

家兔支气管败血波氏杆菌重组百日咳杆菌粘附素 (PRN) 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立

胡佳佳¹, 恽时锋², 王芳¹, 范志宇¹, 胡波¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部动物疫病免疫与诊断重点开放实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014;
2. 南京军区南京总医院比较医学科, 江苏 南京 210002)

【摘要】 目的 表达支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*, Bb) PRN 蛋白, 并以此建立检测 Bb 抗体的间接 ELISA 方法。**方法** 参照 GenBank 公布的猪源支气管败血波氏杆菌 prn 基因序列 (AY376325) 设计了一对特异性引物, PCR 扩增出相应的核苷酸片段。将 PCR 扩增产物连接至原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 以 *E. coli* BL21 (DE3) 为表达菌株进行诱导表达, 以纯化重组蛋白 PRN 作为诊断抗原, 通过探索最佳抗原包被量和抗体血清稀释倍数等, 建立检测支气管败血波氏杆菌抗体的间接 ELISA 方法。**结果** 成功克隆了 prn 全基因序列, 并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中获得高效表达, 经 SDS-PAGE、Western blot 分析显示重组蛋白 PRN 具有良好的抗原性。应用重组蛋白 PRN 为抗原建立了检测 Bb 血清抗体的间接 ELISA 诊断方法。试验确定重组蛋白 PRN 抗原的包被浓度为 500 ng/mL, 最适血清稀释度为 1:40。**结论** 建立的 ELISA 检测方法, 不仅为 Bb 抗体检测提供了实用的血清学检测手段, 也为进一步开发 Bb 检测试剂盒奠定了基础。

【关键词】 兔; 支气管败血波氏杆菌; 百日咳杆菌粘附素 (PRN); 原核表达; 间接 ELISA

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0028-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.002.007

Prokaryotic Expression of Rabbits *Bordetella Bronchiseptica* Pertactin Recombinant Protein and Development of an Indirect ELISA for Detection of Its Antibodies

HU Jia-jia¹, YUN Shi-feng², WANG Fang¹, FAN Zhi-yu¹, HU Bo¹

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Disease Diagnostics and Immunology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bioproducts, Nanjing 210014, China; 2. Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002)

【Abstract】 Objective To get *Bordetella bronchiseptica* (Bb) expressing recombinant protein pertactin (PRN) and establish an indirect ELISA for detection of rabbit *Bordetella bronchiseptica* antibodies. **Methods** According to a pair of

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycyt44)。

[作者简介] 胡佳佳 (1985 -), 女, 硕士, 主要从事畜禽传染病防治学研究, E-mail: clear_4277@126.com。

[通讯作者] 恽时锋 (1965 -), 男, 教授, 博士, 从事医学实验动物学专业, E-mail: yunshifeng1@163.com; 王芳 (1972 -), 女, 研究员, 博士, 主要从事畜禽传染病免疫机理及诊断方法研究, E-mail: rwangfang@126.com。

designed specific primers, PRN gene of rabbit *Bordetella bronchiseptica* was amplified by PCR and inserted into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant expression plasmids were transfected into BL21 (DE3) strain. The optimal concentration of coated antigen recombinant protein PRN and serum dilution was determined to develop the ELISA technique. **Results** PRN gene of *Bordetella bronchiseptica* was successfully cloned and expressed. The SDS-PAGE and Western blot analysis unfolded the excellent immunogenicity of the recombinant proteins which were used as coating antigens to develop the ELISA method for Bb-specific antibody diagnosis. The peridium consistency of the recombinant protein PRN determined in this experiment was 500 ng/mL, and the optimal testing serum dilution was 1:40.

Conclusions The PRN indirect ELISA developed in this study offers a simple and practical way for monitoring antibody of Bb, and provides much information for laying a basis for development of a Bb diagnosis kit.

【Key words】 Rabbits; *Bordetella bronchiseptica*; pertactin (PRN); Prokaryotic expression; Indirect ELISA

支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*, Bb) 是广泛感染家畜、野生动物和实验动物上呼吸道的一种革兰氏阴性球杆菌, 常引起家兔发生传染性鼻炎和支气管肺炎, 更重要的是, Bb 的先期感染易于导致其它多种细菌的继发性感染, 如多杀性巴氏杆菌、葡萄球菌等^[1,2], 从而增加兔群呼吸道疾病的发病率和严重程度, 同时也为 Bb 的分离检测增加了一定的难度。近年来, 人们发现 Bb 可经动物传染给人, 并在免疫功能缺陷或低下的人群 (如 AIDS 患者) 体内形成严重感染^[3-5]。因此, 本病具有一定的公共卫生意义。

目前, Bb 的诊断方法主要是细菌学检查、血清学凝集试验、PCR 检测等, 未找到引用源。而常规的细菌学检查过程繁琐、费时费力; 血清学凝集试验和 PCR 检测方法常出现假阳性结果^[7], 因此, 建立一种快捷、高效、敏感、特异的检测方法对本病的防控尤为重要。研究表明, 百日咳杆菌粘附素 (pertactin, PRN) 是 Bb 最重要的粘附因子和抗原成分^[8], 由 prn 基因编码的一种具有保护性的自动转运蛋白, 属于膜相关抗原, 存在菌体外膜上, 也存在于液体培养物上清中^[9], prn 还可被病原菌利用以加强自身的附着作用^[10]。本研究以临床病例中分离的高毒力兔 Bb 菌株 (BJL0504) 的基因组为模板, 对 PRN 基因进行了克隆、序列分析及原核表达, 并将表达蛋白作为抗原, 建立了检测 Bb 抗体的间接 ELISA 方法, 为更好地防治本病奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种和血清

兔支气管败血波氏杆菌株 (BJL0504, 相菌), 由范志宇等分离鉴定并保存^[11]; BL21 (DE3) 原核表达载体 pGEX-4T-1 由江苏省农业科学院兽医所保存; 兔支气管败血波氏杆菌阴、阳性血清自行制

备并保存; 绵羊血采自江苏省农科院兽医所; 待检血清 113 份采自华东地区 4 个兔场。

1.2 主要试剂

*Bam*H I、*Xho* I、TaqDNA 聚合酶、蛋白酶 K 和 PCR 回收纯化试剂盒、IPTG 等购自大连宝生物工程有限公司; GST 融合蛋白纯化柱购于 GE Healthcare; EB、琼脂糖购于南京基天生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、酶标羊抗兔 IgG (HRP-IgG) 购自生物晶美公司; TMBS 购自 Amersco 公司。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

参照 GenBank 公布的猪源支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 的 prn 基因序列 (AY376325) 针对上游和下游序列设计了一对特异性引物:

上游引物: 5'-GTGGATCCGACTGGAACAACC AGTCCATCATCA-3'

下游引物: 5'-TTCTCGAGGTTGGCGATATAG GTGGCA-3'

为了便于构建表达载体, 在上、下游引物 5' 端分别加入 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点 (引物中下划线部分)。PCR 扩增条件为: 以 Bb I 相菌基因组为模板, 进行 PCR 扩增, 95℃ 预热 5 min; 94℃ 变性 1 min, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2.5 min, 33 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 冷却至 4℃ 保存。取 PCR 扩增产物 10 μL, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统观察、拍摄、分析结果。用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.4 prn 基因的克隆与鉴定

取 PCR 产物和原核表达载体 pGEX-4T-1 适量, 用 *Bam*H I、*Xho* I 酶消化, 连接, 转化, 得到重组质粒 pGEX-4T-1-prn。将初选的阳性质粒分别进行 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切、PCR 及测序鉴定。

1.5 重组蛋白的诱导表达与纯化

重组表达载体 pGEX-4T-1-prn 转入 *E. coli*

BL21(DE3)中。将含有阳性重组质粒 pGEX-4T-1-prn 和 pGEX-4T-1 空载体的 E. coli BL21 (DE3) 单个菌落,分别接种于 3 mL LB (Amp⁺) 液体培养基,37℃ 200 r/min 振荡培养 2 h 左右,使 A₆₀₀ 达到 0.4~0.6。加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,37℃ 诱导表达 6 h。取适量诱导表达后的细菌沉淀物经超声波裂解,加入含 8 mol/L 尿素的 binding buffer 进行充分溶解,然后按 GST 融合蛋白纯化柱说明书进行纯化。

1.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

按照文献[12]介绍的方法进行重组蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析,一抗为兔抗 Bb 高免血清,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG,按照 DAB 显色液试剂盒显色。

1.7 间接 ELISA 检测方法的建立

1.7.1 重组蛋白和待检血清最佳工作浓度的确定:将纯化后的重组蛋白 PRN 用抗原包被液分别稀释为 1 000、500、250、125、62.5、31.25 ng/mL 共 6 个梯度,100 μL/孔,37℃ 孵育 2 h,4℃ 过夜。次日弃去包被液,PBST 洗涤 5 次拍干。用 2% BSA 封闭,200 μL/孔,37℃ 封闭 1.5 h。用血清稀释液将阴、阳性血清分别作 1:20、1:40、1:80 倍比稀释,做 ELISA 方阵试验,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h,确定抗原和血清的最适工作浓度。HRP-羊抗兔 IgG 做 1:2000 稀释,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h。新鲜配制的 TMBS-H₂O₂ 底物显色液,37℃ 避光显色 10 min。每孔 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 中止反应,测定 A₄₅₀ 值。比较阳性血清和阴性血清 A₄₅₀ 比值 (P/N),以确定合适的抗原包被浓度以及待测血清的最佳稀释度。

1.7.2 判定标准的确定:取鉴定为 Bb 抗体阴性的 50 份兔血清,按照已经确立的间接 ELISA 方法进行检测。经统计学分析,得到 A₄₅₀ 平均值 X 和标准差 S。根据统计学原理,A₄₅₀ 值 ≥ X + 3S 时,判为阳性。A₄₅₀ 值 ≤ X + 2S 者判为阴性,介于二者之间者判为可疑。

1.7.3 阻断试验:取 5 份波氏杆菌阳性血清作最佳稀释,与等量重组蛋白抗原 PRN (5 μg/mL) 混合,37℃ 作用 2 h,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,与未经抗原处理的阴、阳性血清一起,同时作 ELISA 检测。计算 (N-P)/N 值,若此值大于 0.5,则判为阻断阳性。

$$(N-P)/N = (\text{未阻断孔 A 值} - \text{阻断孔 A 值}) /$$

未阻断孔 A 值

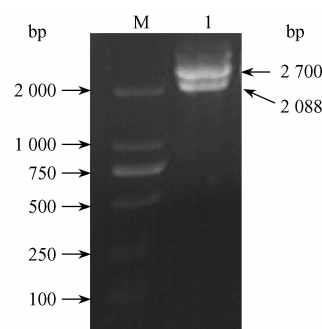
1.7.4 重复性试验:取 6 份阳性血清、3 份阴性血清在不同时间相同条件下,重复检测 3 次,观察 A₄₅₀ 值的变化。

1.7.5 临床应用:用建立的间接 ELISA 方法对采自华东地区 4 个兔场的 113 份血清进行检测,初步评价应用效果及兔场 Bb 感染情况。

2 结果

2.1 prn 基因的扩增

以支气管败血波氏杆菌 I 相菌 (BJL0504) 为模板进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在 2 088 bp 左右处有特异条带,与预期大小相符 (图 1)。



M: DNA 分子质量标准 (DL2000)

1: prn 基因 PCR 产物

图 1 prn 基因的 PCR 结果

Note: M: DNA marker (DL2000),

1: PCR products of prn gene

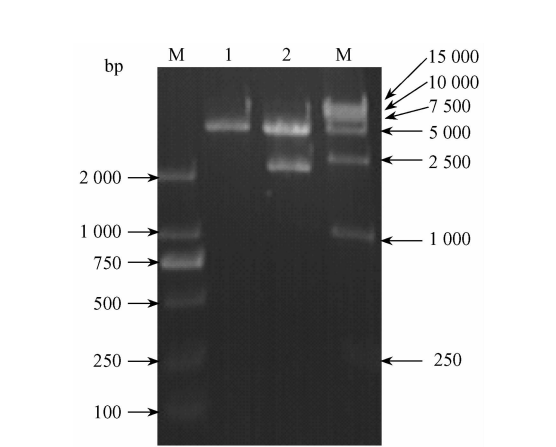
Fig. 1 PCR products of prn gene

2.2 重组表达质粒 pGEX-4T-1-prn 的鉴定

使用引物对两重组表达质粒进行 PCR 扩增,在预期大小处得到了特异性条带;进一步对其进行双酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳,得到与预期片段大小一致的特异条带 (图 2);测序结果显示,克隆的兔 Bb prn 基因序列与 GenBank 公布的 4 个猪源 prn 基因序列: AJ245927、AX418061、AY376325、BD409972 相比,核苷酸同源性高达 97.1% 以上,说明成功构建了目的片断的重组表达质粒 pGEX-4T-1-prn。

2.3 SDS-PAGE 及 Western blot 结果

表达的重组蛋白经 GST 融合蛋白纯化柱纯化后,用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 检测,结果表明 pGEX-4T-1-prn 在诱导后出现一条大小约为 101 kDa 的特异性蛋白条带,与预期大小基



注:M: DNA 分子质量标准(DL 2000,DL 15000)
1:阴性对照; 2: pGEX-4T-1-prn*BamH* I 和 *Xho* I 双酶切产物

图 2 重组质粒 pGEX-4T-1-prn 的酶切鉴定

Note: M: DNA marker (DL 2000, DL 15000); 1: Negative control; 2: pGEX-4T-1-prn digested with *BamH* I and *Xho* I restriction enzyme.

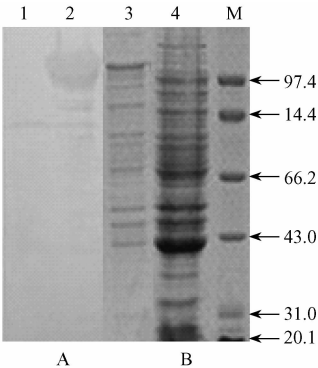
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEX-4T-1-prn by enzyme digestion

本一致,命名为 PRN(图 3-3 泳道),紫外分光光度计检测纯度为 0.62 mg/mL。

Western blot 显示,DNT1 融合蛋白在约 101 kDa 处出现很强的特异性反应条带(图 3-2 泳道),质粒 pGEX-4T-1 诱导表达后在预期位置处无反应条带(图 3-4 泳道),表明重组蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达,并具有良好的反应原性。

2.4 间接 ELISA 检测方法的建立

2.4.1 重组蛋白和待检血清最佳工作浓度的确定:通过方阵滴定试验,不同梯度阴、阳性血清和抗原的反应结果见表 1。确定重组蛋白 PRN 抗原和血清的最佳工作条件为:抗原最佳包被浓度为 500 ng/mL,血清最佳稀释倍数为 1/40。



注:M:标准蛋白分子质量;
1,4:pGEX-4T-1 阴性对照;
2:未纯化的 PRN;3:纯化后的 PRN

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 结果和 Western blot 分析

Note: M: Protein marker; 1,4: pGEX-4T-1 negative control;
2: Unpurified PRN expression products;
3: Purified PRN expression products

Fig. 3 Western blot (A) and SDS-PAGE (B) analyses of the expression products

2.4.2 结果判定:50 份健康兔血清用建立的 ELISA 方法进行检测。结果表明,重组蛋白 PRN 包被板的平均 A_{450} 值($\bar{x}$)为 0.109,标准差(SD)为 0.062,临界值 $\bar{X} + 3S = 0.295$ 。据此,确定血清样品 $A_{450} \leq 0.295$,且 $P/N \leq 2.1$,方可判为阳性; $A_{450} \leq 0.233$ 为阴性;介于二者之间判为可疑。

2.4.3 阻断实验:重组蛋白 PRN 抗原处理血清的阻断抑制率为 77.3%。证明重组蛋白 PRN 对血清抗体与包被抗原的结合有很强的抑制作用,包被抗原与血清抗体的结合是特异的。

2.4.4 重复性实验:取同一批次重组蛋白抗原包被酶标板,在不同时间相同条件下检测 6 份阳性血清,重复检测 3 次,以结果判定为标准,检测结果相同。

表 1 重组蛋白 PRN 和血清的不同稀释度反应结果
Tab. 1 Reaction results of the recombinant PRN protein and different serum dilutions

血清稀释度 Serum dilution ratio	项目 Item	抗原浓度 Antigen concentration(ng/mL)						空白对照 Blank
		1000	500	250	125	62.5	31.25	
1:20	P	1.32	1.264	1.297	1.15	1.133	1.04	0.015
	N	0.117	0.151	0.174	0.163	0.104	0.095	0.026
	P/N	11.282	8.371	7.454	7.055	10.894	10.947	
1:40	P	0.938	1.053	0.917	0.905	0.921	0.965	
	N	0.097	0.091	0.084	0.099	0.132	0.101	
	P/N	9.670	11.571	10.917	9.141	6.977	9.554	
1:80	P	0.702	0.87	0.785	0.758	0.785	0.892	
	N	0.085	0.077	0.089	0.073	0.068	0.095	
	P/N	8.259	11.299	8.820	10.384	11.544	9.389	

2.4.5 临床应用:用建立的间接 ELISA 方法对采自华东地区几个兔场的 113 份血清进行检测。总阳性率为 41.6%,这说明本地兔场 Bb 的感染率较高。

3 讨论

PRN 是由 prn 基因编码的一种具有保护性的外膜蛋白成分,是 Bb 感染重要的粘附因子^[13]。有人在做猪的 Bb 感染试验时发现不产生 PRN 的 Bb 菌株不能导致猪发生波氏菌病,且猪群的保护率与 PRN 抗体水平呈线性关系,因此 PRN 被认为是 Bb 最主要的保护性抗原^[14,15]。此外,prn 还具有对巨噬细胞的毒素作用,从而逃避宿主的免疫保护作用^[9]。天然 PRN 存在于菌体外膜上,分泌量非常有限,且纯化工艺复杂,因此,本试验借助原核表达系统进行克隆与体外表达 PRN,并将其作为 ELISA 包被抗原以检测动物体内特异的 Bb 抗体,从而诊断兔群是否发生了波氏杆菌病。

以自行分离的兔源 Bb 的基因组为模板进行克隆,克隆出的 prn 基因通过核苷酸和氨基酸序列比对,发现与 GenBank 公布的 4 个猪源 PRN 基因序列相比,同源性高达 97.1%,表明 prn 基因是非常保守的,可考虑作为兔波氏杆菌病的检测抗原和亚单位疫苗研究的候选基因。从融合蛋白的理化特性看,该蛋白质属于稳定蛋白质^[16],具备了作为基因工程抗原的理化条件。SDS-PAGE 结果表明,纯化的重组蛋白 PRN 纯度不是很高,但以其作为包被抗原建立的 Bb 抗体检测的间接 ELISA 方法重复性特异性和敏感性良好,分析其原因可能是:(1)表达产物理化特性稳定,受环境影响小,易于保持抗原活性;(2)重组蛋白表达量高,反应原性好,从而降低了非特异性反应。Western blot 分析可见,目的带处呈现明显的条带而未见明显的非特异性条带,说明表达产物具有良好的反应原性和特异性,这是本方法成功建立的关键。并且该基因在大肠杆菌中获得大量表达,为进一步开发为诊断试剂抗原奠定基础。用建立的 ELISA 方法对华东地区 4 个兔场进行监测,113 份血清样品的总阳性率为 41.6%,这说明华东地区兔场 Bb 的感染率较高。应引起高度关注。

本方法的建立,克服了细菌分离鉴定较为繁琐费时和 PCR 检测易出现假阳性的缺点;此外,包被

抗原易于纯化,ELISA 操作方法简单。因此,本研究建立的新方法,有望成为一种准确、快速和实用的兔 Bb 病血清学诊断方法。

参考文献:

- [1] 段会勇. 肉兔巴氏杆菌与波氏杆菌混合感染的诊断 [J]. 畜牧兽医杂志, 2005(2):44-46.
- [2] 余树民,邓俊良. 獭兔金黄色葡萄球菌和波氏杆菌混合感染的诊治[J]. 四川畜牧兽医, 2002, (B05):9-10.
- [3] Viejo G, de la Iglesia P, Otero L, et al. *Bordetella bronchiseptica* pleural infection in a patient with AIDS [J]. Scand J Infectious Dis, 2002, 34(8):628-629.
- [4] Valencia ME, Enriquez A, Camino N, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in patients with HIV [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004, 22(8):502-503.
- [5] De JY, Gonzalez S, Sante M. Respiratory pathogens in bronchoalveolar lavage in a Puerto Rican population infected with the human immunodeficiency virus [J]. P R Health Sci J, 2005, 24(3):197-202.
- [6] De Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. (In): Straw BE, dAllaire S, Mengeling WL (eds.), Diseases of swine [M]. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999:355-384.
- [7] Charles IG, Dougan G, Pickard D, et al. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P. 69 from *Bordetella pertussis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86:3554-3558.
- [8] Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, et al. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine [J]. Lancet, 1997, 350(9091):1569-1577.
- [9] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2007:275-277.
- [10] Amador C, Chiner E, Calpe JL, et al. Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS [J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(4):771-772.
- [11] 范志宇, 恽时锋, 薛家宾, 等. 新西兰白兔支气管败血波氏杆菌的分离鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17: 278-282.
- [12] 黄培堂, 译. Sambrook J, Russel DW (eds.) 分子克隆实验指南 (第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002:1565-1595.
- [13] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestation of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies [J]. Clin Microb Rev, 2005, 18(2):326-382.
- [14] Novotny P, Kobisch M, Cownley K, et al. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Infect Immun, 1985, 50(1):190-198.
- [15] Kobisch M, Novotny P. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets [J]. Infect Immun, 1990, 58:352-357.
- [16] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the Expasy server. In: John M Walker (eds). The proteomics protocols handbook [M]. NJ, USA: Humana Press, 2005, pp. 571-607.