

论著

单增李斯特菌胶体金免疫层析试纸条的研制

潘秀华,孟宪荣,栗绍文,张超,谢世琦,闫少侠,蔡旭旺

(华中农业大学动物医学院 农业部兽用诊断制剂创制重点实验室,湖北 武汉 430070)

摘要:目的 以单增李斯特菌(LM)内化素A蛋白(InlA)单克隆抗体为基础,研制其胶体金免疫层析检测试纸条。方法 采用DNASar软件对LM *inlA* 全长基因编码蛋白进行抗原表位分析,截取部分 *inlA* 基因片段构建原核表达质粒,诱导表达和纯化获得重组蛋白。以该蛋白免疫BALB/c小鼠,筛选高效分泌抗InlA单克隆抗体的杂交瘤细胞株,制备单克隆抗体;以双抗体夹心的原理研制胶体金免疫层析检测试纸条,并对其特异性、敏感性、稳定性进行评价。结果 筛选到2株高效分泌抗InlA单克隆抗体的杂交瘤细胞株,抗体属于IgG1亚类,小鼠腹水抗体效价为1:64 000;研制的试纸条可与LM发生阳性反应,而非LM李斯特菌、链球菌、鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌O157:H7等食源性致病菌均不发生阳性反应;LM纯培养物敏感性为 2.4×10^5 cfu/ml,模拟猪肉样品敏感性为 4.0×10^6 cfu/ml;4℃保存期可达16周以上。结论 研制的胶体金免疫层析试纸条具有快速、特异、敏感等优点,可以用于样品中LM的快速检测。

关键词:单增李斯特菌; InlA蛋白; 单克隆抗体; 胶体金免疫层析检测试纸条; 食源性致病菌

中图分类号:R155; R378.99⁺4; Q511 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2014)02-0115-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.003

Development of colloidal gold strip for detection of *Listeria monocytogenes*

PAN Xiu-hua, MENG Xian-rong, LI Shao-wen, ZHANG Chao, XIE Shi-qi, YAN Shao-xia, CAI Xu-wang

(Key Lab of Veterinary Diagnostics Innovation in Agricultural Ministry, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Hubei Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To develop a colloidal gold strip for detection of *Listeria monocytogenes* (LM) based on the monoclonal antibody against LM internalin A (InlA) protein. **Methods** After analyzing the antigenic epitopes of LM *inlA* full-length gene encoded protein using DNASar software, the target *inlA* gene fragment was selected to construct the prokaryotic expression plasmid, and the recombinant InlA protein was prepared by inducible expression and used to immunize the BALB/c mice. The specific monoclonal antibody against LM InlA protein was prepared. Based on the principle of double-antibody sandwich method, the colloidal gold strip was developed, and its specificity, sensitivity, and stability were evaluated. **Results** Two hybridoma cell lines were identified to specifically secrete anti-InlA monoclonal antibodies, and the antibody subclasses were IgG1 subtype. The antibody titers of acites were 1: 64 000. The colloidal gold strip showed positive reaction with the LM strains, but showed negative reactions with *Listeria* other than LM, as well as other food-borne bacteria such as *Streptococcus*, *Salmonella typhimurium* and EHEC O157: H7. The detection limits for LM pure cultures and analog samples were 2.4×10^5 and 4.0×10^6 cfu/ml, respectively. The strip could be stored at 4℃ for more than 16 weeks. **Conclusion** The colloidal gold strip could be used to detect LM in food sample rapidly, sensitively and accurately.

Key words: *Listeria monocytogenes*; InlA protein; monoclonal antibody; colloidal gold strip; food-borne pathogen

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)

是一种重要的人兽共患病原菌,在自然环境中分布广泛,易造成食物污染,可引起人的败血症、脑膜炎、胃肠炎、肺炎等,病死率高,免疫力低下者(如65岁以上的老人、孕妇及新生儿)更易感染^[1-2]。世界卫生组织(WHO)将其列为需要重点监测的食源性致病菌之一^[3],因此加强食品中LM的快速检测,具有重要的公共卫生意义。

目前食品中LM的检测主要采用GB 4789.30—

收稿日期:2013-09-16

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题(2012AA101601);
武汉市科技攻关计划(2013020501010172)

作者简介:潘秀华 女 硕士生 研究方向为动物源性食品安全研究
E-mail:panxiuhua1987@126.com

通讯作者:栗绍文 男 副教授 研究方向为动物源性食品安全研究
E-mail:lishaowen@mail.hzau.edu.cn

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》^[4]规定的分离培养法,鉴定主要依赖于生化试验,耗时长、操作繁琐。胶体金免疫层析技术具有快速、准确、无需大型仪器设备等优点,适于基层应用,因此在 LM 快速检测方面得到广泛关注^[5-11]。本研究通过对 LM 特异性的内化素 A 蛋白(InlA)进行重组表达,以重组 InlA 蛋白作为免疫原制备单克隆抗体,以金标单克隆抗体作为捕获抗体,以多克隆抗体作为检测抗体,研制 LM 胶体金免疫层析检测试纸条,并对其性能进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞及实验动物

LM 模式株(CCTCC AB97021)、大肠杆菌 O157:H7 模式株(EDL933)、金黄色葡萄球菌模式株(ATCC 25923)、英诺克李斯特菌分离株、格氏李斯特菌分离株、链球菌分离株、鼠伤寒沙门菌分离株及 SP2/0 骨髓瘤细胞株均由本实验室保存。BALB/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心(许可证号:42000600002720)。

1.1.2 主要仪器与试剂

点膜仪、切条机均购自美国 Bio-Dot,酶标仪(美国 Bio-Tek),PCR 仪(美国 Bio-Rad),半干转膜仪(美国 Hoefer)。

E. coli DH5 α 、BL21 感受态细胞和 pET32a 载体为本实验室保存,LM 多抗、羊抗鼠 IgG 由本实验室制备;pMD18-T 试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I 和 T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、蛋白质 Marker 均购自大连 TaKaRa 公司,HRP 标记山羊抗鼠 IgG(北京博士德生物公司),硝酸纤维素膜、样品垫、金标垫均购自 Millipore, BHI 培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 克隆 *inlA* 基因

利用 DNASTar 软件对 LM *inlA* 全长基因的编码蛋白进行抗原表位预测,截取抗原性好、表位暴露在外侧较多的蛋白片段的编码基因设计引物,上游引物 P1: 5'-CGCGGATCCTTGGCTAATTTAACAAG AATTACCAATTAG-3',下游引物 P2:5'-GCCGTCGAC TTATTACTAGCACGTGCTTTTTAGTAAGAG-3',下划线分别为 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点。以 LM 模式菌株基因组为模板,PCR 扩增目标基因,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 将其定向克隆到 pET32a 载体

上,转化 DH5 α 感受态细胞,重组质粒经双酶切和测序鉴定。

1.2.2 制备重组 InlA 蛋白

重组质粒转化 BL21 感受态细胞,PCR 鉴定阳性的克隆菌液按 1:100 接种于 LB 液体培养基(含 0.1% Amp),异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,菌液沉淀以缓冲液 A 重悬,高压破碎。包涵体过柱纯化后进行变性和复性获得重组蛋白。用 LM 多抗进行 Western Blot 检测重组 InlA 蛋白的反应原性。

1.2.3 InlA 单克隆抗体的制备

杂交瘤细胞株建立:用重组 InlA 蛋白免疫 BALB/c 小鼠。3 次免疫后 1 周采血检测抗体。当血清效价达到 1:10 000 以上时,进行脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合。用 HIS 标签蛋白、重组 InlA 蛋白和灭活 LM 分别包被进行间接 ELISA 筛选,选择强阳性克隆扩大培养,同时用有限稀释法连续克隆直至能够 100% 分泌抗体,杂交瘤细胞扩增培养后液氮冻存^[12]。

单克隆抗体的制备:对 BALB/c 小鼠进行杂交瘤细胞腹腔注射,8 d 后采集腹水,离心收集上清,采用间接 ELISA 方法测定抗体效价,用单抗亚类鉴定试剂盒鉴定单抗亚类。

单克隆抗体特异性的鉴定:将灭活的 LM、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌、链球菌、鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌调整浓度为 10⁸ cfu/ml,包被酶标板,用间接 ELISA 鉴定单克隆抗体的特异性。

1.2.4 胶体金免疫层析试纸条的研制

用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,标记单克隆抗体,用差速离心法进行纯化。以金标单克隆抗体包被试纸条 NC 膜的金标垫,抗 InlA 蛋白多抗(实验室制备)和羊抗鼠 IgG 抗体分别包被检测线和质控线,研制胶体金免疫层析试纸条。

1.2.5 胶体金免疫层析试纸条的评价

特异性试验:将灭活的 LM、英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌、链球菌、鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌调整浓度为 10⁸ cfu/ml,采用试纸条进行检测。

敏感性试验:将灭活 LM 悬液进行 10 倍系列稀释后进行试纸条检测,以能够检出的最低细菌浓度作为对菌液检测的敏感性。

模拟样品试验:取 10 cfu/ml 的 LM 接种于 225 ml BHI 液体培养基,加入 25 g 剪碎的生猪肉样品,37 °C 振荡培养 12 h。取上清进行细菌平板计数后离心收集菌体,沸水浴灭活,用培养基 10 倍

系列稀释后进行试纸条检测,以能够检出的最低细菌浓度作为对模拟样品检测的敏感性。

稳定性试验:将试纸条用塑料袋及铝箔进行密封,加干燥剂于 4 ℃ 保存,每隔 1 周检测 1 次,检测其稳定性。

2 结果

2.1 目的基因的克隆

经 DNASTar 软件分析, *inlA* 基因编码的蛋白第 400 ~ 800 个氨基酸(即下游 1 200 bp 的基因片段)的抗原位点较多暴露在外面,抗原性较好(见图 1),因此选择该片段的编码基因构建原核表达质粒。

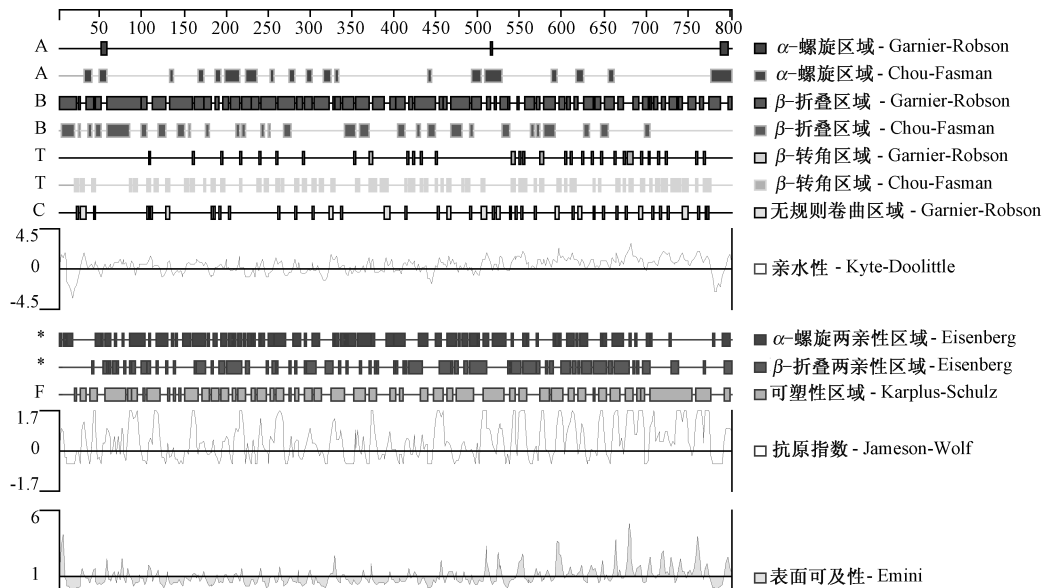


图 1 DNASTar 软件对 *inlA* 基因编码蛋白的抗原表位预测图

Figure 1 Predication of antigenic epitopes of protein encoding by LM *inlA* gene using DNASTar software

2.2 重组 InlA 蛋白的制备

重组质粒 pET-32a-InlA 经 IPTG 诱导,可见与预期大小 65 kD 相符的重组表达蛋白片段;Western Blot 结果显示重组蛋白与 LM 多抗形成阳性条带(见图 2),表明重组蛋白具有与天然 InlA 蛋白相同的抗原表位,可以与 LM 多抗中针对天然 InlA 蛋白的抗体发生阳性反应。

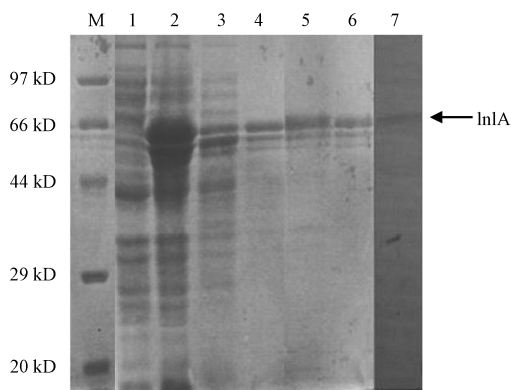
2.3 单克隆抗体的制备

筛选到 2 株阳性杂交瘤细胞 4B4 和 4E1,腹水抗体效价均为 1:64 000,抗体亚类均为 IgG1 型。间接 ELISA 方法检测表明,腹水抗体只与 LM 发生阳性反应,而非 LM 李斯特菌和其他食源性致病菌均不发生阳性反应。

2.4 胶体金试纸条的评价

2.4.1 特异性

试纸条检测 LM 呈阳性,检测英诺克李斯特菌、格氏李斯特菌、链球菌、鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌 O157:H7 均呈阴性,但检测金黄色葡萄球菌时存在微弱阳性反应(见图 3)。另外,采用试纸条对实验室分离的 4 株 LM 检测结果均为阳性,48 株非 LM 李斯特菌均为阴性,进一步证实试纸条具有良好的特异性。



注:M:Maker;1:诱导前重组质粒 HIS-InlA;
2:诱导后重组质粒 HIS-InlA;3:HIS-InlA 诱导后上清;
4:HIS-InlA 诱导后包涵体;6~7:纯化的包涵体;
8:Western Blot 结果

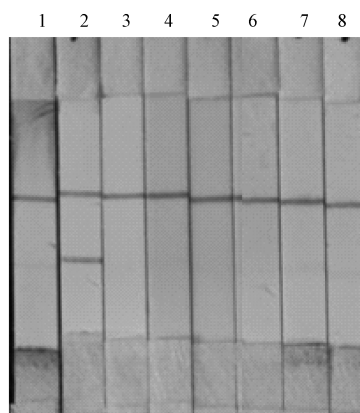
图 2 重组 InlA 蛋白 SDS-PAGE 和 Western Blot 结果
Figure 2 SDS-PAGE and Western Blot analysis of recombinant InlA protein

2.4.2 敏感性

采用试纸条对不同浓度灭活 LM 菌液进行检测, 2.4×10^5 cfu/ml 以上可以检出,故试纸条对 LM 菌液的检测敏感性为 2.4×10^5 cfu/ml,见图 4。

2.4.3 模拟样品试验结果

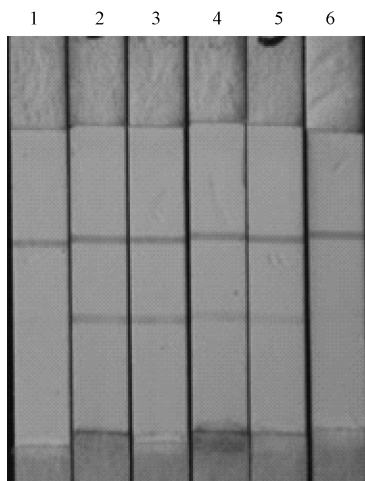
采用试纸条对经过系列稀释的模拟猪肉样品



注:1:PBS;2:LM;3:英诺克李斯特菌;
4:格氏李斯特菌;5:链球菌;6:鼠伤寒沙门菌;
7:EHEC O157:H7;8:金黄色葡萄球菌

图3 试纸条的特异性试验结果

Figure 3 Specificity test of the detection strip



注:1:PBS;2: 2.4×10^8 cfu/ml;3: 2.4×10^7 cfu/ml;
4: 2.4×10^6 cfu/ml;5: 2.4×10^5 cfu/ml;6: 2.4×10^4 cfu/ml

图4 试纸条的敏感性试验结果

Figure 4 Sensitivity test of the detection strip

进行检测,试纸条可以检出细菌浓度为 4.0×10^6 cfu/ml 以上的样品,表明试纸条对猪肉样品的直接检测敏感性为 4.0×10^6 cfu/ml。

2.4.4 稳定性

试纸条密封干燥条件下 4°C 保存 16 周后敏感性无明显变化,表明保存期为 4°C 条件下至少 16 周。

3 讨论

LM 是一种重要的食源性致病菌,加强食品中 LM 的检测至关重要。胶体金免疫层析检测技术具有快速、灵敏、特异、准确等优点,在 LM 的快速鉴定方面受到了广泛关注。国内学者已针对 LM 全菌^[7-9,13]、鞭毛蛋白^[6]、肌动蛋白 ActA^[5]、P60^[10] 蛋白等靶抗原开展了检测试纸条的研究。本研究选

取的 InIA 蛋白是一种 LM 特有的内化素蛋白,在细菌黏附入侵上皮细胞方面具有重要作用。InIA 蛋白由 800 个氨基酸组成,富含亮氨酸高度重复区域(LRR),此结构区对于 InIA 识别上皮细胞的黏附位点尤为关键。另外,InIA 的 C 端 LPXTG 基序通过共价键与 LM 细胞表面的肽聚糖相连,使该蛋白呈现于细菌表面,便于与特异性抗体的反应。InIA 良好的种属特异性和表面展示性决定其可用于 LM 的检测^[13-14]。为更好地展示 InIA 蛋白的免疫原性,本研究对全长 *inIA* 基因编码蛋白进行抗原表位预测,截取免疫原性好、抗原位点暴露在外侧较多的蛋白片段编码基因作为克隆的靶基因。Western Blot 显示重组表达蛋白可与 LM 多抗发生阳性反应,表明重组 InIA 蛋白具有与天然 InIA 蛋白类似的反应原性,可用作制备单克隆抗体的免疫原。

目前市售 LM 胶体金免疫层析检测试纸条,一般采用多抗-多抗^[1,9,12]或单抗-单抗^[5-7,9]夹心模式制备。本研究筛选到两株分泌特异性抗 InIA 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 4B4 和 4E1,但二者具有相同的抗原表位,不适于夹心法检测抗原。并且考虑到金标单抗结合到抗原表位时,可能阻碍其他单抗与抗原结合;而多抗具有更多抗原结合表位,有利于形成对抗原的夹心。因此,本研究选择单抗-多抗夹心的模式制备试纸条,以金标单克隆抗体 4B4 包被金标垫,以 LM 多克隆抗体包被检测线。该试纸条检测快速、准确,菌液检测的敏感性达 2.4×10^5 cfu/ml。敏感性略微偏低,可通过对检测样品进行增菌培养来解决;所研制试纸条具备良好的特异性,但与金黄色葡萄球菌有微弱交叉免疫反应,可能与金黄色葡萄球菌分泌的 SPA 蛋白可与鼠 IgG 结合有关;在保存期方面,该试纸条在密封干燥 4°C 条件下,可以保证 16 周敏感性不发生明显变化。下一步主要将对试纸条工作条件和样品处理方法进行优化,以提高试纸条的敏感性和特异性;将对方法进行完善,研制出检测试剂盒,并对保存期进一步加以评价。

参考文献

- [1] Hof H. An update on the medical management of listeriosis[J]. Pharmacotherapy, 2004, 5(8):1727-1735.
- [2] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3):584-640.
- [3] Yucl N, Citak S, Onder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey[J]. Food Microbiology, 2005, 22:241-245.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 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.
- [5] 崔焕忠,张辉,王兴龙. 单增李斯特菌单克隆抗体的制备及胶体金试纸的研制[J]. 中国兽医科学,2010,40(1):45-50.
- [6] 段霞. 单核细胞增生李斯特氏菌胶体金免疫层析方法的建立[D]. 南昌:南昌大学,2011.
- [7] 李峰. 应用胶体金免疫层析技术检测单核细胞增生李斯特菌[D]. 长春:吉林大学,2012.
- [8] 罗立新,缪珑,潘力,等. 快速检测产单核李斯特菌免疫胶体金层析法的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(2):154-156.
- [9] 罗雁非,贾芙蓉,丁旭,等. 胶体金标记单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒制备[J]. 中国实验诊断学,2009,13(9):1231-1234.
- [10] 谢士嘉,王静,王振国. 利用胶体金免疫层析技术快速定量检测单增李斯特菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2010,33(2):126-129.
- [11] 熊国华,于丽,曹际娟,等. 单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测[J]. 中国公共卫生,2008,24(2):248-249.
- [12] 喻翠翠,孟宪荣,栗绍文,等. 猪结合珠蛋白克隆、原核表达及单克隆抗体制备[J]. 中国兽医学报,2010,30(9):1245-1247.
- [13] 彭珍,魏华,万翠香,等. 单核增生李斯特菌 Internalin A 的克隆表达及单克隆抗体制备[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(12):1073-1076.
- [14] Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes* [J]. PNAS,2011,108(49):19484-19491.

论著

多重 PCR 鉴定动物源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌方法的建立

盖文燕,王君玮,王娟,曲志娜,黄秀梅,赵思俊,李玉清,翟海华

(中国动物卫生与流行病学中心 农业部畜禽产品质量安全风险评估实验室(青岛),山东 青岛 266032)

摘要:目的 建立鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的多重 PCR(mPCR)方法。方法 分别以 16S rRNA、马尿酸酶和 16S-23S rRNA 基因为靶序列设计特异性引物,建立多重 PCR 方法检测 37 株菌株样品,同时采用^mgene CAM nested PCR 检测试剂盒检测验证,进行结果比较分析。结果 该多重 PCR 方法可扩增出空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的特异性条带,其他对照菌株均未扩增出条带,具有较好的特异性;检测敏感性可达 0.81 pg/μl 空肠弯曲菌 DNA,0.93 pg/μl 结肠弯曲菌 DNA。多重 PCR 方法和试剂盒检测结果的符合率为 100%,二者与国标 GB/T 4789.9—2008 方法的符合率达 97% 以上。结论 本试验建立的多重 PCR 方法操作快速方便、节约试验成本,具有较好的特异性、敏感性和重复性,可用于弯曲菌的鉴定。

关键词:空肠弯曲菌;结肠弯曲菌;多重 PCR;鉴定;动物源性致病菌;食源性致病菌;食品安全

中图分类号:R155;R378;TS207.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0119-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.004

A multiplex PCR assay for animal origin *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

GAI Wen-yan, WANG Jun-wei, WANG Juan, QU Zhi-na, HUANG Xiu-mei,

ZHAO Si-jun, LI Yu-qing, ZHAI Hai-hua

(China Animal Health and Epidemiology Center, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Shandong Qingdao 266032, China)

Abstract: Objective To establish a multiplex PCR (mPCR) method to identify *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Methods** Specific primer pairs were designed based on the sequence of 16S rRNA gene, hippuricase gene and 16S-23S rRNA gene. 37 strains were detected by the mPCR and ^mgene CAM nested PCR assay kit. **Results** The results showed that the species-specific product could be detected after amplification of the DNA template of *C. jejuni* and *C. coli*, while other strains could not be detected. The sensibility for detection of *C. jejuni* and *C. coli* was 0.81 and 0.93 pg/μl, respectively. The coincidence rate mPCR method and nested PCR assay kit was 100%. Coincidence of the two methods with the national standard method were also over 97%. **Conclusion** This new method was rapid, convenient, highly specific, sensitive and repeatable. It could be used for rapid identification of *Campylobacter* spp. .

收稿日期:2013-10-11

基金项目:农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目—948 项目(2011-G14(2))

作者简介:盖文燕 女 助理研究员 研究方向为动物源性食品安全 E-mail:gaiwenyan0929@163.com

通讯作者:王君玮 男 研究员 研究方向为动物源性食品安全与疫病控制 E-mail:yffs2000@sina.com