



实用生物信息技术课程期末交流报告

生物信息技术在腐败梭菌病基因工程疫苗研究中的应用

报 告 人：彭国瑞

小组成员：安兴奎（组长）、薛庆婉
张启龙、彭国瑞

组 别：G13

报告内容

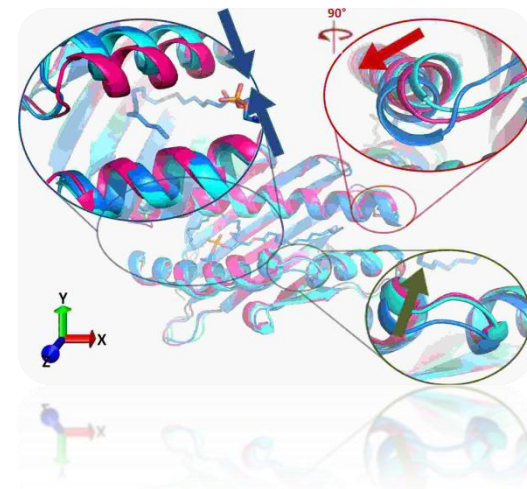
课题研究背景

课题研究内容

生物信息技术的应用

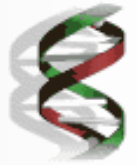
研究进展

下一步工作设想





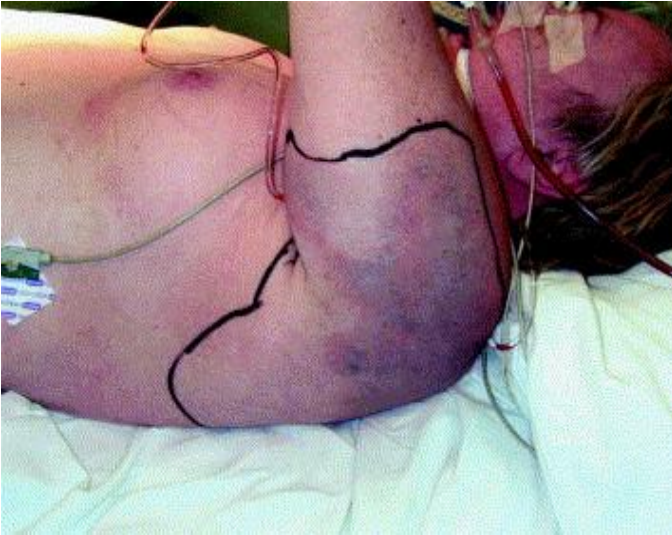
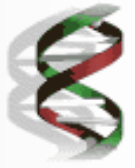
研究背景



- 腐败梭菌(*Clostridium septicum*)是一种革兰氏阳性厌氧杆菌，广泛分布于土壤，人和动物消化道及粪便中，是一种常见人畜共患病原菌，其致病范围广，可引起多数动物和人的恶性水肿病，伤口感染可致气性坏疽病。
- 另外，已有证实该菌还与人的直肠癌有关。

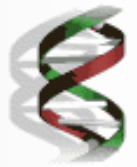


临床医学





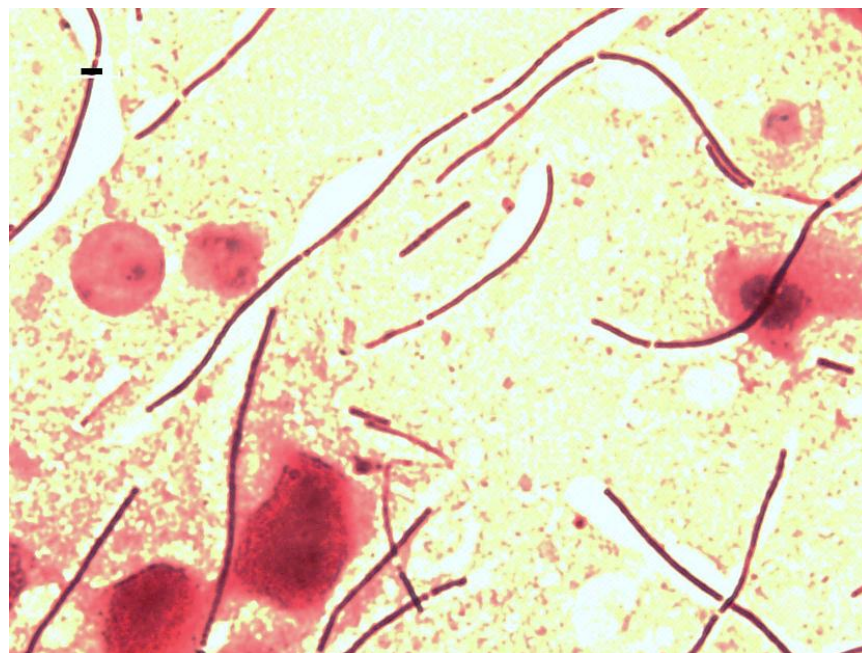
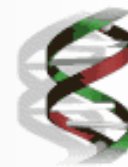
动物医学



羊经消化道感染引起的羊快疫（**Braxy**），是一种常见、多发、非接触、致死性传染病，以突然发病、不表现临床症状即发生急性死亡为特征。

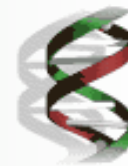


实验动物模型





腐败梭菌 α 外毒素



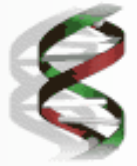
腐败梭菌产生的 α 毒素是该菌最主要的致死性毒力因子，并且也是唯一经过鉴定的毒力因子和保护性抗原。

具有溶血、致死和坏死三种生物活性，直接引起动物急性休克性死亡。

因此，对 α 毒素研究在动物疾病防控和公共卫生学中均具有十分重要的意义。



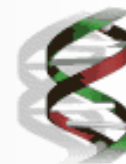
研究内容



- 设计引物，扩增获得 α 毒素基因；
- 构建含 α 毒素基因的重组工程菌；
- 对制备得到的重组 α 毒素的生物学特性研究；
- 对重组 α 毒素的免疫原性进行研究；
- 分析 α 毒素的氨基酸序列特性与空间结构。



一、引物设计



- NCBI核酸数据库查找Alpha Toxin Gene of Clostridium septicum;
- 参考已登录的完整基因用primer5.0设计上下游扩增引物;
- PCR扩增获得 α 毒素基因。

The screenshot displays the GeneBank 'NewSequence' window and the Primer Premier software interface. The GeneBank window shows a DNA sequence starting with '1 CCG GAA TTC ATG TCA AAA AAA TCT TTT GCT AAA AAA GTA ATT TGT ACA TCT ATG ATT GCA ATT CAG TGT GCG GCA GTA GTA CCA CAT GTA CAA GCT TAT GCA CTT ACA AAT CTT GAA GAG GGG'. The Primer Premier window shows a sequence alignment with a primer selected at position 1350. Below the alignment is a table of primer properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	AG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	54	1	30	70.7	33.3	-57.4	32.0	1	--
Anti-sense	42	1350	31	59.6	25.8	-51.2	30.8	1	--
Product	72	--	1350	81.3	29.8	--	--	--	49.8

Below the table, the 'Most Stable SRe:' section shows 'AG = -16.9' and '5' GCGCTCACCTTATATATTAAATTAAT'.

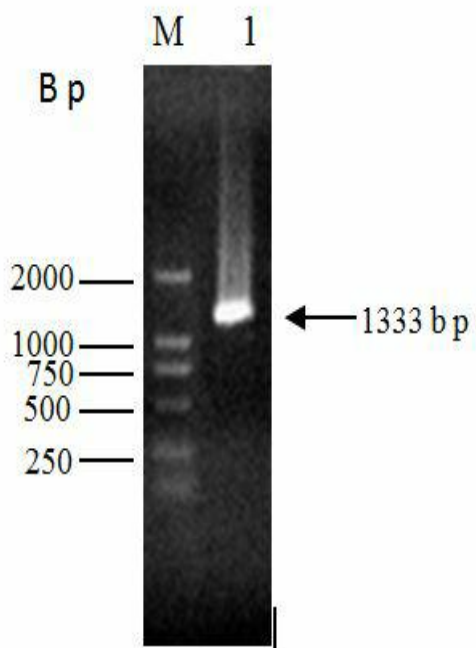


图1 腐败梭菌 α 毒素基因的PCR产物

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of α -toxin gene from *Clostridium septicum* C55-1



二、构建克隆表达载体

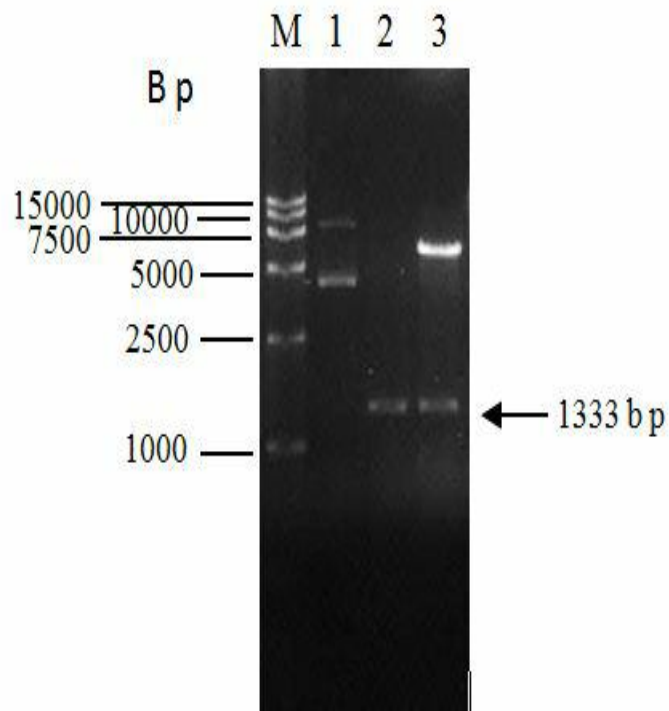
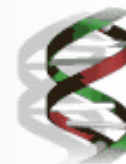


图2 重组表达质粒pET28a-csa的鉴定

Fig.2 Analysis of recombinant prokaryotic expression plasmids pET28a-csa



三、重组 α 毒素的表达

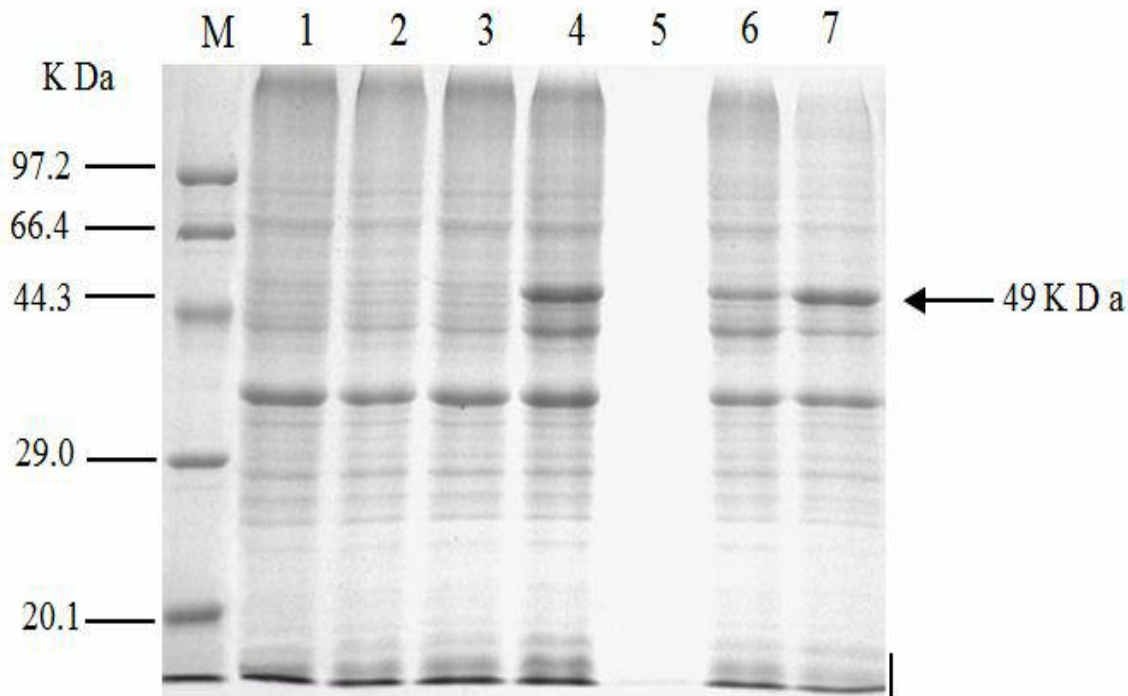
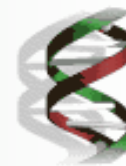
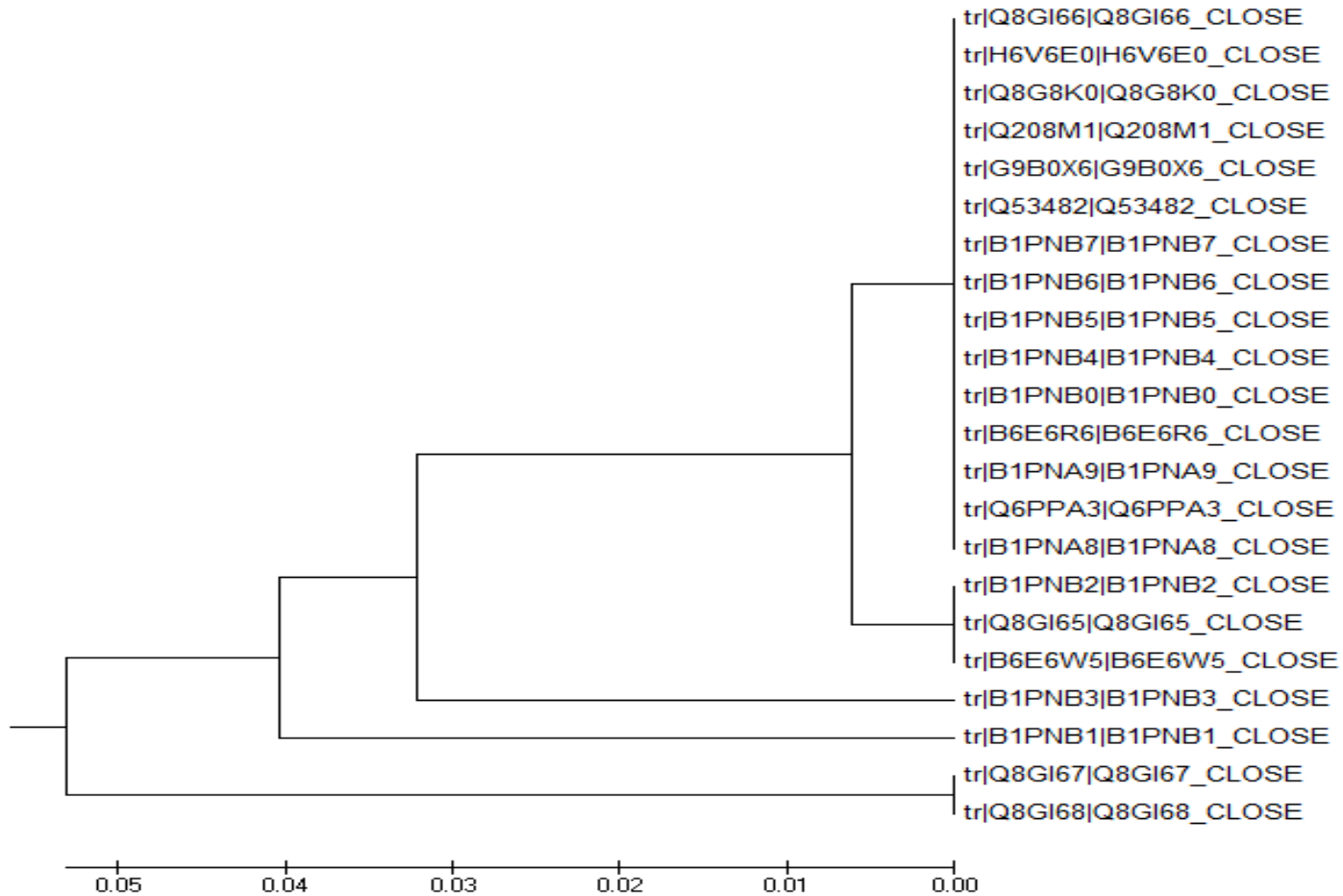


图3 重组表达质粒在大肠杆菌 BL21中的表达

Fig.3 Recombinant expression plasmids expressed in E.coil BL21



构建进化树





四、重组 α 毒素的生物学特性研究

1、用腐败梭菌阳性高免血清作为一抗对表达产物进行Western-blot分析

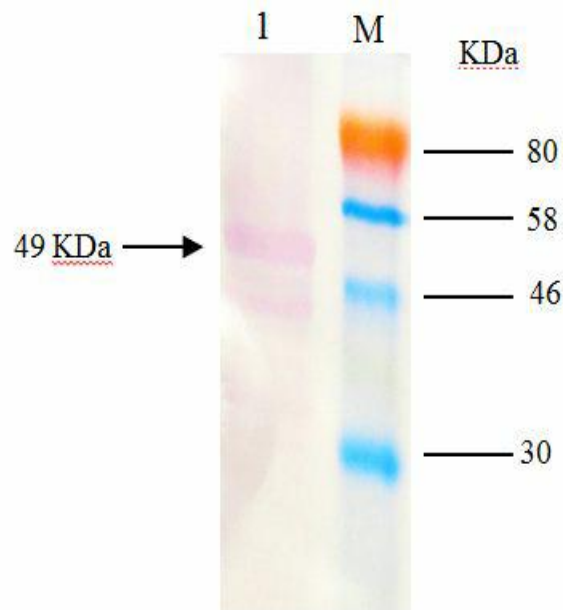
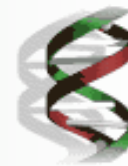


图4 表达产物的Western-blot分析

Fig.4 Western-blot analysis of expression products



2、重组 α 毒素的毒性测定

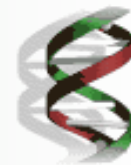


重组 α 毒素尾静脉注射小鼠，24h内即可致死小鼠，毒性较强的活性成分甚至注射后1min内小鼠即发生死亡，所有死亡小鼠生前均表现出与天然毒素相同的被毛粗乱、失明和后肢麻痹等中毒症状。

经测定1mL重组 α 毒素混合液能使350只小鼠死亡。



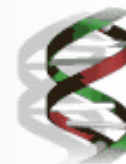
五、重组 α 毒素的免疫原性



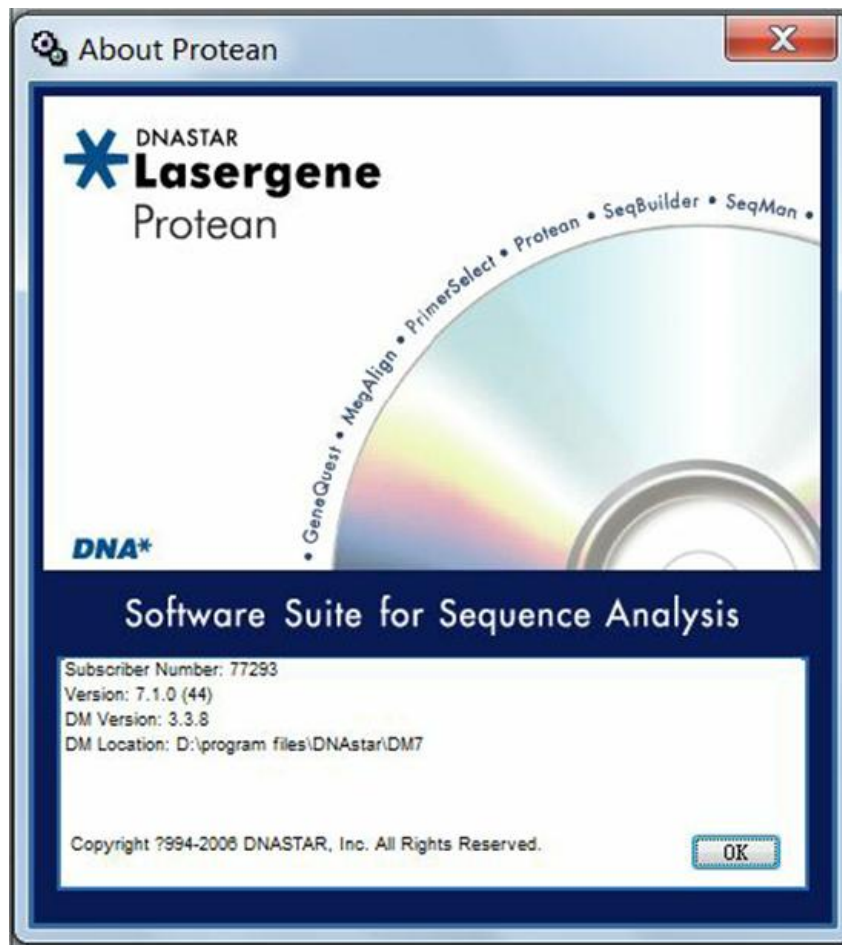
- 将含 α 毒素的重组大肠杆菌经灭活脱毒处理后制成腐败梭菌病灭活疫苗免疫大耳白兔。
- 免疫一次后，用20个致死量的天然毒素攻击，对照组全部死亡，免疫组全部健活。

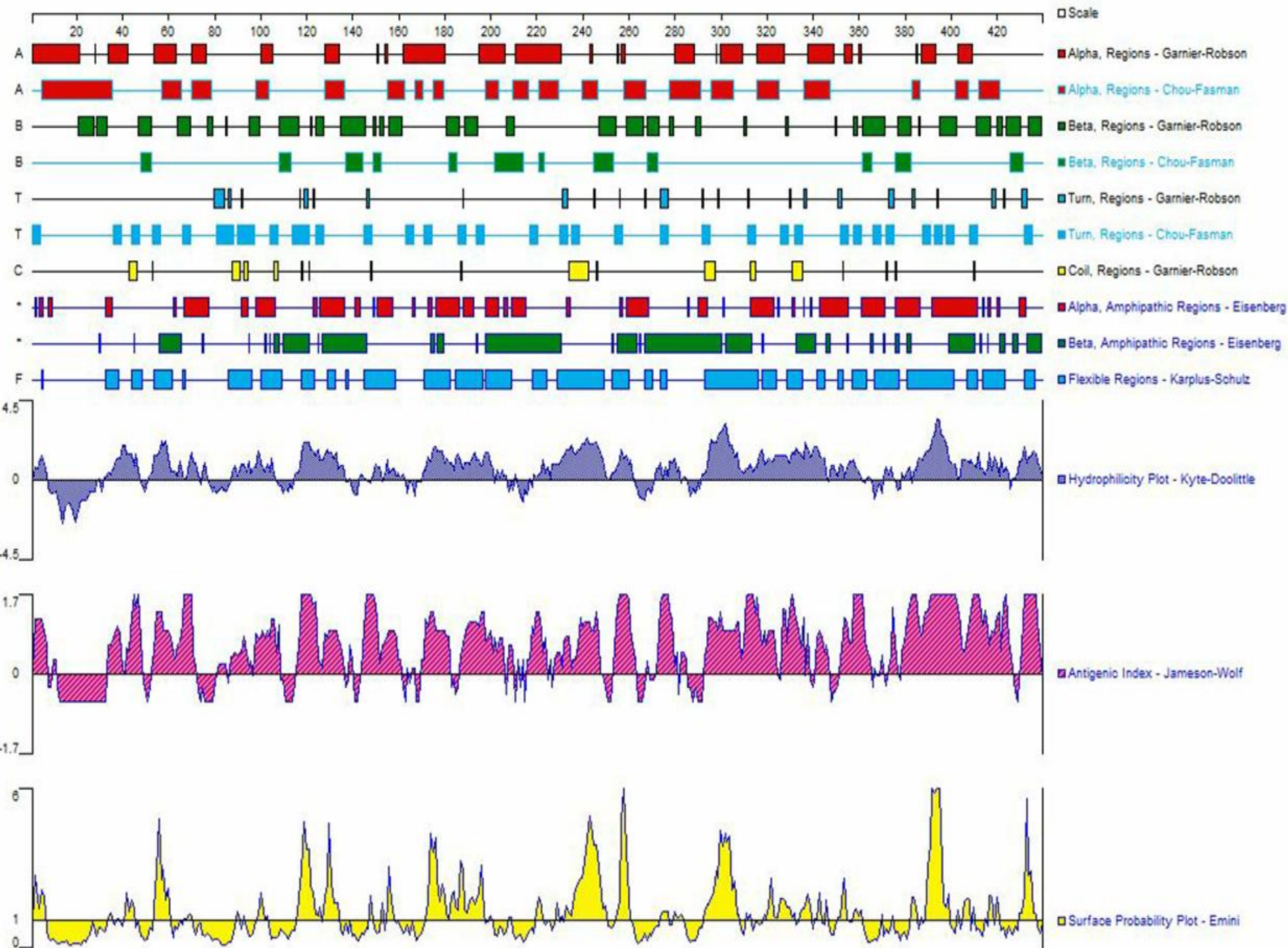


六、 α 毒素蛋白质结构与序列分析



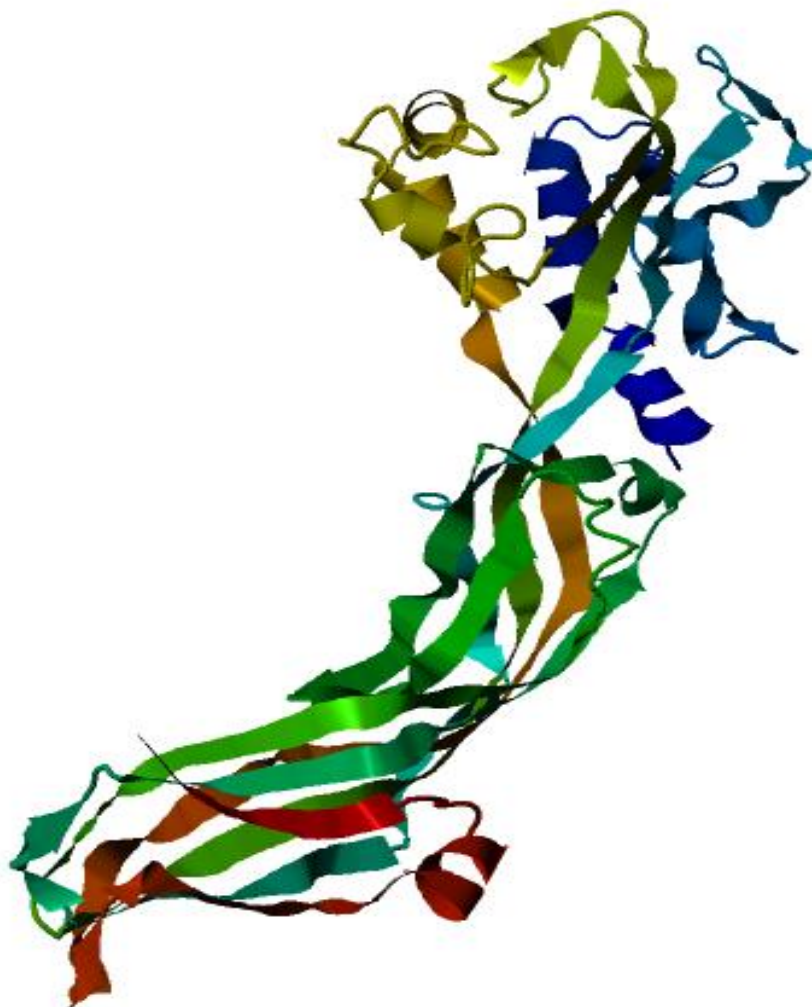
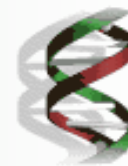
1、使用DNASTAR-Protean对重组 α 毒素的氨基酸序列进行分析，获得其 α 螺旋、 β 折叠、亲水性、以及抗原表位等性质。





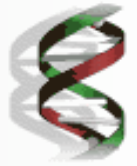


2、重组 α 毒素的结构预测

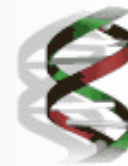




下一步工作设想



- 1、完善腐败梭菌病基因工程疫苗实现商品化应用。
- 2、以重组 α 毒素氨基酸序列抗原表位分析结果为依据，进一步分析能够刺激机体产生免疫应答的关键位点。
- 3、以与预测的重组 α 毒素空间结构结果为依据，通过试验验证其产生生物活性的表位



谢谢！