



分类号 S855.1
学 号 Z20213685

山西農業大學

全日制硕士专业学位论文

马鼻疽杆菌菌种鉴定及竞争 ELISA 方法的建立

姓 名： 彭明媛

指 导 教 师： 牛瑞燕 教 授

李俊平 研究员

徐 磊 高级兽医师

学 位 类 别： 兽医硕士

培 养 单 位： 动物医学学院

中 国 · 山 西 · 太 谷
二〇二四年五月

Shanxi Agricultural University

Full-time Master of Professional Degree Dissertation

**Identification of malleosis bacillus and establishment of
competitive ELISA method**

Name: Mingyuan Peng

Supervisor: Professor Ruiyan Niu

Professor Junping Li

Associate Professor Lei Xu

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Institute: College of Veterinary Medicine

Taigu Shanxi China

May, 2024

本研究由
“十四五”国家重点研发计划（2021YFD1800504）
提供资助

This research was supported by The Program for National Key
Research and Development of China
(Project No.2021YFD1800504)

目 录

1. 文献综述.....	2
1.1 . 马鼻疽概述.....	2
1.1.1 . 马鼻疽杆菌病原学.....	2
1.1.2 . 马鼻疽杆菌致病机制.....	3
1.1.3 . 马鼻疽疫苗研究进展.....	4
1.1.4 . 马鼻疽检测方法研究进展.....	4
2. 研究目的和意义	8
第一章 马鼻疽杆菌菌种鉴定	9
1. 材料与方法.....	9
1.1 . 试验材料.....	9
1.2 . 方法.....	11
2. 结果.....	17
2.1 . 培养特性及生化鉴定.....	17
2.2 . 全基因组测序.....	21
2.3 . 毒力测定.....	29
2.4 . CVCC67003 免疫原性测定.....	35
2.5 . CVCC67003 比较基因组分析.....	36
3. 讨论.....	38
4. 小结.....	40
第二章 马鼻疽单克隆抗体的制备	41
1. 材料与方法.....	41
1.1 . 菌株、细胞.....	41
1.2 . 试验试剂.....	41
1.3 . 实验动物.....	42
1.4 . 方法.....	42
2. 结果.....	48
2.1 . 抗原鉴定.....	48
2.2 . 小鼠血清效价测定.....	49
2.3 . 阳性杂交瘤细胞株的确定.....	50
2.4 . 单克隆抗体亚型鉴定.....	50
2.5 . 单克隆抗体特异性鉴定.....	51
2.6 . 杂交瘤细胞分泌抗体稳定性的鉴定.....	52
2.7 . 腹水纯化效果.....	53
2.8 . 腹水纯化前后效价测定.....	53

2.9. 双向电泳及质谱鉴定结果.....	54
3. 讨论.....	66
4. 小结.....	67
第三章 马鼻疽抗体竞争 ELISA 方法的建立.....	68
1. 材料与方法.....	68
1.1. 血清与菌株.....	68
1.2. 试验试剂.....	68
1.3. 方法.....	68
2. 结果.....	70
2.1. 最适抗原包被浓度和单抗稀释度.....	70
2.2. 包被条件.....	72
2.3. 最适封闭液和封闭时间.....	72
2.4. 最适血清和二抗稀释度.....	73
2.5. 最适血清、二抗孵育时间.....	74
2.6. 最适显色时间.....	75
2.7. 重复性.....	75
2.8. 临界值.....	76
2.9. 敏感性和特异性.....	77
2.10. 符合率试验.....	79
3. 讨论.....	80
4. 小结.....	81
结论.....	82
中英文缩略词表	83
参考文献.....	84

摘要

马鼻疽是由鼻疽杆菌引发的一种急性接触性人畜共患传染病。对我国菌株的流行情况和毒力了解尚显不足,同时,国内市场也缺乏商品化的诊断试剂盒。为此,我们经过培养特性、生化鉴定和全基因组测序鉴定了国内早期分离的 CVCC67001、CVCC67002 和 CVCC67003 三株鼻疽杆菌,并进行了毒力试验和 CVCC67003 的免疫原性试验。利用 CVCC67003 灭活全菌作为抗原制备了单克隆抗体,以此建立了马鼻疽竞争 ELISA 抗体检测试剂盒,以期为我国马鼻疽的检疫监测提供必要的技术储备。研究结果如下:

CVCC67003 在 VP 试验中呈阳性,而另外两株呈阴性。遗传分析显示三株菌位于 L3 分支,但 CVCC67003 与其他两株不属于同一集群。比较基因组学发现 CVCC67003 的基因组与参考菌株 ATCC 23344 存在显著差异,包含大量的插入、缺失和置换。毒力测定结果显示 CVCC67002 的 LD_{50} 为 9.5×10^4 CFU; CVCC67001 的 LD_{50} 为 2.6×10^5 CFU;而 CVCC67003 未引起动物死亡。CVCC67003 在免疫原性研究中对鼻疽杆菌急性感染达到 80~100% 的保护力,表现出作为弱毒活疫苗候选株的潜力。

成功得到一株单克隆抗体 3A4,亚型为 IgG_{2b}。Western Blot 显示其在约 50 kDa 的有单一条带,经双向电泳和质谱鉴定预测可能是伴侣蛋白 GroEL 或延伸因子 Tu。

基于单抗 3A4 成功建立了马鼻疽的竞争 ELISA 抗体检测方法。试验步骤:抗原包被浓度为 10 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 包被 12 h;5 %脱脂奶于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;样本和单抗分别 1:20 和 1:1000 稀释,共孵育 15 min;酶标抗体 1:10000 稀释,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;室温避光显色 10 min,读取 OD_{450 nm} 值,计算 PI %。当 PI % $\geq$ 68.5 %时,判定为阳性;当 PI % $\leq$ 49.6 %时,判定为阴性;位于二者之间判定为可疑。经补体结合试验测定效价为 1:100 的马鼻疽阳性血清进行 1:80 倍稀释时,检测结果仍为阳性。特异性结果显示该方法可以区分马流产沙门氏菌病、马腺疫链球菌病,无法区分类鼻疽。与补体结合试验结果的符合率为 99.28 %,显示良好应用潜力。

综上,本研究鉴定了三株鼻疽杆菌 CVCC67001、CVCC67002 和 CVCC67003,其中 CVCC67003 具有作为弱毒活疫苗候选株的潜质。制备了单抗 3A4 株,并建立了马鼻疽竞争 ELISA 检测法,为马鼻疽的防控提供了技术支持。

关键词: 鼻疽伯克霍尔德氏菌;全基因组测序;单克隆抗体;竞争 ELISA

1.文献综述

1.1.马鼻疽概述

马鼻疽是世界动物卫生组织（ World Organization for Animal Health, WOAH ）法定通报疫病，马属类动物较为敏感^[1]。此病主要侵害成年马匹的呼吸道系统、淋巴系统及皮肤，在其气管黏膜、鼻腔、喉头或皮肤生成特异性瘢痕，在其淋巴结、肺部以及其他实质器官形成鼻疽性的结节^[2]。目前没有用于人或马的鼻疽病疫苗，可供使用的抗生素很少，未经治疗的人具有较高的死亡率^[3,4]。

1.1.1.马鼻疽杆菌病原学

早在公元前 450-425 年希腊人首次记载了马鼻疽^[5]，其病原菌为鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia mallei*, *B.mallei*），属于伯克霍尔德氏菌属^[6]，我国通常称为鼻疽杆菌。鼻疽杆菌是一种不运动的、兼性需氧的革兰氏阴性菌，显微镜下呈两端钝圆、无芽孢、荚膜的杆状^[7]。该病主要感染马属动物，人类病例主要发生在与马相关工作者及实验室人员身上^[8]。鼻疽杆菌可通过食物、气溶胶或皮肤途径传播给易感宿主，疾病的病程取决于接触途径^[9]。临床上，马主要表现为上呼吸道和肺出现肉芽肿及溃疡，皮肤和粘膜出现特征性溃疡结节病变^[10]。该菌具有两条环形染色体，基因组大小为 5.8 M^[11]。有人提出，鼻疽杆菌是从类鼻疽伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia pseudomallei*, *B.pseudomallei*）的单一菌株进化而来的，在一个祖先菌株感染了一个动物宿主，然后失去了在宿主中生存所不需要的基因，最终成为一个专属病原体^[12]，二者遗传同源性超过 99 %^[13]。鼻疽杆菌是一种专性宿主病原体，在哺乳动物宿主外生存能力有限（大多数情况下存活不超过 2 周），55 °C 10 min、紫外照射 24 h 即可将其杀死，但它在潮湿潮湿的环境中存活时间延长。并对大多数消毒剂（包括 1 %次氯酸钠、70 %乙醇、2 %戊二醛、碘、苯扎氯铵、酒精中的氯化汞和高锰酸钾）较敏感，但对酚类消毒剂较不敏感^[14]。由于该疾病对人类具有致命性和传染性，马鼻疽杆菌被认为是生物恐怖主义的潜在媒介，被美国疾病控制和预防中心（Centers for Disease Control and Prevention, CDC）列为 B 类生物威胁剂，曾在第一次和第二次世界大战期间分别被德国和日本使用^[15]。

马鼻疽曾是全球分布的疫病。20 世纪初，美国、加拿大和英国等许多国家根据细菌学、病理学和临床表现实施了严格的控制方案，从而根除了该疾病。如今，在亚洲和中东的部分地区、北非和中南美洲偶尔会发生暴发或出现个例。该疾病被认为是印度、伊拉克、蒙古、巴基斯坦和巴西各地区的地区病^[14]。对于分子流行病学，常用的方法包括单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）分型和全基因组多位点序列

分型（Complete Genome Multilocus Sequence Typing, cgMLST）。通过全基因组测序比对，阐明各地流行菌株基因型的多样性，并对疾病的流行情况有更清晰的了解和防范^[16]。Girault, G^[17]等人设计了一种高分辨率熔融方法，基于 SNP 建立了 45 株鼻疽杆菌的遗传进化树，将其分为 3 个谱系和 12 个分支、次分支、集群。2021 年 5 月，尼泊尔首次向 WOAHI 通报了马鼻疽疫情，通过 SNP 建立发育树发现分离株与印度和巴基斯坦菌株在同一分支上。印度与尼泊尔两国之间有一段不受控制的开放边界，随着马鼻疽在印度的爆发，通过非法贸易导致了该病在尼泊尔的传播与流行^[18]。

1.1.2. 马鼻疽杆菌致病机制

不同伯克霍尔德氏菌属的细菌的致病机制各不相同，但对宿主上皮细胞的粘附和侵袭是感染过程中的重要步骤，主要取决于整体毒力。马鼻疽杆菌是一种兼性细胞内病原体，为了成功感染宿主细胞，鼻疽杆菌依靠众多毒力因子和机制来完成对宿主的入侵和扩散^[19]。研究发现鼻疽杆菌毒力相关基因主要包括胞外荚膜多糖、脂多糖、IV 型菌毛以及 III 型（植物和动物样）和 VI 型分泌系统的基因，并且大多数分泌系统和毒力相关基因都位于 2 号染色体上，而参与代谢、荚膜和脂多糖生物合成的基因则位于 1 号染色体上。对鼻疽杆菌胞内特征的研究主要集中在 III 型分泌系统（T3SS），这可能是对宿主入侵并在宿主体内存活和逃逸的重要途径。鼻疽杆菌携带两个编码 TTSSs 的染色体区域：一个与动物样 TTSS（BsaT3SS）相似，另一个与在植物病原体中发现的 TTSS 相似^[20]。鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌在宿主上皮细胞和吞噬细胞内入侵和复制的方式相似，当细菌被宿主细胞摄取后（通过吞噬或入侵），进入初级吞噬体。在吞噬体成熟过程中，BsaT3SS（III 型分泌系统）效应物的分泌导致液泡膜的破坏，从而促进细菌逃逸到宿主细胞质中。一旦游离，细菌激活病原体识别受体（PRRs）和 BimA 依赖的肌动蛋白运动，并逃避宿主自噬。T6SS（VI 型分泌系统）效应子影响细菌的复制能力，促进宿主细胞肌动蛋白聚合，并诱导质膜（PM）融合。进入相邻细胞后，细菌逃离次级吞噬体，促进在宿主体内的进一步复制和扩散。最佳的细胞间扩散来自于以肌动蛋白为基础的膜突起和多核巨细胞的形成^[21]。

根据菌落生长形态可将细菌分为光滑型菌落、粗糙型菌落，光滑型和粗糙型菌落本质的区别在于菌体表面脂多糖（LPS）结构的差异。脂多糖由脂质 A、核心寡糖和 O-抗原多糖链组成，O-抗原是一个种结构最多多样化的脂多糖成分，通过 O-抗原的差异可将类鼻疽伯克霍尔德氏菌脂多糖分为 A、B、B₂ 和 R 四种类型，其中 A、B、B₂ 型为光滑型，R 型为粗糙型^[22]。一些研究已经证明鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌具有相似的脂多糖结构和抗原特性^[23]。研究表明菌体脂多糖是马鼻疽杆菌重要的保护性抗原，可分为光滑-A 型和粗糙型^[24]。光滑-A 型具有典型的阶梯条带模式，而粗糙型没有阶梯

条带^[25]。光滑表型的菌株对 30 % 人类血清表现出一定的抵抗力能够存活，而粗糙型菌株较为敏感不能存活^[26]，这也解释了光滑型菌株表现出更强的致病力。哺乳动物宿主细胞对 LPS 抗原的识别是通过与 Toll 样受体 4 (TLR4) 复合物的相互作用来介导的。当单核细胞和巨噬细胞在被 LPS 通过 TLR4 复合物激活时，会分泌促炎细胞因子，如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6，从而增强对入侵微生物的先天免疫反应。而过量的这些细胞因子可导致宿主多器官衰竭、休克和死亡^[24,27]。脂多糖作为在感染早期被宿主识别并激起免疫应答的优势抗原之一，可用作候选疫苗的开发。

1.1.3. 马鼻疽疫苗研究进展

鼻疽杆菌对多种抗生素具有耐药性，包括许多 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类和多混合物类，这使得疾病的治疗变得困难。调查发现，即使采用积极的抗生素治疗，在泰国东北部的病死率也达 50 %，澳大利亚为 19 %^[28]。缺乏针对这些细菌的有效治疗方法，突出了有效疫苗的必要性。目前已进行了许多疫苗研究，但迄今为止仍没有获得批准的疫苗^[29]。疫苗研发进展表明，由亚单位或弱毒活毒株组成的疫苗对鼻疽杆菌是最有效的^[30]。Gregory, Anthony E^[31]等人提出了一种功能化的金纳米颗粒 (AuNPs) 连接糖结合疫苗。将 AuNPs 与三种不同的蛋白载体 (TetHc、Hcp1 和 FliC) 中的一种共价偶联，然后偶联从非毒性克隆亲属泰国芽孢杆菌纯化的 LPS。与单独的 LPS 相比，糖偶联的 LPS 产生了更显著的抗体滴度，并且提高了吸入型攻毒模型小鼠的保护力。此外重组 Hcp 蛋白、LPS、截断的重组蛋白 LolC 和 PotF、外膜囊泡形成的亚单位疫苗也体现出良好的保护力，安全性良好，但他们在细胞介导的免疫过程中还不能提供更好的免疫保护力^[30]。Mott 等人通过马鼻疽杆菌 ATCC 23344 *tonB* 基因中未标记的阅读框内缺失，构建了一个铁转运缺陷菌株。BALB/c 小鼠经 1.5×10^5 和 1.5×10^4 CFU 免疫后，分别用鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌进行攻毒，存活率分别为 100 % 和 75 %，对未来开发马鼻疽和类鼻疽的疫苗显示出巨大的潜力^[13]，其安全性还有待进一步评价。然而，确定能够提供长期和完全保护以及杀菌免疫的候选疫苗仍然是一个需要进一步攻克的艰巨目标。

1.1.4. 马鼻疽检测方法研究进展

通过加强血液检测、全面宰杀阳性动物和严格的贸易限制等对策，西方大多数国家现已根除了这种疾病，然而，在亚洲、中东、中美洲和南美洲，马鼻疽仍然流行^[32]。我国于 2005 年实现了马鼻疽的消灭计划，但在 2018 年 8 月，重庆市沙坪坝区发生马鼻疽疫情^[33]，加大对马鼻疽的检疫力度具有非常重要的现实意义。

1.1.4.1.病原学检测方法

从临床样本中分离和鉴定鼻疽杆菌是诊断马鼻疽的金标准方法^[34]。鼻疽杆菌可从患病动物未破损或未受污染的病灶、淋巴结、皮肤结节和血液中分离，含 3 %甘油的脑心浸润琼脂，可用来大量培养鼻疽杆菌，通过常规的表型和生化反应可以对鼻疽杆菌进行鉴定^[35,36]。Kinoshita Y^[37]等人开发了一种名为 BM 的选择性琼脂培养基，它可以鉴别伯克霍尔德氏菌属和其他种类的细菌，鼻疽杆菌大多能在 48 h 内生长良好，形成圆形、紫色、光滑、大于 1 mm 的菌落。由于细菌在标准培养基上的生长速度缓慢，培养耗时长，不容易从临床标本中分离出来。同时，在无菌环境中采集的样品，马鼻疽杆菌很容易被其他细菌过度生长，不作为马鼻疽诊断的首选方法之一。

1.1.4.2.分子检测技术

1.1.4.2.1.聚合酶链式反应

对于鼻疽杆菌的分离鉴定，建立了不同的聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）检测方法。Yingst SL^[38]等人通过比较 PCR 技术、细菌培养和组织病理学技术三种诊断方法，发现 PCR 不仅可以进行快速诊断且对组织的损伤较小，有可能用于快速暴发性疾病的诊断。Schmoock G^[39]等人利用鼻疽杆菌趋化性 motB 蛋白（由鞭毛运动基因 motB 编码）的移码突变设计了一种用荧光标记引物的传统的双链 PCR 方法，该方法可以明确区分鼻疽杆菌和类鼻疽伯克菌。Zakharova I^[40]等人开发一种可以鉴别类鼻疽伯克菌、鼻疽杆菌和泰国芽孢杆菌的多重 PCR，可检测 6023 - 9561 个基因组当量，并具有较高敏感性。Janse I^[41]等人建立了一种检测致病性伯克霍尔德氏菌的单反应四重 qPCR 方法，其中包括 DNA 提取和扩增的内控标记，使用多拷贝签名序列允许每次反应检测不到 1 个基因组当量，该方法可区分鼻疽杆菌和类鼻疽伯克菌。Laroucau K^[42]等人用实时荧光定量 PCR 对由 PCR 检测结果为阴性的马匹检测结果显示为阳性，并结合多位点序列分型（Multilocus Sequence Typing, MLST）和 SNP 的基因分型方法，提出了使用 PCR 系统进行马鼻疽分子诊断的建议，特别是在鼻疽菌株尚未完全被遗传特征化的地区。PCR 和实时荧光定量 PCR 的检测需要精密的仪器和昂贵的试剂，而在偏远的马鼻疽流行地区往往资源有限，缺乏这些仪器和试剂，未能得到广泛推广。

1.1.4.2.2.环介导等温扩增技术

环介导等温扩增（Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP）由 Notom 等人于 2000 年首次提出，是一种新型核酸扩增技术^[43]。Mirzai S^[44]等人针对整合酶基因簇设计了一组 6 个特异性引物用于 LAMP 试验，在 63 °C 下 60 min 具有较高的特异性和

敏感性，可用于检测马鼻疽杆菌和早期诊断马鼻疽。Pal V^[36]等人建立了一种实时 LAMP，该方法对马鼻疽杆菌具有高度特异性，不会和其他细菌菌株发生交叉反应。Saxena A^[45]等人也建立了一种实时 LAMP 技术，灵敏度高，可检测出 ≥ 250 fg 的马鼻疽杆菌基因组 DNA 和 ≥ 100 个含有目标 DNA 序列的重组质粒。该方法有望成为资源有限马鼻疽流行地区替代 PCR 的更便捷的检测技术。但 Shchit IY^[46]等人指出 LAMP 技术和实时荧光定量 PCR 技术相比，由于鼻疽杆菌基因组中存在丰富的 G-C 区域，以及在等温条件下出现二级结构，其重复性不如实时荧光定量 PCR。

重组酶聚合酶扩增（Recombinase Polymerase Amplification, RPA）是一种新型的等温扩增方法，可以检测特定的 DNA 或 RNA，其扩增时间短（5-20 min），具有较高的灵敏度（小于 50 fg DNA），操作简单所需仪器少^[47]。Saxena A^[48]等人开发了一种重组酶聚合酶扩增-侧流技术，用于检测马鼻疽的早期感染。该方法并具有高灵敏度、高特异性，可以将鼻疽杆菌和类鼻疽伯克菌区分开，并且操作简单、快速，不需要复杂的仪器，适用于偏远地区的现场诊断。

1.1.4.3.鼻疽菌素试验

鼻疽菌素是从鼻疽杆菌中提取的水溶性蛋白质，诊断时需将鼻疽菌素抗原注射到马体内中从而引发变态反应。鼻疽菌素试验是诊断鼻疽病最常用的试验，特别是在该病的临床和晚期病例中，包括鼻疽菌素点眼法、鼻疽菌素皮下注射法和鼻疽菌素眼睑皮内注射法，其中鼻疽菌素点眼法常用于大规模马匹的检疫工作，在诊断急性和开放性鼻疽方面具有较高应用价值^[49]。目前，眼睑皮内试验已很大程度上取代了点眼和皮下试验，用结核菌素注射器将 0.1 mL 的鼻疽菌素注射至下眼睑皮内，于 48 h 判定结果，阳性反应包括眼睑的明显水肿、眼睑痉挛以及严重的脓性结膜炎^[50]。WOAH 考虑到动物福利问题，不推荐使用该方法^[51]。该方法也存在检测耗时较长，需要专业人员进行操作以及出现假阳性结果等不足之处^[37]。

1.1.4.4.血清学诊断

1.1.4.4.1.补体结合试验

补体结合试验（Complement fixation test, CFT）是经典的抗原、抗体检测方法，具有较高的灵敏度和特异性，可用于检测某些病毒、细菌、立克次体、钩端螺旋体感染并对虫媒病毒、埃可病毒等进行分型，也可测定自身抗体、某些蛋白质、酶或激素等，是应用较广泛的试验之一^[52]。2014 年 WOAH 在制定马鼻疽诊断标准中考虑到动物福利的因素不推荐使用鼻疽菌素点眼试验，将补体结合试验列为国际贸易指定首选试验之一^[53]。该试验主要是根据抗原抗体特异性结合从而对补体进行消耗的原理来进行诊断。众

所周知，该检测具有很高的灵敏度，但用这种方法检测未感染马鼻疽的较为瘦弱的马时极容易出现马腺疫病或者马流感等的阳性交叉反应。这些假阳性结果对动物及其产品的国际贸易造成不必要的限制，并给马主和马业造成经济损失^[51,52]。

1.1.4.4.2.酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附法（Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA）是 WOAHA 推荐的用于马鼻疽的诊断方法，并指出使用抗鼻疽杆菌 LPS 的单克隆抗体以及以鼻疽杆菌作为抗原开发的竞争 ELISA（C-ELISA），在识别临床病例中显示出比补体结合试验具有更高的灵敏度。有研究对酶联免疫吸附试验、补体结合试验、琼脂免疫扩散试验和血凝试验等方法进行比较的结果显示，ELISA 与临床马鼻疽确诊病例符合率达到 100%，而其他试验仅有 90.9% 的符合率，因此，ELISA 能够作为马鼻疽常规采用的高灵敏度诊断方法^[56]。Wernery U^[57]等人提出了针对马鼻疽杆菌的脂多糖的单克隆抗体，并开发了用于马鼻疽杆菌感染的 C-ELISA。结果表明该方法能鉴别鼻疽杆菌属和其他属别的细菌，但不能区分马鼻疽杆菌和类鼻疽伯克菌。Singh S^[58]等人提出了基于重组截断马鼻疽杆菌胞内运动 A（BimA）蛋白的间接 ELISA 并被报道用于马鼻疽的诊断，其灵敏度和特异性分别可达 100% 和 98.88%。该方法操作简单，时间短，结果准确，受人为因素干扰少，适用于大规模的检测。Singha H^[59]等人开发了基于重组蛋白 TssB 的间接 ELISA，其敏感性和特异性分别为 99.7% 和 100%，指出 TssB 蛋白作为马鼻疽血清学诊断抗原的巨大潜力，为马鼻疽提供了更安全、更快速、更高效的血清学诊断方法。Pal V^[60]等人发现两种重组蛋白 0375H 和 0375TH，用他们作为间接 ELISA 的诊断抗原，表现出 100% 的敏感性和特异性，并且与类鼻疽伯克菌无交叉反应。Elschner MC^[61]等人对比双抗原夹心 ELISA 方法和补体结合试验发现，其特异性（99.8%）高于 CFT（97.0%），并且具有很好的敏感性，可作为马匹贸易中血清学检测可行的替代方法。单克隆抗体有特异性强、灵敏度高等特点，将其应用在 ELISA 检测中，可提高特异性和灵敏性。Sprague LD^[62]等人比较了 CFT、间接 ELISA、C-ELISA 三种方法对马鼻疽的敏感性和特异性。把福尔马林处理过的鼻疽杆菌菌体作为抗原，结合鼠源性单克隆抗体技术，以筛选出的单抗建立 C-ELISA 检测方法具有非常好的敏感性和特异性。为了避免假阳性结果，建议将 CFT 和 C-ELISA 结合使用。

1.1.4.4.3.虎红平板凝集试验

虎红平板凝集试验（Rose Bengal Plate test, RBT）是一种使用孟加拉玫瑰将热灭活菌悬液进行染色的凝集试验。这是一种快速简单的方法，但需要从马鼻疽杆菌培养物中纯化抗原^[63]。RBT 具有和鼻疽菌素试验同等的特异性（约 100%），但敏感性高于鼻疽菌素试验，RBT 的敏感性约为 90%，鼻疽菌素试验的敏感性为 75%。该测试所需设

备简单, 2 min 内就能得出结果, 可以在现场条件下进行。鉴于 RBT 操作简单、快速、准确性高, 可作为野外条件下异指周围动物鼻疽病诊断的一种补充试验^[64]。然而, 由于在目前的研究中仍使用了全菌抗原, 因此有必要使用单一纯化的抗原 (荚膜抗原或脂多糖) 进一步评估该试验, 以尽量减少在补体结合试验中观察到的假阳性现象^[65]。

1.1.4.4.4. 免疫印迹试验

蛋白免疫印迹法 (Western blot, WB) 在许多科学研究领域中得到广泛应用。Elschner MC^[55]等人利用含有三株鼻疽伯克霍尔德菌抗原的部分纯化脂多糖, 建立了一种 WB 检测方法, 具有较高敏感性和特异性, 并克服了 CFT 假阳性的不足之处。Shakibamehr N^[66]等人设计并优化了 84 例马鼻疽血清的免疫印迹检测方法, 并将 ELISA 和 CFT 与 WB 的敏感性和特异性进行了比较, 结果显示 CFT、WB、ELISA 的敏感性和特异性分别为 (95.7 %, 98.5 %)、(95 %, 100 %) 和 (85 %, 100 %), 表明 WB 有一定的开发价值。

2. 研究目的和意义

马鼻疽是一种高度传染且危害较大的人兽共患病, 可感染马、驴、骡等多种经济动物, 目前缺乏疫苗和有效治疗方案。鉴于鼻疽杆菌不易从临床样本分离并难以通过临床症状确诊, 开发不具宿主物种差异并且快速诊断方法显得尤为重要。本研究对中国早期分离的三株鼻疽杆菌进行了系统鉴定, 包括培养特性、生化鉴定、全基因组测序、毒力测定和免疫原性试验, 丰富了国内马鼻疽菌株物种信息库, 对该病的研究提供新的试验材料。基于生物安全考虑, 选择毒力最弱的 CVCC67003 为试验材料, 利用小鼠杂交瘤技术制备单克隆抗体。利用筛选出的单抗, 通过优化试验条件建立马鼻疽 C-ELISA 抗体检测方法, 为我国马鼻疽的诊断和防控提供了重要的技术储备。

第一章 马鼻疽杆菌菌种鉴定

1.材料与amp;方法

1.1.试验材料

1.1.1.菌株和实验动物

鼻疽杆菌 CVCC6001、 CVCC67002、 CVCC67003 株由国家兽医微生物菌（毒）种保藏中心分离保存。 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究被中国兽医药品监察所实验动物福利与动物实验伦理委员会审核通过，编号分别为中监所（福） 2023 第 00281 号、中监所（福） 2024 第 00023 号。试验期间小鼠可以自由饮水和采食，适应性饲养一周后开展试验。

1.1.2.试剂耗材

试验所需试剂见表 1。

表 1 主要试剂

Table 1 Main reagents	
试剂名称	生产商
Reagent name	Manufacturer
TSA 培养基	美国 BD 公司
BHI 培养基	北京路桥技术股份有限公司
4%甘油琼脂培养基	北京中海生物科技有限公司
SIM 动力培养基	北京索莱宝科技有限公司
革兰氏染色试剂	北京索莱宝科技有限公司
4%组织细胞固定液	北京索莱宝科技有限公司
HE 染色试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	北京索莱宝科技有限公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
甘油	国药集团化学试剂有限公司
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司

表 1 主要试剂 (续表)

Table 1 Main reagents(Continued form)	
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司
E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit	OMEGA 公司
12.5% SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒	北京博泰斯生物技术有限公司
三色预染蛋白 Marker	北京博泰斯生物技术有限公司
API 20E 生化鉴定试剂盒	生物梅里埃法国股份有限公司
3%过氧化氢	青岛日水生物技术有限公司
LPS 提取试剂盒	韩国 iNtRON 生物技术公司

1.1.3. 试验仪器

试验期间常用仪器见表 2。

表 2 主要仪器与设备

Table 2 Main instruments and equipment	
设备名称	生产商
Equipment name	Manufacturer
MCO-18AC 型二氧化碳恒温培养箱	北京奥龙万兴科技有限公司
低速离心机	上海安亭科学仪器有限公司
冷冻型高通量组织研磨器	宁波新芝生物科技股份有限公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯光学技术公司
立式压力蒸汽灭菌器	重庆雅马拓科技有限公司
3-18K 高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
MDF-C8V1 型 -80 冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
DW-25L262 型 -20 冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
HTC-390 型 4℃冰柜	青岛海尔特种电器有限公司
NU-425-600E 型 II 级生物安全柜	美国 Nuair 公司
Specific Max190 全波长酶标仪	Molecular Devices 公司
DEM-III 型自动酶标洗板机	北京拓普分析仪器有限公司

表 2 主要仪器与设备（续表）

Table 2 Main instruments and equipment(Continued form)

Bio-Rad GelDoc XR+ 型凝胶成像系统	美国 BIO-RAD 公司
SK-O330-Pro LED 数控圆周摇床	北京大龙兴创实验仪器有限公司

1.2.方法

1.2.1.培养特性和生化鉴定

1.2.1.1.培养特性

将冻干菌种 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 分别用无菌生理盐水制备细菌悬液，悬液在 4 %甘油琼脂培养基上培养，37 °C 孵育 48 h。挑取单菌落进行传代培养，37 °C 孵育 24 h。用接种环挑取单个菌落在含 4 %甘油 TSA 培养基上进行转接，37 °C 培养 24 h 后观察菌落形态和生长特点。

1.2.1.2.运动性鉴定

将在含 4 %甘油 TSA 培养基上生长的三株菌，挑取单菌落在 SIM 动力培养基上进行穿刺培养，观察三株菌是否在 SIM 培养基中沿着穿刺线生长，并设置类鼻疽伯克霍尔德氏菌作为对照。

1.2.1.3.生化鉴定

将复苏的三株菌在含 4 %甘油 TSA 培养基上进行平板划线培养，对马鼻疽伯克霍尔德氏菌的代表性菌落进行革兰氏染色、过氧化氢酶试验。根据 API 20E 生化鉴定试剂盒说明书，挑取鼻疽杆菌纯培养物单菌落加入到 5 mL 灭菌生理盐水中，震荡混匀。用灭菌吸管将菌悬液分别加到测试条中，每条测试条由 20 个含干燥底物的微量小管组成，将测试条放在含有无菌蒸馏水的孵育盒内置于 37 °C 温箱孵育 18-24 h 后进行结果判读。

1.2.1.4.三株菌脂多糖类型进行鉴定

挑取单菌落在含 4 %甘油 TSA 培养基上富集，37 °C 培养 48 h，用无菌生理盐水将菌苔洗下，于水浴锅中 99 °C 灭活 30 min。将灭活的菌 8000 r/min 离心 30 min，用无菌生理盐水洗涤 3 遍。使用 LPS 提取试剂盒^[57]分别提取和纯化三株菌的 LPS。三株菌提取步骤一致，具体步骤如下：

(1)收集在含 4 %甘油 TSA 培养基上于 37 °C 下培养 2 天的菌体，并在 20 mL 裂解缓冲液中剧烈震荡，使其充分裂解。

(2)再加入 4 mL 氯仿剧烈涡旋溶解，在室温下孵育 5 min。

(3)将溶液在 4 °C，13000 r/min 离心 10 min。

(4)将顶部的水相层转移到一个干净的离心管中，加入两倍体积的纯化缓冲液。样品在 -20 °C下孵育 10 min，4 °C，13000 r/min 离心 15 min。

(5)弃去上层液体，用 70 %乙醇洗涤 LPS 沉淀，4 °C，13000 r/min 离心 3 min。

(6)弃去上层 70 %乙醇，晾干。加入 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH=8.0)，涡旋煮沸 2 min。提取的 LPS 进一步用每 1 µg 的 LPS 用 2.5 µg 的蛋白酶 K 在 50 °C下处理 30 min，以去除污染蛋白。通过 SDS-PAGE 和银染试剂盒鉴定 LPS 及其纯度。

SDS-PAGE 具体步骤如下：

(1)将提取的 LPS 煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳。使用一步法 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒配置两块 12.5 % 的 SDS-PAGE 凝胶，每孔上样量为 10 µL，并设置蛋白 Marker 对照。先以 80 v 恒压电泳 30 min，待条带在分离胶处聚集到同一水平位置时，调整电压为 120 v 电泳 45 min。

(2)电泳结束后，一块胶用考马斯亮蓝染液进行染色 2 h 后脱色观察。

银染试剂盒鉴定 LPS 具体方法如下：

(1)SDS-PAGE 电泳结束的另一块胶先用含 0.7 %高碘酸、40 %乙醇、5 %乙酸的固定液 200 mL 于室温氧化固定 20 min。

(2)蒸馏水清洗 3 次，每次 5 min，倒掉蒸馏水。

(3)将 4 mL 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 56 mL 的 1.0 M 的 NaOH 与 200mL 的蒸馏水混合，加入 20 %的 AgNO_3 10 mL（逐滴加入并不断搅拌），蒸馏水定容至 300mL，以配好的染色液染色 10 min。

(4)蒸馏水洗 3 次，每次 5 min，倒掉蒸馏水。

(5)将 0.01 g 的柠檬酸溶解于 200 mL 的蒸馏水，加入 0.1 mL 的 37 %的甲醛，以配好的液体显影 5~10 min。

(6)视显色颜色和背景颜色变化情况终止，以 10 %的乙酸作用 1 min。染色液和显影液需要现用现配。

(7)拍照记录结果。

1.2.2.三株菌全基因组测序

将三株菌提取核酸送至诺禾致源科技股份有限公司进行全基因组测序及分析。用于建树的 28 株马鼻疽杆菌全基因组序列基本信息见表 3。

表 3 28 株鼻疽杆菌参考菌株全基因组信息

Table 3 Whole genome information of 28 reference strains of *Burkholderia mallei*

菌株	分离地	分离/收藏时间	Gen Bank 序列号
6	土耳其	2014	GCA_000755845.1
11	土耳其	2015	GCA_000959405.1
NCTC 10247	土耳其	2014	GCA_000762285.1
NCTC 10247	土耳其	2007	GCA_000015625.1
Turkey1	土耳其	2017	GCA_002345985.1
Turkey10	土耳其	2017	GCA_002346005.1
Turkey2	土耳其	2017	GCA_002346025.1
Turkey3	土耳其	2017	GCA_002346065.1
Turkey4	土耳其	2017	GCA_002346085.1
Turkey5	土耳其	2017	GCA_002346105.1
Turkey6	土耳其	2017	GCA_002346125.1
Turkey7	土耳其	2017	GCA_002346145.1
Turkey8	土耳其	2017	GCA_002346165.1
Turkey9	土耳其	2017	GCA_002346185.1
NCTC 10229	匈牙利	2007	GCA_000015605.1
2000031063	匈牙利	2014	GCA_000756025.1
2002734299	匈牙利	2015	GCA_000959165.1
23344	缅甸	2014	GCA_000755865.1
FMH 23344	缅甸	2014	GCA_000755785.1
FMH	美国	2017	GCA_002346045.1
JHU	美国	2017	GCA_002346205.1
2002734306	英国	2015	GCA_000959485.1
BMQ	印度	2014	GCA_000755885.1
India86-567-2	印度	2015	GCA_000959465.1
ATCC 23344	巴拿马	2005	GCA_000011705.1
Bahrain1	巴林	2016	GCA_001729545.1
SAVP1	未知	2007	GCA_000015465.1
34	未知	2022	GCA_939576165.1
2002721276	未知	2015	GCA_000959625.1

1.2.2.1.菌株培养及 DNA 的提取

将三株冻干菌株于 4 %甘油琼脂培养基上复苏，挑单菌落进行扩大培养，用生理盐水收集菌体，并于 99 °C水浴 30 min 进行灭活。采用 E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit 提取细菌 DNA。收获的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳检测，并通过 Qubit®2.0 荧光仪（热

科学)进行定量。

1.2.2.2.全基因组测序程序

每个样品取 1 μ g DNA 作为 DNA 样品制备的输入材料。使用 NEBNext®Ultra™DNA 文库准备试剂盒 (NEB, 美国) 生成测序文库, 并将索引代码添加到每个样本的属性序列中。即将 DNA 样本超声片段至 35 bp 大小, 然后将 DNA 片段末端抛光, 用全长适配器连接 Illumina 测序, 并进行进一步的 PCR 扩增。最后对 PCR 产物进行纯化 (AMPure XP 系统), 用安捷伦 2100 生物分析仪分析文库的大小分布, 实时荧光定量 PCR 定量, 并由北京诺禾致源生物信息技术有限公司用 Illumina NovaSeq PE150 进行测序, 获得原始数据。

1.2.2.3.基因组组成预测

基因组成分预测包括编码基因、重复序列、非编码 RNA、基因组岛、前噬菌体和聚类规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) 的预测。采用 GeneMarkS 程序来检测相关的编码基因; 用 RepeatMasker 对分散的重复序列进行预测, 串联重复序列采用 TRF (Tandem repeats finder) 进行分析; tRNA 由 tRNAscan-SE 方法进行预测, rRNA 由 rRNAmmer 进行分析, snRNA 由 Rfam 数据库预测进行预测; 用 IslandPath-DIOMB 程序对基因组岛进行预测; PHAST 用于原噬菌体的预测, CRISPR Finder 用于 CRISPR 鉴定。

1.2.2.4.基因组功能分析

使用 GO 数据库注释、KEGG 数据库注释、NR 数据库注释数据库对鼻疽杆菌基因功能进行预测。还包括分泌蛋白及 T3SS 效应蛋白预测、次级代谢基因簇分析、毒力或致病性分析 (细菌致病菌毒力因子注释、耐药基因注释)。

1.2.2.5.鼻疽杆菌的 SNP 检测及遗传进化分析

基于 SNP 分析构建生物遗传进化树, 并进行比较基因组分析。

1.2.3.CVCC67003 株比较基因组分析

根据生化 VP 试验、三株菌全基因组测序及遗传进化树分析结果显示, CVCC67003 菌株不同于其他菌株, 因此单独对此菌株进行比较基因组分析。参考菌株为研究最为广泛的具有代表性的 ATCC 23344, 详细信息见表 3。

1.2.3.1.SV 统计分析

使用 MUMmer 将 CVCC67003 和 ATCC 23344 两个基因组快速比对, 确定序列

的相对方向，并对基因组进行调整，对齐基因组起点。运用 LASTZ 软件进行全基因组比对。使用 chainNet 等软件包将比较零散的比对结果连接成更长的比对结果(如 chain、net 等形式)。根据新的比对块顺序排列关系和相对方向，查找出属于易位 (Translocation)、倒置 (Inversion) 和易位兼倒置 (Trans+Inver) 关系的比对块，再根据两个基因组上相邻比对块之间的距离关系确定比对块间的 SV 区域。

1.2.3.2.共线性分析

使用 MUMmer 软件对 CVCC67003 基因组和参考基因组 ATCC 23344 进行比对，确定了基因组间的大范围共线性关系。后使用 LASTZ 对区域间进行比对，确认局部位位置排列关系，并从中查找易位 (Translocation/Trans)，倒置 (Inversion/Inv) 和易位+倒置 (Trans+Inv) 的区域。

1.2.4.毒力测定

1.2.4.1.动物试验设计及分组

将 80 只小鼠分为 16 个组，三株不同的菌株分别设置 5 个不同剂量组，同时设置对照组，每组 5 只小鼠，详细信息见表 4。将三株菌冻干菌种在 4 %甘油琼脂上进行复苏后，挑取单菌落在含 4 %甘油的 TSA 培养基上划线于 37 °C 培养 24 h 后，挑取单菌落溶于 100 μL 生理盐水中振荡混匀，在含 4 %甘油的 TSA 培养基上进行涂板，37 °C 温箱培养 48 h 后，用脑心浸润培养基 (BHI) 分别洗脱三株菌种的培养物，倍比稀释后进行菌落计数。试验组通过滴鼻方式 0.02 mL/只，空白组滴鼻注入空白 BHI 培养液，0.02 mL/只。

表 4 不同菌株对小鼠的毒力测定试验

Table 4 Test of virulence of different strains on mice

组别	实验动物	接种剂量(CFU)	动物数量	接种方式
CVCC67001	雌性 BALB/c	3×10 ²	5	滴鼻，10 μL/鼻孔
		3×10 ³	5	
		3×10 ⁴	5	
		3×10 ⁵	5	
		3×10 ⁶	5	
CVCC67002	雌性 BALB/c	3×10 ²	5	滴鼻，10 μL/鼻孔

表 4 不同菌株对小鼠的毒力测定试验（续表）

Table 4 Test of virulence of different strains on mice(Continued form)

CVCC67002	雌性 BALB/c	3×10^3	5	滴鼻，10 μ L/鼻孔
		3×10^4	5	
		3×10^5	5	
		3×10^6	5	
		3×10^2	5	
CVCC67003	雌性 BALB/c	3×10^3	5	滴鼻，10 μ L/鼻孔
		3×10^4	5	
		3×10^5	5	
		3×10^6	5	
空白对照	雌性 BLAB/c	BHI 培养基	5	滴鼻，10 μ L/鼻孔

1.2.4.2.半数致死量测定

每日观察小鼠生存情况，记录三株菌实验小鼠死亡数量，通过寇式法（Karber 法）计算三株菌的半数致死量。公式: $LD_{50} = \lg^{-1}[X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$; X_m : 最大剂量的对数值; i : 相邻两组剂量对数值之差; P : 各组动物死亡率，用小数表示; ΣP : 各组动物死亡率之总和。

1.2.4.3.组织病理学观察

攻毒后 14 d，逐日观察小鼠的健康状态、被毛情况、精神状态、饮食，记录死亡情况。感染后第 14 d 解剖小鼠，肉眼观察肺脏、脾脏和肝脏的病变情况，取疑似有病变的肺、脾和肝用 4 % 的多聚甲醛固定 24 h 后，将肺、脾、肝脏组织转移到含 75 % 酒精的新的 EP 管内，4 °C 保存（可保存 1 个月）。将已在 75 % 酒精中浸泡 12 h 的肺、脾、肝脏组织取出，放置在洁净的平皿上。用刀片分别将组织切成厚度约为 3 mm 的组织块。按照实验室常规方法对组织进行脱水、浸蜡与包埋。切片厚度为 5 μ m。设定摊片温度为 37 °C，烤片温度为 58 °C。制备的切片用于后续的苏木精-伊红染色（HE 染色）。

苏木精-伊红染色。将制备好的石蜡切片按照 HE 染色试剂盒说明书，进行二甲苯脱蜡，50 %-100 % 浓度梯度乙醇水化，苏木精染细胞核 5 min，1 % 盐酸乙醇分化 1 min，伊红倒进倒出，浓度梯度的乙醇和二甲苯使切片脱水透明，中性树脂封片后待其自然晾干即可置于光学显微镜下拍照观察并记录肺、脾、肝脏组织病理学变化。

1.2.4.4.脾脏分菌情况

攻毒 14 天后剖解存活小鼠,无菌采集脾脏进行分菌。将脾脏加入 1 mL 无菌 PBS ,置于冷冻型高通量组织研磨器中研磨 2 min,进行梯度稀释后在含 4 % 甘油的 TSA 培养基上进行涂板。37 °C培养 48 h,进行菌落计数。

1.2.5.免疫原性试验

根据毒力试验结果,以 CVCC67003 株作为弱毒疫苗候选株进行初步免疫原性评价,将 30 只小鼠分为 3 组,即免疫一组(3×10^3 CFU)、免疫二组(3×10^4 CFU)、对照组(BHI),每组各 10 只小鼠。菌株培养及免疫、攻毒方式同毒力测定试验。根据毒力测试结果延长免疫时间,在免疫 28 天^[67,68]后无菌采取脾脏进行分菌($n=3$),观察菌体在体内的清除情况,并采集脾脏($n=2$)进行组织病理观察。并于第 28 天将毒性最强的 CVCC67002 株对剩余实验动物按照 3 倍 LD_{50} ^[69]进行攻毒,观察小鼠存活情况,计算存活率,评估免疫菌株对鼻疽杆菌的保护力。

1.2.6.数据处理

使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行生存曲线的绘制;使用 IBM SPSS Statistics 27.0.1 软件进行数据统计分析。

2.结果

2.1.培养特性及生化鉴定

三株菌分别在 4 %甘油 TSA 培养基上生长良好,形成圆形、光滑的乳白色菌落,见图 1。革兰氏染色均为阴性,见图 2。在 SIM 动力培养基上只沿着穿刺线生长,见图 3,与在培养基中呈弥散生长的类鼻疽相区别,说明鼻疽杆菌不具有运动性,这是能从培养特性与类鼻疽伯克霍尔德氏菌进行区分的特点。三株菌通过 API 20E 试剂盒进行初步生化反应鉴定,见图 4。CVCC67001、CVCC67002 两株菌反应结果完全一致,均表现为精氨酸水解反应、柠檬酸钠、硝酸盐还原反应、过氧化氢酶试验阳性,吲哚试验、VP 试验、明胶阴性。这与 Karimi, A^[64]的试验结果一致。CVCC67003 株 VP 试验阳性,生长过程中可利用葡萄糖生成丙酮酸,并将其转化为乙酰甲基甲醇,其余生化反应与其他两株菌一致。三株菌 LPS 银染结果见图 6,均具有典型的阶梯条带,表明三株菌均为光滑型菌株。

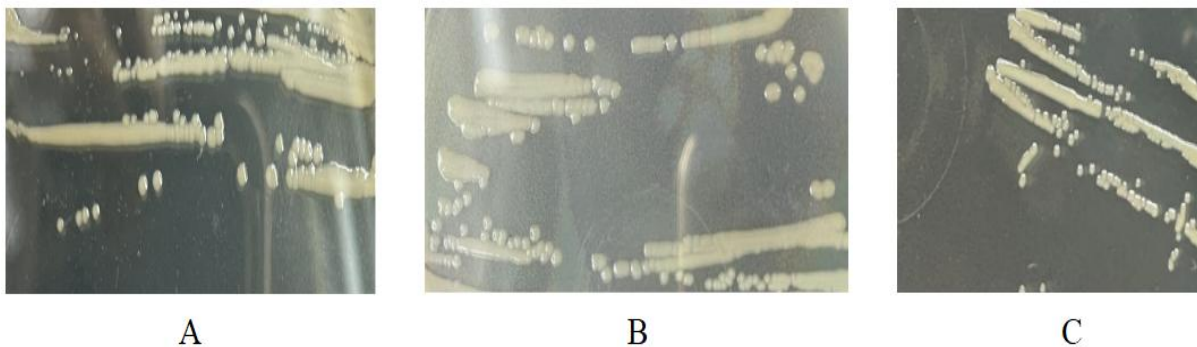


图 1 在含 4%甘油 TSA 培养基上生长情况

(A 为 CVCC67001 株; B 为 CVCC67002 株; C 为 CVCC67003 株)

Fig. 1 Growth on TSA medium containing 4% glycerin

(A is *B.mallei* CVCC67001; B was *B.mallei* CVCC67002 ; C is *B.mallei* CVCC67003)

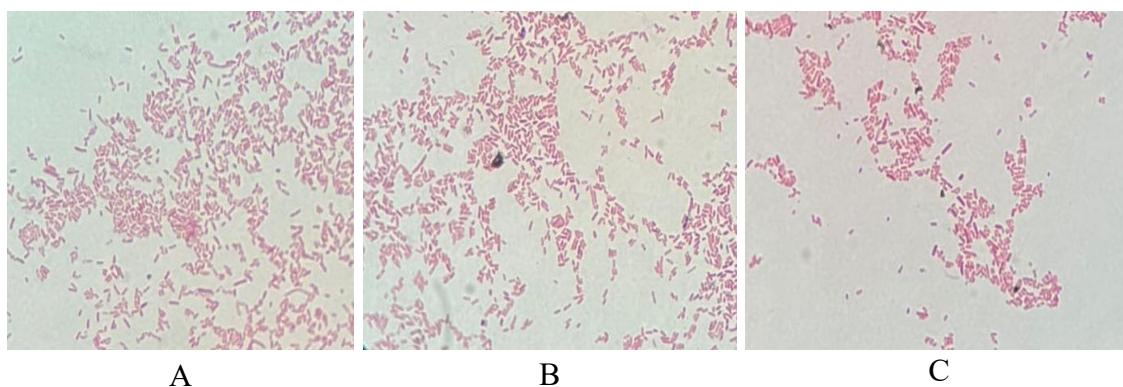


图 2 革兰氏染色结果(100×)

(A 为 CVCC67001 株; B 为 CVCC67002 株; C 为 CVCC67003 株)

Fig. 2 Result of Gram staining (100×)

(A is *B.mallei* CVCC67001; B is *B.mallei* CVCC67002 ; C is *B.mallei* CVCC67003)

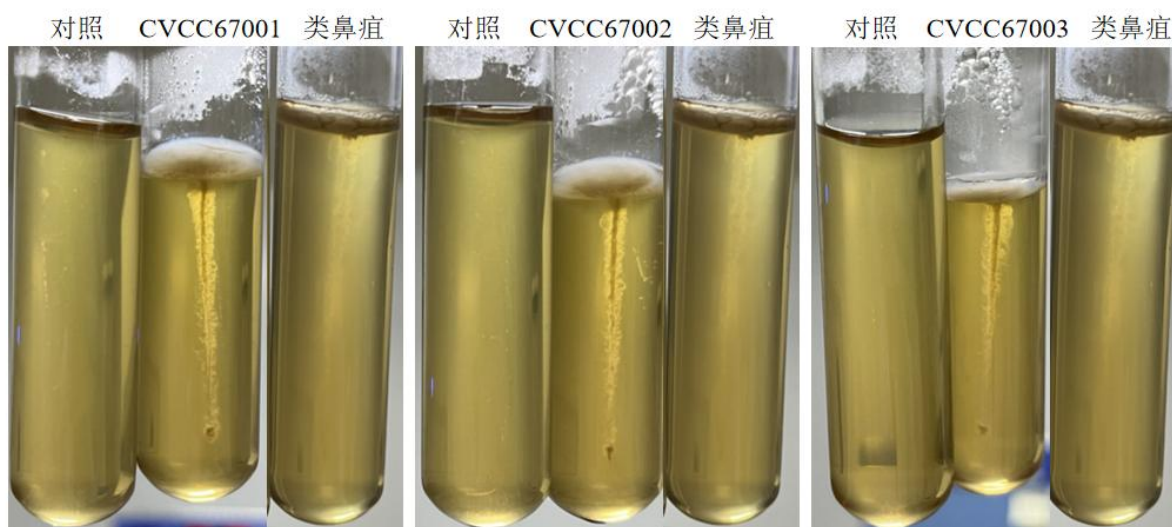


图 3 SIM 培养基生长情况

(A 为 CVCC67001 株; B 为 CVCC67002 株; C 为 CVCC67003 株)

Fig. 3 The growth of SIM medium

(A is *B. mallei* CVCC67001; B is *B. mallei* CVCC67002 ; C is *B. mallei* CVCC67003)



图 4 API 20E 生化鉴定结果

(-为阴性; +为阳性)

Fig. 4 Results of API 20E biochemical identification

(- Negative; + is positive)

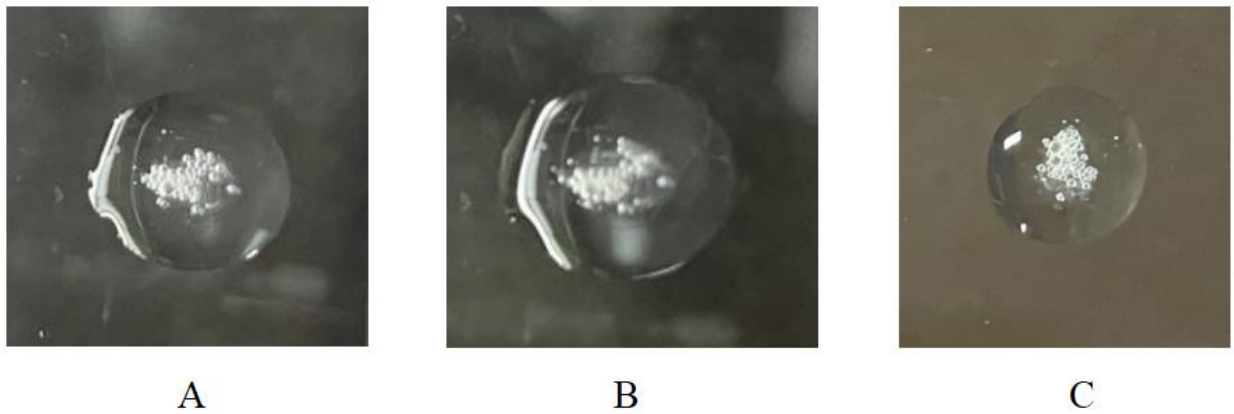


图 5 过氧化氢酶试验结果

(A 为 CVCC67001 株; B 为 CVCC67002 株; C 为 CVCC67003 株)

Fig. 5 Results of catalase experiment

(A is *B.mallei* CVCC67001; B is *B.mallei* CVCC67002 ; C is *B.mallei* CVCC67003)

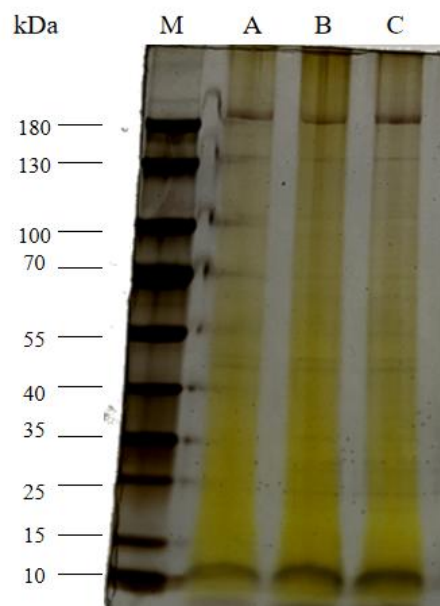


图 6 提取 LPS 银染图

(M 为蛋白 Marker; A 为 CVCC67001 株; B 为 CVCC67002 株; C 为 CVCC67003 株)

Fig. 6 LPS silver stain was extracted

(M is a protein Marker; A is *B.mallei* CVCC67001; B is *B.mallei* CVCC67002 ; C is *B.mallei* CVCC67003)

2.2.全基因组测序

2.2.1.全基因组组成成分

三株鼻疽杆菌 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 的基因组组分见表 5。其基因组大小基本相似，约为 5.76~5.84 Mb，比类鼻疽伯克霍尔德氏菌（7.2 Mb）和泰国鼻疽杆菌（6.7 Mb）都小^[11]；平均 G+C 含量约为 68.56 %；三株菌大约有 5076~5120 个编码基因，其平均长度约为 920 bp；平均编码基因占整个基因组序列为 81.61 %。

表 5 三株鼻疽杆菌的基因组组分

Table 5 Genomic components of three strains of <i>Burkholderia mallei</i>			
项目	数量/百分比		
	CVCC67001	CVCC67002	CVCC67003
基因组大小	5.78Mb	5.76Mb	5.84Mb
G+C 含量	68.54%	68.56%	68.59%
编码基因	5120	5099	5076
CRISPR	33	24	24
基因岛	9	10	11
tRNA	62	60	59
rRNA	8	8	8
sRNA	1	1	1
串联重复序列	2851	2791	2848
散在重复序列	162	165	167
前噬菌体	44	49	46
编码基因百分比	81.61%	81.44%	81.77%
平均基因大小	918bp	918bp	925bp

2.2.2.KEGG 功能注释分析

利用 KO（KEGG ORTHOLOG）系统将各个 KEGG 注释系统联系在一起，建立了一套完整 KO 注释的系统，可完成新测序物种的基因组或转录组的功能注释。三株菌 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 基因组中与代谢相关的基因分别有 3452、3479、3457 个。三株菌基因功能注释结果类似，见图 7，在此选取 CVCC67002 菌株结果进行分析，其中 2353 个基因在代谢通路上得到注释，12 个代谢通路中，氨基酸代谢相

关基因为 289 个，碳水化合物代谢相关的基因为 280 个。402 个基因在环境信息处理层面得到注释，其中与信号传导相关的基因为 138 个，与膜转运相关的基因 264 个。在所有注释通路中，耐药性通路包括阳离子抗菌肽（CAMP）、万古霉素、β-内酰胺类药物和抗叶酸耐药性通路。次级代谢物生物合成通路包括新霉素、卡那霉素和庆大霉素的合成，以及青霉素和头孢菌素、链霉素的合成。

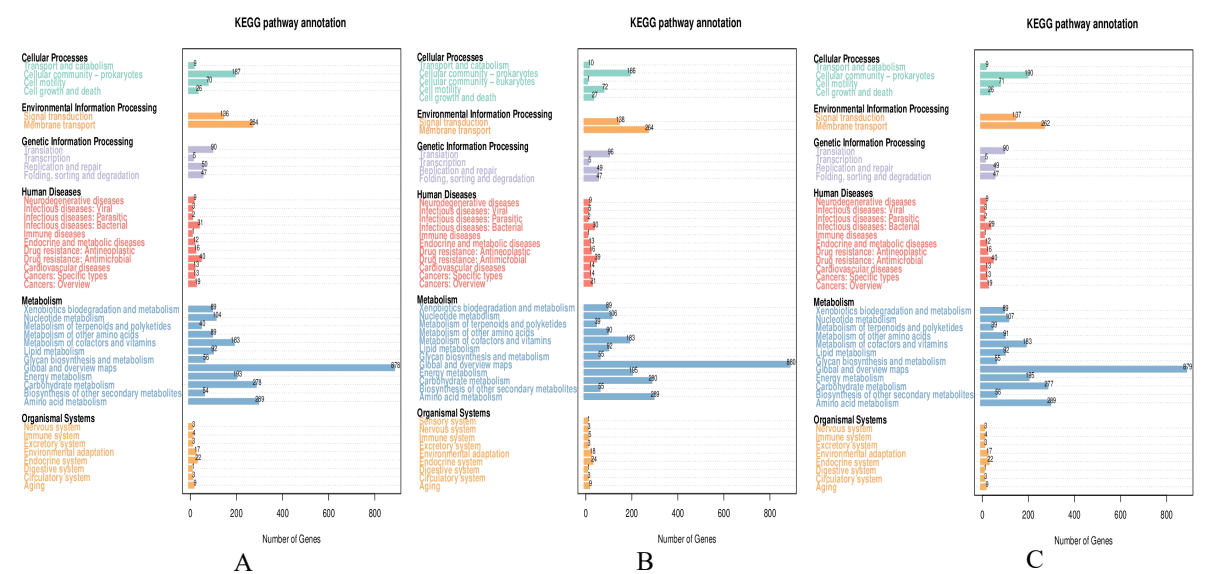


图 7 KEGG 功能注释结果

(A: 菌株 CVCC67001; B: 菌株 CVCC67002; C: 菌株 CVCC67003)

Fig. 7 KEGG function annotation results

(A: *B.mallei* CVCC67001; B: *B.mallei* CVCC67002 ; C: *B.mallei* CVCC67003)

2.2.3.GO 功能注释分析

GO 数据库分为三大类：细胞学组件（Cellular Component）；分子功能（Molecular Function）；生物学途径（Biological Process）。根据 GO 数据库分析，菌株 CCC67001、CVCC67002、CVCC67003 分别注释了 3385 个、3385 个、3384 个蛋白编码基因。三株菌注释结果相似，以 CVCC67002 株为例，如图 8，其中细胞学组件中基因参与数量最多的前三位是细胞、细胞部分和大分子复合物；分子功能中催化活性、结合和转运活性是基因数量最多的功能注释；生物学途径中得到最多注释的前三位是代谢过程、细胞过程和定位。

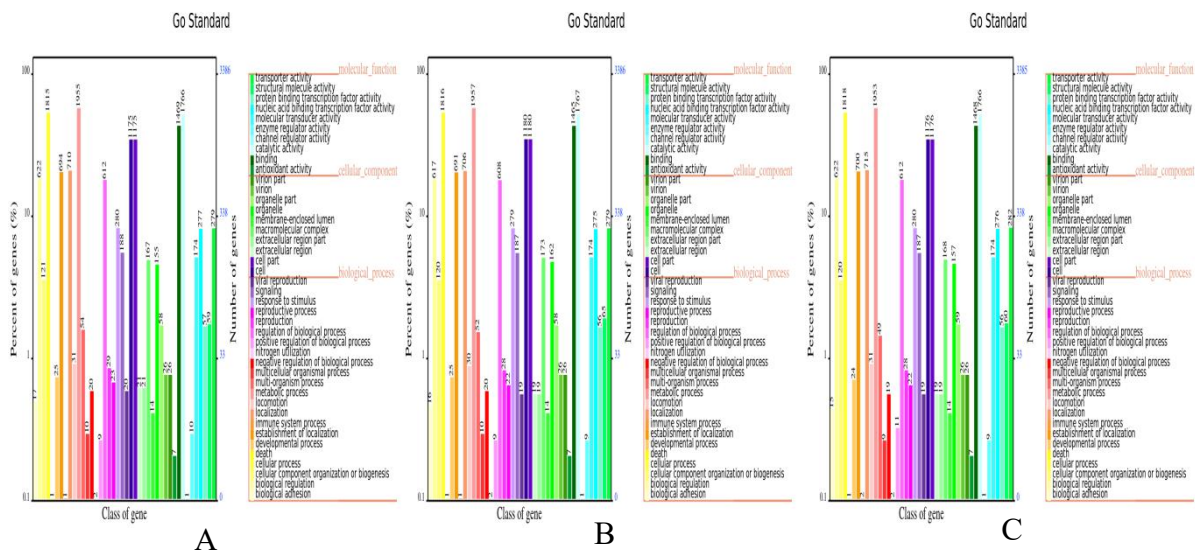


图 8 三株菌 GO 功能注释结果

(A: 菌株 CVCC67001; B: 菌株 CVCC67002; C: 菌株 CVCC67003)

Fig. 8 GO function annotation results of three strains

(A: *B. mallei* CVCC67001; B: *B. mallei* CVCC67002 ; C: *B. mallei* CVCC67003)

2.2.4. 耐药基因 (ARDB、CARD) 注释

ARDB 和 CARD 数据库可以找到耐药性相关基因的名称, 所耐受的抗生素种类等信息。ARDB 数据库中, 菌株 CVCC67001、CVCC67002 和 CVCC67003 分别检测到 7 个、6 个、7 个抗性基因, 包括氯霉素、杆菌肽以及氨基糖苷类、大环内酯类、吡啶黄素, 见图 9。CARD 数据库中, 菌株 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 分别含有 213、212、218 个抗性基因, 其中含有丰富的类鼻疽外膜孔道蛋白 38 基因 (Omp 38)、大环内酯类抗性基因 (Mac B) 和 adeL 抗性基因。

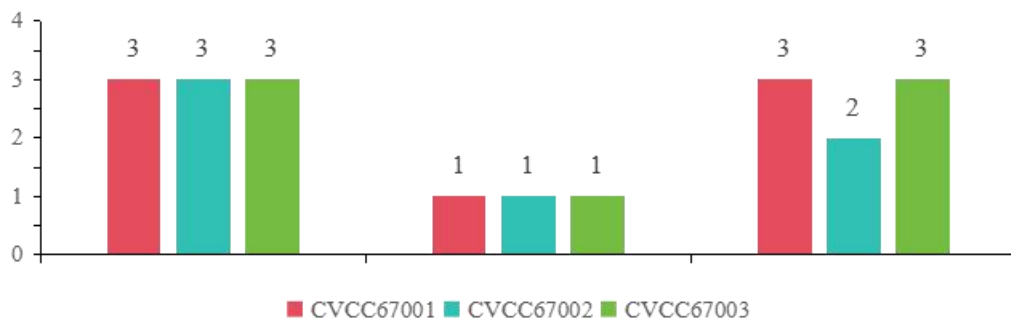


图 9 耐药性基因

Fig. 9 Resistance gene

2.2.5.分泌系统蛋白及 T3SS 效应蛋白预测

病原菌通过分泌系统 TNSS (type N secretion systems, 目前确定的有 7 种, I 型-VII 型) 将该类蛋白分泌至胞外或是宿主细胞中, 通过控制免疫应答反应以及细胞衰亡引起病理反应, 而其中革兰氏阴性菌的 T3SS 通常用来从分子水平研究病原菌, 感染机制, 毒力作用等, 是研究得比较多的分泌系统。如图 10, 三株菌均具有 T2SS、T3SS 和 T6SS 分泌系统效应蛋白, 其中预测为 T3SS 分泌系统效应蛋白的基因个数占总基因数的 3.09 %~3.22 %。而 CVCC67003 的 T6SS 分泌系统效应蛋白基因比 CVCC67001 和 CVCC67002 少 2 个, T3SS 分泌系统效应蛋白基因比 CVCC67001 和 CVCC67002 少 1 个。

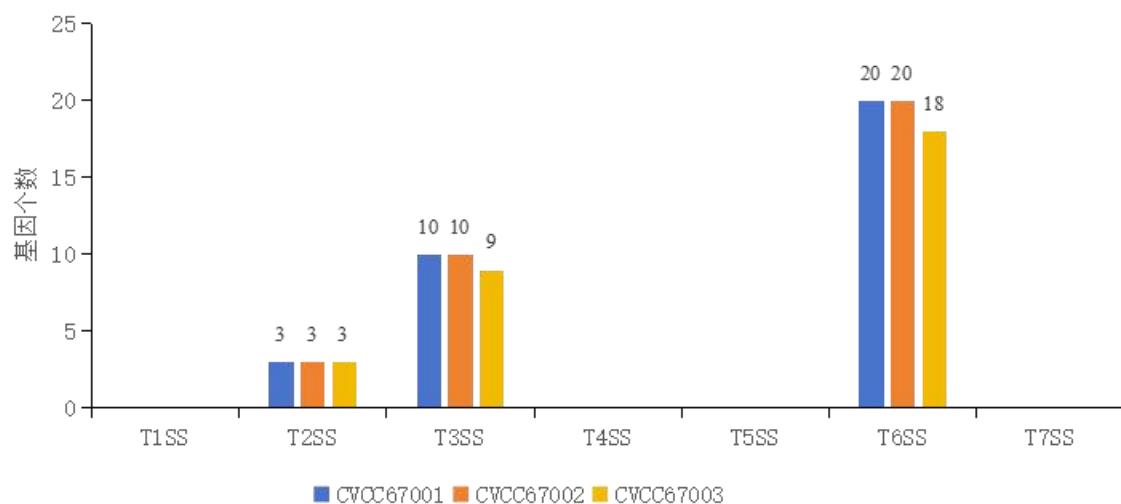


图 10 各类分泌系统相关蛋白情况

Fig. 10 Various secretory system related proteins

2.2.6.细菌致病菌毒力因子 (VFDB) 注释

VFDB 是致病细菌、衣原体和支原体的毒力因子数据库。三株菌 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 种分别发现了 553、545、552 个毒力基因, 其中以鞭毛基因、Bsa T3SS 基因和荚膜 I 型蛋白基因较为丰富。三株菌毒力因子分布趋势一致, 均含有 58 个鞭毛基因, CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 分别含有 48、40、41 个动物样病原 T3SS 基因, 均含有 26 个荚膜 I 型蛋白基因和 11 个 LPS 基因。见图 11。

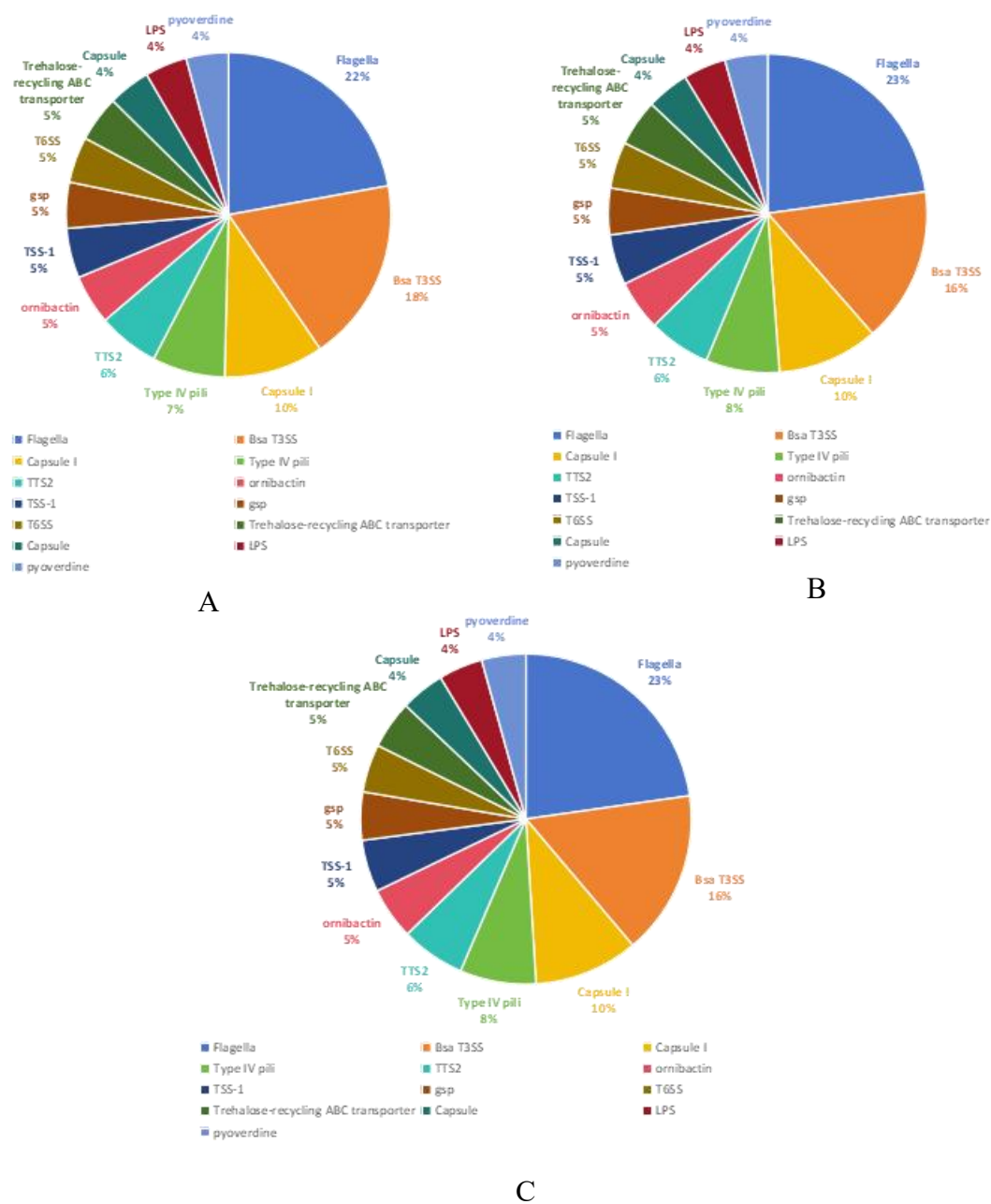


图 11 VFDB 注释分布图

(A: 菌株 CVCC67001; B: 菌株 CVCC67002; C: 菌株 CVCC67003)

Fig. 11 VFDB annotation distribution map

(A: *B.mallei* CVCC67001; B: *B.mallei* CVCC67002 ; C: *B.mallei* CVCC67003)

2.2.7.次级代谢基因簇分析

次级代谢产物是指微生物培养到生长后期通过代谢产生的物质，它往往具有一定的应用价值，对人类的生产和生活具有一定意义。因此通过 antiSMASH 程序对基因组进行预测，获得该菌株在基因组中基因簇分布情况，共预测到 14 个次级代谢产物合成相关的基因簇（见表 6），包括高丝氨酸内酯类（hserlactone）、聚酮合酶（PKS）、萜类（terpene）、非核糖体合成酶类（NRPS）、磷酸酯类（phosphonate）、细菌素类（bacteriocin）。菌株 CVCC67001、CVCC67003 分别含有 9 个和 8 个 trans-AT-PKS 基因，但菌株 CVCC67002 没有预测到；菌株 CVCC67003 预测到 44 个 NRPS-like 的合成基因簇，但其余两株不具有该次级代谢产物合成基因簇。NRPSs 是微生物合成生物学和药理活性的天然产物肽骨架的关键酶，NRPS-like 酶通常包括腺苷化（A）、硫化（T）和硫代酯酶（TE）结构域，与 NRPSs 相比，它们不含任何缩合结构域，通常催化 α -酮羧酸二聚化，为蛋白的进一步修饰提供了更多支架。

表 6 三株菌次级代谢产物合成基因簇预测

Table 6 Prediction of gene clusters for synthesis of secondary metabolites in three strains

Clusters	CVCC67001		CVCC67002		CVCC67003	
	Clusters number	Gene number	Clusters number	Gene number	Clusters number	Gene number
hglE-KS,terpene	1	37	1	24	1	37
PKS-like	1	12	1	12	1	12
hserlactone	2	40	2	40	2	33
Trans-AT-PKS-like	1	25	2	29	1	25
NRPS	4	88	4	87	4	88
Trans-AT-PKS	1	9	0	0	1	8
phosphonate	1	30	1	30	1	20
T1PKS	1	24	1	24	1	24
NRPS,T1PKS,trans	1	60	1	56	1	55
AT-PKS						
bacteriocin	2	16	2	15	2	15
terpene	3	53	3	54	3	51
NRPS,lassopeptide	1	39	1	39	1	39
NRPS-like	0	0	0	0	1	44

2.2.8.NR 数据库注释及亲缘进化树分析

NR 数据库注释结果中包含有物种信息，可作物种分类。根据 NR 数据库注释得到的物种情况如图 12 所示，有 2973 个基因注释为 *B.mallei*。

将分离的三株菌与 NCBI 数据库中已上传的全基因组菌株进行遗传进化分析（序列信息见表 3），结果如图 13，三株菌（标注红色五角星处）均在 L3 分支上，但不在 B2、B3 次分支上，与其他土耳其株、印度株、匈牙利株具有较远亲缘关系，没有地域交叉；三株菌中可见菌株 CVCC67003 与其他两株菌不在同一集群。综合遗传进化树表明本试验所测三株菌可能还未被记载探索的新型鼻疽杆菌，对鼻疽杆菌基因组信息库的填充具有重大意义，也为马鼻疽疾病治疗和疫苗研发提供了新的可能。

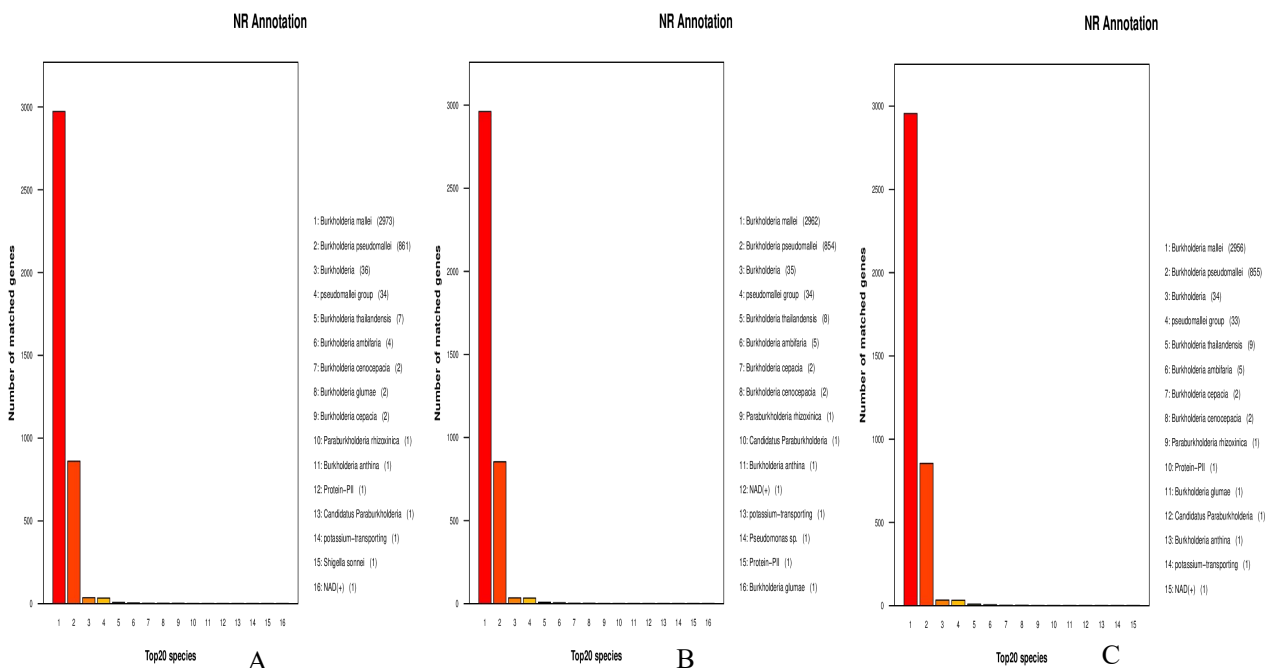


图 12 三株菌的 NR 注释结果

(A: 菌株 CVCC67001; B: 菌株 CVCC67002; C: 菌株 CVCC67003)

Fig. 12 NR annotation results of three strains

(A: *B.mallei* CVCC67001; B: *B.mallei* CVCC67002; C: *B.mallei* CVCC67003)

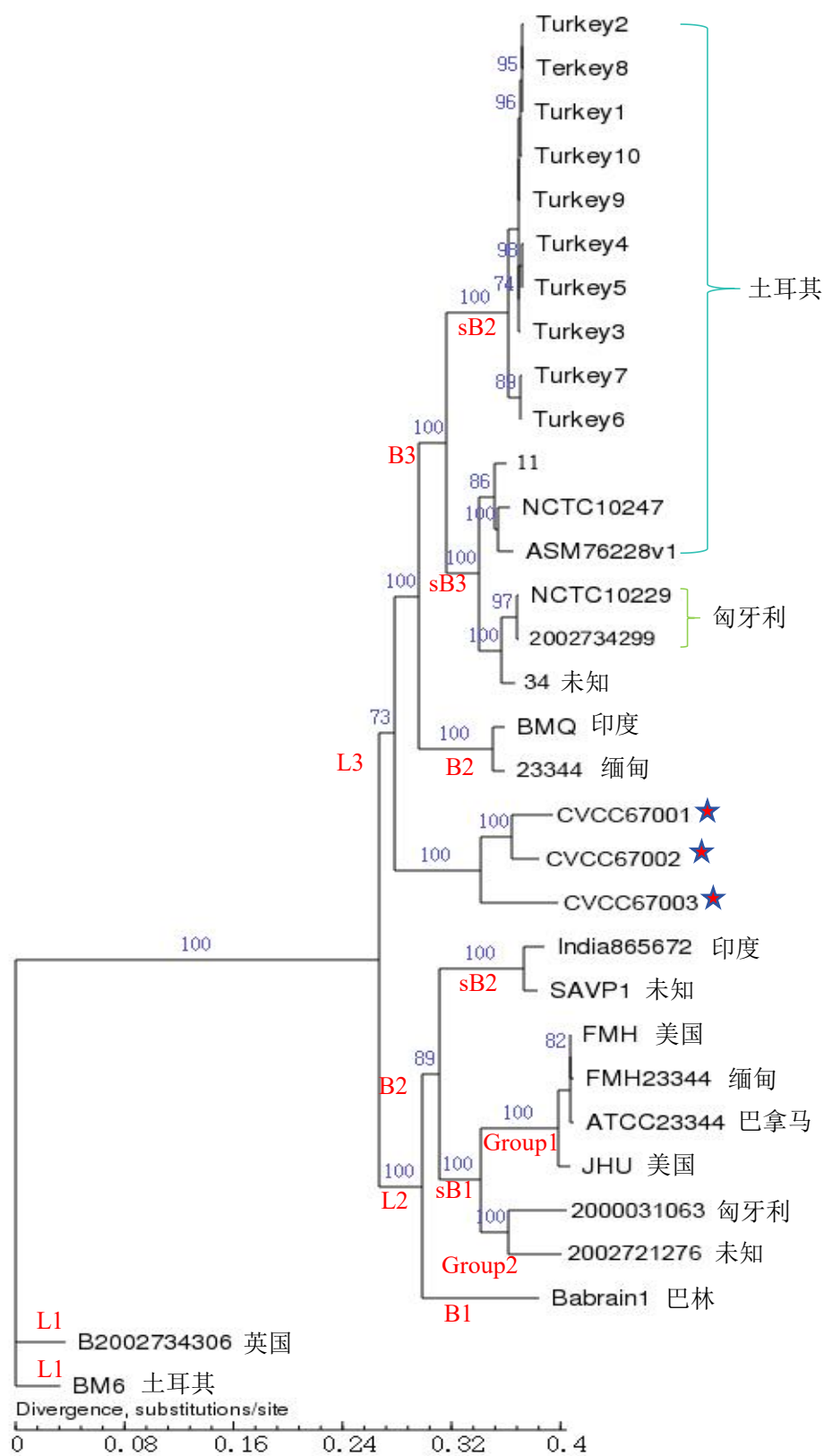


图 13 31 鼻疽杆菌进化关系图

Fig. 13 31 Evolutionary relationship of *B. mallei*

2.3.毒力测定

2.3.1.生存曲线绘制及半数致死量测定

根据三株菌在 14 天内死亡及存活小鼠情况，绘制了三株菌的生存曲线图，见图 14。经计算，CVCC67001 菌株的 LD_{50} 为 2.6×10^5 CFU；CVCC67002 菌株的 LD_{50} 为 9.5×10^4 CFU。CVCC67003 菌株试验在试验周期内未出现死亡动物。

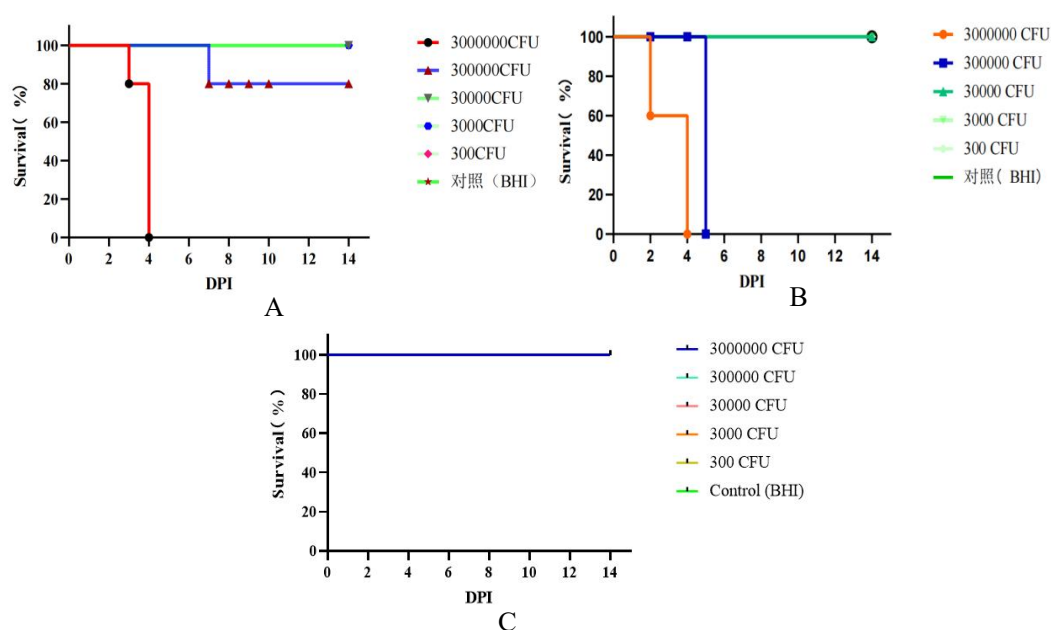


图 14 三株鼻疽杆菌生存曲线

(A:菌株 CVCC67001; B: 菌株 CVCC67002; C: 菌株 CVCC67003)

Fig. 14 Survival curve of three strains of *B.mallei*

(A: *B.mallei* CVCC67001; B: *B.mallei* CVCC67002; C: *B.mallei* CVCC67003)

2.3.2.脾脏形态及脾重分析

三株菌不同剂量组脾脏形态结果显示（见图 15），三株菌脾脏均出现不同程度的肿大，并且伴有特征性肉芽肿。对脾脏重量进行统计（图 16），结果显示，三株菌在 3×10^6 CFU 剂量组中，CVCC67001 株攻毒小鼠脾重低于对照组，其余两株攻毒组均高于对照组，且 CVCC67003 株小鼠脾重与对照组具有显著差异($p < 0.01$)；在 3×10^5 CFU 剂量组中，三株菌小鼠脾重均大于对照组，CVCC67001、CVCC67003 组小鼠脾重与对照组相比具有显著差异 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 三株菌 3×10^4 CFU 剂量组小鼠脾重与对照组均具有显著性差异 ($p < 0.01$, $p < 0.01$, p

< 0.05)。三株菌在 3×10^3 CFU 剂量组和 3×10^2 CFU 剂量组统计结果一致，CVCC67001、CVCC67002 株小鼠脾重均与对照组具有显著差异 ($p < 0.01$, $p < 0.01$)，CVCC67003 株小鼠脾重与对照组无显著性差异。

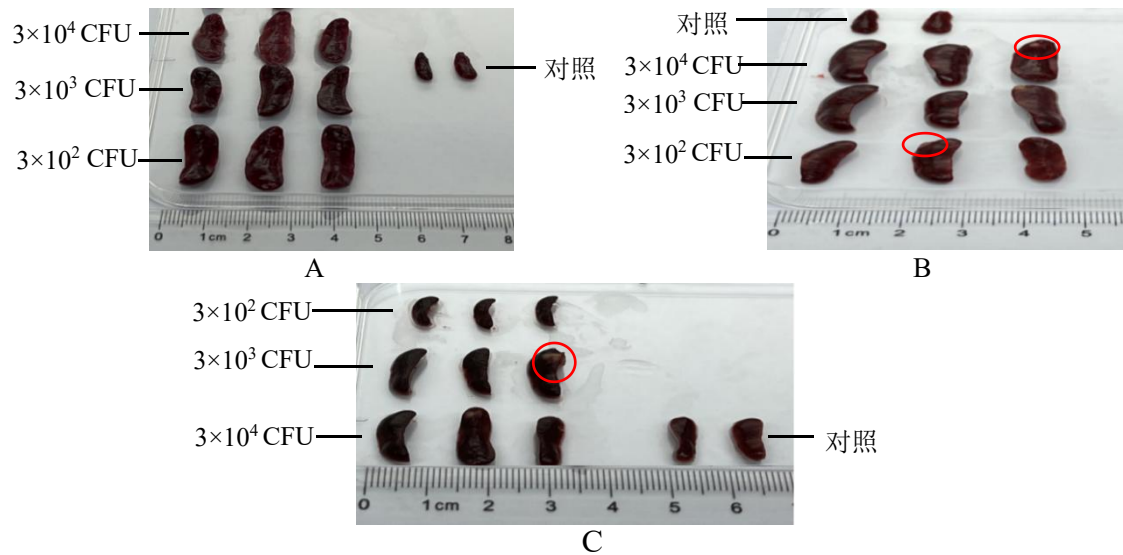


图 15 三株菌不同剂量组脾脏对比
(A.CVCC67001 株; B.CVCC67002 株; C.CVCC67003 株; 圆圈为肉芽肿病变)

Fig. 15 Comparison of spleen in different dose groups of three strains
(A. *B.mallei* CVCC67001; B. *B.mallei* CVCC67002; C. *B.mallei* CVCC67003; The circles are granulomatous lesions)

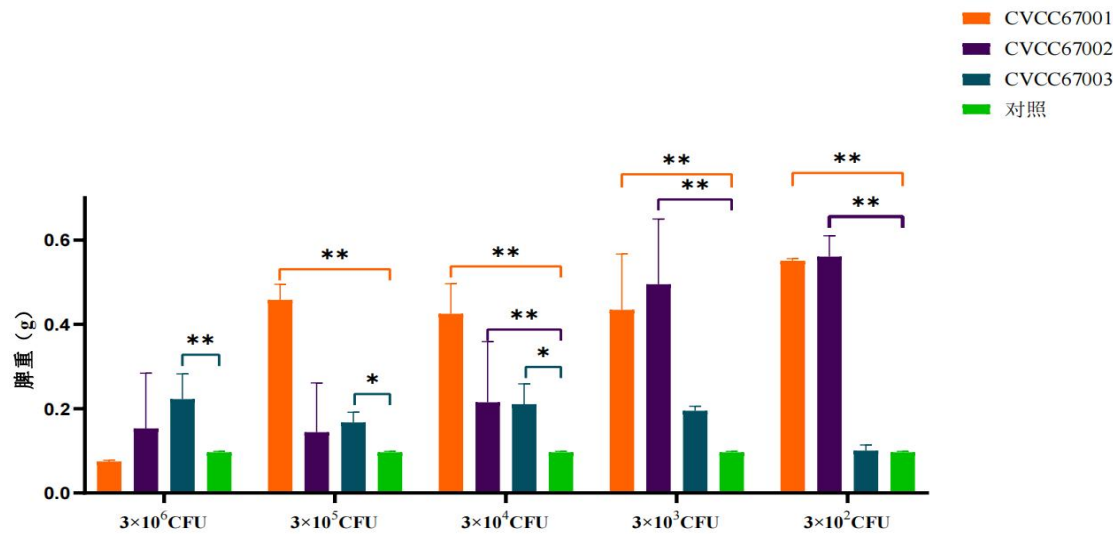


图 16 三株菌脾重对比结果
Fig. 16 Results of spleen weight comparison among three strains

2.3.3.组织病理学观察

三株菌不同剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果见图 17。

(1) 3×10^6 CFU 剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果显示(图 17-A)。三株菌均可见肝细胞小灶性坏死,胞核溶解、碎裂或固缩深染,胞质嗜酸性增强,血管及肝窦淤血扩张。CVCC67001 株菌攻毒小鼠肝脏可见少量肝细胞脂肪变性,多量肝细胞气球样变;CVCC67002 株菌攻毒小鼠肝脏可见少量肝细胞脂肪变性,肝板排列不规则,伴有淋巴细胞散在浸润;CVCC67003 株菌攻毒小鼠肝脏多量肝细胞水样变性,少量淋巴细胞、粒细胞散在浸润。三株菌攻毒小鼠脾脏均可见红髓淋巴细胞数量少,广泛可见淤血。CVCC67001 株和 CVCC67002 株菌攻毒小鼠脾脏视野内白髓形状不规则,白髓及红髓可见少量细胞点状坏死,胞核碎裂;CVCC67003 株菌攻毒小鼠脾脏白髓形状规则。三株菌攻毒小鼠肺脏均可见肺泡壁增厚,并伴有粒细胞浸润。CVCC67001 株菌攻毒小鼠肺脏局部可见出血,肺泡腔内可见较多红细胞,肺泡内可见嗜酸性组织液;CVCC67002 株菌攻毒小鼠肺脏肺泡大小不一,部分肺泡代偿性扩张;较大范围肺泡出血,肺泡内可见较多红细胞;肺泡壁偶见细胞点状坏死,胞核碎裂;CVCC67003 株菌攻毒小鼠肺脏细支气管内可见脱落的上皮细胞;肺泡壁可见少量细胞点状坏死,肺泡壁毛细血管淤血。

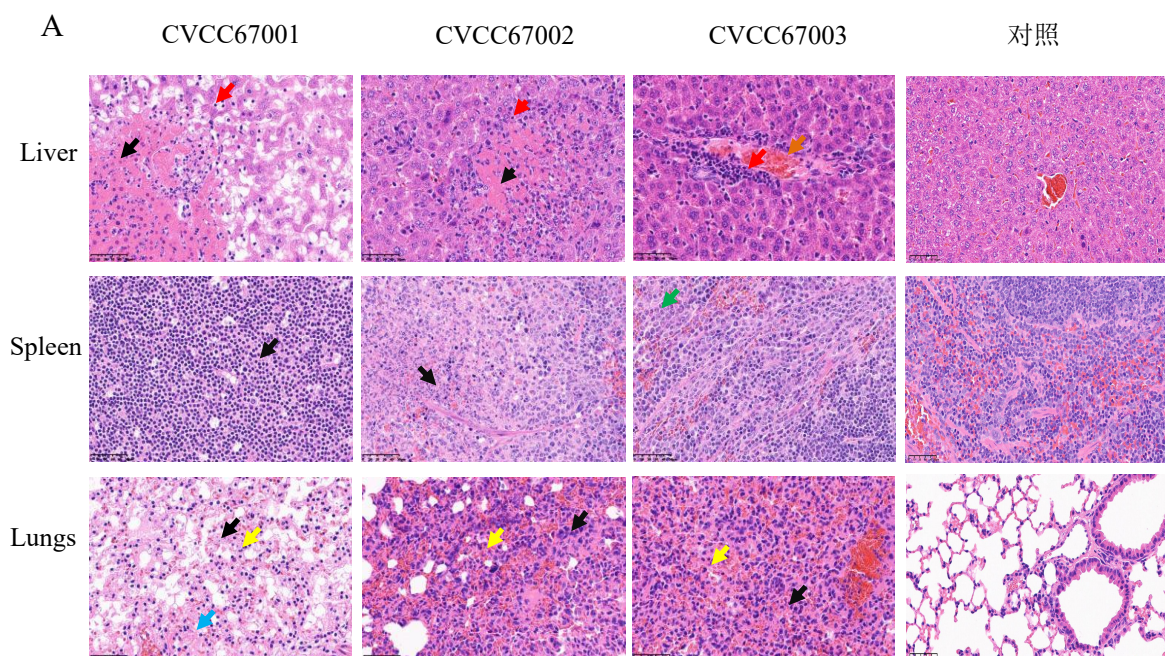
(2) 3×10^5 CFU 剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果显示(图 17-B)。CVCC67001、CVCC67002 株菌攻毒小鼠均出现肝细胞小灶性坏死,胞核溶解、碎裂或固缩深染,胞质嗜酸性增强,肝板排列不规则,伴有淋巴细胞、粒细胞小灶性浸润。CVCC67002、CVCC67003 株试验组小鼠肝小叶内偶见髓外造血细胞小灶性聚集。CVCC67002 株菌攻毒小鼠肝脏还可见少量血管及肝窦淤血扩张;CVCC67003 株菌攻毒小鼠肝脏具有少量肝细胞水样变性。CVCC67001、CVCC67002 株菌攻毒小鼠脾脏组织出现点状坏死,白髓形状不规则;CVCC67002、CVCC67003 株试验组小鼠脾脏可见髓外造血细胞小灶性聚集。CVCC67001 株菌攻毒小鼠肺脏肺泡壁可见少量粒细胞浸润,细支气管内可见嗜酸性絮状物;CVCC67002 株菌攻毒小鼠肺脏局部可见出血灶,肺泡轻度扩张;CVCC67003 株菌攻毒小鼠肺脏可见出血灶,局部肺泡内可见嗜酸性絮状物。

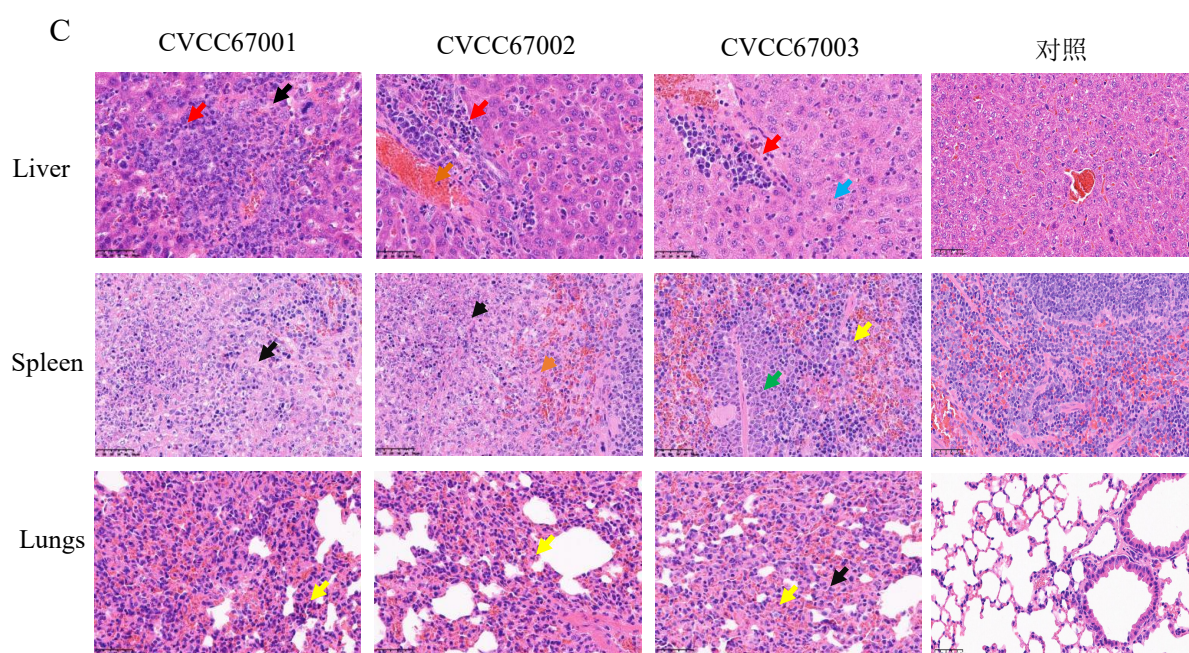
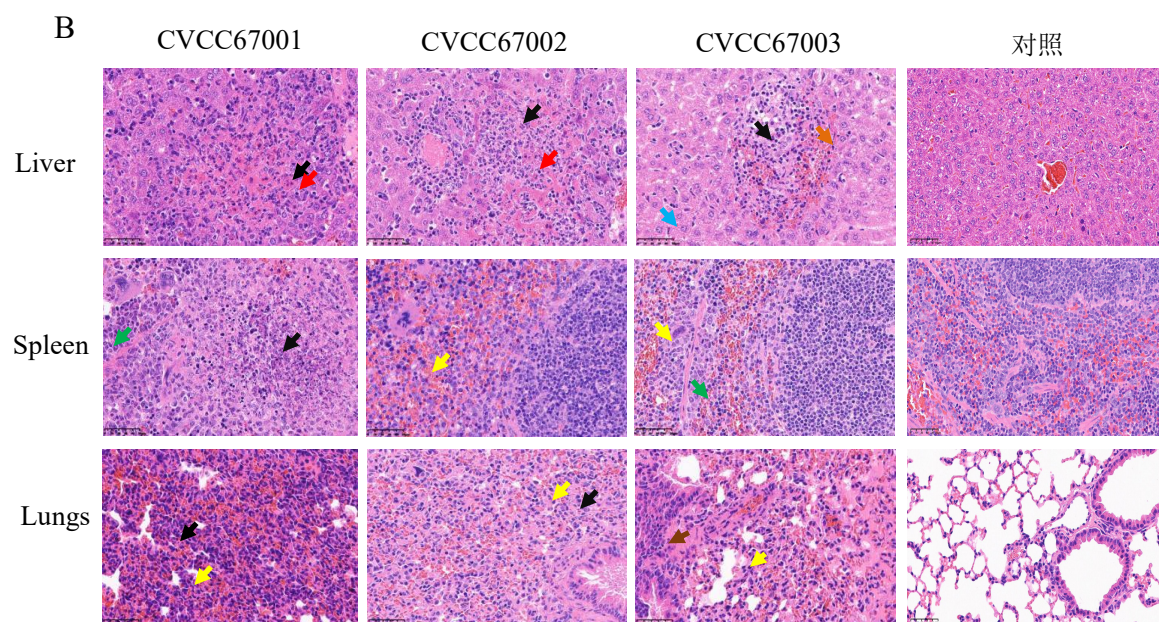
(3) 3×10^4 CFU 剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果显示(图 17-C)。三株菌攻毒小鼠肝脏组织均可见多量淋巴细胞、少量粒细胞小灶性浸润;CVCC67001 株菌攻毒小鼠肝脏偶见肝细胞点状坏死;CVCC67002 株菌攻毒小鼠肝脏少量血管可见淤血;CVCC67003 株菌攻毒小鼠少量肝细胞出现水样变性。三株菌攻毒小鼠脾脏组织均可见白髓形状不规则,脾脏组织可见小灶性坏死,胞核碎裂,可见少量结缔组织增生。三株菌攻毒小鼠肺脏均可见肺泡壁增厚,肺泡大小不一,可见较多粒细胞浸润,少量细胞点状坏死,胞核碎裂;CVCC67001、CVCC67002 株菌攻毒小鼠肺脏还可见细支气管

内可见脱落的上皮细胞和嗜酸性絮状物。

(4) 3×10^3 CFU 剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果显示 (图 17-D)。三株菌均可见肝细胞小灶性坏死, 胞核溶解、碎裂, 坏死灶周围及肝窦内可见较多淋巴细胞散在浸润; CVCC67003 株攻毒小鼠肝细胞出现水样变性。CVCC67001、CVCC67003 株攻毒小鼠脾脏组织白髓形状规则, 小梁周围可见少量髓外造血细胞, 可见较大范围红髓淤血, 较多髓窦淤血扩张; CVCC67002 株小鼠脾脏组织白髓形状不规则, 组织可见较大范围坏死, 胞核碎裂, 周围可见多量结缔组织增生。三株菌攻毒小鼠肺脏组织均可见肺泡壁可见多量粒细胞浸润, 细支气管黏膜上皮厚, 管腔内可见脱落的上皮细胞; CVCC67001、CVCC67002 株小鼠肺组织可见肺实质化, 肺泡壁可见少量细胞点状坏死。

(5) 3×10^2 CFU 剂量组肝脏、脾脏、肺脏组织 HE 染色结果显示 (图 17-E)。CVCC67001、CVCC67002 株菌攻毒小鼠肝脏组织可见肝细胞小灶性坏死, 坏死灶周围偶见淋巴细胞散在浸润; CVCC67003 株菌攻毒小鼠肝细胞形态正常, 只见少量血管淤血及淋巴细胞小灶性浸润。三株菌攻毒小鼠脾脏组织白髓形状不规则, 可见少量髓外造血细胞, 白髓及红髓可见较大范围坏死。三株菌攻毒小鼠肺脏组织病变程度同 3×10^3 CFU 剂量组。





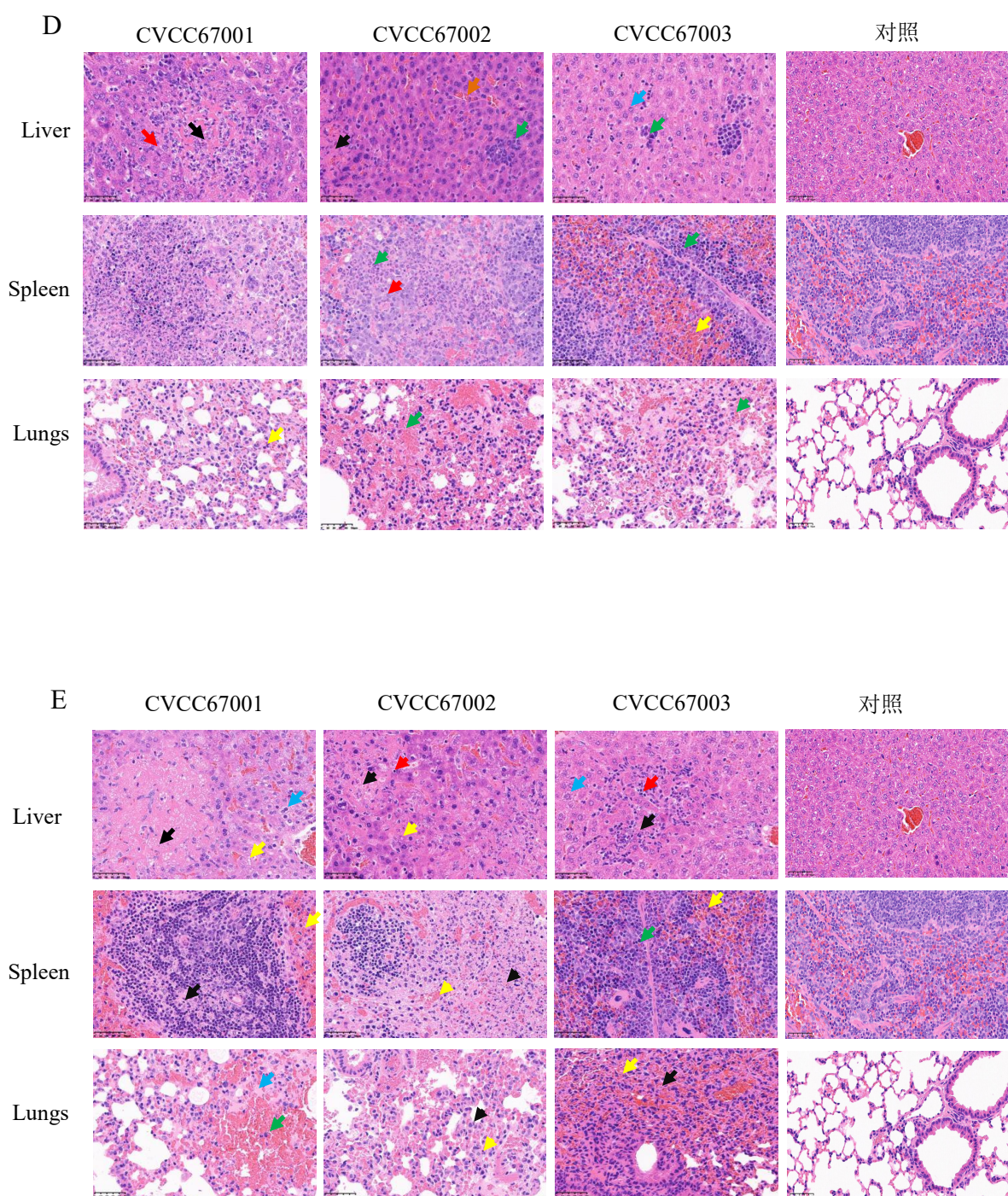


图 17 三株菌不同剂量小鼠肝、脾、肺组织 HE 染色图 ($\times 400$)

(A: 三株菌分别在 3×10^2 CFU 攻毒剂量组小鼠肝脏、脾脏和肺脏组织 HE 染色结果; B: 三株菌分别在 3×10^3 CFU 攻毒剂量组小鼠肝脏、脾脏和肺脏组织 HE 染色结果; C: 三株菌分别在 3×10^4 CFU 攻毒剂量组小鼠肝脏、脾脏和肺脏组织 HE 染色结果; D: 三株菌分别在 3×10^5 CFU 攻毒剂量组小鼠肝脏、脾脏和肺脏组织 HE 染色结果; E: 三株菌分别在 3×10^6 CFU 攻毒剂量组小鼠肝

脏、脾脏和肺脏组织 HE 染色结果)

Fig. 17 HE staining of liver, spleen and lung tissues of different doses of three strains ($\times 400$)

(A: HE staining results of liver, spleen and lung tissue of mice in 3×10^2 CFU challenge dose group; B: HE staining results of liver, spleen and lung tissue of mice in 3×10^3 CFU challenge dose group; The results of HE staining of liver, spleen and lung tissue of mice in 3×10^4 CFU challenge dose group were obtained. D: HE staining results of liver, spleen and lung tissue of mice in 3×10^5 CFU challenge dose group; E: HE staining results of liver, spleen and lung tissue of mice in 3×10^6 CFU challenge dose group, respectively)

2.3.4.脾脏分菌情况

分别对三株菌株各剂量组死亡小鼠和攻毒结束后存活组小鼠无菌采取脾脏进行分菌试验，脾脏分菌结果见表 7。CVCC67001、CVCC67002 株试验组至最低剂量组仍能分离出鼻疽杆菌，CVCC67003 株最低剂量组脾脏未分离出病原菌。因此后续选择毒力最弱的 CVCC67003 株进行了免疫原性评价试验。

表 7 三株菌攻毒 14 天脾脏残余菌量 (n 为样本数量)

Table 7 Spleen residual bacteria amount after 14 days of three strains challenge (n is the number of samples)

菌株	接种剂量 (CFU)	残余菌量平均值 (CFU, n=3)
CVCC67001	3×10^4	1.38×10^3
	3×10^3	2.87×10^2
	3×10^2	2.5×10^2
CVCC67002	3×10^4	6.003×10^3
	3×10^3	4.22×10^2
	3×10^2	1.2×10^2
CVCC67003	3×10^4	3.03×10^3
	3×10^3	75
	3×10^2	0

2.4.CVCC67003 免疫原性测定

根据毒力实验结果，以 CVCC67003 株作为弱毒疫苗候选株进行免疫原性评价，初

步评估 3×10^3 CFU（免疫一组）、 3×10^4 CFU（免疫二组）免疫剂量对小鼠的保护力。以三株菌中毒力最强的 CVCC67002 株作为攻毒菌株，攻毒剂量为 3×10^5 CFU。两免疫组小鼠在免疫 28 天后，无菌采取脾脏进行分菌实验，脾脏残余菌量均为 0，见表 8，表明 CVCC67003 菌株可以在小鼠脾脏内被清除。

攻毒后每天观察小鼠精神状态和死亡情况。对照组 66.68 %死亡，攻毒后 2 天出现被毛粗糙、眼睑红肿但无分泌物，4 天后精神沉郁、行动不稳，攻毒后 5 天死亡 2 只（2/6），攻毒后 7 天死亡 1 只（3/6），攻毒 28 天后无小鼠死亡。免疫一组攻毒后直至实验结束未见死亡小鼠，且精神状态正常；免疫二组死亡 1 只小鼠（1/5），其余小鼠未见死亡及异常。免疫一组和免疫二组存活率分别为 100 %和 80 %。生存曲线见图 22。表明菌株 CVCC67003 对马鼻疽杆菌造成的急性感染具有一定的保护性，揭示了菌株 CVCC67003 可作为马鼻疽弱毒疫苗候选株的巨大潜力。

表 8 免疫 28 天后脾脏分菌情况（n 为样品数量）

Table 8 Bacterial classification of spleen after 28 days of immunization（n is the number of samples）

菌株	接种剂量（CFU）	残余菌量平均值（CFU，n=3）
CVCC67003	3×10^4	0
	3×10^3	0

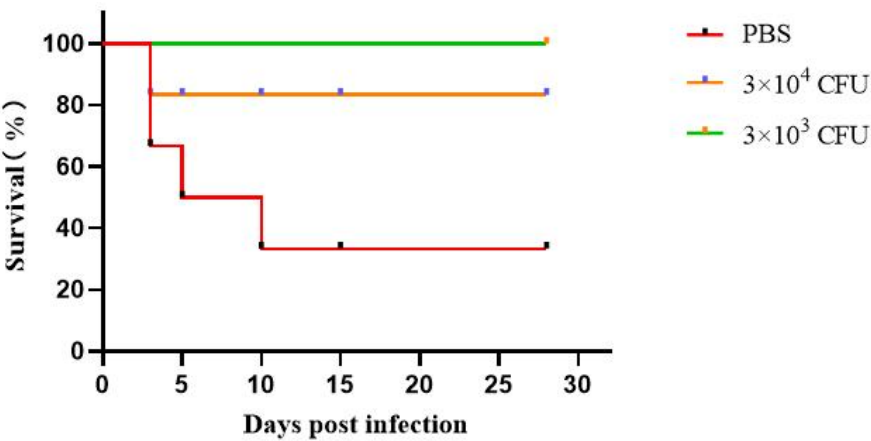


图 22 攻毒后 28 天生存曲线

Fig. 22 28-day survival curve after challenge

2.5.CVCC67003 比较基因组分析

2.5.1.SV 统计分析

通过对 CVCC67003 与 ATCC 23344 全基因组进行比对，得到全基因组结构变异

配对图，见图 23。二者基因组相比出现了大量的插入和部分缺失基因。与各蛋白数据库比对分析，发现 CVCC67003 与 ATCC 23344 相比缺失了关于 AcrAB acrB 吡黄碱抗性蛋白 B 基因，该基因注释蛋白可能介导对宿主源性抗菌肽的抗性，与抗生素耐药性有关。其余毒力因子未发现明显差异，从基因层面无法评估两株菌明显毒力差异。

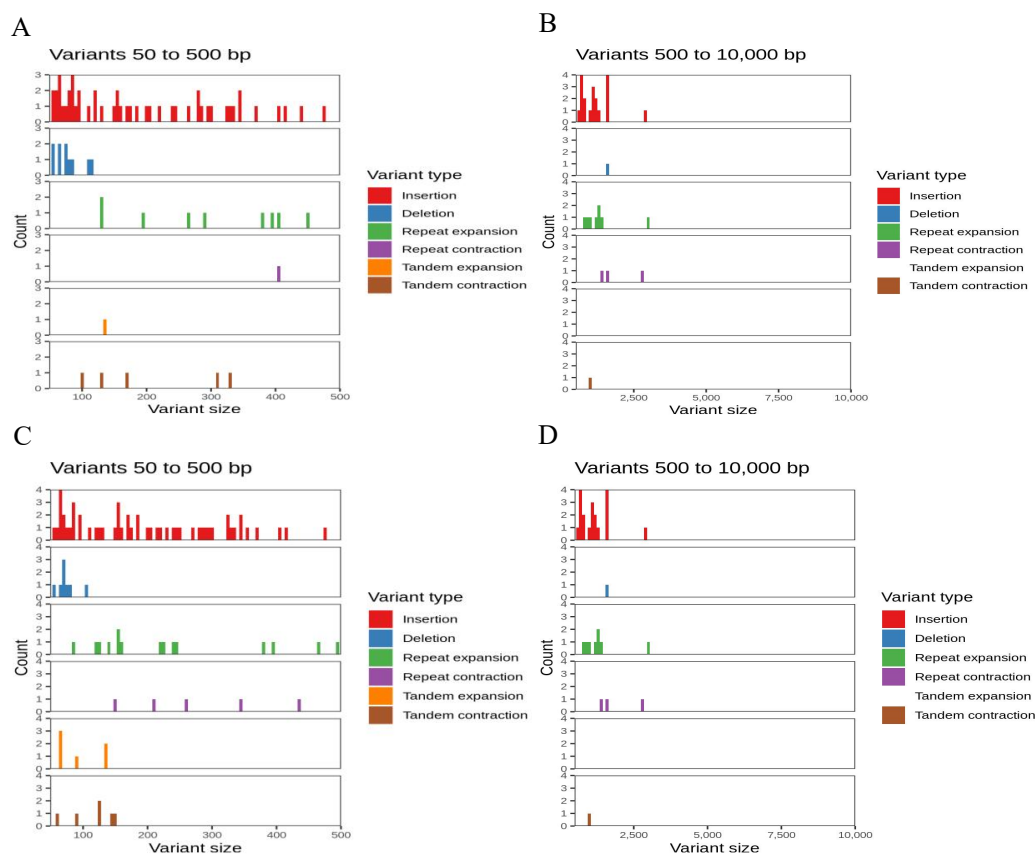


图 23 全基因组结构变异类型配对图

A：染色体 1 基因组 50bp-500bp 大小比对结果；B：染色体 1 基因组 500bp-1000bp 大小比对结果；
C：染色体 2 基因组 50bp-500bp 大小比对结果；D：染色体 2 基因组 500bp-1000bp 大小比对结果

Fig. 23 Genome-wide matching map of structural variation types

A: Comparison results of chromosome 1 genome size 50bp-500bp; B: Results of 500bp-1000bp size comparison of chromosome 1 genome; C: Comparison results of chromosome 2 genome size 50bp-500bp;

D: Results of 500bp-1000bp size comparison of chromosome 2 genome

2.5.2.共线性分析

通过将菌株 CVCC67003 与参考菌株 ATCC23344 进行比对（图 24），可以看出，

CVCC67003 和 ATCC23344 在两条染色体上的高度变异，出现复杂的易位、插入、缺失和置换。后续可针对插入、缺失基因的深入检测，探究这些基因突变对 CVCC67003 生物活性的影响。

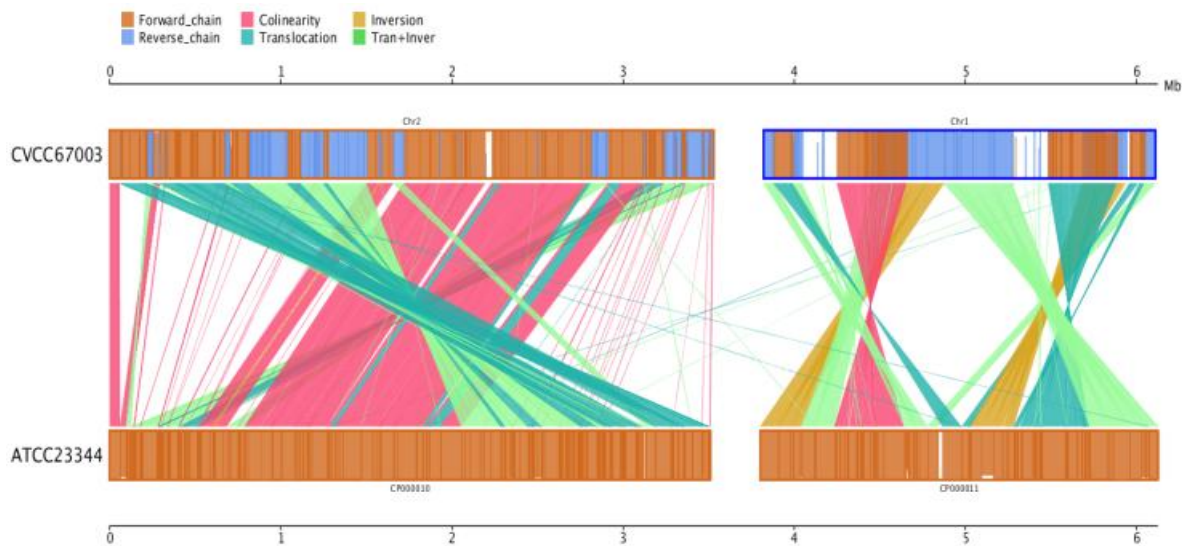


图 24 菌株 CVCC67003 与 ATCC 23344 基因组共线性分析

Fig. 24 Genomic collinearity analysis of strain *B.mallei* CVCC67003 and *B.mallei* ATCC 23344

3.讨论

鼻疽杆菌是一种宿主适应性病原菌，通常通过呼吸道或皮肤接触途径感染动物，常导致肺炎和菌血症^[70]。鼻疽杆菌是一种遗传稳定的物种，与引起类鼻疽的条件致病菌类鼻疽伯克霍尔德氏菌密切相关。Losada L^[12]等人通过对 7 株鼻疽杆菌、8 株类鼻疽伯克霍尔德氏菌的基因组组内和组间分别进行比对，发现鼻疽杆菌基因组在类鼻疽伯克霍尔德氏菌基因组基础上通过随机 IS 元件介导的重组来不断进化，基因含量的差异可能导致鼻疽杆菌菌株之间毒力的差异。这一结果与鼻疽杆菌由某一类鼻疽伯克霍尔德氏菌菌株入侵动物宿主后，通过 IS 元件扩增、噬菌体消除、基因组重排和同源重组介导导致基因组减少进化而来的观点一致。虽然我国于 2023 年 7 月宣布马鼻疽已实现清除计划，但全球仍有部分地区存在马鼻疽^[71]。对早期分离的本地株进行鉴定有助于丰富鼻疽杆菌的种群信息，为该病的研究提供理论支持。

本研究对中国早期分离的三株临床菌株 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 进行培养特性、生化鉴定、全基因组测序和毒力试验试验鉴定均为鼻疽杆菌，并在生化

反应中 CVCC67003 株的 VP 试验显示阳性, 与其余两株均为阴性; 全基因组测序结果中, CVCC67003 株预测出 44 个 NRPS-like 基因, 而其余两株均无; 进化树分型显示 CVCC67003 与 CVCC67001、CVCC67002 在同一次级分支上, 但不在同一集群中。CVCC67003 比较基因组分析, CVCC67003 与 ATCC 23344 基因组均具有不同程度的插入、确实、易位和倒置, 具体差异基因所代表的功能蛋白还需进一步研究分析。通过毒力试验初步比较了三株菌的毒力大小, 结果显示三株菌毒力从低到高分别为 CVCC67003、CVCC67001、CVCC67002, 导致毒力差异的具体原因可结合预测的毒力基因继续探究。虽然 CVCC67003 株对试验动物造成病理损伤, 基于 CVCC67003 出现被实验动物清除的现象, 进一步进行了免疫原性试验, 在 3×10^3 CFU、 3×10^4 CFU 剂量组对小鼠保护力分别为 100 % 和 80 %, 对 CVCC67002 株所造成的急性感染有一定保护作用, 具有作为弱毒活疫苗候选株的潜质, 后续还需对该菌进一步致弱评价。

马鼻疽杆菌是一种兼性细胞内病原体, 可以在上皮细胞和吞噬细胞系中入侵、存活和复制, 利用肌动蛋白在细胞内和细胞间传播, 从而逃脱宿主体液免疫反应^[72]。本试验所检测马鼻疽杆菌的毒力因子主要有鞭毛基因、Bsa T3SS 基因和荚膜蛋白基因, 这与文献报道的一致^[73]。虽然马鼻疽杆菌不具有运动性, 缺乏鞭毛, 但它的基因组包含许多鞭毛和趋化基因, 且大部分几乎是完整的。其原因包括甲基化趋化基因的移码突变, 以及位于 IS 元件的一段 65 kb 片段的插入破坏了鞭毛合成所必需的 *fliP* 基因, 而鞭毛运动 *motB* 基因的移码突变也消除了其生理功能, 这些少数基因的突变一定程度上解释了鼻疽杆菌不带鞭毛, 但其余的趋化性和运动性基因尚未衰减^[11]。Schmoock Gd 等^[39]利用鼻疽杆菌趋化性 *motB* 蛋白的移码突变设计了一种用荧光标记引物的传统的双链 PCR 方法, 具有 100% 的特异性, 可明确区分鼻疽杆菌和类鼻疽伯克菌, 具有较高应用价值。马鼻疽杆菌在动物中生存所需的几个主要毒力因子是影响生物体细胞相互作用的关键过程, 其中包括动物病原体样 III 型分泌系统 (T3SS_{AP})、T6SS-1 和 VirAG 双组分调节系统。T3SS_{AP} 对于早期空泡逃逸至关重要, 而 T6SS-1 对于其在细胞内生长和运动性也是必要^[74]。III 型分泌系统已被证明是鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌在小鼠和仓鼠模型中产生毒性所必需的^[75]。有研究发现临床分离菌株 SAVP1 不随着接种剂量的增加而表现出临床症状, 将其与强毒株 ATCC 23344 进行基因比对发现该菌株缺失所有动物病原体样 T3SS 基因, 这解释了菌株 SAVP1 的无毒性及 T3SS 的毒力作用^[76]。DeShazer^[77]等通过免疫电镜观察发现在马鼻疽杆菌 ATCC 23344 (亲本株) 表面存在荚膜, 而在荚膜突变株泰国鼻疽杆菌 DD3008 表面没有荚膜。菌株 ATCC 23344 对仓鼠和小鼠均有高毒力, 而菌株 DD3008 对两种动物均无毒力。表明在两种马鼻疽杆菌感染的动物模型中, 马鼻疽杆菌的荚膜多糖是致病所必需的, 是一个主要的毒力因子。

荚膜多糖（CPS）和脂多糖（LPS）是鼻疽伯克霍尔德氏菌属表达最好的表面抗原，在疾病的早期诊断中具有重要意义。由于 CPS 和 LPS 的被动免疫以前已被证明可以提供部分抗感染保护，目前的疫苗研究集中在结合 LPS 或 CPS 以增强免疫^[13]。本试验所测三株菌均含丰富的荚膜、T3SS、鞭毛基因，而三株菌毒力试验表现出明显的毒力差异，其可能的毒力影响因子可通过比较基因组学分析进行进一步探索、验证。

鼻疽杆菌对多种抗生素具有耐药性，目前还没有获得许可的疫苗^[78]。人类患马鼻疽的病例较为少见，因此关于治疗药物的信息有限^[79]。而类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染人较多，对其研究更为深入，其治疗常依赖于长期抗生素的联合使用，鉴于马鼻疽杆菌表现出与类鼻疽伯克霍尔德氏菌相似的抗生素敏感性模式，可以借鉴类鼻疽伯克霍尔德氏菌的治疗经验^[80]。本试验测序三株菌均具有氯霉素、杆菌肽、氨基糖苷类、大环内酯类以及吡啶黄抗生素基因，与类鼻疽伯克霍尔德氏菌耐药抗生素种类相似。本研究预测的耐药基因后续可通过药敏试验进行进一步验证，为该病选择性培养基的研发提供数据支持。

对于鼻疽杆菌的分型，通过单核苷酸多态性（SNPs）的高分辨率熔融 PCR（HRM-PCR）技术可以将菌株分为三个谱系（L1 到 L3），以及具有地理特异性的分支、子分支和集群^[81]。通过下载 NCBI 数据库中最新上传的马鼻疽杆菌全基因组序列共 28 株进行分析并构建遗传进化树，结果显示所涉及的马鼻疽杆菌分布范围较广，包含西欧、亚洲和北美洲等地区。本试验的三株菌与土耳其、匈牙利、缅甸流行的菌株在同一分枝上，与美国等地区菌株关系较远。三株菌均位于 L3 分支上，但 CVCC67003 和 CVCC67001、CVCC67002 不在同一集群。三株菌尚未纳入鼻疽杆菌基因库，了解鼻疽杆菌的基因进化关系及基因组特征有助于中国马鼻疽流行病学的研究。

4.小结

对实验室保存的三株临床分离菌经鉴定均为鼻疽杆菌，CVCC67003 与其余两株菌具有遗传差异，与 ATCC 23344 全基因组具有较多缺失、插入、易位和置换片段。毒力试验发现 CVCC67001 的 LD_{50} 为 2.6×10^5 CFU；CVCC67002 的 LD_{50} 为 9.5×10^4 CFU；CVCC67003 未在试验周期内引发动物死亡，毒力最弱。CVCC67003 免疫原性试验表现出其具有一定的抗原保护力，具有作为弱毒活疫苗候选株的潜质。

第二章 马鼻疽单克隆抗体的制备

1.材料与方法

1.1.菌株、细胞

鼻疽杆菌 CVCC67003 株由本实验室分离保存。小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由国家兽医微生物菌（毒）种保藏中心保存。

1.2.试验试剂

试验所需主要试剂见表 9。

表 9 主要试剂

Table 9 Main reagents

试剂名称	生产商
Reagent name	Manufacturer
DMEM 细胞培养基	Gibco 公司
HAT 培养基添加剂	上海麦克林生化科技股份有限公司
HT 培养基添加剂	上海麦克林生化科技股份有限公司
弗氏完全佐剂	Sigma-Aldrich 公司
弗氏不完全佐剂	Sigma-Aldrich 公司
聚乙二醇 2000 (PEG2000)	Sigma-Aldrich 公司
脱脂奶	Sigma-Aldrich 公司
鱼明胶	Sigma-Aldrich 公司
BSA	Sigma-Aldrich 公司
胎牛血清	Pan-Biotech 公司
青链霉素混合液	北京索莱宝科技有限公司
二甲基亚砜（细胞培养级）	北京索莱宝科技有限公司
ELISA 包被液	北京索莱宝科技有限公司
单组份 TMB 显色液	北京索莱宝科技有限公司

表 9 主要试剂（续表）

Table 9 Main reagents(Continued form)

ELISA 终止液	北京索莱宝科技有限公司
ECL Plus 超敏发光液	北京索莱宝科技有限公司
蛋白上样缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠 IgG	Jackson ImmunoResearch 公司
HiTrap rProtein A FF 亲和柱	GE Healthcare 公司
12.5 %SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒	北京博泰斯生物技术有限公司
三色预染蛋白 Marker	北京博泰斯生物技术有限公司
小鼠单抗 Ig 类亚型鉴定用酶标二抗即用套装	苏州博奥龙科技有限公司
吐温 -20	国药集团化学试剂有限公司

1.3.实验动物

6-8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究被中国兽医药品监察所实验动物福利与动物实验伦理委员会审核通过，编号为中监所（福） 2023 第 00059 号。试验期间小鼠可以自由饮水和采食，适应性饲养一周后开展试验。

1.4.方法

1.4.1.免疫抗原及单抗筛选抗原的制备

鼻疽杆菌被我国列为三类病原微生物，对人类健康具有一定的威胁，根据第一章三株菌毒力试验结果，出于生物安全考虑，选择 CVCC67003 株灭活菌进行动物免疫。脂多糖是鼻疽杆菌的优势抗原，能在感染早期激起宿主免疫应答。试验选用粗提的脂多糖作为筛选抗原，除脂多糖外包含少量蛋白抗原，以筛选到更多可能的单克隆抗体。用 0.9 %的生理盐水将在含 4 %甘油的大豆酪蛋白琼脂培养基（TSA）上生长的鼻疽杆菌 CVCC67003 株洗下，置于水浴锅中 80 °C 灭活 1 h，调节菌液浊度，使其浊度达至 1×10^{10} CFU/mL，作为免疫小鼠所用抗原，放置于 2~8 °C 保存。同时取一部分灭活的菌液，采用热酚水法^[82]提取脂多糖（LPS）。取 1 L 培养物，离心 5 min，收集菌体沉淀，加入 15 mL 灭菌水重悬菌体，加热至 65 °C，同时预热 90 %苯酚水溶液至 65 °C；向细菌悬液中加入等体积热苯酚水溶液，65 °C 孵育 20 min，4 °C 10000×g 离心 15min，收

集酚相；加 3 倍体积的饱和醋酸钠甲醇溶液，20 °C 孵育过夜；10000×g 离心 20 min，弃去上清，沉淀用含 20 mmol/L MgCl₂ 和 5 mmol/L EDTA 的 PBS 重悬。分别加 DNase I 和 RNase (2 μg/mL)，37 °C 孵育 2 h；随后加等体积 90 % 热苯酚水溶液，65 °C 孵育 20 min；收集水相和酚相，加 3 倍体积饱和醋酸钠甲醇溶液，20 °C 沉淀过夜，10000×g 离心 20 min；沉淀用灭菌水重悬，30000×g 超速离心 3 h，灭菌水重悬，洗涤沉淀 3 次，弃上清；沉淀用少许灭菌水重悬，冷冻干燥保存。

1.4.2. 抗原鉴定

通过 SDS-PAGE 和银染方法进行鉴定，具体步骤同第一章 1.1.4。

1.4.3. 小鼠免疫

选择 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 4 只，将 1.4.1 制备的免疫原与弗氏完全佐剂 1: 1 混合充分乳化后背部皮下多点注射，每只小鼠 0.2 mL；间隔两周进行下一次免疫，共免疫三次，除第一次免疫使用弗氏完全佐剂，其余几次免疫均使用弗氏不完全佐剂与抗原进行混合乳化。免疫三次后一周，通过颌下静脉窦采血，收集血清，用间接 ELISA 方法测定血清效价。选择效价最高的一只小鼠进行加强免疫，腹腔注射 0.2 ml 的 2×10^{10} CFU/mL 的灭活 CVCC67003 菌液，在加强免疫后四天进行细胞融合。

1.4.4. 间接 ELISA 筛选方法检测小鼠血清效价

将上述制备的筛选抗原作为包被抗原，具体操作程序如下：

- (1) 用 ELISA 包被液将粗提 LPS 稀释至 10 μg/mL，每孔 100 μL 进行包被，置于 4 °C 孵育 12 h。
- (2) 用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 1 次。
- (3) 每孔加入 100 μL 10% 脱脂奶粉，37 °C 封闭 2 h。
- (4) 用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 1 次。
- (5) 将小鼠血清从 1: 1000 开始进行 2 倍梯度稀释至 1: 32000，每孔加入 100 μL 稀释好的小鼠血清。37 °C 孵育 30 min。
- (6) 用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 3 次。
- (7) 每孔加入 100 μL 1: 10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG，37 °C 孵育 30 min。
- (8) 用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 3 次。
- (9) 加入 100 μL TMB 显色液室温避光显色 15 min，加入 50 μL 终止液。
- (10) 使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。

1.4.5.杂交瘤细胞的筛选

1.4.5.1.饲养细胞的制备

在融合前一天制备饲养细胞。取一只 4 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，摘眼球取血后脱颈处死，于 75 % 的酒精中浸泡 5 min。将小鼠放入无菌平皿内，用镊子小心夹起皮毛，剪开腹部皮肤，顿性分离皮肤与腹膜，充分暴露腹膜。用 5 mL 无菌注射器吸取 5 mL 含有 10 % FBS、1×HAT 的 DMEM 注入小鼠腹腔，轻轻按摩小鼠腹壁，吸回营养液，注入离心管内，可见营养液变浑浊。重复冲洗腹腔三到四次。补培养基至 60 mL，混匀后平铺致 6 块 96 孔细胞板中，置于 5 % CO₂ 培养箱内备用。

1.4.5.2.脾细胞的制备

将加强免疫后四天的小鼠摘除眼球放血，收集血液分离血清作为抗体阳性对照。将小鼠脱颈处死，置于 75 % 酒精中浸泡 5 min。无菌取出脾脏，用灭菌注射器吸取 DMEM 培养基，将针头插入脾脏的一端轻吹，将脾脏内的细胞冲洗出来，反复冲洗数次。将洗下的脾细胞移入离心管内，进行细胞计数。将计数后的细胞 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用适量 DMEM 培养基重悬细胞备用。

1.4.5.3.小鼠 SP2/0 骨髓瘤悬浮细胞的制备

融合前 24 h 将 SP2/0 细胞传代培养。在融合当天，选择形态良好、处于对数生长期的 SP2/0 细胞，用适量 DMEM 基础培养基将其从瓶壁上轻轻吹下，收集于 50 mL 离心管内，进行细胞计数。将计数后的细胞 1000 r/min 离心 10 min，弃上清，用适量 DMEM 培养基重悬细胞沉淀备用。

1.4.5.4.细胞融合

吸取适量脾细胞和骨髓瘤细胞按 5: 1 的数量比例加入至 50 mL 离心管内进行混合。将混合后的细胞 1000 r/min 离心 10 min 后去上清，剩余细胞团块通过将离心管在橡胶手套上轻轻摩擦，使沉淀细胞均匀分散成糊状，使两种细胞充分混匀。随后一手均匀转动离心管，一手用滴管吸取 1 mL 已提前预热至 37 °C 的 PEG 2000，沿离心管壁缓缓加入，约 60 s 加完，然后将细胞悬液在 30 s 左右内吸入滴管，静置 30 s，再将其在 30 s 左右轻轻吹回至离心管内。加入 25 mL DMEM 液终止 PEG 2000 的作用后，将其置于 37 °C 温箱中静置 10 min，800 r/min 离心 7 min，弃净上清。加入 60 mL 含有 20 % FBS、1×HAT 的 DMEM 培养液轻轻吹吸，使沉淀细胞混合均匀。将细胞液均匀加入 6 块铺有饲养细胞的 96 孔板中，每孔 100 μL。置于 CO₂ 培养箱中培养。

融合 5 天后每天观察细胞生长情况。

1.4.5.5.阳性杂交瘤细胞的筛选与克隆

待融合后的细胞生长至覆盖孔底 1/3 时,使用与 1.4.4 中相同的间接 ELISA 方法对融合细胞细胞孔的细胞上清进行效价检测。选取其中阳性值较高的 8 个细胞孔进行亚克隆,并扩大培养后进行冻存。在进行亚克隆的前一天按照 1.4.5.1 步骤制备饲养细胞。通过有限稀释法对阳性孔细胞进行稀释,用含有 15 % FBS、1×HAT 的 DMEM 培养基稀释杂交瘤细胞至 10 个/mL。将稀释后的细胞均匀加到含有饲养细胞的 96 孔细胞板中。每天观察细胞生长情况并进行细胞上清效价的检测。重复亚克隆 3~4 次,第 3、4 次亚克隆使用含有 10 % FBS、1×HT 的 DMEM 培养基进行稀释和培养。当连续两次亚克隆阳性率达到 100 %时,将获得的阳性杂交瘤细胞株进行扩大培养并冻存。

1.4.6.杂交瘤细胞的冻存与复苏

每次克隆均要对阳性杂交瘤细胞进行冻存。冻存方法如下:将生长状态良好的细胞从瓶壁轻轻吹下,移入离心管 1000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入适量预冷的冻存液(10 %DMSO+30 %FBS+60 %DMEM),吹打均匀,分装至无菌冻存管,每管 1 mL 密封管口,置程序冻存盒中放入 -80 °C冰箱 24 h 后,移入液氮罐中长期保存。

细胞复苏:取出冻存的细胞管,将其置于 37 °C水浴中快速融化后(以降低冰晶和 DMSO 对细胞的损伤),将冻存管 1000 r/min 离心 10 min。弃净上清,使用含有 20 % FBS 的 DMEM 培养基将细胞进行重悬,转移至细胞培养瓶进行培养。

1.4.7.单克隆抗体的鉴定

1.4.7.1.单克隆抗体亚型的鉴定

使用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用试剂盒对获得的单抗的抗体亚型进行鉴定。具体操作步骤如下:

(1)使用与 1.4.4 中相同的方法包被 ELISA 板。将每株待测杂交瘤细胞上清加 6 个孔,每孔 100 μ L, 37 °C孵育 30 min。用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 5 次。

(2)分别将试剂盒中的 6 种酶标记物加入到含同一种细胞的酶标孔中,每孔 100 μ L, 37 °C孵育 30 min。用含有 0.05% Tween 的 PBST 洗板 5 次。

(3)加 TMB 显色液避光显色 15 min,加入 50 μ L 终止液终止。

(4)使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。每株单抗 OD_{450nm} 值高的孔所对应的酶标二抗类型即为所测单抗的 Ig 类别。

1.4.7.2.单克隆抗体特异性鉴定

以马鼻疽杆菌 CVCC67003 灭活全菌、粗提 LPS 以及纯化后的 LPS 作为抗原包被酶标板，以杂交瘤细胞培养上清作为一抗进行间接 ELISA 检测。

进一步以 Western blot 鉴定单克隆抗体的特异性，采用硫酸-苯酚法测定多糖含量。将马鼻疽杆菌 CVCC67003 灭活全菌，粗提 LPS 以及纯化后的 LPS 调整至相同上样量，经 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜上，用含 5 %脱脂牛奶的 PBST 于室温孵育 2 h；一抗为杂交瘤细胞上清（1:500 稀释），4 °C孵育 12 h；用含有 0.05 % Tween 的 PBST 漂洗 5 次，每次 5 min；然后用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 酶标抗体（1:8000 稀释）作为二抗，室温孵育 1 h；用含有 0.05 % Tween 的 PBST 漂洗 5 次，每次 5 min。再用 PBS 漂洗 5 min。根据 PVDF 膜的大小，配置适量的超敏发光液，向 PVDF 膜上均匀滴加。使用化学发光成像仪检测发光信号。

1.4.8.杂交瘤细胞抗体分泌稳定性的检测

将杂交瘤细胞进行连续传代培养，分别在第 1、5、10、15、20、25、30 代收集细胞上清，使用间接 ELISA 方法检测其抗体效价。将冻存后 6 个月的杂交瘤细胞复苏后培养，收集细胞上清，使用间接 ELISA 方法检测抗体效价。

1.4.9.单克隆抗体腹水制备

将 5 mL 液体石蜡注射到 10 只经产 BALB/c 母鼠腹腔，每只 0.5 mL。7 天后，用 DMEM 培养基将扩大培养的 SP2/0 细胞收集计数，将细胞浓度调整为 0.5×10^7 个/mL。将 SP2/0 细胞 0.5 mL/只腹腔接种小鼠。7 天后，观察小鼠腹部隆起状态，待小鼠腹部胀大、行动迟缓是，用无菌注射器采集腹水。将腹水 5000 r/min 离心 10 min，收集上清于 -20 °C保存备用。

1.4.10.单抗的纯化

(1)使用 IgG_{2b} 偶联缓冲液将腹水进行 1: 3 稀释，12000 r/min，4 °C离心 10 min，取上清再使用 0.22 μm 滤膜过滤，以除去脂肪、细胞残渣及小颗粒物质。

(2)使用 10 倍柱体积的 IgG_{2b} 偶联缓冲液平衡柱子，保持流速为 2 s/滴。

(3)用注射器把样品加入至柱子上端接口，将流出液收集于 50 mL 离心管中，保持流速为 4 s/滴。

(4)用 5 倍柱体积的 IgG_{2b} 偶联缓冲液过柱，保持流速为 2 s/滴。

(5)在不同 EP 管中加入不同体积的 1 M Tris-HCl 缓冲液（pH =9.0），滴加洗脱液到 1.0 mL，混匀后检测 pH 值。根据结果调整 Tris-HCl 的量，使中和后溶液 pH 为 7.0。

(6)取 5 个 EP 管, 根据中和调试结果, 按量分别加入中和液。

(7)用 5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱抗体, 收集于上述 EP 管中, 保持流速为 4 s/滴。

(8)用间接 ELISA 方法测定腹水纯化前和纯化后的效价。并将纯化前后的腹水进行 SDS-PAGE, 分析单克隆抗体的纯度。

1.4.11.单抗的纯化双向电泳及质谱鉴定

将鼻疽杆菌 CVCC67003 全菌蛋白及 3A4 单抗送至北京百泰派克生物科技有限公司进行双向电泳和质谱鉴定。

1.4.11.1.等电聚焦

(1)取 1 mg CVCC67003 灭活菌体蛋白样品, 使用 2D Clean up kit 处理, 将干燥后的蛋白用 340 μ L IEFsample loading solution 溶解。

(2)将试管 12000 $\times$ g 离心 10 min, 除去不溶杂质并消除加样产生的气泡。

(3)将样品上样至 IPG 胶条槽内。从冰箱取出干胶条复温, 吸取样品上清液从槽顶端开始, 沿边缘加入聚焦盘槽中, 使样液加成一条细线, 均匀分布在聚焦盘中。撕去胶条保护膜, 将胶面朝下从一端慢慢覆盖在样液上, 避免产生气泡。再吸 1.2 mL 矿物油覆盖在胶条上方, 隔绝胶条与空气。最后盖上盖子。

(4)等电聚焦程序: S1: 30 V 6 h 水化; S2: 60 V 6 h 除盐; S3: 100 V 1 h 除盐; S4: 500 V 1 h 升压; S5: 1000 V 1 h 升压; S6: 5000 V 2 h 升压; S7: 8000 V 2 h 升压; S8: 8000 V 64000 vhr 聚焦; S9: 500 V 10 h。

1.4.11.2.SDS-PAGE

(1)将聚焦好的胶条用镊子拿出, 用纯水小心冲去矿物油后分别用平衡液 I 和 II 各平衡 15 min, 结束后用水轻轻冲去平衡液。

(2)配制 12.5 %的丙烯酰胺凝胶一块, 室温凝固 40 min 后, 将 Marker 放在滤纸上, 并将滤纸放入大胶中, 胶条裁取合适长度后放入大胶, 小心倒入琼脂糖封胶液以避免产生气泡。

(3)将电压设定为 70 V, 运行 40 min。然后将电压调整为 200 V, 运行至结束。

(4)将转膜后的胶取出, 考马斯亮蓝染色过夜, 用水脱色 30 min, 拍照。

1.4.11.3.Western Blot

(1)使用半干转膜法对电泳后的胶进行转膜。

(2)完成转膜电泳后, 小心取出 PVDF 膜, 放置在清洗容器中, 用 PBST 清洗膜表面两次, 每次 5 分钟。

- (3)配制 5 %的脱脂奶粉，放置在水平摇床上摇匀封闭 2 h。
- (4)完成封闭后，弃去脱脂奶粉，用含有 0.05 % Tween 的 PBST 清洗 3 次 PVDF 膜，每次 10 min。
- (5)用 5 %脱脂奶粉 1：2000 稀释单抗 3A4，4 °C孵育过夜。
- (6)用含有 0.05 % Tween 的 PBST 清洗 3 次 PVDF 膜，每次 10 min。
- (7)用 5 %脱脂奶粉 1：5000 稀释山羊抗鼠酶标二抗，放置在水平摇床上慢摇常温孵育 1 h。
- (8)用 PBST 清洗 3 次，每次 10 min。用 PBS 清洗 1 次。
- (9)将显色液 A、B 等体积均匀混合。滴加至 PVDF 膜上，显色，拍照。
- (10)对应 WB 显色图和凝胶显色图，在胶上切取胶点。

1.4.11.4.质谱

对切取的胶点进行洗涤、脱色、脱水、干燥以及酶切，将处理好的胶粒用质谱仪进行 LC-MS/MS 分析。液相色谱条件为：分析柱为 75 μm i.d. $\times$ 25 cm, NanoViper C18 1.9 μm ;流动相 A 为 0.1 %甲酸;流动相 B 为 0.1 %甲酸, 80 % ACN;流速为 300 nL/min;每个组分分析时间为 66 min。一级质谱参数为 Resolution: 120000; AGCtarget: Standard; Maximum IT: 20 ms; Scanrange: 300 to 1800 m/z。二级质谱参数为 Resolution: 15000; AGCtarget: Standard; Maximum IT: 22 ms; Top N: 30; NCE/stepped NCE: 28。将质谱原始文件使用 Max Quant (2.1.4.0) 分别检索目标蛋白数据库。

2.结果

2.1.抗原鉴定

经热酚水法提取的 LPS 含有少量蛋白，分别位于 100 kDa、37 kDa 以及 10 kDa 左右。见图 25、图 26。

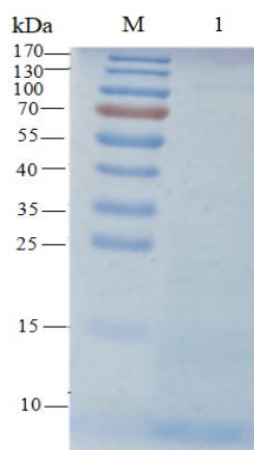


图 25 CVCC67003 株 LPS 考马斯亮蓝染色图

(M 为蛋白 Marker; 1 为粗提 LPS)

Fig. 25 *B.mallei* CVCC67003 LPS Coomassie bright blue stain

(M is a protein Marker. 1 is crude extraction of LPS)

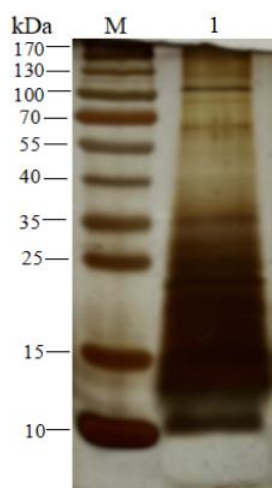


图 26 CVCC67003 株 LPS 银染图

(M 为蛋白 Marker; 1 为粗提 LPS)

Fig. 26 *B.mallei* CVCC67003 LPS Coomassie bright blue stain

(M is a protein Marker. 1 is crude extraction of LPS)

2.2.小鼠血清效价测定

使用建立的间接 ELISA 方法, 以未免疫小鼠血清为空白对照, 对 4 只三次免疫后的小鼠血清效价进行测定, 结果见表 10, 1、2、3、4 号小鼠血清效价均达到了 1: 16000,

从中选取了 4 号小鼠进行加强免疫。

表 10 三次免疫后小鼠血清抗体效价 ELISA 检测 OD_{450nm} 结果

Table 10 ELISA results of mouse serum antibody potency after three immunizations

血清稀释浓度	小鼠编号				阴性对照
	1	2	3	4	
1: 2000	2.87	3.0138	3.1006	3.1151	0.1372
1: 4000	2.2494	2.3634	2.3929	2.5497	0.0926
1: 8000	1.1322	1.0747	1.5533	1.4701	0.0813
1: 16000	0.7037	0.5361	0.824	0.8915	0.0623
1: 32000	0.3108	0.2632	0.3526	0.3312	0.0314

2.3.阳性杂交瘤细胞株的确定

将经 CVCC67003 株灭活全菌免疫的小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞进行融合，如图 27 所示，细胞融合后 7 天，可见成团的杂交瘤细胞。使用同 1.4.4 建立的间接 ELISA 方法检测杂交瘤细胞上清效价，筛选阳性杂交瘤细胞孔进行亚克隆。经 4 次亚克隆后，获得 4 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株，将其分别命名为 3A4、3A7、3B2 和 3G12。



图 27 融合 7 天后杂交瘤细胞生长状态（4×）

Fig. 27 Hybridoma cell growth after 7 days of fusion(4×)

2.4.单克隆抗体亚型鉴定

用小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用酶标二抗即用试剂盒，鉴定结果见表 11 所示，3A4、

3A7、3B2 和 3G12 的抗体亚型均为 IgG_{2b} 亚型。

表 11 四株单克隆抗体亚型鉴定结果

Table 11 Identification results of four monoclonal antibody subtypes

亚型	杂交瘤细胞株			
	3A4	3B2	3A7	3G12
IgA	0.045	0.0566	0.0467	0.0555
IgG3	0.0454	0.0462	0.0451	0.0459
IgG1	0.0419	0.0425	0.0419	0.041
IgG2a	0.0394	0.0472	0.0421	0.0419
IgG2b	0.7832	0.8056	0.8557	0.9482
IgM	0.0623	0.0549	0.0605	0.069

2.5.单克隆抗体特异性鉴定

选择效价最高的 3A4 株杂交瘤细胞进行鉴定。结果见表 12，间接 ELISA 结果显示 3A4 株细胞上清与 CVCC67003 株全菌和粗提 LPS 反应，但不与纯化 LPS 反应。说明该单抗是针对鼻疽杆菌的菌体蛋白，具体蛋白表位有待进一步确认。

Western blot 结果见图 28 显示，在鼻疽杆菌全菌泳道、粗提 LPS 泳道位于 50 kDa 处均具有反应条带，但在纯化 LPS 泳道没有条带。与间接 ELISA 结果一致。

表 12 3A4 与鼻疽杆菌不同抗原成分反应的 ELISA 结果

Table 12 ELISA results of 3A4 reacting with different antigenic components of *B.mallei*

	全菌	粗提 LPS	纯化 LPS
OD _{450nm} 值	1.916	1.3944	0.0768

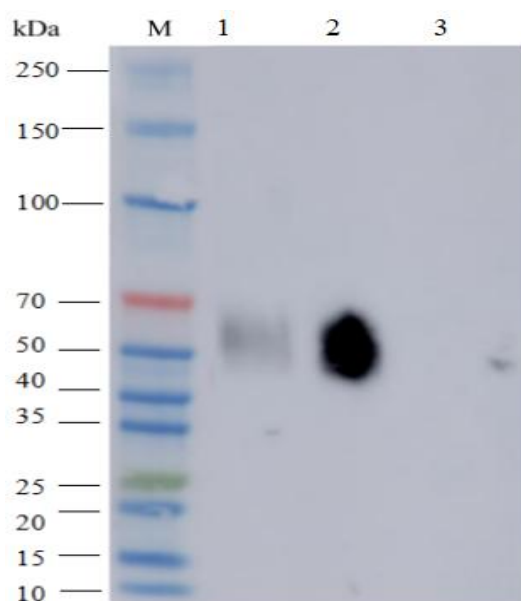


图 28 3A4 与鼻疽杆菌不同抗原成分反应的 WB 结果

(M 为蛋白 Marker; 1 为 CVCC67003 株全菌; 2 为粗提 LPS; 3 为纯化后 LPS)

Fig. 28 WB results of reaction of 3A4 with different antigenic components of *B.mallei* CVCC67003

(M is a protein Marker. 1 is the whole strain of *B.mallei* CVCC67003; 2 for crude extraction of LPS; 3 is purified LPS)

2.6. 杂交瘤细胞分泌抗体稳定性的鉴定

检测抗体效价的结果见表 13, 3A4 株杂交瘤细胞均具有稳定传代培养并分泌单克隆抗体的能力。

表 13 3A4 株分泌抗体稳定性检测结果

Table 13 The stability of antibody secreted by strain 3A4 was detected

杂交瘤细胞株	传代次数						
	1	5	10	15	20	25	30
3A4	3.2425	3.4865	3.5124	2.898	2.5928	2.963	3.0894

2.7.腹水纯化效果

用 Protein G 亲和柱纯化后的腹水，经 SDS-PAGE 检测后，如图 29 所见，纯化后的腹水杂带明显减少，并清晰显示出在 50-55 kDa 处有一重链和在 23 kDa 附近处有一轻链。

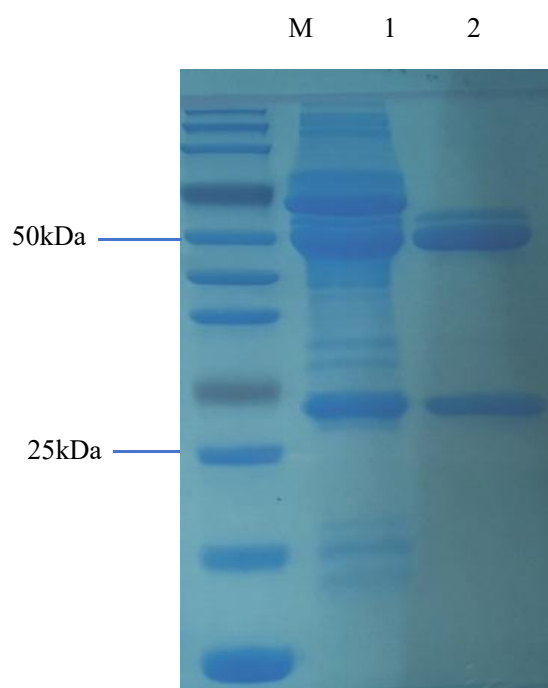


图 29 单克隆抗体 3A4 腹水纯化前后效果比较

(M 为 Marker; 1 为纯化前; 2 为纯化后)

Fig. 29 Comparison of the effect of monoclonal antibody 3A4 before and after purification of ascites

(M.Protein Marker; 1. Pre-purified ascites; 2. Post-purified ascites)

2.8.腹水纯化前后效价测定

采用间接 ELISA 测定纯化前后 3A4 腹水效价，结果见表 14 显示，纯化后效价稍有降低，但都能达到 3.2×10^4 以上。

表 14 腹水纯化前后效价测定结果

Table 14 Results of potency determination before and after purification of ascites

稀释倍数	编号	
	3A4-纯化前	3A4-纯化后
1: 1000	3.4386	3.2582
1: 2000	3.3106	3.0355
1: 4000	2.984	2.1297
1: 8000	2.0445	1.3243
1: 16000	0.9417	0.7681
1: 32000	0.443	0.3021
1: 64000	0.2623	0.1579
1: 128000	0.2259	0.1188

2.9.双向电泳及质谱鉴定结果

2.9.1.双向电泳结果

鼻疽杆菌 CVCC67003 全菌蛋白进行双向电泳分离后,经过考马斯亮蓝染色并标定分离蛋白的位置,分离结果见图 30 所示。同时将抗原蛋白进行双向电泳分离转膜后,以纯化后的单克隆抗体 3A4 作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗进行 Western blot 试验,结果见图 31。将两份结果重叠,见图 32,发现在 42~100 kDa、pH=3~7 区间均有重合蛋白点分布。对应 WB 显色图和凝胶显色图,在胶上切取(图 32)标注的 5 个点作为疑似蛋白点进行后续检测。

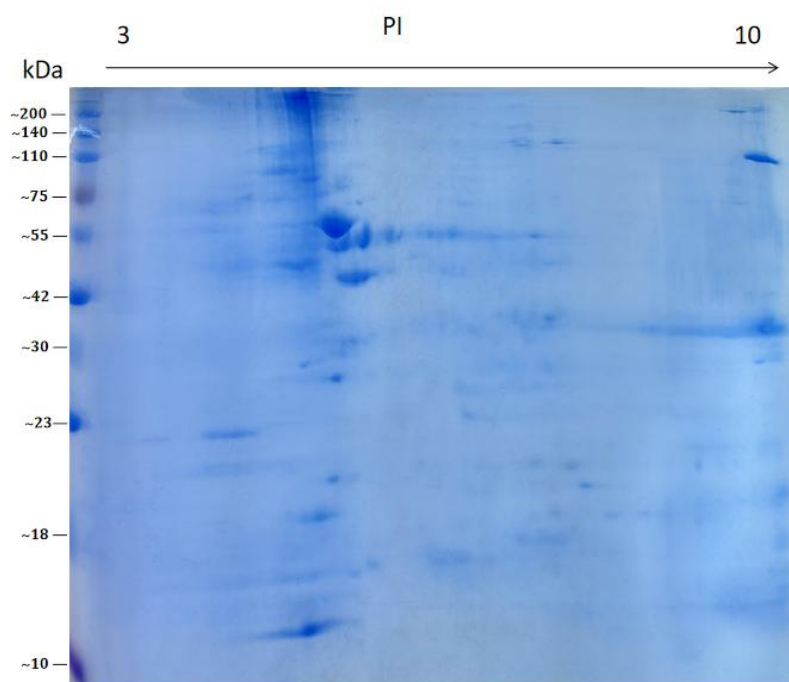


图 30 鼻疽杆菌 CVCC67003 全菌蛋白考马斯亮蓝染色结果

Fig. 30 Results of Coomassie bright blue staining of whole bacterial protein of *B.mallei* CVCC67003

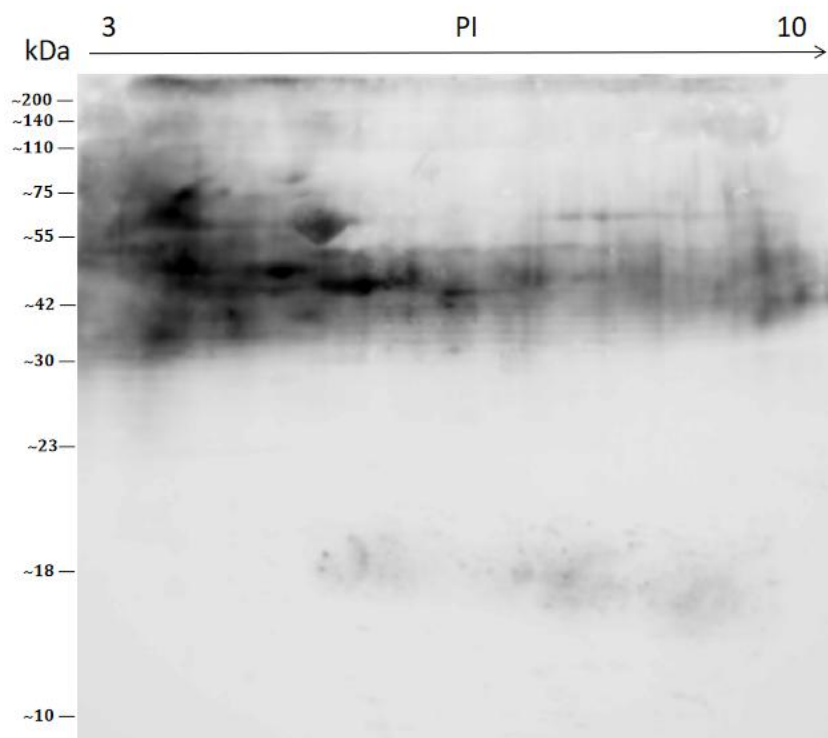


图 31 鼻疽杆菌 CVCC67003 全菌蛋白 2D-Western blot 结果

Fig. 31 Results of 2-D Western blot of whole bacterial protein of *B.mallei* CVCC67003

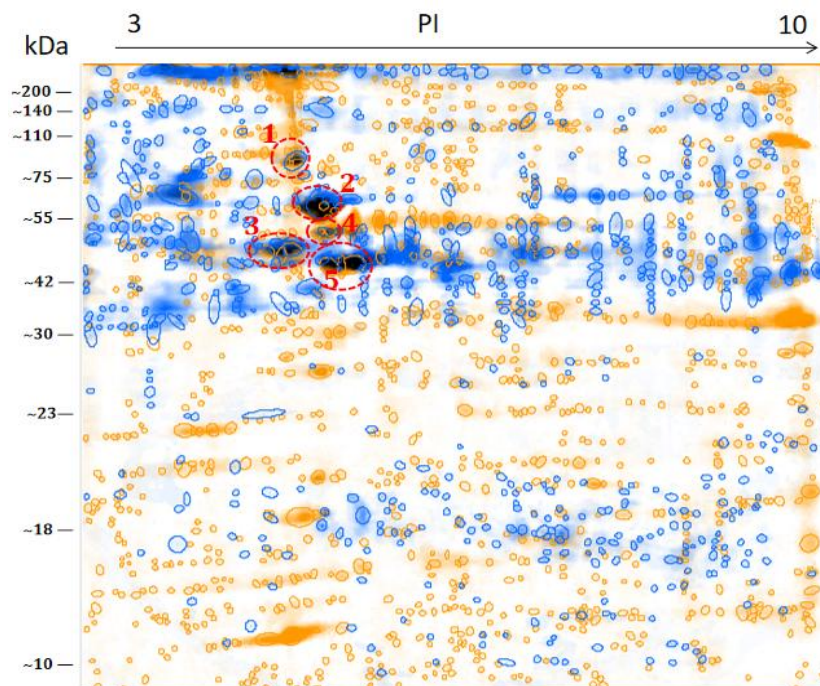


图 32 鼻疽杆菌 CVCC67003 蛋白双向电泳分析

(圈 1 为蛋白点 1；圈 2 为蛋白点 2；圈 3 为蛋白点 3；圈 4 为蛋白点 4；圈 5 为蛋白点 5)

Fig. 32 Bidirectional electrophoresis analysis of CVCC67003 protein in *B. malei*

(Circle 1 is protein point 1; Circle 2 is protein point 2; Circle 3 is protein point 3; Circle 4 is protein point 4; Circle 5 is the protein point 5)

2.9.2. 抗原蛋白质谱结果

从双向电泳凝胶挖取选定的 5 个蛋白点进行质谱分析，各蛋白点命名分别为 1、2、3、4、5，各蛋白肽指纹图谱见图 33。根据质谱结果，筛选出五个蛋白点中至少在一个蛋白点出现 2 次及以上的可能蛋白 ID 进行汇总，见表 15，在 Uni Port 蛋白质数据库中搜索所获预测蛋白，选取了在 5 个蛋白点质谱结果中重复出现的两个蛋白点，分别为延伸因子 Tu (Elongation factor, EF Tu) 和伴侣蛋白 GroEL (Chaperonin GroEL)，大小分别在 43 kDa、57 kDa 左右。推测单抗 3A4 针对的抗原表位可能位于这两种蛋白上，后续还需对两种蛋白进行表达验证。

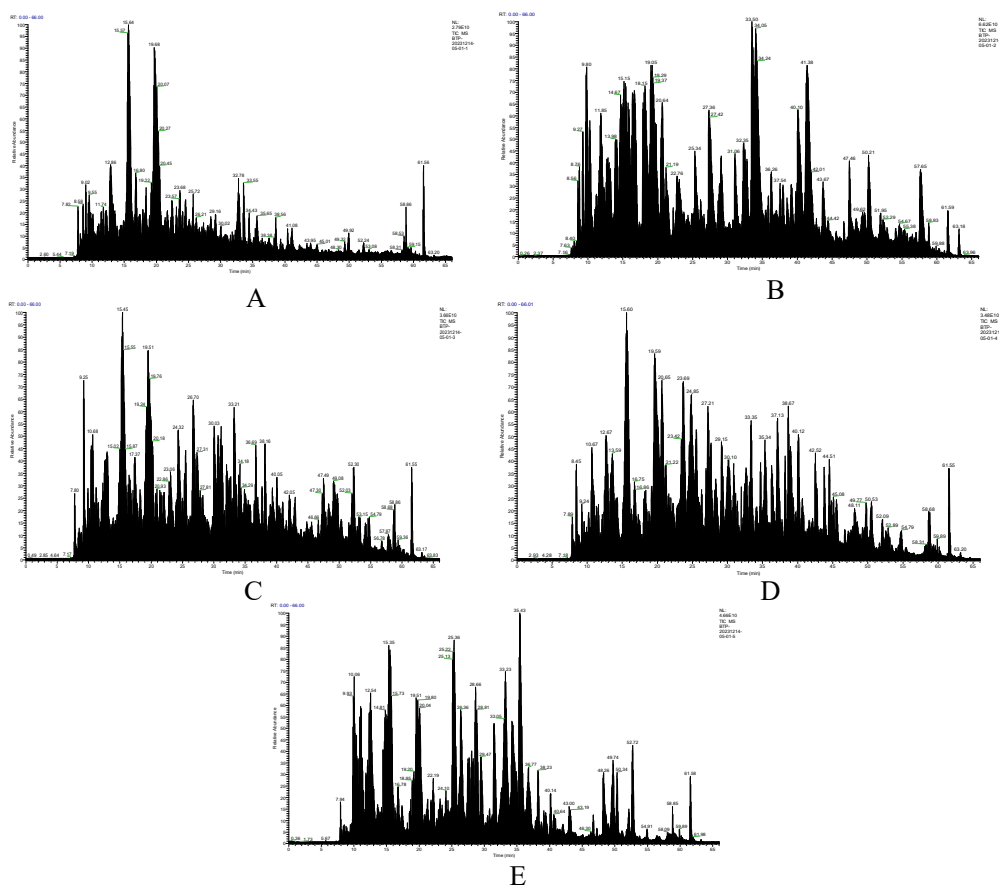


图 33 5 个蛋白点的蛋白肽指纹图谱

(A.蛋白点 1 指纹图谱; B.蛋白点 2 指纹图谱; C.蛋白点 3 指纹图谱; D.蛋白点 4 指纹图谱; E.蛋白点 5 指纹图谱)

Fig. 33 Protein peptide fingerprint of 5 protein points

(A.Protein site 1 fingerprinting; B.Protein site 2 fingerprinting; C.Protein site 3 fingerprinting; D.Protein site 4 fingerprinting; E.Protein site 5 fingerprinting)

表 15 抗原蛋白质谱鉴定

Table 15 Predictive protein aggregation

Majority protein IDs	Fasta headers	Number of proteins	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Sequence length	Score	Intensity
蛋白点 1	Q62I82;Q4 PPC2;C4A MP2;A3M MB4;A2S9 S5;A1V1Z9	sp Q62I82 CH60_BURMA Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=groEL PE=3 SV=1;tr Q4PPC2 Q4PPC2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=groL PE=3 SV=1;tr C4AMP2 C4AMP2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia						
		6	30	59.1	57.521	550	323.31	21644000000
	Q62GK3;C 4B091;A3 MRT8;A2S 7F9;A1V8 A5;A0A0E 1FXD0;C4 B0A5	sp Q62GK3 EFTU_BURMA Elongation factor Tu OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=tuf1 PE=3 SV=1;tr C4B091 C4B091_BURML Elongation factor Tu OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=tuf_1 PE=3 SV=1;sp A3MRT8 EFTU_BURM7 Elongation fac						
		7	23	63.6	42.991	396	323.31	13794000000

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 1	Q62GK2;C4B092;A2S7H3;A0A6C6YS31;A0A3N4FMT1	sp Q62GK2 EFG2_BURMA Elongation factor G 2 OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=fusA2 PE=3 SV=1;tr C4B092 C4B092_BURML Elongation factor G OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=fusA_1 PE=3 SV=1;sp A2S7H3 EFG_BURM9 Elongation fa	5	26	57.3	77.446	700	323.31	12539000000
	Q62I82;Q4PPC2;C4AMP2;A3M1MB4;A2S9S5;A1V1Z9	sp Q62I82 CH60_BURMA Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=groEL PE=3 SV=1;tr Q4PPC2 Q4PPC2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=groL PE=3 SV=1;tr C4AMP2 C4AMP2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia	6	100	99.8	57.521	550	323.31	218380000000
	C4AY80;A2S7W5;A0A6C6YRC1;A0A0H2WIA1;A0A3B0DD69	tr C4AY80 C4AY80_BURML Carbohydrate porin, OprB family OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=BMAGB8_3501 PE=3 SV=1;tr A2S7W5 A2S7W5_BURM9 Carbohydrate porin, OprB family OS=Burkholderia mallei (strain NCTC 10229) OX=412022 GN=BMA10229_A2070 PE=3	5	24	65.7	53.079	504	323.31	212770000000
	A0A3N4FVQ6	tr A0A3N4FVQ6 A0A3N4FVQ6_BURML Glycerol kinase OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=glpK PE=3 SV=1	1	1	78.6	54.533	500	323.31	60151000000

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 2	Q62FR5;C4 AQU1;A3 MQJ9;A1V 8T1;A0A3 N4G0R4;A 2S6J8	sp Q62FR5 ATPB1_BURMA ATP synthase subunit beta 1 OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=atpD1 PE=3 SV=1;tr C4AQU1 C4AQU1_BURML ATP synthase subunit beta OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=atpD_1 PE=3 SV=1;sp A3MQJ9 ATPB1_BURM	6	29	73.7	50.622	464	323.31	51977000000
	Q62GK3;C 4B091;A3 MRT8;A2S 7F9;A1V8 A5;A0A0E 1FXD0;C4 B0A5	sp Q62GK3 EFTU_BURMA Elongation factor Tu OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=tuf1 PE=3 SV=1;tr C4B091 C4B091_BURML Elongation factor Tu OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=tuf_1 PE=3 SV=1;sp A3MRT8 EFTU_BURM7 Elongation fac	7	26	75.3	42.991	396	323.31	40204000000
	Q62CH7;C 4B2Y6;A3 MEC6;A2R WD6;A1U VS4;A0A3 N4FE24	sp Q62CH7 BETB_BURMA Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=betB PE=3 SV=1;tr C4B2Y6 C4B2Y6_BURML Betaine aldehyde dehydrogenase OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=betB PE=3 SV=1;sp A3MEC6 BETB_B	6	22	59.1	52.173	489	323.31	14698000000

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 2	Q62GK2;C 4B092;A2S 7H3;A0A6 C6YS31;A0 A3N4FMT 1	sp Q62GK2 EFG2_BURMA Elongation factor G 2 OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=fusA2 PE=3 SV=1;tr C4B092 C4B092_BURML Elongation factor G OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=fusA_1 PE=3 SV=1;sp A2S7H3 EFG_BURM9 Elongation fa	5	17	44.6	77.446	700	323.31	14614000000
	C4APY0;A 2RXL2;A0 A6C6YKT3 ;A0A3N4F DG9;A0A0 H2WDH7	tr C4APY0 C4APY0_BURML Outer membrane porin OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=opcP PE=4 SV=1;tr A2RXL2 A2RXL2_BURM9 Outer membrane porin OS=Burkholderia mallei (strain NCTC 10229) OX=412022 GN=opcP PE=4 SV=1;tr A0A6C6YKT3 A0A6C6YKT3_BURM7 Out	10	16	74.5	39.396	376	323.31	10046000000
	Q62J10;C4 AR34;A3M L77;A2SA U7;A1V5K 2;A0A3N4 FVT3	sp Q62J10 ENO_BURMA Enolase OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=eno PE=3 SV=1;tr C4AR34 C4AR34_BURML Enolase OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=eno PE=3 SV=1;sp A3ML77 ENO_BURM7 Enolase OS=Burkholderia mallei (strain NCTC 1	6	42	81.3	45.682	427	323.31	642870000000

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 3	Q62I82;Q4	sp Q62I82 CH60_BURMA Chaperonin GroEL							
	PPC2;C4A	OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344)							
		OX=243160 GN=groEL PE=3							
	MP2;A3M	SV=1;tr Q4PPC2 Q4PPC2_BURML Chaperonin GroEL	6	52	85.5	57.521	550	323.31	263920000000
	MB4;A2S9	OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=groL PE=3							
	S5;A1V1Z9	SV=1;tr C4AMP2 C4AMP2_BURML Chaperonin GroEL							
		OS=Burkholderia							
	C4APY0;A	tr C4APY0 C4APY0_BURML Outer membrane porin							
	2RXL2;A0	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	A6C6YKT3	GN=opcP PE=4 SV=1;tr A2RXL2 A2RXL2_BURM9	5	17	84	39.396	376	323.31	75397000000
	;A0A3N4F	Outer membrane porin OS=Burkholderia mallei (strain							
	DG9;A0A0	NCTC 10229) OX=412022 GN=opcP PE=4							
	H2WDH7	SV=1;tr A0A6C6YKT3 A0A6C6YKT3_BURM7 Out							
	Q62GK3;C	sp Q62GK3 EFTU_BURMA Elongation factor Tu							
	4B091;A3	OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344)							
	MRT8;A2S	OX=243160 GN=tuf1 PE=3							
	7F9;A1V8	SV=1;tr C4B091 C4B091_BURML Elongation factor Tu	7	33	87.6	42.991	396	323.31	62634000000
	A5;A0A0E	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	1FXD0;C4	GN=tuf_1 PE=3 SV=1;sp A3MRT8 EFTU_BURM7							
	B0A5	Elongation fac							

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 4	Q62FR5;C4 AQU1;A3 MQJ9;A1V 8T1;A0A3 N4G0R4;A 2S6J8	sp Q62FR5 ATPB1_BURMA ATP synthase subunit beta 1 OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=atpD1 PE=3 SV=1;tr C4AQU1 C4AQU1_BURML ATP synthase subunit beta OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=atpD_1 PE=3 SV=1;sp A3MQJ9 ATPB1_BURM	6	45	92	50.622	464	323.31	494670000000
	C4AY80;A 2S7W5;A0 A6C6YRC1 ;A0A0H2W IA1;A0A3B 0DD69	tr C4AY80 C4AY80_BURML Carbohydrate porin, OprB family OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390 GN=BMAGB8_3501 PE=3 SV=1;tr A2S7W5 A2S7W5_BURM9 Carbohydrate porin, OprB family OS=Burkholderia mallei (strain NCTC 10229) OX=412022 GN=BMA10229_A2070 PE=3	5	31	70.2	53.079	504	323.31	320960000000
	A0A3N4FV Q6	tr A0A3N4FVQ6 A0A3N4FVQ6_BURML Glycerol kinase OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=glpK PE=3 SV=1	1	2	84.2	54.533	500	323.31	206830000000
	Q62I82;Q4 PPC2;C4A MP2;A3M MB4;A2S9 S5;A1V1Z9	sp Q62I82 CH60_BURMA Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=groEL PE=3 SV=1;tr Q4PPC2 Q4PPC2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=groL PE=3 SV=1;tr C4AMP2 C4AMP2_BURML Chaperonin GroEL OS=Burkholderia	6	40	75.8	57.521	550	323.31	111550000000

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 4	Q62GK3;C	sp Q62GK3 EFTU_BURMA Elongation factor Tu							
	4B091;A3	OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344)							
	MRT8;A2S	OX=243160 GN=tuf1 PE=3							
	7F9;A1V8	SV=1;tr C4B091 C4B091_BURML Elongation factor Tu	7	27	80.3	42.991	396	323.31	35531000000
	A5;A0A0E	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	1FXD0;C4	GN=tuf_1 PE=3 SV=1;sp A3MRT8 EFTU_BURM7							
	B0A5	Elongation fac							
	Q62CH7;C	sp Q62CH7 BETB_BURMA Betaine aldehyde							
	4B2Y6;A3	dehydrogenase OS=Burkholderia mallei (strain ATCC							
	MEC6;A2R	23344) OX=243160 GN=betB PE=3	6	29	64.4	52.173	489	323.31	26032000000
	WD6;A1U	SV=1;tr C4B2Y6 C4B2Y6_BURML Betaine aldehyde							
	VS4;A0A3	dehydrogenase OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4							
	N4FE24	OX=320390 GN=betB PE=3 SV=1;sp A3MEC6 BETB_B							
	Q62J10;C4	sp Q62J10 ENO_BURMA Enolase OS=Burkholderia							
	AR34;A3M	mallei (strain ATCC 23344) OX=243160 GN=eno PE=3							
	L77;A2SA	SV=1;tr C4AR34 C4AR34_BURML Enolase	6	21	68.1	45.682	427	323.31	23092000000
	U7;A1V5K	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	2;A0A3N4	GN=eno PE=3 SV=1;sp A3ML77 ENO_BURM7 Enolase							
	FVT3	OS=Burkholderia mallei (strain NCTC 1							

表 15 抗原蛋白质谱鉴定 (续表)

Table 15 Predictive protein aggregation(Continued form)

蛋白点 5	Q62GK3;C	sp Q62GK3 EFTU_BURMA Elongation factor Tu							
	4B091;A3	OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344)							
	MRT8;A2S	OX=243160 GN=tufI PE=3							
	7F9;A1V8	SV=1;tr C4B091 C4B091_BURML Elongation factor Tu	7	55	98.7	42.991	396	323.31	595920000000
	A5;A0A0E	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	1FXD0;C4	GN=tuf_1 PE=3 SV=1;sp A3MRT8 EFTU_BURM7							
	B0A5	Elongation fac							
		sp Q62I82 CH60_BURMA Chaperonin GroEL							
	Q62I82;Q4	OS=Burkholderia mallei (strain ATCC 23344)							
	PPC2;C4A	OX=243160 GN=groEL PE=3							
	MP2;A3M	SV=1;tr Q4PPC2 Q4PPC2_BURML Chaperonin GroEL	6	40	77.1	57.521	550	323.31	26418000000
	MB4;A2S9	OS=Burkholderia mallei OX=13373 GN=groL PE=3							
	S5;A1V1Z9	SV=1;tr C4AMP2 C4AMP2_BURML Chaperonin GroEL							
		OS=Burkholderia							
	C4APY0;A	tr C4APY0 C4APY0_BURML Outer membrane porin							
	2RXL2;A0	OS=Burkholderia mallei GB8 horse 4 OX=320390							
	A6C6YKT3	GN=opcP PE=4 SV=1;tr A2RXL2 A2RXL2_BURM9							
	;A0A3N4F	Outer membrane porin OS=Burkholderia mallei (strain	5	17	81.4	39.396	376	323.31	13016000000
	DG9;A0A0	NCTC 10229) OX=412022 GN=opcP PE=4							
	H2WDH7	SV=1;tr A0A6C6YKT3 A0A6C6YKT3_BURM7 Out							

3.讨论

马鼻疽的治疗难度大,死亡率高,预防和快速检测尤为重要。特异性单克隆抗体的筛选被认为是一个有前景的研究方向,并且这些单克隆抗体也可能作为感染后的替代或辅助治疗手段^[83]。ZHANG S^[84]等人筛选出了大量针对鼻疽杆菌的单克隆抗体,根据单克隆抗体对不同种鼻疽杆菌的反应特异性以及所识别的不同抗原(脂多糖、胶囊多糖、蛋白质和糖蛋白),将其分为不同的组。通过体外细胞试验检测了部分单克隆抗体的杀菌活性,发现所有具有较强抗菌活性的单克隆抗体均对细菌的荚膜多糖(PS)或脂多糖(LPS)具有特异性。进一步的研究表明,在完整的细菌中,荚膜多糖或 LPS 分子上的抗原表位都很容易结合,而蛋白质/糖蛋白上的表位则不容易获得单抗抗体。因此本研究通过鼻疽杆菌全菌抗原免疫小鼠,以粗提 LPS 作为筛选抗原,旨在筛选出针对脂多糖的单克隆抗体,为马鼻疽的诊断和治疗提供选择。试验得到的 3A4 株单抗经鉴定并非针对马鼻疽 LPS 抗原表位,通过双向电泳和质谱分析,初步预测出两个可能的蛋白位点,即延伸因子 Tu 和伴侣蛋白 GroEL。

延伸因子 Tu 蛋白是一种 GTP 结合蛋白,负责将每个氨基酸基 tRNA (aa-tRNA) 运送到核糖体,这一过程涉及 GTP 的水解和复合物的解离^[85]。在最初的蛋白翻译过程中,EF-Tu (以三元复合物 EF-Tu •GTP •aa-tRNA 的形式)与核糖体结合,允许 aa-tRNA 分子与位于核糖体 A 位点的 mRNA 密码子形成碱基对相互作用。密码子-反密码子相互作用的形成导致 GTP 水解,EF-Tu 发生大规模构象变化这导致 EF-Tu 释放 aa-tRNA^[86]。NIEVES W^[87]等人证明了细菌延伸因子-Tu (EF-Tu)可作为类鼻疽伯克霍尔德氏菌的一种潜在疫苗抗原,并诱导小鼠产生特异性抗体和细胞介导的免疫应答。YI J^[88]等人也说明了类鼻疽伯克霍尔德氏菌的 EF-Tu 具有免疫原性,并且血清中 IgM 在感染山羊的第 14 天达到峰值。鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌抗原具有交强交叉性,由此推测 EF-Tu 蛋白在鼻疽杆菌中也具有免疫原性。该结论还需后续试验进行验证。

细菌伴侣蛋白 GroEL 是一种存在于细菌细胞质的协助蛋白质折叠的蛋白质,由两个前后堆叠的环组成的圆柱形复合物,其共同伴侣蛋白 GroES 像一个圆顶盖一样结合在 GroEL 的两端。只有当 GroEL 被 GroES 覆盖时,它才能捕获底物蛋白,GroEL-GroES 系统形成了一个纳米笼,给蛋白质折叠提供了一个优越的物理环境,防止错误折叠或聚集。当折叠完成时,GroES 从 GroEL 中解离,折叠的底物被释放^[89-91]。Dohre S K^[92]等人在二维免疫印迹上鉴定出多种免疫反应蛋白,如 GroEL、翻译延伸因子 Tu、延伸因子 Ts、精氨酸脱亚胺酶、苹果酸脱氢酶、DNA 定向 RNA 聚合酶亚基 α ,结果显示以重组 GroEL 蛋白建立的 ELISA 方法其灵敏度和特异性分别为 96 %和

98.7 %，强调了 GroEL 蛋白在马鼻疽的血清诊断中的潜力。

针对不同抗原表位单克隆抗体的筛选具有随机性，不仅表现在免疫抗原和筛选抗原的选择，也体现在单抗的亚克隆过程中。细胞融合成功后，同一细胞孔中含有分泌针对不同抗原抗体的杂交瘤细胞，通过有限稀释法，将单个杂交瘤细胞分离出来。在稀释过程中，可能由于操作原因导致目标细胞死亡或丢失。在筛选过程中，由于人力有限，常放弃弱阳性细胞孔。而不同细胞生长速度存在差异，可能存在同一细胞孔中含有两种及以上杂交瘤细胞，其中针对目标抗原的杂交瘤长势较慢，分泌抗体较少，其他细胞生长较快使整个孔细胞数量达到检测条件，使最终呈现弱阳性结果，从而忽略部分阳性细胞。为保证尽可能多的筛选到目标细胞，可延长弱阳性细胞孔培养时间。

4.小结

使用鼻疽杆菌 CVCC67003 成功筛选出一株单抗 3A4 并进行鉴定，其抗体亚型为 IgG_{2b}，其针对筛选抗原中的蛋白成分。经双向电泳和质谱分析初步预测该抗体针对的表位可能为延伸因子 Tu 或伴侣蛋白 GroEL。

第三章 马鼻疽抗体竞争 ELISA 方法的建立

1.材料与方法

1.1.血清与菌株

马鼻疽阳性血清、阴性血清由本实验室采集保存。马流产沙门氏菌、马腺疫链球菌、类鼻疽假单胞菌阳性血清由本实验室免疫制备并鉴定保存。

1.2.试验试剂

试验所涉及主要试剂见表 9。

1.3.方法

1.3.1.竞争 ELISA 方法的建立

使用单克隆抗体 3A4 及鼻疽杆菌 CVCC67003 的粗提脂多糖建立马鼻疽竞争 ELISA 抗体检测方法，具体操作步骤如下：

(1)包被：将粗提 LPS 用包被液稀释至 10 $\mu\text{g/mL}$ 。振荡混匀后每孔加入 100 μL 至 96 孔酶标板中，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h。

(2)洗板：用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 1 次，拍净板内液体。

(3)封闭：将 10 %的脱脂奶粉 100 μL /孔加入至酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。

(4)洗板：用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 1 次，拍净板内液体。

(5)加待检血清及单抗：将待检血清在血清稀释板上 1:50 稀释，单克隆抗体 3A4 进行 1:1000 倍稀释，二者同时加入酶标板中，每孔加入 50 μL ，振荡混匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min。

(6)洗板：用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 3 次，拍净板内液体。

(7)加酶标二抗：将 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 酶标二抗进行 1:10000 倍稀释，每孔中加入 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 30 min。

(8)洗板：用含有 0.05 % Tween 的 PBST 洗板 3 次，拍净板内液体。

(9)显色：加入 100 μL 的 TMB 显色液，避光显色 15 min。

(10)终止：加入 50 μL 终止液终止。

(11)读数：使用酶标仪测定 OD_{450nm} 值，读数，记录结果。

(12)计算：抑制率 (PI) = [(阴性血清 OD_{450nm} - 样品血清 OD_{450nm})] / 阴性血清

$OD_{450nm} \times 100\%$ 。

1.3.2.最适抗原包被浓度和单抗稀释度

通过棋盘法，其他反应条件不变，确定最适抗原包被浓度和单抗稀释度。在未知单抗针对具体抗原表位情况下，使用单克隆抗体筛选抗原进行包被。将抗原浓度调整为 30 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ ，单抗进行 1: 100、1: 500、1: 1000、1: 2000、1: 4000、1: 6000、1: 8000、1: 10000 倍稀释，按照竞争 ELISA 操作步骤分别检测阳性和阴性血清，根据阳性血清 OD_{450nm} 处值为 0.1 左右，阴性血清 OD_{450nm} 处值为 1.0 左右，且抑制率较高、成本最小来综合选择竞争 ELISA 方法的最佳单抗稀释度及抗原浓度。

1.3.3.最适包被条件

按照抗原最佳浓度，将抗原分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h，37 $^{\circ}\text{C}$ 下包被 1 h、2 h、3 h，并按照确定的单抗稀释倍数进行竞争 ELISA 试验，其他条件保持一致，加入显色液和终止液读取 OD_{450nm} 值。选择抑制率较高的为最优包被条件。

1.3.4.最适封闭条件

根据上述确定的最佳抗原包被浓度和包被条件，分别使用 1 %BSA、3 %BSA、1 %脱脂乳、5 %脱脂乳、10 %脱脂乳、1 %鱼明胶、3 %鱼明胶对酶标板进行封闭，分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 条件下进行封闭，按照上述优化好的最佳单抗稀释浓度进行竞争 ELISA 试验，加入显色液和终止液读取 OD_{450nm} 值，抑制率较高的为最优封闭条件。

1.3.5.最适血清、二抗稀释度

按照确定好的抗原和单抗最佳浓度和稀释倍数、包被条件、封闭条件进行竞争 ELISA 试验，血清的稀释倍数按照 1: 5、1: 10、1: 20、1: 50、1: 80、1: 100、1: 150、1: 200 进行稀释，用 PBS 将 HRP 标记羊抗鼠酶标抗体按照 1:5000、1:10000、1:15000 和 1:20000 进行稀释，根据棋盘法进行竞争 ELISA 试验，读取阴阳性血清 OD_{450nm} 值，计算抑制率。选择抑制率最高的血清和二抗稀释度为最优反应条件。

1.3.6.最适血清、二抗孵育时间

根据确定好的抗原浓度、包被条件、封闭条件、血清和二抗稀释度，将血清在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min、30 min、45 min、60 min，另在确定的二抗稀释度下，将二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15 min、30 min、45 min、60 min，加入显色液和终止液读取 OD_{450nm} 值，选择抑制率最高的为血清、二抗最优孵育时间。

1.3.7.最适显色时间

根据上述确定的抗原、封闭液、血清、二抗、显色液反应条件进行试验，在加入显

色液后,按照室温 5 min、10 min、15 min 和 20 min 进行最佳显色条件的确定,加入终止液后读取 OD_{450nm} 值,选择抑制率最高的为最佳显色时间。

1.3.8.重复性

根据优化好的反应条件,在同一块酶标反应板上,随机挑选 份血清,每份血清重复 8 孔,测定 OD_{450nm},计算批内变异系数;取 3 块不同批次包被的酶标板,以同样的 8 份血清按相同条件进行检测,每板每份血清重复 8 孔,测定 OD_{450nm} 值,计算批间变异系数,以评价该方法的重复性。

1.3.9.临界值的测定

取本实验室保存的 81 份临床马血清阴性样本,设立阴性对照、阳性对照血清进行竞争 ELISA 检测。测定其血清 OD_{450nm} 值,计算阻断率%(PI%)=[(阴性孔 OD_{450nm} 值-阳性孔 OD_{450nm} 值)/阴性孔 OD_{450nm} 值]×100%,并计算阴性血清平均阻断率(X)和阴性血清阻断率标准差(SD)。当样本 PI% ≥ X+3SD 时判为阳性, P% ≤ X+2SD 时判为阴性,当样本位于二者之间判为可疑。

1.3.10.敏感性和特异性试验

用建立好的竞争 ELISA 方法对经补体结合试验测定效价为 1:100 的马鼻疽阳性对照血清进行 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 倍稀释后进行检测,以确定竞争 ELISA 方法的敏感性。通过实验室免疫马匹并验证为阳性的类鼻疽、马流产沙门氏菌、马腺疫链球菌马血清,以马鼻疽阳性血清作为阳性对照,对所建立的竞争 ELISA 方法进行特异性分析。

1.3.11.符合率试验

将本实验室保存的经补体结合试验测定的 547 份临床阴马血清、12 份阳性血清用于竞争 ELISA 方法检测,计算两种方法检测临床样品的符合率。

2.结果

2.1.最适抗原包被浓度和单抗稀释度

抗原包被条件结果见表 16,综合结果发现,在抗原 10 μg/mL、单抗 1:1000 倍稀释时阳性血清 OD_{450nm} 值在 0.1 左右,阴性血清 OD_{450nm} 值在 1.0 左右且抑制率较高。

表 16 包被抗原和单抗稀释度的筛选结果

Table 16 Screening results of coated antigen and monoclonal antibody dilution

单抗 稀释 倍数	抗原浓度（μg/mL）							
		30	20	15	10	5	2.5	1.25
100	P	0.8074	0.7464	0.587	0.4881	0.3627	0.2614	0.3364
	N	2.0514	2.098	1.7495	1.7675	1.3313	0.8564	0.6387
	PI	60.64%	64.42%	66.45%	72.38%	72.76%	69.48%	47.33%
500	P	0.4075	0.4159	0.2679	0.211	0.1235	0.0943	0.2051
	N	1.8913	1.898	1.7353	1.4999	0.9801	0.5246	0.3667
	PI	78.45%	78.09%	84.56%	85.93%	87.40%	82.02%	44.07%
1000	P	0.3163	0.2779	0.2142	0.1551	0.095	0.0649	0.0939
	N	1.5449	1.6048	1.4312	1.0472	0.6493	0.3034	0.2814
	PI	79.53%	82.68%	85.03%	85.19%	85.37%	78.61%	66.63%
2000	P	0.2752	0.215	0.1699	0.1184	0.0774	0.0582	0.0535
	N	1.0041	1.1181	0.8156	0.6971	0.3937	0.209	0.327
	PI	72.59%	80.77%	79.17%	83.02%	80.34%	72.15%	83.64%
4000	P	0.2527	0.1859	0.1446	0.1024	0.0827	0.055	0.0511
	N	0.6536	0.7682	0.5494	0.4783	0.2371	0.1524	0.2011
	PI	61.34%	75.80%	73.68%	78.59%	65.12%	63.91%	74.59%
6000	P	0.2398	0.1671	0.1384	0.0936	0.0698	0.054	0.1221
	N	0.5035	0.6168	0.4237	0.2974	0.2187	0.1318	0.2074
	PI	52.37%	72.91%	67.34%	68.53%	68.08%	59.03%	41.13%

表 16 包被抗原和单抗稀释度的筛选结果（续表）

Table 16 Screening results of coated antigen and monoclonal antibody dilution(Continued form)

	P	0.2021	0.1436	0.1263	0.0917	0.0679	0.0579	0.1943
8000	N	0.5784	0.5617	0.414	0.3174	0.2386	0.129	0.1174
	PI	65.06%	74.43%	69.49%	71.11%	71.54%	55.12%	-65.50%
	P	0.2586	0.1521	0.1505	0.1259	0.1302	0.1523	0.1592
10000	N	0.5389	0.4793	0.3608	0.2889	0.1709	0.1218	0.1787
	PI	52.01%	68.27%	58.29%	56.42%	23.82%	-25.04%	10.91%

2.2.包被条件

以抗原的最适包被量及单抗的最佳作用浓度为基础,将抗原包被条件分别为 4℃包被 12 h, 37℃包被 1 h、2 h、3 h, 进行 C-ELISA 试验, 分别检测阴、阳性样品, 选择 PI 值最大的组合(表 17)。试验表明, 抗原 4℃包被 12 h 时 PI 值最大。

表 17 包被条件的确定

Table 17 Determination of packet condition

	37℃			4℃
	1h	2h	3h	12h
+	0.135525	0.14865	0.1829	0.121575
-	0.6205	0.7172	0.693475	0.728375
PI%	78.16	79.27	73.63	83.31

2.3.最适封闭液和封闭时间

根据确定的抗原包被浓度及条件、单抗稀释度进行竞争 ELISA 试验, 分别用 8 种不同的封闭液进行封闭, 并分别在 37℃孵育 1 h、2 h、3 h, 对各阴性、阳性血清进行 OD_{450nm} 值的测定。计算 PI 值并进行比较, 筛选出最佳的封闭条件(表 18)。结果表明, 以 5% BSA 为封闭液, 37℃条件下孵育 2 h, PI 值最高, 为 85.96%, 确定最佳封闭条件为 5% BSA 在 37℃条件下封闭 2 h。

表 18 封闭条件的优化

Table 18 Optimization of closed conditions

封闭 时间	封闭液								
		10%脱脂奶	5%脱脂奶	5%BSA	3%BSA	1%BSA	5%明胶	3%明胶	1%明胶
1h	P	0.1494	0.1595	0.2105	0.2105	0.2126	0.1736	0.1733	0.1808
	N	1.0179	1.0191	1.0004	0.9600	1.0058	0.8643	0.8867	0.8539
	PI	85.32%	84.35%	78.96%	78.07%	78.87%	79.91%	80.45%	78.83%
2h	P	0.13835	0.1394	0.2007	0.192	0.1946	0.1664	0.1662	0.1611
	N	0.9592	0.9926	1.1608	1.0809	1.0281	0.9493	0.9095	0.8605
	PI	85.58%	85.96%	82.71%	82.24%	81.07%	82.47%	81.72%	81.28%
3h	P	0.1234	0.1276	0.1874	0.1926	0.1850	0.1648	0.145	0.1431
	N	0.8397	0.8671	0.9599	0.9991	0.8244	0.7160	0.6614	0.6516
	PI	85.31%	85.28%	80.48%	80.73%	77.56%	76.99%	78.08%	78.03%

2.4.最适血清和二抗稀释度

将血清的稀释倍数按照 1: 5、1: 10、1: 20、1: 50、1: 80、1: 100、1: 150、1: 200 进行稀释,用 PBS 将 HRP 标记羊抗鼠酶标抗体按照 1:5 000、1:10000、1:15 000 和 1:20 000 进行稀释,根据棋盘法进行竞争 ELISA 试验,读取阴阳性血清 OD_{450nm} 值,计算抑制率。结果显示(表 19),当血清 1: 20 倍稀释时,二抗 1: 10000 倍稀释时的抑制率最大,因此血清最佳稀释度为 1: 20,二抗最佳稀释度 1: 10000。

表 19 血清和二抗最佳稀释度的确定

Table 19 Determination of optimal dilution of serum and secondary antibody

血清稀释倍数	二抗稀释倍数			
	1: 5000	1: 10000	1: 15000	1: 20000
1: 5	66.161%	69.440%	63.092%	67.722%
1: 10	77.128%	79.362%	75.836%	74.381%

表 19 血清和二抗最佳稀释度的确定（续表）

Table 19 Determination of optimal dilution of serum and secondary antibody(Continued form)

1: 20	77.821%	83.953%	82.123%	78.262%
1: 50	69.115%	72.330%	73.822%	71.234%
1: 80	55.623%	63.545%	64.819%	63.638%
1: 100	53.057%	59.149%	61.127%	47.970%
1: 150	48.763%	50.118%	59.110%	55.920%
1: 200	39.716%	43.404%	50.361%	47.470%

2.5.最适血清、二抗孵育时间

根据确定好的抗原浓度、包被条件、封闭条件，血清、单抗和二抗稀释度进行竞争 ELISA 检测，结果显示(表 20)血清在 37 °C 孵育 15 min 时 PI 值最高，二抗在 37 °C 孵育 30 min 时 PI 值最高（表 21）。因此最佳血清孵育条件为 37 °C 15 min，二抗最佳孵育条件为 37 °C 30 min。

表 20 血清最佳孵育时间的确定

Table 20 Determination of optimal incubation time of serum

	血清孵育时间			
	15min	30min	45min	60min
P	0.1464	0.1530	0.1472	0.1306
N	0.9368	0.8446	0.8088	0.6320
PI%	84.38	81.88	81.80	79.34

表 21 酶标二抗最佳孵育时间的确定

Table 21 Determination of the optimal incubation time for enzyme-labeled secondary antibodies

	二抗孵育时间			
	15min	30min	45min	60min
P	0.1287	0.1582	0.1740	0.1477
N	0.7459	0.9325	0.7644	0.6059
PI %	82.75	83.03	77.24	75.63

2.6.最适显色时间

TMB 显色时间按 5 min、10 min、15 min 和 20 min 室温避光孵育，抑制率最高为 10 min（表 22），因此底物最佳作用时间为 10 min。

表 22 底物最佳作用时间的确定

Table 22 Determination of optimal action time of substrate

	显色时间			
	5min	10min	15min	20min
P	0.0919	0.1179	0.1589	0.1884
N	0.5003	0.6742	0.8021	0.8723
PI %	81.63	82.52	80.19	78.41

2.7.重复性

分别取 8 份临床阴性血清进行重复性试验，结果显示，批内变异系数为 3.39 %~5.12 %（表 23），批间变异系数为 1.24 %~5.07 %（表 24），均小于 10 %，说明该竞争 ELISA 具有良好的重复性，稳定性好。

表 23 批内重复试验结果

Table 23 The results were repeated in batches

	样品编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
平均值	0.7856	0.6480	0.8110	0.9275	0.9072	0.6673	0.6122	0.7056
标准差	0.0355	0.0220	0.0380	0.0345	0.0404	0.0203	0.0313	0.0292
变异系数 %	4.52	3.39	4.69	3.72	4.45	3.04	5.12	4.14

表 24 批间重复试验结果

Table 24 The results were repeated between batches

	样品编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
平均值	0.7217	0.6026	0.7418	0.8233	0.8042	0.6333	0.5653	0.6140
标准差	0.0090	0.0171	0.0317	0.0270	0.0408	0.0236	0.0120	0.0143
变异系数 %	1.24	2.84	4.27	3.27	5.07	3.72	2.12	2.33

2.8.临界值

检测临床 81 份阴性马血清进行临界值的检测, 计算 PI 值 (表 25)。结果显示阴性血清平均抑制率为 11.84 %, 阴性血清抑制率标准差为 18.89 %, 以抑制率 (PI) = 平均值+3×标准差为阳性样本临界值, 即 $PI = 68.5\%$; 抑制率 (PI) = 平均值+2×标准差为阴性样本临界值, 即 $PI = 48\%$ 。当样本抑制率 $\geq 68.5\%$ 时, 判定为阳性; 当样品抑制率 $\leq 49.6\%$ 时, 判定为阴性; 当样品抑制率在 $49.6\% \sim 68.5\%$ 之间时判定为可疑, 需再次检测, 若结果仍为可疑, 则判定为阴性。

表 25 临界值测定

Table 25 Determination of critical values

编号	样本 PI 值 (%)	编号	样本 PI 值 (%)	编号	样本 PI 值 (%)	编号	样本 PI 值 (%)	编号	样本 PI 值 (%)
1	0.44	18	0.24	35	0.10	52	0.28	69	0.06
2	0.07	19	0.23	36	0.16	53	0.07	70	-0.06
3	0.02	20	0.15	37	0.23	54	0.03	71	-0.34
4	0.11	21	0.04	38	0.04	55	-0.10	72	0.43
5	0.33	22	-0.10	39	0.15	56	-0.02	73	0.29
6	0.09	23	-0.10	40	-0.17	57	0.19	74	0.23
7	0.26	24	0.30	41	-0.16	58	-0.01	75	0.25
8	0.27	25	0.17	42	0.32	59	0.30	76	-0.08
9	-0.12	26	-0.09	43	0.05	60	0.25	77	0.39
10	-0.16	27	-0.12	44	0.08	61	0.21	78	0.26
11	0.16	28	-0.13	45	-0.16	62	0.25	79	-0.28
12	-0.10	29	-0.10	46	0.25	63	0.22	80	0.04
13	0.03	30	0.05	47	0.36	64	0.00	81	0.19
14	0.31	31	0.45	48	0.33	65	-0.1000		
15	0.23	32	0.30	49	-0.21	66	0.21		
16	-0.02	33	0.28	50	0.46	67	0.19		
17	0.55	34	0.19	51	-0.01	68	0.19		

2.9.敏感性和特异性

对马鼻疽阳性对照血清进行 1: 10、1: 20、1: 40、1: 80、1: 160、1: 320、1: 640 倍稀释后的血清进行检测, 结果显示 (表 26) 当血清 1: 80 倍稀释时能检测到阳性结果, 在血清 1: 160 倍稀释时, PI 值位于 48 %~66.5 % 之间, 经过重复检测, 其结果仍处于可疑范围内, 最终判定为阴性, 因此该方法的敏感性为 1: 80。用建立的竞争 ELISA 方法对类鼻疽伯克霍尔德氏菌、马流产沙门氏菌、马腺疫链球菌阳性血清

进行检测，结果显示类鼻疽伯克霍尔德氏菌阳性血清为阳性结果，马流产沙门氏菌、马腺疫链球菌阳性血清均为阴性结果（图 34）。表明该方法可以区分马流产沙门氏菌和马腺疫链球菌，但不能鉴别类鼻疽伯克霍尔德氏菌。WB 结果（图 35）显示单抗 3A4 与鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌都能反应，但针对的抗原大小不同。

表 26 敏感性试验结果
Table 26 Sensitivity test results

	稀释倍数							
	1: 5	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640
OD 值	0.1142	0.1067	0.1196	0.1465	0.2365	0.3885	0.7034	1.0202
PI (%)	88.53	89.28	87.99	85.29	76.24	60.97	29.33	-2.50
结果判定	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

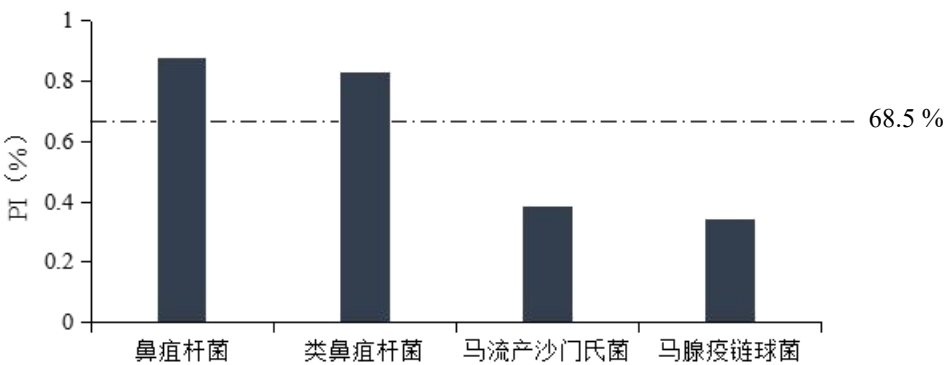


图 34 特异性试验结果

Fig. 34 Specific test results

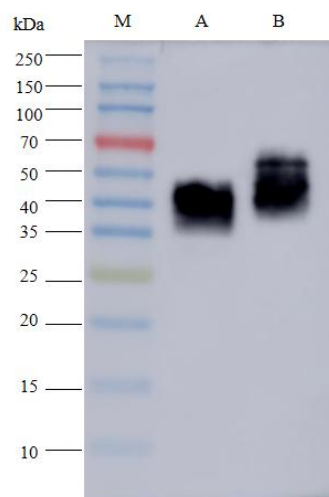


图 35 单抗 3A4 与鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌 WB 反应结果

(M 为蛋白 Marker; A 为类鼻疽伯克霍尔德氏菌; B 为鼻疽杆菌)

Fig. 35 Results of WB reaction of monoclonal antibody 3A4 with *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*

(M is a protein Marker; A is *Burkholderia pseudomallei*; B is *Burkholderia mallei*)

2.10.符合率试验

将实验室保存的经补体结合试验检测结果为 547 份阴性样品与 12 份阳性样品，与建立的竞争 ELISA 方法检测结果进行比较，测得符合率试验结果见表 27。由表可知，建立的竞争 ELISA 方法检测 12 份阳性血清中有 10 份结果为阳性，检测 547 份阴性血清结果中有 545 份为阴性，2 份阳性，可知阳性符合率为 83.33 %，阴性符合率为 99.63 %，总符合率为 99.28 %。

表 27 符合率试验结果

Table 27 The result of coincidence rate experiment

检测方法	竞争 ELISA			符合率	
	P	N	合计		
补体结合试验	P	10	2	12	83.33%
	N	2	545	547	99.63%
	合计	12	547	559	99.28%

3.讨论

我国目前没有马鼻疽的相关商品化诊断试剂盒，传统的补体结合试验和鼻疽菌素试验操作繁琐且耗时较长，无法实现对该病的快速诊断。ELISA 检测方法是 WOA 推荐使用的检测马鼻疽的血清学检测方法之一。对于马鼻疽的诊断，与 CFT 检测方法相比，竞争 ELISA 方法是一种技术上更可重复、客观和方便的方法，并且也避免了血清溶血、补体干扰、只能检测单一物种相关的问题^[93]。竞争 ELISA 特异性和敏感性的高低，与抗原种类的选择及单抗特性息息相关。抗原与聚苯乙烯固相载体通过物理吸附结合，受抗原分子量、等电点、浓度等的影响。固相载体上没有吸附抗原分子的部分由封闭液填补，由此减少非特异性反应结果。试验时，单抗和血清同时竞争结合载体表面固定的抗原表位，竞争结果取决于抗原的种类和浓度、单抗对抗原分子的亲和力（即氢键、范德华力等作用力）、单抗的浓度。而临床阳性血清成分非常复杂，含有针对菌体不同抗原成分（外膜蛋白、鞭毛、荚膜多糖、脂多糖、胞内蛋白等）的抗体，若针对所选包被抗原的抗体含量较少，则很有可能竞争不过单抗，导致阳性信号低，呈现弱阳性结果。并且在不同感染时期所含抗体成分也有较大差异，早期感染主要由菌体表面抗原（荚膜多糖、脂多糖）激起机体免疫反应，针对这类抗原的抗体含量会高于其他抗体成分。在感染后期，随着菌体的裂解，胞内抗原成分不断暴露引发机体免疫应答，从而产生针对胞内抗原的抗体。因此可以根据抗原暴露的顺序选择包被抗原来检测不同时期感染情况。

试验前期对比了包被全菌灭活菌液、全菌破碎上清、粗提 LPS，结果发现检测 OD_{450nm} 值呈现全菌灭活菌液 > 全菌破碎上清 > 粗提 LPS 结果，但三种抗原 PI 值无明显差异。即在同一抑制率水平下，当有效抗原浓度越高时，所用的单抗、血清抗体也越多，生产成本也越高，因此选择了成本最低的粗提 LPS 作为包被抗原。因酶标仪在 OD_{450nm} ≈ 1 时，准确性最高，因此以 OD_{450nm} ≈ 1 时的抗原包被浓度和单抗稀释倍数为佳，本研究最佳抗原包被浓度和单抗稀释度优化结果显示，当抗原包被浓度为 5 μg/mL、单抗稀释倍数在 1:500 时，抗原包被浓度为 10 μg/mL、单抗稀释倍数在 1:1000 时，抗原包被浓度为 30 μg/mL、单抗稀释倍数在 1:2000 时，阴性 OD₄₅₀ 值均接近 1.0，综合考虑检测方法的成本和敏感性，选择抗原和抗体用量适中的一组作为最佳抗原包被浓度和单抗稀释倍数。综合确定包被浓度和单抗稀释倍数后，继续摸索最佳血清稀释倍数和酶标二抗稀释倍数，根据 PI 值最大确定竞争 ELISA 的相关试剂的最佳用量。

根据 DNA-DNA 同源性、16S rRNA 的碱基序列和表型特征，鼻疽杆菌和类鼻疽伯克霍尔德氏菌非常相似。Anuntagool N^[94]等人研究发现针对类鼻疽伯克霍尔德氏菌 200 kDa 抗原的单克隆抗体中有 50 % 的单抗与马鼻疽也存在交叉反应，但其反应条带低于 200 kDa 位置。本试验结果与其类似，3A4 单抗与鼻疽杆菌在 35-70 kDa 具有反应条带，与类鼻疽伯克霍尔德氏菌在 35-50 kDa 处有反应条带。筛选针对鼻疽杆菌的特异性抗体还需通过大量试验来获得。

4. 小结

成功建立了马鼻疽的竞争 ELISA 抗体检测方法，该方法的敏感性和特异性良好，与补体结合试验结果的符合率达 99.28 %。该方法不与马流产沙门氏菌、马腺疫链球菌发生交叉反应，但不能鉴别诊断与鼻疽杆菌具有 99 % 以上同源基因的类鼻疽伯克霍尔德氏菌。

结论

1.鉴定了三株临床分离菌株 CVCC67001、CVCC67002、CVCC67003 的种属信息，CVCC67003 在培养特性、系统发育树分群层面与其余两株菌存在差异，其比较基因组结果显示，CVCC67003 与 ATCC 23344 相比整个基因组出现多处缺失、插入、易位和倒置。对三株菌毒力进行了初步探索，发现菌株 CVCC67003 毒力最弱，其免疫原性试验显示 3.3×10^3 CFU 剂量组和 3.3×10^4 CFU 剂量组保护率分别为 100 %和 80 %，揭示了该菌株具有作为弱毒活疫苗候选株的潜质。

2.筛选出了一株针对 CVCC67003 的单克隆抗体 3A4 株，经过双向电泳和质谱分析，预测得到两个可能的抗原成分，分别为延伸因子 Tu 或伴侣蛋白 GroEL。

3.成功建立了基于单抗 3A4 的竞争 ELISA 抗体检测方法。该方法具有良好的敏感性和特异性，与补体结合试验符合率达 99.28 %。

中英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
BHI	Brain Heart Infusion Broth	脑心浸出液肉汤培养基
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid	脱氧核糖核苷酸
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附试验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine Medium Supplement	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷添加剂
HT	Hypoxanthine-Thymidine Medium Supplement	次黄嘌呤-胸苷添加剂
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核苷酸
TSA	Tryptic Soy Agar	胰蛋白胨大豆琼脂
TMB	3, 3',5, 5'-Tetramethylbenzidine	3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺

参考文献

- [1] Neubauer H, Sprague L, Zacharia R, et al. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives[J]. Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 2005, 52(5): 201–205.
- [2] 梅强; 马鼻疽的临床症状与诊断防治[J]. 新农业, 2022(06): 57.
- [3] Kettle A, Wernery U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses[J]. Equine Veterinary Journal, 2016, 48(5): 654–658.
- [4] Malik P, Singha H, Goyal S, et al. Incidence of *Burkholderia mallei* infection among indigenous equines in India[J]. Veterinary Record Open, 2015, 2(2): e000129.
- [5] Santos Júnior E, Moura J, Protásio B, et al. Clinical repercussions of Glanders (*Burkholderia mallei* infection) in a Brazilian child: a case report[J]. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 2020, 53: e20200054.
- [6] Pal M, Gutama K, Gerbaba N, et al. Glanders: A highly infectious re-emerging serious zoonotic bacterial disease[J]. Journal of Advances in Microbiology Research, 2022, 3(2): 25–28.
- [7] Abreu D, Gomes A, Tessler, et al. Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR[J]. Veterinary and Animal Science, 2020, 10: 100147.
- [8] Pinho A, Ferreira F, Fuck J, et al. Epidemiological Situation of Glanders in the State of Pará, Brazil[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2023, 12(2): 218.
- [9] Waag D, Chance T, Trevino S, et al. Comparison of three non-human primate aerosol models for glanders, caused by *Burkholderia mallei*[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 155: 104919.
- [10] Singh S, Dohre S, Kamthan A, et al. Improvement of recombinant-truncated *Burkholderia* motility protein A (BimA)-based indirect ELISA for equine glanders[J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2018, 39(5): 565–575.
- [11] Nierman W, DeShazer D, Kim H, et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(39): 14246–14251.
- [12] Losada L, Ronning C, DeShazer D, et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements[J]. Genome Biology and Evolution, 2010, 2: 102–116.
- [13] Hatcher C, Muruato L, Torres A. Recent Advances in *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei* Research[J]. Current Tropical Medicine Reports, 2015, 2(2): 62–69.
- [14] EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen S S, Alvarez J, et al. Assessment of the control measures of the category A diseases of Animal Health Law: *Burkholderia mallei* (Glanders)[J]. EFSA journal. European Food Safety Authority, 2022, 20(1): e07069.
- [15] Khan I, Wieler L, Melzer F, et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2013, 60(3): 204–221.
- [16] Brangsch H, Saqib M, Sial A, et al. Sequencing-Based Genotyping of Pakistani *Burkholderia mallei* Strains: A Useful Way for Investigating Glanders Outbreaks[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2022, 11(6): 614.
- [17] Girault G, Wattiau P, Saqib M, et al. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and

- Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2018, 63: 1–4.
- [18] P K, M M, S M, et al. First glanders cases detected in Nepal underscore the need for surveillance and border controls[J]. BMC veterinary research, 2022, 18(1): 132.
- [19] Saikh K, Mott T. Innate immune response to *Burkholderia mallei*[J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 2017, 30(3): 297–302.
- [20] Whitlock G, Estes D, Torres A. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*[J]. FEMS microbiology letters, 2007, 277(2): 115–122.
- [21] Galyov E, Brett P, DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis[J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64: 495–517.
- [22] Stone J, Mayo M, Grasso S, et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* O-antigen serotypes in near-neighbor species[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 250.
- [23] Moustafa D, Scarff J, Garcia P, et al. Recombinant Salmonella Expressing *Burkholderia mallei* LPS O Antigen Provides Protection in a Murine Model of Melioidosis and Glanders[J]. PloS One, 2015, 10(7): e0132032.
- [24] Brett P, Burtnick M, Snyder D, et al. *Burkholderia mallei* expresses a unique lipopolysaccharide mixture that is a potent activator of human Toll-like receptor 4 complexes[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(2): 379–390.
- [25] Nualnoi T, Norris M, Tuanyok A, et al. Development of Immunoassays for *Burkholderia pseudomallei* Typical and Atypical Lipopolysaccharide Strain Typing[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2017, 96(2): 358–367.
- [26] Brett P, Burtnick M, Heiss C, et al. *Burkholderia thailandensis* oacA Mutants Facilitate the Expression of *Burkholderia mallei*-Like O Polysaccharides[J]. Infection and Immunity, 2011, 79(2): 961–969.
- [27] Tamigney K, Mazur M, Nualnoi T, et al. Deciphering minimal antigenic epitopes associated with *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* lipopolysaccharide O-antigens[J]. Nature Communications, 2017, 8: 115.
- [28] Titball R, Burtnick M, Bancroft G, et al. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* vaccines: Are we close to clinical trials?[J]. Vaccine, 2017, 35(44): 5981–5989.
- [29] Hatcher C, Mott T, Muruato L, et al. *Burkholderia mallei* CLH001 Attenuated Vaccine Strain Is Immunogenic and Protects against Acute Respiratory Glanders[J]. Infection and Immunity, 2016, 84(8): 2345–2354.
- [30] Mott T, Vijayakumar S, Sbrana E, et al. Characterization of the *Burkholderia mallei* tonB Mutant and Its Potential as a Backbone Strain for Vaccine Development[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2015, 9(6): e0003863.
- [31] Gregory A, Judy B, Qazi O, et al. A gold nanoparticle-linked glycoconjugate vaccine against *Burkholderia mallei*[J]. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine, 2015, 11(2): 447–456.
- [32] Kumar S, Malik P, Verma S, et al. Use of a recombinant *burkholderia* intracellular motility a protein for immunodiagnosis of glanders[J]. Clinical and vaccine immunology: CVI, 2011, 18(9): 1456–1461.
- [33] 田海蓉,李涛,景小金,等. 2018 年贵州省马鼻疽流行病学调查[J]. 贵州畜牧兽医, 2019,43(05) : 56–57.
- [34] Currie B. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: Melioidosis and Glanders[M].Elsevier,2014.
- [35] 陈琦,夏炉明,刘佩红,等. 马鼻疽研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2012,48(11) : 48–50.

- [36] Pal V, Saxena A, Singh S, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): e32–e39.
- [37] Kinoshita Y, Cloutier A, Rozak D, et al. A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens[J]. BMC veterinary research, 2019, 15(1): 133.
- [38] Yingst S, Facemire P, Chuvala L, et al. Pathological findings and diagnostic implications of a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model of aerosol exposure to *Burkholderia mallei* (glanders)[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(6): 646–653.
- [39] Schmooock G, Elschner M, Sprague L. Clear distinction between *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* using fluorescent motB primers[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2015, 57(1): 13.
- [40] Zakharova I, Teteryatnikova N, Toporkov A, et al. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex[J]. Acta Tropica, 2017, 174: 1–8.
- [41] Janse I, Hamidjaja R, Hendriks A, et al. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*[J]. BMC infectious diseases, 2013, 13: 86.
- [42] Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, et al. A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in Kuwait: Consequences for the PCR diagnosis of glanders[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68(2): 960–963.
- [43] 周振杰;王冬梅;欧阳松应. 环介导等温扩增技术在新型冠状病毒检测中的应用研究进展[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2022,38(05) : 69–78.
- [44] Mirzai S, Safi S, Mossavari N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Burkholderia mallei*[J]. Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France), 2016, 62(10): 32–36.
- [45] Saxena A, Pal V, Tripathi N, et al. A real-time loop mediated isothermal amplification assay for molecular detection of *Burkholderia mallei*, the aetiological agent of a zoonotic and re-emerging disease glanders[J]. Acta Tropica, 2019, 194: 189–194.
- [46] Shchit I, Ignatov K, Biketov S. [Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and meliodosis.][J]. Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika, 2018, 63(6): 378–384.
- [47] Peng Y, Zheng X, Kan B, et al. Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay[J]. PloS One, 2019, 14(7): e0213416.
- [48] Saxena A, Pal V, Tripathi N, et al. Development of a rapid and sensitive recombinase polymerase amplification-lateral flow assay for detection of *Burkholderia mallei*[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(2): 1016–1022.
- [49] 白守兄. 马鼻疽检疫及注意事项[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2020(06): 165–166.
- [50] 张师杨. 家畜鼻疽的诊治方法[J]. 畜牧兽医科技信息, 2021(05): 41.
- [51] Wang G, Glaser L, Scott N, et al. A glycoengineered antigen exploiting a conserved protein O-glycosylation pathway in the *Burkholderia* genus for detection of glanders infections[J]. Virulence, 2021, 12(1): 493–506.
- [52] 贺亚玲,刘欢,唐慧,等. 补体结合试验方法的改良[J]. 现代医药卫生, 2017,03 (33): 407–409.
- [53] 陈杰,王雪峰,关平原,等. 马鼻疽补体结合反应检测方法的改进[J]. 中国预防兽医学报, 2017,07(39): 550–555.

- [54] 荣霞. 马鼻疽的检疫及其注意事项[J]. 中国畜禽种业, 2019,15(02): 140.
- [55] Elschner M, Laroucau K, Singha H, et al. Evaluation of the comparative accuracy of the complement fixation test, Western blot and five enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of glanders[J]. PloS One, 2019, 14(4): e0214963.
- [56] 谢柱彬,袁镜乐,殷进方,等. 应用间接 ELISA 方法检测马鼻疽抗体[J]. 畜牧兽医科技信息, 2016(08): 37–38.
- [57] Wernery U, Chan E, Raghavan R, et al. Development of a sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Burkholderia mallei*, a Tier 1 select agent[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2021, 15(12): e0010007.
- [58] Singh S, Dohre S, Kamthan A, et al. Improvement of recombinant-truncated *Burkholderia* motility protein A (BimA)-based indirect ELISA for equine glanders[J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2018, 39(5): 565–575.
- [59] Singha H, Malik P, Goyal S, et al. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines[J]. TheScientificWorldJournal, 2014, 2014: 469407.
- [60] Pal V, Kumar S, Malik P, et al. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders[J]. Clinical and vaccine immunology: CVI, 2012, 19(8): 1193–1198.
- [61] Elschner M, Melzer F, Singha H, et al. Validation of a Commercial Glanders ELISA as an Alternative to the CFT in International Trade of Equidae[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 628389.
- [62] Sprague L, Zachariah R, Neubauer H, et al. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses[J]. BMC veterinary research, 2009, 5: 32.
- [63] Wang G, Glaser L, Scott N, et al. A glycoengineered antigen exploiting a conserved protein O-glycosylation pathway in the *Burkholderia* genus for detection of glanders infections[J]. Virulence, 2021, 12(1): 493–506.
- [64] Karimi A, Mosavari N. Development of Rose Bengal test against mallein test for rapid diagnosis of equine glanders[J]. Tropical Animal Health and Production, 2019, 51(7): 1969–1974.
- [65] Naureen A, Saqib M, Muhammad G, et al. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2007, 19(4): 362–367.
- [66] Shakibamehr N, Mosavari N, Harzandi N, et al. Designing of Western Blot Technique for Glanders Diagnosing in Iran[J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2021, 99: 103403.
- [67] Hatcher C, Mott T, Muruato L, et al. *Burkholderia mallei* CLH001 Attenuated Vaccine Strain Is Immunogenic and Protects against Acute Respiratory Glanders[J]. Infection and Immunity, 2016, 84(8): 2345–2354.
- [68] Khakhum N, Bharaj P, Myers J, et al. *Burkholderia pseudomallei* Δ tonB Δ hcp1 Live Attenuated Vaccine Strain Elicits Full Protective Immunity against Aerosolized Melioidosis Infection[J]. mSphere, 2019, 4(1): e00570-18.
- [69] Gregory A, Judy B, Qazi O, et al. A gold nanoparticle-linked glycoconjugate vaccine against *Burkholderia mallei*[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2015, 11(2): 447–456.
- [70] Daligault H, Johnson S, Davenport K, et al. Draft Genomes for Eight *Burkholderia mallei* Isolates from Turkey[J]. Genome Announcements, 2016, 4(1): e01234-15.

- [71] Mahendra Pal;Kirubel Paulos Gutama. Glanders: A Potential Bioterrorism Weapon Disease[J]. American Journal of Infectious Diseases and Microbiology, 2022(3 vo 10): 98–101.
- [72] Schell M, Ulrich R, Ribot W, et al. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(6): 1466–1485.
- [73] Ee G, Pj B, D D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis[J]. Annual review of microbiology, Annu Rev Microbiol, 2010, 64.
- [74] Burtnick M, Brett P. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* cluster 1 type VI secretion system gene expression is negatively regulated by iron and zinc[J]. PloS One, 2013, 8(10): e76767.
- [75] Varga J, Vigil A, DeShazer D, et al. Distinct human antibody response to the biological warfare agent *Burkholderia mallei*[J]. Virulence, 2012, 3(6): 510–514.
- [76] Schutzer S, Schlater L, Ronning C, et al. Characterization of clinically-attenuated *Burkholderia mallei* by whole genome sequencing: candidate strain for exclusion from Select Agent lists[J]. PloS One, 2008, 3(4): e2058.
- [77] DeShazer D, Waag D, Fritz D, et al. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant[J]. Microbial Pathogenesis, 2001, 30(5): 253–269.
- [78] Hatcher C, Muruato L, Torres A. Recent Advances in *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei* Research[J]. Current Tropical Medicine Reports, 2015, 2(2): 62–69.
- [79] Barnes K, Bayliss M, Davies C, et al. Efficacy of finafloxacin in a murine model of inhalational glanders[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1057202.
- [80] Tapia D, Sanchez-Villamil J, Torres A. Emerging role of biologics for the treatment of melioidosis and glanders[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2019, 19(12): 1319–1332.
- [81] P K, M M, S M, et al. First glanders cases detected in Nepal underscore the need for surveillance and border controls[J]. BMC veterinary research, 2022, 18(1): 132.
- [82] 农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[D]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [83] Zou N, Tsai S, Feng S-H, et al. Relationship between antigenicity and pathogenicity for *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* revealed by a large panel of mouse MAbs[J]. Hybridoma (2005), 2008, 27(4): 231–240.
- [84] Zhang S, Feng S-H, Li B, et al. In Vitro and In Vivo studies of monoclonal antibodies with prominent bactericidal activity against *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. Clinical and vaccine immunology: CVI, 2011, 18(5): 825–834.
- [85] Weijland A, Harmark K, Cool R, et al. Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(6): 683–688.
- [86] Yang H, Perrier J, Whitford P. Disorder guides domain rearrangement in elongation factor Tu[J]. Proteins, 2018, 86(10): 1037–1046.
- [87] Nieves W, Heang J, Asakrah S, et al. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization[J]. PloS One, 2010, 5(12): e14361.
- [88] Yi J, Simpanya M, Settles E, et al. Caprine humoral response to *Burkholderia pseudomallei* antigens during acute melioidosis from aerosol exposure[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2019, 13(2): e0006851.
- [89] Kanazawa University. A chaperonin protein, GroEL, has a more complex mechanism than was thought before[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B), 2018.
- [90] Taguchi H, Koike-Takeshita A. In vivo client proteins of the chaperonin GroEL-GroES provide insight

- into the role of chaperones in protein evolution[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, 10.
- [91] Jaworek M, Möbitz S, Gao M, et al. Stability of the chaperonin system GroEL-GroES under extreme environmental conditions[J]. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 2020, 22(6): 3734–3743.
- [92] Dohre S, Kamthan A, Singh S, et al. Identification of a new diagnostic antigen for glanders using immunoproteome analysis[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2017, 53: 26–32.
- [93] Katz J, Dewald R, Nicholson J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2000, 12(1): 46–50.
- [94] Anuntagool N, Sirisinha S. Antigenic Relatedness between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(3): 143–150.

Identification of *Burkholderia mallei*, preparation of monoclonal antibody and establishment of competitive ELISA method

Abstract

Glanders is an acute zoonotic infectious disease caused by *Burkholderia mallei*(*B.mallei*).The prevalence and virulence of the strains in China are still not well understood, and there is a lack of commercial diagnostic kits in the domestic market. To this end, we identified three strains of *B.mallei* CVCC67001, *B.mallei* CVCC67002 and *B.mallei* CVCC67003 isolated early in China, through culture characteristics, biochemical identification, whole genome sequencing and carried out virulence test and immunogenicity test of CVCC67003. The monoclonal antibody was prepared by using CVCC67003 inactivated whole bacteria as antigen, and the competitive ELISA antibody detection kit was established to provide necessary technical reserve for quarantine and surveillance of Glanders in China. The results are as follows:

B.mallei CVCC67003 tested positive for VP, while the other two strains were negative. Genetic analysis showed that the three strains were located in the L3 branch, but *B.mallei* CVCC67003 did not belong to the same cluster as the other two strains. Comparative genomics found that the genome of *B.mallei* CVCC67003 was significantly different from that of the reference strain *B.mallei* ATCC 23344, containing a large number of insertions, deletions, and replacements. Virulence assay results showed that the LD₅₀ of *B.mallei* CVCC67002 was 9.5×10^4 CFU. The LD₅₀ of *B.mallei* CVCC67001 is 2.6×10^5 CFU; *B.mallei* CVCC67003 did not cause animal deaths. *B.mallei* CVCC67003 has shown potential as a live attenuated vaccine candidate in immunogenicity studies.

A monoclonal antibody 3A4, subtype IgG_{2b}, was successfully obtained. Western Blot showed a single band at about 50 kDa, which was predicted to be chaperone GroEL or elongation factor Tu by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry.

A competitive ELISA method for detection of Glanders was established using monoclonal antibody 3A4. After optimization, the experimental procedures were as follows: the antigen coated concentration was 10 µg/ml and coated at 4 °C for 12 h; 5 % skimmed milk was enclosed at 37 °C for 2 h; The samples and monoclonal antibodies were respectively diluted at 1:20 and 1:1000, and incubated at 37 °C for 15 min. The dilution of the enzyme-labeled antibody was 1:10000 times and incubated at 37 °C for 30 min. Color development at room temperature for 10 min away from light, reading at OD₄₅₀ nm, calculated PI %. When PI % ≥ 68.5 %, it is judged as positive. When PI % ≤ 49.6%, judged as negative; Anything in between is considered suspicious. The coincidence rate of combination with complement was 99.28 %, which showed

good application potential.

In summary, three strains of *B.mallei* CVCC67001, *B.mallei* CVCC67002 and *B.mallei* CVCC67003 were identified in this study, and *B.mallei* CVCC67003 had the potential to develop a live attenuated vaccine. Monoclonal antibody 3A4 was prepared, and a competitive ELISA method was established to detect Glanders, which provided technical support for prevention and control.

Key Words: *Burkholderia mallei*; Whole genome sequencing; Monoclonal antibody; Competitive ELISA