

猪丹毒丝菌天然 SpaA 和重组 SpaA-N 免疫保护效果的评价

吾鲁木汗·那孜尔别克, 张磊, 何翠, 彭清忠, 恩特马克·布拉提白*

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000)

摘要:【目的】本试验以小鼠为动物模型, 评估了猪丹毒丝菌重组表面保护性抗原 A 的 N 端保护区域 (rSpaA-N) 和天然 SpaA 的免疫保护效果。【方法】将猪丹毒丝菌 C43311 株 SpaA-N 以可溶形式表达在大肠杆菌 BL21 中, 用 GST Bind Resin 纯化试剂盒纯化 rSpaA-N, 采用电洗脱法从猪丹毒丝菌 C43311 株 NaOH 提取抗原中纯化天然 SpaA, 将 rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原制成亚单位疫苗, 同时设 GST 及生理盐水对照组, 间隔 2 周分 3 次皮下免疫小鼠, 第 3 次免疫后 2 周用 100LD₅₀ 猪丹毒丝菌 C43065 株进行腹腔攻毒, 采用间接 ELISA 方法检测免疫组小鼠血清的抗体动态变化。【结果】SDS-PAGE 结果显示, 采用 GST Bind Resin 纯化试剂盒和电洗脱法纯化得到了 66 kDa 的 rSpaA-N 和 64 kDa 的天然 SpaA, 蛋白含量分别为 1.34 mg/mL 和 1.26 mg/mL, 而 Western 印迹结果表明 rSpaA-N 和纯化前后的 SpaA 具有良好的免疫反应性。保护试验结果表明, 不同免疫剂量的 rSpaA-N 组、天然 SpaA 组和 NaOH 提取抗原组均能完全保护小鼠受强毒株 C43065 的致死性攻击, 而 GST 组和生理盐水组小鼠攻毒后全部死亡。ELISA 检测结果表明, 在不同免疫剂量的 rSpaA-N 组、天然 SpaA 组和 NaOH 提取抗原组小鼠血清中的抗体效价之间无显著差异 ($P < 0.05$)。【结论】本研究结果表明 rSpaA-N 具有良好的免疫保护作用, 可以作为猪丹毒亚单位疫苗。

关键词: 猪丹毒丝菌; rSpaA-N; 免疫保护; 亚单位疫苗

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0367-06

猪丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 是一种人畜共患传染病的病原体, 能引起猪丹毒、禽类的败血症、人类丹毒、鱼类的脏器出血和肾脏肿大等疾病, 给养殖业造成巨大的经济损失, 也给人们的食品卫生和人体健康带来威胁^[1-3]。在国内从人尿路感染患者和糖尿病患者的尿道口及外阴部分离到万古霉素和氨基糖甙类的抗性猪丹毒丝菌, 而国外也有猪丹毒丝菌引起人心内膜炎、脓毒性关节炎、皮肤损伤及死亡的报道^[4-6]。目前, 预防猪丹毒的灭活苗和弱毒苗只能预防特急性、急性和风疹性疾病, 而无法预防该菌引起的慢性疾病, 且在疫苗应用中仍有疫情再次爆发, 至今世界各地尚未彻底消灭本病^[7-8]。因此, 研制安全高效的亚单位疫苗对预防

猪丹毒是极为重要。

Kitajima 等用 NaOH 提取法制备了血清型 2 猪丹毒丝菌的菌体表面抗原, 将其制备成疫苗并检测该疫苗的保护效率, 结果显示该疫苗能抵抗不同血清型菌株对清洁级猪的致病性攻击, 且疫苗组分中的 64-67 kDa 蛋白分别能与攻毒前免疫血清和康复期免疫血清发生特异性反应, 暗示这些蛋白可能是猪丹毒丝菌的保护性抗原^[9]。Makino 等分别用猪丹毒丝菌表面保护性抗原 A (surface protective antigen A, SpaA) 的单克隆抗体和 *spaA* 基因的特异性探针检测了该蛋白在不同血清型猪丹毒丝菌中的分布, 结果表明, SpaA 蛋白只有在 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 和 N 等 11 个血清型菌株中表达, 而在

基金项目: 国家自然科学基金 (30972206); 湖南省教育厅重点基金项目 (07A055)

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

作者简介: 吾鲁木汗·那孜尔别克 (1961-), 女, 新疆塔城托里县人, 博士, 教授, 主要从事动物代谢病研究。E-mail: ulum@jssu.edu.cn

收稿日期: 2009-08-13; **修回日期:** 2009-11-30

4,6,11,19 和 21 等 5 个血清型菌株中没有检测到 SpaA 蛋白及其基因^[10]。吾鲁木汗等用 PCR 从血清型 2 猪丹毒丝菌 C43311 株基因组 DNA 中克隆了编码 SpaA 蛋白 N 端免疫保护区(N-terminal protective domain of SpaA, SpaA-N)的 *spaA-N* 基因片段,将其以可溶形式表达在大肠杆菌表达系统中,而带有 GST 标签的融合蛋白 rSpaA-N 能与抗天然 SpaA 蛋白抗体发生特异性反应,表明 rSpaA-N 具有良好的免疫反应性^[11]。从上述国内外对猪丹毒丝菌免疫保护性抗原进行的研究动态可以看出,SpaA 蛋白是研制安全高效亚单位疫苗的候选抗原,具有广阔的应用前景。

为了比较 rSpaA-N 和天然 SpaA 的免疫保护作用,本试验用 GST Bind Resin 纯化试剂盒和电洗脱法提纯 rSpaA-N 和天然 SpaA,并用小鼠动物模型检测它们对小鼠的免疫保护作用,为猪丹毒新型亚单位疫苗的研制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物:血清型 2 猪丹毒丝菌 C43311 株和 C43065 株购自国家兽医微生物菌种保藏管理中心,重组菌 pGEX-*spaA-N*/BL21 由笔者所在实验室构建,清洁级昆明系小鼠购自中南大学湘雅医学院实验动物学部。

1.1.2 主要试剂和仪器:低分子量蛋白质标准为大连宝生物工程有限公司产品,IPTG 为 Promega 公司产品,X-Gal 为北京鼎国公司产品,GST Bind Resin 纯化试剂盒为 Novagen 公司产品,辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 和二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司,Brain Heart Infusion(BHI)培养基为 Bacto 公司产品,脱脂奶粉和 BSA 为 Difco 公司产品,邻苯二胺(OPD)购自北京索莱宝科技有限公司,酶标仪为 Bio Tec 公司产品,DYCP-40C 型半干式碳板转印仪为北京沃德生物医学仪器公司产品,AE-6580 洗脱电泳槽为日本 ATTO 公司产品,超声波细胞粉碎机为宁波新芝生物科技股份有限公司产品。

1.2 猪丹毒丝菌 NaOH 提取抗原的制备

按照 Kitajima 等^[9]报道的 NaOH 抽提法制备猪丹毒丝菌 C43311 株的 NaOH 提取抗原,用 Bradford 法测定蛋白含量。

1.3 猪丹毒丝菌 SpaA 蛋白的纯化

天然 SpaA 采用电洗脱法^[12]进行纯化,具体如下:用 SDS-PAGE 电泳分离 NaOH 提取抗原后,将凝

胶与 0.3 mol/L CuCl₃ 溶液染色,用刀片从胶上切下含目的蛋白的凝胶条带后蒸馏水洗涤 3 次。用电洗脱仪从凝胶条带中洗脱回收目的蛋白,PEG6000 干粉进行浓缩,用 Bradford 法测定蛋白含量。

1.4 重组蛋白 rSpaA-N 的诱导表达及其纯化

按照吾鲁木汗等报道的诱导条件^[11]对重组菌 pGEX-*spaA-N*/BL21 进行诱导表达,具体如下:将重组菌的单菌落接种于 10 mL 的 LB 液体培养基(含 100 μg/mL 的氨苄青霉素)中,37℃ 摇床培养 6 h,取 5 mL 菌液接种于 500 mL 新鲜的 LB 液体培养基(含 100 μg/mL 的氨苄青霉素)中,37℃ 摇床培养至对数生长期($OD_{600} = 0.6$)时,加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。经离心收集菌体后用 PBS 洗涤 3 次,应用 Novagen 公司 GST Bind Resin 纯化试剂盒从超声波破碎后的上清中纯化 rSpaA-N。同时将空载体 pGEX-6P-2 转化大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导后用 GST Bind Resin 纯化试剂盒提纯 GST 蛋白,Bradford 法测定蛋白含量。

1.5 SpaA 蛋白和 rSpaA-N 蛋白免疫反应性的 Western 印迹检测

为了比较 rSpaA-N 和纯化前后天然 SpaA 的免疫反应性,将 rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原经 SDS-PAGE 电泳分离后,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,与抗 rSpaA-N 免疫血清(1:500)室温孵育 2 h,然后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 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。

1.6 猪丹毒丝菌对小鼠的半数致死量测定

将血清型 2 猪丹毒丝菌 C43311 株和 C43065 株分别接种于 BHI-T80 固体培养基中,37℃ 培养过夜,挑取单菌落接种于 10 mL 新鲜 BHI-T80 液体培养基中,37℃ 培养 18 h,用 BHI-T80 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,用平板菌落计数法计算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为 9 组,每组 10 只,试验组小鼠按 0.1 mL/只皮下注射猪丹毒丝菌 C43311 株和 C43065 株的不同稀释倍数的菌悬液,而对照组小鼠皮下注射 0.1 mL 的 BHI-T80 液体培养基。连续观察 14 d,记录小鼠发病及死亡情况后,按寇氏法计算猪丹毒丝菌 C43311 株和 C43065 株对小鼠的半数致死量(LD₅₀)。

1.7 免疫保护试验

参照 Shimoji 等报道的 SpaA 蛋白小鼠免疫保护

试验^[13], 将 40 只 5 周龄雌性昆明系小鼠随机分为 8 组, 5 只/组。4 组小鼠分别用 rSpaA-N、天然 SpaA、NaOH 提取抗原、GST 与弗氏完全佐剂以 1:1 的比例进行乳化后, 经背部皮下注射, 50 μg /只; 3 组小鼠分别用 rSpaA-N、天然 SpaA、NaOH 提取抗原与弗氏完全佐剂以 1:1 的比例进行乳化后, 背部皮下注射, 100 μg /只; 剩余的 1 组小鼠注射生理盐水作为非免疫对照组。间隔 2 周, 用等剂量抗原与等体积的弗氏不完全佐剂混匀加强免疫 2 次, 同时各组小鼠免疫后 2 周、4 周和 6 周用尾静脉采血法取血及分离血清。第 3 次免疫后 2 周, 用 100 LD₅₀ (1.1×10^3 cfu) 猪丹毒丝菌 C43065 株对各试验组小鼠进行腹腔攻毒, 连续观察 12 d, 记录各组小鼠死亡数, 计算各免疫组的保护率。

1.8 SpaA 蛋白抗体水平的 ELISA 检测

以 10 μg 天然 SpaA 蛋白为包被抗原, 利用吾鲁木汗等报道的间接 ELISA 方法^[11] 检测免疫组和对照组小鼠在免疫后 2 周、4 周和 6 周时采集免疫血清 SpaA 蛋白特异性抗体的动态变化。用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 配制蛋白含量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 天然 SpaA 溶液并包被 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 用含 0.05% Tween20 的 PBS (PBS-T20) 缓冲液洗涤 3 次。用含 1% 脱脂奶粉和 1% BSA 的 PBS-T20 缓冲液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 3 h, 将待测血清用封闭液进行稀释后加入孔中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 用 PBS-T20 缓冲液洗涤 3 次。将辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 用封闭液进行 1:1000 稀释, 加入孔中并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。用 PBS-T20 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 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min 后用 2 mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应后, 用酶标仪测定 OD₄₉₂ 的光吸收值, 并用 Fisher's 精确检验分析各组小鼠血清抗体水平的差异。

2 结果

2.1 猪丹毒丝菌 NaOH 提取抗原的制备

SDS-PAGE 结果显示 (图 1), 猪丹毒丝菌 C43311 株 NaOH 提取抗原含有分子量分别为 12、18、26、29、43、64 kDa 的 6 个蛋白条带, 其中 64 kDa 蛋白染色最深 (图 1 泳道 3), 与 Imada 等报道的猪丹毒丝菌 Fujisawa 株表面抗原结构基本相似^[14]。NaOH 提取抗原的蛋白含量为 3.26 mg/mL。

2.2 猪丹毒丝菌 SpaA 蛋白的纯化

SDS-PAGE 结果表明, 用电洗脱方法从猪丹毒

丝菌 C43311 株 NaOH 提取抗原中纯化得到了分子量为 64 kDa 的 SpaA 蛋白, 纯化蛋白的纯度达到 96% (图 1 泳道 2), 蛋白含量为 1.26 mg/mL, 表明 SpaA 蛋白在猪丹毒丝菌 C43311 株中得到了高效表达。

2.3 rSpaA-N 的诱导表达及其纯化

用 0.2 mmol/L 的 IPTG 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 后, 用 GST Bind Resin 纯化试剂盒纯化 rSpaA-N。SDS-PAGE 结果表明, 纯化 rSpaA-N 蛋白的纯度达到 96% (图 1 泳道 1), 蛋白含量为 1.34 mg/mL, 说明 rSpaA-N 在大肠杆菌 BL21 中得到了高效表达。

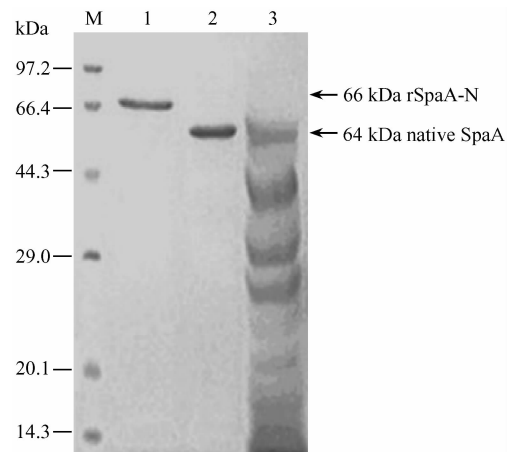


图 1 猪丹毒丝菌 C43311 株 rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原的 SDS-PAGE 检测

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of rSpaA-N, native SpaA and NaOH-extracted antigen of *E. rhusiopathiae* strain C43311. M: Low molecular weight marker; 1. Purified rSpaA-N; 2. Purified native SpaA; 3. NaOH-extracted antigen.

2.4 Western 印迹检测

Western 印迹结果显示 (图 2), 抗 rSpaA-N 免疫血清分别能与 66 kDa 的 rSpaA-N 和纯化前后的 64 kDa 天然 SpaA 蛋白发生特异性反应, 说明抗 rSpaA-N 抗体分别可以结合纯化前后的天然 SpaA 蛋白, 而 GST 标签不影响 rSpaA-N 蛋白的免疫反应性。

2.5 猪丹毒丝菌对小鼠的毒性

猪丹毒丝菌 C43065 株组小鼠在攻毒后第 2 天开始出现死亡, 第 3 天全部死亡, 剖检小鼠可见腹腔积液, 心、肝、脾、肾和肺有不同程度的出血和充血, 说明 C43065 株对小鼠具有很强的毒性, 其对小鼠的 LD₅₀ 为 11 cfu。而感染猪丹毒丝菌 C43311 株的小鼠全部存活, 说明 C43311 株是对小鼠没有毒性的弱毒株。

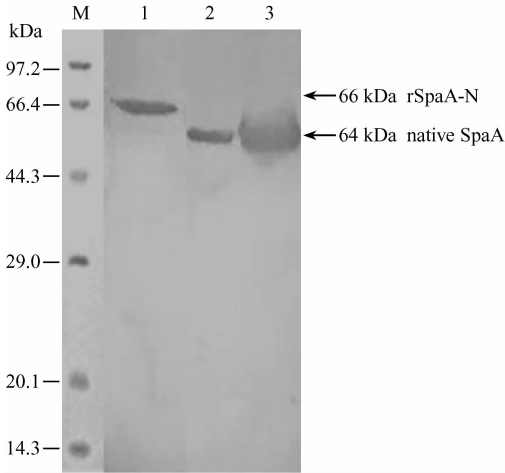


图2 猪丹毒丝菌 C43311 株 rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原免疫反应性的 Western 印迹检测

Fig. 1 Immunoreactivity of rSpaA-N, native SpaA and NaOH-extracted antigen of *E. rhusiopathiae* strain C43311 by Western blot.

M. Low molecular weight marker; 1. Purified rSpaA-N; 2. Purified native SpaA; 3. NaOH-extracted antigen.

2.6 SpaA 蛋白抗体水平的 ELISA 检测

用间接 ELISA 方法检测各试验组小鼠产生的

SpaA 蛋白抗体效价。首次免疫后 2 周, rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原组所有小鼠抗体均转为阳性。第 2 次免疫后 2 周、第 3 次免疫后 2 周所有试验组小鼠 SpaA 蛋白的抗体水平均达到最高水平, 非免疫对照组小鼠和 GST 蛋白组小鼠在整个试验期间 SpaA 蛋白抗体均为阴性(图 3)。Fisher's 检验结果表明, SpaA 蛋白抗体水平在不同免疫剂量的 rSpaA-N 组、天然 SpaA 组和 NaOH 提取抗原组之间无显著差异 ($P < 0.05$), 说明 rSpaA-N 和纯化前后的天然 SpaA 均具有良好的免疫原性。

2.7 免疫保护试验

用不同类型疫苗对小鼠皮下进行 3 次免疫后, 再用 100 LD₅₀ 的 C43065 株对小鼠进行腹腔接种感染。GST 免疫组和生理盐水对照组小鼠在攻毒后表现出虚弱、食欲下降、毛发起皱及精神沉郁等症状, 第 3 天开始死亡, 到第 5 天全部死亡。免疫 rSpaA-N、天然 SpaA 和 NaOH 提取抗原的各免疫组所有小鼠没有出现严重的发病症状, 表明免疫 rSpaA-N 和纯化前后的天然 SpaA 蛋白均能完全保护小鼠受强毒株 C43065 的致死性感染(表 1)。

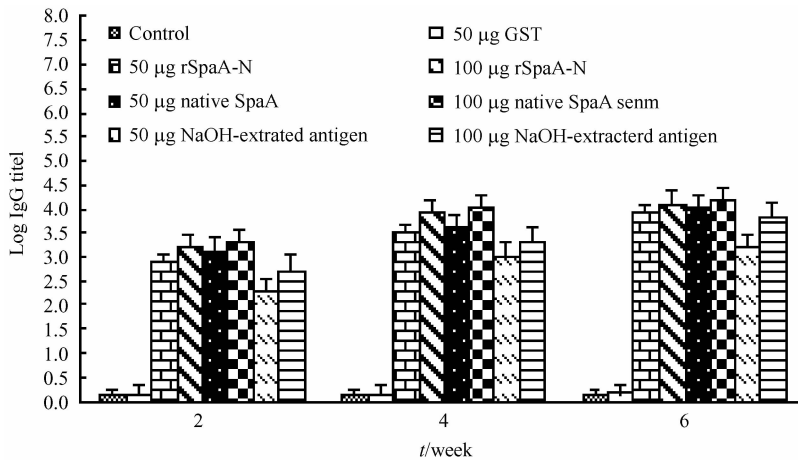


图3 免疫后不同时间小鼠体内 SpaA 蛋白抗体水平的 ELISA 检测

Fig. 3 Antibody responses in the sera of mice immunized with sterilized saline, purified GST, rSpaA-N, native SpaA and NaOH-extracted antigen, respectively. ELISA plates were coated with 10 µg native SpaA of *E. rhusiopathiae* strain C43311. The data are presented as the log mean endpoint titers and the bars indicate standard error of the means.

3 讨论

Lachmann 和 Deicher 用 SDS、TritonX-100 及 EDTA 等去污剂从猪丹毒丝菌 T28 株中提取菌体表面抗原, 通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹检测发现 48、68、72 及 78 kDa 的高分子量免疫原性抗原^[15]。Kitajima 等用血清型 2 猪丹毒丝菌 Kyoto 株制备 NaOH 提取抗原, 将 NaOH 提取抗原与油佐剂以 3:1

的比例进行乳化对清洁级猪肌肉注射 3 次后, 用 5.7×10^6 cfu 的 Fujisawa 强毒株(血清型 1a)和 3.4×10^7 cfu 的 Saitama-1 强毒株(血清型 2)进行肌肉攻击, 结果表明 NaOH 提取抗原疫苗能够完全保护猪受同源强毒株和异源强毒株的致死性感染, 其免疫保护力强于传统弱毒苗, 同时表明分子量约为 60-67 kDa 蛋白在 NaOH 提取抗原的交叉保护功能中可能起重要作用^[9]。后来 Shimoji 等用 PCR 技术

表 1 小鼠免疫后的攻毒保护性试验

Table 1 Evaluation of protection conferred to immunized mice against live *E. rhusiopathiae* challenge

| Group | Type of vaccine ^a | Dose/mice / μ g | Survive/total ^b | Protective rate/% |
|-------|------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------|
| 1 | rSpaA-N | 50 | 5/5 | 100 |
| 2 | rSpaA-N | 100 | 5/5 | 100 |
| 3 | Native SpaA | 50 | 5/5 | 100 |
| 4 | Native SpaA | 100 | 5/5 | 100 |
| 5 | NaOH-extracted antigen | 50 | 5/5 | 100 |
| 6 | NaOH-extracted antigen | 100 | 5/5 | 100 |
| 7 | GST | 50 | 0/5 | 0 |
| 8 | Physiological saline | / | 0/5 | 0 |

^aMouse were inoculated subcutaneously three times with various types of vaccine at 2 weeks interval. ^b Mouse were exposed intraperitoneally with 1.1×10^3 CFU/0.1 mL of *E. rhusiopathiae* strain C43065.

从强毒株 Fujisawa 基因组 DNA 中分别克隆了 *spaA* 基因全长及其 C 端重复区域 (C-terminal repeat region of *spaA*, *spaA*-C), 将它们表达在大肠杆菌表达系统中后进行纯化, 用于免疫保护试验, 结果表明, SpaA 蛋白具有良好的免疫保护功能, 而 rSpaA-C 没有保护功能, 他们认为 SpaA 蛋白的免疫保护区域在其 N 端 2/3 处^[13]。吾鲁木汗等利用 PCR 技术和大肠杆菌表达系统克隆和表达了我国分离株 C43311 的 SpaA 蛋白 N 端免疫保护区域 (rSpaA-N), Western 印迹检测结果表明, 该蛋白具有良好的免疫反应性^[11]。

本研究通过小鼠毒力试验确定了国内分离的 C43065 株及 C43311 株对小鼠的致病性, 结果表明 C43065 株对小鼠有较强的致病性, 而 C43311 株对小鼠无致病性, 为猪丹毒丝菌不同类型疫苗的免疫保护作用的检测提供了可靠的数据。通过对从血清型 2 菌株中克隆的 SpaA 蛋白的 N 端免疫保护区域进行诱导表达, 纯化得到了高纯度的 rSpaA-N, 分析结果表明, SpaA 蛋白属于稳定型蛋白、氨基酸序列保守、表达量高且易于纯化, 具备了作为基因工程抗原的理化条件。分别用 50 μ g 或 100 μ g 剂量的 rSpaA-N、天然 SpaA 及 NaOH 提取抗原与弗氏佐剂乳化制成亚单位疫苗, 利用小鼠模型比较了 rSpaA-N 和纯化前后天然 SpaA 对小鼠的免疫保护效果, 结果表明, 不同剂量的 rSpaA-N、天然 SpaA 及 NaOH 提取抗原均能完全保护小鼠受猪丹毒丝菌强毒株 C43065 的致死性攻击。Western 印迹和 ELISA 检测结果表明, rSpaA-N 和纯化前后的天然 SpaA 具有良好的免疫原性和抗原性, 是具有保护功能的完全抗原。因此, 本研究为猪丹毒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] Fthenakis GC, Christodoulou G, Leontides L, et al. Abortion in ewes associated with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Small Ruminant Research*, 2006, 63 (1-2):183-188.
- [2] Colavita G, Vergara A, Ianieri A. Deferment of slaughtering in swine affected by cutaneous erysipelas. *Meat Science*, 2006, 72 (2):203-205.
- [3] Hassanein R, Sawada T, Kataoka Y, et al. Pathogenicity for mice and swine of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle. *Veterinary Microbiology*. 2003, 91 (2-3):231-238.
- [4] 刘洋, 李丽, 陈芳. 尿路感染患者中检出一例红斑丹毒丝菌. 中外健康文摘·医药学刊 (*World Health Digest Medical Monthly*), 2008, 5(2):89.
- [5] 叶兴德. 糖尿病患者尿培养检出红斑丹毒丝菌 1 例. 西北国防医学杂志 (*Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China*), 2007, 28 (2):115.
- [6] Yamamoto Y, Shiohita K, Takazono T, et al. An autopsy case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. *Internal Medicine*, 2008, 47(15):1437-1440.
- [7] Eamens G, Forbes W, Djordjevic S. Characterisation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(4):329-338.
- [8] Eamens G, Chin J, Turner B, et al. Evaluation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccines in pigs by intradermal challenge and immune responses. *Veterinary Microbiology*, 2006, 116(1-3):138-148.
- [9] Kitajima T, Oishi E, Amimoto K, et al. Protective effect of NaOH-extracted *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine in pigs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60 (1):9-14.
- [10] Makino S, Yamamoto K, Murakami S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, 1998, 25(2):101 - 109.
- [11] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 刘祝祥, 李科, 等. 猪丹毒丝菌 C43311 株 *spaA* 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48 (2):207-212.
- [12] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, et al. Capsule thickness and amount of a 39 kDa protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlated with their pathogenicity for chickens. *Veterinary Microbiology*, 2003, 97(3-4):215-227.

- [13] Shimoji Y, Mori Y, Fischetti V. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, 1999, 67 (4):1646-1651.
- [14] Imada Y, Goji N, Ishikawa H, et al. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infection and Immunity*, 1999, 67(9):4376-4382.
- [15] Lachmann PG, Deicher H. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. *Infection and Immunity*, 1986, 52(3):818-822.

Immunity of native SpaA and recombinant SpaA-N against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice

Wulumuhan Nazierbieke, Lei Zhang, Cui He, Qingzhong Peng, Entomack Borrathybay *

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

Abstract: [**Objective**] We evaluated the effects of surface protective antigen A (SpaA) and its N-terminal protective domain (rSpaA-N) against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. [**Methods**] The SpaA was purified by electroelution from NaOH-extracted antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43311. The rSpaA-N was expressed in *E. coli* BL21 as a soluble protein by IPTG inducing, and purified with GST affinity chromatography. Mice of each group were subcutaneously immunized three times with 50 μ g or 100 μ g of native SpaA, rSpaA-N or NaOH-extracted antigen with in complete or incomplete Freund adjuvant at 2-week intervals. Five mice of each group were challenged with 100 LD₅₀ of *Erysipelothrix rhusiopathiae* virulent strain C43065 two weeks after the third immunization, and the specific antibody responses for SpaA was determined by indirect ELISA. [**Results**] Mice immunized with 50 μ g or 100 μ g of native SpaA, rSpaA-N, or NaOH-extracted antigen were protected completely against the challenge with strain C43065. There was no significant difference ($P < 0.05$) between the antibody responses observed for native SpaA, rSpaA-N and NaOH-extracted antigen at any dosages. Western blot results indicated that the native SpaA and rSpaA-N were recognized specifically by an antiserum against the native SpaA of strain C43311. [**Conclusion**] These results demonstrated that the rSpaA-N is a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 2 strains, and might be a useful vaccine candidate against swine erysipelas.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; rSpaA-N; protective immunity; subunit vaccine

(本文责编:王晋芳)