

## 猪源支气管败血波氏杆菌百日咳杆菌黏附素基因的原核表达及其抗体检测 ELISA 方法

赵战勤, 薛云, 吴斌\*, 汤细彪, 陈焕春, 李增强, 胡睿铭, 张建民, 段龙川

(华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 【目的】以猪源支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, *Bb*)百日咳杆菌黏附素(PRN)基因的原核表达产物为抗原建立检测 PRN 抗体的间接 ELISA 方法。【方法和结果】利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统对 PRN 基因在大肠杆菌中进行融合表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测证实该基因获得高效表达, 产物易于纯化且具有良好的免疫学活性。通过凝血酶酶切 GST-PRN 并回收, 获得不含 GST 载体蛋白的 PRN 蛋白片段。以 PRN 蛋白片段为抗原建立检测天然 PRN 抗体的间接 ELISA 方法。该方法对猪巴氏杆菌病等 7 种常见细菌性疾病阳性血清的检测结果均为阴性, 其敏感性比乳胶凝集试验提高 4~128 倍, 能检测到人工感染 14 d 后的仔猪血清抗体 IgG, 对临床送检的 1,229 份猪血清的检测阳性率为 32.7%。ELISA 方法对阳性猪场的监测结果预示了保育期仔猪的合群导致猪群大量感染支气管败血波氏杆菌。【结论】该方法具有特异性强、敏感性高、重复性好的特点, 可用于猪群 PRN 抗体水平监测和猪波氏菌病流行病学调查。

**关键词:** 支气管败血波氏杆菌; 百日咳杆菌黏附素; ELISA

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0330-07

支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, *Bb*)可引起猪发生肺炎和非进行性萎缩性鼻炎, 也是猪呼吸道疾病综合症的重要致病因子之一<sup>[1]</sup>。更重要的是, *Bb*的先期感染易于导致其它多种细菌性和病毒性病原, 如多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, *Pm*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus suis*, *HPS*)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory Syndrome virus, PRRSV)、猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)等的继发感染, 从而提高猪群呼吸道疾病的发病率和严重程度, 造成较大损失<sup>[1-5]</sup>。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, 因此引起高度关注<sup>[6]</sup>。

目前, 针对猪波氏菌病诊断方法的报道很少, 主要是细菌学检查、血清学凝集试验、PCR 检测等方法<sup>[1]</sup>。细菌学检查是通过从肺冲洗物、尸检肺组织及鼻分泌物中进行病原菌的分离、鉴定, 该方法的缺点是操作技术要求较高、过程繁琐、花费时间长。而血清学凝集试验和 PCR 检测方法常出现假阳性结果。这是因为, 血清学凝集试验以灭活 *Bb* 菌体为检测抗原, 该抗原易于和巴氏杆菌、链球菌等的血清抗体发生交叉反应<sup>[7, 8]</sup>; PCR 方法虽然能够检测到 *Bb* 的存在, 但作为一种呼吸道常在菌, *Bb* 的存在并不一定代表猪群已经发生感染或者发病。因此, 这些方法在临床诊断中并没有得到广泛使用。目前急需一种特异、敏感的猪波氏菌病诊断方法。

*Bb* 具有 O、K 和 H 抗原, 其毒力因子包括粘附

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

\*通讯作者: Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 赵战勤(1980-), 男, 河南开封人, 博士研究生, 研究方向为细菌分子生物学和基因工程疫苗。E-mail: zhaozhanqin@126.com

收稿日期: 2007-07-06; 修回日期: 2007-12-19

素和毒素两大类。粘附素包括丝状血凝素(filamentous hemagglutinin, FHA)、百日咳杆菌粘附素(pertactin, PRN)、菌毛(fimbriae)等; 毒素包括皮肤坏死毒素(dermonecrotic toxin, DNT)、气管细胞毒素(tracheal cytotoxin)、腺苷环化酶溶血素(adenylate cyclase-hemolysin, AC-Hly)等<sup>[9]</sup>。这些毒力因子的表达与病原所处的环境具有紧密的相关性, 均由 BvgA/S 双因子调节系统调节表达。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* 感染的重要黏附因子<sup>[9, 10]</sup>。在猪的感染试验中, 发现不产生 PRN 的 *Bb* 菌株不能导致猪发生波氏菌病<sup>[11, 12]</sup>, 且猪群的保护率与 PRN 抗体水平呈线性关系<sup>[10, 11, 13]</sup>, 这就预示着可以通过检测动物体内特异的 PRN 抗体来诊断猪波氏杆菌病。本研究利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统对 *prn* 基因进行了原核表达, 并以表达产物为抗原初步建立了 PRN 抗体的间接 ELISA 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒、血清和试验动物:** 猪源 *Bb* HH0809 和 ZK1217 株(FHA<sup>+</sup>, PRN<sup>+</sup>, DNT<sup>+</sup>)由本实验室分离鉴定和保存; 受体菌株大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、表达菌株大肠杆菌 BL21 为本实验室保存。表达载体 pGEX-KG、*Bb* HH0809 株猪阳性血清、阴性血清和其它血清由本实验室提供。20 日龄断奶仔猪购自湖北天种畜牧股份有限公司。

**1.1.2 主要试剂:** DNA Marker、Pyrobest DNA Polymerase、T<sub>4</sub> DNA Ligase 和限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司; 基因组提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自上海 Sangon 公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自国药集团公司; GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B 购自 Amersham Biosciences 公司; 凝血酶 Thrombin、弗氏佐剂购自 Sigma 公司; IPTG 购自 Promega 公司; 蛋白质 Marker 购自 NEB 公司; HRP 标记的羊抗猪 IgG 抗体、底物 DAB 购自 SouthernBiotech 公司。

### 1.2 *prn* 基因的克隆、序列分析及表达载体的构建

利用 DAS 软件<sup>[14]</sup>和 HMMTOP 软件<sup>[15]</sup>(<http://www.cn.expasy.org/tools/>)对 GenBank 上公布的 *prn* 基因(AJ245927)编码的氨基酸序列进行跨膜性预测, 为 *prn* 的引物设计和高效表达提供理论依据。参

考 GenBank 公布的 *prn* 基因序列 AJ245927 设计 1 对引物(由上海 Sangon 公司合成), P1: 5'-TTTTGGATCCGACTGGAACAACCAGTCCAT-3 和 P2: 5'-TTTTGAATCCCCGCCGCCGTCGCCGGTAAA-3 (上下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性酶切位点)。引物扩增区域为除去 N 端信号肽的 2040 bp 成熟蛋白基因编码区。按试剂盒说明书提取 *Bb* HH0809 株基因组为模板。PCR 反应采用 25  $\mu$ L 体系, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 59  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收。用 *Bam*H I 与 *Eco*R I 分别对 PCR 产物和 pGEX-KG 载体质粒进行酶切、回收、连接构建重组质粒, 命名为 pGEX-*prn*。将连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 提取质粒, 进行酶切鉴定和序列测定(由大连 TaKaRa 公司完成)。分别利用生物学网络软件 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)和 ProtParam (<http://www.cn.expasy.org/tools/ProtParam/>)<sup>[16]</sup>进行核苷酸和氨基酸序列分析。

### 1.3 *prn* 基因的表达和 Western blot 分析

将重组质粒 pGEX-*prn* 转化 BL21, 挑取单菌落于含有氨苄青霉素(终浓度为 100  $\mu$ g/mL)的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、225 r/min 摇床培养至对数生长期时( $OD_{600}$ =0.6~1.0), 加入 IPTG 诱导表达 4 h。通过 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)<sup>[17]</sup>分析蛋白的表达特性。按文献[17]所述方法提取包涵体并进行复性。根据产品说明书, 用 GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose<sup>TM</sup> 4B 对表达产物(命名为 GST-PRN)进行纯化。根据产品说明书, 进一步用凝血酶 Thrombin 对部分纯化的 GST-PRN 进行酶切, 回收表达产物的 PRN 片段。蛋白浓度通过分光光度计进行测定, 纯度经 SDS-PAGE 电泳和 GelExpert 软件(NucleoTech 公司 NucleoVision 凝胶成像系统自带软件)进行分析。按文献[18]所述方法对表达产物 GST-PRN 进行 Western blot 分析, GST 蛋白为对照。一抗为 *Bb* HH0809 株感染猪阳性血清。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG。

### 1.4 间接 ELISA 检测方法的初步建立

**1.4.1 间接 ELISA 最佳反应条件的选择:** 采用去除 GST 载体蛋白的纯化 PRN 蛋白作为 ELISA 方法包被抗原。通过方阵滴定试验确定确定抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。抗原从 1:10、1:20 稀释到 1:1,280,

分别加到酶标板的 1~8 行。血清从 1:10、1:20 稀释到 1:320。阳性血清按其稀释度加到第 1~6 列, 阴性血清按其稀释度加到第 7~12 列。按间接 ELISA 方法进行操作, 分光光度计测定  $OD_{630}$  值。以阳性  $OD_{630}$  值比阴性  $OD_{630}$  值(P/N 值) 最大的孔所对应的抗原包被浓度和血清稀释度为最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

**1.4.2 确定结果判定标准:** 将临床送检的经乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>检测为波氏菌病阴性的 16 份猪血清, 进行 ELISA 检测均为阴性, 计算该 16 份血清的平均值  $X$ 、标准差  $SD$ , 阴阳界限计算公式  $X + 3SD$ 。

**1.4.3 分析特异性试验:** 分别检测猪巴氏杆菌病( $T^+Pm$ , D 型)、猪大肠杆菌病(*E. coli*, O<sub>139</sub>, F18<sup>+</sup>, SLT-e<sup>+</sup>)、仔猪副伤寒(猪霍乱沙门氏菌 C<sub>78-1</sub>, 血清型 6,7:C:1,5)、猪传染性胸膜肺炎(胸膜肺炎放线杆菌, 1 型)、副猪嗜血杆菌病(*HPS*)、猪链球菌病(*S. suis*, SC-1, 2 型, MRP<sup>+</sup>, EF<sup>+</sup>, SLY<sup>+</sup>)、猪波氏菌病(*Bb* HH0809 株, *Bb* ZK1217 株)阳性血清, 猪波氏菌病阴性血清、接种了猪波氏菌病灭活疫苗(*Bb* HH0809)的猪血清。猪大肠杆菌病、巴氏杆菌病、副猪嗜血杆菌病、猪链球菌病、猪波氏菌病、猪气喘病阳性血清为病原菌感染猪所制。仔猪副伤寒、猪传染性胸膜肺炎阳性血清为病原菌经灭活免疫猪所制。猪波氏菌病阴性血清为乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>检测阴性血清。

**1.4.4 敏感性试验:** 用该 ELISA 方法和乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>分别检测 2 份人工感染猪波氏菌病(*Bb* HH0809 株, *Bb* ZK1217 株)血清和 9 份临床诊断猪波氏菌病阳性血清, 按各自的阳性判断标准判定两种方法所能检测到的阳性血清的最大稀释度, 对比两种方法的敏感性。另外, 用 *Bb* HH0809 株  $2 \times 10^{10}$  CFU 通过气管注射感染仔猪, 分别在感染前和感染后 5、8、14、21、30、60 天从耳缘静脉采血, 通过 ELISA 方法和乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>分别检测感染后仔猪血清转为阳性的最早时间。

**1.4.5 重复性试验和方法比较试验:** 用相同批次和不同批次的酶标板对不同抗体水平的血清样品(其中 4 份阳性血清, 4 份阴性血清)进行批内和批间重复性测定, 计算批内和批间的吸收变异系数。选择乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>与本研究建立的 ELISA 方法分别检测 121 份血清, 比较两者的符合率。

**1.4.6 ELISA 诊断方法的临床应用:** 对湖北省某 2 个阳性猪场进行了疾病监测。分别选取断奶前仔猪、保

育期仔猪、生长前期猪和育肥猪各年龄段的血清进行检测, 分析其血清流行病学规律。另外, 用建立的 ELISA 方法对 2005~2007 年间的来自湖北、河南、湖南、安徽、广东、福建、江西、上海等省市送检的 1,229 份血清进行检测, 统计血清阳性率。

## 2 结果

### 2.1 PRN 蛋白的序列分析

GenBank 上公布的 *prn* 基因(AJ245927)编码区成熟 PRN 蛋白全长 2,136bp, 编码 712 个氨基酸, 利用 DAS 软件<sup>[14]</sup>和 HMMTOP 软件<sup>[15]</sup>对 PRN 氨基酸序列进行跨膜区预测分析, 结果表明, PRN 的氨基酸序列存在 1 个跨膜区, 位于约第 19~28 (DAS)或 17~34 (HMMTOP)氨基酸之间, 对应于 Charles 等<sup>[20]</sup>已经报道的 PRN 的信号肽序列位置。引物的设计避开了 N 端信号肽序列(前 34 个氨基酸)。用 DAS 和 HMMTOP 软件对 PCR 扩增片段编码的 PRN 氨基酸序列的分析结果与 AJ245927 中对应 PRN 氨基酸序列结构一致。利用 ProtParam 软件<sup>[16]</sup>对 PRN 基因编码蛋白的理化性质进行分析, 结果显示其分子结构式为 C<sub>3016</sub>H<sub>4828</sub>N<sub>920</sub>O<sub>941</sub>S<sub>6</sub>, 理论 pI 值为 9.02, 分子量为 69,225.4 道尔顿, 脂肪系数为 81.83, 不稳定系数为 38.33, 属于稳定型蛋白质。

### 2.2 *prn* 基因的克隆和表达载体的构建

将 PCR 产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 可见扩增出 2,040 bp 左右大小的清晰条带, 与预期的 DNA 片段大小相符。将重组质粒 pGEX-*prn* 分别由 *Bam*H I、*Eco*R I 及 *Bam*H I、*Sal* I 酶切鉴定。*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 得到两条带, 大小为 5,000bp 和 2,040 bp 左右。*Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后, 得到 3 条带, 大小为 5,000 bp、1,176 bp 和 864 bp 左右, 均与预期 DNA 片段相符。序列测定的结果进一步表明 *prn* 基因片段在 pGEX-KG 表达载体中得到正确连接。

### 2.3 *prn* 基因的表达和 Western blot 分析

SDS-PAGE 结果表明(图 1-A), 含 pGEX-*prn* 重组质粒的 *E. coli* BL21 在约 95 kDa 处有明显的表达带, 是 PRN 与 GST 表达的融合蛋白。空载体对照在约 27 kDa 有明显的表达带, 相当于 GST 蛋白的分子量。Western blot 分析表明(图 1-B), 重组 PRN 蛋白 GST-PRN 能够与 *Bb* HH0809 株的感染猪血清发生特异性的免疫反应, GST 蛋白则不能。这证实克隆基因

片段获得正确表达, 并具有很好的免疫学反应活性。提取的包涵体经过复性, 并使用 GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose™ 4B 纯化后, 得到浓度为 207.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、纯度为 90.1% 的融合蛋白 GST-PRN, 通过凝血酶 Thrombin 对纯化 GST-PRN 进行酶切并回收 PRN 蛋白片段得到约大小约 68 kDa、浓度为 140.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、纯度为 93.1% 的 PRN 表达蛋白片段。

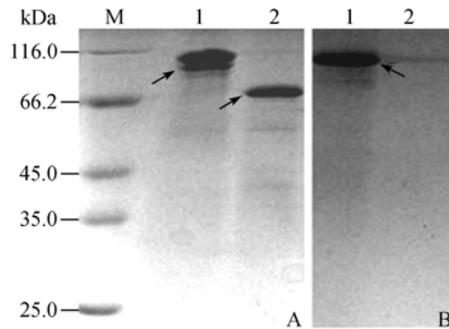


图 1 表达产物的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析  
Fig.1 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the expressed protein. A: 1 and 2. SDS-PAGE of GST-PRN (arrow) and PRN proteins after purification (arrow); B: 1 and 2. Western-blotting analysis of GST-PRN (arrow) and GST in BL21 cell lysates; M. protein marker.

## 2.5 ELISA 检测方法的初步建立

**2.5.1 ELISA 最适条件及阴阳界限的确定:** 方阵滴定结果显示, 血清最佳稀释度为 1:40, PRN 抗原最佳稀释度为 1:320(439 ng/孔)。对 16 份猪波氏菌病阴性血清进行检测, 求得其平均值  $\bar{X}=0.114$ , 标准偏差  $SD=0.057$ , 确定阴阳性临界点为  $\bar{X}+3SD=0.285$ 。结果判定: 以空白孔调零, 在酶标仪上测各孔  $OD_{630}$

值,  $OD_{630} \geq 0.285$  判为阳性, 诊断为猪波氏菌感染;  $OD_{630} < 0.285$  判为阴性。

**2.5.2 重复性试验:** 取相同批次的 5 块包被抗原的酶标板(批内)和不同批次的 5 块包被抗原的酶标板(批间)检测 8 份抗体水平不同的血清样品(4 份阳性血清和 4 份阴性血清), 结果显示批内重复的吸收变异系数在 563%~735%之间。批间重复的吸收变异系数在 436%~824%之间, 说明该诊断方法具有良好的重复性。

**2.5.3 分析特异性试验:** 用 ELISA 方法检测猪巴氏杆菌病、猪大肠杆菌病、仔猪副伤寒、猪传染性胸膜肺炎、副猪嗜血杆菌病、猪链球菌病、猪气喘病阳性血清和 5 份猪波氏菌病阴性血清都呈阴性, 其  $OD_{630}$  值分别为 0.083、0.139、0.252、0.097、0.058、0.099 和 0.154。ELISA 方法对 2 份接种了猪波氏菌病灭活疫苗(*Bb* HH0809, ZK1217 株)的猪血清和 2 份 *Bb* (HH0809, ZK1217)感染猪血清的检测结果均为阳性, 其  $OD_{630}$  值分别为 0.538、0.644、1.264、和 0.956。这些试验结果表明该方法的分析特异性良好。

**2.5.4 敏感性试验:** 选择用国内常用的检测方法乳胶凝集试验与本研究建立的 ELISA 诊断方法同步检测临床送检 121 份仔猪血清, 二者相比较来确定该 ELISA 诊断方法的诊断敏感性与符合率。该 ELISA 方法和乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>对 2 份人工感染猪波氏菌病(*Bb* HH0809 株, *Bb* ZK1217 株)血清和 9 份临床诊断猪波氏菌病阳性血清的检测结果见表 2, 该 ELISA 方法的敏感性比乳胶凝集方法<sup>[19]</sup>高 4~128 倍。另外, 乳胶凝集试验<sup>[19]</sup>和 ELISA 方法检测感染后仔猪血清转阳的最早时间均为 14 d, 检测效价分别为 1 和 8。

表 1 ELISA 方法和 LAT 试验诊断敏感性试验比较

Table 1 Diagnosis sensitivity of ELISA method compared to LAT test

Serum samples	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LAT	32	8	8	64	2	16	128	32	16	2	16
ELISA	512	64	32	1,024	16	1,024	512	1,024	256	256	128

Note: 1 and 2, serum samples from pigs inoculated with *Bb* HH0809 or ZK1217 strains, respectively; 3-11, positive serum samples from *Bb*-infected pigs identified by clinical diagnosis.

**2.5.5 符合率试验:** 在对比试验中, 送检的 121 份猪血清经乳胶凝集试验检测阳性和阴性样品分别为 80 和 41 份; 间接 ELISA 检测阳性和阴性样品分别为 37 和 84; 两种方法检测均为阳性或阴性的样品分别为 37 和 41 份; 乳胶凝集试验检测和间接 ELISA 检测的总阳性率分别为 66.1% (80/121) 和 30.6% (37/121); 间

接 ELISA 检测结果阳性的样本, 用乳胶凝集试验检测结果也均为阳性, 符合率为 100% (37/37)。

**2.5.6 ELISA 方法的临床初步应用:** 用该 ELISA 方法检测 2005~2007 年间来自全国各地的 1,229 份猪血清样本, 共检测出阳性血清 402 份, 阳性率为 32.7%。在不同的猪场其阳性率差别较大, 有的猪场

阳性率为 0, 有的阳性率达 80%。用该方法对湖北 2 个阳性猪场各年龄段猪群的进行血清流行病学监测, 发现 2 个猪场中阳性猪群的分布具有相似性(表 2)。断奶前仔猪和保孕期猪群的阳性率较低(均低于 20%), 生长前期猪群的血清阳性率明显升高, 分别提高了 3 倍多, 而育肥期的猪群基本维持了同样的血清阳性率。这预示着保育期仔猪的合群导致猪群发生了大量感染。

表 2 间接 ELISA 方法对湖北某 2 个猪场血清样品的临床监测结果

Table 2 The detection results of clinical sera by indirect ELISA in two pig fields

Sources of serum	Days of pigs' age	NO. of samples	NO. of positive	Positive rate/%
I	15 ~ 21	145	13	9.0
	22 ~ 35	147	19	12.9
	36 ~ 55	163	70	42.9
	56 ~ 90	166	77	46.3
II	15 ~ 21	163	21	12.9
	22 ~ 35	143	27	18.9
	36 ~ 55	148	93	62.8
	56 ~ 90	149	97	65.1

### 3 讨论

PRN 是由 *Bb prn* 基因编码的一种具有保护性的外膜蛋白成分, 是 *Bb* 感染的重要的黏附因子<sup>[9, 10]</sup>。在猪的感染试验中, 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, PRN 被认为是 *Bb* 最主要的保护性抗原<sup>[10, 11, 13]</sup>。因此, 以 PRN 蛋白作为 ELISA 包被抗原检测动物体内特异的 PRN 抗体, 可以用来诊断猪群是否发生了波氏菌病, 该方法也可以用来对猪波氏菌病疫苗抗体的保护力进行评价。

本研究通过核苷酸和氨基酸序列比对, 发现 GenBank 上已提交的猪源 *Bb prn* 基因序列和氨基酸序列, 均有 98% 以上的同源性。这表明该基因可能高度保守, 可考虑作为猪波氏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<sup>[16]</sup>, 具备了作为基因工程抗原的理化条件。以本实验室分离的猪源 *Bb* 强毒菌株 HH0809 的基因组为模板克隆 *prn* 基因, 发现其核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 已经提交的序列也具有 98% 以上的同源性。更重要的是, 表达产物

GST-PRN 经 SDS-PAGE 后转膜进行 Western blot 分析, 目的带处呈现明显的条带而未见非特异性条带, 表明表达产物的特异性较好, 这是成功建立本方法的关键。另外, 该基因在大肠杆菌中表达量高。通过 GST 融合蛋白纯化试剂 Glutathione Sepharose™ 4B 进行纯化, 方法简单、快速、纯度高。这就为进一步开发为诊断试剂抗原奠定基础。

在获得纯化 GST-PRN 的基础上, 进一步使用凝血酶 Thrombin 将酶切纯化的 GST-PRN 并回收 PRN 蛋白, 以该回收 PRN 蛋白为包被抗原建立的检测 PRN 抗体的间接 ELISA 方法具有较好的重复性、特异性和敏感性。分析其原因可能包括: (1) 表达产物纯度高, 且消除了 GST 载体蛋白, 使 ELISA 的非特异性反应降到最低水平; (2) 表达产物为稳定性蛋白, 受环境的影响较小, 易于保持抗原活性。本研究建立的 ELISA 与乳胶凝集试验相比较, 其敏感性较之高 4 ~ 128 倍, 有 100% 的符合率。虽然乳胶凝集试验检测的主要对象是感染早期出现的 IgM 类抗体, 而该 ELISA 方法只针对血清中的 IgG, 但在检测人工感染猪血清转阳时间的试验中, ELISA 方法仍然比乳胶凝集试验敏感性高 8 倍。而当检测其它阳性样品时, ELISA 的敏感性均远远高于乳胶凝集试验方法。

本研究建立的以亚单位表达蛋白 PRN 为检测抗原的 ELISA 方法与以灭活 *Bb* 菌体为检测抗原的乳胶凝集试验方法有 100% 的符合率, 但乳胶凝集方法检出率高达 66.1%, 而 ELISA 方法是 30.6%。分析其原因, 主要有三点: (1) 某些 *Bb* 弱毒菌株不表达或只表达极少量 PRN 抗原, 感染机体后不能刺激产生可检测水平的相应抗体。这类菌株虽然能够造成猪群在一定程度上感染, 但不能使猪发病而产生典型的临床症状<sup>[11, 12]</sup>。(2) 乳胶凝集试验的特异性可能较低, 其检出率偏高。以波氏杆菌灭活菌体为抗原建立的乳胶凝集试验与巴氏杆菌抗体等可能存在交叉反应<sup>[7, 8]</sup>。在研究中我们也发现, 乳胶凝集试验和猪霍乱沙门氏菌抗体有较强的交叉反应, 该方法还有待进一步改进。(3) ELISA 阴阳性界限偏高。在设定判定标准时, 不同的报道采用的计算公式不同, 本试验采用均值加 3 个标准差的计算方法使阴阳性界限偏高。其结果是增加了 ELISA 方法的特异性, 但是却相应的降低了其敏感性, 特别是对于抗体水平较低的样品增加了假阴性结果。如果使用均值加 2 个标准差的计算方法, 其阴阳性界限为  $OD_{630} \geq 0.228$ , 其阳性率也随

之升高到 40.5%。但是两者符合率降为 91.8%。ELISA 方法阴阳性界限的确定还有待进一步分析和研究。

在临床应用中, ELISA 方法检测 1,229 份血清样品的总阳性率为 32.7%, 这说明国内波氏菌的感染率很高。对 2 个阳性猪场的监测发现, 猪群的血清阳性率随生长年龄的增长而增加, 但是生长期和育肥猪的阳性率远高于断奶前乳猪和保育期仔猪。由于大龄动物对 *Bb* 并不易感, 且保育期之前猪群相互接触的机会较少, 因此推测是仔猪在保育期大量合群时发生相互感染, *Bb* 菌潜伏至生长期时, 抗体才升高到可以被检测出来的水平。

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; 此外包被抗原易于纯化, ELISA 操作方法简单。更有意义的是, 该 ELISA 方法直接检测抗 PRN 的抗体, 阳性结果说明猪群已发生感染, 阳性率高低能反应猪群的实际感染情况。因此, 本研究建立的新方法, 有望成为一种准确、快速和实用的猪波氏菌病血清学诊断方法。

### 参 考 文 献

- [1] De Jong MF. Progressive and Nonprogressive Atrophic Rhinitis. In: Straw BE, et al. ed. Diseases of swine. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999.
- [2] Dugal F, Belanger M, Jacques M. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. *Can J Vet Res*, 1992, 56: 260–264.
- [3] Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect Immun*, 1992, 60: 550–556.
- [4] Brockmeier SL. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Vet Microbiol*, 2004, 99(1): 75–78.
- [5] Brockmeier SL, Palmer MV, Bolin SR. Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am J Vet Res*, 2000, 61: 892–899.
- [6] Viejo G, de la Iglesia P, Otero L, et al. *Bordetella bronchiseptica* pleural infection in a patient with AIDS. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2002, 34(8): 628–629.
- [7] Jenkins EM. An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *Can J Comp Med*, 1978, 42(3): 286–292.
- [8] Hølby N, Hertz JB, Andersen V. Cross-reactions between *Bordetella pertussis* and twenty-eight other bacterial species. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1976, 84(6): 395–400.
- [9] Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 8(2): 326–382.
- [10] Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 1985, 47: 744–751.
- [11] 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. *Infect Immun*, 1985, 50: 190–198.
- [12] Novotny P, Chubb AP, Cownley K, et al. Adenylate cyclase activity of a 68,000-molecular-weight protein isolated from the outer membrane of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*, 1985, 50(1): 352–357.
- [13] 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. *Infect Immun*, 1990, 58: 352–357.
- [14] Cserzo M, Wallin E, Simon I, et al. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot Eng vol*, 1997, 10(6): 673–676.
- [15] Tusnády GE, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 2001, 17: 849–850.
- [16] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: John M Walker (ed). The proteomics protocols handbook. NJ, USA: Humana Press, 2005, pp. 571–607.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] 刘国平, 吴斌, 林艺远, 等. 大肠杆菌 Ee 株 SLT-IIeB 基因的 3 拷贝融合表达及其生物学活性与免疫原性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4): 686–691.
- [19] 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. *中国兽医科技 (Chinese Journal of Veterinary Science and Technology)*, 2001, 31(6): 21–22.
- [20] Charles IG, Dougan G, Pickard D, et al. Fairweather. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, 86: 3554–3558.

## Expression of *prn* gene of *Bordetella bronchiseptica* and development of a recombinant protein-based indirect ELISA for antibodies detection

Zhanqin Zhao, Yun Xue, Bin Wu<sup>\*</sup>, Xibiao Tang, Huanchun Chen, Zengqiang Li, Ruiming Hu, Jianmin Zhang, Longchuan Duan

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

**Abstract:** [Objective] We developed an indirect ELISA method for detecting *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*) pertactin antibodies based on the recombinant pertactin protein expressed in *Escherichia coli* (DE3) strain. [Methods and results] The *prn* gene encoding *Bb* pertactin was fused to the downstream of glutathione S-transferase (GST) of pGEX-KG expression vector, resulting in the fusion expression plasmid pGEX-*prn*. SDS-PAGE showed that the GST-PRN fusion protein was expressed in high level in BL21 carrying pGEX-*prn*. The strong reactivity of the GST-PRN fusion protein, specifically with antiserum against porcine Bordetellosis caused by *Bb* HH0809, was identified by Western blot. The recombinant protein fragment of rPRN was purified from the GST-PRN fusion protein digested by protease thrombin with the purity of 93.1%. The rPRN-based indirect ELISA was developed for detecting antibodies against PRN. The ELISA could detect positive samples in experimentally infected pigs fourteen days post inoculation and the degree of sensitivity was over 4 times higher than the latex agglutination test with the coating antigen of killed *Bb*. Thirty-two point seven percent of positive samples were detected in 1,229 clinical samples while no false positive results were found in detecting 7 antisera against porcine bacterial diseases. Sera samples from two bordetellosis-positive pig fields were tested by the indirect ELISA method and the results indicated that pigs were infected by *Bb* during the nursery periods. [Conclusion] The assay showed excellent specificity, sensitivity and reduplication, and can be useful for epidemiological survey and clinical diagnosis of swine bordetellosis.

**Keywords:** *Bordetella bronchiseptica*; pertactin; ELISA

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471292) and the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A206)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

Received: 6 July 2007/ Revised: 19 December 2007

### 欢迎订阅《微生物学报》

2008年《微生物学报》改为月刊(每月4日出版),每期页码为144面,单价为55.00元,全年定价660元。读者可以通过以下3种方式订阅本刊。刊号为:ISSN 0001-6209;CN11-1995/Q。

1. 邮购:欢迎广大读者直接与本刊编辑部联系购买,可通过邮局汇款,我们将按期免费邮寄。

汇款地址:(100101)北京朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所内

收款人:《微生物学报》编辑部;电话:(010)64807321;E-mail:actamicro@im.ac.cn

另外,本刊编辑部现存有少量过期期刊,如有需要者可与编辑部联系,款到即免费寄上。(注:请事先与编辑部电话或e-mail联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

2. 邮发:全国各大邮局均可订阅。

国内邮发代号:2-504;国外发行代号:BM67

3. 科学出版社期刊出版中心发行部:直接与科学出版社联系。

地址:(100717)北京东黄城根北街16号;电话:(010)64034563;E-mail:journal@mail.sciencep.com