

猪血清中抗猪丹毒丝菌特异性 IgG 的纯化

胡云霏, 钱幸, 王淑琴, 余兴龙*, 刘晓波, 罗璋

(湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:为了获得纯度高、特异性好的抗猪丹毒丝菌特异性 IgG, 采用抗原反向吸附结合重组葡萄球菌蛋白 A(SPA)亲和层析法对猪丹毒丝菌阳性血清进行纯化。结果表明, 血清用量对 IgG 的纯化结果影响不大, 而细菌的用量则与 IgG 的获得量成正比; 用猪丹毒丝菌与阳性血清吸附, 初步纯化出的猪丹毒丝菌特异性 IgG, 再用 SPA 亲和层析法特异性的浓缩和纯化 IgG, 获得的抗体含量为 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 即从 8 mL 阳性血清中获得 360 μg 猪丹毒丝菌特异性 IgG, 其纯度接近 100%, 可用于噬菌体展示的靶分子。

关键词:猪丹毒丝菌; 特异性免疫球蛋白 G(IgG); 猪血清; IgG 纯化; 纯度; 重组葡萄球菌蛋白 A 凝胶(SPA); SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDSPAGE)

中图分类号: S855

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)02-0183-05

Purification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* specific IgG from swine serum

HU Yun-fei, QIAN Xing, WANG Shu-qin, YU Xing-long*, LIU Xiao-bo, LUO Zhang

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: To obtain *Erysipelothrix rhusiopathiae*(*E. rhusiopathiae*) special IgG with high specificity and purity, we use the antigen reverse adsorption combined with recombination protein A (SPA) of staphylococcus affinity chromatography to purify the specific IgG from swine serum. The result showed that the volume of serum showed little influence on the amount of IgG obtained, while the amount of bacteria was positively related to the yield of IgG. *Erysipelothrix rhusiopathiae* specific IgG was first purified from swine serum, and then subjected to SPA affinity chromatography, the final concentration of the IgG obtained is 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$, thus, we get 360 μg antibody from the 8 mL swine serums, the purity of which is about 100% which can be applied in phage display.

Key words: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; specific immunoglobulin G(IgG); swine serum; IgG purification; purity; staphylococcal protein A(SPA); sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

猪丹毒丝菌广泛存在于自然环境中, 主要感染猪, 所引起的疾病(猪丹毒)^[1-2]流行范围广, 易给养猪业造成巨大的经济损失^[3]。目前, 对于该病的致病机理还不是很清楚, 也没有发现与该病原体相关的毒素。噬菌体展示技术可以用于猪丹毒丝菌抗原表位的筛选, 进而分析猪丹毒丝菌的致病机理, 而要筛选这些抗原表位, 首先需要获得猪丹毒丝菌特异性IgG。

常用的IgG纯化方法有盐析(如硫酸铵沉淀、辛

酸沉淀), 离子交换(如DEAE层析柱、羟磷灰石), 凝胶过滤, 亲和层析(SPA、抗原吸附、抗免疫球蛋白亲和层析^[4])等。不同的方法纯化的IgG, 其纯度、浓度和特异性都有较大差异。由于亲和层析法提取的IgG纯度和稳定性都很高, 因而应用比较广泛^[5]。

多种纯化方法结合, 如硫酸铵沉淀结合DEAE层析^[6]、辛酸-硫酸铵沉淀^[7-8]、饱和硫酸铵沉淀结合离子交换层析^[9]、硫酸铵沉淀结合分子筛层析^[10]、辛酸-硫酸铵沉淀结合DEAE离子交换层析^[11]等都

收稿日期: 2012-10-26

基金项目: 湖南省科学技术厅重点项目(2011FJ2017)

作者简介: 胡云霏(1988—), 男, 湖南浏阳人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究, huyunfei415@163.com; *通信作者, xlyu999@126.com

可以得到纯度高、特异性强的IgG。这些组合方法纯化的IgG,除了含有特异性的IgG,还含非特异性的IgG。要获得纯度高的特异性IgG,可用目标抗原吸附^[12-13]。

葡萄球菌蛋白A(SPA)对多种哺乳动物的IgG有很高的亲和性,能在几秒钟内结合IgG,且不会破坏其结构和功能^[14]。笔者采用抗原反向吸附法,用猪丹毒丝菌吸附猪丹毒阳性猪血清中的特异性IgG,再用SPA亲和层析纯化IgG分子,以期获得特异性好,纯度高的猪丹毒丝菌特异性IgG,用于下一步噬菌体展示。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细菌、供试血清

猪丹毒丝菌(2010年分离自某猪场);猪丹毒丝菌主要保护性抗原Spa蛋白(湖南农业大学分子与免疫实验室保存);10份待检血清样品(编号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10),采集自猪丹毒感染猪场的母猪;参考阳性血清,采自免疫了猪丹毒疫苗的母猪;参考阴性血清,采集自未感染猪丹毒的母猪。

1.1.2 主要试剂

TSB培养基购自Sigma;兔血清购自益康生物公司;牛血清白蛋白购自上海生工生物科技有限公司;二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗猪IgG多克隆抗体)购自KPL;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自Thermo;重组葡萄球菌蛋白A(SPA)凝胶购自Pierce;其他常用试剂均为国产,分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 阳性血清的鉴定

用TSB培养基(10%兔血清)培养猪丹毒丝菌^[15],将10 mL细菌(约 10^8 cfu/mL)用PBS(pH 7.2)洗涤2次,并用PBS悬浮到原体积,再加入等量包被液(NaHCO_3 , pH 9.0),以每孔100 μL 包被ELISA酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置24 h,之后加入封闭液(5%脱脂奶粉),于37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,用PBST(Tween 0.05%)洗涤2次后,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。取Spa蛋白液,将浓度调整到300 ng/mL,以同样的方式包被ELISA酶标板。

将10份待检血清稀释100倍,用猪丹毒丝菌包被的和Spa包被的ELISA酶标板,分别进行ELISA检测(均以只封闭孔和未包被孔作对照),具体操作为:在酶标板中加入稀释好的猪血清,于37 $^{\circ}\text{C}$ 作用0.5 h, PBST洗涤4次后,每孔加入100 μL 二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用0.5 h,用PBST洗涤4次,加入底物,于37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色10 min后,用硫酸终止反应,测 $OD_{450\text{nm}}$ 吸光值,以 $P/N > 2.1$ 为阳性效价值判定标准^[16]。

1.2.2 抗原反向吸附法纯化特异性 IgG

培养猪丹毒丝菌,离心浓缩细菌(分 2×10^{15} 、 5×10^{15} 、 1×10^{16} cfu的细菌组),加入阳性血清(分100、200、300 μL 血清组)悬浮、混匀,室温静置吸附(分5、10、15、20、25 min吸附组),用PBST(Tween, 0.5%)洗涤3次,用100 μL 洗脱液(0.2 mol/L Gly-HCl, pH 2.2)悬浮^[17-18],室温静置(分4、6、8、10、12、14、16 min组),得到的洗脱液用15 μL 中和液(1 mol/L Tris-HCl, pH 9.1)中和,用ELISA(包被猪丹毒丝菌)和SDS-PAGE检测洗脱液中特异性IgG。

1.2.3 洗脱效果验证

将最佳洗脱组的猪丹毒丝菌包被于酶标板上,同时包被未经纯化的猪丹毒丝菌,分2组进行ELISA检测:一组直接加二抗;另一组加阳性血清作用后再加二抗,验证洗脱效果。

1.2.4 血清的再次吸附

用ELISA检测纯化一次后的血清,再将其与新的猪丹毒丝菌吸附,作第二次特异性IgG纯化,用ELISA(包被猪丹毒丝菌)检测。

1.2.5 血清稀释对反向吸附纯化效果的影响

经以上方法,能纯化出特异性IgG的阳性血清,用其他纯化不出特异性IgG的阳性血清、参考阴性血清及PBS分别作1、2、3、4倍稀释,各2个重复,进行纯化,得到的IgG稀释10倍后用ELISA(包被猪丹毒丝菌)检测。

1.2.6 SPA亲和层析

将吸附纯化的猪丹毒特异性IgG用SPA亲和层析纯化,具体操作见说明书,共收集3管洗脱液,

每管1 mL。

1.2.7 纯化IgG的纯度、效价和浓度的检测

经SPA亲和层析获得的3管洗脱样品,分别作还原型和非还原型SDS-PAGE检测,检测样品用量为15 μL;将纯化后的抗体及原血清分别以1 100、1 200、1 400、1 800、1 1600、1 3200、1 6400、1 12800作系列稀释,用ELISA(包被猪丹毒丝菌)方法测定抗体效价,以P/N > 2.1为阳性效价值判定标准^[16];用BCA蛋白浓度测定法测定抗体的浓度。

2 结果与分析

2.1 血清的检测结果

10份待检血清,分别用猪丹毒丝菌包被和Spa蛋白包被的ELISA板做检测,以P/N > 2.1为阳性判断标准,前者OD_{450 nm}检测值大于0.823的为阳性、后者OD_{450 nm}检测值大于0.815的为阳性(表1)。根据检测结果,10份血清全为猪丹毒丝菌的阳性血清,且其中7份血清(2、4、5、6、8、9、10)为Spa蛋白抗体阳性,参考阳性血清的检测值均低于这7份血清(表1)。

表1 血清的ELISA检测

血清(编号)	OD _{450nm}	
	猪丹毒丝菌包被	Spa蛋白包被
参考阳性	1.669	1.441
参考阴性	0.395	0.388
1	1.984	0.712
2	2.680	2.610
3	1.923	0.615
4	2.682	2.540
5	2.089	1.998
6	2.434	2.320
7	1.802	0.765
8	2.375	2.231
9	2.468	2.298
10	2.443	2.378

2.2 猪丹毒丝菌特异性IgG的抗原反向吸附纯化

用抗原猪丹毒丝菌反向吸附7份阳性血清,并设不同的吸附时间组和洗脱时间组,结果只有2号阳性血清与参考阳性血清能纯化出特异性IgG。用不同数量(2×10¹⁵、5×10¹⁵、1×10¹⁶cfu)的细菌吸附相同体积的血清,得到的特异性IgG的OD_{450 nm}分别

为1.406、1.856和2.097,说明特异性IgG的量随细菌的增加而增加;用相同量的细菌吸附不同体积(100、200、300 μL)的血清,得到的特异性IgG的OD_{450 nm}分别为2.012、2.005和2.033,说明猪丹毒丝菌对特异性IgG的吸附量与血清的体积关系不大;猪丹毒丝菌与血清吸附5,10,15,20,25 min后,纯化所得的抗体的OD_{450 nm}分别为1.801、2.088、2.061、2.054、2.068,说明吸附10 min抗体的OD_{450 nm}达到最高,以后趋向平稳,即吸附10 min最为合适。猪丹毒丝菌与血清作用后,室温洗脱10 min,纯化得到的抗体的OD_{450 nm}最高,说明洗脱时间10 min最为合适(图1)。

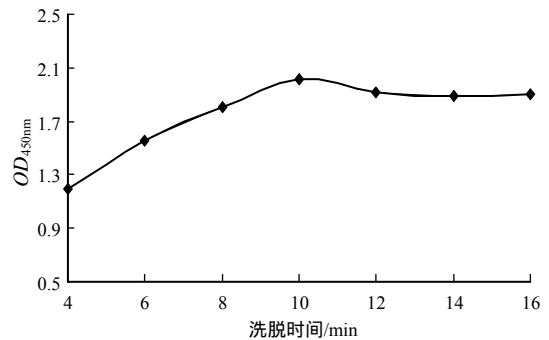


图1 不同洗脱时间的比较洗脱效果

Fig. 1 The effect of elution time on IgG purification

2.3 血清稀释后的吸附纯化效果

由图2可知,不作稀释的血清,纯化效果最好;血清用PBS稀释,随着稀释比例的加大,获得的IgG量也随之下降;将6份不能纯化出IgG的阳性血清混合,用此混合液及参考阴性血清分别稀释2号血清,随着稀释比例的增大,获得的IgG也随之下降,但下降的幅度相对PBS稀释的要小。

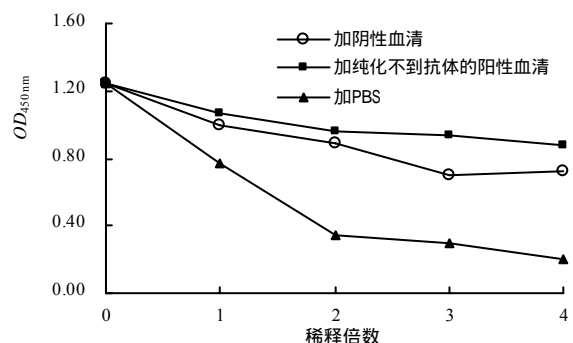


图2 血清稀释后的纯化效果

Fig. 2 The purification results using diluted serum

2.4 Gly-HCl 的洗脱效果

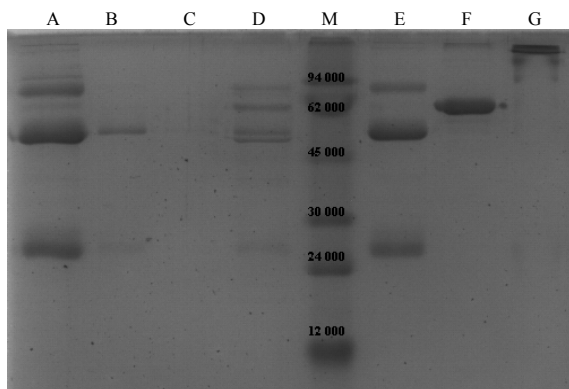
纯化后及未纯化的猪丹毒丝菌,包被ELISA酶标板后,先加阳性血清吸附,再加二抗进行IgG检测,纯化及未纯化的猪丹毒丝菌的检测 $OD_{450\text{ nm}}$ 分别为1.799、2.065,结果均为阳性,说明纯化后的细菌没有发生很大结构变化,而直接加二抗进行IgG检测,其检测 $OD_{450\text{ nm}}$ 分别为0.228、0.234,结果均为阴性,说明纯化后的细菌,已经没有特异性的IgG黏附,即猪丹毒丝菌吸附的血清中的IgG被完全洗脱下来,说明吸附纯化过程中用的洗脱液Gly-HCl的洗脱效果较好。

2.5 血清再次特异性纯化的结果

将纯化一次后的血清,用猪丹毒丝菌包被的ELISA作检测,检测 $OD_{450\text{ nm}}$ 为1.033,即含有猪丹毒丝菌特异性IgG。将其与新的猪丹毒丝菌吸附,纯化后,经ELISA检测,结果 $OD_{450\text{ nm}}$ 为0.212,即检测不到特异性的IgG,说明吸附纯化过一次的血清不宜再次用于IgG纯化。

2.6 SPA亲和层析后 IgG 的纯度、效价和浓度

SPA亲和层析纯化后的IgG,经SDS-PAGE检验,结果见图3,特异性纯化后的猪丹毒丝菌IgG浓度很低,并且还有一些杂带(可能是IgG之外的蛋白);SPA亲和层析纯化后,大部分纯化的IgG在第一管洗脱液中;第1管洗脱液的IgG在还原型SDS-PAGE中呈现3条带(IgG链断裂的结果),在



A SPA亲和层析第1管洗脱液;B SPA亲和层析第2管洗脱液;C SPA亲和层析第3管洗脱液;D 抗原反向吸附纯化的IgG;M marker;E SPA纯化IgG的还原型电泳;F BSA(0.25 mg/mL);G SPA纯化IgG的非还原型电泳。

图3 猪丹毒丝菌IgG纯化的SDS-PAGE结果

Fig.3 The results of SDS-PAGE for *E.rhusiopathiae* specific IgG

非还原型SDS-PAGE中呈现1条带,表明获得的IgG的纯度接近100%。经BCA法蛋白浓度测定,并与标准BSA比较得出,纯化后的IgG浓度为240 $\mu\text{g/mL}$,即从8 mL阳性血清中纯化到360 μg 猪丹毒丝菌特异性IgG。

由表2可知,未经纯化的血清,其猪丹毒特异性IgG的效价值为1 800,经猪丹毒丝菌吸附纯化结合SPA亲和层析纯化后,猪丹毒特异性IgG的效价值上升到1 3 200。

表2 IgG 效价

稀释比例	$OD_{450\text{ nm}}$	
	纯化前	纯化后
1 100	2.087	2.220
1 200	1.796	1.921
1 400	1.415	1.687
1 800	0.990	1.489
1 1 600	0.677	1.248
1 3 200	0.445	0.867
1 6 400	0.302	0.613
1 12 800	0.210	0.425

3 结论与讨论

笔者用抗原反向吸附和 SPA亲和层析组合方法纯化IgG,从8 mL阳性血清中纯化到360 μg 猪丹毒丝菌特异性IgG,得到的特异性IgG的浓度为240 $\mu\text{g/mL}$,与相关抗原吸附法纯化的IgG的结果相似^[12-13],但他们纯化的IgG都未检测纯度。本研究获得的IgG纯度接近100%,达到了用于噬菌体展示的要求。

抗原反向吸附是本研究组合方法的关键,其中血清的选择尤为重要。Spa蛋白为猪丹毒主要保护性抗原,常用来建立间接ELISA方法检测血清中的猪丹毒抗体^[19-20]。笔者选用猪丹毒丝菌全菌及Spa蛋白包被的ELISA共同筛选出的7份阳性血清中,只有1份血清(2号血清)用猪丹毒丝菌吸附到了抗体,说明还有其他因素影响猪丹毒丝菌对其特异性IgG的吸附。在实际工作中,要从血清中获得某种抗原的IgG,可以加大筛选血清的样本量。

用猪丹毒丝菌吸附未经稀释的血清,纯化的效果最好。将6份纯化不出IgG的血清样品混合,与

参考阴性血清一起分别作 2 号血清的稀释液, 纯化效果前者要好于后者, 说明这 6 份血清包含有抗猪丹毒丝菌的 IgG。此外, 用 2 种 ELISA 检测的待检血清的猪丹毒丝菌特异性抗体的阳性值都高于参考阳性血清, 说明 6 份纯化不出 IgG 的血清中并不是因为特异性 IgG 含量较少, 而参考阳性血清也能纯化出特异性 IgG, 进一步说明血清中有未知的因素影响了猪丹毒丝菌对其特异性 IgG 的吸附。用 PBS 作血清稀释液与阳性血清及参考阴性血清比较, 从 PBS 稀释的血清中纯化出的抗体的量明显小于用阳性血清与参考阴性血清稀释的血清, 可能是血清的环境最适合猪丹毒丝菌与其特异性 IgG 相互作用。用猪丹毒丝菌吸附过一次的能纯化出特异性 IgG 的阳性血清, 再进行吸附纯化, 得不到 IgG; 因此, 即使血清中有特异性 IgG, 经过吸附后也不适合用于抗体的纯化。

在猪丹毒丝菌与血清的吸附中, 血清的体积对细菌能吸附的 IgG 的量没有多大影响, 而细菌用量越多, 则吸附到的 IgG 就越多; 因此, 在抗原反向吸附中, 可以摸索抗原的最大用量。

猪丹毒丝菌吸附阳性血清, 获得的初步纯化的猪丹毒丝菌特异性 IgG, 其浓度较低, 并含除有特异性 IgG 之外的其他蛋白, 经 SPA 亲和层析后, 猪丹毒丝菌特异性 IgG 的纯度接近 100%, 说明 SPA 能特异性的吸附 IgG。综上所述, 用抗原反向吸附结合 SPA 亲和层析的纯化方法, 能获得纯度和浓度高的猪丹毒丝菌特异性 IgG, 并为猪丹毒丝菌以外的其他细菌的特异性 IgG 的纯化提供了一种思路。

参考文献:

- [1] Brooke C, Riley T. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen[J]. J Med Microbiol, 1999, 48: 789-799.
- [2] Wood R. Swine erysipelas—a review of prevalence and research[J]. Journal of the American Veterinary, 1984, 184(8): 944.
- [3] Leman A, Straw B, Mengeling W. Diseases of Swine[M]. Ames: Iowa State University, 1992: 475-486.
- [4] Harlow E, David L. Antibody: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988: 284-300.
- [5] 李慧, 吴恩应, 张彦鹏, 等. 人血清 IgG 分离纯化方法探讨[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2008, 33(1): 109-112.
- [6] 刘生杰, 余为一. 两步法提纯猪血清 IgG 得率分析[J]. 生物学杂志, 2007, 24(6): 64-66.
- [7] 张大川, 付云洁, 刘志国, 等. 不同纯化兔抗苏丹红 I IgG 方法的比较[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(2): 5-7.
- [8] 武薇, 韩克光. 两种方法纯化兔抗绵羊肺炎支原体 IgG 的比较[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(2): 31-32.
- [9] Wang Y, Zhang P Y, Liu S J, et al. Purification of IgG from sera of rabbit and guinea pig by flow-through mode ion-exchange chromatography using DEAE sepharose fast flow column[J]. Chromatographia, 2011, 74: 209-214.
- [10] 孙建宏, 曹殿军, 刘培欣, 等. 从血清中分离纯化鸡 IgG、IgM 的实用方法[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(5): 378-380.
- [11] 钱垂文, 王一飞, 陆家海, 等. 兔抗 SARS 冠状病毒 IgG 的纯化及鉴定[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2005, 26(4): 535-537.
- [12] 郎婧, 金敏, 王新为, 等. 大肠杆菌 O157:H7 多克隆 IgG 纯化[J]. 解放军预防兽医学杂志, 2008, 26(4): 238-241.
- [13] 牛瑞江, 赖卫华, 熊齐荣, 等. 鼠伤寒沙门氏菌特异性多克隆 IgG 的纯化方法[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 151-155.
- [14] Forsgren A, Sjoquist J. Protein A from *S. Aureus*. pseudo-immune reaction with human globulin[J]. The Journal of Immunology, 1966, 97(6): 822-827.
- [15] Wood R. A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosus*[J]. J Vet Res, 1965, 26: 1303-1308.
- [16] Scott M A, David J M, Schwartz K A. Staphylococcal protein A binding to canine IgG and IgM[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1997, 59: 205-212.
- [17] Harlow E, David L. Antibody: A Laboratory Manual[M]. Ames: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988: 549-552.
- [18] 于世林. 亲和色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 41-44.
- [19] Imada Y, Mori Y, Daizoh M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay employing a recombinant antigen for detection of protective antibody against swine erysipelas[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(11): 5015-5021.
- [20] Sato H, Yamazaki Y, Tsuchiya K, et al. Use of the protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in the enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination[J]. J Vet Med, 1998, 45: 407-420.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维