

# 基于免疫蛋白质组学的单增李斯特菌强免疫原性蛋白挖掘

张颖<sup>1,2</sup>, 吴诗<sup>2</sup>, 古其会<sup>2</sup>, 叶青华<sup>2</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 陈谋通<sup>2\*</sup>, 吴清平<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

**摘要:** 该研究采用高毒力持留基因型单增李斯特菌 819-2 菌株全菌蛋白免疫 SPF 级 Balb/C 小鼠制备抗血清, 利用免疫蛋白质组学对菌株胞外蛋白质组进行分析, 旨在挖掘筛选单增李斯特菌强免疫原性蛋白作为特异性抗体制备的候选抗原。超声法提取 819-2 菌株全菌蛋白免疫 SPF 级 Balb/C 小鼠制备抗血清, 四次免疫后经间接 ELISA 测定效价达 1:512 000。脱氧胆酸钠 (DOC)-10% (m/V) TCA 沉淀法提取单增李斯特菌 819-2 菌株胞外蛋白, 利用免疫蛋白质组学和 LC-MS/MS 技术挖掘并鉴定具有强免疫反应的蛋白点, 结果表明双向电泳图谱成功获得 85 个蛋白点, 并成功鉴定了 P60、InlC、MltG、Enolase 和假定蛋白 YxeA family protein 等 5 个强免疫原性蛋白, 研究结果为基于强免疫原性蛋白制备特异性抗体用于食品及其加工环境中单增李斯特菌富集及快速检测技术研制提供了数据基础。

**关键词:** 单增李斯特菌; 免疫蛋白质组学; 抗血清; 免疫印迹

文章编号: 1673-9078(2024)03-301-308

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0439

## Screening for Strong Immunogenic Proteins of *Listeria monocytogenes* Using the Immunoproteomics Approach

ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, WU Shi<sup>2</sup>, GU Qihui<sup>2</sup>, YE Qinghua<sup>2</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, CHEN Moutong<sup>2\*</sup>, WU Qingping<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health; Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

**Abstract:** Antiserum was prepared by immunizing SPF-grade Balb/C mice with the whole-cell protein of the highly virulent *Listeria monocytogenes* 819-2 strain. The extracellular proteome of the strain was analyzed using the immunoproteomics approach.

张颖, 吴诗, 古其会, 等. 基于免疫蛋白质组学的单增李斯特菌强免疫原性蛋白挖掘[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 301-308.

ZHANG Ying, WU Shi, GU Qihui, et al. Screening for strong immunogenic proteins of *Listeria monocytogenes* using the immunoproteomics approach [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 301-308.

收稿日期: 2023-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072326; 32222068); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022B1515020068); 广东省科学院创新驱动发展能力建设专项资金项目 (2021GDASYL-20210103012)

作者简介: 张颖 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食源性致病菌控制, E-mail: zhangy9823@163.com; 共同第一作者: 吴诗 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食源性致病菌危害与控制, E-mail: wushiloveyou@126.com

通讯作者: 陈谋通 (1984-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食源性致病菌危害形成与靶向控制, E-mail: cmtoon@hotmail.com; 共同通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物安全与健康, E-mail: wuqp203@163.com

immunoproteomics approach, to identify and obtain strong immunogenic proteins of *L. monocytogenes* as candidate antigens for specific antibody preparation. The whole-cell protein of the 819-2 strain was extracted using the ultrasonic method. The SPF-grade Balb/C mice were immunized four times using this protein extract to prepare antiserum, and the titer of the antiserum equaled 1:512 000 as measured using indirect ELISA. The extracellular protein of *L. monocytogenes* 819-2 strain was extracted using TCA precipitation with 10% (*m/V*) deoxycholate sodium (DOC). The spots for strong immunogenic proteins were identified with the help of immunoproteomics and LC-MS/MS. Two-dimensional electrophoresis results showed 85 protein spots and five strong immunogenic proteins, including P60, InlC, MltG, Enolase, and YxeA family protein, were successfully identified. The results provide a foundation for the preparation of specific antibodies based on highly immunogenic proteins for the enrichment and rapid detection of *L. monocytogenes* in food and food processing environments.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; immunoproteomics; antiserum; western blotting

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌), 是一种常见的革兰氏阳性食源性致病菌, 其可以在干燥、高盐条件及低温等环境中存活<sup>[1]</sup>。感染单增李斯特菌会造成败血症、脑膜炎、胃肠炎等李斯特菌病, 严重还会影响中枢神经系统甚至造成孕妇流产, 致死率高达 20%~30%<sup>[2]</sup>。

笔者实验室对全国 43 个代表性城市不同种类食品进行单增李斯特菌风险识别研究, 采用多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 分析发现肉及肉制品中序列型 (Sequence Type, ST) 9、ST8、ST87、ST155 以及 ST121 是占比最高的 ST 型; 即食食品和奶制品中 ST87、ST8、ST9 为常见 ST 型; ST299, ST87 和 ST8 是污染水产品的主要 ST 型<sup>[3-5]</sup>。Sun 等<sup>[6]</sup>对食用菌产业链进行周期性单增李斯特菌污染溯源分析发现, ST87 菌株是持续污染食用菌产业链的持留型菌株。Lu 等<sup>[7]</sup>荟萃分析发现导致我国 2008~2019 年李斯特菌病主要由 ST87 和 ST1 等亚型感染引起。上述研究结果表明 ST87 不仅是我国食品及其产业链的优势株, 而且是感染我国居民的首要临床流行亚型。同时, ST87 菌株除了含有李斯特菌毒力岛 1 (LIPI1) 和毒力岛 2 (LIPI2) 外, 还含有李斯特菌毒力岛 4 (LIPI4), 是我国常见的高毒力持留 ST 型<sup>[2,8]</sup>。单增李斯特菌在不同种类食品中均存在不同程度污染, 基于单增李斯特菌检测技术的开发是保障食品微生物安全的重要需求。

目前单增李斯特菌的检测方法主要包括平板计数法、MPN 计数法等传统培养法; PCR 技术、核酸分子探针杂交技术、荧光定量 PCR 检测等分子生物学检测方法和免疫学检测技术。基于传统培养法的标准检测方法操作较简便, 但检测周期长, 不适用于食品样品中病原菌的快速检测。分子生物学方

法具有通量大、灵敏度高等优点, 但需要价格高昂的专业设备以及需要对操作人员进行专业的技能培训。免疫学检测方法主要是利用抗原-抗体发生特异性反应进行检测结果的判定, 具有更简便、更高效等优点, 在食品样品高通量检测领域具有广阔的应用前景; 但该方法对抗体特异性要求较高, 因此亟需挖掘强免疫原性蛋白并制备相应特异性抗体。有国内学者采用免疫蛋白质组学技术进行单增李斯特菌抗原蛋白挖掘, 但大多数研究采用全菌蛋白进行免疫蛋白质组学挖掘的蛋白大多为胞内蛋白, 基于这些蛋白开发的抗体在快速检测中受到一定的局限<sup>[9,10]</sup>。因此, 本研究利用 ST87 高毒力持留型单增李斯特菌 819-2 菌株全菌蛋白制备其抗血清, 采用双向电泳技术对其胞外蛋白进行免疫蛋白质组学分析, 挖掘具有强免疫原性的蛋白点, 为单增李斯特菌特异性抗体制备与快速检测方法研制奠定前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和实验动物

单增李斯特菌 819-2 菌株为 ST87 菌株, 本实验室保藏菌株, 6~8 周龄 Balb/C 雌性小鼠购自广东省医学实验动物中心。实验小鼠许可证号: SYXK(粤) 2021-0156, 伦理审查号: GT-IACUC202210253。

#### 1.1.2 主要试剂

BHI 肉汤, 购自广东环凯微生物科技有限公司, PBS、尿素、Tris-HCl、SDS、考马斯亮蓝 G250、电泳缓冲液、转膜缓冲液、5× 蛋白加样缓冲液、低熔点琼脂糖、脱脂奶粉、非干扰型蛋白浓度测定试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;

Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (产品编号: P0006)、特超敏 ECL 化学发光试剂盒, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma-Aldrich; 脱氧胆酸钠、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、3-(3-胆胺丙基) 二甲氨基-1-丙磺酸 (CHAPS)、碘乙酰胺 (IAA), 购自上海麦克林生化科技有限公司; 三氯乙酸 (TCA), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 丙酮、甲醇、乙醇、乙酸、硫酸铵、甘油、硫脲, 购自广州化学试剂厂; 二硫苏糖醇 (DTT), 购自南京建成生物工程研究所有限公司; IPG (4-7) 胶条、IPG buffer, 购自美国 GE healthcare 公司; PVDF 膜 (0.22  $\mu\text{m}$ ), 购自美国 Bio-rad 公司; ELISA 包被液、ELISA 终止液、单组分 TMB 显色液, 购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白预染 marker, 购自北京兰博利德生物技术有限公司; Goat Anti-Mouse IgG(H&L)-HRP Conjugated, 购自柏奥易杰 (北京) 科技有限公司。

### 1.1.3 主要仪器

垂直电泳装置, 美国 Bio-rad 公司; Ettan IPGphor III 等点聚焦系统、Ettan DALsix 大型垂直电泳系统、ImageScanner III, 美国 GE healthcare 公司; 超声波细胞破碎仪 (VC-505), 美国 SONICS 公司; 超高灵敏度化学发光成像系统 (ChemiDoc MP), 美国 Bio-rad 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 全菌蛋白制备

将单增李斯特菌 819-2 菌株以 1% (V/V) 接种量接种 BHI 肉汤活化, 然后按 1% (V/V) 转接 100 mL BHI 肉汤 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜培养。收集菌体, PBS 洗涤 3 次后用 10 mL PBS 重悬, 然后冰浴条件下超声破碎, 功率 180 W, 超声 5 s 停 5 s 直至溶液澄清。4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 000 $\times$ g 离心 20 min 吸出上清, 利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行定量后分装, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.2 单增李斯特菌 819-2 菌株抗血清制备

取 819-2 全菌蛋白与等体积弗氏不完全佐剂乳化, 腹腔注射免疫 6~8 周龄 Balb/C 小鼠, 每只 30  $\mu\text{g}$ , 两周后改用弗氏完全佐剂进行加强免疫, 免疫量不变, 共加强免疫三次。第三次加强免疫结束后一周收集抗血清, 采用间接 ELISA 法测定抗血清效价。利用 ELISA 包被液稀释 819-2 菌株全菌蛋白至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 然后每孔 100  $\mu\text{L}$  包被酶标板 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBST 洗涤 5 次后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  5% (m/V)

脱脂奶粉 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h, 同上 PBST 洗涤, 然后以 1:2 000 开始 2 倍梯度稀释 819-2 菌株阳性血清 (P) 及阴性血清 (N), PBST 为空白对照, 每孔 100  $\mu\text{L}$  37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h 后 PBST 洗涤, 再按照每孔 100  $\mu\text{L}$  添加量加入 1:2 000 稀释的羊抗鼠二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, PBST 洗涤后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液室温避光显色 15 min 后向每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  ELISA 终止液, 测量 OD<sub>450</sub>, 以 P/N $\geq$ 2.1 作为 ELISA 终点判断标准。同 1.2.1 超声提取单增李斯特菌全菌蛋白, SDS-PAGE 电泳并将蛋白条带印迹至 PVDF 膜上, 以 Balb/C 小鼠血清为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠抗体为二抗, 利用特超敏 ECL 化学发光试剂盒显影后用超高灵敏度化学发光成像系统拍照显影, 分析抗血清与单增李斯特菌全菌蛋白的免疫反应。

### 1.2.3 819-2 菌株胞外蛋白 2-DE 样品制备

按照 Dumas 等<sup>[11]</sup>方法进行胞外蛋白 2-DE 样品制备。以 1% (V/V) 接种量接种 BHI 肉汤活化 819-2 菌株, 然后按 1% (V/V) 接种量转接 500 mL BHI 肉汤, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 摇床培养 12 h。5 000 $\times$ g 离心 5 min 去除菌体, 收集上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 然后加入苯甲基磺酰氟使终浓度为 0.2 mmol/L, 以 0.2 mg/mL 添加量加入脱氧胆酸钠, 冰浴 30 min 后加入三氯乙酸 (TCA) 至终体积分数为 10%, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜放置。4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 000 $\times$ g 离心 20 min 收集蛋白沉淀, 然后用 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的丙酮溶液 (20 mmol/L DTT) 洗涤 3 次, 加入 500  $\mu\text{L}$  水化液 [7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、2% (m/V) CHAPS、0.5% (V/V) IPG buffer、2.8% (m/V) DTT] 裂解蛋白。冰上裂解 3 h 后离心去除沉淀, 利用非干扰性蛋白浓度测量试剂盒测定浓度。

### 1.2.4 双向电泳分析

参考 Liu 等<sup>[12]</sup>方法进行单增李斯特菌胞外蛋白双向电泳分析 (稍作修改)。从 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出 IPG 胶条, 室温平衡 30 min。取 500  $\mu\text{g}$  上述蛋白与水化液混匀, 加入 1% (m/V) 溴酚蓝, 离心, 取 340  $\mu\text{L}$  样品水化液均匀加入胶条槽中, 然后从胶条酸性端 (+) 慢慢撕开胶条表面保护膜, 镊子夹取胶条, 使胶面朝下, 胶条酸性端对齐胶条槽尖端慢慢浸入水化液中, 来回轻轻移动使溶液铺满整条胶条。胶条两端放置用超纯水润湿的纸条连接在胶条槽电极上, 然后在胶条槽上覆盖 3 mL 矿物油, 盖上盖子后将胶条槽放置在等电聚焦仪 (水平仪调节确保水平)

上, 盖上聚焦仪盖子设定程序开始等电聚焦。程序: 50 V, 16 h; 200 V, 1 h; 500 V, 4 h; 500~1 000 V, 1 h; 1 000~8 000 V, 3 h; 8 000 V; 195 000 Vhr; 500 V, 维持; 共 40 514 Vhrs。聚焦结束后取出胶条, 滤纸吸干胶条矿物油, 然后至于平衡缓冲液 I [6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.8)、29.3% (V/V) 甘油、2% (m/V) SDS、0.002% (m/V) 溴酚蓝、1% (m/V) DTT] 中摇床平衡 15 min, 再用平衡缓冲液 II [6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.8)、29.3% (V/V) 甘油、2% (m/V) SDS、0.002% (m/V) 溴酚蓝、2.5% (m/V) 碘乙酰胺] 平衡 15 min。平衡结束后胶条用 1× 电泳缓冲液润洗, 然后胶条支撑膜贴蛋白胶长玻璃板慢慢推至提前配制的浓度为 12.5% SDS-PAGE 凝胶上, 上方用低熔点琼脂糖溶液 [0.5% (m/V) 琼脂糖、0.002% (m/V) 溴酚蓝溶液, 1× 电泳缓冲液溶解] 密封覆盖胶条。电泳条件: 1 W, 1 h; 然后 16 W 直到溴酚蓝移至下层, 温度: 10 °C。电泳结束后取出凝胶, 固定液 [10% (V/V) 乙酸、40% (V/V) 乙醇] 中固定 1 h 后考马斯亮蓝 [0.8 g 考马斯亮蓝 G250、5% (V/V) 无水乙醇、20% (V/V) 磷酸、80g 硫酸铵、20% (V/V) 甲醇] 染色 2 h, 然后用去离子水脱色直至背景清晰, 用于蛋白点质谱分析的 2-DE 凝胶保存于 5% (V/V) 乙酸溶液中, 另一块凝胶用于免疫印迹分析。

### 1.2.5 免疫印迹

取出其中一块双向电泳凝胶, 用转膜缓冲液浸泡, 同时剪取 6 张与凝胶相同大小滤纸以及一张 PVDF 膜, 滤纸用转膜缓冲液浸泡, PVDF 膜用甲醇浸泡 5 min 活化, 然后按照阴极 -3 层滤纸 - 蛋白凝胶 - PVDF 膜 - 3 层滤纸 - 阳极的顺序安装转膜装置, 然后按照 0.8 mA/cm<sup>2</sup> 转膜 90 min, 转膜结束后取出 PVDF 膜, 用 5% (m/V) 脱脂奶粉封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 然后以 1:2 000 稀释度抗血清孵育 2 h, PBST 洗涤后再按稀释度 1:5 000 加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 利用特超敏 ECL 化学发光试剂盒显影后用超高灵敏度化学发光成像系统拍照。

### 1.2.6 斑点挖取及质谱鉴定

参考 Liu 等<sup>[12]</sup>方法进行蛋白质点胶内酶切和质谱检测样品制备。根据免疫印迹结果挖取具有强免疫原性的相应位置蛋白质点进行质谱鉴定, 超纯水清洗 1 min 后离心去除上清, 一共清洗两次, 然

后加入 50% (V/V) MeOH/50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 于 37 °C 恒温箱脱色 30 min 后去除上清, 加入 100% (V/V) ACN 震荡 30 s 脱水, 待胶粒变白后去除液体, 向干燥胶粒中加入 25 mmol/L DTT/50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 56 °C 反应 30 min 后吸出, 再加入 55 mmol/L IAA/50 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 室温暗处放 30 min 后吸出液体, 再用 MilliQ 水清洗 3 次, 用 100% ACN (V/V) 使胶粒脱水变白, 加入适量 20 ng/μL 的胰酶 (25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 稀释), 冰浴 30 min 后补加 25 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 直至覆盖胶粒 37 °C 恒温酶切过夜。将 EP 管放入超声仪中超声 20 min 后吸出到新的 EP 管中, 用样品溶解液 [0.1% (V/V) 甲酸、2% (V/V) 乙腈] 溶解, 13 200 r/min, 4 °C 离心 20 min 后吸取上清进行质谱检测。肽段经液相色谱串联质谱 (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 分析, 获得的肽质量指纹图谱提交至 Mascot 数据库进行检索, 检索参数设置如下<sup>[9,13]</sup>: 数据库: Uniprot; 搜索范围: All entries; 胰酶酶解方式; 设定几种可能的修饰方式: Carbamidomethyl(C) 和 Oxidation(M); 最大允许漏切位点: 1; 肽质量误差范围: 0.6 u。MASCOT 检索分数 ≥ 83 分认为是统计学显著 ( $P \leq 0.05$ ), 判定该点质谱鉴定成功。为使鉴定结果更可靠, 每一个查询要求至少有 5 个肽段匹配, 且其在蛋白质整个蛋白序列中的覆盖率不低于 15%; 对于小于 20 ku 的蛋白质, 则要求至少有 3 个肽段匹配和不低于 20% 的覆盖率。

### 1.2.7 候选蛋白生物信息学分析

候选蛋白特异性分析: 根据免疫蛋白质谱鉴定结果通过 Uniprot 蛋白登录号查询对应蛋白序列, 然后将蛋白序列在 NCBI 进行蛋白序列 Blast, 根据结果选择特异性较高的蛋白; 候选蛋白亚细胞定位<sup>[14]</sup>: 将特异性高的蛋白序列提交 PSORTb (PSORTb Subcellular Localization Prediction Tool-version 3.0) 进行亚细胞定位分析; 信号肽分析<sup>[15]</sup>: 将筛选后蛋白的序列提交在线网站 SignalP-6.0 (SignalP-6.0-Services-DTU Health Tech) 进行信号肽预测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单增李斯特菌全菌蛋白抗血清制备

采用间接 ELISA 法测抗血清效价, OD<sub>450</sub> 值大于阴性对照的 2.1 倍即可认定为最终效价, 采用

单增李斯特菌全菌蛋白进行四次免疫 Balb/C 小鼠后, 效价可达到 1:512 000 (表 1)。如图 1 所示, 效价为 1:512 000 的抗血清稀释比例为 1:2 000 时, western blotting 条带较清晰, 且具有强免疫原性的蛋白分子量主要集中在 75、55、43 ku。

表 1 免疫小鼠血清效价测定

**Table 1 Determination of serum titers of immunized Balb/C**

比例 (1:10 <sup>3</sup> )	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
P	3.54	3.48	3.22	2.63	1.24	0.88	0.47	0.27	0.22	0.17
N	0.12	0.11	0.10	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09
P/N	30.48	31.96	33.54	29.54	16.29	11.27	6.23	3.53	2.62	1.92

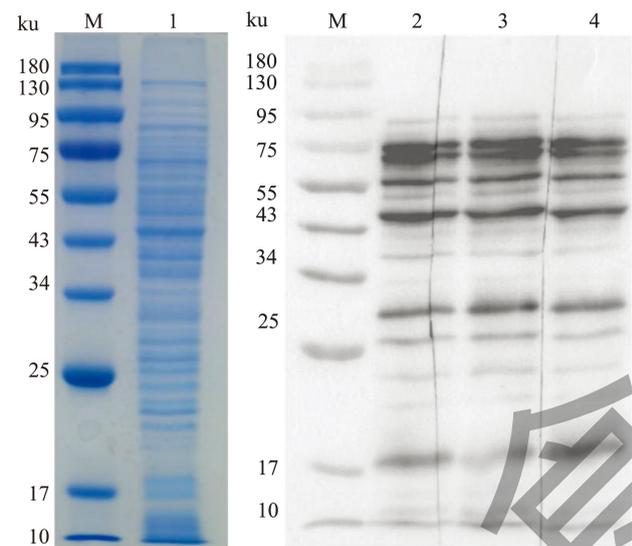


图 1 单增李斯特菌全菌蛋白抗血清免疫反应分析

**Fig.1 Western blotting analysis of anti-serum for *Listeria monocytogenes***

注: M: marker; 泳道 1: 单增李斯特菌全菌蛋白; 泳道 2~4: 抗血清稀释比例分别为 1:800、1:1 000、1:2 000。

## 2.2 胞外蛋白双向电泳分析

高质量提取胞外蛋白是本研究的关键, 赵伟等<sup>[16]</sup>在提取乳杆菌胞外蛋白时认为高体积分数 TCA 会沉淀 MRS 培养基中杂质而造成提取蛋白背景深, 比较三个体积分数 6%、10%、15% TCA 沉淀效果最终选择了 6% TCA 进行实验。同时有研究表明, TCA 体积分数为 5%~40% 时, 溶液中大部分蛋白可以被沉淀; 当 TCA 体积分数高于 40% 时, 蛋白又会重新溶解<sup>[17]</sup>。因 BHI 培养基成分复杂, 本实验中 TCA 沉淀蛋白也会造成高背景, 但在前期实验中通过比较发现不同体积分数 TCA 沉淀提取蛋白效果一致, 故选取常见 10% TCA 体积分数进行实验。

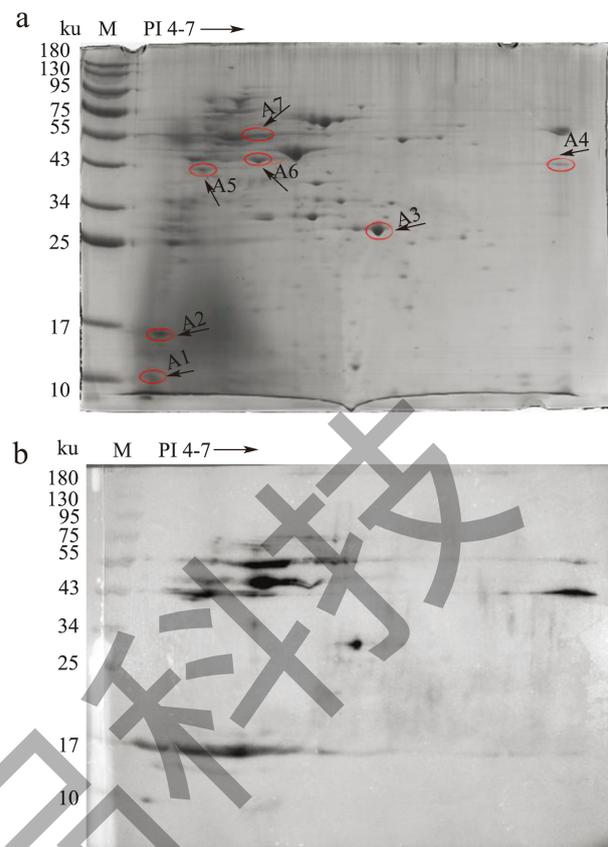


图 2 819-2 胞外蛋白免疫蛋白质组学分析

**Fig.2 The extracellular proteome analysis of *Listeria monocytogenes* 819-2 based on immunoproteomics approach**

注: (a) 胞外蛋白 2-DE 电泳分析; (b) 胞外蛋白免疫蛋白质组学分析。

使用图像分析软件对 819-2 菌株胞外蛋白双向电泳图谱进行分析, 如图 2a 所示, 经过利用 TCA-丙酮法处理后的蛋白进行双向电泳分析, 发现蛋白点清晰无拖尾, 横纹和纵纹较少, 利用 PDQuest 软件分析表明在分子量 10~180 ku 和等电点 pI 4.0~7.0 的范围内, 共有 85 个蛋白点。通过与免疫印迹进行比对, 在凝胶上找出免疫印迹所对应的蛋白点, 挑取显色明显匹配度高的 7 个免疫印迹所对应的蛋白点进行质谱鉴定 (图 2b)。

## 2.3 强免疫原性蛋白点鉴定与生物信息分析

免疫蛋白质组学是目前挖掘致病菌抗原蛋白的常用技术, 本研究共挑取 7 个蛋白点进行质谱鉴定, 均成功得到肽指纹图谱且检索到匹配数据 (表 2), 主要包括 YxeA family protein、MltG、P60、InlC 和 Enolase 五个蛋白, 其中 YxeA 家族蛋白为假定蛋白。

表 2 单增李斯特菌819-2胞外蛋白鉴定结果

Table 2 Identification of extracellular proteins of *Listeria monocytogenes* 819-2 strain

编号	蛋白登录号	名称	理论分子量	理论等电点	匹配肽段数	覆盖度/%	得分
A1	A0A0B8RCN3 A0A0B8RCN3_LISMN	YxeA family protein	13 115	9.6	8	54	1 109
A2	A0A0H3GBV0 A0A0H3GBV0_LISM4	Endolytic transglycosylase MltG	17 853	9.22	9	49	3 876
A3	A0A0B8R5Z5 A0A0B8R5Z5_LISMN	Internalin C	36 382	8.66	9	36.7	875
A4	A0A0B8R9V1 A0A0B8R9V1_LISMN	Peptidase P60	42 605	8.56	12	30.9	2 673
A5	A0A0B8R9V1 A0A0B8R9V1_LISMN	Peptidase P60	42 602	8.56	12	34.2	4 479
A6	A0A0H3GN27 A0A0H3GN27_LISM4	Enolase	46 444	4.7	22	61.4	6 488
A7	A0A2Z5C5D3 A0A2Z5C5D3_LISMN	Probable endopeptidase p60	48 192	9.26	27	64.4	6 456

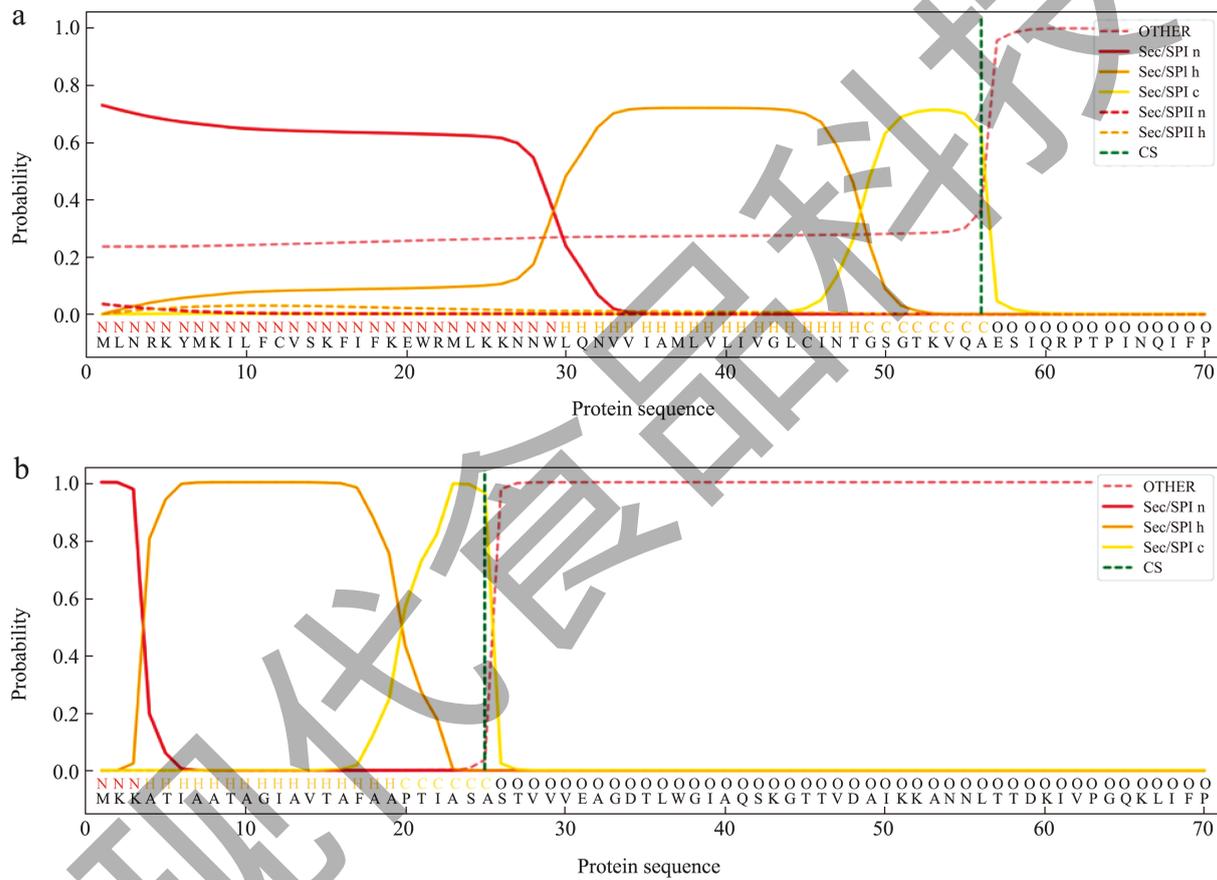


图 3 InIc 和 P60 蛋白信号肽预测

Fig.3 The signal peptide analysis of InIc and P60 protein

注: (a) InIc 蛋白; (b) P60 蛋白。

通过 NCBI 公用数据库对 5 个蛋白序列进行 Blast 分析, 结果发现 YxeA family protein 蛋白主要存在于李斯特菌属细菌, 但其在单增李斯特菌中覆盖度处于 41%~100%, 相似度处于 32.84%~100%, 保守性较差; MltG (与大肠杆菌相似度 100%, 覆盖度为 100%) 和 Enolase (与 *Domibacillus aminovorans* 相似度为 86.08%, 覆盖度 100%) 均在其他细菌中存在; 而蛋白 InIc 与绵羊李斯特菌

InIc 蛋白有较高相似度 (覆盖度 88%, 相似度 > 99%) 外, 与李斯特属内其他细菌以及其他常见食源性致病菌相似度低 (低于 40%); P60 为已报道的李斯特菌属特有蛋白, 具有属特异性。因此, 笔者后续拟选择 InIc 和 P60 作为候选抗原进行多克隆抗体和单克隆抗体制备, 用于食品及其加工环境中单增李斯特菌的富集与快速检测。本研究进一步利用 PSORTb 在线软件对蛋白 InIc 亚细胞定位分

析,结果显示为胞外蛋白,与 Uniprot 网站预测一致; PSORTb 在线软件预测 P60 为胞外蛋白,据文献报道 P60 还可以锚定在细菌表面, Uniprot 网站预测显示 P60 为胞外蛋白及细菌表面蛋白,表明胞外蛋白的免疫蛋白质组分析结果可靠。同时,将 InlC 和 P60 蛋白序列上传 SignalP-6.0 在线分析网站进行信号肽预测分析发现 InlC 信号肽位置为 1~56 aa; P60 信号肽位置为 1~26 aa (图 3),为后续将 InlC 和 P60 进行非分泌型原核蛋白表达提供了数据基础。

从蛋白鉴定结果与图谱对比发现蛋白分子量大小与等电点不能完全匹配, Dumas 等<sup>[11]</sup>在 2-DE 图谱中也报道类似的研究结果,发现 PlcB 和 InlC 存在不同分子量和等电点的多个蛋白点。蛋白预测分子量包含了信号肽这部分,而成熟蛋白质会切除掉这部分所以造成分子量大小差异,蛋白修饰也会导致分子量大小改变,从而导致蛋白点位置存在偏移情况。

MltG 在细菌中广泛保守,具有内切转糖基酶活性,作为肽聚糖合成酶的终止酶,在葡聚糖聚合物内部进行切割以此裂解肽聚糖多糖从而发挥作用<sup>[18]</sup>。内化素家族蛋白是单增李斯特菌重要毒力蛋白,该家族中最早发现具有免疫原性的是参与细菌粘附和内化的 InlA 和 InlB<sup>[19,20]</sup>。后来发现 InlA 和 InlC2 是单增李斯特菌感染期间体液免疫反应的靶点蛋白,可以作为李斯特菌病诊断或疫苗研制, InlC 蛋白在单增李斯特菌菌中高度保守,目前仅发现在较为罕见的序列型 (Sequence Type, ST) 299 菌株中不携带 *inlC* 基因<sup>[21,22]</sup>。P60 是单增李斯特菌一种细胞壁表面蛋白,在李斯特菌属细菌中高度保守,研究表明所有李斯特菌属细菌培养液上清中都存在这种蛋白<sup>[23,24]</sup>。Enolase 是糖酵解过程中的关键烯醇化酶,是一种高度保守蛋白,可能与细菌入侵机体有关<sup>[25]</sup>。除发现在单增李斯特菌<sup>[9]</sup>中具有免疫原性外, Enolase 还被发现在芽孢杆菌<sup>[26]</sup>、嗜酸乳酸菌<sup>[27]</sup>以及白色念珠菌<sup>[28]</sup>中具有免疫原性。

### 3 结论与展望

综上所述,本研究以高毒力持留基因型单增李斯特菌 819-2 菌株胞外蛋白为研究对象,运用免疫蛋白质组学共挖掘到 InlC、P60、MltG、Enolase 和 YxeA family protein 共五种蛋白,其中 YxeA family protein 为假定蛋白,其中 InlC 具有种特异性, P60 具有属特异性。本研究结果为基于强免疫原性蛋白制备特异性抗体用于食品样本中单增李斯特菌快速

检测技术研制提供了数据基础,后续研究拟将这两种蛋白作为抗原检测病人血清中对应抗体的水平评估病人是否感染了单增李斯特菌;同时,考虑到两种蛋白均为胞外蛋白,通过制备抗体后检测病人血清中是否含有该蛋白来判断病人是否感染了单增李斯特菌,为未来临床中单增李斯特菌检测提供了思路。笔者将来拟基于 InlC 以及 P60 蛋白进行非分泌型原核表达纯化后免疫 Balb/C 雌性小鼠制备多/单克隆抗体,为食品及其加工环境中单增李斯特菌高效富集与特异性检测奠定基础。

### 参考文献

- [1] FAN Y, QIAO J, LU Z, et al. Influence of different factors on biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and the regulation of *chey* gene [J]. Food Research International, 2020, 137: 109405.
- [2] LI W, BAI L, FU P, et al. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2018, 15(8): 459-466.
- [3] CHEN M, CHENG J, ZHANG J, et al. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 946.
- [4] CHEN Y, CHEN M, WANG J, et al. Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 642.
- [5] CHEN M, CHENG J, WU Q, et al. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2215.
- [6] SUN Q, CAI S, CHENG J, et al. Distribution, contamination routes, and seasonal influence of persistent *Listeria monocytogenes* in a commercial fresh *Hypsizygus marmoreus* production facility [J]. Food Control, 2021, 127: 108118.
- [7] LU B, YANG J, GAO C, et al. Listeriosis cases and genetic diversity of their *L. monocytogenes* isolates in China, 2008–2019 [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 608352.
- [8] CHEN M, CHENG J, WU Q, et al. Prevalence, Potential virulence, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from edible mushrooms in Chinese markets [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1711.
- [9] 张晨菊.三株致病性李斯特菌的蛋白质组学研究[D].扬州:扬州大学,2010.
- [10] 张向.食品中两种致病菌的特征分析与免疫蛋白鉴定[D].天津:天津科技大学,2016.
- [11] DUMAS E, MEUNIER B, BERDAGUÉ J, et al.

- Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7399-7409.
- [12] LIU J, HUANG H, XING X, et al. Comparative proteomic analysis on human L-02 liver cells treated with varying concentrations of trichloroethylene [J]. Toxicology and Industrial Health, 2007, 23(2): 91-101.
- [13] 赵忠鹏, 吴朔, 罗德炎, 等. 羊种布鲁氏菌疫苗株M5和强毒株16M的比较蛋白质组学研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12): 1172-1175.
- [14] YU N Y, WAGNER J R, LAIRD M R, et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes [J]. Bioinformatics, 2010, 26(13): 1608-1615.
- [15] TEUFEL F, ARMENTEROS J, JOHANSEN A R, et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models [J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(7): 1023.
- [16] 赵伟, 郭慧媛, 任发政, 等. 乳杆菌胞外蛋白提取鉴定与双向电泳图谱建立[J]. 农业机械学报, 2016, 47(9): 234-240.
- [17] SIVARAMAN T, KUMAR T K S, JAYARAMAN G, et al. The mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced protein precipitation [J]. Journal of Protein Chemistry, 1997, 16(4): 291-297.
- [18] BOHRHUNTER J L, ROHS P D A, TORRES G, et al. MltG activity antagonizes cell wall synthesis by both types of peptidoglycan polymerases in *Escherichia coli* [J]. Molecular Microbiology, 2021, 115(6): 1170-1180.
- [19] KHELEF N, LECUIT M, BIERNE H, et al. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein [J]. Cellular Microbiology, 2006, 8(3): 457-470.
- [20] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(1): 32-46.
- [21] YU W L, DAN H, LIN M. Novel protein targets of the humoral immune response to *Listeria monocytogenes* infection in rabbits [J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(7): 888-895.
- [22] YU W L, DAN H, LIN M. InlA and InlC2 of *Listeria monocytogenes* serotype 4b are two internalin proteins eliciting humoral immune responses common to listerial infection of various host species [J]. Current Microbiology, 2008, 56(5): 505-509.
- [23] CAPO A, D AURIA S, LACROIX M. A fluorescence immunoassay for a rapid detection of *Listeria monocytogenes* on working surfaces [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 21729.
- [24] BUBERT A, KUHN M, GOEBEL W, et al. Structural and functional properties of the p60 proteins from different listeria species [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(24): 8166-8171.
- [25] SCHAUMBURG J, DIEKMANN O, HAGENDORFF P, et al. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes* [J]. Proteomics, 2004, 4(10): 2991-3006.
- [26] DELVECCHIO V G, CONNOLLY J P, ALEFANTIS T G, et al. Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6355-6363.
- [27] PRANGLI A, UTT M, TALJA I, et al. Antigenic proteins of *Lactobacillus acidophilus* that are recognised by serum IgG antibodies in children with type 1 diabetes and coeliac disease [J]. Pediatric Allergy and Immunology, 2010, 21(4p2): e772-e779.
- [28] PITARCH A, DÍEZ-OREJAS R, MOLERO G, et al. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model [J]. Proteomics, 2001, 1(4): 550-559.