

樊琛,纪秋峰,王会,等. 间接 ELISA 在 Iss 蛋白检测中的优化改进[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):150-152.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.042

# 间接 ELISA 在 Iss 蛋白检测中的优化改进

樊琛,纪秋峰,王会,曾庆华,郑焕芹

(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

**摘要:**为改善间接 ELISA 在 Iss 蛋白检测中的应用,将重组菌经 IPTG 诱导、分离,获得 Iss 融合蛋白。免疫雏鸡获得抗血清进行间接 ELISA 检测。采用甲醇处理、紫外线照射、调节反应物浓度、干燥等方法调节间接 ELISA 反应条件。结果表明,在封闭之前,先将包被板紫外线照射 24 h,包被液包被蛋白或细菌 37 ℃ 2 h 后 4 ℃ 过夜,56 ℃ 干燥 12 h,可改善间接 ELISA 检测结果。

**关键词:**Iss 蛋白;抗血清;ELISA 检测;大肠杆菌;优化条件

**中图分类号:**TS207 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)14-0150-02

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)通常被称为大肠杆菌,属于肠道杆菌中的一种,当饲养环境差、通风不好、营养缺乏或应激等情况出现时会诱发畜禽大肠杆菌病,为人兽共患且危害食品安全<sup>[1]</sup>。Iss 蛋白为大肠杆菌毒力岛的 iss 基因(increased serum survival gene)所编码的外膜蛋白,可增强大肠杆菌在血清中的存活能力,是大肠杆菌的重要毒力因子之一<sup>[2]</sup>。通过间接酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,简称 ELISA)检测细菌表面 Iss 蛋白的表达水平可能反映细菌对血清补体的抗性强弱。ELISA 通过检测抗原、抗体及半抗原,在实际应用中可用作疾病临床诊断与监察、食品中有害成分残留的测定等,具有广阔的发展前景<sup>[3-4]</sup>。但是 ELISA 的影响因素较多,须进行检测条件的摸索、优化。为改善间接 ELISA 在大肠杆菌 Iss 蛋白检测中的应用,将重组菌经过异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside,简称 IPTG)诱导、分离,获得 Iss 融合蛋白;免疫雏鸡获得抗血清进行间接 ELISA 检测;采用甲醇处理、紫外线照射、调节反应物浓度、干燥等方法,进行 ELISA 的条件优化,为食品中大肠杆菌 Iss 蛋白的检测提供试验依据。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 O2 为 Iss+致病性大肠杆菌,由东北农业大学动物医学院赠送,聊城大学食品安全教研室保存;pGEX-6p-1-iss/BL21(DE<sub>3</sub>)PlysS 为重组菌,由东北农业大学动物医学院赠送,聊城大学食品安全教研室保存;BL21 为感受态细菌,购自济南科赛特科技有限公司。

1.1.2 雏鸡 1 日龄无特定病原体(specific pathogen free,简称 SPF)雏鸡购于山东省聊城市阳谷县养鸡场。

1.1.3 主要试剂 LB 液体培养基、IPTG、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基,均购自青岛海博生物技术有限公司;兔抗鸡 IgY++(IgG)(H+L)、四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine,简称 TMB)染色液,均购自 Beyotime Biotechnology 公司;脱脂奶粉,购自伊利乳业有限责任公司;其他试剂为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 Iss 融合蛋白诱导表达与检测 挑取活化的重组菌落接于含氨苄青霉素(ampicillin,简称 Amp)50 μg/mL 的 LB 液体培养基,37 ℃ 摇床培养 6 h。各取 0.2 mL 菌液接于 20 mL LB 液体培养基(体积比 1:100),37 ℃ 摇床培养 3 h,测 D<sub>600 nm</sub> 值。各取 2 mL 菌液作诱导前对照,其他培养物加 IPTG(终浓度分别为 0.1、0.2、0.5 mmol/L),37 ℃ 摇床培养 3 h,测 D<sub>600 nm</sub> 值<sup>[5]</sup>。各取 2 mL 菌液为诱导后样品,与诱导前样品均于 12 000 r/min 离心 2~5 min,弃上清,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,简称 PBS)洗涤 2 次,加入 6×十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)上样缓冲液,混匀,100 ℃ 煮沸 5~10 min,-20 ℃ 保存,用于点样。将诱导后的样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,简称 SDS-PAGE),电泳结束后卸下胶板,切去溴酚蓝条带,将胶放于考马斯亮蓝染色液染色 1 h,脱色观察。

1.2.2 融合蛋白的纯化 将诱导后的样品进行 SDS-PAGE,电泳结束后卸下胶板,切去溴酚蓝条带,将胶放于去离子水中漂洗;再用 PBS 洗 2 遍,用 0.25 mol/L KCl 溶液染色 2~3 min,直至看见清晰条带;切下来放于 1.5 mL 离心管中,称质量;-20 ℃ 冻融,研磨至碎,凝胶与 PBS 按 1:3 的比例,将凝胶融化放于 1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心取上清,经 SDS-PAGE 鉴定。按公式计算蛋白浓度:

蛋白浓度(mg/mL) =  $1.55 \times D_{280 \text{ nm}} - 0.76 \times D_{260 \text{ nm}}$   
式中: $D_{280 \text{ nm}}$ 、 $D_{260 \text{ nm}}$  分别表示在 280、260 nm 下蛋白质溶液的吸光度。

1.2.3 抗血清的制备 取灭过菌的 2 支试管,分别标记对照组、试验组,对照组加入 PBS、弗氏佐剂,试验组加入融合蛋白、弗氏佐剂,乳化<sup>[6]</sup>。将 1 日龄 SPF 雏鸡饲养 14 d,分为空白、对照、试验 3 组,每组 10 羽。空白组不作注射,对照组及

收稿日期:2016-04-13

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31302128);聊城大学博士科研启动基金(编号:31805)。

作者简介:樊琛(1978—),女,山东聊城人,博士,副教授,主要从事食品营养、食品安全方向的研究。E-mail:fanchen7810@126.com。

试验组每隔 1 周免疫 1 次,第 4 次免疫后 5 d 取血。首次免疫佐剂为完全弗氏佐剂,第 2 次到第 4 次免疫佐剂为不完全弗氏佐剂。

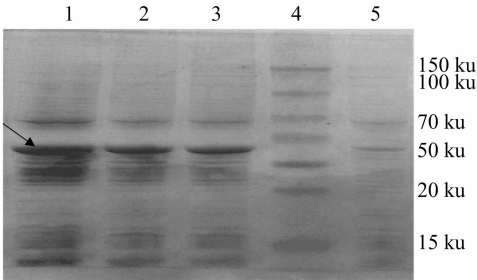
表 1 间接 ELISA 检测条件的优化方法

包被板处理	包被	包被后处理	抗原稀释液	抗原浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	一抗稀释 倍数	二抗稀释 倍数	显色液 ( $\mu\text{L}$ )
紫外线照射 24 h	4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜	干燥	PBS	2	未稀释	1 000	100
未经紫外照射	37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h	甲醇处理	包被液	5	20	5 000	200
	37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜	甲醇处理并干燥		10	100	10 000	

2 结果与分析

2.1 IPTG 诱导结果

IPTG 终浓度为 0.1、0.2、0.5 mmol/L 时,经 SDS - PAGE 电泳,在目的条带 36 ku 左右处,均具有特异条带;未加 IPTG 组,无目的条带(图 1)。

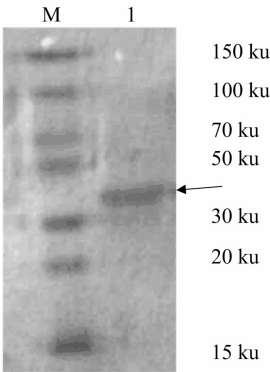


1~3 分别表示 IPTG 终浓度为 0.1、0.2、0.5 mmol/L;  
4 表示 marker; 5 表示未诱导组; 箭头表示目的条带  
图1 IPTG 诱导结果

由图 1 可见,IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时获得的带较宽,浓度为 0.2、0.5 mmol/L 时也有目的条带,但获得的目的条带比浓度为 0.1 mmol/L 时窄。表明 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 时,表达量最大。因此,选取 0.1 mmol/L 作为 IPTG 的诱导浓度。

2.2 融合蛋白的纯化

经切胶纯化,取 5  $\mu\text{L}$  上清液,进行 SDS - PAGE 鉴定,在约 36 ku 处有特异条带(图 2)。



M—蛋白marker; 1— Iss 蛋白纯化条带;  
箭头—目的条带  
图2 Iss 融合蛋白纯化结果

由图 2 可见,在 36 ku 处,有符合目的条带大小的特异条带,且为单一条带。表明通过纯化获得目的蛋白并且无杂蛋白。通过吸光度法检测在 280、260 nm 处的吸光值分别为 0.40、0.45,按蛋白浓度( $\text{mg/mL}$ ) =  $1.55 \times D_{280\text{nm}} - 0.76 \times$

1.2.4 间接 ELISA 检测条件的优化 在实验室常规间接 ELISA 检测方法的基础上,对反应条件进行优化,具体条件如表 1 所示。

$D_{260\text{ nm}}$  计算,得蛋白浓度为 0.278  $\text{mg/mL}$ 。

2.3 间接 ELISA 检测的优化

经 96 孔板预处理、包被条件、反应物浓度等方面的调节,计算  $\Delta D_{450\text{ nm}} = (D_{450\text{ nm, 阳性血清}} - D_{450\text{ nm, 空白}}) - (D_{450\text{ nm, 阴性血清}} - D_{450\text{ nm, 空白}})$ 。与常规间接 ELISA 检测  $\Delta D_{450\text{ nm}}$  相比,结果以优化试验组  $\Delta D_{450\text{ nm}}$  与常规方法组  $\Delta D_{450\text{ nm}}$  之差,即  $\Delta\Delta D_{450\text{ nm}}$  表示。结果表明,甲醇处理、洗涤次数、抗原浓度、一抗浓度、二抗浓度、稀释液种类,均对  $\Delta\Delta D_{450\text{ nm}}$  值无明显影响;紫外线照射包被板 24 h、包被后 56  $^{\circ}\text{C}$  干燥 12 h,对  $\Delta\Delta D_{450\text{ nm}}$  有明显影响(表 2)。

表 2 处理方法与结果

处理方法	$\Delta\Delta D_{450\text{ nm}}$
改变反应物浓度、洗涤次数	$\leq 0.004$
包被后干燥	0.023 5
甲醇处理	0.006
甲醇—干燥	0.013
紫外线—甲醇—干燥	0.034
紫外线—包被后干燥	0.039 5
紫外线	0.028
PBS 作稀释液	0.013

由表 2 可见,紫外线照射包被板 24 h,包被后先 56  $^{\circ}\text{C}$  干燥 12 h 再封闭,能明显升高  $\Delta D_{450\text{ nm}}$  差值;改变反应物浓度、甲醇处理、PBS 稀释,对结果影响不明显。

优化条件:96 孔板紫外线照射 24 h,包被液包被蛋白或细菌 37  $^{\circ}\text{C}$  2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,56  $^{\circ}\text{C}$  干燥 12 h,封闭 3 h,一抗稀释 100 倍,37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 3 h,二抗稀释 1 000 倍,37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 2 h,加入显色液 25  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h。

有研究者认为,Iss 基因编码的外膜蛋白 Iss 可能通过调节细胞表面上对补体膜攻击复合体敏感的位点,导致表面排斥,使菌株具有抗补体溶菌作用的能力,增强 *E. coli* 血清抗性<sup>[7]</sup>。而补体抗性又与毒力高度相关,是重要的致病因素<sup>[8]</sup>。多数研究者认为,Iss 蛋白是结合在细胞表面的<sup>[7]</sup>,因此,本试验没有将菌体裂解而是采用全菌作为抗原包被,进行间接 ELISA 检测。庄翹楚等在试验中,采用包被抗体、二抗浓度、改变包被液、改变封闭液、调节封闭时间、调节 TMB 底物作用时间、改变单一变量进行 ELISA 的条件优化。如在包被抗体和二抗工作浓度、封闭液、底物和作用时间都一致的情况下,采用不同的包被液进行包被,以研究不同包被液对试验结果的影响。确定最佳条件:包被抗体 1 : 1 280、二抗 1 : 320、N - 溴代琥珀酰亚胺(N - bromobutanamide,简称 NBS)作为包被液、质量分数为 5%的 BSA - PBS 作为封闭液、封闭 30 min、显色 30 min<sup>[9]</sup>。Johnson 等对 ELISA 检测中的常

贾久满, 张丽娜. 不同品种鸡蛋的蛋品质及营养成分比较[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 152–155.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.043

# 不同品种鸡蛋的蛋品质及营养成分比较

贾久满<sup>1</sup>, 张丽娜<sup>2</sup>

(1. 钦州学院海洋学院, 广西钦州 535011; 2. 河北科技大学图书馆, 河北石家庄 050018)

**摘要:**为了探讨在完全相同的条件下饲养的柴鸡、芦花鸡、贵妃鸡、白羽绿壳乌鸡与海兰褐蛋鸡在蛋品质与鸡蛋营养成分方面的差异,测定了蛋质量、蛋形指数、蛋壳厚度、蛋黄颜色、哈夫单位、蛋黄/蛋白等蛋品质指标,以及蛋白与蛋黄中氨基酸含量、蛋黄中脂肪与磷脂含量等营养成分。结果表明,柴鸡、芦花鸡、贵妃鸡、白羽绿壳乌鸡等地方特色品种的鸡蛋蛋黄颜色、哈夫单位、蛋黄/蛋白等蛋品质指标总体上均优于海兰褐蛋鸡,鸡蛋白与蛋黄中总氨基酸含量和必需氨基酸含量也更高;海兰褐鸡蛋黄中的脂肪含量最高,柴鸡蛋黄中的磷脂含量最高。因此认为,柴鸡、芦花鸡、贵妃鸡、白羽绿壳乌鸡等品种的鸡蛋无论是蛋品质还是氨基酸、脂肪、磷脂等营养成分,总体上均好于海兰褐鸡蛋。

**关键词:**鸡蛋;品种;蛋品质指标;氨基酸;脂肪;磷脂;蛋鸡养殖效益

**中图分类号:** S831.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0152-04

鸡蛋含有蛋白质、脂肪、卵黄素、卵磷脂、维生素和微量元素等多种营养物质,一个受过精的鸡蛋,在合适的温度、湿度条件下,不需要从外界补充任何营养就可以孕育出一个完整的生命。由于鸡蛋营养丰富而完善,几乎含有人体需要的所有的营养物质,特别是鸡蛋的蛋白质品质最佳,仅次于母乳,氨基酸组成与人体组织蛋白质最为接近,具有完全蛋白质模式,且吸收率极高,可达 98% 以上,被称为“理想的营养库”“全营养食品”“营养之王”。因此,鸡蛋是最受我国老百姓欢迎的、物美价廉的动物性产品。

我国是鸡蛋的生产与消费大国,蛋鸡存栏量、鸡蛋产量均

排名世界第一,如 2014 年,我国蛋鸡存栏量为 14.5 亿羽,鸡蛋产量达到 2 450 万 t。目前,市场上出售的鸡蛋大体上可以分为 2 种类型,一种是标准化品种的蛋鸡在笼养条件下生产的普通鸡蛋,另一种是以地方特色品种为主的蛋鸡生产的“柴鸡蛋”“土鸡蛋”等,其售价后者通常是前者的 2~5 倍。因此也就出现了柴鸡蛋是不是比普通鸡蛋更有营养的争论,如白建等的研究认为,就营养价值而言,笨鸡蛋并不比笼养鸡鸡蛋高多少,但笨鸡蛋具有无污染、天然绿色的优势,比笼养鸡鸡蛋更容易获得人们的青睐<sup>[1]</sup>。而董修建等的研究认为,不同蛋鸡品种在鸡蛋品质的许多方面存在差异,综合考虑柴鸡、绿壳蛋鸡在生产优质鸡蛋方面具有一定的遗传优势<sup>[2]</sup>。为了进一步探讨地方特色品种蛋鸡与标准化品种海兰褐蛋鸡在蛋品质与鸡蛋营养成分方面的差异,本试验把柴鸡、芦花鸡、贵妃鸡、白羽绿壳乌鸡等几个地方特色品种蛋鸡与海兰褐蛋

收稿日期:2016-04-19

作者简介:贾久满(1968—),男,河北迁西人,硕士,教授,研究方向为生态农业。Tel:(0777)2807959;E-mail:jiajml2@163.com。

见问题及解决方法进行了研究<sup>[10]</sup>。ELISA 检测的影响因素较多,如标本、试剂、操作等<sup>[10]</sup>,这些因素导致了 ELISA 检测中的常见问题。本试验采用单因素试验对 ELISA 进行条件优化,结果表明,紫外线照射、干燥处理可明显升高  $\Delta D_{450\text{nm}}$ 。推测经紫外线照射、干燥处理增强了 ELISA 反应中抗原和/或细菌菌体与包被板的结合,使  $\Delta D_{450\text{nm}}$  值升高。

## 3 结论

优化条件为 96 孔板紫外线照射 24 h,包被液包被蛋白或细菌 37 ℃ 2 h 后 4 ℃ 过夜,56 ℃ 干燥 12 h,封闭 3 h,一抗稀释 100 倍,37 ℃ 温浴 3 h,二抗稀释 1 000 倍,37 ℃ 温浴 2 h,加入显色液 25 ℃ 放置 1 h,检测  $D_{450\text{nm}}$ 。

## 参考文献:

- [1] 金文杰. 禽致病性大肠杆菌耐药基因和毒力因子的分子流行病学及 HPI Irp1 细胞表位作用的研究[D]. 扬州:扬州大学,2006.
- [2] 樊琛,王亚君,李一经. iss 基因与鸡大肠杆菌毒力相关性的分析[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(1):58-61.

- [3] 刘纪成,吴海港,易先国,等. 豫南地区鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志,2011,47(6):43-45.
- [4] 樊琛,刘桂芹,王亚君,等. iss 蛋白在鸡源大肠杆菌不同毒力菌株中的检测[J]. 畜牧与兽医,2010,42(2):71-73.
- [5] 朱善元,陆辉,王健,等. 禽源大肠杆菌的分离及其毒力因子的检测[J]. 微生物学报,2007,47(5):795-799.
- [6] 王亚宾,王三虎,赵聘,等. 动物性食品检验学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2003:346-347.
- [7] 樊琛,徐旺辉,李丹丹,等. PCR 方法检测大肠杆菌 iss 基因的缺陷及改进[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):69-70.
- [8] 李贵萧,朱宗涛,康燕青,等. 鸡大肠杆菌的血清抗性与致病性检验[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):301-303.
- [9] 庄翹楚,孟祥晨. 双抗夹心 ELISA 法检测双歧杆菌反应条件的优化[J]. 中国乳品工业,2008,36(5):55-58.
- [10] Johnson T J, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(8):3228-3236.