

# 炭疽杆菌致死因子 LF253 的制备及活性分析

许小明<sup>1</sup>, 郑峰<sup>2</sup>, 周婷婷<sup>2</sup>, 熊四平<sup>3</sup>, 刘鹏<sup>2</sup>, 王长军<sup>2</sup>, 冯振卿<sup>3</sup>, 周玮<sup>1\*</sup>, 朱进<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>蚌埠医学院附属解放军第八二医院内分泌科, 江苏 淮安 223001; <sup>2</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002; <sup>3</sup>南京医科大学病理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:制备具有生物学活性的重组致死因子 253(lethal factor 253, LF253)抗原,获得纯化的目的蛋白,检测其与全分子致死因子(lethal foctor, LF)蛋白竞争性结合保护性抗原(protective antigen, PA)的能力。方法:PCR 扩增致死因子 LF253 片段的 DNA,将目的基因插入 pET-28a(+)表达载体中,利用大肠杆菌 BL21(DE3)作为宿主菌, IPTG 诱导重组蛋白表达,通过 His 标签亲和和层析柱获得目的蛋白, Western blot 和 ELISA 法检测蛋白抗原性, Biacore T-100 测定重组蛋白与保护性抗原 PA 结合的亲和力,细胞毒性实验检测其生物学活性。结果:成功构建原核表达载体 pET-28a/LF253,诱导获得重组蛋白 sLF253 的表达。Western blot 和 ELISA 检测结果证实,该重组蛋白具有良好抗原特异性;细胞毒实验结果表明,重组蛋白可在体内外中和致死毒素引起的生物学效应。结论:本研究制备的融合蛋白 sLF253 能够与保护性抗原 PA 结合,可竞争性抑制 LF 全分子蛋白与 PA 的聚合,阻断炭疽毒素的致死作用,为今后炭疽疫苗等药物的研发奠定了基础。

**[关键词]** 炭疽;致死因子;表达;活性分析

**[中图分类号]** R517.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-340-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150309

## Preparation and activity analysis of truncated anthrax lethal factor 253

Xu Xiaoming<sup>1</sup>, Zheng Feng<sup>2</sup>, Zhou Tingting<sup>2</sup>, Xiong Siping<sup>3</sup>, Liu Peng<sup>2</sup>, Wang Changjun<sup>2</sup>, Feng Zhengqin<sup>3</sup>, Zhou Wei<sup>1\*</sup>, Zhu Jin<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>The 82nd Hospital of PLA Affiliated to Bengbu Medical College, Huaian 223001; <sup>2</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; <sup>3</sup>Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To acquire the purified recombinant lethal factor 253(LF253)antigen which owned biological activity and test its competitive capacity binding protective antigen(PA)compared with lethal foctor(LF)protein. **Methods:**The LF253 gene was amplified by PCR,and the truncated LF gene was inserted into pET-28a(+),and transferred into *E.coli*.BL21(DE3) as the host strain. LF253 was expressed as a recombinant protein induced with isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG). The protein was purified with His label affinity chromatography and was subjected to antigenicity by Western blot and ELISA. The affinity was detected by Biacore T-100,and the biological activity was detected by cellular toxicity test. **Results:**We successfully established prokaryotic expression vector pET-28a/LF253,and sLF253 was expressed and purified. Western blot and ELISA results showed that sLF253 had an excellent antigenicity. Cellular toxicity detection showed that recombinant protein neutralized the biological effects caused by lethal toxin *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion:**Recombinant sLF253 can recognize PA and competitively inhibit LF polymerization with PA to block its lethal effects. This protein may lay the experimental basis for the future of anthrax vaccine research and development.

**[Key words]** anthrax;lethal factor;expression;activity analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 340-345]

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31170884);江苏省自然科学基金项目(BK2012527)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail:zhouwei82yy@sina.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

炭疽杆菌是一种革兰染色阳性、杆状、产芽孢的厌氧菌,是炭疽的病原体。炭疽是一种急性、病程进展迅速的人畜共患传染病。炭疽杆菌芽孢,作为病原体的感染形式,长期被恐怖分子用作生化武器<sup>[1-2]</sup>。

炭疽杆菌的致病力是由两个染色体外的质粒造

成的,分别为pXO1(182 kb)和pXO2(96 kb)。pXO1质粒编码3个炭疽毒素组成部分:分子量为83 000的保护性抗原(protective antigen,PA),分子量为89 000的致死因子(lethal factor,LF)和分子量为90 000的水肿因子(edema factor,EF)。PA是炭疽杆菌发挥毒性作用必不可少的一部分<sup>[3-4]</sup>,它能够与LF和EF分别结合形成致死毒素(lethal toxin,LT)和水肿毒素(edema toxin,ET)<sup>[5]</sup>。机体感染炭疽杆菌后,PA与宿主靶细胞上的细胞膜受体结合,并且被furin蛋白酶切除其N端的PA20片段,余下的PA63寡聚化形成七聚体或八聚体的结构,能与LF结合<sup>[6-7]</sup>,引起感染动物的死亡。

LF是具有771个氨基酸的多肽,其具有两种酶促活性:它能起锌金属蛋白酶的作用,并且能使促分裂原活化的蛋白激酶失活<sup>[8]</sup>。LF蛋白是由4个特殊的结构域构成:结构域1(1~262aa)、结构域2(263~302aa和383~551aa)、结构域3(303~382aa)和结构域4(552~770aa)<sup>[9]</sup>。结构域1由12螺旋构成,其中还包含1个4股β折叠平面。在第2、第3折叠之间有1个30个氨基酸残基的环突出于平面之上<sup>[10]</sup>。LF253是包含了1~253个氨基酸的LF结构域1中的蛋白片段,只保留结构域1的LF在与PA混合并添加到培养的噬菌体中,或注射到动物体内后没有任何毒性作用<sup>[11]</sup>。但是关于LF253片段中和致死毒素,竞争性抑制LF全分子蛋白与PA结合的作用,目前国内仍鲜有研究。

本研究构建分泌性表达载体pET-28a/LF253,在大肠杆菌中进行sLF253的表达,并用细胞毒实验检测重组蛋白的竞争性抑制作用,为今后研究LF的作用机制、发展新型炭疽疫苗等防治药物奠定了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒和菌种

实验用炭疽芽孢杆菌A16R株基因组DNA、大肠杆菌BL21(DE3)和表达载体pET-28a(+)为本实验保存。

#### 1.1.2 试剂

Nco I、Xho I限制性内切酶、Pfu酶、蛋白预染Marker购自美国Thermo公司。DNA分子质量Marker、T4连接酶、质粒提取试剂盒购自日本TaKaRa公司。攻毒用PA、LF为本实验室保存。凝胶回收试剂盒购自美国Promega公司,His Trap<sup>TM</sup> HP层析柱

购自美国GE公司,HRP标记的His标签抗体购自美国Abmart公司,Cell Titer 96 Aqueous非放射性细胞增殖检测试剂盒(Promega公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 克隆载体构建

根据GenBank中发表的炭疽芽孢杆菌A16R株基因序列设计引物,引物序列:上游5'-GGATCCATGGCGGGCGGTCATGGTGAT-3',在5'端加Nco I酶切位点,下游5'-CTCGAGCCGTTGATCTT-TAAGTCTTC-3',在5'端加Xho I酶切位点(划线处为酶切位点)。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR扩增:反应体系40 μl,10×扩增缓冲液4 μl,dNTP混合物3 μl,上、下游引物各5 pmol,模板0.5 μl,Pfu DNA聚合酶2.5 U,双蒸水补足至40 μl。反应条件:95℃预变性5 min;94℃ 1 min,54℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min。扩增产物取5 μl,1%琼脂糖凝胶电泳,120 V电泳30 min,使用凝胶成像仪观察结果并拍照。扩增产物与克隆载体pACK4a-Bs连接后转化*E.coli*.DH5α感受态细胞,筛选和鉴定阳性克隆,阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序,测序结果使用序列分析软件Vector NTI进行比对。

#### 1.2.2 表达载体的构建

用限制性内切酶Nco I和Xho I同时酶切质粒pET-28a(+)和pACK4a-Bs/LF253,1%琼脂糖凝胶电泳、分离回收,用T4连接酶进行连接。连接产物转化*E.coli*.BL21(DE3),分别以PCR法和酶切法鉴定LF253的重组质粒。

#### 1.2.3 sLF253蛋白在*E.coli*.BL21(DE3)中的诱导表达

将验证结果正确的阳性克隆菌株接种于2 ml的LB培养基中(含50 μg/ml卡那霉素),37℃、200 r/min过夜摇菌,按2%比例转接至新培养基,37℃、200 r/min培养至吸光度值D(600 nm)为0.5~0.6时加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,37℃、200 r/min诱导表达4 h。诱导结束后处理样品,电泳上样量为10 μl/孔,12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析目的蛋白的表达。

#### 1.2.4 sLF253蛋白用His Trap<sup>TM</sup> HP层析预装柱纯化

1 000 ml LB培养基诱导细菌,离心后的菌体用100 ml PBS磷酸盐缓冲液(pH7.4)重悬,4℃超声30 min,10 000 r/min离心10 min,上清液用0.45 μm滤膜过滤。先用0.2 mol/L的硫酸镍溶液过层析柱,使凝胶与金属镍离子结合。放置5 min,用去离子水洗涤层析柱去除多余的镍离子。用结合缓

冲液(含20 mmol/L咪唑的PBS)平衡层析柱,样品1 ml/min上样,结合缓冲液洗去杂蛋白,洗至基线,用不同咪唑浓度(50、100、200、300、400、500 mmol/L)的洗脱缓冲液洗脱。收集洗脱液,12%SDS-PAGE分析。

### 1.2.5 Western blot 分析

对纯化后的样品进行12%SDS-PAGE分析,再进行Western blot检测。重组蛋白sLF253电泳后,用考马斯亮蓝染色、脱色,另一电泳胶块转印至PVDF膜,湿式转印,300 mA,19 min,封闭液(5%脱脂奶粉溶液)室温封闭1h后,加入用封闭液1:5 000稀释的HRP标记的His标签单抗,室温孵育1h, TBST洗3遍,每次5 min, DAB显色后终止反应。

### 1.2.6 ELISA 方法检测 sLF253 重组蛋白抗原特异性、敏感性

本实验室前期已经成功制备了鼠源LF单克隆抗体,分别命名为Ab105、Ab110、Ab111、Ab112、Ab0210。利用上述方法制备的sLF253重组蛋白抗原包被96孔ELISA反应板(每孔所含蛋白约为1 μg),用单抗检测重组蛋白的活性。单抗稀释度为1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200。在450 nm下检测吸光度值。

### 1.2.7 Biacore T-100 测定 sLF253-PA 亲和力

根据等电点及按照Biacore T-100 control soft的操作说明优化偶联条件,斜率优化选择醋酸钠作为偶联稀释缓冲液。用此缓冲液稀释PA样品至25 μg/ml后偶联到CM5芯片上。预设偶联水平1 500 RU。用pH7.4的Running buffer(10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTANa<sub>2</sub>, 0.05% P20, pH7.4)稀释sLF样品,稀释浓度至100、200、400、800、1 600 nmol/L。设置进样时间为180 s,解离时间10 min,再生缓冲液用50 mmol/L Gly-HCl(pH2.2)。按照BiacoreT-100 control soft的说明进行上机测试。

### 1.2.8 sLF253 的生物学活性分析

将小鼠单核巨噬细胞(J774A.1)培养在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%双抗(青霉素/链霉素)的DMEM培养基中,37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。待细胞培养良好后,转入96孔细胞培养板,过夜培养细胞汇合达70%时,无菌条件下按不同剂量加入按比例稀释好的炭疽致死毒素(PA: 0.1 μg/ml, LF: 10 μg/ml)和sLF253片段(0.05 mg/ml),用5种不同的中和抗LF抗体(Ab105、Ab110、Ab111、Ab112、Ab0210)做对照,继续培养3 h,显微镜下观察细胞死亡情况,然后用Cell Titer 96 Aqueous

非放射性细胞增殖检测试剂盒检查乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),计算分析保护率,实验重复3次。

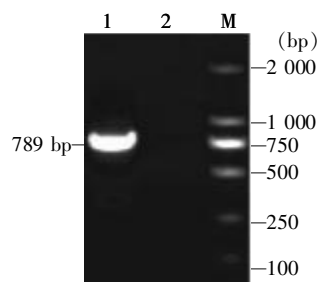
### 1.2.9 sLF253 的体内保护性实验

使用体重150 g左右的雌性Fischer344(F344)大鼠,实验设2组,分别为毒素组(对照组)、毒素+sLF253组(治疗组),每组6只大鼠。攻毒前30 min,尾静脉注射不同剂量的sLF253重组蛋白,蛋白剂量为20、40、60、80 μg/只(无菌PBS定容),然后尾静脉注射炭疽毒素(每只30 μg PA+30 μg LF,无菌PBS定容到30 μl),观察大鼠存活情况。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 LF253 基因

PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,得到的片段长为789 bp,测序结果与理论值一致(图1)。



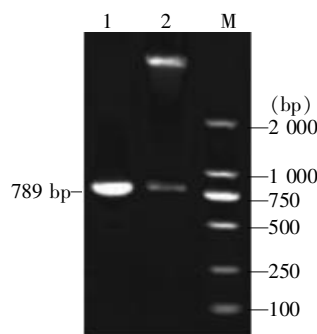
1: PCR 扩增产物; 2: 阴性对照; M: DL 2000 DNA 标准分子质量。

图1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Results of PCR product by agarose gel electrophoresis

### 2.2 重组质粒的鉴定

pET-28a/LF253表达质粒经PCR检测及双酶切处理,1%琼脂糖电泳,得到核酸片段的大小与理论值一致(图2)。阳性克隆经南京金斯瑞生物科技有限公司分析,测序结果表明,表达质粒pET-



1: PCR 扩增产物; 2: 以 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切 pET-28a/LF253; M: DL 2000 DNA 标准分子质量。

图2 PCR 及重组质粒 pET-28a/LF253 酶切图谱

Figure 2 PCR and identification of recombinant plasmid pET-28a/LF253

28a/LF253 构建成功。

### 2.3 sLF253 的诱导表达、纯化和鉴定

含表达载体的工程菌经 IPTG 诱导后,产生的重组蛋白大部分以可溶性形式存在,分子量约为 29 000。经过 His 标签亲和层析,每升诱导物大概可

获得重组蛋白 5 mg(图 3)。

### 2.4 ELISA 检测

用本实验室制备的 LF 单克隆抗体检测克隆表达的重组蛋白 sLF253 的活性,结果显示重组蛋白 sLF253 与抗体有良好的结合能力(表 1)。

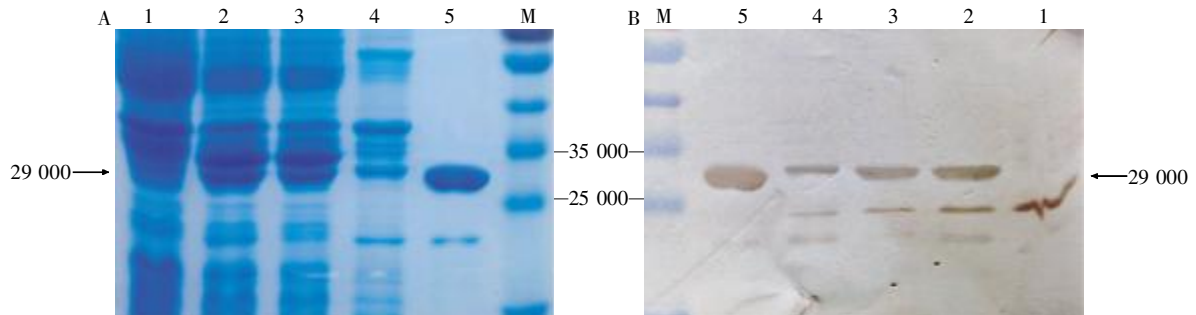


图 3 sLF253 的表达纯化  
Figure 3 Expression and purification of sLF253  
A:SDS-PAGE 检测结果;B:Western blot 检测结果。1:诱导前全菌蛋白;2:诱导后全菌蛋白;3:超声破碎上清液;4:超声破碎沉淀;5:纯化蛋白;M:Pageruler 预染蛋白标准分子质量。

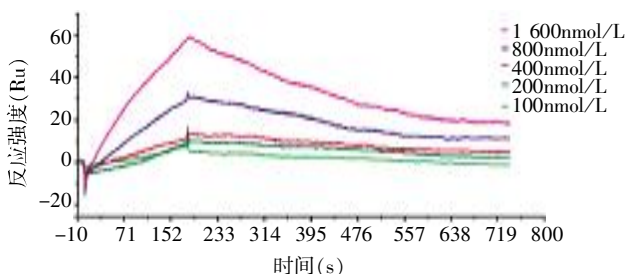
表 1 sLF253 包被 ELISA 板对不同单抗的检测

Table 1 Optical density value of different monoclonal antibody binding to sLF253 antigen by ELISA

单抗稀释倍数/单抗类型	吸光度值				
	Ab105	Ab110	Ab111	Ab112	Ab0210
1:50	0.959	1.258	0.778	1.288	0.703
1:100	0.771	1.215	0.679	1.078	0.697
1:200	0.560	1.200	0.622	0.964	0.696
1:400	0.424	1.205	0.444	0.782	0.676
1:800	0.213	1.147	0.300	0.676	0.694
1:1 600	0.149	1.187	0.201	0.661	0.704
1:3 200	0.096	1.194	0.159	0.693	0.577
0	0.067	0.088	0.091	0.079	0.099

### 2.5 sLF-PA 亲和力

经 BiacoreT-100 检测,本研究所制备的 sLF253 与 PA 结合的亲和力为  $5.813 \times 10^{-7}$  mol/L(图 4)。



Curve	ka(1/Ms)	ka(1/s)	KD(M)	Ch <sup>2</sup> (RU) <sup>2</sup>	U-value
Cycle:6 100nmol/L	7800	0.004534	5.813E-7	1.87	1
Cycle:7 200nmol/L					
Cycle:8 400nmol/L					
Cycle:9 800nmol/L					
Cycle:10 1600nmol/L					

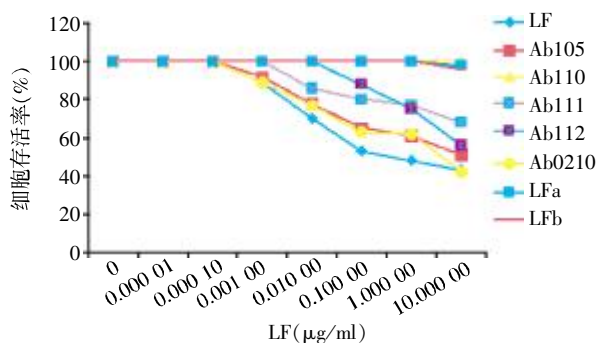
图 4 sLF-PA 的亲和力测试  
Figure 4 The affinity test of sLF-PA

### 2.6 sLF253 片段的生物学活性分析结果

检测结果显示,sLF253 片段和抗体 Ab110 株均可以中和致死毒素,保护细胞,并且这种中和作用呈剂量-效应关系。在低浓度炭疽致死毒素的作用下,sLF253 片段和 5 种单克隆抗体均能完全保护细胞,当致死毒素浓度逐渐增加,保护率随之下降,当 LF 浓度为 10  $\mu$ g/ml 时,sLF253 和抗体 Ab110 株的细胞保护率约为 95%,而其余 4 种抗体的细胞保护率均低于 70%(图 5)。

### 2.6 sLF253 的体内保护性实验结果

体内动物试验结果显示,当重组蛋白 sLF253 的剂量为 20、40  $\mu$ g 时,大鼠在 90 min 内全部死亡,当重组蛋白 sLF253 的剂量达 60  $\mu$ g 以上后,大鼠存活率为 100%。该结果提示本研究所制备的重组蛋白 sLF253,在大鼠体内具有较好的中和活性,能够抑制炭疽毒素的致死作用,可以进一步应用于制备炭疽治疗药物。



LF 为大分子蛋白;Ab105、Ab110、Ab111、Ab112、Ab0210 为 LF 单克隆抗体;LFa 和 LFb 为本实验制备的 sLF253 重组蛋白。

图5 sLF253 及不同抗体对细胞的保护作用

Figure 5 sLF253 and different antibodies for cell protection

### 3 讨论

炭疽毒素是炭疽杆菌的主要致病物质,包括致死毒素 LT 和水肿毒素 ET 两种。LF 是一种锌依赖性金属蛋白酶,可以降解细胞内多种促分裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKK), 从而阻断多种细胞 MAPK 信号转导通路,包括胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和非受体酪氨酸激酶 (non-receptor tyrosine kinase, NTK) 等,导致内皮细胞、巨噬细胞的溶解、树突状细胞的功能受损、细胞因子的分泌失调,进而造成机体死亡<sup>[12-13]</sup>。

本研究中使用 pET-28a(+) 原核表达体系,成功构建了 pET-28a/LF253 表达载体,使重组蛋白在大肠杆菌中大量表达。重组蛋白的 C 端融合了一个 6x His 组氨酸标签,使蛋白易于纯化。在表达过程中,对诱导条件进行了优化,分别调整诱导时间为 2、4、6 和 12 h,调整 IPTG 浓度至终浓度为 0.1、0.5、1.0 和 2.0 mmol/L,改变诱导温度为 37℃ 和 25℃。SDS-PAGE 分析表明,在 37℃ 下 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后,大部分蛋白能以可溶性蛋白的形式表达,避免了变性复性带来的问题,使得重组蛋白更好地保持其天然构象。

重组获得的目的蛋白 sLF253 经过一系列的实验检测,表现出良好的免疫原性、亲和力和生物学活性。研究炭疽毒素的两个常用细胞系是小鼠巨噬细胞系 J774A.1 和 RAW 264.7,对致死毒素都很敏感。本研究则选择 J774A.1 细胞作为评价 sLF253 和 LF 单克隆抗体体外中和致死毒素的靶细胞。将本研究制备的 sLF253 蛋白和前期制备的 LF 单克隆抗体分别与不同浓度的炭疽杆菌致死毒素混合,作用靶细胞后计算细胞存活率,结果表明 sLF253 蛋白与

LF 单克隆抗体 Ab110 能够竞争性结合 PA 抗原,使其不能与 LF 结合形成致死毒素,发挥其细胞毒作用,并且其中和致死毒素的作用呈剂量-效应关系。在 sLF253 蛋白的体内保护性实验中,当进入体内的 sLF253 蛋白达到一定量时,可使实验大鼠免于死亡。体内外实验的结果充分说明,本实验制备的 sLF253 蛋白在体内外可中和致死毒素,具有一定的保护作用,具有良好的临床应用价值。

单克隆抗体虽然具有理化性状高度均一、生物活性单一、与抗原结合的特异性强、便于人为处理和质控等优点,但是克隆效率低,抗体产量低,细胞系不稳定,筛选过程繁琐费时,并且鼠源性抗体在人体中应用易诱发人抗鼠抗体反应<sup>[14]</sup>。正是因为单克隆抗体的特异性较高,每一种单抗只针对一个抗原表位,所以相应的敏感性也可能会更低,难以人为控制。相对于单克隆抗体,通过基因工程得到的 sLF253 蛋白是能与 PA 天然聚合的结构域 1,亲和力更高,因此中和炭疽致死毒素的能力更强。

目前商业化的炭疽疫苗包括减毒活疫苗、重组疫苗以及核酸疫苗<sup>[15]</sup>,但要制备一种安全、高效、免疫过程简单、可应用于人体的炭疽疫苗,未来还需要深入研究。针对炭疽的中和抗体现在已成为治疗炭疽病的研究热点之一,包括抗 PA 抗体、抗 LF/EF 抗体以及抗荚膜抗体等<sup>[16]</sup>。相对于 PA,对以 LF 为主的疫苗研究还较少<sup>[17]</sup>。本研究获得的 sLF253 蛋白在体外实验中对细胞有 95% 的保护率,初步的大鼠体内保护性实验也表明当重组蛋白 sLF253 的剂量达 60 μg 以上可使大鼠免于死亡,而且 sLF253 蛋白没有细胞毒性,抗原特异性强,具有很高的研究价值。同时由于基因工程蛋白具有表达技术成熟、制备简单、产量较高等优势,本研究制备的 sLF253 蛋白也为进一步开发新型炭疽疫苗奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Anderson PD, Bokor G. Bioterrorism: pathogens as weapons [J]. J Pharm Pract, 2012, 25(5): 521-529
- [2] Toumier JN, Ulrich RG, Quesnel-Hellmann A, et al. Anthrax, toxins and vaccines: a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7(2): 219-236
- [3] Beierlein JM, Anderson AC. New developments in vaccines, inhibitors of anthrax toxins, and antibiotic therapeutics for *Bacillus anthracis* [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(33): 5083
- [4] Bann JG. Anthrax toxin protective antigen-insights into

- molecular switching from prepore to pore [J]. *Protein Sci*, 2012, 21(1):1-12
- [5] Collier RJ. Membrane translocation by anthrax toxin [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(6):413-422
- [6] Kintzer AF, Thoren KL, Sterling HJ, et al. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes [J]. *J Mol Biol*, 2009, 392(3):614-629
- [7] Phillips DD, Fattah RJ, Crown D, et al. Engineering anthrax toxin variants that exclusively form octamers and their application to targeting tumors [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13):9058-9065
- [8] Lee CS, Dykema KJ, Hawkins DM, et al. MEK2 is sufficient but not necessary for proliferation and anchorage-independent growth of SK-MEL-28 melanoma cells [J]. *PloS One*, 2011, 6(2):e17165
- [9] Baillie LW, Huwar TB, Moore S, et al. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor [J]. *Vaccine*, 2010, 28(41):6740-6748
- [10] Pannifer AD, Wong TY, Schwarzenbacher R, et al. Crystal structure of the anthrax lethal factor [J]. *Nature*, 2001, 414(6860):229-233
- [11] Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation [J]. *Nature*, 1992, 357(6377):375-379
- [12] Langer M, Duggan ES, Booth JL, et al. *Bacillus anthracis* lethal toxin reduces human alveolar epithelial barrier function [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(12):4374-4387
- [13] Liu S, Moayeri M, Leppla SH. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(6):317-325
- [14] Azinovic I, DeNardo GL, Lamborn KR, et al. Survival benefit associated with human anti-mouse antibody (HAMA) in patients with B-cell malignancies [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(12):1451-1458
- [15] 熊小培, 杨晓明. 炭疽杆菌毒素致病机制及炭疽疫苗的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19(6):653-656
- [16] Chen ZC, Moayeri M, Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax [J]. *Toxins*, 2011, 3(8):1004-1019
- [17] Froude II JW, Thullier P, Pelat T. Antibodies against anthrax; mechanisms of action and clinical applications [J]. *Toxins(Basel)*, 2011, 3(11):1433-1452

[收稿日期] 2014-08-11

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。