *P. multocida* C48-3 grown in allantoic fluids of chicken embryo.

化 Cp39 蛋白含量为 1.26 mg/mL。用软件 BandScan 对凝胶进行的扫描估测结果表明,Cp39 含量约占总荚膜蛋白含量的 27%。

2.2 rCp39 的诱导表达及其纯化

重组菌 pMAL-p2X-cp39/BL21 经 0.3 mmol/L IPTG 于 37℃ 诱导 2 h 后,用超声波破碎菌体,经离心收集上清。SDS-PAGE 结果显示,用 pMAL™ Protein Fusion and Purification System 从超声波破碎后上清中纯化得到了分子量约为 81 kDa 的蛋白,与融合蛋白预期的分子量一致(图 2 泳道 6),而该融合蛋白部分以包涵体和可溶形式表达(图 2 泳道 4 和 5)。菌体破碎液上清经 Amylose Resin 亲和层析纯化,获得分子量为 81 kDa 的融合蛋白(图 2 泳道

6);用蛋白酶 Factor Xa 消化融合蛋白,分离融合蛋白前体 MBP 和 rCp39(图 2 泳道 7),再用 Amylose Resin 亲和层析纯化得到了分子量约为 39 kDa 的 rCp39(图 2 泳道 8),纯化重组 rCp39 蛋白含量为 1.32 mg/mL。

2.3 巴氏杆菌对小鼠的致病性

禽巴氏杆菌 C48-3 株组小鼠在感染后第 2 天开始死亡,到第 3 天小鼠全部死亡,而兔巴氏杆菌 C51-3 株组小鼠在攻毒后第 2 天开始出现死亡,到第 4 天全部死亡。剖检死亡小鼠肝脏、肾脏和肺等主要器官出现不同程度的出血,证明禽巴氏杆菌 C48-4 株和兔巴氏杆菌对小鼠有很强的致病性,C48-3 株和 C51-3 株对小鼠的 LD<sub>50</sub> 分别为 6.7 cfu 和 10.6 cfu。

2.4 免疫保护试验

第二次免疫后 15 d,用 6.7 × 10<sup>2</sup> cfu 的禽巴氏杆菌 C48-3 株或 1.1 × 10<sup>3</sup> cfu 的兔巴氏杆菌 C51-3 株对各试验小鼠进行腹腔攻毒,观察各组小鼠死亡情况。结果显示,生理盐水对照组小鼠在攻毒后第 2 天开始表现出虚弱、食欲下降、毛发起皱及精神沉郁等症状,第 4 天全部死亡。保护试验结果表明,DSA 培养基培养菌体荚膜蛋白免疫组小鼠对同源菌株 C48-3 和异源菌株 C51-3 攻毒的保护率分别为 100 % 和 60 %,鸡胚尿囊液增殖菌体荚膜蛋白免疫组小鼠对同源菌株 C48-3 和异源菌株 C51-3 攻毒的保护率分别为 100 % 和 80 %,天然 Cp39 免疫组小鼠和重组 rCp39 免疫组小鼠对同源菌株 C48-3 攻毒的保护率为 100 %,而异源菌株 C51-3 株的保护率均为 80%(表 1)。本试验结果表明,Cp39 和 rCp39 免疫小鼠后刺激免疫系统产生良好的免疫应答。

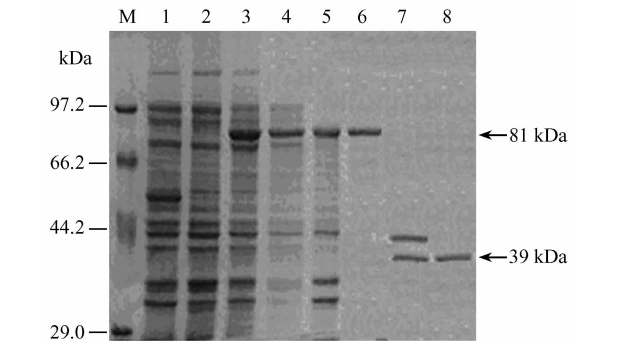


图 2 表达蛋白和纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of fusion protein MBP-rCp39 and purified rCp39 protein. M. Low molecular protein marker; 1. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pMAL-p2X induced with IPTG; 2. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pMAL-p2X-cp39 without IPTG induction; 3. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pMAL-p2X-cp39 induced with IPTG; 4. Supernatant of *E. coli* harboring pMAL-p2X-cp39 induced with IPTG; 5. Precipitate of *E. coli* BL21 harboring pMAL-p2X-cp39 induced with IPTG; 6. Purified fusion protein of MBP-rCp39; 7. Purified fusion protein after Factor Xa cleavage; 8. Purified recombinant protein of rCp39.

表 1 小鼠免疫后攻毒保护性试验结果

Table 1 Protection of immunized mice following challenge with <i>P. multocida</i> C48-3 and C51-3			
Group	Type of vaccine <sup>a</sup>	Survival rate of mice challenge-exposed with	
		Strain C48-3 <sup>b</sup>	Strain C51-3 <sup>c</sup>
1	Physiological saline	0/5 (0) <sup>d</sup>	0/5 (0)
2	Capsular proteins <i>in vitro</i> (100 μg)	5/5 (100)	3/5 (60)
3	Capsular proteins <i>in vivo</i> (100 μg)	5/5 (100)	4/5 (80)
4	Purified native Cp39 (100 μg)	5/5 (100)	4/5 (80)
5	Purified recombinant rCp39 (100 μg)	5/5 (100)	4/5 (80)

<sup>a</sup> Mice were inoculated subcutaneously twice with various types of vaccine at 2 week intervals. <sup>b</sup> Mice were exposed intraperitoneally with 6.7 × 10<sup>2</sup> CFU/0.1 ml of strain C48-3. <sup>c</sup> Mice were exposed intraperitoneally with 1.1 × 10<sup>3</sup> CFU/0.1 ml of strain C51-3. <sup>d</sup> No. of survived/no. exposed (%).

2.5 rCp39 蛋白抗体的监测

用 ELISA 方法检测各免疫组小鼠血清 rCp39 蛋白特异性抗体的动态变化。首次免疫后 2、4 周,鸡胚增殖 C48-3 株荚膜蛋白免疫组、体外培养 C48-3

株荚膜蛋白免疫组、Cp39 免疫组和 rCp39 免疫组小鼠抗体均转为阳性。第二次免疫后 2 周所有试验组小鼠抗体水平迅速升高,而 Cp39 免疫组和 rCp39 免疫组抗体水平显著高于其他两组 ( $P < 0.05$ ),且

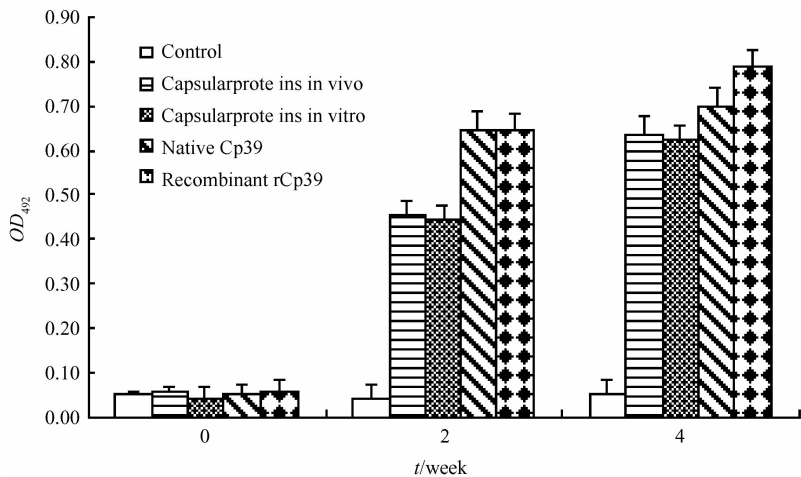


图3 各组小鼠 rCp39 蛋白抗体的动态变化

Fig. 3 The dynamic changes of antibody levels against rCp39 protein per group. Mice were immunized with saline for negative control, Capsular proteins of strain C48-3 grown in allantoic fluids of chicken embryo, Capsular proteins of strain C48-3 cultured on DSA medium, Native Cp39 and rCp39, respectively. The antibody levels were measured by ELISA using rCp39 as an antigen. Each value represents the Mean  $\pm$  Standard deviation.

OD 值达到 0.7 以上(图3)。

2.6 Cp39 蛋白免疫原性的 Western 印迹检测

纯化前后天然 Cp39 蛋白的 Western 印迹检测结果显示,抗 rCp39 蛋白免疫血清分别能与鸡胚增殖或体外培养 C48-3 株荚膜蛋白中的 39 kDa 蛋白和纯化后 39 kDa 蛋白条带发生特异性反应,且鸡胚增殖 C48-3 株荚膜蛋白中 39 kDa 蛋白的反应性强于纯化后的 39 kDa 蛋白(图 4-A)。抗天然 Cp39 蛋白免疫血清和纯化前后的 39 kDa 蛋白之间发生较强的反应(图 4-B)。本实验结果证明天然 Cp39 蛋白具有良好的免疫原性。

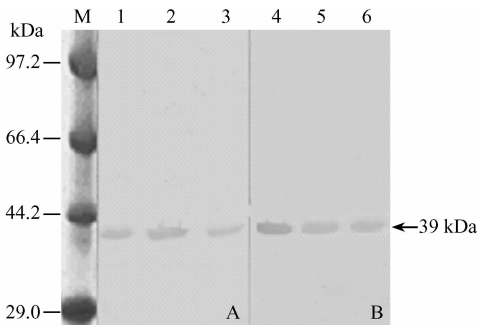


图4 Western 印迹检测 Cp39 的免疫原性

Fig. 4 Western blot analysis of Cp39 protein from *P. multocida* C48-3 probed with mice antisera against rCp39 (A) or mice antisera against native Cp39 (B). M. Low molecular protein marker; 1 and 4. Capsular proteins of *P. multocida* C48-3 cultured on DSA medium; 2 and 5. Capsular proteins of *P. multocida* C48-3 grown in chicken embryo; 3 and 6. Purified Cp39 protein from Capsular proteins of *P. multocida* C48-3.

3 讨论

本研究用重组菌 pMAL-p2X-cp39/BL21 通过 IPTG 诱导表达禽巴氏杆菌 C48-3 株的 rCp39,采用 NaCl 提取法分别制备体内或体外培养禽巴氏杆菌 C48-3 株荚膜蛋白,用电洗脱法从荚膜蛋白中纯化天然 Cp39,经 SDS-PAGE 结果显示,分子量约为 28 kDa、39 kDa、87 kDa、99 kDa 的 4 个蛋白均表达在体内外培养禽巴氏杆菌 C48-3 株中,而在鸡胚尿囊液培养细菌中特异表达了分子量约为 109 kDa 的蛋白,与已报道的缺铁条件下培养的巴氏杆菌铁调蛋白的分子量相符<sup>[6]</sup>。通过毒力试验检测禽巴氏杆菌 C48-3 株和兔巴氏杆菌 C51-3 株对小鼠的半数致死剂量,结果显示 C48-3 株和 C51-3 株的 LD<sub>50</sub> 分别为 6.7 cfu 和 10.6 cfu,说明兔源巴氏杆菌也对小鼠具有较强的致病性,为免疫保护试验的顺利进行提供可靠的实验数据。以体内外培养禽巴氏杆菌荚膜蛋白、纯化的天然 Cp39 和 rCp39 为抗原,经 2 次免疫后用 100 LD<sub>50</sub> 的血清型 A: 1 强毒株 C48-3 或血清型 A: 3 强毒株 C51-3 对小鼠进行攻毒,结果显示,天然 Cp39 组小鼠和 rCp39 组小鼠血清 Cp39 蛋白的特异性抗体水平显著高于体内外培养禽巴氏杆菌荚膜蛋白组,其原因为 Cp39 蛋白在荚膜蛋白中的含量只占 27 %。保护试验结果表明免疫体内外培养菌体荚膜蛋白组、天然 Cp39 组和 rCp39 组对血清型 A: 1 强毒株 C48-3 株的保护率 100%,而对血清型 A: 3 强毒株 C51-3 株攻击的保护率为 60% - 80%。Ali 等研究表明,免疫 50 μg 剂量的天然

Cp39 组小鼠对同源 P-1059 株和异源 X-73 株攻毒的保护率为 100 % ,即完全保护不同血清型强毒株对小鼠的致死性攻毒<sup>[17]</sup>。Sthitmatee 等的结果表明,免疫 100  $\mu\text{g}$  剂量的天然 Cp39 组鸡和 rCp39 组鸡对同源 P-1059 株的保护率为 100 % ,而对异源 X-73 株的保护率 80 %<sup>[16]</sup>。Borrathybay 等用 Cp39 特异性抗体从禽巴氏杆菌血清型 A: 3 菌株 P-1059 的表达型基因组文库克隆了 *cp39* 基因,并表达和纯化 rCp39,制备其免疫血清,用于粘附抑制试验,证明抗 rCp39 抗体显著地抑制不同血清型禽巴氏杆菌对 CEF 细胞粘附<sup>[18]</sup>。上述研究表明,禽巴氏杆菌荚膜蛋白 Cp39 是具有粘附功能的交叉保护抗原。

本试验结果表明,Cp39 蛋白是禽巴氏杆菌荚膜蛋白中的主要交叉保护抗原,可以作为禽霍乱亚单位疫苗,而从其粘附功能的角度考虑,Cp39 抗体也可以抑制禽巴氏杆菌对宿主粘膜细胞的粘附,达到抑制病原体在宿主体内增殖。因此,本研究结果为禽霍乱新型亚单位疫苗及疫苗添加成分的开发奠定了基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Hofacre CL, Glisson JR. A serotypic survey of *Pasteurella multocida* isolated from poultry. *Avian Diseases*, 1986, 30(3) : 632-633.
- [ 2 ] Hopkins BA, Huang TH, Olson LD. Differentiating turkey postvaccination isolants of *Pasteurella multocida* using arbitrarily primed polymerase chainreaction. *Avian Diseases*, 1998, 42(2) : 265-274.
- [ 3 ] 刘丽洁,张伟,詹武,等. 荷斯坦奶牛注射牛多杀性巴氏杆菌疫苗造成死亡的病例分析. 养殖技术顾问 (*Technical Advisor for Animal Husbandry*), 2008, 160(8) : 100.
- [ 4 ] Heddlestone KL, Rebers PA. Properties of free endotoxin from *Pasteurella multocida*. *American Journal of Veterinary Research*, 1975, 36(4) : 573-574.
- [ 5 ] Syuto B, Matsumoto M. Purification of a protective antigen from a saline extract of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 1982, 37(3) : 1218 -1226.
- [ 6 ] Rimler RB. Partial purification of cross-protection factor (s) from *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*, 1994, 38(4) : 778-789.
- [ 7 ] Rimler RB, Brogden KA. Ultrastructural location of the cross-protection factor on *in vivo* and *in vitro* grown *Pasteurella multocida*. *Avian Diseases*, 2001, 45(4) : 946-952.
- [ 8 ] Borrathybay E, Sawada T, Kawamoto Y, et al. Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. *Veterinary Microbiology*, 2003a, 97(3-4) : 215-227.
- [ 9 ] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, et al. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Veterinary Microbiology*, 2003b, 97(3-4) : 229-243.
- [ 10 ] Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, et al. Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 2004, 100(1-2) : 43-53.
- [ 11 ] 吾鲁木汗·那孜尔别克,彭清忠,何翠,等. 禽巴氏杆菌 C48-3 株成熟黏附蛋白基因 *cpm39* 的克隆及序列分析. 生物技术通讯 (*Letters in Biotechnology*), 2008, 19(1) : 17-19.
- [ 12 ] 严芳,何翠,张磊,等. 禽多杀性巴氏杆菌 C48-3 株成熟黏附蛋白的表达及其免疫原性检测. 生物技术通讯 (*Letters in Biotechnology*), 2009, 20(6) : 756-759.
- [ 13 ] Kodama H, Matsumoto M, Snow LM. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys. *American Journal of Veterinary Research*, 1981, 42(10) : 1838-1841.
- [ 14 ] Sá-Pereira P, Duarte J, Costa-Ferreira M. Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCMI 966. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27(1-2) : 95-99.
- [ 15 ] 沈泽天,杨觅,禹立霞,等. 紫杉类药物温敏纳米胶束的小鼠 LD<sub>50</sub> 及其毒性差异. 江苏医药 (*Jiangsu Medical Journal*), 2008, 1(34) : 56-58.
- [ 16 ] Sthimatee N, Nume S, Kawamoto E, et al. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*, 2008, 26(19) : 2398-2407.
- [ 17 ] Ali HA, Sawada T, Noda K. Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2004, 66(12) : 1603-1604.
- [ 18 ] Entomack B, Sthimatee N, Tsuchida S, et al. Molecular characterization of an adhesive protein of *Pasteurella multocida* strain P-1059 and its variant strain P-1059B. *Bulletin of Nippon Veterinary and Life Science University*, 2008, 57 : 90-99.

# Cross-protective effect of the Cp39 adhesive proteins against avian *Pasteurella multocida* in mice

Entomack Borrathybay, Qingzhong Peng, Fang Yan, Cui He, Wulumuhan Nazierbieke \*

(College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China)

**Abstract:** [Objective] We evaluated the cross-protective effect of a 39-kDa adhesive protein (Cp39), recombinant adhesive protein (rCp39), and capsular proteins from *in vitro* and *in vivo* grown avian *P. multocida* in mice. [Methods] The Cp39 was purified by electroelution from capsular proteins of *in vivo* grown strain C48-3. The rCp39 was expressed in *E. coli* B21 as a soluble protein by IPTG inducing, and purified with pMAL<sup>TM</sup> protein fusion and purification system. Mice of each group were subcutaneously immunized twice with 100 $\mu$ g of rCp39, Cp39 or capsular proteins from *in vivo* or *in vitro* grown strain C48-3 with in complete or incomplete Freund adjuvant at 2-week intervals. Five mice of each group were challenged with 100 LD<sub>50</sub> of avian *P. multocida* strain C48-3 or rabbit *P. multocida* strain C51-3 two weeks after the second immunization, while the antibody response specific for rCp39 was determined by ELISA. [Results] SDS-PAGE indicated that the Cp39 protein was expressed *in vitro* and *in vivo* grown *P. multocida*. Mice immunized with rCp39, native Cp39 or capsular proteins from *in vivo* and *in vitro* grown strain C48-3 were protected completely against the challenge with the homologous strain C48-3, while 60 – 80% protection was demonstrated in the mice against the challenge with the heterologous strain C51-3. [Conclusion] In conclusion, rCp39 is a cross immunoprotective antigen of *P. multocida* capsular serogroup A strains, and might be a useful vaccine candidate against fowl cholera.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*; adhesive protein; immunogenicity; cross-protection

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972206) and the Nature Science Found of Hunan Education Burreau (08C711)

\* Corresponding author. Tel: +86-743-8565217; Fax: +86-743-8565323; E-mail: ulum@ jsu. edu. cn

Received;20 August 2009/Revised; 8 November 2009

## 《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】