

# 原核表达 MurA 蛋白并制备其多克隆抗体用于免疫磁珠快速检测单增李斯特菌

童吉宇 李志清 闻一鸣 李雨辰 向军俭\*

(广东省分子免疫与抗体工程重点实验室 暨南大学抗体工程研究中心 广东 广州 510632)

**摘要:**【目的】制备 MurA 多抗, 结合免疫磁珠与选择平板进行单增李斯特菌的快速检测, 建立单增李斯特菌的免疫磁珠快速检测方法。【方法】构建 MurA 的原核表达载体, 转化大肠杆菌进行优化表达。镍柱纯化表达产物, 质谱鉴定重组蛋白, 再免疫小鼠, 制备其多克隆抗体。用所获多抗制备免疫磁珠, 建立单增李斯特菌免疫磁珠-选择性培养基检测方法, 并对人工污染牛奶样品进行检测。【结果】在大肠杆菌中高效表达了分子量约为 72 kD 的可溶性融合蛋白, 质谱鉴定其为 MurA 蛋白; 免疫小鼠获得的抗血清效价达 1:10 000, 与伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌、大肠杆菌及属内其它病原菌均无交叉; 所建立的免疫磁珠-选择性培养基检测法可检出浓度为  $10^3$  CFU/mL 及以上的单增李斯特菌, 仅与英诺克李斯特菌存在一定交叉反应; 牛奶样品单次仅需 9 h 增菌就能被检出, 较常规增菌时间缩短 39 h; 检测限为 0.4 CFU/mL。【结论】表达并纯化得到高纯度的单增李斯特菌 MurA 蛋白, 制备的鼠源多克隆抗体亲和力高, 特异性好; 建立了快速检测单增李斯特菌的免疫磁珠联合选择性培养基法, 在灵敏度不变的情况下, 实现 24 h 内成功对牛奶样品的检测, 较国标法减少 42 h 以上。

**关键词:** 单增李斯特菌, MurA, 多克隆抗体, 免疫磁珠

## Prokaryotic expression of MurA protein and development of polyclonal antibody for rapid detecting *Listeria monocytogenes* using immunomagnetic beads

TONG Ji-Yu LI Zhi-Qing WEN Yi-Ming LI Yu-Chen XIANG Jun-Jian\*

(Guangdong Province Key Laboratory of Molecular Immunology and Antibody Engineering, Antibody Engineering Center of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

**Abstract:** [Objective] To develop polyclonal antibody against MurA protein and combine immunomagnetic with selective plate to rapidly detect *Listeria monocytogenes* (LM). [Methods] Prokaryotic expression vector of MurA was constructed and transformed into *E. coli* to optimally express. Product after expression was purified by nickel affinity chromatography, mass spectrometry analysis was used to identify the recombinant protein; after correct identification, the protein was applied to immune mice in order to prepare polyclonal antibodies. The antibodies we acquired were used to develop immunomagnetic beads, which combined with selective medium to

\*通讯作者: ✉: txjj@jnu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-15; 接受日期: 2014-03-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-24

detect artificial contaminated milk samples. **[Results]** A soluble fusion protein with a molecular weight of 72 kD was expressed in *E. coli*, this protein was identified as MurA protein; antiserum possessed a titer as high as 10 000, with no cross-reaction to *Salmonella typhi*, *Vibrio parvolyticus*, *E. coli* and other pathogenic bacteria. Despite a little cross reaction with *Listeria innocua*, the method combined specific immunomagnetic beads with selective medium managed to detect LM of a concentration of  $10^3$  CFU/mL or above. After nine hours enrichment, milk samples within an original concentration of more than 0.4 CFU/mL were successfully detected, which was 39 hours less than the regular enrichment method. **[Conclusion]** Recombinant MurA protein was highly expressed in *E. coli* and showed high purity after purification, the polyclonal antibodies showed high affinity and specificity against LM. The immunomagnetic beads-selective medium method for detecting LM was able to detect milk samples within 24 hours, which was 42 hours less than national standard method with the same sensitivity.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, MurA, Polyclonal antibody, Immunomagnetic beads

李斯特菌属包括单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM)、伊氏李斯特菌 (*L. ivanovii*)、英诺克李斯特菌 (*L. innocua*)、威尔斯李斯特菌 (*L. welshimeri*)、西尔李斯特菌 (*L. seeligeri*)、格氏李斯特菌 (*L. grayi*) 和默氏李斯特菌 (*L. murrayi*) 7 个菌, 其中单增李斯特菌可引起人类的脑膜炎、败血症、流产及新生儿感染等疾病<sup>[1]</sup>。LM 在自然环境中广泛存在, 且能在低温下繁殖, 这些特点使其成为冷冻食品与即食食品安全的关注对象<sup>[2-5]</sup>。近年来, LM 引起的食物中毒在欧美等国家经常发生<sup>[6-7]</sup>, 如 2001 年日本李斯特菌污染奶酪事件; 2010 年 1 月的加拿大肉制品预警; 2012 年造成美国 11 个州 21 人死亡的“毒西瓜”事件等<sup>[8]</sup>。我国主要以熟食为主, 单增李斯特菌对热比较敏感, 煮食可杀灭细菌。但随着生活节奏的不断加快, 快餐食品和各种即食食品不断增加, 单增李斯特菌对我国人民的健康具有潜在的危害。因此建立快速、特异的单增李斯特菌检测方法是食品安全的研究热点之一。

目前国内外许多学者致力于该菌的快速检测方法的研究工作, 在常规分离鉴定检测方法的基础上不断探索免疫学和分子生物学的快速检测方法, 并将免疫磁珠分离技术与 PCR 或显色培养基快速鉴定技术联用<sup>[9]</sup>。免疫学方法具有快速、敏感、特异、简便、结果容易判定等特点。检测 LM 的免疫学方法主要有 ELISA、免疫荧光、免疫磁珠捕获法等。但是特异性高亲和力抗体是制约免疫学检测

方法发展的主要瓶颈。

本实验室用灭活的单增李斯特菌直接免疫小鼠, 经融合筛选, 获得了 3 株特异性结合单增李斯特菌的单抗 A7、1G3、3G8, 经 Western blot 分析发现, 这 3 株抗体均可识别菌体一个分子量约 72 kD 的蛋白。通过抗体偶联磁珠的方法将此 72 kD 的蛋白从菌体蛋白中分离出来, 经质谱鉴定为自溶素 (Autolysin) 家族中的 MurA 蛋白。

MurA 蛋白是单增李斯特菌体的细胞外膜蛋白<sup>[10]</sup>, 由 MurA 基因编码, 是目前鉴定的 LM 六种自溶素中的一种, 具有水解胞壁质作用, 其 N-末端具有胞壁酸酶同源结构, C-末端含有 4 个重复的 LysM 基序。有研究表明其在单增李斯特菌的增殖分裂中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。对其基因组序列分析表明, 英诺克李斯特菌、威尔斯李斯特菌也含有 MurA 蛋白, 其与 LM 的蛋白分别有 94% 和 87% 的一致性, 但是该蛋白是否在英诺克李斯特菌和威尔斯李斯特菌表面表达还不确定。本研究通过原核表达 MurA 蛋白, 制备其鼠源多克隆抗体, 并利用该多抗与磁珠进行偶联, 制备免疫磁珠, 联合选择性平板法, 建立单增李斯特菌的免疫磁珠-选择性平板快速检测方法<sup>[13-14]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验菌株: 单增李斯特菌 54002 (*Listeria monocytogenes* 54002)、英诺克李斯特菌 (*L.*

*innocua*)、威尔斯李斯特菌(*L. welshimeri*)、格氏李斯特菌(*L. grayi*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella entericasubspenterica*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* 50071),均由广东省微生物研究所赠予。

**1.1.2 质粒:** pMD18-T Simple Vector T 载体(*lacZ*, *Amp<sup>r</sup>*),大连宝生物工程有限公司;pET28a(+),本室保存。

**1.1.3 实验动物:** 4-6 周龄 BALB/c 小鼠,购于南方医科大学实验动物中心。

**1.1.4 主要器材:** 4800 plus MALDI-TOF/TOF ,ABI 公司;荧光倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;混匀仪 Dynal-MIX1 ,美国 Invitrogen 公司;UV-2550 紫外分光光度计,日本 SHIMADZU 公司;酶标仪 Multiskan MK ,Thermo Labsystem 公司;弗氏佐剂, Sigma 公司;镍离子亲和层析柱, GE 公司。

## 1.2 MurA 的原核表达及纯化

**1.2.1 murA 基因的 PCR 扩增及克隆:** 利用软件设计 *murA* 基因的引物:上下游分别含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。上游引物:5'-GGATCCGACGA AACAGCGCCTGCTGA-3';下游引物:5'-CTCGA GTCACCTAATTGTTAATTTCTGACC-3'。以提取的单增李斯特菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为:DNA 模板(36.5 mg/L) 1  $\mu$ L, dNTPs (25 pmol/L) 5  $\mu$ L;10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ L;上游引物(100 mmol/L) 1  $\mu$ L;下游引物(100 mmol/L) 1  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 36.5  $\mu$ L。反应条件为:95  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min;55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 90 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物回收后,与 pMD18-T 载体 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。利用 Axygen 公司的质粒抽提试剂盒抽提质粒,进行 PCR 鉴定及 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定和测序鉴定。

**1.2.2 表达载体的构建:** 将鉴定正确的重组质粒和 pET28a(+)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 pET28a(+)-MurA 重组表达质粒,连接产物转化 *E. coli* BL21,经含卡那霉素的 LB 平板筛选,挑选单

菌落提取质粒并测序鉴定。

**1.2.3 重组 MurA 蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析:** 将鉴定正确的重组菌液按体积比 1:1 000 接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、270 r/min 培养过夜。从新鲜菌液中取 1 mL,接种于 100 mL 2 $\times$ YT 培养基中,37  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h 左右,OD<sub>600</sub>=0.5 时,加入 1 mol/L IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L;28  $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 8 h。4  $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 10 min,收集菌体;加入 PBS 缓冲液(pH 7.4)重悬菌体,冰浴超声波破碎。4  $^{\circ}$ C、8 500 r/min 离心 30 min,分别取上清液组分和沉淀组分,用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析。

**1.2.4 重组 MurA 蛋白的分离纯化及鉴定:** 表达菌体经超声破碎后,8 500 r/min 离心 30 min,将上清过滤后上样至用平衡缓冲液(NaCl 500 mmol/L, PB 20 mmol/L,咪唑 5 mmol/L, pH 8.0)平衡的镍离子亲和层析柱。再依次分别用含 30、50、75 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液(NaCl 500 mmol/L, PB 20 mmol/L, pH 7.4)进行分阶段洗脱,收集各阶段洗脱峰。将各阶段洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳分析。将纯化所得蛋白条带从胶中切下,经胰蛋白酶酶切后,得到的肽段混合物经过基质辅助激光解吸附电离串联飞行时间质谱分析鉴定;并对鉴定结果采用 Mascot 搜索引擎在 NCBI 数据库中进行搜索。

## 1.3 MurA 鼠多克隆抗体的制备及分析

**1.3.1 MurA 鼠多抗的制备<sup>[15-16]</sup>:** balb/c 小鼠适应性饲养一周后,用纯化的 MurA 抗原作为免疫原,背部皮下多点免疫;免疫抗原体积为 200  $\mu$ L,免疫剂量为 100  $\mu$ g;第一次所用佐剂为完全佐剂,以后为不完全佐剂,每次免疫间隔两周。每次免疫后一周断尾采血,间接 ELISA 方法测定血清效价。第 4 次免疫 7 d 后摘眼球采集全部血液,收集血清,分装保存。

**1.3.2 抗体效价的测定及其交叉性分析<sup>[17]</sup>:** 单增李斯特菌、英诺克李斯特菌、威尔斯李斯特菌、格氏李斯特菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌经加热

灭活后,用麦氏比浊法将菌体浓度调至  $10^9$  个/mL。取上述菌体 100  $\mu$ L 包被 ELISA 板孔,小鼠血清稀释不同梯度后,间接 ELISA 测效价。

#### 1.4 免疫磁珠(Immunomagneticbeads, IMB)-选择性培养基检测方法的建立

**1.4.1 MurA 多抗偶联磁珠制备单增李斯特免疫磁珠:** 根据 DYNABEADS M-280 TOSYLACTIVATED 试剂盒说明书操作。以实验室前期制备的铅单克隆抗体与磁珠偶联,作为阴性对照组。

**1.4.2 IMB-选择性培养基检测特异性分析:** 分别将 LM、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌和威尔斯李斯特菌接种于 TSB-YE 液态培养基,大肠杆菌、伤寒沙门氏菌接种于 LB 培养基,副溶血弧菌接种于含 3% NaCl 的 LB 培养基中,置摇床中 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h;以灭菌的 PBS 稀释菌液至  $10^4$  CFU/mL,每种菌各取 1 mL 与 25  $\mu$ L 已偶联 MurA 多抗的磁珠反应,同时取 1 mL 同样浓度的菌液与 25  $\mu$ L 偶联无关抗体的磁珠反应,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗 2 次,重溶至 50  $\mu$ L PBS,涂布于 PALCAM 平板,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h。次日计算平板上菌落数。

**1.4.3 IMB-选择性培养基检测灵敏度分析:** 接种单增李斯特菌于 TSB-YE 液体培养基,置摇床中 37  $^{\circ}$ C 培养 18 h;菌液以 PBS 稀释至浓度为  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  CFU/mL。取 50  $\mu$ L 各浓度菌液,涂布于 TSB-YE 固体培养基,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h,以确定菌的浓度。每浓度菌液各取 1 mL 与 25  $\mu$ L 免疫磁珠 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗 2 次,重溶至 50  $\mu$ L PBS,涂布于 PALCAM 平板,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h。次日计算平板上菌落数。实验重复 2 次以确定方法检测限。

**1.4.4 IMB-选择性培养基检测人工污染牛奶样品:** (1) IMB-选择性培养基检测不同浓度人工污染牛奶样品:接种单增李斯特菌 5 mL TSB-YE 液体培养基,于摇床中培养 18 h;次日以无菌 PBS 倍比稀释菌液,菌浓度调至  $10^2$  CFU/mL 水平,再进行倍比稀释(2 $\times$ 、4 $\times$ 、8 $\times$ 、16 $\times$ ),每浓度各取 1 mL 菌液与 9 mL 纯牛奶混合,作为人造食物污染样品。每个浓度下的样品各取 1 mL,加入到 9 mL 无菌的

TSB-YE 液体培养基中培养,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h;次日,每个浓度各取 1 mL 菌液与 25  $\mu$ L 免疫磁珠于 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBST 洗 2 次,磁分离后溶解于 50  $\mu$ L PBS,涂于 PALCAM 培养基中,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后,计数。

(2) IMB-显色培养基法检测不同增菌时间下的人工污染牛奶样品:接种单增李斯特菌 5 mL 于 TSB-YE 液体培养基,摇床中培养 18 h;次日以无菌 PBS 倍比稀释菌液,菌浓度调至低于 10 CFU/mL 水平,设置 6 个不同增菌时间的实验组,分别加入 1 mL 该浓度下菌液和 9 mL 纯牛奶,增菌 3、6、9、12、15、18 h。增菌后每组各取 1 mL 牛奶样品与 25  $\mu$ L 免疫磁珠 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h, PBST 洗 2 次,磁分离后溶解于 50  $\mu$ L PBS,涂于 PALCAM 培养基中,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后,计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 murA 基因的 PCR 扩增结果

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,观察到 1 600 bp 左右的扩增片段,与 murA 基因预期片段一致(图 1)。

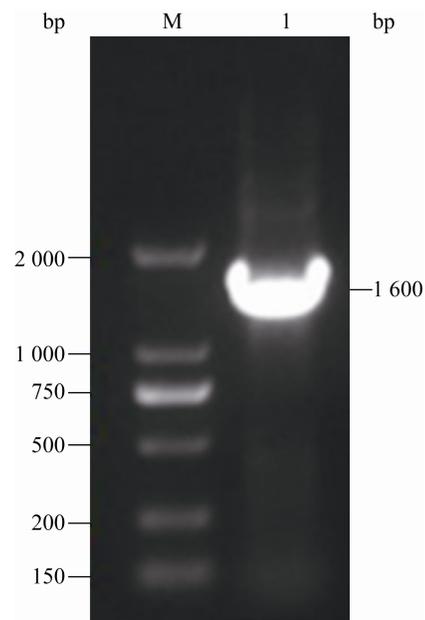


图 1 murA 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification

Note: M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of murA.

## 2.2 pET28a(+)-MurA 的酶切鉴定

pET28a(+)-MurA 分别用 *Bam*H I、*Xho* I 单酶切后都获得约 8 000 bp 的产物,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切可获得 6 100 bp 和 1 600 bp 的产物(图 2)。经测序鉴定,序列分析证实该 DNA 片段大小为 1 617 bp,阅读框架正确。与 GenBank 发布的 LM EGD 株 *murA* 基因序列相比较,其核苷酸序列一致性达到 99%,推导出的氨基酸序列一致性为 99%。证明 *murA* 基因已成功插入 pET28a(+)表达载体。

## 2.3 重组 MurA 蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析

转化后的 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导后,在 72 kD 左右有明显的条带出现(图 3),说明在 IPTG 的作用下,重组 MurA 蛋白诱导表达成功。进一步摸索其最佳表达条件为 28 °C、0.1 mmol/L IPTG 诱导 8 h,经测定,目的蛋白占总蛋白含量的 13%。诱导表达菌体经超声破碎后,8 500 r/min 离心 30 min,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。如图 4 所示,泳道 1 和 2 分别为破碎后的上清和沉淀,可见目的条带主要存在于上清中,说明重组菌

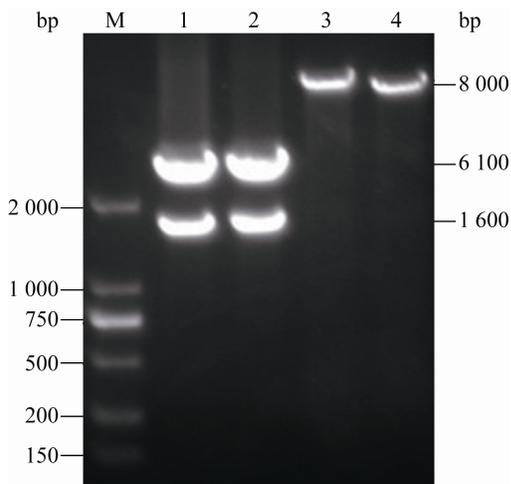


图 2 pET28a(+)-MurA 的酶切鉴定

**Figure 2 Identification of recombinant plasmid pET28a(+)-MurA**

Note: M: DNA marker DL2000; 1, 2: Recombinant plasmid pET28a(+)-MurA digested with *Bam*H I and *Xho* I; 3: Recombinant plasmid pET28a(+)-MurA digested with *Bam*H I; 4: Recombinant plasmid pET28a(+)-MurA digested with *Xho* I.

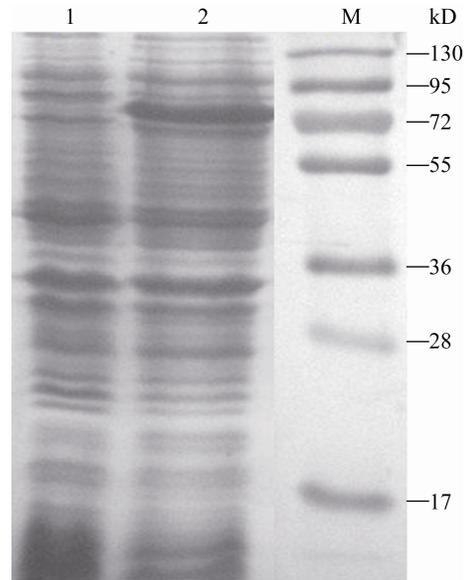


图 3 pET28a(+)-MurA 在 *E. coli* BL21 中诱导表达的 SDS-PAGE 分析

**Figure 3 SDS-PAGE analysis of pET28a(+)-MurA expression products in *E. coli* BL21 induced with IPTG**

Note: 1: pET28a(+) expression products in *E. coli* BL21; 2: pET28a(+)-MurA expression products in *E. coli* BL21. M: Protein weight marker.

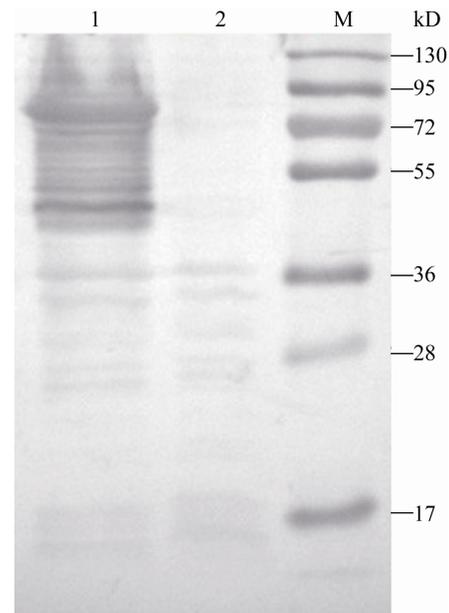


图 4 诱导表达菌体经超声破碎后的 SDS-PAGE 分析

**Figure 4 SDS-PAGE analysis of the sonicated bacterial cells**

Note: 1: SDS-PAGE of the supernatant; 2: SDS-PAGE of the pellet; M: Protein weight marker.

的表达产物是以可溶性形式存在, 这为亲和层析纯化目的蛋白奠定了基础。

## 2.4 重组蛋白的纯化及鉴定

摸索 MurA 蛋白经镍柱亲和和层析纯化的最佳条件为: 用含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白, 再用含 75 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 经测定, 每毫升菌液纯化后可获得蛋白 0.2 mg, 得到的 MurA 蛋白纯度在 98% 以上(图 5)。

将图 5 中的蛋白条带切下, 经质谱分析鉴定其为 MurA 蛋白(图 6)。

## 2.5 多抗与 LM 菌体的效价测定及其交叉性分析

4 次免疫小鼠后, 制备的多抗分别与甲醛灭活的 LM、格氏李斯特菌、威尔氏李斯特菌、英诺克李斯特菌、伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌和大肠杆菌进行反应, 以测定其交叉性。结果显示, 该多抗与 LM 具有良好的反应性, 效价可达 1:10 000, 且与伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌、大肠杆菌及属内的格氏李斯特李斯特菌、威尔斯李斯特菌、英诺克李斯特菌均无交叉反应(图 7)。

## 2.6 IMB-选择性培养基检测特异性分析

分别将 LM、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌、威尔斯李斯特菌大肠杆菌、伤寒沙门氏菌、副溶血弧菌的浓度调至  $10^4$  CFU/mL, 进行免疫磁珠捕获实验。结果显示: 仅英诺克李斯特菌有部分交叉(图

8), 在平板上形成与 LM 相似的灰黑色菌落。

## 2.7 IMB-选择性培养基检测灵敏度分析

用 IMB-PALCAM 分别检测不同菌浓度 ( $10^5$ – $10^1$  CFU/mL) 下的 LM, 结果如表 1 所示, 表明该方法对浓度  $10^3$  CFU/mL 的 LM, 可以检出; 浓度  $10^2$  CFU/mL 的 LM, 则无法准确检出。故确定 IMB-PALCAM 法检测 LM 的检测限为  $10^3$  CFU/mL。

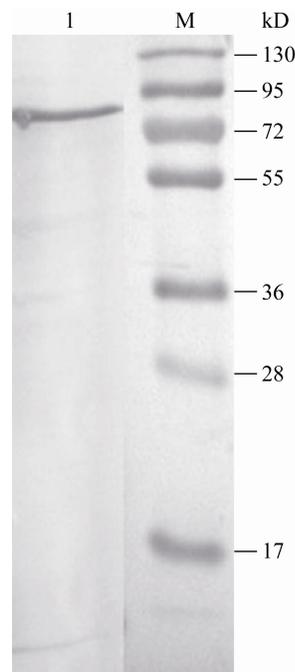


图 5 亲和层析纯化 MurA 蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Figure 5 SDS-PAGE analysis of the purified MurA by affinity chromatography purification

Gel Idx/Pos	2/A2	Instr./Gel Origin	AK208/szh_20111107		Process Status	Analysis Succeeded					
Plate #/Name	[1] szh_20111107	Instrument Sample Name			Spectra	10					
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %			
1	autolysin [Listeria monocytogenes FSL R2-503]	gjl167215346	45471.1	9.94	86	98.243					
Peptide Information											
	Calc. Mass	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
	1054.5204	1054.5168	-0.0036	-3	189	197 SDFIYPGQK	19	0			Mascot
	1054.5204	1054.5168	-0.0036	-3	338	346 SDFIYPGQK					Mascot
	1132.611	1132.614	0.003	3	379	388 KGDSLWAI SR					Mascot
	1968.9451	1968.9307	-0.0144	-7	59	74 YPSYHQSL EDYAQVIR	36	0			Mascot
	1968.9451	1968.9307	-0.0144	-7	59	74 YPSYHQSL EDYAQVIR					Mascot
	2097.04	2097.0156	-0.0244	-12	59	75 YPSYHQSL EDYAQVIRK					Mascot
2	autolysin [Listeria monocytogenes FSL J2-071]	gjl168266900	50719.6	9.89	84	97.085					

图 6 质谱鉴定纯化蛋白

Figure 6 Protein identification by MS-MS/MS

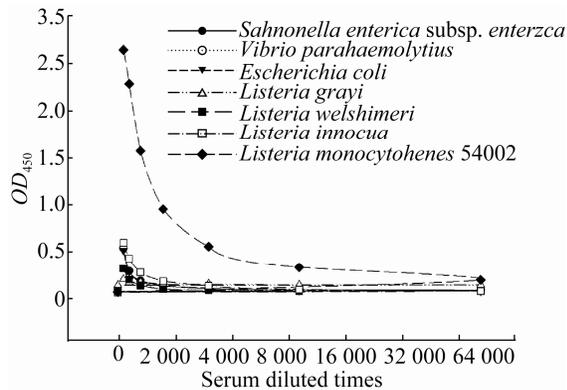
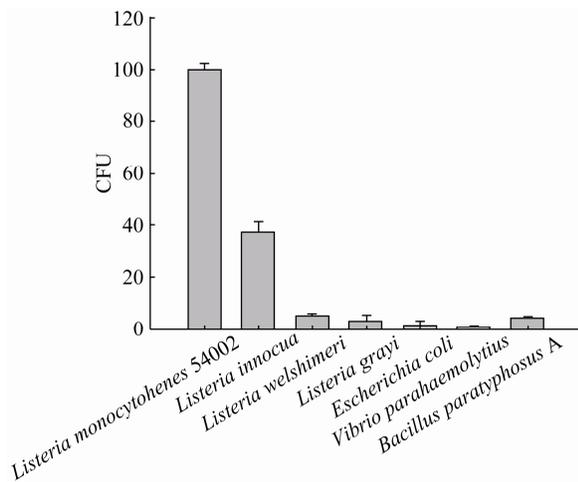


图7 多抗效价曲线

Figure 7 Titer curve of the polyclonal antibody

图8 IMB-PALCAM 法检测不同细菌的交叉反应分析  
Figure 8 Crossreaction analysis of IMB-PALCAM on different bacteria

Concentration of LM (CFU/mL)	IMS-PALCAM
$10^5$	+
$10^4$	+
$10^3$	+
$10^2$	+/-
$10^1$	-

注：+：免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基有单增李斯特菌生长；-：免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基上无单增李斯特菌生长。

Note: +: *L. monocytogenes* were grown on PALCAM after immunomagnetic separation; -: *L. monocytogenes* were not grown on PALCAM after immunomagnetic separation.

## 2.8 IMB-选择性培养基检测不同浓度人工污染牛奶样品

通过向牛奶样品中添加 LM，以模拟受到 LM 污染的食物样品。如表 2 所示，经 24 h 增菌后，对 LM 浓度为  $10^2$  CFU/mL 以下的受污染牛奶样品，IMB-PALCAM 法可以检出，检测限为 5 CFU/mL。

## 2.9 IMB-显色培养基法检测不同增菌时间下的人工污染牛奶样品

将 LM 浓度调整到 10 CFU/mL 以下时，对免疫磁珠能检出 LM 所需的增菌时间进行摸索，结果如表 3 所示，当牛奶中菌浓度为 0.4 CFU/mL 时，经过 9 h 增菌后，LM 可被 IMB-PALCAM 法检出。

## 3 讨论

本实验室前期制备了 3 株针对 LM 的特异性单抗。通过分析发现，3 株抗体均可特异性结合 72 kD 的单增李斯特菌膜表面蛋白。进一步的研究发现，此蛋白为 MurA 蛋白，预示这一膜蛋白可能成为检测单增李斯特菌的新靶点。

本研究制备了 MurA 的多克隆抗体，运用免疫磁珠联合选择性培养基建立 LM 的快速检测方法，可对菌浓度在  $10^2$  CFU/mL 以上的 LM 直接检出；当菌浓度在  $10^2$  CFU/mL 以下时，无法准确检出，实验结果与国外报道的 IMB-选择性培养基检

表2 IMB-PALCAM 法检测牛奶样品中的 LM  
Table 2 Detection of *L. monocytogenes* using IMB-PALCAM in milk samples

Diluted times ( $\times 10^2$ CFU/mL)	IMS-PALCAM results
1	+
2	+
4	+
8	+
16	+
Blank	-

注：+：免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基有单增李斯特菌生长；-：免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基上无单增李斯特菌生长。

Note: +: *L. monocytogenes* were grown on PALCAM after immunomagnetic separation; -: *L. monocytogenes* were not grown on PALCAM after immunomagnetic separation.

表3 IMB-PALCAM 法检测增菌时间不同的牛奶样品  
Table 3 Detection of milk samples in different culture time using IMB-PALCAM

Culture time (h)	Initial concentration of LM in milk (CFU/mL)	Concentration of LM after culture (CFU/mL)	IMS-PALCAM result
3	0.4		
6	0.4	10 <sup>1</sup>	
9	0.4	10 <sup>2</sup>	+
12	0.4	10 <sup>3</sup>	+
15	0.4	10 <sup>3</sup>	+
18	0.4	10 <sup>4</sup>	+
Blank	0	-	-

注: +: 免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基有单增李斯特菌生长; -: 免疫磁珠分离后在 PALCAM 培养基上无单增李斯特菌生长。

Note: +: *L. monocytogenes* were grown on PALCAM after immunomagnetic separation; -: *L. monocytogenes* were not grown on PALCAM after immunomagnetic separation.

测法检测限吻合(10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> CFU/mL)<sup>[18-19]</sup>。在受污染的食品样品检测中,由于菌浓度较低,因此仍需要进行预增菌<sup>[20]</sup>。传统国标法检测 LM 需通过二次增菌,结合选择性平板及生化鉴定进行检测,整个过程需 72 h 以上,结果准确;本研究建立的免疫磁珠-选择性平板法将免疫磁珠的高特异性、迅速富集能力与选择性平板的生化鉴定能力相结合,达到对 LM 快速检测的要求,步骤简单,结果可靠。在菌浓度在 10 CFU/mL 以下的牛奶样品中,经过 9 h 增菌后,就可对样品污染程度进行鉴定,整个检测过程较国标法节省 39 h 以上。

然而,研究中发现 LM 与英诺克菌均含有 *murA* 基因,提示在英诺克菌表面也可能存在 MurA 蛋白,但用甲醛灭活的不同菌进行 ELISA 检测时却没有发生交叉反应;进一步的实验发现英诺克活菌及加热灭活的英诺克菌均与 LM 存在交叉反应,表明在甲醛灭活的英诺克菌体表面, MurA 多抗结合表位被隐藏或被破坏。因此,若需要区分两种菌,还需利用其他方法做进一步验证。目前也有使用 IMS 结合显色培养基<sup>[21]</sup>、IMS 结合 PCR<sup>[22]</sup>等方法对 LM 进行检测,但前者成本较高,后者需要相应仪器,不利于推广使用。故本研究所建立的 LM 快速检测方法更适用于食物样品的初步筛查。

## 参考文献

[1] 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.

- [2] 郭宏华, 贾芙蓉, 韩晓英, 等. 单核细胞增生性李斯特菌研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 197-199.
- [3] 付瑞燕, 周阳, 祝长青. 食品中单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(6): 940-943.
- [4] 王福. 单核细胞增生李斯特菌研究进展[J]. 口岸卫生控制, 2011, 16(5): 50-53.
- [5] 胡杨峰, 韩军, 贾英民. 选择性增菌液对单核增生性李斯特氏菌检出效果的比较[J]. 微生物学通报, 2008, 35(12): 1987-1991.
- [6] Gottlieb SL, Newbern EC, Griffin PM, et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(1): 29-36.
- [7] Bille J, Blanc DS, Schmid H, et al. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005[J]. Eurosurveillance, 2006, 11(6): 91-93.
- [8] 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.
- [9] Corchero JL, Villaverde A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(8): 468-476.
- [10] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*[J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(5): 238-245.
- [11] Carroll SA, Hain T, Technow U, et al. Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(23): 6801-6808.
- [12] Machata S, Hain T, Rohde M, et al. Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of

- Bacteriology, 2005, 187(24): 8385-8394.
- [13] Wolter AR, Niessner R, Seidel M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(15): 5854-5863.
- [14] Karsunke XY, Niessner R, Seidel M. Development of a multichannel flow-through chemiluminescence microarray chip for parallel calibration and detection of pathogenic bacteria[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(6): 1623-1630.
- [15] 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.
- [16] 彭珍, 魏华, 万翠香, 等. 单核增生李斯特菌 Internalin A 的克隆表达与抗体制备[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(12): 1073-1076.
- [17] 张辉, 崔焕忠. 单增李斯特菌 ActA 的表达、免疫原性研究及单克隆抗体的制备[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 71-74.
- [18] Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM. Evaluation of immunomagnetic separation and plating media for recovery of *Salmonella* from meat[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(2): 198-201.
- [19] Uyttendaele M, Van Hoorde I, Debevere J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 54(3): 205-212.
- [20] Stevens KA, Jaykus LA. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(1): 7-24.
- [21] Wadud S, Leon-Velarde CG, Larson N, et al. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria chromogenic* agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(2): 153-159.
- [22] Yang H, Li H, Jiang X. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 118(2): 132-138.

## 科技信息摘录

### 早产或与胎盘中微生物有关

美国一个研究小组说, 孕妇胎盘并不像人们此前认为的那样是一个无菌环境, 而是生存着一个小型但多元的微生物群落。这些微生物直接影响胎儿的健康, 甚至可能与胎儿是否早产有关。

微生物群落是细菌、病毒与真菌等的总称。休斯敦贝勒医学院副教授谢斯蒂·奥高及同事在美国《科学—转化医学》杂志上报告说, 新研究表明, 孕妇胎盘中的微生物可能来自口腔, 说明孕妇口腔健康对胎儿健康至关重要。此外, 早产胎儿与足月产胎儿的胎盘微生物群落组成存在明显不同, 说明胎盘微生物群落与早产之间可能存在关联。

长期以来, 医学界认为胎盘是一个无菌的环境。而奥高等此前发现, 婴儿出生时肠道内就有微生物群落存在, 但与孕妇阴道中的微生物群落并不匹配, 因此猜测新生儿肠道内的微生物群落存在其他来源, 最有可能就是胎盘。

在新研究中, 奥高等利用宏基因组鸟枪测序法, 分析 320 个来自捐赠的胎盘的微生物组成, 发现胎盘中大约有 300 种微生物存在, 不过水平较低, 其中大多数微生物都发挥着重要作用, 比如为发育中的胎儿代谢维生素。

研究还表明, 胎盘中数量最多的是肠道中常见的、不致病的大肠杆菌, 两种口腔菌坦纳氏普雷沃氏菌与奈瑟菌数量也相对较多。总体而言, 胎盘的微生物群落组成与在口腔中发现的微生物群落最为相似。

奥高猜测, 口腔微生物可能首先“溜”入孕妇血液之中, 然后迁徙到胎盘“定居”。她说, 这说明女性怀孕期间保持口腔健康的重要性, “强化了一个长期以来的观点——牙周疾病与早产风险存在关系”。

研究人员还发现, 早产孕妇胎盘的微生物群落组成不同于足月产孕妇的胎盘。但奥高表示, 目前还不清楚是否是这种差异造成早产, 接下来计划观察 500 多名有早产风险的孕妇, 以进一步探究其中的联系, 这也将有助于开发预测女性早产的诊断工具以及帮助她们预防早产的新策略。

——摘自《科学网》2014-06-03

<http://news.sciencenet.cn/htmlpaper/20146318511190533252.shtm>