

猪源 ST11 型艰难梭菌 TcdB 毒素受体结合域双抗体夹心 ELISA 的建立

梁伟^{1#}, 全柯吉^{1#}, 赵勤^{1,2,3}, 武耀民¹, 穆瑜¹, 曹三杰^{1,2,3}

1 四川农业大学 动物医学院 猪病研究中心, 四川 成都 611130

2 四川农业大学 国家级动物类实验教学示范中心, 四川 成都 611130

3 农业部兽用药物与兽医诊断技术四川科学观测站, 四川 成都 611130

梁伟, 全柯吉, 赵勤, 武耀民, 穆瑜, 曹三杰. 猪源 ST11 型艰难梭菌 TcdB 毒素受体结合域双抗体夹心 ELISA 的建立. 生物工程学报, 2022, 38(1): 185-195.

LIANG W, QUAN KJ, ZHAO Q, WU YM, MU Y, CAO SJ. Development of a double-antibody sandwich ELISA targeting the receptor binding domain of TcdB toxin of ST11 type *Clostridium difficile* of porcine origin. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 185-195.

摘要: 艰难梭菌是一种重要的人兽共患肠道病原菌, 广泛存在于人和多种动物体内。ST11 型艰难梭菌是国际上流行最广泛、危害最大的亚型之一。我国作为养猪业大国, 猪源艰难梭菌的检测方法欠缺, 给猪场艰难梭菌的防控留下隐患。本研究旨在建立一种特异、敏感的双抗体夹心 ELISA, 为猪源 ST11 型艰难梭菌流行病学调查提供血清学检测方法。首先采用原核表达并纯化出 97 kDa 的受体结合域 (receptor binding domain, RBD) 蛋白, 并利用杂交瘤技术成功筛选出能稳定分泌针对 RBD 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞 AE2D3, 经检测其抗体亚型为 IgG2b (κ)。其次以针对 RBD 蛋白的单克隆抗体为检测抗体、兔多克隆抗体为捕获抗体, 运用棋盘法确定了捕获抗体和检测抗体的配对浓度、抗原包被条件、封闭条件、检测抗体和待检样品的孵育条件、羊抗小鼠 IgG/HRP 和 TMB 显色液反应条件。经测定, 此方法的临界值 OD_{450} 为 0.152, 与 13 株非 ST11 型的艰难梭菌无交叉反应, 对 RBD 蛋白的最低检测浓度为 8.83 ng/mL。这一特异、敏感、可用于兽医临床检测猪源 ST11 型艰难梭菌的双抗体夹心 ELISA, 为养猪业 ST11 型艰难梭菌流行病学调查提供了可靠的血清学检测方法。

关键词: 艰难梭菌; ST11 型; RBD 蛋白; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

Received: May 17, 2021; **Accepted:** September 26, 2021; **Published online:** October 14, 2021

Supported by: Sichuan Provincial International Science and Technology Innovation Cooperation Project/Hong Kong, Macao and Taiwan Provincial Science and Technology Innovation Cooperation Project in China (2019YFH0067)

Corresponding author: CAO Sanjie. Tel: +86-28-86293053; E-mail: csanjie@sicau.edu.cn

[#]These authors contributed equally to this study.

基金项目: 四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目 (2019YFH0067)

Development of a double-antibody sandwich ELISA targeting the receptor binding domain of TcdB toxin of ST11 type *Clostridium difficile* of porcine origin

LIANG Wei^{1#}, QUAN Keji^{1#}, ZHAO Qin^{1,2,3}, WU Yaomin¹, MU Yu¹, CAO Sanjie^{1,2,3}

1 Research Center of Swine Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 National Teaching and Experiment Center of Animals, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Sichuan Science-Observation Experimental Station of Veterinary Drugs and Veterinary Diagnostic Technique, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: *Clostridium difficile* is an important zoonotic intestinal pathogen, which is widely present in humans and a variety of animals. The ST11 type *C. difficile* is one of the most widespread and harmful subtypes in the world. As a large country in pig farming, China lacks efficient methods for detecting *C. difficile* of porcine origin, leaving hidden dangers for the prevention and control of *C. difficile*. The aim of this study was to develop a specific and sensitive double-antibody sandwich ELISA for the epidemiological investigation of ST11 type *C. difficile* of porcine origin. Firstly, a 97 kDa receptor binding domain (RBD) was expressed in a prokaryotic host and purified. A hybridoma cell line AE2D3 capable of stably secreting monoclonal antibody targeting the RBD was screened, and the antibody subtype was determined to be IgG2b (κ). Secondly, a double antibody sandwich ELISA method was developed, where the monoclonal antibody targeting the RBD was used as a detection antibody, and the rabbit polyclonal antibody was used as a capture antibody. The chessboard method was used to determine the matching concentration of the capture antibody and the detection antibody, the antigen coating conditions, the blocking conditions, the incubation conditions for detection antibody and samples to be tested, as well as the reaction conditions of HRP-conjugated and reaction conditions of TMB chromogenic solution. The negative cutoff OD_{450} was 0.152, and no cross-reaction with 13 strains of non-ST11 type *C. difficile* was found. The minimum detection concentration of RBD was 8.83 ng/mL. This specific and sensitive double-antibody sandwich ELISA provides a reliable serological detection method for epidemiological investigation of the ST11 type *C. difficile* in pig industry.

Keywords: *Clostridium difficile*; ST11 type; RBD protein; monoclonal antibody; double-antibody sandwich ELISA

艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 是一种严格厌氧生长的革兰阳性梭状芽胞杆菌, 为肠道中的常在菌群, 属于条件致病菌^[1]。感染后可导致

人和多种动物 (猪、牛、禽等) 抗生素相关性腹泻 (antibiotic associated diarrhea, AAD) 或假膜性结肠炎 (pseudomembranous colitis, PMC) 的发

生^[2]。艰难梭菌定殖于宿主的盲肠和结肠,其芽胞抵抗力强,在外界环境下可存活数月^[2-3]。动物源食品感染是艰难梭菌在人和动物之间传播的重要途径,对澳大利亚和荷兰分离的猪源和人源艰难梭菌进行基因组分析表明,艰难梭菌在人群和猪群之间广泛传播^[4]。有研究报道,在屠宰加工过程中,艰难梭菌的检出率高达 9%,对人类健康带来威胁^[5-6]。艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI) 在澳大利亚 (67%)^[7]、德国 (73%)^[8]、斯洛文尼亚 (50.9%)^[9] 和捷克 (56.7%)^[10] 等猪肉生产国普遍存在。我国对于艰难梭菌的分型多采用多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST), 是基于 7 个管家基因序列对所分离的菌株进行分型的方法, 并且该方法具有国际数据库, 利于数据的交流。2005 年荷兰首次报道分离出人源 ST11 型艰难梭菌, 随后 3 年内 ST11 型艰难梭菌感染率提升了 10%, 并且在欧洲、北美和中国台湾等地的家畜中均分离出 ST11 型艰难梭菌^[11]。通过对人源、猪源、鸭源的 ST11 型艰难梭菌进行全基因组测序分析, 进一步证实了不同来源的 ST11 型艰难梭菌具有遗传相似性^[4]。中国作为猪肉生产和消费大国, 对于猪群 CDI 的研究报道并不多, 这对我国养猪业的安全生产和人民群众的健康留下隐患。因此, 对于猪群中艰难梭菌的检测及调查研究亟待开展, 为了能在养殖场进行大规模的艰难梭菌检测, 提高检测结果的准确性, 需要建立针对猪源艰难梭菌的检测方法。

艰难梭菌主要的致病因子是毒素 A (TcdA)、毒素 B (TcdB) 和二元毒素 (CDT)。有研究表明, TcdB 毒素的毒力是 TcdA 毒素的 10 倍, 且临床上只产 TcdB 毒素的菌株可以引起 AAD 的暴发^[2,12]。CDT 毒素主要由高毒力菌株分泌,

具有增强 TcdA 和 TcdB 毒素毒力的作用^[2]。研究发现, 产 CDT 毒素的菌株可使 TcdA 毒素的表达量升高 16 倍, 使 TcdB 毒素的表达量升高 23 倍^[13]。ST11 型艰难梭菌能分泌 TcdA、TcdB 和 CDT 3 种毒素, 且具有更强的传染性, 是国际上流行最广泛、危害最大的亚型之一^[11]。目前, 关于艰难梭菌亚单位疫苗的抗原和诊断抗原的研究主要集中在毒素蛋白的受体结合域 (receptor binding domain, RBD)^[14]。Genth 等^[15] 将 TcdB 毒素的 RBD 蛋白进行重组表达, 发现 TcdB 毒素和抗 RBD 的血清结合后能使肠上皮细胞免受细胞病变的影响, 说明 RBD 蛋白具有作为候选亚单位疫苗和诊断抗原的潜力。因此, 以 RBD 蛋白作为诊断抗原, 制备针对 RBD 蛋白的单克隆抗体, 对于建立可靠的血清学诊断方法具有重要意义。

目前, 国内对于艰难梭菌的研究大多集中在医源性感染, 对于养殖业艰难梭菌的研究报道极少, 并且国内缺乏可用于兽医临床检测艰难梭菌的方法^[16]。细胞毒性检测 (cytotoxicity assay, CTA) 和产毒菌株培养 (toxinogenic bacterium culture, TC) 作为艰难梭菌检测的金标准, 操作费时耗力, 并且目前市场上 CTA 和 TC 的检测试剂盒大都用于人的临床样本检测, 价格昂贵, 不适合用于国内养殖业对艰难梭菌的大规模检测^[16-18]。因此, 建立一种特异、敏感、经济、可用于兽医临床检测艰难梭菌的方法亟待解决。本研究以制备的猪源 ST11 型艰难梭菌 TcdB 毒素 RBD 蛋白的单克隆抗体为检测抗体、兔多克隆抗体为捕获抗体, 建立了一种特异、敏感、可用于兽医临床检测 ST11 型艰难梭菌的双抗体夹心 ELISA, 以期为我国猪场高致病性的 ST11 型艰难梭菌的流行病学调查提供可靠的血清学检测方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及细胞

猪源艰难梭菌 ST11 型 C1、C2、P1 分离株, ST3 型 P2 分离株, ST35 型 LW3、LW6 分离株, ST109 型 Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10 分离株, 由本实验室分离并保存^[19]; pET-32a(+) 质粒由本实验室保存并提供; SP2/0 骨髓瘤细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 大肠杆菌 BL21(DE3)、DH5 α 购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.1.2 试验动物

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠、2 kg SPF 级雌性新西兰兔, 均购自成都达硕实验动物有限公司 (实验动物许可证号 SCXK(川 2020-030)), 所有动物实验方案均经四川农业大学实验动物伦理与福利委员会审核通过。

1.1.3 主要试剂

DMEM 培养基、50 \times HAT、100 \times HT 购自 Gibco 公司, 羊抗小鼠 IgG/HRP、小鼠抗组氨酸标签单克隆抗体购自博士德生物工程有限公司, 小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗试剂盒购自洛阳佰泰科生物技术公司, PrimeSTAR[®]Max DNA Polymerase 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, MONTANIDE GEL 02 PR 佐剂购自 Seppic 公司, 弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司, 细菌基因组提取试剂盒购自天根生物科技 (北京) 有限公司, 5 mL 镍柱购自成都百乐科技有限公司, 谷氨酸脱氢酶蛋白

(GDH) 由本实验室保存并提供。

1.2 方法

1.2.1 *rbd* 基因片段的扩增及重组质粒的构建

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取艰难梭菌 C1 分离株的基因组 DNA, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。参照艰难梭菌 TcdB 毒素 *rbd* 基因 (NMDC number: NMDCN0000LT8) 序列设计扩增引物, 引物信息如表 1 所示。PCR 扩增反应体系为 (25 μ L): 艰难梭菌 C1 基因组 DNA 1 μ L, PrimeSTAR[®]Max DNA Polymerase 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 用 ddH₂O 补齐。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。随后对 PCR 产物进行纯化, 与双酶切 (*Bam*H I 和 *Sac* I) 的 pET-32a(+) 载体进行连接, 构建重组质粒 pET-32a(+)-RBD。最后经 PCR、双酶切和测序鉴定重组质粒是否构建成功。

1.2.2 RBD 融合蛋白诱导表达、纯化与鉴定

将重组质粒 pET-32a(+)-RBD 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 时, 加入 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 25 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导 12 h。诱导后的重组大肠杆菌超声破碎后, 用镍柱对上清进行纯化, 采用 SDS-PAGE 分析 RBD 蛋白的纯化情况。纯化后的 RBD 蛋白用磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 3 次, 用 30 kDa 超滤管对蛋白进行浓缩并测定浓度, 后将浓缩的 RBD 蛋白分装, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 小鼠免疫

将 RBD 蛋白与 MONTANIDE GEL 02 PR 佐剂按体积比 10:1 混匀, 对 6 周龄 BALB/c 雌

表 1 *rbd* 基因扩增引物

Table 1 Primers for *rbd* gene amplification

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Cleavage sites	Gene location	Size (bp)
<i>rbd</i> -F	<u>CGGGATCC</u> CTTATGTCAACTAGTGAAGAAAATAAGG	<i>Bam</i> H I	5 251-5 278	1 848
<i>rbd</i> -R	CGAGCTCTTCACTAATCACTAATTGAGCTGTATC	<i>Sac</i> I	7 072-7 098	

Note: the sequence of cleavage sites is underlined.

鼠进行背部皮下多点注射免疫, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{只}$, 每次免疫间隔 14 d, 三免后 7 d 采集小鼠血清测定抗体效价。细胞融合前 3 d, 用 RBD 蛋白进行加强免疫, 免疫剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{只}$, 3 d 后取血清抗体效价最高的小鼠脾脏细胞进行细胞融合。

1.2.4 细胞融合与阳性杂交瘤细胞筛选

将生长状态良好的 SP2/0 骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞进行融合, 同时制备饲养层细胞。融合细胞用含 10%胎牛血清的 HAT 选择培养基进行培养。以 RBD 蛋白为正向筛选抗原、GDH 蛋白为负向筛选抗原, 采用间接 ELISA 对融合后杂交瘤细胞进行初步筛选及亚克隆。筛选出 OD_{450} 值最大的阳性孔细胞, 予以 4–6 次的有限稀释克隆培养, 直至筛选出阳性率 100%的杂交瘤细胞, 然后通过姬姆萨染色鉴定杂交瘤细胞染色体数目。将阳性杂交瘤细胞连续培养 90 d 后测定细胞培养上清的抗体效价; 同时将冻存的杂交瘤细胞在第 90 天和第 180 天时复苏, 测定细胞培养上清的抗体效价, 检测杂交瘤细胞分泌的特异性单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 的稳定性。

1.2.5 单克隆抗体亚类鉴定

取阳性杂交瘤细胞培养上清, 使用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗套装试剂盒对单克隆抗体进行亚类鉴定。

1.2.6 腹水制备与纯化

对 6 周龄 BALB/c 雌鼠腹腔注射 200 μL 弗氏不完全佐剂, 使其致敏, 7 d 后给予小鼠腹腔注射 10^6 个/500 μL 的阳性杂交瘤细胞, 待小鼠腹腔明显肿胀后采集腹水。收集的腹水采用硫酸铵盐析进行初提^[16], 后用 Protein G 亲和层析进一步纯化 IgG 抗体, 并用 SDS-PAGE 分析纯化效果。

1.2.7 单克隆抗体相对亲和力与特异性检测

利用间接 ELISA 测定阳性杂交瘤细胞的培

养上清及经亲和层析纯化后腹水的抗体效价, 检测单克隆抗体的相对亲和力。用 Western blotting 方法对猪源 ST11、ST3、ST35、ST109 型艰难梭菌培养上清以及 RBD 和 GDH 蛋白对单克隆抗体进行特异性检测。

1.2.8 兔抗 RBD 蛋白多克隆抗体制备

将 RBD 蛋白与 MONTANIDE GEL 02 PR 佐剂按体积比 10:1 混匀, 对新西兰兔的颈背部进行皮下多点注射免疫, 免疫剂量为 1 mg/只, 每次免疫间隔 14 d, 每次免疫 7 d 后进行耳缘静脉采血, 收集血清测定抗体效价。三免后对新西兰兔进行心脏采血, 分离血清, 采用硫酸铵盐析进行纯化^[16], $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存, 即得到兔抗 RBD 蛋白多克隆抗体 (polyclonal antibody, pAb)。

1.2.9 双抗体夹心 ELISA 的最佳反应条件确定

以兔抗 RBD 蛋白多克隆抗体 (pAb) 为捕获抗体、小鼠抗 RBD 蛋白单克隆抗体 (mAb) 为检测抗体, 运用棋盘法对双抗体夹心 ELISA 反应条件进行确定, 当样品孔与阴性孔的 OD_{450} 比值 (P/N) 最大时, 确定为最佳反应条件。将捕获抗体和检测抗体按 1:1 600–1:12 800 的浓度进行 2 倍梯度稀释, 确定捕获抗体和检测抗体的最佳配对使用浓度。兔抗 RBD 蛋白多克隆抗体在酶标板上按每孔 1 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{L}$ 的浓度进行包被, 设置 0.01、0.05、0.1 mmol/L 抗原包被液浓度梯度及 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h 的包被条件, 确定捕获抗体最佳孵育时间; 同时将检测抗体在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5、1、1.5、2 h, 确定检测抗体最佳孵育时间。将待检样品在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5、1、1.5 h, 确定待检样品的最佳孵育时间。随后设置浓度为 1.5%、3%、5%的脱脂奶粉 (封闭液), 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5、1、2 h, 确定

最佳封闭条件。将羊抗小鼠 IgG/HRP (酶标二抗) 按 1:2 000–1:10 000 的浓度进行梯度稀释, 在 37 °C 条件下作用 0.5、1、1.5 h, 确定酶标二抗的最佳使用条件。最后对 TMB 显色液作用时间进行确定, 设置 10、15、20 min 时间梯度, 确定 TMB 的最佳显色时间。

1.2.10 双抗体夹心 ELISA 的临界值确定

收集 13 份未感染艰难梭菌的仔猪粪便, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释 10 倍后取上清, 用建立的双抗体夹心 ELISA 进行临界值的确定。测定 OD_{450} 的吸光度, 计算吸光度的平均值 (\bar{x}) 与标准差 (s), 当 $OD_{450} \geq \bar{x} + 3s$ 时, s 判定为阳性; $OD_{450} \leq \bar{x} + 2s$ 时, s 判定为阴性。介于二者之间为可疑样本需重测。

1.2.11 双抗体夹心 ELISA 的特异性试验

用建立的双抗体夹心 ELISA 检测临床分离的艰难梭菌 ST11 型 C1、C2、P1 分离株及其他 ST 型的 13 株艰难梭菌培养上清、RBD 和 GDH

蛋白, 确定双抗体夹心 ELISA 的特异性。

1.2.12 双抗体夹心 ELISA 的敏感性试验

以不同浓度 (2.21–4 520 ng/mL) 的 RBD 蛋白为抗原, 用建立的双抗体夹心 ELISA 对 RBD 蛋白浓度底限进行检测, 检测建立方法的敏感性。

1.2.13 统计学分析

使用统计软件 SPSS 27.0 对数据进行统计学分析, 组间两两比较采用 t 检验分析差异显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 9.1 作图。

2 结果与分析

2.1 *rbd* 基因重组质粒的鉴定

重组质粒 pET-32a(+)-RBD 经 PCR 及双酶切鉴定, 得到大小为 1 848 bp 的条带 (图 1), 测序结果证明重组质粒 pET-32a(+)-RBD 构建成功。

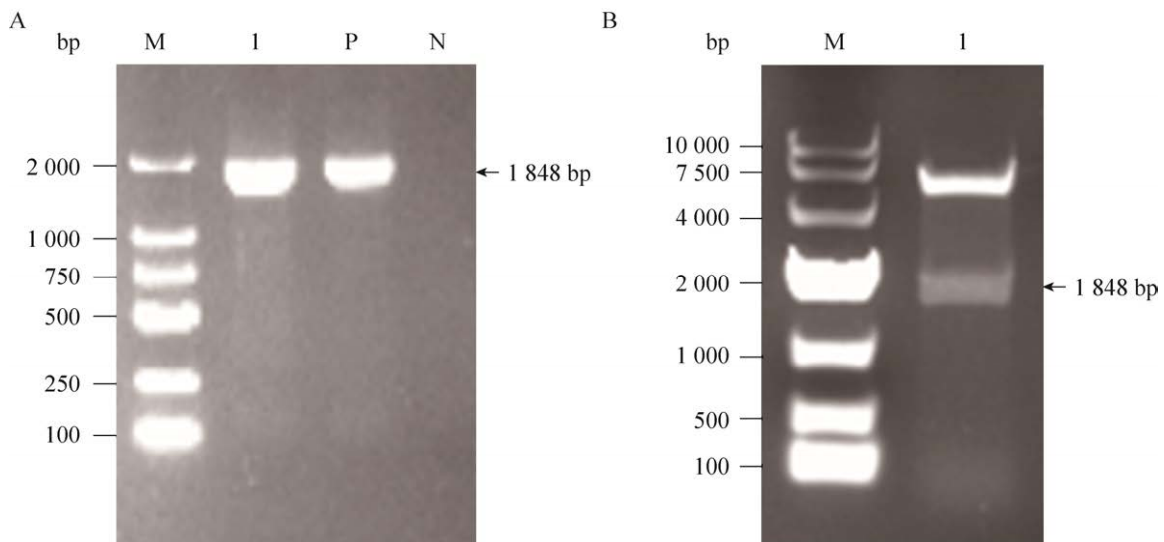


图 1 重组质粒 pET-32a(+)-RBD PCR(A)及双酶切鉴定(B)

Figure 1 Recombinant plasmid pET-32a(+)-RBD PCR (A) and double digestion identification (B). (A) M: DL2 000 DNA marker; 1: recombinant plasmid *rbd* gene amplification; P: positive control; N: negative control. (B) M: DL10 000 DNA marker; 1: recombinant plasmid with double enzyme digestion.

2.2 RBD 融合蛋白的鉴定

转入重组质粒 pET-32a(+)-RBD 的 BL21(DE3) 在诱导表达、纯化后, 用 SDS-PAGE 分析, 诱导表达和纯化后都有明显的 RBD 蛋白条带, 大小为 97 kDa, 与预期结果相符 (图 2)。

2.3 单克隆抗体的纯度和亚类鉴定

三免后所有小鼠血清的抗体效价均在 1:50 000 以上, 达到进行细胞融合标准, 加强免疫 3 d 后进行细胞融合。通过 4 轮有限稀释筛选, 得到 1 株能够稳定分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞, 命名为 AE2D3。用 RBD 蛋白、GDH 蛋白检测 AE2D3 培养上清抗体的效价, AE2D3 可以分泌针对 RBD 的特异性单克隆抗体 (****, $P < 0.000 1$) (图 3A)。然后通过姬姆萨染色对阳性杂交瘤细胞染色体数目进行鉴定, 结果显示, AE2D3 染色体数目为 109 条, SP2/0 骨髓瘤细胞染色体数目为 68 条, 证实 AE2D3 为杂交瘤细胞。连续培养 90 d 的 AE2E3

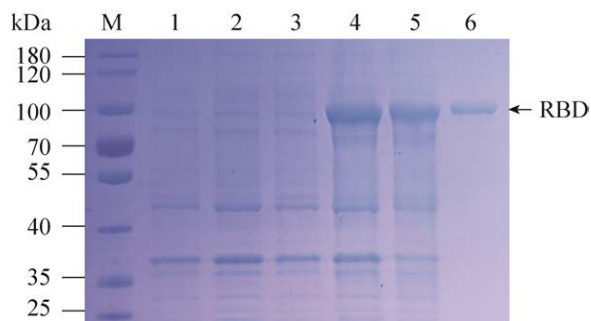


图 2 RBD 蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of RBD protein. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa; 1: pET-32a(+)-BL21 was not induced; 2: pET-32a(+)-BL21 was induced; 3: pET-32a(+)-RBD-BL21 was not induced; 4: pET-32a(+)-RBD-BL21 was induced; 5: supernatant after ultrasonic crushing of pET-32a(+)-RBD-BL21; 6: RBD protein was purified.

细胞培养上清和复苏冻存了 90 d、180 d 的 AE2E3 细胞培养上清中单克隆抗体效价均达 1:500 000, 表明无论是连续传代还是长时间冻存后复苏, AE2D3 都能够稳定地分泌特异性抗体。SDS-PAGE 分析显示, 收集的腹水经纯化后得到纯度 95% 以上的 IgG 抗体, 仅存在重链 (约 50 kDa) 和轻链 (约 25 kDa) 2 个条带 (图 3B)。使用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗套装试剂盒对单克隆抗体亚类进行鉴定, 结果显示, AE2D3 分泌的特异性抗体重链为 IgG2b 型, 轻链为 κ 型。

2.4 单克隆抗体的亲和力与特异性

对 AE2D3 杂交瘤细胞培养上清和纯化后的腹水抗体效价进行测定, 腹水中抗体效价明显高于细胞培养上清的 (图 4A)。因此, 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立将使用纯化后的腹水作为检测抗体。Western blotting 结果显示, 单克隆抗体能与 RBD 结合, 与 GDH 蛋白不结合 (图 4B); 同时, 单克隆抗体与艰难梭菌 ST11 型的 C1、C2、P1 菌株培养上清结合, 与 ST3 型 P2 菌株、ST35 型 LW3 和 LW6 菌株、ST109 型 Y1 和 Y2 菌株的培养上清不结合 (图 4C)。表明制备的单克隆抗体具有较好的特异性和反应原性。

2.5 双抗体夹心 ELISA 的最佳反应条件

三免后新西兰兔血清中 RBD 蛋白的抗体效价达 1:100 000, 可作为兔抗 RBD 蛋白多克隆抗体使用。运用棋盘法确定双抗体夹心 ELISA 各个环节的最佳反应条件。捕获抗体稀释度 1:1 600、检测抗体稀释度 1:3 200 为二者最佳配对的使用浓度 (表 2); 捕获抗体用 0.05 mmol/L 抗原包被液包被后在 37 °C 孵育 1 h 后 4 °C 孵育 12 h 为最佳包被条件 (表 3); 检测抗体和待检样品分别在 37 °C 孵育 1 h 为最佳孵育条件; 浓度为 3% 的脱脂牛奶在 37 °C

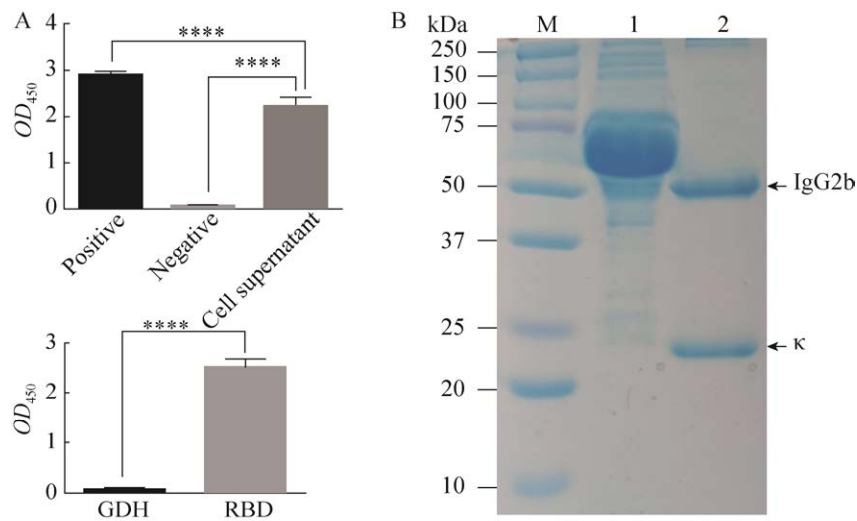


图3 阳性杂交瘤细胞上清抗体效价测定(A)与腹水纯化的单克隆抗体 SDS-PAGE 分析(B)

Figure 3 Determination of the titer in the cell supernatant of positive hybridoma (A) and SDS-PAGE analysis of the purified monoclonal antibodies from ascites (B). (A) The antibody titer of cell supernatant was determined by indirect ELISA. Positive: mouse positive serum. Negative: mouse negative serum. The coated protein was RBD protein. ****: $P < 0.0001$. (B) SDS-PAGE analysis of ascites purification. M: true color two-color pre-stained protein marker; 1: unpurified ascites; 2: the purified ascites showed clear heavy and light chains of monoclonal antibodies.

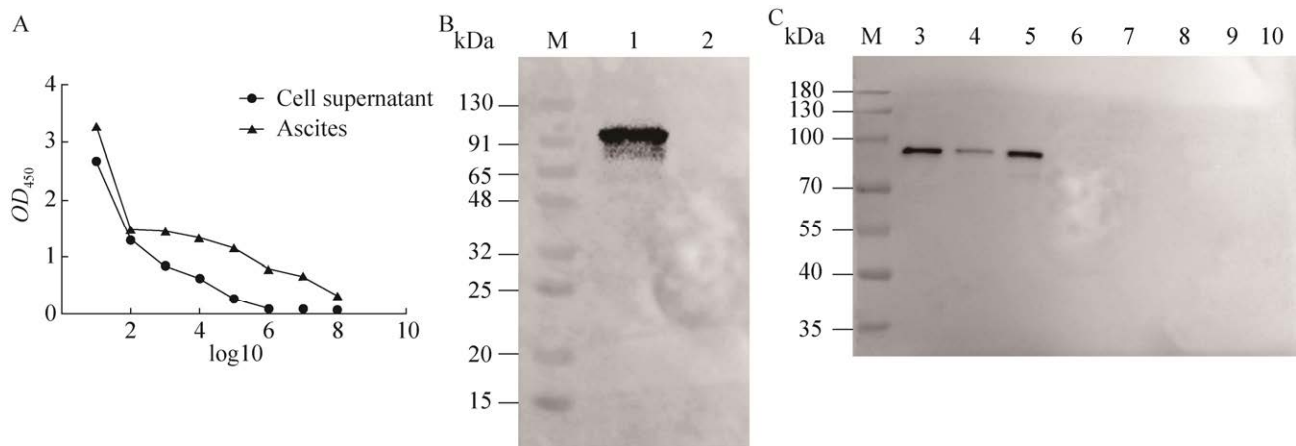


图4 单克隆抗体亲和力(A)与特异性(B和C)的检测

Figure 4 Determination of monoclonal antibody affinity (A) and specificity (B and C). (A) Determination of monoclonal antibody affinity between supernatant and ascites of AE2D3 cells. Cell supernatant: AE2D3 supernatant; Ascites: purified ascites; log10: log10 of cell supernatant and ascites dilution. (B) Specific detection of monoclonal antibodies. M: true color two-color pre-stained protein marker; 1: monoclonal antibodies against RBD protein were detected; 2: monoclonal antibody against GDH protein was detected. (C) Specific detection of monoclonal antibodies. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa; 3: culture supernatant of *C. difficile* C1 strain; 4: culture supernatant of *C. difficile* C2 strain; 5: culture supernatant of *C. difficile* P1 strain; 6: culture supernatant of *C. difficile* P2 strain; 7: culture supernatant of *C. difficile* LW3 strain; 8: culture supernatant of *C. difficile* LW6 strain; 9: culture supernatant of *C. difficile* Y1 strain; 10: culture supernatant of *C. difficile* Y2 strain.

表 2 捕获抗体和检测抗体最佳配对浓度(P/N)的确定

Table 2 Determination of the optimal pairing concentration of capture antibody and detection antibody

mAb	pAb			
	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800
1:1 600	5.480	6.038	5.453	5.083
1:3 200	6.098	4.522	4.949	4.080
1:6 400	5.551	4.087	3.505	2.632
1:12 800	3.627	3.925	2.298	2.211

表 3 捕获抗体最佳包被条件确定

Table 3 Determination of the optimal coating conditions of capture antibody

Condition	Concentration (mmol/L)		
	0.1	0.05	0.01
37 °C 2 h	5.439	5.667	5.541
37 °C 1 h+4 °C 12 h	5.887	6.271	5.027
4 °C 12 h	5.905	5.785	5.355

孵育 1 h 为最佳封闭条件；稀释度为 1 : 5 000 的羊抗小鼠 IgG/HRP (酶标二抗) 在 37 °C 反应 1 h 为最佳反应条件；TMB 显色液在常温下、避光显色 10 min 为最佳反应条件。

2.6 双抗体夹心 ELISA 的临界值

用建立的双抗体夹心 ELISA 检测 13 份未感染艰难梭菌的仔猪粪便, 测得阴性样品 OD_{450} 平均值 \bar{x} 为 0.09, 标准差 s 为 0.031, 即 $OD_{450} \geq 0.183$ ($\bar{x} + 3s$) 时判定为阳性, $OD_{450} \leq 0.152$ ($\bar{x} + 2s$) 判定为阴性; 介于两者之间为可疑, 则重测, 当 OD_{450} 仍然大于 0.152 则判定为阳性, 反之判定为阴性。

2.7 双抗体夹心 ELISA 的特异性

用建立的双抗体夹心 ELISA 检测 3 株 ST11 型、13 株其他 ST 型艰难梭菌培养上清。运用本方法检测非 ST11 型艰难梭菌培养上清与 GDH 蛋白的 OD_{450} 小于 0.152 呈阴性结果; 检测 RBD 蛋白与 ST11 型艰难梭菌培养上清 OD_{450} 大于 0.183 呈阳性结果 (图 5), 表明建立的双抗体夹心 ELISA 无交叉反应。

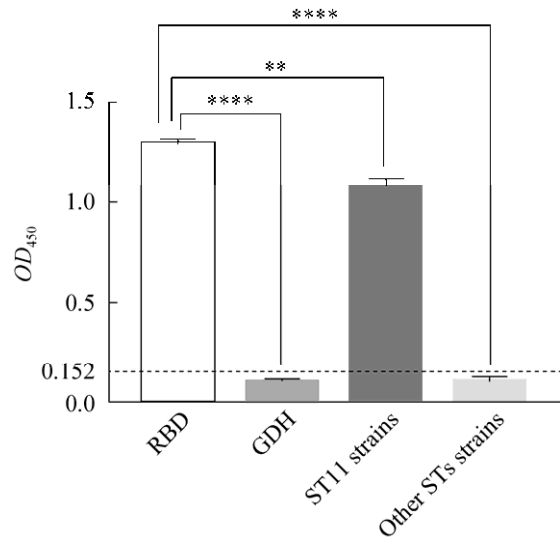


图 5 双抗体夹心 ELISA 特异性检测

Figure 5 The specificity of double-antibody sandwich ELISA.

2.8 双抗体夹心 ELISA 的敏感性

用建立的双抗体夹心 ELISA 对 RBD 蛋白最低检测浓度进行测定, 最低检测浓度为 8.83 ng/mL (图 6), 说明建立的双抗体夹心 ELISA 敏感。

3 讨论

艰难梭菌作为一种人兽共患条件致病菌, 自 1935 年在婴儿肠道首次发现以来, 已在多种

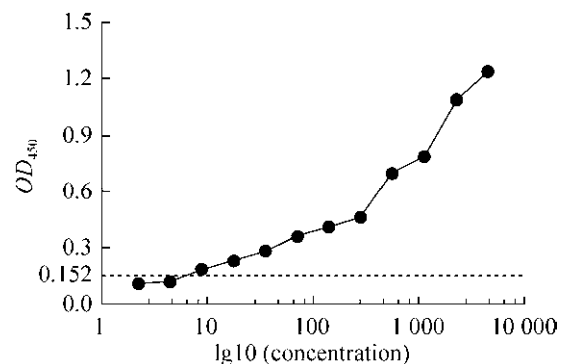


图 6 双抗体夹心 ELISA 灵敏度测定

Figure 6 The sensitivity determination of double-antibody sandwich ELISA.

动物(猪、牛、鸡、鸭等)体内分离出来,目前 CDI 已成为国际上一个重要的公共卫生问题^[19-21]。ST11 型艰难梭菌是 1 种高致病性、高传播风险的菌株,在欧洲、澳大利亚的人群和猪群之间曾暴发流行^[7-8]。对我国四川地区猪源艰难梭菌进行流行病学调查时,发现了仔猪感染 ST11 型艰难梭菌^[19],表明四川地区猪群存在 CDI 且有向人群流行的风险。在国际上还未研究出针对艰难梭菌的有效疫苗之前,操作便捷和经济实惠的血清学诊断技术更适合动物间大规模的流行病学调查^[22-23]。我国对于人源艰难梭菌的检测方法成熟,但针对猪源艰难梭菌检测方法仍缺乏。主要原因在于目前艰难梭菌的检测操作复杂,不适合在猪群中进行大规模的艰难梭菌检测,这给我国猪群艰难梭菌的防控带来挑战^[1,22]。

可靠的血清学诊断方法的建立与所选抗原的抗原性密切相关。有研究显示, TcdB 毒素和抗 TcdB 毒素 RBD 蛋白的血清结合,能使细胞免受细胞病变的影响,说明 TcdB 毒素的 RBD 蛋白具有良好的抗原性,可作为血清学诊断方法的候选抗原^[15]。细胞毒性检测 (CTA) 和产毒菌株培养 (TC) 作为艰难梭菌检测的金标准^[18],具有非常高的敏感性,但检测时间长、成本高的缺点成为了其应用于临床样本快速检测的阻碍;同时,由于艰难梭菌属于条件致病菌,当其未成为肠道中优势菌群时,采用 CTA 和 TC 检测可能会被误诊^[22,24-25]。谷氨酸脱氢酶 (GDH) 是艰难梭菌共有的一种抗原,可以长期稳定地存在,但 GDH 的检测不能鉴定艰难梭菌是否产毒,只能鉴定艰难梭菌的存在,因此不能判断患者是否感染艰难梭菌^[26]。分子诊断的检测方法是针对基因层面的检测,不能确定毒素基因的转录水平,因此不能直接用于分辨 CDI 患者与携带者^[24]。酶联免疫试验 (EIA) 操作便捷、检测速度快,临床上较为普及^[22,27];但以往的

EIA 检测普遍使用多克隆抗体为检测抗体进行检测,敏感性较低,易出现假阳性,对某些菌株敏感性只有 16%^[27];此外, Planche 等评估了 6 种 EIA 检测方法,发现大部分 EIA 方法的特异性强,但敏感性低^[28];陈伟用人源艰难梭菌 TcdB 毒素受体结合域的单克隆抗体建立了双抗体夹心 ELISA,但方法不够敏感,不适合开展艰难梭菌的大规模检测^[6]。

为提高血清学方法中检测抗体的敏感性,本研究以制备的猪源 ST11 型艰难梭菌 TcdB 毒素 RBD 蛋白的单克隆抗体为检测抗体、兔多克隆抗体为捕获抗体,建立了特异、敏感、操作便捷的双抗体夹心 ELISA,为检测高致病性的 ST11 型艰难梭菌提供一个可靠的血清学诊断方法。

4 结论

本研究利用原核表达技术成功表达并纯化 ST11 型艰难梭菌 TcdB 毒素的 RBD 蛋白,采用杂交瘤技术成功筛选出 1 株针对 RBD 蛋白特异、敏感、且稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞 AE2D3。建立了一种可用于兽医临床大规模检测猪源 ST11 型艰难梭菌的双抗体夹心 ELISA,为猪场高致病性、高传播风险的 ST11 型艰难梭菌流行病学调查提供可靠的血清学检测方法。

REFERENCES

- [1] Hopman NE, Keessen EC, Harmanus C, et al. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol*, 2011, 149(1/2): 186-192.
- [2] Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* toxin biology. *Annu Rev Microbiol*, 2017, 71: 281-307.
- [3] Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med*, 2008, 359(18): 1932-1940.
- [4] Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of

- Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Eurosurveillance*, 2014, 19(45): 20954.
- [5] Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, et al. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. *Anaerobe*, 2012, 18(6): 621-625.
- [6] Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, et al. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 932: 65-92.
- [7] Moono P, Putsathit P, Knight DR, et al. Persistence of *Clostridium difficile* RT 237 infection in a Western Australian piggyery. *Anaerobe*, 2016, 37: 62-66.
- [8] Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, et al. *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(11): 3796-3803.
- [9] Avbersek J, Janezic S, Pate M, et al. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe*, 2009, 15(6): 252-255.
- [10] Goldová J, Malinová A, Indra A, et al. *Clostridium difficile* in piglets in the Czech Republic. *Folia Microbiol*, 2012, 57(2): 159-161.
- [11] Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(9): 1162-1170.
- [12] Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 2010, 467(7316): 711-713.
- [13] Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16020.
- [14] Wang S, Wang Y, Cai Y, et al. Novel chimeric protein vaccines against *Clostridium difficile* infection. *Front Immunol*, 2018, 9: 2440.
- [15] Genth H, Selzer J, Busch C, et al. New method to generate enzymatically deficient *Clostridium difficile* toxin B as an antigen for immunization. *Infect Immun*, 2000, 68(3): 1094-1101.
- [16] 陈伟. 抗艰难梭菌毒素 B 受体结合区单克隆抗体制备及初步应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.
Chen W. The preparation and preliminary application of monoclonal antibodies to *Clostridium difficile* toxin B receptor binding region [D]. Changsha: Central South University, 2014 (in Chinese).
- [17] 陈淑仪. 艰难梭菌毒素 TcdB 转位结构域的功能及 TcdB 单克隆抗体的制备与应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
Chen SY. Research on the function of translocation domain of *Clostridium difficile* toxin B and application of anti-toxin B monoclonal antibodies [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016 (in Chinese).
- [18] Barbut F, Kajzer C, Planas N, et al. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(4): 963-967.
- [19] 王博. 四川地区仔猪艰难梭菌分子分型调查研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
Wang B. Molecular typing of *Clostridium difficile* surveyed from neonatal pigs in Sichuan district [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [20] Putsathit P, Neela VK, Joseph NMS, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from piglets. *Vet Microbiol*, 2019, 237: 108408.
- [21] Lim SC, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* and one health. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(7): 857-863.
- [22] Keessen EC, Hopman NE, van Leengoed LA, et al. Evaluation of four different diagnostic tests to detect *Clostridium difficile* in piglets. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(5): 1816-1821.
- [23] Riley TV, Lyras D, Douce GR. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. *Vaccine*, 2019, 37(50): 7300-7306.
- [24] McCollum DL, Rodriguez JM. Detection, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(6): 581-592.
- [25] Carroll KC, Loeffelholz M. Conventional versus molecular methods for the detection of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9_Supplement): S49-S52.
- [26] Doing KM, Hintz MS, Keefe C, et al. Reevaluation of the premier *Clostridium difficile* toxin A and B immunoassay with comparison to glutamate dehydrogenase common antigen testing evaluating Bartels cytotoxin and Prodesse ProGastro™ Cd polymerase chain reaction as confirmatory procedures. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 66(2): 129-134.
- [27] Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10): 3719-3724.
- [28] Planche T, Aghaizu A, Holliman R, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(12): 777-784.

(本文责编 陈宏宇)