

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.01

# 产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素 C 末端与中和抗原表位的串联表达及免疫保护性分析

杜吉革, 薛麒, 朱真, 彭小兵, 张秀坤, 李启红, 印春生, 姚文生, 康凯, 陈小云\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-01-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0001-06 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为获得产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素(CPA)的C末端( $CPA_C$ )与中和抗原表位NE(ARGF<sub>AK</sub>)的串联融合蛋白并评价其免疫原性,对已知的A型产气荚膜梭菌  $CPA_C$  及NE的编码基因进行优化设计,并将两个基因的三拷贝序列串联,经人工合成获得基因片段  $GCPA_{C3}N_{E3}$ 。将该片段克隆至原核表达载体 pET30a (+) 中进行表达与纯化,获得重组蛋白。利用 Western blot 方法检测重组蛋白与A型产气荚膜梭菌毒素抗血清的反应性。随后,以纯化的重组蛋白免疫家兔,根据《中华人民共和国兽药典》(2015年版)规定的方法检测家兔血清的中和抗体效价。在二免后 21 d,以 1 个 MLD 的A型产气荚膜梭菌毒素对家兔进行攻毒。结果表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在表达且能与A型产气荚膜梭菌毒素抗血清反应。每毫升的一免抗血清可中和 40 个最小致死量(MLD)、二免抗血清可中和 80 个 MLD 的A型产气荚膜梭菌毒素;1 个 MLD 的A型产气荚膜梭菌毒素攻毒后,对照组 4/4 死亡,免疫组得到了 100%(4/4)的保护。以上结果说明,重组蛋白具有良好的免疫原性,从而为A型产气荚膜梭菌病基因工程疫苗的研制提供了重要的实验数据。

**[关键词]** 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素;C末端;中和抗原表位;串联表达;抗原性

## Immunogenicity of a Tandem Fusion Protein of C-terminal and a Neutralizing Epitope of *Clostridium perfringens* $\alpha$ Toxin

DU Ji-ge, XUE Qi, ZHU Zhen, PENG Xiao-bing, ZHANG Xiu-kun, LI Qi-hong,  
YIN Chun-sheng, YAO Wen-sheng, KANG Kai, CHEN Xiao-yun\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: CHEN Xiao-yun, E-mail: caucxy@163.com

**Abstract:** This study was conducted to obtain a tandem fusion protein of C-terminal ( $CPA_C$ ) of CPA and a neutralizing epitope, NE (ARGF<sub>AK</sub>), and to evaluate the immunogenicity of it. Based on the known CPA sequence of *Clostridium perfringens* type A, genes of  $CPA_C$  and NE were optimized and three copies of  $CPA_C$  and NE were tandemly linked, following with the  $GCPA_{C3}N_{E3}$  being synthesized. Then, this sequence was cloned into

基金项目: 科技部十三五“牛羊重要疫病免疫防控新技术研究”重点专项课题(2017WFD0500903)

作者简介: 杜吉革, 博士, 从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 陈小云。E-mail: caucxy@163.com

prokaryotic expression vector pET30a (+) for expression and purification to get the recombinant protein. Reactivity of the protein with antiserum of *Clostridium perfringens* type A was detected by Western blot. The rabbit antiserum against the recombinant protein was prepared and the neutralizing titer was measured according to the method prescribed in Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015). The results showed that recombinant protein was presented predominantly in an insoluble form (inclusion bodies), and it could react with the antiserum of *Clostridium perfringens* type A. After the first immunization, sera from rabbits immunized with recombinant protein could neutralize 40 minimum lethal dose (MLD) of *Clostridium perfringens* type A toxin per mL, and 80 mice MLD after twice immunization. Moreover, rabbits immunized by the recombinant protein fully survived at the dose of 1 MLD of *Clostridium perfringens* type A toxin challenge, whereas all of the rabbits died (4/4) in the control groups. These data suggest that the recombinant protein is a potential vaccine candidate for genetic engineering subunit vaccine of *Clostridium perfringens* type A.

**Key words:** *Clostridium perfringens*  $\alpha$  toxin; C-terminal; neutralizing epitope; recombinant expression; antigenicity

产气荚膜梭菌是一种重要的人畜共患菌,能引起人类以及多种家畜家禽发病<sup>[1]</sup>,不仅威胁着人类的健康,而且对畜牧业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。产气荚膜梭菌主要的致病因素是其分泌的外毒素,并通过其产生的毒素发挥致病作用<sup>[3]</sup>。根据产生 4 种主要致死性外毒素  $\alpha$  (CPA)、 $\beta$  (CPB)、 $\epsilon$  (ETX) 和  $\iota$  (CPI) 的种类,可将该菌分为 A、B、C、D、E 五个毒素型<sup>[3]</sup>。其中,对养牛业危害最大的是 A、C 和 D 型。在国外,牛的产气荚膜梭菌病以 C、D 型菌导致牛的坏死性肠炎或肠原性毒血症为主,而在国内,牛的产气荚膜梭菌病则以 A 型菌导致的牛“猝死症”为主<sup>[4]</sup>。病牛往往无任何前驱症状,而突然发作死亡<sup>[4-5]</sup>。因此,疫苗免疫是防制该病的有效手段。然而,国内还没有商品化的疫苗来预防牛的 A 型产气荚膜梭菌病。在预防羊的产气荚膜梭菌病方面,虽然产气荚膜梭菌灭活疫苗,起到了一定的效果,但该类疫苗是通过灭活细菌培养物上清而制备的天然类毒素,制备过程冗杂,抗原成分复杂,有效抗原量较低。如大剂量的肌肉注射会破坏牛肉的品质。因此,提供安全、纯净、有效的抗原对未来预防该菌感染具有重要意义。

CPA 是由产气荚膜梭菌染色体基因 *plc* 编码<sup>[6]</sup>,该基因存在于五个毒素型的菌株中,但在 A 型毒株中表达水平最高<sup>[7]</sup>。CPA 分为 N-末端 (1-246,简称 CPA<sub>N</sub>) 和 C-末端 (247-370) 两个结

构域。其中,CPA<sub>N</sub> 是 CPA 发挥酶活性的主要区域,而 CPA<sub>C</sub> 是毒素与细胞结合的主要区域<sup>[8]</sup>。研究表明,重组 CPA 仍存在一定的毒力<sup>[9]</sup>,而通过甲醛灭活后的天然 CPA 抗原性会明显降低<sup>[10-11]</sup>。为此,无毒力 CPA 的研制具有重要的意义。已有的研究证实,CPA<sub>C</sub> 能够对天然 CPA 起到一定的免疫保护作用<sup>[12-14]</sup>。此外,Alison 等<sup>[15]</sup> 筛选出一株在体内和体外实验中对 CPA 均具有中和保护作用的单抗,进一步的研究证实,该单抗针对的线性表位 NE 的氨基酸序列是 ARGFAK,位于 CPA 的第 193~198 位。由于 CPA<sub>C</sub> 蛋白分子量较小,研究者通常选择将 CPA<sub>C</sub> 与 GST 等大分子量标签蛋白融合表达,从而引入了过多无关的抗原成分<sup>[13-14]</sup>。为了更好地发挥 CPA<sub>C</sub> 和 NE 的免疫保护作用,试验根据我国现行 A 型产气荚膜梭菌标准株 (C57-1 株) CPA<sub>C</sub> 和 NE 的编码序列进行密码子优化设计,并将上述两种基因序列分别进行 3 次重复后串联,经原核系统表达、纯化和鉴定,并对重组蛋白的免疫保护性进行研究。

## 1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、实验动物和试剂 A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株、A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株天然毒素、A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清及 pET30a(+) (以下简称 pET) 表达载体均为中国兽医药品监察所基础保障处微生物实验室保存;1.5~2.0 kg 普通

级健康日本大耳白兔和 16~18 g ICR 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;感受态细胞 Top10 和 BL21 (DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司;佐剂 Montanide ISA 201 购自法国 seepic 公司;蛋白 Marker (M1)、Western blot Marker (M2)、Ni-IDA 亲和层析介质试剂盒,购自金斯瑞生物科技有限公司;高保真 PCR 酶 KOD 购自东洋坊;premix taq version 2.0,购自 takara;T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promaga 公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 购自 NEB 公司;抗 His 标签单抗、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,购自碧云天生物技术有限公司;LB 培养基购自北京中海生物科技有限公司。

1.2 基因合成及密码子优化 以 A 型产气荚膜梭菌 C57-1 的 CPAC 和 NE3 编码基因序列为模版进行优化设计,将二者的 3 拷贝序列串联后,在串联基因的 3'端添加 6 \* His 标签蛋白的编码序列,由中美泰和公司合成基因片段  $GCPC_{C_3}N_{E_3}$ 。

1.3 原核表达载体的构建 以人工合成的片段为模板,采用引物对 1F/1R 进行 PCR 扩增。其中上游引物 1F 序列为:5'-GGCGGATCCGTTGGTAAGAAC-3',其 5'端引入限制性内切酶 *Bam*H I 位点(下划线部分)及保护性碱基;下游引物 1R 序列为:5'-GGCCTCGAGTTAGTGGTGATGGT 及保护性碱基,其 5'端引入限制性内切酶 *Xho* I 位点(下划线部分)。PCR 体系为 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;98  $^{\circ}$ C 变性 10 s,56  $^{\circ}$ C 退火 30 s,68  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 33 个循环;最后 68  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

回收目的条带,采用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,与经过相同酶切处理的 pET 连接。将连接好的质粒转化 Top10 感受态细胞,挑取单克隆,提取质粒,进行 PCR 和双酶切鉴定,将鉴定结果为阳性的质粒送中美太和公司测序,将测序正确的质粒命名为  $pCPA_{C_3}N_{E_3}$ 。

1.4 重组蛋白的表达与纯化 将  $pCPA_{C_3}N_{E_3}$  以及 pET 转化至 BL21 感受态细胞中,分别在 15  $^{\circ}$ C 和 37  $^{\circ}$ C 条件下用 IPTG 诱导表达,采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况及其可溶性,并采用 Western

blot 方法,以抗 His 标签蛋白抗体为一抗,对重组蛋白做进一步的鉴定。对以包涵体形式表达的蛋白进行进一步的纯化和复性,具体方法见文献<sup>[2]</sup>。

1.5  $rCPA_{C_3}N_{E_3}$  与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清的反应  $rCPA_{C_3}N_{E_3}$  经 SDS-PAGE 电泳后转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,以 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清为一抗,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗进行孵育,按照底物显色试剂盒说明书进行显色。

## 1.6 抗原性分析

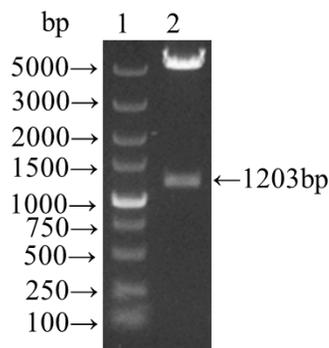
1.6.1 免疫程序 选用对 A 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价为 0 的家兔,进行重组蛋白的免疫,具体免疫方法和程序见文献<sup>[2]</sup>。

1.6.2 血清中和效价测定 采用血清中和的方法测定兔血清的毒素中和效价,具体操作方法见文献<sup>[2]</sup>。

1.6.3 攻毒试验 二免后 21d,用 1 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌天然毒素进行攻毒,具体的免疫程序见文献<sup>[2]</sup>,判定试验疫苗的免疫保护效力。

## 2 结果

2.1  $CPA_{C_3}N_{E_3}$  串联基因的原核表达载体的成功构建 采用引物 1F/1R 进行 PCR 扩增,扩增片段经酶切后克隆至 pET 载体上。获得重组质粒的双酶切电泳结果如图 1 所示,酶切后出现大小约 5 kb 的载体 DNA 片段,以及大小约 1203 bp 的目的基因片段,与预期相符。测序结果表明,插入的外源基因序列正确,将此质粒命名为  $pCPA_{C_3}N_{E_3}$ 。



1: DL5000 plus DNA 相对分子质量标准;

2:  $pCPA_{C_3}N_{E_3}$  的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

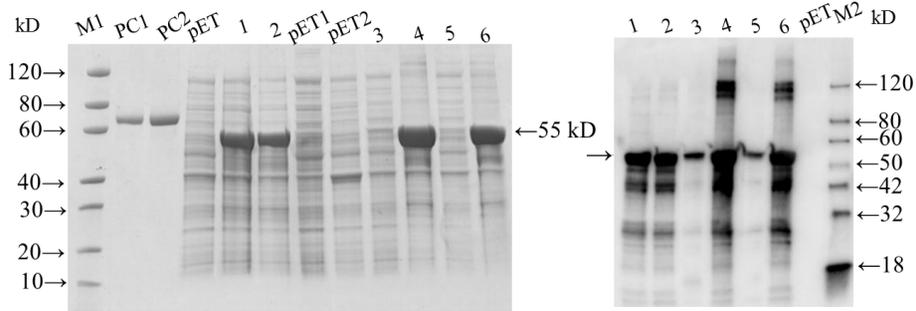
1:DL5000 plus DNA Marker; 2: $pCPA_{C_3}N_{E_3}$  digested with *Bam*H I and *Xho* I

图 1 原核表达重组质粒的酶切鉴定

Fig 1 Identification of recombinant prokaryotic expression plasmids

2.2 CPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 串联基因的原核表达与纯化 将 pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 及 pET 分别转化 BL21 (DE3) 并诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示,在 15 °C 诱导 16 h 和 37 °C 诱导 4 h 两种条件下表达的重组蛋白均以包涵体的形式表达,分子量约为 55 kD,且均能与抗 His 标签抗体发生反应,与预期相符

(图 2)。综合考虑蛋白表达量和诱导时间,选择 37 °C 诱导 4 h 的条件进行后续的诱导。如图 3 所示,按照 Ni-IDA 琼脂糖凝胶说明书对重组蛋白进行纯化,收集纯度较高的 Lane11-12 洗脱液进行透析和复性,最终获得的 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 蛋白浓度为 0.671 mg/mL。



a: 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定; b: 重组蛋白与抗 His 单抗反应的 Western blot

M1: 蛋白 Marker; M2: Western blot Marker; PC1: BSA (1 µg); PC2: BSA (2 µg); pET: pET 37 °C、4 h 诱导的细胞裂解物;

1: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>、15 °C、16 h 诱导的细胞裂解物; 2: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>、37 °C、4 h 诱导的细胞裂解物; pET1: pET 37 °C 4 h 诱导的细胞裂解上清; pET2: pET 37 °C 4 h 诱导的细胞裂解沉淀; 3: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 15 °C 16 h 诱导的细胞裂解上清; 4: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 15 °C 16 h 诱导的细胞裂解沉淀;

5: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 37 °C 4 h 诱导的细胞裂解上清; 6: pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 37 °C 4 h 诱导的细胞裂解沉淀

a. The identification of recombinant protein expression by SDS-PAGE;

b: The identification of recombinant protein with anti-His monoclonal antibody by Western blot

M1: protein Marker; M2: Western blot Marker; PC1: BSA (1 µg); PC2: BSA (2 µg); pET: The cell lysates of pET induced with IPTG for 4 h at 37 °C;

1: The cell lysates of pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 16 h at 15 °C; 2: The cell lysates of pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 4 h at 37 °C;

pET1: The supernatant of cell lysates of pET induced with IPTG for 4 h at 37 °C; pET2: The precipitation of cell lysates of pET induced with IPTG for 4 h at 37 °C; 3: The supernatant of cell lysates of pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 16 h at 15 °C; 4: The precipitation of cell lysates of

pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 16 h at 15 °C; 5: The supernatant of cell lysates of pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 4 h at 37 °C;

6: The precipitation of cell lysates of pCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> induced with IPTG for 4 h at 37 °C

图 2 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 的原核表达与鉴定

Fig 2 Prokaryotic expression and identification of rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>

2.3 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清的鉴定 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 经 SDS-PAGE 后转移到 NC 膜上进行 Western blot, 结果如图 4 所示, rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 与 A 型产气荚膜梭菌毒素抗血清发生明显反应。

2.4 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 的免疫原性分析

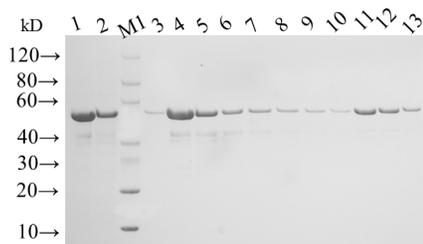
2.4.1 抗 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 兔血清的毒素中和和抗体效价测定 经血清中和法测定, 以 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 免疫家兔后, 每毫升的一免抗血清可中和 40 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素; 每毫升的二免抗血清可中和 80 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素, 而佐剂对照组的

兔血清对毒素无中和作用。

2.4.2 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 免疫对兔的免疫保护结果 在二免后 21 d, 对所有 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 免疫组和对对照组的家兔, 经耳缘静脉注射 1 个 MLD 的 A 型产气荚膜梭菌天然毒素, 结果对照组家兔在攻毒后 5 d 内全部死亡, rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 免疫组家兔全部健活, 未见任何不良反应, 保护率达 100%。

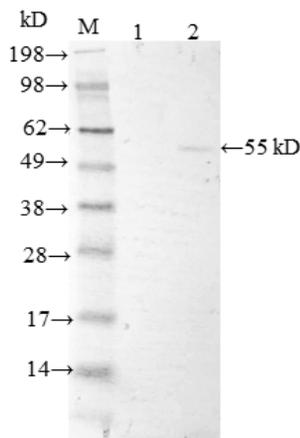
### 3 讨论

随着研究的深入, 与产气荚膜梭菌密切相关的主要致死性外毒素的结构和致病机理越来越清晰,



M: 蛋白 Marker; 1: 包涵体溶解离心后上清;  
 2: 上清同 Ni-IDA 孵育后流出液; 3-10: 50 mmol/L Imidazole 的洗脱液;  
 11-12: 100 mmol/L Imidazole 的洗脱液; 13: 300 mmol/L Imidazole 的洗脱液  
 M: protein Marker; 1: The supernatant of dissolved inclusion bodies;  
 2: The flow-through from Ni-IDA resin after incubated with supernatant;  
 3-10: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer  
 (contain 50 mmol/L Imidazole); 11-12: The elution from Ni-IDA resin  
 washed with elution buffer (contain 100 mmol/L Imidazole);  
 13: The elution from Ni-IDA resin washed with elution buffer  
 (contain 300 mmol/L Imidazole)

图 3 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 的纯化  
 Fig 3 Purification of CPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>



M: 蛋白 Marker; 1. pET 37 °C 4 h 诱导的细胞裂解物;  
 2: 纯化后的 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>

M: Protein Marker; 1: The cell lysates of pET induced with IPTG  
 for 4 h at 37 °C; 2: rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> after purification

图 4 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 与 A 型产气荚膜梭菌抗毒素血清的反应  
 Fig 4 Interaction of rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> with antitoxin serum  
 of *Clostridium perfringens* type A

致死性外毒素的部分无毒区域 (CPA、CPB 以及 CPI 的 C 末端) 或者无毒突变体 (ETX 和 θ 毒素 (PFO)<sup>[2]</sup>) 作为亚单位疫苗抗原已经被证实能够有效地中和相应的毒血症。作为 A 型产气荚膜梭菌

的主要致死性毒素, CPA 的减毒乃至无毒研究工作成为了众多研究者的方向。虽然对 CPA 发挥功能的关键氨基酸位点进行单点突变能够实现减毒的目的<sup>[16-18]</sup>, 但这些突变体的免疫原性还没有得到充分的研究。此外, 单个氨基酸突变的 CPA 在未来基因工程疫苗大规模生产中存在一定的生物安全隐患。对 CPA 的两个区域免疫保护性分析的结果表明, 单独的 CPA<sub>C</sub> 具有一定的免疫保护作用, 而单独的 CPA<sub>N</sub> 却无免疫保护作用。然而, 针对 CPA 第 193~198 位氨基酸的单抗已被证实具有良好的中和保护作用, 而该表位则处于 CPA<sub>N</sub> 内<sup>[15]</sup>。这可能由于单独的 CPA<sub>N</sub> 分子量过小, 用与 GST 融合蛋白免疫动物, 实际的抗原量不足。为此, 试验将 CPA<sub>C</sub> 和线性表位 NE 分别进行 3 次重复后串联进行融合表达, 不仅增加了有效抗原量, 也增加抗原蛋白整体的分子量, 更有利于增强抗原蛋白的抗原性。

对非可溶形式表达的重组蛋白进行纯化和复性后获得 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub>, 进一步的研究发现, rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 具有较好的免疫原性。在实际生产中, 以包涵体形式表达的重组蛋白在纯化中可显著降低产物中内毒素的含量, 这是 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 作为制备疫苗用抗原的优势之一。然而, 在前期的研究中我们发现可溶性表达的重组 ETX 免疫原性明显高于非可溶性表达的重组蛋白。为此, 如何提高 rCPA<sub>C3</sub>N<sub>E3</sub> 的可溶性表达量并验证其免疫原性, 将是后续研究的重要方向。

参考文献:

[1] Van I F, De B J, Pasmans F, et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health [J]. Avian Pathology, 2004, 33(6):537-549.  
 [2] 杜吉革, 张秀坤, 朱真, 等. 重组产气荚膜梭菌 ε 毒素三点突变体的融合表达及其免疫活性分析 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(7):28-34.  
 Du J G, Zhang X K, Zhu Z, et al. Expression and immunocompetence of *Clostridium perfringens* ε toxin derivative with three mutations [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(7):28-34.  
 [3] Revittmills S A, Rood J I, Adams V. *Clostridium perfringens*

- extracellular toxins and enzymes: 20 and counting [J]. *Microbiology Australia*, 2015, 36(3):114-117.
- [4] 郑晓丽, 窦贤明, 胡道俊, 等. 产气荚膜梭菌对养牛业的危害及其防制[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8):211-214.
- Zheng X L, Dou X M, Hu D G, *et al.* The threat, prevention and control of *Clostridium perfringens* in cattle industry [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 37(8):211-214.
- [5] Lebrun M, Mainil J G, Linden A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis [J]. *Vet Rec*, 2010, 167(1):13-22.
- [6] Canard B, Cole S. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6676-6680.
- [7] Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action [J]. *J Biochem*, 2004, 136: 569-574.
- [8] Oda M, Terao Y, Sakurai J, *et al.* Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. *Toxins*, 2015, 7: 5268-5275.
- [9] Goossens E, Verherstraeten S, Valgaeren B R, *et al.* The C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis [J]. *Vet Res*, 2016, 47(1):52-61.
- [10] Byrne M P, Smith L A. Development of vaccines for prevention of botulism [J]. *Biochimie*, 2000, 82: 955-966.
- [11] Kulkarni R R, Parreira V R, Sharif S, *et al.* Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* alpha - induced necrotic enteritis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14:1070-1077.
- [12] Nagahama M, Oda M, Kobayashi K, *et al.* A recombinant carboxy-terminal domain of alpha-toxin protects mice against *Clostridium perfringens* [J]. *Microbiol Immunol*, 2013, 57: 340-345.
- [13] Bennett A M, Lescott T, Phillpotts R J, *et al.* Recombinant vaccinia viruses protect against *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. *Viral Immunol*, 1999, 12(2):97-105.
- [14] Hoang T H, Hong H A, Clark G C, *et al.* Recombinant *Bacillus subtilis* expressing the *Clostridium perfringens* alpha toxoid is a candidate orally delivered vaccine against necrotic enteritis [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(11):5257-5265.
- [15] Logan A J, Williamson E D, Titball R W, *et al.* Epitope mapping of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*[J]. *Infect Immun*, 1991, 59: 4338-4342.
- [16] Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, *et al.* Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 1179-1185.
- [17] Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, *et al.* Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities [J]. *Infect Immun*, 1997, 65:3489-3492.
- [18] Guillouard I, Garnier T, Cole S T. Use of site-directed mutagenesis to probe structure-function relationships of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64: 2440-2444.

(编辑:李文平)