

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.13

## 鸭疫里氏杆菌吉林分离株 *camp* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 检测方法的建立

么乃全<sup>1</sup>, 高云航<sup>1\*</sup>, 于丹<sup>2</sup>, 张敏<sup>3</sup>, 耿磊<sup>1</sup>, 王全凯<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学 动物科技学院, 吉林 长春 130118; 2. 长春市动物疫病预防控制中心, 吉林 长春 130061;

3. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

**摘要:** 为建立鸭疫里氏杆菌(RA)的血清学快速检测方法, 本研究根据 GenBank 中登录的 *camp* 基因序列设计引物, 以吉林 RA 分离株 JL-1 的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *camp* 基因, 并构建 pET-*camp* 重组表达质粒, 转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 中诱导表达出分子量约为 37 ku 重组蛋白, western blot 分析结果表明该蛋白能够与血清 1、2、10、11 和 17 型 RA 全菌体阳性血清发生特异性反应。以纯化的重组蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 方法, 结果显示其具有良好的特异性和重复性, 与 RA 超声裂解抗原 ELISA 方法的符合率达到 77.5%。研究结果进一步验证了 Camp 蛋白具有良好免疫原性, 并且为 RA 多种血清型共同抗原, 在 RA 的检测及亚单位疫苗开发中具有良好的应用价值。

**关键词:** 鸭疫里氏杆菌; *camp* 基因; 克隆与表达; ELISA

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0054-04

## Expression of *camp* gene of *Riemerella anatipestifer* from Jilin isolate and establishment of indirect ELISA using Camp protein as the coating antigen

YAO Nai-quan<sup>1</sup>, GAO Yun-hang<sup>1\*</sup>, YU Dan<sup>2</sup>, ZHANG Min<sup>3</sup>, GENG Lei<sup>1</sup>, WANG Quan-kai<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Changchun Prevention and Control Center of Animal Disease, Changchun 130061, China; 3. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To establish the diagnosis method to detection of *Riemerella anatipestifer* (RA) infection, the *camp* gene was amplified by PCR from genome of RA Jilin isolate with primers designed according to the sequence in GenBank, and cloned into pET28a vector for expressing in *E.coli* BL21 (DE3). A molecular weight of about 37 ku recombinant protein was expressed by induction with IPTG and western blot results show the protein was able to react with positive sera of RA serotype 1, 2, 10, 11 and 17. Indirect ELISA method was established with purified Camp protein as coating antigen and proved to have good reproducibility and specificity. The coincidence rate with ELISA of RA ultrasound lysate antigen was 77.5%. This study further validates the Camp as RA serotypes common antigen has a higher value in the diagnosis and subunit vaccine development against RA.

**Key words:** *Riemerella anatipestifer*; *camp* gene; clone and expression; ELISA

\*Corresponding author

收稿日期: 2012-10-24

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20110230); 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(201348)

作者简介: 么乃全(1980-), 男, 吉林长春人, 讲师, 主要从事动物传染病及免疫学研究。

\* 通信作者: E-mail: quankaiw@yahoo.com.cn; gaoyunhang@163.com

鸭疫里氏杆菌病是目前影响养鸭业最为严重的细菌性传染病, 在世界各养鸭地区几乎均有流行, 尤其在鸭饲养密度高的东南亚地区, 发病情况尤为严重<sup>[1]</sup>。控制该病最有效的措施是全菌体灭活油佐剂疫苗免疫预防, 对同血清型菌攻毒保护率可达 100 %<sup>[2]</sup>。但因其病原鸭疫里氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 血清型众多及血清型间缺乏交叉保护, 限制了灭活油佐剂疫苗的应用, 因此开发 RA 的亚单位疫苗成为解决此问题的关键。Camp 是一种唾液酸糖蛋白, 具有促进溶血素溶血功能的作用, 已被初步证明是 RA 可能的毒力因子, 并且在各血清型间具有很高的同源性和保守性, 在部分血清型菌株间具有反应原性<sup>[3]</sup>。为评价该蛋白用于亚单位疫苗开发及诊断的潜在价值, 本研究以吉林奥白星鸭分离鉴定的 JL-1 RA 的 DNA 为模板, 克隆 *camp* 基因并进行原核表达, 利用 western blot 进一步验证该 Camp 是众多血清型 RA 菌株共有的具有良好反应原性和免疫原性蛋白; 同时以 Camp 表达蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 检测方法, 为鸭 RA 的流行病学调查、亚单位疫苗的开发提供有效的方法和实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及血清 血清 1 型鸭 RA 分离自吉林某鸭场的法国奥白星鸭, 命名为 JL-1; 血清 1、2、11 型 RA 由南京农业大学张炜博士惠赠, 血清 10、17 型 RA 由北京农业大学苏敬良副教授惠赠; *E.coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)感受态和 pET-28a、pMD18-T 载体均由吉林农业大学传染病实验室保存; 兔抗血清 1、2、10、11、17 型 RA 全菌体阳性血清、鸭抗 RA (JL-1) 阳性血清、鸭 *E.coli*、沙门氏菌 (*Salmonella*)、巴氏杆菌 (*Pasteurellosis*) 和鸭肝炎病毒 (DHV) 阳性血清由本实验室制备; 待检血清采自吉林某鸭场; SPF 鸭血清购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 主要试剂 HRP 标记羊抗兔、鸭 HRP-IgG、DAB 显色剂购自北京鼎国生物技术有限责任公司; Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTP Mixture、*Bam*H 及 *Xho*、蛋白质 Marker 和 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 凝胶 DNA 回收、质粒小提试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司。

1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 中登录的

*camp* 基因 (AF202727) 序列使用 Primer 5.0 设计一对引物, 上游引物 P1: 5'-GCGGATCCATGAAACAATCTATT-3' (*Bam*H ), 下游引物 P2: 5'-CGCTCGAGTTACTTTACATTTA-3' (*Xho* ), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 *camp* 基因的克隆及 pET-*camp* 重组质粒的构建 以 JL-1 株 RA 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 产物经 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定。目的条带经凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收后克隆于 pMD18-T 载体中, 并通过 *Bam*H 和 *Xho* 进行双酶切亚克隆于 pET-28a 中构建重组表达质粒 pET-*camp*, 将其转化于 *E.coli* BL21 中, 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序鉴定。

1.5 Camp 重组蛋白的诱导表达及纯化 采用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 对含有阳性重组质粒和空载体质粒的 *E.coli* BL21 诱导表达 5 h, 诱导后菌体经超声裂解收集包涵体, 经处理后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 观察 Camp 蛋白表达情况。诱导表达的蛋白用电洗脱方法进行纯化, SDS-PAGE 电泳检测纯化效果, 同时测定纯化蛋白浓度。

1.6 Camp 表达蛋白的 western blot 鉴定 纯化的 Camp 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法将表达蛋白从凝胶中转印至 PVDF 膜上, 10 % 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜, 分别加入兔抗血清 1、2、10、11、17 型 RA 阳性血清, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 以羊抗兔 HRP-IgG 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, DAB 显色剂显色。

1.7 间接 ELISA 方法的建立

1.7.1 ELISA 反应体系确立 将纯化的 Camp 表达蛋白用 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释不同浓度包被酶标板, 将鸭抗 RA (JL-1) 阳性、阴性血清倍比稀释进行双方阵试验, 同时对酶标二抗的稀释度进行优化, 筛选出最佳的抗原包被浓度、血清稀释度及酶标抗体工作浓度, 确定最终的 ELSIA 反应体系。同时参照文献[4]的方法, 以 RA 菌体超声破碎抗原包被酶标板建立间接 ELISA。

1.7.2 ELISA 临界值的确定 用建立的 ELISA 方法对经试管凝集检测为阴性的 50 份血清进行检测, 计算出阴性血清平均 OD<sub>490nm</sub> 值 ( $\bar{X}$ ) 和标准差 (SD), 计算公式为  $\bar{X}+3SD$ , 得出结果即为判定血清阴、阳性的临界值。

1.7.3 间接 ELISA 方法的特异性检验 利用建立的 ELSIA 方法对鸭 *E.coli*、*Salmonella*、*Pasteurellosis*、

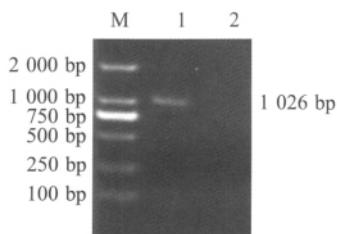
DHV、RA 的阳性血清进行检测,测得各自 OD<sub>490nm</sub> 值根据临界值判定阴、阳性,以检验 ELISA 方法的特异性。

**1.7.4 间接 ELISA 方法重复性检验** 使用同一批制备的表达抗原对筛选的阳性和阴性血清样本进行检测,每个样品设 6 个重复,分别进行板内和板间重复性试验,测得结果经 SPSS 17.0 软件分析计算板内和板间的变异系数(CV),以检验 ELISA 方法的重复性。

**1.7.5 间接 ELISA 方法临床应用及对比试验** 利用建立的 Camp-ELISA 及 RA 菌体超声破碎 ELISA 方法分别检测吉林省部分鸭场采集的 240 份鸭血清样本及 12 份 SPF 鸭血清样本,根据临界值判定结果,统计两种方法检测血清样本的阳性率,比较两种方法符合率。

## 2 结果

**2.1 camp 基因的克隆及 pET-camp 重组质粒构建** 应用设计的引物以 RA (JL-1)基因组 DNA 为模板扩增出约 1 000 bp 的目的基因片段(图 1),与预期大小相符(1 026 bp)。构建的 pET-camp 原核表达质粒经 *Bam*H、*Xho* 双酶切和 PCR 鉴定,均可见与目的基因大小一致片段,经测序表明重组质粒构建正确,并且目的基因与 GenBank 中登录的几株 RA 的 *camp* 基因序列同源性达到 99%。



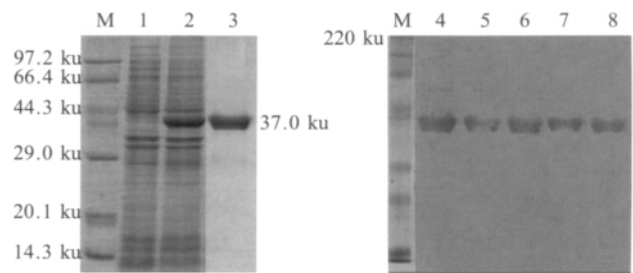
1: *Camp* gene; 2: Negative control; M: DNA Marker DL2000

图 1 *Camp* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of *camp* gene by PCR

**2.2 Camp 重组蛋白表达、纯化及 western blot 分析** pET-*camp* 重组质粒转入 *E.coli* BL21 中经 IPTG 诱导 5 h 后进行 SDS-PAGE 电泳检测,在约 37 ku 处可见一条清晰蛋白条带(图 2),与预期结果一致,表明正确表达出包涵体形式的 Camp 蛋白。以电洗脱方法纯化目的蛋白,经测定蛋白浓度为 2.5 mg/mL。同时 western blot 分析显示 Camp 蛋白与兔抗血清 1、

2、10、11 和 17 型 RA 全菌体阳性血清均发生特异性反应。



1: pET28a/BL21 induced; 2: pET-*camp*/BL21 induced;  
3: Purified protein of Camp; M: Lower molecular protein Marker;  
4: Positive serotype 1; 5: Positive serotype 2; 6: Positive serotype 10;  
7: Positive serotype 11; 8: Positive serotype 17;  
M: Golden rainbow protein standards

图 2 Camp 诱导表达、纯化及 western blot 鉴定结果

Fig.2 Expression and purification of Camp protein and western blot analysis

### 2.3 间接 ELISA 方法建立

**2.3.1 ELISA 最佳反应体系及临界值确定** 如表 1 所示,经双方阵试验确定 Camp 表达蛋白的最佳包被浓度为 10  $\mu$ g/mL,血清最佳稀释度为 1:100,尽管血清稀释度 1:50 时阳性血清 OD<sub>490nm</sub> 值最高,但阴性血清 OD<sub>490nm</sub> 也相对偏高。在固定抗原包被浓度和血清稀释倍数后确定酶标抗体工作浓度为 1:2 000 时阳性血清 OD<sub>490nm</sub> 最高,并且与阴性血清 OD<sub>490nm</sub> 差值最大。计算所检测 50 份阴性血清 OD<sub>490nm</sub> 的平均值( $\bar{X}$ )和标准差(SD)分别为 0.236 和 0.0452,经公式计算为 0.372,为所建立 ELISA 的临界值。

表 1 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数确定

Table 1 Result of optimal antigen coating concentration and serum dilution

抗原浓度 Antigen concentration ( $\mu$ g/mL)	血清稀释度 Serum dilution							
	1:50		1:100		1:200		1:400	
	+	-	+	-	+	-	+	-
2.5	0.784	0.177	0.658	0.094	0.706	0.083	0.544	0.024
5	0.803	0.156	0.694	0.136	0.581	0.103	0.478	0.102
10	1.104	0.206	1.083	0.107	0.897	0.056	0.765	0.043
20	0.985	0.230	1.045	0.167	0.901	0.100	0.741	0.035

**2.3.2 特异性试验** 通过对鸭 *E.coli*、*Salmonella*、*Pasteurellosis*、DHV、RA 的阳性血清进行检测,除 RA 为阳性外,其它几种病原阳性血清 OD<sub>490nm</sub> 值均小于 0.372(表 2),表明 Camp 蛋白与上述几种血清不发生交叉反应。

**2.3.3 重复性试验** ELISA 重复性检测结果经 SPSS 软件统计分析,表明板内和板间重复性检测的变异系数均小于 6%(表 3),表明所建立的 ELISA 检测

方法具有良好的重复性。

表 2 特异性试验结果  
Table 2 Result of specificity test

	各种病原体阳性血清 Positive serum of some pathogens				
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pasteurellosis</i>	DHV	RA
OD <sub>600nm</sub>	0.142	0.197	0.205	0.106	0.985

表 3 重复性试验结果  
Table 3 Result of repetitive test

重复性试验 Reproducibility test	n	组内重复性试验 Intra-coefficient of variation		组间重复性试验 Inter-coefficient of variation	
		$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
阳性血清 Positive samples	3	1.05±0.03	3.18	1.12±0.05	4.21
		1.07±0.04	3.99	1.20±0.05	4.183
		0.92±0.02	2.63	1.24±0.05	4.13
阴性血清 Negative samples	3	0.11±0.005	4.54	0.15±0.006	3.86
		0.08±0.002	2.87	0.13±0.007	5.16
		0.09±0.003	3.25	0.14±0.007	5.03

**2.3.4 临床检测及对比试验** 对吉林省部分鸭场采集 240 份鸭血清及 12 份 SPF 鸭血清样本进行检测, 12 份 SPF 鸭血清样本均为阴性结果。240 份鸭血清检测结果如表 4 所示, Camp 表达蛋白 ELISA 检测血清抗体阳性 86 份, 阳性率 35.8%, RA 菌体超声破碎抗原 ELISA 检测血清抗体阳性 126 份, 阳性率 52.5%。两种方法的符合率为 77.5%。

表 4 比对试验结果  
Table 4 Result of comparison test

	菌体超声破碎抗原 ELISA ELISA with ultrasonic breaking antigen			
	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	
	Camp-ELISA	72	14	86
	54	100	154	
合计 Total	126	114	240	

### 3 讨论

当前控制鸭 RA 感染主要办法是用灭活油佐剂疫苗进行免疫。郭宇飞、谢永平及胡清海等均研制了鸭 RA 多价灭活疫苗, 对同血清型菌攻击有较好的免疫保护效果<sup>[5-7]</sup>。但鸭 RA 血清型较多并且缺乏交叉保护使灭活疫苗的应用有很大局限性。因此, 开发 RA 基因工程亚单位疫苗是目前研究的重点。Crastra 等研究表明 RA 中存在一种唾液酸糖蛋白(Camp 因子), 与链球菌 Camp 因子具有相似的促进溶血素溶

血功能, 推测是 RA 的毒力因子, western blot 还证明 Camp 蛋白能够与血清 1、2、3、5、6、13、14、19 型菌株 Camp 表达蛋白抗血清发生特异性反应<sup>[3]</sup>。本研究克隆的 camp 基因与公布的 RA-GD、RA-CH-1 及 ATCC11845 等序列同源率为 99%, 表明其在 RA 菌株间具有非常高的同源性, 可以用于 RA 的鉴定。同时, western blot 分析表明该蛋白还可以与 10、11、17 型菌株全菌体阳性血清发生特异性反应, 进一步表明该蛋白是众多血清型菌所共有的, 并且具有良好的免疫原性。Jiang 等将 Camp 因子作为组分用于研制乳房链球菌疫苗并取得了成功<sup>[6]</sup>, 因此推测 RA 的 Camp 因子也可以作为亚单位疫苗组分用于该病的防控。

本研究建立的检测 Camp 的间接 ELISA 检测方法, 经验证具有良好的特异性和重复性, 与全菌体裂解抗原 ELISA 方法的符合率达到 77.5%, 但抗体阳性检出率显著低于全菌体裂解抗原 ELISA 方法。推测其原因是 Camp 作为 RA 的毒力因子, 只有活菌在感染过程中表达才能被检测到, 与方钦的研究结果具有一定的符合性<sup>[9]</sup>, 提示该 ELISA 方法可以用于 RA 血清学流行病学调查, 也为深入研究 Camp 提供了依据。

### 参考文献:

- Teo T P, Tan H C, Loh H. Protective efficacy of a bivalent *Pasteurella anatipestifer* broth-grown bacteria in ducklings [J]. Singapore J Pri Ind, 1992, 20: 53-60.
- 王小兰, 胡青海. 血清 1 型鸭疫里氏杆菌灭活油乳剂疫苗的研制[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(4): 313-316.
- Crastra K C, Chua K L. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *riemerella anatipestifer* [J]. J Bacteriol, 2002, 184(7): 1932-1939.
- 程龙飞, 施少华. 2 型鸭疫里氏杆菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. 福建农业学报, 2006, 21(2): 131-134.
- 郭宇飞, 程安春, 汪铭书, 等. 鸭疫里氏杆菌病四价灭活疫苗的研究[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 3-10.
- 谢永平, 陈泽祥, 许力干, 等. 鸭疫里氏杆菌油乳剂三价灭活疫苗的研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 45-48.
- 胡清海, 刘晓文, 赵世华, 等. 鸭疫里氏杆菌病三价油乳剂灭活疫苗的研究[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(7): 6-9.
- Jiang M, Potter A A, MacLachlan P R. Camp factor of *streptococcus uberis* [P]. US, 5863543, 1999, 1.
- 方钦. 间接 ELISA 方法检测鸭疫里氏杆菌抗体方法的建立及应用[D]. 重庆: 西南大学, 2007, 6.

(本文编辑: 李 爽)