

单增李斯特菌 InternalinA 的表达、纯化 及多克隆抗体的制备

李志清 向军俭* 李雨辰 闻一鸣 杨红宇

(广东省分子免疫与抗体工程重点实验室 暨南大学抗体工程研究中心 广东 广州 510632)

摘要: 【目的】克隆表达单增李斯特菌膜表面蛋白 InternalinA (InlA), 经免疫家兔获得多克隆抗体, 为建立其免疫磁珠富集快速检测方法奠定基础。【方法】利用生物软件设计单增李斯特菌 *inlA* 基因的引物, 通过 PCR 扩增出 *inlA* 基因, 并将其克隆至 pET28a(+) 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 进行优化表达。镍柱纯化表达产物, 质谱鉴定重组蛋白, ELISA 分析其免疫原性。免疫家兔, 制备其多克隆抗体。间接 ELISA 检测多抗的效价及交叉性, 免疫荧光分析多抗与单增李斯特菌菌体结合的特异性。【结果】成功表达了 InlA 蛋白, 融合表达产物分子量约为 92 kD, 质谱鉴定其为 InlA 蛋白; 免疫家兔获得的抗血清效价为 1:100 000, 除与金黄色葡萄球菌约 20% 的交叉外, 与副溶血弧菌等其它病原菌均无交叉; 免疫荧光证实该多抗特异性结合于单增李斯特菌膜表面, 与同种属的威尔斯李斯特菌不结合。【结论】成功制备了单增李斯特菌特异性的兔多克隆抗体, 为单增李斯特菌免疫磁珠富集快速检测方法的建立奠定了基础。

关键词: 单增李斯特菌, InlA, 多克隆抗体

Expression and purification of InternalinA from *Listeria monocytogenes* and preparation rabbit polyclonal antibody against InternalinA

LI Zhi-Qing XIANG Jun-Jian* LI Yu-Chen WEN Yi-Ming YANG Hong-Yu

(Guangdong Province Key Laboratory of Molecular Immunology and Antibody Engineering, Antibody Engi-

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2009B030803010)

*通讯作者: Tel: 86-20-85223259; 信箱: txjj@jnu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-01; 接受日期: 2012-02-02

neering center of Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] To clone and express protein InternalinA (InlA) from *Listeria monocytogenes* (Lm) and prepare the polyclonal antibody against InlA. To provide basis for preparing the immunomagnetic beads which separated Lm efficiently and specifically. **[Methods]** Use biological software to design the primers of *inlA* gene, amplify the *inlA* gene from Lm by PCR and construct the gene into prokaryotic expression vector PET28a(+), then transform the gene into *Escherichia coli* BL21 and express optimally; purify the recombinant product InlA by nickel affinity chromatography, identify the recombinant protein by mass spectrometry analysis, and test the immunogenicity by ELISA. The purified protein is used as antigen for immunization of rabbit to prepare polyclonal antibody and the binding affinity between polyclonal antibody and Lm is determined. **[Results]** The recombinant InlA protein with relatively molecular mass of 92 kD was over-expressed in *E.coli* BL21. The InlA antiserum were obtained with a titer as high as 1:100 000. The antibodies had no cross reaction with other pathogenic microorganisms except *Staphylococcus aureus*. Immunofluorescent staining showed that it only binds to the cell surface of Lm but not *L. welshimeri*. **[Conclusion]** The polyclonal antibodies which binds to the cell surface of Lm specifically are prepared successfully. These results would provide basis for preparing the immunomagnetic beads which separated Lm efficiently and specifically.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, InlA, Polyclonal antibody

李斯特菌属包括单增李斯特菌(*L. monocytogenes* Lm)、伊氏李斯特菌(*L. ivanovii*)、英诺克李斯特菌(*L. innocua*)、威尔斯李斯特菌(*L. welshimeri*)、西尔李斯特菌(*L. seeligeri*)、格氏李斯特菌(*L. grayi*)、默氏李斯特菌(*L. murrayi*) 7个菌种,仅单增李斯特菌可引起人类的脑膜炎、败血症、流产及新生儿感染等疾病。由于Lm在自然环境中广泛存在,而且能在低温下繁殖,这些特点使其成为冷冻食品与即食食品安全的关注对象^[1]。近年来,Lm引起的食物中毒在欧美国家经常发生^[2-3],而且在我国云南也曾引起人和动物发病^[4]。2010年1月,加拿大食品检疫局就一系列若干品牌的肉制品发布预警,原因是它们可能被单增李斯特菌污染。特别是今年美国的“毒香瓜”事件,已有11个州的21人因食用受李斯特菌污染的香瓜而死亡,这是美国10多年来最严重的食物中毒事件。因此建立快速、特异的检测方法是保证食品卫生安全和有效防治本病原的重要手段。

InlA(内化素A)由800个氨基酸残基组成,为Lm入侵人上皮细胞所必需,其受体为E-钙粘素。InlA的C端包含Leu-Pro-X-Thr-Gly(LPXTG)基元,它可以使该蛋白结合到细胞壁上。InlA为最早鉴定出的与细菌侵袭相关的毒力因子,为被非吞噬细胞内化所必需,是Lm所特有,不存于英诺克李斯特菌等非致病性李斯特菌膜表面^[5-7]。因此,它可以做为检测Lm的一个很好的靶点。该研究通过原核表达InlA蛋白,制备其兔多克隆抗体,以期为Lm免疫磁珠富集检测方法的建立奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株:单增李斯特菌 54002 (*Listeria monocytogenes* 54002)、英诺克李斯特菌(*L. innocua*)、威尔斯李斯特菌(*L. welshimeri*)、大肠埃希菌 O157:H7 8099 (*Escherichia coli* O157: H7 8099)、副溶血弧菌 ATCC 17802 (*Vibrio parahaemolyticus*

ATCC 17802)、枯草芽胞杆菌 ATCC 9372 (*Bacillus subtilis* ATCC 9372)、蜡样芽胞杆菌 CMCC 63303 (*Bacillus cereus* CMCC 63303)、铜绿假单胞菌 ATCC 15442 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442)、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538), 均由广东省微生物研究所赠予。

1.1.2 实验动物: 新西兰大白兔, 购于南方医科大学实验动物中心。

1.1.3 主要器材: 4800 plus MALDI-TOF/TOF, ABI 公司; 荧光倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 混匀仪 Dynal-MIX1, 美国 Invitrogen 公司; UV-2550 紫外分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; 酶标仪 Multiskan MK, Thermo Labsystem 公司; 弗氏佐剂, Sigma 公司; 镍离子亲和层析柱, GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 *inlA* 基因的 PCR 扩增及克隆: 利用软件设计 *inlA* 基因的引物: 上下游分别含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。上游引物: 5'-CGGGATCCT TAGTATTTGGCAGTGG-3', 下游引物: 5'-CCG CTCGAGTTAGTAAGAGCCATTGCAGTTCC-3'。以提取的单增李斯特菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增。将 PCR 产物回收后, 与 pMD18-T 载体 16 °C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 。利用 Axygen 公司的质粒抽提试剂盒抽提质粒, 进行 PCR 鉴定及 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.2 表达载体的构建: 将上述鉴定正确的重组质粒和 pET28a(+)质粒载体用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切, 纯化回收后用 T4 DNA 连接酶连接构建 pET28a(+)-*inlA* 重组表达质粒, 连接产物转化 *E. coli* BL21, 经含卡那霉素的 LB 平板筛选, 挑选单菌落提取质粒并测序鉴定。

1.2.3 重组 InlA 蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析: 将鉴定正确的重组菌液按体积比 1:1 000 接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、270 r/min 培养过夜。从新鲜菌液中取 1 mL, 接种于 100 mL 2 \times YT 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 2 h 左右, OD_{600} 值 0.5 时, 加入 1 mol/L IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L; 28 °C、160 r/min 培养 8 h。4 °C、8 500 r/min 离心 10 min, 收集菌体; 加入 PBS 缓冲液(pH 7.4)重悬菌体, 冰浴超声波破碎。4 °C、8 500 r/min 离心 30 min, 分别取上清液组分和沉淀组分, 用 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 重组 InlA 蛋白的分离纯化及鉴定: 表达菌体经超声破碎后, 8 500 r/min 离心 30 min, 将上清过滤后上样至用平衡缓冲液(NaCl 500 mmol/L, PB 20 mmol/L, 咪唑 5 mmol/L, pH 8.0)平衡的镍离子亲和层析柱。再依次分别用含 30、50、75 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液(NaCl 500 mmol/L, PB 20 mmol/L, pH 7.4)进行分阶段洗脱, 收集各阶段洗脱峰。将各阶段洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳分析。将纯化所得蛋白条带从胶中切下, 经胰蛋白酶酶切后, 得到的肽段混合物经过基质辅助激光解吸附电离串联飞行时间质谱分析鉴定。并对鉴定的结果采用 Mascot 搜索引擎在 NCBI 数据库上进行搜索。

1.2.5 InlA 蛋白的免疫原性分析: 分别用甲醛灭活的 Lm 菌体免疫家兔和小鼠, 制备其抗血清, 用于 InlA 蛋白的免疫原性分析。纯化的 InlA 蛋白, 以包被缓冲液(碳酸盐缓冲液, pH 9.6)稀释至浓度为 1 mg/L, 吸取 100 μ L 包被 ELISA 板孔。分别用上述阳性兔血清和阳性小鼠血清作为一抗, 稀释不同梯度后, 间接 ELISA 测效价, 分析其免疫原性。

1.2.6 兔多克隆抗体的制备: 新西兰大白兔(雌雄各一只, 2.0 kg 左右)适应性饲养一周后, 耳静

脉采血 1.0–1.5 mL, 作为阴性血清。用纯化的 InlA 蛋白作为免疫原, 背部皮下多点免疫; 免疫抗原体积为 1 mL, 免疫剂量为 600 μg ; 第一次所用佐剂为完全佐剂, 以后为不完全佐剂, 每次免疫间隔两周。每次免疫前一周耳缘静脉采血, 间接 ELISA 方法测定血清效价。第 5 次免疫 7 d 后颈动脉采集全部血液, 收集血清, 分装保存。

1.2.7 抗体效价的测定及其交叉性分析: 单增李斯特菌、英诺克李斯特菌、威尔斯李斯特菌、大肠埃希菌 O157: H7、副溶血弧菌、枯草芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌经加热灭活后, 用麦氏比浊法将菌体浓度调至 10^9 个/mL。取上述菌体 100 μL 包被 ELISA 板孔, 兔血清稀释不同梯度后, 间接 ELISA 测效价。

1.2.8 免疫荧光观察多抗与 Lm 菌体的特异性结合: 分别取加热灭活的 Lm 菌体和 *L. welshimeri* 菌体(10^9 个/mL) 500 μL 于 EP 管中, 12 000 $\times g$ 离心收集菌体。加入 500 μL 封闭液(含 5% BSA 的 0.015 mol/L、pH 7.4 的 PBST 缓冲液)置于混匀仪上混匀封闭 1 h。加入 1:100 倍稀释的多抗 500 μL 室温混匀反应 1 h, PBST 洗 2 遍。加入 250 μL (100 倍稀释)的 FITC 标记的山羊抗兔二抗, 室温反应 1 h, PBST 洗 3 遍。用 100 μL pH 9.0 的缓冲甘油将菌体重悬, 取 20 μL 滴加在载玻片上, 封片, 镜检。

2 结果

2.1 *inlA* 基因的 PCR 扩增结果

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察到 2 300 bp 左右的扩增片段, 与 *inlA* 基因预期片段大小一致(图 1)。

2.2 pET28a(+)-*inlA* 的酶切鉴定

pET28a(+)-*inlA* 分别用 *Bam*H I、*Xho* I 单酶切后都获得约 8 000 bp 的产物, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切可获得 5 400 bp 和 2 300 bp 的产物(图 2)。经测序鉴定, 序列分析证实该 DNA 片段

大小为 2 333 bp, 阅读框架正确。与 GenBank 发布的 Lm EGD 株 *inlA* 基因序列相比较, 其核苷酸序列同源性为 98%, 推导出的氨基酸序列同源性为 99%。证明 *inlA* 基因已成功插入 pET28a(+)表达载体。

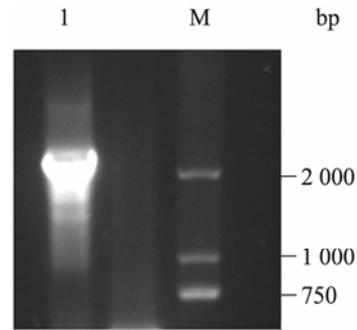


图 1 *inlA* 基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification
Note: M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of *inlA*.

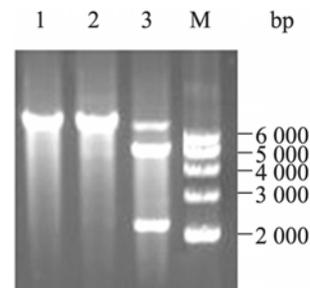


图 2 PET28a(+)-*inlA* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid PET28a(+)-*inlA*

Note: M: DNA marker; 1: Recombinant plasmid PET28a(+)-*inlA* digested with *Bam*H I; 2: Recombinant plasmid PET28a(+)-*inlA* digested with *Xho* I; 3: Recombinant plasmid PET28a(+)-*inlA* digested with *Bam*H I and *Xho* I.

2.3 重组 InlA 蛋白的诱导表达及表达产物的可溶性分析

转化后的 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导后, 在 92 kD 左右有明显的条带出现(图 3), 与 1991 年 Gaillard JL 在 *E. coli* 中表达的 InlA 蛋白大小相似^[8]。说明在 IPTG 的作用下, 重组 InlA 蛋白诱导表达成功。进一步摸索其最佳表达条件为 28 $^{\circ}\text{C}$ 、0.1 mmol/L IPTG 诱导 8 h。

诱导表达菌体经超声破碎后, 8 500 r/min 离

心 30 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。如图 4 所示, 泳道 1 和 2 分别为破碎后的沉淀和上清, 可见目的条带主要存在于上清中, 说明重组菌的表达产物是以可溶性形式存在, 这为亲和层析纯化目的蛋白奠定了基础。

2.4 重组蛋白的纯化及鉴定

摸索 InIA 蛋白经镍柱亲和层析纯化的最佳条件为: 用含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱杂蛋白, 再用含 75 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 这样可以得到的 InIA 蛋白纯度在 98% 以上(图 5)。

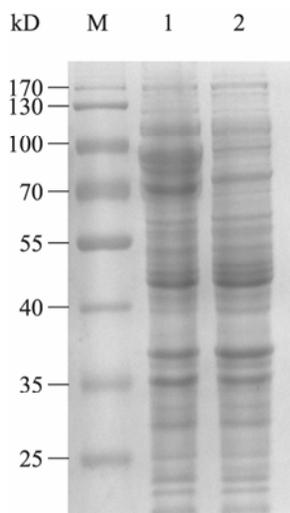


图 3 PET28a(+)-inIA 在 *E. coli* BL21 中诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of PET28a(+)-inIA expression products in *E. coli* BL21 induced with IPTG

Note: M: Protein weight marker; 1: PET28a(+)-inIA expression products in *E. coli* BL21; 2: pET28a(+) expression products in *E. coli* BL21.

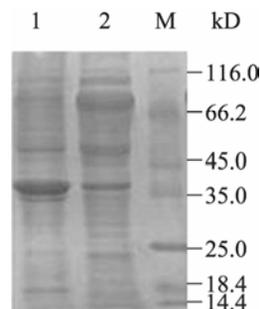


图 4 诱导表达菌体经超声破碎后的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the sonicated bacterial cells

Note: M: Protein weight marker; 1: SDS-PAGE of the pellet; 2: SDS-PAGE of the supernatant.

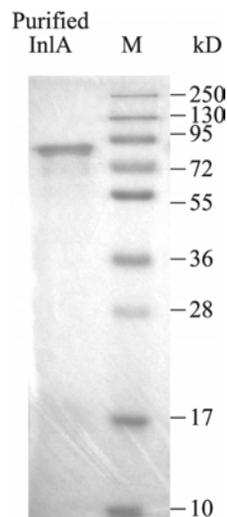


图 5 亲和层析纯化 InIA 蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified InIA by affinity chromatography purification

将图 5 中的蛋白条带切下, 经质谱分析鉴定其为 InIA 蛋白(图 6)。

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
	internalin A [<i>Listeria monocytogenes</i>]	gil112961772	80830.1	4.67	128	100	90	99.995
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification
945.4828	945.4496	-0.0332	-35	317	323 LFFYNNK			
1437.7584	1437.7245	-0.0339	-24	599	611 TTTQAVDYQGLLK			
1694.9323	1694.8973	-0.035	-21	463	478 EVEAGNLLTEPAKPKV			
2421.1741	2421.1379	-0.0362	-15	15	36 TNVTDTVSQTDLDQVTTL	90	99.995	

图 6 质谱鉴定纯化蛋白

Fig. 6 Protein identification by MS-MS/MS

2.5 InlA 蛋白的免疫原性分析

从图 7 可以看出: 重组表达的 InlA 蛋白与兔血清能够很好的反应, 效价达 1:10 000, 而与小鼠血清呈阴性反应。说明该蛋白对于家兔有较好的免疫原性, 但是对于小鼠免疫原性较差。

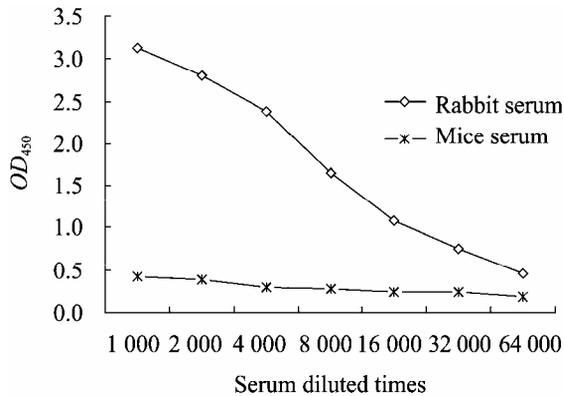


图 7 InlA 蛋白的免疫原性分析

Fig. 7 Analysis of immunoreactivity of InlA

2.6 多抗与 Lm 菌体的效价测定及其交叉性分析

5 次免疫家兔后, 制备的多抗与 Lm 菌体的效价为 1:100 000, 与属内的英诺克李斯特菌与威尔斯李斯特菌无交叉反应, 与副溶血弧菌、蜡样芽

胞杆菌等常见病原菌不存在交叉反应; 但是与金黄色葡萄球菌存在约 20% 的交叉(图 8)。

2.7 免疫荧光观察多抗与 Lm 菌体表面的特异性结合

为探讨该多抗与 Lm 菌体的特异性结合, 将多抗分别与 Lm 菌体和 *L. welshimeri* 菌体孵育后, 用 FITC 标记的羊抗兔二抗处理, 然后在荧光显微镜下观察菌体发光情况。结果(图 9)显示, 在荧光显微镜下能清楚的观察到 Lm 菌体发出绿色的荧光, 而 *L. welshimeri* 没有观察到荧光, 但是在普通光镜下两者均可见大量的菌体。说明该多抗特异性结合于 Lm 菌体表面。

3 讨论

单增李斯特菌的致病性主要由以下几个毒力因子所决定: 李斯特细胞溶菌酶 O、蛋白 ActA、磷脂酶 C、内化素(InlA 和 InlB)、蛋白 CwhA 和金属蛋白酶。其中, InlA 蛋白为 Lm 所特有, 不存在于非致病性李斯特菌中。其能够通过 C 端的 LPXTG 基元牢固结合在菌体表面, 而且无论生长条件如何改变, 该蛋白都存在一定的基础表达。

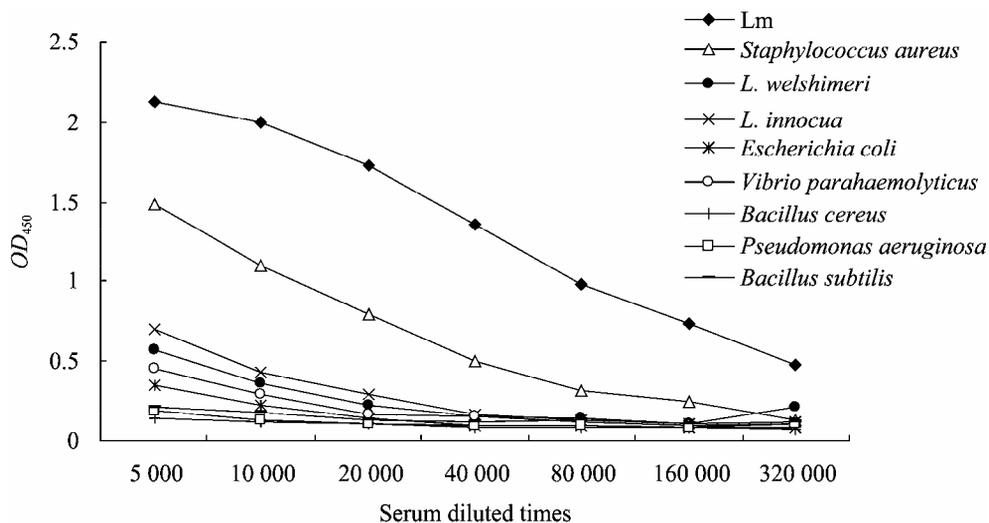


图 8 多抗效价曲线

Fig. 8 Titer cure of the polyclonal antibody

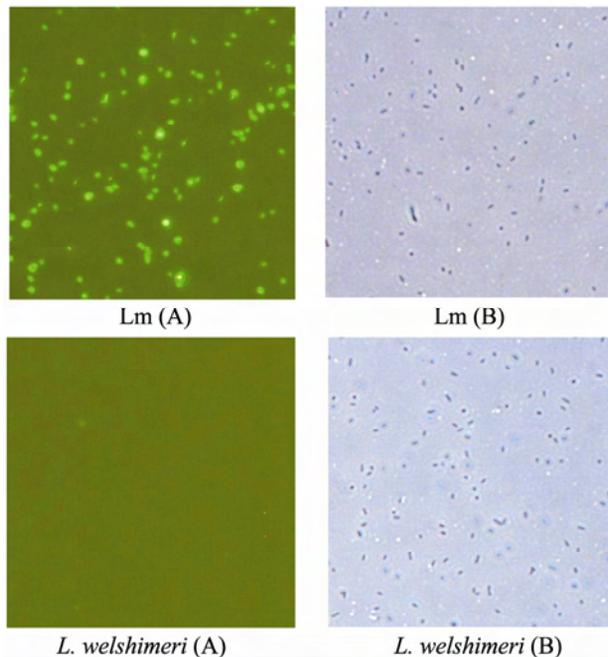


图 9 免疫荧光观察多抗与 Lm 菌体表面的特异性结合(200×)

Fig. 9 Combination of the polyclonal antibody with Lm and *L. welshimeri* (200×)

Note: A: Fluorescent images; B: Phase-contrast images of bacterial cells in the same field.

Christine Jacquet 等研究表明, 只有表达完整 InlA 蛋白的 Lm 菌体才具有致病性, 所以该蛋白可以作为 Lm 毒力的一个评价分子^[9]。以上特点, 使其成为 Lm 检测的靶点。彭珍等原核表达了 InlA 蛋白并制备了其单克隆抗体, 但是还未用该单抗建立检测方法^[10-11]。Stephen Hearty 等用 Lm (1/2a) 全菌免疫小鼠, 用同属的英诺克和威尔斯李斯特菌进行排除筛选, 得到了一株 Lm 特异性的单抗“mAb2B3”, 并鉴定出该单抗所识别的蛋白为 InlA 蛋白^[12-14]。

本研究成功表达和纯化了 InlA 蛋白, 质谱鉴定了所表达蛋白的正确性。间接 ELISA 分析 InlA 蛋白的免疫原性表明, 重组表达的 InlA 蛋白对于家兔有很好的免疫原性, 但是对于小鼠的免疫原性较差。将该蛋白同时免疫小鼠和家兔, 结果表

明: 免疫小鼠制备的血清与 Lm 全菌反应性很弱(结果未显示); 免疫家兔制备的血清与 InlA 蛋白的效价达 1:1 600 000, 与 Lm 全菌的效价达 1:100 000。分析其原因可能为: 不同的物种对于同一蛋白的免疫反应性不同; 菌体灭活方式会影响其表面蛋白的免疫原性, 在实验中也发现加热灭活菌体有利于兔多克隆抗体与菌体的反应; 另外, 原核表达的蛋白在蛋白折叠结构上与菌体表面的天然蛋白可能存在差异。由于 Lm 与金黄色葡萄球菌等异属菌及英诺克等同属异种菌存在交叉抗原^[15], 所以制备的多抗与金黄色葡萄球菌存在约 20% 的交叉, 但是与其它的异属菌及英诺克等同属异种菌都不存在交叉反应。

进一步实验证明该多抗与加热灭活的 Lm、甲醛灭活的 Lm 以及 Lm 活菌均能较好的反应, 因此该多抗可用于 Lm 的检测与鉴定。既可用于 ELISA、免疫标记; 也可用于制备免疫磁珠, 对待测样品中的活菌进行快速简便的富集处理^[16]。总之, 本研究为 Lm 快速、灵敏和特异性检测技术的建立奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 林婷婷, 杨晶, 李志清, 等. 单增李斯特菌溶血素(LLO)的原核表达及其生物学活性鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 878-883.
- [2] Gottlieb SL, Newbern EC, Griffin PM, et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(1): 29-36.
- [3] Bille J, Blanc DS, Schmid H, et al. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005[J]. Eurosurveillance, 2006, 11(6): 91-93.
- [4] 肖义泽, 任丽娟, 王金玉, 等. 云南省首次动物源性李斯特菌病暴发的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(3): 36-236.

- [5] 张辉. 单增李斯特菌 ACTA 的表达、免疫原性及胶体金试纸研制[D]. 吉林: 吉林大学博士学位论文, 2006.
- [6] 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.
- [7] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*[J]. Trends in Microbiology, 2002, 10(5): 238-245.
- [8] Gaillard JL, Berche P, Frehel C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci[J]. Cell, 1991, 65(7): 1127-1141.
- [9] Jacquet C, Doumith M, Gordon JJ, et al. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2004, 189(11): 2094-2100.
- [10] 殷月兰, 董慧, 焦新安, 等. 产单核细胞李斯特菌 *actA* 基因在大肠杆菌中的表达及其单克隆抗体的研制[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 999-1002.
- [11] 彭珍, 魏华, 万翠香, 等. 单核增生李斯特菌 Internalin A 的克隆表达与抗体制备[J]. 中国微生物生态学杂志, 2009, 21(12): 1073-1076.
- [12] Hearty S, Leonard P, Quinn J, et al. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 294-312.
- [13] Lin M, Todoric D, Mallory M, et al. Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *Listeria monocytogenes* serotype 4b[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55(3): 291-299.
- [14] Lin M, Armstrong S, Ronholm J, et al. Screening and characterization of monoclonal antibodies to the surface antigens of *Listeria monocytogenes* serotype 4b[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(5): 1705-1714.
- [15] 张辉, 崔焕忠. 单增李斯特菌 ActA 的表达、免疫原性研究及单克隆抗体的制备[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 71-74.
- [16] Wadud S, Leon-Velarde CG, Larson N, et al. Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(2): 153-159.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。