

应用表达微小隐孢子虫 P23 的重组干酪乳杆菌 建立微小隐孢子虫 IFAT 诊断方法

格日勒图^{1,2}, 石 泉¹, 王艳霞¹, 兰 丽³, 满 达¹, 张和平^{2*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018; 3. 内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

摘 要: 本试验旨在建立 IFAT 和间接 ELISA 方法作为微小隐孢子虫病诊断方法。应用 DNA 重组技术, 构建原核表达载体 pGEX-P23, 经 IPTG 诱导表达出 GST-P23 融合蛋白, 并进行纯化, 将该重组融合蛋白作为包被抗原, 建立 ELISA 诊断方法; 同样构建重组载体 pMG-P23, 用电转化方法将其转入干酪乳杆菌中, 称为重组活干酪乳杆菌 (含 pMG-P23), 以此为已知抗原, 建立 IFAT 诊断方法。应用 ELISA 和 IFAT 方法检测来自内蒙古地区的 508 份牛血清、187 份绵羊血清和 197 份山羊血清; 其中 ELISA 方法在各种动物血清中阳性率依次分别为 0.59%、5.88% 和 4.57%, 而 IFAT 方法则为 0.19%、5.88% 和 4.57%。2 种检测方法阳性符合率在牛血清样品中为 33.33%, 在绵羊和山羊中则均为 100%。试验结果表明, 重组抗原 P23 具有良好的反应原性, 2 种诊断方法的结果基本吻合, 显示出良好的一致性和敏感性, 可在微小隐孢子虫病的诊断实践中推广应用。

关键词: 微小隐孢子虫; 重组干酪乳杆菌; P23 重组抗原; ELISA; IFAT

中图分类号: S852.723

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)10-1296-05

Establishment of the Diagnostic Method of IFAT for *Cryptosporidium parvum* Using the Recombinant *Lactobacillus casei* Expressing *C. parvum* P23

Geriletu^{1,2}, SHI Quan¹, WANG Yan-xia¹, LAN Li³, MAN Da¹, ZHANG He-ping^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering of Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

3. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The present experiment was performed with the objective of establishing the diagnostic methods of IFAT and ELISA for detection of the *Cryptosporidium parvum*. The prokaryotic expression vector pGEX-P23 was constructed by DNA recombinant technology and expression of the GST-P23 fusion protein by IPTG induction. After purification, the fusion protein was used as coating antigen in the ELISA. Using the same method, the recombinant vector pMG-P23 has been constructed and electrotransformed into the *Lactobacillus casei*, named as recombinant *Lactobacillus casei*, which was used as a known antigen in IFAT. 508 samples of bovine serum, 187 samples of sheep serum and 197 samples of goat serum collected from the animals in Inner Mongolia were detected by ELISA and IFAT. The positive rates were 0.59% (bovine), 5.88% (sheep) and 4.57% (goat) by ELISA and 0.19%, 5.88% and 4.57% by IFAT. Accordance rate of these two diagnostic methods in bovine serum samples was 33.33% and the rate in sheep and goat was 100%. The results showed that the recombinant P23 has a good reactionogenicity. The

收稿日期: 2010-01-27

资助项目: 国家自然科学基金项目(30960279); 中国博士后项目(57545); 内蒙古农业大学“博士启动基金”项目(k11629)

作者简介: 格日勒图(1972-), 男, 蒙古族, 博士, 副教授, 主要从事乳酸菌分子生物学研究, E-mail: geriletunjau@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 张和平, E-mail: hepingZhang@imau.edu.cn

positive results of two diagnostic methods were basically identical, which showed good identity and sensitivity. The methods could be widely applied in the diagnosis of *Cryptosporidiosis*.

Key words: *Cryptosporidium parvum*; recombinant *Lactobacillus casei*; recombinant P23 protein; ELISA; IFAT

隐孢子虫(*Cryptosporidium*)属于顶复门,可引起人畜共患的细胞内寄生性原虫类病,微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)是其中主要的虫种之一,牛、绵羊和山羊等反刍动物均易感^[1]。自 Nime 等报道首例人体隐孢子虫病以来^[2],隐孢子虫病已引起全世界的关注,特别是 1993 年美国由于水源污染而导致隐孢子虫病的暴发后^[3]。隐孢子虫病通常为免疫自限性的表现,其主要临床症状为人和动物的严重腹泻,幼畜、幼儿及免疫力低下或缺陷者(如艾滋病患者)更容易发生^[4-6]。据流行病学调查,我国人隐孢子虫感染率为 0.85%~12.3%,且有升高的趋势^[7]。因此,隐孢子虫病不仅危害畜牧业的发展,而且严重威胁人类的健康。

对于隐孢子虫病,目前还没有特效的治疗药物或疫苗,缺乏早期诊断方法^[8]。随着分子生物学的发展,学者们相继报道了限制性核酸内切酶片段多态性分析法(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[9-11]、聚合酶链式反应(PCR)^[12-14]、随机扩增多态性 DNA 法(Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)^[15]和 DNA microarray 技术^[16]等多种诊断隐孢子虫病的分子生物学方法,虽然这些方法开辟了诊断该病的新途径,但是由于技术难度大且对实验室条件要求高等原因,不易在基层推广应用。

免疫学疫病诊断方法因其高特异性和高敏感性等优点,一直为广大研究者们普遍采用,如可以采用间接免疫荧光试验(Indirect fluorescent antibody test, IFAT)^[17]和 ELISA^[18]方法检测粪便中的卵囊,但是卵囊的抗原成分复杂,真正有诊断意义的抗原成分在整个虫卵中较少,获取较高纯度虫体抗原的难度很大^[19]。Priest 等^[20]和 Parviz 等^[21]分别用重组 CP23 蛋白作为特异抗原,建立了诊断隐孢子虫感染的间接 ELISA 方法,证实了重组 CP23 抗原比普遍采用的粗卵囊抗原 ELISA 法敏感性更高。

本试验以微小隐孢子虫子孢子抗原 *p23* 基因为目标,分别在大肠杆菌和干酪乳杆菌中表达该基因,从而建立了诊断牛微小隐孢子虫病的重组 ELISA 和 IFAT 方法,并应用 2 种方法对野外采集

的牛、山羊和绵羊血清进行了检测和分析。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 虫种与菌种 *C. parvum* 及其子孢子 cDNA 文库由日本带广畜产大学国家原虫病研究所提供。*E. coli* BL21;干酪乳杆菌(*L. casei* Zhang), 以上 2 菌株由本实验室分离并保存。

1.1.2 主要试剂 溶菌酶(Lysozyme, Sigma), 牛血清白蛋白(国产), 0.3% Triton100, 4% 福尔马林组织细胞固定液(Paraformaldehyde phosphate buffer solution, Wako);羊抗鼠 IgG(由辣根过氧化物酶标记, Invitrogen);绵羊抗牛 IgG(由辣根过氧化物酶标记, Invitrogen);驴抗山羊 IgG(由辣根过氧化物酶标记, Sigma);驴抗绵羊 IgG(由辣根过氧化物酶标记, Sigma);羊抗鼠 IgG(由荧光素标记, Invitrogen);绵羊抗牛 IgG(由荧光素标记, Invitrogen);驴抗山羊 IgG(由荧光素标记, Sigma);驴抗绵羊 IgG(由荧光素标记, Sigma)。

1.1.3 各种动物血清 本研究中的送检血清样本均来自内蒙古地区,其中 508 份牛血清中 96 份来自正蓝旗、120 份来自正镶白旗、148 份来自锡林郭勒盟其他地区、144 份来自达茂旗;187 份绵羊血清来自东乌珠穆沁旗;197 份山羊血清来自于巴彦淖尔地区。

1.1.4 仪器设备 96 孔酶标板(Corning costar 3590);酶标仪(美国 Thermo Fisher, Multiskan MK3);恒温培养箱(上海一恒科技有限公司 DHP-9272);多头移液器(ependorf);免疫荧光显微镜(Olympus BX41, 日本)等。

1.2 方 法

1.2.1 在 *E. coli* 中表达 P23 蛋白与纯化 应用 PCR 方法,从 *C. parvum* 子孢子 cDNA 文库中扩增出隐孢子虫子孢子抗原 *p23* 基因,定点克隆到 GST 融合表达载体 pGEX-6P 中,构建了原核表达重组载体 pGEX-P23 并加入适量的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达 5~6 h,收集菌体悬浮于 10 mL PBS 和 150 U 溶菌酶溶液中进行裂解,收集上清用 Sepharose 4B 柱(GE Healthcare)纯化 P23

蛋白。纯化步骤按 Sepharose 4B(GE Healthcare) 试剂盒操作规程进行,对纯化的重组蛋白用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 方法进行鉴定。

1.2.2 重组干酪乳杆菌 pMG-P23 的制备 把本实验室已构建的重组载体 pMG-P23 按文献[22]中的电转化法转入到干酪乳杆菌中,在 Ery 抗性平板上挑取 48 h 内长出的可疑菌落,接入 MRS 培养基,过夜培养的细菌用无菌 PBS 洗 2 遍,备用于 IFAT 鉴定试验。

1.2.3 重组间接 ELISA 方法 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 9.6 CB Buffer 将 1.2.1 中已纯化的 P23 重组抗原和 GST 蛋白分别以 $1:1\,000$ 稀释(约 $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),按每孔 $50 \mu\text{L}$ 的量移入 96 孔酶标板,置 4°C 包被过夜。次日以常规方法进行间接 ELISA 试验:用 PBST(pH7.4)洗涤平板,用 3%脱脂乳的 PBS 溶液 37°C 封闭 1 h。用 PBST 洗涤酶标板后加入第一抗体(包括小鼠制备的 P23 重组抗原特异的阳性血清以及自然收集的牛羊血清), 37°C 作用 1 h。用 PBST 洗涤后每孔加入第二抗体(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG) $50 \mu\text{L}$, 37°C 作用 1 h。最后加入底物 ABTS,室温放置 1 h 进行显色,用酶标仪读取 $\text{OD}_{415 \text{ nm}}$ 值并进行数据统计。本试验的判断标准: $\text{OD}_{415 \text{ nm}}(\text{P23}) - \text{OD}_{415 \text{ nm}}(\text{GST}) \geq 0.1$ 视为阳性结果, <0.1 视为阴性结果。

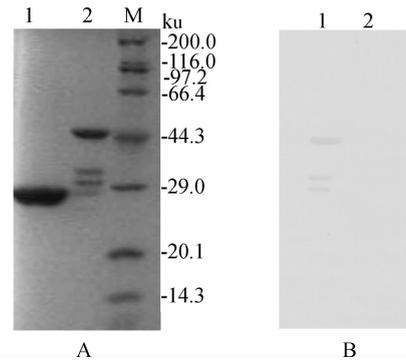
1.2.4 IFAT 方法 按 1.2.2 方法获得可疑菌落接入 MRS 培养基中培养过夜。取该培养物 1 mL 离心收集菌体,用 1 mL 灭菌 PBS 洗涤 1 次,重新悬浮于适量 PBS 中(含菌数为 $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。将上述菌体悬浮液以 $15 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的剂量滴加到 IFAT 试验专用载玻片上,自然晾干。此后滴加足量的 4%福尔马林组织细胞固定液(Paraformaldehyde phosphate buffer solution)浸泡 20 min。用灭菌 PBS 冲洗 1 次,以 $15 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 的剂量滴加 0.3% Triton100,室温放置 5 min。用 PBST 洗涤载玻片 2 次,指定孔内滴加第一抗体(用 3%BSA 以 $1:100$ 稀释的各种动物血清),室温作用 45 min 后,再用 PBST 洗涤 2 次,相应孔内滴加第二抗体,放置室温作用 30 min。同样用 PBST 洗涤 2 次并滴加 50%甘油,加盖玻片,用荧光显微镜进行观察,记录结果并拍照。

2 结果

2.1 纯化后重组蛋白 P23 的 SDS-PAGE 以及 Western Blotting 检测

用 SDS-PAGE 方法检测已经纯化的重组 P23

和 GST 表达产物,其大小分别为 46~47 和约 27 ku,与预计理论值大小相符(图 1 中 A)。并且 P23-GST 融合蛋白能与小鼠抗 P23 蛋白的血清反应,不与 GST 蛋白反应(图 1 中 B)。



A. SDS-PAGE 试验结果:1. GST 蛋白;2. 重组 P23 蛋白;M. 蛋白质相对分子质量标准。B. Western blotting 试验结果:1. 重组 P23 蛋白;2. GST 蛋白

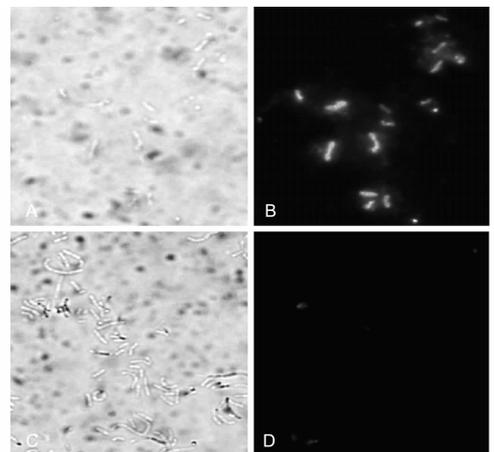
A. Result of SDS-PAGE; 1. GST; 2. Recombinant protein of P23; M. Protein marker. B. Result of Western blotting; 1. Recombinant protein of P23; 2. GST protein

图 1 重组 P23 蛋白纯化试验结果

Fig. 1 Result of purification test for recombinant protein P23

2.2 重组干酪乳杆菌 pMG-p23 的鉴定

按 1.2.2 方法获得重组干酪乳杆菌(含 pMG-p23)和对照干酪乳杆菌(pMG36e),为证实其表达产物的准确性,在荧光显微镜下观察,*p23* 基因稳定表达于干酪乳杆菌(图 2)。



A. 重组干酪乳杆菌(含 pMG-p23,未给荧光);B. 重组干酪乳杆菌(含 pMG-p23,给荧光);C. 对照干酪乳杆菌(含 pMG36e,未给荧光);D. 对照干酪乳杆菌(含 pMG36e,给荧光)

A. Experiment group of recombinant *L. casei* Zhang (harboring pMG-p23, no Immunofluorescence); B. Experiment group of recombinant *L. casei* Zhang (harboring pMG-p23, Immunofluorescence); C. Control group of *L. casei* Zhang (harboring pMG36e, no Immunofluorescence); D. Control group of *L. casei* Zhang (harboring pMG36e, Immunofluorescence)

图 2 荧光显微镜观察结果

Fig. 2 Results of Immunofluorescence assay (IFA)

2.3 重组 ELISA 试验

ELISA 方法检测到阳性的血清数分别如下:锡盟牛 3 份,东乌珠穆沁旗绵羊 11 份,巴彦淖尔山羊 9 份。检出的阳性率依次分别为 0.59%、5.88% 和 4.57%。在相同样品中,IFAT 检测出的阳性率依次分别为 0.19%、5.88% 和 4.57%。对 ELISA 检

测结果为阳性的 3 份牛血清经 IFAT 试验确定,仅 1 份为阳性,二者阳性符合率为 33.33%。在 9 份阳性山羊血清和 11 份绵羊血清中,经 IFAT 试验确定,二者阳性符合率均为 100%。而其余各种动物血清均表现为阴性,二者阴性符合率为 100%(表 1)。

表 1 间接 ELISA 和 IFAT 试验结果

Table 1 Results of ELISA and IFAT tests

	牛血清 Bovine serum	绵羊血清 Sheep serum	山羊血清 Goat serum
ELISA	3/508(0.59%)	11/187(5.88%)	9/197(4.57%)
IFAT	1/508(0.19%)	11/187(5.88%)	9/197(4.57%)
符合率/% Coincident rate	33.33	100	100

3 讨论

在全球范围内,至今仍未能研制出有效防治隐孢子虫的疫苗和药物。世界卫生组织早在 1986 年已经把它列入必须检疫的重点疫病病原,是具有公共卫生意义的虫种之一^[7]。为此,研究该病原的早期快速诊断和疫病防治等技术越来越受到医学界和兽医工作者的普遍重视。

国内张珍等^[23]率先分别以 CP23 重组抗原和卵囊全抗原建立间接 ELISA,并与粪便检查虫卵方法作比较,在 112 份腹泻病患者血清和粪便样品中进行普查的结果显示,CP23 重组抗原包被的 ELISA 方法检出率高于其它 2 种方法,证实了 CP23 重组蛋白良好的反应原性。本研究以重组干酪乳杆菌(含 pMG-p23)为已知抗原的 IFAT 和 CP23 重组蛋白为包被抗原的 ELISA 两种诊断方法,检测了野外采集的牛、山羊和绵羊血清中 *C. parvum* 特异性的抗体。2 种试验结果显示出类似的敏感性和重复性,尤其是采用 IFAT 诊断方法有以下几方面的优点:①安全,无需直接接触病原体或其卵囊,所以无病原扩散或操作人员感染的担忧;②后备抗原 CP23 容易获得,无需对 CP23 重组蛋白进行变性、复性和纯化等繁琐过程,可以从重组干酪乳杆菌直接产生近似天然的抗原,操作简便易行;③IFAT 诊断结果比重组 ELISA 更直观,可以直接对靶蛋白进行定位;④以亲缘关系较远的重组干酪乳杆菌代替虫体,可降低甚至避免其它无关交叉反应所带来的干扰;⑤IFAT 敏感性与重组 ELISA 相当,但是操作所需时间要比重组 ELISA 短,所以前者更适于在一般实

验室推广应用。

本试验所采用的 2 种诊断方法在特异性方面仍需进一步论证。例如与其它虫种间有无交叉反应或与传统方法(如粪便检查虫卵)比较检出率有何差异等。作者在 508 份牛粪便中按常规方法查找虫卵,虽然在个别牛的粪样中找到了隐孢子虫卵,但是因为数量太少,形态不典型,所以未能正确鉴定出虫卵的种类。此外,各种动物中 *C. parvum* 阳性检出率结果显示,在绵羊和山羊血清样品中明显高于牛群。508 份牛血清中,重组 ELISA 方法只检出 3 份弱阳性的血清,IFAT 方法只有 1 份。这可能与牛群集约化饲养管理程度有一定关系。对于机体免疫状况表现异常的人群,如长期腹泻病患者、免疫缺陷病患者、肿瘤患者和做过器官移植手术者隐孢子虫病流行情况如何? 由于现实条件所限,本试验未能展开进行这方面的工作。

本试验对早期快速诊断隐孢子虫病诊断方法进行了有意义的尝试,为实验条件差的基层实验室对该病进行流行病学调查提供了新的思路和方法。

参考文献:

- [1] MAC KENZIE W R, HOXIE N J, PROCTOR M E, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(3): 161-167.
- [2] NIME F A, BUREK J D, PAGE DL, et al. Acute enterocolitis in a human being infecting with the protozoan *Cryptosporidium* [J]. *Gastroenterology*, 1976, 70: 592-598.

- [3] GOSTIN L O, LAZZARINI Z, NESLUND V S, et al. Water quality laws and waterborne diseases: *Cryptosporidium* and other emerging pathogens [J]. *Am J Public Health*, 2000, 90(6):847-853.
- [4] SUNNOTEL O, LOWERY C J, MOORE J E, et al. *Cryptosporidium* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 43: 7-16.
- [5] GABRIELA C, TRAMY N, KARINE G, et al. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma [J]. *Infect Agents Cancer*, 2007, 2: 22.
- [6] SUNNOTEL O, SNELLING W J, XIAO L, et al. Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides [J]. *Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3285-3291.
- [7] 王利磊, 闫 歌. 人体隐孢子虫病流行病学及临床研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 12: 953-957.
- [8] 袁忠英, 沈玉娟, 曹建平, 等. 牛源隐孢子虫上海分离株的巢式 PCR 鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 2: 135-139.
- [9] 姚龙泉, 张西臣, 吴 涛, 等. 隐孢子虫 SSU rRNA 基因的巢式 PCR-RFLP 分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(6): 321-325.
- [10] AMAR C F, DEAR P H, MCL AUCHLIN J. Detection and identification by real time PCR/RFLP analyses of *Cryptosporidium* species from human faeces [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004; 38(3): 217-222.
- [11] 王 权, 陈永军, 袁耀明, 等. 奶牛隐孢子虫 Nested PCR-RFLP 方法的建立及初步应用 [J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(3): 65-72.
- [12] GARCÉS-SANCHEZ G, WILDERER P A, MUNCH J C, et al. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples [J]. *Water Res*, 2009, 43(10): 2669-2678.
- [13] PARR J B, SEVILLEJA J E, SAMIE A, et al. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76(5): 938-942.
- [14] LECHEVALLIER M W. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters [J]. *A ppl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 971-979.
- [15] 耿艺介, 高世同, 黄达娜, 等. 食品和水源微小隐孢子虫 18S rRNA 鉴定方法研究 [J]. 中国热带医学, 2006, 6: 944-946.
- [16] LEE D Y, SETO P, KORCZAK R. DNA microarray-based detection and identification of waterborne protozoan pathogens [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(2): 129-133.
- [17] LECHEVALLIER M W, NORTON W D, SIEGEL J E, et al. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 690-697.
- [18] ROSENBLATT J E, SLOAN L M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(6): 1468-1471.
- [19] 赵巧莲, 黄慧聪, 潘长旺, 等. 隐孢子虫 Gal/GalNAc 特异性凝集素 P30 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 6: 439-444.
- [20] PRIEST J W, KWON J P, MOSS D M, et al. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens [J]. *Clin Microbiol*, 1999, 37(5): 1385-1392.
- [21] PARVIZ S, ELAHE E, MOHAMAD-REAZA M D, et al. Recombinant *Cryptosporidium parvum* p23 as a target for the detection of *Cryptosporidium*-specific antibody in calf sera [J]. *Parasitol Res*, 2008, 103: 1207-1211.
- [22] 格日勒图, 王艳霞, 包秋华, 等. 电转化方法将外源性质粒导入干酪乳杆菌的研究 [J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 9-14.
- [23] 张 珍, 李红星, 刘春会, 等. cp23 重组抗原用于微小隐孢子虫病血清学诊断价值的研究 [J]. 山东医药, 2009, 11: 52-53.

(编辑 白永平)