

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(8):1109-1114; 4 August 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 空肠弯曲菌 FlaA 单克隆抗体的制备与鉴定

黄金林<sup>#</sup>, 尹衍新<sup>#</sup>, 梅德霞, 张弓, 潘志明, 刘秀梵, 焦新安<sup>\*</sup>

(扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

**摘要:**【目的】原核表达空肠弯曲菌鞭毛蛋白 FlaA, 并制备其单克隆抗体。【方法】克隆目的基因并将其构建到 pET30a(+) 和 pGEX-6p-1 表达载体, 分别以变复性纯化后的 rHis-FlaA、rGST-FlaA 蛋白为免疫原和检测原进行杂交瘤细胞的筛选。采用间接 ELISA 法测定细胞上清和单抗腹水效价, Dot-ELISA、Western blot 分析单抗特异性。【结果】成功构建 pET30a(+)-flaA 和 pGEX-6p-1-flaA 重组原核表达质粒, 并融合表达 rHis-FlaA 和 rGST-FlaA 蛋白, Western blot 试验显示天然蛋白多抗血清能与体外表达的蛋白呈现特异性反应, 表明表达蛋白具有免疫原性。筛选获得 3 株稳定分泌抗 FlaA 的单克隆杂交瘤细胞株, 分别命名为 2D12、5E12、6A9, 其 Ig 亚类分别为 IgG2a、IgG1、IgG1, 腹水效价分别为 1:102400, 1:102400 和 1:51200; Western blot 试验显示, 3 株单抗均能与表达 rHis-FlaA 重组蛋白的细菌发生特异性反应; Dot-ELISA 试验表明, 3 株单抗均能与不同来源的空肠弯曲菌分离株发生特异性反应。【结论】本研究制备的单克隆抗体有较高特异性, 具有良好的应用价值。为进一步研究空肠弯曲菌鞭毛蛋白的生物学特性、致病机理, 以及建立快速检测技术奠定基础。

**关键词:** 鞭毛蛋白 FlaA; 空肠弯曲菌; 单克隆抗体

**中图分类号:** R329 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-06-1109

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*) 是一种重要的食源性人兽共患病原菌, 是全球范围内引起人胃肠道感染最常见的病原菌, 也是引起旅游者腹泻的主要致病菌<sup>[1]</sup>。同时, 特定血清型空肠弯曲菌引起的肠炎是格林-巴利综合症 (Guillain-Barre syndrome, GBS) 的重要前驱因子<sup>[2]</sup>。人类主要通过被污染的水源、乳制品及食物或与动物直接接触而感染。

近年来, 由空肠弯曲菌引起的人类疾病呈上升趋势, 对其致病性研究已成为一个热点问题<sup>[3]</sup>。但由于缺乏合适的动物模型及其基因组低 GC 含量导致的基因表达困难等原因, 空肠弯曲菌致病机理至今仍不清晰<sup>[3]</sup>。目前, 对空肠弯曲菌致病机理的研究主要集中在外膜蛋白、结构蛋白和毒素, 其中鞭毛

蛋白是公认的对致病性起关键作用的结构元件<sup>[4]</sup>。空肠弯曲菌具有极鞭毛, 有较强的运动力, 在小肠黏附与定殖过程中鞭毛起重要作用。研究表明<sup>[5]</sup>, *flaA* 基因编码的 FlaA 蛋白与空肠弯曲菌的鞭毛形成密切相关, *flaA* 基因突变株无法形成鞭毛。国内外尚无针对空肠弯曲菌鞭毛蛋白 FlaA 单克隆抗体制备的报道, 本研究通过表达纯化 FlaA 蛋白, 制备其单克隆抗体, 为建立空肠弯曲菌的快速检测方法及其致病机理研究奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株、培养基及生长条件: 大肠杆菌

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划 (2007AA02Z419); 国家支撑计划 (2009BADB9B01); 江苏省社会发展支撑计划 (BE2008655); 扬州大学科技创新培育基金

<sup>\*</sup> 通信作者。Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

**作者简介:** <sup>#</sup> 对本文有同等贡献。黄金林 (1969-), 男, 江苏姜堰人, 博士、副教授, 主要从事人兽共患病原微生物研究, E-mail: jinlin@yzu.edu.cn; 尹衍新 (1985-), 男, 山东日照人, 硕士研究生。

**收稿日期:** 2010-03-01; **修回日期:** 2010-04-26

(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21 和 BL21 (DE3)、沙门氏菌、李斯特菌、结肠弯曲菌和空肠弯曲菌分离株由江苏省人兽共患病学重点实验室保存, ATCC33560 由江苏出入境检验检疫局蒋原研究员惠赠、NCTC11168 由遵义医学院孙万邦教授惠赠。所有空肠弯曲菌株接种 CCDA 培养基, 置厌氧培养罐中, 加入微需氧产气袋后, 密封、培养 48 h, 经国标方法鉴定正确后<sup>[6]</sup>, 备用。

**1.1.2 细胞系及实验动物:**骨髓瘤细胞系 SP2/0-Ag-14 为本室保存。雌性 BALB/c 小鼠(6-8 周龄, 体重为 18-22 g/只)、ICR 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

**1.1.3 主要试剂:**质粒载体 pET-30a(+)、pGEX-6p-1 载体分别购自 Novagen 公司和 Amersham Biosciences 公司。DNA 回收试剂盒购自捷瑞生物工程(上海)有限公司;高保真 DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、T4 DNA 连接酶、IPTG、蛋白质 Marker、DNA ladder 购自大连宝生物工程有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自 Fluka 公司;PEG (MW4000)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、HRP 标记羊抗鼠 IgG 和 IgM 抗体、HRP 标记兔抗羊 IgG 抗体、鼠源单克隆抗体亚类试剂盒、高糖 DMEM、次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶核苷(T)、氨基嘌呤(A)、DMSO 等均购自 Sigma 公司;其余常规试剂为国产分析纯。

## 1.2 *flaA* 基因扩增

采用基因组 DNA 抽提纯化试剂盒制备模板, 根据 GenBank 中空肠弯曲菌标准菌株 (NCTC11168) *flaA* 基因序列设计引物: Primer1 (含 *Bam*H I 酶切位点): 5'-TAGGATCCAAAATGGGATTTTCGTATTA-3', Primer2 (含 *Xho* I 酶切位点): 5'-AGACTCGAGTGTTCCTAAACCCAT-3', 引物间跨度 1886 bp。扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 105 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物与 pUCm-T 载体连接、转化, 蓝白斑筛选, 提取质粒酶切鉴定, 初步鉴定阳性的克隆送大连宝生物工程公司测序。

## 1.3 重组质粒构建及鉴定

阳性质粒酶切后, 试剂盒纯化回收目的片段, 分别与 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pGEX-6p-1 表达载体和 pET30a(+ ) 表达载体连接, 构建重组质粒 pET-30a(+)-*flaA*、pGEX-6p-1-*flaA*。将重组质粒分别转化 BL21(DE3) 和 BL21 感受态细菌, 重组菌命名为 BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*)、BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*), 表达蛋白命名为 rHis-FlaA、

rGST-FlaA。连接、转化、质粒提取、电泳的方法等均参照文献<sup>[7]</sup>。

## 1.4 重组 FlaA 蛋白诱导表达及变复性纯化

重组菌 BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*)、BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) 新鲜培养物以 1:100 分别接种于含相应抗生素的液体 LB 培养基, IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h, 诱导产物 SDS-PAGE 鉴定, 操作步骤依据文献的方法进行<sup>[7]</sup>。表达产物包涵体变复性程序参照文献的方法进行<sup>[8]</sup>。

## 1.5 重组蛋白 FlaA 的生物学活性鉴定

参照文献的方法提取空肠弯曲菌标准株 NCTC11168 的天然鞭毛蛋白<sup>[9]</sup>, SDS-PAGE 鉴定后以天然鞭毛蛋白免疫 BALB/c 小鼠获得多抗血清。经诱导的 BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) 进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 以获得的鼠源多抗血清为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 Ig(G+M) 抗体为二抗, DAB 为底物显色, 进行蛋白印迹分析。

## 1.6 免疫方案

取 6-8 周龄、体重 18-20 g/只雌性 BALB/c 小鼠, 将制备的免疫原 rHis-*flaA* 蛋白与等体积弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 经皮下多点注射免疫, 剂量为每只 100  $\mu$ g。以后每隔 2 周, 取与一免等剂量的免疫原和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后皮下注射加强免疫, 加强免疫共 2 次, 融合前 3 d 加倍剂量与等体积生理盐水混匀, 强化免疫 1 次。

## 1.7 杂交瘤细胞筛选与克隆

以变复性纯化的 rGST-*flaA* 蛋白作为检测抗原, 用间接 ELISA 方法进行杂交瘤细胞筛选, 方阵实验确定检测抗原的最佳包被浓度为 0.1  $\mu$ g/孔, 间接 ELISA 反应条件如下: 细胞上清 50  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h; PBST 洗涤后加入工作浓度的酶标二抗 50  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h 后洗涤, OPD 显色 10 min。OD<sub>490</sub> 数值大于 1.0 判定为阳性孔, 阳性孔细胞以有限稀释法进行克隆化<sup>[10]</sup>。

## 1.8 单抗亚类鉴定

按单克隆抗体亚类试剂盒说明书进行。

## 1.9 单抗腹水制备及效价测定

采用体内诱生法制备腹水<sup>[10]</sup>, 间接 ELISA 法测定抗体效价, 分装, -70 $^{\circ}$ C 保存。

## 1.10 Western blot 分析

经诱导的 BL21 (DE3) (pET-30a(+)) 及纯化蛋白 rHis-FlaA 进行 SDS-PAGE 后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 分别以获得的单克隆抗体为一抗, 进行蛋白印迹分析。

### 1.11 Dot-ELISA 分析

分别吸取 BL21 (DE3) (pET)、BL21 (DE3) (pET-30a(+)-flaA)、BL21 (6p-1-flaA)、IPTG 诱导后的裂解液上清以及肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌、结肠弯曲菌、空肠弯曲菌分离株、标准株 NCTC11168 和 ATCC33560 裂解液上清及 NCTC11168 提纯鞭毛蛋白各 5 μL 点于 NC 膜上, 37°C 30 min 干燥后, 用含 10% 小牛血清的 PBST 封闭过夜; 分别以获得的单克隆抗体为一抗, HRP 标记羊抗鼠 Ig(G+M) 抗体为二抗, DAB 显色分析。

## 2 结果

### 2.1 flaA 基因扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳出现一条长约

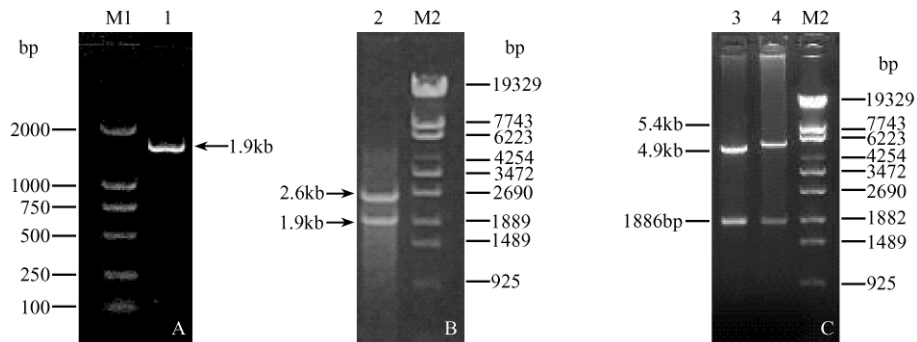


图 1 目的基因的扩增、质粒构建与鉴定

Fig.1 Amplification of gene and analysis of plasmids with restriction enzyme. M1. DNA Marker DL2000; M2. λ-EcoT 14 I digest Marker; 1. *flaA* PCR product; 2. pUCm-T-*flaA*/*Bam*H I + *Xho* I; 3. pGEX-6p-1-*flaA*/*Bam*H I + *Xho* I; 4. pET-30a(+)-*flaA*/*Bam*H I + *Xho* I.

### 2.4 FlaA 重组蛋白的表达和变复性纯化

新鲜培养的重组大肠杆菌 BL21 (pGEX -6p-1-*flaA*)、BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) 经 IPTG 诱导表达, 超声波裂解后, 分别将菌体裂解后上清、沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示在裂解后沉淀中有明显的诱导表达的目的蛋白条带 (图 2), 与预期值 63 kDa (rHis-FlaA), 84 kDa (rGST-FlaA) 相符。表明重组蛋白 rHis-FlaA, rGST-FlaA 得到正确表达。包涵体蛋白经变复性处理后得到纯度较高的可溶性蛋白, 分光光度计测定其浓度分别为 1.54 g/L (rHis-FlaA), 2.03 g/L (rGST-FlaA)。

### 2.5 FlaA 重组蛋白的生物学活性鉴定

由图 3 的免疫印迹分析显示, 经纯化的 NCTC11168 鞭毛蛋白免疫小鼠得到的多抗血清能与纯化蛋白 rHis-*flaA* 反应, 不与宿主菌 BL21 (DE3) (pET-30a(+)) 全菌蛋白反应。结果表明, 表达的 FlaA 蛋白具有免疫生物学活性。

1.9 kb 的特异性条带, 无杂条带, 与预期设计片段大小相符 (图 1-A), 测序结果显示该基因长为 1886 bp, 相对分子量为 59 kDa。

### 2.2 克隆载体构建

将目的基因与 pUCm-T 载体连接后得到重组质粒 pUCm-T-*flaA*, 质粒经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切后分别出现大小为 2.6 kb 的载体条带和大小为 1.9 kb 的目的条带 (图 1-B), 酶切鉴定和测序结果正确。

### 2.3 原核表达质粒鉴定

重组质粒 pET-30a(+)-*flaA*、pGEX-6p-1-*flaA* 经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切后分别出现载体条带和大小 1886 bp 的目的条带 (图 1-C), 与预期相符, 表明重组质粒构建正确。

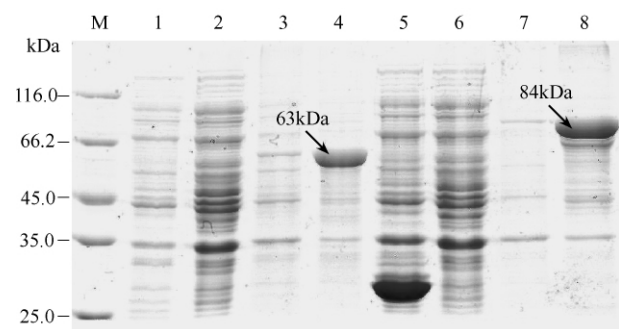


图 2 重组大肠杆菌 BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*)、BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) 的 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed product. M. Protein marker; 1. BL21 (DE3) (pET-30a(+)) induced by IPTG; 2. BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) induced without IPTG; 3. Cracked supernatant of BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) induced by IPTG; 4. Cracked deposit of BL21 (DE3) (pET-30a(+)-*flaA*) induced by IPTG; 5. BL21 (pGEX-6p-1) induced by IPTG; 6. BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*) induced without IPTG; 7. Cracked supernatant of BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*) induced by IPTG; 8. Cracked deposit of BL21 (pGEX-6p-1-*flaA*) induced by IPTG.

### 2.6 单克隆抗体的生物学特性测定

经2次融合,共筛选得到3株单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为2D12、5E12和6A9。亚类鉴定分别为IgG2a、IgG1、IgG1,杂交瘤细胞腹水ELISA效价分别为1:102400,1:102400和1:51200。在Dot-ELISA试验中,3株单克隆抗体与几种重组菌及细菌的反应谱测定结果见表1,从结果中可以看到,3株单克隆抗体均能与重组菌BL21(DE3)(pET-30a(+)-flaA),BL21(pGEX-6p-1-flaA)反应,与空肠弯曲菌标准株、标准株提纯鞭毛蛋白及分离株反应,而与空载体、非空肠弯曲菌没有反应性。反应谱的测定结果表明,3株FlaA单克隆抗体具有良好的特异性。

### 2.7 Western blot 分析

由图4的免疫印迹分析显示,3株单克隆抗体均能与纯化蛋白rHis-FlaA反应,均不与宿主菌BL21(DE3)(pET-30a(+))全菌蛋白反应。结果表明,表达的FlaA蛋白具有免疫生物学活性,同时进

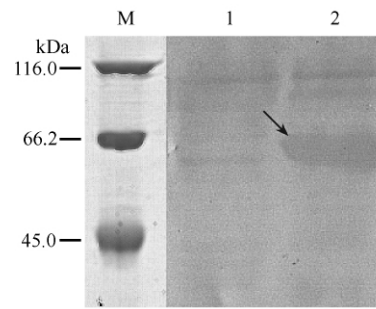


图3 rHis-FlaA蛋白的Western blot结果

Fig. 3 Western blot analysis of rHis-FlaA. M. protein marker; 1. BL21(DE3)(pET-30a(+)) whole protein; 2. BL21(DE3)(pET-30a(+)-flaA) whole protein

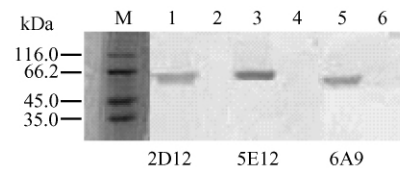


图4 三株单克隆抗体的Western blot结果

Fig. 4 Western blot analysis of mAbs. M. protein marker; 1, 3, 5. Purified fusion protein rHis-FlaA; 2, 4, 6. BL21(DE3)(pET-30a(+)) whole protein.

表1 FlaA单克隆抗体与细菌的反应谱

Table 1 The reactivities of monoclonal antibodies with different bacteria

Strain	Sources and number of strain	2D12	5E12	6A9
BL21(DE3)(pET-30a(+)-flaA)	Recombinant bacteria	+++	+++	+++
BL21(6p-1-flaA)	Recombinant bacteria	+++	+++	+++
BL21(DE3)(pET)	Recombinant bacteria	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	NCTC11168	+++	+	++
<i>C. jejuni</i>	ATCC33560	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Human, po-4-17	++	+	++
<i>C. jejuni</i> isolate	Human, po-6-9	+++	++	++
<i>C. jejuni</i> isolate	Human, po-19-3	++	++	++
<i>C. jejuni</i> isolate	Human, po-33-5	+++	+	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Human, po-61-9	+++	+	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Avian, AND-45	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Avian, 3-11	+++	++	++
<i>C. jejuni</i> isolate	Avian, HQHL-4	+++	+	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Avian, HQHL-5	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Avian, SHAJ-3	++	+	++
<i>C. jejuni</i> isolate	Cow, TZDN-16	+++	++	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Cow, TZDN-53	+++	+	+++
<i>C. jejuni</i> isolate	Cow, YZDN-18	+++	++	+++
<i>C. coli</i> isolate	Human, PO-3-15	-	-	-
<i>C. coli</i> isolate	Avian, d-2-12	-	-	-
<i>C. coli</i> isolate	Cow, XNSC-4-1	-	-	-
<i>Escherichia. coli</i>	C191	-	-	-
<i>S. paratyphi A</i>	CMCC 50507	-	-	-
<i>S. paratyphi A</i>	CMCC 50002	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	CMCC 50708	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	SCDC	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	CMCC 50041	-	-	-
<i>S. newington</i>	CMCC 50049	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	LM751521	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	LM1/2a	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>		-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	49005	-	-	-
<i>Lactic acid bacillus</i>	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i> purified flagellin		+++	++	+++

Negative(-); Positive(+).

一<sup>①</sup> 实了所获得的 3 株单克隆抗体均为针对 FlaA 的特异性单克隆抗体。

### 3 讨论

空肠弯曲菌是引起人类细菌性腹泻的重要肠道病原菌,鞭毛蛋白在该菌对宿主肠道细胞的黏附、侵袭和定植过程有重要作用,鞭毛蛋白单链由 FlaA 和 FlaB 蛋白组成,分别由 2 个相邻的基因 *flaA*、*flaB* 编码<sup>[11]</sup>,*flaA* 基因是空肠弯曲菌主要毒力基因。Wassenaar 等<sup>[12]</sup>发现,*flaB* 基因的突变体仍然具有运动性,而 *flaA* 基因的突变株无运动性,且不能黏附和侵袭宿主肠道细胞。Nuijten 等<sup>[5]</sup>借助 DNA 重组技术,使无运动性的 *flaA* 基因突变株在其编码鞭毛蛋白的基因定位区进行 DNA 重组,从而恢复其运动性、侵袭力和定植力。

在本研究中,我们扩增了空肠弯曲菌 *flaA* 基因,通过原核表达系统获得了重组鞭毛蛋白 rHis-FlaA、rGST-FlaA,在重组菌表达时,我们尝试不同的诱导温度,诱导剂浓度,诱导时间等,但发现虽然提高了目的蛋白的表达量,但目的蛋白的可溶形式没有增加,因此最终选择使用包涵体蛋白进行变复性纯化。

Raymond 等<sup>[13]</sup>在分析不同国家、不同血清型 GBS 患者空肠弯曲菌分离株时,发现其鞭毛 *flaA* 基因中间部分存在变异,而两侧保守区核苷酸变异多数不产生氨基酸变化。本研究中 Dot-ELISA 实验结果显示 3 株单克隆抗体具有良好的反应谱,但对不同来源的空肠弯曲菌反应强度不同,尤其是单抗 2D12、6A9。研究结果为深入分析 FlaA 蛋白的生物学特性、建立快速诊断方法和致病机理研究提供了材料。

### 参考文献

- [ 1 ] 黄金林,许海燕,姜峰,尹衍新,张弓,潘志明,刘秀梵,焦新安. 空肠弯曲菌脉冲场凝胶电泳分子检测方法的建立及初步应用. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2009,49( 4): 126-130.
- [ 2 ] Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain - Barré syndrome; a true case of molecular mimicry. *Trends in immunology*, 2004, 25(2): 61-66.
- [ 3 ] Huang JL, Xu HY, Bao GY, Zhou XH, Ji DJ, Zhang G, Liu PH, Jiang F, Pan ZM, Liu XF, Jiao XA. Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients. *Epidemiology and infection*, 2009, 137(8): 1111-1120.
- [ 4 ] Mohran ZS, Guerry P, Lior H, Murphy JR, el-Gendy AM, Mikhail MM, Oyofa BA. Restriction fragment length polymorphism of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and/or *C. coli* isolates from Egypt. *Journal of clinical microbiology*, 1996, 34(5): 1216-1219.
- [ 5 ] Nuijten PJ, Berg AJ, Formentini I, van der Zeijst BA, Jacobs AA. DNA rearrangements in the flagellin locus of an *flaA* mutant of *Campylobacter jejuni* during colonization of chicken ceca. *Infection and immunity*, 2000, 68(12): 7137-7140.
- [ 6 ] 中华人民共和国国家标准. 食品卫生微生物学检验—空肠弯曲菌检验. GB/T 4789.9-2008: 59-66.
- [ 7 ] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南,第三版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [ 8 ] 张成全. 牛  $\gamma$  干扰素和白细胞介素 4 基因的原核表达及其产物的单克隆抗体研制. 扬州大学学位论文,2008.
- [ 9 ] 文科. 鼠伤寒沙门菌鞭毛蛋白刺激小鼠细胞产生的免疫应答及鞭毛蛋白佐剂效应的初步研究. 扬州大学学位论文,2009.
- [ 10 ] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用. 安徽:安徽科学技术出版社. 1994.
- [ 11 ] Galkin VE, Yu X, Bielnicki J, Heuser J, Ewing CP, Guerry P, Egelman EH. Divergence of Quaternary Structures Among Bacterial Flagellar Filaments. *Science*, 2008, 320(5874): 382-385.
- [ 12 ] Wassenaar TM, Bleumink-Pluym NM, Newel DG, Nuijten PJ, van der Zeijst BA. Differential flagellin expression in a *flaA*<sup>-</sup>/*flaB*<sup>+</sup> mutant of *Campylobacter jejuni*. *Infection and immunity*, 1994, 62(9): 3901-3906.
- [ 13 ] Owen RJ, Fayos A, Hernandez J, Lastovica A. PCR-based restriction fragment length Polymorphism analysis of DNA sequence diversity of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and allied species. *Molecular and cellular probes*, 1993, 7(6): 471-480.

## Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for FlaA protein of *Campylobacter jejuni*

Jinlin Huang, Yanxin Yin, Dexia Mei, Gong Zhang, Zhiming Pan, Xiufan Liu, Xin'an Jiao\*

(Jiangsu Key Lab of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We expressed and purified *Campylobacter jejuni* flagellin FlaA protein to develop monoclonal antibodies (mAbs) against this protein. [ **Methods** ] The *C. jejuni flaA* gene was amplified and inserted into the expression plasmids, pET30a (+) and pGEX-6p-1. The purified rHis-FlaA protein was used as an immunogen in 8-week-old BALB/c mice, and injected subcutaneously. The purified rGST-FlaA protein used as a detecting antigen for screening mAbs against FlaA was prepared by using a denaturation and renaturation technique. The specificity of mAbs was characterized by Dot-ELISA and Western blot assays. [ **Results** ] The recombinant expression plasmids, pET30a(+)-flaA and pGEX-6p-1-flaA were obtained. The sizes of the recombinant proteins, rHis-FlaA and rGST-FlaA, were consistent with their predicted size. Specific reaction was found between FlaA positive serum and expressed protein by Western-blot assay, confirming its identification as a *Campylobacter jejuni* immunogen. Three hybridoma cell lines, designated 2D12, 5A12 and 6A9, secreting mAbs against FlaA were obtained. Their immunoglobulin subclasses were IgG2a, IgG1 and IgG1, respectively. The ELISA titers of the ascites fluid were 1:102 400, 1:102 400 and 1:51 200, respectively. Western blot analysis confirmed that the three mAbs reacted with the rHis-FlaA fusion protein but not the His tag. The Dot-ELISA results demonstrated that the three mAbs only with FlaA and not the tags for the expression vectors. [ **Conclusion** ] The successful preparation of three mAbs specific for the FlaA protein lays the foundation for further study regarding the biological characteristics of FlaA and the pathogenesis of *C. jejuni*.

**Keywords:** flagellin FlaA; *Campylobacter jejuni*; monoclonal antibodies

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z419), the National Key Technology RD Program (2009BADB9B01) and the Grants from Jiangsu Provincial Government (BE2008655)

\* Corresponding author. Tel: +86-514-87971803; Fax: +86-514-87311374; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 1 March 2010/Revised: 26 April 2010

(上接第 1103 页)

有一些例外的缩写语,包括度量单位如毫升(mL)、公斤(kg)、分钟(min)等,则不必全拼全名给予解释。其实即使记不住那么多的惯例和规则,始终记住你文章的可读性和信息传播的目的,你就会负责地正确使用科技写作的英语缩写语。期待《微生物学报》能够迅速成为一个正确使用英语缩写语的净土。

**注:**在中文稿件中,对于正文中第一次出现的西文缩写语,应附上完整的西文名,以避免由于翻译上的不统一而造成误解。应写为:中文名(西文全名,缩写)。

(朱阳 供稿)