

气肿疽梭菌主要抗原及毒力因子的研究进展

张文璇¹ 曲庭伟¹ 方 程¹ 金 鑫^{1,2*} 严昌国³

1. 延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133000; 2. 东北寒区肉牛科技创新教育部工程研究中心/延边大学, 吉林延吉 133002; 3. 延边大学农学院动物科学系, 吉林延吉 133000

摘要 气肿疽梭菌是一种严格厌氧的有芽孢的杆菌, 可引起常见反刍家畜组织毒性缺氧, 严重可致死, 常为畜牧养殖业带来巨大的经济损失。气肿疽对反刍动物的影响存在已久, 但其确切发病机制和相关毒力因子的作用仍未能被完全解读。随着研究的深入, 已发现气肿疽梭菌的 4 种主要抗原和毒力因子在气肿疽发病过程中起着重要的作用。本文主要对气肿疽梭菌的 4 种主要抗原和毒力因子(细胞毒素 A、鞭毛蛋白、神经氨酸酶和透明质酸酶)的相关研究进行总结概述, 期望能为日后气肿疽检测方法和新型疫苗的研究提供参考。

关键词 气肿疽梭菌; 抗原; 毒力因子

气肿疽梭菌是属于细菌纲, 芽孢杆菌科, 梭菌属的一种专性厌氧菌^[1], 无荚膜, 有鞭毛, 在体内外均可形成芽孢, 且芽孢可长期在土壤中生存, 在自然界中分布广泛^[2]。因其基因组与其他梭状芽孢杆菌相比较小, 所以气肿疽梭菌一度被认为只感染反刍动物, 一般是反刍动物食用被污染的饲草或水源, 通过消化道创伤侵入机体, 或经由机体深部外伤感染侵入。但在 2007 年, 有报道显示该菌也可以导致人类气性坏疽^[3], 严重情况可致死亡, 该消息迅速引起众多学者对其进行深入研究。

经研究, 现已发现气肿疽梭菌的 4 种主要抗原和毒力因子在气肿疽发病过程中起着重要的作用, 分别为细胞毒素 A(CctA)、鞭毛蛋白(flagella)、神经氨酸酶(NanA)和透明质酸酶(nagH)。本文将主要对以上 4 种抗原的相关研究进行总结概述, 期望能为日后气肿疽检测方法和新型疫苗的研究提供参考。

1 细胞毒素 A

细胞毒素 A(CctA)是一种由 Joachim Frey 及其

团队经全基因序列分析发现的蛋白质毒素, 其分子质量为 33 ku, 属于细菌毒素杀白细胞素超家族 β-微孔形成毒素^[4], 主要起到细胞毒性和溶血活性的作用。经系统发育进化树分析, 细胞毒素 A 与毒素 β、毒素 NetB 也有较近的亲缘关系, 可以认为是梭状芽孢杆菌旁支出来的新亚科毒素^[5-6]。

陈晓洁等^[7]对其进行了蛋白结构域分析, 发现该蛋白无跨膜区, 有信号肽存在, 并预测该蛋白有多个磷酸化位点, 可能含有较多抗原表位, 为找到其致病的分子机理提供了一定依据。

云中宴等^[8]建立了用于临床诊断的以气肿疽细菌毒素 CctA 基因为基础的气肿疽聚合酶链式反应检测方法, 是目前比较快速、高效的检测方法^[9]。并在后续试验^[2]中对几种气肿疽 PCR 检测方法进行了比较, 最终发现以 CctA 为靶基因设计的引物最为敏感, 其最小检测 DNA 量为 1.230×10^{-5} pg/μL, 为气肿疽病临床诊断提供了可靠技术手段。

张皓等^[10]成功扩增了 CctA 基因目的片段, 并获得了与预期大小相符的重组质粒 pMD19-T-CctA

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: “高等学校学科创新引智计划资助”(D20034); 东北寒区优质肉牛高效安全养殖技术应用与示范(2018YFD0501702)

* 通讯作者

张文璇, 女, 1997 年生, 硕士研究生在读。

和真核表达质粒 pVAX1-CctA。齐强^[11]成功构建了能有效刺激小鼠的体液及细胞免疫应答的牛气肿疽 CctA 基因核酸疫苗,在一定程度上增加了机体细胞免疫水平,为牛气肿疽基因 CctA 核酸疫苗及免疫策略的研究奠定一定的基础。

2 鞭毛蛋白

鞭毛蛋白(flagella)分子质量为 46 ku^[12],是气肿疽梭菌的一种重要抗原,也是引起气肿疽发病和生物体感染的最重要的毒力因子之一。鞭毛的作用主要是帮助菌体运动,促进感染在机体内的进一步扩散。

早在 1994 年,Mayumi 等^[13]就发现气肿疽梭菌的鞭毛至少有 3 个抗原决定簇。张永佳等^[14]进行了气肿疽延边株 FliA 基因真核表达载体的构建,综合 Mattar 等^[15]通过建立小鼠模型进行的研究,可知该基因在病原学检测和免疫学方面具有重要的意义^[16]。另有试验^[17]成功构建了重组克隆载体 pMD18-T FliA (c),但需要注意的是,该方法构建克隆载体时,目的片段扩增时退火温度的筛选以及目的基因与 pMD18-T 连接的成功率仍不够理想^[17],进行下一步研究时可以考虑更换更为适合的 PCR 方法,或者寻找更合适的载体。

3 唾液酸酶

唾液酸酶(NanA)也称神经氨酸酶,分子质量约为 81 ku,是主要的毒力基因。经三级结构分析可知:有 2 个凝血因子活力区^[18];有 1 个唾液酸酶活力的糖苷水解酶家族^[19],4 个糖苷水解酶活力区;有 1 个类似半乳糖结合位点及刀豆蛋白样葡萄糖酶凝集素^[20]。有研究显示^[21]唾液酸酶能够水解寡糖、糖醛酸苷、糖蛋白和糖脂中的末端唾液酸残基和甘氨酸残基,从而影响细胞内基质^[22]并能够破坏宿主免疫调节的通路^[23-24]。

2011 年,Vilei 等^[25]在气肿疽的培养物中提取到了唾液酸酶。根据绿脓杆菌产生唾液酸酶帮助其在呼吸道上定殖的相关研究结果,有理由推测唾液酸酶在细菌感染和定殖过程中起到了重要作用。且气肿疽之所以具有发病迅速,病程短的特点,也很可能是因为唾液酸酶的作用^[26]。2019 年,马玉腾等^[27]对该基因进行了真核表达载体的构建,同年张皓^[23]在此基础上进行了小鼠免疫试验,结果显示该核酸疫苗能够明显使小鼠产生细胞免疫和体液免疫应答,

为该病的防控提供了新思路。

4 透明质酸酶

透明质酸酶是帮助细菌传播的重要毒力因子,可以分解透明质酸,帮助病原体从最初感染的部位移动到目标器官^[28]。Frey 等^[29]的研究发现了气肿疽梭菌的基因组有 2 种不同的透明质酸酶基因,分别为 *nagH* 和 *nagJ*,并证实了 *nagH* 的免疫活性。通过对透明质酸酶的克隆和序列分析得出,透明质酸酶参与了细胞内基质和连接组织的分解,加快了气肿疽梭菌及其代谢物质在受感染宿主机体内的传播。总体来说,目前对于气肿疽梭菌透明质酸酶的研究相对较少。

参 考 文 献

- [1] 陈发喜,蔡扩军,范玉娟,等.家畜气肿疽的研究进展[J].草食家畜,2015(3):6-10.
- [2] 云中宴.延边株气肿疽梭菌的分离鉴定及 cctA 基因的克隆和表达[D].延吉:延边大学,2015.
- [3] NAGANO N,ISOMINE S,KATO H,et al.Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei* [J].Journal of clinical microbiology,2008,46(4):1545-1551.
- [4] JOACHIM F,ANDERS J,SIBYLLE B,et al.Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis [J].Vaccine,2012,30(37):5500-5505.
- [5] ANTHONY L K,JOHN D B,PAOLA V,et al.NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *clostridium perfringens*[J].PLoS Patho-gens,2008,4(2):26-29.
- [6] 段雪岩.延边地区牛气肿疽流行病学调查及 CctA 基因真核表达载体的构建与表达[D].延吉:延边大学,2016.
- [7] 陈晓洁,李新苹,何高明,等.气肿疽梭菌 CctA 全长基因的克隆及生物信息学分析[J].甘肃畜牧兽医,2020,50(2):59-64.
- [8] 云中宴,任春宇,车达,等.气肿疽梭菌不同靶基因检测方法的比较[J].江苏农业科学,2015(11):278-279,280.
- [9] 于建华,张皓,陈竞,等.气肿疽研究综述[J].黑龙江畜牧兽医,2018(18):133-135.
- [10] 张皓,段雪岩,张永佳,等.气肿疽梭菌 CctA 基因真核表达载体的构建与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2018(3):142-144.
- [11] 齐强.牛气肿疽 CctA 基因核酸疫苗的制备及免疫效果评价[D].延吉:延边大学,2017.
- [12] YUTAKA T,MAYUMI T.Opsonic activity of anti-flagellar serum against *Clostridium chauvoei* by mouse polymorphonuclear leucocytes[J].Veterinary microbiology,1987,14(1):81-86.
- [13] MAYUMI K T,TAMURA Y,Shoko S,et al.Antigenic mimicry of *Clostridium chauvoei* flagella by polyclonal anti-idiotypic antibodies[J].Pathogens and disease,1994,40(1):70-75.

