

技术与方法

肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白 ELISA 检测方法的研究

李轻舟* 张燕 戚薇 杜连祥

(天津科技大学食品与生物工程学院, 天津 300222)

摘要 以肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白为免疫原, 获得了抗肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白抗血清, 通过硫酸铵分级沉淀与吸附法相结合的方法对抗血清进行纯化, 并在此基础上建立了肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白间接 ELISA 检测方法。该检测方法的检测灵敏度为 0.031 mg/L, 线性检测范围为 2.5 ~ 30.0 mg/L, 批内误差为 1.04% ~ 3.22%, 批间误差为 2.61% ~ 8.35%。

关键词 肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白, 间接 ELISA, 检测方法

学科分类号 Q946.819

免疫调节剂可以增强非特异免疫功能, 改善机体的免疫状态, 进而增强特异性免疫功能, 目前是感染性疾病防治的研究热点。肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Kp*) 的荚膜糖蛋白是一种理想的免疫调节剂, 实验证明, *Kp* 荚膜糖蛋白对 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞有多种功能, 能增强机体体液和细胞免疫, 对多种细菌、真菌和病毒感染具有明显的保护作用^[1]。

糖蛋白的定量检测常用毛细管电泳或 HPLC 等方法, 不仅需要昂贵的仪器, 而且提取纯化程序冗长, 其应用受到很大影响。而 ELISA 法具有取样量少、精确度高、提取纯化步骤少、容易操作等优点, 可以进行微量、大批样品的测定。而迄今还没有见到有关建立 *Kp* 荚膜糖蛋白间接 ELISA 检测方法的报道。

实验制备并纯化了肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白的多克隆抗体, 建立了 *Kp* 荚膜糖蛋白的酶联免疫检测方法, 为 *Kp* 荚膜糖蛋白免疫调节剂的制备和监测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物: 雄性大耳白兔由天津医科大学公共卫生学院提供。

1.1.2 免疫原: 法国罗素公司生产的 *Kp* 荚膜糖蛋白药物必思添。

1.1.3 试剂: 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂 (Sigma 公司), 溶菌酶 (Sigma 公司), Goat anti Rabbit IgG-HRP (华美生物工程公司), 96 孔酶标

板 (Nunc 公司)。

1.1.4 实验仪器: EL_x-800 酶标测定仪 (Bio-Tek 公司), Beckman Coulter Avanti-J25 高速冷冻离心机等。

1.2 方法

1.2.1 免疫血清的制备: 以肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白为抗原, 采用皮内多点注射结合腹腔注射的方法, 免疫无基础交叉抗体的雄性大耳白兔, 获得免疫血清, 加入 0.02% 叠氮钠分装, -70℃ 保存待用。

1.2.2 硫酸铵分级沉淀纯化 IgG^[2]。

1.2.3 吸附法纯化特异性抗体^[3]。

1.2.4 ELISA 操作程序^[4]: 荚膜糖蛋白包被缓冲液为 pH 9.6, 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液; 稀释缓冲液为 pH 7.4, 20 mol/L PBS; 洗涤缓冲液为含 0.05% Tween20 的稀释缓冲液; 封闭缓冲液为含 5% 小牛血清的稀释缓冲液; 酶反应基质液为含 0.4% 邻苯二胺、0.5% H₂O₂ 的 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2mol/L Na₂HPO₄ 缓冲液 (临用前配制)。

1.2.5 抗荚膜糖蛋白抗体工作浓度及酶联抗体稀释度的确定: 选择连续稀释的抗荚膜糖蛋白抗体 (1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000 稀释度) 及 HRP-酶联抗体 (1:500, 1:1 000, 1:1 500, 1:2 000, 1:3 000 稀释度) 进行棋盘滴定, 确定抗 *Kp* 荚膜糖蛋白抗体及 HRP-酶联抗体的工作浓度。

1.2.6 *Kp* 荚膜糖蛋白包被浓度的确定: 选择不同浓度的荚膜糖蛋白 (80, 60, 40, 30, 20,

* 通讯联系人。

Tel: 022-81914849, E-mail: sina_lily@eyou.com

收稿日期: 2003-11-24, 接受日期: 2004-02-28

10 mg/L) 包被酶标板, 每孔 100 μ l, 在上述棋盘滴定法确定的工作浓度下确定荚膜糖蛋白的饱和包被浓度。

1.2.7 K_p 荚膜糖蛋白含量标准曲线的绘制: 采用间接 ELISA 法, 以上述棋盘滴定法确定的 K_p 荚膜糖蛋白饱和包被浓度为基础, 将 K_p 荚膜糖蛋白用包被剂稀释成不同浓度包板, 每孔 100 μ l, 以上述棋盘滴定法确定的抗荚膜糖蛋白抗体工作浓度和酶联抗体稀释度绘制 K_p 荚膜糖蛋白标准曲线。

1.2.8 样品稀释曲线的绘制: 肺炎克雷伯菌发酵液经裂解、沉淀、水溶等处理, 得到荚膜糖蛋白粗提液, 经包被剂稀释至不同稀释度, 用间接 ELISA 法检测并绘制样品稀释曲线。

2 结果与讨论

2.1 间接 ELISA 检测方法的建立

2.1.1 免疫血清的制备及纯化: 实验选择无基础交叉抗体的雄性大耳白兔 3 只, 通过皮内注射免疫和腹腔注射免疫, 2 只获得免疫血清, 初始抗血清效价为 1:64 000, 对肺炎克雷伯氏菌荚膜糖蛋白有很高的免疫特异性, 但对其他一些蛋白质和微生物也有交叉反应, 将会影响 ELISA 检测的特异性, 因此需要对其进行纯化。实验采用硫酸铵分级沉淀结合吸附法纯化特异性抗体。

肺炎克雷伯氏菌 (K_p) 属肠杆菌科, 为肠道菌群的一种, 其 K 抗原 (荚膜抗原) 和大肠杆菌的 K 抗原之间存在许多相似性, 其 O 抗原 (菌体抗原) 又与大肠杆菌类群的抗血清有很大程度的交叉反应^[5]。实验显示, 由肺炎克雷伯氏菌荚膜

糖蛋白免疫获得的抗血清对大肠杆菌的非特异性吸附较为显著, 因此实验选用不表达真正靶抗原而又具有明显交叉反应的大肠杆菌吸附交叉反应抗体, 以提高多克隆抗体的特异性。经纯化后血清效价为 1:16 000, 效价高、特异性较好, 对未纯化的免疫血清有明显吸附作用的非特异性抗原, 对纯化抗体的吸附降为阴性 (图 1, $P/N < 2.1$)。

2.1.2 试剂工作浓度的确定: 棋盘滴定选择光吸收值在 1 左右的抗体稀释度作为 K_p 荚膜糖蛋白抗体及酶联抗体的工作浓度^[6], 确定抗 K_p 荚膜糖蛋白抗体稀释度为 1:1 000, 酶联抗体稀释度为 1:1 500。

K_p 荚膜糖蛋白包被浓度确定实验中, 发现酶显色的光吸收值随包被荚膜糖蛋白量增加呈可饱和的趋势, 当荚膜糖蛋白浓度达到 30 mg/L 后, 光吸收值基本不再变化, 选择此浓度为 K_p 荚膜糖蛋白最高包被浓度。

2.1.3 ELISA 检测方法的步骤: 样品用包被剂配制并稀释至 0~30 mg/L 之间的浓度, 取 100 μ l 包被酶标板 (若干平行), 先 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h, 再于 4 $^{\circ}$ C 放置 12 h。倾去包被液, 洗板 (PBST 洗三次, 每次 3 min), 每孔加满 5% 小牛血清 (PBS 稀释) 封闭, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h。倾去封闭液, 洗板, 每孔加入 100 μ l 1:1 000 的纯化抗荚膜糖蛋白抗体, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h。倾去一抗, 洗板, 每孔加入 100 μ l 1:1 500 的 HRP-酶联抗体, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。倾去二抗, 每孔加入 100 μ l 邻苯二胺底物系统, 蔽光放置 20 min, 然后加入 50 μ l 2 mol/L 硫酸终止反应, 在 490 nm 进行检测。

2.2 方法学参数

2.2.1 K_p 荚膜糖蛋白含量的标准曲线及检测灵敏度: K_p 荚膜糖蛋白用包被剂稀释至不同浓度包板, 每个浓度 6 个平行, 一抗工作浓度 1:1 000、酶联抗体工作浓度 1:1 500, 结果获得荚膜糖蛋白标准曲线 (图 2, 其中 A 值为实际测量值减去零标准管平均值)。如对检测结果进行拟合, 可得 r^2 为 0.9745 的二次曲线, 方程为 $y = -0.0011x^2 + 0.0989x$, 以零标准管平均 $A_{490} \pm 2s$ 计算, K_p 荚膜糖蛋白的检测限约为 0.031 mg/L。取 0~2.5 mg/L 之间的实验点, 可得 $r^2 = 0.9927$ 的直线, 方程为 $y = 0.1771x$, 线性检测范围在 0.031~2.5 mg/L 之间 (图 3); 取 2.5~30.0 mg/L 之间的实验点, 可得 $r^2 = 0.994$ 的直线, 方程为 $y = 0.0581x + 0.2982$, 线性检测范围在 2.5~30.0 (图 4)。鉴于

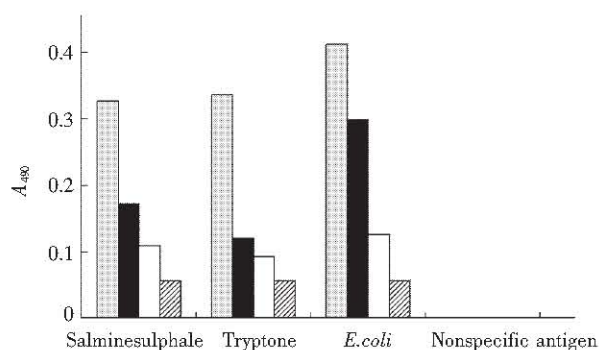


Fig. 1 The nonspecific adsorption of the purified antibody

▨: original antiserum; ■: antibody purified by ammonium sulfate fractionated; □: antibody purified by lysate-bacterium adsorption; ▤: blank.

实验实际情况, 对 2.5 ~ 30.0 mg/L 之间的实验点进行后续研究.

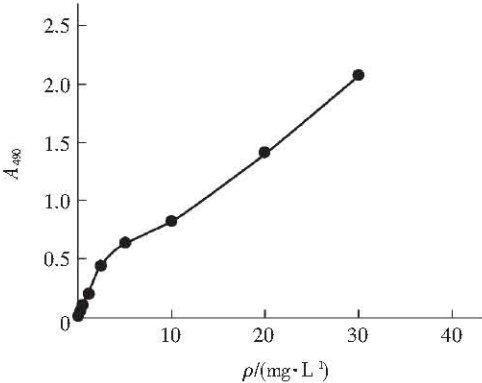


Fig. 2 Standard curve of glycoprotein

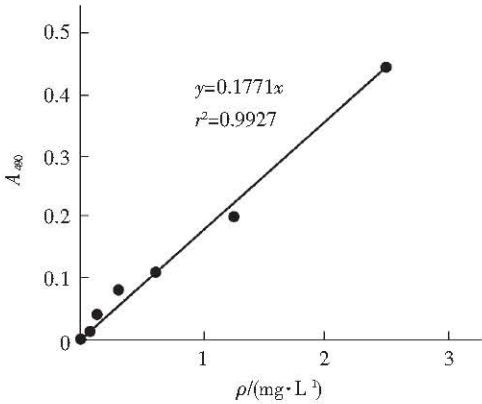


Fig. 3 Standard curve of glycoprotein from 0 to 2.5 mg/L

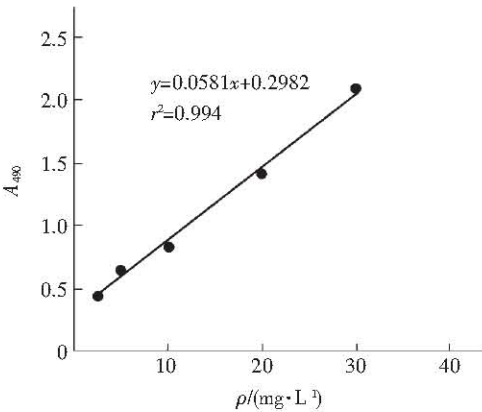


Fig. 4 Standard curve of glycoprotein from 2.5 to 30.0 mg/L

2.2.2 重复性实验: 一个月内在 2.5 ~ 30 mg/L 之间对标准曲线重复 4 次, 每次每标准点 6 个平行孔, 结果如下.

批内 CV 是 1.04% ~ 3.22%, 符合批内误差 <5% 的要求.

批间 CV 为 2.61% ~ 8.35%, 符合批间误差 <10% 的要求.

2.2.3 准确性实验: 包被剂中分别加入 Kp 荚膜糖蛋白, 使其浓度为 4.0 mg/L, 8.0 mg/L, 12.0 mg/L, 于同一酶标板上进行检测, 每个浓度 6 个平行, 结果显示 (表 1), 该法的误差和回收率均符合方法学要求.

Table 1 Veracity test

	Measured	CV/%	Recovery rate/%
4 mg/L	4.20	2.6	105.0
8 mg/L	7.85	1.9	98.1
12 mg/L	12.12	3.2	101.0

n = 6.

2.3 健全性实验

肺炎克雷伯菌发酵液经裂解、沉淀、水溶后, 稀释至适当倍数, 用间接 ELISA 法检测, 每个稀释倍数 6 个复孔, 绘制样品稀释曲线, 结果见图 5. 将不同稀释倍数的样品对应的 A 值代入 2.5 ~ 30.0 mg/L 标准曲线方程, 计算得样品中荚膜糖蛋白含量为 120.8 mg/L, 以稀释 10 倍样品计算, 则样品稀释曲线横坐标与实际荚膜糖蛋白含量间存在关系: 实际含量 = 坐标值 × 1.208, 代入样品稀释曲线方程, 则样品稀释曲线方程变为 $y = 0.0587 \times (1.208x) + 0.301$, 样品稀释曲线与标准曲线基本平行 (图 4 和图 5), 说明肺炎克雷伯菌裂解液可用该法准确测定.

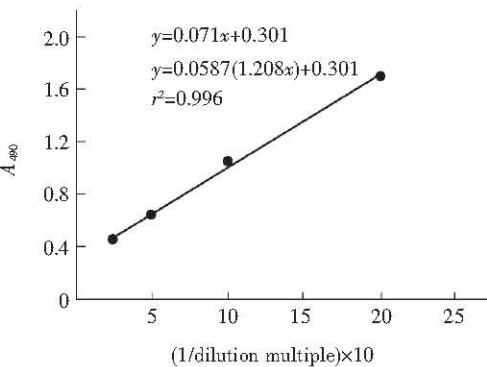


Fig. 5 Sample dilution curve

3 讨 论

Kp 荚膜糖蛋白作为一种非特异性免疫增强剂, 对 B 和 T 淋巴细胞有多种作用。它能加速 B 淋巴细胞增殖, 增强巨噬细胞的吞噬、消化、破坏抗原及其趋化作用, 并能促进巨噬细胞内白介素的产生, 从而使 T 淋巴细胞增殖, 对细菌(脓绿杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、伤寒杆菌等)、病毒(流感病毒、引起脑和心肌炎病变的病毒)和真菌(白色念珠菌)的感染均具有明显的保护作用, 在抗感染方面有良好的应用前景。

本文以 *Kp* 荚膜糖蛋白为抗原制备并纯化了兔源抗 *Kp* 荚膜糖蛋白抗体, 在此基础上建立了间接酶联免疫检测方法 ELISA 法。用 *Kp* 荚膜糖蛋白包板, 使其吸附在酶标板上, 然后使抗 *Kp* 荚膜糖蛋白抗体与吸附在酶标板上的 *Kp* 荚膜糖蛋白发生特异性吸附, 再与 HRP-羊抗兔 IgG 发生免疫学结合, 最后通过固相上的荚膜糖蛋白-抗 *Kp* 荚膜糖蛋白抗体——抗抗体酶复合物中酶催化的显色反应检测 *Kp* 荚膜糖蛋白含量。该方法灵敏度高, 稳定性好, 测量准确, 并且具有 ELISA 检测法微量、特异、高效、经济、方便和安全等特点, 可用于 *Kp* 荚膜糖蛋白大批量、快速检测。ELISA 法实验中, 间接 ELISA 测抗体较好, 夹心法测抗原较好, 实际应用时, 要检测的是未知的 *Kp* 荚膜糖蛋白, 所以如果有可能, 用夹心法测 *Kp* 荚膜糖蛋白, 在实际应用中要方便得多, 但鉴于实验时间及条件所限, 未能对夹心法深入研究, 研究有待深入。

实验发现, 检测系统的关键因素有: a. 包被条件, 由于荚膜糖蛋白含有大量糖基侧链, 影响它与酶标板的吸附效果, 因此必须严格控制包被时样液的 pH、包被时间和包被温度, 样液 pH 应在 9.6

左右, 如用包被缓冲液不能将样液 pH 调至 9.6, 则应先调节 pH 至 9.6 再加缓冲液稀释至适当浓度, 包被程序为 37℃ 包被 4 h, 然后 4℃ 包被过夜; b. 封闭剂的选择, 本实验对明胶、脱脂乳粉、BSA、小牛血清、胎牛血清的封闭作用进行比较, 结果表明小牛血清和胎牛血清封闭时对酶孔吸收值与空孔一致, 胎牛血清效果比小牛血清稍好, 而明胶、脱脂乳粉和 BSA 封闭本底较高, 同时酶联抗体稀释液也以小牛血清或胎牛血清配制效果最好, 但考虑到成本问题, 以选择小牛血清为宜; c. 各试剂工作浓度的确定, 通过棋盘滴定实验, 为检测系统确定了最佳的抗体、酶联抗体工作浓度, 进而确定荚膜糖蛋白饱和包被浓度, 在此基础上绘制的标准曲线, 检测范围宽, 准确性和精确度都较好。

参 考 文 献

- 1 Hirsch J, Buret J P. Glycoproteins extract from microorganisms. United States Patent, 3855197. 1974-12-17
- 2 F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 2001. 436
- 3 Ausubel F, Brent R, Kingston R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology. Beijing: Science Press, 2001. 436
- 4 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999. 590
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd. Beijing: Science Press, 1999. 590
- 6 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000. 352 ~ 356
- ZHU L P, CHEN X Q. Common Experiment Technique of Immunology. Beijing: People Surgeon Press, 2000. 352 ~ 356
- 8 R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984. 449
- Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th. Beijing: Science Press, 1984. 449
- 6 沈关心, 周儒麟. 现代免疫学实验技术. 第二版. 湖北: 湖北科学技术出版社, 2002. 158
- SHEN G X, ZHOU R L. Modern Immunology Experiment Technique. Hubei: Hubei Science and Technology Press, 2002. 158

The Enzyme-linked Immunosorbent Assay of *Klebsiella pneumoniae* Capsule Glycoprotein

LI Qing-Zhou*, ZHANG Yan, QI Wei, DU Lian-Xiang

(Food and Biotechnology Engineering Department, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect and quantitate the *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) capsule glycoprotein. The rabbit antiserum of *Klebsiella pneumoniae* capsule glycoprotein was prepared successfully by using a purified *Kp* capsule glycoprotein as antigen and the antibody was

purified with ammonium sulfate fractionation and adsorption. The sensitivity of the assay is 0.031 mg/L. The standard curve is linear from 2.5 mg/L to 30 mg/L. The error of inter-plate is from 1.04% to 3.22%, and the error of intra-plate is from 2.61% to 8.35%.

Key words *Klebsiella pneumoniae* capsule glycoprotein, indirect enzyme-linked immunosorbent assay, mensuration

* Corresponding author. Tel: 86-22-81914849, E-mail: sina_lily@eyou.com

Received: November 24, 2003 Accepted: February 28, 2004

科学出版社最新图书推介

《疫苗学》

主编: 张延龄 张 晖

2004 ISBN 7-03-011586-4/ Q. 1280

16开, 纸面精装, 1500页 定价: 198.00元

国内第一本全面系统地介绍疫苗学及相关知识的专著, 全书分理论管理篇、技术篇和各论三部分, 共六十四章。理论管理篇主要介绍了疫苗的基本概念、发展简史、疫苗研制、开发与生产应用等基本知识。技术篇全面系统地介绍了疫苗研制、开发和生产所涉及的各种实验技术、方法和操作过程。各论篇就各种类型疫苗的基本概念、病原学与流行病学原理、病原致病机制以及疫苗的免疫机制与临床应用等内容进行了详细地介绍。

《肿瘤遗传学》

吴 旻

ISBN 7-03-011581-3/ Q. 1279

16开, 定价: 138.00元

国内首部大型肿瘤遗传学专著, 院士牵头, 编著者多为这一研究领域的资深或活跃在研究一线的中青年专家。第一篇为肿瘤遗传学基础; 第二篇为肿瘤遗传学各论; 第三篇为肿瘤预防、早期诊断和治疗的遗传学对策; 第四篇为研究技术。

《基因免疫的原理与方法》

主编: 姜勋平

ISBN 7-03-012588-6/ Q. 1351

16开, 定价: 38.00元

系统介绍基因免疫的基本原理、研究方法和应用现状, 有基因疫苗工作原理、基因疫苗抗原基因的筛选与克隆、基因疫苗的构建、基因疫苗制备、基因疫苗免疫方法等内容, 反映了当前国际上基因免疫研究的前沿进展和我国学者的研究成就。

《蛋白质化学与蛋白质组学》

夏其昌 曾 嵘 等

ISBN 7-03-012401-4/ Q. 1331

定价: 75.00

系统论述了蛋白质化学基础理论和实验技巧, 也反映了蛋白质组学研究的最新成果。在蛋白质组学领域介绍了基本概念、样品制备、双向凝胶电泳的图像分析和定量分析、质谱等常规方法, 并介绍了国际上最新的多维技术在研究中的应用; 同时充分体现了生物信息学在蛋白质组研究中的重要性。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街16号科学出版社 科学分社, 联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目, 010-64012501