

自制多抗检测金黄色葡萄球菌PVL蛋白的研究

陈述¹, 邹治情^{2,3}, 张海¹, 丁龙坤³, 席月³, 闫曼³, 孙畅³, 吴亮^{3*}

¹江苏大学附属医院普外科, 江苏 镇江

²上海市嘉定区安亭医院, 上海

³江苏大学医学院医学检验系, 江苏 镇江

收稿日期: 2022年3月1日; 录用日期: 2022年3月25日; 发布日期: 2022年4月7日

摘要

目的: 携带杀伤白细胞素(*pvl*)基因的耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌毒力强, 可以诱发高致死率的社区获得性肺炎, 但目前仍缺少快速简便的检测方法。本研究拟制备抗PVL多克隆抗体用于其快速检测。方法: 本研究通过将金黄色葡萄球菌PVL蛋白S亚基的重组质粒LukS-PV/pET28a导入大肠杆菌诱导表达重组蛋白, 再经免疫新西兰兔制备抗血清, 以Western blotting法检测金黄色葡萄球菌PVL蛋白表达。结果: 成功纯化出重组LukS-PV蛋白, 并制备抗LukS-PV抗血清。通过Western blotting法采用自制多克隆抗体成功检测出金黄色葡萄球菌PVL表达。结论: 自制抗PVL多克隆抗体可以检测金黄色葡萄球菌PVL表达, 为下一步试剂盒制备奠定技术基础。

关键词

金黄色葡萄球菌, 杀白细胞素, 多克隆抗体, 检测

Study of PVL Protein Detection in *Staphylococcus aureus* by Self-Made Polyclonal Antibody

Shu Chen¹, Zhiqing Zou^{2,3}, Hai Zhang¹, Longkun Ding³, Yue Xi³, Man Yan³, Chang Sun³, Liang Wu^{3*}

¹Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

²Anting Hospital, Jiading District, Shanghai

³Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

Received: Mar. 1st, 2022; accepted: Mar. 25th, 2022; published: Apr. 7th, 2022

Abstract

Objective: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), which carries the Panton-Valentine

*通讯作者。

文章引用: 陈述, 邹治情, 张海, 丁龙坤, 席月, 闫曼, 孙畅, 吴亮. 自制多抗检测金黄色葡萄球菌 PVL 蛋白的研究[J]. 临床医学进展, 2022, 12(4): 2463-2468. DOI: 10.12677/acm.2022.124356

leukocidin (*pvl*) gene, is highly virulent and can cause community-acquired pneumonia with a high fatality rate, but a quick and easy test is still lacking. In this study, polyclonal antibodies against PVL were prepared for rapid detection. Methods: In this study, the recombinant plasmid LukS-PV/pET28a of PVL protein S subunit of *S. aureus* was introduced into *Escherichia coli* to induce the expression of the recombinant protein, and then anti-serum was prepared by immunizing rabbits, and the expression of PVL protein of *S. aureus* was detected by Western blotting method. Results: Recombinant LukS-PV protein was successfully purified and antiserum was prepared. The expression of PVL in *S. aureus* was detected by Western blotting and polyclonal antibody. Conclusion: The self-made anti-PVL polyclonal antibody can detect the expression of PVL in *S. aureus*, and lay a technical foundation for the preparation of the kit.

Keywords

Staphylococcus aureus, Panton-Valentine Leukocidin, Polyclonal Antibody, Detection

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金黄色葡萄球菌是一种常见的机会性感染病原菌，可引起从轻微的局部皮肤化脓性感染到危及生命的深层组织感染或全身感染、菌血症等。耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)由于对青霉素类和头孢菌素类抗生素耐药，临床治疗困难，给临床医生带来极大困扰[1]。但研究发现在不少健康者口咽部和呼吸道中仍可以检出 MRSA 菌，表明 MRSA 菌的毒力并不与其耐药性呈正相关，某些情况下 MRSA 菌可以定植于健康人口咽中并不引起临床症状，单纯痰液中 MRSA 菌的检出并不一定预示着患者会发生严重肺部化脓性感染[2]。近年来，金黄色葡萄球菌的杀白细胞素(Panton-Valentine leukocidin, PVL)引起了人们的关注[3]。英国学者最早发现，由携带 *pvl* 基因的 MRSA 菌感染导致的社区内肺炎患者死亡率高达 90%，因此 PVL 是金黄色葡萄球菌重要毒力因子，也极可能是潜在高危型金黄色葡萄球菌的分子标记。目前仍未见有金黄色葡萄球菌 PVL 的快速检测方法，本研究通过自行制备抗 PVL 多克隆抗体，为下一步 PVL 快速检测提供了技术保障。

2. 实验材料

2.1 实验物品

实验菌株

携带 *pvl* 基因的金黄色葡萄球菌分离于本院患者血液，经 PCR 法鉴定表达 *pvl* 基因，保存于本研究室菌种库中。

2.2. 实验耗材

2.2.1. 细菌培养所需实验耗材

磷酸盐缓冲液(PBS)、Muller-Hinton (MH)培养基和羊血琼脂培养平板购自法国生物梅里埃公司；酵母浸出液、胰蛋白酶购自英国 OXIOD 公司。

2.2.2. PCR 及载体构建相关耗材

2 × Taq Master Mix (Dye Plus)试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自南京 Vazyme 公司, 溶菌酶、异丙醇、氯仿、无水乙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海生工生物公司。

2.2.3. PCR 引物

根据金黄色葡萄球菌 PVL 编码序列引物, 引物序列为: F: CTTGCATCAAGTTCAGCTCTTCC, R: AAGTGAGCCTCAACCGCATCCT, 交由苏州金智唯公司合成。

2.3. 实验方法

2.3.1. 制备重组金黄色葡萄球菌 PVL 蛋白(S 亚基)

金黄色葡萄球菌 LukS-PV/pET28a 质粒由安徽省立医院常文娇博士和马筱玲教授惠赠, 以热激法导入感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 并涂布于 LB 平板上。平板琼脂中含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素用于筛选阳性克隆。次日挑取单个菌落接种于新鲜 LB 液体培养基(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)扩大培养 12 h。离心收集菌液, 采用碱裂解法提取质粒, 并重溶于 20 μL 灭菌双蒸水中。再采用热激法导入将上述质粒导入大肠杆菌 BL21 感受态中, 并涂片于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆。次日挑取单个菌落接种含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基增菌 12 h, 再按 1:100 比例接种新鲜 LB 培养基并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 增菌至菌液 OD₆₀₀ = 0.6, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后收集菌体沉淀重悬于结合缓冲液, 以超声法裂解蛋白(超声功率 45 W, 每次 15 s, 间隔 15 s, 持续 30 次)。超声完毕后以 16,000 rpm 离心 20 min 彻底去除上清用于 Ni-NAT 亲和层析法纯化重组 LukS-PV 蛋白, 纯化后重组 LukS-PV 蛋白以 SDS-PAGE 电泳分析纯化效果。

2.3.2. 制备兔抗 LukS-PV 多克隆抗体

取纯化后的重组 LukS-PV 蛋白与等量弗氏完全佐剂混合充分研磨至完全乳化“油包水”状态后用于免疫新西兰兔, 免疫量为 1 mg/只, 采用背部皮内多点注射法免疫。首次免疫后的第二周和第四周将纯化后 PVL 蛋白与等量弗氏不完全佐剂完全乳化后新西兰兔。于采集兔血清前采用 ELISA 法检测抗体效价, 达到 1:128,000 时即采集血清用于后续实验研究。

2.3.3. Western Blotting 法检测 PVL 表达

选取已鉴定为携带 *pvl* 基因的 MRSA 菌株, 于血平板复苏并经液体 LB 培养基大量扩增后收集菌体, 加入适量 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 10 min 后离心取上清, 用于 Western blotting 法检测。细菌蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后转印至 PVDF 膜, 经 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 再以自制兔血清为一抗(免疫前和免疫后兔血清按照 1:5000 比例使用 5%脱脂奶粉封闭液稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日使用 TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 10 min。再与二抗(TBST 溶液以 1:1000 比例稀释的羊抗兔二抗)于室温下孵育 1 h, 滴加 ECL 发光液, 观察结果, 并照相记录。使用 Image J 图像分析软件按照相应操作步骤对照片进行灰度扫描, 记录结果后使用 SPSS 软件分析。

3. 结果

3.1. PCR 法检测金黄色葡萄球菌 *pvl* 基因

10 株临床分离 MRSA 菌株煮沸后经 PCR 法检测, 5 株 *pvl* 基因阳性, 5 株阴性(图 1)。

3.2. 重组 LukS-PV 蛋白表达与纯化

使用 IPTG 诱导表达 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h, 经 SDS-PAGE 电泳检测发现 0.4 mmol/L IPTG 诱导 6 h 时重组 LukS-PV 蛋白表达量达到最高。经 Ni-NTA 介质纯化后, SDS-PAGE 电泳显示 35 kDa 处

有一明显而清晰的条带，与 LukS-PV 分子量大小一致，表达纯化金黄色葡萄球菌重组 LukS-PV 蛋白获得成功(图 2)。

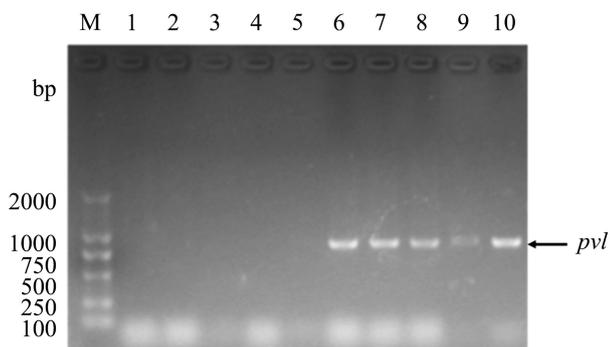


Figure 1. Detection of *pvl* genes by PCR
图 1. PCR 法检测 *pvl* 基因

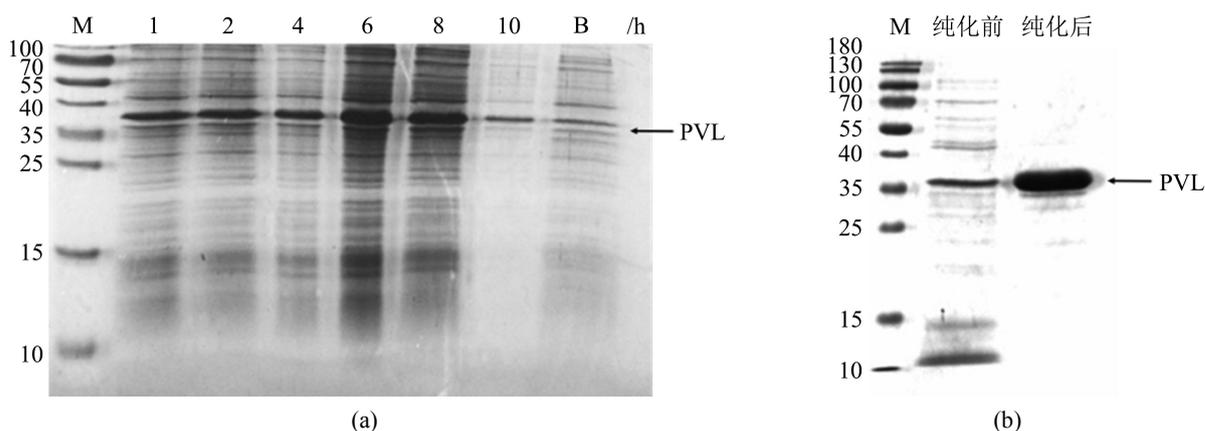


Figure 2. Expression and purification of LukS-PV protein. (a) Recombinant LukS-PV protein was expressed 6 h after IPTG induction; (b) Purification of recombinant LukS-PV protein
图 2. 重组 LukS-PV 蛋白表达与纯化。(a) 经 IPTG 诱导 6 h 时重组 LukS-PV 蛋白表达情况；(b) 重组 LukS-PV 蛋白纯化效果

3.3. 抗 PVL 多克隆抗体制备

以免疫前、后兔血清按 1:5000 比例稀释后作为一抗检测 MRSA 菌 PVL 表达。结果可见，免疫后血清可识别 35 kDa 处特异性条带，而免疫前血清未识别出 35 kDa 处条带，表明抗体制备成功(图 3)。

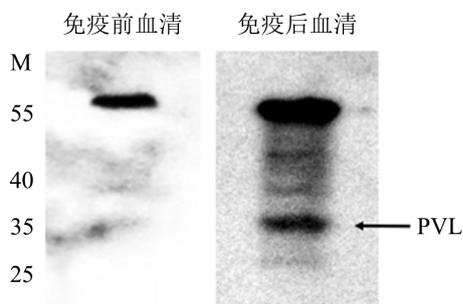


Figure 3. The PVL protein was identified by self-made polyclonal antibodies
图 3. 采用自制多抗鉴定 PVL 蛋白

3.4. Western Blotting 法检测 MRSA 菌 PVL 表达

选取四株 MRSA 菌株, 以自制兔抗血清按 1:5000 比例稀释后作为一抗检测 MRSA 菌 PVL 表达, 可见两株携带 PVL 的菌株(3 号和 4 号菌株)在 35 kDa 处有特异性条带, 而两株不携带 PVL 的菌株(1 号和 2 号菌株)在 35 kDa 处未见特异性条带(图 4)。

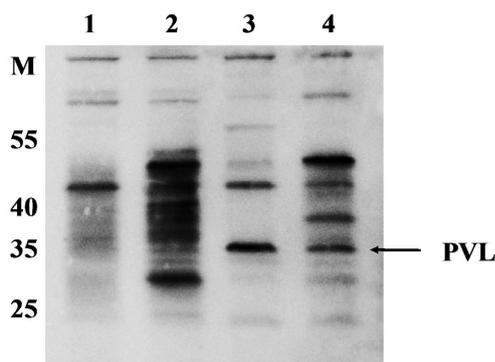


Figure 4. Detection of PVL by Western blotting

图 4. Western blotting 法检测 PVL

4. 讨论

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是革兰阳性菌, 常定植于宿主皮肤、鼻腔、肠胃中, 在宿主免疫力低下时诱发各种感染性疾病, 如肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至引发脓毒血症造成死亡[4]。随着抗生素的滥用导致金黄色葡萄球菌的耐药性逐年增强, 1961 年首次发现了对多种抗生素广泛耐药菌株—耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 并于上世纪 80 年代在全球范围内蔓延, 每年直接或者间接夺去数百万人的生命[5]。过去认为由 MRSA 菌引起的感染通常伴随着高死亡率、高发病率和高额医疗费用, 但近年来的研究发现健康人群的口咽部和呼吸道也存在 MRSA 菌的定植, 并且不会引起宿主任何症状[6]。这表明, 单纯依靠 MRSA 菌评估金黄色葡萄球菌并不可靠, 易造成临床过度治疗。

金黄色葡萄球菌的毒力主要取决于多种毒素, 包括溶血素、肠毒素、中毒休克综合征毒素-1 等, 以及各种侵袭性酶如蛋白酶、脂肪酶和透明质酸酶等[7]。其中溶血素可以导致特应性皮炎(Atopic dermatitis, AD), 肠毒素可以导致食物中毒, 而杀白细胞素(PVL)是金黄色葡萄球菌的一种重要毒素, 可引起高致死性社区内肺炎。特别是能够表达 PVL 毒素的 MRSA 菌, 对常规青霉素类和头孢类抗生素耐药, 极易导致患者死亡, 因此建立金黄色葡萄球菌 PVL 的快速筛选技术具有重有临床应用价值。目前国外十分重视社区内发现 MRSA 菌株携带 *pvl* 基因的筛查, 已将其推荐为国家疾病预防控制中心微生物学实验室的常规检测项目, 但国内尚未见相关检测研究[8]。

1884 年 Van deleid 等首次发现某些金黄色葡萄球菌可以分泌一种直接杀伤家兔白细胞的外毒素, 1932 年 Panton 和 Valentine 两位学者在提纯金黄色葡萄球菌溶血素时意外发现了 PVL。金黄色葡萄球菌 PVL 蛋白是一种双组份成孔毒素, 包括 F 亚基(LukF-PV)和 S 亚基(LukS-PV), 可以杀伤宿主各类吞噬细胞, 帮助细菌逃避宿主免疫清除[9]。研究发现 LukS-PV 先与多形核白细胞(PMNs)细胞膜上的受体特异性结合, 再与 LukF-PS 结合形成二聚体, 并进一步形成一个环状异聚体在 PMNs 细胞膜上打孔。低浓度 PVL 会造成 PMNs 线粒体外膜穿孔, 激活 Caspase-3 和 Caspase-9, 继而释放线粒体内细胞色素 C 诱发凋亡; 高浓度 PVL 可以直接激活蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 的磷酸化, 导致 Ca^{2+} 活化内流至胞内促使产生各种

炎性介质，直接杀伤溶解细胞[10]。

我们研究中，我们制备出金黄色葡萄球菌 PVL 多克隆抗体，并建立了 Western blotting 法检测金黄色葡萄球菌表达 PLV 蛋白，该结果为下一步制备金黄色葡萄球菌 PVL 快速检测试剂盒奠定了技术基础。

参考文献

- [1] Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., *et al.* (2018) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, **4**, Article No. 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- [2] Cheung, G., Bae, J.S. and Otto, M. (2021) Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, **12**, 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- [3] Mazzoleni, V., Zimmermann, K., Smirnova, A., *et al.* (2021) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Triggers an Alternative NETosis Process Targeting Mitochondria. *FASEB Journal*, **35**, e21167. <https://doi.org/10.1096/fj.201902981R>
- [4] Troeman, D., Van Hout, D. and Kluytmans, J. (2019) Antimicrobial Approaches in the Prevention of *Staphylococcus aureus* Infections: A Review. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**, 281-294. <https://doi.org/10.1093/jac/dky421>
- [5] Wu, S., Huang, J., Zhang, F., *et al.* (2019) Prevalence and Characterization of Food-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00304>
- [6] Schuetz, C.R., Hogan, P.G., Reich, P.J., *et al.* (2021) Factors Associated with Progression to Infection in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*-Colonized, Critically Ill Neonates. *Journal of Perinatology*, **41**, 1285-1292. <https://doi.org/10.1038/s41372-021-00944-8>
- [7] Alvarez, A., Fernandez, L., Gutierrez, D., *et al.* (2019) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals: Latest Trends and Treatments Based on Bacteriophages. *Journal of Clinical Microbiology*, **57**, e1006-e1019. <https://doi.org/10.1128/JCM.01006-19>
- [8] Takadama, S., Nakaminami, H., Sato, A., *et al.* (2018) Dissemination of Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Clone in Multiple Hospitals in Tokyo, Japan. *Clinical Microbiology Infection*, **24**, 1211.E1-1211.E7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.012>
- [9] Duployez, C., Le Guern, R., Tinez, C., *et al.* (2020) Panton-Valentine Leukocidin-Secreting *Staphylococcus aureus* Pneumonia Complicating COVID-19. *Emerging Infectious Diseases*, **26**, 1939-1941. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201413>
- [10] Hanitsch, L.G., Kruger, R., Hoppe, P.A., *et al.* (2020) Outpatient Decolonization after Recurrent Skin Infection with Panton-Valentine Leukocidin (PVL)-Producing *S. aureus*—The Importance of Treatment Repetition. *PLoS ONE*, **15**, e231772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772>