

重组钩端螺旋体外膜蛋白酶联免疫吸附 (ELISA) 检测方法的建立

范薇¹, 于长明², 杨敬¹, 隋丽华¹, 战大伟¹, 贺争鸣³, 孙岩松¹

1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071;
3. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立以重组外膜蛋白为基础的钩端螺旋体抗体间接 ELISA 检测方法。方法 以基因重组技术获取重组钩端螺旋体外膜蛋白 LipL32, 以该蛋白为抗原, 特异的钩体抗血清进行 ELISA 方阵滴定、交叉性试验、阻断试验, 并对北京地区的 70 份犬血清使用建立的 ELISA 方法以及德国 Virion 公司的全菌体钩端螺旋体 ELISA 试剂盒进行相互验证。结果 方阵滴定试验确立以 100 ng/孔为抗原包被浓度, 1:160 为血清稀释度。交叉性试验具有广泛性、阻断试验表明该方法特异性强、灵敏度高。两种方法数据经 χ^2 检验, 两者检出率之间差异不显著。结论 重组 LipL32 蛋白具有结合活性。初步建立了以重组 LipL32 蛋白为抗原的钩端螺旋体抗体间接 ELISA 检测方法。

【关键词】 钩端螺旋体病; 细菌外膜蛋白类; 酶联免疫吸附测定

【中图分类号】 R377⁺. 5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2005)04-0249-04

Establishment of Recombinant Leptospiral Outer Membrane Protein LipL32-based Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

FAN Wei¹, YU Chang-ming², YANG Jing¹, SUI Li-hua¹, ZHAN Da-wei¹, HE Zheng-ming³, SUN Yan-song¹

1. Laboratory Animal Centre, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
3. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To establish the recombinant protein LipL32-based indirect enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). **Methods** Recombinant leptospiral outer membrane protein LipL32 was obtained by genetic engineering method. Purified recombinant LipL32 and anti-*Leptospira* sera were used to make ELISA, chessboard titration crossing test and interdiction test then performed. SERION ELISA classic *Leptospira* IgG-Kit from Virion Corporation, Germany, was used to validate the recombinant Protein LipL32-based ELISA method. 70 sera samples collected from Beijing area were assayed using this established method. **Results** Data of chessboard titration showed that the fitful concentration of antigen is 100 ng per well, and of serum, is 1:160. Results of crossing test and interdiction test demonstrated specificity and sensitivity of the method. Statistical data showed that there was no significant difference between two detection systems. **Conclusion** The recombinant protein LipL32 has high immunoreactivity. The recombinant protein-based indirect ELISA method has been established.

【Key words】 *Leptospirosis*; Bacterial outer membrane protein; Enzyme-linked immunosorbent assays

钩端螺旋体(钩体)病是由致病性钩体引起的一种分布广泛的人兽共患病,人类通过接触带菌动物尿液污染的物品、水体等而感染。钩体病的临床症状轻重不一,有的只是隐性感染,严重者可出现黄

疸,出血和肾衰竭等,愈后不良。动物中,犬钩端螺旋体的感染率较高,大多呈隐性感染,但钩体在肾脏中长期存在,持续随尿液向外排菌。由于钩端螺旋体对人的强致病性,以及由动物传播给人引起的严重公共卫生问题,快速准确地进行钩端螺旋体病的诊断,显得尤为重要。

目前钩体的标准检测方法为显微凝集法和全菌体 ELISA 方法,因其需要各种血清型的钩体活菌,只

[基金项目] 国家科技部基础性工作专项重点项目[编号:2002-DEA-2002(3)]。

[作者简介] 范薇(1973-)女,硕士,助理研究员,分题负责人。目前从事实验动物微生物研究。E-mail:rosefanwei@hotmail.com

能在极少数的专业实验室进行。培养活菌的安全性差问题以及各批次间抗原均一性不好的问题促使研究者寻找更好的方法来检测钩体感染。以重组抗原为基础的检测方法近年来发展迅速,若将其应用到钩体的检测中有可能建立一种简便特异的方法。

钩端螺旋体外膜蛋白 LipL32 在各种钩体中高度保守,基因同源性在 93.5% ~ 99.6% 之间,若以重组 LipL32 蛋白作为检测抗原,既可检出不同血清型钩体感染产生的抗体,又可避免经典方法固有的缺陷。

本研究对钩体 LipL32 蛋白的基因片段在大肠埃希菌中进行了表达和重组蛋白的纯化,初步建立了以重组 LipL32 蛋白为抗原的间接 ELISA 检测方法,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

钩端螺旋体黄疸出血群赖型 56601,犬群犬型 56603,波摩那群型 56608,来自中国医学细菌保藏管理中心。

E. coli. DH-5 α 由本室保存, pGEM-T 克隆载体为 Promega 公司产品, pQE32 表达载体, *E. coli*. M15 受体菌为 Qiagen 公司产品。

羊抗犬 IgG-HRP 为 SIGMA 公司产品。

1.2 实验动物、免疫程序及血清样本

普通级雄性未免疫健康比格犬 3 只(合格证号: SCXK-(军) 2002-001 号),将 10 亿/ml 浓度钩体灭活菌液分别以 0.5、1.0 和 1.0 ml 剂量三次股内侧皮下多点注射,每次间隔 14 d,末次注射后 10 d 试血,若效价不高,再用 1.0 ml 剂量加强。第一次注射用菌液与福氏完全佐剂 1:1 混合制成的乳剂菌液混合注射,第二次注射用菌液与福氏不完全佐剂 1:1 混合注射,以后的注射不加佐剂。

免疫阳性血清由中国药品生物制品检定所钩端螺旋体研究室采用显微凝集法(MAT)进行标化,凝集效价 1:1280。

血清样本来自北京地区各实验犬生产单位。

1.3 重组钩端螺旋体外膜蛋白 ELISA 抗原制备

采用 PCR 方法从钩端螺旋体 DNA 中获取编码 LipL32 的基因片段约 750 bp,构建重组克隆载体 pGEM-T/L32 和表达载体 L32-pQE32,分别转化受体菌 *E. coli*. DH-5 α 和 *E. coli*. M15, IPTG 诱导表达重组 LipL32 蛋白。大量培养阳性基因工程菌;经离心

收集菌体,超声裂解后, SDS-PAGE 电泳显示: LipL32 蛋白主要以包涵体形式表达;将包涵体溶解后进行 Ni-NTA 亲和层析纯化和在位复性重组蛋白。将纯化的蛋白加入 0.03% 硫柳汞备用。

1.4 方阵滴定试验

用 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲包被液稀释已纯化的蛋白,进行方阵滴定试验,将纯化的蛋白按 800、400、200、100、50 ng/孔分别加入到酶标板的第 1 至 5 列,第 6 列加相同量的包被液,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;次日以含 0.5% 牛血清白蛋白的 PBST 37 $^{\circ}$ C 湿盒封闭 1 h, PBST 洗涤扣干,将阳性血清 P1 以 PBST 作 1:20、1:40、1:80、1:160 稀释加入到酶标板的第 1、3、5、7 行,阴性血清 N1 同样稀释后加入到酶标板的第 2、4、6、8 行,第 6 列不加血清,加入等量 PBST, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min⁻¹ h, PBST 洗涤,加入 1:20 000 稀释的羊抗犬 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 1 h, PBST 洗涤, TMB 显色 10 min, 2 mol/L 硫酸中止反应,测定 A₄₅₀ 值。

1.5 羊抗犬 IgG-HRP 最佳工作浓度测定

确定最佳抗原包被浓度后,以相应浓度包被酶标板,以阳性血清 P1 测定羊抗犬 IgG-HRP 最佳工作浓度。

1.6 交叉性试验

按间接 ELISA 操作步骤,以 3 份阳性血清做交叉试验,测定 A₄₅₀ 值。

1.7 阻断试验

将 1:80 稀释的阳性血清 P1、P2、P3 与 10 倍抗原包被浓度的抗原等量混合, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min ~ 1 h,取作用后液体按间接 ELISA 操作步骤,测定 A₄₅₀ 值。同时取未处理的 1:160 稀释的阳性血清 P1、P2、P3 按间接 ELISA 操作步骤,测定 A₄₅₀ 值。根据测得的 A₄₅₀ 值,计算阻断率。阻断率大于 50% 判为阳性。阻断率按如下公式计算:

$$\text{阻断率} = \frac{\text{阻断前 } A_{450} \text{ 值} - \text{阻断后 } A_{450} \text{ 值}}{\text{阻断前 } A_{450} \text{ 值}}$$

1.8 方法验证

采用德国 Virion 公司的全菌体钩端螺旋体 ELISA 试剂盒 (SERION ELISA classic Leptospira IgG-Kit) 确证。

2 结果

2.1 方阵滴定实验结果

抗原包被浓度以 100 ng/孔,血清稀释度以 1:160 较为合适。见图 1。

2.2 酶标抗体稀释度确定

按照羊抗犬 IgG-HRP 说明书, 对该抗体做

1:20 000、1:30 000、1:40 000 稀释, 结果确定, 以 1:20 000 作为酶标抗体的最适工作浓度。见图 2。

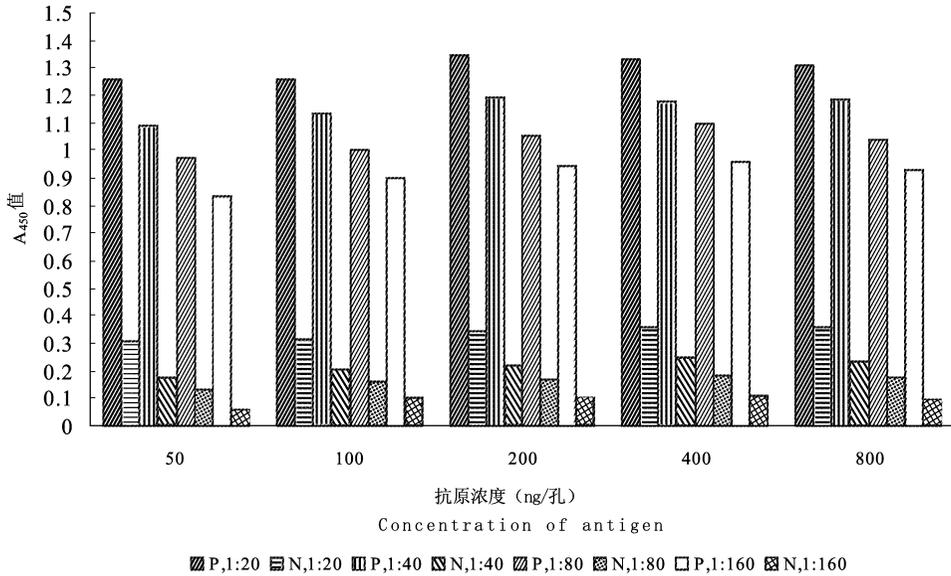


图 1 方阵滴定

Fig. 1 Chessboard titration

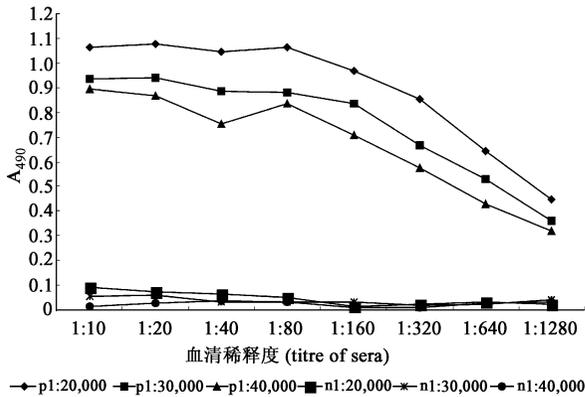


图 2 酶标抗体浓度测定(抗原浓度: 100 ng/孔)

Fig. 2 Selection of concentration of sheep anti-dog IgG-HRP. Concentration of antigen: 100 ng/well

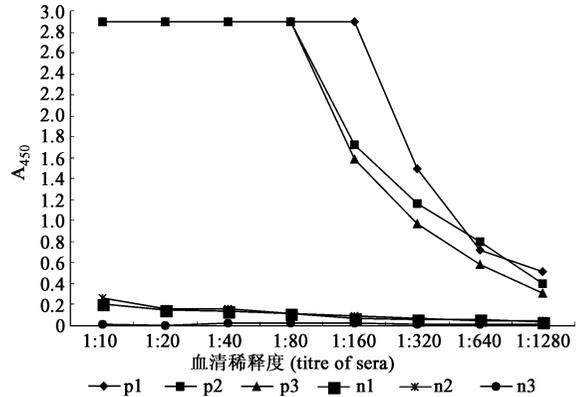


图 3 交叉试验, 抗原浓度: 100 ng/孔

Fig. 3 Crossing test. Concentration of antigen: 100 ng/well

2.3 交叉性试验

对 3 份不同血清型的钩端螺旋体阳性血清, 以及 3 份阴性血清进行测定, 发现重组 LipL32 蛋白对不同血清型的钩端螺旋体感染产生的抗体具有较好的检出效果。对阴性血清均不发生反应。见图 3。

2.4 阻断试验

阳性血清与重组 LipL32 蛋白作用后进行测定, 其 A₄₅₀ 值显著降低, 3 份血清的阻断率均在 80% 以上, 说明阻断阳性, 该法具有较好的特异性。见表 1。

表 1 阻断试验

Tab. 1 Interdiction test

样品编号 Sample No.	阻断前 A 值 Value A before interdiction	阻断后 A 值 Value A after interdiction	阻断率(%) Interdiction rate
P1	2.112	0.148	92.9
P2	1.728	0.207	88.0
P3	1.581	0.257	83.7

2.5 方法的验证

对北京地区的 70 份犬血清使用建立的 ELISA 方法以及德国 Virion 公司的全菌体钩端螺旋体

ELISA 试剂盒进行测定钩端螺旋体 IgG 抗体, 效价大于 1:160 判为阳性。结果发现德国试剂盒检出 58 份阳性, 12 份阴性, 自制试剂盒检出 57 份阳性, 13 份阴性, 两种试剂盒结果完全吻合的为阳性 56 份, 阴性 11 份。对检测结果使用 SPSS 软件进行 χ^2 检验, 结果表明, $P=1.001$, $P>0.05$ 。两者之间检出率差异不显著。

3 讨论

LipL32 的结构基因由 816 bp 核苷酸组成, 编码 272 个氨基酸, 相对分子质量为 32×10^3 , 其中包含由 19 个氨基酸组成的脂蛋白信号肽及其切割位点, 经剪切后成为相对分子质量大小为 27.6×10^3 的成熟功能蛋白^[1,2]。目前已测序并公布的几种钩体的 LipL32 基因序列都高度保守, 同源性的 93.5%~99.6%。资料显示, LipL32 是钩体中保守的抗原成分, 也是其中含量最多的蛋白, 可刺激机体产生中和抗体, 引起完全的免疫应答, 它只存在于致病性钩体中, 而在非致病性钩体中未发现^[3]。通过对三株钩体的 LipL32 基因序列测定发现, 其同源性较高, 只有个别碱基出现差异, 但其氨基酸序列完全一致, 说明不同血清型钩体的 LipL32 蛋白是高度保守的。这为我们构建表达重组 LipL32 蛋白作为检测抗原, 检出不同血清型钩体感染产生的抗体提供了较好的实验依据。

在实验动物质量国家标准中, 规定了犬钩端螺旋体的检测方法为显微凝集法 (MAT) 和全菌体的 ELISA 方法。显微凝集法以及经典的 ELISA 方法都需要培养各种血清群、型的钩体活菌, 培养时间长、操作繁琐, 安全性差, 需要在专业的实验室进行、有经验的工作人员来实施; 而显微凝集法结果判断也容易受到多种因素的影响, 各批次间的抗原的均一性较差, 也不利于标准化操作; 全菌体抗原的 ELISA 方法因为其特异性和敏感性较差, 目前尚未完全推广应用^[4]。

以重组蛋白为基础的血清学检测方法, 其特异性和敏感性更高, 因为所使用的抗原是滴度更高的具有免疫反应性的抗原, 摒弃了全菌体抗原中非特异性的部分。一个理想的抗原应该是引起免疫应答的主要成分, 只在致病性钩体中出现, 且在导致疾病的 200 多种血清型中高度保守, 本研究重组表达的 LipL32 蛋白, 正是符合了这些特性^[5]。试验结果也证实了这一论点, 来自不同血清群和血清型的抗血清能与重组蛋白进行特异接合。本研究建立的重组蛋白间接 ELISA 检测方法, 由于重组抗原特异性强, 可以准确定量, 各批次间试剂的均一性好; 结果可通过酶标仪测定出具体的数值, 因而结果的判定更加客观准确。

经全菌体 ELISA 实验验证, 本研究建立的重组蛋白间接 ELISA 检测方法与其在检出率上差异不显著; 同时交叉性实验和阻断性实验表明了它的广泛性和特异性, 显示了该方法较好的应用前景。但由于检测的样本数相对偏少, 区域性较强, 此结论有待更多的血清样本以及自然感染血清的验证。

参 考 文 献

- [1] Haake DA, Matsunaga J. Characterization of leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins [J]. *Infect Immunol*, 2002, 70(9):4936-4945.
- [2] Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, et al. Global analysis of outer membrane protein from *Leptospira interrogans* serovar Lai [J]. *Infect Immunol*, 2002, 70(5):2311-2318.
- [3] Haake DA, Chao G, Ziemer RL, et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection [J]. *Infect Immunol*, 2000, 68(4):2276-2285.
- [4] 于恩庶, 罗海波, 鲍行豪, 等. 钩端螺旋体病学 [M], 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1992, 153-248.
- [5] Flannery B, Costa D, Carvalho FP, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9):3303-3310.

[收稿日期] 2004-02-25