

禽波氏杆菌外膜蛋白的提取及其免疫原性的检测

胡晓娜, 朱瑞良*, 刘红珍, 毕建敏

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要: 为研究禽波氏杆菌 OMP 的免疫原性, 试验采用超声波破碎、TritonX-100 处理技术提取了禽波氏杆菌 OMP, 采用 Bradford 方法测定禽波氏杆菌 OMP 含量, 进行了 SDS-PAGE 检测, 然后制备油乳剂 OMP 免疫抗原, 对 1 日龄雏鸡分别以 0.3mL(OMP90 μ g)、0.5mL(OMP150 μ g)、0.8mL(OMP240 μ g) 的剂量颈部皮下接种。结果: 禽波氏杆菌 OMP 含量为 300 μ g/mL, 禽波氏杆菌 OMP 最佳免疫剂量为 0.5mL/只, 通过免疫抗体与攻毒保护相关性测试, 抗体效价在 1:2⁸ 以上能抵抗致死量禽波氏杆菌的攻击。据间接 ELISA 法检测的抗体水平可知, 抗体的持续时间足以保护雏鸡避过易感日龄, 试验发现 OMP 具有良好的免疫原性。本试验结果将为禽波氏杆菌 OMP 单克隆抗体的制备、快速诊断试剂盒的研制、亚单位疫苗的开发奠定良好的基础。

关键词: 禽波氏杆菌; 外膜蛋白; 提取; ELISA; 免疫原性

中图分类号: Q939.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)04-0714-04

禽波氏杆菌病是由禽波氏杆菌(*Bordetella avium*)引起家禽的一种高度接触性传染病。1967 年 Filion 等^[1]首次报道在加拿大发生由波氏杆菌属细菌引起的火鸡鼻炎。1984 年, Kersters^[2]对该病原进行了系统的研究, 认为该菌是波氏杆菌属的一个新种, 并定名为禽波氏杆菌。我国最早是由朱瑞良等在 1990 年初发现的, 该病主要引起鸡胚死亡、孵化率降低和雏鸡急性死亡及成年鸡的眼炎等^[3,4]。据报道^[5-7]该病在不同地区的感染率为 10% ~ 50%, 患病鸡群生长迟缓, 饲料报酬低, 给养鸡业造成了较大的经济损失。

近年来, 细菌细胞膜中的一种重要组成成分外膜蛋白(outer-membrane-protein, OMP)的免疫作用越来越受到科技人员的关注。实验证明, OMP 具有良好的免疫原性, 不仅可刺激体液免疫, 而且也可刺激细胞免疫作用^[8]。尽管本课题组曾经研究过禽波氏杆菌全菌苗的免疫效果^[9], 但由于全菌中与免疫无关的成分太多, 可能影响主要免疫物质的免疫作用, 所以我们进行了禽波氏杆菌 OMP 的提取工艺及其免疫原性的研究, 试验证实 OMP 具有良好的免疫原性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物: 1 日龄健康海兰褐雏鸡, 由潍坊显合种鸡场提供; 经检测无禽波氏杆菌母源抗体; 1 月龄健康家兔, 由山东农业大学畜牧工程中心提供。

1.1.2 实验菌株: 禽波氏杆菌 P5 株(从山鸡体内分离)、P8 株(从鸡体内分离), 为本校预防兽医学教研室分离并鉴定的菌株。禽波氏杆菌 P5 株的 LD₅₀ 为 1.324 × 10⁴ CFU/mL, P8 株

的 LD₅₀ 为 1.458 × 10⁴ CFU/mL。

1.1.3 培养基: 普通营养肉汤、鲜血琼脂、厌氧肝汤、SS 琼脂、LB 肉汤等按常规方法制备。

1.1.4 主要试剂和仪器: 十二烷基肌氨酸(Sarkosyl), Sigma 公司生产; N-二羟乙基哌嗪-N-Z-乙磺酸(HEPES), DNN 公司生产; 白油、Span-80、Tween-80、硬脂酸铝, 购自天津大学实验化工厂。电泳所用试剂: 30% Acr.-Bis; 1mol/LpH8.8 Tris-HCl 缓冲液; 1mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液; 10% SDS; 10% 过硫酸铵; TEMED; 电极缓冲液(pH8.3); 2 × 样品稀释液; 考马斯亮蓝 R-250 染色液; 考马斯亮蓝染色脱色液。兔抗鸡酶标抗体: Promega 公司产品。可见分光光度计; 旋涡混合器; 北京六一仪器厂的 DYY-6C 电泳仪; NichipetEX 系列移液器; SANYO 公司的标准型单人超净工作台; 美国 Bio-Rad 公司的酶标仪。

1.2 禽波氏杆菌 OMP 提取流程^[10]

采用超声波破碎条件(功率为 500W、破碎时间 60s、间隔 60s、反复破碎 10 次), 其他步骤同参考文献, 经过透析处理后, 分装, 置-20℃备用^[11]。

1.3 禽波氏杆菌 OMP 蛋白含量测定

采用文献^[12]的标准方法, 用标准蛋白质量(mg)为横坐标, 用吸光度值 A595 为纵坐标, 作图, 得到一条标准曲线。由此标准曲线, 测出样品的蛋白质含量。

1.4 禽波氏杆菌 SDS-PAGE 电泳检测

参照 Lameli 方法^[13], 解离非连续缓冲系统垂直平板电泳。丙烯酰胺浓度: 分离胶 12%、浓缩胶 5%, 含 SDS 的聚丙烯酰胺, 电泳结束, 采用考马斯亮蓝 R250 染色, 以标准低

基金项目: 国家自然科学基金(30670114); 山东省自然科学基金(Y2006D09)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-538-8242341 E-mail zhurl@sdau.edu.cn

作者简介: 胡晓娜(1981-), 女, 山东乳山市人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物与免疫学专业的研究。E-mail: xiaonahu2000@163.com

其他作者: 王伟, 李新苍

收稿日期: 2006-12-22 接收日期: 2007-02-02 修回日期: 2007-05-23

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

蛋白分子量的对数值和电泳迁移率绘制标准曲线,求出各蛋白分子量。

1.5 兔抗禽波氏杆菌 OMP 免疫血清的制备

用禽波氏杆菌 P5、P8 株 OMP(1:1)制备混合抗原,选体重 1.5~2.0kg 的健康家兔 6 只,用加油乳佐剂的禽波氏杆菌 OMP 抗原进行免疫(颈背部皮下注射)3 次,每次间隔 1 周,免疫剂量为 50 μ gOMP/只/次,第 4 次用禽波氏杆菌 18h 肉汤培养物强化免疫 1mL/只(3.5 \times 10¹⁰CFU/mL),在最后 1 次免疫后 7d 试血,待兔血清凝集价 1:64 以上时心脏采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 禽波氏杆菌 OMP 免疫保护效力的检测

1.6.1 OMP 对雏鸡的免疫试验:对 1 日龄雏鸡分别按 0.3mL/只(免疫组 a)、0.5mL/只(免疫组 b)、0.8mL/只(免疫组 c)颈部皮下接种 OMP 免疫抗原,另设对照组(用常规菌体苗 0.5mL/只免疫),每组 20 只。

1.6.2 OMP 免疫鸡血清抗体的 ELISA 检测:所有免疫组于免疫后 3、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77d 采血、分离血清,用间接 ELISA 法测定血清中的中和抗体效价,然后计算中和抗体的几何平均数(GMT),研究抗体消长规律。

1.6.3 间接 ELISA 反应条件的优化:用提纯的禽波氏杆菌 OMP 包被 ELISA 板,采用方阵滴定法,确定最佳抗原包被浓度与血清稀释度,用测得的最适浓度抗原包被酶标板,确定最佳酶标抗体稀释浓度。

1.7 ELISA 抗体效价与免疫保护相关性试验

根据抗体检测结果,将不同抗体水平的试验鸡分成不同组,每组选取 8 只,分别用 10⁴ 个 LD₅₀(约 10⁸ 个菌)禽波氏杆菌混合株攻毒。隔离观察,以雏鸡死亡数为标准,统计保护率,对死亡雏鸡剖检,观察病理变化,并从肝、脾中分离细菌。

2 结果

2.1 禽波氏杆菌 OMP 含量

经 Bradford 方法测定禽波氏杆菌 OMP 含量为 300 μ g/mL。

2.2 禽波氏杆菌 OMP 的 SDS-PAGE

SDS-PAGE 电泳结果表明(图 1)P5 株、P8 株均含有相对分子量为 5.8 \times 10⁴、4.7 \times 10⁴、4.1 \times 10⁴ 的 3 条蛋白主带,P8

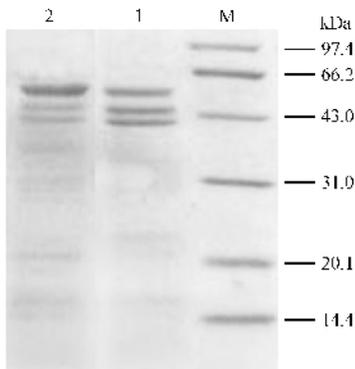


图 1 禽波氏杆菌 OMP 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE of the outer membrane protein of *Bordetella avium*. M (marker); 1: P5 strain; 2: P8 strain

株相对于 P5 株 4.7 \times 10⁴、4.1 \times 10⁴ 2 条蛋白主带颜色深浅有差异,P5 株还有 3.6 \times 10⁴、2.4 \times 10⁴ 蛋白带,P8 株还有 3.8 \times 10⁴、2.1 \times 10⁴、1.6 \times 10⁴ 蛋白带。但这些可能都是 OMP 中主要免疫保护性抗原,有必要分别纯化,并深入研究其诱发保护性免疫的能力^[14,15]。

2.3 禽波氏杆菌 OMP 免疫保护效力的检测

2.3.1 间接 ELISA 法检测抗体效价 间接 ELISA 试验的最佳反应条件:禽波氏杆菌 OMP 抗原的最佳稀释度为 1:20(此时蛋白浓度为 15 μ g/mL),血清最佳稀释度为 1:50,酶标抗体稀释度为 1:4000,抗原进行 4 $^{\circ}$ C、24h 包被,37 $^{\circ}$ C、3h 封闭。

间接 ELISA 试验临界值:15 份禽波氏杆菌阴性血清 OD₄₅₀ 平均值在 0.108 左右,标准方差(s)为 0.024,临界值=阴性血清平均 OD₄₅₀ + 3 \times 标准方差(s),最终确定为 0.180。因此,确定血清样品的 P/N \geq 2.1,且 OD \geq 0.180 即可判为阳性。以 OD 值大于阴性血清临界值的最大稀释倍数作为该血清的 ELISA 效价(表 1)并根据抗体效价作免疫禽波氏杆菌 OMP 油佐剂抗原后的中和抗体消长曲线(图 2)。

表 1 试验鸡免疫禽波氏杆菌 OMP 后的血清抗体滴度 $\bar{X} \pm S$ (随机抽取 8 只)

Table 1 Serum neutralizing antibody titer of chicken after immunization with the OMP of *Bordetella avium*

Antibody titer(log ₂) of chickens on different days after immunization	Group			
	a	b	c	Control
3d	3 \pm 0.58	3.5 \pm 0.75	3 \pm 0.65	1 \pm 0.63
7d	4 \pm 0.49	4 \pm 0.68	4 \pm 0.67	1.5 \pm 0.54
14d	5 \pm 0.23	5 \pm 0.52	4.6 \pm 0.56	2 \pm 0.49
21d	6.5 \pm 0.53	7 \pm 0.48	6 \pm 0.32	3 \pm 0.63
28d	8 \pm 0.49	10 \pm 0.38	9.5 \pm 0.68	3.8 \pm 0.71
35d	9 \pm 0.53	12 \pm 0.55	11 \pm 0.23	4.5 \pm 0.68
42d	8.5 \pm 0.36	12.5 \pm 0.64	12 \pm 0.43	5 \pm 0.58
49d	7.5 \pm 0.43	11 \pm 0.78	11.5 \pm 0.74	4 \pm 0.45
56d	6.5 \pm 0.85	9.5 \pm 0.61	10 \pm 0.81	3.2 \pm 0.53
63d	5.5 \pm 0.54	8 \pm 0.67	8.6 \pm 0.46	3 \pm 0.49
70d	5 \pm 0.66	6.5 \pm 0.36	7.2 \pm 0.52	2 \pm 0.58
77d	3.2 \pm 0.47	4.8 \pm 0.82	5.2 \pm 0.71	1.6 \pm 0.67

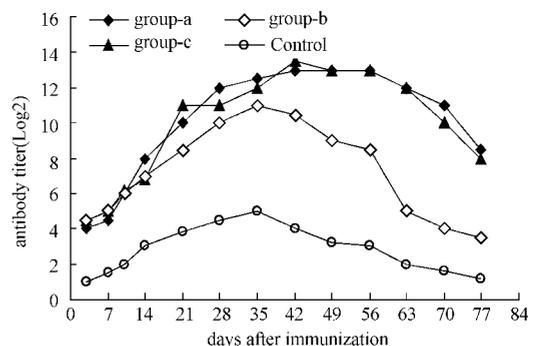


图 2 免疫禽波氏杆菌外膜蛋白佐剂抗原后中和抗体消长曲线

Fig.2 The growth curve of neutralizing antibody titer after immunization.

2.3.2 禽波氏杆菌 OMP 免疫保护抗体临界点的确定 间接 ELISA 法检测效价为 $1:2^8 \sim 1:2^{12}$ 的雏鸡,用禽波氏杆菌攻毒后 72h 均 100% 健康存活,效价为 $1:2^6 \sim 1:2^7$ 的雏鸡攻毒 72h 后,各有死亡,保护率分别为 37.5% 和 75%。而效价在 $1:2^5$ 以下的免疫雏鸡攻毒后 72h 内均死亡,表明 ELISA 效价与抗强毒保护呈正相关。死亡雏鸡剖检均为败血症变化,且内脏均分离到攻毒菌,对照雏鸡全部死亡。攻毒后发病雏鸡的主要病变为腹部皮下紫红色,皮下胶冻样浸润,肝脏边缘白色有坏死灶,肺有出血点,肌胃肌肉萎缩、坏死,腺胃肌胃交界处有出血点,上段、中段肠道轻微出血,盲肠出血严重,呈紫黑色、膨大如香肠样,内有栓塞,盲肠粘膜脱落,肾有出血点。

3 讨论

国外对于火鸡波氏杆菌病疫苗的研究较多,目前用于预防火鸡波氏杆菌病的疫苗包括温度敏感株和全细胞菌素,一些研究表明,对于一日龄火鸡用温度敏感株免疫后,不能防止感染和发病^[16,17]。国外仅对火鸡波氏杆菌病疫苗防治进行了研究,国内王玉燕等(1999)用禽波氏杆菌峰胶苗免疫一日龄雏鸡,两周后进行攻毒,结果表明疫苗的免疫效果不理想。

OMP 有多种提取方法。张晓华等^[18]认为不同研究者得到的同一种细菌 OMP 的 SDS-PAGE 图谱之所以有所不同,与细菌的培养条件、OMP 的制备方法以及菌株的不同有关。不同研究者制备的 OMP 其免疫效果也不同。

OMP 免疫保护效力的检测结果显示接种 0.5mL (150 μ gOMP) 的 b 组、0.8mL (240 μ gOMP) 的 c 组能激发明显免疫应答,持续产生高滴度体液抗体,能有效地抵抗相应强毒的攻击,接种 0.3mL (90 μ g OMP) 的 a 组也产生免疫应答,但产生的抗体滴度偏低,只能部分抵抗相应强毒的攻击。分析其原因可能是 a 组接种的量太小,OMP 含量太少,不能产生足够的免疫力, b 组和 c 组雏鸡产生的免疫保护力相当(差异不显著),可以确定 0.5mL 油乳剂型 OMP 为最佳免疫剂量。

攻毒试验结果表明禽波氏杆菌混合株的免疫保护与 ELISA 血清抗体效价呈正相关,血清效价在 $1:2^8$ 以上时才能保证免疫效果,此数值可作为禽波氏杆菌 OMP 的免疫保护临界值,用来评价该免疫原的免疫效果。

关于免疫鸡抗体的测定,从图 2 可以看出,3 组产生的抗体水平高低不同,但抗体的消长规律基本一致,以免疫组 b 和 c 产生的抗体水平较高,维持时间最长,0.5mL 的 OMP 免疫原(约含 150 μ g 的 OMP)为最佳免疫剂量。在雏鸡免疫禽波氏杆菌 OMP 油乳剂抗原后第 7 天开始,抗体水平开始逐渐上升,在免疫后第 28 天达到最高水平并持续 4 周的时间,然后逐渐下降,第 77 天的抗体水平与免疫后第 14 天的抗体水平相当。鉴于禽波氏杆菌只感染 1 月龄以内的雏鸡,此抗体持续时间已经足够避开雏鸡的易感日龄,可以广泛应用于早期免疫,避免雏鸡发病带来的严重经济损失。

本试验采用超声波破碎和 TritonX-100 处理技术提取的禽波氏杆菌 P5、P8 株 OMP,以 1:1 的含量比制成油乳剂型 OMP 抗原,试验发现 OMP 具有良好的免疫原性。本试验结果将为禽波氏杆菌 OMP 单克隆抗体的制备、快速诊断试剂盒的研制、亚单位疫苗的开发奠定良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Filion PR, S Cloutier, ER Vrancken, et al. Infection respiratoire due au *Bordetella bronchiseptica* cause par un microde apparente au *Bordetella bronchiseptica*. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1967, (31): 129-134.
- [2] Kersters K, Hinz KH, Hertle A, Segers P. *Bordetella avium* sp. nov. isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bacteriol*, 1984, 34: 56-70.
- [3] 朱瑞良,张绍学,唐珂心. 鸡波氏杆菌病的研究初报. 山东农业大学学报, 1991, 22(1): 92-94.
- [4] 朱瑞良,牛钟相,张绍学,等. 病鸡眼中禽波氏杆菌德分离与鉴定. 中国兽医科技, 1994, 24(4): 302-306.
- [5] 张绍学,朱瑞良,唐珂心,等. 鸡波氏杆菌病的流行病学调查. 中国畜禽传染病, 1992, (2): 25-26.
- [6] 庄国宏,朱国强,周继红,等. 禽波氏杆菌病原性的研究. 中国畜禽传染病, 1998, (2): 71-75.
- [7] 朱瑞良,万连英,李洁珍,等. 广东省鸡波氏杆菌病血清学调查. 吉林畜牧兽医, 1994, (5): 39-40.
- [8] 赵香汝,杨汉春. 细菌外膜蛋白的研究现状. 中国兽医杂志, 1997, 12(23): 41-42.
- [9] 王玉燕,朱瑞良. 禽波氏杆菌病原性研究及防治初探. 中国预防兽医学报, 2001, 23: 117-120.
- [10] Kapur V, White DG, Wilson RA, et al. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O₂ and O₇₈ strains that cause avian septicemia. *Infection and Immunity*, 1992, 60(4): 1687-1691.
- [11] Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, et al. Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Micro*, 1998, 36: 1347-1351.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [13] Lameli UK. *Nature*, 1970, 227: 680.
- [14] 廖立新,赵英,李国辉,等. 革兰氏阴性杆菌的敏感性分析. 江西医学院学报, 2001, 41: 117-118.
- [15] 廖立新,曹郁生,李国辉,等. 一种快速粗提绿脓杆菌外膜蛋白的方法. 江西医学院学报, 2003, 42: 60-61.
- [16] Jackwood MW, Saif YM. Efficacy of a commercial turkey coryza vaccine in turkey poults. *Avian Dis*, 1985, 29: 1130-1139.
- [17] Hofstad MS, Jeska EL. Immune response of poults following intranasal inoculation with Artvax vaccine and a formalin inactivated *Bordetella avium* bacterin. *Avian Dis*, 1986, 29: 746-754.
- [18] 张晓华, Robertson P, Austin B, 等. 弧菌标准菌株外膜蛋白的比较研究. 微生物学报, 1997, 37: 449-454.

Study on extraction and antigenicity of the outer-membrane-protein of *Bordetella avium*

HU Xiao-na , ZHU Rui-liang* , LIU Hong-zhen , BI Jian-min

(College of Animal Science and Veterinary Medicine of Shandong Agricultural University , Tai'an 271018 , China)

Abstract :To study the immunogenicity of *Bordetella avium* OMP , ultrasonic dispersion、TritonX-100 technique were used to extract *Bordetella avium* OMP. Its content was determined by Bradford method and it was detected by SDS-PAGE. Then OMP immunizing antigen was prepared and 1-day chicken was vaccinated by hypodermic inoculation , with the immunizing does of 0.3mL(OMP90 μ g) , 0.5mL(OMP150 μ g) , 0.8mL(OMP240 μ g) , respectively.

Results showed that content of *Bordetella avium* OMP is 300 g/mL , the best immunizing does is 0.5mL each one and Chickens can be protected against *Bordetella avium* at fetal dose if antibody titer is over $1:2^8$. We can see from the antibody level detected by indirect ELISA that antibody can last long enough to help chickens pass susceptible period , so OMP has good immunogenicity. Results of this study lay good foundation for the development of monoclonal antibody to OMP , rapid diagnosis kit and subunit vaccine.

Keywords : *Bordetella avium* ; outer membrane protein ; extraction and purification ; ELISA ; antigenicity

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(30670114) ; Natural Science Foundation of Shandong Province(Y2006D09)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-538-8242341 ; E-mail : zhurl@sdau.edu.cn

Other authors : WANG Wei , LI Xin-cang

Received 22 December 2006/Accepted 2 February 2007/Revised : 23 May 2007 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>