

可结合 Caco-2 细胞表面蛋白的副溶血弧菌外膜蛋白的筛选与鉴定

陈萌¹, 李卓昱¹, 鲍玉杰¹, 袁增智^{1,2*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要 [目的] 筛选可结合 Caco-2 细胞表面蛋白的副溶血弧菌外膜蛋白。[方法] 筛选副溶血弧菌外膜中的黏附蛋白, 将 Caco-2 细胞表面蛋白生物素化并固定于中性卵白素树脂上, 进一步利用亲和层析技术来筛选副溶血弧菌的外膜蛋白。[结果] 通过 LC-MS/MS 质谱技术鉴定出 3 个候选蛋白: ATP synthase subunit alpha、ATP synthase subunit beta 和 outer membrane protein U。通过对这 3 个蛋白进行克隆基因和原核表达, 成功纯化得到相应重组蛋白。通过进一步的间接免疫荧光试验, 发现 3 种蛋白对于 Caco-2 细胞均有黏附作用。[结论] 推测 ATP synthase subunit alpha、ATP synthase subunit beta 和 outer membrane protein U 这 3 种蛋白可能是潜在的黏附因子。

关键词 副溶血弧菌; 外膜蛋白; 黏附因子

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)12-0118-04

Screening and Identification of Outer Membrane Protein of *Vibrio parahaemolyticus* Binding to Caco-2 Cell Surface Proteins

CHEN Meng, LI Zhuo-yu, BAO Yu-jie et al (College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] To screen the outer membrane protein of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) binding to Caco-2 cell surface proteins. [Method] In order to screen adhesins of VP, the cell surface proteins of Caco-2 cells were biotinylated and then employed as the baits to capture host binding outer membrane proteins of VP by using affinity chromatography. [Result] ATP synthase subunit alpha, ATP synthase subunit beta and outer membrane protein U were identified by LC-MS/MS approach. The three recombinant candidate proteins were expressed and purified, furtherly their binding activity to Caco-2 cells were evaluated via indirect immune-flourescence assays. [Conclusion] The three outer membrane proteins of VP which are capable of binding to Caco-2 cell surface proteins are candidates of VP adhesion.

Key words *Vibrio parahaemolyticus*; Outer membrane protein; Adhesin

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 为嗜盐类革兰氏阴性菌, 短杆状, 无芽孢, 带有鞭毛。VP 主要分布在海洋环境中, 是重要的食源性病原^[1-2], 已经成为世界性公共卫生问题之一。VP 除了会感染人的肠道, 引起腹泻和肠胃炎, 还能感染海洋动物, 例如虾类, 感染后会引发虾类的红腿病。目前对于弧菌的治疗手段普遍是采用抗生素, 病菌的抗药性也在不断增强^[3], 寻找新的药物靶标对于开发新型 VP 感染治疗药物非常关键。

已报道的 VP 毒力作用因子有侵袭因子、外膜蛋白、尿素酶、黏附因子、蛋白酶、脂多糖、溶血毒素等^[4]。而病原体表面蛋白与宿主受体之间的识别和黏附过程是病原体侵染的首要因素, 因此对 VP 黏附机制的研究尤为重要。Jiang 等^[5]通过黏附和抑制试验发现 VP 表面的烯醇酶对上皮细胞有黏附作用。Gingras 等^[6]通过对比神奈川阳性菌和阴性菌发现, VP 普遍对于人肠道的上皮细胞具有黏附作用。Nakasone 等^[7]通过 VP 纯化的菌毛或纯化的菌毛抗体处理兔的肠道细胞, 发现 VP 不能继续黏附肠道, 推测 VP 的菌毛对肠道的黏附过程起到重要作用。Caco-2 细胞株来源于人结肠癌细胞, 在结构和功能上与人小肠上皮细胞相似, 因此笔者以 Caco-2 细胞作为研究对象, 探究其与副溶血弧菌外膜蛋白间的黏附作用。

VP 的外膜蛋白位于菌体表面, 特殊的位置决定了外膜蛋白在侵染宿主的过程中可能起到黏附的作用。笔者采用

基于生物素化的亲和层析技术对 VP 黏附 Caco-2 细胞相关的外膜蛋白进行筛选和初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料 副溶血弧菌 NY-172 株是由天津水生动物疫病预防控制中心提供; Caco-2 细胞, 大肠杆菌 DH5 α 菌株、BL21 (DE3) 菌株, pET-28a 质粒为天津师范大学生命科学学院水生生物学实验室保存。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器。 PCR 仪 (BIO-RAD, 北京伯乐技术开发公司)、凝胶成像仪 (GDS-8000, 北京六一仪器厂)、电泳仪 (DYU-6C)、核酸蛋白检测仪 (BIO-RAD)、电泳槽 (DYCZ-28A, 北京六一仪器厂)。

1.2.2 试剂。 *Sal* I 和 *Xho* I 限制性酶 (TaKaRa 公司); LB 固体、液体培养基 (生工生物工程股份有限公司); NHS-PEG₄-Biotin、DMEM、胰酶、血清、青霉素链霉素双抗、Chemiluminescent Substrate 显色液 (Thermo Fisher Scientific); His 标签单抗、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 羊抗鼠标记的二抗 (天津三箭生物技术有限公司); 同源重组连接酶 (Vazyme 公司)。

1.3 方法

1.3.1 Caco-2 细胞表面蛋白的生物素化标记。 待 Caco-2 细胞培养至单层, 倒去 DMEM 培养基, PBS 冲洗 3 次后将细胞刮下置于 15 mL 无酶管中离心后收集。沉淀用 PBS 冲洗 3 次, 重悬至 2.5×10^7 个/mL, 添加终浓度为 2 mmol/L 的 NHS-PEG₄-Biotin 试剂, 于 4 °C 下孵育 30 min, 用 PBS 冲洗 3 次; 添加 100 mmol/L 的甘氨酸置于 4 °C 下反应 15 min, 使用 PBS 冲洗 3 次; 按照 1:250 的比例加入 FITC 置于 37 °C 下

基金项目 国家自然科学基金项目 (31402322); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (15JCQNJC46400); 天津师范大学博士基金项目 (52XB1412)。

作者简介 陈萌 (1992—), 女, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物分子生物学。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事水生动物传染病学研究。

收稿日期 2018-02-05

反应 30 min,用 PBS 冲洗 3 次;使用荧光显微镜观察,并扫描记录。将剩余细胞加入裂解液进行裂解,4 ℃ 下反应 30 min,4 ℃、1 200 r/min 离心取上清,保存于 -80 ℃ 备用。

1.3.2 副溶血弧菌外膜蛋白的提取。参考王忠等^[8]和周丽等^[9]的方法提取 VP 的外膜蛋白。取 150 mL 过夜培养的菌液,4 ℃、6 000 r/min 离心 20 min。用含有 EDTA 的 Tris-HCl 溶液重悬菌体,洗涤沉淀 3 次,弃上清;加入 10 mL 含有 20 mmol/L PMSF 的 PBS 重悬菌体,并置于 45 ℃ 水浴中 40 min,超声波破碎 5 min(振幅 39%,破碎 5 s,间隔 5 s),超速离心机 140 000 r/min 离心 30 min,取上清收集外膜蛋白。

1.3.3 与 Caco-2 细胞表面蛋白结合的 VP 外膜蛋白的筛选。将自旋柱做好标记,设置对照组,用 PBS 冲洗柱子 3 次;加入 200 μL 中性卵白素树脂,4 ℃ 500 r/min 离心 1 min;用 PBS 平衡柱子 2 次,4 ℃ 500 r/min 离心 1 min;将生物素化标记的 Caco-2 细胞作为试验组,以 PBS 缓冲液作为对照组,均加入到自旋柱中,上下颠倒混匀 15 min,4 ℃ 500 r/min 离心 1 min;2 组自旋柱分别加入封闭液,于室温封闭 15 min,4 ℃ 500 r/min 离心 1 min;加入副溶血弧菌的外膜蛋白与之互作,上下颠倒 60 min,4 ℃ 500 r/min 离心 1 min,用洗涤缓冲液清洗 5 次;添加刚好没过树脂的洗脱溶液,先室温反应

3~5 min,后 4 ℃ 下 500 r/min 离心 1 min,收集流穿液,送上 海中科新生命生物科技有限公司进行质谱鉴定。

1.3.4 基因克隆、原核表达及蛋白纯化。通过质谱鉴定得到 3 个副溶血弧菌候选外膜蛋白,在 NCBI 上分别搜索到 ATP synthase subunit alpha、ATP synthase subunit beta、outer membrane protein U 蛋白的基因编码序列,通过 SignalP 和 THMHH 在线软件预测后,除去信号肽或跨膜区,使用 primer primer 5.0 设计同源重组上下游引物(表 1)。同时试验过程中使用已报道过的黏附因子 VpadF 作为阳性对照。

提取 VP 基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增出序列全长,对其进行纯化胶回收,与 pET-28a 质粒经 *Sal*I 和 *Xho*I 双酶切的线性化产物进行同源重组连接,得到 pET-28a-ATPα、pET-28a-ATPβ、pET-28a-OmpU 重组质粒,送样测序。

将测序正确的重组质粒转化至 BL21(DE3)大肠杆菌中,参照杜欣军等^[10]的方法进行相应蛋白的表达和纯化,简述如下:先实施小量诱导表达,待确定最佳的诱导条件后进行大规模诱导表达,利用 Ni 柱进行亲和层析纯化,对于表达在包涵体中的蛋白用尿素进行梯度复性,使其恢复活性并透析于 PBS 缓冲液中保存。

1.3.5 Western blot 检测重组蛋白。用 5 μg 的重组蛋白上

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The sequences of PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物片段长度 Primer fragment length//bp
ATPαF	ccgaattcgagctcgtcgacATGCATTGCAGTCTTAATGG	41
ATPαR	gtggtgggtgggtgctcgagCCAAGTTTTGGTTGCTTTGAA	42
ATPβF	ccgaattcgagctcgtcgacATGGCTACAGGTAAGATCGTACAGAT	47
ATPβR	gtggtgggtgggtgctcgagTAGCTTCTTCGCATTCTCGATAGC	45
OmpUF	ccgaattcgagctcgtcgacGCTGAACTTTACAACCAAGACGG	44
OmpUR	gtggtgggtgggtgctcgagGAAGTCGTAACGTAGACCTAGAGCTAGC	49

样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析,浓缩胶 80 V,分离胶 120 V 电泳分析,PVDF 膜先用甲醇浸泡 5~10 min,再用转膜缓冲液浸泡 20~30 min 进行转膜,置于冰上 300 mA、2 h;用去离子水洗涤 PVDF 膜除去 SDS,放到封闭液中封闭过夜,用 TBST 洗 3 次,使用 His 标签单克隆抗体常温孵育 2 h,TBST 洗 3 次;用 HRP 标记的羊抗鼠二抗常温孵育 2 h,TBST 洗 3 次,使用 Thermo Chemiluminescent Substrate 显色液,使 PVDF 膜浸泡其中显色,BIO-RAD 凝胶成像仪扫描并保存。

1.3.6 间接免疫荧光验证黏附作用。待 Caco-2 细胞培养至 12 孔板中长成单层时,每个孔中加入相应 200 μg 重组蛋白,37 ℃ 孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,用 PBS 将多聚甲醛稀释到浓度为 4%(V/V)的反应液,添加到 12 孔板中,常温反应 15 min,PBS 冲洗 3 次;使用 His 单克隆抗体,常温反应 30 min,PBS 冲洗 3 次;使用 HRP 标记的羊抗鼠二抗,常温反应 30 min,PBS 冲洗 3 次;荧光显微镜观察,扫描并保存。

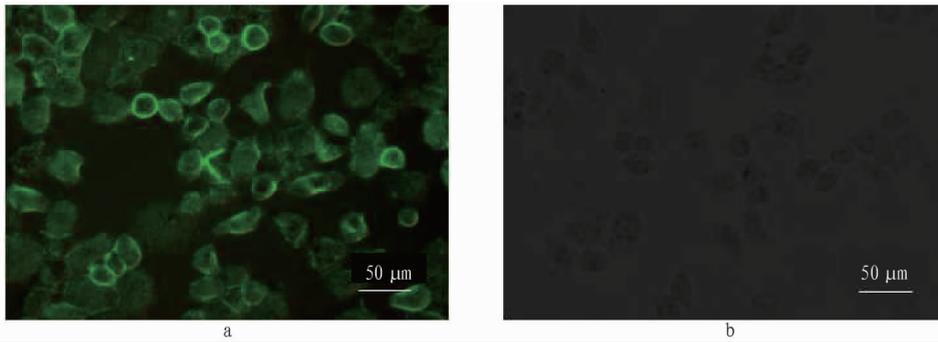
2 结果与分析

2.1 Caco-2 细胞表面蛋白的生物素化标记 为了提取 Caco-2 细胞表面的蛋白作为垂钩诱饵,使用 NHS-PEG₄-

Biotin 试剂对 Caco-2 细胞表面的蛋白进行生物素化。由于该试剂高度亲水,因此正常情况下无法穿透细胞膜,只有细胞表面的蛋白才会被生物素化。进一步利用 Avidin 与生物素的特异性结合作用来证明生物素化是否成功。将 FITC-Avidin 分别与生物素化的 Caco-2 细胞和未生物素化的 Caco-2 细胞孵育,显微镜观察结果如图 1 所示。结果能看到生物素化的细胞表面有明显的荧光,而对照组无荧光,证明 Caco-2 细胞表面蛋白成功生物素化,可用于下一步的筛选。

2.2 副溶血弧菌外膜蛋白提取 将 PMSF 法提取的外膜蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测分析,结果如图 2 所示。可以看到外膜蛋白的大小集中在 20~90 kD,条带清晰且均匀,说明 PMSF 方法适用于副溶血弧菌外膜蛋白的提取,外膜蛋白可用于下一步试验。

2.3 与 Caco-2 细胞表面蛋白结合的副溶血弧菌外膜蛋白的筛选 利用卵白素树脂与生物素的亲和作用,将 Caco-2 细胞进行生物素化并固定于卵白素树脂,与提取到的 VP 外膜蛋白进行孵育,亲和垂钩副溶血弧菌的外膜蛋白。用洗脱缓冲液洗脱树脂,分别取洗脱物进行 LC-MS/MS 质谱鉴

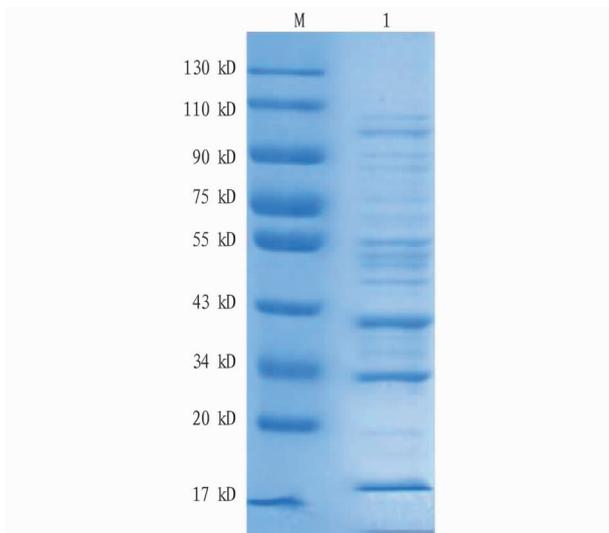


注:a.生物素化后的Caco-2细胞;b.未生物素化的Caco-2细胞

Note: a. Caco-2 cell of pre-biotinylation; b. Caco-2 cell of post-biotinylation

图1 FITC-Avidin标记生物素化的Caco-2细胞

Fig.1 Detection of biotinylated Caco-2 cells by FITC-Avidin



注:M. Marker;1. PMSF法提取的外膜蛋白

Note: M. Marker; 1. the outer membrane proteins with PMSF methods

图2 SDS-PAGE分析PMSF法提取外膜蛋白

Fig.2 SDS-PAGE profiles of the outer membrane proteins with PMSF methods

定,结果见表2。通过与对照组比较,筛选出ATP α 、ATP β 、OmpU共3个蛋白。经在线软件SignalP 4.1 server预测分析ATP α 、ATP β 均无信号肽,OmpU序列1~21区域的氨基酸存在信号肽。在线软件TMHMM server v 2.0预测分析结果显示ATP α 、ATP β 、OmpU均无跨膜区,为胞外蛋白。

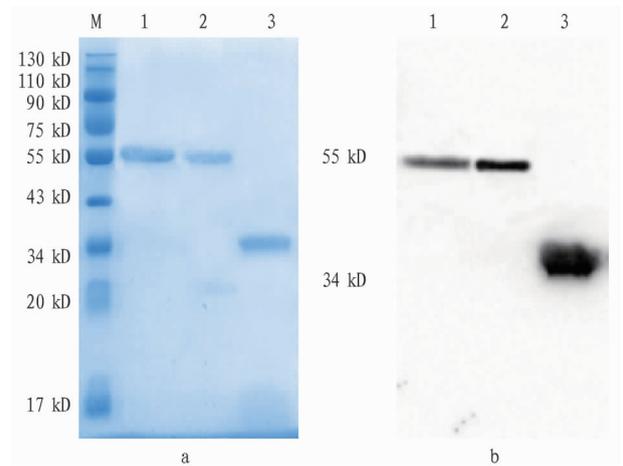
表2 候选外膜蛋白质谱鉴定及其生物信息学分析

Table 2 Mass spectrum identification and bioinformatics analysis of candidate outer membrane proteins

蛋白名称 Name of protein	质谱鉴定肽段数 Number of peptide fragment identified by mass spectrum	相对分子质量 Relative molecular mass	预测是否胞外蛋白 Prediction of extracellular protein
ATP α	29	56.0 $\times 10^3$	是
ATP β	26	50.0 $\times 10^3$	是
OmpU	33	36.0 $\times 10^3$	是

2.4 重组蛋白进行基因克隆、原核表达、蛋白纯化及Western blot检测 将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌中,

对其实施大规模诱导表达,利用亲和层析技术纯化蛋白,结果如图3a所示。蛋白分子量符合预期,条带清晰且单一。进一步运用Western blot试验检测重组蛋白与多聚组氨酸标签抗体的识别作用,结果如图3b所示。结果显示3种重组蛋白均可以被带有多聚组氨酸标签抗体识别,可以被用来进行下一步试验。



注:M. Marker;1. ATP α ;2. ATP β ;3. OmpU

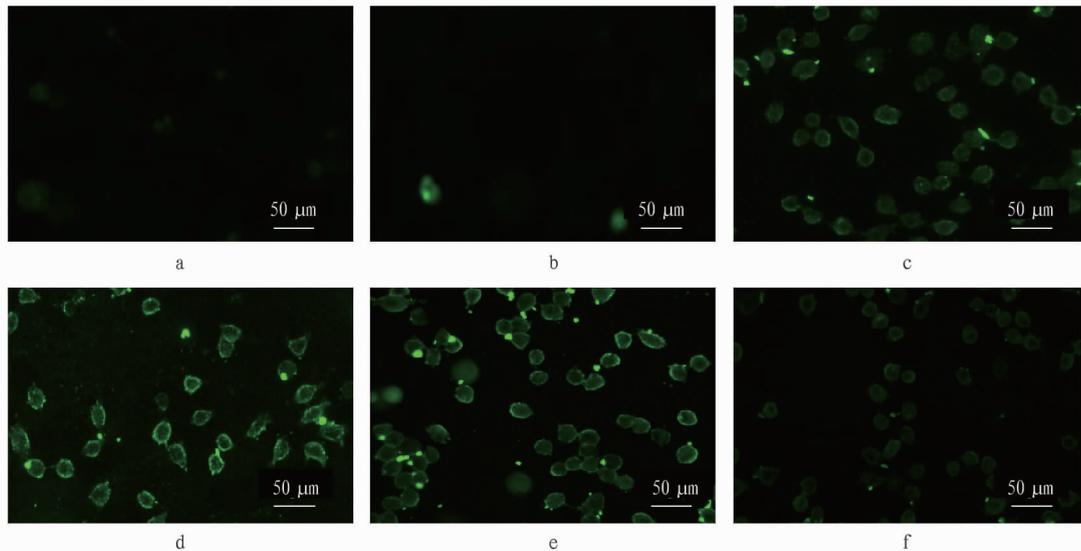
图3 各重组蛋白纯化结果(a)及检测(b)

Fig.3 Purification of recombinant protein and Western blot detection

2.5 间接免疫荧光验证黏附作用 该研究运用间接免疫荧光法来验证纯化的重组蛋白ATP α 、ATP β 、OmpU与Caco-2细胞之间是否存在黏附作用,结果如图4所示。通过荧光显微镜观察到重组蛋白与阳性对照组VpadF对比都有较强的荧光,而空白组(PBS)和阴性对照组(BSA)没有任何荧光,表明重组蛋白ATP α 、ATP β 、OmpU与Caco-2细胞存在黏附作用。

3 讨论

病原体表面蛋白与宿主靶细胞受体的黏附作用是病原体侵染的重要环节。该研究首次将Caco-2细胞表面蛋白进行生物素化,利用生物素与卵白素树脂的天然亲和性,制成有特异性的固相载体,使用层析方法筛选出来能与Caco-2细胞表面相互作用的VP外膜蛋白,垂钧得到3个候选蛋



注: a. PBS; b. BSA; c. VpadF; d. ATP α ; e. ATP β ; f. OmpU

图 4 间接免疫荧光验证各重组蛋白与 Caco-2 细胞间的相互作用

Fig. 4 Confirmation of the interaction between recombinant proteins and Caco-2 cells by indirect immune-fluorescence assays

白。ATP 合成酶是生物能量代谢的重要酶,不同来源的 ATP 合成酶都具有相同的组成单位和亚基,是结合部分 F1 和处于膜内部亲脂的 FO, F1 包括 α 、 β 、 γ 、 ϵ 、 σ 这 5 个亚基^[11]。邢林林等^[12]通过表达培养沉默 ATP 合成酶的菌株发现其几乎不生长于 TSB 培养基中,在培养过程中加入外源的 ATP 同样不能生长,推测外源的 ATP 不能代替细菌的原有 ATP 合成路径,从而证明 ATP 合成酶与细菌的生长密切相关。而细菌中 ATP 合成酶是否参与了黏附宿主的过程目前尚无明确报道。弧菌外膜蛋白中的 OmpU 是重要的抗原,其序列在弧菌中有较高的同源性。试验证实 OmpU 对哈维氏弧菌^[13]、副溶血弧菌^[14]、鳃弧菌^[15]和溶藻弧菌^[16]均表现出很好的免疫保护作用。除此之外, Aeckersberg 等^[17]还发现费氏弧菌中 OmpU 能帮助其定殖在宿主的新生发光器官中,从而推测 OmpU 可能是具有黏附作用的外膜蛋白。该研究通过原核表达和蛋白纯化技术成功得到 3 个重组蛋白,并进行间接免疫荧光试验验证其功能。将 VP 黏附因子 VpadF 作为阳性对照,发现 ATP α 、ATP β 、OmpU 均能与 Caco-2 细胞黏附,其中 ATP β 的黏附作用最强。因此推测 3 个候选蛋白均是潜在的黏附因子。

综上所述,该研究筛选出 VP 外膜蛋白中的 3 个潜在黏附因子 ATP α 、ATP β 、OmpU。该研究成果将有助于探究 VP 侵染宿主的致病过程,为下一步病原菌预防和防治新型药物开发奠定基础。

参考文献

- [1] KONDO H, TINWONGGER S, PROESPRAIWONG P, et al. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand[J]. Genome announcements, 2014, 2(2): 221-234.
- [2] WANG J J, SUN W S, JIN M T, et al. Fate of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp after acidified electrolyzed water treatment[J]. International journal of food microbiology, 2014, 179: 50-56.
- [3] 刘祥. 溶藻弧菌外膜蛋白 OmpU 的原核表达、抗原性鉴定与生物信息

学分析[J]. 华北农学报, 2015, 30(6): 37-43.

- [4] 张德福, 付绪磊, 张明, 等. 副溶血弧菌毒力因子及致病机理的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 216-222.
- [5] JIANG W, HAN X C, WANG Q, et al. *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2014, 98(11): 4937-4948.
- [6] GINGRAS S P, HOWARD L V. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to human epithelial cell lines[J]. Applied and environment microbiology, 1980, 39(2): 369-371.
- [7] NAKASONE N, IWANAGA M. Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor[J]. Infection & immunity, 1990, 58(1): 61-69.
- [8] 王忠, 邓灯, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌外膜蛋白抗原性分析[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 455-459.
- [9] 周丽, 刘洪明. 鳃弧菌、溶藻弧菌外膜蛋白的分离及特性[J]. 中国水产科学, 2003, 10(1): 31-35.
- [10] 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 38-43.
- [11] 刘平. 基于 ATP 合成酶的新型抗结核化合物的设计、合成和生物活性评价[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [12] 邢林林, 卢凤英, 愈慧, 等. 鸭疫里默氏杆菌 ATP 合成酶 F1 亚单位 α 亚基的部分生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(4): 266-269.
- [13] WANG Q, CHEN J, LIU R, et al. Identification and evaluation of an outer membrane protein OmpU from a pathogenic *Vibrio harveyi* isolate as vaccine candidate in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Letters in applied microbiology, 2011, 53(1): 22-29.
- [14] 刘瑞, 赵明君, 杨慧, 等. 副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) *tdh2* 基因和鳃弧菌 (*V. anguillarum*) *ompU* 基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 免疫保护作用[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 580-586.
- [15] SUN Y, ZHANG M, LIU C S, et al. A divalent DNA vaccine based on Sia10 and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder[J]. Fish & shellfish immunology, 2012, 32(6): 1216-1222.
- [16] CAI S H, LU Y S, WU Z H, et al. Cloning, expression of *Vibrio alginolyticus* outer membrane protein-OmpU gene and its potential application as vaccine in crimson snapper, *Lutjanus erythropterus* Bloch[J]. Journal of fish diseases, 2013, 36(8): 695-702.
- [17] AECKERSBERG F, LUPP C, FELICIANO B, et al. *Vibrio fischeri* outer membrane protein OmpU plays a role in normal symbiotic colonization [J]. Journal of bacteriology, 2001, 183(22): 6590-6597.