

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.04

腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达及其免疫效力评价

彭国瑞, 彭小兵*, 李旭妮, 董令赢, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-09-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0026-07 [中图分类号] S852.44

[摘要] 为获得腐败梭菌 α 毒素和 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达产物, 并鉴定其致死活性和反应原性, 评价其免疫保护效力, 利用 PCR 扩增腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素基因 Gcsa 和 Gcpe 并克隆至 pETDuet-1 质粒, 转化 *E.coli* BL21(DE3), 自诱导培养基诱导这 2 段基因共表达; 用 SDS-PAGE 和 Western-blot 以及小鼠毒性试验、抗毒素血清中和试验对表达产物进行鉴定; 将诱导后的大肠杆菌灭活, 制成铝佐剂疫苗 1 mL/只皮下注射免疫家兔 2 次, 测定免疫血清中和抗体效价, 用 1 MLD 的腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素分别攻击。结果显示, 所构建的 *E.coli* BL21(pETDuet-Gcsa-Gcpe) 可以同时表达 Gcsa 和 Gcpe, 表达产物能够与腐败梭菌和 D 型产气荚膜抗毒素血清反应; 且具有小鼠致死毒性, 只有用 2 种抗毒素一同作用, 才能将其毒性中和; 制成灭活疫苗免疫家兔, 免疫血清对腐败梭菌毒素的中和抗体效价为 2 MLD/0.1 mL, 对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和抗体效价 ≥ 50 MLD/0.1 mL; 用 2 种毒素攻击, 免疫组家兔全部保护, 对照组全部死亡, 达到《中华人民共和国兽药典》(2015 版) 效力检验标准。结果表明, 所构建的表达载体可以实现 α 毒素和 ϵ 毒素的活性共表达, 本研究为腐败梭菌和产气荚膜梭菌的多联基因工程灭活疫苗的研究提供了实验基础。

[关键词] 腐败梭菌; 产气荚膜梭菌; α 毒素; ϵ 毒素; 共表达; 免疫; 疫苗

Evaluation Immune Efficacy of Co-expression of *Clostridium septium* α -toxin and *Clostridium perfringens* ϵ -toxin

PENG Guo-rui, PENG Xiao-bing*, LI Xu-ni, DONG Ling-ying, JIANG Yu-wen*

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

Corresponding author: PENG Xiao-Bing, E-mail: pengxiaobing@ivdc.org.cn; JIANG Yu-Wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

基金项目: 国家重点研发计划“牛羊重要细菌病新型疫苗及其工艺研究(2017YFD0500905)”

作者简介: 彭国瑞, 助理研究员, 从事兽用生物制品检验。

通讯作者: 彭小兵, E-mail: pengxiaobing@ivdc.org.cn; 蒋玉文, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

with monoclonal antibodies against the nucleocapsid protein of PRRSV[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2009, 16(12): 1822-1828.

[14] Dea S, Gagnon C, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European

isolates [J]. Archives of Virology, 2000, 145(4): 659-688.

[15] Dong X, Tang B, Li J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (Glycine max) seed ferritin complex in *Escherichia coli* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(2): 299-307.

(编辑:李文平)

Abstract: In order to prepare co-expression of *Clostridium septium* α -toxin and *Clostridium perfringens* (D) ε -toxin, identify its toxicity and reactionogenicity, and evaluate its immune efficacy, in this study, Gcsa encoding *Clostridium septium* α -toxin and Gepe encoding *Clostridium perfringens* ε -toxin were amplified and cloned into the co-expression plasmid vector pETDuet-1 respectively, and transformed into *E.coli* BL21 (DE3). Gcsa and Gepe were induced and co-expressed in medium for auto-induction, and the co-expression was identified with SDS-PAGE and Western-blot, toxicity and neutralization test. Besides, the co-expression was inactivated and prepared into vaccine. Rabbits were immunized with 1 mL of the vaccine twice. And the immunological effect was evaluated by 1 MLD *C.septium* or *C.perfringens* (D) toxin challenge and serum neutralization tests. The results showed that *E.coli* BL21 (pETDuet-Gcsa-Gepe) was constructed and used to co-expressed Gcsa and Gepe successfully. And the co-expression was toxicant for mouse and could react with *C.septium* and *C.perfringens* (D) anti-toxoid sera peculiarly. Furthermore, only the two kinds of anti-toxin sera together could neutralize its toxicity. In addition, the co-expression vaccine generated 2 MLD and ≥ 50 MLD of neutralizing antibodies against respective toxin after the rabbits were immunized twice. And the rabbits were completely protected from the two kinds of toxin challenge, which reached to the principle of Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015). The results suggested that *C.septium* α -toxin and *C.perfringens* ε -toxin can co-express in *E.coli*, and the co-expression may be developed into a bivalent vaccine candidate.

Key words: *Clostridium septicum*; *Clostridium perfringens*; α -toxin; ε -toxin; co-expression; immune; vaccine

腐败梭菌 (*Clostridium septium*) 可引起人和多种动物的恶性水肿、肌肉坏死、气性坏疽和坏死性肠炎以及羊快疫等疾病,该菌可分泌 α 、 β 、 γ 和 δ 等多种外毒素,其中 α 毒素是主要的致病性毒力因子和免疫保护性抗原^[1-3]。产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 也是一种重要的人畜共患病源菌^[4],根据产生外毒素 α 、 β 、 ε 、 ι 种类的不同分为 A、B、C、D、E 5 个型,其中 D 型常引起新生羔羊痢疾和山羊、牛等家畜的肠毒血症,致死性强, ε 毒素是该型主要致死性毒力因子和保护性抗原^[5-6]。由这两种病原菌引发的疾病往往发病急,病程短,来不及治疗动物即发生死亡,故免疫接种是预防这两种病最为有效的途径之一。目前,国内用于预防羊快疫和肠毒血症的疫苗有羊梭菌病多联干粉灭活疫苗、羊快疫、猝狙、肠毒血症三联灭活疫苗和羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗,近年来随着养羊业的快速发展,该类疫苗的需求逐年增加,但疫苗的检验合格率和实际免疫效果却并不十分理想^[7]。诸多研究表明,通过基因工程大肠杆菌制备的有毒性或是无毒性的重组 α 毒素^[8-9] 和 ε

毒素^[10-12]均具有很好的免疫原性。本实验构建了可以共表达腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ε 毒素的双基因表达载体,探究了共表达产物的反应原性、毒性和相互作用等生物学特性,并将其制成基因工程灭活疫苗,评价了该疫苗的免疫效力,为羊快疫和肠毒血症基因工程多联疫苗的研制提供了试验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 腐败梭菌 C55-1 株、D 型产气荚膜梭菌 C60-3 株、腐败梭菌毒素和 D 型产气荚膜梭菌毒素及其抗毒素羊血清均由中国兽医药品监察所保存,自诱导培养基由中国兽医药品监察所配制。pETDuet-1 购自 EMD Biosciences, Inc; *E. coli* BL21 (DE3) 购自北京康为世纪生物有限公司。HRP 标记兔抗羊 IgG 购自 Sigma 公司,酶标二抗显色试剂盒购自 Vector 公司。PCR mix 购自艾德莱生物公司、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*EcoR* V、*Xho* I 和 DNA 分子量标准等购自宝生生物(大连)公司,T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。LB 肉汤、TG 培养基、TSB 培养基等由北京中海生物科技有限公司提供,氢氧

化铝胶佐剂由中牧实业有限公司兰州生物药厂提供,其他试剂均为国产或进口分析纯或试剂纯。体重16~18 g ICR 小鼠购自北京维通利华实验动物公司,1.5~2.0 kg 家兔购自北京隆安实验动物中心。

1.2 共表达载体的构建

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 腐败梭菌 α 毒素和产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的基因序列设计 2 对引物(表 1),由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。

表 1 扩增 α 毒素和 ϵ 毒素引物

Tab 1 Primers amplifying <i>C.septium</i> α -toxin and <i>C.perfringens</i> ϵ -toxin genes					
基因名 Gene Name	GenBank 登录号 NO.	大小/bp Molecular weight	引物名 Primer Name	引物序列(5'→3') Sequence	酶切位点 Restriction site
Gcsa (<i>C.septium</i> α -toxin gene)	AY829447	1327	Fcsa	5'-CGGAATTCGATGTCAAAAAATCTTTTGCT-3'	EcoR I
			Rcsa	5'-GCCGTCGACTTAATTAATATCAATTTTTTAT-3'	Sal I
Gcpe (<i>C.perfringens</i> ϵ -toxin gene)	M80837	888	Fcpe	5'-CGGATATCGAAGGAAATATCTAATACAGTA-3'	EcoR V
			Rcpe	5'-GCCTCGAGTTCTAATAATAATCTTATTTT-3'	Xho I

1.2.2 PCR 扩增 反应体系(25 μ L):10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTP 2 μ L,上下游引物(20 pmol/ μ L)各 0.5 μ L,模板 1 μ L,5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,ddH₂O 18 μ L。分别以腐败梭菌 C55-1 株和 D 型产气荚膜梭菌 C60-3 株基因组为模板 PCR 扩增。Gcsa 反应条件:94 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Gcpe 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 pETDuet-Gcsa-Gcpe 的构建 EcoRI、SalI 双酶切 Gcsa PCR 产物和 pETDuet-1 质粒,胶回收后,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化感受态 *E.coli* BL21(DE3),涂布 Amp+LB 平板,挑取单菌落,PCR 和双酶切鉴定。EcoRV、Xho I 双酶切经鉴定阳性的重组质粒 pETDuet-Gcsa 和 Gcpe PCR 产物,胶回收后连接,转化感受态 *E.coli* BL21(DE3),涂布 Amp+LB 平板,挑取单菌落,进行 PCR 和双酶切鉴定,同时送上海生工生物公司测序。

1.3 自诱导共表达及产物的鉴定

1.3.1 SDS-PAGE 分析 鉴定合格的 *E.coli* BL21(pETDuet-Gcsa-Gcpe)接种 Amp+自诱导培养基,28 $^{\circ}$ C 220 r/min 震荡诱导表达 24 h 收获,SDS-PAGE 电泳和灰度扫描分析表达量。

1.3.2 Western-blot 鉴定 以腐败梭菌抗毒素和产气荚膜梭菌抗毒素血清分别作为一抗,HRP 标记兔

抗羊 IgG 作为二抗进行 Western-blot 检测。

1.3.3 毒性和毒性中和试验 自诱导收获的 *E.coli* BL21(pETDuet-Gcsa-Gcpe)菌液经超声波裂解,0.2 mL/只腹腔注射小鼠 5 只,鉴定表达产物的毒性。将腐败梭菌抗毒素血清和 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清分别与裂解菌液 1:1(V/V)混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min,0.4 mL/只腹腔注射小鼠各 5 只;将两种抗毒素一同与裂解菌液 1:1:1 混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min,0.6 mL/只腹腔注射小鼠 5 只,进行毒性中和试验。同时设 *E.coli* BL21(DE3)裂解菌液、2 种抗毒素血清和自诱导培养基对照,观察 7 d。

1.4 共表达产物的免疫效力评价

1.4.1 灭活疫苗的制备 自诱导收获的 *E.coli* BL21(pETDuet-Gcsa-Gcpe)菌液,加 0.4%甲醛溶液,密封,37 $^{\circ}$ C 灭活 3 d,每天轻摇 4~5 次。灭活完全后加 20%灭菌氢氧化铝胶混匀,作为灭活菌苗备用。

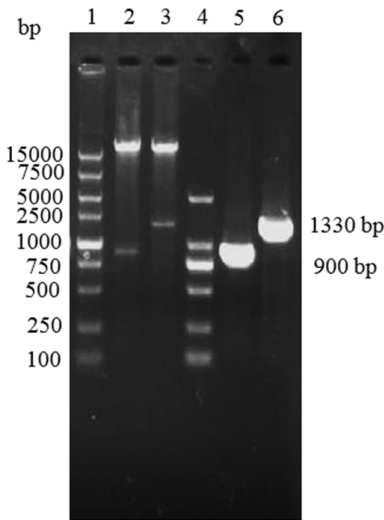
1.4.2 无菌检验与安全检验 疫苗按照《中国兽药典》2015 版三部规定的方法进行无菌检验^[13]。家兔 4 只各皮下注射疫苗 5.0 mL,观察 10 d,进行安全检验。

1.4.3 免疫效力评价 疫苗 1.0 mL/只颈背部皮下注射免疫家兔 10 只,对照组 10 只注射 20%铝胶 PBS,21 d 后以同样的方法进行二免。按照《中国兽药典》相关疫苗规定的方法,测定免疫血清中和效价并用毒素攻击,分别采集一免 21 d 后和二免

14 d 后血清,将同组同次采集的血清等量混合制成混合血清,与经适当稀释的腐败梭菌和产气荚膜梭菌毒素分别 1 : 2 混合,37 ℃ 孵育 40 min,0.3 mL/只尾静脉注射小鼠各 2 只,观察 3 d,直到血清刚好能中和毒素。二免 14 d 后取免疫组家兔 5 只和对照组 5 只耳缘静脉注射 1 MLD 腐败梭菌毒素,另取免疫组 5 只和对照组 5 只注射 1 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素,观察 7 d。

2 结 果

2.1 共表达载体的鉴定 提取待鉴定菌落的质粒经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切,用引物 *Fcsa* 和 *Rcsa* PCR 鉴定,见大小约 1330 bp 的片段与 *Gcsa* 预期大小接近;用 *EcoR* V、*Xho* I 双酶切,引物 *Fcpe* 和 *Rcpe* PCR 鉴定,见大小约 900 bp 片段与 *Gcpe* 预期大小接近(图 1);测序结果显示,*Gcsa* 和 *Gcpe* 序列和阅读框正确。以上结果表明,共表达载体 pETDuet-*Gcsa-Gcpe* 构建成功。

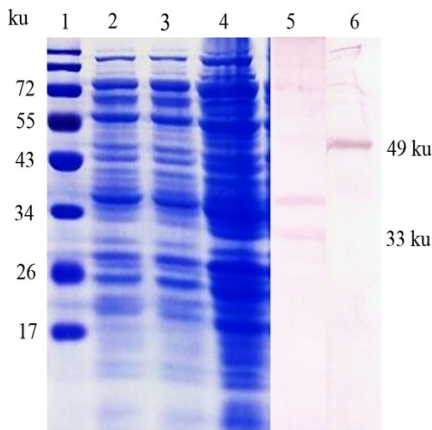


1:DL15000 DNA 相对分子质量标准;2:*EcoR* I、*Sal* I 双酶切 pETDuet-*Gcsa-Gcpe*;3:*EcoR* V、*Xho* I 双酶切 pETDuet-*Gcsa-Gcpe*;
4:DL5000 DNA 相对分子质量标准;5:PCR 鉴定 *Gcsa*;6:PCR 鉴定 *Gcpe*
1: DL15000 DNA marker; 2: pETDuet-*Gcsa-Gcpe* digested with *EcoR* I and *Sal* I; 3: pETDuet-*Gcsa-Gcpe* digested with *EcoR* V and *Xho* I; 4: DL5000 DNA marker; 5: PCR product of *Gcsa* from pETDuet-*Gcsa-Gcpe*; 6: PCR product of *Gcpe* from pETDuet-*Gcsa-Gcpe*

图 1 共表达载体的鉴定

Fig 1 Identification of the co-expression vector

2.2 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定 自诱导 *E.coli* BL21(pETDuet-*Gcsa-Gcpe*) 表达产物经 SDS-PAGE 分析,以腐败梭菌抗毒素血清和 D 型产气荚膜梭菌抗毒素血清分别为一抗 Western-blot 检测。结果显示,在约 49 ku 处见特异条带能够与腐败梭菌抗毒素血清反应条带,表达量为 0.28 mg/mL,在约 33 ku 处见可与产气荚膜梭菌抗毒素血清反应的条带,表达量为 0.39 mg/mL(图 2)。结果表明,*Gcsa*和 *Gcpe* 实现了共表达,且均具有反应原性。



1:蛋白质 Maker;2:*E.coli* BL21(DE3);
3:*E.coli* BL21(pETDuet-*Gcsa-Gcpe*) 诱导前;
4:*E.coli* BL21(pETDuet-*Gcsa-Gcpe*) 诱导后;
5:产气荚膜梭菌抗毒素血清作为一抗 Western-blot;
6:腐败梭菌抗毒素血清作为一抗 Western-blot
1: Protein Marker ; 2: *E.coli* BL21(DE3);
3: *E.coli* BL21(pETDuet-*Gcsa-Gcpe*) before induction;
4: *E.coli* BL21(pETDuet-*Gcsa-Gcpe*) after induction;
5: Reaction of co-expression with *C.perfringens* anti-toxoid sera in Western-blot; 6: Reaction of co-expression with *C.septium* anti-toxoid sera in Western-blot

图 2 共表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定

Fig 2 Identification of the co-expression by SDS-PAGE and Western blot

2.3 毒性和毒性中和试验 小鼠注射了没有中和和用单一抗毒素血清中和的裂解菌液后,在观察期内全部死亡;注射了用 2 种抗毒素中和的菌液以及 *E.coli* BL21 (DE3) 菌液、抗毒素血清和自诱导培养基小鼠,均存活(表 2)。结果表明,共表达产物同时具有 2 种毒素的毒性,进一步证实 *Gcsa* 和 *Gcpe* 获得了共表达。

2.4 疫苗的无菌检验和安全检验 疫苗接种培养结果表明,所制备的疫苗无菌检验和安全检验合格,可以用于免疫效力评价。

基均无菌生长,接种家兔后在观察期内全部健活。

表 2 共表达产物的的毒性及其中和试验

Tab 2 Result of toxicity and neutralization test of co-expression								
样品	<i>E. coli</i> BL21 (pETDuet - Gcsa-Gcpe) 共表达产物	腐败梭菌抗 毒素中和共 表达产物	D 型产气荚 膜梭菌抗毒 素中和共表 达产物	2 种抗毒素 中和共表达 产物	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	腐败梭菌抗 毒素	D 型产气荚 膜梭菌抗毒 素	培养基
小鼠死亡情况 Mouse death rate	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

2.5 免疫效力评价 疫苗免疫家兔,一免血清对腐败梭菌毒素的中和效价为 1 MLD/0.1 mL,对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价为 5 MLD/0.1 mL;二免血清对腐败梭菌毒素的中和效价为 2 MLD/0.1 mL,对 D 型产气荚膜梭菌毒素的中和效价 ≥ 50 MLD/0.1 mL。二免后用 1 MLD 腐败梭菌毒素

和 D 型产气荚膜梭菌毒素分别攻击,观察期内免疫组均 100%保护,对照组均全部死亡(表 3)。结果表明,Gcsa 和 Gcpe 的共表达产物具有免疫原性,其灭活菌苗免疫家兔可以同时抵抗腐败梭菌和 D 型产气荚膜梭菌毒素攻击。

表 3 免疫血清中和试验和攻毒保护试验结果

Tab 3 Results of immune serum neutralization and immune protection tests				
组别	毒素	血清中和效价/(MLD/0.1 mL)		保护率
		一免	二免	
免疫组 Immune group	腐败梭菌毒素 <i>C.septium</i> toxin	1	2	5/5
	D 型产气荚膜梭菌毒素 <i>C.perfringens</i> (D) toxin	5	≥50	5/5
对照组 Control group	腐败梭菌毒素 <i>C.septium</i> toxin	0	0	0/5
	D 型产气荚膜梭菌毒素 <i>C.perfringens</i> (D) toxin	0	0	0/5

3 分析与讨论

许多研究将共表达方法应用于目的蛋白与分子伴侣一同表达,其目的或是为了改变蛋白的表达形式,或是为了提高表达量,亦或是为了优化蛋白质空间构象和增强生物活性等。Zhang Y^[14]等用共表达载体 pETDuet-1 将霍乱毒素 B 亚单位 CTB 与分子伴侣 SKP 一同表达,提高了 CTB 的可溶性表达比例和生物活性;Liu XL^[15]等将影响莽草酸代谢通路的多种蛋白酶进行不同形式的组合共表达,比

较了不同蛋白酶的不同组合以及顺序的差异对莽草酸产量的影响;Lu XY^[16]等尝试了多种分子伴侣以不同方式组合共表达用于提高 1,2,4 丁三醇的产量。共表达方法在新型疫苗的应用研究方面,Yu YZ^[17]等将破伤风毒素受体蛋白(THc)与硫氧还原(Trx)共表达,优化了蛋白构想,提高了 THc 的免疫原性。另外,也有将抗原基因与免疫刺激因子共表达增强了免疫效果^[18]。

很多梭菌外毒素是主要的致病性毒力因子和

免疫保护性抗原,研究表明,通过基因工程大肠杆菌可以获得具有免疫活性的重组外毒素。而将共表达方法应用于羊梭菌多联新型候选疫苗的研制,可以实现多种抗原同步生产。韩广伟^[18]等共表达了同一种梭菌 D 型产气荚膜梭菌 α 毒素和 ϵ 毒素两种外毒素,纯化后免疫小鼠,证实二者能同时发挥很好的免疫原性。本实验获得了 2 种梭菌,分别是腐败梭菌 α 毒素和 D 型产气荚膜梭菌 ϵ 毒素的共表达,两者同时保持其各自的生物活性,表达产物的免疫原性良好,一次免疫血清中和效价即可以达到《中国兽药典》效力检验标准。在疫苗制备工艺方面,将含有重组抗原的工程菌菌液用甲醛灭活制成灭活疫苗,一方面甲醛在对工程菌灭活的同时,对毒素做了脱毒处理,保证了疫苗的安全;另一方面重组大肠杆菌本身在疫苗免疫过程中发挥了佐剂的作用,克服亚单位疫苗蛋白质分子量小免疫刺激弱的不足^[19];同时简化了疫苗制备的工艺,省去了细菌裂解、蛋白质纯化和包涵体复性等工序。此外,采用含乳糖的自诱导培养基诱导基因表达,代替了有毒性的 IPTG,提高了疫苗的安全性。综上,本试验为梭菌病基因工程多价和多联疫苗的开发提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Kennedy C L, Lyras D, Corder L M, *et al.* Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for *Clostridium septicum*-mediated myonecrosis [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(3): 943-951.
- [2] Kirchner S, Metzner K, Dorner M B, *et al.* Necrotizing endometritis and isolation of an alpha-toxin producing strain of *Clostridium septicum* in a wild sooty mangabey from Côte d'Ivoire [J]. *Journal of Medical Primatology*, 2013, 26: 12047.
- [3] 彭国瑞,蒋玉文,彭小兵,等. 腐败梭菌 α 毒素的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 53-56.
Peng G R, Jiang Y W, Peng X B, *et al.* Research Progress of *Clostridium septicum* Alpha-toxin [J]. *Chinese journal of Veterinary Drug*, 2013, 47(10): 53-56.
- [4] 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.
- [5] Filho E J, Carvalho A U, Assis R A, *et al.* Clinicopathological features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle [J]. *Veterinary Pathology*, 2009, 46(6): 1213-1220.
- [6] Popoff M R. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin [J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(23): 4602-4615.
- [7] 彭小兵,李旭妮,蒋玉文,等. 腐败梭菌类毒素抗原含量与免疫效果之间的关系研究 [J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(4): 6-12.
Peng X B, Li X N, Jiang Y W, *et al.* Study on relationship between antigenic amount of *Clostridium Septicum* toxoid and its immune effect [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*. 2016, 52(04): 6-12.
- [8] 彭国瑞,彭小兵,李旭妮,等. 截短腐败梭菌 α 毒素的表达及其免疫原性评价 [J]. 中国兽医科, 2019, 49(02): 220-225.
Peng G R, Peng X B, Li X N, *et al.* Expression and immunogenicity evaluation of two truncated alpha toxins of *Clostridium septicum* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(02): 220-225.
- [9] Lancot C A, Foster L K, Kromm M M, *et al.* A noncytolytic α toxin recombinant protein protects turkeys against *Clostridium septicum* challenge [J]. *Avian Diseases*, 2014, 58(4): 566-571.
- [10] 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* epsilon toxin derivative with three mutations [J]. *Chinese journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(7): 28-34.
- [11] Alimolaei M, Golchin M, Daneshvar H. Oral immunization of mice against *Clostridium perfringens*, epsilon toxin with a *Lactobacillus casei*, vector vaccine expressing epsilon toxoid [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 40: 282-287.
- [12] Dorca-arévalo J, Pauillac S, Dlaz-hidalgo L, *et al.* Correlation between *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* lethal activity in mice of epsilon toxin mutants from *Clostridium perfringens* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102417.
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 45-46.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China volume III 2015 edition* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2016: 45-46.
- [14] Zhang Y, Qiao X, Yu X, *et al.* Enhanced soluble production of

cholera toxin B subunit in *Escherichia coli* by co-expression of SKP chaperones [J]. Protein Expression and Purification, 2017, 138: 1-6.

[15] Liu X L, Lin J, Hu H F, *et al.* Enhanced production of shikimic acid using a multi-gene co-expression system in *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016,14(4) :286-293.

[16] Lu X Y, He S Y, Zong H, *et al.* Improved 1, 2, 4-butanetriol production from an engineered *Escherichia coli* by co-expression of different chaperone proteins [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(9) :149.

[17] Yu Y Z, Gong Z W, Ma Y, *et al.* Co-expression of tetanus toxin fragment C in *Escherichia coli* with thioredoxin and its evaluation as an effective subunit vaccine candidate [J]. Vaccine, 2011, 29 (35) :5978-85.

[18] 韩广伟,李兆才,宫晓炜,等. 产气荚膜梭菌 α 毒素和 ϵ 毒素的共表达及其免疫原性的研究[J]. 中国兽医科学, 2014, 44 (6) : 630-635.

Han G W, Li Z C, Gong X W, *et al.* Co-expression of *Clostridium perfringens* α -toxin and ϵ -toxin and study on its immunogenicity [J]. Chinese Veterinary Science, 2014, 44 (6) : 630-635.

[19] Ferreira M R, Moreira G M, Cunha C E, *et al.* Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines [J]. Toxins, 2016, 8(11) . pii: E340.

(编 辑:侯向辉)