

• 基础实验研究论著 •

快速检测土壤中类鼻疽伯霍尔德杆菌的双抗体夹心 ELISA 法的建立*

马广强^{1,2}, 江闰德¹, 王倩¹, 朱金华¹, 叶荷平¹, 袁志明², 万红娇^{1△}

(1. 江西中医学院病原生物学与免疫学教研室, 江西南昌 330004;

2. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

摘要:目的 建立快速检测土壤中类鼻疽伯霍尔德杆菌(*B. pseudomallei*)的双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法,用于该菌疫源地的流行病学调查。方法 通过基因工程克隆并表达 *B. pseudomallei* 的特异性鞭毛蛋白,纯化后免疫小鼠,制备针对特异性 *B. pseudomallei* 鞭毛蛋白的单克隆抗体。以单克隆抗体为捕获抗体,全菌体多克隆抗体为检测抗体,建立双抗体夹心 ELISA 方法。结果 成功建立双抗夹心 ELISA 法,采用该法对土壤中细菌进行检测,其敏感性和特异性分别为 100%(15/15)和 97.5%(40/41);对广西地区 154 个土壤样品进行检测,12 个土壤样品为阳性。结论 双抗体夹心 ELISA 法对土壤中 *B. pseudomallei* 检测的敏感性和特异性好,可用于类鼻疽的流行病学调查。

关键词:伯霍尔德杆菌,类鼻疽;酶联免疫吸附测定;土壤微生物学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1060-03

Establishment of double-antibody sandwich ELISA method for rapid detection of soil melioidosis *Burkholderia pseudomallei**Ma Guangqiang^{1,2}, Jiang Runde¹, Wang Qian¹, Zhu Jinhua¹, Ye Heping¹, Yuan Zhiming², Wan Hongjiao^{1△}

(1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: **Objective** To establish double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid detection of soil melioidosis *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) and epidemiological investigation of this bacteria in epidemic focus. **Methods** Specific *B. pseudomallei* flagellin was cloned and expressed through genetic engineering. It was used to immunize mice after purification in order to prepare monoclonal antibody against specific *B. pseudomallei* flagellin. Double-antibody sandwich ELISA method was established by monoclonal antibody being served as capture antibody and polyclonal antibody against whole *B. pseudomallei* as detection antibody. **Results** Double-antibody sandwich ELISA method was successfully established. It was then employed to detect bacteria in soil. It's detective sensitivity and specificity were 100%(15/15) and 97.5%(40/41), respectively, and 12 soil samples were found positive when 154 soil samples obtained from Guangxi region were undergone bacteria detection. **Conclusion** Double-antibody sandwich ELISA method possesses high sensitivity and specificity in detection of soil *B. pseudomallei*, and can be used in epidemiological investigation of melioidosis.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*; enzyme-linked immunosorbent assay; soil microbiology

类鼻疽伯霍尔德杆菌(*B. pseudomallei*)是一种革兰阴性短杆菌,主要分布于东南亚和澳大利亚东北部的稻田、橡胶园、田野、耕地以及水源地附近,是导致人和动物类鼻疽病的病原体。流行病学调查表明,类鼻疽病例多发于南、北纬 20°之间的赤道地区,它是导致泰国东北部以及澳大利亚人群中 20% 的获得性败血症患者和 20%~40% 的菌血症患者死亡的主要原因^[1-2]。中国于 1990 年发现第 1 例类鼻疽病例,之后陆续在广东、广西和海南省等发现动物和人的类鼻疽病例^[3-5],并分离出 *B. pseudomallei*,但是,目前关于该菌的详细分布情况尚不清楚^[6],国内对其检测和鉴定还停留在分离培养(金标准)的水平上,分离培养耗时长,一般需 2~3 周的时间^[7]。本课题组为建立快速检测土壤 *B. pseudomallei* 方法,采用其特异性鞭毛抗原的单克隆抗体作为捕获抗体,建立双抗体夹心酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法,直接检测土壤中 *B. pseudomallei*,并采用此法对类鼻疽疫源地——中国广西的土壤样品进行检测,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株 *B. pseudomallei* CVCC 67004 与 CVCC 53001、*B. mallei* CVCC 326 购自中国兽医兽药监督所菌种保藏中心,研究所用的其他 13 株 *B. pseudomallei* 由本实验室自广西地区采集的土壤样品中分离获得,其他病原微生物由西安交通大学医学院馈赠。

1.2 特异性鞭毛抗原的克隆与表达 根据 *B. pseudomallei* K96243 的鞭毛蛋白基因序列(Genbank Acc. No. BX571966)设计引物, *fli1*: 5'-AAA AGA ATT CGC GTC GGC GCT GCA ACA GGA ACT CG-3'; *fli2*: 5'-AAA AAA GCT TTT ACA TCG CCT GGT ACG CGC CCG TCT GC-3'。采用天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组提取试剂盒进行 *B. pseudomallei* 全基因组 DNA 的提取。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增产物用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后连接至表达载体 pET28a(Novagen 公司),得到重组载体 pET-*fli* C。鞭毛蛋白基因由上海英俊生物技术

* 基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划)(2005AA219070)。 作者简介:马广强(1977~),男,博士,主要从事病原微生物研究。 △ 通讯作者, E-mail: ann.wan@163.com。

有限公司测序后提交并在 Genbank(Acc. No. U73848)发表。重组载体 pET-*fli C* 转化到表达菌株大肠埃希菌 BL21 中,在抗性培养基上筛选获得大肠埃希菌重组菌株 E-pET-*fli C*。重组菌株在含相应抗菌药的 LB(Luria-Bertani)培养基中培养过夜,然后接种到新鲜的 LB 培养基中,37 °C 震荡培养 3 h 后,加入 1 μg/mL 异丙基-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside,IPTG),30 °C 诱导 4 h 后,4 °C 离心 10 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),收集菌液,储存于-20 °C 冰箱中备用。采用 His-Bind 亲和层析柱(Novagen 公司)纯化 *B. pseudomallei* 鞭毛蛋白。采用蛋白浓度检测试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)对纯化蛋白采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)法进行浓度测定。

1.3 单克隆抗体的获得 取 10 μg 纯化鞭毛抗原,用弗氏完全佐剂混匀后,腹腔内注射接种 BALB/c 小鼠(合格证号:2005A013),免疫 2 周后,取出小鼠的脾脏,小鼠脾细胞在体外用 1 μg 的鞭毛抗原免疫;2 d 后,脾细胞与骨髓瘤细胞(P3x63-Ag8.653)融合,采用间接 ELISA 法监测杂交细胞的抗体水平。间接 ELISA 是用 5 μg/mL 的全菌体蛋白包被 96 孔板,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗鼠二抗作为检测抗体。阳性的杂交克隆再用限制性稀释法重新克隆 2 次。将包含抗体的上清液浓缩 10 倍后储存于-20 °C 冰箱。采用 Western blot 检测抗体的特异性。

1.4 全菌体多克隆抗体的获得 500 μg 纯化全菌体用弗氏完全佐剂混匀后,皮下注射新西兰大白兔(合格证号:0030004),2 周后加强免疫 1 次;1 个月后收集兔血清作为全菌体多克隆抗体。用间接 ELISA 法检测去全菌体多克隆抗体的效价。间接 ELISA 是用 5 μg/mL 的全菌体蛋白包被 96 孔板,HRP 标记的羊抗鼠二抗作为检测抗体。采用 Western blot 检测抗体的特异性。

1.5 双抗体夹心 ELISA 试剂盒的研制 以 5 μg/mL 单克隆抗体溶液包被 96 孔板,用 HRP 标记的 *B. pseudomallei* 全菌体多克隆抗体作为二抗,试剂盒的制作采用单克隆抗体稀释液(100 μL/孔)包被 96 孔板的方法。理想的抗体稀释浓度由抗体滴度决定。捕获抗体溶于 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.5),按每孔 100 μL 包被后置于 4 °C 冰箱过夜。检测样品加入 96 孔板后孵育 90 min,然后用含吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution with Tween-20,PBST)冲洗 4 次,加入 HRP 标记的全菌体二抗,孵育 30 min,加入检测 A、B 液各 1 滴,孵育 10 min,加入 50 μL H₂SO₄(2.5 mol/L)终止反应,于 450 nm 波长处检测光密度(optical density,OD)值。

1.6 土壤中 *B. pseudomallei* 的检测 用广西稻田土壤作为典型土壤。分别将不同浓度 *B. pseudomallei* 接种到 1 g 疫源地稻田土壤中,然后加入 9 mL LB 培养基(含庆大霉素和黏杆菌素各 100 μg/mL),37 °C 静置培养,每隔 4 h 取 100 μL 上清液用于双抗体夹心 ELISA 的检测。

1.7 土壤样品的检测 采用建立的 ELISA 试剂盒检测 2007 年 12 月在广西采集的 154 份稻田土壤样品。样品来自 77 个采样地点(每个地点采集 2 个样品)距地面深 30~60 cm 的土壤,每份约 10 g,置于灭菌塑料袋中,所有样品进行分离培养鉴定。

2 结 果

2.1 单克隆抗体和多克隆抗体的特异性检测 鞭毛抗原免疫小鼠后,通过淋巴细胞瘤单克隆抗体技术,共得到 5 株单克隆抗体杂交瘤细胞株(即 1#、2#、3#、4#、5#),其中 3# 单克

隆抗体对全菌体细胞的滴度为 1:400 000,效价最高。多克隆抗体对全菌体细胞的滴度为 1:200 000,因此,用 3# 单克隆抗体作为双抗体夹心 ELISA 试剂盒的捕获抗体,多克隆抗体为标记抗体用于该试剂盒的研制。

2.2 Western blot 检测抗体的特异性 纯化的鞭毛抗原经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)后转到醋酸纤维膜上,用 3# 单克隆抗体作为一抗与鞭毛抗原杂交,用碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗进行标记(图 1)。结果表明 3# 单克隆抗体是鞭毛抗原的特异性抗体。

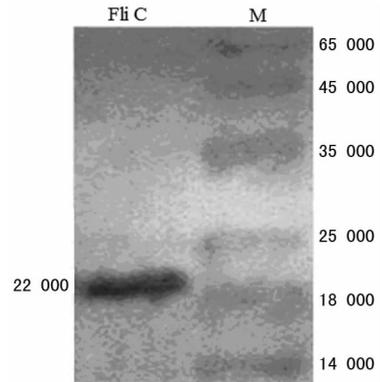


图 1 鞭毛蛋白的单克隆抗体检测(Western blot)

2.3 双抗体夹心 ELISA 的敏感性和特异性检测 15 株 *B. pseudomallei* 均检测为阳性,肠球菌有弱阳性。双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测经 LB 培养基培养的 *B. pseudomallei* 的敏感性和特异性分别为 100.00%(15/15)和 97.56%(40/41)。采用 *B. pseudomallei* 培养基检测敏感性,结果表明,检测试剂盒的最低检测浓度为 105 CFU/mL(图 2)。

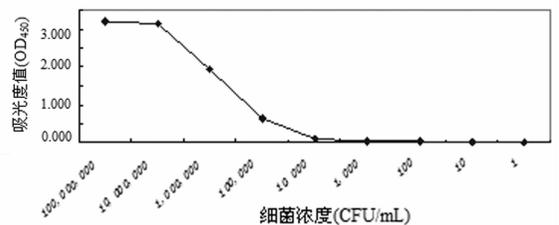


图 2 ELISA 检测的敏感性

2.4 土壤中 *B. pseudomallei* 的敏感性检测 以 OD₄₅₀ 值大于 0.5 作为阳性判读标准,土壤中 *B. pseudomallei* 的检测结果见表 1。细菌浓度低于 10 CFU/mL 时,土壤标本检测结果为阴性;大于 10 CFU/mL 时,土壤标本检测结果出现阳性。

表 1 检测不同细菌浓度及不同培养时间的土壤培养物中 *B. pseudomallei* 的 OD₄₅₀ 值

细菌浓度(CFU/mL)	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	48 h
<5	0.123	0.134	0.145	0.148	0.152	0.164	0.180	0.203
5~<10	0.121	0.123	0.128	0.134	0.145	0.146	0.147	0.156
10~<50	0.120	0.133	0.150	0.345	0.686	1.480	2.365	2.891
≥50	0.130	0.153	0.289	0.433	0.753	1.904	2.782	3.112

2.5 标准培养与双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测方法比较 154 个广西土壤样品中,标准培养检测,样品均呈阳性结果;双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测,12 个样品呈阳性,有 1 个样品呈阴性,见表 2。

表 2 标准培养与双抗体夹心 ELISA 试剂盒对 *B. pseudomallei* 检测的比较

土壤样品	标准培养	ELISA 试剂盒	细菌浓度(CFU/g)
中东 1	阳性	阳性	337
中东 2	阳性	阳性	402
南宁 1	阳性	阳性	103
南宁 2	阳性	阳性	73
南宁 3	阳性	阳性	27
南宁 4	阳性	阳性	203
钦州 1	阳性	阳性	189
钦州 2	阳性	阳性	521
钦州 3	阳性	阴性	23
防城 1	阳性	阳性	354
防城 2	阳性	阳性	267
北海 1	阳性	阳性	431
北海 2	阳性	阳性	206

3 讨 论

B. pseudomallei 鞭毛基因具有显著特异性,广泛用于 *B. pseudomallei* 的检测^[8-9]。由于 *B. mallei* 也含有相同的鞭毛基因,用基因检测法不能区分 *B. pseudomallei* 和 *B. mallei*;但 *B. mallei* 无鞭毛,*B. pseudomallei* 有 6~8 根鞭毛,通过检测其鞭毛抗原的方法可很容易地区分 *B. pseudomallei* 和 *B. mallei*。本实验用 *B. pseudomallei* 鞭毛的单克隆抗体作为捕获抗体进行双抗体夹心 ELISA 试剂盒的研究。

研究结果表明该试剂盒具有很好的特异性和敏感性。检测试剂盒的最低检测浓度为 105 CFU/mL,这个结果是 2000 年采用直接单克隆抗体凝集方法检测 *B. pseudomallei* 敏感性的 50 倍。在对广西土壤样品的检测过程中,出现 1 例假阴性,对该例假阴性土壤的分析表明,该土壤样品的 *B. pseudomallei* 浓度是所有土壤样品中浓度最低的(23 CFU/mL),土壤样品较干燥,且在实验室保存了 1 年,这些原因可能导致了细菌的死亡。文献表明,*B. pseudomallei* 可在 15 种不同类型的土壤中存活 439 d,但在含水量低于 10% 的土壤中,其生存时间只有 70 d^[10]。

为了检测土壤培养物中的 *B. pseudomallei*,本研究用含庆大霉素和黏杆菌素的 LB 培养基培养土壤样品,这 2 种抗菌药能显著抑制大多数细菌的生长与繁殖^[11],而 *B. pseudomallei* 却不受这 2 种抗菌药影响^[12]。通过在典型土壤中接种不同浓度 *B. pseudomallei*,获得双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测的最低检测浓度(10 CFU/mL)。相关文献表明,老挝和泰国境内的土壤中 *B. pseudomallei* 浓度为 10~120 CFU/mL^[13],本研究中,广西地区阳性土壤中 *B. pseudomallei* 的浓度为 23~521 CFU/mL,即疫源地 *B. pseudomallei* 在土壤中的浓度达到

10 CFU/g 以上时才能用培养的方法检测到细菌,双抗体夹心 ELISA 试剂盒的最低检测浓度与培养法一致。

最后,培养法需要 21 d 才能获得检测结果,ELISA 法只需 28 h(培养 24 h 后检测)。以上结果表明:双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测法是一种敏感性高、特异性强的检测方法,可用于疫源地 *B. pseudomallei* 分布情况的流行病学调查,具有重大的公众卫生意义。

参考文献

- [1] 陈光远,曾夏杏,冯欣,等. 广东省雷州半岛地区类鼻疽病流行的调查[J]. 中华流行病学杂志,2004,25(5):390-390.
- [2] 莫成锦,谷海瀛,王旭明,等. 类鼻疽病血清学调查[J]. 中国卫生工程学,2002,1(4):230-230.
- [3] Yang S. Melioidosis research in China[J]. Acta Trop, 2000, 77(2):157-165.
- [4] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报,2011,33(13):1315-1317.
- [5] Ashdown LR. Identification of pseudomonas pseudomallei in the clinical laboratory[J]. J Clin Pathol,1979,32(5):500-504.
- [6] Kaestli M, Mayo M, Harrington G, et al. Sensitive and specific molecular detection of Burkholderia pseudomallei, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia[J]. Appl Environ Microbiol,2007,73(21):6891-6897.
- [7] Pongsunk S, Thirawattanasuk N, Piyasangthong N, et al. Rapid identification of Burkholderia pseudomallei in blood cultures by a monoclonal antibody assay[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11): 3662-3667.
- [8] 方瑶,顾江,王海光,等. 抗类鼻疽伯克霍尔德菌多抗血清的制备及评价[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(3):292-294.
- [9] Supaprom C, Wang D, Leelayuwat C, et al. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of Burkholderia pseudomallei in clinical blood specimens[J]. J Clin Microbiol,2007,45(9):2894-2901.
- [10] 佟世德,陆振勇,何维海. 类鼻疽杆菌生态学研究[J]. 中国兽医学报,1995(2):125-129.
- [11] Ashdown LR. Rapid differentiation of Pseudomonas pseudomallei from Pseudomonas cepacia[J]. Lett Appl Microbiol,1992,14(5): 203-205.
- [12] Howard K, Inglis TJ. Novel selective medium for isolation of Burkholderia pseudomallei[J]. J Clin Microbiol,2003,41(7):3312-3316.
- [13] Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, et al. Quantitative recovery of Burkholderia pseudomallei from soil in Thailand[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg,1995,89(5):488-490.

(收稿日期:2012-11-23)

(上接第 1059 页)

- 2011,52(6):899-900.
- [10] Zhang YJ, Miao YF, Cheng KB, et al. Protein C polymorphism and susceptibility to PTE in China[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2012,23(8):693-699.
- [11] Ikejiri M, Tsuji A, Wada H, et al. Analysis three abnormal Protein S genes in a patient with pulmonary embolism[J]. Thromb Res, 2010,125(6):529-532.
- [12] Fournier D, Luft FC, Bader M, et al. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system[J]. J Mol Med (Berl), 2012,90(5):495-508.

- [13] Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, et al. Ablation of angiotensin IV receptor attenuates hypofibrinolysis via PAI-1 downregulation and reduces occlusive arterial thrombosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2009,29(12):2102-2108.
- [14] Fridley BL, Biernacka JM. Gene set analysis of SNP data: benefits, challenges, and future directions[J]. Eur J Hum Genet,2011, 19(8):837-843.
- [15] Hill WG. Quantitative genetics in the genomics era[J]. Curr Genomics,2012,13(3):196-206.

(收稿日期:2013-01-31)