

# 产气荚膜梭菌 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$ 融合蛋白原核表达及其间接 ELISA 方法的建立

潘瑶<sup>1</sup>, 任小侠<sup>2</sup>, 胡云皓<sup>2</sup>, 王雅茜<sup>2</sup>, 刘燕<sup>2</sup>, 蓝岚<sup>1</sup>, 王豪杰<sup>2</sup>, 岳怀宁<sup>2</sup>, 吴建平<sup>\*1</sup>, 朱良全<sup>\*2</sup>

1 四川省甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川 康定 626000

2 中国兽医药品监察所, 北京 100081

潘瑶, 任小侠, 胡云皓, 王雅茜, 刘燕, 蓝岚, 王豪杰, 岳怀宁, 吴建平, 朱良全. 产气荚膜梭菌  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3189-3200.

PAN Yao, REN Xiaoxia, HU Yunhao, WANG Yaqian, LIU Yan, LAN Lan, WANG Haojie, YUE Huaining, WU Jianping, ZHU Liangquan. Prokaryotic expression of the fusion protein  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  of *Clostridium perfringens* and establishment of an indirect ELISA method[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3189-3200.

**摘要:**【背景】产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是引起牛魏氏梭菌病(猝死症)的主要病原, 严重危害养牛业。酶联免疫吸附法(ELISA)是诊断疫病及抗体检测的重要手段。【目的】表达重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白, 并以此为靶抗原建立间接 ELISA 抗体检测方法, 为临床检测牦牛 *C. perfringens* 及流行病学调查提供技术支持。【方法】利用生物信息学软件(EditSeq、Protean)和 Jameson-Wolf 方法分析牛源 *C. perfringens* 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 2 和  $\epsilon$  蛋白抗原指数, 截取抗原指数较高肽段并用柔性 Linker 连接, 经密码子优化后克隆至载体 pET-32a(+), 构建重组表达质粒 pET-32 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$ , 转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞, 经培养、诱导表达、纯化后采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。以重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白作为包被抗原, 经棋盘法和控制单一变量法优化反应条件, 建立间接 ELISA 抗体检测方法, 通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线确定临界值并对其敏感性、特异性、重复性和临床效果进行评价。【结果】 $\alpha$  的 241–403 肽段、 $\beta$ 2 的 161–355 肽段、 $\epsilon$  的 154–331 肽段抗原指数较高, 将它们连接并融合表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定融合蛋白表达正确。ELISA 抗体检测方法最佳工作条件为: 抗原包被浓度 5  $\mu$ g/mL 4  $^{\circ}$ C 过夜或 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min; 5% 脱脂乳于 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 血清稀释度为 1:150 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 酶标二抗 1:2 000 于 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 避光显色 10 min。检测临界值为 0.470 2; 敏感性高, 可检测阳性血清最大稀释度为 1:3 200; 特异性强, 与溶血性曼氏杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800703); 四川省科技厅苗子工程重点项目(2023JDRC0121); 甘孜州校州合作项目

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800703), the Key Project of Seedling Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2023JDRC0121), and the Ganzi School-State Cooperation Project.

\*Corresponding authors. E-mail: ZHU Liangquan, 1367391894@qq.com; WU Jianping, 258628955@qq.com

Received: 2024-03-23; Accepted: 2024-04-24; Published online: 2024-05-14

等阳性血清均无交叉反应；重复性好，批内和批间变异系数均小于 10%。四川省甘孜藏族自治州部分地区共 277 份牦牛血清样品检测结果显示，*C. perfringens* 抗体阳性率为 89.89%，与商品化产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒检测结果基本一致。【结论】成功制备重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白并建立检测 *C. perfringens* 的间接 ELISA 抗体检测方法。

关键词：产气荚膜梭菌； $\alpha$  毒素； $\beta$ 2 毒素； $\epsilon$  毒素；融合表达；间接 ELISA

## Prokaryotic expression of the fusion protein $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$ of *Clostridium perfringens* and establishment of an indirect ELISA method

PAN Yao<sup>1</sup>, REN Xiaoxia<sup>2</sup>, HU Yunhao<sup>2</sup>, WANG Yaqian<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, LAN Lan<sup>1</sup>, WANG Haojie<sup>2</sup>, YUE Huaining<sup>2</sup>, WU Jianping<sup>\*1</sup>, ZHU Liangquan<sup>\*2</sup>

1 Animal Husbandry Science Institute of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Sichuan Province, Kangding 626000, Sichuan, China

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Background] *Clostridium perfringens* is the main pathogen causing sudden death syndrome in cattle, seriously endangering the cattle industry. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an important tool for diagnosis of this disease and antibody detection. [Objective] We expressed the recombinant  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  fusion protein and used this protein as the target antigen to establish an indirect ELISA method for antibody detection, aiming to provide technical support for the clinical detection of *C. perfringens* in yaks and epidemiological investigation. [Methods] The bioinformatic tools EditSeq and Protean and the Jameson-Wolf method were employed to analyze the antigenic indices of  $\alpha$ ,  $\beta$ 2, and  $\epsilon$  proteins of *C. perfringens* from cattle. The peptides with higher antigenic indices were captured, ligated, optimized for codons, and then cloned into the pET-32a(+) vector to construct the recombinant expression plasmid pET-32 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$ , which was transformed into BL21(DE3) competent cells. The cells were cultured and induced for protein expression, and the expressed protein was purified and identified by SDS-PAGE and Western blotting. With the recombinant  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  fusion protein as the coating antigen, we optimized the reaction conditions by the checkerboard assay and single factor tests to establish an indirect ELISA method. The cut-off was determined by the receiver operating characteristic (ROC) curve, and the specificity, sensitivity, reproducibility, and clinical efficacy of the established method were evaluated. [Results] The peptides with high antigenic indices of  $\alpha$  (aa 241–403),  $\beta$ 2 (aa 161–355), and  $\epsilon$  (aa 154–331) toxins were selected for fusion expression, and the fusion protein was determined as correctly expressed by SDS-PAGE and Western blotting. The optimal ELISA conditions for antibody detection were as follows: incubation with the coating antigen (5  $\mu$ g/mL) at 4 °C overnight or 37 °C for 60 min; incubation with 5% skimmed milk at 37 °C for 1 h; incubation with the serum (dilution at 1:150) at 37 °C for 30 min; incubation with secondary antibody (1:2 000) at 37 °C for 30 min; color

development for 10 min with protection from light. The cut-off of detection was 0.470 2. The established method demonstrated high specificity because of no cross-reactivity with positive sera of *Mannheimia haemolytica*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. It showcased high sensitivity, with the maximum dilution of detectable serum being 1:3 200. The coefficients of variation within and between batches were less than 10%, which indicated high reproducibility of the established method. The detection for 277 yak serum samples from Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Sichuan Province with the established method showed that the antibody positivity rate of *C. perfringens* was 89.89%, which was basically in agreement with the results obtained by the commercial ELISA kit for the detection of *C. perfringens*  $\alpha$ -toxin. **[Conclusion]** We successfully constructed the recombinant  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  fusion protein and established an indirect ELISA method for the detection of *C. perfringens*.

**Keywords:** *Clostridium perfringens*;  $\alpha$ -toxin;  $\beta$ 2-toxin;  $\epsilon$ -toxin; fusion expression; indirect ELISA

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)也称魏氏梭菌,是一种重要的人畜共患病原菌,广泛分布于自然界(土壤、污水、饲料、粪便等),其宿主较为广泛,可感染牛、猪、羊、鸡和人等<sup>[1-2]</sup>。依据主要致死性毒素( $\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、CPE、NetB)及其抗毒素的中和试验,可将 *C. perfringens* 分为 7 种血清型(A、B、C、D、E、F、G)<sup>[3-4]</sup>。牛产气荚膜梭菌病主要由 A 型、C 型和 D 型所引起,临床表现为牛梭菌性肠炎、出血性肠炎、空肠出血综合征、肠毒血症、猝死等症状,会给养牛业造成巨大的经济损失<sup>[5-7]</sup>。现阶段预防该病主要以灭活疫苗为主,但其产生抗体滴度会随时间延长而下降<sup>[8-9]</sup>。因此,建立灵敏、特异、快速准确的诊断方法对于疫病诊断和抗体水平监测非常重要。

检测 *C. perfringens* 的方法有细菌分离培养、分子生物学和血清学检测等。细菌分离培养存在操作烦琐、耗时长等缺点;PCR 或荧光定量 PCR 方法存在成本高昂、需特殊设备、对操作人员要求较高等缺点<sup>[10-11]</sup>;ELISA 方法具有敏感性高、特异性强、操作简单等优点,且可监测动物抗体水平<sup>[12]</sup>。

选择良好的靶抗原是建立间接 ELISA 抗体检测方法的关键。 $\alpha$  毒素存在于所有类型

*C. perfringens* 中,具有磷脂酶 C 和鞘磷脂酶活性,可进入血液循环引起动物败血症或毒血症,进而导致急性死亡<sup>[13]</sup>; $\beta$ 2 毒素是由 B、C 型产气荚膜梭菌分泌的一种具有细胞毒性、致死性的毒素,可使感染动物引起坏死性肠炎和肠毒血症<sup>[14]</sup>; $\epsilon$  毒素主要是 B 型和 D 型 *C. perfringens* 分泌的一种外毒素,能使感染动物出现肌肉组织坏死<sup>[15]</sup>。目前,虽有以  $\alpha$  毒素、 $\beta$ 1 毒素为包被抗原建立的间接 ELISA 方法,但其靶标单一,抗体检测存在一定局限性<sup>[16-17]</sup>。

本研究以重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白为靶抗原,优化反应条件后建立 *C. perfringens* 间接 ELISA 抗体检测方法,以期对 *C. perfringens* 流行病学调查、疫病诊断及抗体水平监测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、传染性牛鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、牛副流感病毒

(bovine parainfluenza virus, BPIV)、牛冠状病毒 (bovine coronavirus, BCoV) 和牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) 的阳性血清, 以及 *C. perfringens* 的阳性血清和阴性血清、*E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞、马血清、24 份阳性血清和 24 份阴性血清均由中国兽医药品监察所制备保存。277 份牦牛血清样品采自四川省甘孜藏族自治州部分地区 (其中九龙县 12 份、甘孜县 24 份、道孚县 60 份、炉霍县 19 份、理塘县 79 份、雅江县 49 份和色达县 34 份)。

## 1.2 主要试剂和仪器

HRP-兔抗牛 IgG (H+L)、蛋白 Marker (10–180 kDa), 博奥龙生物科技有限公司; TMB 显色液、快速转膜液、ECL 化学发光试剂盒、PVDF 膜和 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; PBS、PBST 缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司; 96 孔酶标板, 康宁公司; 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒, 上海烜雅生物科技有限公司。核酸蛋白测定仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 分光光度计, 美谷分子仪器有限公司; 凝胶成像仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

## 1.3 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\varepsilon$ 毒素蛋白抗原指数预测和菌液 PCR 鉴定

使用 EditSeq、Protean 软件及 Jameson-Wolf 方法分别预测  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\varepsilon$  毒素蛋白的抗原指数<sup>[18]</sup>, 选择抗原指数较高的肽段并通过柔性 Linker (5'-GGTGGCGGCGGCTCT-3') 将 3 个片段进行连接。将连接后的序列送北京睿博兴科生物科技有限公司进行整体密码子优化后合成并构建重组表达质粒 pET-32 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$ 。根据 GenBank 公布的  $\alpha$ 、 $\varepsilon$  基因序列, 利用 Vazyme 网页在线设计引物 (<https://crm.vazyme.com/cetool/simple.html>), 得到  $\alpha$ -F (5'-GACAAGGCCATGGCTGATATCATGAGTCATAGTTGGGATGATTGGG-3') 和  $\varepsilon$ -R (5'-TT

ATTTTATTCCTGGTGCCTTAATAGA-3'), 并由北京六合华大基因科技有限公司合成, 引物工作浓度均为 10  $\mu$ mol/L。对合成后的重组表达质粒进行菌液 PCR 鉴定。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 引物  $\alpha$ -F、 $\varepsilon$ -R 各 1  $\mu$ L, 菌液 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L; PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后取 5  $\mu$ L PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 送北京睿博兴科生物科技有限公司测序。

## 1.4 重组 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$ 融合蛋白表达与纯化

将重组表达质粒 pET-32 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$  转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 涂布于含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板, 37  $^{\circ}$ C 静置培养过夜。挑取单菌落接种于 10 mL 含 Amp 的 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。将菌液按 1% 接种量接种至 500 mL 含 Amp 的 LB 培养基, 待菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.6 时, 添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导表达 5 h。5 000 r/min 离心 2 min 弃上清, 使用 PBS 重悬菌体, 在高压细胞破碎机 128 MPa 条件下将其破碎后, 用 8 mol/L 尿素溶解沉淀, 并使用 Ni NTABeads 6FF 重力柱进行纯化, 分别在含 8、6、4、2 mmol/L 尿素的透析缓冲液中透析 8 h, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.5 重组 $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$ 融合蛋白的鉴定

对重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$  融合蛋白用 20% 的蛋白预制胶进行 SDS-PAGE 鉴定, 观察纯化结果, 再进行 Western blotting 分析: 将 SDS-PAGE 蛋白带转移至亲水 PVDF 膜上, 5% 脱脂乳 37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h; *C. perfringens* 阳性血清 1:200 稀释并于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 10 次, 每次 3 min; HRP-兔抗牛 IgG (H+L) 1:5 000 稀释并于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗涤 10 次, 每次 3 min; 使用 ECL 化学发光试剂盒避光显色 1–2 min, 在凝胶成像仪器

中观察结果。

### 1.6 间接 ELISA 条件的优化

采用棋盘法和控制单一变量法确定最佳反应条件。将重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\epsilon$  融合蛋白用 PBS (pH 9.6) 分别稀释至 10.0、5.0、2.5  $\mu\text{g/mL}$  (抗原包被浓度优化), 100  $\mu\text{L/孔}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBST 洗涤 3 次; 用 5.0% 脱脂乳、1.0% 马血清、5.0% BSA、2.5% 脱脂乳、2.5% BSA、1.0% 明胶分别封闭(封闭剂优化), 300  $\mu\text{L/孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  分别孵育 30、60、90、120 min (封闭时间优化); PBST 洗涤 3 次; *C. perfringens* 阳性血清和阴性血清分别进行 1:100、1:150、1:200、1:250、1:300 稀释(最佳血清稀释倍数优化), 100  $\mu\text{L/孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  分别孵育 30、45、60 min (最佳血清作用时间优化); HRP-兔抗牛 IgG (H+L) 分别按照 1:500、1:1 000、1:1 500、1:2 000 稀释(酶标二抗稀释倍数优化), 100  $\mu\text{L/孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  分别孵育 30、45、60 min (酶标二抗作用时间优化); PBST 洗涤 3 次; 加 TMB 显色液 100  $\mu\text{L/孔}$ , 分别避光显色 5、10、15 min (显色时间优化); 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 在  $OD_{450}$  条件下读数, 选择阳性/阴性 (positive/negative, P/N) 值最大的为最佳条件 (以上试验均重复 3 次, 取平均值)。

### 1.7 检测临界值的确定

利用已优化的间接 ELISA 方法对已知标准的 24 份阳性血清和 24 份阴性血清进行检测, 获得每个样品的  $OD_{450}$  值, 使用 SPSS 软件分析并绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC), 确定检测方法的敏感度值(sensitivity, Se)、特异度值(specificity, Sp) 及曲线下面积(area under curve, AUC), 并计算约登指数(Youden=Se+Sp-1), Youden 指数最大的值对应的数值为检测临界值<sup>[19]</sup>。

### 1.8 敏感性试验

将 *C. perfringens* 阳性血清和阴性血清分别

使用 PBS 进行倍比稀释, 从 1:100 稀释到 1:25 600, 按照优化好的条件进行检测, 测定每孔  $OD_{450}$  值, 以验证该方法能检测到的血清最大稀释度(每个试验 3 个重复, 求平均值)。

### 1.9 特异性试验

利用建立的间接 ELISA 方法分别对 *M. haemolytica*、*S. enteritidis*、*E. coli*、*S. aureus*、*P. multocida*、BVDV、IBRV、BPIV、BCoV 和 *Mycoplasma bovis* 的阳性血清进行检测, 以阳性血清和阴性血清为对照, 以评价该方法的特异性(每个试验 3 个重复, 求平均值)。

### 1.10 重复性试验

随机选取 6 份血清样品, 利用建立的 *C. perfringens* 间接 ELISA 抗体检测方法对同一批次包被的 3 个不同 ELISA 板进行批内重复性试验; 另外随机选用 3 个不同批次包被的 ELISA 板, 用本试验建立的方法对上述 6 份血清样品进行批间重复性试验。计算批间或批内的平均值( $\bar{x}$ )、标准差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV), 评估该检测方法的重复性。

### 1.11 临床样品检测

利用本研究建立的 *C. perfringens* 间接 ELISA 抗体检测方法与商业化的产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒同时检测采集的 277 份牦牛血清, 初步评估该方法的临床应用效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ 、 $\beta$ 2 和 $\epsilon$ 毒素蛋白抗原表位和融合基因大小

用 Protean 软件预测  $\alpha$ 、 $\beta$ 2 和  $\epsilon$  毒素蛋白的抗原指数, 发现  $\alpha$ 、 $\beta$ 2 和  $\epsilon$  毒素蛋白抗原指数均较高, 整体抗原性较好(图 1)。选择抗原性较为突出且中间部分无终止密码子的  $\alpha$  毒素蛋白

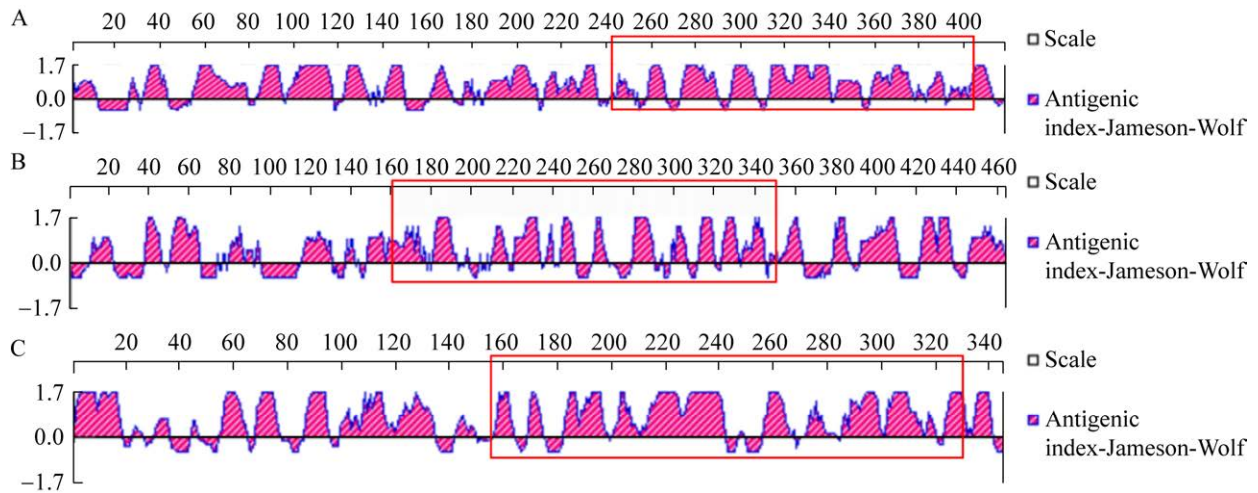


图1 Protean 软件预测  $\alpha$  (A)、 $\beta_2$  (B)和  $\epsilon$  毒素(C)的蛋白抗原表位

Figure 1 Prediction of protein epitopes of  $\alpha$  (A),  $\beta_2$  (B) and  $\epsilon$  toxins (C) by Protean software.

的 241–403 肽段、 $\beta_2$  毒素蛋白的 161–355 肽段和  $\epsilon$  毒素蛋白的 154–331 肽段进行融合表达, 经 PCR 和测序鉴定其基因含碱基 1 617 bp, 与预期一致(图 2)。

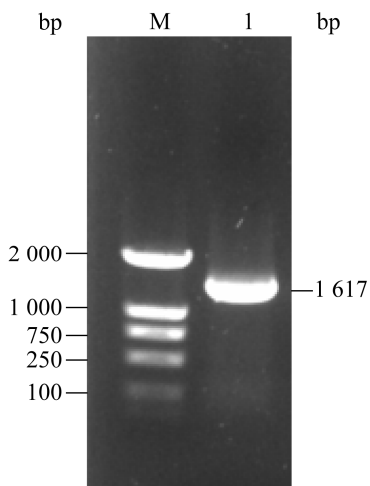


图2 产气荚膜梭菌  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  重组质粒菌液 PCR 产物扩增图 M: DL2000 DNA Marker; 1:  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  扩增的产物, 大小 1 617 bp

Figure 2 Amplification of *Clostridium perfringens*  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  recombinant plasmid PCR products. M: DL2000 DNA Marker; 1:  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  amplification product, size 1 617 bp.

## 2.2 重组 $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$ 融合蛋白的特性

对诱导表达的 500 mL 菌液离心破碎, 经 SDS-PAGE 鉴定, 主要以包涵体形式表达, 上清表达较少(图 3)。通过对包涵体变性、纯化、复

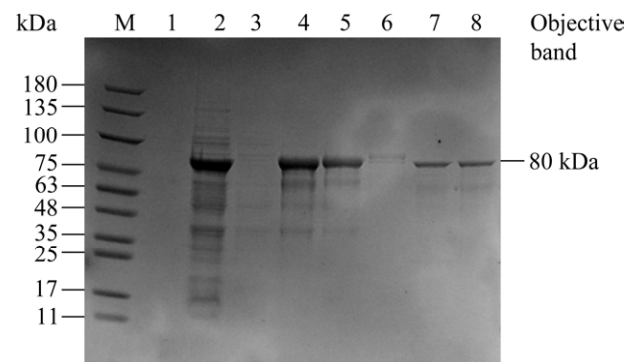


图3 重组  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  融合蛋白 SDS-PAGE 图 M: 11–180 kDa 蛋白 Marker; 1: 诱导前未裂解全菌; 2: 诱导后裂解菌液; 3: 上清; 4: 沉淀; 5: 流穿液; 6: 洗涤液; 7–8: 蛋白洗脱液

Figure 3 SDS-PAGE results of recombinant  $\alpha$ - $\beta_2$ - $\epsilon$  fusion protein. M: 11–180 kDa Protein Marker; 1: Whole bacteria not lysed before induction; 2: Lysed bacterial solution after induction; 3: Supernatant; 4: Precipitation; 5: Penetrating fluid; 6: Washing liquid; 7–8: Protein eluent.

性,最终获得 2.27 mg 蛋白质。经 Western blotting 鉴定,重组  $\alpha$ - $\beta$ 2- $\varepsilon$  融合蛋白相对分子质量约 80 kDa,并且该蛋白可与 *C. perfringens* 阳性血清发生良好的反应,表明其反应原性较好(图 4)。

### 2.3 抗原包被浓度与血清稀释倍数

采用棋盘法对包被抗原浓度与血清稀释倍数进行优化。结果显示(表 1),当抗原包被浓度为 5  $\mu$ g/mL,血清稀释倍数为 1:150 时,P/N 值最大。

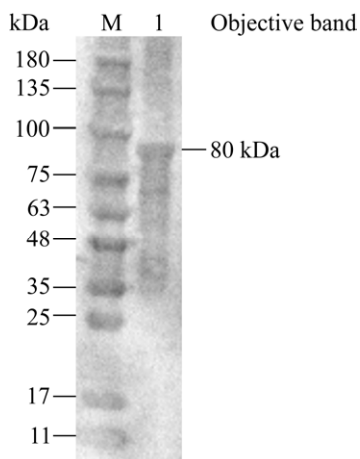


图 4 Western blotting 结果 M: 11–180 kDa 蛋白 Marker; 1: *C. perfringens* 阳性血清反应

Figure 4 Western blotting results. M: 11–180 kDa protein Marker; 1: *C. perfringens* positive serum reaction.

### 2.4 其他 ELISA 条件优化结果

采用单一控制变量法分别对封闭剂及封闭时间、血清作用时间、酶标二抗稀释倍数及作用时间以及显色时间进行优化。结果显示,5% 脱脂乳作为封闭剂最优(图 5A),封闭 1 h (图 5B),最佳血清作用时间为 30 min (图 5C),酶标二抗最佳稀释倍数为 1:2 000 (图 5D),其最佳作用时间为 30 min (图 5E),最佳显色时间为 10 min (图 5F)。

### 2.5 检测临界值的确定结果

利用已优化的间接 ELISA 方法对已知标准的 24 份阳性血清和 24 份阴性血清进行检测,使用 SPSS 软件分析并绘制 ROC 曲线。结果显示,当  $OD_{450}=0.470 2$  时,Se 为 88%; Sp 为 100%, Youden 指数=0.88 最大(图 6),AUC=0.986。因此,当  $OD_{450}\geq 0.470 2$  时,判定检测血清为阳性;当  $OD_{450}< 0.470 2$  时,判定检测血清为阴性。

### 2.6 敏感性试验结果

将 *C. perfringens* 阳性血清和阴性血清分别使用 PBS 从 1:100 稀释到 1:25 600,利用建立的间接 ELISA 方法进行检测。结果显示,当血清 1:3 200 稀释时, $OD_{450}> 0.519$  (图 7),仍可以检测到,表明该方法敏感性较高。

表 1 适宜抗原包被浓度和血清稀释倍数

Table 1 Determination of antigen coating concentration and serum dilution

抗原浓度 Antigen concentration ( $\mu$ g/mL)		血清稀释倍数 Serum dilution multiple				
		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
10	P	0.713 1	0.526 4	0.470 1	0.224 65	0.204 75
	N	0.431 1	0.335 2	0.252 9	0.198 7	0.166
	P/N	1.654 141	1.570 406	1.858 837	1.130 599	1.233 434
5	P	0.601 75	0.480 05	0.228 6	0.267 75	0.278 05
	N	0.354 75	0.212 65	0.171 1	0.215 45	0.188 5
	P/N	1.696 265	2.257 465	1.336 061	1.242 748	1.475 066
2.5	P	0.374 85	0.202 3	0.280 7	0.198 85	0.139 7
	N	0.216 5	0.212 85	0.266 3	0.161 75	0.126 8
	P/N	1.731 409	0.950 435	1.054 074	1.229 366	1.101 735

P: 阳性血清; N: 阴性血清

P: Positive serum; N: Negative serum.

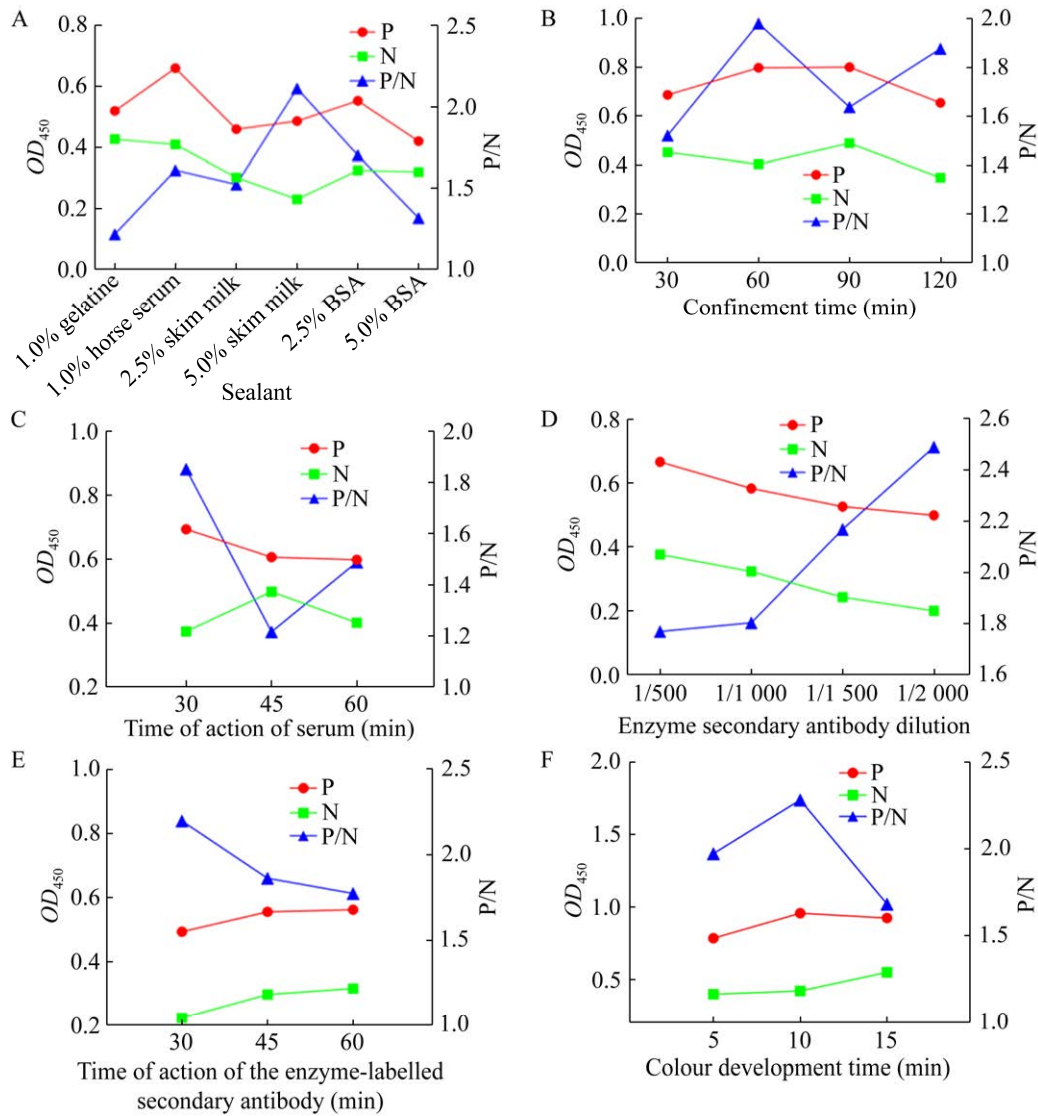


图 5 间接 ELISA 相关反应条件优化结果 A: 封闭剂筛选; B: 封闭时间优化; C: 最佳血清作用时间优化; D: 酶标二抗稀释倍数优化; E: 酶标二抗作用时间优化; F: 最佳显色时间优化. P: 阳性血清; N: 阴性血清

Figure 5 The optimization results of indirect ELISA related reaction conditions. A: Screening of encapsulants. B: Optimisation of encapsulation time. C: Optimisation of optimal serum action time. D: Optimisation of enzyme-labelled secondary antibody dilution. E: Optimisation of enzyme-labelled secondary antibody action time. F: Optimisation of optimal colour development time. P: Positive serum; N: Negative serum.

## 2.7 特异性试验结果

结果显示, 与其他阳性血清均无交叉反应 (图 8), 表明该方法特异性较好。

## 2.8 重复性试验结果

结果显示, 批间与批内试验变异系数均小

于 10% (表 2), 表明该方法重复性较好。

## 2.9 临床样品检测结果

利用建立的 *C. perfringens* 间接 ELISA 抗体检测方法 与商品化的产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒同时检测 277 份牦牛血清。结果显



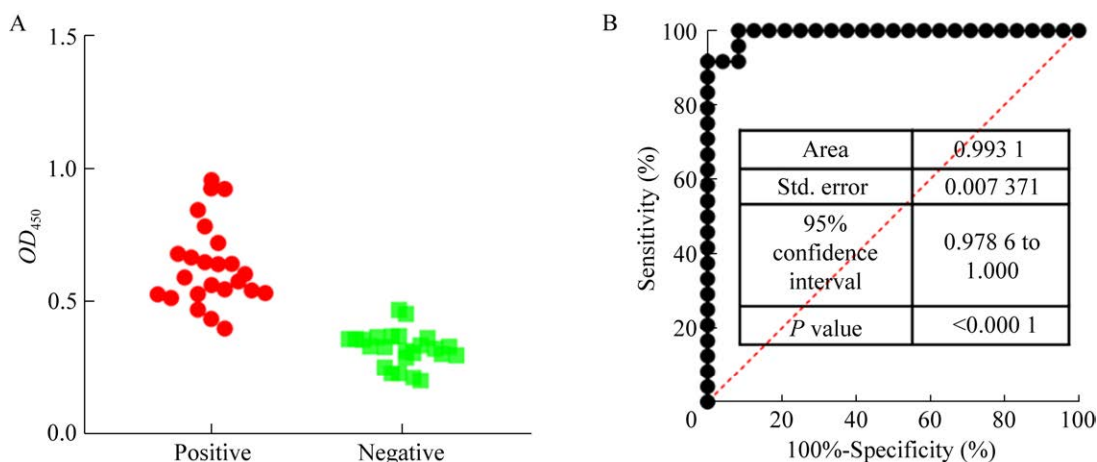


图 6 检测临界值的确定 A: 48 份血清检测结果. B: 受试者工作特征曲线分析

Figure 6 Determination of detection critical value. A: 48 serum test results. B: Receiver operating characteristic curve analysis.

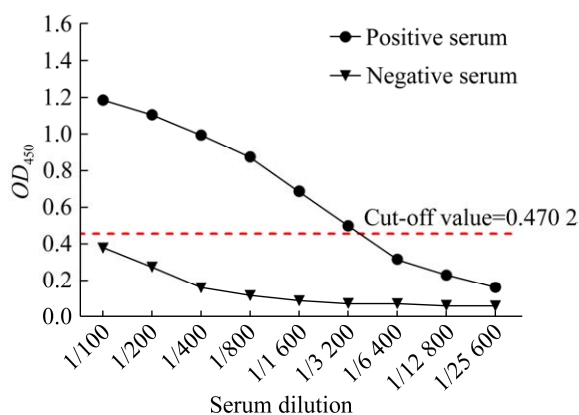


图 7 血清不同稀释倍数检测的 OD 值

Figure 7 Detection results of serum maximum dilution multiple.

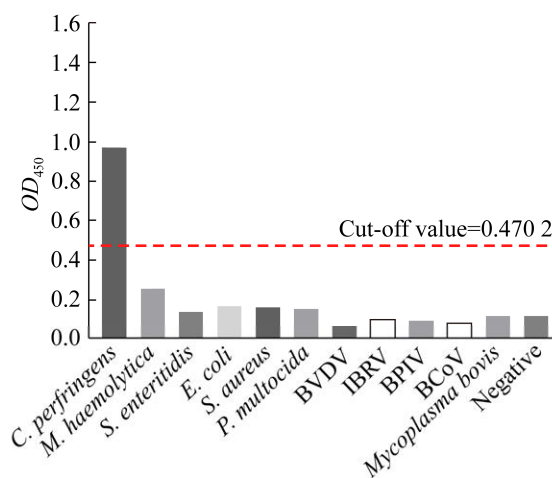


图 8 特异性检测结果

Figure 8 Specific detection results.

示, 整体阳性率为 89.89%, 具体结果见表 3。此外, 该方法与产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒鉴定阳性率 88.09% 符合, 表明其具有良好的临床应用效果。

### 3 讨论与结论

牦牛作为高原地区牧民家庭的主要养殖畜种, 是当地畜牧业的重中之重, 与地方经济发展紧密相关<sup>[7-8,17]</sup>。据报道, 在高原地区产气荚

表 2 重复性试验结果

Table 2 Repeatability test results

样品 Sample	批间试验 Inter-batch testing		批内试验 Intra-batch testing	
	$\bar{x} \pm SD$	CV (%)	$\bar{x} \pm SD$	CV (%)
1	0.588±0.012	2.04	0.591±0.015	2.54
2	0.459±0.015	3.27	0.457±0.008	1.75
3	0.804±0.009	1.12	0.813±0.012	1.48
4	1.081±0.021	1.30	1.069±0.009	0.84
5	0.196±0.011	5.61	0.201±0.013	6.47
6	0.212±0.013	6.13	0.211±0.007	3.32

表3 建立的方法与  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒检测临床样品结果比较Table 3 Comparison of the results of the established method with the  $\alpha$ -toxin ELISA kit for clinical samples

地点 Site	数量 Number	本研究所建立方法 Establishment of methodology in this study		$\alpha$ 毒素 ELISA 检测试剂盒 Clostridium perfringens $\alpha$ -toxin ELISA kit	
		阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate (%)	阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate (%)
		九龙县 Jiulong County	12	11	91.67
甘孜县 Ganzi County	24	19	79.17	18	75.00
道孚县 Daofu County	60	56	93.33	52	86.67
炉霍县 Luhuo County	19	19	100.00	18	94.74
理塘县 Litang County	79	68	86.08	69	87.34
雅江县 Yajiang County	49	43	87.76	43	87.76
色达县 Seda County	34	33	97.06	32	94.12
共计 Total	277	249	89.89	244	88.09

膜梭菌的阳性率在 22.99%–47.06%。本研究选择在牦牛中 *C. perfringens* 流行率较高的 A 型、C 型、D 型的  $\alpha$  毒素、 $\beta$ 2 毒素和  $\epsilon$  毒素抗原性良好的肽段实现串联融合表达<sup>[18-20]</sup>，建立适合检测牦牛 *C. perfringens* 抗体的间接 ELISA 方法。该方法检测 *C. perfringens* 阳性血清最大稀释倍数达 1:3 200，与溶血性曼氏杆菌、传染性鼻气管炎病毒、牛支原体等 11 种代表性牛常见病原血清均无交叉反应，批间与批内试验变异系数均小于 10%。运用本方法首次对四川省甘孜藏族自治州部分地区牦牛血清进行检测，结果整体阳性率为 89.89%，与商品化的产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素 ELISA 检测试剂盒检测结果基本一致，表明该方法具有良好的临床应用效果。

间接 ELISA 中包被抗原是建立该方法的前提。鲍长磊等<sup>[21]</sup>基于重组表达的  $\alpha$  毒素蛋白建立了间接 ELISA 抗体检测方法，该方法特异性

为 96.5%，敏感性为 98%。吴霜等<sup>[22]</sup>以  $\beta$ 2 毒素重组蛋白为靶抗原建立了间接 ELISA 抗体检测方法，并筛选出 4 株具有 ELISA 检测功能的单克隆抗体，且具有良好的特异性和敏感性。王武斌等<sup>[23]</sup>以绵羊源 *C. perfringens* 的  $\epsilon$  毒素重组蛋白为靶抗原建立了间接 ELISA 抗体检测方法，其检测血清敏感度为 1:3 200，并且与其他病原菌阳性血清无交叉反应。据报道， $\alpha$  毒素虽存在所有型 *C. perfringens* 中，但仅在 A 型中表达水平最高<sup>[9]</sup>。因此，本研究将  $\beta$ 2 和  $\epsilon$  毒素部分片段与  $\alpha$  毒素串联表达，以期在检测过程中加强与 C 型、D 型反应。

临界值是影响间接 ELISA 结果准确判定的关键因素之一。通常使用检测阴性样品平均值  $\bar{x} \pm 3SD$  用于 ELISA 检测临界值的确定，但平均值  $\bar{x} \pm 3SD$  是假设数据服从正态分布，对于非正态分布数据可能会得到不准确的结果，而

ROC 曲线是将诊断试验结果划分为若干临界点, 对所有可能的阈值加以计算, 可显示灵敏度和特异性之间的相互关系, 是较全面、准确评价诊断试验的有效工具。因此本试验采用 ROC 曲线法替代  $\bar{x} \pm 3SD$  方法<sup>[24]</sup>。经 *C. perfringens* ROC 曲线法计算, 间接 ELISA 抗体检测临界值为 0.470 2, 此时 Se 为 88%, Sp 为 100%, 所对应的约登指数最大, 并且曲线下面积为 0.986, 表明准确性较好。

本研究成功建立了敏感、特异、稳定地检测牛 *C. perfringens* 抗体的间接 ELISA 方法, 该方法已在临床牦牛血清样本中得到了初步应用, 丰富了牦牛产气荚膜梭菌病流行病学数据, 未来仍须进一步运用黄牛、水牛、奶牛等临床样品不断实践完善。

## REFERENCES

- [1] KIU R, HALL LJ. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 141.
- [2] FU Y, ALENEZI T, SUN XL. *Clostridium perfringens*-induced necrotic diseases: an overview[J]. *Immuno*, 2022, 2(2): 387-407.
- [3] ROOD JI, ADAMS V, LACEY J, LYRAS D, McCLANE BA, MELVILLE SB, MOORE RJ, POPOFF MR, SARKER MR, SONGER JG, UZAL FA, van IMMERSEEL F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5-10.
- [4] GOHARI IM, NAVARRO MA, LI JH, SHRESTHA A, UZAL F, McCLANE BA. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 723-753.
- [5] MIYASHIRO S, BALDASSI L, NASSAR A. Genotyping of *Clostridium perfringens* associated with sudden death in cattle[J]. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 2009, 15(3): 491-497.
- [6] ATHIRA CK, MILTON AAP, REDDY A, RAJENDRAKUMAR AM, ABHISHEK, VERMA MR, KUMAR A, NAGALEEKAR VK, AGARWAL RK. Diversity of toxin-genotypes among *Clostridium perfringens* isolated from healthy and diarrheic neonatal cattle and buffalo calves[J]. *Anaerobe*, 2018, 49: 99-102.
- [7] COMPIANI R. Prevention of the main clostridial diseases in cattle[J]. *Large Animal Review*, 2021, 27(1): 51-56.
- [8] CHANGQING Q, XUELI Y. *Clostridium* infection (jisizheng) in yaks in Qinghai, China[J]. *Veterinary Research Communications*, 2001, 25(7): 555-563.
- [9] SAADH MJ, LAFI FF, DAHADHA AA, ALBANNAN MS. Immunogenicity of a newly developed vaccine against *Clostridium perfringens* alpha-toxin in rabbits and cattle[J]. *Veterinary World*, 2022, 15(7): 1617-1623.
- [10] CHEN K, AHMED S, SHENG YJ, SUN CF, DENG CL, OJHA SC. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification-based assays for *Clostridium perfringens*-associated diseases: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(9): e00363-20.
- [11] YOUNIS GA, RADWAN MM, ELKENANY RM, ELDERIENY MH. Detection of alpha toxin and enterotoxins of *Clostridium perfringens* isolated from minced meat by real time polymerase chain reaction (PCR)[J]. *Microbiology Research*, 2018, 12(23): 546-555.
- [12] 王武斌, 崔洁文, 曹小安, 高鹏程, 马清龙, 李学瑞, 储岳峰. 产气荚膜梭菌  $\epsilon$  毒素蛋白的原核表达及其抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(4): 426-433.
- [13] WANG WB, CUI JW, CAO XA, GAO PC, MA QL, LI XR, CHU YF. Prokaryotic expression of *Clostridium perfringens*  $\epsilon$ -toxin protein and establishment of an indirect ELISA method for its antibody[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(4): 426-433 (in Chinese).
- [14] AUNG MS, MATSUDA A, URUSHIBARA N, KAWAGUCHIYA M, OHASHI N, MATSUDA N, NAKAMURA M, ITO M, HABADERA S, MATSUMOTO A, HIROSE M, KOBAYASHI N. Clonal diversity of *Clostridium perfringens* human clinical isolates with various toxin gene profiles based on multilocus sequence typing and alpha-toxin (PLC) typing[J]. *Anaerobe*, 2021, 72: 102473.
- [15] LEE KW, LILLEHOJ HS. Role of *Clostridium perfringens* necrotic enteritis B-like toxin in disease pathogenesis[J]. *Vaccines*, 2021, 10(1): 61.
- [16] KHIIV LA, EMADI A, ZAHMATKESH A. A simple method for purification of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D for serum neutralization assay[J].

- Journal of Microbiological Methods, 2022, 193: 106395.
- [16] DAS S, MAJUMDER S, NAG M, KINGSTON JJ. A sandwich duplex immuno PCR for rapid and sensitive identification of *Clostridium perfringens* alpha and enterotoxin[J]. Anaerobe, 2019, 57: 63-74.
- [17] SHAH AM, BANO I, QAZI IH, MATRA M, WANAPAT M. "The Yak" -a remarkable animal living in a harsh environment: an overview of its feeding, growth, production performance, and contribution to food security[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10: 1086985.
- [18] SERRONI A, COLABELLA C, CRUCIANI D, CIULLO M, CROTTI S, PAPA PL, Di PAOLO A, GOBBI M, FORTI K, PELLEGRINI M, SALINI R, D'AVINO N, CAGIOLA M, PEZZOTTI G, de GIUSEPPE A. Identification and characterization of *Clostridium perfringens* atypical CPB2 toxin in cell cultures and field samples using monoclonal antibodies[J]. Toxins, 2022, 14(11): 796.
- [19] TAKEHARA M, KOBAYASHI K, NAGAHAMA M. *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin up-regulates plasma membrane CD11b expression on murine neutrophils by changing intracellular localization[J]. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 2022, 1864(12): 184054.
- [20] DORCA-ARÉVALO J, de ARANDA IG, BLASI J. New mutants of *Epsilon* toxin from *Clostridium perfringens* with an altered receptor-binding site and cell-type specificity[J]. Toxins, 2022, 14(4): 288.
- [21] 鲍长磊, 何亚鹏, 张琪, 付明哲, 许信刚. 产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素的原核表达及间接 ELISA 的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(8): 939-945.
- BAO CL, HE YP, ZHANG Q, FU MZ, XU XG. Establishment and application of an indirect ELISA with alpha-toxin protein of *Clostridium perfringens* expressed in *Escherichia coli*[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(8): 939-945 (in Chinese).
- [22] 吴霜, 马玲玲, 张思雨, 王东, 李勇, 王玉炯, 曾瑾. 产气荚膜梭菌  $\beta$ 2 毒素单克隆抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 生物学杂志, 2022, 39(4): 110-116.
- WU S, MA LL, ZHANG SY, WANG D, LI Y, WANG YJ, ZENG J. Establishment of indirect ELISA assay method for monoclonal antibody against *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2 toxin[J]. Journal of Biology, 2022, 39(4): 110-116 (in Chinese).
- [23] 王武斌, 崔洁文, 曹小安, 高鹏程, 马清龙, 李学瑞, 储岳峰. 产气荚膜梭菌  $\epsilon$  毒素蛋白的原核表达及其抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(4): 426-433.
- WANG WB, CUI JW, CAO XA, GAO PC, MA QL, LI XR, CHU YF. Prokaryotic expression of  $\epsilon$  toxin protein of *Clostridium perfringens* and establishment of an indirect ELISA method for detection of  $\epsilon$  toxin antibody[J]. Chinese Veterinary Science, 2023, 53(4): 426-433 (in Chinese).
- [24] OBUCHOWSKI NA, BULLEN JA. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine[J]. Physics in Medicine & Biology, 2018, 63(7): 07TR01.