

家兔支气管败血波氏杆菌重组蛋白 DNT1 的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立

赵宁¹, 恽时锋², 王芳¹, 范志宇¹, 胡波¹, 刘涛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;
- 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) DNT 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 dnt 基因序列 (AB020025) 针对其 N-端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 pET-28a(+) 载体中, 以 *E. coli* BL21 (DE3) 为表达菌株进行诱导表达, 以纯化重组蛋白 DNT1 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, 建立检测支气管败血波氏杆菌重组蛋白 DNT1 抗体的 ELISA 方法。结果 成功克隆了 dnt N-端的基因序列, 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 DNT1 具有良好的抗原性。应用重组蛋白 DNT1 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 DNT1 抗原的包被浓度为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最适血清稀释度为 1:100。结论 建立的 ELISA 检测方法, 不仅为 Bb 抗体检测提供了一种比较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; 坏死毒素 (DNT); 原核表达; 间接 ELISA

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0047-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.04.011

Prokaryotic Expression of *Bordetella Bronchiseptica* DNT1 Recombinant Protein from Rabbits and Development of an Indirect ELISA for Detection of Its Antibodies

ZHAO Ning¹, YUN Shi-feng², WANG Fang¹, FAN Zhi-yu¹, HU Bo¹, LIU Tao¹

- 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 Bio-Products, Nanjing 210014, China;
- Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002)

【Abstract】 Objective To get expression of *Bordetella bronchiseptic* recombinant protein DNT1 and establish an indirect ELISA for detection of recombinant protein DNT1. **Method** According to a pair of specific primers designed to

[基金项目] 农业部公益性行业科研专项 (nyhyzx07-040); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycytx-44); 江苏省科技支撑计划——农业部分 (BE2008372)。

[作者简介] 赵宁 (1985 -), 女, 硕士, 主要从事畜禽传染病防治学研究, E-mail: zhaoningnjau@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, 副研究员, 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。

amplify DNT gene of *Bordetella bronchiseptica* in swines promulgated by Genbank, the fragment of the target gene was amplified by PCR and then constructed with prokaryotic expression vector PET-28a(+). The recombinant expression plasmids were transfected into BL21 (DE3) strain. The optimal concentration of coated antigen recombinant protein DNT1 and serum dilution was determined to develop the ELISA technique. **Results** DNT1 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 DNT1 determined in this experiment was 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the optimal testing serum dilution was 1:100. **Conclusion** The development of DNT1 indirect ELISA 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*; Dermonecrotic toxin (DNT); 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,Bb 的感染常导致多杀性巴氏杆菌、葡萄球菌等其它细菌的继发性感染^[1-2],从而增加实验兔呼吸道疾病的发病率和严重程度,同时也为细菌学检查增加了难度。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。

Bb 诊断主要是细菌学检查、血清学凝集试验、PCR 等检测方法^[6]。常规细菌学检查操作繁琐、费时费力;血清凝集试验和 PCR 方法常出现假阳性结果^[7],因此,建立一种快速、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,皮肤坏死毒素(dermonecrotic toxin, DNT)是 Bb 重要的毒力因子^[8],由 dnt 基因编码,由 A-B 两个亚单位构成,A 亚单位(C 端)为毒素的活性中心,B 亚单位(N 端)称结合单位,能使毒素分子特异性地结合在宿主易感组织的细胞膜受体上,并协助 A 亚单位穿过细胞膜^[9-11]。本研究将 N 端结合单位命名为 DNT1,并以临床病例中分离的高毒力 Bb 菌株(BJL0504)的基因组为模板,对其进行了克隆、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 菌种与血清

兔支气管败血波氏杆菌株(BJL0504, I 相菌),由范志宇等分离鉴定并保存^[12];BL21 (DE3)、原核表达载体 pET-28a(+)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 100 份采自江苏省境内 4 个兔场。

1.2 主要试剂

Sac I、*Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶和 PCR 回收纯化试剂盒、IPTG 等购自大连宝生物工程有限公司;His Trap 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 dnt 基因序列(AB020025)针对 N-端(DNT1)设计了一对特异性引物:

上游引物:5'-CATGAGCTCCGCCTGGATTAC-3'

下游引物:5'-TGGAAGCTTGGGCGTGAAAA-3'

为了便于构建表达载体,在上、下游引物 5' 端分别加入 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点(引物中下划线部分)。PCR 扩增条件为:以 Bb I 相基因组为模板,进行 PCR 扩增,95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 dnt1 基因的克隆与鉴定

取 PCR 产物和原核表达载体 pET-28a(+)适量,用 *Sac* I、*Hind* III 酶消化,连接,转化,得到重组质粒 pET-28a-dnt1。将初选的阳性质粒分别进行 *Sac* I、*Hind* III 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 pET-28a-dnt1 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中。将含有阳性重组质粒 pET-28a-dnt1 和

pET-28a(+)空载体的 *E. coli* BL21(DE3) 单个菌落,分别接种于 3 mL LB (Kan+) 液体培养基,37℃ 200 r/min 振荡培养 2 h 左右,使 A_{600} 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 His Trap 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 [13] 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 DNT1 用抗原包被液分别作 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共 8 个梯度稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 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 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 37℃ 封闭 1.5 h。用血清稀释液将阴、阳性血清分别作 1:100、1:200、1:400 倍比稀释,做 ELISA 方阵试验,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 37℃ 孵育 30 min,确定抗原和血清的最适工作浓度。HRP-羊抗兔 IgG 做 1:20 000 稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 37℃ 孵育 60 min。新鲜配制的 TMBS- H_2O_2 底物显色液,37℃ 避光显色 10 min。每孔 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 中止反应,测定 A_{450} 值。比较阳性血清和阴性血清 A_{450} 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,按照已确立的间接 ELISA 方法进行检验。经统计学分析,得到 A_{450} 平均值 \bar{X} 和标准差 S 。根据统计学原理, A_{450} 值 $\geq \bar{X} + 3S$ 时,判为阳性。 A_{450} 值 $\leq \bar{X} + 2S$ 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 DNT1 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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。

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

1.7.4 重复性试验:取 6 份阳性血清、3 份阴性血

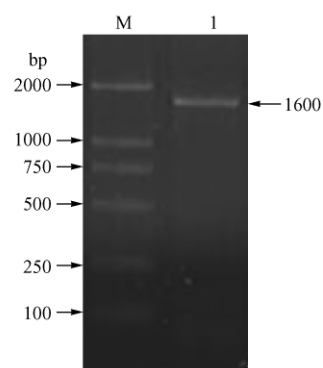
清在不同时间相同条件下,重复检测 3 次,观察 A_{450} 值的变化。

1.7.5 临床应用:分别对江苏省境内 4 个兔场的家兔采集血清,每个兔场随机采集 25 份,用建立的间接 ELISA 方法对这 100 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 dnt1 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 1 600 bp 左右处有特异条带,与预期大小相符 (图 1)。



注:M: DNA 分子质量标准 (DL2000)

1: dnt1 扩增产物

图 1 dnt1 基因的 PCR 结果

Note:M: DNA marker (DL2000)

1: PCR products of dnt1 gene

Fig. 1 PCR products of dnt1 gene

2.2 重组表达质粒 pET-28a-dnt1 的鉴定

使用引物对重组表达质粒进行 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 dnt1 基因序列与 GenBank 公布的 4 个猪源 dnt1 基因序列:U59687、AB020025、E17214、NP890512 相比,核苷酸同源性高达 99% 以上,说明成功构建了目的片段的重组表达质粒 pET-28a-dnt1。

2.3 SDS-PAGE 及 Western blot 结果

表达的重组蛋白经 His Trap 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 pET-28a-dnt1 在诱导后出现一条大小约为 60 KDa 的特异性蛋白条带,与预期大小基本一致,命名为 DNT1 (图 3-4 泳道),紫外分光光度计检测纯

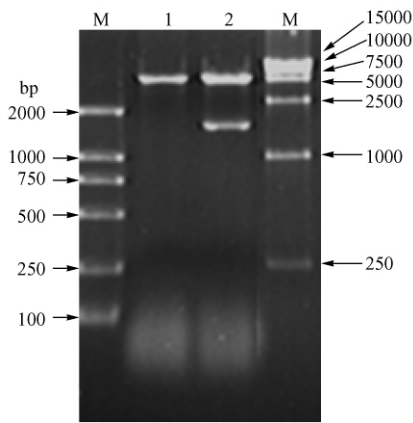


图 2 重组质粒 pET-28a-dnt1 的酶切鉴定

注: M: DNA 分子质量标准 (DL2000, DL15000)

1: 阴性对照; 2: pET-28a-dnt1 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切产物

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET-28a-dnt1 by enzyme digestion

Note: M: DNA marker (DL2000, DL15000)

1: Negative control

2: pET-28a-dnt1 digested by *Sac* I and *Hind* III restriction enzyme.

度为 3 mg/mL。

Western blot 显示, DNT1 融合蛋白在约 60KDa 处出现很强的特异性反应条带 (图 3-2 泳道), 质粒 pET28a (+) 诱导表达后在预期位置处无反应条带 (图 3-1 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 DNT1 抗原和血清的最佳工作条件为: 抗原最佳包被浓度为 6.25 μg/ml, 血清最佳稀释倍数为 1:100。

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 DNT1 包被板的平均 A_{450} 值 (\bar{x}) 为 0.066, 标准差 (SD) 为 0.052, 临界值 $\bar{x} + 3S = 0.222$ 。据此, 确定血清样品

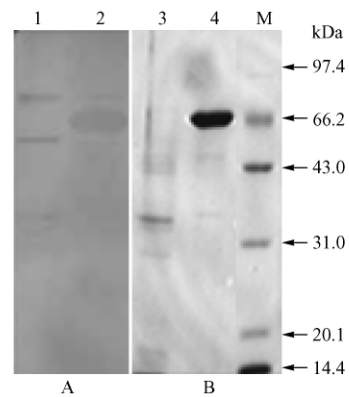


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 结果和 Western blot 分析

注: M: 标准蛋白分子质量;

1 β : pET-28a (+) 阴性对照; 2 β : 纯化后的 DNT1

Fig. 3 SDS-PAGE (B) and Western blot (A) analyses

Note: M: Protein marker; 1 β : pET-28a (+) negative control;

2 β : Purified DNT1 expression products

$A_{450} \geq 0.222$, 且 $P/N \geq 2.1$, 方可判为阳性; $A_{450} \leq 0.170$ 为阴性; 介于二者之间判为可疑。

2.4.3 阻断实验: 重组蛋白 DNT1 抗原处理血清的阻断抑制率为 88.0%。证明重组蛋白 DNT1 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 重复性试验: 取同一批次重组蛋白包被酶标板, 在不同时间相同条件下检测 9 份血清, 重复检测 3 次。以结果判定为标准, 所得检测结果完全相同。

2.4.5 临床应用: 用建立的间接 ELISA 方法对采自江苏境内 4 个兔场的 100 份血清进行检测, 总阳性率为 56.7%, 说明本地兔场 Bb 的感染率较高, 应引起高度关注。

3 讨论

DNT 是 Bb 的主要毒力因子, 早在 1979 年, 有人将 I 相菌经超声波处理后得到的无菌抽提物成功地人工复制猪萎缩性鼻炎, 当接种于仔猪鼻腔后,

表 1 重组蛋白 DNT1 和血清的不同稀释度反应结果

Tab. 1 Reaction results of the recombinant protein of DNT1 and different serum dilutions

血清稀释度 Serum dilution ratio	项目 Item	抗原浓度 Antigen concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						空白对照 Blank
		100	50	25	12.5	6.25	3.125	
1:100	P	1.724	1.717	1.653	1.692	1.692	1.669	0.014
	N	0.106	0.100	0.099	0.101	0.109	0.129	0.013
	P/N	16.264	17.170	16.697	16.752	15.523	12.938	
1:200	P	1.275	1.238	1.275	1.250	1.291	1.258	
	N	0.070	0.067	0.069	0.075	0.077	0.087	
	P/N	18.214	18.478	18.478	16.667	16.766	14.460	
1:400	P	0.717	0.700	0.724	0.734	0.797	0.844	

可产生和自然感染时萎缩性鼻炎相似的鼻部损伤。此外,毒素也可能通过损坏呼吸道内正常保护层上皮细胞而间接地促进菌株附着作用^[14-15]。DNT 可以通过去酰氨基和多聚 Rho 蛋白来促进 Bb 纤毛运动,还可以促使宿主中 DNT 受体细胞膜的增殖以及内化的形成,从而加快粘附宿主细胞。天然 DNT 的分泌量非常有限,且纯化工艺复杂,人工表达全毒素的效率也较低,通过提纯天然和体外表达来制备 DNT 较困难。因此,本试验将结合位点命名为 DNT1 进行了克隆与表达,并将其作为 ELISA 包被抗原以检测动物体内特异的 DNT 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 dnt 基因通过核苷酸和氨基酸序列比对,发现与 GenBank 公布 4 个猪源 DNT 基因序列相比,均有 99% 以上的同源性。这表明该基因高度保守,可考虑作为波氏杆菌病的检测抗原和亚单位疫苗研究的候选基因。Western blot 分析表明,重组蛋白 DNT1 呈现良好的特异性抗原反应。此外,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盒抗原奠定基础。用建立的 ELISA 方法对江苏 4 个兔场进行了监测,100 份血清样品的总阳性率为 56.7%,这说明江苏地区兔场波氏杆菌的感染率较高,应引起高度关注。

以纯化的重组蛋白 DNT1 为包被抗原建立的检测 Bb 抗体的间接 ELISA 方法具有良好的重复性、特异性和敏感性。其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 J Y, 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, d'Allaire 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] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 275 - 278.
- [9] Matsuzawa T, Kashimoto T, Katahira J, et al. Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella dermonecrotic* toxin [J]. Infect Immun, 2002, 70(7): 3427 - 3432.
- [10] Horiguchi Y, Senda T, Sugimoto N, et al. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho [J]. J Cell Sci, 1995, 108 (Pt 10): 3243 - 3251.
- [11] Kashimoto T, Matsuzawa T, Katahira J, et al. Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing* toxin [J]. Infect Immun, 1999, 67: 3727 - 3732.
- [12] 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.
- [13] Sambrook J, Russel DW. 黄培堂, 译. 分子克隆实验指南 (第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Pullinger GD, Adams TE, Mullan PB, et al. Cloning expression and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella spp* [J]. Infect Immun, 1996 Oct, 64: 4163 - 4171.
- [15] Brockmeier SL, Register KB, Magyar T, et al. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine [J]. Infect Immun, 2002, 70: 481 - 490.

(修回日期) 2010-11-10