

# 日本斑点热立克次体近缘株重组 OmpB 蛋白抗原性研究

宗佳, 刘伯玉, 陈振, Adams, 李嘉嘉, 章孝成, 刘晓宁, 任翠平, 柳燕

**摘要** 目的 探讨关于斑点热立克次体的临床诊断及流行病学调查而进行的诊断方法学研究。方法 构建 *R. Japonica* Anhui 120 strain OmpB 原核表达质粒, 表达、鉴定并纯化重组蛋白, 用其作为抗原建立间接 ELISA 检测方法, 检测 120 份临床样本中日本斑点热立克次体特异性 IgG 抗体, 并评价方法的敏感性和特异性。结果 获得了高表达、高纯度的 OmpB 重组蛋白, 建立的间接 ELISA 方法体系与美国食品和药物管理局认可的诊断试剂盒相比有良好的特异性和敏感性, 两者的特异性为 100%, 敏感性为 96.7%, 符合率为 99.2%,  $\kappa$  值为 0.98。结论 OmpB 重组蛋白具有很好的免疫反应性, 能特异地检出斑点热立克次体 IgG 抗体, 间接 ELISA 方法可作为临床诊断的技术储备及流行病学调查和科学研究。

**关键词** 日本斑点热立克次体; OmpB; 蛋白纯化; 包涵体; 间接 ELISA

中图分类号 Q 939.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1768-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.005

斑点热群立克次体病是一类分布广、危害大的蜱传人兽共患疾病。如康氏立克次体引起的地中海

斑点热, 立氏立克次体引起的落基山斑点热。斑点热的临床症状初期与普通的感冒相似, 往往伴随着高烧、各种疼痛、恶心、呕吐和皮疹, 严重的患者可能出现中枢神经系统的症状。1984 年日本学者从患者血中分离到斑点热立克次体, 经血清学鉴定显示均与斑点热群参照株不同, 于是就将其命名为日本斑点热立克次体<sup>[1]</sup>。

2013 年前, 我国对斑点热的研究主要集中于黑龙江立克次体、西伯利亚立克次体和内蒙古立克次体 3 个种的流行病学调查<sup>[2]</sup>。2013 年, 该研究团队在安徽省大别山区一例连续转诊的发热患者血液标本中分离到一株日本斑点热立克次体近缘株安徽 120 株 (*R. Japonica* Anhui 120 strain), 简称安徽 120 株, 这是首次在我国发现并成功分离的人感染日本斑点热立克次体菌。OmpB 蛋白是立克次体主要表面蛋白, 与致病密切相关<sup>[3]</sup>, 且可诱导机体产生相应抗体。由于目前我国还没有用于临床、流行病学调查的日本斑点热立克次体检测试剂盒<sup>[4-6]</sup>, 该研究通过分子生物学和免疫学方法构建 OmpB 原核表达质粒、纯化表达的重组蛋白并建立间接 ELISA 检测方法以检测斑点热立克次体特异性 IgG 抗体, 旨在为立克次体致病机制研究和血清学诊断提供实验方法学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 4 只新西兰大白兔, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 室温维持在 24~30 °C, 提

2017-08-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81571963); 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH213); 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号: KJ2015A020、KJ2016A331); 安徽医科大学博士启动基金(编号: XJ201314、XJ201430、XJ201503)

作者单位: 安徽医科大学微生物教研室, 合肥 230032

作者简介: 宗佳, 女, 硕士研究生;

柳燕, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yliu16888@163.com

SOD and GSH-px in different group were statistically significant different ( $P < 0.05$ ). Compared with CN group, the level of SOD and GSH-px were lower in GDM ( $P < 0.05$ ). After received DHA supplement, the level of SOD was significantly higher in GDM mice ( $P < 0.05$ ). ③ Compared with CN group, GDM down-regulated the mRNA expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), while the mRNA expression of plasma membrane fatty acid binding proteins (FABP-pm) and fatty acid-transport protein 6 (FATP-6) mRNA were up-regulated. After received DHA supplement, the mRNA expression of FABP-pm and FATP-6 were down-regulated.

**Conclusion** DHA supplement can increase the level of SOD and down-regulate the mRNA expression of FABP-pm and FATP-6 in GDM mice.

**Key words** GDM; fatty acid transporters; DHA; PPAR $\gamma$

供食物和水。

**1.1.2 实验试剂** DNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、TaqDNA 聚合酶限制性内切酶 Hind III、Xho I 和 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和大肠杆菌 BL21 感受态细胞由本实验室制备;96 孔聚苯乙烯微量细胞培养板、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 购自北京中杉金桥生物公司;斑点热立克次体、斑疹伤寒、恙虫病 IgG 抗体免疫荧光试剂盒购自美国 Focus 公司;中国食品和药物管理局认可的新布尼亚病毒 IgG 抗体检测试剂盒。

**1.1.3 标本来源** 经美国 Focus 公司和 FDA 认证试剂盒确诊的 30 份新布尼亚病毒 IgG 阳性血清,30 份斑点热 IgG 阳性血清,4 份确诊的斑疹伤寒 IgG 阳性血清,26 份 FDA 认证确诊的恙虫病 IgG 阳性血清以及 30 份正常人血清。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌种的复苏培养** 从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出冻存的 *R. Japonica* Anhui 120 strain,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中,待融化后,取 0.5 ml 感染含 3% 胎牛血清的 RPMI 的人单核白血病细胞 (human monocytic leukemia cells, THP-1) 并在 34  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度下培养。感染 5 d 后,每天通过 Diff-Quick 染色后在油镜下观察,当感染率接近 100% 的时候,即可作为日本斑点热立克次体 DNA 提取的模板 (活菌培养工作在生物安全 III 级实验室进行)。

**1.2.2 PET-30a-OmpB 原核表达载体的构建** 采用 Primer Premier 5.0 软件在 OmpB2050-3642 基因的上下游设计引物,引物 5' 端加上酶切位点,下面画横线部分为酶切位点,具体见下:上游引物:5'-CCCAAGCTTGGGAATAATACTCTTGCAGCCGG-3' (Hind III);下游引物:5'-CCGCTCGAGCGGTTG-GATTAAAGTATAAGT-3' (Xho I)。收集感染率接近 100% 的 THP-1 细胞提取 DNA 作为模板,利用 PCR 技术对目的基因进行扩增。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,1 个循环;94  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,50  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s 共 40 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 1 个循环。对琼脂糖凝胶电泳中目的条带进行切胶回收,连接 PMD-18-T 载体导入 DH5 $\alpha$  感受态大肠埃希菌中扩增;将连接上 T 载体的目的片段和表达载体 PET-30a 同时进行双酶切,并再次通过琼脂糖凝胶电泳对酶切后片段进行纯化。将纯化后的目的基因片段和载体片段用 T4 连接酶 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接后导入感受态大肠埃希菌 BL21 中,过夜摇菌之后送上海生物工程有限公司进

行测序。

## 1.2.3 OmpB 重组蛋白的诱导与表达

**1.2.3.1 复苏菌种** 按 1:1 000 比率分别将氨苄青霉素、重组菌种加入种子液中,置于摇床上 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min) 过夜;向每瓶液态培养基中加入 10 ml 菌液之后,置于摇床上 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min) 培养 2 h 后至光密度 (optical density, OD) 值约 0.8。

**1.2.3.2 诱导表达与鉴定** 待培养基 OD 值约 0.8 之后,取出锥形瓶加入 500  $\mu\text{l}$  异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖苷诱导剂后置于摇床上 (32  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min),诱导 5 h 后将培养液倒入离心管中,6 500 r/min 离心 15 min,取出沉淀,将装有重悬液的烧杯置于超声破碎机中,破碎后取出备用 (每次 3 个循环,每个循环 6 min,共 3 次)。取出破碎后的溶液,12 000 r/min 离心 15 min,留取沉淀及部分上清液备用。利用 SDS-PAGE 和 Western blot 法检测上清液及沉淀中的 OmpB 重组蛋白。

**1.2.4 OmpB 重组蛋白纯化** 对于包涵体蛋白的纯化采用变复性的方式进行纯化。依次用 10% 菌体体积的 PBS 配置 1、2、3、4 mol/L 尿素,均含有 0.5% Triton X-100,低速重悬后室温孵育 10 min,离心后收集上清液和沉淀,最后用 8 mol/L 尿素 (PBS, 1 mmol/L DTT) 溶解包涵体,最后用 SDS-PAGE 鉴定 OmpB 重组蛋白的纯度,上述操作重复 3 次。用含高浓度脲素的缓冲液,然后 12 000 r/min 离心 15 min,留上清液;将溶解后的包涵体蛋白装入透析袋,按一定浓度梯度每隔 8 h 按 4、3、2、1 mol/L 尿素进行透析,直至完全去除尿素。

**1.2.5 *R. Japonica* Anhui 120 strain 全菌多克隆抗体的制备** 取 4 只健康的新西兰白兔分别标记为 1、2、3、4。1、2 作为实验组,3、4 作为对照组。实验组注射 1 ml 的 THP-1 细胞培养的 *R. Japonica* Anhui 120 strain,对照组注射 1 ml 正常的 THP-1 细胞的 6 d 培养物,共免疫 5 次,每隔 7 d 免疫一次,免疫 5 次结束,免疫结束后,采用心脏取血,分离获得免疫血清,无菌分装在 2 ml 冻存管中,保存在 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

## 1.2.6 OmpB 重组蛋白间接 ELISA 方法的建立

**1.2.6.1 利用棋盘滴定法** 依次确定抗原的最佳使用浓度,最佳血清稀释浓度。

**1.2.6.2 间接 ELISA 阳性阈值 (cut-off value) 的确定** 用 30 份已知阴性血清,每份阴性血清做 3 个复孔,取平均值,以阴性血清 OD<sub>450 nm</sub> 值的均数加 2 倍标准差为 cut-off 值,OD 值高于 cut-off 值为阳性。

**1.2.6.3 ELISA 试剂盒建立及评价** 用已建立的间接 ELISA 方法对 90 份临床患者血清和 30 份正常人血清进行检测,每个待测血样均作 3 个复孔,设阴性和阳性对照,所得结果与美国 Focus 公司和 FDA 认可方法对相同的 120 份样本的结果进行比较分析,以验证该间接 ELISA 方法的可靠性。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件对间接 ELISA 结果进行数据处理,两组数据采用  $\chi^2$  或 Fisher 确切概率法进行检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 OmpB2050-3642 基因的克隆及产物鉴定结果**

用设计的引物对 *R. Japonica* Anhui 120 strain DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物大小为 1 588 bp,与目的基因理论大小一致(图 1A),并经测序证实。OmpB 重组质粒用 PET-30a 载体引物 T7 和 T7-ter 进行筛选,电泳后出现 1 800 bp 条带与目的基因理论大小一致,且测序结果与目的序列相同,测序结果表明构建表达载体成功(图 1B)。

**2.2 OmpB 重组蛋白表达及鉴定结果** 重组质粒 PET-30a-OmpB 转化到感受态大肠杆菌 BL21 中,诱

导表达出约 53 ku 目的蛋白,破碎菌体后发现目的蛋白为包涵体形式出现在沉淀中(图 1C)。重组蛋白的 Western blot 分析表明 OmpB 重组蛋白都具有很好的免疫反应性。

**2.3 OmpB 重组蛋白的纯化结果** 包涵体形式的蛋白利用变复性的方法进行纯化,显示用 4 mol/L 尿素溶解破碎后沉淀的蛋白表达量最高(图 1D)。通过 lowey 法测得 OmpB 重组蛋白浓度为 4 mg/ml。结合纯度和浓度分析,PET-30a 构建的重组蛋白具有高浓度和高纯度的特点,可作为间接 ELISA 方法中的抗原。

**2.4 间接 ELISA 方法建立及评价**

**2.4.1 棋盘滴定法确定最适抗原抗体浓度** 最适抗原使用浓度为 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ,最适兔多抗的稀释度为 1 : 8 000,最适人血清稀释浓度为 1 : 320(表 1)。最终确定血清与抗原作用时间为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、1.5 h;酶标二抗最适稀释度 1 : 100 000,作用时间 37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 h;用 5% 脱脂奶粉 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜封闭;显色时间为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

**2.4.2 间接 ELISA 阳性阈值( cut-off value) 的确定** 经过对 30 份已知阴性血清各 3 个复孔的检测,得出 cut-off 为 0.360。

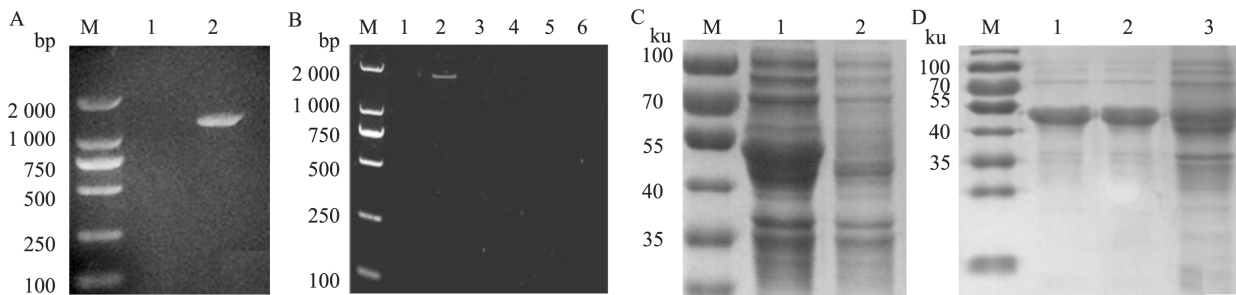


图 1 OmpB 基因的 PCR 扩增、重组质粒构建及重组蛋白 SDS-PAGE 鉴定和纯化图

A:OmpB 基因的 PCR 扩增图;M:DNA Marker;1:阴性对照;2:PCR 扩增产物 1 588 bp;B:重组质粒构建鉴定图;M:DNA Marker;1:阴性对照;2~6:菌落 PCR 扩增图,其中第 2 孔为重组 PET-30a-OmpB 重组质粒;C:OmpB 重组蛋白 SDS-PAGE 鉴定图;M:蛋白分子量标准;1:诱导 5 h 的蛋白条带,大小约为 53 ku;2:空载;D:OmpB 重组蛋白纯化 SDS-PAGE 鉴定图;M:蛋白分子量标准;1、2:4 mol/L 尿素重悬结果,大小约为 53 ku;3:异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖苷诱导 5 h 的未纯化的蛋白条带,大小约为 53 ku

表 1 抗原最适包被浓度及兔血清最佳稀释度的确定

兔血清 稀释倍数	抗原包被浓度( $\mu\text{g/ml}$ )							
	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
1 : 4 000	0.840(3.000)	1.126(3.060)	1.408(3.259)	1.127(2.997)	1.207(3.372)	1.242(3.559)	0.927(2.641)	0.912(2.613)
1 : 8 000	0.957(9.475)	0.912(6.909)	0.952(5.840)	0.965(7.256)	1.033(7.416)	0.956(5.401)	1.026(7.175)	0.960(5.275)
1 : 16 000	0.229(6.735)	0.232(6.105)	0.307(4.205)	0.262(2.817)	0.347(3.274)	0.287(2.633)	0.279(2.385)	0.177(2.135)
1 : 32 000	0.043(6.143)	0.060(7.500)	0.046(4.600)	0.082(2.563)	0.097(3.731)	0.084(3.231)	0.092(4.822)	0.081(5.786)
1 : 64 000	0.027(2.700)	0.031(1.938)	0.037(9.250)	0.045(1.800)	0.065(3.824)	0.053(2.650)	0.042(2.625)	0.028(2.000)

注:表中前面数值为阳性血清  $A_{450}$  值,括号内为阳性与阴性比值

**2.4.3 间接 ELISA 方法评价** 经美国 Focus 公司和 FDA 认证试剂盒方法对临床不同患者血液样本及正常人血液样本进行检测(其中包括对斑点热、斑疹伤寒、新布尼亚病毒、恙虫病的检测),每个样本做 3 个复孔,其结果与所建立的间接 ELISA 结果比较。用建立的间接 ELISA 方法检测这 120 份临床样本,结果显示 29 份斑点热立克次体 IgG 抗体阳性,其余标本阴性。上述同样的标本用美国 Focus 公司和 FDA 认证试剂盒检测上述 120 份样本,结果显示新布尼亚病毒 IgG 阳性的标本 30 份,斑点热 IgG 阳性的样本 30 份,斑疹伤寒 IgG 阳性的样本 4 份,恙虫病 IgG 阳性的样本 26 份,上述各种抗体为阴性 30 份。将本研究所建立的间接 ELISA 方法与美国 Focus 公司和 FDA 认可的方法的检测结果进行配对  $\chi^2$  (Fisher 确切概率法) 检验,检测结果差异无统计学意义,进一步计算两者的特异性为 100%,敏感性为 96.7%,符合率为 99.2%,Kappa 值为 0.98,说明两种方法一致性极好。

### 3 讨论

本文中这株日本斑点热立克次体病原体的发现和成功分离扩大了我国斑点热立克次体的种类;说明安徽是日本斑点热立克次体的疫源地,具有重要的流行病学意义,同时对临床医师的诊治也是很好的提示。

不同种的立克次体表面蛋白有差异,同种立克次体表面蛋白在核苷酸和氨基酸序列也可存在差异,从而表现为其致病性、免疫性的不同<sup>[7-9]</sup>,有些立克次体能使人致病,有些立克次体不能使人致病,比如康氏立克次体可引起地中海斑点热,蒙他拿立克次体却不能使人致病。本研究通过对 *R. Japonica* Anhui 120 strain 的 OmpA、OmpB、geneD、16SrRNA、17kD 基因进行 PCR 测序分析显示,OmpB 基因 PCR 片段在 3 170 bp 处和 3 204 bp 处与 PubMed 上的日本斑点热立克次体(Sequence ID: AB003681.1) 比对后发现存在 2 个不连续单个碱基突变。鉴于立克次体科 *R. Prowazekii* 斑疹伤寒疫苗株一个碱基的突变可导致疫苗株毒力恢复并导致致病<sup>[10]</sup>,本研究考虑 *R. Japonica* Anhui 120 strain OmpB 基因的点突变可能是导致 *R. Japonica* Anhui 120 strain 致病性增高的原因,故通过构建含这段突变的 OmpB 基因片段(OmpB2050-3642)的原核表达质粒、制备抗原以期能为我省斑点热患者的诊断、流行病学调查及下一步的科学研究提供方法储备和技术支持。

本文采用 PET-30a 作为表达载体载体来构建 OmpB 重组质粒,成功表达后通过变复性的方式纯化包涵体形式的 rOmpB 蛋白。通过 lowey 法测得用载体 PET-30a 构建的高纯度的重组蛋白 OmpB 浓度为 4 mg/ml。比用 PET-22b(+) 作为载体纯化得到可溶性蛋白浓度高了 22 倍。通过 Western blot 法检测分析包涵体形式的 rOmpB 蛋白具有很好的免疫反应性。故本研究采用 PET-30a 构建的高纯度的 OmpB 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法。

本研究利用棋盘滴定法<sup>[11]</sup>通过设定不同的抗原浓度和血清稀释度,得出最适抗原浓度和血清稀释度。本研究对最适抗原浓度和血清稀释度的判定标准为:已知阳性血清和已知阴性血清在 450 nm 处的阳性与阴性比值,阳性与阴性比值最大且 OD<sub>450 nm</sub> 阳性值在 1.0 左右,阴性值在 0.2 以下。本文抗原最佳使用浓度和血清稀释度分别为 12.5  $\mu$ g/ml 和 1:320。本文对间接 ELISA 体系的 cut-off 值的确定是通过 30 份来自山区的正常人血清标本,通过检出的阴性血清在 450 nm 处 OD 值的平均数加 2 倍的标准差为正常值上限判断出 cut-off 值为 0.360。最适抗原浓度和血清稀释度及 cut-off 值都是经过严格设计而得出,具有科学性。

本研究用构建的 OmpB 重组蛋白作为抗原建立间接 ELISA 方法对 120 份患者及正常人标本进行检测斑点热立克次体 IgG 抗体,同时用美国 Focus 公司和 FDA 认可的检测方法对此 120 份标本进行检测并将两者结果相互比较,经统计学方法得出所建方法的敏感性和特异性。在这 120 份患者和正常人血清中,美国 Focus 公司和 FDA 认证试剂盒分别检出包括 30 份新布尼亚病毒 IgG 阳性样本,30 份斑点热立克次体 IgG 阳性样本,4 份斑疹伤寒 IgG 阳性样本和 26 份恙虫病 IgG 阳性样本。re-OmpB ELISA 方法检测斑点热立克次体 IgG 阳性的结果为 29 份阳性(包含在美国 Focus 公司免疫荧光试剂盒确诊的斑点热 IgG 阳性的 30 份样本中),其余样本均为阴性。其中斑点热、斑疹伤寒和恙虫病同属于立克次体科下的不同属,新布尼亚病毒与斑点热立克次体同属蜱传疾病,所以研究表明选择了这几种阳性血清进行方法学验证最具有科学性。结果显示所建方法与斑疹伤寒、恙虫病和新布尼亚病毒均无交叉反应,具有很好的种属特异性。而对于美国 Focus 公司免疫荧光试剂盒和 re-OmpB ELISA 方法对斑点热 IgG 检测结果不一致唯一的一份血清,在 450 nm 处的 OD 值为 0.356 与 cut-off 值 0.360 接近,可能

是由于在稀释过程中出现的误差影响了结果阴阳性的判断。通过统计学分析,该方法的敏感性 96.7%,特异性 100%,与美国 Focus 公司立克次体 IgG 免疫荧光试剂盒检测方法的符合率为 99.2%, Kappa 值为 0.98,其中 Kappa 值是一个介于 -1 ~ +1 的数。由于 Kappa 值  $\geq 0.75$ ,说明该方法与 FDA 认可的方法一致性极好。在后续的研究中,本研究将在本方法的基础之上继续加以完善,如通过加大检测样本量来进一步检测所建立的间接 ELISA 方法的特异性和敏感性。

综上所述,本研究利用 *R. Japonica* Anhui 120 strain OmpB 重组蛋白建立的间接 ELISA 方法对临床患者血清样本和正常人血清样本的斑点热立克次体的 IgG 抗体检测,有较高的敏感性和特异性,可以用于临床患者血清学辅助诊断、流行病学调查和为科研提供实验支持。

#### 参考文献

- [1] 严延生,内田孝宏. 日本立克次体 ompB 蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1996,16(3):220-6.
- [2] Fan M Y, Walker D H, Liu Q H, et al. Rickettsial and serologic evidence for prevalent spotted fever rickettsiosis in Inner Mongolia [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1987, 36(3): 615-20.
- [3] Gilmore RD Jr, Cieplak W Jr, Policastro P F, et al. The 120 Kilo-

- dalton outer membrane protein (rOmpB) of *Rickettsia* ricket Esziis encoded by an unusually long open reading frame: evidence for protein processing from a large precursor [J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(10):2361-70.
- [4] Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging Zoonoses [J]. *Vet Res*, 2005, 36(3):469-92.
- [5] Rovey C, Brouqui P, Raoult D. Questions on mediterranean spotted fever a century after its discovery [J]. *Emerg Infect Dis* 2008, 14(9):1360-7.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal cases of rocky mountain spotted fever in family cluster-three states, 2003 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004, 53(19):407-10.
- [7] Radulovic S, Feng H M, Morovic M, et al. Isolation of *Rickettsia akari* from a patient in a region where mediterranean spotted fever is endemic [J]. *Clin Infect Dis*, 1996, 22(2):216-20.
- [8] Chao C C, Zhang Z, Wang H, et al. Serological reactivity and biochemical characterization of methylated and unmethylated forms of a recombinant protein fragment derived from outer membrane protein B of *Rickettsia typhi* [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(4):684-90.
- [9] Chan Y G, Riley S P, Chen E, et al. Molecular basis of immunity to rickettsial infection conferred through outer membrane protein B [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(6):2303-13.
- [10] Driskell LO, Yu X J, Zhang L, et al. Directed mutagenesis of the *Rickettsia prowazekii* pld gene encoding phospholipase D [J]. *Infect Immun* 2009, 77(8):3244-8.
- [11] 王芳,冯宇,张阁,等. 牛布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(9):1818-25.

## Study on the antigenicity of the recombinant protein of *R. Japonica* OmpB

Zong Jia, Liu Boyu, Chen Zhen, et al

(Dept of Microbiology Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the diagnostic and epidemiological methods of clinical diagnosis and epidemiological investigation of *R. Japonica*. **Methods** *R. Japonica* Anhui 120 strain OmpB prokaryotic expression plasmid was constructed by using gene engineering expression. Identification and purification of recombinant protein was used as antigen to establish indirect ELISA detection method to detect *R. Japonica* specific IgG antibody. And the sensitivity and specificity of the method will be evaluated in 120 clinical samples. **Results** The high expression and high purity of OmpB recombinant protein was obtained. Compared with FDA approved diagnostic kit, the established indirect ELISA method system had good specificity and sensitivity. The specificity of both was 100%, the sensitivity was 96.7%, the coincidence rate was 9.2%, Kappa value was 0.98. **Conclusion** OmpB recombinant protein has a good immune response and can be specifically used to detect *R. Japonica* IgG antibody. Indirect ELISA method can be used as technical storage for clinical diagnosis epidemiological investigation and scientific research.

**Key words** *R. Japonica*; rOmpB; protein purification; inclusion body; indirect ELISA