

一种新的空肠弯曲菌外膜囊泡提取方法的建立

聂翔^{1,2}, 王涓^{1*}, 吴清平², 张菊梅², 马国祥^{1,2}, 汪智^{2,3}, 唐胜君^{1,2}, 潘琪琪^{1,2}, 张伟培^{1,2}, 肖铠姗^{1,2}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 广东广州 510070)

(3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 是其在生长过程中分泌到细胞外的球状小泡, 主要含有外膜蛋白及一些周质空间的物质, 对细菌的生存、定植、细菌与宿主细胞间的交流及致病机制发挥重要的作用。因此, 开发一种高效提取方法是研究空肠弯曲菌 OMVs 生物学功能的关键。该研究发现在微需氧条件下, 使用 MH 培养基培养空肠弯曲菌 15 h 后提取 OMVs 最为合适。在最优条件下, 采用超滤浓缩法从菌液中提取 OMVs, 并使用 0.22 μm 的微孔滤头进一步过滤提取物除去鞭毛等杂质。为了表征所提取的 OMVs 质量, 首先使用透射电镜技术, 发现所提取的 OMVs 具有典型形态, 大小在 50~300 nm 之间, 所含杂质较少。SDS-PAGE 电泳结果表明 OMVs 内部含有大量蛋白, 含量可达 40.50 mg/mL。最后利用外膜蛋白抗体成功证明所提取的物质主要成分为 OMVs。该研究成功建立了一种从液体培养基中提取空肠弯曲菌 OMVs 的提取体系, 多种分析方法证明其提取效率高、质量较好, 适用于后续空肠弯曲菌 OMVs 生物功能相关研究。

关键词: 空肠弯曲菌; 外膜囊泡; 超滤浓缩法

文章编号: 1673-9078(2021)12-265-271

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0282

A New Method for Extracting Outer Membrane Vesicles of *Campylobacter jejuni*

NIE Xiang^{1,2}, WANG Juan^{1*}, WU Qingping², ZHANG Jumei², MA Guoxiang^{1,2}, WANG Zhi^{2,3}, TANG Shengjun^{1,2}, PAN Qiqi^{1,2}, ZHANG Weipei^{1,2}, XIAO Kaishan^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

(3. School of Bioscience and Bioengineering South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Outer membrane vesicles (OMVs) of *Campylobacter jejuni* are globular vesicles secreted to the outside of cells during the growth process, which mainly contain outer membrane proteins and some periplasmic substances, and play an important role in the survival, colonization, communication between bacteria and host cells, and pathogenic mechanisms. Therefore, the development of an efficient extraction method is the key to studying the biological function of OMVs. This study found that it is most appropriate to extract OMVs after culturing *C. jejuni* with MH medium for 15 h under microaerobic conditions. Under optimal conditions, the ultrafiltration concentration method was used to extract OMVs from the bacterial liquid, and the extract was further filtered using a 0.22 μm microporous filter to remove flagella and other impurities. In order to characterize the quality of the extracted OMVs, a transmission electron microscope was used. It was found that the

引文格式:

聂翔, 王涓, 吴清平, 等. 一种新的空肠弯曲菌外膜囊泡提取方法的建立[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 265-271

NIE Xiang, WANG Juan, WU Qingping, et al. A new method for extracting outer membrane vesicles of *Campylobacter jejuni* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 265-271

收稿日期: 2021-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801650); 国家重点研发计划项目 (2017YFC1601200); 广东省重点领域研发计划 (2018B020205001; 2018B020205002); 华南应用微生物国家重点实验室开放基金项目 (SKLAM004-2016)

作者简介: 聂翔 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 空肠弯曲菌危害形成机制, E-mail: 1010633347@qq.com

通讯作者: 王涓 (1986-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物安全检测与监测, E-mail: wangjuan@scau.edu.cn

extracted OMVs had a typical morphology (with their size ranging from 50 to 300 nm), and contained less impurities. The results of SDS-PAGE showed that OMVs contained a large amount of proteins (whose total content was 40.50 mg/mL). Finally, the outer membrane protein antibody was used to prove successfully that the main components of the extracted material were OMVs. In this study, an extraction system for extracting *C. jejuni* OMVs from liquid culture medium was successfully established. Various analytical methods have proved that its extraction efficiency is high and its quality is good. It is suitable for subsequent studies on the biological functions of *C. jejuni* OMVs.

Key words: *Campylobacter jejuni*; outer membrane vesicles; ultrafiltration concentration

外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs), 是一种直径在 20~250 nm 之间的球形结构^[1-2], 主要由革兰氏阴性菌在生长过程中于细菌表面形成并分泌到胞外^[3], 内含脂多糖、外膜蛋白、磷脂及 DNA/RNA 等成分^[4-6]。1963 年首次通过电子显微镜发现紧挨着细菌细胞壁处存在囊泡状物质, 并认为它可能和细菌的功能有关^[7]。直到 1999 年, Beveridge 等^[8]再次通过电镜观察到 OMVs, 研究发现其存在多种与致病相关的物质, 逐渐引起研究人员的重视。目前研究的焦点主要是 OMVs 的生物学功能, 如促进生物膜形成, 作为毒力基因、活性物质和信号分子等的传输载体, 促进细胞间相互交流, 与宿主细胞相互作用诱导免疫应答等^[9-16]。

空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 是一种人畜共患的革兰氏阴性菌, 广泛分布于鸡鸭等家禽中, 从 20 世纪 80 年代起就受到国内外广泛重视。人感染空肠弯曲菌会导致急性细菌性肠炎, 严重者还会导致格林-巴利综合征 (GBS)^[17]。空肠弯曲菌具有多种潜在的毒力因子, 包括细胞毒素^[18-19]和各种酶类^[20-22], 但缺乏类似其他肠道病原体能直接将效应物传递给靶细胞的经典毒性相关分泌系统^[23]。在一些菌株中也发现了 VI 型分泌系统 (T6SS) 的存在, 但是对于空肠弯曲菌中 T6SS 的功能仍然不是很了解^[24-25]。而 OMVs 是目前发现的另外一种毒力传递机制, 它是革兰氏阴性菌中一种独有的分泌系统。现有研究证明空肠弯曲菌 OMVs 中确实存在一系列的毒力因子, 如能促进空肠弯曲菌入侵肠上皮细胞的细胞质扩张毒素和致病性相关的蛋白酶^[21-22]。病原体的一个重要特征是能够感知环境, 并适当地改变和调节毒力因子^[26]。当空肠弯曲菌的生长温度从 37 °C 从改变为 42 °C 时, OMVs 的蛋白质丰度也发生了变化, 37 °C 时 OMVs 中蛋白质 PEB4 和 PEB1 的丰度增加^[27]。在先前的研究中发现 PEB4 蛋白在空肠弯曲菌生物膜形成、运动及宿主细胞入侵中起重要作用^[28-30]。PEB1 蛋白在与上皮细胞相互作用和在鼠肠道定植中发挥作用^[31]。另外, 在空肠弯曲菌培养物中添加牛黄胆酸钠 (ST), 能增加 OMVs 的蛋白水解活性、细胞毒性和肠上皮细胞的免疫原性^[22]。因此, OMVs 中含有的各种生物分子对空

肠弯曲菌的生存和致病性起到关键性作用。

OMVs 的提取是研究 OMVs 与空肠弯曲菌生物膜形成、耐药性、毒力及与宿主间相互作用的基础。因此, 开发一种快速、高效的空肠弯曲菌 OMVs 的提取方法具有重要意义。现有研究中超速离心法是 OMVs 提取的经典方法^[26-32], 但其 OMVs 回收率低, 不适用于 OMVs 需求量大的实验。超滤法能收集并提取大量样本中的 OMVs, 可满足研究要求。因此本研究首先通过比较菌株在不同培养基、培养时间及不同氧气环境下的生长情况, 确定空肠弯曲菌在液体环境中的最适生长条件, 然后利用超滤浓缩法从培养的菌液中提取 OMVs 并对其特性进行鉴定。本研究建立了适用于空肠弯曲菌 OMVs 的提取体系, 为建立高回收率的 OMVs 制备方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验所用的空肠弯曲菌为本实验室分离与保存。所有目标空肠弯曲菌鉴定按照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》GB 4789.9-2014 方法进行。

1.1.2 材料与试剂

血平板、MH 肉汤粉末、布氏肉汤粉末、BHI 肉汤粉末、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、96 孔板, 均购自广东环凯微生物科技有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸和 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸粉末 (HEPES)、氯化钠 (NaCl)、乙酸、乙醇、硫代硫酸钠、醋酸钠, 均购自广州诺德生化科技有限公司; 碳酸钠, 购自广州化学试剂厂; 硝酸银、甲醛, 购自美国 Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 购自广州捷威斯生物公司; 100 ku 超滤离心管, 购自上海优宁维生物科技股份有限公司; 超速离心管, 购自美国 Beckman Coulter 公司。Anti-Major outer 膜蛋白抗体 (cj-01) (一抗), 购自艾博抗(上海)贸易有限公司; 6×protein、Anti-Mouse IgG HRP (二抗) 和显影液 EasySee® Western Blot Kit, 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.3 仪器设备

二氧化碳培养箱 CB220, 购自德国 BINDER 公司; 大型高速冷冻离心机 J-26 XP, 购自德国 Beckman avanti 公司; 超速离心机 (Optima XPN-100) 和配套 SW32Ti 水平转子, 均购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

将-80℃冻存的空肠弯曲菌接种于血平板, 42℃培养 48 h, 挑取单菌落于血平板增菌, 42℃培养 48 h。

1.2.2 细菌在液体环境中最适生长条件的优化

(1) 液体培养基

配制 MH、布氏及 BHI 液体培养基, 将增菌后的菌株用棉签从血平板上转移至上述三种不同的培养基中, 调整菌液的初始 OD₆₀₀ 为 0.20, 42℃培养并测定其在液体培养基中的生长曲线, 确定空肠弯曲菌液体培养的最适培养基。

(2) 培养时间

菌株增菌后用棉签从血平板上转移至 MH 液体培养基中, 调整菌液的初始 OD₆₀₀ 为 0.001、0.005、0.01、0.05, 42℃培养并测定其在液体培养基中的生长曲线, 确定空肠弯曲菌液体培养的最适培养时间。

(3) 氧气环境

增菌后的菌株用棉签从血平板上转移至 MH 液体培养基中, 调整菌液的初始 OD₆₀₀ 为 0.01, 将其分别置于大气环境和微需氧环境下培养菌株的生长情况, 确定空肠弯曲菌液体培养的最适氧气条件。

1.2.3 超滤浓缩法提取 OMVs

将培养后的菌液以 4800 r/min, 4℃离心 30 min, 收集上清, 用 0.22 μm 的微孔滤头过滤, 将过滤后的上清用截留相对分子质量 100 ku 的超滤离心管以 5200 r/min, 4℃离心 20 min, 重复多次, 直至最后的液体体积为原体积的 1/6。将浓缩后的上清液转移至超速离心管, 29600 r/min, 4℃超速离心 3 h, 弃去上清, 将沉淀重悬于 2 mL 0.01 mmol/L 的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中, 用 0.22 μm 的微孔滤头过滤鞭毛等杂质, 4℃保存。

1.2.4 SDS-PAGE 检测 OMVs 内的蛋白

配制 SDS-PAGE 凝胶, 下层为 12% 的分离胶, 上层为 6% 的浓缩胶。将提取的 OMVs 样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经垂直电泳分离后, 取下蛋白胶用超纯水清洗, 固定液 (20 mL 乙醇、5 mL 冰醋酸、25 mL 超纯水) 固定 30 min, 用增敏液 (15 mL 乙醇、35 mL 超纯水、0.1 g 硫代硫酸钠、3.4 g 醋酸钠) 增敏 30 min, 超纯水洗三次, 每次 5 min, 随后配制银染液 (0.0625 g 硝酸银

粉末、25 mL 超纯水、10 μL 甲醛) 银染 20 min, 超纯水洗二次, 每次 1 min, 最后用显色液 (1.25 g 碳酸钠、50 mL 超纯水、10 μL 甲醛) 显色 2~5 min, EDTA (0.73 g EDTA-Na₂-2H₂O、50 mL 超纯水) 反应 10 min 终止显色, 超纯水洗三次, 每次 5 min, 观察蛋白质条带。

1.2.5 透射电镜观察 OMVs 形态

将提取的 OMVs 样品滴加到碳包铜网上, 滴加 2% 醋酸双氧铀, PBS 洗三次, 室温干燥, 在电镜下进行检测。

1.2.6 OMVs 总蛋白浓度检测

用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定提取的 OMVs 蛋白质浓度, 根据试剂盒说明进行样品处理, 用酶标仪进行检测其 OD₅₆₂, 根据标准曲线, 计算出 OMVs 中蛋白浓度。

1.2.7 Western blotting 检测外膜蛋白

(1) 全菌蛋白的提取: 将血平板上培养的菌转移到装有 1 mL PBS 的离心管中, 5880 r/min 离心 5 min, 去掉上清, 沉淀用 PBS 重悬, 重悬液超声破碎 5 min (功率 40%), 得到全菌蛋白溶液。

(2) 可溶蛋白和膜蛋白的提取: 同样将血平板上培养的菌转移到装有 1 mL PBS 的离心管中, 5880 r/min 离心 5 min, 去掉上清, 沉淀用 PBS 重悬, 重悬液超声破碎 5 min (功率 40%), 之后 8652 r/min 离心 5 min, 收集上清液在 24200 r/min 下超速离心 1 h, 吸取最上层 500 μL 作为可溶蛋白; 8652 r/min 离心的沉淀用 PBS 洗 3 次, 之后加入 500 μL 1% Triton X-100, 8652 r/min 离心 5 min, 上清为膜蛋白。

(3) Western blot 分析: 取 30 μL 空肠弯曲菌的可溶蛋白、膜蛋白、全菌蛋白及 OMVs 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经垂直电泳分离后, 取出蛋白胶, 按顺序排好蛋白胶、PVDF 膜和滤纸的位置, 排气泡后放入模具内; 整个电泳装置置于含冰水混合物的冰盒中, 转膜条件为 55 V 恒压工作 1.5 h; 将膜浸泡 5% 脱脂奶粉中室温封闭液 1 h, 用 PBS-T 溶液洗膜, 10 min/次, 洗 3 次; 加入按 1:5000 配制的含有一抗的溶液, 室温下振荡孵育 1 h, 用 PBS-T 溶液洗 3 次; 再加入按 1:10000 配制的二抗溶液孵育 45 min, 用 PBS-T 溶液清洗 3 次; 配制显影液对 PVDF 膜进行显影, 曝光时间 15 s, 用 Image Lab 图像分析系统采集图像。

2 结果与讨论

2.1 空肠弯曲菌在液体环境中的最适生长条件

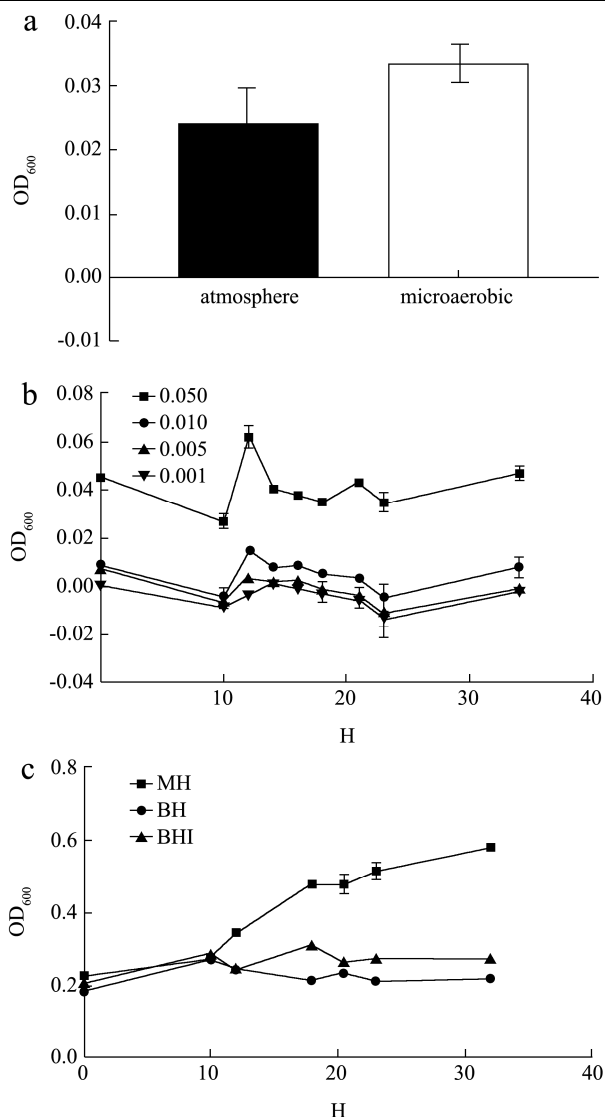


图1 空肠弯曲菌液体培养的最适条件

Fig.1 Optimum conditions for liquid culture of *Campylobacter jejuni*

注: a: 菌株在大气环境和微需氧环境的生长情况; b: 4种不同初始 OD₆₀₀ 下菌株的生长曲线; c: 菌株在不同液体培养基中的生长曲线。

细菌的 OMVs 一般是在液体环境下释放的, 在对数后期分泌较为旺盛^[26], 为保证 OMVs 的高回收率, 则需要对空肠弯曲菌的液体培养环境进行优化, 从培养基、培养时间、培养的氧气环境三方面使其达到最佳的生长状态。首先, 探索了气体环境对于空肠弯曲菌的影响, 发现在微需氧的条件下, 菌株的生长能力更强 (图 1a), 因此, 后期的实验均是在此条件下进行。接着, 探索了接种量对于空肠弯曲菌的影响, 发现接种量越高, 菌株的生长能力越强, 但其达到对数生长期的时间几乎相似 (图 1b), 均为 12 h, 为保证

OMVs 分泌量, 选择 15 h 作为菌株在液体培养中的最佳时间。后期选择了较高的接种量进行试验, 并探索不同培养基对菌体生长的影响, 发现在 MH 肉汤中, 其 OD₆₀₀ 能达到 0.60, 最终菌体密度能达到其他两种培养基的 3 倍左右 (图 1c)。因此, 空肠弯曲菌在 MH 液体培养基中微需氧培养 15 h 是提取 OMVs 的最适生长条件, 与文献报道相符^[27]。

2.2 OMVs 电镜形态

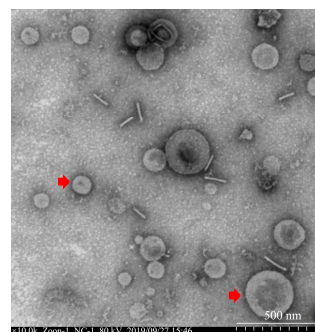


图2 OMVs 电镜形态

Fig.2 The morphology of OMVs observed by electron microscopy

为更好的研究空肠弯曲菌 OMVs 的组成部分及生物学性质, 需要建立一种快速有效的 OMVs 提取体系。国内关于空肠弯曲菌 OMVs 研究尚未见报道, 因此本研究建立了从空肠弯曲菌菌液中提取 OMVs 的方法。将提取的样品在电镜下观察, 发现均为 50~300 nm 间的球形囊泡状结构, 符合 OMVs 的形态特征 (图 2)。

目前, 差速离心法 (differential centrifugation) 因其工艺简单, 底物可重复利用等优点成为分离提取 OMVs 最常见最基本的方法^[33]。其原理即低速与高速离心交替进行, 根据沉降系数的不同依次除去不同的杂质, 最终利用超高速离心力使囊泡沉淀在底部达到分离的目的。超滤浓缩法是在差速离心之前, 用特定孔径的滤膜进行样品浓缩, 提高 OMVs 的回收率。根据文献报道^[34], 研究人员常采用 100 ku 滤膜进行过滤浓缩, 本实验中同样采用 100 ku 滤膜进行浓缩, 电镜下可以看到 OMVs 数量较多 (图 2)。张佳星等^[34]利用超滤浓缩提取的铜绿假单胞菌 OMVs 中存在细胞碎片、鞭毛等多种杂质, 而本研究在重悬沉淀之后, 用 0.22 μm 的微孔滤头对 OMVs 进行了过滤, 去除了部分杂质, 图中仅能看到少数截断的鞭毛 (图 2)。因此, 建立的超滤浓缩法适合于空肠弯曲菌 OMVs 的提取。

2.3 OMVs 中的蛋白质含量

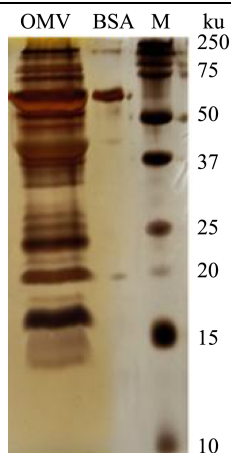


图3 空肠弯曲菌 OMVs SDS-PAGE 鉴定

Fig.3 Identification of *Campylobacter jejuni* OMVs by SDS-PAGE

注: BSA: 胎牛血清蛋白; M: 250 ku 的蛋白预染 Marker。

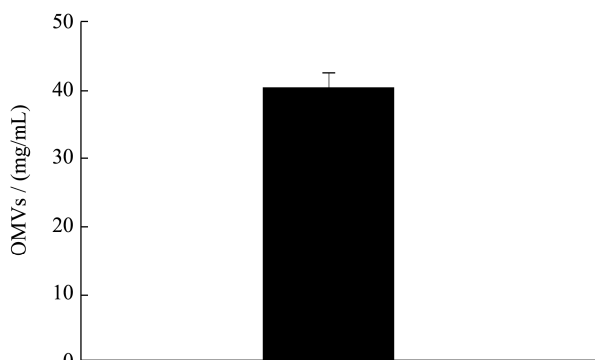


图4 OMVs 的蛋白质浓度

Fig.4 Total protein concentration of OMVs

此前研究表明 OMVs 中含有大量蛋白质^[6], 因此利用 SDS-PAGE 及 BCA 蛋白测量试剂盒对提取的 OMVs 中的蛋白质进行了测定。SDS-PAGE 鉴定结果显示, OMVs 中包含多种不同大小的蛋白质, 其条带范围在 15~250 ku 之间 (图 3)。根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒提供的标准品检测值与对应浓度绘制蛋白浓度标准曲线, 并生成标准曲线方程, 标准方程为 $y=0.0004x+0.1108$, $R^2=0.99$ 。通过待测样本 OD_{562} 值计算待测样品浓度, 结果显示提取的 OMVs 中蛋白质浓度为 40.50 mg/mL (图 4)。因此, 本研究建立的超滤浓缩法提取体系可在短时间内从较大的样本量中分离得到大量富含蛋白质成分的 OMVs。除超滤浓缩法外, 另外一些分离 OMVs 的方法还有色谱分析法 (chromatography)^[35]。尺寸排阻色谱法^[33]是色谱分析法的一种, 其利用分子筛选效应, 对通过色谱柱的分子进行分离, 可以获得不同分子量的囊泡, 但有些分子质量相近的物质无法完全分离。近年来又出现了一些新的分离纯化方法, 例如免疫亲和层析分离 (immunoaffinity isolation)、试剂盒法、声纳过滤系统

(acoustic nano-filter system) 等^[36-37]。免疫亲和层析分离^[36]可以利用抗原抗体的相互作用来分离囊泡, 虽然分离得到的囊泡纯度非常高, 但需要 OMVs 中具有特定的抗原, 分离后对抗原抗体进行相应检测。因此它分离所需成本较高, 且操作步骤较为繁琐。而本研究中超滤浓缩法提取空肠弯曲菌 OMVs 仅需 4 h 左右便可完成, 时间短, 且操作简单。

2.4 OMVs 验证

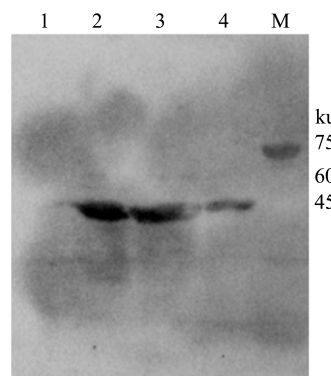


图5 空肠弯曲菌 OMVs 的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*

注: 泳道 1: 可溶蛋白; 泳道 2: 外膜蛋白; 泳道 3: 全菌蛋白; 泳道 4: OMVs; M: 蛋白分子 marker。

目前研究报道^[38]OMVs 是由外膜突起形成的, 且含有外膜蛋白的成分, 因此实验选用空肠弯曲菌 Anti-Major outer 膜蛋白抗体 (cj-01) 靶向超滤浓缩法分离得到的产物, 进而表征提取物中的主要成分是否为 OMVs。Western Blotting 结果显示, 空肠弯曲菌的可溶蛋白没有条带, 而膜蛋白、全菌蛋白及 OMVs 均显示出 46 ku 的正确条带, 证明了 OMVs 的存在。

3 结论

综上所述, 本研究首先确定了空肠弯曲形成最佳条件, 通过超滤浓缩法从菌液中提取 OMVs, 通过透射电镜、蛋白质含量测定、特定外膜蛋白抗体等实验分别对其形态、纯度、含量及成分进行分析, 表明本文所建立的方法 OMVs 提纯效率高、质量较好。因此, 本研究成功建立了一种从液体培养基中提取空肠弯曲菌 OMVs 的提纯体系, 为后续研究空肠弯曲菌中 OMVs 生物学功能提供技术支持。

参考文献

- [1] 易洁,刘青,孔庆科.革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展[J].微生物学报,2016,6:911-921
YI Jie, LIU Qing, KONG Qingke. Advances in outer

- membrane vesicles of gram-negative bacteria as subunit vaccines [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 6: 911-921
- [2] Wang H J, Liang K, Kong Q K, et al. Immunization with outer membrane vesicles of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 induces protective immunity in chickens [J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 236: 108367
- [3] Wang E H, Liu Y K, Qiu X H, et al. Bacteria-released outer membrane vesicles promote disseminated intravascular coagulation [J]. *Thrombosis Research*, 2019, 178: 26-33
- [4] Sampath V, McCaig W D, Thanassi D G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella* [J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(4): 523-541
- [5] 梅晨,孙爱华,李淑芳,等.副鸡禽杆菌外膜囊泡提取及成分分析[J].*动物医学进展*,2019,40(11):44-49
MEI Chen, SUN Aihua, LI Shufang, et al. Extraction and composition analysis of *Avibacterium paragallinarum* outer membrane vesicles [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(11): 44-49
- [6] Liu Q, Li X Z, Zhang Y X, et al. Orally-administered outer-membrane vesicles from *Helicobacter pylori* reduce *H. pylori* infection via Th2-biased immune responses in mice [J]. *Pathogens and Disease*, 2019, 77(5): ftz050
- [7] Bladen H A, Waters J F. Electron microscopic study of some strains of *Bacteroides* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1963, 86: 1339-1344
- [8] Beveridge T J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 4725-4733
- [9] Huang W W, Zhang Q S, Li W R, et al. Anti-outer membrane vesicle antibodies increase antibiotic sensitivity of pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1379
- [10] Huang W W, Zhang Q S, Li W R, et al. Development of novel nanoantibiotics using an outer membrane vesicle-based drug efflux mechanism [J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 317(10): 1-22
- [11] 唐波,何大维,李典,等.大肠杆菌胞外囊泡对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J].*南方医科大学学报*,2018,3:334
TANG Bo, HE Dawei, LI Dian, et al. Effect of outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* on proliferation, apoptosis and migration of human neuroblastoma SK-N-SH cells *in vitro* [J]. *Journal Southern Medical University*, 2018, 3: 334
- [12] Furuta N, Takeuchi H, Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment [J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77: 4761-4770
- [13] Fulsundar S, Harms K, Flaten G E, et al. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80: 3469-3483
- [14] 高雪姣,李婷,魏斌,等.肠道菌群介导溃疡性结肠炎大鼠肠 CYP3A 和 P-糖蛋白的变化及机制[J].*药学报*,2017,52(1): 34-43
GAO Xuejiao, LI Ting, WEI Bin, et al. Regulatory mechanisms of gut microbiota on intestinal CYP3A and P-glycoprotein in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017, 52(1): 34-43
- [15] Lin J S, Zhang W P, Cheng J L, et al. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1-12
- [16] Wei S C, Peng W J, Mai Y R, et al. Outer membrane vesicles enhance tau phosphorylation and contribute to cognitive impairment [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(5): 4843-4855
- [17] Souza C O, Vieira M A C S, Batista F M A, et al. Serological markers of recent *Campylobacter jejuni* infection in patients with guillain-barresyndrome in the state of Piaui, Brazil, 2014-2016 [J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2018, 98(2): 586-588
- [18] Lindmark B, Rompikuntal P K, Vaitkevicius K, et al. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni* [J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 220
- [19] Elmi A, Watson E, Sandu P, et al. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells [J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80: 4089-4098
- [20] Karlyshev A V, Thacker G, Jones M A, et al. *Campylobacter jejuni* gene *cj0511* encodes a serine peptidase essential for colonisation [J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 4: 468-472
- [21] Elmi A, Nasher F, Jagatia H, et al. *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle-associated proteolytic activity promotes bacterial invasion by mediating cleavage of intestinal epithelial cell E-cadherin and occludin [J]. *Cellular Microbiology*, 2016, 18: 561-572
- [22] Elmi A, Dorey A, Watson E, et al. The bile salt sodium

- taurocholate induces *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle production and increases OMV-associated proteolytic activity [J]. Cellular Microbiology, 2018, 20: e12814
- [23] Parkhill J, Wren B W, Mungall K, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences [J]. Nature, 2000, 403: 665
- [24] Bleumink Pluym N M, van Alphen L B, Bouwman L I, et al. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity [J]. PLoS Pathogens, 2013, 9: e1003393
- [25] Ugarte Ruiz M, Stabler R A, Dominguez L, et al. Prevalence of type VI secretion system in Spanish *Campylobacter jejuni* isolates [J]. Zoonoses and Public Health, 2015, 62: 497-500
- [26] Davies C, Taylor A J, Elmi A, et al. Sodium taurocholate stimulates *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle production via down-regulation of the maintenance of lipid asymmetry pathway [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, 9: 177
- [27] Taheri N, Fallman M, Wai S N, et al. Accumulation of virulence-associated proteins in *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles at human body temperature [J]. Journal of Proteomics, 2019, 195, 33-40
- [28] Asakura H, Yamasaki M, Yamamoto S, et al. Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 275(2): 278-285
- [29] Rathbun K M, Thompson S A. Mutation of PEB4 alters the outer membrane protein profile of *Campylobacter jejuni* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 300(2): 188-194
- [30] Rathbun K M, Hall J E, Thompson S A. Cj0596 is a periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerase involved in *Campylobacter jejuni* motility, invasion, and colonization [J]. BMC Microbiology, 2009, 9(160): 1471-2180
- [31] Pei Z, Burucoa C, Grignon B, et al. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice [J]. Infection and Immunity, 1998, 66(3): 938-943
- [32] Taheri N, Mahmud A K M F, Sandblad L, et al. *Campylobacter jejuni* bile exposure influences outer membrane vesicles protein content and bacterial interaction with epithelial cells [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 16996
- [33] 刘聪慧,殷慧群,姜宏. 胞外囊泡分离提取方法的研究进展 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(2): 125-129
LIU Chonghui, YIN Huiqun, JIANG Hong. Research progress in the separation and extraction of extracellular vesicles [J]. International Reproductive Health/Journal of Family Planning, 2017, 36(2): 125-129
- [34] 张佳星,沈犁,华子瑜,等. 两种提取铜绿假单胞菌外膜囊泡的方法比较 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2014, 34(3): 279-282
ZHANG Jiaying, SHEN Li, HUA Ziyu, et al. Comparison of two methods of extraction outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University Medical Science, 2014, 34(3): 279-282
- [35] Nordin J Z, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties [J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2015, 11(4): 879-883
- [36] Tauro B J, Greening D W, Malhadas R A, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. Methods, 2012, 56(2): 293-304
- [37] Witwer K W, Buzas E I, Bemis L T, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2013, 2: 20360
- [38] Eberlein C, Baumgarten T, Starke S, et al. Immediate response mechanisms of Gram-negative solvent-tolerant bacteria to cope with environmental stress: cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids and outer membrane vesicle secretion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(6): 2583-2593