

· 基础研究 ·

鼠疫菌 PsaA 抗原的表达及抗体制备和应用 *

洪文艳^{1,2} 王浩然¹ 王津¹ 郭兆彪¹ 周蕾¹ 杨瑞馥^{1△}

(1 军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071 2 广州军区疾病预防控制中心 广东 广州 510507)

摘要 目的: 制备鼠疫菌 PsaA 抗原及抗体, 建立针对 PsaA 抗体的快速检测方法, 并检测鼠疫感染猴血清标本中的 PsaA 抗体的阳性率。方法: 利用 PCR 方法扩增出 PsaA 蛋白基因片段, 在大肠杆菌原核表达系统中表达出重组 PsaA 抗原, 以镍柱亲和层析纯化包涵体形式的表达蛋白, 以尿素梯度透析复性成可溶蛋白。再以表达蛋白为免疫原, 常规免疫家兔, 收集兔血清制备多抗, 并以正辛酸-硫酸铵法提纯获得 PsaA 抗体 IgG。利用得到的 PsaA 抗原和抗体为材料, 建立两种检测 PsaA 抗体的快速检测方法, 即间接 ELISA 法和上转换发光(Up-converting Phosphor Technology, UPT)免疫层析试纸条法。最后利用这两种方法检测 18 份猴血清标本中的 PsaA 抗体。结果: 鼠疫菌感染猴血清标本中 PsaA 抗体的阳性率为 62%(8/13)。结论: 成功建立了针对鼠疫菌 PsaA 抗体的快速检测方法, 并检测到 13 份鼠疫感染猴血清标本中的 PsaA 抗体的阳性率为 62%。

关键词 鼠疫菌; PsaA 抗原; 蛋白表达; 抗体制备; 抗体检测

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)12-2201-03

PsaA Antigen Expression of *Y. pestis* and Its Antibody Development and Application*

HONG Wen-yan^{1,2}, WANG Hao-ran¹, WANG Jin¹, GUO Zhao-biao¹, ZHOU Lei¹, YANG Rui-fu^{1△}

(1 Microbe Epidemic Institute of Military Medicine Academy of Sciences, Beijing 100071, China; 2 Guangzhou military region disease prevention control center, Guangzhou 510507, China)

ABSTRACT Objective: To develop the PsaA antigen of *Y. Pestis* and its antibody, and to develop the fast detection assays, and to detect the positive ratio of PsaA antibody in 18 plague monkey serum samples. **Methods:** The PsaA gene was amplified by PCR method. The production was cloned and expressed using an *E. coli* expression system, purified with the Ni-NTA affinity chromatography, and renatured the inclusion body expressed proteins using a urea gradient dialysis method. The corresponding polyclonal antibody was prepared by immunizing rabbits using the conventional method. Bloods were obtained from rabbits for collection of sera and purification of specific immunoglobulin G (IgG) with a caprylic acid-saturated ammonium sulfate precipitation method. Then both indirect ELISA method and Up-converting Phosphor Technology (UPT) lateral flow assay were developed to detect PsaA antibodies of samples. Lastly, 18 monkey serum samples were tested. **Results:** The data showed that the positive ratio of the PsaA antibody in plague monkey serum samples was 62%(8/13). **Conclusion:** The fast detection assays were successfully developed for the PsaA antibody test. And the positive ratio of the antibody in plague monkey serum samples was 62%.

Key words: *Y. pestis*; PsaA antigen; Protein expression; Antibody development; Antibody detection

Chinese Library Classification(CLC): R373 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)12-2201-03

鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*, 鼠疫菌)是一种革兰氏阴性菌, 感染人或动物后能导致危害人类最严重的烈性传染病之一——鼠疫^[1]。鼠疫传染性强, 病死率高, 流行区域呈世界性分布, 且人群普遍易感。由于鼠疫菌可以通过气溶胶形式传播, 所以也是一种标准的生物战剂和生物恐怖剂, 20 世纪初美国就已将鼠疫菌列为最需防范的 6 种生物战剂之一^[2]。为了更有效的预防、诊断及治疗此烈性传染病, 避免其带来的灾难性后果, 与鼠疫菌致病有关的各重要毒力因子都是各国研究者在鼠疫

研究中的一大热点^[3]。

PsaA 抗原是鼠疫菌中除 F1 和 LcrV 之外的重要毒力因子之一, 一直受到众多的研究关注, 有报道表明该抗原可能在鼠疫菌的感染早期就开始起作用^[4]。为了更好的研究此抗原在鼠疫菌致病过程中的功能及作用机理, 本实验利用原核表达系统表达了此抗原并制备了相应的抗体, 为后续实验提供一定的研究基础。

1 材料与方法

* 基金项目 国家 973 项目(2007CB310505) 国家科技支撑计划项目(2009BAK43B31) 北京市自然科学基金(5082017)

作者简介 洪文艳, 女, 现工作于广州军区疾病预防控制中心疾控科, 2007-2010 年于中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所就读获博士学位。E-mail: 1hchhw521@163.com。

△通讯作者 杨瑞馥 E-mail: ruiyufang@gmail.com

(收稿日期 2011-02-06 接受日期 2011-02-28)

1.1 材料

实验菌株:鼠疫菌 EV76 株,大肠杆菌 BL21 株,为军事医学科学院微生物研究所提供。质粒提取试剂盒,PCR 产物纯化试剂盒,内切酶等分子生物实验试剂,购自北京天根生物公司。2-3kg 清洁级新西兰大白兔,由军事医学科学院实验动物研究所提供。酶联包被液及显色液和 HRP 标记的羊抗兔二抗,均由军事医学科学院微生物研究所提供。UPT 试纸条制备材料及检测设备,均由军事医学科学院微生物研究所提供。猴血清标本:由青海地方病防治所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 PsaA 基因的克隆 参照文献^[5],根据鼠疫菌 91001 株中 PsaA 的基因组序列(GenBank 登录号:AL590842)设计一对引物,序列如下:P1(上游):5'-gggatccaactccaaggatgtttctg-3',P2(下游):5'-ggtcgacttaaaatacactactctcaacac-3'。PCR 扩增目的基因片段 385bp,扩增体系为:PCR buffer 2.5μl;10mM dNTPs2μl;上、下游引物各 0.2μl (100pM);DNA 模板 1μl (5ng/μl);Taq DNA 聚合酶(5U) 0.2μl,补足水至总体积 25μl。扩增参数为:95℃ 7min,94℃ 40s,56℃ 40s,72℃ 40s (30 个循环);72℃ 7min。扩增完毕以琼脂糖凝胶电泳检测产物,再用 DNA 纯化回收试剂盒纯化。

PCR 结果显示,扩增出与设计的序列大小一致的产物,约 385bp 的目的基因片段。

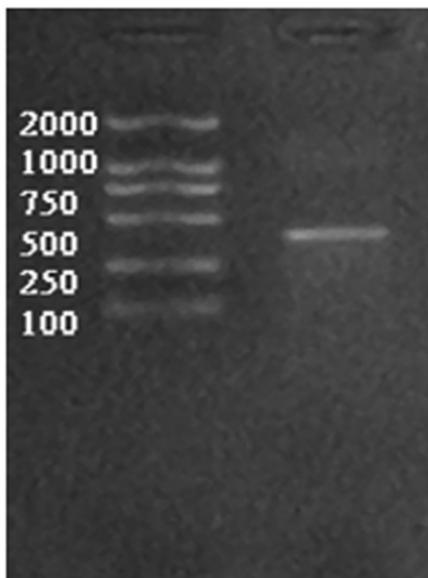


图 1 PCR 产物的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of PCR offspring

1.2.2 PsaA 蛋白的表达及纯化 参照文献^[6],纯化所得的连接产物,转化 BL21 感受态细菌,在转化后的平板上随机挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定,鉴定阳性的克隆株继续培养并以化学诱导剂 IPTG(终浓度为 1mM)诱导蛋白表达,经 SDS-PAGE 电泳确定有目的蛋白表达的阳性表达株送上海生物工程公司测序,测序正确的菌株经超声碎菌后以 SDS-PAGE 凝胶电泳分析鉴定蛋白为包涵体形式表达。以镍柱亲和层析方式纯化表达蛋白,纯化后蛋白采用尿素梯度透析复性。

蛋白表达及纯化后的 SDS-PAGE 电泳结果如下图 2,说明

目的重组蛋白 PSAA 以变性的包涵体为主要表达形式,经镍柱纯化后获得了纯度较高的蛋白。

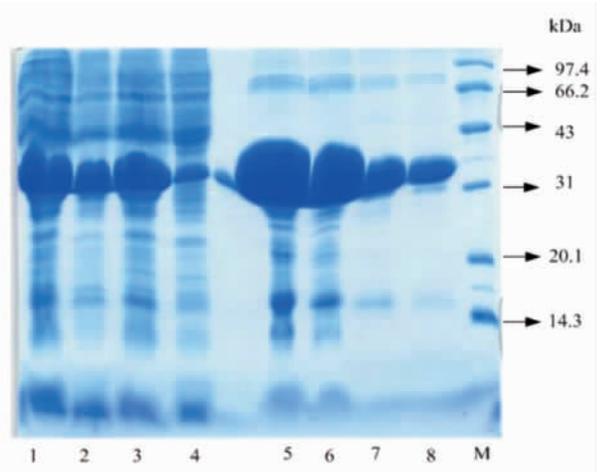


图 2 PsaA 重组蛋白的表达与纯化结果

1:全菌 2:超声后沉淀 3:全菌 4:超声后上清 5-8:纯化蛋白 M:蛋白 marker

Fig. 2 Expression and purification result of PSAA recombination albumen 1,3:Complete mushroom; 2:Deposit after supersound; 4:Upper liquid after supersound; 5-8:Rarefied protein; M:Protein marker

1.2.3 PsaA 多克隆抗体的制备及纯化 以实验获得的 PsaA 重组蛋白为抗原免疫家兔,参照文献^[7]。采取常规的多点多次免疫方案,在第 0,15,30 天分别免疫三针,免疫用抗原依次为 200μg 蛋白加等体积弗氏完全佐剂、400μg 蛋白加等体积弗氏不完全佐剂、800μg 蛋白不加佐剂,前两针肌注四肢腹股沟等皮下多点,最后一针耳缘静脉注射。免疫结束后分离得到的兔血清即为粗制的兔多抗血清。

采用正辛酸-硫酸铵沉淀法,操作按参考文献^[8],从获得的粗制多抗血清中提取抗体 IgG,得到纯化的抗 PsaA 抗原的兔多抗 IgG。紫外分光光度计测得纯化抗体 IgG 溶液的浓度为 22mg/ml。

2 结果

2.1 测定 PsaA 抗体的间接 ELISA 方法的建立

参照文献^[9],以矩阵法筛选出最佳抗原包被量为 50ng/孔,常规方法包被空白板条并封闭后即成为 ELISA 实验用的检测板条。纯化多抗 IgG 倍比稀释(1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400) 后即为一抗,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG,免疫前后的兔血清分别为阴阳性对照。检测步骤及结果判定同一般 ELISA 操作^[10]。测得纯化抗体 1mg/ml 的效价为 1:25600。

2.2 测定 PsaA 抗体的 UPT 免疫层析试纸条检测方法的建立

参照文献^[11]的制备过程,制备 UPT 双抗原夹心测抗体的免疫层析试纸条。检测带和质控带抗体浓度分别为 0.8 mg/ml 和 2mg/ml。检测步骤及结果判定同文献^[11]所述。

2.3 实际标本中 PsaA 抗体的检测

待测标本共 18 份,其中 13 份为人工感染鼠疫强毒株 144 株半年后的免疫猴血清,5 份为正常猴血清,以 1mg/ml 多抗

IgG 为阳性对照。对所有标本分别以 ELISA 和 UPT 试纸条两种方法检测 5 份正常猴血清的检测结果全部为阴性, 另外 13 份免疫猴血清标本的检测结果及统计分析如表 1。

表 1 标本中 PsaA 抗体检测结果
Tab. 1 PsaA antibody detection result

		ELISA		Total
		+	-	
UPT	+	7	1	8
	-	1	4	5
Total		8	5	13

参照文献^[12] χ^2 检验分析 $P < 0.05$, 说明两种方法检测结果统计学差异不明显, 计算两种方法测得的 13 份免疫猴血清标本中 PsaA 抗体阳性率结果均为 62%(8/13)。

3 讨论

鼠疫菌 PsaA 抗原又名 YPO1303 抗原或 pH6 抗原, 相当于传统的细菌抗原 4, 是依其表达调控条件命名的。研究表明^[13], 鼠疫菌在 pH5~6.7, 35~41℃ 条件下体外培养时可表达此抗原, 在鼠疫菌感染小鼠体内的肝和脾等脏器中、及体外缺钙条件下时也可检测到其表达。当鼠疫菌侵入巨噬细胞后, 处于细胞内的酸性环境中, 其 PsaA 基因会在细菌表面编码一种纤维状结构蛋白, 在传递鼠疫菌三型分泌系统中的 Yops 效应蛋白进入噬菌细胞过程中可能起到提供进入通道的作用, 另外还可在细菌表面形成小纤丝, 以促进细菌的粘附与血凝集^[14]。还有报道认为^[15], 重组 PsaA 抗原是一种新型的细菌 Fc 受体, 可特异性的与人 IgG1, IgG2 和 IgG3 结合, 此结合不能提高细菌与巨噬细胞间的结合力, 但在抗吞噬方面能起一定作用。

为了更好的研究 PsaA 抗原的功能及机体感染鼠疫后产生的 PsaA 抗体所起的作用, 本课题组制备了重组的 PsaA 蛋白及相应的多克隆抗体, 并建立了检测 PsaA 抗体的 ELISA 及 UPT 免疫层析试纸条方法, 为以后的抗原及抗体研究提供了一个检测平台。本实验还利用已建立的两种方法检测了多份猴血清标本, 发现在 13 份鼠疫菌感染的猴血清标本中 PsaA 抗体的阳性率为 62%(8/13), 说明 PsaA 抗体的产生是有一定个体差异的, 即使是感染了鼠疫强毒株 144 株, 也有部分猴血清中检测不到此抗体。这些实验结果都为进一步的蛋白功能研究提供了一定的基础。

参考文献(References)

- [1] 于恩庶, 刘岱伟. 加强鼠疫病原学研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(3): 1-3
YU En-shu, LIU Dai-wei. Strengthen black death aetiology study[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2003, 19(3): 1-3
- [2] Zietz, B.P., Dunkelberg, H. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis* [J]. Int J Hyg Environ Health 2004, 207(2): 165-178
- [3] Lindler, L.E., Tall, B.D. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages [J]. Mol Microbiol 1993, 8(2): 311-324
- [4] 曹淑兰, 张市, 张贵军, 等. 青海田鼠鼠疫自然疫源地鼠疫菌毒力因子测定[J]. 中国地方病防治杂志, 2005, 20(6): 370-372

- CAO Shu-lan, ZHANG Shi, ZHANG Gui-jun, et al. Factor measure of Chinghai field mice black death focus of natural infection black death mushroom virulence [J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2005, 20(6): 370-372
- [5] R.J.Simpson. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 2003-2009
- [澳] R.J.辛普森. 蛋白质与蛋白质组学实验指南(影印版)[M]. 科学出版社, 2003-2009
- [6] EdHarlow, DavidLane. Antibody technology experiment guide [M]. Beijing: Science Press, 2002, 10
- [7] 马连红, 周兵, 田伟. 羊兔血清 IgG 的快速纯化及其分析鉴定[J]. 免疫学杂志, 1996, 12: 197
MA Lian-hong, ZHOU Bin, Tian-wei. Fast purification and analyse certificate of sheep rabbit sera IgG [J]. Chinese Journal of Immunology, 1996, 12: 197
- [8] 王传新, 王国礼. 现代检验医学技术及质量控制[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 2004: 32-33
WANG Chuan-xin, WANG Guo-li. Modern times proven medical technology and quality control[M]. Shandong: Shandong scientific & Technical Publishers, 2004: 32-33
- [9] 张文艳, 胡红霞. 酶联免疫吸附试验中常见问题及解决方法 [J]. 中外医疗, 2009, 28(32): 80
ZHANG Wen-yan, HU Hong-xia. FAQ and resolvent of enzyme linked immunosorbent assay on trial [J]. China Foreign Medical Treatment, 2009, 28(32): 80
- [10] Qu, Q., Zhu, Z., Wang, Y. et al., Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay[J]. J Microbiol Methods. 2009, 7: 15-19
- [11] 孙振球. 医学统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002
SUN Zhen-qiu. Medical statistics [M]. Beijing: People's Medical Publish House, 2002
- [12] Huang, X.Z., Lindler, L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen [J]. Infect Immun 2004, 72 (12): 7212-7219
- [13] Makoveichuk, E., Cherepanov, P., Lundberg, S., et al. PsaA antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes[J]. J Lipid Res 2003, 44(2): 320-330
- [14] Anisimov, AP., Bakhteeva, IV., Panfertsev, EA., et al. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice [J]. Journal of Medical Microbiology. 2009, 58(1)