微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
48(3)：342~348; 4 March 2008
ISSN 0001-6209; CN11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn

猪胸膜肺炎放线杆菌溶血毒素的克隆表达及其对小鼠免疫保护作用

杜爱庆, 刁有祥*, 张伟, 张瑞平, 臧大鹏, 刘芳娜

(山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要：将猪胸膜肺炎放线杆菌血清 3 型分离株的 ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 基因和血清 5 型分离株的 ApxⅠA 基因分别克隆到原核表达载体 pGEX-5X-3, 并在大肠杆菌 BL21 中进行表达。SDS-PAGE 结果表明重组菌表达的最佳条件为诱导时间 2 小时和 IPTG 终浓度 1mmol/L。通过硫酸铵盐析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化表达产物。Western blot 检测结果显示表达产物具有免疫活性。按照不同组合将表达产物与弗氏佐剂等比例混合, 制备 3 种亚单位疫苗。并在 30 日龄和 45 日龄免疫小白鼠, 在 60 日龄分别用血清 1、3、5、7 和 10 型胸膜肺炎放线杆菌攻毒。血清 1、5 和 7 型胸膜肺炎放线杆菌攻毒后, 3 种亚单位疫苗分别提供 58.4%、66.6%和 91.7%的保护率。试验结果表明重组蛋白具有免疫保护作用, 且含有四种融合蛋白的亚单位疫苗免疫保护效果最佳。

关键词：胸膜肺炎放线杆菌; 溶血毒素; 克隆与表达; 免疫保护

中图分类号：R392　　文献标识码：A　　文章编号：0001-6209 (2008) 03-0342-07

猪传染性胸膜肺炎(Porcine pleuropneumonia)是由猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)引起的一种高度传染性、致死性呼吸道疾病, 以急性出血和慢性的纤维素性坏死性胸膜肺炎为主要特征[1]。该病在我国的发生呈逐年上升趋势, 对我国养猪业造成严重的经济损失[2]。

APP的致病因子较多, 包括荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白、转铁结合蛋白及溶血毒素(Apx)等, 其中溶血毒素是最重要的致病因子。APP能产生四种溶血毒素即ApxⅠ、ApxⅡ、ApxⅢ和ApxⅣ, 它们均属于RTX毒素(repeat in the structure, RTX)家族[3,4]。ApxⅠ大小为 105kDa, 具有强溶血活性和强细胞毒性, 能够产生ApxⅠ的血清型菌株通常都是致病力强的菌株, 也经常能从严重爆发APP的猪场分离得到; ApxⅡ的分子量也为 105 kDa, 溶血活性和细胞毒性比ApxⅠ弱, 除血清型 10 外, 其它所有血清型的APP都能产生这种毒素; ApxⅢ大小为 120 kDa, 具有强细胞毒性, 血清型 2、3、4、6 和 8 的APP能分泌该毒素; ApxⅣ是一种新发现的溶血毒素, 虽然它在APP发病机理中的确切作用还不十分清楚, 但已确定ApxⅣ是APP的第一个诱导毒素基因[5]。溶血毒素是引起细胞病变的主要原因, 同时也是APP最重要的保护性抗原, 是高效疫苗不可缺少的成分。本试验对猪胸膜肺炎放线杆菌的ApxⅠA、ApxⅡA、ApxⅢA和ApxⅣA基因进行克隆、表达和纯化, 并用纯化的融合蛋白制备亚单位疫苗, 研究其对小白鼠的免疫保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和试验动物来源：pGEX-5X-3 质粒、BL21 菌株由本实验室保存。猪胸膜肺炎放线杆菌血清 1 型、3 型、5 型、7 型、10 型菌株由本实验室分离鉴定并保存。小白鼠, 购自山东米歇尔生物制品有限公司, KM, 洁净级。

基金项目: 山东农业大学科技创新基金(23414)

*通讯作者。Tel: +86-538-8242593-8009；E-mail: yxdiao@163.com

作者简介: 杜爱庆(1979－), 男, 山东平邑人, 硕士研究生, 从事畜禽病原的分离鉴定与防制研究。E-mail: aiqingdu@163.com

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2007-10-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.1.2 主要试剂和仪器：UltraClean™15 DNA Purification Kit(MOBIO公司); T4DNA连接酶、TaqDNA聚合酶(5U/μL)、*Xho*I、*Eco*RI、*Sal*I、dNTP、IPTG(大连TaKaRa公司); 丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(北京鼎国生物技术发展中心); Sephadex G-200(北京欣经科生物技术公司); 弗氏佐剂(Sigma公司)。PCR仪(Eppendorf); 电泳仪、凝胶成像仪(Biorad); 超声波细胞粉碎机 JY92-Ⅱ(宁波新芝科器研究所); 紫外分光光度计(UV-2012C, 尤尼柯(上海)仪器有限公司)。

1.2 不同溶血毒素 **A** 基因的克隆与表达

根据 GenBank 已发表的 APP 血清 3 型菌株 ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 的基因序列和血清 5 型菌株 ApxⅠA 基因序列, 分别设计 4 对引物(表 1), 由上海生物工程有限公司合成。

表 **1** 4 种溶血毒素 **A** 基因的引物设计

Table 1 The primer design of A gene from four hemolytic-toxins

Toxin type	Primers	Primer sequence (5′→3′)	Restrictive enzyme sites	Length / bp
ApxⅠA	F1	CCGGAATTCCCGAAAGATTATCAAG	*Eco*RⅠ	1095
	R1	ATACTCGAGGAAGATTGCCTGTTTAG	*Xho*Ⅰ	
ApxⅡA	F2	CAGGAATTCGGGTCAAGGAAATGGA	*Eco*RⅠ	1017
	R2	AAAGTCGACCAGCAACGAGTAACGCA	*Sal*Ⅰ	
ApxⅢA	F3	GCCCGAATTCAAATAGCCAAACGT C	*Eco*RⅠ	1462
	R3	AATGTCGACATCCCTGAGCCACCCAA	*Sal*Ⅰ	
ApxⅣA	F4	ACCGAATTCCAAAGGACACGGACAGGAT	*Eco*RⅠ	537
	R4	TCGGTCGACTTCCGCATAATTCACATCG	*Sal*Ⅰ	

参照文献[6]介绍的方法, 进行APP的培养及模板DNA的制备, PCR扩增ApxⅠA、ApxⅡA、ApxⅢA和ApxⅣA基因。PCR采用 50.0μL反应体系。PCR反应条件为：ApxⅠA：95℃ 3 min, 94℃ 1 min,52℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环, 72℃ 15min。ApxⅡA、ApxⅢA 和ApxⅣA：94℃ 5min, 94℃ 30s, 58℃ 1 min, 72℃ 1min, 28 个循环, 72℃ 10min。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳对PCR扩增产物进行鉴定, 按UltraClean™ DNA Purification Kit介绍的方法, 回收并纯化PCR产物, 然后与pMD18-T载体连接，转化大肠杆菌TG1, 经蓝白斑筛选得到阳性克隆, 酶切鉴定, 对阳性重组质粒, 送上海生工生物工程有限公司测序。

用 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切 ApxⅠA 基因的 PCR 产物及 pGEX-5X-3 质粒 DNA, 用 *Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切 ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 基因的 PCR 产物及 pGEX-5X-3 质粒 DNA, 将双酶切后的 ApxⅠA、ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 基因的 PCR 产物分别与酶切质粒 pGEX-5X-3 连接, 连接产物转入 BL21 菌株。对质粒 DNA 进行提取并酶切鉴定。

1.3 表达产物最佳诱导时间的确定

4 种重组菌分别在 2×YT培养基(Amp^+)中 37℃振荡培养 2h, 然后分别向试管中加入终浓度为 1.0mmol/L的IPTG, 分别诱导 1h、2h、3h、4h, 以确定最佳诱导时间。同时, 按照上述同样的方法诱导表达pGEX-5X-3 空载体转化的BL21 大肠杆菌。

取 1mL 诱导表达的菌液, 离心、弃上清, 用 1mLPBS(pH7.2)洗涤沉淀, 最后将菌体沉淀重悬于 100μLPBS 中, 加入 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸 10min。取 20μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.4 表达产物的免疫活性检测

取 SDS-PAGE 后的凝胶, 直接用 Bio-RAD 公司 Mini Trans-Blot Electrophoretic cell 转印装置, 将其转印于 NC 膜上。以封闭液稀释的鼠抗血清 3 型或 5 型 APP 抗体为一抗, 以封闭液稀释的兔抗鼠 IgG-HRP 酶标抗体为二抗, Western blot 检测其反应活性。

1.5 表达产物的纯化及浓度的测定

4 种重组菌在 2×YT培养基(Amp^+)中, 37℃振荡培养至最佳的诱导时间, 4℃ 10000r/min离心 10min, 收集的菌体通过 PBS(pH7.2) 悬浮, 超声波破碎, 4℃ 10000r/min离心 10min, 将上清液通过硫酸铵盐析, Sephadex G-200 凝胶过滤层析纯化表达产物, 收集并标记每个洗脱峰所对应的样品。以上各步纯化的样品, 分别取 50μL加入等体积的 2×SDS上样缓冲液, 煮沸 10min。取 20μL进行SDS-PAGE, 检测样品的纯化程度。将纯化的表达产物, 在波长 280nm处测定其浓度[7]。

1.6 重组蛋白对小鼠的免疫保护作用

1.6.1 重组蛋白亚单位疫苗的制备：根据不同血清型 APP 分泌 Apx 的规律, 将纯化的表达产物分别制备成 3 种亚单位疫苗：疫苗 A(ApxⅠA 和 ApxⅣA 重组蛋白的等量混合液, 再按 1:1 的比例与弗氏佐剂制备成亚单位疫苗); 疫苗 B(ApxⅠ、ApxⅢA 和 ApxⅣA 重组蛋白的等量混合液, 再按 1:1 的比例与弗氏佐剂制备成亚单位疫苗); 疫苗 C(ApxⅠA、ApxⅡA、ApxⅢA 和 ApxⅣA 重组蛋白的等量混合液, 再按 1:1 的比例与弗氏佐剂制备

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

成亚单位疫苗)。其中重组蛋白总含量为 100μg/mL。

1.6.2 重组蛋白亚单位疫苗的免疫保护作用：将 30 日龄的小白鼠随机分成 18 组，每组 8 只，雌雄各 4 只，进行免疫保护试验。表 2 为免疫过程及处理方式。

表 2 小白鼠的免疫和处理方式

Table 2 The immunization and treatment in mice

t/d	Group1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
30, 45	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)	Subcutaneous injection with vaccine A (0.5mL/mouse)
60	Challenged with ser. 1 APP (1mL/mouse)	Challenged with ser. 3 APP (1mL/mouse)	Challenged with ser. 5 APP (1mL/mouse)	Challenged with ser. 7 APP (1mL/mouse)	Challenged with ser. 10 APP (1mL/mouse)	Blank control Challenged with PBS (1mL/mouse)
65	The survived mice were killed and dissected.					

* VaccineB and VaccineC had the same immunity and treatment in mice with Vaccine A.

2 结果

2.1 不同溶血毒素 A 基因 PCR 扩增结果

提取 APP 血清 5 型和 3 型菌株的基因组 DNA，经 PCR 扩增，结果扩增出大小约为 1095bp、1017bp、1462bp 和 537bp 的特异性条带，与预期的目的片段大小一致。

2.2 不同溶血毒素 A 基因序列分析

用 DNAstar 软件对序列进行分析表明：血清 3 型 ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 基因的序列与 GenBank 中发表的胸膜肺炎放线杆菌 ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 基因的同源性在 95%以上，而血清 5 型胸膜肺炎放线杆菌 ApxⅠA 基因序列与 GenBank 中发表的 ApxⅠA 基因的同源性 93%以上。

2.3 重组质粒的鉴定结果

对经转化 BL21 的重组菌提取质粒后进行酶切鉴定，从质粒的电泳图可以看出，重组质粒 pGEX-ApxⅠA 经 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ双酶切后琼脂糖凝胶电泳分别出现 5500bp 和 1095bp 左右的条带。重组质粒 pGEX-ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA 经 *Eco*RⅠ和 *Sal*I 双酶切后，琼脂糖凝胶电泳分别出现 5500bp 和 1017bp、5500bp 和 1462bp、5500bp 和 537bp 左右的条带(图 1-A、图 1-B、图 1-C、图 1-D)。

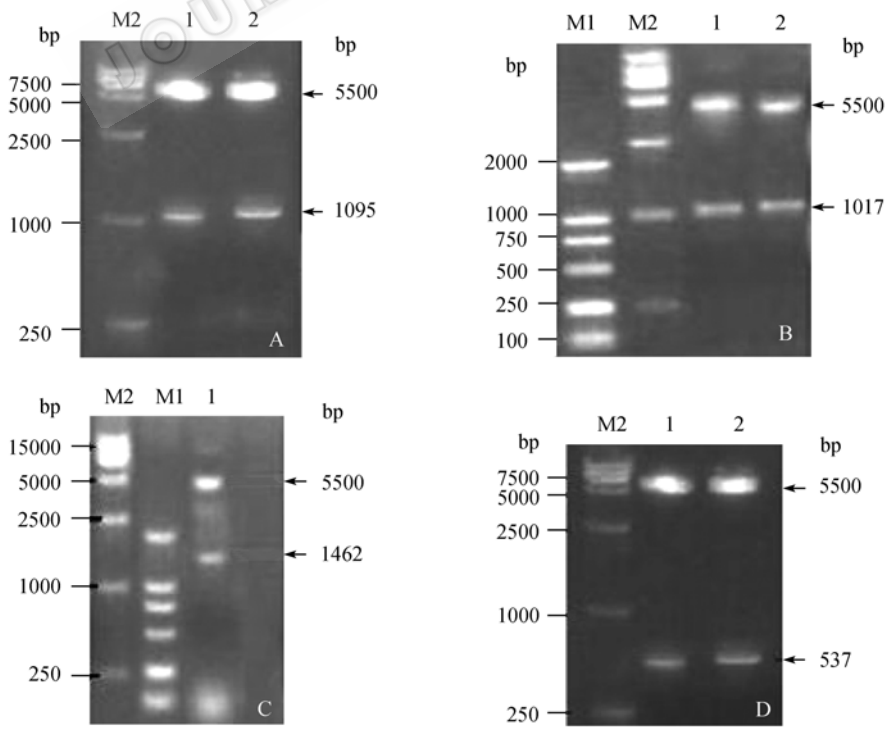

图 1 **pGEX-Apx** 双酶切电泳结果

Fig.1 The result of Apx-pGEX digested by *Eco*RI and *Sal*Ⅰ. A: ApxⅠA; B: ApxⅡA; C: ApxⅢA; D: ApxⅣA. M1. DL-2000 marker; M2. DL-15000 marker; 1and 2. Sample.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.4 不同诱导时间表达产物的含量

对不同诱导时间的重组菌取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。SDS-PAGE 结果表明，表达产物因诱导时间不同而产量不等，4 种重组菌被诱导 2h 时，表达产物的含量已达到最高。(图 2-A、图 2-B、图 2-C、图 2-D)。

2.5 表达产物免疫原性检测及纯化结果

对溶血毒素 A 基因重组菌的诱导表达产物进行 Western blot 检测，结果显示 ApxⅠ、ApxⅡ、ApxⅢ、ApxⅣ分别在 58 kDa、66 kDa、82 kDa、49 kDa 出现特异性条带，说明表达的融合蛋白具有反应原性。样品经硫酸铵分级盐析和 Sephadex G-200 凝胶过滤层析得到纯化，并在纯化的流程中取样进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。纯化后表达产物的浓度为 2.8mg/mL。

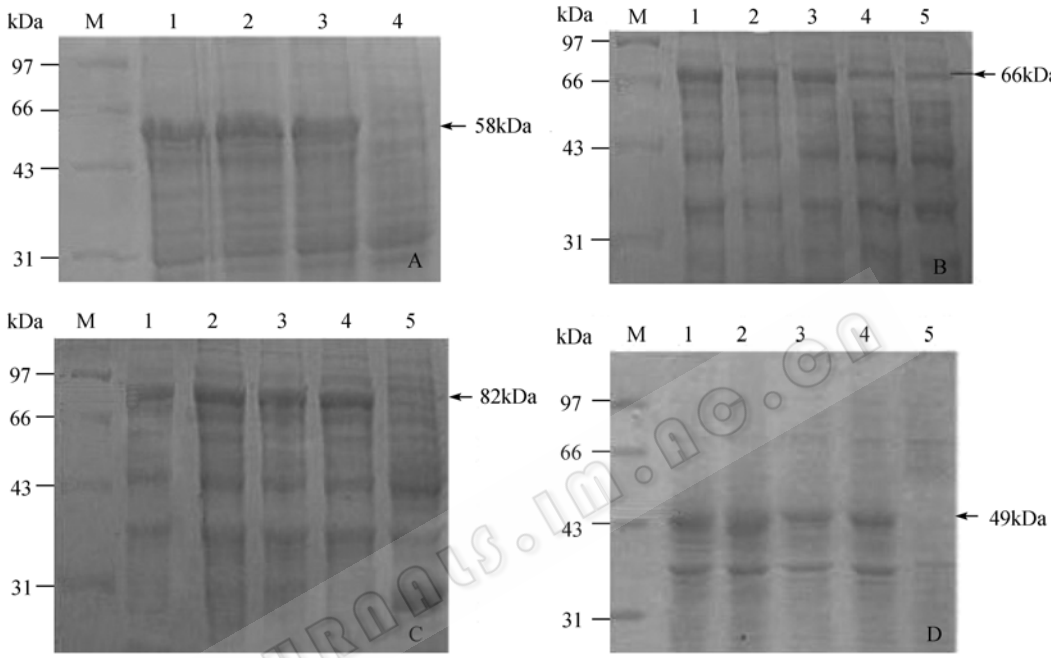

图 2 Apx 基因表达产物的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed pGEX-Apx in BL21. A: ApxⅠA; B: ApxⅡA; C: ApxⅢA; D: ApxⅣA. 1-4. Induced pGEX-Apx *E.Ccoi* in different times; 5. Uninduced pGEX-5X-3 *E.coli* ; M. Protein marker.

2.6 重组蛋白对小白鼠的免疫保护作用

不同血清型的 APP 攻击经过二免的小白鼠，攻击 24h 后小白鼠表现被毛粗糙，精神萎靡，个别表现尾根发紫。当用血清型 1、5 和 7 攻击时，疫苗 A、B 和 C 的提供的保护率分别达到 58.4%、66.6%和 91.7%，剖检可见少数小白鼠的肝脏和肺脏出现不同程度的肿大、出血。其中毒力较强的血清 1 型和 5 型 APP 攻击时，免疫疫苗 C 的小白鼠肝脏和肺脏仅有轻微的肿胀和轻微的出血，而免疫疫苗 A 和 B 的部分小白鼠肝脏和肺脏出现肿胀和出血。当用血清 3 型和血清 10 型 APP 攻击小白鼠时，疫苗 A、B 和 C 提供的保护率分别达到 82%、87.5%和 100%。剖检结果显示，二免后的小白鼠肝脏和肺脏均表现轻微的出血和肿胀。免疫保护试验结果表明疫苗 C 具有较佳的免疫保护作用。重组蛋白亚单位疫苗的免疫保护试验结见表 3。

表 3 重组蛋白亚单位疫苗的免疫结果

Table3 The protection of subunit vaccine of recombinant proteins

Group	Treatment	Vaccine	No. sick	Mortality/%	Lesion	
					Liver	Lung
1	Vac.,challenge with ser. 1 APP	A	8/8	37.5 (3/8)	Swelling	Bleeding
		B	7/8	37.5 (3/8)	Swelling	Bleeding
		C	5/8	25 (1/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

(续表 3)

Group	Treatment	Vaccine	No. sick	Mortality/%	Lesion	
					Liver	Lung
2	Vac.,challenge with ser. 3 APP	A	5/8	12.5 (1/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
		B	3/8	12.5 (1/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
		C	2/8	0 (0/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
3	Vac.,challenge wIth ser. 5 APP	A	6/8	50 (4/8)	Swelling	Seriously bleeding
		B	5/8	37.5 (3/8)	Swelling	Seriously bleeding
		C	4/8	0 (0/8)	Slightly Swelling	Slightly bleeding
4	Vac.,challenge with ser. 7 APP	A	6/8	37.5 (3/8)	Swelling	Bleeding
		B	5/8	25 (2/8)	Swelling	Bleeding
		C	3/8	12.5 (1/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
5	Vac.,challenge with ser. 10 APP	A	3/8	25 (2/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
		B	2/8	12.5 (1/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
		C	2/8	0 (0/8)	Slightly swelling	Slightly bleeding
6	Vac.,unchallenge	A	0/8	0 (0/8)	Normal	Normal
		B	0/8	0 (0/8)	Normal	Normal
		C	0/8	0 (0/8)	Normal	Normal

JOURNALS.IM.AC.CN

3 讨论

猪胸膜肺炎放线杆菌共有 15 个血清型[8,9]不同国家和地区流行的APP血清型不同，我国流行的APP以1、3、5 和 7 型为主 [10~12]，因此，我们选择 1、3、5 和 7 型APP进行攻毒试验。APP的致病力与其分泌的溶血毒素有重要的关系，其中溶血毒素A基因在操纵子中起着编码毒素结构蛋白的重要作用，也是APP重要的保护性抗原，因此本实验对 4 种溶血毒素的A基因进行克隆表达，并研究表达产物的免疫保护 作用。

目前国内外学者对胸膜肺炎放线杆菌疫苗的研究主要集中于灭活疫苗、高效亚单位疫苗[13,14]和弱毒疫苗[15~17]。灭活疫苗仅能保护同种血清型APP的攻击，因而具有一定的局限性；弱毒疫苗随着毒力的降低，其免疫原性也有所降低，且存在毒力返强的现象；通过基因工程方法获得的不同胸膜肺炎放线杆菌弱毒菌株，因其抗性标记和生物安全的问题，距离临床的应用还有很大的距离。因而亚单位疫苗的研制成为较理想的研究方向。

本试验通过基因工程方法对溶血毒素 A 基因进行克隆、表达和纯化，并根据不同血清型的 APP 分泌溶血毒素的规律，制备不同组合的亚单位疫苗进行免疫保护试验。结果，含 ApxⅠ和 ApxⅣ的亚单位疫苗 A，含 ApxⅠ、ApxⅢ和 ApxⅣ的亚单位疫苗 B 和含 4 种毒素的亚单位疫苗 C 对强毒血清 1 型、5 型和 7 型 APP 的攻击可分别产生平均为 58.4%、66.6%和 91.7%的保护率，对弱毒血清型 3 型和 10 型 APP 的攻击可分别产生平均为 82%、87.5%和 100%的保护率。由此可知，亚单位疫苗随着组分中表达产物种类的增加，产生的免疫保护率也随之升高，其中含 4 种毒素的亚单位疫苗对所选 5 种血清型 APP 的攻击均能

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

产生显著的免疫保护作用，显示了良好的应用前景，为本病的防治提供了一种新的方法。

含 4 种毒素的亚单位疫苗对于强毒血清 1 型、5 型和 7 型APP的攻击可产生 87.5%、100%和 87.5%的保护率，说明在APP的致病过程中，其他致病因子如荚膜多糖、脂多糖、外膜蛋白等起着一定的作用。含ApxⅠ、ApxⅢ和ApxⅣ的亚单位疫苗B对小白鼠的免疫保护作用略优于含ApxⅠ和ApxⅣ的亚单位疫苗A，可能有两方面的原因：一方面与疫苗中Apx的致病性有关。ApxⅠ和ApxⅡ均具有溶血活性和细胞毒性[18,19]，ApxⅣ具有溶血活性，且能够增强其他毒力因子的致病性，而ApxⅢ仅具有细胞毒性，因此在致病性方面ApxⅢ的作用弱于ApxⅠ、ApxⅡ和ApxⅣ。另一方面与亚单位疫苗中Apx的含量有关，疫苗B中ApxⅠ和ApxⅣ的含量低于疫苗A中的含量，因此当强毒血清型 1 型、5 型和 7 型APP攻击时，疫苗B和疫苗A产生免疫保护作用相近。

参 考 文 献

[1] Tonnpitak W, Baltes N, Hennining Panka I, *et al*. Construction of an *Actinoabacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prololype live negative maker vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70(12): 7120–7125.

[2] 陈如明, 谢鸣星, 李云峰, 等. 豫地区猪传染性胸膜肺炎血清学调查.中国畜禽传染病(*Chinese Journal of Animal and Poultry Infections Diseases*), 1990, 4: 38–40.

[3] Choi C, Kwon D, Min K, *et al*. Detection and localization of ApxⅠ, -Ⅱ and -Ⅲ genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in natural porcine pleuropneumonia by in situ hybridization. *Vet Pathol*, 2001, 38 (4): 390–395.

[4] Cho WS, Chae C. Expression of the ApxⅣ gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comp Pathol*, 2001, 125 (1): 34–40.

[5] Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, *et al*. CharacterizatIon of ApxⅣ, a new RTX determination of *Actionbacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol*, 1999, 145(8): 2105–2116.

[6] Prideaux CT, Lenghaus C, Krywult J, *et al*. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site specific mutagenesis of the ApxⅡ operon. *Infection and Immunity*, 1999, 67: 1962–1966.

[7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2000.

[8] Blackcall PJ, Klaasen HLB M, Van Den Hosclh H, *et al*. Proposal of a new seruvar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 15 Veterinary. *Microbiology*, 2002, 84(1-2): 47–52.

[9] 李树清, 易建平, 陈志飞, 等. 复合 PCR 鉴定胸膜肺炎放线杆菌方法的建立及初步应用. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(6): 966–969.

[10] 张立昌. 猪传染性胸膜肺炎研究进展. 养猪(*Swine Production*), 2001, 1: 40–42.

[11] 张培君, 孙惠玲, 苗得园, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌和副猪嗜血杆菌的鉴别诊断及血清型鉴定. 中国兽药杂志(*Chinese Journal of Veterinary Drug*), 2002, 36(10): 18–20.

[12] 刁有祥,丁家波, 姜世金, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌山东分离株的血清型与 Apx 毒素型研究. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*), 2005, 38 (11): 2349–2354.

[13] Byrd W, Hannon B G, Kadis S. Protective efficacy of conjugate vaccines against experimental challenge with porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunophathology*, 1992, 34: 307–324.

[14] Goethe R, Gonzales OF, Lindner T, *et al*. A novel strategy for protechve detergent *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine*, 2001, 19: 966–975.

[15] Byrd W, Hooke AM. Temperahure-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. *Infection and Immunity*, 1997, 65: 2206–2210.

[16] Ingbam A, Zbang Y, Prideaux C. Actenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of aroQ. *Veterinary Microbiology*, 2002, 84: 263–273.

[17] Tonpitak W, Baltes N, Hennig-Pauka I, *et al*. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity*, 2002, 70: 7120–7125.

[18] 徐晓娟, 何启盖, 陈焕春. 胸膜肺炎放线杆菌毒素的分子生物学. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2004, 26(3): 234–237.

[19] Frey J, Nicolet J. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Clin Microbiol*, 1990, 28: 232–236.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Cloning and Expression of Hemolytic-toxin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and the Immunoprotection in Mice

Aiqing Du, Youxiang Diao, Wei Zhang, Ruiping Zhang, Dapeng Zang, Fangna Liu

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The ApxⅡA、ApxⅢA、ApxⅣA genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 3 and the ApxⅠA gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 were respectively cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-5X-3.Then the recombinant expression plasmids were respectively transformed into *E.coli* BL 21 and fusion protein expression were induced by IPTG. The expression products were purified by precipitation with ammonium sulfate and chromatography on Sephadex G-200. SDS-PAGE indicated that the productsexpressed at a high level when the recombinant *E.coli* BL21 was induced 2h, joining IPTG to final concentration 1mmol/L. Western blot analysis showed that the expression products had immunogenicity and specificity.Subunit vaccines were made by different purified expression products and Freund's adjuvant**.** Mice were immunized at 30 days and 45 days with the subunit vaccines. Then the mice were challenged with the APP of serotype 1, 3, 5,7or 10 at 60 days. The result of animal immunoprotection test showed that subunit vaccines (ApxⅠA +ApxⅣA, ApxⅠA + ApxⅢA +ApxⅣA ,ApxⅠA + ApxⅡA + ApxⅢA + ApxⅣA) could offer 58.4%、66.6%、91.7% protection in mice against the challenge of serotype 1, 5 and 7 APP, respectively. These results suggested that the recombinant proteins had good immunogenicity and the subunit vaccine containing four kind of recombinant proteins could induce better immunoprotection.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; Hemolytic-toxin; Cloning and Prokaryotic expression; Immunoprotection.

JOURNALS.IM.AC.CN

Supported by the Innovation and Technology Fund of Shandong Agricultural University(23414)
*Corresponding author. Tel: +86-538-8242593-8009; E-mail: yxdiao@163.com
Received: 24 July 2007/Revised: 18 October 2007

《微生物学报》投稿方式

2007 年 12 月修定

从 2006 年起，本刊采用“稿件远程处理系统”，全面试行网上投稿、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：请先登录本刊网站【http:// journals.im.ac.cn】，点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿，请先点击进行“注册”，注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投稿的，则可直接投稿。如果忘了用户名和密码，请联系本刊编辑部，可以找回登录口令。

(2) 邮寄纸样：所有来稿均需要邮寄 1 份纸稿、介绍信。

(3) 稿件受理费：投稿时请随寄 100 元受理费，务必通过邮局汇款，切忌随信邮寄！【注：务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号(如果有)”。】

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn