

富集核糖体蛋白检测大肠杆菌

刘鹏, 魏纪平, 李超, 袁文蛟, 刘皓, 李达

(天津现代职业技术学院, 天津 300350)

摘要: 致病菌的快速检测已成为研究热点, 该文通过合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 纳米粒子, 利用该材料的带电性和介孔的富集能力, 提高基质辅助激光解吸飞行时间质谱对核糖体蛋白的灵敏性和检测限, 并利用核糖体蛋白的保守性完成对大肠杆菌 *O157:H7* 的鉴别。

关键词: 富集; 核糖体; 蛋白; 检测; 大肠杆菌 *O157:H7*; 致病菌

Detection of *Escherichia coli* by the Enrichment of Ribosomal Protein

LIU Peng, WEI Ji-ping, LI Chao, YUAN Wen-jiao, LIU Hao, LI Da

(Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

Abstract: The rapid detection of pathogenic bacteria has become a topic spot. In the study, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ nanoparticles were synthesized to improve the sensitivity and detection limit of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS) to ribosomal proteins using its charged property and mesoporous enrichment ability. The conservation of ribosomal proteins had been used to identify *E. coli O157:H7*.

Key words: enrichment; ribosomal; protein; detection; *Escherichia coli O157:H7*; pathogenic bacteria

引文格式:

刘鹏, 魏纪平, 李超, 等. 富集核糖体蛋白检测大肠杆菌[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 187-191.

LIU Peng, WEI Jiping, LI Chao, et al. Detection of *Escherichia coli* by the Enrichment of Ribosomal Protein[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 187-191.

近年来, 致病菌快速检测成为研究热点^[1-2]。目前致病菌检测的方法很多, 有经典生理生化法、16S rRNA 检测法、多位点测序与扩增片段长度多态性技术等, 而利用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS/MS)蛋白鉴别微生物, 是近几年发展起来的新方法^[3-5], 该方法有不同的研究方向, 其中利用核糖体蛋白保守性对微生物进行鉴别, 是一种简单、快速的检测方法, 但是该方法也面临诸多问题, 主要是核糖体蛋白质谱检出率低, 其蛋白检出数量很难达到鉴别微生物的要求^[6-9]。

为达到 MALDI-TOF MS/MS 快速检测微生物要求, 本文引入金属-有机骨架材料(metal organic framework, MOFs)对微生物和核糖体蛋白进行快速富集, 提高质

谱检测的灵敏性和分辨率, 以达到微生物鉴别的目的。目前, 在 MOFs 材料中 MIL-101 是最常用的富集介孔材料, 而且具有优良的蛋白富集能力^[10-11]。本文通过合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 纳米粒子, 利用其带电性和介孔的富集特性达到快速富集菌体和核糖体蛋白, 并利用核糖体蛋白微生物鉴别数据库对 *Escherichia coli O157:H7* 进行鉴别。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸钠、乙二醇、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、苯二甲酸(均为分析纯): 天津市光复精细化工研究所; α -腈基-4-羟基苯丙烯酸(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA): 美国布鲁克·道尔顿

基金项目: 天津市科技计划项目(17YFFCZC00220、18YFZCNC01140); 天津市津南区科技计划项目(20190112)

作者简介: 刘鹏(1982—), 男(汉), 副教授, 硕士研究生, 主要从事营养与食品卫生及食品生物技术方面研究。

公司;三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)(色谱纯)、乙腈(acetonitrile, ACN)(色谱纯);美国杰帝贝柯公司。

Autoflex III 型基质辅助激光解吸飞行时间质谱:美国布鲁克·道尔顿公司;BSP-100 型振荡培养箱:上海博迅实业有限公司;DynaMag-2 型磁性分离器:美国赛默飞世尔科技公司;TU-1901 型紫外可见吸收分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;JEM-2100F 型透射电子显微镜:日本电子株式会社;Mini-flex 600 型 X 射线衍射仪:日本理学株式会社;VSM1100 型振动探针式磁强计:美国兰道科技公司;TriStar 3000 型比表面仪:美国麦克默瑞提克有限公司;Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪:英国马尔文仪器有限公司。

1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 合成

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 采用 Bromberg 等^[2]的水热法进行合成。

1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 表征

透射电镜图像(transmission electron microscope, TEM)是在 200 kV 加速电压下通过 JEM-2100F TEM 进行表征磁性 MOFs 复合物。磁性 MOFs 复合物的分辨率的 X 射线衍射数据是由 X 射线衍射仪($\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$ 射线源 $\lambda=1.541\text{ \AA}$)完成,记录磁性 MOFs 复合物的晶体结构。磁性 MOFs 复合物的磁力分析是在 25 °C 条件下通过振动样品磁强度计对材料的磁性进行表征。磁性 MOFs 复合物的表面积、孔体积、孔径分布的测量是在 77 K, $0.02 \leq P/P_0 \leq 0.20$ (P 为氮气分压, P_0 为液氮温度下氮气的饱和蒸汽压)条件下,利用比表面仪采集磁性 MOFs 复合物的比表面积和孔径数据。

1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 等电点测定

把 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 加入到不同 pH 值的磷酸缓冲液中,利用纳米粒度电位仪测定 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 等电点。

1.5 菌液培养

在 37 °C 下, *E. coli* O157:H7 接种于 25 mL 灭菌胰蛋白胨大豆肉汤培养基中,摇床 120 r/min 培养 16 h 后,1 mL 细菌菌悬液离心(12 000 r/min)5 min,倒出上清液,并用磷酸盐缓冲液清洗 2 次,然后利用紫外可见吸收分光光度计 600 nm 波长调整到所需的浓度,并利用活菌计数法对其进行计数。

1.6 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 富集与 MALDI-TOF MS/MS 检测

把 20 μL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)配制 MIL-101 磁性颗粒悬浊液(10 mg/mL)加入到 1 mL 含有致病菌悬浊液的离心管中,涡旋振荡

5 min,使 MIL-101 磁性颗粒吸附到菌体表面,然后把离心管放入微波炉中,微波辐射 30 s 破壁,然后加入 2 mmol/L 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),振荡 30 min 富集蛋白,磁性分离 5 min,去除上清液,加入 20 μL 乙腈与 0.1% 三氟乙酸(体积比 1:1),涡旋振荡 3 min 洗脱菌体蛋白,磁性分离 5 min,把 1 μL 上清液移到 MALDI-TOF MS/MS 靶盘待测,加入基质 CHCA 后,采用 MALDI-TOF MS/MS 线性模式进行分析。

1.7 微生物鉴别

利用 Flexanalysis 软件(version 3.0; Bruker Daltonics)对质谱数据进行基线校正、平滑和标峰。然后利用 Tagident 搜索工具(<http://web.expasy.org/tagident/>)对质谱峰进行数据库检索(UniProtKB/Swiss-Prot 和 UniProtKB/TrEMBL)确定蛋白。利用得到的核糖体蛋白搜索微生物快速鉴别数据库(Rapid Microorganism Identification Database; <http://rmidb.org>)确定致病菌菌株水平归属。

Tagident 搜库参数为数据库:Swiss-Prot/TrEMBL;质量差: $\pm 3\text{ Da}$; $pI=0\sim 14$;生物类别: *Escherichia coli* O157:H7

1.8 模拟样本 *E. coli* O157:H7 分析与鉴别

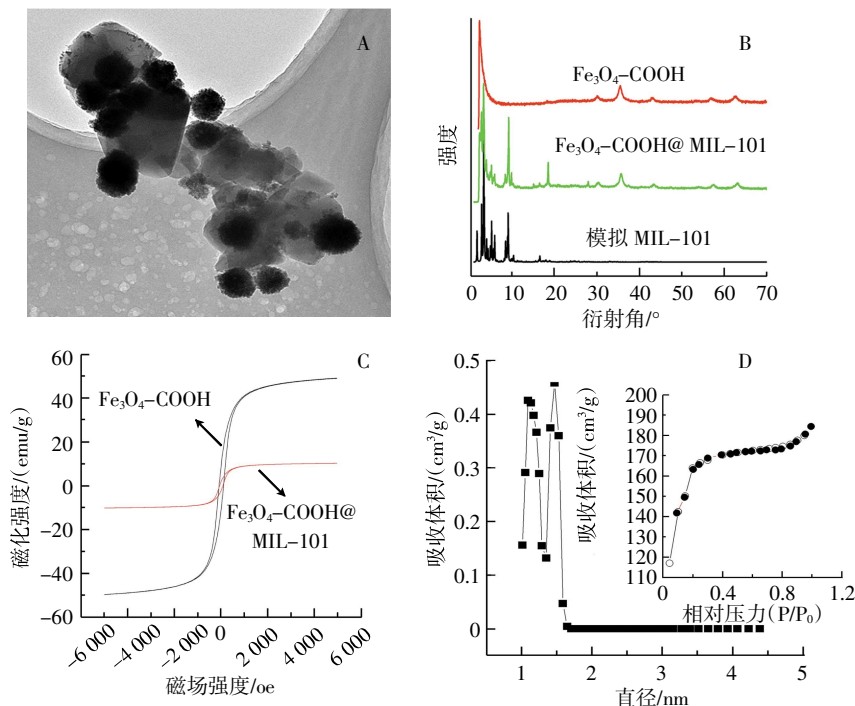
从超市中购买碳酸饮料,加入活菌计数完毕的 *E. coli* O157:H7 的菌悬液,然后利用 MIL-101 磁性颗粒富集与辅助微波破壁, MALDI-TOF MS/MS 检测,并利用数据库进行菌株鉴别。

2 结果与讨论

2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 表征

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 合成完之后,利用透射电子显微镜、X 射线衍射、磁滞回线和 N_2 吸附-解吸等温曲线对 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 合成效果进行表征,以证明其成功合成,表征结果如图 1 所示。

透射电镜图直观表征了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 的大小和表面特征。图 1A 证实了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 纳米粒子的非均匀黏附在 MIL-101 晶体的表面,表明 MIL-101 晶体成功被磁化。为进一步证实磁性 MOFs 材料的存在, X 射线衍射用来研究 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 合成是否成功。从图 1B 可以看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 纳米粒子与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 的衍射角在 30°~70° 范围内相匹配;而模拟的 MIL-101 晶体的衍射角 2 θ 数据在 0°~10° 范围内与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 相匹配,这证明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 被成功合成。磁滞回线显示了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 磁化性能,从图 1C



A.透射电镜图;B.X-射线衍射;C.磁滞回线;D.N₂吸附-解吸等温曲线与孔径分布。

图1 Fe₃O₄-COOH @MIL-101 的表征

Fig.1 Characterization of Fe₃O₄-COOH @MIL-101

可以看出,Fe₃O₄-COOH@MIL-101 磁化值为10.1 emu/g,虽然其磁化值较 Fe₃O₄-COOH 低,但是其磁化值足够从水溶液中快速分离 Fe₃O₄-COOH@MIL-101。利用氮气吸附来证实 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 介孔性质,由图 1D 可知,所制备的 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 复合材料具有的表面积为 592.7 m²/g,孔体积为 0.256 cm³/g,其孔径长约 2.2 nm。氮气吸附数据表明 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 可以足够用来吸附蛋白。

2.2 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 富集能力和 MALDI-TOF MS/MS 检测限

Fe₃O₄-COOH@MIL-101 的富集能力是提高MALDI-TOF MS/MS 检测微生物灵敏性的关键,常规 MALDI-TOF MS/MS 溶剂法检测微生物的浓度限值在 10⁵ CFU/mL~10⁶ CFU/mL。图 2 是利用 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 对不同浓度大肠杆菌富集的质谱检测结果,以此来验证 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 富集能力和 MALDI-TOF MS/MS 的检测限。

由图 2A 可知,未利用 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 富集的方法检测 *E. coli* O157:H7 的浓度为 6.0×10⁵ CFU/mL 时,几乎没有质谱信号出现;而当添加 Fe₃O₄-COOH@MIL-101(浓度为 10 mg/mL)时,质谱信号显著增强,质谱峰的数量明显增加(图 2B),这主要是因为 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 带正电,纳米粒度电位仪测定Fe₃O₄-

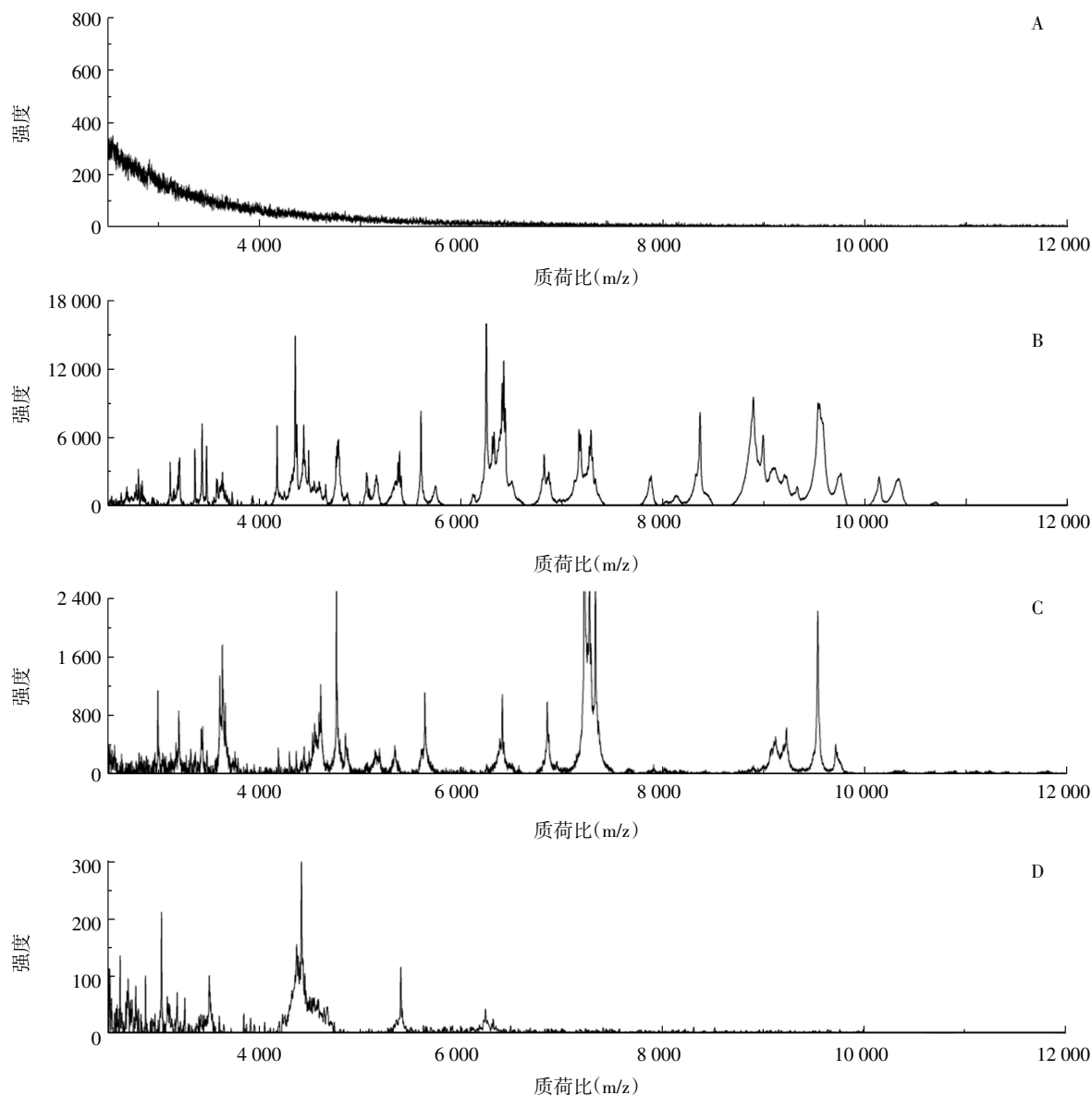
COOH@MIL-101 等电点为 8.0,因此带正电的纳米粒子和带有负电的大肠杆菌细胞快速结合,当利用微波破壁时,蛋白可以快速的释放到含有 2 mmol/LSDS 溶液中,SDS 可以提高蛋白的溶解性;另外 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 比表面积大,富集能力强,能吸附大量溶液中的蛋白,因此利于质谱检测。

但是当溶液中的菌体浓度逐渐降低时,MALDI-TOF MS/MS 的检测能力逐渐下降(图 2C),这主要是溶液中可溶解的蛋白降低的缘故,因为 SDS 的浓度不能添加过多,当 SDS 的浓度超过 5 mmol/L 时,SDS 就会明显压制质谱信号。因此当大肠杆菌菌体浓度达到 6.0×10³ CFU/mL 时,质谱信号变得微弱,而且质谱峰的数量也大大减少,但是 MALDI-TOF MS/MS 仍能检测到蛋白信号,只是其蛋白数量不能用来鉴别微生物,因此 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 富集后能鉴别微生物的检测限为 6.0×10⁴ CFU/mL。

2.3 模拟样本检测

为验证该方法在实际检测中的效果,把碳酸饮料中添加不同浓度的 *E. coli* O157:H7 构成模拟实际样本。通过模拟实际样本,检验 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 在实际检验中的富集能力,如图 3 所示。

图 3 显示利用 Fe₃O₄-COOH@MIL-101 富集后,模拟样本中能鉴别微生物的检测限为 6.0×10⁵ CFU/mL。



A.未富集菌体浓度 6.0×10^5 CFU/mL; B.用富集菌体浓度 6.0×10^5 CFU/mL; C.用富集菌体浓度 6.0×10^4 CFU/mL; D.用富集菌体浓度 6.0×10^3 CFU/mL。

图2 *Escherichia coli* O157:H7 的富集与检测限

Fig.2 Enrichment and detection limit of *Escherichia coli* O157:H7

这主要是因为随着菌体浓度降低,可溶解在溶液中的蛋白减少,而且碳酸饮料中杂质离子对质谱信号的压制非常显著。虽然在菌体富集后,利用去离子水对其进行清洗,但是效果仍不明显,可能是有些菌体被洗脱掉,而造成检测结果不理想。

在模拟样本中,当菌体浓度为 6.0×10^5 CFU/mL 时, MALDI-TOF MS/MS 检测信号强,核糖体蛋白数量多,如表 1 所示,根据 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库搜索结果, *E. coli* O157:H7 有更多的核糖体蛋白被检测。这样利于微生物鉴别数据库检索,提高了 *E. coli* O157:H7 鉴别的准确性,经微生物鉴别数据库检索可以确认模拟样本中的微生物为 *E. coli* O157:H7。

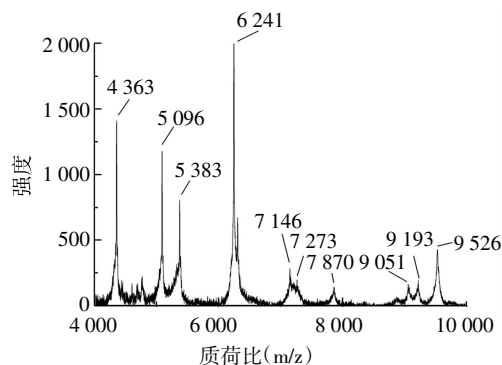


图3 模拟样本中 *Escherichia coli* O157:H7 的检测

Fig.3 Detection of *E. coli* O157:H7 in simulation samples

由表 1 可知,其主要质谱峰中,共有 7 个核糖体蛋白,

表1 大肠杆菌 *O157:H7* 蛋白 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库搜索结果
Table 1 Search results of *E. coli O157:H7* protein in Swiss-Prot/TrEMBL database

测量值(m/z)	理论值(m/z)	数据库入口名	蛋白质名称
9 526	9 525	Q8X8U6	toxin of the YeeV-YeeU toxin-antitoxin system(耶耶夫毒素-抗毒素系统毒素)
9 193	9 191	B5YTP0	30S ribosomal protein S16(30S 核糖体 S16 蛋白)
9 051	9 051	A0A0H3JFK6	partial high-affinity L-arabinose transport system membrane protein, 1 (部分高亲和力 L-阿拉伯糖转运系统膜蛋白, 1)
7 870	7 871	B5YTN5	50S ribosomal protein L31(50S 核糖体 L31 蛋白)
7 273	7 273	B5YT15	50S ribosomal protein L29(50S 核糖体 L29 蛋白)
7 146	7 145	C4TIG3	DNA binding protein(DNA 结合蛋白)
6 241	6 240	RL33_ECO57	50S ribosomal protein L33(50S 核糖体 L33 蛋白)
5 383	5 380	P0A7L2	50S ribosomal protein L34(50S 核糖体 L34 蛋白)
5 096	5 096	A0A5Q2EMC8	30S ribosomal protein S22(30S 核糖体 S22 蛋白)
4 363	4 364	P0A7W0	50S ribosomal protein L36(50S 核糖体 L36 蛋白)

它们的分子量分别是 9 193、7 870、7 273、6 241、5 383、5 096、4 363 Da, 它们分别是核糖体大小亚基蛋白。利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 富集后可得到更多的核糖体蛋白, 通过利用核糖体蛋白的保守性, 可以对微生物进行鉴别, 这主要是因为核糖体蛋白不仅为菌体中高峰蛋白, 而且为碱性蛋白, 其等电点大都在 10.0 以上, 当控制溶液 pH 9.0 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 带负电(等电点为 8.0), 核糖体蛋白带正电, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 不仅可以利用孔径吸附蛋白, 而且可以利用带电性对核糖体蛋白进行富集, 因此提高核糖体蛋白检出率, 从而利于微生物的鉴别。

3 结论

本文通过合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 纳米材料, 利用该材料的带电性和介孔的富集能力, 通过 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH@MIL-101}$ 对菌体和蛋白的两次富集, 提高了 MALDI-TOF MS/MS 检测的灵敏性, 使其对 *E. coli O157:H7* 的检测限达到 6.0×10^4 CFU/mL, 而利用模拟样本对其 *E. coli O157:H7* 的检测限达到 6.0×10^5 CFU/mL, 同时利用核糖体蛋白搜索微生物快速鉴别数据库完成对 *E. coli O157:H7* 的鉴别。

参考文献:

- [1] CHEN J, PARK B. Recent advancements in nanobioassays and nanobiosensors for foodborne pathogenic bacteria detection [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(6): 1055-1069.
- [2] HOTTA Y, SATO J, SATO H, et al. Classification of the genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in S10 and spe operons[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(10): 5222-5230.
- [3] DOMÍNGUEZ I, GARRIDO FRENICH A, ROMERO-GONZÁLEZ R. Mass spectrometry approaches to ensure food safety[J]. Analytical Methods, 2020, 12(9): 1148-1162.

- [4] DURIGHELLO E, BELLANGER L, EZAN E, et al. Proteogenomic biomarkers for identification of *Francisella* species and subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(19): 9394-9398.
- [5] CLARK C G, KRUCZKIEWICZ P, GUAN C, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 94(3): 180-191.
- [6] SUN L W, JIANG W J, ZHANG J Y, et al. Identification and detection sensitivity of *Microcystis aeruginosa* from mixed and field samples using MALDI-TOF MS[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(12): 1-13.
- [7] TERAMOTO K, SATO H, SUN L W, et al. A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences[J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(10): 3899-3907.
- [8] HOTTA Y, TERAMOTO K, SATO H, et al. Classification of genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS based on ribosomal protein coding in S10-spc-alpha operon at strain level[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12): 6722-6728.
- [9] TANIGAWA K, KAWABATA H, WATANABE K. Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(12): 4055-4062.
- [10] ILAVENIL S, AL-DHABI N A, SRIGOPALRAM S, et al. Removal of SDS from biological protein digests for proteomic analysis by mass spectrometry[J]. Proteome Science, 2016, 14(1): 11.
- [11] ZHANG Y W, LI Z, ZHAO Q, et al. A facile synthesized amino-functionalized metal-organic framework for highly specific and efficient enrichment of glycopeptides[J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2014, 50(78): 11504-11506.
- [12] BROMBERG L, HATTON T A. Aldehyde-alcohol reactions catalyzed under mild conditions by chromium (III) terephthalate metal organic framework (MIL-101) and phosphotungstic acid composites [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011, 3(12): 4756-4764.

加工编辑:张璐

收稿日期:2021-03-17