

以重组融合蛋白为基础的钩端螺旋体酶联免疫吸附试验检测试剂盒的初步研制

胡玉山, 刘巧谊, 肖丽红, 周勇, 侯水平, 刘俊华

广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440

摘要: **目的** 建立以钩端螺旋体融合蛋白 LipL32-LipL41 (LipL32: 脂蛋白 L32, lipoprotein32; LipL41: 脂蛋白 L41, lipoprotein41) 为包被抗原的酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂。 **方法** 选择问号钩端螺旋体 LipL32 和 LipL41 作为研究靶标, 采用连接引物 PCR 法构建 lipL32-lipL41 融合基因, 原核表达获得重组蛋白, 以该蛋白为包被抗原建立 ELISA 检测体系, 对检测体系的灵敏度、特异性、稳定性等性能指标进行评价。 **结果** 扩增获得了 1 900 bp 左右的 lipL32-lipL41 融合基因, 原核表达出了 90 kDa 左右的重组融合蛋白 LipL32-LipL41, 建立了基于 LipL32-LipL41 的 ELISA 检测体系, 采用 77 例确诊病例和 85 例阴性对照血清进行初步验证, 检测体系的灵敏度为 96.1%, 特异度为 97.6%, 粗一致性为 96.9%, 约登指数为 0.937。 **结论** 以 LipL32-LipL41 重组融合蛋白为包被抗原建立 ELISA 免疫检测初步验证的灵敏度、特异性和稳定性较好, 可进行下一步验证工作。

关键词: 钩端螺旋体; 融合蛋白 LipL32-LipL41; ELISA

中图分类号: R514.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2019)07-0808-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.07.010

Preliminary development of an enzyme-linked immunosorbent assay kit based on recombinant fusion antigen protein for detection of *Leptospira*

HU Yu-shan, LIU Qiao-yi, XIAO Li-hong, ZHOU Yong, HOU Shui-ping, LIU Jun-hua

Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China

Abstract: **Objective** To establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection reagent based on *Leptospira* fusion protein LipL32-LipL41 as a coated antigen. **Methods** *Leptospira interrogans* lipoprotein32 (LipL32) and lipoprotein41 (LipL41) were selected as research targets. The fusion gene lipL32-lipL41 was constructed by using PCR with ligation primers. The recombinant protein was expressed in prokaryotic expression system. The ELISA detection system was established by using the fusion protein as the coated antigen. The sensitivity, specificity and stability of the detection system were evaluated. **Results** About 1,900 bp lipL32-lipL41 fusion gene fragment was obtained. The molecular weight of the recombinant fusion protein LipL32-LipL41 prokaryotically expressed was about 90 kDa, and an ELISA detection system based on LipL32-LipL41 was established. 77 confirmed serum samples and 85 negative control ones were used for preliminary verification. The sensitivity, specificity, crude consistency and Yorden index of the detection system were 96.1%, 97.6%, 96.9% and 0.937 respectively. **Conclusions** It is preliminarily verified that the ELISA diagnostic kit based on the recombinant fusion protein LipL32-LipL41 as a coated antigen has high sensitivity, specificity and stability, and can be proceeded with the next verification.

Key words: *Leptospira interrogans*; fusion protein LipL32-LipL41; enzyme-linked immunosorbent assay

钩端螺旋体简称钩体, 属螺旋体目、钩端螺旋体科、钩端螺旋体属, 其所致钩端螺旋体病是一种世界范围流行的自然疫源性人畜共患病^[1-2], WHO 报道每年有超过 100 万严重感染病例^[3]。我国是钩体病的主要疫区之一, 特别是南方地区, 本病在 1955 年列入我国法定传染病, 截至 2016 年, 全国有 300 多万病例^[4-5]。

基金项目: 广州市科技计划项目 (2014J4100074), 广州市医学重点学科建设项目 (2017-2019-07)

作者简介: 胡玉山 (1976-), 男, 湖南郴州人, 博士, 主任技师, 主要研究方向为病原体检验。

钩体病发病急、临床症状复杂多样且不典型, 极易误诊漏诊。分离钩体耗时耗力, 而血清学的诊断则是一种应用极为广泛的方法, 血清学检测的关键在于抗原的筛选。但致病性钩体血清型繁多, 不同型别的钩体抗原组成复杂多样^[6], 因此筛选高特异、高灵敏的诊断抗原就显得尤为重要。已有研究证实脂蛋白 L32 (lipoprotein 32, LipL32)、脂蛋白 L41 (lipoprotein 41, LipL41) 是位于钩体外膜的脂蛋白, 属致病性钩体的保守性抗原成分^[7-9], 因此将其融合表达, 可望获得更强的抗原性, 有更好的灵敏度和特异度。本研究利用连

接引物 PCR 法构建 *LipL32-LipL41* 融合基因,获得重组蛋白作为诊断抗原,研制 ELISA 检测试剂盒,并对其性能评价。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 钩体菌株为本中心保存的国内常见问号钩体(*Leptospira interrogans*, *L. interrogans*) 参考标准株黄疸出血群赖型 56 601 株、犬群犬型 56 603 株、致热群致热型 56 605 株、秋季群秋季型 56 606 株、澳洲群澳洲型 56 607 株、波摩那群波摩那型 56 608 株、流感伤寒群临型 56 609 株。

1.2 钩体基因组 将培养好的钩体菌株采用 QIAGEN 公司 QIAamp UCPathogen Mini Kit 试剂盒按说明书提取 DNA。

1.3 钩体 *lipL32-lipL41* 融合基因的构建设计 融合基因扩增引物 *lipL32-overlap-R* 与 *lipL41-overlap-F*; 设计 *lipL41* 基因不带终止密码子的下游引物用于融合基因的表达,序列均见表 1。

表 1 钩体 <i>lipL32-lipL41</i> 融合基因扩增引物	
引物名称	引物序列
<i>lipL32-overlap-R</i>	GAGAAGATAATTTCTCTAGTCGCGTCAGAAGCAG
<i>lipL41-overlap-F</i>	GCTTCTGACGGCGACTAAGAGAAATTTATCTTCTCTAATTTTC
XhoI- <i>lipL41-D2</i>	CCGCTCGAGCTTTGCGTTGCTTTCGTCAAC
EcoRI- <i>LipL32-U</i>	CCGGAATTCATGAAAAAAGCTTCGATTTTG

注:*lipL32-overlap-R* 下划线为与 *lipL41* 基因重叠区;*lipL41-overlap-F* 下划线为与 *lipL32* 基因重叠区;*XhoI-lipL41-D2* 下划线为 *XhoI* 酶切位点;*EcoRI-LipL32-U* 下划线是 *EcoRI* 酶切位点。

首先,用 20 μ l PCR 反应体系分别扩增出带有重叠区域的基因 *lipL32-overlap* 和 *lipL41-overlap*。扩增 *lipL32-overlap* 体系为:模板 pEasy*lipL32-a* 质粒 DNA 0.5 μ l;引物 *EcoRI-LipL32-U* 和 *LipL32-overlap-R* 各 1 μ l;PCR 反应混合液 10 μ l; H_2O 7.5 μ l,反应体系共 20 μ l。扩增 *lipL41-overlap* 体系为:模板 pEasy-*lipL41-a* 质粒 DNA 0.5 μ l;引物 *XhoI-lipL41-D2* 和 *lipL41-overlap-F* 各 1 μ l;PCR 反应混合液 10 μ l; H_2O 7.5 μ l。PCR 反应条件为 1 cycle:98 $^{\circ}C$ for 3 min;30 cycles:98 $^{\circ}C$ for 10 s,55 $^{\circ}C$ for 10 s,72 $^{\circ}C$ for 20 s;1 cycle:72 $^{\circ}C$ for 5 min。回收纯化 PCR 产物 *lipL32-overlap* 和 *lipL41-overlap*,以纯化的 PCR 产物为模板扩增 *lipL32-lipL41* 融合基因。扩增 *lipL32-lipL41* 融合基因体系为:模板为纯化的 *lipL32-overlap* PCR 产物和纯化的 *lipL41-overlap* PCR 产物各 5 μ l;引物 *EcoRI-lipL32-U* 和 *XhoI-lipL41-D2* 各 2 μ l;PCR 反应混合液 25 μ l; H_2O 11 μ l,反应体系共 50 μ l。PCR 反应条件为 1 cycle:98 $^{\circ}C$ for 3 min;30 cycles:98 $^{\circ}C$ for 10 s,53 $^{\circ}C$

for 10 s,72 $^{\circ}C$ for 20 s;1 cycle:72 $^{\circ}C$ for 5 min。

1.4 *LipL32-LipL41* 融合蛋白的表达与鉴定 胶回收纯化 PCR 产物 *lipL32-lipL41*,用 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切纯化的 PCR 产物 *lipL32-lipL41* 及表达载体 pET28a,胶回收纯化经过酶切的 *lipL32-lipL41* 和 pET28a,连接 *lipL32-lipL41* 至 pET28a 载体中,构建 pET28a-*lipL32-lipL41* 重组质粒。转化至扩增菌大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,酶切测序鉴定。然后转化至表达菌大肠杆菌 DE3 中,挑取阳性菌落,提取质粒酶切鉴定,诱导表达水溶性 *LipL32-LipL41* 融合蛋白。用 6XHis 单克隆抗体作为一抗进行免疫印迹法(Western blotting, WB)检测鉴定蛋白的表达,用化学显影剂反应曝光成像。

1.5 试剂盒试制 试剂盒研制过程参考文献^[10]并稍有修改,将鉴定成功的重组蛋白作为包被抗原,用棋盘法确定最佳包被浓度 0.4 μ g/ml,酶标二抗抗人 IgG-HRP 1:60 000,样品及酶标二抗的孵育时间分别为 30 min。

1.6 性能评价 用上述试剂盒对已确定阴阳性的血清进行灵敏度、特异度、精密度及稳定性评价。

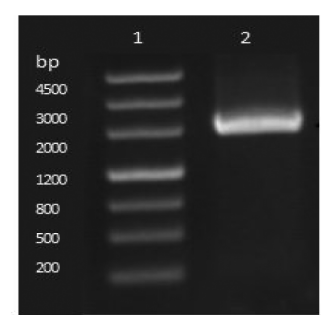
1.6.1 灵敏度、特异度评价 选取正常人排除螺旋体感染的阴性血清 85 例,显微镜凝集试验阳性的病人阳性血清 77 例,用上述试剂盒进行 ELISA 检测。

1.6.2 精密度评价 重复检测弱阳性样本(*OD* 值 0.3~0.5,20 个复孔),算出 *OD* 450 值均值(\bar{x})、标准差(s),代入变异系数方程 $CV\% = S/\bar{x} \times 100\%$ 。

1.6.3 热稳定性评价 两盒试剂同时置于 4 $^{\circ}C$ 和 37 $^{\circ}C$ 7 d,选用阳性样本 8 份检测其 *OD* 450 值,计算 37 $^{\circ}C$ *OD* 450 值与 4 $^{\circ}C$ *OD* 450 值之比。

2 结果

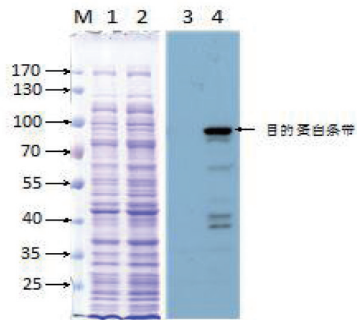
2.1 融合基因 *lipL32-lipL41* 的构建 用已纯化的 *LipL32-overlap* 和 *LipL41-overlap* 的 PCR 产物为模板扩增 *lipL32-lipL41* 融合基因,结果显示 1 900 bp 左右有特异目的条带。见图 1。



注:1:DNA Marker,2:*lipL32-lipL41*

图 1 PCR 构建钩体融合基因 *lipL32-lipL41*

2.2 LipL32-LipL41 融合蛋白表达及 WB 鉴定
pET28a-LipL32-LipL41 转化入 BL21/DE3 感受态大肠杆菌诱导表达,与未诱导菌液对比结果显示约 90 kDa 处有目的蛋白表达。WB 鉴定结果表明,分子量 90 kDa 处有可被 6xHis 单克隆抗体识别的特异条带,说明基因融合表达成功。见图 2。



注:M:蛋白 marker,1:重组蛋白未诱导,2:重组蛋白诱导,3:WB 阴性对照,4:WB 阳性结果

图 2 融合蛋白 LipL32-LipL41 表达鉴定
2.3 灵敏度、特异度结果 77 例确诊阳性的病人血清检出阳性 74 例,85 例正常人样检为阴性 83 例,具体结果见表 2。灵敏度 = $74 / (74 + 3) \times 100\% = 96.1\%$ 。特异度 = $83 / (2 + 83) \times 100\% = 97.6\%$ 。粗一致性 = $(74 + 83) / (74 + 3 + 2 + 83) \times 100\% = 96.9\%$ 。约登指数 = $74 / (74 + 3) + 83 / (2 + 83) - 1 = 0.937$,说明试剂盒符合率较高。

ELESa 结果	评价用血清		合计
	阳性血清	阴性血清	
阳性	74	2	76
阴性	3	83	86
合计	77	85	162

2.4 精密度结果平行检测 弱阳性样本 (20 个复孔),OD 450 值均值=0.387,标准差 S=0.022,CV%=5.611%,见表 3,说明精密度良好,孔间变异较小。

孔	OD 450
1	0.383
2	0.360
3	0.363
4	0.410
5	0.411
6	0.382
7	0.364
8	0.387
9	0.415
10	0.427
11	0.361
12	0.406
13	0.384
14	0.376

孔	OD 450
15	0.357
16	0.393
17	0.412
18	0.409
19	0.368
20	0.376
$\bar{x} \pm s$	0.387±0.022
CV (%)	5.611

2.5 稳定性结果 将试剂同时置于 4℃和 37℃7 d 后,同时检测样品的 OD 450 值,结果见表 4。试剂 37℃放置 7 d 后,检测阴阳性样本 OD 450 值与试剂 4℃放置检测样本 OD 450 值相比得一比值,具体比值见下表,均在 0.9 以上。这些比值表明热力学破坏实验中,37℃放置 7 d 相当于在 4℃放置 12 个月,说明试剂盒稳定性较好。

编号	OD 450 值及 OD 450 比值		
	37℃	4℃	37℃/4℃
NC	0.068	0.069	0.986
PC	2.583	2.682	0.963
N1	0.078	0.083	0.940
N2	0.053	0.056	0.946
P1	0.864	0.878	0.984
P2	1.63	1.731	0.942
P3	1.438	1.454	0.989
P4	2.08	2.212	0.940
P5	0.622	0.653	0.953
P6	0.892	0.912	0.978
P7	0.887	0.913	0.972
P8	0.941	1.007	0.934

注:NC,negative control,阴性对照;PC,positive control,阳性对照;N1,阴性样本 1;N2 阴性样本 2;P1~P8,阳性样本 1~8。

3 讨论
钩端螺旋体引起的钩端螺旋体病是一种世界性流行的自然疫源的人畜共患病^[11]。长期以来,钩体病的实验诊断一直是以培养为主,基层单位由于条件的限制,培养费时又易受污染,所以成功率很低。宿主在感染后钩体后会产生多种针对钩体抗原的抗体,因此可从血清学角度检测针对钩体的抗体作为诊断钩体感染的依据。血清学抗体检测试剂的关键在于包被抗原,而抗原在于有效抗原表位的筛选及融合表达,因此,本研究将致病性钩体保守抗原成分钩体脂蛋白 LipL32 和 LipL41 进行融合表达纯化,作为诊断抗原用于钩体抗体的 ELISA 检测。

用于构建融合基因的技术较多,如产物连接末端加接头、设置内切酶位点、两个片段之间增加连接序列等,而我们采用一种高保真、便捷、准确的连接引物 PCR 法融合表达 lipL32-lipL41。经过目的基因扩增、

酶切鉴定、测序验证及 WB 等多步实验验证融合基因表达成功后,对其进行纯化。将纯化后的蛋白用于 ELISA 检测试剂盒的包被抗原,在 ELISA 中,进行各项实验条件的选择是很重要的,如包被浓度、包被抗体选择,酶标抗体浓度等。我们用棋盘法确定最佳包被浓度、最佳一抗、酶标二抗稀释比例,并优化反应体系,确定孵育时间为 30 min+30 min,试制 ELISA 法钩体抗体检测试剂盒。

对试剂盒性能进行评价,结果显示灵敏度为 96.1%(74/77),特异度为 97.6%(83/85),精密密度为 5.611%,稳定性良好,热力学破坏实验结果表明可在 4℃ 稳定储存 12 个月,相较于胶体金检测钩体,无论特异性、敏感性、精密性,还是稳定性均优于胶体金法,但是在检测时限上,胶体金法明显耗时更短^[12]。本研究实验结果与理论预测相一致,我国主要流行钩体均含有 *lipL32* 和 *lipL41* 基因,因此融合蛋白具有很好的抗原性。

总之,用融合蛋白 LipL32-LipL41 包被的 ELISA 检测试剂无需培养活钩体,不易感染,安全性更好,所用方法简单,无需特殊仪器设备即可在基层单位开展快速检测,具有较好的经济效益与实用价值。

参考文献

- [1] Guerra MA. Leptospirosis: public health perspectives [J]. Biologicals, 2013, 41(5):295-297.
- [2] Yuzsniahyati Y, Kenneth FR, Daisy VJ. Leptospirosis: recent incidents

and available diagnostics a review[J]. Med J Malaysia, 2015, 70(6): 351-355.

- [3] Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, et al. Epidemiology of leptospirosis transmitted by rodents in southeast Asia[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(6):941-945.
- [4] 徐国英,严延生,张志珊,等. 钩端螺旋体外膜蛋白 LipL32 的克隆、表达及应用于致病性钩体免疫血清的检测[J]. 中国人兽共患病学报,2008,24(5):391-394.
- [5] 王跃兵,杨向东,杨发莲,等. 不明原因发热病人钩端螺旋体和巴尔通体感染调查[J]. 实用预防医学,2015,22(4):430-432.
- [6] González S, Geymonat JP, Hernández E, et al. Usefulness of real-time PCR assay targeting *lipL32* gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay[J]. J Infect Dev Ctries,2013,7(12):941-945.
- [7] Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, et al. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant *OmpL1* or *LipL41* antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2008,102(8):699-708.
- [8] Lin X, Sun A, Ruan P, et al. Characterization of conserved combined T and B cell epitopes in *Leptospira interrogans* major outer membrane proteins *OmpL1* and *LipL41* [J]. BMC Microbiol, 2011, 11(1):21-29.
- [9] 胡玉山,肖丽红,刘巧谊,等. 问号钩端螺旋体 *lipL32-lipL41* 融合基因的克隆与原核表达[J]. 热带医学杂志,2016,16(8):987-990,1003.
- [10] Shiokawa K, Gamage CD, Koizumi N, et al. Evaluation of truncated *LipL32* expressed by *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* for serodiagnosis of *Leptospira* infection in rodents [J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(2):221-230.
- [11] Dahal KP, Sharma S, Sherchand JB, et al. Detection of anti-leptospira IgM antibody in serum samples of suspected patients visiting National Public Health Laboratory, Teku, Kathmandu [J]. Int J Microbiol, 2016,12(4):698-706.
- [12] 黄德惠,曾竣,蒋震铃,等. 两种方法检测钩端螺旋体病的一致性评价[J]. 实用预防医学,2015,22(10):1262-1263,1270.

收稿日期:2018-10-16

(上接第 804 页)

绍儿童安全座椅的适用年龄、作用等。

3.3 儿童安全座椅使用立法需求与现状分析 安全座椅的立法工作受到了国内外专家的密切关注,本次调查结果显示 84.1% 的宜兴幼儿家长认为需要制定相关法律法规要求儿童乘车必须使用安全座椅,高于深圳市 70% 的父母认为我国需要制定儿童安全座椅相关法律^[8],这表明了我市幼儿家长们对于使用儿童安全座椅的支持及重视。《中国儿童乘车安全蓝皮书》中世界卫生组织的数据显示,在发生小轿车碰撞时,儿童安全座椅能使婴儿的死亡率降低 71%,幼儿的死亡率降低 54%。美国一项关于强制使用儿童安全座椅的立法效果评估发现,该项法规的执行减少了 35% 的道路交通死亡,各种伤害降低了 17%,儿童安全座椅的使用增加了 13%^[9]。国际成功经验表示立法强制是关于儿童安全座椅使用的有效措施。此外,随着道路交通的快速发展,居民经济条件的改善,二胎政策的开放,越来越多的孩子会成为机动车的乘客,促使大众特别是幼儿家长必须更加关注安全座椅的使用^[10]。由于我

国国情与发达国家不同,全员接受及使用的过程会比较长,这就更加督促需要有强制的立法及持续有效的宣传,但如何做好强化执法还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 贾尚春,徐伟,谢建荣,等. 2006-2009 年安徽省 0~14 岁儿童伤害监测资料分析[J]. 中华疾病控制杂志,2010,14(10):964-967.
- [2] World Health Organization. Global status report on road safety 2013: supporting a decade of action [R]. Geneva: WHO, 2014:26.
- [3] World Health Organization. Global status report on road safety 2015 [R]. Geneva: WHO, 2015:9-36.
- [4] 邓晓,金叶,段蕾蕾. 中国 3 城市 9484 例儿童安全座椅使用及认知状况[J]. 中国妇幼保健研究,2016,27(5):551-555.
- [5] 陈晓军,杨静珍,Corinne PA,等. 城市儿童乘车安全措施使用情况调查[J]. 中华疾病控制杂志,2013,17(10):851-854.
- [6] 晏晓颖,邓晓娟,吴俊武,等. 2015 年广州市海珠区有需求家庭对儿童安全座椅认知及行为状况分析[J]. 实用预防医学,2017,24(9):1091-1093.
- [7] 李海,黄小娜,杨君,等. 海淀区 2 所幼儿园儿童安全座椅购买使用及影响因素分析[J]. 中国学校卫生,2015,35(4):595-597.
- [8] 向莹君,曾念彬,周海滨,等. 深圳市儿童安全座椅使用情况调查[J]. 实用预防医学,2015,22(12):1448-1450.
- [9] World Health Organization. World report on road traffic injury prevention [R]. Geneva: WHO, 2008:132.
- [10] 崔民彦. 儿童约束系统在中国推进的机遇与挑战[J]. 伤害医学(电子版),2017,6(21):5-10.

收稿日期:2018-10-17