

猪支气管败血波氏杆菌菌毛 *fimD* 基因的克隆表达及间接 ELISA 检测方法的建立

何 华,裴 洁,吴 斌*,赵战勤,张建民,罗 勇,向 敏,卢 顺
(华中农业大学动物医学院农业微生物国家重点实验室,武汉 430070)

摘 要: 参照 GenBank 上支气管败血波氏杆菌的菌毛 *fimD* 基因序列(X75811),设计 1 对引物,从本实验室分离鉴定的猪源支气管败血波氏杆菌中扩增出 *fimD* 编码区 1 098 bp 的片段,将其克隆至原核表达载体 pET-28a,转化到大肠杆菌 BL21(DE₃)中进行融合表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测证实该表达产物以包涵体形式存在,大小约 42 ku,与用支气管败血波氏杆菌菌体制备的阳性血清能发生特异性反应。将包涵体变性和复性后被酶标板建立间接 ELISA(*fimD*-ELISA),特异性良好。用 *fimD*-ELISA 检测临床送检的 668 份血清,阳性率为 30.7%。用该法与微量凝集试验平行检测 102 份血清,*fimD*-ELISA 的敏感性高于微量凝集试验。

关键词: 支气管败血波氏杆菌;*fimD*;克隆;表达;ELISA

中图分类号:S852.614

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)01-0098-05

Indirect ELISA for Detection of Antibody against Swine *Bordetella bronchiseptica* Using Recombinant *fimD* Expressed in *E. coli*

HE Hua, PEI Jie, WU Bin*, ZHAO Zhan-qin, ZHANG Jian-min,
LUO Yong, XIANG Min, LU Shun

(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology, College of Veterinary Medicine,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: According to the *Bordetella bronchiseptica fimD* sequence(X75811) of GenBank, we designed a pair of primer, and 1 098 bp DNA fragment of *fimD* was amplified from swine *Bordetella bronchiseptica* identified in our laboratory. The acquired PCR products were inserted into pET-28a and expressed in BL21(DE₃). Results of Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot assay showed that the *fimD* gene was expressed in the form of inclusion body, and the recombinant protein was about 42 kD, and can react with the swine antisera to *Bordetella bronchiseptica*. The fusion protein was purified and used as coating antigen to develop the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA). When using this ELISA to detect 668 clinical sera, 30.7% positive sera were detected. Parallel examination of the same 102 serum samples was conducted by using the ELISA and micro-agglutination test(MAT), the result showed that the ELISA is more sensitivity than MAT.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*; *fimD*; clone; expression; ELISA

支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, *Bb*)是寄生在动物呼吸道黏膜纤毛上皮细胞

的一种革兰氏阴性小球杆菌,能够感染多种动物,引起呼吸系统疾病^[1-2]。对于养猪业来讲,*Bb*可以单

收稿日期:2008-01-23

基金项目:国家自然科学基金项目(30471292);国家“863计划”(2006AA10A206)

作者简介:何 华(1982-),女,湖南浏阳人,硕士生,主要从事细菌分子生物学和基因工程疫苗研究,E-mail: jency_1118@126.com

* 通讯作者:吴 斌,E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

独或其他病原菌(如产毒多杀性巴氏杆菌、猪链球菌、副猪嗜血杆菌等)协同致病^[3-5],从而提高呼吸道疾病的发病率,并增加其发病的严重程度。近年来,人们发现 *Bb* 可经动物传染人,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,因此引起高度关注^[6-7]。

目前国内外关于 *Bb* 检测方法的报道很少,主要有细菌学检查、血清学凝集试验和 PCR 检测方法^[8-10]。传统的细菌学检测方法和 PCR 方法都需通过 36~48 h 的细菌培养,耗时多,操作繁琐^[10];而血清学凝集试验以灭活的 *Bb* 菌体来检测抗体,易发生交叉反应^[8-9]。因此,这些方法在临床诊断中还没有得到广泛应用。菌毛是 *Bb* 主要的黏附因子之一,它在细菌感染初期可以介导细菌特异性黏附宿主组织,诱导机体产生体液免疫反应^[11-13]。*Bb* 菌毛蛋白有 5 种血清型,其中位于菌毛顶端的蛋白是所有血清型共有的,该蛋白由 *fimD* 基因编码,介导 *Bb* 直接黏附宿主细胞^[1,14]。因此,作者尝试克隆和表达该结构蛋白基因 *fimD*,用其纯化的蛋白包被酶标板,建立一种快速、敏感的间接 ELISA 检测方法,以了解临床猪场 *Bb* 感染的情况,为 *Bb* 的净化提供血清流行病学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Bb HH0809 由本实验室分离鉴定和保存。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3)、pET-28a 质粒由本实验室保存。副猪嗜血杆菌(*HPS*)、猪产毒素巴氏杆菌(*DNT+Pm*)、猪大肠杆菌(*E. coli*)、猪链球菌(*SS*)、猪伪狂犬病毒(*PRV*)、猪细小病毒(*PPV*)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(*PRRSV*)和猪衣原体(*CP*)的标准阳性血清由本实验室制备和保存。猪抗 *Bb* 标准阳性血清由本实验室用 HH0809 的 I 相菌免疫猪制备。DNA Marker、*rTaq* DNA Polymerase、T₄ DNA Ligase 和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;基因组提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自上海生工公司。

1.2 方 法

1.2.1 *fimD* 基因的引物设计 根据 GenBank 中 *Bb* 菌株 RB50 的 *fimD* 基因序列(X75811),设计了 1 对引物以扩增编码区 1 098 bp 的片段。上游引物 P1 : 5'-TAAGGATCCCGTGCCCGCGCGCGTA-ATTTTC-3'; 下游引物 P2 : 5'-GCCAAGCTT-

TCAGTCATAGTTCAAGGTCA-3'。为了便于 PCR 产物的克隆和表达,上、下游引物分别添加 1 个 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点以及 3 个保护性碱基。引物由上海生工合成。

1.2.2 *fimD* 基因的克隆和表达载体的构建 按照基因组提取试剂盒说明书进行 HH0809 的培养及其基因组的提取。以本室分离的 HH0809 菌株为模板,PCR 扩增 *fimD* 基因全长。采用 25 μ L 的 PCR 反应体系:模板 DNA 1 μ L, 10 \times PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μ L, 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 1.5 μ L, DMSO 1 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ P1 和 P2 各 1 μ L, 5 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA Polymerase 1.0 以及灭菌去离子水 16.5 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,56 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,与 pMD-18T 连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,获得重组质粒 pT*fimD*。经测序和用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切鉴定后,回收 1 098 bp 的 *fimD* 片段。将回收的 *fimD* 片段和经相同酶切后的 pET-28a 用 T₄ DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。用碱裂解法提取重组质粒 pET*fimD*,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定。

1.2.3 *fimD* 的诱导表达和表达产物的提取 将重组表达质粒 pET*fimD* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取单菌落,于 37 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6~1.0),加入 IPTG 至终浓度 0.8 mmol \cdot L⁻¹,继续诱导培养 3 h,收集菌体。同时设空白载体 pET-28a 转化子作对照。按常规方法提取包涵体,用紫外分光光度计测定蛋白浓度。菌体裂解液和包涵体提取物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 Western blot 分析 按文献[15]所述方法对表达产物 *fimD* 进行 Western blot 分析。一抗为 *Bb* HH0809 菌株感染猪的阳性血清。

1.2.5 间接 ELISA 方法的建立 以不同浓度的包涵体提取物包被酶标板(同时设 pET-28a 转化菌裂解液对照),以制备的标准阴阳性猪血清作倍比稀释后进行方阵滴定,按常规进行间接 ELISA 操作,确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。用最佳浓度的抗原包被酶标板,检测 40 份经微量凝集试验^[16]检测为阴性的 *Bb* 阴性猪血清,计算 \bar{x} 和 s ,得出阴阳性界限($\bar{x} + 2s$)。并且检测 *HPS*、*DNT+Pm*、*E. coli*、*SS*、*APP*、*PRV*、*PPV*、*PRRSV* 和 *CP* 的标准阳

性血清。

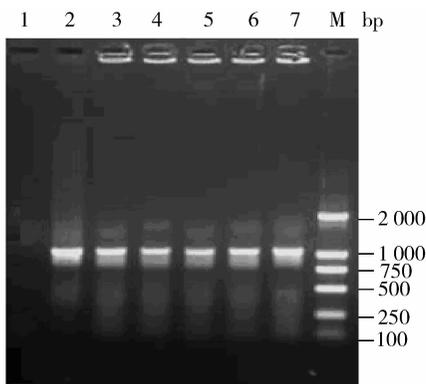
1.2.6 对比试验 用所建立的 *fimD*-ELISA 和微量凝集试验平行检测 102 份血清,比较二者的灵敏度和符合率。

1.2.7 ELISA 方法的临床初步应用 分别对湖北省的 3 个猪场哺乳仔猪、保育仔猪和生长猪的共 668 份血清进行 *Bb* 的抗体检测,分析其流行病学规律。

2 结果

2.1 *fimD* 的克隆与表达载体的构建

PCR 扩增 *fimD* 片段约为 1 098 bp,与预计大小一致(图 1)。将目的片段插入到 pET-28a 的 *BamH* I 和 *Hind* III 位点,得到重组表达质粒 pET*fimD*,其双酶切鉴定结果如图 2 所示,片段大小分别为 1 098 和 5 315 bp。



1. 阴性对照;2~7. *fimD* PCR 产物;M, DL2000 相对分子质量标准

1. Negative control;2-7. PCR products (*fimD*); M, DL2000 marker

图 1 *fimD* 的 PCR 结果

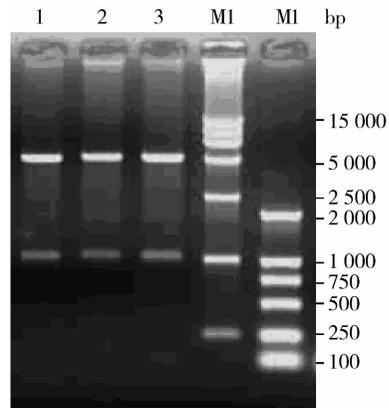
Fig. 1 PCR results of *fimD*

2.2 *fimD* 基因的表达和 Western blot 分析

将 pET-28a 和 pET*fimD* 分别转化 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析,结果发现,在 pET*fimD* 转化子的裂解物中出现 1 条约 42 ku 的蛋白带,与预期的融合蛋白相对分子质量相符,该表达产物以包涵体形式存在。Western blot 结果显示,表达产物能与 *Bb* 标准阳性血清发生特异性反应(图 3)。按常规方法提取包涵体,用紫外分光光度计测定蛋白浓度为 223 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 间接 ELISA 方法的建立

2.3.1 最佳包被浓度的确定 用方阵滴定法确定,

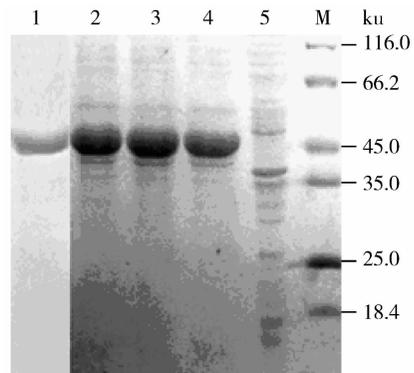


1~3. *BamH* I 和 *Hind* III 酶切产物;M1, DL15000 相对分子质量标准;M2, DL2000 相对分子质量标准

1-3. pET*fimD*/*BamH* I-*Hind* III; M1, DL15000 marker;M2, DL2000 marker

图 2 重组质粒 pET*fimD* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pET*fimD* by enzyme digestion



1. pET*fimD* 蛋白的免疫印迹;2~4:含 pET*fimD* 的 BL21 诱导裂解物;5. 含 pET-28a 的 BL21 诱导裂解物;M, SM0431 蛋白相对分子质量标准

1. Western blot analysis of pET*fimD* in BL21 lysates;2-4. SDS-PAGE of BL21 lysates transformed by pET*fimD*; 5. SDS-PAGE of BL21 lysates transformed by pET-28a;M, Protein marker SM0431

图 3 重组菌的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed protein from recombinant BL21 (DE3)

fimD 蛋白最佳包被浓度为 7.03 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 临界值的确定 用 *fimD*-ELISA 检测 40 份经微量凝集试验检测为阴性的 *Bb* 阴性猪血清,其 $OD_{630\text{nm}}$ 的平均值(\bar{x})为 0.263 3,标准差(s)为 0.058 1,因此确定阴阳性临界值为 $\bar{x} + 2s =$

0.38, 即当检测血清的 $OD_{630\text{ nm}} > 0.38$ 时判为阳性, 当检测血清的 $OD_{630\text{ nm}} \leq 0.38$ 时判为阴性。

2.3.3 特异性试验 用 *fimD*-ELISA 检测了 HPS、DNT+ *Pm*、*E. coli*、SS、APP、PRV、PPV、PRRSV 和 CP 的标准阳性血清, 除 *Bb* 标准阳性血清的 $OD_{630\text{ nm}} > 0.38$ (临界值) 判为阳性外, 其它猪细菌和病毒性疾病的标准阳性血清的 $OD_{630\text{ nm}}$ 均小于临界值, 为阴性(表 1), 表明用体外表达的 *fimD* 蛋白建立的间接 ELISA 方法特异性良好。

2.4 对比试验

用建立的 *fimD*-ELISA 和微量凝集试验平行

表 1 *fimD*-ELISA 的特异性试验结果

Table 1 Specificity of *fimD*-ELISA for *Bb*

	不同病原体的阳性血清 Positive serum for different pathogen									
	<i>Bb</i>	HPS	APP	DNT+ <i>Pm</i>	<i>E. coli</i>	SS	PRV	PPV	PRRSV	CP
$OD_{630\text{ nm}}$	1.5	0.12	0.14	0.19	0.12	0.15	0.13	0.10	0.09	0.14

表 2 间接 ELISA 试验与微量凝集试验的对比结果

Table 2 Comparative results of *fimD*-ELISA and MAT of 102 sera samples

		<i>fimD</i> -ELISA		
		阳性	阴性	总计
		Positive	Negative	Sum
微量凝集 MAT	阳性 Positive	29	0	29
	阴性 Negative	6	67	73
	总计 Sum	35	67	102

表 3 *fimD*-ELISA 的临床应用

Table 3 The detection of clinical sera by *fimD*-ELISA

日龄	血清数/份	阳性血清数/份	阳性率/%
Age/d	Sera samples	Positive samples	Positive rate
12~21	198	75	37.8
22~38	220	52	23.6
39~90	250	78	31.2

3 讨论

菌毛在细菌感染初期可以介导细菌特异性黏附宿主组织, 在诱导宿主机体产生细胞免疫和体液免疫方面有着重要的作用^[1-2]。*Bb* 菌毛属于 IV 型菌毛, 此类菌毛能使细菌牢固附着于动物消化道、呼吸道和泌尿生殖道的黏膜上皮细胞, 是公认的毒力因子^[17-18]。国外学者发现当分别用 *Bb* 突变株和野生

检测 102 份血清。间接 ELISA 的阳性率为 34.3%, 微量凝集的阳性率为 28.4%, 微量凝集检测为阳性的血清间接 ELISA 检测也都为阳性, 微量凝集检测为阴性的血清里间接 ELISA 检测有 6 份为阳性, 阳性符合率为 82.8%, 阴性符合率为 100%。详见表 2。

2.5 *fimD*-ELISA 的临床初步应用

用该 ELISA 方法检测湖北省 3 个猪场不同年龄段共 668 份血清。总的阳性率为 30.7%。具体分布如表 3 所示。

菌株感染动物时, 血清中抗体的质量和数量有很大的差异^[18]。因此, 用 *Bb* 菌毛的亚单位蛋白 *fimD* 作为 ELISA 包被抗原检测动物体内特异抗体, 可以用来诊断猪群的早期感染情况, 同时也可以用来对疫苗的抗体保护力进行评价。

本研究中所建立的以菌毛亚单位蛋白 *fimD* 为检测抗原的 ELISA 与 *Bb* 菌体为检测抗原的微量凝集试验进行了对比, 间接 ELISA 的检出率要高于微量凝集, 且微量凝集检测为阴性的血清经间接 ELISA 检测有 6 份为阳性, 这说明 ELISA 的敏感性和特异性高于微量凝集方法。

在临床的初步应用中, 检测断奶前仔猪、保育仔猪和生长猪共 668 份血清, 阳性率分别为 37.8%、23.6% 和 31.2%, 总的阳性率为 30.7%。分析结果, 反映了以下几个方面: 第一, 由于现在猪场的种猪普遍都注射猪萎缩性鼻炎疫苗, 作者所测得的断奶前仔猪阳性率可能只是反映母源抗体的水平, 不同猪场由于免疫程序的不同这段时期的阳性率有很大差异; 第二, 随着保育仔猪的合群, 一方面母源抗体会有所下降甚至消失, 另一方面猪群相互接触的机会增加, 感染 *Bb* 的机会也相应增加, 但是总的来说抗体水平是下降的; 第三, 生长期母源抗体消失, 保育期感染 *Bb* 产生的抗体在一段时间后才能被检测得到, 因此这段时间的阳性率又有一定的回升。当然, *Bb* 的阳性率与猪场管理和环境好坏也是密切

相关的,管理得好的猪场阳性率普遍较低。

本方法的建立,克服了细菌分离鉴定较为繁琐费时和 PCR 检测易于出现假阳性的缺点;此外包被抗原表达量高,易于纯化,ELISA 操作方法简单。因此,该 ELISA 检测方法的建立,有望成为一种快速、准确的支气管败血波氏杆菌血清学诊断方法。

参考文献:

- [1] MATTOO S, CHERRY J D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18: 326-382.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社,2002:276-277.
- [3] DUGAL F, BELANGER M, JACQUES M. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Can J Vet Res*, 1992, 56:260-264.
- [4] VECHT U, WISSELINK H J, VAN DIJK J E, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype[J]. *Infect Immun*, 1992, 60:550-556.
- [5] BROCKMEIER S L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1):75-78.
- [6] VIEJO G, DE LA IGLESIA P, OTERO L, et al. *Bordetella bronchiseptica* pleural infection in a patient with AIDS[J]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2002, 34(8):628-629.
- [7] VALENCIA M E, ENRIQUEZ A, CAMINO N, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in patients with HIV[J]. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 2004, 22: 502-503
- [8] JENKINS EM. An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine [J]. *Can J Comp Med*, 1978, 42(3):286-292.
- [9] 吴 斌,陈焕春,何启盖,等. 应用乳胶凝集试验进行猪传染性萎缩性鼻炎血清流行病学调查[J]. 中国兽医科技,2001, 31(6):21-22.
- [10] REGISTER K B, DEJONG K D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 117: 201-210.
- [11] KIRIMANJESWARA G S, MANN P, HARVILL E. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections[J]. *Infect Immun*, 2003,71 :1719-1724.
- [12] MATTOO S, MILLER J F, COTTER P A. Role of *Bordetella bronchiseptica* Fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(4): 2024-2033.
- [13] RAJEEV S, KANIA S A, NAIR R V, et al. *Bordetella bronchiseptica* fimbrial protein-enhanced immunogenicity of a *Mannheimia haemolytica* leukotoxin fragment[J]. *Vaccine*, 2001, 19:4842-4850.
- [14] GEUIJEN C A W, WILLEMS R J L, BONGAERTS M, et al. Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, fimb, in colonization of the mouse respiratory tract [J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(10): 4222-4228.
- [15] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [16] 鲁 承,金 鑫,扬咏洁. 猪传染性萎缩性鼻炎微量凝集反应诊断抗原的制备[J]. 黑龙江畜牧兽医,2003, (11):38-39.
- [16] PARKHILL J, SEBAIHIA M, PRESTON A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* [J]. *Nat Genet*, 2003, 35: 32-40.
- [17] PRESTON A, PARKHILL J, MASKELL D J. The *Bordetellae*: lessons from genomics[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 379-390.
- [18] MOOI F R, JANSEN W H, BRUNINGS H, et al. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae[J]. *Microb Pathog*, 1992, 12:127-135.