

单增李斯特菌鞭毛蛋白提取方法的研究

陈 钢, 赖卫华*, 段 霞

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 本实验对单增李斯特菌鞭毛蛋白提取方法进行研究, 分别在 23℃ 和 37℃ 的条件下对单增李斯特菌(血清型 IVb)进行扩增培养, 发现 23℃ 下单增李斯特菌产鞭毛的能力更强。运用酸解法处理单增李斯特菌后, 分别通过超速离心法和硫酸铵沉淀法对鞭毛蛋白进行纯化, SDS-PAGE 电泳以及电镜的实验结果表明, 超速离心较硫酸铵沉淀法简便、耗时短、纯度高、产量高, 适用于单增李斯特菌鞭毛蛋白的提取。

关键词: 单增李斯特菌; 酸解法; 鞭毛; 超速离心

Extraction of Flagellin from *Listeria monocytogenes*

CHEN Gang, LAI Wei-hua*, DUAN Xia

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, the extraction of flagellin from *Listeria monocytogenes* was studied. *Listeria monocytogenes* IVb was cultured at 23 °C and 37 °C, respectively. Stronger flagellin-producing capability was observed at 23 °C of culture condition. Flagellin was purified through ultra-centrifugation and ammonia sulfate precipitation after acid hydrolysis treatment of *Listeria monocytogenes*. Results from SDS-PAGE and electronic microscope revealed that ultra-centrifugation combined ammonia sulfate precipitation was an applicable method for flagellin extraction because this simple and time-saving method could provide flagellin with high purity and high yield.

Key words: *Listeria monocytogenes*; acid hydrolysis; flagellin; ultra-centrifugation

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)23-0262-04

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM, 简称单增李斯特菌)属于李斯特氏菌属, 是一种人畜共患的病原菌^[1]。能引起人和多种动物患脑膜炎、脑炎、败血症、可导致孕妇流产等疾病^[2]。该菌的生长温度范围为 4~42℃, 最适温度 35~37℃, 穿刺培养 2~5d 可见倒立伞状生长, 在 20~25℃ 培养有动力, 这种动力有助于产生周生鞭毛并可以作为一种抗原对该菌进行血清学分类^[3]。目前, 已鉴定出 13 种单增李斯特菌的血清型。大约 90% 临床感染的疾病是由血清型 Ia、Ib、IVb 单增李斯特菌引起的^[4]。

如今, 食品安全已成为全球性公共卫生热点, 食源性致病菌引起的食源性疾病越来越受到人们的关注^[5]。1926 年, 英国首次在病死的兔子体内发现李斯特菌。随后, 美国、加拿大等国多次爆发由该菌引起的食物中毒, 死亡率达 30% 以上^[6]。近年来, 在吉林^[7]、广州^[8]、杭州^[9]、江门^[10]、南平^[11]等省市的多种食品中都检测到了该菌。

在现有文献报道中, 有关单增李斯特菌鞭毛蛋白的提取主要体现在鞭毛的脱落方面。其中, 最具有代表性的成果是 Peel 课题组将该菌经培养基培养后采用机械破碎的方法使鞭毛脱落, 然后通过差速离心提纯鞭毛蛋白^[12]。然而, 经过这种方法提纯的鞭毛蛋白中含有杂蛋白和菌体抗原。本实验以单增李斯特菌(血清型为 IVb)为研究对象, 采用酸解超速离心的方法进行研究, 旨在设计一种比较简便、快捷的提取纯化方法, 为进一步开展单增李斯特菌鞭毛抗原单克隆抗体的制备作准备。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

单核细胞增生性李斯特菌(血清型 IVb, 菌株号 54007) 中国医学细菌保藏管理中心。

LB 营养琼脂、LB 肉汤培养基 杭州百思生物技术有限公司; 单核细胞增生性李斯特菌免疫层析试纸条(VIP) 美国 Biocontrol 公司。

收稿日期: 2009-07-03

作者简介: 陈钢(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全。E-mail: Chen0214gang@163.com

* 通讯作者: 赖卫华(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量安全。E-mail: talktolaiwh@163.com

H-2050R 台式高速冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; GHP-9050 隔水式恒温培养箱 上海一恒仪器有限公司; Optima™ L-90K 制备型超速离心机 美国 Beckman 公司; H-600 透射电镜 日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种验证方法

待验证菌的单菌落接种于 9ml 的 LB 肉汤培养基中, 在 37℃ 下培养 20h。从密封的铝箔袋中取出单核细胞增生性李斯特菌免疫层析试纸条, 加入 0.1ml 培养液到加样孔中, 10min 后观察结果。如果检测线出现条带, 结果为单核细胞增生性李斯特菌阳性; 如果检测线不出现条带, 结果为单核细胞增生性李斯特菌阴性。无论是阴性结果或阳性结果, 控制线必须出现条带, 否则检测结果无效。

1.2.2 培养条件对单增李斯特菌动力的影响

准备两个 U 型管, 管中加入含琼脂 0.4% 的半固体 LB 培养基。取 1ml 单增李斯特菌菌液加到 9ml LB 营养肉汤培养基中, 37℃ 条件下培养 18h 后, 将单增李斯特菌穿刺 U 型管的一端, 分别在 37℃ 和 23℃ 下培养, 观察该菌在不同温度下的动力情况。

1.2.3 培养条件对单增李斯特菌鞭毛生长的影响

1ml 单增李斯特菌菌液加到 9ml LB 营养肉汤培养基中培养 12h, 培养温度分别控制在 37℃ 和 23℃。两种不同温度条件下培养的单增李斯特菌在电镜下观察其鞭毛情况。

1.2.4 酸解超速离心法提纯单增李斯特菌鞭毛蛋白

将 23℃ 条件下 U 型管未穿刺的一端筛选到的有活泼动力的单增李斯特菌接种到 10ml LB 肉汤培养基中, 23℃, 静置培养 24h 再移种到盛有 250ml LB 肉汤培养基的 500ml 圆底烧瓶中。用 4 个烧瓶共接种 1L 培养基。

在 23℃, 静置培养 24h 后 $5000 \times g$ 离心 30min 收集细菌, 用 5ml、0.01mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液(简称 PBS)洗涤两次, 去除菌体。

在上清液中加入 1mol/L 的 HCl 调 pH 值至 2.0, 室温磁力搅拌 30min, $5000 \times g$ 离心 30min 后保留上清液, 将沉淀用 PBS 洗涤两次以分离沉淀中所含的鞭毛蛋白。

将上清液及洗液进一步 $14000 \times g$ (4℃) 离心 50min 后弃沉淀, 收集上清液, 缓慢加入 1mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.2, 将上清液进一步 $200000 \times g$ 离心 1.5h (4℃) 得到鞭毛蛋白。

将样品做 SDS-PAGE 电泳实验以及电镜观察并保存于一 20℃ 冰箱中。

1.2.5 硫酸铵沉淀法提纯单增李斯特菌鞭毛蛋白

量取 1.2.4 节中高速离心($14000 \times g$)后所得到的上清液 11ml 并缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 2.67mol/L, 边

加边磁力搅拌, 使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 完全溶解, 4℃ 维持 12h。

$15000 \times g$ 离心 15min, 弃上清液, 用约 8ml 灭菌 PBS 使沉淀溶解完全。将溶解物转移至预先处理过的透析袋, 流水透析 2h, 之后将透析袋放入 4L 灭菌 PBS 中, 4℃ 条件下磁力搅拌 48h 进行透析。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳实验方法

1.2.6.1 组装模具

用海绵蘸取少量清洁剂, 擦洗干净两块玻璃板, 自来水冲洗 3~5 遍然后, 再用无水乙醇冲洗两遍, 晾干待用。将已清洗干净的两块玻璃板用封条封严。组装在电泳架上, 浅玻璃板朝外, 然后固定结实。

1.2.6.2 制胶

配 12% 分离胶, 用水膜封闭空气后, 配 5% 浓缩胶, 插上齿梳, 等待凝胶完全聚合, 约需 30min, 小心拔出梳子, 将整个电泳架放入电泳槽, 在内外槽中倒入电泳缓冲液, 内槽液面应在前后玻璃板之间。

1.2.6.3 点样

吸取蛋白样品到 EP 管中, 加入上样缓冲液, 混匀, 沸水中加热 5min, 上样, 同时吸取蛋白 Marker 点样。

1.2.6.4 电泳

连接好电源正负极导线, 设置参数, 至蛋白样品到达分离胶底部。

1.2.6.5 染色

电泳结束后剥胶, 将凝胶小心放入考马斯亮蓝染色液中浸泡, 室温摇床摇 30min, 再将凝胶泡入考马斯亮蓝脱色液中, 室温摇床摇 4~8h, 期间更换脱色液 3~4 次, 观察蛋白电泳情况。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定

实验所用菌种经过单增李斯特菌免疫层析试纸条的检测, 检测结果如图 1 所示。检测线和控制线均出现明显条带, 为单增李斯特菌阳性结果。此方法为 AOAC 官方方法(996.09), 证明所用菌种是单增李斯特菌。

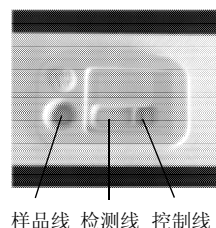


图1 单增李斯特菌的免疫层析试纸条检测
Fig.1 Rapid detection of *Listeria monocytogenes*

2.2 鞭毛诱导结果

在不同温度下, 穿刺半固体培养基 3d 后, 细菌鞭毛的诱导情况如图 2 所示。

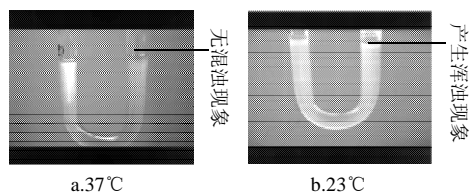


图2 37℃ (a) 及 23℃ (b) 条件下单增李斯特菌鞭毛诱导对比
Fig. 2 Flagellin induction of *Listeria monocytogenes* cultured at 37℃ and 23℃

由图 2 可知, U 型管穿刺的一端都可见单增李斯特菌倒立伞状生长, 然而, 图 2b 中未穿刺的一端(即箭头所指的一端)变浑浊, 相反, 图 2a 则未见浑浊现象产生。由此表明, 单增李斯特菌经过 23℃ 诱导, 具备活泼的运动性。

2.3 不同温度下鞭毛的表达结果

如图 3、4 所示, 箭头所指向的为单增李斯特菌鞭毛, 经 37℃ 培养的李斯特菌表达的鞭毛比较少, 只有一根或者没有。相反, 23℃ 培养有利于鞭毛的生长, 在此温度下该菌表达的鞭毛很丰富。



图3 透射电镜观察 23℃ 单增李斯特菌鞭毛的表达(×12000)
Fig.3 Transmission electronic micrographs of flagellin expression in *Listeria monocytogenes* cultured at 23℃ (×12000)

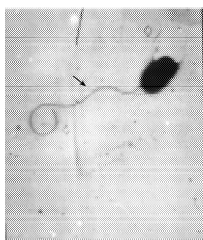
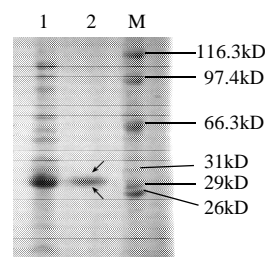


图4 透射电镜观察 37℃ 单增李斯特菌鞭毛的表达(×12000)
Fig.4 Transmission electronic micrographs of flagellin expression in *Listeria monocytogenes* cultured at 37℃ (×12000)

2.4 不同提取方法的比较结果

2.4.1 超速离心法 SDS-PAGE 实验结果



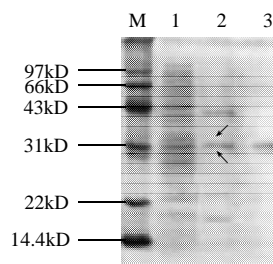
M.标准蛋白分子量(kD); 1.高速离心(14000 × g)后得到的上清液(上样量 30 μl); 2.超速离心(200000 × g)后得到的鞭毛蛋白(上样量 30 μl)。

图5 超速离心法 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE of flagellin prepared by ultra-centrifugation

由图 5 可知, 超速离心后提取得到的鞭毛蛋白经 SDS-PAGE 电泳结果显示只有一条清晰的蛋白条带, 即箭头所指的条带。且蛋白分子量为 31kD, 经紫外分光光度计测得其蛋白浓度为 1.1mg/ml。

2.4.2 硫酸铵沉淀法 SDS-PAGE 电泳结果



M.蛋白分子质量; 1.1.2.4 节 23℃ 培养的单增李斯特菌离心后得到的沉淀用 PBS 缓冲液重悬后煮 3~5min 后上样; 2.硫酸铵沉淀法提取得到的鞭毛蛋白; 3.超速离心后得到的鞭毛蛋白。

图6 硫酸铵沉淀法与超速离心法 SDS-PAGE 电泳对比

Fig.6 SDS-PAGE of flagellin prepared by ultra-centrifugation and ammonium sulfate precipitation

由图 6 可知, 箭头所指示的为目的蛋白条带, 且蛋白分子量为 31kD, 经紫外分光光度计测得其蛋白浓度为 0.53mg/ml。与超速离心法相比, 硫酸铵沉淀法提取得到的鞭毛样品中有杂带出现, 说明经此方法获得的鞭毛蛋白样品中含有杂蛋白。

2.5 鞭毛蛋白样品的确定

经酸解超速离心后得到的鞭毛蛋白样品做透射电镜观察, 其结果如图 7 所示。

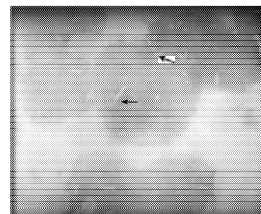


图7 透射电镜负染观察单增李斯特菌鞭毛蛋白(×50000)

Fig.7 Transmission electronic micrograph of a negatively-stained flagella of *Listeria monocytogenes* (×50000)

由图7可知,箭头所指即为酸解超速离心后得到的鞭毛蛋白,图中并没有显示出菌体和其他杂质的存在,由此可以说明酸解超速离心法提取单增李斯特菌鞭毛蛋白是可行的。

3 讨论

单增李斯特菌含有2~4根周生鞭毛,且比较容易脱落。在提取鞭毛蛋白时,需要考虑两个方面的问题:第一是鞭毛的培养条件,第二是鞭毛的脱落方法。

根据文献报道,Peel利用菌体细胞与小玻璃珠产生的剪切力作用使菌体与其鞭毛得到分离,这是通过机械手段来完成的^[12]。然而,Petersen等^[3]认为此方法会产生RNA、“O”抗原(即菌体抗原)以及菌体脂多糖等干扰物质,对最终的蛋白纯化结果产生了一定的影响。Kim等^[13]通过SDS-PAGE电泳实验观察到杂蛋白条带也证明了这一点。

本研究采用的酸解法是通过将重悬后的菌体细胞调pH值至2.0并在4℃条件下保存30min使菌体与鞭毛充分分离,并且消除了RNA等污染物对鞭毛提取的影响。此法在20世纪80年代已经得到广泛应用。最具有代表性的课题是Ibrahim等^[14]运用酸解法获得高纯度的鞭毛蛋白。此外,Strindeliu等^[15]应用此法成功获得了所需要的鞭毛蛋白。值得注意的是,本研究所采用的两种提取方法都是以体积为1L的单增李斯特菌培养物为研究对象,最终提取得到的鞭毛蛋白浓度经紫外分光光度计测得,其结果表明超速离心法提取得到的鞭毛蛋白产量比硫酸铵沉淀法高。分别为1.1mg/ml和0.53mg/ml。

通过SDS-PAGE电泳实验结果可以观察到,目的条带所指示的分子量为31kD,与Kathariou等^[16]报道的31kD的结果相同,与Peel等^[12]报道的29kD以及Dons等^[17]报道的33kD的结果不同。Dons指出^[17],导致这种结果的原因可能是转译后修饰或者蛋白质的降解。另外,通过在透射电镜下观察到的鞭毛蛋白以及SDS-PAGE实验结果,可以得出利用酸解超速离心法提取单增李斯特菌鞭毛蛋白是具有现实价值的。

本研究采用了酸解超速离心法以及硫酸铵沉淀法两种方法提取单增李斯特菌鞭毛蛋白,超速离心法较透析法简便、耗时短、纯度高、产量高,适用于单增李斯特菌鞭毛蛋白的提取。

参考文献:

- [1] COCOLIN L, RANTSIOU K, IACUMIN L, et al. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (12): 6273-6282.
- [2] 吴晓芳, 程平庆, 徐德顺. 湖州市食品中单增李斯特菌的污染状况调查[J]. 中国卫生检验, 2007, 17 (10): 1876-1877.
- [3] PETERSEN C S, PETERSEN N S, AXELSEN N H. A simple method for the isolation of flagella from *Treponema reuteri*[J]. Acta Pathol Microbiol Scand Sect, 1981, 89(6): 379-385.
- [4] 王海艳, 刘中学, 石新华, 等. 单增李斯特菌及其表面蛋白的研究进展[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(2): 76-80.
- [5] 郑华英, 龙一兵. 食品安全与食源性疾病的控制[J]. 中国卫生监督, 2002, 9(1): 32-34.
- [6] JOSEA V B, MICHAEL K, PATRICK B, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14 (3): 584-640.
- [7] 辛生, 刘桂华, 杨红, 等. 近三年来吉林省食品中沙门菌和单增李斯特菌主动监测及结果分析[J]. 中国卫生检验, 2006, 16(10): 1227-1228.
- [8] 傅宜方, 梁春霞, 卢国钧, 等. 广州市售熟肉制品单核细胞增生李斯特菌污染状况调查及前增菌方法运用效果观察[J]. 华南预防医学, 2008, 34(1): 68-70.
- [9] 许珂, 斯国静, 张蔚, 等. 杭州市李斯特菌分布情况调查[J]. 中国卫生检验, 2009, 19(5): 1118-1120.
- [10] 尹本康, 梁柏年, 李占裕, 等. 江门市区食品中单增李斯特菌污染及耐药状况调查[J]. 疾病监测, 2007, 22(5): 294-296.
- [11] 陈萍. 南平市2007年食品污染物检测微生物指标结果分析[J]. 海峡预防医学, 2009, 15(2): 50-51.
- [12] PEEL M, DONACHIE W, SHAW A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting[J]. J Gen Microbiol, 1988, 134: 2171-2178.
- [13] KIM S H, PARK M K, KIM J Y, et al. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies [J]. J Vet Sci, 2005, 6(1): 41-46.
- [14] IBRAHIM G F, FLEET G H, LYONS M J, et al. Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins[J]. J Clin Microbiol, 1985, 22(6): 1040-1044.
- [15] STRINDELIUS L, FILLER M, SJÖHOLM I. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice[J]. Vaccine, 2004, 22(27/28): 3797-3808.
- [16] KATHARIOU S, MIZUMOTO C, ALLEN R D, et al. Monoclonal antibodies with a high degree of specificity for *Listeria monocytogenes* serotype 4b[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 3548-3552.
- [17] DONS L, RASMUSSEN O F, OLSEN J E. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*[J]. Mol Microbiol, 1992, 6(20): 2919-2929.