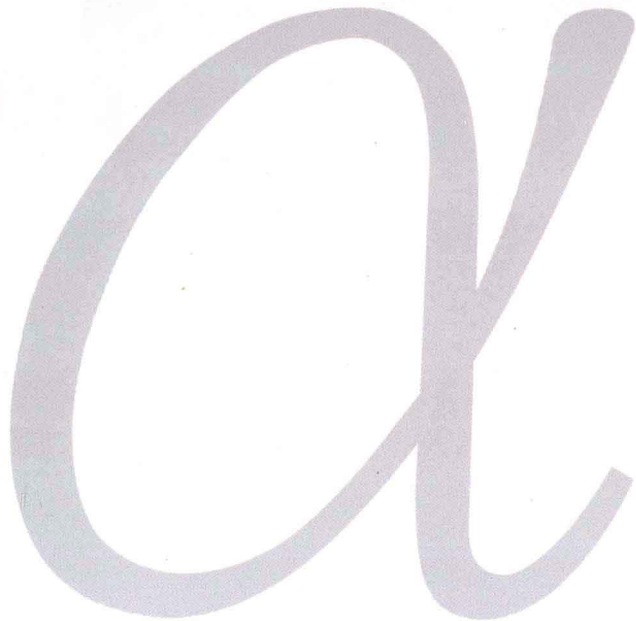


刘松梅◆著



抗魏氏梭菌病 转基因植物研究



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

刘松梅◆著

抗魏氏梭菌病 转基因植物研究



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

抗魏氏梭菌病转基因植物研究 / 刘松梅著. -- 哈尔滨 : 黑龙江大学出版社, 2012. 8

ISBN 978 - 7 - 81129 - 519 - 1

I. ①抗… II. ①刘… III. ①产气荚膜杆菌 - 抗菌素 - 应用 - 转基因植物 - 研究 IV. ①Q789

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 176522 号

抗魏氏梭菌病转基因植物研究

KANG WEISHI SUOJUN BING ZHUANJIYIN ZHIWU YANJIU

刘松梅 著

责任编辑 安宏涛 林召霞

出版发行 黑龙江大学出版社

地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号

印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司

开 本 880 × 1230 1/32

印 张 5.25

字 数 110 千

版 次 2012 年 8 月第 1 版

印 次 2012 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 519 - 1

定 价 16.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

序

刘松梅博士的《抗魏氏梭菌病转基因植物研究》即将出版,这本书是她在东北农业大学预防兽医学专业博士论文基础上修订完成的,她委托我为此书作序。促我动笔写下此序的原因之一是作为博士生导师的我对此书的研究始末了如指掌,另外,毕业答辩委员会的诸位先生对其学术研究价值予以的好评也给我留下了深刻的印象。希望此序能使大家对本研究成果的价值和意义有更加深入的了解。

《抗魏氏梭菌病转基因植物研究》的作者刘松梅博士是黑龙江大学生命科学学院的教师,主讲生物化学、生物化学实验和基因工程制药课程,主要从事生物化学和分子生物学方面的研究,硕士毕业于哈尔滨师范大学植物学专业,2009年考上了东北农业大学预防兽医学专业博士研究生。作为学业导师,我根据她的研究特长和科研经历为她制定了抗魏氏梭菌病转基因植物方面的研究课题。

魏氏梭菌是引起魏氏梭菌病的元凶,条件适宜时魏氏梭菌会在肠道内大量繁殖,产生毒素,毒素经消化道吸收,引起动物出现肠毒血症、坏死性肠炎,人类食物中毒等,给畜牧业和人类造成了极大危害。魏氏梭菌的外毒素是魏氏梭菌致病的毒力因子, α 毒素是最重要的毒力因子,能使细胞膜破裂,具

有溶血性、细胞毒性、致死性和皮肤坏死性等特性。目前国内关于魏氏梭菌在动物、微生物层面的研究成果颇丰,但在 α 毒素转基因植物方面的研究较少。

利用转基因植物制备疫苗的技术难题是如何使重组抗原在植物中高效表达。多数转基因植物疫苗的有效成分含量都较低,口服这种疫苗不但不会诱发机体产生免疫保护性反应,相反还会引起免疫耐受。针对魏氏梭菌病的发病动物多为草食动物的特点,刘松梅博士选择了在畜牧业中占有重要地位、素有“牧草之王”美誉的,被认为是“最有可能生产重组蛋白质的植物体系”的苜蓿作为表达载体,她根据植物密码子使用的偏爱性设计引物,添加了连接肽和内质网滞留信号肽序列,优化了启动子和筛选标记,添加了强有力的黏膜性佐剂 *LT-B* 基因,提高了免疫反应,并大大提高了重组抗原 α 毒素的表达效果。

目前,转基因植物疫苗的加工方式主要利用植物生产大量的蛋白质抗原,经分离、提纯,再制成疫苗,然而经过剧烈的加工处理后,作为口服疫苗中的抗原蛋白往往会变性失活。刘松梅博士在研究时不采用任何提纯手段,只对苜蓿作了简单处理,就将转基因苜蓿像普通苜蓿一样饲喂家兔,或用普通果蔬榨汁机和一块纱布制成苜蓿汁口服免疫小鼠,其给药方式非常简单、方便、经济、高效。同时,刘松梅博士还利用苜蓿无性繁殖的特点,来获得大量安全无毒、高效表达的转基因植物口服疫苗。

刘松梅博士利用其转基因苜蓿表达的重组蛋白口服免疫动物,使其产生了较高水平的抗体,在致病性魏氏梭菌攻毒和

血清抗体中和试验中,免疫动物均表现出了较好的免疫保护作用 and 防御能力,这说明刘松梅博士所构建的重组苜蓿表达系统具有较高的实用价值,为转基因植物口服疫苗的研究提供了理论依据,也为开发新型魏氏梭菌 α 毒素重组口服疫苗奠定了物质基础。

转基因植物研究是植物学、预防兽医学、分子生物学等多学科交叉形成的研究领域,我认为刘松梅博士多年积累的理论知识、研究手段、创新理念都是其进行转基因植物研究的基础,她在这条道路上所作的努力也是值得肯定的。因此,我向大家郑重推荐该著作,也希望刘松梅博士以此作为学术的新起点,继续深入探索转基因植物研究领域中存在的各类前沿性课题,拓展学术视野,努力提高自身的学术水平,在学术上不断进步。

李一经

2012 年 7 月于东北农业大学

目 录

1	绪 论	1
1.1	魏氏梭菌病原学及其毒素研究进展	3
1.2	苜蓿作为植物口服疫苗生物反应器的研究 进展	21
1.3	研究目的和意义	36
2	抗魏氏梭菌病转基因植物研究材料与方法	38
2.1	研究材料	38
2.2	试验方法	42
3	抗魏氏梭菌病转基因植物研究结果与分析	64
3.1	目的基因的 PCR 扩增	64
3.2	重组植物表达载体的鉴定	66
3.3	α 毒素基因转化苜蓿及其表达蛋白的鉴定	68
3.4	α 毒素转基因苜蓿遗传稳定性的研究	77
3.5	A 型魏氏梭菌致病性与形态变化规律	79
3.6	口服 α 毒素转基因苜蓿免疫学指标测定结果	82
3.7	A 型魏氏梭菌攻毒感染和血清抗体中和试验 结果	89

4	抗魏氏梭菌病转基因植物研究设计与讨论	94
4.1	提高转基因苜蓿有效表达外源蛋白的设计 思路	94
4.2	转基因苜蓿表达魏氏梭菌 α 毒素蛋白的 抗原性	107
4.3	表达魏氏梭菌 α 毒素转基因苜蓿的免疫效果 分析	109
4.4	不同免疫方式对口服免疫转基因苜蓿产生保护 效力的影响	112
4.5	LT-B 在转基因苜蓿口服疫苗中的佐剂作用 ...	115
4.6	魏氏梭菌形态变化与致病能力的关系	119
5	结 论	123
	附 录	126
	参考文献	135
	后 记	155

1 绪 论

魏氏梭菌(*Clostridium welchii*)是英国人 Welchii 和 Nutted 最早从人类尸体腐败、产气的血管中分离到的,因此以 Welchii 命名。魏氏梭菌是引起创伤性气性坏疽和人类食物中毒,以及动物坏死性肠炎、肠毒血症的主要病原菌之一(Hathaway C L, 1990),它广泛分布在土壤、水、饲料、圈舍和消化道中,是动物肠道正常菌群之一,也是引发魏氏梭菌病的元凶。其发病机理是在饲养环境和饲料突然改变等诱因下,肠道内魏氏梭菌大量繁殖,产生的毒素经消化道吸收,导致动物出现肠毒血症、坏死性肠炎,以及仔猪红痢、羔羊痢疾、兔出血性下痢、创伤性气性坏疽、动物猝死症等。

自 20 世纪 80 年代中期以来,全国有多个省市的兔、牛、羊、猪群中出现了一种发病呈急性经过、死亡快、死亡率高的顽症,根据其发病急、死亡快的特点,将其定名为“猝死症”。农业部在 20 世纪 90 年代中期曾组织科研人员在山东、四川、河南、吉林、湖北、宁夏等地进行调查,经过对病原分离鉴定,证明家畜“猝死症”与魏氏梭菌的感染有直接关系(李复中, 1998;李永明等,2000)。我国各地反刍动物坏死性肠炎或肠毒血症、羔羊痢疾和仔猪红痢的发病率呈上升趋势,给养殖业带

来了巨大的经济损失。

由魏氏梭菌感染引起的各种动物疾病具有发病急、死亡快、死亡率高的特点,目前尚无有效的药物治疗方法。免疫接种是预防该病的唯一途径,某些发达国家和地区通过类毒素疫苗免疫接种取得了满意效果,发展中国家也有应用类毒素疫苗来控制该病的。类毒素疫苗在控制该病的发生上起到了积极作用,但该疫苗必须经过非口服途径接种,才能诱导机体产生循环性抗体,其难以产生分泌型抗体,因此不能阻挡毒素通过黏膜进入机体。

魏氏梭菌对人类的危害亦较大,特别是第一次世界大战期间,受伤战士气性坏疽的发病率和死亡率都很高,气性坏疽以局部水肿、产气、肌肉坏死及全身中毒为特征,该菌引发的伤口感染夺去了 15 万军人的生命(柴同杰等,2001)。在我国四川省汶川大地震中,很多人也因为伤口感染魏氏梭菌,产生气性坏疽而不得不截肢。同时,魏氏梭菌还能引起人类食物中毒,在美国等西方国家,魏氏梭菌引起的食物中毒排在前几位。在我国该菌引起的食物中毒,仅次于沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,为此我国颁布了关于产气荚膜梭菌食品卫生微生物学检验的国家标准。

魏氏梭菌病的发病实质是毒素中毒,即由于肠道内该菌快速繁殖并产生大量毒素,经消化道吸收发生中毒性疾病。针对该病由肠道吸收毒素引发全身性中毒反应的特点,研制口服魏氏梭菌毒素,有效刺激肠道黏膜免疫系统,阻断病原因子入侵机体的第一步,进行科学预防免疫,对防治本病具有重要而深远的意义。

1.1 魏氏梭菌病原学及其毒素研究进展

1.1.1 魏氏梭菌的生物学特性

魏氏梭菌属于梭菌属 (*Clostridium*), 又名产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 或产气荚膜杆菌。在自然界分布极广, 可于污水、土壤、饲料、食物、粪便以及人畜肠道中见到。菌体呈两端钝圆的粗大杆菌, 单独或成双排列, 有时呈短链排列, 革兰氏阳性菌, 在陈旧培养物中易变成阴性, 无鞭毛, 不运动。在自然界中常以芽孢形式存在, 芽孢的抵抗力非常强, 10% 的甲醛在 10 min 之后才能将其杀死, 芽孢大, 呈卵圆形, 位于菌体中央或近端, 不大于菌体直径, 但有些菌株在一般培养条件下很难形成芽孢, 在人和动物活体组织内或在含血清的培养基上生长时可形成荚膜, 这是本菌区别于其他梭菌的特点之一。

魏氏梭菌为厌氧性细菌, 但与其他同属成员相比厌氧要求并不十分严格, 暴露于空气 60 min 仍能存活。其对营养要求亦不十分苛刻, 在普通培养基上即可生长, 普通琼脂平板培养 15 h 左右便可见到菌落, 其呈凸面状, 表面光滑且半透明, 正圆形。在营养成分不足或琼脂浓度较高的平板上, 经过传种的菌株, 可能形成带锯齿状边缘或放射状条纹的 R 型菌落, 若加葡萄糖或血液则生长得更好。在绵羊血葡萄糖琼脂平板上, 37 °C 厌氧培养 24 h 后就会形成纽扣状菌落, 有时会出现裂叶状边缘的粗糙菌落或丝状边缘的不规则扁平大菌落。在

血琼脂平板上多数菌株有双层溶血环,内环是由 θ 毒素引起的完全溶血,外环是由 α 毒素引起的不完全溶血,一些B型和C型菌株在绵羊血或牛血琼脂平板上可形成由 δ 毒素产生的较宽溶血环(王云峰等,1999;王娅,2007)。在乳糖、牛奶、卵黄琼脂平板上,菌落周围出现乳白色浑浊圈,若在培养基中加入 α 毒素的抗血清,则不出现浑浊,因为此反应能被抗毒素抑制。由于发酵乳糖菌落周围的培养基颜色发生变化(中性红指示剂呈粉红色)而不消化牛奶、不分解游离脂肪,菌落周围也不出现透明环及虹彩层。此现象是本菌的Nagler反应,前者是由细菌产生的卵磷脂酶(α 毒素)分解蛋黄中的卵磷脂所致,后者是由 α 毒素被抗毒素中和所致。

魏氏梭菌代谢非常活跃,可分解多种糖类,产酸产气。在厌氧肉肝汤中培养5~6 h即呈均匀浑浊状,且产生大量气体。在深层葡萄糖琼脂中培养时会产生大量气体,而使琼脂破碎。在庖肉培养基中培养数小时即可见到生长,呈均匀浑浊状,或出现黏稠沉淀物,产生大量气体,肉渣或肉块变得略带粉色,但不被消化。魏氏梭菌可发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖及蔗糖,不发酵甘露醇或水杨苷,产酸产气;液化明胶,产生硫化氢,不产生靛基质;可还原硝酸盐为亚硝酸盐;但也有例外,能将亚硫酸盐还原为硫化物,在含亚硫酸盐及铁盐的琼脂中形成黑色菌落。在牛奶培养基中,魏氏梭菌能分解乳糖产酸,使其中的酪蛋白凝固,同时产生大量气体(H_2 和 CO_2),把凝固的酪蛋白冲成蜂窝状,将液面封固的凡士林层向上推开,甚至冲走试管口的棉塞,气势凶猛,称“汹涌发酵”(stormy fermentation),这是本菌最突出的生化特性,也是主要鉴别的指标,但菌体不能

消化已凝固的蛋白质和血清。魏氏梭菌在含糖的厌氧肉肝汤培养基中,产酸后几周内即可死亡,而在无糖厌氧肉肝汤中能存活几个月,一般芽孢经 90 ℃ 30 min 或 100 ℃ 5 min 处理后便会死亡,而食物中毒型的芽孢要煮沸 1~3 h 后才会死亡。

魏氏梭菌生长适宜温度在 37~47 ℃,大多认为 43~47 ℃ 是最适宜本菌生长和繁殖的温度,在适宜的条件下其增代时间仅需 8 min,此外,可利用高温快速培养法对该菌进行选择分离,如在 45 ℃ 下,每培养 3~4 h 传种 1 次,即可较易获得纯培养物。

1.1.2 魏氏梭菌的毒力因子与相关疾病

魏氏梭菌属于腐生性厌氧梭状芽孢杆菌,致病条件与全国各地破伤风梭菌相似。魏氏梭菌既能产生强烈的外毒素,又含有多种侵袭性酶(如卵磷脂酶、纤维蛋白酶、透明质酸酶、胶原酶等),并具有荚膜,能形成强大的侵袭力,引起多种动物或人感染相关疾病。魏氏梭菌的外毒素毒性虽不如肉毒毒素及破伤风毒素强,但种类繁多,研究发现该菌至少可以产生 15 种以上的毒素($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta, \theta, \iota, \kappa, \lambda, \mu, \nu$ 等),均为蛋白质,相对分子质量在 40 000 以上,但致死性毒素只有 4 种,即 α, β, ϵ 和 ι (Billington S J et al, 1998; 高文伟等, 2006)。根据主要致死性毒素与其抗毒素中和试验的差别,可将魏氏梭菌分为 5 个血清型,即 A、B、C、D、E 等 5 个型(见表 1-1)。外毒素是魏氏梭菌的毒力因子,其中最重要、最根本的致病因子为 α 毒素 (Clostridium perfringens alpha-toxin, CPA),它是 A~E 各菌型所共有的致死性毒素, α 毒素属于强毒素,也是 A 型魏氏梭菌中

最主要的毒力因子,在魏氏梭菌的致病过程中起着至关重要的作用,有的菌株还可产生肠毒素、溶血素和血凝素等。

表 1-1 各型魏氏梭菌及其主要分泌毒素

菌型	外毒素类型			
	α	β	ϵ	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

注:“+”表示分泌毒素,“-”表示不分泌毒素

近来,国外对于魏氏梭菌的 4 个主要外毒素的组成、结构、作用机理、检测及分子遗传学等方面进行了较为深入的研究,并取得了很大进展(Fernandez - Miyakawa M E et al, 2007; Lebrun M et al, 2007)。国内对魏氏梭菌的研究大多集中在 α 和 β_1 这两种外毒素上,且主要着眼于这两种毒素基因的克隆与表达,未见深入研究其致病机理的报道; β_2 毒素是牛致死性肠炎、肠毒血症及其并发症的主要致病因子,国外对它已经进行了大量研究,而我国对 β_2 和 ϵ 毒素进行研究的报道极少;对 ι 毒素的研究几乎是一片空白,大大落后于国外的研究,这与魏氏梭菌对我国畜牧业产生的巨大危害是很不相称的(李云霄等, 2007)。

A 型魏氏梭菌可引起人气性坏疽和食物中毒,以及创伤性气性坏疽,是潜在的标准毒素战剂之一(Hatheway C L, 1990),具有制备生物武器的潜力。A 型魏氏梭菌对我国养殖业亦构成严

重威胁,每年各地仔猪红痢、反刍动物的坏死性肠炎或肠毒血症的发病率呈上升趋势,近年来各地关于“猝死综合征”(sudden death syndrome, SDS)的报道屡见不鲜,新近研究发现 A 型魏氏梭菌为家畜“猝死症”的主要致病菌。

β 毒素是 B 型和 C 型魏氏梭菌的主要毒力因子。B 型菌主要引起羔羊痢疾,还可引起犊牛、羔羊、绵羊和山羊的肠毒血症或坏死性肠炎;C 型菌主要是仔猪肠毒血症、绵羊猝狙(struck)的病原,可引起羔羊、犊牛、绵羊的肠毒血症和坏死性肠炎,其致病因子是菌体产生的 α 、 β 毒素;D 型菌可引起绵羊、山羊、羔羊、牛等的肠毒血症;E 型菌可致犊牛、羔羊肠毒血症,但很少发生;B 型和 D 型魏氏梭菌能产生 α 毒素,其产生的 ϵ 毒素也是引起动物病理变化和死亡的重要因素之一(王光华等,2009)。国外魏氏梭菌血清型在世界各地分布均不同,Hagan W A 等(1988)指出 A 型魏氏梭菌分布于世界各地,能在土壤中生长繁殖,也能在人和动物肠道中生存,该血清型主要是能引起人的伤口感染;B、C、D 和 E 型魏氏梭菌较常见于动物肠道,这些血清型不能在土壤中存活,它们能引起动物坏死性肠炎和肠原毒血症。欧美等国研究发现 C、D 型魏氏梭菌是引起感染的主要血清型(王海荣,2005)。Niilo L(1980)和 Uzal F A(1996)明确指出,D 型魏氏梭菌是牛、山羊、绵羊肠原毒血症的病原体,B、E 型魏氏梭菌偶尔出现,但我国报道的与国际上不一致,多为 A 型。

1964 年我国湖北畜牧特产研究所,首次从患红痢仔猪中分离出魏氏梭菌。20 世纪 80 年代末魏氏梭菌病仅在豫东地区零星发现,1994 年后在山东、宁夏、吉林、辽宁、新疆等地区暴发了大规模的魏氏梭菌病,并蔓延至全国(张红英,2004)。目前该病

已广泛分布于世界各地,呈全球流行态势,严重危害了各国畜禽业的发展,成为动物传染病学、兽医微生物学的研究热点。在经济动物死亡病例中,魏氏梭菌是致病率最高的病原菌,表现为肠管大面积出血,特别是空肠最明显,外表呈红褐色,切开后可见肠内有大量红棕色黏液,肠黏膜脱落,呈弥漫性出血,肠系膜呈树枝状出血;心脏质地变软,心耳有大量出血点;肺水肿,呈鲜红色;肾淤血,肿胀;肝脾胀大,出血,呈紫黑色;淋巴结肿大,呈大理石样。羊发病后表现为腹胀,呼吸急促,烦躁不安,口鼻流出大量泡沫样物质,全身颤抖,而后倒地,四肢乱划,狂叫不停,很快死亡。发病家畜多为猪、牛、羊和兔。除家畜以外,死亡还威胁着其他动物,其中 A 型菌株引起兔、狐狸、貉、水貂、犬等死亡的比例高达 85%,可见我国感染魏氏梭菌的动物以 A 型为主,少数为 B 型、C 型和 D 型。传统的观点认为,对牛致病的魏氏梭菌主要为 B 型和 D 型,但 2001 年 8~9 月,江苏某奶牛场奶牛陆续发生腹泻,怀疑是由魏氏梭菌所致,遂对它们进行了实验室诊断和药敏试验,结果表明所有分离株均为 A 型(张小荣,2003)。2005 年 8 月初喀什地区疏附县的 4 个乡镇陆续发生牛不明原因的急性死亡,共计发病牛 196 头,死亡 65 头,经细菌学检验并结合 API 鉴定系统,得知这些牛的死亡是由魏氏梭菌引起的,经毒素定型试验最终确定为 A 型魏氏梭菌,因而 A 型魏氏梭菌是导致奶牛发病的一个重要因素(施远翔等,2006)。

1.1.3 魏氏梭菌 α 毒素的研究进展

1.1.3.1 α 毒素的生物学特性和致病机理

α 毒素是魏氏梭菌分泌的外毒素,外毒素是某些致病菌在生长繁殖过程中产生并释放至体外的一种蛋白质。 α 毒素是一种 Zn^{2+} 依赖性多功能的金属酶,具有磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)和鞘磷脂酶(sphingomyelinase)活性,能同时水解卵磷脂(phosphatidylcholine)和鞘磷脂(sphingomyelin)而使细胞膜破裂。人和动物的细胞膜是磷脂和蛋白质的复合物,可被卵磷脂酶破坏, α 毒素依靠这两种酶活性,损伤多种细胞的细胞膜,水解膜磷脂(组成细胞膜的主要成分),从而破坏细胞膜结构的完整性,导致细胞裂解,因而 α 毒素具有溶血性、细胞毒性、致死性和皮肤坏死、血小板聚集和增加血管渗透性等多种毒性作用,能使肝脏和心脏功能受损,是一种既有酶活性又有毒素特性的细菌蛋白。

α 毒素的溶血活性具有冷热溶血效应(hot - coldhemolysis),即当温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, α 毒素与红细胞作用,红细胞不发生裂解,当温度降至 4 $^{\circ}\text{C}$ 时,红细胞发生裂解。 α 毒素对胰酶比较敏感,2.5%的胰酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下作用 1 h 便可使其完全失活。 α 毒素不耐热,当加热至 60 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 时,就会失去活性,但进一步加热到 100 $^{\circ}\text{C}$ 时,又可以恢复部分活性(Hale M L et al, 1999)。不同动物对 α 毒素的敏感性不同:人和鼠的红细胞膜容易被 α 毒素水解;兔和马的红细胞不能被 α 毒素水解;羊的红细胞和 α 毒素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下孵育后不水解,冷却到 4 $^{\circ}\text{C}$ 时被水解。 α