



蒋志琼, 钟泽民, 谭博敏, 等. 丹毒丝菌 *SpaA* 基因免疫保护区的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 20-25.

丹毒丝菌 *SpaA* 基因免疫保护区的克隆 及其在毕赤酵母中的表达

蒋志琼, 钟泽民, 谭博敏, 余希尧, 黄毓茂

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】以毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33 为宿主表达猪丹毒丝菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* *SpaA* 基因氨基端的免疫保护区蛋白.【方法】以采集于广东某猪场的猪丹毒丝菌为模板, 根据 NCBI 中已发表的 *Spa* 基因 cDNA 序列设计 1 对引物, 通过 PCR 扩增得到 *SpaA-N*, 并将其连接到表达载体 pPICZαC 上, 得到重组表达质粒 pPICZαC-*SpaA-N*; 用 *Sac* I 酶将重组表达质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 线性化后电转化入毕赤酵母 X-33, 经含博来霉素 *Zencin*TM 抗性的 YPDS 平板筛选和 PCR 鉴定的阳性转化子, 用含不同浓度博来霉素抗性的 YPDS 平板筛选出高拷贝子并进行甲醇诱导培养, 分别于诱导 48、72、96 h 后离心收集上清液, 立即做 SDS-PAGE, 并进行 SDS-PAGE 及 Western-blot 试验.【结果和结论】成功克隆并表达了 *SpaA-N* 基因, 构建了重组表达质粒 pPICZαC-*SpaA-N*, 并以毕赤酵母 X-33 为宿主成功表达了猪丹毒丝菌 *SpaA* 基因氨基端的免疫保护区蛋白. 丹毒丝菌 *SpaA-N* 作为免疫保护区在酵母宿主中得以成功表达.

关键词: 丹毒丝菌; *SpaA* 基因; 毕赤酵母; 克隆和表达; 亚单位疫苗

中图分类号: S855

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)03-0020-06

Cloning surface protective antigen A gene from *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its expression in *Pichia pastoris*

JIANG Zhiqiong, ZHONG Zemin, TAN Bomin, YU Xiyao, HUANG Yumao

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】Immunization protection area protein, which lies in the N-terminal protective domain of surface protective antigen A (*SpaA*) of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, was expressed in *Pichia pastoris* X-33.【Method】Using the swine erysipelas, which was isolated from a pig farm in Guangdong as template, a pair of primers was designed according to the cDNA sequence of *Spa* gene from NCBI. The amino terminal sequence was achieved by PCR amplification, after being inserted into the expression vector pPICZαC to get the recombinant plasmid of pPICZαC-*SpaA-N*. Recombinant plasmid of pPICZαC-*SpaA-N* by *Sac* I enzyme was linearized, and electro transformed it into *P. pastoris* X-33. The positive transformant, screened by YPDS tablet with *Zencin*TM and identified by PCR at different concentrations of *Zencin*TM, achieved the high number of copies which were induced and cultured by methanol. Supernatant was collected by centrifugation at 48, 72, 96 h respectively after induction, and SDS-PAGE and Western-blot tests were carried out.【Result and conclusion】The *SpaA* gene was successfully cloned and expressed, and the recombinant plasmid of pPICZαC-*SpaA-N* was constructed. The immunization protection area protein, which lies in *SpaA* gene amino terminal of swine *E. rhusiopathiae* in *P. pastoris* X-33, was successfully expressed. *SpaA* gene of swine *E. rhusiopathiae* has been successfully expressed asim-

收稿日期: 2014-04-21 优先出版时间: 2015-04-14

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150414.0925.002.html>

作者简介: 蒋志琼 (1987—), 女, 硕士研究生, E-mail: 827209378@qq.com; 通信作者: 黄毓茂 (1964—), 男, 副教授, 博士,

E-mail: ymaohuang@scau.edu.cn

<http://xuebao.scau.edu.cn>

munization protection area protein in yeast host, which will lay a foundation for the development and the mass production of subunit vaccine of swine *E. rhusiopathiae*.

Key words: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *SpaA* gene; *Pichia pastoris*; cloning and expression; subunit vaccine

丹毒丝菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* 属于丹毒丝菌属,是一种兼性厌氧、无芽孢、不产酸的纤小革兰阳性杆菌^[1],是引起猪丹毒和人类丹毒症的病原体^[2].该菌能够在各种环境中长期存在(包括海中)^[3],并且能够感染各种野生动物和家畜、鸟类和鱼类^[4-8],从而引发疾病(鱼除外),该病在全球广泛存在,呈散发或流行性发生,特别是能够引起猪的急性热性败血症、亚急性疹块、慢性关节炎和心内膜炎,给养猪业造成了巨大的损失^[9].目前国内猪丹毒病仍时有发生^[10-14],虽然感染阳性率不高,但是猪丹毒的阳性检出率却比较高^[15],因此猪丹毒的隐性感染值得关注.目前,常用防治猪丹毒的方法还是传统疫苗,虽然此类疫苗在一定程度上起到了相应的作用,但对慢性猪丹毒的作用效果并不强,而且还在很大程度上增加了猪慢性关节炎的发病率^[16-17],因此研究一种新型猪丹毒疫苗迫在眉睫.

近年来国内外学者对猪丹毒免疫保护性蛋白(rSpa)进行了大量的研究,为猪丹毒的诊断和防治提供了科学的理论依据.其中表面保护抗原 A (SpaA)由 N 端的免疫保护性区域和 C 端的细胞结合区域组成,大量研究表明其具有良好的免疫保护功能^[8,18-20].而 SpaA 蛋白中起主要免疫保护效应的核心区段为氨基端(SpaA-N),其免疫保护作用受到国内外学者的广泛关注,并进行了大量的试验研究^[21-25].研究者们利用原核表达技术成功地克隆出 Spa-N 片段基因序列,并且研究了其免疫功能^[23,25].

本试验成功地扩增了 Spa-N 基因序列,并利用酵母表达系统对其进行表达,为 Spa-N 作为一种亚单位疫苗投入生产时的高产量、生长快速、易操作和低成本提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 猪丹毒菌分离自广东某猪场, pPICZαC 为 Invitrogen 公司产品,大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 为 TaKaRa 公司产品,毕赤酵母 *Pichia pastoris* X-33 由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

1.1.2 试剂与酶类 质粒提取试剂盒、胶回收试剂

盒、纯化试剂盒等为 Omega 公司产品;各限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 聚合酶、DNA Marker 等为 TaKaRa 公司产品;PCR 引物合成及测序由 Invitrogen 公司完成;博莱霉素、D-生物素、酵母氮碱等为 Sigma 公司产品;培养基成分如蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、培养基以及 SDS-PAGE 试验所需试剂、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 等均为北京鼎国生物技术公司产品;其他试剂均为国产分析纯.

1.1.3 培养基 LB 液体培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g NaCl,双蒸水定容至 1 L. 固体 LB 培养基:在液体 LB 培养基基础上加 1.5% 琼脂粉. 血清琼脂培养基:在普通 LB 培养基的配方基础上,双蒸水定容至 90 mL 后混匀高压,待冷却至一定温度时加入 10% 的兔血清. YPD 培养基:酵母提取物 10 g,胰蛋白胨 20 g,溶于 900 mL 双蒸水中,高压灭菌 20 min,再加入 100 mL 已过滤 0.2 g · mL⁻¹ 的 D-葡萄糖. YPDS 培养基:酵母提取物 10 g,胰蛋白胨 20 g,山梨醇 182.2 g,双蒸水定容至 900 mL,高压 20 min 后加入 100 mL 已灭菌的 0.2 g · mL⁻¹ 的 D-葡萄糖. BMGY 培养基:酵母提取物 10 g、胰蛋白胨 20 g 溶于 700 mL 双蒸水中,高压灭菌后冷却至室温,分别加入 100 mL 已除菌的 1 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH6.0)、134 g · L⁻¹ 酵母氮碱、体积分数为 10% 的丙三醇及 20 mg · L⁻¹ 的生物素 2 mL. BMMY 培养基:酵母提取物 10 g,胰蛋白胨 20 g,溶于 700 mL 双蒸水中,高压灭菌后冷却至室温,分别加入 100 mL 已除菌的 1 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH6.0)、134 g · L⁻¹ 酵母氮碱、体积分数为 10% 的甲醇 10 mL 及 20 mg · L⁻¹ 的生物素 2 mL.

1.2 重组毕赤酵母表达载体的建立

1.2.1 引物的设计与合成 根据 NCBI 上 SpaA 序列,登录号:AB259654.1,运用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物用于扩增 SpaA-N. 上游引物 P1 加入 *Xho* I 酶切位点;下游引物 P2 加入 *Xba* I 酶切位点和终止密码子. 本试验预采用毕赤酵母表达载体的 α 因子信号肽,由于质粒 pPICZαC 双酶切中会丢失 KEX2 蛋白酶的酶切位点 Lys-Arg,因此在设计上游引物的时候,还加入了编码 Lys-Arg 的密码子 AAAAGA. 引物由 Invitrogen 公司合成. 引物序列:上

游引物 P1, 5'-CCCTCGAGAAAAGAGGGTACCAA-AGTTTCGAAGC-3'; 下游引物 P2, 5'-GC TCTAGATTA-GATCTTTAGGTTTTCTTCATCAA-3'.

1.2.2 丹毒丝菌 *SpaA-N* 的 PCR 扩增 利用煮-冻-煮法裂解猪丹毒丝菌的细胞壁, 进行菌落 PCR. PCR 反应体系: Ex 10 × PCR Buffer 2 μL, 2.5 mmol dNTP Mixture 2 μL, 引物 P1、P2 各 0.5 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.125 μL, ddH₂O 17.375 μL, 模板 2 μL. 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min. 经 8 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳分析产物后, 利用 DNA 回收试剂盒进行纯化回收.

1.2.3 重组表达载体的构建 对胶回收后的回收产物 *Spa-N* 和表达载体 pPICZαC 同时进行 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切, 并利用 DNA 胶回收试剂盒进行纯化回收. 将酶切回收后的目的基因与表达载体连接后转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 将最后一步的重悬液均匀涂布于含 *Zencin*TM (25 μg · mL⁻¹) 的低盐 LB 固体培养基上, 放入 37 °C 培养箱中培养 12 ~ 16 h.

1.2.4 重组表达质粒的鉴定 PCR 鉴定: 挑选低盐 LB 平板上的可疑菌落于含 *Zencin*TM (100 μg · mL⁻¹) LB 液体培养基中 37 °C 震荡培养 8 h, 做菌液 PCR 鉴定. PCR 体系与反应条件同“1.2.2”.

单酶切和双酶切鉴定: 按照相应体系, 利用酶 *Xho* I 与 *Xba* I 进行双酶切鉴定, 用酶 *Xba* I 进行单酶切鉴定.

1.3 *SpaA-N* 基因在毕赤酵母中的表达

1.3.1 毕赤酵母 X-33 感受态细胞的制备 参照 Invitrogen EasySelect Pichia Expression kit 介绍的方法进行制备.

1.3.2 重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 的电击转化 根据 Invitrogen 公司实验手册进行. 先利用 *Sac* I 单酶切重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N*, 使之线性化, 同时对空质粒 pPICZαC 也进行同酶同系线性化, 反应体系 (50 μL): 10 × Buffer 5 μL, pPICZαC-*SpaA-N* 30 μL, *Sac* I 3 μL, ddH₂O 12 μL. 将 75 μL 新制备的感受态酵母细胞与 25 μL 线性化的重组质粒轻轻混匀后转入预冷的电转杯中冰浴 5 min. 设定电转参数 305 V, 进行 15 ms 电转后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol · L⁻¹ 山梨醇, 混匀后转入 5 mL 离心管, 30 °C 条件下静置 1 ~ 2 h, 再加入 YPD 液体培养基 1 mL, 30 °C 震荡培养 1 h. 4 000 r · min⁻¹ 收集菌体, 用 50 ~ 200 μL YPD 重悬菌体后铺于新鲜制备的 YPDS 平板 (含 *Zencin*TM 100 μg · mL⁻¹) 上, 将平板倒置于 30 °C 培养箱中培

养 3 ~ 5 d.

1.3.3 重组酵母菌菌液 PCR 鉴定及高拷贝转化子的筛选 挑取单菌落于 1 mL YPDS 培养基中 (含 *Zencin*TM 200 μg · mL⁻¹) 扩菌培养, 采用煮-冻-煮法制备 PCR 模板分析毕赤酵母转化子, 以 P1、P2 为引物扩增出 1 029 bp 的片段为阳性转化子. PCR 体系与反应条件同“1.2.2”. 再经不同浓度 *Zencin*TM 的 YPDS 平板筛选高拷贝克隆工程菌, 用于高效诱导表达 *SpaA-N* 蛋白.

1.3.4 抗血清的制备 购买 8 只体质量都在 15 g 左右的 SPF 雌鼠. 培养猪丹毒菌, 用平板计数法进行计数, 并用生理盐水将其稀释至 10 LD₅₀ (1.1 × 10² cfu), 加入体积分数为 0.1% 的甲醛进行灭菌处理, 划板验证为无菌后进行下一步试验. 将铝胶佐剂与经过灭菌处理的猪丹毒菌液按照体积比 1:5 的比例进行混合, 第 1 次免疫时每只小鼠腹腔注射 100 μL 混合液, 14 d 后进行第 2 次免疫, 第 2 次免疫 10 d 后进行第 3 次免疫, 3 次注射剂量均相同, 在第 3 次免疫 10 d 后进行摘眼取血. 采集的血液先置 37 °C 条件下凝固约 2 h, 然后置 4 °C 条件下过夜, 使血块收缩, 第 2 天 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 收集血清, 于 -80 °C 条件保存备用.

1.3.5 高拷贝酵母工程菌的诱导表达和 SDS-PAGE 挑取阳性单克隆转化子, 接种至 BMGY 中, 28 °C 摇至 *D*_{600 nm} 为 2 ~ 6, 用 BMMY 重悬细胞至 *D*_{600 nm} 为 1.0 进行诱导表达, 每 24 h 加甲醇至甲醇终体积分数为 1% 以继续诱导. 分别在 48、72、96 h 时离心收集上清液, 立即做 SDS-PAGE 或 -20 °C 条件保存备用, 并做 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析.

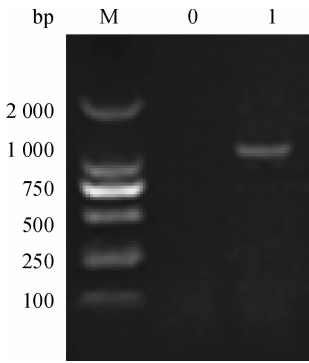
1.3.6 免疫及动物保护试验 将 16 只体质量为 18 ~ 20 g 的昆明小鼠随机分为 2 组, 每组 8 只. 将生理盐水、经过毕赤酵母表达的 *SpaA-N* 蛋白分别与铝胶佐剂以体积比 5:1 进行混合, 每只小鼠腹腔注射混合液 100 μL 进行第 1 次免疫, 分别命名为组 1、组 2, 其中组 1 为空白对照组. 第 1 次免疫 14 d 后进行第 2 次免疫, 各组的免疫剂量与方法同第 1 次免疫. 分别对第 2 次免疫 14 d 后的 2 组免疫小鼠进行腹腔注射攻毒, 攻毒剂量为 100 LD₅₀ (1.1 × 10³ cfu), 连续观察 10 d, 记录各组小鼠死亡数, 计算各免疫组的保护率.

2 结果

2.1 *SpaA-N* 基因的合成

以菌液为模板, P1、P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 经 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳可观察到有单一条带,

与实际条带 1 029 bp 相符(图 1).



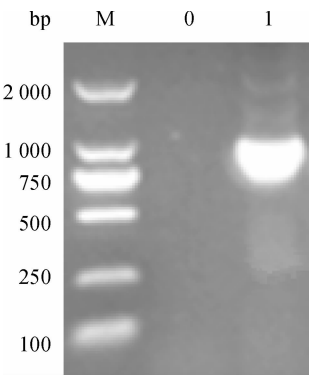
M: DNA marker DL2000;0:阴性对照;1:*Spa-N* 基因.

图 1 *Spa-N* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Spa-N* gene

2.2 重组表达质粒的 PCR 鉴定

从转化后培养的低盐 LB 平板上挑取疑似阳性的单菌落,接种于含 *Zencin*TM 25 μg · mL⁻¹ 的 LB 液体培养基中,37 ℃ 条件下震荡过夜,直接以菌液为模板进行 PCR 鉴定,以 P1、P2 为引物,扩增产物经 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳,可观察到大小约为 1 029 bp 的单一一条带(图 2),而阴性对照无任何条带. 结果表明猪丹毒 *SpaA-N* 已成功插入表达载体中.



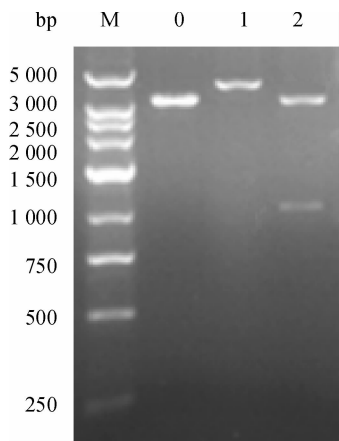
M: DNA marker DL2000;0:阴性对照;1:重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N*.

图 2 重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pPICZαC-*SpaA-N* by PCR

2.3 重组表达质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 的单酶切及双酶切鉴定

以抽提的质粒分别在 20 μL 体系中做 *Xho* I 单酶切鉴定及 *Xba* I 和 *Xho* I 的双酶切鉴定,并且以不加酶的重组表达质粒作阴性对照,于 37 ℃ 恒温水浴过夜后,以 1 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测结果. 单酶切出现 1 条 4.6 kb 左右条带,与实际相符;双酶切出现 2 条带,其中 1 条大小约为 1 029 bp,与外源目的基因大小 1 029 bp 相符(图 3).



M:250 bp DNA ladder marker;0:未酶切的 pPICZαC-*SpaA-N* 质粒;1:pPICZαC-*SpaA-N* 质粒 *Xho* I 单酶切产物;2:pPICZαC-*SpaA-N* 质粒 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切产物.

图 3 重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 的酶切鉴定

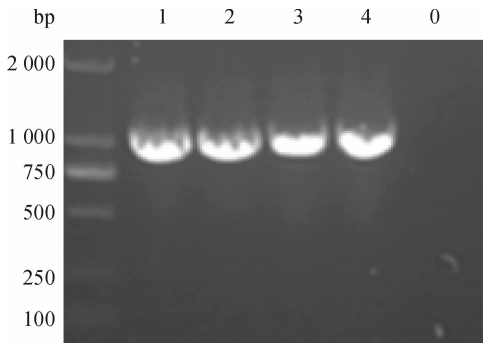
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pPICZαC-*SpaA-N* by restriction endonucleases digestion

2.4 重组表达质粒的序列测定结果

将经过 PCR 和酶切鉴定的阳性重组表达质粒,送 Invitrogen 公司,用载体引物(即通用引物)对重组质粒 pPICZαC-*SpaA-N* 进行测序. 结果显示,目的片段与 NCBI 已发表的 *Spa-N* 序列的相似性高达 99%.

2.5 重组酵母菌液 PCR 鉴定

挑取电转的阳性菌落于 1 mL 的 YPDS 液体培养基中(含 *Zencin*TM 100 μg · mL⁻¹),30 ℃ 条件下 180 r · min⁻¹ 振荡培养,取少量菌液进行 PCR 鉴定. 同时取空载体 pPICZαC/X-33 转化的重组酵母菌作阴性对照,电泳检测. 结果显示:重组质粒转化的重组酵母菌液可以扩增出大小约为 1 029 bp 的特异条带,而空质粒转化的酵母菌液在 1 029 bp 处无条带(图 4).



M: DNA marker DL2000;0:空质粒转化酵母 PCR 扩增产物;1~4:重组质粒/X-33 的 PCR 扩增产物.

图 4 重组酵母菌液 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant yeast by PCR

2.6 *SpaA-N* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

高拷贝重组酵母工程菌株经甲醇诱导表达,分

<http://xuebao.scau.edu.cn>

别于诱导 48、72、96 h 后经 10 000 r · min⁻¹离心收集酵母上清液后进行 SDS-PAGE(12% 分离胶和 5% 浓缩胶)表达分析,考马斯亮蓝染色鉴定.结果显示,相对分子质量约为 40 000 的 Spa-N 蛋白得以表达(图 5),表明猪丹毒 Spa-N 蛋白在酵母 X-33 中成功表达.

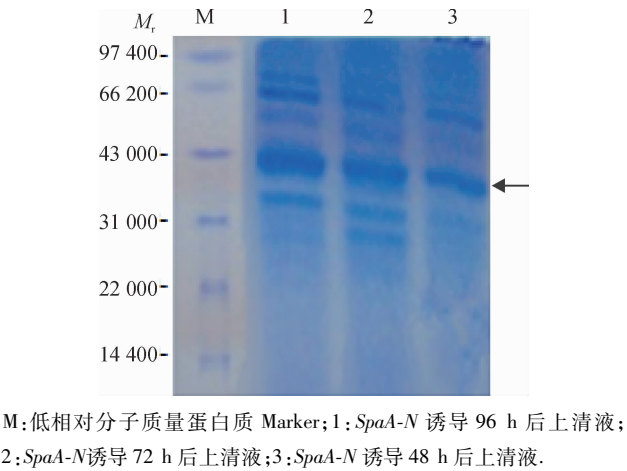


图 5 *SpaA-N* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analyses of expression products of *SpaA-N* gene

2.7 *SpaA-N* 表达产物的 Western-blot 分析

表达蛋白的 Western-blot 免疫印迹检测结果显示,抗天然 SpaA 蛋白抗体(抗血清)和通过酵母表达的 SpaA-N 蛋白发生了特异性反应,说明 SpaA-N 蛋白在毕赤酵母中得到成功的表达(图 6).

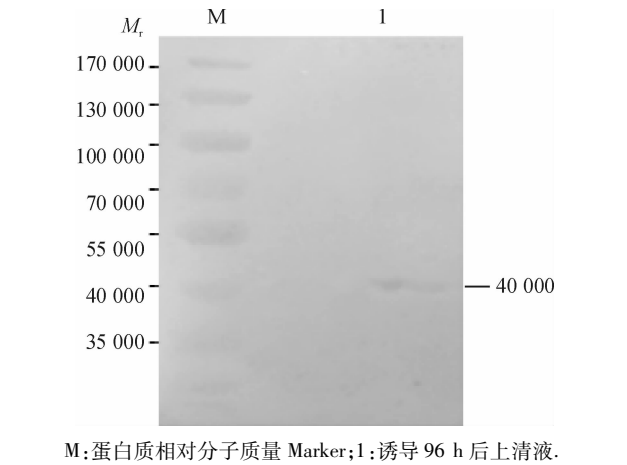


图 6 *SpaA-N* 表达产物的 Western-blot 分析

Fig. 6 Immunoreactivities of expression products of *SpaA-N* gene by Western-blot

2.8 免疫及动物保护试验结果

组 1 的生理盐水对照组小鼠在攻毒后表现出一些不适的症状:食欲下降、毛发起皱及精神沉郁等,第 5 天开始死亡,到第 8 天全部死亡.而组 2 的 SpaA-N 蛋白试验组在攻毒的前 2 d 有一些不适症状,但到后期这些不适症状消失,没有出现死亡情况.试验结果

表明试验所表达的 SpaA-N 蛋白具有免疫保护性.

3 讨论

现在世界各地猪丹毒仍频繁爆发^[26],给世界各国的养猪业造成了巨大的经济损失.目前常用活菌疫苗、灭活疫苗及联苗等来预防和控制该病的发生和传播,但是接种活菌苗有可能使免疫动物变成带菌者和细菌的传播者,从而使得慢性病例逐渐增加;灭活疫苗的培养液本身是异体蛋白,易使接种动物发生过敏反应.而亚单位疫苗具有安全性高、产量高、稳定性好等优点,克服了活菌疫苗的毒力返强和灭活对猪只引起过敏反应等缺点.

近几年来,相继出现了一些对猪丹毒杆菌的分子生物学和免疫学的研究,Makino 等^[18]克隆和表达了猪丹毒丝菌表面保护性抗原 SpaA,发现 SpaA 的 N 端 342 个氨基酸残基组成的多肽承担了该蛋白的免疫保护功能.前人对猪丹毒杆菌 SpaA 的氨基酸进行原核表达和重组疫苗的研究结果表明,SpaA-N 蛋白具有良好的免疫保护作用^[21-25].但现如今的研究都是基于原核表达系统上,其表达的目的产物常以包涵体形式存在,无翻译后的修饰加工过程^[27],包涵体复性困难且效率很低.而本试验采用的毕赤酵母表达系统与其他表达系统相比,有着不可比拟的优势,其既有原核生物繁殖快、易于培养、培养基廉价和试验过程简单可行等特点,又具有强有力的启动子,还可以对外源蛋白进行加工折叠和翻译后修饰^[28]等真核生物表达体系的特点,而且巴斯德毕赤酵母还是一种能高效表达外源蛋白的表达系统,具有遗传稳定、表达水平高、蛋白可翻译后加工、产物可分泌、可高密度发酵等许多优点^[29].

本研究成功克隆并表达了猪丹毒丝菌 C43065 *SpaA* 的 N 端免疫保护片段,测序结果分析发现其与 NCBI 上已登录的不同血清型菌株的 *SpaA* 基因的核苷酸序列的相似性高达 99%,说明该基因具有很高的保守性. SDS-PAGE 及 Western-blot 结果表明其具有免疫反应性,因此,本研究为猪丹毒新型亚单位疫苗的研制和大规模生产奠定了基础.

致谢:感谢兽医学院传染病教研室的老师和同学给予的支持和帮助!

参考文献:

[1] BROOKE C J, RILEY T V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of

- an occupational pathogen[J]. J Med Microbiol, 1999, 48(9): 789-799.
- [2] BOO T W, HONE R, HURLEY J. *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis: A preventable zoonosis[J]. Ir J Med Sci, 2003, 172(2): 81-82.
- [3] SITT T, BOWEN L, MYRA T, et al. Cellular immune responses in cetaceans immunized with a porcine erysipelas vaccine [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 137(3/4): 181-189.
- [4] GARTRELL B D, ALLEY M R, MACK H, et al. Erysipelas in the critically endangered kakapo (*Strigops habroptilus*) [J]. Avian Pathol, 2005, 34(5): 383-387.
- [5] HASSANEIN R, SAWADA T, KATAOKA Y, et al. Serovars of *Erysipelothrix* species isolated from the tonsils of healthy cattle in Japan [J]. Vet Microbiol, 2001, 82(1): 97-100.
- [6] BOERNER L, NEVIS K R, HINCKLEY L S, et al. *Erysipelothrix* septicemia in a little blue penguin (*Eudyptula minor*) [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16(2): 145-149.
- [7] HOLTIFIELD J L, COOPER G L, CHARLTON B R. An outbreak of erysipelas in 2-day-old poultry [J]. Avian Pathol, 2000, 44(33): 721-724.
- [8] CHEUN H I, KAWAMOTO K, HIRAMATSU M, et al. Protective immunity of *SpaA*-antigen producing lactococcus lactis against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection[J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(6): 1347-1353.
- [9] HASSANEIN R, SAWADA T, KATAOKA Y, et al. Pathogenicity for mice and swine of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle [J]. Vet Microbiol, 2003, 91(2/3): 231-238.
- [10] 朱凤琼, 陈达燕, 夏英杰, 等. 猪丹毒杆菌的分离及鉴定[J]. 现代农业科技, 2012(4): 316-317.
- [11] 邱美珍, 杜丽飞, 杨爱梅, 等. 猪丹毒杆菌临床分离鉴定与药敏试验[J]. 养猪, 2011(6): 111-112.
- [12] 郭良兴, 陈克研, 赵魁, 等. 猪丹毒杆菌的分离鉴定及耐药性试验[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 199-202.
- [13] 车勇良, 陈如敬, 王隆柏, 等. 猪丹毒杆菌的分离鉴定及其 *SpaA* 基因的遗传变异分析[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1591-1593.
- [14] 万莉, 韩国全, 郭万柱, 等. 猪丹毒疫苗研究进展[J]. 猪业科学, 2010(6): 32-35.
- [15] 周绪斌, 丹尼, 李聪, 等. 猪丹毒——古老的传染病是否从中国规模化猪场消失了[J]. 农业新技术, 2009(5): 22-24.
- [16] FREDDY H, FRANK P, KOEN C, et al. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect[J]. Vet Microbiol, 2004, 100(3/4): 255-268.
- [17] SILVA A J, HORTA A C, IEMMA M, et al. Production of potential subunit vaccine against swine erysipelas in fed-batch cultures of *E. coli* BL21 (DE3) [J]. New Biotechnol, 2009, 25(6): 187-188.
- [18] MAKINO S, YAMAMOTO K, MURAKAMI S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, *SpaA*, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Microb Pathog, 1998, 25(2): 101-109.
- [19] IMADA Y, GOJI N, ISHIKAWA H, et al. Truncated surface protective antigen (*SpaA*) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotypes 1a and 2b in pigs [J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4376-4382.
- [20] ALAINA L I, JAMES A R, PAUL J H. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Association of *Spa*-type with serotype and role in protective immunity [J]. Vaccine, 2010, 28(13): 2490-2496.
- [21] 曹文尧. 丹毒丝菌表面保护抗原 A 作为重组亚单位疫苗和核酸疫苗的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2007.
- [22] 谭侃侃. 丹毒丝菌的分离鉴定及其 *SpaA*-N 蛋白和 lipo 蛋白的免疫原性分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- [23] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 张磊, 何翠, 等. 猪丹毒丝菌天然 *SpaA* 和重组 *SpaA*-N 免疫保护效果的评价[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 367-372.
- [24] 李伟杰, 赵耘, 康凯, 等. 红斑丹毒丝菌 *SpaA* 抗原基因的克隆、序列分析及蛋白结构预测[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(11): 1591-1594.
- [25] DA A J, SILVA M R, IEMMA A C, et al. Cloning, auto-induction expression, and purification of r*SpaA* swine erysipelas antigen [J]. Curr Microbiol, 2012, 65(4): 369-374.
- [26] OPRIESSNIG T L, HOFFMAN J, HARRIS D L, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Genetic characterization of Midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed field gel electrophoresis [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16(2): 101-107.
- [27] JIN F L, XU X X, YU X Q, et al. High-level expression of active recombinant ubiquitin carboxyl terminal hydrolase of drosophila melanogaster in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2009, 65(2): 115-121.
- [28] 杨梅, 温真, 林丽玉. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(4): 46-51.
- [29] DALY R, HEARN M T W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production [J]. J Mol Recognit, 2005, 18(2): 119-138.

【责任编辑 柴 焰】