

分类号 _____

密级 _____

U D C _____

编号 _____

南方医科大学 本科毕业论文

产气荚膜梭菌溶素 O(PFO)的重组表达及分离纯化

Recombinant Expression, Isolation and

Purification of Perfringolysin O

欧阳继华

指导教师姓名	马 强
单位名称及地址	南方医科大学检验与技术学院
专业名称	2016 级生物技术（生物制药）
论文提交日期	2020 年 5 月 25 日
论文答辩日期	2020 年 6 月 1 日
答辩委员会主席	马 骊
论文评阅人	李 珍

2020 年 6 月 10 日

产气荚膜梭菌溶素 O(PFO)的 重组表达及分离纯化

本科生：欧阳继华

指导教师：马强

摘 要

目的：由产气荚膜梭状芽孢杆菌产生的穿孔毒素产气荚膜梭菌溶素 O（PFO）是一种胆固醇依赖性溶细胞素（CDCs），能够通过和胆固醇相互作用在哺乳动物细胞膜表面形成跨双层膜的孔洞，对疾病的发生发展起着重要推动作用，并作为一种穿孔蛋白广泛应用于各类细胞生物实验。表达并分离纯化 PFO 是研究或利用其生物活性的基础。**方法：**将表达 PFO 蛋白的基因片段插入到 pET-28a 质粒载体中，再将该载体经转化导入 BL21(DE3)细菌，在合适的条件下经诱导表达和分离纯化，并将其浓缩至所需浓度，最后测定其生物活性。**结果：**PFO 被大量诱导表达出来，并经过分离纯化浓缩达到了一定的纯度和浓度，同时探索出了表达 PFO 的一系列最佳实验条件，为后续实验的进行打下了坚实的基础。**结论：**重组 PFO 可在大肠杆菌中经诱导后大量表达，并且经过实验优化后其表达量可以有较大提升。不过其体外活性仍有待进一步验证。

关键词：产气荚膜梭菌；PFO；重组表达；分离纯化

Recombinant Expression, Isolation and Purification of Perfringolysin O

Name: Ouyang Jihua

Supervisor: Ma Qiang

ABSTRACT

Objective: Produced by *Clostridium perfringens*, the pore-forming toxin perfringolysin O (PFO) is one of the cholesterol-dependent cytolysins (CDCs) and able to interact with cholesterol in mammalian cell membrane surface to form a bilayer-spanning pore, it plays an important role in the occurrence of diseases development and is widely applied in all kinds of cell biology experiment as a kind of perforin. The expression, isolation and purification of PFO is the basis for studying or using its biological activity. **Methods:** Insert the gene fragment expressing PFO protein into the pET-28a plasmid vector, and then transform the vector into BL21 (DE3) bacteria, induce expression and isolation and purification under suitable conditions, and concentrate it to the desired concentration, Finally determine its biological activity. **Results:** The target protein was induced to be expressed in large quantities, reaching a certain purity and concentration through separation, purification and concentration. Meanwhile, a series of optimal experimental conditions for the expression of PFO were explored, which laid a solid foundation for the follow-up experiments. **Conclusion:** The recombinant PFO can be induced to be expressed in large quantities in *Escherichia coli* and its expression can be greatly improved after experimental optimization. However, its activity in vitro remains to be further verified.

Key words: *Clostridium perfringens*; PFO; Recombinant expression; Isolation and purification

目 录

摘 要	I
ABSTRACT.....	i
1 绪论.....	1
2 材料与方法.....	2
2.1 材料.....	2
2.1.1 细胞、菌种、质粒.....	2
2.1.2 主要仪器设备.....	2
2.1.3 主要试剂.....	2
2.2 方法.....	5
2.2.1 克隆表达载体的构建.....	5
2.2.2 提取质粒与检验.....	7
2.2.3 转化, 诱导表达, 电泳及 Western-blot.....	8
2.2.4 优化实验条件.....	9
2.2.5 大量表达与分离纯化.....	9
2.2.6 包涵体复性与蛋白质浓缩.....	10
2.2.7 PFO 蛋白质生物活性的测定 (部分实验已完成)	11
3 结果与分析.....	12
3.1 第一次表达后的电泳结果.....	12
3.2 WESTERN-BLOT 结果	13
3.3 优化实验结果.....	14
3.3.1 最佳诱导时间的探究.....	14
3.3.2 最佳诱导温度的探究.....	14
3.3.4 最佳诱导物浓度的探究.....	15
3.3.5 最佳诱导时间点的探究.....	15
3.4 亲和层析效果检验.....	16
3.5 BCA 试剂盒检测蛋白浓度实验结果.....	16
3.6 生物活性测定结果.....	17
3.6.1 DAPI 染色实验 (已完成)	17
3.6.2 LDH 检测实验 (未完成)	18
3.6.3 SYTOX Green 染色实验 (未完成)	18
结 论.....	18
参考文献.....	19
致 谢.....	21
附 录.....	22

1 绪论

产气荚膜梭状芽孢杆菌是一种革兰氏阳性厌氧致病菌，可在人类、家禽和农业上的重要家畜中引起多种疾病^[1]。其一般是从环境中分离出来的，也可以从人和动物的肠道中分离出来，作为正常菌群的主要成分，然而在人和动物中的产气荚膜梭菌在外界环境发生改变或受到某些刺激后，能够快速增殖并产生几种毒素，导致疾病的发生^[2,3]。产气荚膜梭菌根据其与自然条件下合成的四种主要毒素 $\alpha, \beta, \epsilon, \iota$ 可被分为 A-E 五型，此外，这种细菌还能够以不同的组合方式产生多达 16 种其他毒素^[4]。A 型产气荚膜梭菌是大多数人类感染的致病菌株，其产生的产气荚膜梭菌溶素 O (PFO) 和 α 毒素 (CPA) 是产气荚膜梭菌的主要毒力因子，能够造成气性坏疽和坏死性肠炎等疾病，威胁人类健康，同时给养殖行业带来巨大损失^[5-7]。

PFO 是由产气荚膜梭菌环状染色体上 *pfoA* 基因编码的含 500aa 的序列，其 N 端含有 27 个氨基酸残基的信号肽^[8]。PFO 是胆固醇依赖性溶细胞素 (CDCs) 的一员，相似的毒素在其他菌属中也有发现，这类毒素通过在含有胆固醇的细胞膜上插入一个大的 β 桶结构来形成跨膜孔洞，胆固醇对于孔洞的形成来说是必须的^[9,10]。CDCs 尽管广泛存在于不同的物种中，但大多数 CDC 与 PFO 相比都有超过 39% 的序列显示出同源性，PFO 被认为是 CDCs 的原型^[11,12]。PFO 被分泌到细胞外后以水溶性单体的形式存在，其在晶体中或在高浓度溶液中以首尾相连的二聚体的形式存在，至于其在生理浓度下是否以二聚体的形式存在仍不清楚^[13-15]。解出的晶体结构揭示 PFO 拥有可被划分为四个结构域的细长结构，结构域四 (D4) 包括两个 β 片层，每个 β 片层由 4 条 β 链通过 4 个环连接在一个称之为 β 三明治的结构中；结构域三 (D3) 的核心是一个 β 片层，两侧分别是 3 个 α 螺旋，还有一个额外的 α 螺旋连接着结构域一 (D1) 的 β 5 链，D1 和结构域 2 (D2) 负责连接 D3 和 D4，D2 包括一个 β 片层，而 D1 包含一个 β 片层和 4 个 α 螺旋^[16,17]。PFO 的 C 端，也就是 D4 结构域，负责胆固醇依赖的膜结合，这是 CDC 成员中氨基酸同一性百分比最高的结构域，通过 D4 结构域识别胆固醇是 CDCs 的一个显著特征^[18]。一旦插入到哺乳动物细胞膜中，PFO 就会组装成含有 30-50 个单体的前孔复合体，随后前孔复合体经过转变成跨双层膜的直径在 300-350 Å 的孔洞（有关研究表明，孔洞直径大小与 PFO 跨膜片段长度呈正相关），这些孔隙远远超过了许多其他蛋白孔隙的大小，使得细胞外环境和细胞内环境之间的离子和小分子不受控制地流动，破坏了细胞的稳态，对疾病的发生发展产生了重要影响^[19-22]。

PFO 的上述特性使其能够应用于疾病致病机制的研究并且广泛应用于各类细胞生物学实验，由此可见获得纯度和浓度较高并具有生物活性的 PFO 蛋白具有重大现实意义。鉴于目前以大肠杆菌为代表的原核表达体系已相当成熟，同时考虑到早在上个世纪 80 年代就有研究人员将 *pfoA* 基因克隆到 *Prt1b* 质粒载体并将其导入大肠杆菌成功表达出了 PFO 蛋白，验证了 PFO 蛋白外源重组表达的可行性^[23,24]，于是我们决定将 *pfoA* 基因插入到表达质粒 PET-28a(+) 上，并在合适的条件下诱导其表达，分离纯化得到一定纯度和浓度的 PFO 蛋白，同时探索其表达的最优条件，最后验证其生物活性，希望能为以后需要用到 PFO 蛋白的研究人员提供一定的借鉴与参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞、菌种、质粒

1. 表达菌：大肠杆菌 BL21(DE3)，一种常用且较成熟的大肠杆菌宿主菌；
2. 质粒载体：pET-28a(+)质粒，一种成熟的质粒表达载体；
3. 293T 细胞：购自上海细胞库，此实验中用于验证 PFO 蛋白的生物活性。

2.1.2 主要仪器设备

表 1 主要仪器设备

设备名称	购买公司
Milli-Q 超纯水系统	美国 MilliPore 公司
凝胶成像系统	Biorad 公司
离心机	Sigma 公司
BeckmanJ2-MC 高速冷冻离心机	Beckman 公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司
电子天平、分析天平、pH 计	瑞士 Mettler-Toledo 公司
细菌摇床	上海一恒科技有限公司
4℃、+20℃冰箱、4℃层析柜	海尔公司
微型涡旋震荡混合仪	美国 Scientific Industries 公司
凝胶成像分析系统	美国 BioRad 公司
紫外分光光度计	岛津公司
-80 摄氏度冰箱	Thermo 公司
荧光倒置显微镜	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司 OL YMPUS 公司
超滤管	Merck-millipore
透析袋	BIOSHARP
高压锅	日本 HIRAYAMA
制冰机	日本三洋
台式冷冻离心机	Eppendorf 公司
550 型酶标仪	美国 BioRad 公司

2.1.3 主要试剂

2.1.3.1 购买的主要试剂

表 2 购买的主要试剂

试剂名称	来源
蛋白 Marker	Thermo
上样缓冲液	Thermo
质粒小提试剂盒（DP103）	天根生化科技（北京）有限公司
抗 His 标签抗体	Proteintech
ECL 化学发光反应试剂	Tanon
DAPI 染色剂	碧云天
BCA 试剂盒	Thermo
LDH 检测试剂盒	碧云天

Sytox green 染色剂	Thermo+
一抗稀释液	碧云天
蛋白 Marker	Thermo

2.1.3.2 其他配制的试剂

1. 细菌培养相关试剂

(1) LB 液体培养基:

表 3 LB 培养基配方

各组分名称	加样量 (g) /L
胰蛋白胨	10
酵母提取物	5
NaCl	10

以配制 500mlLB 培养基为例,按上述称量量的一半将各组分依次加入 1L 的烧杯中,加入 400ml 左右的双蒸水,磁力搅拌器搅拌约 1 小时,直至所有固体物质溶解,溶液变成透明的淡黄色液体,然后将其定容到 500ml,高压灭菌并冷却后放入 4 摄氏度冰箱中备用。

(2) LB 平板培养皿制备:

- 1) 在配制液体 LB 培养基的过程中,再加入 15g/L 的琼脂糖粉,溶解并定容后拿去高压蒸汽锅高压灭菌。
- 2) 准备好无菌操作台,将培养皿的盖子打开并铺好整齐摆放在实验台上。
- 3) 从高压锅取出培养基后待其冷却至刚好不烫手的温度(也可冷却至室温再放入冰箱,下次使用前需要用微波炉加热融化),拿到无菌操作台,加入适宜种类和量的抗生素,混合均匀
- 4) 加入抗生素后,迅速将液体培养基依次倒入准备好的培养皿中,轻轻晃动培养皿,使其底部被完全覆盖,表面光滑,(注意:要在培养基冷却前迅速将其倒入所有的培养皿中),然后静待十分钟左右,等待其凝固。
- 5) 将凝固后的 LB 固体培养皿盖好盖子,用封口胶封好,放入 4℃ 冰箱备用。

2. SDS-PAGE 电泳相关试剂

(1) 蛋白胶的配制

先配分离胶,即下胶。本实验经过摸索后采用的分离胶浓度为 12%,按下表进行分离胶的配制:

表 4 蛋白下胶的配方

试剂名称	加入量 (ml)
H ₂ O	3.3
30% Acr-Bis (29:1)	4.0
1.5mol/L Tris.cl (pH 8.8)	2.5
10%SDS	0.1
10%AP	0.1
TEMED	0.004

注:按此配方表配制的胶的总体积为 10ml 左右,为两块分离胶的量。如果室内温度较高,可适当减少 TEMED 的加入量,相反,如果室内温度过低,则可适当增加 TEMED 的加入量。将上述所有试剂加入合适大小的烧杯后,用玻璃棒充分搅拌均匀,用 1ml 的移液枪将其注入到配胶槽中,注入量要控制在 5ml 左右。加完后再加入 1ml 左右的无水乙醇将胶的上端压平。静待 20min,等待下胶凝固。

下胶制备完成后,进行上胶(浓缩胶)配制:

表 5 蛋白上胶的配方

试剂名称	加入量 (ml)
H ₂ O	2
30% Acr-Bis (29:1)	0.5
1.5mol/L Tris.cl (pH 6.8)	0.5
10% SDS	0.04
10% AP	0.03
TEMED	0.004

将上表试剂按量依次加入烧杯中并充分混匀后,用移液枪缓慢平稳地加在下胶上,然后迅速插入样梳,防止有气泡的产生,约 30 分钟后其完全凝固后用湿布包好放入 4℃冰箱备用。

(2) 电泳缓冲液配制 (5X)

表 6 电泳缓冲液的配方

组分名称	加样量 g/L
Tris	15.1
Glycine	94
SDS	5.0

将上述固体加入烧杯充分溶解后,再用双蒸水定容,常温下备用。使用时用双蒸水将其稀释至所需浓度即可。

表 7 上样缓冲液配制

试剂名称	加样量
10% SDS	0.4ml
Tris HCl(6.8)	0.333ml
甘油	0.2ml
1% 溴酚蓝	10ul
β 巯基乙醇	100ul

加入上述试剂后定容至 1ml, -20℃ 保存备用。

3. WB 相关溶液配制

(1) 转膜液

10X 转膜液配制如下:

表 8 转膜液配方

试剂名称	加样量
甘氨酸	72.074g
Tris	15.14g
DDwater	400ml

加双蒸水定容至 500ml, 放置于 4 摄氏度冰箱保存。

使用时再将其稀释 10 倍: 10X 转膜液: 甲醇: DDwater = 2 : 3 : 15

(2) 洗膜液 TBS-T

Tris 12.1g、NaCl 40g 定容至 500ml 获得 10XTBS

TBST : TBS: 吐温=1000: 1

4. 分离纯化相关试剂

(1)

表 9 包涵体处理试剂

试剂名称	配制方法
------	------

菌体破碎缓冲液	20mM Tris, 5mM EDTA, pH 8.0
洗涤液 I	20mM Tris, 0.5% Triton X100, pH 8.0
洗涤液 II	20mM Tris, 2M Urea, pH 8.0
洗涤液 III	20mM Tris, 3M Urea, pH 8.0
包涵体溶解液	20mM Tris, 2mM DTT（现加现用），8M 尿素, PH 8.0

(2)

表 10 亲和层析使用试剂

试剂名称	配制方法
亲和层析上样缓冲液	20mM Tris, 5mM 咪唑, 500mM NaCl, pH 8.0
亲和层析洗脱液 I	20mM Tris, 20mM 咪唑, 500mM NaCl, pH 8.0
亲和层析洗脱液 II	20mM Tris, 50mM 咪唑, 500mM NaCl, pH 8.0
亲和层析洗脱液 III	20mM Tris, 100mM 咪唑, 500mM NaCl, pH 8.0
亲和层析洗脱液 IV	20mM Tris, 250mM 咪唑, 500mM NaCl, pH 8.0

2.2 方法

2.2.1 克隆表达载体的构建

鉴于现在生物科技迅猛发展,成果丰硕,在体外大规模合成目的基因的技术已十分成熟,我们决定将此部分工作托付给苏州金唯智生物科技有限公司完成,以便高效、快速地获得含目的基因片段的质粒载体,为后续实验的探索节约宝贵的时间。

本实验室提供:

- 1.目的基因序列信息:NCBI 参考序列编号 (NC_003366.1)
2. pET-28a 质粒,其序列信息如图 1 所示

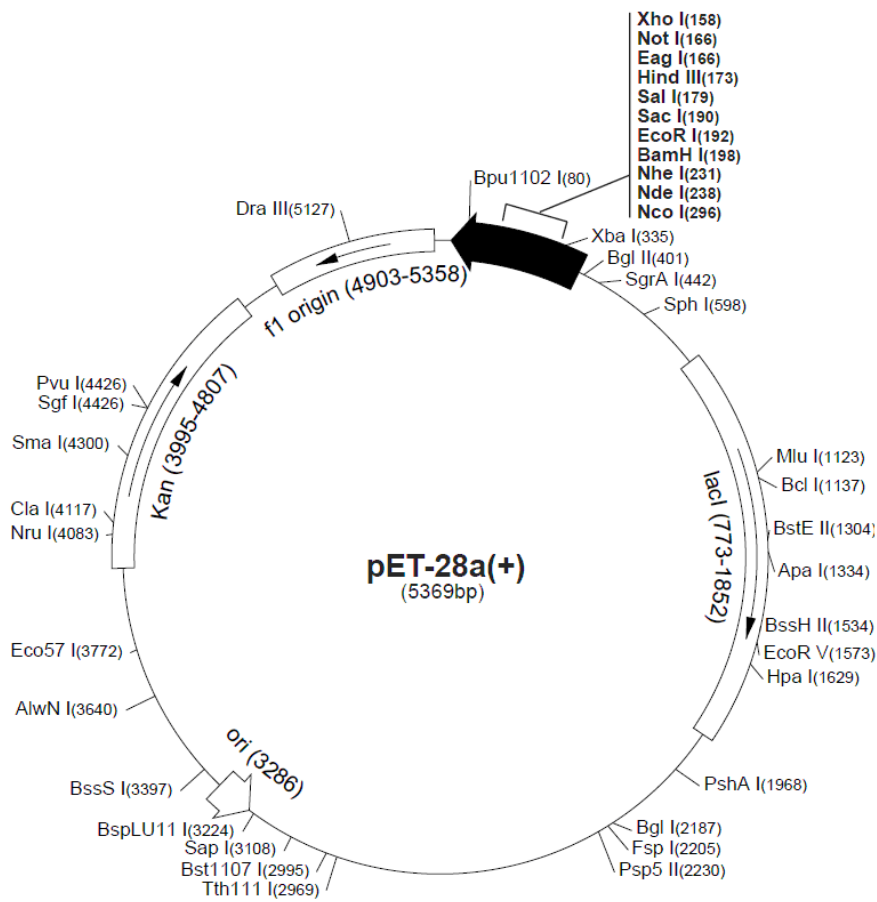


图 1

（此图为 pET-28a 环状质粒图谱,谱中标明了质粒上的酶切位点和转录、复制等元件）

我们要求该公司：

1. 根据目的基因序列信息合成目的基因
2. 将目的基因片段插入 pET-28a 质粒中，使其能够在适当条件下表达目的基因编码的蛋白。

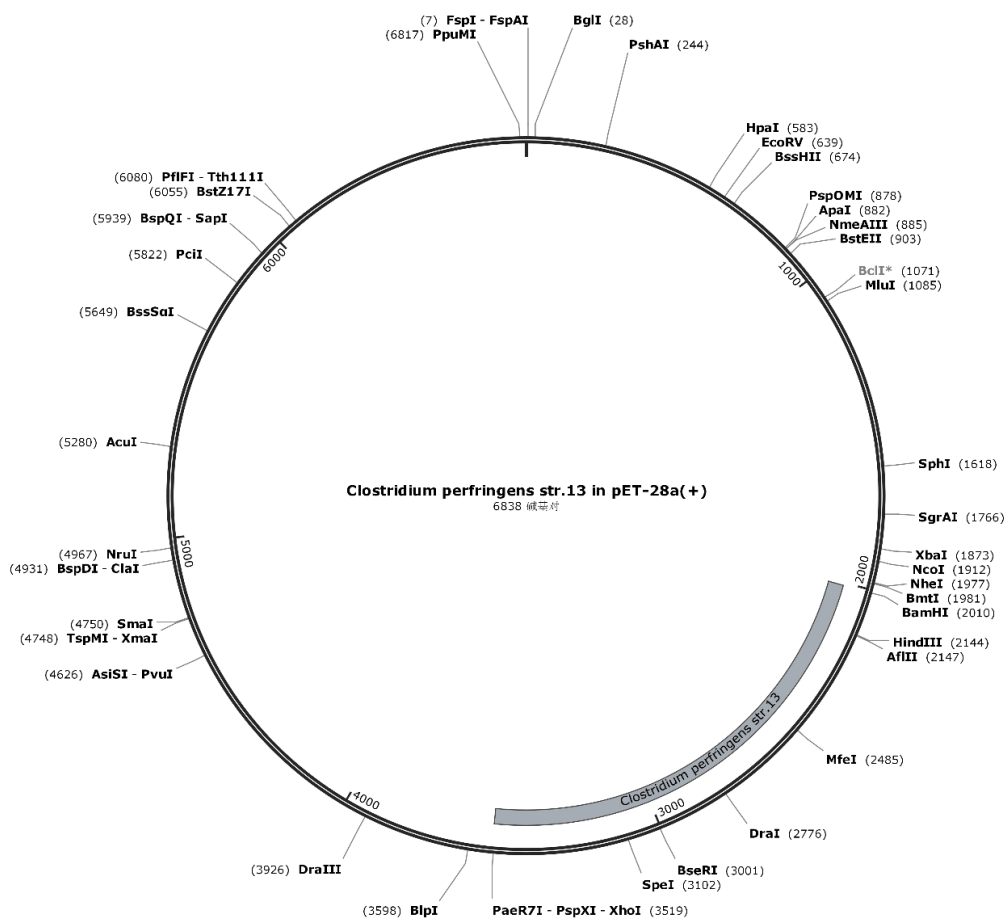


图 2

（图为 pET-28a 载体中插入基因片段后的示意图，长度为 1503bp 的目的基因在其两端分增加了 6bp 长度的 BamHI 限制酶切位点和 6bp 的 XhoI 限制酶切位点，故插入 pET-28a 的片段总长度为 1515bp）

最终我们获得了插入目的基因的 pET-28a 质粒载体和含有该质粒载体的穿刺菌。该质粒载体的序列信息如图 2 所示。

2.2.2 提取质粒与检验

由于从公司获得的质粒数量不是很多，为了防止出现转化时质粒浓度不够的情况，我们决定先将穿刺菌活化扩增，并从中提取质粒，这样做一方面可以获得足够数量的质粒，另一方面还可以通过核酸电泳检验穿刺菌所含质粒是否为含目的基因的质粒载体。具体操作方法如下：

1. 穿刺菌的活化与扩增

在无菌操作台中，取一个一次性接种环，轻轻插入穿刺管中，将蘸了菌的接种环在事先准备好的 LB 平板上划线，将 LB 平板置于 37℃ 恒温培养中培养，第二天从 LB 平板中生长的菌落中挑取一个单克隆接种到含有卡那霉素的 LB 液体培养基中，放在 37℃、220rpm 摇床中过夜培养。

2. 质粒的提取

质粒提取的操作严格按照操作说明书进行。

提取出质量后用微量核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度及 A260/A280 比值，以检验质粒提取的效果

3. 核酸电泳

配制琼脂糖浓度为 1%的核酸凝胶，用提取出来的质粒和已有的 PET-28a 质粒、公司寄送质粒作对比，观察电泳条带的位置，以判断从穿刺菌中提取的质粒是否为插入目的基因片段的克隆表达载体。

2.2.3 转化，诱导表达，电泳及 Western-blot

当确认了提取到的质粒即为插入了目的基因的质粒后，将质粒导入合适的表达菌中开始进行诱导表达。同时将空载的 PET-28a 质粒也导入表达菌中作为对照。此处表达菌选择常用的 BL21(DE3)感受态菌。诱导表达完成后对菌液进行电泳，随后转膜，敷上一抗（带荧光标记的抗 His 标签抗体），在扫描仪上观察是否有目的条带出现，以及目的条带的位置。

1. 转化

用热激法将上述提取的质粒导入 BL21(DE3)大肠杆菌中。

空载 pET-28a 质粒导入、公司寄送质粒导入，操作与上同。

2. 诱导表达

在无菌操作台中，选取一个大小和外观都适宜的单克隆，用一次性接种环转移至 3-5ml 盛有 LB 液体培养基的离心管中，37℃，220rpm 培养 8 个小时左右，即测量其 OD₆₀₀ 值=0.6 时，加入终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导剂，继续在 37℃条件下诱导约 4h，收样，开始进行下一步实验。（注：此处采用的诱导温度，诱导时间，IPTG 浓度是根据以往经验设定的，后续优化实验会进一步探索该蛋白表达的最佳实验条件）。

3. SDS-PAGE 电泳

- (1) 收样：将细菌离心 4000r,5min，再分别用双蒸水重悬，向对照组和实验组的菌液加入适量的蛋白 loading buffer，金属浴 100℃，10min，随后 12000rpm,离心 2min。
- (2) 将电泳装置装好之后开始上样，上样时注意取离心管上清，不要碰到离心管底部，上样量为：Marker 每孔 4ul，样品每孔 10ul。浓缩胶 80V、25min；分离胶 120V，120min。
- (3) 跑完胶后将胶取出放在干净的塑料盒中，倒入考马斯亮蓝染液，震荡机上缓慢震荡染色至少 2h，随后将染色液回收，倒入脱色液，缓慢震荡 2h 后弃掉脱色液，换用新的脱色液继续震荡直至蛋白条带清晰可见。
- (4) 将已有清晰条带的胶用扫描仪扫描，记录实验结果。

4. 超声破碎，Western-blot

- (1) 将菌液离心后用菌体破碎缓冲液重悬，放在冰块上，用小型超声机（振幅 45%，Cycle=0.3）破碎约 10 分钟左右，直至菌液由白色浑浊开始变得澄清透明。
- (2) 将超声后的菌体破碎液用 12000rpm,10min，4℃离心，将上清和沉淀（包涵体）分开。
- (3) 对照组大肠杆菌离心处理后，同样用菌体破碎缓冲液重悬。
- (4) 向对照组和实验组的上清和包涵体的缓冲液加入适量的蛋白 loading buffer，金属浴 100℃，10min，随后 12000rpm,离心 2min。
- (5) 将电泳装置装好之后开始上样，上样时注意取离心管上清，不要碰到离心管底部，上样量为：Marker 孔 4ul，样品每孔 10ul。电泳参数设置：上胶 80V、25min；下胶 120V，120min。电泳完后将上胶切去，只留下下胶进行转膜。
- (6) 转膜：将 PVDF 膜放在 CH₃OH 溶液中浸泡 6min，使其活化为易吸附蛋白的状态，在转膜夹中按照转膜方向将转膜所需的各物品放好，电泳槽中加满转膜液，在恒流 200mA，120min 且冰浴条件下将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上。
- (7) 封闭：用 5g 脱脂奶粉/100mlTBST 溶液作为封闭液。转膜完毕后，将 PVDF 膜移至封闭液中，在室温条件下缓慢震荡 2 小时或层析柜中 4℃过夜。
- (8) 一抗孵育：先用抗体稀释液将一抗稀释至所需的工作浓度，加入 PVDF 膜中，缓慢震荡 2 小时或在层析柜中 4℃低温过夜。
- (9) 显影：配置好发光液，扫描时滴在 PVDF 膜上，观察目的条带的位置并记录实验结果。

保菌操作：确定转化成功，即 WB 显示有目的条带的时候，需要将空载菌和转入克隆表达载体的菌进行保菌操作，以确保后续实验能够顺利进行。具体操作为：向冻存管中加入 20% 的甘油，80% 的转化菌液，总体积为 1ml，放入 -20℃ 冰箱保存备用。

2.2.4 优化实验条件

在做完上述 WB 实验，确定 PFO 的表达形式后，开始做优化蛋白表达的实验，以探究让 PFO 获得最大表达量的实验条件，为次本实验设置了四个个实验变量：诱导时间、诱导温度，加入诱导物的浓度，加入诱导物的时间点，采用控制变量法来探索这四个条件的最佳数值，实验设计如下：

1. 探究最佳诱导时间

固定诱导温度为 37℃，IPTG 浓度为 1mM，加入诱导物的时间点为 OD600=0.6 时，诱导时间确定为：3.5、4、4.5、5、5.5、6 小时。将各组菌液与对照组（空载）菌液一起电泳，观察其表达量，以得出最佳诱导时间。

2. 探究最佳诱导温度

固定诱导时间为最佳诱导时间，IPTG 浓度为 1mM，加入诱导物的时间点为 OD600=0.6 时，诱导温度设定为：18、25、37、43（摄氏度）。将各组菌液与对照组（空载）菌液一起电泳，观察其表达量，以得出最佳诱导温度。

3. 探究最佳诱导物浓度

固定诱导时间为最佳诱导时间，诱导温度为最佳诱导温度，加入诱导物的时间点为 OD600=0.6 时，诱导物 IPTG 浓度设定为：0.1mM,0.5mM,1mM,1.5mM。将各组菌液与对照组（空载）菌液一起电泳，观察其表达量，以得出最佳诱导浓度。

4. 探究最佳诱导时间点

固定诱导时间为最佳诱导时间，诱导温度为最佳诱导温度，IPTG 浓度为最佳浓度。诱导时间点设定为：OD600=0.5, 0.6, 0.7, 0.8 将各组菌液与对照组（空载）菌液一起电泳，观察其表达量，以得出最佳诱导温度。

2.2.5 大量表达与分离纯化

由于已经确定了最佳诱导时间、诱导温度，加入诱导物的浓度，加入诱导物的时间点，后续便开始进行大量表达和分离纯化操作。

1. 大量表达

大量表达在这里指培养细菌的菌液至少在 1L 以上，以便使提取出的蛋白质能够用于生物功能分析。操作与普通表达类似，只不过是普通表达时摇菌的离心管换成 1L 的锥形瓶。此处以操作 1L 菌为例

2. 包涵体变性溶解

- (1) 将菌液离心并弃上清，将所得到的细菌用菌体破碎液重悬，放入冰块中，随后进行超声破碎，超声破碎仪的设置如下：变幅杆 6，工程 1，功率为 40%，工作时间为 30min，超声开时间 6.0s，超声关时间 9.0s，报警温度 25℃。
- (2) 超声完后将所得液体 12000rpm,10min,4℃ 离心，将上清保存在 4℃ 冰箱中，沉淀（即包涵体）继续进行下一步操作
- (3) 将包涵体洗涤，溶解，过滤

3. 过亲和层析柱

由于蛋白表达载体上有 6XHis 标签，故可以利用 Ni 柱与组氨酸结合的特性将包涵体溶解液中带组氨酸标签的蛋白吸附在柱子上，再用洗脱液将蛋白洗脱下来。最后进行 WB 鉴定。亲和层析过程如下（峰形图见下）：

- (1) 处理 Ni 亲和层析柱，水冲洗 20ml，亲和层析洗脱液冲洗 10ml，亲和层析上样缓冲液平衡 50mL。

- (2) 加入样品，此时注意放慢样品通过柱体系的速度，注意观察亲和层析仪上峰型，及时收集流穿峰。（注：收集的每管液体应该做好标记，下同）
- (3) 待样品上样完成后，及时将取样器放入上样缓冲液中，注意绝对不能使柱体系进入空气，该过程若有峰型，也应当收集。
- (4) 待波形平稳时开始上洗脱液，依次为洗脱液 1、2、3、4，有峰型时注意即刻收集蛋白。
- (5) 亲和层析完成后，用纯水冲洗柱体系，灌上 20%乙醇溶液，关闭仪器

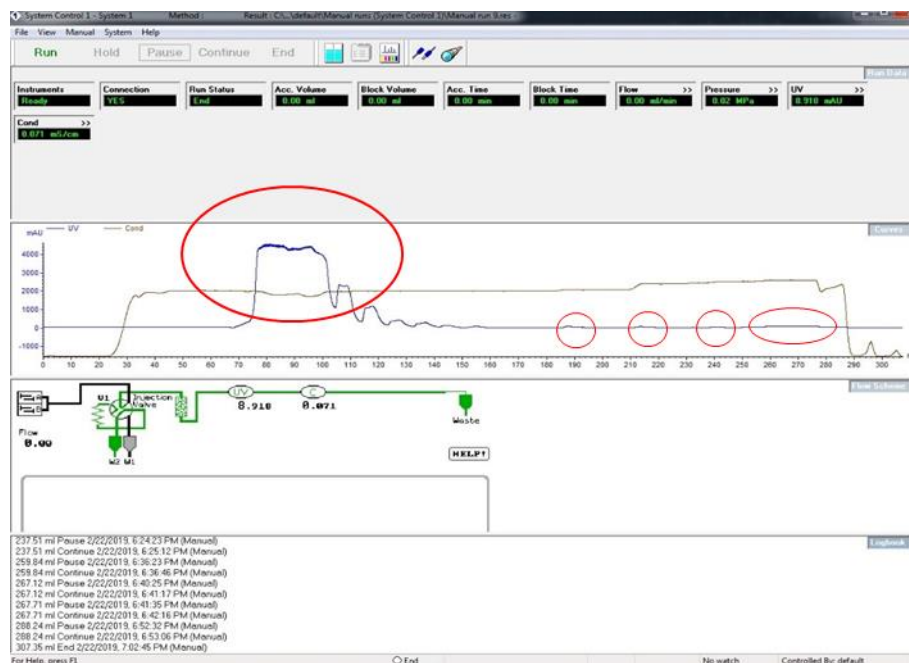


图 3 亲和层析峰形图

（此图反映的是用镍柱进行亲和层析的峰型图，左边大而多的峰为流穿峰，右边非常小的四个峰依次是用咪唑浓度从低到高的洗脱液进行洗脱的洗脱峰，洗脱液中咪唑的浓度分别为 20mM、50mM、100mM、250mM）

4. 样品检验

将亲和层析过程中收集到的液体进行 WB 实验，以确定目标蛋白在哪个收集液体中，WB 的操作流程与上同。

2.2.6 包涵体复性与蛋白质浓缩

1. 包涵体复性

在 WB 实验确定 PFO 在哪一管收集液中后，对该管蛋白进行包涵体复性操作，主要目的为去除尿素，使包涵体蛋白恢复正常的空间构象。受实验条件限制，复性操作在这里采用透析的方法。具体操作如下：

- (1) 根据 PFO 的分子质量选择分子截留量大小适合的透析袋，对透析袋进行预处理（按说明书操作进行）
- (2) 准备好需要和收集管中液体进行置换的液体，此处选择 PBS 缓冲液，因为后续需要做细胞实验。
- (3) 将透析袋的一端用橡皮筋绑紧，倒入需要透析的收集管中的液体，将另一端也绑紧，悬挂在玻璃棒上。将透析袋放入装有 PBS 缓冲液的烧杯中，使其浸没在 PBS 液体中。
- (4) 烧杯底部放入搅拌子，在 4℃ 层析柜中搅拌过夜。

2. 蛋白质浓缩

透析过后通常会导致溶液体积增大，蛋白质浓度降低。因此需要对透析过后的收集液进行浓缩。本实验采用离心超滤管对蛋白质溶液进行浓缩，操作方法如下：

- (1) 依据 PFO 的特性和蛋白质溶液的体积购买合适大小和截留分子量的离心超滤管，加入足量超纯水，在冰箱中预冷
- (2) 将蛋白溶液倒入超滤管中，不要超过超滤管的最大体积（本实验中为 4ml），4 摄氏度 4000rpm，离心 15-20 分钟，当管中只剩下约 1ml 左右的液体时，浓缩完成。
- (3) 用一个干净的枪头将超滤管中的液体吸出，转移至另一个干净的离心管中。
- (4) 重复上述操作，直至所有需要浓缩的蛋白溶液全部浓缩完毕。
- (5) 将超滤管用纯水洗涤，灌注浓度为 20% 的酒精，放入 4℃ 冰箱备用。

3. BCA 试剂盒测蛋白浓度

研究过程中，我们采用 BCA 试剂盒快速准确地测出了目标蛋白浓度。其过程简介如下：

- (1) 计算并配制好工作液
- (2) 配制好不同浓度的 BSA 溶液的标准品，和所需测量蛋白加入到 96 孔板的两排孔中，每孔加入的总体积相同（25ul），不够的用 DDwater 来补。
- (3) 上述每孔加入 200ul 的工作液，将九十六孔板放入三十七摄氏度恒温箱中半小时。
- (4) 取出 96 孔板，用酶标仪读出每孔 OD562 数值，绘制标准曲线，计算 PFO 溶液浓度。

2.2.7 PFO 蛋白质生物活性的测定（部分实验已完成）

通过前面所述的纯化，浓缩方法获得足够浓度和纯度的蛋白质后，进入到整个实验的最后一个环节，也就是对蛋白质的活性进行检验，这是整个实验成功与否的关键。根据已有文献资料和 PFO 蛋白自身特性，我们决定使用三种方法对 PFO 蛋白的活性进行检测，即对 PFO 蛋白处理过的细胞进行 DAPI 染色、LDH 检测、Sytox Green 染色。具体操作如下：

1. DAPI 染色（已完成）

- (1) 将实验用到的细胞 96 孔板铺板准备，细胞数量大约为每孔 3000 个，这里使用的细胞为 293T 细胞，是一种实验室常用的人肾上皮细胞，PFO 蛋白理论上能与其发生作用。
- (2) 将 PFO 蛋白加入到各孔中，注意设置对照组和蛋白的不同浓度梯度。
- (3) 将 DAPI 染色液用 PBS 缓冲液稀释一定倍数，加入 96 孔板的细胞孔中，使其最终的工作浓度为 100ng/ml。
- (4) 染完色后立即将细胞荧光显微镜观察细胞的染色情况，记录实验结果。

2. LDH 检测（未完成）

- (1) 提前一个晚上根据实验需要将细胞铺板，铺板的数量不宜过多也不宜过少，大约为每孔 3000-5000 个细胞左右。
- (2) 吸去培养液，用 PBS 液洗涤一次，设置好各实验组和对照组。
- (3) 到达预定时间后，取各孔的上清液进行 LDH 活性测定。

样品测定：

- 1) 各孔分别加入 0.06ml LDH 检测工作液。
- 2) 避光孵育约半小时。然后测定吸光度值。
- 3) 计算（注意各组吸光度值-本底值），并记录实验结果。

3. SYTOX Green 核酸染色（未完成）

SYTOX Green 绿色染色剂能够透过死细胞膜，与核酸结合后其荧光强度会增加数百倍。

在此实验中能够快速准确反映出 PFO 蛋白的生物活性。其具体操作如下：

- (1) 提前一个晚上将 293T 细胞接种到 96 孔板中，使待检测时细胞密度适当。
- (2) 吸去培养液，并用生理盐水将细胞洗涤一次，加入 PFO 蛋白溶液进行处理，设置好对照组和实验组各浓度梯度。
- (3) 将购买的 SYTOX Green 试剂用生理盐水稀释 100 倍，加入到各孔中，染色 5min 即可。
- (4) 检测：在荧光显微镜下观察各组细胞染色情况并记录实验结果。

3 结果与分析

3.1 第一次表达后的电泳结果

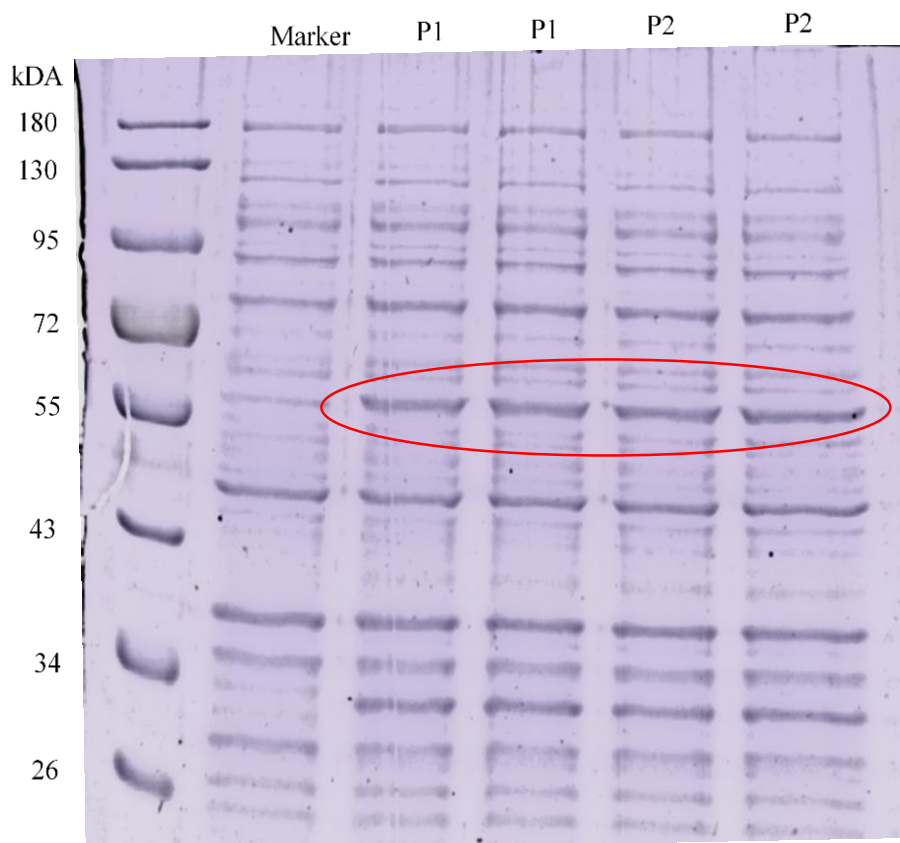


图 4

（从左至右依次为蛋白 Marker,空载菌, 导入公司寄送质粒的菌 P1, 导入自提质粒的菌 P2;样品制备: 取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬, 取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合, 100℃金属浴下加热 10min, 随后 12000rpm 离心 2min, 取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul, 菌液 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。图中红色椭圆形区域为目的条带所在区域）

分析: 由电泳结果可知, 在目的条带位置 (PFO 分子量为 55699), 空载菌没有表达条带, 而在转化了克隆载体的大肠杆菌中出现了表达条带, 说明 PFO 在 BL21(DE3)菌中是有表达的, 至于其表达的是否为 PFO 蛋白, 结果需要进一步验证。

3.2 Western-Blot 结果

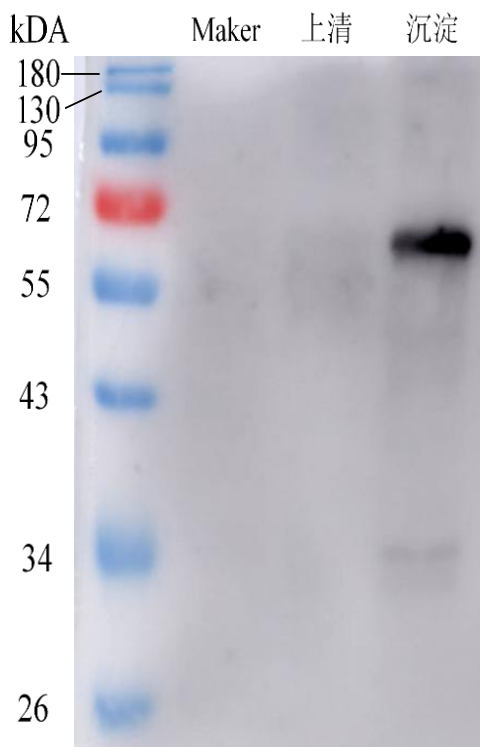


图 5

（从左至右上样顺序为：蛋白 Marker、空载菌、超声上清、超声沉淀。样品制备：取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬,取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合,100℃金属浴下加热 10min,随后 12000rpm 离心 2min,取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul,菌液,超声上清,超声沉淀各 10ul。）

分析：此实验结果进一步验证了电泳结果的推断，即出现在 55-72kDA 之间的条带基本确定是目的条带，因为只有目的条带上才带有组氨酸标签与一抗结合；同时，目的条带出现在加样为超声沉淀的那一列中，在一定程度上可以证明该蛋白是以包涵体的形式进行表达的。

3.3 优化实验结果

3.3.1 最佳诱导时间的探究

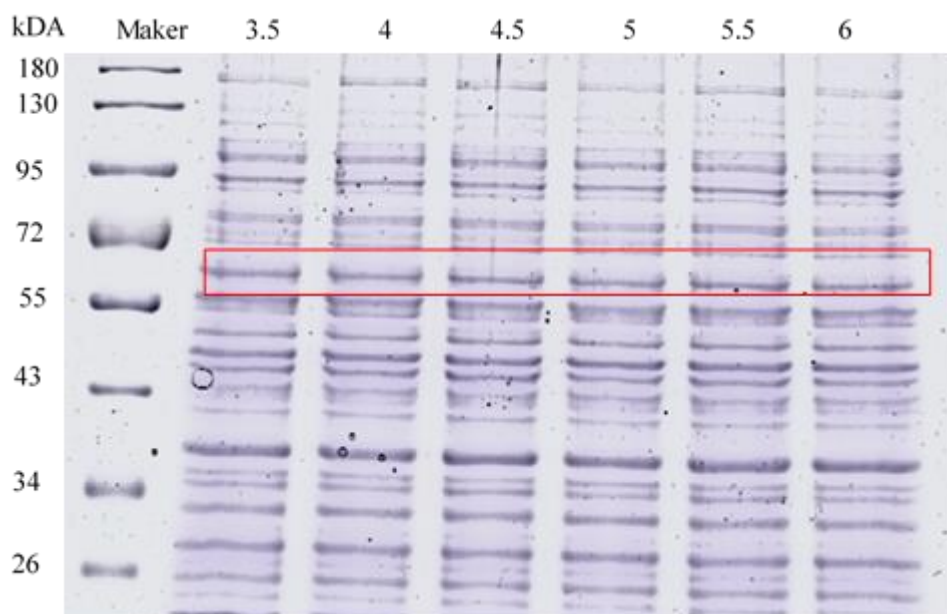


图 6

（上图从左至右加入菌液诱导的时间分别为 3.5、4、4.5、5、5.5、6h。样品制备：取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬,取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合,100 \square 金属浴下加热 10min,随后 12000rpm 离心 2min,取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul,各组菌液各 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。）

分析：在目的条带位置观察不到有明显区别,可以认为,在一定时间范围内,诱导时间对白表达量的影响不大,为了节约实验时间,在后续实验中我们都将诱导时间定为 4h。

3.3.2 最佳诱导温度的探究

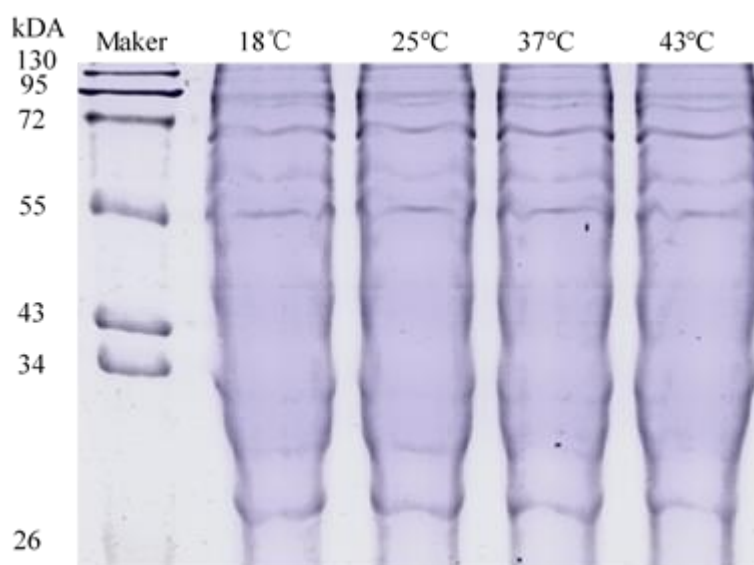


图 7

（从左至右加入菌液的诱导温度为 18℃、25℃、37℃、43℃。样品制备：取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬, 取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合, 100℃金属浴下加热 10min, 随后 12000rpm 离心 2min, 取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul,各组菌液各 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。）

分析: 根据目的条带的大小和颜色深浅基本可以估测 PFO 的表达量。由实验结果可知, 在 25℃时, PFO 的表达量最大。

3.3.4 最佳诱导物浓度的探究

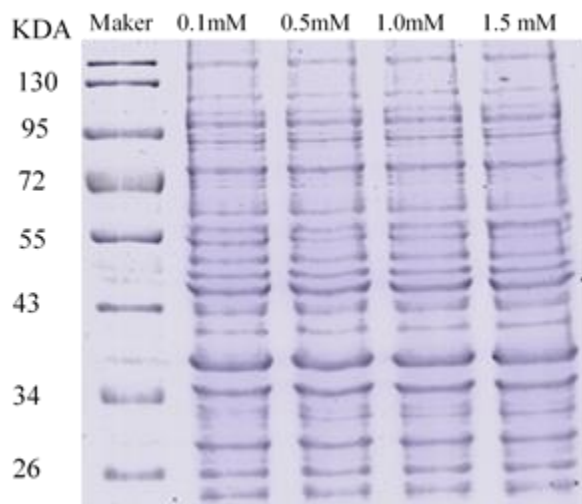


图 8

（从左至右菌液加入的 IPTG 浓度为 0.1, 0.5, 1, 1.5mM。样品制备：取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬, 取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合, 100℃金属浴下加热 10min, 随后 12000rpm 离心 2min, 取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul,各组菌液各 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。）

分析: 根据目的条带的大小和颜色深浅基本可以估测 PFO 的表达量。由实验结果可知, 在 IPTG 浓度为 1.5mM 时, PFO 的表达量最大。

3.3.5 最佳诱导时间点的探究

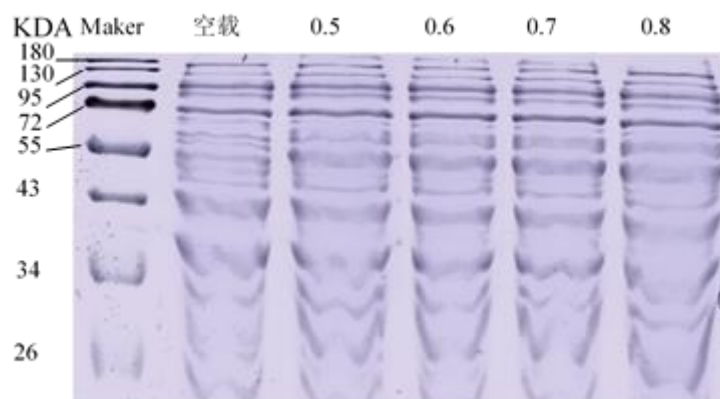


图 9

（从左至右的菌液是在 OD600 的值依次为 0.5、0.6、0.7、0.8 加入 IPTG 诱导的, 空载菌是在 OD600=0.6 时进行诱导的。样品制备：取 1ml 菌液 4000rpm,10min 离心,用 100ul 菌体破碎缓冲液重悬, 取 40ul 菌液与 10ul5X 的 Loading Buffer 充分混合, 100℃金属浴下加热 10min, 随后 12000rpm 离心 2min, 取上层液体进行上样;上样量为: Maker 4ul,各组菌液各 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。）

分析：根据目的条带的大小和颜色深浅基本可以估测 PFO 的表达量。由实验结果可知，在 OD600 的值为 0.8 时加入诱导物，PFO 的表达量最大。

根据上述四组数据，我们基本上确定了 PFO 蛋白表达的最优条件，即在 OD600=0.8 时，加入终浓度为 1.5mM IPTG 时，PFO 蛋白表达能获得最大量。

3.4 亲和层析效果检验

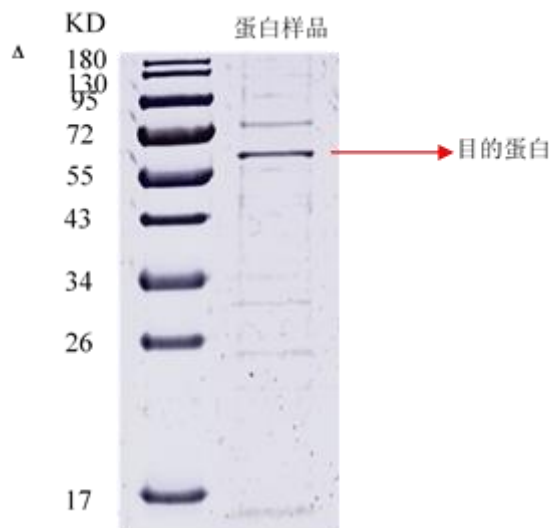


图 10

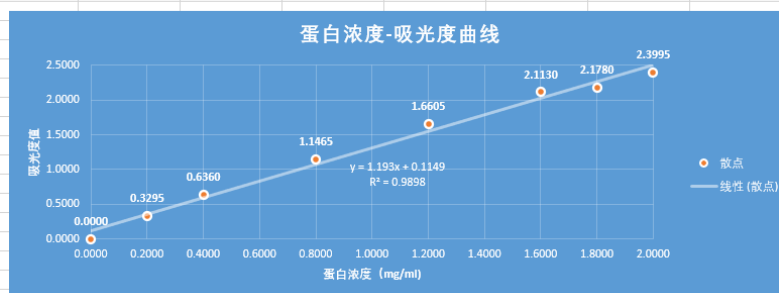
（样品制备：取浓缩后的蛋白溶液 10ul+20ulPBS 溶液+7.5ul Loading Buffer 混合，100℃金属浴下加热 10min，随后 12000rpm 离心 2min，取上层液体进行上样；上样量为：Marker 4ul,蛋白样品 10ul。随后进行考马斯亮蓝染色。）

分析：亲和层析的目的是将带 His 标签的 PFO 从包涵体溶解液中分离出来，以达到纯化 PFO 的效果。因此在做完亲和层析和 WB 检测后，将含 PFO 的收集液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳可以初步评估蛋白溶液中 PFO 的纯度。上图结果说明：即便溶液中含有少量杂质，PFO 的纯度也十分可观，基本符合我们的实验预期。

3.5 BCA 试剂盒检测蛋白浓度实验结果

表 11 蛋白浓度的测量值

BCA试剂盒测蛋白浓度实验数据									
	空白对照组	对照组1	对照组2	对照组3	对照组4	对照组5	对照组6	对照组7	PFO蛋白组
第一次测量吸光度值	0.1370	0.4690	0.7400	1.2910	1.6220	2.2270	2.3380	2.5270	0.3650
第二次测量吸光度值	0.1370	0.4640	0.8060	1.2760	1.9730	2.2730	2.2920	2.5460	0.3840
两次测量平均值	0.1370	0.4665	0.7730	1.2835	1.7975	2.2500	2.3150	2.5365	0.3745
每组平均值-空白组平均值	0.0000	0.3295	0.6360	1.1465	1.6605	2.1130	2.1780	2.3995	0.2375
蛋白浓度 (mg/ml)	0.0000	0.2000	0.4000	0.8000	1.2000	1.6000	1.8000	2.0000	待测值



分析：根据实验数据计算得：所得蛋白浓度为 0.1028mg/ml，这已经远远超过了其工作浓度（10ug/ml），说明用超滤管浓缩蛋白取得了一定效果。

3.6 生物活性测定结果

3.6.1 DAPI 染色实验（已完成）

对照组细胞和经 PFO 蛋白处理过的细胞的 DAPI 染色结果如下所示



图 12



图 12

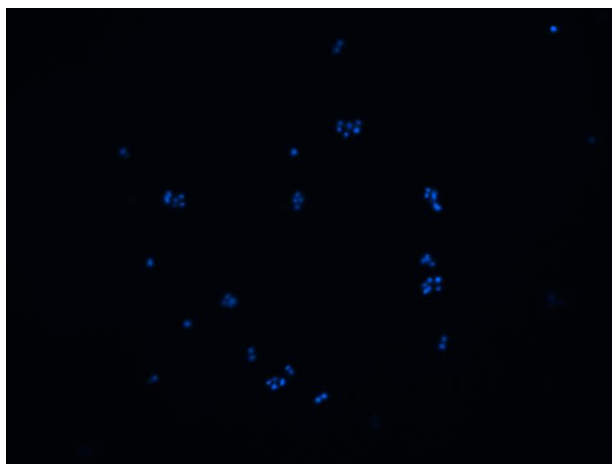


图 14

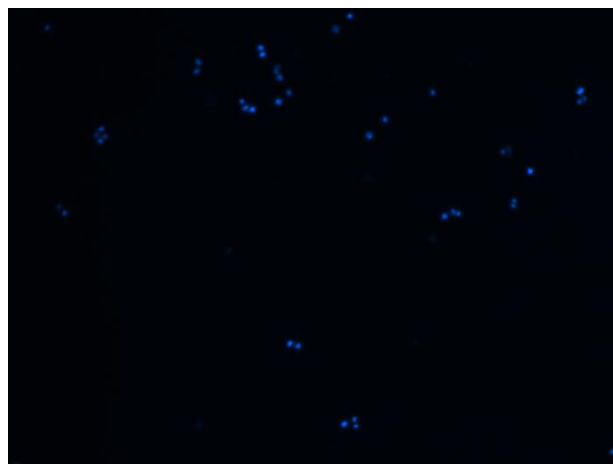


图 14

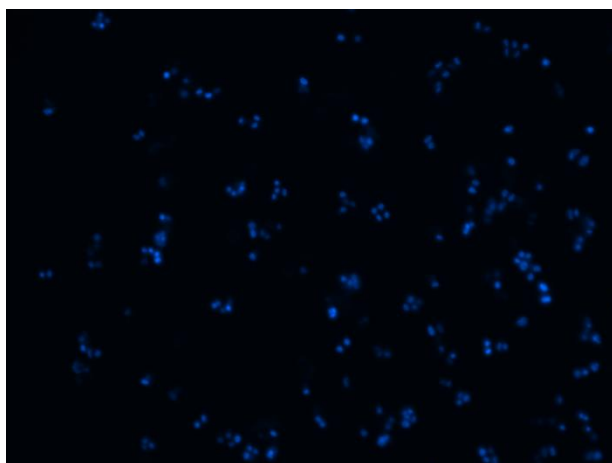


图 16

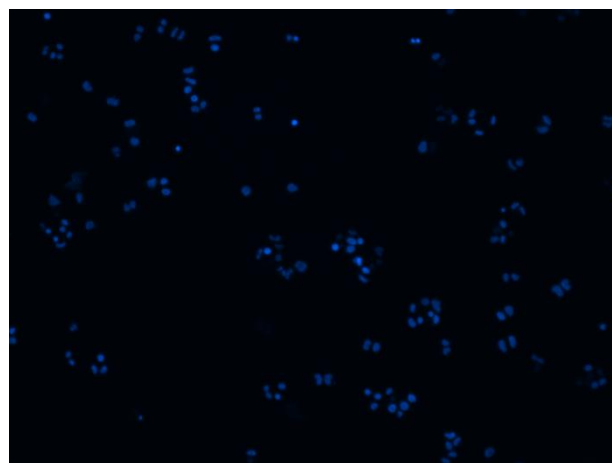


图 16

（先用 PBS 缓冲液配制好不同浓度的蛋白溶液，高浓度组为 35ug/ml,低浓度组为 8.75ug/ml。将孵育 293T 细胞的 96 孔板从孵箱取出后吸去培养基，设置好分组，每组 3 个复孔，每孔加入 50ul 相应浓度的蛋白质溶液，第一组为对照组，只加入等量 PBS 缓冲液，常温下孵育 30min；将配制好的终浓度为 10ug/ml 的 DAPI 染液加入各孔中，5min 后在荧光显微镜下观察，记录并保存实验结果）

分析：图 11、图 12 为对照组细胞染色情况，图 14、图 13 为低浓度处理组，图 16 图 15 为高浓度处理组。由实验结果可以看出，高浓度处理组的染色深度>低浓度处理组的染色深度>对照组的染色深度，这极有可能是 PFO 蛋白显示出了生物活性，在细胞膜上形成孔洞，使 DAPI 染料快速进入了细胞，与 DNA 小沟处的 AT 碱基对结合，使荧光强度扩大了 20 倍，从而使被染色的核酸清晰可见。当然，光凭此实验结果并不能有力地证明 PFO 的生物活性，需要靠后续实验进一步分析确定。

3.6.2 LDH 检测实验（未完成）

PFO 蛋白的成孔毒性会造成乳酸脱氢酶的释放，这早已是学术界的共识，因此通过检测 LDH 活性来评估 PFO 蛋白的生物活性在理论上是完全可行的。

预测实验结果：在相同的实验处理条件下，实验组细胞上清的 LDH 活性应该会明显强于对照组，且实验组中随着 PFO 处理的浓度越高，其检测到的 LDH 活性应该越强。

3.6.3 SYTOX Green 染色实验（未完成）

SYTOX Green 是一种能够透过死细胞膜但不能透过活细胞膜的 DNA 染料，当其与细胞内的 DNA 结合时，会发出明显的绿色荧光。由于 SYTOX Green 只能穿透死细胞，相比于 DAPI（既能透过活细胞膜又能透过死细胞膜）是一种更加出色的荧光染料，在本实验中 SYTOX Green 染色的实验结果更能准确地验证 PFO 蛋白的生物活性。

预测实验结果：在相同的实验处理条件下，对照组的细胞几乎不显示绿色荧光，实验组会有强烈的绿色荧光显示，且实验组中 PFO 蛋白浓度越高，其所显示出的荧光越强烈。

结 论

产气荚膜梭菌溶素 O (PFO) 在自然状态下是由 A 型产气荚膜梭菌产生的一类胆固醇依赖性溶细胞素 (CDC)，近些年来在生物医学领域得到了越来越广泛的应用。一方面，由于产气荚膜梭菌对人类身体健康、食品安全、畜牧业生产带来极大危害^[25,26]，人们努力探究 PFO 等毒素在气性坏疽和坏死性肠炎等疾病中的致病机制^[27]，同时积极寻找药物用于这些疾病的治疗^[28]；另一方面，PFO 被广泛应用于生物学实验，近些年来，科学家利用 PFO 的生物特性，开创性地将其用于细胞胆固醇分布和调控、炎性小体、药物载体、人类精子生理学等方面的研究，取得了许多重大科研成果^[29-34]。

鉴于 PFO 在生物学实验室有重大研究价值和实用意义，PFO 蛋白的表达和分离纯化也就成了一项十分重要的工作。在此项研究中，我们开创性地 PFO 基因插入 PET-28a 表达载体，并导入表达菌 BL21(DE3)中进行表达，通过大量的优化实验，我们获得了该体系中 PFO 蛋白表达的最适条件，即在 OD₆₀₀=0.8 时加入终浓度为 1.5mM 的 IPTG，在 25℃ 条件下诱导 4h 即可获得该体系下最大的蛋白表达量。虽然本研究并没有全部顺利完成，产物的生物活性有待进一步证实，却也取得了阶段性的成果，在一定程度上有了实质性进展，我们希望这项研究能够促使该领域的学者们展开更深入的探索，使 PFO 蛋白能够被更加广泛地应用到生物医学领域中，促进科研发展，增进人类福祉。

参考文献

- [1] Muhammad Israr, Lv Guoping, Xu Shujing, et al. Biochemical characterization and mutational analysis of alanine racemase from *Clostridium perfringens*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 149-155.
- [2] J-G Songer. Clostridial enteric diseases of domestic animals[J]. *Clinical microbiology reviews*, 1996, 9(2): 216-234.
- [3] Stefanie Verherstraeten, Goossens Evy, Valgaeren Bonnie, et al. Perfringolysin O: The Underrated *Clostridium perfringens* Toxin?[J]. *Toxins*, 2015, 7(5): 1702-1721.
- [4] F-A Uzal, Vidal J-E, McClane B-A, et al. *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases[J]. *The open toxinology journal*, 2010, 224-42.
- [5] M-M Awad, Ellemor D-M, Boyd R-L, et al. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene[J]. *Infection and immunity*, 2001, 69(12): 7904-7910.
- [6] Stefanie Verherstraeten, Goossens Evy, Valgaeren Bonnie, et al. The synergistic necrohemorrhagic action of *Clostridium perfringens* perfringolysin and alpha toxin in the bovine intestine and against bovine endothelial cells[J]. *Veterinary research*, 2013, 44(1): 45.
- [7] 张辉, 包红朵. 产气荚膜梭菌耐药及防控研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(06): 1846-1851.
- [8] R-K Tweten. Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin[J]. *Infection and immunity*, 1988, 56(12): 3235-3240.
- [9] Alejandro-P Heuck, Savva Christos-G, Holzenburg Andreas, et al. Conformational Changes That Effect Oligomerization and Initiate Pore Formation Are Triggered throughout Perfringolysin O upon Binding to Cholesterol[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(31): 22629-22637.
- [10] Sergey-N Savinov, Heuck Alejandro-P. Interaction of Cholesterol with Perfringolysin O: What Have We Learned from Functional Analysis?[J]. *Toxins*, 2017, 9(12): 381.
- [11] Alejandro-P Heuck, Moe Paul-C, Johnson Benjamin-B. *The Cholesterol-Dependent Cytolysin Family of Gram-Positive Bacterial Toxins*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010: 551-577.
- [12] Benjamin-B Johnson, Heuck Alejandro-P. Perfringolysin O structure and mechanism of pore formation as a paradigm for cholesterol-dependent cytolysins[J]. *Sub-cellular biochemistry*, 2014, 8063-81.
- [13] Eileen-M Hotze, Tweten Rodney-K. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1818(4): 1028-1038.
- [14] R-K Tweten. Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin[J]. *Infection and immunity*, 1988, 56(12): 3235-3240.
- [15] Alexandra-S Solovyova, Nöllmann Marcelo, Mitchell Timothy-J, et al. The solution structure and oligomerization behavior of two bacterial toxins: pneumolysin and perfringolysin O[J]. *Biophysical journal*, 2004, 87(1): 540-552.
- [16] Jamie Rossjohn, Feil Susanne-C, McKinstry William-J, et al. Structure of a Cholesterol-Binding, Thiol-Activated Cytolysin and a Model of Its Membrane Form[J]. *Cell*, 1997, 89(5): 685-692.
- [17] Rajesh Ramachandran, Heuck Alejandro-P, Tweten Rodney-K, et al. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin[J]. *Nature Structural Biology*, 2002, 9(11): 823-827.
- [18] Sergey-N Savinov, Heuck Alejandro-P. Interaction of Cholesterol with Perfringolysin O: What Have We Learned from Functional Analysis?[J]. *Toxins*, 2017, 9(12): 381.

- [19] Cláudia Brito, Cabanes Didier, Sarmiento Mesquita Francisco, et al. Mechanisms protecting host cells against bacterial pore-forming toxins[J]. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2019, 76(7): 1319-1339.
- [20] Qingqing Lin, Wang Tong, Li Huilin, et al. Decreasing Transmembrane Segment Length Greatly Decreases Perfringolysin O Pore Size[J]. The Journal of Membrane Biology, 2015, 248(3): 517-527.
- [21] Rodney-K Tweten. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins[J]. Infection and immunity, 2005, 73(10): 6199-6209.
- [22] Eileen-M Hotze, Tweten Rodney-K. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex[J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1818(4): 1028-1038.
- [23] R-K Tweten. Cloning and expression in Escherichia coli of the perfringolysin O (theta-toxin) gene from Clostridium perfringens and characterization of the gene product[J]. Infection and immunity, 1988, 56(12): 3228-3234.
- [24] R-K Tweten. Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta-toxin) from Clostridium perfringens: significant homology with the genes for streptolysin O and pneumolysin[J]. Infection and immunity, 1988, 56(12): 3235-3240.
- [25] 王亚炜, 孙智勇, 徐振明, 等. 部队训练伤致产气荚膜梭菌感染 1 例[J]. 西北国防医学杂志, 2020, 41(01): 47-49.
- [26] 张玲. 产气荚膜梭菌微生物学质控考核分析[J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 35(01): 92-94.
- [27] Cláudia Brito, Mesquita Francisco-S, Bleck Christopher-K-E, et al. Perfringolysin O-Induced Plasma Membrane Pores Trigger Actomyosin Remodeling and Endoplasmic Reticulum Redistribution[J]. Toxins, 2019, 11(7): 419.
- [28] Shui Liu, Yang Xiaofeng, Zhang Hong, et al. Amentoflavone Attenuates Clostridium perfringens Gas Gangrene by Targeting Alpha-Toxin and Perfringolysin O[J]. Frontiers in pharmacology, 2020, 11179.
- [29] Kiyonobu Yamamura, Ashida Hiroshi, Okano Tokuju, et al. Inflammasome Activation Induced by Perfringolysin O of Clostridium perfringens and Its Involvement in the Progression of Gas Gangrene[J]. Frontiers in microbiology, 2019, 102406.
- [30] Masashi Maekawa. Domain 4 (D4) of Perfringolysin O to Visualize Cholesterol in Cellular Membranes-The Update[J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2017, 17(3): 504.
- [31] Benjamin-B Johnson, Breña Mariana, Anguita Juan, et al. Mechanistic Insights into the Cholesterol-dependent Binding of Perfringolysin O-based Probes and Cell Membranes[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 13793.
- [32] Cristián-A Pocognoni, De Blas Gerardo-A, Heuck Alejandro-P, et al. Perfringolysin O as a useful tool to study human sperm physiology[J]. Fertility and Sterility, 2013, 99(1): 99-106.
- [33] Takuma Kishimoto, Tomishige Nario, Murate Motohide, et al. Cholesterol asymmetry at the tip of filopodia during cell adhesion[J]. The FASEB Journal, 2020, 34(5): 6185-6197.
- [34] Léa-P Wilhelm, Voilquin Laetitia, Kobayashi Toshihide, et al. Intracellular and Plasma Membrane Cholesterol Labeling and Quantification Using Filipin and GFP-D4. New York, NY: Springer New York, 2019: 137-152.

致 谢

本篇毕业课题设计虽然原理十分简单，但是却凝聚了许多人的心血，中间经历了无数次的挫折和失败才能取得现阶段的研究成果。论文得以顺利完成，要感谢的人实在太多了，首先我要感谢我的指导老师马强老师、王萍老师以及生物制药系的其他老师对我的悉心指导，他们治学严谨，学识渊博，视野广阔，在他们的带领下整个实验室营造了一种良好的学术氛围，这种氛围是我不畏艰险，不断前进的重要源泉；感谢同一个实验室的在读硕士生续艳梅师姐、刘诗俐师姐带领我进行了本研究的大部分实验，她们自己虽然面临着繁重的学业任务，却不厌其烦地回答我的问题，亲手教我实验操作，让我从一个对生物学实验不甚了解的实验小白成长为一个具备基本实验素养，能够在实验室独立操作，完成基本科学研究的合格的生物学专业本科毕业生。还要感谢实验室其他师兄师姐对我提供的无私的帮助，同时也要感谢和我一起实习的同专业的同学对我的支持和鼓励，另外，感谢南方医科大学所有给过我帮助和授予过我知识的老师、教授，没有这些坚实的基础我也不可能顺利毕业。

天下没有不散的宴席，虽然大四的生活多半时间还是呆在学校里，但是论文致谢语写就的那一刻也真正标志着我与这所学校就此分离了，没有伤感，更多的是遗憾，但是总归不如意事十有八九，过去的不能挽回，人应该大胆向前看，所以这段文字应该像它的标题一样充满感恩和致谢，感谢四年来在我的成长道路上扶持过我，指点过我的人。

感谢！

附录

产气荚膜菌素 O：被低估的产气荚膜梭菌毒素？

摘要：产气荚膜梭菌表达多种毒素，可促进人和动物的疾病发展。其中一种毒素是产气荚膜梭菌溶素 O (PFO, 即 θ 毒素)，一种形成孔的胆固醇依赖性细胞溶血素 (CDC)。PFO 是一种水溶性单体，通过胆固醇识别和结合膜。膜结合单体经历结构变化，最终在膜表面形成寡聚化的前孔复合体。然后，前孔复合体转化为直径约为 250–300Å 的双层跨越孔。PFO 在几乎所有已鉴定的产气荚膜梭菌菌株中都有表达，并且具有一些有趣的特征，这些特征表明全 PFO 在疾病发展中的潜在作用尚不明确。研究表明 PFO 在气性坏疽进展和牛坏死性出血性肠炎中发挥作用，但现有数据有限，无法确定 PFO 是否也在由产气荚膜梭菌引起的其他疾病中发挥作用。本文综述了 PFO 已知的结构和功能特点，同时强调了 PFO 对疾病发病机制的潜在贡献。

关键词：胆固醇依赖性溶血素；气性坏疽；肌坏死；坏死性出血性肠炎；肠毒血症；犊牛

1. 介绍

产气荚膜梭菌是一种厌氧的、芽孢形成的革兰氏阳性细菌，通常作为动物和人类肠道的正常寄居者被发现。然而，通过尚未完全了解的机制和刺激，产气荚膜梭菌经历快速增殖，同时产生几种毒素，导致疾病的发生。产气荚膜梭菌菌株的分类是基于 α 、 β 、 ϵ 和 ι 毒素的产生，被认为是四种主要的梭菌毒素。其他毒素也由产气荚膜梭菌表达和分泌，如造孔毒素产气荚膜梭菌溶素 O (PFO)，以前称为 θ 毒素。PFO 与 α 毒素协同作用，参与了犊牛气性坏疽和坏死性出血性肠炎的发生。PFO 在产气荚膜梭菌引起的其他疾病中可能也很重要，因为 PFO 已知能增强 D 型肠毒血症小鼠模型中 ϵ 毒素的致死作用，D 型肠毒血症是绵羊和山羊的一种自然发生的疾病。对 PFO 的成孔机理进行了深入的研究，对 PFO 的结构和功能有了深入的认识。然而，尽管 PFO 在动物和人类疾病中的作用比以前认为的更为重要，但其在疾病发展中的作用在发病模型中并不经常被评估。我们在此概述了 PFO 的已知特征，并阐述 PFO 对动物和人类疾病病理学的贡献。

PFO 属于依赖胆固醇的细胞溶血素(CDC)家族，它在含胆固醇的细胞膜上起着成孔毒素的作用。在链球菌、芽孢杆菌、李斯特菌和许多其他属中也发现了类似的毒素。这些 CDCs 具有高度的一级结构同源性。PFO 被视为 CDCs 的原型，因此，本综述中介绍的 PFO 的数据可以部分外推到其他 CDCs，并为 CDCs 的常规造孔机制提供基础。

2. 遗传学特征

产气荚膜梭菌的基因组由一个环状染色体和附加的染色体外质粒组成。许多毒素的产生，包括 β 、 ϵ 毒素，而基因编码 PFO(pfoA)和 α 毒素(plc)位于染色体。几乎所有产气荚膜梭菌菌株都被推测编码了 pfoA 基因，尽管基因组比较显示，大多数产肠毒素食物中毒菌株缺乏 pfoA。结构基因 pfoA 已被克隆、测序和定位。由核苷酸序列衍生出的初级蛋白质结构包括 500 个氨基酸残基和一个 27 残基信号肽。基于这些数据，Tweten 预测 PFO 的相对分子质量为 52469 道尔顿。然而，变异发生在初级结构和 PFO 染色体位置。重组可能解释了 pfoA 和其他染色体编码的毒力基因的位置和序列的变化，尽管 PFO 的一级结构很保守。pfoA 最保守的区域

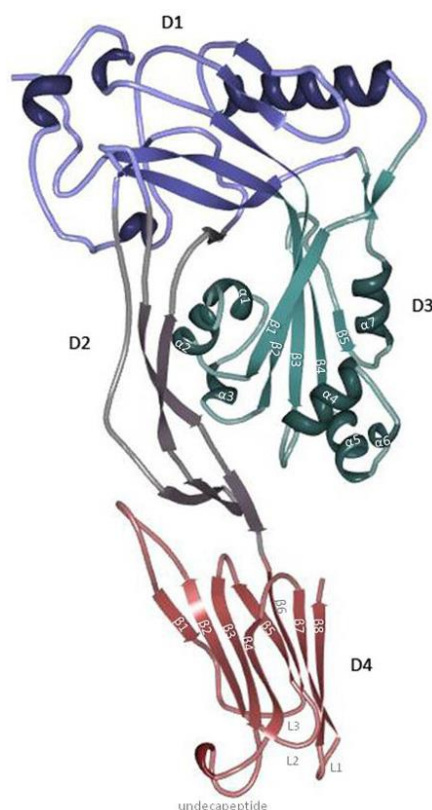
围绕着十一氨基酸多肽，这是一个富含色氨酸的环，包含三个色氨酸残基和分泌的 PFO 中唯一的半胱氨酸残基。

3. PFO 结构

PFO 含有一种典型的信号肽，这种信号肽通过一般分泌途径促进其分泌，从而形成胞外水溶性单体。这个信号肽被 GSP 识别，并在通过细胞膜时被裂。Solovyova 等人假设 PFO 在高浓度溶液中形成二聚体，PFO 的晶体呈现出从头到尾的二聚体。PFO 是否在生理浓度下形成二聚体尚不清楚。一致的晶体结构表明 PFO 单体具有一个细长结构，分为四个以 β 链为主的结构域。域 4 (D4) 包含两个 β -片，每个 β -片由四个 β -链 (D4 β 1-4 和 D4 β 5-8) 组成，以 β -三明治结构包装在一起，由四个环 (L1、L2、L3 和十一肽) 连接。域 3 (D3) 由一个核心 β -片 (D3 β 1-5) 组成，两侧有两组三个 α -螺旋 (D3 α 1-3 和 D3 α 4-6)。另一个 α -螺旋 (α 7) 连接 β 5 和结构域 1 (D1)。域 1 和域 2 (D2) 连接 D3 和 D4 (图 1)。拉长的 D2 包含一个 β -片，而 D1 包含一个 β -片和四个 α -螺旋。在膜包埋孔复合体中，由多个单体生成的 D3 β 链形成一个封闭的柱状 β 片，形成 β 筒。至少需要 35 个单体的协同作用，才能形成直径为 250–300Å 的大跨膜 β 管。

4. 膜结合

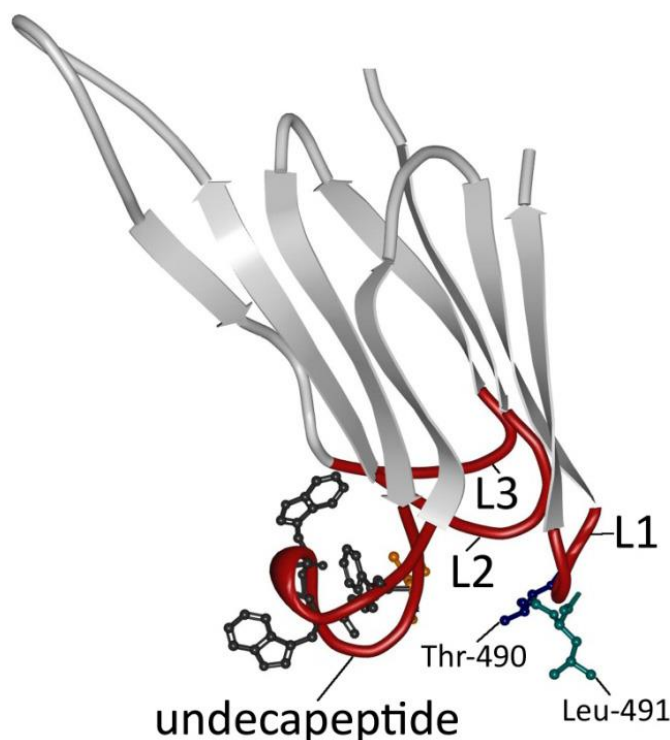
CDCs 的一个保守特征是对胆固醇的需求，胆固醇是哺乳动物细胞膜的一种常见成分，对其细胞溶解活性的需求。因此，胆固醇长期以来被怀疑是 CDC 的受体，因为胆固醇对毛孔形成至关重要，当 CDC 预先接触胆固醇时，CDC 的活性会受到抑。中间链球菌产生的一种疾病控制中心中间溶血素 (ILY) 的结果表明，并非所有疾病控制中心都利用胆固醇进行结合。尽管如此，胆固醇仍然是这些疾病控制中心毛孔形成的关键。



(图 1，产气荚膜溶血素 O (PFO) 结构。PFO 是由 β -strands 和分裂分为四个领域。域 4(红色;D4) 包括两个 β -sheets 四 β -strands(D4 β 1-4 和 D4 β 5-8) 挤在一个 β -sandwich 结构连接四个循环(L1, L2, L3 和十一肽)。域

3(绿色;D3)包含一个核心 β -sheet (D3 β 1-5)两侧是两套三 α -helices (D3 α 1-3 和 D3 α 4-6)和一个额外的 α -helix(α 7)连接 β 5 域 1(蓝色;D1)。域 1 和域 2(紫色;D2)连接 D3 和 D4。D2 是细长的,包含一个 β -sheet。D1 由 β -sheet 和四个 α -helices。图由 RCSB PDB Protein Workshop 4.1.0 (RCSB Protein Data Bank, 皮斯卡塔韦, 新泽西州和拉霍亚, 加利福尼亚州, 美国, 2014), 并改编于 Adobe Photoshop CS3 扩展版(Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA, 2007)

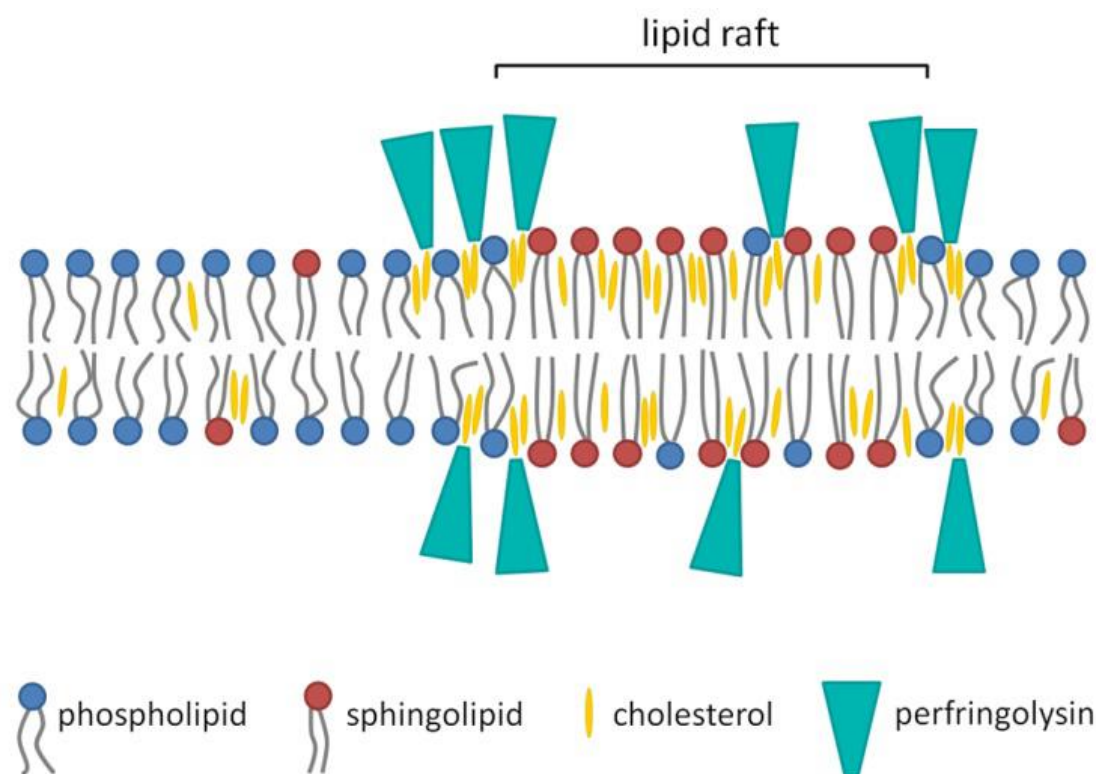
PFO 的细胞溶解机制始于 D4 介导的与真核细胞质膜的结合。D4 通过连接两个 β -片的结构域顶端的环与膜相互作用。其余的 D4 不与膜表面接触。其中一个循环对应于保守的十一肽。直到最近,人们还认为这个富含色氨酸的环作为胆固醇结合基序发挥作用,因为这个区域的修饰影响了 PFO 结合和成孔活性。此外,十一肽中的半胱氨酸似乎参与了细胞溶解机制,因为该半胱氨酸的突变和氧化也改变了富含色氨酸环的构象并阻碍了膜结合然而,最近的证据表明,另外三个环, L1-L3, 在胆固醇识别和结合中是重要的,而不是在不可剥夺肽。另一方面,十一肽有助于将 PFO 锚定在膜上,并有助于与末端构象和结构变化结合的变构偶联,这是将毒素 β -桶插入膜所必需的,这解释了为什么这些色氨酸的突变会影响细胞毒性活性。此外,半胱氨酸修饰通过影响富含色氨酸的环来防止介孔到孔的转变(下面的孔形成的分子机制)。随后, Farrand 等人鉴定了胆固醇结合基序。他指出只有两个残基,苏氨酸 490 和亮氨酸 491 在 L1 中,在识别和结合细胞膜中的胆固醇方面起关键作用。Thr-Leu 对统称为胆固醇识别基序 (CRM)。在 CRM 引发结合后, D4 的 L2 和 L3 插入到膜中并稳定结合,从而使 PFO 垂直于膜定向。



(图 2, PFO 域 4 的详细视图。域 4 (D4)包括两个 β -sheets 四个 β -strands(浅灰色;D4 β 1-4 和 D4 β 5-8)连接四个循环(红色;L1 L2 L3 和十一肽)。在 PFO 中,十一肽含有六分之三的色氨酸(深灰色)以及唯一以分泌形式存在的半胱氨酸(橙色)。最近的研究结果表明 L1 中只有苏氨酸(蓝色)和亮氨酸(绿色)对识别和识别是必需的膜的结合。图由 RCSB PDB 蛋白工作室制作 4.1.0 (RCSB 蛋白数据库, Piscataway, NJ and La Jolla, CA, USA, 2014 使用 adobephotoshopcs3 extended (adobesystems Incorporated, San Jose, CA, USA, 2007)。

有趣的是, CRM 基序在所有已知的 cdc 中都是保守的,甚至在利用人 GPI 锚定的 CD59 (huCD59) 作为膜结合受体而不是胆固醇的中间溶血素 (ly) 中也是如此。在与 huCD59 的

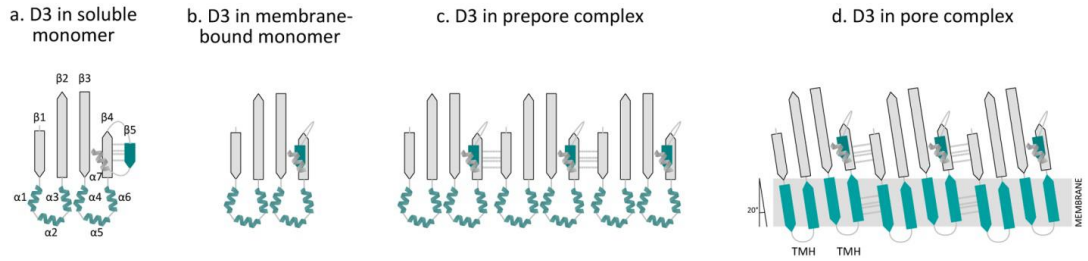
ILY 结合作用之后, ILY 以与 PFO 完全相同的方式使用 CRM 基序和 L2 和 L3 来形成胆固醇依赖性接触。ly 低聚成介子中间体, 同时与 huCD59 结合, 但在转化为孔时与 huCD59 分离。因此, ILY 胆固醇结合在 huCD59 脱离后起到将 ILY 孔固定在膜上的作用。由于 PFO 只与含有大量胆固醇的膜结合, 因此有人认为这种结合与富含鞘脂和胆固醇的液相有序膜域或脂筏有关 (图 3)。Nelson 等人反驳了这一假设, 他没有发现膜筏的存在与 PFO 的结合能力之间的联系。然而, 研究表明, PFO 的结合能力取决于胆固醇的可及性, 而胆固醇的可及性受磷脂头基的堆积和磷脂酰链的饱和的影响, 两者都会影响它们与胆固醇的结合紧密程度。最近的研究表明, PFO 对脂筏有一定的亲和力, 但这种亲和力在液相有序和液相无序的膜域边界处最高和最强, 在那里胆固醇似乎更容易被 PFO 吸收。因此, 的结合不仅受胆固醇含量的控制, 还受胆固醇的脂质环境的控制。膜双层的厚度也可能影响成孔效率, 因为改变 TMH 的长度会阻碍其插入不同宽度的双层中。这并不奇怪, 因为野生型毒素中的 TMH 长度应该是 TMH 插入到围绕膜胆固醇的靶向脂质环境中的最佳长度。



(图 3, PFO 与双膜层的关系示意图。结合膜上的 PFO 不仅与富含鞘磷脂和胆固醇的液体有关有序的膜结构域或脂筏。该协会是最高和最强大的有序膜域的边缘, 胆固醇似乎更容易到达 PFO。这个数字是用 Microsoft Office PowerPoint 2007 (Microsoft)制作, 雷德蒙德, 华盛顿州, 美国, 2007)。

5. 成孔分子机理

在 D3 芯 β -片内, β -链 4 (β_4) 与 β -链 5 (β_5) 形成四个氢键, 从而防止 β_4 与 β -链 1 (β_1) 从相邻单体结合。 β_4 - β_5 相互作用防止可溶性单体的自发齐聚。D4 与膜的结合与 D3 的构象变化耦合, 导致 β_5 围绕保守的甘氨酸-甘氨酸轴旋转, 远离核心 β -片。结果, β_4 暴露, 并可与相邻单体的核心 β -片中始终暴露的 β_1 结合。

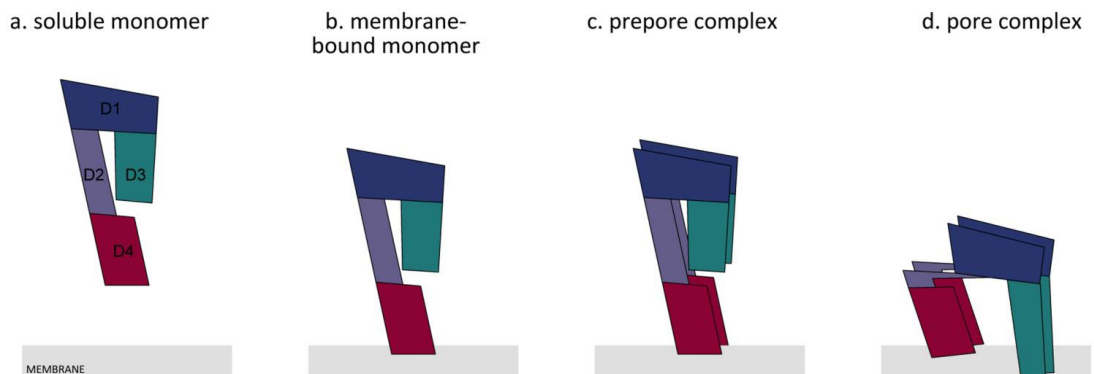


(图4, 从水溶性单体向成孔复合物转变过程中 D3 结构域的构象变化。域 3 (D3) 包含一个 β -sheet (D3 β 1-5) 两侧是两套三 α -helices (D3 α 1-3 和 α 4-6) 和一个额外的 α -helix (α 7) 连接 β 5 域 1 (D1)。水溶性单体, β 4 形成氢键 β -strand β 5 (溶性单体(a) D3)。D4 与膜的结合可以得到 D3 构象的变化, 导致 β 5 远离核心 β -sheet 的旋转, 因此暴露的边缘 β 4 (膜结合单体(b) D3)。因此, β 4 即可形成接触暴露的 β 1 相邻的核心 β -sheet 单体(c) 前孔复合物中的 D3)。在前孔转化为后孔时, 两个 α -helical 包折叠成两个两性分子的跨膜 β -hairpins (TMHs) ((d) D3 孔隙复杂)。孔隙的复杂, D3 单体的 β -strands 倾斜 20 度垂直于膜, 右扭。这个图形是由 Graphisoft 公司制作的 ArchiCAD 13 (Graphisoft, Budapest, Central Hungary, Hungary, 2009)。

在水溶性单体中, D3 的核心 β -片两侧有两组 α -螺旋 (D3 α 1-3 和 D3 α 4-6), 这使得疏水侧链的暴露最小化。由于 D4 与膜结合, D3 的构象变化被诱导, 促进了前驱结构的形成。预聚物由尚未插入 β -桶的低聚单体组成。介子形成后, 两个 α 螺旋展开成两个两亲跨膜 β 发夹 (TMH1 和 TMH2), 插入孔复合体的膜中。首先, 这些 β -发夹从核心 β -片延伸并动态移动。在孔隙复合物中, TMHs 与相邻分子的 TMHs 形成主链氢键, 形成相邻的 β -桶。所有单体以协同、同步的方式将两个 tmh 插入到膜双层中, 形成 β -桶。TMH 同步插入在能量上比从单个单体插入 TMH 的 domino 型插入更有利。TMHs 完全横跨膜, 疏水表面朝向膜的脂质核心, 亲水表面暴露于水孔中。

在孔隙复合物中, D3 的单个 β 链垂直于膜倾斜 20° 并呈右手扭转。需要相对于 D4 旋转 D3 芯 β -片, 以解开芯 β -片并对齐 TMHs。D3 不直接接触 D4, 但与 D1 和 D2 形成接口, 连接 D3 和 D4。膜结合后 D1 的稳定性增加, 这可能对 D2,3 界面的分离很重要。当 D1 被色氨酸残基 (PFO 中的 Trp-165) 取代而失稳时, D2,3 之间的界面未能脱离。此外, Wade 等人。最近的研究表明, 在 D3 中, β 5 与核心 β -片的旋转允许形成强烈的分子间静电相互作用, 通过提供破坏 D3 与 D1,2 之间界面所需的自由能, 驱动从前驱体到孔隙的转变。这些研究强调了畴稳定性以及畴内和畴间相互作用对孔隙形成的重要性。

Czajkowsky 等人和 Ramachandran 等人证实 D1 和 D3 都经历了向膜的 35-40Å 垂直塌陷, 这表明 D2 必须发生构象变化以促进这种塌陷。这种构象变化与溶血素 (PLY) 孔复合物 (由肺炎链球菌产生的 CDC) 的 3D 重建所示的膜插入低聚物复合体外表面的凸起一致。此外, 晶体学模型预测 D4 相对于 D2 发生旋转, 从而断开 D2 和 D3 之间的多个接触, 从而允许 α -螺旋束展开, 然后重新折叠成 TMH。



(图 5, 概述了从水溶性转变的一般机理单体到孔隙络合物。PFO 是一种水溶性单体, 遇到含有胆固醇的膜 D4(红色)与结构域顶端的膜相互作用(b)膜结合单体)。这触发了结构域 3 的构象变化(绿色;D3);因此, 邻边的 D3 单体之间可以相互作用, 这就导致了前孔复合体的形成 c 前孔复合体)。前孔复合体被插入到双层膜中((d)孔隙复杂)。PFO 分子的坍塌发生了, 它移动了结构域 3 和 1(蓝色;D1)靠近细胞膜。这是由 D4 的旋转引起的畴 2 的弯曲(紫色;D2)。后者降低了 D3 之间结合的强度 D2, 因此 D3 和 D1 可以向细胞膜移动。这个数字是与使用 Graphisoft ArchiCAD 13 (Graphisoft, Budapest, Central Hungary, Hungary, 2009)制作。

6. 遗传调控

在产气荚膜梭菌中发现了一个与金黄色葡萄球菌的辅助基因调节系统 (*agr*) 同源的群体感应系统, 该系统可以在外界刺激下调节几种毒力因子的表达。Ohtani 等人。[71]和 Vidal 等人。表明 PFO 和 α 毒素的表达受 *agr* 系统的调控, *agr* 位点的突变影响了这两种毒素的早期对数期表达。产气荚膜梭菌还拥有与 *luxS* 系统同源的额外群体感应系统。*luxS* 突变体在中指数生长期 PFO 表达降低。此外, 由 VirS 传感器蛋白和基因反应调节器 VirR 组成的双组分信号转导系统调节 PFO、 α 毒素、胶原酶和一些内务基因的表达。目前尚不清楚 *agr* 和 *luxS* 系统是否与 VirR/VirS 系统耦合, 或是通过哪种刺激激活 VirR/VirS 系统。信号分子和作用方式仍有待阐明。VirS 的激活导致 VirR 的磷酸化, 使 VirR 结合两个 VirR 盒, 即位于编码 *pfo* 的 *pfo* 基因上游的 12bp 重复序列, 这导致 *pfo a* 转录的直接调节。在 VirR 或 VirS 突变后, PFO 结构基因 *pfoA* 的表达被取消。清水等人怀疑上游 *pfoR* 基因编码的调节蛋白参与了 PFO 结构基因的表达。Awad 和 Rood 通过证明突变的 *pfoR* 不影响 *pfoA* 的表达来反驳这一点。他们假设在某些实验条件下, *pfoR* 基因可能具有调节作用, 例如在感染的病变中, 但这还没有得到证实。

7. PFO 在疾病中的作用

产气荚膜梭菌是引起梭菌性肌坏死 (也称为气性坏疽) 最重要的病原体。当厌氧菌被引入肌肉组织时, 这种疾病会发生, 通常是创伤性损伤的结果。梭菌性肌坏死在一些动物物种中有报道, 如狗、猫、牛、羊、山羊和马, 但也发生在人类身上。该病的特点是肌肉内组织坏死迅速蔓延 (因此称为肌坏死), 如果不及时治疗, 可导致全身毒血症和休克引起的死亡, 死亡率极高。人们普遍认为 α 毒素是一种与气体性坏疽有关的重要致病菌, 因为只有产生 α 毒素的菌株才能在小鼠肌坏死模型中诱发典型的伴有血栓形成的肌坏死病理学。PFO 在气体坏疽中的作用还不太清楚。它似乎与 α 毒素协同作用, 对周围性肌坏死、白细胞增多和血管内凝血病产生影响, 而大多数肌坏死可归因于 α 毒素单独作用。在小鼠肌肉注射产气荚膜梭菌之前, 用 PFO 免疫后观察到死亡率降低。Awad 等人的结果表明, PFO 与 α 毒素协同作用, 导致小鼠肌肉坏死模型中缺乏两种基因的突变株的毒力显著降低, 从而导致气体性坏疽。此外, 与 α 毒素互补的菌株相比, 两种毒素互补的菌株可能产生更严重的病理学问题。这些结果明确提示 PFO 和 α 毒素参与了梭菌性肌坏死或气体性坏疽的病理过程。然而, 这两种毒素对疾病的个人贡献尚未完全确定。

血管性白血病和白细胞向感染部位浸润少是气性坏疽的两个特点。肌肉注射粗梭菌毒素制剂会触发由血小板组成的血管内聚集物的形成, 血小板最初在血管内自由移动。纤维蛋白和白细胞迅速加入到聚集物中, 从而捕获聚集物并阻塞血管。血栓减少甚至完全停止局部血流。这一过程损害了炎症细胞向受感染组织的运动, 这可能解释了在气体性坏疽感染的后期缺乏吞噬细胞的原因。 α 毒素可直接激活血小板聚集受体 *gpiibiiia*。PFO 导致白细胞上的 CD11b/CD18、细胞内粘附分子 1 (ICAM-1) 和人内皮细胞上的血小板活化因子表达增强。血小板活化因子表达增加与 α 毒素暴露后白细胞与内皮细胞的粘附有关。因此, 血小板和内

皮细胞粘附因子以及趋化因子的表达增加也可能有助于血小板-白细胞聚集体粘附到血管内皮细胞，从而导致血栓形成和随后的血流量减少。

这种与内皮细胞的强白细胞粘附也损害了白细胞的跨内皮细胞迁移和随后感染部位的浸润。这对组织中的产气荚膜梭菌是有益的，因为这同时促进了组织的厌氧状态并减少炎症。此外，PFO 和 α 毒素对内皮细胞有直接的细胞毒性作用，这也可能损害白细胞的转归。内皮细胞的破坏也会导致进行性水肿。此外，感染组织中缺乏急性炎症细胞也可能是由于 PFO 和 α 毒素直接抑制了免疫反应，因为在高浓度 PFO 或 α 毒素存在下，已观察到对白细胞的直接细胞溶解作用。

虽然肌坏死感染的后期以吞噬细胞缺乏为特征，但当组织中几乎没有细菌存在时，吞噬细胞的存在可能对控制感染开始时的细菌非常重要。产气荚膜菌能够在巨噬细胞的存在下生存，并能逃离吞噬体。只有在 α 毒素和 PFO 的存在下，吞噬体才能成功逃逸。此外，PFO 是巨噬细胞毒性的最重要因素。

综上所述，PFO 在肌坏死早期引起巨噬细胞毒性，在感染后期对血栓形成很重要。后者是内皮细胞和白细胞对粘附因子和趋化因子表达的影响。虽然 PFO 也参与其中，但 α 毒素也明显参与其中，表明这两种毒素具有协同作用。

Uzal 等人提示 PFO 不是产气荚膜梭菌引起的大多数肠道疾病的主要致病毒素，因为缺乏 PFO a 和 α 毒素基因的 C 型菌株引起的损伤与家兔回肠环模型中的自然病例相当，并且 pfoA 基因在大多数产肠毒素食物中毒菌株的基因组中缺失。然而，近年来，PFO 在牛坏死性出血性肠炎或肠毒血症发病机制中的作用已被证实。这种疾病最典型的特征是猝死，死后肉眼可见小肠坏死和出血性病变。坏死性出血性肠炎是小牛死亡的主要原因，造成了重要的经济损失。与肌坏死的数据相比较，PFO 与 α 毒素协同作用于该疾病的发展，因为缺乏两种基因的突变体诱导坏死性出血性损伤的能力降低，只有与两种基因互补才能恢复到野生型水平。

虽然气体性坏疽的特征是组织坏死、血栓形成和感染部位白细胞缺乏浸润，但牛坏死性出血性肠炎与毛细血管充血、出血和炎症有关。PFO 和 α 毒素参与了气性坏疽和坏死性出血性肠炎，但不同的表型表明，这些毒素在疾病病理中的作用方式不同。这两种毒素对牛内皮细胞都有很强的细胞毒性作用，这可能表明这些毒素通过靶向内皮细胞发挥作用，可能解释了毛细血管出血。

兔静脉注射重组 PFO 可导致心输出量增加。这不是由于直接的心脏毒性作用，而是由于血管阻力的降低和随后的血管扩张。血管松弛被认为是 PFO 对内源性介质如细胞因子的间接影响。然而，在兔体内注射重组 α 毒素后，在观察到心输出量和动脉压降低的同时，血管阻力得以维持。这归因于 α 毒素对心肌收缩力的直接影响。静脉接种粗产气荚膜梭菌上清液的兔子显示出最初的血流量增加，这与 PFO 导致的血管阻力降低有关。然而，随后观察到心输出量和动脉压降低，这归因于 α 毒素。这些结果，结合牛坏死性出血性肠炎（即炎症和出血）和血管完整性丧失的病理观察，似乎与 PFO 在本病中的作用相一致。相反，在肌坏死中没有观察到出血。此外，气体性坏疽似乎与血管阻力的降低无关，因为在受感染肢体/区域的截肢过程中，建议切除所有非出血组织。在啮齿动物体内肌肉注射粗梭菌毒素制剂会触发血管内聚集物的形成，导致血栓形成。在牛坏死性出血性肠炎中没有观察到血管内聚集物和随后的血栓形成，这部分解释了牛坏死性出血性肠炎中存在的炎症，这与气体性坏疽中白细胞浸润（和随后的炎症）的缺乏形成对照。这些观察结果表明，PFO 和 α 毒素的作用是物种和靶器官依赖的。在疾病的晚期，由于 α 毒素对全身血压和心功能的影响，肌肉坏死进一步发展为心血管衰竭引起的全身毒血症和多器官衰竭。牛坏死性出血性肠炎的特点是猝死，这可能与 α 毒素对心肌收缩力的直接影响有关。然而，需要更多的研究来解释气体性坏疽和牛

坏死性出血性肠炎在病理上的差异。需要进一步了解这些毒素的作用方式，以揭示它们对不同靶器官的影响，并确定这两种毒素对发病的相对贡献。

PFO 在由产气荚膜梭菌引起的其他疾病中可能起的作用需要更明确的界定。一些梭菌病的表型被认为是由一种特殊的致病毒素引起的。然而，PFO 可能在这些疾病中也很重要。例如，最近，Fernandez Miyakawa 等人。证明 PFO 对 D 型肠毒血症小鼠模型中 ϵ 毒素的致死作用增强。这种疾病自然主要发生在绵羊和山羊身上，其特征是 D 型产气荚膜梭菌在肠内迅速增殖，导致毒血症和死亡，有时还会出现神经症状。由于 ϵ 毒素是产气荚膜梭菌最致命的毒素，一般认为它是 D 型肠毒血症的致病毒素，静脉接种 ϵ 毒素可复制与自然病例相似的病变。最近，加西亚等人证实了 ϵ 毒素在 D 型肠毒血症中的重要作用，因为 D 型毒株的 ϵ 毒素基因突变消除了十二指肠内接种模型小鼠、绵羊和山羊的致死效应和临床症状。大多数 D 型菌株也产生 α 毒素和 PFO。因此，Fernandez Miyakawa 等人评价二者对 ϵ 毒素的协同作用。静脉和胃内注射 ϵ 毒素联合 PFO 可缩短小鼠存活时间。对于 α 毒素，只有在静脉注射后才能观察到存活时间的缩短。结果表明，PFO 和 α 毒素均能增强 ϵ 毒素的致死作用。

8. 存在的问题

胆固醇对所有胆固醇依赖性细胞溶血素的孔形成至关重要。尽管在所有已知的 cdc 中都存在胆固醇识别基序(CRM)，但不同 cdc 之间胆固醇结合的时间和作用可能不同。对于 PFO，胆固醇似乎是膜结合受体，因为 CRM 在膜中识别胆固醇是膜结合的第一步。然而，ILY 与胆固醇的相互作用仅发生在 ILY 与 huCD59 结合后，胆固醇在 huCD59 脱离后将 ILY 孔锚定在膜上。目前尚不清楚非 CD59 限制性 CDC 是否利用了额外的受体；一项研究表明聚糖可能是一种膜受体，但由于抑制 CDC 与胆固醇结合所需的高浓度竞争性聚糖，数据仍不确定。此外，目前尚不清楚富含鞘脂和胆固醇的液膜结构域或脂筏是否更容易与细胞溶血素结合，因为迄今为止已完成的研究结果是矛盾的和不确定的。我们在基因调控方面的知识还存在一些空白。如前所述，还没有深入了解 VirR/VirS 系统的信号分子和作用方式。此外，上游 pfoR 基因的调控作用还需要进一步阐明。尽管产气荚膜梭菌菌株中广泛产生 PFO，但 PFO 在疾病发展中的作用尚未得到充分研究。今后的研究应考虑到 PFO 在产气荚膜梭菌诱导的疾病发病机制中的潜在作用，尤其应注意 PFO 对致病毒素可能的协同作用。此外，应考虑所有可能涉及的器官，因为其影响可能是靶器官依赖性的。此外，研究疾病发展的早期事件也很重要，因为 PFO 可能在疾病的发病过程中发挥重要作用，而其在疾病后期的作用可能不那么重要。

原文来自：Stefanie Verherstraeten, Goossens Evy, Valgaeren Bonnie, et al. Perfringolysin O: The Underrated Clostridium perfringens Toxin?[J]. Toxins, 2015, 7(5): 1702-1721.