

## 鸭 *C4BP $\alpha$* 的克隆、表达及其与鸭疫里默氏菌的互作

李德龙, 谭理娟, 谷九龙, 王思媛, 刘婷, 陈思怀, 高继业, 唐发书, 李继祥

西南大学 动物科学学院, 重庆 402460

李德龙, 谭理娟, 谷九龙, 等. 鸭 *C4BP $\alpha$*  的克隆、表达及其与鸭疫里默氏菌的互作. 生物工程学报, 2020, 36(4): 693–699.  
Li DL, Tan LJ, Gu JL, et al. Cloning and expression of duck *C4BP $\alpha$*  and verification of its interaction with *Riemerella anatipestifer*. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 693–699.

**摘要:** 为研究鸭 C4 结合蛋白 (C4b-binding protein, C4BP) 与鸭疫里默氏菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 的相互作用, 对鸭 *C4BP $\alpha$*  进行克隆、原核表达, 免疫小鼠制备多克隆抗体, 并利用间接免疫荧光试验及斑点杂交试验验证 C4BP 与 RA 的相互作用。结果显示, 鸭 *C4BP $\alpha$*  核苷酸序列全长为 1 230 bp, 与鸡 *C4BP $\alpha$*  的相似性最高 (82.1%); 系统进化树分析发现, 鸭 *C4BP $\alpha$*  与鸡 *C4BP $\alpha$*  处于同一系统进化树分支上, 两者遗传进化关系最近; *C4BP $\alpha$*  在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中能高效表达, 重组蛋白以胞内可溶性形式存在; 多克隆抗体效价超过 1:10 000, 并且可以与重组蛋白发生特异性反应; 间接免疫荧光试验和斑点杂交试验结果显示 RA 与鸭 C4BP 可以发生相互作用。研究结果为进一步揭示 RA 的致病机制奠定了基础。

**关键词:** 鸭 C4 结合蛋白  $\alpha$ , 克隆, 原核表达, 鸭疫里默氏菌

## Cloning and expression of duck *C4BP $\alpha$* and verification of its interaction with *Riemerella anatipestifer*

Delong Li, Lijuan Tan, Jiulong Gu, Siyuan Wang, Ting Liu, Sihuai Chen, Jiye Gao, Fashu Tang, and Jixiang Li

College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460, China

**Abstract:** To study the interaction between C4b-binding protein (C4BP) and *Riemerella anatipestifer* (RA), we cloned duck *C4BP $\alpha$* , conducted prokaryotic expression and prepared the polyclonal antibody by immunizing mice. Then indirect immunofluorescence assay and dot blotting hybridization assay were used to verify the interaction between C4BP and RA. The full length of duck *C4BP $\alpha$*  nucleotide sequence was 1 230 bp, with the highest similarity to chicken *C4BP $\alpha$*  (82.1%). Phylogenetic tree analysis showed that duck *C4BP $\alpha$*  and chicken *C4BP $\alpha$*  were on the same phylogenetic tree branch and the genetic evolution relationship between them was the closest. *C4BP $\alpha$*  was efficiently expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins existed in intracellular soluble form. The titer of polyclonal antibody was more than 1:10 000

**Received:** June 4, 2019; **Accepted:** November 29, 2019

**Supported by:** The Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. XDJK2018C055), Southwestern University PhD Fund Project (No. 20700506).

**Corresponding author:** Jixiang Li. Tel: +86-23-46751058; E-mail: jixianglucky@126.com

中央高校基本科研业务费专项资金项目 (No. XDJK2018C055), 西南大学博士基金 (含引进人才计划) 项目 (No. 20700506) 资助。

网络出版时间: 2020-03-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200305.1023.001.html>

and polyclonal antibodies could specifically recognize the recombinant proteins. The results of indirect immunofluorescence assay and dot blot hybridization assay showed that RA could interact with duck C4BP. The results provide a basis to further reveal the pathogenesis of RA.

**Keywords:** duck C4 binding protein  $\alpha$ , cloning, prokaryotic expression, *Riemerella anatipestifer*

鸭疫里默氏菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是一种不运动、无芽胞的革兰氏阴性小杆菌<sup>[1]</sup>, 主要感染 1-8 周龄鸭, 但以 2-3 周龄鸭最易感, 发病率和死亡率均很高, 给养鸭业造成了较大经济损失<sup>[2-3]</sup>。一旦 RA 感染了鸭群, 就会逐渐发展为地方流行性疾病<sup>[2]</sup>, 而且细菌的反复感染及耐药性也给该病的防治带来了很大困难<sup>[4-6]</sup>。只有揭示了 RA 的致病机制, 才能更好地防控该病。

病原性细菌感染宿主, 必须采取有效措施逃避、抵抗和战胜宿主的先天免疫应答。补体系统是天然免疫系统的重要组成部分, 由 30 多种蛋白组成, 具有识别与消除外来病原体、激活免疫细胞和调控获得性免疫等功能<sup>[7-8]</sup>。补体系统主要通过经典途径、凝集素途径和旁路途径激活, 形成攻膜复合物 (Membrane attack complex, MAC), 可以直接裂解革兰氏阴性菌<sup>[9-10]</sup>, 但有的细菌可通过不同方式逃避补体系统的清除<sup>[11]</sup>。据报道, 小肠结肠炎耶尔森氏菌及大肠杆菌等革兰氏阴性菌可以通过表面蛋白捕获宿主血清中 C4 结合蛋白 (C4b-binding protein, C4BP) 以达到逃避补体攻击的目的<sup>[11-12]</sup>。C4BP 由 7 个  $\alpha$  链和 1 个  $\beta$  链组成的糖蛋白, 分子量约为 570 kDa, 其中每条  $\alpha$  链含有 8 个短同源重复序列 (Short consensus repeats, SCRs),  $\beta$  链含有 3 个 SCRs<sup>[13-15]</sup>。C4BP 主要通过  $\alpha$  链 SCRs 1-3 与 C4b 结合以干扰 C3 转化酶 (C4bC2a) 的组装与衰变, 并作为 I 因子的辅助因子抑制补体系统经典途径激活<sup>[15-17]</sup>。目前研究多集中于人和鼠 C4BP, 而未见鸭 C4BP 相关研究报道, 也缺乏相关抗体等试剂。RA 是危害养鸭业的重要病原性细菌, 其在致病过程中能否通过与鸭 C4BP 发生相互作用从而逃避补体系统的攻击目前尚不清楚。

本研究在克隆、原核表达鸭 C4BP $\alpha$  及制备多克隆抗体基础上, 利用间接免疫荧光试验 (Immunofluorescence assay, IFA) 和斑点杂交试验研究鸭 C4BP $\alpha$  与 RA 相互作用, 为揭示 RA 逃避补体系统清除的机制奠定基础, 同时为进一步研发 RA 疫苗提供了新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物

10 日龄健康雏鸭 (樱桃谷鸭) 购自重庆永健生物技术有限公司。6-8 周龄 SPF 级雌性昆明小鼠购自西南医科大学实验动物中心。

#### 1.1.2 菌株和载体

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3), 原核表达载体 pCold-TF 均由西南大学动物科学学院动物疫病防控与兽医公共卫生研究室保存。

#### 1.1.3 主要试剂

PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix、Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 及 DNA Ligation Kit 等购自宝日生物技术 (北京) 有限公司; EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; HRP 标记山羊抗鼠 IgG、FITC 标记山羊抗鼠 IgG 和 TRIzol 等购自 Sigma 公司; 健康鸭血清采集自 10 日龄健康鸭; TF 标签蛋白及鼠抗 TF 标签蛋白血清由本研究课题组制备并保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鸭 C4BP $\alpha$ 基因克隆与分析

据文献查阅, 未见有鸭 C4BP $\alpha$  序列的报道, 本试验参考 NCBI 鸡 C4BP $\alpha$  mRNA 序列 (GenBank

登录号 NM\_204664.2) 设计引物 (上游引物: 5'-ATGCAGAGCTTTCCCGTTGGAA-3'; 下游引物 5'-TCATTTACAGCTCGTATATTTGGC-3') 用于 C4BP $\alpha$  核苷酸序列扩增, 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。

健康雏鸭静脉放血处死, 无菌采集肝脏组织 100 mg, 放入液氮预冷的研钵中研磨, 利用 TRIzol 抽提法提取总 RNA, 并据反转录试剂盒说明书合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的 DNA。

将回收的 DNA 与 pMD19-T 载体连接, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 37 °C 过夜培养, 挑取白色单菌落进行培养, 提取质粒, PCR 鉴定, 武汉金开瑞生物工程有限公司测序 (命名为 pMD-C4BP $\alpha$ )。利用 NCBI BLAST 和 DNASTar MegAlign (Cluster W 方法) 软件进行序列分析。利用 clustal X 1.83 和 MEGA X (Neighbor-Joining method, bootstrap 值为 1 000) 进行遗传进化树分析。

### 1.2.2 重组蛋白的诱导表达

根据密码子优化软件 OptimumGene<sup>TM</sup> 对目的 DNA 核苷酸序列进行分析, 序列中存在稀有密码子, 按照大肠杆菌最适密码子人工合成 C4BP $\alpha$ , 命名为 C4BP $\alpha$ (m)。以 pCold-TF 构建重组表达质粒 pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m), 转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 并用抗生素平板筛选单菌落, 扩大培养后转接至新鲜含 Amp 的液体 LB, 37 °C、180 r/min 培养 2.5 h (*OD* 值约为 0.6–0.8)。15 °C 静置 30 min, 加入终浓度为 1.0 mmol/L IPTG, 15 °C、180 r/min 诱导表达 24 h。收集菌液, 离心后用 PBS 重悬菌体, 冰浴条件下超声破碎菌体至悬液澄清, 8 500 $\times$ g、4 °C 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 用于 12% SDS-PAGE 检测。

### 1.2.3 多克隆抗体的制备及鉴定

TF-C4BP $\alpha$ (m) 表达产物经 SDS-PAGE 分离,

切取重组蛋白 TF-C4BP $\alpha$ (m) 凝胶条带, 烘干、研磨, 加适量生理盐水后充分匀浆制备成免疫抗原。将 16 只 6–8 周龄 SPF 级雌性昆明小鼠随机分为 2 组, 8 只/组, 隔离饲养, 一组皮下注射 TF-C4BP $\alpha$ (m) 蛋白免疫抗原, 另一组皮下注射 0.1 mL PBS 作为健康对照。以相同剂量加强免疫 2 次, 间隔时间为 2 周。第 2 次加强免疫后 2 周摘眼球采血并分离血清, -20 °C 保存备用。

ELISA 鉴定: 将 TF-C4BP $\alpha$ (m) 蛋白用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释为 5  $\mu$ g/mL, 每孔 100  $\mu$ L, 4 °C 包被过夜; 每孔 200  $\mu$ L 5% 脱脂奶粉封闭, 37 °C 封闭 2 h; 稀释的鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清, 100  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 1 h。二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 5 000)。TMB 避光显色 15 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ L/孔, 酶标仪测定 *OD*<sub>450</sub>。试验中, 用健康鼠血清作为阴性对照。判定标准:  $S/N = (\text{样品 } OD_{450}) / (\text{阴性对照 } OD_{450})$ ,  $S/N > 2.1$  为阳性。

Western blotting 鉴定: 将 TF-C4BP $\alpha$ (m) 蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 电转移至聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 再与鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清 4 °C 过夜孵育, 加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, DAB 避光显色。

### 1.2.4 间接免疫荧光试验

利用 IFA 鉴定 RA 能否与鸭血清中 C4BP 发生相互作用, 步骤参照文献[18]并进行适当改进。在巧克力培养基上划线培养 RA-AF 株, 37 °C 过夜培养, 挑取平板上的单菌落于 LB 中培养, PBS 洗 3 次后悬浮至均匀浓度, 制备涂片; 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次; 10% 健康鸭血清与涂片在 37 °C 湿盒中孵育 1 h, PBS 洗 3 次; 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清为一抗, 4 °C 过夜作用, PBS 洗 3 次; FITC 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗, 37 °C 孵育 1 h (避光), PBS 洗 3 次, 荧光显微镜观察。试验中, 鼠抗 TF 标签蛋白血清代替鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清为阴性对照组, 健康鼠血清代替鼠抗鸭

C4BP $\alpha$ (m) 血清为空白对照组。

### 1.2.5 斑点杂交试验

利用斑点杂交试验鉴定 RA 能否与 C4BP $\alpha$  发生相互作用, 步骤参照文献[19]并进行适当改进。

样品制备: RA 纯培养物经 PBS 洗 3 次后用明胶维罗纳缓冲盐水 (Gelatin veronal buffered saline, GVBS<sup>++</sup>) 将菌液浓度调至  $1.9 \times 10^9$  CFU/mL; TF-C4BP $\alpha$ (m) 重组蛋白、10% 健康鸭血清和 20% 健康鸭血清分别与菌液在 37 °C 孵育 1 h, GVBS 洗 3 次; 离心后重悬于 0.06 mol/L Tris buffer (2% SDS), 煮沸 5 min;  $12\ 000 \times g$  离心 5 min, 上清即为待测样品。TF 标签蛋白代替 TF-C4BP $\alpha$ (m) 重组蛋白为阴性对照组。

试验步骤: 将 3  $\mu$ L 待测样品滴加于 PVDF 膜中央, 室温静置 10 min; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗 3 次; 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清为一抗, 4 °C 过夜作用, TBST 洗 3 次; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗, 37 °C 作用孵育 1 h, TBST 洗 3 次; DAB 避光显色 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的克隆与序列分析

以鸭肝组织总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到一个大小为 1 230 bp 的特异性片段 (图 1)。经 NCBI BLAST 比对, 与鸡 C4BP $\alpha$  (GenBank 登录号 NM\_204664.2) 的相似

性为 82.1%。通过对系统进化树分析发现, 与鸡 C4BP $\alpha$  在核苷酸和氨基酸水平上均处于同一分支, 遗传进化关系最近 (图 2)。本研究获得的鸭 C4BP $\alpha$  基因序列已上传至 GenBank, 登录号为 MH282865.1。

### 2.2 重组蛋白的检测和存在形式鉴定

pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 用终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 可检测到菌体中存在多量表达且分子量约为 93 kDa 的重组蛋白, 与预期重组蛋白 TF-C4BP $\alpha$ (m) 大小一致。检测超声破碎菌体上清和沉淀, 表达蛋白在上清中, 表明重组蛋白为胞内可溶性表达 (图 3)。

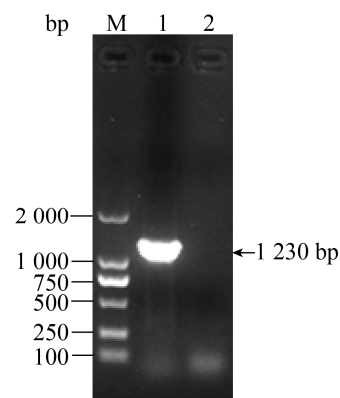


图 1 C4BP $\alpha$  基因的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of C4BP $\alpha$  gene. M: DNA 2 000 marker; 1: C4BP $\alpha$ ; 2: negative control.

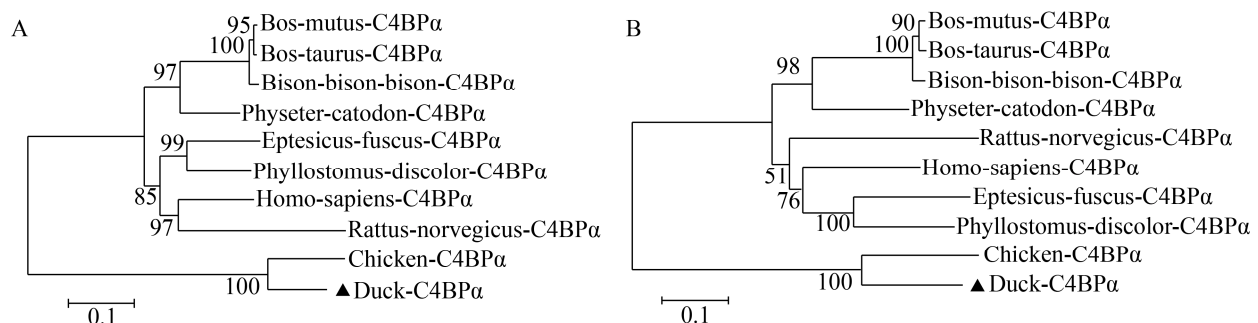


图 2 C4BP $\alpha$  基因系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of C4BP $\alpha$  gene. (A) Phylogenetic tree analysis of nucleotides. (B) Phylogenetic tree analysis of amino acids.

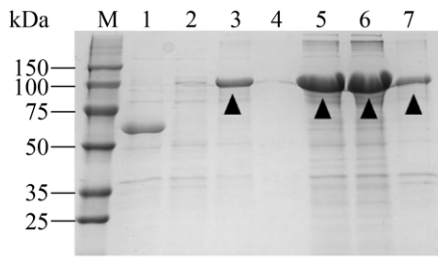


图3 pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 重组表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant expression of pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21. M: standard protein molecular marker; 1: induced pCold-TF; 2: uninduced pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21; 3: induced pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21; 4: induced LB supernatant after centrifugation; 5: unbroken cells of pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 after induction; 6: disrupted supernatant of pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 after induction; 7: disrupted precipitate of pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 after induction. The triangle points to the TF-C4BP $\alpha$ (m) position.

### 2.3 ELISA 检测多克隆抗体效价

经 ELISA 检测, 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清在稀释度 1:10 000 所测得的平均  $OD_{450}$  为 0.605, S/N 均大于 2.1, 因此制备的多克隆抗体鉴定为阳性,

表1 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m)多克隆抗体 ELISA 结果

Table 1 ELISA results of mouse anti-duck C4BP $\alpha$ (m) polyclonal antibody

| Serum dilution | $OD_{450}$ TF-C4BP $\alpha$ (m) |       |       |       |       |       |       |       | $OD_{450}$ negative control |
|----------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------|
|                | No. 1                           | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 |                             |
| 100            | 1.722                           | 1.697 | 1.718 | 1.714 | 1.708 | 1.699 | 1.710 | 1.704 | 0.284                       |
| 1 000          | 1.108                           | 1.042 | 1.069 | 1.101 | 1.087 | 1.095 | 1.048 | 1.098 | 0.151                       |
| 10 000         | 0.612                           | 0.601 | 0.608 | 0.598 | 0.614 | 0.605 | 0.603 | 0.597 | 0.121                       |
| 100 000        | 0.184                           | 0.188 | 0.193 | 0.196 | 0.192 | 0.184 | 0.197 | 0.194 | 0.095                       |

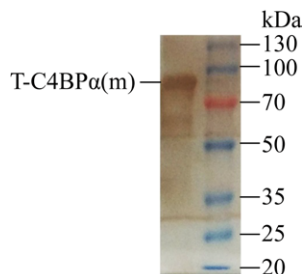


图4 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 多克隆抗体 Western blotting 结果  
Fig. 4 Western blotting result of mouse anti-duck C4BP $\alpha$ (m) polyclonal antibody. M: 15 kDa–130 kDa pre-dyed marker; 1: TF-C4BP $\alpha$ (m).

同时可以判断所获抗体效价较高, 超过 1:10 000, 但是低于 1:100 000 (表 1)。

### 2.4 多克隆抗体与 TF-C4BP $\alpha$ (m) 特异性结合

Western blotting 检测多克隆抗体的特异性。经检测, PVDF 膜上出现一条清晰的约为 93 kDa 条带。由此可见, 鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清可以与重组蛋白 TF-C4BP $\alpha$ (m) 特异性结合 (图 4)。

### 2.5 间接免疫荧光鉴定 C4BP $\alpha$ 与 RA 相互作用

IFA 鉴定鸭 C4BP 与 RA 相互作用。试验组为鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m)血清为一抗, 可见许多散在绿色荧光点 (图 5A); 阴性对照组 (鼠抗 TF 标签蛋白血清为一抗)和空白对照组 (健康鼠血清代替一抗鼠血清)几乎未见绿色荧光点 (图 5B–C)。

### 2.6 斑点杂交试验鉴定 C4BP $\alpha$ 与 RA 相互作用

用斑点杂交试验鉴定鸭 C4BP $\alpha$  与 RA 相互作用。RA 与 TF-C4BP $\alpha$ (m)重组蛋白作用杂交斑点较清晰, RA 与 10%和 20%健康鸭血清作用呈现杂交斑点, 但与 20%血清作用的斑点颜色较浅, 而以 TF 标签蛋白代替 TF-C4BP $\alpha$ (m)重组蛋白的阴性对照组未出现明显的杂交斑点 (图 6)。

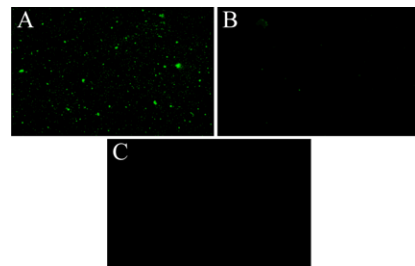


图5 IFA 检测鸭 C4BP $\alpha$  与 RA 相互作用 (800 $\times$ )

Fig. 5 The interaction between duck C4BP $\alpha$  and RA by IFA (800 $\times$ ). (A) Test group. (B) Negative control group. (C) Blank control group.

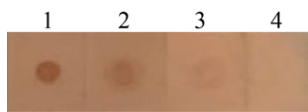


图 6 斑点杂交试验检测鸭 C4BP $\alpha$  与 RA 相互作用

Fig. 6 The interaction between duck C4BP $\alpha$  and RA by dot blotting hybridization. 1: RA and TF-C4BP $\alpha$  (m) treated group; 2: RA and 10% healthy duck serum treated group; 3: RA and 20% healthy duck serum treated group; 4: negative control group.

### 3 讨论

补体系统是抵抗病原微生物入侵宿主的主要非特异性免疫系统之一，而病原微生物也进化出招募并利用宿主液相补体调节蛋白来保护自己免受补体系统攻击的本领，C4BP 就是最常见的补体负调节蛋白之一<sup>[20]</sup>。C4BP 通过干扰 C3 转化酶 C4bC2a 的组装与衰变，以及作为 I 因子的辅助因子抑制经典途径的活化而发挥补体系统负调节作用<sup>[15-16]</sup>。RA 可以分泌胞外蛋白酶抑制补体系统经典途径和凝集素途径激活<sup>[21]</sup>，但是 RA 能否通过与鸭 C4BP 发生相互作用从而逃避补体系统的攻击目前尚不清楚。

由于 C4BP 分子量巨大且可与血清其他成分形成复合物，因此从血清中直接提纯 C4BP 难度较大<sup>[22]</sup>。研究发现， $\alpha$  链是 C4BP 与 C4b 结合的主要功能区域，C4BP $\alpha$  的 SCRs 1-3 与 C4b 结合后，能够干扰经典途径和凝集素途径 C3 及 C5 转化酶的组装，并通过 I 因子增强 C4b 的蛋白水解裂解能力<sup>[23-25]</sup>。因此本研究克隆鸭 C4BP $\alpha$  基因，序列比对分析后发现鸭 C4BP $\alpha$  与鸡 C4BP $\alpha$  遗传进化关系最近。随后将 pCold-TF-C4BP $\alpha$ (m)/*E. coli* BL21 进行诱导表达，成功获得重组蛋白 TF-C4BP $\alpha$ (m)，同时检测超声破碎菌体上清和沉淀，发现重组蛋白为胞内可溶性表达，这就为后期蛋白的收集及纯化提供了便利。在制备免疫抗原时，本研究未采用镍柱亲和层析，考虑到制备多克隆抗体重组蛋白的用量较大，所以采取切胶纯化的方式，这种方法具有操作方便、快速、成本低并且无需佐

剂的优点，同时制备的抗体效价高，特异性好。制备的鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清经 ELISA 检测效价超过 1:10 000，另外 Western blotting 结果也表明多克隆抗体可以与重组蛋白 TF-C4BP $\alpha$ (m) 特异性结合，说明多克隆抗体制备成功，且特异性较好。

为研究 RA 与 C4BP $\alpha$  相互作用关系，本研究进行了 IFA 和斑点杂交试验。以鼠抗鸭 C4BP $\alpha$ (m) 血清为一抗进行的 IFA，在荧光显微镜下可观察到多量的绿色荧光斑点，而以鼠抗 TF 标签蛋白血清及健康鼠血清作对照未能观察到明显的绿色荧光斑点。同时，在斑点杂交试验中，RA 与 TF-C4BP $\alpha$ (m) 重组蛋白及健康鸭血清作用，均能出现可见的杂交斑点，但与 TF 标签蛋白作用不出现杂交斑点。以上结果显示，IFA 和斑点杂交试验验证 RA 与鸭 C4BP $\alpha$  互作具有特异性，RA 能招募健康鸭血清中的 C4BP。在斑点杂交试验中，RA 与 20% 血清作用后检测的斑点比 10% 血清浅，这一结果与文献[19]报道的结果一致。

综上所述，本研究成功克隆了鸭 C4BP $\alpha$  基因，序列分析发现鸭 C4BP $\alpha$  与鸡 C4BP $\alpha$  遗传进化关系最近，制备的鼠源多克隆抗体效价较高、特异性较好，IFA 和斑点杂交试验成功验证 RA 能与鸭血清 C4BP 发生相互作用。本研究为揭示 RA 逃避补体系统清除的机制奠定了基础，同时为进一步研发 RA 疫苗提供了新思路。

### REFERENCES

- [1] Segers PW, Mannheim M, Vancanneyt K, et al. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA homology group. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43(4): 768-776.
- [2] Li JX, Tang Y, Gao JY, et al. *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. *Pak Vet J*, 2011, 31(1): 65-69.
- [3] Ryll M, Hinz KH. Exclusion of strain 670/89 as type

- strain for serovar 20 of *Riemerella anatipestifer*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2000, 113(2): 65–66.
- [4] Sandhu TS. *Riemerella anatipestifer* infection//Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, et al, Eds. Diseases of Poultry. 12th ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd., 2008: 758–764.
- [5] Subramaniam S, Huang B, Loh H, et al. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(2): 168–174.
- [6] Tsai HJ, Liu YT, Tseng CS, et al. Genetic variation of the *ompA* and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*. Avian Pathol, 2005, 34(1): 55–64.
- [7] Walport MJ. Complement. Second of two parts. N Engl J Med, 2001, 344(15): 1140–1144.
- [8] Walport MJ. Complement. First of two parts. N Engl J Med, 2001, 344(14): 1058–1066.
- [9] Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement system part I-molecular mechanisms of activation and regulation. Front Immunol, 2015, 6: 262.
- [10] Sarma JV, Ward PA. The complement system. Cell Tissue Res, 2011, 343(1): 227–235.
- [11] Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(2): 132–142.
- [12] Kraiczy P, Würzner R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. Mol Immunol, 2006, 43(1/2): 31–44.
- [13] Dahlbäck B, Smith CA, Müller-Eberhard HJ. Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(11): 3461–3465.
- [14] Hillarp A, Dahlback B. Cloning of cDNA coding for the beta chain of human complement component C4b-binding protein: sequence homology with the alpha chain. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(3): 1183–1187.
- [15] Scharfstein J, Ferreira A, Gigli I, et al. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. J Exp Med, 1978, 148(1): 207–222.
- [16] Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(12): 6596–6600.
- [17] Hovingh ES, Van Den Broek B, Jongerius I. Hijacking complement regulatory proteins for bacterial immune evasion. Front Microbiol, 2016, 7: 2004.
- [18] Schütz M, Weiss EM, Schindler M, et al. Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun, 2010, 78(6): 2677–2690.
- [19] Hair PS, Wagner SM, Friederich PT, et al. Complement regulator C4BP binds to *Staphylococcus aureus* and decreases opsonization. Mol Immunol, 2012, 50(4): 253–261.
- [20] Ho DK, Jarva H, Meri S. Human complement factor H binds to outer membrane protein Rck of *Salmonella*. J Immunol, 2010, 185(3): 1763–1769.
- [21] Fan MN, Chen SH, Zhang LD, et al. *Riemerella anatipestifer* extracellular protease S blocks complement activation via the classical and lectin pathways. Avian Pathol, 2017, 46(4): 426–433.
- [22] Fei RZ, Xu F. Anti-human C4BP monoclonal antibody preparation and some improvement of procedure. Immunol J, 1990, 6(2): 86–91 (in Chinese). 费如珍, 徐愤. 抗人 C4 结合蛋白单克隆抗体的制备及某些方法的改进. 免疫学杂志, 1990, 6(2): 86–91.
- [23] Blom AM, Webb J, Villoutreix BO, et al. A cluster of positively charged amino acids in the C4BP $\alpha$ -chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function. J Biol Chem, 1999, 274(27): 19237–19245.
- [24] Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Stringent regulation of complement lectin pathway C3/C5 convertase by C4b-binding protein (C4BP). Mol Immunol, 2009, 46(15): 2902–2910.
- [25] Ziccardi RJ, Dahlback B, Müller-Eberhard HJ. Characterization of the interaction of human C4b-binding protein with physiological ligands. J Biol Chem, 1984, 259(22): 13674–13679.

(本文责编 郝丽芳)