

进口竹荚鱼中单核细胞增生李斯特菌的鉴定及其鞭毛蛋白的原核表达

李正义¹ 贾俊涛¹ 曾静^{2*} 魏海燕² 姜英辉¹ 崔鹤¹

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 山东 青岛 266002)

(2. 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 北京 100026)

摘要:【目的】对进口竹荚鱼中分离的一株病原菌 S1-2 进行鉴定,并在大肠杆菌中表达其鞭毛蛋白。【方法】采用全自动微生物鉴定仪和革兰氏阳性菌鉴定卡进行生理生化反应测试,利用 *iap* 基因实时荧光 PCR 特异性扩增检测病原菌。通过 PCR 技术扩增病原菌 S1-2 的鞭毛蛋白 *flaA* 基因,克隆筛选和测序鉴定后,构建该基因的原核表达质粒 pET22b-*flaA*,镍柱法纯化表达产物,通过免疫印迹鉴定其免疫原性。【结果】分离病原菌为革兰氏阳性菌,生理生化特征与单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的相似性为 99%,协同溶血实验在靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强。SDS-PAGE 结果表明融合表达产物分子量约为 32 kD,Western blot 结果表明重组表达的鞭毛蛋白具有免疫原性。【结论】*flaA* 基因的原核表达为制备单核细胞增生李斯特菌的单克隆抗体及其检测方法的建立奠定了基础。

关键词: 竹荚鱼,单增李斯特菌,鉴定,鞭毛蛋白,表达

Identification of *Listeria monocytogenes* from imported *Trachurus japonicas* and prokaryotic expression of flagellin

LI Zheng-Yi¹ JIA Jun-Tao¹ ZENG Jing^{2*} WEI Hai-Yan² JIANG Ying-Hui¹ CUI He¹

(1. Technology Center for Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266002, China)

(2. Technology Center for Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: [Objective] To identify and characterize a bacterial strain S1-2 isolated from the imported *Trachurus japonicas* and express the flagellin in *Escherichia coli* BL21. [Methods] The physiological and biochemical characteristics were elucidated by employing VITEK 2 compact automated microbiology system and Gram-positive identification card. Real-time PCR method aiming for the amplification of the *iap* gene was used to detect strain S1-2. The *flaA* gene from S1-2 was amplified by PCR and cloned into prokaryotic expression vector pET-22b. The recombinant product was purified by nickel affinity chromatography. Western blot was employed to test the immunogenicity. [Results] Strain S1-2 was identified as Gram-positive and exhibited the highest levels of 99% probability to be *Listeria monocytogenes* based on the conventional physiological test. An enhanced zone of β -haemolysis at the intersection of *Staphylococcus aureus* was found.

基金项目: 质检总局公益资助项目(No. 201110034)

*通讯作者: Tel: 86-10-58619245; 信箱: zengj@bjciq.gov.cn

收稿日期: 2013-08-03; 接受日期: 2013-12-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-08

SDS-PAGE indicated that the molecular weight was about 32 kD. Western blot showed that the recombinant protein FlaA had immunogenicity. [Conclusion] These results would provide basis for the further studies on the development of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and the establishment of the detection methods.

Keywords: *Trachurus japonicas*, *Listeria monocytogenes*, Identification, Flagellin, Expression

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 简称单增李斯特菌, 是一种能够引起人兽共患病的食源性致病菌。单增李斯特菌可污染许多食品, 包括生家禽、家畜肉、发酵香肠和海产品等^[1]。该菌的生长最适温度为 35–37 °C, 在 20–25 °C 培养有助于产生周生鞭毛, 可以作为一种抗原对单增李斯特菌进行血清学分类^[2]。单增李斯特菌的鉴定多采用传统的生化反应实验和溶血试验等, 其他方法如 PCR 方法、核酸探针、免疫学等方法为快速检测单增李斯特菌提供了关键性的技术手段^[3-7]。

单增李斯特菌的致病性与 *iap* (Invasion associated protein) 基因编码的 p60 蛋白有关, 该蛋白是细胞壁水解酶, 对 LM 抗吞噬细胞溶解作用以及对机体的感染过程起重要作用^[8-9]。分离到的所有李斯特菌都含有 p60 蛋白或其同系物, 通过比较该基因序列在李斯特菌属内的种间差异, 设计引物和探针, 可以建立 LM 实时荧光 PCR 鉴定方法^[10]。采取原核表达策略在大肠杆菌中表达 LM 溶血素蛋白、毒力因子 ActA 蛋白、Internalin A 表面蛋白等特征性蛋白是一种具有吸引力的制备免疫抗原的方法^[11-13]。单增李斯特菌含有 2–4 根周生鞭毛, 提取鞭毛蛋白作为特征性抗原, 制备单克隆抗体用于 LM 的特异性检测迄今国内外少有报道。鞭毛蛋白的提取采用机械手段完成^[14], 然而此方法会产生 RNA、O 抗原(即菌体抗原)以及菌体脂多糖等干扰物质, SDS-PAGE 电泳实验也观察到杂蛋白^[15], 因此采用纯化的重组蛋白作为抗原, 可以有效消除未知蛋白对免疫和抗体纯化的干扰。本研究采用传统生化试验结合荧光定量 PCR 方法对分离自进口竹荚鱼中的病原菌进行分离鉴定, 并利用 PCR 技术扩增出该菌的鞭毛蛋白 *flaA* 基因, 测序确认后在原核

细胞中获得表达, 经过 IPTG 诱导获得免疫原性的重组表达蛋白, 为进一步研究 LM 单克隆抗体及其检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

实验所用菌株、质粒和引物见表 1, 引物由宝生物工程(大连)有限公司提供。单增李斯特菌 S1-2 分离自进口于日本的竹荚鱼 (*Trachurus japonicas*) 腹部肌肉组织。

1.2 主要试剂和仪器

PALCAM 琼脂平板, 李斯特氏菌显色培养基和羊血琼脂平板购于北京陆桥技术责任有限公司, 限制性内切酶 *Bam*H I、限制性内切酶 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶均购于宝生物工程(大连)有限公司, G^+ 细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司, LightCycler 480 Probes Master 购于罗氏诊断产品(上海)有限公司, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 购于 Merck 公司, Ni^{2+} 亲和层析树脂 (Nickel nitrilotriacetic acid agarose) 购于 Qiagen 公司, 鼠抗组氨酸标签抗体、鼠抗 LM 多抗以及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司。法国生物梅里埃公司全自动微生物鉴定仪, VITEK 2 Compact 革兰氏阳性菌鉴定卡 (GP test kit), BIO-PROFILE 凝胶成像系统, Eppendorf AG PCR 仪和 Roche LightCycler 480 高通量实时荧光定量 PCR 系统。

1.3 病原菌的分离纯化

无菌操作取 25 g 竹荚鱼, 加入到增菌液中 30 °C 培养过夜, 取增菌液划线接种 PALCAM 琼脂平板和李斯特氏菌显色培养基, 挑选可疑单菌落划线 TSA-YE 平板进行纯化, 30 °C 培养 48 h, 培养后观察

表1 实验所用的菌株、质粒和引物		
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study		
菌株、质粒和引物	表型及相关特征	来源
Strains, plasmids and primers	Phenotypes and related characters	Sources
菌株 Strains		
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 13932)	血清型 4b 型	美国菌种保藏中心 American Type Culture Collection
<i>L. innocua</i> (ATCC 33090)		
<i>L. grayi</i> (ATCC 700545)		
<i>L. welshimeri</i> (ATCC 35897)		
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)		
<i>E. coli</i> (ATCC 51755)		
<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 700323)		
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)		
<i>Staphylococcus aureus</i> (CGMCC 1.1529)	中国普通微生物菌种保藏管理中心 China General Microbiological Culture Collection Center	
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>supE</i> 44, Δ(<i>argF lacZ</i> _{ya}), U169 Φ80Δ(<i>lacZ</i>), <i>hsdR</i> 17(<i>r</i> _k ⁻ <i>m</i> _k ⁻), <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> -1, <i>relA</i> 1, λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _B (<i>r</i> _B ⁻ <i>m</i> _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen
质粒 Plasmids		
pMD-18T	TA 克隆; Amp ^r	TaKaRa
pET-22b	C-terminal His tag; Amp ^r ; 5 493 bp	Invitrogen
引物 Primers (5'→3')		
上游引物 Forward primer	GT <u>CCGATCC</u> ATGAAAGTAAATACTAATAT (下划线为 <i>Bam</i> H I 酶切位点)	
下游引物 Reverse primer	CAT <u>CTCGAG</u> TTAGCTGTTAATTAATTGAGT (下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)	

菌落形态,并穿刺和划线血平板观察溶血情况及其与金黄色葡萄球菌的协同溶血试验^[16]。使用全自动微生物鉴定仪和革兰氏阳性菌鉴定卡进行生理生化鉴定。

1.4 病原菌基因组DNA的提取

取分离的病原菌S1-2接种于TSA-YE平板上,30℃培养48 h。采用G⁺细菌基因组DNA小量提取试剂盒说明书提取基因组DNA。

1.5 iap基因实时荧光PCR特异性扩增

引物和Taqman探针参照文献[10],正向引物iapF (5'-AATCTGTTAGCGCAACTTGTTAA-3'),反向引物iapR (5'-CACCTTTGATGGACGTAATAATACTGTT-3'),Taqman探针iapP (5'-FAM-CAACACCAGCGCCACTACGGACG-TAMRA-3')。PCR扩增程序:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 5 s,63℃ 60 s,共40个循环。实时荧光PCR反应体系

为20 μL,LightCycler 480 Probes Master 10 μL,正向、反向引物(20 μmol/L)各1 μL,Taqman探针(10 μmol/L)1 μL,DNA模板2 μL和去离子水5 μL。

1.6 鞭毛蛋白flaA基因的PCR扩增及克隆

取病原菌S1-2基因组DNA为模板进行PCR扩增。体系为50 μL,其中上下游引物各1 μL,Taq DNA聚合酶0.5 μL,10×缓冲液5 μL,25 pmol/L dNTPs 5 μL,模板2 μL和去离子水35.5 μL。反应条件为:94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 2 min,共35个循环。PCR产物回收,连接到pMD18-T载体上,转化*E. coli* DH5α。重组质粒进行PCR鉴定,由北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部进行测序。

1.7 表达载体的构建

将鉴定正确的重组质粒和pET22b质粒载体用*Bam*H I、*Xho*I双酶切,纯化回收后用T4 DNA连

接酶连接构建重组表达质粒pET22b-flaA, 连接产物转化*E. coli* BL21 (DE3), 经含氨苄青霉素(终浓度为100 mg/L)的LB培养基筛选, 挑取单菌落提取质粒并测序鉴定。

1.8 鞭毛蛋白flaA基因的原核表达

将His标记的重组表达质粒转化*E. coli* BL21(DE3)进行IPTG诱导表达: 将1%接种量过夜培养的重组菌液加入1 L新鲜的含氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 °C培养2–3 h, OD_{600} 为0.5–0.8时, 加入IPTG, 终浓度为1 mmol/L, 诱导5 h。诱导产物进行SDS-PAGE分析。

1.9 免疫印迹分析

将*E. coli* BL21(DE3) (pET-flaA)经诱导表达后用超声波法裂解, 离心收集上清, 用镍柱法分离纯化重组表达产物FlaA。纯化的FlaA蛋白经SDS-PAGE后, 电转至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉封闭, 分别用鼠抗组氨酸的抗体和鼠抗LM的多抗作一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG为二抗, 二氨基联苯胺(DAB)为底物, 进行蛋白印迹分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌S1-2的鉴定

2.1.1 培养和生化特征: 菌株S1-2在PALCAM琼脂平板上圆形灰绿色菌落, 周围有棕黑色水解圈, 在李斯特菌显色平板上为圆形蓝色菌落, 周围有白色晕圈。菌细胞革兰氏染色阳性, 杆状。采用VITEK 2 Compact 革兰氏阳性菌鉴定卡鉴定该菌株, 结果显示该菌株的生理生化特征与单增李斯特菌相似性为99% (表2), 处于鉴定卡置信水平极好范围内(96%–99%)。在羊血琼脂上刺种, 刺种点周围产生狭小的透明溶血环, 与金黄色葡萄球菌的协同溶血实验发现病原菌S1-2靠近金黄色葡萄球菌的接种端溶血增强。

2.1.2 iap 基因实时荧光 PCR 特异性试验: 根据文献报道的定量PCR方法, 分别以单增李斯特菌标准菌株、分离病原菌S1-2、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌、威氏李斯特氏菌、奇异变形杆菌、

大肠杆菌、阴沟肠杆菌和肠炎沙门氏菌等DNA作为待检样品, 进行实时荧光PCR扩增。结果显示单增李斯特菌标准菌株和分离病原菌S1-2出现典型的扩增曲线, C_t 值分别为15.56和16.18, 结果为阳性, 其他细菌样品无扩增曲线(图1)。

2.2 flaA 基因的PCR扩增和克隆结果

分离病原菌S1-2的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 呈现出800 bp左右的扩增片段, 与预期大小相符(图2)。测序结果显示该基因长为864 bp, 编码287个氨基酸, 相对分子量约为31 kD。同源性比较结果表明, 其与GenBank上公布的LM LL195 4b血清型、L99血清型4a、ATCC 19117 4d血清型、SLCC 2755血清型1/2b、SLCC 2540血清型3b、SLCC 2378血清型4e、SLCC 2376血清型4c和SLCC 5850血清型1/2a菌株的flaA基因的核酸一致性为100%。pMD18-T载体连接获得的重组质粒经PCR扩增, 经测序鉴定, 其序列与目的flaA基因100%同源。

2.3 表达质粒的构建

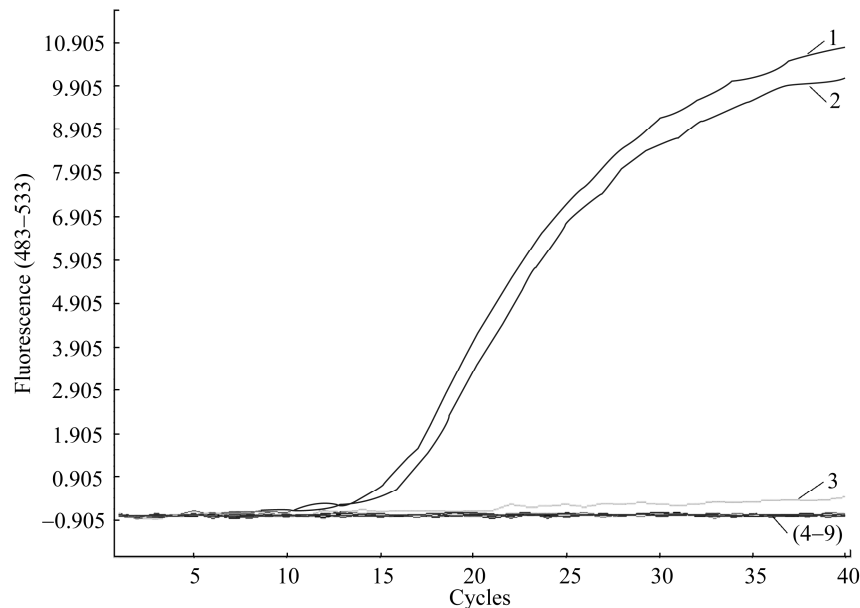
重组表达质粒pET22b-flaA经BamH I、Xho I双酶切后, 电泳出现5.4 kb和0.8 kb左右的2条带, 与预期结果相符。测序后发现, 与GenBank中已公布的49株单增李斯特菌的鞭毛蛋白flaA基因核苷酸序列比对一致性为97%–100%。其中, 与单增李斯特菌标准菌株ATCC 19117 (血清型4d型)、SLCC 2755 (血清型1/2b型)、SLCC 2540 (血清型3b型)、SLCC 2378 (血清型4e型)一致性为100%。结果表明基因已成功插入pET载体。

2.4 重组菌的诱导表达结果

对重组菌BL21(DE3) (pET22b-flaA)诱导表达并纯化, SDS-PAGE结果显示flaA基因在构建载体中获得表达。在pET22b载体中获得表达的融合蛋白相对分子量为32 kD, 与预期大小相符。图3显示采用1 mmol/L IPTG诱导时, 所得发酵液、菌体破碎上清及菌体破碎沉淀的蛋白情况, 从图3中可以看出目的蛋白绝大部分都分泌到细胞外。

表2 分离病原菌S1-2和单核细胞增生李斯特菌ATCC13932表型特征的比较					
Table 2 Comparison of phenotypic feature of isolated strain S1-2 with <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932					
鉴定项目 Characteristics	分离株 Strain	标准菌株 ATCC 13932	鉴定项目 Characteristics	分离株 Strain	标准菌株 ATCC 13932
苦杏仁苷 D-Amygdalin	+	+	多粘菌素 B 耐受 Polymixin B resistance	+	+
磷脂酰磷脂酶 C Phosphatidylinositol phospholipase C	+	+	D-半乳糖 D-Galactose	-	-
D-木糖 D-Xylose	-	-	D-核糖 D-Ribose	-	-
精氨酸双水解酶 1 Arginine dihydrolase1	-	-	L-乳酸盐产碱 L-Lactate alkalinization	-	-
β-D-半乳糖苷酶 Beta-D-Galactosidase	-	-	乳糖 Lactose	+	+
α-葡萄糖苷酶 Alpha-Glucosidase	+	+	N-乙酰-D-氨基葡萄糖 N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro arylamidase	-	-	D-麦芽糖 D-Maltose	+	+
环式糊精 Cyclodextrin	+	+	杆菌肽耐受 Bacitracin resistance	+	+
L-天冬氨酸芳胺酶 L-Aspartate-Arylamidase	-	-	新生霉素耐受 Novobiocin resistance	+	+
β-半乳糖吡喃糖苷酶 Beta-Galactopyranosidase	-	-	6.5% NaCl 生长 Growth in 6.5% NaCl	+	+
α-甘露糖苷酶 Alpha-Mannosidase	+	+	D-甘露醇 D-Mannitol	-	-
磷酸酶 Phosphatase	-	-	D-甘露糖 D-Mannose	+	+
亮氨酸芳胺酶 Leucine arylamidase	+	+	支链淀粉 Pullulan	-	-
L-脯氨酸芳胺酶 L-Proline arylamidase	-	-	D-棉子糖 D-Raffinose	-	-
β-葡萄糖醛酸酶 Beta-Glucuronidase	-	-	O/129 耐受 O/129 resistance (comp. vibrio.)	+	+
α-半乳糖苷酶 Alpha-Galactosidase	-	-	水杨素 Salicin	+	+
焦谷氨酸芳胺酶 L-Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	蔗糖 Sucrose/Saccharose	-	-
丙氨酸芳胺酶 Alanine arylamidase	-	-	D-海藻糖 D-Trehalose	+	+
酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	+	+	精氨酸双水解酶 2 Arginine dihydrolase 2	-	-
D-山梨醇 D-Sorbitol	-	-	奥普托欣耐受 Optochin resistance	+	+
尿素酶 Urease	-	-			

注：+：阳性；-：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

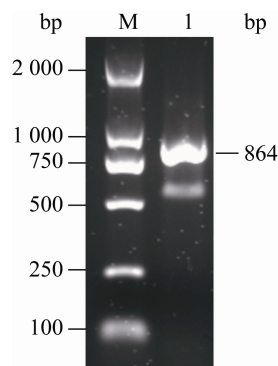
图 1 *iap* 基因实时荧光 PCR 特异性试验曲线图Figure 1 Specificity for detection of the *iap* sequence by real-time PCR

注：1：单增李斯特菌 ATCC 13932；2：分离病原菌 S1-2；3：英诺克李斯特菌 ATCC 33090；4-9：分别为格氏李斯特菌 ATCC 700545，威氏李斯特氏菌 ATCC 35897，奇异变形杆菌 ATCC 25933，大肠杆菌 ATCC 51755，阴沟肠杆菌 ATCC 700323 和肠炎沙门氏菌 ATCC 13076。

Note: 1: *L. monocytogenes* ATCC 13932; 2: Isolated pathogen S1-2; 3: *L. innocua* ATCC 33090; 4-9: *L. grayi* ATCC 700545, *L. welshimeri* ATCC 35897, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *E. coli* ATCC 51755, *Enterobacter cloacae* ATCC 700323, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

2.5 表达产物的 Western blot 分析结果

由图 4 的免疫印迹结果可知，Western blot 实验中 FlaA 能与 anti-His 标签单抗结合说明 FlaA 在 *E. coli* BL21 (DE3) 正确表达，FlaA 与小鼠抗 LM 血清结合说明其具有免疫原性。

图 2 *flaA* 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图Figure 2 The agarose electrophoresis of *flaA* PCR product

注：M：Marker DL2000；1：病原菌 S1-2。

Note: M: Marker DL2000; 1: Pathogen S1-2.

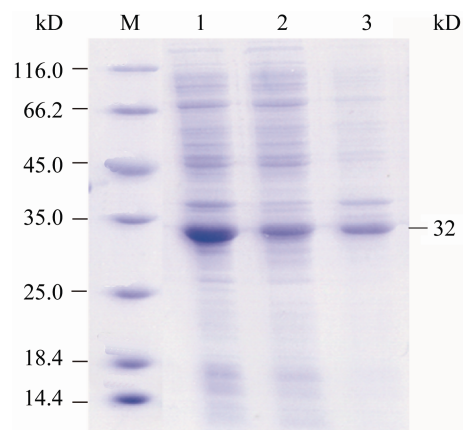


图 3 His-FlaA 融合蛋白大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein His-FlaA from *E. coli* BL21(DE3)

注：M：蛋白质分子量标准；1-3：1 mmol/L IPTG 诱导时胞外蛋白、胞内蛋白和菌体破碎沉淀。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1-3: Extracellular, intracellular and precipitation protein induced by 1 mmol/L IPTG.

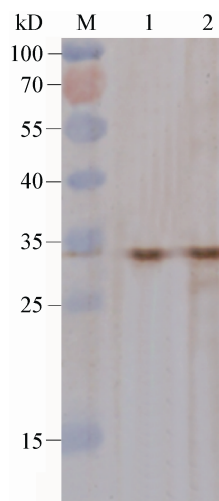


图4 Western blot 鉴定 FlaA

Figure 4 Western blot of FlaA

注：M：蛋白质分子量标准；1：FlaA 与 anti-His 标签单抗结合；2：FlaA 与小鼠抗 LM 多抗结合。

Note：M: Protein molecular weight marker; 1: FlaA with anti-His tag antibody; 2: FlaA with polyclonal antibody of LM.

3 讨论

单增李斯特菌在自然界广泛存在,而且在低温下能够繁殖,因此在世界范围内经常发生 LM 引起的食物中毒^[17]。因此,建立快速准确的检测方法是有效避免李斯特菌病暴发的重要手段。传统的形态观察和生理生化试验,鉴定准确,但操作繁琐、耗时长,现在依赖于商品化的鉴定系统鉴定时间得到缩减,相对于分子生物学方法的 3—4 h 鉴定时间,还是无法达到快速的效果;实时荧光 PCR 方法具有特异性强、自动化程度高、无污染、实时性和准确性等特点,已广泛应用于分子生物学研究和食源致病菌的检测等领域。p60 蛋白是李斯特菌分泌的一种具有高免疫原性的胞壁质水解酶,由 *iap* 基因编码,已知分离到的所有李斯特菌都含有 p60 蛋白或其同系物^[18]。本研究从进口竹荚鱼中分离得到一株食源致病菌 S1-2,利用全自动微生物鉴定仪、实时荧光 PCR 方法即传统的微生物学方法和分子生物学方法两者结合鉴定分离菌株为单增李斯特菌。与其他鉴定方法比较,免疫学方法快速、特异性强、操作简单,其中获取高特异性抗体是关键因

素。LM 全细胞免疫多抗,特异性不强;国内外学者利用大肠杆菌表达系统将多种 LM 特有的基因原核表达作为 LM 特异性诊断试剂的候选抗原 *hly* 基因编码分子量为 58 kD 的细胞溶血素蛋白^[11], *actA* 基因编码分子量为 97 kD 的肌动蛋白聚合蛋白^[12], *InlA* 基因编码分子量为 92 kD 的 Internalin A 表面蛋白^[13], *iap* 基因编码分子量为 60 kD 的 p60 蛋白^[19]。

随着人们对细菌鞭毛蛋白研究的不断深入,已经发现很多细菌的鞭毛具有抗原性,它们能产生针对该鞭毛的抗体^[20]。梁海鹰等^[21]克隆了溶藻弧菌鞭毛蛋白基因并在大肠杆菌中实现表达,重组鞭毛蛋白分子量为 60.5 kD,免疫印迹试验证实其具有免疫生物学活性。袁野等^[22]在大肠杆菌 BL21 中克隆表达了副溶血弧菌的鞭毛蛋白 *flaA* 基因,重组鞭毛蛋白分子量为 62.78 kD,Western blot 分析 His-tag 标签单抗能识别重组鞭毛蛋白。本研究中单增李斯特菌 S1-2 的鞭毛蛋白 *flaA* 基因在大肠杆菌中成功表达,His-tag 融合蛋白分子量为 32 kD,免疫印迹试验证实其具有免疫原性,为 LM 特异性单克隆抗体的制备及其检测方法的建立奠定基础。单增李斯特菌中鞭毛蛋白的表达通过温度调节控制,鞭毛蛋白基因 *flaA* 在 22 °C 或更低温度培养时转录水平最高,但 37 °C 时表达受到抑制^[23],因此利用 FlaA 多抗或单抗检测食品中 LM 时,培养温度控制在 30 °C 甚至更低,有利于 LM 产生鞭毛。鞭毛抗原与细菌的免疫保护性密切相关,因此鞭毛抗原既是病原细菌疫苗的重要材料,又是制备免疫保护特异性强的疫苗的先决因素^[24],本研究克隆表达的鞭毛蛋白能与天然 LM 的全菌蛋白发生免疫反应,提示 LM 鞭毛蛋白 FlaA 是它的主要抗原之一,有望作为其疫苗的有效成分在动物李斯特菌病的防治中发挥作用。

参考文献

- [1] Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis[J]. Microbes and Infection, 2007, 9(10): 1236-1243.
- [2] Peel M, Donachie W, Shaw A. Physical and antigenic

- heterogeneity in the flagellins of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134: 2593-2598.
- [3] Pieter AG, Ilse L. Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products[J]. Food Technology and Biotechnology, 2005, 43(2): 201-205.
- [4] Zhou XH, Jiao XA. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting *actA* gene[J]. Food Control, 2005, 43(2): 125-130.
- [5] Rodríguez-Lázaro D, Jofré A, Aymerich T, et al. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6299-6301.
- [6] Ingiani A, Floris M, Palomba P, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe[J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15: 275-280.
- [7] Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(5): 851-875.
- [8] Pilgrim S, Kolb-Mäurer A, Gentschev I, et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(6): 3473-3484.
- [9] 陈健舜, 江玲丽, 方维焕. 李斯特菌毒力因子及其进化[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 738-742.
- [10] Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scortti M, et al. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and amplifluor technology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1366-1377.
- [11] 林婷婷, 杨晶, 李志清, 等. 单增李斯特菌溶血素(LLO)的原核表达及其生物学活性鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 878-883.
- [12] 殷月兰, 董慧, 焦新安, 等. 产单核细胞李斯特菌 *actA* 基因在大肠杆菌中的表达及其单克隆抗体的研制[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 999-1002.
- [13] 李志清, 向军俭, 李雨辰, 等. 单增李斯特菌 InternalinA 的表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 495-502.
- [14] Peel M, Donachie W, Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134: 2171-2178.
- [15] Kim SH, Park MK, Kim JY, et al. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies[J]. Journal of Veterinary Science, 2005, 6(1): 41-46.
- [16] GB 4789.30-2010, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [17] Mead PS, Dunne EF, Graves L, et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat[J]. Epidemiology and Infection, 2006, 134: 744-751.
- [18] Hein I, Klein D, Lehner A, et al. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(1): 37-46.
- [19] 区燕宜, 徐成刚, 叶贺佳, 等. 单核细胞增生性李斯特菌 *iap* 基因的原核表达[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 108-111.
- [20] 李任峰, 何启盖, 周锐, 等. 细菌鞭毛研究概况及进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 124-127.
- [21] 梁海鹰, 夏立群, 吴灶和, 等. 溶藻弧菌 HY9901鞭毛蛋白 *flaB* 基因的克隆及原核表达[J]. 水产学报, 2010, 34(1): 139-146.
- [22] 袁野, 王秀丽, 郭设平, 等. Gene cloning and prokaryotic expression of recombinant flagellin A from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. 中国海洋与湖沼学报: 英文版, 2010, 28(6): 1254-1260.
- [23] Way SS, Thompson LJ, Lopes JE, et al. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity[J]. Cellular Microbiology, 2004, 152(1): 37-46.
- [24] Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC, et al. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa[J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(11): 1254-1517.