

• 基础研究论著 •

## 类鼻疽假单胞菌鞭毛蛋白的克隆表达及其 ELISA 检测方法的研究\*

马广强<sup>1,2</sup>, 朱金华<sup>1</sup>, 万红娇<sup>1</sup>, 王倩<sup>1</sup>, 叶荷平<sup>1</sup>, 袁志明<sup>2</sup>, 汪建民<sup>1△</sup>

(1. 江西中医学院, 江西南昌 330004; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

**摘要:**目的 建立检测人或动物血清中类鼻疽伯克霍尔德菌特异性抗体的 ELISA 检测法, 并利用该方法研制用于类鼻疽的诊断的检测试剂盒。方法 克隆并表达类鼻疽伯克霍尔德菌的特异性鞭毛抗原, 用其作为 ELISA 检测中的捕获抗原。通过对类鼻疽伯克霍尔德菌感染的家兔血清进行检测来初步证明该方法的可行性。结果 间接 ELISA 方法检测阳性血清效果较好, 血清稀释 80 倍后仍能检测到抗体。结论 这是一种比较有效的快速诊断人类鼻疽的方法。

**关键词:**伯克霍尔德杆菌, 类鼻疽; 类鼻疽; 酶联免疫吸附测定; 鞭毛蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0517-02

Clone and express the flagellin of *Burkholderia pseudomallei* and search for an indirect ELISA method to detect its antibodies in blood\*Ma Guangqiang<sup>1,2</sup>, Zhu Jinhua<sup>1</sup>, Wan Hongjiao<sup>1</sup>, Wang Qian<sup>1</sup>, Ye Heping<sup>1</sup>, Yuan Zhiming<sup>2</sup>, Wang Jianmin<sup>1△</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China;

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

**Abstract:** Objective To establish the method for the detection of *Burkholderia pseudomallei*'s specific antibody in human or animals serum by ELISA and to apply this in the development of the ELISA detection kit. Methods The specificity antigen of *Burkholderia pseudomallei* was cloned and expressed in *E. coli*; and it was used as capture antigen in an indirect ELISA method which was developed to detect antibodies in serums. Results The indirect ELISA could detect serum of melioidosis infector which was diluted eighty times. Conclusion The indirect ELISA method is a useful method to detect melioidosis.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*; melioidosis; enzyme-linked immunosorbent assay; flagellin

类鼻疽是由类鼻疽伯克霍尔德菌(*B. pseudomallei*)感染引起的一种人兽共患病。中国作为类鼻疽的疫源地 1990 年在海南发现了第 1 例类鼻疽。之后陆续在广东、广西和海南有了一些动物和人的类鼻疽病例报告<sup>[1-3]</sup>。海南国际旅游岛的开发以及南海海洋主权维护和经济安全保障等已上升至国家战略要求, 加强类鼻疽研究具有重要的社会意义和军事价值<sup>[4]</sup>。中国类鼻疽研究起步比较晚, 目前没有商业化的快速检测方法。对类鼻疽进行诊断的实验室检测手段还停留在金标准分离培养的水平上。中国目前用得比较多的是 ELISA 与间接红细胞凝集试验(IHA), 这两种方法具有检测速度快的优点, 但是假阳性率比较高, 容易误诊, 一般用于流行病学的调查<sup>[5]</sup>。1996 年, 佟世德<sup>[6]</sup>用 *B. pseudomallei* 的外毒素建立了间接血凝诊断法来对类鼻疽患者的血液标本进行检测, 该方法具有较好的特异性。1998 年, 陈光远等<sup>[7]</sup>使用 2 000 bp 的特异性抗原对类鼻疽疑似病例进行血清学诊断, 同步进行分离培养检测, 得到较好的检测效率。而作为诊断标准的快速检测方法国内还没有成熟的方法。2012 年有研究组制备抗类鼻疽血清用于该病的检测与治疗<sup>[8]</sup>。正是由于国内类鼻疽检测方法的不足, 导致许多类鼻疽病例的误诊为肺结核或者其他疾病, 进一步导致了患者因为不正当的治疗方法而死亡<sup>[9]</sup>。本研究通过基因工程方法表达 *B. pseudomallei* 的特异性抗原作为捕获抗原, 用羊抗兔二抗作为标记抗体, 建立了一种间接 ELISA 方法用于类鼻疽的血清学诊断。

## 1 材料与方

1.1 菌株来源 *B. pseudomallei* CVCC 67004 和 CMCC 53001、*B. mallei* CVCC 326B、*B. pseudomallei* 购买自中国兽医

兽药监督所菌种保藏中心 CVCC(兽医微生物培养采集中心)。13 株 *B. pseudomallei* 由本研究分离保存。

1.2 仪器与试剂 各种限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司, 蛋白质分子量标准购自晶美生物有限公司, 其他生化试剂及药品购自 Sigma 公司。DNA 提取试剂盒购自天良公司。DNA 胶回收和 PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司。His-Bind 亲和层析柱购自 Novagen 公司。商业化的蛋白浓度检测试剂盒(BCA 法)购买自北京百泰克生物有限公司。美国 ABI 公司 96 孔 PCR 仪、Spec-traMax M5 多功能酶标仪。

## 1.3 方法

1.3.1 类鼻疽假单胞菌鞭毛蛋白的克隆与表达 根据 *B. pseudomallei* K96243 菌株的鞭毛蛋白基因序列(Genbank acc. No. BX571966)设计引物 Fli1; 5'-AAA AGA ATT CGC GTC GGC GCT GCA ACA GGA ACT CG-3'和 Fli2; 5'-AAA AAA GCT TTT ACA TCG CCT GGT ACG CGC CCG TCT GC-3'用于扩增 *B. pseudomallei* 的鞭毛蛋白基因。采用试剂盒进行 *B. pseudomallei* 全基因组 DNA 的提取。PCR 扩增产物用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后连接到 pET28a (Novagen)载体上, 得到重组载体 pET-fli C。鞭毛蛋白基因送上海英俊公司测序后与 Genbank 中 *B. pseudomallei* 菌株 K96243 的鞭毛蛋白基因序列(Acc. No.: U73848)进行比对。重组载体 pET-fli C 转化到表达菌株大肠杆菌 BL21 中, 在抗性培养基上筛选获得大肠杆菌重组菌株 E-pET-fli C。将空载体 pET28a 转化到 BL 21 中, 得到空载体对照菌株 E-pET28a。重组菌株在含相应抗菌药物的 LB 培养基中培养过夜后接种

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)资助项目(2005AA219070)。 作者简介: 马广强, 男, 讲师, 主要从事病原细菌学研究。

△ 通讯作者, E-mail: jm\_wang55@126.com。

到新鲜的 LB 培养基中 37 °C 震荡培养 3 h(200 r/min)后,加入 1 μg/mL IPTG,在 30 °C 诱导 4 h 后,离心(10 000 r/min,4 °C)收集菌液,于-20 °C 低温冰箱中保存。利用亲和层析柱(Ni<sup>2+</sup>柱)对表达的 *B. pseudomallei* 鞭毛蛋白进行纯化。采用 BCA 法试剂盒进行纯化蛋白浓度测定后,50 μL 分装冻存于-70 °C 待用。

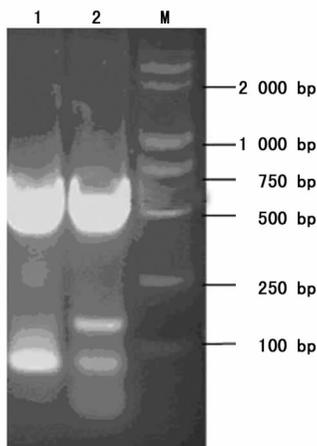
**1.3.2 双抗原夹心 ELISA 检测试剂盒的研究** 过夜培养的细菌经 2% 的甲醛灭菌,离心后去除培养液,用 PBS 清洗 2 次,然后用蛋白浓度检测试剂盒检测菌体蛋白浓度,用 5 g/mL 的全菌体抗原包被 96 孔板,辣根过氧化物酶标记的特异性鞭毛蛋白作为二抗,检测类鼻疽抗体。用全菌体免疫的兔血清作为阳性检测血清,未免疫的家兔血清作为阴性对照。

**1.3.3 间接 ELISA 检测试剂盒的研究** 用 5 μg/mL 的纯化鞭毛抗原包被 96 孔板作为捕获抗原,用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体作为酶标抗体。用全菌体免疫的兔血清作为阳性对照,未免疫的家兔血清作为阴性对照。

**2 结 果**

**2.1 鞭毛蛋白的克隆与表达**

**2.1.1 PCR 扩增鞭毛基因以及表达载体的构建** 使用鞭毛蛋白基因引物 Fli1/Fli2,以 *B. pseudomallei* 的全基因组 DNA 为模版,进行鞭毛蛋白基因的 PCR 扩增。将扩增产物进行凝胶电泳检测,可得到大小约为 600 bp 的电泳条带(图 1)。序列测定分析表明,扩增片段与 *B. pseudomallei* 菌株 K96243 的鞭毛蛋白基因具有高度的同源性(99%)。重组载体 pET28a-flic 转化大肠杆菌表达菌株 BL 21 后得到大肠杆菌重组菌株 E-pET28a-flic DNA 经酶切鉴定表明外源片段插入正确(图 2)。



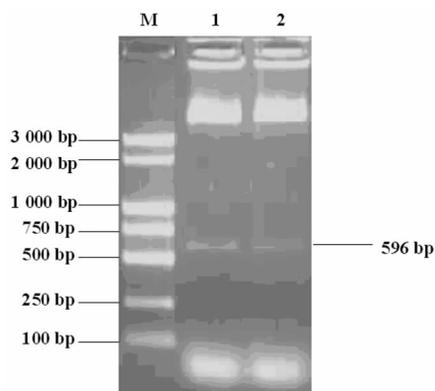
M:DNA 标准带;1~2:PCR 扩增产物。

**图 1 鞭毛蛋白基因扩增产物的凝胶电泳检测**

**2.1.2 鞭毛蛋白的诱导及纯化** E-pET28a-flic 经过 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 3~4 h,可以表达分泌分子质量为 22×10<sup>3</sup> 的鞭毛蛋白带(图 3)。培养液经亲和层析柱纯化得到分子质量为 22×10<sup>3</sup> 的纯化鞭毛蛋白(图 4),浓缩后经蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度为 50 mg/mL。

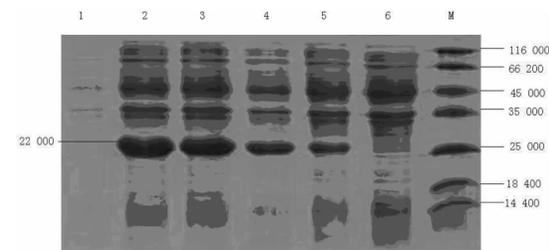
**2.2 多克隆抗体的滴度的测定** 纯化鞭毛蛋白免疫家兔获得的鞭毛多抗对全菌体抗原的效价比较低,只达到 1:800。全菌体多抗对全菌体抗原的效价达到 1:100 000。本实验用全菌体免疫的兔血清作为检测试剂盒的阳性对照,用未免疫的兔血清作为阴性对照<sup>[10]</sup>。

**2.3 抗体检测试剂盒的研究结果** 间接 ELISA 检测法检测家兔阳性血清的最低浓度为 1:80,而双抗原夹心 ELISA 方法不能检测出血清,说明双抗原夹心 ELISA 方法检测类鼻疽阳性血清方法失败,用间接 ELISA 方法得到的结果比较理想。



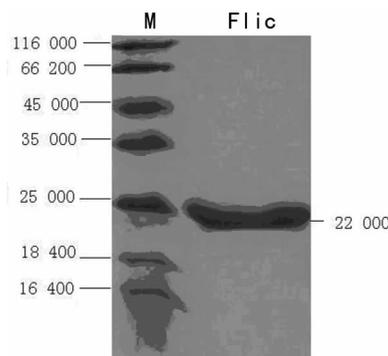
M:DNA 标准带;1~2:重组质粒检测。

**图 2 转化菌株中重组质粒 Pet 28a-flic 酶切鉴定的凝胶电泳检测**



1: E-pET28a 菌株;2~5: E-pET28a-flic 菌株,诱导时间分别为 6 h, 4 h, 2 h, 1 h;6: 蛋白对照;M: 相对分子质量标记。

**图 3 IPTG 诱导 E-pET28a-flic 菌株表达目的蛋白的 SDS-PAGE 检测**



M: 蛋白分子质量标记;Flic: 纯化的蛋白。

**图 4 IPTG 诱导 E-pET28a-flic 表达目的蛋白纯化后的 SDS-PAGE 检测**

**3 讨 论**

*B. pseudomallei* 的鞭毛是非常特异的抗原,也是该菌的主要毒力因子,被广泛的应用在 *B. pseudomallei* 的检测中<sup>[11-12]</sup>。*B. mallei* 含有相同的鞭毛基因,基因检测的方法并不能将 *B. pseudomallei* 和 *B. mallei* 区分开来。由于 *B. pseudomallei* 含有 6~8 根鞭毛,*B. mallei* 没有鞭毛,通过检测抗原的方法则可以很容易的把这两个相似菌区分开来。

本研究采用了 2 种 ELISA 方法进行检测,双抗原夹心法检测不出家兔血清中的抗体,这是因为 *B. pseudomallei* 刺激机体产生的多为针对单个抗原表位的抗体分子,用菌体作为捕获抗原只能捕捉到针对菌体的抗体,而不能捕获到针对鞭毛的抗体;即使捕捉到了针对鞭毛抗原的抗体,也很可能抗体分子已经完全和菌体鞭毛抗原充分结合,很难再与检测二抗的鞭毛特异性抗原结合,这可能是造成双抗原夹心 ELISA 检测方法失败的主要原因。而用特异性的鞭毛抗原(下转第 521 页)

公布的罕见等位基因资料显示,1987 年至 2012 年 3 月,囊括大部分人群的 873 757 份标本中尚未发现有 HLA-C \* 07 : 63 及 HLA-C \* 01 : 24 基因存在。自 Genebank 首次公布并命名此 2 例基因后,未再见有文献报道此基因,近 3 年中华骨髓库入库数据刚刚从低分辨率水平转为高分辨水平,骨髓库高分辨数据正在不断补充之中,一些首次被发现后再次出现而在美国国家骨髓库公布的数据中却显示,发现次数极少或被划为罕见的等位基因也陆续在中国被发现,例如 B \* 51 : 39, C \* 03 : 100, C \* 08 : 22, DRB1 \* 12 : 10 等,且发现次数逐渐增多。以往大家判断高分结果都是根据基因频率,取常见等位基因作为最终结果,直接舍弃罕见等位基因。随着以前被认为是罕见的等位基因发现的次数越来越多,有必要对结果进行再次确认。此次发现的 C \* 07 : 63 及 C \* 01 : 24 为 HLA-C 的相关研究及中华骨髓库建立 HLA 高分辨数据库都提供了有效依据。至于 C \* 07 : 63 及 C \* 01 : 24 等位基因频率是否会大于 1/50 000,并与相关科学研究发生关联,还需要 HLA-C 基因高分辨入库数据数量的逐渐提高<sup>[10]</sup>,才能进行进一步的验证。

参考文献

[1] Colonna M, Brooks EG, Ferrara GB, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C[J]. Science, 1993, 260(5111) : 1121-1124.  
 [1] Colonna M, Brooks EG, Falco M, et al. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C[J]. Science, 1993, 260(5111) : 1121-1124.  
 [2] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors[J]. Blood, 1997, 89(5) : 1818-1823.  
 [3] Ferrara GB, Bacigalupo A, Lamparelli T, et al. Bone marrow transplantation from unrelated donors; the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen

class I heavy chain[J]. Blood, 2001, 98(10) : 3150-3155.  
 [4] Chalandon Y, Tiercy JM, Schanz U, et al. Impact of high-resolution matching in allogeneic unrelated donor stem cell transplantation in Switzerland[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 37(10) : 909-916.  
 [5] Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA association with hematopoietic stem cell transplantation outcome; the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(8) : 965-974.  
 [6] Petersdorf EW, Anasetti C. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation[J]. Tissue Antigens, 2003, 61(1) : 1-11.  
 [7] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation[J]. Blood, 2007, 110(13) : 4576-4583.  
 [8] Moya-Quiles MR, Alvarez R, Miras M, et al. Impact of recipient HLA-C in liver transplant; a protective effect of HLA-Cw \* 07 on acute rejection[J]. Hum Immunol, 2007, 68(1) : 51-58.  
 [9] Irish Schizophrenia Genomics Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genome-wide Association Study Implicates HLA-C \* 01:02 as a Risk Factor at the Major Histocompatibility Complex Locus in Schizophrenia Genome-wide association study implicates HLA-C \* 01:02 as a risk factor at the major histocompatibility complex locus in schizophrenia[J]. Biol Psychiatry, 2012, 72(8) : 620-628.  
 [10] Cano P, Klitz W, Mack SJ, et al. Common and well-documented HLA alleles; report of the Ad-Hoc committee of the American society for histocompatibility and immunogenetics [J]. Hum Immunol, 2007, 68(5) : 392-417.

(收稿日期:2012-08-28)

(上接第 518 页)

作为捕获抗原的的则获得了很好的检测效果,在血清稀释 80 倍后仍能很好的检测到类鼻疽伯克霍尔德氏菌的鞭毛抗体。

有台湾的研究者克隆并表达 *B. pseudomallei* 鞭毛基因用于对患者的血清检测,结果得到了 93.8% 的敏感度和 96.3% 的特异度,从而证明了鞭毛是 *B. pseudomallei* 的一个非常特异的抗原<sup>[13]</sup>。本研究用 *B. pseudomallei* 的鞭毛抗原作为检测抗原来检测血清中的 *B. pseudomallei* 抗体,并应用于 ELISA 试剂盒的研制中,获得了很好的检测结果。

本试剂盒的研制是为了用于出入境人员类鼻疽的筛查,检测的标本为人血清标本。由于本实验室不能获得人类鼻疽的病例材料,所以用新西兰大白兔作为模式动物,人为感染的兔血清作为检测样品,进行了本检测方法的研制,若要实际应用于人血清标本的检测还有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 陈光远,曾夏杏,冯欣,等. 广东省雷州半岛地区类鼻疽病流行的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(5) : 390.  
 [2] 莫成锦,谷海瀛,王旭明,等. 类鼻疽病血清学调查[J]. 中国卫生工程学, 2002, 1(4) : 230.  
 [3] Yang S. Melioidosis research in China[J]. Acta Trop, 2000, 77(2) : 157-165.  
 [4] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13) : 1315-1317.

[5] Brent AJ, Matthews PC, Dance DA, et al. Misdiagnosing melioidosis[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(2) : 349-351.  
 [6] 佟世德. 类鼻疽快速诊断的研究[J]. 中国兽医学报, 1996, 16(4) : 346-349.  
 [7] 陈光远,曾夏杏. 类鼻疽病快速诊断的临床应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(4) : 42-43.  
 [8] 方瑶,顾江,王海光,等. 抗类鼻疽伯克霍尔德菌多抗血清的制备及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3) : 292-294, 296.  
 [9] 陈金堂,程宏宇,莫成锦. 类鼻疽病误诊肺结核病 6 例分析[J]. 山东医药, 2009, 49(41) : 103-104.  
 [10] Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella[J]. Nature, 2010, 467(7314) : 426-429.  
 [11] Wuthiekanun V, Desakorn V, Wongsuvan G, et al. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(4) : 555-556.  
 [12] Thepthai C, Smiththikarn S, Suksuwan M, et al. Serodiagnosis of melioidosis by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2005, 23(2-3) : 127-132.  
 [13] Chen YS, Shiuan D, Chen SC, et al. Recombinant truncated flagellin of Burkholderia pseudomallei as a molecular probe for diagnosis of melioidosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(3) : 423-425.

(收稿日期:2012-12-09)