

## 基于凝集素-糖蛋白特异结合的特性筛选与鉴定空肠弯曲杆菌 NCTC11168 株糖蛋白

白国旺<sup>1,2</sup>, 喻钢<sup>3</sup>, 刘先凯<sup>2</sup>, 冯尔玲<sup>2</sup>, 曾明<sup>3</sup>, 王恒樑<sup>2</sup>, 朱力<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>解放军医学院, 北京 100853

<sup>2</sup>军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

<sup>3</sup>中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** 【目的】从空肠弯曲杆菌 NCTC11168 菌株中筛选糖蛋白。【方法】本实验基于凝集素-糖蛋白特异结合的特性, 先用免疫印迹的方法确定空肠弯曲杆菌内糖蛋白能与凝集素 SBA 特异结合, 再用包被有凝集素 SBA 的磁珠捕获样品中的潜在糖蛋白, 通过 N-乙酰半乳糖胺竞争性洗脱及双向电泳分离, 最后利用串联质谱鉴定捕获的糖蛋白。【结果】质谱分析共鉴定到 22 种空肠弯曲杆菌蛋白, 其中至少 5 种为已报道糖蛋白, 包括 Cj0633 在内的 17 种为迄今为止未知的潜在糖蛋白。【结论】这种糖蛋白筛选策略可用于细菌糖蛋白的分离鉴定。

**关键词:** 糖蛋白, 空肠弯曲杆菌 NCTC11168, 凝集素

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 05-0464-06

蛋白糖基化一度被认为只存在于真核生物中, 但随着近些年人们认识的不断深入及检测技术的不断发展, 一系列的糖蛋白在各种古细菌及真细菌中被发现<sup>[1]</sup>, 这其中就包含多种病原菌, 如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*) 等。最近的研究表明, 这些蛋白的糖基化在病原菌的粘附及侵袭、蛋白组装、保护性免疫等过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。深入对原核生物尤其是一些病原微生物中糖蛋白进行研究很有可能为我们将来预防及治疗相关疾病提供新的靶点, 当前发展迅速的多糖结合疫苗就是一个很好的

应用实例。

空肠弯曲杆菌是一种感染人消化道粘膜的病原菌, 能引发细菌性腹泻。在对其展开的众多研究当中, 一个发现就是研究者不仅在空肠弯曲杆菌中发现了糖蛋白, 还发现了 N-连接糖基化和 O-连接糖基化两种通路<sup>[3]</sup>, 这使得空肠弯曲杆菌成为了研究原核生物蛋白糖基化的重要生物。根据文献报道, 迄今已有 65 种以上空肠弯曲杆菌的蛋白被鉴定为糖蛋白<sup>[4-5]</sup>, 研究者推测空肠弯曲杆菌共有约 150 种糖基化修饰蛋白<sup>[4]</sup>。

参照目前空肠弯曲杆菌糖蛋白的研究报道, 基于凝集素能与特异糖链结合的特性, 我们首先利用常规的免疫印迹方法, 确定了空肠弯曲杆菌糖蛋白

基金项目: 国家自然科学基金 (81271785, 81171531); 国家“973 项目” (2011CB504901)

\* 通信作者。Tel: +86-10-66948835, E-mail: jewly54@126.com

作者简介: 白国旺 (1986 -), 男, 硕士研究生, 研究方向为病原微生物蛋白质组学。E-mail: guowangbai@163.com

收稿日期: 2012-12-17; 修回日期: 2013-02-18

糖链末端含 N-乙酰半乳糖胺。随后,我们选取生物素标记的凝集素 SBA (能特异性识别 N-乙酰半乳糖胺),利用磁珠捕获及双向电泳技术,结合质谱分析,筛选到了 22 种空肠弯曲杆菌的蛋白,其中至少有 5 种已被国外研究者鉴定为糖蛋白<sup>[6]</sup>,从侧面验证了此筛选策略的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**空肠弯曲杆菌 NCTC11168 菌株由中国药品生物制品检定所提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**生物素标记的凝集素、无糖 (Carbo-Free) 封闭液、N-乙酰半乳糖胺及辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素购自 Vector Laboratories;磁珠购自 Invitrogen 公司;ECL 购自 Thermo 公司;显影液、定影液及 X 射线胶片购自 Kodak 公司;IPG 胶条及缓冲液、矿物油购自 GE Healthcare 公司;甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、过硫酸铵、溴酚蓝、甘氨酸、Tirs 碱、考马斯亮蓝 G-250、CHAPS、SDS 购自 Amersco 公司;TEMED 购自 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor) 购自 Roche 公司;碘乙酰胺购自 Acros 公司;其余均为国产分析纯。

### 1.2 空肠弯曲杆菌的培养及样品的制备

免疫印迹样品的制备:将培养皿中的菌用低盐 PBS 收集后,菌体再用低盐 PBS 洗 3 遍,后用 RIPA 裂解液稀释 50 倍,超声 10 min 制样 (超声时超 2 s, 停 2 s)。为防止菌体蛋白降解,超声前菌体稀释液中加入蛋白酶抑制剂并混匀。样品超声完毕后,4℃ 20000 × g 高速离心 20 min,收集上清。取一定体积的上清,加入等量的 2 × SDS 上样缓冲液,震荡混匀,于沸水中煮 5 min 备用。

磁珠捕获样品的制备:与上述相似,略有差异,即 RIPA 裂解液改为低盐 PBS,高速离心后收集上清即为磁珠捕获实验所用样品。

### 1.3 免疫印迹确定糖蛋白的存在

样品进行 SDS-PAGE 后,电转至 PVDF 膜上,将膜用无糖 (Carbo-Free) 封闭液封闭 30 min,弃封闭液,加入用 TBST 稀释的生物素标记的凝集素 (SBA、VVL、WFL、UEAI、WGA、EEL、LL),室温孵育 30 min,弃凝集素,用 TBST 洗 3 次,加入用 TBST 稀释的辣

根过氧化物酶偶联的链霉亲和素,室温孵育 30 min,用 TBST 洗膜 4 次,将 ECL 发光显色液滴加至膜上作用 5 min,用 X 射线胶片进行曝光显影。

### 1.4 磁珠捕获潜在糖蛋白及捕获物的双向电泳

取 400 μL 磁珠,用低盐 PBS 洗 4 次,于生物素标记的凝集素 SBA 中孵育 1 h,低盐 PBS 洗 4 次,于空肠弯曲杆菌超声裂解样品中孵育 3 h,用低盐 PBS 洗 8 次,用 N-乙酰半乳糖胺洗脱,收集洗脱产物。洗脱产物经纯化后可直接进行双向电泳,具体方法可参照文献 [7]。简述如下:等电聚焦采用 pH3-10 18 cm 胶条,总计聚焦 50000 Vhs,胶条经 DTT \ IAA 平衡后,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后进行胶体考马斯亮蓝染色,脱色后进行扫描分析。

### 1.5 质谱分析捕获物

MALD-TOF/TOF 质谱鉴定由国家仪器中心完成。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪完成,具体方法可参照文献 [8]。

## 2 结果

### 2.1 免疫印迹确定糖蛋白的存在

凝集素是一类从各种动植物细胞中提纯的蛋白,其最大特点是能够专一性的与某种特异糖链发生结合。正是基于这个特点,凝集素被广泛应用于糖蛋白的筛选研究。本实验中,我们选取了 7 种生物素标记的凝集素 (SBA、VVL、WFL、UEAI、WGA、EEL、LTL) (表 1),凝集素能与特异糖链结合,生物素能与辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素特异结合,进而能够进行免疫印迹检测样品中是否存在糖蛋白。除了进行常规的免疫印迹,为确保此实验应用免疫印迹方法的可行性,同步进行空白对照,即 PVDF 膜封闭完成后,不加入生物素标记的凝集素,直接加入用 TBST 稀释的辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素,随后的孵育、洗膜、曝光同前,前后进行对比分析。如图 1 可见,各凝集素均有不同程度的条带反应,而能识别 N-乙酰半乳糖胺的 SBA、VVL、WFL 条带反应最为强烈,可推断空肠弯曲杆菌内有糖蛋白且糖蛋白存在 N-乙酰半乳糖胺结构,这也与已有报道一致。而 UEA I、WGA、LL、EEL 与空白对照有着基本相同的条带反映,可以认定为非特异条带,推测与购得的辣根过氧化物酶偶联的链霉亲和素质量有关。

表 1. 本研究选用的凝集素  
Table 1. Lectins used in this study

Lectin	Abbreviation	Sugar specificity
Soybean Agglutinin	SBA	$\alpha$ -or $\beta$ -linked terminal N-acetylgalactosamine
Vicia Villosa Lectin	VVL	$\alpha$ -or $\beta$ -linked terminal N-acetylgalactosamine
Wisteria Floribunda Lectin	WFL	terminating in N-acetylgalactosamine linked $\alpha$ or $\beta$ to the 3 or 6 position of galactose
Ulex Europaeus Agglutinin I	UEA I	$\alpha$ -linked fucose
Wheat Germ Agglutinin	WGA	N-acetylglucosamine/sialic acid
Euonymus Europaeus Lectin	EEL	galactosyl ( $\alpha$ -1,3) galactose
Lotus Tetragonolobus Lectin	LTL	$\alpha$ -linked L-fucose

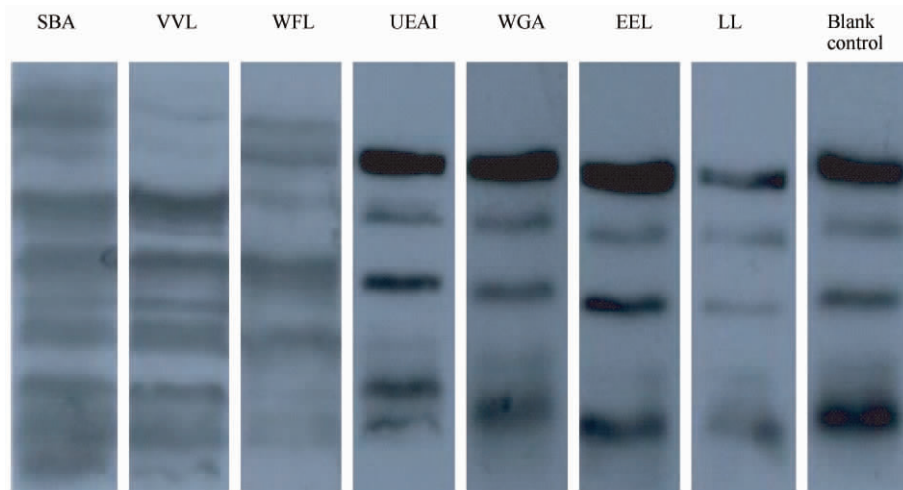


图 1. 空肠弯曲杆菌 NCTC 11168 株全菌蛋白经各凝集素免疫印迹结果

Figure 1. Lectin blotting results of whole-cell *C. jejuni* NCTC 11168 proteins. Western blots of whole-cell *C. jejuni* NCTC 11168 cellular proteins probed with biotinylated lectins. SBA, VVL, WFL, UEAI, WGA, EEL and LL represent biotinylated lectins used in the study.

## 2.2 磁珠捕获潜在糖蛋白及捕获物的双向电泳

对于磁珠捕获过程,我们用特异性识别糖链末端为 N-乙酰半乳糖胺的 SBA 凝集素进行磁珠捕获糖蛋白,然后使用 N-乙酰半乳糖胺进行竞争性洗脱,理论上洗脱的蛋白产物应均含有 N-乙酰半乳糖胺结构,当然存在一定非特异结合及非特异洗脱的可能。洗脱下的蛋白进行双向电泳,用 pH3 - 10 的胶条进行一向的等电聚焦,用 12.5% 的 SDS-PAGE 电泳分离胶分离捕获的蛋白(图 2)。

## 2.3 捕获产物的质谱分析

对经磁珠捕获并双向电泳分离到的点进行质谱分析,我们共鉴定到了 22 种空肠弯曲杆菌 NCTC11168 菌株的蛋白(表 2),其中 Cj0511、Cj0114、Cj1670c、Cj0289c 和 Cj1221 共计 5 种蛋白曾被研究者确定为糖蛋白<sup>[6]</sup>,而对于其它 17 种蛋白尚无相关报道称其是糖蛋白与否。虽不能排除蛋白非特异结合的可能性,经对各蛋白序列分析,我们发

现其中一些蛋白很有可能是糖蛋白,而且首次被鉴定到。

## 3 讨论

病原细菌内糖蛋白有巨大研究价值。致病菌中的糖蛋白与致病菌运动性、与宿主细胞粘附及侵袭、免疫激发都有着潜在的联系,对致病菌糖蛋白展开研究,很有可能帮我们解析其致病机理。致病菌糖蛋白在疫苗研制方面也有潜在价值:一方面,糖基化得蛋白比非糖基化蛋白可能具有更强的免疫原性,这使得致病菌糖蛋白自身有可能成为疫苗研制靶点;而另一方面,研究清楚糖蛋白在致病菌内的合成通路,利用致病菌的糖基转移酶功能,有可能将人工引入的靶蛋白糖基化,从而为多糖结合疫苗的规模化生物法生产提供新的途径<sup>[9]</sup>。

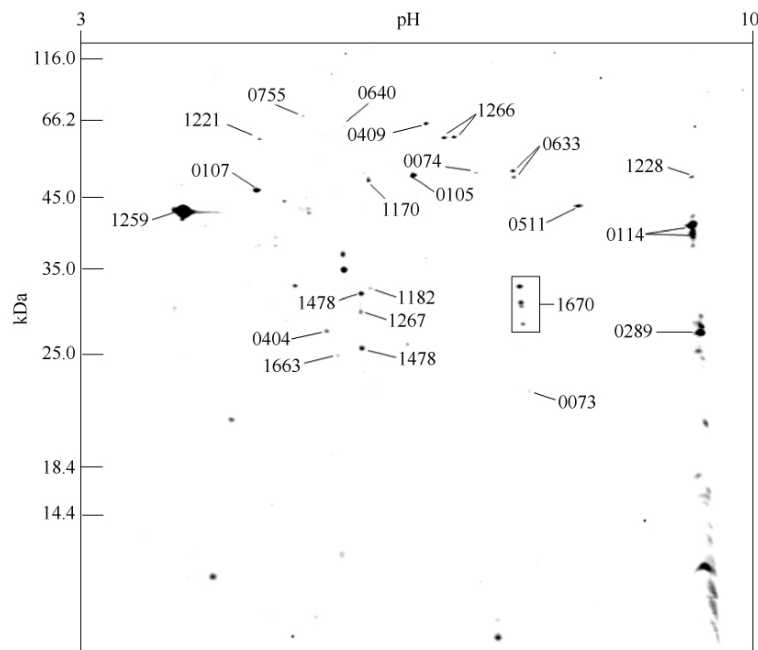


图 2. 磁珠捕获产物双向电泳结果

Figure 2. Two-dimensional gel of the proteins captured by biotinylated SBA. The proteins were separated on two dimensional gel in pH 3 - 10, and then coomassie brilliant blue (cbb) stained. The identities of the spots, shown by their Cj numbering, were determined by mass spectrometry of their tryptic digests. A full list of the identified proteins is given in Table 2.

表 2. 质谱分析结果

Table 2. Results obtained by mass spectrometry analysis

Cj <sup>a</sup>	Score	Annotation
Cj1259	441	major outer membrane protein
Cj0107	490	FOF1 ATP synthase subunit beta
Cj1478 up	377	outer membranefibronectin-binding protein
Cj1478 down	257	outer membranefibronectin-binding protein
Cj1182c	173	30S ribosomal protein S2
Cj1267c	195	Ni/Fe-hydrogenase small chain
Cj0404	260	succinate dehydrogenaseiron-sulfur subunit
Cj1663	108	putative ABC transport system ATP-binding protein
Cj0409	414	fumarate reductase
Cj1266c left	411	Ni/Fe-hydrogenase large subunit
Cj1266c right	285	Ni/Fe-hydrogenase large subunit
Cj0105	473	FOF1 ATP synthase subunit alpha
Cj0633 up	220	putative periplasmic protein
Cj0633 down	271	putative periplasmic protein
Cj0511	180	putative secreted protease
Cj0114 up	432	putative periplasmic protein
Cj0114 down	165	putative periplasmic protein
Cj1670c up	99	putative periplasmic protein
Cj1670c middle	153	putative periplasmic protein
Cj1670c down	133	putative periplasmic protein
Cj0073c	216	hypothetical protein Cj0073c
Cj1170c	191	outer membrane protein
Cj1228c	126	serine protease (protease DO)
Cj0289c	106	major antigenic peptide PEB3
Cj1221	150	60 kDa chaperonin (cpn60)
Cj0755	184	putative iron uptake protein
Cj0074c	87	iron-sulfur cluster binding protein
Cj0640c	149	aspartyl-tRNA synthetase

<sup>a</sup> Scores greater than 81 are meaningful results. Up, middle, down, left and right in the table show the relative position of the same protein in different points on two dimensional gel.

空肠弯曲杆菌作为病原细菌糖蛋白研究的重要生物,目前已发现了 N-连接糖基化和 O-连接糖基化两种通路<sup>[3]</sup>,迄今已有数十种空肠弯曲杆菌的蛋白被鉴定为糖蛋白<sup>[4-5]</sup>。本实验借助磁珠捕获、双向电泳,通过质谱分析,共鉴定到了 22 种空肠弯曲杆菌蛋白,其中有 5 种已被国外研究者鉴定为了糖蛋白<sup>[6]</sup>,另外 17 种则有可能是首次被鉴定为糖蛋白。如 Cj0633,一种假想周质蛋白,其理论分子量只有 41.5 kDa,而双向电泳则显示其分子量约 55 kDa,推测是由于糖基化修饰使得其显示分子量比理论分子量变大,另外,空肠弯曲杆菌内糖基化常见的氨基酸基序 D/E-X-N-X-S/T<sup>[10]</sup>在 Cj0633 中也多次出现,这使得同一种蛋白可以不同程度的被糖基化,Cj0633 在双向电泳图中于同一等电点不同分子量的两个地方被鉴定到即可归咎于此,这种纵向梯状点也是糖蛋白反应在双向电泳图上常见的现象。因此我们有比较充分的理由相信 Cj0633 是糖蛋白且首次被我们鉴定到,其相关功能还有待进一步的研究。当然目前的研究还只是得出一个初步的结论,我们还无法最终确定筛选到的蛋白为糖蛋白,这还需进一步的相关研究。目前做进一步的分析需凭先进的核磁共振技术、HCD/ETD 等质谱技术,借这些

技术能确认糖链存在,并解析出糖链组成、结构、糖基化位点等,借助对相关糖基化基因的敲除研究能进一步分析糖基化机制。

目前相关研究还都是停留在原核细菌糖蛋白鉴定及初步探究糖基化通路方面,相信在不久的将来研究者能更深层次的了解这一普遍存在的生物机制。

## 参考文献

- [1] Abu-Qarn M, Eichler J, Sharon N. Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, 18 (5) :544-550.
- [2] Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (11) :765-778.
- [3] Szymanski CM, Logan SM, Linton D, Wren BW. Campylobacter—a tale of two protein glycosylation systems. *Trends in Microbiology*, 2003, 11 (5) :233-238.
- [4] Nothaft H, Amber S, Aebi M, Szymanski, CM. N-linked protein glycosylation in Campylobacter. Campylobacter. 3rd edition. Washington, DC: ASM Press, 2008:447-469.
- [5] Scott NE, Parker BL, Connolly AM, Paulech J, Edwards AVG, Crossett B, Falconer L, Kolarich D, Djordjevic SP, Højrup P, Packer NH, Larsen MR, Cordwell SJ. Simultaneous glycan-peptide characterization using hydrophilic interaction chromatography and parallel fragmentation by CID, higher energy collisional dissociation, and electron transfer dissociation MS applied to the N-Linked glycoproteome of campylobacter jejuni. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2010, 10 :201-218.
- [6] Young NM. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the gram-negative bacterium, campylobacter jejuni. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (45) :42530-42539.
- [7] Hu W, Zhu L, Shang N, Wang XF, Xu HJ, Feng EL, Wei H, Wang HL. Protein spot train in 2-DE gels for bacterial proteome: a primary research. *Military Medical Sciences*, 2011, 3 (1) :48-53. (in Chinese)  
胡威, 朱力, 商娜, 王雪芳, 徐慧杰, 冯尔玲, 魏华, 王恒樑. 细菌蛋白质组双向电泳中“串联珠”现象初探. *军事医学*, 2011, 3 (1) :48-53.
- [8] 郑学学. 志贺氏菌福氏 2a 2457T 全菌蛋白质组图谱的重建及功能研究. 江南大学的硕士学位论文, 2009.
- [9] Wacker M. N-linked glycosylation in campylobacter jejuni and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, 298 (5599) :1790-1793.
- [10] Balonova L, Hernychova L, Bilkova Z. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the analysis of bacterial glycoproteins. *Expert Review of Proteomics*, 2009, 6 (1) :75-85.

# Screening and identification of glycoproteins from *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 based on specific affinity between lectins and glycoproteins

Guowang Bai<sup>1,2</sup>, Gang Yu<sup>3</sup>, Xiankai Liu<sup>2</sup>, Erling Feng<sup>2</sup>, Ming Zeng<sup>3</sup>, Hengliang Wang<sup>2</sup>, Li Zhu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical University of People's Liberation Army, Beijing 100853, China

<sup>2</sup>Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

<sup>3</sup>National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract:** [Objective] To screen glycoproteins from *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. [Methods] We introduced a screening strategy based on specific affinity between lectins and glycoproteins. First, the specific affinity between Soybean Agglutinin (SBA) and glycoproteins in *C. jejuni* was confirmed by western blotting. Then, magnetic beads coating with Soybean Agglutinin (SBA) were used to capture the putative glycoproteins. Putative glycoproteins were competitively eluted by N-acetylgalactosamine and separated by two-dimensional gel electrophoresis. Spots in gels were further analyzed by mass spectrometry. [Results] A total of 22 proteins were identified by mass spectrometric analysis, of which 5 have ever been identified to be glycoproteins. Others including Cj0633 have not been proved to be glycosylated so far. [Conclusion] The method could be used to screen glycoproteins in bacteria.

**Keywords:** glycoproteins, *Campylobacter jejuni* NCTC 11168, lectins

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271785, 81171531) and by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB504901)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948835 ;E-mail: jewly54@126.com

Received: 17 December 2012/Revised: 18 February 2013

## 《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。