阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 免疫原性蛋白的鉴定

王健，杜欣军，王硕

（天津科技大学，教育部食品营养与安全重点实验室，天津 300457）

摘要：克罗诺杆菌是一种新型的食源性致病菌。迄今为止，对阪崎克罗诺杆菌的免疫原和潜在毒力因子了解很少，而免疫原性蛋白在细菌的致病性方面发挥着重要的作用。本研究利用免疫蛋白组学的方法，鉴定了阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 的免疫原性蛋白。利用固定后的阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 菌体免疫新西兰兔，制备多克隆抗体；采用蔗糖密度梯度离心法，提取蛋白质，并利用双向电泳对蛋白质进行分离；以制备的多克隆抗体作为一抗进行免疫印迹分析，对具有免疫反应的蛋白点进行质谱鉴定，结果共鉴定出 7 种具有明显免疫反应的蛋白质。

关键词：阪崎克罗诺杆菌；免疫原性蛋白；免疫蛋白质组学；双向电泳

文章篇号：1673-9078(2013)6-1370-1373

Identification of Immunogenic Proteins in *Cronobacter sakazakii* ATCC29544

WANG Jian, DU Xin-jun, WANG Shuo

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Cronobacter spp. are emerging opportunistic pathogens. So far, little is known about the species' immunogens and potential virulence factors. Immunogenic proteins play an important role in the pathogenicity of bacteria. In this study, the immunogenic proteins of *C. sakazakii* ATCC 29544 was identified using immunoproteomics. The polyclonal antibody was prepared using the formaldehyde-fixed *C. sakazakii* ATCC 29544 as antigen. Then the proteins of *C. sakazakii* ATCC 29544 were extracted using sucrose density gradient centrifugation and separated using two-dimensional electrophoresis. Western blot was used to detect the surface-exposed proteins and mass spectroscopy was used to identify them. 7 immunoreactive proteins were identified in this study.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; immunogenic proteins; immunoproteomics; two-dimensional electrophoresis

克罗诺杆菌是近年来在奶粉(乳)制品行业中发现的一种条件致病菌。其主要危害人群为新生儿、早产儿等，会引起脑膜炎、败血症及坏死性的小肠结肠炎和系统性脓毒疾等疾病，具有较高的死亡率。因此，该菌已引起世界多国相关部门的重视。克罗诺杆菌目前被分为 8 个种[1~3]，其中有 3 个种被认为与脑膜炎有关，阪崎克罗诺杆菌是其中之一[4]。

免疫蛋白质组学（immunoproteomics）是蛋白质组学的新分支，它是伴随着基因组研究和蛋白质组学研究的兴起和发展、以及生物质谱技术的发展，而产生的一门新兴的学科[5~7]。随着双向电泳技术的不断完善[8~9]、病原菌基因组研究的不断深入、生物质谱技术和生物信息学的不断发展，使得免疫蛋白的分离和鉴定的成功率极大的提高。因此，免疫蛋白质组学被迅速的应用于免疫原性蛋白的研究中。

细菌的免疫原性蛋白在宿主和细胞的相互作用和引发宿主产生免疫反应的过程中发挥着重要的作用。因此它被认为可以用来控制疾病发展的有效方法[10]。阪崎克罗诺杆菌是具有吸附能力的菌株，它可以吸附不同的上皮细胞和血管内皮细胞。因此，确定阪崎克罗诺杆菌与宿主相互作用过程中的潜在毒力因子和保护性抗原，是了解该菌致病机制和免疫机制的重要途径。

本研究以阪崎克罗诺杆菌 ATCC29544 为研究对象，制备了多克隆抗体，利用免疫蛋白质组学的方法（2-DE、免疫印迹和质谱技术），识别、鉴定其免疫原性蛋白，为这一细菌致病机制的阐明奠定了良好的基础。

收稿日期：2013-01-17

基金项目：教育部科学技术研究重点项目（212009），天津市高等学校科技发展基金计划项目（2010ZD01）

作者简介：王健（1982-），女，博士，从事食品微生物方向研究

通讯作者：王硕教授

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌种：C. sakazakii ATCC 29544 购自美国菌种保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）。

实验中使用的常规药品均为市售，蛋白质样品预处理用到的脱盐试剂盒为 Perfect-FOCUSTM (For Preparing Low Conductivity Samples for IEF/2D-Gel Electrophoresis)，购自 G-BIOSCIENCES 公司。

1.2 多克隆抗体的制备

1.2.1 抗原制备

将阪崎克罗诺杆菌活化、转接培养至对数期后，收集菌体，加入甲醛（0.5%），37 ℃水浴固定 24 h，PBS 洗涤 3 次；用 0.9%的生理盐水重悬菌体，利用麦氏比浊管，将固定菌体调整至 1×10^9 CFU/mL。

1.2.2 抗体制备

采取背部皮下多点注射和腿部肌肉注射进行免疫。每两周免疫一次，每次免疫剂量为 1×10^9 CFU，共免疫五次。从第三次免开始，免疫一周后采血，利用间接 ELISA 法检测抗血清效价[11~13]，以监测免疫过程。第五次免疫一周后，收集血液，室温或 37 ℃培养箱中放置 2~3 h 凝血后，放置 4 ℃冰箱中过夜，使血块收缩；将析出的血清全部转移到新的离心管中；血块于 4 ℃，4500 r/min 离心 20 min，取上清液与前面的血清混合，每毫升血清中加 10%的叠氮钠 10 μL，分装，-20 ℃冻存。免疫前，采血 2 mL，作为后期实验的阴性对照。

1.3 蛋白样品的制备

利用蔗糖密度梯度超速离心法制备阪崎克罗诺杆菌蛋白质[14]：将 500 mL 菌液收集到的菌体用 8 mL 预冷的缓冲液（50 mM Tris HCl，1 mM EDTA（pH 7.8），1%（*V/V*）蛋白酶抑制剂）重悬，200 W 超声 10 min 后，3000×g 离心 10 min 去除未破损的细胞。上清液 100,000×g 超速离心 1 h，沉淀用 10 mM/L HEPES（pH 7.4）重悬。经过蔗糖密度梯度（2.02 mol/L、1.44 mol/L、0.78 mol/L 的不连续梯度）80,000×g 超速离心 16 h 后，收集蛋白，于-80 ℃保存。

1.4 一维 SDS-PAGE 电泳

一维 SDS-PAGE 电泳采用 6%的浓缩胶和 12%的分离胶分离阪崎克罗诺杆菌蛋白，电泳条件为恒压 80 V，电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色观察。

1.5 双向电泳

1.5.1 样品脱盐

利用脱盐试剂盒纯化蛋白样品后，Broadford 法测浓度，确保每块胶上样量为 200 μg。

1.5.2 双向电泳条件

11 cm 的 pH 3~10 的胶条按照使用说明在溶胀液中浸泡 12~16 h。一维等电聚焦条件：电压 0~500 V，500 V·h；500 V，2 000 V·h；500~3 000 V，5000 V·h；3000 V，20000 V·h；3000~500 V，25 000 V·h。二维电泳条件：12%的分离胶分离外膜蛋白，恒压 200 V。同时进行两块二维凝胶电泳，其中一块用考马斯亮蓝 G-250 染色观察，另一块用作免疫印迹反应。

1.6 免疫印迹

电泳后的蛋白经过半干式电泳仪转印至 PVDF 膜。转膜条件：200 mA 恒流电转 90 min。转膜后，PVDF 膜立即用 5%的脱脂奶粉封闭，与一抗（1:500）过夜反应后，加入酶标二抗（1:5000）反应，利用 4-氯-1-萘酚显色。

1.7 质谱鉴定

利用 4700 Proteomics Analyzer 质谱仪进行质谱鉴定。

质谱结果判定标准：质谱结果中 Protein Score C.I.%（一级）或 Total Ion Score C.I.%（二级）列数值达到 95%以上认为鉴定成功。

2 结果与分析

2.1 阪崎克罗诺杆菌 ATCC 29544 多克隆抗体的制备

以固定的 ATCC 29544 菌株为抗原，免疫新西兰大白兔。为了排除兔子个体差异对抗血清效价的影响，同时免疫 2 只兔子。间接 ELISA 测得的抗血清效价分别为 30000 和 20000，选取效价为 30000 的抗血清进行后续的免疫印迹实验。

2.2 蛋白质的检测

超声破碎细菌（200 W，10 min）后，利用蔗糖密度梯度法提取阪崎克罗诺杆菌蛋白质，结果如图 1 所示。从图 1 可以看出，提取的细菌蛋白分布在 14~100 kDa 之间，主要密集分布在 30~62 kDa 之间。

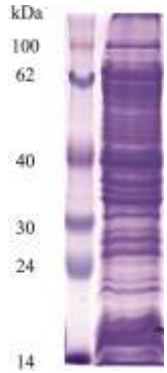


图 1 ATCC 29544 蛋白一维电泳图

Fig.1 SDS-PAGE of proteins in *C. sakazakii* ATCC 29544

2.3 才多克隆抗体的检测

将 ATCC29544 蛋白电泳后的凝胶转印至 PVDF 膜后，利用免疫反应检测抗血清与免疫蛋白的结合能力，以免疫前的血清作为阴性对照。结果如图 2 所示。从图 2 中 A 泳道的免疫检测可以看出，PVDF 膜背景干净，没有任何条带，说明免疫前的血清与蛋白样品不发生免疫反应；从图 2 中 B 泳道的免疫检测可以看出，PVDF 膜上出现多条免疫反应条带，说明制备的多克隆抗体对免疫原性蛋白有较好的识别能力。但是，一维 SDS-PAGE 无法较好的分离免疫反应蛋白，免疫反应条带密集，无法进行进一步的识别与鉴定。

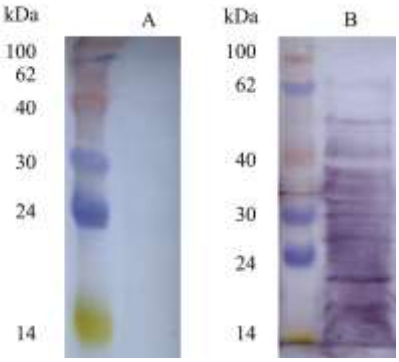


图 2 ATCC 29544 多克隆抗体的免疫反应

Fig.2 Western blot analysis of *C. sakazakii* ATCC 29544

注：泳道 A：免疫前血清；泳道 B：免疫血清。

2.4 蛋白质二维凝胶电泳图谱的构建

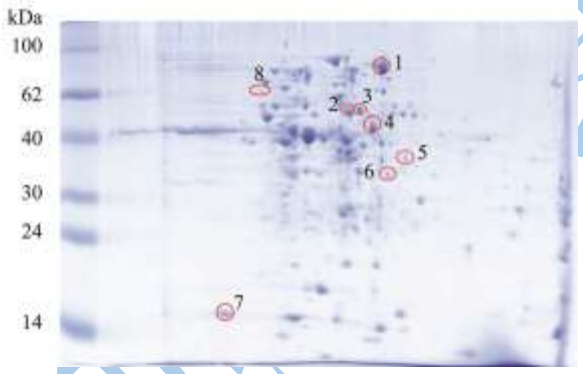


图 3 ATCC 29544 蛋白的二维凝胶电泳图

Fig.3 2-DE maps of proteins in *C. sakazakii* ATCC 29544 in pH 3-10

将一维 SDS-PAGE 电泳检测后的样品，按照二维凝胶电泳的要求进行处理后，进行二维凝胶电泳，结果如图 3 所示。从图中可以看出双向电泳图谱上，背景干净，图谱清晰，这一结果说明利用蔗糖密度梯度离心法提取的蛋白质量良好，该方法适用于阪崎克罗诺杆菌蛋白质的提取；一维等电聚焦时没有出现横向拖尾，且利用 11 cm pH 3~10 的胶条能够将蛋白进行较好的分离，蛋白质样品主要集中在 pH 5~8 的范围内，实验结果表明，这种方法建立的双向电泳图谱重复性好，分辨率高，说明这种方法适用于阪崎克罗诺杆菌蛋白质的分离。和一维电泳图谱相比，双向电泳分离得到的蛋白质的数量，远远的大于一维电泳分离得到蛋白质，说明二维电泳在蛋白分离能力方面优势明显，更适合阪崎克罗诺杆菌蛋白样品的分离鉴定。

2.5 Western blot 检测免疫蛋白

将未染色的凝胶进行 western blot 检测，从图 4 中可以看出，反应后的 PVDF 膜背景较为干净，具有免疫反应的蛋白点信号清晰。利用 PDQuest 软件对双向电泳（图 3）与 western blot 结果（图 4）进行比对，共确定了 8 个完全重合的蛋白点。

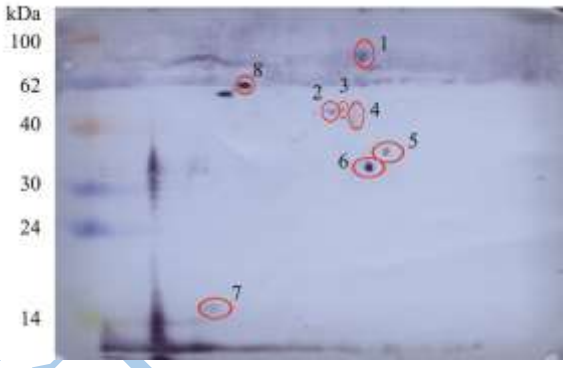


图 4 蛋白质的 Western blotting 检测

Fig.4 Western blot of proteins of *C. sakazakii* ATCC 29544 in the pH range of 3-10

2.6 质谱鉴定 ATCC 29544 的免疫蛋白

将检测到的相互对应、具有免疫反应的蛋白点从考马斯亮蓝染色的凝胶上抠取分离出来，对其进行质谱分析。质谱分析结果如表 1 所示。从表中可以看出，我们成功的鉴定了 8 个点。8 个点共鉴别出 7 种不同的蛋白，分别是双功能乙醛-CoA/乙醇脱氢酶、F0F1 ATP 合成酶 α-亚基、丝氨酸羟甲基转移酶、推测蛋白 ESA_02170（甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A）、甘氨酸甜菜碱转运子胞质亚单位蛋白、外膜蛋白 X 和推测蛋白 ESA_00154（分子伴侣 GroEL）。

查阅资料发现，在细菌中，分子伴侣 GroEL 被看做是一个重要的毒力因子[15]，它能刺激机体产生免疫反应[16]，是免疫优势蛋白；外膜蛋白 X 是阪崎克罗诺杆菌感染宿主细胞的关键因素之一，它使细菌深入人类的肝、脾等器官，是重要的是毒力因子，能刺激机体产生免疫反应[17]；在克罗诺杆菌属的另一个种-苏黎世克罗诺杆菌 3032 的研究中[18]，人们认为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A 是参与宿主血蛋白的粘附并与纤维蛋白原的结合，是重要的毒力因子，刺激机体产生免疫反应。这些报道都说明在阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 的蛋白中检测到分子伴侣 GroEL、外膜蛋白 X 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A 等免疫原性蛋白，与早期的研究报

道是一致的，由此可以看出，利用免疫蛋白质组学可以有效的鉴定阪崎克罗诺杆菌的免疫原性蛋白。据我们所知，目前双功能乙醛-CoA/乙醇脱氢酶、F0F1 ATP合成酶α-亚基、丝氨酸羟甲基转移酶、甘氨酸甜菜碱转运子胞质亚单位蛋白等在阪崎克罗诺杆菌中尚未见毒力方面的报道，因此，它们在阪崎克罗诺杆菌发病机理中的作用，有待于进一步的研究。

表 1 质谱鉴定结果

Table 1 Identified proteins by mass spectrometry

Rank	Protein Name	NCBI ID	Protein M_W	Protein PI
1	Bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	gi|156933713	96 524.898 44	6.2
2	F0F1 ATP synthase subunit alpha	gi|156936114	55 444.820 31	5.93
3	F0F1 ATP synthase subunit alpha	gi|156936114	55 444.820 31	5.93
4	Serine hydroxymethyltransferase	gi|156932908	45 927.328 13	6.29
5	Hypothetical protein ESA_02170	gi|156934339	35 762.421 88	6.61
6	Glycine betaine transporter periplasmic subunit	gi|156932791	36 439.101 56	6.5
7	Outer membrane protein X	gi|156934691	18 346.800 78	4.84
8	Hypothetical protein ESA_00154	gi|156932378	57 391.76	4.83

现代食品科技

3 结论

阪崎克罗诺杆菌是一种认识较晚的食源性致病菌，菌株 ATCC29544 免疫原性蛋白鉴定方面还未见报道。本文利用实验室制备的多克隆抗体，结合免疫蛋白质组学（二维凝胶电泳、免疫检测和一级/二级质谱分析），从 ATCC 29544 的蛋白质样品中，鉴定出了 7 种不同的免疫原性蛋白。其中，分子伴侣 GroEL、外膜蛋白 X 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 A 为已经报道的免疫优势抗原和毒力因子，双功能乙醛-CoA/乙醇脱氢酶、F0F1 ATP 合成酶 α-亚基、丝氨酸羟甲基转移酶、甘氨酸甜菜碱转运子胞质亚单位蛋白为新识别的免疫原性蛋白。这些蛋白的鉴定，为进一步深入研究阪崎克罗诺杆菌的致病机理奠定了基础。

参考文献

[1] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. The taxonomy of Enterobacter sakazakii: proposal of a new genus Cronobacter gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. malonaticus subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* I [J]. BMC Evolutionary Biology, 2007: 764

[2] Iversen C, Mullane N, McCardell B, et al. Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of Enterobacter sakazakii, and proposal of Cronobacter sakazakii gen. nov., comb. nov., Cronobacter malonaticus sp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov., Cronobacter genomospecies I, and of three subspecies, Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis subsp. nov., Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis subsp. nov. and Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi subsp. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6): 1442-1447

[3] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, et al. Cronobacter condimenti sp. nov., isolated from spiced meat, and Cronobacter universalis sp. nov., a species designation for Cronobacter sp. genomospecies I, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(6): 1277-1283

[4] Kucerova E, Clifton S W, Xia X Q, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other Cronobacter species [J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9556

[5] Purcell A W, Gorman J J. Immunoproteomics: Mass spectrometry-based methods to study the targets of the immune response [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(3): 193-208

[6] Krah A, Jungblut P R. Immunoproteomics [J]. Methods in Molecular Medicine, 2004: 9419-9432

[7] Tjalsma H, Schaeps R M, Swinkels D W. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications [J]. Proteomics Clinical Applications, 2008, 2(2): 167-180

[1] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053

[2] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685

[3] West R, Whitmon J, Williamson Y M, et al. A rapid method for capture and identification of immunogenic proteins in Bordetella pertussis enriched membranes fractions: a fast-track strategy applicable to other microorganisms [J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(6): 1966-1972

[4] Wang S, Allan R D, Hill A S, et al. Rapid enzyme immunoassays for the detection of carbaryl and methoprene in grains [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2002, 37(6): 521-532

[5] Wang S, Allan R D, Skerritt J H, et al. Development of a class-specific competitive ELISA for the benzoylphenylurea insecticides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(8): 3330-3338

[6] Akerstrom B, Brodin T, Reis K, et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies [J]. The Journal of immunology, 1985, 135(4): 2589-2592

[7] Roy K, Bartels S, Qadri F, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli elicits immune responses to multiple surface proteins [J]. Infection and Immunity, 2010, 78(7): 3027-3035

[8] Lewthwaite J, Skinner A, Henderson B. Are molecular chaperones microbial virulence factors? [J]. Trends in Microbiology, 1998, 6(11): 426-428

[9] van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation [J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(4): 318-330

[10] Kim K, Kim K P, Choi J, et al. Outer membrane proteins A

(OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of Cronobacter sakazakii [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5188-5198

[11] Carranza P, Hartmann I, Lehner A, et al. Proteomic profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen [J]. Proteomics, 2009, 9(13): 3564-3579

现代食品科技

现代食品科技