

猪链球菌组氨酸三联体蛋白多抗的制备及 Dot-ELISA 检测方法的建立

蔡旭燊¹, 燕书豪¹, 赵芷若¹, 郑 峰², 胡 丹², 卢亚维¹, 申雪娇¹, 何 锐¹, 熊晓辉¹, 操 敏¹, 卢一辰¹

摘要:目的 建立一种猪链球菌的快速、简便检测方法。**方法** 根据猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 组氨酸三联体蛋白 HtpSC 蛋白基因序列设计特异性引物, 将 HtpSC 蛋白基因克隆至原核表达载体 pET-30a 并转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 经 0.2 mmol/L IPTG、15 ℃ 条件下诱导表达 HtpSC 蛋白。经 Ni-IDA 纯化后免疫新西兰白兔获得抗血清, 通过亲和层析纯化制备 Anti-HtpSC 多克隆抗体。在此基础上, 建立检测猪链球菌的斑点酶联免疫吸附检验法(Dot-ELISA), 进一步优化了检测条件, 并对该方法的特异性和敏感性进行评价。**结果** 通过原核表达成功制备了 HtpSC 蛋白。Western blot 结果显示, 制备的 Anti-HtpSC 多克隆抗体可特异性结合 HtpSC 蛋白。优化的最佳多抗使用浓度为 2.5 μg/mL, 最佳酶标二抗稀释倍数为 1:3 000。特异性试验结果表明, 含 HtpSC 蛋白基因的多种血清型猪链球菌均可呈现清晰的黄褐色斑点, 但不含该蛋白基因的 9 型猪链球菌除外。而其他对照菌株:大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、化脓性链球菌、无乳链球菌和粪肠球菌均无斑点出现。灵敏度试验结果表明, 该方法的检测限为 1×10^6 CFU/mL。**结论** 本研究建立的 Dot-ELISA 方法特异性强, 灵敏度良好, 可用于检测多种血清型猪链球菌。

关键词:猪链球菌; HtpSC 蛋白; Dot-ELISA

中图分类号:S858.28 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2022)08-0657-09

Preparation of polyclonal antibody against the histidine triad protein of *Streptococcus suis* and establishment of a dot-ELISA detection method

CAI Xu-shen¹, YAN Shu-hao¹, ZHAO Zhi-ruo¹, ZHENG Feng², HU Dan², LU Ya-wei¹, SHEN Xue-jiao¹, HE Kai¹, XIONG Xiao-hui¹, CAO Min¹, LU Yi-chen¹

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 210035, China;

2. Center for Disease Control and Prevention of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, China)

Abstract: In this study, a rapid and simple method for the detection of *Streptococcus suis* (*S. suis*) was established. Specific primers were designed on the basis of the HtpSC gene sequence of the histidine triad of the *S. suis* 2 virulent strain 05ZYH33. The HtpSC gene was cloned into the prokaryotic expression vector pET-30a and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). HtpSC protein was obtained by induction of expression at 15 ℃ with 0.2 mmol/L IPTG. Antiserum was obtained after immunization of New Zealand white rabbits with Ni-IDA purified protein. Anti-HtpSC polyclonal antibodies were prepared through affinity chromatography purification. We established a dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the detection of *S. suis*, and further optimized the assay conditions and evaluated the specificity and sensitivity of this method. We successfully prepared HtpSC protein through prokaryotic expression. Western blot results indicated that the prepared anti-HtpSC polyclonal antibody specifically bound HtpSC protein. The optimized optimal concentration of anti-HtpSC was 2.5 μg/mL, and the optimal dilution factor for the goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) was 1:3 000. Specificity test results indicated that all

国家重点研发计划(No.2018YFC1602800)

通讯作者:操 敏, Email: anniecao2001@163.com;

ORCID:0000-0002-4543-2013

卢一辰, Email: yichenlu@njtech.edu.cn;

ORCID:0000-0002-9382-9082

作者单位:1. 南京工业大学食品与轻工学院, 南京 210035;

2. 东部战区疾病预防与控制中心, 南京 210002

serotypes of *S. suis* containing the HtpSC protein gene showed clear yellow brown spots, with the exception of *S. suis* 9, which did not contain the HtpSC gene. Other control strains (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus faecalis*) showed no spots. The sensitivity test showed a limit of detection of 1×10^6 CFU/mL. Thus, a specific and sensi-

tive dot ELISA method was established in this study, which can be used to detect most *S. suis* serotypes.

Keywords: *Streptococcus suis*; HtpsC protein; Dot-ELISA

Supported by the National Key Research and Development Program of China (No.2018YFC1602800)

Corresponding authors: Cao Min, Email: anniecao2001@163.com; Lu Yi-chen, Email: yichenlu@njtech.edu.cn

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种人兽共患病病原体^[1]。猪链球菌根据荚膜多糖抗原特性的不同,可分为35个血清型,其中猪链球菌2型(*Streptococcus suis* 2, *S. suis* 2)在全世界范围内分布最广、致病性最强^[2]。感染*S. suis* 2可引起脑膜炎、败血症、急性死亡等严重病症,我国曾在江苏、四川两地暴发过大规模感染*S. suis* 2的疫情,不仅导致了大量生猪的死亡,还分别造成了25人感染14人死亡和204人感染38人死亡的严重后果^[3-4]。其它血清型的分布有明显的地理差异^[5],英国最流行的血清型是1型和14型。而血清型9型在澳大利亚、德国、比利时等国家最为流行^[6],血清型3型在泰国、韩国等亚洲国家最为常见^[7-8]。人感染猪链球菌疫情的反复密集暴发引起了人们的高度关注,及时的诊断和发现*S. suis*感染,是防控人感染猪链球菌疫情的重要措施。因此,针对猪链球菌检测方法的研究具有重要意义。

目前,猪链球菌的检测方法主要包括病原学检测、核酸检测和免疫学检测^[9]。传统病原学检测的过程主要包括猪链球菌的分离和鉴定,该过程繁杂耗时且灵敏度不高。核酸检测方法包括普通PCR^[10-11]、多重PCR^[12]、荧光定量PCR^[13]、环介导等温扩增^[14]、基因芯片^[15]、脉冲场凝胶电泳^[16]等方法。核酸检测方法灵敏度高,但对设备和人员的要求较高,在偏远地区不宜广泛开展。免疫学检测方法利用抗原和抗体之间高度特异性结合的原理,包括酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫层析法(Immuno-chromatographic assay, ICA)和斑点酶联免疫吸附法(Dot enzyme-linked immunosorbent assay, Dot-ELISA)。免疫学检测方法操作简单,不需要任何复杂的设备仪器,适合大规模现场诊断^[17]。Yang等^[18]研制了一种免疫层析试纸条,用于检测*S. suis*抗体。该方法具有良好的敏感性和特异性,然而这种方法不是直接检测抗原,不能较早的检测到*S. suis*感染。目前,建立一种简便、快速、经济的*S. suis*检测方法是畜牧业和科学研究所亟待解决的问题^[19]。

组氨酸三联体蛋白(Histidine triad protein, HTP)是一组膜表面蛋白,广泛分布于多种链球菌

中,根据其结构域组成不同可以分为HTP I 和 HTP II 两个亚型^[20]。与 HTP I 型蛋白相比,大多数 HTP II 型蛋白在末端含有一个富含亮氨酸的重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)结构域,这表明 HTP II 型蛋白在链球菌感染中可能起到粘附因子的作用^[21]。Shao 等^[22-23]在*S. suis* 2 强毒株 05ZYH33 中鉴定了3个 HTP 基因(ORF 编号 SSU0332、SSU1267 和 SSU1577),将它们分别命名为 HtpsA、HtpsB 和 HtpsC。其中 HtpsC 是唯一一个包含 LRR 结构域的蛋白。Li 等^[24]研究发现 HtpsC 蛋白能够与人细胞外基质的两种不同组分(层粘连蛋白和纤维连接蛋白)结合,表明 HtpsC 蛋白是一种新型的粘附素。Lu 等^[25]发现 HtpsC 在结构上与单增李斯特菌毒力因子内化素 A(Internalin A, InlA)相似,进一步研究表明, HtpsC 蛋白参与了*S. suis* 2 侵袭宿主上皮细胞的过程,是与细胞粘附和侵袭有关的重要毒力因子。我们将 HtpsC 蛋白氨基酸序列在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上做 BLAST 分析,结果显示该蛋白广泛存在于*S. suis* 多种株型中,且相似性高。Shao 等^[22]的研究发现,35 种不同血清型*S. suis* 的标准株中,29 种都含有 HtpsC 蛋白基因。另外, HtpsC 蛋白是暴露于*S. suis* 表面的毒力因子,因此,该蛋白可作为抗原建立一种通用的检测方法。

本研究通过原核表达制备了*S. suis* 2 强毒株 05ZYH33 的 HtpsC 蛋白,然后经过动物免疫试验获得了可特异性识别 HtpsC 蛋白的多克隆抗体 Anti-HtpsC,基于制备的 Anti-HtpsC 多克隆抗体建立了*S. suis* 的 Dot-ELISA 检测方法,并对方法中的 Anti-HtpsC 的工作浓度以及酶标二抗的稀释倍数进行了优化,为快速检测*S. suis* 提供了思路和方法。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒来源 *S. suis* 2 强毒株 05ZYH33 分离自 2005 年四川资阳中毒性休克症病人^[26]。*S. suis* 2(NCTC 10234)和*S. suis* 1(5428)、*S. suis* 4(2524)、*S. suis* 7(8074)、*S. suis* 9(22083)、*S. suis* 14(13730)标准株由加拿大 Marecelo Gottschalk 教

授惠赠。*S. suis* 2(T15)来自荷兰 Greeff 实验室,由 Astrid de Greeff 惠赠。*S. suis* 2(WZ48-1)由陆军军医大学李明老师惠赠。大肠杆菌 GDMCC 801268 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 GDMCC 801304(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌 CMCC(B) 26305 (*Staphylococcus aureus*)、单增李斯特菌 ATCC 19115(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌 ATCC 19615(*Streptococcus pyogenes*)、无乳链球菌 GDMCC 1.408(*Streptococcus agalactiae*)、粪肠球菌 ATCC 51299(*Enterococcus faecalis*)购自广东省微生物菌种保藏中心。BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。pET-30a 质粒由本课题组鉴定和保存。

1.2 主要试剂 5 K DNA Marker、硫酸卡那霉素购于生工生物工程(上海)股份有限公司; *Nde* I 和 *Hind* III 购于美国 NEB 公司; PAGE 凝胶快速制剂盒(10%)、双色预染蛋白 Marker(15~150 kDa)、ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜 0.45 μm)购于上海雅酶生物医药科技有限公司; Ni-NTA Agarose 购于德国 QIA-GEN 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提中量试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司; 2 × PrimeSTAR mix Premix 购于宝日生物技术(北京)有限公司; 硝酸纤维素膜(NC 膜,货号:abs959)购于爱必信(上海)生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)(货号:bs-40295G-HRP)购于北京博奥森生物技术有限公司; HRP-DAB 底物显色试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司(货号:PA110), THB 培养基、LB 肉汤培养基、BHI 培养基购于海博生物技术有限公司。

1.3 HtpsC 蛋白的制备

1.3.1 表达菌株的构建 根据 pET-30a 质粒多克隆位点分析,选择 *Nde* I 和 *Hind* III 作为插入位点。使用 *Nde* I 和 *Hind* III 内切酶将 pET-30a 载体切线性化。根据 *S. suis* 2 强毒株 05ZYH33 的 HtpsC 蛋白基因序列(GenBank: CP000407.1)设计特异性引物,引物序列如表 1 所示。以菌液为模板扩增目的基因,使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化目的片段。使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 试剂盒将目的片段和线性化载体进行无缝克隆连接获得重组质粒(pET-30a-HtpsC)。将构建好的重组质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞获得表达菌株。表达菌株通过质粒提取、测序进行验证。

表 1 HtpsC 基因扩增引物

Tab.1 Primers for the HtpsC gene

Gene	Sequence(5'-3')	Tm/°C	length/bp
HtpsC-F	TAAGAAGGAGATATA-CATATGATGAACATA-CGACTTGTAGTG	50	2 472
HtpsC-R	CTCGAGTGCAGGCCGCA-AGTTCTCGCTTACCT-TTGCTT		

1.3.2 HtpsC 蛋白的诱导表达 将表达菌株接种于含有卡纳抗性(终浓度为 50 μg/mL)的 LB 培养基,在 37 °C、180 r/min 培养至 OD₆₀₀ = 0.8,然后加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,在 15 °C 诱导 16 h 后收集菌体。离心后使用 PBS 重悬菌体,超声破碎后离心分离上清和沉淀,分别加入 SDS-PAGE 电泳上样缓冲液并煮沸 10 min,然后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.3 HtpsC 蛋白的纯化 扩大培养体积并在 15 °C 条件下诱导表达 16 h 后收集菌体,然后全菌采用 50 mmol/L Tris(pH8.0),300 mmol/L NaCl,20 mmol/L Imidazole 含 1% Triton X-100,1 mmol/L DTT,1 mmol/L PMSF 超声裂解,同时以 50 mmol/L Tris (pH8.0),300 mmol/L NaCl,20 mmol/L Imidazole 缓冲液平衡 Ni-IDA 亲和层析柱,之后用不同浓度咪唑的平衡缓冲液洗脱目标蛋白并收集。将收集的 HtpsC 蛋白透析至 1×PBS 中,并在透析结束后使用 0.22 μm 滤器过滤,检测蛋白浓度后分装,冻藏于 -80 °C。

1.3.4 Western blot 验证 HtpsC 蛋白 纯化的 HtpsC 蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)后,使用 Western blot 方法进一步验证。具体操作如下:将蛋白凝胶经 PBST 缓冲液(含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS, pH7.4)润洗 3 min。将 PVDF 膜放入甲醇中浸润活化 15 s,然后将蛋白凝胶与 PVDF 膜在转膜缓冲液中平衡 10 min。将蛋白凝胶紧贴 PVDF 膜后,装入转膜夹并放入转印槽中,在冰浴条件下 300 mA 恒流转膜 120 min。转印结束后,将 PVDF 膜放于封闭液(含 5% 脱脂奶粉、0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L PBS, pH7.4)中室温封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次后,加入鼠抗 His 标签单克隆抗体(1:3 000 稀释),室温孵育 1 h。再次用 PBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:3 000 稀释),室温孵育 1 h。使用 PBST 洗涤 3 次后,加 HRP-DAB 底物显色液,

避光反应 10 min,然后观察显色。

1.3.5 ELISA 验证 HtpsC 蛋白 以 HtpsC 蛋白作为抗原,0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液按 10 μg/mL、100 μL/孔 4 ℃ 过夜包被,次日使用 PBST 洗涤 3 次。每孔加 200 μL 封闭液,37 ℃ 封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次后每孔加 100 μL 稀释 200 倍的感染猪链球菌的猪血清,用正常猪血清稀释 200 倍做阴性对照,37 ℃ 孵育 1 h。用 PBST 洗涤 3 次后,每孔加 100 μL 兔抗猪 IgG(1:2 000 稀释),37 ℃ 孵育 1 h。然后用 PBST 洗涤 4 次,每孔加 100 μL TMB 显色液避光反应 10 min。每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μL 终止反应,用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定 OD 值。

1.4 Anti-HtpsC 多克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫 将 2 只新西兰白兔(2~2.5 kg)编号 A、B,饲养观察 3 d,耳缘采血 2 mL 作为阴性血清。以纯化的 HtpsC 蛋白作为抗原,皮下免疫 2 只新西兰白兔,初免剂量为 300 μg/只,二免、三免、四免剂量为 150 μg/只,2 周免疫 1 次。免疫 4 次后采血,收集血清。

1.4.2 间接 ELISA 方法测定多抗血清效价 以 HtpsC 蛋白作为抗原,用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液按 6 μg/mL、100 μL/孔 4 ℃ 过夜包被,次日使用 PBST 洗涤 3 次。每孔加 200 μL 封闭液,37 ℃ 封闭 2 h。PBST 洗涤 3 次后每孔加 100 μL 稀释的兔血清(依次稀释 1 000、2 000、4 000、8 000、16 000、32 000、64 000、128 000 倍),用阴性血清稀释 1 000 倍做阴性对照,37 ℃ 孵育 1 h。用 PBST 洗涤 3 次后,每孔加 100 μL 山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),37 ℃ 孵育 1 h。然后用 PBST 洗涤 4 次,每孔加 100 μL TMB 显色液避光反应 10 min。每孔加 2 mol/L 硫酸 100 μL 终止反应,用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定 OD 值。

1.4.3 Western blot 验证 Anti-HtpsC 多克隆抗体 将收集的多抗血清通过亲和层析纯化得到 Anti-HtpsC 多克隆抗体,然后进行抗原 Western blot 检测。具体操作如下:取纯化的 HtpsC 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(HtpsC 蛋白上样量为 20 ng)。然后转印至 PVDF 膜上,清洗后室温封闭 1 h。清洗 3 次后加入 Anti-HtpsC 多克隆抗体(1:2 000),室温孵育 1 h。清洗 3 次,然后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000),室温孵育 1 h。清洗 3 次后,加 HRP-DAB 底物显色液,避光反应 10 min,然后观察显色。

1.5 Dot-ELISA 检测方法的建立 将 *S. suis* 接种

于 THB 培养基中,160 r/min、37 ℃ 条件下过夜培养。将 NC 膜裁剪成 1×1 cm² 大小的方格置于 24 孔板中。取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,加 1 mL 无菌 1×PBS 缓冲液重悬,100 ℃ 煮沸 10 min 后作为抗原。向 NC 膜中央滴加 2 μL 抗原,37 ℃ 干燥 15 min。加 500 μL 封闭液,37 ℃ 振荡封闭 2 h。然后用 PBST 振荡洗涤 3 次,每次 5 min。多克隆抗体使用封闭液进行稀释并加入到 24 孔板中,每孔 200 μL,37 ℃ 振荡孵育 1 h。孵育结束后用 PBST 清洗 3 次。每孔加 200 μL 稀释到工作浓度的 HRP 标记山羊抗兔 IgG,37 ℃ 振荡孵育 1 h。PBST 清洗 4 次后,吸去多余水分,每孔加 20 μL DAB 显色液,避光反应 10 min。反应结束后,蒸馏水清洗 4 次并吸干。膜上呈黄褐色斑点的即为阳性,反之为阴性。

1.6 Dot-ELISA 检测方法条件的优化

1.6.1 最佳 Anti-HtpsC 多抗使用浓度的确定 封闭结束后,将 Anti-HtpsC 按照 1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600 稀释,按 1.5 操作流程进行后续操作,根据显色结果选择最佳 Anti-HtpsC 多抗使用浓度。试验重复 3 次。

1.6.2 最佳酶标二抗稀释倍数的确定 在确定的最佳 Anti-HtpsC 多抗使用浓度下,将 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 以 1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000 进行稀释,按 1.5 操作流程进行后续操作,根据显色结果确定最佳酶标二抗稀释倍数。试验重复 3 次。

1.7 灵敏度试验 将 *S. suis* 稀释至 1×10⁸ CFU/mL、1×10⁷ CFU/mL、1×10⁶ CFU/mL、1×10⁵ CFU/mL、1×10⁴ CFU/mL、1×10³ CFU/mL,100 ℃ 煮沸 10 min 后作为抗原,以无菌 1×PBS 溶液做空白对照,分别滴加 2 μL 于 NC 膜中央。在确定的最佳方法上进行后续操作,根据 NC 膜上是否出现明显黄褐色斑点确定本方法的检测限。试验重复 3 次。

1.8 特异性试验 使用大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、化脓性链球菌、无乳链球菌、粪肠球菌作为阴性对照。将 9 株 *S. suis*(4 株血清型为 2 型,血清型为 1、4、7、9、14 型各 1 株)同上述阴性对照菌株培养至 1×10⁶ CFU/mL,煮沸后作为抗原。以无菌 1×PBS 溶液做空白对照,分别滴加 2 μL 于 NC 膜中央。在确定的最佳方法上进行后续操作,根据 NC 膜上是否出现明显黄褐色斑点检测本方法的特异性。试验重复 3 次。

2 结果

2.1 Htpsc 氨基酸序列比对 将 Htpsc 蛋白的氨基酸序列同 Slr(GenBank: HQ908654.1)、Blr(GenBank: DQ242614.1)、InlA(GenBank: ABO32426.1)

的氨基酸序列进行比对。结果如图 1 所示,发现 Htpsc 蛋白氨基酸序列与 Slr 和 Blr 的氨基酸序列相似性较高,分别为 37.23% 和 37.07%;和 InlA 的相似性为 27.32%。

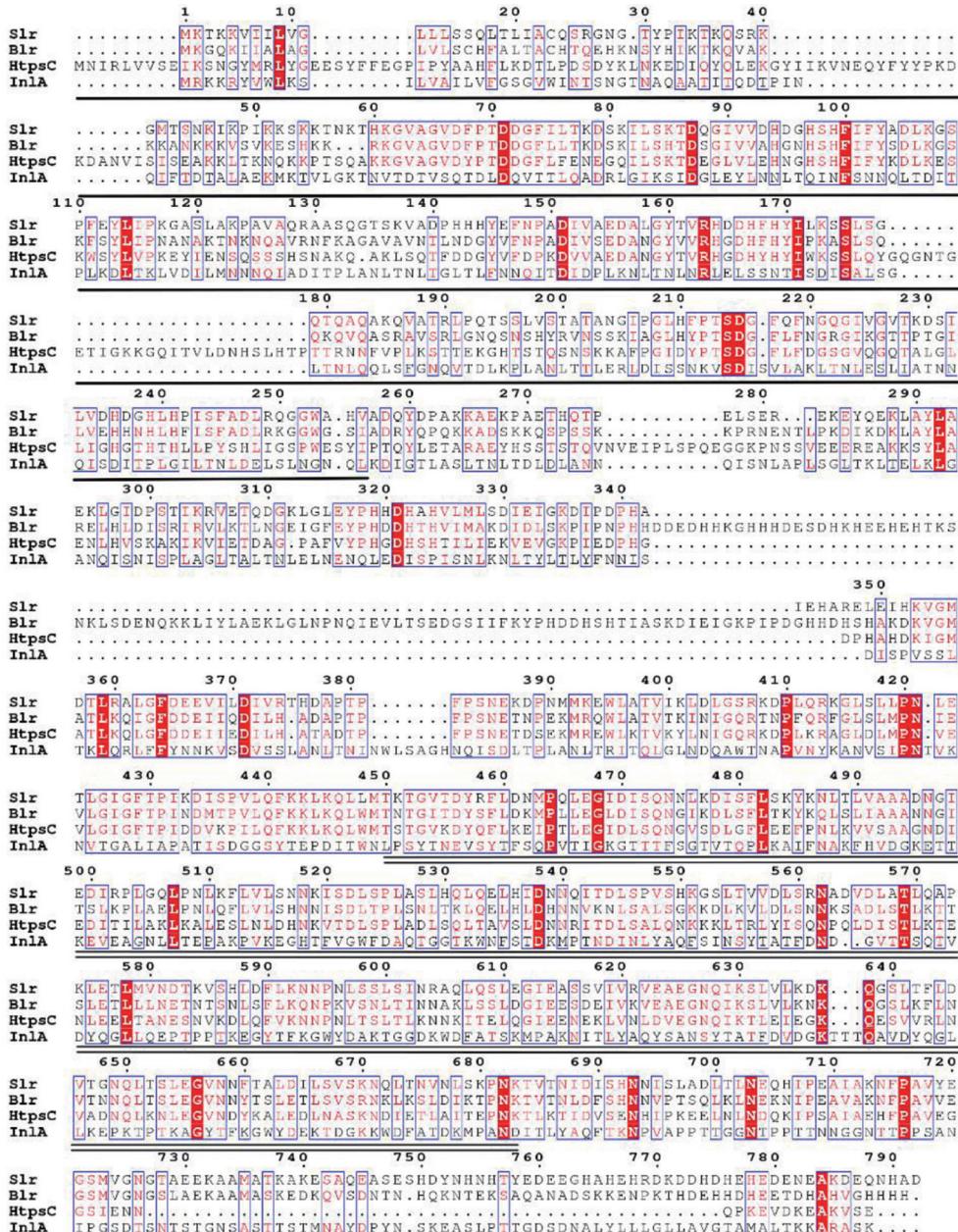


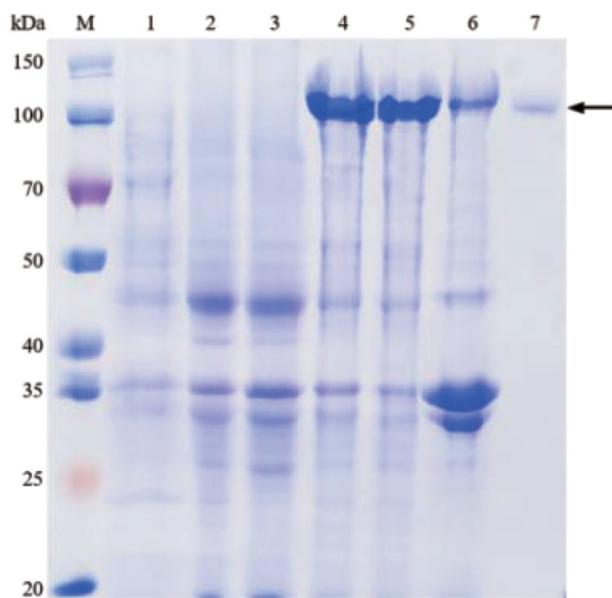
图 1 Htpsc 蛋白与 Slr、Blr 和 InlA 氨基酸序列的比对分析

Fig.1 Alignment analysis of Htpsc protein with Slr, Blr and InlA amino acid sequences

2.2 Htpsc 蛋白的表达和纯化 IPTG 诱导表达的重组菌体经超声破碎后,上清和沉淀分别用 10% SDS-PAGE 电泳分析。在 113 kDa 附近可见明显的 Htpsc 蛋白条带,且重组蛋白主要以可溶性蛋白形式存在(图 2)。离心去除超声破碎后的菌体沉

淀,对上清进行亲和层析纯化。经 300 mmol/L 咪唑多次洗脱后,几乎没有杂蛋白的存在,蛋白纯度大于 90%。收集纯度较高的 Htpsc 蛋白,然后透析至 1×PBS 中,分装后冻存于 -80 °C 冰箱。

2.3 Htpsc 蛋白的 Western blot/ELISA 验证 使

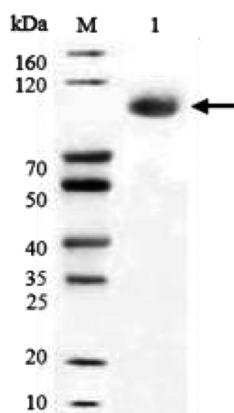


M.蛋白标准品;1.pET-30a未诱导;2.pET-30a诱导;3.pET-30a-HtpsC未诱导;4.pET-30a-HtpsC诱导;5.表达菌裂解液上清;6.表达菌裂解液沉淀;7.HtpsC纯化蛋白

图 2 HtpsC 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of HtpsC

用 His 标签抗体作为检测抗体,对纯化后的 HtpsC 蛋白进行 Western blot 分析,结果如图 3 所示:纯化的 HtpsC 蛋白能够被 His 标签抗体特异性识别。使用感染猪链球菌的猪血清以及正常猪血清对制备的 HtpsC 蛋白进行 ELISA 验证分析,感染猪链球菌的猪血清均大于正常猪血清 OD₄₅₀ 数值的 2.1 倍。综上所述,通过原核表达及亲和层析纯化成功制备了 HtpsC 蛋白(表 2)。



M.蛋白标准品;1.纯化的 HtpsC 蛋白

图 3 HtpsC 蛋白的 Western blot 鉴定

Fig.3 Western blot identification of HtpsC

表 2 ELISA 验证 HtpsC 蛋白

Tab.2 Identification of HtpsC protein by indirect ELISA

编号	阳性血清			阴性血清			空白对照
	1	2	3	1	2	3	
A _{450 nm}	0.493	0.550	0.378	0.068	0.060	0.071	0.036

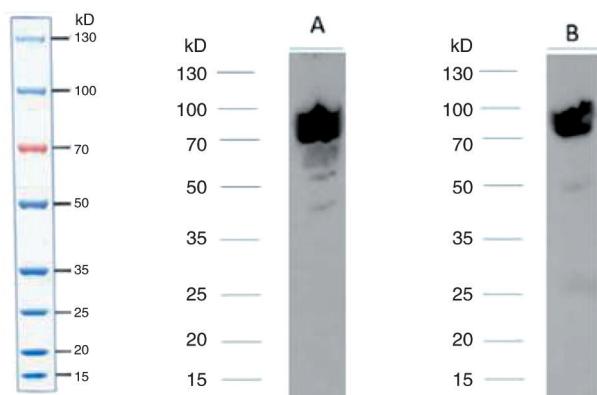
2.4 Anti-HtpsC 效价检测及 Western blot 分析

动物免疫试验后收集多抗血清并使用间接 ELISA 法测定收集的血清中 Anti-HtpsC 的效价。4 次免疫后,两只试验兔收集的多抗血清效价均大于 1:128 000。将多抗血清经亲和层析纯化,分装冻存于 -80 ℃ 冰箱。使用 HtpsC 蛋白作为检测抗原对 Anti-HtpsC 多克隆抗体进行 Western blot 分析,结果如图 4 所示:制备的 Anti-HtpsC 多克隆抗体可特异性识别 HtpsC 蛋白(表 3)。

表 3 间接 ELISA 法检测多抗血清效价

Tab.3 Detection of serum titer by indirect ELISA

编号	稀释倍数	A _{450 nm}	
		A 兔血清	B 兔血清
1	1 000	1.250	1.310
2	2 000	0.969	0.987
3	4 000	0.861	0.857
4	8 000	0.754	0.738
5	16 000	0.647	0.658
6	32 000	0.553	0.572
7	64 000	0.436	0.425
8	128 000	0.327	0.334
9	阴性对照	0.046	0.049
10	空白对照	0.039	0.036

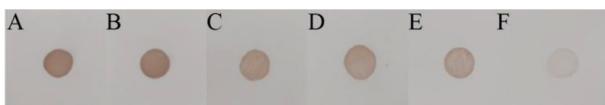


A.A 兔血清中纯化的多抗;B.B 兔血清中纯化的多抗

图 4 Anti-HtpsC 的 Western blot 鉴定

Fig.4 Western blot identification of anti-HtpsC

2.5 最佳多抗工作浓度 Anti-HtpsC 多抗工作浓度优化结果如图 5 所示,背景颜色干扰较小,且多抗稀释小于 400 倍时(图 5A-D)斑点清晰。稀释倍数大于 400 时斑点颜色变淡(图 5E-F)。因此选择多抗的最佳稀释倍数为 1:400,此时 Anti-HtpsC 多抗工作浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



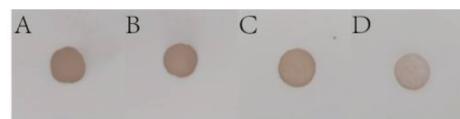
Anti-HtpsC 多抗浓度依次为:A. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;B. 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;C. 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$;D. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;E. 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;F. 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图 5 多抗工作浓度的优化

Fig.5 Optimization of polyclonal antibody working concentration

2.6 最佳酶标二抗稀释倍数 在确定的最佳多抗工作浓度条件下进行酶标二抗稀释倍数的优化,结果如图 6 所示:酶标二抗稀释 1:3 000 时斑点仍然清晰可见(图 6 C)。稀释倍数大于 1:3 000 后斑点颜色减淡。因此选择最佳的酶标二抗稀释倍数为 1:3 000。

2.7 灵敏度、特异性试验 灵敏度检测结果如图 7 所示:当 *S. suis* 浓度大于 $1 \times 10^7 \text{ CFU}/\text{mL}$ 时,斑点清晰可见;当浓度为 $1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$ 时,斑点颜

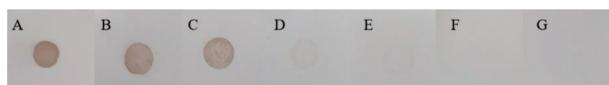


酶标二抗稀释倍数:A. 1:1 000;B. 1:2 000;C. 1:3 000;D. 1:4 000

图 6 酶标二抗稀释倍数的优化

Fig.6 Optimization of HRP secondary antibody working concentration

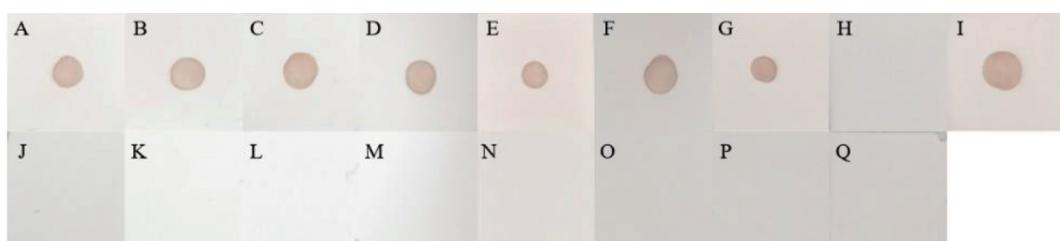
色较浅;当浓度小于 $1 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{mL}$ 时,几乎无斑点显现。灵敏度试验表明,该方法可检测到的 *S. suis* 为 $1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。特异性检测结果如图 8 所示:4 株 *S. suis* 2(图 8A-D)以及血清型为 1、4、7、14 型的 *S. suis* 标准株,斑点清晰明显,而 *S. suis* 9 标准株因为不含有 HtpsC 蛋白基因^[22],所以未见明显的黄褐色斑点(图 8H)。其它对照菌均没有斑点出现,表明该方法的特异性较好。



A. $1 \times 10^8 \text{ CFU}/\text{mL}$;B. $1 \times 10^7 \text{ CFU}/\text{mL}$;C. $1 \times 10^6 \text{ CFU}/\text{mL}$;D. $1 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{mL}$;E. $1 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{mL}$;F. $1 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{mL}$;G. 空白对照

图 7 Dot-ELISA 灵敏度试验

Fig.7 Sensitivity test of dot-ELISA



A-D 依次为 *S. suis* 2 05ZYH33, T15, WZ48-1, NCTC10234; E-I 依次为 *S. suis* 1, *S. suis* 4, *S. suis* 7, *S. suis* 9, *S. suis* 14 标准株;J.大肠杆菌;K.沙门氏菌;L.金黄色葡萄球菌;M.李斯特菌;N.化脓性链球菌;O.无乳链球菌;P.粪肠球菌;Q.空白对照

图 8 Dot-ELISA 特异性试验

Fig.8 Specificity test of dot-ELISA

3 讨论

在过去的几十年里,免疫分析已经成为实验室中最普遍使用的检测细菌或者病毒的免疫学检测方法^[27]。其中 Dot-ELISA 方法是一种可以在一次试验中筛选大量样本的同时,检测抗原或者抗体的快速且简便的试验方法^[28]。Attia 等^[29]的研究表明,与间接 ELISA 方法相比,Dot-ELISA 方法具有更高的敏感性和特异性。周俊明等^[30]建立了针对 *S.*

suis 2 溶菌酶释放蛋白抗体间接 ELISA 检测方法。朱剑等^[31]制备了 *S. suis* 2 分泌核酸酶(SsnA),并建立了间接 ELISA 检测方法用于检测血清中抗体。Xia 等^[32]以谷氨酸脱氢酶为诊断抗原建立了猪链球菌间接 Dot-PPA-ELISA 快速特异性检测方法,与常规平板 ELISA 试剂盒进行比较分析,该方法的特异性和敏感性分别为 97.5% 和 96.6%。然而上述方法的检测对象均为抗体,不能较早的检

测到 *S. suis* 感染。欧瑜等^[33]利用 *S. suis* 2 分离株 HA9801 毒力相关蛋白溶菌酶释放蛋白(MRP)和胞外因子(EF)构建了 Dot-ELISA 方法和间接 ELISA 方法用于检测猪链球菌,两种方法的阳性率均为 61%,但没有给出明确的检测限。

由于资源有限,我们选择了几种主要致病血清型的 *S. suis*(包括 4 株 *S. suis* 2 型菌株以及血清型为 1、4、7、9、14 型的 *S. suis* 标准株)进行了检测。结果显示,该方法能检出血清型为 1、2、4、7、14 型的 *S. suis*,而不含有 HtpSC 蛋白基因的 *S. suis* 9 型没有被检出。虽然我们没有获得所有血清型的猪链球菌用于验证,但基于实验结果,我们可以推测该方法可以适用于含有 HtpSC 蛋白基因的多种血清型 *S. suis* 的检测,而不适用于一些不含有 HtpSC 蛋白基因的 *S. suis*(包括血清型为 9、12、20、29、32 以及 33 型)的检测。在不含 HtpSC 蛋白基因的 *S. suis* 血清型中,仅血清型 9 型有致病性报道,因此在血清型 9 型比较流行的澳大利亚、德国以及北美洲地区^[6],该方法需要结合其它 *S. suis* 检测方法一起使用。氨基酸序列比对结果显示, *S. suis* 的 HtpSC 蛋白和链球菌属中的化脓性链球菌 Slr、无乳链球菌 Blr 存在较高的相似性,因此我们选择这两种链球菌以及常见致病菌中的粪肠球菌、单增李斯特菌、大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌作为对照菌株进行特异性实验。实验结果表明,所建立的 Dot-ELISA 方法具有良好的特异性,因此该方法可以满足 *S. suis* 的初步检测。

综上所述,本研究利用原核表达制备了 HtpSC 蛋白,并制备了 Anti-HtpSC 多克隆抗体。基于 Anti-HtpSC 多克隆抗体,我们建立了能够直接检测 *S. suis* 的 Dot-ELISA 检测方法。在优化的试验方案下,背景清晰、斑点明显。由于试验条件的限制,没有充足的临床实际样本,因此本方法的临床应用表现还有待检验。该方法可以通过直接观察 NC 膜上是否有黄褐色斑点得到试验结果,具有操作简单、方便快捷等特点,适用于在基层、乡镇偏远地区开展 *S. suis* 的初步检测。本方法检测灵敏度可达 1×10^6 CFU/mL,和化脓性链球菌、无乳链球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应,特异性好。

利益冲突:无

引用本文格式:蔡旭燊,燕书豪,赵芷若,等.猪链球菌组氨酸三联体蛋白多抗的制备及 Dot-ELISA 检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2022,38(8):657-665. DOI:10.3969/j.issn.1002-

2694.2022.00.104

参考文献:

- [1] Wertheim H, Nghia H, Taylor W, et al. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5): 617-625. DOI: 10.1086/596763
- [2] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(3): 201-209. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70001-4
- [3] Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6): 914. DOI: 10.3201/eid1206.051194
- [4] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Correction: streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. PLoS Med, 2006, 3(8): e377. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030151
- [5] Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. Emerg Microb Infect, 2014, 3(6): e45. DOI: 10.1038/emi.2014.45
- [6] Vela AI, Goyache J, Tarradas C, et al. Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2498-2502. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2498-2502.2003
- [7] Wongswan, Kanruethai, Marcelo G, et al. Serotype and virulence-associated gene profile of *Streptococcus suis* isolates from pig carcasses in Chiang Mai Province, Northern Thailand[J]. J Vet Med Sci, 2015(77): 233-236. DOI: 10.1292/jvms.14-0380
- [8] Sang IS, Jeon AB, Jung BY, et al. Capsular serotypes, virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from pigs in Korea[J]. J Veter Med Sci, 2017(79): 780-787. DOI: 10.1292/jvms.16-0514
- [9] 张玲梅,王豪举.猪链球菌检测技术研究进展[J].中国生物工程杂志,2020,40(4):84-90. DOI: 10.13523/j.cb.1909042.
- [10] Ishida S, Tien L, Osawa R, et al. Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*[J]. J Microbiol Methods, 2014(107): 66-70. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.09.003
- [11] Ichikawa T, Niwa T, Nakanishi T. Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolated from porcine bacterial en-docarditis and tonsils[J]. J Japan Vet Med Assoc, 2018(71): 193-197. DOI: 10.12935/jvma.71.193
- [12] Hatrongjit R, Akeda Y, Hamada S, et al. Multiplex PCR for identification of six clinically relevant streptococci[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(11): 1590-1595. DOI: 10.1099/jmm.0.000615
- [13] Dekker N, Daemen I, Verstappen K, et al. Simultaneous quantification and differentiation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 by quantitative real-time PCR, evaluated in tonsillar and nasal samples of pigs[J]. Pathogens, 2016, 5(3): 46. DOI: 10.3390/pathogens5030046
- [14] Zhang J, Zhu, Ren H, et al. Rapid visual detection of highly

- pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 isolates by use of loop-mediated isothermal amplification[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(10): 3250-3256. DOI: 10.1128/JCM.01183-13
- [15] 刘玲玲,李文刚,唐桂芬,等.猪链球菌2型基因芯片检测技术的建立[J].河南农业科学,2013,42(2): 128-131. DOI: 10.15933/j.cnki.1004-3268.2013.02.033
- [16] Luey CK, Chu YW, Cheung TK, et al. Rapid pulsed field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(3): 648-650. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.10.010
- [17] Xia XJ, Wang X, Wei XB, et al. Methods for the detection and characterization of *Streptococcus suis*: from conventional bacterial culture methods to immunosensors[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, 111: 2233-2247. DOI: 10.1007/s10482-018-1116-7
- [18] Yang JX, Jin ML, Chen JF, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for detection of *Streptococcus suis* type 2 antibody[J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 19(4): 355-361. DOI: 10.1177/104063870701900403
- [19] Xia XJ, Zhang HH, Chen LK, et al. Development of PPA-ELISA for diagnosing *Streptococcus suis* infection using recombinant SaoM protein as diagnostic antigen[J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2017, 23(6): 989-996. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18110
- [20] Shao ZQ, Zhang YM, Pan XZ, et al. Insight into the evolution of the histidine triad protein (HTP) family in *Streptococcus*[J]. PLoS One, 2013, 8(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0060116
- [21] Bostjan K, Andrey VK. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(6): 725-732. DOI: 10.1016/s0959-440x(01)00266-4
- [22] Shao ZQ, Pan XZ, Li XF, et al. HtpS, a novel immunogenic cell surface-exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice[J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 314(2): 174-182. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02162.x
- [23] Zhang YM, Shao ZQ, Wang J, et al. Prevalent distribution and conservation of *Streptococcus suis* Lmb protein and its protective capacity against the Chinese highly virulent strain infection [J]. Microbiol Res, 2014, 169(56): 395-401. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.007
- [24] Li M, Shao ZQ, Guo Y, et al. The type II histidine triad protein HtpC is a novel adhesion with the involvement of *Streptococcus suis* virulence[J]. Virulence, 2015, 6(6): 631-641. DOI: 10.1080/21505594.2015.1056971
- [25] Lu YJ, Li S, Shen XD, et al. The type II histidine triad protein HtpC facilitates invasion of epithelial cells by highly virulent *Streptococcus suis* serotype 2[J]. J Microbiol, 2021, 59(10): 949-957. DOI: 10.1007/s12275-021-1129-1
- [26] Chen C, Tang J, Wei D, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e315. DOI: 10.1371/journal.pone.0000315
- [27] Wang ZC, Yu DD, Li XY, et al. The development and application of a dot-ELISA assay for diagnosis of southern rice black-streaked dwarf disease in the field[J]. Viruses, 2012, 4(1): 167-183. DOI: 10.3390/v4010167
- [28] Zheng W, Zhang R, Wu X, et al. Evaluating troponin C from Psoroptes cuniculi as a diagnostic antigen for a dot-ELISA assay to diagnose mite infestations in rabbits[J]. Parasite Immun, 2014, 36(2): 53-59. DOI: 10.1111/pim.12076
- [29] Attia MM, Farag HS, Abdel-Saeed H, et al. Advanced immunological studies on *Cephalopina titillator* with special references to the epidemiological uses of Dot-ELISA in camel sera[J]. J Parasitic Dis, 2020, 44(4): 813-821. DOI: 10.1007/s12639-020-01256-y
- [30] 周俊明,李彬,王小敏,等.猪链球菌2型溶菌酶释放蛋白部分片段的原核表达及其抗体间接ELISA检测方法的建立[J].江苏农业学报,2012,28(1): 80-85. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4440.2012.01.015
- [31] 朱剑,康超,张安定,等.猪链球菌2型分泌核酸酶(SsnA)的表达、ELISA方法建立及其在鉴别诊断中的应用[J].畜牧兽医学报,2011,42(2): 228-235.
- [32] Xia XJ, Lei W, Shen ZQ, et al. Development of an Indirect Dot-PPA-ELISA using glutamate dehydrogenase as a diagnostic antigen for the rapid and specific detection of *Streptococcus suis* and its application to clinical specimens[J]. Antonie Van Leeuwenhoek J Microbiol Serol, 2017, 110: 585-592. DOI: 10.1007/s10482-016-0825-z
- [33] 欧瑜,陆承平.检测猪链球菌2型毒力相关蛋白的ELISA法的建立[J].南京农业大学学报,2001,24(2): 94-97. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2030.2001