

# 猪链球菌 2 型感染胶体金诊断方法的研究

胡玉山,肖丽红,刘巧谊,候水平,刘俊华,周勇,吴新伟,杨智聪

510440 广州,广州市疾病预防控制中心微检科

**摘要:**目的 建立猪链球菌 2 型感染胶体金快速诊断方法。方法 选择猪链球菌在进化上极为保守的蛋白谷氨酸脱氢酶的编码基因 *gdh* 作为研究靶基因,对其进行克隆、表达和纯化,应用硝酸纤维膜包被纯化的目的蛋白,运用胶体金溶液与生物大分子金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 结合制备 SPA 金标探针建立猪链球菌 2 型感染的胶体金快速诊断方法。结果 胶体金检测标本阳性结果试纸条上出现两条红色条带, 阴性结果试纸条上只有一条靠近吸水端的质控线出现红色条带,对 370 份标本进行检测,其中 320 份阴性结果,50 份阳性结果。结论 运用胶体金免疫层析技术可以快速诊断猪链球菌 2 型感染。

**关键词:**猪链球菌 2 型感染; 谷氨酸脱氢酶; 胶体金

## Study on colloidal gold rapid diagnosis for *streptococcus suis* serotype 2 infection

HU Yu-shan, XIAO Li-hong, LIU Qiao-yi, HOU Shui-ping, LIU Jun-hua, ZHOU Yong, WU Xing-wei, YANG Zhi-chong

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

**Abstract:** **Objective** To establish a fast colloidal gold diagnostic assay for *Streptococcus suis* II infection. **Methods** The conservative protein GDH encoding gene *gdh* was target gene for cloning, expression and purification. A rapid colloidal gold diagnostic assay for *Streptococcus suis* II infection was established by using microporous membrane carrier such as nitrocellulose membrane and so on to envelope purified protein, using gold granule to label SPA. **Results** Colloidal gold test strip appeared on the positive results of specimens of two red bands, the negative results of only a quality control line strip near the suction end is one red band. **Conclusions** Use of colloidal gold immunochromatography can rapidly diagnose *Streptococcus suis* serotype 2 infection.

**Key words:** *Streptococcus suis* II infection; GDH; Colloidal gold

猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type2, SS2) 是一种重要的人兽共患病病原体,对集约化养猪业和从业人员健康可造成重大经济损失和伤害<sup>[1-3]</sup>。猪链球菌病在养猪业发达的国家均有报道,近年来,在我国江苏、四川等地有爆发流行【<sup>4</sup>补参考文献】。猪链球菌根据荚膜多糖抗原分型有 35 个血清型,其中猪链球菌 2 型(SS2) 致病力最强,人主要感染此型<sup>[5-6]</sup>。谷氨酸脱氢酶属于 GDH (GDH 即谷氨酸脱氢酶英文简写第一次出现应标明中文名) 蛋白家族,在进化上极为保守,其编码基因 *gdh* 在 SS2 中呈保守性存在【<sup>7-8</sup>】。SS2 的 GDH 有保守的抗原性,能与感染猪链球菌 2 型的血清反应,可作为检测猪链球菌 2 型感染的重要诊断性抗原。猪链球菌 2 型的检测在我国主要依靠病原菌的分离鉴定,既费时又费力,敏感性不高<sup>[9]</sup>。为了更好的预防猪链球菌 2 型感染的发生,有效控制其传播与流行,建立一种快速、敏感、特异的检测方法十分重要。本项研究旨在以 GDH 为研究靶标,运用胶体金免疫层析技术建立猪链球菌 2 型感染的快速血清学诊断方法。

## 1 材料和方法

**基金:** 广州市科技计划项目 (2007J1-C0201), 广州市医学重点学科建设项目 (2013-2015-07)

**作者简介:** 胡玉山 (1976-), 男, 副主任技师, 医学博士, 主要从事致病菌研究工作。E-mail: 444699748@qq.com

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒** 猪链球菌2型参考菌株98HAH33华南农大惠赠、受体菌*E. coli* JM109、BL21(DE3)、质粒pGEX4T-2、pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.2 试剂** 蛋白酶K为MERCK 公司产品;PCR 扩增试剂盒、DNA marker DL15000、DNA 回收试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;限制性内切酶*Sal*I、*Bam*HI、T4 DNA连接酶、100bp DNA marker、蛋白分子量marker、柠檬酸三钠、SPA、聚乙二醇20000、硝酸纤维膜等为晶美公司产品;Glutathione Sepharose 4B 为Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 *gdh*基因PCR扩增与T-A克隆** 通过Genbank数据库查找猪链球菌2型相关目的基因序列,根据获得的序列(Genbank No. EU872184),运用DNASTAR软件设计引物,上游引物(P1): 5' - GTG GAT CCA TGT CAA ATG CCA AAG -3',下游引物(P2): 5' - GTT AGA GTC GAC TTATAC CAA ACC TTG G - 3',上游引物引入*Bam*HI 酶切位点,下游引物引入*Sal*I 酶切位点。预计扩增产物大小约1 300bp。PCR 扩增条件为: 94 °C60s, 53 °C60s, 72 °C90s,共30 个循环。PCR 产物经2 %琼脂糖凝胶电泳,割胶称重经DNA 回收试剂盒回收,体外连接pMD19-T 载体,转化JM109 感受态细胞,挑选阳性克隆,获得pMD19-T-*gdh* 质粒,由上海生物工程公司双向测定插入片段*gdh* 的序列,测序结果用DNASTAR软件进行分析。

**1.2.2 重组表达质粒pGEX4T-2-*gdh* 的构建与鉴定** *Sal*I 和*Bam*HI 双酶切pGEX4T-2 质粒及重组质粒pMD19-T-*gdh*,回收纯化约4900bp的pGEX4T-2 片段和1300bp的*gdh*目的片段,T4 DNA连接酶22°C连接2h,转化感受态细胞JM109,涂布于含氨苄青霉素的LB 琼脂平板,37 °C培养过夜,挑取单菌落增菌,提取质粒,通过测序鉴定阳性转化子。

**1.2.3 GDH(大写表示蛋白,小写表示基因大写or小写?下同) 的表达和纯化** 将重组质粒pGEX4T-2-*gdh* 转化*E. coli* BL21 (DE3),经异丙基-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达4h,离心后去上清,沉淀悬浮于1 ×PBS,冰浴中超声破碎。离心取上清和沉淀进行SDS-PAGE 电泳检测。超声裂解上清加Triton X 100 至终浓度为1%,室温作用30min,上样于Glutathione Sepharose4B 亲和层析柱中,用20ml 预冷的1 ×PBS 洗柱,用含5mmol/L 还原型谷胱甘肽的50mmol/L Tris-HCl 5ml洗柱,收集洗脱液,反复洗柱两次,收集流出液。收集的样品用12%SDS-PAGE 电泳鉴定。

**1.2.4 SPA金标探针与快速诊断试纸dipstick的制备** 应用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,加入生物大分子SPA和分子筛聚乙二醇20000制备金标探针。试纸条由吸水纸垫、硝酸纤维膜、金标垫和玻璃纤维膜样品垫四部分组成。金标垫上加金标探针,硝酸纤维素膜上包被纯化的诊断性抗原GDH。

**1.2.5 特异性、敏感性试验** 运用制备好的胶体金诊断试剂条dipstick对临床确诊并分离到病原菌的常见致病菌感染患者血清标本320份和猪链球菌2型感染患者血清标本50份,效价为1:400进行检测,评价其特异性;对猪链球菌2型感染患者血清标本进行10倍稀释后检测,评价其敏感性。

## 2 结果

**2.1 *gdh*基因 PCR 扩增** 猪链球菌2型参考菌株98HAH33 的PCR 扩增产物经电泳后,得到1300bp左右的条带,大小与预期一致,结果见图1。

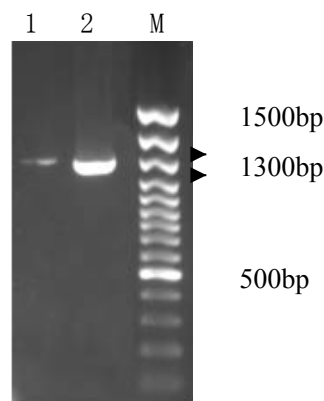


图1 *gdh* 基因 PCR 扩增

Fig 1 *gdh* gene PCR Amplification

1. 阳性对照, 2. 参考菌 98HAH33, M. 100bpmarker

**2.2 TA 克隆产物的鉴定** pMD19-T-*gdh* 重组质粒转化 JM109 感受态细胞, 经 X-gal、IPTG、Amp 筛选得到阳性重组菌, 提取重组质粒作为模板, 使用目的基因扩增引物确认载体中插入片段的大小。含有目的基因的重组质粒均扩增出 1 300bp 左右的目的条带, 不含目的基因的空质粒未能扩增出目的条带, 表明 *gdh* 基因片段已成功克隆, 结果见图 2。克隆产物测序后去掉两端的载体序列和部分引物序列得到 1347bp 的 *gdh* 序列, 证实克隆成功。

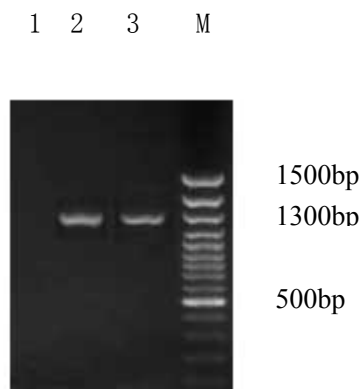


图2 克隆产物 pMD19-T-*gdh* PCR鉴定

Fig 2 Clone ProductspMD19-T-*gdh* PCR Amplification Identification

1. 空质粒 pMD19-T, 2. 阳性对照, 3. 参考菌 98HAH33, M. 100bp marker

**2.3 重组表达质粒pGEX4T-2-*gdh* 的鉴定** 从重组表达质粒转化平板上挑取单菌落, 少量培养后提取质粒, PCR扩增目的基因后进行DNA测序, 测序结果显示与目的基因序列完全一致, 说明重组表达质粒构建成功。

**2.4 GDH 的表达** 含重组表达质粒pGEX4T-2-*gdh* 的大肠埃希菌*E. coli*BL21 (DE3) 经IPTG诱导, SDS-PAGE 分析表明较未诱导菌有明显增加的蛋白条带, 分子量大小与预期一致, 得到*Mr* 为45 kDa 的GDH蛋白(图3)。

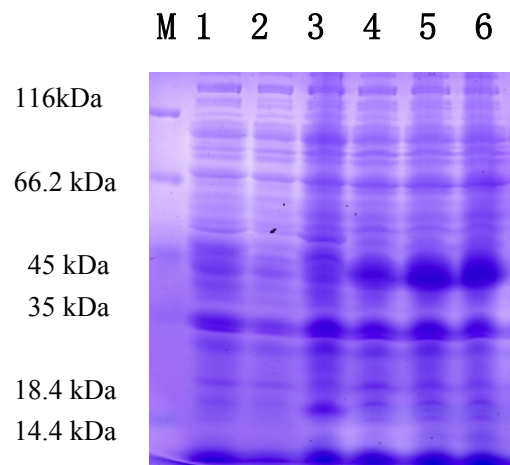


图3 GDH 在*E. coli*BL21 (DE3)中的表达

Fig 3 GDH expression in *E. coli*BL21 (DE3)

M. 蛋白marker, 1. 空质粒诱导0h, 2. 重组质粒诱导0h, 3. 空质粒诱导5h, 4. 重组质粒诱导2h, 5. 重组质粒诱导4h, 6. 重组质粒诱导6h

**2.5 胶体金样本检测** 胶体金免疫层析技术检测患者血清样本实验结果见图 4, 可以看出标本如果是阳性结果, 则试纸条上出现两条红色条带, 若标本是阴性结果, 则只在质控线出现单一红色条带。1 2 3 4 5 6

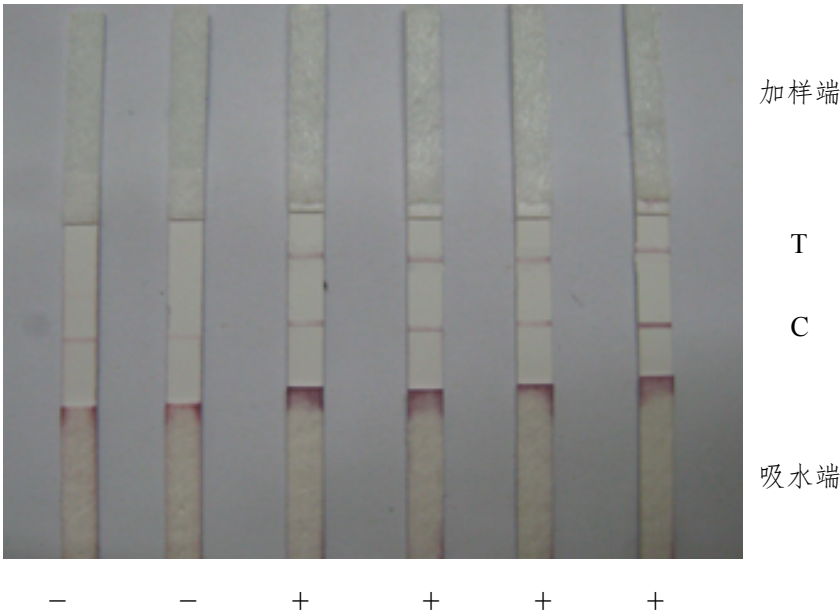


图 4 标本胶体金检测结果图

Fig 4 Colloidal Gold Diagnostic Assay for Specimens

T 检测线；C 质控线；+ 阳性；- 阴性

**2.6 特异性与敏感性** 用胶体金试纸条分别与100份正常人群血清（A）、80份呼吸道致病菌感染患者血清（B）、80份肠道致病菌感染患者血清(C)、60份非猪链球菌2型人兽共患病原菌感染患者血清(D)及50份猪链球菌2型感染患者血清(E)进行检测，结果表明试纸条只与猪链球菌2型感染患者血清产生阳性反应,其余均呈阴性反应，见表1。用胶体金试纸条检测猪链球菌2型感染患者10倍稀释血清,检测下限为 $10^{-5}$ ，见表2。用此法检测标本与ELISA检测相比较，结果基本一致，方法可靠实用，见表3。

表1 胶体金对不同血清检测结果

| 血清类型 | 检查数 | 检测结果 |     |
|------|-----|------|-----|
|      |     | 阳性   | 阴性  |
| A    | 100 | 0    | 100 |
| B    | 80  | 0    | 80  |
| C    | 80  | 0    | 80  |
| D    | 60  | 0    | 60  |
| E    | 50  | 50   | 0   |

表2 胶体金检测敏感性

| 标本                             | 1           | t2        | 3              | 4              | 5              | 6              | 7              |
|--------------------------------|-------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 猪链球菌 2 型<br>感染患者血清<br>(1: 400) | $10^0$<br>+ | $10^{-1}$ | $10^{-2}$<br>+ | $10^{-3}$<br>+ | $10^{-4}$<br>+ | $10^{-5}$<br>+ | $10^{-6}$<br>+ |
|                                |             |           |                |                |                |                | -              |

表3 胶体金法和ELISA法对猪链球菌感染血清检测结果比较

| 血清类型   | 胶体金法 |     |      | ELISA法 |     |     |
|--------|------|-----|------|--------|-----|-----|
|        | 检查数  | 阳性数 | 阳性率  | 检查数    | 阳性数 | 阳性率 |
| 阳性标本血清 | 50   | 50  | 100% | 50     | 49  | 98% |
| 阴性标本血清 | 100  | 0   | 0%   | 100    | 0   | 0%  |

### 3 讨论

猪链球菌2型感染是世界性公共卫生问题,我国是农业大国,集约化养猪业发达,对我国的危害日益加大。目前猪链球菌的检测在我国主要依靠病原菌的分离鉴定,国内也有PCR检测方面的报道,但是这些方法繁琐、费时,不利于开展现场检测,使用胶体金免疫层析技术恰好能有效解决这一问题。

1971年Faulk和Taylor将胶体金引入免疫化学,此后胶体金免疫技术作为一种新的免疫学方法,其技术不断完善和发展,在生物医学各领域得到了日益广泛的应用【10-11】。由于其具有快速、敏感和简便的特点,常广泛应用于对一些疾病的筛查及床边检验。本研究针对保守性诊断性抗原GDH建立的猪链球菌2型感染胶体金免疫层析检测法,用胶体金代替酶标记SPA,样品血清中抗体与金标结合物结合后沿硝酸纤维素膜泳动,在包被有抗原处形成“抗猪链球菌2型抗体-猪链球菌2型抗原-金标SPA”,使待测样品抗体与络合板的金标SPA不断结合,形成复合物,再由层析作用持续通过硝酸纤维素膜,与膜上固相包被抗原结合。由于是所有样品均经过较窄的纤维素膜的持续性反应,实际上对被测的物质起到了浓缩作用,从而使免疫层析法比免疫渗滤法更为敏感。我们用此法对370份标本进行检测,阳性样品全部检出,阴性样本未检出,特异性和敏感性都很好。同时,此方法试剂和样本用量极小,无需洗涤,大大减少了污染机会,无需特殊仪器设备,易于操作,整个检测过程15 min内即可完成,结果判读容易,操作人员无需进行特殊技术培训,适宜于基层和现场应用。此外,其检测的灵敏度与酶联免疫吸附试验等基本一致并且交叉反应率低,因而本方法具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] Marie CJ, Julie B, Sylvain Q, et al. Acquisition of Host Plasmin Activity by the Swine Pathogen *Streptococcus suis* Serotype 2[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 606-610.
- [2] Anusak K, Surang D, Parichart P, et al. Genotypic Profile of *Streptococcus Suis* Serotype 2 and Clinical Features of Infection in Humans, Thailand[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(5): 835-842.
- [3] 胡晓抒, 朱凤才, 汪华等. 人猪链球菌感染性综合征研究[J]. *中华预防医学志*, 2000, 34(3): 1520 - 1521.
- [4] 胡玉山, 刘俊华, 庞杏林, 等. 猪链球菌2型gdh基因的克隆与表达[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(11): 1285-1287.
- [5] Lun S, Perez C J, Connor W, et al. Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2[J]. *Microb Pathog*, 2003, 34(1): 27 - 37.
- [6] Duyeol K, Kiwon H, Yeonsu Oh, et al. Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea [J]. *Can J Vet Res*, 2010, 74(4): 314-316.
- [7] Berthelot H F, Morvan H, Keribin AM, et al. Production of muraminidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France[J]. *Vet Res*, 2000, 31(5): 473 - 479.
- [8] Nahuel Fi, Xu JG, Sonia L, et al. Lineage and Virulence of *Streptococcus Suis* Serotype 2 Isolates from North America[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12): 2239-2244.
- [9] Gottschalk M, Lacouture S and Odierno L. Immunomagnetic isolation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 from swine tonsils[J]. *J Clin Microbial*, 1999, 37(24): 2877 - 2881.
- [10] 饶贤才, 俞树荣, 李芹阶等. 免疫金法检测贝氏柯克斯体[J]. *中华检验医学杂志*,

2000, 23(1):471-473.

[11]郑葵阳, 杜文平, 刘宜升等. 快速斑点免疫金染色法检测抗囊尾蚴抗体的初步应用[J]. 地方病通报, 2002, 17(2):14 - 17.