

检测猪丹毒杆菌抗体重组 SpaA ELISA 的建立

姚焱彬¹ 李倩文¹ 杨志鹏¹ 陆萍¹ 魏建忠¹ 孙裴¹ 李郁^{1,2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036)

(2. 安徽省畜禽产业共性技术研究院 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】利用表达纯化的猪丹毒杆菌表面保护性蛋白 SpaA, 建立检测猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 方法。【方法】克隆扩增猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因, 并将 *SpaA* 基因与原核表达载体 pGEX-6P-1 连接, 通过 PCR、双酶切及测序鉴定后, 将阳性重组质粒转化入受体菌 *E. coli* Rosetta (DE3), 并利用 IPTG 进行诱导表达, SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物。将 SpaA 重组蛋白按不同浓度包被酶标板, 通过方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度及血清稀释度, 并对其他条件进行优化, 最终建立检测猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 方法。【结果】利用克隆表达的猪丹毒杆菌 SpaA 蛋白作抗原, 通过方阵滴定法确定蛋白最佳包被浓度为 1.0 mg/L, 血清的最佳稀释度为 1:100, 建立了检测猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 方法, 批内及批间变异系数均小于 10%, 具有较好的重复性及特异性。用建立的间接 ELISA 方法检测猪丹毒疫苗免疫后的健康猪血清样品, 检测结果与美国 TSZ 公司猪丹毒杆菌抗体检测试剂盒和 Western blot 鉴定结果进行对比, 两者总符合率分别为 92.20%、92.59%。【结论】试验利用原核表达的 SpaA 重组蛋白作抗原建立的检测猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 方法, 特异性强、重复性好、敏感性高, 可用于猪丹毒杆菌的抗体检测及流行病学调查。

关键词: 猪丹毒杆菌, 表面保护性蛋白 SpaA, 克隆表达, 间接 ELISA, 建立

Development of recombinant SpaA-based ELISA for detection of antibodies against swine erysipelas

YAO Yan-Bin¹ LI Qian-Wen¹ YANG Zhi-Peng¹ LU Ping¹ WEI Jian-Zhong¹
SUN Pei¹ LI Yu^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Anhui Institute of Generic Industrial Science and Technology in Livestock and Poultry, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] In the present study, an indirect ELISA was developed using the purified

Foundation item: Key Project of National Spark Program (No. 2014GA710002); Quality Project of Anhui Province (No. 2013sxx008); Innovation Fund Project of Anhui Agriculture University (No. XJ2015142); Anhui Pig Industry Fund Project

*Corresponding author: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

Received: March 22, 2016; Accepted: June 14, 2016; Published online (www.cnki.net): June 21, 2016

基金项目: 国家星火计划重点项目(No. 2014GA710002); 安徽省质量工程项目(No. 2013sxx008); 安徽农业大学大学生创新基金项目(No. XJ2015142); 安徽省生猪产业体系基金项目

*通讯作者: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2016-03-22; 接受日期: 2016-06-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-21

recombinant SpaA protein for detection of the antibodies against *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

[Methods] Using gene recombination technology, the *SpaA* gene was cloned and inserted into prokaryotic expression vector pGEX-6P-1 and the recombinant expression vector was identified with PCR, restriction enzyme digestion and sequencing. The positive recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* Rosetta(DE3) and induced by IPTG. The recombinant protein was detected by SDS-PAGE and Western blot. An indirect ELISA was developed with the purified protein at different concentrations and the optimal antigen concentration and serum dilution were determined by phalanx titration. The other assay conditions were also optimized. **[Results]** The optimal coating concentration of SpaA and serum dilution were 1.0 mg/L and 1:100, respectively. Both the intra- and inter-coefficient of variation were lower than 10%, suggesting its reproducibility and repeatability. The developed indirect ELISA method was compared with the ELISA kit supplied by TSZ and Western blot, the coincidence rate was 92.20% and 92.59% respectively. **[Conclusion]** The developed ELISA had good specificity, reproducibility and sensitivity. It could provide a reliable method for the clinical detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and epidemiological investigations.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Recombinant surface protect antigen A protein, Clone expression, Indirect ELISA, Establish

猪丹毒(Swine erysipelas)是由猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)引起的一种人畜共患传染病,其临床特征主要为高热、急性败血症、皮肤疹块、慢性疣状心内膜炎及皮肤坏死与多发性非化脓性关节炎^[1]。目前,该病在世界上大多数国家都有分布,呈散发或流行性发生,给养猪业造成了很大的经济损失,也给人体健康带来威胁。

由 *SpaA* 基因编码的猪丹毒杆菌表面保护性抗原(Surface protective antigen, Spa)分为三类,即 SpaA、SpaB、SpaC,目前研究最多的是 SpaA 蛋白。*SpaA* 基因的大小为 1 881 bp,它所编码的 SpaA 蛋白主要是由 N 端的免疫保护性区域(Immunoprotection domain)和 C 端的细胞结合区域(Cell-binding domain)组成。研究表明,SpaA 蛋白具有良好的免疫原性,能激发机体产生具有保护性的中和抗体^[2],是猪丹毒杆菌的主要免疫保护性抗原,而且该抗原几乎存在于所有毒力较强的猪丹毒杆菌中^[3]。

目前,猪丹毒杆菌抗体检测技术主要包括免疫荧光抗体实验(Immunofluorescent antibody, IFA)、间接血凝实验(Indirect hemagglutination test, IHA)、酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[4-5]等。其中,IFA 敏感可靠但需要昂贵的仪器设备,IHA 敏感度较低且不能实现高通

量的检测样本,而 ELISA 则具有操作简便、价格低廉、试验周期短、快速敏感、无需复杂仪器设备、易于大批量检测等优点。Imada 等以猪丹毒杆菌 SpaA 蛋白作为包被抗原建立了间接 ELISA 方法,既能评价母源抗体水平和疫苗免疫效果,也能进行野毒感染的监测^[6]。Giménez-Lirola 等采用 SpaA 蛋白建立的间接 ELISA 方法可测定不同血清型猪丹毒杆菌抗体,不仅样品批量大,而且检测结果稳定^[7]。本实验将临床分离的猪丹毒杆菌(1a 型) *SpaA* 基因克隆到原核表达载体 pGEX-6P-1(+)构建重组质粒 pGEX-6P-1-SpaA,在 *E. coli* Rosetta(DE3)菌中进行优化表达,表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。以纯化回收后 SpaA 重组蛋白作为包被抗原建立猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 检测方法,并将检测结果与美国 TSZ 公司猪丹毒杆菌抗体检测试剂盒和 Western blot 检测结果进行对比。旨在研发一种简便、快速、特异的检测方法,为猪群免疫监测和猪丹毒流行病学调查提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和血清及培养基

猪丹毒杆菌 HF20120609 (1a 型),大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、Rosetta(DE3)菌株,原核表达载体 pGEX-6P-1,猪丹毒杆菌阴性血清和阳性血清,传

染性胸膜肺炎放线杆菌(APP), 猪圆环病毒 2 型(PCV2), 猪伪狂犬病毒(PRV), 副猪嗜血杆菌(HPS), 猪瘟病毒(CSFV), 猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)阳性血清, 均由安徽农业大学动物传染病实验室保存提供; 待检血清采自安徽地区部分猪场; 含 0.6% 酵母浸膏胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)、含 0.6% 酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)、LB 肉汤购自绍兴天恒生物科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、Marker DL2000、10×Loading buffer 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自天根生物有限公司; 谷胱甘肽 GST 琼脂糖凝胶 FF 购自北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 新生小牛血清购自杭州四季青有限公司; 牛血清蛋白(BSA)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、未预染和预染标准蛋白 Marker、甘氨酸、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)、30%丙烯酰胺溶液、考马斯亮蓝 R250、β-巯基乙醇和二氨基联苯胺(DAB)购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、HRP 标记羊抗猪 IgG 抗体(IgG-HRP)购自 SIGMA 公司; 酶标板购自美国 Costar 公司; 商品化猪丹毒杆菌抗体检测试剂盒购自美国 TSZ 公司(P8823)。台式高度冷冻离心机购自德国 BECKMAN 公司; Tprofessional ThermoCycler 梯度 PCR 仪购自德国耶拿分析仪器股份公司。

1.3 目的蛋白的表达及鉴定

1.3.1 引物的合成: 根据 GenBank 中已登录的猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因主要免疫保护区 N 端序列(登录号 EF688017.1), 设计一对特异性引物, 预期扩增片段为 1 266 bp, 引物由宝生物工程有限公司合成。

引物序列如下(下划线部分为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点): P1: 5'-CGCGGATCCATGGATTCGACA GATATTTCTGTGA-3'; P2: 5'-CCGCTCGAGATTC GATTCGGGTTTTGATTGA-3'。

1.3.2 目的片段扩增及重组质粒的构建: 采用煮沸法提取细菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应体系: PCR Master mix 12.5 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 1 μg/L DNA 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 9.5 μL。反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 将 PCR 产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段。目的片段和 pGEX-6P-1 载体用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后经琼脂糖凝胶电泳回收, 两者用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜, 连接产物转化入 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 涂布于含 100 mg/L 的 Amp 的 LB 平板。PCR 菌落鉴定阳性的克隆进一步作测序鉴定。测序由金斯瑞生物技术有限公司进行。

1.3.3 SpaA 重组蛋白表达及纯化: 重组质粒转化表达菌 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞, 挑取单菌落接种于含 50 mg/L Amp 的 2 mL LB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养过夜, 待其生长至对数期时(OD_{620} 为 0.6), 加入 IPTG 诱导, 摸索最佳诱导条件表达, 离心收集菌体。经超声破碎菌体后, 离心收集超声上清与谷胱甘肽 GST 琼脂糖凝胶 FF 在室温条件下振荡结合 1 h, 用 20 mmol/L 谷胱甘肽溶液洗脱得到纯化目的蛋白。用核酸蛋白仪测定纯化后的重组蛋白含量, 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 SpaA 重组蛋白的 Western blot 分析: 将纯化后的重组蛋白转印到硝酸纤维素膜上, 含 5% 脱脂奶粉的封闭液中 4 °C 过夜, 以猪丹毒杆菌阳性血清(1:100 稀释)为一抗, 37 °C 作用 1 h, 洗膜后用羊抗猪 IgG-HRP (1:2 000 稀释)为二抗, 37 °C 作用 1 h, 最后在 DAB 缓冲溶液中显色。

1.4 SpaA 重组蛋白间接 ELISA 方法的建立

1.4.1 间接 ELISA 主要操作步骤: 将纯化重组蛋白进行适当稀释后加入酶标板, 4 °C 包被过夜; PBST (PBS 中加入 0.05% 吐温 20)洗涤 3 次, 加入 1% BSA, 37 °C 封闭 1 h; PBST 洗涤 3 次后加入稀释的血清, 37 °C 作用 1 h; PBST 洗涤 3 次后加入

稀释的羊抗猪 IgG-HRP, 37 °C 作用 1 h; PBST 洗涤 3 次后加入 TMB 底物显色, 加入终止液, 测定 OD_{450} 值。每个稀释度 3 个重复, 取其平均值, 计算每个条件下 $OD_{450,P}/OD_{450,N}$ 值。选择阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, $OD_{450,P}/OD_{450,N}$ 值最大的反应组合作为间接 ELISA 的最佳反应条件^[8]。

1.4.2 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定: 采用方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将纯化重组蛋白作 4 个浓度梯度, 分别稀释至终浓度为 4.0、2.0、1.0、0.5 mg/L, 4 °C 过夜包被酶标板。猪丹毒杆菌阴性血清和阳性血清均按 1:50、1:100、1:200、1:400 倍稀释后进行方阵试验, 测定 OD_{450} 值。

1.4.3 封闭液种类的确定: 以 1% BSA、2% BSA、1% 明胶、2% 脱脂奶粉、5% 血清为封闭液, 37 °C 封闭 2 h, 按照 ELISA 操作程序测定。重复 3 次操作, 取平均值, 计算 P/N 值。

1.4.4 一抗最佳作用时间的选择: 加入一抗后, 分别在 37 °C 作用 30、60、90 min 后进行间接 ELISA 测定。重复 3 次操作, 取平均值, 计算 P/N 值。

1.4.5 二抗浓度的选择: 按照上述确定好的最佳条件依次进行包被、封闭、加入阴性血清和阳性血清后, 将羊抗猪 IgG-HRP 分别做 1:800、1:1 000、1:2 000、1:3 000 稀释, 按照间接 ELISA 方法测定。重复 3 次操作, 取平均值, 计算 P/N 值。

1.4.6 二抗作用时间的选择: 按照最佳条件进行包被、封闭、加样, 加入二抗后 37 °C 分别孵育 30、45、60 min, 按照间接 ELISA 方法测定。重复 3 次操作, 取平均值, 计算 P/N 值。

1.4.7 显色时间的确定: 按照已确定的最佳条件进行间接 ELISA 试验, 最后加入 TMB 后分别显色 5、10、15 min 后测定 OD_{450} 值, 重复 3 次操作, 取平均值, 计算 P/N 值。

1.4.8 临界值的确定: 按照上述建立的间接 ELISA 方法检测 30 份已知猪丹毒杆菌抗体阴性血清, 在

最佳反应条件下进行间接 ELISA 试验, 测定其 OD_{450} 值并进行统计学分析, 计算平均值 \bar{x} 和标准差 s , 以 $OD_{450} < \bar{x} + 2s$ 作为阴性判定标准, $OD_{450} \geq \bar{x} + 3s$ 作为阳性判定标准, 介于两者之间者则判为可疑^[8]。

1.5 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法检测未经稀释的 APP、HPS、PCV2、PRV、CSFV、TGEV 阳性血清, 同时设置猪丹毒杆菌阳性、阴性血清对照, 分析该检测方法的特异性。

1.6 重复性试验

在相同试验条件下, 随机选取 4 份猪丹毒杆菌抗体水平不同的血清样品, 每份血清样品平行做 6 个重复, 用同一批次包被的纯化重组抗原建立的 ELISA 方法检测, 结果进行统计学分析, 以检测批内重复性。在相同试验条件下, 随机选取 4 份猪丹毒杆菌抗体水平不同的血清样品, 每份血清样品平行做 3 个重复, 取平均值, 用 6 个不同批次包被的纯化重组蛋白建立的 ELISA 方法检测, 结果进行统计学分析, 以检测批间重复性。

1.7 比对试验

临床采集 90 份猪丹毒疫苗免疫后的健康猪血清样品, 应用建立的间接 ELISA 方法以及美国 TSZ 公司生产的商品化试剂盒同步进行猪丹毒杆菌抗体的检测, 比较检测结果, 计算二者符合率、敏感性和特异性。符合率 = (阳性结果相同样本数 + 阴性结果相同样本数) / 总样本数; 敏感性 = 阳性结果相同样本数 / 商品化试剂盒检测的阳性样本数; 特异性 = 阴性结果相同样本数 / 商品化试剂盒检测的阴性样本数。

临床采集 54 份猪丹毒疫苗免疫后的健康猪血清样品, 应用建立的间接 ELISA 方法进行猪丹毒杆菌抗体的检测, 同时采用 Western blot 进行鉴定。比较检测结果, 计算二者符合率、敏感性和特异性。

2 结果与分析

2.1 *SpaA* 基因的扩增

经 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, 得到与预期片段大小(1 266 bp)相符的 DNA 条带(图 1)。

2.2 重组质粒的鉴定

将经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒双酶切后, 可见约 1 266 bp 的目的条带和 4 900 bp 的质粒条带(图 2)。重组质粒 pGEX-6P-1-*SpaA* 的测序结果显示, 片段大小与预期相符。

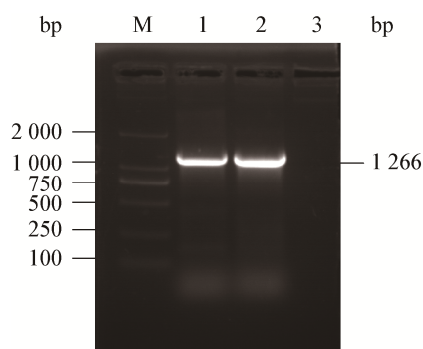


图 1 猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification of *SpaA* gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

注: M: DNA marker DL2000; 1-2: *SpaA* PCR 产物; 3: 阴性对照。
Note: M: DNA marker DL2000; 1-2: PCR product of *SpaA*; 3: Negative control.

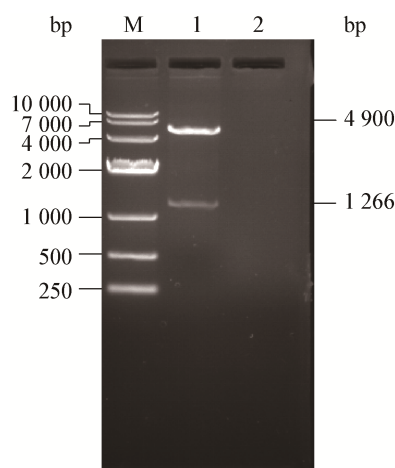


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 2 Restrictive digestion of recombinant plasmid

注: M: Marker DL10000; 1: *Bam*H I/*Xho* I 双酶切重组质粒 pGEX-6P-1-*SpaA*; 2: 阴性对照。

Note: M: Marker DL10000; 1: Digested pGEX-6P-1-*SpaA*; 2: Negative control.

2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

经 IPTG (终浓度 0.6 mmol/L) 37 °C 诱导 4 h 时蛋白表达量最大, 在预期的 75 kD 处出现目的蛋白条带。重组蛋白主要以可溶性蛋白形式存在。纯化后的重组蛋白含量为 232 mg/L (图 3)。

2.4 重组蛋白的 Western blot 分析

Western blot 结果显示, 在 75 kD 处出现明显的特异性条带, 而非诱导后的裂解产物则无特异性条带, 表明目的基因在 *E. coli* Rosetta(DE3)中得到正确表达, 表达产物能够与猪丹毒杆菌阳性血清发生特异性结合, 具有良好的反应原性(图 4)。

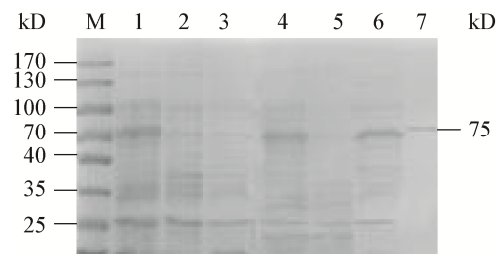


图 3 重组 *SpaA* 蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of recombinant *SpaA* protein expression and purification

注: M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导后重组菌裂解物; 2: 诱导前重组菌裂解物; 3: 诱导后的 pET-32a(+) 重组菌; 4: 超声上清; 5: 超声沉淀; 6: 纯化前的重组蛋白; 7: 纯化后的重组蛋白。
Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Recombinant bacterial extract after induction; 2: Recombinant bacterial extract before induction; 3: Induced pET-32a(+) recombinant; 4: Supernatant after ultrasonic disruption; 5: Pellets after ultrasonic disruption; 6: Recombinant protein before purification; 7: Purified recombinant protein.

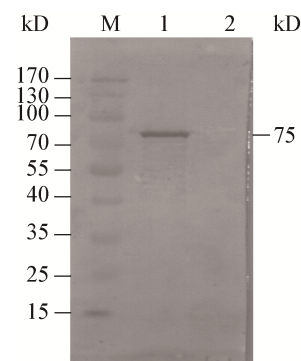


图 4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 4 Western blot analysis of recombinant *SpaA* protein

注: M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导后的裂解产物; 2: 非诱导后的裂解产物。

Note: M: Protein marker; 1: Lysate of induced bacteria; 2: Lysate of non-induced bacteria.

2.5 SpaA 重组蛋白间接 ELISA 方法的建立

2.5.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定: 方阵滴定法结果显示(表 1), 当 SpaA 重组蛋白的包被浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 血清稀释度为 1:100 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, 且 P/N 值最大。因此, 确定

1.0 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白包被浓度为最佳浓度, 血清最佳稀释度为 1:100。

2.5.2 封闭液种类的确定: 表 2 显示, 以 1% BSA 作为封闭液时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定 1% BSA 为最佳的封闭液。

表 1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定

Table 1 Determination of the coating concentration of antigen and serum dilution

抗原包被浓度 Coating concentration of antigen ($\mu\text{g/mL}$)	指标 Index	血清稀释度 Serum dilutions			
		1:50	1:100	1:200	1:400
4	$OD_{450,P}$	1.403	1.151	0.834	0.526
	$OD_{450,N}$	0.463	0.238	0.189	0.148
	$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	3.030	4.840	4.410	3.550
	$OD_{450,P}$	1.225	1.103	0.664	0.659
2	$OD_{450,N}$	0.358	0.259	0.177	0.154
	$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	3.420	4.260	3.750	4.280
	$OD_{450,P}$	1.398	1.074	0.707	0.473
	$OD_{450,N}$	0.394	0.210	0.174	0.142
1	$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	3.550	5.110	4.060	3.330
	$OD_{450,P}$	1.279	1.118	0.653	0.518
	$OD_{450,N}$	0.371	0.244	0.209	0.156
	$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	3.450	4.580	3.120	3.320

2.5.3 血清最佳作用时间的确定: 表 3 显示, 当血清作用 60 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 血清最佳作用时间是 60 min。

2.5.4 二抗浓度和作用时间的确定: 表 4 和表 5 显示, 二抗以 1:1 000 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 45 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 二抗的最佳作用浓度 1:1 000, 最佳作用时间是 45 min。

表 3 血清最佳作用时间的确定

Table 3 Determination of serum incubation time

指标 Index	30 min	60 min	90 min
$OD_{450,P}$	0.845	1.035	1.331
$OD_{450,N}$	0.192	0.215	0.383
$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	4.400	4.810	3.480

表 4 二抗浓度的确定

Table 4 Determination of goat-anti-swine-HRP dilution

二抗稀释倍数 Goat-anti-swine-HRP dilution	$OD_{450,P}$	$OD_{450,N}$	$OD_{450,P}/OD_{450,N}$
1:800	1.441	0.371	3.880
1:1 000	1.062	0.214	4.960
1:2 000	0.756	0.199	3.800
1:3 000	0.493	0.135	3.650

表 2 封闭液的确定

Table 2 Determination of optional blocking solution

指标 Index	1% BSA	2% BSA	5%胎牛血清 5% Fetal bovine serum	2%脱脂奶粉 2% Skimmed milk powder	1%明胶 1% Gelatin
$OD_{450,P}$	0.962	1.349	1.716	0.804	0.686
$OD_{450,N}$	0.220	0.363	0.644	0.263	0.329
$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	4.370	3.720	2.660	3.060	2.090

2.5.5 最佳显色时间的确定: 表 6 显示, TMB 显色时间为 10 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 最佳的显色时间是 10 min。

2.5.6 临界值的确定: 统计 30 份阴性血清样品 OD_{450} 值, 计算平均值 $\bar{x}=0.285$, 标准差 $s=0.063$, $\bar{x}+2s=0.411$, $\bar{x}+3s=0.474$ 。因此血清样品的 OD_{450} 值 <0.411 判为阴性, OD_{450} 值 ≥ 0.474 判为阳性,

表 5 二抗作用时间的确定			
Table 5 Determination of different goat-anti-swine-HRP reaction time			
指标 Index	30 min	45 min	60 min
$OD_{450,P}$	0.730	1.152	1.351
$OD_{450,N}$	0.192	0.216	0.297
$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	3.800	5.330	4.550

表 6 显色时间的确定			
Table 6 Determination of substrate reaction time			
指标 Index	5 min	10 min	15 min
$OD_{450,P}$	0.746	1.157	1.429
$OD_{450,N}$	0.126	0.193	0.397
$OD_{450,P}/OD_{450,N}$	5.130	5.990	3.690

$0.411 \leq OD_{450}$ 值 < 0.474 判为可疑。

2.6 特异性试验结果

利用建立的间接 ELISA 方法检测 APP、HPS、PCV2、PRV、CSFV、TGEV 阳性血清, 结果均为阴性, 猪丹毒杆菌阴性、阳性血清对照均成立 (表 7)。表明建立的间接 ELISA 检测方法具有较好的特异性。

2.7 重复性试验

表 8 显示 批内重复试验变异系数均小于 10%, 表明批内重复性较好; 表 9 显示, 批间重复试验变异系数均小于 10%, 表明批间重复性较好。

表 7 特异性试验结果		
Table 7 Result of the specificity test		
血清 Serum	OD_{450}	结果 Result
APP	0.273	-
HPS	0.175	-
PCV2	0.053	-
PRV	0.124	-
CSFV	0.195	-
TGEV	0.149	-
阳性对照 Positive control	1.140	+
阴性对照 Negative control	0.192	-

表 8 批内重复试验结果									
Table 8 Result of the intro-batch duplicability test									
血清编号 Serum No.	各重复孔的 OD_{450} Duplicability's OD_{450}						平均值 \bar{x}	标准差 s	变异系数 $CV(\%)$
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th			
1	1.083	1.162	1.045	1.137	1.129	1.055	1.102	0.048	4.33
2	0.823	0.721	0.819	0.852	0.773	0.759	0.791	0.049	6.13
3	1.241	1.257	1.173	1.196	1.204	1.276	0.040	0.032	2.49
4	1.415	1.533	1.514	1.426	1.431	1.429	0.051	0.035	3.23

表 9 批间重复试验结果
Table 9 Result of the inter-batch duplicability test

血清编号 Serum No.	各批次的 OD_{450} 值 OD_{450} values of different batch						平均值 \bar{x}	标准差 s	变异系数 CV (%)
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th			
1	1.073	1.026	0.993	0.937	1.065	1.039	1.022	0.050	4.95
2	0.826	0.877	0.923	0.854	0.947	0.912	0.890	0.046	5.12
3	1.125	1.107	1.243	1.258	1.164	1.257	1.192	0.069	5.77
4	0.792	0.749	0.814	0.803	0.776	0.842	0.796	0.032	4.02

2.8 比对试验

建立的间接 ELISA 方法与美国 TSZ 公司商品化试剂盒的检测结果符合率为 92.2%，敏感性为 96.0%，特异性为 73.3% (表 10)。

应用建立的间接 ELISA 方法的检测结果与 Western blot 的鉴定结果符合率为 92.59%，敏感性为 93.33%，特异性为 88.89% (表 11)。

表 10 间接 ELISA 和美国 TSZ 公司试剂盒检测结果比较
Table 10 The result of ELISA compared with US TSZ company kit

项目 Item	阳性 Positive	阴性 Negative	总数 Total
建立间接 ELISA 方法 The developed indirect ELISA	76	14	90
美国 TSZ 公司试剂盒 US TSZ company kit	75	15	90
符合数 Coincidence numbers	72	11	83
符合率 Coincidence rates (%)	92.2		

表 11 间接 ELISA 和 Western blot 鉴定结果比较
Table 11 The result of ELISA compared with Western blot

项目 Item	阳性 Positive	阴性 Negative	总数 Total
建立间接 ELISA 方法 The developed indirect ELISA	43	11	54
Western blot	45	9	54
符合数 Coincidence numbers	42	8	50
符合率 Coincidence rates (%)	92.59		

3 讨论

自 Pasteur 在 1882 年首次从病死猪的皮肤血管中分离到猪丹毒杆菌之后,猪丹毒便逐渐出现在人们的视野中^[9]。20 世纪 80 年代和 90 年代初,猪丹毒、猪瘟和猪肺疫并称为影响我国养猪业的三大传染病。随着规模化养殖中抗生素和疫苗的普遍使用,猪丹毒得到控制并逐渐淡出了人们的视线。然而,近几年我国江西、浙江、湖南、四川、云南、广州、福建以及安徽等地均有猪丹毒散发的报道^[10-11];美国、日本、巴西、泰国、加拿大等国猪丹毒的发生也有明显的增多^[12-13];猪丹毒似乎又有卷土重来之势,给养殖业带来了很大的经济损失。目前免疫接种是预防和控制猪丹毒的重要措施。因此,建立一种特异、敏感、快速检测猪丹毒杆菌抗体的方法,对于合理评价猪丹毒疫苗的免疫效果具有重要的意义^[4]。

猪丹毒杆菌血清型众多,作为主要免疫保护性抗原的 SpaA 蛋白存在于毒力较强的血清型 1a、1b、2、5、8、9、12、15、16、17 和 N 型的菌株中,而临床猪丹毒杆菌分离菌则以血清型 1a、1b、2 型为主,这 3 种血清型中的 SpaA 蛋白又具有高保守性和同源性^[14-16],从而为其作为疫苗、诊断制剂的研发、应用提供了支持。SpaA 蛋白主要保护功能的核心片段为 N 端^[17]。Imada 等克隆和表达了位于 SpaA 蛋白 N 端 348 个氨基酸(第 61 个到第 408 个氨基酸),能防止猪感染猪丹毒杆菌^[18]。Shimoji 等证明 SpaA 蛋白 N 端的 2/3 区域可刺激小鼠免疫系统产生较高水平保护性抗体,从而抵御猪丹毒杆菌的侵袭^[19]。刘丹丹等克隆和表达的 SpaA 蛋白 N 端

免疫保护区, 能完全保护小鼠免受猪丹毒杆菌强毒株的攻击^[20]。李伟杰等通过 SpaA 蛋白的序列分析和结构预测, 提出 SpaA 蛋白无跨膜区域, 可以实现较高量及可溶性表达^[21]。本实验去除了 SpaA 蛋白前端信号肽序列及 C 端重复序列, 克隆与表达 N 端免疫保护区, 亲和层析法纯化蛋白, Western blot 鉴定表达蛋白具有良好的反应原性, 从而为建立检测猪丹毒杆菌抗体的间接 ELISA 方法奠定了良好基础。

本实验进一步应用重组表达纯化的猪丹毒杆菌 SpaA 蛋白作为包被抗原, 通过对抗原包被浓度、血清稀释度和酶标二抗最佳稀释度等条件的优化, 建立了猪丹毒杆菌抗体间接 ELISA 检测方法。通过特异性试验、重复性试验及比对试验, 证明建立的间接 ELISA 方法特异性良好、重复性好。应用该方法和商品化 ELISA 检测试剂盒同步对猪丹毒疫苗免疫的健康猪血清样品进行检测, 敏感性 96.0%, 总符合率 92.2%; 应用该方法和 Western blot 同步对猪丹毒疫苗免疫的健康猪血清样品进行检测与鉴定, 敏感性 93.33%, 总符合率 92.59%。综合证明本实验所建立的间接 ELISA 检测结果与美国 TSZ 公司猪丹毒杆菌抗体检测试剂盒以及 Western blot 鉴定结果具有较高的一致性。相比 Imada 及 Giménez-Lirola 等的研究结果^[6-7], 本实验所建立的 ELISA 方法还需要扩大对临床不同样品的检测应用, 从而进一步验证该法可作为一种可靠的技术手段用于猪丹毒杆菌的抗体检测及流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] Cooper J, Stuart B, Cole J. *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated with swine abortion[J]. Georgia Veterinarian, 1980, 32(2): 10
- [2] Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, et al. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(6): 1347-1353
- [3] Galán JE, Timoney JF. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Infection and Immunity, 1990, 58(9): 3116-3121
- [4] Xiao GS, Cao SJ, Wen XT. Development and application of Dot-PAA-ELISA rapidly detecting antibodies against swine erysipelas[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005, 27(1): 59-62 (in Chinese)
肖国生, 曹三杰, 文心田. Dot-PAA-ELISA 快速检测猪丹毒抗体方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(1): 59-62
- [5] Yang H, Chen TX. Indirect hemagglutination test to detect swine erysipelas maternal antibodies[J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 1988(1): 5 (in Chinese)
杨宏, 陈天祥. 用间接血凝试验检测猪丹毒母源抗体[J]. 甘肃畜牧兽医, 1988(1): 5
- [6] Imada Y, Mori Y, Daizoh M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(11): 5015-5021
- [7] Giménez-Lirola LG, Xiao CT, Halbur PG, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant SpaA protein (rSpaA415) for detection of anti-*Erysipelothrix* spp. IgG antibodies in pigs[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 91(1): 191-197
- [8] Hua Y, Wang W, Li Y, et al. Prokaryotic expression of the structural protein S of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of an indirect ELISA for an detection of antibody against porcine epidemic diarrhea[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 434-443 (in Chinese)
华耀, 王玮, 李郁, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 434-443
- [9] Norrung V, Molin G. A new serotype of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pig slurry[J]. Acta Vet Hung, 1991, 39(3/4): 137-138
- [10] Song PW, Zhu QL. The current swine erysipelas alert scale prevalence and harm[J]. Swine Production, 2013(5): 117-118 (in Chinese)
宋培武, 朱巧玲. 警惕当前猪丹毒在规模猪场的流行与危害[J]. 养猪, 2013(5): 117-118
- [11] Lu P, Huang XH, Li CF, et al. Isolation, identification and characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Anhui province[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1822-1828 (in Chinese)
陆萍, 黄晓慧, 李春芬, 等. 安徽部分地区猪丹毒杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1822-1828
- [12] Opriessnig T, Hoffman LJ, Harris DL, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of Midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2004, 16(2): 101-107
- [13] Wang Q, Fidalgo S, Chang BJ, et al. The detection and recovery of *Erysipelothrix* spp. in meat and abattoir samples in Western Australia[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(5): 844-850
- [14] Ozawa M, Yamamoto K, Kojima A, et al. Etiological and biological characteristics of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated between 1994 and 2001 from pigs with swine erysipelas in Japan[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2009, 71(6): 697-702
- [15] Imada Y, Takase A, Kikuma R, et al. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 45(5): 2121-2126
- [16] Lu Q, Li MB, Peng XW, et al. Bioinformatics analysis of *SpaA* gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(9): 23-27 (in Chinese)
卢琴, 李明波, 彭先文, 等. 猪丹毒杆菌 *SpaA* 基因的生物信息学分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 23-27
- [17] Yan PF, Su YH, Zhao YX, et al. Identification of the major domain in surface protective antigen (SpaA) responsible for immunological protection from *Erysipelothrix rhusiopathiae* C43150[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(6): 1224-1230 (in Chinese)
晏鹏飞, 苏幼红, 赵银霞, 等. 猪丹毒丝菌 C43150 株表面保

- 护性抗原 A 的免疫功能区分析[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(6): 1224-1230
- [18] Imada Y, Goji N, Ishikawa H, et al. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(9): 4376-4382
- [19] Shimoji Y, Mori Y, Fischetti VA. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(4): 1646-1651
- [20] Liu DD, Borrathybay E, Yang ZL, et al. Immunological testing of protein protective domain SpaA of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(5): 5-11 (in Chinese)
- 刘丹丹, 恩特马克·布拉提白, 杨振龙, 等. 红斑丹毒丝菌 SpaA 蛋白保护区域的免疫学检测[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 5-11
- [21] Li WJ, Zhao Y, Kang K, et al. Cloning and sequence analysis of SpaA gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and prediction of protein structure[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(11): 1631-1634, 1639 (in Chinese)
- 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): 1631-1634, 1639

科技信息摘录

科学家首次在细菌中发现朊病毒

朊病毒作为一种病原体, 因为能够引发包括疯牛病在内的退行性脑病而广为人知。如今, 科学家首次在细菌中发现了这种病毒。

研究人员发现, 当被插入酵母和大肠杆菌后, 一种蛋白质在肉毒杆菌(能够导致肉毒中毒的一种微生物)中的片段会表现得像一种朊病毒。研究人员在 1 月 13 日出版的美国《科学》杂志上报告了这一研究成果。

朊病毒由许多在结构上以不同方式折叠的蛋白质构成。通过将一种蛋白质的正常形式转化为朊病毒, 这种蛋白质的朊病毒版本能够以传染的方式长期存在下去。

科学家最早在 20 世纪 80 年代发现了朊病毒, 它被视作潜藏在一种被称为传染性海绵状脑病的致命脑部背后的病原体。从那时开始, 研究人员相继在哺乳动物、昆虫、蠕虫、植物和真菌中发现了错误折叠的蛋白质, 并且知道并非所有的朊病毒都会对宿主造成伤害。

然而迄今为止, 朊蛋白只在真核生物的细胞中被发现, 这类生物包括动物、植物和真菌。

在这项最新研究中, 研究人员利用能够在酵母中识别可以形成朊病毒的蛋白质的软件分析了大约 6 万个细菌基因组。他们聚焦于细菌蛋白质 Rho 的一个片段。

在许多细菌中——例如肉毒杆菌和大肠杆菌, Rho 都是基因表达的一种全局性调节因子, 这意味着它能够控制许多基因的活性。

研究人员发现, 当来自肉毒杆菌的 Rho 的潜在朊病毒形成片段被插入大肠杆菌后, 一团错误折叠的蛋白质具有了由朊病毒形成的大多数特征。此外, 这种蛋白质片段被插入酵母后, 能够取代一种已知可以形成朊病毒的酵母蛋白质的功能。

研究人员同时注意到, 尽管普通版本的 Rho 能够在大肠杆菌中抑制基因的活性, 但是当蛋白质处于其朊病毒形式时, 许多基因是活跃的。

这项研究的共同作者、美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院细菌遗传学家 Ann Hochschild 认为, 这意味着朊病毒可能会让细菌适应特定种类的环境压力。例如, 科学家发现, 与携带了正常版本 Rho 的细菌相比, 被 Rho 的朊病毒版本修改后的大肠杆菌能够更好地适应暴露在乙醇之中。

这些发现表明, 朊病毒的存在早于真核生物与细菌在距今约 23 亿年前在进化上分离的时间。“朊病毒在自然界可能比科学家之前认为的更加普遍。”Hochschild 说, “我们相信在细菌中还会发现其他能够形成朊病毒的蛋白质。”

由于朊病毒是可以遗传的, 因此这一发现表明这些蛋白质在不需要基因突变的前提下便能够让细菌传递相关特征。马萨诸塞大学阿莫斯特分校细菌生物化学家 Peter Chien 表示, “当细菌需要对环境做出快速反应时, 例如处理抗生素”, 它就会派上用场。

Chien 表示, 研究人员下一步需要确认 Rho 能够像一种朊病毒一样在它的自然宿主中产生作用。但 Chien 强调, 这可能会很困难, 因为与传统实验室生物体, 例如大肠杆菌相比, 肉毒杆菌较难在遗传实验中进行处理。

纽约州伊萨卡市康奈尔大学分子生物学家 Jeffrey Roberts 表示, 发展在细菌中进行朊病毒实验的能力, 将有助于揭示更多关于人类朊病毒的行为, 这可能与包括阿尔茨海默氏症和帕金森氏症等在内的疾病有关。

朊病毒是一类能侵染动物并在宿主细胞内复制的小分子无免疫性疏水蛋白质。朊病毒与常规病毒一样, 具有可滤过性、传染性、致病性、对宿主范围的特异性, 但它比已知最小常规病毒小得多(30-50 nm); 电镜下观察不到病毒粒子的结构, 且不呈现免疫效应, 不诱发干扰素产生, 也不受干扰作用。朊病毒对人类最大的威胁是可以导致人类和家畜患中枢神经系统退化性病变, 最终不治而亡, 因此世界卫生组织将朊病毒病和艾滋病并列为危害人体健康的顽疾。

——摘自《科学网》2016-01-17

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/2017117211626342780.shtm>