

锡林高娃, 薛晓阳, 吴金花, 等. 金黄色葡萄球菌表面蛋白 nEBPS 抗体的制备和纯化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1430-1434.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.037

金黄色葡萄球菌表面蛋白 nEBPS 抗体的制备和纯化

锡林高娃^{1,2}, 薛晓阳^{1,2}, 吴金花^{1,2}, 布日额^{1,2}

(1. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古 通辽 028400; 2. 内蒙古民族大学乳源性致病菌研究所, 内蒙古 通辽 028400)

摘要: 为了在原核细胞中表达金黄色葡萄球菌弹性纤维结合蛋白(EBPS), 制备多克隆抗体, 将构建的 pET30a-nEBPS 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达后, 亲和层析法纯化重组蛋白, 以纯化的重组蛋白为抗原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, ELISA 方法检测抗体滴度, 亲和层析法纯化兔抗 nEBPS 多克隆抗体。结果显示, 利用 pET30a-nEBPS 重组质粒, 经原核表达和亲和层析获得了 nEBPS 蛋白; 利用 nEBPS 蛋白质制备多克隆抗体, 间接 ELISA 检测的纯化抗体效价可达 0.686 (OD_{450} 值), P/N 值达 6.7。

关键词: nEBPS 抗体; 多克隆抗体; 制备; 纯化

中图分类号: S852.61¹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1430-05

Preparation and purification of polyclonal antibody against *Staphylococcus aureus* surface protein nEBPS

XI LIN Gao-wa^{1,2}, XUE Xiao-yang^{1,2}, WU Jin-hua^{1,2}, BU Ri-e^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China; 2. Research Institute of Pathogens in Milk, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

Abstract: To prepare polyclonal antibody of *Staphylococcus aureus* surface protein nEBPS, the plasmid pET30a-nEBPS was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). IPTG induction were performed and recombinant protein was purified by nickel affinity chromatography. The purified nEBPS protein was used to raise rabbit nEBPS protein antibody. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the antibody titers against nEBPS was up to 0.686 (OD_{450}), with P/N value of 6.7.

Key words: nEBPS; polyclonal antibody; preparation; purification

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种

重要的人畜共患致病菌。人感染该菌可引发肺炎、盆腔炎、心包炎、产褥感染等, 甚至是脓毒症、败血症等全身性感染^[1-2]。在动物则引发奶牛乳腺炎, 其检出率可达到 30% 以上^[3], 导致牛奶产量减低, 乳中含有致病菌及其毒素, 乳腺纤维化和奶牛淘汰等后果, 从而给奶牛业带来巨大经济损失^[4-7]。目前我国奶牛乳腺炎尚未引起重视, 缺乏快速检测预警机制和技术支持^[8]。因此研究和建立牛乳中致病性金黄色葡萄球菌的快速分子检测方法, 对于该病

收稿日期: 2015-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260600); 内蒙古自治区科技厅科技创新引导计划项目 [20111802 (2012 年, 2013 年)]; 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2012MS0415)

作者简介: 锡林高娃 (1976-), 女, 内蒙古锡林浩特市人, 硕士, 讲师, 主要从事病原微生物及细胞工程研究。(E-mail) xiln-gaowa123@163.com

通讯作者: 布日额, (E-mail) wjhbre@yahoo.com.cn; wjhbre@aliyun.com

菌的预警性监测、溯源和传播机制研究等都具有十分重要意义。

致病性金黄色葡萄球菌弹性纤维结合蛋白(EBPS)是其致病机制中的关键因子,该致病菌主要是通过其菌体表面的 EBPS 与宿主的细胞外基质相结合,继而引起宿主感染^[9]。EBPS 基因组全长基因序列含有 1 486 bp,所编码的 EBPS 蛋白质分为 N 端、3 个疏水区和 C 端,其中 N 端的 59 个氨基酸全部暴露在细胞膜外,在侵染宿主的过程中起配体作用,与金黄色葡萄球菌的致病性密切相关^[10]。因此,我们选择该基因 N 端的粘附配体序列作为靶标片段,通过对靶片段序列的外源性表达,制备相应抗体,为研究其致病机制以及建立快速分子检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、血清及动物 pET30a-nEBPS 重组质粒由内蒙古民族大学乳源性致病菌研究所构建并提供,表达宿主菌株 BL21(DE3)、牛源金黄色葡萄球菌阳性血清均由内蒙古民族大学乳源性致病菌研究所保存。新西兰白兔购自青岛康大兔业发展有限公司。

1.1.2 主要试剂 辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗牛 IgG 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品,多功能 DNA 纯化回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、高纯度质粒小量制备试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品,双色预染蛋白 Marker 为天根生化科技(北京)有限公司产品。HiTraP™抗体纯化柱购自 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 pET30a-nEBPS 的诱导表达 将 pET30a-nEBPS 重组质粒转化表达菌 BL21 感受态细胞,以终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达,同时设立未诱导菌对照。诱导 6 h 后,收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.2 nEBPS 重组蛋白的纯化 超声波破碎 6 h 的菌体,收集离心后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,鉴定目的蛋白质的表达形式。对以可溶形式表达的重组蛋白按 Ni NTA Purification System

使用说明进行纯化。

1.2.3 nEBPS 重组蛋白的鉴定 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后,转印至硝酸纤维素膜,以 5%脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,以牛源金黄色葡萄球菌阳性血清(1:100 稀释)为一抗,37 ℃孵育 1 h,以辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗牛 IgG 抗体(1:5 000 稀释)为二抗,37 ℃孵育 50 min,在二氨基联苯胺(DAB)溶液中显色。

1.2.4 兔抗 nEBPS 蛋白多克隆抗体的制备 取纯化的 nEBPS 蛋白 2 mg,与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,背部皮下多点免疫新西兰白兔,14 d 后取纯化的蛋白质与弗氏不完全佐剂乳化后进行第 2 次免疫,14 d 后进行第 3 次免疫,14 d 后注射不加佐剂的抗原 2 mg 进行加强免疫,7 d 后经心脏采血,分离血清备用。每次免疫前均采集血清,间接 ELISA 法检测血清效价。

1.2.5 兔抗 nEBPS 蛋白抗体效价的测定

1.2.5.1 间接 ELISA 方法 以纯化的 nEBPS 重组蛋白包被酶标板,以免疫前兔血清作为阴性对照血清,将抗 nEBPS 兔血清和阴性对照血清同时进行 1:100~1:51 200 倍比稀释,以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)为二抗,进行间接 ELISA 试验,以免疫血清 OD 值与阴性对照血清 OD 值的比值大于 2.1 判为阳性。

1.2.5.2 凝集试验 将抗 nEBPS 兔血清进行 1:2~1:512 倍比稀释,分别与同一金黄色葡萄球菌菌体进行凝集试验,同时以免疫前兔血清作为阴性对照,判定能够凝集的最高稀释度。

1.2.6 多克隆血清的纯化 将兔抗 nEBPS 蛋白多克隆血清 8 倍稀释样品以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。参照 HiTraP™抗体纯化柱子说明书进行纯化。平衡柱子:流速 1 ml/min,用 5~10 倍柱体积的平衡液平衡柱子;上样:流速 1 ml/min,上样后用 5~10 倍柱体积的上样缓冲液洗杂,流速 1 ml/min;洗脱:流速 1.5 ml/min,用洗脱缓冲液直接洗脱;调 pH 值:将洗脱样品用中和缓冲液调 pH 值为中性备用。

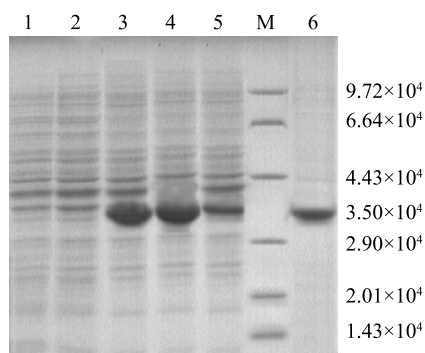
1.2.7 纯化抗体的鉴定 采用 Bradford 法测定纯化后抗体的浓度。取纯化后的抗体进行 SDS-PAGE 电泳分析,检测纯度。间接 ELISA 法检测效价,以纯化的 nEBPS 重组蛋白包被酶标板,以免疫前兔血清作为阴性对照血清,检测纯化后的兔抗 nEBPS 兔血

清效价。

2 结果与分析

2.1 pET30a-nEBPS 的诱导表达与纯化

以终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 对 pET30a-nEBPS 诱导表达 6 h 后,超声波破碎细胞,经 SDS-PAGE 电泳分析发现目的蛋白质大部分以可溶形式表达(图 1)。采用镍离子亲和层析法纯化蛋白质,Bradford 法测定纯化后的蛋白质浓度为 2.16 mg/ml。



M: 蛋白质 Marker; 1: pET30a-nEBPS 未诱导菌; 2: pET30a 诱导菌; 3: pET30a-nEBPS 诱导菌; 4: 上清; 5: 沉淀; 6: 纯化的蛋白质。

图 1 nEBPS 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein nEBPS

2.2 nEBPS 重组蛋白的活性

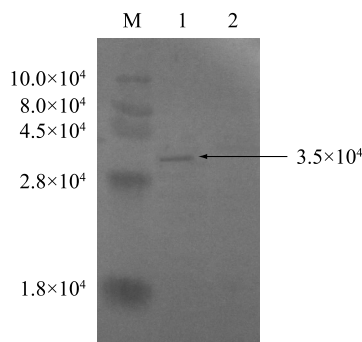
取纯化的 nEBPS 重组蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后,转印至硝酸纤维素膜,与牛源金黄色葡萄球菌阳性血清作用。结果表明,该 nEBPS 蛋白能与牛源金黄色葡萄球菌阳性血清发生特异性反应,而空载体菌表达蛋白与牛源金黄色葡萄球菌阳性血清不发生反应(图 2)。

2.3 兔抗 nEBPS 蛋白多克隆抗体的效价

纯化后的 nEBPS 重组蛋白经过 4 次免疫新西兰白兔后,血清效价已明显升高(图 3)。心脏采血分离血清,以间接 ELISA 和凝集试验测定最后分离的高免血清效价。结果表明,间接 ELISA 检测到的最低效价达 1:25 600(图 4),凝集试验测定的凝集效价达 1:128。

2.4 多克隆血清的纯化及纯化抗体的鉴定

利用 HiTraP™ 抗体纯化柱子纯化血清,收集处于峰值的纯化抗体,共计 10 ml(图 5)。用 Bradford 法测得纯化抗体的浓度为 1.5 mg/ml。兔多克隆抗



M: 双色预染蛋白质 Marker; 1: 纯化蛋白与阳性血清作用; 2: 空载体 pET30a 表达菌表达蛋白与阳性血清作用。

图 2 表达产物的免疫印迹分析

Fig.2 Western blot of expressed products

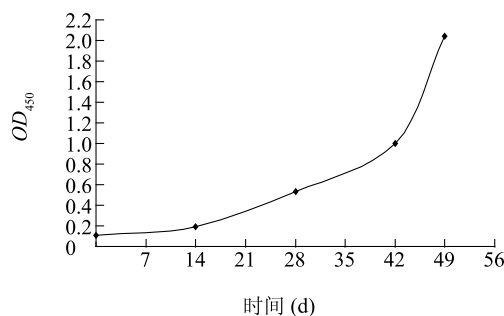
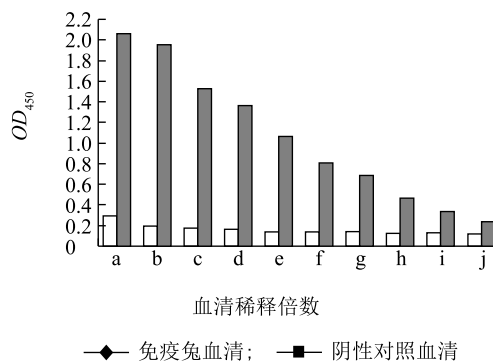


图 3 间接 ELISA 检测的抗 nEBPS 蛋白血清抗体增长曲线

Fig. 3 Growth curve of anti-nEBPS antibodies by indirect ELISA



a: 1:100; b: 1:200; c: 1:400; d: 1:800; e: 1:1 600; f: 1:3 200; g: 1:6 400; h: 1:12 800; i: 1:25 600; j: 1:51 200。

图 4 抗 nEBPS 蛋白的高免兔血清抗体间接 ELISA 检测

Fig.4 Antibody detection of rabbit serum immunized with nEBPS protein by indirect ELISA

体 SDS-PAGE 分析结果(图 6)显示: IgG 抗体是具有 4 条多肽链的对称结构,其中 2 条较长的为相对

分子量较大的相同重链(H 链约 5.5×10^4), 2 条较短的为相对分子量较小的相同轻链(L 链约 2.5×10^4)。链间由二硫键和非共价键联结形成一个由 4 条多肽链构成的单体分子,经煮沸处理后重链、轻链分开,SDS-PAGE 电泳检测结果表明获得了高纯度的抗体,重链清晰可见,轻链有点弥散。间接 ELISA 检测,纯化抗体效价可达 0.686(OD_{450} 值),阴性血清对照为 0.102, P/N 值达 6.7。

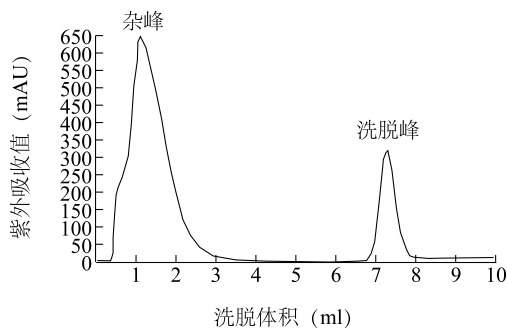
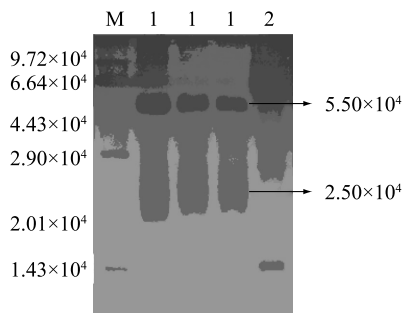


图5 兔多克隆抗体紫外吸收曲线

Fig.5 The UV absorption curve of rabbit polyclonal antibody



M: 蛋白 Marker; 1: 多克隆抗体 2: 兔血清。

图6 兔多克隆抗体 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of rabbit polyclonal antibody

3 讨论

弹性蛋白是由细胞分泌的原弹性蛋白单体交错形成的,生理状态下的弹性蛋白(如间质胶原蛋白以及其他基质)是不溶的聚合纤维形式,原因可能是分泌的原弹性蛋白交错结构中的赖氨酸迅速被赖氨酰氧化酶氧化所致^[11]。弹性纤维结合蛋白(EBPS)在结构上不同于哺乳动物细胞表面的弹性结合蛋白^[12]。统计分析发现金黄色葡萄球菌感染的绝大多数组织为富含弹性结合蛋白的组织,所以

有研究者开始探索金黄色葡萄球菌是否是通过特异性结合弹性结合蛋白来感染宿主。本试验结果表明,金黄色葡萄球菌确实通过其表面分子量为 4.5×10^4 的 EBPS 蛋白结合到弹性结合蛋白的 N-端结构域上,该结构域中并没有 VGVAPG 六肽识别序列^[13],且结合位点与弹性纤维结合蛋白相关的极性 C-末端也不相同,这就表明弹性蛋白中与 EBPS 结合的位点特异性是针对金黄色葡萄球菌的^[14]。由此可以看出 EBPS 在金黄色葡萄球菌感染宿主的过程中,起到至关重要的作用。

内蒙古自治区是中国乳品业主产区,奶牛乳腺炎的控制和原料乳致病菌的检测对于保证乳品安全有着重要意义。本试验将乳源性致病性金黄色葡萄球菌 EBPS 基因编码的膜表面蛋白质在体外获得高效表达,并研究其抗原性,为利用其高效表达蛋白质免疫动物制备的高效亚单位抗体,研发检测牛乳中致病性金黄色葡萄球菌的快速、高效、特异检测试剂盒奠定基础,具有重要的公共卫生学及民生意义,也具有巨大的开发应用价值及潜在的市场前景。

参考文献:

- [1] 宋娟,楚雍烈.金黄色葡萄球菌基因调节系统研究进展[J]. 生命科学,2012(5):463-469.
- [2] BABA-MOUSSA L, ANANI L, SCHEFTEL J M, et al. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections[J]. J Hosp Infect,2008,68(1):32-38.
- [3] TALBOT B G, LACASSE P. Progress in the development of mastitis vaccines[J]. Livestock Production Science,2005,98(1/2):101-113.
- [4] WATTS A, KE D, WANG Q, et al. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence[J]. Infect Immun,2005,73(6):3502-3511.
- [5] THAKKER M, PARK J S, CAREY V, et al. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model[J]. Infect Immun,1998,66(11):5183-5189.
- [6] KARAKAWA W, SUTTON A, SCHNEERSON R, et al. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes[J]. Infect Immun,1988,56(5):1090-1095.
- [7] SANTOS J E P, CERRI R L A, BALLOU M A, et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactation and reproductive performance of Holstein dairy cows[J]. Animal Reproduction Science,2004,80(122):31-45.
- [8] SHRIVER-LAKE L C, SHUBIN Y S, LIGLER F S. Detection of *Staphylococcal enterotoxin B* in spiked food samples[J]. J Food

- Prot, 2003, 66(10):1851-1856.
- [9] NAKAKIDO M, TANAKA Y, TSUMOTO K. The N-terminal domain of elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* changes its secondary structure in a membrane-mimetic environment [J]. J Biochem, 2007, 142(2):131-134.
- [10] 李传芬, 胡成进. 金黄色葡萄球菌膜蛋白 EBPS [J]. 生命的化学, 2009, 29(1):112-114.
- [11] KAGAN H M, TRACKMAN P C. Properties and function of lysyl oxidase [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991, 5(3):206-210.
- [12] PYONG W P, JOEL R, WILLIAM R A, et al. Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (EBPS) in *Staphylococcus aureus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(28):15803-15809.
- [13] PARK P W, BROEKELMANN T J, MECHAM B R, et al. Characterization of the elastin binding domain in the cell-surface 25-kDa elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EBPS) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(5):2845-2850.
- [14] DOWNER R, ROCHE F, PARK P W, et al. The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EBPS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(1):243-250.

(责任编辑:张震林)