

副结核分枝杆菌 MAP0862、MAP1345 基因的串联表达及其在间接 ELISA 中的初步应用

张振^{1,2}, 张阁², 彭永², 彭小微², 孙翠丽^{1,2}, 常维山¹, 朱良全^{2*}, 丁家波^{2*}

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 270018; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2016-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 06-0016-06 [中图分类号] S852.5

[摘要] 为探索副结核特异性蛋白 MAP0862 与 MAP1345 在牛副结核病血清学诊断中的作用, 将通过串联表达获得的融合蛋白 MAP0862-1345 纯化定量后包被酶标板, 经过对反应条件的优化, 初步建立了基于融合蛋白 MAP0862-1345 的间接 ELISA 诊断方法。使用建立的 ELISA 方法对牛副结核病阳性血清、牛结核病阳性血清、牛布病阳性血清、卡介苗免疫牛血清、健康牛血清检测的结果表明其具有较好的特异性; 使用该方法与 IDEXX 副结核病抗体检测试剂盒共同对 300 份临床血清样本检测, 总符合率为 92.7%。

[关键词] 副结核分枝杆菌; 串联表达; 间接 ELISA

Expression of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP0862, MAP1345 and Primary Application in Indirect ELISA

ZHANG Zhen^{1,2}, ZHANG Ge², PENG Yong², PENG Xiao-wei², SUN Cui-li^{1,2},
CHANG Wei-shan¹, ZHU Liang-quan^{2*}, DING Jia-bo^{2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University, Taian, Shandong 270018, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: To explore the effect of MAP0862 and MAP1345 in the diagnosis of *Bovine paratuberculosis*, the specific protein acquired by tandem expression was used as coating antigen after purified and quantification, an indirect ELISA was preliminary established after a series of optimization. The specificity of this method was verified by MAP antisera, Brucella antisera, Bovine tuberculosis (TB) antisera, BCG antisera and negative sera. The detection result of 300 sera showed that the coincidence rate of MAP0862-1345 indirect ELISA with commercial kit was 92.7%.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; tandem expression; indirect ELISA

基金项目: 北京市科技新星计划(xx2013099); 现代农业人才支撑计划项目

作者简介: 张振, 硕士研究生, 从事重要人畜共患病诊断技术和新型疫苗研制方面的研究。

通讯作者: 丁家波, E-mail: dingjiabo@126.com; 朱良全, E-mail: zhuliangquan@ivdc.org.cn

副结核病是由副结核分枝杆菌引起的一种慢性消化系统疾病,主要引起反刍动物慢性肠炎以及生产性能下降。目前该病在全世界范围内流行,尚无有效的治疗方法,最好的控制方法就是对畜群进行严格的检疫并及时淘汰阳性牛^[1]。对于副结核病检疫诊断,常用方法为 ELISA 与皮肤变态反应。但由于副结核分枝杆菌属于禽结核分枝杆菌属的一个分支,其与其他禽结核分枝杆菌存在基因与抗原表位的交叉,如皮肤变态反应用的副结核抗原与禽结核菌素(PPD-A)、牛结核菌素(PPD-B)、环境分枝杆菌存在共同抗原^[2]。因此寻找具有鉴别诊断作用的副结核分枝杆菌特异性蛋白,并以其为基础建立 ELISA 方法是诊断副结核病的有效途径。

关于运用副结核分枝杆菌特异性蛋白建立 ELISA 方法几无报道,不过目前通过比较基因组学已经鉴定出至少 13 个副结核特异性抗原^[3]。实验室前期已原核表达获得了 5 个特异性蛋白,初步试验表明 MAP0862 与 MAP1345 具有一定的血清学鉴别诊断效果。目前关于副结核蛋白的研究较少,已有 MAP0862 蛋白的抗原性报道,然而对于 MAP0862 与 MAP1345 蛋白的结构、功能至今未有相关报道^[4]。为了探索前期发现的具有较好诊断作用的两种蛋白在协同作用下的鉴别诊断中应用价值,本研究通过引入一段柔性氨基酸将副结核特异性蛋白 MAP1345 与 MAP0862 进行串联表达,并对其表达产物进行了抗原性分析,将表达产物纯化复性后作为 ELISA 包被抗原,进一步优化了在 ELISA 反应中的各项参数,为后续系统建立 ELISA 方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体 副结核分枝杆菌菌株 P18 (C68678),购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。原核表达载体 pET-32a 由本实验室保存。

1.1.2 试剂 Herrold 蛋卵黄琼脂培养基购自 BD 公司;DNA 聚合酶 Q5、限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、T4 DNA Ligase 购自 NEB 公司;小量质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;胶回收试剂盒、细菌基因组

DNA 小量纯化试剂盒、片段回收试剂盒购自 Takara 公司;HRP 标记的兔抗牛酶标抗体购自 SIGMA 公司。

1.1.3 包涵体蛋白纯化溶液配制 包涵体洗涤液 1: 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100;包涵体洗液 2: 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 2 mol 尿素;变性液: 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素;复性液: 20 mmol/L Tris, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% 甘氨酸, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L 谷胱甘肽。以上溶液配制后使用盐酸调 pH 值至 7.4。

1.1.4 血清 牛副结核病阳性血清、牛结核病阳性血清、牛布病阳性血清、卡介苗免疫牛血清、健康阴性牛血清(副结核病、结核病及布病抗体均为阴性),由本实验室鉴定保存。临床牛血清采集自山东某牛场。

1.2 方法

1.2.1 菌种复苏与基因组提取 无菌开启一支冻存的 P18 副结核菌种,用 0.5 mL 灭菌生理盐水将菌体重悬后接种于一支 Herrold 蛋卵黄琼脂培养基斜面,置于 37 °C 温箱内培养 21~35 d,待表面长出白色颗粒状菌苔,用 5 mL 灭菌生理盐水将菌体洗下后,80 °C 灭活 2 h。接着将灭活菌体转移至罗氏真空磁珠管中,用组织研磨机上(1 000 r/min, 10 s)将菌体充分震荡打散,然后按照 Takara 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒提取革兰氏阳性菌的步骤提取 P18 全基因组。

1.2.2 引物设计 分别从 GenBank 上调取 MAP0862 与 MAP1345 基因序列,使用 DNASTAR 软件分析两个序列中包含抗原位点的疏水性区域,使用 Primer Premier 5.0 软件设计针对两段基因的特异性引物。序列见表 1。

1.2.3 片段扩增与目的片段回收 以副结核分枝杆菌 P18 基因组作为模板,使用引物 P1 与 P2 扩增 MAP1345 基因,使用引物 P3 与 P4 扩增 MAP0862 基因,反应组分为: 2 × Master Mix 25 μL, 上下游引物(10 mmol/L)各 2.5 μL, 基因组 2 μL, 加灭菌 ddH₂O 至 50 μL。反应程序为: 98 °C 30 s; 98 °C

表1 特异性引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度
MAPI345 P1	CCGGAATTC <u>CCGATTCGGTCTCTCTAC</u> (<i>EcoR</i> I)	555bp
MAPI345 P2	TGAACCACCACCACCTGAACCACCACCACC ATACGTCGGGGCTCTGT	
MAP0862 P3	GGTGGTGGTGGTTCAAGTGGTGGTGGTTCA ATCGCCTTCGTAAACG	1032bp
MAP0862 P4	CCGCTCGAGTTATGGCTTCTCTCGTAAA (<i>Xho</i> I)	

下划线部分为酶切位点,加粗部分为引入的柔性氨基酸序列

10 s,54 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s(30个循环);72 ℃ 10 min延伸 PCR 反应。PCR 反应结束后使用胶回收试剂盒对两个产物进行回收。

1.2.4 重叠 PCR 使用分光光度计对两个 PCR 回收产物测定浓度后按照 1:1 等量混合作为 PCR 反应模板,使用引物 P1 与 P4 对模板进行扩增,PCR 反应程序为:98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,54 ℃ 20 s,72 ℃ 40 s(30个循环);72 ℃ 10 min 延伸 PCR 反应,获得 MAPI345 与 MAP0862 的融合基因。

1.2.5 重组质粒构建与诱导表达 使用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 分别对融合基因 MAPI345 - 0862 与原核表达载体 pET - 32a 进行双酶切后回收目的片段,按照一定比例将两种回收产物混合后使用 T4 DNA Ligase 进行连接,将连接产物转化进入 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单个菌落摇菌后提取质粒进行双酶切鉴定,将含阳性质粒的重组菌转接含氨苄抗性的新鲜 LB 培养基,以 37 ℃、150 r/min 摇菌 4~6 h,当 OD_{450 nm} 为 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,继续摇菌 4 h 后收集菌体。

1.2.6 SDS - PAGE 鉴定 取诱导后菌液超声破碎(30%功率;超声 2 s;暂停 2 s;超声 10 min)。分别取标签蛋白,全菌蛋白,超声后沉淀,超声后上清进行 SDS - PAGE 凝胶电泳,验证目的蛋白大小以及可溶性。

1.2.7 包涵体形式目的蛋白纯化 超声破碎后的菌体经 4 ℃ 12000 r/min 离心 20 min 收集沉淀菌体,每克菌体使用 40 mL 包涵体洗液 1 重悬后,经 4 ℃ 12000 r/min 离心 25 min 收集沉淀;沉淀用 40 mL 包涵体洗液 2 重悬,搅拌溶解 1 h,经 4 ℃ 12000 r/min 离心 25 min 后弃去上清;沉淀加入 40 mL 含 8 mol/L 尿素的变性液室温搅拌 2 h,4 ℃ 12000 r/min 离心 25 min;吸取上清溶液使用 0.45 μm 滤器过滤后装于处理后的透析袋内,然后置 4 ℃ 依次使用含 8、6、4、2、0 mol/L 尿素的复性

液进行透析复性。复性蛋白使用 Hiprep 26/10 Desalting 脱盐后置换到 PBS 溶液中^[5]。

1.2.8 SDS - PAGE 与 Western Blot 鉴定 分别取诱导重组菌超声后上清、超声后沉淀、纯化后的目的蛋白进行 SDS - PAGE,一块凝胶进行考马斯亮蓝染色;另一块凝胶进行 Western Blot,将纯化后的目的蛋白使用伯乐凝胶转印系统转印到 PVDF 膜上,使用牛副结核病阳性血清作为一抗,1:5000 稀释的 HRP 标记的兔抗牛酶标抗体作为二抗,进行 Western Blot 鉴定。

1.2.9 间接 ELISA 条件优化以及方法的建立

1.2.9.1 使用棋盘法确定最佳抗原包被条件以及最佳血清稀释度 将纯化定量后的重组蛋白 MAP0862 - 1345 用 1 × 碳酸盐缓冲液按照 200、100、50、25 ng/mL 四个稀释度进行稀释,将稀释后的重组蛋白按每孔 100 μL 加入酶标板后于 4 ℃ 包被过夜,使用 PBST 缓冲液洗板三次;每孔加入 100 μL 含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液于 37 ℃ 封闭 2 h 后,使用 PBST 缓冲液洗板三次。将阴阳性对照血清按照 1:25、1:50、1:100、1:200 四个稀释度进行稀释后以每孔 100 μL 加入酶标板中,37 ℃ 作用 30 min,PBST 溶液洗板三次;每孔加入 100 μL 1:10000 稀释的 HRP 标记的兔抗牛酶标抗体,37 ℃ 作用 30 min,使用 PBST 溶液洗板三次;每孔加入 100 μL TMB 显色液室温避光显色 15 min,然后每孔加入 50 μL 1 mol/L HCL 终止反应,测定 OD_{450 nm} 值,以阳性血清与阴性血清的最适 OD_{450 nm} 比值(P/N)所对应的抗原包被浓度与血清稀释度作为最佳浓度。

1.2.9.2 最佳封闭条件的确立 在确定最佳抗原包被浓度与血清稀释度后,分别使用含 5% 脱脂奶粉、5% 马血清、5% 明胶的 PBST 溶液作为封闭液,进一步优化 ELISA 参数,以背景值最低的封闭液作为最佳封闭液。

1.2.9.3 最佳酶标抗体浓度的确立 按照优化后的上述 ELISA 条件,用 PBST 将 HRP 标记的兔抗牛酶标抗体分别进行 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000 稀释后进行 ELISA 反应,选择 P/N 值最大时的酶标抗体稀释度作为最适工作浓度。

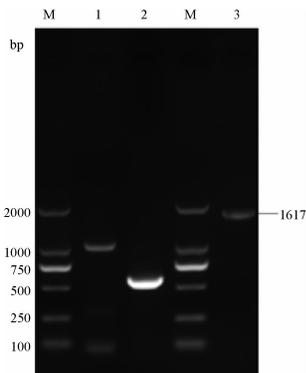
1.2.9.4 阴性血清临界值的确定 使用优化后的 ELISA 方法对实验室保存的 58 份健康牛血清进行检测,分别计算 \bar{x} 与 s ,以 $\bar{x} + 3s$ 作为阳性临界值,当结果大于临界值时判定为阳性。

1.2.9.5 特异性试验 按照优化后的 ELISA 方法,取实验室保存的牛副结核病阳性血清、牛结核病阳性血清、牛布病阳性血清、卡介苗免疫牛血清、健康牛血清进行检测以验证基于不同抗原的 ELISA 实验的特异性。

1.2.9.6 符合性试验 按照建立的 ELISA 方法对 300 份临床采集的牛血清进行检测,将检测结果与 IDEXX 副结核病抗体 ELISA 检测试剂盒检测结果进行比对,计算二者符合率。

2 结果

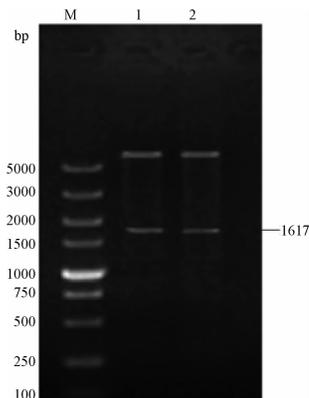
2.1 目的基因扩增与重组质粒双酶切鉴定 经过 PCR 扩增,成功获得了长度为 1032 bp 的 MAP0862 基因与 555 bp 的 MAP1345 基因,将两段基因混合后作为模板,经过重叠 PCR,成功获得了长度为 1617 bp 的目的片段 MAP1345-0862(图 1)。重组质粒经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切,电泳可见有两条符合预期大小的条带(图 2),质粒送公司测序后将结果与 MAP0862 基因及 MAP1345 基因进行序列比对,符合率均为 100%,表明成功构建了 MAP0862-1345 重组质粒,标注为 pET-MAP0862-1345。



M: DL2000 Marker; 1: MAP0862 PCR 产物;

2: MAP1345 PCR 产物; 3: MAP1345-0862 融合 PCR 产物

图 1 MAP0862、MAP1345、MAP0862-1345 PCR 扩增图



M: DL5000 Marker; 1, 2: 重组质粒 MAP0862-1345 双酶切鉴定

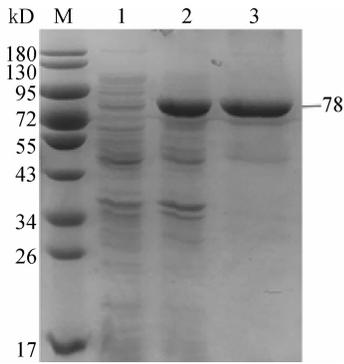
图 2 重组质粒 pET-MAP0862-1345 双酶切鉴定图

2.2 重组蛋白 SDS-PAGE 以及 Western Blot 鉴定 SDS-PAGE 凝胶电泳后可见重组菌表达的目的蛋白主要以包涵体形式存在,使用尿素梯度透析的方法对蛋白进行复性,脱盐及纯化。纯化后的目的蛋白大小与预期相一致,约 78 kD(图 3)。纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,进行 Western Blot 分析,结果在预期的 78 kD 处出现杂交条带,表明纯化后的重组蛋白可以和牛副结核病阳性血清发生特异性免疫学反应,具备良好的反应原性(图 4)。

2.3 ELISA 方法的建立

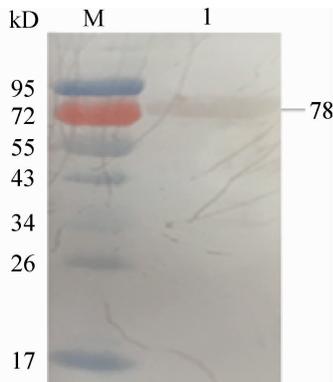
2.3.1 优化后的 ELISA 条件 经过优化后的 ELISA 反应条件如下:重组蛋白使用碳酸盐缓冲液稀释至 25 ng/mL,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;PBST 洗板 3 次后,加入含 5% 明胶的 PBST 溶液进行 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭;PBST 洗板 3 次,加入使用 PBST 进行 1:100 稀释的待检血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBST 洗板 3 次后,加入使用 PBST 进行 1:10000 稀释的兔抗牛酶标抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBST 洗板 3 次后,每孔加入 100 μ L TMB 显色液,室温避光显色 10 min,每孔加入 50 μ L 1 mol/L HCL 终止反应,使用酶标仪读取 OD_{450 nm} 数值。

2.3.2 临界值确立 取实验室保存的 58 份牛副结核病阴性血清使用该 ELISA 方法测定 OD_{450 nm} 数值,经计算 \bar{x} 与 s 分别为 0.355 与 0.067,根据公式: $\bar{x} + 3s$ 为阳性临界值,计算 ELISA 临界值为 0.556。即当样品 OD_{450 nm} 值大于 0.556 时判定为阳性,小于 0.556 时判定为阴性。



M: 蛋白分子量标准; 1: 重组菌超声后上清;
2: 重组菌超声后沉淀; 3: 纯化后的 MAP1345 - 0862 融合蛋白

图3 重组蛋白的 SDS - PAGE 分析



M: 蛋白分子量标准;
1: 纯化后的 MAP1345 - 0862 融合蛋白

图4 重组蛋白 MAP0862 - 1345 的 Western Blot 分析

2.3.3 特异性试验 使用初步建立的基于副结核特异性蛋白 MAP0862 - 1345 的间接 ELISA 方法对经鉴定保存的血清进行检测以验证该方法的特异性,其中副结核病阳性牛血清 18 份、布病阳性牛血清 10 份、牛结核病阳性血清 15 份、卡介苗免疫牛血清 10 份、牛健康阴性血清 58 份进行检测,结果见表 2。

表2 重组蛋白 ELISA 特异性实验结果

实验血清	副结核病 阳性牛血清	布病阳性 牛血清	牛结核病 阳性血清	卡介苗免 疫牛血清	牛阴性 血清
阳性	16	1	1	2	4
阴性	2	9	14	8	54
总计	18	10	15	10	58

2.3.4 符合性试验 使用建立的 ELISA 方法对 300 份牛血清进行检测,并将结果与 IDEXX 牛副

结核病抗体检测试剂盒检测结果进行比对,分别计算阳性符合率、阴性符合率以及总符合率,结果见表 3。阳性符合率: $19/26 * 100\% = 73.1\%$; 阴性符合率: $259/274 * 100\% = 94.5\%$; 总符合率: $(19 + 259)/300 * 100\% = 92.7\%$ 。

表3 重组蛋白 ELISA 符合率结果

MAP0862 - 1345 i - ELISA	IDEXX 牛副结核检测试剂盒		
	阳性	阴性	合计
阳性	19	15	34
阴性	7	259	266
合计	26	274	300

3 讨论

近年来,副结核病带来生产上严重的经济损失,以及潜在的人类生物安全威胁,引起研究者广泛关注^[6]。鉴于机体感染副结核后存在细胞免疫与体液免疫分离现象,并且副结核分枝杆菌与牛结核分枝杆菌以及其他环境分枝杆菌存在共同抗原^[7],因此本研究中挖掘并验证具有鉴别诊断价值的串联表达抗原,初步建立适合不同感染阶段的血清学诊断的 ELISA 方法,具有重要意义。

虽然重组蛋白存在着抗原成分明确、易于质控与无生物危害的优点^[8]。但如何保证两个重组蛋白的构象与功能是面临的难点,我们通过引入一段序列为 G₄S 的柔性氨基酸将两个蛋白进行连接,从而确保两个蛋白的正确构象和功能^[9]。Western Blot 结果进一步证明经复性后的串联表达重组蛋白 MAP0862 - 1345 能与牛副结核病阳性血清发生特异性反应。

实验中将复性后所获的具有较高纯度的可溶性蛋白作为 ELISA 包被抗原,并优化筛选了 ELISA 反应参数,初步建立了基于副结核特异性蛋白 MAP0862 - 1345 的间接 ELISA 方法。但通过对 58 份健康牛血清的检测发现确定的临界值 (OD_{450 nm} 为 0.556) 较高,主要原因可能由于纯化后的目的蛋白仍存在部分表达宿主菌 BL21 的蛋白,另外待检牛血清中可能存在与抗原蛋白含有交叉表位的大肠杆菌的抗体。比如在临床血清检测中,我们发现部分布病牛结核病阳性血清、牛结核阳性血清、卡介苗免疫牛血清被检测为阳性。

另外,IDEXX 副结核病抗体检测试剂盒与本研究建立的方法检测 300 份临床血清样本,阳性符合率仅为 73.1%,推断主要原因:一是副结核病抗体

阳性样本较少导致阳性符合率低,如 300 份临床血清用 IDEXX 副结核病抗体检测试剂盒仅检测到 26 份副结核病抗体阳性血清;二是牛感染副结核后的不同时间段,其 MAP0862 蛋白、MAP1345 蛋白的表达量不同,导致血清中针对该蛋白的特异性抗体含量不同,而当蛋白表达量较低时应用该方法则可能无法有效检出抗体。

总之,建立的 MAP0862 - 1345 间接 ELISA 方法,仍需要大量背景清楚的,不同感染阶段的人工感染血清样本进一步验证和完善。鉴于当前没有一种成熟的商品化副结核病血清学检测方法能够准确诊断不同感染期的血清样本^[10],因此针对可疑牛副结核病的实验室确诊仍需要综合采用多种不同检测方法。

参考文献:

- [1] 白宇,高艳,高云航,等. 鹿副结核病抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 29(12): 956 - 600.
- [2] 吴雪琼,张俊仙,李洪敏,等. 结核分枝杆菌 MPT64 蛋白的表达,纯化及初步应用 [J]. 中国防痨杂志, 2001, 23(2): 85 - 88.
- [3] Paustian M L, Amonsin A, Kapur V, *et al.* Characterization of

novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; implications for diagnosis of Johne's disease [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(6): 2675 - 2681.

- [4] 牟巍,蒋菲,何宇,等. 副结核分枝杆菌 map0862 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(8): 10 - 12.
- [5] 孟闯. 结核分枝杆菌抗原蛋白的表达,免疫特性分析及在牛结核病检测中的初步应用 [D]. 万方数据资源系统, 2011.
- [6] 孔繁德. 副结核分枝杆菌诊断技术的研究进展 [J]. 检验免疫科学, 2004, 14(B12): 57 - 60.
- [7] Leite F L, Reinhardt T A, Bannantine J P, *et al.* Envelope protein complexes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their antigenicity [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(2): 275 - 285.
- [8] 贾红,鑫婷,郭晓宇,等. 牛结核病对人类健康的影响及其诊断方法 [J]. 微生物与感染, 2013, 9(1): 6 - 13.
- [9] 韩小艳. Linker 长度对 MDC 和 CVB3VP1 融合基因疫苗免疫效果的影响 [D]. 河北医科大学, 2007.
- [10] Deb R, Saxena V K, Goswami P P, *et al.* Diagnostic tools against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in animals; a review [J]. *Agricultural Reviews*, 2011, 32(1): 46 - 54.

(编辑:李文平)