

金黄色葡萄球菌肠毒素 SEK 的纯化及 DAS-ELISA 检测方法的建立与应用

杨丹茹, 赵燕英, 唐俊妮

(西南民族大学生命科学与技术学院, 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都 610041)

摘要: 本研究目的为建立一种快速检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEK 的双抗夹心酶联免疫吸附方法。将构建的原核表达载体 pET-28a(+)- Δ NspSEK 转化入 BL 21(DE3) pLysS 细胞中诱导表达, 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化获得重组 SEK 蛋白作为抗原。利用双抗夹心酶联免疫方法检测程序, 确定抗 SEK 单克隆抗体及抗 SEK 多克隆血清的最佳稀释度, 并使用该方法应用于检测 SEK 人工污染样品的加标回收率和茶多酚及乳酸链球菌素 (Nisin) 对 7 株 *sek* 阳性菌株的 SEK 蛋白分泌影响。结果表明, 原核表达载体得到可溶性表达, 重组 SEK 蛋白分子量约为 27.7 ku; 建立的双抗夹心酶联免疫检测方法中, 单克隆抗体最佳包被浓度为 2.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、抗血清的最佳稀释度为 1:500, 回归方程为 $y=0.2165x+0.1627$, 相关系数 $R^2=0.9993$, 最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 检测 SEK 人工污染脱脂奶、LB 肉汤和牛肉糜中的加标回收率高达 97% 以上; 并且, 采用建立的方法测得茶多酚和 Nisin 的添加浓度在其 MIC 及以下浓度时, 茶多酚对 7 株 *sek* 阳性菌株蛋白分泌抑制效果更明显。

关键词: 金黄色葡萄球菌肠毒素 SEK; 原核表达; 蛋白纯化; ELISA 检测方法

文章编号: 1673-9078(2019)03-225-233

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.034

Prokaryotic Expression, Purification, Development and Application of a Double-antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Staphylococcal Enterotoxin K

YANG Dan-ru, ZHAO Yan-ying, TANG Jun-ni

(College of Life Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource and Utilization, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: To measure a newly recognized staphylococcal enterotoxin K (SEK), a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was established in this study. The recombinant protein SEK was expressed in BL21 (DE3) pLysS cells and purified by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography. Using the protein as an antigen, the monoclonal antibody and polyclonal antibodies were prepared. They were employed for detection and capture of SEK in the DAS-ELISA system that was developed to be capable of detecting SEK in spiked skimmed milk, LB medium and minced beef. Subsequently, the ELISA system was applied to determine SEK secretion for 7 *sek* positive *S. aureus* isolates with tea polyphenols and Nisin treatment. The results showed that the recombinant protein SEK was successfully expressed and purified with the expected molecular weight of 27.7 ku. The DAS-ELISA for SEK was developed with the optimal anti-SEK monoclonal antibody concentration 2.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the serum dilution ratio 1:500, the regression equation $y=0.2165x+0.1627$ ($R^2=0.9993$), and the sensitivity 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Using the developed ELISA assay, the recovery rates of SEK in spiked skimmed milk, LB medium and minced beef were more than 97%. Furthermore, both tea polyphenols and Nisin, especially tea polyphenols, inhibited the secretion of SEK at the concentration of MIC.

Key words: Staphylococcal enterotoxin K; prokaryotic expression; protein purification; ELISA

收稿日期: 2018-11-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0500500); 西南民族大学研究生创新项目 (CX2018SZ20)

作者简介: 杨丹茹 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基础兽医学

通讯作者: 唐俊妮 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起细菌性食物中毒的重要食源性致病菌之一,还可以引起化脓性感染、中毒性休克综合征等多种感染性疾病^[1]。该菌在自然界中分布广泛,可以通过各种途径和方式污染食品。因此,各个国家和地区的细菌性食物中毒事件中,由金黄色葡萄球菌引发的案例所占比例位居前列^[2]。在加拿大,该比例可达45%^[3];在美国,金黄色葡萄球菌每年大约引起24.1万人食物中毒^[4];在我国,20%~25%的细菌性食物中毒病例是由金黄色葡萄球菌引起的^[5]。金黄色葡萄球菌的致病力主要来源于其表达和分泌的一系列酶和毒素,包括血浆凝固酶、肠毒素和溶血素等,其中,肠毒素(*Staphylococcal enterotoxins*, SEs)是引发细菌性食物中毒最主要的毒力因子^[6]。

SEs是一类分子量约为26~29 ku的肠毒素蛋白,也是一种热源性超抗原^[7]。肠毒素蛋白具有显著的热稳定性和耐酸能力,受污染的食物经过一般加热处理或温和烹饪,含有的肠毒素不会变性而仍具有致病性^[8]。当毒素进入消化道后,它们对胃肠道蛋白酶(包括胃蛋白酶,胰蛋白酶,凝乳酶和木瓜蛋白酶)也具有抗性,导致恶心、呕吐、肠胃炎和休克等症状。对SEs的检测多局限于5种传统的肠毒素(SEA~SEE),新型肠毒素SEG~SEIX的检测方法还需要加大研究力度。现有的研究表明,检测SEs的方法主要有传统的生化检测、分子生物学方法、免疫学方法以及适配体传感器方法等^[9]。分子生物学方法研究的最为广泛,但只是在核酸水平上检测,不能直接检测SEs蛋白。适配体传感器方法虽然特异性和灵敏度较好,但存在操作复杂和技术不稳定等问题^[10]。已经建立的定量检测肠毒素蛋白的方法主要还是基于免疫学方法。其中,酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是利用抗体与对应抗原发生特异性结合这一性质,通过将特定抗体/抗原作为选择性试剂来对相应待测抗原/抗体进行分析测定的方法,具有分析时间短、灵敏度高、特异性好的优点^[11,12]。其他学者和本实验室研究报道,已经建立了双抗夹心(double-antibody sandwich, DAS)-ELISA检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素SEG、SEI、SEM和SEP^[13-16],但还未见检测新型肠毒素SEK的报道。

因此,本研究拟进行构建载体的原核表达与纯化,获得SEK重组蛋白,试图建立一种DAS-ELISA方法,实现对金黄色葡萄球菌SEK蛋白的快速检测及定量分析,并将该方法应用于检测SEK人工污染样品的回收和研究茶多酚与Nisin对金黄色葡萄球菌SEK蛋白的分泌影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、抗体及血清

金黄色葡萄球菌SA-005株(NCBI登录号:KU574280.1)及7株*sek*阳性菌株(SA-21、SA-131、SA-134、SA-135、SA-136、SA-137、SA-140)由西南民族大学食品微生物实验室分离鉴定及保存;BL21(DE3) pLysS大肠杆菌感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;抗SEK单克隆抗体(0.87 mg/mL)、抗SEK多克隆兔血清(效价>512000)均为本实验室自制;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(HRP-IgG)购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.2 主要材料及试剂

蛋白质分子量标准、SDS-PAGE 5×上样缓冲液、四甲基联苯胺(TMB)购自天根生化科技(北京)有限公司;丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺购自Amresco公司;咪唑、Tris购自北京博奥拓达科技有限公司;Ni-NTA Agarose购自Qiagen公司;重力纯化柱购自北京博奥森生物技术有限公司;脱脂奶粉、胰蛋白胍、酵母粉购自Oxoid公司;96孔聚苯乙烯酶标板购自Corning公司;茶多酚(食品级)购自河南绿邦有限公司;Nisin(食品级)购自宁波王龙科技股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

HZQ-F160全温振荡培养箱;Eppendorf 5804R型冷冻离心机;DYY-6C型电泳仪;宁波新芝JY92-IIN型超声破碎仪;Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra电泳槽;Bio-Tek Elx-808型酶标仪。

1.2 重组蛋白的诱导表达、可溶性分析及纯化

将本实验室构建的重组表达载体pET-28a(+)- Δ NspSEK^[17],转化到表达工程菌BL21(DE3) pLysS,均匀涂布于含有30 μ g/mL硫酸卡那霉素和34 μ g/mL氯霉素的LB琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C恒温培养过夜。挑取单个阳性菌落接种至含相应抗生素的LB肉汤中,再经1 L含相应抗生素的LB肉汤扩大培养,37 $^{\circ}$ C水平震荡至对数生长期,加入0.5 mmol/L的IPTG进行诱导表达12 h,所得菌液8000 r/min离心20 min,收集菌体。参考田万帆^[18]等方法,对收集的菌体超声裂解,SDS-PAGE对SEK重组蛋白进行可溶性检测,使用Ni²⁺-NTA亲和层析柱对其进行纯化。以含有SEK重组蛋白的组分穿透Ni²⁺-NTA亲和层析柱,以含有10、50和100 mmol/L咪唑的Tris-NaCl缓冲液分别洗

脱非目的蛋白及目的蛋白,经 SDS-PAGE 检测洗脱的蛋白收集液。

1.3 SEK 的 DAS-ELISA 检测方法流程

以磷酸盐包被缓冲液适当稀释抗 SEK 单克隆抗体至一定浓度,每孔 100 μL 加入酶标板,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;每孔加入 200 μL 5%脱脂奶粉磷酸盐缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1.5 h 后倾倒在板内液体,用含 Tween-20 (0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗涤 3 次;随后,每孔 100 μL 加入一定浓度 SEK 重组蛋白,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1.5 h, PBST 洗涤 3 次;以按一定浓度稀释的抗 SEK 多克隆兔血清作为一抗,每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;以 1:6000 稀释的羊抗兔 IgG(HRP-IgG) 作为二抗,每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次;最后,每孔加入 TMB 底物溶液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 15 min 后,再加入 100 μL 2 mol/L 的硫酸溶液终止反应。测定 450 nm 处 OD 值,并以检测样品的 OD_{450 nm} 记为 P 值、阴性对照的 OD_{450 nm} 记为 N 值,计算 P/N 值。

1.3.1 最佳检测抗体浓度选择

采用 1.3 的方法对抗 SEK 单克隆抗体的不同包被浓度 (2.18、2.89、4.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和抗 SEK 多克隆兔血清不同稀释度 (1:500、1:1000、1:1500、1:2000、1:3000) 进行检测,采用 1:6000 稀释度 IgG/HRP 及已知浓度的 SEK 重组蛋白 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为阳性,磷酸盐缓冲液代替抗原为阴性,测定 OD_{450 nm} 值,计算 P/N 值,选择 P/N 值最高的配对组合,确定抗 SEK 单克隆抗体、抗 SEK 兔血清的最佳稀释度。

1.3.2 测定 DAS-ELISA 标准曲线

按照 1.3 的步骤,用 DAS-ELISA 法检测不同质量浓度 (0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) SEK 重组蛋白,测定 OD_{450 nm} 绘制标准曲线。

1.4 SEK 的 DAS-ELISA 方法的应用

1.4.1 人工污染样品中 SEK 加标回收检测

参照文献^[19]制备 SEK 人工污染样品,样品选择脱脂牛奶、LB 肉汤和牛肉糜。用生理盐水将 SEK 重组蛋白稀释成不同浓度 (6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为阴性对照,在三种样品中添加 SEK 重组蛋白使其终浓度为 6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为实验组。采用 1.3 建立的 SEK DAS-ELISA 检测方法分别检测实验组和对照组,每个梯度重复三次,记录 OD_{450 nm},以回收率=测量浓度/实际添加浓度 \times 100%计算样品的回收率。

1.4.2 检测茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌

分离菌株中 sek 阳性菌株蛋白分泌的影响

根据《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014) 规定的茶多酚和 Nisin 最大使用限量 0.8 mg/mL 以及 0.5 mg/mL 的要求,使用无菌水配制质量浓度为 8 mg/mL 的茶多酚储液和 5 mg/mL 的 Nisin 储液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。参考马伊萨兰等^[20]的方法,采用微量肉汤稀释法测定茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度 (MIC)。将本实验室-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 7 株 sek 阳性的金黄色葡萄球菌分离菌株复苏后,接种于 TSB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水平震荡培养 12 h,用生理盐水适当稀释使其终浓度达到 10^5 CFU/mL。利用二倍稀释法,茶多酚的终浓度分别设置为 800、400、200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及对照组, Nisin 的终浓度分别设置为 500、250、125、62.5、31.25、15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及对照组,同时设置空白组。试验组中加入 160 μL 的 TSB、20 μL 菌液及 20 μL 各稀释浓度的茶多酚或 Nisin,对照组中用 20 μL 的无菌水代替茶多酚或 Nisin,空白组中只加 200 μL TSB。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h,观察能够抑制金黄色葡萄球菌生长的茶多酚或 Nisin 的最低浓度作为各组 MIC。根据最小抑菌浓度的结果,添加相应 MIC 及 MIC 以下不同终浓度的茶多酚和 Nisin 至接种 sek 阳性菌株的 TSB 中,在 0、6、12、24 h 分别取 1 mL 菌液,离心后取上清置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用,用 1.3 的 DAS-ELISA 方法分别检测各组 OD_{450 nm}。

2 结果与分析

2.1 SEK 重组蛋白的表达、可溶性及纯化检测

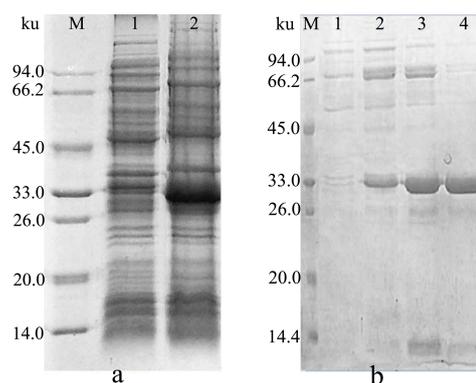


图 1 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达、可溶性及纯化效果

Fig.1 Verification of expression, solubility analysis and purification of SEK protein by SDS-PAGE

注: a: 重组蛋白的表达及可溶性分析; M: 蛋白质分子量标准; 泳道 1: 菌体裂解沉淀; 泳道 2: 菌体裂解上清。b: 重组蛋白的纯化; M: 蛋白质分子量标准; 泳道 1: 10 mmol/L 咪唑 Tris-NaCl 缓冲液洗脱; 泳道 2~3: 50 mmol/L 咪唑 Tris-NaCl 缓冲液洗脱; 泳道 4: 100 mmol/L 咪唑 Tris-NaCl 缓冲液洗脱。

经 IPTG 诱导表达培养后,对收集的菌体超声裂解,通过对上清液及沉淀进行 SDS-PAGE 检测,结果表明 SEK 重组蛋白主要存在于上清液中,其分子量大小与预期 (27.7 ku) 相符,说明目的蛋白成功表达 (图 1a)。利用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱对 SEK 重组蛋白进行

纯化,由图 1b 可知,目的蛋白在含 50 mmol/L 咪唑的 Tris-NaCl 缓冲液洗脱浓度下开始流出,但含有部分杂蛋白;以含 100 mmol/L 咪唑的 Tris-NaCl 缓冲液洗脱时,所得目的蛋白纯度较高,说明纯化效果良好 (图 1b)。

表 1 不同抗体包被浓度下的 OD_{450nm}

Table 1 The OD_{450nm} values at different concentrations of antibodies

组别		单克隆抗体质量包被浓度/(μg/mL)					
		4.34		2.89		2.18	
抗血清稀释度	对照	OD _{450nm}	P/N	OD _{450nm}	P/N	OD _{450nm}	P/N
1:500	阳性	0.78±0.01		0.80±0.05		0.84±0.03	
	阴性	0.111	6.99	0.115	7.01	0.131	6.43
1:1000	阳性	0.69±0.01		0.76±0.03		0.75±0.00	
	阴性	0.138	5.01	0.137	5.53	0.147	5.09
1:1500	阳性	0.43±0.01		0.49±0.00		0.48±0.01	
	阴性	0.092	4.67	0.1	4.88	0.112	4.25
1:2000	阳性	0.56±0.03		0.55±0.03		0.56±0.02	
	阴性	0.10	5.44	0.102	5.36	0.106	5.29
1:3000	阳性	0.36±0.02		0.35±0.00		0.35±0.00	
	阴性	0.09	3.89	0.09	4.02	0.08	4.21

2.2 最佳检测抗体工作浓度

采用棋盘法确定抗 SEK 单克隆抗体最佳包被浓度及抗 SEK 多克隆兔血清的最佳稀释度,结果如表 1 所示,当抗 SEK 单克隆抗体包被浓度为 2.89 μg/mL、抗 SEK 多克隆兔血清的稀释度为 1:500 时, P/N 值最大,确定其为最佳抗体浓度。

2.3 DSA-ELISA 标准曲线

根据最佳的抗体工作浓度,以 0.1~25.6 μg/mL 线性范围内不同浓度 SEK 重组蛋白作为抗原进行测定并制做标准曲线、进行线性回归分析,得到的回归方程为 $y=0.2165x+0.1627$, 相关系数 $R^2=0.9993$ (图 2)。经过多次实验确定该方法的最低检测限为 0.1 μg/mL。

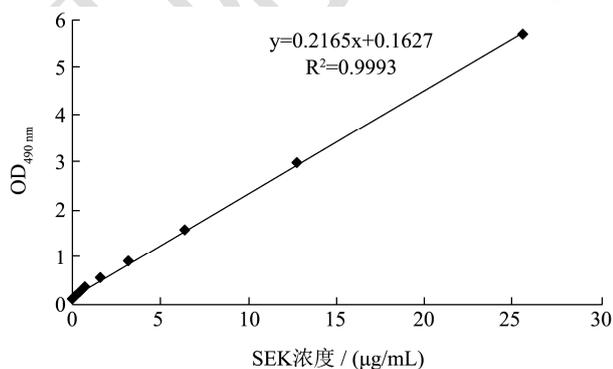


图 2 SEK DAS-ELISA 检测标准曲线

Fig.2 Standard curve of DAS-ELISA for SEK

2.4 人工污染样品中 SEK 加标回收率

表 2 DAS-ELISA 检测污染样品 SEK 的回收率

Table 2 The recovery rate of SEK in samples by using

样品	DAS-ELISA		
	SEK 浓度/(μg/mL)		回收率/%
	实际浓度	检测浓度	
脱脂牛奶	6.4	6.33±0.04	98.90
	3.2	3.19±0.02	99.70
	1.6	1.61±0.10	101
	0.8	0.78±0.10	97.50
	0.4	0.42±0.11	105
	0.2		
	6.4	6.42±0.04	100
牛肉糜	3.2	3.18±0.02	99.40
	1.6	1.58±0.03	98.80
	0.8	0.88±0.16	110
	0.4	0.39±0.08	98.50
	0.2		
	6.4	6.43±0.04	100
	3.2	3.21±0.11	100
LB 肉汤	1.6	1.58±0.12	98.80
	0.8	0.79±0.09	99.30
	0.4	0.39±0.07	97.75
	0.2	0.14±0.01	71.50
	0.2		

通过检测不同浓度 SEK 污染的脱脂牛奶、LB 肉汤和牛肉糜样品中 SEK 回收率, 样品污染浓度及最终检测浓度详见表 2, 可以得知人工污染的三种样品中

SEK 污染浓度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 及以上时, 样品检测的准确度高, 回收率达 97% 以上, 且 SEK 回收率和检测准确度随着 SEK 污染浓度的增加而增高。

表 3 茶多酚和 Nisin 对 7 株 *sek* 阳性菌株的最小抑菌浓度

Table 3 MIC of additive tea polyphenols and Nisin for 7 *sek* positive *S. aureus* isolates

菌株编号	SA-21	SA-131	SA-134	SA-135	SA-136	SA-137	SA-140
茶多酚 MIC/ $(\mu\text{g/mL})$	100	100	100	100	100	100	100
Nisin MIC/ $(\mu\text{g/mL})$	125	250	250	125	125	125	125

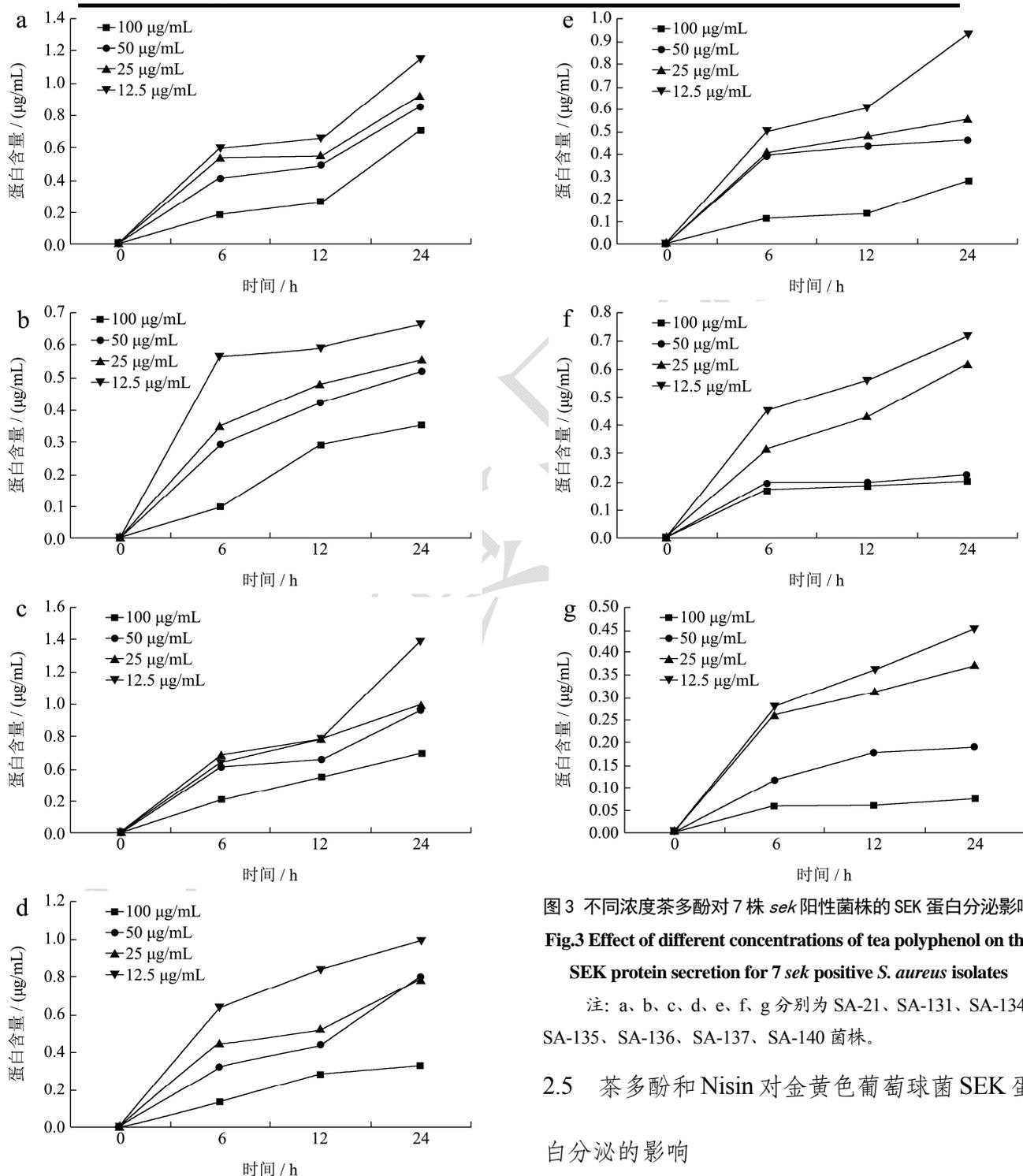


图 3 不同浓度茶多酚对 7 株 *sek* 阳性菌株的 SEK 蛋白分泌影响
Fig.3 Effect of different concentrations of tea polyphenol on the SEK protein secretion for 7 *sek* positive *S. aureus* isolates

注: a、b、c、d、e、f、g 分别为 SA-21、SA-131、SA-134、SA-135、SA-136、SA-137、SA-140 菌株。

2.5 茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌 SEK 蛋白分泌的影响

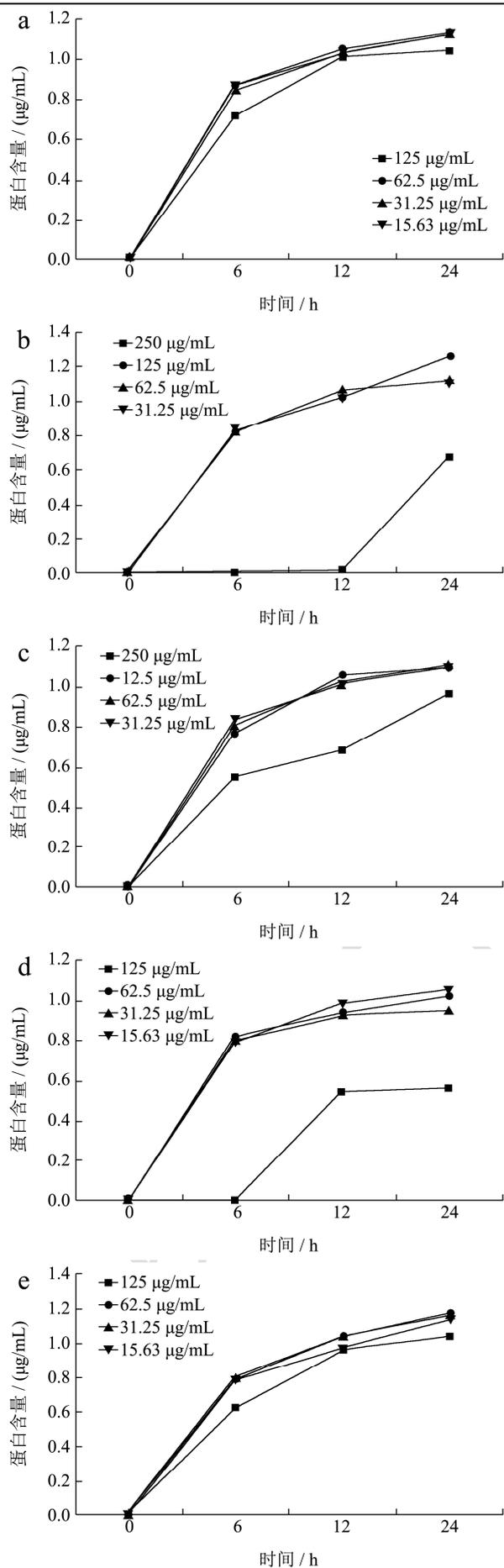


图4 不同浓度Nisin对7株 *sek* 阳性菌株的SEK 蛋白分泌影响
Fig.4 Effect of different concentrations of Nisin on the SEK protein secretion for 7 *sek* positive *S. aureus* isolates

注: a、b、c、d、e、f、g 分别为 SA-21、SA-131、SA-134、SA-135、SA-136、SA-137、SA-140 菌株。

茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度实验结果见表3,茶多酚的MIC对于不同菌株均为100 µg/mL; Nisin 对于不同菌株的MIC为125 µg/mL或250 µg/mL。分别以各菌株的MIC为最高添加浓度,利用二倍稀释法添加不同质量浓度的茶多酚和 Nisin 至接种菌株的TSB中,在0、6、12、24 h分别取样后,用建立的DAS-ELISA方法检测上清液中的SEK蛋白含量,观察茶多酚和Nisin对金黄色葡萄球菌SEK蛋白分泌的影响情况,结果如图3、图4所示。在接种菌株的培养基中添加茶多酚时,随茶多酚质量浓度的升高,培养菌液的上清液中SEK蛋白含量下降;当茶多酚添加浓度为100 µg/mL时,对除菌株SA-137外的其他6株菌株SEK蛋白的分泌均有较为明显的抑制效果。同时发现菌株SA-137和SA-140在培养6 h以后,SEK含量基本不再增加,增加量低于0.02 µg/mL,表明抑制效果良好(图3)。

由图4可知,以125 µg/mL或250 µg/mL为最高添加浓度的各浓度梯度的Nisin对7株菌分泌SEK蛋白的抑制效果主要为2种情况:一是添加Nisin的质量浓度为MIC时,对菌株有较为明显的抑菌效果:特别是图4b中的SA-131在0~12 h阶段中SEK的浓度几乎没有变化,在12 h时出含量仅为0.02 µg/mL;图

4d 的 SA-135 在 0~6 h 阶段中检测 SEK 浓度为 0。可见在前期生长阶段内, Nisin 抑制菌株 SA-131 和 SA-135 SEK 蛋白分泌的效果强; 二是添加低于 MIC 的不同质量浓度的 Nisin 对于菌株分泌 SEK 蛋白的抑制作用不显著, 在培养 24 h 中, SEK 含量变化曲线具有相似的增长趋势, 除菌株 SA-131 和 SA-135, 其他 5 株菌在 24 h 时测得 SEK 含量均高于 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

金黄色葡萄球菌作为最常见的食源性致病菌之一, 其分泌的肠毒素是导致食物中毒和过敏性休克的关键毒力因子, 近年来, 随着研究的不断深入, 除传统肠毒素外, 许多新型肠毒素也被相继报道。针对肠毒素 SEK 的研究经常是应用 PCR 技术检测基因是否存在, Cheng 等^[21]报道, *sek* 在携带 SEs 基因的金黄色葡萄球菌中检出率达 18.60%; Varshney 等^[22]在检测 207 株金黄色葡萄球菌临床分离菌株中新型 SEs 时发现, *sek* 检出率高于 50%, 在新型 SEs 基因检出率中位列第三。也有研究认为 *sek* 基因与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有显著相关性^[22-24], 这提示 SEK 蛋白对金黄色葡萄球菌的致病力和耐药性有潜在影响。Orwin 等^[25]用 Western-blot 法在 36 株金黄色葡萄球菌中检出 14 株分泌 SEK, 但未进行定量检测。可见, 涉及 SEK 的研究大多局限于基因水平而非蛋白水平。Omoe 等^[26]报道了 SEK 对灵长类动物食蟹猕猴具有催吐作用, 提示其具有引起人类食物中毒的能力。鉴于目前还缺乏对肠毒素蛋白 SEK 检测方法的研究, 因此, 本研究通过对金黄色葡萄球菌 SEK 的原核表达载体 pET-28a(+)- ΔNspSEK 成功进行诱导表达, 得到了 SEK 重组纯化蛋白, 并初步建立了 SEK 蛋白定量检测方法。

本研究中, 建立了对金黄色葡萄球菌肠毒素 SEK 定量检测的 DAS-ELISA 方法, 标准曲线为 $y=0.2165x+0.1627$, 相关系数 $R^2=0.9993$, 在 0.1~25.6 $\mu\text{g/mL}$ 范围内有良好的线性关系, 最低检测限 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 重复性、稳定性较好。但由于肠毒素种类较多, 肠毒素纯品及相应抗体的获取比较困难, 本研究的局限在于没有将 SEK 与其它肠毒素进行特异性验证, 在今后的研究中我们将进一步深入和完善。通过进一步应用建立的 DAS-ELISA 方法, 对模拟食品环境的培养基质(脱脂牛奶、牛肉糜, 以及 LB 肉汤中人为添加的 SEK 纯化蛋白)进行检测, 均有较高的回收率和准确度, 在一定程度上说明该方法对不同实际食品样品中 SEK 的检测具有应用价值。另外, 采用建立的方法, 本实验也探讨了茶多酚和 Nisin 两种食品

添加剂对肠毒素 SEK 表达的抑制影响。我们发现, 在添加量为两者最大使用限量时可完全抑制金黄色葡萄球菌生长, 说明茶多酚和 Nisin 对金黄色葡萄球菌具有较好的抑菌效果, 这与李柯欣^[27]、王琼等^[28]和胡艳军等^[29]的报道相符。同时, 我们从检测 7 株携带 *sek* 基因的阳性分离菌株分泌 SEK 情况发现, 茶多酚添加浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、培养时间 24 h 时, 除菌株 SA-21 外, 其他菌株蛋白分泌量均在 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下, 并且蛋白表达水平随茶多酚质量浓度升高而下降; 而添加各质量浓度 Nisin 的菌株在 24 h 培养后, 除菌株 SA-131 和 SA-135 SEK 含量分别为 0.68 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.56 $\mu\text{g/mL}$ 外, 其他菌株均高于 1 $\mu\text{g/mL}$ 。反映了茶多酚较 Nisin 对 *sek* 阳性菌株蛋白分泌的抑制效果更明显。

综上, 本研究成功表达和纯化了 SEK 蛋白, 初步建立了 SEK 蛋白检测的 DAS-ELISA 方法, 并对方法进行了应用与验证, 表明建立的方法可用于食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 SEK 的分泌检测。建议以后对金黄色葡萄球菌肠毒素食物中毒的调查, 应考虑纳入新型肠毒素的检测。

4 结论

本研究使用 BL 21(DE3) pLysS 细胞对金黄色葡萄球菌 SEK 的原核表达载体 pET-28a(+)- ΔNspSEK 成功进行了诱导表达, 得到分子量为 27.7 ku 的可溶性 SEK 重组纯化蛋白, 以该蛋白作为抗原, 建立了一种检测金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEK 的双抗夹心 ELISA 方法, 该方法回归方程为 $y=0.2165x+0.1627$, $R^2=0.9993$, 最低检测限 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 检测人工污染的脱脂牛奶、LB 肉汤和牛肉糜样品, SEK 回收率达 97% 以上; 本研究使用建立的 DAS-ELISA 方法监测添加茶多酚和 Nisin 后 *sek* 阳性菌株分泌蛋白情况, 发现两种添加剂对菌株生长均有良好的抑制作用, 但茶多酚对菌株肠毒素 SEK 蛋白分泌的抑制作用较 Nisin 更强。

参考文献

- [1] Hu F P, Guo Y, Zhu D M, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014 [J]. *Clinical Microbiology & Infection*, 2016, 22: S9-S14
- [2] Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 68(1): 105-113

- [3] Tirado C, Schmidt K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. world health organization [J]. Journal of Infection, 2001, 43(1): 80-84
- [4] Kadariya J, Smith T C, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health [J]. Biomed Research International, 2014, 827965
- [5] 黄嘉慧,吴诗,张峰,等.我国市售食用菌中金黄色葡萄球菌污染调查、耐药性及其肠毒素基因检测[J].食品科学技术学报,2018,36(3),25-32
HUANG Jia-hui, WU Shi, ZHANG Feng, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin gene detection of *Staphylococcus aureus* isolated from retail edible mushrooms in China [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(3): 25-32
- [6] Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives [J]. Science, 1990, 248(4956): 705-711
- [7] Le L Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning [J]. Genetics & Molecular Research, 2003, 2(1): 63-76
- [8] Pinchuk I V, Beswick E J, Reyes V E. Staphylococcal enterotoxins [J]. Voprosy Pitaniia, 2010, 2(8): 2177
- [9] 李琼琼,范一灵,宋明辉,等.食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法[J].食品安全质量检测学报,2016,7(2):555-560
LI Qiong-qiong, FAN Yi-ling, SONG Ming-hui, et al. Research advances on foodborne staphylococcal enterotoxins and its detection methods [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(2): 555-560
- [10] Wu S, Duan N, Ma X, et al. A highly sensitive fluorescence resonance energy transfer aptasensor for staphylococcal enterotoxin B detection based on exonuclease-catalyzed target recycling strategy [J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 782(9): 59-66
- [11] 王华,潘家荣,熊汉国.免疫分析技术在食品安全检测中的应用现状[J].食品科技,2007,6:34-37
WANG Hua, PAN Jia-rong, XIONG Han-guo. Application of immunoassay methods in food safety [J]. Food Science and Technology, 2007, 6: 34-37
- [12] Postmes T J, Hout J C V, Saat G, et al. A radioimmunoassay study and comparison of seasonal variation in plasma triiodothyronine and thyroxine concentrations in normal healthy persons [J]. Clinica Chimica Acta, 1974, 50(2): 189-195
- [13] Nagaraj S, Ramlal S, Kingston J, et al. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 136-141
- [14] 朱安妮,唐俊妮,赵燕英,等.金黄色葡萄球菌新型肠毒素 I 双抗夹心-酶联免疫检测方法的建立[J].食品科学,2016, 37(16):193-198
ZHU An-ni, TANG Jun-ni, ZHAO Yan-ying, et al. Development of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin I (SEI) [J]. Food Science, 2016, 37(16): 193-198
- [15] Zhao Y Y, Zhu A N, Tang J N, et al. Identification and measurement of staphylococcal enterotoxin M from *Staphylococcus aureus* isolate associated with staphylococcal food poisoning [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(1): 27
- [16] 杜玄,赵燕英,刘骥,等.金黄色葡萄球菌肠毒素 P 双抗夹心酶联免疫检测方法的建立[J].现代食品科技,2018,34(4): 264-269
DU Xuan, ZHAO Yan-ying, LIU Ji, et al. Development of a double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin P [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 264-269
- [17] 刘骥,潘洁,田万帆,等.新型肠毒素蛋白 SEIK 编码基因的克隆测序、生物信息学分析和表达载体构建[J].西南民族大学学报:自然科学版,2016,42(3):274-280
LIU Ji, PAN Jie, TIAN Wan-fan, et al. Cloning, sequence bioinformatic analysis and construction of expression vector for the newly identified staphylococcal enterotoxins SEIK-encoding Gene [J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2016, 42(3): 274-280
- [18] 田万帆,刘骥,赵燕英,等.金黄色葡萄球菌新型肠毒素 SEK 原核表达、纯化及溶液构象分析[J].食品科学 2019,40(4): 138-145
TIAN Wan-fan, LIU Ji, ZHAO Yan-ying, et al. Prokaryotic expression, purification, and solution conformation of staphylococcal enterotoxin K [J]. Food Science, 2019, 40(4): 138-145
- [19] Sparding N, Slotved H C, Nicolaisen G M, et al. Development of an ELISA for evaluation of swab recovery efficiencies of bovine serum albumin [J]. Plos One, 2014, 9(11): 378-390
- [20] 马伊萨兰,张荣,王洪志,等.食品中金黄色葡萄球菌生物被膜形成基因分析及影响因素研究[J].食品工业科技, 2017,38(15):129-133

- MA Yi-sa-lan, ZHANG Rong, WANG Hong-zhi, et al. Analysis of biofilm formation related genes and its influence factors for *Staphylococcus aureus* food isolates [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(15): 129-133
- [21] Cheng J, Wang Y, Cao Y, et al. The distribution of 18 enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains from different sources in east China [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2016, 13(4): 171
- [22] Varshney A K, Mediavilla J R, Robiou N, et al. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(21): 6839
- [23] Aguilar J L, Varshney A K, Wang X, et al. Detection and measurement of staphylococcal enterotoxin-like K (SEI-K) secretion by *Staphylococcus aureus* clinical isolates [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(7): 2536-2543
- [24] Wu D J, Shen X Z, Li X M, et al. OL-064 Superantigen gene profiles and presence of exfoliative toxin genes in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from Chinese children [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(1): S36-S36
- [25] Orwin P M, Leung D Y M, Donahue H L, et al. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K [J]. Infection & Immunity, 2001, 69(1): 360
- [26] Omoe K, Hu D L, Ono H K, et al. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins [J]. Infection and Immunity, 2013, 81(10): 3627-3631
- [27] 李柯欣. 茶多酚的提取、抑菌作用与抑菌机理研究[D]. 成都: 西华大学, 2017
- LI Ke-xin. Study on extraction, bacteriostasis and bacteriostatic mechanism of tea polyphenols [D]. Chengdu: Xihua University, 2017
- [28] 王琼, 唐俊妮, 汤承, 等. 6种食品防腐剂对金黄色葡萄球菌抑菌效果及肠毒素基因表达的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 151-156
- WANG Qiong, TANG Jun-ni, TANG Cheng, et al. Inhibitory effect of six food antiseptics on the growth and staphylococcal enterotoxin(SE) gene expression of *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science, 2016, 37(21): 151-156
- [29] 胡艳军, 夏素琴, 陈雨欣. 茶多酚联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(20): 2977-2979
- HU Yan-jun, XIA Su-qin, CHEN Yu-xin. Effects of tea polyphenols and vancomycin on biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2017, 14(20): 2977-2979

(上接第6页)

- [12] Aldini G, Dalle-Donne I, Colombo R, et al. Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction [J]. Cheminform, 2006, 1: 1045
- [13] Bresciani G, Cruz I B M D, González-Gallego J. Chapter four-manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation [J]. Advances in Clinical Chemistry, 2015, 68: 87-130
- [14] Sabaretnam T, Kritharides L, O'Reilly J N, et al. The effect of aging on the response of isolated hepatocytes to hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide [J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24: 123-128
- [15] Picca A, Pesce V, Fracasso F, et al. Aging and calorie restriction oppositely affect mitochondrial biogenesis through TFAM binding at both origins of mitochondrial dna replication in rat liver [J]. Plos One, 2013, 8:e74644
- [16] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. 动物学杂志, 2007, 42: 153-160
- ZHANG Ke-feng, ZHANG Zi-ping, CHEN Yun, et al. Antioxidant defense system in animals [J]. Chinese Journal of Zoology, 2007, 42: 153-160
- [17] Toroser D, Yarian C S, Orr W C, et al. Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation [J]. Biochimica et biophysica acta, 2006, 1760: 233
- [18] Wang K, Chen Z, Huang J, et al. Naringenin prevents ischemic stroke damage via anti-apoptotic and anti-oxidant effects [J]. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology, 2017, 44(8): 862-871
- [19] Brenner D, Mak T W. Mitochondrial cell death effectors [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2009, 21: 871-877
- [20] Mannick J B, Hausladen A, Liu L, et al. Fas-induced caspase denitrosylation [J]. Science, 1999, 284: 651-654
- [21] 罗文娟. 黑果枸杞原花青素对小鼠衰老皮肤抗氧化作用及凋亡相关蛋白的影响[J]. 山东医药, 2018, 58: 32-35
- LUO Wen-juan. Effects of proanthocyanidins in *Lycium ruthenicum* from Chaidamu on anti-oxidize effect and expression of apoptosis-related proteins in aging skin of mouse [J]. Shandong Medical Journal, 2018, 58: 32-35

现代食品科技