

鸭疫里氏杆菌多种血清型间接 ELISA 检测方法的建立

季慕寅^{1,2Δ} 王晴^{1Δ} 翟志鹏¹ 陈绵绵¹ 马彩凤¹ 姚火春¹ 陆承平¹ 张炜^{1*}

(1. 南京农业大学 动物医学院 江苏 南京 210095)

(2. 芜湖职业技术学院 生物工程学院 安徽 芜湖 241003)

摘要:【目的】鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种重要的禽病病原,分为21个血清型。但一直缺乏一种针对多种血清型广泛适用的抗体检测方法。前期的研究表明,外膜蛋白A(Outer membrane protein A, OmpA)广泛存在于多种血清型的RA菌株中,是一种重要的免疫原性蛋白,并且其基因序列在RA血清型之间具有高度的保守性,提示其可以作为RA感染血清抗体检测的靶点分子。以重组蛋白OmpA建立间接酶联免疫吸附试验检测RA的抗体。【方法】通过诱导表达条件的摸索及蛋白纯化,获得适用于ELISA包被的重组OmpA抗原。通过Western-blot证明重组蛋白OmpA是否与RA多种血清型发生免疫学反应。进行方阵试验以确定ELISA抗原的最佳包被浓度、被检测血清的反应浓度。重复性、特异性和敏感性试验检查该方法的实用性。【结果】实验证实加入1%乙醇的诱导培养基有利于重组蛋白的可溶性表达。Western-blot结果表明,重组蛋白OmpA可以与1、2、6、10、11、13、14和17型多种RA主要流行血清型有良好的免疫反应性。经方阵试验确定抗原的最佳包被浓度为8 mg/L,待检血清的最佳稀释度为1:160。所建立检测方法具有良好的重复性、特异性和敏感性。【结论】实验建立的鸭疫里氏杆菌多种血清型间接ELISA检测方法可以用于免疫后抗体消长以及感染性抗体的检测。

关键词: 鸭疫里氏杆菌, 外膜蛋白A, 多血清型, 间接酶联免疫吸附试验

Development of indirect ELISA for detecting antibodies against multi-serotypes of *Riemerella anatipestifer*

JI Mu-Yin^{1,2Δ} WANG Qing^{1Δ} ZHAI Zhi-Peng¹ CHEN Mian-Mian¹MA Cai-Feng¹ YAO Huo-Chun¹ LU Cheng-Ping¹ ZHANG Wei^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. School of Biological Engineering, Wuhu Institute of Technology, Wuhu, Anhui 241003, China)

Abstract: [Objective] *Riemerella anatipestifer* (RA) is an important poultry pathogen. Considering the twenty-one serotypes, it still lacked a method for detecting multi-serotypes antibodies. Previous studies showed that the Outer membrane protein A (OmpA), widely existing in multi-serotypes of RA strains, is a protein with immunogenicity. Its encoding gene is highly conserved among the genomes of RA of

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK20141363); 国家自然科学基金优秀青年基金项目(No. 31322054)

*通讯作者: Tel: 86-25-84395328; 信箱: vszw@njau.edu.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2015-05-18; 接受日期: 2015-08-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-09-09

different serotypes, which indicates that OmpA can be used as a target molecule for serum antibody detection of RA infection. An indirect ELISA method to detect the antibody caused by RA infection was developed with the recombinant OmpA as the coating antigen. **[Methods]** The recombinant OmpA was purified after optimizing the prokaryotic expression conditions, and its immuno reactivity was tested by Western-blot with sera obtained from ducks infected by different serotypes of RA. Furthermore, the optimum testing conditions of ELISA were determined by phalanx test. Reproducibility, specificity and sensitivity tests were performed to estimate the practicability. **[Results]** The recombinant protein would be more soluble by adding 1% of ethanol in the medium. As analysed by Western-blot, the purified protein is immunogenic among 1, 2, 6, 10, 11, 13, 14, 17 serotypes of RA. Phalanx test results showed the optimal concentration of coated antigen is 8 mg/L, and the optimal dilution degree of serum is 1:160. Also, the developed assay was proved to be quite repetitive, specific and sensitive. **[Conclusion]** An indirect ELISA method for detecting the infection of multi-serotypes of *Riemerella anatipestifer* was established in this study and could be used for evaluating the immune effects of RA vaccine and for diagnosing RA infections with different serotypes of RA.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, OmpA, Multi-serotypes, Indirect ELISA

鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是感染禽类的重要病原之一, 主要感染雏鸭、雏鹅、雏火鸡等禽类。RA 感染的主要特征是引起纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎等, 给养鸭业带来了严重的经济损失^[1]。目前, 至少已经报道有 21 种 RA 的血清型^[2-4], 张大丙等^[5]提出在我国已出现 15 种 RA 血清型, 其中 1、2、6、10 型呈主要流行, 近年来, 11 型^[6]、13 型^[7]也多有报道。有研究表明, 不同血清型之间的全菌疫苗之间, 没有明显的交叉保护作用^[8], 这一特征给该病的免疫和快速诊断带来了困难^[9]。但是本课题组前期的研究表明, RA 的外膜蛋白 A (Outer membrane protein A, OmpA) 是 RA 的一种重要的免疫原性蛋白^[10], 能引起机体产生较强的免疫反应, 存在于多种血清型的 RA 菌株中, 动物实验表明, 用重组 OmpA 蛋白免疫后, 对 RA 1 与 RA 2 型强毒株攻击, 均有一定的保护性^[11]。有研究报道, *OmpA* 基因在 RA 不同血清型之间广泛分布^[12-13], 但是尚不清楚该基因表达的蛋白能否被血清所识别。

RA 感染的及时检测有利于对该病的控制, 目前已经报道了多种检测方法, 包括玻片和试管凝集试验、间接酶联免疫吸附试验 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, iELISA)、免疫荧光抗体 (Immunofluorescent antibody, IFA) 测试和

聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 等^[14-15]。其中, iELISA 是检测 RA 感染的一种重要方法, 但多以 RA 全菌蛋白作为包被抗原, 存在散毒、杂蛋白干扰等缺点, 因此, 寻求一种合适的包被抗原是十分必要的^[16]。

本研究运用原核表达的方法使 RA 的 *OmpA* 基因在大肠杆菌中表达出近 70 kD 的融合蛋白, Western-blot 分析其对多种同血清型 RA 血清的免疫反应性, 建立了以融合蛋白 OmpA 为包被抗原, 间接 ELISA 检测 RA 血清抗体的方法, 并优化了检测条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和血清: 在本实验室前期的研究中, 利用免疫蛋白组学筛选到在不同血清型中具有免疫保守性的诊断靶点外膜蛋白 A (OmpA), 将以 2 型 RA 代表株的基因组为模板扩增的 *OmpA* 基因与原核表达载体 pET-32a 连接, 制备的重组质粒 pET-32a-*OmpA*^[17] 转化到感受态细胞 BL21(DE3) 中, 此重组菌由南京农业大学预防兽医系微生物实验室保存。本实验使用 8 株鸭疫里氏杆菌, 分别代表 8 种 RA 血清型, 菌株信息见表 1, 血清型参考菌株由福建农业科学院兽医所程龙飞研究员惠赠。此

表 1 RA 菌株
Table 1 RA isolates used in this research

血清型 Serotype	菌株 Strain	来源 Isolation area
1	RAf [*] ₆₃	福建
2	RAf [*] ₁₅₃	福建
6	RAf [*] ₁₆₇	福建
10	RAf [*] ₁₀	福建
11	RAf [*] ₇₄	福建
13	RAf [*] ₄₃	福建
14	RAf [*] ₂₇	福建
17	RAf [*] ₁₇	福建

外, 在 ELISA 特异性试验中用到鸭源沙门氏菌 LH01、鸭感染大肠杆菌 *Escherichia coli* 134 及鸭感染大肠杆菌阳性血清均由南京农业大学预防兽医系微生物实验室保存。RA 鸭阴性血清、RA 鸭康复血清及 RA 兔高免血清在本研究中制备。

1.1.2 实验动物: 7 日龄无 RA 感染背景的雏鸭, 购自安徽某鸭场; 40 日龄健康新西兰大白兔, 用于制备 RA 8 个血清型代表菌株的高免血清。所有动物试验均经江苏省科技部门的许可。

1.1.3 主要试剂: 佐剂 Montanide ISA 206 VG, 购自 Seppic 公司; BCA 蛋白定量试剂盒及葡萄球菌 A 蛋白-HRP, 购自武汉博士德生物工程有限公司; HRP*PcAb 兔抗鸭 IgY(IgG), 购自上海亨代劳公司; TMB 单组分显色液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒, 购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 血清的制备: (1) RA 鸭康复血清。

ELISA 实验所用阳性血清为抗 RAf₁₅₃ (2 型) 鸭康复血清。选 10 只体重相近的 7 日龄雏鸭, 采集血清用 RAf₁₅₃ 全菌包被 ELISA 进行检测, 选择 5 只抗体阴性雏鸭用于血清制备。人工感染前采集阴性血清, 作为 ELISA 实验的阴性血清对照。菌株培养至对数末期, PBS 洗涤 3 次后调整至浓度

5.0×10^7 CFU/mL, 腹前部皮下注射 10 日龄雏鸭, 1 mL/只。攻毒后连续观察 10 d, 出现典型症状并康复的鸭再次等剂量攻毒, 7 d 后心脏采血, 收集血清备用。

(2) RA 兔高免血清。

于免疫前采集阴性血清, 8 株代表菌株培养至对数生长末期后用 0.8% 甲醛灭活, 37 °C 放置 48 h 后, PBS 缓冲液洗菌 3 次, 调整浓度至 2.0×10^9 CFU/mL, 与佐剂 Montanide ISA 206 VG 按体积比 1:1 充分混合后, 于新西兰大白兔背部皮内分点注射 2 mL, 3 周后同剂量进行二免, 再过 2 周后加强免疫。于加强免疫 2 周后心脏采血, 收集血清备用。

1.2.2 融合蛋白 OmpA 的表达: 含有重组质粒 pET-32a-OmpA 的大肠杆菌 BL21(DE3) 经过 PCR 和双酶切 (*Bam*H I、*Xho* I) 鉴定以及重组质粒测序后, 取鉴定结果为阳性者扩大培养。将阳性菌接种至含终浓度为 100 mg/L 氨苄西林的 200 mL LB 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 摇床培养至 OD_{600} 值为 0.4–0.6。从培养物中吸出 1 mL 菌液置于 4 °C 作为诱导前对照, 随即向剩余的菌液中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5–6 h。富集菌体, PBS 洗菌 3 次。用超声波破碎仪破碎菌体 (300 W, 工作 10 s, 间歇 5 s), 冰上充分破碎后, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测表达蛋白。

1.2.3 促进 OmpA 蛋白可溶性表达条件的优化: 目的蛋白呈可溶性和包涵体两种形式存在, 尝试通过诱导表达条件的优化, 使目标蛋白尽量表达在上清中, 呈可溶性表达, 保持蛋白活性, 同时免去变性、复性等步骤。参考文献 [18–19] 中的方法, 改变细菌的培养条件、IPTG 终浓度、诱导条件及时间, 收集不同条件下的超声裂解后上清, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 应用软件 BandScan 5.0 分析融合蛋白 OmpA 的表达量。

1.2.4 融合蛋白 OmpA 的纯化: 按照优化后的条件

参数表达 OmpA 蛋白, 收集破碎后的上清液, 利用 HisTrap™ HP (GE Healthcare) 镍柱纯化融合蛋白。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, R-250 染色。

1.2.5 Western-blot 分析: 收集纯化后的融合 OmpA 蛋白, 进行 Western-blot 分析。将蛋白转印至 PVDF 膜, 薄膜放入 TBST (Tris-HCl 缓冲盐溶液加 0.05% Tween-20) 配制的 5% (质量体积比) 脱脂乳中于 4 °C 封闭过夜, 随后在 1:10 000 稀释的 RA 兔高免血清中 37 °C 孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再加 1:10 000 稀释的葡萄球菌 A 蛋白-HRP 37 °C 孵育 1 h, 洗涤 3 次, DAB 为底物显色 20 min 后结束。

1.2.6 间接 ELISA 检测方法的建立及工作条件的确定: BCA 法(参照试剂盒说明书)对纯化后的融合蛋白进行定量, 用 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 进行 128–0.25 mg/L 的倍比稀释包被 96 孔板, 每孔 100 μ L, 每个稀释度设置 3 个重复孔, 置于 4 °C 包被过夜, 每孔加 380 μ L PBST (PBS 缓冲液加 0.05% 吐温-20) 洗涤 3 次。随后, 用 PBST 配制 0.5% (质量体积比) 牛血清白蛋白(BSA), 380 μ L/孔加入到 96 孔板, 37 °C 封闭 2 h, 同上洗涤。将 RA 鸭康复血清和阴性血清从 1:10 到 1:1 280 倍比稀释, 每孔 100 μ L 进行 ELISA 方阵试验, 每个稀释度设置 3 个重复, 37 °C 孵育 2 h, 洗涤之后于每孔加入 100 μ L 以 1: 10 000 稀释的 HRP*PcAb 兔抗鸭 IgY (IgG), 37 °C 孵育 1 h, 同上洗涤, 每孔加 100 μ L TMB 底物进行 37 °C 避光显色 10 min, 2 mol/L H₂SO₄ (50 μ L/孔) 终止反应, 读取 450 nm 处的 OD 值。以阳性血清 OD₄₅₀ 大于 1.0, 且 P/N (阳性血清 OD₄₅₀/阴性血清 OD₄₅₀) 最大时的条件为最佳工作条件。

1.2.7 ELISA 结果的判定: 根据文献[20]中的 ELISA 结果的判定方法, 将 30 份 RA 阴性血清在最佳工作条件下进行间接 ELISA 测定。统计分析, 计算阴性血清的平均值和标准差, 以平均值加上 3 倍的标准差作为阴性血清的临界值。

1.2.8 重复性试验: 参照文献[21]的方法, 在保证其他条件一致的情况下, 用同一份融合 OmpA 抗原

包被酶标板, 取 3 份血清样品, 在同一 96 孔板上进行间接 ELISA 试验, 每份血清设置 6 次重复。测定 OD₄₅₀, 计算板内变异系数。

再用以上 3 份血清分别在 6 块 96 孔板上做间接 ELISA 检测, 测定 OD₄₅₀, 计算出板间变异系数。

1.2.9 特异性试验: 按照所建立的间接 ELISA 检测方法检测鸭感染大肠杆菌阳性血清, 并设置 RA 阴性血清和 RA 阳性血清对照, 每份血清检测 3 次, 测定 OD₄₅₀。

此外, 采用全菌包被 ELISA 检测 RA 阴性血清及 RA 阳性血清间接验证所建立检测方法的特异性。参照徐步等^[22]建立的间接 ELISA 方法, 将灭活后的鸭感染大肠杆菌 *E. coli* 134 和鸭源沙门氏菌 LH01 从 10⁹ CFU/mL 梯度稀释至 10⁵ CFU/mL, 每孔加 100 μ L 菌液, 于 37 °C 干燥吸附 24 h, 之后的封闭等实验过程按照 1.2.6 进行, 空白对照组以 PBST 代替一抗血清, 每份血清在每个抗原包被梯度做 3 个重复。

1.2.10 敏感性试验: 将 RA 阳性血清从 1:160 进行连续倍比稀释至 1:20 480, 每个稀释度血清做 3 个重复, 间接 ELISA 检测, 根据 OD₄₅₀ 值判断能够检测为阳性的最高稀释度。

1.2.11 临床应用: (1) 江苏南京周围地区 RA 抗体的初步调查。

应用建立起来的鸭疫里氏杆菌 OmpA 蛋白间接 ELISA 检测方法对南京周边地区送检的 100 份鸭血清进行检测。

(2) 免疫鸭的抗体消长水平检测。

10 只生理条件一致的 7 日龄无 RA 感染背景的雏鸭均分成两组, 1–5 号颈部皮下注射 RA 疫苗, 0.25 mL/只, 6–10 号颈部皮下注射等量 PBS 作为对照组。免疫后连续静脉采血 14 d, 进行间接 ELISA 检测血清中的抗体消长情况。

2 结果与分析

2.1 OmpA 蛋白 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析 菌液超声破碎后收集上清和沉淀, 分别进行

SDS-PAGE 凝胶电泳, 以 PageRuler Prestained Protein Ladder 为参照, 大约在 70 kD 处出现明显的蛋白条带, OmpA 融合蛋白以包涵体和可溶两种形式表达(图 1A)。促进 OmpA 蛋白可溶性表达的优化条件为: 于 37 °C、180 r/min 培养表达菌至 OD_{600} 介于 0.7-0.8 之间, 于培养基中加入 1% (体积比) 乙醇及终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 于 28 °C、180 r/min 诱导表达 7-8 h, 优化后的 SDS-PAGE 电泳结果见图 1B。

将纯化后的重组蛋白 OmpA 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转印到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶封闭, 以 8 种 RA 兔高免血清(1、2、6、10、11、13、14、17 型)为一抗, 葡萄球菌 A 蛋白-HRP 为二抗, 进行 Western-blot 试验。结果显示, 在 70 kD 附近有明显的印记(图 2), 即该融合蛋白能够与多种 RA 兔高免血清结合, 具有良好的免疫反应性。

2.2 间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.1 间接 ELISA 最佳检测条件的确定: 方阵试验的结果显示: 重组 OmpA 蛋白最佳包被浓度

为 8 mg/L, 待检血清最佳稀释倍数是 1:160。

2.2.2 间接 ELISA 的结果判定: 30 份 RA 阴性血清经 1:160 稀释后, 间接 ELISA 检测的平均值为 0.231, 标准差为 0.035, 经计算, 阴性血清的临界值为 0.336。

2.2.3 重复性试验: 按照变异系数($CV, \%$)=标准差(s)/平均值(\bar{x})^[21], 计算板内变异系数在 0.067 3-0.084 7 之间(表 2), 板间变异系数在 0.090 5-0.102 1 之间(表 3), 说明该方法具有良好的重复性。

2.2.4 特异性试验: 用纯化后的重组蛋白 OmpA 检测阴性血清、鸭感染大肠杆菌阳性血清及 RA 阳性血清的平均 OD_{450} 分别为 0.229、0.296、1.081, OmpA 抗原与鸭感染大肠杆菌阳性血清呈阴性反应, 表明建立的检测方法具有良好的特异性。

将经甲醛灭活的鸭感染大肠杆菌 *E. coli* 134 和鸭源沙门氏菌 LH01 梯度稀释, 包被至致敏后的 ELISA 板上, 同时检测阴性血清和 RA 阳性血清并设置空白对照组以更准确地评价所检血清中是否含有相关抗体。检测结果如表 4 所示, 阴性血清的

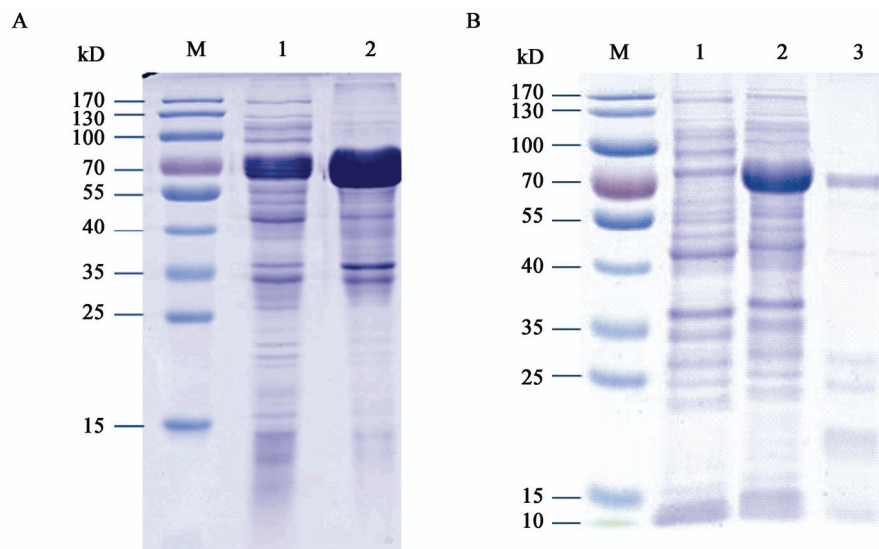


图 1 重组 OmpA 蛋白的表达及纯化的 SDS-PAGE 电泳分析结果

Figure 1 SDS-PAGE analysis of recombinant OmpA expression and purification

注: M: 蛋白 Marker. A: 1: 上清; 2: 包涵体. B: 1: 未诱导; 2: 诱导后; 3: 纯化后 OmpA.

Note: M: Protein marker. A: 1: Dissoluble expression; 2: Expressed in inclusion body. B: 1: Uninducible expression; 2: Inducible expression; 3: Purified recombinant OmpA.

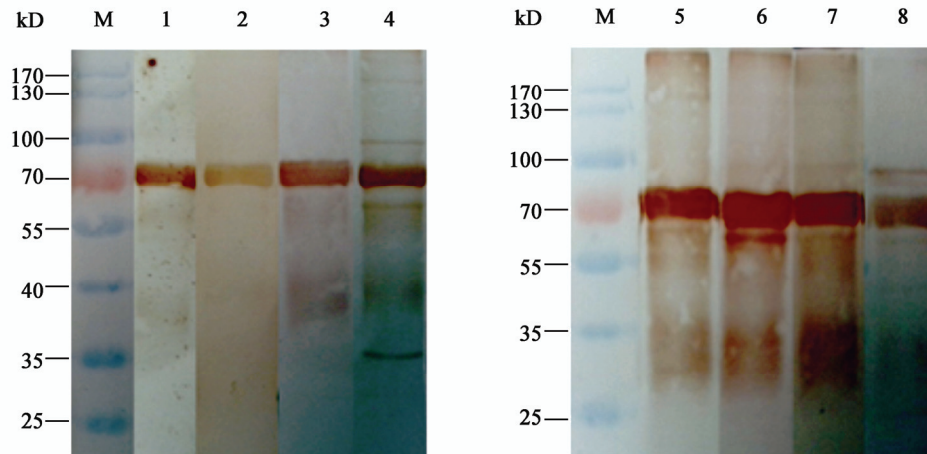


图 2 重组 OmpA 蛋白的 Western-blot 结果

Figure 2 Western-blot analysis of recombinant OmpA

注: M: 蛋白 Marker; 1: 1 型(RAf₆₃); 2: 2 型(RAf₁₅₃); 3: 6 型(RAf₁₆₇); 4: 10 型(RAf₁₀); 5: 11 型(RAf₇₄); 6: 13 型(RAf₄₃); 7: 14 型(RAf₂₇); 8: 17 型(RAf₁₇).

Note: M: Protein marker; 1: Serotype 1 (RAf₆₃); 2: Serotype 2 (RAf₁₅₃); 3: Serotype 6 (RAf₁₆₇); 4: Serotype 10 (RAf₁₀); 5: Serotype 11 (RAf₇₄); 6: Serotype 13 (RAf₄₃); 7: Serotype 14 (RAf₂₇); 8: Serotype 17 (RAf₁₇).

表 2 板内重复性试验结果(OD_{450})

Table 2 Reproducibility of the iELISA within one ELISA plate (OD_{450})

血清 Serum	测定次数 Testing times						平均值 Means	标准差 Standard deviations	变异系数 Variable coefficients (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	1.266	1.155	1.434	1.326	1.288	1.167	1.273	0.104	8.17
2	0.966	1.015	1.108	1.125	1.151	1.223	1.098	0.093	8.47
3	0.706	0.793	0.731	0.811	0.751	0.842	0.772	0.052	6.73

表 3 板间重复性试验结果(OD_{450})

Table 3 Reproducibility of the iELISA among different ELISA plates (OD_{450})

血清 Serum	测定次数 Testing times						平均值 Means	标准差 Standard deviations	变异系数 Variable coefficients (%)
	1	2	3	4	5	6			
1	1.153	1.387	1.276	1.105	1.338	1.172	1.238	0.112	9.05
2	1.095	0.948	1.154	1.018	1.006	1.206	1.071	0.098	9.15
3	0.693	0.793	0.831	0.946	0.866	0.812	0.823	0.084	10.21

表 4 全菌包被 ELISA 检测结果(OD_{450})
Table 4 The result of bacteria-coated ELISA (OD_{450})

抗原 Antigens	包被浓度 Coating concentration (CFU/mL)	阴性血清 Negative serum (Means of OD_{450})	RA 阳性血清 RA positive serum (Means of OD_{450})	空白组 The blank group (Means of OD_{450})
<i>E. coli</i> 134	10^9	0.579	0.650	0.561
	10^8	0.477	0.535	0.462
	10^7	0.488	0.571	0.437
	10^6	0.445	0.521	0.432
	10^5	0.452	0.486	0.424
LH01	10^9	0.525	0.530	0.470
	10^8	0.510	0.529	0.428
	10^7	0.458	0.512	0.424
	10^6	0.491	0.498	0.436
	10^5	0.464	0.472	0.450

OD_{450} 值与空白组接近,说明没有两种抗原对应的抗体。所检测的 RA 阳性血清 OD_{450} 值与阴性血清的 OD_{450} 值相差不超过 0.1,按照本研究叙述的间接 ELISA 结果判定方法,所检测的 RA 阳性血清均为阴性结果,说明 RA 阳性血清中没有上述两种抗原对应的抗体,即 RA 阳性血清与鸭感染大肠杆菌及鸭感染沙门氏菌两种抗原没有反应性。以上结论从反向证明了以 RA 种内保守性蛋白 OmpA 作为包被抗原检测 RA 抗体方法的特异性。

2.2.5 敏感性试验: RA 阳性血清连续倍比稀释后进行间接 ELISA 检测,当血清以 1:10 240 稀释时检测结果仍然为阳性(图 3),说明所建立的检测方法具有良好的敏感性。

2.3 临床应用检测结果

2.3.1 江苏南京周围地区 RA 抗体的初步调查结果: 纯化后的 OmpA 蛋白进行 BCA 法定量,按照确定的检测条件检测 100 份血清样品,每份重复 2 次,测定 OD_{450} ,取平均值,结果检测出 72 份阳性样品。

2.3.2 免疫鸭的抗体水平监测结果: 应用建立的方法对免疫后的雏鸭血清进行检测,每份血清重复 2 孔,测定 OD_{450} ,并分别计算不同检测时间两组

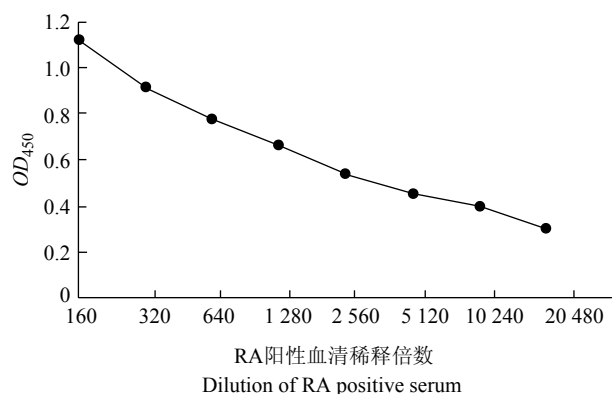


图 3 间接 ELISA 检测 RA 阳性血清的最低稀释度
Figure 3 Sensitivity analysis of the iELISA with RA positive serum

血清 OD_{450} 的平均值和标准差(表 5),其抗体的动态变化情况见图 4。结果显示,第 0-3 天,阴、阳性血清的检测结果基本一致,雏鸭在免疫后第 5 天开始产生抗体,第 11 天抗体可达到较高浓度。

3 结论

ELISA 是检测感染性疾病常用的免疫学技术,具有敏感、特异、快速等优点,可用于大批样品的检测。在 ELISA 检测 RA 抗体的研究中,胡清海等^[23]以脂多糖为包被抗原、Huang 等^[24]以重组蛋白

表 5 ELISA 检测免疫鸭体内的抗体消长水平(OD_{450})
Table 5 The dynamic change of antibodies in RA-immunized ducks by ELISA test (OD_{450})

免疫后天数 Days after immunity (d)	PBS 组 PBS group		平均值 Means	标准差 Standard deviations	免疫组 Immune group		平均值 Means	标准差 Standard deviations
	Test1	Test2			Test1	Test2		
0	0.227	0.223	0.239	0.071	0.238	0.230	0.220	0.010
	0.249	0.252			0.221	0.206		
	0.340	0.379			0.226	0.211		
	0.175	0.202			0.212	0.225		
	0.163	0.183			0.216	0.216		
3	0.253	0.217	0.234	0.021	0.232	0.241	0.241	0.010
	0.254	0.247			0.229	0.234		
	0.211	0.211			0.242	0.260		
	0.216	0.223			0.239	0.240		
	0.235	0.271			0.239	0.251		
5	0.430	0.336	0.289	0.072	0.442	0.433	0.397	0.048
	0.227	0.308			0.453	0.432		
	0.245	0.245			0.414	0.422		
	0.343	0.328			0.326	0.336		
	0.203	0.226			0.360	0.351		
7	0.179	0.172	0.214	0.032	1.268	1.247	1.187	0.073
	0.194	0.209			1.166	1.208		
	0.213	0.214			1.113	1.108		
	0.219	0.212			1.237	1.296		
	0.252	0.278			1.119	1.105		
9	0.172	0.155	0.188	0.015	1.505	1.516	1.430	0.046
	0.187	0.197			1.394	1.403		
	0.202	0.203			1.414	1.441		
	0.202	0.192			1.386	1.417		
	0.180	0.187			1.432	1.391		
11	0.195	0.177	0.172	0.010	1.561	1.553	1.517	0.041
	0.165	0.174			1.457	1.579		
	0.171	0.176			1.504	1.542		
	0.160	0.164			1.561	1.444		
	0.165	0.176			1.514	1.520		
13	0.186	0.164	0.178	0.023	1.587	1.606	1.514	0.057
	0.182	0.191			1.531	1.41		
	0.159	0.163			1.474	1.474		
	0.220	0.208			1.494	1.512		
	0.149	0.160			1.518	1.539		

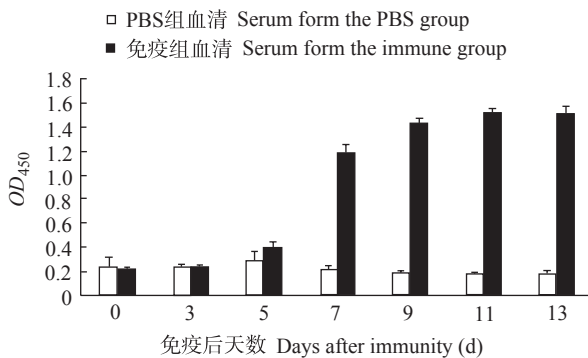


图4 免疫鸭血清抗体消长情况

Figure 4 The dynamic change of antibodies in RA-immunized ducks

P45N 包被, 李富祥等^[21]、程安春等^[25]、程龙飞等^[26]、刘学贤等^[27]以全菌蛋白作为包被抗原, 辜新贵等^[28]以重组 P25 蛋白包被, 均达到检测 RA 抗体的目的。此外, 孙奕^[16]、杨依靠等^[20]曾以 1 型 RA 的 OmpA 重组蛋白建立了检测 1 型 RA 抗体的间接 ELISA 方法。本研究以 2 型 RA 的 OmpA 蛋白为包被抗原建立了检测多种血清型 RA 的间接 ELISA 方法, 不仅可以反映 RA 的感染状况, 还可以评价疫苗的免疫效果。BLAST 结果显示 *OmpA* 基因为 RA 基因组中的保守序列, 且早已证实 OmpA 蛋白具有良好的免疫原性^[29], 具有血清学检测价值^[28]。本研究利用原核表达技术和对诱导条件的优化表达出可溶性的 OmpA 蛋白, 经 Western-blot 分析表明, 该蛋白能与本实验室保存的 8 种血清型代表菌株都产生较强的免疫反应, 是多种血清型 RA 共有的抗原, 可用于检测多种血清型 RA 的感染。经进一步纯化 OmpA 蛋白后, 将其作为间接 ELISA 的包被抗原, 避免杂蛋白产生的非特异性结合, 保证检测结果的准确性。

本研究建立的间接 ELISA 方法使用的包被抗原浓度为 8 mg/L 即可达到满意的效果, 且重复性试验结果显示变异系数在 6.73%–10.21% 之间, 具有良好的重复性、稳定性。因此, 本研究成功建立了可同时检测 1、2、6、10、11、13、14、17 型 8 个 RA 血清型的间接 ELISA 方法, 由于本实验室缺乏

其他血清型 RA 的阳性血清, 建立的方法能否检测更多的 RA 血清型还需进一步的确认。

参考文献

- [1] Saif YM. Disease of Poultry[M]. Translated by Su JL, Gao F, Suo X, et al. 11th Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 767-775 (in Chinese)
Saif YM. 禽病学[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 等译. 第11版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 767-775
- [2] Bisgaard M. Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination[J]. Avian Pathology, 1982, 11(3): 341-350
- [3] Loh H, Teo TP, Tan HC. Serotypes of '*Pasteurella*' isolates from ducks in Singapore: a proposal of new serotypes[J]. Avian Pathology, 1992, 21(3): 453-459
- [4] Sandhu TS, Leister ML. Serotypes of '*Pasteurella*' *anatipestifer* isolates from poultry in different countries[J]. Avian Pathology, 1991, 20(2): 233-239
- [5] Zhang DB, Qu FF, Zheng XJ. General research on serotypes of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2006, 42(11): 38-40 (in Chinese)
张大丙, 曲丰发, 郑献进. 鸭疫里默氏菌血清型的研究概况[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(11): 38-40
- [6] Yang XH, Cheng LF, Chen HM, et al. Isolation and identification of serotype 11 *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(5): 23-27 (in Chinese)
杨晓辉, 程龙飞, 陈红梅, 等. 血清 11 型鸭疫里默氏菌的分离鉴定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(5): 23-27
- [7] Chen HZ, Liu T, Wang R, et al. The epizootiological investigation of *Riemerella anatipestifer* infection occurred in commercial duck farms of Xinyang[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014(5): 113-115 (in Chinese)
陈宏智, 刘涛, 王瑞, 等. 信阳地区肉鸭场鸭疫里默氏菌流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(5): 113-115
- [8] Subramaniam S, Huang B, Loh H, et al. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000, 7(2): 168-174
- [9] Du JL, Mu W, Zhao YR, et al. Research progress on OMPs of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(6): 38-42 (in Chinese)
杜金玲, 牟巍, 赵亚荣, 等. 鸭疫里氏杆菌外膜蛋白研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(6): 38-42
- [10] Zhai ZP, Cheng LF, Tang F, et al. Immunoproteomic identification of 11 novel immuno reactive proteins of *Riemerella anatipestifer* serotype 2[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2012, 65(1): 84-95
- [11] Zhai ZP, Li XX, Xiao X, et al. Immunoproteomics selection of cross-protective vaccine candidates from *Riemerella anatipestifer* serotypes 1 and 2[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2/4): 850-857
- [12] Wei XL, Sun YN, Jiang SJ, et al. Cloning and sequencing of outer membrane protein A of Chinese *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(3): 7-11 (in Chinese)
魏秀丽, 孙亚妮, 姜世金, 等. 鸭疫里默氏杆菌中国分离株的外膜蛋白 A 基因的克隆与序列分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 7-11
- [13] Tsai HJ, Liu YT, Tseng CS, et al. Genetic variation of the *ompA* and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*[J]. Avian Pathology, 2005, 34(1): 55-64

- [14] Fang Q. Development and application of indirect ELISA for detecting RA antibody[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2007 (in Chinese)
方钦. 间接 ELISA 检测鸭疫里氏杆菌抗体方法的建立及应用[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2007
- [15] Hu QH, Liu XW, Zhao SH, et al. Detection of *Riemerella anatipestifer* by PCR[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2002, 24(6): 471-473 (in Chinese)
胡清海, 刘晓文, 赵世华, 等. 应用 PCR 技术检测鸭疫里氏杆菌的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(6): 471-473
- [16] Sun Y. Development and application of an ELISA using a recombinant outer membrane proteins A for the detection of serotype 1 *Riemerella anatipestifer* infections in ducks[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2010 (in Chinese)
孙奕. 1型鸭疫里氏杆菌 OmpA 蛋白间接 ELISA 方法的建立及应用[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2010
- [17] Zhai ZP. Selection and application of protective antigens of *Riemerella anatipestifer*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese)
翟志鹏. 鸭疫里氏杆菌保护性抗原的筛选及应用[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013
- [18] Chai ZB, Zhang GL, Wang XZ, et al. Optimization of condition for soluble expression of GST-PADI4 fusion protein and purification of expressed product[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(3): 404-411 (in Chinese)
柴政斌, 张更林, 王学政, 等. 融合蛋白 GST-PADI4可溶性表达条件的优化及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(3): 404-411
- [19] Liu S, Hu BC. Strategy of protein soluble expression in *Escherichia coli*[J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16(2): 172-175 (in Chinese)
刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(2): 172-175
- [20] Yang YF, Luo QP, Zhang RR, et al. Development and application of an indirect ELISA for detection of *Riemerella anatipestifer* serotype 1[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(1): 13-18 (in Chinese)
杨依靠, 罗青平, 张蓉蓉, 等. 1型鸭疫里氏杆菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(1): 13-18
- [21] Li FX, Yang B, Chang ZS, et al. Development and application of indirect ELISA for the detection of serum antibodies against *Riemerella anatipestifer* in duck[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2010, 37(1): 202-205 (in Chinese)
李富祥, 杨斌, 常志顺, 等. 间接 ELISA 检测鸭疫里氏杆菌血清抗体方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 202-205
- [22] Xu B, Chen FY, Cai BX, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against avian strain of *Pasteurella multocida*[J]. China Poultry Science, 1995(1): 5-8 (in Chinese)
徐步, 陈溥言, 蔡宝祥. 禽多杀性巴氏杆菌单克隆抗体的制备及其基本性状研究[J]. 中国家禽学报, 1995(1): 5-8
- [23] Hu QH, Li G, Zheng MQ, et al. Development of an ELISA for the detection of antibody to *Pasteurella anatipestifer* in ducks[J]. Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases, 1998, 20(6): 352-356 (in Chinese)
胡清海, 李刚, 郑明球, 等. 间接 ELISA 检测鸭疫里氏杆菌抗体的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(6): 352-356
- [24] Huang B, Jimmy K, Loh H, et al. Development of an ELISA using a recombinant 41 kDa partial protein (P45N') for the detection of *Riemerella anatipestifer* infections in ducks[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 88(4): 339-349
- [25] Cheng AC, Wang MS, Fang PF, et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the humoral antibody to serotype 2 *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2004, 40(12): 14-16 (in Chinese)
程安春, 汪铭书, 方鹏飞, 等. 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清2型鸭疫里氏杆菌抗体的研究[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(12): 14-16
- [26] Cheng LF, Shi SH, Fu GH, et al. Detection of the antibody against *Riemerella anatipestifer* serotype 2 by indirect enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2006, 21(2): 131-134 (in Chinese)
程龙飞, 施少华, 傅光华, 等. 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
- [27] Liu XX, Gong JL, Shan YJ, et al. Development and application of ELISA for detecting of the antibody against *Riemerella anatipestifer*[J]. China Poultry, 2009, 31(22): 52-54 (in Chinese)
刘学贤, 龚建林, 单艳菊, 等. 鸭疫里氏杆菌 ELISA 检测方法的研究及初步应用[J]. 中国家禽, 2009, 31(22): 52-54
- [28] Gu XG, Yuan JF, Qin ZH, et al. Development of an indirect ELISA using recombinant P25 protein for detecting *Riemerella anatipestifer* infection in ducks[J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(3): 218-223 (in Chinese)
辜新贵, 袁建丰, 覃宗华, 等. 鸭疫里氏杆菌重组蛋白 P25 间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(3): 218-223
- [29] Thwaites RN, Kadis S. Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the protein[J]. Infection and Immunity, 1991, 59(2): 544-549